

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.16.004

大鼠早期骨关节炎软骨下骨结构与骨改建相关基因表达研究*

兰贵华¹, 张波², 刘苹², 翁土军², 邓蔓菁^{1△}

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所:1. 口腔科;2. 第四研究室创伤、
烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400042)

[摘要] **目的** 考察创伤性关节炎早期软骨下骨的微结构变化和基因表达变化,探索软骨下骨的骨重建特点及其在关节软骨退变中的作用。**方法** 选择 13 只 SD 大鼠,利用内侧半月板撕裂(MMT)模型模拟创伤性关节炎,右侧膝关节行 MMT 手术,左侧行假手术,术后 3 周处死大鼠并取膝关节组织标本 4%PFA 固定。取 10 只 SD 大鼠的造模侧及对照侧胫骨关节,利用 micro-CT 扫描并重建分析软骨下骨的微结构变化。标本脱钙后石蜡包埋切片,番红 O 固绿染色,普通光学显微镜观察摄片。另取 3 只 SD 大鼠,提取软骨下骨的组织 RNA,RT-PCR 检测两组之间骨形成标志基因(ALP、RUNX2、OCN)与骨吸收相关基因(TRAP、CTSK、MMP9)mRNA 水平的表达变化。**结果** MMT 术后 3 周,胫骨关节 micro-CT 扫描显示模型组软骨下骨的小梁骨结构紊乱,软骨下骨小梁骨的骨体积分数(BV/TV)、骨小梁连接密度(Conn. D)、骨小梁厚度(Tb. Th)降低($P < 0.05$),骨小梁间隔(Tb. Sp)增大($P < 0.05$)。组织病理结果显示,模型组关节软骨未发生明显结构变化、软骨下骨骨小梁结构稀疏。与对照组比较,模型组骨形成标志基因 mRNA 表达水平降低($P < 0.05$),骨吸收相关基因 mRNA 表达水平升高($P < 0.05$)。**结论** 大鼠膝关节内侧 MMT 诱导的创伤性关节炎模型早期,软骨下骨体积分数降低、骨小梁厚度变薄,成骨细胞的标志基因表达下降,破骨细胞的功能基因表达增加。

[关键词] 骨关节炎;软骨下骨;微结构;micro-CT

[中图分类号] R363.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)16-2170-03

Research on the subchondral bone architecture and bone remodeling related genes change in the initial stage of osteoarthritis in rat*

Lan Guihua¹, Zhang Bo², Liu Ping², Weng Tujun², Deng Manjing^{1△}

(1. Department of Stomatology, Daping Hospital & Research Institute of Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China; 2. Department 4, Daping Hospital & Research Institute of Surgery, Third Military Medical University, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Chongqing 400042, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the changes of microarchitecture and gene expression of subchondral bone in the initial stage of traumatic arthritis, to explore the characteristics of subchondral bone remodeling and its role in the articular cartilage degeneration. **Methods** The medial meniscal tear (MMT) was performed on the right knees of 13 SD rats to simulate the traumatic osteoarthritis, while sham operation on the control group. Three weeks later, all the rats were executed and dissected, with proximal tibiae being kept and distributed into the two groups, 10 respectively. Micro-computed tomography (micro-CT) was adopted to reconstruct and analyze the subchondral bone. After being fixed by 4% paraformaldehyde, all the samples were decalcified until six weeks passed, followed by paraffin-sectioning, safranin O and fast green staining, and examining and photographing under an ordinary optical microscope. The RNA of another 3 SD rats' subchondral bone was extracted, and a real-time PCR test was carried out to illuminate the expression variation of bone-formation marker genes (ALP, RUNX2, and OCN), and bone-resorption marker genes (TRAP, CTSK and MMP9), between the two groups. **Results** Three weeks after MMT surgery, subchondral bone disorders were observed among the experimental samples through micro-CT scanning. There was lesser BV/TV, Conn. D and Tb. Th ($P < 0.05$) and more Tb. Sp ($P < 0.05$) in the experimental group compared with the control group. In the pathological section, arthritic degeneration was not spotted in both groups, but trabeculae of the experimental group were found to be sparse. Compared with control group, the level of mRNA expression of the bone-formation marker genes of the experimental group was decreased ($P < 0.05$), while bone-resorption related genes increased ($P < 0.05$). **Conclusion** The model of initial traumatic osteoarthritis induced by MMT in rats' knees showed an active bone remodeling, more bone absorbing than bone formation, lowered bone volume, and microarchitecture changing of the subchondral bone.

[Key words] osteoarthritis; subchondral bone; microarchitecture; micro-CT

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种关节退行性疾病,临床主要表现为关节疼痛和关节功能障碍等,严重影响患者的生活质量。其主要病理表现为关节软骨的丢失,软骨下骨的硬化和骨赘的形成等。引起 OA 的主要因素有衰老、炎症和创伤

等。目前,关节软骨与软骨下骨在 OA 中的作用尚未完全阐明,以往研究认为关节软骨的退变导致了软骨下骨的继发改变^[1],越来越多的研究表明软骨下骨在 OA 的发生、发展中发挥重要作用。在结构上,由于软骨下骨与关节软骨紧密相连,

关节软骨的退变必然导致软骨下骨的改变。本研究通过考察创伤性 OA 早期软骨下骨微结构变化和基因表达变化,明确软骨下骨的骨重建特点。

1 材料与与方法

1.1 材料 动物为 8 周龄雄性 SD 大鼠,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。Trizol(美国 Invitrogen 公司),GoScript 逆转录试剂盒(美国 Promega 公司),micro-CT(瑞士 VivoCT 公司),病理切片机(德国 Laica 公司),番红 O(美国 Sigma 公司),固绿 FCF(生工生物),RNAlater(美国 Life 公司),分光光度计(美国 Thermo 公司),实时定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司),显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模 取 8 周龄健康 SD 大鼠 13 只,雄性,体质量 200~220 g,无关节病变。分为两组,第 1 组 10 只,第 2 组 3 只。术前 1 d 用 8% 硫化钠溶液将双侧膝关节备皮,范围为关节上下各 2 cm。3% 戊巴比妥钠按 30 mg/kg 大鼠腹腔注射麻醉,麻醉成功后动物仰卧,消毒铺巾,备皮。模型侧:取右膝关节内侧长约 0.8 cm 切口,沿内侧副韧带切断,打开内侧关节腔进入关节腔,找到内侧半月板,用微创剪剪断,生理盐水冲洗,依层缝合,术中不损伤软骨面。假手术侧:同时取对侧膝关节,入路同前,打开关节腔,冲洗,关闭切口^[2]。大鼠术后不做任何处理,分开饲养,自由活动及进食。

1.2.2 标本采集和处理 3 周后,将两组大鼠脱颈处死,取双侧胫骨近端,第 1 组用 4% 多聚甲醛固定。第 2 组去除胫骨关节软骨,获得软骨下骨组织,并将组织放置于 RNAlater 中,备用。

1.2.3 显微 CT 检查 将胫骨标本垂直固定在适配容器内,沿标本长轴方向,从胫骨近端骨骺上极扫描至干骺端下极。扫描条件:球管电压 55 kV,球管电流 145 μA,8 W,矩阵 2 048×2 048,分辨率 19 μm。将扫描所得 DICOM 图像,用 SCANCO 工作站软件 V6.1 进行软骨下骨分析和三维重建,观察分析创伤性 OA 模型中早期软骨下骨的影像表现。

1.2.4 组织学观察 完成显微 CT 扫描后,将大鼠的双侧胫骨标本用 4% 多聚甲醛固定 24 h,0.5 mol/L EDTA 脱钙,针刺反应阳性后进行乙醇梯度脱水、透明、浸蜡和石蜡包埋,从冠状面对每个样本进行 6 μm 连续切片,并进行番红 O 固绿染色,中性树胶封片,光学显微镜下观察并拍照。

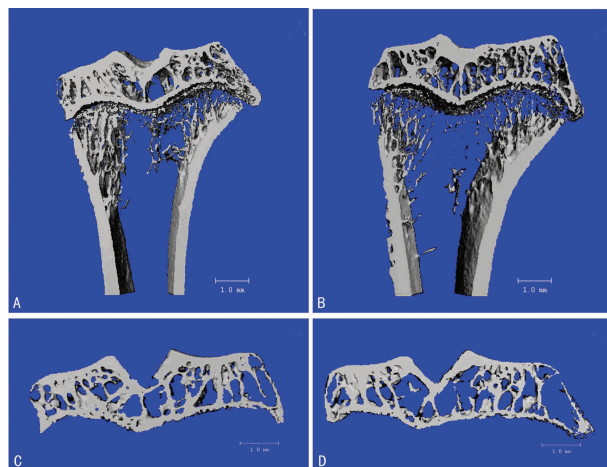
1.2.5 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测软骨下骨骨形成与骨吸收相关基因 mRNA 的表达 通过液氮保护下研磨软骨下骨,利用 Trizol 一步法抽提软骨下骨组织总 RNA,分光光度计测吸光度(A)_{260/280}及 RNA 水平。逆转录为 cDNA 备用,应用 ABI step one 实时 PCR System 进行操作。使用 Primer5.0 设计引物 GAPDH 上游:5'-CAA GTT CAA CGG CAC AGT CA-3',GAPDH 下游:5'-ACA TAC TCA GCA CCA GCA TCA C-3';Runx2 上游:5'-AAC TTC CTG T-GC TCC GTG CT-3',Runx2 下游:5'-CTC CGG CCT ACA AAT CTC AGA-3';OCN 上游:5'-GAC AAG TCC CAC ACA GCA AC-3',OCN 下游:5'-CCG GAG TCT ATT C-AC CAC CT-3';ALP 上游:5'-AAA TGC CCT GAA ACT CCA AA-3',ALP 下游:5'-ATC TCC AGC CGT GTC TCC TC-3';CTSK 上游:5'-TGA CTC TGA AGA CGC TT-ACCC-3',CTSK 下游:5'-CAC ATT ATC ACG GTC GCA GTT-3';TRAP 上游:5'-ACG

GCT ACC TAC GCT TTC AC-3',TRAP 下游:5'-CCC TCC CTC AGA CCC ATT-AG-3';MMP9 上游:5'-ATG GTT TCT GCC CCA GTG AG-3',MMP9 下游:5'-CCT TTA GTG GTG CAG GCA GA-3'。RT-PCR 反应条件:95 °C,预变性 10 min,95 °C,变性 15 s,57 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 30 s,反应 40 个循环。结果分析:目的基因的相对表达量 = 2^{-ΔΔCt} (Ct = Ct1 - Ct2,Ct1:待测基因的临界循环数,Ct2:GAPDH 的临界循环数)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间采用独立样本 t 检验分析,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 考察软骨下骨微结构改变的影像学表现 术后 3 周,胫骨近端通过 micro-CT 扫描与分析,模型侧较假手术侧关节小梁骨结构发生改变(图 1),软骨下骨小梁骨的骨体积分数(BV/TV)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁连接密度(Conn.D)降低(P < 0.05),骨小梁间距(Tb.Sp)增加(P < 0.05),骨小梁数目(Tb.N)减少但差异无统计学意义(P > 0.05),见表 1。



A、C:假手术侧;B、D:模型侧。

图 1 胫骨 micro-CT 扫描结果

表 1 假手术侧与模型侧软骨下骨 micro-CT 分析结果($\bar{x} \pm s$)

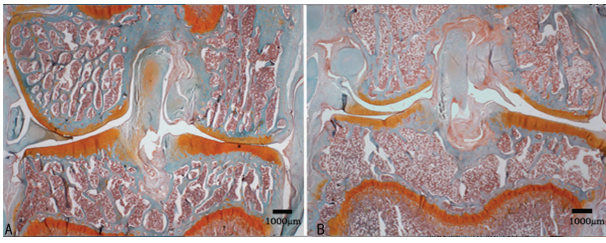
项目	假手术侧	模型侧
BV/TV(%)	49.18 ± 3.41	45.28 ± 4.38 *
Tb.Th(μm)	186.36 ± 7.27	178.54 ± 7.26 *
Tb.Sp(μm)	262.29 ± 20.04	286.43 ± 28.32 *
Tb.N(L/mm)	3.85 ± 0.31	3.56 ± 0.28
Conn.D(L/mm ³)	47.46 ± 2.92	44.66 ± 2.67 *

*: P < 0.05,与假手术侧比较。

2.2 番红 O 固绿染色 为明确术后 3 周软骨下骨的病理学改变,行胫骨组织切片分析,两组中关节软骨未发生明显退变,而模型侧软骨下骨骨小梁结构较假手术侧稀疏。结果显示骨关节炎早期将影响软骨下骨结构的改建,见图 2。

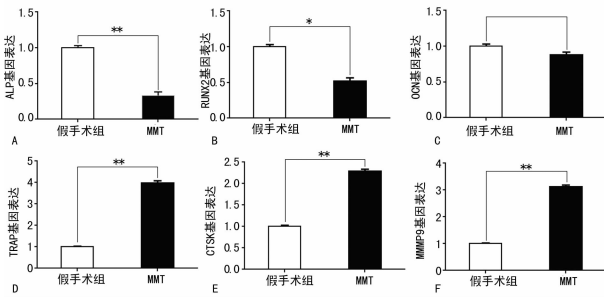
2.3 软骨下骨组织 RT-PCR RT-PCR 结果显示,术后 3 周软骨下骨的成骨细胞相关基因 ALP、RUNX2、OCN 大量表达,MMT 侧小于假手术侧(P < 0.05),表明骨形成降低。破骨细胞相关基因 TRAP、CTSK、MMP9 表达升高,且 MMT 侧高于假手术侧(P < 0.01),结果表明,创伤性骨关节炎早期软骨下

骨重建加快,骨吸收大于骨形成,见图 3。



A:假手术侧;B:模型侧。

图 2 番红 O 固绿染色的组织病理学切片(×20)



A:ALP 基因表达;B:RUNX2 基因表达;C:OCN 基因表达;D:TRAP 基因表达;E:CTSK 基因表达;F:MMP9 基因表达;* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$ 。

图 3 软骨下骨 mRNA 中骨形成与骨吸收基因的表达

3 讨 论

目前,通过实验动物模型模拟人 OA 来研究其发生、发展,其具有造模周期相对较短,操作简便,能模拟 OA 随时间进展的基本病理过程,能复制出 OA 的退变过程,以及软骨下骨重建的特点。OA 动物模型包括自发性和诱发性动物模型,从实验周期、成本控制等方面考虑,诱发性动物模型应用更为广泛。诱发性 OA 模型的主要方法包括机械制动、药物注射和手术方法^[3]。本研究中所使用的模型骨关节炎实验动物模型由 Bendele^[2] 提出,术后 3 周就能造成关节退行性变,特点是软骨细胞和蛋白多糖减少,骨赘形成等。此实验动物模型得到了大学者的认可^[4-7]。

以往研究认为 OA 的主要病理变化为软骨的退变引起了软骨下骨的改变,近年来越来越多的研究表明软骨下骨的改变是 OA 的始因,软骨下骨的结构、生物力学性能及生物学方面的变化与 OA 密切相关^[8]。本研究表明,3 周时关节软骨未出现明显组织学变化,而软骨下骨小梁体积减小,骨小梁变薄,表现为轻度的骨吸收,表明在 OA 早期,软骨下骨转换活跃,骨吸收大于骨形成,软骨下骨的改变早于关节软骨的退变。OA 早期软骨下骨重建加快,软骨下骨转换的增加,以及之后软骨下骨的硬化与 OA 的进展密切相关。因此,考察软骨下骨骨体积有利于全面了解 OA 的病理变化过程。在 Hayami 等^[9] 的研究中发现 OA 早期软骨下骨量减少,骨转换加快,骨吸收大于骨形成。软骨下骨改建与 OA 的发生、发展密切相关,在 OA 的发生、发展中起重要作用,抑制软骨下骨的异常骨转换可能减缓 OA 进展。Stupina 等^[10] 研究发现,改变软骨下骨的微结构和改善其血管化能增强软骨细胞的新陈代谢,实现软骨和软骨下骨的体内平衡和改善组织营养,恢复其功能。在 Botter 等^[11] 用 micro-CT 三维成像技术观察大鼠 OA 动物模型 4 周后造模处骨组织的变化,发现软骨下骨板的厚度下降,骨小梁之间的连接减少,体积减小,骨小梁间距增加。OA 早期常伴有骨重建加快引起的骨量丢失,晚期可见骨转换率降低并

引起软骨下骨板致密化及软骨全部丢失。OA 早期软骨下骨重塑过程加快,软骨下骨板变薄^[12]。OA 早期未出现临床症状时,OA 患者受累关节骨吸收标志物水平明显升高,提示 OA 软骨下骨重塑加快早于软骨受损的发生^[13]。

RT-PCR 结果显示,MMT 侧骨形成基因表达降低,而骨吸收基因表达升高。CTSK 和 TRAP 基因作为破骨细胞特殊生物学标记物,可以作为检测破骨细胞功能的指标。有研究表明 CTSK、TRAP 和 MMP9 基因在 OA 软骨下骨中表达明显上调^[14-16]。ALP、RUNX2 及 OCN 基因在成骨过程中发挥重要作用,在早期 OA 中表达下调^[17]。在 OA 的发生、发展中,软骨下骨的重建可能起着至关重要的作用^[18],干预 OA 的骨重塑过程可能减缓其进展。Hayami 等^[19] 在 ACLT OA 模型中发现抑制 CTSK 能够保持软骨下骨的完整性,防止软骨退化,减少骨赘的形成。抑制软骨下骨的过快骨吸收可以延缓软骨的退变。比如一些抑制破骨细胞功能的药物通过改善软骨下骨的骨重建能延缓软骨退变,从而治疗 OA^[20]。

综上所述,在早期 OA 中,软骨下骨微结构发生明显改变,软骨下骨在 OA 的发生、发展中发挥重要作用,研究早期 OA 软骨下骨的变化能预测随后疾病的症状及结构的发展。本研究考察了软骨下骨的骨重建变化及骨改建特点,发现早期 OA 软骨下骨骨小梁减少、骨吸收增强,为调控软骨下骨的骨转换防治早期 OA 提供了实验依据。

参考文献

- [1] Yamada K, Healey R, Amiel D, et al. Subchondral bone of the human knee joint in aging and osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002, 10(5): 360-369.
- [2] Bendele AM. Animal models of osteoarthritis[J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2001, 1(4): 363-376.
- [3] 余国荣, 查振刚, 汪飞, 等. 软骨下骨量变化与软骨退变的相关性[J]. *中国组织工程研究*, 2015(20): 3134-3140.
- [4] Prasadam I, Mao X, Wang Y, et al. Inhibition of p38 pathway leads to OA-like changes in a rat animal model[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2012, 51(5): 813-823.
- [5] Yu DG, Nie SB, Liu FX, et al. Dynamic alterations in microarchitecture, mineralization and mechanical property of subchondral bone in rat medial meniscal tear model of osteoarthritis[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2015, 128(21): 2879-2886.
- [6] Bove SE, Laemont KD, Brooker RM, et al. Surgically induced osteoarthritis in the rat results in the development of both osteoarthritis-like joint pain and secondary hyperalgesia[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006, 14(10): 1041-1048.
- [7] Wei T, Kulkarni NH, Zeng QQ, et al. Analysis of early changes in the articular cartilage transcriptome in the rat meniscal tear model of osteoarthritis; pathway comparisons with the rat anterior cruciate transection model and with human osteoarthritic cartilage[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010, 18(7): 992-1000.
- [8] Karsdal MA, Leeming DJ, Dam EB, et al. Should subchondral bone turnover be targeted when treating osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, 16(6): 638-646.
- [9] Hayami T, Pickarski M, Zhuo Y, et al. Characterization of articular cartilage and subchondral bone(下转第 2175 页)

TNFR1 中和抗体结合 TNFR1,有效阻断 TNF- α 与 TNFR1 的结合,TNF- α 主要与 TNFR2 结合,与空白对照组相比 OPC 的活力无明显差别并能沿着少突胶质谱系细胞进行分化。本研究至少证实了 TNF- α 与 TNFR2 结合并不阻碍 OPC 向少突胶质谱系细胞进行分化^[12]。进一步的研究发现,与空白对照组比较 TNF- α 组 OPC 的 TNFR1 表达明显增加,预先加入 TNFR1 中和抗体的 TNF- α 组 TNFR1 的表达下调。提示 TNF- α 主要通过 TNFR1 影响 OPC 的增殖及分化过程,但具体的信号传导还有待于进一步的探讨。在 TNFR1 存在的情况下,TNFR2 所起的作用及相关机制还有待于进一步的阐明。

参考文献

- [1] Sherwin C, Fern R. Acute lipopolysaccharide-mediated injury in neonatal white matter glia: role of TNF- α , IL-1 β , and calcium[J]. *J Immunol*, 2005, 175(1): 155-161.
- [2] Falahati S, Breu M, Waickman AT, et al. Ischemia-induced neuroinflammation is associated with disrupted development of oligodendrocyte progenitors in a model of periventricular leukomalacia[J]. *Dev Neurosci*, 2013, 35(2/3): 182-196.
- [3] Back SA, Luo NL, Borenstein NS, et al. Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury[J]. *J Neurosci*, 2001, 21(4): 1302-1312.
- [4] Tsuji T, Okumura A, Kidokoro H, et al. Differences between periventricular hemorrhagic infarction and periventricular leukomalacia[J]. *Brain Dev*, 2014, 36(7): 555-562.
- [5] Patel J, Balabanov R. Molecular mechanisms of oligodendrocyte injury in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(8): 10647-10659.

- [6] 张晔,李春鹏,夏春林,等. 蛋白脂蛋白在两型星形胶质细胞和少突胶质细胞中的表达[J]. *解剖学杂志*, 2006, 29(5): 536-538, 580.
- [7] Brambilla R, Ashbaugh JJ, Magliozzi R, et al. Inhibition of soluble tumour necrosis factor is therapeutic in experimental autoimmune encephalomyelitis and promotes axon preservation and remyelination[J]. *Brain*, 2011, 134(Pt 9): 2736-2754.
- [8] Cabal-Hierro L, Lazo PS. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors[J]. *Cell Signal*, 2012, 24(6): 1297-1305.
- [9] Kichev A, Rousset CI, Baburamani AA, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) signaling and cell death in the immature central nervous system after hypoxia-ischemia and inflammation[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(13): 9430-9439.
- [10] Fischer R, Wajant H, Kontermann R, et al. Astrocyte-specific activation of TNFR2 promotes oligodendrocyte maturation by secretion of leukemia inhibitory factor[J]. *Glia*, 2014, 62(2): 272-283.
- [11] Mc Guire C, Beyaert R, Van Loo G. Death receptor signalling in central nervous system inflammation and demyelination[J]. *Trends Neurosci*, 2011, 34(12): 619-628.
- [12] Patel JR, Williams JL, Muccigrosso MM, et al. Astrocyte TNFR2 is required for CXCL12-mediated regulation of oligodendrocyte progenitor proliferation and differentiation within the adult CNS[J]. *Acta Neuropathol*, 2012, 124(6): 847-860.

(收稿日期:2016-01-18 修回日期:2016-03-06)

(上接第 2172 页)

- changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis[J]. *Bone*, 2006, 38(2): 234-243.
- [10] Stupina TA, Stepanov MA, Teplen'kii MP. Role of subchondral bone in the restoration of articular cartilage[J]. *Bull Exp Biol Med*, 2015, 158(6): 820-823.
 - [11] Botter SM, van Osch GJ, Waarsing JH, et al. Quantification of subchondral bone changes in a murine osteoarthritis model using micro-CT[J]. *Biorheology*, 2006, 43(3/4): 379-388.
 - [12] Intema F, Sniekers YH, Weinans H, et al. Similarities and discrepancies in subchondral bone structure in two differently induced canine models of osteoarthritis[J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(7): 1650-1657.
 - [13] Bolbos RI, Zuo J, Banerjee S, et al. Relationship between trabecular bone structure and articular cartilage morphology and relaxation times in early OA of the knee joint using parallel MRI at 3 T[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, 16(10): 1150-1159.
 - [14] 贺占坤,沈杰威. MMP-2、MMP-3、MMP-9 和 TIMP-1 评价膝关节骨性关节炎的临床研究[J]. *重庆医学*, 2013, 42(32): 3872-3874.
 - [15] Drake FH, Dodds RA, James IE, et al. Cathepsin K, but

not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(21): 12511-12516.

- [16] Andersen TL, del COM, Kirkegaard T, et al. A scrutiny of matrix metalloproteinases in osteoclasts: evidence for heterogeneity and for the presence of MMPs synthesized by other cells[J]. *Bone*, 2004, 35(5): 1107-1119.
- [17] Zhang R, Fang H, Chen Y, et al. Gene expression analyses of subchondral bone in early experimental osteoarthritis by microarray[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e32356.
- [18] Hofstaetter JG, Wang J, Yan J, et al. Changes in bone microarchitecture and bone mineral density following experimental osteonecrosis of the hip in rabbits[J]. *Cells Tissues Organs*, 2006, 184(3/4): 138-147.
- [19] Hayami T, Zhuo Y, Wesolowski GA, et al. Inhibition of cathepsin K reduces cartilage degeneration in the anterior cruciate ligament transection rabbit and murine models of osteoarthritis[J]. *Bone*, 2012, 50(6): 1250-1259.
- [20] Zhen G, Wen C, Jia X, et al. Inhibition of TGF- β signaling in mesenchymal stem cells of subchondral bone attenuates osteoarthritis[J]. *Nat Med*, 2013, 19(6): 704-712.

(收稿日期:2016-01-11 修回日期:2016-03-22)