

· 研究论文 ·

黄原胶对前交叉韧带切断术所致骨关节炎的疗效及其机制

张 伟^{1,3}, 张军敏², 张富强¹, 王天一¹, 韩冠英^{1,3,4*}

(1. 锦州医科大学药学院, 辽宁 锦州 121000; 2. 中国人民解放军 93263 部队医院, 辽宁 锦州 121015; 3. 山东省药学院, 生物制药重点实验室, 多糖药物工程实验室, 多糖药物国家-地方联合工程实验室, 山东 济南 250101; 4. 锦州医科大学附属第一医院, 辽宁 锦州 121000)

摘要: 本研究评价黄原胶 (xanthan gum, XG) 对前交叉韧带切断术 (anterior cruciate ligament transection, ACLT) 所致的兔膝关节骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 模型中软骨损伤的保护作用, 并探讨 XG 对 OA 软骨中 caspase-3、Bax 蛋白表达的影响。将 60 只雄性新西兰大白兔按随机数字表法分为 6 组, 每组 10 只, 随机选取 1 组为正常对照组 (control 组), 剩余 5 组右膝采用 ACLT 建立 OA 模型, 并根据药物干预不同分为模型组 (model 组)、XG-0.6 mg·kg⁻¹、XG-1.2 mg·kg⁻¹、XG-2.4 mg·kg⁻¹ 治疗组和玻璃酸钠 (sodium hyaluronate, SH-1.2 mg·kg⁻¹) 治疗组。测量治疗过程中各组兔膝关节局部温度和膝关节宽度; 治疗结束后, 对各组兔关节进行大体形态学观察; 通过 HE 染色对各组兔关节软骨组织病理学形态进行观察; Western blot 法检测各组兔软骨细胞中 Bax 和 caspase-3 的激活态 cleaved caspase-3 含量。实验结果表明, XG 可抑制 OA 所致的膝关节局部温度的上升和膝关节宽度的增加, 且具有剂量依赖性; XG 具有改善由 OA 所致的股骨髁和胫骨平台形态学异常和组织损伤的作用; Western blot 结果表明: 与 control 组相比, model 组和 XG-0.6 mg·kg⁻¹ 组兔膝关节软骨细胞中 Bax 和 cleaved caspase-3 水平显著增加 ($P < 0.01$), model 组和 XG-0.6 mg·kg⁻¹ 组间兔膝关节软骨细胞中 Bax 和 cleaved caspase-3 水平无显著性差别 ($P > 0.05$), 且明显高于 XG-1.2 mg·kg⁻¹ 和 XG-2.4 mg·kg⁻¹ 组 ($P < 0.01$), XG-2.4 mg·kg⁻¹ 和 XG-1.2 mg·kg⁻¹ 组间兔膝关节软骨细胞中 cleaved caspase-3 水平无显著性差别 ($P > 0.05$), XG-2.4 mg·kg⁻¹ 组兔膝关节软骨细胞中 Bax 水平低于 XG-1.2 mg·kg⁻¹ 组 ($P < 0.05$)。综上所述, XG 能够有效地保护 OA 中的软骨损伤, 并能够抑制 OA 软骨中 Bax 和 caspase-3 蛋白的表达。

关键词: 黄原胶; 骨关节炎; 前交叉韧带切断术; 含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3; B 淋巴细胞瘤-2 基因相关 X 蛋白

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 10-1533-08

Effect and mechanism of xanthan gum on osteoarthritis caused by anterior cruciate ligament transection

ZHANG Wei^{1,3}, ZHANG Jun-min², ZHANG Fu-qiang¹, WANG Tian-yi¹, HAN Guan-ying^{1,3,4*}

(1. School of Medicine, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China; 2. 93263 Military Hospital of the Chinese People's Liberation Army, Jinzhou 121015, China; 3. Shandong Academy of Pharmaceutical Science, Key Laboratory of Biopharmaceuticals, Engineering Laboratory of Polysaccharide Drugs, National-Local Joint Engineering Laboratory of Polysaccharide Drugs, Jinan 250101, China; 4. The First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China)

Abstract: The study is designed to evaluate the protective effect of xanthan gum (XG) injection on cartilage injury in the rabbit osteoarthritis (OA) model induced by anterior cruciate ligament transection (ACLT), and

收稿日期: 2017-04-06; 修回日期: 2017-05-26.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81302681); 国家“十二五”重大新药创制基金资助项目 (2012ZX093016-002); 辽宁省自然科学基金资助项目 (2013022051); 辽宁省大学生创新训练项目 (201510160000004, 201510160000016).

*通讯作者 Tel: 86-416-4605096, E-mail: hgy19800223@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0319

to explore the effect of XG on the expression of caspase-3 and Bax protein in OA cartilage. Sixty male New Zealand white rabbits were randomly divided into 6 groups ($n=10$) according to random number table method, and one group was selected randomly as the normal control group (control) while the other 5 groups of right knee were used to establish the OA model with ACLT, which were then divided into model group (model), XG-0.6 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, XG-1.2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, XG-2.4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ treatment group and sodium hyaluronate (SH-1.2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) treatment group according to drug intervention. The knee joint temperature and knee joint width of each group were measured in the course of treatment. After treatment, the macroscopic morphology of rabbit joints in each group was observed. The pathological morphology of articular cartilage of rabbits in each group was observed using HE staining. The expression of Bax and cleaved caspase-3 in the cartilage of rabbits were detected by Western blot. The result shows that XG inhibited the increase in knee joint temperature and knee width caused by OA in a dose-dependent manner. XG improved the morphological abnormalities and tissue injuries of the femoral condyle and tibial plateau caused by OA. Western blot result shows that, compared with the control group, the levels of Bax and cleaved caspase-3 in knee cartilage cells of model group and XG-0.6 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ group were significantly increased ($P<0.01$). However, no significant difference was observed in the levels of Bax and cleaved caspase-3 between the model group and the XG-0.6 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ group ($P>0.05$). These two groups are significantly higher than those of XG-1.2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and XG-2.4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($P<0.01$) groups. Meanwhile, no significant difference was observed in the level of cleaved caspase-3 between the knee cartilage in XG-2.4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and XG-1.2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ group ($P>0.05$). The level of Bax in knee cartilage in XG-2.4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ group was lower than that of XG-1.2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ group ($P<0.05$). In conclusion, XG effectively protected cartilage damage in OA, and inhibited the expression of Bax and caspase-3 protein in OA cartilage.

Key words: xanthan gum; osteoarthritis; anterior cruciate ligament transection; cysteinyl aspartate specific proteinase-3; B-cell lymphoma-2 associated X protein

黄原胶 (xanthan gum, XG) 是经发酵产生的微生物胞外杂多糖。其基本结构为重复的五碳糖单位, 由主链与侧链组成, 主链为由 *D*-葡萄糖以 1–4 糖苷键连接成的类纤维素结构, 侧链为由 α -甘露糖、 β -甘露糖和 β -葡糖醛酸组成的三糖单位, 侧链反向缠绕主链形成双螺旋的二级结构, 再由二级结构形成网状的三级结构^[1] (图 1)。XG 的独特结构赋予了其自身独特的性质——高稳定性 (耐高温、耐高盐、耐酸和耐碱)、良好的水溶性、假塑流变性 (黏弹性) 和安全性等^[2]。由于 XG 与玻璃酸钠 (sodium hyaluronate, SH) 都属于多糖类药物, 性质相近, 黏弹性高, 关节腔注射 XG 也可起到润滑和缓冲作用, 降低组织间摩擦。而且 XG 侧链反相缠绕主链进而保护主链的特殊结构决定其主链不易被破坏, XG 的稳定性更好, 在关节腔存留时间更长, 可减少给药次数。因此, XG 有可能成为治疗关节炎 (osteoarthritis, OA) 新药。本研究拟通过前交叉韧带切断术 (anterior cruciate ligament transection, ACLT) 建立 OA 模型, 并给予 XG 干预, 评价 XG 对 OA 模型中软骨损伤的保护作用, 并探讨 XG 对 OA 软骨中 caspase-3 和 Bax 表达的影响。

材料与方法

动物 健康新西兰大耳白兔 70 只, 普通级, 检

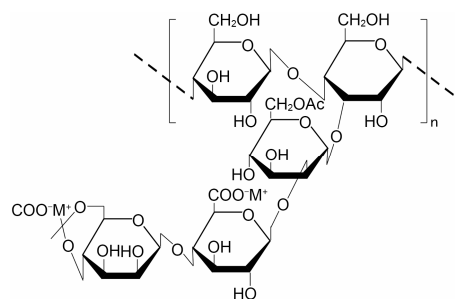


Figure 1 The chemical structure of xanthan gum (XG)

疫合格后挑选 60 只用于本实验, 6~8 月龄, 均为雄性, 体重 2.5~2.8 kg, 由锦州医科大学动物实验中心提供, 合格证号: JZMU20160604。实验过程经锦州医科大学伦理委员会评定批准。单笼饲养。饲养条件: 温度 16~26 $^{\circ}\text{C}$, 日温差 ≤ 4 $^{\circ}\text{C}$; 湿度: 40%~70%; 换气次数: 每小时 ≥ 8 次; 照明时间: 昼夜明暗交替时间 12 h/12 h。

药品与试剂 黄原胶粉末 (山东省药科学院); 玻璃酸钠粉末 (山东福瑞达医药集团); 鼠抗兔 Bax 单克隆抗体、鼠抗兔 caspase-3 单克隆抗体、兔抗鼠二抗、反应停止液、苯甲基磺酰氟、四氮唑蓝 (美国 Cell Signaling Technology 公司); BCA 总蛋白测定试剂盒 (武汉博士德生物工程公司); 无水乙醇等其他试剂 (国产分析纯)。

实验仪器 -80 ℃冰箱 (日本三洋公司); XSP-4C 显微镜 (上海彼爱姆光学仪器有限公司); 电泳仪、转膜机、湿式电转移槽凝胶成像仪、显色仪 (美国 Bio Rad 公司); 酶标仪 (美国 Thermo 公司); 微量移液器 (Thermosystems 公司)。

OA 模型制备与药物治疗 参考文献^[3], 将 60 只兔按随机数字表法分为 6 组 [正常对照组 (control)、模型组 (model)、XG-0.6 mg·kg⁻¹、XG-1.2 mg·kg⁻¹、XG-2.4 mg·kg⁻¹ 治疗组和 SH-1.2 mg·kg⁻¹ 治疗组], 每组 10 只, 随机选取 1 组为 control, 剩余 5 组右膝采用 ACLT 建立 OA 模型。于实验前 1 天, 对所有家兔进行剔除膝关节毛发并消毒备皮处理。行 ACLT 的 5 组家兔耳缘静脉注射水合氯醛 (10%, 3 mL·kg⁻¹) 进行麻醉, 于每只家兔的右腿膝关节内侧做纵形切口, 切口长度约 2 cm。钝性分离关节囊处筋膜使髌骨显露, 将髌骨向膝关节外侧脱位, 曲屈膝关节使前交叉韧带较大程度地暴露出来, 用眼科剪剪断前交叉韧带, 行抽屉实验确认交叉韧带已完全剪断, 确认后用生理盐水 (NS) 冲洗切口, 逐层缝合筋膜、表皮。手术后, 对所有家兔恢复手术前饲养条件, 并允许各组家兔自由活动, 另外自手术结束起, 对进行手术的家兔每天肌肉注射抗生素头孢唑啉 (1.0 mg·kg⁻¹), 1 次/天, 持续 3 天。术后第 4 周, 对家兔进行治疗干预, model 组和 control 组兔右膝关节腔注射 0.1 mL·kg⁻¹ NS, 1 次/周, 连续 5 周; XG-0.6 mg·kg⁻¹、XG-1.2 mg·kg⁻¹ 和 XG-2.4 mg·kg⁻¹ 组兔右膝关节腔分别注射 XG 0.6 mg·kg⁻¹、1.2 mg·kg⁻¹ 和 2.4 mg·kg⁻¹, 1 次/周, 连续 5 周; SH-1.2 mg·kg⁻¹ 组兔右膝关节腔注射 1.2 mg·kg⁻¹ SH, 1 次/周, 连续 5 周。所有家兔于术后第 9 周处死。

生理指标监测 自手术处理第 1 周起, 用游标卡尺每天测量、记录每只家兔的膝关节宽度, 膝关节宽度测量位置为股骨和胫骨相接处, 用红外测量仪每天测量、记录家兔膝关节温度。

大体形态学观察及 HE 染色 药物干预至第 9 周末结束治疗, 每组随机选取 6 只家兔, 耳缘静脉注射空气处死, 对尸体立即进行解剖, 取出右膝关节处的股骨髁和胫骨平台。观察股骨髁和胫骨平台的表面平整度、光泽度和颜色, 参照参考文献^[4]对大体形态进行评分。稍作清理后用 10% 福尔马林进行固定, 72 h 后经脱钙、脱水、石蜡包埋, 然后切片, 显微镜下观察软骨细胞的形态结构改变, 并根据参考文献^[5]对结构改变进行评分。评分标准见表 1 和表 2。

Table 1 The gross scoring criteria for articular cartilage surfaces

Score	Surface morphology of articular cartilage
0	Surface smooth and complete with bright color
1	Surface rough, with minor defects and matt or darker glossiness
2	Surface erosion, damage extending into the superficial or middle layers
3	Surface forms ulceration and damage extending into the deep layers
4	Complete cartilage erosion with subchondral bone exposed

Table 2 The histopathological scoring criteria of articular cartilage

Item	Score	Description
Structure	0	Normal
	1	Surface irregularities
	2	Surface and vessel irregularities
	3	Fissures extending into transitional zone
	4	Fissures extending into radio zone
	5	Fissures extending into calcification zone
Cell	6	Most of the structures defect
	0	Normal
	1	More diffuse cells
	2	Local cells increase
Matrix staining	3	Few cells
	0	Normal
	1	Severe staining
	2	Moderate staining
Tidemark's integrity	3	Slight staining
	4	Unstained
Tidemark's integrity	0	Complete
	1	Vessel destroyed

Western blot 检测软骨细胞中 Bax 和 caspase-3 含量 参考文献^[6, 7], 将软骨于液氮中研磨成粉末, 加入现配的裂解液, 将组织用超声波破碎仪粉碎 30 s (冰上操作), 冰上放置 30 min, 4 ℃、12 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 提取上清液。用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定细胞中总蛋白浓度。根据所测结果确定上样量和 PBS 的用量, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 根据目的蛋白的大小, 参照蛋白 Mark 的指示适时终止电泳。采用半干法转膜, 封闭, 洗膜, 按照对应分子质量切割后分别置于 1:1 000 稀释的 caspase-3 和 Bax 等一抗溶液中, 4 ℃ 杂交过夜, 第 2 天用洗膜液漂洗后加入 1:1 000 稀释的二抗, 摇床上杂交 1 h, 取出用洗膜液冲洗, 然后加 ECL 显色剂进行显色, 检测。

统计学处理 使用 SPSS 17.0 软件进行数据分析, 计数资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 进行比较。P < 0.05, 具有统计学差异。

结果

1 膝关节宽度和膝关节温度

家兔膝关节宽度随时间的变化见图 2。Control 组家兔膝关节宽度在整个实验过程中无较大波动, 始终维持在实验起始阶段水平。与 control 组相比, 接受手术的各组家兔在第 1 周膝关节宽度均有明显增加, 第 2 周起逐渐恢复。Model 组家兔膝关节宽度与 XG-0.6 mg·kg⁻¹ 组始终无显著性差别 ($P > 0.05$), 第 4 周进行治疗干预, 除 XG-1.2 mg·kg⁻¹ 组家兔膝关节宽度于第 6 周和 model 组无显著性差别 ($P > 0.05$) 外, 自第 6~9 周治疗结束, model 组家兔膝关节宽度均高于其他药物干预组 (XG-1.2 mg·kg⁻¹、XG-2.4 mg·kg⁻¹ 和 SH-1.2 mg·kg⁻¹ 组) ($P < 0.05$), XG-1.2 mg·kg⁻¹、XG-2.4 mg·kg⁻¹ 和 SH-1.2 mg·kg⁻¹ 组间家兔膝关节宽度无显著性差别 ($P > 0.05$)。

与 Control 组比较, 接受手术各组家兔膝关节温

度在手术操作后迅速上升, 于第 1 周达到最高水平, 并在第 2~4 周维持在较高水平, 无明显波动; 于第 4 周进行治疗干预后, 接受手术各组家兔膝关节温度呈逐渐下降趋势, 但 model 组和 XG-1.2 mg·kg⁻¹ 组家兔膝关节温度一直保持在较高的水平, 且两组间无显著性差别 ($P > 0.05$), 两组自第 5 周实验结束时其膝关节温度高于其他药物干预组 ($P < 0.05$); XG-1.2 mg·kg⁻¹、XG-2.4 mg·kg⁻¹ 和 SH-1.2 mg·kg⁻¹ 组间家兔膝关节温度无显著性差别 ($P > 0.05$) (图 3)。

2 大体形态学观察

Control 组股骨髁和胫骨平台肉眼观察表面平滑、完整, 呈白色, 光泽度较好, model 组股骨髁和胫骨平台表面局部呈凹凸不平状, 颜色显示浅黄色, 有缺损和裂隙, 光泽度偏暗, 并在股骨髁表面发现有骨赘生成 (图 4A, G)。XG-0.6 mg·kg⁻¹、XG-1.2 mg·kg⁻¹、XG-2.4 mg·kg⁻¹ 和 SH-1.2 mg·kg⁻¹ 组股骨髁和胫骨平

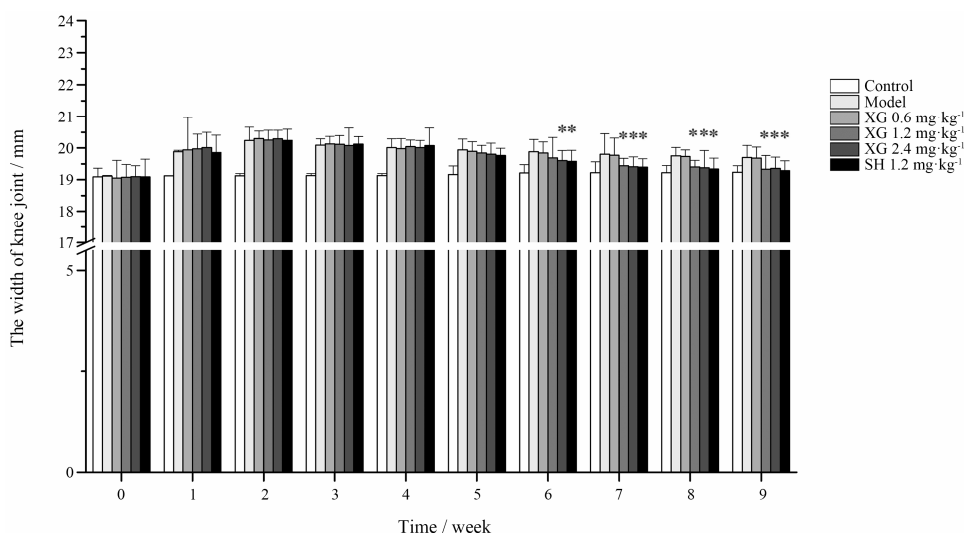


Figure 2 Changes of knee joint width with time in rabbits. SH: Sodium hyaluronate. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs model group

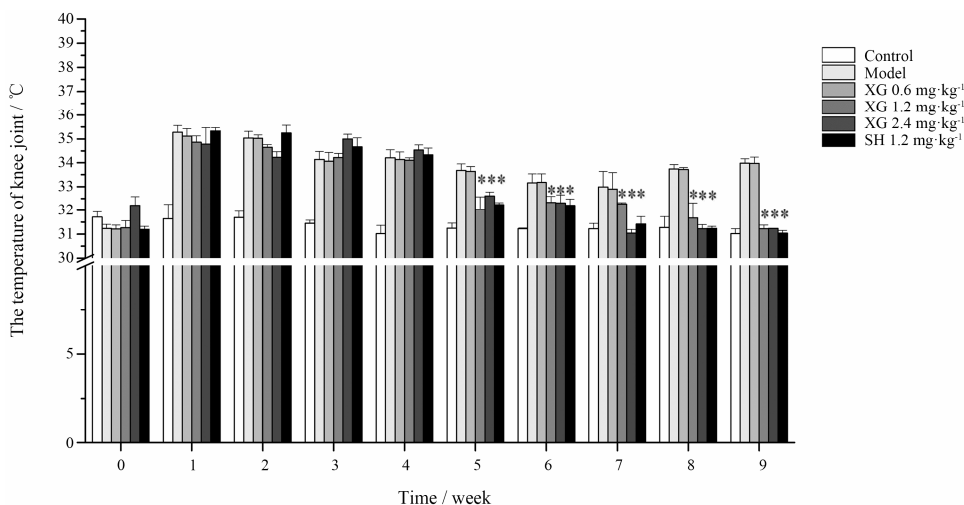


Figure 3 Changes of knee joint temperature with time in rabbits. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs model group

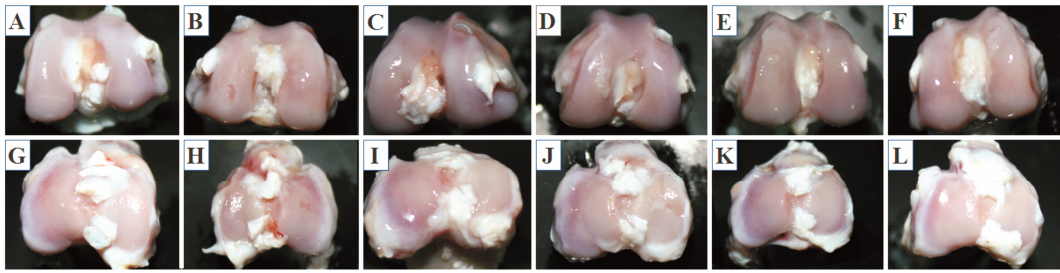


Figure 4 Observation of gross morphology of osteoarthritis cartilage in rabbits as following: femoral condyle (A–F) and tibial plateau (G–L). A, G: Control group; B, H: Model group; C, I: XG-0.6 mg·kg⁻¹ group; D, J: XG-1.2 mg·kg⁻¹ group; E, K: XG-2.4 mg·kg⁻¹ group; F, L: SH-1.2 mg·kg⁻¹ group

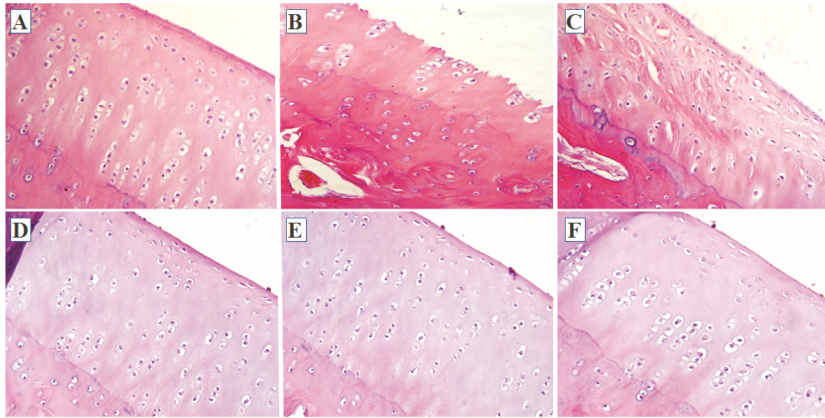


Figure 5 Histological observation of rabbit osteoarthritis cartilage. A: Control group; B: Model group; C: XG-0.6 mg·kg⁻¹ group; D: XG-1.2 mg·kg⁻¹ group; E: XG-2.4 mg·kg⁻¹ group; F: SH-1.2 mg·kg⁻¹ group

台表面基本保持完整, 呈白色, 没有发现骨赘和缺损, 光泽度也较好 (图 4C, I; 图 4D, J; 图 4E, K; 图 4F, L)。XG-1.2 mg·kg⁻¹、XG-2.4 mg·kg⁻¹ 组和 SH-1.2 mg·kg⁻¹ 组大体形态学观察评分明显低于 model 组 ($P < 0.01$), XG-2.4 mg·kg⁻¹ 组和 SH-1.2 mg·kg⁻¹ 组大体形态学观察评分低于 XG-0.6 mg·kg⁻¹ 组 ($P < 0.05$), XG-2.4 mg·kg⁻¹ 组和 SH-1.2 mg·kg⁻¹ 组相比, 大体形态学观察评分无显著性差别 ($P > 0.05$) (表 3)。

Table 3 Gross score of cartilage. $n=6$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs XG-0.6 mg·kg⁻¹ group

Group	Femoral condyle	Tibial plateau
Control	0.3 ± 0.32	0.2 ± 0.37
Model	3.0 ± 0.27	2.7 ± 0.25
XG-0.6 mg·kg ⁻¹	2.8 ± 0.25	2.5 ± 0.14
XG-1.2 mg·kg ⁻¹	1.6 ± 0.47**	1.7 ± 0.25**
XG-2.4 mg·kg ⁻¹	0.9 ± 0.21** Δ	1.2 ± 0.34** Δ
SH-1.2 mg·kg ⁻¹	1.1 ± 0.11** Δ	1.3 ± 0.31** Δ

3 HE 染色结果

Control 组 HE 染色显示软骨组织完整, 表面平整, 细胞有序排列, 潮线较深且连续 (图 5A)。Model 组 HE 染色显示软骨细胞明显减少, 表面缺损, 组织

完整性破坏, 细胞无规则排列, 潮线较浅且不连续 (图 5B)。XG-0.6 mg·kg⁻¹ 组 HE 染色显示软骨细胞表面基本保持完整, 细胞排列无规则, 组织间出现裂隙, 潮线保持完整 (图 5C)。XG-1.2 mg·kg⁻¹、XG-2.4 mg·kg⁻¹ 和 SH-1.2 mg·kg⁻¹ 组 HE 染色显示软骨组织完整, 表面较为平整, 软骨细胞排列规则, 潮线较深且连续 (图 5D~F)。XG-1.2 mg·kg⁻¹、XG-2.4 mg·kg⁻¹ 和 SH-1.2 mg·kg⁻¹ 组的组织病理学评分明显低于 model 组 ($P < 0.01$)。XG-2.4 mg·kg⁻¹ 组和 SH-1.2 mg·kg⁻¹ 组组织病理学评分低于 XG-0.6 mg·kg⁻¹ 组 ($P < 0.05$), XG-2.4 mg·kg⁻¹ 组和 SH-1.2 mg·kg⁻¹ 组相比, 组织病理学评分无显著性差别 ($P > 0.05$) (表 4)。

Table 4 Histological score of articular cartilage. $n=6$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs XG-0.6 mg·kg⁻¹ group

Group	Score
Control	0.24 ± 0.38
Model	8.10 ± 0.99
XG-0.6 mg·kg ⁻¹	7.58 ± 0.25
XG-1.2 mg·kg ⁻¹	3.80 ± 0.63**
XG-2.4 mg·kg ⁻¹	3.20 ± 0.84** Δ
SH-1.2 mg·kg ⁻¹	3.49 ± 0.64** Δ

4 Western blot 检测软骨细胞中 Bax 和 caspase-3 蛋白含量

与 control 组相比, model 组和 XG-0.6 mg·kg⁻¹ 组家兔膝关节软骨细胞中 Bax 和 cleaved caspase-3 水平明显增加 ($P < 0.01$), model 组和 XG-0.6 mg·kg⁻¹ 组家兔膝关节软骨细胞中 Bax 和 cleaved caspase-3 水平无显著性差别 ($P > 0.05$) 且明显高于 XG-1.2 mg·kg⁻¹ 和 XG-2.4 mg·kg⁻¹ 组 ($P < 0.01$), XG-2.4 mg·kg⁻¹ 和 XG-1.2 mg·kg⁻¹ 组家兔骨关节软骨细胞中 cleaved caspase-3 水平无显著性差别 ($P > 0.05$), XG-2.4 mg·kg⁻¹ 组家兔骨关节软骨细胞中 Bax 水平低于 XG-1.2 mg·kg⁻¹ 组 ($P < 0.05$) (图 6)。

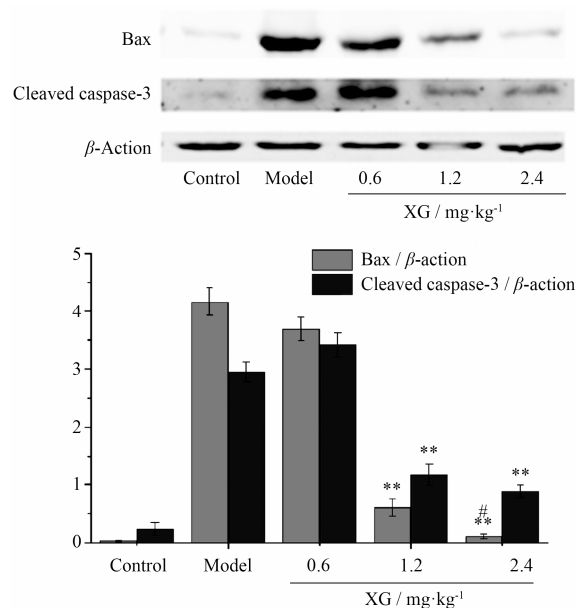


Figure 6 Effect of XG on the expression of cleaved caspase-3 and Bax in rabbit osteoarthritis. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs model group; # $P < 0.05$ vs XG-1.2 mg·kg⁻¹ group

讨论

目前,我国 OA 的患病人数占总人口的 15%,为 2 亿左右,已成为世界上 OA 患病人数最多的国家之一。OA 给中老年人带来了极大的疼痛和经济负担,已成为导致人类残疾的主要疾病之一,被称为“不死的癌症”^[8]。因此,开发有效的防治 OA 的方案具有重要的应用价值和社会效益。OA 的治疗主要包括运动疗法、物理因子疗法、辅助器具与矫形器疗法及药物治疗^[9]。研究表明,SH 对 OA 具有疗效,已成为临床治疗早中期 OA 的常用药物,但 SH 易被体内的酶降解且易被自由基氧化,半衰期短,患者需连续给药(临床治疗方案:1 周/1 次,连续 5 周为 1 个疗程)^[10]。因此,寻找一种与其结构和功能相似,但更稳

定、给药间隔周期更长的药物具有重要意义。

在 XG 的相关研究中, Han 等^[11, 12]通过制备 XG 注射液建立了注射用 XG 的质量控制标准,并对关节腔内注射 XG 的安全性和 XG 对兔关节软骨细胞的细胞毒性进行了评价,结果表明 XG 用于关节腔注射时对动物局部和全身无明显毒性,对体外培养兔软骨细胞亦无明显毒性。在此基础上,通过关节腔注射木瓜蛋白酶建立 OA 体内模型和用白介素-1 β 诱导体外培养软骨细胞建立软骨细胞体外损伤模型,以此研究 XG 对 OA 损伤模型中软骨细胞的保护作用,结果表明, XG 可以在体内和体外有效地保护关节软骨细胞,且体内实验结果表明 XG 比 SH 给药周期更长的情况下依然可以达到相同的治疗效果^[11, 11, 13]。Shao 等^[14]通过碘乙酸诱导的 OA 模型研究了 XG 对实验性 OA 引起的疼痛的缓解作用,结果显示黄原胶可以明显地缓解实验性 OA 引起的疼痛。以上研究均为 XG 成为治疗 OA 的新药提供了依据。

建立 OA 模型的方法有多种,包括手术诱导、药物诱导和关节制动诱导^[15]。其中手术诱导较为常用,包括半月板摘除术、ACLT 和后交叉韧带切断术(PCLT)等,其中 ACLT 是被广泛认可的一种,故本研究选择使用 ACLT 诱导兔膝关节 OA 模型^[16]。在建立 OA 模型的过程中,提高家兔的生存率是获得较全面数据、顺利进行实验的重要因素,这就要求手术过程中选用恰当的手术药物并于术后对家兔进行合理的护理,此外,为了避免不同实验人员进行手术的操作差异,提高建立模型的稳定性,本实验对所有家兔进行的 ACLT 均由同一实验人员完成。

OA 的发生与多种因素有关,包括力学因素如机械磨损,生物学因素如软骨细胞凋亡、免疫异常等^[17]。其中关节软骨细胞凋亡在 OA 的发生过程中起着重要的作用^[18],而 caspase-3 和 Bax 对细胞凋亡具有重要的调控作用^[19, 20]。Bax 蛋白水平的升高可诱发线粒体途径的细胞凋亡^[21, 22],caspase-3 为细胞凋亡的执行蛋白,其表达的增加可加速细胞的凋亡进程^[23, 24]。本实验对软骨细胞中 caspase-3 和 Bax 的表达水平进行检测,以期探讨 XG 对保护作用的机制。实验结果显示, XG 可以通过降低软骨细胞中 caspase-3 和 Bax 水平抑制细胞凋亡,进而保护软骨细胞。

骨关节炎病程中伴有疼痛和关节肿胀等症状,这些症状的表现强弱往往也间接反映了骨关节炎的严重程度。其中,骨关节炎兔的膝关节宽度可以反映关节处炎症的严重程度,膝关节越宽,表明关节处越

肿胀, 关节炎越严重^[25-28]。膝关节温度亦可以反映骨关节炎的严重程度^[29], 膝关节处温度越高, 表示骨关节炎病情越严重。本实验通过测量膝关节宽度和关节局部温度, 作为一种辅助指标, 观察了不同组别兔关节炎的严重程度, 从而达到辅助研究黄原胶药效的目的。

本实验采用 ACLT 建立兔 OA 模型, 并以此研究了 XG 对该模型关节软骨的保护作用及其作用机制。实验结果显示, 对兔膝关节进行 0.6、1.2 和 2.4 mg·kg⁻¹ 剂量的 XG 膝关节注射具有保护关节软骨的作用; 并且, 该保护作用可能是通过抑制软骨细胞中凋亡因子 caspase-3 和 Bax 的表达实现的。在 OA 的进程中, 由于细胞凋亡所涉及的信号通路较为复杂, 所以 XG 保护 OA 中软骨细胞的机制仍需进一步探讨。

References

- [1] Han G, Wang G, Zhu X, et al. Preparation of xanthan gum injection and its protective effect on articular cartilage in the development of osteoarthritis [J]. *Carbohydr Polym*, 2011, 87: 1837-1842.
- [2] Petri DFS. Xanthan gum: a versatile biopolymer for biomedical and technological applications [J]. *J Appl Polym Sci*, 2015, 132: 42035.
- [3] Levillain A, Boulocher C, Kaderli S, et al. Meniscal biomechanical alterations in an ACLT rabbit model of early osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2015, 23: 1186-1193.
- [4] Liu ZL, Man ZT, Zhang JX, et al. Comparison of feasibility of HHGS and OCHAS in evaluating knee osteoarthritis after anterior cruciate ligament rupture in rabbits [J]. *Chin J Sports Med (中国运动医学杂志)*, 2015, 34: 103-110.
- [5] Su DM, Zhao JH, Huang ZY, et al. Effect of Jianxi Qianggu Pill on the pathological changes of articular cartilage in knee osteoarthritis rabbits [J]. *Chin J Tiss Engin Res (中国组织工程研究)*, 2014, 18: 657-662.
- [6] Hu XG, Gan ZL, Zhang Y. Effects and mechanism of Ligustrazine on the proliferation and apoptosis of chondrocytes in rabbits [J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med (现代中西医结合杂志)*, 2016, 25: 2418-2421.
- [7] Wang L, Yu RS, Yang WL, et al. Effects of paclitaxel loaded-drug micelles on cell proliferation and apoptosis of human lung cancer A549 cells [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 1240-1245.
- [8] Gu YC, Liu SQ, Xia SQ, et al. Advances on the pathogenesis and treatment of osteoarthritis [J]. *Chin J Bone Joint (中国骨与关节杂志)*, 2016, 5: 770-774.
- [9] Wang LH, Wang LX, Ren CP. Clinical study of nonpharmacologic combined with pharmacologic intervention in the treatment of knee osteoarthritis [J]. *Chin Med (中国医药)*, 2013, 8: 369-370.
- [10] Shen JX, Yue YF. Clinical pharmacodynamics of sodium hyaluronate in the treatment of degenerative osteoarthritis [J]. *China Prac Med (中国实用医药)*, 2012, 7: 165-166.
- [11] Han GY. Study on Xanthan Gum Injection and Its Pharmacodynamics and Action Mechanism on Experimental Osteoarthritis (黄原胶注射液的研制及其对实验性骨关节炎疗效和作用机制的研究) [D]. Jinan: Shandong University, 2012.
- [12] Han GY, Ling PX, Wang FS, et al. Safety evaluation of intra-articular injection of xanthan gum into knee joint of rabbit [J]. *Chin J Biochem Pharm (中国生化药物杂志)*, 2012, 33: 109.
- [13] Han GY, Shao HR, Ling PX, et al. The protective effect of xanthan gum on interleukin-1 β induced rabbit chondrocytes [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 89: 870-875.
- [14] Shao HR, Han GY, Ling PX, et al. Intra-articular injection of xanthan gum reduces pain and cartilage damage in a rat osteoarthritis model [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 92: 1850-1857.
- [15] McCoy AM. Animal models of osteoarthritis: comparisons and key considerations [J]. *Vet Pathol*, 2015, 52: 803-818.
- [16] Hu B, Hu ZG, Zhang YW, et al. Animal model of osteoarthritis: artificial induction versus spontaneous induction [J]. *Chin J Tiss Engin Res (中国组织工程研究)*, 2010, 14: 6202-6205.
- [17] Shi XM, Yu ZG. The research progress of osteoarthritis pathogenesis [J]. *Chin J Clin (Electronic Edition) (中华临床医师杂志:电子版)*, 2013, 12: 284-286.
- [18] Zhou Y, Liu SQ. Research progress of apoptosis model and its mediated signal transduction pathway *in vitro* [J]. *J Pract Orthop (实用骨科杂志)*, 2016, 22: 1010-1014.
- [19] Hwang HS, Kim HA. Chondrocyte apoptosis in the pathogenesis of osteoarthritis [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16: 26035-26054.
- [20] Wang ZB, Lu QY, Li ZC, et al. *L*-Monomethyl-arginine decreases apoptosis of chondrocytes by altering Bax, and Bcl-2 expression in osteoarthritis of rabbit knee [J]. *Afr J Biotechnol*, 2014, 11: 7094-7097.
- [21] Li Y. RNA interference of Bax gene inhibits apoptosis of rat chondrocytes and its possible mechanism [J]. *Basic Clin Med (基础医学与临床)*, 2012, 32: 217-221.

- [22] Wu Q, Wang N, Wang Y, et al. Protective effect of ligustilide against glutamate-induced apoptosis in PC12 cells [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 162–168.
- [23] Bao G, Xu L, Xu X, et al. SGTB promotes the caspase-dependent apoptosis in chondrocytes of osteoarthritis [J]. *Inflammation*, 2016, 39: 1–10.
- [24] Xiao B, Zhang X, Zhang ML, et al. Apoptosis of human hepatocellular carcinoma HepG-2 cells upon inhibition of STAT3 by 5,2',4'-trihydroxy-6,7,5'-trimethoxy flavone nanoparticle [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 1845–1851.
- [25] Jean YH, Wen ZH, Chang YC, et al. Increase in excitatory amino acid concentration and transporters expression in osteoarthritic knees of anterior cruciate ligament transected rabbits [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, 16: 1442–1449.
- [26] Jean YH, Wen ZH, Chang YC, et al. Intra-articular injection of the cyclooxygenase-2 inhibitor parecoxib attenuates osteoarthritis progression in anterior cruciate ligament-transected knee in rats: role of excitatory amino acids [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2007, 15: 638–645.
- [27] Wen ZH, Tang CC, Chang YC, et al. Glucosamine sulfate reduces experimental osteoarthritis and nociception in rats: association with changes of mitogen-activated protein kinase in chondrocytes [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010, 18: 1192–1202.
- [28] Lee CH, Wen ZH, Chang YC, et al. Intra-articular magnesium sulfate (MgSO₄) reduces experimental osteoarthritis and nociception: association with attenuation of *N*-methyl-*D*-aspartate (NMDA) receptor subunit 1 phosphorylation and apoptosis in rat chondrocytes [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009, 17: 1485–1493.
- [29] Denoble AE, Hall N, Pieper CF, et al. Patellar skin surface temperature by thermography reflects knee osteoarthritis severity [J]. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskeletal Disord*, 2010, 3: 69.