

温针灸对膝骨关节炎大鼠 P53、Map2k3 和 PGE₂ 的影响

王华敏¹, 宓轶群¹, 赵媛媛¹, 张永亮²

(1. 上海交通大学附属第六人民医院, 上海 200233; 2. 河北医科大学第二医院, 石家庄 050000)

【摘要】 目的 通过观察温针灸对 KOA 大鼠肿瘤抑制蛋白 P53 (P53)、促分裂原活化蛋白激酶 3 (Map2k3) mRNA 和前列腺素 E₂ (PGE₂) 蛋白含量的影响, 探讨温针灸治疗 KOA 的可能机制。方法 将 28 只健康的雄性 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、药物组和温针灸组, 每组 7 只。正常组常规饲养, 余 3 组大鼠采用关节腔注射木瓜蛋白酶 papain 联合强迫运动造模处理。造模成功后, 温针灸组大鼠选用双侧“膝前穴”; 药物组大鼠予美洛昔康药物治疗。治疗结束后通过 HE 染色观察大鼠滑膜组织形态学变化, ELISA 检测大鼠血清 PGE₂ 蛋白含量, 实时荧光定量 PCR 法检测滑膜组织中 P53 和 Map2k3 mRNA 的表达情况。结果 HE 染色结果显示与正常组相比, 模型组可见明显的炎性细胞浸润, 药物组可见少量炎性细胞、部分脂肪细胞和增生的血管, 温针灸组可见少量炎性细胞散在分布。与正常组比较, 模型组、药物组和温针灸组大鼠血清 PGE₂ 含量、滑膜组织 P53 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 温针灸组、药物组血清 PGE₂ 蛋白含量、滑膜组织 P53 mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$); 温针灸组与药物组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组大鼠滑膜组织中 Map2k3 mRNA 表达比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 温针灸在一定程度上可以减少滑膜组织炎性细胞数量, 通过降低 PGE₂ 的含量抑制炎性反应。温针灸能够降低 KOA 大鼠滑膜组织 P53 mRNA 的异常高表达。

【关键词】 灸法; 温针灸; 骨关节炎, 膝; 肿瘤抑制蛋白 P53; 促分裂原活化蛋白激酶 3; 前列腺素 E₂

【中图分类号】 R2-03 **【文献标志码】** A

DOI:10.13460/j.issn.1005-0957.2020.03.0391

Effect of Warm Needling Moxibustion on P53, Map2k3 and PGE₂ in Knee Osteoarthritis Rats WANG Hua-min¹, MI Yi-qun¹, ZHAO Yuan-yuan¹, ZHANG Yong-liang². 1. Shanghai Jiaotong University Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China; 2. Hebei Medical University Second Hospital, Shijiazhuang 050000, China

[Abstract] Objective To explore the possible mechanism of warm needling moxibustion treatment for knee osteoarthritis through observing its effect on tumor suppressor protein P53 (P53), mitogen-activated protein kinase 3 (Map2k3) mRNA and prostaglandin E₂ (PGE₂) contents in knee osteoarthritis rats. **Method** Twenty-eight healthy male SD rats were randomized to normal, model, medication and warm needling moxibustion groups, seven each. The normal group was fed routinely. In the other three groups of rats, the model was made by intraarticular injection of papain plus forced movement. After successful model making, the warm needling moxibustion group of rats was treated with bilateral “anterior knee point” and the medication group of rats, with meloxicam. After the completion of treatment, rat morphological changes in synovial membrane were observed by HE staining, serum PGE₂ content was measured by ELISA and the expressions of P53 and Map2k3 mRNAs in synovium were determined by real-time fluorescent quantitative PCR assay. **Result** HE staining results showed that inflammatory cell infiltration was obviously visible in the model group, a few inflammatory cells, partial adipocytes and hyperplastic blood vessels were

基金项目:上海市卫生和计划生育委员会科研课题(201740034);上海市卫生和计划生育委员会中医药科技创新项目(ZYKC201701006);上海市徐汇区重要疾病联合攻关项目(XHLHGG201802)

作者简介:王华敏(1988—),男,住院医师,硕士,Email:13593149307@163.com

通信作者:宓轶群(1970—),女,主任医师,硕士生导师,Email:miyiqun@126.com

visible in the medication group and a few inflammatory cells were scatteredly distributed in the warm needling moxibustion group, compared with the normal group. Serum PGE₂ content and the expression of P53 mRNA in synovium increased significantly in the model, medication and warm needling moxibustion groups of rats compared with the normal group ($P < 0.01$) and decreased significantly in the warm needling moxibustion and medication groups compared with the model group ($P < 0.05$); there were no statistically significant differences between the warm needling moxibustion and medication groups ($P > 0.05$). There was no statistically significant difference in the expression of Map2k3 mRNA in synovium between various groups of rats ($P > 0.05$). **Conclusion** Warm needling moxibustion can decrease the number of inflammatory cells in synovium to a certain extent and inhibit inflammatory reactions by reducing PGE₂ content. It can decrease abnormal high expression of P53 mRNA in synovium in knee osteoarthritis rats.

[Key Words] Moxibustion; Warm needling moxibustion; Osteoarthritis, knee; Tumor suppressor protein P53; Mitogen-activated protein kinase 3; Prostaglandin E₂

膝骨关节炎(Knee Osteoarthritis, KOA)是一种多发生于中老年人的慢性骨关节炎疾病,关节软骨退变、滑膜增生与炎症是该病的主要病理特征。该病具有高发病率、高增长率高致残率。有文献研究表明前列腺素 E₂与 KOA 发病关系密切^[1-2]。近年来相关研究表明 KOA 的发病与多条信号通路中的相关 mRNA 调控有关^[3-4],本实验通过检测 KOA 大鼠外周血清中前列腺素 E₂(Prostaglandin E₂, PGE₂)含量及滑膜组织中肿瘤抑制蛋白 P53(Tumor protein p53, P53)和促分裂原活化蛋白激酶 3 (Mitogen-activated protein kinase 3, Map2k3)mRNA 的表达情况,探讨温针灸治疗 KOA 的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

28 只健康的清洁级雄性 3 月龄 SD 大鼠,体质量(270±30)g,购于上海西普尔-必凯实验动物公司[生产许可证号为 SCXK(沪)2013-0016]。饲养环境自然光每日光照 12 h,温度 18℃~22℃,相对湿度 50%~70%,每笼 7 只,自由饮水、摄食,常规饲养 1 周后按随机数字表法分为正常组、模型组、药物组和温针灸组,每组 7 只。实验过程严格遵守实验动物管理条例。

1.2 主要试剂和仪器

小艾炷(上海泰成科技发展有限公司),针灸针(固始公元医疗器械有限公司),美洛昔康片(7.5 mg/片,国药准字 H20020217,上海勃林格殷格翰药业有限公司),papain(P-3250, Sigma 公司),EDTA、NaOH、NaCl、Na₂HPO₄、HCl(上海化学试剂公司),离心机(Sigma 公

司),MK3 型酶标仪(Thermo 公司),PGE₂ELISA 检测试剂盒(KGE004B, RD 公司),RNA 酶抑制剂(RG90925, Epicentre 公司),SuperScriptTMIII 逆转录酶、5×RT 缓冲液(Invitrogen 公司),Primer(英骏生物技术有限公司)。其他涉及的试剂设备和仪器均由上海交通大学附属第六人民医院实验中心提供。

1.3 溶液配制

木瓜蛋白酶(papain)溶液的制备^[5]方法为 32 mL 双蒸水中加入 0.05 g NaH₂PO₄、0.72 g Na₂HPO₄、0.04 g NaOH 和 1.6 g NaCl,混合轻搅溶解后加入 NaOH, pH 浓度调至 8.0,加 0.64 g papain 和 15 mg EDTA-2Na,轻搅溶解后液体呈淡黄色,最后加入 HCL 将 pH 值调至 6.5,双蒸水定溶至 40 mL 后低温保存。美洛昔康溶液的制备,选用临床抗炎镇痛疗效显著的美洛昔康片,将其碾磨粉碎后溶解于生理盐水,反复摇匀后制成 0.5 mg/mL 溶液。

1.4 模型制备

除正常组外,其余 3 组采用关节腔注射 papain 结合被动运动的方法造模^[6-7],准备好配制好的 papain 溶液、手套和 75%医用乙醇棉球等,将大鼠固定在解剖板,充分暴露并屈曲双侧后肢 45°,常规消毒 3 遍关节腔周围的皮肤,注射器快速破皮后斜刺入关节腔,当针下有落空感时外提回抽无血即可注射 papain 溶液。根据临床过度运动易损伤关节造成炎症反应的特点,无固定状态下用自制滚筒每天强迫大鼠超负荷运动 15 min;3 组大鼠分别于第 1 天、第 4 天、第 7 天关节腔注射 papain,单膝单次注射 0.1 mL,2 周后通过 Lequesne MG 膝关节级别评估,观察局部反应、步态

反应、关节活动和关节肿胀 4 个方面,与正常组相比,造模的 3 组大鼠差异有统计学意义(*Kruskal-Wallis* 分析局部反应, $P=0.00039$;步态, $P=0.00037$;关节活

动, $P=0.00025$;关节肿胀, $P=0.00048$),提示动物模型制备成功。详见表 1。

表 1 造模后各组大鼠膝关节评估

(例)

组别	n	局部反应					步态					关节活动					关节肿胀			
		I	II	III	IV	\bar{R}_i	I	II	III	IV	\bar{R}_i	I	II	III	IV	\bar{R}_i	I	II	III	\bar{R}_i
正常组	7	7	0	0	0	25.00	7	0	0	0	25.00	7	0	0	0	25.00	7	0	0	25.00
模型组	7	0	0	2	5	14.57 ^{D)}	0	0	3	4	13.86 ^{D)}	0	0	4	3	11.71 ^{D)}	1	1	5	12.21 ^{D)}
温针灸组	7	0	1	2	4	8.29 ^{D)}	0	1	3	3	7.93 ^{D)}	0	0	5	2	14.29 ^{D)}	0	2	5	12.79 ^{D)}
药物组	7	0	0	3	4	10.14 ^{D)}	0	1	2	4	11.21 ^{D)}	0	1	3	3	7.00 ^{D)}	0	3	4	8.00 ^{D)}

注:与正常组比^{D)} $P<0.05$

1.5 干预方法

正常组与模型组采用与温针灸组相同的抓取和固定,余不做特殊处理。温针灸组诱导大鼠进入固定器后仰卧固定于解剖板,将大鼠后肢双侧膝关节弯曲 45° 便于关节腔的暴露和穴位的定位,揣摩并定位大鼠“膝前穴”(后膝膝盖前方),穴位定位参考《实验针灸学》及相关文献^[8-9],用 75%乙醇棉球消毒 3 遍后持 0.25×25 mm 针灸针迅速刺入,刺入深度为 5~7 mm,随后将长度为 7 mm,直径为 5 mm,重量为 0.5 g 的小艾炷插入并固定于针柄处,点燃后其燃烧完成后换另外一炷,待其充分燃烧完成后即可拔掉针灸针(约为 10 min),每日 1 次,每次 2 壮,连续治疗 10 d。药物组抓紧大鼠背部皮肤,垂直固定身体,充分后仰头部便于打开嘴巴,将灌胃针沿咽后壁方向从嘴角慢慢插入,当进针深度约为 4~5 mm 时回抽观察是否有气泡,如若无气泡则可慢慢推注,推完后迅速出针,药物组大鼠灌胃后采用与温针灸组相同的抓取和固定。根据人和大鼠体质量换算比例 SD 大鼠服用美洛昔康溶液的剂量为 3.75 mg/kg,每日 1 次,连续灌胃 10 d。

1.6 观察指标与检测方法

治疗结束后采用腹腔注射戊巴比妥钠麻醉后处死大鼠,腹主动脉采血 5~10 mL,滴入离心管,随后以 3000 rpm/min,离心 3 min,分离出血清, -80℃ 保存,留待 ELISA 检测。摘取大鼠的双侧膝关节,切开皮肤逐层打开并充分暴露关节腔,手术刀沿髌骨下缘向上钝性分离和剥取滑膜组织,将分离好的滑膜组织放入离心管中置于 -80℃ 冰箱保存,留待 HE 染色和实时定量 PCR 检测。

1.6.1 组织形态学观察

采用 HE 染色观察 4 组大鼠滑膜组织形态学改变。

将滑膜组织浸泡于 10% 的福尔马林溶液中,24 h 后取出进行脱水处理,脱水完成后浸泡于二甲苯中,待组织透明后进行石蜡包埋处理,切片处理后贴到载玻片上,放入 45℃ 恒温箱中烘干;染色之前需要将切片中的蜡块祛除,具体步骤为将切片放置于二甲苯中 30 min,置于 100% 乙醇中 10 min,置于 80% 乙醇中 5 min,置于蒸馏水中 5 min 后即可染色。苏木精染色、冲洗、脱水、伊红染色、冲洗、封片,最后在电子显微镜下观察各组切片染色结果。

1.6.2 血清 PGE₂ 蛋白含量检测

依据 ELISA 试剂盒操作步骤检测血清 PGE₂ 蛋白含量。取出血清和 ELISA 试剂盒,室温下平衡,设立 10 个标准孔,2 个非特异结合孔,其他为样品孔,先后加入 150 μL 相应的试剂和样品,50 μL 一抗(除了非特异结合孔),封板,置于水平摇床(500±50) rpm 孵育 1 h;不洗板,每孔加入 50 μL PGE₂ 结合液,封板,室温摇床孵育 2 h;置于自动洗板机上,Wash Buffer 洗板 4 次。每孔加 200 μL 底物溶液,避光静置孵育 30 min。每孔加入 100 μL 终止液后,30 min 内用酶标仪检测光密度和浓度。

1.6.3 P53 和 Map2k3 mRNA 表达检测

采用实时定量 PCR 法检测,取滑膜组织样品加入 Trizol 试剂混合匀浆,通过氯仿,异丙醇进行 RNA 的提取,紫外吸收法测定 RNA 的浓度和纯度;将提取好的 RNA 样品进行 cDNA 的合成,完成后 -20℃ 冰箱保存;将所有的 cDNA 样品分别配置 Realtime PCR 反应体系进行 PCR 反应,P53 mRNA、Map2k3 mRNA 和管家 mRNA GAPDH 的浓度结果由机器生成,采用 GAPDH 作为内参来校正差异,结果选用待测 mRNA 相对含量(每个样品的浓度除以其管家的浓度,即为此样品 mRNA 校正后的相对含

量)。实时定量 PCR 使用引物列表详见表 2。

表 2 引物列表

名称	双向引物序列	退火温度(°C)	产物长度(bp)
GAPDH	F5' GCTCTCTGCTCCTCCCTGTTCTA3'	60	124
	R5' TGGTAACCAGGCGTCCGATA3'		
P53	F5' GTATGCTGAGTATCTGGACGACA3'	60	170
	R5' CCAGCGTGATGATGGTAAGG3'		
Map2k3	F5' CTCATCAACAAAGAGGGGCAC3'	60	221
	R5' GACTCGTAAGGAATCGAGA3'		

1.7 统计学方法

采用 SPSS21.0 软件统计分析各组实验数据。符合

正态分布的计量资料用均数±标准差表示,采用单因素方差分析;不符合正态分布的计量资料用中位数,(四分位数)表示,两独立样本组间比较用非参数检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 滑膜组织形态学观察

正常组可见大量的脂肪细胞和滑膜细胞,模型组可见明显的炎性细胞浸润,药物组可见少量炎性细胞、部分脂肪细胞和增生的血管,温针灸组可见少量炎性细胞散在分布。详见图 1。

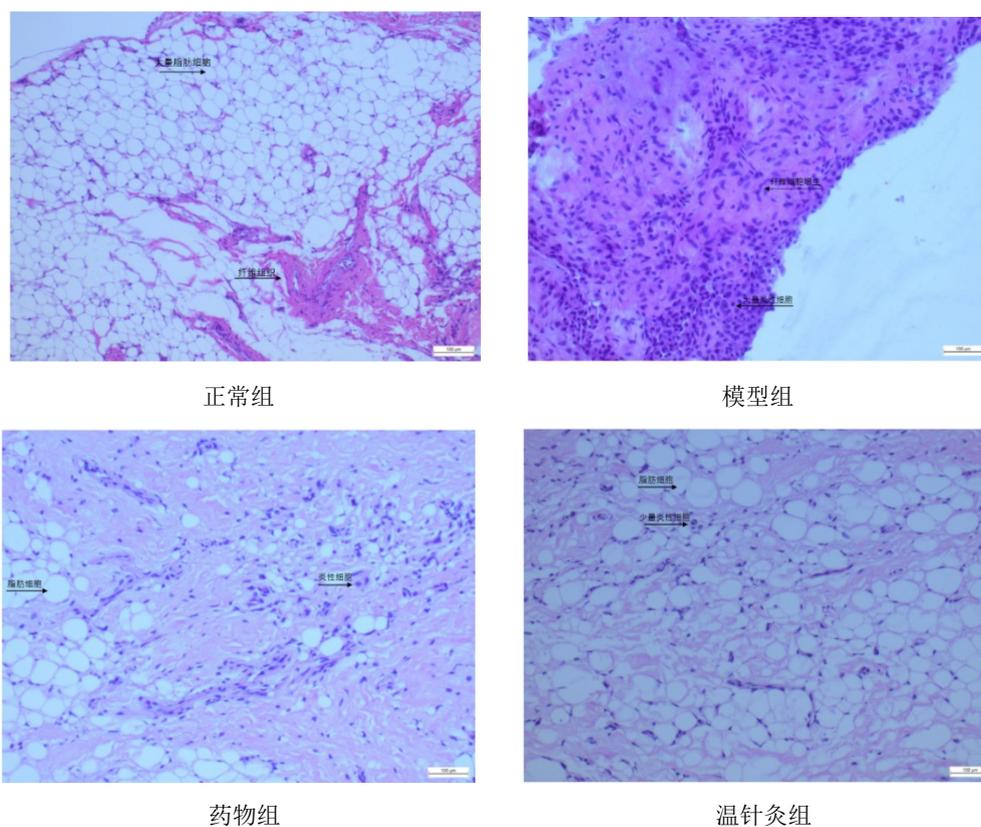


图 1 各组大鼠关节滑膜组织病理学比较(×200)

2.2 各组大鼠血清 PGE₂ 含量比较

与正常组比较,其他 3 组 PGE₂ 含量均明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,温针灸组、药物组 PGE₂ 含量均明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);而温针灸组与药物组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见表 3。

2.3 各组大鼠滑膜组织 Map2k3 mRNA 表达

Map2k3 mRNA 表达数据资料不符合正态分布,4 组组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),各组大鼠滑膜

组织 Map2k3 mRNA 表达无显著差别。详见表 4。

表 3 各组大鼠血清 PGE₂ 蛋白含量比较 [M, (P₂₅, P₇₅)]

组别	n	PGE ₂ (pg/mL)
正常组	7	868.02, (816.81, 871.82)
模型组	7	2832.19, (2712.29, 2893.44) ¹⁾
药物组	7	881.19, (881.19, 1161.40) ¹⁾²⁾
温针灸组	7	1315.90, (881.15, 1961.21) ¹⁾²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$

表 4 各组大鼠滑膜组织 Map2k3 mRNA 表达比较

组别	n	[M, (P ₂₅ , P ₇₅)]
		Map2k3/GAPDH
正常组	7	0.00, (0.00, 0.00)
模型组	7	0.00, (0.00, 0.01)
药物组	7	0.00, (0.00, 0.01)
温针灸组	7	0.01, (0.00, 0.03)

2.4 各组大鼠滑膜组织 P53 mRNA 表达

与正常组比较,模型组、温针灸组和药物组的大鼠滑膜组织中 P53 mRNA 均明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$);与模型组比较,温针灸组大鼠滑膜组织中 P53 mRNA 均明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);而温针灸组与药物组,药物组与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。详见表 5。

表 5 各组大鼠滑膜组织 P53 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	P53/GAPDH
正常组	7	0.03 ± 0.02
模型组	7	0.11 ± 0.04 ¹⁾
药物组	7	0.08 ± 0.01 ¹⁾
温针灸组	7	0.07 ± 0.02 ¹⁾²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$

3 讨论

KOA 又称为退行性关节炎,是一种多发于中老年人,常累及滑膜、关节软骨和软骨下骨,临床以疼痛和功能活动障碍为主的慢性骨关节疾病。常见的临床表现包括活动时关节的弹响和摩擦音,关节的疼痛肿胀和畸形,关节活动不利和功能障碍。据报道我国 KOA 的整体患病率为 8.1%,最高为西南地区的 13.7%,60 岁以上达 50%,75 岁以上高达 80%,患病率随年龄的增长而升高^[10-11],KOA 的高发病率和致残率,不仅影响个人生活质量,也造成了一定的社会经济负担。

最近的研究表明 KOA 和滑膜炎关系密切,滑膜对于维持正常的关节活动功能是必需的,它是一种关节内的间充质组织,可以发生于 KOA 的早、中和晚期各个阶段,发病时的滑膜组织多见滑膜层的增厚,炎症细胞的浸润,弥漫性纤维增生和血管增生等^[12-13]。从本次实验研究来看,正常的滑膜平滑光整、色泽淡红,模型组滑膜水肿炎性渗出,色泽呈黄白色,可见明显增生肥厚,镜下可见大量炎症细胞浸润。温针组大鼠经过治疗后滑膜水肿减轻,色泽较模型组有明显改善,镜下炎症

细胞数量明显减少,可见温针灸可以减轻 KOA 的滑膜炎炎症。

多种细胞炎性因子参与骨关节炎的发病进程,包括白细胞介素-1、肿瘤坏死因子、一氧化氮、基质金属蛋白酶及 PGE₂ 等,其中 PGE₂ 是花生四烯酸环氧合酶的代谢产物,在骨关节炎关节中通过 COX-2 作用生成进而产生促炎致痛作用,参与诸多调节软骨基质降解和关节软骨破坏的过程^[14-15]。温针灸可以通过降低 KOA 大鼠关节液和血清中 PGE₂ 含量^[16],这与本研究实验结果一致,模型组中大鼠血清 PGE₂ 含量明显高于正常组,进一步证实了 PGE₂ 升高与 KOA 的发病有着密切关系。而与模型组比较温针灸治疗可以明显降低大鼠血清 PGE₂ 含量,温针灸组与药物组比较无显著差异,说明针灸可以通过降低 PGE₂ 表达水平进而起到抗炎的作用。

近年来的研究表明 P53 是一种抑癌蛋白,同时也是一种转录因子,在细胞处于应激状态时可被诱导表达,它能够诱导细胞的凋亡,调控炎症反应,同时还具有调控代谢的作用。Zhu X 等^[17]研究表明在 KOA 患者中 P53 蛋白的表达较常人有明显的升高,P53 的上调可能会促进 KOA 发病过程中软骨细胞的凋亡。Bateman JF 等^[18]研究确认了在鼠类骨关节炎发病中起关键作用的基因包括 Ptgs2、Crlf1、Inhba、Phdla2、Il11、Col10a1、P53、Foxo4 和 Xbp1 等。Narici M 等^[19]研究表明全膝关节置换术后患者出现的肌肉减少症与 P53 蛋白的表达密切相关,该基因的有效性可以作为肌肉萎缩的生物标记物。P53 mRNA 可能与 KOA 的发病存在某种联系,其可能是通过调控某种炎症介质作用于某条信号通路来起到抑炎止痛作用,因此本次实验研究选取其作为研究指标,观察温针灸是否能对其表达起到调控作用,结果显示 P53 mRNA 在模型组、药物组和温针灸组中高表达提示其可能是 KOA 大鼠的其中一个致病基因,与模型组相比,温针灸能够明显降低 KOA 大鼠滑膜组织 P53 mRNA 的表达水平。Map2k3 属于丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 家族的特异性蛋白激酶,有研究表明 Map2k3 mRNA 可能通过作用于 p38MAPK 信号通路来起到调控骨关节炎的作用,本实验研究结果显示各组间比较 Map2k3 差异无统计学意义,可能说明 Map2k3 mRNA 对骨关节炎调控作用微乎其微。

温针灸治疗大鼠 KOA 疗效明确,可以减轻滑膜炎性细胞浸润,减轻滑膜增生水肿,降低 PGE₂ 的含量,抑制 P53 mRNA 表达来抑制炎症反应,这可能是温针灸防

治骨关节炎的作用机制之一。

参考文献

[1] 刘慧娜. 盐酸氨基葡萄糖对不同时期骨关节炎患者 TNF- α 、IL-1 β 以及 PGE-2 的影响[J]. 中国医药导刊, 2018, 20(1):24-27.

[2] 徐小丽, 卢新刚, 张霆, 等. 针刺对老年 KOA 患者炎症因子表达的影响[J]. 老年医学与保健, 2017, 23(5):389-391, 395.

[3] 蔡伟松, 李皓桓. 信号通路在骨关节炎发病机制中的研究进展[J]. 广西医学, 2019, 41(6):751-754.

[4] Sun HY, Hu KZ, Yin ZS. Inhibition of the p38-MAPK signaling pathway suppresses the apoptosis and expression of proinflammatory cytokines in human osteoarthritis chondrocytes[J]. *Cytokine*, 2017, 90:135-143.

[5] Havdrup T, Telhag H. Papain-induced changes in the knee joints of adult rabbits[J]. *Acta Orthop Scand*, 1977, 48(2):143-149.

[6] 张镇, 李辉, 焦海胜. 三种不同浓度木瓜蛋白酶建立 SD 雌性大鼠 KOA 模型比较研究[J]. 世界科技研究与发展, 2015, 37(5):570-574, 610.

[7] 张林, 张兵, 李博, 等. 木瓜蛋白酶对兔膝关节骨关节炎滑膜病变的诱导作用[J]. 药物评价研究, 2018, 41(1):78-82.

[8] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 2 版. 北京:中国中医药出版社, 2007:242-244.

[9] 华兴邦, 周浩良. 大鼠穴位图谱的研制[J]. 实验动物与动物实验, 1991, (1):1-5.

[10] Tang X, Wang S, Zhan S, et al. The Prevalence of Symptomatic Knee Osteoarthritis in China: Results From the China Health and Retirement Longitudinal Study[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2016, 68(3):648-653.

[11] 赵昌盛, 钟群杰, 林剑浩. 中国膝关节骨关节炎流行病学调查现状[J]. 广东医学, 2016, 37(13):2050-2052.

[12] Ene R, Sinescu RD, Ene P, et al. Synovial inflammation in patients with different stages of knee osteoarthritis[J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2015, 56(1):169-173.

[13] O'Neill TW, Parkes MJ, Maricar N, et al. Synovial tissue volume: a treatment target in knee osteoarthritis (OA)[J]. *Ann Rheum Dis*, 2016, 75(1):84-90.

[14] Shimomura K, Kanamoto T, Kita K, et al. Cyclic compressive loading on 3D tissue of human synovial fibroblasts upregulates prostaglandin E2 via COX-2 production without IL-1 β and TNF- α [J]. *Bone Joint Res*, 2014, 3(9):280-288.

[15] Attur M, Krasnokutsky S, Statnikov A, et al. Low-grade inflammation in symptomatic knee osteoarthritis: prognostic value of inflammatory plasma lipids and peripheral blood leukocyte biomarkers[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2015, 67(11):2905-2915.

[16] 吴广文, 褚剑锋, 蔡巧燕, 等. 温针灸对大鼠早期膝骨性关节炎血清和关节液 NO PGE2 的影响[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(4):748-750.

[17] Zhu X, Yang S, Lin W, et al. Roles of Cell Cycle Regulators Cyclin D1, CDK4, and p53 in Knee Osteoarthritis[J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2016, 20(9):529-534.

[18] Bateman JF, Rowley L, Belluoccio D, et al. Transcriptomics of wild-type mice and mice lacking ADAMTS-5 activity identifies genes involved in osteoarthritis initiation and cartilage destruction[J]. *Arthritis Rheum*, 2013, 65(6):1547-1560.

[19] Narici M, Conte M, Salvioli S, et al. Alpine Skiing With total knee ArthroPlasty (ASWAP): impact on molecular and architectural features of musculo-skeletal ageing[J]. *Scand J Med Sci Sports*, 2015, 25 (Suppl 2):33-39.

收稿日期 2020-03-19