

音猬因子复合海藻酸钠水凝胶修复大鼠膝关节软骨缺损

魏明珠¹ 刘伟乐¹ 何信欢¹ 黎旭¹ 詹潇锐¹ 龚凯钦¹ 刘莹松^{1△}

[摘要] 目的:探讨音猬因子(Shh)复合海藻酸钠水凝胶对大鼠膝关节软骨缺损的修复作用。方法:培养人骨髓间充质干细胞(BMSCs),制备音猬因子复合海藻酸钠水凝胶。采用随机对照动物观察实验,选择6周龄48只健康SPF级SD雄性大鼠,全部建立膝关节软骨缺损模型,随后随机分为损伤组、观察组、对照组3组,每组16只。损伤组不进行任何处理;对照组植入不含音猬因子的海藻酸钠水凝胶25 μ L与BMSCs悬液25 μ L;观察组植入含音猬因子的海藻酸钠水凝胶25 μ L与BMSCs悬液25 μ L。12周后各组大鼠接受安乐死并观察膝关节软骨缺损和修复的效果,采用国际软骨修复协会(ICRS)评分评估,并用苏木精-伊红(HE)染色和番红O染色检测膝关节软骨组织变化,用免疫组织化学法检测各组中Ⅱ型胶原蛋白的表达,用qRT-PCR法检测各组中Sox9和糖胺多糖(GAG)的mRNA表达水平。结果:与损伤组比,对照组和观察组大鼠的ICRS评分增加,膝关节软骨组织损伤明显改善,软骨厚度明显增加,Ⅱ型胶原、Sox9 mRNA和GAG mRNA的表达水平都上调($P<0.05$)。与对照组比,观察组大鼠的ICRS评分增加,膝关节软骨组织损伤明显改善,软骨厚度明显增加,Ⅱ型胶原、Sox9 mRNA和GAG mRNA的表达水平都上调($P<0.05$)。结论:音猬因子复合海藻酸钠水凝胶对膝关节软骨缺损具有良好的修复作用。

[关键词] 音猬因子;海藻酸钠水凝胶;膝关节软骨缺损;Ⅱ型胶原

[中图分类号] R684 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2024)02-0007-05

DOI:10.20085/j.cnki.issn1005-0205.240202

Sonic Hedgehog Factor-Loaded Sodium Alginate Hydrogel on the Repair of Rat Knee Articular Cartilage Defects

WEI Mingzhu¹ LIU Weile¹ HE Xinhuan¹ LI Xu¹
ZHAN Xiaorui¹ GONG Kaiqin¹ LIU Yingsong^{1△}

¹ Huizhou First Hospital, Huizhou 516003, Guangdong China.

Abstract Objective: To investigate the effect of sonic hedgehog factor (Shh)-loaded sodium alginate hydrogel on the repair of the rat knee articular cartilage defects. **Methods:** Human bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) were cultured. Shh-loaded sodium alginate hydrogel was prepared. A randomized controlled animal observation experiment was conducted. 48 healthy SPF male SD rats aged 6 weeks were selected to establish knee cartilage defect models. They were randomly divided into three groups: injury group, observation group, and control group, with 16 rats in each group. The injury group did not receive any treatment, the control group was implanted with 25 μ L of Shh-free sodium alginate hydrogel and 25 μ L of BMSCs suspension, and the observation group was implanted with 25 μ L of Shh-loaded sodium alginate hydrogel and 25 μ L of BMSCs suspension. After 12 weeks, the rats in each group were euthanized, and the effect of cartilage defect and repair were observed. International cartilage repair society (ICRS) scores were assigned, and histological changes in cartilage tissue were evaluated using hematoxylin and eosin (HE) staining and Safranin O staining. Immunohistochemistry was performed to detect the expression of type II collagen in each group. The qRT-PCR was used to measure the

mRNA expression levels of Sox9 and glycosaminoglycan (GAG) in each group. **Results:** Compared with the injury group, the ICRS scores of the control group and observation group rats increased, the cartilage tissue injury of knee joint was significantly improved, and the cartilage thickness was

基金项目:广东省惠州市科技计划(医疗卫生)项目

(2022CZ010143)

¹ 惠州市第一人民医院(广东 惠州, 516003)

[△]通信作者 E-mail:liuyingsong@live.com

significantly increased. The expression levels of type II collagen, Sox9 mRNA, and GAG mRNA were up-regulated in both groups ($P < 0.05$). Compared with the control group, the ICRS scores of the observation group rats increased, the cartilage tissue injury of knee joint was significantly improved, and the cartilage thickness was significantly increased. The expression levels of type II collagen, Sox9 mRNA, and GAG mRNA were up-regulated in the observation group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Shh-loaded sodium alginate hydrogel exhibits excellent reparative effects on knee articular cartilage defects.

Keywords: sonic hedgehog factor; sodium alginate hydrogel; knee articular cartilage defect; type II collagen

膝关节退变、炎症或创伤会导致不可逆的关节软骨缺损^[1],严重影响患者生活质量^[2],目前,治疗膝关节软骨缺损仍是重大挑战^[3]。海藻酸钠因其类似于细胞外基质(Extracellular Matrix, ECM)结构,在骨组织工程仿生技术中广受欢迎^[4-5]。音猬因子(Sonic Hedgehog, Shh)在软骨缺损发生中及软骨细胞分化和凋亡中起着重要作用^[6]。音猬因子复合海藻酸钠水凝胶对膝关节软骨损伤的修复作用尚不清楚,本研究旨在阐明音猬因子复合海藻酸钠水凝胶对大鼠膝关节软骨缺损的修复作用,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

50只成年雄性无特定病原级别(SPF)SD大鼠购于广州复锐西科生物医药科技有限公司(生产许可编号为SCXK(粤)1301-G015723)。大鼠饲养于23~25℃,相对湿度为40%~70%,明/暗循环为12 h/12 h(06:00~18:00 昼, 18:00~06:00 夜)的环境中,所有大鼠均接受普通标准大鼠饲料和自来水并自由进食饮水,大鼠适应性饲养48 h后进行实验。

1.2 主要试剂

海藻酸钠水凝胶购于青岛双成海藻有限公司(HZ-0035),骨髓间充质干细胞(BMSCs)购于杭州滨尼生物科技有限公司(Ce097373),重组音猬因子蛋白购于北京百普赛斯生物科技股份有限公司(ACC-006)。CaCl₂溶液购于天津美德太平洋科技有限公司(09000318794),苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(C0105M)和番红O染色试剂盒(T4103)购于上海碧云天生物科技有限公司,兔抗II型胶原的一抗(ab307674)和山羊抗兔IgG的二抗(ab6721)购于英国Abcam公司。RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit试剂盒(74104)和PrimeScript™ RT试剂盒(ER104)购于北京天根生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 骨髓间充质干细胞培养 取液氮冻存的骨髓间充质干细胞,复苏后以 1×10^{10} 个/L的细胞浓度接种于含10% FBS的DMEM培养皿中。细胞在37℃和5% CO₂的培养箱中培养,每隔24 h换液一次。48 h传代一次,对数生长期的骨髓间充质干细胞用于

后续实验。

1.3.2 海藻酸钠水凝胶的制备 将海藻酸钠溶于PBS中,配制浓度为0.5%的海藻酸钠溶液,静置去除气泡。将音猬因子溶解于PBS中以制备100 mg/L的音猬因子溶液。将适量音猬因子溶液加入海藻酸钠溶液中,混合均匀。在混合溶液中加入浓度为2%的CaCl₂溶液,静置15 min,滤出凝胶备用。同理制备不含音猬因子的海藻酸钠水凝胶。在动物实验修复软骨缺损前,将等体积的骨髓间充质干细胞悬液注入海藻酸钠水凝胶中并混合均匀。

1.3.3 膝关节软骨缺损模型的制作 采用随机对照动物观察实验。选择6周龄48只健康SPF级SD雄性大鼠作为研究对象,体重为145~160 g,取48只建立膝关节软骨缺损模型,造模后根据随机数字表,将造模的大鼠用随机数字表法分为损伤组、观察组和对照组,每组16只。损伤组不进行任何处理;对照组植入不含音猬因子的海藻酸钠水凝胶25 μL与骨髓间充质干细胞悬液25 μL,细胞浓度为 1×10^{10} 个/L;观察组植入含音猬因子的海藻酸钠水凝胶25 μL与骨髓间充质干细胞悬液25 μL,细胞浓度为 1×10^{10} 个/L。

大鼠按10%水合氯醛(0.33 mL/100 g 体重)进行腹腔注射麻醉,麻醉满意后常规备皮消毒铺巾,取左髌旁内侧切口显露膝关节,打开关节囊,暴露关节腔,向外侧脱位髌骨,暴露髌股关节面滑车切迹的软骨,在距髌间窝上2 mm处制备直径为2 mm、深度为1.5 mm的圆形软骨全层缺损模型,复位髌骨,充分止血,逐层关闭切口。术后大鼠每日肌注青霉素,共3 d,不采取固定措施,继续喂养。

1.3.4 大体观察 术后12周时,每组随机处死8只大鼠,打开关节腔后,取出膝关节,观察缺损修复程度、表面光滑程度及与周围区域融合程度。根据国际软骨修复协会(International Cartilage Repair Society, ICRS)评分标准进行缺损评估,该评分主要包括缺损修复程度、边界的整合、大体表现3个方面,每个参数0~4分,总分12分为正常,8~11分为接近正常,4~7分为异常,1~3分为严重异常。

1.3.5 组织学观察 分离股骨滑车标本,生理盐水冲洗,置于4%甲醛溶液中固定48 h,脱钙液脱钙20 d。

体积分数 95%，100%乙醇脱水，二甲苯透明，石蜡包埋、切片，切片厚度约为 5 μm ，进行常规苏木精-伊红染色与番红 O 染色。

1.3.6 免疫组化染色 大体观察后分离股骨滑车标本，生理盐水冲洗，置于 4%甲醛溶液中固定 48 h，脱钙液脱钙 20 d。体积分数 95%，100%乙醇脱水，二甲苯透明，石蜡包埋、切片，切片厚度约 4 μm 。65 $^{\circ}\text{C}$ 展片 30 min，滴加胰蛋白酶工作液处理 15 min，在室温下用血清封闭液封闭 15 min，洗涤 PBS，然后用稀释（1:200）的 II 型胶原孵育过夜，用生物素标记小鼠抗大鼠 IgG 二抗孵育 30 min，DAB 显色，苏木精复染，脱水、透明、中性树脂封片，显微镜下分析 II 型胶原蛋白表达。

根据组织学与免疫组化染色结果，Wakitani 评分标准进行组织学评分，总分为 0~14 分，包括细胞形态、修复组织表面平整度、修复组织厚度、修复组织与周围软骨结合情况、II 型胶原染色几个方面，总评分越低说明修复效果越好。

1.3.7 qRT-PCR 检测 术后 12 周，取对照组与观察组的膝关节软骨组织，qRT-PCR 检测 Sox9、糖胺多糖（Glycosaminoglycan, GAG）mRNA 的表达。按照 RNeasy® LipidTissueMiniKit 试剂盒说明书提取总 RNA，以 PrimeScript™ RT 试剂盒将总 RNA 逆转录为 cDNA。用 qRT-PCR 检测系统执行基因的相对表达的检测，通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算表达的相对水平，GAPDH 作为 mRNA 的内参基因。

1.4 统计学方法

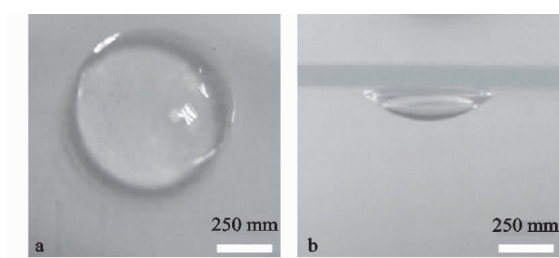
采用 SPSS 22.0 进行数据分析，采用 K-S 法检验计量资料的正态性，采用 Levene 法检验计量资料的方差齐性，对符合正态分布且方差齐的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 形式表示，多组样本比较采用方差分析；非正态分布或

方差不齐时，计量资料用中位数（25%位数—75%位数）表示，行 Mann-Whitney U 秩和检验； $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 海藻酸钠水凝胶的特征

通过质谱和高效液相色谱验证，本研究制备的海藻酸钠水凝胶被证明成功合成。海藻酸钠水凝胶相对分子质量为 1 320.45，纯度为 95.11%。海藻酸钠水凝胶形成了纳米纤维，该纤维的直径平均为 $(13.4 \pm 4.9) \text{ nm}$ ，长度可达 600 nm。这些纳米纤维交织在一起，形成网状的多孔结构。另外，0.5%海藻酸钠水凝胶能够快速自组装生成水凝胶，结构完整均匀，有足够的内聚力保持固定形状，见图 1。

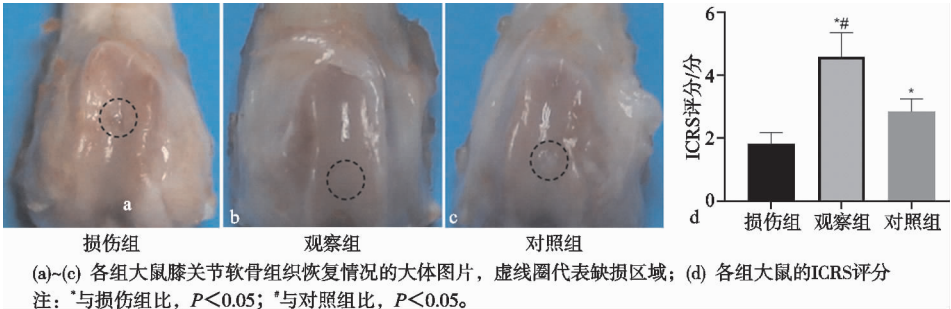


(a) 载玻片上凝胶呈现均匀的、无明显凝胶颗粒，凝胶表面具有一定的弹性；(b) 当载玻片倒置时，凝胶无表现出明显的流动性

图 1 海藻酸钠水凝胶的照片

2.2 音猬因子复合海藻酸钠水凝胶治疗对膝关节软骨缺损大鼠 ICRS 评分的影响

观察组大鼠的膝关节软骨组织在经过音猬因子复合海藻酸钠水凝胶治疗后软骨缺损特征明显改善，而且音猬因子复合海藻酸钠水凝胶效果优于对照组，见图 2(a-c)。与损伤组比，观察组的 ICRS 评分显著增加，而且对照组的 ICRS 评分也增加，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。另外，与对照组比，观察组的 ICRS 评分显著增加，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，见图 2d。



(a)~(c) 各组大鼠膝关节软骨组织恢复情况的大体图片，虚线圈代表缺损区域；(d) 各组大鼠的 ICRS 评分
注：*与损伤组比， $P < 0.05$ ；*与对照组比， $P < 0.05$ 。

图 2 音猬因子复合海藻酸钠水凝胶治疗对膝关节软骨缺损大鼠 ICRS 评分的影响

2.3 音猬因子复合海藻酸钠水凝胶治疗对膝关节软骨缺损大鼠软骨组织的修复作用

采用 HE 染色和番红 O 染色评估各组中缺损的软骨组织的修复情况，HE 染色结果显示观察组和对照组的钙质软骨厚度均较损伤组明显减少，见图 3。

番红 O 染色同样观察到观察组和对照组的软骨厚度较损伤组明显增加，而且与对照组比，观察组的软骨层更厚，表明音猬因子复合海藻酸钠水凝胶的治疗能够增加软骨的修复从而改善了膝关节软骨缺损，见图 3。

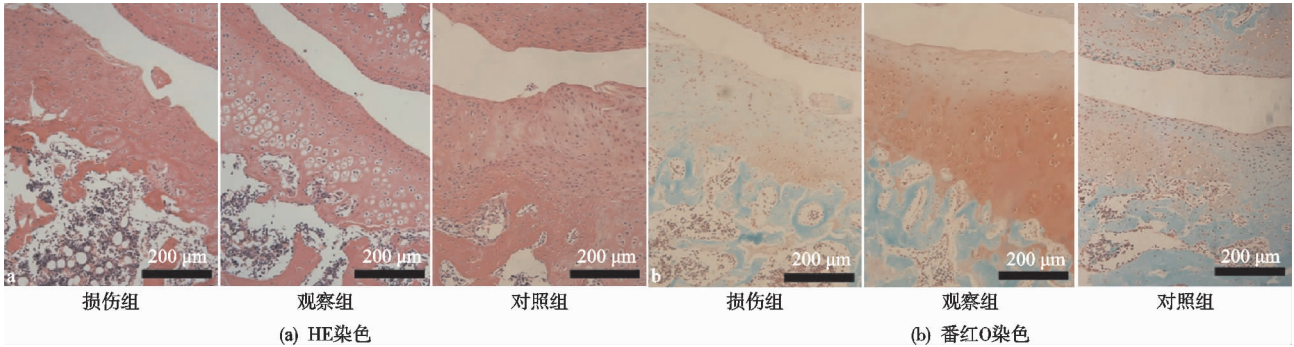


图3 采用 HE 和番红 O 染色对缺损的软组织进行组织学分析(×100)

2.4 音猬因子复合海藻酸钠水凝胶治疗对膝关节软骨缺损大鼠中Ⅱ型胶原表达的影响

与损伤组比,观察组的Ⅱ型胶原表达阳性区域占比显著增加,而且对照组的Ⅱ型胶原表达阳性区

域占比较损伤组也增加,差异都有统计学意义($P < 0.05$)。另外,与对照组比,观察组的Ⅱ型胶原表达阳性区域占比显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图4。

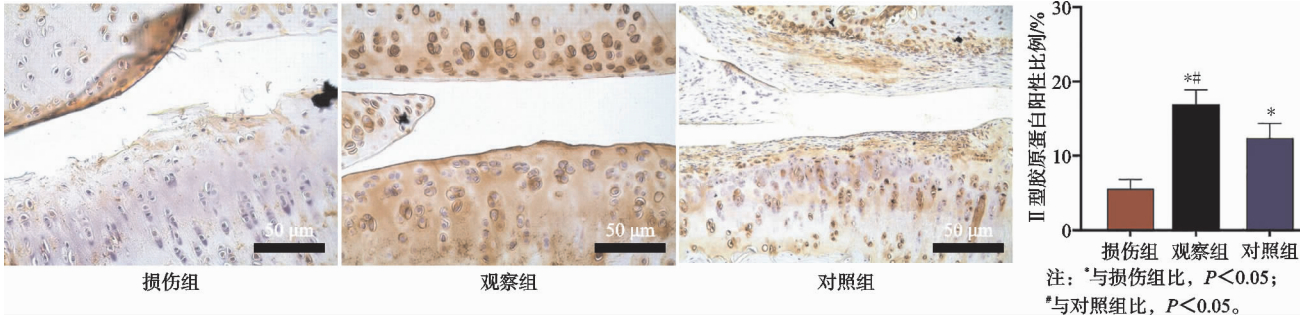


图4 采用免疫组织化学法检测Ⅱ型胶原蛋白的表达

2.5 音猬因子复合海藻酸钠水凝胶治疗对膝关节软骨缺损大鼠 Sox9、GAG 表达的影响

与损伤组比,观察组的 Sox9 和 GAG 的 mRNA 表达水平都显著增加,而且对照组的 Sox9 和 GAG 的 mRNA 表达水平较损伤组也增加,差异都有统计学意义($P < 0.05$)。另外,与对照组比,观察组的 Sox9 和 GAG 的 mRNA 表达水平都显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图5。

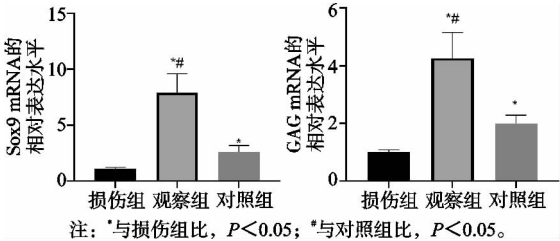


图5 采用 qRT-PCR 法检测 Sox9 和 GAG 的 mRNA 水平

3 讨论

膝关节软骨缺乏血管及营养供应的生理结构特点,因此损伤或缺损后不仅难以自行修复^[7],而且关节软骨缺损易造成关节疼痛、肌肉萎缩和功能障碍^[8],这也使得膝关节软骨缺损的治疗更加困难^[9]。主要的软骨修复技术如骨髓刺激和同种异体/自体移植还存在局限性,如组织整合增加疾病传播的风险,造成继发性创伤,无法永久解决实际问题^[10]。因此,提高膝关节

软骨缺损后的修复作用是一个非常重要的医学课题。膝关节软骨缺损如果不及时治疗,即使是较小的损伤也可能会逐渐恶化,最终导致整个关节的退变和骨关节炎。目前治疗膝盖关节软骨缺损的方法有很多,包括降低体重、营养、锻炼、药物和外科手术等^[11-12]。然而传统的保守治疗效果有限,而关节内注射药物治疗的疗效也不确定,因此寻找新的软骨修复手段非常必要。本研究观察了音猬因子复合海藻酸钠水凝胶在软骨缺损修复中的作用。

海藻酸钠水凝胶是一种新型的支架材料,被广泛应用于内源性软骨细胞的募集^[4],海藻酸钠具有良好的生物相容性、生物降解性、生物稳定性和安全性。作为一种天然多糖,可以吸水膨胀形成孔径约为 5 nm 的水凝胶,可以用于大多数药物或蛋白质。海藻酸钠的柔韧性使其能完全适应组织缺损,并能负载生物活性分子,其独特的三维凝胶结构可为种子细胞提供三维生长空间,良好的缓释性能为其在人体内的应用奠定了基础^[4]。该凝胶还可以通过微创方式注入关节内,并提供润滑和填补软骨缺损的作用,具有较大的优势^[13]。另外,除了类似于细胞外基质外,海藻酸钠水凝胶无毒性,并且有很好的生物相容性,海藻酸钠水凝胶对细胞活力、细胞增殖、钙含量、碱性磷酸酶和骨钙素水平都有正向促进作用^[4]。本研究通过建立膝关节

软骨缺损大鼠模型,在体内证明了海藻酸钠水凝胶以及音猬因子复合海藻酸钠水凝胶在膝关节软骨缺损修复中的优越性。海藻酸钠水凝胶及音猬因子复合海藻酸钠水凝胶不仅能够促进软骨细胞生长的标志物的表达,还具备良好的软骨修复、界面整合和软骨再生作用。另外,音猬因子复合海藻酸钠水凝胶的作用效果明显强于海藻酸钠水凝胶,因此音猬因子复合海藻酸钠水凝胶是一种非常有潜力的膝关节软骨缺损修复的候选者。

音猬因子蛋白是哺乳动物中最广泛表达的刺猬(Hedgehog, Hh)蛋白,其控制着从胚胎到成体的发育^[14]。音猬因子蛋白是哺乳动物中最广泛表达的Hh蛋白,其控制着从胚胎到成体的发育,其主要作用是促进胚胎早期的肢体和脊髓中的骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化。音猬因子蛋白在骨发生蛋白信号通路的诱导下可以促进Sox9形成自身调节回路,并调节着软骨细胞的增殖及分化作用,主要是对软骨细胞的分化晚期具有特异性且作用显著,而且音猬因子可激活软骨细胞促使其成熟,并抑制软骨细胞的退变^[15],这与音猬因子介导的发育调控可能具有重要关系。另外,音猬因子信号通路在不同的细胞中调控增殖、分化、凋亡等^[16],内源性音猬因子可以调节血管生成基因和血管腔的形成^[17],外源性音猬因子进一步诱导体外血管系统的发育(血管腔的形成、大小和分布)。植入音猬因子后,体外血管的发育改善了人工组织的体内灌注,是促进新生成成熟骨组织形成的必要条件。与再生的愈伤组织类似,人工组织经过膜内和软骨内成骨,形成骨小梁样骨器官,包括骨髓样腔^[18]。本研究中与海藻酸钠水凝胶比,音猬因子复合海藻酸钠水凝胶治疗后大鼠的ICRS评分明显增加,软骨组织损伤明显改善,软骨厚度也明显增加。为进一步验证音猬因子复合海藻酸钠水凝胶的软骨缺损修复作用,笔者利用番红O染色和HE染色检测了膝关节软骨组织缺损后各组的变化,发现音猬因子复合海藻酸钠水凝胶具有较好的软骨修复、界面整合和软骨再生作用,效果强于海藻酸钠水凝胶。笔者推测这与音猬因子具备较好的诱导软骨细胞增殖作用以及抑制细胞凋亡的功能有关,进一步检测软骨细胞标志物Ⅱ型胶原、Sox9、GAG的表达水平,发现在膝关节软骨缺损治疗中音猬因子复合海藻酸钠水凝胶对Ⅱ型胶原、Sox9、GAG表达的促进作用强于海藻酸钠水凝胶。以上结果均表明音猬因子复合海藻酸钠水凝胶对膝关节软骨缺损具有良好的修复作用。

综上所述,本研究表明音猬因子复合海藻酸钠水凝胶可以促进软骨的修复和再生,改善软骨缺损的界

面整合。因此,音猬因子复合海藻酸钠水凝胶将是一种很有前途的促进软骨再生的候选者。

参考文献

- [1] SALZMANN G M, OSSENDORFF R, GILAT R, et al. Autologous minced cartilage implantation for treatment of chondral and osteochondral lesions in the knee joint: an overview[J]. *Cartilage*, 2021, 13(1): 1124S-1136S.
- [2] SUN T Y, HSU C L, TSENG W C, et al. Risk factors associated with cartilage defects after anterior cruciate ligament rupture in military draftees[J]. *J Pers Med*, 2022, 12(7): 1076.
- [3] SZWEDOWSKI D, SZCZEPANEK J, PACZESNY Ł, et al. The effect of platelet-rich plasma on the intra-articular microenvironment in knee osteoarthritis[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 5492.
- [4] YUAN H, ZHENG X, LIU W, et al. A novel bovine serum albumin and sodium alginate hydrogel scaffold doped with hydroxyapatite nanowires for cartilage defects repair[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2020, 192: 111041.
- [5] FAROKHI M, JONIDI SHARIATZADEH F, SOLOUK A, et al. Alginate based scaffolds for cartilage tissue engineering: a review[J]. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 2020, 69(4): 230-247.
- [6] SEROWOKY M A, KUWAHARA S T, LIU S, et al. A murine model of large-scale bone regeneration reveals a selective requirement for sonic hedgehog[J]. *NPJ Regen Med*, 2022, 7(1): 30.
- [7] 敖英芳, 代文立. 关节软骨损伤修复进展[J]. *临床外科杂志*, 2021, 29(4): 301-304.
- [8] 王远政, 陈龙, 余荣峰, 等. 透明质酸钠结合尿源性干细胞修复创伤性软骨缺损的实验研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2019, 43(10): 1318-1323.
- [9] KRYCH A J, SARIS D B F, STUART M J, et al. Cartilage injury in the knee: assessment and treatment options[J]. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 2020, 28(22): 914-922.
- [10] CASE J M, SCOPP J M. Treatment of articular cartilage defects of the knee with microfracture and enhanced microfracture techniques[J]. *Sports Medicine and Arthroscopy Review*, 2016, 24(2): 63-68.
- [11] LI M, YIN H, YAN Z, et al. The immune microenvironment in cartilage injury and repair[J]. *Acta Biomaterialia*, 2022, 140: 23-42.
- [12] SUN X, ZHEN X, HU X, et al. Osteoarthritis in the middle-aged and elderly in China: prevalence and influencing factors[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2019, 16(23): 4701.

- [7] 陈长兴,仲卫红,金灵璐,等.乌头汤抑制膝关节炎软骨细胞氧化应激反应的作用研究[J].风湿病与关节炎,2022,11(11):1-4.
- [8] KEDZIORA M,BOCCCELLA S,MARABESE I,et al. Inhibition of anandamide breakdown reduces pain and restores LTP and monoamine levels in the rat hippocampus via the CB₁ receptor following osteoarthritis[J]. *Neuropharmacology*,2023,222(1):109304-109314.
- [9] DAGNEAUX L,LIMBERG A K,OWEN A R,et al. Knee immobilization reproduces key arthrofibrotic phenotypes in mice[J]. *Bone Joint Res*,2023,12(1):58-71.
- [10] KAYA S,BAILEY K N,SCHYRMAN C A,et al. Bone-cartilage crosstalk informed by aging mouse bone transcriptomics and human osteoarthritis genome-wide association studies[J]. *Bone Rep*,2022,18(12):101647-101658.
- [11] MA K,SINGH G,WANG J,et al. Targeting vascular endothelial growth factor receptors as a therapeutic strategy for osteoarthritis and associated pain[J]. *Int J Biol Sci*,2023,19(2):675-690.
- [12] FUJIWARA Y,DING C,SANADA Y,et al. miR-23a/b clusters are not essential for the pathogenesis of osteoarthritis in mouse aging and post-traumatic models[J]. *Front Cell Dev Biol*,2023,10(1):1043259-1043272.
- [13] LI G,LIU S,CHEN Y,et al. Teriparatide ameliorates articular cartilage degradation and aberrant subchondral bone remodeling in DMM mice[J]. *J Orthop Translat*,2022,38(12):241-255.
- [14] HE Q,YANG J,PAN Z,et al. Biochanin a protects against iron overload associated knee osteoarthritis via regulating iron levels and NRF2/System xc-/GPX4 axis[J]. *Biomed Pharmacother*,2023,157(1):113915-113930.
- [15] CHRISTIANSEN B A,CHAN D D,VAN DER MEULEN M C H,et al. Small-animal compression models of osteoarthritis[J]. *Methods Mol Biol*,2023,2598(1):345-356.
- [16] 武永利,李龙,刘君伟,等.温针灸抑制 NLRP3 炎症小体激活改善兔膝关节炎的软骨损伤[J].中国组织工程研究,2023,27(20):3202-3208.
- [17] 赵文婷,朱兴旺,赵晓峰,等.乌头汤及四妙丸对人肿瘤坏死因子- α 转基因关节炎小鼠模型的作用研究[J].中华中医药杂志,2021,36(5):2534-2538.
- [18] CHENG X,PI Z,ZHENG Z,et al. Combined 16S rRNA gene sequencing and metabolomics to investigate the protective effects of Wu-tou decoction on rheumatoid arthritis in rats[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*,2022,1199(5):123249-123250.
- [19] XIA T,ZHAO R,HE S,et al. Gardenoside ameliorates inflammation and inhibits ECM degradation in IL-1 β -treated rat chondrocytes via suppressing NF- κ B signaling pathways[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2023,640(1):164-172.
- [20] SOPHOCLEOUS A,AZFER A,HUESA C,et al. Probiotics inhibit cartilage damage and progression of osteoarthritis in mice[J]. *Calcif Tissue Int*,2023,112(1):66-73.
- [21] TU Q,XU L L,ZHANG H F,et al. Andrographolide improves the dysfunction of endothelial progenitor cells from angiotensin II-induced hypertensive mice through SIRT1 signaling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2023,642:11-20.
- [22] CHEN J,ZHANG J,LI J,et al. 1,25-dihydroxyvitamin D deficiency accelerates aging-related osteoarthritis via downregulation of SIRT1 in mice[J]. *Int J Biol Sci*,2023,19(2):610-624.

(收稿日期:2023-07-06)

(上接第 11 页)

- [13] LI X,LU Y,WANG Y,et al. Thermo-responsive injectable naringin-loaded hydrogel polymerised sodium alginate/bioglass delivery for articular cartilage[J]. *Drug Deliv*,2021,28(1):1290-1300.
- [14] CHEN L,LIU G,LI W,et al. Synergistic effects of Indian hedgehog and sonic hedgehog on chondrogenesis during cartilage repair[J]. *J Mol Histol*,2021,52(2):407-418.
- [15] FENG M,LIU W,DING J,et al. Sonic hedgehog induces mesenchymal stromal cell senescence-associated secretory phenotype and chondrocyte apoptosis in human osteoarthritic cartilage[J]. *Front Cell Dev Biol*,2021,9:716610.
- [16] CHEN S,GU S,XU M,et al. Krüppel-like factor 9 promotes neuroblastoma differentiation via targeting the sonic hedgehog signaling pathway[J]. *Pediatr Blood Cancer*,2020,67(3):e28108.
- [17] BAUSCH D,FRITZ S,BOLM L,et al. Hedgehog signaling promotes angiogenesis directly and indirectly in pancreatic cancer[J]. *Angiogenesis*,2020,23(3):479-492.
- [18] CARADU C,GUY A,JAMES C,et al. Endogenous sonic hedgehog limits inflammation and angiogenesis in the ischaemic skeletal muscle of mice[J]. *Cardiovasc Res*,2018,114(5):759-770.

(收稿日期:2023-08-09)