

• 基础研究 •

膝关节骨关节炎发病过程中 HSP70 对软骨细胞凋亡的影响

徐守宇^{1,2}, 姚新苗¹, 翟云¹, 潘文胜³, 方针¹, 何帮剑¹, 许晶虹³

(1. 浙江中医药大学附属第三医院康复科, 浙江 杭州 310005; 2. 日本顺天堂大学医学部, 日本 东京 113-8421; 3. 浙江大学医学院附属第二医院病理科, 浙江 杭州 310009)

【摘要】 目的: 观察热休克蛋白 70(HSP70)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 蛋白 (caspase-3)在膝关节骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA)发病过程中的表达, 探讨其相关性。方法: 40 只 3 月龄 SD 大鼠分为两组, 实验组 30 只, 对照组 10 只。实验组采用 Hulth 法复制膝骨性关节炎模型, 作前交叉韧带切断加内侧 1/3 半月板切除术, 对照组不作特殊处理。造模后, 不采取任何措施, 自由饲养。分别在术后 1、2、4 周取材股骨端和胫骨端关节, 对本组组织进行肉眼、免疫组化及光镜观察, 采用 Mankin 改良的关节软骨病理评分标准进行组织学评分。结果: 肉眼及光镜观察, 实验组均可见 KOA 的改变, 如滑膜增生、表层软骨糜烂等; 同时, 免疫组化中, 术后 1、2、4 周 HSP70 的表达逐渐增加, caspase-3 的表达先增加后降低, 而对照组并无类似改变。Mankin 评分显示 1 周分别和 2、4 周比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论: 膝关节骨关节炎发病过程中, 热休克蛋白抑制软骨细胞凋亡, 并对软骨细胞具有保护作用, 这将为临床上诸保守治疗提供一定程度的客观科学依据。

【关键词】 骨关节炎, 膝; 热休克蛋白 70; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3; 软骨细胞; 细胞凋亡

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2012.10.015

Effect of HSP70 on apoptotic of cartilage cells in knee osteoarthritis XU Shou-yu*, YAO Xin-miao, ZHAI Yun, PAN Wen-sheng, FANG Zhen, HE Bang-jian, XU Jing-hong. *Department of Rehabilitation, the 3rd Hospital Affiliated to Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310005, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To investigate the expression and relationship between HSP70 and caspase-3 in knee osteoarthritis. **Methods:** Forty adult SD rats were divided into experimental group and control group. Thirty rats in experimental group, anterior cruciate ligament transaction (ACLT) was cut off and partial meniscectomy of 1/3 inside incision were performed to reproduce knee osteoarthritis (KOA) model according to Hulth methos, and the other 10 rats was treated with nothing as control group. The rats were sent to the cage and free to move. At 1, 2 and 4 weeks later, the arthritis cartilage of femoral and tibial end were observed through immunohistochemistry staining and light microscope. Meanwhile, Mankin scale system was adopted for histomorphology evaluation. **Results:** Changes of KOA such as hyperplastic synovium, erosion on the surface of cartilage and so on were found in experiment group, the expression of HSP70 was augmentation all the time, but the expression of caspase-3 was reduction 1 week later; no similar changes were found in control group. Mankin scale system showed that there were significant differences in the first week as compared with the second week and 4th week (both $P < 0.01$). **Conclusion:** Heat shock protein inhibit the apoptosis of cartilage cells and protect the cartilage cells in knee osteoarthritis, the conservative treatment for clinical provide objective scientific basis.

KEYWORDS Osteoarthritis, knee; Heat-shock proteins 70; Caspase-3; Chondrocytes; Apoptosis

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2012, 25(10):847-851 www.zggszz.com

膝关节骨性关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是在活动关节上发生的一种慢性、进行性疾病, 以关节基质崩解、软骨细胞的明显减少为主要特征。但由于

其发病机制复杂, 具有遗传倾向^[1], 病变涉及到滑膜、软骨及软骨下骨质各部位等复杂性, 研究工作曾一度陷入困境。近年临床上的一个世界性新动向是重新审视保守治疗 (包括运动康复疗法, 物理温热疗法以及我国的针灸推拿等) 的疗效和应用。由于保守治疗的疗效被重新肯定, 而且发现长期坚持保守治疗的患者能延缓或阻止软骨破坏的进程 (X 线片上关节间隙的保存或扩大), 其机制研究必将引起学者们的重视^[2]。如能解明可能存在的内源性软骨保护

基金项目: 1. 浙江省教育厅高校科研计划基金项目 (编号: Y200907379); 2. 浙江省“重中之重”学科建设经费资助课题 (浙教高科[2008]255 号)

Fund programs: Supported by Scientific Research Fund of Zhejiang Province Department of Education (No. Y200907379)

通信作者: 徐守宇 E-mail: overnightjo@msn.com

机制,则将为临床上诸保守治疗提供客观科学依据,并为此类疗法的改进提供客观的评判指标。还将为骨关节炎的深入基础研究提供新的亮点。

由于骨关节炎发病的各种相关刺激因素本身可能诱发内源性热休克蛋白 70(heat shock protein-70, Hsp70), 并且 KOA 软骨细胞的凋亡与 KOA 的病程进展密切相关^[3]。因此笔者假设 KOA 发病过程中本身存在内源性保护机制,也就是说 Hsp70 对 KOA 软骨细胞的凋亡可能有积极的调控(抑制)作用。但相关研究报道甚少,为此,本研究采用大鼠骨关节炎模型观测骨关节炎发病过程中热休克蛋白对软骨细胞凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器材料 兔抗 HSP70 抗体(产品编号:bs-0126R,博奥森公司产品),兔抗 caspase-3 抗体(产品编号:bs-2593R,博奥森公司产品),免疫组化试剂盒(产品编号:SP9001,Sigma 公司产品),HE 染色试剂盒(产品编号:C-0021,博奥森公司产品);多功能真彩色细胞 IPP(Image-Pro Plus)图像分析管理系统(美国 Media Cybernetics 公司)。

1.2 实验动物及分组 采用 3 月龄 SD 大鼠 40 只[上海西普尔—必凯实验动物有限公司委托浙江中医药大学动物实验中心饲养,使用许可证:SYXK(浙)2008-0115],体质量为 250 g 左右,雌雄各半,采用随机化数字表,根据大鼠体重的不同,由轻到重排列编号,分为对照组、实验 1 周组、2 周组及 4 周组,每组 10 只。

1.3 动物模型制作 采用 Hulth 法复制膝骨性关节炎模型^[4],将动物用橡皮筋固定后,戊巴比妥钠 3 g,100 ml 生理盐水配制成 3%的溶液。用右手拇指抓住大鼠两耳后颈部皮肤和尾巴,翻转掌心即可行腹腔注射。每 100 g 体重腹腔注射 0.15 ml。麻醉好后,用剃须刀片将手术区域及周围剃净,用湿纱布洗干净,碘伏消毒,常规铺巾,在靠近内侧切开皮肤及关节腔,将髌骨向后向外翻,并将膝关节处于最大的屈曲状态,暴露关节腔,用眼科剪分离内侧半月板,并将内侧 1/3 的半月板切除,同时剪断前交叉韧带。小心操作以防损伤软骨,对照组膝关节只切开皮肤和关节腔,作为假手术对照。生理盐水冲洗关节后,用细线缝合皮肤及关节囊,碘伏棉球擦洗伤口,并贴上注射用敷贴。术前、中、后均给青霉素 1/3 支肌肉注射,放入笼中饲养,任其自由活动,密切注意伤口感染以及其他的并发症。

1.4 组织取材和标本制备 实验组于 1、2、4 周后将大鼠处死,对照组于 4 周后将大鼠处死,观察膝关节有无关节积液和滑膜肿胀等滑膜炎表现及关节软

骨的变化。用骨刀将双侧大鼠膝关节离断,小心取出股骨端和胫骨端关节,磷酸盐缓冲液(PBS)洗,取小于 0.5 cm×0.5 cm×0.1 cm 组织块。4%多聚甲醛溶液中 4℃固定过夜,脱钙,移入梯度酒精脱水、透明、浸蜡、包埋。

1.5 HE 染色和番红 O(Safranin O)染色 严格按照染色步骤进行染色,封片后光镜下观察。

1.6 免疫组化染色 采用 S-P 法,步骤包括:①切片:将厚度 5 μm 的组织切片附于经多聚赖氨酸附膜的载玻片上,60℃过夜。②脱蜡、入水:将切片浸于二甲苯中 5 min×2 次、100%乙醇 5 min×2 次、95%乙醇 5 min×2 次、90%乙醇 5 min×2 次、85%乙醇 5 min×2 次、75%乙醇 5 min×2 次、自来水冲洗、PBS 洗 2 次。③1%甲醇双氧水,室温 10 min,蒸馏水洗 1 次,0.1 mol PBS 洗 5 min×3 次。④切片上滴加抗原修复液,室温 10 min,0.1 mol PBS 洗 5 min×3 次。⑤切片上滴加正常山羊血清封闭液,室温 20 min。甩去多余液体,不洗。⑥切片上滴加第一抗体,4℃过夜,0.1 mol PBS 洗 5 min×3 次。⑦切片上滴加生物素化第二抗体(IgG),37℃ 20 min,0.1 mol PBS 洗 5 min×3 次。⑧切片上滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液(S-A/HRP),37℃ 20 min,0.1 mol PBS 洗 5 min×3 次。⑨DAB 显色:使用 DAB 显色试剂盒 1 ml 蒸馏水加显色剂 A、B、C 各 1 滴,混匀后加至标本上,显色 6 min,充分水洗。⑩苏木素复染细胞核 1 min,充分水洗、1%盐酸酒精分化、1%氨水反蓝、充分水洗、经 70%乙醇 5 min、80%乙醇 5 min、90%乙醇 5 min×2 次、95%乙醇 5 min×2 次、100%乙醇 5 min×2 次脱水、二甲苯透明 5 min×2 次、中性树脂封片。

1.7 观察指标与方法 常规 HE 染色、Safranin O 染色,通过光镜(×400)观察软骨表面是否规则、有无裂隙,细胞数量、分布、排列是否规则等。应用 Mankin 改良的关节软骨病理评分标准^[4]进行组织学评分。免疫组化染色,细胞胞浆内出现棕黄色颗粒者为阳性(HSP70 蛋白和 Caspase-3 蛋白的阳性信号主要位于细胞质中,高倍镜(×400)下可见细胞胞浆内出现棕黄色阳性染色颗粒,部分细胞核中也可见少量阳性细胞,但以蓝色的非阳性染色颗粒为主);切片在高倍镜(×400)视野下观察,采用 IPP(Image-Pro Plus)图像分析系统,测量 HSP70 和 caspase-3 的阳性反应细胞平均光密度值(average optical density, AOD)^[5]。

1.8 统计学分析 应用 SPSS17.0 版统计学软件包进行统计分析,数据用($\bar{x} \pm s$)表示。各组均数比较用单因素方差分析,组间两两比较使用 Student-Newman-Keuls(SNK-q)检验; $P < 0.05$ 表示差异有统计学

意义, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 骨关节炎大体病理学改变

对照组标本关节软骨表面正常, 平整。实验 1 周组标本可见关节软骨部分表层不平整, 以股骨内髌关节和胫骨负重部明显; 2 周组标本关节面失去原有光泽, 透亮度减低, 灰白, 但无溃疡、无裂纹; 4 周组标本可见关节滑膜充血增生, 关节液量增多, 关节软骨触之较硬, 表面无明显裂纹、溃疡及糜烂, 但颜色失去正常乳白色, 开始发黄, 股骨内髌软骨部分可见少量骨赘形成。

2.2 HE、Safranin O 染色检测

2.2.1 光镜观察 对照组标本

HE 染色可见关节面表层光滑、平整; Safranin O 染色正常(见图 1-2)。实验 1 周组标本 HE 染色见关节面表层基本光滑、平整, 软骨细胞分布大致均匀, 序列较整齐, 层次清楚, 无软骨细胞簇集, 潮线基本完整; Safranin O 染色基本正常(见图 3-4)。2 周组标本 HE 染色可见细胞排列规律性尚在, 偶见少量细胞簇集现象; Safranin O 染色轻度减少(见图 5-6)。4 周时标本组软骨中度损伤为主, 表面粗糙、伴有裂隙, 部分出现少许钙化层裂隙, 但软骨基质内无明显纤维化, 所有标本出现细胞数目的变化, 细胞散在增生和巢状增生, 细胞簇集出现的频率增加, 部分出现潮线不清晰和中断; Safranin O 染色中度至重度减少(见图 7-8)。

2.2.2 Mankin 改良的关节软骨病理评分

实验组关节软骨病变在造模后随时间呈进行性发展。Mankin 改良关节软骨病理评分显示实验 2 周组、4 周组分别和 1 周组比较, 差异均有统计学意义($P<0.01$)。实验 4 周组与对照组比较, 差异有统计学意义($P<0.01$)(见表 1)。

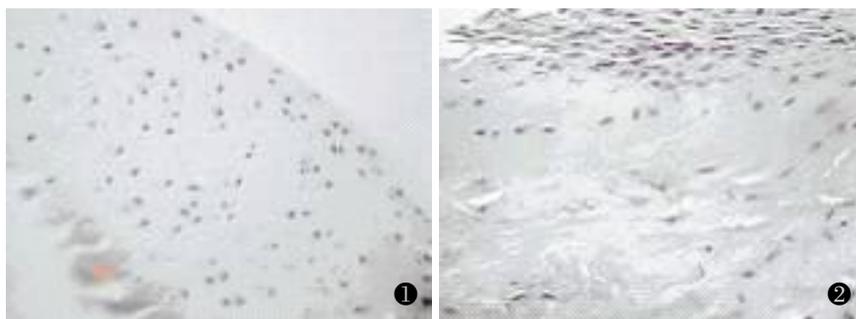


图 1 对照组软骨细胞, 关节面表层光滑 (HE, x400) 图 2 对照组软骨细胞, 染色正常 (Safranin O, x400)

Fig.1 Cartilage cells of control group, joint surface smooth (HE, x400) Fig.2 Cartilage cells of control group, dyeing normal (Safranin O, x400)

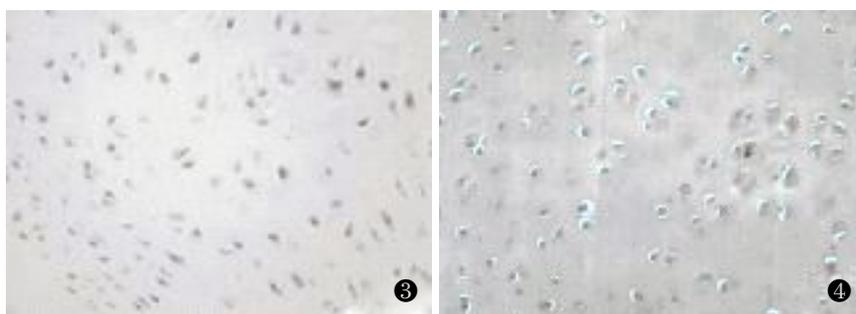


图 3 术后 1 周组软骨细胞, 关节面表层基本光滑 (HE, x400) 图 4 术后 1 周组软骨细胞, 染色基本正常 (Safranin O, x400)

Fig.3 Cartilage cells after 1 week, joint surface smooth (HE, x400) Fig.4 Cartilage cells after 1 week, dyeing normal (Safranin O, x400)

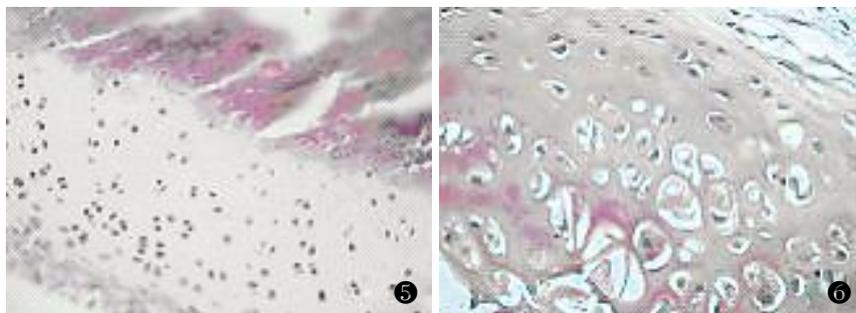


图 5 术后 2 周组软骨细胞, 细胞排列基本规律 (HE, x400) 图 6 术后 2 周组软骨细胞, 染色轻度减少 (Safranin O, x400)

Fig.5 Cartilage cells after 2 weeks, cells arranged in order (HE, x400) Fig.6 Cartilage cells after 2 weeks, dyeing reduce (Safranin O, x400)

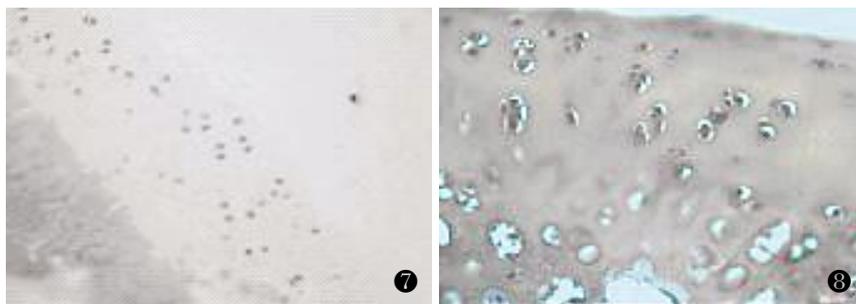


图 7 术后 4 周组软骨细胞, 中度损伤 (HE, x400) 图 8 术后 4 周组软骨细胞, 染色中度至重度减少 (Safranin O, x400)

Fig.7 Cartilage cells after 4 weeks, moderate damage (HE, x400) Fig.8 Cartilage cells after 4 weeks, dyeing reduce seriously (Safranin O, x400)

2.3 HSP70、caspase-3 免疫组化染色检测

2.3.1 光镜观察 对照组软骨细胞中未见明显的 HSP70 和 Caspase-3 阳性表达(图 9-10)。实验 1 周组可见两种蛋白的表达逐渐增多,但仅在软骨表层检出(见图 11-12)。2 周组 HSP70 阳性细胞增加明显,而 Caspase-3 表达数量达到高峰(见图 13-14)。4 周组 HSP70 阳性细胞数达到高峰,而 Caspase-3 表达数量减少,但 Caspase-3 阳性细胞数仍比对照组高;此时,HSP70 蛋白和 Caspase-3 蛋白在软骨深层也能检出(见图 15-16)。

2.3.2 阳性产物图像分析仪统计分析 实验组的 HSP70 阳性细胞胞浆平均光密度值(AOD)在造模后均随时间逐渐增加,IPP(Image-Pro Plus)图像分析系统显示实验 2 周组、4 周组的数据分别和 1 周组比较,差异均有统计学意义($P<0.01$);实验 4 周组与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。实验组的 Caspase-3 阳性细胞胞浆 AOD 在造模后先增加,2 周时达到高峰,后降低,但到 4 周时 Caspase-3 阳性细胞胞浆 AOD 仍然高于对照组,IPP(Image-Pro Plus)图像分析系统显示实验 2 周组、4 周组的数据分别和 1 周组比较,差异均有统计学意义($P<0.01$);实验 4 周组与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.01$)(见表 2)。

3 讨论

3.1 KOA 软骨细胞的凋亡 细胞凋亡(apoptosis),又称程序性细胞死亡,是细胞在一定的应激(生理或病理)条件下发生的自主有序的死亡。凋亡的主要特征是细胞收缩、膜排空、核破裂和 DNA 破碎,它可能被许多因素所诱导,例如肿瘤坏死因子受体、生长因子的破坏、过多 DNA 损坏、化学药物,或是各种刺激如热休克、

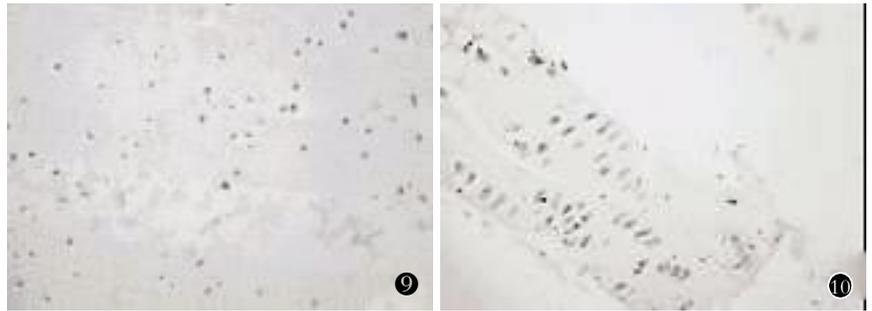


图 9 对照组 HSP70 蛋白(免疫组化染色,×400) 图 10 对照组 Caspase-3 蛋白(免疫组化染色,×400)

Fig.9 HSP70 in control group(SP,×400) Fig.10 Caspase-3 in control group(SP,×400)

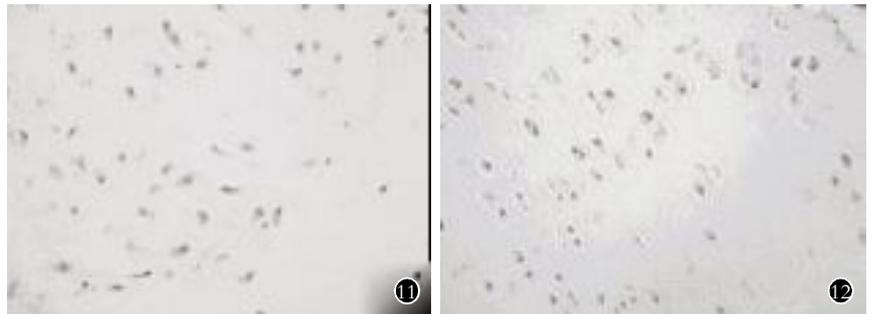


图 11 术后 1 周组 HSP70 蛋白(免疫组化染色,×400) 图 12 术后 1 周组 Caspase-3 蛋白(免疫组化染色,×400)

Fig.11 HSP70 after 1 week(SP,×400) Fig.12 Caspase-3 after 1 week(SP,×400)

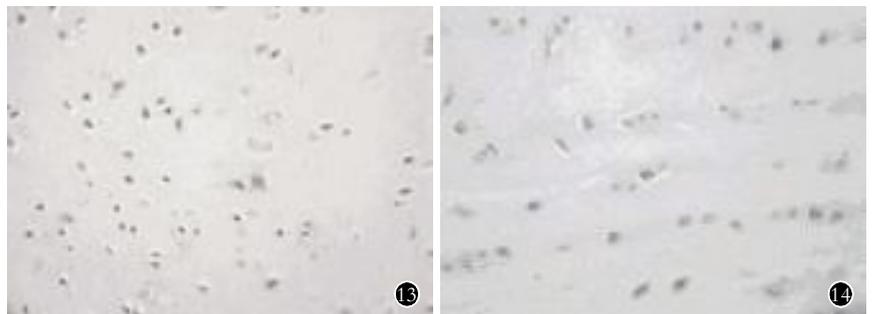


图 13 术后 2 周组 HSP70 蛋白(免疫组化染色,×400) 图 14 术后 2 周组 Caspase-3 蛋白(免疫组化染色,×400)

Fig.13 HSP70 after 2 weeks(SP,×400) Fig.14 Caspase-3 after 2 weeks(SP,×400)

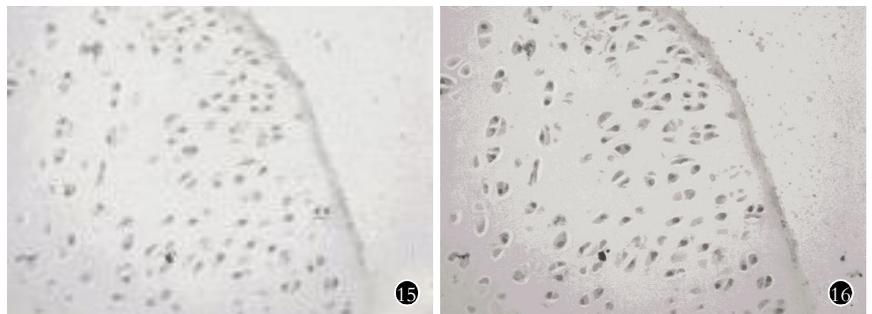


图 15 术后 4 周组 HSP70 蛋白(免疫组化染色,×400) 图 16 术后 4 周组 Caspase-3 蛋白(免疫组化染色,×400)

Fig.15 HSP70 after 4 weeks(SP,×400) Fig.16 Caspase-3 after 4 weeks(SP,×400)

紫外线照射等。KOA 软骨细胞的生物学反应是极为复杂的,在正常情况下,软骨及软骨下骨细胞也存在着凋亡的现象,其凋亡对于软骨的成熟和形态维持

表 1 Mankin 关节软骨病理评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of Mankin scores of cartilage cells in knee osteoarthritis ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	Mankin 评分
对照组	10	0.60±0.513
实验 1 周组	10	2.30±0.481
实验 2 周组	10	4.80±1.032 ^a
实验 4 周组	10	8.00±0.815 ^{bcd}

注:与实验 1 周组比较, ^a $q=2.28, P<0.01$; ^b $q=1.58, P<0.01$ 。与实验 2 周组比较, ^c $q=1.31, P<0.01$ 。与对照组比较, ^d $q=1.07, P<0.01$

Note: Compared with 1 week group, ^a $q=2.28, P<0.01$; ^b $q=1.58, P<0.01$ 。 Compared with 2 weeks group, ^c $q=1.31, P<0.01$ 。 Compared with control group, ^d $q=1.07, P<0.01$

表 2 HSP70 和 Caspase-3 阳性细胞胞浆平均光密度值 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Average optical density of HSP70 and Caspase-3 positive cytoplasm ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	AOD(HSP70)	AOD(Caspase-3)
对照组	10	0.06±0.02	0.07±0.01
实验 1 周组	10	0.33±0.09	0.50±0.12
实验 2 周组	10	0.68±0.07 ^{al}	1.06±0.33 ^{a2}
实验 4 周组	10	1.14±0.12 ^{blc-dl}	0.17±0.09 ^{b2-3d2}

注:与实验 1 周组比较, ^{a1} $q=3.28, P<0.01$; ^{a2} $q=3.09, P<0.01$; ^{b1} $q=2.58, P<0.01$; ^{b2} $q=3.39, P<0.01$ 。与实验 2 周组比较, ^{c1} $q=3.31, P<0.01$; ^{c2} $q=3.14, P<0.01$ 。与对照组比较, ^{d1} $q=4.07, P<0.01$; ^{d2} $q=4.23, P<0.01$

Note: Compared with 1 week group, ^{a1} $q=3.28, P<0.01$; ^{a2} $q=3.09, P<0.01$; ^{b1} $q=2.58, P<0.01$; ^{b2} $q=3.39, P<0.01$ 。 Compared with 2 weeks group, ^{c1} $q=3.31, P<0.01$; ^{c2} $q=3.14, P<0.01$ 。 Compared with control group, ^{d1} $q=4.07, P<0.01$; ^{d2} $q=4.23, P<0.01$

有着重要的作用^[6]。但凋亡超出一定的范围,软骨细胞数量过少,引起细胞外基质合成的减少,其又使软骨细胞的凋亡增加,如此形成恶性循环,从而导致 KOA 的发生。有研究发现细胞凋亡是骨关节炎关节软骨细胞的中心性特征,其对 KOA 软骨破坏起着支配性的作用^[7]。

细胞内外的许多信号刺激可以诱导细胞发生凋亡,如高宁阳等^[8]认为,软骨细胞中的 Wnt 信号通路调节控制着细胞形态的分化及维持、凋亡等,并与早期软骨的化生与形成具有重要的作用,并已成为骨关节炎发病机制研究的新热点。尽管这些信号以及随后的反应途径多种多样,但现已公认,细胞凋亡后期的共同途径是半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase)的激活。

3.2 Caspase-3 与软骨细胞的凋亡 在已发现的 14 个 Caspase 家族成员中, Caspase-3 处于凋亡有序级联反应的下游,有研究用结缔组织生长因子重组体、包含有 RGD 模体的人工合成多肽、IL-4、香烟提取物等处理细胞后,都可见 Caspase-3 的激活,细胞都发生凋亡的典型变化,并且凋亡可被 Caspase-

3 的抑制剂所抑制^[9]。大多数触发细胞凋亡的因素,最终均需要通过 Caspase-3 介导的信号传递途径导致细胞凋亡,已证实 Caspase-3 是细胞凋亡过程中的主要效应因子^[10],在各种刺激因素的作用下它都被证明是凋亡的关键执行者,故本实验用 Caspase-3 作指标反映软骨细胞凋亡的程度。

本实验研究发现,随着 KOA 病程的发展,特别是在 1 周至 2 周这段时间,软骨细胞的凋亡率增加明显。在造模后 1 周左右,软骨细胞的凋亡多出现在软骨的较浅层,随着关节炎程度的加重,其深层的软骨细胞凋亡增多;同时,可反映细胞凋亡情况的 Caspase-3 蛋白表达上调,提示在 KOA 关节软骨的细胞凋亡过程中也有 Caspase-3 途径的参与。在本研究中, Caspase-3 蛋白在对照组的软骨细胞中有少量表达,说明在正常情况下也存在着软骨细胞的自发凋亡,而在各个实验组中均有明显表达,从表 2 数据可以看出,实验组 AOD 值均高于对照组,差异具有统计学意义 ($P<0.01$)。

3.3 HSP70 对软骨细胞的保护作用 热休克蛋白 70(HSP70)是一组在进化上高度保守的蛋白质,应激时细胞合成增加,在细胞内发挥作用,启动内源性保护机制,属于非分泌性蛋白质^[11]。正常情况下 HSP70 在细胞内呈基础表达,表达水平较低;而在高温及各种有害应激状态下, HSP70 的合成速度显著增加,而原来的蛋白质合成则减少,以提高生物体的抗应激能力^[12]。

本研究中, HSP70 的表达持续增加,4 周时的 AOD 值与其他任何时候相比,差异均有统计学意义 ($P<0.01$)。1 周后标本的染色阳性细胞仅在软骨表层才能检出,4 周后在软骨深层也能检出 HSP70 表达。从 HSP70 与 Caspase-3 平均光密度值表(表 2)可以看到,2 周左右 Caspase-3 的表达达到高峰,后降低,这可能与 HSP70 抗凋亡有关,它的不断增加可能是抑制了 Caspase-3 的凋亡作用,阻止了软骨细胞系统中凋亡细胞的死亡,进而起到了保护细胞的作用。

3.4 HSP70 与 Caspase-3 的相关性 从本实验 HSP70 及 Caspase-3 的检出量看,两者在早期均随着 KOA 的发展而增加,而到后期 Caspase-3 的表达量虽然降低了,但仍然高于对照组,两者比较,差异有统计学意义 ($P<0.01$)。由此可以推测 KOA 的病态与 HSP70 和软骨细胞凋亡相关联。在连续切片中, HSP70 及 Caspase-3 染色阳性细胞的分布呈现部分不一致,这可能是由于 HSP70 的抗凋亡效果,在 KOA 软骨细胞中有存活的细胞存在。临床上,诸如温热疗法等康复方法,可以刺激 HSP70 表达增加,通过本研究得出的结论,可以在一定程度上阐明此

类保守疗法的作用机制。

参考文献

- [1] Weiss E, Jurmain R. Osteoarthritis revisited; a contemporary review of aetiology[J]. *Int J Osteoarchaeol*, 2007, 17(5):4372-4450.
- [2] Doi T, Akai M, Fujino K, et al. Effect of home exercise of quadriceps on knee osteoarthritis compared with nonsteroidal antiinflammatory drugs; a randomized controlled trial[J]. *Am J Phys Med Rehabil*, 2008, 87(4):258-269.
- [3] Hopwood B, Tsykin A, Findlay DM, et al. Microarray gene expression profiling of osteoarthritic bone suggests altered bone remodelling, WNT and transforming growth factor-beta/bone morphogenic protein signalling[J]. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9(5):100.
- [4] 王贤波, 蒋青. 大鼠骨性关节炎模型的构建及其稳定性观察[J]. *中国临床康复*, 2005, 9(10):72-73.
Wang XB, Jiang Q. Establishment of rat osteoarthritis model and stability[J]. *Zhongguo Lin Chuang Kang Fu*, 2005, 9(10):72-73. Chinese.
- [5] Kuroki H, Nakagawa Y, Mori K, et al. Acoustic stiffness and change in plug cartilage over time after autologous osteochondral grafting: correlation between ultrasound signal intensity and histological score in a rabbit model[J]. *Arthritis Res Ther*, 2004, 6(6):492-504.
- [6] 庞坚, 曹月龙, 石印玉. 骨关节炎软骨下骨研究进展[J]. *中国骨伤*, 2011, 24(8):702-704.
Pang J, Cao YL, Shi YY. Subchondral bone in osteoarthritis[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2011, 24(8):702-704. Chinese with abstract in English.
- [7] D'Lima D, Hennida J, Hashimoto S, et al. Caspase inhibitors reduce severity of cartilage lesions in experimental osteoarthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(6):1814-1821.
- [8] 高宁阳, 曹月龙, 刘婷, 等. Wnt 信号通路与骨关节炎[J]. *中国骨伤*, 2010, 23(4):320-323.
Gao NY, Cao YL, Liu T, et al. Wnt signaling pathways and osteoarthritis[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2010, 23(4):320-323. Chinese with abstract in English.
- [9] Azab KSh, Osman SA, El-Fatih NM. Implication of caspase-3 and granzyme B expression and activity in spleenocytes of ehrlich ascites carcinoma mice subjected to immunotherapy[J]. *N Am J Med Sci*, 2011, 3(8):371-377.
- [10] Juraver - Geslin HA, Ausseil JJ, Wassef M, et al. Barhl2 limits growth of the diencephalic primordium through Caspase3 inhibition of beta-catenin activation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(6):2288-2293.
- [11] Bhagat L, Singh VP, Dawra RK, et al. Sodium arsenite induces heat shock protein 70 expression and protects against secretagogue-induced trypsinogen and NF-kappaB activation[J]. *J Cell Physiol*, 2008, 215(1):37-46.
- [12] Fujita S, Arai Y, Nakagawa S, et al. Combined microwave irradiation and intraarticular glutamine administration - induced HSP70 expression therapy prevents cartilage degradation in a rat osteoarthritis model[J]. *J Orthop Res*, 2012, 30(3):401-407.

(收稿日期:2012-02-21 本文编辑:王玉曼)

·读者·作者·编者·

本刊关于中英文摘要撰写的要求

为了便于国际间的交流,本刊要求论著(骨伤论坛、临床研究、基础研究)及综述类栏目的稿件必须附中英文摘要。

临床研究和基础研究等论著类稿件的中英文摘要按结构式的形式撰写,即包括目的(说明研究的背景和要解决的问题)、方法(说明主要工作过程,包括所用原理、条件、材料、对象和方法,有无对照、病例或实验次数等)、结果(客观举出最后得出的主要数据资料)、结论(对结果的分析、研究、比较、评价,提出主要贡献和创新、独到之处,或提出问题及展望)4部分,文字一般不超过400字,英文摘要应较中文摘要详细。述评、骨伤论坛和综述类稿件可采用报道性摘要的形式,文字在200字左右。

中英文摘要均采用第三人称撰写,不使用第一人称“I”“We”“本文”主语,应着重反映文章的新内容和新观点。不要对论文的内容作诠释和评论。不要使用非公知公用的符号和术语,英文缩写第一次出现时要注明英文全称,其后括号内注明缩写。

英文摘要的内容应包括文题(为短语形式,可为疑问句)、作者姓名(汉语拼音,姓的全部字母均大写,复姓应连写;名字的首字母大写,双字名中间加连字符)、作者单位名称、所在城市、邮政编码、省和国名。作者应列出全部作者的姓名,如作者工作单位不同,只列出通讯作者的工作单位,在通讯作者姓名的右上角加“*”,同时在单位名称首字母左上角加“*”,例如:MA Yong-gang*, LIU Shi-qing, LIU Min, PENG Hao. *Department of Orthopaedics, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, China

另外,有关中医药英译要求:中药材译名用英文;中成药、方剂的名称用汉语拼音,剂型用英文,并在英文后用括号加注中文,例如:Xuefu Zhuyu decoction(血府逐瘀汤);中医证型的英译文后以括号注明中文,例如:Deficiency both of Yin and Yang(阴阳两虚)。