

·基础研究·

体外冲击波对大鼠膝骨关节炎白细胞介素-1 β 及肿瘤坏死因子- α 表达的影响

刘洪柏¹ 张鸣生^{1,2} 区丽明¹ 朱洪翔¹

摘要

目的:观察体外冲击波(ESW)对大鼠膝骨关节炎(OA)中白细胞介素-1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的影响,探讨ESW治疗膝骨关节炎的可能机制。

方法:将30只SD大鼠随机分为治疗组、模型组、对照组,每组各10只。治疗组和模型组采用单侧后肢跟腱切除法建立膝OA模型,对照组不做任何处理。治疗组造模后立即给予ESW治疗1次,能流密度0.1mJ/mm²,冲击次数1000次。各组大鼠分别于治疗后4周处死,取膝OA关节液和关节软骨,分别采用酶联免疫吸附试验(ELISA)和免疫组化技术法,检测各组膝关节中IL-1 β 和TNF- α 的水平,并比较各组之间的差异。

结果:采用ELISA法行关节液IL-1 β 和TNF- α 含量测定,治疗组和模型组较对照组明显增高($P < 0.01$),治疗结束后治疗组较模型组下降($P < 0.05$)。免疫组化法关节软骨IL-1 β 和TNF- α 测定,治疗组和模型组阳性率较对照组明显增高($P < 0.01$),治疗结束后治疗组的阳性率较模型组下降($P < 0.05$)。

结论:膝骨关节炎中IL-1 β 和TNF- α 水平上升,而ESW能下调膝OA大鼠IL-1 β 、TNF- α 的表达,提示可通过降低关节软骨的炎症因子水平,对膝骨关节炎起防治作用。

关键词 体外冲击波;骨关节炎;白细胞介素-1 β ;肿瘤坏死因子- α

中图分类号:R684.3, R454 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2014)-03-0208-04

Influence of extracorporeal shock wave therapy on expressions of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α in cartilage of rats with knee osteoarthritis/LIU Hongbai, OU Liming, ZHANG Mingsheng, et al// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2014, 29(3):208—211

Abstract

Objective: To observe the effect of extracorporeal shock wave therapy (ESWT) on the expressions of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in cartilage of rats with experimental knee osteoarthritis (OA), and to explore its potential mechanism.

Method: Thirty rats were randomly and averagely divided into treatment group, model group and control group. The method of heel tendon resection on unilateral hind limb was used to establish OA animal model. The treatment group was treated with ESWT(each 1000 impulse, energy flux density 0.1mJ/mm²), the control group hadn't any treatment. The rats were sacrificed respectively at 4 weeks after ESWT. The articular genu rinse solution were collected from rats for detecting the expressions of IL-1 β and TNF- α in synovia by ELISA, and immunohistochemical staining was used to observe the expression characteristics of IL-1 β and TNF- α in cartilage of each group, and the differences were compared among the groups.

Result: Expressions of both IL-1 β and TNF- α were down-regulated significantly in treatment group compared with model group, the difference between the two groups was significant ($P < 0.05$). ELISA assay showed the concentrations of IL-1 β and TNF- α in joint irrigation of treatment group and model group rose higher than

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2014.03.003

1 广东省人民医院(广东省医学科学院)康复科,广州,510080;2 通讯作者
作者简介:刘洪柏,男,硕士,主治医师;收稿日期:2013-05-29

that of control group ($P < 0.01$), after ESWT those reduced more in treatment group than in modal group ($P < 0.05$), immunohistochemical assay showed the positive rates of IL- β and TNF- α in cartilage rose higher in treatment group and model group than that in control group ($P < 0.01$), after ESWT positive rate reduced more in treatment group than in model group ($P < 0.05$).

Conclusion: In KOA the level of IL- β and TNF- α rose, while ESW could down-regulate the expressions of IL- β and TNF- α of KOA rats. It suggested by reducing the level of inflammation factors of cartilage ESW might prevent and treat KOA.

Author's address Guangdong General Hospital, 510080

Key word extracorporeal shock wave; osteoarthritis; interleukin- β ; tumor necrosis factor- α

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种退行性关节疾病,其基本病理改变是软骨的退变和损伤。白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)能促进软骨细胞的分解代谢,抑制软骨细胞的合成修复能力,引起细胞外基质的降解,在OA的发生中有十分重要的作用。

体外冲击波(extracorporeal shock wave, ESW)治疗近年来被广泛应用于运动医学领域,由于体外冲击波治疗时,关节被暴露于冲击波的治疗范围,因此其对关节软骨的影响也引起了关注。尽管现有的国内外许多研究表明低能量ESW能够促进软骨细胞的增殖和细胞外基质的表达,但目前缺乏低能量ESW对骨关节炎中IL-1 β 和TNF- α 表达影响的研究。本实验应用低能量ESW治疗实验性大鼠膝OA,观察其对关节软骨中IL-1 β 和TNF- α 水平的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

健康清洁级SD大鼠30只,体重200—250g,购于中山大学医学部动物实验中心。实验动物动物质量合格证号:SCXK(粤)2011-0029,动物实验室:中山大学医学部动物实验中心。标准饲料饲养,自由饮水。室温控制在15—18 $^{\circ}$ C,湿度70%左右。

将30只大鼠按数字随机分成治疗组、模型组和对照组,每组10只。治疗组和模型组采用单侧左后肢跟腱切除法^[1],均建立膝OA模型,术后4周造模成功。对照组未采取任何干预措施。

1.2 试剂与仪器

大鼠抗IL-1 β (产品编号:BA2728, EK0393)和TNF- α (产品编号:BA0131, EK0526)ELISA试剂盒

购自武汉博士德生物有限公司。切片机(厂家:Leica, 型号:RM2245),显微镜(OLYMPUS, 型号:BX51123),染色机(厂家:SAKURA, 型号:Tissue-Tek DRS 2000),体外冲击波(瑞士DolorClast型)。

1.3 治疗方法

治疗组给予体外冲击波治疗1次,能流密度0.1mJ/mm²,冲击次数1000次。模型组和对照组均不给予干预治疗。

1.4 关节取材

分别于治疗后4周大鼠称重,腹腔注射10%氯胺酮0.1ml/100g麻醉,仰位固定,沿左侧后腿膝关节正中纵行切开皮肤,直至暴露出以膝关节为中心约3cm \times 3cm的区域,沿髌骨上沿约0.3—0.4cm处向下切割直至髌骨,再分别沿髌骨两侧向下分离至胫骨,打开膝关节腔,用无菌蒸馏水1ml冲洗关节腔,收集关节腔液0.5ml,用于IL-1 β 、TNF- α 的ELISA检测。然后收集每只大鼠左后肢膝关节股骨端软骨,10%甲醛溶液固定24h以上,再用混合酸脱钙液脱钙10d。再将标本脱水、透明、浸蜡及包埋,制成石蜡标本,经切片机切成5 μ m厚的石蜡切片。

1.5 关节液测定

按照ELISA试剂盒提供的说明进行操作:先加入标准品和待测样品,设置阴性对照,37 $^{\circ}$ C反应90min,不洗,加生物素标记抗体(IL-1 β , NF- α),37 $^{\circ}$ C反应60min,0.01mmol/L的TBS洗涤3次,加ABC工作液,37 $^{\circ}$ C反应30min,0.01mmol/L的TBS洗涤5次,TMB显色液37 $^{\circ}$ C避光反应18—22min,加入TMB终止液,上酶标仪在450nm测定A值,绘制标准曲线,计算浓度。

1.6 免疫组织化学染色

组织切片暴露抗原,二甲苯脱蜡,梯度乙醇组织

切片水化,抗原修复,过氧化物酶阻断剂抑制内源性过氧化物酶。蛋白阻断剂孵育,一抗孵育,二抗孵育,DAB工作液显色,苏木素复染,二甲苯透明,60℃烤箱烤干脱水,中性树胶封片。观测指标:每张切片随机取6个视野(400倍),其中3个位于软骨表层和中上层,另3个位于软骨中下层和下层,计算每个视野的阳性细胞数和总细胞数,IL-1 β 、TNF- α 的表达量用细胞分数,即阳性细胞数占总细胞数的百分比表示。每张切片的细胞计数分别由两个独立的观察者进行,评分误差率控制在5%以内,取两者的平均值为最后的得分值。阳性细胞的确定条件:①细胞浆染色呈棕黄色;②细胞核比较清晰;③形状比较规则。

1.7 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件分析处理,治疗组、模型组和对照组3组比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 q 检验。

2 结果

2.1 关节液中IL-1 β 和TNF- α 的ELISA检测

治疗组和模型组大鼠膝关节液中IL-1 β 和TNF- α 的含量较对照组明显升高($P < 0.01$),而ESW干预治疗后,治疗组中IL-1 β 和TNF- α 的含量较模型组有下降($P < 0.05$)。见表1。

2.2 免疫组织化学染色结果

对照组软骨细胞胞浆中偶见浅棕黄色IL-1 β 、TNF- α 弱阳性染色。模型组见大量软骨细胞呈深棕色IL-1 β 、TNF- α 强阳性染色颗粒。治疗组软骨细胞胞浆呈浅棕黄色IL-1 β 、TNF- α 阳性染色。模型组和治疗组IL-1 β 和TNF- α 的表达都较正常组上调,差异均有显著性意义($P < 0.01$)。治疗组的表达较模型组下调,差异有显著性意义($P < 0.05$)。见表2。

3 讨论

OA的病因及发病机制至今尚未完全明确。目

表1 关节液中IL-1 β 和TNF- α 的含量比较 ($\bar{x} \pm s, \text{ng/L}$)

组别	例数	IL-1 β	TNF- α
对照组	10	33.28 \pm 6.35	26.08 \pm 4.30
模型组	10	70.75 \pm 10.20	46.10 \pm 7.43
治疗组	10	59.78 \pm 13.21	40.18 \pm 5.96

表2 软骨细胞IL-1 β 和TNF- α 表达的阳性细胞率 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	阳性细胞率	
		IL-1 β	TNF- α
对照组	10	9.1 \pm 3.09	5.2 \pm 2.29
模型组	10	20.3 \pm 3.34	43.2 \pm 10.92
治疗组	10	15.7 \pm 3.12	36.7 \pm 9.88

前,细胞因子在OA发病机制中的作用越来越受关注,其中IL-1 β 、TNF- α 被认为是参与关节软骨破坏的重要因子。Wood等^[2]报道在正常关节液中,只有微量的IL-1 β ,正常软骨浅表层部分软骨细胞中存在IL-1 β 。而在OA的关节滑液中可检测到高水平的IL-1 β ,而且IL-1 β 的强阳性表达可在OA软骨的浅中层被检测到。在OA患者中,由于软骨细胞、滑膜单核细胞等受到一定刺激而产生IL-1 β ,继而激活软骨中的MMP,引起软骨基质的降解。研究发现^[3]IL-1 β 可增强MMP-13、MMP-3 mRNA基因在软骨细胞的表达,抑制II型胶原及蛋白聚糖的表达。软骨细胞蛋白组分析发现,IL-1 β 能促进MMP-1、MMP-3的合成,通过降解II型胶原,引起关节软骨的破坏。同时,IL-1 β 增加软骨细胞诱导iNOS mRNA基因的表达,使得NO释放量和iNOS活性增强,进而升高MMP活性,加速关节软骨蛋白聚糖和胶原降解^[4]。另外研究发现IL-1 β 可刺激软骨细胞产生大量NO,引起体外培养的软骨细胞发生凋亡^[5]。同时,IL-1 β 还可以通过Fas这一途径介导软骨细胞的凋亡。此外,还有实验^[6]发现OA软骨损害程度与小窝蛋白(caveolin-1)的表达水平具有相关性,IL-1 β 可以刺激软骨细胞表达caveolin-1,上调caveolin-1的mRNA和蛋白质水平,诱导软骨细胞的凋亡。TNF- α 和IL-1 β 只有3%的同源性,生物活性比IL-1 β 低100倍,但TNF- α 于靶组织的效应与IL-1 β 在很大程度上类似。目前多项研究显示^[7-8],IL-1 β 、TNF- α 通过激活有丝分裂原活化蛋白激酶MAPK和核因子NF- κ B途径,从而影响细胞核内基因转录和转录后修饰,使得软骨细胞合成MMPs、NO,促进骨关节炎进展。

近年来,临床上发现ESW可以促进OA治疗区域的血管扩张和生成,减轻组织炎症反应,从而减轻疼痛。但是,现有研究对低能量ESW减轻组织炎症的分子机制仍不十分清楚。Ciampa AR等^[9]观察到以0.03mJ/mm²能流密度的低能量ESW作用于大鼠

神经胶质细胞瘤 C6 时,发现 ESW 干预致炎 C6 后,能有效下调 NF-KB 的活化和 NF-KB 相关基因 iNOS 和 TNF- α 的表达,减轻炎症。Hagai^[10] 等使用能流密度为 0.1mJ/mm² 的 ESW,作用于进行正畸牙大鼠牙槽骨,研究发现 ESW 可以降低牙龈液和牙槽骨中的 IL-1 β 而发挥抗炎作用。Han SH^[11] 等使用能流密度为 0.17mJ/mm² 的 ESW,作用于正常拇长屈肌腱和炎性跟腱细胞,该研究发现 ESW 可以通过降低 IL-1、IL-6、IL-13 和 MMP-1、MMP-13,抑制胶原蛋白的分解。ESW 在 OA 软骨细胞中是否也能抑制相关炎症因子仍不清楚。Moretti B^[12] 等取自成人膝 OA 软骨细胞培养,然后使用低能量 ESW 治疗,能流密度分别为 0.05mJ/mm²、0.17mJ/mm²,48h 后检测发现 ESW 能流密度为 0.17mJ/mm² 组别中的 IL-10 升高和 TNF- α 有明显下降。Zhe Zhao^[13] 等利用 ESW 干预治疗实验性兔膝 OA 模型后,发现在治疗后 4 周时和 8 周时,ESW 都能使关节液中 NO 的水平较对照组明显下降。曾有研究表明,周期性张应力可以通过抑制 NF-KB 的核定位来阻滞 IL-1 β 诱导的促炎症基因的表达^[14]。ESW 作为一种应力,可能也可通过抑制软骨细胞 NF-KB 的活化和 NF-KB 依赖的基因表达,而发挥抑制炎症因子表达。因此本实验观察低能量 ESW 对 OA 炎症因子中 IL-1 β 、TNF- α 表达的影响是十分有意义的。

建立大鼠 OA 动物模型常用方法有 Hulth 法、木瓜蛋白酶关节内注射和跟腱切断法,为了避免手术创伤和外来注射药物对炎症因子的影响,因此本实验选用单侧跟腱切断 4 周后建立 OA 模型^[15]。通过免疫组化染色检测到模型组和治疗组中 IL-1 β 、TNF- α 的强阳性表达主要在 OA 软骨的中间层和基层,并且这两组的 IL-1 β 、TNF- α 水平较对照组显著升高,同样在关节液的 ELISA 检测中也能见到类似现象,说明 IL-1 β 和 TNF- α 随着 OA 的发生而大量产生,进而促进软骨的退变。同时实验中进一步观察到治疗组中软骨细胞和关节液中 IL-1 β 、TNF- α 的水平比模型组要降低,说明低能量 ESW 对 IL-1 β 、TNF- α 的分泌具有抑制作用。

预实验中参考国外实验采用 0.18mJ/mm² 的 ESW 治疗后^[16],发现大鼠容易在疼痛中醒来,而且膝关节出现皮下瘀血、治疗后关节肿胀,因此本实验

采用 0.1mJ/mm² 的 ESW 治疗,结果发现大鼠的膝关节皮肤略红,未见皮下淤血、关节肿胀。由于大鼠的膝关节较小,ESW 对大关节和人骨关节中的炎症因子的影响仍需要进一步研究。而且实验只采用了单一剂量的 ESW 治疗,缺少中高剂量的 ESW 对 OA 中的炎症因子影响的比较。Wang CJ^[17] 等利用 ESW 每周 3 次治疗大鼠膝 OA 模型中,发现 ESW 过度治疗会导致 MMP-13 增高、II 型胶原减少,而每周 1—2 次的治疗则可以减少 MMP-13、增加 II 型胶原,因此对 ESW 的治疗频率还必须进一步研究。总之在临床使用 ESW 治疗 OA 患者时,还需要评估 ESW 的安全性,ESW 能量参数的选择和治疗频率,以及深入研究 ESW 延缓 OA 发展的机制。

参考文献

- [1] 王道海,包飞,吴志宏,等.针刺对膝骨关节炎大鼠软骨白细胞介素-1 β 及肿瘤坏死因子- α 表达的影响[J].中国骨伤,2011,24(9):775—778.
- [2] Wood DD, Ihrle EJ, Dinarello CA, et al. Isolation of an interleukin-1-like factor from human joint effusions[J]. Arthritis Rheum, 1983, 26(8):975—983.
- [3] Clutterbuck AJ, Smith JR, Allaway D, et al. High throughput proteomic analysis of the secretome in an explants model of articular cartilage inflammation[J]. J Proteomics, 2011, 74(5):704—715.
- [4] Abramson SB. Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10(Suppl 2):S2.
- [5] Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, et al. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide[J]. Am J Pathol, 2005, 146(1):75—85.
- [6] Dai SM, Shan ZZ, Nakamura H, et al. Catabolic stress induces features of chondrocyte senescence through overexpression of caveolin 1: possible involvement of caveolin 1-induced down-regulation of articular chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis[J]. Arthritis Rheumatism, 2006, 54(3):818—831.
- [7] Sondergaard BC, Schultz N, Madsen SH, et al. MAPKs are essential upstream signaling pathways in proteolytic cartilage degradation--divergence in pathways leading to aggrecanase and MMP-mediated articular cartilage degradation[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2010, 18(3):279—288.
- [8] Lu YC, Jayakumar T, Duann YF, et al. Chondroprotective

(下转第 217 页)