

· 基础研究 ·

# 黄芪甲苷对人膝关节炎退变关节软骨细胞基质金属蛋白酶-1 及基质金属蛋白酶-3mRNA 表达的影响

孙书龙<sup>1</sup>, 姜宏<sup>2</sup>, 汤晓晨<sup>2</sup>, 孟祥奇<sup>2</sup>, 龚正丰<sup>2</sup>, 王拥军<sup>3</sup>, 莫文<sup>4</sup>

(1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210046; 2. 江苏省苏州市中医医院, 江苏 苏州 215009; 3. 上海中医药大学脊柱病研究所, 上海 200032; 4. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032)

**摘要 目的:**研究黄芪甲苷对人膝关节炎退变关节软骨细胞基质金属蛋白酶-1 及基质金属蛋白酶-3mRNA 表达的影响。**方法:**取膝关节炎患者膝关节软骨进行细胞培养, 将培养的软骨细胞分离传代后取第 3 代细胞, 通过 HE 染色、甲苯胺蓝染色和 II 型胶原免疫荧光染色进行软骨细胞鉴定, 并进行基质金属蛋白酶-1 和基质金属蛋白酶-3 免疫荧光染色。观察软骨细胞退变情况后将其分为 6 组, A 组不进行干预; B 组加入  $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  黄芪甲苷; C 组加入  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  黄芪甲苷; D 组加入  $75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  黄芪甲苷; E 组加入  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  黄芪甲苷; F 组加入  $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  黄芪甲苷。分别于培养开始后 4 h、8 h、24 h、48 h、72 h 5 个时间点, 采用实时荧光定量聚合酶链式反应检测各组退变软骨细胞内基质金属蛋白酶-1 和基质金属蛋白酶-3mRNA 表达的情况。**结果:**①形态观察。原代细胞中梭形细胞和多角形细胞并存, 细胞核偏于细胞的一侧而贴近细胞膜, 细胞纤丝较长。HE 染色细胞质为红色, 胞膜呈蓝色; 甲苯胺蓝染色细胞质和胞膜均呈深蓝色; II 型胶原染色阳性为绿色荧光, 细胞核采用 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚复染, 在不同波段荧光激发下, 胞浆和胞膜可见清晰绿色荧光, 细胞核区域未见明显绿色荧光, 证明培养细胞表达特征性基因 II 型胶原, 主要分布在胞浆和细胞膜上, 证明所培养的细胞为软骨细胞。基质金属蛋白酶-1 和基质金属蛋白酶-3 免疫荧光染色可见清晰绿色荧光, 软骨细胞以多角形多见。②基质金属蛋白酶-1mRNA 表达。不同时间点间软骨细胞基质金属蛋白酶-1mRNA 表达水平有差异 ( $F=11.027, P=0.000$ ); 不同组间软骨细胞基质金属蛋白酶-1mRNA 表达水平有差异 ( $F=102.345, P=0.000$ ), A 组高于 B 组、C 组、D 组、E 组 ( $P=0.000; P=0.000; P=0.000; P=0.000$ ), F 组高于 A 组、B 组、C 组、D 组、E 组 ( $P=0.009; P=0.000; P=0.000; P=0.000; P=0.000$ ); 时间因素和组间因素存在交互效应 ( $F=8.258, P=0.000$ )。③基质金属蛋白酶-3mRNA 表达。不同时间点间软骨细胞基质金属蛋白酶-3mRNA 表达水平有差异 ( $F=12.316, P=0.000$ ); 不同组间软骨细胞基质金属蛋白酶-3mRNA 表达水平有差异 ( $F=66.112, P=0.000$ ), A 组高于 B 组、C 组、D 组、E 组 ( $P=0.008; P=0.000; P=0.000; P=0.000$ ), F 组高于 A 组、B 组、C 组、D 组、E 组 ( $P=0.000; P=0.000; P=0.000; P=0.000; P=0.000$ ); 时间因素和组间因素存在交互效应 ( $F=14.846, P=0.000$ )。**结论:**低浓度的黄芪甲苷能通过抑制退变软骨细胞合成基质金属蛋白酶-1 和基质金属蛋白酶-3, 延缓软骨细胞退变; 浓度过高则会促进退变软骨细胞合成基质金属蛋白酶-1 和基质金属蛋白酶-3, 加速软骨细胞退变。

**关键词** 骨关节炎, 膝 软骨细胞 黄芪甲苷 基质金属蛋白酶 1 基质金属蛋白酶 3

**Effect of astragaloside IV on the expression of matrix metalloproteinase - 1 mRNA and matrix metalloproteinase - 3 mRNA in the chondrocytes of degenerated joint for patients with knee osteoarthritis** SUN Shu-long\*, JIANG Hong, TANG Xiao-chen, MENG Xiang-qi, GONG Zheng-feng, WANG Yong-jun, MO Wen. \* Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, Jiangsu, China

**ABSTRACT Objective:** To study on the effect of astragaloside IV on the expression of matrix metalloproteinase - 1 mRNA (MMP - 1 mRNA) and matrix metalloproteinase - 3 mRNA (MMP - 3 mRNA) in the chondrocytes of degenerated joint for patients with knee osteoarthritis (KOA). **Methods:** Knee joint cartilages were fetched out from KOA patients for cell culture, and the third generation cells were chosen from the cultured chondrocytes after isolation and subculture. Chondrocytes identification was made through HE staining, toluidine blue staining and collagen type II immunofluorescence staining, then immunofluorescent staining was used to detect MMP - 1 and MMP - 3. The chondrocytes were divided into 6 groups after observing their degeneration conditions. Cells in group A were not intervened, cells in other groups were placed in the culture fluids respectively added with  $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  astragaloside IV (group B),  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  astragaloside IV

基金项目: 江苏省中医药管理局计划项目 (HZ07089)

通讯作者: 姜宏 E-mail: honghong751@126.com

(group C),  $75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  astragaloside IV (group D),  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  astragaloside IV (group E), and  $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  astragaloside IV (group F). The expression of MMP-1 mRNA and MMP-3 mRNA in the degenerated chondrocytes of the 6 groups were inspected through real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction 4, 8, 24, 48 and 72 hours after the culture respectively. **Results:** ① Morphological observations: the situations as coexistence of spindle cells and polygonal cells, the nucleus located at the side of cells were close to the cell membrane and the longer cell microfibril were shown in primary cells. Red cytoplasm and blue cell membrane were shown after HE staining; cytoplasm and cell membrane were dark blue after toluidine blue staining, collagen type II-positive cells were shown of green fluorescence after immunofluorescence staining, and nucleus were further processed with counterstaining through 4', 6-diamidino-2-phenylindole, then the clear green fluorescence was shown in cytoplasm and cell membrane under fluorescence excitation in different wavebands, while there was not obvious green fluorescence in nuclear regions, which showed that the characteristic gene collagen type II were expressed in the culture cells and were mainly distributed in the cytoplasm and cell membrane, then the culture cells were proved to be chondrocytes. Clear green fluorescence was shown after MMP-1 and MMP-3 immunofluorescent staining, and most of chondrocytes were polygonal cells. ② MMP-1 mRNA expression: there was statistical difference in MMP-1 mRNA expression levels of chondrocytes among different time points ( $F=11.027, P=0.000$ ); there was statistical difference in MMP-1 mRNA expression levels of chondrocytes among different groups ( $F=102.345, P=0.000$ ), and expression level of group A was higher than that of group B, C, D, E respectively ( $P=0.000; P=0.000; P=0.000; P=0.000$ ) and expression level of group F was higher than that of group A, B, C, D, E respectively ( $P=0.009; P=0.000; P=0.000; P=0.000; P=0.000$ ); there was interaction between time factor and grouping factor ( $F=8.258, P=0.000$ ). ③ MMP-3 mRNA expression: there was statistical difference in MMP-3 mRNA expression levels of chondrocytes among different time points ( $F=12.316, P=0.000$ ); there was statistical difference in MMP-3 mRNA expression levels of chondrocytes among different groups ( $F=66.112, P=0.000$ ), and expression level of group A was higher than that of group B, C, D, E respectively ( $P=0.008; P=0.000; P=0.000; P=0.000$ ) and expression level of group F was higher than that of group A, B, C, D, E respectively ( $P=0.000; P=0.000; P=0.000; P=0.000; P=0.000$ ); there was interaction between time factor and grouping factor ( $F=14.846, P=0.000$ ). **Conclusion:** Low concentration of astragaloside IV can delay chondrocytes degeneration through inhibiting the synthesis of MMP-1 and MMP-3 in degenerated chondrocytes, while high concentration of astragaloside IV can accelerate chondrocytes degeneration through promoting the synthesis of MMP-1 and MMP-3.

**Key words** Osteoarthritis, knee; Chondrocytes; Astragaloside IV; Matrix metalloproteinase 1; Matrix metalloproteinase 3

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是一种常见的与老龄化相关的退行性关节病, 以膝关节软骨退变为主要特征。关节软骨由软骨细胞组成, 软骨细胞的变性与凋亡在骨关节炎的发生发展中起着关键作用<sup>[1-2]</sup>。越来越多的研究表明, 软骨局部基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) 异常增高可导致软骨细胞外基质合成与降解失衡, 使软骨逐渐出现糜烂、溃疡等一系列退行性改变<sup>[3]</sup>。芪藤汤是全国名老中医龚正丰教授治疗膝骨关节炎的经验方, 临床疗效显著。为探讨该方中君药黄芪的主要成分黄芪甲苷对 KOA 的防治作用, 笔者通过实验观察了黄芪甲苷对人 KOA 退变关节软骨细胞 MMP-1 mRNA 和 MMP-3 mRNA 表达的影响, 现总结报告如下。

## 1 材料与仪器

**1.1 软骨组织** 15 例标本来源于上海中医药大学附属龙华医院骨伤科、上海交通大学附属第六人民医院骨科、苏州市中医医院骨伤科同期收治的人工膝关

节置换 3 期<sup>[4]</sup> 患者的软骨组织。所有患者知情同意, 实验经过 3 家医院伦理委员会共同论证通过。

**1.2 实验仪器** Espec BNA-311 型培养箱、Olympus U-RFCT50 倒置显微镜、LXJ-I 型低温离心机、恒温摇箱、Rotor Gene 3000 型四通道荧光实时定量聚合酶链式反应仪; Mastercycler Personal 型基因扩增仪。

**1.3 实验药物与试剂** 黄芪甲苷 (130659-200809), 购自中国药品生物制品检定所; 0.25% 胰蛋白酶、高糖 DMEM、胎牛血清, 购自杭州四季青公司; TRizol 试剂、逆转录酶, 购自北京天根生化科技有限公司; 伊红试剂、苏木素试剂、甲苯胺蓝试剂, 购自上海太阳生物技术有限公司; 兔抗 II 型胶原单克隆抗体, 购自上海日初生物科技有限公司; 免疫组织化学试剂盒, 购自武汉博士德公司; MMP-1、MMP-3 基因引物及内参照  $\beta$ -actin 引物序列, 购自华大基因生物技术有限公司。

## 2 方 法

**2.1 细胞培养** 将从 15 例患者膝关节所取的软骨组织放入盛有 PBS 液的培养皿中,清除表面血污及附着的其他组织,再用含青霉素钠和庆大霉素双抗液的 PBS 液冲洗数次后移入超净台。将软骨组织剪碎至  $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ ,均匀敷贴于半径为 5 cm 的培养皿底壁上(组织块约占培养皿底面积的  $1/3$ ),加入体积分数为 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基,置于  $37^\circ\text{C}$ 、体积分数 5% 的  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。细胞贴壁后换液,以后隔天换液 1 次。待细胞长满培养皿底壁 70%~80% 后,弃旧培养液,用无菌镊子移除组织块,再用 PBS 液清洗 3 次,加入适量 0.25% 胰蛋白酶,室温下振荡 2~5 min。镜下观察贴壁细胞逐渐脱落,变成圆形,个别细胞开始浮游后,加入新培养液,吹打混匀,以  $1\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min,收集细胞,按 1:2 比例传代,细胞数量充足时取第 3 代传代细胞进行实验。

### 2.2 细胞染色

**2.2.1 HE 染色及甲苯胺蓝染色** 将盖玻片放置于 6 孔板内,以每孔  $1 \times 10^5$  的浓度将传代的第 3 代软骨细胞等量接种于 6 孔板内的盖玻片上,在 2 mL 含有 20% FBS 的 DMEM 培养基中培养 3 d 后,改用无血清培养基培养过夜。然后每 5 min 用 PBS 冲洗盖玻片 1 次,冲洗 2 次后加入 4% 多聚甲醛固定 30 min,每 5 min 以 PBS 冲洗 1 次,共 3 次。HE 染色及甲苯胺蓝染色 2 h,每 5 min 蒸馏水冲洗 1 次,共 3 次,镜下观察并照相记录。

**2.2.2 II 型胶原免疫荧光染色** 细胞培养固定方法同上。PBS 清洗 3 次,室温下用体积分数 10% 的正常山羊血清孵育 1 h, PBS 清洗干净。再加入兔抗 II 型胶原单克隆抗体(1:100),  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜。次日用 PBS 彻底清洗后,加入带异硫氰酸荧光素标记的山羊抗兔多克隆抗体(1:100)避光孵育 1 h,以 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色法进行细胞核标记,然后用 PBS 漂洗 30 min,封固,荧光显微镜下观察并照相记录。

**2.2.3 MMP-1 及 MMP-3 免疫荧光染色** 细胞培养固定方法同上。PBS 清洗 3 次,室温下用体积分数 10% 正常山羊血清孵育 1 h, PBS 清洗干净。再加入兔抗 MMP-1(或 MMP-3)型单克隆抗体(1:100),  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜。次日用 PBS 彻底清洗后,加入带异硫氰酸荧光素标记的山羊抗兔多克隆抗体(1:100)避光孵育 1 h,以 DAPI 染色法进行细胞核标记,然后用 PBS

漂洗 30 min,封固,荧光显微镜下观察并照相记录。

**2.3 分组方法** 将第 3 代传代细胞等量接种于 5 个 6 孔板中,每 5 孔为 1 组,分别加入不同浓度的黄芪甲苷进行干预:A 组不进行干预;B 组加入  $25\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  黄芪甲苷;C 组加入  $50\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  黄芪甲苷;D 组加入  $75\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  黄芪甲苷;E 组加入  $100\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  黄芪甲苷;F 组加入  $500\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  黄芪甲苷。分别于培养开始后 4 h、8 h、24 h、48 h、72 h 5 个时间点,采用实时荧光定量聚合酶链式反应法检测各组 MMP-1mRNA 及 MMP-3mRNA 表达情况。

**2.4 统计学方法** 采用 SPSS18.0 统计软件对所得数据进行统计分析,各组软骨细胞 MMP-1mRNA 和 MMP-3mRNA 表达水平的比较采用重复测量资料的方差分析,检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 3 结 果

**3.1 形态观察** 原代细胞中梭形细胞和多角形细胞并存,细胞核偏于细胞的一侧而贴近细胞膜,细胞纤维丝较长。HE 染色细胞质为红色,胞膜呈蓝色[图 1(1)],甲苯胺蓝染色细胞质和胞膜均呈深蓝色[图 1(2)],证明所培养细胞分泌和合成蛋白聚糖;II 型胶原染色阳性为绿色荧光,细胞核采用 DAPI(蓝色)复染,在不同波段荧光激发下,胞浆和胞膜可见清晰绿色荧光,细胞核区域未见明显绿色荧光,证明培养细胞表达特征性基因 II 型胶原,主要分布在胞浆和细胞膜上[图 1(3)],证明所培养的细胞为软骨细胞。MMP-1 和 MMP-3 免疫荧光染色可见清晰绿色荧光,软骨细胞以多角形多见[图 1(4)、图 1(5)]。

**3.2 MMP-1mRNA 表达** 不同时间点间软骨细胞 MMP-1mRNA 表达水平有差异;不同组间软骨细胞 MMP-1mRNA 表达水平有差异,A 组高于 B 组、C 组、D 组、E 组( $P=0.000$ ;  $P=0.000$ ;  $P=0.000$ ;  $P=0.000$ ),F 组高于 A 组、B 组、C 组、D 组、E 组( $P=0.009$ ;  $P=0.000$ ;  $P=0.000$ ;  $P=0.000$ ;  $P=0.000$ );时间因素和组间因素存在交互效应(表 1)。

**3.3 MMP-3mRNA 表达** 不同时间点间软骨细胞 MMP-3mRNA 表达水平有差异;不同组间软骨细胞 MMP-3mRNA 表达水平有差异,A 组高于 B 组、C 组、D 组、E 组( $P=0.008$ ;  $P=0.000$ ;  $P=0.000$ ;  $P=0.000$ ),F 组高于 A 组、B 组、C 组、D 组、E 组( $P=0.000$ ;  $P=0.000$ ;  $P=0.000$ ;  $P=0.000$ ;  $P=0.000$ );时间因素和组间因素存在交互效应(表 2)。

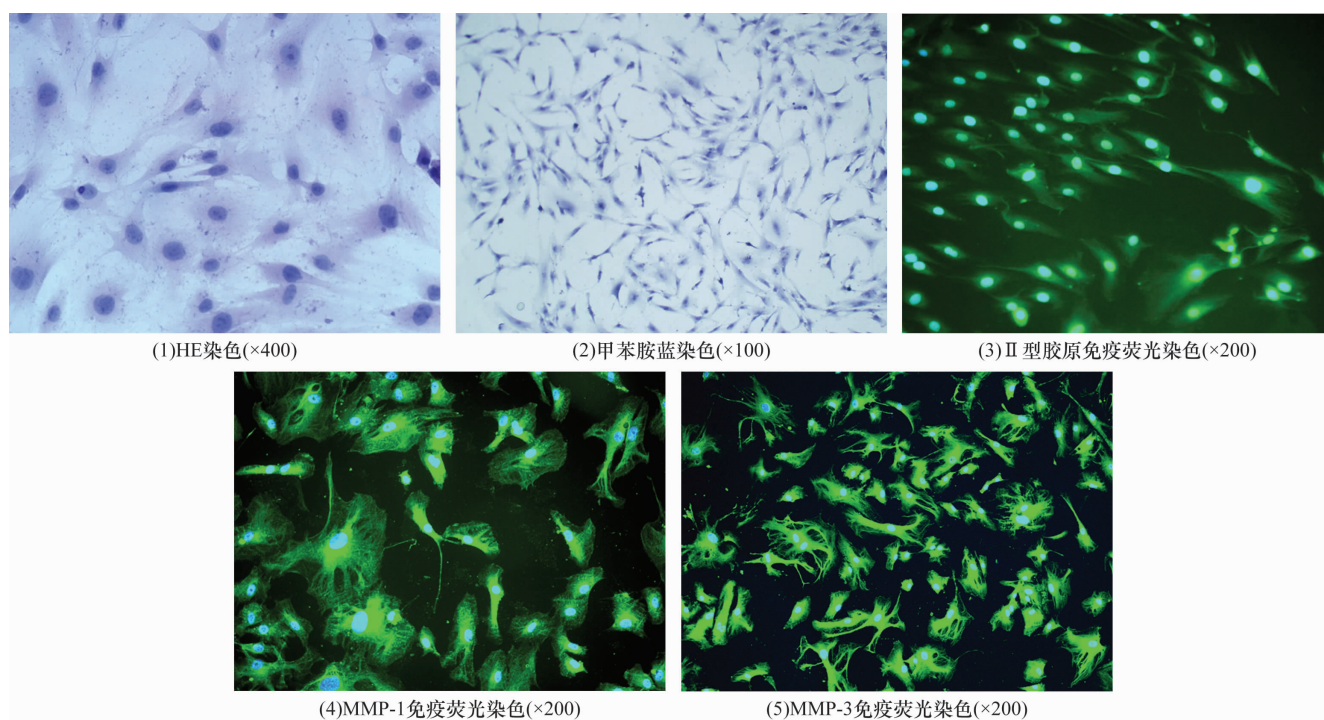


图 1 软骨细胞染色

表 1 软骨细胞 MMP-1mRNA 表达水平

组别	测量时间点					合计	F 值	P 值
	4 h	8 h	24 h	48 h	72 h			
A 组	1.00 ± 0.03	1.02 ± 0.06	1.13 ± 0.03	1.29 ± 0.16	1.37 ± 0.13	1.16 ± 0.17	9.653	0.002
B 组	1.02 ± 0.02	1.00 ± 0.02	0.91 ± 0.04	0.93 ± 0.06	1.01 ± 0.05	0.97 ± 0.06	5.305	0.015
C 组	0.99 ± 0.05	0.98 ± 0.03	0.82 ± 0.02	0.85 ± 0.04	0.88 ± 0.06	0.90 ± 0.08	11.410	0.001
D 组	1.12 ± 0.03	1.08 ± 0.04	0.91 ± 0.03	0.90 ± 0.07	0.96 ± 0.02	0.99 ± 0.10	22.567	0.000
E 组	0.97 ± 0.07	1.00 ± 0.01	0.94 ± 0.04	1.07 ± 0.03	1.08 ± 0.05	1.01 ± 0.07	7.344	0.005
F 组	1.06 ± 0.04	1.03 ± 0.05	1.24 ± 0.12	1.22 ± 0.13	1.52 ± 0.21	1.21 ± 0.20	5.284	0.044
合计	1.03 ± 0.01	1.02 ± 0.01	0.99 ± 0.01	1.04 ± 0.02	1.14 ± 0.02		11.027	0.000
F 值	6.335	3.125	43.221	12.939	11.860	102.345	$F = 8.258, P = 0.000$	
P 值	0.004	0.049	0.000	0.000	0.008	0.000		

表 2 软骨细胞 MMP-3mRNA 表达水平

组别	测量时间点					合计	F 值	P 值
	4 h	8 h	24 h	48 h	72 h			
A 组	1.00 ± 0.01	0.99 ± 0.03	0.99 ± 0.01	1.23 ± 0.09	1.07 ± 0.11	1.07 ± 0.11	6.880	0.034
B 组	1.04 ± 0.02	1.03 ± 0.04	1.00 ± 0.01	1.06 ± 0.02	1.04 ± 0.03	1.04 ± 0.03	1.529	0.267
C 组	1.05 ± 0.03	1.07 ± 0.03	0.98 ± 0.01	0.98 ± 0.03	1.01 ± 0.04	1.01 ± 0.04	7.632	0.004
D 组	1.07 ± 0.03	1.06 ± 0.03	0.99 ± 0.03	0.83 ± 0.05	0.97 ± 0.10	0.97 ± 0.10	23.023	0.000
E 组	0.97 ± 0.01	1.01 ± 0.02	1.01 ± 0.04	1.02 ± 0.03	0.99 ± 0.04	0.99 ± 0.04	5.000	0.018
F 组	0.92 ± 0.05	1.02 ± 0.02	0.96 ± 0.06	1.54 ± 0.20	1.16 ± 0.27	1.16 ± 0.27	10.644	0.017
合计	1.01 ± 0.01	1.03 ± 0.01	0.99 ± 0.01	1.11 ± 0.02	1.08 ± 0.01		12.316	0.000
F 值	11.277	3.086	0.680	11.377	11.359	66.112	$F = 14.846, P = 0.000$	
P 值	0.008	0.051	0.657	0.006	0.007	0.000		

## 4 讨 论

目前 KOA 的发病机制尚不完全清楚,但从病理角度来看,它是一种以关节软骨退变和关节周围骨质增生为特征的慢性进行性骨关节病,是力学和生物学因素共同作用下软骨细胞、细胞外基质以及软骨下骨三者降解与合成偶联失衡的结果<sup>[5]</sup>。因此,关节软骨细胞生存所依赖的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)降解异常是导致软骨退变的另一个重要原因<sup>[6]</sup>。ECM 是一种处于不断变化中的物质,MMPs 在维持其合成和降解的动态平衡中发挥着重要作用<sup>[7]</sup>。MMP-1 是成纤维细胞型胶原酶,可切割包括 II 型胶原在内的多种细胞外胶原。它在正常软骨中很难被发现,但在 OA 软骨中的含量较高,其作用对象主要是新合成的 II 型胶原,可使 II 型胶原裂解,软骨发生破坏和缺损,导致 OA<sup>[8]</sup>。MMP-3 主要来源于软骨细胞,其作用底物主要是基质中的蛋白多糖、糖蛋白和各型胶原。在实验性 OA 的早期,它可降解蛋白多糖 IX 型胶原。MMP-3 除可直接降解蛋白多糖的核心外,还可激活 MMP-1,加速胶原的病理性降解,也可使与透明质酸相连的可聚蛋白多糖由于网络的松解而丢失。Hausser 等<sup>[9]</sup>的研究发现,OA 患者关节液中 MMP-3 水平显著高于健康人关节液水平。李桂叶等<sup>[10]</sup>的研究也发现,OA 兔血清中 MMP-3 水平明显升高。

黄芪始载于《神农本草经》,古代写作黄耆。李时珍在《本草纲目》中释其名曰:“耆,长也。黄耆色黄,为补药之长,故名。”现代研究表明,黄芪有增强免疫力、扩张血管、改善微循环、强心、抗细胞衰老及保护肾脏的作用<sup>[11]</sup>。自 1981 年北川勋首次从黄芪中分离出黄芪甲苷以来,关于其在 OA 发病中的作用及机理的研究一直持续至今。

本研究结果显示,25 ~ 100 mmol · L<sup>-1</sup> 的黄芪甲苷可以降低软骨细胞 MMP-1 mRNA 和 MMP-3 mRNA 的表达水平,而 500 mmol · L<sup>-1</sup> 的黄芪甲苷可以促进软骨细胞 MMP-1 mRNA 和 MMP-3 mRNA 的表达。这提示低浓度的黄芪甲苷能通过抑制退变软

骨细胞合成基质金属蛋白酶-1 和基质金属蛋白酶-3,延缓软骨细胞退变;浓度过高则会促进退变软骨细胞合成基质金属蛋白酶-1 和基质金属蛋白酶-3,加速软骨细胞退变。这与芪藤汤中黄芪用量为 15 ~ 60 g 相一致,为芪藤汤对 KOA 的防治作用及其机制提供了充分的理论依据。

## 5 参考文献

- [1] Roach HI, Aigner T, Kouri JB. Chondroptosis: a variant of apoptotic cell death in chondrocytes? [J]. Apoptosis, 2004, 9(3): 265-277.
- [2] Del Carlo M Jr, Loeser RF. Cell death in osteoarthritis [J]. Curr Rheumatol Rep, 2008, 10(1): 37-42.
- [3] Malemud CJ, Goldberg VM. Future directions for research and treatment of osteoarthritis [J]. Front Biosci, 1999, 4: D762-D771.
- [4] 刘威, 赵印震, 卢博. 分期治疗膝关节骨性关节炎 [J]. 四川中医, 2007, 25(8): 91-92.
- [5] Hardingham T. Extracellular matrix and pathogenic mechanisms in osteoarthritis [J]. Curr Rheumatol Rep, 2008, 10(1): 30-36.
- [6] Buckwalter JA, Martin JA. Osteoarthritis [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2006, 58(2): 150-67.
- [7] Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes [J]. Arthritis Rheum, 2001, 44(3): 585-594.
- [8] 管剑龙, 施桂英. 基质金属蛋白酶与骨关节炎 [J]. 中华风湿病学杂志, 2000, 4(1): 54-55.
- [9] Hausser HJ, Decking R, Brenner RE, et al. Testican-1, an inhibitor of pro-MMP-2 activation, is expressed in cartilage [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2004, 12(11): 870-877.
- [10] 李桂叶, 张荣富, 潘琳, 等. 骨关节炎兔血清中软骨寡聚基质蛋白和基质金属蛋白酶-3 水平 [J]. 中华内科杂志, 2011, 50(5): 416-419.
- [11] 雷载权, 陈松育, 高学敏. 中药学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1995: 280.

(2011-12-23 收稿 2012-05-02 修回)

## · 作者须知 ·

## 论著类文章的书写要求

论著类文章要求附结构式中、英文摘要及关键词。摘要包括目的、方法、结果、结论四要素,关键词尽量采用最新《中文医学主题词表》(CMeSH)中所列的词。摘要中不要使用英文缩写,如 OA;摘要中也不能标注参考文献。