

荣筋拈痛方对膝关节软骨细胞外基质代谢的作用及机制

赵忠胜^{1,2}, 陈振沅¹, 黄云梅¹, 张铃¹, 吴广文³, 陈俊^{1,3}

https://doi.org/10.12307/2023.522

投稿日期: 2022-05-31

采用日期: 2022-08-13

修回日期: 2022-10-20

在线日期: 2022-11-16

中图分类号:

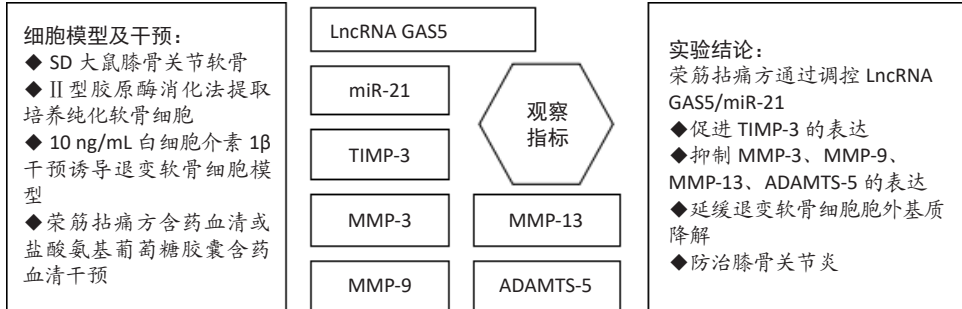
R459.9; R318; R274.9

文章编号:

2095-4344(2023)28-04448-08

文献标识码: A

文章快速阅读: 荣筋拈痛方调控胞外基质代谢进而防治膝骨关节炎



文题释义:

细胞外基质: 是多细胞有机体细胞周围多种大分子组成的复杂网络, 主要由胶原蛋白、非胶原蛋白、弹性蛋白、蛋白聚糖与氨基聚糖5类物质组成。软骨细胞外基质具有保护软骨细胞免受机械应力破坏的作用。

摘要

背景: 课题组前期动物实验研究表明, 荣筋拈痛方可通过LncRNA GAS5/miR-21影响软骨基质分解和合成代谢, 以达到防治膝骨关节炎的作用。LncRNA GAS5/miR-21能否作为防治膝骨关节炎的靶点, 仍需从细胞水平研究验证。

目的: 从细胞水平探讨荣筋拈痛方防治膝骨关节炎的作用机制。

方法: ①8周龄SPF级雄性SD大鼠40只, 随机分组后给予生理盐水、荣筋拈痛方(0.45 g/mL)、盐酸氨基葡萄糖胶囊(0.015 g/mL)灌胃, 制备含药血清。②分离培养SD大鼠膝关节软骨细胞, 采用白细胞介素1β干预软骨细胞, 诱导退变软骨细胞模型, 采用CCK-8法明确含药血清干预软骨细胞的量效时效关系。③将第2代软骨细胞分为空白组(空白血清)、模型组(白细胞介素1β+空白血清)、治疗组(白细胞介素1β+荣筋拈痛方含药血清)、对照组(白细胞介素1β+盐酸氨基葡萄糖胶囊含药血清)诱导干预48 h, Real-time PCR法和Western blot法检测各组软骨细胞血清干预后LncRNA GAS5、miR-21、基质金属蛋白酶抑制物3(tissue inhibitor of metalloproteinases 3, TIMP-3)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)3、MMP-9、MMP-13和解聚蛋白样金属蛋白酶5(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, ADAMTS-5)基因及蛋白表达。④慢病毒转染软骨细胞过表达LncRNA GAS5, 分为LncRNA GAS5空载体+空白血清组、LncRNA GAS5空载体+荣筋拈痛方含药血清组、LncRNA GAS5过表达+空白血清组、LncRNA GAS5过表达+荣筋拈痛方含药血清组, 各组干预后Real-time PCR检测LncRNA GAS5、miR-21、TIMP-3、MMP-9、MMP-13、ADAMTS-5基因表达。

结果与结论: ①荣筋拈痛方含药血清体积分数为10%、培养48 h, 盐酸氨基葡萄糖胶囊含药血清体积分数为15%、培养48 h, 能显著提高软骨细胞活性; ②干预48 h后, 与模型组相比, 荣筋拈痛方含药血清和盐酸氨基葡萄糖胶囊含药血清均能抑制LncRNA GAS5、MMP-3、MMP-9、MMP-13、ADAMTS-5基因和蛋白的表达($P < 0.05$), 促进miR-21、TIMP-3基因和蛋白表达($P < 0.05$); ③与空载体组相比, LncRNA GAS5过表达组LncRNA GAS5、MMP-9、MMP-13、ADAMTS-5基因表达量明显升高($P < 0.05$), miR-21、TIMP-3基因表达量明显降低($P < 0.05$); 与LncRNA GAS5过表达+空白血清组相比, LncRNA GAS5过表达+荣筋拈痛方含药血清组MMP-9、MMP-13和ADAMTS-5 mRNA表达量均降低($P < 0.05$), miR-21、TIMP-3基因表达量升高($P < 0.05$); ④结果表明, 荣筋拈痛方通过调控LncRNA GAS5/miR-21, 促进TIMP-3的表达, 抑制MMP-3、MMP-9、MMP-13、ADAMTS-5等表达, 从而延缓退变软骨细胞外基质降解, 起到防治膝骨关节炎的作用。

关键词: 荣筋拈痛方; 软骨细胞; LncRNA GAS5; miR-21; 基质代谢

Role and mechanism of Rongjin Niantong Fang for extracellular matrix metabolism of chondrocytes

Zhao Zhongsheng^{1,2}, Chen Zhenyuan¹, Huang Yunmei¹, Zhang Ling¹, Wu Guangwen³, Chen Jun^{1,3}

¹Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, Fujian Province, China; ²Department of Orthopedics, Chongqing Hospital of traditional Chinese Medicine, Chongqing 400021, China; ³Key Laboratory of Orthopedics & Traumatology of Traditional Chinese Medicine and Rehabilitation, Ministry of Education, Fuzhou 350122, Fujian Province, China

Zhao Zhongsheng, MD, Attending physician, Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, Fujian

¹福建中医药大学中西医结合研究院, 福建省福州市 350122; ²重庆市中医院骨科, 重庆市 400021; ³中医骨伤及运动康复教育部重点实验室, 福建省福州市 350122

第一作者: 赵忠胜, 男, 1990年生, 甘肃省康乐县人, 汉族, 博士, 主治医师, 主要从事中西医结合防治骨关节病的基础与临床研究。

通讯作者: 陈俊, 副教授, 福建中医药大学中西医结合研究院, 福建省福州市 350122; 中医骨伤及运动康复教育部重点实验室, 福建省福州市 350122

https://orcid.org/0000-0002-1470-0396(赵忠胜)

基金资助: 国家自然科学基金面上项目(82074465), 项目负责人: 吴广文; 福建省自然科学基金面上项目(2020J01750), 项目负责人: 吴广文

引用本文: 赵忠胜, 陈振沅, 黄云梅, 张铃, 吴广文, 陈俊. 荣筋拈痛方对膝关节软骨细胞外基质代谢的作用及机制 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(28):4448-4455.



Province, China; Department of Orthopedics, Chongqing Hospital of traditional Chinese Medicine, Chongqing 400021, China

Corresponding author: Chen Jun, Associate professor, Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, Fujian Province, China; Key Laboratory of Orthopedics & Traumatology of Traditional Chinese Medicine and Rehabilitation, Ministry of Education, Fuzhou 350122, Fujian Province, China

Abstract

BACKGROUND: Our previous animal experiments have shown that *Rongjin Niantong Fang* can affect the decomposition and anabolism of cartilage matrix through long non-coding RNA (LncRNA) growth arrest-specific transcript 5 (GAS5)/miR-21, thereby preventing and treating knee osteoarthritis. Whether LncRNA GAS5/miR-21 can be used as a target for the prevention and treatment of knee osteoarthritis still needs to be verified at the cellular level.

OBJECTIVE: To explore the mechanism of *Rongjin Niantong Fang* in the treatment of knee osteoarthritis at the cellular level.

METHODS: (1) Forty 8-week-old SPF male Sprague-Dawley rats were randomly divided into blank serum group, *Rongjin Niantong Fang*-containing serum group, and glucosamine hydrochloride capsule-containing serum group. 0.9% normal saline, *Rongjin Niantong Fang* (0.45 g/mL), and glucosamine hydrochloride capsule (0.015 g/mL) were intragastrically given to the rats in the corresponding groups to collect drug containing serum. (2) Cells were treated with interleukin-1 β to induce degenerative chondrocyte model. (3) Chondrocytes from the knee joint of Sprague-Dawley rats were isolated and cultured. Passage 2 chondrocytes were obtained and divided into blank group (blank serum), and model group (interleukin-1 β +blank serum), treatment group (interleukin-1 β +*Rongjin Niantong Fang*-containing serum), and control group (interleukin-1 β +glucosamine hydrochloride capsule-containing serum). After 48 hours of intervention, the gene and protein expressions of LncRNA GAS5, miR-21, tissue inhibitor of metalloproteinases 3 (TIMP-3), matrix metalloproteinase (MMP)-3, MMP-9, MMP-13, and a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS-5) were detected by real-time PCR and western blot, respectively. (4) Chondrocytes were transfected with LncRNA GAS5 overexpression lentiviral vector. Then, the transfected cells were divided into LncRNA GAS5 empty vector + blank serum group, LncRNA GAS5 empty vector + *Rongjin Niantong Fang*-containing serum group, LncRNA GAS5 overexpression + blank serum group, and LncRNA GAS5 overexpression + *Rongjin Niantong Fang*-containing serum group. The gene expressions of LncRNA GAS5, miR-21, TIMP-3, MMP-9, MMP-13, and ADAMTS-5 were detected using real-time PCR.

RESULTS AND CONCLUSION: Culture with the serum containing 10% *Rongjin Niantong Fang* and 15% glucosamine hydrochloride capsule for 48 hours significantly increased the activity of chondrocytes. Compared with the model group, *Rongjin Niantong Fang*-containing serum and glucosamine hydrochloride capsule-containing serum could inhibit the gene expression of LncRNA GAS5, MMP-3, MMP-9, MMP-13, and ADAMTS-5 ($P < 0.05$) and promote the gene and protein expression of miR-21 and TIMP-3 ($P < 0.05$). Compared with the blank group, the gene expression of LncRNA GAS5, MMP-3, MMP-9, MMP-13, and ADAMTS-5 in the LncRNA GAS5 overexpression group increased significantly ($P < 0.05$), while the gene expression of miR-21 and TIMP-3 decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with the LncRNA GAS5 overexpression+blank serum group, the gene expression of MMP-9, MMP-13, and ADAMTS-5 was significantly decreased in the LncRNA GAS5 overexpression+*Rongjin Niantong Fang*-containing serum group ($P < 0.05$), while the gene expression of miR-21 and TIMP-3 were significantly increased ($P < 0.05$). To conclude, *Rongjin Niantong Fang* could delay the degradation of cartilage extracellular matrix by promoting TIMP-3 expression and inhibiting the expression of MMP-3, MMP-9, MMP-13 and ADAMTS-5 through regulating LncRNA GAS5/miR-21, thereby preventing and treating knee osteoarthritis.

Key words: *Rongjin Niantong Fang*; chondrocyte; LncRNA GAS5; miRNA-21; matrix metabolism

Funding: the National Natural Science Foundation of China (General Program), No. 82074465 (to WG); General Project of Fujian Natural Science Foundation, No. 2020J01750 (to WG)

How to cite this article: ZHAO ZS, CHEN ZY, HUANG YM, ZHANG L, WU GW, CHEN J. Role and mechanism of *Rongjin Niantong Fang* for extracellular matrix metabolism of chondrocytes. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2023;27(28):4448-4455.

0 引言 Introduction

膝关节关节炎发病的根本是软骨退变，其直接原因在于软骨细胞和细胞外基质的平衡被打乱，即软骨细胞减少、细胞外基质进行性降解^[1-2]。细胞外基质合成和分解代谢的动态平衡维持着正常关节的完整功能^[3-4]。因此，在膝关节关节炎的预防和治疗上，如何平衡细胞外基质的合成与分解代谢，是防治膝关节关节炎的关键问题^[5-7]。随着对长链非编码 RNA(long non-coding RNA, LncRNA) 的不断探索和研究，LncRNA 在各类疾病中发挥的调控作用也逐渐被阐明^[8-10]。越来越多的研究发现，在与膝关节关节炎发生发展密切相关的软骨基质代谢紊乱、软骨细胞增殖凋亡、关节炎症反应等方面，LncRNAs 均起重要的调控作用^[11-13]。研究发现，LncRNA 生长停滞特异性转录本 5(growth arrest-specific transcript 5, GAS5) 与膝关节关节炎软骨基质的降解存在联系，并证实 LncRNA GAS5 表达的改变可调节软骨基质的降解，说明 LncRNA GAS5 在膝关节关节炎的发病机制中发挥着重要作用，LncRNA GAS5 通过抑制胞外基质合成代谢，促进分解代谢，从而促进膝关节关节炎发生^[14-18]。miR-21-5p 可促进软骨合成代谢而促进软骨生成，可能是膝关节关节炎中一种潜在的疾病修饰化合物^[19-20]。LncRNA GAS5 可通过 miR-21 促进细胞外基质降解，加重膝关节关节炎病理进展。

荣筋拈痛方源于陈可冀院士《清宫配方集成》^[21]，具有“补肝肾、壮筋骨、祛风湿、止痹痛”之功效，可对证治疗

痹症日久、肝肾俱虚^[22-25]。课题组前期计算机分子模拟研究表明，荣筋拈痛方可能具有刺激关节软骨中蛋白多糖合成、抗炎镇痛的作用^[26-28]；荣筋拈痛方化合物能与治疗膝关节关节炎靶点基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP)1、MMP-3、诱导型一氧化氮合成酶、白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 作用，提示荣筋拈痛方能有效延缓软骨基质降解，抑制关节软骨退变^[29-33]，但其效应的作用机制有待深入研究。基于此，设计进行体外细胞实验，采用白细胞介素 1 β 诱导退变软骨细胞模型，给予荣筋拈痛方含药血清干预后，Real-time PCR、Western blot 法检测退变软骨细胞中 LncRNA GAS5、miR-21、基质金属蛋白酶抑制物 3 (tissue inhibitor of metalloproteinases 3, TIMP-3)、MMP-3、MMP-9、MMP-13 和解聚蛋白样金属蛋白酶 5(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, ADAMTS-5) 的表达，探讨荣筋拈痛方含药血清通过 LncRNA GAS5/miR-21 影响退变软骨细胞外基质代谢的作用机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞实验，先采用白细胞介素 1 β 诱导退变软骨细胞模型，含药血清干预后，Real-time PCR、Western blot 法检测退变软骨细胞中 LncRNA GAS5、miR-21、TIMP-3、MMP-3、MMP-9、MMP-13 和 ADAMTS-5 的表达，探讨荣筋拈痛方含药血清通过 LncRNA GAS5/miR-21 影响退变软骨细

胞外基质代谢的作用机制。然后,拟设计细胞慢病毒感染实验,过表达 LncRNA GAS5、含药血清干预后,Real-time PCR 法检测荣筋拈痛方含药血清对感染软骨细胞 LncRNA GAS5、miR-21、TIMP-3、MMP-9、MMP-13 和 ADAMTS-5 的影响,探讨荣筋拈痛方通过 LncRNA GAS5/miR-21 对软骨细胞外基质代谢的影响。

1.2 时间及地点 实验于 2018 年 1 月至 2019 年 12 月在福建中医药大学中西医结合研究院、福建中医药大学动物实验中心完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 8 周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠 40 只,用于含药血清的制备。4 周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠 42 只,用于原代软骨细胞的分批提取。SD 大鼠由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,合格证号:SCXK(沪)2019-0007。实验方案经福建中医药大学动物实验伦理委员会批准(FJTCM IACUC 2020053)。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在戊巴比妥钠麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

1.3.2 实验药物与试剂 荣筋拈痛方由牛膝、当归、独活、羌活、防风、甘草组成,购于闽侯县上街致诚医药商店;盐酸氨基葡萄糖胶囊(香港美制药厂)。白细胞介素 1β(美国 Sigma 公司,货号: I 2393); II 型胶原酶(美国 Sigma 公司,货号: V900892-100MG); 胎牛血清(美国 Hyclone 公司,货号: 10099141C); 低糖 DMEM(上海源培生物科技股份有限公司,货号: H210811); Trizol(美国 Invitrogen 公司,货号: 15596018); PrimeScript™ RT mRNA 反转录试剂盒(日本 Takara 公司,货号: RR047A); Mir-X™ miRNA 反转录试剂盒、TB Green™ Premix Ex Taq™ II 试剂盒(日本 Takara 公司,货号: 638316); AceQqPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒(中国 Vazyme 公司,货号: Q111-02); LncRNA GAS5 过表达慢病毒 LV-GAS5(45283-1)及空载体病毒 CON238(上海吉凯公司); RIPA 裂解液、PMSF、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术有限公司,货号: P0013B、ST506、P0012); ADAMTS-5、MMP-3、MMP-9、MMP-13、TIMP-3 一抗(美国 abcam 公司,货号: ab41037、ab52915、ab76003、ab39012、ab39184); Anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody 二抗(CST 公司,货号: 7074s); 各指标相关引物委托福州尚亚生物技术有限公司设计合成。

1.3.3 实验仪器 NanoDrop 2000 超微量分光光度计(Thermo 公司); PCR 仪(Bio-Rad 公司,型号: S1000); 实时荧光定量基因扩增仪(美国 AB 公司,型号: 7500 Fast System); 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司,型号: 5417R); Olympus 荧光倒置显微镜(日本太阳交易株式会社,型号: IX70); 凝胶电泳系统(美国 ThermoFisher 公司,型号: E-GEL); 小型槽式转印系统、化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司,型号: IX70ChemiDocXRS+)。

1.4 方法

1.4.1 大鼠软骨细胞的获取^[34] 在动物房取材室,取 2 只 4 周龄 SPF 级 SD 大鼠,用 2% 戊巴比妥钠按 5 mL/kg 的剂量使大鼠麻醉致死,开始取材。无菌条件下从髌部、踝部游离下肢,完整保留双膝关节,置入装有体积分数为 75% 乙醇的无菌烧杯中,在超净工作台中无菌操作,先用生理盐水或 PBS 充分漂洗取材组织,用刀片切断肌肉、韧带打开膝关节,分离切除滑膜、交叉韧带、半月板等,显露胫骨平台、股骨髁表面的关节软骨,用尖刀片小心削下关节表面乳白色的弹性软骨,不要切取过多而误带软骨下骨, PBS 漂洗 3 次,用圆刀片将关节软骨尽量切碎,约至 1 mm³ 大小,加入 0.2% II 型胶原酶 5 mL,用移液器转移至小锥形瓶中,置 37 °C 恒温水浴摇床上消化 2 h 后,取出静置 5 min,吸上清经 200 目尼龙网筛过滤后,加入 15 mL EP 管中,1 000 r/min 离心 3 min,弃上清液,留下底部沉淀,加入 4 mL 含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,移液器吹打重悬细胞,接种于 25 cm² 培养瓶中,置于 37 °C、体积分数为 5% CO₂ 培养箱中进行原代培养,即为原代细胞。若离心后,EP 管底部细胞沉淀较多,可平均分为 2 瓶或 3 瓶培养。在原消化瓶中继续加入 0.2% II 型胶原酶 5 mL,继续消化、处理 3 次,最后未能消化的软骨小块及杂质丢弃,每 48 h 更换 1 次培养基,倒置显微镜下观察细胞生长情况。

大鼠软骨细胞的培养及鉴定:

细胞来源	4 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠胫骨平台、股骨髁表面的关节软骨
培养方法	II 型胶原酶消化法提取培养软骨细胞,胰酶消化法传代培养、纯化软骨细胞
培养基	含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液
培养时间	原代细胞培养 24 h 开始换液,之后每 48 h 更换 1 次培养基
细胞传代	待原代软骨细胞生长至 25 cm ² 培养瓶底密集度 80%~90% 时进行传代,加入 0.25% 胰蛋白酶 300~500 μL,配制成细胞浓度为 1×10 ⁸ L ⁻¹ 的细胞悬液,加入培养瓶培养,每瓶 4 mL,即为第 1 代软骨细胞,48~72 h 传 1 代,获得稳定、纯化的第 2 代软骨细胞,进行后续实验
细胞鉴定	甲苯胺蓝染色法与 II 型胶原蛋白免疫细胞化学染色法鉴定软骨细胞
伦理学批准	该实验经过福建中医药大学实验动物伦理委员会批准,批准文号: FJTCM IACUC 2020053

1.4.2 含药血清制备 8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只,采用随机数字表法分为空白血清组(20 只)、荣筋拈痛方含药血清组(10 只)和盐酸氨基葡萄糖胶囊含药血清组(10 只),根据“人和动物体表面积折算的等效剂量比率表”换算^[35-36],按 10 mL/kg 分别给予生理盐水、荣筋拈痛方(0.45 g/mL)、盐酸氨基葡萄糖胶囊(0.015 g/mL)灌胃,连续 7 d^[37-39]。第 7 天灌胃前禁食 12 h,灌胃 1, 2, 3 h 后腹主动脉采血制备含药血清,血清室温静置 4 h,3 000 r/min 离心 15 min,吸取上层血清,56 °C 水浴 30 min,0.22 μm 针头滤器过滤,-80 °C 保存备用,按需取出用 DMEM 培养基配制相应浓度完全培养基。

CCK-8 法确定含药血清干预软骨细胞量效时效关系: 取生长良好的第 2 代软骨细胞, 消化传代计数, 用含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基调配细胞悬液, 细胞浓度为 $5 \times 10^7 L^{-1}$, 接种于 96 孔板, 每孔 100 μL 。设 1 列为一组, 依次为 5%, 10%, 15% 不同体积分数干预组。设 1 个 96 孔板为一个干预时间段, 分为干预 24, 48, 72 h。接种 24 h 后, 分别将 96 孔板中的培养基换为 DMEM 培养基和不同体积分数荣筋拮痛方含药血清或盐酸氨基葡萄糖胶囊含药血清。每干预 24 h, 取 1 块板, 避光条件下, 每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL , 避免产生气泡, 37 $^{\circ}C$ 孵育 2 h 后, 测定 450 nm 波长处吸光度值。

1.4.3 大鼠软骨细胞的干预 传至 2 代软骨细胞进行干预, 分为空白组 (空白血清)、模型组 (10 ng/mL 白细胞介素 1β + 空白血清)、治疗组 (10 ng/mL 白细胞介素 1β + 体积分数为 10% 荣筋拮痛方含药血清)、对照组 (10 ng/mL 白细胞介素 1β + 体积分数为 15% 盐酸氨基葡萄糖胶囊含药血清), 各组干预 48 h 后, 检测相关指标。

1.4.4 RNA 提取及 Real-time PCR 检测 Trizol 法提取总 RNA, 分别用 PrimeScriptTM RT mRNA 反转录试剂盒和 Mir-XTM miRNA 反转录试剂盒反转录获得 cDNA, 用 AceQqPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒和 TB GreenTM Premix Ex TaqTM II 试剂盒分别上机检测各个指标的 CT 值, miR-21 以 U6 为内参, 其余以 β -actin 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量。具体引物序列如下 (5'-3'): LncRNA GAS5 上游引物: AAG GCA TGG CAA GCT CCA CAC, 下游引物: TGT TCA AGC ATC CAT CCA GTC ACC; miR-21-5p 引物: GCA CCG TTA GCT TAT CAG ACT GA; U6 上游引物: CTC GCT TCG GCA GCA CA, 下游引物: AAC GCT TCA CGA ATT TGC G; MMP-3 上游引物: GGC ACC AGT CAA CCT CAA, 下游引物: CCA TCT ACA CAG AGA CAG TTA CTT; MMP-9 上游引物: GCT GCT CCA ACT GCT GTA, 下游引物: CAT CCA ATA AAT TCC TCT GTC CCT A; MMP-13 上游引物: GCT AAG GCA GAC ATA GTA AGT AGA T, 下游引物: ACA CAT CAG TAA GCA CCA AGT; ADAMTS-5 上游引物: AGG GCA CTG GCT ATT ACG, 下游引物: GTT CTC ACG CAC CTT CCT; TIMP-3 上游引物: GCG TGT ATG AAG GCA AGA TGT A, 下游引物: CAG GTG GTA GCG GTA ATT GAG; β -actin 上游引物: TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ATG A, 下游引物: CAT CGG AAC CGC TCA TTG CCG ATA G。

1.4.5 蛋白的提取及 Western blot 检测 用 RIPA 裂解液提取总蛋白, BCA 法测定各组蛋白浓度, SDS-PAGE 凝胶电泳蛋白, 湿转法将胶上蛋白转至 PVDF 膜上, 室温封闭 1 h, ADAMTS-5、MMP-3、MMP-9、MMP-13、TIMP-3 一抗孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 室温孵育二抗 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 然后于膜上均匀滴加 ECL 显影液进行曝光显影, Image Lab 软件分析条带。

1.4.6 荣筋拮痛方含药血清干预过表达 LncRNA GAS5 的软骨细胞 取细胞浓度为 $5 \times 10^7 L^{-1}$ 的软骨细胞 2 mL 接种于 6 孔板中加入慢病毒感染, 分为 LncRNA GAS5 空载体 + 空白血清

组、LncRNA GAS5 空载体 + 体积分数为 10% 荣筋拮痛方含药血清组、LncRNA GAS5 过表达 + 空白血清组、LncRNA GAS5 过表达 + 体积分数为 10% 荣筋拮痛方含药血清组, 干预 48 h 后 Real-time PCR 检测各组 LncRNA GAS5、miR-21、TIMP-3、MMP-9、MMP-13 和 ADAMTS-5 基因表达。

1.5 主要观察指标 ①体外细胞实验, Real-time PCR、Western blot 检测退变软骨细胞中 LncRNA GAS5、miR-21、TIMP-3、MMP-3、MMP-9、MMP-13 和 ADAMTS-5 的表达; ②细胞慢病毒感染实验, Real-time PCR 检测慢病毒感染软骨细胞中 LncRNA GAS5、miR-21、TIMP-3、MMP-9、MMP-13 和 ADAMTS-5 的表达。

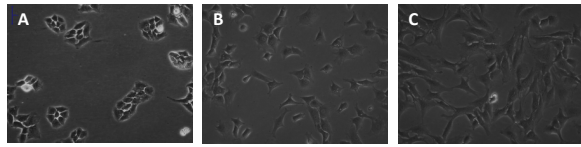
1.6 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件进行数据统计分析。计量资料符合正态分布时以 $\bar{x} \pm s$ 表示。符合正态分布的多组间比较采用单因素方差分析; 组间两两比较, 方差齐采用 LSD 检验, 方差不齐采用 Games-Howell 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。文章统计学方法已经福建中医药大学统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 软骨细胞的生长情况及形态特点 软骨细胞培养过程中, 采用倒置相差显微镜观察其形态变化、生长情况等。原代软骨细胞培养第 4 天, 细胞已贴壁生长并开始分裂, 多数呈多角形或梭形, 分裂增殖速度加快, 形成伪足样突起, 数个细胞簇成团分布, 胞核为圆形或椭圆形, 位于胞体中心, 核浆着色淡, 核仁着色较深, 见图 1A。第 1 代软骨细胞培养第 2 天, 细胞贴壁速度较原代软骨细胞快, 大多数已贴壁生长, 细胞多呈梭形, 形态结构均一, 边界清晰, 分布均匀, 生长状态良好, 见图 1B。第 2 代软骨细胞培养第 2 天, 细胞贴壁速度较第 1 代软骨细胞快, 已全部贴壁生长, 呈梭形或三角形, 边界清晰, 形态结构均一, 生长状态良好, 增殖速度较快, 细胞分泌基质的能力较强, 见图 1C。

2.2 含药血清干预软骨细胞的采血时间与时效量效关系 CCK-8 检测结果见图 2。从不同采血时间点看, 与空白血清相比, 各体积分数含药血清干预细胞不同时间后的细胞活性均升高 ($P < 0.05$); 其中 2 h 采血时间点细胞活性达到最高 ($P < 0.05$)。从不同培养时间段看, 各体积分数含药血清培养细胞 24, 48, 72 h 时, 细胞活性均升高 ($P < 0.05$); 其中培养 48 h 时细胞活性达到最高 ($P < 0.01$)。从不同血清体积分数看, 体积分数为 10% 荣筋拮痛方含药血清培养细胞的活性高于体积分数为 5%, 15% 荣筋拮痛方含药血清 ($P < 0.05$); 体积分数为 15% 的盐酸氨基葡萄糖胶囊含药血清培养细胞的活性高于体积分数为 5%, 10% 盐酸氨基葡萄糖胶囊含药血清 ($P < 0.05$)。综合发现 2 h 采血、体积分数为 10% 荣筋拮痛方含药血清、培养 48 h; 2 h 采血、体积分数为 15% 盐酸氨基葡萄糖胶囊含药血清、培养 48 h, 对软骨细胞活性有明显影响。

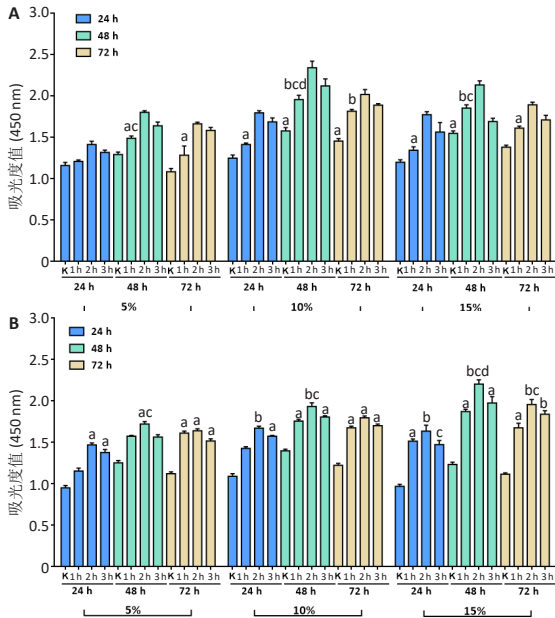
2.3 荣筋拮痛方含药血清对退变大鼠软骨细胞中 LncRNA GAS5、miR-21、TIMP-3 基因表达水平的影响 见图 3。



图注：图 A 为原代培养第 4 天；B 为第 1 代培养第 2 天；C 为第 2 代培养第 2 天

图 1 | 倒置相差显微镜观察软骨细胞形态变化 (×200)

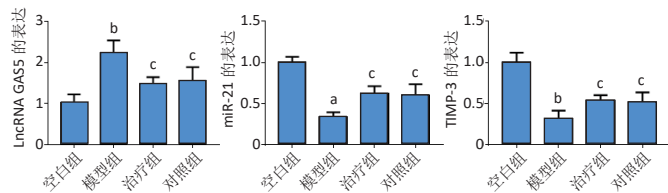
Figure 1 | Morphological changes of chondrocytes observed by inverted phase contrast microscope (×200)



图注：图 A 为荣筋拈痛方含药血清时效果效关系；B 为盐酸氨基葡萄糖胶囊含药血清时效果效关系。K 为空白血清；1, 2, 3h 为采样时间点；24, 48, 72 h 为干预细胞时间点；5%, 10%, 15% 为含药血清体积分数。与空白血清相比，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ ；与培养 24 h 相比，^c $P < 0.05$ ；与体积分数 5% 相比，^d $P < 0.05$

图 2 | CCK-8 法检测含药血清对软骨细胞活力的影响

Figure 2 | Effect of drug containing serum on chondrocyte viability detected by cell counting kit-8 method



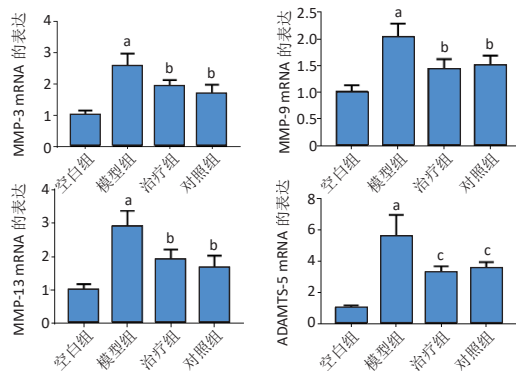
图注：与空白组相比，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ ；与模型组相比，^c $P < 0.05$ 。TIMP-3：基质金属蛋白酶抑制物 3

图 3 | 各组软骨细胞中 LncRNA GAS5、miR-21、TIMP-3 基因的表达

Figure 3 | Expression of LncRNA GAS5, miR-21, and TIMP-3 mRNA in chondrocytes

与空白组相比，模型组软骨细胞中 LncRNA GAS5 表达升高，miR-21、TIMP-3 表达下降，差异均有显著性意义 (均 $P < 0.05$)；与模型组相比，治疗组大鼠软骨细胞中 LncRNA GAS5 表达下降，miR-21、TIMP-3 表达升高，差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)；治疗组与对照组比较差异无显著性意义。

2.4 荣筋拈痛方含药血清对退变大鼠软骨细胞中 MMP-3、MMP-9、MMP-13 和 ADAMTS-5 基因表达水平的影响 见图 4。



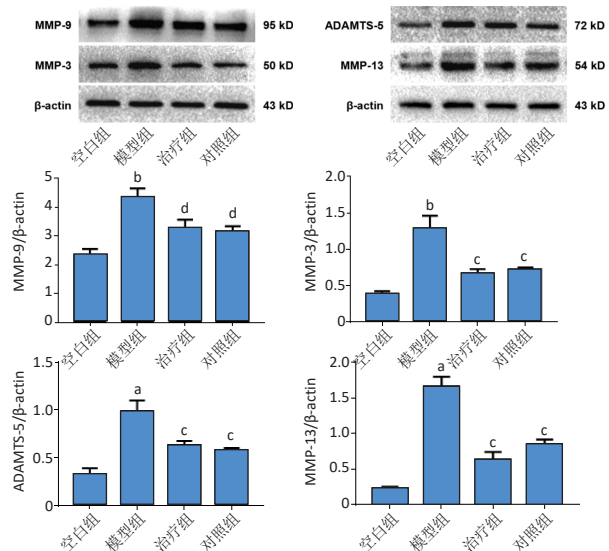
图注：与空白组相比，^a $P < 0.01$ ；与模型组相比，^b $P < 0.05$ ，^c $P < 0.01$ 。MMP：基质金属蛋白酶；ADAMTS-5：解聚蛋白样金属蛋白酶 5

图 4 | 各组软骨细胞中 MMP-3、MMP-9、MMP-13 和 ADAMTS-5 mRNA 的表达

Figure 4 | Expression of MMP-3, MMP-9, MMP-13, and ADAMTS-5 mRNA in chondrocytes

与空白组相比，模型组中 MMP-3、MMP-9、MMP-13、ADAMTS-5 基因表达升高，差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)；与模型组相比，治疗组中 MMP-3、MMP-9、MMP-13 和 ADAMTS-5 基因表达下降，差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)。治疗组与对照组差异无显著性意义。

2.5 荣筋拈痛方含药血清对退变大鼠软骨细胞中 MMP-3、MMP-9、MMP-13 和 ADAMTS-5 蛋白表达水平的影响 见图 5。



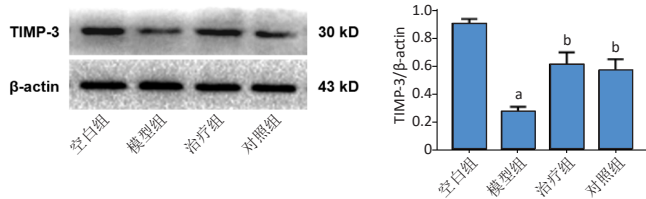
图注：与空白组相比，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ ；与模型组相比，^c $P < 0.05$ ，^d $P < 0.01$ 。MMP：基质金属蛋白酶；ADAMTS-5：解聚蛋白样金属蛋白酶 5

图 5 | 各组软骨细胞中 MMP-9、MMP-3、ADAMTS-5 和 MMP-13 蛋白的表达

Figure 5 | Expression of MMP-9, MMP-3, ADAMTS-5, and MMP-13 protein in chondrocytes

与空白组相比，模型组中 MMP-3、MMP-9、MMP-13、ADAMTS-5 蛋白表达升高，差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)；与模型组相比，治疗组 MMP-3、MMP-9、MMP-13、ADAMTS-5 蛋白表达下降，差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)。治疗组与对照组比较差异无显著性意义。

2.6 荣筋拈痛方含药血清对退变大鼠软骨细胞中 TIMP-3 蛋白表达水平的影响 见图 6。



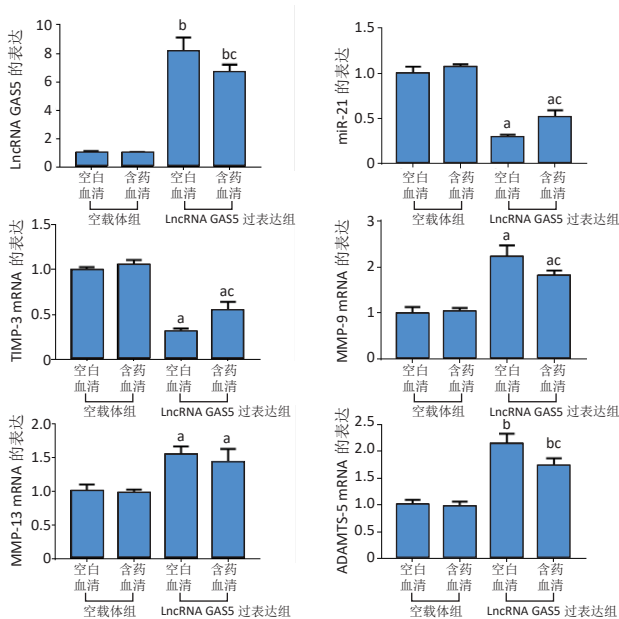
图注：与空白组相比，^a $P < 0.01$ ；与模型组相比，^b $P < 0.05$ 。TIMP-3：基质金属蛋白酶抑制物 3

图 6 | 各组软骨细胞中 TIMP-3 蛋白的表达

Figure 6 | Expression of TIMP-3 protein in chondrocytes

与空白组相比，模型组中 TIMP-3 蛋白表达降低，差异有显著性意义 ($P < 0.05$)；与模型组相比，治疗组 TIMP-3 蛋白表达升高，差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。治疗组与对照组差异无显著性意义。

2.7 荣筋拈痛方含药血清对 LncRNA GAS5 过表达软骨细胞外基质代谢的影响 见图 7。



图注：与空载体组相比，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ ；与 LncRNA GAS5 过表达 + 空白血清组相比，^c $P < 0.05$ 。MMP：基质金属蛋白酶；ADAMTS-5：解聚蛋白样金属蛋白酶 5；TIMP-3：基质金属蛋白酶抑制物 3

图 7 | LncRNA GAS5 过表达软骨细胞中 LncRNA GAS5、miR-21、TIMP-3、MMP-9、MMP-13 和 ADAMTS-5 基因的表达

Figure 7 | Expression of LncRNA GAS5, miR-21, TIMP-3, MMP-9, MMP-13, and ADAMTS-5 in LncRNA GAS5 overexpressed chondrocytes

与空载体组相比，LncRNA GAS5 过表达组 LncRNA GAS5 表达量明显升高 ($P < 0.01$)；与 LncRNA GAS5 过表达 + 空白血清组相比，LncRNA GAS5 过表达 + 体积分数 10% 荣筋拈痛方含药血清组 LncRNA GAS5 表达量降低 ($P < 0.05$)。与空载体组相比，LncRNA GAS5 过表达组 miR-21、TIMP-3 表达量降低 ($P < 0.05$)；与 LncRNA GAS5 过表达 + 空白血清组相比，LncRNA GAS5 过表达 + 体积分数 10% 荣筋拈痛方含药血清组 miR-21、TIMP-3 表达量升高 ($P < 0.05$)。与空载体组相比，LncRNA GAS5 过表达组 ADAMTS-5 mRNA 表达量明显升高 ($P < 0.01$)，MMP-9 和 MMP-13 mRNA 表达量升高 ($P < 0.05$)；与 LncRNA GAS5 过表达 + 空白血清组相比，LncRNA GAS5 过表

达 + 体积分数 10% 荣筋拈痛方含药血清组 MMP-9、MMP-13 和 ADAMTS-5 mRNA 表达量均降低 ($P < 0.05$)。

3 讨论 Discussion

膝骨关节炎是慢性退行性骨关节疾病，以关节滑膜炎、软骨退变、软骨下骨硬化、骨赘形成等为主要病理特征^[1-3]。患者常出现行走或劳累后关节酸胀疼痛，甚至晨僵；病情反复发作，逐渐加重，最终可能导致膝关节力线改变、畸形，引起关节活动障碍，严重影响患者的生活质量，给家庭和社会带来很大负担^[40]。膝骨关节炎发病的根本是软骨退变，其直接原因在于软骨细胞和细胞外基质的平衡被打乱，即软骨细胞减少、细胞外基质进行性降解。因此，如何抑制软骨细胞外基质降解，是防治膝骨关节炎的关键。中医学采用补肝肾、强筋骨、活血、祛瘀、止痛等治法防治膝骨关节炎，以达到补益肝肾、荣养关节、祛除外邪、缓解疼痛的目的，延缓膝骨关节炎的进展。荣筋拈痛方源于陈可冀院士《清宫配方集成》，课题组前期计算机分子模拟研究表明，荣筋拈痛方可能具有刺激关节软骨蛋白多糖合成、抗炎镇痛的作用，能有效延缓软骨基质降解，抑制关节软骨退变，但其效应的作用机制有待深入研究。

该研究采用含药血清的方法干预退变软骨细胞，以明确实验药物对软骨细胞外基质代谢的影响。基于血清药理学理论，把荣筋拈痛方水提物、盐酸氨基葡萄糖胶囊水溶液，按比率给予大鼠灌胃。药物经过新陈代谢，有效成分进入血液循环，采集血清中含有该药物的有效成分。灌胃一定时间后，采血、分离血清，使用前灭活，用含有药物的血清进行体外细胞实验。在研究荣筋拈痛方的药效作用时，用含药血清进行体外细胞实验，具有一定优势。一方面，该方法除了可以验证中药有效成分的作用，还可反映出药物在实验动物体内的新陈代谢产物及药物诱导的内源性成分的作用^[41]。与直接将受试药物作用于细胞的方法相比，含药血清法因条件可控性强、重复性好，适用于中药复方的体外实验。由于中药复方的药代动力学较为复杂，制备含药血清时，需要确定有效的给药剂量、给药时间及采血时间，以更好地体现出中药药效^[36, 39]。该研究分别以荣筋拈痛方水提物、盐酸氨基葡萄糖胶囊水溶液临床等效剂量为灌胃量制备含药血清。因不同药物的含药血清干预软骨细胞的有效浓度、时间不同，所以在应用含药血清进行体外实验时，需要明确其有效的时效、量效关系。该研究 CCK-8 法检测细胞活性结果表明，荣筋拈痛方含药血清的最佳采血时间为 2 h，有效干预时间为 48 h，有效体积分数为 10%。

该研究退变软骨细胞中 TIMP-3 的表达量明显降低；MMP-3、MMP-9、MMP-13、ADAMTS-5 mRNA 和蛋白的表达明显升高，说明退变软骨细胞外基质分解代谢增强，合成代谢减弱，胞外基质出现降解，加速软骨细胞退变。由分解代谢和合成代谢紊乱失衡所致的软骨细胞外基质降解是引起软骨退变的重要病理变化^[42]。在胞外基质代谢过程中，基

质代谢酶如 MMPs、TIMPs、ADAMTS 和去整合素等物质发挥重要作用。MMPs 作为破坏细胞外基质的蛋白酶，在膝关节炎中表达均有所增加。MMPs 的活性受 TIMPs 的调控，二者保持平衡以维持软骨正常的结构和功能^[43]。荣筋拮痛方含药血清对胞外基质代谢的影响，与对照含药血清无明显差异，说明二者延缓胞外基质降解的效果相当。荣筋拮痛方含药血清组与对照含药血清组 MMP-3、MMP-9、MMP-13、ADAMTS-5 mRNA 和蛋白的表达均有一定程度降低，TIMP-3 mRNA 和蛋白的表达水平均有一定程度升高，说明荣筋拮痛方含药血清能促进 TIMP-3 的表达，通过抑制 MMPs、ADAMTS 的表达，抑制胞外基质分解代谢，从而延缓软骨细胞退变。

该研究退变软骨细胞中 LncRNA GAS5 的表达明显升高，miR-21 及其靶基因 TIMP-3 的表达量明显降低，说明 LncRNA GAS5 可能通过 miR-21 及其靶基因 TIMP-3 发挥其生物学功能。同时，软骨细胞退变中，MMP-3、MMP-9、MMP-13、ADAMTS-5 mRNA 和蛋白的表达明显升高，说明 LncRNA GAS5 可通过 miR-21 及 TIMP-3 调控软骨细胞外基质降解，促进软骨细胞退变。在细胞外基质降解、软骨细胞退变凋亡、软骨下骨的异常改变、炎症反应和血管新生等膝关节炎病理变化、发生发展过程中，LncRNA 均起重要的调控作用^[11-12]。近年来许多研究证实，LncRNA 可通过 miRNA 调控 mRNA 表达，也是维持或降解胞外基质的关键调控因子^[44-46]。SONG 等^[14]研究发现，骨关节炎软骨细胞中 LncRNA GAS5 表达上调。LncRNA GAS5 的过表达增加了 MMP-2、MMP-3、MMP-9、MMP-13 和 ADAMTS-4 等 MMPs 的表达水平，促进了细胞凋亡，抑制了自噬反应。miR-21 是骨关节炎发病过程中 LncRNA GAS5 的调节因子。该实验中，LncRNA GAS5 过表达慢病毒感染软骨细胞后，过表达软骨细胞中 LncRNA GAS5 的表达水平明显升高，升高幅度可达空载体组的 8-10 倍。miR-21 及其靶基因 TIMP-3 的表达量明显降低，而 MMP-9、MMP-13、ADAMTS-5 表达量升高。LncRNA GAS5 是软骨细胞外基质代谢的负向调控因子，过表达 LncRNA GAS5 可通过 miR-21 及其靶基因 TIMP-3，增加 MMP-9、MMP-13 和 ADAMTS-5 的表达，促进分解代谢，加速胞外基质降解。骨关节炎软骨组织中 miR-21 的表达水平明显降低，LncRNA GAS5 的异位表达可抑制 miR-21 的诱导，结果表明 LncRNA GAS5 作为 miR-21 的负调节因子调控细胞外基质代谢，参与骨关节炎的发病。荣筋拮痛方含药血清组与对照含药血清组 LncRNA GAS5 的表达降低，miR-21 及其靶基因 TIMP-3 的表达量升高，说明荣筋拮痛方含药血清可降低软骨细胞退变中 LncRNA GAS5 的表达量，且 LncRNA GAS5 可能通过 miR-21 调控软骨细胞外基质代谢。LncRNA GAS5 过表达的软骨细胞经荣筋拮痛方含药血清干预后，LncRNA GAS5 的表达量降低；miR-21、TIMP-3 的表达量升高，MMP-9、MMP-13、ADAMTS-5 的表达量降低，说明荣筋拮痛方含药血清可通过 LncRNA GAS5、miR-21 及 TIMP-3 调控细胞外基质合成与分解代谢，延缓软骨细胞外基

质降解。

总之，荣筋拮痛方通过调控 LncRNA GAS5/miR-21，促进 TIMP-3 的表达，抑制 MMP-3、MMP-9、MMP-13、ADAMTS-5 等表达，从而延缓退变软骨细胞外基质降解，起到防治膝关节炎的作用。

作者贡献：赵忠胜、陈俊进行实验设计，赵忠胜、陈振沅、张铃进行实验实施，黄云梅进行资料收集，吴广文、陈俊进行实验评估和审核。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] HUNTER DJ, BIERMA-ZEINSTRAS S. Osteoarthritis. *Lancet*. 2019;393(10182):1745-1759.
- [2] SHI Y, HU X, CHENG J, et al. A small molecule promotes cartilage extracellular matrix generation and inhibits osteoarthritis development. *Nat Commun*. 2019;10(1):1914.
- [3] QUICKE JG, CONAGHAN PG, CORP N, et al. Osteoarthritis year in review 2021: epidemiology & therapy. *Osteoarthritis Cartilage*. 2021;30(2):196-206.
- [4] DIELEMAN JL, CAO J, CHAPIN A, et al. US Health Care Spending by Payer and Health Condition, 1996-2016. *JAMA*. 2020;323(9):863-884.
- [5] YOUNG DA, BARTER MJ, SOUL J. Osteoarthritis year in review: genetics, genomics, epigenetics. *Osteoarthritis Cartilage*. 2022;30(2):216-225.
- [6] 李西海, 刘献祥. 骨关节炎的核心病机——本痿标痹[J]. *中医杂志*, 2014,55(14):1248-1249,1252.
- [7] BERNARD NJ. Controlling chondrocyte senescence. *Nat Rev Rheumatol*. 2019;15(6):319.
- [8] NAIR L, CHUNG H, BASU U. Regulation of long non-coding RNAs and genome dynamics by the RNA surveillance machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(3):123-136.
- [9] SLACK FJ, CHINNAIYAN AM. The Role of Non-coding RNAs in Oncology. *Cell*. 2019;179(5):1033-1055.
- [10] WEI LH, GUO JU. Coding functions of “noncoding” RNAs. *Science*. 2020;367(6482):1074-1075.
- [11] SUN H, PENG G, NING X, et al. Emerging roles of long noncoding RNA in chondrogenesis, osteogenesis, and osteoarthritis. *Am J Transl Res*. 2019;11(1):16-30.
- [12] ABBASIFARD M, KAMIAB Z, BAGHERI-HOSSEINABADI Z, et al. The role and function of long non-coding RNAs in osteoarthritis. *Exp Mol Pathol*. 2020;114:104407.
- [13] MISHRA S, VERMA SS, RAI V, et al. Long non-coding RNAs are emerging targets of phytochemicals for cancer and other chronic diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(10):1947-1966.
- [14] SONG J, AHN C, CHUN CH, et al. A long non-coding RNA, GAS5, plays a critical role in the regulation of miR-21 during osteoarthritis. *J Orthop Res*. 2014;32(12):1628-1635.

- [15] ZHANG Z, ZHU Z, WATABE K, et al. Negative regulation of lncRNA GAS5 by miR-21. *Cell Death Differ.* 2013;20(11):1558-1568.
- [16] 郑伟, 董洁, 李少华, 等. lncRNA-GAS5 抑制 miR-21 介导的非完全匹配靶 mRNA 降解 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2017,44(7):580-590.
- [17] LIU X, SHE Y, WU H, et al. Long non-coding RNA Gas5 regulates proliferation and apoptosis in HCS-2/8 cells and growth plate chondrocytes by controlling FGF1 expression via miR-21 regulation. *J Biomed Sci.* 2018;25(1):18.
- [18] LIU K, LIU C, ZHANG Z. lncRNA GAS5 acts as a ceRNA for miR-21 in suppressing PDGF-bb-induced proliferation and migration in vascular smooth muscle cells. *J Cell Biochem.* 2019;120(9):15233-15240.
- [19] WANG XB, ZHAO FC, YI LH, et al. MicroRNA-21-5p as a novel therapeutic target for osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2019:kez102.
- [20] ZHU H, YAN X, ZHANG M, et al. miR-21-5p protects IL-1beta-induced human chondrocytes from degradation. *J Orthop Surg Res.* 2019;14(1):118.
- [21] 陈可冀. 清宫配方集成 [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2013.
- [22] 林洁, 范展彪, 刘献祥. 基于数据挖掘技术探讨陈可冀《清宫配方集成》中治疗骨关节炎组方的用药规律 [J]. *中医正骨*, 2017,29(11):15-19,25.
- [23] 刘献祥. 基于陈可冀学术思想之骨性关节炎研究 [J]. *康复学报*, 2016, 26(1):2-5.
- [24] 吴广文, 黄艳峰, 刘献祥. 荣筋拈痛方治疗膝骨性关节炎的药理学基础 [J]. *福建中医药*, 2018,49(3):83-85.
- [25] 朱定钰, 林木南, 万宁, 等. 荣筋拈痛方治疗膝骨性关节炎临床疗效观察 [C]. 呼和浩特: 第二十四届中国中西医结合骨伤科学术年会, 2017.
- [26] 林洁, 赵忠胜, 黄艳峰, 等. 荣筋拈痛方对骨关节炎作用靶点的分析及验证 [J]. *中华中医药杂志*, 2019,34(8):3743-3746.
- [27] 郑春松, 范展彪, 叶蕙芝, 等. 计算机模拟研究荣筋拈痛方治疗骨关节炎的药效物质基础、作用靶点及作用特点 [J]. *中医正骨*, 2017, 29(10):20-24.
- [28] 郑春松, 范展彪, 叶蕙芝, 等. 从化学空间探讨荣筋拈痛方补肝肾强筋骨和祛风湿止痹痛的作用 [J]. *风湿病与关节炎*, 2018,7(2):33-36.
- [29] 付长龙, 谢新宇, 何俊君, 等. 基于 PERK 通路探讨荣筋拈痛方对软骨细胞内质网应激反应抑制作用 [J]. *福建中医药*, 2022,53(4):22-24,28.
- [30] 潘丹虹, 李路, 王文义, 等. 荣筋拈痛方对白细胞介素 -1 β 诱导的体外大鼠软骨细胞自噬相关基因表达的影响 [J]. *风湿病与关节炎*, 2022,11(2):1-5,15.
- [31] 黄艳峰, 陈俊, 林洁, 等. 荣筋拈痛方对白细胞介素 -1 β 诱导大鼠退变软骨细胞增殖的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2021,36(4):2077-2082.
- [32] 朱定钰, 黄艳峰, 徐欣, 等. 基于 p38 MAPK 炎症相关通路探讨荣筋拈痛方对大鼠体外退变软骨细胞的机制影响 [J]. *中医临床研究*, 2021,13(16):1-5.
- [33] 陈俊, 郑若曦, 张婷, 等. 荣筋拈痛方含药血清对骨关节炎大鼠 SDF-1/CXCR4 信号通路的影响 [J]. *福建中医药*, 2021,52(7):26-29.
- [34] 杨帆, 刘保一, 刘家河, 等. 体外培养 SD 大鼠关节软骨细胞原代至第 3 代的形态学特点 [J]. *中国组织工程研究*, 2021,25(14):2161-2165.
- [35] 魏伟, 吴希美, 李元健. 药理实验方法学 [M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010:71-72.
- [36] 刘建勋, 韩笑, 孙宇扬. 含药血清药理作用强度与体内给药的量效、时效关系研究 [J]. *中国中药杂志*, 2006(10):829-831.
- [37] 王洪武, 倪青, 林兰. 中药含药血清的研究进展及其在中医中的应用 [J]. *北京中医药*, 2008,27(9):698-701.
- [38] 张君涛, 王平, 刘爱峰, 等. 中药含药血清制备方法的研究概述 [J]. *中华中医药杂志*, 2015,30(11):4006-4009.
- [39] 张灵娜, 林兵, 宋洪涛. 中药血清药理学、血清药物化学的研究概况及展望 [J]. *中草药*, 2015,46(17):2662-2666.
- [40] 吕苏梅, 张瑞丽. 中老年膝骨关节炎的流行病学研究进展 [J]. *中国老年学杂志*, 2016,36(16):4133-4135.
- [41] 张红敏, 谢春光, 陈世伟. 含药血清体外药理试验的评价 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2004(8):741-745.
- [42] LI D, YANG C, YIN C, et al. lncRNA, Important Player in Bone Development and Disease. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2020;20(1):50-66.
- [43] HULL R, POPE FM. Osteoarthritis and cartilage collagen genes. *Lancet.* 1989;1(8650):1337-1338.
- [44] XING D, LIANG JQ, LI Y, et al. Identification of long noncoding RNA associated with osteoarthritis in humans. *Orthop Surg.* 2014;6(4):288-293.
- [45] XIANG S, LI Z, BIAN Y, et al. Identification of changed expression of mRNAs and lncRNAs in osteoarthritic synovium by RNA-sequencing. *Gene.* 2019;685:55-61.
- [46] CHEN L, ZHANG Y, RAO Z, et al. Integrated analysis of key mRNAs and lncRNAs in osteoarthritis. *Exp Ther Med.* 2018;16(3):1841-1849.

(责任编辑: MZH, ZN, ZJP)