

· 中药药理 ·

化湿补肾法对膝骨关节炎大鼠软骨修复机制的研究*

葛海雅¹ 张应生¹ 卢文亚¹ 耿秋东¹ 秦竣育¹ 刘东波¹ 王和鸣^{1,2} 李楠^{1,2#}

(1 福建中医药大学中医学院 福建 350122; 2 中医骨伤及运动康复教育部重点实验室)

摘要:目的 探讨化湿补肾法治疗膝骨关节炎(KOA)的机制。**方法** 将48只SPF级SD大鼠随机分为空白组、模型组、化湿定痛汤组、龟鹿二仙胶组、化湿补肾法组,采用木瓜蛋白酶关节腔注射建立膝骨关节炎模型,造模成功后各组大鼠灌胃相应药物,化湿定痛汤组灌胃化湿定痛汤4.68 g/(kg·d),龟鹿二仙胶组灌胃龟鹿二仙胶汤2.7 g/(kg·d),化湿补肾法组灌胃化湿补肾法中药7.38 g/(kg·d),连续灌胃28 d,于第28天对大鼠进行取材,取右侧股骨行HE染色观察软骨形态,取右侧胫骨平台滑膜、关节液用ELISA检测前列腺素-2(PGE-2)、环氧化和酶-2(COX-2)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的表达,取右侧胫骨平台软骨用qPCR检测p38、p53、II型胶原的表达。**结果** HE染色形态结果表明化湿补肾法组、龟鹿二仙胶组、化湿定痛汤组均优于模型组。与龟鹿二仙胶组相比,化湿补肾法组PGE-2、COX-2、IL-1 β 、TNF- α 表达量下降($P < 0.05$),软骨的p38、p53表达降低($P < 0.05$),II型胶原表达升高($P < 0.05$)。**结论** 化湿补肾法可有效减轻滑膜和关节液中炎症因子表达,增加软骨细胞合成代谢,抑制软骨细胞凋亡,从而促进关节软骨的修复,延缓KOA的进程。

关键词:化湿补肾法;化湿定痛汤;龟鹿二仙胶;膝骨关节炎;大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1006-2157.2021.02.010

中图分类号:R285.5

Mechanism of dampness-resolving kidney-tonifying method in cartilage repair in rats with knee osteoarthritis*Ge Haiya¹, Zhang Yingsheng¹, Lu Wenya¹, Geng Qiudong¹, Qin Juanyu¹, Liu Dongbo¹, Wang Heming^{1,2}, Li Nan^{1,2#}

(1 School of Traditional Chinese Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fujian 350122, China; 2 Key Laboratory of Orthopedics & Traumatology of Traditional Chinese Medicine and Rehabilitation, Ministry of Education, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fujian 350122, China)

Abstract: Objective To preliminarily explore the mechanism of treating knee osteoarthritis (KOA) by dampness-resolving kidney-tonifying method. **Methods** 40 SPF SD rats were randomly divided into blank group, model group, dampness-resolving pain-relieving decoction (DP) group, Guilu Erxian (GE) group, and dampness-resolving kidney-tonifying (DK) group (n = 8). The model of osteoarthritis was established by injecting papain into the articular disc. After successfully establishing the model, rats in the DP group, GE group and DK group were gavaged with DP decoction 4.68 g/(kg·d), GE decoction 2.7 g/(kg·d) and DK decoction 7.38 g/(kg·d) respectively for 28 days in succession, and the blank group and model group were gavaged with an equal amount of normal saline solution. After 28 days, the cartilage of right femur was taken for morphologic observation with HE staining. The expression of PGE, COX2, IL-1 β and TNF- α in synovium and synovial fluid of right tibial plateau were observed with ELISA. The expression of p38, p53 and type II collagen of right tibial plateau were

葛海雅,女,在读硕士生

通信作者:李楠,男,博士,教授,主要研究方向:中医药防治骨病,E-mail:mr.linan@126.com

* 国家自然科学基金项目(No. 81973880),福建省自然科学基金项目(No. 2019J01349)

detected with PCR. **Results** The pathological morphologic changes of articular cartilage observed with HE staining showed better results in the DK group, GE group and DP group compared with the model group. The expression of PGE-2, COX-2 and IL-1 β were decreased in various degrees in the DK group compared with the GE group ($P < 0.05$). In the DK group, the expression of p38 and p53 in the cartilage was decreased, while the expression of type II collagen was increased compared with the GE group ($P < 0.05$). **Conclusion** Dampness-resolving kidney-tonifying method seems to effectively reduce the expression of inflammatory factors in synovium and synovial fluid, promote the anabolism of chondrocytes, and inhibit the apoptosis of chondrocytes, thus promoting the repair of articular cartilage, and delaying the process of KOA.

Keywords: dampness-resolving kidney-tonifying (DK) method; dampness-eliminating pain-relieving (DP) decoction; guilu erxian (GE) decoction; knee osteoarthritis; rats

Corresponding author: Professor Li Nan, M. D., Fujian University of Traditional Chinese Medicine, No. 1 Qiuyang Road, Minhoushangjie Street, Fuzhou, 350122. E-mail: mr.linan@126.com

Funding: National Natural Science Foundation of China (No. 81973880), Natural Science Foundation of Fujian Province (No. 2019J01349)

Ethical review: Animal Ethical and Welfare Committee of Fujian University of Traditional Chinese Medicine (No. FUTCM-2019028)

Conflicts of interest: None

膝骨关节炎 (Knee Osteoarthritis, KOA) 是一种常见的慢性骨关节疾病, 主要临床表现为关节疼痛、肿胀、功能障碍, 历代医家将其归属于中医“痹证”的范畴^[1]。调查显示, 随着人口老龄化程度加重, KOA 已经成为危害老年人健康的常见病之一, 年患病率已上升到 8.8%^[2-3]。KOA 病理机制复杂, 炎症反应是 KOA 发生发展的重要环节^[4]。现代研究表明, KOA 滑膜炎症会逐渐导致滑膜增生、肥厚, 不仅会促进关节周围血管增生, 还能使炎症介质及软骨降解酶分泌, 破坏关节软骨, 加快 KOA 的进展^[5]。通过抑制 KOA 患者膝关节炎症反应, 可有效延缓膝关节病理进程的发展, 促进患者肢体功能恢复^[6]。

依据中医理论, “膝者, 筋之府”, 因风寒湿杂至而致瘀血阻络, 加之肝肾亏虚病变日久则合而为痹, 故临床 KOA 治疗当以补益肝肾、祛风除湿、活血化瘀为主^[7]。化湿补肾法中药是由治疗骨关节炎的经方龟鹿二仙胶与我国著名中医骨伤科前辈林如高先生的经验方化湿定痛汤化裁而来, 全方以补益肝肾为主, 辅以祛风除湿、活血化瘀。本研究拟通过观察化湿补肾法对 KOA 大鼠膝关节组织的病理学变化及其相关炎症因子表达的影响, 为临床推广化湿补肾中药治疗 KOA 提供理论依据。

1 材料

1.1 动物

4 月龄 SPF 级 SD 大鼠 48 只, 上海斯莱克实验

动物有限责任公司提供, 合格证号: SCXK(沪) 2017-0005。

1.2 伦理审查

本研究由福建中医药大学实验动物伦理委员会审查通过。动物实验方案设计合理, 实验方法和目的符合人类道德伦理标准和国际惯例, 批准编号: FUTCM-2019028。

1.3 药物

龟鹿二仙胶(龟板胶 9 g、鹿角胶 6 g、人参 6 g、枸杞 9 g)、化湿定痛汤(苍术 6 g、炮山甲 6 g、淮山药 9 g、五加皮 9 g、羌活 6 g、独活 6 g、当归 6 g、肉桂心 1 g、甘草 3 g)、化湿补肾法中药(龟板胶 9 g、鹿角胶 6 g、人参 6 g、枸杞 9 g、苍术 6 g、炮山甲 6 g、淮山药 9 g、五加皮 9 g、羌活 6 g、独活 6 g、当归 6 g、肉桂心 1 g、甘草 3 g) 均为中药颗粒剂, 购于福建中医药大学附属第三人民医院, 由北京康仁堂药业有限公司提供。

1.4 试剂与仪器

伊红染色液(G1080)、苏木素染色液(G1100)、木瓜蛋白酶(G8430)购于北京索莱宝科技有限公司、水合氯醛(C104202)购于上海阿拉丁生化科技有限公司、ELISA 试剂盒、前列腺素-2 (PGE-2, A4504)、白细胞介素-1 β (IL-1 β , F01209)、环氧化和酶-2 (COX-2, F15265)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α , F15870)均购于上海西唐生物科技有限公司。高通

量组织研磨器(宁波新芝),数字显示隔水式电热恒温培养箱(型号 PYX-DHS,上海跃进医疗器械厂),离心机(型号 TGL-168,上海安亭科学仪器厂),酶标仪(型号 DENLEY DRAGON Wellscan MK 3 Thermo),电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司),连续分液器(Tomos Life Science Group)。

2 方法

2.1 造模

采用随机数字表法从48只SD大鼠中分出12只作为空白组,其余大鼠分别在第1、3、7天对膝关节注射4%木瓜蛋白酶造模^[8]。造模结束后分别从空白组和造模组各取4只大鼠,取右侧胫骨平台软骨,观察其形态学改变并用Mankin's评分进行模型鉴定。

2.2 分组及给药

造模成功后将剩余的造模组大鼠随机分为模型组、龟鹿二仙胶组、化湿定痛汤组及化湿补肾法组,每组8只。造模成功后第1天开始给大鼠灌胃,根据人与动物体表面积计算法换算出各药物溶液的灌胃剂量,予空白组和模型组灌胃等量生理盐水,化湿定痛汤组灌胃化湿定痛汤4.68 g/(kg·d),龟鹿二仙胶组灌胃龟鹿二仙胶汤2.70 g/(kg·d),化湿补肾法组灌胃化湿补肾法中药7.38 g/(kg·d),连续4周。

2.3 取材

灌胃4周后采集标本,标本采集前1d各组大鼠禁食不禁水。大鼠腹腔注射10%水合氯醛麻醉后取右侧股骨,置于多聚甲醛中固定24h后,换10%EDTA脱钙液中脱钙6周,2~3d更换1次,脱水后包埋;取右侧胫骨平台软骨、滑膜、关节液,存于液氮中待用。

2.4 HE染色

将存于脱钙液的组织进行常规包埋、切片、烤片、脱蜡入水后,按照HE染色步骤进行染色。

2.5 ELISA检测

滑膜、关节液的取材:20%乌拉坦(5 mL/kg)腹腔注射麻醉大鼠,从大鼠膝关节上方股骨近端0.5 cm处开一小口,1 mL注射器抽取0.1 mL生理盐水注入关节腔内,再将关节液和生理盐水混合物从关节腔内抽吸出注入1.5 mL的EP管内;利用眼科剪顺着剪开的小口打开关节腔暴露滑膜,将其刮取下来放入1.5 mL EP管内。将取出的滑膜和关节液放入-80℃冰箱保存。双抗体夹心法ELISA检测滑膜中的IL-1 β 、TNF- α 和关节液中PGE-2、COX-2含

量。按说明书严格操作,实验结束后,立刻用酶标仪在450 nm处测定每孔对应的吸光度,作标准曲线,并以此计算滑膜中的IL-1 β 、TNF- α 和关节液中的PGE-2、COX-2含量。

2.6 qPCR检测软骨中II型胶原、p38、p53 mRNA的表达

严格按照总RNA提取的试剂盒说明书,取大鼠软骨组织50 mg并提取RNA,紫外分光仪测RNA的质量和浓度,依据 A_{260}/A_{280} 值检测RNA的完整性。再按试剂盒说明书要求配制cDNA需要的反应液,并进行合成反应。Real-time PCR仪中按要求加入配制好的反应体系进行扩增。两种反应体系中,一种加入基因的扩增引物;另一种加入GAPDH扩增引物,最终获得溶解曲线和扩增曲线。最后利用软件分析目的基因的表达量。

2.7 统计方法

本实验数据使用SPSS 20.0应用软件进行统计分析,符合正态分布的计量资料以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,方差齐的多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较采用LSD检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

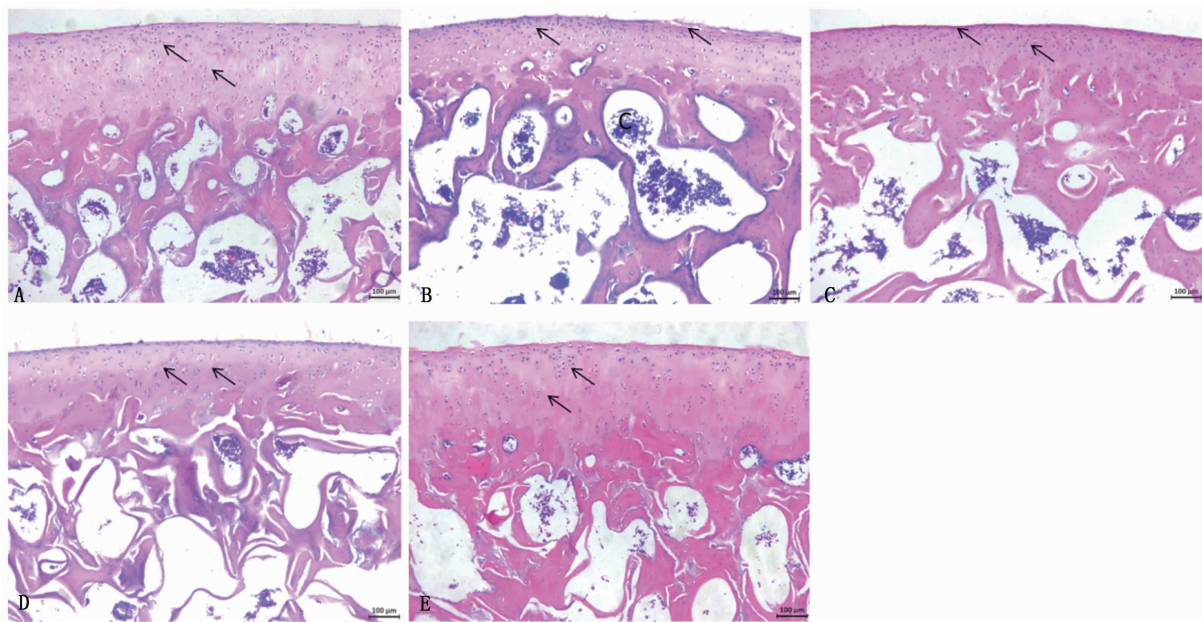
3.1 大鼠膝关节关节炎软骨病理观察

空白组软骨表层光滑、无裂隙,各层细胞排列规则无簇集;模型组软骨表层缺损严重,有裂隙,软骨组织基质染色分布不均,表层软骨细胞大量缺失,移行层软骨细胞成簇聚集,钙化层软骨细胞排列紊乱。结果见图1。与模型组比,空白组Mankin's评分(0.38 ± 0.04)显著低于模型组(6.00 ± 0.71),表明模型组大鼠膝关节软骨损伤严重,造模成功。

龟鹿二仙胶组较模型组软骨表层相对光滑,移行层细胞排列相对紊乱,略有增生(如图1C箭头所示);化湿定痛汤组较模型组软骨表层光滑,移行层细胞排列略紊乱(如图1D箭头所示);化湿补肾法组较龟鹿二仙胶组软骨表层光滑,可见少量受损,各层细胞排列相对均匀(如图1E箭头所示)。

3.2 对大鼠膝关节液中COX-2、PGE-2的影响

与空白组相比,模型组关节液中的COX-2、PGE-2表达量显著升高($P < 0.01$);与模型组相比,化湿定痛汤组、化湿补肾法组关节液中的COX-2、PGE-2表达量显著下降($P < 0.01$);与龟鹿二仙胶组相比,化湿补肾法组关节液中的COX-2、PGE-2表达量较少($P < 0.01$)。结果见表1。



A: 空白组; B: 模型组; C: 化湿定痛汤组; D: 龟鹿二仙胶组; E: 化湿补肾法组。标尺 = 100 μm。

A: Blank group; B: Model group; C: DP group; D: GE group; E: DK group. scale = 100 μm.

图1 各组关节软骨病理结果比较 (HE × 100)

Fig. 1 Comparison of pathological results of articular cartilage in each group (HE × 100)

表1 关节液中炎症指标 COX-2、PGE-2 含量比较

(ng/L; $\bar{x} \pm s$; n = 8)

Table 1 Comparison of the expression of COX2 and PGE2 in synovial fluid of each group (ng/L; $\bar{x} \pm s$; n = 8)

组别 Groups	COX-2	PGE-2
空白组 Blank group	0.142 ± 0.037	0.247 ± 0.081
模型组 Model group	0.406 ± 0.024 **	0.817 ± 0.043 **
化湿定痛汤组 DP group	0.159 ± 0.029###	0.340 ± 0.207###
龟鹿二仙胶组 GE group	0.390 ± 0.072	0.792 ± 0.041
化湿补肾法组 DK group	0.160 ± 0.028###▲▲	0.322 ± 0.015###▲▲
F	72.552	50.697
P	<0.001	<0.001

注:与空白组相比 ** P < 0.01;与模型组相比 ### P < 0.01;与龟鹿二仙胶组相比 ▲▲ P < 0.01。

Note: ** P < 0.01 compared with the blank group; ### P < 0.01 compared with the model group; ▲▲ P < 0.01 compared with GE group.

3.3 对大鼠膝关节滑膜中 IL-1β、TNF-α 的影响

与空白组相比,模型组滑膜中的 IL-1β、TNF-α 表达量显著增加(P < 0.01);与模型组相比,龟鹿二仙胶组滑膜中的 TNF-α 表达量相对较低(P < 0.01),化湿定痛汤组、化湿补肾法组滑膜中的 IL-1β、TNF-α 表达量显著减弱(P < 0.01);与龟鹿二仙

胶组相比,化湿补肾法组滑膜中的 IL-1β、TNF-α 表达量表达量明显降低(P < 0.05)。结果见表2。

表2 滑膜中炎症指标 IL-1β、TNF-α 含量比较

(ng/L; $\bar{x} \pm s$; n = 8)

Table 2 Comparison of the expression of IL-1β and TNF-α in synovial of each group (ng/L; $\bar{x} \pm s$; n = 8)

组别 Groups	IL-1β	TNF-α
空白组 Blank group	22.613 ± 1.709	32.232 ± 2.138
模型组 Model group	46.141 ± 7.285 **	51.201 ± 4.373 **
化湿定痛汤组 DP group	31.950 ± 1.202###	33.080 ± 4.105###
龟鹿二仙胶组 GE group	53.452 ± 4.749	45.473 ± 1.149#
化湿补肾法组 DK group	32.282 ± 8.865###▲▲	35.840 ± 1.708###▲▲
F	40.996	54.648
P	<0.001	<0.001

注:与空白组相比 ** P < 0.01;与模型组相比 #P < 0.05 ### P < 0.01;与龟鹿二仙胶组相比 ▲▲ P < 0.01。

Note: ** P < 0.01 compared with the blank group; #P < 0.05, #P < 0.01 compared with the model group; ▲▲ P < 0.01 compared with GE group.

3.4 对大鼠膝关节软骨中 II 型胶原、p38、p53 表达的影响

与空白组相比,模型组软骨中 II 型胶原表达量减少(P < 0.01),模型组软骨中 p38、p53 表达量增

加($P < 0.01$);与模型组相比,化湿定痛汤组、龟鹿二仙胶组、化湿补肾法组软骨中 II 型胶原表达量增加($P < 0.01$),化湿定痛汤组、龟鹿二仙胶组、化湿补肾法组软骨中 p38、p53 表达量减少($P < 0.01$);

与龟鹿二仙胶组相比,化湿补肾法组软骨中 II 型胶原表达量增加($P < 0.01$),软骨中 p38、p53 表达量降低($P < 0.01$)。结果见表 3。

表 3 软骨中 II 型胶原、p38、p53 mRNA 表达量比较 ($\bar{x} \pm s$; $n = 3$)

Table 3 Comparison of the expression of type II collagen, p38 and p53 in cartilage ($\bar{x} \pm s$; $n = 3$)

组别 Groups	II 型胶原 type II collagen	p38	p53
空白组 Blank group	0.980 ± 0.029	0.922 ± 0.066	0.979 ± 0.040
模型组 Model group	0.213 ± 0.082 **	8.510 ± 0.960 **	9.122 ± 0.282 **
化湿定痛汤组 DP group	0.368 ± 0.063 ###	6.248 ± 0.221 ###	5.230 ± 5.507 ###
龟鹿二仙胶组 GE group	0.553 ± 0.051 ###	5.083 ± 0.213 ###	4.625 ± 1.143 ###
化湿补肾法组 DK group	0.619 ± 0.046 ###▲▲	3.262 ± 0.456 ###▲▲	3.214 ± 0.168 ###▲
F	139.827	199.623	858.097
P	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白组相比 ** $P < 0.01$;与模型组相比 ### $P < 0.01$;与龟鹿二仙胶组比 ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ 。

Note: ** $P < 0.01$ compared with the blank group; ### $P < 0.01$ compared with the model group; ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ compared with GE group.

4 讨论

龟鹿二仙胶具有补养肝肾、益精养血的功效,利用该方治疗膝关节炎临床疗效较好^[9~11]。本课题组前期已经证实龟鹿二仙胶可逆转软骨表型化的骨髓基质干细胞(BMSCs)凋亡^[12],促进软骨细胞增殖^[13]。虽然龟鹿二仙胶疗效显著,但我们也发现,对于一些由于膝关节过度使用而导致 KOA 反复发作的老年患者而言,龟鹿二仙胶起效时间往往在 45 d 左右,患者常不易坚持,究其原因,这与 KOA 的病理过程有关。现代研究表明,滑膜炎是加重 KOA 的重要因素^[14]。一方面,老年人随着年龄的增长,软骨基质大量流失,软骨分解合成代谢的失衡加速了关节活动过程中软骨的磨损,软骨碎屑落入关节腔中刺激滑膜,产生炎症^[15~16];另一方面,滑膜细胞分泌大量的炎症因子也会进一步刺激软骨,导致软骨细胞的损伤^[17]。

从中医理论来看,老年患者素体肝肾亏虚,易感风寒湿邪。寒湿侵络,留滞于关节,阻遏气机,导致患者体内气机升降失调,阳气不布,肌肤麻木;气血运行不畅,骨节酸痛。因此临床上以化湿散瘀与补益肝肾相结合,即化湿补肾法,能大大增强治疗 KOA 的疗效。

龟鹿二仙胶是治疗骨关节炎的常用方,而化湿定痛汤则是我国岭南地区著名的中医骨伤科前辈林如高的经验方,该方用于关节酸痛,痛有定处,屈伸不利,肌肤麻木的患者。化湿补肾法中药由两方化

裁而来,旨在补益肝肾的基础之上辅以化湿散瘀,标本兼治,从而缩短治疗 KOA 起效的时间。化湿补肾法中药以龟板胶和鹿角胶为君药,龟板胶强筋健骨、滋阴潜阳,鹿角胶补益肾阳、益肾壮骨,两味中药一阴一阳,互根互用,发挥大补肾阳、益肾健骨之功;人参可大补阳气、助鹿角胶补益肝肾之阳,枸杞善于滋阴、助龟板胶补益肝肾之阴,是为臣药;五加皮、羌活、独活、苍术祛风湿,散表寒,利关节;当归、炮山甲活血补血,化瘀定痛,是为佐药;肉桂心、甘草温通血脉,散寒止痛;淮山药补脾益胃,固后天之本,为使药。全方共奏补益肝肾、化湿散瘀、温经止痛之功。本实验研究发现,空白组软骨表层光滑、无裂隙,各层细胞排列规则;模型组表层缺损严重,有裂隙,软骨组织基质染色分布不均,表层软骨细胞大量缺失,移行层软骨细胞成簇聚集,钙化层软骨细胞排列紊乱。龟鹿二仙胶组较模型组软骨表层破坏相对较轻,移行层相对完整,细胞排列相对紊乱,略有增生;化湿补肾法组较龟鹿二仙胶组软骨表层较为光滑,可见少量受损,各层细胞排列相对均匀,说明化湿补肾法组治疗 KOA 疗效优于龟鹿二仙胶组。

KOA 急性发作期,滑膜衬里细胞分泌大量促使软骨基质降解的炎症介质^[18]。多年研究表明,滑膜和软骨中分泌的 IL-1 家族炎症因子以 IL-1 β 为主,其在关节腔中的高表达会直接损伤软骨细胞^[19]。KOA 患者急性发作期的滑膜中,滑膜巨噬细胞会大量活化,分泌出 TNF- α 等炎症因子也可导致软骨损

伤^[20-21]。Alkofahi M 等^[22]研究发现 IL-1 β 、TNF- α 等炎症介质可以诱导 COX-2 大量表达,其与前列腺素合成酶(PGES)结合形成 PGE-2 不仅可导致膝关节周围血管扩张、增生,产生疼痛、肿胀,同时还会降低软骨细胞中 II 型胶原表达、减少关节软骨细胞的合成代谢^[23-24]。此外,早期骨关节炎软骨细胞中的炎症因子也可促进 p38 的大量表达,进而激活 MAPK 通路下游凋亡因子 p53,增加关节组织中 COX-2、PGE-2 表达,造成膝关节内环境紊乱,关节滑膜炎与软骨退变相互影响,最终形成恶性循环,加快疾病的进展^[25-26]。本研究结果发现,与龟鹿二仙胶组相比,化湿补肾法组的关节滑膜中 TNF- α 表达量较低,证明龟鹿二仙胶的基础上加入化湿定痛汤的组方药物能明显减少膝关节的滑膜和关节液炎症因子表达;化湿补肾法组的软骨中 II 型胶原的表达高于龟鹿二仙胶,说明化湿定痛汤的组方药物可助龟鹿二仙胶修复软骨。化湿补肾法组对膝关节软骨中的 p38、p53 含量低于龟鹿二仙胶组,证明化湿定痛汤的组方能助龟鹿二仙胶修复关节软骨与其抑制 MAPK 凋亡因子释放有关。

综上,化湿补肾法一方面可减少滑膜中炎症介质 IL-1 β 、TNF- α 的释放,降低 COX-2 的表达,减少 PGE-2 的合成,从而减轻关节周围组织炎症,缓解膝关节疼痛;另一方面,化湿补肾法能减少关节软骨组织中 p38 的表达,进而减少 MAPK 通路下游凋亡相关因子 p53 释放,减少软骨细胞凋亡,最终达到治疗目的,但具体的作用机制仍有待进一步研究。

参考文献:

[1] 蒲晓东,杨艳梅. 膝骨关节炎中医病名再辨识[J]. 时珍国医国药,2017,28(12):2972-2973.
Pu XD, Yang YM. Re-identification of the TCM sickness name of knee osteoarthritis[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2017,28(12):2972-2973.

[2] Cleveland RJ, Alvarez C, Schwartz TA, et al. The impact of painful knee osteoarthritis on mortality: a community-based cohort study with over 24 years of follow-up[J]. Osteoarthritis and Cartilage, 2019,27(4):593-602.

[3] Liu Q, Wang S, Lin J, et al. The burden for knee osteoarthritis among Chinese elderly: estimates from a nationally representative study[J]. Osteoarthritis and Cartilage, 2018,26(12):1636-1642.

[4] Liu-Bryan R, Terkeltaub R. Emerging regulators of the inflammatory process in osteoarthritis[J]. Nature Reviews Rheumatology, 2015,11(1):35-44.

[5] 曾明珠,段戡,袁长深,等. 不同分期骨关节炎滑膜细胞

中 COX-2 mRNA 表达的差异[J]. 中国组织工程研究, 2014,18(7):1003-1008.

Zeng MZ, Duan K, Yuan CS, et al. COX-2 mRNA expression at different stages of osteoarthritis synoviocytes[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2014,18(7):1003-1008.

[6] Estell EG, Silverstein AM, Stefani RM, et al. Cartilage wear particles induce an inflammatory response similar to cytokines in human fibroblast-like synoviocytes[J]. Journal of Orthopaedic Research, 2019,37(9):1979-1987.

[7] 李具宝,张磊,屈尚可,等. 膝骨关节炎近 10 年文献中内服方药功效和中医证型分析[J]. 中国中医骨伤科杂志,2014,22(3):20-21.
Li JB, Zhang L, Qu SK, et al. Analysis of the effect of oral prescription and syndrome type of traditional Chinese medicine for knee osteoarthritis in recent 10 years[J]. Chinese Journal of Traditional Medical Traumatology & Orthopedics, 2014,22(3):20-21.

[8] 汪宗保,徐亚林,廖威明,等. 木瓜蛋白酶诱导大鼠膝早期骨关节炎软骨表面的电镜扫描[J]. 中国组织工程研究,2014,18(2):177-182.
Wang ZB, Xu YL, Liao WM, et al. Cartilage surface of early osteoarthritis in rats induced by papain under scanning electron microscope[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2014,18(2):177-182.

[9] 林嘉辉,陈炳李,李楠. 龟鹿二仙胶治疗骨关节炎的研究概况[J]. 中华中医药杂志,2017,32(12):5509-5512.
Ling JH, Chen BY, Li N. General research on Guilu Erxian Glue in treating osteoarthritis[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2017,32(12):5509-5512.

[10] 李文顺,李楠,余丹丹. 龟鹿二仙胶汤治疗膝骨性关节炎的临床研究[J]. 福建中医学院学报,2005,15(6):30-32.
Li WS, Li N, Yu DD, et al. Clinical Study of Guilu Erxian Decoction in Treating Knee Osteoarthritis[J]. Journal of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, 2005,15(6):30-32.

[11] 张农. 龟鹿二仙胶治疗老年增生性骨关节炎的临床观察[J]. 中医临床研究,2012,4(13):79-80.
Zhang N. Clinical observation on treating proliferative osteoarthritis in elderly with Guilu Erxian capsule[J]. Clinical Journal of Chinese Medicine, 2012,4(13):79-80.

[12] 李文顺,李楠,王和鸣,等. 龟鹿二仙胶汤含药血清对体外软骨细胞表型 BMSCs 凋亡的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志,2009,17(1):5-7.
Li WS, Li N, Wang HM, et al. Effects of Guilu Erxian Decoction serum on apoptosis of chondrogenic phenotype bone marrow-derived mesenchymal stem cell in vitro[J]. Chinese Journal of Traditional Medical Traumatology & Orthopedics, 2009,17(1):5-7.

[13] 王和鸣,余丹丹,汤亭亭,等. 龟鹿二仙胶汤及其拆方对关节软骨细胞增殖的作用[J]. 中国中医骨伤科杂志,2007,15(7):45-49.
Wang HM, Yu DD, Tang TT, et al. Effects of Guilu Erx-

- ianjiao Formula and its sub-formula on proliferation of chondrocyte in rats [J]. Chinese Journal of Traditional Medical Traumatology & Orthopedics, 2007, 15 (7): 45 - 49.
- [14] Felson DT, Niu J, Neogi T, et al. Synovitis and the risk of knee osteoarthritis: the most study [J]. Osteoarthritis & Cartilage, 2016, 24 (3): 458 - 464.
- [15] 张栋, 王庆甫, 石鑫超, 等. 膝骨关节炎肌骨超声与 X 线片表现的比较与分析 [J]. 中国骨伤, 2016, 29 (5): 429 - 433.
- Zhang D, Wang QF, Shi XC, et al. Analysis and comparison about musculoskeletal ultrasonography and X-ray of knee osteoarthritis [J]. China Journal of Orthopaedics and Traumatology, 2016, 2 (5): 429 - 433.
- [16] 王庆甫, 马玉峰, 殷岳衫, 等. 低频超声促透中药对兔膝关节炎细胞因子的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2013, 36 (2): 108 - 112, 146.
- Wang QF, Ma YF, Ying YS, et al. Influence of low-frequency ultrasound for enhancing permeation of Chinese medicinal on cytokines in rabbits with knee osteoarthritis [J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2013, 36 (2): 108 - 112, 146.
- [17] Tan CJ, Zhang JH, Chen WL, et al. Inflammatory cytokines via up-regulation of aquaporins deteriorated the pathogenesis of early osteoarthritis [J]. PloS One, 2019, 14 (8): e0220846.
- [18] 杨威, 康武林, 袁普卫, 等. 滑膜炎在骨关节炎发病机制中作用的研究进展 [J]. 中国康复理论与实践, 2015, 21 (5): 530 - 533.
- Yang W, Kang WL, Yuan PW, et al. Role of synovitis in pathogenesis of osteoarthritis (review) [J]. Chinese Journal of Rehabilitation Theory and Practice, 2015, 21 (5): 530 - 533.
- [19] 王红权, 詹杰. 白细胞介素家族在骨关节炎中的表达意义 [J]. 现代免疫学, 2016, 36 (3): 261 - 264.
- Wang HQ, Zhang J. Expression significance of interleukin-family in osteoarthritis [J]. Current Immunology, 2016, 36 (3): 261 - 264.
- [20] Liu B, Zhang M, Zhao J, et al. Imbalance of M1 /M2 macrophages is linked to severity level of knee osteoarthritis [J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2018, 16 (6): 5009 - 5014.
- [21] Kraus VB, McDaniel G, Huebner JL, et al. Direct in vivo evidence of activated macrophages in human osteoarthritis [J]. Osteoarthritis and Cartilage, 2016, 24 (9): 1613 - 1621.
- [22] Alkofahi M, Becker F, Gavins FNE, et al. IL-1 β reduces tonic contraction of mesenteric lymphatic muscle cells, with the involvement of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 [J]. British Journal of Pharmacology, 2015, 172 (16): 4038 - 4051.
- [23] 谢辉晋, 杜远立. 骨关节炎相关细胞因子作用机制研究进展 [J]. 重庆医学, 2011, 40 (4): 395 - 398.
- Xie HJ, Du YL. Research progress in the mechanism of action of osteoarthritis-related cytokines [J]. Chongqing Medicine, 2011, 40 (4): 395 - 398.
- [24] 窦鹏程. 四种药物对骨关节炎滑膜成纤维细胞分泌 IL-1 β 、MMP-13、PGE2 的影响 [D]. 长沙: 中南大学, 2012.
- Dou PC. Effects of four drugs on levels of IL-1 β , MMP-13 and PGE2 secreted by OA synovial fibroblast [D]. Changsha: Central South University, 2012.
- [25] Bonnet CS, Williams AS, Gilbert SJ, et al. AMPA/kainate glutamate receptors contribute to inflammation, degeneration and pain related behaviour in inflammatory stages of arthritis [J]. Annals of the rheumatic diseases, 2015, 74 (1): 242 - 251.
- [26] 高世超, 殷海波, 刘宏潇, 等. MAPK 信号通路在骨关节炎发病机制中的研究进展 [J]. 中国骨伤, 2014, 27 (5): 441 - 444.
- Gao SC, Yin HB, Liu HX, et al. Research progress on MAPK signal pathway in the pathogenesis of osteoarthritis [J]. China Journal of Orthopedics and Traumatology, 2014, 27 (5): 441 - 444.

(收稿日期: 2020-08-09)