

## 红景天苷联合右美托咪定对 LPS 诱导的人关节软骨细胞凋亡和炎症反应的调节作用

杜 刚<sup>1</sup>, 陈 娜<sup>2</sup>, 刘晓艳<sup>1</sup>, 赵 亮<sup>3</sup>

**摘要** 目的 探讨红景天苷(Sal)联合右美托咪定(Dex)对脂多糖(LPS)诱导的人关节软骨细胞凋亡和炎症反应的促进作用和机制。方法 分离人关节软骨细胞体系,分别设置健康对照组(Ctrl组)、LPS诱导模型组(LPS组)、单用Sal组(LPS+Sal组)、单用Dex组(LPS+Dex组)、Dex联合Sal组(LPS+Dex+Sal组)。各组模型中LPS刺激8 h(100 ng/ml),Sal(50  $\mu$ g/ml)和Dex(100 nmol/L)连续作用48 h。免疫荧光检测细胞凋亡;5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)染色鉴定细胞生长状态,Western blot检测软骨细胞凋亡标志分子、细胞功能及通路分子活性;ELISA法检测血清中炎症因子。结果 与Ctrl组比较,LPS组细胞发生明显凋亡,凋亡相关标志和通路分子活性明显上调,增殖能力下降,并分泌大量炎症细胞因子( $P < 0.01$ )。与LPS组比较,LPS+Sal组与LPS+Dex组细胞凋亡现象有所缓解,凋亡标志及相关通路分子活性下降,增殖能力有所提高,炎症因子分泌水平下降( $P < 0.01$ )。与LPS+Dex组比较,LPS+Dex+Sal组细胞凋亡现象显著缓解,并伴随着凋亡标志和通路分子表达水平下调,细胞增殖能力显著提高,炎症因子分泌水平受到明显抑制。结论 Sal可以提高Dex对LPS诱导的人软骨细胞凋亡和炎症反应;其机制可能是通过下调磷酸化核转录因子 $\kappa$ B p65(p-NF- $\kappa$ B p65)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )及下游通路活性来发挥作用。

**关键词** 红景天苷;右美托咪定;关节软骨细胞;凋亡;炎症因子

**中图分类号** R 684.3

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2019)09-1366-06  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.09.007

骨关节炎(osteoarthritis, OA)又称退行性关节炎或退行性骨关节病,主要表现为关节疼痛、僵硬及活动受限等症状<sup>[1]</sup>。全世界范围内,OA发病率约为

15%,在中老年慢性疾病中位列第2位<sup>[2]</sup>。软骨细胞数目及稳定的功能对于维持软骨稳态、软骨基质合成和降解平衡有着至关重要的作用。右美托咪定(dexmedetomidine, Dex)是一种高选择性受体激动剂,具有镇静、镇痛等多种功效<sup>[3]</sup>,研究<sup>[4]</sup>表明Dex还具有抗炎作用。红景天苷(salidroside, Sal)是红景天的主要活性成分,已有研究<sup>[5-6]</sup>报道Sal对缺血缺氧心肌以及神经元具有一定保护作用,Sal作用机制与减轻兴奋性毒性、拮抗钙超载及清除细胞内活性氧基团或分子(reactive oxygen species, ROS)等相关。该研究主要探讨Sal和Dex联合用药在脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的人关节软骨细胞凋亡和炎症反应模型中对软骨细胞的影响机制。

### 1 材料与方法

**1.1 试剂** DMEM细胞培养液、胎牛血清和胰酶均购自美国Gibco公司;赫斯特(Hoechst)染色3342染色试剂盒(货号: ab228551)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶9(cysteinylaspartate-specific proteinase-9, Caspase-9)(货号: ab32539)、Caspase-3(货号: ab13847)、BrdU(货号: ab8955)、二型胶原蛋白(denatured type II collagen, Collagen II)(货号: ab34712)、聚集蛋白聚糖(货号: ab3778)、MMP-13(货号: ab39012)、p65(货号: ab16502)、p-p65(货号: ab6503)、GAPDH(货号: 1056)一抗均购自美国abcam公司;LPS(货号: L2630)购自美国sigma公司;HRP标记的山羊抗小鼠二抗购自美国Santa Cruz公司;ELISA试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;白介素6(interleukin-6, IL-6)(货号: E-EL-R0015c)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ )(货号: E-AB-10698)、IL-1 $\beta$ (货号: E-EL-M0037c)购自上海博耀有限责任公司。

**1.2 仪器** PCR仪、电泳仪及半干转膜仪均购自美国伯乐公司;Gel View 6000化学发光凝胶成像系统购自广州云星仪器有限公司。Multiskan GO酶标仪购自美国Thermo公司。

2019-06-17 接收

基金项目: 山东省自然科学基金(编号: ZR2014HP005)

作者单位: 山东省淄博市第一医院<sup>1</sup> 手术麻醉科、<sup>2</sup> 质控科, 淄博 255200

<sup>3</sup> 中国人民解放军第960医院淄博分院麻醉科, 淄博 255300

作者简介: 杜 刚,男,硕士研究生,主治医师;

赵 亮,男,硕士,主治医师,责任作者, E-mail: zclhn148@126.com

### 1.3 实验方法

**1.3.1 分离人关节软骨细胞** 手术室无菌条件下,获取因外伤进行关节置换患者软骨组织(获得知情同意),先后使用 0.2% 胰蛋白酶、0.2% II 型胶原酶低糖 DMEM 溶液、0.2% II 型胶原酶溶液消化 30 min,再加入 DMEM 培养基(含 20% 胎牛血清、链霉素 100 u/ml、青霉素 100 u/ml)制成细胞悬液,转入培养皿中,再置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养,一般 4~6 h 后软骨组织块消化完全。观察细胞生长情况,每 3 d 换液。

**1.3.2 LPS 诱导人关节软骨细胞关节炎及联合用药分组** 取传代 3 次的人关节软骨细胞,分别设置健康对照组(Ctrl 组)、LPS 诱导模型组(LPS 组)、单用 Sal 组(LPS + Sal 组)、单用 Dex 组(LPS + Dex 组)、Dex 联合 Sal 组(LPS + Dex + Sal 组)。各组模型中 LPS 刺激 8 h(100 ng/ml),Sal(50 µg/ml)和 Dex(100 nmol/l)连续使用 48 h。收集细胞备用。

**1.3.3 Hoechst 染色** 对药物处理的细胞培养 48 h 后进行染色处理:吸尽培养液后加入 0.5 ml 固定液固定 10 min;去除固定液用 PBS 洗 2 次,每次 3 min;加入 0.5 ml Hoechst 染色液染色 5 min;用 PBS 洗 2 次,每次 3 min;滴加抗荧光淬灭封片液盖上盖玻片荧光显微镜下观察。

**1.3.4 免疫荧光染色** 操作步骤按照说明书进行,细胞接种于预先用 0.01% 多聚赖氨酸包被的盖玻片,经药物处理后,进入 4% 多聚甲醛固定 30 min。PBS 漂洗,用含 Triton X-100 封闭液在冰上通透 5 min;吸掉通透液,加入预温的封闭液,室温下封闭 1 h;孵育一抗 4 °C 过夜。次日,PBS 漂洗,孵育荧光标记的二抗(浓度为 1:200),室温避光孵育 1 h,PBS 漂洗,50% 甘油-指甲油封片,立即避光共聚焦显微镜观察。

**1.3.5 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromodeoxyuridine, BrdU)检测细胞增殖** 取处理后各组软骨细胞对 6 孔细胞板进行铺板,1 × 10<sup>5</sup> 个/孔。加入 BrdU,37 °C 孵育 40 min;弃培养液,培养板用 PBS 洗涤 3 次,甲醇固定 10 min;经过空气干燥,0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-甲醇 30 min 灭活内源性氧化酶;5% 正常兔血清封闭,甲酰胺 100 °C、5 min 变性核酸;冰浴冷却后 PBS 洗涤,加一抗即抗小鼠 BrdU 单抗(工作浓度 1:50),阴性对照加 PBS,Hoechst 衬染,在显微镜下随机选择 10 个视野,进行参数统计。

**1.3.6 Western blot 检测细胞中蛋白表达** 收集 4 组细胞,PBS 清洗 3 次,用添加蛋白酶抑制剂的细胞

裂解液进行裂解,用 RIPA 裂解液提取各组细胞总蛋白。用 BCA 试剂盒检测总蛋白浓度,10% SDS-PAGE 分离蛋白后用半干转膜仪转移蛋白质至 PVDF 膜。用 5% 脱脂牛奶室温封闭蛋白 2 h,随后加入一抗于 4 °C 封闭过夜,第 2 天加入对应二抗室温封闭 1 h,最后滴加 ECL 曝光显影。SDS-PAGE 凝胶电泳分离并转至 PVDF 膜,经 5% BSA 封闭后依次孵育相应一抗和二抗。显色并统计灰度值计算相对表达量。

**1.3.7 ELISA 检测炎症因子** 取各组细胞上清液低温 4 000 r/min 离心 8 min,取出上清液供实验使用。加样:分别设空白孔、标准品待测样品孔。在酶标包被板上标准品准确加样 50 µl,待测样品孔先加样品稀释液 40 µl,然后再加待测样品 10 µl。温育:用封板膜封板后置 37 °C 温育 30 min。配液:将 30 倍浓缩洗涤液用蒸馏水稀释 30 倍后备用。洗涤:小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置 30 s 后弃去,如此重复 5 次,拍干。加酶:每孔加入酶标试剂 50 µl,空白孔除外。温育:再次用封板膜封板后置 37 °C 温育 30 min。洗涤:再次小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置 30 s 后弃去,如此重复 5 次,拍干。显色:每孔先加入显色剂 A 50 µl,再加入显色剂 B 50 µl 轻轻震荡混匀,37 °C 避光显色 10 min。终止:每孔加入 50 µl 终止液,终止反应(此时蓝色立转为黄色)。测定:以空白孔调零,450 nm 波长依序测量各孔的吸光值(optical density, OD)。测定在加终止液后 15 min 内进行。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 19.0 进行统计分析,实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。方差齐且服从正态分布则组间比较用单因素方差分析,反之则用秩和检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Sal 联合 Dex 抑制人关节软骨细胞凋亡水平

Hoechst 染色实验结果表明,Ctrl 组软骨细胞着色较浅、均匀分布,细胞形态均一;与 Ctrl 组比较,LPS 组软骨细胞核着色较深,数量增多( $P < 0.01$ );与 LPS 组比较,LPS + Sal 组和 LPS + Dex 组软骨细胞核着色深度有所降低,数量减少( $P < 0.01$ );与 LPS + Dex 组比较,LPS + Sal + Dex 组软骨细胞核着色显著降低,数量明显减少( $P < 0.01$ ),见图 1。对各组样品进行 Western blot 检测发现,与 Ctrl 组比较,LPS 组 Caspase -3 和 Caspase -9 表达量显著增高( $P < 0.01$ );

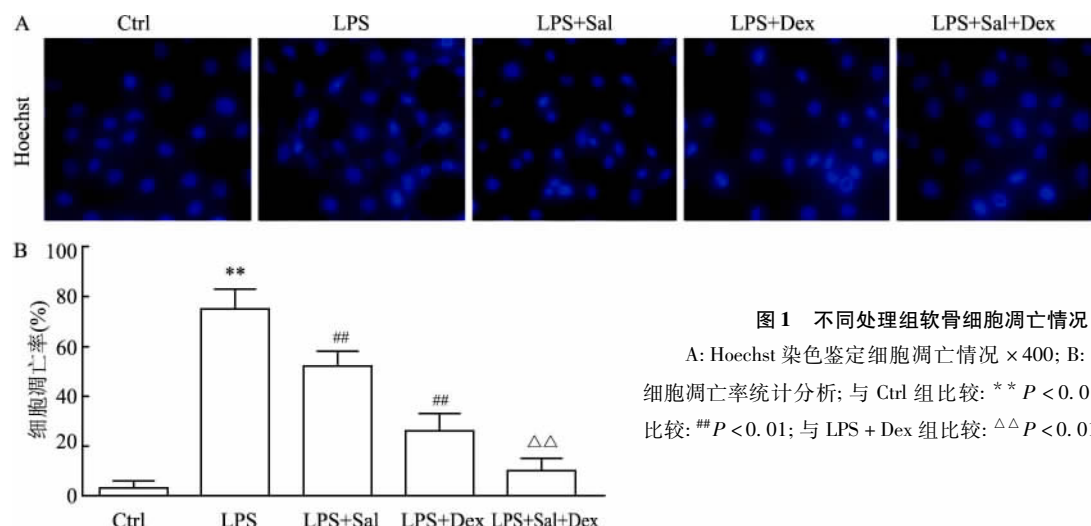


图1 不同处理组软骨细胞凋亡情况

A: Hoechst 染色鉴定细胞凋亡情况  $\times 400$ ; B: 不同处理组细胞凋亡率统计分析; 与 Ctrl 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 LPS 组比较: ##  $P < 0.01$ ; 与 LPS + Dex 组比较: △△  $P < 0.01$

与 LPS 组比较, LPS + Sal 组和 LPS + Dex 组 Caspase-3 和 Caspase-9 表达量明显减少 ( $P < 0.01$ ); 与 LPS + Dex 组比较, LPS + Sal + Dex 组 Caspase-3 和 Caspase-9 表达量则显著降低 ( $P < 0.01$ ), 见图 2。

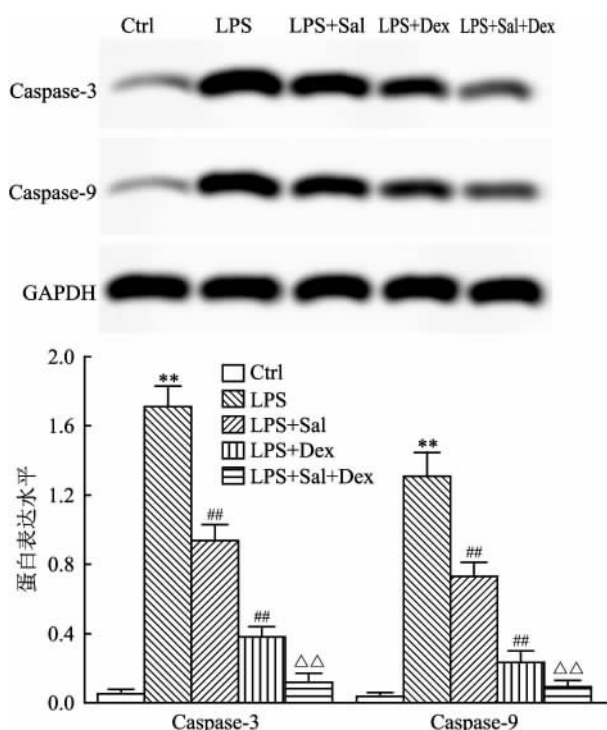


图2 Western blot 检测不同处理组细胞中 Caspase-3 和 Caspase-9 表达水平

与 Ctrl 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 LPS 组比较: ##  $P < 0.01$ ; 与 LPS + Dex 组比较: △△  $P < 0.01$

**2.2 Sal 联合 Dex 促进软骨细胞增殖** BrdU 染色实验显示, Ctrl 组软骨细胞着色数量较多; 与 Ctrl 组比较, LPS 组软骨细胞着色数量显著减少 ( $P <$

0.01); 与 LPS 组比较, LPS + Sal 组和 LPS + Dex 组软骨细胞着色数量有所增加 ( $P < 0.01$ ); 与 LPS + Dex 组比较, LPS + Sal + Dex 组软骨细胞着色数量增加显著 ( $P < 0.01$ )。见图 3。

### 2.3 Sal 联合 Dex 促进软骨细胞分泌功能蛋白

Western blot 实验显示, 与 Ctrl 组比较, LPS 组软骨细胞分泌 Collagen II 和软骨蛋白聚糖水平显著降低, 基质金属蛋白酶-13 (matrix metalloproteinases-13, MMP-13) 表达能力显著上升 ( $P < 0.01$ ); 与 LPS 组比较, LPS + Sal 组和 LPS + Dex 组软骨细胞分泌 Collagen II 和软骨蛋白聚糖水平有所提高, MMP-13 表达量有所下降 ( $P < 0.01$ ); 与 LPS + Dex 组比较, LPS + Sal + Dex 组软骨细胞分泌 Collagen II 和软骨蛋白聚糖水平显著升高, 分泌 MMP-13 能力显著下调 ( $P < 0.01$ )。见图 4。

### 2.4 Sal 联合 Dex 降低软骨细胞分泌炎症因子

ELISA 检测细胞样本中相关炎症因子 IL-6、TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  结果显示, 与 Ctrl 组比较, LPS 组软骨细胞分泌炎症因子水平显著增强 ( $P < 0.01$ ); 与 LPS 组比较, LPS + Sal 组和 LPS + Dex 组软骨细胞分泌炎症因子水平有所下降 ( $P < 0.01$ ); 与 LPS + Dex 组比较, LPS + Sal + Dex 组软骨细胞分泌炎症因子能力显著下调 ( $P < 0.01$ )。见图 5。

### 2.5 Sal 联合 Dex 抑制软骨细胞中 NF- $\kappa$ B p65 信号活性

为了进一步探究 Sal 对 Dex 在人软骨细胞炎症中的调节作用, 通过免疫荧光技术检测不同处理组细胞中 p65 入核情况 (使用 Hoechst 对软骨细胞进行背景染色), 与 Ctrl 组比较, LPS 组软骨细胞核几乎全部为阳性 ( $P < 0.01$ ); 与 LPS 组比较, LPS + Sal 组和 LPS + Dex 组软骨细胞核阳性率有所下

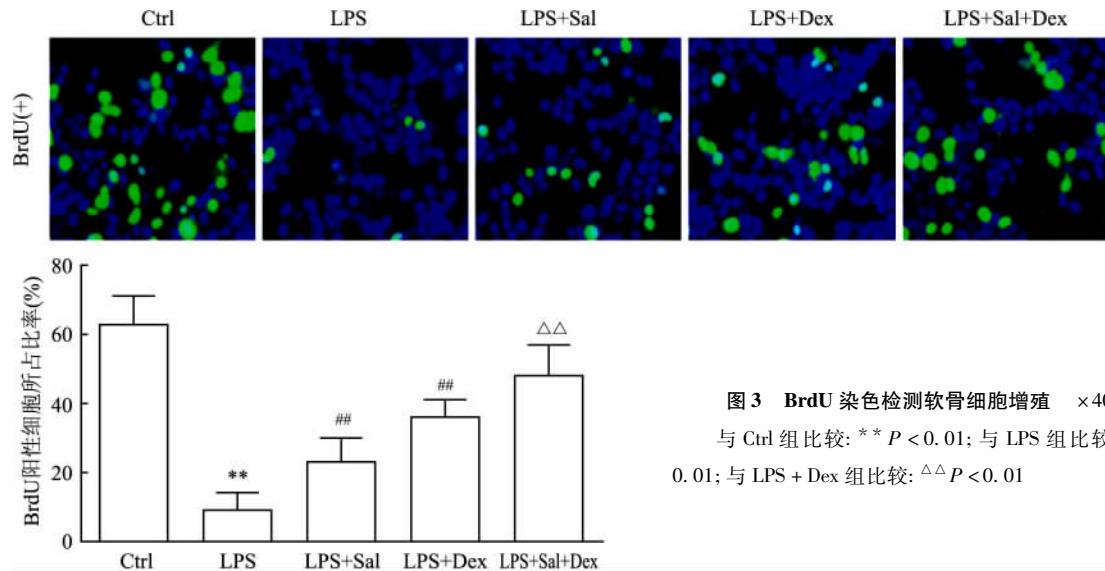


图3 BrdU 染色检测软骨细胞增殖 ×400  
与 Ctrl 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 LPS 组比较: ##  $P < 0.01$ ; 与 LPS + Dex 组比较: ΔΔ  $P < 0.01$

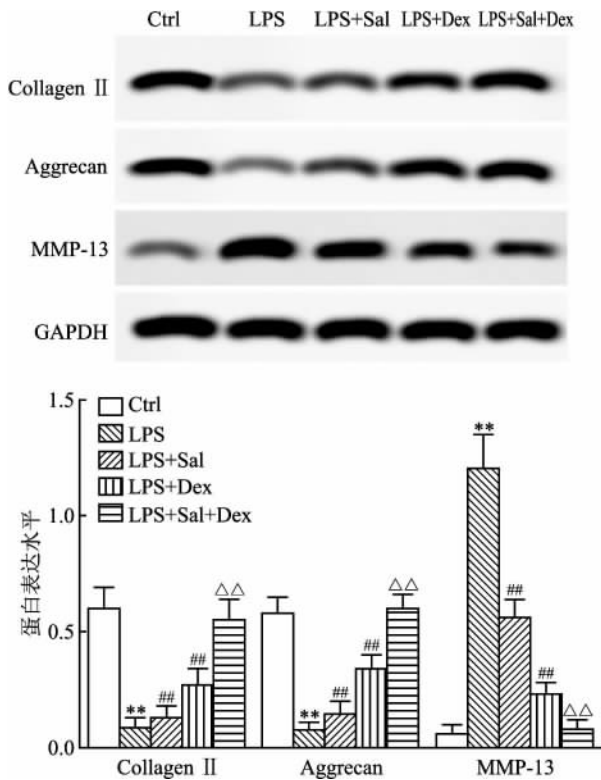


图4 Western blot 检测显示软骨细胞相关蛋白表达水平

与 Ctrl 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 LPS 组比较: ##  $P < 0.01$ ; 与 LPS + Dex 组比较: ΔΔ  $P < 0.01$

降 ( $P < 0.01$ ) ; 与 LPS + Dex 组比较, LPS + Sal + Dex 组软骨细胞核阳性率显著下降 ( $P < 0.01$ ) , 见图 6。同时, 使用 Western blot 对各组软骨细胞中核转录因子  $\kappa B$  p65 ( nuclear transcription factor  $\kappa B$  p65, NF- $\kappa B$  p65) 激活情况进行检测。与 Ctrl 组比较, LPS 组软骨细胞 NF- $\kappa B$  p65 激活水平显著升高 ( $P < 0.01$ ) ;

与 LPS 组比较, LPS + Sal 组和 LPS + Dex 组软骨细胞中 NF- $\kappa B$  p65 激活情况有所下降 ( $P < 0.01$ ) ; 与 LPS + Dex 组比较, LPS + Sal + Dex 组软骨细胞中 NF- $\kappa B$  p65 活性显著下调 ( $P < 0.01$ ) , 见图 7。

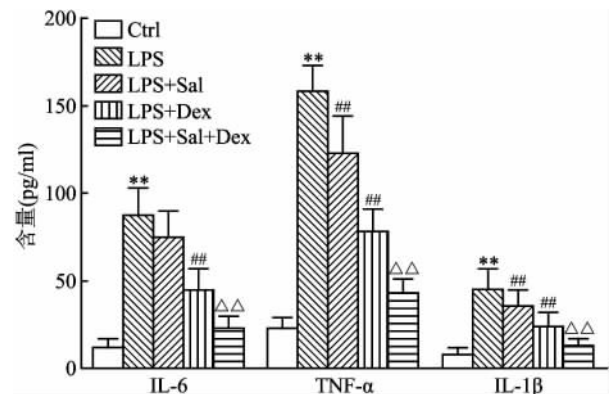


图5 ELISA 法检测软骨细胞相关因子表达水平

与 Ctrl 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 LPS 组比较: ##  $P < 0.01$ ; 与 LPS + Dex 组比较: ΔΔ  $P < 0.01$

### 3 讨论

我国传统藏药红景天富含 Sal, 具有抗衰老、抗氧化应激等药理作用。Dex 除了具有镇静、镇痛等作用外, 同时还可以通过激活胆碱能抗炎通路, 使单核/巨噬细胞 TNF- $\alpha$  等炎症因子的合成、释放明显减少, 从而抑制全身过度炎症反应<sup>[7]</sup>。Luo et al<sup>[8]</sup>研究证实, 在非小细胞肺癌 A549 细胞系中, Dex 可以通过降低 C/EBP 同源蛋白信号通路的活性来抑制凋亡的发生; 而 Wang et al<sup>[9]</sup>同样在 A549 细胞中



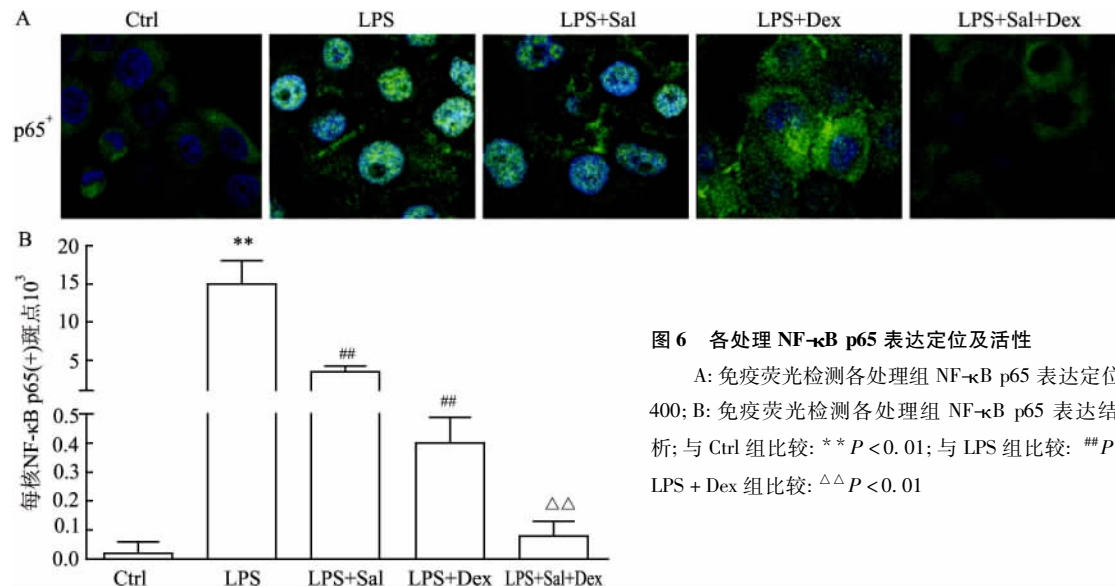


图6 各处理 NF-κB p65 表达定位及活性

A: 免疫荧光检测各处理组 NF-κB p65 表达定位及活性 × 400; B: 免疫荧光检测各处理组 NF-κB p65 表达结果统计分析; 与 Ctrl 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 LPS 组比较: ##  $P < 0.01$ ; 与 LPS + Dex 组比较: △△  $P < 0.01$

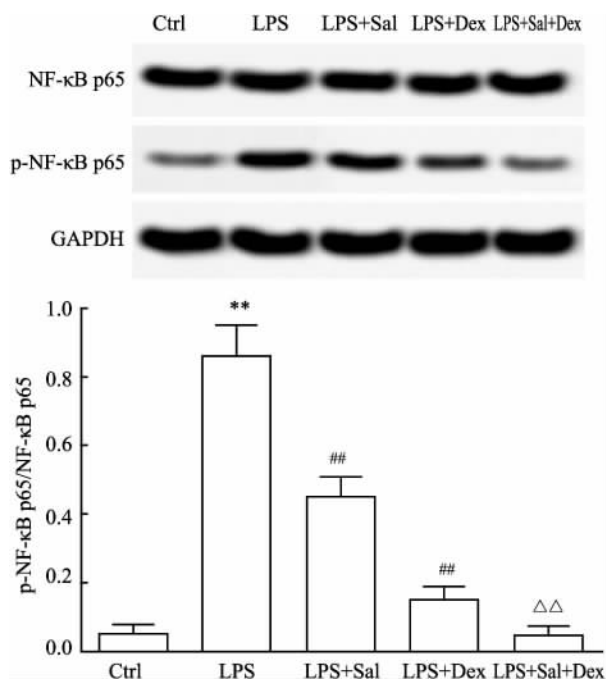


图7 Western blot 检测各处理组 NF-κB p65 表达水平

与 Ctrl 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 LPS 组比较: ##  $P < 0.01$ ; 与 LPS + Dex 组比较: △△  $P < 0.01$

证明 Dex 可以通过  $\alpha 2$ -肾上腺素能受体来激活抗凋亡的通路,抑制凋亡的发生。有实验报道称 OA 软骨氧浓度明显低于正常软骨,低氧环境又促进缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 表达水平上调<sup>[10]</sup>。HIF-1 $\alpha$  可以激活 TGF- $\beta 1$  分子<sup>[11]</sup>以活化纤维蛋白溶酶原(plasminogen activator, PA)来减少胶原蛋白合成;通过 PA 诱导 TNF- $\alpha$  上调,激活下游 Caspase-3 和 MMP-13 通路<sup>[12]</sup>;上调 MMP 抑制因子 1 表达从而降解下游靶蛋白以减少

软骨细胞内胶原蛋白合成<sup>[13]</sup>。本研究结果证明, LPS 诱导的人关节软骨细胞产生大量炎症因子 IL-6、TNF- $\alpha$  等。对 LPS + Dex 组软骨细胞进行 Sal 联合 Dex 处理后,细胞分泌 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  等减少,并且细胞内 Caspase-3 和 Caspase-9 都发生明显降低,并且还促进软骨细胞的增殖比例。同时也检测到 Collagen II 和 Aggrecan 蛋白分泌增加, MMP-13 分泌显著下调。表明 Sal 可以促进 Dex 对软骨细胞功能改善,可以有效抑制软骨细胞凋亡,同时还可以促进细胞增殖速率。

TGF- $\beta$  信号分子在多种重要信号途径中参与多细胞应答,如细胞增殖、分裂、凋亡、免疫及验证应答等<sup>[14]</sup>。TGF- $\beta 1$  一方面降低 p-NF- $\kappa B$  p65 和 TNF- $\alpha$  活性来降低炎症因子 IL-6、IL-17 等来抑制免疫炎症<sup>[15]</sup>,另一方面还可以结合 TNF- $\alpha$  共同抑制 Caspase-3 依赖的凋亡通路来抑制凋亡发生。实验结果表明,正常组软骨细胞 p-p65 和 TNF- $\alpha$  表达水平较低,且 p-NF- $\kappa B$  p65 极少入核;经过 LPS 诱导之后两者水平显著升高,p-NF- $\kappa B$  p65 大量进入细胞核,Dex 虽然可以有效降低二者表达水平,但是在经过 Sal 处理后细胞 p-NF- $\kappa B$  p65 和 TNF- $\alpha$  等表达水平进一步降低,p-NF- $\kappa B$  p65 入核现象也得到明显改善。说明 Sal 可以有效促进 Dex 对细胞内 NF- $\kappa B$  p65 激活,并且进一步影响下游相关基因的表达。

## 参考文献

- [1] Carlson A K, Rawle R A, Adams E, et al. Application of global metabolomic profiling of synovial fluid for osteoarthritis biomarkers [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 499(2): 182-8.
- [2] Endo Y, Nwawka O K, Smith S, et al. Tarsometatarsal joint com-

- munication during fluoroscopy-guided therapeutic joint injections and relationship with patient age and degree of osteoarthritis [J]. *Skeletal Radiol*, 2018,47(2):271–7.
- [3] Venn R M, Bradshaw C J, Spencer R, et al. Preliminary UK experience of dexmedetomidine, a novel agent for postoperative sedation in the intensive care unit [J]. *Anaesthesia*, 1999, 54(12):1136–42.
- [4] Taniguchi T, Kidani Y F, Kanakura H, et al. Effects of dexmedetomidine on mortality rate and inflammatory responses to endotoxin-induced shock in rats [J]. *Crit Care Med*, 2004, 32(6):1322–6.
- [5] Xu M C, Shi H M, Gao X F, et al. Salidroside attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury *via* PI3K/Akt signaling pathway [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2013, 15(3):244–52.
- [6] Lai W, Xie X, Zhang X, et al. Inhibition of complement drives increase in early growth response proteins and neuroprotection mediated by salidroside after cerebral ischemia [J]. *Inflammation*, 2018, 41(2):449–63.
- [7] Yoshikawa H, Kurokawa M, Ozaki N, et al. Nicotine inhibits the production of proinflammatory mediators in human monocytes by suppression of i-kappaB phosphorylation and nuclear factor-kappaB transcriptional activity through nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  [J]. *Clin Exp Immunol*, 2006, 146(1):116–23.
- [8] Luo Z Y, Gao H, Xiang B Q, et al. Effect of dexmedetomidine on apoptosis and CHOP in hypoxia/reoxygenation injury A549 cell [J]. *Chin J Appl Physiol*, 2018, 34(2):137–42.
- [9] Wang C, Datto T, Zhao H, et al. Midazolam and dexmedetomidine affect neuroglioma and lung carcinoma cell biology *in vitro* and *in vivo* [J]. *Anesthesiology*, 2018, 129(5):1000–14.
- [10] Coimbra I B, Jimenez S F, Hawkins D F, et al. Hypoxia inducible factor-1  $\alpha$  expression in human normal and osteoarthritic chondrocytes [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2004, 12(4):336–45.
- [11] Holmdahl L, Eriksson E, Eriksson B, et al. Depression of peritoneal fibrinolysis during operation is a local response to trauma [J]. *Surgery*, 1998, 123(5):539–44.
- [12] Jha N K, Jha S K, Sharma R, et al. Hypoxia-induced signaling activation in neurodegenerative diseases: Targets for new therapeutic strategies [J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 62(1):15–38.
- [13] Chegini N, Kotseos K, Bennett B, et al. Matrix metalloproteinase (MMP-1) and tissue inhibitor of mmp in peritoneal fluids and sera and correlation with peritoneal adhesions [J]. *Fertil Steril*, 2001, 76(6):1207–11.
- [14] Massague J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors [J]. *Genes Dev*, 2005, 19(23):2783–810.
- [15] Bystrom J, Clanchy F I, Taher T E, et al. TNF $\alpha$  in the regulation of Treg and Th17 cells in rheumatoid arthritis and other autoimmune inflammatory diseases [J]. *Cytokine*, 2018, 101:4–13.

## Synergistic effect and its mechanism of salidroside combined with dexmedetomidine in LPS-induced articular chondrocytes cells

Du Gang<sup>1</sup>, Chen Na<sup>2</sup>, Liu Xiaoyan<sup>1</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Operative Anesthesiology, <sup>2</sup>Dept of Quality Control, The First Hospital of Shandong Zibo, Zibo 255200)

**Abstract Objective** To investigate the regulative effect and mechanism of Salidroside (Sal) combined with dexmedetomidine in lipopolysaccharide (LPS)-induced articular chondrocytes cells. **Methods** The experiment was set as healthy control group (Ctrl group), LPS induction model group (LPS group), Sal group alone (LPS + Sal group), dexmedetomidine (Dex) group alone (LPS + Dex group), Dex combined with Sal group (LPS + Dex + Sal group). In each group, LPS was stimulated for 8 h (100 ng/ml), Sal (50  $\mu$ g/ml) and Dex (100 nmol/L) for 48 h. For this purpose in this study, the apoptosis were detected by the immunofluorescence; the cells growth were investigated by BrdU staining. The protein expression of apoptosis-and inflammatory-related were determined by Western blot. The levels of inflammatory factors were detected by ELISA. **Results** The effect of Dex suppressed the apoptosis and inflammation were promoted by Sal in articular chondrocytes cells, inhibited the activation of NF- $\kappa$ B p65, and decreased the inflammatory factors including IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , associated with the declined of Caspase-3 and Caspase-9 ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Sal can increase the apoptosis and inflammatory response of Dex induced by LPS in human chondrocytes; the main reason may be by down-regulating phosphorylated nuclear transcriptional  $\kappa$ B p65 (p-NF- $\kappa$ B p65), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and downstream pathway activity.

**Key words** salidroside; dexmedetomidine; articular chondrocytes; apoptosis; inflammatory factor