

# 电针对实验性兔膝关节炎病变软骨 BMP-2/Smad1 表达的影响\*

邵湘芝<sup>1</sup> 陶红星<sup>1</sup> 杨万章<sup>1</sup> 李健<sup>2</sup> 滕斌<sup>2</sup> 任培根<sup>2,3</sup>

## 摘要

**目的:**观察电针(EA)治疗兔膝关节炎(KOA)模型关节软骨中骨形态发生蛋白-2(BMP-2)、Smad1 表达的变化,探讨电针治疗 KOA 的作用机制。

**方法:**制作兔膝关节炎模型,将建模成功的新西兰兔纳入模型对照组;正常组和模型组行常规饲养,不行治疗;电针组行电针治疗 20d。实验结束后,分别观察各组兔行为学评分、右膝关节宽度、软骨大体形态及组织学评分、软骨 BMP-2、Smad1 免疫组化及实时荧光定量 PCR 的变化。

**结果:**电针组与模型组在行为学评分、软骨大体形态及组织学评分(Mankin 评分)方面差异均无显著性( $P>0.05$ ),电针组兔右膝关节宽度小于模型组( $P<0.05$ )。各组 BMP-2 免疫组化结果无显著差异,电针组较模型组 Smad1 蛋白质表达降低。模型组和模型对照组 BMP-2 mRNA 表达水平较正常组上调,差异无显著性意义( $P>0.05$ ),模型组 Smad1 mRNA 表达水平较模型对照组和正常组均显著上调( $P<0.05$ ),电针组 BMP-2 及 Smad1 mRNA 表达水平较模型对照组和模型组均显著下调( $P<0.05$ )。

**结论:**电针可能通过下调早期兔膝关节炎软骨 BMP-2/Smad1 的表达抑制骨赘形成,延缓膝关节炎的病理进程。

**关键词** 电针;膝关节炎;软骨修复;BMP-2;Smad1;骨赘形成

中图分类号:R246,R684.3 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2015)-07-0655-06

Effects of electroacupuncture on regulating the expressions of BMP2/Smad1 in impaired cartilage of experimental rabbits with knee osteoarthritis/SHAO Xiangzhi,TAO Hongxing,YANG Wanzhang, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2015, 30(7): 655—660

## Abstract

**Objective:**To explore the mechanism about electroacupuncture(EA) treatment of knee osteoarthritis(KOA) by observing the expressions of BMP2,Smad1 in impaired cartilage of rabbits with KOA after EA treatment.

**Method:**Models of KOA were established with papain.The model control group had successfully modeled rabbits.The treatment group was treated with EA for 20 days. The normal group and model group were bred without treatment.Behavior scoring,right knee width,cartilage morphology,Mankin score and the expressions of BMP-2,Smad1 using immunohistochemical and real-time PCR methods were analysed.

**Result:**The treatment group and model group showed no significant difference in behavior scoring,cartilage morphology and Mankin score( $P>0.05$ ).The treatment group showed significant smaller right knee width compared with the model group( $P<0.05$ ).No significant difference of BMP-2 protein level were showed between two groups.The treatment group showed lower Smad1 protein level compared with the model group.The model group and model control group showed no significant higher level of BMP-2 mRNA compared with the normal group( $P>0.05$ ).The model group showed higher levels of Smad1 mRNA compared with the model control

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2015.07.005

\*基金项目:深圳市南山区人民医院科研基金资助项目(2013005)

1 深圳市南山区人民医院,深圳,518052; 2 中国科学院深圳先进技术研究院; 3 通讯作者

作者简介:邵湘芝,女,硕士研究生; 收稿日期:2015-01-30

group and normal group( $P<0.05$ ).The treatment group showed significant lower levels of BMP-2 mRNA and Smad1 mRNA compared with the model control group and model group( $P<0.05$ ).

**Conclusion:** The EA showed therapeutical effect,could delay the development of rabbit KOA by reducing BMP-2, and Smad1 levels.

**Author's address** Shenzhen Nanshan Hospital,Shenzhen,518052

**Key word** electroacupuncture; knee osteoarthritis; cartilage repair; BMP-2; Smad1; osteophyte

骨关节炎(osteoarthritis,OA)是一种最常见的与年龄相关的关节和软骨疾病。随着社会人口老龄化,OA的患病率越来越高。OA可发生于任何关节部位,临床上以膝、髌、手、脊柱和足部关节多发<sup>[1]</sup>。OA特征性的病理改变为软骨损伤,软骨修复是探索OA改善的主要治疗目标<sup>[2]</sup>。治疗OA的药物,如非甾体类消炎止痛药,对胃肠道有一定刺激作用,越来越多的患者转向补充替代疗法<sup>[3]</sup>,针刺治疗作为其中一种方法,越来越被接受和认同。既往研究已证实,电针对膝骨关节炎(knee osteoarthritis,KOA)损伤的软骨具有治疗作用<sup>[4]</sup>,但具体机制有待进一步探索,因此探讨电针治疗KOA的机制成为该领域的研究热点之一。

本实验拟通过电针治疗实验性兔KOA模型来探讨骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)/Smad1在电针治疗KOA中的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物与分组

健康雄性新西兰大白兔21只,体质量2.0—2.5kg,普通级,由广州市花都区花东信华实验动物养殖场提供,动物生产许可证号:SCXK(粤)2009-0023。实验过程中对动物的处置严格遵守国家科技部2006年发布的《关于善待实验动物的指导性意见》。动物自由摄食和饮水,动物房内光照与黑暗为12h交替,室温20—25℃左右,相对湿度50%左右。实验前使动物适应饲养环境7d(自购入之日算起)。实验动物依据随机分配的原则分为正常组、模型对照组、模型组和电针组。

### 1.2 主要试剂及仪器设备

木瓜蛋白酶(美国Sigma公司);L-半胱氨酸(美国Sigma公司);石蜡(国药化学试剂有限公司);苏木素伊红染色试剂盒(北京雷根生物技术有限公

司);番红O水溶液(北京雷根生物技术有限公司);BMP-2一抗鼠单克隆抗体(美国abcam公司);Smad1一抗兔多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司);二抗过氧化物标记山羊抗兔IgG(北京康为世纪生物科技有限公司);二抗过氧化物标记兔抗鼠IgG(美国Abcam公司);免疫组化DAB显色试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司);RNA提取试剂盒(美国Qiagen公司);反转录试剂盒(日本TAKARA公司);实时PCR试剂盒(日本TAKARA公司);引物(上海英俊生物技术有限公司)。

一次性无菌针灸针,规格:0.3mm×0.25mm(环球牌,苏州针灸用品有限公司);韩氏穴位神经刺激仪,型号:HANS-200E(南京济生医疗科技有限公司);游标卡尺(桂林广陆数字测控股份有限公司);轮转式石蜡切片机(德国Leica);高速冷冻离心机(德国Eppendorf);激光共聚焦显微镜(德国Leica);梯度PCR仪(德国Eppendorf);实时荧光定量PCR LightCycler 480 II系统(德国Roche)。

### 1.3 模型建立与鉴定

采用关节腔内注射木瓜蛋白酶的方法建立骨关节炎模型<sup>[5]</sup>,对随机纳入造模的新西兰大白兔在1、3、5d进行右膝关节腔注射2%(w/v)木瓜蛋白酶和0.03mol/L的L-半胱氨酸混合溶液0.1ml/kg。根据研究,首次注射后第2周,可建立骨关节炎模型<sup>[6]</sup>。

首次注射后第2周,随机抽取实验兔,取右膝关节软骨做石蜡切片,HE和番红O染色后行Mankin评分,据此判断模型建立是否成功<sup>[6-7]</sup>,将建模成功的新西兰兔纳入模型对照组。

### 1.4 干预处理

除正常组外,其余动物实施造模,判断造模成功后,将造模成功的新西兰大白兔随机分为模型组和电针组,每组6只。正常组和模型组均常规饲养,未行治疗;电针组行电针治疗,取穴:血海、梁丘、足三里、阳陵泉(取穴及操作参考李忠仁的“实验针灸

学”)。操作方法及治疗时间:用30号1寸毫针刺入相应穴位,行捻转手法,至针下沉紧后,针柄连接韩氏穴位神经刺激仪上,采取疏密波刺激(疏波2Hz,密波30Hz),1次/d,20min/次,连续治疗10次,间隔1d后,再连续治疗10次;共治疗20次。

1.5 检测指标与方法

1.5.1 大体形态及组织学观察:电针治疗结束后,遵循安乐死的原则将各组实验兔处死,解剖各组实验兔双侧膝关节并暴露关节软骨,肉眼观察关节软骨光滑度、色泽、表面是否有糜烂及溃疡、是否有纤维性增生及边缘是否有骨赘形成等。取膝关节胫骨平台软骨,经4%多聚甲醛4℃固定、脱钙、脱水、透明、浸蜡、包埋,制作成石蜡标本,行4—6μm厚切片。HE染色及番红O染色后,行Mankin评分,判断骨关节炎严重程度。

1.5.2 免疫组织化学检测:按照免疫组化DAB显色试剂盒说明对本切片进行染色,在显微镜下观察并拍照,以细胞质内出现棕黄色颗粒状染色为阳性,观察各组切片染色情况。

1.5.3 实时荧光定量PCR检测:按照RNA提取、反转录、实时PCR试剂盒说明进行RNA提取、反转录及目的基因扩增,反转录条件:37℃ 15min,85℃ 5s。扩增条件:95℃ 5s,60℃ 30s,40循环,扩增;95℃ 5s,60℃ 1min,95℃ 1个循环,溶解;50℃ 30s,1个循环,退火。记录Ct值,基因表达的扩增倍数以 $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$ 表示, $\Delta Ct=C_{t\text{目的基因}}-C_{t\text{GAPDH}}$ , $\Delta(\Delta Ct)=\Delta Ct_{\text{实验组}}-\Delta Ct_{\text{对照组}}$ 。

1.6 统计学分析

应用SPSS19.0统计学软件进行数据分析,计量资料数据以均数±标准差表示。

若数据呈正态分布且方差齐性,多组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用LSD检验;若数据呈正态分布但方差不齐,多组间比较采用Welch法和Brown-Forsythe法,多重比较采用Dunnett T3检验;以P<0.05为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 动物状态、体重、右膝关节宽度及行为学评分

在整个实验过程中,所有兔均存活,一般状态良好。兔体重于首次注射木瓜蛋白酶后第1周呈下降

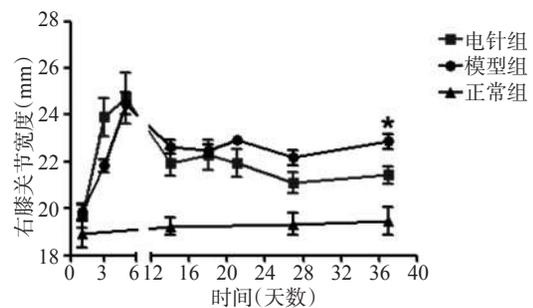
趋势,之后有所缓解,并于首次注射2周后逐渐增长。首次注射1d后即出现跛行和关节肿胀,1周后跛行和肿胀开始减轻,2周后跛行基本消失,遗留轻度关节肿胀。膝关节宽度测量结果表明:造模后患侧膝关节宽度于首次注射木瓜蛋白酶后开始增长,第三次注射后达到最高值,之后有所缓解。电针治疗一段时间后,电针组患侧膝关节宽度(21.44±0.3603mm)小于模型组(22.87±0.3068mm),差异有显著性意义(P<0.05),见图1。

4个时间段各组新西兰兔的行为学评分见表1。注射木瓜蛋白酶后,新西兰兔膝关节功能可不完全的自行恢复。随着时间推移,各组均呈好转趋势。行为学0d评分,各组间差异无显著性;第5天评分,各组与正常组(N组)之间差异均有显著性(M>N, P<0.0001, T>N, P<0.0001),模型组与电针组差异无显著性;第14天评分,各组与N组之间均有显著性差异(M>N, P<0.0001, T>N, P<0.0001),模型组与电针组差异无显著性;第37天评分,各组与N组之间均有显著性差异(M>N, P<0.0001, T>N, P<0.0001),模型组与电针组差异无显著性。

2.2 软骨大体形态观察

正常组右膝关节胫骨平台及股骨髁软骨表面光滑、色泽正常、无肉眼可见糜烂及溃疡,首次注射木瓜蛋白酶后第2周,胫骨平台软骨可见浅表糜烂,注

图1 各组兔右膝关节宽度



\*与电针组比较 P<0.05

表1 实验过程中各组新西兰兔行为学评分 (x±s)

组别	动物数(只)	注射前(0d)	注射后第5天(5d)	注射后第14天(14d)	电针治疗后(37d)
正常组(N)	6	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组(M)	6	0.00±0.00	3.00±0.89 <sup>①</sup>	1.33±0.52 <sup>①</sup>	0.83±0.41 <sup>①</sup>
电针组(T)	6	0.00±0.00	2.17±0.75 <sup>①</sup>	1.00±0.63 <sup>①</sup>	1.00±0.00 <sup>①</sup>

①与正常组比较 P<0.0001

射后第6周及电针治疗后,患侧软骨损伤较第2周加重,可见明显糜烂及溃疡。各组膝关节股骨髁软骨均与正常组无异。造模后,随着时间的延长,患侧膝关节胫骨平台软骨损伤加重;电针治疗后,软骨损伤缓解不明显。

### 2.3 软骨组织学观察

首次注射木瓜蛋白酶后第2周,对比健侧,患侧膝关节胫骨平台软骨细胞排列紊乱、数目减少,细胞簇聚,细胞外基质染色减少。实验结束后,与模型组对比,电针组患侧膝关节胫骨平台软骨表面相对光滑,细胞排列相对规则,软骨无明显裂隙;模型组和电针组细胞外基质均明显失染,呈淡绿色,软骨部分缺失、结构紊乱。

软骨 Mankin 评分见表 2,各组较正常组评分显著提高( $P<0.0001$ ),模型组及电针组较模型对照组(注射木瓜蛋白酶后第2周)评分显著性提高( $P<0.0001$ ),电针组同模型组评分相比差异无显著性意义( $P>0.05$ )。

### 2.4 免疫组化观察软骨 BMP-2、Smad1 表达

正常组 BMP-2 在过渡层见部分胞质有极浅染

色(图 2A),模型组(图 2B)和电针组(图 2C)胞质内无明显染色;正常组(图 2D)Smad1 在软骨过渡层和放射层均可见胞质内棕褐色颗粒,模型组(图 2E)可见过渡层部分胞质内有棕褐色颗粒,电针组(图 2F) Smad1 在过渡层胞质内仅有少许棕褐色颗粒。

### 2.5 各组兔膝关节炎损伤软骨中 BMP-2 及 Smad1 mRNA 表达

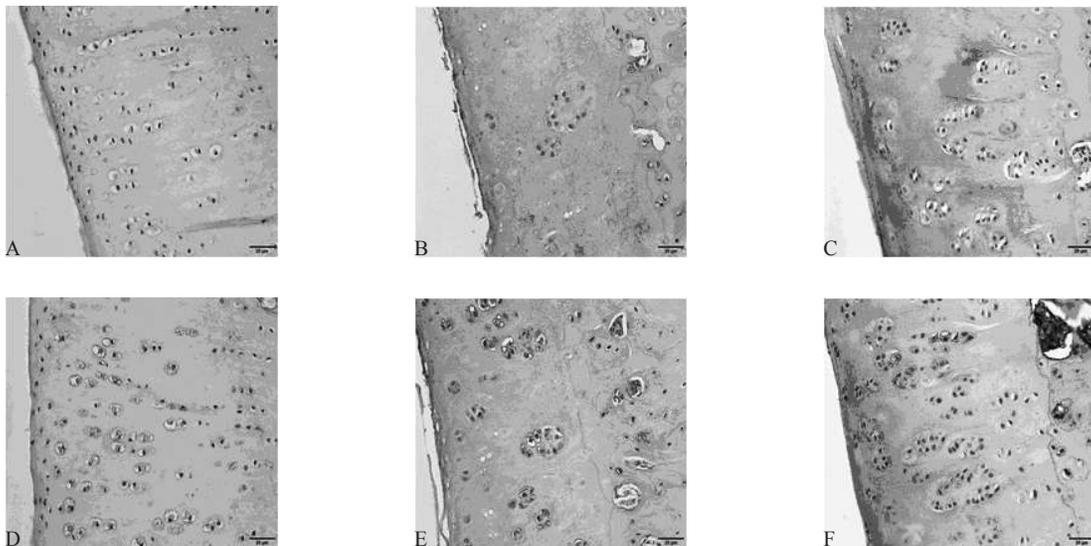
结果见表 3。电针组 BMP-2 mRNA 表达水平较模型对照组和模型组均显著下调( $P<0.0001$ ,  $P<0.05$ ),模型组 Smad1 mRNA 表达水平较模型对照组和正常组均显著上调( $P<0.05$ ,  $P<0.001$ ),电针组较模型对照组和模型组 Smad1 mRNA 表达水平显著下调( $P<0.05$ ,  $P<0.0001$ )。

组别	动物数(只)	得分	损伤程度(得分)
正常组	6	0.19±0.48	无(0—1)
模型对照组	3	7.10±4.81 <sup>①</sup>	轻度(2—7)
模型组	6	10.37±1.62 <sup>②</sup>	中度(8—12)
电针组	6	9.86±2.62 <sup>③</sup>	中度(8—12)

①与正常组比较: $P<0.0001$ ,②与模型对照组比较: $P<0.0001$ ,③与模型对照组比较: $P<0.001$

图 2 胫骨平台软骨 BMP-2/Smad1 免疫组化染色

(IHC, ×40)



AD:正常组右膝关节软骨,BE:模型组右膝关节软骨,CF:电针组右膝关节软骨。

### 3 讨论

KOA 属于中医学“骨痹”、“膝痹”等范畴。中医认为本病系慢性劳损、受寒、轻微外伤或年老体弱、

肝肾亏损、气血不足所致。针刺疗法可疏通经络气血,“通则不痛”。临床研究表明,电针治疗 KOA 疗效确切<sup>[8-9]</sup>,通过降低 KOA 患者血清白介素-1(interleukin-1, IL-1)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis

表3 四组新西兰兔 BMP-2 mRNA 及 Smad1 mRNA 相对表达量 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数 (只)	BMP-2 mRNA/ GAPDH	Smad1 mRNA/ GAPDH
正常组	6	1.00±0.12	1.00±0.28
模型对照组	3	1.35±0.35	1.43±0.33
模型组	6	1.46±0.33	1.61±0.50 <sup>③④</sup>
电针组	6	0.76±0.38 <sup>①②</sup>	0.62±0.32 <sup>③⑤</sup>

①与模型对照组比较:  $P < 0.0001$ , ②与模型组比较:  $P < 0.05$ , ③与模型对照组比较:  $P < 0.05$ , ④与正常组比较:  $P < 0.001$ , ⑤与模型组比较:  $P < 0.0001$

factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ), 提高转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 水平起到缓解疼痛等作用<sup>[10]</sup>。动物研究提示, 电针一方面具有抗炎作用<sup>[11-12]</sup>, 另一方面也对退变软骨起到一定的保护和促修复作用<sup>[11,13-15]</sup>。关于针刺选穴方面, 田策等<sup>[16]</sup>通过分析近几年针灸治疗 KOA 的选穴规律, 发现研究者们多取病变膝关节周围的穴位, 如犊鼻、血海、足三里、阳陵泉、梁丘等。蹇睿等<sup>[15]</sup>发现“血海、梁丘、足三里、阳陵泉”四穴配伍能使实验性兔 KOA 软骨基质金属蛋白酶减少, 软骨细胞重排, 对 KOA 有积极的治疗作用。因此, 本实验选用“血海、足三里、阳陵泉、梁丘”四穴来进一步探讨电针对 KOA 病变软骨保护作用的机制。

关于 OA 动物模型的制备<sup>[17]</sup>, 大致分为以下三类: 自发性 OA 模型、关节腔内药物注射以及手术造模。由于造成 OA 发展的原因复杂以及临床 OA 症状的多变性, 目前没有一种造模方法可以完全模拟 OA<sup>[18]</sup>, 应根据主要的研究目的来选择最优的造模方法<sup>[19]</sup>。关节腔内注射木瓜蛋白酶的方法尤适于软骨基质退变的研究<sup>[18]</sup>, 符合本实验探讨电针对 KOA 软骨保护机制的研究。因此, 实验采取关节腔内注射木瓜蛋白酶方法建立模型。

在本实验中, 注射木瓜蛋白酶后第2周, 肉眼观察到膝关节胫骨平台软骨局部糜烂, 病理组织学切片 HE 染色显示软骨细胞排列紊乱、数目减少、细胞簇聚现象, 番红 O 染色显示软骨细胞外基质染色减退, 这些都说明木瓜蛋白酶可以促使软骨细胞凋亡、过度增生、排列紊乱以及细胞外基质降解, 从而构建 KOA 模型。Mankin 评分 [(7.10±4.81) 分] 提示此阶段膝关节软骨处于轻度损伤状态, 可以模拟早期膝关节关节炎模型。电针处理在此阶段介入, 观察其对早期 KOA 的治疗作用。

BMP-2 从属 BMP 家族, 对骨和软骨代谢具有重要的调节作用。研究表明, BMP-2 可以刺激软骨蛋白多糖的合成、诱导蛋白聚糖和 II 型胶原的表达<sup>[20]</sup>, 诱导间充质干细胞向软骨细胞分化、调节新生软骨细胞表型, 使新生软骨内的蛋白多糖和胶原纤维的含量更加趋近正常<sup>[21]</sup>, 长期维持体外培养的软骨细胞表型、加速全层关节软骨修复、改善修复软骨组织的质量<sup>[22]</sup>。当进一步研究 BMP-2 对 KOA 的治疗作用时, 却发现了它新的意义。Van Beuningen 等<sup>[23]</sup>将 BMP-2 注射到正常小鼠膝关节腔内, 观察到在注射初期小鼠膝关节软骨蛋白聚糖合成增多, 但随着时间延长, 蛋白聚糖开始丢失, 骨赘逐渐形成。Uusitalo 等<sup>[24]</sup>将 BMP-2 高表达的腺病毒转染骨膜细胞, 发现了它对间充质干细胞有促软骨形成的作用, 却伴随着软骨内成骨。随着对 BMP-2 研究的增多, Nakase<sup>[25]</sup>和 Davidson 等<sup>[26]</sup>观察到 BMP-2 在骨赘组织中显著表达, Van der Kraan 等<sup>[27]</sup>进一步提出 BMP-2 诱导骨赘发生的位置位于生长板和关节间隙之间。这些研究说明, BMP-2 在骨关节炎疾病中对骨赘的形成起着一定的作用。

Smad1 是 Smad 蛋白家族的成员之一。它作为已知的细胞质内信号转导分子, 通过直接与 DNA 结合成为转录因子, 或与其它转录因子及活化因子相互作用诱导对 BMP 信号的转录应答<sup>[28]</sup>。除了 Smad2/3, 包括 Smad1 在内的其它 Smad 蛋白均以一种相互协调、互补的模式在骨骺生长板表达, 表明 TGF- $\beta$  超家族的 SMAD 信号途径在软骨内骨形成的过程中起到了调节形态发生的作用<sup>[29]</sup>。

观察本实验软骨大体形态观察结果和组织学评分, 提示电针对早期兔 KOA 软骨大体形态学和组织形态学均未出现显著影响。实验结束后电针组右膝关节宽度小于模型组, 差异有统计学意义, 结合既往研究成果<sup>[10-12]</sup>: 电针可降低 KOA 人和动物的血清或者关节液炎症因子水平, 说明电针可通过抑制炎症渗出而减小关节宽度, 体现了电针对 KOA 的抗炎消肿作用。研究表明<sup>[29]</sup>, TGF- $\beta$  在正常表达情况下对软骨是一种保护性因子, 但在病理条件下, TGF- $\beta$  表达的异常升高也会对软骨造成损坏, 并诱发骨赘形成。

BMP-2 作为 TGF- $\beta$  家族成员, 与骨赘的形成与

发展关系密切。观察 real-time PCR 结果,发现注射木瓜蛋白酶2周后,软骨 BMP-2 和 Smad1 mRNA 水平开始上调,可能是软骨损伤后的代偿反应,企图通过提高 BMP-2 表达来促进软骨修复,Smad1 作为其信号转导蛋白与其具有相同的变化趋势;随着时间的延长,Smad1 mRNA 表达进一步提高,而 BMP-2 mRNA 未出现显著升高,可能是 BMP-2 mRNA 的提高未反应在本观察点,也可能是在这段时间中,动物体内发生了新的分子生物学变化,使得 BMP-2 mRNA 的表达无明显变化;但是电针治疗后 BMP-2 和 Smad1 mRNA 均较模型组显著下降,在一定程度上可以说明电针能抑制兔 KOA 病变软骨 BMP-2 和 Smad1 mRNA 的表达,推测其机制可能是 BMP-2 和 Smad1 mRNA 参与了中晚期 KOA 骨赘形成的调节,电针治疗可能干扰 KOA 病变软骨 BMP-2 和 Smad1 mRNA 的表达,使之降低,从而抑制或者延缓骨赘的形成。观察免疫组化研究结果,BMP-2 和 Smad1 在各组间蛋白质表达水平与实时荧光定量 PCR 结果并不完全一致,表现在模型组 BMP-2 和 Smad1 蛋白质表达水平较正常组未明显提高,考虑是 mRNA 翻译成蛋白质需要时间,蛋白质的表达存在时间延迟性,因此模型组 BMP-2 和 Smad1 蛋白质表达量不高;也可能是从转录到翻译的过程中,机体的自我调节干扰了基因的翻译。但是观察电针组 BMP-2 和 Smad1 蛋白质表达均低,此与实时荧光定量 PCR 结果一致,说明电针可能通过抑制兔 KOA 模型病变软骨 BMP-2/Smad1 表达水平延缓骨赘形成。

本实验初步探索了电针治疗 KOA 可能存在的分子机制,电针可能通过下调兔 KOA 病变软骨 BMP-2/Smad1 表达水平延缓骨赘的形成。在本实验中,我们也发现电针未改变兔 KOA 软骨大体形态学及组织学,可能因为本实验观察的时间点太少,也可能因为电针的周期不长等原因;对于本研究中 mRNA 与蛋白质水平的差异,我们认为这两种基因表达的调控具有多样性,有待于进一步研究。

### 参考文献

[1] Cooper C, Dennison E, Edwards M, et al. Epidemiology of osteoarthritis[J]. *Medicographia*, 2013, 35(2): 145—151.  
[2] Loeser R F, Goldring S R, Scanzello C R, et al. Osteoarthritis:

a disease of the joint as an organ[J]. *Arthritis and Rheumatism*, 2012, 64(6): 1697—1707.  
[3] Li A, Zhang Y, Lao L, et al. Serotonin receptor 2A/C is involved in electroacupuncture inhibition of pain in an osteoarthritis rat model[J]. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 2011:619650.  
[4] Jubb RW, Tukmachi ES, Jones PW, et al. A blinded randomised trial of acupuncture (manual and electroacupuncture) compared with a non-penetrating sham for the symptoms of osteoarthritis of the knee[J]. *Acupuncture in Medicine*, 2008, 26(2): 69—78.  
[5] Ganying Han,Guilan Wang.Preparation of xanthan gum injection and its protective effect on articularcartilage in the development of osteoarthritis[J]. *Carbohydrate Polymers*,2012,87(2):1837—1842.  
[6] 韩冠英,凌沛学,王凤山,等.不同浓度木瓜蛋白酶建立兔膝关节炎模型比较研究[J].*中国骨伤*,2012,25(5):424—429.  
[7] Van der Sluijs J A,Geesink R G T, 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.  
[8] 诸剑芳,王国军,金肖青,等.电针治疗早,中期老年性膝关节炎的临床疗效观察[J].*中华中医药杂志*,2013,28(7):2085—2087.  
[9] 包飞,张燕,吴志宏,等.电针治疗膝关节炎疗效观察及对软骨磁共振 T2 图的影响[J].*中国针灸*, 2013, 33(3): 193—197.  
[10] 吉玲玲.针灸对膝关节炎患者血清细胞因子影响的临床研究[D].南京中医药大学,2012.  
[11] 李卫平,胥方元,蹇睿,等.电针对实验性兔膝关节炎模型白细胞介素-1 $\beta$  和基质金属蛋白酶-1 表达的影响[J].*中国康复医学杂志*, 2013, 28(2): 139—142.  
[12] 吴明霞,李西海,吴广文,等.电针后血清对肿瘤坏死因子 $\alpha$  诱导软骨细胞凋亡的影响[J].*中国组织工程研究*, 2011, 15(46): 8551—8555.  
[13] 郑秀存.针刺,电针和温针治疗对膝骨性关节炎(KOA)软骨基质代谢调节作用的实验研究[D].成都中医药大学, 2005.  
[14] 包飞,孙华,吴志宏,等.针刺对膝关节炎大鼠软骨基质金属蛋白酶及其抑制剂表达的影响[J].*中国针灸*, 2011, 31(3): 241—246.  
[15] 蹇睿,胥方元,李卫平,等.电针对兔膝关节炎软骨细胞基质金属蛋白酶-13 表达的影响[J].*中国康复医学杂志*, 2011, 26(9): 799—802.  
[16] 田策,鲁娟,曹良东.近5年来针灸治疗膝骨性关节炎选穴规律的分析[J].*现代中医药*, 2013(3): 70—73.  
[17] Kim HA, Cheon EJ. Animal Model of Osteoarthritis[J].*Journal of Rheumatic Diseases*,2012,19(5): 239—247.  
[18] Teeple E, Jay GD, Elsaid KA, et al. Animal models of os-

(下转第 666 页)