

· 药理 ·

四妙方对实验性骨关节炎大鼠软骨基质的影响

刘倩^{1,2}, 徐颖¹, 李莉³, 赵铁军³, 陈卫衡³, 林娜^{1*}

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 江西中医学院, 南昌 330004;
3. 中国中医科学院望京医院, 北京 100102)

[摘要] 目的: 观察四妙方对骨关节炎(osteoarthritis, OA)大鼠软骨基质的影响并探讨初步的作用机制。方法: 健康雄性 SD 大鼠 84 只, 随机分成假手术组、模型组、四妙方低、中、高剂量组、硫酸氨基葡萄糖组, 每组 14 只。除假手术组外, 其他组均采用大鼠前交叉韧带切断及部分半月板切除(anterior cruciate ligament transection and medial meniscus resection, ACLT + MMx)造成 OA 模型, 造模后四妙方低、中、高剂量组分别给予四妙方 0.63, 1.25, 2.50 g·kg⁻¹·d⁻¹ 治疗, 硫酸氨基葡萄糖组 ig 给予硫酸氨基葡萄糖 0.16 g·kg⁻¹·d⁻¹ 治疗, 连续 6 周, 假手术组和模型组分别给予等体积蒸馏水。6 周后, 腹主动脉采血测定 II 型胶原 C 端肽(collagen type II C-telopeptide, CTX II) 和 II 型胶原 C 前肽(type II procollagen C-propeptide, CP II); 取大鼠右侧股骨进行 HE 染色观察四妙方对 OA 大鼠软骨病变的影响, 甲苯胺蓝染色对软骨基质蛋白聚糖(proteoglycan, PG) 的影响以及 II 型胶原免疫组化染色对 II 型胶原的影响。结果: 与假手术组相比, 模型组软骨表层变薄, 软骨细胞明显减少, Mankin's 积分显著升高($P < 0.01$), 甲苯胺蓝、II 型胶原免疫组化染色平均灰度值和 II 型胶原阳性表达均显著降低($P < 0.01$), 血清 CTX II 显著升高($P < 0.01$), CP II 显著降低($P < 0.01$)。与模型组相比, 四妙方 1.25, 2.50 g·kg⁻¹ 均能显著降低 Mankin's 积分($P < 0.01$), 上调甲苯胺蓝染色平均灰度值($P < 0.05, P < 0.01$), 增加 II 型胶原阳性表达量($P < 0.01$), 下调 CTX II、上调 CP II 水平($P < 0.01$)。结论: 四妙方能有效减轻 OA 大鼠关节软骨基质破坏, 其机制可能跟抑制软骨基质主要成分丢失、调节 II 型胶原合成、降解标志物有关。

[关键词] 四妙方; 骨关节炎; 软骨基质; 蛋白聚糖; II 型胶原

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0161-05

[doi] 10.11653/syfj2013100161

Effect of Simiao Prescription on Cartilage Matrix of an Eeperimental Osteoarthritis Rat Model

LIU Qian^{1,2}, XU Ying¹, LI Li³, ZHAO Tie-jun³, CHEN Wei-heng³, LIN Na^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Traditional Chinese Medicine (TCM), Beijing 100700, China;

2. Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China;

3. Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Simiao prescription on cartilage matrix of rat osteoarthritis, as well as to explore their mechanism of prevention and treatment for osteoarthritis (OA). **Method:** Eighty-four male Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham group, model group, Simiao prescription low, moderate and high does group, glucosamine sulfate group ($n = 14$). Except the sham group, underwent surgical destabilization (anterior cruciate ligament transection and partial medial meniscectomy) of the right knee to

[收稿日期] 20130226(005)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81072900)

[第一作者] 刘倩, 硕士研究生, 从事中药药理研究, Tel:010-64014411-2869, E-mail:shuidingdong0707@yahoo.cn

[通讯作者] * 林娜, 博士生导师, 研究员, 从事中药药性理论和中药药理研究, Tel:010-64014411-2869, E-mail:linna888@163.com

induce OA. The sham group and model group were fed with saline, glucosamine sulfate group were fed with glucosamine sulfate and others with Simiao prescription. After 6 weeks, using blood obtained from the abdominal aorta, and then measured the C-terminal peptide of collagen type II and Collagen type II C-propeptide, and then rat right femoral were removed. Sections of the articular cartilage were stained with HE, to observe cartilage damage, Toluidine blue stain, collagen II immunohistochemistry stain was performed to assess the contents of proteoglycan and collagen II. **Result:** Compared with the sham group, thinning of the cartilage surface of the model group, the cartilage cells decreased significantly and Mankin's score significantly higher, toluidine blue stain, collagen II immunohistochemistry stain indicated that there was proteoglycan and collagen II loss in the model group. The serum CTX II was significantly increased, CP II significantly decreased. Compared with model group, Simiao prescription can significantly reduce the Mankin's score, increase proteoglycan and type II collagen content, lower levels of CTX II raise CP II. **Conclusion:** Simiao prescription can effectively reduce articular matrix destruction of experimental rat osteoarthritis, the metabolism may be related with inhibition of the main component of cartilage matrix, regulation of type II collagen synthesis and degradation markers.

[**Key words**] Simiao prescription; osteoarthritis; cartilage matrix; proteoglycan; collagen II

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是以关节软骨破坏为主要病理特征的退行性关节疾病。研究表明^[1] 软骨基质代谢的失衡与关节软骨的破坏直接相关。目前,通过促进软骨基质合成或抑制软骨基质分解代谢来延缓甚至逆转关节软骨破坏过程,已成为 OA 防治研究的重点。而确定理想的反映 OA 病情活动的特异性生物标志物是筛选治疗药物的前提,也是突破 OA 治疗瓶颈的关键。四妙方出自清末张秉成的《成方便读》,临床用治湿热下注所致骨痹,有较好疗效^[2],但相关作用机制未明。本研究通过前交叉韧带切断及部分半月板切除方法建立大鼠 OA 模型,旨在从软骨组织病理结构形态、软骨基质成分和生物标志物方面探索四妙方对 OA 软骨基质的干预影响。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 SD 大鼠 84 只,10 周龄,体重 200 ~ 230 g,由中国生物制品鉴定所动物中心提供。动物许可证号 SCXK(京)2009-0017。

1.2 药品与试剂 四妙方(按 2010 年版药典记录):苍术 125 g,牛膝 125 g,盐黄柏 250 g,薏苡仁 250 g,购自北京同仁堂药店,以上干味中药,粉碎成细粉,过 100 目筛,水溶配成质量浓度为 125 g·L⁻¹ 悬液,4 ℃ 保存;硫酸氨基葡萄糖胶囊 (Rottapharm Ltd,批号 H20090797);苏木素染液(批号 110601)、伊红染液(批号 110507)购自北京中杉金桥生物技术有限公司,兔抗鼠 II 型胶原多克隆抗体(批号 10CM222)、两步法免疫组化试剂盒(批号 07C23CJH)和 DAB 显色试剂盒(批号 AR1022)均购自武汉博士德生物工程有限公司;II 型胶原 C 端肽

(CTX II) 和 II 型胶原 C 前肽 (CP II) 检测试剂盒 (美国 RD 公司)。

1.3 仪器 TSJ-1 自动组织脱水机、BMJ-1 生物组织包埋机、QPJ-C 轮转式切片机、ZPJ-1A 展片机、KPJ-1A 烤片机均为爱华公司产品。Olympus BX60 光学显微镜,美国 MIS 图像分析仪。

2 方法

2.1 动物分组及给药 健康雄性 SD 大鼠 84 只,随机分为以下 6 组:假手术组,模型组,四妙方低、中、高剂量组(分别为 0.63,1.25,2.50 g·kg⁻¹·d⁻¹,为临床等效剂量的 0.5,1,2 倍),硫酸氨基葡萄糖组 (0.16 g·kg⁻¹·d⁻¹) 每组 14 只。造模同时以 10 mL·kg⁻¹,ig 给药,1 次/d,连续 6 周,假手术组组和模型组分别 ig 给予等体积蒸馏水。

2.2 模型制备 参照文献[3-4]报道,将大鼠术区备皮、碘伏消毒,取右膝髌旁内侧切口,逐层打开关节腔,将髌骨向外侧推使之脱位,膝关节处于最大屈曲状态,暴露关节腔。分离内侧半月板,用显微剪刀剪除内侧部分半月板并剪断前交叉韧带,勿损伤软骨。先后用碘伏、生理盐水冲洗关节腔,5~0 丝线缝合关节腔及皮肤。假手术组只切开皮肤和关节腔,并不损伤软骨。术后每天肌注青霉素 20 万 U,持续 5 d。

2.3 组织取材与处理 造模 6 周后,大鼠腹主动脉取血,分离血清,-20 ℃ 保存,用于检测 CTX II,CP II。取右侧股骨,行 HE、甲苯胺蓝和免疫组化染色。

2.4 组织学观察 动物处死后取右侧股骨放入 4% 多聚甲醛溶液中固定 48 h,10% 的 EDTA 脱钙,流

水冲洗,系列乙醇脱水,石蜡包埋切片,切片厚度为 $5\ \mu\text{m}$,进行 HE 染色,光镜下观察其组织病理学改变。然后进行 Mankin's 评分^[5]。

2.5 蛋白聚糖(PG)甲苯胺蓝染色 石蜡切片常规脱蜡至水,0.1% 甲苯胺蓝染色,流水冲洗,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察,蛋白聚糖被染成深蓝色。每张切片上选择 5 个视野,结果以累积吸光度($A = \text{阳性表达面积} \times \text{平均 IA}$)或平均 A 表示。

2.6 II 型胶原免疫组化染色 取组织石蜡切片,脱蜡至水,3% 双氧水处理后蒸馏水洗涤,37 °C 抗原修复。PBS 洗涤,血清封闭,滴加 I 抗(1:30),置 4 °C 过夜,用两步法免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒进行 II 型胶原免疫组织化学染色,每张切片取 5 个视野(200 倍),应用 Image-Pro Plus 6.0 图像处理分析系统,进行图像分析,结果以 IA 或平均 A 表示。

2.7 标志物检测 采用 ELISA 方法测定大鼠血清中 CTX II, CP II 含量,具体操作步骤参照试剂盒说明。

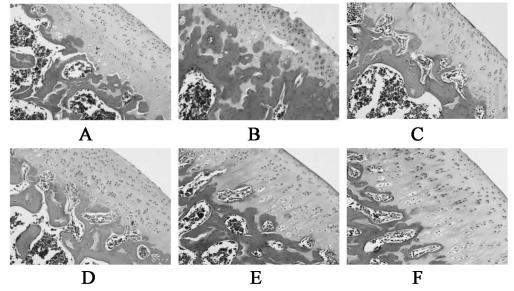
2.8 统计学分析 采用 SPSS 15.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有显著意义。

3 结果

3.1 对 OA 大鼠股骨组织病理学的影响 假手术组:大鼠股骨表层光滑完整,软骨表层、中间层(移行层)、辐射层、钙化层 4 层结构清晰,潮线完整;表层的细胞扁平,呈纺锤形,和关节面平行排列,中间层的细胞呈柱状,与软骨表面垂直,深层可见增生的软骨细胞;基质染色均匀。模型组:局部软骨消失,表层变薄,4 层结构很难辨认,潮线消失;软骨细胞明显减少,细胞形态改变,基质染色减少。四妙方低剂量组:软骨表层部分有凹陷缺损,4 层结构有些紊乱,潮线不完整;表层细胞变圆,软骨细胞数目整体明显增多,细胞簇集现象明显;基质染色中度减少。四妙方中剂量组:软骨表层基本完整,部分区域出现绒毛状,潮线不规则;软骨细胞有簇集现象,排列紊乱;基质染色轻度减少。四妙方高剂量组:软骨表层完整,4 层结构较易辨认,潮线较完整;局部软骨细胞簇集增生,基质染色欠均匀。硫酸氨基葡萄糖组:软骨表面光滑平整,仅有少量纤维素覆盖,四层结构较清晰,潮线较完整;软骨细胞排列均匀;基质染色较均匀。见图 1。

与假手术组相比,模型组 Mankin's 评分明显升高($P < 0.01$)。与模型组相比,四妙方各给药组均

能明显抑制股骨损伤积分($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。四妙方抑制 OA 大鼠股骨软骨退变作用与硫酸氨基葡萄糖相似,统计学比较无显著性差异。见表 1。



A. 假手术组;B. 模型组;C. 四妙方 $0.63\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;
D. 四妙方 $1.25\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;E. 四妙方 $2.50\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;
F. 硫酸氨基葡萄糖 $0.16\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组(图 2~3 同)

图 1 实验 6 周四妙方对股骨组织形态学影响(HE, $\times 200$)

3.2 对 OA 大鼠股骨 PG 含量的影响 假手术组:大鼠股骨甲苯胺蓝着色深蓝,染色均匀无失染。模型组:染色大部分层次失染严重,甚至不着色。四妙方低剂量组:关节软骨浅层颜色变浅,基质中可见空的软骨陷窝,周围淡染。四妙方中剂量组:染色较均匀,出现轻中度减退。四妙方高剂量染色较均匀,无明显丢失。硫酸氨基葡萄糖组:染色轻度减退。见图 2。

与假手术组相比,模型组 PG 含量显著降低($P < 0.01$)。与模型组相比,四妙方低剂量组 PG 含量有提高趋势;四妙方中、高剂量组能明显提高 PG 水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。四妙方高剂量组抑制软骨 PG 含量降解作用与硫酸氨基葡萄糖相似,统计学比较无显著性差异。见表 1。

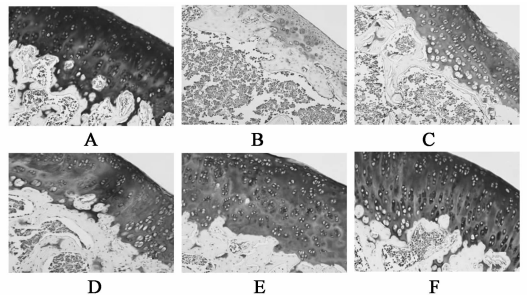


图 2 实验 6 周四妙方对股骨 PG 含量变化的影响(甲苯胺蓝, $\times 200$)

3.3 四妙方对 OA 大鼠股骨 II 型胶原阳性表达的影响 假手术组:II 型胶原免疫组化染色见细胞外基质呈棕色,染色均匀,软骨浅层见软骨细胞染色阳性。模型组:阳性细胞基本消失,基质中 II 型胶原残留少量表达。四妙方低剂量组:免疫组化染色见软骨层变薄,软骨细胞少量着色,细胞外基质着色轻。四妙方中高剂量组:阳性染色明显增多, E; 硫酸氨

表 1 四妙方对 OA 大鼠股骨组织病理学积分及骨 PG 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	PG/IA	Mankin's 积分
假手术	-	91.63 ± 14.72	1.63 ± 0.92
模型	-	44.71 ± 14.54 ²⁾	7.00 ± 1.30 ²⁾
四妙方	0.63	54.44 ± 15.07	5.38 ± 1.41 ³⁾
	1.25	78.40 ± 29.69 ³⁾	3.25 ± 1.03 ⁴⁾
	2.50	80.53 ± 23.83 ⁴⁾	3.13 ± 0.83 ⁴⁾
硫酸氨基葡萄糖	0.16	89.00 ± 21.86 ⁴⁾	3.00 ± 0.76 ⁴⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较

³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

基葡萄糖组:染色均匀,阳性面积和强度显著增强。见图 3。

与假手术组相比,模型组 II 型胶原含量显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组相比,四妙方低剂量组 II 型胶原含量有上升趋势;四妙方中、高剂量组 II 型胶原含量明显升高 ($P < 0.01$)。四妙方抑制软骨 II 型

胶原丢失作用于硫酸氨基葡萄糖相似,相比无统计学差异。见表 2。

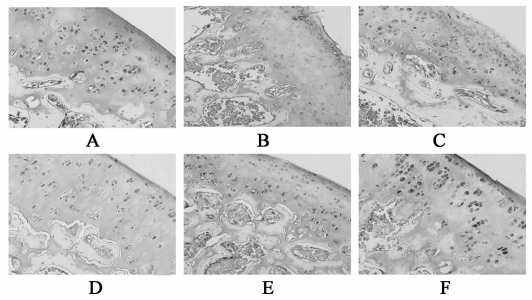


图 3 实验 6 周四妙方对股骨 II 型胶原表达的影响 ($\times 200$)

3.4 四妙方对 OA 大鼠股骨 II 型胶原标志物含量的影响 与假手术相比,模型组血清 CTX II 显著升高 ($P < 0.01$),CP II 显著降低 ($P < 0.01$);与模型组相比,四妙方中、高剂量组和硫酸氨基葡萄糖组血清 CTX II 显著降低 ($P < 0.01$),CP II 显著升高 ($P < 0.01$);四妙方低剂量组无统计学意义。见表 2。

表 2 四妙方对 OA 大鼠股骨 II 型胶原表达及血清 II 型胶原标志物含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 14$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	II 型胶原 /IA	CTX II /μg·L ⁻¹	CP II /μg·L ⁻¹
假手术	-	806.99 ± 163.51	34.41 ± 5.33	613.00 ± 121.56
模型	-	203.51 ± 47.81 ²⁾	56.16 ± 10.67 ²⁾	304.40 ± 50.16 ²⁾
四妙方	0.63	289.14 ± 134.31	51.83 ± 7.27	356.15 ± 70.62
	1.25	484.62 ± 191.08 ⁴⁾	43.15 ± 7.91 ⁴⁾	407.36 ± 66.24 ⁴⁾
	2.50	510.41 ± 212.02 ⁴⁾	42.719 ± 8.30 ⁴⁾	487.50 ± 122.52 ⁴⁾
硫酸氨基葡萄糖	0.16	640.61 ± 188.10 ⁴⁾	37.49 ± 3.97 ⁴⁾	524.15 ± 64.50 ⁴⁾

4 讨论

OA 是老年人活动能力丧失的最重要原因,近年发病率呈持续增长趋势。随着基础研究的深入,关节软骨基质在 OA 病理机制中的作用越来越受到重视。已知软骨基质由软骨细胞合成并分泌,其组成主要有 II 型胶原和蛋白聚糖两大成分^[6]。II 型胶原和其他胶原构成关节软骨的网状骨架,蛋白聚糖和透明质酸相互交联形成毛刷样结构,将软骨细胞深埋在其中。多种原因所诱导的软骨细胞坏死和软骨基质破坏直接引起软骨降解,最终,造成关节软骨的损毁和关节功能的丧失^[7]。

目前,许多学者试图使用生物学标志物评估 OA。在众多生物标注物中,II 型胶原的组成部分被认为是评价 OA 的最重要标志物。II 型胶原是由 3 股 α 链形成的螺旋结构,每条 α 链分别在两端存在 N 端肽及 C 端肽。CTX II 和 CP II 作为 II 型胶原的降解、合成标志物,其含量综合反映关节软骨损伤

程度^[8]。

本研究中,笔者采用前交叉韧带切断和部分半月板切除方法制作大鼠 OA 模型,HE 染色结果显示模型组大鼠关节软骨变薄消失,表层、中间层、辐射层、钙化层 4 层结构很难辨认,软骨细胞变性坏死;甲苯胺蓝特殊染色结果发现模型组大鼠关节软骨大部分层次失染严重,甚至不着色,提示软骨中的蛋白聚糖明显减少;而免疫组化分析结果则显示模型组大鼠关节软骨细胞外基质 II 型胶原阳性表达基本消失;标志物检测发现模型组 CTX II 明显升高、CP II 明显降低,以上这些均较好地反映了大鼠关节软骨退变的病理变化情况,也说明能较成功地复制大鼠 OA 模型。

中医学将 OA 归属于“痹证”范畴,认为年老肝肾亏虚,筋骨失养是其发病的基础。因此,临床常用补益肝肾、活血行气之法治疗,收到较好的效果。实验研究证实,具有补益肝肾、活血通络、温经散寒、消

肿止痛等作用的中药对 OA 具有一定的治疗作用^[9-10]。四妙方由黄柏、苍术、牛膝、薏苡仁组成,药味虽少,但组方精巧。黄柏苦寒燥湿,善祛下焦湿热。苍术辛苦而温,芳香而燥;牛膝补肝肾,强筋骨,引药下行,对于下焦病证湿热痿痹尤为适宜;薏苡仁健脾、祛湿舒筋。四药合用,攻补兼施,共奏强健筋骨、清热燥湿之功。现代药理研究已知黄柏、苍术、牛膝和薏苡仁均有较好的抗炎镇痛作用,黄柏尚有促进软骨细胞蛋白聚糖合成作用^[11],牛膝能改善微循环、提高机体免疫功能等^[12]。OA 是一种以关节软骨病理改变为主的疾病,因此防治关节软骨破坏、保护软骨功能对 OA 的治疗具有重要意义。本实验中,OA 大鼠经四妙方治疗后,HE 染色镜下观察与模型组相比软骨表层丢失、四层结构紊乱、软骨细胞簇集或是减少、潮线改变及基质染色不均匀均有不同程度的减轻,显示出很好的关节软骨病理损伤治疗作用,提示四妙方能抑制或减缓 OA 大鼠的病理损伤进程,这也在一定程度上证明了本研究立法遣方的科学性。从甲苯胺蓝染色、免疫组化和标志物检测分析结果看,本实验中四妙方中、高剂量均能明显提高 PG, II 型胶原, CP II 水平,同时降低 CTX II 水平,且四妙方高剂量较低、中剂量作用更为显著,具有一定的量效关系。因此,说明了四妙方对 OA 大鼠软骨基质具有一定的保护作用,能够抑制软骨基质成分 PG、总胶原和 II 型胶原的丢失,且能调节 II 型胶原合成、降解标志物。

硫酸氨基葡萄糖是软骨基质聚多糖链和关节炎滑液聚氨基葡萄糖的正常组成部分,可以刺激软骨细胞合成生理性的聚氨基葡萄糖和蛋白多糖。它在保护软骨基质成分、改善 OA 病情、减轻炎症症状等方面有明显的治疗作用。通过对本实验数据的统计分析,发现四妙方高剂量保护软骨基质成分作用与硫酸氨基葡萄糖人临床等效量相近,但四妙方价格远低于硫酸氨基葡萄糖,因此使用四妙方治疗 OA 在保护软骨基质的基础上,将为患者节省大量的医疗经费,在攻克 OA 难题上对其进一步研究具有积极的意义。

综上所述,四妙方能有效减轻实验性 OA 大鼠的关节软骨基质破坏,其作用可能与抑制软骨基质成分的丢失并有效调节其合成及代谢的标志物有关。鉴于 OA 的发生发展还与细胞因子、软骨细胞

凋亡、基质金属蛋白酶等相关联,因此四妙方治疗 OA 的作用及机制尚有待进一步的研究探讨。

[参考文献]

- [1] Wancket Lyn M, Baragi Vijay, Bove Susan, et al. Anatomical localization of cartilage degradation markers in a surgically induced rat osteoarthritis model [J]. Toxicol Pathol, 2005, 33(4) : 484.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 647.
- [3] Appleton C T, McErlain D, Pitelka V, et al. Forced mobilization accelerates pathogenesis; characterization of a preclinical surgical model of osteoarthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2007, 9(1) : R13.
- [4] Appleton C T, Pitelka V, Henry J, et al. Global analyses of gene expression in early experimental osteoarthritis [J]. Arthritis Rheuma, 2007, 56(6) : 1854.
- [5] Mankin H J, Dofman H, Lippiello L, et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips: II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data [J]. J Bone J Surg (Br), 1971, 53(3) : 523.
- [6] 吴志宏. 骨关节炎的关节软骨细胞外基质的变化 [J]. 实用骨科杂志, 1999, 2(4) : 212.
- [7] 黄金刚, 童海骏, 刘宏强, 等. IL-1 β 和 TNF- α 对软骨细胞基质降解的影响及相关机制研究 [J]. 上海交通大学学报, 2010, 30(9) : 1084.
- [8] Kiyohito Naito, Taiji Watari, Tomoya Muta, et al. Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) increases the articular cartilage type II collagen in a rat osteoarthritis model [J]. J Orthop Res, 2010, 28(3) : 361.
- [9] 王桂芳, 石宇, 张金超. 蚁龙通痹汤改善兔膝骨关节炎软骨组织骨生物力学的炎症机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15) : 221.
- [10] 刘春芳, 林娜, 陈卫衡, 等. 骨痹散防治小鼠的膝骨关节炎的实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(1) : 55.
- [11] 岳珍, 王嘉芙, 吕红斌, 等. 行气消肿类中药对体外培养的软骨细胞代谢的影响 [J]. 中国运动医学杂志, 1998, 17(1) : 1.
- [12] 周军. 牛膝中化学成分和药理作用研究进展 [J]. 天津药学, 2009, 21(3) : 66.

[责任编辑 聂淑琴]