

跳骨片含药血清抑制脂多糖诱导的软骨细胞炎症反应的作用机制研究

郑文伟¹, 何晓娟¹, 贾良良¹, 马玉环¹, 陈后煌¹, 邵翔¹, 陈达¹, 刘献祥¹, 李西海¹, 叶蕪芝²

(1. 福建中医药大学, 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:探讨跳骨片含药血清抑制脂多糖诱导的软骨细胞炎症反应的作用机制。**方法:**将 10 只 8 周龄雄性 SD 大鼠随机分为跳骨片组和空白组, 跳骨片组以 $0.32 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量的跳骨片灌胃, 空白组给予等量生理盐水灌胃; 每天灌胃 1 次, 连续 7 d; 末次灌胃 1 h 后, 经腹主动脉取血, 分别制备跳骨片含药血清和空白血清, 低温保存备用。从 10 只 4 周龄 SD 大鼠膝关节软骨中分离软骨细胞并培养, 光学显微镜下观察软骨细胞形态, 并用 II 型胶原酶免疫组化鉴定。将培养好的第 2 代软骨细胞随机分为空白血清组、模型组、跳骨片含药血清组, 其中空白血清组以含 10% 空白血清的培养基 (dulbecco modified eagle medium, DMEM) 培养; 模型组以浓度为 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的脂多糖和含 10% 空白血清的 DMEM 培养; 跳骨片含药血清组以浓度为 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的脂多糖和含 10% 跳骨片含药血清的 DMEM 培养; 3 组均连续干预培养 8 h, 采用酶联免疫吸附法检测软骨细胞基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 3、MMP9 含量, 采用荧光定量 RT-PCR 法检测软骨细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路相关基因表达水平, 采用 Western blot 法检测软骨细胞中 β -链蛋白 (β -catenin)、卷曲蛋白-2 (Frizzled-2) 的蛋白表达量, 采用免疫荧光检测法检测软骨细胞中 β -catenin、糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)、蛋白多糖 1 (proteoglycans 1, PGS1) 的蛋白表达量。**结果:**①软骨细胞免疫组化鉴定结果。第 2 代软骨细胞胞浆及细胞膜呈棕黄色阳性染色, 具有典型的软骨细胞生物学特征。②软骨细胞 MMP3、MMP9 含量。脂多糖干预 8 h 后, 空白血清组、模型组和跳骨片含药血清组的软骨细胞 MMP3、MMP9 含量比较, 组间差异均有统计学意义 [$(34.019 \pm 1.036) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $(44.645 \pm 2.473) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $(32.941 \pm 1.792) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $F = 36.060$, $P = 0.000$; $(1.348 \pm 0.038) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $(1.562 \pm 0.112) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $(1.331 \pm 0.015) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $F = 11.319$, $P = 0.000$]; 模型组软骨细胞 MMP3、MMP9 含量均高于空白血清组 ($\text{LSD} - t = -7.016$, $P = 0.000$; $\text{LSD} - t = -3.768$, $P = 0.003$); 跳骨片含药血清组软骨细胞 MMP3、MMP9 含量均低于模型组 ($\text{LSD} - t = 7.652$, $P = 0.000$; $\text{LSD} - t = 4.066$, $P = 0.002$); 空白血清组软骨细胞 MMP3、MMP9 含量与跳骨片含药血清组比较, 差异均无统计意义 ($\text{LSD} - t = 0.635$, $P = 0.549$; $\text{LSD} - t = 0.299$, $P = 0.770$)。③软骨细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路相关基因的表达。脂多糖干预 8 h 后, 空白血清组、模型组和跳骨片含药血清组软骨细胞中 β -catenin、GSK-3 β 、Frizzled-2、Wnt-4、CKI- ϵ 基因表达量比较, 组间差异均有统计学意义 (1.000 ± 0.275 , 2.258 ± 0.206 , 1.431 ± 0.304 , $F = 36.709$, $P = 0.000$; 1.000 ± 0.133 , 0.417 ± 0.104 , 0.842 ± 0.094 , $F = 29.259$, $P = 0.000$; 1.000 ± 0.191 , 1.737 ± 0.238 , 1.445 ± 0.337 , $F = 7.027$, $P = 0.015$; 1.000 ± 0.341 , 3.801 ± 0.579 , 1.876 ± 0.388 , $F = 71.903$, $P = 0.000$; 1.000 ± 0.309 , 2.208 ± 0.708 , 1.441 ± 0.421 , $F = 64.178$, $P = 0.000$); 模型组软骨细胞中 β -catenin、Frizzled-2、Wnt-4、CKI- ϵ 基因表达量均高于空白血清组 ($\text{LSD} - t = -8.431$, $P = 0.000$; $\text{LSD} - t = -3.723$, $P = 0.005$; $\text{LSD} - t = 8.062$, $P = 0.000$; $\text{LSD} - t = -11.235$, $P = 0.000$), GSK-3 β 基因表达量低于空白血清组 ($\text{LSD} - t = 7.397$, $P = 0.000$); 跳骨片含药血清组软骨细胞中 β -catenin、Frizzled-2、Wnt-4、CKI- ϵ 基因表达量均低于模型组 ($\text{LSD} - t = 5.541$, $P = 0.000$; $\text{LSD} - t = 1.477$, $P = 0.017$; $\text{LSD} - t = 8.062$, $P = 0.000$; $\text{LSD} - t = 6.882$, $P = 0.000$), GSK-3 β 基因表达量高于模型组 ($\text{LSD} - t = -5.387$, $P = 0.000$); 空白血清组软骨细胞中 β -catenin、Wnt-4、CKI- ϵ 基因表达量均低于跳骨片含药血清组 ($\text{LSD} - t = -2.289$, $P = 0.018$; $\text{LSD} - t = -3.658$, $P = 0.005$; $\text{LSD} - t = -4.352$, $P = 0.002$); 空白血清组软骨细胞中 GSK-3 β 、Frizzled-2 基因表达量与跳骨片含药血清组比较, 差异均无统计学意义 ($\text{LSD} - t = 2.009$, $P = 0.075$; $\text{LSD} - t = -3.658$, $P = 0.051$)。④软骨细胞中 β -catenin、Frizzled-2 的蛋白表达。脂多糖干预 8 h 后, 空白血清组、模型组和跳骨片含药血清组软骨细胞中 β -catenin、Frizzled-2 蛋白表达量比较, 组间差异均有统计学意义 (0.449 ± 0.063 , 0.746 ± 0.156 , 0.549 ± 0.056 , $F = 5.323$, $P = 0.026$; 1.348 ± 0.038 , 1.562 ± 0.112 , 1.331 ± 0.015 , $F = 6.291$, $P = 0.034$); 模型组软骨细胞中 β -catenin、Frizzled-2 蛋白表达量高于空白血清组 ($\text{LSD} - t = -11.235$, $P = 0.005$; $\text{LSD} - t = -3.104$, $P = 0.021$); 跳骨片含药血清组软骨细胞中 β -catenin、Frizzled-2 蛋白表达量低于模型组 ($\text{LSD} - t = 6.883$, $P = 0.037$; $\text{LSD} - t = 3.039$, $P = 0.023$); 空白

基金项目:福建省科学技术厅重点资助项目(2014Y0064)

通讯作者:叶蕪芝 E-mail:yelin0930@163.com

血清组软骨细胞中 β -catenin 蛋白表达量低于跳骨片含药血清组 ($LSD-t = -4.352, P = 0.002$); 空白血清组软骨细胞中 Frizzled-2 蛋白表达量与跳骨片含药血清组比较, 差异无统计学意义 ($LSD-t = -0.065, P = 0.950$)。⑤软骨细胞中 β -catenin、GSK-3 β 、PGS1 的蛋白表达。脂多糖干预 8 h 后, 软骨细胞中 β -catenin、GSK-3 β 、PGS1 蛋白染色明显, 呈绿色; 空白血清组、模型组和跳骨片含药血清组软骨细胞中 β -catenin、GSK-3 β 、PGS1 蛋白表达量比较, 组间差异均有统计学意义 ($0.014 \pm 0.002, 0.029 \pm 0.006, 0.018 \pm 0.002, F = 9.910, P = 0.013; 0.380 \pm 0.011, 0.237 \pm 0.015, 0.287 \pm 0.002, F = 56.639, P = 0.000; 0.034 \pm 0.003, 0.022 \pm 0.002, 0.029 \pm 0.003, F = 27.232, P = 0.001$); 模型组软骨细胞 β -catenin 蛋白表达量高于空白血清组 ($LSD-t = -4.103, P = 0.006$), GSK-3 β 、PGS1 蛋白表达量低于空白血清组 ($LSD-t = 1.048, P = 0.000; t = 7.365, P = 0.000$); 跳骨片含药血清组软骨细胞 β -catenin 蛋白表达量低于模型组 ($LSD-t = -3.548, P = 0.012$), GSK-3 β 、PGS1 蛋白表达量高于模型组 ($LSD-t = -3.657, P = 0.011; LSD-t = -3.273, P = 0.017$); 空白血清组软骨细胞中 β -catenin 蛋白表达量与跳骨片含药血清组比较, 差异无统计学意义 ($LSD-t = -0.554, P = 0.599$); 空白血清组软骨细胞中 GSK-3 β 、PGS1 蛋白表达量高于跳骨片含药血清组 ($LSD-t = 6.827, P = 0.000; LSD-t = 4.092, P = 0.010$)。结论: 跳骨片含药血清可以抑制脂多糖诱导的软骨细胞炎症反应, 延缓关节软骨退变。其作用机制可能与 Wnt/ β -catenin 信号通路的调控有关, 其中 β -catenin、Frizzled-2、GSK-3 β 、Wnt-4、CKI- ϵ 基因可能是该信号通路的重要靶点。但是由于引起 OA 的因素众多且跳骨片含药血清成分多且复杂, 有待于进一步研究证实。

关键词 骨关节炎; 软骨细胞; 跳骨片; 软骨退变; Wnt/ β -catenin 信号通路; 脂多糖类; 基质金属蛋白酶类; 炎症反应; 动物实验

Study on mechanism of action of Tiaogu Pian (跳骨片) medicated serum in inhibiting inflammatory reaction induced by lipopolysaccharides in chondrocytes

ZHENG Wenwei¹, HE Xiaojuan¹, JIA Liangliang¹, MA Yuhuan¹, CHEN Houhuang¹, SHAO Xiang¹, CHEN Da¹, LIU Xianxiang², LI Xihai², YE Hongzhi¹

1. 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 explore the mechanism of action of Tiaogu Pian (跳骨片, TGP) medicated serum in inhibiting inflammatory reaction induced by lipopolysaccharides in chondrocytes. **Methods:** Ten 8-week-old male SD rats were randomly divided into TGP group and blank group. The rats in TGP group were intragastric administrated with TGP in dosage of 0.32 g/kg, while the others in blank group were intragastric administrated with the same dose of normal saline, once per day for 7 consecutive days. At 1 hour after the last intragastric administration, their blood were fetched out from abdominal aorta and were made into TGP medicated serum and blank serum respectively and the serum were reserved at low temperature for future use. The chondrocytes of ten 4-week-old SD rats were isolated from knee articular cartilage and were cultured. The chondrocytes morphology were observed under optical microscope, and immunohistochemical identification were carried out by using type II collagenase. The second-generation chondrocytes were randomly divided into blank serum group, model group and TGP medicated serum group. The chondrocytes in blank serum group were cultured in dulbecco modified eagle medium (DMEM) supplemented with 10% blank serum. The chondrocytes in model group were cultured in DMEM supplemented with lipopolysaccharide (LPS) with concentration of 10 ng/ml and 10% blank serum. The chondrocytes in TGP medicated serum group were cultured in DMEM supplemented with LPS with concentration of 10 ng/ml and 10% TGP medicated serum. The chondrocytes in the 3 groups were intervened and cultured for continuous 8 hours. The content of matrix metalloproteinase (MMP)3 and MMP9 in chondrocytes were detected by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression levels of gene related to Wnt/ β -catenin signaling pathway in chondrocytes were detected by using fluorescence quantitative RT-PCR method. The protein expressions of β -catenin and Frizzled-2 in chondrocytes were detected by using Western blot method. The protein expressions of β -catenin, glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) and proteoglycans 1 (PGS1) in chondrocytes were detected by using immunofluorescence assay (IFA). **Results:** The second-generation chondrocytes had typical biological characteristics of chondrocytes and their endochylemas and cytomembranes presented with brown-yellow positive staining. After 8-hour intervention by LPS, there was statistical difference in the content of MMP3 and MMP9 in chondrocytes between blank serum group, model group and TGP medicated serum group ($34.019 \pm 1.036, 44.645 \pm 2.473, 32.941 \pm 1.792$ ng/ml, $F = 36.060, P = 0.000; 1.348 \pm 0.038, 1.562 \pm 0.112, 1.331 \pm 0.015$ ng/ml, $F = 11.319, P = 0.000$). The content

of MMP3 and MMP9 in chondrocytes were higher in model group compared to blank serum group ($LSD - t = -7.016, P = 0.000; LSD - t = -3.768, P = 0.003$) and were lower in TGP medicated serum group compared to model group ($LSD - t = 7.652, P = 0.000; LSD - t = 4.066, P = 0.002$). There was no statistical difference in the content of MMP3 and MMP9 in chondrocytes between blank serum group and TGP medicated serum group ($LSD - t = 0.635, P = 0.549; LSD - t = 0.299, P = 0.770$). After 8-hour intervention by LPS, there was statistical difference in gene expression levels of β -catenin, GSK-3 β , Frizzled-2, Wnt-4 and CKI- ε between blank serum group, model group and TGP medicated serum group ($1.000 \pm 0.275, 2.258 \pm 0.206, 1.431 \pm 0.304, F = 36.709, P = 0.000; 1.000 \pm 0.133, 0.417 \pm 0.104, 0.842 \pm 0.094, F = 29.259, P = 0.000; 1.000 \pm 0.191, 1.737 \pm 0.238, 1.445 \pm 0.337, F = 7.027, P = 0.015; 1.000 \pm 0.341, 3.801 \pm 0.579, 1.876 \pm 0.388, F = 71.903, P = 0.000; 1.000 \pm 0.309, 2.208 \pm 0.708, 1.441 \pm 0.421, F = 64.178, P = 0.000$). The gene expression levels of β -catenin, Frizzled-2, Wnt-4 and CKI- ε in chondrocytes were higher and the gene expression levels of GSK-3 β were lower in model group compared to blank serum group ($LSD - t = -8.431, P = 0.000; LSD - t = -3.723, P = 0.005; LSD - t = 8.062, P = 0.000; LSD - t = -11.235, P = 0.000, LSD - t = 7.397, P = 0.000$). The gene expression levels of β -catenin, Frizzled-2, Wnt-4 and CKI- ε in chondrocytes were lower and the gene expression levels of GSK-3 β were higher in TGP medicated serum group compared to model group ($LSD - t = 5.541, P = 0.000; LSD - t = 1.477, P = 0.017; LSD - t = 8.062, P = 0.000; LSD - t = 6.882, P = 0.000; LSD - t = -5.387, P = 0.000$). The gene expression levels of β -catenin, Wnt-4 and CKI- ε in chondrocytes were lower in blank serum group compared to TGP medicated serum group ($LSD - t = -2.289, P = 0.018; LSD - t = -3.658, P = 0.005; LSD - t = -4.352, P = 0.002$). There was no statistical difference in gene expression levels of GSK-3 β and Frizzled-2 between blank serum group and TGP medicated serum group ($LSD - t = 2.009, P = 0.075; LSD - t = -3.658, P = 0.051$). After 8-hour intervention by LPS, there was statistical difference in protein expressions of β -catenin and Frizzled-2 between blank serum group, model group and TGP medicated serum group ($0.449 \pm 0.063, 0.746 \pm 0.156, 0.549 \pm 0.056, F = 5.323, P = 0.026; 1.348 \pm 0.038, 1.562 \pm 0.112, 1.331 \pm 0.015, F = 6.291, P = 0.034$). The protein expressions of β -catenin and Frizzled-2 in chondrocytes were higher in model group compared to blank serum group ($LSD - t = -11.235, P = 0.005; LSD - t = -3.104, P = 0.021$). The protein expressions of β -catenin and Frizzled-2 in chondrocytes were lower in TGP medicated serum group compared to model group ($LSD - t = 6.883, P = 0.037; LSD - t = 3.039, P = 0.023$). The protein expressions of β -catenin in chondrocytes were lower in blank serum group compared to TGP medicated serum group ($LSD - t = -4.352, P = 0.002$). There was no statistical difference in protein expressions of Frizzled-2 between blank serum group and TGP medicated serum group ($LSD - t = -0.065, P = 0.950$). After 8-hour intervention by LPS, the chondrocytes presented with obvious green staining of β -catenin, GSK-3 β and PGSI protein. There was statistical difference in protein expressions of β -catenin, GSK-3 β and PGSI between blank serum group, model group and TGP medicated serum group ($0.014 \pm 0.002, 0.029 \pm 0.006, 0.018 \pm 0.002, F = 9.910, P = 0.013; 0.380 \pm 0.011, 0.237 \pm 0.015, 0.287 \pm 0.002, F = 56.639, P = 0.000; 0.034 \pm 0.003, 0.022 \pm 0.002, 0.029 \pm 0.003, F = 27.232, P = 0.001$). The protein expressions of β -catenin were higher and the protein expressions of GSK-3 β and PGSI were lower in model group compared to blank serum group ($LSD - t = -4.103, P = 0.006; LSD - t = 1.048, P = 0.000; t = 7.365, P = 0.000$). The protein expressions of β -catenin were lower and the protein expressions of GSK-3 β and PGSI were higher in TGP medicated serum group compared to model group ($LSD - t = -3.548, P = 0.012; LSD - t = -3.657, P = 0.011; LSD - t = -3.273, P = 0.017$). There was no statistical difference in protein expressions of β -catenin between blank serum group and TGP medicated serum group ($LSD - t = -0.554, P = 0.599$). The protein expressions of GSK-3 β and PGSI were higher in blank serum group compared to TGP medicated serum group ($LSD - t = 6.827, P = 0.000; LSD - t = 4.092, P = 0.010$). **Conclusion:** TGP medicated serum can inhibit inflammatory reaction induced by LPS in chondrocytes and delay the articular cartilage degeneration. The mechanisms of action may be related to the regulation of Wnt/ β -catenin signaling pathway, in which β -catenin gene, Frizzled-2 gene, GSK-3 β gene, Wnt-4 gene and CKI- ε gene may be the important action targets. However, many factors can cause OA and there are many complicated ingredients in TGP medicated serum, further studies are needed to confirm the specific action targets.

Key words osteoarthritis; chondrocytes; Tiaoguo Pian; cartilage degeneration; Wnt/ β -catenin signaling pathway; lipopolysaccharides; matrix metalloproteinases; inflammatory reaction; animal experimentation

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 以关节软骨退变、软骨下骨重塑、骨赘形成、关节内炎症反应为主要病理

特征的慢性退行性关节疾病,是生物力学、生物学、基因遗传等多种因素共同作用的结果^[1]。炎症反应在

OA 的发生发展过程中起着重要作用。Wnt/ β -链蛋白(β -catenin)信号通路对关节的形成、软骨细胞的分化及关节软骨的退变等起着重要作用^[2]。当 Wnt/ β -catenin 信号通路被激活时能够促进基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)的表达^[3]。MMP 是破坏关节软骨的主要酶,其中以 MMP-13 的破坏性最显著,其能够降解细胞外基质中的胶原及蛋白多糖,是导致 OA 发生的重要原因之一。目前临床尚缺乏有效治疗 OA 的方法,因此寻求一种经济、有效、不良反应小的治疗方法已成为医学界的共识。本课题组前期实验发现跳骨片水提物具有提高软骨细胞活性的作用^[4]。本实验旨在探讨跳骨片含药血清抑制脂多糖诱导的软骨细胞炎症反应的作用机制,以期能为跳骨片治疗 OA 提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 4 周和 8 周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠各 10 只,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,由福建中医药大学实验动物中心提供,实验动物许可证号:SCXK(沪)2012-0002。实验方案通过医学动物实验伦理委员会批准。

1.2 实验药物与试剂 跳骨片(中国福州屏山制药有限公司);糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)、Wnt-4、 β -catenin、卷曲蛋白-2(Frizzled-2)、CKI- ϵ 抗体(美国 Santa Cruz 公司);Collagen II、 β -actin 抗体(美国 Abcam 公司);曲拉通、脂多糖(美国 sigma 公司);水合氯醛(中国上海士锋生物科技有限公司);RIPA 裂解液(强)、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒(中国碧云天生物技术有限公司);MMP-9 酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(美国 R&D Systems 公司);MMP-3、MMP-13ELISA 试剂盒(中国武汉云克隆科技有限公司);GOXRB ALEXA FLUOR 488、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)、蛋白多糖 1(proteoglycans 1, PGS1)抗体(美国 Thermo 公司);AceQ[®] qPCR SYBR[®] Green Master Mix 试剂盒(中国诺唯赞生物科技有限公司);DAB 显色试剂盒、免疫组化试剂盒(中国武汉博士德生物工程有限公司);Trizol(美国 Life 公司)。

1.3 实验仪器 激光共聚焦显微镜(德国 ZEISS 公司);RNA 浓度测定仪(美国 Thermo 公司);光学显微镜

(德国 LEICA 公司);LX-800 酶标仪(美国 Bio-tek 公司);荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

2 方法

2.1 动物分组 将 10 只 8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为跳骨片组和空白组,每组各 5 只。

2.2 含药血清制备 大鼠给药剂量按人和动物药物等效剂量换算公式^[5]计算,将跳骨片成人(按体质量 60 kg 计算)的临床用药剂量折算成大鼠的用药剂量。跳骨片组以 0.32 g·kg⁻¹剂量的跳骨片灌胃,空白组给予等量生理盐水灌胃。每天灌胃 1 次,连续 7 d。末次灌胃 1 h 后,采用 10% 水合氯醛进行腹腔麻醉,无菌条件下行腹主动脉取血,室温下静置 2 h 后,用离心机离心 20 min(转速 3000 r·min⁻¹,离心半径 $r=8.4$ cm),吸取上层血清,56 °C 水浴灭活 30 min,用直径 0.22 μ m 无菌滤头过滤除菌,于 -80 °C 的环境下保存备用。

2.3 软骨细胞分离、培养与鉴定 取 10 只 4 周龄 SPF 级 SD 大鼠,采用 10% 水合氯醛进行麻醉处死,无菌条件下截取大鼠双侧膝关节;将其置于 75% 的酒精中消毒 15 min 后,在超净台上用手术刀刮下胫骨平台和股骨髁的关节软骨,置于培养皿中用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)洗 3 次;然后用刀片将其切碎成约 1 mm³ 的小块,加入 3 mL 0.2% 的 II 型胶原酶,于 37 °C 培养箱中消化;每 2 h 吸取上清液,用离心机离心 5 min(转速 1500 r·min⁻¹,离心半径 $r=8.4$ cm);弃上清,将细胞重悬于含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的培养液中,重复 4~5 次至组织块被消化完全,此为原代软骨细胞;隔天更换 1 次培养液,细胞长满至培养皿底 80%~90% 时,传第 1 代软骨细胞;继续培养并传代,获得第 2 代软骨细胞。取生长良好的第 2 代软骨细胞接种于 6 孔板中,放入细胞爬片,加入 2 mL 含 10% FBS 的培养液培养 48 h,4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗 3 次;0.3% 曲拉通破膜 10 min, PBS 洗 3 次;3% H₂O₂ 处理 30 min, PBS 洗 3 次;5% BSA 封闭 1 h;4 °C 下一抗 Collagen II 孵育过夜(阳性组),而阴性对照组不进行一抗 Collagen II 孵育;室温孵育二抗 1 h, DAB 显色 3 min 后自来水漂洗;苏木素复染 30 s 后自来水荡洗,晾干,中性树脂封片,光学显微镜下观察软骨细胞形态。

2.4 软骨细胞分组和干预 将生长状态良好的第 2 代软骨细胞以 2×10^4 个·mL⁻¹接种于 6 孔培养板

中,每孔 2 mL。细胞贴壁后,将细胞随机分为空白血清组、模型组、跳骨片含药血清组,其中空白血清组以含 10% 空白血清的培养基(dulbecco modified eagle medium, DMEM)培养;模型组以浓度为 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的脂多糖和含 10% 空白血清的 DMEM 培养;跳骨片含药血清组以浓度为 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的脂多糖和含 10% 跳骨片含药血清的 DMEM 培养;3 组均连续干预培养 8 h。

2.5 软骨细胞 MMP-3、MMP-9 含量检测 采用 ELISA 法。脂多糖干预 8 h 后,吸取各组细胞培养液, 4°C 离心 5 min ($3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心半径 $r = 8.4 \text{ cm}$), 取上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书处理细胞上清液样品,用多功能酶标仪以 450 nm 波长检测样品中 MMP3、MMP9 的浓度。

2.6 软骨细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路相关基因表达水平检测 采用荧光定量 RT-PCR 检测法。脂多糖干预 8 h 后,各组软骨细胞用 PBS 洗涤 2 次,每孔加入 1 mL Trizol 试剂提取各组总 RNA,测完浓度后取 2 μg 的总 RNA,根据表 1 条件进行逆转录。取 2 μL 的逆转录产物,按 AceQ[®] qPCR SYBR[®] Green Master Mix 试剂盒说明书进行加样,使用荧光定量 PCR 仪进行荧光收集,其中引物序列见表 2。以 GAPDH 为内参基因,并采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各组间的基因表达差异(Ct 值为每个反应管内的荧光信号到达所设定的阈值时所经历的循环数)。

表 1 逆转录条件

步骤	温度($^\circ\text{C}$)	时间(min)
第 1 步	42	60
第 2 步	70	5
第 3 步	4	保存

表 2 荧光定量 RT-PCR 实验所用引物序列

基因名称	序列(5'-3')
GAPDH	上游: ACGGCAAGTTCAACGGCACAG 下游: GAAGACGCCAGTAGACTCCACGAC
β -catenin	上游: AGGCACTGGGGCTTCATCTGAC 下游: GCCTTCCATCCCTTCTGCTTAG
Frizzled-2	上游: CTTCTGTCTACTCTCCGCATC 下游: ATAAGACGCCGATACGCACCAT
Wnt-4	上游: ATGGAGCCGATCCGGTCCAG 下游: CACCATGCACCTCTCCACG
GSK-3 β	上游: GAGGCAATCGCACTGTGTAG 下游: AGGTAGAGTTGGAGGCTGATG
CKI- ε	上游: ATCAGCGAGAAGAAGATGTCAAC 下游: TAGGAGTAGTCAGGTTTGTTCATCG

2.7 软骨细胞中 β -catenin、Frizzled-2 蛋白表达检测 采用 Western blot 法。脂多糖干预 8 h 后,各组软骨细胞用 PBS 洗 3 次,加入 200 μL 蛋白裂解液(RA-PI: PMSF = 100:1), 4°C 下裂解 30 min;细胞裂解完毕后,用细胞刮刀轻轻将裂解物刮下,收集并转移入至环氧树脂管中, 4°C 下离心 30 min (转速 $14\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心半径 $r = 8.4 \text{ cm}$),吸取上清液获取总蛋白。根据 BCA 蛋白定量结果上样,以 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 2.5 h,将蛋白转至聚偏二氟乙烯膜上,转膜结束后用 TBST 洗 3 次,每次 10 min;然后用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 4°C 下分别孵育 β -catenin、Frizzled-2 一抗过夜, TBST 洗 3 次,每次 10 min,室温孵育二抗 1 h, TBST 洗 3 次,每次 10 min,曝光、显影。应用 Image Lab 图像处理软件分析目的蛋白和内参 β -actin 条带灰度值,计算机读取并记录每条条带的灰度值。

2.8 软骨细胞中 β -catenin、GSK-3 β 、PGS1 的蛋白表达检测 采用免疫荧光检测法。脂多糖干预 8 h 后,吸去培养板中的培养液,用 PBS 洗 3 次;加入冰甲醇, 4°C 固定 30 min,用 PBS 洗 3 次,每次 5 min;5% 牛血清白蛋白(albumin from bovine serum, BSA) 封闭 1 h,分别加入 β -catenin、GSK-3 β 、PGS1 一抗, 4°C 孵育过夜, PBS 洗 3 次,每次 5 min;抗兔荧光二抗 37°C 孵育 1 h 后, DAPI 染色 5 min, PBS 洗 5 次,每次 5 min;荧光显微镜下观察,每个样品随机选取 5 个视野($\times 200$),拍照并保存;采用 Image-Pro Plus 6.0 软件对图片进行图像分析,测出图像中阳性表达累积光密度(integrated optical density, IOD)、目标组织区域面积(Area),并计算出各图片的平均光密度(ODmean),计算公式如下: $\text{ODmean} = \text{IOD} / \text{Area}$ 。

2.9 数据统计学分析 采用 SPSS19.0 统计软件对所得数据进行统计学处理。脂多糖干预 8 h 后 3 组大鼠软骨细胞 MMP3、MMP9 含量,软骨细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路相关基因表达水平,软骨细胞中 β -catenin、Frizzled-2、GSK-3 β 、PGS1 的蛋白表达水平的组间比较均采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结 果

3.1 软骨细胞鉴定结果 第 2 代软骨细胞胞浆及细胞膜被染成棕黄色,具有典型的软骨细胞生物学特征(图 1)。

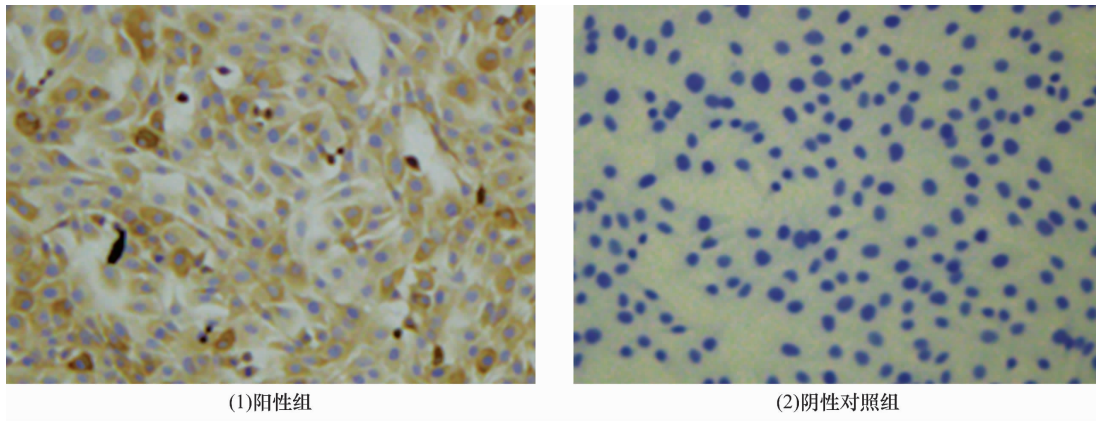


图 1 第 2 代软骨细胞 II 型胶原免疫组化染色结果 (×100)

3.2 软骨细胞 MMP3、MMP9 含量 脂多糖干预 8 h 后,空白血清组、模型组和跳骨片含药血清组的软骨细胞 MMP3、MMP9 含量比较,组间差异均有统计学意义;模型组软骨细胞 MMP3、MMP9 含量均高于空白血清组 ($LSD - t = -7.016, P = 0.000$; $LSD - t = -3.768, P = 0.003$);跳骨片含药血清组软骨细胞 MMP3、MMP9 含量均低于模型组 ($LSD - t = 7.652, P = 0.000$; $LSD - t = 4.066, P = 0.002$);空白血清组软骨细胞 MMP3、MMP9 含量与跳骨片含药血清组比较,差异均无统计意义 ($LSD - t = 0.635, P = 0.549$; $LSD - t = 0.299, P = 0.770$)。见表 3。

表 3 3 组大鼠软骨细胞中 MMP3、MMP9 含量的比较
 $\bar{x} \pm s, ng \cdot mL^{-1}$

组别	MMP3	MMP9
空白血清组	34.019 ± 1.036	1.348 ± 0.038
模型组	44.645 ± 2.473	1.562 ± 0.112
跳骨片含药血清组	32.941 ± 1.792	1.331 ± 0.015
<i>F</i> 值	36.060	11.319
<i>P</i> 值	0.000	0.000

MMP:基质金属蛋白酶

3.3 软骨细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路相关基因的表达 脂多糖干预 8 h 后,空白血清组、模型组和

表 4 3 组大鼠软骨细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路相关基因表达量的比较 $\bar{x} \pm s$

组别	β -catenin	GSK-3 β	Frizzled-2	Wnt-4	CKI- ϵ
空白血清组	1.000 ± 0.275	1.000 ± 0.133	1.000 ± 0.191	1.000 ± 0.341	1.000 ± 0.309
模型组	2.258 ± 0.206	0.417 ± 0.104	1.737 ± 0.238	3.801 ± 0.579	2.208 ± 0.708
跳骨片含药血清组	1.431 ± 0.304	0.842 ± 0.094	1.445 ± 0.337	1.876 ± 0.388	1.441 ± 0.421
<i>F</i> 值	36.709	29.259	7.027	71.903	64.178
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.015	0.000	0.000

β -catenin: β -链蛋白;GSK-3 β :糖原合成酶激酶-3 β ;Frizzled-2:卷曲蛋白-2

3.4 软骨细胞中 β -catenin、Frizzled-2 的蛋白表达 脂多糖干预 8 h 后,空白血清组、模型组和跳骨片含

跳骨片含药血清组软骨细胞中 β -catenin、GSK-3 β 、Frizzled-2、Wnt-4、CKI- ϵ 基因表达量比较,组间差异均有统计学意义;模型组软骨细胞中 β -catenin、Frizzled-2、Wnt-4、CKI- ϵ 基因表达量均高于空白血清组 ($LSD - t = -8.431, P = 0.000$; $LSD - t = -3.723, P = 0.005$; $LSD - t = 8.062, P = 0.000$; $LSD - t = -11.235, P = 0.000$), GSK-3 β 基因表达量低于空白血清组 ($LSD - t = 7.397, P = 0.000$);跳骨片含药血清组软骨细胞中 β -catenin、Frizzled-2、Wnt-4、CKI- ϵ 基因表达量均低于模型组 ($LSD - t = 5.541, P = 0.000$; $LSD - t = 1.477, P = 0.017$; $LSD - t = 8.062, P = 0.000$; $LSD - t = 6.882, P = 0.000$), GSK-3 β 基因表达量高于模型组 ($LSD - t = -5.387, P = 0.000$);空白血清组软骨细胞中 β -catenin、Wnt-4、CKI- ϵ 基因表达量均低于跳骨片含药血清组 ($LSD - t = -2.289, P = 0.018$; $LSD - t = -3.658, P = 0.005$; $LSD - t = -4.352, P = 0.002$);空白血清组软骨细胞中 GSK-3 β 、Frizzled-2 基因表达量与跳骨片含药血清组比较,差异均无统计学意义 ($LSD - t = 2.009, P = 0.075$; $LSD - t = -3.658, P = 0.051$)。见表 4。

药血清组软骨细胞中 β -catenin、Frizzled-2 蛋白表达量比较,组间差异均有统计学意义;模型组软骨细

胞中 β -catenin、Frizzled-2 蛋白表达量高于空白血清组 ($LSD - t = -11.235, P = 0.005$; $LSD - t = -3.104, P = 0.021$); 跳骨片含药血清组软骨细胞中 β -catenin、Frizzled-2 蛋白表达量低于模型组 ($LSD - t = 6.883, P = 0.037$; $LSD - t = 3.039, P =$

表 5 3 组大鼠软骨细胞中 β -catenin、Frizzled-2 蛋白

表达量的比较 $\bar{x} \pm s$

组别	β -catenin	Frizzled-2
空白血清组	0.449 ± 0.063	1.348 ± 0.038
模型组	0.746 ± 0.156	1.562 ± 0.112
跳骨片含药血清组	0.549 ± 0.056	1.331 ± 0.015
<i>F</i> 值	5.323	6.291
<i>P</i> 值	0.026	0.034

β -catenin: β -链蛋白; Frizzled-2: 卷曲蛋白-2

3.5 软骨细胞中 β -catenin、GSK-3 β 、PGS1 的蛋白表达 脂多糖干预 8 h 后, 软骨细胞核 DAPI 染色明显, 呈蓝色; 软骨细胞 β -catenin、GSK-3 β 、PGS1 蛋白染色明显, 呈绿色 (图 3)。空白血清组、模型组和跳骨片含药血清组软骨细胞中 β -catenin、GSK-3 β 、PGS1 蛋白表达量比较, 组间差异均有统计学意义; 模型组软骨细胞 β -catenin 蛋白表达量高于空白血清组 ($LSD - t = -4.103, P = 0.006$), GSK-3 β 、PGS1 蛋白表达量低于空白血清组 ($LSD - t = 1.048, P = 0.000$; $t = 7.365, P = 0.000$); 跳骨片含药血清组软骨

0.023); 空白血清组软骨细胞中 β -catenin 蛋白表达量低于跳骨片含药血清组 ($LSD - t = -4.352, P = 0.002$); 空白血清组软骨细胞中 Frizzled-2 蛋白表达量与跳骨片含药血清组比较, 差异无统计学意义 ($LSD - t = -0.065, P = 0.950$)。见表 5、图 2。

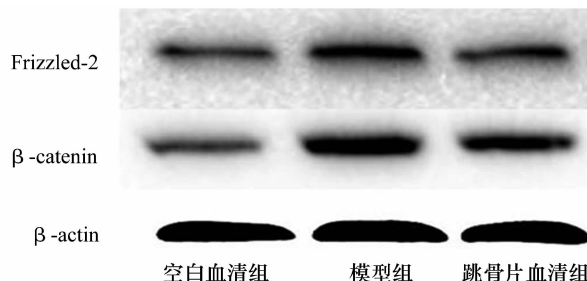


图 2 3 组大鼠软骨细胞中 β -catenin、Frizzled-2 蛋白表达 β -catenin: β -链蛋白; Frizzled-2: 卷曲蛋白-2

细胞 β -catenin 蛋白表达量低于模型组 ($LSD - t = -3.548, P = 0.012$), GSK-3 β 、PGS1 蛋白表达量高于模型组 ($LSD - t = -3.657, P = 0.011$; $LSD - t = -3.273, P = 0.017$); 空白血清组软骨细胞中 β -catenin 蛋白表达量与跳骨片含药血清组比较, 差异无统计学意义 ($LSD - t = -0.554, P = 0.599$); 空白血清组软骨细胞中 GSK-3 β 、PGS1 蛋白表达量高于跳骨片含药血清组 ($LSD - t = 6.827, P = 0.000$; $LSD - t = 4.092, P = 0.006$)。见表 6、图 3。

表 6 3 组大鼠软骨细胞中 β -catenin、GSK-3 β 、PGS1 蛋白表达量的比较 $\bar{x} \pm s$

组别	β -catenin	GSK-3 β	PGS1
空白血清组	0.014 ± 0.002	0.380 ± 0.011	0.034 ± 0.003
模型组	0.029 ± 0.006	0.237 ± 0.015	0.022 ± 0.002
跳骨片含药血清组	0.018 ± 0.002	0.287 ± 0.002	0.029 ± 0.003
<i>F</i> 值	9.910	56.639	27.232
<i>P</i> 值	0.013	0.000	0.001

β -catenin: β -链蛋白; GSK-3 β : 糖原合成酶激酶-3 β ; PGS1: 蛋白多糖 1

4 讨论

OA 属于中医“痹证”范畴。中医学认为该病由风、寒、湿热等外邪侵袭人体, 痹阻经络, 气血运行不畅所导致, 治宜舒筋活血、消肿止痛、祛风散寒除湿。跳骨片中马钱子 (制)、独活、冰片、羌活、乌药具有消肿定痛的功效; 骨碎补、狗脊具有补肝肾、强筋骨的功效; 三七、红花、土鳖虫具有舒筋活血、祛风散寒的作用。诸药配伍, 共奏补肝肾强筋骨、活血舒筋、祛风散寒、消肿定痛的功效。

炎症在 OA 的发生发展过程中起着重要作用^[6]。MMP 主要由软骨细胞、滑膜细胞等细胞产生, 是降解

软骨基质中最重要的酶, 其中以 MMP13 破坏性最为显著。不同的 MMP 可通过相互作用降解细胞外基质, 也可以通过相互协同作用加速关节软骨的破坏。MMP9 是一种以暴露胶原、破坏软骨基质、破坏胶原形成的网状结构为主的酶^[7]。MMP3 不仅可以降解细胞外基质中的蛋白多糖、胶原等成分, 同时也可以激活 MMP9、MMP13, 加速关节软骨破坏^[8], 而选择性抑制 MMP13 的活性可以降低 II 型胶原的降解, 延缓关节软骨退变^[9]。本实验结果显示, 跳骨片含药血清能降低脂多糖诱导的炎症软骨细胞 MMP3、MMP9 表达, 这提示跳骨片可以有效降低炎症因子的表达以及

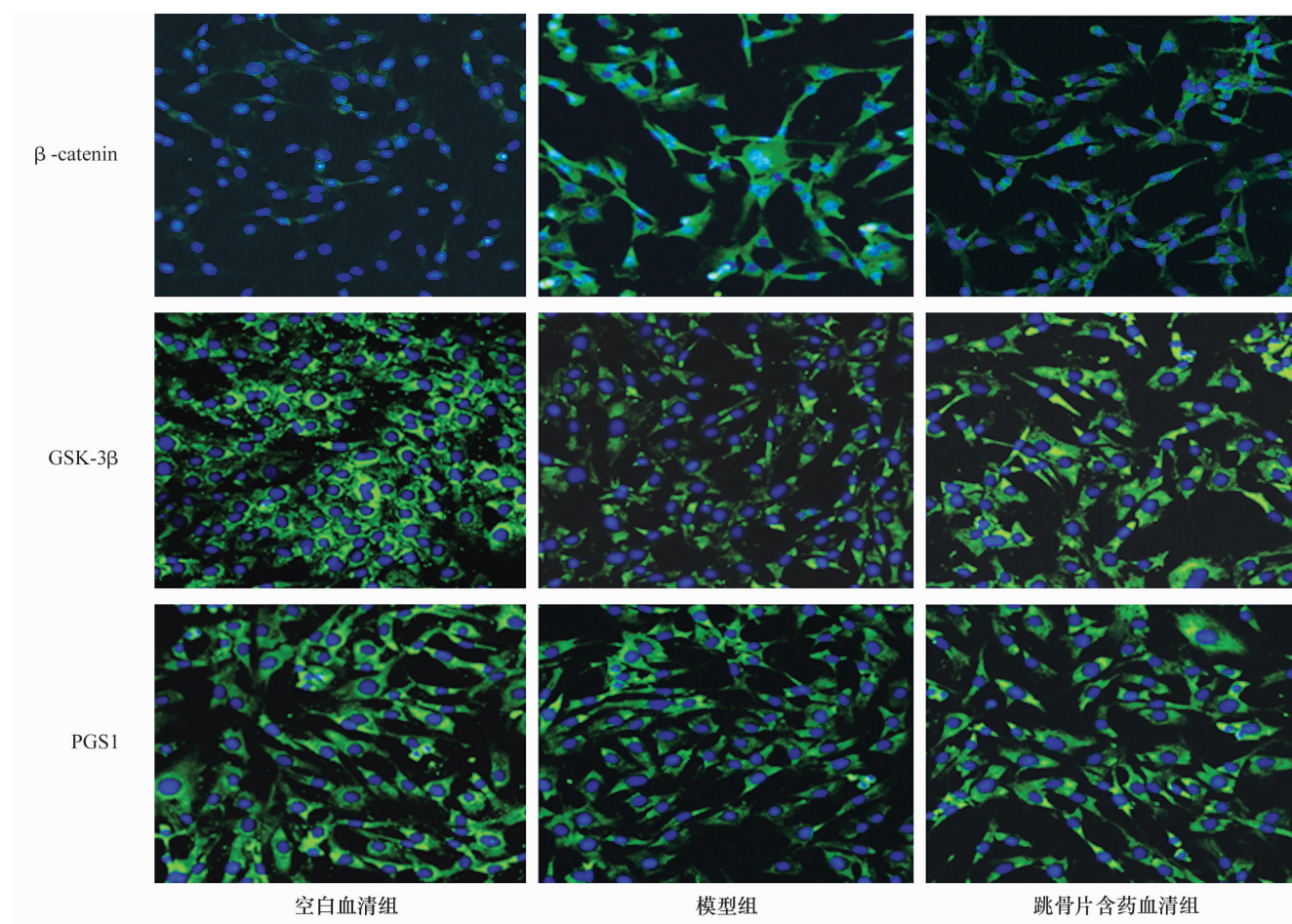


图 3 3 组大鼠软骨细胞免疫荧光染色结果 (×200)

β-catenin:β-链蛋白;GSK-3β:糖原合成酶激酶-3β;PGS1:蛋白多糖 1

抑制软骨基质降解而发挥保护关节软骨的作用。

Wnt/β-catenin 信号通路参与软骨退变,影响 OA 的病理过程,是 OA 软骨破坏病程中最重要的信号通路。β-catenin 作为 Wnt/β-catenin 信号通路中的重要组成成员之一,其表达水平高低对 OA 发生发展起着重要作用。当 Wnt 通路被激活时,Wnt 与膜受体 Frizzled 及低密度脂蛋白受体相关蛋白 (LRP5/6) 结合后进行信号转导;Frizzled 促使胞浆中散乱蛋白发生磷酸化,磷酸化的散乱蛋白抑制 GSK-3β 的磷酸化,从而抑制 GSK-3β 对 β-catenin 的磷酸化降解作用,使未磷酸化 β-catenin 在胞质中积累并转位入核,进入细胞核与转录因子 T 细胞因子/淋巴增强因子结合,促进 Wnt 下游通路某些靶基因的表达,如 MMP^[10]。CKI-ε 能抑制 GSK-3β 对 β-catenin 的磷酸化降解,促使 Wnt/β-catenin 信号通路的激活^[11-12]。当 Wnt / β-catenin 信号通路被激活时能够提高炎症细胞因子白细胞介素-1β、肿瘤坏死因子-α 表达,促进 MMP 的生成^[13]。Wnt/β-catenin

信号通路过表达时可提高 MMP 及蛋白聚糖酶的表达,促进 OA 进程^[14]。因此,Wnt/β-catenin 信号通路是治疗 OA 的潜在药靶,其中 β-catenin、Frizzled-2、GSK-3β、Wnt-4、CKI-ε 基因是该信号通路的重要靶点。荧光定量 RT-PCR、Western blot 检测结果显示,跳骨片含药血清能抑制炎症软骨细胞 β-catenin、Frizzled-2、Wnt-4、CKI-ε 表达,促进 GSK-3β 表达。同时免疫荧光染色结果显示,跳骨片含药血清能够抑制 β-catenin 在胞浆积累及核转位,促进 GSK-3β、PGS1 蛋白表达,这进一步说明了跳骨片含药血清可调控 Wnt/β-catenin 信号通过,抑制炎症反应介导的软骨基质的降解,从而延缓关节软骨的退变。

本研究结果显示,跳骨片含药血清可以抑制脂多糖诱导的软骨细胞炎症反应,延缓关节软骨退变。其作用机制可能与 Wnt/β-catenin 信号通路的调控有关,其中 β-catenin、Frizzled-2、GSK-3β、Wnt-4、CKI-ε 基因可能是该信号通路的重要靶点。但是由

于引起 OA 的因素众多且跳骨片含药血清成分多且复杂,有待于进一步研究证实。

5 参考文献

- [1] MALAISE O, RELIC B, QUESADA - CALVO F, et al. Selective glucocorticoid receptor modulator compound A, in contrast to prednisolone, does not induce leptin or the leptin receptor in human osteoarthritis synovial fibroblasts[J]. Rheumatology (Oxford), 2015, 54(6): 1087 - 1092.
- [2] ROCKEL JS, YU C, WHETSTONE H, et al. Hedgehog inhibits β - catenin activity in synovial joint development and osteoarthritis[J]. J Clin Invest, 2016, 126(5): 1649 - 1663.
- [3] BOUAZIZ W, SIGAUX J, MODROWSKI D, et al. Interaction of HIF1 α and β - catenin inhibits matrix metalloproteinase 13 expression and prevents cartilage damage in mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(19): 5453 - 5458.
- [4] 郑文伟, 马玉环, 林平冬, 等. 跳骨片水提物对体外大鼠关节软骨细胞活性的影响[J]. 风湿病与关节炎, 2017, 6(1): 5 - 8.
- [5] 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.
- [6] CHAN CM, MACDONALD CD, LITHERLAND GJ, et al. Cytokine - induced MMP13 Expression in Human Chondrocytes Is Dependent on Activating Transcription Factor 3 (ATF3) Regulation[J]. J Biol Chem, 2017, 292(5): 1625 - 1636.
- [7] KANEKO M, TOMITA T, NAKASE T, et al. Expression of proteinases and inflammatory cytokines in subchondral bone regions in the destructive joint of rheumatoid arthritis[J]. Rheumatology (Oxford), 2001, 40(3): 247 - 255.
- [8] SUN S, BAYJENSEN AC, KARSDAL MA, et al. The active form of MMP - 3 is a marker of synovial inflammation and cartilage turnover in inflammatory joint diseases[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2014, 15(1): 93.
- [9] ÖZLER K, AKTAŞ E, ATAY Ç, et al. Serum and knee synovial fluid matrix metalloproteinase - 13 and tumor necrosis factor - α levels in patients with late stage osteoarthritis[J]. Acta Orthop Traum Turc, 2016, 50(3): 356.
- [10] USAMI Y, GUNAWARDENA AT, IWAMOTO M, et al. Wnt signaling in cartilage development and diseases: lessons from animal studies[J]. Lab Invest, 2016, 96(2): 186 - 196.
- [11] GAO ZH, SEELING JM, HILL V, et al. Casein kinase I phosphorylates and destabilizes the β - catenin degradation complex[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(3): 1182 - 1187.
- [12] UMAR S, WANG Y, MORRIS AP, et al. Dual alterations in casein kinase I - epsilon and GSK - 3 β modulate β - catenin stability in hyperproliferating colonic epithelia[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007, 292(2): G599 - G607.
- [13] DU G, SONG Y, WEI L, et al. Osteonin inhibits proliferation and induces catabolism in rat chondrocytes and cartilage tissue[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 36(6): 2480 - 2493.
- [14] 赵晋, 闫振宇, 张立智. 骨性关节炎软骨和软骨下骨之间信号通路[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2016, 9(2): 193 - 198.

(2017-03-22 收稿 2017-06-09 修回)

· 简 讯 ·

《中医正骨》2018 年征订启事

《中医正骨》杂志[CN 41 - 1162/R, ISSN 1001 - 6015]是由国家中医药管理局主管、河南省正骨研究院与中华中医药学会联合主办的中医骨伤科学学术性期刊,也是《中国学术期刊影响因子年报》统计源期刊、全国中医药优秀期刊、波兰《哥白尼索引》收录期刊,由我国中医药界首位“白求恩奖章”获得者、首批国家级非物质文化遗产项目——中医正骨疗法的代表性传承人之一、洛阳平乐郭氏正骨第六代传人郭维淮主任医师担任主编,创刊于 1989 年。

《中医正骨》具有中医特色突出、临床实用性强、办刊定位准确、发行量大、图文并茂等特点,办刊宗旨是:突出中医骨伤特色,反映学术进展,交流新经验,报道新成果,传递新信息,为促进中医骨伤科现代化服务。

该刊为月刊,大 16 开本,84 页,国内外公开发行,每月 20 日出版,铜版纸彩色印刷,每期定价 RMB 15.00 元,全年定价 RMB 180.00 元。国内读者请继续到当地邮政分公司订阅,邮发代号:36 - 129;国外读者请与中国国际图书贸易集团有限公司联系(邮政编码:100048,北京 399 信箱,国外代号:M 4182)。创办近 30 年的《中医正骨》杂志将继续坚持办刊宗旨,为广大读者、作者提供更加充足、快捷的科技信息。

编辑部地址:河南省洛阳市瀍河区启明南路 82 号 邮政编码:471002

http://www.zygz.com

联系电话:0379 - 63551943 或 63546705

E-mail:zyzg1989@126.com

欢 迎 订 阅

欢 迎 投 稿