

·基础研究·

低强度脉冲超声波对早中期兔膝骨性关节炎软骨细胞外基质及MAPKs信号通路的影响*

高明霞¹ 程 凯¹ 林 强¹ 王大新² 于俊龙¹ 林爱翠¹ 安恒远¹ 陈安亮¹ 李雪萍^{1,3}

摘要

目的:研究低强度脉冲超声波(LIPUS)对早中期兔膝骨性关节炎(OA)软骨细胞外基质(ECM)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)信号通路的影响,探讨LIPUS对关节软骨损伤修复和延缓退变的作用机制。

方法:36只健康新西兰兔随机分成6组,早期对照组(EC组)、早期OA组(EO组)、早期治疗组(ET组)、中期对照组(MC组)、中期OA组(MO组)和中期治疗组(MT组),6只/组。EO、ET、MO及MT组均接受左后肢前交叉韧带切断术(ACLT),对照组仅接受左侧膝关节囊切开术。ET组和MT组分别于术后第3天和第5周起接受LIPUS治疗。超声频率3MHz,强度40mW/cm²,作用时间20min,1次/d,6d/周,持续6周。EO与MO组的LIPUS方案与治疗组相同,但无超声输出。LIDUS 6周后,采用甲苯胺蓝染色进行关节软骨的组织学观察,并进行Mankin评分。采用免疫印迹法检测蛋白多糖、Ⅱ型胶原、磷酸化的细胞外信号调节激酶1/2(p-ERK1/2)及p38(p-p38)的变化。

结果:①组织学观察及Mankin评分:EO组关节软骨表面不规则、甲苯胺蓝染色变浅、软骨细胞减少,与EC组相比,Mankin评分显著升高($P<0.01$);MO组关节软骨损伤明显,Mankin评分较MC组显著升高($P<0.01$)。与EO组相比,ET组病理学改变程度轻,Mankin评分显著降低($P<0.01$);但MT组Mankin评分较MO组无显著降低($P>0.05$)。②Ⅱ型胶原、蛋白多糖检测:与EC组比较,EO组和ET组均下降,但EO组较ET组明显下降($P<0.05$);与MC组相比,MO和MT组均显著降低($P<0.05$),MO组与MT组间无显著差异($P>0.05$)。③p-ERK1/2、p-p38检测:与EC组相比,EO组表达量显著升高($P<0.05$),但与EO组相比,ET组显著降低($P<0.05$);与MC组相比,MO组和MT组表达显著升高($P<0.05$),MT组与MO组间无明显差异($P>0.05$)。

结论:LIPUS可以减轻关节软骨ECM的损伤程度,其作用与LIPUS治疗后关节软骨中p38、ERK1/2表达下调有关,这种作用与OA的病变阶段密切相关,即在OA早期进行LIPUS作用更明显。

关键词 低强度脉冲式超声波;骨性关节炎模型;细胞外基质;丝裂原活化蛋白激酶;丝裂原活化蛋白激酶信号通道
中图分类号:R454.1,R684 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2013)-07-0593-07

Effect of low-intensity pulsed ultrasound on extracellular matrix and MAPKs signaling pathways in early and medium term of rabbit knee osteoarthritis model/GAO Mingxia,CHENG Kai,LIN Qiang, et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2013,28(7): 593—599

Abstract

Objective:To establish rabbit osteoarthritis(OA) model by anterior cruciate ligament transaction and to observe the articular cartilage repair effects of low-intensity pulsed ultrasound(LIPUS) and to explore it's mechanism.

Method:Thirty-six healthy New Zealand rabbits were randomized into early control(EC) group, early osteoarthritis(IA) group, early treatment(ET) group, medium-term control(MC) group, medium-term osteoarthritis(MO) group and medium-term treatment(MT) group. Animals in EC group and MC group underwent articular capsulotomy surgery, and those in other four groups underwent anterior cruciate ligament transection(ACLT).

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2013.07.001

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(81272151)

1 南京医科大学附属南京医院(南京市第一医院)康复医学科,南京,210006; 2 扬州大学临床医学院; 3 通讯作者

作者简介:高明霞,女,硕士研究生; 收稿日期:2012-10-21

In EO group and ET group, rabbits received LIPUS at 3d after surgery, while in MO group and MT group received LIPUS at the beginning of the 5th week after surgery. LIPUS treatment was applied with 3MHz, 40mW/cm², for 20min, 1times/d, 6d/week, total 6 weeks. However, in EO group and MO group had no LIPUS output. Six weeks after LIPUS, the rabbits were sacrificed and pathologic changes of articular surface of femoral condyle were assessed. Also, expressions of type II collagen, proteoglycan, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase1/2(P-ERK1/2) and p38 of articular cartilage were measured with Western blot.

Result: ① Histopathological observations and Mankin scores: In comparison with EC group, in EO group, the surfaces of articular cartilage were irregular and not smooth, toluidine blue staining became light, the amounts of cartilage cells were less, Mankin scores increased significantly($P<0.01$); in MO group, damages of cartilage were obvious, Mankin scores were higher than that of MC group($P<0.01$). In comparison with EO group, pathological changes in ET group were lighter, Mankin scores reduced significantly($P<0.01$); but compared with MO group, Mankin scores of MT group had no significant decrease($P>0.05$). ② The expressions of type II collagen, proteoglycan in Western blot analysis: In comparison with EC group, the expressions of type II collagen and proteoglycan in EO and ET groups both decreased, but that in ET group were significantly higher than that in EO group ($P<0.05$); In comparison with MC group, the expressions of both in MO and MT groups decreased ($P<0.05$), and no difference was found between MO and MT group ($P>0.05$). ③ The expressions of p-ERK1/2 and p-p38 with Western blot analysis: In comparison with EC group, the expressions of p-ERK1/2 and p-p38 in EO group increased significantly($P<0.05$), and no difference in EC group ($P>0.05$). In comparison with EO group, the expressions of p-ERK1/2 and p-p38 in ET group decreased significantly($P<0.05$). While in comparisons with MC group, the expressions of p-ERK1/2 and p-p38 in MO and MT groups increased significantly($P<0.05$).

Conclusion: Low-intensity pulsed ultrasound intervention is beneficial to articular cartilage repair by abating damages of extracellular matrix in early term of osteoarthritis, and extracellular signal-regulated kinase1/2 and p38 signaling pathway was involved.

Author's address Dept. of Rehabilitation, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, 210006

Key word low-intensity pulsed ultrasound; osteoarthritis model; extracellular matrix; mitogen-activated protein kinases; mitogen-activated protein signaling pathways

骨性关节炎(osteoarthritis, OA)是一种常见的慢性进行性退变的骨关节病。临床表现为不同程度的关节疼痛、僵硬、功能障碍和畸形^[1], 常严重影响患者的生存质量。OA在膝、髋关节的发生率分别为6%和3%^[2],且其发生率随年龄而增加,已成为当前老年人致残的主要原因^[3]。据统计^[4-5],美国60岁以上老年人群中约有13%的人有OA症状,中国有4%,这就意味着可能给社会和家庭带来了巨大的精神和经济负担。

关节软骨进行性退变和丢失是OA的主要特征^[6],其由1%的软骨细胞和99%的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)组成,后者的主要组成部分为:胶原、蛋白多糖(proteoglycan, PG)和水,其中II型胶原约占胶原总量的90%。生理情况下,蛋白多糖和胶原纤维结合,在软骨表面包裹胶原纤维,起到

分子筛的作用并保护软骨免受降解酶的攻击,二者一旦受到攻击,软骨破坏的危险性就大大增加。ECM被蛋白水解酶过度降解是OA形成过程中最关键的环节^[7-9]。

关节软骨不仅缺乏相应的血管、神经和淋巴管的分布,而且其细胞密度及活性相对较低,决定了其自身修复能力极其低下,一旦损伤,往往不可避免地导致关节软骨退变。目前临幊上治疗OA的方法颇多,但治疗方法的创伤性或效果都无法令人满意。低强度脉冲式超声波(low-intensity pulsed ultrasound, LIPUS)作为一种新型物理因子,近年来广泛用于治疗骨折、骨不连的愈合。它不仅能缩短骨折、骨不连的治疗时间,而且能明显提高其生物力学性能^[10]。研究发现^[11],其促进骨折愈合的机制可能是通过加速软骨形成和软骨内化骨实现的,体内外研

究发现,LIPUS不但可促进软骨细胞增殖^[12]、促进II型胶原、蛋白多糖的表达和合成^[13—14],而且还能够促进关节软骨的缺损修复^[15]和软骨形成^[16]。此过程涉及多条信号通道,其中MAPKs信号通道是较重要的一条,它主要包括细胞外信号调节激酶1/2(extracellular signal-regulated kinase1/2, ERK1/2)、丝裂原活化蛋白激酶p38(mitogen-activated protein kinase, p38)和C-Jun N-terminal kinase,JNK)三大成员^[17]。

OA是呈慢性、进展性过程,所以LIPUS应用时机的选择显得尤为重要。本实验采用前交叉韧带切断术(anterior cruciate ligament transection, ACLT)建立兔膝OA模型,在OA早期和中期分别行LIPUS照射,通过组织学和分子生物学相结合的方法分析II型胶原、蛋白多糖、p-ERK 1/2和p-p38的变化,评价LIPUS对早、中期兔膝OA模型关节软骨的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料

1.1.1 实验动物:取骨骼闭合的健康成年新西兰兔36只,普通级,雌雄不限,体重2.5—3.0kg,由南京医科大学附属南京第一医院动物实验中心订购(青龙山动物饲养中心),所有动物均饲养于12h昼夜循环,不限量供应水和食物的装置内。实验方案遵循美国国家卫生研究院(NIH)公布的实验动物使用指南,并经南京医科大学附属南京第一医院伦理委员会审核批准。

1.1.2 主要仪器与试剂:电泳仪与湿式电转移槽(Bio-Rad,美国,164-5051),高速冷冻离心机(美国科俊仪器公司,SH03014),分光光度计(SHIMADZ,UV-2540),切片机(美国Reichert HistoSTAT),PVDF膜(PALL,65421),ECL化学发光试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司,KGP1123),DAB试剂盒(福州迈新生物科技有限公司),苏木素染色液(福州迈新公司)。

II型胶原多克隆抗体(abcam公司),蛋白多糖多克隆抗体(abcam公司),p-p38单克隆抗体(santa cruz公司),p-ERK1/2单克隆抗体(santa cruz公司)

1.2 实验分组

将36只新西兰兔随机分为6组,6只/组,分别为

早期对照组(early control group, EC group)、早期OA组(early OA group, EO group)、早期治疗组(early treatment group, ET group)、中期对照组(medium-term control group, MC group)、中期OA组(medium-term OA group, MO group)、中期治疗组(medium-term treatment group, MT group)。其中,EC和MC组仅接受左后肢膝关节囊切开术,EO、ET、MO及MT组均接受左后肢膝关节ACLT术。

1.3 手术步骤

采用ACLT法制作OA动物模型^[18]。实验动物体位与固定:仰卧位,四肢固定于恒温手术台上,开放耳缘静脉通道。3%戊巴比妥钠静脉麻醉,1ml/kg。膝部脱毛后,常规消毒、铺巾,在无菌条件下,沿左后肢膝关节内侧做一约3.5cm长切口,逐层分离皮下筋膜、肌肉,推开髌韧带,切开关节囊,屈膝,暴露前交叉韧带并剪断(注意避免损伤关节软骨),予抽屉实验确认完全断裂后,彻底止血,生理盐水冲洗关节腔,3—0可吸收缝线逐层缝合关节囊、筋膜,5—0尼龙手术缝线缝合皮肤。适当包扎伤口,但不予以外固定,单笼喂养。术后肌注青霉素20万U,2次/d,连注3天。

1.4 LIPUS治疗

应用HT2009-1型LIPUS(日本,伊藤公司),FREE模式,通断比20%,频率为3MHz,输出强度为40mW/cm²,治疗时间20min,1次/d,6d/周,持续6周。其中,ET组于术后第3天起接受LIPUS治疗,MT组于术后第5周起接受LIPUS治疗;EO和MO组LIPUS治疗方案与治疗组相同,但无超声输出;EC和MC组不进行治疗。

采用固定法进行治疗,先将兔膝关节外侧脱毛(注意保持皮肤完整),均匀涂上厚约1mm的超声耦合剂,使探头与照射部位皮肤紧密结合。

1.5 取材

治疗6周后,立即解剖实验兔侧膝关节,取胫骨平台软骨备做甲苯胺蓝染色,取股骨髁软骨备做免疫印迹。

1.6 检测方法

将从膝关节切取的胫骨平台软骨标本用10%乙二胺四乙酸钠(EDTA)缓慢脱钙3周后,脱钙完成

后,在髁间嵴处矢状位切开取材,常规脱水、浸蜡、包埋和切片(厚度4 μm),行甲苯胺蓝染色。所有切片均同一批完成,以控制操作中的差别。

1.6.1 组织学观察:对切片进行显微镜下的病理学观察,内容包括软骨表面、甲苯胺蓝染色程度、裂隙的形成等;并采用改良Mankin评分法评价(表1)^[35],包括纤维化、基质分布、软骨细胞缺失及软骨细胞集落等方面。由2位独立的观察者进行双盲评价并出具报告,结果取平均值。

表1 改良Mankin组织学评分量表

亚组1.纤维化	1 表面规则 2 表面不规则 3 仅浅表层有纤维化和裂隙形成 4 裂隙延伸至浅表层以下,但尚未达放射层 5 裂隙深达放射层
亚组2.细胞基质分布	1 染色正常 2 中度染色 3 重度染色 4 完全未染色
亚组3.软骨细胞缺失	1 浅表层细胞缺失 2 移行层细胞缺失 3 放射层细胞缺失
亚组4.软骨细胞集落	1 全层均无细胞集落形成 2 浅表层有细胞集落形成 3 浅表层至移行层有少于4个细胞的集落形成 4 浅表层至移行层,甚至放射层有多于4个细胞的集落形成

注:以上评分分别在内侧股骨髁、股骨外髁、内侧胫骨平台和侧胫骨平台进行。最低评分4分,最高评分16分。

1.6.2 免疫印迹(Western blot, WB):采用Western blot检测蛋白多糖、Ⅱ型胶原、p-ERK1/2和p-p38蛋白表达水平。取股骨髁关节面软骨约50g,加液氮研磨至粉末状,再加裂解液500 μl ,抽提蛋白并测浓度,-80°C保存。制胶后取蛋白标本,加上样缓冲液,100°C变性5min。采用SDS-PAGE电泳,浓缩胶恒压60—80V,分离胶恒压80—100V。剥胶,采用Bio-Rad Mini湿式转移电泳槽恒流200mA,转膜2h。转膜结束,以5%脱脂牛奶封闭,37°C中封闭2h后,分别加入蛋白多糖、Ⅱ型胶原、p-ERK1/2、p-p38(1:500)和 β -actin(1:1000)一抗,4°C孵育过夜。转膜缓冲液(TBST)漂洗3次 \times 5min后加二抗(1:

5000)。ECL显影洗片。采用Image J 3.0图像分析软件对显影后的条带灰度进行分析。

1.7 统计学分析

组织学评分采用等级资料的秩和检验。组间比较采用单因素方差分析。Western blot实验数据采用方差分析进行统计学处理,以 $P<0.05$ 为具有显著性差异。统计采用Stata 7.0软件

2 结果

2.1 LIPUS对OA关节软骨的组织学影响

见图1,表2。照射6周后,光学显微镜下观察并比较各组之间的变化。结果显示,EO组关节软骨表面不规则、甲苯胺蓝染色变浅、软骨细胞减少,与EC组相比,Mankin评分显著升高($P<0.01$);MO组关节软骨损伤明显,Mankin评分较MC组显著升高($P<0.01$)。与EO组相比,ET组病理学改变程度轻,Mankin评分显著降低($P<0.01$);但MT组Mankin评分较MO组差异无显著性($P>0.05$)。

2.2 LIPUS对OA关节软骨ECM的影响

见表3。Western blot检测各组Ⅱ型胶原、蛋白多糖表达,与EC组比较,EO组和ET组Ⅱ型胶原、蛋白多糖均下降,但EO组较ET组均明显下降($P<0.05$);与MC组相比,MO、MT组均显著降低($P<0.05$),但MO组与MT组间差异无显著性($P>0.05$)。

2.3 LIPUS对OA关节软骨细胞内MAPKs信号通道的影响

见表3。Western blot检测各组p-ERK1/2和p-p38表达结果:EC和MC组,p-ERK1/2和p-p38均有少量表达。与EC组相比,EO组p-ERK1/2和

图1 各组组织学观察结果

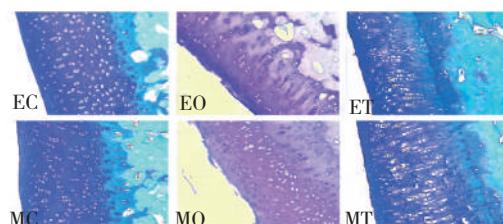


表2 各组术侧膝关节Mankin评分结果

($\bar{x} \pm s, n=6$)

	EC组	EO组	ET组	MC组	MO组	MT组
Mankin评分	4.83 ± 0.75	10.33 ± 2.66	6.67 ± 1.21	3.87 ± 0.83	12.31 ± 2.07	10.82 ± 1.59

表3 各组关节软骨中Ⅱ型胶原、蛋白多糖、p-ERK1/2、p-p38含量比较

(x±s)

	EC组	EO组	ET组	MC组	MO组	MT组
Ⅱ型胶原	1.670 ± 0.153	0.712 ± 0.083 ^①	1.139 ± 0.116 ^{①②}	1.751 ± 0.194	0.518 ± 0.079 ^①	0.564 ± 0.086 ^①
蛋白多糖	0.832 ± 0.075	0.316 ± 0.064 ^①	0.517 ± 0.121 ^{①②}	0.791 ± 0.051	0.209 ± 0.037 ^①	0.192 ± 0.048 ^①
p-ERK1/2	3.217 ± 0.553	5.218 ± 0.371 ^①	2.957 ± 0.673 ^②	3.519 ± 0.418	6.173 ± 0.287 ^①	5.716 ± 0.589 ^①
p-p38	0.723 ± 0.149	1.257 ± 0.059 ^①	0.715 ± 0.134 ^②	0.691 ± 0.138	1.176 ± 0.143 ^①	1.239 ± 0.201 ^①

^①与EC组相比,P<0.05;^②与EO组相比,P<0.05

p-p38表达量显著升高($P<0.05$),但与EO组相比,ET组显著降低($P<0.05$);与MC组相比,MO和MT组p-ERK1/2和p-p38均显著升高($P<0.05$),MT组与MO组间无明显差异($P>0.05$)。

3 讨论

ACLT法建立动物OA模型,一般需4—6周^[19];术后4周起,兔ACLT术侧膝关节软骨的可限制压缩系数及黏多糖密度均明显减少,且关节软骨的这种物理性质的变化与人OA相似;Micro-CT、MR及超声显示:术后4周股骨内髁的软骨破坏,术后8周股骨外髁及胫骨内、外髁软骨损伤;术后5个月,术侧前交叉韧带仍完全断裂,半月板、胫骨及股骨关节软骨退变,内侧胫骨平台骨赘形成明显^[20]。本实验采用ACLT法建造动物OA模型,LIPUS照射6周后,光学显微镜下观察各组组织学变化,结果显示:EO组关节软骨表面不规则、甲苯胺蓝染色减轻、软骨细胞减少,与EC组相比,Mankin评分显著升高($P<0.01$);MO组关节软骨损伤明显,Mankin评分较MC组显著升高($P<0.01$),提示本研究采用ACLT法所造动物OA模型成功。

Cook等^[21]用全层关节软骨缺损的犬模型进行实验,发现LIPUS可改善关节软骨的形态学和组织学特征。Jia等^[22]通过动物实验,观察到LIPUS治疗组关节软骨的大体外观等级、组织学评分、甲苯胺蓝光密度值均较对照组显著升高,这一点我们的实验结果与前人相符。研究表明,模型兔接受ACLT术后6—24周,可观察到关节软骨的纤维性变并有关节软骨的全层缺失及骨赘形成等^[23],且ACLT侧的病理变化随手术后时间延长而加重^[24],提示应用ACLT法进行兔膝OA造模,关节软骨破坏程度与病程时间有关。本实验观察了在OA不同时期应用LIPUS的效果,发现在OA早期应用LIPUS可减少关节软骨的破坏,而在OA中期应用LIPUS则无明

显作用,提示LIPUS对OA软骨的修复有一定的时间限制。

由于关节软骨具富含基质的组织学特征,因此,基质的破坏意味着关节软骨的破坏。关节软骨的ECM主要由Ⅱ型胶原和蛋白多糖组成,二者占总ECM干重的90%以上。Ⅱ型胶原以三螺旋形式存在的结构特点,赋予关节软骨一定的硬度和弹性,同时还能维持蛋白多糖的空间结构。而带负电荷的蛋白多糖富含亲水支链,可产生膨胀压,抵抗挤压压力,起润滑和抗压作用^[1]。生理情况下,软骨基质由软骨细胞合成并分泌,软骨细胞保证了软骨基质的质量,反过来,软骨基质保证了软骨细胞的生存环境,其一旦遭到破坏,势必引起软骨细胞发生变性坏死,进而影响胶原和蛋白多糖的质和量,终致关节软骨的退行性变^[16]。

本实验结果显示,与EC组相比,EO组和ET组的Ⅱ型胶原和蛋白多糖表达量均下降,但ET组较EO组明显下降($P<0.05$),提示OA关节软骨ECM中Ⅱ型胶原降解,蛋白多糖的含量下降,而早期应用LIPUS可延缓OA关节软骨破坏的进程。与MC组相比,MO和MT组均显著降低($P<0.05$),且MO与MT组间Ⅱ型胶原和蛋白多糖含量无明显差异($P>0.05$),提示在OA中期应用LIPUS对OA关节软骨无明显保护作用。目前关于LIPUS对软骨ECM影响的研究颇多,但观点尚不统一。Parvizi等^[25]发现LIPUS可刺激鼠软骨细胞蛋白多糖mRNA的表达和蛋白多糖的合成,但并不影响软骨细胞的增殖。而Zhang等^[26]研究表明,LIPUS可促进鸡胚软骨细胞的增殖,并有强度依赖性,但不增加蛋白多糖和Ⅱ型胶原的mRNA表达及其合成。Korstjens等^[16]发现,LIPUS不仅能够促进体外培养的人软骨细胞的增殖,而且还可促进软骨基质的合成。Gurkan等^[27-28]利用自发性OA动物模型研究,发现LIPUS治疗4个月后,虽不能完全阻止预防组的关节软骨退变,但

降低了关节软骨退变的严重程度;同时,LIPUS也延缓了疾病组的关节软骨退变进程,但在缓解程度上不及预防组,提示LIPUS不仅可以一定程度的预防关节软骨的退变程度,而且也能够延缓其退变进程,但此影响在病变早期作用更大,与本实验结果相似。

本实验发现,OA早期应用LIPUS治疗,可促进软骨ECM的合成,减轻对关节软骨的破坏,从而延缓OA病变进展。这一结果与部分体外实验结论相悖,可能主要与体内外实验中,软骨细胞所处环境有较大差异有关。另有研究^[29]表明,LIPUS能够促进血液中小分子物质向关节滑液内弥散,增加关节滑液的渗出,改善关节软骨的营养代谢状态,但LIPUS究竟是增强了未损伤的软骨细胞分泌ECM的能力,还是改善了损伤的软骨细胞的功能,尚待确认。

MAPKs是细胞内信号通路的关键组成部分,与细胞的增殖、分化、凋亡、细胞因子的反应、MMPs的表达等有关。研究显示,MAPKs广泛参与关节软骨退变的信号传导,主要包括ERK、JNK和p38,它们对软骨基质的合成起负性调节作用^[30]。在所有MAPKs信号转导通路中,ERK1/2被MAPK激酶1/2(MEK1/2)磷酸化激活进入细胞核,最终引起某些特定基因的表达,是MAPKs通路中非常重要的部分。p38信号转导途径与软骨细胞表型的保持和分化、软骨细胞的肥大与钙化、软骨细胞的凋亡等有密切关系^[31],可能在OA软骨细胞的破坏中处于枢纽地位。Choi^[32]等发现,LIPUS可提高II型胶原及蛋白多糖的表达,与其可激活MAPKs信号系统中的ERK及JNK通路有关。众多文献表明,p-38信号转导途径在人OA的发病过程中起重要作用^[32-33]。Raucci等^[34]在成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)抑制软骨细胞生长的研究中发现,FGF通过p38和ERK信号途径抑制软骨细胞增殖,且两种信号活化的持续时间和强度与软骨细胞生长抑制程度有关。

本实验发现,与EO组相比,ET组p-ERK1/2和p-p38显著降低($P<0.05$),提示OA早期应用LIPUS可抑制p-ERK1/2和p-p38的表达;与MC组相比,MO和MT组p-ERK1/2和p-p38均显著升高($P<0.05$),提示p-ERK1/2和p-p38信号通道在OA早期即开始升高,当病变发展至中期时LIPUS对其并无

明显抑制效果。p-ERK1/2和p-p38信号通道随病变持续高表达,进一步提示二者可能在OA整个病程中持续发挥作用。

4 结论

LIPUS可以延缓关节软骨ECM的退变,但此作用与OA的病变阶段密切相关。其作用机制可能与LIPUS照射后关节软骨ECM中II型胶原与蛋白多糖的合成有关,而后者又与软骨细胞中ERK1/2、p38信号通道表达下调有关。

参考文献

- [1] Pearle AD, Warren RF, Rodeo SA. Basic science of articular cartilage and osteoarthritis[J]. Clin Sports Med, 2005, 24(1): 1—12.
- [2] Felson DT, Zhang Y. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention[J]. Arthritis Rheum, 1998, 41(8): 1343—1355.
- [3] Michael JW, Schluter-Brust KU, Eysel P. The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee[J]. Dtsch Arztebl Int, 2010, 107(9): 152—162.
- [4] Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC, et al. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States[J]. Arthritis Rheum, 1998, 41(5): 7787—7799.
- [5] Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG, et al. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States[J]. Part II. Arthritis Rheum, 2008, 58(1): 26—35.
- [6] Hunter DJ. Imaging insights on the epidemiology and pathophysiology of osteoarthritis[J]. Rheum Dis Clin North Am, 2009, 35(3): 447—463.
- [7] Takaishi H, Kimura T, Dalal S, et al. Joint diseases and matrix metalloproteinases: a role for MMP-13[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2008, 9(1): 47—54.
- [8] Billinghurst RC, Dahlberg L, Ionescu M, et al. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage[J]. J Clin Invest, 1997, 99(7): 1534—1545.
- [9] Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, et al. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis[J]. J Clin Invest, 1996, 97(9): 2011—2019.
- [10] Wang SJ, Lewallen DG, Bolander ME, et al. Low intensity ultrasound treatment increases strength in a rat femoral fracture model[J]. J Orthop Res, 1994, 12(1): 40—47.
- [11] Malizos KN, Hantes ME, Protopappas V, et al. Low-intensity pulsed ultrasound for bone healing: an overview[J]. Inju-

- ry, 2006, 37 Suppl 1: S56—62.
- [12] Takeuchi R, Ryo A, Komitsu N, et al. Low-intensity pulsed ultrasound activates the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt pathway and stimulates the growth of chondrocytes in three-dimensional cultures: a basic science study[J]. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10(4): R77.
- [13] Choi BH, Woo JI, Min BH, et al. Low-intensity ultrasound stimulates the viability and matrix gene expression of human articular chondrocytes in alginate bead culture[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2006, 79(4): 858—864.
- [14] Iwashina T, Mochida J, Miyazaki T, et al. Low-intensity pulsed ultrasound stimulates cell proliferation and proteoglycan production in rabbit intervertebral disc cells cultured in alginate[J]. *Biomaterials*, 2006, 27(3): 354—361.
- [15] Cook SD, Salkeld SL, Popich-Patron LS, et al. Improved cartilage repair after treatment with low-intensity pulsed ultrasound[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2001, (391 Suppl): S231—243.
- [16] Korstjens CM, Van der Rijt RH, Albers GH, et al. Low-intensity pulsed ultrasound affects human articular chondrocytes in vitro[J]. *Med Biol Eng Comput*, 2008, 46(12): 1263—1270.
- [17] Choi BH, Choi MH, Kwak MG, et al. Mechanotransduction pathways of low-intensity ultrasound in C-28/I2 human chondrocyte cell line[J]. *Proc Inst Mech Eng H*, 2007, 221 (5): 527—535.
- [18] Jean YH, Wen ZH, Chang YC, et al. Increase in excitatory amino acid concentration and transporters expression in osteoarthritic knees of anterior cruciate ligament transected rabbits[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, 16(12): 1442—1449.
- [19] Jean YH, Wen ZH, Chang YC, et al. Increase in excitatory amino acid concentration and transporters expression in osteoarthritic knees of anterior cruciate ligament transected rabbits[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, 16(12): 1442—1449.
- [20] Batiste DL, Kirkley A, Laverty S, et al. Ex vivo characterization of articular cartilage and bone lesions in a rabbit ACL transection model of osteoarthritis using MRI and micro-CT[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2004, 12(12): 986—996.
- [21] Cook SD, Salkeld SL, Patron LP, et al. The effect of low-intensity pulsed ultrasound on autologous osteochondral plugs in a canine model[J]. *Am J Sports Med*, 2008, 36 (9): 1733—1741.
- [22] Jia XL, Chen WZ, Zhou K, et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound in repairing injured articular cartilage[J]. *Chin J Traumatol*, 2005, 8(3): 175—178.
- [23] Sah RL, Yang AS, Chen AC, et al. Physical properties of rabbit articular cartilage after transection of the anterior cruciate ligament[J]. *J Orthop Res*, 1997, 15(2): 197—203.
- [24] Hayami T, Pickarski M, Zhuo Y, et al. Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis[J]. *Bone*, 2006, 38(2): 234—243.
- [25] Parvizi J, Wu CC, Lewallen DG, et al. Low-intensity ultrasound stimulates proteoglycan synthesis in rat chondrocytes by increasing aggrecan gene expression[J]. *J Orthop Res*, 1999, 17(4): 488—494.
- [26] Zhang ZJ, Huckle J, Francomano CA, et al. The effects of pulsed low-intensity ultrasound on chondrocyte viability, proliferation, gene expression and matrix production[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2003, 29(11): 1645—1651.
- [27] Mukai S, Ito H, Nakagawa Y, et al. Transforming growth factor-beta1 mediates the effects of low-intensity pulsed ultrasound in chondrocytes[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2005, 31 (12): 1713—1721.
- [28] Gurkan I, Ranganathan A, Yang X, et al. Modification of osteoarthritis in the guinea pig with pulsed low-intensity ultrasound treatment[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010, 18(5): 724—733.
- [29] Weishaupt D, Schweitzer ME, Rawool NM, et al. Indirect MR arthrography of the knee: effects of low-intensity ultrasound on the diffusion rate of intravenously administered Gd-DTPA in healthy volunteers[J]. *Invest Radiol*, 2001, 36 (8): 493—499.
- [30] Yin W, Park JI, Loeser RF. Oxidative stress inhibits insulin-like growth factor-I induction of chondrocyte proteoglycan synthesis through differential regulation of phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt and MEK-ERK MAPK signaling pathways[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(46): 31972—31981.
- [31] Westra J, Limburg PC. P38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) in rheumatoid arthritis[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2006, 6(8): 867—874.
- [32] Liacini A, Sylvester J, Li WQ, et al. Inhibition of interleukin-1-stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF-kappa B) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes[J]. *Matrix Biol*, 2002, 21(3): 251—262.
- [33] Wada Y, Shimada K, Sugimoto K, et al. Novel p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor R-130823 protects cartilage by down-regulating matrix metalloproteinase-1,-13 and prostaglandin E2 production in human chondrocytes[J]. *Int Immunopharmacol*, 2006, 6(2): 144—155.
- [34] Raucci A, Laplantine E, Mansukhani A, et al. Activation of the ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates fibroblast growth factor-induced growth arrest of chondrocytes[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(3): 1747—1756.
- [35] Gurkan I, Ranganathan A, Yang X, et al. Modification of osteoarthritis in the guinea pig with pulsed low-intensity ultrasound treatment[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010, 18(5): 724—733.