

· 论著 ·

骨髓间充质干细胞对膝关节炎大鼠软骨损伤及 KDM6A/SOX9 信号通路的影响

季健坤 李克文* 赵宏涛 张斌斌 冯唱 扎西达娃 吴磊 刘朝政
青海大学附属医院关节外科,青海 西宁 810000

中图分类号: R684.3 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2022)04-0486-07

摘要: 目的 观察骨髓间充质干细胞对膝关节炎大鼠的影响,并探讨其机制。方法 将40只SD大鼠随机分为正常对照组(Control)、膝关节炎组(KOA)、骨髓间充质干细胞组(BMSCs),每组10只,剩余10只用于骨髓间充质干细胞的分离。处理4周后进行大鼠关节指数(AI)评分;HE染色观察软骨组织病理学变化;免疫组化检测软骨组织Col II、IL-6、MMP-3、MMP-13表达;ELISA法检测血清IL-6、TNF- α 、MMP-3、MMP-13含量;qRT-PCR检测软骨组织Col II、Col I、TNF- α 、IL-6、MMP-13、KDM6A、SOX9、Aggrecan mRNA表达;Western blot检测软骨组织KDM6A、SOX9、Aggrecan蛋白表达。结果 与Control组比较,KOA组大鼠AI评分、血清IL-6、TNF- α 、MMP-3、MMP-13含量、软骨组织IL-6、MMP-3、MMP-13表达明显升高($P < 0.05$);Col II、KDM6A、Aggrecan、SOX9 mRNA和蛋白表达明显降低($P < 0.05$)。与KOA组比较,BMSCs组大鼠AI评分、血清IL-6、TNF- α 、MMP-3、MMP-13含量、软骨组织IL-6 mRNA表达明显降低($P < 0.05$),软骨组织KDM6A、Aggrecan mRNA和蛋白表达明显升高($P < 0.05$)。结论 骨髓间充质干细胞明显改善膝关节炎大鼠病理损伤,可能通过调节KDM6A/SOX9信号通路发挥对膝关节炎大鼠的治疗作用。

关键词: 膝关节炎;骨髓间充质干细胞;软骨损伤;信号通路

Effects of bone marrow mesenchymal stem cells on cartilage damage and KDM6A/SOX9 signaling pathway in rats with knee osteoarthritis

Ji Jiankun, Li Kewen*, Zhao Hongtao, Zhang Binbin, Feng Chang, Zhaxi Dawa, Wu Lei, Liu Chaozheng

Department of Joint Surgery, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810000, China

* Corresponding author: LI Kewen, Email: QDFYkwl@126.com

Abstract: Objective To observe the effect of bone marrow mesenchymal stem cells on knee osteoarthritis rats and to explore the possible mechanisms. **Methods** Forty SD rats were randomly divided into normal control group (Control, saline 0.3 mL, once a week for 4 times), knee osteoarthritis group (KOA, saline 0.3 mL, once a week for 4 times), bone marrow mesenchymal stem cells group (BMSCs, 0.3 mL, once a week for 4 times), 10 rats in each group, and the remaining 10 rats were used for the isolation of bone marrow MSCs. After 4 weeks, the joint index (AI) scores of rats were performed; the pathological changes of cartilage tissue were observed by HE staining; immunohistochemistry was performed to detect the expression of Col II, IL-6, MMP-3 and MMP-13 in cartilage tissues; the content of IL-6, TNF- α , MMP-3 and MMP-13 in serum was detected by ELISA method; and the expression of Col II, Col I, TNF- α , IL-6, MMP-13, KDM6A, SOX9 and Aggrecan mRNA in cartilage tissue was detected by qRT-PCR; Western blot to detect KDM6A, SOX9, Aggrecan protein expression in cartilage tissue. **Results** Compared with the control group, AI score, serum IL-6, TNF- α , MMP-3, MMP-13 content, and cartilage tissue IL-6, MMP-3, MMP-13 expression were significantly higher in the KOA group rats ($P < 0.05$); Col II, KDM6A, Aggrecan, SOX9 mRNA and protein expression significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the KOA group, the BMSCs group significantly decreased AI score, significantly decreased serum IL-6, TNF- α , MMP-3, MMP-13 levels, and IL-6 mRNA expression in cartilage tissue ($P < 0.05$), and significantly increased KDM6A, Aggrecan mRNA and protein expression in cartilage tissue ($P < 0.05$). **Conclusion** Bone marrow mesenchymal stem cells significantly improved the pathological damage of knee osteoarthritis and may exert therapeutic

基金项目: 青海省科技厅自然科学基金(2018-ZJ-763)

* 通信作者: 李克文, Email: QDFYkwl@126.com

effects on knee osteoarthritis rats by regulating the KDM6A/SOX9 signaling pathway.

Key words: osteoarthritis of the knee; bone marrow mesenchymal stem cells; cartilage damage; signaling pathways

骨关节炎(OA)是一种严重的关节退行性疾病,是关节疼痛和残疾的常见原因,特别是在老年人中^[1]。目前,全球有15%的人口患有OA,其特征是由于细胞外基质(ECM)的丧失、广泛的纤维化和裂隙的形成而导致的关节软骨退变,最终导致软骨表面的完全丧失^[2]。虽然一些药物如非甾体抗炎药和细胞外基质成分透明质酸可以通过改变软骨下骨和滑膜来缓解OA的症状,但由于OA的复杂病理和慢性性质,目前尚无有效的治疗方法,且许多OA患者在疾病后期需要关节置换治疗,但假体寿命有限^[3]。因此寻找积极的OA治疗方法非常必要。间充质干细胞(MSCs)在同种异体移植过程中可以迅速扩增而不会引起免疫学问题,在治疗各种人类疾病的过程中增加了许多移植干预措施的成功率^[4-5]。骨髓间充质干细胞(BMSCs)是一种来源于骨髓的MSCs,作为具有多向分化潜能的干细胞,BMSCs可以分化为不同类型的组织,包括脂肪、软骨和骨骼,此外,BMSCs还可以进行自我更新并产生免疫调节反应^[6-7]。因此,BMSCs在软骨损伤和关节疾病的治疗中得到了积极的应用。尽管BMSCs已经用于治疗OA,但BMSCs治疗骨性关节炎的具体机制尚不清楚,但有研究者怀疑BMSCs通过分泌一系列免疫因子和细胞因子发挥作用,进而发挥免疫调节和抗炎作用^[8]。研究^[9]报道在低氧环境下培养MSCs期间,细胞表现出一套独特的分化、增殖和衰老特性。缺氧暴露可以激活赖氨酸特异性去甲基化酶6A(KDM6A)的表达,从而使SOX9启动子去甲基化,SOX9的下调参与了OA的发病^[10]。因此,本研究通过建立膝关节骨性关节炎(KOA)动物模型,将BMSCs在缺氧条件下共培养,研究BMSCs预处理对KOA的治疗作用并初步探讨其机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF级SD大鼠40只,体质量(160~180)g,购自四川大学华西医院,使用许可证号:SYXK(川)2018-119,饲养于恒温(20~25)℃、恒湿(50%±5%)环境中,自然采光,自由饮水。大鼠适应性饲养1周后随机分为3组:正常对照组(Control)、膝关节骨性关节炎组(KOA)、骨髓间充质干细胞组

(BMSCs),每组10只,剩余10只大鼠用于骨髓间充质干细胞的分离。

1.2 主要试剂及仪器

L-DMEM培养基、胰蛋白酶购自Gibco;木瓜蛋白酶(S10011;CAS:9001-73-4)购自上海源叶科技;苏木素染液(批号:ZH193907)购自武汉塞维尔生物;伊红染液(批号:C200403)购自珠海贝索生物;白细胞介素-6(IL-6,货号:ZC-36404)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α ,货号:ZC-37624)、基质金属蛋白酶-3(MMP-3,货号:ZC-36752)、基质金属蛋白酶-13(MMP-13,货号:ZC-36747)购自上海茁彩生物;RNA Trizol Reagent(批号:vs18061730)购自合肥博美生物;TB Green TM Premix Ex TaqTM II(Tli RNaseH Plus)(货号:RR820A)购自宝日医生物;抗Col II(货号:ab188570)、IL-6(货号:ab233706)、MMP-3(货号:ab52915)、MMP-13(货号:ab219620)、KDM6A(货号:ab36938)、SOX9(货号:ab185966)、Aggrecan(货号:ab3778)抗体购自Abcam;BCA蛋白浓度测定试剂盒(货号:P0009)购自Beyotime;BMJ-A型包埋机(常州郊区中威电子仪器厂);BA210Digital数码三目摄像显微镜(麦克奥迪实业集团);SpectraMAX Plus384酶标仪(美谷分子仪器有限公司);PIKORed 96实时荧光定量(RT-PCR)仪(美国ThermoFisher仪器有限公司)。

1.3 骨髓间充质干细胞的分离和鉴定

取剩余10只大鼠,1%戊巴比妥钠(35 mg/kg)腹腔注射麻醉,75%乙醇全身浸泡消毒10 min,在无菌条件下分离股骨和胫骨,用添加青/链霉素的L-DMEM培养基冲出骨髓,然后制成单细胞悬液,1 000 r/min离心5 min后弃去上清液,重悬以 1×10^9 /L的细胞浓度接种于25 cm²培养瓶中,置37℃、CO₂饱和湿度培养箱中培养,每3天更换1次新鲜培养基,待细胞密度长至70%~80%融合时,用0.25%胰酶消化,1:2的比例进行传代培养,1% O₂浓度条件低氧培养。培养后采用倒置相差显微镜观察细胞形态变化及生长状况并拍照。采用流式细胞仪检测细胞表面标记(CD29、CD34、CD105、CD45)鉴定MSCs,具体步骤:收集培养后的细胞于1 000 r/min 4℃离心5 min,各管依次加入单克隆抗体CD29、CD34、CD105、CD45,避光冰上孵育45 min,用500 μ L PBS(含1%BSA)重悬细胞,流式细

胞仪进行检测分析。

1.4 膝关节炎大鼠模型构建

除 Control 组外,其余两组均采用木瓜蛋白酶关节腔注射建立 KOA 大鼠模型。用 0.9% NaCl 溶液配 4% (w/v) 木瓜蛋白酶溶液,用 1% 戊巴比妥钠 (35 mg/kg) 腹腔注射麻醉大鼠,然后双膝关节备皮、消毒、屈曲约 45°,从髌骨下缘前内侧的膝眼向髌间窝方向进针,明显有落空感后,针尖抵达股骨内侧髁再回撤 2 mm,并注射木瓜蛋白酶,分别向双侧膝关节腔注入 4% 木瓜蛋白酶 0.2 mL。每隔 3 d 注射 1 次,连续注射 3 次(即第 1 天、第 4 天、第 7 天注射)。注射后 1 周,观察各组大鼠膝关节外观,并在各组各取 1 只大鼠处死后,取关节软骨行组织病理切片,验证造模是否成功。

1.5 治疗方法

造模成功后第 2 天,Control 组和 KOA 组大鼠膝关节腔注射生理盐水 0.3 mL,每周 1 次,共 4 次;BMSCs 组大鼠膝关节腔内一次性注射骨髓间充质干细胞 0.3 mL (细胞浓度为 1×10^8 /L),同时每周 1 次膝关节腔内注射生理盐水 0.3 mL,共 4 次。治疗结束后,进行大鼠关节指数(AI)评分^[11]:0 为无肿胀或红斑、1 为轻度肿胀或红斑、2 为中度肿胀、3 为重度肿胀、4 为关节僵硬或畸形,评分之和作为最终的 AI 评分。然后处死大鼠,采集软骨和血清样本进行进一步分析。

1.6 指标检测

1.6.1 软骨组织病理学变化:分离膝关节软骨组

织,经 10% 多聚甲醛固定,将固定的软骨组织,经脱钙、水合、透明、石蜡包埋后切片,切片厚度 5 μ m,采用 HE 染色,梯度酒精脱水,中性树脂封固,镜检观察膝关节软骨组织病理学变化。

1.6.2 免疫组织化学染色:软骨组织切片进行 Col II、IL-6、MMP-3、MMP-13 免疫组织化学染色。将 5 μ m 厚的切片经 3% 甲醇双氧水室温 10 min, PBS 洗 3 次,后浸入 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液,加热至沸腾,冷却后,滴加山羊血清封闭液室温 20 min,滴加抗 Col II、IL-6、MMP-3、MMP-13 抗体在 4 °C 孵育过夜,滴加生物素化二抗 37 °C 30 min, DAB 显色,苏木素轻度复染、脱水、透明,中性树脂封片,镜检观察。

1.6.3 酶联免疫吸附(ELISA)法检测:ELISA 法检测血清 IL-6、TNF- α 、MMP-3、MMP-13 含量。根据 ELISA 试剂盒说明步骤严格操作。

1.6.4 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测:qRT-PCR 检测软骨组织 Col II、Col I、TNF- α 、IL-6、MMP-13、KDM6A、SOX9、Aggrecan 的基因表达。采用 RNA 提取试剂盒提取软骨组织总 RNA,将总 RNA 加入反转录反应体系(10 μ L),根据制造商说明书用特异性 RT 引物反转录为 cDNA。RT-qPCR 在 BioRad 实时 PCR 仪器上进行,以 GAPDH 为内参,引物序列如表 1 所示。qRT-PCR 反应条件:95 °C 初始变性 10 min,随后 95 °C 变性 10 s,60 °C 退火 10 s,72 °C 延伸 10 s,45 个循环,记录 CT 值,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 分析相对表达水平。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

| 引物 | 正向引物(5'-3') | 反向引物(5'-3') |
|---------------|----------------------------|----------------------------|
| Col II | CCTGTTGGTCTGCTGGCAAGAATGG | GCCTCTGCTACCTGTTCCGCTGTC |
| Col I | TGAGACTGGTCTGCTGCTGCTGCT | TGCCTCTGTACCTTGTTCGCCGTTT |
| TNF- α | GCCTCAGCCTCTTCTCCTTCTCCT | GGTTGTCTTCCAGCTTCACACCGTTG |
| IL-6 | CAGGAGGATACCCACAACAGACC | CGGAAGTCCAGAAGACCAGAGCAGAT |
| MMP-13 | TTTGGGCTGAAAGTACTGGGAAACC | AATGGCATGGTCCACATCTGCTCTTG |
| KDM6A | TATTGGCCCAGGTGACTGTGAA | CAGATCTCCAGGTCGCTGAATAAAC |
| SOX9 | GAAGATGACCGACGAGCAGGAGAAGG | GCTTGTCTTGTGGAGCCGTTGAC |
| Aggrecan | GGACTCCTGACACCACTGCGACATCT | TGCCAGAAGACTCTCCACTGCCACTT |
| GAPDH | GACTTATGACCACCGTCCAGCCATC | CGCCTGCCCTCACCCTCTTGTATCT |

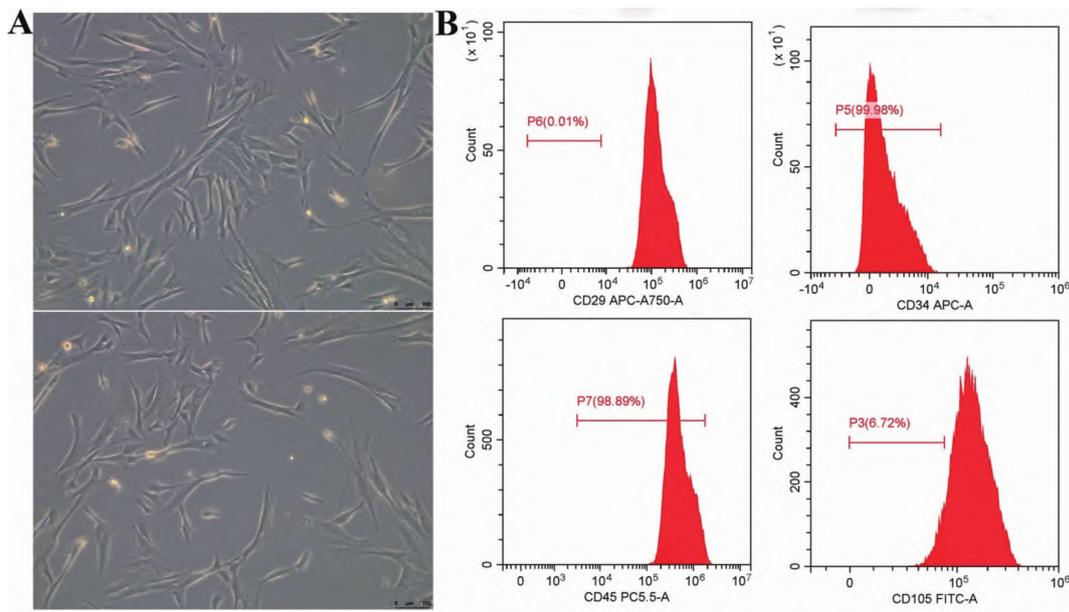
1.6.5 蛋白印迹法(Western blot)检测:取软骨组织, RIPA 裂解缓冲液提取总蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,样品煮沸变性后于 -20 °C 保存备用。使用等量蛋白质上样,经 10% SDS-PAGE 分离后,置于聚偏氟乙烯膜上,在 5% 脱脂牛奶中封闭

1 h 后,与 KDM6A、SOX9、Aggrecan 一抗结合,于 4 °C 孵育过夜,然后选择合适的二抗在室温孵育 1 h, ECL 暗室显色。以 β -actin 表达作为内参,用 Image-Pro Plus6.0 软件分析各条带的光密度值,并用样品光密度值与 β -actin 光密度值的比值进行分析。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件分析, 试验数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间数据比较采用 LSD- t 检验, 多组间数据比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果



注: A: 细胞形态学观察; B: CD29、CD34、CD105、CD45 流式分析结果。

图1 骨髓间充质干细胞形态学观察及细胞表面标志物的表达(100 \times)

Fig.1 Morphology and surface markers expression of bone marrow mesenchymal stem cells(100 \times)

2.2 软骨组织病理学

Control 组: 关节软骨结构完整, 表面被覆薄层透明软骨, 关节面光滑, 关节软骨分为表层、移行层、放射层和钙化层, 结构较为清晰, 潮线以上放射层以下为钙化层, 未见明显潮线, 软骨细胞分布均匀, 软骨内无血管和神经, 未见明显软骨缺损、软骨细胞坏死及纤维增生等病理改变。KOA 组: 关节软骨侵蚀, 见软骨面不平整, 表层缺失, 软骨基质着色变淡, 表面纤维组织增生, 并有炎性细胞浸润和新生毛细血管形成, 炎性细胞以淋巴细胞为主, 部分软骨局部形成裂隙, 软骨细胞成簇, 排列不规律, 软骨细胞坏死, 嗜酸性增强。BMSCs 组: 关节软骨损伤, 见软骨面不平整, 部分软骨基质着色变淡, 软骨细胞数量增多, 排列紊乱, 软骨细胞成簇, 部分软骨细胞变性坏死, 嗜酸性增强。(图2)。关节指数(AI)评分显示, 与 Control 比较, KOA 组 AI 评分明显增加, 与 KOA 组比较, BMSCs 组 AI 评分明显降低(图2)。

2.3 软骨表型和炎症

免疫组化结果显示, 与 Control 组比较, KOA 组

2.1 骨髓间充质干细胞的鉴定

细胞形态观察显示细胞排列紧密, 逐渐融合成片, 且细胞形态均一, 呈梭形生长, 生长旺盛(图1A)。流式细胞仪检测结果显示, 培养后的 BMSCs 均表达 CD29、CD34、CD105、CD45(图1B)。表明 BMSCs 具有较强的分裂增殖能力。

Col II 蛋白表达明显降低, IL-6、MMP-3、MMP-13 蛋白表达明显升高($P < 0.01$), 与 KOA 组比较, BMSCs 组 Col II 蛋白表达明显升高, IL-6 蛋白表达明显降低($P < 0.05$), MMP-3、MMP-13 蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$)(图3A~B)。qRT-PCR 检测结果显示, 与 Control 组比较, KOA 组 Col II、Col I mRNA 表达明显降低, TNF- α 、IL-6、MMP-13 mRNA 表达明显升高($P < 0.01$), 与 KOA 组比较, BMSCs 组 Col I mRNA 表达明显升高, IL-6 mRNA 表达明显降低($P < 0.05$), Col II、TNF- α 、MMP-13 mRNA 表达差异无统计学意义($P > 0.05$)(图3C)。ELISA 结果显示, 与 Control 组比较, KOA 组血清中 IL-6、TNF- α 、MMP-3、MMP-13 水平均明显升高($P < 0.01$), 与 KOA 组比较, BMSCs 组血清中 IL-6、TNF- α 、MMP-3、MMP-13 水平均明显降低($P < 0.05$)(图3D)。

2.4 KDM6A/SOX9 信号通路因子变化

qRT-PCR 和 Western blot 检测结果显示, 与 Control 组比较, KOA 组 KDM6A、Aggrecan、SOX9 mRNA 和蛋白表达均明显降低($P < 0.05$); 与 KOA

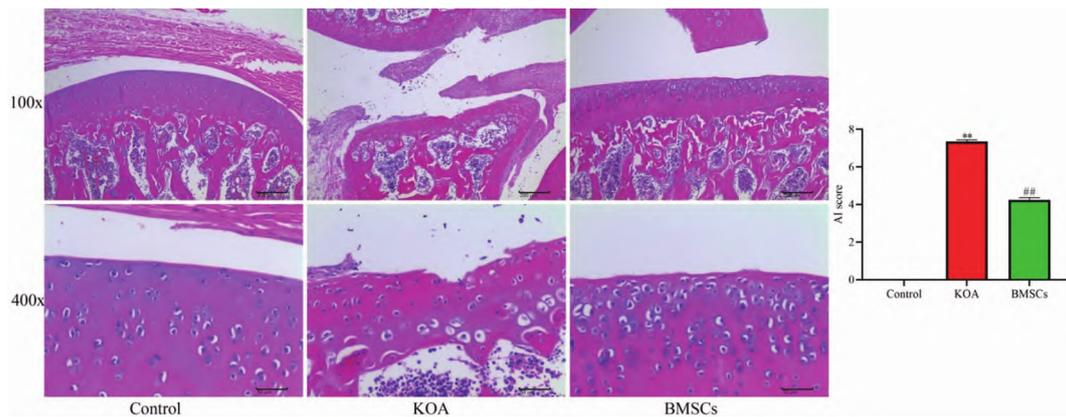


图2 各组大鼠软骨组织病理学(HE)

Fig.2 Chondrohistopathology of rats in each group (HE)

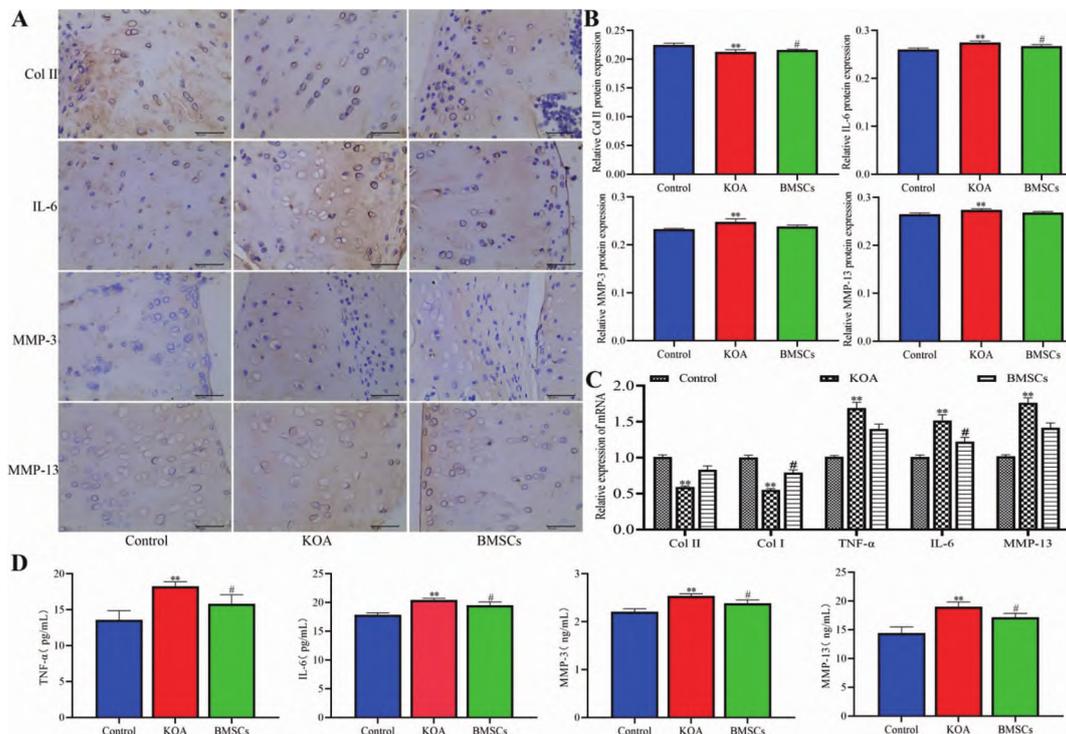
组比较 ,BMSCs 组 KDM6A、Aggrecan mRNA 明显升高($P < 0.05$) ,KDM6A、Aggrecan、SOX9 蛋白表达均明显升高($P < 0.05$) (图 4A~C)。

3 讨论

BMSCs 是公认的免疫调节剂 ,可以限制炎症反应 ,研究表明 BMSCs 可分化为软骨并表现出免疫抑制活性 ,可能为治疗骨性关节炎提供一种新的途径^[12]。然而 BMSCs 治疗骨性关节炎的具体机制尚

仍有待进一步研究。因此 本研究拟建立 KOA 动物模型 将 BMSCs 在缺氧条件下共培养 ,研究 BMSCs 预处理对 KOA 的治疗作用并初步探讨其机制。

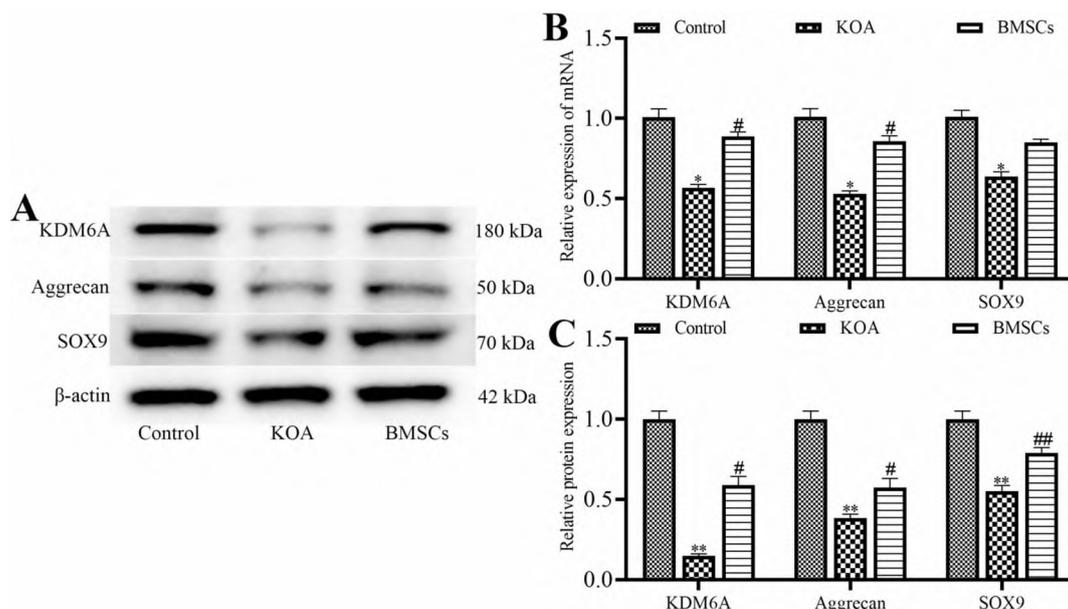
研究发现 ,体内移植缺氧预处理的 hBM-MSCs 可促进无菌小鼠软骨细胞的增殖并产生软骨样组织^[13]。含 1 % O_2 的精氨酸-天冬氨酸-海藻酸钠水凝胶中培养的细胞可促进成骨和血管生成反应 ,2 %的 O_2 可提高干细胞的增殖和成骨分化水平 ,提示低氧预处理是促进骨愈合的有效治疗方法^[14-15]。



注: A: 免疫组化染色结果; B: 免疫组化染色定量分析; C: qRT-PCR 检测各基因的相对表达; D: TNF- α 、IL-6、MMP-3、MMP-13 含量。与 Control 组比较 , * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图3 各组大鼠软骨表型和炎症结果

Fig.3 Cartilage phenotype and inflammation results of rats in each group



注: A: WB 检测各种蛋白的相对表达; B: qRT-PCR 检测各基因的相对表达; C: KDM6A、Aggrecan、SOX9 定量分析。与 Control 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 KOA 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 4 KDM6A/SOX9 信号通路相关因子变化

Fig.4 Changes of related factors in the KDM6a /SOX9 signaling pathway

本研究结果显示 BMSCs 低氧预处理可明显改善 KOA 软骨组织病理学变化,提示 BMSCs 对 KOA 软骨组织病变具有延缓作用。Lu 等^[16] 研究显示骨关节炎的特征是蛋白多糖丢失、软骨细胞数量减少、软骨不规则和纤维组织形成,而 BMSCs 来源的分化软骨细胞可显著增加软骨细胞外基质蛋白 Col II 的表达,减少软骨细胞凋亡和炎症反应。本研究结果显示 BMSCs 低氧预处理可明显升高软骨组织中 Col II 表达,本研究结果与其报道一致。研究显示炎症反应是骨性关节炎的重要病理基础,其抑制软骨基质的合成,抑制软骨细胞的增殖^[17]。尽管 BMSCs 在炎症性疾病中具有包括抗炎活性在内的有益作用,但 BMSCs 治疗骨性关节炎受到可能的促炎表型的限制^[18]。因此,在 BMSCs 用于骨性关节炎治疗之前,需要阻断这些细胞中的炎症信号。本研究结果显示 BMSCs 低氧预处理明显降低血清及软骨组织中 IL-6、MMP-3、MMP-13 的表达,提示 BMSCs 对 KOA 具有抗炎作用,表明 BMSCs 可降低 KOA 炎症反应,减缓了疾病的进展。

低氧条件下 KDM6A 的表达明显增加,这也增加了离子通道蛋白钠钙交换体(NCX)的表达^[19]。KDM6A 作为组蛋白去甲基化酶的一种,可以通过抑制组蛋白 H3 赖氨酸 27(H3K27)的转录,调节包括细胞增殖、肿瘤发生和胚胎发育在内的各种生物学过程^[20]。KDM6A 的激活还可使 SOX9 启动子去甲

基化进而促进干细胞分化^[10]。SOX9 是一种软骨性转录因子,主要在间充质软骨的形成过程中表达,并对 Aggrecan 和 Col2a1 的转录起重要作用^[21]。研究报告 SOX9 在骨关节炎患者发病过程中的表达水平呈显著降低^[22]。此外,低氧可增加参与软骨形成的 SOX9 的表达水平^[23]。本研究结果显示, BMSCs 低氧预处理可明显增加 KOA 大鼠 KDM6A、Aggrecan、SOX9 的表达。KDM6 家族成员,如 KDM6B/JMJD3 和 KDM6A/UTX 可作为基于 MSC 的干预新靶点, KDM6A 通过间接或直接作用影响 SOX9 的转录,从而调控 BMSCs 的软骨形成^[24]。表明 BMSCs 低氧预处理可调控 KDM6A/SOX9 信号通路,在关节软骨的维持中发挥重要作用。

综上所述,本研究结果提示 BMSCs 低氧预处理通过激活 KDM6A/SOX9 信号通路来减缓膝关节骨性关节炎的进展,进一步完善低氧预处理 BMSCs 的研究可能会促进 BMSCs 在骨性关节炎潜在的临床应用。

【参 考 文 献】

- [1] 陈荣国,代凤雷,欧先锋,等.血清和关节液中钙结合蛋白(S100A12)的水平与膝关节骨关节炎严重程度的相关性分析[J].中国骨质疏松杂志,2016,22(8):985-988.
- [2] Barnett R. Osteoarthritis [J]. Lancet, 2018, 391(10134):1985.
- [3] Abramoff B, Caldera FE. Osteoarthritis: pathology, diagnosis,

- and treatment options [J]. *Med Clin North Am*, 2020, 104(2): 293-311.
- [4] Li N, Hua J. Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(13): 2345-2360.
- [5] Fu X, Liu G, Halim A, et al. Mesenchymal stem cell migration and tissue repair [J]. *Cells*, 2019, 8(8): 784.
- [6] Furuta T, Miyaki S, Ishitobi H, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote fracture healing in a mouse model [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2016, 5(12): 1620-1630.
- [7] Watanabe Y, Tsuchiya A, Seino S, et al. Mesenchymal stem cells and induced bone marrow-derived macrophages synergistically improve liver fibrosis in mice [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2019, 8(3): 271-284.
- [8] Cho DI, Kim MR, Jeong HY, et al. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages [J]. *Exp Mol Med*, 2014, 46(1): e70.
- [9] Xing J, Ying Y, Mao C, et al. Hypoxia induces senescence of bone marrow mesenchymal stem cells via altered gut microbiota [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2020.
- [10] Wang P, Li Y, Meng T, et al. KDM6A promotes chondrogenic differentiation of periodontal ligament stem cells by demethylation of SOX9 [J]. *Cell Prolif*, 2018, 51(3): e12413.
- [11] 马俊福, 孟庆良, 郑福增, 等. 雷公藤内酯醇对胶原诱导性关节炎大鼠 γ -干扰素和白细胞介素-17A 表达的影响 [J]. *北京中医药大学学报*, 2020, 43(7): 592-598.
- [12] Song Y, Du H, Dai C, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells for osteoarthritis: a pilot study with long-term follow-up and repeated injections [J]. *Regen Med*, 2018, 13(3): 295-307.
- [13] Duval E, Baugé C, Andriamanalijaona R, et al. Molecular mechanism of hypoxia-induced chondrogenesis and its application in in vivo cartilage tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(26): 6042-6051.
- [14] Ho SS, Hung BP, Heyrani N, et al. Hypoxic preconditioning of mesenchymal stem cells with subsequent spheroid formation accelerates repair of segmental bone defects [J]. *Stem Cells*, 2018, 36(9): 1393-1403.
- [15] Ciapetti G, Granchi D, Fotia C, et al. Effects of hypoxia on osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells used as a cell therapy for avascular necrosis of the femoral head [J]. *Cytotherapy*, 2016, 18(9): 1087-1099.
- [16] Lu Z, Liu Q, Liu L, et al. A novel synthesized sulfonamido-based gallate-JEZTC blocks cartilage degradation on rabbit model of osteoarthritis: An in vitro and in vivo study [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(6): 2304-2319.
- [17] Mateen S, Zafar A, Moin S, et al. Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Clin Chim Acta*, 2016, 455: 161-171.
- [18] Burke J, Hunter M, Kolhe R, et al. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell based therapy for osteoarthritis [J]. *Clin Transl Med*, 2016, 5(1): 27.
- [19] Li Y, Quan X, Li X, et al. Kdm6A protects against hypoxia-induced cardiomyocyte apoptosis via H3K27me3 demethylation of Ncx gene [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2019, 12(5): 488-495.
- [20] Andricovich J, Perkal S, Kai Y, et al. Loss of KDM6A activates super-enhancers to induce gender-specific squamous-like pancreatic cancer and confers sensitivity to BET inhibitors [J]. *Cancer Cell*, 2018, 33(3): 512-526.
- [21] Ouyang Y, Wang W, Tu B, et al. Overexpression of SOX9 alleviates the progression of human osteoarthritis in vitro and in vivo [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 2833-2842.
- [22] Song H, Park KH. Regulation and function of SOX9 during cartilage development and regeneration [J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 67(Pt 1): 12-23.
- [23] Zhang FJ, Luo W, Lei GH. Role of HIF-1 α and HIF-2 α in osteoarthritis [J]. *Joint Bone Spine*, 2015, 82(3): 144-147.
- [24] Lefebvre V, Dvir-Ginzberg M. SOX9 and the many facets of its regulation in the chondrocyte lineage [J]. *Connect Tissue Res*, 2017, 58(1): 2-14.
- (收稿日期: 2021-05-18; 修回日期: 2021-06-01)

(上接第 485 页)

- [13] 曾汝君, 马亚仙, 张郡, 等. α -MEM 培养基和高糖 DMEM 培养基对 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化的影响 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2018, 24(6): 745-749.
- [14] 王礼宁, 马勇, 郑苏阳, 等. 蛇床子素对 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化的影响及其机制 [J]. *北京中医药大学学报*, 2018, 41(11): 950-958.
- [15] 许丹, 律颖, 朱小语, 等. 小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 (RAW264.7) 的培养及其在诱导破骨细胞中的应用 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2016, 22(10): 1355-1360.
- [16] Magnusson C, Uribe P, Jugdaohsingh R, et al. Inhibitory effects of orthosilicic acid on osteoclastogenesis in RANKL-stimulated RAW264.7 cells [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2021, 109(10): 1967-1978.
- [17] Kodama J, Chen H, Zhou T, et al. Antibacterial efficacy of quaternized chitosan coating on 3D printed titanium cage in rat intervertebral disc space [J]. *Spine J*, 2021, 21(7): 1217-1228.
- [18] McDonald MM, Khoo WH, Ng PY, et al. Osteoclasts recycle via osteomorphs during RANKL-stimulated bone resorption [J]. *Cell*, 2021, 184(5): 1330-1347.
- [19] Paolino M, Kogalgruber R, Cronin S, et al. RANK links thymic regulatory T cells to fetal loss and gestational diabetes in pregnancy [J]. *Nature*, 2021, 589(7842): 442-447.
- [20] Yamashita J, Sawa N, Sawa Y, et al. Effect of bisphosphonates on healing of tooth extraction wounds in infectious osteomyelitis of the jaw [J]. *Bone*, 2021, 143: 115611.
- [21] 俞素静, 童培建, 吴承亮, 等. 破骨细胞形成过程中的融合与分裂 [J]. *中华骨科杂志*, 2013, 33(1): 82-88.
- (收稿日期: 2021-04-29; 修回日期: 2021-06-03)