·基础研究·

低强度脉冲超声波对兔膝骨性关节炎软骨整合素-FAK-MAPKs信号通路蛋白表达的影响*

沈士浩'程凯'林强'夏鹏'高明霞'任莎莎'李雪萍1.2

摘要

目的:观察低强度脉冲超声波(low-intensity pulsed ultrasound ,LIPUS)对兔膝骨性关节炎(osteoarthritis ,OA)软骨中整合素-FAK-MAPKs力化学细胞信号转导通路相关蛋白表达的影响。

方法:18只成年新西兰大白兔随机平均分成3组,分为正常对照组(normal control,NC),OA模型组(OA group,OA),OA模型照射组(O+L)。OA组接受右侧后肢前交叉韧带切断(ACLT)处理术后4周接受LIPUS假辐射,O+L组同样手术处理,术后4周接受LIPUS辐射,NC组仅切开关节囊。LIPUS作用6周后,处死实验动物,取右后肢,采用HE染色行改良Mankin评分比较各组胫骨平台关节表面病理学改变。同时,采用Western blot技术检测Ⅱ型胶原,MMP-13,整合素β1的蛋白表达水平以及FAK、MAPKs家族蛋白(p38、ERK1/2、JNK)磷酸化水平。

结果:①组织学观察及Mankin 评分:LIPUS 干预后,OA软骨表层轻微不平整,染色轻度缺失,可见软骨细胞增殖; Mankin 评分,NC组:4.67±0.57;OA组:10.57±2.55;O+L组:7.66±1.74。与NC组相比,OA组、O+L组Mankin 评分明 显增高,但OA组增高更为明显(P<0.05);与OA组相比,O+L组Mankin 评分明显降低(P<0.05)。②Ⅱ型胶原、 MMP-13含量:LIPUS 干预后,II型胶原含量较NC组升高,MMP-13含量有明显下降。③整合素β1-FAK-MAPKs信 号通路相关蛋白表达:LIPUS 干预使整合素β1、磷酸化FAK表达增高;同时MAPKs信号通路相关蛋白ERK1/2、p38 磷酸化水平明显下降,而JNK磷酸化水平无明显变化。

结论:LIPUS 可以减轻骨性关节炎软骨 ECM 损伤程度,与LIPUS 产生机械应力使关节软骨中细胞表面应力受体之 一整合素β1 及其下游分子黏着斑激酶 FAK 磷酸化表达增高,进一步下游的磷酸化p38,ERK1/2表达下调有关。LI-PUS 的机械效应可经力化学转导途径作用于OA关节软骨,为治疗骨性关节炎提供一种新的思路。 关键词 低强度脉冲超声波;骨性关节炎;整合素;粘着斑激酶;丝裂原活化蛋白激酶

中图分类号:R684 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2016)-02-0160-07

Effects of low-intensity pulsed ultrasound on integrin-FAK-MAPKs mechanochemical transduction pathway in rabbit knee osteoarthritis cartilage/SHEN Shihao, CHENG Kai, LIN Qiang, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2016,31(2): 160–166

Abstract

Objective: To observe the effect of low-intensity pulsed ultrasound(LIPUS) on integrin-FAK-MAPKs mechanochemical transduction pathway related protein expression in rabbit knee osteoarthritis cartilage.

Method: Eighteen 2—2.5kg New Zealand rabbits were chosen and randomly divided into three groups, including normal control group(NC), OA model group(OA) and OA model plus LIPUS group(O+L). Twelve of these rabbits underwent anterior cruciate ligament transaction(ACLT) at the right hind limbs, the rest were taken fake operation. Six of operated rabbits, O+L group, were exposed to LIPUS radiation four weeks after OA models established. The other six operated rabbits, OA group, were exposed to fake LIPUS radiation. The rest of rab-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2016.02.007

^{*}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; 2 通讯作者

作者简介:沈士浩,男,硕士研究生; 收稿日期:2014-01-03

bits acted as normal control. After six weeks LIPUS radiation, the rabbits were sacrificed and pathological changes of articular surface of femoral condyle were assessed by Mankin Scores. Also, protein expressions of collagen type II, MMP-13, integrinβ1, FAK, ERK1/2, JNK, p38, p-FAK, p-ERK1/2, p-JNK, p-p38 were measured with Western blot analysis.

Result: ①collagen type II: Compared with NC group, the expression of collagen type II was significantly lower in OA and O+L group, with more significant decrease in OA group(P<0.05); Compared with OA group, collagen type II expression was significantly higher in O+L group(P<0.05). ② MMP-13: Compared with NC group, the expression of MMP-13 was significantly higher in OA and O+L group, with more significant increase in OA group(P<0.05); Compared with OA group, MMP-13 expression was significantly lower in O+L group(P<0.05). ③ integrin β 1 and p-FAK: Compared with NC group, the expressions of integrin β 1 and phosphorylated FAK were significantly higher in OA and O+L group, with more significant increase in O+L group (P<0.05). Compared with OA group, expressions of integrin β 1 and phosphorylated FAK were significantly higher in OA and O+L group, with more significant increase in O+L group (P<0.05). Compared with OA group, expressions of integrin β 1 and phosphorylated FAK were significantly higher in O+L group (P<0.05). ④ p-ERK1/2 and p-p38: Compared with NC group, the ratio of p-ERK/ERK, p-p38/ p-38 were significantly higher in OA group and O+L group (P<0.05). Compared with OA group, expressions of these two ratios decreased significantly in O+L group (P<0.05). ③ p-JNK: Compared with OA group, the ratio of p-JNK was significantly higher in OA group and O+L group (P<0.05). Compared with OA group, there was no significant p-JNK expression change in O+L group (P<0.05).

Conclusion: LIPUS inhibits the ECM degradation in rabbit knee osteoarthritis cartilage by activating integrin-FAK-MAPKs mechanochemical transduction pathway. Integrinß1, as one of the stress receptors on the surface of chondrocytes, was activated by mechanical loading produced by LIPUS and induced the phosphorylation of FAK and MAPKs. The results show that LIPUS might repair the ECM of OA via integrin-FAK-MAPKs mechanochemical transduction pathway, providing a new possibility for OA treatment.

Author's address Department of Rehabilitation Medicine, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing, 210006

Key word low-intensity pulsed ultrasound; osteoarthritis; integrin; focal adhesion kinase; mitogen-activated protein kinases

骨性关节炎(osteoarthritis,OA)作为常见的一 种多因素致病关节退变性疾病,以不可逆的关节软 骨破坏为主要特点。关节软骨是由大量富含蛋白多 糖和胶原蛋白,其中Ⅱ型胶原(collagen type II)占 90%的细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)和少 量软骨细胞构成^{III}。ECM 被金属蛋白酶家族(matrixmetalloproteinase, MMPs。其中最重要的酶为 MMP-13^[2])水解后产生的蛋白聚糖和Ⅱ型胶原片 段,在多项体内外研究中发现,且这种ECM的流失 不可逆性,成为关节软骨降解的关键一步^[3]。OA的 原因目前仍不清楚,涉及机械应力、生物化学、分子 水平改变等相关因素。适度的机械应力负荷刺激能 够加速软骨细胞分化、增殖,促进ECM的合成代谢 活动,维持关节软骨的完整性14。机械应力刺激作 为一种力学信号能够引起细胞内一系列特异的信号 分子及其相应的下游信号通路改变,称之为力化学 转导。

整合素(integrin β1)是细胞表面的应力受体之 一,是由不同α和β亚基构成的异二聚体糖蛋白^[5]。 整合素位于细胞骨架和ECM之间,适合作为机械应 力接受器,能够使细胞感受机械应力刺激,在ECM 中产生生化水平的改变,建立细胞内外的信号通路 反应^[6]。成年正常软骨的软骨细胞中主要表达整合 素亚单位α5β1,而软骨细胞膜上主要表达整合素亚 基β1,作为软骨细胞主要的机械应力接受器,适当 的力学刺激可促进软骨的形成、塑形及软骨细胞分 化、成熟、ECM合成^[4]。

黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)是整 合素信号转导通路的关键黏附分子,能够被整合素 激活。磷酸化的FAK可以继续与多种下游分子结 合,使其磷酸化,激活下游通路⁽⁷⁾。其中激活的一条 信号通路为丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)信号通路¹⁸,包括其一系列终末家族蛋白激酶:丝裂原活化蛋白激酶p38 (mitogen activated protein kinase38, p38)、细胞外 信号调节蛋白激酶1/2(extracellular-signal regulated protein kinases, ERK1/2)、C6N末端激酶(C-Jun N-terminal Kinase, JNK)^[9]。磷酸化的ERKs、JNKs、 p38蛋白激酶,在调控软骨细胞分泌MMPs中起关 键作用,从而影响ECM的代谢,导致关节软骨的损 伤^[10-11]。

低强度脉冲超声波(low-intensity pulsed ultrasound, LIPUS)以机械波的形式能对作用的组织产 生一定的机械应力刺激^[12]。LIPUS作为一种应力刺 激的方式,能够激活成骨细胞,促进骨形成和增加骨 强度,可用于临床加快骨折愈合,但在临床上用于软 骨修复仍受到限制^[13]。研究发现,LIPUS可以增加 软骨细胞的增殖、II型胶原蛋白的表达和合成,促进 软骨形成^[14—15];还可通过软骨ECM,能够使软骨细 胞接受到来自细胞外的机械应力信号,激活软骨细 胞,促进ECM合成^[16]。但是,LIPUS作为一种机械 力学刺激,如何通过力化学信号转导通路起到一定 的软骨保护作用的具体机制仍不清楚。

本研究中,我们通过采用ACLT法建立兔膝OA 模型,通过组织学和分子生物学相结合的方法观察 LIPUS作为一种机械应力刺激的形式,对整合素β1、 FAK磷酸化,以及下游MAPKs信号通路家族蛋白 激酶 p-ERK1/2、p-JNK、p-p38的表达影响,通过 Mankin评分法、II型胶原、MMP-13等指标评价LI-PUS对兔膝OA模型关节软骨修复的作用,了解可 能的软骨保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物及材料

1.1.1 实验动物:新西兰大白兔18只,体重2.5— 3.0kg,雌雄不限,普通级,身体健康,均采购自青龙 山动物饲养中心。所有动物均饲养于南京医科大学 附属南京医院(南京市第一医院)动物实验中心,24h 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NIH公布的实验动物使用指南,并经南 京医科大学附属南京医院(南京市第一医院)伦理委 员会审核批准。 **1.1.2** 主要器材及试剂:LIPUS 仪(Osteoarthritis Ⅲ,日本株式会社),Western 电泳仪(Bio-Rad,美国, 型号: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, 型号:65421);全蛋白提取试剂盒(凯基生物有限公 司),ECL 化学发光试剂盒(凯基生物有限公司, KGP1123), DAB试剂盒(福州迈新生物科技有限公 司),苏木精-伊红染色液(福州迈新生物科技有限公 司),Ⅱ型胶原抗体(Acris公司),MMP-13 抗体 (Thermo Scientific公司),整合素的抗体(Abcam公 司), FAK 抗体(Abcam 公司), 磷酸化 FAK 抗体 (Cell Signaling Technology 公司), ERK1/2 抗体 (Abcam 公司),磷酸化 ERK1/2 抗体(Santa cruz 公 司),JNK抗体(Abcam公司),磷酸化JNK抗体(Abcam公司),p38抗体(Abcam公司),磷酸化p38抗体 (SantaCruz公司)。

1.2 实验分组

将兔随机编号为1—18号,随机分成3组,每组 6只,分别为正常对照组(normal control,NC),OA 模型组(OA),OA模型照射组(O+L)。NC组仅切开 关节囊,作为对照,OA组接受右侧后肢前交叉韧带 切断(anterior cruciate ligament transection,ACLT) 处理术后4周接受LIPUS假辐射^[17-18],O+L组同样 手术处理,术后4周接受LIPUS辐射。

1.3 方法

1.3.1 OA动物造模:采用ACLT法制作兔OA动物 模型,月龄为2月、体重2—2.5kg的新西兰兔,统一 选择兔右后膝为手术关节,麻醉后沿膝关节内侧切 开皮肤,逐层分离皮下筋膜、肌肉,切开关节囊,找到 并剪断前交叉韧带,予抽屉试验确认完全断裂后,彻 底止血,生理盐水冲洗关节腔,逐层缝合关节囊、筋 膜、皮肤。对照组仅切开关节囊。术后肌肉注射青 霉素 20万U,2次/d,共3天。3天后每日笼外放养 lh,使其术侧膝关节主动屈伸。OA模型于术后4周 建立。

1.3.2 LIPUS 干预:应用HT2009 -1型LIPUS 仪(日本,伊藤公司), FREE 模式,通断比 20%,频率为 3MHz,辐射强度为 40 mW/cm², 20min/次,每天 1 次,6d/周,持续 6周¹¹⁹。其中,O+L 组于术后 4 周起

接受LIPUS治疗;OA组LIPUS治疗方案与治疗组相同,但无超声输出;NC组不进行治疗干预。

采用固定法进行治疗干预。固定实验动物于兔板,先将兔右膝关节外侧脱毛,注意保持关节表面皮肤完整,均匀涂上厚约1mm的超声耦合剂,使探头与膝关节照射部位皮肤紧密结合。

1.3.3 取材:治疗6周后,分别在无菌条件下取各组 实验兔右侧膝关节,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。

1.3.4 组织病理学观察:将各组实验兔取下的胫骨 平台软骨标本用5%的甲醛固定,10%乙烯二胺四乙 酸钠(EDTA)缓慢脱钙3周,脱钙完成后,在髁间嵴 处矢状位切开取材,常规酒精脱水、浸蜡、火棉胶石 蜡双重包埋和切片(厚度4µm),行常规HE染色后 准备阅片。所有切片均在同一批完成,以控制操作 中的差别。

将切片进行显微镜下的病理学观察,内容包括 软骨表面、HE染色程度、裂隙的形成等等;并采用改 良 Mankin 评分法评价^[20],包括纤维化、细胞基质分 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。

1.3.5 免疫印迹技术:采用Western blot 检测Ⅱ型 胶原,MMP-13,整合素β1、FAK、p-FAK、p38、p-p38、 ERK1/2、p-ERK1/2、JNK、p-JNK的蛋白表达水平。 取股骨髁关节面软骨约50g,液氮研磨至粉末状,加 裂解液 500µl,待裂解完全,10000r/min,4℃离心 5min,抽取10ul上清液并检测蛋白浓度,其余上清 液加入上样缓冲液煮沸变性,于-80℃保存。取蛋白 总量为20—25µg样品采用SDS-PAGE电泳,浓缩胶 恒压80V电泳,分离胶恒压100V。电泳结束,采用 Bio-Rad Mini湿式转移电泳槽以恒流 200mA 转膜 2h。PVDF 膜在 5%的脱脂牛奶, 恒温 37℃中封闭 2h;分别加 II 型胶原, MMP-13, 整合素β1, FAK, p-FAK,p38、p-p38、ERK1/2、p-ERK1/2、JNK、p-JNK抗 体(1:500稀释),4℃孵育过夜;PBST漂洗滤膜4次, 每次5min;加辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5000 稀释), 37℃ 孵育 2h, PBST 漂洗滤膜 4次, 每次 5min;按0.1ml/cm²显影液计算用量,将显影液加于 PVDF 膜上,室温放置1min。用保鲜膜将膜包好(尽量避免气泡)。暗室中迅速将膜蛋白贴在X 光胶 片上曝光,洗片机中显影、洗像。调整曝光时间,直 至出现最佳条带,然后采用Image too 3.0图像分析 软件进行灰度分析。

1.4 统计学分析

采用 SPSS18.0 统计软件进行分析。数据用均数±标准差表示,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, P<0.05 表示差异显著。

2 结果

2.1 LIPUS对兔膝OA关节软骨的组织学影响

LIPUS 干预6周,光镜下观察并比较各组间软 骨HE染色变化比较(放大200倍)。NC组软骨HE 染色见关节软骨表层规则、平整,细胞外基质染色均 匀,软骨细胞排列平整,分布均匀。OA组见关节软 骨表层略不平整、欠规则,染色轻、中度缺失,细胞排 列紊乱,数量减少。在O+L组,见表层轻微不平整, 染色轻度缺失,可见软骨细胞增殖。见图1。

Mankin 评分: NC组: 4.67±0.57; OA组: 10.57± 2.55; O+L组: 7.66±1.74。与NC组相比, OA组、O+L 组 Mankin 评分明显增高, 但OA组增高更为明显 (*P*<0.05); 与OA组相比, O+L组 Mankin 评分明显 降低(*P*<0.05)。

2.2 Western blot检测兔膝OA关节软骨II型胶原、 MMP-13、整合素β1、FAK及其磷酸化水平的蛋白表 达

II型胶原:与NC组相比,OA组、O+L组II型胶 原含量均有降低,但OA组下降更为明显(P<0.05); 与OA组相比,O+L组显著增高(P<0.05)。MMP-13:与NC组相比,OA组、O+L组MMP-13含量明显 增多,但OA组增多更为明显(P<0.05);与OA组相 比,O+L组显著降低(P<0.05)。整合素β1、磷酸化 FAK含量:与NC相比,OA组整合素β1、磷酸化FAK 含量增多,但O+L组增多更明显(P<0.05);与OA组 相比,O+L组显著增高(P<0.05),见表1。

2.3 Western blot 检测兔膝 OA 关节软骨 ERK1/2、 JNK、p38 及其磷酸化水平的蛋白表达

ERK1/2、p38磷酸化水平:与NC组相比,OA 组、O+L组ERK1/2、p38磷酸化水平明显增高,OA

组增多更为明显(P<0.05);与OA组相比,O+L组下降更为明显(P<0.05)。JNK磷酸化水平:与NC组相比,OA组、O+L组JNK磷酸化水平明显增高(P<0.05);与OA组相比,O+L组JNK磷酸化水平无明显差异(P>0.05),见表2。

图1 L	IPUS 对兔膝 OA 关† 组织学影响	5软骨的 (HE染色,×100)
NC	OA	OfL

正常对照组(NC组):关节软骨表层规则、平整,细胞外基质染色均匀,软骨细胞排列平整,分布均匀;OA模型组(OA组):关节软骨表层略不平整、欠规则,染色轻、中度缺失,细胞排列紊乱,数量减少;OA模型照射组(O+L组):关节软骨表层轻微不平整,染色轻度缺失,可见软骨细胞增殖。

表1	各组关节软骨中结果II型胶原、MMP-13、			
	整合素βı、磷酸化FAK含量比较	$(\overline{x}\pm s, n=6)$		

	NC组	OA组	O+L组	
Ⅱ型胶原	0.739±0.032	0.457±0.055	0.631±0.051	
MMP-13	0.471±0.091	0.853±0.031	0.713±0.041	
整合素β1	0.270 ± 0.056	0.532±0.057	0.703±0.061	
磷酸化FAK	0.167±0.035	0.331±0.026	0.517±0.035	

NC组:正常对照组;OA组:OA模型组;O+L组:OA模型照射组

表 2 各组关节软骨中结果磷酸化 ERK1/2、JNK、p38 含量比较 (x±s, n=6)

	NC组	OA组	O+L组	
p-ERK1/2	0.494 ± 0.045	0.841±0.066	0.718±0.093	
p-JNK	0.432 ± 0.046	0.750 ± 0.046	0.747±0.059	
p-p38	0.498 ± 0.031	0.801 ± 0.037	0.667 ± 0.074	
NC组,正党对昭组,OA组,OA 植刑组,O+I组,OA 植刑昭尉组				

NC组:止吊对照组;OA组:OA 模型组;O+L组:OA 模型照射

3 讨论

本研究的目的在于比较兔膝正常与OA软骨, 经LIPUS干预后,组织病理学改变及整合素-FAK-MAPK力化学信号转导通路相关蛋白表达以及磷 酸化水平变化,分析LIPUS干预对于上述分子蛋白 的表达影响作用,了解LIPUS可能的软骨保护机 制。

本实验以ACLT法^[21]建立兔膝OA动物模型, LIPUS照射6周后,行组织病理学及Western blot检 测。ACLT法建立OA动模型一般需要4—6周,在 前交叉韧带切断后出现不同程度软骨细胞减少,细 胞外基质降解,纤维化等软骨损伤特征,且随术后时 间增加逐渐加重,能够全面反映OA软骨退行性变化的病理过程^[22–23]。本实验各组关节软骨组织学结果显示:OA组关节软骨表面不规则、欠平整,HE染色轻、中度减轻,软骨细胞排列紊乱、数量减少,与NC组相比,Mankin评分显著升高(P<0.01)。

Western Blot结果亦显示:与NC组相比,OA组 II型胶原含量减少;对于MMP-13,与NC组相比, OA组含量明显增加。II型胶原作为软骨细胞外基 质一种主要成分,能够维持关节软骨的完整性^[24],金 属蛋白酶类,如MMP-13^[2]等炎性因子过度水解软骨 细胞外基质成分是骨性关节炎的主要病理改变,使 软骨发生破坏和缺损^[1,3,25-26]。以上实验结果证明本 研究采用ACLT法造模OA成功,符合实验需要。

给予各实验组软骨频率 3MHz,强度 40mW/ cm2的LIPUS每天干预 20min,持续6周,结果显示: O+L组较OA组可见软骨表层轻微不平整,软骨细 胞增殖等软骨保护特征,且II型胶原表达量增加, MMP-13表达量下降。提示LIPUS具有明显的软骨 保护作用,本实验中LIPUS早期的软骨保护、延缓 软骨退变进程作用与前人的研究结果相符^[27-28]。

通过Western blot检测结果,我们还发现OA组 中整合素β1的表达量及FAK、ERK1/2、JNK、p38的 磷酸化水平较NC组软骨均有明显增高,提示整合 素-FAK-MAPKs信号通路蛋白表达变化与OA关节 软骨的病理改变密切相关。整合素β1作为软骨细 胞膜上主要表达的整合素亚单位[29],在关节软骨力 化学学信号转导通路中具有重要的作用,参与调控 软骨细胞的增殖、分化、伸展与迁移等,起到软骨保 护作用^[30-31]。FAK是整合素力学信号转导途径中的 的关键介导分子,磷酸化FAK对于调节软骨细胞增 殖,分化,促进Ⅱ型胶原表达,起着重要作用¹²¹。磷 酸化FAK可进一步启动整合素下游多个信号转导 通路,其中之一为MAPKs信号通路,主要包括 ERK1/2、JNK和p38^[33]。MAPKs信号通路与软骨基 质合成及软骨稳定有关[34-35],其信号通路的改变会 导致软骨功能紊乱,可能参与OA的病理机制,促进 疾病进程^[36]。ERK1/2、p38与软骨骨化,软骨细胞的 肥大、钙化、凋亡有关四,广泛参与关节软骨退行性 变的信号转导,对软骨ECM起负性调节作用^[38]。

LIPUS 进行干预后 Western blot 检测结果还发

现,O+L组整合素β1的表达量以及FAK磷酸化水平 较OA组软骨有更明显增加,同时能降低ERK1/2、 p38磷酸化水平。先前关于LIPUS对软骨修复及再 生的研究通过可靠的Ki67增殖指数标记,软骨细胞 经过LIPUS干预后确有增长,提供了LIPUS修复软 骨的可能^[13]。此外,LIPUS可促进整合素β1的表达, 诱导FAK磷酸化,并激活ERK1/2,p38信号转导通 路,促进II型胶原的合成^[39-40]。本研究结果表明LI-PUS对于OA软骨有同样的保护作用,可减少OA软 骨中II型胶原的降解,该作用可能与激活整合素-FAK-MAPKs信号通路相关,抑制炎症因子MMP-13 的表达来产生。

本次研究从整体水平观察LIPUS 干预对兔膝 OA软骨的作用及对整合素-FAK-MAPKs信号通路 的影响,但由于该研究没有应用相关抑制剂,不能直 接证明LIPUS 对于软骨的作用是通过该通路完成 的。本次研究选用了兔膝OA软骨,关于LIPUS 对 于人OA软骨是否有同样的作用目前无法证实。

本研究发现兔膝 OA 软骨中整合素-FAK-MAPKs力化学信号通路明显被激活,同时伴有II型 胶原的下降以及MMP-13的升高,提示该通路的激 活可对OA软骨ECM产生影响,表明该通路在OA 病理进程中发挥重要作用。应用LIPUS干预OA软 骨后可明显减少Ⅱ型胶原的降解以及抑制 MMP-13 的升高,同时还发现整合素-FAK-MAPKs力化学信 号通路明显被激活,提示LIPUS作为一种机械应力 波,在OA发生时可能以软骨细胞表面机械应力受 体整合素B1为介导,激活该通路对OA软骨产生一 定的保护作用。与过去的研究不同,我们将OA对 软骨 ECM 的影响与整合素-FAK-MAPKs 信号通路 整体联系在一起,分析了LIPUS对于OA软骨的作 用,不仅证实了LIPUS对于OA软骨有一定的保护 作用,也提示了该保护作用与整合素-FAK-MAPKs 力化学信号通路密切相关。目前LIPUS用于治疗 OA在临床中尚未广泛开展,该研究将为LIPUS广 泛应用于临床治疗提供有利的理论依据。

4 结论

LIPUS能够减少关节软骨 ECM 的降解,起到 一定的软骨保护作用,其作用机制可能与激活整合

素-FAK-MAPKs力化学信号通路密切相关。

参考文献

- Goldring SR, Goldring MB. Clinical aspects, pathology and pathophysiology of osteoarthritis[J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2006, 6(4): 376–378.
- [2] 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.
- [3] Karsdal MA,Madsen SH,Christiansen C, et al. Cartilage degradation is fully reversible in the presence of aggrecanase but not matrix metalloproteinase activity[J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10(3): R63.
- [4] Liu J,Sekiya I,Asai K, et al. Biosynthetic response of cultured articular chondrocytes to mechanical vibration[J]. Res Exp Med (Berl), 2001, 200(3): 183—193.
- [5] Jean C,Gravelle P,Fournie JJ, et al. Influence of stress on extracellular matrix and integrin biology[J]. Oncogene, 2011, 30(24): 2697–2706.
- [6] Ramage L, Nuki G,Salter DM. Signalling cascades in mechanotransduction: cell-matrix interactions and mechanical loading[J]. Scand J Med Sci Sports, 2009, 19(4): 457–469.
- [7] Shahrara S,Castro-Rueda HP,Haines GK, et al. Differential expression of the FAK family kinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovial tissues[J]. Arthritis Res Ther, 2007. 9(5): R112.
- [8] 高明霞,程凯,林强,等.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[J].中国康 复医学杂志,2013,28(07):593—599..
- [9] Ding L, Guo D, Homandberg GA. The cartilage chondrolytic mechanism of fibronectin fragments involves MAP kinases: comparison of three fragments and native fibronectin[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2008, 16(10): 1253–1262.
- [10] Stanton LA, Beier F. Inhibition of p38 MAPK signaling in chondrocyte cultures results in enhanced osteogenic differentiation of perichondral cells[J]. Exp Cell Res, 2007, 313 (1): 146—155.
- [11] Sondergaard BC,Scultz 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]. Osteo-arthritis Cartilage, 2010, 18(3): 279–288.
- [12] Li YP,Zhou SX,Andreas S, et al. Effect of LIPUS on the cellular behavior of human primary macrophages[J]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 2007,23(12): 1113-1116.
- [13] 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.

- [14] Tang CH,Yang RS,Huang TH,et al. Ultrasound stimulates cyclooxygenase-2 expression and increases bone formation through integrin, focal adhesion kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt pathway in osteoblasts[J]. Mol Pharmacol, 2006, 69(6): 2047–2057.
- [15] Huang MH,Ding HJ,Chai CY, et al. Effects of sonication on articular cartilage in experimental osteoarthritis[J]. J Rheumatol, 1997, 24(10): 1978–1984.
- [16] 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.
- [17] Marshall KW, Chan AD. Arthroscopic anterior cruciate ligament transection induces canine osteoarthritis[J]. J Rheumatol, 1996,23(2): 338—343.
- [18] Johnson RG. Transection of the canine anterior cruciate ligament: a concise review of experience with this model of degenerative joint disease[J]. Exp Pathol, 1986, 30(4): 209– 213.
- [19] 安恒远. 低强度脉冲超声波对体外培养兔软骨细胞 MMP-13 与Ⅱ型胶原的影响[J]. 南京医科大学,2011: 64.
- [20] 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.
- [21] Stoop R,Buma P,van der Kraan PM, et al. Type II collagen degradation in articular cartilage fibrillation after anterior cruciate ligament transection in rats[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2001, 9(4): 308–315.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] Pearle AD, Warren RF, Rodeo SA, Basic science of articular cartilage and osteoarthritis[J]. Clin Sports Med, 2005,24(1): 1-12.
- [25] Mitchell PG,Magna HA,Reeves LM, et al. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage[J]. J Clin Invest, 1996, 97(3): 761–768.
- [26] Korstjens CM,van der Rijt RH, et al. Low-intensity pulsed ultrasound affects human articular chondrocytes in vitro[J]. Med Biol Eng Comput, 2008, 46(12): 1263—1270.
- [27] 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.

- [28] 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.
- [29] Humphries MJ. Integrin structure[J]. Biochem Soc Trans, 2000, 28(4): 311–339.
- [30] Zemmyo M,Meharra EJ,Kuhn K, et al. Accelerated, agingdependent development of osteoarthritis in alpha1 integrindeficient mice[J]. Arthritis Rheum, 2003, 48(10): 2873— 2880.
- [31] Loeser RF,Sadiev S,Tan L, et al. Integrin expression by primary and immortalized human chondrocytes: evidence of a differential role for alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins in mediating chondrocyte adhesion to types II and VI collagen[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2000, 8(2): 96—105.
- [32] Kim YH,Lee JW. Targeting of focal adhesion kinase by small interfering RNAs reduces chondrocyte redifferentiation capacity in alginate beads culture with type II collagen [J]. J Cell Physiol, 2009, 218(3): 623–630.
- [33] Stanton LA, Underhill TM,Beier F. MAP kinases in chondrocyte differentiation[J]. Dev Biol, 2003, 263(2): 165–175.
- [34] Zhen X,Wei L,Wu Q, et al. Mitogen-activated protein kinase p38 mediates regulation of chondrocyte differentiation by parathyroid hormone[J]. J Biol Chem, 2001,276(7): 4879–4885.
- [35] Watanabe H,de Caestecker MP,Yamada Y. Transcriptional cross-talk between Smad, ERK1/2, and p38 mitogen-activated protein kinase pathways regulates transforming growth factor-beta-induced aggrecan gene expression in chondrogenic ATDC5 cells[J]. J Biol Chem, 2001, 276(17): 14466— 14473.
- [36] Loeser RF, Erickson EA,Long DL. Mitogen-activated protein kinases as therapeutic targets in osteoarthritis[J]. Curr Opin Rheumatol, 2008, 20(5): 581—586.
- [37] Stanton LA, Beier F, Inhibition of p38 MAPK signaling in chondrocyte cultures results in enhanced osteogenic differentiation of perichondral cells[J]. Exp Cell Res, 2007, 313 (1): 146—155.
- [38] Yin W, Park JI,Loeser RF. Oxidative stress inhibits insulinlike 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.
- [39] Whitney NP,Lamb AC,Louw TM, et al. Integrin-mediated mechanotransduction pathway of low-intensity continuous ultrasound in human chondrocytes[J]. Ultrasound Med Biol, 2012, 38(10): 1734–1743.
- [40] Ren L,Yang Z,Song J, et al. Involvement of p38 MAPK pathway in low intensity pulsed ultrasound induced osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells[J]. Ultrasonics, 2013, 53(3):686–690.