

- doxorubicin[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2020, 21(7):1959-1967.
- [17] ZHANG J, YANG S, WANG K, et al. Crocin induces autophagic cell death and inhibits cell invasion of cervical cancer SiHa cells through activation of PI3K/AKT[J]. Ann Transl Med, 2020, 8(18):1180-1190.
- [18] AMIN A, FARRUKH A, MURALI C, et al. Saffron and its major ingredients' effect on colon cancer cells with mismatch repair deficiency and microsatellite instability[J]. Molecules, 2021, 26(13):3855-3872.
- [19] TENG S, HAO J, BI H, et al. The protection of crocin against ulcerative colitis and colorectal cancer via suppression of NF- κ B-mediated inflammation[J]. Front Pharmacol, 2021, 12:639458. DOI: 10.3389/fphar.2021.639458.
- [20] GÜLLÜ N, KOBELT D, BRIM H, et al. Saffron crudes and compounds restrict MACC1-dependent cell proliferation and migration of colorectal cancer cells[J]. Cells, 2020, 9(8):1829-1845.
- [21] 孙亚超,王静东,金博,等. 激活 Shh 信号通路影响结肠癌细胞上皮间质表型转化的研究[J]. 新疆医科大学学报, 2016, 39(11):1428-1431.
- [22] CHEN S, WANG B, FU X, et al. ALKAL1 gene silencing prevents colorectal cancer progression via suppressing Sonic Hedgehog (SHH) signaling pathway[J]. J Cancer, 2021, 12(1):150-162.
- [23] SKODA AM, SIMOVIC D, KARIN V, et al. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: a comprehensive review[J]. Bosn J Basic Med Sci, 2018, 18(1):8-20.
- [24] JENG KS, CHANG CF, LIN SS. Sonic Hedgehog signaling in organogenesis, tumors, and tumor microenvironments[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(3):758-777.
- [25] RAHI S, GUPTA R, SHARMA A, et al. Smo-Shh signaling activator purnorphamine ameliorates neurobehavioral, molecular, and morphological alterations in an intracerebroventricular propionic acid-induced experimental model of autism[J]. Hum Exp Toxicol, 2021, 40(11):1880-1898.
- (收稿日期:2022-09-27,修回日期:2022-11-08)

引用本文:梁朝鑫,周安远,吕沛,等.富血小板血浆调控SOX9对缓解SD大鼠膝骨关节炎的影响[J].安徽医药,2024,28(2):229-234.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2024.02.005.

◇ 药学研究 ◇



富血小板血浆调控SOX9对缓解SD大鼠膝骨关节炎的影响

梁朝鑫^{1,2},周安远³,吕沛³,王哲纬³,杨斯淇⁴,赵政伟⁵,杨渊^{3,6}

作者单位:¹广西中医药大学,广西壮族自治区 南宁 530200;

²广西医科大学再生医学研究中心,广西壮族自治区 南宁 530021;

³广西医科大学,广西壮族自治区 南宁 530021;

⁴广西医科大学附属肿瘤医院检验科,广西壮族自治区 南宁 530021;

⁵广西壮族自治区总工会南宁职工康复医院康复科,广西壮族自治区 南宁 530000;

⁶广西医科大学开元东医院骨科,广西壮族自治区 南宁 530028

通信作者:杨渊,男,教授,硕士生导师,研究方向为骨与关节外科,Email:yangy062@sina.com

基金项目:广西壮族自治区自然科学基金项目(2020GXNSFAA159162);南宁市青秀区科技计划项目(2020014)

摘要 **目的** 探讨富血小板血浆细胞(PRP)与Y染色体上的性别决定基因区域(SOX9)受体激动剂对缓解SD大鼠膝骨关节炎综合征(KOA)的影响。**方法** 实验自2021年4月至2022年3月,体外用脂多糖(LPS)诱导SD大鼠关节软骨细胞炎症模型,用不同浓度的PRP与SOX9激动剂干预经LPS处理后的SD大鼠软骨细胞,采用酶联免疫吸附测定(ELISA)与实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)检测相关疾病的mRNA表达水平。体内注射实验通过在局部麻醉作用下假手术离断SD大鼠的前交叉韧带而建立了KOA模型,分为实验组(10只)、对照组(10只)和假手术组大鼠(10只),采用苏木精-伊红(HE)染色、番红固绿染色及双甲苯胺蓝染色均显示无病理损伤,采用免疫组化染色检测软骨中基质金属蛋白酶-13(MMP-13)和低聚蛋白多糖酶-4(ADAMTS-4)。**结果** 体外实验,ELISA法结果显示,与正常组比较,在LPS的影响下白细胞介素(IL)-1 β (81.65 \pm 1.37比58.3 \pm 2.26)、IL-6(73.3 \pm 1.75比34.75 \pm 1.75)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)(22.76 \pm 0.37比13.41 \pm 0.23)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)(1.06 \pm 0.01比0.84 \pm 0.02)浓度明显上升,加入不同浓度的PRP后各炎症因子均明显下降($P<0.05$),在加入SOX9激动剂后各炎症因子下降更明显(64.29 \pm 1.87、47.01 \pm 1.75、19.24 \pm 0.16、0.92 \pm 0.01)(均 $P<0.01$);RT-PCR结果显示,在LPS的影响下MMP-3、MMP-13、ADAMTS-4、ADAMTS-5、IL-1 β 、IL-6、环氧合酶-2抑制剂(COX-2)的mRNA表达上升,而软骨蛋白聚糖抗体(ACAN)和II型多肽胶原酶(COL2A1)的表达量明显下降(均 $P<0.05$),在加入不同浓度的PRP和SOX9激动剂后在各指标均得到明显恢复,其中以SOX9激动剂影响下最为明显(均 $P<0.01$)。体内病理实验,通过膝关节软骨大体观检查和关节病理组织切片及染色等结果的显示,实验组关节软骨的局部病理软组织损伤及程度可较对照组明显减轻。**结论** 富血小板血浆可能会通过调控SOX9受体

的表达,减少高聚蛋白多糖的丢失和抑制软骨细胞肥大因子及软骨细胞基质中的Ⅱ型胶原的诱导降解,并还能直接有效地抑制由于LPS所致软骨的各种炎症因子蛋白的异常表达生成和诱导释放,从而可减少对软骨细胞的外源基质因子的诱导降解,达到缓解骨关节炎病程发展的目的。

关键词 骨关节炎,膝; 富血小板血浆; SOX9激动剂; 软骨细胞; 脂多糖

Effect of platelet-rich plasma regulating SOX9 on alleviating osteoarthritis in SD rats

LIANG Chaoxin^{1,2}, ZHOU Anyuan³, LYU Pei³, WANG Zhewei³, YANG Siqi⁴, ZHAO Zhengwei⁵, YANG Yuan^{3,6}

*Author Affiliations:*¹Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning, Guangxi Zhuang Autonomous Region 530200, China;²Experimental Research Center of Regenerative Medicine, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi Zhuang Autonomous Region 530021, China;³Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi Zhuang Autonomous Region 530021, China;⁴Department of Laboratory, Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi Zhuang Autonomous Region 530021, China;⁵Department of Rehabilitation, Nanning Workers Rehabilitation Hospital, Guangxi Federation of Trade Unions, Nanning, Guangxi Zhuang Autonomous Region 530000, China;⁶Department of Orthopaedics, Guangxi Medical University's Kaiyuan Lang East Hospital, Nanning, Guangxi Zhuang Autonomous Region 530028, China

Abstract Objective To investigate the effects of Platelet-rich plasma (PRP) and SOX9 receptor agonists on alleviating knee osteoarthritis (KOA) in SD rats. **Methods** From April 2021 to March 2022, the articular chondrocyte inflammation model was induced by lipopolysaccharide (LPS) in vitro, and the LPS-treated SD rat chondrocytes were treated with different concentrations of PRP and SOX9 agonists, and the related diseases were detected quantitatively by ELISA and RT-PCR using real-time fluorescence quantitative gene detection mRNA expression levels of pathogenic genes. In vivo injection experiment, the anterior cruciate ligament of SD rats was severed by sham operation under local anesthesia and KOA model was established. The rats in the experimental group (10 rats), control group (10 rats) and sham operation group (10 rats) were divided into the experimental group (10 rats). No pathological damage was shown by HE, safranin solid green staining and ditoluidine blue staining, and stromal gold in cartilage was detected by immunohistochemical staining. It belongs to protease-13 (MMP-13) and polyproteoglycan enzyme-4 (ADAMTS-4). **Results** In vitro, the results of ELISA showed that the concentrations of IL-1 β (81.65 \pm 1.37 vs. 58.3 \pm 2.26), IL-6 (73.3 \pm 1.75 vs. 34.75 \pm 1.75), TNF- α (22.76 \pm 0.37 vs. 13.41 \pm 0.23) and iNOS (1.06 \pm 0.01 vs. 0.84 \pm 0.02) were significantly increased under the influence of LPS, and the inflammatory factors were significantly decreased after adding different concentrations of PRP ($P < 0.05$), and the inflammatory factors were significantly decreased after adding SOX9 agonist (64.29 \pm 1.87, 47.01 \pm 1.75, 19.24 \pm 0.16, 0.92 \pm 0.01) (all $P < 0.01$). RT-PCR results showed that under the influence of LPS, the mRNA expressions of MMP-3, MMP-13, ADAMTS-4, ADAMTS-5, IL-1 β , IL-6 and COX-2 were increased, while the expressions of ACAN and COLA2A1 were significantly decreased (all $P < 0.05$). After the addition of different concentrations of PRP and SOX9 agonists, the indexes were significantly recovered, and the SOX9 agonist was the most significant (all $P < 0.01$). In vivo pathological experiment, through the knee cartilage gross examination and joint pathological tissue section and staining results, the experimental results of the group of articular cartilage local pathological soft tissue injury and degree can be significantly reduced compared with the control group. **Conclusion** Platelet rich plasma may regulate the expression of SOX9 receptor through, to reduce the loss of the high poly proteoglycan and inhibition of cartilage cell hypertrophy factor and type II collagen induced degradation of cartilage matrix, and can also directly effective inhibition caused by LPS cartilage inflammation of the various factor protein abnormal expression of generation and induce the release, which can reduce exogenous of cartilage cells. The induced degradation of matrix factors can alleviate the progression of osteoarthritis.

Keywords Osteoarthritis, knee; Platelet-rich plasma; SOX9 agonist; Chondrocytes; LPS

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种常见慢性的骨关节疾病,由于慢性关节软骨组织变性损伤或功能遭受过度破坏,关节边缘骨赘组织形成,导致局部疼痛剧烈,从而可能影响其行走、上下楼梯活动等一系列日常功能活动,且其久治也难愈,若没有及时有效地采用药物治疗,将使KOA的病情进一步发展,导致永久性关节功能畸形、残疾

等严重后果,影响病人正常的生活质量^[1-2]。KOA综合征常发生于一些老年病人,病情严重者甚至可突然出现肢体行动迟缓及下肢运动功能障碍,给许多家庭乃至对整个社会经济都给带来了巨大的经济负担,所以采取有效的治疗尤为重要^[3-5]。在骨科,治疗膝骨性关节炎的最常用非手术方法有在关节腔中注射透明质酸钠、口服多种非甾体抗炎药以及

采用局部理疗手法和全身药疗等,这些方法虽然能缓解部分疼痛,但并不能起到抗炎和减轻软骨退化的作用。富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)是一种通过快速离心抽取全血标本而采集得到的富含高浓度血小板血浆,PRP样本中含有的游离血小板浓度至少是正常健康人全血样品中含血小板浓度的近3~5倍^[6]。PRP含有多种不同的生长因子,可促进关节软骨的修复,有可能成为治疗KOA的有效方法^[7]。研究^[8]发现,Y染色体上的性别决定基因区域(SOX9)具有能够直接影响基因在软骨细胞增生及骨骼组织中的再分化或成熟表达的决定性作用。且SOX9基因能成为结合软骨细胞肥大的重要标志物X型染色体胶原(ColX)基因表达的关键启动子,同时可以激活影响其成熟表达基因^[9]。随着治疗技术日趋成熟,近年来对PRP及其应用机制在临床治疗和KOA上的实验研究工作越来越多,然而,PRP在治疗KOA病程发展中的药物作用机制相关的基础研究则报道甚少。因此,本研究2021年4月至2022年3月从体外通过采用脂多糖(LPS)抑制剂诱导大鼠软骨细胞的损伤,体内通过体外离断损伤大鼠膝前交叉韧带建立了KOA动物模型,研究PRP通过体外调控因子SOX9的表达及对大鼠体外的抗炎机制和大鼠体内的对KOA病情的缓解及其作用机制,为临床对于KOA的诊断和治疗提供一条新思路。

1 材料与方法

1.1 材料 SPF级SD大鼠(2~5日龄)6只,8周龄雄性SD大鼠30只,由广西医科大学动物实验中心提供(伦理编号202105004)。SOX9激动剂(M09282290)购于广西卓一科技有限公司;DMEM培养基(SH30022.01B)购自美国Hyclone公司;胎牛血清(21030704)购于浙江天杭生物科技股份有限公司;II型胶原酶(C8150)购于北京索莱宝科技有限公司;0.25%胰蛋白酶购于北京索莱宝科技有限公司(20210717);LPS(L2630)购于美国Sigma公司;PBS(SV30087.02)购于美国Hyclone公司;DEPC处理水(C3088)购于德国RUIBIO公司;氯仿(H44020154)购于中国上海国药;异丙醇(80109218)购于中国上海沪试公司;无水乙醇(CN-NO.32061)购于中国常熟市鸿盛精细化工有限公司;SYBRGreen PCR试剂盒(Thermo F-415XL)购于美国赛默飞;逆转录试剂盒(Thermo K1622)购于美国赛默飞。

1.2 方法

1.2.1 SD大鼠软骨细胞提取和培养 2~5日龄SD大鼠均在全身麻醉下处死,经严格的无菌条件下取

出膝关节软骨,剔除肌肉、韧带等软组织,从膝关节韧带下方剪取膝关节软骨,并将全部软骨剪为约1 mm³的碎块。使用0.25%胰蛋白酶-EDTA抑制剂在37℃培养基中消化30 min,随后使用2 gL II型胰蛋白酶抑制剂消化4 h,1 000 r/min离心收集底层软骨细胞,加入10%活胎牛血清蛋白液和1%青链霉素混合液后制成的DMEM培养基内进行培养,观察软骨细胞的分布,隔天更换培养基,待软骨细胞增殖到90%以上时,按1:3比例进行细胞传代,第3代软骨细胞还可用于作后续培养实验。

1.2.2 实验分组与药物干预 实验分为正常组、模型组(10 mg/LLPS)、低、中、高浓度PRP实验组(10 mg/L LPS+5%PRP、10 mg/L LPS+10%PRP和10 mg/L LPS+20%PRP)和SOX9实验组(10 mg/L LPS+SOX9激动剂)。将第3代软骨细胞分别接种到6个孔板内及放有爬片板的第24孔板孔中,待软骨细胞表面完全贴壁以后,模型组和实验组先以10 mg/L LPS处理1 h后分别加入5%PRP、10%PRP、20%PRP及含少量SOX9激动剂的DMEM培养基中,每组接种3个复孔,药物处理后24 h后收样。

1.2.3 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测相关炎症因子的水平 各组细胞培养24 h后,通过离心取上清液进行ELISA检测。按检测试剂盒说明书,检测各组细胞的白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)等炎症因子水平。

1.2.4 实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)分析软骨蛋白相关基因的表达水平 采用qPCR分析软骨蛋白聚糖抗体(ACAN)、II型多肽胶原酶(COL2A1)、基质金属蛋白酶(MMP)-3、MMP-13、低聚蛋白多糖酶(ADAMTS)-4、ADAMTS-5、IL-1 β 、IL-6、环氧酶-2抑制剂(COX-2)等的表达水平。采用各组总的RNA作为样品装入提取试剂盒,提取纯化出上述各组样品中总的RNA,然后分别使用逆转录试剂盒将这些RNA样品全部经过逆转录处理保存记录为cDNA。qPCR反应主要过程为95℃变性加热10 s,60℃变性加热退火60 s,共分作40个反应循环。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参。按照2^{- $\Delta\Delta C_t$} 方法计算各个目的基因相对表达量。重复3次。

1.2.5 动物试验和病理切片染色 成年的健康大鼠按随机数字表法分为实验组、对照组、假手术组,每组各10只,实验组和对照组通过离断膝关节前交叉韧带来建立大鼠急性骨关节炎动物模型,假手术组动物通过切开大鼠关节腔后直接缝合建立。造模1个月后,实验组隔日予膝关节腔内注射

PRP溶液(PRP:氯化钙=1:9)0.5 mL,对照组和假手术组隔日分别关节腔内注射等量0.9%氯化钠溶液,连续1个月,各组将大鼠关节软骨组织脱蜡酶激活后分别用常规石蜡包埋切片,苏木精-伊红(HE)染色、番红固绿染色和甲苯胺蓝染色后用光学显微镜下连续拍照取图。

1.3 统计学方法 采用SPSS 24.0统计分析软件对数据进行统计分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组计量资料比较采用单因素方差分析,组间的两两比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组炎症因子水平比较 采用ELISA法定量检测各组大鼠血清IL-1 β 、TNF- α 、IL-6及iNOS水平。与正常组比较,模型组软骨细胞在经过LPS处理以后,IL-1 β 、TNF- α 、IL-6和iNOS水平明显增高,而分别予以不同药物浓度的PRP处理和SOX9处理以后,其血清炎症因子水平则不同程度降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且SOX9实验组降低效果最为显著(均 $P < 0.01$)。见表1。

2.2 各组软骨蛋白相关基因的表达水平比较 采

用RT-PCR分析ACAN、COL2A1等软骨特异性基因表达和MMP-3、MMP-13、ADAMTS-4、ADAMTS-5、IL-1 β 、IL-6、COX-2等软骨炎症相关的蛋白基因表达水平。与正常组比较,模型组使用LPS后软骨细胞软骨特异性基因的表达水平被明显下调,软骨炎症相关基因的表达水平被明显上调,三种不同浓度PRP和SOX9激动剂处理后,明显逆转了软骨特异性基因表达水平的下调和软骨炎症相关基因表达的上调,其中以SOX9实验组的作用最为显著(均 $P < 0.01$)。见表2。

2.3 各组大鼠膝关节大体观 通过对比实验组、对照组和假手术组的膝关节大体观发现,实验组与假手术组膝关节表面光滑,差异并不明显,对照组膝关节大体观肿胀且表面粗糙。见图1。

2.4 各组大鼠膝关节软骨组织HE、番红O及甲苯胺蓝染色 假手术组大鼠膝关节的软骨表层保持光滑与完整,软骨细胞结构未遭受损伤破坏,细胞结构排列整齐,细胞内外两层基质均完整存在;对照组大鼠膝关节的软骨层较为粗糙,细胞结构遭受严重破坏,细胞结构排列出现紊乱、散落及不整齐,

表1 各组大鼠血清IL-1 β 、TNF- α 、IL-6和iNOS的水平比较 $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	IL-1 β	IL-6	TNF- α	iNOS
正常组	3	58.3 \pm 2.26	34.75 \pm 1.75	13.41 \pm 0.23	0.84 \pm 0.02
模型组	3	81.65 \pm 1.37 ^①	73.3 \pm 1.75 ^①	22.76 \pm 0.37 ^①	1.06 \pm 0.01 ^①
低浓度PRP实验组	3	77.46 \pm 0.89 ^{①②}	65.12 \pm 2.67 ^{①②}	22.06 \pm 0.14 ^{①②}	1.02 \pm 0.01 ^{①②}
中浓度PRP实验组	3	72.37 \pm 1.37 ^{①②}	57.53 \pm 1.75 ^{①②}	20.88 \pm 0.21 ^{①②}	0.99 \pm 0.01 ^{①②}
高浓度PRP实验组	3	68.95 \pm 1.58 ^{①②}	53.44 \pm 1.01 ^{①②}	19.75 \pm 0.21 ^{①②}	0.95 \pm 0.01 ^{①②}
SOX9实验组	3	64.29 \pm 1.87 ^{①②}	47.01 \pm 1.75 ^{①②}	19.24 \pm 0.16 ^{①②}	0.92 \pm 0.01 ^{①②}

注:IL为白细胞介素,TNF- α 为肿瘤坏死因子 α ,iNOS为诱导型一氧化氮合酶。

①与正常组比较, $P < 0.05$;②与模型组比较, $P < 0.05$ 。

表2 各组大鼠软骨特异性基因及软骨炎症相关基因的表达水平比较 $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	ACAN	COL2A1	MMP-3	MMP-13
正常组	3	1.00 \pm 0.07	1.00 \pm 0.01	1.00 \pm 0.01	1.00 \pm 0.01
模型组	3	0.64 \pm 0.01 ^①	0.64 \pm 0.01 ^①	1.39 \pm 0.01 ^①	1.47 \pm 0.01 ^①
低浓度PRP实验组	3	0.74 \pm 0.02 ^{①②}	0.65 \pm 0.01 ^{①②}	1.33 \pm 0.01 ^{①②}	1.43 \pm 0.01 ^{①②}
中浓度PRP实验组	3	0.79 \pm 0.01 ^{①②}	0.69 \pm 0.01 ^{①②}	1.32 \pm 0.01 ^{①②}	1.40 \pm 0.01 ^{①②}
高浓度PRP实验组	3	0.81 \pm 0.01 ^{①②}	0.70 \pm 0.01 ^{①②}	1.29 \pm 0.01 ^{①②}	1.33 \pm 0.01 ^{①②}
SOX9实验组	3	0.90 \pm 0.02 ^{①②}	0.84 \pm 0.02 ^{①②}	1.16 \pm 0.02 ^{①②}	1.19 \pm 0.02 ^{①②}
组别	ADAMTS-5	IL-6	COX-2	IL-1 β	ADAMTS-4
正常组	1.00 \pm 0.03	1.00 \pm 0.06	1.00 \pm 0.03	1.00 \pm 0.01	1.00 \pm 0.03
模型组	1.24 \pm 0.01 ^①	1.41 \pm 0.01 ^①	1.49 \pm 0.01 ^①	1.44 \pm 0.01 ^①	1.58 \pm 0.01 ^①
低浓度PRP实验组	1.22 \pm 0.01 ^①	1.39 \pm 0.01 ^{①②}	1.45 \pm 0.01 ^①	1.33 \pm 0.01 ^{①②}	1.50 \pm 0.01 ^{①②}
中浓度PRP实验组	1.17 \pm 0.01 ^{①②}	1.36 \pm 0.01 ^{①②}	1.27 \pm 0.01 ^①	1.28 \pm 0.01 ^{①②}	1.45 \pm 0.02 ^{①②}
高浓度PRP实验组	1.15 \pm 0.01 ^{①②}	1.32 \pm 0.01 ^{①②}	1.22 \pm 0.01 ^②	1.25 \pm 0.01 ^{①②}	1.41 \pm 0.01 ^{①②}
SOX9实验组	1.08 \pm 0.01 ^{①②}	1.20 \pm 0.01 ^{①②}	1.15 \pm 0.017 ^②	1.15 \pm 0.02 ^{①②}	1.31 \pm 0.01 ^{①②}

注:ACAN为软骨蛋白聚糖抗体,COL2A1为II型多肽胶原酶,MMP为基质金属蛋白酶,ADAMTS为低聚蛋白多糖酶,IL为白细胞介素,COX-2为环氧化酶-2抑制剂。

①与正常组比较, $P < 0.05$ 。②与模型组比较, $P < 0.05$ 。

部分细胞的基质也发生变性降解,并见局部有明显炎症细胞浸润和组织坏死变性;实验组大鼠膝关节的膝关节软骨层均较正常连续而完整且光滑,软骨细胞数量比较多且细胞排列相对较规范整齐,细胞外基质亦较对照组连续和完整,仅有少量软骨炎症细胞浸润。见图2。

2.5 各组大鼠膝关节软骨组织免疫组化染色结果 本研究中,MMP-13和ADAMTS-4两种抗体均在免疫组化染色中有阳性表现。

3 讨论

KOA是骨科目前较常见到的一种膝关节退化性骨骼肌肉疾病,影响整个关节表面的骨关节所有重要组织,包括膝关节软骨、骨、韧带肌腱和肌肉等,KOA导致的主要临床病理组织改变有关节软骨细胞的增生变性、损坏及骨质增生形成和骨周围皮肤软组织损伤的继发性炎症刺激反应等。目前KOA的治疗方法都有其局限性,近年来随着PRP的不断深入研究与应用,采用在膝关节腔内注射PRP治疗KOA取得了进一步的发展。PRP作为含有多种生长因子的血小板浓缩物,可有效促进膝关节软骨细胞的再生^[10]。其中,在关节腔内注射PRP治疗KOA,可使免疫促炎因子IL-1 β 和TNF- α 均降低,进而改善了KOA的症状^[11-12]。本研究探讨了PRP能通过选择性调控SOX9受体的表达及其对LPS诱导下的大鼠关节软骨损伤后的功能保护效果及PRP产生了对大鼠骨关节功能的潜在保护修复作用,结果表明PRP可通过选择性调控SOX9基因的表达来有效缓解并阻断了小鼠KOA病情的进展。

KOA病程中,在膝关节的退行性改变和生物力学失衡的影响下,刺激了软骨细胞产生炎症反应,并通过巨噬细胞对关节退变、损伤等病理环境下发生反应,产生了大量的炎症因子^[13-14]。有研究^[15]发现,软骨调控相关基因表达异常可能与退行性改变相关。由于PRP中含有着较高水平的血小板浓度,同时活化血小板还可直接激活其他多种血小板生长因子,为KOA病变组织的修复创造了更有利的环境^[16-17]。同时,研究^[18]发现PRP可减少软骨中MMP-13阳性细胞的表达,通过抑制MMP-13的表达从而进一步发挥了对软骨的保护作用。并且ADAMTS-4也是关节退行性构改变发生的一种重要生物学标志蛋白之一,其本身作为对关节软骨外膜基质蛋白的水解酶,关节软骨蛋白质的诱导降解酶有其重要独特的作用^[19],并在关节炎中聚蛋白多糖降解具有巨大效力^[20]。相关研究^[21]结果显示,通过抑制ADAMTS-4的和调节ADAMTS-5的结合水平可同时有效的降低对聚蛋白多糖的降解,从而明显减

少聚蛋白多糖的丢失率和软骨细胞破坏。SOX9蛋白属于SOX蛋白家族,对软骨细胞表型调控及软骨稳态细胞的有效诱导保护功能具有特殊重要生理作用,在诱导软骨细胞的分化增殖与分化凋亡中均有很重要独特的重要作用,是将合成的软骨细胞生长刺激因子诱导成为软骨组织分化生长过程调控中关键的重要因素^[22]。有研究^[23]发现,SOX9可调节软骨外基质的表达。Zhang等^[24]研究发现,SOX9还可抑制ADAMTS-4、ADAMTS-5、ADAMTS-7、ADA及MTS-12个基因表达的mRNA蛋白生成,进而有效影响了聚蛋白多糖酶基因表达的逆转录,证实出了SOX9确实是一种聚蛋白多糖酶表达的特异性抑制活性物,从而可能对关节软骨和细胞外基质产生的有效保护。SOX9可以直接通过抑制软骨细胞中的软骨肥大酶和促进部分未被分化过的软骨细胞进行细胞再生分化过程^[25-26],且间接参与促进了对软骨细胞中的COL2A1软骨细胞特异性酶激活诱导作用,控制促进了COL2A1在软骨细胞分子中的特异性表达^[27]。而MMP-13则可使COL2A1降解^[28]。由此推断SOX9可能通过抑制ADAMTS-4和MMP-13基因的表达,从而达到减少聚蛋白多糖丢失和抑制软骨细胞肥大及COL2A1降解,进而可有效缓解KOA病程的发展。

本研究中的体外实验部分在中体外使用了LPS(10 mg/L)对软骨细胞产生出了关节炎的诱导病理反应,建立出了由软骨细胞的炎症模型,体内部分研究通过离断SD大鼠膝关节前交叉韧带而建立出的膝骨关节炎模型。体外试验研究数据中,不同的血清浓度水平上的PRP和SOX9激动剂联合作用位点均可同时通过两种作用机制分别增强了胶原软骨特异性基因ACAN和对COL2A1 mRNA水平的高选择性诱导表达,且在SOX9激动剂的作用下表达最明显,同时它们亦可分别通过降低对MMP-3、MMP-13和对ADAMTS-4、ADAMTS-5基因的mRNA表达的水平,从而缓解II型胶原的降解和阻止了聚蛋白多糖的丢失,这二者似乎都可能更大程度有利于软骨细胞的外基质结构的重新形成。在软骨炎症因子方面,各浓度下的PRP表达和在SOX9激动剂作用下均不同程度降低了在LPS诱导条件下的软骨组织损伤模型细胞表面中的包括IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、COX-2等在内的高特异性mRNA水平的表达,同时在软骨细胞表面上的包括IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、iNOS等其他抗炎症因子水平含量也明显降低,并且在SOX9激动剂作用下的效果最明显。大鼠病理切片显示,PRP能明显改善KOA的关节病变,从而减缓大鼠延缓型关节炎病程和发展趋势,表明PRP对

关节软骨损伤的恢复具有积极的作用。

综上所述,PRP对关节软骨损伤有保护作用,其作用机制可能是通过调控SOX9的表达,进而降低炎症因子的表达且缓解Ⅱ型胶原降解和减少聚蛋白多糖的流失,缓解了软骨细胞外基质的降解,从而有效缓解了KOA的进一步发展。目前膝关节腔内注射PRP越来越多地成为在临床上治疗KOA的有效方案。然而,对于PRP的长期疗效和具体作用机制还需进一步研究。

(本文图1,2见插图2-1)

参考文献

- [1] 崔桂华.富血小板血浆与透明质酸钠治疗膝骨关节炎的效果比较[J].中国当代医药,2018,25(16):102-104,117.
- [2] 张宏,王旭昀,郑伟康,等.药物治疗膝骨关节炎的研究进展[J].中国医药导报,2018,15(27):38-41.
- [3] VINA ER, KWOH CK. Epidemiology of osteoarthritis: literature update [J]. *Current Opinion in Rheumatology*, 2018, 30(2): 160-167.
- [4] CROSS M, SMITH E, HOY D, et al. The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study[J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2014, 73(7): 1323-1330.
- [5] 陈玉书,张燕红,刘日许.富血小板血浆治疗膝骨关节炎的临床疗效[J/CD].中华关节外科杂志(电子版),2017,11(6): 33-36.DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-134X.2017.06.006.
- [6] DREW WT, PETRERA M, HENDRY M, et al. A systematic review of the use of platelet-rich plasma in sports medicine as a new treatment for tendon and ligament injuries[J]. *Clin J Sport Med*, 2011, 21(4): 344-352.
- [7] 庞成龙,颜世昌,陈晖.富血小板血浆治疗膝骨性关节炎的研究进展[J].骨科,2019,10(2):167-172.
- [8] LIU CF, LEFEBVRE V. The transcription factors SOX9 and SOX5/ SOX6 cooperate genome-wide through super-enhancers to drive chondrogenesis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(17): 8183-203.
- [9] STUDER D, MILLAN C, ÖZTÜRK E, et al. Molecular and biophysical mechanisms regulating hypertrophic differentiation in chondrocytes and mesenchymal stem cells [J]. *Eur Cell Mater*, 2012, 24(4): 118-135.
- [10] ZHU Y, YUAN M, MENG HY, et al. Basic science and clinical application of platelet-rich plasma for cartilage defects and osteoarthritis: a review[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013, 21(11): 1627-1637.
- [11] COLE BJ, KARAS V, HUSSEY K, et al. Hyaluronic acid versus platelet-rich plasma: a prospective, double-blind randomized controlled trial comparing clinical outcomes and effects on intra-articular biology for the treatment of knee osteoarthritis[J]. *American Journal of Sports Medicine*, 2017, 45(2): 339-346.
- [12] SUNDMAN EA, COLE BJ, KARAS V, et al. The anti-inflammatory and matrix restorative mechanisms of platelet-rich plasma in osteoarthritis [J]. *Am J Sports Med*, 2014, 42(1): 35 - 41.
- [13] ATTUR MG, DAVE M, AKAMATSU M, et al. Osteoarthritis or osteoarthrosis: the definition of inflammation becomes a semantic issue in the genomic era of molecular medicine [J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2002, 10(1): 1-4.
- [14] LOESER RF. Molecular mechanisms of cartilage destruction: mechanics, inflammatory mediators, and aging collide [J]. *Arthritis & Rheumatism*, 2006, 54(5): 1357-1360.
- [15] GORDON CT, TAN TY, BENKO S, et al. Longrange regulation at the SOX9 locus in development and disease [J]. *J Med Genet*, 2009, 46(10): 649-656.
- [16] 闫利勇,张丽,肖长杰.富血小板血浆修复根分歧病变的临床应用研究[J].社区医学杂志,2015,13(17):1-4.
- [17] 张帅,邵东旭.膝关节骨性关节炎的治疗进展[J].中医临床研究,2016,8(25):146-148.
- [18] 王振中,喻飞,杨波,等.富血小板血浆对兔骨关节炎软骨中基质金属蛋白酶-13表达的影响[J].首都医科大学学报,2020, 41(6): 923-928.
- [19] 王富军,贾峰,张世华.龙胆苦苷对骨关节炎大鼠软骨组织损伤和软骨细胞凋亡的作用 [J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(6): 1248-1252.
- [20] NAITO S, SHIOMI T, OKADA A, et al. Expression of A DAMTS (aggrecanase-1) in human osteoarthritic cartilage [J]. *Pathol Int*, 2007, 57(11): 703-711.
- [21] GLASSON SS, ASKEW R, SHEPPARD B, et al. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis [J]. *Nature*, 2005, 434(7033): 644-648.
- [22] 廖军义,周年,林良波,等.联合表达BMP2和Sox9促进体外培养间充质干细胞成软骨分化[J].南方医科大学学报,2014, 34(3): 317-22.
- [23] LEFEBVRE V, DE CROMBRUGHE B. Toward understanding SOX9 function in chondrocyte differentiation [J]. *Matrix Biol*, 1998, 16(9): 529-540.
- [24] ZHANG Q, JI Q, WANG X, et al. SOX9 is a regulator of ADAMTSs-induced cartilage degeneration at the early stage of human osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2015, 23(12): 2259-2268.
- [25] TEW SR, LI Y, POTHACHAROEN P, et al. Retroviral transduction with SOX9 enhances re-expression of the chondrocyte phenotype in passaged osteoarthritic human articular chondrocytes [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2005, 13(1): 80-89.
- [26] CUCCHIARINI M, THURN T, WEIMER A, et al. Restoration of the extracellular matrix in human osteoarthritic articular cartilage by overexpression of the transcription factor SOX9 [J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(1): 158-167.
- [27] 马兆龙,邱勇,朱锋,等. SOX9、L-SOX5、SOX6及Ⅱ型胶原在青少年特发性脊柱侧凸患者顶椎终板软骨的共表达及意义 [J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2008, 18(8): 621-626, 641.
- [28] WEI F, ZHOU J, WEI X, et al. Activation of indian hedgehog promotes chondrocyte hypertrophy and upregulation of MMP-13 in human osteoarthritic cartilage [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2012, 2(7): 755-763.

(收稿日期:2022-09-26,修回日期:2022-11-11)