

六味骨痹汤对兔骨关节炎软骨的修复作用及其机制初探

李媛¹ 陈达² 余闾^{3△} 彭力平³ 胡烈奎¹ 廖州伟³ 马笃军³

[摘要] 目的:观察六味骨痹汤对兔骨关节炎模型关节软骨形态、Ⅱ型胶原蛋白表达及体液中胶原酶 3 (MMP-13)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、软骨寡聚基质蛋白 (COMP) 的影响,探讨其对骨关节炎 (OA) 软骨的修复作用及其可能机制。方法:取 2~3 月龄清洁级新西兰兔 32 只,体质量 (2.42 ± 0.23) kg,采用木瓜蛋白酶关节注射法建立兔 OA 模型,随机区组法分为六味骨痹汤组、硫酸氨基葡萄糖 (GS) 组和模型组,另设正常组。前两组分别予六味骨痹汤 3.83 g/(kg·d)、硫酸氨基葡萄糖胶囊 77 mg/(kg·d) 溶于生理盐水 10 mL 灌胃,模型组和正常组均予生理盐水 (10 mL/d) 灌胃。6 周后采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测血清及关节液中 MMP-13, TNF- α 及 COMP 的含量;处死实验兔,按 Pelletier 原则对关节软骨大体形态评分;取软骨病理标本,部分予苏木精-伊红染色后用改良 Mankin's 法予组织形态学观察评分,其他标本免疫组化染色后对其Ⅱ型胶原蛋白表达情况进行观察评分。结果:与模型组相比,六味骨痹汤组血清和关节液中 MMP-13, TNF- α 及 COMP 的含量降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);关节软骨 Pelletier 评分和改良 Mankin's 评分显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);Ⅱ型胶原蛋白表达有所增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 GS 组相比,上述指标差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论:六味骨痹汤可促进兔 OA 模型软骨修复,其机制可能是通过降低兔血清和关节液中 MMP-13, TNF- α 等因子的含量抑制软骨破坏,从而提高Ⅱ型胶原蛋白的表达来发挥作用。

[关键词] 六味骨痹汤;骨关节炎;兔;关节软骨修复;Ⅱ型胶原蛋白

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2018)09-0009-05

Effect and Mechanism of Liuweigubi Decoction on Osteoarthritis Cartilage in Rabbits

LI Yuan¹ CHEN Da² YU Tian^{3△} PENG Liping³ HU Liekui¹
LIAO Zhouwei³ MA Dujun³

¹ Fourth Clinical Medical College, Affiliated to Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518033, Guangdong China;

² Baoan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518101, Guangdong China;

³ Shenzhen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518033, Guangdong China.

Abstract Objective: To observe the morphology of articular cartilage, the expression of type II collagen and the collagenase 3 (MMP-13), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in rabbit osteoarthritis model and explore the effect of Liuweigubi Decoction on osteoarthritis (OA) cartilage and its possible mechanism in rabbits with osteoarthritis. **Methods:** Thirty-two clean-grade New Zealand rabbits aged 2 to 3 months were used and the body weight was (2.42 ± 0.23) kg. Rabbit OA models which established by papain joint injection were randomly divided into Liuweigubi decoction (LD) group, glucosamine sulfate (GS) group and model group. In addition, normal group was set up separately. The first two groups were respectively treated with Liuweigubi decoction 3.83 g/(kg·d) and glucosamine sulfate

capsules 77 mg/(kg·d) which were dissolved in 10 mL normal saline. Normal group and model group received normal saline 10 (mL/d) gavage. After 6 weeks, serum MMP-13, TNF- α , and COMP levels in serum and joint fluid were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Rabbits were sacrificed, and general articular cartilage mor-

基金项目:广东省中医药局科研项目(20171245)

¹ 广州中医药大学第四临床医学院(广东 深圳, 518033)

² 深圳宝安中医院(集团)骨伤科一区

³ 深圳市中医院骨伤科一病区

[△]通信作者 E-mail: yutianmail@hotmail.com

phology was scored according to the Pelletier principle. Cartilage pathological specimens were taken, and after hematoxylin-eosin staining, histomorphological observations were performed using improved Mankin's method. The expression of type II collagen was observed in other specimens after immunohistochemical staining. **Results:** Compared with the model group, the levels of MMP-13, TNF- α and COMP in the serum and synovial fluid of the Liuweigubi decoction group decreased ($P < 0.05$), and the Pelletier score and improved Mankin's score of the articular cartilage decreased significantly ($P < 0.05$). The expression of type II collagen was increased ($P < 0.05$). There was no statistically significant difference between the above parameters compared with GS group ($P > 0.05$). **Conclusion:** Liuweigubi decoction can promote the repair of OA model cartilage in rabbits. The mechanism may be to reduce cartilage destruction by decreasing the content of MMP-13, TNF- α and other factors in rabbit serum and synovial fluid, so as to increase the expression of type II collagen.

Keywords: Liuweigubi decoction; osteoarthritis; rabbit; articular cartilage repair; type II collagen

六味骨痹汤是广东省名中医彭力平教授多年临床治疗骨关节炎(OA)的经验方,由淫羊藿、南五加皮、龟甲、怀牛膝、骨碎补及甘草6味中药组成。OA是临床常见的骨科疾病之一,属中医“痹症”“骨痹”范畴,此病高发于中老年群体且致残率极高,尤其膝骨关节炎已被列为全球第四大致残因素^[1],而中医药治疗OA具有筋骨并治、内外兼顾等特点,且成本低、副作用小,是国内治疗OA的重要手段。本课题组前期研究表明六味骨痹汤对肝肾亏虚型骨痹临床疗效显著^[2],但其作用机制尚不明确。目前多数研究者认为关节面和周边软骨的退化是OA最主要的病理特征^[3],故本课题组自2017年1月至2018年1月通过观察“六味骨痹汤”对兔OA模型的软骨及相关因子的作用,探讨本方对OA关节软骨的修复作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级新西兰兔32只,雌雄不限,体质量(2.42 ± 0.23)kg,兔龄2~3个月,由广东省实验动物中心提供,合格证号SCXK(粤)2014-0035。饲养于深圳北京大学/香港科技大学医学中心动物实验室,饲养环境室温 $15 \sim 25$ ℃,湿度45%~60%,明暗各12h。普通饮用水、标准饲料、一兔一笼独立喂养,动物饲料许可证号SCXK(粤)2013-0002。实验中对动物的处置方法获得本单位医学实验动物伦理委员会批准且符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

1.2 实验药物及试剂

六味骨痹汤:淫羊藿10g,南五加皮10g,怀牛膝15g,龟甲20g,骨碎补10g,生甘草5g。药物购自深圳市中医院中药房,由深圳市中医院中药制剂室统一煎制;每付煎煮2次,每次1.5h,合并2次滤液,低压浓缩至含药浓度1g/mL;硫酸氨基葡萄糖胶囊(信东生技股份有限公司,批号7KO0103)。木瓜蛋白酶(美国Sigma公司),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫试剂盒、兔基质金属蛋白酶-3(MMP-3)酶联免疫试剂盒

(上海AMEKO公司,批号分别为AE90301Rb,3460),软骨寡聚基质蛋白COMP酶联免疫试剂盒(瑞典AnaMar Medical AB公司,批号121105),免疫组化第一抗体Anti-Collagen Type II(美国Santa公司,批号E0416)。

1.3 实验仪器

H1650-W型台式离心机(美国Thermo公司),BCD_220UEMA6型低温冰箱(海尔公司),BK43型显微镜(日本奥林巴斯公司),EOS600D型显微照相机(日本Cannon公司)。

1.4 方法

1.4.1 动物分组及造模 将32只新西兰兔适应性喂养1周,随机选取8只为正常组,剩余24只采用关节腔内注射木瓜蛋白酶方法制作膝骨关节炎动物模型,具体方法:取兔右膝关节屈曲位,沿髌骨下极髌腱外缘进针,将0.5mL的6%木瓜蛋白酶生理盐水溶液注入关节腔,屈伸膝关节使木瓜蛋白酶溶液充分扩散于关节腔,造模开始第1、4及7天各注射1次。造模期间对所有动物进行驱赶,2次/d,每次30min,连续4周。4周后按照随机区组法对造模完成的24只新西兰兔随机分为模型组、六味骨痹汤组和GS组,每组8只。

1.4.2 干预方法 造模结束后,按照药理实验中动物与人体等效剂量换算,六味骨痹汤组、GS组分别予药物3.83g/(kg·d)及77mg/(kg·d)溶于10mL生理盐水灌胃;模型组、正常组予生理盐水10mL/d灌胃;4组同时连续灌胃6周。

1.4.3 记录动物一般情况 每天观察并记录实验兔一般情况,包括精神状态、饮食、大小便、皮肤、肢体、步态及死亡等。

1.4.4 标本制作方法

1.4.4.1 血清及关节液:灌胃结束后,自实验兔耳缘取血10mL,常温下静置2h,1000r/min离心10min,取血清,-20℃保存备用。将实验兔右膝关节脱毛、消毒处理,生理盐水1mL注入关节腔冲洗,充分活动关节后抽出0.6~1.0mL冲洗液至EP管,

1 000 r/min 离心 10 min,取上清液,−20 ℃ 保存备用。

1.4.4.2 关节软骨标本:取血和关节液完毕后,用空气栓塞法处死实验兔,即刻解剖兔造模关节,观察关节大体情况后,剔除韧带、半月板等组织,暴露股骨内外髌及胫骨平台,观察关节软骨大体情况,将股骨髌部及胫骨区整块切取,保留关节上下两骨块均厚 1.0~1.5 cm待检。

1.5 实验指标测定

1.5.1 血清及关节液中 MMP-13,TNF-α 及 COMP 的含量 严格按照试剂盒使用说明书,采用 ELISA 法对血清及关节液中 MMP-13,TNF-α 及 COMP 的含量进行检测。

1.5.2 关节软骨大体形态学观察评分 动物处死后,打开膝关节腔,观察关节面是否光滑,色泽是否正常,有无剥脱、缺损、软骨下骨质暴露,按 Pelletier 原则对关节软骨大体形态观察评分,分值越高说明软骨退变越严重。

1.5.3 关节软骨组织形态学观察评分 将关节软骨切片脱蜡脱水,部分行苏木精-伊红染色,每张切片选择 3 个不同的视野,光镜下观察组织形态变化,参照参考文献[4]对软骨结构、细胞、染色以及潮线的完整性进行改良 Mankin's 法评分,评分越高说明软骨退变越严重。

1.5.4 关节软骨Ⅱ型胶原蛋白表达情况 剩余软骨标本应用免疫组织化学方法染色,在高倍镜下观察,结合染色强度和染色面积对关节软骨Ⅱ型胶原蛋白表达情况进行综合评分,0~1 分为阴性(−),2~3 分为弱

阳性(+),4~5 分为中等阳性(++),6~7 分为强阳性(+++),其中(−)和(+)记为低表达组,(++)和(+++)记为高表达组。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件对所得数据进行统计处理。全部计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用随机区组设计的单因素方差分析,两两比较采用 SNK 法检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。组织病理学评分采用 Kruskal-Wallis 法检验,组间差异及各组间两两比较分别以 $P < 0.05$ 及 $P < 0.01$ 判断差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

灌胃期间 GS 组有 1 只实验兔出现腹泻症状,予土霉素灌胃 1~2 d 后好转。其余各组动物除关节肿胀及跛行等骨关节炎症状外,均未出现食欲不振、腹泻、死亡等不良情况。

2.2 血清及关节液中 MMP-13,TNF-α 及 COMP 的含量

与正常组相比,模型组血清及关节液中 MMP-13,TNF-α 及 COMP 的含量均明显上升,差异有统计学意义($P < 0.01, P < 0.05$);六味骨痹汤组、GS 组分别与正常组、模型组相比差异均有统计学意义($P < 0.01, P < 0.05$),其中六味骨痹汤组及 GS 组各项指标比模型组明显降低,而六味骨痹汤组与 GS 组相比差异无统计学意义($P > 0.05$),表明六味骨痹汤与硫酸氨基葡萄糖胶囊均可有效降低兔 OA 模型血清和关节液中 MMP-13,TNF-α 及 COMP 的含量且疗效相当,见表 1-2。

表 1 六味骨痹汤对兔 OA 模型血清中 MMP-13,TNF-α 及 COMP 含量的影响($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}$)

组别	例数	MMP-13	TNF-α	COMP
正常	8	11.03±1.88	59.03±3.42	0.56±0.21
模型	8	19.77±1.93 ¹⁾	109.65±8.06 ¹⁾	1.09±0.52 ¹⁾
六味骨痹汤	8	14.73±1.96 ^{1,2)}	66.24±2.75 ^{1,2)}	0.88±0.17 ^{1,2)}
GS	8	14.09±2.15 ^{1,2)}	67.13±3.71 ^{1,2)}	0.89±0.37 ^{1,2)}
F		26.714	173.442	3.200
P		<0.01	<0.01	0.038

注:1)与正常组比较, $P < 0.01$;2)与模型组比较, $P < 0.05$ (表 1-4 同)。

表 2 六味骨痹汤对兔 OA 模型关节液中 MMP-13,TNF-α 及 COMP 含量的影响($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}$)

组别	例数	MMP-13	TNF-α	COMP
正常	8	6.63±0.44	215.23±19.08	0.71±0.53
模型	8	10.98±0.87 ¹⁾	341.15±19.19 ¹⁾	1.41±0.36 ¹⁾
六味骨痹汤	8	7.74±0.61 ^{1,2)}	267.13±23.98 ^{1,2)}	1.09±0.35 ^{1,2)}
GS	8	7.73±0.70 ^{1,2)}	266.71±22.34 ^{1,2)}	1.12±0.12 ^{1,2)}
F		62.414	47.563	4.822
P		<0.01	<0.01	<0.01

2.3 关节软骨大体形态及组织形态学观察评分

2.3.1 大体形态学观察 正常组关节腔内无明显关

节积液和滑膜增生,股骨髌、胫骨平台面软骨表面光滑平整、无缺损、色泽明亮;模型组关节腔均可见积液及

滑膜增生,关节表面软骨粗糙糜烂,8 例均可见骨赘形成,有 5 例出现软骨下骨质暴露,以关节内侧为主。六味骨痹汤组和 GS 组与模型组相比,关节积液、关节表面骨赘及滑膜增生均较少,关节软骨损伤程度较低,均未见软骨下骨质暴露。

2.3.2 组织形态学观察 正常组关节骨组织 4 层结构可分辨清楚,关节表面软骨平整,形态及结构未见异常,软骨细胞散在分布均匀,排列较整齐,细胞呈卵圆

形,软骨区染色均匀明显,基质呈浅红色,潮线完整平滑;模型组软骨表面毁损严重,形态不规则,可见不规则裂隙达辐射层,软骨变薄,伴纤维化,软骨细胞成簇分布,数目减少,伴炎症细胞浸润,染色深浅不一,局部基质失染甚至无染色,局部可见多重潮线;六味骨痹汤组和 GS 组与模型组相比,关节软骨退变的表现较轻,局部软骨表面可见不规则裂隙达钙化层,软骨细胞数量增多,基质染色呈浅红色,潮线较完整,见图 1。

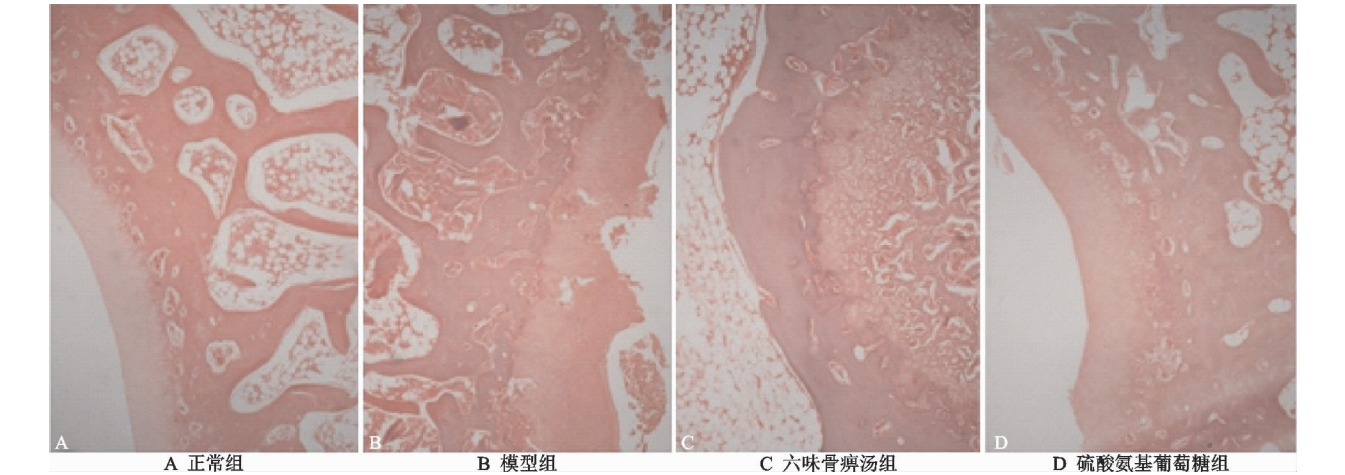


图 1 六味骨痹汤对兔 OA 模型关节软骨组织病理变化的影响(苏木精-伊红,100×)

2.3.3 评分 模型组与正常组相比 Pelletier 评分、改良 Mankin's 评分明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$);六味骨痹汤组、GS 组与模型组组间比较两种评分均降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);与 GS 组相比,六味骨痹汤组 Pelletier 评分稍高,改良 Mankin's 评分较低,差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

2.3.4 关节软骨Ⅱ型胶原蛋白表达情况 正常组Ⅱ型胶原蛋白表达情况评分与模型组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。六味骨痹汤组和 GS 组提示Ⅱ型胶原表达增加,分别与正常组、模型组比较,差异均有统

计学意义($P<0.05$)。六味骨痹汤组与 GS 组比较差异无统计学意义(均 $P>0.05$),见表 4。

表 3 六味骨痹汤对兔 OA 模型关节软骨 Pelletier 评分和改良 Mankin's 评分的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	Pelletier 评分	改良 Mankin's 评分
正常	8	0.23 ± 0.17	0.59 ± 0.22
模型	8	$2.86\pm0.45^{1)}$	$7.93\pm0.53^{1)}$
六味骨痹汤	8	$2.31\pm0.54^{1,2)}$	$5.69\pm0.75^{1,2)}$
GS	8	$2.27\pm0.72^{1,2)}$	$5.84\pm0.69^{1,2)}$
<i>F</i>		41.116	227.806
<i>P</i>		<0.01	<0.01

表 4 六味骨痹汤对兔 OA 模型关节软骨Ⅱ型胶原蛋白表达的影响

组别	例数	(-)/例	(+)/例	(++)/例	(+++)/例	评分($\bar{x}\pm s$)
正常	8	0	1	4	3	5.38 ± 1.06
模型	8	5	3	0	0	$0.75\pm1.16^{1)}$
六味骨痹汤	8	1	0	6	1	$4.00\pm1.77^{1,2)}$
GS	8	1	1	4	2	$3.63\pm1.92^{1,2)}$
<i>F</i>						13.033
<i>P</i>						<0.01

3 讨论

目前 OA 的发病机制尚不明确,多数研究者认为其发生是关节软骨细胞及细胞外基质、软骨下骨质三者降解与合成失衡的结果。OA 以关节软骨破坏、关节表面形成骨赘、滑膜增生和关节间隙变窄为主要病理表现,其中以软骨破坏最为关键。由于关节软骨是无血管、淋巴管和神经的组织,自身修复能力有限,故

恢复关节软骨的组织结构及功能是当前治疗 OA 须重点解决的问题。

研究发现多种因子在 OA 的发生发展中起重要作用,可作为反映关节软骨损伤或修复的标志。Ⅱ型胶原蛋白是软骨细胞外基质中表达最丰富的蛋白,它不仅赋予了关节软骨特有的张力和硬度,还刺激软骨细胞生长和再分化,是软骨细胞表达的特征性标志^[5,6]。

TNF- α 作为一种多功能炎性细胞因子,可直接攻击原本被细胞外基质包绕的软骨细胞,还能诱导合成多种蛋白酶导致骨和软骨的破坏^[7,8]。如 TNF- α 可诱导 MMP-13 的产生, MMP-13 属金属蛋白酶(Matrix Metalloproteinases, MMPs)种属, MMPs 在正常软骨组织中较少表达,发生 OA 时则通过自身激活或其他细胞因子诱导合成等途径高表达。MMP-13 可特异性降解 II 型胶原纤维,且降解能力是其他胶原酶的 10~30 倍,故 MMP-13 的变化能特异性反映出组织基质中 II 型胶原的代谢变化^[9,10]。除此之外,COMP 通过与 II 型胶原结合在软骨组织胶原网中起稳定作用,虽然 COMP 也可少量发现于肌腱和滑膜中,但其只在软骨内高表达。关节软骨受到损伤时 COMP 会从软骨释放到关节液并吸收入血,故关节液及血清中 COMP 的含量也可反映 II 型胶原的代谢^[11,12]。

OA 属于中医学“骨痹”“痹症”范畴,发病多因外伤、劳损、年老等因素导致机体气血失养、肝肾不足,正虚之体复感风、寒、湿、痰、瘀等邪气发而为此病。统计研究发现骨痹临床中医辨证中以肝肾亏虚型最为多见^[13]。《黄帝内经》及《中藏经》中提到:“肝主筋”“肾主骨”“骨痹者伤于肾”。故肝虚则血不养筋,筋不能维持骨节之张弛,关节失滑利;肾虚则髓减,筋骨均失所养为肝肾亏虚型骨痹的基本病机,这与前文中所述西医认为的 OA 发病机制不谋而合。

六味骨痹汤是广东省名中医彭力平教授多年治疗骨痹的经验方,由淫羊藿、南五加皮、怀牛膝、龟甲、补骨脂、生甘草 6 味中药组成,主要适用于以关节痹痛、肢体拘挛、腰膝酸软等为主要表现的肝肾亏虚型骨痹,尤其对膝痹病的疗效最为显著。方中淫羊藿可温肾壮阳、强筋骨、祛风湿,为君药;南五加皮及龟甲补肝肾、强筋骨共为臣药,前者可增强淫羊藿祛风湿之效,后者滋阴潜阳,养血补心,与淫羊藿配伍可防止药性过于温燥;怀牛膝、骨碎补为佐药,二者不仅可增强前药补肝肾、强筋骨之功,尚有活血通经、引药下行之效;甘草益气补中,缓急止痛,并能调和诸药,为使药。目前临床上中医药治疗骨痹多从肾论治,而“六味骨痹汤”则标本兼治,治本为主,全方温寒并用,性归五脏,肝肾同治,兼顾阴阳,不仅对肝肾亏虚型骨痹疗效显著,对此病好发人群常见并发症如失眠、耳鸣、水肿等也有一定治疗作用。

现代药理学研究表明六味骨痹汤中多种有效成分可通过上调或下调软骨相关基因表达、提高机体痛阈值及促进 II 型胶原表达等多方面达到修复关节软骨及改善 OA 症状的作用。如淫羊藿苷不仅可上调软骨特征基因 SOX₉、COL₂ 和 Aggrecan 表达、维持关节软骨表型^[14,15],还能降低小鼠软骨 MMP-13 及 TNF- α 的

mRNA 表达,从而促进关节软骨细胞增殖和细胞外基质的分泌^[16];五加皮正丁醇可提高小鼠角叉菜胶性足肿胀模型的痛阈值,有抗炎镇痛的作用^[17];龟甲胶可上调豚鼠关节软骨细胞 MEK1/2 和 ERK1/2 的表达,促进 OA 软骨细胞的增殖^[18];骨碎补可降低兔 OA 模型关节软骨中 TNF- α 的含量,缓解 OA 症状^[19];本课题组前期研究发现牛膝醇提物可降低兔血清及关节液中 MMP-3、IL-1 β 及 TNF- α 的含量,提高关节软骨 II 型胶原蛋白表达,促进软骨修复^[20]。

在本实验中,六味骨痹汤组相比模型组兔 OA 关节软骨 Pelletier 及改良 Mankin's 评分明显下降,II 型胶原蛋白表达也有显著提高,表明六味骨痹汤对 OA 关节软骨有一定的修复作用,笔者推测其机制可能是本方通过降低兔血清和关节液中 MMP-13 和 TNF- α 等细胞因子的含量,一定程度上抑制了软骨细胞及细胞外基质的破坏,从而促进 II 型胶原蛋白表达及关节软骨的修复,达到改善 OA 的目的。本研究为六味骨痹汤的临床应用提供了科学依据,但尚缺乏分子机制方面的研究,下一步将从分子生物学角度出发,探究本方对软骨修复的有效成分及信号通路,为中医药治疗软骨损伤性疾病及相关新药的研发提供参考。

参考文献

- [1] Fransen M, Bridgett L, March L, et al. The epidemiology of osteoarthritis in Asia [J]. International Journal of Rheumatic Diseases, 2011, 14(2): 113-1121.
- [2] 陈达, 彭力平, 余闾, 等. “六味骨痹汤”治疗膝骨关节炎疗效及安全性的临床研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2017, 25(5): 26-29.
- [3] 卫彦强, 石继祥, 纪斌, 等. 骨性关节炎发病机制的研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(5): 838-842.
- [4] 王晶, 董芳芳, 李晓锋, 等. 益气化痰方减轻 HIF-1 α 条件性基因敲除小鼠膝关节软骨退变的研究[J]. 中国骨伤, 2013, 26(6): 486-492.
- [5] 晏丹. 关节软骨生化结构及其与力学性能关系研究进展[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2009, 29(3): 341-346.
- [6] 蒋萍, 蔚芃, 赵明才, 等. I、II 型胶原蛋白对人软骨细胞生物学特性的影响[J]. 中国临床康复, 2014, 18(30): 4845-4850.
- [7] Horiuchi K. A brief history of tumor necrosis factor α -converting enzyme: an overview of ectodomain shedding [J]. Keio Journal of Medicine, 2013, 62(1): 29-30.
- [8] 刘奋飞. 滑液尿酸、血清及滑液 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平与膝骨关节炎的相关性[J]. 中国卫生工程学, 2017, 16(3): 367-370.
- [9] 乔长峰, 杨开舜. MMP-13、TIMP-1 在兔骨关节炎模型的表达及其意义[J]. 中国现代医生, 2009, 47(3): 39-41.

(上接第 13 页)

- [10] 祁雷,姚运峰,荆珏华. 基质金属蛋白酶抑制剂在骨关节炎治疗中应用的研究进展[J]. 齐鲁医学杂志,2017,32(1):111-114.
- [11] 刘志伟,严伟洪,孙晓亮,等. 软骨代谢标志物 COMP 对骨关节炎软骨改变的反应[J]. 实用骨科杂志,2007,13(8):469-471.
- [12] Larsson E, Erlandsson HH, Larsson A, et al. Corticosteroid treatment of experimental arthritis retards cartilage destruction as determined by histology and serum COMP [J]. Rheumatology(Oxford),2004,43(4):428-434 .
- [13] 李具宝,张磊,屈尚可,等. 膝骨关节炎近 10 年文献中内服方药功效和中医证型分析[J]. 中国中医骨伤科杂志,2014,22(3):20-21.
- [14] 张璇,肖玉梅,王茹,等. 淫羊藿苷对胶原支架中软骨细胞生长及胞外基质分泌的影响[J]. 中药药理与临床,2010,26(6):25-27.
- [15] 鲍远. 淫羊藿苷促进关节软骨细胞增殖和表型维持及相关机制研究[D]. 武汉:华中科技大学,2016.
- [16] 高堪达. 淫羊藿苷对骨关节炎小鼠软骨下骨的保护作用及其机制研究[D]. 南京:南京医科大学,2016.
- [17] 郑婧,张贵君,韦敏,等. 五加皮药材基原、化学成分及药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2015,17(8):104-107.
- [18] 陈泽华. 龟甲胶、鹿角胶含药血清对豚鼠关节软骨细胞活性的影响[D]. 福州:福建中医药大学,2016.
- [19] 金连峰. 单味中药骨碎补对兔膝骨关节炎软骨细胞凋亡作用的实验研究[J]. 中华中医药学刊,2013,31(7):1699-1703.
- [20] 陈达,廖州伟,马笃军,等. 牛膝醇提物对兔骨关节炎模型的疗效比较[J]. 中国医药导报,2016,13(25):21-24.

(收稿日期:2018-04-01)