

脉冲电磁场可抑制老年大鼠膝关节软骨退变

尹林伟^{1,2,3}, 黄夏荣^{1,2,3}, 孙光华^{1,2,3}, 刘静^{1,2,3}, 钟培瑞^{1,2,3}, 王金玲^{1,2,3}, 陈佳倩^{1,2,3}, 文幸^{1,2,3}, 甘邵婷^{1,2,3}, 胡文韬^{1,2,3}, 李萌萌^{1,2,3}, 周君^{1,2,3,4}

https://doi.org/10.12307/2024.464

投稿日期: 2023-07-12

采用日期: 2023-09-06

修回日期: 2023-09-20

在线日期: 2023-10-07

中图分类号:

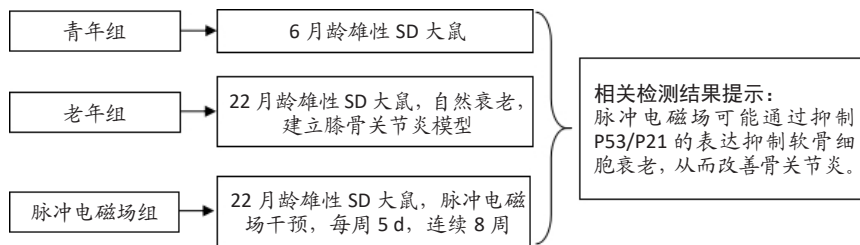
R459.9; R319; R493

文章编号:

2095-4344(2024)28-04522-06

文献标识码: A

文章快速阅读: 脉冲电磁场对老年大鼠膝关节软骨退变的影响



文题释义:

骨关节炎: 是一种常见的与年龄相关的疾病, 主要表现为关节疼痛、僵硬和功能障碍。目前治疗骨关节炎的方法包括药物治疗、物理治疗、手术等。

基质金属蛋白酶: 是一类可降解基质组分的酶, 主要参与细胞外基质的重塑和组织再建过程。基质金属蛋白酶可以降解胶原蛋白、纤维连接蛋白等基质组分, 调节细胞外基质的合成和降解平衡, 对于细胞迁移、组织修复、免疫应答等过程具有重要影响。在某些病理情况下, 基质金属蛋白酶的活性过高可能导致细胞外基质破坏和病理损伤, 通过调控基质金属蛋白酶的活性可以达到抑制病理过程的目的。

摘要

背景: 脉冲电磁场作为一种重要的物理治疗方法对骨关节炎的疗效确切, 但其作用机制尚未完全明确。

目的: 观察脉冲电磁场对老年大鼠膝关节软骨退变的影响。

方法: 选取8只6月龄SD大鼠作为青年组, 正常饲养8周, 不做任何处理; 将16只22月龄SD大鼠随机分为老年组($n=8$)和脉冲电磁场组($n=8$), 对脉冲电磁场组大鼠进行脉冲电磁场干预, 1次/d, 每周5d, 连续干预8周, 老年组正常饲养8周, 不做任何处理。8周后麻醉处死所有大鼠, 进行相关指标的检测。

结果与结论: ①与青年组相比, 老年组大鼠血清II型胶原C端肽水平升高($P < 0.05$); 与老年组相比, 脉冲电磁场组大鼠血清II型胶原C端肽水平降低($P < 0.05$); ②显微CT显示, 与青年组相比, 老年组大鼠胫骨的骨体积分数、骨密度、骨小梁数量均降低($P < 0.05$), 骨小梁间隙增大($P < 0.05$); 与老年组相比, 脉冲电磁场组大鼠胫骨的骨体积分数、骨密度、骨小梁数量均升高($P < 0.05$), 骨小梁间隙减少($P < 0.05$); ③胫骨平台番红O-固绿染色显示, 老年组大鼠关节软骨结构紊乱, 软骨细胞明显减少, 无法区分潮线; 脉冲电磁场组上述情况有所改善; ④RT-qPCR与Western blot检测显示, 与青年组相比, 老年组大鼠关节软骨及软骨下骨中基质金属蛋白酶1、基质金属蛋白酶13、P53、P21的mRNA与蛋白表达均升高($P < 0.05$); 与老年组相比, 脉冲电磁场组大鼠关节软骨及软骨下骨中基质金属蛋白酶1、基质金属蛋白酶13、P53、P21的mRNA与蛋白表达均降低($P < 0.05$); ⑤结果表明, 脉冲电磁场可能通过抑制P53/P21的表达抑制软骨细胞衰老, 缓解关节软骨降解及抑制软骨下骨骨质疏松, 改善老年大鼠骨关节炎。

关键词: 脉冲电磁场; 老年大鼠; 膝骨关节炎; 关节软骨退变; P53; P21

Pulsed electromagnetic fields inhibit knee cartilage degeneration in aged rats

Yin Linwei^{1,2,3}, Huang Xiarong^{1,2,3}, Sun Guanghua^{1,2,3}, Liu Jing^{1,2,3}, Zhong Peirui^{1,2,3}, Wang Jinling^{1,2,3}, Chen Jiaqian^{1,2,3}, Wen Xing^{1,2,3}, Gan Shaoting^{1,2,3}, Hu Wentao^{1,2,3}, Li Mengmeng^{1,2,3}, Zhou Jun^{1,2,3,4}

¹Department of Rehabilitation, ²Rehabilitation Medicine Center, ³Rehabilitation Laboratory, the First Affiliated Hospital of Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China; ⁴Key Laboratory of Rehabilitation Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Yin Linwei, Therapist-in-charge, Department of Rehabilitation, Rehabilitation Medicine Center, Rehabilitation Laboratory, the First Affiliated Hospital of Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China

¹南华大学衡阳医学院附属第一医院, ¹康复医学科, ²康复医学中心, ³康复医学实验室, 湖南省衡阳市 421001; ⁴四川大学华西医院康复医学四川省重点实验室, 四川省成都市 610041

第一作者: 尹林伟, 男, 1991年生, 湖南省衡阳市人, 汉族, 主管治疗师, 主要从事骨、关节疾病康复的基础与临床研究。

通讯作者: 周君, 博士, 博士生导师, 主任医师, 南华大学衡阳医学院附属第一医院, 康复医学科, 康复医学中心, 康复医学实验室, 湖南省衡阳市 421001; 四川大学华西医院康复医学四川省重点实验室, 四川省成都市 610041

https://orcid.org/0000-0001-7172-977X(尹林伟)

基金资助: 国家自然科学基金面上项目(81973917), 项目负责人: 周君; 湖南省临床医疗技术创新引导项目(2021SK51805), 项目负责人: 周君; 湖南省自然科学基金项目(2021JJ40493), 项目负责人: 黄夏荣; 湖南省卫生健康委员会重点项目(202103060198), 项目负责人:

周君; 南华大学临床医学4310项目, 项目负责人: 周君; 南华大学校级重点项目子项目(USCKF201902K02), 项目负责人: 周君

引用本文: 尹林伟, 黄夏荣, 孙光华, 刘静, 钟培瑞, 王金玲, 陈佳倩, 文幸, 甘邵婷, 胡文韬, 李萌萌, 周君. 脉冲电磁场可抑制老年大鼠膝关节软骨退变 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(28):4522-4527.



Corresponding author: Zhou Jun, MD, Doctoral supervisor, Chief physician, Department of Rehabilitation, Rehabilitation Medicine Center, Rehabilitation Laboratory, the First Affiliated Hospital of Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China; Key Laboratory of Rehabilitation Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Abstract

BACKGROUND: Pulsed electromagnetic fields, as an important physical therapy, are exactly effective in the treatment of osteoarthritis, but the mechanism has not been fully clarified.

OBJECTIVE: To observe the effect of pulsed electromagnetic field on the degeneration of knee joint cartilage in aged rats.

METHODS: Eight 6-month-old Sprague-Dawley rats were selected as the young group and were subjected to normal diet with no treatment. Sixteen 22-month-old Sprague-Dawley rats were randomly divided into old group ($n=8$) and pulsed electromagnetic field group ($n=8$). The rats in the pulsed electromagnetic field group were subjected to a pulsed electromagnetic field intervention, once a day, 5 days per week for continuous 8 weeks. The rats in the old group were given no treatment. All rats were anesthetized and executed after 8 weeks for the detection of relevant indexes.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the young group, serum type II collagen C-terminal peptide level was increased in the old group ($P < 0.05$); compared with the old group, serum type II collagen C-terminal peptide level was decreased in the pulsed electromagnetic field group ($P < 0.05$). Micro-CT showed that the bone volume fraction, bone mineral density, and number of bone trabeculae decreased ($P < 0.05$) and the trabecular separation increased ($P < 0.05$) in the tibia of rats in the aged group compared with the young group; and the bone volume fraction, bone density, and number of trabeculae increased ($P < 0.05$) and the trabecular separation decreased ($P < 0.05$) in the tibia of rats in the pulsed electromagnetic field group compared with the aged group. The tibial plateau Safranin O-fast green staining showed that the articular cartilage structure of rats in the aged group was disorganized, and the number of chondrocytes was obviously reduced, and the tidal line could not be distinguished. The above results were improved in the pulsed electromagnetic field group. RT-qPCR and western blot assay showed that the mRNA and protein expression levels of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 13, P53 and P21 in the articular cartilage and subchondral bone of rats were elevated in the aged group compared with the young group ($P < 0.05$) and decreased in the pulsed electromagnetic field group compared with the old group ($P < 0.05$). To conclude, pulsed electromagnetic fields may improve osteoarthritis in aged rats by inhibiting chondrocyte senescence, alleviating articular cartilage degradation and inhibiting subchondral bone osteoporosis through suppressing the expression of P53/P21.

Key words: pulsed electromagnetic field; aged rat; knee osteoarthritis; articular cartilage degeneration; P53; P21

Funding: National Natural Science Foundation of China, No. 81973917 (to ZJ); Hunan Provincial Clinical Medical Technology Innovation Guidance Project, No. 2021SK51805 (No. ZJ); Hunan Provincial Natural Science Foundation, No. 2021JJ40493 (to HXR); Hunan Provincial Health Commission Key Project, No. 202103060198 (to ZJ); Project 4310 of Clinical Medicine of University of South China (to ZJ); Key Sub-project of University of South China, No. USCKF201902K02 (to ZJ)

How to cite this article: YIN LW, HUANG XR, SUN GH, LIU J, ZHONG PR, WANG JL, CHEN JQ, WEN X, GAN ST, HU WT, LI MM, ZHOU J. Pulsed electromagnetic fields inhibit knee cartilage degeneration in aged rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(28):4522-4527.

0 引言 Introduction

骨关节炎是最常见的年龄相关性疾病之一，40岁以上人群的患病率超过了40%^[1]，影响着全球数亿人的健康生活，给高龄人群造成了极大的困扰。膝骨关节炎的临床表现主要有晨僵、疼痛和功能障碍^[2-4]，关节软骨退化和软骨细胞衰老可能是引起这些症状的“元凶”之一^[5-6]。目前骨关节炎的发病机制尚未完全明确，研究表明可能与关节软骨退化密切相关^[7]。关节软骨退化的病理过程涉及基质金属蛋白酶降解细胞外基质、软骨下骨重建失衡及软骨细胞衰老因子P53、P21的过表达等^[8-9]。软骨细胞基质降解会导致软骨纤维化并影响钙化层；胶原蛋白、蛋白多糖等释放到滑膜液中将加重滑膜炎症状，导致关节软骨退化，骨关节炎进一步加重。因此，抑制关节软骨退化是治疗骨关节炎的一种重要方法。

脉冲电磁场是一种无痛、无创的物理治疗方式^[10]，临床中常用于骨关节疾病的治疗。脉冲电磁场治疗骨关节炎的疗效确切，但其作用机制尚未完全明确。此次研究探索脉冲电磁场对老年大鼠关节软骨细胞衰老和关节退化的影响，为临床上应用脉冲电磁场治疗骨关节炎提供更为充实的理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验，组间比较采用单因素方差分析、LSD-*t* 检验及 Tamhane T2 检验等。

1.2 时间及地点 实验于2020-10-12/2021-01-02在南华大学动物实验部及南华大学附属第一医院中心实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 动物和分组 8只6月龄雄性SD大鼠为青年组。采用随机数字表法将16只22月龄雄性SD大鼠分成老年组和脉

冲电磁场组，每组8只。24只大鼠由长沙天勤生物技术公司提供，合格证号CXK(湘)2019-0013，饲养于南华大学动物部，整个过程严格遵守《实验动物管理条例》。实验方案经南华大学附属第一医院医学伦理委员会批准，批准号NO.202012110054。

1.3.2 实验试剂与设备 脉冲电磁场仪程控电源、脉冲电磁场仪水冷线圈(湖南永逸科技有限公司);台式冷冻离心机(湖南湘仪);显微CT(广州中科恺盛);荧光定量RCP仪、荧光PCR板(美国Thermo);电泳仪(中国北京六一公司);血清II型胶原C端肽试剂盒(中国北京康为世纪);mRNA反转录试剂盒、miRNA反转录试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司);DM2000 Plus DNA Marker(中国北京康为世纪);常规化学试剂(上海国药);还原型5×SDS上样缓冲液、PBST缓冲液、转膜缓冲液、电泳缓冲液(中国abiowell);基质金属蛋白酶1一抗、基质金属蛋白酶13一抗、P53一抗、P21一抗(Rabbit)、β-actin一抗(Mouse)(中国北京康为世纪)。

1.4 方法

1.4.1 分组干预 对脉冲电磁场组的大鼠进行脉冲电磁场干预。脉冲电磁场分为线圈和控制器两部分，调试控制器，参数设置为方波，电流10 A，用高斯计测得线圈中间磁场强度为(3.8±0.2) mT，频率设定为8 Hz^[11]。将大鼠置于鼠盒内自由活动，放置于脉冲电磁场仪的线圈中间，保证所有脉冲电磁场组大鼠都受到脉冲电磁场治疗，每次干预40 min，每天干预1次，每周干预5 d，共干预8周。老年组进行同样的步骤，但不接电。青年组大鼠正常饲养8周，不作处理。

1.4.2 标本采集与处理 干预完成后进行取材，采用上海新亚药业有限公司的2%戊巴比妥钠(80 mg/kg)腹腔注射进行

麻醉。麻醉后对所有大鼠眼眶取血，用于 ELISA 检测 II 型胶原 C 端肽水平；取左胫骨软骨下骨，使用多聚甲醛固定后用于显微 CT 检测；显微 CT 检测后，应用番红 O- 固绿染色法观察左胫骨平台软骨组织形态学结构；取右膝关节软骨及软骨下骨用于 RT-qPCR、Western blot 检测。

组织工程实验动物造模过程中的相关问题：

造模目的	探讨脉冲电磁场治疗老年大鼠骨关节炎可能的作用机制
选择动物的基本资料	雄性 SD 大鼠，青年大鼠 6 月龄，老年大鼠 22 月龄
模型与所研究疾病的关系	通过自然衰老建立老年大鼠骨关节炎模型，探究脉冲电磁场治疗骨关节炎的可能机制
造模技术描述	通过自然衰老建立老年大鼠骨关节炎模型 ^[12]
动物数量及分组方法	8 只 6 月龄 SD 雄性大鼠为青年组，16 只 22 月龄 SD 雄性大鼠随机分老年模型组和脉冲电磁场组，每组 8 只
造模成功评价指标	通过自然衰老建模，番红 O- 固绿染色观察左胫骨平台软骨组织形态及改良 Mankin's 评分确认造模成功
造模后取材及观察指标	大鼠眼眶取血用于 ELISA 检测 II 型胶原 C 端肽水平；左胫骨软骨下骨置于多聚甲醛固定后用于显微 CT 检测；显微 CT 检测后，番红 O- 固绿染色观察左胫骨平台软骨组织形态学结构；右膝关节软骨及软骨下骨用于 RT-qPCR、Western blot 检测
伦理委员会批准	实验方案经南华大学附属第一医院医学伦理委员会批准，批准号 NO.202012110054

1.5 主要观察指标

1.5.1 ELISA 法检测 II 型胶原 C 端肽水平 麻醉大鼠后取眼眶血 3 mL，在 25 °C 下静置 2 h，12 000 r/min 离心 20 min，取上清液，置于 -80 °C 冰箱保存，按 ELISA 试剂盒说明检测 II 型胶原 C 端肽水平。

1.5.2 显微 CT 检测左胫骨软骨下骨微结构 处死各组大鼠，取左胫骨软骨下骨，置于多聚甲醛溶液 (40 g/L) 中浸润 24 h，放入冰箱保存。将左胫骨放置在显微 CT 下扫描，参数设置为：旋转角度 200°，曝光时间 3 000 ms，分辨率 50.0 μm。分析大鼠左胫骨软骨下骨骨密度、骨小梁数量、骨体积分数与骨小梁间隙。

1.5.3 番红 O- 固绿染色 显微 CT 检测完成后，将左胫骨置于 EDTA 中脱钙，进行石蜡切片后，常规脱蜡，进行番红 O- 固绿染色，水洗、脱水、封固。

1.5.4 改良 Mankin's 评分 使用改良 Mankin's 评分量表观察软骨组织染色的形态学^[13]。评估项包括软骨结构，软骨细胞，基质染色及潮线的完整性，评分细则见表 1。

表 1 | 改良 Mankin's 评分细则
Table 1 | Modified Mankin's scoring details

评分	软骨结构	软骨细胞	番红 O- 固绿染色	潮线
0 分	软骨表面正常	正常	正常	正常
1 分	表面不规则，有裂隙	弥散增多	轻度减少	多重潮线
2 分	表面有裂隙，达移行层	出现大量细胞聚	中度减少	血管入侵潮线
3 分	裂隙到辐射层	数量明显减少	重度减少	
4 分	裂隙达钙化层		染色消失	
5 分	软骨脱落，无法分清结构			

1.5.5 RT-qPCR 法检测 检测大鼠右膝关节软骨及软骨下骨基质金属蛋白酶 1、基质金属蛋白酶 13、P53、P21 的 mRNA 表达水平。

取组织约 0.02 g，加入液氮充分研磨，加入 1 mL Trizol 混匀后裂解 5 min；加入 200 μL 三氯甲烷，剧烈振荡 15 s，室温静置 3 min；4 °C 下 12 000 r/min 离心 15 min，取上层液相，转移至离心管中；加入等体积的异丙醇，混匀，室温静置 10 min；4 °C 下 12 000 r/min 离心 10 min，去上清，加入 1 mL 体积分数 75% 乙醇洗涤沉淀；4 °C 下 12 000 r/min 离心 3 min，去上清；空气干燥 5-10 min，加入 20-30 μL 无菌无酶水溶解沉淀；紫外分光光度计测定浓度；以组织总 mRNA 为模板，反转录 cDNA；振荡混匀，离心；42 °C 孵育 50 min，85 °C 孵育 5 min，离心，冷却；反转录产物进行荧光定量 PCR 反应，置于 -20 °C 保存；实验结束后记录目的基因及内参基因 β-actin 的 Ct 值，采用 2^{-ΔΔCt} 法计算各基因的相对表达量。运用 primer5 软件设计引物，由北京擎科合成引物，引物序列见表 2。

表 2 | RT-qPCR 检测引物信息
Table 2 | Primer sequences and product lengths

基因	引物序列 (5'-3')	产物长度
基质金属蛋白酶 1	F: CAC TCC CTT GGA CTC ACT	97 bp
	R: TAT CCT CCT GGT TTA GCA	
基质金属蛋白酶 13	F: CAA AGA CTA TCC CCG CCT CA	147 bp
	R: ACT CTC ACA ATG CGA TTA CTC C	
P53	F: GCT TCG AGA TGT TCC GAG AG	119 bp
	R: AGA CTG GCC CTT CTT GGT CT	
P21	F: AGT GCC TTG ACG ATA CAG CTA	150 bp
	R: TGC ACT GTA CTC CTC TTG ACC	
β-actin	F: ACA TCC GTA AAG ACC TCT ATG CC	223 bp
	R: TAC TCC TGC TTG CTG ATC CAC	

1.5.6 Western blot 检测 检测大鼠右膝关节软骨及软骨下骨基质金属蛋白酶 1、基质金属蛋白酶 13、P53、P21 的蛋白表达水平。

取组织约 0.02 g，用 PBS 清洗 1 次，加入 300 μL RIPA 裂解液，生物匀浆；冰上裂解 10 min；4 °C 下 12 000 r/min 离心 15 min，将上清转移至离心管中；配制 10% 的分离胶，加入 TEMED 后摇匀灌胶，用异丙醇封胶；待胶充分凝固后去胶上层异丙醇并吸干；配制 4.8% 的浓缩胶，加入 TEMED 后摇匀灌胶，插梳；取 200 μL 蛋白上清液，加入 50 μL 5×loading buffer 混匀，沸水煮 5 min。电泳、转膜、用 1×PBST 配制 5% 脱脂奶粉封闭，室温放置 90 min，4 °C 过夜。用 1×PBST 将一抗按 1 : 5 000/1 : 1 000 稀释，4 °C 过夜孵育，洗膜 3 次，每次 15 min；用 1×PBST 稀释 HRP 标记的二抗 (SA00001-1) 按 (1 : 5 000) 孵育 90 min；洗膜 3 次，每次 15 min。ECL 显色曝光 1-60 min；显影冲洗，用 quantity one 专业灰度分析软件进行分析。将基质金属蛋白酶 1、基质金属蛋白酶 13、P53、P21 的吸光度分别与相应的 β-actin 吸光度比值作为其蛋白的相对表达量。

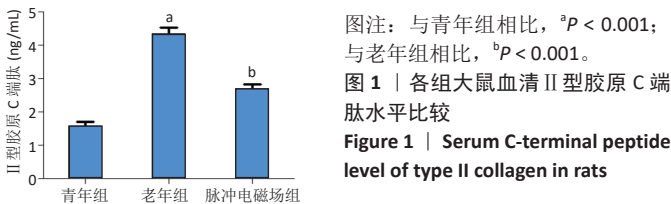
1.6 统计学分析 实验数据采用 SPSS 26.0 版软件进行统计分析，符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 描述。组间比较采用单因素方差分析，若方差齐，用 LSD-t 检验；若方差不齐，采用 Tamhane T2 检验。不符合正态分布的，采用非参数检验进行组间比较。P < 0.05 认为差异有显著性意义。该文统计

学方法已经南华大学生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 24 只大鼠全部进入结果分析。

2.2 各组大鼠血清 II 型胶原 C 端肽水平比较 与青年组相比，老年组大鼠血清中 II 型胶原 C 端肽水平升高 ($P < 0.001$)；与老年组相比，脉冲电磁场组大鼠血清中 II 型胶原 C 端肽水平降低 ($P < 0.001$)，见图 1。血清中软骨细胞降解产物 II 型胶原 C 端肽水平检测显示，老年组大鼠软骨细胞降解代谢增加，脉冲电磁场干预可抑制软骨降解。



图注：与青年组相比，^a $P < 0.001$ ；与老年组相比，^b $P < 0.001$ 。

图 1 | 各组大鼠血清 II 型胶原 C 端肽水平比较

Figure 1 | Serum C-terminal peptide level of type II collagen in rats

2.3 各组大鼠左胫骨软骨下骨微结构比较 与青年组相比，老年组大鼠胫骨骨密度、骨体积分数、骨小梁数量均降低 ($P < 0.05$)，骨小梁间隙增大 ($P < 0.05$)；与老年组相比，脉冲电磁场组大鼠胫骨骨密度、骨体积分数、骨小梁数量均升高 ($P < 0.05$)，骨小梁间隙减小 ($P < 0.05$)，见图 2、表 3。

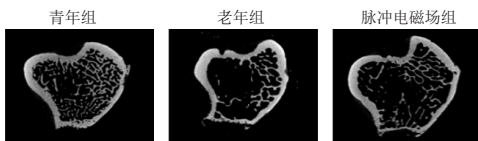


图 2 | 各组大鼠左胫骨软骨下骨显微 CT 图像

Figure 2 | Micro-CT observation of the subchondral bone in the left tibia of rats

表 3 | 各组大鼠左胫骨软骨下骨微结构比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 | Comparison of bone microstructure of the rat's left tibial subchondral bone among groups

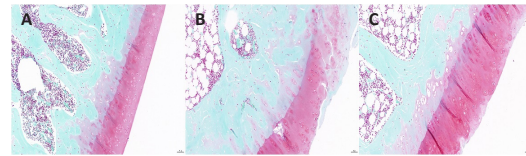
组别	骨密度 (g/cm^3)	骨体积分数 (%)	骨小梁数量 (1/mm)	骨小梁间隙 (mm)
青年组	0.32±0.05	20.64±3.51	2.27±0.35	0.31±0.04
老年组	0.18±0.03 ^a	7.63±3.54 ^a	0.74±0.35 ^a	0.96±0.47 ^a
脉冲电磁场组	0.23±0.02 ^b	12.21±1.31 ^b	1.17±0.08 ^b	0.59±0.11 ^b

表注：与青年组相比，^a $P < 0.05$ ；与老年组相比，^b $P < 0.05$ 。

2.4 各组大鼠胫骨平台软骨组织番红 O-固绿染色 青年组染色均匀，层次分明，软骨表面平整，细胞分布均匀有序，排列整齐，形态正常；老年组染色不均匀，各层相互融合，软骨表面崎岖不平，出现裂痕，细胞分布不均，排列无序，细胞形态异常，出现缺如；脉冲电磁场组染色较均匀，层次较分明，软骨表面稍平整，仍有少量裂痕，细胞分布较整齐，形态正常，整体情况较老年组有改善，见图 3。

2.5 各组大鼠软骨组织改良 Mankin's 评分比较 与青年组相比，老年组改良 Mankin's 评分升高 ($P < 0.001$)；与老年组相比，脉冲电磁场组改良 Mankin's 评分降低 ($P < 0.001$)，见图 4。

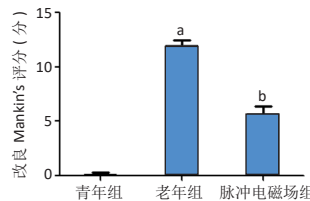
2.6 各组大鼠胫骨软骨及软骨下骨 RT-qPCR 检测结果 与青年组相比，老年组大鼠右膝关节软骨及软骨下骨基质金属



图注：A-C 分别为青年组、老年组、脉冲电磁场组。老年组大鼠关节软骨结构紊乱，软骨细胞明显减少，无法区分潮线；脉冲电磁场组上述情况有所改善。

图 3 | 各组大鼠胫骨平台软骨组织番红 O-固绿染色 ($\times 200$)

Figure 3 | Safranin O-fast green staining of the rat's tibial plateau ($\times 200$)



图注：与青年组相比，^a $P < 0.001$ ；与老年组相比，^b $P < 0.001$ 。

图 4 | 各组大鼠软骨组织改良 Mankin's 评分比较

Figure 4 | Comparison of modified Mankin's scores of rat's cartilage tissue between groups

蛋白酶 1、基质金属蛋白酶 13、P53、P21 的 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)；与老年组相比，脉冲电磁场组大鼠右膝关节软骨及软骨下骨基质金属蛋白酶 1、基质金属蛋白酶 13、P53、P21 的 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$)，见表 4。

表 4 | 各组大鼠胫骨软骨及软骨下骨基质金属蛋白酶 1、基质金属蛋白酶 13、P53、P21 的 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 4 | Comparison of mRNA expression levels of matrix metalloproteinases-1 and 13, P53 and P21 in the tibial cartilage and subchondral bone of rats

组别	基质金属蛋白酶 1	基质金属蛋白酶 13 P53	P21	
青年组	1.18±0.48	0.80±0.33	1.23±0.53	1.07±0.41
老年组	7.29±1.94 ^a	7.16±1.19 ^a	6.38±1.43 ^a	6.46±1.79 ^a
脉冲电磁场组	2.66±1.47 ^b	3.04±1.47 ^b	2.22±0.90 ^b	2.40±0.85 ^b

表注：青年组相比，^a $P < 0.05$ ；与老年组相比，^b $P < 0.05$ 。

2.7 各组大鼠胫骨软骨及软骨下骨 Western blot 检测结果 与青年组相比，老年组大鼠右膝关节软骨及软骨下骨基质金属蛋白酶 1、基质金属蛋白酶 13、P53、P21 的蛋白表达升高 ($P < 0.05$)；与老年组相比，脉冲电磁场组大鼠右膝关节软骨及软骨下骨基质金属蛋白酶 1、基质金属蛋白酶 13、P53、P21 的蛋白表达降低 ($P < 0.05$)，见表 5、图 5。

表 5 | 各组大鼠胫骨软骨及软骨下骨基质金属蛋白酶 1、基质金属蛋白酶 13、P53、P21 的蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 5 | Comparison of protein expression levels of matrix metalloproteinase-1 and 13, P53 and P21 in the tibial cartilage and subchondral bone of rats

组别	基质金属蛋白酶 1	基质金属蛋白酶 13 P53	P21	
青年组	16.77±5.00	16.15±3.36	23.55±4.21	25.39±7.77
老年组	53.97±4.69 ^a	46.66±7.84 ^a	44.65±3.47 ^a	50.83±8.33 ^a
脉冲电磁场组	33.59±7.53 ^b	34.82±10.37 ^b	35.78±6.10 ^b	35.90±4.56 ^b

表注：青年组相比，^a $P < 0.05$ ；与老年组相比，^b $P < 0.05$ 。

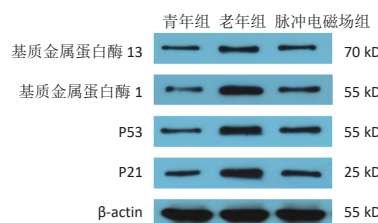


图 5 | 各组大鼠胫骨软骨及软骨下骨组织基质金属蛋白酶 1、基质金属蛋白酶 13、P53 及 P21 蛋白表达免疫印迹图

Figure 5 | Western blot detection of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 13, P53 and P21 protein expression in tibial cartilage and subchondral bone tissues of rats

3 讨论 Discussion

骨关节炎大鼠造模主要有手术模型、非手术模型和自发模型等^[12]。此次实验的研究对象为老年大鼠，采用了自发模型的造模方式，自发模型是指采用自然衰老的方式形成骨关节炎^[14]。验证骨关节炎大鼠造模成功的指标有病理染色和细胞因子检测等^[15]。此次研究结果显示与青年组相比，老年组大鼠番红 O-固绿染色显示关节软骨结构紊乱，软骨细胞明显减少，无法区分潮线；基质金属蛋白酶 1、基质金属蛋白酶 13 的 mRNA 和蛋白表达均升高 ($P < 0.05$)，表明造模成功。改良 Mankin's 评分是公认评价关节软骨退变程度的通用标准^[13]，总分 14 分，评分越高表明软骨退变程度越严重。此次研究中，老年组大鼠改良 Mankin's 评分为 (12.18±1.33) 分，也表明老年组大鼠膝关节软骨发生了严重退变。因此，实验应用老年大鼠进行骨关节炎自发模型造模是成功的。

关节软骨退变是骨关节炎早期发展的病理基础之一^[16]。关节面长期应力不均和磨损会导致软骨退变，出现弹性降低而脆性增高、关节表面粗糙裂纹等病理改变^[17-18]。骨关节炎进一步发展，关节软骨中 II 型胶原蛋白会大量降解成 II 型胶原 C 端肽等代谢产物^[19]。II 型胶原蛋白主要存在于软骨组织中^[20]，II 型胶原 C 端肽作为 II 型胶原蛋白的降解产物是衡量软骨损伤和退化的重要标志物^[19]。大量研究表明，II 型胶原 C 端肽可作为骨关节炎的诊断、预后和治疗效果的监测指标^[21-23]。此次研究结果显示，与青年组相比，老年组大鼠血清中 II 型胶原 C 端肽水平升高 ($P < 0.05$)，进行脉冲电磁场干预后大鼠血清中 II 型胶原 C 端肽水平下降 ($P < 0.05$)，实验结果提示，脉冲电磁场的干预可以抑制老年大鼠关节软骨的退化、降解。

骨关节炎除了软骨退变的病理改变，软骨下骨的骨重建也是其重要病理进程，关节炎软骨下骨的骨重建以骨吸收为主，骨吸收导致的局部骨质疏松形成是膝骨关节炎的特征之一^[24-25]。研究表明骨关节炎与骨微结构的改变密切相关^[26]。骨关节炎患者表现出不同程度的骨小梁数量减少、间隙扩大和密度降低等改变^[16]，这些变化可能是骨骼长期受到应力作用引起骨质损伤做出的适应性改变。此次研究结果显示，与青年组相比，老年组大鼠胫骨骨密度、骨体积分数、骨小梁数量均降低 ($P < 0.05$)，骨小梁间隙增大 ($P < 0.05$)；进行脉冲电磁场干预后，老年大鼠骨密度、骨体积分数、骨小梁数量均升高 ($P < 0.05$)，骨小梁间隙减小 ($P < 0.05$)。结果表明老年大鼠软骨下骨骨质丢失，局部骨质疏松形成，而关节软骨下骨的骨质疏松改变在进行脉冲电磁场干预后得到改善，表明脉冲电磁场治疗可以抑制骨质丢失、改善骨微结构。

基质金属蛋白酶存在于大多数结缔组织中，在机体生长和组织修复的过程中有重要的作用^[27-28]，当其功能失调时会导致疾病进展。基质金属蛋白酶 1 和 13 含量与骨关节炎密切相关^[29-30]，骨关节炎患者关节组织中基质金属蛋白酶 1 和 13 含量明显增高。研究发现，在骨关节炎早期关节液中基质金属蛋白酶 1 含量较高，可能与其降解关节软骨细胞外基质

相关^[31]。基质金属蛋白酶 13 在软骨细胞受到损伤、炎症和老化等病理刺激时分泌，正常情况下其会迅速被软骨细胞吞噬溶解，但在关节病损处基质金属蛋白酶 13 过量表达，与基质金属蛋白酶 1 协同作用破坏软骨内胶原蛋白，加重骨关节炎。同时，基质金属蛋白酶 13 还是骨关节炎中软骨衰老的重要中枢调节因子^[32]。此次研究结果显示，老年组大鼠软骨中基质金属蛋白酶 1、13 的 mRNA 和蛋白表达明显增高，关节软骨受到侵袭，骨关节炎进一步加重；脉冲电磁场干预后，基质金属蛋白酶 1、13 的 mRNA 和蛋白表达明显降低，软骨细胞破坏的情况明显缓解，骨关节炎得到改善。

软骨细胞衰老是骨关节炎发展的主要危险因素之一^[33-34]。衰老的细胞由于细胞分裂能力耗尽而进入一种稳定的细胞周期阻滞状态，细胞停止生长和增殖。软骨细胞的衰老会导致细胞外基质降解与合成失衡，从而使软骨细胞维持关节软骨功能的能力下降，骨关节炎进一步发展。细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 P53、P21 是细胞衰老的重要调节途径之一^[35-38]。P53 又称管家基因，是衰老程序的核心组成部分，在软骨细胞衰老过程中表达和乙酰化增加。P21 是 P53 最重要的下游基因之一，当细胞受损，P53 会激活下游的 P21，促进 P21 的表达。同时，衰老相关蛋白通过 P53-P21-Prb 途径使 Rb 蛋白磷酸化，介导细胞衰老的发生。有研究表明，脉冲电磁场可以通过抑制软骨细胞衰老、改善骨关节炎^[39]。此次研究结果显示，与青年组相比，老年组大鼠胫骨软骨及软骨下骨 P53、P21 的 mRNA 和蛋白表达增强，脉冲电磁场干预后，P53、P21 的 mRNA 和蛋白表达降低，表明脉冲电磁场可能通过降低衰老因子 P53、P21 的表达改善膝骨关节炎。

该研究仍有一些不足：如未设置多种干预参数进行对照，无法明确脉冲电磁场治疗骨关节炎的最适强度，这也是下一步探究的方向；在下一步的研究中可设置更多年龄组的大鼠，进一步探究脉冲电磁场对各年龄段大鼠骨关节炎的作用。

综上所述，脉冲电磁场可能通过抑制衰老因子 P53、P21 表达降低基质金属蛋白酶 1 和 13 的表达，延缓关节软骨退化、改善骨关节炎。

致谢：感谢南华大学动物部、南华大学附属第一医院中心实验室及参与本研究的老师们！

作者贡献：周君、刘静参与设计实验方案；尹林伟、黄夏荣、孙光华参与文章撰写核对；钟培瑞、王金玲参与数据收集分析；尹林伟、陈佳倩、文幸、甘邵婷、胡文韬、李萌萌参与实验实施。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

4 参考文献 References

- [1] WANG X, PERRY TA, ARDEN N, et al. Occupational Risk in Knee Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2020;72(9):1213-1223.
- [2] EBELL MH. Osteoarthritis: Rapid Evidence Review. *Am Fam Physician*. 2018;97(8):523-526.
- [3] ILFELD BM, SHUSTER JJ, THERIAQUE DW, et al. Long-term pain, stiffness, and functional disability after total knee arthroplasty with and without an extended ambulatory continuous femoral nerve block: a prospective, 1-year follow-up of a multicenter, randomized, triple-masked, placebo-controlled trial. *Reg Anesth Pain Med*. 2011;36(2):116-120.
- [4] EFE ARSLAN D, KUTLUTÜRKAN S, KORKMAZ M. The Effect of Aromatherapy Massage on Knee Pain and Functional Status in Participants with Osteoarthritis. *Pain Manag Nurs*. 2019;20(1):62-69.
- [5] HOLLA JF, STEULTJENS MP, VAN DER LEEDEN M, et al. Determinants of range of joint motion in patients with early symptomatic osteoarthritis of the hip and/or knee: an exploratory study in the CHECK cohort. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011;19(4):411-419.
- [6] 刘伦, 王云鹭, 李锡勇, 等. 髌下脂肪垫在膝关节骨关节炎发病机制中作用的研究进展 [J]. *实用骨科杂志*, 2023,29(6):526-531.
- [7] BERENBAUM F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis Cartilage*. 2013;21(1):16-21.
- [8] CHIEN SY, TSAI CH, LIU SC, et al. Noggin Inhibits IL-1 β and BMP-2 Expression, and Attenuates Cartilage Degeneration and Subchondral Bone Destruction in Experimental Osteoarthritis. *Cells*. 2020;9(4):927.
- [9] YAN JY, TIAN FM, WANG WY, et al. Age dependent changes in cartilage matrix, subchondral bone mass, and estradiol levels in blood serum, in naturally occurring osteoarthritis in Guinea pigs. *Int J Mol Sci*. 2014;15(8):13578-13595.
- [10] MARKOVIC L, WAGNER B, CREVENNA R. Effects of pulsed electromagnetic field therapy on outcomes associated with osteoarthritis: A systematic review of systematic reviews. *Wien Klin Wochenschr*. 2022;134(11-12):425-433.
- [11] 马原军, 于世宾. 电磁脉冲在骨关节炎治疗中的作用机制研究进展 [J]. *医学研究杂志*, 2021,50(5):15-19+168.
- [12] 杨梦琪, 张向东, 寇赵渐, 等. 膝骨关节炎动物建模研究进展 [J]. *现代疾病预防控制*, 2023,34(3):161-165.
- [13] 吴伟, 李慧, 邹军, 等. 骨关节炎小动物模型的制备及量表评价 [J]. *中国组织工程研究*, 2017,21(28):4529-4535.
- [14] MCCOY AM. Animal Models of Osteoarthritis: Comparisons and Key Considerations. *Vet Pathol*. 2015;52(5):803-818.
- [15] 刘宇涵, 樊渝江, 王启光. 早期创伤性膝骨关节炎动物模型构建方案的比较 [J]. *中国组织工程研究*, 2024,28(4):542-549.
- [16] 郑梅梅, 江自鲜, 郑俭彬, 等. 骨关节炎病理变化过程的研究进展 [J]. *云南中医药大学学报*, 2023,46(3):106-112.
- [17] KATZ JN, ARANT KR, LOESER RF. Diagnosis and Treatment of Hip and Knee Osteoarthritis: A Review. *JAMA*. 2021;325(6):568-578.
- [18] DIEPPE PA, LOHMANDER LS. Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. *Lancet*. 2005;365(9463):965-973.
- [19] NAH HD, SWOBODA B, BIRK DE, et al. Type IIA procollagen: expression in developing chicken limb cartilage and human osteoarthritic articular cartilage. *Dev Dyn*. 2001;220(4):307-322.
- [20] EYRE D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res*. 2002;4(1):30-35.
- [21] HE T, WU W, HUANG Y, et al. Multiple biomarkers analysis for the early detection of prosthetic aseptic loosening of hip arthroplasty. *Int Orthop*. 2013;37(6):1025-1031.
- [22] BERRY PA, MACIEWICZ RA, CICUTTINI FM, et al. Markers of bone formation and resorption identify subgroups of patients with clinical knee osteoarthritis who have reduced rates of cartilage loss. *J Rheumatol*. 2010;37(6):1252-1259.
- [23] 闻振坤, 郭建斌, 张育民. 骨关节炎早期诊断生物学标志物的研究进展 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2017,31(11):1142-1144.
- [24] 郭曹培, 程飘涛, 杨成兵, 等. 骨免疫与骨代谢 [J]. *中国组织工程研究*, 2024,28(14):2261-2266.
- [25] DEQUEKER J, GEUSENS P. Osteoporosis and arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1990;49(5):276-280.
- [26] 孙文渊, 潘娅岚, 郭杨, 等. 骨质疏松症与骨关节炎共病的影像学研究进展 [J]. *中国医学影像学杂志*, 2023,31(5):550-554.
- [27] DE ALMEIDA LGN, THODE H, ESLAMBOLCHI Y, et al. Matrix Metalloproteinases: From Molecular Mechanisms to Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacol Rev*. 2022;74(3):712-768.
- [28] 武志娟, 柴志欣, 王吉坤, 等. 牦牛骨骼肌中特异基质金属蛋白酶及其功能相关基因的表达分析 [J]. *中国畜牧兽医*, 2023,50(5):1774-1784.
- [29] HU Q, ECKER M. Overview of MMP-13 as a Promising Target for the Treatment of Osteoarthritis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(4):1742.
- [30] MAHMOUD RK, EL-ANSARY AK, EL-EISHI HH, et al. Matrix metalloproteinases MMP-3 and MMP-1 levels in sera and synovial fluids in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ital J Biochem*. 2005;54(3-4):248-257.
- [31] 《中国骨质疏松杂志》骨代谢专家组, 张萌萌, 马倩倩, 等. 骨代谢生化指标临床应用专家共识 (2023 修订版) [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2023,29(4):469-476.
- [32] 肖云, 尚奇, 张学来, 等. 铁死亡在骨衰老中的机制 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2023,29(4):562-566.
- [33] CORYELL PR, DIEKMAN BO, LOESER RF. Mechanisms and therapeutic implications of cellular senescence in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2021;17(1):47-57.
- [34] ZHU J, YANG S, QI Y, et al. Stem cell-homing hydrogel-based miR-29b-5p delivery promotes cartilage regeneration by suppressing senescence in an osteoarthritis rat model. *Sci Adv*. 2022;8(13):eabk0011.
- [35] XU M, FENG M, PENG H, et al. Epigenetic regulation of chondrocyte hypertrophy and apoptosis through Sirt1/P53/P21 pathway in surgery-induced osteoarthritis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;528(1):179-185.
- [36] 时孝晴, 揭立士, 殷松江, 等. 软骨细胞衰老与骨关节炎的研究进展 [J]. *医学研究生学报*, 2021,34(9):962-968.
- [37] RIM YA, NAM Y, JU JH. The Role of Chondrocyte Hypertrophy and Senescence in Osteoarthritis Initiation and Progression. *Int J Mol Sci*. 2020;21(7):2358.
- [38] 黄夏荣, 胡莉芝, 孙光华, 等. 电针干预老年膝骨关节炎大鼠关节软骨及软骨下骨 P53、P21 的表达 [J]. *中国组织工程研究*, 2024,28(8):1174-1179.
- [39] WANG T, YANG L, LIANG Z, et al. Pulsed electromagnetic fields attenuate glucocorticoid-induced bone loss by targeting senescent LepR+ bone marrow mesenchymal stromal cells. *Biomater Adv*. 2022;133:112635.

(责任编辑: LWJ, GW, ZN, WL)