

- Res, 2016, 11 (1): 6.
- [2] Kjell J, Olson L. Rat models of spinal cord injury: from pathology to potential therapies [J]. Dis Model Mech, 2016, 9 (10): 1125-1137.
- [3] 王甜甜, 陈淳媛, 杨雷, 等. Nrf2/HO-1 信号轴在氧化应激性疾病中的机制 [J]. 中南大学学报: 医学版, 2019, 44 (1): 74-80.
- [4] Liu Y, Tachibana T, Dai Y, et al. Heme oxygenase-1 expression after spinal cord injury: the induction in activated neutrophils [J]. J Neurotrauma, 2002, 19 (4): 479-490.
- [5] 李永华, 梁洪生, 张立阳, 等. 炎症体在中枢神经系统损伤的作用机制 [J]. 解剖科学进展, 2016, 22 (4): 459-462.
- [6] 王赛男, 胡建国, 吕合作. 炎症小体活化对脊髓损伤局部免疫微环境的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34 (5): 765-768, 773.
- [7] Kaushal V, Dye R, Pakavathkumar P, et al. Neuronal NLRP1 inflammasome activation of Caspase-1 coordinately regulates inflammatory interleukin-1-beta production and axonal degeneration-associated Caspase-6 activation [J]. Cell Death Differ, 2015, 22 (10): 1676-1686.
- [8] Agarwal A, Bolisetty S. Adaptive responses to tissue injury: role of heme oxygenase-1 [J]. Trans Am Clin Climatol Assoc, 2013, 124: 111-122.
- [9] Yamada K, Tanaka N, Nakanishi K, et al. Modulation of the secondary injury process after spinal cord injury in Bach1-deficient mice by heme oxygenase-1 [J]. J Neurosurg Spine, 2008, 9 (6): 611-620.
- [10] Lu T, Wu X, Wei N, et al. Lipoxin A4 protects against spinal cord injury via regulating Akt/nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2/heme oxygenase-1 signaling [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 97 (1): 905-910.
- [11] Kim Y, Kim J, Ahn M, et al. Lithium ameliorates rat spinal cord injury by suppressing glycogen synthase kinase-3 β and activating heme oxygenase-1 [J]. Anat Cell Biol, 2017, 50 (3): 207-213.
- [12] Li Z, Wu F, Xu D, et al. Inhibition of TREM1 reduces inflammation and oxidative stress after spinal cord injury (SCI) associated with HO-1 expressions [J]. Biomed Pharmacother, 2019 (109): 2014-2021.
- [13] Liu X, Gu X, Yu M, et al. Effects of ginsenoside Rb1 on oxidative stress injury in rat spinal cords by regulating the eNOS/Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. Exp Ther Med, 2018, 16 (2): 1079-1086.
- [14] 林文平, 王思远, 郑煜晖, 等. 腺相关病毒介导血红素加氧酶-1 基因转移对大鼠脊髓损伤的保护作用 [J]. 中华实验外科杂志, 2018, 35 (1): 46-49.
- [15] Lee S H, Kim Y, Rhew D, et al. Effect of canine mesenchymal stromal cells overexpressing heme oxygenase-1 in spinal cord injury [J]. J Vet Sci, 2017, 18 (3): 377-386.
- [16] Khan I U, Yoon Y, Kim A, et al. Improved healing after the co-transplantation of HO-1 and BDNF overexpressed mesenchymal stem cells in the subacute spinal cord injury of dogs [J]. Cell Transplant, 2018, 27 (7): 1140-1153.
- [17] de Rivero Vaccari J P, Dietrich W D, Keane R W. Activation and regulation of cellular inflammasomes: gaps in our knowledge for central nervous system injury [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2014, 34 (3): 369-375.
- [18] Mousavi M, Hedayatpour A, Mortezaee K, et al. Schwann cell transplantation exerts neuroprotective roles in rat model of spinal cord injury by combating inflammasome activation and improving motor recovery and remyelination [J]. Metab Brain Dis, 2019, 34 (4): 1117-1130.
- [19] Mohamadi Y, Noori Moghahi S M H, Mousavi M, et al. Intrathecal transplantation of Wharton's jelly mesenchymal stem cells suppresses the NLRP1 inflammasome in the rat model of spinal cord injury [J]. J Chem Neuroanat, 2019 (97): 1-8.
- [20] 吴立莹, 周鑫, 谷艳婷, 等. 丙磺舒对大鼠急性脊髓损伤后 NLRP1 炎症小体活化的影响 [J]. 中国矫形外科杂志, 2019, 27 (6): 536-541.

• 基础研究 •

基于核酸适配体的微流控芯片的构建及对循环肿瘤细胞筛选性能的测定

福建省福州市第二医院骨科 (福州 350007) 肖莉莉 刘 晖 贾春锋¹

【摘要】 目的 构建一种具有骨肉瘤细胞靶向性的 GaN 微流控芯片, 考察其对循环肿瘤细胞的筛选能力。方法 利用细胞指数富集的配基系统进化 (Cell-SELEX) 技术对人骨肉瘤细胞 MG63 核酸适配体进行筛选和合成, 利用化学气相沉积法 (CVD), 在硅片上以 Au 为催化剂制备 GaN 纳米线形成 GaN 纳米结构基片, 利用软刻蚀方法制备聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 混沌混合芯片作为盖片, 并通过生物素-亲和素将核酸适配体与基片、盖片相结合来制备具有骨肉瘤细胞靶向性的 GaN 微流控芯片, 通过原子力显微镜对基片形貌进行表征, 并考察微流控芯片对循环肿瘤细胞的捕获能力及对细胞活力的影响。结果 成功构建了一种具有骨肉瘤细胞靶向性的 GaN 微流控芯片, 其平均高度、平均直径、粗糙度及表面积较原始

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (2017J01330)

¹ 通信作者, 福州市第二医院外科主任医师, Email: jiachunfeng_fj@126.com

硅片显著升高,纳米线的平均直径达到 377.2 nm,对人骨肉瘤细胞 MG63 的捕获率为 $(95.34 \pm 5.4)\%$,对骨髓间充质干细胞(BMSCs)的捕获率为 $(4.2 \pm 1.1)\%$,核酸外切酶作用 20 min 后,芯片上的循环肿瘤细胞的释放率为 92.16%,培养 20 h 后细胞活力与对照组细胞无显著性差异($P > 0.05$)。结论 成功制备具有骨肉瘤细胞靶向性的 GaN 微流控芯片,其在捕获能力、捕获特异性及生物安全性上具有良好效果,具有较好的应用前景。

【关键词】骨肉瘤;核酸适配体;循环肿瘤细胞;微流控芯片

【中图分类号】R73-3 【文献标识码】A 【文章编号】1002-2600(2020)02-0119-04

骨肉瘤作为一种间叶组织恶性肿瘤,在儿童及青少年中最为常见,其发病年龄段集中于 15—19 岁^[1]。目前缺乏有效的早期诊疗技术,无法对骨肉瘤转移和复发进行早期干预,因此骨肉瘤的致死、致残率均处于较高水平。循环肿瘤细胞(CTCs)的发现对肿瘤的早期诊断、预后监测和转移机制研究都具有重要意义,由于缺少有效的骨肉瘤靶向分子,目前对骨肉瘤 CTCs 的研究相当有限。本研究首先利用细胞指数富集的配基系统进化(Cell-SELEX)技术对人骨肉瘤细胞 MG63 核酸适配体进行筛选和合成,随后将其与 GaN 纳米结构基片及聚二甲基硅氧烷(PDMS)混沌混合芯片进行连接,从而构建一种具有骨肉瘤细胞靶向性的 GaN 微流控芯片,同时考察该微流控芯片的检测性能。

1 材料与方法

1.1 材料:人骨肉瘤细胞 MG-63 系、BMSCs 细胞系(中科院上海细胞所细胞库),DMEM 培养基、WB 洗涤缓冲液、PBS 缓冲液、BB 结合缓冲液、生物素、亲和素(美国 Invitrogen 公司),RCA 标准清洗液(美国 Sigma 公司)、Vybrant DiI/DiO 染液(美国 Amresco 公司)、硅片(上海阿洛卡医用仪器有限公司)、管式炉(中国科学院上海光机所)、NX10 型原子力显微镜(韩国 PARK 原子力显微镜公司)、微型注射泵(美国 MILLIPORE 公司)。其余均为国产试剂(分析纯)。

1.2 人骨肉瘤细胞 MG63 核酸适配体的筛选及合成^[2]:通过 Cell-SELEX 技术建立人骨肉瘤细胞核酸适配体筛选平台,即经过 ssDNA 文库设计、PCR 扩增引物合成、第一轮筛选文库(正筛选)的确立、文库 PCR 的预扩增、ssDNA 的制备、反筛选及重复筛选、核酸适配体的克隆测序和合成,可得人骨肉瘤细胞 MG-63 的核酸适配体,其序列为:5'-AGTCCTATTCCCGGACCGTAGCAAGGCTAACGGG-ACGAA-3'、5'-TCACCTAATATTCAGGGTCCCAATAAGGGGCCATTAGGCT-3',且在其 3' 端修饰了生物素。本研究所用 DNA 均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.3 骨肉瘤细胞 MG63 的培养及标记:取目标细胞株 MG63 骨肉瘤细胞及对照细胞株骨髓间充质干细胞(BMSCs),均用 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和链霉素)置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度细胞培养箱中培养。取对数生长期细胞用 WB 洗涤缓冲液冲洗,悬浮至 1.0×10^6 个/mL。然后每 1 mL 细胞悬浮液中加入 5 μ L 细胞荧光标记溶液 Vybrant DiI (红色)/DiO (绿色),37℃ 混合静置 5 min 后 WB 洗涤缓冲液冲洗 2 次,重新悬浮至 1.0×10^6 个/mL 后置于冰块上保存,此时 MG63 骨肉瘤细胞标记为红色荧光, BMSCs 细胞标记为绿色荧光。

1.4 骨肉瘤 CTCs 分离微流控芯片的构建:

1.4.1 GaN 纳米结构基片的构建^[3]:用 RCA 标准清洗液反复清洗硅片作为衬底,自然风干,然后用通过磁控溅射法在硅片表面沉积一层约 5 nm 的 Au 催化剂薄膜。将处理好的硅片和 Ga 源置于不同陶瓷舟中,注意 Ga 源应位于管式炉中央,硅片则应置于 NH₃ 气流的下流,维持 Ga 源和硅片 2 cm 的距离。随后抽取管式炉中少量空气,开始加热至 850℃,以 60 mL/min 的流量通入 NH₃,时间 80 min。反应结束后让管式炉自然冷却,用镊子小心取出样品,这时候可以在硅片衬底上可以观察到淡黄色的反应沉淀物,即为生成的高密度纳米线。利用原子力显微镜(AFM)对样品的形貌进行测定。

1.4.2 具有骨肉瘤细胞靶向性的 GaN 纳米结构基片的构建:将构建好的 GaN 基片浸入由 10 mol/L PBS 缓冲液配制的 1 mg/mL 的亲素溶液中,孵育 30 s 后采用 BB 结合缓冲液清洗,随后将芯片置于 20 pmol/L 的末端标记有生物素的核酸适配体溶液中孵育 30 s,随后采用 BB 结合缓冲液清洗后风干。

1.4.3 具有肿瘤细胞靶向性的 GaN 微流控芯片的构建:通过软刻蚀方法制备聚二甲基硅氧烷(PDMS)混沌混合芯片(chaotic mixing chip)作为盖片^[4],然后将此盖片和洁净的具有骨肉瘤细胞靶向性的 GaN 纳米结构基片在无尘埃环境下进行可逆贴合:首先将两部分的表面用去离子水和甲醇反复清洗,然后使用氮气吹干,然后将直接将 PDMS 盖片与 GaN 纳米结构基片接触粘合,并用夹具进行固定,放入烘箱,80℃ 处理 10 min。

1.5 微流控芯片的细胞捕获实验:用 BB 结合缓冲液将标记好的 MG63 骨肉瘤细胞与 BMSCs 细胞配制成一定浓度的细胞溶液。利用微量加样器将配置好的细胞溶液缓慢的滴于微流控芯片进样口处,利用微型注射泵以 1 mL/h 的速度将细胞溶液吸入芯片。最后,通入与细胞溶液等体积的 BB 结合缓冲液进行冲洗,随后进行显微成像观察,每次实验重复 3 次。捕获效率=捕获细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.6 微流控芯片上细胞的释放:为了释放微流控芯片上捕获的 CTCs,取 Lambda 核酸外切酶(5 000 U/mL)以微型注射泵以 0.1 mL/h 的速度从微流控芯片的出口处反向注入 DMEM 培养基中,持续 30 min,分别于 5、10、15、20、25、30 min 拍照记录残留的和已释放的肿瘤细胞数。释放效率=释放细胞数/捕获细胞数 $\times 100\%$ 。

1.7 微流控芯片对细胞活性的影响:取释放后的 MG63 CTCs 置于细胞培养箱中进行培养,注意定时更换新鲜培养液,分别培养 12、24、36、48、50 h 后采用 MTT 法用酶标仪在 490 nm 波长下测定吸光度。对照组采用人工配置的未经微流控芯片筛选的 MG63 骨肉瘤细胞悬液。

1.8 统计学分析:结果用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。计量数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GaN 纳米结构基片的形貌特征: GaN 纳米结构基片的原子力显微镜 (AFM) 检测结果见表 1。

表 1 GaN 纳米结构基片的表征

项目	平均高度/ nm	平均直径/ nm	粗糙度/ nm	表面积/ μm^2
硅片	24.2	3	8.4	144
GaN 纳米结构基片	344.5	377.2	304.8	380.7

2.2 微流控芯片的细胞捕获效率: 本实验对比观察了具有

肿瘤细胞靶向性的 GaN 微流控芯片对 MG63 骨肉瘤细胞与 BMSCs 细胞捕获量的差异。附着有人骨肉瘤细胞 MG-63 的核酸适配体的 GaN 微流控芯片能显著捕获 MG63 骨肉瘤细胞 (95.34 ± 5.4)%, 与捕获 BMSCs 细胞 (4.2 ± 1.1)% 相比的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 微流控芯片上细胞的释放效率: 在核酸酶的作用下, 捕获的 CTCs 可从芯片表面释放, 当 Lambda 核酸外切酶作用 20 min 后, 芯片上的 CTCs 基本释放完毕, 释放率为 92.16% (图 1)。

2.4 微流控芯片对细胞活性的影响: 各组细胞数量随着培养时间的增加逐渐增长, 在培养前 24 h, 对照组较观察组具备更好的生长活力, 随着培养时间的增加, 洗脱下来的观察组细胞逐步恢复活力, 此后一直培养到 50 h, 两组细胞之间比较的差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 2)。

表 2 微流控芯片对细胞活性的影响 (A 值)

组别	12 h	24 h	36 h	48 h	50 h
对照组	0.142 ± 0.007	0.354 ± 0.009	0.634 ± 0.015	0.746 ± 0.068	0.772 ± 0.064
观察组	$0.054 \pm 0.013^*$	$0.264 \pm 0.016^*$	0.611 ± 0.012	0.738 ± 0.071	0.753 ± 0.805

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

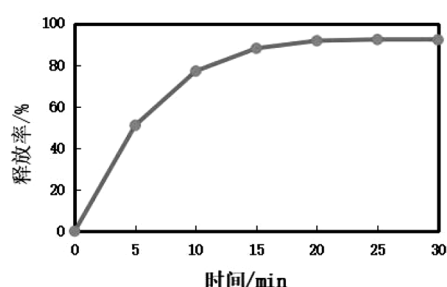


图 1 微流控芯片上细胞的释放情况

3 讨论

骨肉瘤作为青少年常见的原发恶性骨肿瘤, 其在发病初期易出现微转移, 其中 80% 为肺部转移, 这给家庭和社会带来极大负担。生物靶向分子的研究是近年来肿瘤诊疗中的热点, 其已在乳腺癌、非小细胞肺癌、肝癌等多种肿瘤的诊疗中初见成效, 基于它发展起来的诊疗手段与传统技术相比具有靶向性高、系统毒性低的特点, 使成为肿瘤诊疗的一个重要研究方向。近年来, CTCs 的研究成为新的热点, 许多报告已经证实, 其在肿瘤转移的早期诊断、治疗及肿瘤转移机制研究等方面具有重要价值, 然而 CTCs 在人体中的含量极低, 这使得在发病率相对较低的骨肉瘤研究方面更加艰难。

微流控芯片技术是一种在微米尺的流道内对微纳级的液体进行操控以实现流动、能量交换和生化反应效果的技术, 具有使用简单、低样本需求、高通量、可连接多部件等优点, 因此越来越受到人们的关注, 在 CTCs 方面的应用也越来越多。Nagrath 等^[5]采用传统微流道直接结合抗体的方式制作了改良版的 CTCs-Chip 微流控芯片, 实现了人非小

细胞肺癌细胞系 NCI-H165 的 PBS 悬液 99% 的细胞捕获效率。Ahmed 等^[6]设计了 DLD 式微柱阵列, 通过在微柱表面修饰抗 EpCAM 抗体来构建 CTCs 高效率富集微流控芯片, 结果表明, 在全血环境下 CTCs 的富集效率达到 (92.2 ± 6.4)%, 纯度高达 (82.3 ± 3.8)%。目前研究主要是利用针对细胞表面高表达的 EpCAM 等上皮细胞因子的靶向分子来实现的。由于缺少有效的骨肉瘤靶向分子, 目前对骨肉瘤 CTCs 的研究相当有限^[7]。

本研究通过将人骨肉瘤细胞 MG63 核酸适配体与 GaN 纳米结构基片及聚二甲硅氧烷 (PDMS) 混沌混合芯片进行连接, 构建了一种具有骨肉瘤细胞靶向性的 GaN 微流控芯片, 采用原子力显微镜 (AFM) 对 GaN 纳米结构基片的形貌进行了表征, 结果表明, GaN 纳米结构基片的平均高度、平均直径、粗糙度及表面积较原始硅片显著升高, 且纳米线的平均直径达到 377.2 nm, 这样尺寸大小在正常的细胞外基质的纳米结构范围内 (260~410 nm), 有助于 CTCs 的捕获; 通过捕获实验结果发现, CTCs 对人骨肉瘤细胞 MG63 的捕获率能达到 (95.34 ± 5.4)%, 对 BMSCs 细胞的捕获率只有 (4.2 ± 1.1)%, 说明, 该微流控芯片对于 CTCs 的捕获具有良好的特异性; 在核酸酶的作用下, 捕获的 CTCs 能够很好地从芯片表面释放, 且释放后经复苏培养其细胞活力基本不受影响。这有利于 CTCs 的富集, 有助于后期各类临床检测的开展, 具有良好的应用前景。

参考文献

- [1] Yamamoto N, Tsuchiya H. Chemotherapy for osteosarcoma—where does it come from? What is it? Where is it going? [J]. Expert Opin Pharmacother, 2013, 14 (16): 2183-2193.
- [2] 翁艳, 陈冬冬, 涂少臣, 等. Cell-SELEX 筛选人骨肉瘤细胞

- MG63 核酸适配体的实验研究 [J]. 福建医药杂志, 2018, 40 (2): 111-114.
- [3] 万想, 孟宪权, 刘义鹤. 化学气相沉积法制备 GaN 纳米线及其形貌结构和生长机理研究 [J]. 功能材料, 2014, 45 (2): 02082-02085.
- [4] 赵庆. 微流控芯片用于循环肿瘤细胞高效捕获的研究 [D]. 长沙: 湖南大学, 2013.
- [5] Nagrath S, Sequist L V, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumor cells in cancer patients by microchip technology [J]. Nature, 2008, 450 (7173): 1235-1239.
- [6] Ahmed M G, Abate M F, Song Y, et al. Isolation, detection, and antigen-based profiling of circulating tumor cells using a size-dictated immunocapture chip [J]. Angew Chem Int Ed, 2017, 56 (36): 10681-10685.
- [7] Tellez-Gabrie M, Heymann M F, Heymann D. Circulating tumor cells as a tool for assessing tumor heterogeneity [J]. Theranostics, 2019, 9 (16): 4580-4594.

• 基础研究 •

补骨颗粒含药血清对软骨细胞硫氧还蛋白 2 表达水平及信号转导通路的调控作用

福建省福州市第二医院康复医学科 (福州 350007) 陈舜喜 林 伟¹

【摘要】目的 研究补骨颗粒含药血清对软骨细胞硫氧还蛋白 2 (Trx2) 表达水平及信号转导通路的调控作用, 揭示 Trx2 对软骨细胞凋亡的调控机理。**方法** 选取 2016 年 9—12 月之间接受膝关节表面置换的骨性关节炎 (OA) 患者和因车祸需行截肢手术患者的膝关节软骨组织, 分为 4 组, A 组用空白血清 DMEM 完全培养液培养第 3 代正常软骨细胞, B 组用补骨颗粒含药血清 DMEM 完全培养液培养第 3 代正常软骨细胞, C 组用空白血清 DMEM 完全培养液培养第 3 代 OA 软骨细胞, D 组用补骨颗粒含药血清 DMEM 完全培养液培养第 3 代 OA 软骨细胞, 比较不同血清对 OA 软骨细胞及软骨细胞的氧化歧化酶 (SOD) 值以及 Trx2、凋亡信号调节激酶-1 (ASK1)、硫氧还蛋白结合蛋白 (TXNIP) 及 Caspase 3 的 mRNA 和蛋白含量的影响。**结果** 不同血清处理细胞后, C 组 SOD 含量、TXNIP 蛋白含量均低于 A、B、D 组, Trx2、TRXR2、ASK1、Caspase 3 mRNA 含量及蛋白含量均高于 A、B、D 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 补骨颗粒含药血清通过调控 TXNIP-Trx2-ASK1 信号途径来发挥抵抗氧化应激和细胞凋亡作用, 能够逆转 OA 软骨细胞的 SOD 值及 Trx2、TRXR2 等的 mRNA 及蛋白含量。

【关键词】 含药血清; 软骨细胞; 硫氧还蛋白 2

【中图分类号】 R91 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2020)02-0122-03

骨性关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种在世界范围内广泛存在的慢性骨关节疾病^[1], 主要病理特征是关节软骨退行性变和继发性骨质增生, 临床上主要表现为慢性关节疼痛、变形、僵硬、活动受限。此疾病的病因是成骨细胞与破骨细胞失衡, 但发病机制还不甚清楚。研究表明, 软骨细胞的凋亡在骨性关节炎的发生发展过程中起着重要的作用, 阻止或延缓软骨细胞发生凋亡是防治骨性关节炎的一条有效途径^[2-3]。然而, 文献较少报道关于软骨细胞凋亡如何在骨性关节炎软骨退变的发生发展中的作用, 以及细胞凋亡与药物治疗骨性关节炎疗效之间的关系。

本课题组在前期的实验研究过程中发现通过补骨颗粒含药血清干预软骨细胞后线粒体中的硫氧还蛋白 2 (thioredoxin-2, Trx2) 将发生明显的变化, 并且在细胞凋亡方面发挥着重要的作用。这与 Yan 等研究的发现相似, 缺硒能够影响硫氧还蛋白还原酶 2 (thioredoxin reductase 2, TrxR2) 表达, 从而影响软骨细胞的凋亡^[4]。因此, 本研究拟用补骨

颗粒含药血清干预软骨细胞, 然后通过观察 Trx 2、凋亡信号调节激酶-1 (apoptosis-activating kinase, ASK1)、硫氧还蛋白结合蛋白 (thioredoxin-binding protein, TXNIP)、信号转导通路相关因子 TRXR2 及 Caspase 3 的变化, 旨在揭示 Trx2 对软骨细胞凋亡的调控机理, 为进一步了解骨性关节炎的发病机制提供思路, 并为寻找补肾活血方药及其作用靶点提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验标本: 收集 2018 年 9—12 月在福州市第二医院因车祸需行截肢手术的患者 9 例以及接受膝关节表面置换的骨性关节炎患者 31 例, 共计 40 例。其中男性 25 例, 女性 15 例; 年龄 18~76 岁, 平均年龄 (34.1±5.7) 岁。骨性关节炎诊断依据美国风湿协会 2012 年版指南, 截肢手术患者经排除关节疾病病史。软骨组织标本取材均经患者或家属知情同意, 并经福建省医学伦理学会审批。用双层塑料袋将截肢和关节置换术切取下的膝关节软骨组织标本密封包裹, 然后

基金项目: 2017 年福建省卫计委中医药科研课题 (2017FJZYJC207); 2017 年福建省临床重点专科建设项目 (市二医院骨科); 2017 年福州市临床重点专科建设项目 (康复医学科)

¹ 通信作者, Email: linwei_fj@126.com