

·综述·

低强度脉冲超声波促进骨性关节炎软骨修复的研究进展

李雪萍¹ 励建安^{2,3}

骨性关节炎(osteoarthritis, OA)是一种以关节软骨的损伤、退变及软骨下骨的硬化、增生、囊变,继而导致关节间隙狭窄为特征的慢性退行性疾病^[1]。骨性关节炎是老年人常见疾病,也是老年人致残的一个主要原因。据统计 60 岁以上人群患病率达 50%,75 岁以上人群患病率约为 80%,该病最终致残率为 53%^[2]。随着人口寿命的延长及老年社会的到来,骨性关节炎已成为导致老年人功能障碍的重要疾病之一,给很多家庭和社会带来了巨大的精神压力和沉重的经济负担,世界卫生组织为此成立了由众多国家参与的骨与关节疾病治疗小组,并将 2000—2010 年的十年定为“骨与关节十年”,骨性关节炎已成为重要的公共卫生问题^[3]。

由于关节软骨损伤的自我修复能力极其有限,如何延缓软骨细胞坏死和促进软骨再生,迄今仍无令人满意的治疗方法。低强度脉冲超声波(low-intensity pulsed ultrasound, LIPUS)一般是指应用强度为 1—50mW/cm²,频率为 1—3MHz 的脉冲超声波。大量研究表明,LIPUS 能够促进骨折愈合,美国食品和药物管理局(FDA)分别于 1994 年 10 月与 2000 年 2 月对 LIPUS 在加速新鲜骨折愈合及治疗骨折不愈合中的作用予以认可^[4-5]。研究证实 LIPUS 促进骨折愈合的作用机制与加速了软骨形成和软骨内化骨密切相关,由于软骨损伤修复与骨损伤修复的关系密切,应用 LIPUS 来促进骨性关节炎的软骨修复成为近年来临床基础研究的热点之一,本文就相关的研究进展作一综述。

1 常用超声波疗法对 OA 的作用研究

研究发现常用超声波疗法(频率为 0.8—1MHz,强度为 0.5—3W/cm²)^[6]对骨性关节炎疗效不确切或效果不佳,Welch 等^[7]通过对 294 例膝关节骨性关节炎患者进行随机对照试验研究显示:超声治疗组与安慰剂对照组治疗 4 周后,患者膝关节疼痛及功能状况等指标没有改善,超声治疗组与短波透热治疗比较差异无显著性意义。Gro^[8]通过对 2000 年—2007 年的研究进行 Meta 分析发现超声波疗法对骨性关节炎的疼痛及功能恢复治疗效果不明确。由于超声治疗的生物学效应与其治疗参数包括强度、频率、作用时间、脉冲通断比等密切

相关,分析上述报道中超声波疗法对骨性关节炎治疗不明确的原因,可能与所用治疗参数的不完全相同有关^[7,9-10]。Nuri^[11]等应用常规超声(频率为 1MHz,强度为 1.5W/cm²,10min/次)联合热敷、等张肌力训练(3/周×8 周)治疗膝 OA,结果显示与对照组(单纯等张肌力训练组)相比,超声组患者的 VAS 评分(visual analog scale scores)和 Lequesne 指数显著降低($P < 0.05$),提示可以同时产生热效应与机械效应的常规剂量超声波对膝 OA 患者有一定的治疗作用。

2 LIPUS 促进软骨细胞活性的体外研究

LIPUS 产生的热效应极低,主要是利用超声波的机械效应^[12]。在 LIPUS 促进骨折愈合的机制研究中发现,LIPUS 作用于体外培养的成骨细胞,未见转化生长因子(TGF- β)、骨钙素、碱性磷酸酶、I 型前胶原基因的表达,故推测软骨细胞或其前体细胞可能为 LIPUS 作用的靶细胞^[13]。

软骨细胞为高度分化的细胞,其功能主要为合成软骨基质、分解基质的酶类(如胶原酶和中性蛋白酶等)。软骨基质含有胶原纤维和蛋白多糖,胶原中主要是 II 型胶原纤维,软骨细胞沿胶原纤维走行排列,位于其间;不同方向的胶原纤维共同组成网状拱形结构,维持着软骨的构形,并赋予软骨组织一定的抗张强度,对应力传导有重要作用。蛋白多糖(proteoglycan, PG)又称黏多糖,由蛋白质和氨基多糖以共价键连接构成,氨基多糖包括透明质酸、硫酸软骨素 A、硫酸软骨素 C 以及硫酸角质素;蛋白多糖使透明软骨具有弹性作用和黏性作用^[14]。

LIPUS 在软骨修复方面的体外细胞研究结果并不一致。Parvizi 等^[15]观察到 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。Nishikori 等^[16]将兔软骨细胞离体并植入含有端胶原的培养基中,并接受 LIPUS 作用,发现 LIPUS 促进了软骨细胞硫酸软骨素的合成,但细胞数量没有明显的增加。Zhang 等^[17]研究表明,LIPUS 可促进鸡胚软骨细胞的增殖,并具有强度依赖性,但不增加蛋白多糖和 II 型胶原的 mRNA 表达及其合成。Korstjens 等^[18]研究表明,LIPUS 能够促进体外培养的人软骨细

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2010.12.023

1 南京医科大学附属南京第一医院康复医学科,南京,210006; 2 南京医科大学附属第一医院康复医学科; 3 通讯作者
作者简介:李雪萍,女,在读博士生,主任医师; 收稿日期:2010-06-02

胞增殖和基质合成,为骨关节炎患者修复软骨组织带来可行性。Mish-ikori^[19]在 LIPUS 作用于软骨细胞及明胶混合物的研究中发现,LIPUS 可以明显促进蛋白多糖的合成,尤其是 6-硫酸软骨素(chondroitin 6-sulfate, C6S)的合成增多,C6S/C4S 亦明显升高,C6S 是一种成熟的蛋白多糖,约占成人关节软骨硫酸软骨素的 90%,而 4-硫酸软骨素(chondroitin 4-sulfate, C4S)是一种不成熟的蛋白多糖,这表明经 LIPUS 作用后,软骨细胞可以合成更多更成熟的蛋白多糖。

Naito 研究发现^[20],LIPUS 可能是通过诱导 II 型胶原 mRNA 表达促进软骨细胞中 II 型胶原的合成。Tien 研究表明^[21],多趾畸形患者的软骨细胞经 LIPUS 暴露后,其蛋白多糖合成明显增加,并且具有时间依赖性。在 48mW/cm² 强度下可观察到最大效应,在这种强度下暴露 14d 后,蛋白多糖和 II 型胶原的合成较对照组明显增加。但是 LIPUS 对软骨细胞增殖没有明显的影响,说明 LIPUS 促进蛋白聚糖和 II 型胶原的合成并非通过增加软骨细胞的增殖。此外,从老年人体内收集的软骨细胞对 LIPUS 的反应较低。Choi 等^[22]从骨关节炎患者离体软骨细胞,发现 LIPUS 可以增加软骨细胞内糖胺聚糖阳性的细胞器数量和体积,如粗面内质网和线粒体,提示 LIPUS 可促进培养基内关节软骨细胞的活性和代谢。

上述研究表明,LIPUS 能够显著影响软骨细胞的增生、基因表达和基质合成,而试验结果的差异可能源于培养基、培养方式以及细胞对 LIPUS 的敏感度。

3 LIPUS 促进软骨修复的体内研究

透明软骨由基质(99%)和软骨细胞(1%)组成。软骨细胞、软骨基质,尤其是 II 型胶原、蛋白多糖等的变化是导致软骨丧失正常生物力学特性的直接原因,正常的软骨细胞保证了软骨基质成分的质量;而软骨细胞位于胶原纤维所构成的网络结构中,受其保护而不被损伤,一旦胶原网络结构破坏,必定引起软骨细胞发生坏死或退变,进而影响胶原和蛋白多糖的合成,并进一步加重关节软骨的损伤^[18]。

Cook 等^[23]用全层关节软骨缺损的犬模型进行体内试验,发现 LIPUS 可改善关节软骨的形态学和组织学特征。Jia 等^[24]用 10 只双边全层软骨缺损的新西兰兔进行动物试验,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,提示 LIPUS 可加速关节软骨的修复。Gurkan 等^[25]利用自发性骨关节炎模型荷兰猪进行研究,发现 LIPUS 对荷兰猪膝关节治疗 4 个月后,虽不能完全阻止预防组荷兰猪的关节软骨退变,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,但在缓解程度上不如预防组,这提示 LIPUS 能够延缓自发性骨关节炎动物模型关节软骨退变进程,这种影响在病变早期作用更大。上述动物研究均证实,LIPUS 可延缓关

节软骨的退变,促进软骨组织缺损的修复。

4 LIPUS 促进关节软骨修复的机制研究

OA 发病的具体机制尚不完全清楚,其主要病理改变是关节软骨基质中胶原的破坏。引起关节软骨基质胶原的破坏因素主要有:降解细胞外基质的金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)、白细胞介素 1(IL-1)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)等炎症细胞因子,自由基一氧化氮(NO)等。多种损害因子的协同作用,以及炎症抑制因子的减少,使关节软骨细胞、细胞外基质和软骨下骨合成与降解失去平衡,从而导致关节软骨的软化、纤维化、溃疡,软骨下骨的硬化、骨囊肿,周围骨赘形成^[26]。LIPUS 促进 OA 关节软骨修复的主要机制可能是打断了软骨合成和降解失衡致关节软骨逐步损伤的恶性循环^[27]。

4.1 LIPUS 对细胞因子及蛋白酶的影响

Dodds 等^[27]在研究中发现,转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor, TGF- $\beta 1$)在早期增生、过渡软骨细胞、成熟的软骨细胞及成骨细胞上表达,在骨形成区最易发现,其阳性集中在分化的软骨细胞上;而在增生过渡性软骨细胞上 TGF- $\beta 1$ 免疫染色较浅,且多为胞浆阳性,少数有胞核阳性。TGF- $\beta 1$ 是软骨分化的标志,它主要诱导软骨细胞不断成熟,促进软骨细胞合成、分泌软骨基质并最终分化成骨。Mukai 等^[26]用 LIPUS 作用体外培养软骨细胞后发现,LIPUS 能显著增加软骨细胞的 II 型胶原和蛋白多糖 mRNA 的表达并延迟 X 型胶原 mRNA 的表达,并且这些改变可被 TGF- $\beta 1$ 模拟并可被 TGF- $\beta 1$ 中和抗体逆转,提示 TGF- $\beta 1$ 可能在介导 LIPUS 对软骨细胞效应中具有重要作用。但 Gurkan 等^[25]研究发现,LIPUS 对荷兰猪膝关节进行治疗 4 个月后,其关节软骨 TGF- $\beta 1$ 蛋白表达水平下降,这可能是因为关节软骨降解已不活跃,仅需要较少的修复反应。此外,研究还发现 LIPUS 治疗组的 MMP-3、MMP-13 表达明显下降、II 型胶原裂解减少,可能是 LIPUS 治疗骨性关节炎的重要机制。Choi 等^[22]研究发现,LIPUS 能够降解软骨细胞 MMP-1,而对 TIMP-1(MMP 抑制剂)没有影响,提示 LIPUS 通过抑制炎症因子来减少 II 型胶原和蛋白多糖的降解。

4.2 LIPUS 对软骨修复信号转导通路的影响

目前研究显示,在 OA 炎症过程中,蛋白激酶信号通路系统广泛参与外界刺激的信号传递,其中包括 MAPKs 家族的 ERK1/2、C6N 末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)和 p38 激酶。Zhou 等^[28]研究发现,LIPUS 能够激活成纤维细胞整合素及其下游的 Rho/ROCK/Src/ERK 信号转导通路,这提示 LIPUS 可能通过这种机制提高软骨细胞合成代谢并加速软骨组织修复。Choi 等^[29]证实 LIPUS 不仅增加了 C-28/I2 软骨细胞的牵张激活通道(stretch-activated channels, SAC)和整合

素(integrins)的表达,也激活软骨细胞的 JNK 和 ERK 信号转导通路,还提高了 II 型胶原和蛋白多糖 mRNA 的表达;使用 SAC 抑制剂、整合素抑制剂能够抑制 II 型胶原和蛋白多糖的表达,并且这种抑制效应与抑制剂的孵育时间相关;使用 ERK 抑制剂能够阻断 LIPUS 介导的 ERK 信号转导通路。上述研究证实,LIPUS 通过传统的机械感受器,如牵张激活通道和整合素,进一步激活 C-28/I2 软骨细胞的 JNK 和 ERK 信号转导通路,从而提高 II 型胶原和蛋白多糖的表达。然而 Takeuchi 等^[30]研究发现,LIPUS 能够促进软骨细胞增殖和 IX 型胶原的合成,这种 LIPUS 诱导的合成代谢是通过整合素/磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B 途径(integrin/PI3K/AKT)介导完成的。关于 LIPUS 介导软骨修复的信号转导机制尚未完全阐明,仍需进一步研究。

LIPUS 还可引起细胞膜通透性的改变,从而引起细胞内信号传导的改变。Parvizi^[31]认为 LIPUS 可能因为激活了细胞膜上的“应力受体”或阳离子通道,促进软骨细胞外钙离子内流,导致胞内钙离子浓度升高;与此同时,内质网释放钙离子也增加,并且胞外钙离子的内流可激活内质网钙离子的释放,从而急剧提高胞内钙离子的浓度,且胞内高浓度的钙离子为促进软骨细胞蛋白多糖合成所必需。软骨细胞内钙离子浓度对超声强度有依赖性,220kPa 的超声即可引起最大的不可逆地增高。细胞内升高的钙离子可作为细胞信号传导的第二信使,而这又促进了蛋白多糖基因的表达,蛋白多糖的合成。以螯合剂结合细胞内钙离子,则可阻断超声促进蛋白多糖合成的效应,这可能与细胞内钙离子可以激活蛋白激酶 C 有关。

LIPUS 作用于机体后可产生一定的机械刺激,使细胞产生剪力变形,改变细胞周围液体流向等,还可能表现为软骨细胞基因表达的改变^[32]。研究发现,LIPUS 可激活软骨细胞骨架与周围基质的黏附,影响细胞代谢及基因表达,从而促进蛋白多糖的合成及细胞增殖^[33]。此外,尽管认为 LIPUS 热效应很小(<1℃),但有些酶(如胶原酶)对温度的变化非常敏感,故 LIPUS 可通过增强酶的活性促进细胞代谢,并抑制细胞凋亡,增加间充质干细胞活性,促进软骨细胞的分化^[34]。LIPUS 还能够促进血液中的小分子物质向关节滑液内弥散,增加关节滑液的渗出。因此,改善关节软骨的营养也可能是 LIPUS 作用的一个重要机制^[35]。

5 小结

迄今为止,大部分临床前期的研究均提示 LIPUS 可促进关节软骨的修复,其机制涉及超声机械效应、细胞膜机械-化学信号传递、炎症因子、细胞内信号转导、细胞的增殖、分化与凋亡、基因表达和蛋白合成等方面,为 LIPUS 治疗骨性关节炎的临床应用提供了一定的理论依据。

参考文献

- [1] Pelletier JP MJ, Howell DS. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: Koopman WJ, editor. Arthritis & allied conditions: a textbook of rheumatology[M]. 14th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 2195—2245.
- [2] 中华医学会骨科学分会.骨关节炎诊治指南(2007 年版)[J].中华骨科杂志,2007,27(10):793—796.
- [3] 刘健,赵文海.对骨性关节炎发病机制的研究概况[J].辽宁中医药大学学报,2008,10(2):80—82.
- [4] Malizos KN, Hantes ME, Protapappas V, et al. Low-intensity pulsed ultrasound for bone healing: an overview [J]. Injury, 2006, 37(Suppl 1):S56—62.
- [5] 汪方,王秋根.低强度脉冲式超声对关节软骨再生作用研究进展[J].国外医学(骨科学分册),2004,25(6):369—371.
- [6] 乔志恒.物理治疗学全书[M].北京:科学技术文献出版社,2001.787—818.
- [7] Rutjes AW, Nuesch E, Sterchi R, et al. Therapeutic ultrasound for osteoarthritis of the knee or hip [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2001, (1):CD003132.
- [8] Jamtvedt G, Dahm KT, Christie A, et al. Physical therapy interventions for patients with osteoarthritis of the knee: an overview of systematic reviews[J]. Phys Ther, 2008, 88(1):123—136.
- [9] Brosseau L, Casimiro L, Robinson V, et al. Therapeutic ultrasound for treating patellofemoral pain syndrome [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2001, (4):CD003375.
- [10] Gam AN, Johannsen F. Ultrasound therapy in musculoskeletal disorders: a meta-analysis[J]. Pain, 1995, 63(1):85—91.
- [11] Cetin N, Aytar A, Atalay A, Akman MN. Comparing hot pack, short-wave diathermy, ultrasound, and TENS on isokinetic strength, pain, and functional status of women with osteoarthritic knees: a single-blind, randomized, controlled trial. Am J Phys Med Rehabil. 2008, 87(6): 443—451.
- [12] 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.
- [13] Azuma Y, Ito M, Harada Y, et al. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reactions in the fracture callus [J]. J Bone Miner Res, 2001, 16(4):671—680.
- [14] 王群.膝骨性关节炎的研究进展[J].上海医学,1997,20(9):557—559.
- [15] 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.
- [16] Nishikori T, Ochi M, Uchio Y, et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on proliferation and chondroitin sulfate synthesis of cultured chondrocytes embedded in Atelocollagen gel [J]. J Biomed Mater Res, 2002, 59(2):201—206.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] Nishikori T, Ochi M, Uchio Y, et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on proliferation and chondroitin sulfate synthesis of cultured chondrocytes embedded in Atelocollagen gel [J]. J Biomed Mater Res, 2002, 59(2):201—206.
- [20] 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.
- [21] Tien YC, Lin SD, Chen CH, et al. Effects of pulsed low-intensity ultrasound on human child chondrocytes [J]. Ultrasound Med Biol, 2008, 34(7):1174—1181.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] Mukai S, Ito H, Nakagawa Y, et al. Transforming growth factor- β 1 mediates the effects of low-intensity pulsed ultrasound in chondrocytes [J]. Ultrasound Med Biol, 2005, 31(12): 1713—1721.
- [27] Dodds RA, Merry K, Littlewood A, et al. Expression of mRNA for IL1 β , IL6 and TGF β 1 in developing human bone and cartilage [J]. J Histochem Cytochem, 1994, 42(6): 733—744.
- [28] Zhou S, Schmelz A, Seufferlein T, et al. Molecular mechanisms of low intensity pulsed ultrasound in human skin fibroblasts[J]. J Biol Chem, 2004, 279(52):54463—54469.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] Parvizi J, Parpura V, Greenleaf JF, et al. Calcium signaling is required for ultrasound-stimulated aggrecan synthesis by rat chondrocytes[J]. J Orthop Res, 2002, 20(1):51—57.
- [32] Maylia E, Nokes LD. The use of ultrasonics in orthopaedics—a review[J]. Technol Health Care, 1999, 7(1):1—28.
- [33] Quinn TM, Grodzinsky AJ, Buschmann MD, et al. Mechanical compression alters proteoglycan deposition and matrix deformation around individual cells in cartilage explants[J]. J Cell Sci, 1998, 111 (Pt 5):573—583.
- [34] Lee HJ, Choi BH, Min BH, et al. Low-intensity ultrasound inhibits apoptosis and enhances viability of human mesenchymal stem cells in three-dimensional alginate culture during chondrogenic differentiation[J]. Tissue Eng, 2007, 13(5):1049—1057.
- [35] 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.

· 综述 ·

磁共振波谱技术及其在神经科学研究领域中的应用*

侯莉娟¹ 刘晓莉¹ 乔德才^{1,2}

1973 年 Moon 和 Richard 等利用磁共振波谱分析 (magnetic resonance spectroscopy, MRS) 技术对离体红细胞的特征物质变化进行了测定。这一研究成为 MRS 技术在生物学领域应用的开端^[1]。经过近 40 年的发展, MRS 已广泛应用于不同方向的基础科学研究与临床诊疗领域, 它通过无创、直接、准确、可重复地测定人体器官代谢产物、神经递质

等浓度的变化, 可以监测各组织器官的病理生理变化, 对疾病的早期诊断、疗效和预后判断均有十分重要的意义。MRS 中尤以 ¹H 在神经系统疾病诊治中的应用最为广泛, 本文以 ¹H 磁共振波谱为例, 就其基本原理及其在神经科学相关领域的研究现状作一综述。

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2010.12.024

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30771050, 30971416)

1 北京师范大学体育与运动学院, 北京, 100875; 2 通讯作者

作者简介: 侯莉娟, 女, 博士, 实验师; 收稿日期: 2009-10-20