doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.11.006

运用偏振光观测聚乙烯磨屑颗粒诱导人工关节假体无菌性松动*

牛 舜¹ 龙 华¹ 张 艳² 李永伟¹ 马保安¹ (1空军军医大学唐都医院骨科 陕西 西安 710038;2空军军医大学唐都医院肿瘤科 陕西 西安 710038)

摘要目的:探讨运用偏振光显微镜来观测无菌性松动人工关节假体周围的聚乙烯颗粒分布,评估其在研究磨屑颗粒诱导假体无菌性松动机制及防治措施等实验研究中的可行性。方法:我们用雌性新西兰大白兔建立动物模型,在左侧胫骨髓腔内植入羟基磷 灰石 (hydroxyapatite,HA) 涂层假体。并分别于假体表面和膝关节腔内植入 0.5×10⁷ 超高分子量聚乙烯 (Ultra-high molecular weight polyethylene,UHMWPE)颗粒。术后行四环素荧光双标记。膝关节滑膜组织苏木精 - 伊红(hematoxylin-cosin,HE)染色、骨组织改良丽春红染色后分别用普通光镜和偏振光镜观察,未染色的骨组织行荧光显微镜和偏振光镜观察。结果:在聚乙烯颗粒刺激下,膝关节滑膜组织增生明显,骨 - 假体结合差,假体周围骨小梁稀疏,偏振光显微镜可清晰显示双折光性的聚乙烯颗粒在膝关节分布于滑膜及其深层结缔组织中,在骨 - 假体间隙间大量充填,阻碍骨 - 假体整合。结论:运用偏振光显微镜可以清晰而简便地观察滑膜和假体周围的聚乙烯颗粒分布,与传统实验方法相比,更加直观、简便和经济。

关键词:聚乙烯;磨屑颗粒;偏振光;人工关节置换;无菌性松动

中图分类号:R-33;R318.08;R687.4 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2019)11-2032-04

Using Polarized Light to Observe Polyethylene Wear Particles Induced Artificial Joint Aseptic Loosening*

NIU Shun', LONG Hua', ZHANG Yan², LI Yong-wei', MA Bao-an^{1/2}

(1 Department of Orthopedics, Tang Du Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China;

2 Department of Oncology, Tang Du Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: Using polarization microscope to observe the distribution of polyethylene particles around aseptic loosened artificial joints in animal model could evaluate its feasibility in the studies of the mechanism and the preventative and therapeutic interventions of wear debirs induced implant aseptic loosening. **Methods:** We used female New Zealand white rabbits to establish animal model. HA-coated implants were inserted into the left tibia, and 0.5× 10⁷ UHMWPE wear particles were injected both around implants and into knee joints. Tetracycline double labeling was used postoperatively. The synovial membrane of knee joint was observed by HE staining, while bone was observed by modified Ponceau staining under light microscope and polarization microscope. Non-stained bone was observed under fluorescence and polarization microscope. **Results:** The polyethylene particles induced synovial membrane hyperplasia, poor bone-implant integration, sparse peri-implant bone trabecula. Birefringent particles were observed in the whole synovial membrane hyperplasia, poor bone-implant interface under polarized light, which hampered bone-implant integration. **Conclusion:** The distribution of polyethylene particles in the synovial membrane and around implant could be observed easily under polarized light. Compared to traditional methods, polarization microscopy is much more intuitive, convenient and economical.

Key words: Polyethylene; Wear particle; Polarized light; Arthroplasty; Aseptic loosening

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R318.08; R687.4 Document code: A Article ID: 1673-6273(2019)11-2032-04

前言

人工关节置换术是骨科领域近半个世纪来最成功的手术 之一,解决了很多终末期的关节疾患。随着社会老龄化的加重 及平均寿命的延长,骨关节炎等关节疾病发病率逐年上升^[1],大 大降低了老年人的生活质量^[2]。因此,关节置换手术越来越得到 普及,随之而来,关节置换手术的各种并发症也越来越受到人 们的重视。

磨屑颗粒诱导的人工关节假体无菌性松动是关节置换晚 期失败的主要原因^[5-7],因此有不少基础研究围绕这个方面展 开,动物实验自然是其中不可或缺的一环。为了评估动物模型 造模的效果以及各种防治措施是否有效,对于标本中磨屑颗粒 诱导骨溶解的病理状态评估非常重要。常用的评估方法包括以 下几个方面:1)关节内压力测量^[89];2)关节滑膜、骨-假体界膜

^{*}基金项目:国家自然科学基金项目(81401825);唐都医院科技创新发展基金项目(2018LCYJ013)

作者简介:牛舜(1984-),博士,主治医师,讲师,主要研究方向:人工关节置换,电话:13519114744,E-mail:21379067@qq.com

[△] 通讯作者:马保安(1961-),博士生导师,主任医师,教授,主要研究方向:人工关节置换,E-mail:baoanmatd@qq.com

⁽收稿日期:2019-01-12 接受日期:2019-01-31)

组织学观测^[6,10-14];3)假体周围骨组织形态学测量^[13,15,16];4)假体 周围骨密度及矿化评估^[16];5)滑膜和关节液中细胞因子测量^[17]; 6)生物力学测量等^[18,19]。

以上这些方面已经可以非常全面的评估骨-假体的整合 情况。但是以上各种指标观测的只是磨屑颗粒诱导假体周围骨 溶解的结果,至于磨屑颗粒具体在组织中是如何分布的?又是 如何阻碍骨-假体整合的?并不能直观的观察到。

临床上人工关节的摩擦界面大致分为金-金、金-聚、陶-聚、陶-陶,因此,最为常见的引起假体无菌性松动的磨屑颗粒 是聚乙烯颗粒。而聚乙烯颗粒具有双折光性,通过偏振光镜可 以清晰地观察到聚乙烯颗粒。在本研究中,我们将运用偏振光 来观测聚乙烯磨屑颗粒在无菌性松动假体周围组织内的分布, 从而进一步阐述磨屑颗粒诱导假体无菌性松动的机理,为今后 的进一步研究提供更为简洁的检测手段。

1 材料和方法

1.1 材料

UHMWPE 颗粒(直径: 1.74 ± 1.43 μm)由德国 Ernst Krendlinger 教授惠赠,其详细的参数已由 von Knoch 教授描 述^[20]。钛基(Ti6Al4V)假体材料由四川大学生物材料工程研究 中心制作。直径 2.5 mm,长 10 mm,圆柱形,侧面等离子喷涂 30 μm 厚 HA 涂层。涂层 Ca/P 比:1.67,HA 结晶度:>45%。 UHMWPE 颗粒和假体用 Co60 照射消毒。荧光标记用四环素 购自美国 Sigma 公司;Leica SP 1600 硬组织切片机购自德国 Leica 公司;Hitachi S-3400N 扫描电镜购自日本 Hitachi 公司; 荧光显微镜及偏振镜片购自日本 Nikon 公司。

1.2 方法

1.2.1 **手术步骤和标本处理** 选用 10 只雌性新西兰大白兔 (3.00± 0.20 kg),切开左膝关节后,用 2.5 mm 克氏针向胫骨髓 腔扩髓,并将 0.5× 10⁷ UHMWPE 颗粒混悬于 50 μL 生理盐水 后注射在假体柄周围,将另外 0.5× 10⁷ UHMWPE 颗粒干粉直 接喷洒于膝关节腔。术后不限制活动。并分别于处死前的第 14 日和第 4 日肌注盐酸四环素(25 mg/kg)荧光标记新生骨。术后 12 周处死动物。左膝关节滑膜和左侧胫骨分别用 10 %中性甲 醛和 70 %酒精固定 1 周。

1.2.2 膝关节滑膜组织学观测 左膝关节滑膜固定后石蜡包 埋,随后进行 5 μm 厚切片及 HE 染色,分别用普通光镜和偏振 光镜观测滑膜组织增生及磨屑颗粒浸润情况。

1.2.3 **骨组织改良丽春红三色染色测量** 带有假体的胫骨标本固定后用甲基丙烯酸甲酯包埋。用 Leica SP 1600 硬组织切片机连续切取 15 μm 厚切片 5 张,行改良丽春红三色染色,并用普通光镜和偏振光镜观测骨-假体界面整合情况、假体周围骨质情况及磨屑颗粒分布。

1.2.4 骨组织荧光标记观测 用 Leica SP 1600 硬组织切片机
继续连续切取 15 μm 厚切片 5 张,行荧光显微镜观测,评估骨
- 假体界面整合情况、假体周围骨质情况及磨屑颗粒分布。

1.2.5 扫描电镜观测 剩余的胫骨标本使用 Hitachi S-3400N 扫描电镜观测骨 - 假体界面整合情况及磨屑颗粒。



图 1 偏振光镜下的 UHMWPE 颗粒 Fig.1 UHMWPE particles under polarized light Note: Bar=10 µm.

2.1 UHMWPE 颗粒偏振光观测

将 UHMWPE 颗粒混悬后涂抹于载玻片上,通过偏振光 镜,可以发现如图 1 所示,UHMWPE 颗粒呈现出双折光性。

2.2 膝关节滑膜组织学观察

如图 2A 所示,通过普通光镜我们一般可以观察到,经过 UHMWPE 颗粒刺激后,滑膜组织增生、肥厚,表层大量纤维组 织增生,血管翳形成,并且有大量炎细胞浸润,局部肉芽肿形 成。而进一步通过偏振光镜观察,可以发现双折光性颗粒弥散 于滑膜组织内,尤其以滑膜表面最为明显(图 2B)。

2.3 骨-假体界面组织学观察

经过改良丽春红三色染色,通过普通光镜,可以看到骨小 梁呈现棕红色,假体为黑色。骨小梁不规则,变得破碎、稀疏,骨 小梁之间间距变大,而假体与骨小梁之间没有直接接触,存在 间隙(图 3A)。而进一步通过偏振光镜,可以清晰发现假体与骨 小梁之间之所以没有直接接触,是因为大量双折光性的 UHMWPE颗粒填充在骨-假体界面间,阻隔了骨-假体整合 (图 3B)。另外,在骨小梁间同样散在大量 UHMWPE 颗粒。通 过扫描电镜观察,可以进一步证实骨-假体界面未良好整合, 间隙中有 UHMWPE 颗粒(图 3C)。

如图 4A 所示,通过四环素荧光双标记,可以看到假体和 骨小梁之间存在着一个条带,阻碍骨-假体整合。而骨小梁在 UHMWPE 的刺激下变得不规则、稀疏,并且骨代谢收到损害, 骨生成受阻,表现为荧光双标记模糊、间隔不清和不连续(箭 头)。进一步叠加偏振光镜后,可以清晰发现假体与骨小梁之间 充满了大量双折光性的 UHMWPE 颗粒,阻隔了骨-假体整合 (图 4B)。另外,在骨小梁间也散在大量 UHMWPE 颗粒。

3 讨论

磨屑颗粒诱导的人工关节假体无菌性松动是一个复杂的 多因素病理过程,主要包括:关节腔及假体周围的慢性炎症反 应、高关节内压力、假体周围高骨更新率、骨-假体界膜形成等 等^[5-7]。这一切的根源都是磨屑颗粒的诱导,简单来说,磨屑颗粒 形成后会被巨噬细胞等吞噬,分泌各种促炎细胞因子造成关节



图 2 普通光镜和偏振光镜下的滑膜 HE 染色 Fig.2 HE staining of synovium under normal and polarized light

Note: Bar=100 µm.



图 3 普通光镜和偏振光镜下的骨 - 假体界面改良丽春红三色染色及扫描电镜下的骨 - 假体界面 Fig.3 Modified Ponceau S staining of bone-implant interface under normal and polarized light and the bone-implant interface under SEM Note: *: UHMWPE particles; b: trabecular bone; i: implant. Red bar=100 µm, yellow bar=10 µm.



图 4 普通光镜和偏振光镜下的骨 - 假体界面四环素荧光染色 Fig.4 Tetracycline fluorescence staining of bone-implant interface under normal and polarized light Note: *: UHMWPE particles; arrow: tetracycline fluorescence lable; b: trabecular bone; i: implant; if: interface membrane. Bar=100 µm.

内及假体周围的慢性炎症,并导致关节内高压力,同时激活破 骨细胞活性,加速假体周围骨质的骨更新率,导致骨小梁组织 形态学参数变差。而关节内的高压力又进一步促进磨屑颗粒和 各种细胞因子迁移至骨 - 假体间隙^[89],加速了骨 - 假体界膜的 形成^[12-14]。最终在各种因素的作用下,导致骨 - 假体结合的生物 力学性能变差,假体松动。

在这一系列的病理过程中,聚乙烯磨屑颗粒到底是如何分 布的还没有直观的观察结果。我们常用的评估方法是通过制作 组织切片,并进行染色来进行滑膜、骨骼的组织学观察以及骨 骼的组织形态学测量。通过关节滑膜组织 HE 染色,我们可以 观测到,在磨屑颗粒的刺激下,滑膜组织增生、肥厚、炎性细胞 浸润,并有大量血管翳和肉芽组织结节形成(图 2A)。进一步通 过偏振光镜观察,双折光性的聚乙烯颗粒在滑膜组织内的分布 便一目了然了(图 2B)。从图片中可以看到,聚乙烯磨屑颗粒并 不仅仅吸附于滑膜表面,而是被滑膜组织及深层结缔组织中的 细胞吞噬,并诱导组织的炎性反应。因此,可以预见,临床上简 单的关节镜冲洗和滑膜清理并不能完全去除组织内的磨屑颗 粒,对于缓解磨屑颗粒诱导的假体无菌性松动没有太多帮助。 对于骨小梁的染色,常用的方法有很多,例如 HE 染色、甲苯胺 蓝染色、丽春红三色染色、von Kossa 染色、Masson 三色染色和 Van Gieson 染色等,各有各的优势[21-23]。对于骨组织形态学的观 测,我们常用甲苯胺蓝染色和丽春红三色染色,甲苯胺蓝染色 可以将新生骨染成紫红色,而成熟骨质表现为蓝色,丽春红三 色染色可以将新生骨染成蓝色, 而成熟骨质表现为棕红色, 这 两种染色方法色泽鲜亮、不同组织对比明显,我们可以在此基 础上很好地进行各种观察和静态骨组织形态学测量。如图 3A 所示,在聚乙烯磨屑颗粒的刺激下,骨和假体无法良好结合,因 此骨-假体接触率将会变低,这也是假体生物力学性能降低的 主要原因。除此之外,骨小梁结构变得不规则和稀疏,这也会影 响应力通过骨小梁从假体向皮质骨的传导。进一步通过偏振光 镜观察,可以看到双折光性的聚乙烯颗粒充满了骨-假体间隙 以及骨小梁之间(图 3B)。正是聚乙烯磨屑的物理阻隔,使得骨 - 假体无法良好整合, 且骨小梁间的磨屑颗粒也影响了骨小梁 的结构,诱导加速骨吸收[610,11,14]。通过扫描电镜观察,进一步证 实了骨 - 假体间充满了聚乙烯磨屑(图 3C),而偏振光镜观测 比扫描电镜要简便和经济得多。

通常,荧光标记用来进行动态骨组织形态学参数的测量^[2425]。 荧光双标记越长、间距越宽,说明新骨生成越活跃。在聚乙烯磨 屑颗粒的刺激下,我们可以看到荧光标记变得模糊、不连续(图 4A),说明聚乙烯磨屑严重影响了新骨生成。同时,骨-假体间 有微弱荧光的间隔条带,似乎预示着骨-假体并未直接结合^[13]。 进一步通过偏振光镜观察发现,骨-假体间填充了大量的双折 光性颗粒,这是阻碍骨-假体整合的主要原因。

通过偏振光镜,我们可以很简便的观察聚乙烯磨屑颗粒在 关节腔和假体周围的分布情况,为我们进一步研究磨屑颗粒诱 导假体无菌性松动的机制及其防治方法提供了一种简便的实 验方法。与传统的实验方法相比,更加直观和经济,具有推广性

参考文献(References)

- 刘康妍,郑聪,胡海澜. 骨关节炎流行病学研究[J]. 中华关节外科杂志(电子版), 2017, 11(3): 98-100
- [2] 王斌, 邢丹, 董圣杰, 等. 中国膝骨关节炎流行病学和疾病负担的系统评价[J].中国循证医学杂志, 2018, 18(2): 134-142
- [3] Sundfeldt M, Carlsson LV, Johansson CB, et al. Aseptic loosening, not only a question of wear: a review of different theories [J]. Acta Orthop, 2006, 77: 177-197
- [4] 邢金锋,宋科官,彭锂,等. 全关节成形术中假体周围骨溶解的概述:本体因素与未来发展方向[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(2): 386-389

- [5] 杨国曦,陈晓勇,朱锦宇,等. CD11b 表达与人工髋关节置换术后无菌性松动的相关性分析 [J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(11): 2046-2049
- [6] Longhofer LK, Chong A, Strong NM, et al. Specific material effects of wear-particle-induced inflammation and osteolysis at the bone-implant interface: A rat model[J]. J Orthop Translat, 2016, 14(8): 5-11
- [7] Xu H, Guo CC, Gao ZY, et al. Micrometer-Sized Titanium Particles Induce Aseptic Loosening in Rabbit Knee [J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 5410875
- [8] Luna IE, Kehlet H, Jensen CM, et al. The Effect of Preoperative Intra-Articular Methylprednisolone on Pain After TKA: A Randomized Double-Blinded Placebo Controlled Trial in Patients With High-Pain Knee Osteoarthritis and Sensitization [J]. J Pain, 2017, 18 (12): 1476-1487
- [9] Van der Vis H, Aspenberg P, De Kleine R, et al. Short periods of oscillating fluid pressure directed at a titanium-bone interface in rabbits lead to bone lysis[J]. Acta Orthop Scand, 1998, 69: 5-10
- [10] Salkeld SL, Patron LP, Lien JC, et al. Biological and functional evaluation of a novel pyrolytic carbon implant for the treatment of focal osteochondral defects in the medial femoral condyle: assessment in a canine model[J]. J Orthop Surg Res, 2016, 11(1): 155
- [11] Field JR, Callary SA, Solomon LB, et al. Early acetabular cartilage wear following hemiarthroplasty: An ovine model [J]. Vet Comp Orthop Traumatol, 2016, 29(2): 125-130
- [12] Rahbek O, Overgaard S, Lind M, et al. Sealing effect of hydroxyapatite coating on peri-implant migration of particles. An experimental study in dogs[J]. J Bone Joint Surg Br, 2001, 83: 441-447
- [13] Niu Shun, Cao Xiao-rui, Zhang Yan, et al. The inhibitory effect of alendronate-hydroxyapatite composite coating on wear debris-inducedperi-implant high bone turnover [J]. J Surg Res, 2013, 179 (1): e107-115
- [14] Sundfeldt M, Widmark M, Johansson CB, et al. Effect of submicron polyethylene particles on an osseointegrated implant: an experimental study with a rabbit patello-femoral prosthesis [J]. Acta Orthop Scand, 2002, 73: 416-424
- [15] Atkins GJ, Welldon KJ, Holding CA, et al. Findlay DM: The induction of a catabolic phenotype in human primary osteoblasts and osteocytes by polyethylene particles[J]. Biomaterials, 2009, 30: 3672-3681
- [16] Boivin G, Farlay D, Bala Y, et al. Influence of remodelling on the mineralisation of bone tissue[J]. Osteoporos Int, 2009, 20: 1023-1026
- [17] Wang CT, Lin YT, Chiang BL, et al. Over-expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL), inflammatory cytokines, and chemokines in periprosthetic osteolysis of loosened total hip arthroplasty[J]. Biomaterials, 2010, 31: 77-82
- [18] Gramanzini M, Gargiulo S, Zarone F, et al. Combined microcomputed tomography, biomechanical and histomorphometric analysis of the peri-implant bone: a pilot study in minipig model [J]. Dent Mater, 2016, 32(6): 794-806
- [19] Hamad TI, Fatalla AA, Subhi WA, et al. Biomechanical Evaluation of Nano-Zirconia Coatings on Ti-6Al-7Nb Implant Screws in Rabbit Tibias[J]. Curr Med Sci, 2018, 38(3): 530-537
- [20] von Knoch M, Sprecher C, Barden B, et al. Size and shape of commercially available polyethylene particles for in-vitro and in-vivo-experiments[J]. Z Orthop Ihre Grenzgeb, 2004, 142: 366-370

其中药复方治疗概况[J]. 川北医学院学报, 2015, 30(04): 574-578

- [12] Coddrre TJ, Wall PD. Ankle joint urate arthritis in rat; an alterantive animal model of arthritis to that producedby Freunds adjuvant [J]. Pain, 1987, 28(3): 379-393
- [13] 黄火高,孙运峰,胡明,等. 大鼠急性痛风性关节炎模型的建立及 特点[J]. 军事医学科学院院刊, 2005, (06): 538-542
- [14] 李娜,华龙,袁慧. 痛风动物模型的研究进展 [J]. 医学理论与实践, 2016, 29(24): 3335-3337
- [15] 蔡唐彦, 王旭, 何浈, 等. 急性痛风性关节炎大鼠模型的建立及模型维持时间观察[J].中国实验动物学报, 2017, 25(05): 494-499
- [16] 柴文新, 施合欢, 金雯丽, 等. 一种改良方法制备大鼠痛风模型及 其炎症和疼痛效应评价 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2017, 23(10): 730-736
- [17] 郭玉星, 熊辉, 陆小龙, 等. 改良痛风性关节炎大鼠模型的复制[J]. 云南中医学院学报, 2017, 40(02): 18-23
- [18] 尹明,向黎黎,熊辉,等.痛风性关节炎湿热蕴结证大鼠模型建立 的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2015, 35(02): 6-10+73
- [19] 熊辉,曲良烨,向黎黎,等. 痛风性关节炎湿热证病证结合模型的 建立[J]. 中医正骨, 2014, 26(03): 14-20
- [20] 孙赛君,袁卉,蒋金鹏,等.次黄嘌呤灌胃加冰敷法诱导大鼠急性 痛风性关节炎模型 [J]. 长江大学学报 (自科版), 2014, 11(09): 38-40+43+5
- [21] Choi JW, Ford ES, Gao X, et al. Sugar-sweetened soft drinks, diet soft drinks, and serum uric level: The third national health and nutrition examination survey [J]. Arthritis Care & Research, 2008, 59(1): 109-116
- [22] Ha V, Jayalath VH, Cozma AI, et al. Frutcose-containing sug ars, blood pressure, and cardiometabolic risk: a critical review [J]. Curr Hypertens Rep, 2013, 15(4): 281-297
- [23] 李丽玉,林志健,张冰,等.连续高果糖饮水对大鼠尿酸水平的影响及其病理机制[J].中华临床营养杂志,2014,22(6):368-374
- [24] 林志健, 王雪洁, 朱春胜, 等. 2 种高尿酸血症及相关并发症动物模型的建立与比较研究[J]. 转化医学杂志, 2015, 4(06): 347-350

- [25] 牛红娟. 营养型甜味剂对大鼠尿酸代谢的影响及菊苣的干预研究 [D].北京中医药大学, 2016
- [26] 孔悦,张冰,刘小青,等.黄嘌呤氧化酶活性在高尿酸血症动物模型中的变化[J].北京中医药大学学报,2004,(06): 38-40+93
- [27] 陈城,张桥,杨文明. 脑络欣通颗粒对脑梗死急性期气虚血瘀证超 氧化物歧化酶和丙二醛的影响[J/OL].中医药临床杂志,2018,(03): 501-504
- [28] 吕颖智. 化瘀除湿通痹方对肾虚血瘀型膝骨关节炎患者疗效观察及对关节液中炎症因子、氧化应激因子的影响[J].辽宁中医药大学学报,2018,20(03):205-208
- [29] Zhang QB, Qing YF, He YL, et al. Association of NLRP3 polymorphisms with susceptibility to primary gouty arthritis in a Chinese Han population[J]. Clin Rheumatol, 2017
- [30] Khameneh HJ, Ho AW, Laudisi F, et al. C5a Regulates IL-1β Production and Leukocyte Recruitment in a Murine Model ofMonosodium Urate Crystal-Induced Peritonitis[J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 10
- [31] Zhou Q, Yu D H, Zhang N, et al. Anti-inflammatory effect of total saponin fraction from Dioscorea nipponica Makino on gouty arthritis and its influence on NALP3 inflammasome[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2017: 1-8
- [32] 董鹏, 宋慧. 痛风发病机制研究进展[J]. 基础医学与临床, 2015, 35 (12): 1695-1699
- [33] 郑春雨,于雪峰,陈水林,等. 豨莶草水提取物对痛风性关节炎大 鼠 JNK 信号通路影响 [J]. 中国组织工程研究, 2018, 22 (36): 5816-5820
- [34] 张丽红,邓子淳,方佳,等. 异落新妇苷抗痛风活性研究[J]. 吉林中 医药, 2018, 38(10): 1198-1202
- [35] 郭玉星,熊辉,易法银,等. 蠲痹历节清方对改良痛风性关节模型 大鼠滑膜的 TLR4,NF-κB,PPARγ 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(23): 126-133
- [36] 金晓敏,张晓熙,郭璐,等.基于 NLRP3 炎性体轴探讨土茯苓总黄酮对痛风性关节炎的作用和机制 [J].中国实验方剂学杂志,2018, 24(04): 90-95

(上接第 2035 页)

- [21] Rentsch C, Schneiders W, Manthey S, et al. Comprehensive histological evaluation of bone implants[J]. Biomatter, 2014, 4(1): e27993
- [22] Bemenderfer TB, Harris JS, Condon KW, et al. Tips and techniques for processing and sectioning undecalcified murine bone specimens [J]. Methods Mol Biol, 2014, 1130(1130): 123-147
- [23] Abrantes, Adelino Antonio Artur, Rafacho A, et al. Tissue integrity, costs and time associated with different agents for histological bone preparation[J]. Microsc Res Tech, 2017, 80(4): 344-349
- [24] Solomon HM, Murzyn S, Rendemonti J, et al. The use of micro-CT imaging to examine and illustrate fetal skeletal abnormalities in Dutch Belted rabbits and to prove concordance with Alizarin Red stained skeletal examination[J]. Birth Defects Res, 2018, 110(3): 276-298
- [25] Bensimonbrito A, Cardeira J, G Dionisio, et al. Revisiting in vivo staining with alizarin red S-a valuable approach to analyse zebrafish skeletal mineralization during development and regeneration[J]. BMC Dev Biol, 2016, 16(1): 1-10