

细胞因子基因转染的骨髓干细胞复合明胶-硫酸软骨素-透明质酸钠支架修复大鼠骨髓生长板缺损的实验研究

赵守军,熊文化,许柯

(浙江省宁波市第二医院,浙江 宁波 315010)

摘要 **目的:**观察细胞因子基因转染的骨髓干细胞复合明胶-硫酸软骨素-透明质酸钠支架修复大鼠骨髓生长板缺损的效果。**方法:**取 SD 大鼠肋软骨透明带细胞,用 Percoll 密度梯度离心法获取骨髓干细胞。从低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)-1 α 、甲状旁腺激素相关肽(parathyroid hormone-related peptide, PTHrP)、重组人源核因子- κ B(recombinant human nuclear factor- κ B, rhNF- κ B)、HIF-1 α +PTHrP、rhNF- κ B+PTHrP、HIF-1 α +rhNF- κ B、rhNF- κ B+HIF-1 α +PTHrP 共 7 种细胞因子及细胞因子组合中筛选出对骨髓干细胞增殖作用最佳的细胞因子或细胞因子组合。利用筛选出的细胞因子或细胞因子组合,构建能稳定表达重组细胞因子的骨髓干细胞。取 20 只 SD 大鼠,制作右胫骨上端骨髓生长板缺损模型。造模后将大鼠随机分为 2 组,每组 10 只,分别采用从自体肋软骨透明带细胞获取的骨髓干细胞移植(自体移植组)和重组骨髓干细胞植入明胶-硫酸软骨素-透明质酸钠载体(组织工程组)两种方法修复骨髓生长板缺损。分别于修复术后 4 周、8 周时,拍摄 2 组大鼠双下肢 X 线片,计算双侧胫骨长度差值和双侧胫骨角差值。X 线检查结束后从每组随机选取 5 只大鼠,取肋软骨获取骨髓干细胞,以 Western Blot 法测定 Collagen II 及 Collagen X 蛋白水平;同时切取大鼠右胫骨上端,制作切片,HE 染色后光镜下观察骨髓生长板损伤修复情况。**结果:**最终筛选出的细胞因子组合为 HIF-1 α +PTHrP,将其构建入 pIRES2-EGFP 真核表达载体,转染获取的骨髓干细胞,获得稳定表达重组细胞因子的骨髓干细胞。骨髓生长板缺损修复术后 4 周、8 周时,组织工程组大鼠的双侧胫骨长度差值、双侧胫骨角差值均小于自体移植组[(0.07 \pm 0.01)cm, (0.35 \pm 0.05)cm, $t=17.360$, $P=0.000$; (0.83 \pm 0.45)cm, (1.51 \pm 0.13)cm, $t=4.590$, $P=0.001$; 1.50 $^{\circ}$ \pm 0.69 $^{\circ}$, 2.55 $^{\circ}$ \pm 0.40 $^{\circ}$, $t=4.160$, $P=0.001$; 14.26 $^{\circ}$ \pm 1.87 $^{\circ}$, 33.98 $^{\circ}$ \pm 2.17 $^{\circ}$, $t=21.770$, $P=0.000$],组织工程组大鼠的 Collagen II、Collagen X 蛋白水平均高于自体移植组[0.21 \pm 0.02, 0.10 \pm 0.01, $t=15.560$, $P=0.000$; 0.37 \pm 0.03, 0.14 \pm 0.01, $t=16.260$, $P=0.000$; 0.22 \pm 0.03, 0.08 \pm 0.01, $t=14.010$, $P=0.000$; 0.33 \pm 0.02, 0.11 \pm 0.01, $t=21.000$, $P=0.000$]。HE 染色结果显示,修复术后 4 周时,组织工程组胫骨上端骨髓生长板缺损由新生软骨部分填充,自体移植组尚未形成骨髓生长板组织结构;修复术后 8 周时,组织工程组胫骨上端骨髓生长板部分接近闭合,呈薄层柱状结构,自体移植组有新骨髓形成。**结论:**以骨髓干细胞作为种子细胞,以 HIF-1 α +PTHrP 为细胞因子,以明胶-硫酸软骨素-透明质酸钠载体作为生物支架,能有效修复大鼠骨髓生长板缺损。

关键词 骨髓;组织工程;缺氧诱导因子 1, α 亚基;甲状旁腺激素相关肽;干细胞移植;组织支架;大鼠, Sprague-Dawley;动物实验

A combination of epiphysis stem cell transfected with cytokine genes and bio-scaffold consists of gelatin, chondroitin sulfate and sodium hyaluronate for repairing epiphyseal growth plate defect in rats: an experimental study

ZHAO Shoujun, XIONG Wenhua, XU Ke

The Second Hospital of Ningbo City, Ningbo 315010, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To observe the role of a combination of epiphysis stem cell transfected with cytokine genes and bio-scaffold consists of gelatin, chondroitin sulfate and sodium hyaluronate in repairing epiphyseal growth plate defect in rats. **Methods:** The zona-pellicular cells were fetched out from costicartilage of SD rats and the epiphysis stem cells were obtained by using Percoll density gradient centrifugation method. Cytokine or cytokine combinations which had the best promoting effect on proliferation of epiphysis stem cells were selected out of seven kinds of cytokines and cytokine combinations, including hypoxia-inducible factor(HIF)-1 α , parathyroid hormone-

基金项目:宁波市科技局社会发展资助项目(2009C50022)

通讯作者:熊文化 E-mail:270598832@qq.com

related peptide (PTHrP), recombinant human nuclear factor- κ B (rhNF- κ B), HIF-1 α + PTHrP, rhNF- κ B + PTHrP, HIF-1 α + rhNF- κ B and rhNF- κ B + HIF-1 α + PTHrP. Then the epiphysis stem cells which could steadily express recombinant cytokines were constructed by using selected cytokines or cytokine combinations. Twenty SD rats were selected to make models of defect of epiphyseal growth plate of superior extremity of right tibiae. After modeling, the rats were randomly divided into 2 groups, 10 cases in each group. The epiphyseal growth plate defects were repaired through transplantation of epiphysis stem cells which were obtained from zona-pellucida cells of autologous costicartilage (autotransplantation group) and using a combination of recombinant epiphyseal stem cells and bio-scaffold consists of gelatin, chondroitin sulfate and sodium hyaluronate (tissue engineering group) respectively. The X-ray films of double lower limbs were taken in rats of the 2 groups and the differences between bilateral tibiae in length and angle were measured at 4 and 8 weeks after repairing surgery respectively. After the X-ray examination, five rats were randomly selected from each group and the epiphysis stem cells were obtained from their costicartilage, and the levels of Collagen II protein and Collagen X protein were measured by using Western Blot assays. The superior extremities of right tibiae of rats were sectioned for HE staining and the repair of epiphyseal growth plate defect was observed under light microscope. **Results:** HIF-1 α + PTHrP was selected out of the cytokine combination in the end and was imported into pIRES2-EGFP eukaryotic expression vector. The obtained epiphysis stem cells were transfected and then they could steadily express recombinant cytokines. The differences between bilateral tibiae in length and angle were smaller in tissue engineering group compared to autotransplantation group at 4 and 8 weeks after epiphyseal growth plate defect repairing surgery (0.07 +/- 0.01 vs 0.35 +/- 0.05 cm, $t = 17.360, P = 0.000$; 0.83 +/- 0.45 vs 1.51 +/- 0.13 cm, $t = 4.590, P = 0.001$; 1.50 +/- 0.69 vs 2.55 +/- 0.40 degrees, $t = 4.160, P = 0.001$; 14.26 +/- 1.87 vs 33.98 +/- 2.17 degrees, $t = 21.770, P = 0.000$), and the levels of Collagen II protein and Collagen X protein were higher in tissue engineering group compared to autotransplantation group (0.21 +/- 0.02 vs 0.10 +/- 0.01, $t = 15.560, P = 0.000$; 0.37 +/- 0.03 vs 0.14 +/- 0.01, $t = 16.260, P = 0.000$; 0.22 +/- 0.03 vs 0.08 +/- 0.01, $t = 14.010, P = 0.000$; 0.33 +/- 0.02 vs 0.11 +/- 0.01, $t = 21.000, P = 0.0000$). The HE staining results showed that epiphyseal growth plate defect of tibial superior extremity was partially filled with newborn cartilage in tissue engineering group and epiphyseal growth plate structure was not found in autotransplantation group at 4 weeks after repairing surgery. Partial epiphyseal growth plate of tibial superior extremity was approximately closed and presented with lamellar columnar organization in tissue engineering group, and newborn epiphysis was found in autotransplantation group at 8 weeks after repairing surgery. **Conclusion:** Epiphyseal growth plate defect in rats can be effectively repaired by choosing epiphyseal stem cells as seed cells, HIF-1 α + PTHrP as cytokine, and carrier consists of gelatin, chondroitin sulfate and sodium hyaluronate as bio-scaffold.

Keywords epiphyses; tissue engineering; hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit; parathyroid hormone-related peptide; stem cell transplantation; tissue scaffolds; rats, Sprague-Dawley; animal experimentation

对于骨与软骨缺损的处理,目前已有多种处理方法,如自体骨或同种异体骨移植修复、同种软骨膜移植修复等,但存在供体来源有限及排异反应等问题^[1],影响了其疗效及推广^[2-3]。骨组织工程技术为骨与软骨缺损修复提供了一种全新的思路。种子细胞、支架材料和骨诱导因子是骨组织工程研究的3个基本要素^[4-5]。本研究以大鼠骨髓干细胞为种子细胞,筛选最佳细胞因子,以明胶-硫酸软骨素-透明质酸钠载体作为外支架材料,修复大鼠骨髓生长板缺损,现总结报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 清洁级 8~10 周龄健康雄性 SD 大鼠 25 只,体质量 250~300 g,购自上海南方模式动物中心,动物合格证号:SCXK(沪)2009-0007。实验在宁波市第二医院动物实验室进行,在自然光照环境下

的动物房中单笼饲养,室温 20~25 ℃,自由摄食,适应性饲养 1 周后进行实验。实验方案通过医学动物实验伦理委员会审查批准。

1.2 试剂与仪器 H-DMEM 培养基、FBS (Gibco 公司),转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 1 (Peprotech 公司),胰岛素样生长因子-1 (BIOSOURCE 公司),0.25% 胰酶、EDTA (Sigma 公司),戊二醛(国药集团化学试剂有限公司),青霉素以及链霉素(Duchefa 公司);Gallios 库尔特流式细胞仪、AU480 全自动生化仪(Beckman 公司),PE7700 定量 PCR 扩增仪、Lipofectamine 2000 Transfection Reagent(Thermo Fisher Scientific 公司),WD-9413C 凝胶成像系统(北京六一生物科技有限公司),PA8800 特定蛋白分析仪(北京普朗新技术有限公司),Coatron1800 血凝仪(TECO 公司),BPN-50CH CO₂

培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 细胞因子筛选 取 5 只 SD 大鼠,采用 2% 戊巴比妥钠($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)进行腹腔注射麻醉,取肋软骨,用生理盐水进行预处理,在解剖显微镜下取透明带细胞,用 Percoll 密度梯度离心法纯化骨髓干细胞。分别采用低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF) - 1α 、甲状旁腺激素相关肽(parathyroid hormone-related peptide, PTHrP)、重组人源核因子 - κB (recombinant human nuclear factor - κB , rhNF - κB)、HIF - 1α + PTHrP、rhNF - κB + PTHrP、HIF - 1α + rhNF - κB 、rhNF - κB + HIF - 1α + PTHrP 共 7 种细胞因子及细胞因子组合通过 Lipofectamine 2000 转染骨髓干细胞,以 MTT 法观测各种细胞因子干预后骨髓干细胞增殖情况,筛选出最佳细胞因子。

2.2 细胞因子基因转染的大鼠骨髓干细胞构建 将筛选出的细胞因子或细胞因子组合基因构建入 pIRES2 - EGFP 真核表达载体。将获取的大鼠骨髓干细胞分为 2 组,转染组细胞以脂质体法用构建有筛选出的细胞因子基因的 pIRES2 - EGFP 真核表达载体转染,并在低氧条件下培养;非转染组细胞不进行处理,常规条件下培养。用 PCR 法、Western Blot 法从基因和蛋白水平上鉴定基因重组是否成功,并以 G418 筛选出稳定表达重组细胞因子的骨髓干细胞。

2.3 骨髓生长板缺损模型制备及修复

2.3.1 骨髓生长板缺损模型制备 取 20 只大鼠,经右侧胫骨上端前内侧切口切开,用尖刀全层切除骨髓生长板前内侧部分,约占骨髓生长板前内侧面积的 $1/3$,勿损伤膝内侧副韧带,制作骨髓生长板缺损模型。

2.3.2 骨髓生长板缺损修复及效果观察 模型制备完成后,将 20 只大鼠随机分为 2 组,每组 10 只。自体移植组采用从自体肋软骨透明带细胞获取的骨髓干细胞移植的方法修复骨髓生长板缺损;组织工程组取重组的骨髓干细胞植入到明胶 - 硫酸软骨素 - 透明质酸钠载体中,与 TGF - $\beta 1$ 作用,将二者作用后的产物植入大鼠肌袋内。修复后,2 组均以骨蜡封闭缺损边缘,缝合骨膜、皮下组织及皮肤,膝关节加压包扎 24 h 后置于笼内饲养,自由活动。分别于修复术后 4

周、8 周时,拍摄 2 组大鼠双下肢 X 线片,测量双侧胫骨长度和胫骨角,并计算双侧胫骨长度差值和双侧胫骨角差值。胫骨长度为胫骨上下关节面中点的距离,胫骨角为胫骨上下关节面垂线间的夹角,因骨髓生长板损伤侧膝内翻,胫骨上关节面以胫骨平台内外侧缘连线代替。X 线检查结束后从每组随机选取 5 只大鼠,取肋软骨,在解剖显微镜下切取透明带细胞,用 Percoll 密度梯度离心法纯化获取骨髓干细胞,以 Western Blot 法测定 Collagen II 及 Collagen X 蛋白水平;同时切取大鼠右胫骨上端,以 10% 甲醛固定 24 h,10% EDAT 脱钙处理 3 周,常规脱水、包埋及切片,HE 染色后光镜下观察。

2.4 数据统计 采用 SPSS21.0 软件进行数据统计分析。7 种细胞因子(或细胞因子组合)干预后对应骨髓干细胞增殖活性的比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD - t 检验;转染组和未转染组 HIF - 1α 水平、PTHrP 水平的组间比较,组织工程组和自体移植组大鼠骨髓生长板缺损修复术后双侧胫骨长度差值、胫骨角差值的组间比较,Collagen II、Collagen X 蛋白水平的组间比较均采用 t 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

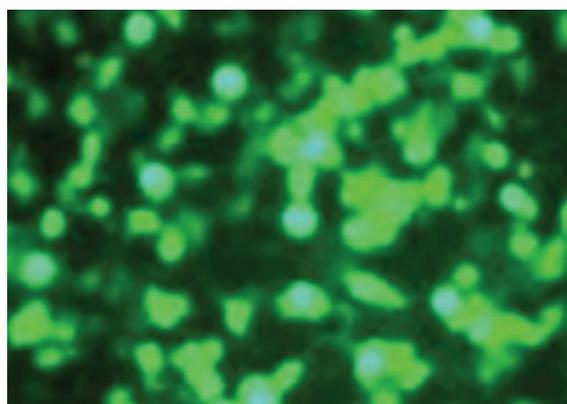
3.1 细胞因子筛选结果 分别以 HIF - 1α 、PTHrP、rhNF - κB 、HIF - 1α + PTHrP、rhNF - κB + PTHrP、HIF - 1α + rhNF - κB 、rhNF - κB + HIF - 1α + PTHrP 干预后,对应骨髓干细胞增殖活性比较,差异有统计学意义[(81.7 ± 5.3)%, (82.9 ± 6.1)%, (76.5 ± 6.7)%, (92.8 ± 5.1)%, (84.1 ± 4.8)%, (84.7 ± 5.1)%, (84.7 ± 5.2)%, $F = 7.760, P = 0.000$],其中 HIF - 1α + PTHrP 干预的骨髓干细胞增殖活性高于其他 6 种细胞因子干预的骨髓干细胞增殖活性($P = 0.024, P = 0.021, P = 0.001, P = 0.013, P = 0.014, P = 0.014$)。

3.2 细胞因子基因转染的大鼠骨髓干细胞构建结果

PCR 结果显示,转染组可见绿色荧光蛋白表达,转染效率约为 80% (图 1);未转染组未见阳性蛋白表达。Western Blot 检测结果显示,转染组 HIF - 1α 及 PTHrP 水平均高于未转染组($1.13 \pm 0.45, 0.47 \pm 0.02, t = 3.589, P = 0.005; 0.83 \pm 0.24, 0.25 \pm 0.01, t = 5.914, P = 0.000$)。

3.3 骨骺生长板缺损修复结果 骨骺生长板缺损修复术后 4 周、8 周时,组织工程组大鼠的两侧胫骨长度差值、双侧胫骨角差值均小于自体移植组。见表 1、图 2。骨骺生长板缺损修复术后 4 周、8 周时,组织工程组大鼠 Collagen II、Collagen X 蛋白水平平均高于自体移植组(表 2)。HE 染色结果显示,修复术后 4

周时,组织工程组胫骨上端骨骺生长板缺损由新生软骨部分填充,自体移植组软骨组织尚未以柱状细胞形式排列,未形成骨骺生长板组织结构;修复术后 8 周时,组织工程组胫骨上端骨骺生长板部分接近闭合,呈薄层柱状结构,自体移植组软骨组织有新骨骺形成(图 3)。



(1)暗场中观察结果



(2)明场中观察结果

图 1 转染组大鼠骨髓干细胞荧光显微镜下观察结果(×100)

表 1 2 组大鼠骨骺生长板缺损修复术后双侧胫骨长度差值和胫骨角差值 $\bar{x} \pm s$

组别	样本量(只)	双侧胫骨长度差值(cm)		双侧胫骨角差值(°)	
		术后 4 周	术后 8 周	术后 4 周	术后 8 周
组织工程组	10	0.07 ± 0.01	0.83 ± 0.45	1.50 ± 0.69	14.26 ± 1.87
自体移植组	10	0.35 ± 0.05	1.51 ± 0.13	2.55 ± 0.40	33.98 ± 2.17
<i>t</i> 值		17.360	4.590	4.160	21.770
<i>P</i> 值		0.000	0.001	0.001	0.000



(1)组织工程组术后4周



(2)组织工程组术后8周



(3)自体移植组术后4周



(4)自体移植组术后8周

图 2 2 组大鼠骨骺生长板缺损修复术后膝关节 X 线片

表 2 2 组大鼠骨骺生长板缺损修复术后 Collagen II 蛋白和 Collagen X 蛋白水平 $\bar{x} \pm s$

组别	样本量(只)	Collagen II 蛋白		Collagen X 蛋白	
		术后 4 周	术后 8 周	术后 4 周	术后 8 周
组织工程组	5	0.21 ± 0.02	0.37 ± 0.03	0.22 ± 0.03	0.33 ± 0.02
自体移植组	5	0.10 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.11 ± 0.01
<i>t</i> 值		15.560	16.260	14.010	21.000
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000

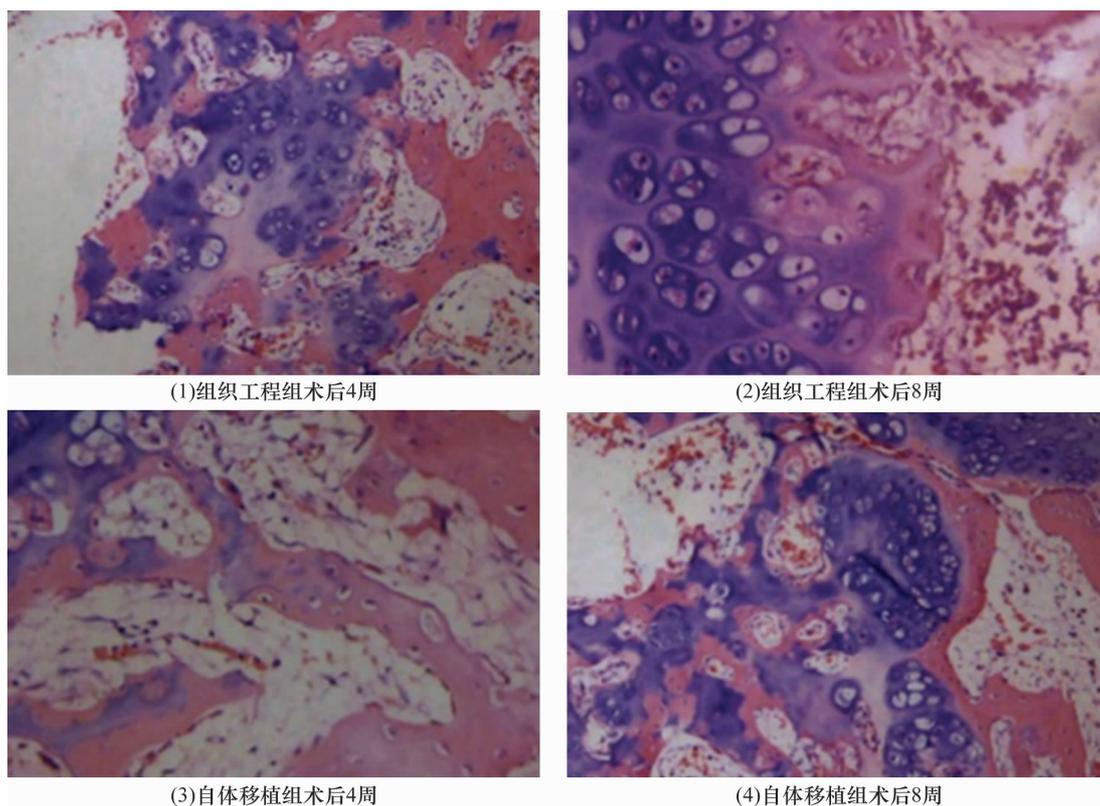


图 3 2 组大鼠骨骺生长板缺损修复术后胫骨干骺端组织 HE 染色结果 (×400)

4 讨论

由创伤、感染及肿瘤等所引发的儿童骨骺生长板损伤临床较常见,伤后肢体畸形的发生率较高^[1],对关节功能影响较大^[6]。骨组织工程技术在修复骨与软骨缺损方面的应用,为骨骺损伤的治疗提供了一种全新的思路。

骨骺细胞在骨与软骨的发生中起着非常重要的作用,它包含 4 种不同分化状态的细胞,分别为静止区软骨细胞、增殖区软骨细胞、肥大区软骨细胞、钙化区成骨细胞^[7-10]。静止区软骨细胞因有持续增殖及定向分化的能力,因此被称为骨骺干细胞。骨骺干细胞是一种成体干细胞,具有程序性分化特性,可在组织工程中作为种子细胞修复骨与软骨缺损^[11]。但单独采用骨骺干细胞修复软骨缺损,效果欠佳^[3,6]。

本文取 SD 大鼠作为研究对象,取大鼠的骨骺干细胞作为骨组织工程修复的种子细胞,并筛选出促进骨骺干细胞增殖能力最强的 HIF-1 α + PTHrP 作为骨诱导因子,以明胶-硫酸软骨素-透明质酸钠作为细胞外支架材料进行骨骺生长板缺损修复。通过与自体移植修复比较,术后 4 周、8 周时,组织工程组大鼠的双侧胫骨长度差值、双侧胫骨角差值均小于自体移植组,证实了该方法的有效性;Western Blot 法检测

结果表明,组织工程组 Collagen II 蛋白和 Collagen X 蛋白水平更高;组织学观察结果显示,组织工程组大鼠的软骨形成速度更快。

综上所述,以骨骺干细胞作为种子细胞,以 HIF-1 α + PTHrP 为细胞因子,以明胶-硫酸软骨素-透明质酸钠作为生物支架,能有效修复骨骺生长板缺损。

5 参考文献

- [1] 帕尔哈提·阿布肚热合曼,白尔娜·吾守尔,木合塔尔·霍加,等. 兔牙髓干细胞与 Pluronic F-127 嵌段共聚物的体外相容性[J]. 中华口腔医学研究杂志(电子版),2016,10(2):97-103.
- [2] 付昌马,钱春生,章有才,等. 微骨折术联合玻璃酸钠注射修复膝关节软骨损伤[J]. 中国实用医刊,2013,40(3):34-37.
- [3] 黄伟. 微骨折术联合玻璃酸钠注射修复膝关节软骨损伤的研究[J]. 现代诊断与治疗,2015,26(21):4941-4942.
- [4] 韩倩倩,薛彬,王涵,等. 骨组织工程材料的研究进展[J]. 组织工程与重建外科杂志,2017,12(6):343-345.
- [5] 神艳. 骺板软骨组织工程支架的研究进展[J]. 中华小儿外科杂志,2015,36(5):397-400.
- [6] 张柏青,张仲文,孙磊,等. II 型胶原修饰脱细胞真皮基质胶原膜修复关节软骨缺损[J]. 中国组织工程研究,2017,21(6):871-876.

- [7] 吴军. 影响老年关节软骨损伤关节镜下微骨折治疗的因素[J]. 中国老年学, 2014, 34(1): 115 - 117.
- [8] 朱渊, 徐向阳, 刘津浩, 等. 踝关节镜下微骨折手术治疗距骨骨软骨损伤[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(3): 211 - 214.
- [9] 张亮, 张宪, 周伟, 等. 半月板损伤患者关节镜术后注射玻璃酸钠效果研究[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7(7): 3185 - 3187.
- [10] 姜志洲, 董黎强, 尹航. 黄芪甲苷对大鼠骨骺干细胞增殖及生物学特性的影响[J]. 浙江中西医结合杂志, 2017, 27(4): 275 - 277.
- [11] 张树威, 郭风劲, 陈安民. 骨骺干细胞相关研究进展[J]. 国际骨科学杂志, 2007, 28(3): 165 - 166.

(收稿日期: 2017-11-20 本文编辑: 李晓乐)

(上接第 6 页)

- [2] YU KH, SEE LC, KUO CF, et al. Prevalence and incidence in patients with autoimmune rheumatic diseases: A nationwide population-based study in Taiwan[J]. Arthritis Care Res (Hoboken), 2013, 65(2): 244 - 250.
- [3] SINGH JA. Racial and gender disparities among patients with gout[J]. Curr Rheumatol Rep, 2013, 15(2): 1 - 9.
- [4] 匡红, 曾琳, 刘书蓉, 等. 成都地区 28097 例健康体检者尿酸水平分析[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(16): 2121 - 2122.
- [5] 濮永杰, 孔卫东, 徐珽. 不同剂量秋水仙碱治疗急性痛风疗效的 Meta 分析[J]. 中国药业, 2015, 24(16): 21 - 23.
- [6] CONWAY N, SCHWARTZ S. Diagnosis and management of acute gout[J]. Med Health R I, 2009, 92(11): 356 - 358.
- [7] 吕军, 吕芳, 方和金, 等. 高尿酸血症并急性痛风性关节炎大鼠模型的建立[J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23(27): 11 - 16.
- [8] 章元沛. 药理学实验[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 238.
- [9] 杨良山, 钟琴. 痛风性关节炎中医病因病机研究综述[J]. 风湿病与关节炎, 2014, 3(8): 53 - 56.
- [10] 向黎黎, 熊辉, 李腾龙, 等. 蠲痹历节清方治疗急性期湿热蕴结型痛风性关节炎 31 例[J]. 湖南中医杂志, 2015, 31(2): 14 - 16.
- [11] 郭玉星, 熊辉, 陆小龙, 等. 蠲痹历节清方治疗急性痛风性关节炎的临床研究[J]. 云南中医学院学报, 2016, 39(1): 81 - 84.
- [12] 李迎春, 徐建华. 急性痛风性关节炎的发病机制及研究进展[J]. 安徽医学, 2013, 34(1): 96 - 98.
- [13] BOLZETTA F, VERONESE N, MANZATO E, et al. Chronic gout in the elderly[J]. Aging Clin Exp Res, 2013, 25(2): 129 - 137.
- [14] 袁晓, 范永升, 谢冠群, 等. 基于“TLR4/NF- κ B”信号通路研究“加味四妙丸”治疗急性痛风性关节炎大鼠的作用机制[J]. 浙江中医药大学学报, 2017, 41(1): 17 - 24.
- [15] MARTINON F, PETRILLI V, MAYOR A, et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome[J]. Nature, 2006, 440(781): 237 - 241.
- [16] 杨洪杰, 周利, 吴海红, 等. 清热解毒中药外敷治疗外伤感染创面的疗效观察及作用机制研究[J]. 中医正骨, 2016, 28(8): 13 - 18.
- [17] 陈鹏, 郭文韬, 龙美兵, 等. 退癍消肿汤联合洛索洛芬钠片治疗急性痛风性关节炎的临床研究[J]. 中医正骨, 2016, 28(8): 19 - 23.

(收稿日期: 2017-12-12 本文编辑: 时红磊)

(上接第 9 页)

- [3] 韵向东, 万麟, 王旭, 等. 桡骨茎突狭窄性腱鞘炎局部封闭致手指坏死一例[J]. 中华手外科杂志, 2008, 24(5): 276.
- [4] 张作仁, 冯殿发, 李国辉, 等. 桡骨茎突狭窄性腱鞘炎局部封闭致手指坏死(附 3 例报告)[J]. 中国矫形外科杂志, 2005, 13(5): 392.
- [5] 王莉, 李义凯, 刘强. 针刀治疗桡骨茎突狭窄性腱鞘炎中存在的问题[J]. 中国康复医学杂志, 2011, 26(3): 275 - 277.
- [6] 陈志豪, 徐华梓, 徐刚, 等. 桡神经浅支及其分支的解剖学研究及临床意义[J]. 浙江创伤外科, 2010, 15(4): 417 - 420.
- [7] 黄秀峰, 黄海珊, 周善金. 桡神经浅支的观测[J]. 右江民族医学院学报, 1998, 20(1): 1 - 3.
- [8] 王培, 杨震军, 王竹君, 等. 桡神经浅支掌背部的临床应用解剖学研究[J]. 河北医学, 2010, 16(9): 1074 - 1076.
- [9] 张朝佑. 人体解剖学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 106 - 107.
- [10] 钟世镇, 王启华, 孙博. 临床解剖学丛书(四肢分册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 13.
- [11] 朱汉章. 针刀医学原理[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 639 - 641.
- [12] 全科, 何冬凤, 刘华, 等. 针刀治疗桡骨茎突狭窄性腱鞘炎疗效观察[J]. 内蒙古中医药, 2016, 35(16): 85.
- [13] 易传军, 田光磊, 李忠哲, 等. 单纯切开拇短伸肌腱鞘治疗桡骨茎突狭窄性腱鞘炎[J]. 中华骨科杂志, 2005, 25(10): 626 - 628.
- [14] IKIZ ZA, UÇERLER H. Anatomic characteristics and clinical importance of the superficial branch of the radial nerve[J]. Surg Radiol Anat, 2004, 26(6): 453 - 458.
- [15] 肖亮, 刘强, 李义凯. 桡骨茎突解剖形态学分型及临床意义[J]. 中国临床解剖学杂志, 2010, 28(5): 507 - 509.

(收稿日期: 2017-11-06 本文编辑: 时红磊)