

长针透刺膝骨关节炎模型大鼠滑膜组织中基质金属蛋白酶抑制剂1水平的变化

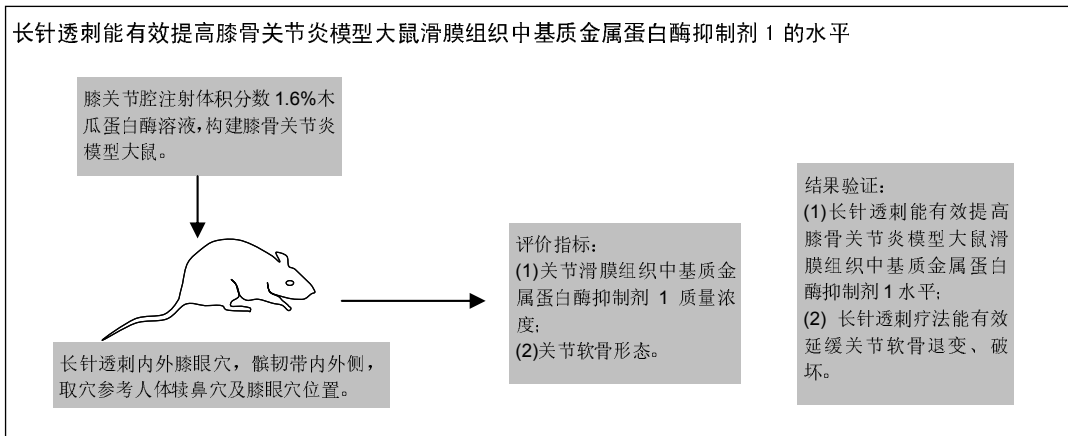
李石胜, 吴耀持, 张峻峰(上海市第六人民医院针推伤科, 上海市 200233)

引用本文: 李石胜, 吴耀持, 张峻峰. 长针透刺膝骨关节炎模型大鼠滑膜组织中基质金属蛋白酶抑制剂1水平的变化[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(18):2609-2614.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.18.004

ORCID: 0000-0001-5784-1909(吴耀持)

文章快速阅读:



李石胜, 男, 1982 年生, 江西省人, 汉族, 2010 年上海中医药大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事针灸推拿对颈肩腰腿痛的治疗。

通讯作者: 吴耀持, 硕士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 上海市第六人民医院针推伤科, 上海市 200233

中图分类号: R318

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2016)18-02609-06

稿件接受: 2016-02-01

http://www.crter.org

文题释义:

长针透刺: 用 0.3 mm×125.0 mm 规格的毫针透刺大鼠内外膝眼穴, 取穴位置参考人体犊鼻穴及膝眼穴位置。由外膝眼进针, 进针时先垂直进针, 透过皮肤后改变针刺方向, 向内膝眼方向进行透刺, 当针尖抵达内膝眼皮下时停止进针, 然后施以捻转补泻手法, 以手下有沉紧感及看到大鼠下肢微微抽动为度, 每次 20 min, 每隔 2 d 针刺 1 次, 留针期间行捻转平补平泻。

滑膜组织中基质金属蛋白酶抑制剂 1: 当发生膝骨关节炎时, 滑膜组织中基质金属蛋白酶抑制剂 1 和基质金属蛋白酶 3 失衡, 基质金属蛋白酶抑制剂 1 活性降低, 基质金属蛋白酶 3 活性增高, 表现出裂解软骨细胞的活性, 从而导致关节软骨及滑膜组织等退变和破坏。

摘要

背景: 基质金属蛋白酶抑制剂 1 在抑制关节退变、破坏方面有重要作用。

目的: 观察长针透刺治疗大鼠膝骨关节炎后, 大鼠滑膜组织中基质金属蛋白酶抑制剂 1 水平变化。

方法: 将 40 只 SD 大鼠随机分成正常组、长针透刺组、药物组及模型组, 每组 10 只, 通过向 SD 大鼠膝关节腔内注射 1.6% 木瓜蛋白酶溶液并驱赶大鼠活动造模, 2 周后建立膝骨关节炎模型。正常组与模型组不干预, 长针透刺组用 0.3 mm×125.0 mm 的毫针透刺大鼠内外膝眼穴, 药物组将透明质酸钠向关节腔内注射。

结果与结论: ①ELISA 法检测: 治疗 4 周后, 正常组大鼠滑膜组织中基质金属蛋白酶抑制剂 1 水平高于模型组 ($P < 0.05$), 长针透刺组及药物组大鼠滑膜组织中基质金属蛋白酶抑制剂 1 水平高于模型组 ($P < 0.05$)。②结果证实, 长针透刺能有效提高膝骨关节炎模型大鼠滑膜组织中基质金属蛋白酶抑制剂 1 水平。

关键词:

动物模型; 骨软骨损伤与修复动物模型; 基质金属蛋白酶抑制剂 1; 骨关节; 膝骨关节炎; 长针透刺; 大鼠; 骨关节炎; 透明质酸钠; 针灸; 透刺; 基质金属蛋白酶

主题词:

组织工程; 模型, 动物; 膝关节

基金资助:

上海市第六人民医院院级课题(院内-1528)

Li Shi-sheng, Master,
Attending physician,
Department of
Acupuncture and Massage
Traumatology, Shanghai
Sixth People's Hospital,
Shanghai 200233, China

Corresponding author: Wu
Yao-chi, Master, Professor,
Chief physician, Doctoral
supervisor, Department of
Acupuncture and Massage
Traumatology, Shanghai
Sixth People's Hospital,
Shanghai 200233, China

Effect of long needle penetration needling on matrix metalloproteinase inhibitor 1 in the synovium of knee osteoarthritis model rats

Li Shi-sheng, Wu Yao-chi, Zhang Jun-feng (Department of Acupuncture and Massage Traumatology, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China)

Abstract

BACKGROUND: Matrix metalloproteinase inhibitor 1 plays an important role in the inhibition of articular cartilage degeneration and destruction.

OBJECTIVE: To observe the changes of matrix metalloproteinase inhibitor 1 expression level in synovium of knee osteoarthritis rats after treated with penetration needling of long needle.

METHODS: A total of 40 Sprague-Dawley rats were randomly assigned into normal group, penetration needling group, drug group and model group, with 10 rats in every group. 1.6% papain solution was injected into knee joint cavity of Sprague-Dawley rats. 2 weeks later, knee osteoarthritis models were established. Rats in the normal and model groups did not receive any intervention. In the penetration needling group, rats were treated by penetration needling with 0.3 mm×125.0 mm filiform needle. Rats in the drug group were intraarticularly injected with sodium hyaluronate.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Enzyme linked immunosorbent assay: at 4 weeks after treatment, matrix metalloproteinase inhibitor 1 expression in synovial membrane was higher in the normal group than in the model group ($P < 0.05$). Matrix metalloproteinase inhibitor 1 expression in synovial membrane was higher in the penetration needling group and drug group than in the model group ($P < 0.05$). (2) Results verified that long needle penetration therapy can effectively increase matrix metalloproteinase inhibitor 1 expression in synovial membrane of knee osteoarthritis model rats.

Subject headings: Tissue Engineering; Models, Animal; Knee Joint

Funding: the Hospital Project of Shanghai Sixth People's Hospital, No. Yuannei-1528

Cite this article: Li SS, Wu YC, Zhang JF. Effect of long needle penetration needling on matrix metalloproteinase inhibitor 1 in the synovium of knee osteoarthritis model rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(18):2609-2614.

0 引言 Introduction

骨关节炎是一种多因素引起的以关节软骨退行性变为基本病理改变的疾病,而膝骨关节炎是骨关节炎中最常见的一种疾病。已有研究证实,造成关节软骨破坏的1个重要原因是软骨细胞外基质的合成与降解失衡^[1]。基质金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)是基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)活性的特异性抑制剂,基质金属蛋白酶3是基质金属蛋白酶大家族中的一员,参与细胞外基质的降解,对关节软骨基质中的蛋白多糖具有高度的裂解活性^[2],在关节软骨破坏,尤其是骨关节炎的病理过程起着重要的作用^[3-4],是膝骨关节炎的重要致病因素之一^[5-7]。而基质金属蛋白酶抑制剂1与基质金属蛋白酶3分子结合成不可逆的1:1非共价键结合的复合物,是基质金属蛋白酶3的特异性抑制剂,能有效抑制基质金属蛋白酶3的活性。在正常情况下,基质金属蛋白酶抑制剂1/基质金属蛋白酶3保持平衡,当发生膝骨关节炎时,基质金属蛋白酶抑制剂1/基质金属蛋白酶3失衡,基质金属蛋白酶抑制剂1活性降低,基质金属蛋白酶3活性增高^[8],表现出裂解软骨细胞的活性,从而导

致关节软骨及滑膜组织等退变和破坏。

膝骨关节炎好发于中老年人群^[9],在中国已经有1亿多60岁以上的人群,而有超过5 000万人患有膝骨关节炎,其最终的致残率也超过50%,除严重影响患者的生活质量,给家庭带来巨大的经济负担外,给当今社会也带来了严重的负担,已经成为影响中老年人群生活质量甚至威胁生命的重大疾病。因此,要想提高中老年人群的生活质量,减轻社会负担,必须重视中老年人群膝骨关节炎的诊治。大量临床及实验研究表明温针、电针等能有效改善膝骨关节炎临床症状、延缓关节软骨退变^[10-11]。有关以长针透刺作为干预手段的研究却很少有报道,仅有张必萌等^[12]从临床研究证实了长针透刺能有效改善膝骨关节炎临床症状,减轻患者病痛,尚无相关长针透刺治疗膝骨关节炎的实验研究的报道,故缺乏长针透刺治疗膝骨关节炎的有效理论依据。

实验采用膝关节腔内注射体积分数1.6%木瓜蛋白酶溶液的方法,在较短时间内就可得到稳定的膝骨关节炎模型,从而采用动物实验方法探讨长针透刺疗法治疗膝骨关节炎的作用原理,通过在光学显微镜下观察长针透刺治疗后大鼠关节软骨组织形态学变化,及从分子生

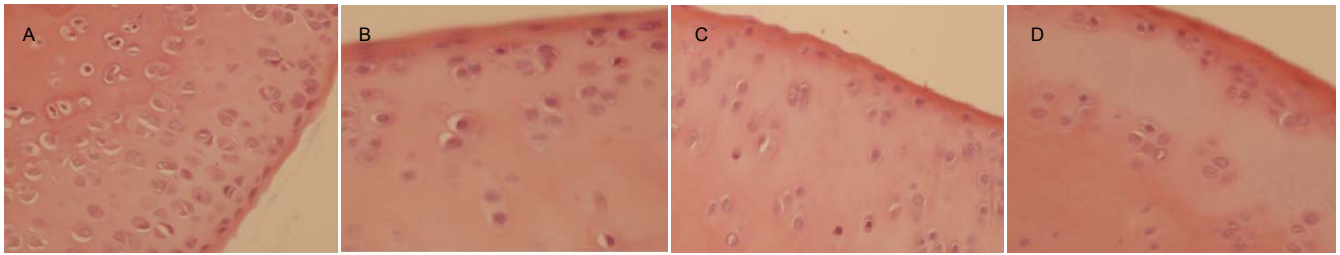


图1 各组大鼠关节软骨组织形态(苏木精-伊红染色, 光学显微镜, $\times 400$)

Figure 1 Histomorphology of articular cartilage of rats in each group (hematoxylin-eosin staining, light microscope, $\times 400$)

图注: 图中A为正常组, 关节面光滑, 软骨细胞数目多, 排列整齐, 层次分明; B为长针透刺组, 关节面有脆裂, 软骨细胞数目稍减少, 排列尚整齐, 可见少量凋亡的软骨细胞, 层次尚清晰; C为药物组, 关节面有脆裂, 软骨细胞稍减少, 排列尚整齐, 可见少量凋亡的软骨细胞, 层次清晰可辨; D为模型组关节软骨层薄而粗糙, 软骨细胞数目少, 排列散乱, 可见大量凋亡的软骨细胞, 层次不清。

物学角度通过ELISA方法, 观察长针透刺治疗膝骨关节炎过程中基质金属蛋白酶抑制剂1水平的变化, 通过对以上两方面进行观察, 希望能为临床上长针透刺治疗膝骨关节炎提供可靠而有力的理论依据, 从而为在临床推广使用提供依据, 为广大患者减轻痛苦同时, 也减轻经济负担。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 造模动物及材料 清洁级3月龄雄性SD大鼠40只, 其中30只用于造模, 10只设为空白对照组, 均由上海西普尔一必凯实验动物公司提供, 合格证号: SCXK(沪)2008-0016。

1.2 造模方法 将40只SD大鼠随机分为正常组、长针透刺组、药物组及模型组, 每组10只。

长针透刺组、药物组及模型组均采用日本鬼头康彦教授的造模方法制备膝骨关节炎大鼠模型^[13], 向大鼠膝关节腔内注入1.6%木瓜蛋白酶溶液(美国Sigma), 并驱赶大鼠在特制鼠笼内跑动, 使其膝关节达到较高强度的主动运动。1.6%木瓜蛋白酶溶液具体配置方法: ①用电子天平分别称取1.6 g NaCl, 0.04 g NaOH, 0.72 g Na_2HPO_4 , 0.05 g NaH_2PO_4 , 15 mg EDTA-2Na, 0.64 g 木瓜蛋白酶; ②用量筒量取双蒸水32 mL; ③将1.6 g NaCl, 0.04 g NaOH, 0.72 g Na_2HPO_4 , 0.05 g NaH_2PO_4 溶于32 mL双蒸水中, 并轻轻搅拌使其充分溶解; ④加入NaOH, 并用试纸调节pH值至8.0; ⑤分别加入15 mg EDTA-2Na, 0.64 g 木瓜蛋白酶, 并轻轻搅拌使其溶解, 得到淡黄色液体, 测其pH值; ⑥加入HCl调节pH值至6.5, 并以双蒸水定溶至40 mL, 低温4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。造模具体操作步骤: 使大鼠膝关节向后屈曲 95° - 100° , 使关节腔间隙充分打开, 关节腔处于最大位置, 然后分别于第1, 3, 7天注入1.6%木瓜蛋白酶溶液0.1 mL, 每天迫使造模的

SD大鼠在特制鼠笼内跑动30 min, 2周后可以得到稳定的膝骨关节炎模型。正常组不做任何处理。

1.3 造模成功的检测标准 关节软骨组织学的Mankin评分^[14]: 0分为关节面光滑, 色泽正常; 1分为关节面粗糙, 且有小的裂隙, 色泽灰暗; 2分为关节面糜烂, 软骨缺损深达软骨中层; 3分为关节面溃疡形成, 缺损深达软骨深层; 4分为软骨剥脱, 软骨下骨暴露。

1.4 干预方法 参照2009年由中国国家标准化管理委员会主编中国标准出版社出版的《针灸技术操作规范第20部分: 毫针基本刺法(GB/T 21709.20-2009)》^[15]。长针透刺组用0.3 mm \times 125.0 mm规格的毫针(苏州华佗牌医疗器械中外合资有限公司)透刺大鼠内外膝眼穴(髌韧带内外侧, 具体取穴参考人体犊鼻穴及膝眼穴位置), 由外膝眼进针, 进针时先垂直进针, 透过皮肤后改变针刺方向, 向内膝眼方向进行透刺, 当针尖抵达内膝眼皮下时停止进针, 然后施以捻转补泻手法, 以手下有沉紧感及看到大鼠下肢微微抽动为度, 每次20 min, 每隔2 d针刺1次, 留针期间行捻转平补平泻, 大鼠装入特制装备中(长约6 cm、直径约为3 cm软PVC管), 使其前肢和后肢在管外, 躯干置于管中, 无需麻醉或捆绑。药物组将0.1 mL透明质酸钠溶液(山东正大福瑞达制药有限公司)注入SD大鼠膝关节腔内, 每周1次, 具体操作步骤同造模时注射体积分数1.6%木瓜蛋白酶溶液, 治疗疗程为4周。

1.5 标本的采集与保存 采用麻醉后颈椎脱位方法将实验大鼠处死, 将大鼠四肢固定在固定板上, 膝关节局部备皮、消毒, 然后逐层切开皮肤、浅筋膜、肌肉层、深筋膜, 刀口长3.0-4.0 cm, 用咬骨钳取下整个膝关节(附带股骨1 cm、胫腓骨1 cm), 固定, 分切, 脱钙, 石蜡包埋, 分别作矢状面内、中、外和冠状面前、中、后1/3切片, 片厚8 μm 。

1.6 苏木精-伊红染色 取膝关节软骨置于体积分数10%中性甲醛溶液中固定24 h, 分组标记。室温25℃下, 体积分数15%EDTA-2Na脱钙液中脱钙, 每隔8-12 h观察组织被脱钙的程度, 刀沿所需的切面修切确定脱钙已经完全, 包埋用DQP-9010型轮转式切片机制备4 μm厚的石蜡切片, 苏木精-伊红染色, 先将染色好的载玻片置于×100的低倍镜下, 在视野中找到物像(膝关节软骨组织及软骨细胞), 再置于×400的高倍镜下观测大鼠膝关节软骨组织及软骨细胞。

1.7 双抗体夹心ELISA法检测各组基质金属蛋白酶抑制剂1水平 治疗4周后, 采用麻醉后颈椎脱位法处死各组SD大鼠, 然后用咬骨钳取下膝关节, 可见由髌骨下缘向上延缓有一层平滑光亮呈淡黄色的滑膜组织, 完整剥离滑膜组织, 最后以眼科镊轻轻夹住其游离端, 用刀片完整切下, 用甲醛溶液固定, 包埋, 切片, 取50 mg滑膜组织及Trizol试剂于1.5 mL的离心管中, 于4℃下1 000×g离心20 min, 提取上清液, 于4℃下密封保存3 d。用包被缓冲液将基质金属蛋白酶抑制剂1抗体稀释至蛋白质水平为5 mg/L, 向96孔酶标板反应孔中加0.1 mL, 制成固相载体, 再通过加样及反复几次洗板后, 再向酶标板反应孔中加入新鲜稀释的基质金属蛋白酶抑制剂1抗体, 再次彻底洗板, 然后加入TMB底物液显色0.1 mL, 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色, 再于各反应孔中加入终止液0.05 mL, 在终止液的作用下转化成最终的黄色, 将酶标板在酶标仪上, 于紫外线450 nm波长下测定吸光度(A)值, 读数输出到Excel表格中, 用UV-Vis方法检测上清液中总蛋白水平, 最终各组滑膜组织基质金属蛋白酶抑制剂1质量浓度用μg/L表示。

1.8 主要观察指标 各组关节滑膜组织中基质金属蛋白酶抑制剂1质量浓度及关节软骨形态。

1.9 统计学分析 计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用SPSS 20.0统计学软件进行数据分析, 多组间数据差异比较采用单因素方差分析和Tukey检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 造模成功动物数量及过程 纳入大鼠40只, 均进入结果分析, 无死亡和感染, 无脱失值, 最终计入结果分析的数量为40只。

2.2 模型创新性 在注射1.6%木瓜蛋白酶溶液后制作专门的供大鼠跑动的鼠笼。

2.3 模型稳定性 此种方法造模简短, 且更易构建较

严重的稳定的膝关节炎模型。

2.4 各组大鼠关节软骨组织形态 光学显微镜下可见, 正常组关节软骨结构层次分明, 软骨细胞数目多, 排列整齐密集, 未见凋亡的软骨细胞, 可见完整的潮线(图1A); 长针透刺组软骨结构层次清晰可见, 软骨表面有脆裂, 软骨细胞数目稍减少, 排列尚整齐, 可见少量凋亡的软骨细胞, 潮线尚完整(图1B); 药物组软骨结构层次清晰可辨, 软骨表面有脆裂, 软骨细胞稍减少, 排列尚整齐, 可见少量凋亡的软骨细胞, 潮线尚完整(图1C); 模型组软骨结构层次不清, 软骨层薄而粗糙, 软骨细胞数目少, 排列散乱, 可见大量凋亡的软骨细胞, 潮线不完整(图1D)。

2.5 各组大鼠滑膜组织基质金属蛋白酶抑制剂1质量浓度变化 正常组较模型组大鼠滑膜组织中基质金属蛋白酶抑制剂1质量浓度显著升高($P < 0.05$), 模型组较长针透刺组及药物治疗组大鼠滑膜组织中基质金属蛋白酶抑制剂1质量浓度显著降低($P < 0.05$), 而长针透刺组与药物组相比较, 两组大鼠滑膜组织中基质金属蛋白酶抑制剂1质量浓度差异无显著性意义($P > 0.05$), 见表1。

表1 各组大鼠滑膜组织基质金属蛋白酶抑制剂1质量浓度及大鼠滑膜组织 Makin 评分 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)
Table 1 Matrix metalloproteinase inhibitor 1 mass concentration and Makin score in the synovial membrane of rats from each group

组别	基质金属蛋白酶抑制剂1 (μg/L)	Makin 评分(分)
正常组	24.54±0.89 ^a	0.49±0.47 ^a
模型组	11.63±0.97	3.12±1.34
长针透刺组	19.72±1.26 ^a	1.86±0.93 ^a
药物组	21.47±1.35 ^a	1.57±0.89 ^a

表注: 与模型组比较, ^a $P < 0.05$ 。

由表1可见, 模型组关节滑膜组织中的基质金属蛋白酶抑制剂1水平明显低于正常组($P < 0.05$), 说明模型制备成立; 与模型组比较, 长针透刺组及药物组能明显升高关节滑膜组织中基质金属蛋白酶抑制剂1水平($P < 0.05$), 提示长针透刺能提高膝关节炎模型大鼠关节滑膜组织中基质金属蛋白酶抑制剂1水平。

2.6 各组大鼠膝关节软骨组织学评分 与正常组比较, 模型组Makin评分明显升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 长针透刺组Makin评分明显降低($P < 0.05$); 长针透刺组与药物组比较, 两组之间差异无显著性意义($P > 0.05$), 见表1。

2.7 不良反应分析 实验过程中大鼠出现的不良反应有出血、皮下血肿, 考虑以下原因引起可能: 所用毫针为正常人体所制备, 而大鼠膝关节相对人体膝关节太小, 毫针相对就偏粗, 故下针容易碰到脉细血管等小血管, 从而引起出血、皮下血肿, 取针时用消毒干棉球轻轻按压1 min后出血停止, 血肿消失。

3 讨论 Discussion

基质金属蛋白酶抑制剂由滑膜及软骨细胞合成, 是一组抑制基质金属蛋白酶活性的多功能因子家族, 由多基因家族成员组成。基质金属蛋白酶是细胞外基质降解及重构最主要的酶, 可以消化分解细胞外所有的基质大分子, 促进关节的退变、剥脱及缺损, 从而导致膝骨关节炎的产生, 而机体内存在天然激活剂和抑制剂, 其活性受基质金属蛋白酶抑制剂 S 调控^[16-17]。目前在人体内发现 4 种特异性基质金属蛋白酶抑制剂, 其中基质金属蛋白酶抑制剂 1 与基质金属蛋白酶的催化区以 1:1 比例可逆性结合, 抑制基质金属蛋白酶活性。基质金属蛋白酶抑制剂和基质金属蛋白酶之间的平衡作用将决定蛋白酶被激活后是否能够起作用。正常情况下, 基质金属蛋白酶抑制剂 1 与基质金属蛋白酶家族中的基质金属蛋白酶 3 之间保持动态平衡, 基质金属蛋白酶抑制剂 1 能有效抑制基质金属蛋白酶 3 对基质蛋白质的降解^[18-19]。膝骨关节炎时, 软骨细胞和滑膜细胞分泌基质金属蛋白酶 3 的量大于基质金属蛋白酶抑制剂 1, 致使基质金属蛋白酶 3/基质金属蛋白酶抑制剂 1 失衡, 导致软骨细胞的降解超过了软骨细胞的合成, 出现软骨细胞大量凋亡, 从而导致关节退变和破坏^[20]。

长针透刺法是在传统的针灸疗法的基础上发展起来的针刺方法^[21-22], 乃仿古之恢刺、关刺之法, 能一针透多经(多穴), 其不仅有普通单穴针刺激发、推动经气运行的作用, 还能加强经络与经络、经穴与经穴之间的沟通交融, 还能调和阴阳, 加强经穴与多个脏腑之间的联系, 使各经之间同时得气。同时, 长针透刺法更容易得气, 长针透刺法还弥补了传统单穴针刺刺激点少的不足。普通单穴进针, 所取的穴位多, 会损伤在表之卫气, 而采用长针透刺法, 则可最大限度的减少对表之卫气的损伤。临床运用长针透刺法时, 可根据机体阴阳的盛衰、正气的虚实及气血是否亏虚等, 再根据“实者泻之、虚者补之”的远侧, 采用“泻者迎之”, “补者随之”的进针手法, 以调和阴阳、调补气血, 促使经脉气血的流通, 所谓“通则不痛”。此外, 长针透刺法具有操作简便、

取穴少、针感较强、疗效显著、价廉等优点, 在增强刺激量的同时, 使针感更容易传导、扩散, 起到了分别针刺两穴所不能起的作用。

以往研究大多以电针、温针为干预手段, 且多数从细胞因子调控角度去探讨针灸治疗膝骨关节炎的作用机制, 而实验以长针透刺为干预手段, 从对基质金属蛋白酶抑制剂调控的角度来探讨其作用原理, 前期已做相关研究工作, 表明长针透刺能有效延缓软骨退变, 改善关节软骨破坏程度, 此次研究为前期工作的延伸, 从而更全面说明长针透刺治疗膝骨关节炎的作用机制, 考虑本项研究深入程度不够, 没有深入到细胞、基因水平, 具有一定的局限性, 但从组织形态学及免疫组化的定量的角度研究, 表明了模型组较正常组整个软骨组织明显损害, 结构层次分辨不清, 软骨细胞出现大量凋亡, 分布散乱, 经过长针透刺干预治疗后软骨结构层次尚清晰, 软骨细胞数明显增多, 排列整齐, 分布均匀。正常对照组大鼠膝关节滑膜组织中基质金属蛋白酶抑制剂 1 水平明显高于膝骨关节炎模型组, 经长针透刺治疗后大鼠膝关节滑膜组织中基质金属蛋白酶抑制剂 1 水平亦较模型组显著升高, 从以上结果证明了长针透刺疗法能有效延缓关节软骨退变、破坏, 能有效提高膝骨关节炎滑膜组织中基质金属蛋白酶抑制剂 1 水平, 从而抑制膝骨关节炎时基质金属蛋白酶的表达, 使基质金属蛋白酶/基质金属蛋白酶抑制剂重新恢复一个相对的平衡, 这也为临床上长针透刺治疗膝骨关节炎提供了可靠的理论依据, 为临床推广长针透刺治疗膝骨关节炎提供了有力的保障。

致谢: 感谢上海市第六人民医院针推伤科各位老师及同学在取材实验技术指导方面的帮助。感谢动物实验室老师对实验大鼠细心的照料。

作者贡献: 李石胜为本次研究者。吴耀持为课题设计及技术指导者。张峻峰负责技术指导及协助实验。

利益冲突: 所有作者共同认可文章内容不涉及相关利益冲突。

伦理问题: 实验方案经上海市第六人民医院动物实验伦理委员会批准。实验动物在戊巴妥钠麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Creamer P, Hochberg MC. Osteoarthritis. *Lancet*. 1997;350(9076):503-508.
- [2] Jain A, Nanchahal J, Troeberg L, et al. Production of cytokines, vascular endothelial growth factors, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitors of metalloproteinases-1 by tenosynovium demonstrates its potential for tendon destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2001;44:1754-1760.
- [3] Bramono DS, Richmond JC, Weitzel PP, et al. Matrix metalloproteinases and their clinical applications in orthopaedics. *Clin Orthop Relat Res*. 2004;(428):272-285.
- [4] Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, et al. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest*. 1989;84(2):678-685.
- [5] Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum*. 2001;44(3):585-594.
- [6] Lijnen HR. Matrix metalloproteinases and cellular fibrinolytic activity. *Biochemistry (Mosc)*. 2002;67(1):92-98.
- [7] Fukui N, Zhu Y, Maloney WJ. Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF-alpha in normal and osteoarthritic chondrocytes. *J Bone Joint Surg Am*. 2003;85-A (Suppl 3):59-66.
- [8] 卫小春. 关节软骨[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [9] Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, et al. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum*. 2012;64(6):1697-1707.
- [10] 高亮, 陈默, 岳萍, 等. 温针灸对膝骨关节炎兔膝关节软骨转化生长因子 β 1 和胰岛素生长因子 1 水平的影响[J]. *针刺研究*, 2015, 40(3):229-232.
- [11] 张必萌, 吴耀持, 沈健. 长针透刺治疗膝骨关节炎的临床研究[J]. *中国针灸*, 2004, 24(9):613-614.
- [12] Oltariz ZA, Milliman C, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimers in vivo with a conserved homolog box that accelerates programmed cell death. *Natural Cell*. 1993;74(4):609-619.
- [13] Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003;92:827-839.
- [14] Pelletier JP, Jovanovic D, Fernandes JC, et al. Reduced regression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Arthritis Rheum*. 1998;41(7):1275-1286.
- [15] 中国国家标准化管理委员会. 针灸技术操作规范第20部分: 毫针基本刺法[M]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [16] Close DR. Matrix metalloproteinase inhibitors in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis*. 2001;60(Suppl 3):62-67.
- [17] 李本杨, 王峰. 基质金属蛋白酶家族与膝骨关节炎成因机制相关性研究进展[J]. *中医药临床杂志*, 2014, 26(5):545-547.
- [18] 陈松. 骨性关节炎患者基质金属蛋白酶(MMP)水平的变化[J]. *江西医学检验*, 2004, 22(5):442-443.
- [19] 包飞, 孙华, 吴志宏, 等. 针刺对膝骨关节炎大鼠软骨基质金属蛋白酶及其抑制剂表达的影响[J]. *中国针灸*, 2011, 31(3):241-246.
- [20] Kevorkian L, Young DA, Darrah C, et al. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. *Arthritis Rheum*. 2004;50(1):131-141.
- [21] 张仁. 实用独特针刺法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997.
- [22] 刘汗银. 实用针灸大全[M]. 北京: 北京出版社, 1992.