

持续被动运动条件下骨关节炎软骨细胞Erk活性及增殖

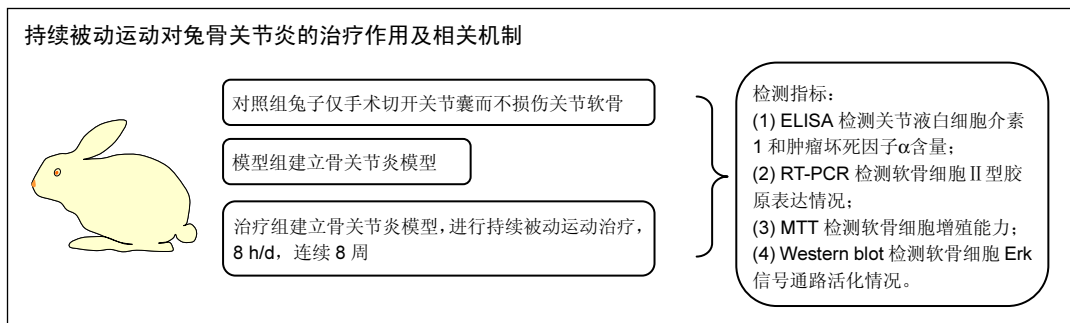
穆耶赛尔·麦提尼亚孜, 胡毅, 任云萍, 张勇, 熊道海(新疆医科大学第五附属医院, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011)

引用本文: 穆耶赛尔·麦提尼亚孜, 胡毅, 任云萍, 张勇, 熊道海. 持续被动运动条件下骨关节炎软骨细胞 Erk 活性及增殖[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(42):6265-6270.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.42.005

ORCID: 0000-0001-8160-0603(穆耶赛尔·麦提尼亚孜)

文章快速阅读:



穆耶赛尔·麦提尼亚孜, 女, 1989 年生, 新疆医科大学在读硕士, 主要从事骨与关节康复、疼痛康复的研究。

通讯作者: 熊道海, 硕士, 主任医师, 新疆医科大学第五附属医院, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

中图分类号: R318

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344

(2016)42-06265-06

稿件接受: 2016-07-24

文题释义:

细胞外信号调节激酶 1/2(extracellular-signal regulated kinase 1/2, Erk1/2): 是 MAPK 家族成员之一。细胞在接受外源的神经递质和生长因子等信号刺激后, 可激活细胞内的 Erk1/2 信号通路, 活化的 Erk1/2 随即进入细胞核, 激活转录因子的表达, 参与细胞的增殖和分化。

连续被动运动仪(continuous passive motion, 简称 CPM): 广泛应用于骨伤及骨关节术后的治疗和康复, 是现代骨科和康复科的必备仪器; 通过连续被动运动仪使关节按照预先设定好的角度和速度, 进行持续的被动运动; 主要用于防治制动引起的关节挛缩, 促进关节软骨、韧带和肌腱的修复, 改善局部血液循环, 促进肿胀、疼痛等症状的消除, 使关节活动角度尽可能恢复到或超过损伤前的程度, 最终使肢体功能的恢复更早、更完善; 由于连续被动运动仪的早期介入使用可以使术后康复起到事半功倍的效果。

摘要

背景: 目前临床上对持续被动运动是否可通过改善软骨细胞的增殖能力而改善骨关节炎病情研究报道较少。

目的: 分析持续被动运动对兔骨关节炎的治疗作用及相关机制。

方法: 36 只新西兰大白兔随机分为 3 组, 每组 12 只。对照组兔子仅手术切开关节囊而不损伤关节软骨; 模型组和治疗组采用 Hulth 方法建立骨关节炎模型。治疗组兔子在后第 1 天即开始进行持续被动运动治疗, 8 h/d, 连续 8 周。ELISA 方法检测关节液白细胞介素 1 和肿瘤坏死因子含量; RT-PCR 方法检测软骨细胞 II 型胶原表达情况; MTT 方法检测软骨细胞增殖能力; Western blot 方法检测软骨细胞 Erk 信号通路活化情况。

结果与结论: ①模型组关节液中白细胞介素 1 和肿瘤坏死因子 α 含量显著升高, 软骨细胞 II 型胶原的 mRNA 表达水平出现显著下调, 给予持续被动运动治疗后, 关节液中白细胞介素 1 和肿瘤坏死因子 α 含量显著降低($P < 0.01$), 同时软骨细胞 II 型胶原的 mRNA 表达水平出现显著上调($P < 0.01$); ②模型组软骨细胞增殖能力显著降低, 而治疗组软骨细胞增殖能力显著升高($P < 0.01$); ③模型组软骨细胞 Erk 信号通路活化情况出现显著下调($P < 0.01$), 给予持续被动运动治疗后软骨细胞 Erk 信号通路活化情况水平出现显著上调($P < 0.01$)。提示持续被动运动可通过影响关节液中白细胞介素 1 和肿瘤坏死因子 α 水平、软骨细胞 II 型胶原表达情况及软骨细胞增殖能力而改善骨关节炎病情, 其机制可能与调节 Erk 信号通路活化情况相关。

关键词:

组织构建; 软骨细胞; 持续被动运动; 骨关节炎; 增殖; 信号通路; 新疆维吾尔自治区自然科学基金

主题词:

运动疗法, 持续被动性; 骨关节炎; 软骨细胞; 信号传导; 组织工程

基金资助:

新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2013211A060)

Muyesaier·Maimaitiniyazi,
Studying for master's
degree, the Affiliated Fifth
Hospital of Xinjiang
Medical University, Urumqi
830011, Xinjiang Uygur
Autonomous Region,
China

Corresponding author:
Xiong Dao-hai, Master,
Chief physician, the
Affiliated Fifth Hospital of
Xinjiang Medical
University, Urumqi 830011,
Xinjiang Uygur
Autonomous Region,
China

Erk activation and proliferation in osteoarthritic chondrocytes after continuous passive motion

Muyesaier·Maimaitiniyazi, Hu Yi, Ren Yun-ping, Zhang Yong, Xiong Dao-hai (the Affiliated Fifth Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

Abstract

BACKGROUND: Whether continuous passive motion improves osteoarthritis by enhancing the proliferation ability of chondrocytes is rarely reported.

OBJECTIVE: To analyze the therapeutic outcomes of continuous passive motion in rabbits with osteoarthritis and the underlying mechanism.

METHODS: Thirty-six New Zealand white rabbits were randomly allotted into three groups ($n=12$ per group). Rabbits in control group only underwent capsulotomy with no harm to the cartilage; osteoarthritis models were established in the rabbits of model and treatment groups using Hulth method. At 1 day after modeling, the treatment group rabbits were treated with continuous passive motion, 8 hours daily for consecutive 8 weeks. Interleukin-1 and tumor necrosis factor α levels in the synovial fluid were detected by ELISA; collagen type II expression and the proliferation ability of chondrocytes were detected by MTT assay; Erk signaling pathway activation was determined using western blot assay.

RESULTS AND CONCLUSION: In the model group, interleukin-1 and tumor necrosis factor α levels in the synovial fluid were significantly increased, and the expression level of collagen type II mRNA was remarkably down-regulated. Continuous passive motion significantly downregulated interleukin-1 and tumor necrosis factor α levels and up-regulated the collagen type II mRNA level ($P < 0.01$). The model group showed significantly decreased proliferation ability of chondrocytes and down-regulated Erk signaling pathway activation, while after continuous passive motion, all above indicators were significantly improved ($P < 0.01$). These results indicate that the continuous passive motion can alleviate osteoarthritis probably by influencing interleukin-1 and tumor necrosis factor α levels, proliferation ability of chondrocytes, and collagen type II expression, as well as regulating Erk signaling pathway activation.

Subject headings: Motion Therapy; Continuous Passive; Osteoarthritis; Chondrocytes; Signal Transduction; Tissue Engineering

Funding: the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. 2013211A060

Cite this article: Muyesaier·Maimaitiniyazi, Hu Y, Ren YP, Zhang Y, Xiong DH. Erk activation and proliferation in osteoarthritic chondrocytes after continuous passive motion. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu.* 2016;20(42):6265-6270.

0 引言 Introduction

骨关节炎随着年龄的增长其发病率逐渐升高, 骨关节炎主要临床表现是关节疼痛、僵硬、活动受限和关节畸形等^[1-3], 可严重影个人的生活质量。骨关节炎可能会影响到多个关节, 尤其是负重关节如膝关节。据估计, 18.0%的女性及10%的男性人群会在60岁以上出现膝部及臀部的骨关节炎症状^[4-5]。

细胞凋亡是由多个信号通路调控的一个程序性细胞死亡过程。软骨细胞凋亡所致的软骨退变在骨关节炎发生发展中起重要作用, 并且可能成为目前临床治疗骨关节炎的潜在目标之一^[6-7]。骨关节炎病理特征是软骨细胞功能的丧失和细胞外基质的降解。软骨细胞凋亡改变了软骨基质的合成, 从而导致基质退化和破坏, 最终导致骨关节炎发病^[8]。由于软骨细胞的内在修复能力较差, 关节软骨损伤常常是永久性的, 因此, 改善和维持软骨细胞的增殖潜能可能会延缓骨关节炎的发病, 并可能成

为骨关节炎的有效治疗方法^[9-10]。

已知持续被动运动(continuous passive motion, CPM)在骨关节炎治疗中具有显著的疗效^[11]。然而, 持续被动运动是否可通过改善软骨细胞的增殖能力而改善骨关节炎病情还未见文献报道。据此, 研究首先观察了持续被动运动治疗兔骨关节炎后, 关节液中白细胞介素1和肿瘤坏死因子 α 含量、软骨细胞II型胶原表达情况, 初步观察持续被动运动对骨关节炎是否具有显著的治疗作用, 并进一步观察了持续被动运动对兔软骨细胞增殖能力及Erk信号通路活化情况的影响, 深入研究了持续被动运动治疗骨关节炎的机制, 以期为临床上利用持续被动运动方法治疗骨关节炎提供一定的科学依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2013年1月至2014年12月在

新疆医科大学第一附属医院实验动物科学研究部完成。

1.3 材料

实验动物及分组: 健康雄性新西兰大白兔36只, 购自重庆医科大学实验动物中心, 许可证号: SYXK(渝)20070001; 动物合格证号: SCXK(渝)20020001。体质量2.0–2.5 kg, 随机分为3组, 每组12只: 分别为对照组, 模型组, 治疗组。

持续被动运动仪器(CPM): 参照文献[5]研究自制持续被动活动仪, 其中主要包括支架部分、装卡台、驱动部分及传动结构等; 所用材料为低温热塑板材(克莱瑞迪医疗器械有限公司, 中国广州); 主要技术参数: 兔膝关节活动范围, 屈曲15°–130°; 运行速度范围, 23–9 (°)/s; 指定训练时间, 1–8 h。

1.4 实验方法

1.4.1 各组处理 对照组兔子仅手术切开发节囊而不损伤关节软骨, 术后笼内自由活动; 模型组和治疗组采用Hulth方法建立骨关节炎模型^[6], 模型组兔子术后笼内活动; 治疗组兔子在术后第1天即开始进行持续被动运动治疗, CPM仪运动8 h/d, 连续8周, 运动的起始角度20°, 速度为8 (°)/s, 并在其耐受范围内增加角度, 最大角度为100°, 8周后处死所有兔子。

1.4.2 软骨细胞获取方法 无菌手术条件下分离兔软骨组织, 并采用眼科剪剪碎至1–3 mm, 用Hank's液清洗2次, 随后加入0.25% II型胶原酶在37 °C消化1 h, 采用100目孔径滤网过滤, 收集滤过液, 1 500 r/min离心5 min, 所得沉淀即为兔软骨细胞。

1.4.3 ELISA检测关节液中白细胞介素1和肿瘤坏死因子 α 含量 白细胞介素1和肿瘤坏死因子 α ELISA检测试剂盒购自北京四正柏生物科技有限公司, 严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.4.4 RT-PCR Trizol提取细胞总RNA, 反转录成cDNA。PCR反应条件: 95 °C 5 min, 95 °C 10 s, 60 °C 20 s, 共40个循环。得到的数据通过比较CT值法($2^{-\Delta\Delta Ct}$)进行定量分析。

引物序列:

基因	序列
II型胶原	正向: 5'- TGC CCA GAA AAT GAA AAA GG-3' 反向: 5'- GTG TAT GTG GCA ATG CGT TC-3'
GAPDH	正向: 5'-GGT GAA GGT CGG AGT CAA CG -3' 反向: 5'-CAA AGT TGT CAT GGA TGG ACC-3'

1.4.5 MTT方法检测软骨细胞增殖能力 软骨细胞培

养至对数生长期, 接种于96孔培养板中, 每孔中加入20 μ L的MTT溶液, 作用4 h后吸出上清, 加入150 μ L的二甲基亚砷溶液, 低速震荡10 min后, 波长490 nm处测定A值。

1.4.6 Western-blot检测p-Erk1/2表达 软骨细胞采用Novagen公司的Cytobuster提取细胞总蛋白, 提取蛋白经10% SDS-PAGE 分离胶和5%浓缩胶分离后, 通过湿转的方法将蛋白转印至硝酸纤维素膜上, 硝酸纤维素膜以含5%脱脂奶粉的TBST室温封闭2 h, 加入相应一抗4 °C旋转孵育过夜。次日采用0.1% TBST洗膜3次, 每次5 min, 加入山羊抗兔/鼠IgG的HRP标记二抗, 室温旋转孵育1 h。0.1%TBST 洗膜3次, 每次5 min。硝酸纤维素膜以Supersignal West Femto化学发光底物对条带进行显色。Actin作为内参对照。所有实验至少重复3次。

1.5 主要观察指标 关节液白细胞介素1和肿瘤坏死因子 α 水平、软骨细胞II型胶原表达情况、软骨细胞增殖能力及Erk信号通路活化情况。

1.6 统计学分析 采用Graphpad软件进行数据分析。多组数据间比较采用Anova检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 参与者数量分析 实验选用新西兰大白兔36只, 分为3组, 实验过程无脱失, 全部进入结果分析。

2.2 关节液白细胞介素1和肿瘤坏死因子 α 水平检测 见表1。与对照组比较, 模型组关节液中白细胞介素1和肿瘤坏死因子 α 水平显著升高($P < 0.01$); 给予持续被动运动治疗后, 与模型组比较, 治疗组关节液中白细胞介素1和肿瘤坏死因子 α 质量浓度显著降低($P < 0.01$)。

表1 关节液白细胞介素1和肿瘤坏死因子 α 含量测定结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$, ng/L)

Table 1 Levels of interleukin-1 and tumor necrosis factor α in the synovial fluid

组别	白细胞介素1	肿瘤坏死因子 α
对照组	6.54 \pm 1.83	7.56 \pm 1.67
模型组	22.64 \pm 3.45 ^a	44.64 \pm 5.45 ^a
治疗组	10.94 \pm 2.01 ^b	15.56 \pm 2.94 ^b

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.01$

2.3 软骨细胞II型胶原表达情况比较 见图1。

RT-PCR结果所示, 与对照组相比, 模型组软骨细

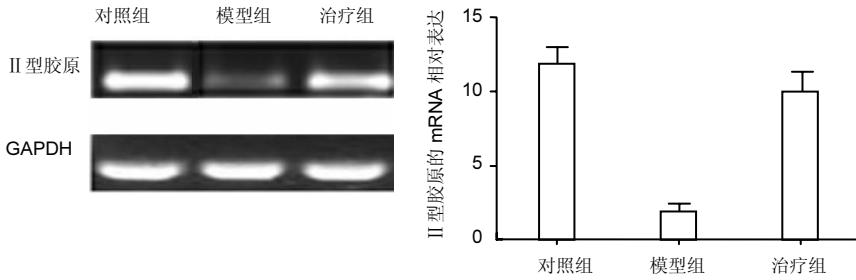


图 1 RT-PCR 方法检测软骨细胞 II 型胶原表达情况

Figure 1 Expression of collagen type II in chondrocytes detected by RT-PCR

图注: 与模型组相比, 治疗组软骨细胞 II 型胶原的 mRNA 表达水平出现显著上调($P < 0.01$)。

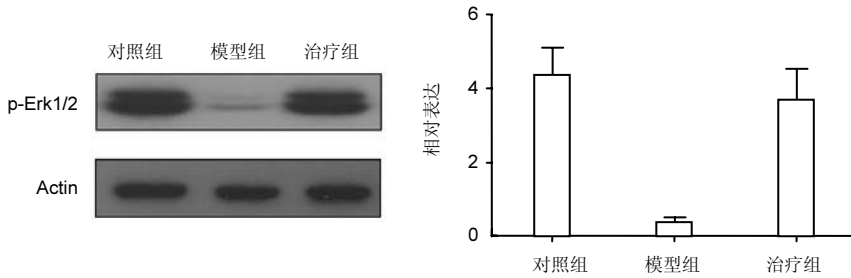


图 3 Western blot 检测软骨细胞 p-Erk1/2 蛋白表达

Figure 3 Expression of p-Erk1/2 in chondrocytes by western blot assay

图注: 与模型组相比, 治疗组软骨细胞 Erk 信号通路活化情况水平出现显著上调($P < 0.01$)。

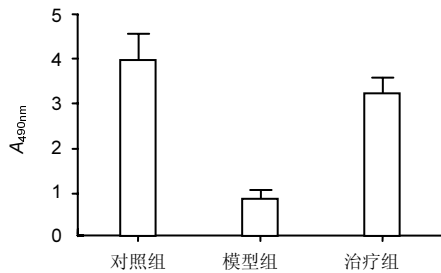


图 2 MTT 方法检测软骨细胞培养 4 h 后增殖能力

Figure 2 The proliferation ability of chondrocytes after 4 hours of culture by MTT assay

图注: 与模型组相比, 治疗组软骨细胞增殖能力显著升高($P < 0.01$)。

胞 II 型胶原的 mRNA 表达水平出现显著下调 ($P < 0.01$)。给予持续被动运动治疗后, 与模型组相比, 治疗组软骨细胞 II 型胶原的 mRNA 表达水平出现显著上调 ($P < 0.01$)。

2.4 软骨细胞增殖能力比较 见图 2。对照组软骨细胞培养 4 h 后增殖能力为 3.97 ± 0.58 , 模型组软骨细胞培养 4 h 后增殖能力为 0.85 ± 0.23 , 与对照组相比, 模型组软骨细胞增殖能力显著降低 ($P < 0.01$); 治疗组软骨细胞增殖能力为 3.18 ± 0.39 , 与模型组相比, 治疗组软骨细胞增殖能力显著升高 ($P < 0.01$)。

2.5 软骨细胞 Erk 信号通路活化情况比较 见图 3。采用 p-Erk1/2 的表达情况代表 Erk 信号通路活化情况, Western blot 结果所示, 与对照组相比, 模型组软骨细胞 Erk 信号通路活化情况出现显著下调 ($P < 0.01$)。给予持续被动运动治疗后, 与模型组相比, 治疗组软骨细胞 Erk 信号通路活化情况水平出现显著上调 ($P < 0.01$)。

3 讨论 Discussion

骨关节炎是世界范围内最常见的关节疾病之一。疼痛、活动受限、药物不良反应及关节相关的手术并发症使得骨关节炎成为严重影响患者健康的重要问题^[12]。目前临床上骨关节炎治疗的基本方案包括健康教育、减轻体质量、身体康复及体育锻炼等^[13-14]。临床广泛应用的骨关节炎治疗药物主要有非类固醇抗炎药, 但治疗效果并不明显且不良反应较大^[15]。目前在骨关节炎治疗中已开展多种非药物治疗方法。

持续被动运动在全膝关节置换术恢复治疗中疗效显著, 在骨关节炎治疗中也取得一定的成果^[16-17]。然而关于持续被动运动治疗骨关节炎, 改善骨关节炎病情的机制目前尚未完全研究清楚。研究首先观察了持续被动运动治疗后, 关节液中白细胞介素 1 和肿瘤坏死因子 α 含量、软骨细胞 II 型胶原表达情况。结果显示, 持续被动运动治疗后, 与模型组比较关节液中白细胞介素 1 和肿瘤坏死因子 α 质量浓度显著降低, 而软骨细胞 II 型胶原表达量则显著升高。白细胞介素 1 和肿瘤坏死因子 α 是已知导致骨关节炎发病的关键因素, 而骨关节炎病理特征是细胞外基质的降解^[18-19]。研究结果显示持续被动运动治疗后关节液中白细胞介素 1 和肿瘤坏死因子 α 含量显著降低, 提示持续被动运动对骨关节炎病情具有显著的治疗作用。

软骨细胞凋亡所致的软骨退变在骨关节炎发生发展中起重要作用^[20-22]。由于软骨细胞的内在修复能力较差, 关节软骨损伤常常是永久性的, 因此, 改善和维持软骨细胞的增殖潜能可能会延缓骨关节炎的发病, 并可

能成为骨关节炎的有效治疗方法^[23-25]。那么持续被动运动是否可通过改善软骨细胞的增殖情况从而改善骨关节炎病情目前还未见文献报道。据此, 研究进一步观察了在持续被动运动治疗后软骨细胞的增殖情况, 结果显示, 在骨关节炎模型组软骨细胞的增殖能力显著降低, 在给予持续被动运动治疗后, 软骨细胞的增殖能力显著升高。

细胞外信号调节激酶 1/2(extracellular-signal regulated kinase 1/2, Erk1/2)是 MAPK 家族成员之一^[26-27]。细胞在接受外源的神经递质和生长因子等信号刺激后, 可激活细胞内的 Erk1/2 信号通路, 活化的 Erk1/2 随即进入细胞核, 激活转录因子的表达, 参与细胞的增殖和分化^[28-30]。研究还进一步观察了持续被动运动治疗后软骨细胞 Erk 信号通路的活化情况, 结果显示, 在骨关节炎模型组软骨细胞 Erk 信号通路的活化情况显著降低, 在给予持续被动运动治疗后, 软骨细胞的 Erk 信号通路的活化情况显著升高。

综上所述, 研究结果证实持续被动运动可通过降低关节液白细胞介素 1 和肿瘤坏死因子 α 水平, 提高软骨细胞 II 型胶原表达量, 进而改善兔骨关节炎病情。其机制可能是通过改善软骨细胞增殖能力而发挥的。持续被动运动调节软骨细胞增殖能力可能与调节 Erk 信号通路活化情况相关, 该研究为临床上利用持续被动运动方法治疗骨关节炎提供了一定的科学依据。

作者贡献: 实验设计为第一作者及第五作者, 实验实施为第一、二、三作者, 实验评估为第一、三、四、五作者, 其中第三、四作者采用盲法评估。

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: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 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] García-Padilla S, Duarte-Vázquez MA, Gonzalez-Romero KE, et al. Effectiveness of intra-articular injections of sodium bicarbonate and calcium gluconate in the treatment of osteoarthritis of the knee: a randomized double-blind clinical trial. *BMC Musculoskelet Disord*.2015; 16(1):114.
- [2] Osajie FE, Yakubu K.A retrospective non-comparative analysis of the quality of care for osteoarthritis at the general out-patient department of Jos University Teaching Hospital, Nigeria. *J Family Med Prim Care*. 2015; 4(2):217-220.
- [3] Tsois KC, Bei ES, Papatheanasiou I, et al. Comparative proteomic analysis of hypertrophic chondrocytes in osteoarthritis. *Clin Proteomics*.2015; 12(1):12.
- [4] Liao EY,Luo XH.Effects of 17beta-estradiol on the expression of matrix metalloproteinase-1, -2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human osteoblast-like cell cultures. *Endocrine*.2001; 15(3):291-295.
- [5] 张云,王艳,张京,等.持续被动运动对兔骨关节炎软骨细胞中G/J 活性及细胞凋亡的影响[J].中国临床研究,2016, 29(3):381-383.
- [6] Xie GP, Jiang N, Wang SN, et al. Eucommia ulmoides Oliv. bark aqueous extract inhibits osteoarthritis in a rat model of osteoarthritis. *J Ethnopharmacol*.2015; 162: 148-154.
- [7] Kitay GS, Koren MJ, Helfet DL,et al.Efficacy of combined local mechanical vibrations, continuous passive motion and thermotherapy in the management of osteoarthritis of the knee. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17(10):1269-1274.
- [8] Liu L, Gu H, Liu H, et al.Protective effect of resveratrol against IL-1 β -induced inflammatory response on human osteoarthritic chondrocytes partly via the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway: an "in vitro study". *Int J Mol Sci*. 2014; 15(4):6925-6940.
- [9] Kou S, Wu Y. Meta-analysis of tumor necrosis factor alpha -308 polymorphism and knee osteoarthritis risk[J]. *BMC Musculoskelet Disord*. 2014; 15:373.
- [10] Chen Q, Zhang B, Yi T, et al. Increased apoptosis in human knee osteoarthritis cartilage related to the expression of protein kinase B and protein kinase Ca in chondrocytes. *Folia Histochem Cytobiol*. 2012; 50(1): 137-143.
- [11] Huang JG, Xia C, Zheng XP, et al. 17 β -Estradiol promotes cell proliferation in rat osteoarthritis model chondrocytes via PI3K/AKT pathway. *Cell Mol Biol Lett*. 2011; 16(4): 564-575.
- [12] 邓小兰,晋贞超,王健,等. ERK途径可能参与抗坏血酸诱导的神经干细胞向多巴胺能细胞分化[J]. 第三军医大学学报,2013,35(22):2430-2434.

- [13] Green DM, Noble PC, Bocell JR Jr, et al. Effect of early full weight-bearing after joint injury on inflammation and cartilage degradation. *J Bone Joint Surg Am.* 2006; 88:2201-2209.
- [14] Xu Y, Dai GJ, Liu Q, et al. Sanmiao formula inhibits chondrocyte apoptosis and cartilage matrix degradation in a rat model of osteoarthritis. *Exp Ther Med.* 2014; 8(4):1065-1074.
- [15] Thomas CM, Fuller CJ, Whittles CE, et al. Chondrocyte death by apoptosis is associated with the initiation and severity of articular cartilage degradation. *Int J Rheum Dis.* 2011;14(2): 191-198.
- [16] Mahmoud RK, El-Ansary AK, El-Eishi HH, et al. Matrix metalloproteinases MMP-3 and MMP-1 levels in sera and synovial fluids in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Biochem.* 2005; 54:248-257.
- [17] 单鹏程,何名江,张洪美,等. 温阳益髓中药干预兔膝关节炎软骨基质金属蛋白酶的表达[J]. *中国组织工程研究*, 2014,18(7):997-1002.
- [18] Johnson AR, Pavlovsky AG, Ortwine DF, et al. Discovery and characterization of a novel inhibitor of matrix metalloproteinase-13 that reduces cartilage damage in vivo without joint fibroplasia side effects. *J Biol Chem.* 2007; 282: 27781-91.
- [19] Stanton H, Rogerson FM, East CJ, et al. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature.* 2005; 434: 648-652.
- [20] Shiozawa S, Tsumiyama K. Pathogenesis of rheumatoid arthritis and c-Fos/AP-1. *Cell Cycle.* 2009; 8(10):1539-1543.
- [21] 郭秦炜,田得祥,敖英芳.骨性关节炎关节软骨中I型、II型、III型及X型胶原的分布[J].*中国运动医学杂志*,2002,21(3): 228-231.
- [22] Willian Hunter.Of the structure and disease of the articular cartilage .*Clin Orthop.*2006; 11(3):317.
- [23] Mort JS Billington CJ. Articular cartilage and changes in arthritis matrix degradation. *Arthritis Res.*2001; 3: 337-341.
- [24] Little CB, Barai A, Burkhardt D, et al. Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development. *Arthritis Rheum.*2009; 60:3723-3733.
- [25] Wang L,Gai P,Xu R,et al. Shikonin protects chondrocytes from interleukin-1beta-induced apoptosis by regulating PI3K/Akt signaling pathway. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8(1):298-308.
- [26] Takahashi M, Naito K, Abe M, et al. Relationship between radiographic grading of osteoarthritis and the biochemical markers for arthritis in knee osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2004; 6:R208-R212.
- [27] Scarpellini M, Lurati A, Vignati G, et al. Biomarkers, type II collagen, glucosamine and chondroitin sulfate in osteoarthritis follow-up: the Magenta osteoarthritis study. *J Orthop Traumatol.* 2008; 9(2):81-87.
- [28] Tong KM, Shieh DC, Chen CP, et al. Leptin induces IL-8 expression via leptin receptor, IRS-1, PI3K, Akt cascade and promotion of NFkappaB /p300 binding in human synovial fibroblasts. *Cell Signal.* 2008;20(8): 1478-1488.
- [29] Liacini A, Sylvester J, Zafarullah M, et al. Mithramycin downregulates proinflammatory cytokine-induced matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther.*2005; 7:777-783.
- [30] Jain A, Nanchahal J, Troeberg L, et al. Production of cytokines, vascular endothelial growth factor, 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.