

· 基础研究 ·

温针灸对兔膝骨性关节炎模型软骨细胞中 c-Jun 氨基末端激酶信号通路的影响

武永利 刘 娣 马晓秀 李 春

摘要 目的 观察温针灸治疗兔膝骨性关节炎(KOA)模型软骨中 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)信号通路及基质金属蛋白酶(MMP)-1、MMP-13 的表达,为温针灸治疗 KOA 提供现代医学理论支持。**方法** 40 只新西兰大耳兔随机选择 30 只采用右膝关节伸直位石膏固定制备 KOA 模型,另 10 只为正常对照组。固定 6 周后行 X 线检查确定造模成功后随机分为温针灸组、双氯芬酸钠组、模型组,每组 10 只。温针灸组选取足三里、鹤顶、内膝眼穴给予温针灸治疗,每天 1 次,15 min/次,治疗 2 周;双氯芬酸钠组按 15 mg/kg 灌胃,每天 1 次,治疗 2 周;模型组及正常对照组不予任何干预,正常饲养。采用免疫组织化学法、RT-PCR、免疫蛋白印迹法(Western Blot)检测软骨中 JNK1、JNK2、MMP-1、MMP-13 的表达。**结果** 与正常对照组比较,模型组关节软骨中 MMP-1、MMP-13、JNK1、JNK2 mRNA 及蛋白表达升高($P < 0.05$),且温针灸组、双氯芬酸钠组关节软骨中 MMP-1、MMP-13、JNK1、JNK2 mRNA 及蛋白表达较模型组降低($P < 0.05$),同时温针灸组 MMP-1、MMP-13 mRNA 蛋白表达及 JNK1、JNK2 mRNA 表达较双氯芬酸钠组降低更为明显($P < 0.05$)。**结论** 温针灸可抑制 KOA 软骨细胞中 JNK1、JNK2、MMP-1、MMP-13 的表达,温针灸治疗 KOA 可能是通过激活 JNK 信号通路,抑制 MMP-1、MMP-13 的表达而达到治疗作用。

关键词 温针灸;膝骨关节炎;基质金属蛋白酶;c-Jun 氨基末端激酶信号通路

Effect of Warming Moxibustion on Expression of c-Jun N-terminal Kinase of Cartilage Cells in Rabbits with Knee Osteoarthritis WU Yong-li, LIU Di, MA Xiao-xiu, and LI Chun *Department of Orthopedics and Traumatology of Traditional Chinese Medicine, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan(750004)*

ABSTRACT Objective To observe the effect of the warming moxibustion(WM) on the expression of c-Jun N-terminal kinase(JNK) and matrix metalloproteinase-1/13(MMP-1、MMP-13) in knee cartilage of osteoarthritis rabbits, and explore the mechanism of WM treatment on knee osteoarthritis(KOA). **Methods** Ten rabbits were selected randomly from 40 rabbits as the normal controls group(NC group), and the rest 30 rabbits were established model of KOA by extension position with plaster cast. After 6 weeks, X-ray checking was used to determine the model success. The 30 model rabbits were randomly divided into the WM group, the diclofenac sodium group(DS group) and the model group(MG group), 10 in each group. WM at Zusanli(ST-36), Hedong(EX-LE2), Neixiyan(EX-LE4) was performed in the WM group, 15 min each, once per day. The rabbits in the DS group were administrated with diclofenac sodium by gavage 15 mg/kg, once per day for 2 weeks. The rabbits in the MG and NC group received no treatment. The change of content of JNK1, JNK2, MMP-1, MMP-13 expression in cartilage after treatment were observed respectively by immunohistochemical method, reverse transcription-Polymerase Chain Reaction and Western Blot. **Results** Compared with the NC group, the mRNA and protein expressions of JNK1, JNK2, MMP-1, MMP-13 in the MG group were significantly increased($P < 0.05$). Compared with the MG group, the mRNA and protein expressions of JNK1, JNK2, MMP-1, MMP-13 in the WM and DS group were

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81260545)

作者单位:宁夏医科大学总医院中医骨伤科(银川 750004)

通讯作者:武永利, Tel: 0951-6743363, E-mail: wuyongli999@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20170929.229

significantly decreased ($P < 0.05$). The mRNA and protein expressions of MMP-1, MMP-13 and the mRNA expression of JNK1, JNK2 in the MG group were decreased significantly than those in the DS group ($P < 0.05$). Conclusions WM can inhibit the expression of JNK1, JNK2, MMP-1, MMP-13 in KOA chondrocytes, indicating that WM might relieves knee osteoarthritis by reducing the expression of MMP-1 and MMP-13 by JNK pathway.

KEYWORDS warming moxibustion; knee osteoarthritis; matrix metalloprotein; c-Jun N-terminal kinase pathway

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是临床上最常见的关节疾患之一, 是导致关节长期慢性疼痛及关节功能障碍的主要病因, 引起了国际社会的广泛关注, 手术治疗只能处理终末期的症状, 对早中期缺乏有效的治疗手段。临床研究发现, 温针灸治疗早中期膝骨性关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 具有一定的临床疗效^[1,2], 但其作用机制未完全阐明。有研究报道不同的应激刺激可以通过刺激 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 信号蛋白通路引起软骨退变及损伤等一系列变化, 包括慢性应激刺激能够引起关节软骨细胞、滑膜细胞产生相关炎症因子^[3], 炎症因子进一步经过 JNK 信号通路进行细胞内信号转导, 最终引起基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) 表达升高、自由基的生成、细胞凋亡等一系列的过程^[4-7], 达到抑制蛋白多糖和二型胶原的合成, 促进细胞外基质降解, 引起并加快 KOA 的进展。现代研究表明, MMPs 与 JNK 信号通路在软骨细胞退变中起到了重要的作用^[8-10], 且温针灸可抑制软骨细胞中 MMPs 的表达^[11,12]。因此, 温针灸治疗 KOA 的作用机制可能与抑制 MMPs 的表达及 JNK 信号通路之间存在相关性。本实验制备 KOA 模型兔, 采用温针灸疗法作用于 KOA 兔关节周围穴位, 以期观察温针灸治疗 KOA 的临床疗效及对软骨细胞 JNK 信号转导通路中 JNK1、JNK2 的表达及通路下游的 MMP-1、MMP-13 表达的影响。

材料与方 法

1 动物 40 只普通级 6 月龄雄性新西兰大耳兔 (宁夏医科大学动物实验中心提供, 动物许可证号: SCXK2014-0005), 体重 (2.54 ± 0.51) kg。实验通过宁夏医科大学总医院医学科研伦理审查委员会批准。

2 试剂及仪器 兔抗人 β -catenin 单克隆抗体、兔抗人 TCF-4 单克隆抗体、兔抗人 sost 单克隆抗体 (Abcam 公司, 美国); HRP 标记山羊抗兔 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司, 中国); RNA Pure Tissue Kit 动物组织 RNA 提取试剂盒 (北京康为世纪生物科技有限

公司, 中国); UltraSYBR Mixture (with high ROX, 北京康为世纪生物科技有限公司); Image Pro Plus 6.0 图像分析软件 (Media Cybernetics 公司, 美国); H6023i 显微镜及图像采集系统 (Leica 公司, 德国); ALS4000 凝胶成像仪 (GE 公司, 美国); CFX Connect 定量 PCR 仪 (BIO-RAI 公司, 美国)。

3 分组及造模 40 只大耳兔采用随机数字表法分为温针灸组、双氯芬酸钠组、模型组、正常对照组, 每组 10 只, 各组大耳兔在实验前均适应性喂养 3 天, 除正常对照组其余各组采用右膝关节伸直位石膏固定术制备兔 KOA 模型^[13]。首先将大耳兔侧卧位固定在兔架上, 兔毛剪短至 0.5 cm 左右 (注意误剪伤大耳兔), 由助手将右后肢膝关节完全伸直, 操作者用管型石膏将之固定于过伸位, 长度从髌关节远端约 2 cm 至踝关节上缘 2 cm, 待石膏干硬后, 再放回兔笼, 固定 6 周制备 KOA 兔软骨退变模型, 造模结束后行 X 线检查确定造模成功。KOA 兔模型制备过程中未出现实验兔死亡, 经 X 线检验所制备模型均符合 KOA 的诊断标准。

4 干预方法 造模完成 3 天后, 对各组进行干预。温针灸组: 选取鹤顶、足三里、内膝眼穴行温针灸治疗 (操作方法: 取长 1.5 寸毫针直刺, 在留针过程中, 取约 1 cm 长艾条一段, 套在针柄之上, 距皮肤 2 ~ 3 cm, 从其下端点燃施灸。在操作过程中, 术者一手置于穴位附近, 如觉温度过高, 可在该穴区置一硬纸片, 以稍减火) 每日 1 次, 灸一壮, 7 天为 1 个疗程, 共治疗 2 个疗程。双氯芬酸钠组: 造模完成 3 天后, 按照 15 mg/kg 灌胃双氯芬酸钠, 每日 1 次, 7 日为 1 个疗程, 共治疗 2 个疗程。模型组: 造模完成 3 日后开始, 不予任何干预手段, 每天在固定器上固定 15 min。正常对照组: 不予造模, 不予任何干预手段。均干预 2 周。

5 标本收集方法 干预结束后, 耳缘静脉注射空气 20 mL 栓塞处死大耳兔。常规消毒, 打开膝关节后, 充分暴露关节软骨, 观察关节软骨表面情况及关节内滑膜增生情况, 观察完毕后取右后肢内侧胫骨关节面软骨。一部分软骨标本生理盐水冲洗表面血迹后立

即放入 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 ~ 48 h, 15% ED-TA 脱钙液(每周更换 1 次), 石蜡包埋, 切片(5 μm), 用于免疫组织化学检测软骨细胞中 MMP-1、MMP-13 的表达; 另一部分放入液氮中保存, 用于 RT-PCR 及 Western Blot 检测 MMP-1、MMP-13、JNK1、JNK2 的表达。

6 免疫组织化学检测 MMP-1、MMP-13 (1) 取组织经 4% 多聚甲醛固定, 常规包埋, 石蜡切片; (2) 切片经纯二甲苯、梯度酒精脱蜡结束后, 用自来水漂洗、PBS 漂洗各 3 次, 每次 5 min; (3) 加 3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶, 室温下作用 10 min, PBS 洗 3 遍, 每次 5 min; (4) 加入 0.1% 胰酶修复液中, 37 $^\circ\text{C}$ 修复 20 min, PBS 洗 3 遍, 每次 5 min; (5) 切片放入 10% 尿素中, 37 $^\circ\text{C}$ 静置 10 min, PBS 洗 3 遍, 每次 5 min; (6) 加入封闭用正常山羊血清封闭(湿盒内操作), 室温下静置 30 min; (7) 加入对应的第一抗体(湿盒内操作), 浓度为 1:100, 室温下静置 30 min 后放入 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱过夜; (8) 从 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱取出, 室温静置 30 min 后经 PBS 洗 3 遍, 每次 5 min; (9) 加入生物素化二抗, 室温静置 1 h, PBS 洗 3 遍, 每次 5 min; (10) 加链霉菌卵白素-辣根过氧化物酶, 室温下静置 10 min; (11) PBS 洗 3 遍后加入 DAB, 显色 1 ~ 5 min; (12) 苏木素浅复染(小于 5 min), 常规脱水、封片、分析结果。结果分析采用 IPP 图像分析软件, 测定其 OD 值。

7 Western Blot 检测法检测 JNK1、JNK2 取软骨组织 100 mg, 边研磨边加入液氮, 直至将组织完全研磨成粉末状, 加入细胞裂解液, 提取总蛋白; 配置 10% 的分离胶和 4% 的浓缩胶, 按照 BCA 试剂盒操作步骤对蛋白含量进行测定; 经过上样、电泳及转膜后, 加入浓度为 1:100 的一抗, 完成孵育后再进行洗膜; 选择与一抗来源合适的二抗工作液, 将浓度稀释为 1:10 000 后进行二抗孵育; 二抗孵育完成后进行洗膜, 最后曝光及洗片。采用 Image J 软件分析灰度值, 最后进行统计分析。

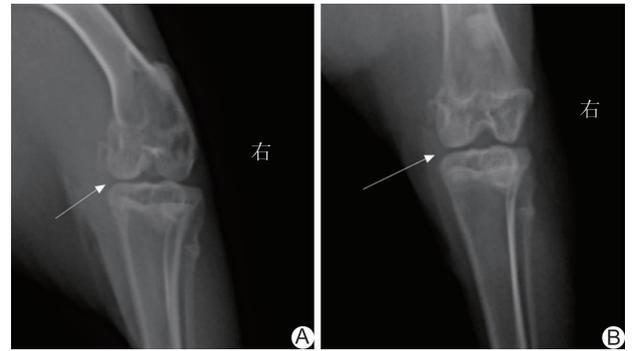
8 RT-PCR 检测法检测 MMP-1、MMP-13、JNK1、JNK2 mRNA 表达 将软骨从液氮中取出, 在预冷的研钵中加入液氮, 将软骨研磨成粉, 将粉末转移至预冷的离心管中, 按照 Trizol 提取试剂盒说明操作提取 RNA, 并用紫外分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度; 逆转录合成 cDNA, 加入 MMP-1、MMP-13、JNK1、JNK2 的引物并将反应体系放入实时荧光定量 PCR 仪进行 DNA 表达检测。

9 统计学方法 采用 SPSS 20.0 对数据进行统

计分析, 所有实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 One Way ANOVA。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 模型组与正常对照组 X 片比较(图 1) 正常对照组关节面光滑平整, 关节间隙正常, 关节边缘整齐平整无骨赘形成(图 1B), 模型组关节软骨表面欠光滑, 骨赘形成, 关节间隙明显变窄, 关节边缘欠平整光滑(图 1A), 同时大体观察发现正常对照组关节软骨表面呈乳白色光泽, 关节表面光滑平整, 关节液清亮, 模型组关节软骨面呈淡黄色, 无光泽, 关节边缘不平整。



注: A 为模型组; B 为正常对照组; 箭头所指为病变处

图 1 模型组与正常对照组 X 线检查结果比较

2 各组 MMP-1、MMP-13 蛋白表达比较(表 1, 图 2、3) MMP-1、MMP-13 的阳性结果为软骨细胞质或/和细胞核内呈现棕褐色颗粒。正常对照组软骨细胞 MMP-1、MMP-13 基本无表达; 模型组软骨细胞中可见 MMP-1、MMP-13 强阳性表达, 细胞核、细胞质均可见深棕色颗粒, 表层表达最强烈, 全层可见; 温针灸组软骨细胞中可见 MMP-1、MMP-13 部分表达, 多表现在细胞核, 细胞质基本无表达, 且颜色变浅, 只在表层可见部分较深表达; 双氯芬酸钠组软骨细胞中可见 MMP-1、MMP-13 部分表达, 细胞质、细胞核均可见, 颜色相对较深。采用 IPP 图像分析软件, 测定软骨细胞中 MMP-1、MMP-13 表达的 OD 值, 与正常对照组比较, 模型组 MMP-1、MMP-13 蛋白含量表达升高($P < 0.05$);

表 1 各组 MMP-1、MMP-13 蛋白表达比较
(OD 值, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | MMP-1 | MMP-13 |
|-------|----|--------------------------------|--------------------------------|
| 正常对照 | 10 | 0.29 \pm 0.08 | 0.24 \pm 0.02 |
| 模型 | 10 | 1.10 \pm 0.07* | 1.02 \pm 0.06* |
| 双氯芬酸钠 | 10 | 0.63 \pm 0.06 Δ | 0.64 \pm 0.07 Δ |
| 温针灸 | 10 | 0.34 \pm 0.11 $\Delta\Delta$ | 0.32 \pm 0.05 $\Delta\Delta$ |

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与双氯芬酸钠组比较, $\Delta\Delta P < 0.05$

与模型组比较,双氯芬酸钠组及温针灸组 MMP-1、MMP-13 蛋白含量表达降低,且温针灸组低于双氯芬酸钠组(均 $P < 0.05$)。

3 各组关节软骨中 JNK1、JNK2 蛋白表达比较(表 2,图 4) 与正常对照组比较,模型组 JNK1、JNK2 蛋白表达升高($P < 0.05$);与模型组比较,温针灸组 JNK1、JNK2 蛋白表达降低($P < 0.05$)。双氯芬酸钠组与模型组及温针灸组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

4 各组 JNK1、JNK2、MMP-1、MMP-13 mRNA 水平比较(表 3) 与正常对照组比较,模型组 JNK1、JNK2、MMP-1、MMP-13 mRNA 水平升高($P < 0.05$);与模型组比较,双氯芬酸钠组及温针灸组 JNK1、JNK2、MMP-1、MMP-13 mRNA 水平降低,且温针灸组低于双氯芬酸钠组(均 $P < 0.05$)。

讨 论

OA 是一种常见的老年性退行性疾病,严重影响患者的身体健康和生活质量,带来了极大的家庭负担及经济压力。中医学将 KOA 归类于“膝骨痹”的范畴,

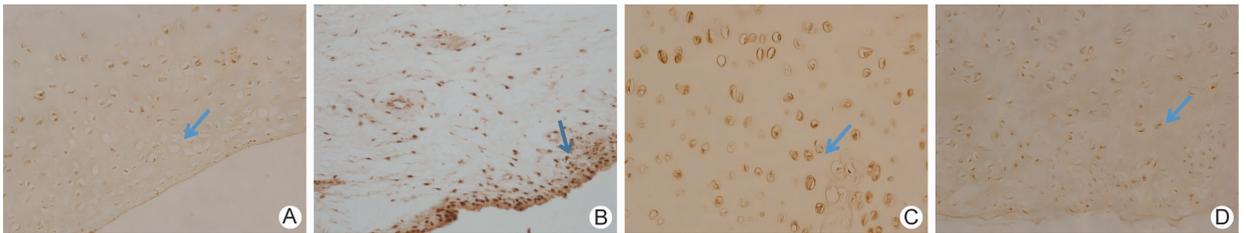
认为其形成的主要原因为“风、寒、湿”邪侵袭人体,或因素体虚弱,邪气趁虚而入,致使经脉痹阻不通,故治疗上多采用温补之法,以达到温通经脉,通络止痛之效。温针灸疗法同时具有针刺与艾灸的双重疗效,在针刺活血通络,调整气血的同时,配合灸的热敏刺激,改善局部微循环,具有温阳补虚、行气活血的作用。本实验选取具有治疗膝关节酸痛的鹤顶穴、内膝眼穴,以及补虚要穴足三里穴,病痛局部取穴及循经选穴可疏通经络气血,营卫调和,使风、寒、湿邪无所依附,达到通则不痛的疗效。

表 2 各组关节软骨中 JNK1、JNK2 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | JNK1 | JNK2 |
|-------|----|------------------------|------------------------|
| 正常对照 | 10 | 0.399 ± 0.178 | 0.378 ± 0.156 |
| 模型 | 10 | 1.233 ± 0.024 * | 1.243 ± 0.025 * |
| 双氯芬酸钠 | 10 | 1.177 ± 0.047 | 1.157 ± 0.067 |
| 温针灸 | 10 | 0.870 ± 0.220 Δ | 0.860 ± 0.220 Δ |

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

本实验选择了膝关节伸直位石膏固定的方法制备兔 KOA 模型。此方法是参考经典的 Videman T 造模法^[14],将兔子的右膝关节固定在伸直位上 6 周形成



注:A 为正常对照组,B 为模型组,C 为双氯芬酸钠组,D 为温针灸组,箭头所指为阳性表达位置;图 3 同

图 2 免疫组化检测各组 MMP-1 阳性细胞表达 (免疫组化染色, ×400)

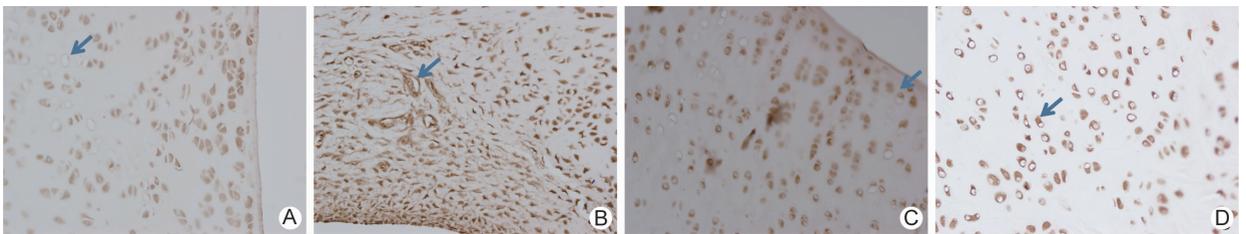
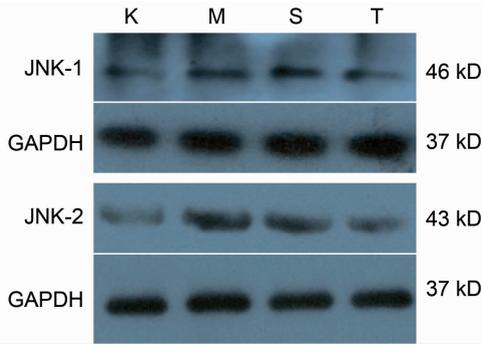


图 3 免疫组化检测各组 MMP-13 阳性细胞表达 (免疫组化染色, ×400)

表 3 各组 JNK1、JNK2、MMP-1、MMP-13 mRNA 水平比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | MMP-1 | MMP-13 | JNK1 | JNK2 |
|-------|----|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 正常对照 | 10 | 1.00 ± 0.55 | 1.02 ± 0.48 | 1.00 ± 0.41 | 1.01 ± 0.33 * |
| 模型 | 10 | 2.55 ± 0.50 * | 3.25 ± 0.38 * | 2.87 ± 0.29 * | 2.92 ± 0.31 * |
| 双氯芬酸钠 | 10 | 1.99 ± 0.61 Δ | 1.91 ± 0.38 Δ | 1.95 ± 0.39 Δ | 1.91 ± 0.29 Δ |
| 温针灸 | 10 | 1.28 ± 0.54 Δ ▲ | 1.05 ± 0.45 Δ ▲ | 1.29 ± 0.40 Δ ▲ | 1.31 ± 0.36 Δ ▲ |

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$;与双氯芬酸钠组比较,▲ $P < 0.05$



注: K 为正常对照组; M 为模型组; W 为温针灸组; S 为双氯芬酸钠组

图 4 各组关节软骨中 JNK1、JNK2 蛋白电泳图

KOA 模型。兔 KOA 模型制备成功后,膝关节大体观察发现兔 KOA 模型关节表面不光滑,无光泽,软骨不透明,可见明显缺损及骨赘形成,在不对膝关节内环境造成影响的前体下,极大程度上模拟了 KOA 发生的全过程,该法操作简便且成功率较高,适用于本实验。

KOA 发病的主要原因是力学和生物学因素共同作用下,软骨细胞、细胞外基质以及软骨下骨三者降解和合成正常偶联失衡导致。随着对信号通路研究的深入,目前发现 MAPK 信号通路在 OA 的发病机制中起到了关键性的作用,并且已经证实 JNK、P38 激酶及 ERK 信号通路均参与了 OA 的发病^[15]。JNK 信号通路是参与炎症反应调控的重要信号通路,外界多种应激原如细胞因子都可以致 JNK 磷酸化,引起细胞内蛋白激酶的连锁反应^[16]。关节软骨是由软骨细胞和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)共同组成,且软骨细胞是关节软骨中唯一的细胞。正常状态下,软骨细胞在细胞因子和生长因子的共同调节作用下,保证蛋白酶和蛋白酶抑制剂含量处于动态平衡,维持 ECM 结构和功能上的完整。软骨细胞影响 ECM 的同时,也受 ECM 的影响,包括软骨细胞的激活、增殖及分化。当软骨基质的降解和合成明显失调,就会引起关节软骨基质胶原的降解,关节软骨破坏,软骨细胞数量减少,软骨结构改变,其中 MMP-1、MMP-13 是加速 OA 细胞外基质病理性降解的主要蛋白酶^[17]。当软骨细胞受到炎症因子、机械应力等刺激时,会通过细胞内的信号转导途径,将信号传递给各种转录因子,调控着软骨组织的发生、改建、内环境的稳定以及创伤修复等病理生理过程,而其中 MAPKs 信号通路是介导骨关节炎软骨损伤最重要的信号转导系统。既往 Sylvester J 等^[18]研究发现 IL-17 通过 JNK 途径诱导 MMP-13 和蛋白聚糖酶的表达从而引起关节软骨细胞基质的降解。而 IL-6 作用于牛关节软骨细胞时,

能通过激活 ERK 和 JNK 途径而引起 MMP-1、MMP-3、MMP-13 的增高^[15]。Chowdhury TT 等^[19]研究发现,在 KOA 发展过程中, JNK 信号通路可以提高 MMPs 的表达水平。Liacini A 等^[20]使用姜黄素特异性的阻断 JNK/SPAK 通路,发现其可降低 MMP-3、MMP13 的表达。说明在 OA 的发展过程中,在力学及生物学因素的影响下,促进炎症因子的分泌,进一步激活 JNK 信号通路,引起 MMP-1、MMP-13 等基质金属蛋白酶表达升高,加速细胞外基质的降解,导致 KOA 的发生。本次实验结果显示,温针灸治疗后关节软骨中 JNK1、JNK2、MMP-1、MMP-13 的 mRNA 及蛋白表达较模型组明显降低,由此可以推测温针灸治疗 KOA 的机制与其抑制 JNK 信号通路,引起 MMP-1、MMP-13 表达下降有关。

综上所述,本研究发现温针灸引起 JNK 信号通路蛋白表达下降,促进 MMP-1、MMP-13 含量的下调,进一步延缓软骨细胞的退变,缓解 ECM 降解,提示 JNK 信号通路的表达变化与 MMPs 表达具有相关性,但因本研究没有应用相关抑制剂,无法证明温针灸对关节软骨细胞中 MMP-1、MMP-13 的作用是通过 JNK 信号通路完成的,另外温针灸对各种病变程度 KOA 软骨细胞及人软骨细胞是否有具有同样的作用目前还无法证实,需要进一步深入研究证实。

参 考 文 献

- [1] 丁明辉,李燕,张宏.温针灸治疗膝骨性关节炎的近期疗效[J].中国康复杂志,2009,24(4):321-324.
- [2] 武永利,张跃全,牛子瞻.膝关节骨性关节炎温针灸治疗的中远期疗效观察[J].宁夏医学院学报,2008,30(2):199-200.
- [3] Wojdasiewicz P, Poniatowski ŁA, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis [J]. Mediators Inflamm, 2014, 2014: 561459.
- [4] Loeser RF. Molecular mechanisms of cartilage destruction in osteoarthritis [J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2008, 8(4): 303-306.
- [5] 郑洁,王瑞辉,寇久社.炎症反应在骨关节炎软骨退变中的作用[J].基础医学与临床,2014,34:1146-1149.
- [6] Akhtar N, Rasheed Z, Ramamurthy S, et al. MicroRNA-27b regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in human osteoarthritis chondrocytes [J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(5): 1361-1371.
- [7] Yoon HS, Kim HA. Prolongation of c-Jun N-terminal kinase is associated with cell death induced by

- tumor necrosis factor alpha in human chondrocytes [J]. *J Korean Med Sci*, 2004, 19(4): 567–573.
- [8] Mengshol JA, Vincent MP, Coon CI, et al. Interleukin-1 induction of collagenase3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3 [J]. *Arthritis Rheum*, 2000, 43(4): 801–811.
- [9] Nishitani K, Ito H, Hiramitsu T, et al. PGE2 inhibits MMP expression by suppressing MKK4-JNK MAP kinase-c-JUN pathway via EP4 in human articular chondrocytes [J]. *Cell Biochem*, 2010, 109(2): 425–433.
- [10] Zhang Y, Li HY, Zhang ZH, et al. Garlic-derived compound S-allylmercaptocysteine inhibits cell growth and induces apoptosis via the JNK and p38 pathways in human colorectal carcinoma cells [J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(6): 2591–2596.
- [11] Bluteau G, Gouttenoire J, Conrozier T, et al. Differential gene expression analysis in a rabbit model of osteoarthritis induced by anterior cruciate ligament (ACL) section [J]. *Biorheology*, 2002, 39(1–2): 247–258.
- [12] Giannopoulos G, Pavlakis K, Parasi A, et al. The expression of matrix metalloproteinases -2 and -9 and their tissue inhibitor 2 in pancreatic ductal and ampullary carcinoma and their relation to angiogenesis and clinicopathological parameters [J]. *Anticancer Res*, 2008, 28 (3B): 1875–1881.
- [13] 张洪, 江捍平, 王大平, 等. 关节制动制作骨性关节炎动物模型的探讨 [J]. *中国现代医学杂志*, 2006, 16 (12): 1843–1848.
- [14] Videman T. Experimental osteoarthritis in the rabbit: comparison of different periods of repeated immobilization [J]. *Acta Orthop Scand*, 1982, 53 (3): 339–347.
- [15] Kimura H, Yukitake H, Suzuki, et al. The chondroprotective agent ITZ-1 inhibits interleukin-1 beta-induced matrix metalloproteinase-13 production and suppresses nitric oxide-induced chondrocyte death [J]. *J Pharmacol Sci*, 2009, 110(2): 201–211.
- [16] Prassdam I, Friis T, Shi W, et al. Osteoarthritic cartilage chondrocytes alter subchondral bone osteoblast differentiation via MAPK signalling pathway involving ERK1/2 [J]. *Bone*, 2010, 46 (1): 226–235.
- [17] Murphy G, Knäuper V, Atkinson S, et al. Matrix metalloproteinases in arthritic disease [J]. *Arthritis Res*, 2002, 4 (Suppl 3): S39–S49.
- [18] Sylvester J, Liacini A, Li WQ, et al. Interleukin-17 signal transduction pathways implicated in inducing matrix metalloproteinase-3, -13 and aggrecanase-1 genes in articular chondrocytes [J]. *Cell Signal*, 2004, 16(4): 469–476.
- [19] Chowdhury TT, Salter DM, Bader DL, et al. Signal transduction pathways involving p38 MAPK, JNK, NF- κ B and AP-1 influences the response of chondrocytes cultured in agarose constructs to IL-1 β and dynamic compression [J]. *Inflamm Res*, 2008, 57(7): 306–313.
- [20] Liacini A, Sylvester J, Li WQ, et al. Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF- α is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF- κ B transcription factors in articular chondrocytes [J]. *Exp Cell Res*, 2003, 288(1): 207–217.

(收稿: 2016–03–31 修回: 2017–08–26)

责任编辑: 汤 静