

康复新液对兔膝关节炎软骨缺损模型的修复作用及机制研究[△]

王涛^{1*}, 郭英¹, 殷红², 唐晓霞¹, 廖江龙¹, 黄文泽¹, 许燕飞¹, 艾元亮¹, 李金磊¹, 温辉¹, 杨景帆^{1#}(1. 云南中医学院第三附属医院/昆明市中医医院, 昆明 650500; 2. 云南中医学院, 昆明 650200)

中图分类号 R684.3; R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)02-0197-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.02.11

摘要 目的: 探讨康复新液对兔膝骨性关节炎(KOA)软骨缺损模型的修复作用及其机制。方法: 取雄性新西兰兔72只, 随机分为模型对照组和康复新低、中、高剂量组, 每组18只。采用麻醉后手术钻孔的方式造成兔右膝关节股骨内侧髁软骨缺损模型, 然后立即在软骨缺损处进行关节腔注射给药, 康复新低、中、高剂量组分别给予体积分数为20%、40%、80%的康复新液, 模型对照组给予等体积生理盐水, 0.2 mL/kg, 每3天1次持续给药。于给药后第4、8、12周时, 观察兔软骨缺损伤口修复情况; 于给药完毕即刻和给药后第4、8、12周时, 结合Wakitani评分标准对兔软骨缺损处修复组织进行组织学评分; 于给药后第12周, 采用Masson染色法观察兔关节软骨缺损处修复组织的病理学变化; 采用酶联免疫吸附法检测兔关节液中一氧化氮(NO)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化脂质(LPO)和尿液中吡啶酚(PYD)水平。结果: 给药后第4、8、12周时, 与模型对照组比较, 康复新低、中、高剂量组兔软骨缺损区修复情况较好; 给药后第4、8、12周时, 与给药完毕即刻及同时时间点的模型对照组比较, 康复新低、中、高剂量组兔膝关节软骨缺损处修复组织形态学评分均显著降低($P < 0.05$); 给药后第12周时, 与模型对照组比较, 康复新低、中、高剂量组兔膝关节软骨缺损处组织病理学程度明显减轻; 给药后第4、8、12周时, 与模型对照组比较, 康复新低、中、高剂量组兔关节液中NO、LPO和尿液中PYD水平均有不同程度地降低, SOD水平均有不同程度地升高, 到给药第12周时, 各指标差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: 康复新液对KOA软骨缺损模型兔的软骨损伤具有明显的修复作用, 其作用机制主要与提高SOD表达并介导NO抑制软骨细胞凋亡有关。

关键词 康复新液; 兔; 软骨缺损; 修复作用; 机制; 一氧化氮; 超氧化物歧化酶; 过氧化脂质; 吡啶酚

Study on Repairing Effect of Kangfuxin Liquid on Cartilage Defect of Knee Osteoarthritis Model Rabbits and Its Mechanisms

WANG Tao¹, GUO Ying¹, YIN Hong², TANG Xiaoxia¹, LIAO Jianglong¹, HUANG Wenzhe¹, XU Yanfei¹, AI Yuanliang¹, LI Jinlei¹, WEN Hui¹, YANG Jingfan¹(1. The Third Affiliated Hospital of Yunnan College of TCM/Kunming Hospital of TCM, Kunming 650500, China; 2. Yunnan College of TCM, Kunming 650200, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the effects of Kangfuxin liquid on repairing cartilage defect model of knee osteoarthritis (KOA) in rabbits and its mechanism. METHODS: Totally 72 male New Zealand rabbits were selected and randomly divided into model control group and Kangfuxin low-dose, medium-dose, high-dose groups, with 18 rabbits in each group. A cartilage defect model of the medial femoral condyle of the right knee joint in rabbits was established by drilling after anesthesia surgery. Then the rabbits in each group were given medicine via articular cavity immediately. Kangfuxin low-dose, middle-dose and high-dose groups were given 20%, 40%, 80% Kangfuxin liquid; model control group was given constant volume of normal saline consecutively, 0.2 mL/kg, once every 3 days. At 4th, 8th, 12th week after medication, the wound repair of cartilage defect in rabbits was observed. Immediately after medication and at 4th, 8th, 12th week after medication, repaired tissue of cartilage defect in rabbits was scored histologically with Wakitani scoring standard under light microscope. At 12th week after medication, pathological changes of repaired tissue of cartilage defect in rabbits were observed by Masson staining. The levels of NO, SOD and LPO in joint fluid and PYD in urine of rabbits were detected by ELISA. RESULTS: At 4th, 8th, 12th week after medication, compared with model control group, cartilage defects in rabbits were repaired well in Kangfuxin low-dose, medium-dose and high-dose groups. At 4th, 8th, 12th week after medication, compared with immediately after medication and model control group at same time point, histomorphological score of repairing cartilage defect of knee joint in rabbits decreased significantly in Kangfuxin low-dose, medium-dose and high-dose groups ($P < 0.05$). At 12th week after medication, compared with model control group, the histopathology degree of cartilage defect of knee joint in rabbits was significantly alleviated in Kangfuxin low-dose,

[△] 基金项目: 云南省科技计划项目——省应用基础研究-中医联合专项[No.2015FB205-(037)]

* 主治医师, 硕士。研究方向: 退行性关节病的防治。电话: 0871-63804622。E-mail: wt_w@163.com

通信作者: 主任医师, 硕士。研究方向: 运动医学及关节外科。电话: 0871-63129364。E-mail: 1005246919@qq.com

medium-dose and high-dose groups. At 4th, 8th, 12th week after medication, compared with model control group, the levels of NO and LPO in joint fluid and PYD level in urine were decreased to different extent in Kangfuxin low-dose, medium-dose and high-dose groups, while SOD level was increased to different extent; at 12th week after medication,

the difference of each index has statistical significance ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). CONCLUSIONS: Kangangxin liquid can significantly repair cartilage defect of KOA cartilage defect model rabbits, the mechanism of which may be associated with increasing the expression of SOD and mediating NO-inhibited chondrocyte apoptosis.

KEYWORDS Kangangxin liquid; Rabbits; Cartilage defect; Repairing effect; Mechanism; NO; SOD; LPO; PYD

膝骨性关节炎(Knee osteoarthritis, KOA)是以关节软骨退变、骨质硬化及增生为病理特征的一种骨关节疾病,具有高发病率、高复发率、高耐药性的特点;而覆盖在膝关节表面的膝关节软骨由于不含血管、神经或淋巴组织,一旦出现损伤,则其自愈能力相当有限^[1]。关节腔内注射药物是治疗KOA的主要方法之一,经实践验证其疗效显著^[2-3]。康复新液是以蜚蠊(俗称蟑螂)为主药的一种生物制剂^[4],《神农本草经》记载:蜚蠊“味、咸、寒,生川泽,治血癖症坚、寒热,破积聚,喉咽痹,内寒无子”。现代药理研究表明,康复新液在炎症介质诱导下能迅速产生或促使多种体液免疫因子参与抑菌,能促进非特异免疫细胞分泌创伤修复因子,促进伤口愈合,还能加快骨修复启动进程^[5],但其作用机制尚未完全明确。现代医学认为,骨关节炎是多种因素参与介导的慢性炎症反应,其致病因素主要与软骨细胞凋亡有关^[6]。基于此,本研究通过建立兔KOA软骨缺损模型,考察在关节腔注射康复新液对兔关节软骨病理性改变的影响;同时,通过检测兔关节液中的一氧化氮(NO)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化脂质(LPO)与尿液中吡啶酚(PYD)水平的变化,旨在探讨康复新液防治KOA的作用机制是否与软骨细胞凋亡有关。

1 材料

1.1 仪器

BM-VII型生物组织包埋机(湖北省宏业医用仪器有限公司);KH-Q350型切片机(河南海阔医疗器械有限公司);64R型低温高速离心机(美国Beckman公司);ELx808型酶联免疫检测仪(美国Biotek公司);CKX53型倒置显微镜(日本Olympus公司);立式320L型超低温冰箱(杭州艾普仪器设备有限公司)。

1.2 药品与试剂

康复新液(四川好医生攀西药业有限责任公司,批准文号:国药准字Z51021834,规格:10 mL/瓶);Masson三色染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号:G1340);兔NO、SOD、LPO、PYD酶联免疫检测试剂盒(上海恪敏生物科技有限公司,批号均为H8021);pH 7.4磷酸盐缓冲液[PBS,赛默飞世尔科技(中国)有限公司];其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为双蒸水。

1.3 动物

健康成年新西兰兔72只,雄性,清洁级,5~6月龄,体质量1.5~2.5 kg,购自四川省医学科学院实验动物研究所[动物生产许可证号:SCXK(湘)2013-0004,合格证

号:0002777]。动物在实验前适应性饲养1周,自由饮食,环境温度(22 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,每天12 h光照(8:00—20:00)。

2 方法

2.1 分组、造模、给药与取样

取兔72只,随机分为模型对照组和康复新低、中、高剂量组,每组18只。依据改良型关节刻痕法^[1,5]建立膝关节软骨缺损模型:3%戊巴比妥钠溶液经兔耳缘静脉麻醉(1 mL/kg),剃毛,常规消毒右下肢;沿髌骨内缘切口,分离皮下组织,切断内侧关节囊,暴露关节腔;膝关节过伸,向外侧脱位髌骨,用2.0 mm克氏针手钻在膝股骨内侧髁中心钻孔(直径:3 mm),造成兔股骨内侧髁软骨缺损;然后立即在各组兔软骨缺损处进行关节腔注射给药,0.2 mL/kg,每3天1次持续给药。按人用剂量换算后,对康复新低、中、高剂量组兔分别给予体积分数分别为20%、40%、80%的康复新液(用含10%胎牛血清的DMEM培养液进行稀释,在超净台上用0.22 μm 一次性过滤器过滤除菌, -20°C 保存,备用),模型对照组兔给予等体积生理盐水。

各组兔在给药完毕即刻和给药后第4、8、12周时取尿液待测;同时,沿兔髌骨内缘作纵行切口,逐层分离至关节囊,反复屈伸关节以便将关节液挤压至髌上囊内侧,在关节液最集中处轻轻划开关节囊,注入生理盐水1.5 mL,反复抽吸后将关节液尽量抽出,在 4°C 下以15 000 r/min离心15 min,取上清液,保存于 -80°C ,待测。各组兔在上述时间点分别处死2只,剥离软骨缺损周围组织,在距缺损处上、下、左、右端至少1 mm左右,用钢锯截取标本,进行骨修复组织的形态学评分和病理学观察。取材前动物均禁食不禁水10 h。

2.2 各组兔膝关节软骨缺损区修复情况观察

肉眼观察各组兔在软骨缺损模型制备完成后的一般情况,并分别于给药后第4、8、12周时观察兔软骨缺损伤口修复情况。

2.3 各组兔膝关节软骨缺损处修复组织的形态学评分

分别于给药完毕即刻及给药后第4、8、12周时,在显微镜下对兔软骨缺损处修复组织的软骨厚度、基质异染性、表面规则性以及填充软骨与周围软骨的结合情况进行观察,并结合Wakitani评分标准^[1,6]进行组织学评分(总分0~10分,得分越高,则表明软骨缺损修复越差):(1)软骨厚度 $>2/3$ 计0分, $1/3 \sim 2/3$ 计1分, $<1/3$ 计2分。(2)对软骨组织进行苏木精-伊红(HE)染色后评判基质异染性:正常计0分,轻度减少计1分,明显减少计2分,无异染性着色计3分。(3)表面规则性:光滑 $>3/4$ 计0

分,中等1/2~3/4计1分,不规则1/4~1/2计2分,特别不规则<1/4计3分。(4)填充软骨与周围软骨两边缘结合计0分,仅一边结合计1分,两边均未结合计2分。

2.4 各组兔膝关节软骨缺损处修复组织的病理学观察

于给药后第12周,采用经典Masson染色法^[7]对软骨缺损处组织进行染色。取兔膝关节软骨缺损处组织,石蜡包埋,切片(厚度4 μm);切片置于载玻片上,常规脱蜡,梯度乙醇脱水;复合性染液(1%桔黄G染色液+苦味酸酶染色液)染色30 min,水洗;苏木精核染15 min,水洗;复合性染液(丽春红+酸性复红染色液)染色10 min,水洗;1%磷钨酸分化10 min,水快洗;1%亚甲蓝染液染色15 min;95%乙醇分色,乙醇快速脱水;二甲苯透明,中性树胶封片后,在显微镜下观察修复组织的病理学变化。

2.5 各组兔关节液中NO、SOD、LPO和尿液中PYD水平检测

采用酶联免疫吸附法检测兔关节液中NO、SOD、LPO和尿液中PYD水平,按相应检测试剂盒的说明书步骤操作。

2.6 统计学方法

采用GraphPad prism 5.0软件对数据进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组兔一般情况及膝关节缺损区修复情况

各组兔在软骨缺损模型建立完成后,一般情况均相对良好:伤口无红肿,伤口周围皮温正常。

给药后各组兔软骨缺损伤口愈合情况如下:第4周时,模型对照组兔软骨缺损伤口凹陷明显,可见肉芽组织;康复新低、中、高剂量组兔软骨缺损伤口均凹陷明显,可见白色骨样组织。给药后第8周时,模型对照组兔软骨缺损伤口处可见少量填充软骨;康复新低、中剂量组兔软骨缺损伤口处可见适量填充软骨;康复新高剂量组兔软骨缺损伤口处可见少量骨赘形成。给药后第12周时,模型对照组兔软骨缺损伤口处凹凸不平;康复新低剂量组兔软骨缺损区填平,表面粗糙;康复新中剂量组兔软骨缺损区填平,但表面欠光滑;康复新高剂量组兔关节软骨结构良好,缺损区填平,且表面较光滑。

3.2 各组兔膝关节软骨缺损处修复组织的形态学评分结果

与给药完毕即刻比较,给药后第4、8、12周时模型对照组以及康复新低、中、高剂量组兔膝关节软骨缺损处修复组织的形态学评分均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与同时时间点的模型对照组比较,康复新低、中、高剂量组兔膝关节软骨缺损处修复组织的形态学评分均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。各组兔膝关节软骨缺损处修复组织的形态学评分结果

见表1。

表1 各组兔膝关节软骨缺损处修复组织的形态学评分结果($\bar{x} \pm s, n=2$,分)

Tab 1 Results of histomorphological score of repairing cartilage defect of knee joint in rabbits of each group ($\bar{x} \pm s, n=2$, score)

组别	给药完毕即刻	给药后第4周	给药后第8周	给药后第12周
模型对照组	12.68±1.03	10.01±0.83*	9.85±0.63*	9.11±0.91*
康复新低剂量组	12.78±1.04	9.82±0.89**	7.76±0.93**	4.63±1.01**
康复新中剂量组	12.72±0.98	9.61±0.19**	6.96±0.34**	4.04±0.43**
康复新高剂量组	12.69±1.12	9.03±1.18**	5.03±1.04**	3.60±0.57**

注:与给药完毕即刻比较,* $P < 0.05$;与模型对照组比较,** $P < 0.05$

Note: vs. immediately after medication, * $P < 0.05$; vs. model control group, ** $P < 0.05$

3.3 各组兔膝关节软骨缺损处组织病理学变化情况

给药后第12周时,模型对照组兔膝关节软骨缺损处组织的软骨细胞少且分泌的胶原纤维很少,有大量的纤维素生成且排列紊乱;康复新低剂量组兔膝关节软骨缺损处修复组织的软骨细胞排列紊乱,软骨细胞分泌的胶原纤维较少;康复新中剂量组兔膝关节软骨缺损处修复组织的细胞排列相对规律,软骨细胞较多但分泌的胶原纤维较少,纤维素较多但排列相对规律;康复新高剂量组兔膝关节软骨缺损处修复组织的细胞排列规律,软骨细胞多且排列规律,胶原纤维较多但纤维素明显减少。各组兔膝关节软骨缺损处组织病理学变化显微图见图1。

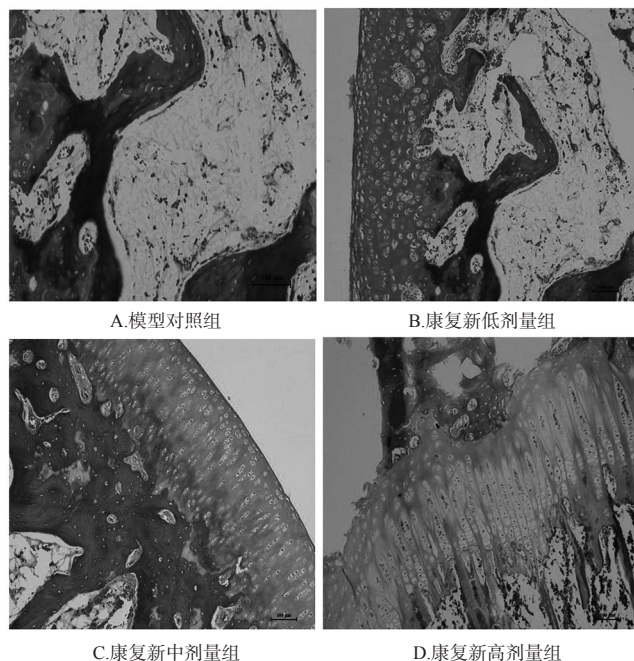


图1 各组兔膝关节软骨缺损处组织病理学变化显微图(Masson染色,×100)

Fig 1 Pathological micrographs of cartilage defect of knee joint in rabbits of each group (Masson staining, ×100)

3.4 各组兔关节液中NO、SOD、LPO和尿液中PYD水平检测结果

给药完毕即刻,各组兔关节液中NO、SOD、LPO和尿液中PYD水平组间比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。给药后第4周时,与模型对照组比较,康复新各剂量组兔关节液中NO、LPO和尿液中PYD水平均有不同程度地降低,SOD水平均有不同程度地升高;其中,康复新中、高剂量组兔关节液中NO、SOD、LPO水平,以及康复新高剂量组兔尿液中PYD水平与模型对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。给药后第8周时,与模型对照组比较,康复新各剂量组兔关节液中NO、LPO和尿液中PYD水平均有不同程度地降低,SOD水平均有不同程度地升高;其中,康复新低、中、高剂量组兔关节液中SOD水平,以及康复新中、高剂量组兔关节液中NO、LPO和尿液中PYD水平与模型对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。给药后第12周时,与模型对照组比较,康复新各剂量组兔关节液中NO、LPO和尿液中PYD水平均显著降低,SOD水平均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。给药完毕即刻和给药后第4、8、12周时各组兔关节液中NO、SOD、LPO和尿液中PYD水平检测结果见表2~表5。

表2 给药完毕即刻各组兔关节液中NO、SOD、LPO和尿液中PYD水平检测结果($\bar{x} \pm s, n = 18$)

Tab 2 The levels of NO, SOD and LPO in joint fluid and PYD in urine of rabbits of each group immediately after medication ($\bar{x} \pm s, n = 18$)

组别	关节液			尿液PYD, ng/mL
	NO, $\mu\text{mol/L}$	SOD, U/mL	LPO, nmol/mL	
模型对照组	14.72 \pm 1.34	117.1 \pm 10.4	1.72 \pm 0.31	0.84 \pm 0.22
康复新低剂量组	14.83 \pm 1.33	118.3 \pm 10.5	1.75 \pm 0.33	0.85 \pm 0.20
康复新中剂量组	14.53 \pm 1.42	116.5 \pm 9.6	1.69 \pm 0.34	0.87 \pm 0.24
康复新高剂量组	14.24 \pm 1.33	116.4 \pm 9.7	1.70 \pm 0.33	0.87 \pm 0.19

表3 给药后第4周时各组兔关节液中NO、SOD、LPO和尿液中PYD水平检测结果($\bar{x} \pm s, n = 16$)

Tab 3 The levels of NO, SOD and LPO in joint fluid and PYD in urine of rabbits of each group at 4th week after medication ($\bar{x} \pm s, n = 16$)

组别	关节液			尿液PYD, ng/mL
	NO, $\mu\text{mol/L}$	SOD, U/mL	LPO, nmol/mL	
模型对照组	17.23 \pm 1.54	118.4 \pm 9.7	2.26 \pm 0.37	1.23 \pm 0.33
康复新低剂量组	16.82 \pm 1.63	123.5 \pm 10.6	1.99 \pm 0.43	1.19 \pm 0.40
康复新中剂量组	16.11 \pm 1.43*	129.3 \pm 10.5*	1.75 \pm 0.45*	1.17 \pm 0.43
康复新高剂量组	15.91 \pm 1.32*	132.4 \pm 11.8**	1.74 \pm 0.47*	1.01 \pm 0.22*

注:与模型对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. model control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

4 讨论

康复新液能改善血液循环,促进肉芽样组织生长活跃,使成纤维母细胞相对密集,刺激骨生长因子分泌与

表4 给药后第8周时各组兔关节液中NO、SOD、LPO和尿液中PYD水平检测结果($\bar{x} \pm s, n = 14$)

Tab 4 The levels of NO, SOD and LPO in joint fluid and PYD in urine of rabbits of each group at 8th week after medication ($\bar{x} \pm s, n = 14$)

组别	关节液			尿液PYD, ng/mL
	NO, $\mu\text{mol/L}$	SOD, U/mL	LPO, nmol/mL	
模型对照组	16.74 \pm 1.44	117.3 \pm 9.9	2.15 \pm 0.35	1.25 \pm 0.36
康复新低剂量组	16.73 \pm 1.53	120.3 \pm 9.6*	1.94 \pm 0.37	1.18 \pm 0.33
康复新中剂量组	15.53 \pm 1.32*	122.1 \pm 10.7*	1.72 \pm 0.39**	0.97 \pm 0.32*
康复新高剂量组	15.21 \pm 1.10**	130.4 \pm 11.5**	1.72 \pm 0.37**	0.83 \pm 0.27**

注:与模型对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. model control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表5 给药后第12周时各组兔关节液中NO、SOD、LPO和尿液中PYD水平检测结果($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Tab 5 The levels of NO, SOD and LPO in joint fluid and PYD in urine of rabbits of each group at 12th week after medication ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	关节液			尿液PYD, ng/mL
	NO, $\mu\text{mol/L}$	SOD, U/mL	LPO, nmol/mL	
模型对照组	17.13 \pm 1.62	114.3 \pm 9.1	2.19 \pm 0.38	1.28 \pm 0.42
康复新低剂量组	15.83 \pm 1.43*	120.2 \pm 9.5*	1.87 \pm 0.39*	1.02 \pm 0.29*
康复新中剂量组	15.23 \pm 1.32**	121.1 \pm 10.1*	1.75 \pm 0.40**	0.94 \pm 0.31*
康复新高剂量组	15.12 \pm 1.14**	129.8 \pm 11.6**	1.64 \pm 0.32**	0.73 \pm 0.25**

注:与模型对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. model control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

合成,加快骨修复启动进程,在骨修复启动阶段能发挥一定作用^[1]。KOA治疗指南指出:化学药可缓解KOA患者疼痛、改善关节活动度,但不能抑制KOA的进展,更不能修复关节软骨损伤^[8-9]。而既往临床实践已证实,中医药可延缓关节软骨退变,保护关节软骨,延缓KOA的发展。本研究结果显示,康复新液给药后第12周时,模型对照组兔软骨缺损伤口处凹凸不平,而康复新各剂量组兔软骨缺损区填平或结构恢复良好,表面粗糙或较光滑。给药后第4、8、12周时模型对照组和康复新各剂量组兔膝关节软骨缺损处修复组织形态学评分均显著降低,而康复新各剂量组的组织形态学评分较之模型对照组也显著降低。组织病理学观察结果显示,给药后第12周时,不同剂量的康复新液对软骨缺损处软骨细胞排列、软骨细胞分泌胶原纤维均有影响。上述实验结果表明,康复新液能有效促进软骨生长,加快KOA模型兔软骨损伤的修复。

软骨细胞凋亡是骨关节炎最关键的发病机制之一^[10]。在骨关节炎的发展过程中,自由基的增加与细胞凋亡呈正相关^[11]。NO兼具信息传导和细胞毒性因子功能,具有广泛的生理作用:过量的NO会增强胶原酶和金属蛋白酶活性,抑制基质蛋白多糖合成,增加蛋白聚糖和胶原的裂解;NO水平的升高又可协同各种细胞因子发挥作用,从而抑制软骨细胞增殖,促进软骨细胞糖酵解及

凋亡,引起骨质破坏,加剧骨关节炎的发展^[12]。LPO则是自由基脂质过氧化反应的代谢产物,能损伤细胞及细胞膜的结构,可间接反映出自由基对组织细胞的损伤程度;加之自由基的增加与细胞凋亡呈正相关,因此LPO水平的升高又能从侧面反映出骨关节炎炎症程度及软骨细胞凋亡情况^[13]。SOD是体内清除氧自由基的重要酶,能通过歧化作用清除氧自由基,保护滑膜和软骨细胞免受损伤;SOD还能通过阻断细胞色素C依赖的线粒体凋亡途径来保护细胞^[14]。已有研究证实,减少NO、LPO的产生能抑制软骨细胞凋亡^[13],提高SOD的活性能改善软骨细胞代谢^[15]。本研究结果显示,与给药完毕即刻比较,给药后各时间点模型对照组兔关节液中NO、LPO水平均呈升高趋势;给予康复新液干预后,兔关节液中NO、LPO水平显著降低,而SOD水平显著升高。因此,笔者推测康复新液对KOA模型兔软骨损伤的修复作用可能是通过抑制脂质过氧化反应而减少自由基的产生,增加SOD表达从而促进自由基的清除,最终减少自由基、抑制软骨细胞凋亡,从而起到保护和修复软骨组织的作用。

PYD是一种存在于软骨中的胶原纤维连接物,也是临床常用的骨吸收标志物;在发生关节损伤后,胶原中的PYD会被释放至循环系统中,继而随尿液排出,其尿液水平的升高可用于评估骨降解程度进而判断KOA病情进展情况^[16]。本实验结果显示,与给药完毕即刻比较,给药后各时间点模型对照组兔尿液中PYD水平均呈升高趋势;给予康复新液干预后,兔尿液中PYD水平显著降低,表明康复新液能有效修复兔软骨损伤。

综上,康复新液对膝关节软骨缺损模型兔的软骨损伤具有明显的修复作用,其作用机制主要与通过提高SOD表达并介导NO抑制软骨细胞凋亡有关。

参考文献

- [1] 殷红. 康复新修复兔膝关节软骨缺损的实验研究[D]. 昆明: 云南中医学院, 2018.
- [2] KOENIG KM, ONG KL, LAU EC, et al. The use of hyaluronic acid and corticosteroid injections among medicare patients with knee osteoarthritis[J]. *J Arthroplasty*, 2016, 31(2):351-355.
- [3] 崔梦丽, 刘雅敏, 陈庆, 等. 中药治疗关节疼痛外用制剂的研究进展[J]. *风湿病与关节炎*, 2015, 4(9):76-80.
- [4] 唐晓东. 康复新液修复骨缺损的动物实验研究[D]. 成都: 四川大学, 2007.
- [5] PRASADAM I, MAO X, SHI W, et al. Combination of MEK1/2 inhibitor and hyaluronic acid has a synergistic effect on anti-hypertrophic and pro-chondrogenic activities in osteoarthritis treatment[J]. *J Mol Med: Berl*, 2013, 91(3):369-380.
- [6] WAKITANI S, GOTO T, YOUNG RG, et al. Repair of large fullthickness articular cartilage defects with allograft articular chondrocytes embedded in a collagen gel[J]. *Tissue Eng*, 1998, 4(4):429-444.
- [7] KIM J, KIM IS, CHO TH, et al. In vivo evaluation of MMP sensitive high-molecular weight HA-based hydrogels for bone tissue engineering[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2010, 95(3):673-681.
- [8] MCALINDON TE, BANNURU RR, SULLIVAN MC, et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2014, 22(3):363-388.
- [9] 洪振强, 高弘建, 苏友新, 等. 马钱子总碱对兔膝关节炎模型软骨损伤修复作用及机制[J]. *中国中西医结合杂志*, 2018, 38(8):991-996.
- [10] ZAMLI Z, ADAMS MA, TARLTON JF, et al. Increased chondrocyte apoptosis is associated with progression of osteoarthritis in spontaneous guinea pig models of the disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(9):17729-17743.
- [11] INTEKHAB-ALAM NY, WHILE OB, GETTING SJ, et al. Urocortin protects chondrocytes from NO-induced apoptosis: a future therapy for osteoarthritis? [J]. *Cell Death Dis*, 2013. DOI:10.1038/cddis.2013.231.
- [12] TOMITA M, SATO EF, NISHIKAWA M, et al. Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and functions of articular chondrocytes[J]. *Arthritis Rheum*, 2001, 41(1):96-104.
- [13] BENTZ M, ZAOUTER C, SHI Q, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents lipid peroxidation in osteoarthritic chondrocytes[J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(7):2256-2267.
- [14] SUGAWARA T, NOSHITA N, LEWEN A, et al. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage by blocking the mitochondrial pathway of caspase activation[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(1):209-217.
- [15] KALACI A, YILMAZ HR, ASLAN B, et al. Effects of hyaluronan on nitric oxide levels and superoxide dismutase activities in synovial fluid in knee osteoarthritis[J]. *Clin Rheumatol*, 2007, 26(8):1306-1311.
- [16] GARNERO P, PIPERNO M, GINEYTS E, et al. Cross sectional evaluation of biochemical markers of bone, cartilage, and synovial tissue metabolism in patients with knee osteoarthritis: relations with disease activity and joint damage[J]. *Ann Rheum Dis*, 2001, 60(6):619-626.

(收稿日期:2018-06-16 修回日期:2018-12-04)

(编辑:段思怡)