

· 基础研究 ·

基于转录组学探讨海桐皮方提取膏外用治疗膝骨关节炎的作用机制

夏迪, 谷金玉, 李法杰, 苏超, 张清

(中国中医科学院望京医院脊柱二科, 北京 100102)

【摘要】 目的: 基于转录组学探讨海桐皮方提取膏外用治疗膝骨关节炎的作用机制。方法: 将 12 只 SPF 级大鼠分为正常组(control, C 组)、模型组(model, M 组)和海桐皮方提取膏组(Haitongpi prescription, HP 组), 对 M 组和 HP 组通过 Panicker 法建立膝骨关节炎大鼠模型, 并通过海桐皮方提取膏局部外用对 HP 组干预 4 周。提取小鼠膝关节软骨总 RNA, 并通过测序获得 3 组的差异基因。通过 GO 功能及 KEGG 通路富集分析对差异基因进行功能预测和分析。结果: C 组 vs M 组共鉴定出差异基因 109 个, M 组 vs HP 组鉴定出差异基因 118 个, 共有基因 28 个。GO 功能富集分析显示海桐皮方提取膏治疗膝骨关节炎的机制主要涉及免疫球蛋白介导的免疫应答、免疫球蛋白复合物和抗原结合等; KEGG 通路富集分析显示与肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)信号通路、白细胞介素-17(interleukin 17, IL-17)信号通路和雌激素信号通路相关。结论: 海桐皮方提取膏可通过免疫球蛋白介导的免疫应答、免疫球蛋白复合物和抗原结合等机制, TNF 信号通路、IL-17 信号通路和雌激素信号通路等信号通路发挥对膝骨关节炎的治疗作用。

【关键词】 海桐皮方提取膏; 膝骨关节炎; 转录组学; 作用机制

中图分类号: R684.3

DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.2023.11.016

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Study on the mechanism of haitongpi prescription extract ointment in the treatment of knee osteoarthritis based on transcriptome

XIA Di, GU Jin-yu, LI Fa-jie, SU Chao, ZHANG Qing (Spine II Department, Wangjing Hospital of China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100102, China)

ABSTRACT Objective To explore the mechanism of Haitongpi Prescription extract in the treatment of knee osteoarthritis based on transcriptome. **Methods** Total of 12 SPF grade rats were divided into control group (group C), model group (group M), and Haitongpi prescription group (group HP). The knee osteoarthritis rat model was established using the Panicker method for group M and group HP, and group HP was intervened by local topical application of Haitongpi Prescription extract for 4 weeks. Total RNA from mouse knee cartilage was extracted and three sets of differential genes were obtained through sequencing. Differential genes were prediction and analysis through GO function and KEGG pathway enrichment analysis. **Results** A total of 109 differentially expressed genes were identified in Group C versus Group M, while 118 differentially expressed genes were identified in Group M versus Group HP, resulting in a total of 28 genes. GO functional enrichment analysis showed that the mechanism of HP extract in treating knee osteoarthritis mainly involved immunoglobulin mediated immune response, immunoglobulin complexes, and antigen binding; KEGG pathway enrichment analysis showed correlation with tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway, interleukin 17 (IL-17) signaling pathway, and estrogen signaling pathway. **Conclusion** HP extract can exert therapeutic effects on knee osteoarthritis through mechanisms such as immunoglobulin mediated immune response, immunoglobulin complexes, and antigen binding, as well as signaling pathways such as TNF signaling pathway, IL-17 signaling pathway, and estrogen signaling pathway.

KEYWORDS Haitongpi prescription extract cream; Knee osteoarthritis; Transcriptome; Mechanism of action

基金项目:首都卫生发展科研专项项目(编号:2018-2-4162);中国中医科学院“优势病种——医院制剂-新药”研发专项(编号:ZZ15-XY-PT-12);中国中医科学院科技创新工程-重大攻关项目(中医骨伤科学)专项(编号:CI2021A02003)

Fund program: Capital Health Development Research Special Project (No. 2018-24162)

通讯作者:张清 E-mail: zhangqingys@163.com

Correspondence author: ZHANG Qing E-mail: zhangqingys@163.com

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是最常见的慢性关节疾病,由于频繁使用和高应力,膝关节成为了OA的常见部位^[1-2]。全球放射学证实的症状性膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)的患病率总体为3.8%,在60岁以上的人群中随着年龄的增长而增加^[3]。海桐皮方(Haitongpi prescription, HP)原方首见于《医宗金鉴·正骨心法要旨》,由海桐皮、川椒、川芎、防风、

白芷、甘草等 12 味中药组成,现代研究具有显著的临床疗效^[4-7]。本团队的前期动物实验证实,HP 提取膏具有较为显著的抗炎镇痛作用,并通过两种工艺分别制备海桐皮方提取膏,对比发现工艺 1 组的抗炎镇痛效果优于工艺 2 组^[8]。因此,本研究通过转录组学的方法,进一步探讨 HP 提取膏外用治疗 KOA 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂 海桐皮方提取膏,由中国中医科学院中药所提供(批号:202206),主要成分为海桐皮、透骨草、乳香、没药、当归、川椒、川芎、红花、威灵仙、白芷、甘草、防风;L-半胱氨酸(Solarbio,货号 C0012);木瓜蛋白酶(Sigma,货号 110203);氯仿(中国国药公司);酚(中国国药公司);异丙醇(中国国药公司);乙醇(中国国药公司);琼脂糖(北京 UP-Lab 公司);goldview(北京 UP-Lab 公司);质检试剂盒 DNA 1000 assay Kit(立陶宛 Agilent Technologies 公司);ABI Step One Plus Real-Time PCR System(美国 Life Technologies 公司)。

1.1.2 仪器 微量分光光度计(美国 Thermo 公司);实验室离心机(中国 BIOBASE 公司);PCR 仪(美国 Thermo 公司);凝胶成像系统(美国 UVP 公司);安捷伦 2100(德国 Agilent Technologies 公司)。

1.1.3 数据库平台 GO 数据库:<http://geneontology.org/>;KEGG 数据库:<http://www.kegg.jp/>;蛋白质数据库:Uniprot(<https://www.uniprot.org/>)。

1.2 动物

选择 8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 12 只,体质量 200~220 g,由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供,动物许可证编号 SYXK(京)2018-0022。所有大鼠均放置于清洁级实验动物房内饲养,动物房内温度(25±2)℃,环境相对湿度 45%~60%,昼夜交替光照。本实验的动物伦理审查由动物伦理委员会审核批准(伦理批件号:中科针伦 D2022-05-25)。

1.3 造模方法与给药

1.3.1 造模方法 将 12 只大鼠适应性喂养 1 周后随机分为 3 组:正常组(control,C 组)、模型组(model,M 组)和海桐皮方提取膏组(HP 组),每组各 4 只。C 组大鼠为空白对照,M 组和 HP 组参照 Panicker 法^[9]造模:将 4%的木瓜蛋白酶与 0.03 mol·L⁻¹的 L-半胱氨酸混合后静置 0.5 h。采用 3 mg·ml⁻¹戊巴比妥钠对大鼠进行麻醉,按 1 ml/100 g 体重比例腹腔注射。麻醉完成后对右膝关节进行备皮,并碘伏消毒。将大鼠右膝关节屈曲 45°,自髌韧带外侧向股骨髁间窝方向进针,突破关节腔并注射木瓜蛋白酶、

L-半胱氨酸混合液 20 μl。针头一边旋转,一边退出关节腔,退出后对膝关节进行充分屈伸,保证注射液在关节腔中均匀散布。分别于 0、4、7 d 各注射 1 次,随后常规喂养 1 周。

1.3.2 给药 C 组、M 组不予药物干预,HP 组予 HP 提取膏按 19.2 g·kg⁻¹ 体重局部外涂(经前期临床观察及计算,标准体重约 60 kg 的成人用药最高剂量约相当于 3.11 g·kg⁻¹ 体重,经过查表,转换系数 Rab=6.17,经转换,大鼠最高用药剂量约为 19.2 g·kg⁻¹ 体重^[10-11])。具体用法:右膝关节局部备皮后环绕关节一周均匀涂抹,并用无菌贴包裹,每日 2 次,持续给药 4 周。干预 4 周后处死大鼠,每组随机选取 3 只,剥离大鼠右侧膝关节周围皮肤及肌肉等组织,切开关节囊并切除髌骨后取出完整膝关节软骨。将软骨组织放入冻存管中,使用液氮对取出的软骨进行冷冻处理,置于-80℃冰箱保存以备后续转录组学分析。

1.4 观察项目与方法

1.4.1 表达差异分析 应用 edgeR 软件包 3.22.5 进行。使用 Benjamini & Hochberg 方法调整 P 值,并按照差异倍数 log₂ Fold Change>1,显著性 P<0.05 进行筛选。

1.4.2 富集分析 GO 分析:通过 clusterProfiler 3.8.1 软件实现差异表达基因的 GO 富集分析,对各组差异基因进行 GO 功能分析,以注释并推测这些基因可能的作用。P<0.05 的 GO 条目为差异有统计学意义。

KEGG 分析:通过京都基因与基因组百科全书(KEGG)可以了解生物系统的高级功能和效用。本研究使用 cluster Profiler 3.8.1 软件分析 KEGG 通路中差异表达基因的统计富集。P<0.05 为显著富集的阈值。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。以相关性分析中的皮尔逊相关系数 ρ 作为生物学重复相关性的评价指标,ρ 越接近 1,相关性越强;使用 FPKM 作为衡量基因表达水平的指标,FPKM=cDNA 片段数量/比对片段总数(106)×转录本长度(kb),按照差异倍数 log₂FoldChange>1,错误发现率(false discovery rate,FDR)<0.05 筛选差异基因,以 FDR<0.05 作为具有显著性的 GO 功能条目和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)信号通路。

2 结果

2.1 转录组测序数据的质量评估

用 Pearson 相关系数表示表达水平相关性,相关

系数越接近 1,表明相关性越强,在 0.8~1 之间时属于极强相关。分析结果显示,在 C 组、M 组和 HP 组共 9 个样本中,任意两个样本之间的相关系数均 $\geq 0.98(0.98 \leq r \leq 1)$,说明本研究涉及的 9 个样本中,任意两个样本之间均存在极强的相关性,具体见图 1a。通过 R 语言的 DESeq 软件包进行 PCA 主成分分析,图中不同颜色分别表示 3 个组别,不同图形为同一组别中的 3 个重复样本,样本距离越近,表示相似性越高,图中可见 HP 组的 3 个样本聚在一起,表明 HP 组的 3 个样本相似性较高,见图 1b。

2.2 差异表达分析

经筛选发现,C 组 vs M 组共筛选出差异基因 109 个,其中上调基因 52 个,下调基因 57 个;M 组 vs HP 组共筛选出差异基因 118 个,其中上调基因 42 个,下调基因 76 个,具体见表 1。并以火山图和 MA 图的形式直观表示 M 组 vs HP 组的差异基因,见图 2。对三组之间的差异基因进行聚类分析并绘制热图,图中显示 HP 组的 3 个样本聚集在一起,可以与 C 组、M 组样本分开,表明 HP 组差异基因的表达量与其他两组相比具有差异性,见图 3。

表 1 表达差异分析结果统计

Tab.1 Statistics of expression differences analysis results

组别	上调基因	下调基因	总计
C 组 vs M 组	52	57	109
M 组 vs HP 组	42	76	118
C 组 vs HP 组	31	69	100

2.3 富集分析

对以上筛选出来的基因分别进行 GO 富集分析和 KEGG 富集分析。GO 富集分析的结果显示,HP 提取膏治疗 KOA 的病理机制主要涉及免疫球蛋白介导的免疫应答(immunoglobulin mediated immune

response)、吞噬作用(phagocytosis)等生物过程,免疫球蛋白复合物(immunoglobulin complex)、质膜外侧(external side of plasma membrane)等细胞组分,抗原结合(antigen binding)免疫球蛋白受体结合(immunoglobulin receptor binding)等分子功能。见图 4。根据 KEGG 富集分析结果,在 HP 提取膏治疗 KOA 的通路中挑选 FDR 值最小的 20 条通路进行展示,包括肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor,TNF)信号通路(TNF signaling pathway)、白细胞介素-17(interleukin-17,IL-17)信号通路(IL-17 signaling pathway)和雌激素信号通路(estrogen signaling pathway),见图 5。

3 讨论

3.1 KOA 发病机制

KOA 是一种软骨退行性疾病,涉及到创伤、机械力、炎症、生化反应和代谢紊乱等多种致病因素^[12-13]。在 KOA 的发病机制中,软骨中 miRNA 水平的改变可能导致靶基因的正常表达,从而破坏软骨的稳态。此外,血管性血友病因子裂解酶(a disintegrin like and metalloproteinase with thrombospondin type I motif-13,ADAMTS-13)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase-5,MMP-5)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor binding protein 1,IGFBP1)和 V-Ral 猴白血病病毒癌基因同系物 A (V-Ral simian leukemia viral oncogene homolog A,RALA)等 miRNA 的靶标在介导软骨基质降解、调节胰岛素样生长因子-140 (instlin-like growth factor-140,IGF-140)在关节中的可用性以及调节软骨基质的发育方面发挥重要作用^[14-16]。也有研究证明,IL-1 β /AP-1/miR-30a/ADAMTS-5 通路可以促进 IL-1 β 诱导的 OA 软骨基质的降解^[17]。国内体外细胞实验发现,与半月板损伤的患者相比,KOA 患者的软骨细胞中 circ_0040646 明显高表达,且该 RNA 在高表达状态

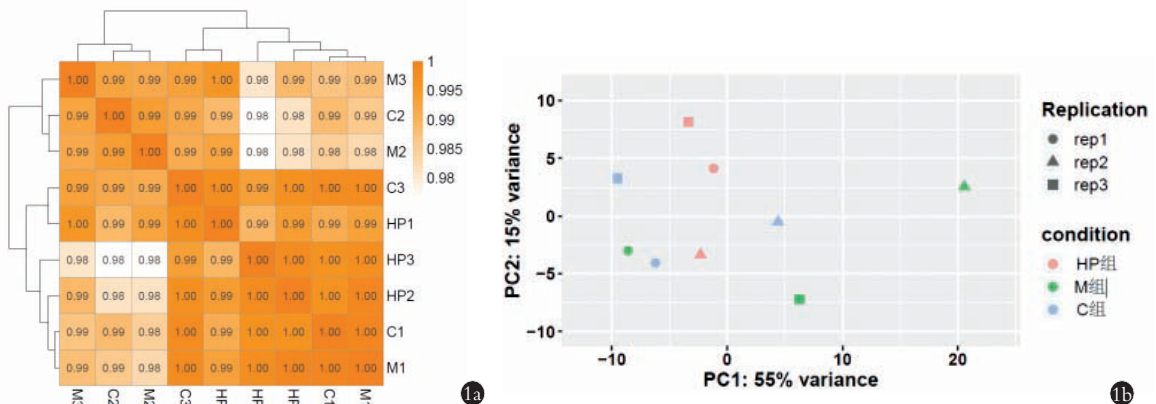


图 1 转录组测序数据相关性分析 1a. Pearson 相关系数 1b. 主成分分析

Fig.1 Correlation analysis of transcriptome sequencing data 1a. Pearson correlation coefficient test 1b. Principal component analysis

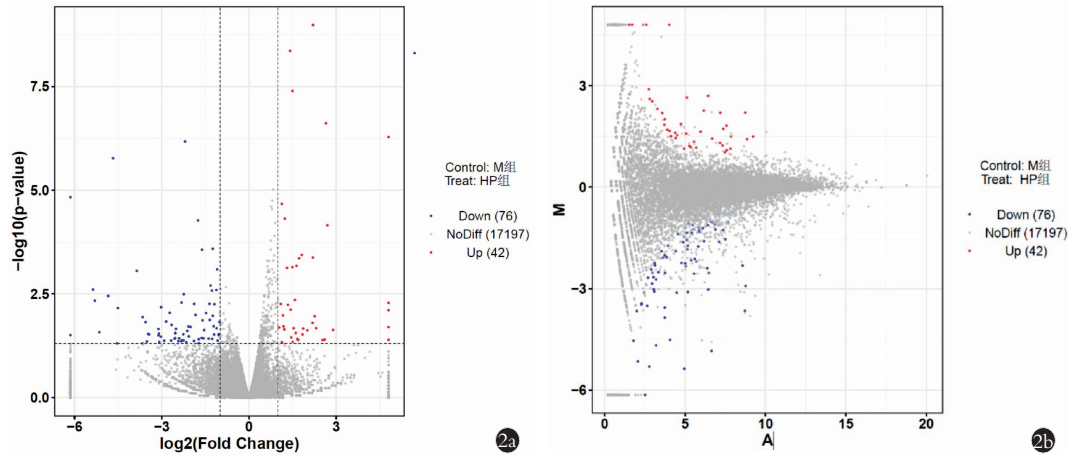


图 2 M 组与 HP 组差异表达基因火山图和 MA 图 2a. 火山图 2b. MA 图

Fig.2 Volcano and MA maps of differentially expressed genes between the M and HP groups 2a. Volcano map 2b. MA map

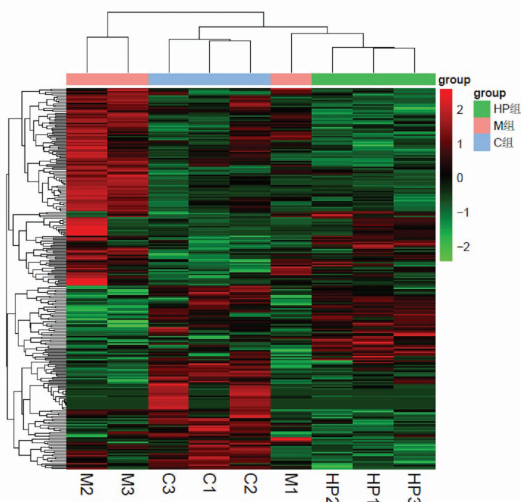


图 3 C 组、M 组和 HP 组差异表达基因聚类分析

Fig.3 Cluster analysis of differentially expressed genes in groups C, M, and HP

下，会抑制细胞增殖分化，促进细胞凋亡，表明该 RNA 可能成为治疗 KOA 的干预靶点^[18]。另外，miR-125a 也可以通过 NFATc1/miR-125a 调控通路参与破骨细胞的分化调节，对 KOA 的发生从发挥影响^[19]。有研究发现，世界范围内女性的 OA 患病率明显高于男性，因此也有学者提出雌激素水平或许与 OA 的发生存在相关性^[20]。TANG 等^[21]的研究表明，OA 的发生与雌激素受体相关受体 α (estrogen receptor-related receptor α , ERR α) 和 α ERR γ 相关。其中 ERR α 可以通过 IL-1 β 和 MMP-13 介导软骨降解，促进 OA 的发生和发展；而 ERR γ 则通过 IL-9 介导 MAPK/ERK 通路上调 MMP-6 的表达，参与软骨的破坏过程^[22]。SUN 等^[23]发现，G 蛋白偶联雌激素受体 (G-protein coupled receptor, GPER) 在激活机械应激诱导的软骨细胞凋亡中起着至关重要的作用，且 GPER 在 OA 软骨和大鼠 OA 模型中的表达显著降低。

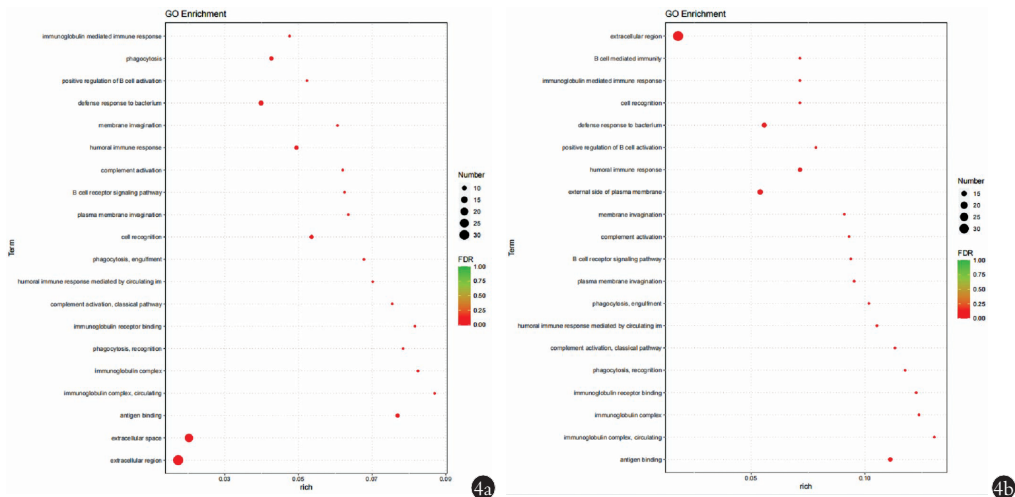


图 4 GO 富集分析 4a. C 组 vs M 组 4b. M 组 vs HP 组

Fig.4 GO enrichment analysis 4a. Group C vs group M 4b. Group M vs group HP

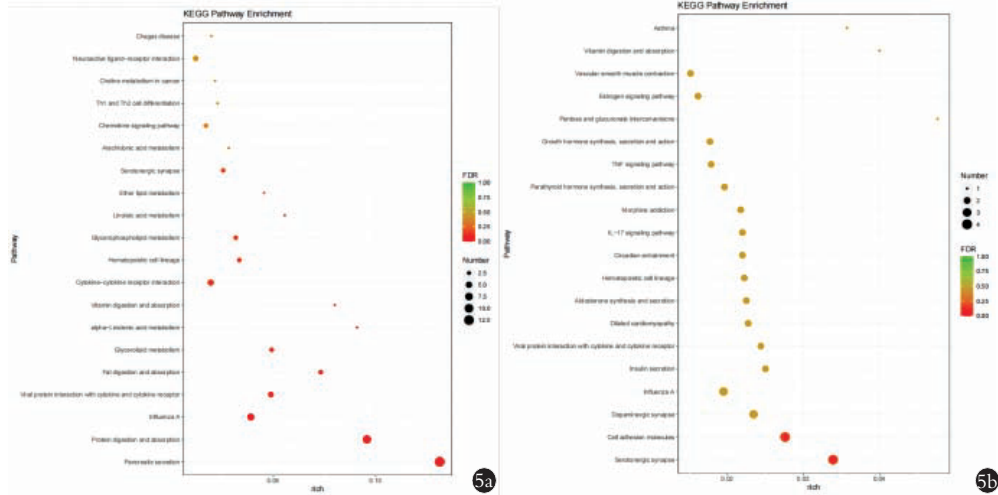


图 5 KEGG 富集分析 5a. C 组 vs M 组 5b. M 组 vs HP 组
Fig.5 KEGG enrichment analysis 5a. Group C vs group M 5b. Group M vs group HP

3.2 HP 提取膏治疗 KOA 机制探讨

在《医宗金鉴》中有言,海桐皮汤主治“一切跌打损伤、筋翻骨错、疼痛不止”,如今常用与骨关节炎、腰椎间盘突出症等疾病的治疗。有研究将海桐皮汤熏洗用于肘关节 OA 的术后恢复中,并随访 10~24 个月,发现患者肘关节的活动范围、Mayo 肘关节功能评分和上海肘关节功能障碍评分均有改善,优良率可达 92.5%,术后 8 个月 VAS 由平均 6.5 分降至 0.5 分^[24]。

本研究 C 组、M 组共发现差异基因 109 个,其中上调基因 52 个,下调基因 57 个;M 组 vs HP 组共发现差异基因 118 个,其中上调基因 42 个,下调基因 76 个。在以上差异基因中,共有基因发现 31 个。有研究发现,ADAMTS4 是一类重要的 ADAMTS 金属蛋白酶,参与了软骨组织的降解等过程,在 KOA 患者的膝关节滑膜组织中,ADAMTS4 的基因呈阳性表达^[25]。本研究发现,HP 提取膏外用可以抑制该基因的表达。在此前有研究将 OA 组织与股骨颈骨折后组织进行比较,发 OA 组织中的 ADAMTS16 基因上调 ($P < 0.0001$)^[26],但近些年的 OA 研究中缺乏对该基因的进一步探讨。本研究也观察到 KOA 患者软骨中的 ADAMTS16 基因表达升高,且 HP 提取膏可以下调该基因,或许在后期研究中,可以将该基因作为一个切入点进行更深层次的探讨。

TNF 信号通路、IL-17 信号通路和雌激素信号通路在 HP 提取膏治疗 KOA 的过程中发挥了重要作用。虽然目前雌激素的作用机制尚不明朗,但越来越多的研究表明,雌激素对软骨具有保护作用^[27]。近些年研究发现,雌激素 17 β -雌二醇 2 可以通过 SIRT1 介导的 AMPK/mTOR 通路诱导线粒体自噬上

调,以促进软骨的增殖和活力^[28]。本研究通过 KEGG 富集分析发现,HP 提取膏可以通过雌激素信号通路对 KOA 发挥治疗作用,但具体通路尚不清楚,仍需要进一步研究。而分析发现的 TNF 通路和 IL-17 通路均为治疗 KOA 的经典通路^[29-30]。

综上所述,HP 提取膏可以下调以 ADAMTS4 为代表的一系列金属蛋白酶靶点基因的表达,通过 TNF 通路、IL-17 通路以及雌激素通路对 KOA 进行治疗。目前的研究中对 TNF 通路和 IL-17 通路的研究相对丰富,但在 KOA 的发病和治疗中,关于雌激素通路的研究较少,或许此通路可以为 KOA,尤其是女性绝经后 KOA 的治疗提供新的临床思路。

参考文献

- [1] JANG S, LEE K, JU J H. Recent updates of diagnosis, pathophysiology, and treatment on osteoarthritis of the knee[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(5): 2619.
- [2] MORA J C, PRZKORA R, CRUZ-ALMEIDA Y. Knee osteoarthritis: pathophysiology and current treatment modalities[J]. J Pain Res, 2018, 11: 2189-2196.
- [3] BROPHY R H, FILLINGHAM Y A. AAOS clinical practice guideline summary: management of osteoarthritis of the knee (nonarthroplasty), third edition[J]. J Am Acad Orthop Surg, 2022, 30(9): e721-e729.
- [4] 吴谦. 医宗金鉴: 第五分册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 2306.
- [5] WU Q. Jin Jian of Medical Sect[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1982: 2306. Chinese.
- [6] 于浩洋. PRP 配合海桐皮汤对膝骨关节炎的临床观察[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2022.
- [7] YU H Y. Clinical observation of PRP combined with Haitongpi Decoction on knee osteoarthritis[D]. Harbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine, 2022. Chinese.
- [8] 田彪, 陈博, 常跃文, 等. 海桐皮汤熏洗联合玻璃酸钠注射治疗膝骨关节炎临床疗效的 Meta 分析[J]. 时珍国医国药, 2020, 31

- (7):1778-1782.
- TIAN B, CHEN B, CHANG Y W, et al. Meta-analysis of clinical efficacy of Haitongpi Decoction fumigation combined with sodium hyaluronate injection in the treatment of knee osteoarthritis[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2020, 31(7):1778-1782. Chinese.
- [7] 杨欢, 赵敏, 肖璟. 海桐皮汤联合依降钙素对绝经后骨质疏松合并膝关节炎患者 IL-1 β , OPN 和 MMP-13 及其抑制因子表达的影响[J]. *湖北中医杂志*, 2021, 43(9):3-7.
- YANG H, ZHAO M, XIAO J. Effect of steaming and washing therapy with Haitongpi Tang combined with calcitonin on interleu-1 β , osteopontin, matrix metalloproteinase-13 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 levels in patients with postmenopausal knee osteoarthritis[J]. *Hubei J Tradit Chin Med*, 2021, 43(9):3-7. Chinese.
- [8] 李法杰, 谷金玉, 张悦, 等. 海桐皮汤提取膏经皮给药对小鼠抗炎镇痛作用及机制研究[J]. *海南医学院学报*, 2022, 28(16):1214-1221.
- LI F J, GU J Y, ZHANG Y, et al. Effect and mechanism of Hai Tongpi Decoction ointment on anti-inflammation and analgesia by transcutaneous administration in mice[J]. *J Hainan Med Univ*, 2022, 28(16):1214-1221. Chinese.
- [9] Murat N, Karadam B, Ozkal S, et al. Sicanlarda papainle olusturulan osteoartritin Mankin skorlu ile zaman bagli derecelendirilmesi [J]. *Acta Orthop Traumatol Turc*, 2007, 41(3):233-237.
- [10] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9):1069-1072.
- HUANG J H, HUANG X H, CHEN Z Y, et al. Dose conversion among different animals and healthy volunteers in pharmacological study[J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2004, 9(9):1069-1072. Chinese.
- [11] 邓文龙. 动物中人体剂量换算遵循的原则[J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(3):196-197.
- DENG W L. Principles of human dose conversion in animals[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2016, 32(3):196-197. Chinese.
- [12] MORA J C, PRZKORA R, CRUZ-ALMEIDA Y. Knee osteoarthritis: pathophysiology and current treatment modalities[J]. *J Pain Res*, 2018, 11:2189-2196.
- [13] RIEGGER J, BRENNER R E. Pathomechanisms of posttraumatic osteoarthritis: chondrocyte behavior and fate in a precarious environment[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5):1560.
- [14] LIANG Z J, ZHUANG H, WANG G X, et al. MiRNA-140 is a negative feedback regulator of MMP-13 in IL-1 β -stimulated human articular chondrocyte C28/I2 cells[J]. *Inflamm Res*, 2012, 61(5):503-509.
- [15] KARLSEN T A, JAKOBSEN R B, MIKKELSEN T S, et al. microRNA-140 targets RALA and regulates chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by translational enhancement of SOX9 and ACAN[J]. *Stem Cells Dev*, 2014, 23(3):290-304.
- [16] LI S H, WU Q F. microRNAs target on cartilage extracellular matrix degradation of knee osteoarthritis[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(3):1185-1197.
- [17] JI Q B, XU X J, ZHANG Q, et al. The IL-1 β /AP-1/miR-30a/ADAMTS-5 axis regulates cartilage matrix degradation in human osteoarthritis[J]. *J Mol Med*, 2016, 94(7):771-785.
- [18] 张学普, 吴月欣, 赵浩森, 等. 环状 RNA circ_0040646 靶向抑制 miR-188-3p 调控膝骨关节炎软骨细胞的增殖、分化和凋亡[J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(20):3141-3146.
- ZHANG X P, WU Y X, ZHAO H S, et al. A circular RNA, circ_0040646, regulates the proliferation, differentiation, and apoptosis of knee osteoarthritis chondrocytes by targeted inhibition of microRNA-188-3p[J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2022, 26(20):3141-3146. Chinese.
- [19] 杨丽, 赵新兰, 雷丹丹, 等. 破骨细胞分化中 NFATc1/miR-125a 作用通路的研究[J]. *疑难病杂志*, 2015, 14(3):280-283.
- YANG L, ZHAO X L, LEI D D, et al. NFATc1/miR-125a function pathway mediates osteoclastogenesis[J]. *Chin J Difficult Complicat Cases*, 2015, 14(3):280-283. Chinese.
- [20] BRIGGS A M, CHAN M, SLATER H. Models of Care for musculoskeletal health: moving towards meaningful implementation and evaluation across conditions and care settings[J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2016, 30(3):359-374.
- [21] TANG J S, LIU T, WEN X G, et al. Estrogen-related receptors: novel potential regulators of osteoarthritis pathogenesis[J]. *Mol Med*, 2021, 27(1):5.
- [22] CILEK M Z, VEGA S D, SHIOZAWA J, et al. Synergistic upregulation of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by cytokines and its suppression in knee osteoarthritic synovial fibroblasts[J]. *Lab Invest*, 2022, 102(1):102-111.
- [23] SUN Y, LENG P, GUO P C, et al. G protein coupled estrogen receptor attenuates mechanical stress-mediated apoptosis of chondrocyte in osteoarthritis via suppression of Piezo1[J]. *Mol Med*, 2021, 27(1):96.
- [24] 王自方, 李洋洋, 明朝戈, 等. 海桐皮汤熏洗联合理筋手法治疗中重度肘关节骨关节炎术后血瘀络阻证[J]. *实用手外科杂志*, 2021, 35(3):382-384.
- WANG Z F, LI Y Y, MING Z G, et al. Treatment of blood stasis and collateral obstruction syndrome after moderate and severe elbow osteoarthritis with Haitongpi Decoction fumigation and washing combined with reasonable tendon manipulation[J]. *J Pract Hand Surg*, 2021, 35(3):382-384. Chinese.
- [25] LI T, PENG J, LI Q Q, et al. The mechanism and role of ADAMTS protein family in osteoarthritis[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(7):959.
- [26] DAVIDSON R K, WATERS J G, KEVORKIAN L, et al. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in synovium and cartilage[J]. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8(4):R124.
- [27] MARTIN-MILLAN M, CASTANEDA S. Estrogens, osteoarthritis and inflammation[J]. *Joint Bone Spine*, 2013, 80(4):368-373.
- [28] MEI R H, LOU P, YOU G C, et al. 17 β -estradiol induces mitophagy upregulation to protect chondrocytes via the SIRT1-mediated AMPK/mTOR signaling pathway[J]. *Front Endocrinol*, 2020, 11:615250.
- [29] MIMPEN J Y, BALDWIN M J, CRIBBS A P, et al. Interleukin-17A causes osteoarthritis-like transcriptional changes in human osteoarthritis-derived chondrocytes and synovial fibroblasts in vitro[J]. *Front Immunol*, 2021, 12:676173.
- [30] CHEN Z, LIN C X, SONG B, et al. Spermidine activates RIP1 deubiquitination to inhibit TNF- α -induced NF- κ B/p65 signaling pathway in osteoarthritis[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(7):503.