

• 论著 •

草乌甲素对大鼠胶原诱导性关节炎的作用*

杨建浩 杨云皓 喻双雨 何成松

(西南医科大学附属医院风湿免疫科, 四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 探究草乌甲素对大鼠胶原诱导性关节炎的作用。**方法** 20 只雄性 SPF 级 SD 大鼠随机选取 5 只作为对照组, 剩下的 15 只 SD 大鼠用来建立胶原诱导性关节炎(CIA)模型, 根据关节炎评分表评估 CIA 模型, 建模成功后再随机分成模型组、低剂量草乌甲素治疗组(50 $\mu\text{g/kg}$)、高剂量草乌甲素治疗组(100 $\mu\text{g/kg}$), 此后每组大鼠连续给药干预 30 d, 第 31 天后处死大鼠。酶联免疫吸附法(ELISA)测定大鼠 TNF- α 、IL-6、IL-17、MMP-3 水平, 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)测定关节滑膜组织中 MMP-3 mRNA 表达水平, 蛋白印迹法(Western Blot)检测关节滑膜组织中 MMP-3 蛋白水平, HE 染色观察滑膜组织病理变化。**结果** 与对照组比较, 模型组及草乌甲素治疗组 TNF- α 、IL-6、IL-17、MMP-3 水平明显升高($P<0.05$); 同时, 与模型组比较, 草乌甲素治疗组 TNF- α 、IL-6、IL-17、MMP-3 水平明显降低($P<0.05$)。与对照组相比, 模型组 MMP-3 mRNA、MMP-3 蛋白表达水平明显升高; 同时, 与模型组比较, 草乌甲素治疗组 MMP-3 mRNA、MMP-3 蛋白表达水平降低($P<0.05$)。组织病理结果显示草乌甲素治疗组的关节滑膜处的炎症细胞浸润及滑膜增生情况均减轻。**结论** 草乌甲素可以抑制炎症因子分泌和降低 MMP-3 的表达, 对大鼠胶原诱导性关节炎具有一定的治疗作用。

【关键词】 草乌甲素; 胶原诱导性关节炎; 类风湿关节炎; 促炎细胞因子; MMP-3

【中图分类号】 R593.22 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2023.08.005

Effect of Bulleyaconitine A on collagen-induced arthritis in rats

YANG Jianhao, YANG Yunhao, YU Shuangyu, HE Chengsong

(Department of Rheumatology and Immunology, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of Bulleyaconitine A on collagen-induced arthritis rats. **Methods** Five of the 20 male SPF SD rats were randomly selected as the control group, and the remaining 15 SD rats were used to establish the collagen-induced arthritis (CIA) model. The CIA model was evaluated against the arthritis rating scale. After successful modeling, they were randomly divided into model group, low-dose aconitine treatment group (50 $\mu\text{g/kg}$) and high-dose aconitine treatment group (100 $\mu\text{g/kg}$). The rats in each group were given continuous intervention for 30 days, and the rats were killed on the 31st day. The levels of TNF- α , IL-6, IL-17 and MMP-3 were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the mRNA expression of MMP-3 in synovium was determined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The level of MMP-3 protein in synovial tissue was detected by Western Blot, and the pathological changes of synovial tissue were observed by HE staining. **Results** Compared with control group, the levels of TNF- α , IL-6, IL-17 and MMP-3 in model group and aconitine treatment group were significantly increased ($P<0.05$). Compared with model group, the contents of TNF- α , IL-6, IL-17 and MMP-3 in monoponitine treatment group were significantly decreased ($P<0.05$). Histopathological results showed that the inflammatory cell infiltration and synovial hyperplasia were reduced in the joint synovium treated group. **Conclusion** Bulleyaconitine A can inhibit the secretion of inflammatory factors and reduce the expression of MMP-3, which has a therapeutic effect on collagen-induced arthritis in rats.

【Key words】 Bulleyaconitine A; Collagen-induced arthritis; Rheumatoid arthritis; Pro-inflammatory cytokine; MMP-3

基金项目: 四川省科学技术与泸州市人民政府、泸州医学院联合科研专项资金资助项目(川科发计[2014]10 号 74 项)

通讯作者: 何成松, 主任医师, E-mail: 13700980878@163.com

引用本文: 杨建浩, 杨云皓, 喻双雨, 等. 草乌甲素对大鼠胶原诱导性关节炎的作用[J]. 西部医学, 2023, 35(8): 1117-1121. DOI:10.3969/j.issn.

1672-3511. 2023. 08. 005

类风湿关节炎(Rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性、进行性炎症性疾病,其主要表现为对称性的多关节炎,可能会导致关节和关节周围结构损伤和系统性炎症^[1]。RA 的病理特征主要包括滑膜组织增生、炎症细胞浸润以及关节软骨的破坏三个方面^[2]。既往有研究显示,RA 在全球范围内的患病率约为 0.24%^[3],而在我国 RA 的患病率为 0.36%~0.42%^[4]。目前的研究对 RA 发病机制有了较深的认识,但是在临床治疗方面仍存在较多困难,缺乏较为安全有效的治疗方法。草乌甲素是一种现代植物药,其具有抗炎、镇痛和一定免疫调节作用,广泛用于治疗慢性疼痛的患者^[5]。本研究采用胶原诱导性关节炎(Collagen-induced arthritis, CIA)大鼠作为本研究的实验动物模型,其与 RA 的发病机制在诸多方面存在着相似之处,包括滑膜增生、炎症浸润等,是目前研究 RA 的模型之一^[6]。本研究旨在探究草乌甲素对大鼠胶原诱导性关节炎的作用,同时为临床上使用该药治疗 RA 提供更多依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 8 周龄雄性 SD 大鼠 20 只,体质量为 180~220 g,由西南医科大学实验动物中心提供,饲养等级为 SPF 级,动物许可证编号:SCXK(川)2018-17。本动物实验经西南医科大学实验动物伦理委员会讨论审议通过(批准文号:SWMU20220023)。

1.2 主要药品、试剂与仪器 草乌甲素(白色粉末,纯度大于 98%)购于成都曼思特生物科技有限公司,弗氏完全佐剂及牛Ⅱ型胶原蛋白购于上海碧云天生物技术有限公司,胶原蛋白购于上海金穗生物科技有限公司,IL-6 试剂盒、TNF- α 试剂盒、MMP-3 试剂盒以及 HE 染色试剂盒购于武汉恒意赛生物科技有限公司。台式离心机(上海安亭科学仪器厂),恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司),PCR 仪(杭州博日科技)。

1.3 方法

1.3.1 建立 CIA 大鼠模型 将牛Ⅱ型胶原蛋白溶于 0.5%的冰醋酸中,提前预冷,终浓度为 4 mg/mL,隔夜 4℃,在冰浴条件下,将上述溶液加入相同体积的完全弗氏佐剂,使两者充分乳化;首次免疫在大鼠的足、尾根部多点皮内注射牛型胶原乳剂(按 0.3 mL/只)进行^[7],首次免疫 7 d 后在足、尾根再次使用上述乳剂加强免疫;加强免疫 21 d 后,使用 CIA 模型评分进行评估,评分大于 6 分表示造模成功。关节炎指数评分标准^[6]如下。0 分:无关节肿胀;1 分:单个关节肿胀;2 分:2 个关节肿胀;3 分:2 个以上的关节肿胀;4 分:全部关节肿胀。

1.3.2 实验分组 20 只 SPF 级 SD 大鼠随机分为对照组(5 只)和诱导模型组(15 只)。将诱导模型组中造模成功的 CIA 大鼠随机分为模型组、低剂量草乌甲素治疗组、高剂量草乌甲素治疗组。低剂量草乌甲素治疗组和高剂量草乌甲素治疗组分别按照 50、100 $\mu\text{g/kg}$ 腹腔注射草乌甲素溶液,同时于对照组和模型组的大鼠腹腔内注射同等剂量的生理盐水,每日 1 次,连续给药 30 d。第 31 天时处死大鼠,取大鼠的腹主动脉血,高速离心后获取上层血清,同时获取大鼠后踝关节滑膜组织保存备用。

1.3.3 酶联免疫吸附法(ELISA)测定 TNF- α 、IL-6、IL-17、MMP-3 水平 解冻血清,4℃条件下 2000 g 离心 15 min,吸取上清液。按照 ELISA 试剂盒说明书,测定每组大鼠血清中的 TNF- α 、IL-6、IL-17、MMP-3 的水平。

1.3.4 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)测定大鼠关节滑膜组织中 MMP-3 mRNA 的表达水平 引物购自武汉金开瑞生物工程有限公司,经人工合成提供。GAPDH 上游引物序列:AACAGCAACTCCCA TTCTTCC,下游引物序列:TGGTCCAGGGTTTCT TACTCC;MMP-3 上游引物序列:AGTTCCTTGGG CTGAAGATGAC,下游引物序列:CCTGGAGAAT GTGAGTGGGG。提取各组大鼠滑膜组织总 RNA,利用 M-MLV Reverse Transcriptase 试剂盒(ELK Biotechnology, EQ002)合成 cDNA。利用 QuFast SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒(ELKRT-Biotechnology, EQ001)检测 MMP-3 mRNA 表达水平,反应条件:95℃ 1 min,95℃ 15 s,58℃ 20 s,72℃ 45 s,共 40 个循环。根据计算公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 得出 MMP-3 mRNA 相对表达量。

1.3.5 Western Blot 检测关节滑膜组织中 MMP-3 蛋白表达水平 使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒,对滑膜组织进行蛋白浓度测定。用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离相同蛋白量的血清蛋白样本,同时转移至 PVDF 膜上,室温下加入封闭液孵育 PVDF 膜 1 h 后,加入抗 MMP-3(武汉三鹰,17873-1-AP)、GAPDH(美国 abcam 公司,ab181602)的特异性一抗在 4℃过夜孵育。次日加入对应的二抗常温孵育 1 h。用 ECL 化学发光法检测蛋白荧光信号。以 GAPDH 作为内参蛋白计算 MMP-3 蛋白的相对表达量。

1.3.6 HE 染色观察滑膜组织病理情况 给药至第 31 天处死大鼠,获取大鼠的后踝关节滑膜组织,通过固定、脱钙、石蜡包埋及切片进行处理。HE 染色:将准备好的切片,经二甲苯、梯度浓度酒精脱蜡后,用苏木素染色 10 min,蒸馏水冲洗,酸性乙醇分化 3 s,蒸

馏水冲洗 1 min,入伊红染色 3 min,蒸馏水冲洗、脱水、透明、封片,最后在显微镜下观察切片。

1.4 统计学分析 使用 SPSS 21.0 软件对数据进行统计分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,使用方差分析进行比较。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 草乌甲素对大鼠血清中 IL-6、IL-17、TNF- α 、

MMP-3 的影响 与对照组相比,模型组大鼠血清中的 IL-6、IL-17、TNF- α 、MMP-3 水平明显升高(均 $P < 0.05$)。草乌甲素治疗组大鼠血清 IL-6、IL-17、TNF- α 、MMP-3 水平较模型组明显降低(均 $P < 0.05$),且呈剂量依赖性($P < 0.05$),当草乌甲素的剂量达到最高水平(100 $\mu\text{g/kg}$)时,对 IL-6、IL-17、TNF- α 、MMP-3 表达水平的抑制作用最为显著。见表 1。

表 1 草乌甲素对 CIA 模型大鼠血清中 TNF- α 、IL-6、IL-17、MMP-3 含量的比较($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of the levels of TNF- α , IL-6, IL-17 and MMP-3 in serum of CIA model rats

分组	n	IL-6(pg/mL)	IL-17(pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	MMP-3(ng/mL)
对照组	5	30.08 $\pm$ 3.03	26.07 $\pm$ 2.19	27.24 $\pm$ 2.19	1.23 $\pm$ 0.12
模型组	5	48.98 $\pm$ 3.98	42.79 $\pm$ 2.47	44.48 $\pm$ 3.85	2.53 $\pm$ 0.19
低剂量草乌甲素治疗组	5	43.66 $\pm$ 3.76	35.53 $\pm$ 3.20	38.96 $\pm$ 3.75	1.97 $\pm$ 0.16
高剂量草乌甲素治疗组	5	37.53 $\pm$ 3.13	31.28 $\pm$ 3.53	33.48 $\pm$ 3.63	1.67 $\pm$ 0.21
F		27.016	29.751	23.299	48.658
P		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

2.2 草乌甲素对大鼠滑膜组织中 MMP-3 mRNA 表达的影响 与对照组相比,模型组大鼠滑膜组织的 MMP-3 mRNA 水平升高(均 $P < 0.05$)。予以草乌甲素治疗后大鼠滑膜组织中的 MMP-3 mRNA 水平降低(均 $P < 0.05$),其中对 MMP-3 mRNA 的调节作用呈剂量依赖性(均 $P < 0.05$)。见图 1。

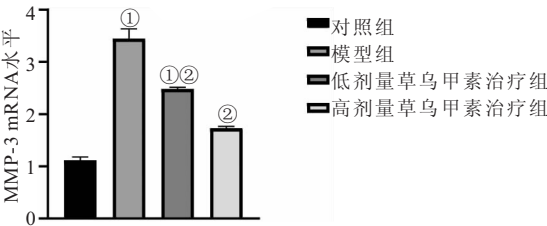


图 1 草乌甲素对 CIA 模型大鼠滑膜组织 MMP-3mRNA 表达的影响
Figure 1 Effect of aconitine on MMP-3mRNA expression in synovial tissue of CIA model rats

注:与对照组比较,① $P < 0.05$;与模型组比较,② $P < 0.05$ 。

2.3 草乌甲素对大鼠滑膜组织中 MMP-3 蛋白水平的影响 与对照组相比,模型组大鼠滑膜组织中的 MMP-3 蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$)。予以草乌甲素治疗后的大鼠滑膜组织中的 MMP-3 蛋白表达水平降低(均 $P < 0.05$)。见图 2。

2.4 草乌甲素对大鼠踝关节组织病理学的影响 HE 染色后观察大鼠踝关节滑膜组织增生及炎症细胞浸润的情况,与对照组相比,模型组滑膜组织增生明显伴有炎症细胞大量浸润;与模型组相比,高剂量草乌甲素组滑膜组织未见明显增生伴有少量炎症细胞浸润,见图 3。提示,草乌甲素可以改善 CIA 大鼠关节滑膜处的滑膜增生和炎症浸润。

3 讨论

RA是一种慢性、系统性、侵蚀性、全身性自身免疫性疾病,以滑膜增生及炎性细胞浸润为主要的病理

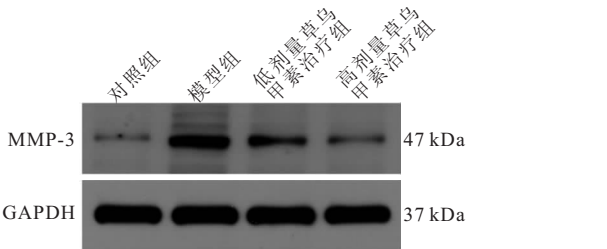


图 2 草乌甲素对 CIA 模型大鼠滑膜组织中 MMP-3 蛋白水平的影响
Figure 2 Effect of aconitine on protein levels of MMP-3 in synovial tissue of CIA model rats

注:与对照组比较,① $P < 0.05$;与模型组比较,② $P < 0.05$ 。

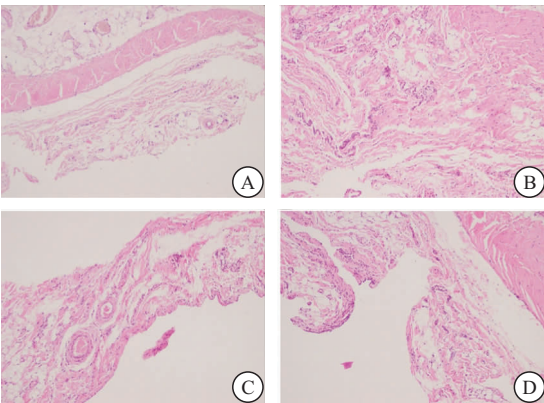


图 3 HE 染色观察草乌甲素对 CIA 模型大鼠踝关节滑膜组织病理学的影响(100 $\times$)

Figure 3 HE staining was used to observe the effect of mononitine on the synovial histopathology of ankle joint in CIA model rats

注:A. 对照组;B. 模型组;C. 低剂量草乌甲素治疗组;D. 高剂量草乌甲素对照组。

特点^[8]。临床治疗 RA 的药物目前包括糖皮质激素、非甾体抗炎药 (NSAIDs)、疾病改善抗风湿药物 (DMARDs) 以及生物制剂。糖皮质激素及非甾体抗炎药可有效缓解 RA 疼痛及僵硬; DMARDs 药物包括羟氯喹、甲氨蝶呤、来氟米特等, 可改善风湿病情; 生物制剂是靶向抑制免疫和炎症反应中的特定分子, 进而改善风湿病情^[9]。草乌甲素是一种从乌头属植物滇西乌头中分离得到的 C-19 二萜双酯型生物碱, 其具有镇痛、抗炎作用, 并有一定的免疫调节功能^[10]。本研究选用 CIA 大鼠作为研究 RA 的实验模型, 因其在发病机制上与 RA 有很多相似之处, 包括关节肿胀、滑膜增生、炎性细胞浸润等^[11]。龙丽等^[12]研究表明草乌甲素能提高佐剂关节炎 (Adjuvant-induced arthritis, AIA) 的镇痛作用, 主要与血清 PGE₂ 及提升内源性 β -内啡肽水平有关, 其中 AIA 动物模型也是研究 RA 的动物模型之一, 其主要表现为 T 细胞介导的细胞免疫反应。笔者本次使用的 CIA 动物模型则包括细胞免疫反应和体液免疫反应两个方面, 相比与 AIA 动物模型更与人类相似。

胡建楣等^[13]研究表明高草乌甲素对佐剂性关节炎性大鼠足肿胀有显著抑制作用, 其主要是降低大鼠血清 TNF- α 、IL-2、CIA 和 PGE_a 水平而发挥抗炎作用。CIA 大鼠模型建立成功后, 使用不同剂量的草乌甲素处理 CIA 大鼠, 病理结果显示, 草乌甲素治疗组的 CIA 大鼠滑膜组织增生和炎症细胞浸润减轻, 提示草乌甲素对大鼠胶原诱导性关节炎具有一定的治疗作用。

TNF- α 是炎症因子, 其主要是通过活化的单、巨噬细胞产生, 具有杀伤和抑制肿瘤细胞, 以及可以促进细胞增殖和分化的生物学特性, 从而参与自身免疫疾病的发生和发展^[14]。在 RA 患者体内, TNF- α 是一种高表达的促炎因子^[15]。TNF- α 可以促进其他促炎因子的释放, 如 IL-6 同时进一步强化炎症反应, 在 RA 的疾病活动中有重要的作用^[16]。既往有研究表明, IL-6 在免疫调节、造血、炎症和肿瘤等方面具有广泛的生物学活性^[17]。IL-17 由辅助性 T 细胞产生, 在体内可以促进粒细胞集落刺激因子和趋化因子的产生, 具有强大的致炎作用^[18]。随着促炎因子的产生增多, 增加的中性粒细胞参与诱发滑膜炎炎症反应的机率, 从而加剧体内了软骨和骨的破坏^[19]。基质金属蛋白酶 (MMPs) 是属于锌依赖性的内肽酶, 因其具有降解细胞外基质中各种蛋白质的作用, 被认为是一类负责降解细胞外基质分子的酶, 细胞外基质分子作为参与生物组织重塑中的重要调节因子^[20]。有研究发现 MMPs 可以在关节软骨中表达, 因为其具有降解 III ~

VII 型胶原及多种纤维连接蛋白的作用, 并且在 RA 疾病活动时表达进一步升高, 从而被认为是参与软骨降解最重要的蛋白酶^[21]。MMP-3 在 RA 患者中水平较高反映了疾病活动和结构损伤^[22], 被认为是 RA 疾病活动度、疾病结局可预测性和治疗反应的可靠标志物^[23]。

本实验通过 ELISA 对大鼠血清中的细胞因子进行检测, 发现 CIA 大鼠血清中 TNF- α 、IL-6、IL-17、MMP-3 水平均显著高于正常大鼠, 而接受草乌甲素治疗的 CIA 大鼠 TNF- α 、IL-6、IL-17、MMP-3 水平可显著降低 ($P < 0.05$), 且呈剂量依赖性降低, 提示草乌甲素具有一定抗炎作用。同时在本研究实验中检测 CIA 大鼠滑膜组织中 MMP-3 的 mRNA 以及蛋白表达水平, 发现 CIA 大鼠滑膜组织中 MMP-3 的表达含量均显著高于正常大鼠, 而接受草乌甲素治疗的 CIA 大鼠, MMP-3 表达水平明显下降 ($P < 0.05$)。由此可知草乌甲素对于 CIA 大鼠具有一定的治疗作用, 但其作用机制目前还尚不明确, 可能与抗炎作用有关, 有待进一步研究。

4 结论

草乌甲素可以抑制炎症因子分泌和降低 MMP-3 的表达, 对大鼠胶原诱导性关节炎具有一定的治疗作用, 在 RA 的治疗上具有良好的应用前景。

【参考文献】

- [1] CUSH J J. Rheumatoid Arthritis: Early Diagnosis and Treatment [J]. Med Clin North Am, 2021, 105(2): 355-365.
- [2] LIN Y J, ANZAGHE M, SCHÜLKE S. Update on the Pathomechanism, Diagnosis, and Treatment Options for Rheumatoid Arthritis [J]. Cells, 2020, 9(4): 880-880.
- [3] OTÓN T, CARMONA L. The epidemiology of established rheumatoid arthritis [J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2019, 33(5): 101477.
- [4] 中华医学会风湿病学分会. 2018 中国类风湿关节炎诊疗指南 [J]. 中华内科杂志, 2018, 57(4): 242-251.
- [5] 张轩, 周斌, 路慧丽. 草乌甲素的药理作用机制及临床应用研究进展 [J]. 慢性病学杂志, 2016, 17(11): 1210-1213.
- [6] BRAND D D, LATHAM K A, ROSLONIEC E F. Collagen-induced arthritis [J]. Nat Protoc, 2007, 2(5): 1269-1275.
- [7] ELHAI M, CHIOCCIA G, MARCHIOL C, et al. Targeting CD226/DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1) in collagen-induced arthritis mouse models [J]. J Inflamm (Lond), 2015, 12(1): 9.
- [8] CUSH J J. Rheumatoid Arthritis: Early Diagnosis and Treatment [J]. Rheum Dis Clin North Am, 2022, 48(2): 537-547.
- [9] ABBASI M, MOUSAVI M J, JAMALZEH S, et al. Strategies toward rheumatoid arthritis therapy: the old and the new [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(7): 10018-10031.
- [10] 林彦君, 宋流东. 草乌甲素的研究进展 [J]. 中国民族民间医

- 药, 2021, 30(20): 58-62.
- [11] CHOUDHARY N, BHATT L K, PRABHAVALKAR K S. Experimental animal models for rheumatoid arthritis [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2018, 40(3): 193-200.
- [12] 龙丽, 赵金霞, 贾汝琳, 等. 草乌甲素对大鼠佐剂性关节炎的影响 [J]. 临床药物治疗杂志, 2013, 11(1): 16-18.
- [13] 胡建楣, 肖柳英, 潘竞骅, 等. 高乌甲素抑制佐剂性关节炎大鼠模型的实验研究 [J]. 中药材, 2009, 32(3): 420-422.
- [14] JANG D I, LEE A H, SHIN H Y, *et al.* The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(5): 2719-2735.
- [15] MOELANTS E A V, MORTIER A, VAN DAMME J, *et al.* Regulation of TNF- α with a focus on rheumatoid arthritis [J]. Immunol Cell Biol, 2013, 91(6): 393-401.
- [16] ALAM J, JANTAN I, BUKHARI S N A. Rheumatoid arthritis: Recent advances on its etiology, role of cytokines and pharmacotherapy [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 92(1): 615-633.
- [17] CHOY E H S, CALABRESE L H. Neuroendocrine and neurophysiological effects of interleukin 6 in rheumatoid arthritis [J]. Rheumatology (Oxford), 2018, 57(11): 1885-1895.
- [18] KUWABARA T, ISHIKAWA F, KONDO M, *et al.* The Role of IL-17 and Related Cytokines in Inflammatory Autoimmune Diseases [J]. Mediators Inflamm, 2017, 2017: 3908061. doi: 10.1155/2017/3908061.
- [19] PHOKSAWAT W, JUMNAINSONG A, SORNKAYASIT K, *et al.* IL-17 and IFN- γ Productions by CD4+ T cells and T cell Subsets Expressing NKG2D Associated with the Number of Risk Factors for Cardiovascular Diseases [J]. Mol Immunol, 2020, 122: 193-199.
- [20] CUI N, HU M, KHALIL R A. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases [J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2017, 147: 1-73.
- [21] SHIVNATH N, RAWAT V, SIDDIQUI S, *et al.* Antiosteoarthritic effect of Punica granatum L. peel extract on collagenase induced osteoarthritis rat by modulation of COL-2, MMP-3, and COX-2 expression [J]. Environ Toxicol, 2020. doi: 10.1002/tox.23005.
- [22] SKACELOVA M, HERMANOVA Z, HORAK P, *et al.* Higher levels of matrix metalloproteinase-3 in patients with RA reflect disease activity and structural damage [J]. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2017, 161(3): 296-302.
- [23] LERNER A, NEIDHÖFER S, REUTER S, *et al.* MMP3 is a reliable marker for disease activity, radiological monitoring, disease outcome predictability, and therapeutic response in rheumatoid arthritis [J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2018, 32(4): 550-562.

(收稿日期: 2022-08-29; 修回日期: 2023-07-02; 编辑: 黎仕娟)

(上接第 1116 页)

- [22] ZHANG S, CHENG X, SHI J, *et al.* Electrochemical deposition of calcium phosphate chitosan gentamicin on a titanium alloy for bone tissue healing [J]. Intl J Electrochem Sci, 2018, 13: 4046-4054.
- [23] MOKABBER T, CAO H T, NOROUZI N, *et al.* Antimicrobial electrodeposited silver-containing calcium phosphate coatings [J]. ACS Appl Mater Interf, 2020, 12(5): 5531-5541.
- [24] MULLIN J W. Crystallization [M]. Butterworth-Heinemann Press, 2001: 123.
- [25] PEREZ N. Electrochemistry and corrosion science [M]. Kluwer Academic Press, 2004: 74.
- [26] 张鉴清. 电化学测试技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 37.
- [27] PEREZ N. Electrochemistry and corrosion science [M]. Kluwer Academic Press, 2004: 132.
- [28] 张立岩, 金掌, 甘维, 等. 镉锌共掺杂磷酸八钙微球制备及其骨修复性能 [J]. 材料科学与工程学报, 2016, 34(6): 900-905.
- [29] WEN H B, DE WIJN J R, CUI F Z, *et al.* Preparation of calcium phosphate coatings on titanium implant materials by simple chemistry [J]. J Biomed Mater Res, 1998, 41(2): 227-236.

(收稿日期: 2022-12-03; 修回日期: 2023-01-11; 编辑: 黎仕娟)