

双醋瑞因对碘乙酸钠诱导的骨关节炎软骨细胞损伤的保护作用

张慧东

(河北省唐山市工人医院骨二科 063000)

[摘要] **目的** 探讨双醋瑞因对碘乙酸钠(MIA)诱导的骨关节炎软骨细胞的保护作用。**方法** 实验分为正常组,模型组(4 μ M MIA),双醋瑞因低、中、高剂量组(1、10、100 μ M)。噻唑蓝(MTT)法检测各组软骨细胞活力;分光光度法检测各组半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)活性;Western blot 分析核因子- κ B (NF- κ B)信号通路激活情况及下游靶蛋白 Bax、Bcl-2、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、基质金属蛋白酶-13(MMP-13)的表达量。**结果** 1、10、100 μ M 双醋瑞因能提高 MIA 诱导的大鼠软骨细胞的活力并降低 Caspase-3 活性($P<0.05$);10、100 μ M 双醋瑞因能降低 I κ B α 及 NF- κ B 磷酸化水平,并下调 Bax、MMP-9 及 MMP-13 的表达,上调 Bcl-2 的表达($P<0.05$)。**结论** 双醋瑞因能够抑制 MIA 诱导的软骨细胞凋亡与细胞外基质降解,与 NF- κ B 信号通路有关。

[关键词] 骨关节炎;双醋瑞因;软骨细胞;凋亡;NF- κ B 信号通路

[中图分类号] R684

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)08-1019-03

Protective effect of diacerein on MIA-induced injury in rat osteoarthritis chondrocytes

Zhang Huidong

(Second Department of Orthopedics, Tangshan Municipal Workers Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect of diacerein on monosodium iodoacetate (MIA) induced injury in rat osteoarthritis chondrocytes. **Methods** The experiment was divided into five groups, including the normal group, model group (4 μ M MIA), diacerein low, middle and high doses groups (1, 10, 100 μ M). The viability of chondrocytes was detected by MTT assay. The activity of cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (Caspase-3) was measured by spectrophotography. The activation of nuclear factor kappa B (NF- κ B) signaling pathway and expression level of downstream target molecule cell Bax, Bcl-2, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and MMP-13 were detected by Western blot. **Results** 1, 10, 100 μ M diacerein could increase the viability of MIA-induced chondrocytes and reduce the activity of Caspase-3 ($P<0.05$). 10, 100 μ M diacerein could decrease the phosphorylation level of I κ B α and NF- κ B p65, furthermore downregulated the level of Bax, MMP-9 and MMP-13 protein, and upregulated the level of Bcl-2 protein ($P<0.05$). **Conclusion** Diacerein could inhibit cell apoptosis and degradation of extracellular matrix in MIA-induced rat chondrocytes, which might be related to the NF- κ B signal pathway.

[Key words] osteoarthritis; diacerein; chondrocytes; apoptosis; NF- κ B signal pathway

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种多发于老年人的慢性退行性关节疾病,以关节软骨退行性变和关节周围骨质增生为主要病理特征,主要与年龄、性别、遗传因素等有关,而软骨病变是骨关节炎的中心环节^[1-2]。现治疗 OA 的药物主要分为非特异性和特异性药物,非特异性药物只能缓解症状,无法改善病情,如非甾体抗炎药物等;而特异性药物不仅能抗炎镇痛,还能缓解基质降解,如双醋瑞因,可发挥抗炎、镇痛作用,并促进软骨修复。孙先润等^[3]研究显示关节腔注射双醋瑞因可显著改善 SD 大鼠 OA 病理形态并提高 II 型胶原蛋白的表达。廖俊琳等^[4]研究显示 1、10、100 μ M 双醋瑞因显著抑制白细胞介素-1 β (IL-1 β)诱导的软骨细胞凋亡,但其作用机制尚不清楚。因此本课题主要探讨双醋瑞因是否可以抑制碘乙酸钠(MIA)诱导的骨关节炎软骨细胞损伤及其可能作用机制。

1 材料与方

1.1 实验动物 雄性 SD 大鼠,体质量(100 \pm 20)g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,合格证 SCXK(沪 2012-0002)。室内温度控制在(23 \pm 2) $^{\circ}$ C,大鼠自由饮食和饮水。

1.2 试剂 双醋瑞因胶囊购自昆明积大制药有限公司;碘乙酸钠购自阿拉丁;兔抗 Bax、Bcl-2、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、基质金属蛋白酶-13(MMP-13)、pp65、I κ B α 、p-I κ B α 抗体购

自 Epitomics 公司;鼠抗 p65、GADPH 抗体、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)检测试剂盒购自碧云天生物技术研究所;II 型胶原酶,新生牛血清(NCS),DMEM/F-12 培养基购自 Gibco 公司。ChemiDocTM XRS 凝胶成像系统购自 Bio-Rad 公司;Tecan Infinite F200/M200 型多功能酶标仪购自瑞士 TECAN 集团公司。

1.3 大鼠软骨细胞的制备^[1-2] 无菌环境下,小心刮取 SD 大鼠双侧膝关节胫骨坪、股骨髁状突及髌骨内侧透明软骨,充分漂洗软骨小块,用眼科剪剪碎至 1 mm³ 大小。将软骨碎片转移至小锥形瓶中,依次用 0.25% 的胰蛋白酶及 0.2% 的胶原酶分别消化 30 min 及 2 h。胶原酶消化时每隔 20 min 振荡 1 min。将消化液经 200 目筛网过滤,以便得到单细胞悬液,1 000 rpm/min 离心 10 min。用 DMEM/F-12 培养基重悬细胞(含 20% NCS, 100 U/mL 青霉素, 100 U/mL 链霉素),将细胞悬液转移至干净无菌的细胞培养瓶中,37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱中培养,约 48 h,细胞绝大部分贴壁,弃去未贴壁的细胞,更换新鲜的培养基继续培养,约 4~5 d 细胞开始融合,实验使用第 2~3 代细胞。

1.4 软骨细胞活力检测 采用噻唑蓝(MTT)法,将第 2~3 代的软骨细胞,用 0.25% 的胰蛋白酶消化细胞,用含 10%

NCS 的 DMEM/F-12 培养基调整细胞浓度为每毫升 1×10^5 个,接种于 96 孔细胞培养板, 37°C 5% CO_2 培养箱中培养 24 h,使细胞充分贴壁。加入含 5% NCS 的 DMEM/F-12(含 $4 \mu\text{M}$ MIA 及 1、10、100 μM 双醋瑞因)培养基, 37°C 5% CO_2 条件下培养 48 h,每孔加 MTT(5 mg/mL) $20 \mu\text{L}$,继续培养 4 h 后,小心吸出培养上清液,每孔加入 DMSO $150 \mu\text{L}$,待结晶充分溶解后,酶标仪 570 nm 处测定 OD 值。

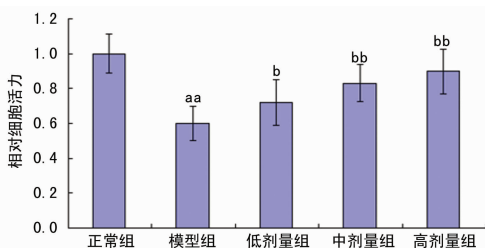
1.5 Caspase-3 活性检测 将第 2~3 代软骨细胞进行消化,调整细胞浓度为 $2 \times 10^5/\text{mL}$,接种于 37°C 5% CO_2 培养箱中培养 24 h。加入含 5% NCS 的 DMEM/F-12(含 $4 \mu\text{M}$ MIA 及 1、10、100 μM 双醋瑞因)培养基,继续培养 48 h。按 Caspase-3 分光光度法检测试剂盒进行检测。

1.6 Western blot 收集处理过的样本,加入预冷的 RIPA 裂解液裂解,冰浴 30 min,每隔 10 min 震荡 5 s,以 1×10^4 r/min 4°C 离心 15 min,获得蛋白样品。用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。以每孔(30~50 ng)蛋白上样,SDS 凝胶电泳后湿法转膜,以 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h 加入一抗 4°C 孵育过夜。次日 TBST 漂洗 3 次,加二抗,室温孵育 1 h 后漂洗 3 次。采用 Bio-rad 曝光系统进行曝光。

1.7 统计学处理 所有数据均用 SPSS 17.0 进行统计分析,至少重复 3 次,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 双醋瑞因对 MIA 诱导的软骨细胞活力的影响 与正常组比较,模型组中软骨细胞活力显著下降,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,双醋瑞因低、中、高剂量组中软骨细胞活力显著上升,差异具有统计学意义($P < 0.01$);说明 1、10、100 μM 双醋瑞因对 MIA 诱导的大鼠软骨细胞的活力具有保护作用(图 1)。



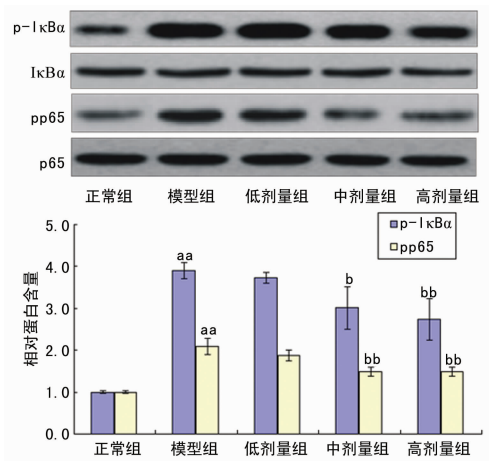
aa: $P < 0.05$, 与正常组比较; b: $P < 0.05$, bb: $P < 0.01$, 与模型组比较。

图 1 双醋瑞因对 MIA 诱导的软骨细胞活力的影响

2.2 双醋瑞因对 MIA 诱导的软骨细胞中 NF- κ B 信号通路的影响 与正常组比较,模型组中 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 及 NF- κ B p65 磷酸化水平显著提高,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,双醋瑞因中、高剂量组中 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 及 NF- κ B p65 磷酸化水平下降,差异具有统计学意义($P < 0.01$);说明 10、100 μM 双醋瑞因可通过 NF- κ B 信号通路保护 MIA 诱导的大鼠软骨细胞损伤(图 2)。

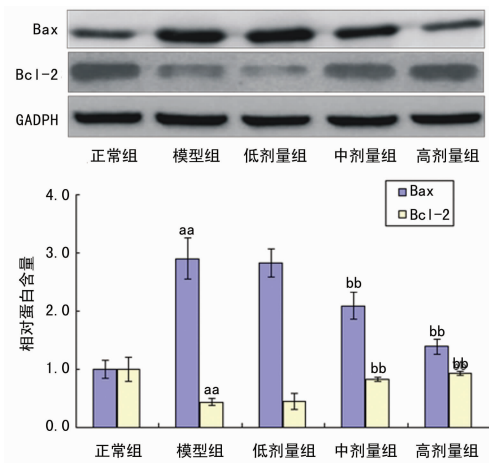
2.3 双醋瑞因对 MIA 诱导的软骨细胞中细胞凋亡相关蛋白表达量的影响 与正常组比较,模型组中 Bax 表达量上升, Bcl-2 表达量下降,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,双醋瑞因中、高剂量组中 Bax 表达量下降, Bcl-2 表达量上升,差异具有统计学意义($P < 0.05$);说明 10、100 μM 双醋瑞因可通过抑制细胞凋亡蛋白从而抑制 MIA 诱导的大鼠软骨

细胞凋亡(图 3)。



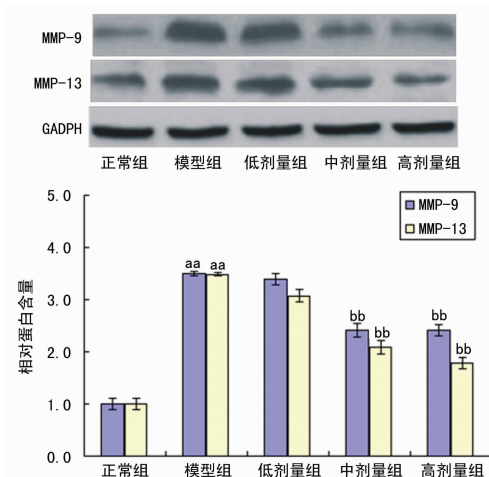
aa: $P < 0.05$, 与正常组比较; b: $P < 0.05$, bb: $P < 0.01$, 与模型组比较。

图 2 双醋瑞因对 MIA 诱导的软骨细胞中 NF- κ B 信号通路的影响



aa: $P < 0.05$, 与正常组比较; bb: $P < 0.01$, 与模型组比较。

图 3 双醋瑞因对 MIA 诱导的软骨细胞中细胞凋亡相关蛋白表达量的影响



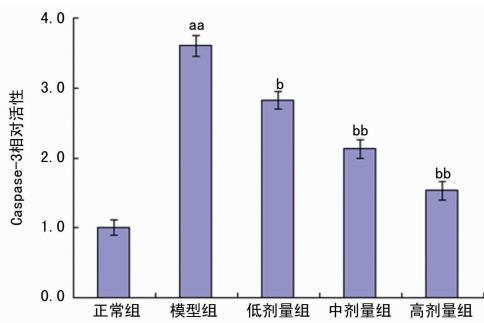
aa: $P < 0.05$, 与正常组比较; bb: $P < 0.01$, 与模型组比较。

图 4 双醋瑞因对 MIA 诱导的软骨细胞中基质金属蛋白酶表达量的影响

2.4 双醋瑞因对 MIA 诱导的软骨细胞中基质金属蛋白酶表

达量的影响 与正常组比较,模型组中 MMP-9 及 MMP-13 表达量上升,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,双醋瑞因中、高剂量组中 MMP-9 及 MMP-13 表达量下降,差异具有统计学意义($P < 0.05$);说明 10、100 μM 双醋瑞因可通过抑制 MMPs 从而抑制 MIA 诱导的大鼠软骨细胞细胞外基质的降解(图 4)。

2.5 双醋瑞因对 MIA 诱导的软骨细胞中 Caspase-3 活性的影响 与正常组比较,模型组中 Caspase-3 活性显著提高,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,双醋瑞因低、中、高剂量组中 Caspase-3 活性显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$);说明 1、10、100 μM 双醋瑞因可通过降低 Caspase-3 活性从而抑制 MIA 诱导的大鼠软骨细胞凋亡(图 5)。



aa: $P < 0.05$, 与正常组比较; b: $P < 0.05$, bb: $P < 0.01$, 与模型组比较。

图 5 双醋瑞因对 MIA 诱导的软骨细胞中 Caspase-3 活性的影响

3 讨论

软骨细胞是关节软骨唯一的细胞,在软骨形成、代谢以及修复中发挥重要作用。因此抑制软骨细胞的凋亡,可显著延缓 OA 进程。细胞因子、NO、能量代谢抑制剂(如 MIA)等多种因素可引起软骨细胞损伤乃至死亡,其中 MIA 为糖酵解途径中 3-磷酸甘油醛脱氢酶抑制剂,通过抑制细胞能量代谢而导致细胞因供养不足而死亡^[5]。MIA 体外刺激 24 h 能造成大鼠软骨细胞的死亡^[6]。本实验亦表明 MIA 诱导 24 h 会降低软骨细胞活力,1、10、100 μM 双醋瑞因可一定程度上抑制软骨细胞活力的下降。

NF- κB 是一类能与多种基因启动子或增强子部位 κB 位点发生特异性结合并促进其转录的蛋白质。正常生理状态下,在细胞质中与 I κB 结合,受外界环境或上游信号刺激,即可脱离 I κB ,进入细胞核,与下游靶基因相应 DNA 位点结合,促使其进行转录。它可以调控多种靶基因,包括细胞凋亡蛋白 Bax, Bcl-2, MMPs 等^[1-2]。在 DBA/1 小鼠早期 OA 和类风湿关节炎中发现软骨细胞中 NF- κB 的核转位异常^[7]。在关节炎患者血清中 NF- κB p65 活性显著提高^[8]。用 siRNA 干扰 NF- κB p65 的表达,可减轻大鼠 OA 病理进程^[9-10],说明抑制 NF- κB 的活性成为治疗 OA 的靶点。因此本实验通过 Western blot 检测各组中 NF- κB 的激活情况,发现了双醋瑞因(10、100 μM)能显著降低 I $\kappa\text{B}\alpha$ 及 NF- κB p65 磷酸化水平,说明双醋瑞因可通过抑制 NF- κB 信号通路,从而发挥其抗 OA 作用。

软骨细胞的凋亡是 OA 中心环节。且软骨细胞凋亡严格受到癌基因的调控。其中 Bcl-2 家族是最常见的癌基因,能与 Bax 亚家族相互作用,启动软骨细胞内的凋亡信号转导,从而

诱导细胞凋亡。研究已证实关节炎患者血清中, Bax 含量显著上升, Bcl-2 含量下降^[11],因此抑制此变化,一定程度也能缓解 OA。本实验证实双醋瑞因提高 OA 软骨细胞中 Bcl-2 的表达,降低 Bax 的表达,从而抑制软骨细胞凋亡,达到治疗 OA 的目的。通过抑制 NF- κB 信号通路,可使大鼠软骨细胞 Bax 表达下降, Bcl-2 上升, Caspase-3 活性降低^[1]。Caspase-3 是一类进化上保守的天冬氨酸蛋白酶家族,依赖 caspase 的信号途径是细胞凋亡的主要途径。在 OA 患者中 Caspase-3 的表达高于正常,并随着 OA 程度的加重 Caspase-3 的表达也增加^[12]。通过使用 Caspase-3 抑制剂 Z-DEVD-FMK 可抑制 IL-1 β 引起的软骨细胞凋亡^[13]。本实验也证实双醋瑞因可降低 Caspase-3 活性,从而抑制软骨细胞凋亡。

正常生理状态下,软骨组织时合成代谢和分解代谢处于动态平衡,当分解代谢速度快于合成速度后,会导致 MMPs 的大量产生。MMPs 是一个含有锌指样结构细胞外蛋白酶大家族,是迄今为止发现的唯一能分解纤维类胶原的酶,其中 MMP-9 属于明胶酶类, MMP-13 属于胶原酶类。OA 时 MMP-9, MMP-13 的表达明显增高,导致关节软骨细胞外基质二型胶原,蛋白多糖过度降解,破坏关节软骨,使关节发生退变^[14]。MMP-9、MMP-13 表达量的下调,能显著缓解 OA 进程^[15]。同时 NF- κB 信号通路的失活可显著抑制 MMPs 的表达^[1-2]。因此本实验通过 Western blot 检测各组中 MMPs 的表达,证实了双醋瑞因可通过下调 MMP-9 及 MMP-13 的表达,从而缓解 OA 时细胞外基质降解。

综上所述,双醋瑞因可提高 MIA 诱导的大鼠软骨细胞活力并抑制 Caspase-3 活性,降低 I $\kappa\text{B}\alpha$ 及 NF- κB 磷酸化水平,并下调 Bax, MMP-9 及 MMP-13 的表达,上调 Bcl-2 的表达。说明双醋瑞因能通过 NF- κB 信号通路抑制 MIA 诱导的软骨细胞凋亡与细胞外基质降解。

参考文献

- [1] Zhang XH, Xu XX, Xu T, et al. beta-Ecdysterone suppresses interleukin-1 beta-Induced apoptosis and inflammation in rat chondrocytes via inhibition of NF-kappa B signaling pathway[J]. Drug Dev Res, 2014, 75(3): 195-201.
- [2] Zhang XH, Xu XX, Xu T. Ginsenoside Ro suppresses interleukin-1 beta-induced apoptosis and inflammation in rat chondrocytes by inhibiting NF-kappa B[J]. Chin J Nat Med, 2015, 13(4): 283-289.
- [3] 孙先润,姚绍平,叶吉云,等. 关节腔注射双醋瑞因对 SD 大鼠骨关节炎形态及 ED1 和 COL2 表达的影响[J]. 中国矫形外科杂志, 2014, 22(6): 539-543.
- [4] 廖俊琳,王声,刘日光. 双醋瑞因对白细胞介素 1 β 诱导软骨细胞凋亡的影响[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(7): 1161-1164.
- [5] Wang XD, Kou XX, He DQ, et al. Progression of cartilage degradation, bone resorption and pain in rat temporomandibular joint osteoarthritis induced by injection of iodoacetate[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e45036.
- [6] Tong P, Xu S, Cao G, et al. Chondroprotective activity of a detoxicated traditional Chinese medicine(下转第 1025 页)

原形式存在,当凋亡机制启动后,形成具有活性的 Caspase。Caspase-3 被称为刽子手胱天蛋白酶,无论是在内在和外在的凋亡途径中都有 Caspase-3 的激活,激活的 Caspase-3 将导致一些结构和调节蛋白的裂解从而引起细胞凋亡^[8]。所以 Caspases-3 的表达增加,可以说标志着细胞内凋亡机制的启动。本研究发现,正常对照组中 Caspase-3 蛋白表达较低,而与正常对照组比较,A771726 组、LY294002 组中 Caspase-3 蛋白的表达明显增加,然而与 A771726 组比较,LY294002 组中 Caspase-3 蛋白的表达无明显变化,而 A771726 联合 LY294002 组中 Caspase-3 蛋白的表达较 A771726 组、LY294002 组明显增加,这进一步说明 A771726 可诱导大鼠系膜细胞的凋亡,且 A771726 可协同 LY294002 诱导大鼠系膜细胞的凋亡,因此笔者推测 A771726 诱导大鼠肾小球系膜细胞的凋亡可能是通过上调 Caspase-3 活性而实现的。

为进一步探讨 PI3K/Akt/mTOR 信号通路在 A771726 对大鼠系膜细胞凋亡中的作用,本实验采用免疫荧光法检测 mTOR 蛋白的表达,结果显示:与正常对照组比较,A771726 组 mTOR 荧光强度明显减弱,而 LY294002 组 mTOR 荧光强度与 A771726 组无明显差异,这说明 A771726 可能是通过下调 PI3K/Akt/mTOR 信号通路而诱导大鼠系膜细胞凋亡。而 A771726 联合 LY294002 组 mTOR 荧光强度较 A771726 组、LY294002 组明显降低,这说明 A771726 可协同 LY294002 抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路。因此,笔者推测 A771726 可抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,且其作用靶点可能是 PI3K。

综上所述,A771726 可诱导大鼠肾小球系膜细胞的凋亡,其机制可能是通过下调 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,且 A771726 可协同 LY294002 诱导大鼠系膜细胞的凋亡。

参考文献

[1] 程秋梅,潘延斌,谭美乐,等. 来氟米特对脂多糖诱导下

(上接第 1021 页)

- (Fuzi) of *Aconitum carmichaeli* Debx against severe-stage osteoarthritis model induced by mono-iodoacetate[J]. *J Ethnopharmacol*,2014,151(1):740-744.
- [7] Song X, Shen J, Wen H, et al. Impact of schistosoma japonicum infection on collagen-induced arthritis in DBA/1 mice; a murine model of human rheumatoid arthritis[J]. *PLoS One*,2011,6(8):e23453.
- [8] 郭静,勾向博,张文丽,等. 骨关节炎患者膝关节软骨和滑膜中 p38MAPK、NF- κ B 的表达及其意义[J]. *河北联合大学学报:医学版*,2013,15(6):749-751.
- [9] Chen LX, Lin L, Wang HJ, et al. Suppression of early experimental osteoarthritis by in vivo delivery of the adenoviral vector-mediated NF-kappaBp65-specific siRNA[J]. *Osteoarthritis Cartilage*,2008,16(2):174-184.
- [10] 陈连旭,于长隆. 腺病毒介导核因子 κ Bp65 特异性小干扰 RNA 抑制骨关节炎[J]. *中国组织工程研究*,2012,16(46):8551-8555.
- [11] Wang SJ, Guo X, Zuo H, et al. Chondrocyte apoptosis and expression of Bcl-2, Bax, Fas, and iNOS in articular carti-

lage in patients with Kashin-Beck disease[J]. *J Rheumatol*,2006,33(3):615-619.

- [2] Ren Q, Zeng HS, Zeng XF. Leflunomide inhibits the apoptosis of human embryonic lung fibroblasts infected by human cytomegalovirus[J]. *Eur J Med Res*,2013,18(1):3.
- [3] 韦丽,刘春,陶林,等. 来氟米特对糖尿病大鼠肾组织单核趋化蛋白 1、转化生长因子 β 1 表达的影响[J]. *临床荟萃*,2012,27(3):202-205.
- [4] Zhu SQ, Yan XM, Xiang ZH, et al. Leflunomide reduces proliferation and induces apoptosis in neuroblastoma cells in vitro and in vivo[J]. *PLoS One*,2013,8(8):e71555.
- [5] D'anglemont DA, Berdeaux A, Souktani R, et al. The volume-sensitive chloride Channel inhibitors prevent both contractile dysfunction and apoptosis induced by doxorubicin through PI3 kinase, Akt and Erk 1/2[J]. *Eur J Heart Fail*,2008,10(1):39-46.
- [6] 赵丹,罗星,杨晓萍. 活性维生素 D₃ 对系膜细胞增殖的影响[J]. *广东医学*,2013,34(23):3551-3553.
- [7] 张春江,赵丹,贺德刚,等. 1,25-(OH)₂D₃ 对大鼠系膜细胞增殖的影响及机制探讨[J]. *山东医药*,2011,51(47):32-34.
- [8] Feinstein-Rotkopf Y, Arama E. Can't live without them, can live with them: roles of caspases during vital cellular processes[J]. *Apoptosis*,2009,14(8):980-995.

(收稿日期:2015-08-08 修回日期:2015-12-19)

lage in patients with Kashin-Beck disease[J]. *J Rheumatol*,2006,33(3):615-619.

- [12] Sena P, Manfredini G, Benincasa M, et al. Up-regulation of the chemo-attractive receptor ChemR23 and occurrence of apoptosis in human chondrocytes isolated from fractured calcaneal osteochondral fragments[J]. *J Anat*,2014,224(6):659-668.
- [13] Shakibaei M, John T, Seifarth C, et al. Resveratrol inhibits IL-1 beta-induced stimulation of caspase-3 and cleavage of PARP in human articular chondrocytes in vitro[J]. *Ann N Y Acad Sci*,2007(1095):554-563.
- [14] 王维山,史晨辉,李长俊,等. OA 患者关节液 uPA 和 MMP-3,9,13,14 的表达水平与关节功能的相关性研究[J]. *中国骨质疏松杂志*,2014,20(6):602-605,610.
- [15] 李卫平,蹇睿,胥方元. 超声波治疗兔膝骨关节炎对 MMP-1 和 MMP-13 表达的影响[J]. *重庆医学*,2012,41(16):1564-1566,封 2.

(收稿日期:2015-09-16 修回日期:2015-11-08)