

新型蛋白酶体抑制剂对骨关节炎的治疗作用及其分子机制研究

姜厚森^{1△} 李忠¹ 韩宁¹ 赵阳² 郭佳¹ 吴培刚²

[摘要] **目的:**探讨新型蛋白酶体抑制剂 YSY-01A 对骨关节炎(OA)大鼠的治疗作用及其分子机制。**方法:**体外培养人软骨细胞,分为对照组(NC)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)组、YSY-01A 6.2 μ mol/L、12.5 μ mol/L、25 μ mol/L 组。采用一氧化氮(NO)试剂盒测量细胞中上清 NO 含量;采用 ELISA 法检测细胞上清中 PGE₂、IL-6、TNF- α 含量;蛋白免疫印迹(Western Blot)检测细胞中 COX-2 和 iNOS 的蛋白水平。SPF 级雄性 SD 大鼠 72 只,随机分为假手术组、模型组、YSY-01A 低剂量、中剂量、高剂量组和阳性药组。采用前交叉韧带横断术建立骨关节炎大鼠模型,观察软骨病理变化,测量 OA 大鼠血清中 COX-2 和 PGE₂ 水平及组织中 iNOS 和 NO 含量。**结果:**与 IL-1 β 组比较,YSY-01A 6.2 μ mol/L、12.5 μ mol/L、25 μ mol/L 组细胞上清 NO、PGE₂、IL-6 和 TNF- α 含量明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$);细胞中 COX-2 和 iNOS 蛋白表达下调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,YSY-01A 中剂量和高剂量组软骨病理变化缓解,血清中 COX-2 和 PGE₂ 含量下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);组织中 iNOS 和 NO 含量减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**YSY-01A 对骨关节具有一定的保护作用,可能与抑制炎症反应和软骨基质降解有关。

[关键词] 新型蛋白酶体抑制剂;软骨细胞;基质降解;骨关节炎

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2021)05-0001-05

Therapeutic Efficacy and Molecular Mechanism of a New Proteasome Inhibitor on Osteoarthritis

JIANG Housen^{1△} LI Zhong¹ HAN Ning¹ ZHAO Yang² GUO Jia¹ WU Peigang²

¹ Department of Hand, Foot and Orthopedics, Weifang People's Hospital; The First Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Weifang 261041, Shandong China;

² Weifang Medical College, Weifang 261053, Shandong China.

Abstract Objective: To investigate the therapeutic efficacy and molecular mechanism of a new protease inhibitor YSY-01A on osteoarthritis. **Methods:** Human chondrocytes were cultured in vitro and divided into NC group, IL-1 β group, YSY-01A 6.2 μ mol/L, 12.5 μ mol/L, and 25 μ mol/L groups. Nitric oxide (NO) kit was used to measure the NO content in the cell supernatant. ELISA was used to measure the PGE₂, IL-6, TNF- α content in the cell supernatant. Western Blot was used to detect the protein levels of COX-2 and iNOS in the cells. 72 SPF male SD rats were randomly divided into sham group, model group, YSY-01A low-dose, medium-dose, high-dose group and positive drug group. Anterior cruciate ligament transection was used to establish a rat model of osteoarthritis. The pathological changes of cartilage were observed by HE and safranin O-Fast green staining. The COX-2 and PGE₂ in serum and the content of iNOS and NO in tissues were detected by ELISA. **Results:** Compared with IL-1 β group, the levels of NO, PGE₂, IL-6 and TNF- α in YSY-01A (6.2 μ mol/L, 12.5 μ mol/L, 25 μ mol/L) groups were decreased significantly ($P < 0.05$). The expression of COX-2 and iNOS protein was down-regulated in YSY-01A (6.2 μ mol/L, 12.5 μ mol/L, 25 μ mol/L) groups ($P < 0.05$). Compared with the model group, the pathological changes of cartilage in YSY-01A middle-dose and high-dose groups were alleviated. The content of COX-2 and PGE₂ in serum were decreased in YSY-01A middle-dose and high-dose groups ($P < 0.05$). The content of

iNOS and NO in tissue were decreased in YSY-01A middle-dose and high-dose groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** YSY-01A has a protective efficacy on osteoarthritis, which may be related to the inhibition of inflammation and cartilage matrix degradation.

Keywords: new proteasome inhibitor; chondrocytes; matrix degradation; osteoarthritis

基金项目:山东省医药卫生科技发展计划项目(2016ws0641)

¹ 山东潍坊市人民医院(潍坊医学院第一附属医院)手足骨外科(山东 潍坊, 261041)

² 潍坊医学院

[△]通信作者 E-mail: jhsresolve81@163.com

骨关节炎(OA)是一种常见的退化性骨关节疾病,表现为关节软骨慢性变性、关节疼痛和功能障碍^[1]。骨关节炎与炎症反应和基质降解密切相关,特别是软骨炎症反应与骨关节炎的发展密切相关^[2]。因此,靶向软骨炎症反应和基质降解是骨关节炎治疗的有效方法。目前,非甾体类抗炎药是临床主要用于缓解骨关节炎患者疼痛和治疗的有效药物^[3]。但非甾体类抗炎药具有胃肠道等不良反应,而且对软骨基质降解的影响较小。因此,开发同时具有抗炎和抗软骨基质降解活性的药物是非常必要的。白细胞介素-1 β (IL-1 β)是存在于滑膜液和软骨细胞中的重要促炎细胞因子,可以诱导分解代谢介质和炎症因子的产生。因此,IL-1 β 诱导软骨细胞模型常被用于骨关节炎体外药物和病理研究^[4-5]。YSY-01A是化学合成的一种新型蛋白酶体抑制剂,可通过阻断细胞周期杀伤肿瘤细胞,具有抗乳腺癌活性^[6-7]。本研究观察和探讨了YSY-01A对骨关节炎的治疗作用和相关分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级SD大鼠,72只,雄性,体质量230~270 g,由潍坊医学院实验动物中心提供,饲养于清洁级动物房内。本研究符合潍坊医学院实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。

1.2 药物

YSY-01A,由潍坊医学院药理学实验室合成并提供,纯度99%以上,溶解于DMSO溶液,配制浓度为0.01 mol/L, -20℃保存。

1.3 试剂

CCK-8试剂盒(Dojindo,日本),诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和 β -actin一抗(Santa Cruz,美国),COX-2一抗(Abcam,美国),一氧化氮测量试剂盒(碧云天,中国),前列腺素E₂(PGE₂)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-6、金属基质蛋白酶(MMP)-3、MMP-13人ELISA试剂盒(R&D,美国)。

1.4 软骨细胞培养

人软骨细胞(HC-A)购自Sigma公司(美国),用含有10% FBS、100 U/mL青霉素及100 μ g/mL链霉素的DMEM/F12培养基,于5% CO₂和37℃的细胞培养箱中培养。体外将细胞分为NC组、IL-1 β 组、YSY-01A 6.2 μ mol/L、12.5 μ mol/L、25 μ mol/L组,用不同浓度的YSY-01A预处理细胞2 h,除对照组外,IL-1 β (10 ng/mL)处理细胞24 h,进行后续实验。

1.5 细胞活力

根据CCK-8试剂盒制造商说明书测量,将软骨细胞接种到96孔板(5 000个细胞/孔)中,并用不同浓度YSY-01A(0 μ mol/L、6.25 μ mol/L、12.5 μ mol/L、

25 μ mol/L、50 μ mol/L和100 μ mol/L)处理细胞24 h。然后,将10 μ L CCK-8溶液加入软骨细胞中并孵育2 h。最后,于波长450 nm处测量吸光度。

1.6 一氧化氮测量

收集细胞培养上清液,使用NO测定试剂盒以硝酸还原酶法测定NO含量。最后,于波长550 nm处测量吸光度。

1.7 酶联免疫吸附(ELISA)法

根据PGE₂、TNF- α 、IL-6、MMP-3、MMP-13人ELISA试剂盒制造商说明书测量软骨细胞上清的含量。

1.8 蛋白免疫印迹(Western Blot)法

收集软骨细胞,用含1 mmol/L PMSF和蛋白酶抑制剂混合物的蛋白裂解缓冲液提取细胞总蛋白,然后用BCA蛋白试剂盒测量蛋白浓度。将40 μ g蛋白质上样SDS-PAGE凝胶电泳分离,随后将蛋白质转移至PVDF膜。用5%脱脂奶粉封闭1 h,然后与一抗(iNOS按1:1 000稀释;COX-2按1:500稀释; β -Actin按1:1 000稀释)于4℃孵育过夜,洗涤,并在室温下二抗孵育2 h。使用增强型化学发光试剂盒曝光条带。

1.9 骨关节炎大鼠模型

将大鼠随机分为假手术组、模型组、YSY-01A低剂量组(2.5 mmol/L)、YSY-01A中剂量组(5 mmol/L)、YSY-01A高剂量组(10 mmol/L)和阳性药组(塞来昔布,2.86 mg/kg)。根据文献报道^[8-9],采用前交叉韧带横断术建立实验模型:麻醉大鼠(约3.5%的异氟烷),并于手术显微镜下进行关节囊切口和前交叉韧带横断手术。手术后1周开始给药治疗,连续给药4周,1周2次,共8次。实验结束后收集实验大鼠的血液和组织样本。

1.10 体内ELISA法

大鼠眼球取血,收集于1.5 mL EP管,室温静置30 min,3 000 g下4℃离心10 min,收集上清,存储于-80℃下,根据制造商说明测量大鼠血清中COX-2和PGE₂含量。分离和定量称取大鼠软骨组织,收集于1.5 mL EP管,加入生理盐水,组织研磨仪匀浆,10 000 g下4℃离心15 min,收集上清,存储于-80℃下,根据试剂盒说明书测量组织中iNOS活性和NO含量。

1.11 病理学观察

收集实验大鼠右膝的胫骨样本,置于中性福尔马林中固定48 h,然后置于EDTA脱钙液中脱钙15 d,每3 d换1次液。石蜡包埋,用切片机切成5 μ m薄片。用苏木精-曙红和番红O-固绿染色,然后显微镜观察软骨和蛋白聚糖变性的变化并拍照。

1.12 统计学分析

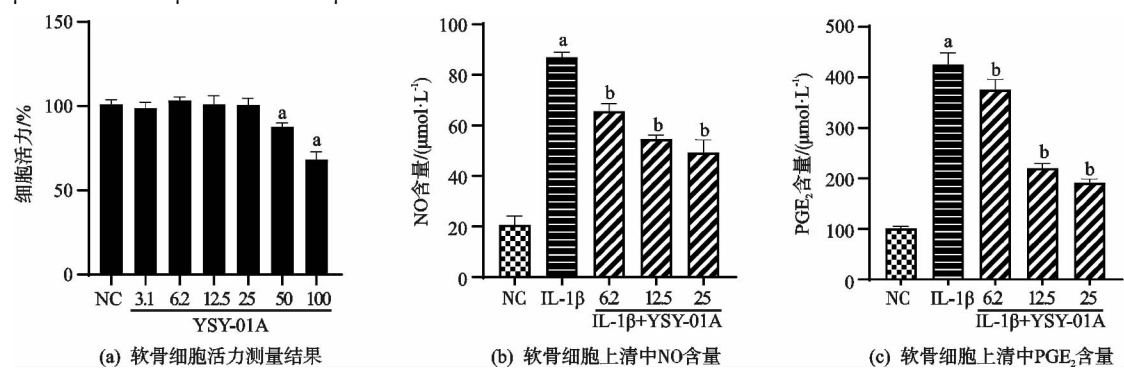
所有数据均采用GraphPad Prism 8.0软件分析,结果表示为 $\bar{x} \pm s$,用One-Way ANOVA进行多组数

据的检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 YSY-01A 对软骨细胞活力和炎症介质 NO 及 PGE₂ 的影响

用不同浓度 YSY-01A (0 $\mu\text{mol/L}$ 、3.1 $\mu\text{mol/L}$ 、6.2 $\mu\text{mol/L}$ 、12.5 $\mu\text{mol/L}$ 、25 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$) 处理软骨细胞 24 h, 细胞活力检测结果表明与 NC 组比较, 50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞活力下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 见图 1a), 故后续均采用 6.2 $\mu\text{mol/L}$ 、12.5 $\mu\text{mol/L}$ 及 25 $\mu\text{mol/L}$ 进行试验。



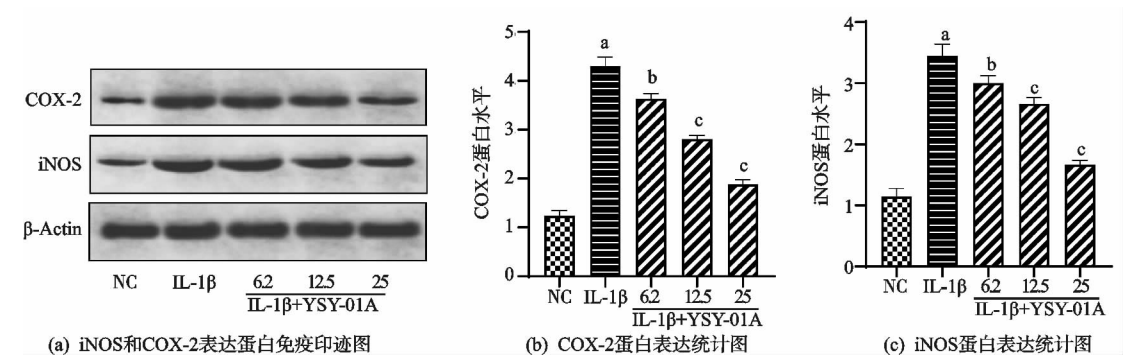
(a) 软骨细胞活力测量结果

(b) 软骨细胞上清中NO含量

(c) 软骨细胞上清中PGE₂含量

注: $F_{\text{细胞活力}} = 38.85$, $P_{\text{细胞活力}} < 0.001$; $F_{\text{NO}} = 162.0$, $P_{\text{NO}} < 0.001$; $F_{\text{PGE}_2} = 249.9$, $P_{\text{PGE}_2} < 0.001$ 。a) 与 NC 组比较, $P < 0.001$; b) 与 IL-1 β 组比较, $P < 0.001$ 。

图 1 YSY-01A 对软骨细胞活力和炎症介质 NO 及 PGE₂ 的影响



(a) iNOS和COX-2表达蛋白免疫印迹图

(b) COX-2蛋白表达统计图

(c) iNOS蛋白表达统计图

注: $F_{\text{COX-2}} = 322.8$, $P_{\text{COX-2}} < 0.001$; $F_{\text{iNOS}} = 169.5$, $P_{\text{iNOS}} < 0.001$ 。a) 与 NC 组比较, $P < 0.001$; b) 与 IL-1 β 组比较, $P < 0.05$; c) 与 IL-1 β 组比较, $P < 0.001$ 。

图 2 YSY-01A 对软骨细胞 iNOS 和 COX-2 表达的影响

2.3 YSY-01A 对软骨细胞炎症因子和金属基质蛋白酶的影响

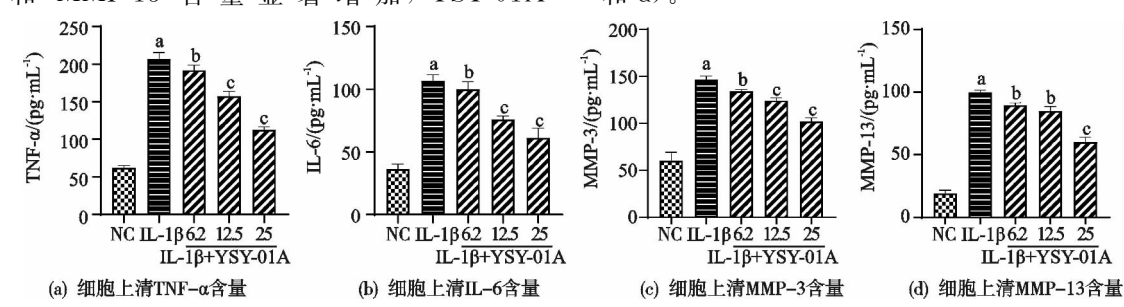
与 NC 组比较, IL-1 β 组细胞上清 TNF- α 、IL-6、MMP-3 和 MMP-13 含量显著增加, YSY-01A

与 NC 组比较, IL-1 β 组细胞上清中 NO 和 PGE₂ 含量显著升高, YSY-01A (6.2 $\mu\text{mol/L}$ 、12.5 $\mu\text{mol/L}$ 、25 $\mu\text{mol/L}$) 组细胞上清中 NO 和 PGE₂ 含量较 IL-1 β 组减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 见图 1b 和 c)。

2.2 YSY-01A 对软骨细胞 iNOS 和 COX-2 表达的影响

与 NC 组比较, IL-1 β 组细胞 iNOS 和 COX-2 蛋白表达显著上调, YSY-01A (6.2 $\mu\text{mol/L}$ 、12.5 $\mu\text{mol/L}$ 、25 $\mu\text{mol/L}$) 组细胞较 IL-1 β 组 iNOS 和 COX-2 蛋白表达下调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 见图 2a, b 和 c)。

(6.2 $\mu\text{mol/L}$ 、12.5 $\mu\text{mol/L}$ 、25 $\mu\text{mol/L}$) 组细胞较 IL-1 β 组 TNF- α 、IL-6、MMP-3 和 MMP-13 含量显著减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 见图 3a, b, c 和 d)。



(a) 细胞上清TNF- α 含量

(b) 细胞上清IL-6含量

(c) 细胞上清MMP-3含量

(d) 细胞上清MMP-13含量

注: $F_{\text{TNF-}\alpha} = 293.9$, $P_{\text{TNF-}\alpha} < 0.001$; $F_{\text{IL-6}} = 83.18$, $P_{\text{IL-6}} < 0.001$; $F_{\text{MMP-3}} = 136.1$, $P_{\text{MMP-3}} < 0.001$; $F_{\text{MMP-13}} = 375.8$, $P_{\text{MMP-13}} < 0.001$ 。a) 与 NC 组比较, $P < 0.001$; b) 与 IL-1 β 组比较, $P < 0.05$; c) 与 IL-1 β 组比较, $P < 0.001$ 。

图 3 YSY-01A 对软骨细胞炎症因子和金属基质蛋白酶的影响

2.4 YSY-01A 对骨关节炎大鼠软骨基质降解的影响

与假手术组相比,在模型组中观察到软骨浅表破坏,软骨侵蚀,大量蛋白聚糖损失和明显的细胞减少,导致透明软骨(HC)厚度减少和钙化软骨(CC)的增

加。关节腔内注射不同剂量的 YSY-01A 导致关节软骨厚度显著增加并改善了软骨损伤,并增加透明软骨厚度和减少钙化软骨(CC),见图 4a 和 b。

2.5 YSY-01A 对骨关节炎大鼠炎症反应的影响

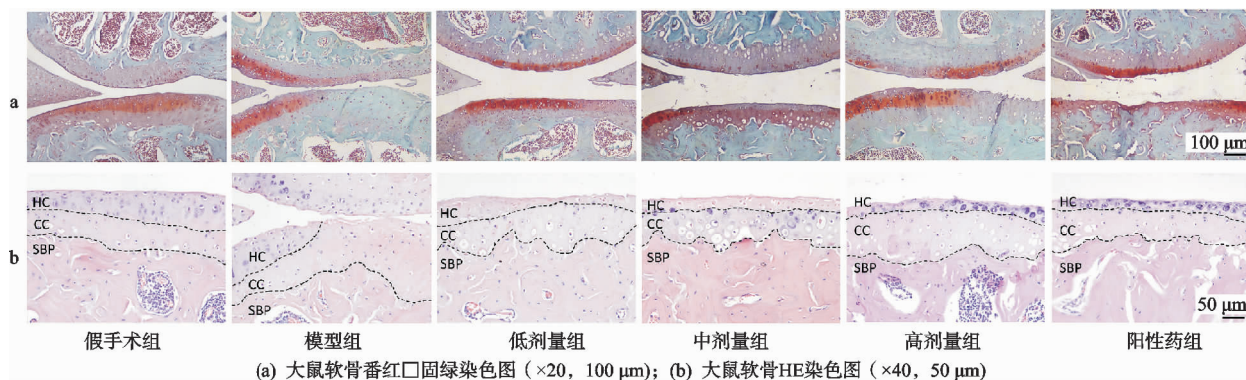
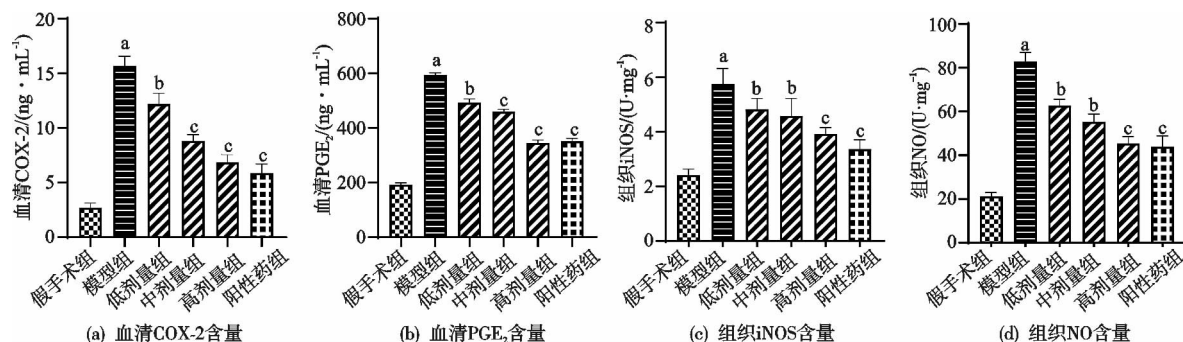


图 4 YSY-01A 对 OA 大鼠软骨基质降解的影响

与假手术组比较,模型组大鼠血清中 COX-2 和 PGE₂ 含量显著增加,YSY-01A(低剂量,中剂量和高剂量)组较模型组大鼠血清中 COX-2 和 PGE₂ 含量减少,差异有统计学意义($P < 0.05$,见图 5a 和 b)。与假

手术组比较,模型组大鼠组织中 iNOS 和 NO 含量显著增加,YSY-01A(低剂量,中剂量和高剂量)组较模型组大鼠组织中 iNOS 和 NO 含量减少,差异有统计学意义($P < 0.05$,见图 5c 和 d)。



注: $F_{\text{COX-2}} = 113.5, P_{\text{COX-2}} < 0.001; F_{\text{PGE}_2} = 986.6, P_{\text{PGE}_2} < 0.001; F_{\text{iNOS}} = 22.72, P_{\text{iNOS}} < 0.001; F_{\text{NO}} = 102.6, P_{\text{NO}} < 0.001$ 。a)与假手术组比较, $P < 0.001$;b)与模型组比较, $P < 0.05$;c)与模型组比较, $P < 0.001$ 。

图 5 YSY-01A 对 OA 大鼠炎症反应的影响

3 讨论

骨关节炎是最普遍的关节疾病之一,炎症反应与骨关节炎的病理发展密切相关。IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 作为机体主要的促炎细胞因子,参与并介导骨关节炎病理中的炎症级联反应^[10]。众多细胞因子中 IL-1 β 尤为重要,骨关节炎患者滑膜液和软骨细胞中存在大量的 IL-1 β 。IL-1 β 可以诱导促炎介质和炎症因子的释放,以及分解代谢介质产生,如 NO、MMP 等^[11]。IL-1 β 主要由软骨细胞、滑膜细胞和巨噬细胞局部分泌,通过细胞表面受体和信号传导途径之间的相互作用加剧软骨损伤^[12]。此外,软骨细胞作为软骨组织唯一的细胞,主要负责细胞外基质的合成和降解,其功能障碍及代谢异常也可以加剧骨关节炎的病理进程^[13]。研究发现 IL-1 β 处理的软骨细胞通过产生和释放 MMP 和炎症因子引起细胞外基质降解,可以体外模拟骨关节炎的发展^[14]。因此,IL-1 β 诱导软骨细胞模型通常用于体外骨关节炎的病理和药物干预研究^[15]。本研究也发现体外 IL-1 β

诱导软骨细胞中炎症介质(COX-2、NO 和 PGE₂)和促炎细胞因子(TNF- α 和 IL-6)含量增加,与之前研究一致,这说明本研究建立了骨关节炎体外模型。

NO 作为一种重要的炎症介质,可以引起软骨细胞凋亡,与骨关节炎的病理发展密切相关。iNOS 作为负责 NO 产生的酶,与 NO 在骨关节炎患者的滑膜液中含量明显增加,且 MMP 表达上调^[16]。此外,NO 诱导了包括 MMP-3 和 MMP-13 在内的基质降解酶的释放^[17]。本研究发现 YSY-01A 体外抑制 IL-1 β 诱导软骨细胞中 NO 和 iNOS 的产生,同时体内也能够抑制骨关节炎大鼠组织的 iNOS 活性和 NO 含量。另外,炎症因子 TNF- α 和 IL-6 是 NO 产生的促进剂,参与骨关节炎的病理发展。本研究发现 YSY-01A 也能够抑制 IL-1 β 诱导软骨细胞中炎症因子 TNF- α 和 IL-6 产生。PGE₂ 作为花生四烯酸环氧合酶代谢产物,是一种重要的促炎介质。COX-2 是机体内 PGE₂ 生成的重要酶,非甾体抗炎药主要通过抑制 COX-2 酶活性降低 PGE₂ 含量发挥抗

炎活性。本研究也同样发现 YSY-01A 体外抑制了 IL-1 β 诱导的 PGE₂ 产生,并抑制了 COX-2 的表达。YSY-01A 体内也降低了骨关节炎大鼠血清中 PGE₂ 和 COX-2 含量。这些结果说明 YSY-01A 在体内外对骨关节炎均具有抗炎活性,对骨关节炎具有潜在的治疗价值。

除炎症反应外,软骨细胞外基质降解也是骨关节炎的重要病理特征。软骨细胞与软骨修复、再生、体内平衡和结构完整性密切相关,软骨细胞变性也是骨关节炎的主要原因之一^[17]。多种炎症因子刺激下,软骨细胞从“静止”状态变为“激活”状态,上调金属蛋白酶 MMP-3 和 MMP-13 表达促进了软骨细胞外基质的降解,加剧了骨关节炎的病理变化^[18]。本研究发现 YSY-01A 体外抑制 IL-1 β 诱导 MMP-3 和 MMP-13 释放,这说明 YSY-01A 可能对软骨基质降解具有潜在活性。骨关节炎动物模型主要包括部分或全部半月板切除、内侧半月板失稳、前十字韧带和后十字韧带横断术等模型^[19]。骨关节炎大鼠模型表现为疾病进展快、而且成本低,研究发现术后 4 周大鼠可表现出轻度的软骨基质破坏,故广泛应用于骨关节炎的药物干预研究^[20]。与体外研究一致,发现 YSY-01A 局部给药能够缓解骨关节炎大鼠的软骨基质降解,但具体机制不太清晰,仍需后续进一步研究。这些结果均说明 YSY-01A 可以缓解软骨基质降解,对骨关节具有保护作用。

综上所述,本研究表明 YSY-01A 可以同时抑制炎症反应和软骨基质降解,对骨关节炎具有潜在的治疗活性。但是,YSY-01A 的抗炎和抗软骨基质降解的机制仍然不太清晰,需要进一步探索。

参考文献

- [1] 肖昆林,张蕊,张维杰,等.间充质干细胞来源的外泌体对骨关节炎的治疗作用研究[J].实用骨科杂志,2019,25(3):232-236.
- [2] LOESER R F, COLLINS J A, DIEKMAN B O. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12(7):412-420.
- [3] 周炎,刘世清.天然免疫介导凋亡-炎症途径参与骨关节炎发病的研究进展[J].实用骨科杂志,2019,25(5):434-437.
- [4] 文良华,陈世华,寿折星. miR-31-5p 靶向 Notch1 调节骨关节炎软骨细胞增殖和凋亡的作用[J].实用骨科杂志,2020,26(5):421-426.
- [5] SHEN J, ABU-AMER Y, O'KEEFE R J, et al. Inflammation and epigenetic regulation in osteoarthritis[J]. Connect Tissue Res, 2017, 58(1):49-63.
- [6] LIU J T, YUAN X, XU B, et al. Inhibition effect and mechanism of YSY-01A, a novel proteasome inhibitor, on tumor-induced angiogenesis[J]. Pro Biochem Bio, 2013, 40(8):748-755.
- [7] 贾璇,袁霞,楚明明,等.新的蛋白酶体抑制剂 YSY-01A 对 SK-OV-3 细胞的周期阻滞作用[J].中国药学,2013,22(6):483-490.
- [8] PANAHI FAR A, JAREMKO J L, TESSIER A G, et al. Development and reliability of a multi-modality scoring system for evaluation of disease progression in pre-clinical models of osteoarthritis: celecoxib may possess disease-modifying properties[J]. Osteoarthr Cartil, 2014, 22(10):1639-1650.
- [9] 吴培刚,杨学栋,曹振昊,等.新型蛋白酶体抑制剂膝腔内注射对兔骨关节炎的治疗作用及其机制[J].山东医药,2020,60(12):46-49.
- [10] SCANZELLO C R. Chemokines and inflammation in osteoarthritis: insights from patients and animal models[J]. J Orthop Res, 2017, 35(14):735-739.
- [11] QU Y, ZHOU L, WANG C, et al. Mangiferin inhibits IL-1 β -induced inflammatory response by activating PPAR- γ in human osteoarthritis chondrocytes[J]. Inflammation, 2017, 40(1):52-57.
- [12] DONG Y H, WANG P, YANG Y G, et al. PRMT5 inhibition attenuates cartilage degradation by reducing MAPK and NF- κ B signaling[J]. Arthritis Res Ther, 2020, 22(1):201-210.
- [13] 王世川,王小健,杨烜,等.葡萄糖依赖的肠促胰岛素对关节软骨损伤保护机制的研究进展[J].实用骨科杂志,2019,25(12):34-39.
- [14] SU X, WU C, YE X, et al. Embryonic lethality in mice lacking Trim59 due to impaired gastrulation development[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(3):302-310.
- [15] LI H, WANG D, YUAN Y J, et al. New insights on the MMP-13 regulatory network in the pathogenesis of early osteoarthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2017, 19(1):248.
- [16] MALDONADO M, NAM J. The role of changes in extracellular matrix of cartilage in the presence of inflammation on the pathology of osteoarthritis[J]. BioMed Res Int, 2013:284873.
- [17] CLYNES M A, JAMESON K A, EDWARDS M H, et al. Impact of osteoarthritis on activities of daily living: does joint site matter? [J]. Aging Clin Exp Res, 2019, 31(8):1049-1056.
- [18] WANG W T, HUANG Z P, SUI S, et al. microRNA-1236 promotes chondrocyte apoptosis in osteoarthritis via direct suppression of PIK3R3[J]. Life Sci, 2020, 253:117694.
- [19] YONG P H, SUN W J, CHOI J H, et al. Inhibitory effects of L-theanine on airway inflammation in ovalbumin-induced allergic asthma[J]. Food Chem Toxicol, 2017, 99:162-169.
- [20] PISKIN A, GULBAHAR M Y, TOMAK Y, et al. Osteoarthritis models after anterior cruciate ligament resection and medial meniscectomy in rats: a histological and immunohistochemical study[J]. Saudi Med J, 2008, 28(12):1796-1802.