

补肾活血方调控膝骨性关节炎大鼠软骨下骨的作用机制研究

叶大林^{1,2} 谢平金^{1,2} 魏合伟^{1*} 柴生颢¹ 刘海全¹ 梁桂洪^{1,2}

1. 广州中医药大学第三附属医院骨科, 广东 广州 510104

2. 广州中医药大学, 广东 广州 510405

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2018)12-1606-06

摘要: **目的** 探讨补肾活血方对大鼠膝骨性关节炎(knee osteoarthritis, KOA)软骨下骨重建中 BMP-2 及 Smad-1/5 的调节作用机制。**方法** 将 24 只 SPF 级健康 6 月龄雌性 SD 大鼠随机分为治疗组、模型对照组及假手术组。治疗组、模型对照组参考改良 Hulth 造模法构建膝骨性关节炎模型,造模成功后 4 周模型对照组及假手术组灌予生理盐水,治疗组灌予等量补肾活血中药干预,并于灌胃第 4、8 周,测定软骨下骨 BMP-2 及 Smad-1/5 的表达水平。**结果** 假手术组、治疗组在 BV/TV、Tb. N 上明显低于模型对照组($P < 0.05$),在 Tb. Th、Tb. Sp 上明显高于模型对照组($P < 0.05$)。假手术组与治疗组 Tb. N、Tb. Th、Tb. Sp 上比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),用药 4 周,治疗组 BMP-2、Smad-1/5 灰度值及阳性细胞个数较模型对照组增加($P < 0.05$),较假手术组有所减少,差异无统计学意义($P > 0.05$);用药 8 周后与用药 4 周比较,BMP-2、Smad-1/5 灰度值及阳性细胞个数增加($P < 0.05$)。**结论** 补肾活血方通过提高 BMP-2 及 Smad-1/5 在 KOA 软骨下骨平衡分配,改善 KOA 软骨下骨异常代谢,从而起到治疗 KOA 的作用。

关键词: 补肾活血方;骨性关节炎;软骨下骨;BMP-Smad 信号通路

Study on the mechanism of nourishing kidney and promoting blood flow decoction on the subchondral bone of rats with knee osteoarthritis

YE Dalin^{1,2}, XIE Pingjin^{1,2}, WEI Hewei^{1*}, CHAI Shengting¹, LIU Haiquan¹, LIANG Guihong^{1,2}

1. The Affiliated Orthopedics and Trauma Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510104, China

2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

* Corresponding author: WEI Hewei, Email: whwhou@163.com

Abstract: Objective To investigate the regulatory mechanism of nourishing kidney and promoting blood flow decoction on BMP-2 and Smad-1/5 in the subchondral bone reconstruction of rats with knee osteoarthritis (KOA). **Methods** Twenty-four healthy SPF grade 6-month-old female SD rats were randomly divided into treatment group, model control group, and sham operation group. The KOA model was established in the treatment group and the model control group with modified Hulth model. After the model was established, rats in the model control group and the sham operation group received normal saline for 4 weeks, and rats in the treatment group received the same amount of nourishing kidney and promoting blood flow decoction with gavage. At the 4th and 8th week after intragastric administration, the expression of BMP-2 and Smad-1/5 in subchondral bone was measured. **Results** BV/TV and Tb. N were significantly lower in the sham operation group and treatment group than those in the model control group ($P < 0.05$), but Tb. Th and Tb. Sp were significantly higher ($P < 0.05$). There was a statistically significant difference between the sham group and the treatment group in Tb. N, Tb. Th, and Tb. Sp ($P < 0.05$). After 4 weeks of treatment, BMP-2 and Smad-1/5 gray values and the number of positive cells in the treatment group increased compared with those in the model control group ($P < 0.05$), but they were lower than in the sham operation group. The difference was not statistically significant ($P > 0.05$). After 8

基金项目: 国家自然科学基金(81302991,30901915);广东省自然科学基金项目(2015A030313367);2017 年省级大学生创新训练计划立项项目(201710572084);2018 年广东大学生科技创新培育专项资金项目(攀登计划专项,pdjhb0116);2018 年省级大学生创新训练计划立项项目(201810572088)

* 通信作者: 魏合伟, Email: whwhou@163.com

weeks of treatment, BMP-2, Smad-1/5 gray value, and the number of positive cells increased compared with 4 weeks of treatment ($P < 0.05$). **Conclusion** Nourishing kidney and promoting blood flow decoction relieves KOA by increasing the distribution of BMP-2 and Smad-1/5 in subchondral bone of KOA and improving the metabolism of subchondral bone in KOA.

Key words: nourishing kidney and promoting blood flow decoction; osteoarthritis; subchondral bone; BMP-Smad signaling pathway

膝骨性关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是在力学因素和生物学因素的共同作用下导致软骨细胞、细胞外基质、软骨下基质三者降解和合成失衡的一种慢性、进展性关节疾病^[1]。其病理以关节软骨退变、软骨下骨硬化与骨赘形成为特点^[2]。KOA 与多种因素有关,其发病率也逐渐升高,所造成的关节功能障碍严重影响了生活质量,而其病因和发病机制尚未完全明确。本研究通过切除实验大鼠双侧膝关节的前交叉韧带、内侧副韧带及内侧半月板建立 KOA 大鼠模型,探讨补肾活血方调控 BMP-2 及 Smad-1/5 在 KOA 软骨下骨重建过程的变化水平,以进一步研究补肾活血方在 KOA 软骨下骨重建过程中的作用机制,为其临床应用提供参考价值及理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物:SPF 级健康 6 月龄雌性 SD 大鼠 24 只,体重 180 ~ 220 g,由广州中医药大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂:BMP-2 试剂盒、Smad-1/5 试剂盒购自广州市齐云生物技术有限公司。

1.1.3 药物制备:补肾活血方(桑寄生 30 g,鸡血藤 30 g,阿胶(烊化)20 g,补骨脂 20 g,怀牛膝 20 g,龟板 30 g,丹参 10 g,熟地黄 30 g,仙鹤草 10 g,地龙 15 g,当归 10 g,黄芪 30 g,白芍 30 g),加水浸泡 30 min 后,文火煎煮 1 h,过滤取出药汁,加水复煎 0.5 h,合并 2 次滤液,取上清液加热浓缩,其提取物按照人与大鼠体表面积折算,含生药量 0.8 377 g/mL (由广州中医药大学附属骨伤科医院制剂室提供)。

1.2 方法

1.2.1 分组与造模:将动物随机分为假手术组、模型对照组和治疗组,每组 8 只,用 10% 水合氯醛麻醉大鼠后,参考改良 Hulth 造模法^[3],模型对照组和治疗组均切断双侧膝关节的前交叉韧带、内侧副韧带及内侧半月板,彻底止血,逐层缝合;假手术组切开双膝关节处皮肤,不切断韧带。术后分笼饲养,术后连续 4 d 给予青霉素溶液 4 万 U/d 肌注。

1.2.2 干预方法:术后第 4 周,开始灌胃给药治疗,治疗组灌服补肾活血方 2 mL,模型对照组及假手术组灌服等量的生理盐水,每天 1 次,连续灌胃 8 周。

1.2.3 检测指标:(1)OA 软骨下骨骨组织内 BMP2、Smad-1/5 的动态变化检测:分别于给药后 4、8 周随机选取 3 只大鼠右侧胫骨,置于 10% 多聚甲醛固定、脱钙、脱水、透明、浸蜡、包埋,制作成骨长轴方向切片,采用 SABC 法免疫组化染色,测量 BMP-2 及 Smad-1/5 不同时间点的表达水平。每张切片随机选 5 个视野($\times 400$),用倒置显微镜(Olympus IX70)观察软骨下骨组织并拍照,采用 MOTC6.0 图像分析软件(厦门麦克奥迪有限公司)对每张照片进行 BMP-2 及 Smad-1/5 表达的阳性细胞计数及进行灰度值测量。测量前需进行:①空间定标:将刻有已知直径圆圈的标尺,在 400 倍镜下采集 15011 tm 圆圈图像,以备图像分析时空间定标时使用。②亮度定标:采用 SMR103 黑白标准密度片(中国计量科学研究院),在 400 倍镜下连续采集 21 个级数密度图象,以备图像分析时亮度定标使用。每张、每组切片取其平均值,试验以 PBS 替代一抗作阴性对照。阳性判断标准:当细胞膜、胞浆和或细胞核出现棕黄色阳性物质为阳性细胞。用平均灰度值表示染色强弱。(2)软骨下骨骨组织计量检测:于灌胃 8 周后,处死大鼠,取大鼠左侧胫骨,进行固定、脱水、不脱钙骨硬组织包埋。包埋块用硬组织切片机分别切下 9 μ m 切片,直接封片,采用 HMIAS22000 图像分析系统(广州中医药大学国家重点实验室)行软骨下骨组织形态计量分析。每例标本 3 张,每张随机取 6 个视野,测量后取平均值。测量参数包括:①骨体积(BV/TV):测量范围内骨小梁体积占全部骨组织体积的百分比,反映骨小梁分布密度;②骨小梁厚度(Tb. Th); $(2000/1.199) \times (\text{骨小梁面积}/\text{骨小梁周长})$;③骨小梁密度(Tb. N); $(1.199/2) \times (\text{骨小梁周长}/\text{骨小梁面积})$;④骨小梁分离度(Tb. Sp); $(2000/1.199) \times ([\text{总面积} - \text{骨小梁面积}]/\text{骨小梁周长})$ 。

1.3 统计学处理

用 SPSS 软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$

为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 软骨下骨组织计量检测

假手术组、治疗组在 BV/TV、Tb. N 上明显低于

模型对照组 ($P < 0.05$), 在 Tb. Th、Tb. Sp 上明显高于模型对照组 ($P < 0.05$)。假手术组与治疗组 Tb. N、Tb. Th、Tb. Sp 上比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组软骨下骨组织计量学分析比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of bone histomorphometry of the subchondral bone among the groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	BV/TV/%	Tb. Th/ μm	Tb. N/(1/mm)	Tb. Sp/ μm
假手术组	38.10 $\pm$ 3.06	129.55 $\pm$ 9.71	6.45 $\pm$ 2.10	278.33 $\pm$ 26.08
模型对照组	51.39 $\pm$ 2.71 [▲]	80.24 $\pm$ 8.82 [▲]	10.08 $\pm$ 1.97 [▲]	134.54 $\pm$ 29.75 [▲]
治疗组	44.75 $\pm$ 2.99 [△]	116.49 $\pm$ 11.78 ^{▲△}	7.98 $\pm$ 1.77 ^{▲△}	205.11 $\pm$ 37.34 ^{▲△}

注:与假手术组对比: [▲] $P < 0.05$;与模型对照组对比: [△] $P < 0.05$ 。

2.2 OA 软骨下骨组织内 BMP2、Smad-1/5 的变化

给药后 4、8 周各组 BMP-2 图像变化结果, 见图 1~6。



图 1 给药后 4 周模型对照组胫骨干骺端 BMP-2 (免疫组化染色, $\times 400$)

Fig. 1 Immunohistological staining of BMP-2 in the epiphysis of the tibia in the model control group after 4-week drug administration ($\times 400$)

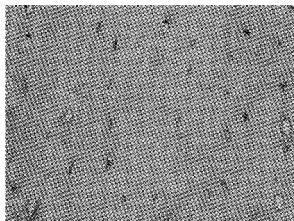


图 2 给药后 4 周假手术组胫骨干骺端 BMP-2 (免疫组化染色, $\times 400$)

Fig. 2 Immunohistological staining of BMP-2 in the epiphysis of the tibia in the sham operation group after 4-week drug administration ($\times 400$)

由图 1-6, 可见用药 4 周, 治疗组 BMP-2 阳性细胞个数较模型对照组增加, 较假手术组有所减少; 用药 8 周, 治疗组较模型对照组显著增加。

给药后 4、8 周各组 Smad-1/5 图像变化结果, 见图 7~12。



图 3 给药后 4 周治疗组胫骨干骺端 BMP-2 (免疫组化染色, $\times 400$)

Fig. 3 Immunohistological staining of BMP-2 in the epiphysis of the tibia in the treatment group after 4-week drug administration ($\times 400$)

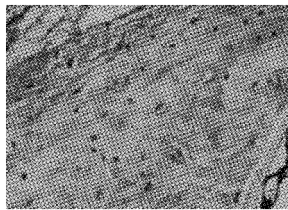


图 4 给药后 8 周模型对照组胫骨干骺端 BMP-2 (免疫组化染色, $\times 400$)

Fig. 4 Immunohistological staining of BMP-2 in the epiphysis of the tibia in the model control group after 8-week drug administration ($\times 400$)

由图 7~12, 用药 4 周, 治疗组 Smad-1/5 阳性细胞个数较模型对照组增加, 较假手术组有所减少, 差异无统计学意义; 用药 8 周, 治疗组较模型对照组显著增加。

2.3 不同时段各组 BMP-2 灰度值及阳性细胞个数变化结果

用药 4 周, 治疗组 BMP-2 灰度值及阳性细胞个数较模型对照组增加 ($P < 0.05$), 较假手术组有所减少, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 用药 8 周, 治疗组较模型对照组显著增加 ($P < 0.05$), 较假手术组增加 ($P < 0.05$)。见表 2。

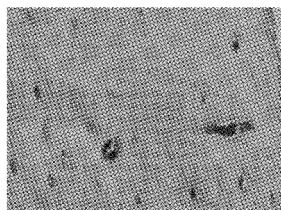


图 5 给药后 8 周假手术组胫骨干骺端 BMP-2 (免疫组化染色, ×400)

Fig. 5 Immunohistological staining of BMP-2 in the epiphysis of the tibia in the sham operation group after 8-week drug administration (×400)

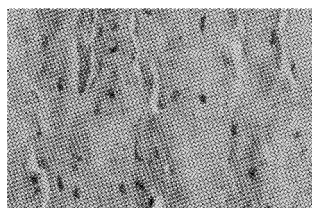


图 6 给药后 8 周治疗组胫骨干骺端 BMP-2 (免疫组化染色, ×400)

Fig. 6 Immunohistological staining of BMP-2 in the epiphysis of the tibia in the treatment group after 8-week drug administration (×400)



图 7 给药后 4 周模型对照组胫骨干骺端 Smad-1/5 (免疫组化染色, ×400)

Fig. 7 Immunohistological staining of Smad-1/5 in the epiphysis of the tibia in the model control group after 4-week drug administration (×400)

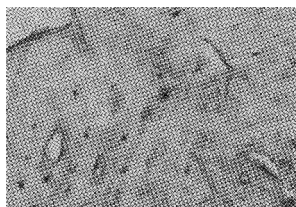


图 8 给药后 4 周假手术组胫骨干骺端 Smad-1/5 (免疫组化染色, ×400)

Fig. 8 Immunohistological staining of Smad-1/5 in the epiphysis of the tibia in the sham operation group after 4-week drug administration (×400)

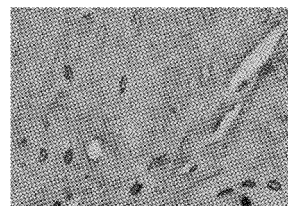


图 9 给药后 4 周治疗组胫骨干骺端 Smad-1/5 (免疫组化染色, ×400)

Fig. 9 Immunohistological staining of Smad-1/5 in the epiphysis of the tibia in the treatment group after 4-week drug administration (×400)

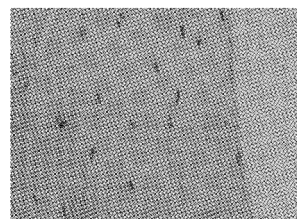


图 10 给药后 8 周模型对照组胫骨干骺端 Smad-1/5 (免疫组化染色, ×400)

Fig. 10 Immunohistological staining of Smad-1/5 in the epiphysis of the tibia in the model control group after 8-week drug administration (×400)



图 11 给药后 8 周假手术组胫骨干骺端 Smad-1/5 (免疫组化染色, ×400)

Fig. 11 Immunohistological staining of Smad-1/5 in the epiphysis of the tibia in the sham operation group after 8-week drug administration (×400)

表 2 各组大鼠胫骨上端软骨下骨 BMP-2 灰度值及阳性细胞个数 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 BMP-2 gray value and the number of positive cells in the subchondral bone of the proximal tibia in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	BMP-2 平均灰度	阳性细胞个数
假手术组 (4 周)	60.37 ± 2.89	18.32 ± 2.43
模型对照组 (4 周)	43.54 ± 2.92 [▲]	11.70 ± 2.28 [▲]
治疗组 (4 周)	57.72 ± 3.85 [△]	16.74 ± 3.33 [△]
假手术组 (8 周)	60.24 ± 2.73	19.89 ± 2.50
模型对照组 (8 周)	43.49 ± 2.73 [▲]	12.14 ± 2.77 [▲]
治疗组 (8 周)	88.65 ± 3.61 ^{▲△*}	31.53 ± 4.85 ^{▲△*}

注:与假手术组对比: [▲] $P < 0.05$; 与模型对照组对比: [△] $P < 0.05$; 与治疗组 4 周对比: ^{*} $P < 0.05$ 。

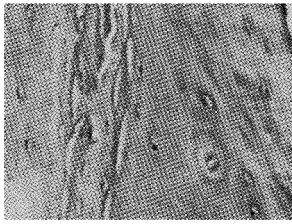


图 12 给药后 8 周治疗组胫骨干骺端 Smad-1/5 (免疫组化染色, $\times 400$)

Fig. 12 Immunohistological staining of Smad-1/5 in the epiphysis of the tibia in the treatment group after 4-week drug administration ($\times 400$)

2.4 不同时段各组 Smad-1/5 灰度值及阳性细胞个数变化结果

用药 4 周, 治疗组 Smad-1/5 灰度值及阳性细胞个数较模型对照组增加 ($P < 0.05$), 较假手术组有所减少, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 用药 8 周, 治疗组较模型对照组显著增加 ($P < 0.05$), 较假手术组增加 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠胫骨上端软骨下骨 Smad-1/5 灰度值及阳性细胞个数 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Smad-1/5 gray value and the number of positive cells in the subchondral bone of the proximal tibia in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	Smad-1/5 平均灰度	阳性细胞个数
假手术组 (4 周)	80.87 $\pm$ 3.62	23.18 $\pm$ 3.05
模型对照组 (4 周)	42.54 $\pm$ 3.47 [▲]	14.68 $\pm$ 4.62 [▲]
治疗组 (4 周)	78.96 $\pm$ 3.51 [△]	22.74 $\pm$ 2.59 [△]
假手术组 (8 周)	76.88 $\pm$ 2.21	20.78 $\pm$ 5.36
模型对照组 (8 周)	43.98 $\pm$ 3.38 [▲]	13.18 $\pm$ 3.77 [▲]
治疗组 (8 周)	80.24 $\pm$ 2.84 ^{▲△*}	39.65 $\pm$ 4.55 ^{▲△*}

注: 与假手术组对比, [▲] $P < 0.05$; 与模型对照组对比, [△] $P < 0.05$; 与治疗组 4 周对比: ^{*} $P < 0.05$ 。

3 讨论

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA), 是一种以膝关节软骨的变性、破坏及关节周围骨质增生为特征的慢性关节病^[1], 常见于中老年人, 临床上症状多表现为膝关节局部疼痛、晨僵、肿胀、活动受限, 严重者可出现关节的畸形, 并最终可导致残疾的风险。中医学认为该病当属“膝痹”范畴, 其病机为“本虚标实”, 而肾虚血瘀则是发病的关键因素。本研究中, 采用改良 Hulth 造模法复制膝骨性关节炎, 即通过切除 6 月龄雌性老年大鼠的双侧膝关节前交叉韧带、内侧副韧带及内侧半月板, 导致膝关节的持续力学失稳态, 进而诱发骨关节炎, 有利于临床与基

础研究相互结合而更加明确地阐述 KOA 的病理及作用机制。

骨吸收的增加和骨重建的加快为早期 KOA 关节软骨下骨变化主要表现^[4], 这种骨吸收增加可导致后期软骨下骨骨质硬化和材料学性质改变, 因此越来越多研究重视如何控制其软骨下骨骨重建速度及改变软骨下骨硬度。Felson 等于 1972 年初次提出关节退变的发病机制可能起始于软骨下骨^[5]。骨组织持续不断地重复着陈旧骨清除及新骨形成的骨重建过程, 骨重建过程无论在细胞学还是组织学水平都被认为是骨吸收与骨形成过程的偶联, 一旦发生失衡, 即可导致骨量与骨结构的变化。在细胞水平, 破骨细胞和成骨细胞的协同调控是骨重建中两个最重要的过程^[6]。在分子水平, 多条骨重建调控途径获得证据被认为参与了 KOA 软骨下骨骨重建的调控。骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 途径是主要参与调控骨形成过程的重要途径之一。BMPs 是一组多功能参与软骨再生的主要软骨形成生长因子, 具有类似结构的高度保守的功能蛋白, 在其羧基端部分包括特征性的 7 个高度保守的半胱氨酸, 属于转化生长因子 TGF- β 超家族成员^[7]。有研究^[8]表明, TGF- β 1 和 BMP2 诱导的人关节软骨细胞与骨关节炎关节软骨细胞 (AC) 的浅表和深层亚群具有不同的代谢特征。BMP2 不仅诱导软骨形成, 而且在异位骨/软骨形成过程中促进软骨内骨化, BMP2 可以在同一系统内自发诱导软骨形成分化, 成骨分化和软骨内骨形成, 目前亦有相关研究用于软骨组织工程以调节软骨形成^[9]。有研究^[10-11]表明, 细胞外信号调节激酶 (ERKs), c-Jun N-末端蛋白激酶 (JNK) 能通过介导的 BMP2 表达和 Smad-1/5/8 磷酸化增强成骨细胞分化。BMPs 功能十分广泛, 其发挥生物学作用主要通过信号转导蛋白 (drosophila mothers against decapentaplegic proteins, Smads) 依赖性和非 Smads 依赖性两条途径实现^[12-13]。已有研究表明, 抑制 BMP2 活性引起 Smad1 表达上调^[14]; Runt 相关转录因子 2 (runt-related transcription factor 2, Runx2) 可以与 Smad1 和 Smad5 相互作用而增强一些成骨细胞特异性基因的表达^[15]; 体内外研究已经确定 BMP-Smad 信号通路能调控成骨细胞生命周期的各个方面, 包括骨髓间充质干细胞 (MSCs) 向成骨细胞分化、骨原细胞的扩增、成骨细胞矿化的活力以及其与破骨细胞的偶联^[16-17]。由此可知, 骨吸收/骨形成偶联发生失衡, 即可导致骨量与骨结构的变化, 可能与

BMP-Smad 信号通路的功能异常有关。Hyuck 等^[18]研究发现,通过刺激 Smad-1/5/8 和 p38 途径增强 BMP2 的体内成骨能力,被认为是骨疾病的治疗策略之一。

肾虚血瘀则是 KOA 发病的关键因素,补肾活血方作为我院的经验方,具有补肾壮骨、健脾益气、活血通络的功效,在临床治疗 KOA 上取得一定的疗效。前期基础研究表明,补肾活血中药治疗 KOA 的疗效和止痛效果均优于塞来昔布,且在改善患者的膝关节功能和安全性方面与塞来昔布相当^[19];补肾活血方能抑制骨性关节炎关节软骨中 MMP-1 的表达及降低关节液中的 PGE2 水平,促进软骨细胞生长,以减缓骨性关节炎^[20]。本实验结果表明,补肾活血方通过调控 BMP-2 及 Smad-1/5 在 KOA 大鼠软骨下骨重建过程的表达水平,使 BMP-2 及 Smad-1/5 的表达水平提高;使软骨下骨组织 BV/TV、Tb.N、Tb.Th、Tb.Sp 水平重新调节以趋向平衡。经造模后的大鼠 BV/TV、Tb.Th 水平升高,这可能在 OA 早期阶段,受到破坏的骨质,软骨下骨破骨细胞的活跃,骨小梁破坏、吸收,然后启动软骨下骨的骨重塑过程,导致了软骨下骨骨代谢增强,骨小梁的进一步增生和增厚。由此表明补肾活血方可能通过调控 BMP-2 及 Smad-1/5 水平,从而调控 BMP-Smad 信号通路使其骨吸收/骨形成偶联趋向平衡。补肾活血方可以改善 OA 软骨下骨异常代谢,从而起到预防和治疗 OA 的作用。本研究为补肾活血方在防治 OA 上提供了一定的实验依据。虽然目前中医药对 OA 作用机制有了一定深入的研究,也使得中医药治疗骨关节炎的作用机制有一定的科学依据,对其的治病思路和用药指导有一定的帮助,而且在越来越多的证据表明 KOA 与骨质疏松的发病及进展中相互联系,而软骨下骨在其中起着非常重要的作用,故科学研究不应只局限在关节软骨方面,应多重视软骨下骨的研究,其可能为治疗 KOA 寻找新靶点提供的突破口,为补肾活血方治疗 KOA 提供实验依据和新的指导理论。

【参 考 文 献】

- [1] David JH. Osteoarthritis Best Practice & Research Clinical[J]. Rheumatology, 2011, 25(6):801-814.
- [2] 李能,廖瑛,廖源,等. 伊班膦酸钠对大鼠膝关节炎关节软骨及软骨下骨的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(1): 78-83.
- [3] 卢向阳,唐芳,马武开,等. 骨关节炎动物模型的研究进展[J]. 风湿病与关节炎, 2017, 6(2):63-67, 75.
- [4] 张增乔,冯伟,卢远坚,等. 软骨和软骨下骨的生物力学相互作用对骨关节炎影响的研究进展[J]. 中医正骨, 2017, 29(5):23-26, 30.
- [5] Felson DT, Neogi T. Osteoarthritis: is it a disease of cartilage or of bone[J]. Arthritis Rheum, 2004, 2:341-344.
- [6] Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate[J]. Nature, 423(2003) 332-336.
- [7] Zhou N, Li Q, Lin X, et al. BMP2 induces chondrogenic differentiation, osteogenic differentiation and endochondral ossification in stem cells[J]. Cell Tissue Res, 2016, 36(1): 101-111.
- [8] Wang Cuicui, Richard M Silverman, Jie Shen, et al. Distinct metabolic programs induced by TGF-β1 and BMP2 in human articular chondrocytes with osteoarthritis[J]. J Orthopaedic Translat, 2018, 12:66-73.
- [9] Toh WS, Liu H, Heng BC, et al. Combined effects of TGF beta1 and BMP2 in serum-free chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced hyaline-like cartilage formation[J]. Growth Factors, 2005, 23(4):313-321.
- [10] Zhu D, Deng X, Han XF, et al. Wedelolactone enhances osteoblastogenesis through ERK- and JNK-mediated BMP2 expression and Smad1/5/8 Phosphorylation[J]. Molecules, 2018, 23(3):561.
- [11] Kim BS, Kang HJ, Park JY, et al. Fucoidan promotes osteoblast differentiation via JNK- and ERK-dependent BMP2-Smad 1/5/8 signaling in human mesenchymal stem cells[J]. Exp Mol Med, 2015, 47:e128.
- [12] Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling[J]. Nature, 425(2003): 577-584.
- [13] Paarmann Pia, Dörpholz Gina, Fiebig Juliane. Dynamin-dependent endocytosis of Bone Morphogenetic Protein2 (BMP2) and its receptors is dispensable for the initiation of Smad signaling[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2016, 76:51-63.
- [14] 李丽莉. BMP-Smad 信号通路的调节及其在成骨分化中的作用[D]. 山东大学, 2013.
- [15] Lee MH, Kwon TG, Park HS, et al. BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 309(3):689-694.
- [16] Cao X, Chen D. The BMP signaling and in vivo bone formation[J]. Gene, 2005, 357:1-8.
- [17] Aquino-Martínez R, Artigas N, Gámez B, et al. Extracellular calcium promotes bone formation from bone marrow mesenchymal stem cells by amplifying the effects of BMP-2 on SMAD signalling[J]. PLoS One, 2017, 12(5):e0178158.
- [18] Hyuck Choi, Byung-Chul Jeong, Min-Suk Kook, et al. Betulinic acid synergically enhances BMP2-induced bone formation via stimulating Smad 1/5/8 and p38 pathways[J]. J Biomed Sci, 2016, 23:45.
- [19] 林勇凯,黄宇新,梁桂洪,等. 补肾活血方对骨性关节炎模型 SD 大鼠基质金属蛋白酶-1 及前列腺素 E2 的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(7):212-215.
- [20] 梁桂洪,梁祖建,林勇凯,等. 补肾活血中药对比塞来昔布治疗膝骨性关节炎疗效与安全性的 Meta 分析[J]. 中国药房, 2016, 27(27):3810-3814.