·实验研究·

加味独活寄生汤对兔膝骨关节炎软骨细胞凋亡的影响

严可[1] 欧梁[1] 邝高艳[1] 谢佳佳[1] 卢敏[1] 王林华[1△]

[摘要] **目的**:探讨加味独活寄生汤对兔膝骨关节炎软骨细胞凋亡的作用机制。**方法**:将新西兰大白兔 32 只随机分组为空白组、模型组、加味独活寄生汤组、氨基葡萄糖组,每组 8 只;造模后予加味独活寄生汤组 3.4 mL/kg 的剂量灌胃给药,空白组、模型组、氨基葡萄糖组等剂量生理盐水溶解灌胃。观察体征、体质量、活动情况,采用 TUNEL 法检测软骨细胞凋亡情况,RT-PCR 检测 Wnt/β-catenin 等 mRNA 表达情况。**结果**:加味独活寄生汤组体征表现有明显改善,TUNEL 法阳性细胞计数结果显示:与空白组比较,模型组、加味独活寄生汤组和氨基葡萄糖组软骨中 TUNEL 法阳性细胞数量明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,加味独活寄生汤组和氨基葡萄糖组软骨中 TUNEL 法凋亡的阳性细胞数量明显减少,差异有统计学意义($P<0.05$)。Wnt3a,β-catenin 及 MMP-13 的表达:与空白组比较,模型组、加味独活寄生汤组和氨基葡萄糖组的 Wnt3a,β-catenin 及 MMP-13 mRNA 表达显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,加味独活寄生汤组和氨基葡萄糖组的 Wnt3a,β-catenin 及 MMP-13 mRNA 表达均明显下调,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论**:加味独活寄生汤通过调控 Wnt/β-catenin 通路和下游因子 MMP-13 等相关基因表达,从而抑制膝关节软骨细胞凋亡,可能是加味独活寄生汤治疗骨关节炎的作用机制。

[关键词] 加味独活寄生汤;膝骨关节炎;细胞凋亡;实验研究
[中图分类号] R-33 [文献标志码] A [文章编号]1005-0205(2019)04-0001-06

Influence of Modified Duhuo Parasitic Mixture on Chondrocyte Apoptosis in Rabbit Knee Osteoarthritis

YAN Ke[1] *OU Liang*[1] *KUANG Gaoyan*[1] *XIE Jiajia*[1] *LU Min*[1] *WANG Linhua*[1△]
[1]First Affiliated Hospital, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China.

Abstract **Objective**: To investigate the mechanism of modified Duhuo parasitic mixture on chondrocyte apoptosis in rabbit knee osteoarthritis. **Methods**: Thirty-two New Zealand white rabbits were randomly divided into blank group, model group, modified Duhuo parasitic mixture group, glucosamine group (8 in each group). The dosage of 3.4 mL/kg in the group of modified Duhuo parasitic mixture was given by gavage. In the glucosamine group, 5 mg/kg was dissolved and perfused with normal saline at the same dose to observe the signs, weights and activities. TUNEL method was used to detect the apoptosis of chondrocytes, in RT-PCR, the expression of Wnt/β-catenin and mRNA were detected. **Results**: The physical signs of rabbits in the modified Duhuo parasitic mixture group were obviously improved. The results of TUNEL positive cell count showed that, compared with the blank group, the model group, the number of TUNEL positive cells in cartilage of modified Duhuo parasitic mixture group and glucosamine group were significantly increased ($P<0.05$). Compared with the model group, the number of TUNEL apoptotic positive cells in the modified Duhuo parasitic mixture group and the glucosamine group were significantly decreased ($P<0.05$), and Wnt3a, β-catenin, MMP-13 were also found in the cartilage group ($P<0.05$). Compared with blank group, the expression of Wnt3a, β-catenin, MMP-13 mRNA in model group, modified Duhuo parasitic mixture group and glucose group were significantly increased ($P<0.05$). Compared with the model group, the expression of Wnt3a, β-catenin, MMP-13 mRNA in the modified Duhuo parasitic mixture group and glucose group were significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion**: Modified Duhuo parasitic mixture can inhibit the fine cartilage of knee joint by regulating the expression of Wnt/β-catenin pathway and downstream factor MMP-13. Apoptosis may be the mechanism of modified Duhuo parasitic mixture in the treatment of osteoarthritis.

Keywords: modified Duhuo parasitic mixture; knee osteoarthritis; apoptosis; experimental study

基金项目:国家自然科学基金项目(81574004,81874476)
湖南省中医药科研计划项目(2017149)
湖南省教育厅项目(17C1224)
[1] 湖南中医药大学第一附属医院(长沙,410007)
△通信作者 E-mail:155053648@qq.com

膝骨关节炎是中老年人常见病、多发病，其病理特征为进性关节软骨退化，软骨下骨改变，关节边缘骨赘形成，滑膜组织炎症和增生，韧带退变和半月板以及关节囊肥大[1-3]。骨关节炎的病理生理机制仍然没有明确，缺乏特异性治疗方法[4,5]。但由于OA的主要特征是关节软骨的进行性丢失，所以关于OA发病机制的大部分研究致力于基质合成和降解的调节，软骨细胞作为软骨组织中唯一的细胞类型，其表型稳定性和生物学活性对维持适当的软骨基质至关重要，在动物和人的体内、体外研究中软骨细胞凋亡数量增加与OA严重程度之间存在显著相关性[6,7]。加味独活寄生汤为湖南中医药大学第一附属医院院内制剂，临床上用于治疗膝骨关节炎风寒湿痹、肝肾亏虚证疗效显著[8-10]，为进一步研究其作用机制，从细胞凋亡和Wnt信号通路的角度探究加味独活寄生汤治疗膝骨关节炎的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年(6个月龄)新西兰大白兔32只，普通级，雄性，体质量(2.5±0.3)kg，由湖南中医药大学动物实验中心提供，许可证号为SCXK(湘)2015-0004；动物实验室许可证号为SCXK(湘)2013-0005；单笼喂养，室内温度22～26 ℃，相对湿度45%～60%，每日喂饲料和水2次，每半月喂胡萝卜1次(供其磨牙用)。该研究方案遵循湖南中医药大学动物实验条例规定，所有动物处理和实验均经过湖南中医药大学伦理委员会批准后进行。

1.2 实验药物及试剂

加味独活寄生汤由湖南中医药大学第一附属医院药剂科提供，其组成为独活6 g，桑寄生18 g，杜仲12 g，牛膝6 g，防风6 g，川芎6 g，细辛3 g，秦艽6 g，茯苓12 g，肉桂3 g，党参12 g，甘草3 g，当归12 g，白芍10 g，熟地黄15 g，制天南星6 g，黄芩6 g，木瓜12 g，威灵仙12 g. 制备工艺：以上19味药加水浸泡0.5 h，煎煮2次，第1次加水10倍量煎煮2.0 h，第2次加水8倍量煎煮1.0 h，煎液滤过，滤液合并，浓缩至相对密度为1.050(60 ℃时)，滤过，加入苯甲酸钠2.5 g使溶解，加水至1 000 mL，混匀，无菌分装，每瓶250 mL，含生药0.664 g/mL.

氨基葡萄糖胶囊剂：浙江海正药业股份有限公司，批号为2392016，规格为0.25 g，湖南中医药大学第一附属医院药剂科提供。

TUNEL试剂盒，Roche公司；DAB显色剂，北京索莱宝科技有限公司；PCR引物，长沙爱科博生物有限公司；Trizol，TaKaRa公司；SDS-PAGE凝胶配制试剂盒，碧云天生物技术有限公司。

1.3 实验仪器

生物组织摊片机，金华市益迪医疗设备有限公司；全自动震动切片机，德国LEICA公司；全自动自清洗血流变仪，北京普利生仪器有限公司；台式高速冷冻离心机，湖南湘立科学仪器有限公司；倒置相差显微镜，日本Olympus公司。

1.4 方法

1.4.1 造模方法 参照摆雪等[11]造模，在伸直位石膏固定1周后，以氢化可的松10 mg/kg剂量，灌胃1次/d，连续10 d. 待肾虚证处理结束后，第2天再结合环境因素干预：每日上午定时用喷雾瓶通过石膏间隙处向兔患侧膝关节喷4 ℃冰水约10 mL，使局部皮毛微微湿润，然后再置于距离电风扇前约10 cm处吹干(1 200 r/min，约5 min)，连续25 d. 以上整个造模周期为6周。

1.4.2 分组方法 将32只新西兰大白兔连续编号，按随机数字表法随机抽取8只为空白组(A组)，其余24只进行病证结合造模处理，造模6周后，24只新西兰大白兔再次随机分为3组：模型组(B组)、加味独活寄生汤组(C组，实验组)、氨基葡萄糖组(D组，阳性对照组)，每组8只。

1.4.3 干预方法 空白组和模型组予等剂量生理盐水灌胃。加味独活寄生汤组：根据课题组之前的临床研究结果显示[7]，该药成人每次用量约62.5 mL，2次/d，即每次生药量为62.5 mL×0.664 g/mL=41.5 g，则60 kg成人的每千克体质量生药量为0.69 g. 按照《药理实验方法学》[12]所述的体表面积剂量换算法计算，成人与兔的换算系数为3.27，则兔子每公斤灌胃的生药量为2.26 g，换算成加味独活寄生汤为3.4 mL/kg的剂量，2次/d定时灌胃给药。氨基葡萄糖组，同样用上述公式计算出新西兰大白兔给药剂量为25 mg/kg，去掉胶囊后溶于等剂量生理盐水中灌胃，2次/d.

1.4.4 标本制作方法 无菌操作下截取每只新西兰大白兔右后肢膝关节，远近端各距离关节膝间隙1 cm截骨，去除关节囊外的软组织，不破坏关节囊。将取出二分之一的关节置于冰盒上进行操作，切开关节囊，先进行大体观察，再将每组半数兔子的关节软骨置于4%多聚甲醛溶液内固定，用于苏木精-伊红染色、TUNEL法及免疫组化检测。剩余二分之一置于EP管内，−80 ℃冷冻，用于RT-PCR和Western Blot检测。

1.5　实验室指标测定

1.5.1　一般指标的观察，动物行为和体征观察　上午喂食前观察家兔的精神状态、活动度、体质量、二便、觅食、毛发、爪甲、唇色等情况，每周记录 1 次。参考程志清等[9]方法制定相应的动物症状及体征评分量表进行评分。

1.5.2　造模 TUNEL 法检测软骨组织中细胞凋亡情况　依次将切片脱蜡、修复、显色采用 Motic Image Advanced 3.2 软件对阳性细胞核进行计数，每张切片随机选择 5 个高倍视野（200 倍以上），统计阳性细胞数，按每组分别每个样取 5 个视野，分别计算出凋亡指数并取平均值。

1.5.3　RT-PCR 检测 Wnt3a，β-catenin 及 MMP-13 的表达水平　进行 RT-PCR 检测、显微镜镜检，图像采集分析各组关节软骨组织中 Wnt3a，β-catenin 及 MMP-13 的表达。

1.6　统计学方法

使用 SPSS19.0 软件进行数据分析。实验数据中的计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示，若满足正态性和方差齐性检验，组间比较采用单因素方差分析（ANOVA），组间差异有统计学意义，则进一步采用 LSD 法进行两两比较；若不满足正态性和方差齐性，采用非参数检验（如 Kruskal-Wallis 法），$P<0.05$ 差异有统计学意义。

2　结果

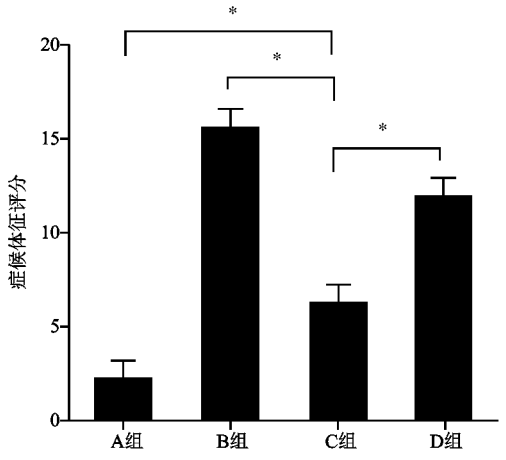
2.1　加味独活寄生汤对 KOA 模型症候体征的影响

给药 6 周后，与空白组比较，其余各组新西兰大白兔的神态及活动较差，3 组的症状及体征评分明显增高，差异有统计学意义（$P<0.05$）；与模型组和硫酸氨基葡萄糖组比较，加味独活寄生汤组新西兰大白兔的体征表现有明显改善，其症状及体征评分减少，差异有统计学意义（$P<0.05$），见表 1 及图 1.

表 1　各组动物症状及体征评分比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	数量	评分
空白组	8	2.13±0.99
模型组	8	15.25±1.28[1)]
加味独活寄生汤组	8	6.13±0.99[1)2)3)]
氨基葡萄糖组	8	11.50±1.41[1)2)]
F		191.36
P		<0.01

注：1）与空白组比较，$P<0.05$；2）与模型组比较，$P<0.05$；3）与氨基葡萄糖组比较，$P<0.05$.



A 空白组；B 模型组；C 加味独活寄生汤组；D 氨基葡萄糖组

图 1　各组动物症状及体征评分比较

2.2　加味独活寄生汤对 KOA 模型兔软骨细胞凋亡的影响

关节软骨组织 TUNEL 法镜下显示：空白组可见少量软骨细胞凋亡，散布在软骨表层；模型组见大量阳性凋亡细胞，呈片状分布；加味独活寄生汤组可见凋亡细胞数量多于空白组，而明显少于模型组，不均匀分布于软骨组织中；氨基葡萄糖组与空白组比较凋亡细胞数量增加，与模型组比较凋亡细胞数量有所减少，部分凋亡细胞核破裂，核仁染成棕黄色，见图 2.

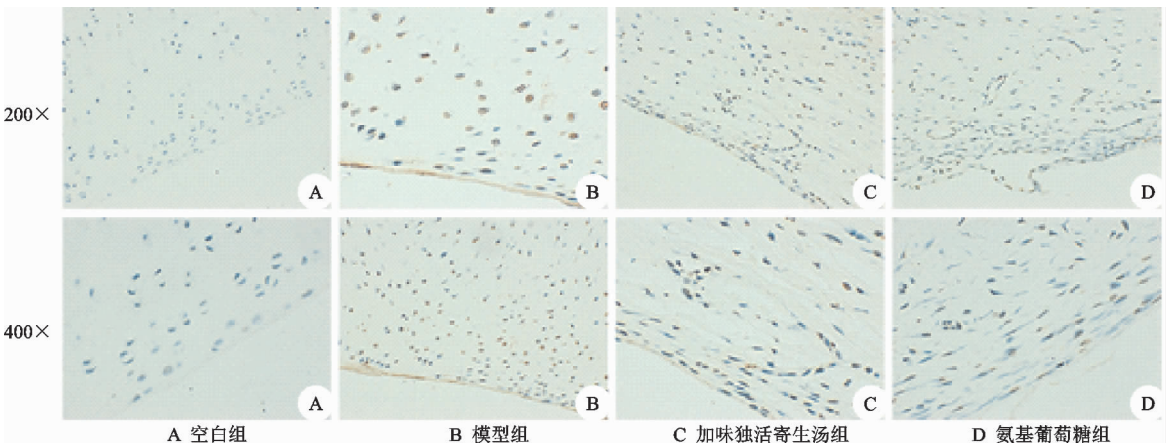


图 2　各组兔 TUENL 法结果的比较（200×，400×）

各组兔 TUNEL 法凋亡阳性细胞计数结果显示：与空白组比较，模型组、加味独活寄生汤组和氨基葡萄糖组软骨中 TUNEL 法阳性细胞数量明显增加，差异有统计学意义（$P<0.05$）；与模型组比较，加味独活寄

生汤组和氨基葡萄糖组软骨中 TUNEL 法阳性细胞数量明显减少，差异有统计学意义（$P<0.05$）；此外，加味独活寄生汤组和氨基葡萄糖组软骨中 TUNEL 阳性细胞数量的差异无统计学意义（$P>0.05$），见表 2 及图 3.

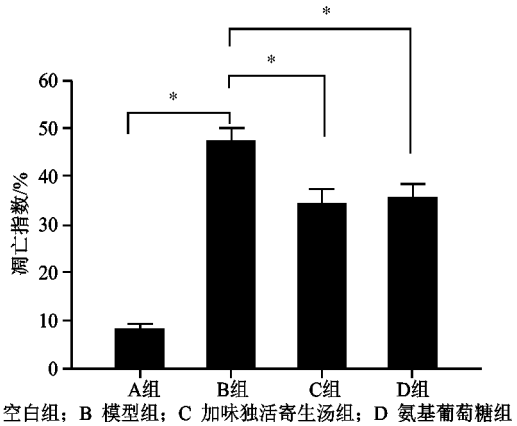
表 2　各组兔软骨细胞凋亡指数比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	数量	细胞凋亡指数/%
空白组	8	7.71±1.38
模型组	8	47.01±2.91[1)]
加味独活寄生汤组	8	34.14±3.39[1)2)]
氨基葡萄糖组	8	35.43±3.21[1)2)]
F		232.98
P		<0.01

注：1）与空白组比较，$P<0.05$；2）与模型组比较，$P<0.05$.

2.3　RT-PCR 检测各组软骨组织中 Wnt3a，β-catenin 及 MMP-13 表达情况

Wnt3a，β-catenin 及 MMP-13 的表达：与空白组比较，模型组、加味独活寄生汤组和氨基葡萄糖组的 Wnt3a，β-catenin 及 MMP-13 表达显著升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）；与模型组比较，加味独活寄生汤组和氨基葡萄糖组的 Wnt3a，β-catenin 及 MMP-13 表达均明显下调，差异有统计学意义（$P<0.05$），见表 3 及图 4.



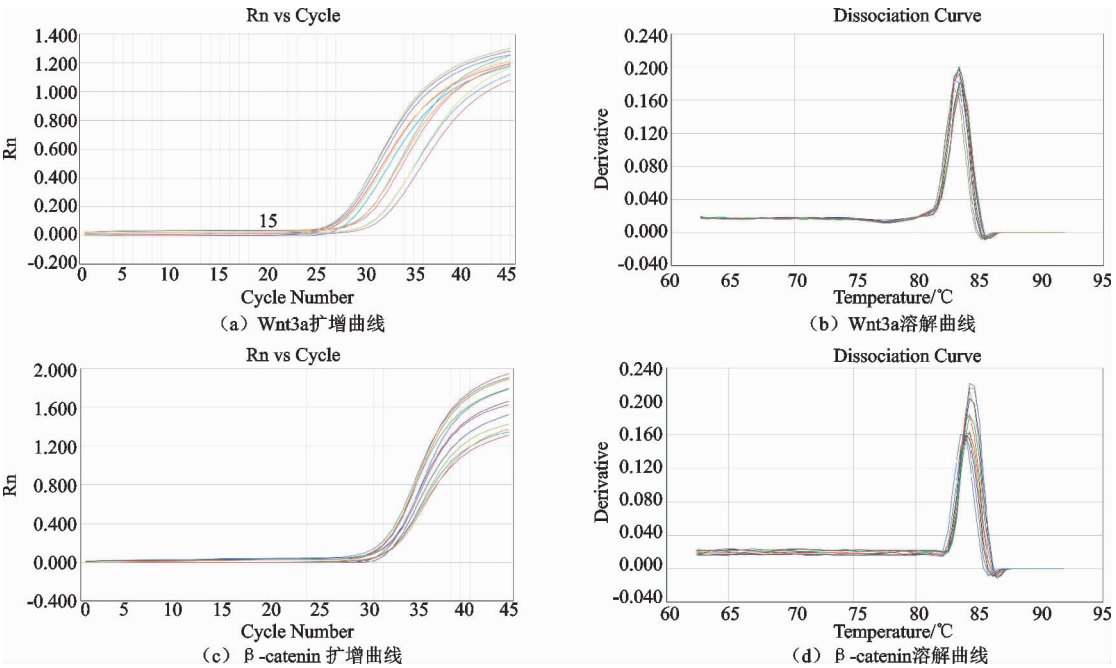
A 空白组；B 模型组；C 加味独活寄生汤组；D 氨基葡萄糖组

图 3　各组兔软骨细胞凋亡指数比较

表 3　各组 Wnt3a，β-catenin，MMP-13 的 mRNA 表达（$\bar{x}\pm s$）

组别	数量	Wnt3a	β-catenin	MMP-13
空白组	8	1.00±0.08	1.00±0.06	1.00±0.06
模型组	8	3.86±0.24[1)]	4.74±0.29	4.86±0.57[1)]
加味独活寄生汤组	8	1.50±0.12[1)2)]	1.80±0.17[1)]	2.50±0.13[1)2)]
氨基葡萄糖组	8	1.64±0.11[1)2)]	2.23±0.21[1)2)3)]	3.37±0.21[1)2)3)]
F		56.98	79.45	73.62
P		<0.01	<0.01	<0.01

注：1）与空白组比较，$P<0.05$；2）与模型组比较，$P<0.05$；3）与氨基葡萄糖组比较，$P<0.05$.



（a）Wnt3a扩增曲线
（b）Wnt3a溶解曲线
（c）β-catenin 扩增曲线
（d）β-catenin溶解曲线

图 4　Wnt3a 和 β-catenin 的扩增曲线和溶解曲线

3　讨论

膝骨关节炎属于祖国医学的痹证范畴[13-15]。《素问·痹论》："风寒湿三气杂至，合而为痹，其风气胜者为行痹，寒气胜者为痛痹，湿气胜者为着痹……病在阴者命曰痹"。独活寄生汤为治痹的经典名方，加味独活寄生汤以独活寄生汤为基础，增加威灵仙、制南星等药

物经现代中药制剂工艺精制而成的汤，为湖南中医药大学第一附属医院骨伤科院内制剂，具有祛风除湿、补益肝肾、通痹止痛之功效，但其作用机制尚不明确[8-10,16]。本课题组在前期研究中采用在伸直位石膏固定、氢化可的松灌胃结合环境因素干预，诱导出具有“虚、瘀、毒”病机特点的 KOA 病证结合模型，此模型更符合人类自然发生的 KOA 病变特点及中医症候特征。氢化可的松灌胃致肝肾亏虚，气血虚弱，筋脉失养，不荣则痛，乃成虚证；风寒湿邪侵袭筋肉关节，经脉气血瘀阻不通，不通则痛，则为实证，共同体现了肝肾亏虚、风寒湿痹型膝骨关节炎本虚标实的病理特点。加味独活寄生汤紧扣 KOA 疾病发生的本质，共奏补肾活血、祛风除湿、强壮筋骨之功，缓解膝骨关节炎症状。

Wnt/β-catenin 信号传导可能在调节骨关节炎的发病机制中起重要作用，该信号通路的激活会使 OA 恶化，其抑制可改善 OA[17-21]. β-catenin 是细胞质中的一种多功能蛋白，是调控基因转录的 Wnt 信号通路中的关键分子[22-24]。经典的 Wnt/β-catenin 通路在软骨细胞形成和分化以及细胞外基质代谢过程中起着至关重要的作用。β-catenin 的过表达可导致 MMP-13 的基因表达水平升高，进一步加重软骨基质和关节软骨的降解，导致软骨的破坏和缺损，进而引起骨关节炎的发生，通过中医药可调控 Wnt 信号通过从而改善骨关节炎[25-30]。

本方案从细胞凋亡和 Wnt 信号通路的角度研究加味独活寄生汤治疗 KOA 的作用机制。结果显示给药 6 周后，与空白组比较，其余各组新西兰大白兔的神态及活动较差，3 组的症状及体征评分明显增高；与模型组和硫酸氨基葡萄糖组比较，加味独活寄生汤组的体征表现有明显改善，其症状及体征评分减少，差异有统计学意义。在本实验中，采用 TUNEL 法检测发现在 OA 模型组中的软骨细胞凋亡数量明显高于正常组，且与凋亡相关的因子 MMP-13 表达水平升高。正常组兔关节软骨组织中 Wnt3a，β-catenin 和 MMP-13 的表达水平较低，而在模型组中，Wnt3a，β-catenin 和 MMP-13 的表达水平显著升高，说明 Wnt/β-catenin 信号通路在 KOA 的病程中处于异常激活的状态，细胞过度凋亡参与了 OA 的病程，而凋亡的可能机制与 Wnt3a，β-catenin 及 MMP-13 等凋亡因子表达水平有关。

综上所述，加味独活寄生汤治疗 KOA 的作用机制可能与调控 Wnt/β-catenin 通路和 Wnt3a，β-catenin、MMP-13 等因子，减少软骨细胞凋亡，抑制炎症反应相关，由于缺少信号阻断剂组，故加味独活寄生汤直接作用靶点有待下一步深入研究。

参考文献

[1] LIU-BRYAN R. Inflammation and intracellular metabolism: new targets in OA[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2015, 23(11): 1835-1842.

[2] 中华医学会风湿病学分会. 骨关节炎诊断及治疗指南[J]. 中华风湿病学杂志, 2010, 14(6): 416-419.

[3] WU L, LIU H, LI L, et al. Mitochondrial pathology in osteoarthritic chondrocytes[J]. Curr Drug Targets, 2014, 15(7): 710-719.

[4] HWANG H S, KIM H A. Chondrocyte apoptosis in the pathogenesis of osteoarthritis[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(11): 26035-26054.

[5] 袁普卫，康武林，李小群，等. 骨性关节炎发病机制及相关细胞因子的研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2016, 24(11): 1010-1015.

[6] SOOK H H, AH K H. Chondrocyte apoptosis in the pathogenesis of osteoarthritis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(11): 26035-26054.

[7] KATSARA O, ATTUR M, RUOFF R, et al. Increased activity of chondrocyte translational apparatus accompanies osteoarthritis[J]. Arthritis & Rheumatology, 2016, 69(3): 586-597.

[8] 张永辉，欧梁，邝高艳，等. 加味独活寄生合剂对膝关节骨性关节炎关节液中 IL-1、NO、Sox9 及 Collagen Ⅱ 的影响[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(8): 3710-3712.

[9] 张永辉，欧梁，邝高艳，等. 加味独活寄生合剂促进膝骨关节炎软骨修复疗效及作用机制研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(1): 28-32.

[10] 谭开云，卢敏. 加味独活寄生合剂治疗风寒湿痹、肝肾亏虚型膝骨关节炎临床疗效观察[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(2): 425-427.

[11] 摆雪，张洪平，刘俊昌，等. 石膏铁丝固定法建立兔膝痹模型[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(18): 2603-2608.

[12] 魏伟. 药理实验方法学[M]. 4 版. 北京：人民卫生出版社, 2010: 28-46.

[13] 曹月龙. 膝骨关节炎中医药临床研究的问题与启示[J]. 中医正骨, 2018, 30(9): 1-3.

[14] 蒲晓东，杨艳梅. 膝骨关节炎中医病名再辨识[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(12): 2972-2973.

[15] 李具宝，张磊，屈尚可，等. 治疗膝骨关节炎近十年文献中特殊内服中药分析[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2013, 21(3): 36-38.

[16] 邝高艳，严可，卢敏，等. 加味独活寄生合剂含药血清对兔退变软骨细胞 Wnt/β-catenin 信号通路的影响[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(9): 2093-2097.

[17] ROBINSON J A, CHATTERJEEKISHORE M, YAWORSKY P J, et al. Wnt/β-catenin signaling is a normal physiological response to mechanical loading in bone[J]. Journal of Biological Chemistry, 2016, 281(42): 31720-31728.

[18] NUSSE R, CLEVERS H. Wnt/β-catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities[J]. Cell, 2017, 169(6): 985-999.

[19] YE S, ZHANG D, CHENG F, et al. Wnt/β-catenin and LIF/Stat3 signaling pathways converge on Sp5 to promote mouse embryonic stem cell self-renewal[J]. Journal of Cell Science, 2016, 129(2): 269-276.

[20] MCCRACKEN K W, AIHARA E, MARTIN B, et al. Wnt/β-catenin promotes gastric fundus specification in mice and humans[J]. Nature, 2017, 541(7636): 182-187.

[21] ZHANG Z, NOR F, MIN O, et al. Wnt/β-catenin signaling determines the vasculogenic fate of post-natal mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells, 2016, 34(6): 1576-1587.

[22] WANG X, MENG X, XUN S, et al. Wnt/β-catenin signaling pathway may regulate cell cycle and expression of cyclin A and cyclin E protein in hepatocellular carcinoma cells[J]. Cell Cycle, 2009, 8(10): 1567-1570.

[23] ZENG R, DUAN L, KONG Y K, et al. Prognostic significance of beta-catenin expression in patients with esophageal carcinoma: a meta-analysis[J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention Apjcp, 2014, 15(15): 6103-6108.

[24] VANGIPURAM S D, LYMAN W D. Ethanol affects differentiation - related pathways and suppresses wnt signaling protein expression in human neural stem cells[J]. Alcoholism Clinical & Experimental Research, 2012, 36(5): 788-797.

[25] 武永利，刘娣，马晓秀，等. 温针灸对兔膝骨性关节炎模型软骨细胞中 c-Jun 氨基末端激酶信号通路的影响[J]. 中国中西医结合杂志，2017，37(11)：1372-1377.

[26] 吴疆，吴龙，马龙，等. SOST 和 β-catenin 在不同分期膝骨关节炎患者软骨及软骨下骨表达的研究[J]. 中国骨质疏松杂志，2016，22(6)：689-694.

[27] 沈鹏飞，王斌，谢子康，等. 软骨寡聚基质蛋白过表达对 BMP-2 诱导骨髓间充质干细胞分化的影响[J]. 中国生物工程杂志，2016，36(10)：1-7.

[28] 张荣凯，陈琰，张颂阳，等. 转化生长因子-β 通路在早期创伤性骨性关节炎软骨下骨的动态变化[J]. 中华创伤骨科杂志，2013，15(2)：132-137.

[29] 林健静，曾晖，肖德明，等. 白藜芦醇激活 PI3K/Akt 信号通路对软骨细胞细胞外基质合成的影响[J]. 中国矫形外科杂志，2017，25(13)：1220-1224.

[30] 潘建科，杨伟毅，谢辉，等. 龙鳖胶囊对膝骨关节炎大鼠软骨和滑膜病理的影响[J]. 中国中西医结合杂志，2017，37(7)：807-812.

（收稿日期：2018-12-06）