

本文引用:余毅,张婷,熊逸啸,向振,欧广洋,潘波,刘剑,徐仪昕,刘雅娟,李梅琪,余望贻. 活血化瘀法对膝骨性关节炎模型兔基质金属蛋白酶的影响[J].湖南中医药大学学报,2021,41(7):998-1002.

活血化瘀法对膝骨性关节炎模型兔 基质金属蛋白酶的影响

余毅¹,张婷¹,熊逸啸¹,向振¹,欧广洋¹,潘波¹,刘剑²,徐仪昕¹,刘雅娟¹,李梅琪¹,余望贻^{1*}
(1.湖南中医药大学,湖南长沙410208;2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙410007)

〔摘要〕目的 研究活血化瘀法对膝骨性关节炎模型兔基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)的影响。方法 将32只新西兰兔分为对照组、模型组、中药组、阳性药组,每组8只。采用改良Hulth造模法建立兔膝骨性关节炎模型,给予药物治疗28 d。中药组给予活血化瘀合剂(1.4 g/kg),阳性药组给予硫酸氨基葡萄糖溶液(0.07 mg/kg),对照组及模型组给予等体积蒸馏水。给药结束后,取兔右后膝关节软骨行HE染色,用于组织病理分析;收集关节液,采用ELISA法检测MMP-3、MMP-9、MMP-13的含量;采用Western blot和RT-qPCR法分别检测兔关节软骨MMP-3、MMP-9、MMP-13蛋白及mRNA水平。结果 与对照组比较,模型组兔关节软骨存在浅表层纤维化,软骨细胞成簇、排列无规则、部分坏死,滑膜增厚,基质染色丢失等病理现象,关节液MMP-3、MMP-9、MMP-13含量较对照组显著升高($P<0.01$),其蛋白及mRNA表达在关节软骨中也显著上升($P<0.01$);与模型组比较,中药组兔关节软骨病理损伤得以缓解,关节液MMP-3、MMP-9、MMP-13含量明显下降($P<0.01$ 或 $P<0.05$),关节软骨MMP-3、MMP-9蛋白及mRNA表达均下调($P<0.01$),MMP-13 mRNA表达下调($P<0.05$);与中药组比较,阳性药组MMP-13 mRNA表达水平显著降低($P<0.05$)。结论 活血化瘀法能缓解膝骨性关节炎模型兔关节软骨的损伤,其机制可能与抑制MMPs的表达,尤其是MMP-3和MMP-9表达有关。

〔关键词〕膝骨性关节炎;活血化瘀;基质金属蛋白酶;关节软骨;关节液

〔中图分类号〕R255.6

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.07.005

Effects of Huoxue Huayu Method on Matrix Metalloproteinase in Rabbit Model of Knee Osteoarthritis

YU Yi¹, ZHANG Ting¹, XIONG Yixiao¹, XIANG Zhen¹, OU Guangyang¹, PAN Bo¹, LIU Jian²,
XU Yixin¹, LIU Yajuan¹, LI Meiqi¹, YU Wangyi^{1*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

〔Abstract〕 Objective To study the effects of Huoxue Huayu method on matrix metalloproteinase (MMPs) in rabbit model of knee osteoarthritis. **Methods** 32 New Zealand rabbits were divided into control group, model group, Chinese medicine group and positive drug group, with 8 rats in each group. A rabbit model of knee osteoarthritis was established by modified Hulth modeling method, followed by drug treatment for 28 days. The Chinese medicine group was given Huoxue Huayu Mixture (1.4 g/kg), the positive drug group was given glucosamine sulfate solution (0.07 mg/kg), and the control group and the model group

〔收稿日期〕2021-03-09

〔基金项目〕国家自然科学基金项目(81574004,81874476);湖南省自然科学基金项目(2020JJ4460);湖南省教育厅一般项目(19C1420);湖南中医药大学大学生创新课题项目(2020100)。

〔作者简介〕余毅,男,硕士,研究方向:中医骨伤。

〔通信作者〕*余望贻,男,教授,E-mail:yuwangyi2006@163.com。

were given equal volume of distilled water. At the end of the administration, rabbit right posterior knee articular cartilage was taken for histopathological analysis through HE staining, and the content of MMP-3, MMP-9 and MMP-13 of synovial fluid was detected by ELISA; Western blot and RT-qPCR were used to detect MMP-3, MMP-9, MMP-13 protein and mRNA levels in rabbit articular cartilage. **Results** There were superficial fibrosis in the articular cartilage of rabbits in the model group compared with the control group, the chondrocytes were clustered, arranged irregularly, partially necrotic, thickened synovial, and lost in matrix staining, the content of MMP-3, MMP-9 and MMP-13 in synovial fluid was higher than control group ($P<0.01$), and the protein and mRNA expression in the articular cartilage also increased significantly ($P<0.01$); compared with the model group, the pathological damage of rabbit articular cartilage of Chinese medicine group was relieved, and the content of MMP-3, MMP-9 and MMP-13 in joint fluid decreased significantly ($P<0.01$ or $P<0.05$), articular cartilage MMP-3, MMP-9 protein and mRNA expression were down-regulated ($P<0.01$), and MMP-13 mRNA expression was down-regulated ($P<0.05$); compared with the Chinese medicine group, MMP-13 mRNA expression in positive drug group was down-regulated ($P<0.05$). **Conclusion** Huoxue Huayu method can alleviate the damage of articular cartilage in rabbits with knee osteoarthritis model, and its mechanism may be related to the inhibition of MMPs expression, especially the expression of MMP-3 and MMP-9.

[**Keywords**] knee osteoarthritis; Huoxue Huayu; matrix metalloproteinase; articular cartilage; joint fluid

膝骨性关节炎是由于膝关节局部损伤、炎症或慢性劳损引起的软骨变性及活动障碍的慢性退行性骨关节病,在老年人中患病率高达50%^[1]。软骨组织损伤是膝骨性关节炎的重要病理特征,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)在软骨基质降解过程中发挥了关键作用^[2-3]。因而,抑制MMPs表达能保护软骨组织,恢复膝骨关节的正常活动。膝骨性关节炎属中医学“痹证”范畴,气滞血瘀是其主要病机,治宜活血化瘀,基于此理法而成的消炎散是湖南中医药大学第一附属医院院内制剂,已使用40余年,全方由近20味中药组成,具活血凉血、散瘀止痛之功,临床疗效显著^[4]。本研究选用消炎散中主要的活血化瘀中药“当归、赤芍、姜黄”组成活血化瘀合剂,通过建立膝骨性关节炎动物模型,明确活血化瘀法治疗膝骨性关节炎的作用特点,并以MMPs为切入点,阐明其分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

32只SPF级健康新西兰兔,体质量2.0~2.5 kg,雌雄各半,由湖南中医药大学实验动物中心代购,使用许可证号为SKYK(湘)2019-0009。

1.2 实验药物

活血化瘀合剂药物组成:当归10 g,赤芍10 g,姜黄10 g,原药材均购自湖南中医药大学第一附属医院。全方煎煮2次,第1次加10倍量水、第2次加8倍量水,每次煎煮1.5 h,合并水煎液,浓缩至终质量浓度为含生药量1.3 g/mL,保存备用。硫酸氨基葡萄糖(伊索佳)购自新兴同仁药业有限公司,批

号:18092602,规格:0.25 g×12粒,国药准字H20041317。

1.3 主要试剂与仪器

MMP-3、MMP-9、MMP-13 ELISA试剂盒(批号:CSB-E09269Rb、CSB-E06933Rb、CSB-E14220Rb,武汉华美生物工程有限公司);MMP-3、MMP-9、MMP-13一抗(批号:14351S、13667S、69926S,美国CST中国分公司);反转录试剂盒(批号:740703,日本Takara有限公司);苏木精、伊红(批号:ZLI-3301、ZLI-9613,北京中杉金桥生物技术有限公司)。

RM223 切片机、DMi1 倒置光学显微镜(德国Leica公司);MK3 酶标仪(美国Thermo中国有限公司);CFX96 荧光定量PCR仪、ChemiDoc XRS+化学发光成像系统(美国Bio-Rad生物技术有限公司)。

1.4 动物分组、造模与给药

将32只新西兰兔随机分为对照组、模型组、中药组、阳性药组,每组8只。除对照组外,均采用改良的Hulth造模法建立兔膝骨性关节炎模型^[5]。耳缘静脉注射20%的乌拉坦(4 mL/kg)麻醉兔,固定,取右侧后腿膝关节,常规脱毛、消毒,使膝关节屈曲,沿兔膝关节内侧入路,使内侧副韧带及前交叉韧带完全离断。经前抽屉试验、内侧应力试验验证韧带完全离断后,充分冲洗创口,逐层缝合,术后连续3 d注射青霉素。对照组不切开关节囊,用盐水冲洗后缝合。术后预防感染。造模后4周随机挑选3只动物进行X线片检查,X线下见兔右膝关节间隙变窄、关节面呈高密度影、关节周围骨赘形成,提示造模成功^[5]。造模成功后开始灌胃给药,给药量按照70 kg成人

与 1.5 kg 兔体表面积等效换算 (成人剂量 $\times 70 \text{ kg} \times 0.07/1.5 \text{ g/kg}$)。中药组给予临床等效剂量的活血化瘀合剂(1.4 g/kg),阳性药组给予临床等效剂量的硫酸氨基葡萄糖溶液(0.07 g/kg),对照组及模型组给予等体积蒸馏水,均持续给药 28 d。

1.5 动物处理

实验过程中共有 5 只动物死亡,其中模型组 2 只,中药组 2 只,阳性药组 1 只。末次给药完成后,采用空气栓塞法处死动物,取右后膝后髌上囊处常规脱毛,作长约 0.5 cm 的纵形切口,用 1 mL 生理盐水灌洗关节腔 3 次后,收集关节液,而后切除右后膝关节软骨,切断软骨,一半置于 4% 多聚甲醛中固定,一半保存于液氮中。

1.6 HE 染色观察兔关节软骨病理损伤情况

取固定的兔关节软骨,常规石蜡包埋后切片,经脱蜡、水化后进行 HE 染色,脱水、透明、封片,装盒待用。于光学显微镜下观察、拍照,分析病理损伤情况,并在光镜下对切片进行 Mankin 评分^[6],Mankin 评分用来评价软骨组织病理变化程度,包含对软骨结构(0~6 分)、软骨细胞(0~3 分)、基质染色(0~3 分)、潮线(0~1 分)等方面的观察判定,评分越高,提示软骨受损程度越严重。每个样本取 3 次评分的平均值。

1.7 ELISA 检测兔关节液 MMPs 含量

收集关节液后,于 4 °C、4 000 r/min 条件下离心 10 min(离心半径 6 cm),取上清液。根据 ELISA 试剂盒说明书的详细步骤进行实验操作,检测右膝关节液中 MMP-3、MMP-9、MMP-13 的含量。

1.8 Western blot 检测兔关节软骨组织 MMPs 蛋白表达水平

取兔关节软骨组织,匀浆,测定总蛋白含量。制备分离胶和浓缩胶,蛋白变性,上样,SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,5% 脱脂奶粉封闭,裁剪条带,加入稀释后的一抗(按 1:1 000 稀释),4 °C 孵育过夜。洗涤条带,加入二抗室温下孵育 4 h,洗涤条带,化学发光法显影。采用 Image J 成像软件分析条带灰度值,以 GAPDH 为内参蛋白,计算关节软骨中 MMP-3、MMP-9、MMP-13 蛋白的相对表达水平。

1.9 RT-qPCR 检测兔关节软骨组织 MMPs mRNA 表达水平

取兔关节软骨组织,加入 Trizol 试剂,匀浆,提取组织总 RNA,并进行含量检测。根据反转录试剂盒操作步骤将 RNA 逆转录成 cDNA,之后进行 PCR 反应扩增目的基因,扩增条件为:95 °C 15 min 预变性,95 °C 10 s 变性,60 °C 30 s 退火延伸,35 个

循环,以 β -actin 基因为内参。引物由深圳华大基因公司合成,序列见表 1。

表 1 各基因引物序列

基因	序列	长度/bp
MMP-3	正向: GTACCAACCTATTCTGCTTGC	231
	反向: CCAGAGAGTTAGATTTGCTGGG	
MMP-9	正向: AAGTTGAAGCTCAGCCTTTGAGG	225
	反向: GTCGAATTTCCAGATACGTTCC	
MMP-13	正向: CGTAGTGATCAGAGCCAAGC	225
	反向: TCTGCCTTTCTCGCAATTAGA	
GAPDH	正向: GTGCTGAGTATCTCGTGGAGTCT	292
	反向: ACAGTCTTCTGAGTGGCAGTGA	

1.10 统计学分析

所有的实验数据均以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,用 SPSS 19.0 软件进行数据分析。所有数据均符合正态分布,方差齐者采用单因素方差分析,多重比较用 LSD 检验,方差不齐时用 Tamhane's T2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组兔关节软骨 HE 染色情况

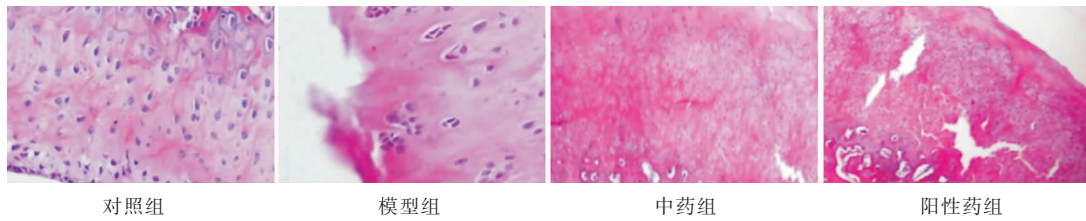
对照组兔关节软骨结构清晰,表面光滑,细胞排列整齐,基质染色基本均匀;模型组软骨浅表层纤维化,软骨细胞成簇、排列无规则、部分坏死,滑膜增厚,基质染色丢失;中药组及阳性药组关节软骨表层偶见少量簇集的软骨细胞,无细胞坏死,滑膜稍微增厚,基质染色尚可。Mankin 评分结果显示,与对照组比较,模型组、中药组、阳性药组兔软骨组织评分均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组比较,中药组及阳性药组评分显著下降,差异均有统计学意义($P < 0.01$);中药组与阳性药组比较,评分差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1、表 2。

2.2 各组兔关节液 MMPs 含量比较

与对照组比较,模型组、中药组及阳性药组关节液 MMP-3、MMP-9、MMP-13 含量均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组比较,中药组及阳性药组关节液 MMP-3、MMP-9、MMP-13 含量显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);中药组与阳性药组比较,MMP-3、MMP-9、MMP-13 含量差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

2.3 各组兔关节软骨 MMPs 蛋白表达水平比较

与对照组比较,模型组及阳性药组关节软骨 MMP-3、MMP-9、MMP-13 蛋白表达水平均显著升高,中药组 MMP-3、MMP-13 表达升高,差异均有

图1 兔右膝关节软骨 HE 染色图($\times 200$)表2 兔关节软骨组织 Mankin 评分结果($n=4, \bar{x} \pm s$, 分)

组别	得分
对照组	3.92±0.41
模型组	8.74±0.77**
中药组	5.78±0.64* ^{##}
阳性药组	6.01±0.49* ^{###}

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.01$ 表3 兔右膝关节液中 MMPs 含量($n=6, \mu\text{g/mL}, \bar{x} \pm s$)

组别	MMP-3	MMP-9	MMP-13
对照组	40.91±5.27	9.79±0.78	5.29±0.47
模型组	78.91±10.72**	30.91±4.25**	11.92±2.32**
中药组	50.49±6.31* ^{##}	18.21±2.39* ^{##}	7.38±0.87* [#]
阳性药组	54.73±5.25* ^{##}	16.74±2.21* ^{##}	7.80±0.69* [#]

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$

统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,中药组 MMP-3、MMP-9 表达水平显著降低,差异均有统计学意义($P<0.01$),MMP-13 降低,但差异无统计学意义($P>0.05$);与模型组比较,阳性药组 MMP-3、MMP-9、MMP-13 蛋白表达水平显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);中药组与阳性药组比较,MMP-3、MMP-9、MMP-13 表达差异均无统计学意义($P>0.05$)。见图2、表4。

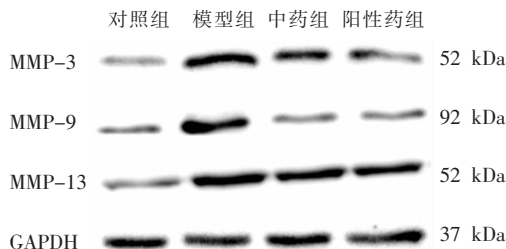


图2 兔关节软骨 MMPs 蛋白表达条带图

表4 兔关节软骨 MMPs 蛋白表达水平($n=4, \bar{x} \pm s$)

组别	MMP-3	MMP-9	MMP-13
对照组	0.23±0.02	0.27±0.03	0.30±0.03
模型组	0.94±1.22**	0.84±0.06**	0.81±0.05**
中药组	0.52±0.06* ^{##}	0.35±0.05 ^{##}	0.68±0.08**
阳性药组	0.45±0.05* ^{##}	0.38±0.03* ^{##}	0.57±0.07* ^{##}

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$

2.4 各组兔关节软骨 MMPs mRNA 表达水平比较

与对照组比较,模型组、中药组及阳性药组关节软骨 MMP-3、MMP-9、MMP-13 mRNA 表达水平均显著升高,差异均有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,中药组及阳性药组 MMP-3、MMP-9、MMP-13 mRNA 表达水平明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与中药组比较,阳性药组 MMP-13 mRNA 表达水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表5。

表5 兔关节软骨 MMPs mRNA 表达水平($n=4, \bar{x} \pm s$)

组别	MMP-3	MMP-9	MMP-13
对照组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	2.71±0.34**	2.93±0.33**	2.45±0.29**
中药组	1.78±0.19* ^{##}	2.04±0.25* ^{##}	1.82±0.27* [#]
阳性药组	1.82±0.15* ^{##}	1.89±0.20* ^{##}	1.51±0.21* ^{##} [△]

注:与对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与中药组比较,[△] $P<0.05$

3 讨论

膝骨性关节炎属中医学“痹证”范畴,与“痹病”“骨痹”类似,是由于风、寒、湿邪独立或合而入侵犯经络闭阻、气血不通而发生。《素问·痹论》云:“风寒湿三气杂至,合而为痹也。”该病多发于中老年人群,是由于其长期劳损、气血不足,累及筋骨关节,致气血不和、瘀血内生、阻塞经络、瘀热互结,故而成痹。清代医家王清任的《医林改错》中明确提出“痹有瘀血”,提示可用活血化瘀法治疗痹证。课题组前期运用活血化瘀法治疗膝骨性关节炎已取得良好的疗效,以当归、赤芍、姜黄为主要活血化瘀药物的消炎散治疗瘀阻脉络、气滞血瘀型关节炎疗效尤为明显^[7]。当归、赤芍是临床常用的活血补血药对,当归味甘而重,气轻而辛,专补血行血,为血中气药,又通经活络,常用于治疗瘀血肿痛、跌打损伤、风湿痹痛等;赤芍苦而微寒,善清热凉血、散瘀止痛,主治瘀滞经闭、胁痛、跌扑损伤;姜黄可破血行气、通经止痛,常用于跌打损伤。临床与基础研究均证实,活血化瘀合剂对膝骨性关节炎有良好的治疗效果^[8-9]。

膝骨性关节炎的关键病理特征之一是软骨细胞

的大量降解,而关节软骨主要由细胞外基质组成,抑制基质降解和软骨细胞凋亡被认为是治疗膝骨性关节炎的关键^[10]。MMPs是基质合成和降解的关键调节因子,其过量表达会加速软骨基质中蛋白聚糖的分解,并促进软骨细胞凋亡,诱发疾病的发生^[11]。MMP-9是与骨关节炎发生联系最为紧密的MMPs亚型,其含量的异常升高与其组织金属蛋白酶抑制剂水平的相对下降与骨性关节炎的软骨退变过程密切相关^[12];同时,MMP-3和MMP-13表达的异常在膝骨性关节炎的发生发展中发挥了重要作用^[13]。此外,MMP-1、MMP-7等亚型也被报道参与了膝骨疾病的发生^[14-15]。由此可见,MMPs多种亚型均参与了关节软骨退变过程,但MMP-3、MMP-9和MMP-13可能在疾病发生过程中扮演了更为关键的角色。RYU JH等^[16]研究发现,炎症因子在与其受体结合后会通过激活细胞外信号调节酶相关通路,诱导软骨组织释放MMP-3、MMP-9及MMP-13,增加II型胶原和聚集蛋白聚糖的剪切和降解,破坏关节软骨。

本研究中,膝骨性关节炎模型兔关节软骨病理损伤明显,软骨细胞成簇肥大、排列紊乱、部分细胞凋亡甚至坏死,滑膜增厚。与对照组比较,模型组软骨组织Mankin评分、关节液及关节软骨中MMPs含量均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,中药组及阳性药组软骨组织Mankin评分、关节液及关节软骨中MMPs含量显著下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。硫酸氨基葡萄糖为天然的氨基单糖,是人体关节软骨基质中合成蛋白聚糖的必需成分,临床广泛用于预防和治疗各种类型的骨性关节炎,研究^[17-18]表明,硫酸氨基葡萄糖可参与抗氧化、抗炎,并抑制MMPs、氧化自由基的形成,预防糖皮质激素及非甾体抗炎药对关节软骨细胞的损害。本研究结果也证实,硫酸氨基葡萄糖能够抑制膝骨性关节炎MMPs的产生,保护关节软骨细胞。

本研究结果提示,活血化瘀合剂能够缓解膝骨性关节炎模型兔关节软骨的病理损伤,其机制与抑制关节液及软骨中MMP-3、MMP-9、MMP-13水平有关。本研究证实活血化瘀法能通过调控MMPs水平发挥治疗膝骨性关节炎的功效,一定程度阐明了活血化瘀法的疗效机制,为其临床治疗膝骨性关节炎提供了良好的理论依据。

参考文献

[1] 陈松.骨性关节炎发病机制的研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2019,19(7):27-28.
[2] GEORGIEV T, IVANOVA M, KOPCHEV A, et al. Cartilage oligomeric protein, matrix metalloproteinase-3, and Coll2-1 as serum biomarkers in knee osteoarthritis: A cross-sectional study[J].

Rheumatology International, 2018, 38(5): 821-830.

- [3] MALEK MAHDAVI A, MAHDAVI R, KOLAH S. Effects of l-carnitine supplementation on serum inflammatory factors and matrix metalloproteinase enzymes in females with knee osteoarthritis: A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study[J]. Journal of the American College of Nutrition, 2016, 35(7): 597-603.
[4] 田志清,吴官保,董克芳.透明质酸钠关节内注射配合消炎散外敷治疗膝关节创伤性滑膜炎的疗效观察[J].湖南中医药大学学报,2008,28(2):63-64,69.
[5] 刘献祥,李西海,周江涛.改良Hulth造模法复制膝骨性关节炎的实验研究[J].中国中西医结合杂志,2005,25(12):1104-1108.
[6] VAN DER SLUIJS J A, GEESINK R G, VAN DER LINDEN A J, et al. The reliability of the Mankin score for osteoarthritis[J]. Journal of Orthopaedic Research, 1992, 10(1): 58-61.
[7] 邝高艳,严可,陈国茜,等.从“虚、瘀、毒”论治膝骨性关节炎的临床研究[J].辽宁中医杂志,2017,44(2):334-336.
[8] 邝高艳,严可,陈国茜,等.活血化瘀法对兔创伤性膝骨性关节炎模型关节液中IL-6及TNF- α 的影响[J].时珍国医国药,2017,28(1):25-28.
[9] 余毅,潘波,杨冬梅,等.活血化瘀合剂对膝骨性关节炎模型兔炎症因子及TLR4/NF- κ B通路的影响[J].中国中医药信息杂志,2020,27(3):39-42.
[10] WANG X X, TANG D Z, SHEN P, et al. Analysis of DNA methylation in chondrocytes in rats with knee osteoarthritis[J]. BMC Musculoskeletal Disorders, 2017, 18(1): 377-382.
[11] KO J H, KANG Y M, YANG J H, et al. Regulation of MMP and TIMP expression in synovial fibroblasts from knee osteoarthritis with flexion contracture using adenovirus-mediated relaxin gene therapy[J]. The Knee, 2019, 26(2): 317-329.
[12] FOTOPOULOS V C, TZINIA A, TZURBAKIS M, et al. Expression levels of matrix metalloproteinase (MMP)-9 and its specific inhibitor TIMP-1, in septic and aseptic arthritis of the knee[J]. Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy, 2012, 20(6): 1159-1167.
[13] NAKAI K, KAWATO T, MORITA T, et al. Angiotensin II induces the production of MMP-3 and MMP-13 through the MAPK signaling pathways via the AT(1) receptor in osteoblasts[J]. Biochimie, 2013, 95(4): 922-933.
[14] GENG R, XU Y S, HU W H, et al. The association between MMP-1 gene rs1799750 polymorphism and knee osteoarthritis risk[J]. Bioscience Reports, 2018, 38(5): BSR20181257.
[15] 曾志成,彭俊,姚小磊,等.密蒙花颗粒离子导入对于眼患者泪液质量及基质金属蛋白酶-9表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2020,40(3):364-368.
[16] RYU J H, LEE A, HUH M S, et al. Measurement of MMP activity in synovial fluid in cases of osteoarthritis and acute inflammatory conditions of the knee joints using a fluorogenic peptide probe-immobilized diagnostic kit[J]. Theranostics, 2012, 2(2): 198-206.
[17] 王颖,柳大岗,于成勇.膝骨性关节炎患者血清中MMP-9的测定及硫酸氨基葡萄糖对其表达的影响[J].基层医学论坛,2017,21(28):3887-3888.
[18] 李建,樊炜骏,孙鹏.独活寄生汤联合硫酸氨基葡萄糖治疗膝骨性关节炎的临床观察[J].中国药房,2017,28(14):1955-1958.