

补肾活血汤含药血清干预体外培养大鼠骨髓间充质干细胞成软骨分化及补肾活血汤联合骨髓间充质干细胞治疗大鼠膝关节炎的实验研究

吴刚¹, 童培建²

(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053;

2. 浙江省中医院, 浙江 杭州 310006)

摘要 目的: 观察补肾活血汤含药血清对大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow stem cell, BMSC)成软骨分化的作用, 及补肾活血汤联合 BMSC 治疗大鼠膝关节炎(knee osteoarthritis, KOA)的作用。方法: 从 4 周龄 SD 大鼠股骨中分离培养 BMSC, 以 8 周龄 SD 大鼠制备补肾活血汤含药血清和空白血清。选择体外培养的第 3 代 BMSC, 分为 3 组, 分别加入含 10% 空白血清的 DMEM 培养液(空白组)、含 10% 空白血清的 DMEM 培养液及基础诱导液(诱导组)、含 10% 补肾活血汤含药血清的 DMEM 培养液及基础诱导液(含药血清组), 干预后分别进行甲苯胺蓝染色、Ⅱ型胶原免疫组化染色, 并以 Real-time PCR 法检测各组细胞中Ⅱ型胶原 mRNA、聚集蛋白聚糖 mRNA 的水平。取 18 只 8 周龄 SD 大鼠, 随机分为模型组、BMSC 组及联合组, 每组 6 只。通过切断右前交叉韧带对各组大鼠进行 KOA 造模。造模术后 1 周, 向 BMSC 组与联合组大鼠右侧膝关节腔内注射 5×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ BMSC-PBS 溶液(每次 0.1 mL, 每周 1 次), 向模型组大鼠右侧膝关节腔注射等量 PBS 溶液; 联合组在关节腔注射的基础上每天以补肾活血汤灌胃(每次 4 mL, 每天 1 次)。干预 8 周后处死大鼠, 取右侧膝关节软骨及软骨下骨组织, HE 染色后在光学显微镜下观察。结果: 干预 7 d 后, 含药血清组细胞甲苯胺蓝染色呈阳性, 细胞质呈蓝紫色; 空白组和诱导组染色均为阴性。干预 14 d 后, 含药血清组染色进一步加深, 染色面积增大, 呈明显的紫蓝色; 空白组染色为阴性, 诱导组可见少量蓝紫色染色。干预 7 d、14 d 后, Ⅱ型胶原免疫组化染色结果显示, 空白组细胞均未见明显阳性染色, 诱导组及含药血清组细胞胞浆和细胞间质内呈棕黄色或棕褐色染色, 其中干预 14 d 后含药血清组细胞内染色深于诱导组。干预 7 d 后, 3 组大鼠 BMSC 中Ⅱ型胶原 mRNA 水平、聚集蛋白聚糖 mRNA 水平比较, 组间差异均有统计学意义($1.02 \pm 0.23, 1.33 \pm 0.11, 2.11 \pm 0.23, F=47.181, P=0.000; 1.03 \pm 0.32, 1.36 \pm 0.16, 1.93 \pm 0.10, F=26.508, P=0.000$)。含药血清组的Ⅱ型胶原 mRNA 水平、聚集蛋白聚糖 mRNA 水平均高于空白组和诱导组($P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000$), 诱导组的Ⅱ型胶原 mRNA 水平、聚集蛋白聚糖 mRNA 水平均高于空白组($P=0.017; P=0.029$)。药物干预 8 周后, 模型组大鼠膝关节软骨表面粗糙, 破坏严重, 可见明显纤维增生; BMSC 组软骨可见部分修复, 表面仍较粗糙, 细胞纤维化不明显; 联合组关节软骨面光滑, 软骨表面磨损不明显, 无软骨表面纤维化。结论: 补肾活血汤含药血清能有效促进体外培养的大鼠 BMSC 向软骨细胞分化; 补肾活血汤灌胃联合 BMSC 膝关节腔内注射能有效防治 KOA 大鼠膝关节软骨破坏。

关键词 骨关节炎; 骨髓; 间质干细胞; 软骨, 关节; 补肾活血汤; 大鼠; 动物实验

Impact of Bushen Huoxue Tang(补肾活血汤) medicated serum on chondrogenic differentiation of rat's bone marrow derived mesenchymal stem cells cultured in vitro and curative effect of combination of Bushen Huoxue Tang(补肾活血汤) with bone marrow derived mesenchymal stem cells on knee osteoarthritis in rats: an experimental study

WU Gang¹, TONG Peijian²

1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China

2. Zhejiang Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310006, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To observe the effect of Bushen Huoxue Tang(补肾活血汤, BSHXT) medicated serum on chondrogenic differentiation of rat's bone marrow derived mesenchymal stem cells(BMSCs) and the curative effect of BSHXT and BMSCs on knee osteoarthritis

(KOA) in rats. **Methods:** The BMSCs were isolated from the femurs of 4-week-old SD rats and were cultured, and BSHXT medicated serum and blank serum were prepared by using 8-week-old SD rats. The third-generation BMSCs cultured in vitro were selected and randomly divided into 3 groups, and they were placed into the DMEM culture fluid added with 10% blank serum (blank group), DMEM culture fluid added with 10% blank serum and basic induced fluid (induced group) and DMEM culture fluid added with 10% BSHXT medicated serum and basic induced fluid (medicated serum group) respectively. After the intervention, the BMSCs were received toluidine blue staining and type II collagen immunohistochemical staining respectively, and the expression level of type II collagen mRNA and aggrecan mRNA were detected by using Real-time PCR method. Eighteen eight-week-old SD rats were selected and randomly divided into model group, BMSC group and combination group, 6 cases in each group. The KOA models were created in rats of each group by cutting off the right anterior cruciate ligament (ACL). At 1 week after modeling, the BMSC-PBS solutions (5×10^6 cell/mL) were injected into the right knees of rats in BMSC group and combination group, once a week, 0.1 mL at a time; and the same dose of PBS solutions were injected into the right knees of rats in model group. Moreover, the rats in combination group were intragastric administrated with BSHXT every day, once a day, 4 mL at a time. After 8-week intervention, the rats were executed and their right knee cartilages and subchondral bone tissues were fetched out and observed under the optical microscope after HE staining. **Results:** After 7-day intervention, the toluidine blue staining results of cells presented with positive and their cytoplasm presented with blue-violet staining in medicated serum group, while negative staining results were found in blank group and induced group. After 14-day intervention, the stains deepened and enlarged and the cells presented with obvious violet-blue staining in medicated serum group, while negative staining results were found in blank group and a small amount of blue-purple stains were found in cells of rats in induced group. After 7- and 14-day intervention, the immunohistochemical staining results of type II collagen showed that no obvious positive stains were found in cells of rats in blank group, and the cytoplasm and intercellular substance presented with tawny staining in induced group and medicated serum group, and the intracellular stains were deeper in medicated serum group compared to induced group after 14-day intervention. There was statistical difference in the expression level of type II collagen mRNA and aggrecan mRNA in BMSCs between the 3 groups after 7-day intervention (1.02 ± 0.23 , 1.33 ± 0.11 , 2.11 ± 0.23 , $F = 47.181$, $P = 0.000$; 1.03 ± 0.32 , 1.36 ± 0.16 , 1.93 ± 0.10 , $F = 26.508$, $P = 0.000$). The expression levels of type II collagen mRNA and aggrecan mRNA in BMSCs were higher in medicated serum group compared to blank group and induced group ($P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.000$, $P = 0.000$), and were higher in induced group compared to blank group ($P = 0.017$; $P = 0.029$). After 8-week drug intervention, the rough and severely damaged knee articular cartilage surface with obvious fibroplasia were found in rats of model group, and relatively rough and partially repaired knee articular cartilages without obvious fibroplasia were found in rats of BMSC group, and smooth and slightly worn articular cartilage surfaces without fibroplasia were found in rats of combination group. **Conclusion:** BSHXT medicated serum can effectively promote the differentiation of rat's BMSCs cultured in vitro into chondrocytes, and the combination therapy of intragastric administration of BSHXT and knee intra-articular injection of BMSC can effectively prevent knee articular cartilage damage in rats with KOA.

Keywords osteoarthritis; bone marrow; mesenchymal stem cells; cartilage, articular; Bushen Huoxue Tang; rats; animal experimentation

关节软骨是一种特殊的固态结缔组织,略有弹性,能承受压力和磨擦,有一定的支持和保护作用。但软骨损伤后不能自行修复,后期容易继发骨关节炎 (osteoarthritis, OA)。骨髓间充质干细胞 (bone marrow stem cell, BMSC) 来源于中胚层,未分化的 BMSC 具有多向分化潜能。近年来的研究还发现, BMSC 在 OA 软骨缺损修复治疗中具有重要作用^[1-2]。补肾活血汤具有补肾壮骨、活血止痛的功效,在退行性骨关节病的治疗中已取得了不错的疗效。本研究观察了补肾活血汤含药血清干预大鼠 BMSC 成软骨分化及补肾活血汤联合 BMSC 防治大鼠膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 的作用,现总结报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 54 只,体质量 (220 ± 10) g,实验动物合格证号: SCXK (湘) 2015-0049; 4 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 8 只,体质量 (150 ± 10) g,实验动物合格证号: SCXK (湘) 2015-0107。动物饲养条件: 温度 25℃,湿度 50%。实验在江西中医药大学实验动物科技中心完成,实验动物的处置符合江西中医药大学实验动物处置伦理学标准。

1.2 实验药物与试剂 补肾活血汤药物组成包括当归 15 g、地龙 9 g、木香 9 g、醋延胡索 12 g、陈皮 12 g、盐杜仲 12 g、丹参 30 g、补骨脂 15 g、桃仁 15 g、全蝎

9 g、骨碎补 12 g、淫羊藿 15 g、红花 12 g、透骨草 9 g、甘草 6 g, 中药饮片均购自江西江中中药饮片有限公司, 加水 500 mL 浸泡 2 h 后煮沸, 再文火煎 30 min, 取汁 200 mL 备用(每毫升含生药 0.96 g)。重组转化生长因子- $\beta 1$ (上海拜力生物科技有限公司), 维生素 C (Sigma 公司), 地塞米松(上海宝曼生物科技有限公司), Trizol (Invitrogen 公司), 甲苯胺蓝染液(北京索莱宝科技有限公司), 兔抗鼠 Collagen II 单克隆抗体 (Abcam 公司), 羊抗兔 IgG-HRP 二抗(武汉艾美捷科技有限公司), SYBR 荧光定量试剂盒、反转录试剂盒(Takara 公司)。

1.3 实验仪器 SW-CJ-1D 超净工作台(苏州净化设备有限公司), Thermo371 CO₂ 孵育箱、Thermo2720 Real-time PCR 仪(Thermo 公司), CKX53 倒置相差显微镜(Olympus 公司), DT5-1 离心机(北京时代北利离心机有限公司)。

2 方 法

2.1 BMSC 分离培养 取 8 只 4 周龄 SD 大鼠, 以颈椎脱臼法处死, 分离股骨并剔除两端。用 DMEM 培养液反复冲洗骨髓腔 2 次, 收集冲洗液, 以 $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min(离心半径 7 cm)。弃上清液, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养液重悬沉淀, 按 5.0×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的密度接种于 25 cm^2 细胞培养瓶中, 在 37°C 、5% CO₂ 培养箱中培养, 2 h 换液 1 次, 反复 3 次, 之后 3 d 换液 1 次, 待细胞长至 80%~85% 时传代。

2.2 补肾活血汤含药血清干预 BMSC 成软骨分化

2.2.1 含药血清制备 取 36 只 8 周龄 SD 大鼠, 随机分为空白血清组和补肾活血汤组, 每组 18 只。补肾活血汤组大鼠以制备的补肾活血汤灌胃, 根据人和动物间体表面积折算的等效剂量比值计算, 大鼠应用补肾活血汤的剂量为每次 4 mL, 每天 2 次; 空白血清组大鼠以等量生理盐水灌胃; 连续灌胃 3 d。第 3 天用药结束 0.5 h 后行腹主动脉取血, 血液静置 2 h 后以 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min(离心半径 13.5 cm), 取上层血清, 56°C 水浴 30 min, 以 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤灭菌, 将制备好的空白血清和补肾活血汤含药血清置于 -20°C 冰箱保存备用。

2.2.2 BMSC 分组及干预 选生长状态良好的第 3 代 BMSC, 分别以每孔 2×10^4 个和每孔 5×10^3 个的密度接种于 6 孔培养板和 24 培养板孔板(内置细胞爬片)中。2 个培养板中的细胞均随机分为空白组、

诱导组及含药血清组, 每组设 3 个复孔。空白组加含 10% 空白血清的 DMEM 培养液, 诱导组加含 10% 空白血清的 DMEM 培养液及基础诱导液(含 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 转化生长因子- $\beta 1$ 、 $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 地塞米松、 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 维生素 C), 含药血清组加含 10% 补肾活血汤含药血清的 DMEM 培养液及基础诱导液。3 d 换液 1 次。

2.2.3 BMSC 成骨分化结果观察 24 孔培养板中的各组细胞均于干预 7 d、14 d 后取样进行甲苯胺蓝染色及 II 型胶原免疫组化染色。6 孔培养板中的各组细胞均于干预 7 d 后进行 II 型胶原 mRNA、聚集蛋白聚糖 mRNA Real-time PCR 检测。

甲苯胺蓝染色方法如下: 细胞爬片以 PBS 洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 10 min, 再用 PBS 洗 3 次。以 1% 甲苯胺蓝染液浸染 1.5 h, 水洗 5 min, 洗 3 次, 树脂封片后在镜下观察。

II 型胶原免疫组化染色方法如下: 细胞爬片用 PBS 洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗 3 次。置于 3% 双氧水中 30 min 消除内源性过氧化物酶, PBS 洗 3 次。室温滴加正常山羊血清封闭液(1:20), 30 min 后添加一抗, 于 4°C 湿盒内放置过夜。次日 PBS 漂洗 3 次, 滴加二抗(1:1000), 室温静置 30 min 后滴加 DAB 显色液显色 3~5 min, 纯水冲洗, 封片后光镜下观察染色结果。

II 型胶原 mRNA、聚集蛋白聚糖 mRNA Real-time PCR 检测方法如下: 用 Trizol 液提取 6 孔板内细胞的总 RNA, 逆转录成 cDNA, 采用 SYBR 反应体系进行 Real-time PCR 反应。以 GAPDH 作内参, 检测各组 II 型胶原 mRNA 和聚集蛋白聚糖 mRNA 的水平, 其相对水平用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算结果来表示。

2.3 补肾活血汤联合 BMSC 干预 KOA 模型大鼠

取 18 只 8 周龄 SD 大鼠, 随机分为模型组、BMSC 组、联合组, 每组 6 只。参照文献[3], 各组大鼠通过切断右侧前交叉韧带建立 KOA 模型。造模术后 1 周, 向 BMSC 组与联合组大鼠右侧膝关节腔内注射 5×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ BMSC-PBS 溶液(每次 0.1 mL, 每周 1 次), 向模型组大鼠右侧膝关节腔注射等量 PBS 溶液; 联合组在关节腔注射的基础上每天以补肾活血汤灌胃(每次 4 mL, 每天 1 次)。药物干预共持续 8 周, 期间大鼠自由摄食、活动。最后一次药物干预结束后 2 h, 以颈椎脱臼法处死大鼠, 取右侧膝关节软骨及软

骨下骨组织。将所取右侧膝关节标本在 10% 甲醛溶液固定 72 h, 以 EDTA 脱钙液处理, 2 d 更换 1 次脱钙液, 共持续 6 周。梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 常规切片(厚度 3 μm), HE 染色后在镜下观察。

2.4 数据统计 采用 SPSS22.0 软件对所得数据进行统计学处理。3 组大鼠 BMSC 中 II 型胶原 mRNA 水平、聚集蛋白聚糖 mRNA 水平的组间整体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 补肾活血汤含药血清干预 BMSC 成软骨分化的观察结果 甲苯胺蓝染色结果显示: 干预 7 d 后, 含药血清组细胞甲苯胺蓝染色呈阳性, 细胞质呈蓝紫色; 空白组和诱导组染色均为阴性。干预 14 d 后, 含药血清组染色进一步加深, 染色面积增大, 呈明显的紫蓝色; 空白组染色为阴性, 诱导组可见少量蓝紫色染色。见图 1。

II 型胶原免疫组化染色结果显示: 干预 7 d、14 d

后, 空白组细胞均未见明显阳性染色, 诱导组及含药血清组细胞胞浆和细胞间质内呈棕黄色或棕褐色染色, 其中干预 14 d 后含药血清组细胞内染色深于诱导组。见图 2。

干预 7 d 后, 3 组大鼠 BMSC 中 II 型胶原 mRNA 水平、聚集蛋白聚糖 mRNA 水平比较, 组间差异均有统计学意义。含药血清组的 II 型胶原 mRNA 水平、聚集蛋白聚糖 mRNA 水平均高于空白组和诱导组 ($P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000$), 诱导组的 II 型胶原 mRNA 水平、聚集蛋白聚糖 mRNA 水平均高于空白组 ($P = 0.017; P = 0.029$)。见表 1。

3.2 补肾活血汤联合 BMSC 干预 KOA 模型大鼠的观察结果 药物干预 8 周后, 模型组膝关节软骨表面粗糙, 破坏严重, 可见明显纤维增生; BMSC 组软骨可见部分修复, 表面仍较粗糙, 细胞纤维化不明显; 联合组关节软骨面光滑, 软骨表面磨损不明显, 无软骨表面纤维化。见图 3。

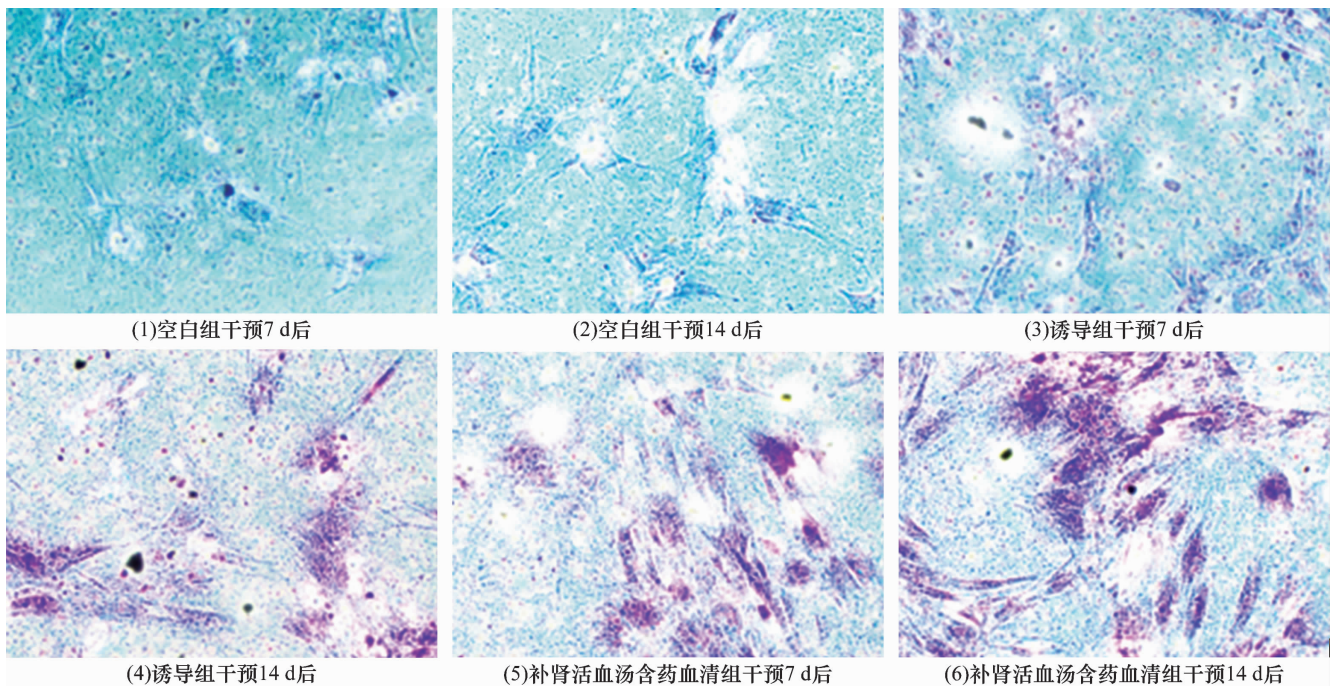


图 1 药物干预后 3 组大鼠骨髓间充质干细胞甲苯胺蓝染色结果 ($\times 200$)

表 1 药物干预后 3 组大鼠骨髓间充质干细胞中 II 型胶原 mRNA 和聚集蛋白聚糖 mRNA 水平 $\bar{x} \pm s$

组别	样本量(孔)	II 型胶原 mRNA	聚集蛋白聚糖 mRNA
空白组	3	1.02 ± 0.23	1.03 ± 0.32
诱导组	3	1.33 ± 0.11	1.36 ± 0.16
补肾活血汤含药血清组	3	2.11 ± 0.23	1.93 ± 0.10
<i>F</i> 值		47.181	26.508
<i>P</i> 值		0.000	0.000

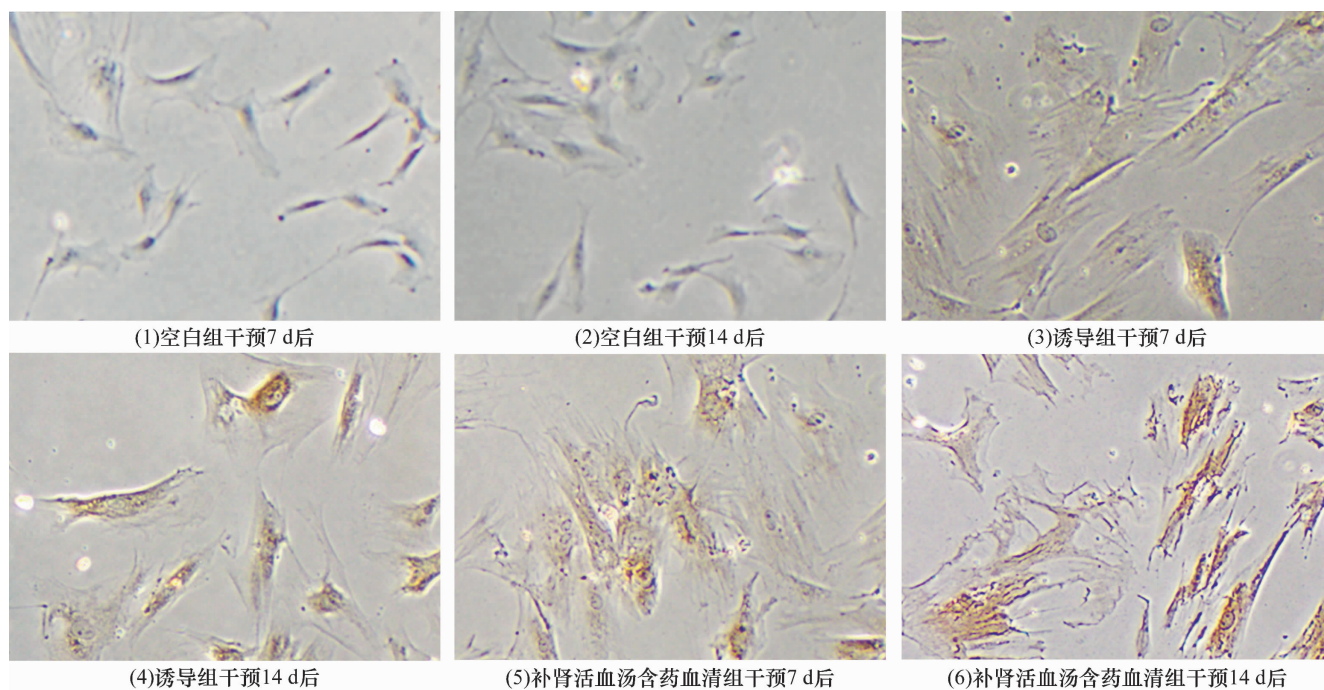


图 2 药物干预后 3 组大鼠骨髓间充质干细胞 II 型胶原免疫组化染色结果 (×200)

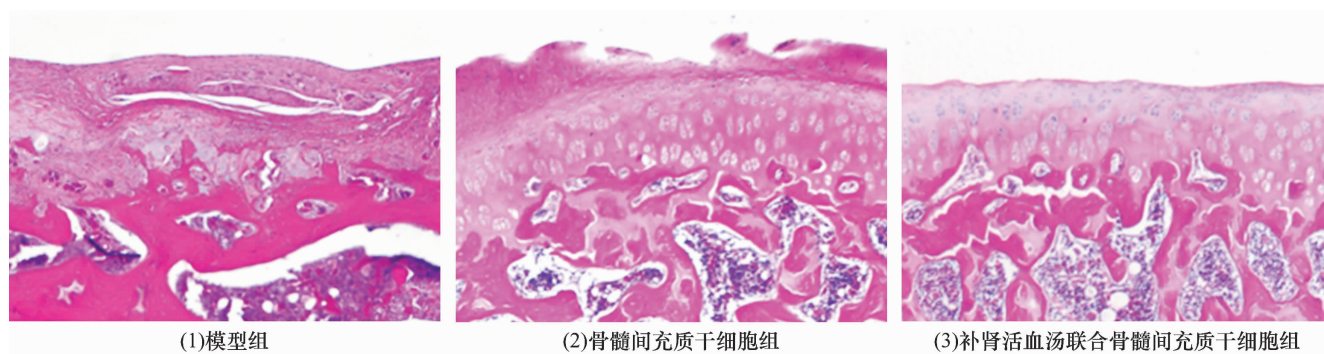


图 3 3 组膝关节炎大鼠关节软骨组织 HE 染色结果 (×50)

4 讨论

关节软骨的主要成分包括 II 型胶原、蛋白聚糖和软骨细胞,能承受压力和磨擦,有一定的支持和保护作用。但由于软骨中无血管、神经、淋巴分布,发生退变及损伤后无法自行修复^[4-5],后期将继发 OA,最终只能进行人工关节置换^[6-7]。目前针对软骨损伤治疗的微骨折术、软骨细胞移植术等,都不能完整恢复关节软骨原有的结构成分和功能^[8-9]。

BMSC 来源于中胚层,未分化的 BMSC 具有多向分化潜能,能定向诱导成骨细胞、软骨细胞等,因此 BMSC 在再生医学研究中具有不可替代的作用^[10]。BMSC 来源丰富,且具有强大的增殖、分化能力,已成为软骨替代治疗研究中的热点。近年来的研究还发现, BMSC 对于 OA 软骨损伤具有很好的治疗作用^[11]。

中医学理论认为“肾主骨,生髓”,骨骼组织的生

长、软骨代谢与肾精盛亏密切相关^[12-13]。肾精充足,骨髓得以充盈,精气方能滑利关节。本实验所用补肾活血汤具有补肾壮骨,活血止痛的功效。季卫锋等^[14]的研究表明,补肾活血法能抑制 OA 大鼠膝关节软骨损伤,改善血液循环及抑制局部炎症反应。李念虎等^[15-16]的研究发现,补肾活血类中药的含药血清可以抑制由脂多糖诱导的滑膜细胞产生白细胞介素-1 β ;补肾活血法能抑制 OA 大鼠关节内滑膜细胞分泌白细胞介素-1 β 及基质金属蛋白酶-1。

正常软骨细胞分泌的 II 型胶原和聚集蛋白聚糖主要构成了软骨细胞外基质^[17-18]。甲苯胺蓝染色及 II 型胶原免疫组化染色结果显示,空白组 BMSC 未表达 II 型胶原和聚集蛋白聚糖,诱导组的 BMSC 仅少量表达 II 型胶原和聚集蛋白聚糖,而含药血清组 BMSC 表达的 II 型胶原和聚集蛋白聚糖明显增多,提示补肾活血汤含药血清能有效促进 BMSC 向软骨细胞分化。

Real-time PCR 结果进一步证实,补肾活血汤含药血清能有效促进 BMSC 向软骨细胞分化。大鼠膝关节软骨组织病理结果显示,模型组软骨随着时间发展破坏加重,后期可见明显纤维增生;BMSC 组软骨可见磨损,软骨部分修复,表面仍较粗糙,细胞纤维化不明显;联合组的关节软骨面光滑,软骨表面磨损不明显,无软骨表面纤维化。

综上所述,补肾活血汤含药血清能有效促进体外培养的大鼠 BMSC 向软骨细胞分化;补肾活血汤灌胃联合 BMSC 膝关节腔内注射能有效防治 KOA 大鼠膝关节软骨破坏。

5 参考文献

- [1] PROCKOP DJ. Marrow stromal cells as stem cells for continual renewal of nonhematopoietic tissues and as potential vectors for gene therapy[J]. J Cell Biochem Suppl, 1998, 30-31:284-285.
- [2] YAMASAKI S, MERA H, ITOKAZU M. Cartilage Repair With Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation: Review of Preclinical and Clinical Studies[J]. Cartilage, 2014, 5(4):196-202.
- [3] LEVILLAIN A, BOULOCHER C, KADERLI S, et al. Meniscal biomechanical alterations in an ACLT rabbit model of early osteoarthritis [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2015, 23(7):1186-1193.
- [4] SNYDER TN, MADHAVAN K, INTRATOR MA, et al. A fibrin/hyaluronic acid hydrogel for the delivery of mesenchymal stem cells and potential for articular cartilage repair [J]. J Biol Eng, 2014, 8:10.
- [5] SHIRAISHI K, KAMEI N, TAKEUCHI SA, et al. Quality evaluation of human bone marrow mesenchymal stem cells for cartilage repair[J/OL]. Stem Cells Int, 2017[2017-11-27]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28835756>.
- [6] BHOSALE AM, RICHARDSON JB. Articular cartilage: structure, injuries and review of management[J]. Br Med Bull, 2008, 87(1):77-95.
- [7] DA CUNHA CAVALCANTI FM, DOCA D, COHEN M. Updating on diagnosis and treatment of chondral lesion of the knee[J]. Rev Bras Ortop, 2012, 47(1):12-20.
- [8] BECK A, MURPHY DJ, CAREY-SMITH R, et al. Treatment of Articular Cartilage Defects With Microfracture and Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis Leads to Extensive Subchondral Bone Cyst Formation in a Sheep Model[J]. Am J Sports Med, 2016, 44(10):2629-2643.
- [9] FOLDAGER CB, FARR J, GOMOLL AH. Patients Scheduled for Chondrocyte Implantation Treatment with MACI Have Larger Defects than Those Enrolled in Clinical Trials[J]. Cartilage, 2016, 7(2):140-148.
- [10] DENNIS JE, MERRIAM A, AWADALLAH A, et al. A quadri-potential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse [J]. J Bone Miner Res, 1999, 14(5):700-709.
- [11] AMIN HD, BRADY MA, ST-PIERRE J, et al. Stimulation of chondrogenic differentiation of adult human bone Marrow-Derived stromal cells by a Moderate-Strength static magnetic field [J]. Tissue Eng Part A, 2014, 20(11/12):1612-1620.
- [12] 李西海, 刘献祥. 骨关节炎的核心病机——本痿标痹[J]. 中医杂志, 2014, 55(14):1248-1249.
- [13] 李佳, 谢晚晴, 郑洪新. 论关节软骨与肾的联系[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(6):1344-1346.
- [14] 季卫锋, 施伟峰, 陈林, 等. 补肾活血法防治大鼠膝骨性关节炎的实验研究[J]. 中国骨伤, 2012, 25(3):246-250.
- [15] 李念虎. 补肾活血中药含药血清对滑膜细胞分泌 TNF- α 、IL-1 β 水平的影响[J]. 中国骨伤, 2007, 20(5):302-303.
- [16] 李念虎, 夏雷, 乙胜, 等. 补肾活血方对骨关节炎模型大鼠关节滑液 IL-1 β 及关节软骨 DDR2 水平的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2013, 21(8):1-4.
- [17] TANG JL, CUI WD, SONG FL, et al. Effects of mesenchymal stem cells on interleukin-1 β -treated chondrocytes and cartilage in a rat osteoarthritic model [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(2):1753-1760.
- [18] DIEKMAN BO. Cartilage tissue engineering using differentiated and purified induced pluripotent stem cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(47):19172-19177.

(收稿日期:2017-11-27 本文编辑:李晓乐)