

doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2025.08.006

三氧联合富血小板血浆对 IL-1 β 诱导人软骨细胞炎症损伤的保护作用及机制研究 *

马雪琴¹ 袁小迪³ 张凌嘉¹ 杨从敏² 王朝杨² 李茸源² 肖奕君² 吴 畏^{1,2,Δ}(¹ 西南医科大学临床医学院, 泸州 646000; ² 中国人民解放军西部战区总医院疼痛科, 成都 610083;³ 成都市第五人民医院麻醉科, 成都 611130)

摘 要 目的: 探究三氧 (ozone, O₃) 联合富血小板血浆 (platelet rich plasma, PRP) 对白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 诱导的人软骨细胞炎症损伤的保护作用及机制。方法: 采用 10 ng/ml 的 IL-1 β 诱导人软骨细胞构建软骨细胞炎症损伤模型, 随机分为 Control 组、IL-1 β 组、PRP 组、O₃ 组、O₃+PRP 组。甲苯胺蓝染色观察细胞形态及数量; CCK-8 法检测细胞活力; 流式细胞术检测细胞凋亡率; ELISA 检测细胞上清液中炎症因子 TNF- α 、IL-6 的水平; 采用 RT-qPCR 和 Western Blot 法分别检测基质金属蛋白酶 13 (matrix metalloproteinase 13, MMP13)、血小板反应蛋白解整合素金属肽酶 5 (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5, ADAMTS5)、二型胶原蛋白 (collagen II)、转录因子核因子红细胞-2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)、核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B)、人核因子 κ B 抑制蛋白 α (inhibitor kappa B alpha, IKB- α)、血红素氧合酶 1 (heme oxygenase 1, HO-1) 的 mRNA 和蛋白表达。结果: 与 Control 组比较, IL-1 β 组 IL-6 和 TNF- α 水平升高, 细胞活力降低且凋亡增加, MMP13、ADAMTS5 和 NF- κ B 的 mRNA 及蛋白表达升高 ($P < 0.05$), Collagen II、Nrf2、HO-1、IKB- α 的 mRNA 及蛋白表达下降 ($P < 0.05$); 与 IL-1 β 组相比, PRP 组、O₃ 组、O₃+PRP 组细胞凋亡均降低 ($P < 0.05$), IL-6 和 TNF- α 水平均下降 ($P < 0.05$), MMP13、ADAMTS5 和 NF- κ B 的 mRNA 及蛋白表达均下降 ($P < 0.05$), Collagen II、Nrf2、HO-1、IKB- α 的 mRNA 及蛋白表达均升高 ($P < 0.05$); 同时, O₃+PRP 组与 PRP 组、O₃ 组相比, 细胞凋亡及炎症因子水平均进一步降低 ($P < 0.05$), MMP13、ADAMTS5 和 NF- κ B 的 mRNA 及蛋白表达均下降 ($P < 0.05$), Nrf2、HO-1、IKB- α 的 mRNA 及蛋白表达均升高 ($P < 0.05$)。结论: O₃ 联合 PRP 能有效降低 IL-1 β 诱导的人软骨细胞炎症损伤, 减少细胞凋亡, 增加细胞活力, 减少细胞外基质降解, 其可能通过上调 Nrf2/HO-1, 抑制 NF- κ B (p65) 通路发挥保护作用。

关键词 富血小板血浆; 三氧; 白细胞介素-1 β ; 软骨细胞; 炎症

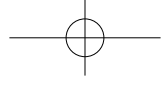
The protective effect and mechanism of ozone combined with platelet rich plasma on IL-1 β induced inflammatory damage in human chondrocytes *

MA Xue-qin¹, YUAN Xiao-di³, ZHANG Ling-jia¹, YANG Cong-min², WANG Chao-yang², LI Rong-yuan², XIAO Yi-jun², WU Wei^{1,2,Δ}(¹ School of Clinical Medical Sciences, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; ² Department of Pain Medicine, General Hospital of Western Theater Command, PLA, Chengdu 610083, China; ³ Department of Anesthesiology, Chengdu Fifth People's Hospital, Chengdu 611130, China)

Abstract Objective: To explore the protective effect and mechanism of platelet rich plasma (PRP) combined with ozone (O₃) on the inflammatory injury in human chondrocytes induced by interleukin-1 β (IL-1 β). **Methods:** Human chondrocytes were induced with 10 ng/ml IL-1 β to establish a model of chondrocyte inflammation and injury. The cells were randomly divided into five groups: Control, IL-1 β , PRP, O₃, and O₃+PRP. Cell morphology and number were observed by toluidine blue staining. Cell viability was detected by the CCK-8 assay. The apoptosis rate

* 基金项目: 四川省干部保健科研项目 (川干研 2022-1301)

Δ 通信作者 吴畏 wuweizj@163.com



was detected by flow cytometry. The levels of inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 in the supernatant were detected by ELISA. RT-qPCR and Western Blot were used to detect mRNA and protein expression of Matrix metalloproteinase 13 (MMP13), a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5 (ADAMTS5), Collagen II, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), nuclear factor kappa-B (NF- κ B), inhibitor kappa B alpha (IKB- α), and heme oxygenase 1 (HO-1). **Results:** Compared with Control group, the IL-1 β group showed increased levels of IL-6 and TNF- α , decreased cell viability, increased apoptosis, and upregulated mRNA and protein expressions of MMP13, ADAMTS5, and NF- κ B ($P < 0.05$). The mRNA and protein expressions of Collagen II, Nrf2, HO-1, and IKB- α were decreased ($P < 0.05$). Compared with IL-1 β group, the PRP, O₃, and O₃ + PRP groups exhibited reduced apoptosis ($P < 0.05$), lower level of IL-6 and TNF- α ($P < 0.05$), and decreased expressions of MMP13, ADAMTS5, and NF- κ B ($P < 0.05$). Additionally, the mRNA and protein expressions of Collagen II, Nrf2, HO-1, and IKB- α were increased in these groups (all $P < 0.05$). Meanwhile, compared with PRP and O₃ groups, the levels of apoptosis and inflammatory factors in O₃ + PRP group were further decreased ($P < 0.05$), the mRNA and protein expressions of MMP13, ADAMTS5, and NF- κ B were decreased ($P < 0.05$). The mRNA and protein expressions of Nrf2, HO-1, and IKB- α were increased ($P < 0.05$) in O₃ + PRP group. **Conclusion:** O₃ combined with PRP effectively reduces IL-1 β -induced inflammatory damage in human chondrocytes, decreases apoptosis, increases cell viability, and reduce extracellular matrix degradation. This protective effect may be mediated by up-regulating Nrf2/HO-1 pathway and inhibiting the NF- κ B (p65) pathway.

keywords platelet rich plasma; ozone; interleukin-1 β ; chondrocytes; inflammation

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种普遍存在且具有破坏性的疾病, 以关节软骨的破坏和丢失、软骨下骨改变、滑膜炎为主要病理特征, 好发于中老年人群, 发病率高, 65 岁以上膝关节疼痛人群有超过 50% 为 OA 病人^[1,2]。OA 最终会导致疼痛、生活质量下降和高医疗成本, 给社会带来巨大的负担。因此 OA 的治疗面临着艰难但有意义的挑战。

OA 的发病机制复杂, 目前尚未完全阐明。研究发现, 核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 信号通路参与 OA 的进展, 通路被激活后可促进炎症基因转录, 调控细胞增殖和凋亡相关基因, 从而加速 OA 的进展^[3]。长期以来, OA 的治疗侧重于改善关节疼痛症状, 而非减缓疾病进展^[4]。富血小板血浆 (platelet rich plasma, PRP) 是一种富含血管内皮生长因子、表皮生长因子、血小板衍生生长因子、转化生长因子- β 的血小板浓缩物质, 这些生长因子调节复杂伤口愈合过程的所有阶段, 并影响参与组织重建、血管和骨重塑、血管生成、凝血的细胞和炎症的获取、生长和分化, 因此被广泛应用于临床^[5,6]。研究表明, PRP 可以促进软骨细胞及间充质干细胞的增殖, 同时沉积 II 型胶原, 并且可以使 OA 中炎症因子, 如 IL-6、IL-8、TNF- α 的水平降低, 从而修复软骨^[7,8]。据报道, PRP 治疗 OA 的机制可能是通过抑制 NF- κ B 信号通路减轻炎症反应来延缓 OA 的进展^[9]。三氧 (ozone, O₃) 是一种强氧化剂,

鉴于其激活细胞代谢和抑制前列腺素合成介导的镇痛、抗炎和抗氧化作用的生物学特性, 对各种炎性疼痛、神经病理性疼痛等均有显著的疗效, 在临床治疗中广受青睐^[10]。O₃ 治疗 OA 机制可能是通过降低 NF- κ B 途径激活, 上调 Nrf2 来抑制氧化应激和炎症反应^[11]。

鉴于两者可能存在的共同作用机制, 欲探讨两者联合使用的疗效, 但相关研究少有报道。因此, 本研究通过体外研究, 采用 IL-1 β 诱导人软骨细胞炎症损伤模型模拟 OA 损伤, 进一步探讨 O₃ 联合 PRP 对其保护作用及机制, 为临床治疗 OA 提供更多理论依据。

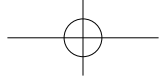
方 法

1. 实验细胞

人原代软骨细胞 (CP-H107, 武汉普诺赛生命科技有限公司) 使用人软骨细胞完全培养基, 置于 37℃ 的 5% CO₂ 恒温培养箱中培养。该细胞可传 5 代左右, 3 代以内状态最佳, 因此选择第 3 代细胞进行后续实验。

2. PRP 来源

本研究通过中国人民解放军西部战区总医院医学伦理委员会审核 (伦理批号 2021EC4-86)。实验所用 PRP 来自于同 1 例临床志愿者, 使用血细胞分



离心机 (MCS + 3000, Haemonetics, 美国) 采集贫白细胞 PRP, 血小板计数为 $1200 \times 10^9/L$ 。

3. 实验方法

(1) CCK-8 法检测细胞活力: 取生长状况良好的第 3 代人软骨细胞, 以每孔 5×10^3 个的密度接种在 96 孔板上, 每孔完全培养基 100 μl , 每组设置 4 个复孔, 在恒温培养箱中培养 24 h 后, 参照既往研究, 在 96 孔板中加入 10 ng/ml IL-1 β 处理 24 h 建立 OA 模型后^[12], 分别用不同浓度 PRP (用培养基稀释成 1/2 倍、1/3 倍、1/4 倍、1/5 倍)、不同浓度 O_3 (10 $\mu g/ml$ 、15 $\mu g/ml$ 、20 $\mu g/ml$ 、30 $\mu g/ml$) 处理软骨细胞。将含 O_3 的 96 孔板在恒温培养箱中分别培养 15 min、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h; 含 PRP 的 96 孔板在恒温培养箱中分别培养 1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h。用 CCK-8 试剂盒 (BMU106-CN, Abbkine, 中国武汉) 测定不同处理组的细胞在 450 nm 波长处的吸光度 (absorbance, OD) 值, 确定 PRP 及 O_3 的最佳干预浓度及时间。

(2) 将软骨细胞进行随机分组: Control 组、IL-1 β 组 (模型组)、PRP 组、 O_3 组、 O_3 +PRP 组。其中 Control 组仅加入完全培养基, IL-1 β 组仅加入 IL-1 β , PRP 组加入 IL-1 β 和 PRP, O_3 组加入 IL-1 β 和 O_3 , O_3 +PRP 组加入 IL-1 β 、 O_3 和 PRP。

(3) 甲苯胺蓝染色观察细胞形态: 以每孔 3×10^5 的密度接种于 6 孔板中, 按照不同分组进行相应处理, 处理完成后弃去培养基, 用 PBS 清洗 2 次, 每次 1 min; 将细胞专用甲苯胺蓝染色液 (G3660, 索莱宝, 中国北京) 加入每孔中, 每孔 300 μl , 染色 5 min; 再向每孔加入等量蒸馏水轻轻吹打或轻轻晃动培养板, 静置 15 min; 弃掉上述染液, 蒸馏水洗 2 次, 每次 30 s, 加入适量蒸馏水完全浸没, 于倒置显微镜下观察拍照。

(4) ELISA 检测细胞上清液中炎症因子表达水平: 以每孔 3×10^5 的密度接种于 6 孔板中, 按实验分组进行处理后, 吸取细胞培养上清液, 4 $^{\circ}C$ 及 2500 r/min 条件下离心 20 min, 收集离心后的上清液, 使用睿信生物科技有限公司的 ELISA 试剂盒检测 IL-6 (RX106126H)、TNF- α (RX104793H) 的水平, 具体步骤参照说明书。

(5) 流式细胞仪检测细胞凋亡: 以每孔 3×10^5 的密度接种于 6 孔板中, 按照不同分组进行相应处理后, 用 0.25% 无 EDTA 胰酶消化, 1200 r/min 离心 3 min 收集细胞, 所用细胞凋亡试剂盒 (AP101) 来自浙江联科生物技术股份有限公司, 用 Binding Buffer

重悬细胞, 取 500 μl 细胞重悬液, 依次加入 5 μl 膜联蛋白-V (Annexin-V)、5 μl 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 轻轻混匀, 避光在室温下孵育 10 min, 1 h 内上流式细胞仪进行检测, 分析软骨细胞凋亡率。

(6) 蛋白质印迹法 (Western Blot, WB): 按照不同分组进行相应处理, 处理完毕后吸去培养液, PBS 冲洗 3 次, 加入含有 1% PMSF 的 RIPA 缓冲液裂解细胞, 用细胞刮刀刮离培养皿中的细胞, 将刮离的细胞和裂解液均移入 EP 管中, 冰上裂解 30 min 后, 4 $^{\circ}C$ 、12,000 r/min 离心 30 min, 测定蛋白浓度, 将蛋白样品煮沸变性。常规电泳、转膜 (PVDF 膜) 后, 封闭 30 min, 一抗 4 $^{\circ}C$ 孵育过夜: MMP13 (Ab51072, Abcam)、Collagen II (Ab188570, Abcam)、ADAMTS5 (Ab188570, Abcam)、NF- κB p65 (10745-1-AP, 武汉三鹰)、Nrf2 (16396-1-AP, 武汉三鹰)、HO-1 (10701-1-AP, 武汉三鹰)、IKB- α (10268-1-AP, 武汉三鹰), TBST 洗膜 4 次, 每次 5 min, 室温孵育山羊抗兔二抗 (Oriscience, 1:5000) 1 h, 洗膜后显影曝光条带。使用 ImageJ 软件处理相应条带的灰度值进行分析。

(7) 实时荧光定量逆转录 PCR 法 (RT-qPCR): 使用 Trizol 法提取人软骨细胞中的总 RNA, 逆转录为 cDNA, 所用逆转录试剂盒来自美国 Bio-Rad 公司。使用实时定量 PCR 仪进行 PCR 扩增, PCR 反应体系组成如下: 5 $\times$ Supermix 5 μl , 引物 forward 0.5 μl , 引物 reverse 0.5 μl , 无酶水 2 μl , cDNA 2 μl ; 引物序列如下: 以 β -actin 为内参基因, forward TTTCCAGCCTTCCTTCCT, reverse CAGGTCTTTGCGGATGTC; MMP13: forward GCACTTCCCA-CAGTGCCTAT, reverse AGTTCTTCCCTTGATG-GCCG; ADAMTS5: forward CCACTTCAGAGAC-TATCAT, reverse GCTATAACGGACATCTAATG; Collagen II: forward CAGCAAGAGCAAGGAGAAG, reverse CGTAGGAAGGTCATCTGGA; Nrf2: forward AACAACTCAGCACCTTAT, reverse TAACATCTG-GCTTCTTACTT; HO-1: forward TCCTGGCTCAG-CCTCAAATG, reverse CACGCATGGCTCAAAAAC-CA; NF- κB (p65): forward TGAACCGAACTCTGG-CAGCTG, reverse CATCAGCTTGCGAAAAGGAG-CC; IKB- α : forward TGTGCTTCGAGTGACTGACC, reverse TCACCCCACATCACTGAACG。

采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因相对表达量。

4. 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析, Graphpad Prism 9.5 绘图, 正态分布计量资料以均数 $\pm$ 标准

差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示, 对符合方差齐性的多组样本数据用 ANOVA 进行检验, 符合方差齐性的两组样本数据使用 t 检验; 不符合方差齐性的数据用 Kruskal-Wallis H 进行检验。每个实验至少重复 3 次, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1. CCK-8 法检测各组细胞活力

结果显示, 相较于 Control 组, IL-1 β 组软骨细胞活力下降 ($P < 0.05$); 以此为基础, 选用不同浓度的 PRP、O₃ 分别同 IL-1 β 诱导的软骨细胞共同孵育, 当 PRP 浓度为 1/3 倍 (将 PRP 稀释 3 倍, 使血小板计数为 $400 \times 10^9/L$ 左右)、O₃ 浓度为 20 $\mu g/ml$ 时, 细胞活力恢复最佳 ($P < 0.05$, 见图 1A, 1C); 当 PRP、O₃ 干预时间分别为 6 h、30 min 时, 与 IL-1 β

组相比, 细胞活力明显增加 ($P < 0.05$, 见图 1B, 1D)。因此, 选择稀释 3 倍 PRP (干预时间 6 h)、O₃ 浓度为 20 $\mu g/ml$ (干预时间 30 min) 作为后续实验研究的有效使用浓度。与 Control 组相比, IL-1 β 组细胞活力明显下降; 与 IL-1 β 组相比, O₃ 组、PRP 组、O₃ + PRP 组细胞活力均增加 ($P < 0.05$); 与 O₃ 组、PRP 组相比, O₃ + PRP 组细胞活力增加更为明显 ($P < 0.05$, 见图 1E)。

2. 甲苯胺蓝染色观察人软骨细胞形态

Control 组中软骨细胞呈梭形或多角形, 细胞结构完整, 数量多; 与 Control 组相比, IL-1 β 组中细胞形态明显变化, 呈纤维状, 且数量减少, 十分稀疏; 与 IL-1 β 组相比, PRP 组、O₃ 组、O₃ + PRP 组中有部分软骨细胞形态恢复, 呈梭形, 细胞数量稍增加, O₃ + PRP 组较 PRP 组、O₃ 组中细胞数量多 (见图 2)。

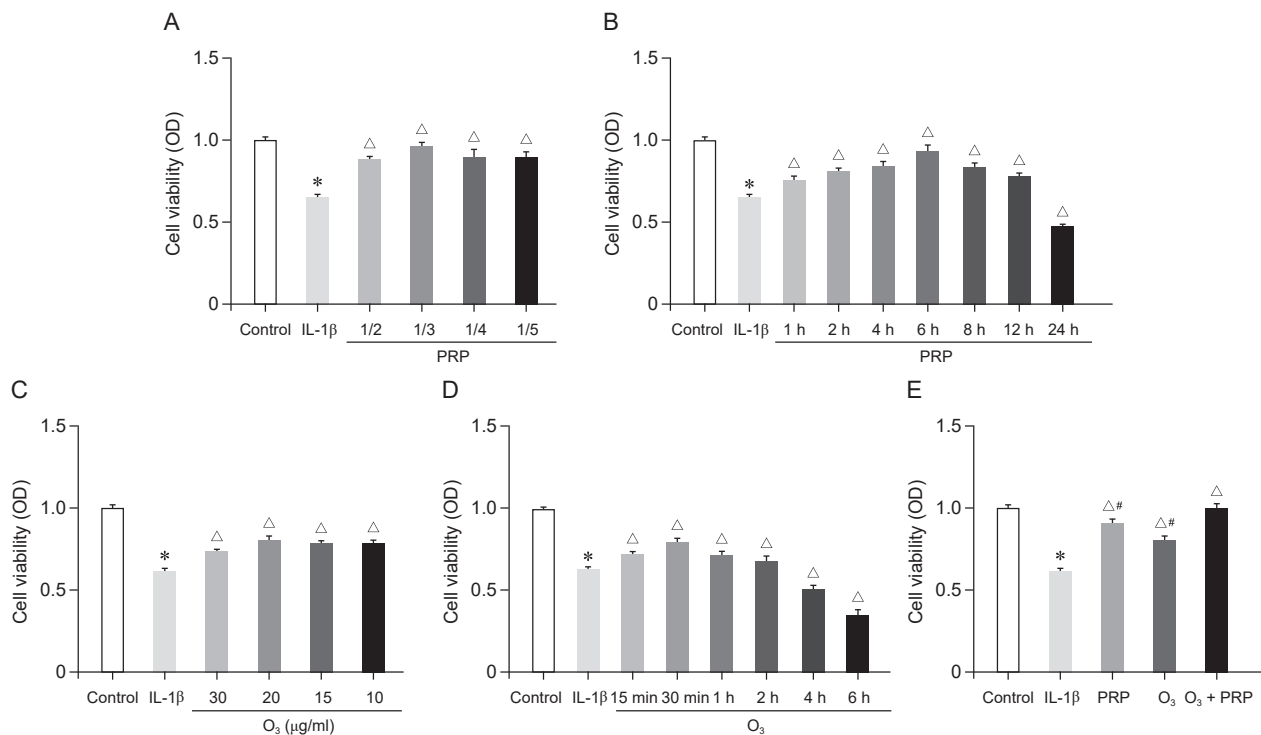


图 1 各组处理后对应的细胞活力

(A) 不同浓度 PRP 处理 6 h 后的细胞活力; (B) PRP 浓度为 1/3 倍时不同 PRP 处理时间的细胞活力; (C) 不同浓度 O₃ 处理 30 min 后的细胞活力; (D) O₃ 浓度为 20 $\mu g/ml$ 时不同 O₃ 处理时间的细胞活力; (E) 经最佳浓度及最佳处理时间处理后的细胞活力

* $P < 0.05$, 与 Control 组相比; $\Delta P < 0.05$, 与 IL-1 β 组相比; # $P < 0.05$, 与 O₃ + PRP 组相比

Fig. 1 Corresponding cell viability after treatment in each group

(A) Cell viability after 6 h treatment with different concentrations of PRP; (B) Cell viability at 1/3 PRP concentration for different PRP treatment times after cell viability; (C) Cell activity after treatment with different concentrations of O₃ for 30 min; (D) Cell activity of different O₃ treatment time at O₃ concentration of 20 $\mu g/ml$; (E) Cell viability after optimum concentration and optimum treatment time.

* $P < 0.05$, compared with Control group; $\Delta P < 0.05$, compared with IL-1 β group; # $P < 0.05$, compared with O₃ + PRP group.

3. 各组细胞上清液中炎症因子释放水平

与 Control 组相比, IL-1 β 组细胞炎症因子水平明显升高 (TNF- α : $P < 0.05$; IL-6: $P < 0.05$); 与 IL-1 β 组相比, PRP 组、O₃ 组、O₃ + PRP 组细胞炎症因子水平降低 (TNF- α : $P < 0.05$; IL-6: $P < 0.05$)。与 PRP 组、O₃ 组相比, O₃ + PRP 组细胞炎症因子水平降低更明显 (TNF- α : $P < 0.05$; IL-6: $P < 0.05$, 见图 3)。

4. 各组软骨细胞凋亡情况

采用 AnnexinV/PI 染色和流式细胞术检测人软骨细胞凋亡, 相较于 Control 组, IL-1 β 组细胞凋亡增多 ($P < 0.05$); 与 IL-1 β 组相比, PRP 组、O₃ 组、O₃ + PRP 组细胞凋亡率降低 ($P < 0.05$)。与 PRP 组、O₃ 组相比, O₃ + PRP 组细胞凋亡率进一步降低 ($P <$

0.05, 见图 4)。

5. 各组 mRNA 表达水平

与 Control 组相比, IL-1 β 组 MMP13、ADAM-TS5、NF- κ B (p65) 的 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$), Collagen II、Nrf2、HO-1、IKB- α 的 mRNA 表达下降 ($P < 0.05$); 与 IL-1 β 组相比, PRP 组、O₃ 组、O₃ + PRP 组 MMP13、ADAMTS5、NF- κ B (p65) 的 mRNA 表达下降 ($P < 0.05$), Collagen II、Nrf2、HO-1、IKB- α 的 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$); 与 PRP 组、O₃ 组相比, O₃ + PRP 组中 MMP13、ADAMTS5、NF- κ B (p65) 的 mRNA 表达降低更为显著 ($P < 0.05$), Collagen II、Nrf2、HO-1、IKB- α 的 mRNA 表达升高更为明显 ($P < 0.05$, 见图 5、6)。

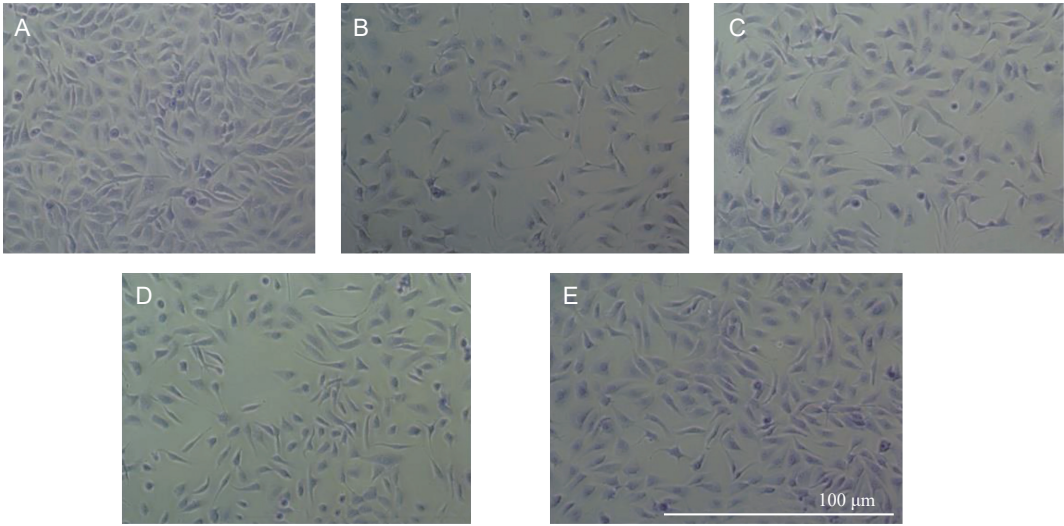


图 2 各组软骨细胞经不同处理后的形态变化 (×100 倍, 标尺 = 100 μ m)
(A) Control 组细胞形态; (B) IL-1 β 组细胞形态; (C) PRP 组细胞形态; (D) O₃ 组细胞形态; (E) O₃ + PRP 组细胞形态
Fig. 2 Morphological changes of chondrocytes in each group (100 $\times$, Scale bar = 100 μ m)
(A) The morphology of cells in the Control group; (B) The morphology of cells in the IL-1 β group; (C) The morphology of cells in the PRP group; (D) The morphology of cells in the O₃ group; (E) The morphology of cells in the PRP + O₃ group.

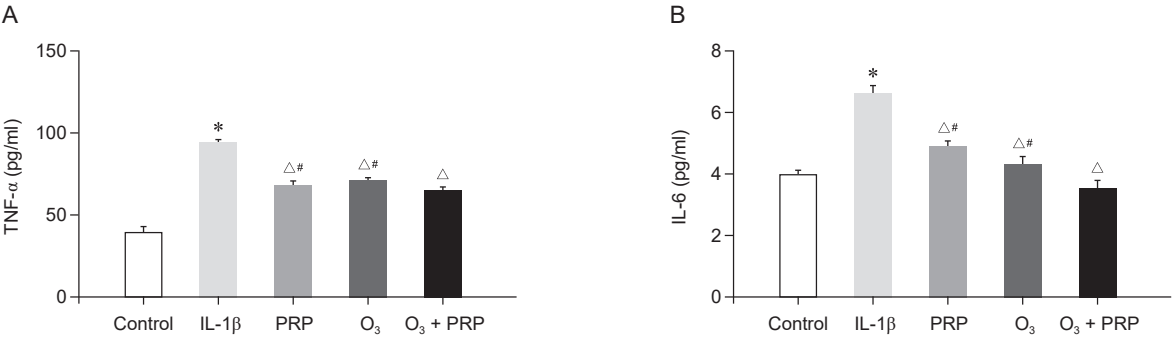


图 3 各组细胞培养上清液中 TNF- α 和 IL-6 的浓度
* $P < 0.05$, 与 Control 组相比; $\Delta P < 0.05$, 与 IL-1 β 组相比; # $P < 0.05$, 与 O₃ + PRP 组相比
Fig. 3 The concentration of TNF- α and IL-6 in cell culture supernatant of each group
* $P < 0.05$, compared with Control group; $\Delta P < 0.05$, compared with IL-1 β group; # $P < 0.05$, compared with O₃ + PRP group.

6. 各组蛋白表达水平

与 Control 组相比, IL-1 β 组 MMP13、ADAMTS5、NF- κ B (p65) 的蛋白表达上调 ($P < 0.05$), Collagen II、Nrf2、HO-1、IKB- α 的蛋白表达下调 ($P < 0.05$); 与 IL-1 β 组相比, PRP 组、O₃ 组、O₃ + PRP 组 MMP13、ADAMTS5、NF- κ B (p65) 的蛋白表达下调 ($P < 0.05$), Collagen II、Nrf2、HO-1、IKB- α 的蛋白表达上调 ($P < 0.05$); 与 PRP 组、O₃ 组相比, O₃ + PRP 组中 MMP13、

ADAMTS5、NF- κ B (p65) 的蛋白表达进一步下调 ($P < 0.05$), Nrf2、HO-1、IKB- α 的蛋白表达进一步上调 ($P < 0.05$, 见图 7、8)。

讨 论

OA 是最普遍的慢性疾病之一, 被认为是全球致残的主要原因^[13]。IL-1 β 是一种重要的促炎细胞

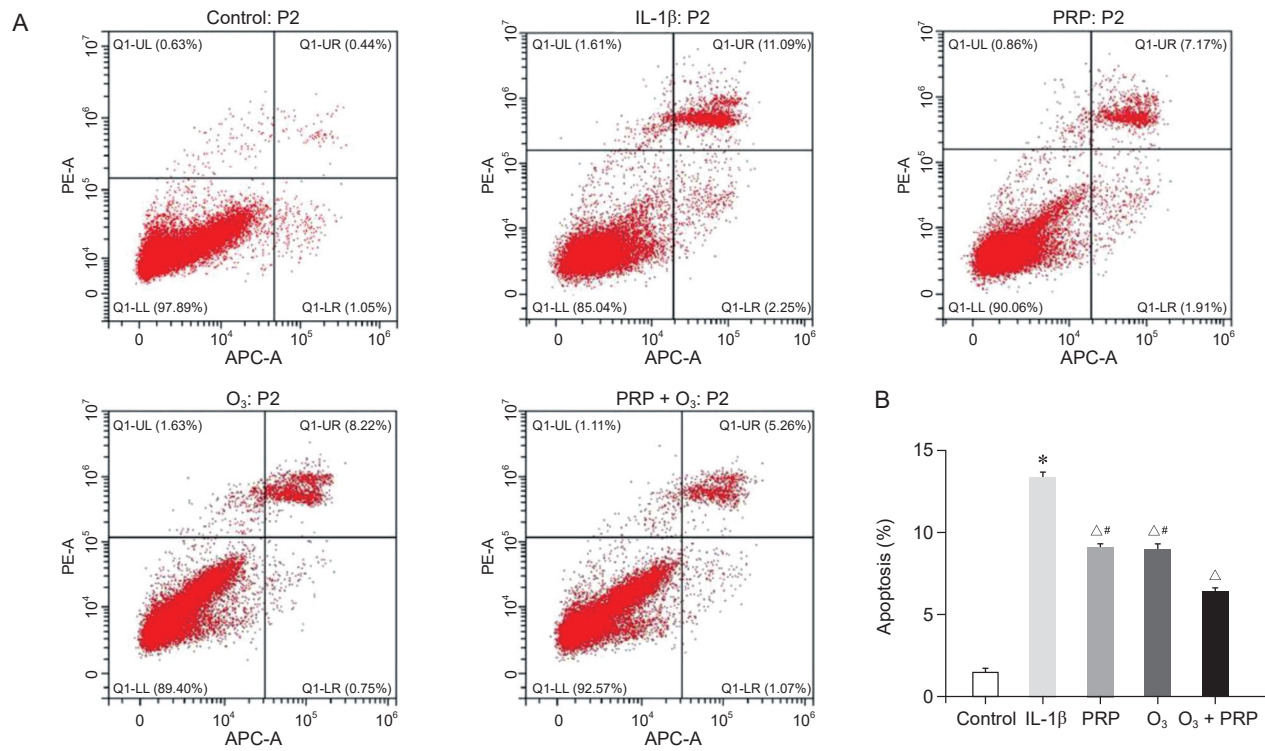


图 4 流式细胞术检测各组细胞凋亡情况

(A) 各组流式细胞凋亡图; (B) 各组流式细胞凋亡率

* $P < 0.05$, 与 Control 组相比; $\Delta P < 0.05$, 与 IL-1 β 组相比; # $P < 0.05$, 与 O₃ + PRP 组相比

Fig. 4 Flow cytometry detection of cell apoptosis in each group

(A) Flow cytometry results of each group; (B) Apoptosis rate of cells in each group by flow cytometry

* $P < 0.05$, compared with Control group; $\Delta P < 0.05$, compared with IL-1 β group; # $P < 0.05$, compared with O₃ + PRP group.

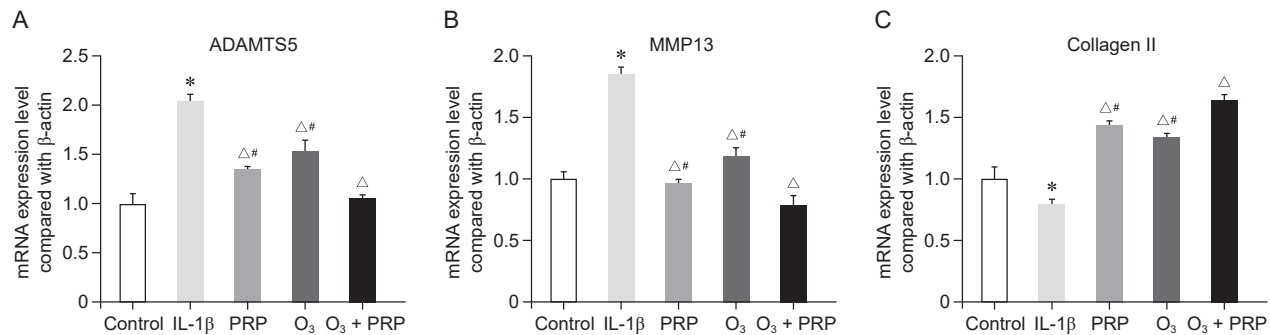


图 5 各组细胞中 ADAMTS5、MMP13、Collagen II 的 mRNA 表达水平

* $P < 0.05$, 与 Control 组相比; $\Delta P < 0.05$, 与 IL-1 β 组相比; # $P < 0.05$, 与 O₃ + PRP 组相比

Fig. 5 The mRNA expression levels of ADAMTS5, MMP13, and Collagen II in each group

* $P < 0.05$, compared with Control group; $\Delta P < 0.05$, compared with IL-1 β group; # $P < 0.05$, compared with O₃ + PRP group.

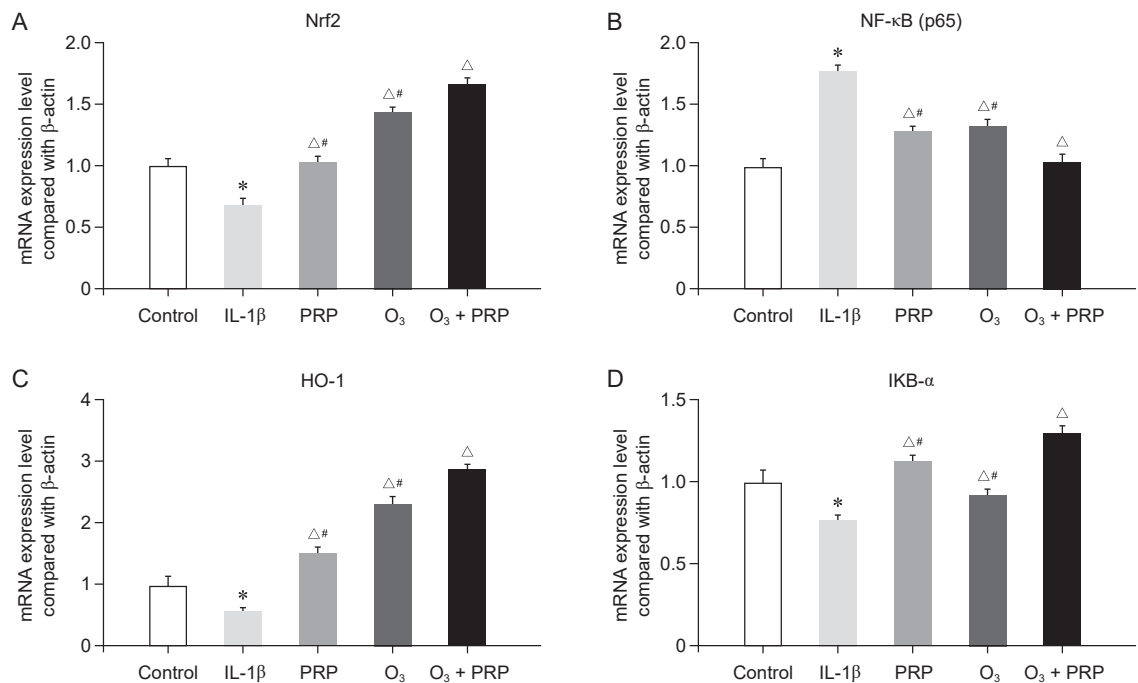


图 6 各组细胞中 Nrf2、NF- κ B (p65)、HO-1、IKB- α 的 mRNA 表达水平
* $P < 0.05$, 与 Control 组相比; $\Delta P < 0.05$, 与 IL-1 β 组相比; # $P < 0.05$, 与 O₃ + PRP 组相比
Fig. 6 The mRNA expression levels of Nrf2, NF- κ B (p65), HO-1, and IKB- α in each group
* $P < 0.05$, compared with Control group; $\Delta P < 0.05$, compared with IL-1 β group; # $P < 0.05$, compared with O₃ + PRP group.

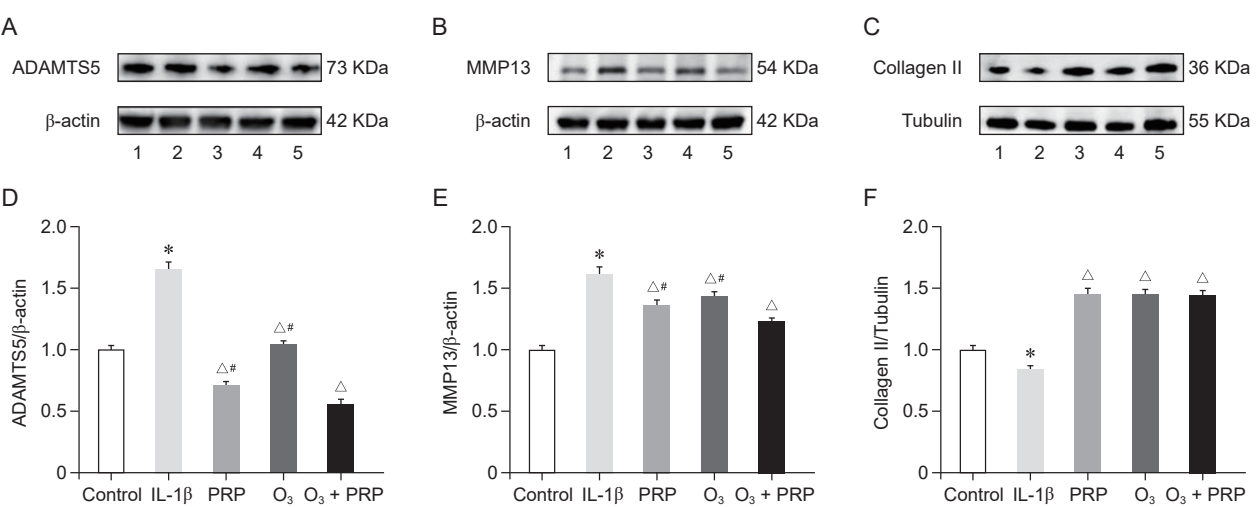


图 7 各组细胞中 ADAMTS5、MMP13、Collagen II 的蛋白表达水平
1: Control 组; 2: IL-1 β 组; 3: PRP 组; 4: O₃ 组; 5: O₃ + PRP 组
(A) ADAMTS5 的蛋白电泳图; (B) MMP13 的蛋白电泳图; (C) Collagen II 的蛋白电泳图; (D) ADAMTS5 的蛋白表达量; (E) MMP13 的蛋白表达量; (F) Collagen II 的蛋白表达量
* $P < 0.05$, 与 Control 组相比; $\Delta P < 0.05$, 与 IL-1 β 组相比; # $P < 0.05$, 与 O₃ + PRP 组相比
Fig. 7 The protein expression levels of ADAMTS5, MMP13, Collagen II in each group
1: Control group; 2: IL-1 β group; 3: PRP group; 4: O₃ group; 5: O₃ + PRP group
(A) Electrophoresis of ADAMTS5 protein; (B) Electrophoresis of MMP13 protein; (C) Electrophoresis of Collagen II protein; (D) ADAMTS5 protein expression; (E) MMP13 protein expression; (F) Collagen II protein expression
* $P < 0.05$, compared with Control group; $\Delta P < 0.05$, compared with IL-1 β group; # $P < 0.05$, compared with O₃ + PRP group.

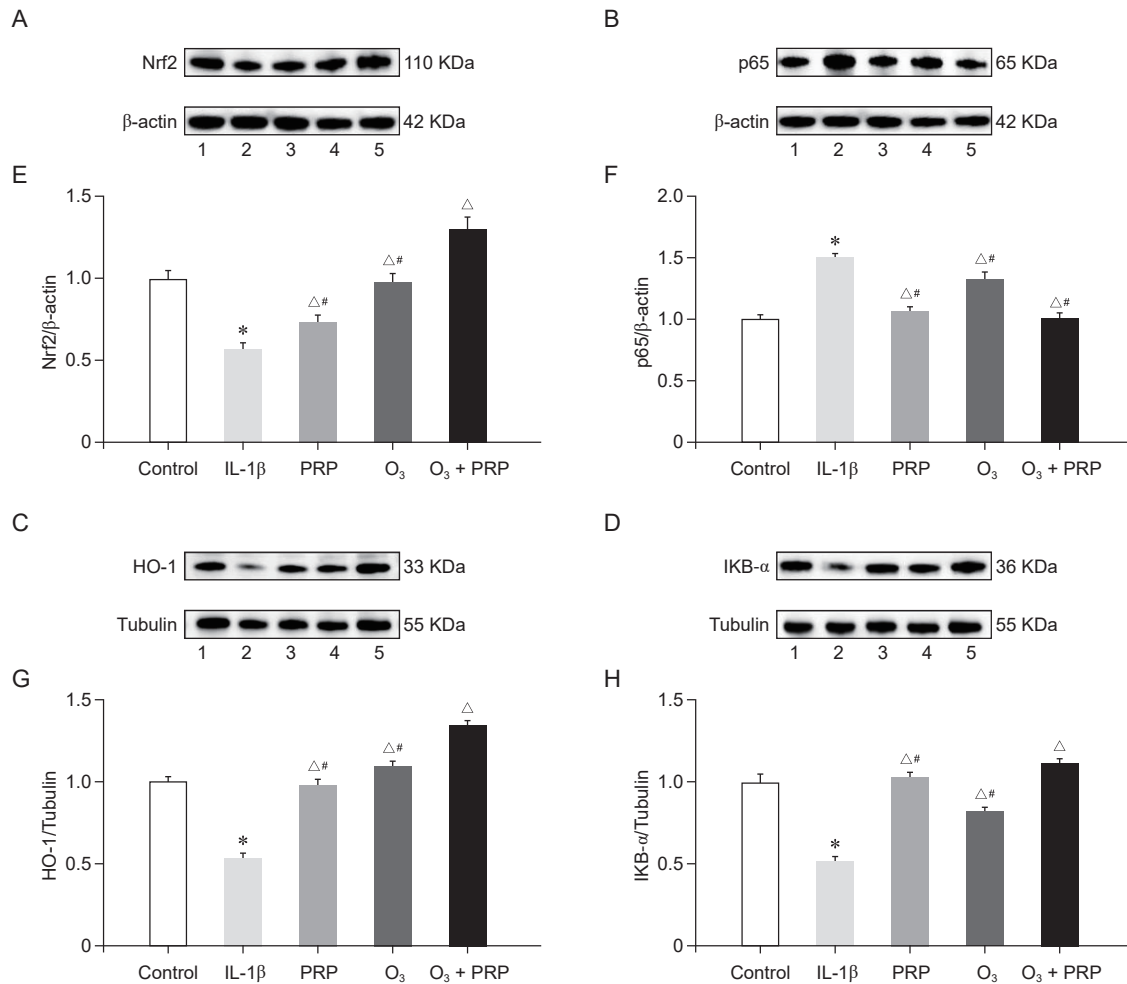


图 8 各组细胞中 Nrf2、NF- κ B (p65)、HO-1、IKB- α 的蛋白表达水平

1: Control 组; 2: IL-1 β 组; 3: PRP 组; 4: O₃ 组; 5: O₃ + PRP 组

(A) Nrf2 的蛋白电泳图; (B) NF- κ B (p65) 的蛋白电泳图; (C) HO-1 的蛋白电泳图; (D) IKB- α 的蛋白电泳图;

(E) Nrf2 的蛋白表达量; (F) NF- κ B (p65) 的蛋白表达量; (G) HO-1 的蛋白表达量; (H) IKB- α 的蛋白表达量

* $P < 0.05$, 与 Control 组相比; $\Delta P < 0.05$, 与 IL-1 β 组相比; # $P < 0.05$, 与 O₃ + PRP 组相比

Fig. 8 The protein expression levels of Nrf2, NF- κ B (p65), HO-1, IKB- α in each group

1: Control group; 2: IL-1 β group; 3: PRP group; 4: O₃ group; 5: O₃ + PRP group

(A) Electrophoresis of Nrf2 protein; (B) Electrophoresis of NF- κ B (p65) protein; (C) Electrophoresis of HO-1 protein; (D)

Electrophoresis of IKB- α protein; (E) Nrf2 protein expression; (F) NF- κ B (p65) protein expression; (G) HO-1 protein

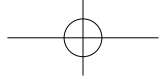
expression; (H) IKB- α protein expression

* $P < 0.05$, compared with Control group; $\Delta P < 0.05$, compared with IL-1 β group; # $P < 0.05$, compared with O₃ + PRP group.

因子, 并且已被证明无论在体内还是体外环境中其均会诱导软骨细胞凋亡, 从而促进 OA 进展^[14]。故本研究选用 IL-1 β 作用于人软骨细胞来模拟 OA 损伤的体外模型, 培养 24 h 后发现, 软骨细胞活力明显降低, 这与既往用 IL-1 β 诱导软骨细胞损伤所得到的结果相似。IL-1 β 诱导软骨细胞去分化, 使软骨细胞形态从菱形、多角形和圆形变为类似成纤维细胞样的扁平、长梭形, 与本研究结果一致, 这说明本实验 OA 模型构建成功。

IL-1 β 主要通过凋亡途径参与 OA 的激活级联

反应, 可诱导急性软骨细胞变性并抑制细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 形成^[15]。有研究发现, IL-1 β 会使细胞内炎症因子 TNF- α 、IL-6 水平升高, 促进炎症反应, 并且炎症进展过程中会刺激 MMP13 的生成, 使 ECM 降解^[16]。本研究结果显示, IL-1 β 处理后的软骨细胞中炎症因子 TNF- α 和 IL-6 含量显著增加。而经 PRP、O₃、O₃ + PRP 处理后, TNF- α 和 IL-6 水平下降, 且 O₃ + PRP 组水平下降最明显。说明 PRP、O₃、O₃ + PRP 改善 IL-1 β 诱导的人软骨细胞损伤可能与降低炎症反应有关, 且 O₃



联合 PRP 使用可能使细胞炎症反应进一步降低。本研究检测了软骨细胞凋亡水平,发现 IL-1 β 可以促进细胞凋亡,而 PRP、O₃、O₃ + PRP 均可降低细胞凋亡,且 O₃ + PRP 联合使用使细胞凋亡进一步降低,这说明其改善 IL-1 β 诱导的人软骨细胞损伤可能与降低细胞凋亡有关。

有研究报道,OA 是由于软骨细胞合成代谢及 ECM 分解代谢平衡失调所致,MMPs (基质金属蛋白酶) 和 ADAMTS (具有血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶) 是介导关节软骨细胞外基质降解的重要分子,在 OA 发病中发挥重要作用^[17]。MMP13 是一种由软骨细胞合成的蛋白酶,它主要通过降解胶原蛋白和其他基质蛋白来促进软骨组织的破坏,进而导致关节结构的退化和功能损伤^[18,19]。本研究利用 RT-qPCR 实验检测各组中 MMP13、Collagen II、ADAMTS5 mRNA 水平,结果显示,软骨细胞经 IL-1 β 处理后,MMP13、ADAMTS5 表达上调,Collagen II 表达下调。而在各组分别加入 PRP、O₃、O₃ + PRP 干预后,逆转了 IL-1 β 诱导的上述基因的表达水平,且 O₃ + PRP 组中 MMP13、ADAMTS5 的基因表达水平较 PRP 组、O₃ 组相比降低更为显著。为了进一步探究其对 OA 的疗效,利用 WB 实验检测了各组中 MMP13、Collagen II、ADAMTS5 蛋白表达水平。结果表明,IL-1 β 能上调 MMP13、ADAMTS5 的蛋白表达水平,下调 Collagen II 的蛋白表达水平。同样,加入干预药物后,上述蛋白的表达水平被逆转。这与 RT-qPCR 检测结果基本一致,说明 IL-1 β 能促进 ECM 降解,PRP、O₃、O₃ + PRP 改善 IL-1 β 诱导的人软骨细胞损伤可能与抑制 ECM 降解有关。

NF- κ B 是一种经典的促炎信号通路,当细胞受到 TNF- α 或其他细胞应激源等分子的刺激时,会使细胞中 IKB- α 磷酸化,导致 IKB- α 被泛素化和降解;随后 NF- κ B 二聚体 (如 p65) 会与下游各种靶基因相结合,促进炎症的发生^[20]。研究发现,Nrf2 在抗氧化应激中发挥重要作用,在正常细胞中,Nrf2 通过与其抑制因子 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 (Keap1) 的相互结合被隔离在细胞质中。当细胞损伤时,Nrf2 逃避 Keap1 的抑制并积聚在细胞核内,与抗氧化响应原件 (antioxidant response element, ARE) 结合,激活 HO-1、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸等抗氧化剂^[21]。由于 Nrf2 会与 p65 竞争转录共激活因子 p300,因此激活 Nrf2 上调 HO-1 的表达有助于抑制 P65 核易位,从而抑制 NF- κ B 通路激活并减少炎症^[22]。Zhao 等^[23] 研究表明,PRP 可以

通过减弱 NF- κ B 信号传导和下游炎症因子 iNOS、TNF- α 和 IL-6 的表达来抑制阿霉素诱导的软骨细胞凋亡和基质降解。de Sire 等^[24] 研究表明,O₃ 可以诱导 Nrf2 的上调,使细胞转录不同的 ARE。O₃ 可以减少 MMPs 的释放 (如胶原酶和明胶酶),减少关节软骨的破坏;另一方面还可以增加 HO-1 等抗氧化酶和抗氧化休克蛋白的表达,抑制细胞因子 IL-4 和 IL-10 以及转化生长因子- β 的过表达,刺激软骨细胞合成蛋白聚糖、糖胺聚糖和胶原蛋白,有利于关节修复^[25,26]。Huang 等^[27] 研究也表明,O₃ 与 PRP 联合使用可以通过调节软骨细胞外基质的合成代谢和分解代谢之间的稳态来防止软骨破坏并改善承重不对称性。本研究分别采用 WB 和 RT-qPCR 测定了 IL-1 β 诱导的 OA 模型中上述通路的基因和蛋白表达水平,发现软骨细胞中 Nrf2/HO-1 蛋白和基因表达水平下降,NF- κ B (p65) 蛋白和基因表达水平升高,IKB- α 蛋白和基因表达水平下降。而加入 PRP、O₃、O₃ + PRP 干预后,前述基因和蛋白表达水平被逆转,且这一表现在 O₃ + PRP 组尤为突出。说明 IL-1 β 能激活细胞中 NF- κ B 信号通路,使细胞炎症反应增加,诱导人软骨细胞损伤;而 PRP、O₃ 激活细胞中 Nrf2/HO-1 信号通路,抑制 NF- κ B (p65) 信号通路,减轻细胞炎症反应,改善人软骨细胞损伤。说明 PRP、O₃、O₃ + PRP 改善 IL-1 β 诱导的人软骨细胞损伤可能与上调 Nrf2/HO-1,抑制 NF- κ B (p65) 通路有关。不难发现,在 O₃ 联合 PRP 处理组,软骨细胞中上述所有测定指标均较单独使用 PRP 或 O₃ 处理表达降低或升高趋势好。表明 O₃ 联合 PRP 应用效果较单独使用有效,其作用机制可能与 Nrf2/HO-1、NF- κ B (p65) 通路有关。

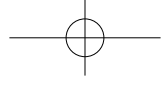
综上所述,O₃ 联合 PRP 能有效降低 IL-1 β 诱导的人软骨细胞炎症损伤,减少细胞凋亡,增加细胞活力,减少细胞外基质降解,其可能通过上调 Nrf2/HO-1,抑制 NF- κ B (p65) 通路发挥保护作用。

本研究的局限性:暂未做相关基因转染,未检测与该机制相关蛋白的磷酸化表达,且仅局限在细胞层面,未来可进一步完善并于动物实验中验证上述结论。

利益冲突声明:作者声明本文无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Yang Y, Shen P, Yao T, *et al.* Novel role of circRSU1 in the progression of osteoarthritis by adjusting oxidative stress[J]. *Theranostics*, 2021, 11(4):1877-1900.
- [2] 李剑峰,张君,谭可可,等.增生疗法联合氨基葡萄



- 糖治疗膝关节炎的疗效分析[J]. 中国疼痛医学杂志, 2024(11):873-875.
- [3] Gu R, Liu N, Luo S, *et al.* MicroRNA-9 regulates the development of knee osteoarthritis through the NF- κ B1 pathway in chondrocytes[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(36):e4315.
- [4] Yao Q, Wu X, Tao C, *et al.* Osteoarthritis: pathogenic signaling pathways and therapeutic targets[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1):56.
- [5] 章晓云, 曾浩, 孟林. 膝关节炎疼痛机制及治疗研究进展[J]. 中国疼痛医学杂志, 2023, 29(1):50-58.
- [6] Cecerska-Heryc E, Goszka M, Serwin N, *et al.* Applications of the regenerative capacity of platelets in modern medicine[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2022, 64:84-94.
- [7] Xin F, Wang H, Yuan F, *et al.* Platelet-rich plasma combined with alendronate reduces pain and inflammation in induced osteoarthritis in rats by inhibiting the nuclear factor- κ B signaling pathway[J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020:8070295.
- [8] Chung PY, Lin MT, Chang HP. Effectiveness of platelet-rich plasma injection in patients with temporomandibular joint osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2019, 127(2):106-116.
- [9] Zhao H, Zhu W, Mao W, *et al.* Platelet-rich plasma inhibits Adriamycin-induced inflammation via blocking the NF- κ B pathway in articular chondrocytes[J]. *Mol Med*, 2021, 27(1):66.
- [10] 苏建林, 杨磊, 龙家鹏, 等. 高压电脉冲射频联合医用三氧水治疗肿瘤病人化疗后合并急性带状疱疹神经痛[J]. 中国疼痛医学杂志, 2024, 30(10):783-787.
- [11] Manoto SL, Maepa MJ, Motaung SK. Medical ozone therapy as a potential treatment modality for regeneration of damaged articular cartilage in osteoarthritis[J]. *Saudi J Biol Sci*, 2018, 25(4):672-679.
- [12] Wu Z, Xu L, He Y, *et al.* DUSP5 suppresses interleukin-1 β -induced chondrocyte inflammation and ameliorates osteoarthritis in rats[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(24):26029-26046.
- [13] Gregori D, Giacobelli G, Minto C, *et al.* Association of pharmacological treatments with long-term pain control in patients with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis[J]. *JAMA*, 2018, 320(24):2564-2579.
- [14] Wang BW, Jiang Y, Yao ZL, *et al.* Aucubin protects chondrocytes against IL-1 β -induced apoptosis in vitro and inhibits osteoarthritis in mice model[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13:3529-3538.
- [15] López-Armada MJ, Caramés B, Lires-Deán M, *et al.* Cytokines, tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β , differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006, 14(7):660-669.
- [16] Gong Z, Wang Y, Li L, *et al.* Cardamonin alleviates chondrocytes inflammation and cartilage degradation of osteoarthritis by inhibiting ferroptosis via p53 pathway[J]. *Food Chem Toxicol*, 2023, 174:113644.
- [17] Cho Y, Jeong S, Kim H, *et al.* Disease-modifying therapeutic strategies in osteoarthritis: current status and future directions[J]. *Exp Mol Med*, 2021, 53(11):1689-1696.
- [18] Xie XW, Wan RZ, Liu ZP. Recent research advances in selective matrix metalloproteinase-13 inhibitors as anti-osteoarthritis agents[J]. *Chem Med Chem*, 2017, 12(15):1157-1168.
- [19] Liu Q, Zhang X, HU X, *et al.* Circular rna related to the chondrocyte ECM regulates MMP13 expression by functioning as a MiR-136 'sponge' in human cartilage degradation[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:22572.
- [20] Albensi BC. What is nuclear factor Kappa B (NF- κ B) doing in and to the mitochondrion?[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 7:154.
- [21] Copple IM. The Keap1-Nrf2 cell defense pathway-a promising therapeutic target?[J]. *Adv Pharmacol*, 2012, 63:43-79.
- [22] 刘江燕, 张晓峰, 徐西林, 等. 中医药通过 NF- κ B 信号通路治疗骨关节炎的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2024, 30(5):725-731.
- [23] Zhao H, Zhu W, Mao W, *et al.* Platelet-rich plasma inhibits Adriamycin-induced inflammation via blocking the NF- κ B pathway in articular chondrocytes[J]. *Mol Med*, 2021, 27(1):66.
- [24] de Sire A, Agostini F, Lippi L, *et al.* Oxygen-ozone therapy in the rehabilitation field: state of the art on mechanisms of action, safety and effectiveness in patients with musculoskeletal disorders[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(3):356.
- [25] Bocci V. How a calculated oxidative stress can yield multiple therapeutic effects[J]. *Free Radic Res*, 2012, 46(9):1068-1075.
- [26] Vendruscolo C, Moreira JJ, Seidel S, *et al.* Effects of medical ozone upon healthy equine joints: clinical and laboratorial aspects[J]. *PLoS One*, 2018, 13(5):e197736.
- [27] Huang P, Wang R, Pang X, *et al.* Platelet-rich plasma combined with ozone prevents cartilage destruction and improves weight-bearing asymmetry in a surgery-induced osteoarthritis rabbit model[J]. *Ann Palliat Med*, 2022, 11(2):442-451.