

糖代谢紊乱对大骨节病软骨细胞功能的影响*

邵婉珍, 张凤娥, 王 森, 郭 雄, 吴翠艳[△]

西安交通大学医学部 公共卫生学院 国家卫生计划生育委员会
微量元素与地方病研究重点实验室(西安 710061)

【摘要】 目的 观察大骨节病糖代谢紊乱对软骨细胞外基质成分胶原和蛋白多糖、细胞凋亡以及氧化应激物质产生的作用,揭示糖代谢异常对大骨节病软骨细胞功能的影响。**方法** 正常培养基和高浓度葡萄糖(高糖)培养基分别体外培养的大骨节病软骨细胞和正常软骨细胞,进行细胞增殖和形态学观察,检测软骨细胞培养基中葡萄糖的浓度,采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)、甲苯胺蓝染色等方法检测两组软骨细胞 II 型胶原和蛋白多糖的表达,流式细胞术检测细胞凋亡和活性氧积累。**结果** 大骨节病软骨细胞生长速度和增殖能力低于正常软骨细胞。高糖环境下正常软骨细胞和大骨节病软骨细胞对葡萄糖的代谢量基本相同($P>0.05$)。高糖造成的糖代谢紊乱使得大骨节病软骨细胞 II 型胶原和蛋白多糖的表达量均降低($P<0.05$)。同时,高糖培养下,大骨节病软骨细胞的凋亡率和细胞内活性氧的含量均增加($P<0.05$)。**结论** 紊乱的糖代谢降低大骨节病软骨细胞 II 型胶原和蛋白多糖的表达,增加细胞凋亡和氧化应激反应,从而影响软骨细胞的功能。

【关键词】 大骨节病 糖代谢 细胞功能

The Effect of Disordered Glycometabolism of Kashin-Beck Disease on the Function of Chondrocytes SHAO Wan-zhen, ZHANG Feng-e, WANG Sen, GUO Xiong, WU Cui-yan[△]. School of Public Health, Health Science Center of Xi'an Jiaotong University; Key Laboratory of Trace Elements and Endemic Diseases, National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, Xi'an 710061, China

[△] Corresponding author, E-mail: wucuiyan@xjtu.edu.cn

【Abstract】 Objective To reveal the effect of disordered glycometabolism in Kashin-Beck disease (KBD) chondrocytes, we compared changes in expressions of extracellular matrix components (collagen and aggrecan), apoptosis and oxidative stress under the condition of different concentrations of glucose. **Methods** The damage of KBD chondrocytes and normal chondrocytes under high glucose culture was measured in compared with cells under normal culture, that included the changes of proliferation and morphology; the concentrations of glucose in culture medium during the process of chondrocytes culture; the expressions of type II collagen and aggrecan detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Toluidine blue staining; cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) content detected by flow cytometry and fluorescence staining. **Results** The growth and proliferation of KBD chondrocytes were inferior to normal chondrocytes. The glucose uptake of KBD chondrocytes and normal chondrocytes under high glucose culture were basically the same ($P>0.05$). Disordered glycometabolism caused by high glucose decreased the expression of type II collagen and aggrecan in KBD chondrocytes ($P<0.05$), meanwhile, increased apoptosis and cellular ROS generation of cultured chondrocytes ($P<0.05$). **Conclusion** The disordered glycometabolism can affect the function of KBD chondrocytes through reducing the expression of type II collagen and aggrecan and increasing the apoptosis and the oxidative stress.

【Key words】 Kashin-Beck disease Glycometabolism Cellular function

大骨节病是一种慢性地方性畸形性骨关节病^[1-2],其发病过程中存在软骨细胞功能改变,主要表现为有关节软骨和生长板软骨深层细胞坏死、软骨细

胞过度凋亡、软骨细胞外基质降解、线粒体功能障碍和氧化应激等^[2-4],但其发生机制尚未阐明。糖代谢是体内物质利用和能量产生的主要通路,对于细胞和机体的生命活动具有至关重要的作用,并且糖代谢中的三羧酸循环联系着脂质、蛋白和核酸的代谢。因此糖代谢异常可能会影响其他物质的代谢过程,进而导致细胞功能的改变。已有大骨节病血清代谢组学研究结果提示大骨节病中存在糖代谢异常,为了进一步

* 国家自然科学基金(No. 81502766)、中国博士后科学基金资助项目(No. 2016M592805)和中央高校基金科研业务费专项资金资助

[△] 通信作者, E-mail: wucuiyan@xjtu.edu.cn

探讨糖代谢异常在大骨节病软骨细胞功能调节中的作用,本研究拟利用高质量浓度葡萄糖干预体外培养的大骨节病软骨细胞,通过检测软骨细胞在高糖环境中对葡萄糖的摄取量,从细胞水平进一步验证大骨节病中是否存在糖代谢紊乱现象;通过检测高糖干预对软骨细胞外基质(Ⅱ型胶原和蛋白多糖)表达、细胞凋亡和活性氧(ROS)含量的影响,揭示糖代谢紊乱对大骨节病软骨细胞功能的影响。

1 材料与方法

1.1 关节软骨组织来源

6 例大骨节病患者〔男性 2 例,女性 4 例,年龄(59.7±4.7)岁〕均来自陕西省大骨节病病区,符合《大骨节病临床诊断标准》(WS/T 207-2010)。6 例健康对照〔男性 3 例,女性 3 例,年龄(55.1±6.0)岁〕来自陕西省非大骨节病病区的正常捐赠者。所有研究对象均排除其它骨关节疾病和系统疾病并且经过捐赠人的知情同意,在膝关节置换手术或外伤处理手术中获取研究对象的关节软骨组织。

1.2 主要仪器与试剂

CO₂ 培养箱和酶标仪(美国 Thermo 公司);流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司);RT-PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。DMEM/F12 培养基、DMEM/高糖培养基、胎牛血清、青霉素和链霉素双抗溶液(HyClone 公司);胰蛋白酶、Ⅱ型胶原酶、二甲基亚砷及甲苯胺蓝(美国 Sigma 公司);葡萄糖测定试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司);RNA 逆转录试剂盒、SYBR 荧光定量 PCR 试剂盒和 PCR 引物设计合成(大连 TaKaRa 公司);Carboxy-H₂DCFDA 活性氧检测试剂盒(美国 Invitrogen 公司);Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(南京建成生物工程有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 软骨细胞培养及形态学观察 将获取的软

骨组织置于含青霉素(100 U/L)和链霉素(100 mg/L)的磷酸盐缓冲液(PBS)中切成 3~5 mm³ 左右小块,0.25% 胰蛋白酶孵育 15~20 min, PBS 浸洗 3 次,0.2% Ⅱ型胶原酶 37 °C 孵育 8~10 h。收集软骨细胞,以(1~5)×10⁵ mL⁻¹ 将细胞接种于 25 cm² 培养瓶内,置于 37 °C、体积分数为 5% CO₂ 培养箱中培养,此培养细胞为原代细胞。以后每 3 d 更换培养液,待原代细胞融合率达到 85%~90% 时,由原培养瓶内分离稀释后传到新的培养瓶,进行一次分离再培养称之为传一代(P1)。P1 软骨细胞用于以下所有细胞实验。软骨细胞培养过程中,通过倒置光学显微镜观察大骨节病和正常对照软骨细胞形态,利用细胞计数法计数细胞数量并绘制软骨细胞的生长曲线。

1.3.2 高糖干预软骨细胞后培养基中葡萄糖质量浓度的检测 实验分为正常软骨细胞+DMEM/F12 组、正常软骨细胞+DMEM/高糖组、大骨节病软骨细胞+DMEM/F12 组和大骨节病软骨细胞+DMEM/高糖组。以 1×10⁵/孔的密度将两种软骨细胞接种于 6 孔板,分别用 DMEM/F12 和 DMEM/高糖(4 500 mg/L)培养基培养。配制葡萄糖标准品,酶标仪 570 nm 波长检测吸光度,绘制标准曲线,分别计算软骨细胞培养 24 h、48 h、72 h 和 96 h 后培养基中葡萄糖的质量浓度。糖代谢越旺盛,培养基中剩余的葡萄糖质量浓度越低。

1.3.3 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测软骨细胞Ⅱ型胶原和蛋白多糖 mRNA 的表达 实验分组同 1.3.2。待 P1 细胞融合率达到 80%~90% 时,使用 Trizol 提取细胞总 RNA,逆转录合成 cDNA;Ⅱ型胶原、蛋白多糖和管家基因 GAPDH(内参)引物序列见表 1。在荧光定量 PCR 仪上进行变性、退火、延伸;反应条件为:95 °C,30 s;60 °C,30 s;95 °C,5 s,40 个循环。应用分析软件 Rotor-Gene 处理所得数据,2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因 mRNA 相对表达水平。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primers for qRT-PCR

Gene	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	TGGTGAAGACGCCAGTGGA
Type II collagen	CTGGCTCCCAACACTGCCAACGTC	TCCTTTGGGTTTGCAACGGATTGT
Aggrecan	CTCACTGCCCAACTACCC	CACGATGCCTTTCACCAC

1.3.4 软骨细胞中蛋白多糖的检测 实验分组同 1.3.2。待 P1 细胞融合率达到 50%~60% 时,制备细胞爬片:圆形盖玻片经过泡酸、高压灭菌后置于 12 孔板中,接种细胞,置于体积分数为 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱内培养。取 0.1 g 甲苯胺蓝溶解

在 100 mL 双蒸水中,滤纸过滤杂质成分制成甲苯胺蓝溶液。细胞爬片用体积分数为 4% 多聚甲醛溶液固定 15 min, PBS 清洗 2 次;甲苯胺蓝溶液浸染细胞爬片 30 s,弃掉甲苯胺蓝溶液,双蒸水轻轻冲洗;取出细胞爬片,晾干,中性树脂封片,显微镜下观

察拍照。蛋白多糖甲苯胺蓝染色可见细胞呈蓝紫色。

1.3.5 细胞凋亡检测 实验分组同 1.3.2。待 P1 细胞融合率达到 80%~90% 时,使用凋亡检测试剂盒,流式细胞术方法检测细胞凋亡。0.25% 胰酶加 0.02% EDTA(T/E) 消化收集细胞于 10 mL 离心管中;1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,预冷 PBS 重悬和洗涤,1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清;PBS 重悬细胞,并使其浓度为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 。加入 $5 \mu\text{L}$ Annexin V-FITC/PI 和 $1 \mu\text{L}$ PI 工作液($100 \mu\text{g}/\text{mL}$),室温避光染色 15 min。细胞悬液加于 5 mL 流式管中,流式细胞仪测定,利用 CellQuest 软件进行参数获取和资料分析。

1.3.6 细胞内 ROS 检测 实验分组同 1.3.2。待 P1 细胞融合率达到 70%~80% 时,使用 Carboxy- H_2DCFDA 试剂盒检测细胞内 ROS 含量。弃掉细胞培养液,PBS 清洗细胞 2 次;Carboxy- H_2DCFDA 工作液避光 37°C 孵育细胞 30 min,移除液体,PBS 清洗细胞 2 次; $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI 室温避光孵育 10 min;使用荧光显微镜直接观察,绿色荧光标识 ROS。T/E 消化细胞并收集液体于离心管;细胞悬液加于 5 mL 流式管中,流式细胞仪测定荧光强度,利用 CellQuest 软件进行参数获取和资料分析。

1.4 统计学方法

在每项实验中各样本均重复 3 次实验或设置 3 个复孔。符合正态分布的数据采用 t 检验,不符合正态分布的数据采用非参数检验, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 软骨细胞生长及其形态学观察

大骨节病软骨细胞生长比正常软骨细胞慢,正常软骨细胞在接种后第 9 天起进入对数生长期,第 17 天后开始缓慢增殖,进入平稳期。大骨节病软骨细胞在接种后第 11 天起进入对数生长期,第 17 天

后开始缓慢增殖,进入平稳期。大骨节病软骨细胞增殖能力低于正常软骨细胞,自接种后第 13 天起大骨节病软骨细胞与正常软骨细胞数目差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 1。

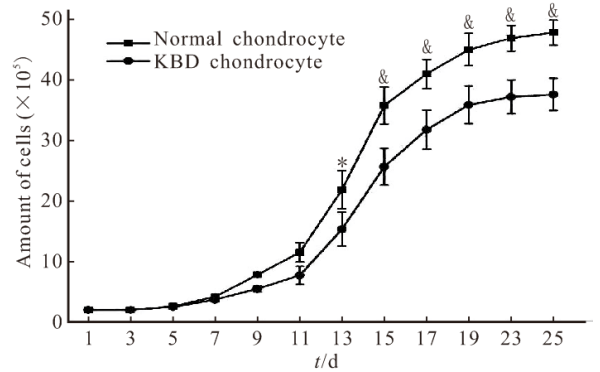


图 1 正常和大骨节病软骨细胞生长曲线

Fig 1 The growth curves of normal and KBD chondrocytes

* $P<0.05$, & $P<0.01$, vs. normal chondrocytes at the same time point

原代软骨细胞刚接种时为球形,2 h 后开始下沉,12 h 后开始贴壁,36 h 后大部分细胞贴壁,并开始分裂增殖。此时细胞呈饱满多角形,表面颗粒少;细胞汇合成片后,分泌一些细胞外基质,具有折光性。一般 5 d 左右细胞体积开始增大,向四周伸出粗大的突起,细胞形状呈长梭形、多边形、三角形等,细胞表面出现较多深色颗粒状分泌物。细胞密度随着培养时间的延长缓慢增加,正常软骨细胞 2 周时开始汇合,大骨节病软骨细胞生长较为缓慢,至 3 周左右才能接触汇合,且大骨节病软骨细胞体积小于正常软骨细胞。两种软骨细胞传代培养后生长明显加快, $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 接种于 25 cm^2 培养瓶,1~2 h 大部分细胞即可贴壁,1~2 周铺满瓶底融合生长。见图 2。

2.2 软骨细胞的葡萄糖代谢

结果见表 2。DMEM/F12 培养时,大骨节病软

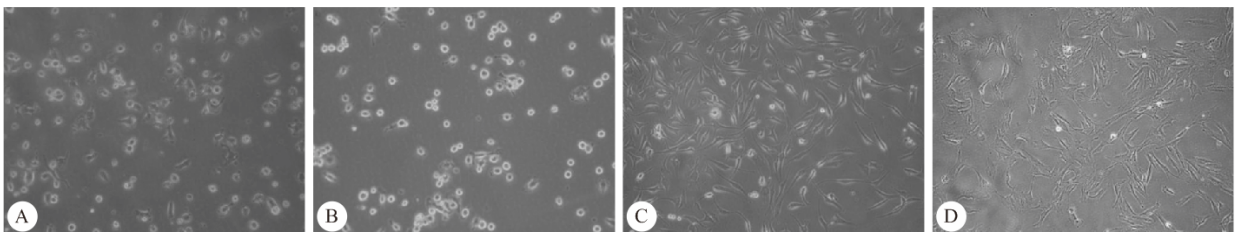


图 2 光学显微镜下正常和大骨节病软骨细胞形态。×200

Fig 2 Normal and KBD chondrocytes under the optical microscope. ×200

A, B: Primary normal (A) and KBD (B) chondrocytes cultured for 12 h; C, D: Primary normal (C) and KBD (D) chondrocytes cultured for 2 weeks

表 2 不同时间点软骨细胞培养液中的葡萄糖质量浓度/($\times 10^3$ mg/L), $\bar{x} \pm s$ Table 2 The concentrations of glucose in different culture mediums conditioned by time/($\times 10^3$ mg/L), $\bar{x} \pm s$

Time/h	n	DMEM/F12		P	DMEM/high glucose		P
		Normal	KBD		Normal	KBD	
0	6	3.20 \pm 0	3.20 \pm 0	>0.05	4.50 \pm 0	4.50 \pm 0	>0.05
24	6	2.90 \pm 0.23	2.85 \pm 0.21	>0.05	3.86 \pm 0.20	3.95 \pm 0.19	>0.05
48	6	2.79 \pm 0.18	2.54 \pm 0.26	<0.05	3.62 \pm 0.19	3.67 \pm 0.27	>0.05
72	6	2.55 \pm 0.24	2.30 \pm 0.19	<0.05	3.17 \pm 0.26	3.25 \pm 0.23	>0.05
96	6	2.12 \pm 0.20	1.78 \pm 0.25	<0.05	2.57 \pm 0.18	2.55 \pm 0.25	>0.05

骨细胞在培养 48 h 及以后对葡萄糖的代谢多于正常软骨细胞($P < 0.05$), 而高糖培养时不同时点大骨节病软骨细胞和正常软骨细胞对于葡萄糖的代谢量基本相同($P > 0.05$)。

2.3 高糖对软骨细胞外基质(Ⅱ型胶原和蛋白多糖)表达的影响

由图 3 可见, 正常条件(DMEM/F12 培养)下, 大骨节病软骨细胞Ⅱ型胶原和蛋白多糖的 mRNA 表达与正常软骨细胞表达量的比值分别为 0.66 ($P = 0.015$)和 0.74($P = 0.023$); 高糖培养条件下, 大骨节病软骨细胞Ⅱ型胶原和蛋白多糖的 mRNA 表达量与正常软骨细胞表达量的比值分别为 0.60 ($P < 0.001$)和 0.71($P = 0.012$), 即高糖增大了这两个基因在大骨节病软骨细胞和正常软骨细胞中的表达差异。

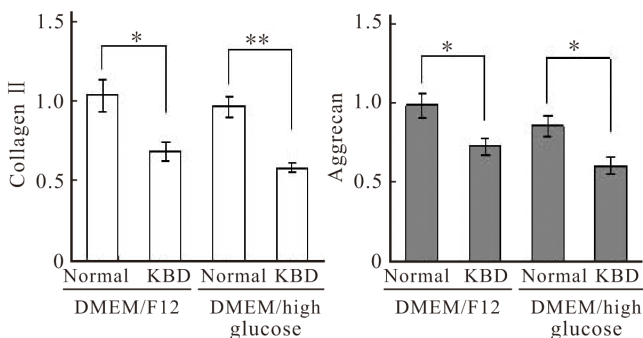


图 3 软骨细胞Ⅱ型胶原和蛋白多糖 mRNA 的表达

Fig 3 The mRNA expression levels of type II collagen and aggrecan in chondrocytes

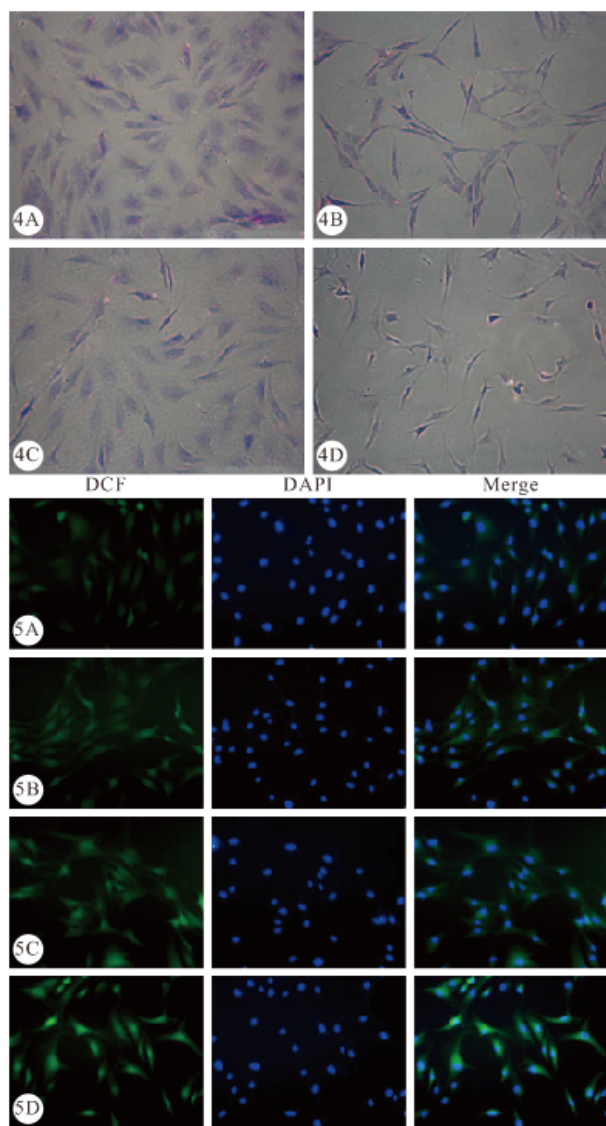
* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$

甲苯胺蓝染色结果显示(图 4), 正常培养基和高糖培养基两种环境下, 大骨节病软骨细胞中甲苯胺蓝染色程度均低于正常软骨细胞; 对于大骨节病软骨细胞和正常软骨细胞, 在正常培养基培养环境中甲苯胺蓝染色程度均高于高糖培养环境。这与蛋白多糖在 mRNA 水平的表达一致。

2.4 高糖对软骨细胞凋亡的影响

流式细胞术检测结果表明, DMEM/F12 培养

下, 大骨节病软骨细胞总凋亡率为 20.84%, 正常软骨细胞总凋亡率为 4.03%, 大骨节病软骨细胞凋亡

图 4 软骨细胞蛋白多糖的表达。甲苯胺蓝染色 $\times 200$ 图 5 细胞内 ROS 的 Carboxy-H₂DCFDA 荧光染色。 $\times 200$ Fig 4 The expression of aggrecan in chondrocytes. Toluidine blue staining $\times 200$ Fig 5 Intracellular ROS level in chondrocytes. Carboxy-H₂DCFDA staining $\times 200$

A, C: Normal chondrocytes; B, D: KBD chondrocytes; A, B: DMEM/F12; C, D: DMEM/high glucose

率较高($P < 0.001$);高糖培养后两种软骨细胞的凋亡率均增加,分别为 27.55%和 10.52%,大骨节病软骨细胞凋亡率仍较高($P = 0.003$);且高糖培养下两种软骨细胞的凋亡率均高于 DMEM/F12 培养下的细胞凋亡率($P < 0.05$)。

2.5 高糖对软骨细胞 ROS 产生的影响

Carboxy-H₂DCFDA 荧光染色图片中,蓝色荧光为 DAPI 荧光,标识细胞核,绿色荧光为 DCF 荧光,标识 ROS。荧光探针检测细胞内 ROS 显示(图 5),A、B、C、D 各组的 DCF 荧光依次增强,即 ROS 含量依次增多。在正常培养和高糖培养条件下,大骨节病软骨细胞中的 ROS 含量均高于正常软骨细胞,且分别为正常软骨细胞的 1.70 倍($P = 0.028$)和 1.37 倍($P = 0.024$);高糖培养增加软骨细胞中 ROS 的含量,正常软骨细胞和大骨节病软骨细胞中 ROS 含量分别增加至正常培养时的 1.51 倍($P = 0.037$)和 1.22 倍($P = 0.041$)。

3 讨论

本研究结果显示,大骨节病中葡萄糖代谢异常影响软骨细胞功能。体外培养的大骨节病软骨细胞生长速度和增殖能力均低于正常软骨细胞($P < 0.05$),反映了大骨节病软骨细胞中细胞代谢能力下降。DMEM/F12 培养时,大骨节病软骨细胞对于葡萄糖的代谢量明显多于正常软骨细胞($P < 0.05$);高糖干预培养时,大骨节病和正常软骨细胞在高糖环境中对葡萄糖的代谢本应延缓正常培养下的趋势(即大骨节病软骨细胞的葡萄糖代谢量多于正常软骨细胞),但两者的代谢量却基本相同($P > 0.05$)。此结果说明,相比正常软骨细胞,大骨节病软骨细胞对于外环境中葡萄糖质量浓度变化的适应性调控能力降低。软骨细胞处于无氧环境,葡萄糖是其主要的能源物质,为软骨细胞细胞外基质合成和细胞内环境稳定提供能源^[5]。当葡萄糖代谢发生紊乱时,必将影响软骨细胞的功能。

葡萄糖及其衍生的糖类(如硫酸氨基葡萄糖)在软骨的发育、稳定、修复和重塑中具有重要作用,糖代谢的紊乱必将引起软骨组织及软骨细胞功能的改变。微环境中葡萄糖质量浓度的改变会对作为软骨细胞结构基础的细胞外基质产生影响。大骨节病关节软骨表层已经发生软骨细胞的“去分化”和细胞外基质降解,以 II 型胶原合成减少和新合成 I 和 III 型胶原为特点,同时伴随蛋白多糖的降解^[6-7]。本研究亦显示,大骨节病软骨细胞中蛋白多糖和 II 型胶

原的表达低于正常软骨细胞;高糖干预后,大骨节病软骨细胞 II 型胶原和蛋白多糖的表达量进一步下降。因此得出,大骨节病软骨细胞中葡萄糖的堆积对于 II 型胶原和蛋白多糖具有毒性作用,可以阻碍两者的合成或加速两者的丢失。II 型胶原合成不足或降解丢失后,其网状结构被破坏,无法阻挡蛋白多糖聚合大量水而产生的膨胀力量,关节软骨组织出现肿胀,肿胀的软骨对负荷的承受力显著下降。

许多细胞类型中都可见葡萄糖的转运和代谢修饰与程序性细胞死亡有关。本研究证实,紊乱的葡萄糖代谢和细胞凋亡有关,不论是对于正常软骨细胞还是大骨节病软骨细胞,高糖均可诱导细胞凋亡。同样有研究证实,高糖通过氧化应激途径诱导细胞凋亡^[8-9]。葡萄糖可通过以下几条途径诱导细胞的凋亡:①葡萄糖代谢障碍或剥离使得 ATP 衰竭,轻微的 ATP 衰竭激活线粒体途径的细胞死亡,严重的 ATP 衰竭就会导致细胞坏死^[10];②葡萄糖代谢障碍或剥离导致氧化应激;③糖代谢通过缺氧诱导因子(HIF)-1 α 诱导 p53 信号通路的细胞死亡^[11]。软骨细胞死亡已是公认的骨关节病中细胞外基质障碍的重要影响因素,也是大骨节病的重要病理特征和发病机制。

紊乱的糖代谢与 ROS 的产生以及氧化应激有关^[12],高糖环境下,ROS 产物的含量增多。一方面,高糖使得运送进细胞的代谢底物增多,物质的过负荷压制电子传递链,线粒体氧化磷酸化解耦联过程失衡,线粒体去极化产生大量的 ROS;另一方面,高糖条件下线粒体的形态变化是高糖产生 ROS 过负荷的另一个途径^[13-15]。暴露于高糖环境中,线粒体被裂变遭受快速的碎片化,呼吸链活性提高,线粒体去极化,诱导产生更多的 ROS^[16]。ROS 本身也是一种凋亡启动信号。另外,高糖暴露产生过量的 ROS 对于软骨细胞的毒性作用还体现在 ROS 对于软骨细胞蛋白多糖和胶原蛋白降解的诱导,以及软骨组织的老化方面。

综上所述,大骨节病中紊乱的糖代谢影响软骨细胞功能,抑制大骨节病软骨细胞表达 II 型胶原和蛋白多糖,并增加细胞凋亡和氧化应激反应。上述结果为了解大骨节病软骨损伤的机制提供了有力的依据。

参 考 文 献

- [1] HINSENKAMP M. Kashin-Beck disease. *Int Orthop*, 2001, 25(3):133. (下转第 270 页)

- [28] KOOB GF. Dynamics of neuronal circuits in addiction: reward, antireward, and emotional memory. *Pharmacopsychiatry*, 2009, 42 Suppl 1: S32-S41.
- [29] KING AC, BERNARDY NC, HAUNER K. Stressful events, personality, and mood disturbance: gender differences in alcoholics and problem drinkers. *Addict Behav*, 2003, 28(1): 171-187.
- [30] 张美霞, 张秀丽, 张瑞岭. 酒依赖患者复饮原因调查与分析. *中国药物滥用防治杂志*, 2013, 19(4): 203-205.
- [31] HASIN DS, GOODWIN RD, STINSON FS, *et al.* Epidemiology of major depressive disorder: results from the National Epidemiologic Survey on Alcoholism and Related Conditions. *Arch General Psychiatry*, 2005, 62(10): 1097-1106.
- [32] HASIN DS, STINSON FS, OGBURN E, *et al.* Prevalence, correlates, disability, and comorbidity of DSM-IV alcohol abuse and dependence in the United States: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *Arch General Psychiatry*, 2007, 64(7): 830-842.
- [33] MCKAY JR. Negative mood, craving, and alcohol relapse: can treatment interrupt the process? *Curr Psychiatry Rep*, 2011, 13(6): 431-433.
- [34] 郝伟. 酒精相关障碍的诊断与治疗指南. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 96-117.

(2017-08-29 收稿, 2017-12-10 修回)

编辑 汤洁

(上接第 225 页)

- [2] GUO X, ZUO H, CAO CX, *et al.* Abnormal expression of Col X, PTHrP, TGF- β , bFGF, and VEGF in cartilage with Kashin-Beck disease. *J Bone Miner Metab*, 2006, 24(4): 319-328.
- [3] YAMAMURO T. Kashin-Beck disease: a historical overview. *Int Orthop*, 2001, 25(3): 134-137.
- [4] PASTEELS J, LIU FD, HINSENKAMP M, *et al.* Histology of Kashin-Beck lesions. *Int Orthop*, 2001, 25(3): 151-153.
- [5] MOBASHERI A, VANNUCCI SJ, BONDY CA, *et al.* Glucose transport and metabolism in chondrocytes: a key to understanding chondrogenesis, skeletal development and cartilage degradation in osteoarthritis. *Histol Histopathol*, 2002, 17(4): 1239-1267.
- [6] GAO ZQ, GUO X, DUAN C, *et al.* Altered aggrecan synthesis and collagen expression profiles in chondrocytes from patients with Kashin-Beck disease and osteoarthritis. *J Int Med Res*, 2012, 40(4): 1325-1334.
- [7] WANG W, GUO X, CHEN J, *et al.* Morphology and phenotype expression of types I, II, III, and X collagen and MMP-13 of chondrocytes cultured from articular cartilage of Kashin-Beck disease. *J Rheumatol*, 2008, 35(4): 696-702.
- [8] QUAGLIARO L, PICONI L, ASSALONI R, *et al.* Intermittent high glucose enhances apoptosis related to oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells: the role of protein kinase C and NAD(P)H-oxidase activation. *Diabetes*, 2003, 52(11): 2795-2804.
- [9] SUSZTAK K, RAFF AC, SCHIFFER M, *et al.* Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. *Diabetes*, 2006, 55(1): 225-233.
- [10] KIM WH, LEE JW, SUH YH, *et al.* Exposure to chronic high glucose induces beta-cell apoptosis through decreased interaction of glucokinase with mitochondria: downregulation of glucokinase in pancreatic beta-cells. *Diabetes*, 2005, 54(9): 2602-2611.
- [11] FULDA S, DEBATIN KM. HIF-1-regulated glucose metabolism: a key to apoptosis resistance? *Cell Cycle*, 2007, 6(7): 790-792.
- [12] KANG BP, FRENCHER S, REDDY V, *et al.* High glucose promotes mesangial cell apoptosis by oxidant-dependent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003, 284(3): 455-466.
- [13] HAN HJ, LEE YJ, PARK SH, *et al.* High glucose-induced oxidative stress inhibits Na⁺/glucose cotransporter activity in renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005, 288(5): 988-996.
- [14] ZHU X, LING G, XIAO L, *et al.* Role of mitochondrial respiratory chain complex III in high glucose peritoneal dialysate-induced hyperpermeability of HPMCs. *Ren Fail*, 2010, 32(9): 1103-1108.
- [15] RUSSELL JW, GOLOVOY D, VINCENT AM, *et al.* High glucose-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurons. *FASEB J*, 2002, 16(13): 1738-1748.
- [16] YU T, ROBOTHAM JL, YOON Y. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(8): 2653-2658.

(2017-09-01 收稿, 2017-12-13 修回)

编辑 余琳