

补肾强筋胶囊对膝骨关节炎的治疗作用及分子机制研究

彭莎^{1,2,3} 姚楠^{1,2,3} 卢岩岩¹ 许学猛^{1,2△} 吴淮^{1,2} 刘文刚^{1,2} 黄雪君^{1,2,3} 陈国材¹

[摘要] **目的:**探讨补肾强筋胶囊对膝骨关节炎(KOA)的治疗作用及相关分子机制。**方法:**将 40 只 SD 大鼠随机分为 4 组,每组 10 只。采用关节腔注射木瓜蛋白酶和半胱氨酸建立 KOA 大鼠模型。正常组和模型组给予生理盐水灌胃,补肾高、低剂量组分别灌胃 0.486 g/kg 和 0.243 g/kg 补肾强筋胶囊。6 周后处死大鼠并采集膝关节软骨和血清进行检测。苏木精-伊红(HE)染色和番红-固绿染色观察各组大鼠膝关节软骨病理变化并进行改良 Mankin 评分;酶联免疫吸附测定(ELISA)检测大鼠血清白细胞介素-1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平;实时荧光定量 PCR 和蛋白免疫印迹(Western Blot)检测 MMP13、Beclin1、LC3B、ULK1、p-AMPK、p-mTOR mRNA 和蛋白的表达。**结果:**与模型组相比,补肾高、低剂量组大鼠膝关节软骨退变程度明显减轻且 Mankin 评分显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。补肾高、低剂量组大鼠血清 IL-1 β 和 TNF- α 水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。补肾高、低剂量组大鼠软骨 MMP13 mRNA 和蛋白表达显著降低,Beclin1、LC3B-II/I、ULK1 mRNA 和蛋白表达显著升高,p-mTOR 蛋白表达显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。补肾高剂量组大鼠软骨 p-AMPK 蛋白表达显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论:**补肾强筋胶囊可能通过 AMPK/mTOR 通路上调 KOA 模型大鼠膝关节软骨自噬水平从而延缓病程。

[关键词] 补肾强筋胶囊;膝骨关节炎;自噬;分子机制

[中图分类号] R684.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2021)04-0013-07

Study on the Effect and Molecular Mechanism of Bushenqiangjin Capsule on Knee Osteoarthritis

PENG Sha^{1,2,3} YAO Nan^{1,2,3} LU Yanyan¹ XU Xuemeng^{1,2△} WU Huai^{1,2}
LIU Wengang^{1,2} HUANG Xuejun^{1,2,3} CHEN Guocai¹

¹ The Fifth Clinical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510095, China;

² Guangdong Second Traditional Chinese Medicine Hospital (Guangdong Province Engineering Technology Research Institute of Traditional Chinese Medicine), Guangzhou 510095, China;

³ Guangdong Provincial Key Laboratory of Research and Development in Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, China.

Abstract Objective: To explore the effect and relative molecular mechanism of Bushenqiangjin capsule on knee osteoarthritis (KOA). **Methods:** 40 SD rats were randomly divided into 4 groups, with 10 rats in each group. The KOA rat model was established by injection of papain and cysteine into joints. After 4 weeks, normal group and model group were given oral administration of normal saline, the high and low dose groups of bushenqiangjin capsule were given oral administration of

0.486 g/kg and 0.243 g/kg Bushenqiangjin capsule respectively. After 6 weeks, all the rats were killed, knee cartilage and serum were collected and tested. Hematoxylin-eosin (HE) staining and Safranin o-fast green staining were used to observe the pathological changes of knee cartilage in each group and modified Mankin score was calculated. The levels of serum interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in rats were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA and protein ex-

基金项目:广东省基础与应用基础研究基金项目
(2018A030313584)

广东省中医药局科研项目(20194002,20183001)

¹ 广州中医药大学第五临床医学院(广州,510095)

² 广东省第二中医院(广东省中医药工程技术研究院)

³ 广东省中医药研究开发重点实验室

△通信作者 E-mail: xuxuemeng@163.com

pressions of MMP13, Beclin1, LC3B, ULK1, p-AMPK and p-mTOR were detected by Real-time PCR and Western Blot. **Results:** Compared with the model group, the degeneration degree of knee cartilage and Mankin score of rats in the high and low dose groups of bushenqiangjin capsule were reduced significantly ($P < 0.01$). Compared with the model group, the levels of serum IL-1 β and TNF- α in the high and low dose groups of bushenqiangjin capsule were decreased significantly ($P < 0.01$). Compared with the model group, the mRNA and protein expression of MMP13 were decreased significantly, the mRNA and protein expressions of Beclin1, LC3B-II/I and ULK1 were increased significantly, and the protein expression of p-mTOR was decreased significantly in the high and low dose groups of bushenqiangjin capsule ($P < 0.01$). In addition, the protein expression of p-AMPK was increased significantly in the high dose group of bushenqiangjin capsule ($P < 0.01$). **Conclusion:** Bushenqiangjin capsule may up-regulate the autophagy level of knee cartilage in KOA model rats through AMPK/mTOR pathway, which delays the course of KOA.

Keywords: Bushenqiangjin capsule; knee osteoarthritis; autophagy; molecular mechanism

膝骨关节炎(KOA)是一种以软骨退变为主要特征的骨退行性疾病,而软骨细胞自噬水平降低是软骨退变的主要原因^[1-2]。维持软骨细胞一定的自噬水平可减缓软骨退变,是软骨细胞生存的重要方式^[1-2]。目前中医药治疗 KOA 已受到广泛关注^[3-4]。补肾强筋胶囊临床运用逾 18 a,临床报道和实验研究均表明其对 KOA 具有一定的疗效^[5-10]。本研究拟以 KOA 大鼠为研究对象,从软骨自噬角度探讨补肾强筋胶囊治疗 KOA 的作用机制,为补肾强筋胶囊临床治疗 KOA 提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

40 只 SPF 级 SD 大鼠,雌雄各半,体质量 180~220 g,购自广东省医学实验动物中心,生产许可证号为 SCXK(粤)2018-0002。动物实验环境:广东省第二中医院(广东省中医药工程技术研究院)SPF 级动物实验室,设施使用许可证号为 SYXK(粤)2015-0059。

1.2 实验药物和试剂

补肾强筋胶囊(批准文号为粤药制字 Z20071352,批号为 20180801,药物组成:杜仲、补骨脂、骨碎补、熟地黄、血竭、全蝎等)由广东省第二中医院制剂室提供;木瓜蛋白酶(美国 Sigma 公司,批号为 SLBR9817V);半胱氨酸(美国 Sigma 公司,批号为 BCBN4306V);大鼠白细胞介素-1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(天津安诺瑞康生物技术有限公司,批号分别为 370180831,569181010);4%组织细胞固定液(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,批号为 893001335);Trigol 试剂(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,批号为 99G00127);RevertAid Reverse Transcriptase(美国 Thermo Fisher Scientific 公司,批号为 00366374);SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)(大连宝生物工程有限公司,批号 AHX0051N);ddH₂O(北京天根生化科技有限公司,批号 R6305);苏木精-伊红

(HE)染液(广州优迪生物科技有限公司,批号为 0314A20);番红染液和固绿染液(北京雷根生物技术有限公司,批号为 1205A14);RIPA 蛋白裂解液和蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(上海贝博生物公司,批号为 BB18091);BCA 蛋白定量分析试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司,批号为 SE248351);Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate(美国 Thermo Fisher Scientific 公司,批号为 QE217005); β -actin 抗体(美国 Proteintech 公司,批号为 00047970);MMP13 抗体(美国 Proteintech 公司,批号为 00018170);Beclin1 抗体(美国 Proteintech 公司,批号为 00018170);LC3B(美国 Abcam 公司,批号为 GR319117-2);ULK1(美国 Proteintech 公司,批号为 00070905);p-AMPK (T172)(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号为 14);p-mTOR(Ser2448)(美国 Affinity Biosciences 公司,批号为 55y1643);辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG(美国 Proteintech 公司,批号为 20000199)。

1.3 实验仪器

BX51 荧光显微镜(日本 Olympus 公司);BSA224S 电子分析天平(德国 Sartorius 公司);全配置病理分析仪器(德国 Leica 公司);5424 型小型高速离心机(德国 Eppendorf 公司);702 型-80℃超低温冰箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Varioskan Flash 全波长多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Smart Spec Plus 核酸蛋白测定仪(美国 Bio-Rad 公司);IQ™5 荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);Tanon 5200 Multi 多功能成像系统(上海天能科技有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 KOA 模型 大鼠双侧膝关节腔内注射木瓜蛋白酶和半胱氨酸,注射剂量为每个膝关节腔 50 μ L,注射时间为第 1、3、7 天,4 周后 KOA 造模成功。

1.4.2 动物分组 40 只 SD 大鼠按随机分组数字表法分为正常组、模型组、补肾高剂量组、补肾低剂量组,

每组 10 只。除正常组外,其余三组大鼠复制 KOA 模型。

1.4.3 动物给药和样本采集 补肾高、低剂量组按照人推荐剂量进行等效换算,分别给予 0.486 g/kg 及 0.243 g/kg 补肾强筋胶囊灌胃,正常组和模型组给予生理盐水灌胃。给药 6 周后,处死动物,收集大鼠血清用于 ELISA 检测;各组随机取 4 只大鼠双侧膝关节组织,放置于 4% 组织细胞固定液中固定,用于 HE 染色和番红-固绿染色以及改良 Mankin 评分;其余大鼠膝关节软组织保存于-80 ℃ 冰箱中,留待实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)和蛋白免疫印迹(Western Blot)检测。

1.4.4 组织病理学检测 大鼠双侧膝关节软骨组织固定 72 h,脱钙处理,石蜡包埋,切薄片,脱蜡,HE 或番红-固绿染色,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,最后用中性树脂封片。光镜下观察各组大鼠膝关节软骨病理改变情况,并进行改良 Mankin 评分定量评估软骨损伤情况。

1.4.5 ELISA 检测 按照试剂盒说明书要求,使用多功能酶标仪在 450 nm 波长下测定标准品各孔的吸

光度。以标准品浓度作为横坐标,各孔检测的吸光度值作为纵坐标绘制标准曲线,按照标准曲线方程式计算各组大鼠血清样品 IL-1 β 和 TNF- α 水平。

1.4.6 实时定量 PCR 检测 从冰箱中取出冻存的大鼠软骨组织剪碎,液氮研磨至细颗粒状,采用 Trizol 裂解并加入氯仿震荡后离心,取最上层上清液,加入等体积的异丙醇,充分混匀静置 30 min 后离心,弃上清。加入 75% 乙醇冲洗沉淀,离心弃上清,离心管开盖静置,待残留的乙醇完全挥发,沉淀变为无色凝胶状时加入 ddH₂O 溶解,即为总 RNA。总 RNA 浓度和纯度采用核酸蛋白测定仪测定。总 RNA 经反转录后合成 cDNA。将 ddH₂O 9.5 μ L,相关前引物 F 和后引物 R (终浓度均是 1 μ mol/L)各 1 μ L,cDNA 1 μ L,SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 12.5 μ L 混合后共 25 μ L 体系放入定量 PCR 仪进行扩增。扩增反应完成后分析产物熔解曲线。以 18S 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法计算各组基因相对表达量。所有引物均由上海英潍捷基贸易有限公司合成,引物信息如表 1 所示。

表 1 相关基因的引物信息

基因名称	基因序列号	引物序列(5'-3')	产物长度/bp
MMP13	NM_133530	F:AGGCCTTCAGAAAAGCCTTC R:GAGCTGCTTGTCAGGTTTC	226
Beclin1	NM_053739	F:GCTCCTGTGGAATGGAATGAAA R:CCCAGAACAGTACAACGGCAAC	180
LC3B	NM_022867	F:ATAGAGCGATACAAGGGTGAGAAG R:AGGAGGAAGAAGGCTTGGTAG	143
ULK1	NM_001108341	F:CACTGACAGCCTACAGGAGAAAC R:GGAAGAGCCCACTGAGAACAT	190
18S	M11188	F:ACGGCTACCACATCC R:CAGACTTGCCCTCCA	162

1.4.7 Western Blot 检测 从冰箱中取出冻存的大鼠软骨组织剪碎,液氮研磨至细颗粒状,加入 PIPA 蛋白裂解液与蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物处理后,震荡,离心,取上清。采用 BCA 蛋白定量测定试剂盒测定蛋白浓度,经 SDS-PAGE 电泳及电转移至 PVDF 膜后,用 8% 牛奶封闭膜 1.5 h,加入蛋白一抗抗体 4 ℃ 过夜,第二天回收一抗抗体,Western 洗涤液洗 4 次后加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 孵育膜 1.5 h,Western 洗涤液洗 4 次。将膜置于显影液中反应 1 min,在成像系统中进行发光显影、拍照,最后采用 Image J 软件进行条带灰度值分析。

1.5 统计学方法

研究中数据采用 SPSS 22.0 软件进行分析,最终结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间均数的比较采用单因素方

差分析, $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 补肾强筋胶囊对 KOA 大鼠膝关节软骨病理变化的影响

正常组大鼠膝关节软骨表面光滑,无裂隙,软骨细胞排列规则,大小均匀,层次分明,基质染色正常,有完整的潮线存在;模型组大鼠软骨表面粗糙,软骨层变薄,有不规则裂隙,细胞数明显减少,基质染色减少,潮线大量破坏;补肾高剂量组和低剂量组大鼠软骨表面基本光滑,偶有裂隙,细胞数有所减少,基质染色轻度减退,细胞排列相对整齐,潮线有所残缺(见图 1-图 2)。改良 Mankin 评分结果表明与正常组相比,模型组 Mankin 评分显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$);补肾高剂量组和低剂量组 Mankin

评分显著低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 3。

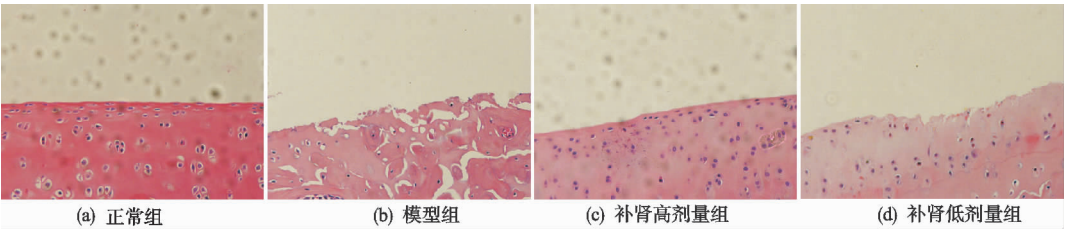


图 1 各组大鼠关节软骨 HE 染色($\times 200$)

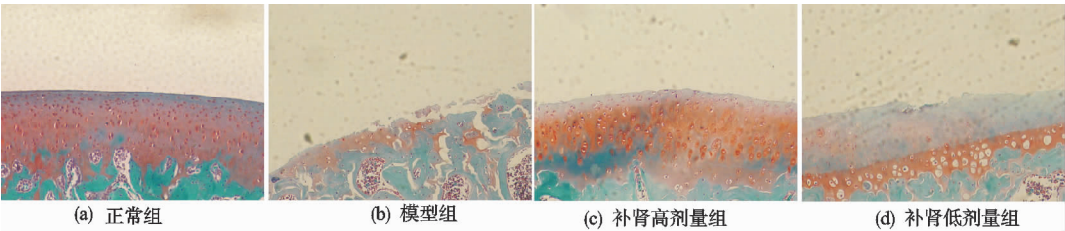


图 2 各组大鼠关节软骨番红-固绿染色($\times 100$)

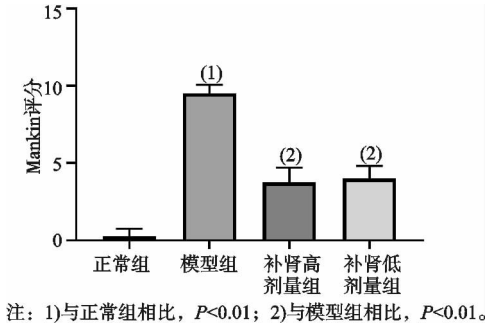


图 3 各组大鼠膝关节软骨 Mankin 评分

2.2 补肾强筋胶囊对 KOA 大鼠血清 IL-1 β 和 TNF- α 水平的影响

如图 4 所示,与正常组相比,模型组大鼠血清 IL-1 β 和 TNF- α 水平显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组相比,补肾高剂量组和低剂量组 IL-1 β 和 TNF- α 水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 补肾强筋胶囊对 KOA 大鼠关节软骨 MMP13、Beclin1、LC3B、ULK1 mRNA 表达的影响

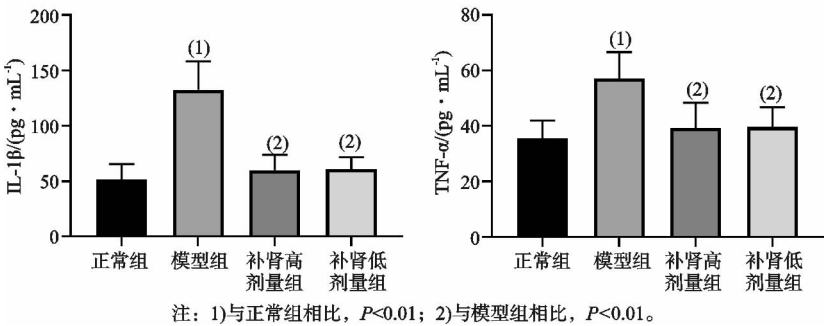


图 4 各组大鼠血清 IL-1 β 和 TNF- α 的水平

如图 5 所示,与正常组相比,模型组 MMP13 mRNA 表达水平显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),Beclin1、LC3B、ULK1 mRNA 表达水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组相比,补

肾高剂量组和低剂量组 MMP13 mRNA 表达水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),Beclin1、LC3B、ULK1 mRNA 表达水平显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

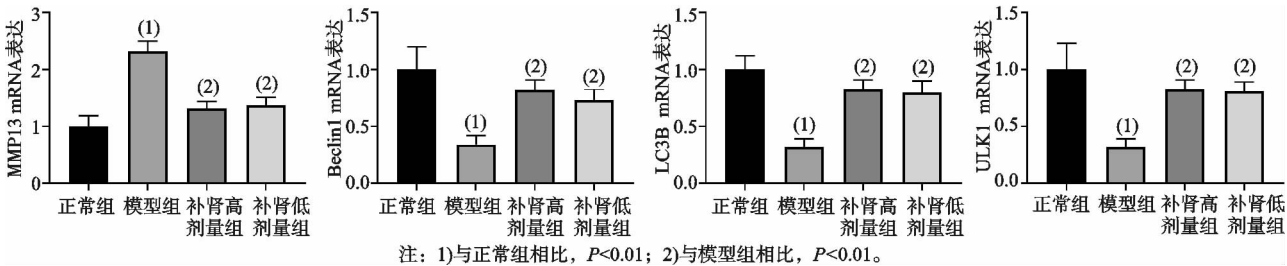


图 5 各组大鼠软骨相关 mRNA 的相对表达

2.4 补肾强筋胶囊对 KOA 大鼠关节软骨 MMP13、Beclin1、LC3B-Ⅱ/Ⅰ、ULK1、p-AMPK、p-mTOR 蛋白表达的影响

如图 6 所示,与正常组相比,模型组 MMP13 和 p-mTOR 蛋白表达水平显著升高,差异有统计学意义 ($P<0.01$),Beclin1、LC3B-Ⅱ/Ⅰ、p-AMPK、ULK1 蛋

白表达水平显著降低,差异有统计学意义 ($P<0.01$);与模型组相比,补肾高剂量组和低剂量组 MMP13 和 p-mTOR 蛋白表达水平显著降低,Beclin1、LC3B-Ⅱ/Ⅰ、ULK1 蛋白表达水平显著升高,补肾高剂量组 p-AMPK 蛋白表达水平显著升高,差异有统计学意义 ($P<0.01$)。

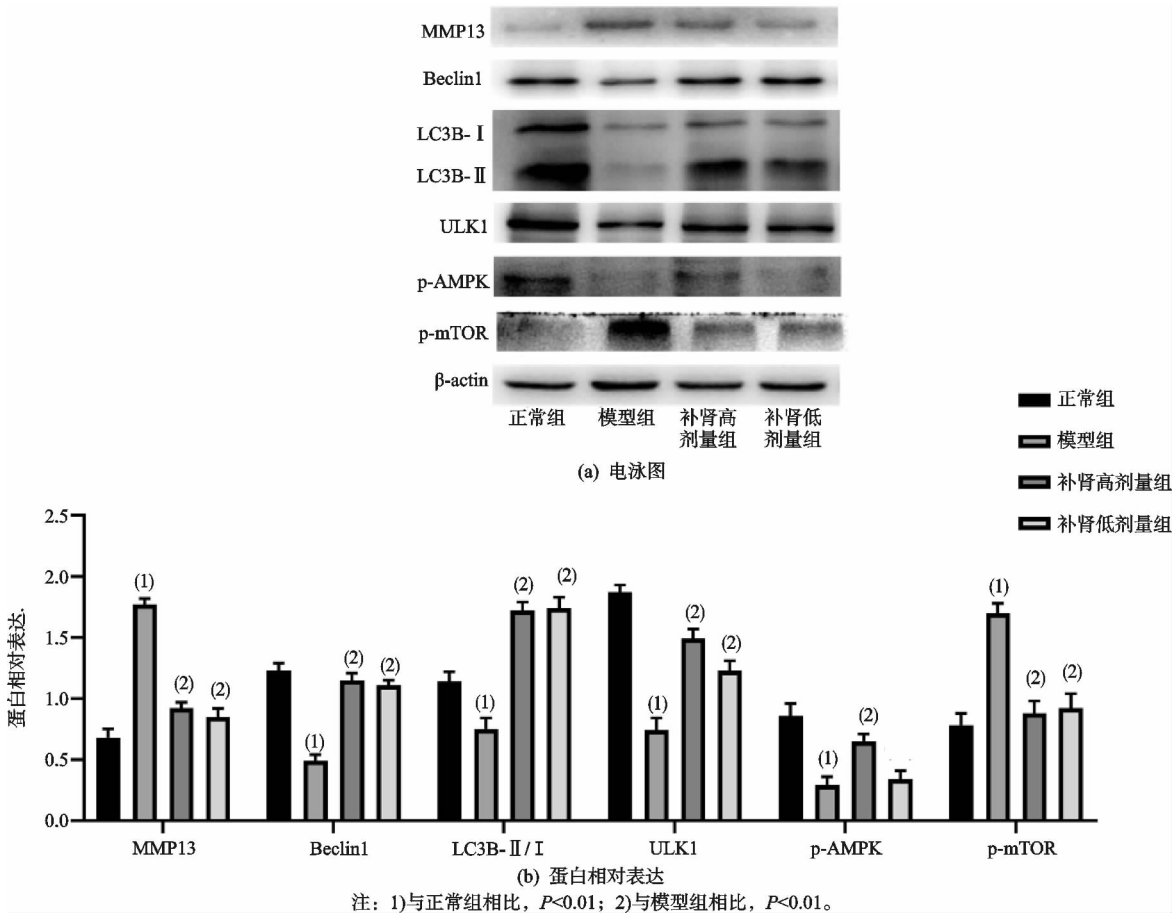


图 6 各组大鼠软骨相关蛋白的相对表达

3 讨论

KOA 的临床表现主要以膝关节进行性疼痛、关节不稳定为特征,属于中医“骨痹”范畴,《素问·长刺论》中记载:“骨痹病,其病在于肾。骨重而不可举,骨髓可见酸痛症状,故名曰骨痹。”其病机特点多为“肾虚血瘀”“肾虚络阻”,当以“补肾活血法”治疗。广东省第二中医院院内制剂补肾强筋胶囊以杜仲、补骨脂、骨碎补、熟地黄四药补肝肾共为君药,血竭活血通络为臣药,全蝎祛风除湿、通络止痛为佐药,六药合用具有强筋壮骨、活血通络之功效。前期的临床报道和实验研究表明其治疗 KOA 疗效良好^[5-10],但其作用机制还未阐明。

本研究通过关节腔注射木瓜蛋白酶复制 KOA 大鼠模型,6 周后染色结果显示模型组大鼠软骨关节面不平整,关节软骨大面积消失,细胞数明显减少,介于正常关节软骨和钙化软骨之间的潮线结构被严重破坏,其 Mankin 评分也明显高于正常组。经补肾强筋

胶囊高、低剂量治疗后,KOA 大鼠的软骨结构更为完整,软骨表面形态受损较轻,Mankin 评分也明显降低。病理观察的结果表明补肾强筋胶囊明显改善了 KOA 大鼠关节软骨病变程度。KOA 发病过程伴随着促炎因子表达的增加^[11],软骨细胞分泌的促炎因子 IL-1 β 和 TNF- α 可以增加 MMP13 的表达,从而导致软骨细胞外基质降解加剧,促进软骨退变^[12-13]。研究发现补肾强筋胶囊降低了促炎因子 IL-1 β 和 TNF- α 的水平,并且通过抑制 MMP13 表达减缓了软骨细胞外基质的分解代谢。

另一方面,这些促炎因子也具有抑制细胞自噬水平的作用^[14]。细胞自噬是真核生物中一种进化保守的溶酶体降解途径,软骨细胞自噬可以为软骨细胞的再生、修复提供原料,维持软骨细胞稳态^[15]。自噬体的形成是自噬过程的必要条件。哺乳动物的自噬关键基因包括 ULK1、Beclin1 和 LC3B。ULK1 处于自噬信号通路中最上游的位置,被认为是自噬的主要调控

因子,在细胞自噬过程中发挥重要作用,招募其他 Atg 蛋白形成自噬体^[16]。ULK1 激酶失活则会抑制自噬发生。Beclin1 是自噬重要的正向调节因子,其表达与自噬水平呈正相关,参与调控自噬体的形成和成熟^[17]。LC3B 为自噬过程中重要的蛋白分子,并且是自噬标志物,有 LC3B-I 和 LC3B-II 两种存在形式,主要参与自噬体的形成^[18]。自噬发生时,LC3B-I 会转化成 LC3B-II,因此 LC3B-II/I 蛋白表达量比值可以用来评估细胞自噬水平。在 KOA 发病过程中,由于软骨细胞正常的自噬水平受到促炎因子的抑制,导致软骨细胞内功能紊乱和受损的细胞器和大分子物质等有害物质无法及时清除,破坏了软骨细胞的稳态,从而加剧了关节软骨退变^[19]。

已有研究表明药物抑制 mTOR 以及软骨特异性敲除 mTOR 都可以减轻小鼠 KOA 的病变程度,抑制 mTOR 信号通路导致软骨细胞的自噬增加,最终起到缓解 KOA 的作用^[14,20]。腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 是细胞主要的能量感受器^[21],AMPK 相关基因敲除后可加重小鼠 KOA 的病变程度^[22]。并且有研究表明 AMPK 信号通路也参与了 KOA 的软骨代谢过程,在 KOA 患者的软骨组织和 IL-1 或 TNF- α 处理的人软骨细胞中均观察到 AMPK 活性的降低^[23]。活化的 AMPK 能够抑制 mTOR 的活性,导致 mTOR 对 ULK1 的抑制作用减弱,ULK1 表达增强,提高细胞自噬水平。当前,广大研究者开始关注 AMPK/mTOR 通路在软骨细胞自噬中扮演的角色。

本研究中关于软骨细胞自噬的结果和 Li 等报道的结果一致^[24],实验中复制的木瓜蛋白酶诱导的 KOA 模型大鼠软骨自噬相关 ULK1、Beclin1、LC3B-II/I 表达均明显下降,表明在此 KOA 模型下存在促炎因子引起的细胞自噬水平下降。研究还发现 p-AMPK 蛋白表达明显降低,p-mTOR 蛋白表达明显上升,表明当前 KOA 大鼠软骨自噬水平降低的状态与 AMPK/mTOR 通路有关。补肾强筋胶囊显著提高了 p-AMPK 蛋白表达水平,降低了 p-mTOR 蛋白表达水平,表明 AMPK 活性增强,mTOR 活性减弱,mTOR 信号通路受到抑制。在此情况下,补肾强筋胶囊显著提高了 ULK1 和 Beclin1 基因和蛋白表达,并且显著提高了 LC3B-II/I 蛋白比值,充分说明其激活了软骨细胞自噬。

综上所述,本研究表明补肾强筋胶囊通过 AMPK/mTOR 通路调节软骨细胞自噬是其有效治疗 KOA 的机制之一。然而补肾强筋胶囊是否通过其他信号通路调控自噬以及该方中调控自噬有效成分的确认还有待进一步研究。

参考文献

[1] CHENG N T, GUO A, MENG H. The protective role of

autophagy in experimental osteoarthritis, and the therapeutic effects of Torin 1 on osteoarthritis by activating autophagy[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2016, 17: 150-159.

[2] CARAMES B, TANIGUCHI N, OTSUKI S, et al. Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage, and its aging-related loss is linked with cell death and osteoarthritis[J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(3): 791-801.

[3] LO P C, LIN F C, TSAI Y C, et al. Traditional Chinese medicine therapy reduces the risk of total knee replacement in patients with knee osteoarthritis[J]. Medicine (Baltimore), 2019, 98(23): e15964.

[4] 施玲玲, 陈东煜. 膝关节骨关节炎的中医药治疗现状[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2014, 22(7): 72-74.

[5] 许学猛, 王羽丰, 邓晋丰, 等. 补肾活血胶囊影响兔膝关节退变性疾病骨内压变化的实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2001, 11(4): 26-29.

[6] 李慧, 曾明珠, 张瑜. 补肾强筋胶囊对早中期膝骨性关节炎滑液中白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子- α 、前列腺素 E-2 及血清前列腺素 E-2 的影响[J]. 中国医药导报, 2019, 16(15): 119-123.

[7] 陈国材, 姚楠, 刘文刚, 等. 补肾活血方含药血清对退变型人原代软骨细胞 microRNA 表达谱的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(5): 1086-1089.

[8] 缪忠绿, 刘文刚, 陈能, 等. 补肾强筋胶囊结合等速肌力训练在膝骨关节炎患者中的应[J]. 世界中西医结合杂志, 2018, 13(5): 710-713.

[9] 刘文刚, 陈能, 许学猛, 等. 补肾强筋胶囊治疗围绝经期及绝经后期膝骨性关节炎临床研究[J]. 河南中医, 2017, 37(5): 911-913.

[10] 姚楠, 陈能, 刘文刚, 等. 补肾活血方调节 miRNA-140-5p 表达干预人原代软骨细胞退变的研究[J]. 风湿病与关节炎, 2017, 6(9): 10-14.

[11] KAPOOR M, MARTEL-PELLETIER J, LAJEUNESSE D, et al. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2011, 7(1): 33-42.

[12] MEHANA E E, KHAFAGA A F, EL-BLEHI S S. The role of matrix metalloproteinases in osteoarthritis pathogenesis: an updated review[J]. Life Sciences, 2019, 234: 116786.

[13] LÓPEZ-ARMADA M J, CARAMÉ S B, LIRES-DEÁN M, et al. Cytokines, tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β , differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2006, 14(7): 660-669.

[14] ZHANG Y, VASHEGHANI F, LI Y H, et al. Cartilage-specific deletion of mTOR upregulates autophagy and protects mice from osteoarthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2015, 74(7): 1432-1440.

[15] VINATIER C, DOMÍNGUEZ E, GUICHEUX J, et al.

- Role of the inflammation-autophagy-senescence integrative network in osteoarthritis[J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 706-711.
- [16] 马涛, 张晓刚, 赵永利, 等. 骨性关节炎软骨细胞自噬中医药研究进展[J]. *中国中医药信息杂志*, 2020, 27(3): 137-140.
- [17] MUSUMECI G, CASTROGIOVANNI P, TROVATO F M, et al. Biomarkers of chondrocyte apoptosis and autophagy in osteoarthritis[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(9): 20560-20575.
- [18] KUMA A, MATSUI M, MIZUSHIMA N. LC3B, an autophagosome marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy: caution in the interpretation of LC3B localization[J]. *Autophagy*, 2007, 3(4): 323-328.
- [19] JEON H, IM G I. Autophagy in osteoarthritis[J]. *Connect Tissue Res*, 2017, 58(6): 497-508.
- [20] TAKAYAMA K, KAWAKAMI Y, KOBAYASHI M, et al. Local intra-articular injection of rapamycin delays articular cartilage degeneration in a murine model of osteoarthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2014, 16(6): 482-489.
- [21] HARDIE D G. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(10): 774-785.
- [22] ZHOU S, LU W, CHEN L, et al. AMPK deficiency in chondrocytes accelerated the progression of instability-induced and ageing-associated osteoarthritis in adult mice[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 43245.
- [23] TERKELTAUB R, YANG B, LOTZ M, et al. Chondrocyte AMP-activated protein kinase activity suppresses matrix degradation responses to proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor[J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(7): 1928-1937.
- [24] LI X, LANG W, YE H, et al. Tougu Xiaotong capsule inhibits the tidemark replication and cartilage degradation of papain-induced osteoarthritis by the regulation of chondrocyte autophagy[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(6): 1349-1356.

(收稿日期: 2020-10-04)

(上接第 12 页)

- [18] PEDERSEN D R, BRAND R A, DAVY D T. Pelvic muscle and acetabular contact forces during gait[J]. *Journal of Biomechanics*, 1997, 30(9): 959-965.
- [19] 冯敏, 从曙光, 郑百林. 人工髋骨接触状态仿真[J]. *计算机辅助工程*, 2014, 23(3): 69-72.
- [20] 蔡跃波, 吴春辉, 李建赤, 等. 股骨粗隆间骨折前倾角改变对步态的影响[J]. *中华关节外科杂志(电子版)*, 2017, 11(2): 135-140.
- [21] 王爱国, 郑昆仑, 张荣位, 等. 股骨粗隆间骨折术后步行状态的生物力学特性[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2019, 25(5): 754-759.
- [22] NODA M, NAKAMURA Y, ADACHI K, et al. Dynamic finite element analysis of implants for femoral neck fractures simulating walking[J]. *Journal of Orthopaedic Surgery*, 2018, 26(2): 920437277.
- [23] 高耀东, 段宇星, 郭鹏年. 基于髋关节 CT 图像三维实体髋骨重建及髋骨承受力数据有限元分析[J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(28): 4564-4569.
- [24] 李兴, 王洪福, 罗伟, 等. 基于术后髋骨 CT 数据重建个性化骨肌多体动力学模型及步态仿真[J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21(35): 5685-5690.
- [25] 杨挺, 郑建河, 姚子龙, 等. 行走中股骨生物力学特性的有限元分析[J]. *广东医学*, 2016, 37(4): 512-515.
- [26] 黄萍, 钟慧敏, 陈博, 等. 正常青年人三维步态: 时空及运动学和运动力学参数分析[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(24): 3882-3888.
- [27] 叶思航, 谢叻, 王海鹏, 等. 基于 3 维动作捕捉的下肢骨折术后步态分析[J]. *江西师范大学学报(自然科学版)*, 2018, 42(5): 507-511.

(收稿日期: 2020-09-06)