

# 补肾益气行血方药对人类骨关节炎软骨细胞 II 型胶原和一氧化氮合酶的影响

● 周琦石 郑晓辉 王海彬 陈基长 黄 枫

**摘 要** 目的:观察补肾益气活血法方剂——骨炎定对一氧化氮抑制离体人骨关节炎软骨细胞 II 型胶原合成的影响,探讨其保护软骨细胞的作用途径。方法:髌关节炎行关节置换术中获取离体股骨头关节软骨,行软骨细胞分离培养传代,通过设立空白血清对照组、IL-1 组、IL-1 加 NAME 组、IL-1 加骨炎定方含药血清组,运用逆转录聚合酶链技术检测对软骨细胞一氧化氮合酶(iNOS)和 II 型胶原的影响。结果:IL-1 组、IL-1 加 NAME 组、IL-1 加骨炎定方含药血清组 iNOS mRNA 的表达均明显增加,但 IL-1 加骨炎定方含药血清组和 IL-1 组相比,可以抑制 iNOS mRNA 的表达,和 IL-1 组相比,有明显差异( $P < 0.05$ ),和 IL-1 组相比,3 组(对照组、IL-1 加 NAME 组、IL-1 加骨炎定方含药血清组)均明显增加 II 型胶原的表达,但各组间无差异( $P > 0.05$ )。培养细胞上清液中亚硝酸盐含量测定显示:关节软骨细胞几乎不产生 NO,但在 IL-1 刺激下可产生 NO,而加入 NO 合酶抑制剂后,可部分抑制 NO 产生,IL-1 加骨炎定方含药血清组也显示出可以部分抑制 NO 的产生,其作用与 NO 合酶抑制剂 NAME 统计学处理没有明显差异。结论:骨炎定方可以抑制 iNOS 的表达,增加 II 型胶原的表达,这种作用与使用一氧化氮合酶抑制剂得出的结果没有明显差异,可能是其保护软骨细胞作用途径之一。

**关键词** 中医药 补肾益气行血法 骨炎定 软骨细胞 一氧化氮合酶 II 型胶原

骨关节炎相当于我国古代医学文献中记载的“膝痛”、“痹证”和“骨痹”等病症,大多数学者强调肝肾亏虚为本,感受风寒湿邪,气血瘀滞为标,肝肾不足,筋骨不坚,筋不束骨,加快关节的退变,因此治疗上多采用补益肝肾、祛风散寒除湿、活血化瘀、温经通络之法并用,收到良好的效果<sup>[1]</sup>。本研究旨在探讨补肾益气活血法对人类软骨细胞中的 NO 和 II 型胶原的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 组织材料** 广州中医药大学第一附属医院骨科髌关节骨关节炎患者进行人工关节置换术时,以无菌技术取出股骨头关节面软骨。

**1.2 动物** 体重  $250\text{g} \pm 20\text{gSD}$  大鼠,雌雄各半,清洁级,100~200d,由广州中医药大学实验动物中心

提供。

**1.3 主要仪器和设备**  $\text{CO}_2$  培养箱(美国 SL);倒置显微镜(Leica);超净工作台(上海净化设备厂);酶标仪(Bio-rad3300);冷冻高速离心机(Hittech);GDS8000 凝胶成像系统,PCR 仪(MJ220)。

### 1.4 主要试剂和药物

**1.4.1 分离及培养细胞试剂** DMEM(Gibco)、L-谷氨酰胺(华美生物工程公司)、HEPES(Sigma)、小牛血清(中国科学院上海细胞所)、胰蛋白酶(Sigma)、II 型胶原酶(Sigma)、链霉素、青霉素、乙二胺四乙酸二钠盐简称 EDTA(上海试剂一厂)。

**1.4.2 检测试剂** MTT(华美生物工程公司)、RNA 抽提试剂盒 SK321(Songon)、RT-PCT 试剂盒(大连宝泰克)、引物的合成(Songon)、Marker(晶美公司)、对氨基苯磺酰胺、萘基乙二胺(上海试剂一厂)、氮-单甲基-左旋精氨酸(L-NAME, Songon)。

**1.4.3 方药组成** 方药采用广州中医药大学骨伤科

• 作者单位 广州中医药大学第一附属医院骨科(510405)

名老中医陈基长教授的骨炎定方,由补骨脂、骨碎补、牛膝各 12g,红花 5g,黄芪 20g,木瓜 15g 组成,属补肾益气行血治法的方剂,由广州中医药大学第一附属医院制剂科提供片剂,批号 20031020。

**1.5 含药血清的制备** 骨炎定片,溶于生理盐水中,0.12g/ml,治疗组每只大鼠 5ml/d,连续给药一个月,于末次给药后 1h 采血,以 3000r/min 离心 20min,取上清,抽滤除菌后分装, -20℃ 保存备用。

**1.6 软骨细胞的培养** 以无菌技术取出股骨头,剔除附着的软组织, D-Hanks 液漂洗后,用解剖刀片削下关节软骨(勿误带软骨下骨和骨膜)。D-Hanks 液漂洗, II 型胶原酶消化,振荡,离心,弃上清,细胞经 PBS 洗后,加含有血清的培养液,将细胞悬液稀释成  $2-3 \times 10^5$ /ml 密度接种于培养瓶,于 37℃、饱和湿度、5% 二氧化碳、95% 空气条件下置于二氧化碳培养箱中培养。72 小时后视细胞贴壁情况更换培养液,以后每两天更换一次。

**1.7 分组** 将第 2 传代细胞接种在 96 孔板中,接种密度  $2 \times 10^4$  个细胞/cm<sup>2</sup>,分为四组:对照组、IL-1 组、IL-1 加 L-NAME 组、中药组。分别用正常血清、100μg/ml IL-1、100μg/ml IL-1 和 1mg/ml NAME 及 100μg/ml IL-1 加骨炎定含药血清刺激。

**1.8 NO 的测定** 根据 Griess 氏反应法加以改进。在 96 孔酶标板内加入细胞培养上清液 100μl,再加入 1% 对氨基苯磺酰胺 50μl,4℃ 放置 15 分钟,加入试剂 0.1% 萘基乙二胺,室温 30 分钟后置于酶标仪 590nm 处读取 OD 值。以 10 ~ 100μm 的亚硝酸盐溶液作为标准曲线。

**1.9 iNOS 及 II 型胶原总 RNA 提取和半定量 RT-PCR** 按每 10cm<sup>2</sup> 加入 1ml 的比例加入 TRIZOL 试剂于培养孔内,静置 5min,加入氯仿 0.2ml/1ml,于 4℃、10000r/min 离心 15min,倒去上清,75% 乙醇清洗后通风橱干燥,加 50μl DEPC 水溶解。逆转录反应:混合 RNA、dNTP 和 AMV 等,逆转录后的 cDNA 置 -20℃ 保存,在 DNA 扩增仪(MJ)上进行 PCR 扩增 30 个循环,退火温度为 59℃,取 PCR 扩增产物 5μl 在 15% 琼脂糖中电泳, GDS8000 凝胶成像系统摄影存盘后应用计算机图像分析软件进行灰度扫描分析,以目的基因与 Marker 中的最小片段条带灰度值比作为反映目的基因 mRNA 水平的相对指标。各组间进行比较。聚合酶链反应引物设计: iNOS: 5'-acaagcctaccctccagat-3', 5'-CTCTATTTTGCCTCTTTGA-3'。 II 型胶原为: 5'-tcacgtacactgcctgaag-3', 5'-tg-

caacggattgtgtgttt-3'。

**1.10 统计学分析** 数据用 SPSS10.0 软件进行统计学分析,结果以  $(\bar{x} \pm s)$  表示,比较采用 *t* 检验。

## 2 结果

**2.1 一氧化氮含量测定** 对照组几乎不产生 NO,加入 IL-1 后 NO 含量明显增加,如果同时加入 L-NAME 或骨炎定含药血清则 NO 含量明显下降,骨炎定组 NO 含量和 L-NAME 组接近,见图 1。

注:1 为对照组,2 为 IL-1 (100u/ml),3 为 IL-1 + NAME (1mg/ml),4 为 IL-1 + 中药组。每组中 n = 6,2、3、4 组与 1 组比较 *P* < 0.05,3、4 组比较无显著性差异。

**2.2 一氧化氮合酶 mRNA 表达** 软骨细胞分离培养后,两组都可以测出 iNOS 的表达,对照组 mRNA 表达阳性强度高于中药组,统计学有明显差异。培养细胞上清液中亚硝酸盐含量测定显示:关节软骨细胞几乎不产生 NO,但在 IL-1 刺激下可产生 NO,而加入 NO 合酶抑制剂 NAME 后,可部分抑制 NO 产生,中药组也显示出可以部分抑制 NO 的产生,其作用与 NO 合酶抑制剂 NAME 统计学处理没有明显差异,见表 1。

表 1 不同培养液对 iNOS 表达的影响  $(\bar{x} \pm s, n = 6)$

| 组别 | 对照组           | IL-1 组          | IL-1 + NAME 组                | IL-1 + 骨炎定组                  |
|----|---------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|
|    | 0.530 ± 0.053 | 0.887 ± 0.073 * | 0.622 ± 0.041 * <sup>○</sup> | 0.683 ± 0.051 <sup>○</sup> * |

注:★对照组比较 *P* < 0.05,○与 IL-1 组比较 *P* < 0.05。

**2.3 II 型胶原表达** 软骨细胞分离培养后,中药组 II 型胶原表达阳性强度高于对照组,统计学有明显差异 (*P* < 0.05),见图 2。

### 3 讨论

中医基础理论认为,“肾主骨生髓”,《素问·五脏生成论篇》曰:“肾之合,骨也。”《素问·逆调论篇》曰:“肾不生,则髓不能满”。《素问·六节脏象论篇》曰:“肾者,主蛰藏之本,精之处也,其华在发,其充在骨。”因此对骨病的治疗应该从肾论治。骨关节炎患者大多肝肾亏损,筋骨不坚,筋不束骨,气虚则无力推动血行,血行不畅则血脉不利。此外,膝骨关节炎患者大多病程迁延日久,呈缓慢进行性发展,必致气血亏虚,从而导致血脉不利的恶性循环。其病乃本虚标实之证,肝肾亏虚为本,血脉不利为标。治宜补益肝肾,益气行血。本实验中采用的补肾益气活血方来源于我校名老中医陈基长教授的经验方骨炎定,以补益肝肾为主,兼以益气活血,达到攻补兼施,标本兼治的目的,临床上取得良好的疗效,方含:补骨脂、骨碎补、牛膝各 12g,红花 5g,黄芪 20g,木瓜 15g。每日 1 剂,早晚分服。方中补骨脂、骨碎补具有温补肝肾之功,共为君药;重用黄芪,伍以少量红花取其益气行血之功,牛膝兼有补肝肾及行血之效并引药下行,共为臣药;川木瓜具有舒筋活络之效,并善走下肢为使药。诸药合方寒温并进,攻补兼施,阴阳相济,以致补而不滞,通而不损。通过既往对骨炎定的实验研究,证实其可以明显延缓兔实验性骨关节炎的关节软骨的病理变化,特别是对于软骨细胞的病理改变(软骨细胞丢失、软骨细胞的排列及细胞克隆)方面与对照组比较有显著的差异<sup>[2]</sup>。

骨关节炎是一种非炎症性的关节病变,但是由直接的机械刺激或软骨基质降解产物引起的滑膜炎症

对疾病的发展还是起到很重要的作用<sup>[3]</sup>。这种炎症状态可以由前炎症细胞因子介导出现的一系列反应而引发。IL-1 是最重要的一种,与骨关节炎软骨基质降解的病理过程密切相关。软骨细胞可以合成浓聚的 IL-1,介导基质金属蛋白酶(MMPs)、蛋白聚糖酶和其他分解基因的表达式<sup>[4]</sup>,还可以通过诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的作用增加 NO 的合成。在最早的关于体外培育的软骨细胞可以通过 IL-1 和 TNF- $\alpha$  介导 NO 的释放的报道后<sup>[5]</sup>,大量的报道证实,在活体内选择性的抑制 iNOS 可以使受损关节的炎症和生化异常情况减轻<sup>[6-8]</sup>。同时,NO 还被认为是 IL-1 介导的众多反应中的一种重要介质,这些反应在骨关节炎的发病机制中起到很重要的作用,包括抑制蛋白聚糖的合成、抑制胶原的合成<sup>[9]</sup>,加强 MMPS 的作用和加快软骨细胞的凋亡<sup>[10]</sup>,以及减少 IL-1 受体拮抗物 IL-1RA 的合成<sup>[11]</sup>。不仅如此,NO 还被认为会提高软骨细胞对氧化物如 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 等造成的损伤的易感性,会有助于对抗胰岛素样生长因子-I(IGF-I)的合成作用<sup>[12]</sup>。而实验发现 NO 不能介导缺乏诱导型 NO 合酶的小鼠产生关节炎<sup>[13]</sup>,也不能介导由 NO 抑制剂提供软骨保护的动物模型产生关节炎<sup>[14]</sup>,很好的支持 iNOS 在软骨损伤中起重要作用的假设。

可见,IL-1 和 NO 在骨关节炎的发生发展过程中起到重要的作用:IL-1 作为前炎症细胞因子,能刺激离体培育的软骨细胞通过诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的作用增加 NO 的合成,而 NO 参与到骨关节炎发病的各个环节中去,包括软骨细胞的凋亡、抑制蛋白聚糖的合成、抑制胶原的合成、加强 MMPS 的作用和加快软骨细胞的凋亡,同时减少 IL-1 受体拮抗物

IL-1RA 的合成,使 IL-1 能持续刺激软骨细胞产生 NO (通过 iNOS 的作用),形成一个相对封闭的环路,持续反复的作用导致骨关节炎的发生。虽然不能认为这就是骨关节炎的唯一发病机制,但是 IL-1 和 NO 两者对关节软骨两大成分—软骨细胞和基质存在相当大的影响,因此任何能在这一环路中的某一个环节造成中断影响的因素都能对骨关节炎的病理进展过程带来有治疗价值的影响。

一氧化氮(NO)对含铁血红素、巯基、巯基团、过氧化物和氧分子有高度的亲和力<sup>[15]</sup>,与上述物质作用时反应很快,它在体内的半衰期很短,分解产物是 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (nitrite) 和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (nitrate),在活体血液中,NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (nitrite) 很快被氧合血红蛋白氧化成为 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (nitrate),因此在血浆中通常只能找到 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (nitrate)<sup>[16]</sup>。在体外 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (nitrite) 和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (nitrate) (并称 NOx) 是一氧化氮(NO)的代谢产物,常被用来衡量一氧化氮(NO)的数量,并作为一氧化氮(NO)的标记。

本研究发现,人类软骨细胞在 IL-1 的刺激下会大量产生 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (nitrite),而没有 IL-1 的刺激只能测出含量很少的 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (nitrite)。如果加入 IL-1 的抑制剂 L-NAME,则 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (nitrite) 的含量大大少于未加抑制剂组,加入骨炎定含药血清也可以大大抑制 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (nitrite) 的产生,与 L-NAME 组没有明显差异(见图 1)。

L-NAME 能通过抑制 iNOS 减少 NO 的产生<sup>[10]</sup> 是一个对骨关节炎具有治疗潜力的研究对象,主要是考虑到 NO 对骨关节炎的各个病理环节有广泛的影响。Mc Innes 等<sup>[17]</sup> 发现外源性的 NO 供体可以在体外培养的滑膜细胞和巨噬细胞中提高 TNF-α 的含量,这可能是 NO 在慢性炎症中的一个作用途径:通过诱导 TNF-α 的产生形成一个正反馈通路,使前炎症细胞因子持续产生而介导慢性炎症的发展。NO 已被证实能抑制蛋白聚糖的合成(通过抑制硫酸盐合成氨基葡萄糖),这一过程能被一氧化氮合酶抑制剂缓解,并且有证据说明这是通过抑制白细胞介素-1(IL-1)介导蛋白聚糖合成而实现的<sup>[18]</sup>。在软骨中 NO 可以提高基质金属蛋白酶的活性,而抑制 NO 的合成后基质金属蛋白酶的活性减弱。在牛和兔的软骨中都发现了这种类似的由 IL-1 介导的 NO 影响基质金属蛋白酶活性的现象<sup>[19]</sup>。NO 还可以通过抑制脯氨酰羟化酶影响胶原的合成,使软骨的基质缺乏抗张能力而容易分解<sup>[20]</sup>。IL-1 抑制兔软骨细胞合成胶原有两个途径:编译前途径,由 Col2A1 mRNA 表达所控制,可以被一氧化氮合酶抑制剂 L-NAME 影响;编译、编译后阶段,

依赖于 NO 的水平<sup>[21]</sup>。可见,NO 对软骨基质的影响是多方面、多途径的,它不仅可以使前炎症细胞因子持续产生而介导进一步的炎症过程,还可以上调 MMPs 活性,抑制蛋白聚糖的合成,影响软骨基质中胶原的合成,在软骨损伤中起重要作用,而 iNOS 作为合成 NO 必要的酶,在骨关节炎的病理过程中发挥着重要作用。

本研究发现 IL-1 组中 iNOS 的基因表达明显增加,证实前炎症细胞因子与 NO 之间存在反馈机制(可以刺激 iNOS 的表达,而 iNOS 合成 NO 有可以维持前炎症细胞因子的持续作用,是一种正反馈机制)。随着 iNOS 表达的增加,NO 合成增加,表现在 IL-1 组 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (nitrite) 含量的显著上升。如果加入 iNOS 抑制剂,则 iNOS 表达和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (nitrite) 含量都下降,骨炎定含药血清组也观察到同样的现象。这表明:骨炎定可能通过抑制 iNOS 的表达,减少 NO 的合成,从而发挥保护软骨的作用,这是补肾活血祛瘀法治疗骨关节炎获得良好疗效的重要作用途径,但其中的机理仍需要进一步深入研究。

## 参考文献

- [1]唐勇,姜杰,孟辉,等.补肾益气行血方治疗膝骨性关节炎 44 例[J].时珍国医国药,2005,16(9):902-903.
- [2]唐勇,姜杰,周永红等.骨炎定对兔实验性膝骨关节炎关节软骨的组织病理学影响[J].四川中医,2004,22(1):23-25.
- [3]Myers SL, Brandt KD, Ehlich JW, et al: Synovial inflammation in patients with early osteoarthritis of the knee. [J]. Rheumatol 17:1662-1669, 1990.
- [4]Attur MG, Dave M, Cipolletta C, Kang P, Goldring MB, Patel IR, et al. Reversal of autocrine and paracrine effects of interleukin-1 (IL-1) in human arthritis by type II IL-1 decoy receptor [J]. J Biol Chem 2000;275:40307-15.
- [5]Stadler, J.; Stefanovic-Racic, M.; Billiar, T. R.; Curran, R. D.; McIntyre, L. A.; Georgescu, H. I.; Simmons, R. L.; Evans, C. H. Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide [J]. J. Immunol. 147:3915-3920;1991.
- [6]Connor JR, Manning PT, Settle SL, et al: Suppression of adjuvant-induced arthritis by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase [J]. Eur J Pharmacol 273:15-24, 1995.
- [7]Pelletier JP, Jovanovic D, Fernandes JC, et al: Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase [J]. Arthritis Rheum 41:1275-1286, 1998.
- [8]Pelletier JP, Mineau F, Ranger P, Tardif G, Martel-Pelletier J: The increased synthesis of inducible nitric oxide inhibits IL-1ra synthesis by human articular chondrocytes: possible role in osteoarthritic cartilage degradation [J]. osteoarthritis Cartilage 4:77-84, 1996.

(下转第 56 页)

干涩;血瘀气滞,声户开合不利,气易耗散,故而语不持久;瘀血阻喉,故声带肥厚;气滞血瘀,津道不畅,故咽喉干燥,咽痒;舌脉乃气滞血瘀之征。

诊断辨证:慢喉暗(气滞血瘀证)。

刘教授施以会厌逐瘀汤加减,理气活血,化瘀开音。方药:柴胡 6g,枳壳 6g,赤芍药 15g,桃仁 6g,粉丹皮 10g,天冬、麦冬各 15g,北沙参 15g,黑元参 12g,干芦根 15g,僵蚕 10g,夏枯草 12g,海蛤壳 15g,蝉衣 10g,苦桔梗 10g,木蝴蝶 15g,粉甘草 3g,水煎服。3 剂后声音稍

利,咽部不适好转,守方续服 6 剂后症状大为改善,已能较轻松地会话,并能持续较长的时间,持续治疗 2 个月后痊愈。

按 方中赤芍药、桃仁、粉丹皮活血祛瘀;柴胡、枳壳疏肝理气,气畅则血活,血活则瘀解;元参、干芦根滋阴降火,生津润燥;天冬、麦冬、沙参养阴清热,润肺开音;僵蚕、蝉蜕清热利喉开音;夏枯草、海蛤壳散结破瘀;木蝴蝶利咽开音;桔梗引药上行;粉甘草调和诸药。全方共奏理气活血,化瘀开音之效。气虚明显者加黄芪、党参以益气补气;气滞重者加香附、郁金、陈

皮以理气行气,活血祛瘀。有挟痰现象者,加皂角刺、海浮石以祛痰散结。

慢喉暗见证较复杂,无论内因、外因和不内外因均可致病,见证虽杂,总不出寒热虚实之范畴。因此临证时首先辨证求因,再审因论治,辨明寒热虚实和兼杂。本病多因“气滞、血瘀、痰凝、气虚”等原因相兼为患,慢喉暗发病慢,缓则治其本,多从阴虚、气虚、痰浊、气血瘀滞等方面进行辨证论治,本病虽以内治为主,但“禁声”应贯穿始终,即“但知养息,不药而愈”。

#### (上接第 53 页)

[9] Taskiran, D. ; Stefanovic - Racic, M. ; Georgescu, H. ; Evans C. Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin - 1 [J]. Biochem. Biophys. Res. Comms. 200;142 - 148;1994.

[10] Clancy RM, Amin AR, Abramson SB; The role of nitric oxide in inflammation and immunity [J]. Arthritis Rheum 41;1141 - 1151, 1998.

[11] Maneiro E, Lopez - Armada MJ, Fernandez - Sueiro JL, et al; Aceclofenac increases the synthesis of interleukin 1 receptor antagonist and decreases the production of nitric oxide in human articular chondrocytes [J]. J Rheumatol 28;2692 - 2699, 2001.

[12] Loeser RF, Carlson CS, Del Carlo M, Cole A; Detection of nitrotyrosine in aging and osteoarthritic cartilage: Correlation of oxidative damage with the presence of interleukin - 1<sub>α</sub> and with chondrocyte resistance to insulin - like growth factor 1 [J]. Arthritis Rheum 46;2349 - 2357, 2002.

[13] van de Loo FA, Arntz OJ, van Enkevort FH, van Lent PL, van den Berg WB; Reduced cartilage proteoglycan loss during zymosaninduced gonarthrosis in NOS2 - deficient mice and in antiinterleukin - 1 - treated wild - type mice with unabated joint inflammation [J]. Arthritis Rheum 41;634 - 646, 1998.

[14] Pelletier JP, Jovanovic DV, Lascau - Coman V, et al; Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces progression of experimental osteoarthritis in vivo; possible link with the reduction in chondrocyte apoptosis and caspase 3 level [J]. Arthritis Rheum 43;1290 - 1299, 2000.

[15] Stamler, J. S. ; Singel, D. J. ; Loscalzo, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox - activated forms [J]. Science 258;1898 - 1902;1992.

[16] Moshage, H. ; Kok, B. ; Huizenga, J. R. ; Jansen, P. L. M. Nitrite and nitrate determinations in plasma; a critical evaluation [J]. Clin. Chem. 41; 892 - 896;1995.

[17] Mc Innes, I. B. ; Leung, B. P. ; Field, M. ; et al. Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and steoarthritis patients [J]. J. Exp. Med. 184;1519 - 1524;1996.

[18] Blanco - FJ, Ochs - RL, Schwarz - H, et al. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide [J]. AmJ Pathol 1995, 141 (1) :75 - 85.

[19] Trachtman, H. ; Futterweit, S. ; Garg, P. ; Reddy, K. ; Singhal, P. C. Nitric oxide stimulates the activity of a 72 - kDa neutral matrix metalloproteinase in cultured rat mesangial cells [J]. Biochem. Biophys. Res. Comm. 218;704 - 708;1996.

[20] Cao, M. ; Westerhausenlarsen, A. ; Niyibizi, C. ; et al. Nitric oxide inhibits the synthesis of type - II collagen without altering Col2A1 mRNA abundance - prolyl hydroxylase as a possible target [J]. Biochem. J. 324;305 - 310;1997.

[21] Hauselmann HJ, Oppliger L, Michel BA, Stefanovic - Racic M, Evans CH; Nitric oxide and proteoglycan biosynthesis by human articular chondrocytes in alginate culture [J]. FEBS Lett 352;361 - 364, 1994.