

小鼠膝关节炎阳虚血瘀证模型的构建与评价

蔡宏杰¹, 王旭², 徐建波¹, 林士能², 童培建¹, 金红婷¹, 陈佳丽¹

(1. 浙江省中医院, 浙江 杭州 310006;

2. 浙江中医药大学第一临床医学院, 浙江 杭州 310053)

摘要 目的:探讨构建小鼠膝关节炎(knee osteoarthritis, KOA)阳虚血瘀证模型的有效方法。**方法:**将 12 只 10 周龄雄性无特定病原 C57BL/6J 小鼠采用内侧半月板失稳(destabilized medial meniscus, DMM)法构建 KOA 模型。KOA 造模成功后,将 12 只 KOA 模型小鼠随机分为 KOA 阳虚血瘀证组和 KOA 对照组,每组 6 只。KOA 阳虚血瘀证组小鼠于浸在冰水混合物中的塑料鼠箱中饲养,并以冰水混合物为饮用水;KOA 对照组小鼠于 22 ℃干燥环境中正常饲养。饲养 10 周后,评价小鼠阳虚血瘀证表现,分析小鼠步态,处死小鼠后进行小鼠膝关节 Micro-CT 分析、膝关节组织病理学观察及膝关节软骨Ⅱ型胶原蛋白 α1 链表达检测。**结果:**①小鼠阳虚血瘀证评价结果。KOA 阳虚血瘀证组小鼠的阳虚证评分和血瘀证评分均高于 KOA 对照组[(13.33 ± 1.37)分, (3.50 ± 1.23)分, $t = 13.120$, $P = 0.000$; (4.83 ± 0.75)分, (0.83 ± 0.75)分, $t = 9.200$, $P = 0.000$]。②小鼠步态分析结果。2 组各收集到 5 只小鼠完整的步态分析数据。KOA 阳虚血瘀证组小鼠右后肢的爪面积和步幅均小于 KOA 对照组[(0.610 ± 0.094)cm², (0.758 ± 0.042)cm², $t = -3.211$, $P = 0.012$; (1.780 ± 0.045)cm, (2.040 ± 0.152)cm, $t = -3.677$, $P = 0.006$]; 2 组小鼠右后肢的摆动期时间和站立期时间比较,组间差异均无统计学意义[(0.060 ± 0.004)s, (0.060 ± 0.009)s, $t = -0.096$, $P = 0.963$; (0.062 ± 0.009)s, (0.076 ± 0.014)s, $t = -1.810$, $P = 0.137$]。③小鼠膝关节 Micro-CT 分析结果。KOA 阳虚血瘀证组小鼠的骨体积分数低于 KOA 对照组[(55.582 ± 2.810)%, (69.248 ± 1.884)%, $t = -6.997$, $P = 0.002$],骨小梁分离度大于 KOA 对照组[(0.114 ± 0.009)mm, (0.077 ± 0.010)mm, $t = 4.883$, $P = 0.008$]; 2 组小鼠的骨小梁厚度、骨小梁数量比较,组间差异均无统计学意义[(0.148 ± 0.005)mm, (0.210 ± 0.036)mm, $t = -2.939$, $P = 0.094$; (3.767 ± 0.100)个·mm⁻¹, (3.368 ± 0.547)个·mm⁻¹, $t = 1.243$, $P = 0.282$]。④小鼠膝关节组织病理学观察结果。2 组小鼠膝关节软骨均有缺失,且 KOA 阳虚血瘀证组小鼠膝关节软骨缺失较 KOA 对照组更严重。⑤小鼠膝关节软骨Ⅱ型胶原蛋白 α1 链表达检测结果。KOA 阳虚血瘀证组小鼠膝关节软骨Ⅱ型胶原蛋白 α1 链阳性表达面积比和平均光密度均低于 KOA 对照组[(0.144 ± 0.003)%, (0.163 ± 0.003)%, $t = -6.580$, $P = 0.003$; (0.051 ± 0.002)lux, (0.095 ± 0.004)lux, $t = -15.878$, $P = 0.001$]。**结论:**DMM 法联合低温诱导法是构建小鼠 KOA 阳虚血瘀证模型的有效方法。

关键词 骨关节炎;膝;小鼠;疾病模型;动物;阳虚血瘀;动物实验

Construction and evaluation of a mouse model of knee osteoarthritis with yang-deficiency and blood-stasis syndrome

CAI Hongjie¹, WANG Xu², XU Jianbo¹, LIN Shineng², TONG Peijian¹, JIN Hongting¹, CHEN Jiali¹

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

2. The First Clinical Medical College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To explore the effective method for building a yang-deficiency-blood-stasis-type knee osteoarthritis(KOA) mouse model. **Methods:** Twelve 10-week-old specific pathogen free(SPF)-grade male C57BL/6J mice were selected out and were intervened by destabilized medial meniscus(DMM)method for inducing KOA. After successful modeling, the 12 KOA model mice were randomly divided into yang-deficiency-blood-stasis-type KOA group and KOA control group, 6 cases in each group. The mice in yang-deficiency-blood-stasis-type KOA group were bred in plastic box submerged in ice-water mixture, and they were fed with ice-water mixture, while the ones in KOA control group were bred normally in a dry environment of 22 ℃. After 10-week feeding, the yang-deficiency and blood-stasis syndrome in KOA model mice were observed and evaluated, and the gaits were analyzed. After that, the mice were executed by using cervical dislocation method, and the knee samples were harvested from their right hind limbs. The knee samples were scanned and analyzed by using micro-CT

基金项目:国家自然科学基金项目(81873324);浙江中医药大学基本科研能力提升项目(2021JKJNTZ014A)

通讯作者:陈佳丽 E-mail:chenjiali1585@163.com

and CTAn1.10 software respectively, followed by observation on histopathological changes of knee tissues and determination of the expression levels of type II collagen $\alpha 1$ chain (Col2A1) in knee cartilage. **Results:** ①The scores of yang-deficiency syndrome and blood-stasis syndrome were higher in yang-deficiency-blood-stasis-type KOA group compared to KOA control group (13.33 ± 1.37 vs 3.50 ± 1.23 points, $t = 13.120, P = 0.000$; 4.83 ± 0.75 vs 0.83 ± 0.75 points, $t = 9.200, P = 0.000$). ②The complete gait analysis data was collected from 5 mice in each group. The paw area and stride length of the right hind limbs were smaller in yang-deficiency-blood-stasis-type KOA group compared to KOA control group (0.610 ± 0.094 vs 0.758 ± 0.042 cm², $t = -3.211, P = 0.012$; 1.780 ± 0.045 vs 2.040 ± 0.152 cm, $t = -3.677, P = 0.006$). There was no statistical difference in the time of swing phase and stance phase of the right hind limbs between the 2 groups (0.060 ± 0.004 vs 0.060 ± 0.009 seconds, $t = -0.096, P = 0.963$; 0.062 ± 0.009 vs 0.076 ± 0.014 seconds, $t = -1.810, P = 0.137$). ③The bone volume fraction was lower and the trabecular separation was greater in yang-deficiency-blood-stasis-type KOA group compared to KOA control group (55.582 ± 2.810 vs $69.248 \pm 1.884\%$, $t = -6.997, P = 0.002$; 0.114 ± 0.009 vs 0.077 ± 0.010 mm, $t = 4.883, P = 0.008$); while there was no statistical difference in trabecular thickness and trabecular number between the 2 groups (0.148 ± 0.005 vs 0.210 ± 0.036 mm, $t = -2.939, P = 0.094$; 3.767 ± 0.100 vs 3.368 ± 0.547 trabeculae/mm, $t = 1.243, P = 0.282$). ④The knee cartilage loss was observed in the model mice of the 2 groups, and it was more severe in yang-deficiency-blood-stasis-type KOA group compared to KOA control group. ⑤The positive expression area ratio and average optical density of Col2A1 in knee cartilage were lower in yang-deficiency-blood-stasis-type KOA group compared to KOA control group (0.144 ± 0.003 vs $0.163 \pm 0.003\%$, $t = -6.580, P = 0.003$; 0.051 ± 0.002 vs 0.095 ± 0.004 lux, $t = -15.878, P = 0.001$). **Conclusion:** Combination of DMM with low temperature induction is an effective method for constructing a mouse model of KOA and yang-deficiency and blood-stasis syndrome.

Keywords osteoarthritis, knee; mice; disease models, animal; syndrome of yang deficiency and blood stasis; animal experimentation

膝关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是一种以关节软骨退变或缺失、骨赘形成为主要病理特征的慢性退行性疾病,可引起膝关节疼痛和功能受限,好发于中老年人群,严重影响患者的生活质量^[1-2]。目前,临床上尚缺乏有效治疗 KOA 的方法^[3]。中医治疗 KOA 在改善患者临床症状方面具有独到的优势^[4-6]。深入研究中医治疗 KOA 的作用机制对于临床上 KOA 的治疗具有重要意义,而小鼠 KOA 证型模型是重要的研究工具^[7-8]。目前,尚无公认的小鼠 KOA 阳虚血瘀证模型构建方法^[9]。本研究采用内侧半月板失稳 (destabilized medial meniscus, DMM) 法联合低温诱导法构建了 KOA 阳虚血瘀证小鼠模型,并对模型进行了评价,现总结报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 无特定病原 C57BL/6J 小鼠 12 只,雄性,10 周龄,体质量 (25.65 ± 1.75) g,由浙江中医药大学动物实验研究中心 [生产许可 SCXK (浙) 2021-0003] 提供。实验方案经浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会审查通过,伦理批件号: IACUC-20200622-07。

1.2 实验试剂 4% 多聚甲醛 (生工生物工程股份有限公司), Alcian Blue 8GX A5268、橙黄 G、伊红 (美国 Sigma 公司), 兔抗小鼠 II 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链 (collagen II $\alpha 1$, Col2A1) 一抗、生物素标记的山羊抗兔免疫球

蛋白 (immunoglobulin, Ig) G 二抗 (美国 Abcam 公司), 山羊血清、内源性过氧化物酶阻断剂、辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液、DAB 显色试剂盒 (中杉金桥公司)。

1.3 实验仪器 Tissue-Tek® VIP™ 5Jr 全封闭组织脱水机 (日本樱花公司)、AP280-2 型包埋机、HM355S 型石蜡切片机 (德国 Microm 公司)、显微镜及显微拍摄系统 (德国蔡司公司)、Skyscan-1176 高分辨率活体 Micro-CT (德国 Bruker 公司)。

2 方法

2.1 KOA 造模方法 采用 DMM 法^[10] 构建小鼠 KOA 模型:将小鼠仰卧位固定于台面上,腹腔注射 0.3% 的戊巴比妥钠麻醉小鼠;右后肢膝关节常规消毒,做长约 3 mm 的纵形切口;钝性分离髌骨韧带,暴露并切断胫侧副韧带;逐层缝合关节囊和切口,无菌辅料包扎。

2.2 分组方法 将 12 只 KOA 模型小鼠称重,按照体质量由高到低排序,依次编号 1~12。从随机数字表中随机选取 1 行,连续抄录 12 个随机数字与编号依次对应,将 12 个随机数字从小到大排序 (如两个随机数字相同则按照出现顺序排序),对应的随机数字排序在前 6 位的小鼠纳入 KOA 阳虚血瘀证组,排序在后 6 位的小鼠纳入 KOA 对照组。

2.3 KOA 阳虚血瘀证造模方法 术后第 3 天,将

KOA 阳虚血瘀证组小鼠置于塑料鼠箱中,鼠箱置于装有冰水混合物的泡沫箱中,固定塑料鼠箱以确保冰水混合物液面高于小鼠,定时加冰确保鼠箱外始终为冰水混合物;KOA 对照组小鼠于 22 ℃ 干燥环境中正常饲养。KOA 阳虚血瘀证组小鼠饮用水为冰水混合物,其他饲养条件与 KOA 对照组小鼠相同,共饲养 10 周。

2.4 KOA 阳虚血瘀证模型评价方法

2.4.1 小鼠阳虚血瘀证评价方法 以畏寒肢冷、活动减少、精神萎靡、皮毛少光泽、饮食减少、大便清稀 6 项指标评价小鼠阳虚证,以舌尖颜色变深、四肢发紫 2 项指标评价小鼠血瘀证^[11-12]。每项指标均有无、轻度、中度、重度 4 个等级,分别赋值 0 分、1 分、2 分、3 分。分别计算阳虚证评分和血瘀证评分,阳虚证评分为 6 项指标得分之和,血瘀证评分为 2 项指标得分之和。

2.4.2 小鼠步态分析方法 饲养 10 周后,驱动小鼠在速度为 $15 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 、跑步带为透明的跑步机上奔跑,采用 DigiGait 成像系统从小鼠腹侧拍摄小鼠奔跑姿态。每次奔跑 40 s,选择 10 个以上连续步幅(时间约 5 s)进行分析。记录右后肢的爪面积、步幅、摆动期时间和站立期时间。爪面积为脚掌接触跑步带的面积,摆动期时间为脚掌相邻 2 次接触跑步带的间隔时间,站立期时间为脚掌接触跑步带的时间。

2.4.3 小鼠膝关节 Micro-CT 分析方法 步态分析后,采用颈椎脱位法处死小鼠。剥离皮毛,剔除多余肌肉筋膜组织,截断股骨中段和胫骨中段,获得小鼠右后肢膝关节。将膝关节在 4% 多聚甲醛中固定 3 d 后,将膝关节样本进行 Micro-CT 扫描,采用 CTOVX3.0.0 软件进行三维重建,并采用 CTAn1.10 软件进行分析,提取胫骨平台软骨下骨的骨体积分数、骨小梁厚度、骨小梁数量(1 mm 线段与骨小梁交点的个数)及骨小梁分离度(骨小梁之间的平均距离)等分析指标。

2.4.4 小鼠膝关节组织病理学观察方法 小鼠膝关节扫描后,置于 14% 的 EDTA 溶液中脱钙 14 d,每隔

1 d 更换 1 次 EDTA 溶液。脱钙结束后,取出小鼠膝关节于流水下冲洗 24 h,冲洗后脱水、石蜡包埋,制作全膝关节矢状位石蜡切片,切片厚度为 $4 \mu\text{m}$ 。选取部分组织切片,采用阿利新蓝-苏木素/橙黄 G(Alcian Blue-Hematoxylin/Orange G, ABH/OG) 染色:将切片脱蜡、水化后,浸入 1% 的盐酸乙醇中 30 s;取出切片,吸去多余水分,浸入 ABH 染液中;于室温放置 1 h 后,纯化水冲洗 3 次,每次 3 min;冲洗后将切片依次浸入 1% 的盐酸酒精中 3 s、0.5% 氨水 15 s、95% 乙醇 60 s、橙黄 G 染色液 90 s、95% 乙醇 60 s;放置于 37 ℃ 烘箱中烘干,中性树脂封片。采用光学显微镜观察小鼠膝关节组织病理学改变。

2.4.5 小鼠膝关节软骨 Col2A1 表达检测方法 选取部分组织切片,脱蜡、水化后,采用柠檬酸钠法进行抗原修复。修复后,PBS 溶液清洗,滴加适量内源性过氧化物酶阻断剂,室温孵育 10 min;PBS 溶液清洗,滴加山羊血清,于室温封闭 15 min;去除封闭液,滴加兔抗小鼠 Col2A1 一抗,于 4 ℃ 孵育过夜;PBS 溶液清洗,加入生物素标记的山羊抗兔 IgG 二抗,室温孵育 15 min;PBS 溶液清洗,滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液,室温孵育 15 min,浸入苏木精染色液 20 s,PBS 溶液清洗后采用 DAB 显色试剂盒显色。酒精脱水、二甲苯透明、中性树脂封片。在显微镜下观察并采集图像。采用 Image J 软件对图像进行分析,测定 Col2A1 的阳性表达面积比和平均光密度。

2.5 数据统计方法 采用 SPSS26.0 统计软件对所得数据进行统计学分析。阳虚证评分、血瘀证评分、爪面积、步幅、摆动期时间、站立期时间、骨体积分数、骨小梁厚度、骨小梁数量、骨小梁分离度、膝关节软骨 Col2A1 阳性表达面积比及平均光密度的组间比较均采用 t 检验;检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 小鼠阳虚血瘀证评价结果 KOA 阳虚血瘀证组小鼠的阳虚证评分和血瘀证评分均高于 KOA 对照组(表 1)。

表 1 2 组小鼠的阳虚证评分和血瘀证评分

组别	样本量/只	阳虚证评分/ $(\bar{x} \pm s, \text{分})$	血瘀证评分/ $(\bar{x} \pm s, \text{分})$
膝骨关节炎阳虚血瘀证组	6	13.33 ± 1.37	4.83 ± 0.75
膝骨关节炎对照组	6	3.50 ± 1.23	0.83 ± 0.75
t 值		13.120	9.200
P 值		0.000	0.000

3.2 小鼠步态分析结果 2 组各收集到 5 只小鼠完整的步态分析数据。KOA 阳虚血瘀证组小鼠右后肢的爪面积和步幅均小于 KOA 对照组,2 组小鼠右后肢的摆动期时间和站立期时间比较,组间差异均无统计学意义(表 2)。

3.3 小鼠膝关节 Micro-CT 分析结果 KOA 阳虚血瘀证组小鼠的骨体积分数低于 KOA 对照组,骨小梁分离度大于 KOA 对照组;2 组小鼠的骨小梁厚度、骨小梁数量比较,组间差异均无统计学意义(表 3)。小鼠膝关节 Micro-CT 三维重建图片见图 1。

3.4 小鼠膝关节组织病理学观察结果 2 组小鼠膝

关节软骨均有缺失,且 KOA 阳虚血瘀证组小鼠膝关节软骨缺失较 KOA 对照组更严重(图 2)。

3.5 小鼠膝关节软骨 Col2A1 表达检测结果 KOA 阳虚血瘀证组小鼠膝关节软骨 Col2A1 阳性表达面积比和平均光密度均低于 KOA 对照组(图 3、表 4)。

4 讨论

KOA 属中医学“骨痹”范畴,病因病机主要是肝肾不足、风寒湿邪气外侵^[13]。临床上,KOA 的中医证候有寒湿痹阻证、湿热痹阻证、气血虚弱证、气滞血瘀证、肝肾亏虚证等^[14]。史云佳等^[15-16]调查发现,KOA 阳虚证和血瘀证在 KOA 患者中占比较高。

表 2 2 组小鼠右后肢步态分析结果

组别	样本量/ 只	爪面积/ ($\bar{x} \pm s, \text{cm}^2$)	步幅/ ($\bar{x} \pm s, \text{cm}$)	摆动期时间/ ($\bar{x} \pm s, \text{s}$)	站立期时间/ ($\bar{x} \pm s, \text{s}$)
膝骨关节炎阳虚血瘀证组	5	0.610 ± 0.094	1.780 ± 0.045	0.060 ± 0.004	0.062 ± 0.009
膝骨关节炎对照组	5	0.758 ± 0.042	2.040 ± 0.152	0.060 ± 0.009	0.076 ± 0.014
<i>t</i> 值		-3.211	-3.677	-0.096	-1.810
<i>P</i> 值		0.012	0.006	0.963	0.137

表 3 2 组小鼠膝关节 Micro-CT 分析结果

组别	样本量/ 只	骨体积分数/ ($\bar{x} \pm s, \%$)	骨小梁厚度/ ($\bar{x} \pm s, \text{mm}$)	骨小梁数量/ ($\bar{x} \pm s, \text{个} \cdot \text{mm}^{-1}$)	骨小梁分离度/ ($\bar{x} \pm s, \text{mm}$)
膝骨关节炎阳虚血瘀证组	3	55.582 ± 2.810	0.148 ± 0.005	3.767 ± 0.100	0.114 ± 0.009
膝骨关节炎对照组	3	69.248 ± 1.884	0.210 ± 0.036	3.368 ± 0.547	0.077 ± 0.010
<i>t</i> 值		-6.997	-2.939	1.243	4.883
<i>P</i> 值		0.002	0.094	0.282	0.008

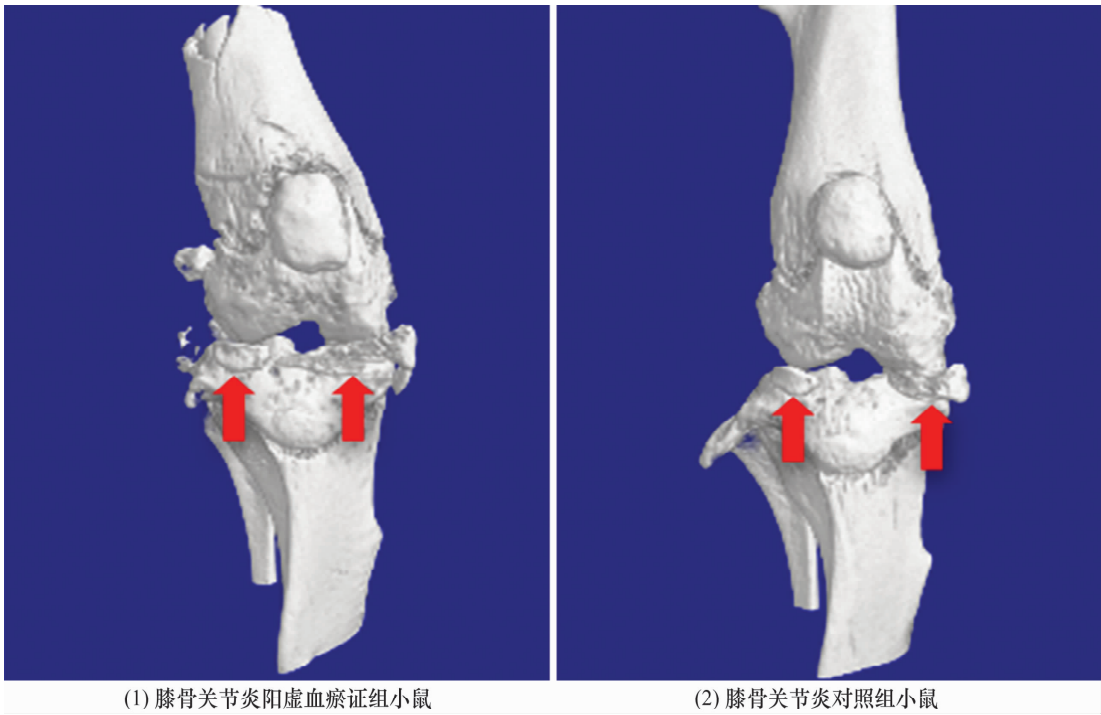


图 1 小鼠右后肢膝关节 Micro-CT 三维重建图片

注:(1)中胫骨平台有骨赘形成(箭头所示);(2)中胫骨平台未见明显骨赘形成(箭头所示)。

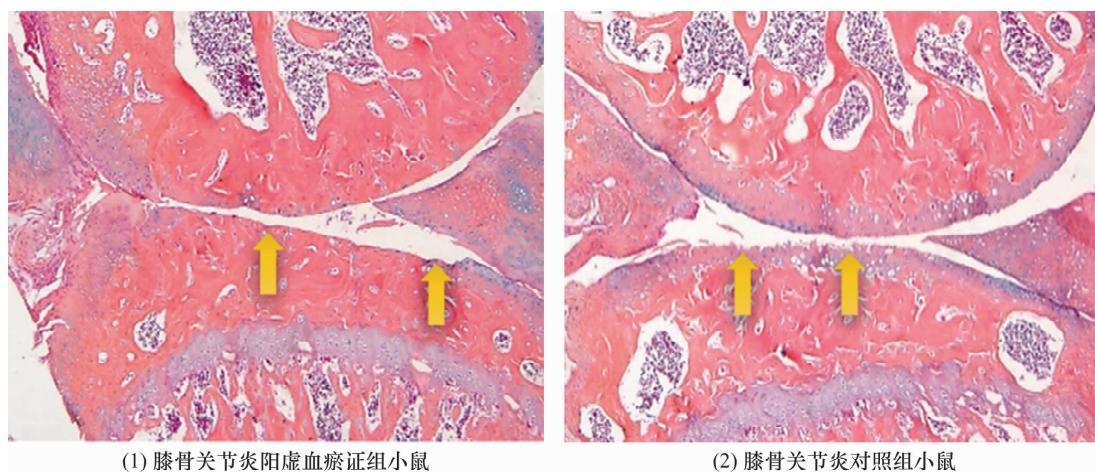
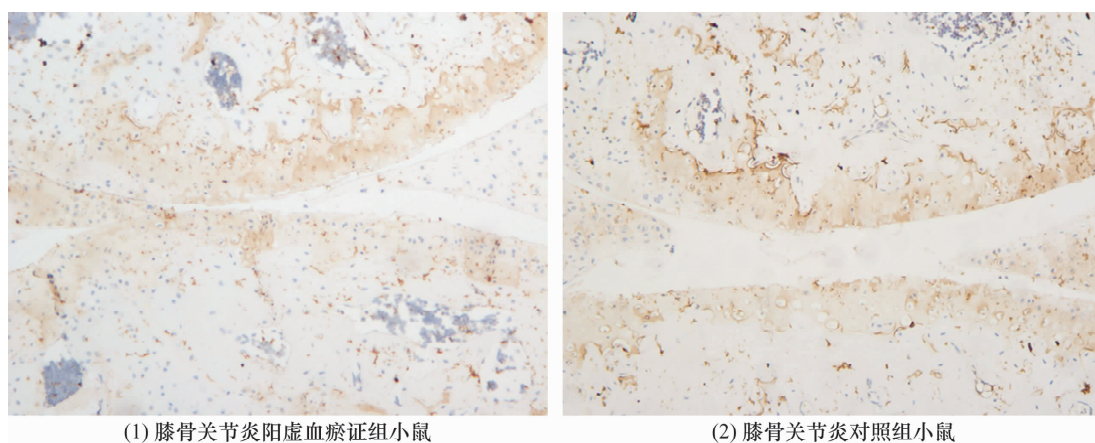


图2 小鼠右后肢膝关节矢状面切片阿利新蓝-苏木素/橙黄 G 染色图片 (×10)

图3 小鼠右后肢膝关节软骨Ⅱ型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链表达免疫组织化学检测结果 (×10)表4 小鼠膝关节软骨Ⅱ型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链的阳性表达面积比和平均光密度

组别	样本量/只	阳性表达面积比/($x \pm s, \%$)	平均光密度/($x \pm s, \text{lux}$)
膝关节炎阳虚血瘀证组	3	0.144 ± 0.003	0.051 ± 0.002
膝关节炎对照组	3	0.163 ± 0.003	0.095 ± 0.004
t 值		-6.580	-15.878
P 值		0.003	0.001

李言杰等^[17]研究发现, KOA 的中医证素以肾、寒、阳虚为主, 肾、寒、血瘀是影响膝关节疼痛的重要中医证素, 肾、血瘀是影响膝关节软骨损伤的重要中医证素。徐传毅等^[18-19]研究发现, 肾虚血瘀与 KOA 关系密切。因此, 小鼠 KOA 阳虚血瘀证模型的构建对于探讨中医治疗 KOA 的作用机制具有重要意义。我们采用 DMM 法构建了小鼠 KOA 模型, 并采用低温刺激 KOA 模型小鼠, 诱导小鼠阳虚血瘀证。低温诱导法操作简单, 实验条件要求低且易控制。我们联合 DMM 法和低温诱导法构建了小鼠 KOA 阳虚血瘀证模型, 小鼠阳虚血瘀证评价结果显示, KOA 阳虚血瘀证组小鼠表现出明显的阳虚血瘀证特征, 阳虚证评分和血瘀证评分均明显高于 KOA 对照组, 提示该方法

构建小鼠 KOA 阳虚血瘀证模型有效。Micro-CT 分析结果显示, KOA 阳虚血瘀证小鼠骨体积分数降低、骨小梁分离度增加, 三维重建图片显示 KOA 阳虚血瘀证小鼠胫骨平台有骨赘形成。组织病理学分析结果显示, KOA 阳虚血瘀证小鼠的膝关节软骨丢失更为严重, 且膝关节软骨 Col2A1 表达量降低。

我们采用 DMM 法和低温诱导法构建了小鼠 KOA 阳虚血瘀证模型, 模型小鼠表现特征与 KOA 阳虚血瘀证患者临床表现具有较高的一致性。但在模型构建过程中还需注意以下问题: ①DDM 法手术应由具有一定动物手术经验的人员操作, 以确保造模的稳定性; ②手术过程应严格消毒, 避免发生术后感染; ③在低温诱导初期, 应密切关注环境温度与小鼠状

态,避免小鼠发生腹部冻伤;④整个低温诱导过程应确保鼠箱内温度保持稳定。

本研究结果表明,DMM 法联合低温诱导法是构建小鼠 KOA 阳虚血瘀证模型的有效方法。

参考文献

- [1] MICHAEL J W, SCHLÜTER-BRUST K U, EYSEL P. The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee[J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2010, 107(9): 152 – 162.
- [2] KAN H S, CHAN P K, CHIU K Y, et al. Non-surgical treatment of knee osteoarthritis[J]. *Hong Kong Med J*, 2019, 25(2): 127 – 133.
- [3] MAHMOUDIAN A, LOHMANDER L S, MOBASHERI A, et al. Early-stage symptomatic osteoarthritis of the knee-time for action[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2021, 17(10): 621 – 632.
- [4] WU B, YANG L, CHEN L, et al. Traditional Chinese medicine therapies for patients with knee osteoarthritis: a protocol for systematic review and network meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2022, 101(28): e29404.
- [5] 王中华. 补肾活血汤为主治疗肾阳虚血瘀型膝骨关节炎的临床观察[D]. 广州: 广州中医药大学, 2011.
- [6] PRIMORAC D, MOLNAR V, ROD E, et al. Knee osteoarthritis: a review of pathogenesis and state-of-the-art non-operative therapeutic considerations[J]. *Genes (Basel)*, 2020, 11(8): 854.
- [7] JANG S, LEE K, JU J H. Recent updates of diagnosis, pathophysiology, and treatment on osteoarthritis of the knee[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5): 2619.
- [8] CAO P, LI Y, TANG Y, et al. Pharmacotherapy for knee osteoarthritis: current and emerging therapies[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2020, 21(7): 797 – 809.
- [9] 刘晓辰, 付维力. 骨关节炎动物模型的选择[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(11): 1769 – 1776.
- [10] 冯萌, 钱庄, 李萌, 等. 内侧半月板失稳诱发 C57BL/6 小鼠骨关节炎模型中关节腔微量注射方法的建立[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2018, 39(3): 434 – 437.
- [11] 彭银花, 龚辉, 赵晔, 等. 抗癌消水散对人胃癌小鼠腹腔移植阳虚模型的干预作用[J]. *湖南中医杂志*, 2022, 38(6): 179 – 183.
- [12] 袁苑, 陈燕霞, 马堃, 等. 探索建立雷公藤多苷致早发性卵巢功能不全肾虚血瘀证的小鼠模型[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(9): 1895 – 1903.
- [13] 中国中医药研究促进会骨伤科分会. 膝骨关节炎中医诊疗指南(2020 年版)[J]. *中医正骨*, 2020, 32(10): 1 – 14.
- [14] 陈黎明, 郭盛君, 许根荣, 等. 28763 例膝骨关节炎患者证候中医特征分析[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(2): 1061 – 1064.
- [15] 史云佳, 吴斌, 李延萍, 等. 重庆地区膝骨关节炎中医证候分布规律[J]. *实用中医内科杂志*, 2022, 36(12): 36 – 39.
- [16] 李兆福, 狄朋桃, 彭江云, 等. 昆明市膝骨关节炎中医证候研究[J]. *中医正骨*, 2014, 26(6): 24 – 27.
- [17] 李言杰, 孙振双, 蔡西国, 等. 膝骨关节炎中医证素与膝关节疼痛及软骨损伤的关系研究[J]. *中医正骨*, 2020, 32(9): 9 – 11.
- [18] 徐传毅, 樊粤光, 宁显明. 肾虚血瘀与膝骨性关节炎关系初探[J]. *新中医*, 2002, 34(3): 7 – 9.
- [19] 康俊峰, 邢士新, 贺金亮, 等. 二仙汤加加减配合小针刀治疗阳虚血瘀型膝骨性关节炎疗效观察[J]. *亚太传统医药*, 2021, 17(7): 70 – 73.
- (收稿日期: 2022-09-04 本文编辑: 吕宁)
- (上接第 17 页)
- [18] DI D S, LI C, DAI Y, et al. Integrative analysis of LGR5/6 gene variants, gut microbiota composition and osteoporosis risk in elderly population[J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 765008.
- [19] ZHANG Y W, CAO M M, LI Y J, et al. The preventive effects of probiotic *Prevotella histicola* on the bone loss of mice with ovariectomy-mediated osteoporosis[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(4): 950.
- [20] OBI Y, MIKAMI S, HAMANO T, et al. Intravenous vitamin B6 increases resistance to erythropoiesis-stimulating agents in hemodialysis patients: a randomized controlled trial[J]. *J Ren Nutr*, 2016, 26(6): 380 – 390.
- [21] YOUNG R C, BLASS J P. Iatrogenic nutritional deficiencies[J]. *Annu Rev Nutr*, 1982, 2: 201 – 227.
- [22] DARLING A L, MILLWARD D J, LANHAM-NEW S A. Dietary protein and bone health: towards a synthesised view[J]. *Proc Nutr Soc*, 2021, 80(2): 165 – 172.
- [23] ANDREEV D, LIU M, WEIDNER D, et al. Osteocyte necrosis triggers osteoclast-mediated bone loss through macrophage-inducible C-type lectin[J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(9): 4811 – 4830.
- (收稿日期: 2022-11-04 本文编辑: 李晓乐)