

凝血酶促大鼠软骨细胞生长、形态转变和抑制胶原合成的作用

朱志恒^{1,2} 吴希晨^{1,2} 丁佳滢^{1,2} 王学宗³ 曹月龙³ 郑昱新³ 丁道芳^{1,2△}

[摘要] 目的:观察凝血酶对大鼠软骨细胞生长、形态和胶原合成的影响。方法:提取新生 SD 大鼠软骨细胞,取 P1 代细胞进行实验,设对照组和凝血酶组,凝血酶组加入 20 U/mL 凝血酶进行干预。倒置显微镜下观察两组细胞形态,并使用 Edu 试剂盒检测细胞增殖;实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)法检测软骨细胞外基质成分 Col2 α 1、Acan、Eln、Comp,炎症因子 IL-6、TNF- α ,炎症趋化因子 Ccl2、Ccl7、Cxcl6、Cxcl16 和胶原合成相关酶 P3H1、Colgalt1、Lox 的表达;免疫细胞化学检测 Lox 的表达;免疫荧光检测 Col2 α 1 的表达;Western Blot 法检测分解代谢基因 MMP9、MMP13、COX2 的表达。结果:与对照组相比,凝血酶组的软骨细胞多为长梭形或不规则形状,且增殖明显;凝血酶组 Col2 α 1、Acan、Eln、Comp、P3H1、Colgalt1、Lox 的 mRNA 表达下调($P<0.05$),IL-6、TNF- α 、Ccl2、Ccl7、Cxcl6、Cxcl16 mRNA 表达上调($P<0.05$),Lox 和 Col2 α 1 表达下调($P<0.05$),MMP9、MMP13、COX2 蛋白表达上调($P<0.05$)。结论:凝血酶能够促进大鼠软骨细胞增殖和纤维样形态转变,提高炎症因子和分解代谢基因的表达,降低胶原合成相关酶表达而抑制胶原合成。

[关键词] 凝血酶;软骨细胞;胶原合成;增殖;形态

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2022)11-0001-06

Efficacy of Thrombin on the Proliferation Morphological Transformation and Collagen Synthesis of Rat Chondrocytes

ZHU Zhiheng^{1,2} WU Xichen^{1,2} DING Jiaying^{1,2} WANG Xuezhong³
CAO Yuelong³ ZHENG Yuxin³ DING Daofang^{1,2△}

¹ School of Rehabilitation Science, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

² Institute of Rehabilitation Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

³ Shi's Center of Orthopedics and Traumatology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China.

Abstract Objective: To observe the efficacy of thrombin on the growth, morphology and collagen synthesis of rat chondrocytes. **Methods:** Primary chondrocytes of neonatal SD rats were isolated, and all experiments were performed with cells from passage one. Chondrocytes were divided into two groups: control group and thrombin group. Chondrocytes were cultured with 20 U/mL thrombin in thrombin group. The cell morphology of the two groups was observed under an inverted microscope, and the cell proliferation was detected by an Edu kit. qRT-PCR was used to detect the expression of extracellular matrix (Col2 α 1, Acan, Eln, Comp), inflammatory factors (IL-6, TNF- α), chemokines (Ccl2, Ccl7, Cxcl6, Cxcl16) and enzymes that were involved in collagen synthesis (P3H1, Colgalt1, Lox). The expression of Lox was detected by immunocytochemistry. The expression of Col2 α 1 was detected by immunofluorescence. The expressions of catabolic genes MMP9, MMP13 and COX2 were detected by Western Blot. **Results:** Compared with the control group, the morphology of chondrocytes in thrombin group became long spindle, and the proliferative efficacy of thrombin on chondrocytes

was significant. The mRNA levels of Col2 α 1, Acan, Eln, Comp, P3H1, Colgalt1, Lox were down-regulated in thrombin group ($P<0.05$), and the expressions of IL-6, TNF- α , Ccl2, Ccl7, Cxcl6, Cxcl16 mRNA were up-regulated ($P<0.05$). The expression of Lox and Col2 α 1 of thrombin group were increased. Compared with the control group, the protein levels of MMP9, MMP13 and COX2 protein in

基金项目:国家自然科学基金项目(81902306,82174406)

¹ 上海中医药大学康复医学院(上海,201203)

² 上海中医药大学康复医学研究所

³ 上海中医药大学附属曙光医院石氏伤科医学中心

[△]通信作者 E-mail:dingdaofang@shutcm.edu.cn

thrombin group were increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Thrombin can promote the proliferation of rat chondrocytes and the morphology transformation towards fibroblastic chondrocytes, and inhibit collagen synthesis by increasing the expression of inflammatory factors and catabolic genes and reducing the activity of collagen synthesis related enzymes.

Keywords: thrombin; chondrocyte; collagen synthesis; proliferation; morphology

骨关节炎(Osteoarthritis, OA)是由多种因素导致软骨退变、软骨下骨硬化、滑膜炎等为主要特征的慢性退行性疾病^[1]。软骨细胞是关节软骨中唯一的细胞,在研究骨关节炎病理时,常被作为重要的治疗靶点^[2]。前期研究显示凝血酶可以促进软骨细胞增殖和纤维样改变,对软骨细胞中分解代谢基因和炎症因子的表达有影响^[3]。此外,凝血酶具有促凝血的生理作用,使血液循环处于阻滞状态,血液不通则痛,这和骨关节炎疼痛症状相吻合。综合这些,笔者推测凝血酶可能是血瘀型骨关节炎的效应物,因此,在本研究中将探讨凝血酶对大鼠软骨细胞生长、形态转变和胶原合成的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

新生 24 h 的 SD 大鼠,无特定病原体(SPF)级,雌性,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,合格证号为 SCXK(沪) 2018-0006。本试验所用实验动物和实验设计均符合上海中医药大学实验动物福利和伦理委员会动物试验伦理审查(PZSHBCM2007)。

1.2 实验材料

德尔贝科改良 Eagle 培养液(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)培养基和胎牛血清购自法国 Biosera 公司;Ⅱ型胶原酶购自美国 Sigma 公司;人体组成评定(BCA)蛋白浓度测定试剂盒购自美国 Pierce 公司;Evo M-MLV 反转录预混型试剂盒和 SYBR® Green Pro Taq HS 预混型 定量聚合酶链反应(qPCR)试剂盒(含 ROX)购自中国艾科瑞生物公司;青霉素-链霉素试液、凝血酶、BeyoClick™ Edu 细胞增殖检测试剂盒、RNAeasy™ 动物核糖核酸(RNA)抽提试剂盒(离心柱式)、鼠抗 β -actin、鼠二抗均购自中国碧云天公司;兔抗 COX2、MMP9、MMP13、Lox 均购自中国 Bimake 公司;Col2 α 1 购自美国 Santa 公司;兔二抗购自美国 CST 公司。

1.3 方法

1.3.1 软骨细胞的分离和培养 将新生 24 h 的幼鼠置于 75%乙醇中浸泡消毒 10 min,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 3 次。在无菌条件下解剖出关节软骨,剥离其他软组织后,PBS 漂洗 3 次,将其切成 1 mm³ 大小的碎片,加入 0.25%Ⅱ型胶原酶,37℃恒温摇床(转速 150 r/min)消化约 60 min;取上清液,2 000 r/min 离心 5 min,倒去上清液,沉淀用 PBS 液洗涤 3 次,用

含 10%胎牛血清(FBS)和 1%青霉素-链霉素的 DMEM 培养基重悬细胞,接种于培养皿中,置 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养。剩余的软骨组织继续加入胶原酶重复上述过程。

1.3.2 分组与干预 取第 1 代软骨细胞进行干预,细胞分为对照组和凝血酶组。对照组加入培养基(10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素试液的 DMEM 培养基),凝血酶组在对照组培养基的基础上加入 20 U/mL 凝血酶。24 h 后,倒置显微镜下观察细胞的形态并拍照。

1.3.3 软骨细胞增殖检测 将软骨细胞接种到 6 孔板中,培养至正常状态,加入 Edu 工作液,继续孵育 2 h。去除培养液,加入固定液,室温固定 15 min。去除固定液,洗涤液清洗 3 次。加入通透液,室温孵育 15 min。洗涤液清洗 3 次,加入 Click 反应液,室温避光孵育 30 min。洗涤液清洗 3 次,DAPI 试剂标记细胞核,避光 10 min。洗涤液清洗 3 次,在荧光显微镜下观察拍照。

1.3.4 免疫细胞化学 将软骨细胞接种到 24 孔板中,分组培养 24 h 后,将培养基弃去,用 PBS 清洗 3 次。使用免疫染色固定液固定 15 min,免疫染色洗涤液清洗 3 次。用内源性过氧化物酶封闭液室温封闭 40 min,免疫染色洗涤液清洗 3 次。用免疫染色封闭液室温封闭 60 min。加入一抗(Lox,稀释比例为 1:500),4℃孵育过夜。免疫染色洗涤液清洗 3 次,加入二抗,避光室温孵育 60 min。免疫染色洗涤液清洗 3 次,加入链霉亲和素-生物素复合物(SABC)工作液,避光室温孵育 30 min。加入 DAB 工作液,避光孵育 10 min。在显微镜下观察拍照。

1.3.5 qRT-PCR 检测 mRNA 表达 软骨细胞分组培养 24 h 后,RNAeasy™ 动物 RNA 抽提试剂盒(离心柱式)抽提细胞内 RNA。采用 Evo M-MLV 反转录预混型试剂盒合成 cDNA,按照 SYBR® Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒(含 ROX)配制 20 μ L 反应体系,包括 2 \times SYBR® Green Pro Taq HS Premix (ROS plus) 10 μ L,10 μ mol/L 浓度的前后引物各 2 μ L,DNA 模板小于 100 ng,ddH₂O 补足体积至 20 μ L。以 β -actin 为内参进行 PCR 扩增,反应条件为 95℃ 30 s,95℃ 5 s,60℃ 30 s,共 40 个循环。以 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法表示各目的基因的相对表达量。各基因的引

物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物名称及序列

基因名称	mRNA 序列(5'-3')
β-actin-F	AGATCAAGATCATTTGCTCCTCTCTG
β-actin-R	GGGTGTAAAACGCAGCTCAG
Comp-F	CCATGATGGCAAGGGTGATG
Comp-R	GGGCACACATCGATCTTGTC
Eln-F	GTGTCGGTCTTCCAGGTGTA
Eln-R	CTTTGGCGCTTTGATGGGAT
Colgalt1-F	TGGTGGCAGTGAAGGGTTTA
Colgalt1-R	CAAGTTGTCTGCTGTCCACAA
Ccl2-F	GCTGCTACTCATTCACTGGC
Ccl2-R	GGTGCTGAAGTCCTTAGGGT
Ccl7-F	GCTTCTGTGTGTGCTGCTC
Ccl7-R	TAACAGCTTCCCAGGGACAC
Cxcl6-F	TTCTGCTGCTGTTTCACTG
Cxcl6-R	TATCAACGAGCTTGTGGGT
Cxcl16-F	AGTGGGTCCGTGAAGTAGTG
Cxcl16-R	GAAAAGTGGAAGTCTGGGTG
Col2α1-F	GGTCCCTCTGGTCTTGGCATC
Col2α1-R	CGTGCTGTCTCAAGGTACTGTCTG
R-TNF-α-F	CGTCGTAGCAAACCAACCAAG
R-TNF-α-R	GAGGCTGACTTTTCTCTGGT
IL-6-F	CCACTGCCTTCCCTACTTCA
IL-6-R	TTCTGACAGTGCATCATCGC
Lox-F	AGGTCCTTGTCACAAAGACTGG
Lox-R	ACGCCCCCTGGTCTTAAAGAATTG
P3H1-F	ACATGGAGTGAAGGCTGTCA
P3H1-R	ACTCTTCTCCAGGTTTCGGG
Acan-F	GCAGGGATAACGGAAGTGAAG
Acan-R	GAGTAAAGTGATCATAGTTCAGCTTG

1.3.6 Western Blot 法检测蛋白表达 软骨细胞分组培养 48 h 后,RIPA 液裂解细胞并且进行超声破碎,提取细胞蛋白。BCA 法测定细胞总蛋白浓度,将蛋白样本与上样缓冲液混合,加热至 100 ℃ 煮沸 10 min。制备 10% 分离胶和 5% 浓缩胶,将蛋白样品加入上样孔中,在 SDS-PAGE 中电泳分离 110 min,再将蛋白电转至 PVDF 膜,使用快速封闭液室温封闭 30 min 后,4 ℃ 条件下过夜孵育一抗 β-actin、COX2、MMP9、MMP13,稀释比例分别为 1:1 000~1:2 000。TBST 洗涤 3 次,室温孵育二抗 60 min,再用 TBST 洗涤 3 次,使用 ECL 试剂盒进行显影并拍照。

1.3.7 免疫荧光检测 将软骨细胞接种到 6 孔板中,培养 24 h 后,细胞约铺满每孔的 80%,将培养基弃去,用 PBS 清洗 3 次。加入免疫染色固定液固定 10 min,免疫染色洗涤液清洗 3 次。使用免疫染色封闭液室温封闭 60 min。加入一抗(Col2α1,稀释比例为 1:200),4 ℃ 孵育过夜。免疫染色洗涤液清洗 3 次,加入荧光二抗,避光室温孵育 60 min。然后加入 DAPI 试剂标记细胞核,避光 10 min。免疫染色洗涤液清洗 3 次,

在荧光显微镜下观察拍照。

1.4 统计学方法

使用 GraphPad Prism 9 作图,采用 SPSS 20.0 进行统计学分析,两个样本均数比较满足正态性,方差齐性,采用两独立样本 *t* 检验,表示为 $\bar{x} \pm s$ 形式。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 软骨细胞形态

对照组中软骨细胞表现为短棒状多角形,而凝血酶组软骨细胞发生明显的形态学改变,多为长梭形(见图 1)。

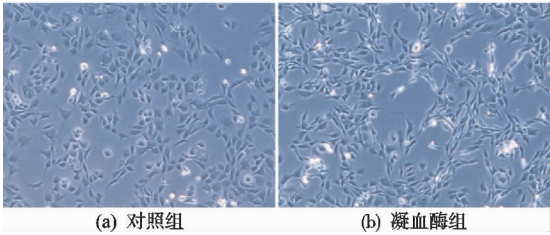


图 1 凝血酶干预对软骨细胞形态的影响(×100)

2.2 软骨细胞增殖

Edu 标记软骨细胞 2~3 h 后,检测 Edu 阳性细胞,结果表明对照组 Edu 阳性细胞比例为 33%,凝血酶组 Edu 阳性细胞比例为 51%(见图 2),差异有统计学意义($P < 0.05$)。

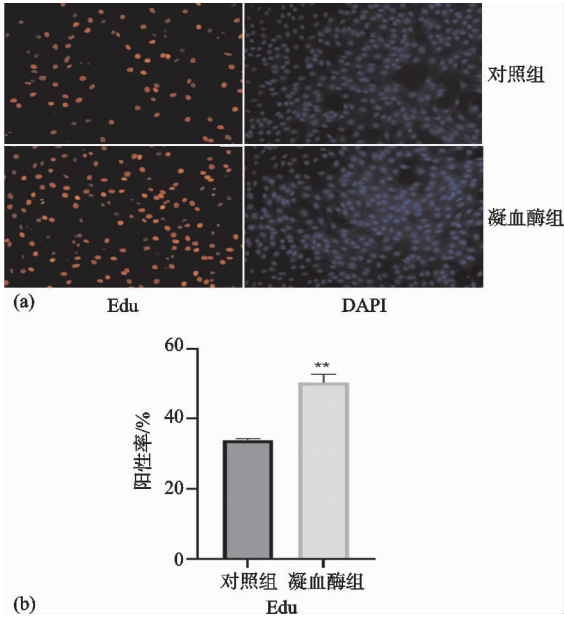


图 2 Edu 染色结果以及 Edu 阳性率
(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ×100)

2.3 软骨细胞外基质中 Col2α1, Acan, Eln 和 Comp 表达

软骨细胞分组培养 24 h 后提取 RNA,qRT-PCR 结果表明凝血酶组软骨细胞中 Col2α1、Eln、Acan、Comp 的 mRNA 表达水平分别为对照组的 63%,

36%, 53%和74%(见图3a), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。细胞免疫荧光结果进一步验证凝血酶的干预

明显下调Ⅱ型胶原蛋白的表达量(见图3b), 与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

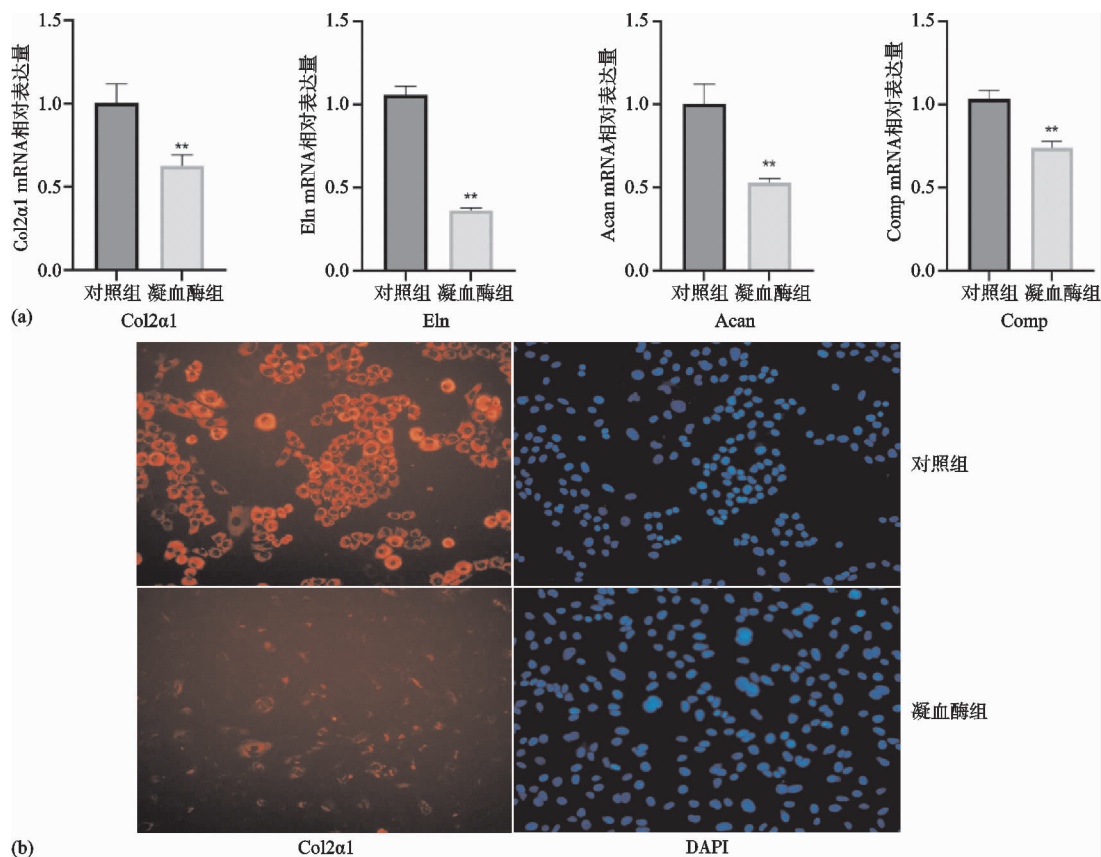


图3 凝血酶干预对软骨细胞外基质的影响(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $\times 100$)

2.4 软骨细胞炎症因子和趋化因子的 mRNA 表达

软骨细胞分组培养 24 h 后提取 RNA, qRT-PCR 检测结果表明凝血酶组软骨细胞中炎症因子 IL-6、

TNF- α , 趋化因子 Ccl2、Ccl7、Cxcl6、Cxcl16 的 mRNA 表达水平明显上调(见图4), 表达倍数改变差异有统计学意义($P < 0.05$)。

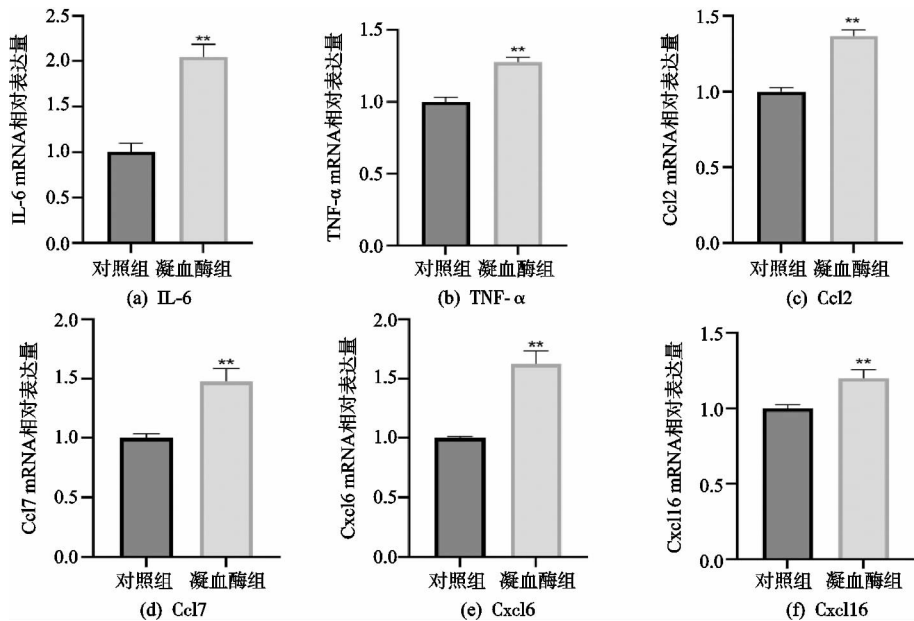


图4 凝血酶干预对软骨细胞中炎症因子和趋化因子的影响(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

2.5 软骨细胞胶原分解代谢酶的表达

软骨细胞分组培养 48 h, 提取蛋白, Western Blot 法检测软骨细胞中 MMP9、MMP13、COX2 蛋白的表

达, 结果表明: 凝血酶组 MMP9、MMP13、COX2 的表达分别是对照组 2.16 倍、2.24 倍和 1.28 倍, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图5。

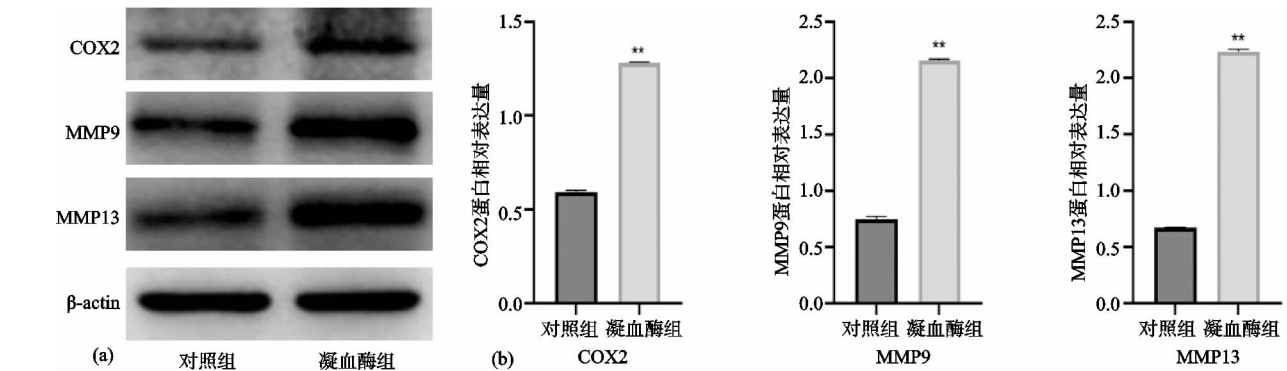


图 5 凝血酶干预对软骨细胞中胶原分解代谢基因的影响(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

2.6 胶原蛋白合成相关酶表达

软骨细胞分组培养 24 h 和 48 h 后,分别提取 RNA 和进行免疫细胞化学检测。qRT-PCR 检测软骨细胞中胶原合成和成熟调控酶 P3H1、Colgalt1、Lox 的表达,结果表明:凝血酶胶原合成相关酶 P3H1、

Colgalt1、Lox 的表达量分别为对照组的 66%,60%和 67%(见图 6a),差异有统计学意义($P < 0.05$)。进一步免疫细胞化学检测,结果表明胶原交联调控酶 Lox 在凝血酶的干预下表达明显下调(见图 6b)。

3 讨论

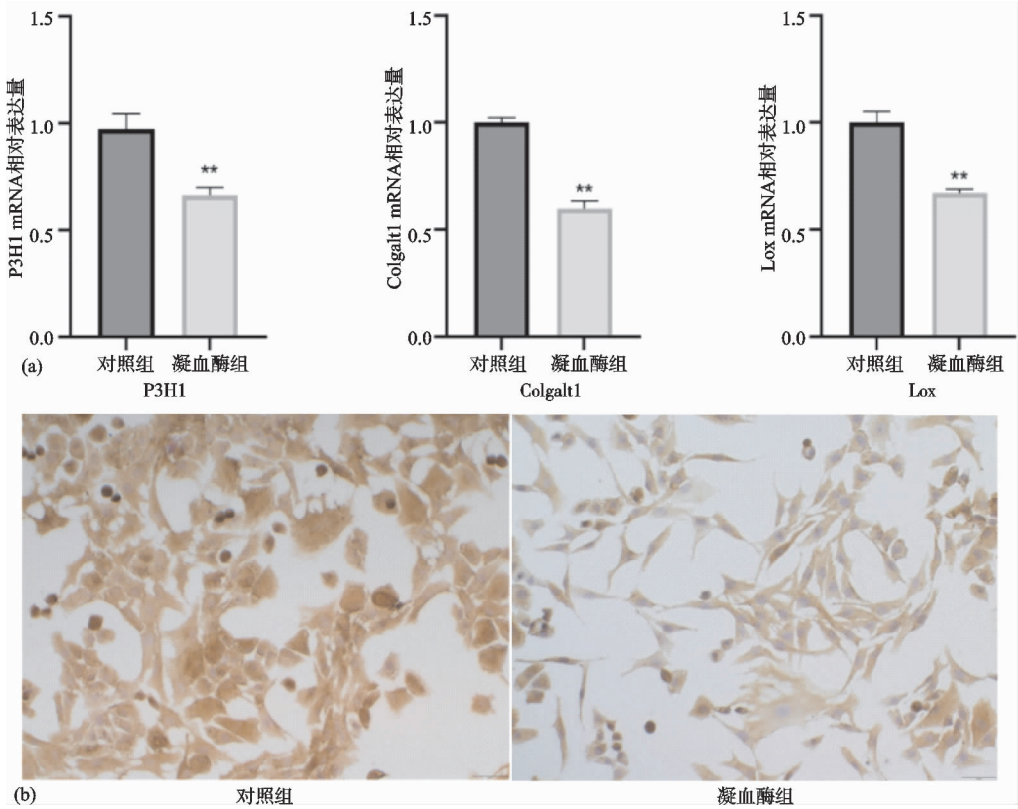


图 6 凝血酶干预对软骨细胞胶原蛋白合成相关酶的影响(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $\times 100$)

正常软骨组织中软骨细胞外基质由软骨细胞合成和分泌,包括 II 型胶原、蛋白聚糖、弹性蛋白和水分子等,其中软骨细胞外基质主要成分是 II 型胶原,起到保护软骨细胞、缓冲关节承受压力负荷的作用^[4]。胶原的丢失作为骨关节炎的最重要的病理之一,与骨关节炎的发生发展密切相关^[5],因此胶原合成和分解的调控基因的表达可能成为骨关节炎治疗的关键环节。

骨关节炎作为多因素引起的系统性关节退行性疾病,最常见的 IL-1 β ,TNF- α 和 IL-6 等炎症因子参与胶原降解的过程。近年来发现凝血酶的受体广泛表达于

体内各种细胞,凝血酶在体内多种疾病中发挥促炎样作用。

在本课题的研究中,笔者在体外培养大鼠的软骨细胞,在凝血酶干预后观察凝血酶的效应,发现凝血酶可明显下调软骨细胞外基质中 Col2 α 1、Eln、Acan、Comp 的表达。

胶原的合成和降解受到各种因素的调控,其中主要是各种炎症因子和趋化因子的大量表达以及分解代谢基因的显著上调。IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 是骨关节炎典型的炎症因子^[6]。IL-1 β 由软骨细胞和滑膜有核

细胞刺激产生,能够上调软骨中 MMP3 和 MMP13 等含量,还可以通过合成 COX2 这一关键的促炎分子,促进前列腺素和一氧化氮合成以加速细胞外基质的降解^[7]。IL-6 在软骨和滑膜中表达上调,不仅可以直接通过 Sp1/Sp3 与 II 型胶原启动子的结合来抑制 II 型胶原的产生,而且有研究证明其可以通过上调 MMP13 的表达,促进胶原的分解^[8]。TNF- α 在软骨中过表达,可直接抑制蛋白多糖的合成,同时刺激 MMP3、MMP9 等表达^[9]。研究表明骨关节炎滑膜中 Ccl2 含量的上升可导致蛋白多糖丢失和胶原降解,同时 Ccl2 的含量与疼痛程度呈正相关^[10-11]。Cxcl6 介导中性粒细胞向炎症部位募集,也可作为疼痛的生物标记物^[12]。本研究结果显示,凝血酶干预可以促进上述炎症因子和趋化因子的上调以及 MMPs 等分解代谢基因的表达,这些炎症因子的表达不仅直接抑制胶原和蛋白多糖的合成,同时通过促进 MMPs 的表达,进一步促进胶原和蛋白多糖的降解,提示凝血酶可能在炎症过程中发挥主导作用。

除了炎症因子和化学趋化因子引起的分解代谢基因的表达增加,笔者发现在凝血酶的作用下,软骨细胞中影响胶原合成和成熟的酶的表达也受到影响。软骨细胞中的胶原需经过胶原链上的脯氨酸和赖氨酸的羟基化、羟基赖氨酸的糖基化以及交联,才能成为成熟的胶原^[13]。而负责胶原羟基化、糖基化以及交联的酶分别是 P3H1、Colgalt1 和 Lox。qRT-PCR 结果显示在凝血酶的干预下,软骨细胞中 P3H1、Colgalt1、Lox 的 mRNA 表达均被下调,表明软骨细胞内的胶原除了受到分解代谢基因(MMP13, MMP9, COX2)的降解作用,在合成和成熟环节也受到抑制。

炎症发生时,不仅炎症因子、化学因子以及基质降解酶的表达上调,细胞的形态和增殖也发生改变。凝血酶可明显促进软骨细胞的增殖和形态纤维样改变,而凝血酶这个效应与 IL-1 β 刺激软骨细胞增殖以及形态转变有相似之处^[14],进一步说明凝血酶在软骨细胞的退变过程中发挥促炎样因子作用。

中医学中血瘀是指离开经脉之血不能及时消散和瘀滞于某一处,或血流不畅,运行受阻,瘀积于经脉或器官之内呈凝滞状态。凝血酶参与了纤维化和血栓形成的病理过程^[15],二者形成过程相似。骨关节炎最明显的特征是疼痛,而中医学认为血瘀引起的梗阻可以产生疼痛。因此,凝血酶是否为血瘀型骨关节炎关键的效应物,这是本课题组将来研究的重点。

综上所述,凝血酶的作用如下:第一,凝血酶刺激软骨细胞增殖,促进软骨细胞形态纤维样改变;第二,凝血酶促进炎症因子和化学趋化因子表达,进一步提高 MMP9 等表达从而促进胶原分解,同时下调胶原合

成相关酶的表达,抑制胶原的合成。

参考文献

- [1] SHARMA L. Osteoarthritis of the Knee[J]. N Engl J Med, 2021, 384(1): 51-59.
- [2] RIM Y A, NAM Y, JU J H. The role of chondrocyte hypertrophy and senescence in osteoarthritis initiation and progression[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(7): 2358.
- [3] WU X C, ZHU Z H, ZHANG J P, et al. Identification of thrombin as a key regulator of chondrocyte catabolic activity through RNA-Seq and experimental verification[J]. Gene, 2022, 823: 146327.
- [4] SUN K, LUO J, GUO J, et al. The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in osteoarthritis: a narrative review[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2020, 28(4): 400-409.
- [5] CHARLIER E, DERoyer C, CIREGIA F, et al. Chondrocyte dedifferentiation and osteoarthritis (OA) [J]. Biochem Pharmacol, 2019, 165: 49-65.
- [6] MOLNAR V, MATIŠIĆ V, KODVANJ I, et al. Cytokines and chemokines involved in osteoarthritis pathogenesis[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(17): 9208.
- [7] WANG T, HE C. Pro-inflammatory cytokines: the link between obesity and osteoarthritis[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2018, 44: 38-50.
- [8] HASEEB A, HAQQI T M. Immunopathogenesis of osteoarthritis[J]. Clin Immunol, 2013, 146(3): 185-196.
- [9] SUN K, LUO J, JING X, et al. Hyperoside ameliorates the progression of osteoarthritis: an in vitro and in vivo study[J]. Phytomedicine, 2021, 80: 153387.
- [10] LI L, JIANG B E. Serum and synovial fluid chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein 1 concentrations correlates with symptomatic severity in patients with knee osteoarthritis[J]. Ann Clin Biochem, 2015, 52(Pt 2): 276-282.
- [11] MILLER R E, TRAN P B, DAS R, et al. CCR2 chemokine receptor signaling mediates pain in experimental osteoarthritis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(50): 20602-20607.
- [12] GOODE A P, SCHWARTZ T A, KRAUS V B, et al. Inflammatory, structural, and pain biochemical biomarkers may reflect radiographic disc space narrowing: the Johnston county osteoarthritis project[J]. J Orthop Res, 2020, 38(5): 1027-1037.
- [13] YAMAUCHI M, SRICHOLPECH M. Lysine post-translational modifications of collagen[J]. Essays Biochem, 2012, 52: 113-133.
- [14] NI Z, KUANG L, CHEN H, et al. The exosome-like vesicles from osteoarthritic chondrocyte enhanced mature IL-1 β production of macrophages and aggravated synovitis in osteoarthritis[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(7): 522.
- [15] TRACY R P. Thrombin, inflammation, and cardiovascular disease: an epidemiologic perspective[J]. Chest, 2003, 124(3 Suppl): 49s-57s.