

基础研究

DOI: 10.11699/cyxb20130309

3种非甾体抗炎药对大鼠骨关节炎关节软骨细胞 IL-1 β 、TNF- α 、IL-1 α 表达的影响

欧云生, 安 洪, 谭 超, 刘显宏

(重庆医科大学附属第一医院骨科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨长期应用塞来昔布、布洛芬、吲哚美辛对大鼠骨关节炎(osteoarthritis, OA)关节软骨细胞白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)、细胞白细胞介素-1 α (interleukin-1 α , IL-1 α)表达的影响。**方法:**采用左侧跟腱切除术建立 Wistar 大鼠同侧膝关节 OA 模型,分 4 组,每日给赛来昔布 24 mg/kg(celecoxib, CE)组、布洛芬 72 mg/kg(ibuprofen, IBP)组、吲哚美辛 9 mg/kg(indomethacin, IN)组及生理盐水(normal saline, NS)组。用免疫组织化学法观察 3、6、9 个月后关节软骨细胞 IL-1 β 、TNF- α 、IL-1 α 表达的变化。**结果:**①连续用药 3 月,CE 对软骨细胞 IL-1 β 、TNF- α 表达无明显影响,抑制 IL-1 α 的表达;IBP 促进软骨细胞 IL-1 β 、TNF- α 的表达,对 IL-1 α 的表达无明显影响;IN 轻度促进软骨细胞 IL-1 β 表达,增强 TNF- α 的表达,对 IL-1 α 的表达无明显影响。②连续用药 6 月,CE 对软骨细胞 IL-1 β 表达无明显影响,轻度抑制 TNF- α 、IL-1 α 表达;IBP 轻度促进软骨细胞 IL-1 β 的表达,促进 TNF- α 表达,轻度抑制 IL-1 α 的表达;IN 轻度抑制软骨细胞 IL-1 β ,抑制 TNF- α 表达,轻度抑制 IL-1 α 的表达。③连续用药 9 月,CE 明显抑制软骨细胞 IL-1 β 的表达,抑制 TNF- α 、IL-1 α 的表达;IBP 抑制软骨细胞 IL-1 β 、TNF- α 的表达,轻度抑制 IL-1 α 的表达。**结论:**CE 抑制软骨细胞 IL-1 β 、TNF- α 、IL-1 α 的表达,可减轻 OA 关节软骨的损害,IBP、IN 在不同时期对软骨细胞 IL-1 β 、TNF- α 、IL-1 α 表达的影响有所不同,其总体抑制效应不明显。

【关键词】非甾体抗炎药;软骨细胞;骨关节炎;白细胞介素-1;肿瘤坏死因子- α

【中国图书分类号】R681.8

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-01-03

Effects of three kinds of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on expressions of IL-1 β , TNF- α and IL-1 α in osteoarthritic chondrocytes of Wistar rats

OU Yunsheng, AN Hong, TAN Chao, LIU Xianhong

(Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the effects of celecoxib, ibuprofen and indomethacin on expressions of interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 α (IL-1 α) in osteoarthritic chondrocytes of Wistar rats. **Methods:** One hundred and thirty Wistar rats were randomly divided into 4 groups: celecoxib (CE) group, ibuprofen (IBP) group, indomethacin group (IN) and normal saline (NS) group. Osteoarthritis (OA) was induced by the excision of the left achilles tendon. In the 3rd, 6th and 9th month of the treatment after surgically induced OA, the articular cartilage was observed with immunohistochemical method to estimate the expressions of IL-1 β , TNF- α and IL-1 α in osteoarthritic chondrocytes of 4 groups. **Results:** ① In the 3rd month, CE exerted no remarkable effects on IL-1 β and TNF- α but suppressed expressions of IL-1 α ; IBP promoted expressions of IL-1 β and TNF- α but exerted no remarkable effects on IL-1 α ; IN mildly promoted expressions of IL-1 β , enhanced expressions of TNF- α but exerted no remarkable effects on IL-1 α . ② In the 6th month, CE exerted no remarkable effects on IL-1 β and mildly promoted TNF- α and IL-1 α expressions; IBP promoted expressions of IL-1 β (mildly) and TNF- α but mildly suppressed expressions of IL-1 α ; IN suppressed expressions of IL-1 β (mildly), IL-1 α and TNF- α (mildly). ③ In the 9th month, CE suppressed expressions of IL-1 β (significantly), TNF- α and IL-1 α ; IBP suppressed expressions of IL-1 β , TNF- α and IL-1 α (mildly). **Conclusions:** During the long-term use of three kinds of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in OA, CE can inhibit the expression of IL-1 β , TNF- α and IL-1 α in osteoarthritic chondrocytes and consequently mitigate the development of OA. Though, IBP and IN exert different influences on expressions of IL-1 β , TNF- α and IL-1 α during different periods, the overall suppression effects are not obvious.

【Key words】nonsteroidal anti-inflammatory drugs; chondrocyte; osteoarthritis; interleukin-1; tumor necrosis factor- α

作者介绍:欧云生, Email: ouyunsheng@yahoo.com.cn,

研究方向: 脊柱外科基础与临床。

通信作者:安 洪, Email: anhong1106@sohu.com。

关节软骨基质的分解与合成代谢是通过分解性细胞因子与合成性细胞因子平衡来维持。各种细胞因子的调控失调所致的合成分解效应在骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 关节软骨退变中起重要作用^[1-3]; 尤其是与软骨破坏有关的因子, 如细胞白介素-1 (interleukin-1, IL-1)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α) 的分泌异常与关节软骨的破坏及修复密切相关。IL-1 是一种重要的炎症调节因子, 抑制关节软骨细胞合成特征性的基质成分 II 型胶原和蛋白多糖, 促使关节软骨细胞发生反分化, 诱导关节软骨细胞表达 I、III 型胶原; IL-1 还能刺激关节软骨细胞分泌降解软骨基质成分的金蛋白酶。TNF- α 的作用与 IL-1 类似, 在软骨组织中 TNF- α 选择性地抑制软骨胶原的产生, 抑制蛋白多糖的合成, 同时促其降解, 在 OA 的发病中与 IL-1 起着协同作用。本文在以前研究的基础上^[4-5], 继续探讨长期应用塞来昔布、布洛芬、吲哚美辛对 OA 关节软骨细胞 IL-1 β 、IL-1 α 、TNF- α 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 动物

健康 Wistar 大鼠 130 只, 其中 OA 模型对照鼠 10 只 (未用药物处理), 3~4 月龄, 由重庆医科大学实验动物中心提供。随机分 4 组: 塞来昔布 (celecoxib, CE) 组、布洛芬 (ibuprofen, IBP) 组、吲哚美辛 (indomethacin, IN) 组和生理盐水 (normal saline, NS) 组。

1.2 方法

1.2.1 OA 模型制备 通过手术切除跟腱致膝关节应力降低, 诱发 Wistar 大鼠膝骨关节炎 OA 模型^[6]。左膝为实验侧, 右膝为对照侧。

1.2.2 试剂与方法 参照《药理实验方法学》药物长期毒性实验方法^[7]。药物剂量: 每天 CE (美国西尔大药厂波多黎各分

厂生产) 24 mg/kg; IBP (重庆西南药业股份有限公司生产) 72 mg/kg; IN (重庆科瑞制药有限责任公司生产) 9 mg/kg; NS (四川科伦大药厂生产)。若大鼠体质量相差超过 50 g, 给药个体化。每日定时经口给药 1 次, 给药时间为 3、6、9 个月。

1.2.3 观察指标

1.2.3.1 关节软骨组织学观察 造模 3、6、9 个月后, 颈椎脱臼法处死动物, 解剖膝关节, 4% 多聚甲醛及 70% 乙醇固定, 10% EDTA 脱钙, 石蜡包埋, 切片。切片 HE 染色, 光镜下观察关节软骨细胞、关节面、软骨基质、潮线等情况。

1.2.3.2 软骨细胞 IL-1 β 、TNF- α 、IL-1 α 的免疫组化染色

使用购自武汉博士德生物化学技术公司的 IL-1 β 、TNF- α 、IL-1 α 抗体、SABC 试剂盒、DAB 显色试剂盒进行实验。阴性对照: 用 PBS 代替一抗进行实验。阳性结果: 软骨细胞胞浆出现棕黄色着色, 着色深度与 IL-1 β 表达强度即浓度成正比。切片经 Olympus 光学显微镜观察照相, 采用北航医学图像分析系统测定计算每 1 个视野 (统计场) 的阳性染色平均光密度, 每个标本取 5 个视野。TNF- α 、IL-1 α 免疫组织化学染色方法与 IL-1 β 相同。

1.3 统计学处理

采用 SAS 6.12 统计分析软件处理。免疫组织化学染色光密度以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 对半定量数据应用方差分析, 进行多个样本均数间的两两比较, 采用 SNK- q 检验。检验水准 $\alpha=0.05$, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OA 动物模型的观察

左膝术后 2 个月时出现 OA 早期改变, 应力集中部位软骨表面轻微毛糙, HE 染色呈淡染, 软骨细胞轻度增生。造模后 3、6、9 个月各时期表现为 OA 的渐进发展过程。3 月时应力集中区域表面不光滑, 双柱状、巢状软骨细胞增生; 6 月时, 关节软骨表层剥脱, 大量软骨细胞增生; 9 月时, 关节软骨表层带进一步粗糙。实验中, IN 组大鼠死亡严重, 不能完成第 9 月实验 (图 1~9)。

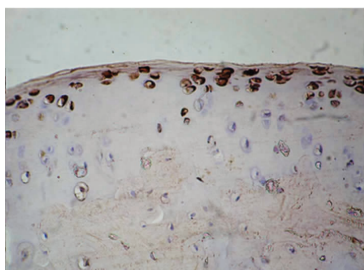


图 1 CE 组 3 月时关节软骨 IL-1 β 免疫组化染色 (400 $\times$)

Fig.1 Immunohistochemical staining of articular cartilage IL-1 β in CE group in the 3rd month (400 $\times$)

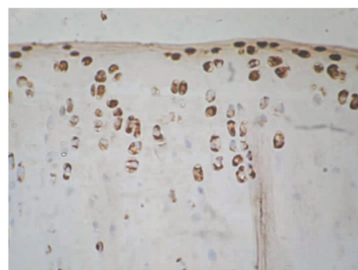


图 2 IBP 组 6 月时关节软骨 IL-1 β 免疫组化染色 (400 $\times$)

Fig.2 Immunohistochemical staining of articular cartilage IL-1 β in IBP group in the 6th month (400 $\times$)

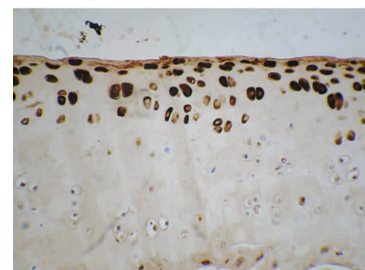


图 3 NS 组 9 月时关节软骨 IL-1 β 免疫组化染色 (400 $\times$)

Fig.3 Immunohistochemical staining of articular cartilage IL-1 β in NS group in the 9th month (400 $\times$)

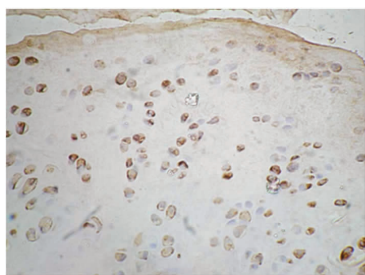


图 4 CE 组 9 月时关节软骨 IL-1β 免疫组化染色 (400×)

Fig.4 Immunohistochemical staining of articular cartilage IL-1β in CE group in the 9th month (400×)

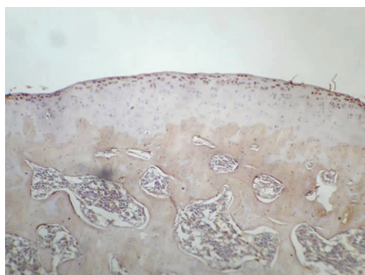


图 5 IBP 组 3 月时关节软骨 TNF-α 免疫组化染色 (100×)

Fig.5 Immunohistochemical staining of articular cartilage TNF-α in IBP group in the 3rd month (100×)

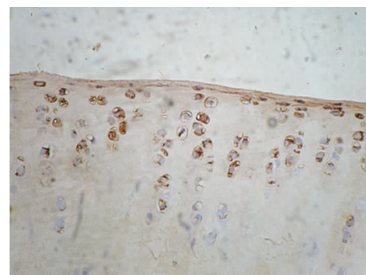


图 6 CE 组 6 月时关节软骨 TNF-α 免疫组化染色 (400×)

Fig.6 Immunohistochemical staining of articular cartilage TNF-α in CE group in the 6th month (400×)

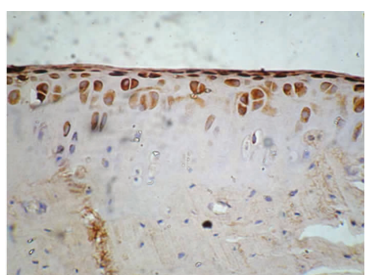


图 7 IBP 组 9 月时关节软骨 TNF-α 免疫组化染色 (400×)

Fig.7 Immunohistochemical staining of articular cartilage TNF-α in IBP group in the 9th month (400×)

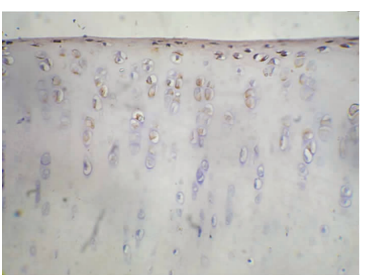


图 8 CE 组 3 月时关节软骨 IL-1α 免疫组化染色 (400×)

Fig.8 Immunohistochemical staining of articular cartilage IL-1α in CE group in the 3rd month (400×)

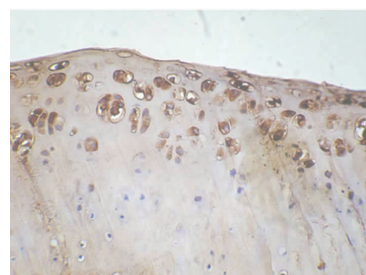


图 9 NS 组 9 月时关节软骨 IL-1α 免疫组化染色 (400×)

Fig.9 Immunohistochemical staining of articular cartilage IL-1α in NS group in the 9th month (400×)

2.2 软骨细胞 IL-1β 表达的图像分析结果

3、6、9 月时,NS、CE、IBP、IN 组的 IL-1β 表达染色平均吸光度结果见表 1。

连续用药 3 月,CE 对软骨细胞 IL-1β 表达无明显影响,IBP 促进 IL-1β 的表达,IN 轻度促进 IL-1β 表达。连续用药 6 月,CE 对软骨细胞 IL-1β 表达无明显影响,IBP 轻度促进 IL-1β 的表达,IN 轻度抑制 IL-1β 的表达。连续用药 9 月,CE 明显抑制软骨细胞 IL-1β 的表达,IBP 亦表现为抑制 IL-1β 的表达。

2.3 软骨细胞 TNF-α 表达的图像分析结果

3、6、9 个月时,CE、IBP、IN、NS 组的 TNF-α 表达染色平均吸光度结果见表 2。

连续用药 3 月,CE 对软骨细胞 TNF-α 表达无明显影响,IBP、IN 则增强 TNF-α 的表达。连续用药 6 月,CE 轻度抑制软骨细胞 TNF-α 表达,IBP 促进软骨细胞 TNF-α 表达,IN 抑制软骨细胞 TNF-α 表达。连续用药 9 月,CE、IBP 均能抑制软骨细胞 TNF-α 的表达。

2.4 软骨细胞 IL-1α 表达的图像分析结果

3、6、9 个月时,CE、IBP、IN、NS 组的 IL-1α 表达染色平均吸光度值结果见表 3。

连续用药 3 月,CE 抑制软骨细胞 IL-α 的表达,IBP、IN 对 IL-1α 的表达无明显影响。连续用药 6 月,CE、IBP、IN 轻度抑制软骨细胞 IL-α 的表达。连续用药 9 月,CE 能抑制软

骨细胞 IL-α 的表达,而 IBP 轻度抑制 IL-α 的表达。

3 讨论

OA 最主要的病理变化为受累关节软骨的进行性破坏,关节软骨基质的分解与合成代谢的失衡^[8-10]。各种细胞因子的调控失调所致的合成和分解效应在软骨退变中起重要作用,IL-1、TNF-α 是引起 OA 炎性变及软骨基质降解的重要细胞因子。IL-1 可能是众多破坏性细胞因子的核心因子^[11]。IL-1 能抑制软骨细胞合成蛋白多糖和 II 型胶原,为降解软骨细胞外基质的重要炎性介质。其破坏作用可能与刺激基质金属蛋白酶(matrix metal proteinase, MMPs)合成或活性有关。IL-1 促进 MMPs 合成,抑制金属蛋白酶组织抑制因子-1 产生,同时通过胞浆素原激活物的分泌,促进 MMPs 活化,并抑制胞浆素原激活物抑制物的合成,导致 OA 中胞浆素的 MMPs 激活,进一步加强了对软骨的破坏作用^[12-16]。IL-1 和 TNF-α 等细胞因子可能与膜相关受体结合后,通过共同的信号传导途径介导 MMPs 的产生。

IL-1 有 2 种,IL-1α 和 IL-β,共同作用于同一

表 1 IL-1 β 表达染色定量分析结果 ($\bar{x} \pm s$)Tab.1 Expressions of IL-1 β in the CE,IBP,IN group and NS group ($\bar{x} \pm s$)

组别	3个月	6个月	9个月
CE组	0.272 $\pm$ 0.036 ^c (n=9)	0.390 $\pm$ 0.050 (n=8)	0.370 $\pm$ 0.054 ^{ac} (n=8)
IBP组	0.464 $\pm$ 0.115 ^{ab} (n=8)	0.472 $\pm$ 0.047 ^b (n=7)	0.532 $\pm$ 0.037 ^a (n=6)
IN组	0.342 $\pm$ 0.065 (n=7)	0.354 $\pm$ 0.038 (n=5)	(n=0)
NS组	0.282 $\pm$ 0.019 (n=9)	0.414 $\pm$ 0.068 (n=9)	0.808 $\pm$ 0.163 (n=8)
F 值	7.88	3.82	22.8
P 值	0.000 6	0.018 3	0.000 1

注:a,与 NS 组比较, $P<0.01$;b,与 IN 组比较, $P<0.01$;c,与 IBP 组比较, $P<0.01$;各时间点处死大鼠的数量:CE 组:3 个月 9 只,6 个月 8 只,9 个月 8 只;IBP 组:3 个月 8 只,6 个月 7 只,9 个月 6 只;IN 组:3 个月 7 只,6 个月 5 只,9 个月 0 只;NS 组:3 个月 9 只,6 个月 9 只,9 个月 8 只;- 为无统计数据

表 2 TNF- α 表达染色定量分析结果 ($\bar{x} \pm s$)Tab.2 Expressions of TNF- α in the CE,IBP,IN group and NS group ($\bar{x} \pm s$)

组别	3个月	6个月	9个月
CE组	0.272 $\pm$ 0.043 ^{bc} (n=9)	0.310 $\pm$ 0.058 ^{bc} (n=8)	0.340 $\pm$ 0.043 ^a (n=8)
IBP组	0.388 $\pm$ 0.030 ^a (n=8)	0.386 $\pm$ 0.043 ^{ab} (n=7)	0.294 $\pm$ 0.021 ^a (n=6)
IN组	0.380 $\pm$ 0.045 ^a (n=7)	0.256 $\pm$ 0.022 ^a (n=5)	- (n=0)
NS组	0.258 $\pm$ 0.054 (n=9)	0.326 $\pm$ 0.017 (n=9)	0.424 $\pm$ 0.025 (n=8)
F 值	11.18	8.59	11.43
P 值	0.000 1	0.000 3	0.000 3

注:a,与 NS 组比较, $P<0.01$;b,与 IN 组比较, $P<0.01$;c,与 IBP 组比较, $P<0.01$;各时间点处死大鼠的数量:CE 组:3 个月 9 只,6 个月 8 只,9 个月 8 只;IBP 组:3 个月 8 只,6 个月 7 只,9 个月 6 只;IN 组:3 个月 7 只,6 个月 5 只,9 个月 0 只;NS 组:3 个月 9 只,6 个月 9 只,9 个月 8 只;- 为无统计数据

表 3 IL-1 α 表达染色定量分析结果 ($\bar{x} \pm s$)Tab.3 Expressions of IL-1 α in CE,IBP,IN group and NS group ($\bar{x} \pm s$)

组别	3个月	6个月	9个月
CE组	0.162 $\pm$ 0.038 ^{ac} (n=9)	0.260 $\pm$ 0.02 (n=8)	0.292 $\pm$ 0.042 ^a (n=8)
IBP组	0.254 $\pm$ 0.069 (n=8)	0.282 $\pm$ 0.022 (n=7)	0.434 $\pm$ 0.132 (n=6)
IN组	0.204 $\pm$ 0.027 (n=7)	0.292 $\pm$ 0.041 (n=5)	- (n=0)
NS组	0.244 $\pm$ 0.040 (n=9)	0.322 $\pm$ 0.039 (n=9)	0.530 $\pm$ 0.088 (n=8)
F 值	4.99	2.12	8.38
P 值	0.005 9	0.115 9	0.001 4

注:a,与 NS 组比较, $P<0.01$;b,与 IN 组比较, $P<0.01$;c,与 IBP 组比较, $P<0.01$;各时间点处死大鼠的数量:CE 组:3 个月 9 只,6 个月 8 只,9 个月 8 只;IBP 组:3 个月 8 只,6 个月 7 只,9 个月 6 只;IN 组:3 个月 7 只,6 个月 5 只,9 个月 0 只;NS 组:3 个月 9 只,6 个月 9 只,9 个月 8 只;- 为无统计数据

个受体,发挥类似的生物活性,是介导软骨破坏最直接的细胞因子。IL-1 对软骨细胞蛋白多糖的合成表现为抑制作用^[17]。IL-1 抑制软骨细胞合成特征性 II、XI 型胶原,促进软骨细胞合成 I、III 型胶原及纤维连接素^[18-19]。

本实验中,CE 长期应用能抑制软骨细胞 IL-1 β 的表达,抑制其对关节软骨的破坏作用;IBP 短、中期应用促进软骨细胞 IL-1 β 的表达,加重退变软骨的损害;随用药时间延长,出现抑制 IL-1 β 的表达,其抑制作用低于 CE;IN 短期应用轻度促进软骨细胞 IL-1 β 的表达,延长用药时间,亦轻度抑制 IL-1 β 的表达。CE 的短、中、长期应用,对软骨细胞 IL-1 α 的表达表现为持续抑制作用,抑制其对关节软骨的

破坏作用;IBP 的短期应用对软骨细胞 IL-1 α 的表达无明显影响,随用药时间延长,IBP 抑制软骨细胞 IL-1 α 的表达,其抑制作用低于 CE;IN 对软骨细胞 IL-1 α 的表达无明显影响。

TNF- α 作用与 IL-1 类似,能作用于软骨细胞基因表达,诱导软骨细胞产生胶原酶、前列腺素 E2、蛋白酶,抑制胶原的产生,抑制蛋白多糖的合成,同时促其降解。OA 关节软骨免疫组化染色,其基质和细胞中 TNF- α 及受体均呈阳性反应,且强度、范围与 OA 严重程度相平行^[20]。TNF- α 通过增加 MMPs 的活性来抑制软骨基质中蛋白多糖和胶原的合成,加速软骨基质的分解代谢。TNF- α 能诱导软骨细胞和滑膜细胞分泌 IL-1 β ,与 IL-1 β 有协同作用,介导关

节软骨破坏。另外, TNF- α 可刺激软骨细胞和滑膜细胞产生前列腺素 E2 和胶原酶, 对软骨基质有很强的降解作用。同 IL-1 的作用一样, TNF- α 不但可以引起软骨基质的破坏, 而且抑制基质的修复。

本实验中, CE 抑制软骨细胞 TNF- α 的表达, 抑制 TNF- α 引起的关节软骨损害, 减轻 OA 关节软骨的退变; 随用药时间延长, 其抑制 TNF- α 表达的作用增强。IBP 的短、中期应用, 促进软骨细胞 TNF- α 表达, 加重软骨基质的损害, 不利于软骨代谢; 随用药时间延长, IBP 又表现为抑制 TNF- α 表达。IN 的短期应用促进软骨细胞 TNF- α 的表达, 加重关节软骨损害; 随用药时间延长, IN 亦抑制 TNF- α 表达。

综上所述, CE 抑制软骨细胞 IL-1、TNF- α 的表达, 抑制 MMPs 的合成与分泌, 抑制软骨基质的分解代谢, 减缓 OA 关节软骨的损害, 对退变的关节软骨有一定的保护作用。IBP、IN 在用药的不同时期对软骨细胞 IL-1、TNF- α 表达的影响有所不同, 其总体抑制软骨细胞 IL-1、TNF- α 表达的效应不明显, 缺乏对退变的关节软骨的保护作用。

参 考 文 献

- [1] Kobayashi M, Squires G R, Mousa A, et al. Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage[J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52(1): 128-135.
- [2] Zayed N, Afif H, Chabane N, et al. Inhibition of interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinases 1 and 13 production in human osteoarthritic chondrocytes by prostaglandin D2[J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(2): 3530-3540.
- [3] 巫衍铤, 李荣亨. 白介素-1 在骨关节炎发病机制中的作用[J]. *中国老年学杂志*, 2008, 8(28): 1550-1552.
- Wu H K, Li R H. Role of interleukin-1 in cartilage destruction in osteoarthritis[J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2008, 8(28): 1550-1552.
- [4] 欧云生, 安 洪. 长期应用塞来昔布、布洛芬、吲哚美辛对大鼠骨关节炎关节软骨胶原代谢的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2007, 27(21): 2070-2072.
- Ou Y S, An H. Effects of Celecoxib, Ibuprofen and Indomethacin on collagen metabolism in rat osteoarthritis model[J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2007, 27(21): 2070-2072.
- [5] 欧云生, 安 洪. 高选择性非甾体抗炎药塞来昔布对大鼠骨关节炎关节软骨的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2007, 17(18): 2223-2225, 2239.
- Ou Y S, An H. Effects of highly selective NSAIDs on osteoarthritic cartilage in experimental rat model[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2007, 17(18): 2223-2225, 2239.
- [6] 顾 延, 戴克茂, 裴世静, 等. 应力降低导致关节软骨退变机理的形态学研究[J]. *中华骨科杂志*, 1995, 15(9): 631-633.
- Gu Y, Dai K R, Qiu S J, et al. A morphological study of degenerative mechanism of articular cartilage induced by low stress[J]. *Chinese Journal of Orthopaedics*, 1995, 15(9): 631-633.
- [7] 徐叔云, 卞如濂, 陈 修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 406.
- Xu S Y, Bian R L, Chen X. Methodology of pharmacological experiment [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1982: 406.
- [8] Squives G R, Okouneff S, Ionescu M, et al. The pathobiology of focal lesion development in aging human articular cartilage and molecular matrix changes characteristic of osteoarthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(5): 1261-1270.
- [9] Lavigne P, Benderdour M, Lajeunesse D, et al. Subchondral and trabecular bone metabolism regulation in canine experimental knee osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2005, 13(4): 310-317.
- [10] 冯传汉, 张铁良. 临床骨科学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 47-49.
- Feng C H, Zhang T L. Clinical orthopedics[M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2004: 47-49.
- [11] Van den berg W B. The role of cytokines and growth factors in cartilage destruction in osteoarthritis and rheumatoid arthritis[J]. *Z Rheumatol*, 1999, 58(3): 136-141.
- [12] Elshaier A M, Hakimiyan A A, Rappoport L, et al. Effect of interleukin-1beta on osteogenic protein 1-induced signaling in adult human articular chondrocytes[J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(1): 143-154.
- [13] López-Armada M J, Caramés B, Lires-Deán M, et al. Cytokines, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta, differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006, 14(7): 660-669.
- [14] 任志伟, 俞永林, 杨丰建, 等. IL-1 β 对兔关节软骨细胞 MMP-1/-13 mRNA 表达和 NO 的影响[J]. *复旦学报 (医学版)*, 2008, 35(2): 167-170.
- Ren Z W, Yu Y L, Yang F J, et al. Effects of interleukin-1 β on gene expression of metalloproteinase-1/-13 mRNA and nitric oxide in rabbit articular chondrocytes[J]. *Fudan University Journal of Medical Sciences*, 2008, 35(2): 167-170.
- [15] Aida Y, Maeno M, Suzuki N, et al. The effect of IL-1beta on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in human chondrocytes[J]. *Life Sci*, 2006, 79(8): 764-771.
- [16] Kimura H, Yukitake H, Suzuki H, et al. The chondroprotective agent ITZ-1 inhibits interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinase-13 production and suppresses nitric oxide-induced chondrocyte death[J]. *J Pharmacol Sci*, 2009, 110(2): 201-211.
- [17] Fernandes J C, Martel-Pelletier J, Pelletier J P. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology[J]. *Biorheology*, 2002, 39(1-2): 237-246.
- [18] Iwamoto M, Koike T, Nakashima K. Interleukin-1: a regulator of chondrocyte proliferation[J]. *Immunol Lett*, 1989, 21(2): 153-156.
- [19] Glodring M B, Birkhead J, Sandell L J. Interleukin-1 suppresses expression of cartilage specific types II and XI collagen and increases type I and III collagens in human chondrocytes[J]. *J Clin Invest*, 1988, 82(6): 2026-2037.
- [20] Neidel J, Sihulze M, Sova L, et al. Practical significance of cytokine determination in joint fluid in patients with arthroses of rheumatoid arthritis[J]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, 1996, 134(4): 381-385.

(责任编辑: 唐秋姗)