

·基础研究·

低强度脉冲超声对大鼠膝骨关节炎软骨细胞内质网应激相关 Caspase-12 表达的影响*

刘秋红¹ 孔 瑛¹ 李灿阳¹ 张长杰^{1,2}

摘要

目的:通过研究低强度脉冲超声(low intensity pulsed ultrasound, LIPUS)对大鼠膝骨关节炎(osteoarthritis, OA)软骨细胞内质网应激相关 Caspase-12 表达的影响,探讨低强度脉冲超声对骨关节炎的作用机制。

方法:体外培养大鼠膝关节软骨细胞,并用 IL-1 β 进行骨关节炎造模。取 3 代以内软骨细胞随机分为空白对照组(A 组),OA 模型对照组(B 组),OA+LIPUS 治疗组(C 组),OA+磷酸盐缓冲液(PBS)对照组(D 组),OA+4-苯基丁酸(4-PBA)组(E 组),OA+4-苯基丁酸(4-PBA)+LIPUS 治疗组(F 组)。超声治疗参数为 3MHz,20%,0.1W/cm²,20min/d,治疗 7 天。采用 HE 染色观察细胞形态,免疫细胞化学染色检测胞质 Col2 的表达,Western-blot 检测 MMP-13、Bax、Caspase-12 蛋白水平。

结果:①HE 染色结果显示与 A 组对比,B、D 组细胞数目最少,形态最差;C 组较 B 组细胞数目及形态有明显改善;与 D 组对比,E、F 组细胞数目增多,细胞形态可。②Col2 免疫细胞化学染色,平均光密度值(AOD 值)进行比较,B 组与 A 组对比 AOD 值明显降低;C 组与 B 组对比 AOD 值有明显的升高;D 组、B 组比较差异无显著性意义;E 组较 D 组 AOD 值显著升高;F 组、E 组 AOD 值差异无显著性意义。③蛋白印迹检测 MMP-13、Bax、Caspase-12 蛋白表达水平,B 组与 A 组比较蛋白表达增多($P < 0.05$);D 组与 B 组比较差异无显著性意义;E 组与 D 组比较蛋白表达降低($P < 0.05$);F 组与 E 组比较差异无显著性意义。

结论:低强度脉冲超声可通过抑制骨关节炎软骨细胞内质网应激相关的 Caspase-12 凋亡途径,减少软骨细胞凋亡,延缓 OA 的发生发展。

关键词 低强度脉冲超声;骨关节炎;内质网应激;Caspase-12 途径

中图分类号:R684,R49 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2020)-10-1172-09

Effects of low intensity pulsed ultrasound on the expression of ERS-related Caspase-12 in chondrocytes of rats with knee osteoarthritis/LIU Qiuhong, KONG Ying, LI Canyang, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2020, 35(10): 1172—1180

Abstract

Objective: To investigate the effect of low intensity pulsed ultrasound on osteoarthritis by studying the effects of low intensity pulsed ultrasound on the endoplasmic reticulum stress-related Caspase-12 in rat knee osteoarthritis.

Method: Rat knee articular chondrocytes were cultured in vitro, and osteoarthritis was modeled with IL-1 β . The chondrocytes within three passages were randomly divided into blank control group (group A), OA model control group (group B), OA+LIPUS treatment group (group C), OA+phosphate buffer saline control group (group D), OA+4-phenylbutyric acid group (group E), OA+4-phenylbutyric acid group+LIPUS treatment group (Group F). Ultrasound treatment parameters were 3HMZ, 20%, 0.1W/cm², 20min/d, treatment for 7 days. The

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2020.10.004

*基金项目:湖南省自然科学基金青年项目(2018JJ3729);湖南省残疾人康复项目(2017XK016)

1 中南大学湘雅二医院,湖南省长沙市人民中路 139 号湘雅二医院康复科,410011; 2 通讯作者

第一作者简介:刘秋红,女,住院医师; 收稿日期:2019-10-11

morphology of the cells was observed by HE staining. The expression of cytoplasmic Col2 was detected by immunocytochemistry. The levels of MMP-13, Bax and Caspase-12 were detected by Western-blot.

Result: ①The results of HE staining showed that compared with group A, the number of cells in group B and group D was the least and the morphology was the worst. The number and morphology of cells in group C were significantly improved compared with group B. Compared with group D, the number of cells in group E and group F increased, and the cell morphology was acceptable. ②Col2 immunocyte staining, average optical density value (AOD value) were compared. The AOD value of group B and group A was significantly lower than that of group A. The AOD value of group C and group B was significantly higher than that of group B. There was no statistical difference between group D and group B. The significance of learning; the AOD value of group E was significantly higher than that of group D; the difference of AOD value between group F and group E was not statistically significant. ③The expression levels of MMP-13, Bax and Caspase-12 protein were detected by Western blotting. The expression of specific protein in group B and group A was increased ($P < 0.05$). There was no significant difference between group D and group B. The difference between group E and group D was compared. Protein expression was decreased ($P < 0.05$); there was no significant difference between group F and group E.

Conclusion: Low intensity pulsed ultrasound can reduce the apoptosis of chondrocytes and delay the occurrence and development of OA by inhibiting the stress-associated Caspase-12 apoptosis pathway of osteoarthritis chondrocytes.

Author's address The Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan, 410011

Key word low intensity pulsed ultrasound; osteoarthritis; endoplasmic reticulum stress; Caspase-12 pathway

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种常见的进行性、退行性骨关节病。关节软骨的退变是其主要病理特征,可致关节活动受限甚至残疾,影响个体日常活动,给社会造成巨大的经济和医疗负担^[1-2]。OA的发病机制复杂,具体作用机制目前尚不明确。但已有研究表明内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)介导的软骨细胞的凋亡在OA的发生发展中发挥了重要作用^[3-4]。据报道,ERS介导的软骨细胞凋亡路径有多种,而半胱氨酸蛋白酶12途径(Caspase-12途径)被认为是ERS介导的凋亡路径中最具代表性的一种,且只在内质网应激中才被激活^[5-6]。ERS介导的软骨细胞凋亡是目前研究的热点,通过研究骨关节炎软骨细胞ERS相关的Caspase-12途径介导的细胞凋亡,可为骨关节炎的治疗和预防提供新的方向及新的靶点。

低强度脉冲超声(low intensity pulsed ultrasound, LIPUS)作为一种常见的物理治疗方法,对OA的治疗具有明显的效果^[7],但其具体作用机制目前尚不明确。有研究表明LIPUS即可通过促进Ⅱ胶原蛋白(Type II collagen, Col2)合成,减少基质金属蛋白酶MMP-13的分泌,对软骨细胞起到保护

作用^[8-9];还可通过减少软骨细胞的凋亡,加速细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的合成代谢,延缓OA的发展^[10-11]。目前LIPUS对ERS介导的细胞凋亡的影响尚未有文献进行相关的报道。因此本实验利用大鼠进行体外原代软骨细胞培养,选取3代以内的软骨细胞进行造模,并予以LIPUS治疗,通过检测MMP-13、Bax、Caspase-12蛋白表达情况探讨LIPUS治疗对ERS相关的Caspase-12凋亡途径的影响,明确LIPUS是否可通过调节Caspase-12凋亡途径来减少软骨细胞凋亡,保护关节软骨,延缓OA的发展,从而为LIPUS用于OA治疗和预防提供新的基础证据支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物

出生8周龄的健康SD大鼠6只,雌性,体重(240±1)g,来自湖南斯莱克景公司,清洁级饲养。实验流程和大鼠处理均遵循实验动物管理规范条例。

1.2 实验器材及试剂

低强度脉冲超声治疗仪(日本伊藤公司,型号:

US-750),倒置显微镜(北京中显恒业,DSZ2000X),电泳仪(美国Bio-rad,164-5050),荧光定量RCP仪(美国Thermo,PIKOREAL96),胎牛血清(Gibco公司),DMEM培养基(Hyclone公司),胰酶(Hyclone公司),青链霉素(碧云天),磷酸盐缓冲液(PBS)(7.2—7.6)(Wellbio公司),Ⅱ型胶原酶(Sigma公司),IL-1 β (abcam公司),4-苯基丁酸(Sigma公司),中性树胶(Sigma公司),Ⅱ型胶原酶(Sigma公司),兔抗鼠Ⅱ型胶原酶抗体(Proteintech,货号:15943-1-AP),兔抗鼠MMP-13抗体(Proteintech,货号:18165-1-AP),兔抗鼠Caspase-12抗体(abcam公司,货号:ab62484),兔抗鼠Bax抗体(Proteintech,50599-2-Ig),HRP goat anti-rabbit IgG(Proteintech,货号:SA00001-2),BCA蛋白定量试剂盒(Wellbio公司)。

1.3 软骨细胞分离与培养

8周龄的健康SD大鼠6只,脱颈处死后用75%酒精棉球擦拭双膝关节2次,再快速地用含双抗PBS洗液(青链霉素-PBS:1ml—49ml)清洗3次,尽快转移到超净台中;用无菌眼科剪将双膝股骨髁关节软骨取出,置于盛有PBS液的培养皿中冲洗并剪切成1.0mm³的小碎片,冲洗2—3遍,转移至含0.25%胰蛋白酶的15ml离心管中,并放置于37℃恒温箱内消化20min;再加入0.02%Ⅱ型胶原酶消化液消化24h,每2h震荡1次;待消化彻底后,将消化后的组织液通过100 μ M的细胞筛网过滤,用PBS清洗2次细胞悬液,予以1000r/min离心5min,收集细胞;用10%FBS-DMEM完全培养基重悬沉淀,将细胞吹打均匀后以1 $\times$ 10⁵个/ml接种于培养皿中,放置在37℃,5%CO₂培养箱内培养,用倒置显微镜观察细胞大部分贴壁后首次更换培养基(约48—36h),贴壁后每两天换液1次。

1.4 软骨细胞表型的鉴定

取3代以内的软骨细胞进行爬片;取出一个小皿,小心地夹出一个用酒精泡过的爬片用酒精灯烘干后,小心摆放其中,然后将单细胞悬液滴加到爬片上,使爬片密度达到60%—70%,放置于37℃,5%CO₂的培养箱中培养,24h后取出小皿;爬片用PBS洗3次,然后在4%多聚甲醛中固定30min后,PBS冲洗5min $\times$ 3次;加入0.3%曲拉通,37℃通透30min;

PBS冲洗3min $\times$ 3次;加入3%H₂O₂,室温10min,以灭活内源性酶;PBS冲洗3min $\times$ 3次;加入一抗(Ⅱ型胶原抗体:1:50)40 μ l,4℃过夜;PBS冲洗5min $\times$ 3次;滴加HRP标记二抗50 μ l,室温37℃,孵育30min,PBS冲洗5min $\times$ 3次;滴加新鲜配制的DAB显色剂50 μ l,室温孵育1—5min,镜下观察染色深浅,染好后立即用蒸馏水洗涤,终止染色反应;将切片放入苏木素染色复染5—10min,蒸馏水冲洗干净,PBS返蓝;分别放置于70%的乙醇中浸泡5min,85%的乙醇中浸泡5min,95%的乙醇中浸泡5min,无水乙醇中浸泡5min;取出切片后置于二甲苯10min $\times$ 2次,晾干后切片上加中性树胶,加盖玻片。光学显微镜下可见软骨细胞胞核蓝染,胞质Ⅱ型胶原染成棕黄色(深的可至褐色)。

1.5 低强度脉冲超声的辐射

应用US-750型低强度脉冲超声仪(日本,伊藤公司),在无菌台上将超声探头置于培养皿下方,探头与培养皿之间涂以耦合剂,耦合剂厚度不低于1mm,以匀速旋转方式进行辐射,采取FREE模式,通断比为20%,频率为3MHz,辐射强度为0.1W/cm²进行治疗,每天20min,连续7天。

1.6 实验分组及处理

取3代以内原代细胞,进行体外诱导骨关节炎模型。将正常软骨细胞随机分成空白对照组正常软骨细胞(A组),骨关节炎模型对照组(B组),骨关节炎模型+磷酸盐缓冲液对照组(D组),骨关节炎模型+4-苯基丁酸组(E组)。实验组骨关节炎模型+低强度脉冲超声治疗组(C组),骨关节炎模型+4-苯基丁酸+低强度脉冲超声治疗组(F组)。实验组予以3MHz,20%,0.1W/cm²,20min/d,连续7天的超声治疗,确保每日超声时间固定,根据细胞生长情况更换新鲜培养液。对照组仅涂耦合剂,无超声刺激。

1.7 HE染色观察细胞形态变化

按前述方法分别第一天对实验组、对照组进行爬片处理。根据预实验结果,第二天对模型组B、C、D、E、F组加入IL-1 β (10ng/ml,24h),第三天对模型组D组予以加入磷酸盐缓冲液(0.5 μ M,24h),模型组E、F组加入4-苯基丁酸(0.5 μ M,24h),同天对C、F组进行超声治疗,治疗第7天结束后立即收样,取出爬片用PBS清洗2—3次,将爬片用4%多聚甲醛固

定30min;PBS冲洗5min×3次;加入0.3%曲拉通适量,37℃通透30min;PBS冲洗3min×3次;苏木素染色5—10min,蒸馏水冲洗,PBS返蓝;伊红染色3—5min,蒸馏水冲洗;梯度酒精(95%—100%)脱水,每级5min;取出后置于二甲苯10min×2次,中性树胶封片,显微镜观察,拍照。

1.8 免疫细胞化学染色观察细胞Ⅱ型胶原表达

按上述方法制作爬片,超声治疗结束后取出爬片,PBS清洗2—3次;爬片用PBS洗3次,然后在4%多聚甲醛中固定30min后,PBS冲洗5 min×3次;加入0.3%曲拉通,37℃通透30min;PBS冲洗3min×3次;加入3% H_2O_2 ,室温10min,以此灭活内源性酶;PBS冲洗3min×3次;加入一抗(Ⅱ型胶原抗体:1:50)40 μ l,4℃过夜;PBS冲洗5min×3次;滴加HRP标记二抗50 μ l,室温37℃,孵育30min,PBS冲洗5min×3次;滴加新鲜配制的DAB显色剂50 μ l,室温孵育1—5min,镜下观察染色深浅,染好后立即用蒸馏水洗涤,终止染色反应;将切片放入苏木素染色复染5—10 min,蒸馏水冲洗干净,PBS返蓝;分别放置于70%的乙醇中浸泡5min,85%的乙醇中浸泡5min,95%的乙醇中浸泡5min,无水乙醇中浸泡5min;取出切片后置于二甲苯10min×2次,晾干后切片上加中性树胶封片,显微镜观察并拍照。计算阳性率:采用IPP(Image-Pro Plus6.0)图像分析软件进行分析,测Ⅱ型胶原平均光密度(AOD)值。

1.9 Western Blot法检测软骨细胞MMP-13、Bax、Caspase-12蛋白的表达

同一实验条件处理7天后,收集并提取各组细胞总蛋白,分别检测各组相应蛋白的表达差异。弃去培养基,用冰预冷PBS洗涤细胞一次,加入850 μ l RIPA裂解液,用细胞刮刀刮下细胞,收集悬液,超声破碎1.5min;冰上,裂解10min;4℃,12000r/min离心15 min;将离心后的上清转移到1.5ml的离心管中;检测完蛋白浓度后加入1/4 体积的上样缓冲液煮沸,放入冰盒中速冷备用;蛋白质样品进行SDS-PAGE后电转至NC膜;转膜完毕后,将膜取出放入1×PBST冲洗3min×3次;用预先新鲜配制的5%脱脂奶粉,将膜浸入后,室温放置60min,4℃过夜,次日室温放置30min;冲洗3min×3次,分别加入兔抗鼠MMP-13抗体(1:500),兔抗鼠Caspase-12抗体(1 μ g/

ml),兔抗鼠Bax抗体(1:2000),将膜与抗体室温孵育90min;1×PBST洗3次,每次15min;加入HRP标记的二抗,室温孵育90min;1×PBST洗3次,每次10min;ECL显色曝光,显影并拍照。用quantity one专业灰度分析软件分析相关条带吸光度(A)值。以目标蛋白与 β -actin 吸光度值的比值表示目标蛋白的相对含量。

1.10 统计学分析

本实验中所有实验数据采用SPSS 25.0统计软件进行分析,计量资料以均数±标准差表示,对于符合正态分布、方差齐性的计量资料,组间两两比较采用单因素方差分析,对于符合正态分布,但方差不齐的计量资料采用Kruskal-Wallis H检验。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 SD大鼠膝软骨细胞的形态学观察

光学显微镜下可见分离消化的细胞呈圆球形,未分离彻底的细胞成团分布(图1A)。原代细胞24h后开始贴壁生长,48—72h后完全贴壁。贴壁后的细胞呈多角形、长梭形,细胞核内可见2—5个核仁(图1B)。软骨细胞的生长速度偏慢,7—9天可见细胞呈集落式生长(图1C)。约15—17天可长满培养皿。传代后细胞生长速度略快,约7—10天可长满传代。

2.2 SD大鼠膝软骨细胞鉴定

3代以内软骨细胞进行细胞染色,未加Ⅱ型胶原抗体组,软骨细胞核呈蓝色,核仁深染,胞质及周围呈浅蓝染(图2A)。加入Ⅱ型胶原抗体组,胞质呈棕褐色,细胞核呈蓝色,核仁深染(图2B)。Col2免疫细胞染色阳性说明成功培养了SD大鼠膝软骨细胞。

2.3 各组软骨细胞HE染色结果

HE染色观察各组软骨细胞的数目以及形态改变。A组:正常软骨细胞膜完整无缺损,细胞排列紧凑有序,呈铺路石样分布,形态正常多表现为圆形、卵圆形;胞质染色均一呈粉红色;胞核形态可呈紫染(图3A)。B组:软骨细胞膜不完整有缺损,细胞数目减少,呈椭圆形或是三角形改变;胞质染色不均呈淡粉色;胞核形态可呈粉紫色(图3B)。C组:软骨细胞胞膜光滑完整,数目明显增多,细胞形态大致正常;胞质染色均匀呈粉色;胞核呈浅紫色(图3C)。D组:

软骨细胞数目减少且形态改变,呈椭圆形;胞质染色变浅,呈淡粉色;胞核呈浅紫色(图 3D)。E 组:软骨细胞数目增多,细胞形态呈多边形或三角形;胞质染色均匀呈粉色;胞核形态可,呈紫色(图 3E)。F 组:

软骨细胞形态可,细胞表面光滑平整,胞质染色均匀呈粉红色;胞核形态可,染色均匀呈紫色(图 3F)。

2.4 各组软骨细胞胞质 Col2 免疫细胞染色结果
软骨细胞胞质 Col2 的着色情况,阳性呈棕褐色

图 1 SD 大鼠膝软骨细胞的形态学观察 (倒置显微镜,×100)

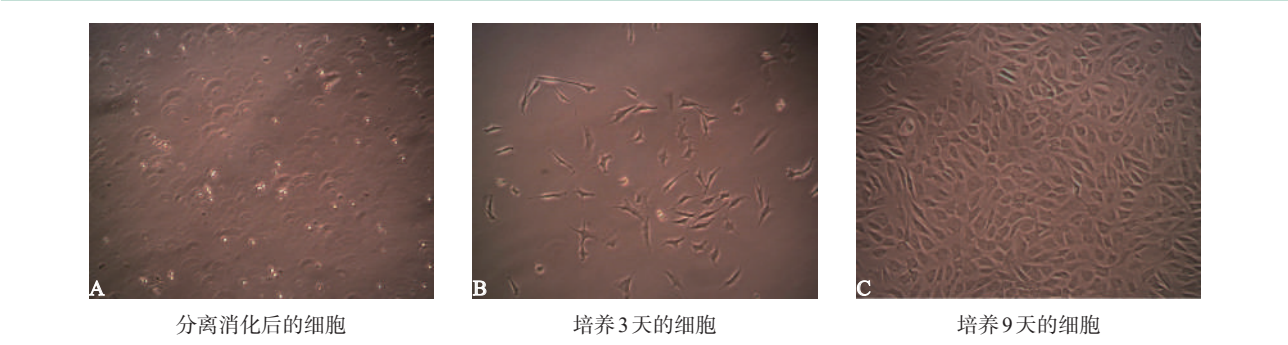


图 2 SD 大鼠膝软骨细胞鉴定 (×100)

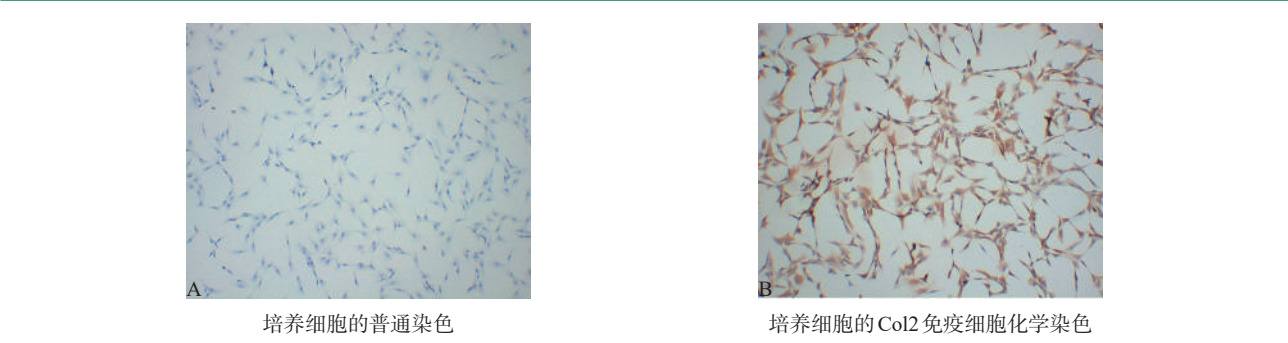
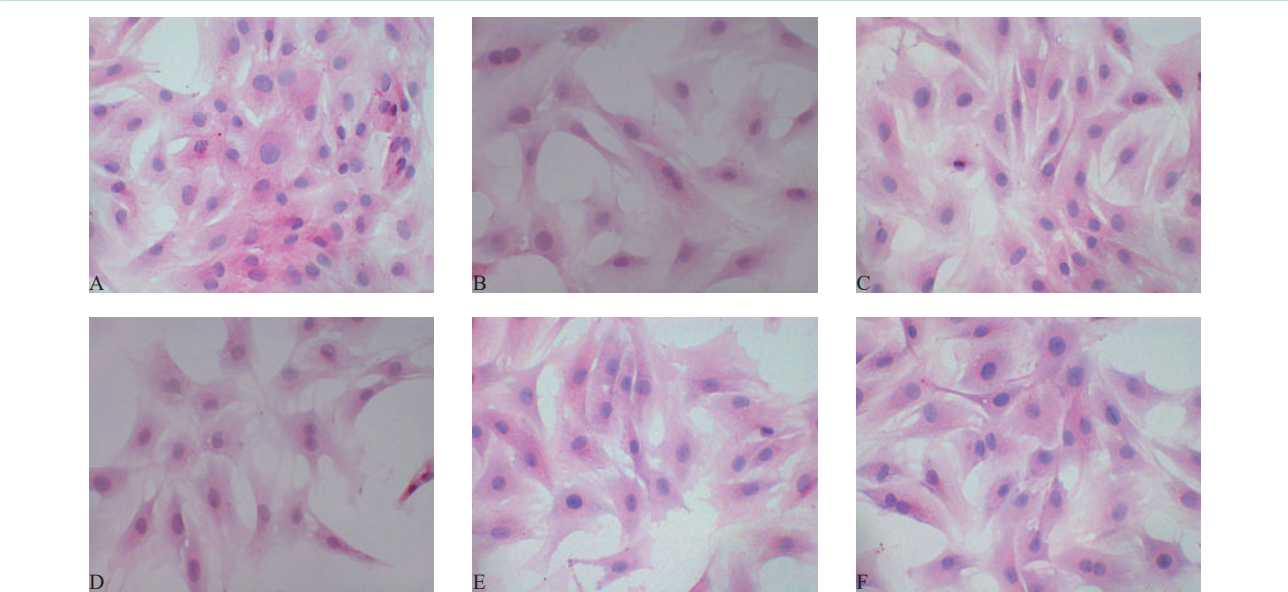


图 3 各组软骨细胞 HE 染色 (×400)



注:A:空白对照组;B:骨关节炎(OA)模型对照组;C:骨关节炎+低强度脉冲超声(LIPUS)治疗组;D:骨关节炎+磷酸盐缓冲液(PBS)对照组;E:骨关节炎+4-苯基丁酸(4-PBA)组;F:骨关节炎+4-苯基丁酸(4-PBA)+低强度脉冲超声(LIPUS)治疗组

或黄色。A组:软骨细胞胞质染色均匀,呈深褐色(图4A)。B组:OA软骨细胞胞质染色不均匀,着色浅,呈浅黄色(图4B)。C组:予以LIPUS的OA软骨细胞胞质着色明显加深,着色均匀,呈黄色(图4C)。D组:加入PBS的OA软骨细胞胞质不均匀,着色浅,呈浅黄色(图4D)。E组:加入4-PBA的OA软骨细胞胞质染色不均匀,着色变深,呈黄色或深黄色(图4E)。F组:给4-PBA处理的OA组予以LIPUS刺激后,OA软骨细胞胞质着色均匀,呈黄色(图4F)。采用IPP图像分析软件进行分析,测其平均光密度值(AOD值)。各组大鼠膝关节Col2的AOD值比较,B组与A组对比AOD值明显降低($P<0.05$);C组与B组对比AOD值有明显的升高($P<0.05$);D组、B组比较差异无显著性意义;E组较D组AOD值显著升高($P<0.05$);F组、E组AOD值比较差异无显著性意义(表1)。

2.5 各组软骨细胞MMP-13、Bax、Caspase-12的蛋白印迹检测结果

如图5所示,与对照组比,OA模型组蛋白印迹检测显示MMP-13、Bax蛋白表达水平明显增高($P<0.05$),予以LIPUS刺激后MMP-13、Bax蛋白表达水平明显降低。如图6所示,与对照组比,OA模型组蛋白印迹检测显示MMP-13、Bax、Caspase-12

蛋白表达水平明显增高($P<0.05$),加入4-PBA后MMP-13、Bax、Caspase-12蛋白的表达明显降低($P<0.05$),予以LIPUS刺激后MMP-13、Caspase-12蛋白、Bax蛋白表达有下降趋势,但数据无显著性意义。

3 讨论

虽然OA的发病机制复杂且不明确,但针对OA治疗的方法却有多种,如药物治疗、物理因子治疗、运动疗法、手术治疗等^[12-13]。近期研究表明,LIPUS作为一种常见、有效的物理治疗方法也可用于OA的治疗,因其廉价、无创且疗效显著的优点目前在临床上被广泛使用^[14]。LIPUS是一种经皮传递的非侵入性的机械波,通过介质的传递在生物器官内产生高频声压波。LIPUS治疗中最重要的一个参数是强

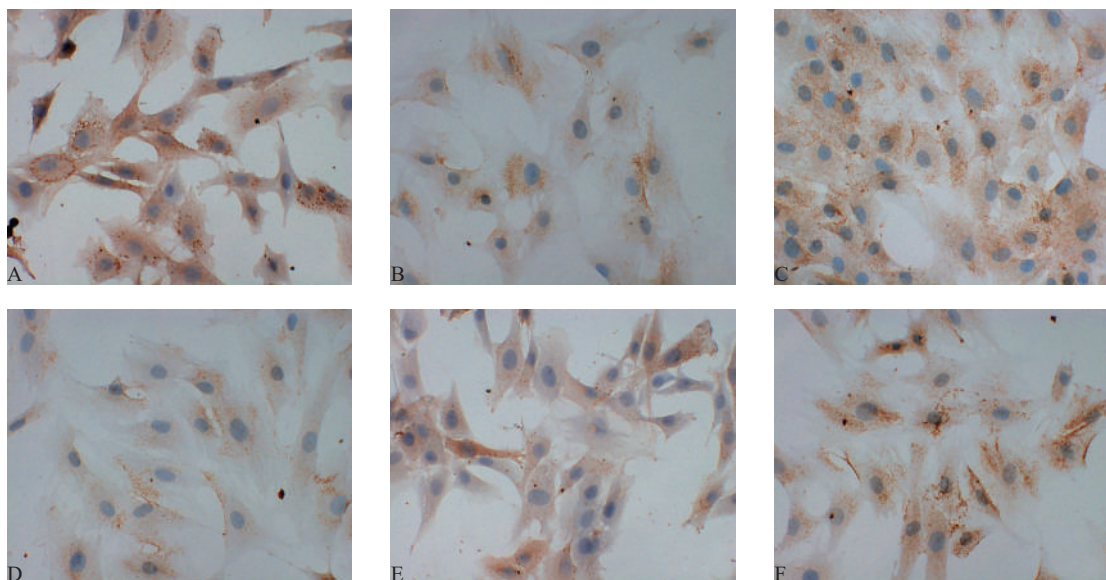
表1 各组软骨细胞Col2平均光密度比较 ($\bar{x}\pm s$,像素)

组别	例数	Col II的平均光密度值
A组	6	0.1067±0.0129
B组	6	0.0167±0.0039 ^①
C组	6	0.0576±0.0099 ^②
D组	6	0.0167±0.0045
E组	6	0.0390±0.0092 ^③
F组	6	0.0399±0.0090

注:①较A组 $P<0.001$;②较B组 $P<0.001$;③较D组 $P<0.001$

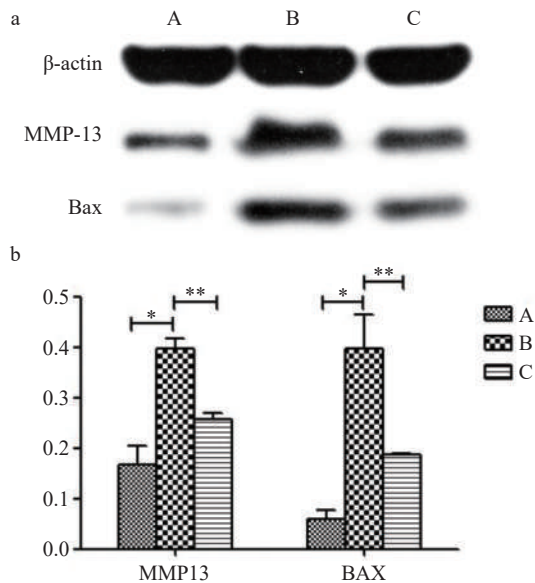
图4 各组软骨细胞免疫细胞化学染色

(×400)



注:A:空白对照组;B:骨关节炎(OA)模型对照组;C:OA+低强度脉冲超声(LIPUS)治疗组;D:OA+磷酸盐缓冲液(PBS)对照组;E:OA+4-苯基丁酸(4-PBA)组;F:OA+4-苯基丁酸(4-PBA)+低强度脉冲超声(LIPUS)治疗组

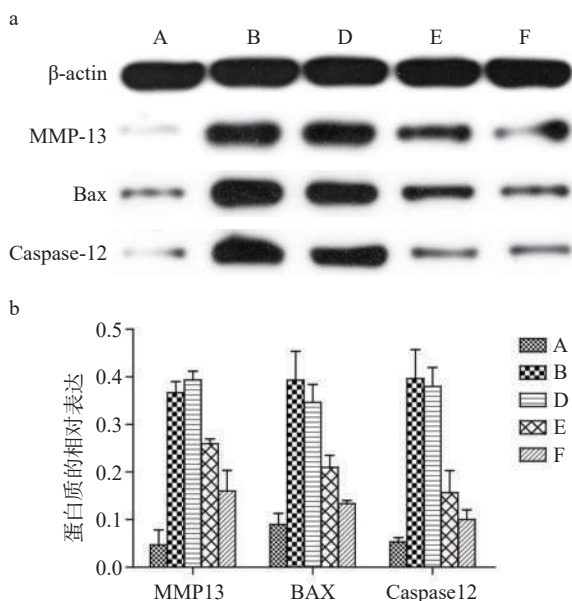
图5 各组软骨细胞MMP-13、Bax蛋白表达



注:a:Western blot法检测软骨细胞MMP-13、Bax蛋白表达;b:软骨细胞MMP-13、Bax蛋白水平的半定量分析。A:空白对照组;B:骨关节炎(OA)模型组;C:OA+低强度脉冲超声(LIPUS)治疗组。

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

图6 各组软骨细胞MMP-13、Bax、Caspase-12蛋白表达



注:a:Western blot法检测软骨细胞MMP-13、Bax、Caspase-12蛋白表达;b:软骨细胞MMP-13、Bax、Caspase-12蛋白水平的半定量分析。A:空白对照组;B:骨关节炎(OA)模型组;D:OA+磷酸盐缓冲液(PBS)对照组;E:OA+4-苯基丁酸(4-PBA)组;F:OA+4-苯基丁酸(4-PBA)+低强度脉冲超声(LIPUS)治疗组。

度,为了避免高强度产生的热效应对细胞造成的损伤,本研究选取了参数为 $0.1\text{W}/\text{cm}^2$, 3MHz , 20% , $20\text{min}/\text{d}$,连续7天的超声治疗^[15]。目前关于LIPUS对OA治疗的研究颇多,但具体的作用机制尚不明确。近期有研究表示,LIPUS与抗细胞凋亡存在密切关系。LIPUS可通过减少细胞凋亡来加速ECM的代谢,起到对抗OA的作用^[16]。而细胞凋亡的方式有多种,ERS介导的细胞凋亡途径是一种新的目前关注比较多的细胞凋亡方式^[17-18],并且LIPUS对ERS介导的软骨细胞凋亡的影响以及作用机制目前尚不清楚。基于以上原因,本实验通过体外培养大鼠膝关节软骨细胞,并进行体外诱导OA模型形成,通过研究LIPUS对骨关节炎ERS反应以及其介导的软骨细胞相关凋亡途径的影响,进一步探讨LIPUS对OA的治疗机制。

ERS已被证明参与了骨关节疾病如OA的病理过程,且在OA的病变过程中发挥了重要作用^[3-4]。Takada等^[19]研究发现,在OA软骨细胞中,过强或持久的ERS会使软骨细胞的凋亡增加,保护性反应降低,从而加速OA病变的进程。据报道,ERS介导的软骨细胞凋亡途径有4种:CHOP途径、JNK途径、Bcl-2家族途径、Caspase-12途径,而Caspase-12途径被认为是最具代表性的一种^[5]。Caspase-12已被证明定位于内质网且由ERS激活,是半胱氨酸蛋白酶家族(Caspase家族)中一种涉及启动细胞凋亡的关键介质^[20]。已有研究证明,在大鼠OA的关节软骨细胞中,Caspase-12的表达增加,且随Caspase-12表达的增加,细胞的凋亡也越多^[21]。虽然Caspase-12在骨关节炎ERS中的作用已经得到了证实,但能否通过影响Caspase-12介导的软骨细胞凋亡途径对OA起到治疗作用仍需充分的研究。本研究通过检测MMP-13、Bax、Caspase-12蛋白的表达探讨LIPUS是否通过影响Caspase-12的表达以及其介导的细胞凋亡途径,对OA起治疗作用。

本课题证实了LIPUS对OA的治疗作用可能与减弱内质网应激反应相关。实验结果显示与对照组相比,OA模型组HE染色细胞形态改变,数目减少且着色变浅(图3A、B)。免疫细胞化学染色显示Col2阳性率显著降低(图4A、B)。予以LIPUS刺激后,HE染色示OA软骨细胞形态发生改变,细胞数

目增多,着色变深(图3C)。免疫细胞化学染色示ECM的主要构成成分Col2的定位表达明显增高(图4C)。这说明本实验选取的LIPUS治疗参数安全且具有疗效,其治疗作用可能与促进细胞外基质的合成有关,尤其是Ⅱ型胶原蛋白。如图5所示免疫印迹结果显示,与正常组相比,OA模型组MMP-13、Bax蛋白表达明显增高,予以LIPUS治疗后,MMP-13、Bax蛋白表达显著降低(图5a、b),这进一步说明LIPUS可通过减少OA软骨细胞的凋亡来调节细胞外基质的合成和分解代谢。

4-苯基丁酸(4-Phenylbutyric acid, 4-PBA)作为一种靶向药物,已被证明用于多种疾病的治疗。在OA的病变过程中,4-PBA可通过抑制ERS反应,减少ERS相关的软骨细胞凋亡,保护软骨免受损伤^[22]。本研究中,加入4-PBA后,OA软骨细胞无论是形态还是细胞的数目都改善(图3D、E),此外Col2的阳性率也明显的提高(图4D、E),这说明4-PBA在OA的病变中起到了抑制ERS反应阻断剂的作用。予以LIPUS刺激后,相关的作用效果不明显(图3F,图4F),提示LIPUS可能是通过抑制ERS反应对OA软骨细胞起到保护作用。

本研究认为LIPUS可通过抑制ERS介导的Caspase-12凋亡途径,减少软骨细胞凋亡,减少基质的降解,起到对抗OA的作用。本实验结果显示:与A组相比,B组Caspase-12蛋白表达水平明显增高,且Bax、MMP-13与其变化呈正相关,提示Caspase-12介导的凋亡途径参与了大鼠膝关节炎软骨细胞的病变过程,且随着Caspase-12表达的增加,细胞的凋亡越多,细胞外基质的降解也越严重。加入4-PBA后,OA软骨细胞Caspase-12蛋白的表达明显减少,同时伴有Bax、MMP-13蛋白表达的显著减低,这说明4-PBA通过抑制ERS相关的Caspase-12凋亡途径,减少了OA软骨细胞的凋亡以及减弱了细胞外基质的分解代谢。而予以LIPUS刺激后,相关作用表现不明显(图6a、b),结合图5a、b,这说明LIPUS可能是通过作用于ERS介导的凋亡途径,即Caspase-12途径,减少细胞凋亡,进一步减弱软骨细胞外基质的降解对OA起治疗作用。但Caspase-12是通过何种路径影响细胞凋亡以及细胞外基质的代谢还不得而知。

通过本研究发现,LIPUS可能通过抑制内质网应激反应,减少Caspase-12介导软骨细胞凋亡,加速细胞外基质的代谢,对OA起到治疗作用。因为财力、物力、人力等方面的原因,本实验对4-PBA发挥最佳效应的时间、剂量以及LIPUS起到最好治疗效果率的治疗参数摸索还不够。且本实验未进行动物在体实验的研究与验证,今后的实验可逐一进行探讨和验证,使结果更具有说服力。另外,关于LIPUS具体是通过什么途径影响ERS以及其相关的凋亡途径,在今后的实验中我们可从细胞水平甚至是基因水平做相关的探讨。

参考文献

- [1] van den Berg WB. Osteoarthritis year 2010 in review: pathomechanisms[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2011, 19(4): 338—341.
- [2] Hoy DG, Smith E, Cross M, et al. The global burden of musculoskeletal conditions for 2010: an overview of methods[J]. Ann Rheum Dis, 2014, 73(6):982—989.
- [3] Hughes A, Oxford AE, Tawara K, et al. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in cartilage pathophysiology: contributing factors to apoptosis and osteoarthritis[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(3):665.
- [4] Liu Y, Zhu H, Yan X, et al. Endoplasmic reticulum stress participates in the progress of senescence and apoptosis of osteoarthritis chondrocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 491(2):368—373.
- [5] Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress[J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(3):184—190.
- [6] Li XF, Zhang Z, Chen ZK, et al. Piezo1 protein induces the apoptosis of human osteoarthritis-derived chondrocytes by activating caspase-12, the signaling marker of ER stress[J]. Int J Mol Med, 2017, 40(3):845—853.
- [7] Zahoor T, Mitchell R, Bhasin P, et al. Effect of low-intensity pulsed ultrasound on joint injury and post-traumatic osteoarthritis: An animal study[J]. Ultrasound Med Biol, 2018, 44(1):234—242.
- [8] Xu SY, Zhang LM, Yao XM, et al. Effects and mechanism of low-intensity pulsed ultrasound on extracellular matrix in rabbit knee osteoarthritis[J]. Zhongguo Gu Shang, 2014, 27(9):766—771.
- [9] Ji JB, Li XF, Liu L, et al. Effect of low intensity pulsed ultrasound on expression of TIMP-2 in serum and expression of mmp-13 in articular cartilage of rabbits with knee

- osteoarthritis[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2015, 8(12):1043-1048.
- [10] Zhou XY, Zhang XX, Yu GY, et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on knee osteoarthritis: A meta-analysis of randomized clinical trials[J]. Biomed Res Int, 2018, 2018:1—7.
- [11] Naito K, Watari T, Muta T, et al. Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) increases the articular cartilage type II collagen in a rat osteoarthritis model[J]. J Orthop Res, 2010, 28(3):361—369.
- [12] Hochberg MC, Altman RD, April KT, et al. American college of rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee[J]. Arthritis Care Res (Hoboken), 2012, 64(4):465—74.
- [13] McAlindon TE, Bannuru RR, Sullivan MC, et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2014, 22(3):363—388.
- [14] Yılmaz V, Karadaş Ö, Dandinoğlu T, et al. Efficacy of extracorporeal shockwave therapy and low-intensity pulsed ultrasound in a rat knee osteoarthritis model: A randomized controlled trial[J]. Eur J Rheumatol, 2017, 4(2):104—108.
- [15] Rubin C, Bolander M, Ryaby JP, et al. The use of low-intensity ultrasound to accelerate the healing of fractures[J]. J Bone Joint Surg Am, 2001, 83(2):259—270.
- [16] Jia L, Chen J, Wang Y, et al. Focused low-intensity pulsed ultrasound affects extracellular matrix degradation via decreasing chondrocyte apoptosis and inflammatory mediators in a surgically induced osteoarthritic rabbit model [J]. Ultrasound Med Biol, 2016, 42(1):208—219.
- [17] Salvamoser R, Brinkmann K, O'Reilly LA, et al. Characterisation of mice lacking the inflammatory caspases-1/11/12 reveals no contribution of caspase-12 to cell death and sepsis[J]. Cell Death Differ, 2019, 26:1124—1137.
- [18] Chen J, Xie JJ, Shi KS, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor regulates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and the associated inflammatory response in chondrocytes and the progression of osteoarthritis in rat[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2):212.
- [19] Takada K, Hirose J, Senba K, et al. Enhanced apoptotic and reduced protective response in chondrocytes following endoplasmic reticulum stress in osteoarthritic cartilage[J]. Int J Exp Pathol, 2011, 92(4):232—242.
- [20] Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, et al. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12[J]. J Biol Chem, 2002, 277(37):34287—94.
- [21] Xie JJ, Chen J, Guo SK, et al. Panax quinquefolium saponin inhibits endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and the associated inflammatory response in chondrocytes and attenuates the progression of osteoarthritis in rat [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 97:886—894.
- [22] Tang YH, Yue ZS, Zheng WJ, et al. 4-Phenylbutyric acid presents therapeutic effect on osteoarthritis via inhibiting cell apoptosis and inflammatory response induced by endoplasmic reticulum stress[J]. Biotechnol Appl Biochem, 2018, 65:540—546.