

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2025. 19. 020

持续被动运动联合富血小板血浆治疗对兔膝关节炎模型的软骨保护作用及 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响^{*}

黎小东,黄继超,杨理宁,田野

成都体育学院附属体育医院运动医学康复科,四川成都 610041

摘要:目的 探讨持续被动运动(CPM)联合富血小板血浆(PRP)治疗对兔膝关节炎(KOA)模型的软骨保护作用及 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响。**方法** 建立新西兰大白兔 KOA 模型,采用随机数字表法将 KOA 模型分为 KOA 组、CPM 组、PRP 组、CPM+PRP 组;另选取假手术的新西兰大白兔作为 Sham 组。CPM 组兔在 CPM 训练仪上进行膝关节 CPM, 1 次/d,每次运动 40 min;PRP 组在兔关节腔内注射 PRP,1 次/d,每次注射 0.3 mL;CPM+PRP 组兔进行 CPM 40 min 后在关节腔内注射 PRP 0.3 mL,1 次/d;Sham 组、KOA 组正常饲养不予以治疗。共干预 8 周。干预结束后,采用硝酸还原酶法检测兔膝关节滑膜液中一氧化氮(NO)水平;采用酶联免疫吸附试验检测兔膝关节滑膜液中白细胞介素(IL)-1 β 及软骨组织中基质金属蛋白酶(MMP)-1、MMP-13 水平;采用实时荧光定量反转录聚合酶链反应、蛋白质免疫印迹法分别检测兔膝关节软骨组织中 Wnt2、 β -catenin mRNA 及 Wnt2、 β -catenin 蛋白水平。**结果** KOA 组兔膝关节滑膜液中 NO、IL-1 β 水平及软骨组织中 MMP-1、MMP-13 水平、Mankin's 评分均高于 Sham 组,软骨组织中 Wnt2、 β -catenin mRNA 及 Wnt2、 β -catenin 蛋白水平均明显低于 Sham 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。CPM 组、PRP 组及 CPM+PRP 组兔膝关节滑膜液中 NO、IL-1 β 水平及软骨组织中 MMP-1、MMP-13 水平、Mankin's 评分均明显低于 KOA 组,软骨组织中 Wnt2、 β -catenin mRNA 及 Wnt2、 β -catenin 蛋白水平均明显高于 KOA 组,且 CPM+PRP 组均优于 CPM 组、PRP 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** CPM 联合 PRP 治疗可更好地减轻 KOA 炎症反应及软骨组织病变,保护软骨组织免受降解,可能与促进 Wnt/ β -catenin 信号通路激活有关。

关键词: 膝骨关节炎; 持续被动运动; 富血小板血浆; 软骨保护; Wnt/ β -catenin 信号通路
中图法分类号: R684.3; R446.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2025)19-2700-06

Effects of continuous passive exercise combined with platelet-rich plasma therapy on cartilage protection and Wnt/ β -catenin signaling pathway in a rabbit knee osteoarthritis model^{*}

LI Xiaodong, HUANG Jichao, YANG Lining, TIAN Ye

Department of Sports Medicine Rehabilitation, Sports Hospital Affiliated to Chengdu University of Sport, Chengdu, Sichuan 610041, China

Abstract: **Objective** To investigate the protective effect of continuous passive motion (CPM) combined with platelet-rich plasma (PRP) on cartilage and Wnt/ β -catenin signaling pathway in rabbit knee osteoarthritis (KOA) model. **Methods** The KOA model of New Zealand white rabbits was established and randomly divided into KOA group, CPM group, PRP group and CPM+PRP group. Another New Zealand white rabbits with Sham operation were selected as sham group, and the rabbits in CPM group underwent CPM on the CPM training instrument once a day for 40 min each time. Rabbits in PRP group were injected with PRP into the joint cavity once a day, 0.3 mL each time. Rabbits in CPM+PRP group were injected with 0.3 mL PRP into the joint cavity after 40 min of CPM, once a day. The Sham group and the KOA group were fed normally without treatment for 8 weeks. After the intervention, the level of nitric oxide (NO) in the synovial fluid of the knee joint was detected by nitrate reductase method. The levels of interleukin (IL)-1 β in synovial fluid and matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-13 in cartilage tissue were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The mRNA and protein levels of Wnt2 and β -catenin in rabbit knee cartilage were detected by real-time fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain reaction and Western blot respectively. **Results** The NO, IL-1 β levels and MMP-1, MMP-13 in synovial fluid and Mankin's score of cartilage tis-

^{*} 基金项目:四川省中医药管理局科学技术研究专项课题(2020LC0066)。
作者简介:黎小东,男,中医师,主要从事中医骨伤、运动损伤及运动康复方面的研究。
引用格式:黎小东,黄继超,杨理宁,等.持续被动运动联合富血小板血浆治疗对兔膝关节炎模型的软骨保护作用及 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响[J]. 检验医学与临床,2025,22(19):2700-2705.

sue in KOA group were higher than those in Sham group, and the levels of Wnt2 and β -catenin mRNA and Wnt2 and β -catenin protein in cartilage tissue in KOA group were significantly lower than those in Sham group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The NO, IL-1 β levels and MMP-1, MMP-13 in synovial fluid and Mankin's score of cartilage tissue in CPM group, PRP group and CPM+PRP group were significantly lower than those in KOA group, the levels of Wnt2, β -catenin mRNA and Wnt2, β -catenin protein in cartilage tissue were significantly higher than those in KOA group, and those in CPM+PRP group were significantly better than those in CPM group and PRP group ($P < 0.05$). **Conclusion** CPM combined with PRP treatment can better reduce the inflammatory response and cartilage tissue lesions of KOA, and protect cartilage tissue from degradation, which may be related to promoting the activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words: knee osteoarthritis; continuous passive movement; platelet-rich plasma; cartilage protection; Wnt/ β -catenin signaling pathway

膝骨关节炎(KOA)好发于老年人,是一种膝关节退行性病变,可使患者长期残疾,严重影响其生活质量及健康水平,给家庭及社会带来严重的经济负担^[1-2]。目前临床治疗 KOA 的方法很多,口服药物可短期内缓解患者症状,但不良反应明显;关节腔注射治疗较口服药物治疗的疗效好,但易复发;手术治疗能够从根本上治愈 KOA,但为有创性,费用高、风险大^[3-4]。因此,寻求经济实用、不良反应小的安全疗法,对制订有效的治疗或延缓 KOA 进展综合治疗策略至关重要。富血小板血浆(PRP)包含的多种生长因子有利于关节软骨修复并恢复关节活动功能。运动疗法具有经济实用、不良反应小、疗效明显等特点,对 KOA 等多种炎症性疾病均具有辅助治疗作用,且应用前景良好^[5-7]。临床实践证实,针对活动受限的 KOA 患者,持续被动运动(CPM)能够加快组织修复、增强关节活动度、预防深静脉血栓、减轻疼痛、缩短住院时间并减少医疗费用^[8-9]。然而 CPM 联合 PRP 治疗 KOA 的临床疗效与作用机制鲜有研究。因此,本研究通过建立兔 KOA 模型,探讨 CPM 联合 PRP 治疗对兔 KOA 软骨保护作用及可能机制,以期为临床 KOA 治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物 普通级健康雄性新西兰大白兔 50 只,体质量 1.9~3.2 kg,由北京隆安实验动物养殖中心[SYXK(京)2017-0042]提供。本实验经本院动物伦理委员会审核批准(202311024)。

1.2 试剂与仪器 TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus, RR820A)购自 TaKaRa 公司;引物由上海吉玛生物科技有限公司合成;一氧化氮(NO)检测分析试剂盒(货号:BC1475)购自北京索莱宝科技有限公司;基质金属蛋白酶(MMP)-1 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(ab100603)、MMP-13 ELISA 试剂盒(ab221839)、白细胞介素(IL)-1 β ELISA 试剂盒(ab8320)、兔源 anti-Wnt2(ab27794)、anti- β -actin(ab8227)、anti- β -catenin(ab32572)一抗、二抗羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(ab6721)抗体均购自英

国 Abcam 公司;7500 实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪、FC 酶标仪均购自美国 Thermo Fisher 公司;半自动图像数字化分析仪购自日本尼康公司。

1.3 方法

1.3.1 PRP 制备 采集兔耳中心动脉血 5 mL 于抗凝真空采血管中,反复晃动以防血液凝固。将采血管置于离心机,以 2 000 r/min 离心 10 min,血液分为上(纤维蛋白原为主的上清液)、中(白细胞及血小板为主的 PRP 层)、下(红细胞层)3 层,吸取上层液、中层下 3 mm 液体,置于另一无菌离心管,以 2 000 r/min 离心 10 min,得到上(贫血小板层)、中(PRP 层)、下(少量红细胞)3 层。弃去上层大量液体,留少量血清与 PRP 层,红细胞层振荡均匀,共得到 0.5~0.7 mL PRP。经测试血小板浓度为之前常规血液血小板浓度的 3~5 倍,符合 PRP 标准要求。

1.3.2 造模 随机选取 40 只新西兰大白兔建立 KOA 模型^[10]。50 g/L 氯胺酮按 100 mg/kg 剂量耳缘静脉注射麻醉,消毒,均于后右腿膝关节内侧作横切口,切开至关节腔,切断内侧副韧带、前后交叉韧带及内侧半月板,缝合。另取 10 只新西兰大白兔进行假手术处理,即右膝关节内侧皮肤作同等规格切口后即进行缝合,不伤及副韧带及关节腔。术后连续 3 d 均给予青霉素预防感染。2 周后利用 X 射线对膝关节正侧位进行观察。成功造模标准为观察到关节间隙改变和膝关节周围骨赘生成。

1.3.3 分组及干预措施 采用随机数字表法将新西兰大白兔分为 KOA 组、CPM 组、PRP 组及 CPM+PRP 组;另选取假手术的新西兰大白兔作为 Sham 组。CPM 组兔在 CPM 训练仪上进行膝关节 CPM, 1 次/d,每次运动 40 min;PRP 组兔在关节腔内注射 PRP, 1 次/d,每次注射 0.3 mL;CPM+PRP 组兔进行 CPM 40 min 后在关节腔内注射 PRP 0.3 mL, 1 次/d;Sham 组、KOA 组正常饲养不予以治疗。共干预 8 周。

1.3.4 标本采集 干预结束后,麻醉处死各组实验动物,采集兔右膝关节滑膜液,分离右膝关节,观察关

节面外观情况及滑膜增生情况,之后采集关节软骨组织标本,一部分置于 4%多聚甲醛中固定 24 h,15%乙二胺四乙酸脱钙后,石蜡包埋保存;另外一部分放入液氮中保存备用。

1.3.5 兔膝关节软骨组织病理学变化观察 兔膝关节软骨组织石蜡包埋块以 5 mm 厚度连续切片,进行苏木精伊红(HE)染色,在光学显微镜下观察兔膝关节软骨组织结构并进行 Mankin's 评分(共 13 分)^[11]。

1.3.6 兔膝关节滑膜液中 NO 水平检测 采用硝酸还原酶法检测各组兔膝关节滑膜液中 NO 水平,以硝酸盐和亚硝酸盐总水平间接表示 NO 水平。具体操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.3.7 兔膝关节滑膜液中 IL-1β 水平及兔膝关节软骨组织中 MMP-1、MMP-13 水平检测 采用 ELISA

检测兔膝关节滑膜液中 IL-1β 水平及兔膝关节软骨组织中 MMP-1、MMP-13 水平,具体操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.3.8 兔膝关节软骨组织中 Wnt2、β-catenin mRNA 水平检测 提取软骨组织总 RNA,反转录成互补 DNA,-20 ℃冻存。采用实时荧光定量反转录聚合酶链反应扩增 Wnt2 及 β-catenin mRNA 片段。Wnt2、β-catenin、内参 β-actin 引物序列见表 1。20.0 μL 反应体系:0.4 μL ROX Reference Dye II (50×),10.0 μL TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus, 2×),2.0 μL cDNA(50 ng/μL),正、反向引物各 0.8 μL,ddH₂O 6.0 μL。扩增条件:95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s, 60 ℃ 34 s,40 个循环。采用 2^{-ΔΔCT} 法计算 Wnt2、β-catenin mRNA 水平。

表 1 引物序列(5'-3')

引物名称	正向	反向
Wnt2	ACACCTCCCATGTCACCCG	TCCAGAGCTTCCAGGAGTC
β-catenin	GGAAAGCAAGCTCATCATTCT	AGTGCCTGCATCCCACCA
β-actin	GAGACCTTCAACACCCAGCC	AATGTCACGCACGATTTC

1.3.9 兔膝关节软骨组织中 Wnt2、β-catenin 蛋白水平检测 采用蛋白质免疫印迹法(WB)检测兔膝关节软骨组织中 Wnt2、β-catenin 蛋白水平。通过蛋白抽提试剂盒从软骨组织中提取总蛋白,采用 BCA 法测量蛋白水平,-80 ℃冻存。50 mg 样品通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转到聚偏二氟乙烯膜,室温封闭,加入 anti-β-catenin(1:5 000)、anti-Wnt2(1:1 000)、anti-β-actin(1:5 000)一抗 4 ℃过夜孵育,加入二抗 IgG(1:5 000),室温孵育 1.5 h,显色,拍照,分析蛋白灰度值,并归一化为 β-actin。

1.4 统计学处理 采用 SPSS25.0 统计软件进行数据分析处理。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

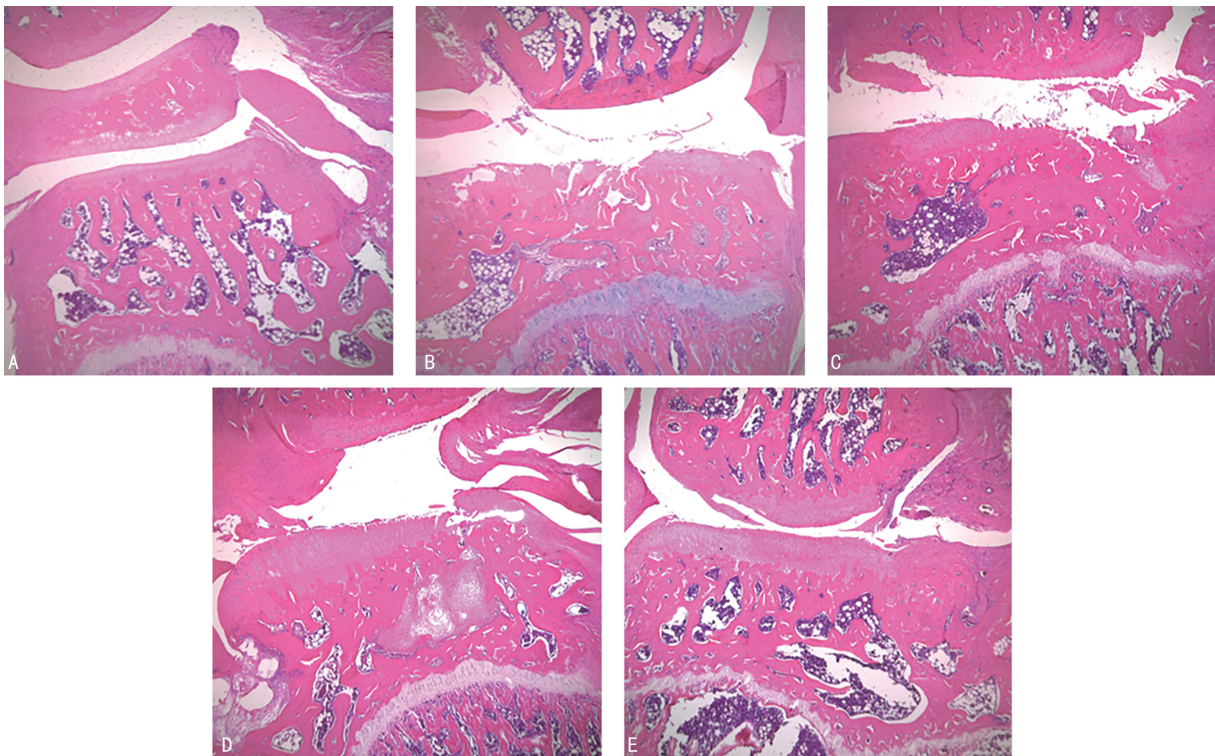
2.1 各组兔膝关节软骨组织病理学变化 Sham 组兔膝关节软骨组织层次分明,基质分散均匀,骨细胞形态及分布正常。KOA 组兔膝关节软骨基质层变薄,甚至消失,骨细胞变性、坏死,层次紊乱。CPM 组、PRP 组、CPM+PRP 组兔膝关节软骨组织表面较为平整,细胞形态及分布较 KOA 正常,软骨丢失减少。见图 1。

2.2 各组兔膝关节软骨组织 Mankin's 评分比较 Sham 组、KOA 组、CPM 组、PRP 组及 CPM+PRP 组兔膝关节软骨组织 Mankin's 评分比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);KOA 组、CPM 组、PRP 组及

CPM+PRP 组兔膝关节软骨组织 Mankin's 评分均明显高于 Sham 组,差异有统计学意义($P < 0.05$);CPM 组、PRP 组及 CPM+PRP 组兔膝关节软骨组织 Mankin's 评分均明显低于 KOA 组,且 CPM+PRP 组兔膝关节软骨组织 Mankin's 评分低于 CPM 组、PRP 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 各组兔膝关节滑膜液中 NO、IL-1β 水平比较 Sham 组、KOA 组、CPM 组、PRP 组及 CPM+PRP 组兔膝关节滑膜液中 NO、IL-1β 水平比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);KOA 组、CPM 组、PRP 组及 CPM+PRP 组兔膝关节滑膜液中 NO、IL-1β 水平均明显高于 Sham 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);CPM 组、PRP 组及 CPM+PRP 组兔膝关节滑膜液中 NO、IL-1β 水平均明显低于 KOA 组,且 CPM+PRP 组膝关节滑膜液中 NO、IL-1β 水平均低于 CPM 组、PRP 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 各组兔膝关节软骨组织中 MMP-1、MMP-13 水平比较 Sham 组、KOA 组、CPM 组、PRP 组及 CPM+PRP 组兔膝关节软骨组织中 MMP-1、MMP-13 水平比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);KOA 组、CPM 组、PRP 组及 CPM+PRP 组兔膝关节软骨组织中 MMP-1、MMP-13 水平均明显高于 Sham 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);CPM 组、PRP 组及 CPM+PRP 组 MMP-1、MMP-13 水平均低于 KOA 组,且 CPM+PRP 组兔膝关节软骨组织中 MMP-1、MMP-13 水平均低于 CPM 组、PRP 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 4。



注:A 为 Sham 组;B 为 KOA 组;C 为 CPM 组;D 为 PRP 组;E 为 CPM+PRP 组。
图 1 各组兔膝关节软骨组织病理学变化(HE 染色,×100)

表 2 各组兔膝关节软骨组织 Mankin's 评分比较($\bar{x} \pm s$)		
组别	<i>n</i>	Mankin's 评分(分)
Sham 组	10	0.85±0.17
KOA 组	10	12.16±2.42 [*]
CPM 组	10	5.68±1.14 ^{*#△}
PRP 组	10	5.59±1.18 ^{*#△}
CPM+PRP 组	10	3.32±0.67 ^{*#}
<i>F</i>		98.005
<i>P</i>		<0.001

注:与 Sham 组比较,^{*}*P*<0.05;与 KOA 组比较,[#]*P*<0.05;与 CPM+PRP 组比较,[△]*P*<0.05。

表 3 各组兔膝关节滑膜液中 NO、IL-1β 水平比较($\bar{x} \pm s$)			
组别	<i>n</i>	NO(μmol/L)	IL-1β(μg/L)
Sham 组	10	4.35±0.45	5.62±1.02
KOA 组	10	13.34±1.03 [*]	11.39±2.31 [*]
CPM 组	10	10.29±0.74 ^{*#△}	9.81±1.43 ^{*#△}
PRP 组	10	10.26±0.75 ^{*#△}	9.65±1.41 ^{*#△}
CPM+PRP 组	10	7.48±0.59 ^{*#}	6.83±1.05 ^{*#}
<i>F</i>		210.889	102.633
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:与 Sham 组比较,^{*}*P*<0.05;与 KOA 组比较,[#]*P*<0.05;与 CPM+PRP 组比较,[△]*P*<0.05。

2.5 各组兔膝关节软骨组织中 Wnt2、β-catenin mRNA 水平比较 Sham 组、KOA 组、CPM 组、PRP 组及 CPM+PRP 组兔膝关节软骨组织中 Wnt2、β-cate-

nin mRNA 水平比较,差异均有统计学意义(*P*<0.05); KOA 组、CPM 组、PRP 组及 CPM+PRP 组兔膝关节软骨组织中 Wnt2、β-catenin mRNA 水平均明显低于 Sham 组,差异均有统计学意义(*P*<0.05); CPM 组、PRP 组及 CPM+PRP 组兔膝关节软骨组织中 Wnt2、β-catenin mRNA 水平均高于 KOA 组,且 CPM+PRP 组兔膝关节软骨组织中 Wnt2、β-catenin mRNA 水平高于 CPM 组、PRP 组,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。见表 5。

表 4 各组兔膝关节软骨组织中 MMP-1、MMP-13 水平比较($\bar{x} \pm s$, ng/mL)			
组别	<i>n</i>	MMP-1	MMP-13
Sham 组	10	60.25±6.13	26.74±3.95
KOA 组	10	101.74±14.65 [*]	56.19±6.12 [*]
CPM 组	10	92.48±10.56 ^{*#△}	48.36±5.23 ^{*#△}
PRP 组	10	90.23±10.75 ^{*#△}	46.39±5.14 ^{*#△}
CPM+PRP 组	10	76.26±7.31 ^{*#}	35.41±4.21 ^{*#}
<i>F</i>		29.207	53.738
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:与 Sham 组比较,^{*}*P*<0.05;与 KOA 组比较,[#]*P*<0.05;与 CPM+PRP 组比较,[△]*P*<0.05。

2.6 各组兔膝关节软骨组织中 Wnt2、β-catenin 蛋白水平比较 Sham 组、KOA 组、CPM 组、PRP 组及 CPM+PRP 组兔膝关节软骨组织中 Wnt2、β-catenin 蛋白水平比较,差异均有统计学意义(*P*<0.05); KOA 组、CPM 组、PRP 组及 CPM+PRP 组兔膝关节软骨组织中 Wnt2、β-catenin 蛋白水平均低于 Sham

组,差异均有统计学意义($P<0.05$);CPM 组、PRP 组及 CPM+PRP 组兔膝关节软骨组织中 Wnt2、 β -catenin 蛋白水平均高于 KOA 组,且 CPM+PRP 组兔膝关节软骨组织中 Wnt2、 β -catenin 蛋白水平高于 CPM 组、PRP 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 2、表 6。

表 5 各组兔膝关节软骨组织中 Wnt2、 β -catenin mRNA 水平比较($\bar{x}\pm s$)			
组别	<i>n</i>	Wnt2 mRNA	β -catenin mRNA
Sham 组	10	0.98 $\pm$ 0.11	0.99 $\pm$ 0.09
KOA 组	10	0.36 $\pm$ 0.05 [*]	0.19 $\pm$ 0.02 [*]
CPM 组	10	0.47 $\pm$ 0.06 ^{*#Δ}	0.31 $\pm$ 0.03 ^{*#Δ}
PRP 组	10	0.49 $\pm$ 0.05 ^{*#Δ}	0.35 $\pm$ 0.04 ^{*#Δ}
CPM+PRP 组	10	0.68 $\pm$ 0.07 ^{*#}	0.61 $\pm$ 0.06 ^{*#}
<i>F</i>		115.879	347.945
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:与 Sham 组比较,^{*} $P<0.05$;与 KOA 组比较,[#] $P<0.05$;与 CPM+PRP 组比较, ^{Δ} $P<0.05$ 。

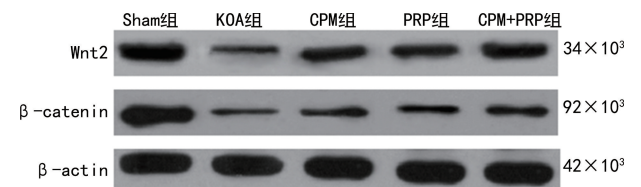


图 2 WB 检测兔膝关节软骨组织中 Wnt2、 β -catenin 蛋白

表 6 各组兔膝关节软骨组织中 Wnt2、 β -catenin 蛋白水平比较($\bar{x}\pm s$)			
组别	<i>n</i>	Wnt2 蛋白	β -catenin 蛋白
Sham 组	10	1.02 $\pm$ 0.10	0.98 $\pm$ 0.09
KOA 组	10	0.19 $\pm$ 0.02 [*]	0.13 $\pm$ 0.01 [*]
CPM 组	10	0.41 $\pm$ 0.04 ^{*#Δ}	0.32 $\pm$ 0.02 ^{*#Δ}
PRP 组	10	0.43 $\pm$ 0.03 ^{*#Δ}	0.34 $\pm$ 0.03 ^{*#Δ}
CPM+PRP 组	10	0.65 $\pm$ 0.07 ^{*#}	0.58 $\pm$ 0.05 ^{*#}
<i>F</i>		276.685	445.000
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:与 Sham 组比较,^{*} $P<0.05$;与 KOA 组比较,[#] $P<0.05$;与 CPM+PRP 组比较, ^{Δ} $P<0.05$ 。

3 讨 论

KOA 是一种退化性关节炎炎症性疾病,本研究以手术损伤方式诱导新西兰大白兔膝关节损伤使其发生炎症反应,结果发现,KOA 组兔软骨层变薄,甚至消失,整体细胞数量增加,骨细胞变性、坏死,层次紊乱,且膝关节软骨组织 Mankin's 评分明显升高,提示模型制备成功。滑膜炎症反应与 KOA 的发生、发展及骨关节疼痛程度密切相关。目前关于 KOA 治疗的目的是校正关节畸形,减轻或消除疼痛,恢复其功能,提高患者生活质量。人工关节置换术虽可真正阻断疾病进展,达到治愈效果,但手术风险较高、易出现并

发症且人工材料磨损严重,这些因素均导致临床应用受限。因此,深入探讨其发病机制、寻找有效的治疗措施至关重要。

PRP 是全血离心获得的血小板浓缩液,可有效降低炎症反应,阻滞坏死细胞迁移,加速组织重建等,已成为骨科界越来越受欢迎的治疗选择^[12]。SHAHID 等^[13]研究报道,PRP 可有效治疗膝关节性疾病,减轻炎症反应。本研究结果发现,PRP 可明显减轻 KOA 兔膝关节软骨组织病理改变,降低 Mankin's 评分,提示 PRP 可能对 KOA 有一定的治疗作用。传统观念认为,KOA 治疗耗时长,且因关节痉挛、肌肉萎缩及关节内粘连等因素严重影响关节功能恢复。而近来专家经大量实验研究发现,科学合理运动锻炼可降低患者关节疼痛,对 KOA 治疗具有积极作用,且不良反应少^[14]。REX^[15]研究报道,CPM 可防止关节粘连,加速关节内软骨再生及修复,促进肢体功能恢复。BRAM 等^[16]研究报道,CPM 可减少前交叉韧带重建后关节纤维化的发生率。本研究结果显示,CPM 亦可减轻 KOA 兔膝关节软骨组织病理改变,降低 Mankin's 评分,提示 CPM 亦可有效改善 KOA 的病理病变。有研究显示,PRP 与本体觉运动疗法联合治疗能够提高膝关节活动度,减轻疼痛^[17];PRP 联合神经肌肉和肌力训练机运动为主的运动疗法对 KOA 的治疗作用优于单纯 PRP 治疗^[18]。本研究将 PRP 及 CPM 联合治疗 KOA 新西兰大白兔,结果发现,联合治疗后疗效明显优于单一治疗,与上述临床研究结果相似,提示 PRP 联合 CPM 可能成为治疗 KOA 的有效方法,但其潜在机制尚不完全明确。

滑膜炎症存在于骨关节炎的早期及晚期,与骨关节疼痛密切相关,滑膜炎症发生时可分泌 MMP、NO、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α 等,关节组织及滑膜液中高水平 MMP 可造成软骨基质降解,严重影响关节功能。武永利等^[19]研究报道,抑制 MMP-1、MMP-13 表达可有效发挥对 KOA 的治疗作用。NO 是一种炎症递质,可直接造成软骨损伤,其水平与关节软骨组织破坏程度呈明显正相关;IL-1 β 是导致软骨基质降解的主要炎症因子之一,可明显刺激 MMP 分泌,抑制骨修复能力,促进骨细胞分解代谢及凋亡,促进 KOA 进展^[20-21]。本研究中,KOA 模型兔膝关节软骨组织中 MMP-1、MMP-13 及滑膜液中 NO、IL-1 β 水平均明显升高,表明软骨组织呈现明显的炎症反应和基质降解,软骨组织遭到破坏,符合 KOA 的临床症状;而 CPM 联合 PRP 治疗可明显降低兔膝关节软骨组织中 MMP-1、MMP-13 及滑膜液中 NO、IL-1 β 水平,且明显优于单一治疗措施,提示 PRP 与 CPM 有一定协同作用,可能通过抑制 IL-1 β 表达有效降低兔膝关节软骨组织中 MMP-1、MMP-13 的分泌,同时降低兔膝关节滑膜液中 NO 水平,进而减轻 KOA 炎症反应,保护软骨组织免受降解,提高关节功能。

Wnt/ β -catenin 经典信号通路激活可通过刺激下游靶基因周期蛋白、骨形态发生蛋白 2、MMP-1/13 等转录,促进成骨细胞分裂、增殖及成熟,同时影响破骨细胞分化及成熟^[22]。有研究证实,Wnt/ β -catenin 信号通路在软骨退变和损伤中起重要作用,该通路激活与 KOA 的发生、发展密切相关。LIU 等^[23] 研究报道,从 PRP 中提取的外泌体通过 Wnt/ β -catenin 信号通路促进软骨细胞增殖,抑制其凋亡,在减轻 KOA 方面具有新的潜力。本研究结果显示,与 Sham 组比较,KOA 组兔膝关节软骨组织中 Wnt2、 β -catenin mRNA 及 Wnt2、 β -catenin 蛋白水平均明显降低,提示 KOA 发生时可能存在 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制。而 CPM 联合 PRP 进行治疗可明显增加兔膝关节软骨组织中 Wnt2、 β -catenin 蛋白水平,且明显优于单一治疗措施,提示 PRP 联合 CPM 治疗 KOA 可能与促进 Wnt/ β -catenin 信号通路而激活有关,其具体机制可能是通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路而抑制 IL-1 β 表达,进而减少软骨组织中 MMP-1、MMP-13 分泌,并抑制滑膜炎症反应,进一步缓解软骨基质降解,提高骨修复能力,最终抑制 KOA 进展。

综上所述,CPM 联合 PRP 治疗可更好地减轻 KOA 炎症反应及软骨组织病变,保护软骨组织免受降解,可能与促进 Wnt/ β -catenin 信号通路激活有关,为临床 KOA 治疗提供新的思路及理论参考。然而,可能有其他信号通路参与 CPM 联合 PRP 治疗 KOA 的过程,需继续深入探讨。

参考文献

- [1] LOPEZ-RUIZ M, LOSILLA J M, MONFORT J, et al. Central sensitization in knee osteoarthritis and fibromyalgia: Beyond depression and anxiety[J]. PLoS One, 2019, 14(12): e0225836.
- [2] TRAISTARU M R, KAMAL D, MARIA D T, et al. Complex evaluation in patients with knee osteoarthritis[J]. Rom J Morphol Embryol, 2019, 60(1): 167-174.
- [3] DADABO J, FRAM J, JAYABALAN P. Noninterventional therapies for the management of knee osteoarthritis[J]. J Knee Surg, 2019, 32(1): 46-54.
- [4] RODRIGUEZ-MERCHAN E C. Topical therapies for knee osteoarthritis[J]. Postgrad Med, 2018, 130(7): 607-612.
- [5] LANA J F, MACEDO A, INGRAO I, et al. Leukocyte-rich PRP for knee osteoarthritis: current concepts[J]. J Clin Orthop Trauma, 2019, 10(Suppl 1): S179-S182.
- [6] SOUTHWORTH T M, NAVEEN N B, TAURO T M, et al. The use of platelet-rich plasma in symptomatic knee osteoarthritis[J]. J Knee Surg, 2019, 32(1): 37-45.
- [7] LE A D K, ENWEZE L, DEBAUN M R, et al. Platelet-rich plasma[J]. Clin Sports Med, 2019, 38(1): 17-44.
- [8] BENNER R W, SHELBOURNE K D, BAUMAN S N, et al. Knee osteoarthritis: alternative range of motion treatment[J]. Orthop Clin North Am, 2019, 50(4): 425-432.
- [9] LIAO C D, TSAUO J Y, HUANG S W, et al. Preopera-

tive range of motion and applications of continuous passive motion predict outcomes after knee arthroplasty in patients with arthritis[J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2019, 27(4): 1259-1269.

- [10] LUO Q, JI S, LI Z, et al. Effects of ultrasound therapy on the synovial fluid proteome in a rabbit surgery-induced model of knee osteoarthritis[J]. Biomed Eng Online, 2019, 18(1): 18-32.
- [11] 吴晓, 檀亚军, 咸杰, 等. 富血小板血浆修复膝关节骨关节炎[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(42): 6259-6264.
- [12] HENNING P R, GREAR B J. Platelet-rich plasma in the foot and ankle[J]. Curr Rev Musculoskelet Med, 2018, 11(4): 616-623.
- [13] SHAHID M, KUNDRA R. Platelet-rich plasma (PRP) for knee disorders[J]. EFORT Open Rev, 2017, 2(1): 28-34.
- [14] JASPERS T, TAEYMANS J, HIRSCHMULLER A, et al. Continuous passive motion does improve range of motion, pain and swelling after ACL reconstruction: a systematic review and meta-analysis[J]. Z Orthop Unfall, 2019, 157(3): 279-291.
- [15] REX C. Continuous passive motion therapy after total knee arthroplasty[J]. Nursing, 2018, 48(5): 55-57.
- [16] BRAM J T, GAMBONE A J, DEFRANCESCO C J, et al. Use of continuous passive motion reduces rates of arthrofibrosis after anterior cruciate ligament reconstruction in a pediatric population[J]. Orthopedics, 2019, 42(1): e81-e85.
- [17] 乔源鑫, 宋子民, 张荣方, 等. 富血小板血浆关节腔注射联合本体觉运动疗法应用于膝关节交叉韧带损伤术后的单中心前瞻性研究[J]. 中国疗养医学, 2023, 32(12): 1267-1270.
- [18] 梁冲, 郑磊鑫, 刘来, 等. 富血小板血浆联合运动疗法在膝骨关节炎中的短期疗效观察[J]. 加速康复外科杂志, 2022, 5(4): 160-164.
- [19] 武永利, 刘娣, 马晓秀, 等. 温针灸对兔膝骨性关节炎模型软骨细胞中 c-Jun 氨基末端激酶信号通路的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(11): 1372-1377.
- [20] 王德刚, 许传勇, 姜玉祥, 等. 黄芪甲苷对 Wnt/ β -catenin 信号通路活化的人滑膜及软骨细胞共培养体系相关因子的调控作用[J]. 广东医学, 2017, 38(3): 354-357.
- [21] 吴迫乐, 陈星强, 陈春蓉, 等. 透骨消痛胶囊及其拆方对退变软骨细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(24): 3568-3573.
- [22] 兰维娅, 唐芳, 马武开, 等. Wnt/ β -catenin 抑制剂 DKK1 调控类风湿关节炎的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(8): 2015-2017.
- [23] LIU X, WANG L, MA C, et al. Exosomes derived from platelet-rich plasma present a novel potential in alleviating knee osteoarthritis by promoting proliferation and inhibiting apoptosis of chondrocyte via Wnt/beta-catenin signaling pathway[J]. J Orthop Surg Res, 2019, 14(1): 470-485.