

· 基础研究 ·

独活寄生汤含药血清对白细胞介素 1 β 诱导的退变关节软骨细胞中基质金属蛋白酶和环氧化酶 2 表达的影响

郑春松¹, 叶蕪芝¹, 李西海², 付长龙¹, 吴广文², 陈星强², 刘献祥¹

(1. 福建中医药大学中西医结合研究院, 福建 福州 350122;

2. 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室, 福建 福州 350122)

摘要 目的: 观察独活寄生汤含药血清对白细胞介素 1 β (interleukin - 1 beta, IL - 1 β) 诱导的退变关节软骨细胞中基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 和环氧化酶 2 (cyclooxygenase 2, COX - 2) 表达的影响。方法: 将 36 只 2 月龄 SD 大鼠随机分为独活寄生汤血清组、壮骨关节丸血清组和空白血清组, 每组 12 只。分别以独活寄生汤、壮骨关节丸溶液和生理盐水灌胃, 每次 0.6 mL, 每天 2 次, 连续 7 d。末次给药后采血, 分离血清备用。将体外培养的 SD 大鼠第 3 代关节软骨细胞分为空白组、模型组、独活寄生汤组和壮骨关节丸组。模型组、独活寄生汤组和壮骨关节丸组软骨细胞加入 IL - 1 β 干预 24 h 后, 分别采用含 10% 空白血清组血清、独活寄生汤血清组血清和壮骨关节丸血清组血清的 DMEM 培养基培养; 空白组软骨细胞不加 IL - 1 β , 直接以含 10% 空白血清组血清的 DMEM 培养基培养。培养 72 h 后采用 Western Blot 法测定各组细胞中 MMP - 1、MMP - 3、MMP - 9、MMP - 13 和 COX - 2 的含量。结果: 4 组软骨细胞的 MMP - 1、MMP - 3、MMP - 9、MMP - 13 和 COX - 2 含量比较, 组间差异均有统计学意义 (0.135 ± 0.007 , 0.324 ± 0.006 , 0.174 ± 0.007 , 0.234 ± 0.007 , $F = 266.333$, $P = 0.000$; 0.150 ± 0.028 , 0.346 ± 0.027 , 0.250 ± 0.028 , 0.293 ± 0.028 , $F = 26.855$, $P = 0.000$; 0.131 ± 0.014 , 0.283 ± 0.009 , 0.148 ± 0.014 , 0.158 ± 0.015 , $F = 50.442$, $P = 0.000$; 0.173 ± 0.035 , 0.691 ± 0.051 , 0.318 ± 0.038 , 0.286 ± 0.039 , $F = 91.860$, $P = 0.000$; 0.201 ± 0.033 , 0.796 ± 0.031 , 0.370 ± 0.033 , 0.327 ± 0.034 , $F = 125.270$, $P = 0.000$)。空白组的 MMP - 1、MMP - 3、MMP - 9、MMP - 13 和 COX - 2 含量均低于模型组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$)。模型组的 MMP - 1、MMP - 3、MMP - 9、MMP - 13 和 COX - 2 含量均高于独活寄生汤组和壮骨关节丸组 ($P = 0.000$, $P = 0.003$, $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.000$, $P = 0.047$, $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$)。独活寄生汤组的 MMP - 1 含量低于壮骨关节丸组 ($P = 0.000$); 2 组的 MMP - 3、MMP - 9、MMP - 13 和 COX - 2 含量比较, 组间差异均无统计学意义 ($P = 0.094$, $P = 0.497$, $P = 0.380$, $P = 0.220$)。结论: 独活寄生汤含药血清可抑制 IL - 1 β 诱导的退变关节软骨细胞中 MMP - 1、MMP - 3、MMP - 9、MMP - 13 和 COX - 2 的表达, 其抑制 MMP - 1 表达的作用优于壮骨关节丸含药血清。

关键词 骨关节炎; 独活寄生汤; 软骨细胞; 基质金属蛋白酶类; 环氧化酶 2; 大鼠, Sprague - Dawley; 动物实验

Impact of Duhuo Jisheng Tang (独活寄生汤) medicated serum on expression of matrix metalloproteinase and cyclooxygenase 2 in degenerative articular chondrocytes induced by interleukin - 1 beta

ZHENG Chunsong¹, YE Hongzhi¹, LI Xihai², FU Changlong¹, WU Guangwen², CHEN Xingqiang², LIU Xianxiang¹

1. Academy of Integrated Medicine affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, Fujian, China

2. Fujian Key Laboratory of Integrated Medicine on Geriatrics, Fuzhou 350122, Fujian, China

ABSTRACT Objective: To observe the impact of Duhuo Jisheng Tang (独活寄生汤, DHJST) medicated serum on expression of matrix metalloproteinase (MMP) and cyclooxygenase 2 (COX - 2) in degenerative articular chondrocytes induced by interleukin - 1 beta (IL - 1 β).

Methods: Thirty - six 2 - month - old SD rats were randomly divided into DHJST serum group, Zhuanggu Guanjie Wan (壮骨关节丸,

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2015J01338, 2014J01357); 福建省中青年教师教育科研项目 (JA14152); 陈可冀中西医结合发展基金 (CKJ2015010)

通讯作者: 叶蕪芝 E-mail: yelin0930@163.com

ZGGJW) serum group and blank serum group, 12 cases in each group. The rats were intragastric administrated with DHJST, ZGGJW solution and normal saline respectively (0.6 mL at a time, twice a day) for 7 consecutive day. After the last dose, the blood was collected and the serum was separated for further use. The third - generation articular chondrocytes of SD rats cultured in vitro were divided into blank group, model group, DHJST group and ZGGJW group. The chondrocytes in the latter 3 groups were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% serum of blank serum group, DHJST serum group and ZGGJW serum group after 24 - hour intervention with IL - 1 β . The chondrocytes in blank group were cultured in DMEM supplemented with 10% serum of blank serum group and didn't intervened by IL - 1 β . The contents of MMP - 1, MMP - 3, MMP - 9, MMP - 13 and COX - 2 in the chondrocytes of each group were measured by using Western Blot after 72 - hour culture. **Results:** There was statistical difference in the contents of MMP - 1, MMP - 3, MMP - 9, MMP - 13 and COX - 2 in the chondrocytes between the 4 groups (0.135 \pm 0.007, 0.324 \pm 0.006, 0.174 \pm 0.007, 0.234 \pm 0.007, F = 266.333, P = 0.000; 0.150 \pm 0.028, 0.346 \pm 0.027, 0.250 \pm 0.028, 0.293 \pm 0.028, F = 26.855, P = 0.000; 0.131 \pm 0.014, 0.283 \pm 0.009, 0.148 \pm 0.014, 0.158 \pm 0.015, F = 50.442, P = 0.000; 0.173 \pm 0.035, 0.691 \pm 0.051, 0.318 \pm 0.038, 0.286 \pm 0.039, F = 91.860, P = 0.000; 0.201 \pm 0.033, 0.796 \pm 0.031, 0.370 \pm 0.033, 0.327 \pm 0.034, F = 125.270, P = 0.000). The contents of MMP - 1, MMP - 3, MMP - 9, MMP - 13 and COX - 2 were lower in blank group compared to model group (P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000). The contents of MMP - 1, MMP - 3, MMP - 9, MMP - 13 and COX - 2 were higher in model group compared to DHJST group and ZGGJW group (P = 0.000, P = 0.003, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.047, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000). The content of MMP - 1 was lower in DHJST group compared to ZGGJW group (P = 0.000) and there was no statistical difference in the contents of MMP - 3, MMP - 9, MMP - 13 and COX - 2 between the 2 groups (P = 0.094, P = 0.497, P = 0.380, P = 0.220). **Conclusion:** DHJST medicated serum can inhibit the expression of MMP - 1, MMP - 3, MMP - 9, MMP - 13 and COX - 2 in degenerative articular chondrocytes induced by IL - 1 β , and it surpasses ZGGJW medicated serum in inhibiting the expression of MMP - 1.

Key words osteoarthritis; Duhuo Jisheng Tang; chondrocytes; matrix metalloproteinases; cyclooxygenase 2; rats, Sprague - Dawley; animal experimentation

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种以关节软骨变性、破坏及骨质增生为特征的慢性关节病, 是最常见的影响人类健康的关节疾患之一^[1]。中医在治疗 OA 方面, 将祛风湿、益肝肾作为根本法则, 收到了良好的效果^[2-3]。独活寄生汤出自唐代孙思邈的《备急千金要方》, 具有祛风湿、止痹痛、益肝肾和补气血的功效^[4]。前期的研究发现, 独活寄生汤治疗 OA 具有多靶点作用的特征, 且存在与基质金属蛋白酶 1 (matrix metalloproteinase 1, MMP - 1)、MMP - 3、MMP - 9、MMP - 13 和环氧化酶 2 (cyclooxygenase 2, COX - 2) 有较好相互作用的化合物^[5]。体外实验显示, 独活寄生汤含药血清能显著促进体外培养关节软骨细胞的增殖, 在 5%、10%、15% 及 20% 浓度的独活寄生汤含药血清中, 10% 为最佳培养浓度^[6]。本实验希望通过观察独活寄生汤含药血清对白细胞介素 1 β (interleukin - 1 beta, IL - 1 β) 诱导下的体外大鼠关节软骨细胞表达 MMP - 1、MMP - 3、MMP - 9、MMP - 13 和 COX - 2 的影响, 进一步从实验角度探讨独活寄生汤对 OA 的治疗作用。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 SPF 级 2 月龄雄性 SD 大鼠 36 只,

体质量 200 ~ 220 g, 购自上海史莱克实验动物有限责任公司, 实验动物许可证号: SCKK (沪) 2012 - 0002; 清洁级 4 周龄雄性 SD 大鼠 7 只, 购自福建医科大学实验动物中心, 实验动物许可证号: SCXK (闽) 2012 - 0001。

1.2 实验药物 独活寄生汤由福建中医药大学中西医结合研究院中药生药室提供, 药物组成包括独活 9 g、桑寄生 6 g、牛膝 6 g、细辛 6 g、秦艽 6 g、茯苓 6 g、肉桂 6 g、防风 6 g、川芎 6 g、当归 6 g、熟地黄 6 g、杜仲 6 g、人参 6 g、白芍 6 g、甘草 6 g。取药材总量 279 g, 煎煮 2 次, 第 1 次加 6 倍量蒸馏水, 浸泡 20 min, 煮沸后继续煎煮 30 min, 过滤后取滤液, 将药渣再加 4 倍量蒸馏水, 煮沸后继续煎煮 30 min, 过滤后将两次药液合并减压浓缩至 2 g \cdot mL⁻¹ 备用。壮骨关节丸 60 g (华润三九医药股份有限公司生产, 批号: 1302011s), 磨成粉末, 加 180 mL 蒸馏水, 超声波提取 1 h, 抽滤后将药液用蒸馏水配成 0.26 g \cdot mL⁻¹ 备用。

1.3 试剂和仪器 IL - 1 β (PeproTech 公司); 胎牛血清 (Gibco 公司); II 型胶原酶 (Sigma 公司); 甲苯胺蓝 (国药集团化学试剂有限公司); Rabbit Anti - MMP - 1、Rabbit Anti - MMP - 3、Rabbit Anti - MMP - 9、Rab-

bit Anti - MMP - 13、abbit Anti - COX - 2、Goat Anti - rabbit IgG/HRP(北京博奥森生物技术有限公司)。3111 型 CO₂ 培养箱(Thermo 公司);Trans - Blot TurboTM system 半干转印系统、PowerpacTM Basic 电泳仪、Universal Hood II 化学发光成像系统(Bio Rad 公司)。

2 方 法

2.1 含药血清制备 将 36 只 2 月龄 SD 大鼠随机分为独活寄生汤血清组、壮骨关节丸血清组和空白血清组,每组 12 只。按照药理试验中动物与人体间的等效剂量^[7]换算后,分别以独活寄生汤、壮骨关节丸溶液和生理盐水灌胃,每次 0.6 mL,每天 2 次,连续 7 d。末次给药后 2 h 以戊巴比妥钠麻醉后腹主动脉采血,采血前禁食 12 h。血液采集后常温下静置 3 h,然后在 4 ℃ 以 3 000 r · min⁻¹ 离心 15 min(离心半径 8 cm),分离血清并分装于 15 mL 离心管中,在 56 ℃ 恒温水浴锅中灭活 30 min,0.22 μm 微孔滤膜过滤后在 -80 ℃ 保存备用。

2.2 关节软骨细胞分离、培养与鉴定 将 7 只 4 周龄 SD 大鼠脱颈处死后,切取膝关节软骨,以 PBS 清洗 4~5 次,切成 1 mm³ 的颗粒,再以 PBS 清洗 1 次后吸去 PBS。加 0.2%Ⅱ型胶原酶 5 mL,置于 37 ℃ 的 CO₂ 培养箱中消化,每隔 2 h 取上清液以 1 000 r · min⁻¹ 离心 5 min(离心半径 8 cm),收集软骨细胞沉淀后更换Ⅱ型胶原酶,继续消化,重复 3 次。将收集到的软骨细胞用含 10% FBS 的培养液重悬,以 2 × 10⁵ 个 · mL⁻¹ 接种至培养瓶中,放置在 5% CO₂ 培养箱中,饱和湿度、37 ℃ 条件下培养,2 d 换液 1 次,待软骨细胞融合,铺满整个培养瓶底面 90% 后消化传代。采用甲苯胺蓝鉴定^[8],倒置显微镜下观察 1 至 4 代软骨细胞的形态结构。

2.3 关节软骨细胞分组与给药 取生长状态良好的第 2 代软骨细胞制成细胞悬液后用自动细胞计数仪计数,调整浓度为 2 × 10⁴ 个 · mL⁻¹ 接种于细胞培养瓶中,每瓶 4 mL,置于 CO₂ 培养箱中 37 ℃ 培养,隔天换液。待培养瓶中的细胞长满至 80%~90% 时,将其分为空白组、模型组、独活寄生汤组和壮骨关节丸组。模型组、独活寄生汤组和壮骨关节丸组软骨细胞加入 10 ng · mL⁻¹ 的 IL - 1β 干预 24 h,然后分别采用含 10% 空白血清组血清、独活寄生汤血清组血清和壮骨关节丸血清组血清的 DMEM 培养基培养 72 h。空白

组软骨细胞不加 IL - 1β,直接以含 10% 空白血清组血清的 DMEM 培养基培养 72 h。

2.4 关节软骨细胞中 MMP 和 COX - 2 表达的 Western Blot 检测 干预结束后,弃培养液,以 PBS 清洗 3 次。每个培养瓶加 300 μL 含 100 mmol · L⁻¹ PMSF 的裂解液,4 ℃ 裂解 30 min,每分钟摇动 10 次。用细胞刮刀刮取贴壁软骨细胞于预冷的 EP 管中,在 4 ℃ 以 14 000 r · min⁻¹ 离心 10 min(离心半径 6 cm),吸取上清液于预冷的新 EP 管中,并预留 10 μL 用于蛋白浓度测定。向新 EP 管中加入上清液 1/4 体积的 5 × 蛋白上样缓冲液,100 ℃ 变性 10 min,各组每孔按 50 μg 上样,经 10% SDS - PAGE 凝胶电泳分离后,半干转法将蛋白转至聚偏二氟乙烯膜上,在室温用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,分别加入一抗稀释液(MMP - 1、MMP - 3、MMP - 9、MMP - 13、COX - 2,稀释比例为 1:500,β - actin 稀释比例为 1:1 000)中,4 ℃ 孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,膜放入二抗稀释液(Goat Anti-rabbit IgG/HRP,稀释比例为 1:5 000),室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,加 ECL 发光剂,以凝胶成像系统扫描,计算目的蛋白条带灰度值与内参蛋白 β - Actin 条带灰度值的比值。

2.5 数据统计分析 采用 SPSS 18.0 软件对所得数据进行统计分析,各组软骨细胞中 MMP - 1、MMP - 3、MMP - 9、MMP - 13 和 COX - 2 含量的组间比较采用方差分析,组间两两比较采用 LSD - *t* 检验,检验水准 α = 0.05。

3 结 果

第 1 代软骨细胞接种后较为稀疏,接种后第 3 天细胞呈三角形或多角形或不规则形,接种后第 8 天细胞连接成片呈铺路石样;第 2 代和第 3 代软骨细胞生长良好,增殖速度快;第 4 代软骨细胞呈现纤维样,增殖速度较第 2 代和第 3 代软骨细胞减慢(图 1)。第 3 代软骨细胞经甲苯胺蓝染色后,细胞核呈蓝色,胞浆及细胞间质呈浅紫红色(图 2)。

4 组软骨细胞的 MMP - 1、MMP - 3、MMP - 9、MMP - 13 和 COX - 2 含量比较,组间差异均有统计学意义。空白组的 MMP - 1、MMP - 3、MMP - 9、MMP - 13 和 COX - 2 含量均低于模型组($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$)。模型组的 MMP - 1、MMP - 3、MMP - 9、MMP - 13 和 COX - 2 含量均高于独活寄生汤组和壮骨关节丸组($P =$

0.000, $P = 0.003$, $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.000$, $P = 0.047$, $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$ 。独活寄生汤组的 MMP-1 含量低于壮骨关节

丸组($P = 0.000$);2 组的 MMP-3、MMP-9、MMP-13 和 COX-2 含量比较,组间差异均无统计学意义($P = 0.094$, $P = 0.497$, $P = 0.380$, $P = 0.220$)。见表 1。

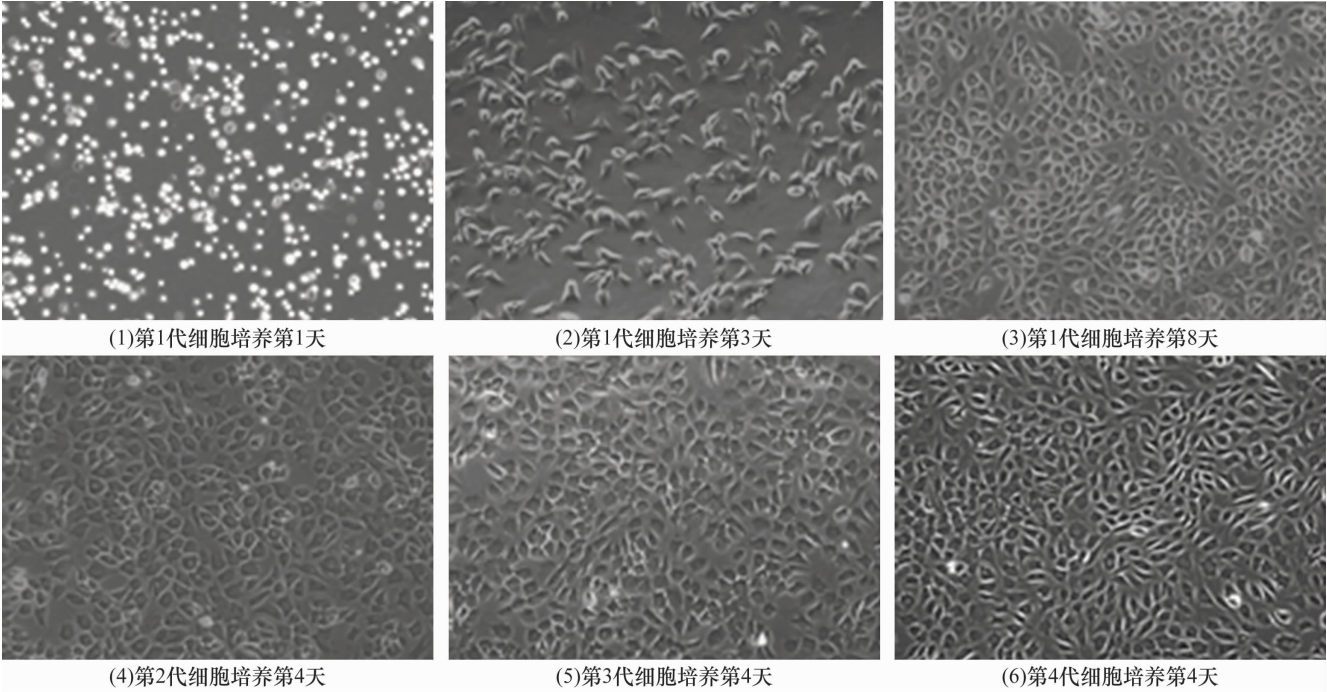


图 1 倒置显微镜下软骨细胞形态结构(×200)

表 1 4 组软骨细胞中 MMP-1、MMP-3、MMP-9、MMP-13 和 COX-2 的表达 $\bar{x} \pm s$

组别	样本量	MMP-1	MMP-3	MMP-9	MMP-13	COX-2
空白组	5	0.135 ± 0.007	0.150 ± 0.028	0.131 ± 0.014	0.173 ± 0.035	0.201 ± 0.033
模型组	5	0.324 ± 0.006	0.346 ± 0.027	0.283 ± 0.009	0.691 ± 0.051	0.796 ± 0.031
独活寄生汤组	5	0.174 ± 0.007	0.250 ± 0.028	0.148 ± 0.014	0.318 ± 0.038	0.370 ± 0.033
壮骨关节丸组	5	0.234 ± 0.007	0.293 ± 0.028	0.158 ± 0.015	0.286 ± 0.039	0.327 ± 0.034
F 值		266.333	26.855	50.442	91.860	125.270
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

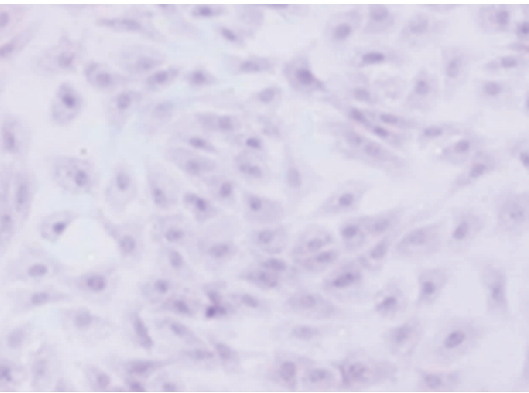


图 2 第 3 代软骨细胞甲苯胺蓝染色结果(×200)

4 讨论

目前,软骨细胞的分离多采用链霉蛋白酶和胶原酶序贯消化法、胰蛋白酶和Ⅱ型胶原蛋白酶序贯消化法^[9],可获得大量软骨细胞。但在软骨组织消化过程中,胰蛋白酶的量和作用时间都很难掌握,而且通过

胰蛋白酶与胶原酶消化法反复循环消化和离心来获得软骨细胞步骤复杂,细胞易受损伤,也容易引起污染^[10-11]。闫虎等^[11]提出Ⅱ型胶原酶消化法可短时间获得大量纯化大鼠或兔关节软骨细胞,是一种经济、简单、实用的方法。此外,丁万军等^[12]研究大鼠膝关节软骨细胞体外培养去分化时间,结果显示大鼠膝关节软骨细胞体外培养前 4 代能维持正常的软骨细胞表型,第 5 代开始发生退变,即前 4 代可以作为软骨细胞研究的靶细胞。因此,本研究选择Ⅱ型胶原酶消化法获取软骨细胞,并将第 3 代细胞作为研究的靶细胞。

在生理状态下,软骨细胞分泌的胶原和蛋白聚糖等物质形成胞外基质,其合成与降解的平衡是通过合成性细胞因子和分解性细胞因子来维持的。各种致病因素引起炎症反应时,平衡机制被破坏导致胞外基

质降解, 软骨组织发生变性, 进而导致关节软骨退化、丧失, 最终引起 OA^[13]。炎症介质和炎性因子在该过程中起关键作用, 并诱导软骨细胞凋亡^[14]。IL-1 β 是导致软骨基质降解最主要的炎症因子之一, 它能显著减少软骨细胞 SOX9 基因和蛋白表达, 诱导软骨细胞凋亡, 通过促进软骨细胞分泌 MMP, 加速软骨细胞分解代谢, 最终导致软骨细胞退变, 推动 OA 的进程^[15-16]。因此, 本研究以 IL-1 β 诱导软骨细胞建立 OA 实验的细胞模型。

MMP 可降解软骨基质, 导致关节软骨进行性破坏, 软骨基质钙化, 水分丢失, 弹性下降, 功能丧失^[17], 其中 MMP-1、MMP-3、MMP-9 和 MMP-13 是文献中报道较多的类型。MMP-1、MMP-9 和 MMP-13 可使 II 型胶原变性裂解, MMP-3 和 MMP-13 可导致蛋白多糖丢失, 加速软骨的破坏进程。MMP-1 和 MMP-13 在 OA 软骨基质降解中占主导地位^[18]。本研究中独活寄生汤组的 MMP-1、MMP-3、MMP-9、MMP-13 含量均低于模型组, 提示独活寄生汤含药血清能够抑制软骨细胞中 MMP-1、MMP-3、MMP-9、MMP-13 的表达。而独活寄生汤组的 MMP-1 含量低于壮骨关节丸组, 提示其抑制 MMP-1 表达的作用优于壮骨关节丸含药血清。

金荣忠等^[19]的研究表明, COX-2 基因及其蛋白在 KOA 软骨组织损害过程中也具有重要作用。特异性 COX-2 抑制剂能够逆转由炎性细胞因子介导的软骨蛋白多糖代谢失衡, 恢复软骨蛋白多糖的含量^[20-21]。作为炎症反应过程中的关键酶, 特异性阻断 COX-2 能够抑制炎症反应的发生, 减少炎症因子的释放和 PGE-2 的生成, 从而抑制 MMP 合成, 保护软骨基质^[22]。本研究中独活寄生汤组 COX-2 含量低于模型组, 提示独活寄生汤含药血清可抑制 IL-1 β 诱导的退变关节软骨细胞中 COX-2 的表达, 其治疗 OA 可能存在潜在的多靶点协同作用机制。

5 参考文献

- [1] 区广鹏, 肖军, 郑佐勇, 等. 老年膝关节骨性关节炎患病危险因素的调查[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(50): 9463-9470.
- [2] 王友庆. 中医内治骨性关节炎的现状与作用机理研究进展[J]. 浙江中医药大学学报, 2008, 32(2): 279-280.
- [3] 邱慈鑫, 余添赐, 杨树华, 等. 龟鹿二仙胶不同提取部位对豚鼠软骨细胞活性的影响[J]. 中医正骨, 2014, 26(10): 7-11.

- [4] 张克昌. 独活寄生汤治疗膝骨性关节炎疗效观察[J]. 世界最新医学信息文, 2014, 14(24): 187.
- [5] Zheng CS, Xu XJ, Ye HZ, et al. Computational approaches for exploring the potential synergy and polypharmacology of Duhuo Jisheng Decoction in the therapy of osteoarthritis[J]. Mol Med Rep, 2013, 7(6): 1812-1818.
- [6] Wu G, Chen W, Fan H, et al. Duhuo jisheng decoction promotes chondrocyte proliferation through accelerated G1/S transition in osteoarthritis[J]. Int J Mol Med, 2013, 32(5): 1001-1010.
- [7] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [8] 叶蕪芝, 李西海, 梁文娜, 等. 软骨细胞体外分离培养与鉴定的实验研究[J]. 福建中医学院学报, 2008, 18(6): 32-33.
- [9] 刘军, 戴刚, 杨柳. 骨关节炎软骨细胞的体外分离培养[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(46): 9045-9048.
- [10] 赵明, 陈竹, 张旭乾, 等. 关节软骨细胞体外培养及生物学特性的实验研究[J]. 川北医学院学报, 2013, 28(2): 95-98.
- [11] 闫虎, 苏友新, 林学义, 等. II 型胶原酶消化法培养兔关节软骨细胞[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(50): 8647-8653.
- [12] 丁万军, 刘世清, 贺斌, 等. 大鼠膝关节软骨细胞体外培养去分化时间的实验研究[J]. 武汉大学学报: 医学版, 2012, 33(1): 47-49.
- [13] 巫桁鏊, 李荣亨. 白介素-1 在骨关节炎发病机制中的作用[J]. 中国老年学杂志, 2008, 28(15): 1550-1552.
- [14] 贺牡丹, 王小平, 陈同生. 白介素-1 β 诱导关节软骨细胞凋亡的分子机理[J]. 中国细胞生物学学报, 2011, 7(1): 49-54.
- [15] Tew SR, Li Y, Pothacharoen P, et al. Retroviral transduction with SOX9 enhances re-expression of the chondrocyte phenotype in passaged osteoarthritic human articular chondrocytes[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2005, 13(1): 80-89.
- [16] 黄金刚, 童海骏, 刘宏强, 等. IL-1 β 和 TNF- α 对软骨细胞基质降解的影响及相关机制研究[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2010, 30(9): 1084-1089.
- [17] Kevorkian L, Young DA, Darrach C, et al. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage[J]. Arthritis Rheum, 2004, 50(1): 131-141.
- [18] 刘志翔, 张柳. 基质金属蛋白酶和骨关节炎的研究进展[J]. 华北煤炭医学院学报, 2007, 9(3): 330-332.

- [19] 金荣忠,谈国明,胡辉东. COX-2 在膝关节骨性关节炎软骨中表达及临床意义[J]. 生物骨科材料与临床研究, 2010,7(6):18-20.
- [20] Mastbergen SC, Lafeber FP, Bijlsma JW. Selective COX-2 inhibition prevents proinflammatory cytokine-induced cartilage damage[J]. Rheumatology (Oxford), 2002, 41(7): 801-808.
- [21] 李明,刘培来,李振峰,等. 特异性 COX-2 抑制剂保护骨关节炎软骨的临床观察[J]. 实用骨科杂志, 2006, 12(1):29-32.
- [22] Abramson SB. The role of COX-2 produced by cartilage in arthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 1999, 7(4): 380-381.

(2015-09-23 收稿 2015-11-19 修回)

《中医正骨》杂志 2015 年重点专刊目录(一)

2015 年第 3 期——胫骨平台骨折专栏

- 1 胫骨平台骨折的分类与手术治疗进展
(述评专家:温州医科大学附属义乌医院 陈红卫教授)
- 2 应用三柱分型理论治疗复杂胫骨平台骨折
- 3 劈开腓肠肌内侧头的改良后内侧入路在胫骨平台后柱骨折内固定术中的应用
- 4 不同手术方式治疗胫骨平台骨折畸形愈合的体会
- 5 联合入路双钢板固定结合自制接骨丹治疗 Schatzker V、VI 型胫骨平台骨折

参考文献著录格式

- [1] 陈红卫. 胫骨平台骨折的分类与手术治疗进展[J]. 中医正骨, 2015, 27(3): 1-4.
- [2] 何涛. 应用三柱分型理论治疗复杂胫骨平台骨折[J]. 中医正骨, 2015, 27(3): 32-34.
- [3] 方华宴, 李兴华, 王爱国. 劈开腓肠肌内侧头的改良后内侧入路在胫骨平台后柱骨折内固定术中的应用[J]. 中医正骨, 2015, 27(3): 35-36.
- [4] 喻长纯, 杨明路, 王战朝. 不同手术方式治疗胫骨平台骨折畸形愈合的体会[J]. 中医正骨, 2015, 27(3): 37-40.
- [5] 翟献斌. 联合入路双钢板固定结合自制接骨丹治疗 Schatzker V、VI 型胫骨平台骨折[J]. 中医正骨, 2015, 27(3): 41-43.

2015 年第 7 期——膝骨关节炎专栏

- 1 探索建立系统的膝骨关节炎中医临床科研范式和理论体系
(述评专家:中国中医科学院望京医院 陈卫衡教授)
- 2 膝骨关节炎中医诊疗专家共识(2015 年版)
- 3 透骨消痛胶囊中补肾柔肝药和活血祛风药治疗骨关节炎作用方式的计算机模拟比较
- 4 加味青娥丸治疗膝骨关节炎的作用机制研究
- 5 壮药骨痹方烫熨联合运动疗法治疗膝骨关节炎的

临床研究

- 6 重组人Ⅱ型肿瘤坏死因子受体-抗体融合蛋白关节腔注射联合中药熏洗治疗膝骨关节炎的临床研究
- 7 核转录因子- κ B 在骨关节炎炎症反应中的作用
- 8 口服补肾活血通络方治疗膝骨关节炎
- 9 关节镜下清理术联合关节腔内注射玻璃酸钠治疗膝骨关节炎

参考文献著录格式

- [1] 陈卫衡. 探索建立系统的膝骨关节炎中医临床科研范式和理论体系[J]. 中医正骨, 2015, 27(7): 1-3.
- [2] 中国中医药研究促进会骨科专业委员会, 中国中西医结合学会骨伤科专业委员会关节工作委员会. 膝骨关节炎中医诊疗专家共识(2015 年版)[J]. 中医正骨, 2015, 27(7): 4-5.
- [3] 郑春松, 叶蕤芝, 李西海, 叶锦霞, 吴广文, 徐筱杰, 刘献祥. 透骨消痛胶囊中补肾柔肝药和活血祛风药治疗骨关节炎作用方式的计算机模拟比较[J]. 中医正骨, 2015, 27(7): 6-10.
- [4] 帅波, 沈霖, 杨艳萍, 徐晓娟, 马陈, 吕林, 夏雪. 加味青娥丸治疗膝骨关节炎的作用机制研究[J]. 中医正骨, 2015, 27(7): 15-21.
- [5] 梅其杰, 袁长深, 段戡, 黄肖华, 陈劲, 姚弘毅. 壮药骨痹方烫熨联合运动疗法治疗膝骨关节炎的临床研究[J]. 中医正骨, 2015, 27(7): 27-30.
- [6] 王丹辉, 张燕, 刘丽娟, 田雪秋, 梁一男, 魏凤娟. 重组人Ⅱ型肿瘤坏死因子受体-抗体融合蛋白关节腔注射联合中药熏洗治疗膝骨关节炎的临床研究[J]. 中医正骨, 2015, 27(7): 31-33.
- [7] 应俊, 张元斌, 罗程, 金红婷, 肖鲁伟, 童培建. 核转录因子- κ B 在骨关节炎炎症反应中的作用[J]. 中医正骨, 2015, 27(7): 40-43.
- [8] 石继祥, 纪斌, 周强, 石文俊, 刘孚瑛, 成翔宇, 周军杰, 庞金辉, 章筛林, 李海旭. 口服补肾活血通络方治疗膝骨关节炎[J]. 中医正骨, 2015, 27(7): 51-52.
- [9] 张华, 李贵山. 关节镜下清理术联合关节腔内注射玻璃酸钠治疗膝骨关节炎[J]. 中医正骨, 2015, 27(7): 53-54.