

## 独活寄生汤调控对大鼠椎间盘软骨细胞 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的影响

刘伯龄<sup>1</sup>, 陈齐勇<sup>1</sup>, 付长龙<sup>2</sup>, 刘少强<sup>1</sup>, 叶小伟<sup>1</sup>, 梁珪清<sup>1</sup>, 叶锦霞<sup>2</sup>, 李西海<sup>2</sup>

**【摘要】**目的：从 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路探讨独活寄生汤水提物对大鼠椎间盘退变软骨细胞功能的影响。方法：用水提加热回流法制备独活寄生汤水提物成分；选取 4 周龄健康雄性 SD 大鼠 30 只，采用机械-酶消化法分离大鼠椎间盘软骨组织，建立软骨细胞体外培养体系并进行鉴定；RT-PCR、Western blot 法分别检测经 DKK-1 抑制剂干预及（或）经白细胞介素-1 $\beta$  诱导的椎间盘软骨细胞 Wnt4、GSK-3 $\beta$ 、 $\beta$ -catenin mRNA 与蛋白含量的表达。结果：椎间盘软骨细胞经 Ⅱ型胶原染色后，阳性对照细胞浆区域浸染为棕黄色；RT-PCR、Western blot 检测结果示，与正常组比较，模型组 Wnt4、GSK-3 $\beta$ 、 $\beta$ -catenin mRNA 与蛋白含量表达显著升高（ $P < 0.01$ ）；与模型组比较，独活寄生汤水提物组（100，200，400  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）的 Wnt4、GSK-3 $\beta$ 、 $\beta$ -catenin mRNA 与蛋白含量表达显著降低（ $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ），其中以 200  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  组的表达量最低（ $P < 0.01$ ）。结论：独活寄生汤水提物组可通过调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路，下调大鼠椎间盘退变关节软骨中 Wnt4、GSK-3 $\beta$ 、 $\beta$ -catenin mRNA 与蛋白含量表达，从而延缓椎间盘软骨细胞退变。

**【关键词】** 椎间盘退变性疾病；椎间盘软骨细胞；独活寄生汤；Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路；大鼠  
doi:10.3969/j.issn.2095-4174.2018.01.001

### Effect of Duhuo Jisheng Tang (独活寄生汤) on the Regulation of Rat Intervertebral Disc Chondrocyte Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling Pathway

LIU Bo-ling, CHEN Qi-yong, FU Chang-long, LIU Shao-qiang, YE Xiao-wei, LIANG Gui-qing, YE Jin-xia, LI Xi-hai

**【ABSTRACT】 Objective:** To investigate the effect of Duhuo Jisheng Tang (独活寄生汤) water extract on the regulation of rat intervertebral disc chondrocyte Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. **Methods:** Duhuo Jisheng Tang water extract was made by the water extraction and reflux method. A total of thirty four-week-old healthy male SD rats used to isolate intervertebral disc cartilage tissue by mechanical enzymatic digestion method to establish in vitro culture system of chondrocytes for identification. RT-PCR, Western blot were used to detect the expression of contents of Wnt4, GSK-3 $\beta$  and  $\beta$ -catenin mRNA intervened by DKK-1 inhibitor and induced by interleukin-1 $\beta$ . **Results:** After type II collagen staining, the cytoplasmic domain of the intervertebral disc cartilage cells in the positive control group was disseminated yellowish brown. RT-PCR and Western blot detect results showed that compared with the normal group, the expression of contents of Wnt4, GSK-3 $\beta$ ,  $\beta$ -catenin mRNA and protein increased significantly in the model group ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the expression of contents of Wnt4, GSK-3 $\beta$ ,  $\beta$ -catenin mRNA and protein in the Duhuo Jisheng group

基金项目：福建省自然科学基金（2017J01224）；福建中医药大学校管课题（X2015034）

作者单位：1. 厦门大学附属福州第二医院，福建 厦门 350007；2. 福建中医药大学中西医结合研究院，福建 福州 350122

通信作者：付长龙 福建省福州市闽侯上街邱阳路1号，993001232@qq.com，15080062996

(100, 200, 400  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) decreased significantly ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ), among which the content expression in the group of 200  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  was the lowest ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Duhuo Jisheng

Tang water extract can delay the cartilage cell degeneration of intervertebral disc by regulating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway and down-regulating the content expression of Wnt4,GSK-3 $\beta$ , $\beta$ -catenin mRNA and protein in degenerated articular cartilage of rat intervertebral disc.

【Keywords】degenerative disc disease;intervertebral disc chondrocyte;Duhuo Jisheng Tang(独活寄生汤); Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway;rats

椎间盘退变性疾病(如腰椎间盘突出症)的根本病理变化是椎间盘退变,其中软骨终板作为椎间盘的重要组成部分,在维持椎间盘正常功能方面发挥重要作用。近年来,软骨终板退变作为椎间盘退变的始动因素成为新的热点<sup>[1-2]</sup>。研究证实,椎间盘退变关键因素之一是椎间盘软骨细胞功能偶联失衡,导致持续病理发生,凋亡与细胞分化异常,进而诱导软骨塑形重建,椎体骨赘形成<sup>[3]</sup>。目前对椎间盘退变规律的研究较为滞后,确切的发病机制和发展过程仍有待进一步探讨,临床往往采取被动的、对症式的治疗措施,在这些治疗中,中医药是有效、安全、不良反应少的常用方法,但迫切需继续深化其预防和治疗机制的研究。

Wnt 信号转导途径调节控制着许多生命过程,包括生物体的生长、发育、疾病、衰老与死亡等;也包括细胞形态与功能的分化与维持、免疫、应激、细胞癌变与细胞凋亡等<sup>[4]</sup>。在脊椎动物骨骼系统发生过程中,Wnt 家族的各成员在骨与软骨发育过程中具有重要调节作用,其中 Dickkopf 族(DKK-1)作为该信号通路的抑制剂,可抑制 Wnt 与膜受体的结合,进而阻断该信号通路<sup>[5-8]</sup>。

独活寄生汤出自唐·孙思邈《备急千金要方》,由独活 9 g,桑寄生、杜仲、茯苓、肉桂心、细辛、防风、川芎、牛膝、当归、人参、秦艽、白芍、熟地黄、甘草各 6 g 组成,具有祛风湿、止痹痛、益肝肾、补气血之功效<sup>[9]</sup>。诸药合用,使外邪得除,肝肾得补,气血得充,邪正兼顾,祛邪不伤正,扶正不留瘀,发挥“从本治痿,从标治痹”作用,切中椎间盘退变性疾病的病因病机。该方长期用于临床,治疗椎间盘退变性疾病有较好疗效<sup>[10-11]</sup>。前期实验研究表明其能延缓软骨退变<sup>[12-13]</sup>,但作用机制有待进一步研究。因此,本文从 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路探讨独活寄生汤水提物调控对大鼠椎间盘退变软骨细胞功能的影响,有目的地调控其功能,对延缓软骨终板以及椎间盘退变有着重要的基础与

应用价值。

## 1 实验材料

1.1 实验动物 SPF 级健康 SD 雄性大鼠 30 只,体质量 90 ~ 100 g,由福建中医药大学实验动物中心提供,实验动物许可证号:SCXK2014-0001(闽)。

1.2 实验药物及主要试剂 独活寄生汤(福建中医药大学附属第三人民医院);磷酸盐缓冲液、DMEM/LOW GLUCOSE(HyClone);TRIZOL(美国 life);异丙醇、无水乙醇(国药集团);琼脂糖(Biowest Agarose);核酸染料(Solarbio);逆转录试剂盒、DNA Marker(北京全式金生物技术有限公司);WB 玻板(美国 BIO-RAD);PMSF(蛋白酶抑制剂)、RISF(裂解液)、蛋白上样缓冲液(Thermo);30%聚丙烯酰胺、Tris(pH = 8.8 与 pH = 6.8)、SDS(十二烷基磺酸钠)、10 $\times$ 电泳液、AP(过硫酸铵)、TEMED、50 $\times$ TAE(碧云天生物有限公司);10 $\times$ TBST(Solarbio);高效封闭液(康为世纪);Wnt4、GSK-3 $\beta$ 、 $\beta$ -catenin、GAPDH 引物(上海生工);一抗(兔抗)Wnt4、GSK-3 $\beta$ 、 $\beta$ -catenin、 $\beta$ -actin(美国 Abcam 公司);二抗(羊抗兔)(美国 CST 公司);1-Step<sup>TM</sup>Transfer Buffer、ECL 高效显影液(美国 Thermo)等。

1.3 主要仪器 DNA 扩增仪(9600 型,美国 PE);低温高速离心机(64R 型,美国 BECKMAN);超纯水装置(MILLI-Q 型,美国 MILLIPORE);荧光倒置相差显微镜(Olympus,日本 TKO);无菌操作台(AIRTECH 型,苏州安泰);超净工作台(SW-CJ-1F 型,苏州安泰);凝胶成像系统(GELDOC2000 型,美国 BIO-RAD);全自动酶标仪(BIO-TEK ELX800 型,美国 BIO-Tek);CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(BB16/BB5060 型,德国 Heraeus)等。

## 2 实验方法

2.1 独活寄生汤水提物的提取 称取独活 9 g,桑

寄生、杜仲、茯苓、肉桂心、细辛、防风、川芎、牛膝、当归、人参、秦艽、白芍、熟地黄、甘草各 6 g, 水回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并提取液, 抽滤, 浓缩成浸膏, 60 ℃ 水浴蒸干至恒重, 待经低温下研磨成粉末状, 精确称量浸膏 50 mg, 加入质量分数为 5% 的 FBS 培养基 5 mL 溶解, 超声 10 min, 再经 0.22 μm 无菌滤嘴过滤后, 4 ℃ 冰箱保存备用, 配成 10 mg · mL<sup>-1</sup> 独活寄生汤水提物母液, 备用。

2.2 软骨细胞的分离、培养与鉴定 质量分数为 10% 的水合氯醛麻醉下脱颈椎处死 SD 大鼠 (每次 5 只), 分离颈、腰椎椎间盘软骨终板, 收集后经剪碎至每单位体积 1 mm<sup>3</sup>, PBS 缓冲液冲洗至少 3 次后移至无菌小培养皿中, 按每皿 2.5 mL 加入质量分数为 0.2% 的 I 型胶原酶进行消化, 15 mL 离心管收集消化后的上清液 (2 h 1 次), 1500 r · min<sup>-1</sup> 离心机离心 5 min 后弃上清液, 移液器代液 (含质量分数为 10% 的胎牛血清 DMEM) 状态缓慢吹匀沉淀, 经计数板计数 (2 × 10<sup>5</sup> · mL<sup>-1</sup>) 后种植原代软骨细胞于培养瓶进行培养, 经 48 h 后初次换液, 镜下观察细胞铺满 80% 瓶底面积时, 经胰酶消化进行细胞传代, 本实验使用第 2 代软骨细胞。

型胶原免疫组织化学染色: 软骨细胞 (经计数每毫升 2500 个) 待爬片后, 经 PBS 冲洗 3 次, 质量分数为 4% 的多聚甲醛固定 30 min, 再经冲洗、裂解 (0.1% 破膜剂 50 μL) 20 min, 冲洗后加入 50 μL 质量分数为 3% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反应 20 min, 再次冲洗后经质量分数为 5% 的 BSA 封闭 30 min, 阳性对照组加入含 I 型胶原 1:200 的一抗反应过夜, 阴性对照组加入 PBS 作为对照, 后经 PBS 冲洗 3 遍后加入 50 μL 二抗 (1:200) 反应 30 min, 再次冲洗后以每张玻片 50 μL DAB 浸润 10 min, 再依次经过漂洗、苏木素复染、冲洗 (PBS)、返蓝 2 s、常温晾干、梯度酒精、二甲苯进行脱水与透明后封片与观察<sup>[6]</sup>。

2.3 实验分组 本实验使用第 2 代软骨细胞, 经鉴定后共分 6 组, 分别为正常组, 模型组, DKK-1 抑制剂组, 以及独活寄生汤水提物低、中、高剂量组。除正常组外, 其余各组均经 10 ng · mL<sup>-1</sup> 浓度 IL-1β 造模, 造模成功后, DKK-1 抑制剂组加入

5 μg · mL<sup>-1</sup> 浓度的 DKK-1, 独活寄生汤水提物低、中、高剂量组分别加入 100, 200, 400 μg · mL<sup>-1</sup> 的独活寄生汤水提物。

## 2.4 RT-PCR 法检测 Wnt4、GSK-3β、β-catenin mRNA 表达

### 2.4.1 Wnt4、GSK-3β、β-catenin mRNA 引物设计与合成 见表 1。

表 1 mRNA 引物序列

mRNA 引物	引物序列
Wnt4	Sense, 5'-GGTCAGCCCACAGGGTTTCCA-3'
	Antisense, 5'-ACCGCTCGCCAGCATGTCTTT-3'
GSK-3β	Sense, 5'-TAGTCCGATTGCGGTATT-3'
	Antisense, 5'-CTCCCTTGTGGTGTTCCT-3'
β-catenin	Sense, 5'-TCCGCATGGAGGAGATAGTTG-3'
	Antisense, 5'-GCTGGAGAACCCATGAGG T-3'
GAPDH	Sense, 5'-ACGGCAAGTTCAACGGCACAG-3'
	Antisense, 5'-GAAGACGCCAGTAGACTCC ACGAC-3'

2.4.2 RT-PCR 方法 采用 Trizol 法进行 Total RNA 提取, 并使用核酸蛋白检测仪进行浓度检测; 逆转录后进行 PCR, 依次使用移液枪准确加入 Mix 10 μL、上游引物 1 μL、下游引物 1 μL、DEPC 水 7 μL、cDNA 1 μL 配制公共管, 即每管 20 μL。PCR 为 94 ℃ 4 min 条件下首先进行预变性, 循环 35 次 (94 ℃ 30 s、退火 58 ℃ 30 s、72 ℃ 45 s) 后置于 72 ℃ 10 min 并于 4 ℃ 保存; 制备 1.5% 琼脂糖凝胶, 上样后, 在 100 V、70 mA、15 min 条件下电泳, 使用 BIO-RAD Fluor-S TM MultiImager 图像分析仪下扫描, 经分析后拍照存档。

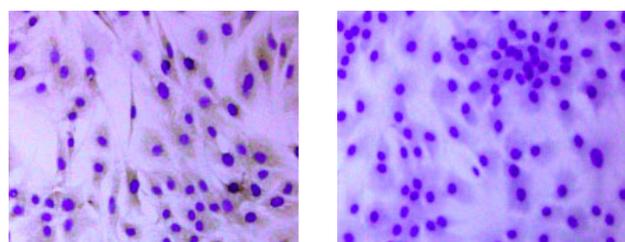
2.5 Western blot 检测软骨细胞 Wnt4、GSK-3β、β-catenin 表达 独活寄生汤水提物 (100, 200, 400 μg · mL<sup>-1</sup>) 干预 48 h 后, 提取各组软骨细胞总蛋白, 并进行 BCA 蛋白定量; 依次配制 12% 分离胶和 5% 浓缩胶并进行灌板, 快速插入梳子, 排除气泡后, 置于室温下凝固; 上样后进行电泳, 采用半干式进行转膜, 转膜完毕后, 迅速取出膜并标记蛋白面, 后将其置于 TBST 中漂洗 2 遍。脱脂牛奶封闭 2 h 后洗膜, 再将各条膜放入预先配置好的 β-actin (1:1000)、Wnt4 (1 μg · mL<sup>-1</sup>)、GSK-3β (1:5000)、β-catenin (1:4000) 的一抗中 4 ℃ 冰箱摇床震荡过夜, 漂洗 3 次 (每次 10 min) 后置于二抗 (1:5000) 封闭袋中室温反

应1 h, 再次漂洗3次(每次10 min), 最后配制ECL发光液进行显影, 在凝胶成像仪下曝光成像并分析储存。

2.6 统计学方法 采用SPSS 19.0软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2组间比较符合正态分布采用*t*检验, 3组及以上组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

### 3 结果

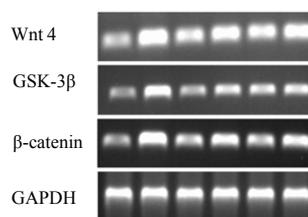
3.1 软骨细胞观察与鉴定 本实验第2代大鼠椎间盘软骨细胞镜下观察: 分布均匀, 边界清晰, 形态结构一致, 呈明显的铺路石状外观; 经型胶原法染色后, 阳性对照组细胞浆区为棕黄色, 阴性对照组细胞浆区颜色透明, 以上可鉴定本实验所用细胞为椎间盘软骨细胞。见图1。



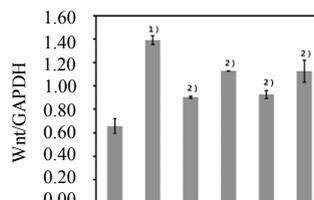
(1) 阳性对照组 (2) 阴性对照组

图1 软骨细胞鉴定( $\times 200$ )

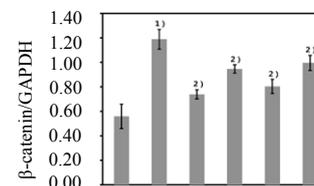
3.2 RT-PCR 检测结果 RT-PCR 检测结果显示, 独活寄生汤水提取物( $100, 200, 400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )作用于经IL-1 $\beta$ 诱导退变的椎间盘软骨细胞后, 可下调Wnt4、GSK-3 $\beta$ 、 $\beta$ -catenin mRNA含量表达。与正常组比较, 模型组Wnt4、GSK-3 $\beta$ 、 $\beta$ -catenin mRNA含量均明显升高, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 提示椎间盘软骨细胞在一定程度上发生退变, 退变模型建立; 而预加入DKK-1抑制剂组的Wnt4、GSK-3 $\beta$ 、 $\beta$ -catenin mRNA含量明显低于模型组( $P < 0.01$ ), 提示预加入DKK-1抑制剂可在一定程度上抑制椎间盘软骨细胞Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路; 在Wnt4、GSK-3 $\beta$ 、 $\beta$ -catenin mRNA指标上, 与模型组比较, 独活寄生汤水提取物组( $100, 200, 400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )的mRNA含量均明显降低, 尤其以 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组的表达量最低( $P < 0.01$ ), 提示独活寄生汤水提取物可通过调控Wnt4、GSK-3 $\beta$ 、 $\beta$ -catenin mRNA表达, 在一定程度上通过调控Wnt/ $\beta$ -catenin途径, 进而延缓大鼠椎间盘软骨细胞的退变进程。见图2。



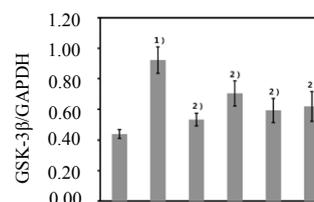
(1) 各组 Wnt4、GSK-3 $\beta$ 、 $\beta$ -catenin mRNA 表达



(2) 各组 Wnt mRNA 表达



(3) 各组  $\beta$ -catenin mRNA 表达



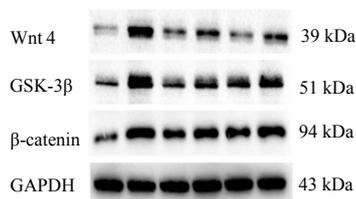
(4) 各组 GSK-3 $\beta$  mRNA 表达

注 正常组, 模型组, DKK-1抑制剂组, 独活寄生汤低、中、高剂量组。与正常组比较, 1)  $P < 0.01$ ; 与模型组比较, 2)  $P < 0.01$

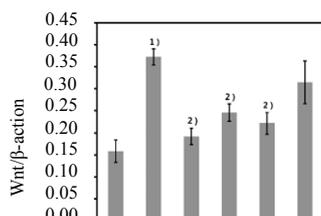
图2 RT-PCR 检测结果

3.3 Western blot 检测结果 Western blot 检测结果显示, 独活寄生汤水提取物( $100, 200, 400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )作用于经IL-1 $\beta$ 诱导退变的椎间盘软骨细胞后, 可下调软骨细胞内Wnt4、GSK-3 $\beta$ 、 $\beta$ -catenin蛋白含量表达。与正常组比较, 模型组Wnt4、GSK-3 $\beta$ 、 $\beta$ -catenin含量均明显升高, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 提示软骨细胞在一定程度上发生退变, 退变模型建立; 而预加入DKK-1抑制剂组的Wnt4、GSK-3 $\beta$ 、 $\beta$ -catenin蛋白含量明显低于模型组( $P < 0.01$ ); 在Wnt4、GSK-3 $\beta$ 、 $\beta$ -catenin指标上, 与模型组比较, 独活寄生汤水提取物组( $100, 200, 400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )的蛋白含量均明显降低, 尤其以 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组的表达量最低( $P < 0.01$ ), 提示

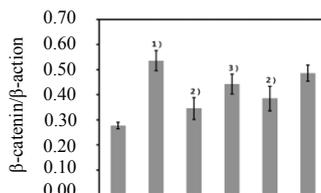
独活寄生汤水提取物可通过调控 Wnt4、GSK-3β、β-catenin 表达，在一定程度上调控 Wnt /β-catenin 途径，进而延缓大鼠椎间盘软骨细胞的退变进程。见图 3。



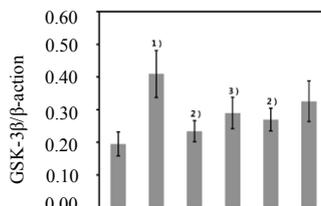
(1) 各组 Wnt4、GSK-3β、β-catenin mRNA 表达



(2) 各组 Wnt mRNA 表达



(3) 各组 β-catenin mRNA 表达



(4) 各组 GSK-3β mRNA 表达

注 正常组， 模型组， DKK-1 抑制剂组， 独活寄生汤低、中、高剂量组。与正常组比较，1)  $P < 0.01$ ；与模型组比较，2)  $P < 0.05$ ，3)  $P < 0.01$

图 3 Western blot 检测结果

#### 4 讨论

Wnt/β-catenin 信号途径与软骨细胞的退变具有密切联系<sup>[14-15]</sup>，其是否也在椎间盘软骨细胞退变过程中发挥重要的调控作用是我们关注的焦点。因此，本研究通过体外培养大鼠椎间盘软骨细胞，并经 型胶原法染色进行鉴定。鉴于 IL-1β 可抑制软骨细胞活性，并下调蛋白聚糖和 型胶原基因表达，同时亦可诱导细胞外基质蛋白酶、炎症因子和

NO 产物产生<sup>[16-17]</sup>，因此本实验使用  $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度 IL-1β 干预椎间盘软骨细胞。结果发现，与正常组比较，模型组在 Wnt4、GSK-3β、β-catenin mRNA 与蛋白含量均明显升高 ( $P < 0.05$ )，因此，IL-1β 可作为一种塑造大鼠椎间盘软骨细胞退变模型的方式。Dickkopf 族 (DKK-1) 可通过间接减少可利用的辅助受体 LRP 的数量抑制 Wnt 与膜受体的结合而发挥作用，常被作为 Wnt/β-catenin 信号通路的抑制剂，因此本实验采用  $5 \text{ μg} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度的 DKK-1 影响 Wnt/β-catenin 信号通路<sup>[18-20]</sup>，结果发现， $5 \text{ μg} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度的 DKK-1 可抑制经 IL-1β 诱导大鼠椎间盘软骨细胞中 Wnt4、GSK-3β、β-catenin mRNA 与蛋白含量表达。

前期研究发现，独活寄生汤水提取物  $200 \text{ μg} \cdot \text{mL}^{-1}$  可显著促进正常软骨细胞内 Cyclin D1、CDK4、CDK6 及 P21 mRNA 的表达<sup>[21]</sup>，故本实验在前期基础上，以 Wnt/β-catenin 信号通路为基点，探讨独活寄生汤水提取物 ( $100, 200, 400 \text{ μg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 调控 IL-1β 诱导的大鼠椎间盘退变软骨细胞功能的影响，结果显示，独活寄生汤水提取物 ( $100, 200, 400 \text{ μg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 干预 IL-1β 诱导的大鼠椎间盘退变软骨细胞 48 h 后，可明显下调 Wnt4、GSK-3β、β-catenin mRNA 与蛋白含量表达，其中以  $200 \text{ μg} \cdot \text{mL}^{-1}$  组的表达最为显著 ( $P < 0.01$ )，这也与前期研究相切合，提示独活寄生汤水提取物可通过影响 Wnt/β-catenin 途径，进而调控 Wnt4、GSK-3β、β-catenin 表达，在一定程度上延缓大鼠椎间盘软骨细胞的退变进程。

本实验研究的重点在于独活寄生汤水提取物对体外培养的大鼠椎间盘软骨细胞影响，其药理药效作用是否亦可经过体内代谢而对椎间盘发挥影响，仍需要进一步通过大量动物实验进行验证。

#### 5 参考文献

- [1] 曹旺烽, 陈长贤. 椎间盘软骨终板退变的研究进展 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2016, 24 (10): 70-74.
- [2] 王海生, 官建中. 椎间盘软骨终板退变的研究进展 [J]. 中国矫形外科杂志, 2016, 24 (5): 436-438.
- [3] WU Y, CISEWSKI S, SACHS BL, et al. Effect of cartilage endplate on cell based disc regeneration: a finite element analysis [J]. Mol Cell Biomech, 2013, 10 (2): 159-182.
- [4] 丰哲, 肖茜, 练克俭. Wnt 信号通路与骨关节炎的研

(下转第 22 页)

- knee osteoarthritis in daily practice [ J ] .Arthritis Rheum,2003,48 ( 1 ) :88-90.
- [ 9 ] 李满意, 娄玉钤. 娄多峰教授治疗骨关节炎经验总结 [ J ] . 风湿病与关节炎, 2015,4 ( 7 ) :43-46.
- [ 10 ] 张康乐, 郭艳幸. 中药外敷联合滑膜炎颗粒口服及功能锻炼对膝关节炎性滑膜炎临床观察 [ J ] . 风湿病与关节炎, 2016,5 ( 6 ) :18-20.
- [ 11 ] 刘映岐, 杨松涛, 陶程露. 中医内治法治疗膝关节炎研究进展 [ J ] . 现代临床医学, 2017,43 ( 2 ) :158-160.
- [ 12 ] 王延冰, 肖丽娜. 膝关节炎的中医外治方法及其护理 [ J ] . 风湿病与关节炎, 2015,4 ( 2 ) :75-77.
- [ 13 ] 张培璐, 王俊杰. 蜡疗联合中医外治法治疗膝关节炎性关节的研究进展 [ J ] . 中国中西医结合外科杂志, 2016,22 ( 2 ) :207-208.
- [ 14 ] 张晨, 马骏, 党晓谦, 等. 非甾体抗炎药治疗骨关节炎的研究进展 [ J ] . 中华关节外科杂志 ( 电子版 ), 2017,11 ( 2 ) :66-69.
- [ 15 ] 沈素红, 席占国, 乔亚亚. 高频超声诊断膝骨关节炎的临床价值 [ J ] . 风湿病与关节炎, 2012,1 ( 4 ) :23-24.
- [ 16 ] 刘志宏, 王华新. 中药蜡疗技术在临床的应用现状 [ J ] . 全科护理, 2017,15 ( 9 ) :1048-1049.
- 收稿日期: 2017-06-19; 修回日期: 2017-09-04
- 
- ( 上接第 9 页 )
- 究进展 [ J ] . 吉林医学, 2017,38 ( 2 ) :383-386.
- [ 5 ] KANG H,HATA A.The role of microRNAs in cell fate determination of mesenchymal stem cells:balancing adipogenesis and osteogenesis [ J ] .Bmb Reports,2015,48 ( 6 ) :319-323.
- [ 6 ] 乔斌, 李盛华, 周明旺, 等. Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路与软骨代谢相关性研究进展 [ J ] . 中国中医骨伤科杂志, 2014,22 ( 10 ) :75-77.
- [ 7 ] KONDO N,YUASA T,SHIMONA K,et al.Intervertebral disc development is regulated by Wnt/beta-catenin signaling [ J ] .Spine,2011,36 ( 8 ) :513-518.
- [ 8 ] SMOLDERS LA,MEIJ BP,RIEMERS FM,et al.Canonical Wnt signaling in the Notochordal cell is upregulated in early intervertebral disk degeneration [ J ] .J Orthop Res,2012,30 ( 6 ) :950-957.
- [ 9 ] 刘发元, 李西海, 叶蕪芝, 等. 独活寄生汤干预骨关节炎软骨细胞凋亡的机制 [ J ] . 中华中医药杂志, 2014,29 ( 7 ) :2165-2168.
- [ 10 ] 黄翊峰, 罗大海, 刘波, 等. 独活寄生汤加减治疗腰椎间盘突出症 70 例疗效观察 [ J ] . 湖南中医杂志, 2014,30 ( 3 ) :69-71.
- [ 11 ] 黄臻, 何敬, 徐无忌, 等. 独活寄生汤对肝肾亏虚型腰椎间盘突出症患者外周血中 Fas/APO-1 的影响 [ J ] . 中医药导报, 2014,20 ( 10 ) :32-34.
- [ 12 ] LIU F,WENG X,LIN P,et al.Duhuo Jisheng decoction inhibits endoplasmic reticulum stress in chondrocytes induced by tunicamycin through the downregulation of miR-34a [ J ] .Int J Mol Med,2015,36 ( 5 ) :1311-1318.
- [ 13 ] LIU F,LIU G,LIANG W,et al.Duhuo Jisheng decoction treatment inhibits the sodium nitroprussiate induced apoptosis of chondrocytes through the mitochondrial dependent signaling pathway [ J ] .Int J Mol Med, 2014,34 ( 6 ) :1573-1580.
- [ 14 ] BOUGAULT C,PRIAM S,HOUARD X,et al.Protective role of frizzled-related protein B on matrix metalloproteinase induction in mouse chondrocytes [ J ] .Arthritis Res Ther,2014,16 ( 4 ) :R137.
- [ 15 ] CHUNG R,WONG D,MACSAI C,et al.Roles of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in the bony repair of injured growth plate cartilages in young rats [ J ] .Bone,2013 ( 52 ) :651-658.
- [ 16 ] LIANG QQ,ZHANG M,ZHOU Q,et al.Muscone protects vertebral end-plate degeneration by anti-inflammatory property [ J ] .Clin Orthop Relat Res,2010,468 ( 6 ) :1600-1610.
- [ 17 ] 张宇, 赵永见, 周泉, 等. 羟基红花黄素 A 拮抗 IL-1 $\beta$  诱导软骨终板细胞凋亡的作用机制 [ J ] . 中国药理学通报, 2011,27 ( 12 ) :1704-1709.
- [ 18 ] VORONKOV A,KRAUSS S.Wnt beta-catenin signaling and small molecule inhibitors [ J ] .Curr Pharm Des,2013,19 ( 4 ) :634-664.
- [ 19 ] SASSI N,LAADHAR L,ALLOUCHE M,et al.Wnt signaling and chondrocytes:from Cell fate determination to osteoarthritis physiopathology [ J ] .J Recept Signal Transduct Res,2014,34 ( 2 ) :73-80.
- [ 20 ] DUESTERDIECK-ZELLMER K,SEMEVOLOS S, KINSLEY M,et al.Age-related differential gene and protein expression in postnatal cartilage canal and osteochondral junction chondrocytes [ J ] .Gene Expr Patterns,2014,17 ( 1 ) :1-10.
- [ 21 ] 陈加守, 李西海, 李会婷, 等. 独活寄生汤水提取物对软骨细胞 G<sub>1</sub> 期调控因子 mRNA 表达的影响 [ J ] . 中国中药杂志, 2013,38 ( 22 ) :3949-3952.
- 收稿日期: 2017-08-20; 修回日期: 2017-09-28