

# 髋关节正常软骨与骨性关节炎软骨相关因子表达的对照研究

刘启明<sup>1</sup> 胡炯<sup>2△</sup> 王伟东<sup>2</sup> 王昌兴<sup>2</sup> 董黎强<sup>2</sup>

**[摘要]** **目的:** 对人髋关节正常关节软骨和骨性关节炎关节软骨进行对比研究,对骨性关节炎生物学特性及炎症因子变化进行比较和评价。**方法:** 选取股骨颈骨折排除关节炎的病例及骨性关节炎病例各 22 例,分为 2 组,正常关节软骨组及骨性关节炎软骨组。1) 大体及组织染色的方法(甲苯胺蓝和 Masson 染色)观察骨性关节炎组及正常软骨组的组织形态、糖胺多糖及胶原蛋白含量。2) Western blot 检测两组关节软骨中 Collagen II, Aggrecan, MMP-13, Caspase3 和 Cleaved caspase3 蛋白表达量。3) ELISA 法检测两组关节液中 TNF- $\alpha$  的表达水平。**结果:** 1) 两组组织染色分别显示蛋白多糖和胶原纤维含量: 骨性关节炎组比正常关节软骨组均明显减少。2) Western blot 检测显示 MMP-13, Caspase3 和 Cleaved caspase3 各蛋白含量在骨性关节炎组中明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。3) Western blot 检测显示 II 型胶原和蛋白多糖蛋白表达量在骨性关节炎组中明显下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。4) ELISA 法检测提示骨性关节炎组关节液中 TNF- $\alpha$  的表达水平较正常组明显上升,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论:** 骨性关节炎的病理过程是多种炎症因子调节下引起关节软骨细胞的凋亡,进而引起的软骨基质成分合成-分解代谢的平衡破坏的过程。

**[关键词]** 骨关节炎; 关节软骨; 炎症因子; 细胞凋亡

**[中图分类号]** R684 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2018)06-0017-06

## Comparative Study of the Expression of Cartilage Related Factors in the Normal Cartilage and Osteoarthritis in the Hip Joint

LIU Qiming<sup>1</sup> HU Jiong<sup>2△</sup> WANG Weidong<sup>2</sup> WANG Changxing<sup>2</sup> DONG Liqiang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fuyang Orthopedics and Traumatology Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 311400, China;

<sup>2</sup>Second Affiliated Hospital of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310005, China.

**Abstract Objective:** To compare and evaluate the biological characteristics and inflammatory factors of human normal cartilage and osteoarthritis. **Methods:** Toluidine blue and Masson staining were observed of glycosaminoglycan and collagen content, from the protein level detection of two groups of Collagen II, aggrecan, MMP-13, caspase 3 and cleaved caspase3 protein level and ELISA method to detect the expression level of TNF- $\alpha$  in synovial fluid. **Results:** 1) Masson staining and toluidine blue staining showed that O proteoglycan and collagen fiber content in osteoarthritic cartilage was weaker. 2) Western blot showed that the levels of MMP-13, caspase 3 and cleaved caspase 3 protein increased significantly in articular cartilage of osteoarthritis ( $P < 0.05$ ). 3) Western blot showed that the expression of type II collagen and proteoglycan in joint cartilage of osteoarthritis was less than that in normal cartilage ( $P < 0.05$ ). 4) ELISA showed that the expression level of TNF- $\alpha$  in bone joint fluid was increased significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** We believe that the pathological process of osteoarthritis is caused by the apoptosis of articular chondrocytes under the regulation of a variety of inflammatory factors, and then leads to the process of balance and destruction of the synthesis and catabolism of cartilage matrix components.

**Keywords:** osteoarthritis; articular cartilage; inflammatory factors; apoptosis

基金项目: 浙江省医药卫生科技项目(2016KYA153)

<sup>1</sup> 杭州市富阳中医骨伤医院(杭州, 311400)

<sup>2</sup> 浙江中医药大学附属第二医院

<sup>△</sup>通信作者 E-mail: yisheng198386912@163.com

骨性关节炎(Osteoarthritis, OA)是一种随年龄增长临床发病率明显增加的退行性关节疾病<sup>[1]</sup>,好发于下肢负重关节,如髋关节、膝关节,骨性关节炎引起膝关节残疾的概率在男性为 40%,女性为 47%,在肥胖人群这种比例会更高<sup>[2,3]</sup>。随着我国人口老龄化加剧

和生活节奏的加快,近几年骨性关节的发病率明显增加并且趋向年轻化,如何有效预防和治疗骨性关节炎越来越受到国内外研究者的关注。

本研究根据髌关节骨性关节炎的主要病理变化关节软骨的退变为依据,对照观察及检测正常软骨与骨性关节炎软骨,对比研究髌关节骨性关节炎的病理变化,蛋白水平研究相关炎症因子及凋亡因子表达以及关节液中肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )水平表达,为阐明骨性关节炎的发病机理及临床有效治疗提供新的依据。

## 1 研究对象与方法

### 1.1 研究对象

患者均来自浙江中医药大学附属第二医院骨科关节病区 2015 年 7 月至 2017 年 7 月,因股骨颈骨折和髌关节骨性关节炎而行关节置换的患者,总共 44 例。

### 1.2 实验分组

1)正常组:股骨颈骨折患者,关节置换手术中取自股骨头负重区域关节软骨;抽取关节腔内关节液 5 mL。

2)骨性关节炎组:骨关节炎全髌关节置换患者,关节置换手术中取自股骨头负重区域关节软骨;抽取关节腔内关节液 5 mL。

上述材料标本均经过浙江中医药大学附属第二医院医学伦理委员会审核同意,同时告知患者获得患者同意,并且均与患者签署知情同意书。

### 1.3 诊断标准

依据 1986 年美国风湿病学会骨性关节炎诊断标准:1)前个月大多数日子疼痛;2)关节活动时骨响声;3)晨僵小于 30 min;4)年龄 $\geq 38$ 岁;5)检查示骨性肥大。骨关节炎存在:具备 1),2),3),4),或 1),2),5)或 1),4),5)项。

### 1.4 纳入标准

1.4.1 骨性关节炎组关节软骨纳入标准 1)符合骨性关节炎诊断标准;2)临床及 X 线检查确诊为髌关节骨性关节炎;3)Kellgren-Lawrence(K-L)分级 II 级及以上;4)患者保守治疗失败需行关节置换手术治疗。

1.4.2 正常组关节软骨纳入标准 1)因外伤致股骨颈骨折;2)无糖尿病等其他内科疾病;3)影像学诊断排除存在骨性关节炎及类风湿性关节炎疾病,确保属于正常关节软骨;4)受伤 1 周内行全髌或半髌关节置换术的患者。

### 1.5 排除标准

1)同时患有其他关节类疾病:如类风湿性关节炎、关节结核、化脓性关节炎、骨肿瘤等;2)年龄大于 70 岁以上者;3)合并心脑血管、肝、肾、造血系统等严重原发疾病或精神病;4)有髌关节创伤史或手术史。

### 1.6 试剂及仪器

1.6.1 主要试剂 Masson 三色染色液(北京雷根生物技术有限公司,DC0032),甲苯胺蓝(武汉塞维尔生物有限公司,G1023),BCA 蛋白定量试剂盒(碧云天

公司,P0010),Anti-MMP-13 antibody, Anti-collagen II antibody 和 Anti-Aggregan antibody(均来自 Affinity 公司),GAPDH(Bioworld 公司,AP0063)。

1.6.2 主要仪器 倒置显微镜(OLYMPUS 公司),凝胶成像仪(Bio-RAD 公司),酶标仪(Molecular Devices 公司),pH 计(Metter-Toledo GmbH 公司),电泳仪电源和小型垂直电泳槽(均来自北京六一仪器厂),Western 电泳及湿转转移槽、Western 发光照相系统(Bio-Rad 公司),细胞培养超净工作台(苏州净化仪器设备厂)CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(Forma 公司)。

### 1.7 研究方法及检测指标

1.7.1 大体及组织学染色观察软骨标本的组织学形态变化 1)大体观察:关节置换术中打开关节腔,观察关节囊、滑膜、关节积液、关节间隙及是否存骨赘增生等情况。观察股骨头关节软骨的情况。

2)染色观察:将各组关节软骨标本常规方法制作石蜡切片。(1)Masson 染色:常规方法处理染色,Weigert 苏木精液染核 $\rightarrow$ 丽春红品红染色液染 $\rightarrow$ 苯胺蓝染色液染,以 0.2%冰醋酸水溶液浸洗片刻;95%酒精、无水酒精、二甲苯透明、中性树胶封固。(2)甲苯胺蓝染色:烤片脱蜡、水化、甲苯胺蓝染色、水洗脱水、中性树胶封皮。光学显微镜下观察各组软骨组织的组织结构变化。

1.7.2 Western blot 检测关节软骨组织中 Collagen II, Aggrecan, MMP-13, Caspase3 和 Cleaved caspase3 蛋白的表达 提取各组软骨组织的总蛋白。按照蛋白质印迹法标准化流程:组织蛋白提取 $\rightarrow$ BCA 法蛋白浓度的测定 $\rightarrow$ 蛋白变性 $\rightarrow$ 电泳胶的制备 $\rightarrow$ 电泳分离 $\rightarrow$ 免疫印迹显色,ECL 显色系统;5%脱脂奶粉封闭;一抗 p-JAK2, p-STAT3, MMP-13, Bax, Bcl2 稀释比例均为 1:1 000,抗孵育液中 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;TBST 洗膜 3 次,10 min/次;加入 1:5 000 对应的二抗孵育条带 2 h,室温反应 2 h;TBST 洗膜 3 次,10 min/次;ECL 液进行曝光显影,Bio-RAD 照相系统拍照。以 GAPDH 蛋白作为内参,用目标条带与内参条带的积分吸光度值的比值百分率表示各检测相关蛋白的表达水平。

1.7.3 ELISA 检测关节液中 TNF- $\alpha$  表达水平 各组取样时均留取关节液检测,加一定稀释的关节液样品 0.1 mL 于已包被之反应孔中,常规 ELISA 检查程序进行,加 TNF- $\alpha$  酶标抗体检测,用酶标仪测定每孔在 450 nm 处的 OD 值。如果波长校正不恰当则用 450 nm 处的读数减去 540 或 570 nm 处的读数,这将纠正光学误差。

### 1.8 统计学方法

蛋白及关节液表达量以中位数和百分位数表示,用 SPSS20.0 软件包进行统计分析,蛋白及关节液表达量不符合正态分布,因此两组之间两两比较用 Mann - Whitney U 检验。 $P < 0.05$  差异有统计学意义。

2 结果

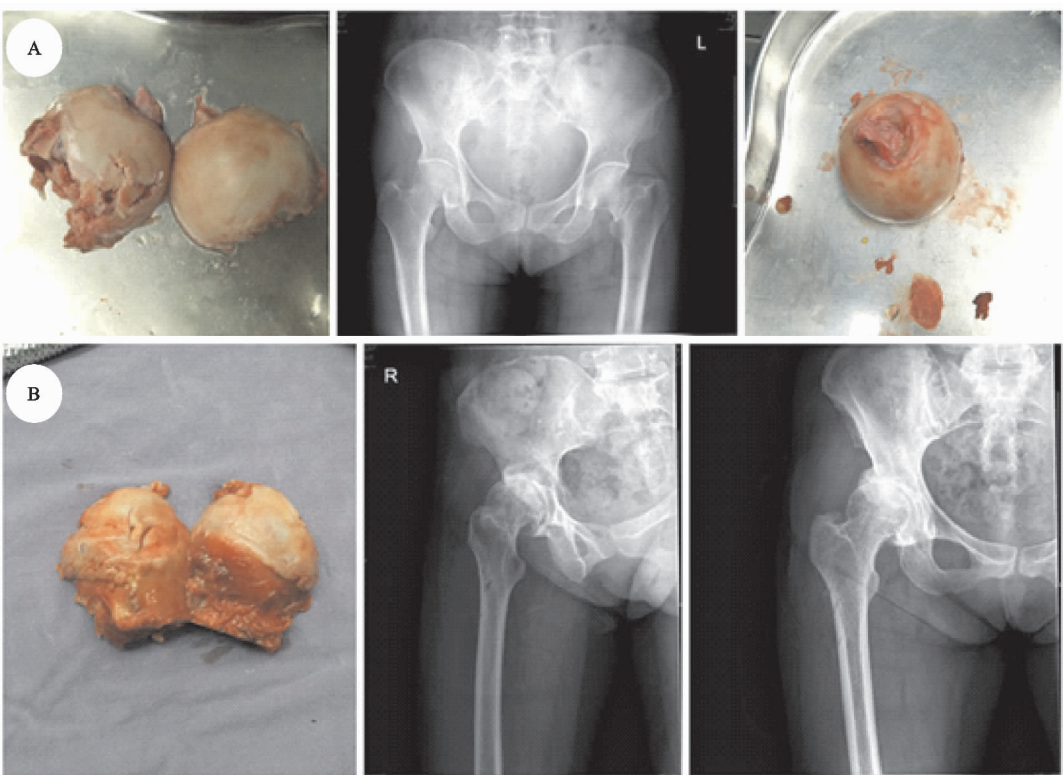
2.1 一般资料

股骨颈骨折 22 例(男性 10 例,女性 12 例),年龄 42~70 岁,平均 61.2 岁。骨性关节炎病人 22 例(男性 9 例,女性 13 例),年龄 51~76 岁,平均 65.7 岁。

2.2 两组大体观察髋关节情况

正常组髋关节关节间隙正常;关节解剖结构正常无明显黏连,无明显骨赘增生,滑膜无明显增生肥厚,

关节液淡黄色,透明;关节软骨表面均匀,质地属于透明软骨,有弹性。骨性关节炎组髋关节关节间隙狭窄明显,关节囊异常增厚,与周围软组织黏连明显,关节囊内滑膜增生充血明显,关节积液浑浊,关节骨赘增生,有些存在关节内游离体,关节表面软骨破坏变性明显、软骨部分脱落,负重区软骨缺损明显,部分区域纤维软骨增生填充。典型病例如图 1 所示。



A 患者,男,62岁,股骨颈骨折,患者自述平时无髋部疼痛不适,患者X线显示关节间隙正常,无明显关节退变。股骨头标本示关节表面光滑,质地有弹性,透明软骨,属于正常关节软骨。  
B 患者,女,63岁,骨性关节炎,主诉:无明显外伤致右髋部疼痛活动受限3年,X线显示患者关节间隙狭窄明显,骨赘,骨质异常硬化,股骨头标本显示股骨头变性增生,滑膜充血肥厚,关节软骨变性纤维化明显,部分区域关节缺损

图 1 典型病例

2.3 两组人关节软骨组织中胶原纤维含量的比较

各种软骨组织 Masson 染色结果。由图 2 可知,正常组的软骨组织的胶原纤维排列紧密,染色呈蓝色;

骨性关节炎组的关节软骨胶原纤维排列紊乱,局部断裂降解,软骨退变。结果表明:与正常组相比,骨关节炎组的关节软骨组织中的胶原纤维含量降低。

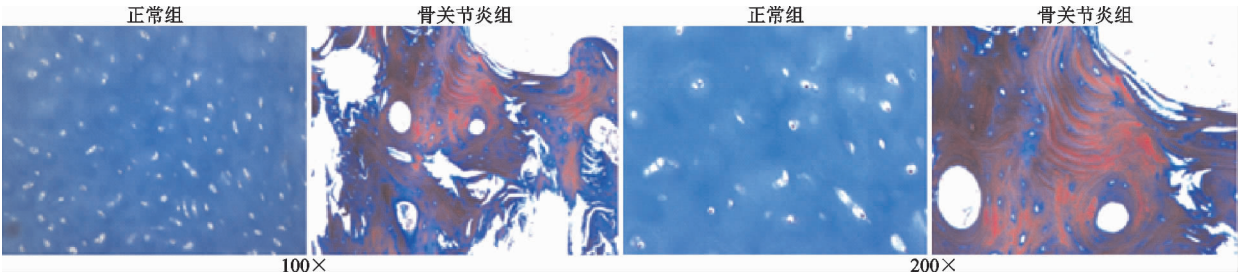


图 2 各组人关节软骨组织 Masson 染色结果(100×和 200×)

2.4 两组人关节软骨组织中酸性糖胺多糖含量的比较

甲苯胺蓝染色结果。甲苯胺蓝是一种碱性染料,组织中酸性酸性糖胺多糖与甲苯胺蓝形成复合物结合显蓝紫色。由图 3 可知,正常组的关节软骨中存在大

量酸性糖胺多糖,呈异染性骨性关节炎组的关节软骨中酸性糖胺多糖的含量降低,一些部位甚至大面积失染。结果表明:与正常组相比,骨性关节炎组关节软骨中的酸性糖胺多糖含量降低。

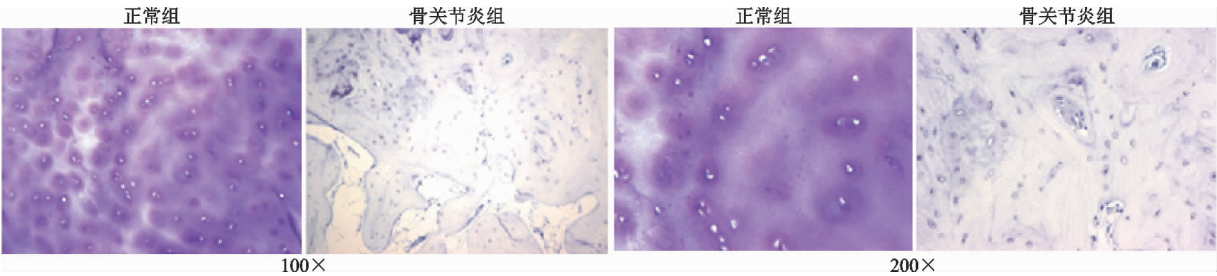
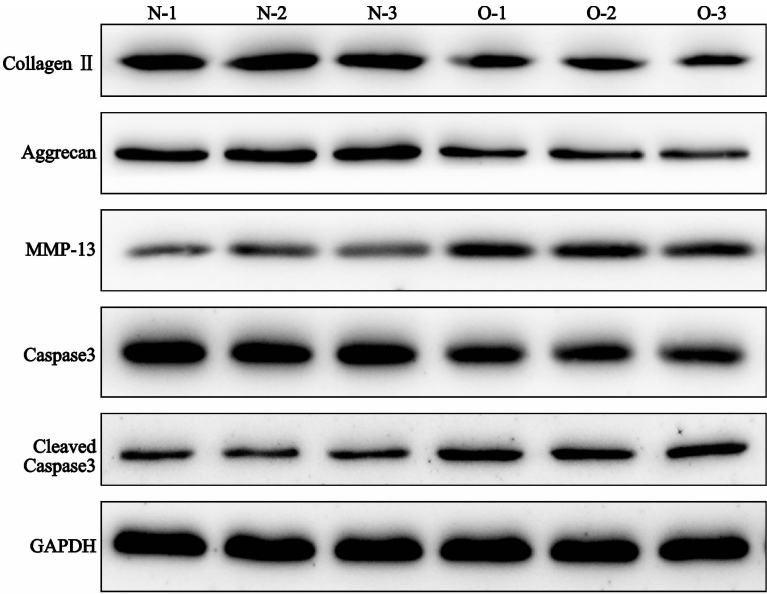


图3 各组人关节软骨组织甲苯胺蓝染色结果(100×和 200×)

2.5 Western blot 检测各组 Collagen II ,Aggrecan, MMP-13,Caspase3 和 Cleaved caspase3 蛋白表达

两组人关节软骨组织中 Collagen II ,Aggrecan, MMP-13,Caspase3 和 Cleaved caspase3 蛋白表达水

平的比较见图 4-5. 数据提示:与正常组相比,骨性关节炎组关节软骨中的 Collagen II 和 Aggrecan 蛋白表达显著降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),而 MMP-13 和 Cleaved caspase3 蛋白表达显著升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 4-5 和表 1.



N-1, N-2和N-3: 为3例股骨颈骨折患者的关节软骨; O-1, O-2和O-3为3例骨关节炎患者废弃的关节软骨

图4 各组 Collagen II ,Aggrecan,MMP-13,Caspase3 和 Cleaved caspase3 的表达水平

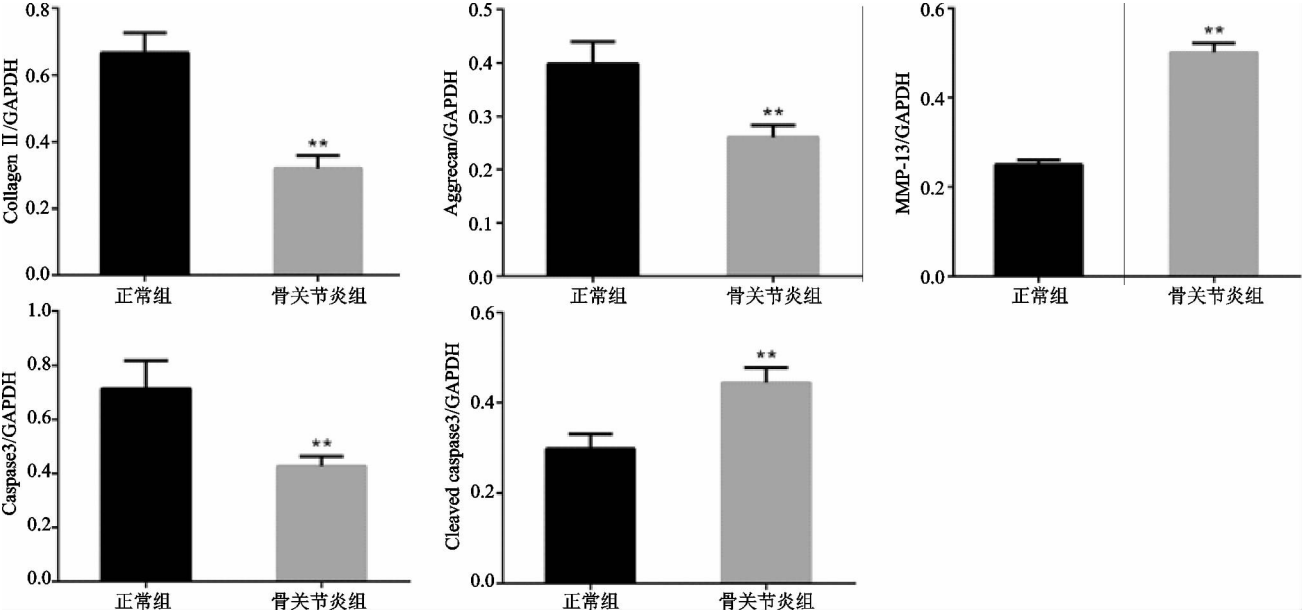


图5 Collagen II ,Aggrecan,MMP-13,Caspase3 和 Cleaved caspase3 的相对表达情况 (\* \*  $P<0.05$ )



表 1 两组关节软骨中各相关蛋白的相对表达量比较

蛋白种类	正常组相关蛋白相对表达量	骨性关节炎组相关蛋白相对表达量
Ⅱ型胶原	0.66(0.59~0.78)	0.37(0.24~0.41) <sup>1)</sup>
蛋白聚糖	0.41(0.34~0.49)	0.28(0.19~0.34) <sup>2)</sup>
基质金属蛋白 13	0.25(0.18~0.33)	0.52(0.47~0.64) <sup>3)</sup>
半胱氨酸天冬氨酸蛋白 3	0.75(0.68~0.84)	0.46(0.33~0.59) <sup>4)</sup>
活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白 3	0.32(0.24~0.45)	0.49(0.36~0.60) <sup>5)</sup>

注:1)两组对照  $Z=-5.24, P=0.016$ ;2)两组对照  $Z=-4.99, P=0.022$ ;3)两组对照  $Z=-5.42, P=0.014$ ;4)两组对照  $Z=-5.06, P=0.017$ ;5)两组对照  $Z=-3.49, P=0.031$ .

2.6 两组人关节液中 TNF-α 表达水平的比较

ELISA 法检测各组关节液 TNF-α 的表达水平。从图 6 可知,与正常组相比,骨性关节炎组的 TNF-α 水平显著上调,差异有统计学意义( $Z=-11.41, P=0.000<0.01$ )。结果表明,骨性关节炎组关节液中的 TNF-α 水平明显高于正常组关节液。

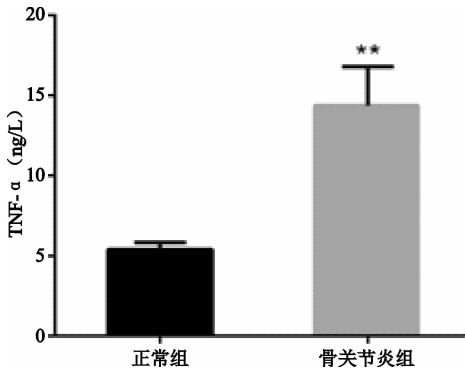


图 6 ELISA 法检测各组关节液中 TNF-α 的表达水平 (\* \*  $P<0.01$ )

3 讨论

本研究通过组织染色及蛋白测定发现髋关节骨性关节炎关节软骨中胶原纤维和蛋白聚糖含量较正常软骨明显减少。蛋白聚糖是一种由核心蛋白和氨基聚糖合成的化合物,而软骨聚集蛋白聚糖(Aggregan)是软骨内主要的蛋白聚糖分子形式,它的主要作用是使关节软骨具有抵抗压力和分散负荷的能力<sup>[4-6]</sup>。胶原是关节软骨的主要成分和张力的决定性因素,关节软骨中含有不同类型的胶原,但是Ⅱ型胶原是构成软骨的主要成分,关节软骨湿重的 30%是胶原,胶原中约 90%是Ⅱ型<sup>[7]</sup>。本次研究表明:骨性关节炎关节软骨这两种成分的表达量均明显不如正常关节软骨,也可以看出关节软骨的变化在骨性关节炎的病理过程中有很重要的作用,具有很大的研究价值。

本研究通过对关节软骨各相关因子的蛋白测定及关节液 ELISA 检测发现骨性关节炎关节软骨中炎症因子及细胞凋亡因子的表达水平较正常关节软骨显著增高。近年研究表明,在骨性关节炎的发展过程中,免疫异常和炎症反应是其发展的重要因素<sup>[8]</sup>。巨噬细胞、中性粒细胞以及其释放的细胞因子<sup>[9-11]</sup>等众多炎症因子及炎症过程参与骨性关节炎的发生和发展过程中,使得关节软骨细胞凋亡、软骨基质降解、促进滑

膜炎症和软骨下骨的吸收等<sup>[12,13]</sup>。研究表明,白介素 1β<sup>[14]</sup>、肿瘤坏死因子 a(TNF-a)<sup>[15]</sup>等炎症因子及 CXC 类趋化因子在骨性关节炎中起重要的作用。基质金属蛋白酶被认为可以降解几乎所有的软骨细胞外基质,因而在骨性关节炎的病理过程中起到非常重要的作用。MMP-13 对Ⅱ型胶原有最活跃的降解能力,并且可以将胶原分解代谢产物进一步降解为适合下一步代谢的分子成分,其对Ⅱ型胶原的降解作用是 MMP-1 的 5~10 倍。IL-1β 可刺激软骨细胞基质金属蛋白酶(MMP)9 和 13 的表达增加<sup>[16,17]</sup>,减弱腺苷酸活化激酶的活力,导致关节软骨的降解代谢远大于合成代谢,出现软骨的微小缺损,进而诱发关节的力学平衡,进一步加重关节软骨的损伤。本实验发现骨性关节炎关节软骨 MMP-13 的蛋白表达水平较正常软骨显著增高,这也证实骨性关节炎关节软骨明显破坏的原因。

本研究对髋关节关节液中 TNF-α 的含量的测量发现,骨性关节炎组较正常组的关节液中 TNF-α 含量显著升高,其与骨性关节炎发病是有密切相关性的。各致病因素导致关节软骨受到破坏,关节囊滑膜分泌的关节液中含有大量碎片,同时碎片又刺激滑膜引起炎症反应,大量炎症因子的释放又进一步降解关节软骨,周而复始,形成恶性循环。TNF-α 的升高,可以诱导产生干扰素 γ(IFN-γ),干扰素则能够在关节液中显著刺激白介素-6(IL-6)、一氧化氮(NO)、前列腺素 E2(PGE2),这些炎症因子又进一步加重骨性关节炎的发生<sup>[18]</sup>。有研究表明软骨细胞可产生 TNF-α,其是软骨基质降解的重要介质,并且在滑膜炎中也起到重要作用,TNF-α 可上调蛋白水解活性受体 2 的 RNA 的表达,引起基质的破坏,能抑制软骨细胞线粒体的活性,抑制基质的修复<sup>[19]</sup>。通过本次研究认为 TNF-α 可以增强基质金属蛋白酶(MMP)的活性,并阻碍关节软骨合成蛋白聚糖和胶原,最后抑制软骨细胞的正常代谢,加快软骨细胞的凋亡,使关节软骨正常结构破坏,从而参与骨性关节炎的发生发展。

文献报道认为在骨性关节炎关节软骨的病理退变中,关节软骨细胞的凋亡多发生在浅层和深层,本研究发现在同样的位置有较高的 Cleaved caspase3 表达,与骨性关节炎的软骨破坏的严重程度呈正相关。

Cleaved Caspase3 在细胞凋亡的发展过程中起到重要的作用<sup>[20]</sup>。国外研究发现:骨性关节炎中关节软骨细胞凋亡率和 Cleaved Caspase-3 的表达较正常软骨细胞两者都明显升高,而且与骨性关节炎严重程度呈正相关。同时利用选择性 Cleaved Caspases-3 抑制剂能阻碍关节软骨细胞的凋亡,并且能降低体外诱导的骨关节炎的发病率。因此笔者认为:关节软骨细胞的凋亡进一步加剧关节软骨基质成分分泌的减少,加剧关节软骨的破坏,最终加重骨性关节炎病情的发展。

综上所述,笔者认为骨性关节炎是以关节软骨破坏为主要病理表现,同时伴有不同程度的滑膜炎症反应的退行性疾病。尽管骨性关节炎确定的发病机制尚未清楚,但是本研究认为骨性关节炎的病理过程是多种炎症因子调节下引起关节软骨细胞的凋亡,进而引起的关节软骨基质成分正常生理代谢的平衡破坏的过程。本研究骨性关节炎组标本均属于晚期骨性关节炎标本,对早期骨性关节炎的病理变化无法准确表达。对于骨性关节炎与各炎症信号通路及各控制细胞凋亡的信号的关系需进一步的研究。

## 参考文献

- [1] Kraus Vb, Kilfoil Tm, Hash Tw, et al. Atlas of radiographic features of osteoarthritis of the ankle and knee [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2015, 23(12): 2059-2085.
- [2] Allen KD, Golightly YM. Epidemiology of osteoarthritis: state of the evidence[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2015, 27(3): 273-283.
- [3] Chan K, Lin KD, Vlad SC, et al. Prevalence of Radiographic and Symptomatic Hip Osteoarthritis in an Urban United States Community: The Framingham Osteoarthritis Study[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2014, 66(11): 3013-3017.
- [4] 杨文芳, 周惠琼. 蛋白聚糖异常代谢在关节炎损伤机制中的作用[J]. *中国骨与关节杂志*, 2015, 4(1): 49-53.
- [5] Li Y, Zhang Y, Chen C, et al. Establishment of a rabbit model to study the influence of advanced glycation end products accumulation on osteoarthritis and the protective effect of pioglitazone[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, 24(2): 307-314.
- [6] Kim JH, Lee G, Won Y, et al. Matrix cross-linking-mediated mechanotransduction promotes posttraumatic osteoarthritis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(30): 9424-9429.
- [7] Smith Rl, Lin J, Trindade MC, et al. Time-dependent effects of intermittent hydrostatic pressure on articular chondrocyte type II collagen and aggrecan mRNA expression[J]. *J Rehabil Res Dev*, 2000, 37(3): 153-163.
- [8] Zhang FJ, Luo W, Lei GH. Role of HIF-1 $\alpha$  and HIF-

- 2 $\alpha$  in osteoarthritis [J]. *Joint Bone Spine*, 2015, 82(3): 144-147.
- [9] Jian LZ, Hang SF, Hao P, et al. the relationship between HIF-2 $\alpha$  and VEGF with radiographic severity in the primary osteoarthritic knee [J]. *Yonsei Med J*, 2016, 57(3): 735-740.
- [10] Ashraf S, Cha BH, Kim JS, et al. Regulation of senescence associated signaling mechanisms in chondrocytes for cartilage tissue regeneration [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, 24(2): 196-205.
- [11] Chen Y, Wang T, Guan M, et al. Bone turnover and articular cartilage differences localized to subchondral cysts in knees with advanced osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2015, 23(12): 2174-2183.
- [12] Hoff P, Buttgerit F, Burmester GR, et al. Osteoarthritis synovial fluid activates pro-inflammatory cytokines in primary human chondrocytes [J]. *Int Orthop*, 2013, 37(1): 145-151.
- [13] Moser C. Response to: cytokine profile of autologous conditioned serum for treatment of osteoarthritis; in vitro effects on cartilage metabolism and intra-articular levels after injection [J]. *Arthritis Res Ther*, 2010, 12(6): 410-421.
- [14] 杨黎黎, 王庆甫, 王欢, 等. 通络止痛方对人膝骨关节炎关节液 IL-1 $\beta$ , HA 及 NO 的影响 [J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2017, 25(1): 1-4.
- [15] 李萌, 贾叙锋, 周玉, 等. 膝关节镜清理术联合中药离子导入治疗膝骨性关节炎的临床研究 [J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2017, 25(3): 25-28.
- [16] Attur M, Statnikov A, Sam SJ, et al. Plasma levels of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) predict radiographic progression of symptomatic knee osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2015, 23(11): 1915-1924.
- [17] 王欣, 秦宇. 白细胞介素 1 对大鼠软骨细胞 MMP-13 表达的影响及 miR-27b 的调控作用 [J]. *天津医药*, 2015, 43(8): 871-875.
- [18] Van PA, Rispens T, Wolbink GJ. Immunogenicity of anti-TNF biologic therapies for rheumatoid arthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2013, 9(3): 164-172.
- [19] Xiang Y, Masuko-Hongo K, Sekine T, et al. Expression of proteinase-activated receptors (PAR)-2 in articular chondrocytes is modulated by IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006, 14(11): 1163-1173.
- [20] 李晓飞, 张钊, 李晓东, 等. 新型机械激活离子通道蛋白 Piezo1 通过 MAPK/ERK1/2 信号通路介导软骨细胞凋亡的机制 [J]. *中华医学杂志*, 2016, 96(13): 2472-2477.

(收稿日期: 2017-11-14)