

杨威,郭斯印,易志勇,等. 膝骨关节炎病证结合动物模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(3): 139-143.
Yang W, Guo SY, Yi ZY, et al. Research progress on animal models of a combination of diseases and syndromes of knee osteoarthritis [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(3): 139-143.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.03.021

膝骨关节炎病证结合动物模型的研究进展

杨威¹, 郭斯印¹, 易志勇², 黄旭东², 韩清民^{2*}, 张荣华^{3*}

(1. 广州中医药大学第三临床医学院, 广州 510405; 2. 广州中医药大学第三附属医院, 广州 510405;
3. 暨南大学, 广州 510632)

【摘要】 膝骨关节炎可分为原发性和继发性, 病因不明, 动物实验是进一步探索其发病机制和防治的重要手段, 基于国内外相关文献, 经典的造模方式可分为人工诱导和自发造模, 与本病相关的主流中医证候是肾阳虚、血瘀和寒湿证, 分别对应三种造模方式, 而病证结合的动物模型将是未来研究的主流趋势, 结合笔者多种造模方式的经验, 对其做一综述以供参考。

【关键词】 膝骨关节炎; 动物模型; 病证结合; 研究进展

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 03-0139-05

Research progress on animal models of a combination of diseases and syndromes of knee osteoarthritis

YANG Wei¹, GUO Siyin¹, YI Zhiyong², HUANG Xudong², HAN Qingmin^{2*}, ZHANG Ronghua^{3*}

(1. the Third Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China.
2. the Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405.
3. Jinan University, Guangzhou 510632)

【Abstract】 Knee osteoarthritis can be divided into primary and secondary types, but the etiology of these types is unknown. Animal experiments enable further exploring the pathogenesis and prevention of knee osteoarthritis. The related literature suggests that classic models can be divided into artificial induction and spontaneous modeling. The associated mainstream traditional Chinese medicine syndromes for this disease are kidney yang deficiency, blood stasis and cold dampness syndrome, which correspond to three modeling method. Animal models that combine these diseases and syndromes will be important for future research. These models, combined with the author's practical experience in multiple modeling method, provide a review for reference.

【Keywords】 knee osteoarthritis; animal model; combination disease and syndrome; research progress

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种快速增长的致残性疾病, 估计全球已有 2.5 亿人受累, 使医疗负担持续剧增, 最常累及膝关节 (knee osteoarthritis,

KOA), 其高发病率与老龄化、肥胖和关节慢性损伤相互作用有关, KOA 是一种全关节慢性炎性进展性疾病, 涉及到关节软骨、关节下骨、韧带、关节囊、半

【基金项目】 重大疑难疾病中西医临床协作试点项目 (国中医药办医政发[2018]3号)。

【作者简介】 杨威 (1988—), 男, 博士研究生, 主治医师, 主要从事中医药治疗骨伤疾病研究。E-mail: yw_doctor@163.com

【通信作者】 韩清民 (1963—), 男, 博士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 主要从事中医药治疗骨伤疾病研究。E-mail: lky_doctor@163.com

张荣华 (1964—), 男, 博士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 主要从事中西医结合老年病。E-mail: tzh@jnu.edu.cn

* 共同通信作者

月板、滑膜和周围肌肉功能与结构的改变^[1-3],按病因分为原发性(primary knee osteoarthritis, PKOA)和继发性^[4],继发性 KOA 包括创伤后(post-traumatic knee osteoarthritis, PTKOA)、废用性和继发于其他系统性疾病的 KOA,由于具体病机不明,尚无有效的干预手段^[3]。而动物实验是人们深入认识 KOA 发病机制和探索有效治疗手段的重要途径^[5-6]。

KOA 属中医学“骨痹”范畴,中医认为其病因病机为“本痿标痹、本虚标实”。肝肾亏虚,筋骨失养为本痿;邪气痹阻,经络不畅为标痹^[7]。大致可分为气滞血瘀证、寒湿痹阻证和肝肾亏虚证,据此遣方用药以减轻 KOA 患者疼痛、改善关节功能和调节整体生理功能进而提高生活质量,为进一步探究其内在机理,将动物作为人类受难的替代者,分别模拟血瘀、寒湿和肾虚证型 KOA 患者,结合国内外相关文献及笔者 KOA 动物造模经验,可将其分为现代医学病理学造模和中医证型造模两大类,以最常用的家兔和大鼠^[8]为例,分析常用造模方式的内在机制及优缺点以供参考。

1 KOA 的现代医学病理学造模

经典的现代医学病理学造模分为自发造模和人工诱发,后者分为侵入性和非侵入性造模,侵入性包括关节腔注射、关节内外手术,非侵入性包括关节制动和机械创伤^[9-10],而目前复制 KOA 动物模型最常用的造模方法为关节内手术、石膏绷带制动和关节腔药物注射法。评价 KOA 模型最经典的指标是关节软骨损伤的 Mankin 评分^[11]和改良 Mankin 评分^[12],后者已逐渐取代前者,而国际骨关节炎研究组织(OARSI)推荐的滑膜组织半定量评分有助于 KOA 早期评价^[13]。

1.1 关节内手术

关节内手术是不同程度破坏或切除前后交叉韧带、内外侧副韧带或半月板等稳定关节的软组织,使关节不同程度地失稳,改变其生物力学,增加关节表面摩擦,进而促使关节软骨退变诱发 KOA。此法模型成功率高,可重复性好,造模时间短,病程可控,但具体操作要求较高,需要严格无菌,术者要掌握膝部解剖并具备一定的外科操作技能,以尽可能减少手术创伤出血。

1.1.1 传统 Hulth 法及 Hulth 改良法

改良的 Hulth 法即切断内侧副韧带及前交叉韧带、内侧半月板切除,而 Hulth 法还需切除后交叉韧带^[9]。王婧等^[14]在大鼠 KOA 三种造模方式的比较中发现 Hulth 模型组 6 周即可造模成功:膝关节软

骨组织大体观可见软骨变薄或部分缺损、表面充血、有小裂缝,伴有骨赘形成;光镜下可见软骨表层较大缺损,软骨细胞层分离,且细胞肥大呈空泡状,潮线消失,软骨下骨小梁断裂,Mankin 评分高,相当于 KOA 中晚期。Hulth 法建模太快,不利于观察不同时期 KOA 滑膜、软骨及软骨下骨的病理表现;而改良的 Hulth 法操作简单,创伤小,可动态观察 KOA 周围组织的病理表现,采用改良 Mankin 评分判定分期。张冲等^[15]采用改良 Hulth+强迫兔奔跑法(约 200 m/d),发现 2 周软骨改变,6 周进入平台期,10 周可见晚期 OA 表现,13 周建立典型 KOA 模型。

1.1.2 前交叉韧带切断术(ACLT)、半月板部分或全部切除术

ACLT(anterior cruciate liagment transection)模型是最早为大众熟知的模型,也是 KOA 研究中最常用到手术模型。钱洁等^[16]认为 ACLT 建模时间较长,术后 6、8 周分别为 KOA 的早期和中期:关节大体可见软骨面失去光泽,滑膜肿胀;镜下观显示软骨形态紊乱,甲苯染色变浅,软骨细胞变性坏死增多,Mankin 评分较高,更适合作为发病机制、药物治疗方面的研究。谭启钊等^[17]对比三种 OA 模型,术后 8 周发现其膝关节软骨和软骨下骨都发生明显病理改变且各有差异,其中 ACLT 组大鼠软骨破坏较重,软骨下骨没有显著改变。在体实验,半月板切除引起内外侧关节面受力不均而导致 KOA 样改变,类似于人类膝内外翻导致的内外侧 KOA^[18],部分切除的机理与全切类似。陈康等^[19]认为切断兔的内外侧半月板和前交叉韧带是制作 KOA 模型较为理想的方法,造模 2、6、10 周后,从实验动物活动表现和大体标本观察,兔右膝关节均呈典型不同时期 KOA 特征。本法创伤相对较小,成功率高,容易控制实验方向,但对术者要求更高,稳定性较差,成模时间较长。

1.2 石膏绷带制动

原理是增加或减少作用关节面的应力诱导产生关节软骨退行性改变。动物实验一般以膝关节为观察对象,按照作用关节是否为观察对象可分为固定观察关节法和固定非观察关节法,按照制动机制不同可分为过屈位和过伸位制动,笔者以为前者主要是限制关节伸直造成关节软骨萎缩性变化,后者主要是限制活动,周围组织对关节面产生过度压力进而导致 KOA,过屈位操作简单,成功率高,而过伸位制动与临床上 KOA 发病机制类似,近年来应用更为广泛^[20]。

无论是否固定在过伸、屈位或中间位,也无论

是否对膝关节施加外力,固定一定时间后的膝关节软骨都会出现类似临床的退变。以新西兰大白兔左后肢为观察对象,田育魁等^[21]或王丽娟等^[22]人分别采用高分子绷带于过屈或过伸位固定,8 或 6 周后成功建立 KOA 模型。亦可用此法观察过度负重的右膝与空白组关节软骨的病理变化,但目前尚未见报道。

1.3 关节腔药物注射法

关节腔药物注射法是将诱导炎症的复合物或生物制剂直接注射到关节腔,多用于研究药物抑制炎症或减轻疼痛的疗效。最常用的化学诱导剂有木瓜蛋白酶和碘乙酸(sodium monoiodoacetate, MIA),其次是尿激酶和胶原酶等。木瓜蛋白酶分解软骨基质中具有抗压作用的糖蛋白,促进关节软骨降解,诱发 KOA。王平乐等^[23]将 1.6% 的木瓜蛋白酶注射到兔的膝关节腔内,每只 0.5 mL,每 3 天一次,共两次,2 周后取材发现注射的膝关节软骨退变。而目前更为常用的是 MIA 注射,它能抑制三羧酸循环中的三磷酸甘油醛脱氢酶导致关节软骨降解,王宝娟等^[24]发现 7.5 mg/kg 的 MIA 为建立家兔 KOA 模型最小有效剂量,且成活率高。最近,刘军等^[25]分别在第 1、7 天将 10 ng/mL 的 TNF- α 注射到大鼠关节腔,4 周后成功构建 KOA 模型。此法操作简便、创伤小且成模时间短,但是药物剂量因动物或部位而异,首次注药后关节肿胀严重阻碍后期注药,往往需要使用其他化学催化剂^[10],反复注射易出现硬结、溃烂,所形成的模型与人类 KOA 有所差异。

现代医学病理学造模方法繁多,且不断创新,无法一一列举,每一种具体造模方式都有其独特的优缺点,需要根据其特有的致病机制、病理变化特点及自身需求选择合适的方法模拟所需 KOA 模型。

2 KOA 的中医证型造模

古今医家对 KOA 病因病机的认识可大致概括为正虚、邪实和虚实夹杂三大证。为模拟临床 KOA 证型,目前中医证型造模也以肾阳虚、血瘀和寒湿证为主,与前文论及的 KOA 现代医学病理学造模相结合形成病证结合的复合模型。目前中医证型的评价是以《医学实验动物学》中临床表现与证型的对应为主。

2.1 肾阳虚证 KOA 模型

肾阳虚证 KOA 模型是肾阳虚证+KOA 病证结合的模型,肾阳虚证模型是研究最早的中医证候动物模型^[26],按机理大致可分为现代医学病理学造模和中医病因学造模,且以前者多见。根据《辨证论

治实验方法学》对肾阳虚证候评分,结合中医基础理论进行证候评价^[27],典型表现为精神萎靡、发抖畏寒喜暖、卷缩弓背、大便稀溏和抓取无抵抗等。

2.1.1 现代医学病理学造模

中医肾包含现代医学的性腺功能,性激素水平下降可反映肾气的衰退,并且下丘脑-垂体-靶腺轴的功能紊乱是肾虚证的主要病理基础^[28]。研究表明 cAMP、cGMP 及其比值可反映肾虚证^[16],肾阳虚时,cAMP 降低,cGMP 升高,cAMP/cGMP 降低,反之为肾阴虚。肾阳虚证的现代医学病理学造模可分为肾上腺皮质、甲状腺、性腺功能抑制模型等。最早和最为常用的是糖皮质激素法,且最为国内外所认可的方式是将氢化可的松注射液以 10 mg/(kg·d) 的剂量注射到成年大鼠腹腔持续 15 d 便可成模^[29]。其次最为常用的是去势法,切除动物双侧睾丸或卵巢,可成功模拟肾阳虚证,但也有研究认为此法不仅创伤大且性腺轴的反馈途径中断,去势后的动物不能较好地模拟临床肾阳虚患者表现^[26]。由于激素造模严重影响骨骼肌力量和骨的代谢,进而影响 KOA 模型,病证结合模型中多采用去势法。陈颖颖等^[30]通过多种不同造模方法比对发现去除双侧睾丸联合 Hulth 法^[9]更适合建立雄性 SD 大鼠 KOA 肾阳虚证模型;根据 Hartley 豚鼠关节软骨快速衰老的特性,笔者前期单纯采用去除双侧卵巢法成功建立豚鼠绝经后 PKOA 肾阳虚证模型,操作虽然简单,但耗时太长,并且去势后骨小梁明显缺失,骨质疏松特别严重^[12]。最近,陈颖颖等^[31]对雄性 SD 大鼠采用 Hulth 造模法+不同浓度腺嘌呤灌胃成功构建肾阳虚型 KOA 模型,并发现 100 mg/kg 是最佳浓度。

2.1.2 中医病因学造模

肾藏精,主骨生髓,主持人体发育和生殖,肾虚多由先天禀赋不足或后天失养,房劳内伤,久病耗气,年老或受惊所致。肾阳虚证中医病因学造模可分为:房劳模型、老年大鼠肾阳虚模型和“恐伤肾”模型等^[32],房劳模型主要是针对单个雄鼠和多个动情期雌鼠同笼,诱导雄鼠房事不节;老年大鼠肾阳虚模型是根据老年大鼠自然衰老所致肾阳虚衰;“恐伤肾”模型主要是利用猫吓鼠,使动物精神-神经内分泌-效应器之间相互关系发生紊乱影响代谢功能,出现肾阳虚证。然笔者尚未发现运用中医病因学方法或复合 KOA 病理学造模法建立肾阳虚型 KOA 复合模型的文献报道。

目前,肾阳虚造模方法种类繁多,病理造模方法远多于病因造模,而后者被越来越多的研究者青睐,但两者都存在明显不足,前者只能反映临床肾

阳虚病理的单个方面,后者病因和病证之间不存在一一对应的关系,病证结合模型将是未来发展的方向^[33]。

2.2 血瘀证 KOA 模型

血瘀证的临床表现为舌质青紫、瘀斑等,动物实验的标准是舌质瘀紫,尾色瘀青,血流缓慢、血黏度增高等,常用的造模方法是肾上腺皮质激素注射法^[34],具体是氢化可的松 10 mg/(kg·d)肌肉注射,13 次用药后肾上腺素 0.36 mg/kg 皮下注射一次。2013 年,刘振峰等^[35]用此法+经典 Hulth 造模法成功建立了动物体征和血液流变学均符合血瘀证的大鼠 KOA 模型;尽管临床上血瘀证常见,且常以活血法治之,但此后未见单纯血瘀证 KOA 动物模型报道,多是复合证 KOA 模型。刘爱峰等^[10]及 Liu 等^[32]用关节内注射木瓜蛋白酶 0.05 mL(1.6U)/关节剂量,并将雄性 Wistar 大鼠膝关节在 50℃ 环境下作用 2 h,观察局部淤血肿胀、疼痛和活动受限程度及软骨病理变化,得到肾虚血瘀型 KOA 模型,此法亦属病理学造模范畴,简便易行,周期短,可重复性高,且成功解决了传统木瓜蛋白酶因首次注射后关节肿胀而致后续注射受阻的难题。截止目前,笔者尚未发现血瘀证病因学造模及客观评价指标的文献报道。

2.3 寒湿证 KOA 模型

《内经·痹论篇》曰:“风寒湿三气杂至,合而为痹也。”风寒湿邪是重要的病因。2016 年,李艳彦及其团队等^[36]采用石膏伸直位固定法+冰水站立复制寒湿证 KOA 模型,通过将大鼠放入(6±0.5)℃ 的水中 6 h,而后予以双下肢石膏固定 18 h,如此反复 6 周后行关节病理学检查低倍镜下可见软骨表面不平,滑膜层增多、增粗,较多血管翳形成,高倍镜下发现大量软骨细胞破坏,排列紊乱,较多炎性细胞及坏死组织分布。随后,赵乐等^[37]对其改进,通过交替将大鼠双下肢伸直位石膏固定和自然站立于(6±2)℃ 冰水中各 6 h,持续 6 周,发现模型组大鼠关节软骨 II 型胶原及 TGF-β 表达明显下降,iNOS(一氧化氮合成酶)表达明显升高。2020 年,孙力威等^[38]采用石膏固定+低温环境刺激(4℃ 气温箱 8 h)+冰水站立成功建立雌性 SD 大鼠肾阳虚寒湿证 KOA 模型,用高剂量黄芪桂枝五物汤灌胃后肾阳虚表现消失,趾温也正常,关节软骨病理学表现及血清炎性指标明显好转,以此反证肾阳虚寒湿证 KOA 复合模型成功。此法为中医病因学造模,即采用致病因素干预,但其作用时间、评判标准或病理学造模未见报道。

3 总结与展望

据中医史料记载,与 KOA 相似症状的病名有骨痹、痛痹、寒痹和鹤膝风等。KOA 中医病因病机是肾阳虚、寒湿和淤血,基本证型是肾阳虚、气滞血瘀证和寒湿阻滞证,分别对应肾阳虚、血瘀证和寒湿证 KOA 动物模型。祖国医学从整体辨证论治的角度出发,治疗 KOA 有独特的优势,而有关 KOA 的中医证候动物模型研究及相关文献资料缺乏或零散,尤其缺少病因学模型研究,由于单一病证病因较多,且同一病因可诱发不同证型,加之临床上患者病证的复杂性、动态性及伴随疾病的相互影响,严重限制了中医药对 KOA 的深入研究。普遍认为 KOA 证型是多种病因相互作用的结果,进而出现多种证型兼夹或转变,因此实际造模时可以将多种基本模型按需求和内在规律组合建立符合中医临床的复合证候模型,但干预因素过多,实际操作困难,模型稳定性和可靠性不高,另外,动物的食水、垫料、光照及周围环境等饲养条件也极为重要。

KOA 病因病机不明,单纯用现代医学或祖国医学都不能有效地解除患者病痛,而两者结合疗效显著,为探究其内在机理,由此过渡到基础实验,将西方先进的 KOA 造模理念结合中医证候模型建立病证结合动物模型^[39]将是人们进一步认识 KOA 病因病机以及药物防治的主流方向。当前 KOA 病证结合模型主要以现代医学病理病因造模为主,缺乏体现中医证候的病因或诱因,在现代医学建模基础上施加中医病因可能有助于解决,另外科学地评价病证结合模型很难,为推动 KOA 模型更好地服务于科研,武晏屹等^[40]以 KOA 中、西医最新临床诊疗规范为依据,创造性地提出了动物模型与中、西医的临床吻合度,也更有利于病证结合模型的发展;宋亚刚等^[39]提出“证候”评价指标+“病”评价指标综合评估,具体需要与兽医合作采集动物的“四诊信息”,结合基因组学、代谢组学和蛋白组学等信息,宏观微观相结合共同评价,必要时运用经典方剂佐证,这将是病证结合模型的发展方向。

参考文献:

- [1] Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis [J]. *Lancet*, 2019, 393(10182): 1745-1759.
- [2] Kolasinski SL, Neogi T, Hochberg MC, et al. 2019 American college of rheumatology/arthritis foundation guideline for the management of osteoarthritis of the hand, hip, and knee [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2020, 72(2): 220-233.
- [3] 袁普卫, 杨威, 陈斌, 等. 雌激素与骨关节炎 [J]. *中国骨质*

- 疏松杂志, 2017, 23(10): 1363-1368, 1395.
- [4] Kuyinu EL, Narayanan G, Nair LS, et al. Animal models of osteoarthritis; classification, update, and measurement of outcomes [J]. *J Orthop Surg Res*, 2016, 11: 19.
- [5] Cope PJ, Ourradi K, Li Y, et al. Models of osteoarthritis; the good, the bad and the promising [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2019, 27(2): 230-239.
- [6] Samvelyan HJ, Hughes D, Stevens C, et al. Models of osteoarthritis; relevance and new insights [J/OL]. *Calcif Tissue Int*, (2020-02-15) [2020-06-22], doi:10. 1007/s00223-020-00670-x.
- [7] 中国中医药研究促进会骨科专业委员会、中国中西医结合学会骨伤科专业委员会关节工作委员会. 膝骨关节炎中医诊疗专家共识(2015年版) [J]. *中医正骨*, 2015, 27(7): 4-5.
- [8] 吴强, 郑倩华, 蒋一璐, 等. 膝骨性关节炎动物模型选择与制备的比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(5): 125-130.
- [9] 刘晓辰, 付维力. 骨关节炎动物模型的选择 [J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(11): 1769-1776.
- [10] 刘爱峰, 巩树伟, 何建造, 等. 膝关节退行性骨关节炎动物模型研究进展 [J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2020, 28(3): 85-88.
- [11] Salo PT, Hogervorst T, Seerattan RA. Selective joint enervation promotes knee osteoarthritis in the aging rat [J]. *J Orthop Res*, 2002, 20(6): 1256-1264.
- [12] 袁普卫, 杨威, 康武林, 等. 豚鼠绝经后肾虚型原发性骨关节炎模型的建立 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(4): 1625-1630.
- [13] Gerwin N, Bendele AM, Glasson S, et al. The OARSI histopathology initiative—recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010, 18(3): S24-S34.
- [14] 王婧, 张忠辉, 孙娇梦, 等. 大鼠骨关节炎三种动物模型的建立及比较 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2010, 32(3): 456-460.
- [15] 张冲, 王恒树, 阚秀莲, 等. 传统中药补肾固筋方对膝骨性关节炎 IL-1、TNF- α 的作用机制 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(3): 312-315.
- [16] 钱洁, 邢雪松, 梁军. 大鼠膝关节骨性关节炎动物模型的两种实验方案 [J]. *实验室研究与探索*, 2014, 33(11): 23-27.
- [17] 谭启钊, 牛国栋, 赵振达, 等. 关节软骨与软骨下骨改变在不同骨关节炎动物模型中的特点 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(4): 450-455.
- [18] Salazar-Noratto GE, De Nijs N, Stevens HY, et al. Regional gene expression analysis of multiple tissues in an experimental animal model of post-traumatic osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2019, 27(2): 294-303.
- [19] 陈康, 陈泽俊, 符红娜, 等. 兔膝关节骨性关节炎模型建立的探讨 [J]. *实验动物科学*, 2014, 31(5): 33-35, 封三.
- [20] 王岩, 董本超, 王颖, 等. 膝骨关节炎动物模型的研究进展 [J]. *生物医学工程与临床*, 2019, 23(3): 365-371.
- [21] 田育魁, 郝洋, 刘俊昌, 等. 高分子绷带结合塑料杆建立的兔膝骨关节炎模型 [J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(23): 3690-3695.
- [22] 王丽娟, 史晓伟, 张伟, 等. 针刀干预对膝骨关节炎兔股四头肌肌腱拉伸力学的影响 [J]. *中国骨伤*, 2019, 32(5): 462-468.
- [23] 王平乐, 郝华, 冯丈进, 等. 补肾活血“对药”对兔膝骨关节炎模型基质金属蛋白酶-3 及其组织抑制剂-1 的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2011, 18(7): 41-42, 78.
- [24] 王宝娟, 郑曙光, 周玉平, 等. 探讨不同浓度碘乙酸钠对家兔早期膝关节骨性关节炎模型的诱导及病理改变 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2019, 39(3): 316-319.
- [25] 刘军, 李旭升, 甄平, 等. 两种方法建立大鼠骨性关节炎模型中软骨细胞变化比较 [J]. *科学技术与工程*, 2019, 19(25): 98-104.
- [26] 张子怡, 陈宝军, 张庆, 等. 肾阳虚证动物模型的造模方法与评价指标 [J]. *福建中医药*, 2014, 45(2): 61-63.
- [27] 秦文艳, 陈贺, 朱竟赫, 等. 不同氢化可的松小鼠肾阳虚模型制备方法对比研究 [J]. *实验动物科学*, 2017, 34(4): 11-14.
- [28] 沈自尹. 从肾阳虚证的研究谈中医药走向世界 [J]. *中国中医药信息杂志*, 1997, 4(4): 5-6.
- [29] Tan Y, Liu X, Lu C, et al. Metabolic profiling reveals Therapeutic biomarkers of processed Aconitum Carmichaeli Debx in treating hydrocortisone induced Kidney-Yang deficiency syndrome rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 152(3): 585-593.
- [30] 陈颖颖, 罗莎, 杜梦梦, 等. 不同造模方法对骨关节炎肾阳虚证动物模型相关指标的影响 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2018, 13(12): 1677-1680.
- [31] 陈颖颖, 杜梦梦, 李冬霞, 等. 腺嘌呤制备肾虚骨关节炎模型最适浓度研究 [J]. *风湿病与关节炎*, 2020, 9(6): 1-5.
- [32] Liu A, Wang P, Zhang J, et al. Restoration effect and tribological behavior of hyaluronic acid reinforced with graphene oxide in osteoarthritis [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2019, 19(1): 91-97.
- [33] 黄越燕. 病证结合动物模型的研究现状与思考 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2018, 13(10): 1459-1462.
- [34] 马治中, 杨明, 和岚, 等. 血瘀病理模型探索(三) [J]. *北京医科大学学报*, 1991, 23(4): 287-289.
- [35] 刘振峰, 方锐, 艾力江·阿斯拉, 等. 肾虚血瘀型膝骨性关节炎大鼠模型的建立 [J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(2): 270-274.
- [36] 李艳彦, 赵乐, 王永辉, 等. 黄芪桂枝五物汤对阳虚寒凝型骨关节炎大鼠免疫及瘀血状态的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(23): 149-154.
- [37] 赵乐, 李艳彦, 王永辉, 等. 黄芪桂枝五物汤对骨关节炎大鼠血管新生的作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(3): 87-93.
- [38] 孙力威. 黄芪桂枝五物汤对阳虚寒凝型骨关节炎疼痛的作用及机制研究 [D]. 太原:山西中医药大学, 2020.
- [39] 宋亚刚, 李艳, 崔琳琳, 等. 中医药病证结合动物模型的现代应用研究及思考 [J]. *中草药*, 2019, 50(16): 3971-3978.
- [40] 武晏屹, 白明, 田硕, 等. 基于中西医临床病证特点的膝骨关节炎动物模型分析 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(11): 2481-2485.