

计算机模拟研究荣筋拈痛方治疗骨关节炎的 药效物质基础、作用靶点及作用特点

郑春松¹, 范展彪¹, 叶蕪芝¹, 付长龙², 叶锦霞², 吴广文², 刘献祥¹

(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:从分子水平探讨荣筋拈痛方治疗骨关节炎(osteoarthritis, OA)的药效物质基础、作用靶点及作用特点。**方法:**通过检索北京大学中草药有效成分三维结构数据库、中药原植物化学成分手册和相关文献,共检索出荣筋拈痛方中有效化合物 411 个,在 Discovery studio 模拟平台上建立荣筋拈痛方化合物分子数据集。通过检索 TTD 数据库和相关文献,确定基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-1、MMP-3、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、5-脂加氧酶(5-lipoxygenase, 5-LOX)、转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)、白细胞介素 1β (interleukin 1β , IL- 1β)和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)为荣筋拈痛方治疗 OA 的靶点,从 RCSB 蛋白数据库下载其蛋白质晶体结构,在 Discovery studio 模拟平台上建立其蛋白分子数据集。通过分子对接和生物网络技术,构建荣筋拈痛方化合物-OA 靶点作用网络,研究荣筋拈痛方治疗 OA 的药效物质基础、作用靶点及作用特点。**结果:**建立的荣筋拈痛方化合物-OA 靶点作用网络中共有 159 个节点,包括 7 个 OA 靶蛋白节点和 152 个荣筋拈痛方化合物节点;7 个 OA 靶蛋白节点中, MMP-1 节点可以与 90 个化合物节点连接、MMP-3 节点可以与 18 个化合物节点连接、iNOS 节点可以与 43 个化合物节点连接、5-LOX 节点可以与 16 个化合物节点连接、TGF- $\beta 1$ 节点可以与 40 个化合物节点连接、IL- 1β 节点可以与 109 个化合物节点连接、TNF- α 节点可以与 53 个化合物节点连接;152 个荣筋拈痛方化合物节点中,约 76.16% 的化合物的作用靶点数量 ≤ 3 个、11.26% 的化合物的作用靶点数量 ≥ 5 个。荣筋拈痛方的活性成分主要为苷类和黄酮类。荣筋拈痛方化合物-OA 靶点的作用关系曲线遵循幂函数 $p(k) = k^{-1.79411}$ 规律。**结论:**荣筋拈痛方治疗 OA 的药效物质基础为苷类和黄酮类,主要作用靶点为 IL- 1β 、TNF- α 和 MMP-1,在缓解疼痛及延缓软骨退变方面具有广谱的作用特点。

关键词 骨关节炎;荣筋拈痛方;计算机模拟

A computer simulation study on pharmacodynamic material basis, action targets and characteristics of Rongjin Niantong Fang(荣筋拈痛方) in treatment of osteoarthritis

ZHENG Chunsong¹, FAN Zhanbiao¹, YE Hongzhi¹, FU Changlong², YE Jinxia², WU Guangwen², LIU Xianxiang¹

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 pharmacodynamic material basis, action targets and characteristics of Rongjin Niantong Fang(荣筋拈痛方, RJNTF) in the treatment of osteoarthritis(OA) at molecular level. **Methods:** Four hundred and eleven effective chemical compounds were searched out from RJNTF by searching Peking University database of three-dimensional structure of Chinese herbal effective components, Encyclopedia of Traditional Chinese medicines: Molecular Structures, Pharmacological Activities, Natural Sources and Applications and related literatures to build the RJNTF chemical compound molecular dataset on the Discovery studio simulation platform. Matrix metalloproteinase(MMP)-1, MMP-3, inducible nitric oxide synthase(iNOS), 5-lipoxygenase(5-LOX), transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), interleukin 1β (IL- 1β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were identified as the targets of RJNTF for treatment of OA through retrieving TTD database and related literatures, and their protein crystal structures were downloaded from RCSB protein database and the molecular dataset of protein were built on the Discovery studio simulation platform. The network of interaction between chemical

基金项目:福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划资助项目(闽教科[2017]52号);陈可冀中西医结合发展基金项目(CKJ2017002)

通讯作者:刘献祥 E-mail:liuxianxiang@163.com

compounds of RJNTF and targets of OA was built by using molecular docking and bio-network technology, and the pharmacodynamic material basis, action targets and characteristics of RJNTF for treatment of OA were studied. **Results:** The network of interaction between chemical compounds of RJNTF and targets of OA consisted of 159 nodes in total, included 7 OA target protein nodes and 152 RJNTF chemical compound nodes. Seven OA target protein nodes consisted of MMP-1, MMP-3, iNOS, 5-LOX, TGF- β 1, IL-1 β and TNF- α nodes, which could be connected to 90, 18, 43, 16, 40, 109 and 53 chemical compound nodes respectively. The number of action targets of about 76.16% and 11.26% of the 152 chemical compound nodes of RJNTF were ≤ 3 and ≥ 5 respectively. The main active ingredients of RJNTF were glycosides and flavonoids. The curve of interaction between RJNTF chemical compounds and OA targets followed the power function $p(k) = k^{-1.79411}$. **Conclusion:** The pharmacodynamic material basis of RJNTF were glycosides and flavonoids in the treatment of OA, and its main action targets were IL-1 β , TNF- α and MMP-1, and it is characterized with broad effect in alleviating pain and delaying cartilage degeneration.

Key words osteoarthritis; Rongjin Niantong Fang; computer simulation

荣筋拈痛方由牛膝、当归、独活、羌活、防风 and 甘草组成,具有补肝肾、壮筋骨、祛风湿和止痹痛的功效。现代药理研究显示,荣筋拈痛方的组成药物均对骨关节炎(osteoarthritis, OA)有很好的治疗作用^[1-6],这些药物的作用主要体现在修复软骨损伤、缓解软骨细胞破坏及减轻滑膜炎等方面。但对于荣筋拈痛方治疗 OA 的药效物质基础及作用机制,目前尚不清楚。为此,本研究基于计算机模拟^[7-8]的方法研究了荣筋拈痛方化学成分与 OA 重要靶点的相互作用,现总结报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验材料 荣筋拈痛方所含化合物数据来源于北京大学中草药有效成分三维结构数据库^[9]、中药原植物化学成分手册^[10]和文献^[11];靶点信息来源于 TTD 数据库^[12]和文献^[13],荣筋拈痛方治疗 OA 的靶点蛋白质结构来源于 RCSB 蛋白数据库^[14]。

1.2 实验设备 Discovery studio 分子模拟软件;Cytoscape 生物信息网络关系软件^[15]。本实验所有计算工作皆在北京大学化学与分子工程学院计算机模拟实验室完成,计算过程中除非特别指明,所选用的参数均为缺省值。

2 方法

2.1 荣筋拈痛方化合物分子数据集和主要靶点蛋白质数据集的建立 通过检索北京大学中草药有效成分三维结构数据库、中药原植物化学成分手册和相关文献,共检索出荣筋拈痛方中有效化合物 411 个,在 Discovery studio 模拟平台上建立荣筋拈痛方化合物分子数据集。通过检索 TTD 数据库和相关文献,确定基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-1、MMP-3、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、5-脂加氧酶(5-lipoxygenase, 5-LOX)、转化生长因子 β 1(transforming growth factor-

β 1, TGF- β 1)、白细胞介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)为荣筋拈痛方治疗 OA 的靶点,从 RCSB 蛋白数据库下载其蛋白质-配体复合物晶体结构(表 1),在 Discovery studio 模拟平台上建立其蛋白分子数据集。

表 1 荣筋拈痛方治疗骨关节炎的主要作用靶点信息

中文名称	英文简称	PDB 代码
基质金属蛋白酶 1	MMP-1	3AYK
基质金属蛋白酶 3	MMP-3	4G9L
诱导型一氧化氮合酶	iNOS	2Y37
5-脂加氧酶	5-LOX	3V99
转化生长因子 β 1	TGF- β 1	1RW8
白细胞介素 1 β	IL-1 β	3O4O
肿瘤坏死因子 α	TNF- α	2AZ5

2.2 荣筋拈痛方化合物-OA 靶点作用网络的构建

在 Discovery studio 模拟平台,将荣筋拈痛方化合物分子数据集配体与荣筋拈痛方治疗 OA 的重要靶点在 LigandFit 模块中进行分子对接^[16]。具体操作如下:蛋白结构去溶剂、去配体、加氢处理后,以其所含的活性原配体来确定活性位点;在 Input Ligands 模块中输入荣筋拈痛方分子数据集的 sd 文件,使用蒙特卡罗方法对配体进行构象采样、Dreiding 力场下进行打分,保留得分最高的构象,对对接成功的配体 DOCK-SCORE 进行排序,大于原配体 DOCK-SCORE 的配体,视为荣筋拈痛方治疗 OA 的活性成分^[17]。将上述化合物与靶点当做节点,两者相互作用用边表示,采用 Cytoscape 软件构建荣筋拈痛方化合物-OA 靶点作用网络,并通过该软件 Plugins 面板下 Network Analysis 模块分析荣筋拈痛方化合物与 OA 靶点的作用情况。同时定义度分布 $p(k)$ 为网络中节点度值为 k 的概率^[18],由此得到网络度的分布情况,以揭示荣筋拈痛方治疗 OA 的作用特点。

3 结 果

建立的荣筋拈痛方化合物 - OA 靶点作用网络 (图 1) 中共有 159 个节点, 包括 7 个 OA 靶蛋白节点和 152 个荣筋拈痛方化合物节点; 7 个 OA 靶蛋白节点中, MMP-1 节点可以与 90 个化合物节点连接、MMP-3 节点可以与 18 个化合物节点连接、iNOS 节点可以与 43 个化合物节点连接、5-LOX 节点可以与 16 个化合物节点连接、TGF- β 1 节点可以与 40 个化合物节点连接、IL-1 β 节点可以与 109 个化合物节

点连接、TNF- α 节点可以与 53 个化合物节点连接; 152 个荣筋拈痛方化合物节点中, 约 76.16% 的化合物的作用靶点数量 ≤ 3 个、11.26% 的化合物的作用靶点数量 ≥ 5 个。

以 Network Analysis 模块分析了荣筋拈痛方化合物 - OA 靶点作用网络中重要节点的网络特征, 结果显示荣筋拈痛方的活性成分主要为苷类和黄酮类 (表 2)。荣筋拈痛方化合物 - OA 靶点的作用关系曲线遵循幂函数 $p(k) = k^{-1.79411}$ 规律 (图 2)。

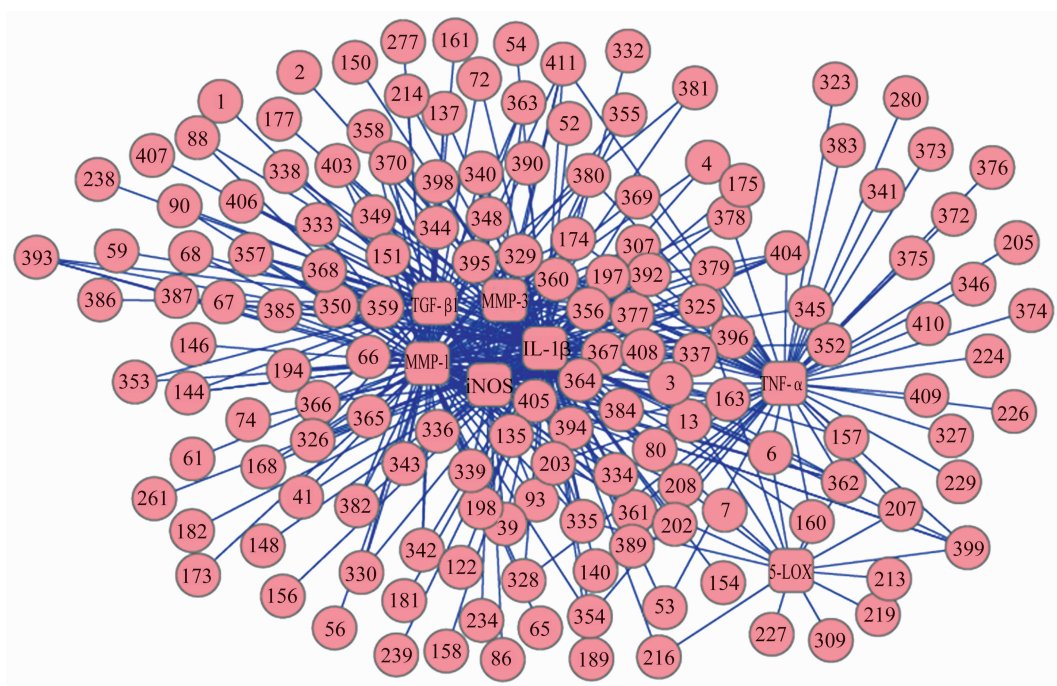


图 1 荣筋拈痛方化合物 - 骨关节炎靶点作用网络

表 2 荣筋拈痛方化合物 - 骨关节炎靶点作用

网络的重要化合物节点信息

代码	化合物名称	度	介数值
362	Isoquercitrin	6	0.0142
174	Bergaptol - O - beta - D - glucopyranoside	6	0.0120
399	Rutin	5	0.0130
408	Uralenol - 3 - methylether	5	0.0109
395	Neoliquiritin	5	0.0109
335	Gancaonin C	5	0.0106
325	Acteoside	5	0.0075
411	Vicenin - 2	5	0.0067
337	Gancaonin E	5	0.0067
404	Uralene	5	0.0067
396	Neuralenol	5	0.0067
394	Neoisoliquiritin	5	0.0067
356	3 - Hydroxyglabrol I	5	0.0067
349	Glycyrrhisoflavone	5	0.0033
367	Licoisoflavone	5	0.0033
405	Uralenin	5	0.0033

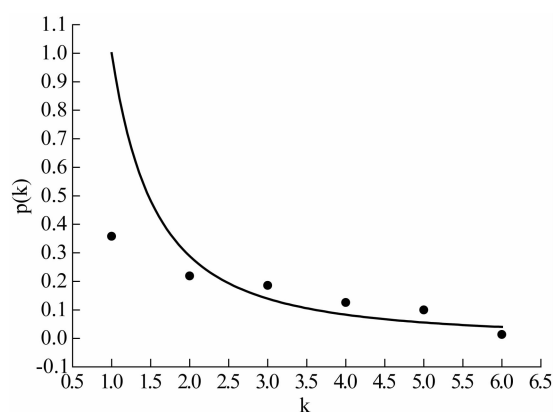


图 2 荣筋拈痛方化合物 - 骨关节炎靶点作用网络中化合物节点度的分布

4 讨 论

OA 属于中医学“痹证”范畴^[19], 中医学理论中有关骨痹的论述始见于《黄帝内经》。《素问·六节脏象论》曰:“肝者, 其充在筋。”《素问·脉要精微论》

曰:“膝者,筋之府,屈伸不能,行则倮俯,筋将惫矣。”《素问·长刺节论篇》曰:“病在骨,骨重不可举,骨髓酸痛,寒气至,名曰骨痹。”《素问·痹论》曰:“风寒湿三气杂至,合而为痹也。其风气胜者为行痹;寒气胜者为着痹也。”《诸病源候论·风病诸候》曰:“亦有血气虚,受风邪而得之者”。从这些论述可以看出,OA 多为“本虚标实”“本痿标痹”之证,其形成内因是正气不足,外因是风寒湿邪侵入,内虚外感而成痹。补肝肾、祛风湿为中医治疗 OA 的重要治法。荣筋拈痛方中牛膝补益肝肾而强壮筋骨,兼能活血以通利肢节筋脉,为君药;当归养血和血,以荣筋骨血脉,为臣药;独活善治伏风、除久痹、性善下行,羌活祛风湿、利关节、止痛,防风祛风胜湿止痛,三药相配,除一身之痹痛,以达祛风湿止痹痛之效,为佐药;甘草缓急止痛,擅治四肢拘挛,还能调和药性,为使药。诸药合用,共奏补肝肾、壮筋骨、祛风湿、止痹痛之功。从中医理论对 OA 的认知和荣筋拈痛方的组方特点看,荣筋拈痛方可用于治疗 OA。

现代医学理论认为,OA 是以关节软骨退变及破坏为主要病变特征的慢性关节疾病^[20]。OA 病变过程中,关节软骨破坏的主要病理表现为软骨细胞外基质的降解超过其合成,导致软骨基质净含量降低,进而造成关节软骨部分甚至完全损耗^[21]。MMP 是与软骨聚蛋白多糖和胶原的降解密切相关的关键酶之一^[22]。Kevorkian 等^[23]应用 RT-PCR 技术证实 OA 患者关节软骨中 MMP-1 和 MMP-3 均显著高于正常对照组。郭静等^[24]研究发现,OA 患者关节软骨及滑膜中 TGF- β 1 的高表达能下调 MMP-9 的表达,对 OA 关节软骨起保护作用,从而延缓 OA 进展。Okamoto 等^[25-26]研究发现,OA 疼痛的程度和炎症介质如 IL-1 β 、TNF- α 等的参与有密切关系,在存在炎症介质的前提下,关节腔内痛觉感受器的敏感性更高,更容易引起关节疼痛。5-LOX 和白三烯类产物是各种慢性疼痛的重要介质因子,5-LOX 抑制剂对慢性炎症引起的疼痛的镇痛效果明显优于 COX-2 抑制剂。iNOS 参与了对炎性疼痛维持阶段的调制作用^[27]。目前治疗 OA 的目的主要是缓解关节疼痛,改善关节功能并重建受损的软骨和骨的结构。因此,本研究选择与疼痛有关的靶点(IL-1 β 、TNF- α 、iNOS 和 5-LOX)及与软骨退变及破坏有关的靶点(MMP-1、MMP-3、TGF- β 1)作为荣筋拈痛方治疗 OA 的靶点。

本研究建立了荣筋拈痛方化合物-OA 靶点的作用网络,节点度和介数可评价该网络中荣筋拈痛方化合物和 OA 靶点的重要性^[8]。从作用网络上各靶点节点的介数值来看,IL-1 β 、TNF- α 和 MMP-1 节点在荣筋拈痛方化合物-OA 靶点的作用网络中具有重要作用,提示荣筋拈痛方可能主要通过作用于 IL-1 β 、TNF- α 缓解疼痛,通过作用于 MMP-1 延缓软骨退变。从作用网络上荣筋拈痛方化合物节点来看,大部分化合物只能作用于 1 个靶点,仅有少数可作用于多个靶点,荣筋拈痛方化合物中作用靶点的最大数量为 6 个;荣筋拈痛方潜在的多靶点活性物质主要为苷类和黄酮类,如防风中的苷类成分 Isoquercitrin(节点 362)能作用于 MMP-1、MMP-3、iNOS、5-LOX、IL-1 β 和 TNF- α ,羌活中的苷类成分 Bergaptol-O-beta-D-glucopyranoside(节点 174)能作用于 MMP-1、MMP-3、TGF- β 1、iNOS、IL-1 β 和 TNF- α ,防风和甘草中的 Rutin(节点 399)能作用于 MMP-1、MMP-3、iNOS、IL-1 β 和 TNF- α 等。这类化合物称为多重激酶抑制剂^[28],是未来 OA 混杂药物开发研究的重要来源。已有研究表明,Isoquercitrin 能降低 MMP 的活性,Isoquercitrin 和 Rutin 具有抗炎作用^[29-30]。此外,荣筋拈痛方中具有组合药物性质的化合物比例占到 35.76%,这类化合物可以通过组合发挥多靶点的作用,如牛膝中 Chrysophanol(节点 1)能作用 TGF- β 1,Ecdysterone(节点 3)能作用 MMP-1,二者结合可能在延缓软骨退变方面起到协同作用。

本研究的结果提示,荣筋拈痛方治疗 OA 的药效物质基础为苷类和黄酮类,主要作用靶点为 IL-1 β 、TNF- α 和 MMP-1;荣筋拈痛方治疗 OA 具有混杂药物及组合药物的性质,在缓解疼痛及延缓软骨退变方面具有广谱的作用特点。未来我们将提取荣筋拈痛方的苷类和黄酮类部位,以大鼠膝关节炎和 IL-1 β 诱导的退变关节软骨细胞为模型^[31-32],开展“中药-有效部位-有效成分-临床表型”的系统层次研究,进一步验证荣筋拈痛方治疗 OA 的作用,为其临床应用提供新的依据。

5 参考文献

- [1] 彭力平,马笃军,林栋栋,等.牛膝醇提物体内诱导兔骨关节炎模型软骨修复的病理学观察[J].湖南中医杂志,2013,29(2):126-129.
- [2] 柯晖,郑洲.怀牛膝对骨关节炎模型膝关节滑膜组织中基质金属蛋白酶-3、13 和金属蛋白酶组织抑制剂-1

- 的影响[J]. 解剖学杂志, 2015, 38(6): 672-674.
- [3] 李成付, 王玖忠, 边瑜健, 等. 牛膝醇提物促进兔骨关节炎软骨修复的作用及其机制的实验研究[J]. 中国临床研究, 2015, 28(7): 844-847.
- [4] 杨安群, 谢获. 当归-牛膝对兔骨关节炎 PI3K/AKT 通路的影响[J]. 放射免疫学杂志, 2012, 25(5): 526-529.
- [5] 乙军, 周业庭, 潘武, 等. 独活挥发油灌胃对兔膝关节的保护作用及其机制[J]. 临床骨科杂志, 2013, 16(4): 451-454.
- [6] 李小军, 汪巍, 范雯, 等. 甘草多糖抗骨关节炎作用及其机制研究[J]. 中国药理通讯, 2009, 26(2): 51.
- [7] ZHENG C, QIU M, XU X, et al. Understanding the diverse functions of Huatan Tongluo Fang on rheumatoid arthritis from a pharmacological perspective [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(1): 87-94.
- [8] 柯志鹏, 张新庄, 丁玥, 等. 利用网络药理学方法研究芪桂痛风片的药效物质基础与分子作用机制[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(14): 2837-2842.
- [9] QIAO X, HOU T, ZHANG W, et al. A 3D structure database of components from Chinese traditional medicinal herbs[J]. *Cheminform*, 2002, 42(3): 481-489.
- [10] 周家驹, 谢桂荣, 严新建. 中药原植物化学成分手册[M]. 北京: 化工工业出版社, 2004: 1165-1211.
- [11] GU J, GUI Y, CHEN L, et al. Use of natural products as chemical library for drug discovery and network pharmacology[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62839.
- [12] ZHU F, SHI Z, QIN C, et al. Therapeutic target database update 2012: a resource for facilitating target-oriented drug discovery[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40 (Database issue): D1128-D1136.
- [13] 朱孝芹, 孙大勇. 改善疾病的骨关节炎治疗药物研究进展[J]. 承德医学院学报, 2010, 27(4): 421-424.
- [14] DESHPANDE N, ADDESS KJ, BLUHM WF, et al. The RCSB Protein Data Bank: a redesigned query system and relational database based on the mmCIF schema[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(Database issue): D233-D237.
- [15] SMOOT ME, ONO K, RUSCHEINSKI J, et al. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(3): 431-432.
- [16] MONTES M, BRAUD E, MITEVA M, et al. Receptor-based viral ligand screening for the identification of novel CDC25 phosphatase inhibitors [J]. *J Chem Inf Model*, 2008, 48(1): 157-165.
- [17] 郑春松, 徐筱杰, 叶蕪芝, 等. 青风藤治疗骨性关节炎药效物质基础多靶导向作用的计算机模拟研究[J]. 中西医结合杂志, 2012, 32(3): 375-379.
- [18] 王林, 戴冠中. 复杂网络的度分布研究[J]. 西北工业大学学报, 2006, 24(4): 405-409.
- [19] 王宾, 王培民. 中医治疗骨性关节炎研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(1): 42-43.
- [20] 丰小燕. 浅谈痹症的病因及治疗[J]. 世界最新医学信息文摘: 连续型电子期刊, 2015, 15(19): 98-98.
- [21] 张恩水. 聚蛋白多糖酶和基质金属蛋白酶在骨关节炎不同时期关节液中的表达[D]. 济南: 山东大学, 2012.
- [22] 李桂叶, 张荣富, 马丽, 等. 软骨寡聚基质蛋白对骨关节炎软骨破坏早期诊断价值的研究[J]. 中华风湿病学杂志, 2011, 15(2): 79-82.
- [23] KEVORKIAN L, YOUNG DA, DARRAH C, et al. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage[J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(1): 131-141.
- [24] 郭静, 张文丽, 李琪佳, 等. 基质金属蛋白酶 9 及 TGF- β 1 mRNA 和蛋白在骨关节炎中的表达[J]. 中国修复重建外科杂志, 2011, 25(8): 992-997.
- [25] OKAMOTO M, ATSUTA Y. Cartilage degeneration is associated with augmented chemically-induced joint pain in rats: a pilot study [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2010, 468(5): 1423-1427.
- [26] CORTES-BURGOS LA, ZWEIFEL BS, SETTLE SL, et al. CJ-13610, an orally active inhibitor of 5-lipoxygenase is efficacious in preclinical models of pain[J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 617(1-3): 59-67.
- [27] 李其, 洪炎国. 一氧化氮在炎性疼痛中的作用[J]. 生命科学, 2007, 19(4): 423-426.
- [28] FRANTZ S. Drug discovery: playing dirty[J]. *Nature*, 2005, 437(7061): 942-943.
- [29] ROGERIO AP, KANASHIRO A, FONTANARI C, et al. Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma[J]. *Inflamm Res*, 2007, 56(10): 402-408.
- [30] MASCARAQUE C, ARANDA C, OCÓN B, et al. Rutin has intestinal antiinflammatory effects in the CD4+ CD62L+ T cell transfer model of colitis[J]. *Pharmacol Res*, 2014, 90: 48-57.
- [31] 郑春松, 叶蕪芝, 李西海, 等. 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酶 2 表达的影响[J]. 中医正骨, 2015, 27(12): 1-6.
- [32] 刘献祥, 李西海, 周江涛. 改良 Hulth 造模法复制膝骨性关节炎的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(12): 1104-1108.