基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000838

深刺加电针法对膝骨关节炎兔软骨细胞 HDAC4 和 Runx2 的影响

刘　菲[1],李学智[1],付妮妮[1],席小芳[1],任　毅[2],杨晓光[1],张　愉[2]
(1. 重庆医科大学中医药学院针灸推拿教研室,重庆　400016;2. 汉中市中心医院,汉中　723000)

【摘　要】目的:观察深刺加电针法对膝骨关节炎(knee osteoarthritis,KOA)软骨细胞组蛋白脱乙酰基酶 4(histone deacetylase 4,HDAC4)和核心结合蛋白因子 2(runt-related transcription factor 2,Runx2)表达的影响。**方法**:新西兰兔 40 只,随机分为 2 组,正常组(n=10)和造模组(n=30),正常组不予任何处理,造模组采用 Hulth-Telhag 手术法建立左膝骨关节炎模型,X 线检查造模情况,造模成功者随机分为 3 组:模型组(n=10)、深刺加电针组(n=10)、普通电针组(n=10)。模型组不做治疗,深刺加电针组和普通电针组取内外膝眼、足三里、阴陵泉、梁丘穴,留针 20 min,每日 1 次,5 次为 1 个疗程,持续 4 个疗程。4 周后观察 Lequesne MG 膝关节评估级别、HE 染色观察软骨细胞的组织学改变,甲苯胺蓝染色观察软骨细胞形态,透射电镜观察细胞的超微形态结构,免疫组织化学法、蛋白质印迹法(Western bolt,WB)检测兔软骨细胞 HDAC4 和 Runx2 蛋白表达。**结果**:深刺加电针组、普通电针组和模型组兔行为学发生明显改变;与正常组比较,模型组关节活动度变小,软骨细胞排列紊乱、数目减少,HDAC4 蛋白表达降低,Runx2 表达升高(均 P=0.000);与模型组相比,深刺加电针组和普通电针组膝关节活动度显著提高,软骨细胞排列有序、数目较多,HDAC4 的蛋白表达升高,Runx2 蛋白的表达降低(均 P=0.000);深刺加电针组和普通电针组比较也有统计学差异(均 P=0.000)。**结论**:深刺加电针法能上调 HDAC4 和下调 Runx2 的表达,从而抑制兔膝骨关节软骨细胞肥大分化,这可能是治疗 KOA 的机制之一,深刺加电针法较普通电针法能更有效地治疗 KOA,可能通过增强针感和得气程度从而更好发挥疗效。

【关键词】膝骨关节炎;深刺;组蛋白脱乙酰基酶 4;核心结合蛋白因子 2
【中图分类号】R245;R684.3　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2015-07-26

Effect of electroacupuncture combined with close-to-bone needling on expression of cartilage cell HDAC4 and Runx2 in rabbits with knee osteoarthritis

Liu Fei[1], Li Xuezhi[1], Fu Nini[1], Xi Xiaofang[1], Ren Yi[2], Yang Xiaoguang[1], Zhang Yu[2]
(1. Teaching and Research Section of Acupuncture and Moxibustion, College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University; 2. Hanzhong Central Hospital)

【Abstract】*Objective*: To explore the effect of electroacupuncture combined with close-to-bone needling on expression of cartilage cell HDAC4 and Runx2 in rabbits with knee osteoarthritis (KOA). ***Methods***: Totally 40 New Zealand rabbits were randomly assigned to control group (without any treatment, n=10) and modeling group (n=30). Knee osteoarthritis model was established by Hulth-Telhag and was evaluated by X-ray examination. Rabbits with successful modeling were randomly divided into model group (n=10), normal thrust needing groups (NTN group, n=10) and eletroacupuncture with close-to-bone needling group (CBN group, n=10). Electroacupuncture was performed in NTN group and CBN group at "neixiyan", "waixiyan", "Zusanli", "yinlingquan" and "liangqiu" points 20 minutes once time per day for 4 courses of treatment, one of which was 10 days with the interval of 3 days. After 4 weeks, the knee joint function was observed based on Lequesne algofunctional index. HE staining and Toluidine blue staining were conducted for the morphologic observation of rabbit articular cartilage and the ultrastructure was observed under transmission electron microscope. Immunohistochemistry and Western blot were used to assess the expressions of HDAC4 and Runx2 in rabbit articular cartilage. ***Results***: No significant change was observed in NTN group, CBN group and model group. Compared with those of control groups, the passive range of motion of the knee in model

作者介绍:刘　菲,Email:statictime@163.com,研究方向:针灸镇痛。
通信作者:李学智,Email:lixz999@126.com。
项目基金:重庆市卫生和计生委中医药科技资助项目(编号:ZY2014 02117)。
优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160109.2047.020.html (2016-01-19)

group significantly decreased, cartilage cell number decreased and arranged in disorder, while the expression of HDAC4 protein decreased and the expression of Runx2 protein increased (all P=0.000). Compared with those in model group, the passive range of motion of the knee in NTN group and CBN group increased, and the chondrocytes arranged in line, while the expression of HDAC4 protein increased and the expression of Runx2 protein decreased (all P=0.000). There was notable differences of each index between NTN group and CBN group (all P=0.000). ***Conclusion***: Electroacupuncture with close-to-bone needling method could inhibit hypertrophic differentiation of chondrocyte through regulating the expression of HDAC4 and Runx2 of cartilage cell, which may be the possible therapeutic mechanism of KOA. Electroacupuncture with close-to-bone needling method is more effective than normal thrust needing for KOA probably due to more intensive needling sensation.

【Key words】knee osteoarthritis; close-to-bone needling; HDAC4; Runx2

骨关节炎（osteoarthritis，OA）是以关节软骨损伤、磨损及骨赘为主要病理变化，关节肿胀、晨僵及功能障碍为主要表现的疾病，其中以膝骨关节炎（knee osteoarthritis，KOA）发病率最高。据美国文献报道，约 30%美国成年人伴有关节疼痛、活动受限等症状，随着人口不断老龄化，预计 2025 年 KOA 患者将接近 40%[1]，已经严重影响人们的生活质量。针刺疗法是治疗该病的有效手段，但其机理研究尚不明确，需要更为深入的实验设计和研究[2]。相关研究发现：Ⅱ类组蛋白脱乙酰基酶家族（HDACs）成员中组蛋白脱乙酰基酶 4（histone deacetylase 4，HDAC4）的异常表达，可以导致软骨细胞向肥大方向分化，使骨骼过早钙化成熟，软骨组织发生退变[3]。HDAC4 可以抑制具体靶转录因子，从而调控核小体的结构，抑制软骨细胞的增殖和分化，同时能抑制软骨细胞分化的重要转录因子核心结合蛋白因子 2（runt-related transcription factor 2，Runx2）的活动[4]，对软骨细胞肥大有重要的调控作用。实验通过建立KOA模型兔观察“深刺加电针法”对膝骨关节炎软骨细胞 HDAC4 和 Runx2 表达的影响，探讨深刺加电针法治疗 KOA 可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康新西兰白兔 40 只，雌雄各半，体质量 2.0~2.5 kg，3 月龄，由重庆医科大学实验动物中心提供[生产许可证：SYXK（渝）2012-0001；质量合格证：0002541]，均单笼饲养，喂成品颗粒饲料，实验期间自由摄水，实验中对待动物遵循重庆医科大学伦理委员会标准。

1.2 主要试剂和仪器

HDAC4（bs-2809R）、Runx2（bs-1134R）一抗由北京博奥森生物技术有限公司提供；HRP（sp-9001-3ml）标记二抗由北京康为生物试剂公司提供，华佗牌无菌针灸针（32 号 1寸、1.5 寸），手术器械（上海手术器械厂），电针治疗仪器（南京，LH200），凝胶成像系统（BIO-RAD）、生物显微镜（iMark-14047，上海）、石蜡切片机（Leica SM2000R，德国）等由重庆医科大学生物工程实验室提供；水浴箱、电子天平、双蒸水仪器（北京，中西远大）、离心机（SIGAM 公司）等由重庆医科大学中医药研究室提供；数字放射成像系统（DR3000）由重庆医科大学附属第一医院放射科提供。

1.3 模型建立及分组

随机分为 2 组：正常组（n=10）和造模组（n=30），用Hulth-Telhag[5]造模方法建立 KOA 动物模型：从兔膝关节内侧进刀，挑断兔子内侧副韧带，摘除内侧半月板，切断前后交叉韧带。术后连续 1 周进行青霉素 4 万 U 肌肉注射防止感染。1 周后每天强迫兔子活动 1 h，连续 6 周。X 线扫描后满足：膝关节对线不良、关节间隙变窄、软骨下骨显露、骨赘形成[6]，可判断造模成功，成功后随机分为：模型组（n=10），深刺加电针组（n=10），普通电针组（n=10）。

1.4 干预方法

正常组：无特殊处理。模型组：造模后不予治疗。深刺加电针组：于造模 6 周后开始治疗，在手术侧取“内外膝眼”，“梁丘”，“阴陵泉”，“足三里”穴，穴位定位参照《实验针灸学》，穴位进行常规消毒，采用 1.5 寸无菌针灸针，内外膝眼斜刺 1.0~1.5 寸左右，贴骨深刺；阴陵泉靠近胫骨内侧下缘贴骨深刺 1.0~1.5 寸；足三里穴采用董氏奇穴针刺方法，较普通针刺靠近胫骨边缘，贴骨进针，并上下提插捻转 1 min；梁丘斜刺进针，刺至股骨，穿过骨膜，透刺至股骨的另一侧，不需行针。得气后接电针仪，采用连续波刺激 20 min，频率 1.6~2.0 Hz，强度以局部肌肉刺激为主。每日 1 次，5 d 1 个疗程，每一疗程间隔 2 d，共 4 个疗程。普通电针组：与深刺加电针组同时治疗，取穴相同，选用 1 寸无菌针灸针，刺入 0.5 寸深，提插捻转，不贴骨抵骨进针，疗程同深刺加电针组相同。

1.5 观察指标及检测方法

1.5.1 X 线检测 分别在造模前后拍摄兔手术侧膝关节正侧位片，观察造模前后膝关节的结构，包括周围软组织，关节间隙，关节面的变化以及有无骨赘形成。X 线参数：照射量：32 mAs；照射电流：250 mA；照射电压：60 kV；照射时间：128 ms。

1.5.2 行为学检测 观察治疗 4 周后兔膝骨关节局部疼痛刺激反应、步态、关节活动范围及关节肿胀程度，用 Lequesne MG 膝关节评估方法[7]进行评分。

1.5.3 HE 及甲苯胺蓝染色检测 将所以兔子在戊巴比妥钠（30 mg/kg）下深度麻醉，打开左侧膝关节，迅速取出软骨关节软骨，分为 3 部分，一部分软骨修成 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小组织块，放入戊二醛中保存；一部分放入液氧中保存；第三部分放入 4%多聚甲醛固定 24 h，进行常规脱水，透明和石蜡包埋，连续冠状面切片约 5 μm，分别进行 HE 和甲苯胺蓝染色。

1.5.4 透射电镜检测 将放入戊二醛内的软骨，用透射电子显微镜观察关节软骨超微结构，细胞器结构变化。

1.5.5 免疫组织化学检测 按上述方法制作石蜡切片，厚度约为 4~5 μm，用二甲苯脱蜡，复合消化液进行酶修复，PBS冲洗后，滴加一抗（1:1 000）放入 4 ℃冰箱孵育过夜，放入37 ℃水浴锅 30 min，PBS 冲洗后，二抗孵育，DAB 工作液显色，苏木素复染 3 min，脱水 5 min 放入碳酸锂 30 s，脱水，二甲苯透明后，中性树胶封片。

1.5.6 蛋白质印迹法检测 取出在液氮里面保存的软骨组织，PBS 冲洗 3 次，细胞裂解法提取全蛋白，放入离心机提取上清液。进行 SDS-PAGE 凝胶电泳，转印至硝酸纤维素膜，封闭，先加一抗（1:500），再加二抗（1:1 000）孵育，洗膜，酶显法显色，凝胶成像系统扫描成像，以 Quantity One 4.6 软件来分析蛋白的条带灰度值。

1.6 统计学方法

所有数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。实验数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。各组之间差异采用单因素方差分析法，组间两两比较采用 LSD-t 检验，检验水准 α=0.01。

2 结 果

2.1 X 线观察

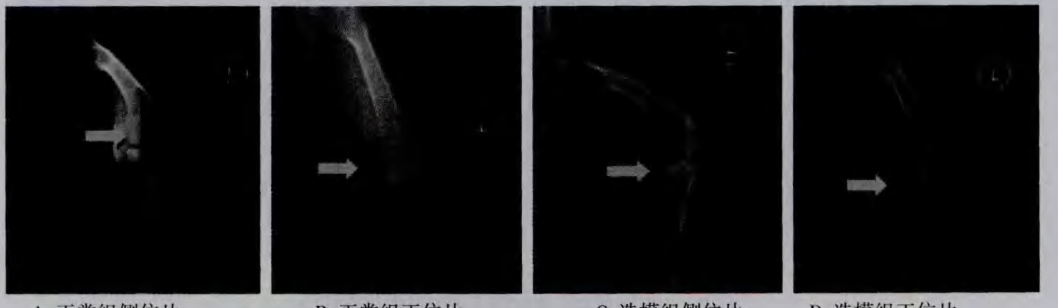
正常组内外侧关节间隙正常，关节面平整光滑无变形，关节边缘整齐规则无骨赘，关节内无游离体，软骨下骨密度分布均匀（图 1A、B）。造模组在造模六周后关节内侧间隙明显变窄，关节面粗糙变形，关节边缘有明显骨赘，软骨下骨骨密度明显增高（图 1C、D），X 线显示造模成功。

2.2 行为学观察

正常组行为学正常，Lequesne MG 评分在 0~1 分，模型组分值显著降低，深刺加电针组与普通电针组分值较模型组有所升高，深刺加电针组升高更明显，各组比较均匀统计学差异（P=0.000）（表 1）。

2.3 HE 及甲苯胺蓝染色结果

在 HE 染色中正常组软骨表面光滑，软骨细胞排序有列，均匀，分界明显，中间层细胞圆形，散在分布，甲苯胺蓝染色均匀一致，细胞呈椭圆形，胞膜完整，胞浆内充满紫红异染色颗粒（图 2A、图 3A）。模型组软骨表面均较粗糙，软骨细胞排列紊乱，空泡明显，细胞分界不清，甲苯胺蓝染色失染，部分软骨细胞染色不均匀，肥大细胞有大量脱颗粒（图 2B、图3B）。深刺加电针组和普通电针组软骨细胞排列较整齐，细胞分界清楚，无异常空泡，甲苯胺蓝染色中肥大细胞有部分的脱颗粒，胞膜变薄破裂，大量的颗粒脱出散在组织内，细胞周围少



A. 正常组侧位片　B. 正常组正位片　C. 造模组侧位片　D. 造模组正位片

图 1 X 线观察兔膝关节变化

Fig.1 Changes in rabbit knee observed by X-ray

表 1 各组兔行为学结果及 HDAC4,Runx2 蛋白的表达比较（n=10, $\bar{x} \pm s$）

Tab.1 Comparison of Lequesne MG algofunctional index and HDAC4.Runx2 protein expression in the cartilage of different groups（n=10, $\bar{x} \pm s$）

组别	例数（n）	Lequesne MG 评分	Runx2蛋白表达量	Runx2蛋白表达量
正常组	10	0.400 ± 0.516	0.728 ± 0.037	0.321 ± 0.021
模型组	10	6.800 ± 0.632[a]	0.301 ± 0.024[a]	0.765 ± 0.036[a]
深刺加电针组	10	3.300 ± 0.675[abc]	0.555 ± 0.020[abc]	0.471 ± 0.036[abc]
普通电针组	10	4.400 ± 0.516[ab]	0.437 ± 0.029[ab]	0.633 ± 0.286[ab]
F 值		203.016	417.310	391.867
P 值		0.000	0.000	0.000

注：a，与正常组比较 P=0.000；b，与模型组比较 P=0.000；c，与普通电针组比较 P=0.000

量的紫红异染色颗粒，深刺加电针组比普通电针组颗粒脱出率明显增高（图 2C、2D，图 3C、3D）。

2.4　透射电镜观察

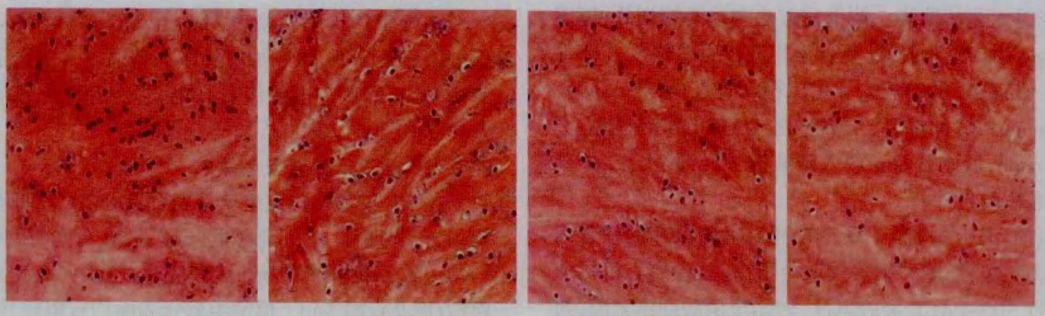
正常组软骨细胞膜完整，核表面光滑，胞浆内粗面内质网和高尔基复合体比较丰富，线粒体分布较少，染色质分布均匀（图 4A）。模型组软骨细胞外形不规则，边界不清晰，细胞质内密度增高，线粒体肿胀明显，脂滴较多，空泡明显（图 4B）。深刺加电针组和普通电针组软骨细胞可见轻度萎缩，内质网增多，可见许多小空泡（图 4C、4D）。

2.5　免疫组化检测

深刺加电针组和普通电针组 HDAC4 的表达量明显高于模型组，Runx2 的表达量明显低于模型组。正常组的 HDAC4 的表达量明显低高于深刺加电针组和普通电针组，Runx2 表达量明显低于深刺加电针组和普通电针组（均 P=0.000）。深刺加电针组的 HDAC4 的表达量高于普通电针组，Runx2 表达量明显低于普通电针组，差异有统计学意义（均 P=0.000）（图 5、图 6、表 1）。

2.6　Western blot 检测

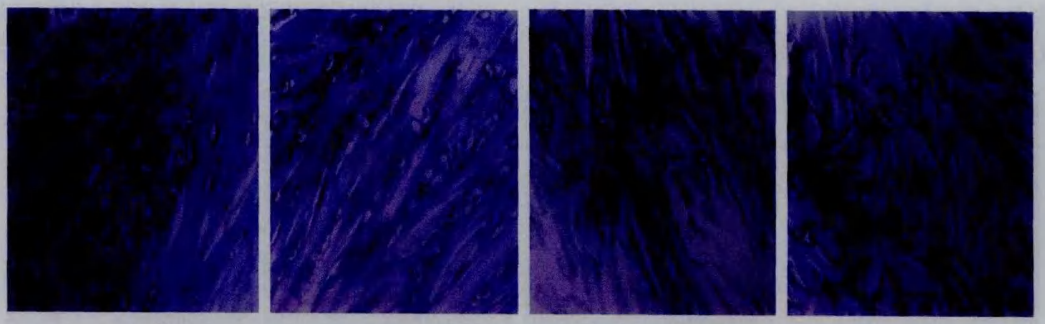
深刺加电针组和普通电针组 HDAC4 的蛋白表达量明显高于模型组，Runx2 的蛋白表达量明显高低于模型组（均 P=0.000），深刺加电针组 HDAC4 的蛋白表达量高于普通电针组，Runx2 蛋白表达量低于普通电针组差异有统计学意义（均 P=0.000）（图 7、表 2）。



A. 正常组　　B. 模型组　　C. 深刺加电针组　　D. 普通电针组

图 2　HE 染色观察兔膝骨关节病理变化（200×）

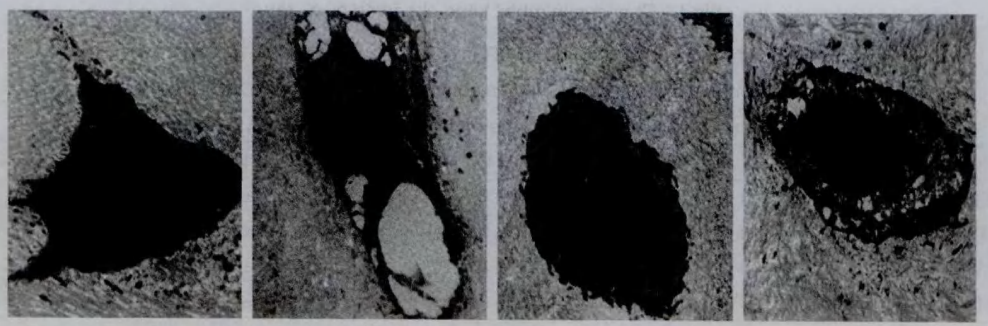
Fig.2　Pathology changes observed by HE staining（200×）



A. 正常组　　B. 模型组　　C. 深刺加电针组　　D. 普通电针组

图 3　甲苯胺蓝染色观察肥大细胞形态（200×）

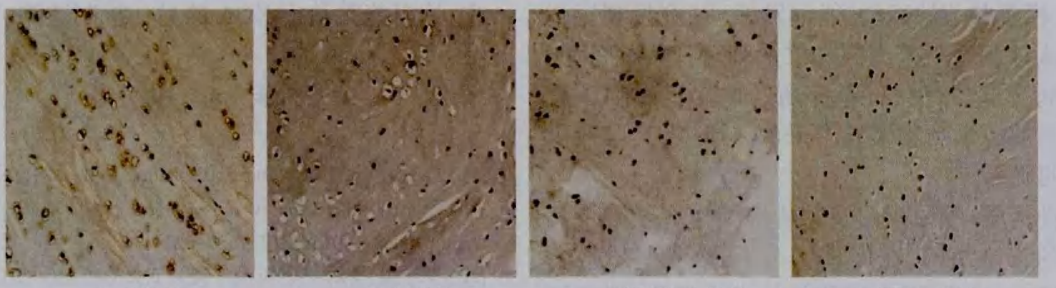
Fig.3　Morphologic changes observed by Toluidine blue staining（200×）



A. 正常组　　B. 模型组　　C. 深刺加电针组　　D. 普通电针组

图 4　透射电镜观察兔膝骨关节形态结构（10 000×）

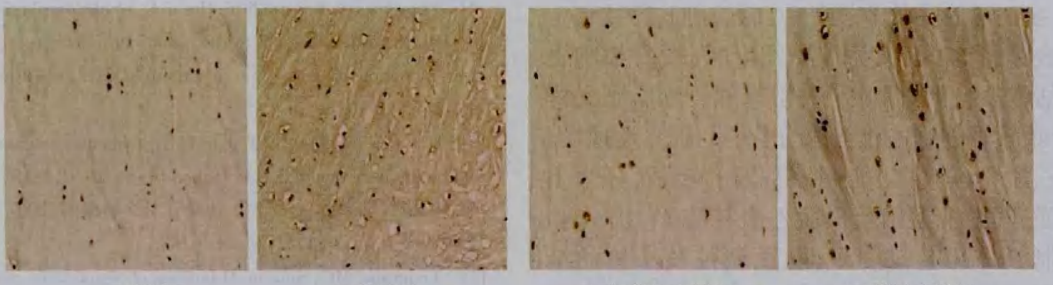
Fig.4　Morphological structure observed by TEM（10 000×）



A. 正常组　B. 模型组　C. 深刺加电针组　D. 普通电针组

图 5　HDAC4 在组织中的表达（200×）

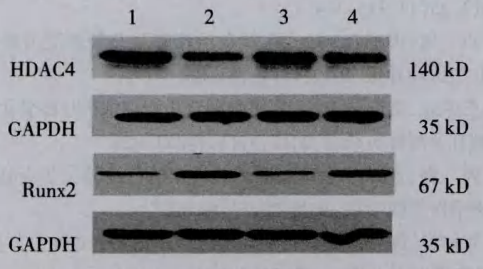
Fig. 5　Expression of HDAC4 in tissues（200×）



A. 正常组　B. 模型组　C. 深刺加电针组　D. 普通电针组

图 6　Runx2 在组织中的表达（200×）

Fig.6　Expression of Runx2 in tissues（200×）



1. 正常组　2. 模型组 3. 深刺加电针组　4. 普通电针组

图 7　Western blot 检测关节软骨 HDAC4 和 Runx2 蛋白表达

Fig.7　Expression of HDAC4 and Runx2 proteins observed by Western blot

表 2　各组兔膝关节软骨中 HDAC4 和 Runx2 蛋白的表达（n=10，$\bar{x}\pm s$）

Tab.2　Expression of HDAC4 and Runx2 proteins in rabbit articular cartilage（n=10，$\bar{x}\pm s$）

组别	例数（n）	HDAC4蛋白表达量	Runx2蛋白表达量
正常组	10	0.701 ± 0.444	0.556 ± 0.522
模型组	10	0.327 ± 0.387[a]	1.574 ± 0.257[a]
深刺加电针组	10	0.617 ± 0.351[abc]	0.835 ± 0.589[abc]
普通电针组	10	0.508 ± 0.250[ab]	1.333 ± 0.356[ab]
F 值		196.433	836.517
P 值		0.000	0.000

注：a，与正常组比较 P=0.000；b，与模型组比较 P=0.000；c，与普通电针组比较 P=0.000

3　讨　论

OA是一种常见关节病变，影响包括软骨下骨、关节囊、韧带、滑膜及关节周围肌肉在内的整个关节，最终导致关节肿胀和功能障碍，主要累及手指关节、肩关节、肘膝关节和脊柱关节。据我国人口调查统计：60 岁以上老年人口已经超过 1.3 亿，估计 KOA 患者超过 5000 万[8]。随着人口老龄化的问题越来越严重，KOA 的发病率也呈现出不断上升的趋势，膝骨关节炎已成为老年患者致残的首要因素，严重影响患者的生存质量。由于对膝骨关节炎的发病机制尚不明确，迄今为止仍然缺乏有效的治疗手段[9]。

中医认为膝骨关节炎主要是由于脾肾亏虚，加之风寒湿邪外袭，导致经络不通，而针针疗法具有扶正祛邪、疏经通络、调和阴阳的作用，对膝骨关节炎有较好疗效[10]。短刺（深刺）法作为古代医学治疗膝骨关节炎的首选针法，始出于《灵枢·官针》篇，“短”是接近的意思，短刺法具体操作：摇动其针深入直达病痛深部，贴骨处做上下提插，主要用于深部病症治疗，故又名深刺。其临床疗效显著，史中亚等[11]提出短刺（深刺）配合功能训练可有效控制病情发展并能显著改善关节疼痛及功能障碍；郭霖等[12]提出短刺（深刺）加温针灸可活血通络、散寒除湿以消

肿止痛、恢复关节的运动；熊继发等[13]研究发现短刺（深刺）法针刺膝关节周围穴位深刺至骨关节间，能针刺到病变部位，使“针至病所”，取得良好临床疗效。但目前医学动物实验中未深入研究，其取效机制尚不明确。

软骨基质、胶原蛋白及软骨细胞构成了维持关节稳定的三维结构，在病理状态下，软骨基质平衡状态被打破，发生降解，三维结构发生变化，软骨细胞修复功能丧失。大量研究表明：软骨细胞表型异常改变，可能是软骨细胞修复功能缺失的根本原因之一[14]。在正常的膝关节软骨中，软骨细胞维持稳定的细胞表型形态，而膝关节炎发生时，软骨细胞丧失维持细胞表型的细胞因子，引起软骨细胞肥大样改变，导致软骨细胞发生终末分化[15]。研究发现：组蛋白去乙酰化（HDAC）能调控基因的转录，分为Ⅰ型和Ⅱ型，其中Ⅱ型组蛋白脱乙酰基酶 4（HDAC4）可以抑制具体靶转录因子，从而调控核小体的结构，抑制软骨细胞的增殖和分化。HDAC4 的异常表达可以导致软骨细胞肥大分化，使骨骼过早钙化成熟，软骨组织发生退变[3]，Vega 等[16]提出 HDAC4 敲除后可以导致软骨细胞过早向肥大方向分化，使生长中的骨骼过早钙化，软骨细胞增殖期中过表达 HDAC4 可以抑制软骨细胞肥大，被称为是“骨骼发育的分子计时器”[3]。Komori 等[17]发现敲除 Runx2 基因，可以破坏小鼠胚胎过程中整个骨的形成，在骨形成的过程中，Runx2 对软骨细胞肥大起着关键性作用，被称为软骨细胞肥大的标志物[18]。研究表明：HDAC4 能通过 DNA 结合方式扩展到核心结合蛋白因子（Runt）区域发生乙酰化，降低Runx2 的活性，从而调控软骨细胞的肥大与分化，抑制其转录活性[16-17]。

深刺法能深入骨缝缓解关节僵硬、疼痛及功能障碍，纠正膝关节力学平衡，针刺内外膝眼、足三里等穴位能改善局部血液循环，改变血管的通透性，降低炎性反应，抑制软骨细胞肥大分化，还能导致一系列生物效应发生，引起局部平滑肌收缩，导致出现酸麻胀痛、气至病所、循经感传等现象[19]，本实验结果表明：深刺加电针法和普通电针法能够改善软骨细胞的形态结构，减轻病理损伤，还能提高 HDAC4 的表达，增强对 Runx2 的抑制作用，有效延缓软骨细胞肥大化进程和膝骨关节炎软骨的退变，对比发现：深刺加电针法效果更优于普通电针法，这与临床研究结果保持一致[11]。综上可知，深刺加电针法能通过抑制软骨细胞肥大分化的进程，降低炎性反应，维持细胞表型的细胞因子，减轻软骨的损伤，这可能是治疗 KOA 的另一机制通路。

参 考 文 献

[1] Farr li J, Mille LE, Block JE. Quality of life in patients with knee osteoarthritis: a commentary on nonsurgical and surgical treatments[J]. Open Orthop J, 2013, 13(7): 619-623.

[2] 罗 圆，胡幼平. 针灸治疗骨关节炎的研究现状[J]. 针灸临床杂志，2013，29(8)：76-78.

[3] Hug BA. HDAC4: a corepressor controlling bone development[J]. Cell, 2004, 119(4): 448-449.

[4] Kamekura S, Kawasaki Y, Hoshi K, et al. Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability[J]. Arthritis Rheum, 2006, 54(8): 2462-2470.

[5] Hulth A, Lindberg L, Telhag H. Experimental osteoarthritis in rabbits. Preliminary report[J]. Acta Orthop Scand, 1970, 41(5): 522-530.

[6] 中华医学会骨科学分会. 骨关节炎诊治指南（2007 年版）[J]. 中国矫形外科杂志，2014，22(3)：287-288.

[7] Lequesne MG, Samson M. Indices of severity in osteoarthritis for weight bearing joints[J]. J Rheumatol Suppl, 1991(27): 16-18.

[8] 任 燕，石娅娅，谭 波，等. 中国人群膝骨关节炎危险因素的 Meta 分析[J]. 现代预防医学，2015，42(12)：2282-2284.

[9] 邓昆明. 电针疗法治疗膝关节骨关节炎进展[J]. 现代诊断与治疗，2012，23(4)：373-374.

[10] 卢 敏，谭旭仪，黄 璐. 针灸治疗膝关节骨性关节炎的 Meta 分析[J]. 中医药导报，2012，18(1)：81-83.

[11] 史中亚，胡奋强，陈 勇. 短刺配合功能训练治疗膝骨关节炎疗效观察[J]. 上海针灸杂志，2012，31(11)：827-828.

[12] 郭 霖，张海山. 短刺加温针灸治疗退行性膝关节炎临床研究[J]. 河南中医学院学报，2008，23(5)：64-65.

[13] 熊继发，黄治庭. 短刺针法加电针治疗膝关节骨性关节炎 36 例疗效观察[J]. 河北中医，2012，34(4)：561-561.

[14] Gouttenoire J, Valcourt U, Ronziere MC, et al. Modulation of collagen synthesis in normal and osteoarthritic cartilage[J]. Biorheology, 2004, 41(3-4): 535-542.

[15] Zheng Q, zhou G, Morello R, et al. Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo[J]. J Cell Biol, 2003, 162(5): 833-842.

[16] Vega RB, Matsuda K, Oh J, et al. Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis[J]. Cell, 2004, 119(4): 555-566.

[17] Komori T, Yaqi H, Nomura S, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts[J]. Cell, 1997, 89(5): 755-764.

[18] Studer D, Millan C, Ozturk E, et al. Molecular and biophysical mechanisms regulating hypertrophic differentiation in chondrocytes and mesenchymal stem cells[J]. Eur Cell Mater, 2012(24): 118-135.

[19] Langevin HM, Churchill DL, Cipolla MJ. Mechanical signaling through connective tissue: a mechanism for the therapeutic effect of acupuncture[J]. FASEB J, 2001, 15(12): 2275-2282.

（责任编辑：冉明会）