

· 基础研究 ·

低强度脉冲超声对兔膝关节炎软骨细胞外基质的影响及机制

徐守宇^{1,2}, 张丽梅¹, 姚新苗¹, 周国庆¹, 李霞¹, 何邦剑¹, 陈小刚¹

(1. 浙江中医药大学附属第三医院康复医学科, 浙江 杭州 310005; 2. 日本顺天堂大学医学部, 日本 东京 113-8421)

【摘要】 目的: 观察低强度脉冲超声(LIPUS)对兔膝关节炎软骨细胞外基质修复的影响并分析其作用机制。方法: 选取 60 只成年雌性家兔, 体质量(2.0±0.2) kg, 采用随机抽签法分为实验组和对照组, 每组 30 只。采用 Hulth 法复制膝关节炎模型。造模后 2 周, 实验组予以 LIPUS 治疗, 超声工作频率为(800±5%) KHz、最大输出空间平均声功率为(50±10%) mw/cm², 每日 1 次, 每次 20 min; 对照组予以假 LIPUS 治疗(即操作与实验组相同, 而探头无能量输出)。分别于治疗后第 2、4、8 周随机处死动物, 每次实验组和对照组各 10 只。观察软骨大体改变、HE 染色组织病理改变, 采用免疫组化技术和 RT-PCR 技术分析软骨中的 II 型胶原、蛋白多糖、MMP-3、MMP-7 以及 MMP-13, 采用硝酸还原法分析软骨中的 NO 的含量。结果: 同一时间点的实验组与对照组比较, 实验组软骨的损伤程度比对照组轻微 ($P < 0.01$); 实验组软骨中 MMP-3、MMP-7、MMP-13 和 NO 的含量均低于对照组 ($P < 0.01$); 实验组软骨中 II 型胶原和蛋白多糖的含量均高于对照组 ($P < 0.01$)。结论: 低强度脉冲超声可以通过降低软骨中 MMP-3、MMP-7、MMP-13 的表达, 抑制 NO 的分泌, 促进 II 型胶原和蛋白多糖的合成, 来加快损伤软骨的修复。

【关键词】 低强度脉冲超声; 骨关节炎, 膝; 软骨细胞; 细胞外基质

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2014.09.013

Effects and mechanism of low-intensity pulsed ultrasound on extracellular matrix in rabbit knee osteoarthritis XU Shou-yu*, ZHANG Li-mei, YAO Xin-miao, ZHOU Guo-qing, LI Xia, HE Bang-jian, and CHEN Xiao-gang.* Department of Rehabilitation, the 3rd Affiliated Hospital of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310005, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To observe the effects of low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on repairing extracellular matrix in rabbit knee osteoarthritis and analyze its mechanism. **Methods:** Sixty adult female rabbits with an average weight of (2.0±0.2) kg, were divided randomly into two groups (experimental group and control group, 30 rabbits in each group). All rabbits were replicated in right knees by Hulth method for knee osteoarthritis model. Two weeks after operation, the rabbits in experimental group were treated with LIPUS, and the ultrasonic frequency was (800±5%) KHz and the maximum intensities of spatially averaged and time averaged (SATA) was (50±10%) mw/cm², for 1 time a day and every time 20 min, while the rabbits in control group were treated with sham LIPUS, the same operation with experimental group but without energy output. At the 2, 4, 8 weeks after treatment, 10 rabbits in each group were randomly killed for each time. The general changes of cartilage and its histopathological changes by HE staining were observed; the expression of collagen type II, proteoglycan, MMP-3, 7, 13 in cartilage were analyzed by immunohistochemical and RT-PCR technique; and the expression of NO in cartilage was analyzed by nitrate reduction method. **Results:** On the same observed time point, the damage degree of cartilage in experimental group was slighter than that of control group ($P < 0.01$), the expression of MMP-3, 7, 13 and NO in cartilage in experimental group was lower than that of control group ($P < 0.01$) while collagen type II and proteoglycan was higher than that of control group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Low-intensity pulsed ultrasound can repair the damaged cartilage by reducing the expression of MMP-3, 7, 13, inhibiting the secretion of NO and promoting the synthesis of collagen type II and proteoglycan in cartilage.

KEYWORDS Low-intensity pulsed ultrasound; Osteoarthritis, knee; Chondrocytes; Extracellular matrix

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2014, 27(9): 766-771 www.zggszz.com

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目(编号: 2012KYA137); 国家中医药管理局重点学科建设经费资助项目[编号: 国中医药人教发(2012) 32号]

Fund program: The Medical Health Science and Technology Projects in Zhejiang Province (No. 2012KYA137)

通讯作者: 徐守宇 E-mail: overnightjo@msn.com

Corresponding author: XU Shou-yu E-mail: overnightjo@msn.com

膝关节骨性关节炎 (knee osteoarthritis, KOA), 是一种以关节软骨退变和丢失为主要病理特征的疾病, 是老年人群中的常见病、多发病。在 KOA 的早期阶段, 积极预防和治疗显得尤为重要^[1]。低强度脉冲超声 (low-intensity pulsed ultrasound, LIPUS) 因其安全无创、穿透性强, 能量能集中于病变部位而成为物理疗法中被广泛注目的手段。近年来, 越来越多的科学研究表明, LIPUS 在促进损伤关节软骨修复方面发挥着重要的作用^[2-5]。本实验主要是研究 LIPUS 对兔 KOA 模型关节软骨中 II 型胶原、蛋白多糖 (proteoglycan, PG)、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 和一氧化氮 (NO) 的影响, 评价其对软骨细胞外基质的修复效应, 并试图阐明其作用机制, 进一步为 KOA 的保守治疗提供相关的科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要药品、试剂及仪器 3%戊巴比妥钠溶液, 青霉素 (80 万 U/支), 超声波骨折愈合仪 (专利号: ZL93107355.3 国际专利分类号: A61N5/00), NO 试剂盒 (A012, 南京建成生物工程研究所), 免疫组化一抗 (博奥森公司), 显微镜 (日本奥林巴斯, BX51T-PHD-J11), RT-PCR 试剂盒 (DRR047A), 多功能真彩色细胞图象分析管理系统 (美国 Media Cybernetics 公司 Image-Pro Plus)。

1.2 实验动物及分组 选取健康成年清洁级家兔 60 只 (浙江中医药大学实验动物研究中心提供), 雌性, 体质量 (2.0±0.2) kg。采用随机抽签法, 将兔子分为实验组和对照组, 每组 30 只。饲养于浙江中医药大学实验动物研究中心, 标准饲料适应性饲养 1 周, 自由饮水, 室温 (23±2) °C, 间隔 12 h 照明, 定期消毒及通风。

1.3 动物模型制作 采用 Hulth 等^[6]法复制兔 KOA 模型, 首先将家兔固定在手术台上, 经耳缘静脉注射 3%戊巴比妥钠溶液 1 ml/kg。麻醉后, 用剪刀及剃须刀将家兔右膝关节手术区域及其周围剃净, 碘伏消毒, 常规铺巾。在靠近膝关节的内侧面切开皮肤, 打开关节腔, 将髌骨向后向外翻, 并使膝关节维持在最大的屈曲状态。暴露关节腔后, 用眼科剪刀分离内侧半月板, 并将内侧半月板切除, 同时剪断前交叉韧带。小心操作以防损伤软骨。生理盐水冲洗关节后, 缝合关节囊及皮肤。最后用碘伏棉球擦洗伤口, 并贴上注射用敷贴。术后每只动物肌注青霉素 40 万 U, 连续 3 d, 防止伤口感染。放入笼中饲养, 任其自由活动, 密切观察防止伤口感染及其他并发症。

1.4 干预措施 动物造模 2 周后, 实验组右侧膝关节使用超声波骨折愈合仪予以 LIPUS 治疗, 超声工作频率为 (800±5%) KHz、最大输出空间平均声功率

为 (50±10%) mw/cm², 每日 1 次, 每次 20 min; 对照组右侧膝关节则予以假 LIPUS 治疗 (即操作与实验组相同, 而探头无能量输出)。两组分别于治疗后第 2、4、8 周随机处死, 每组各 10 只, 处死方法采用空气栓塞法 (每只耳缘静脉注射空气 30 ml)。处死后迅速切开皮肤, 打开关节腔, 观察膝关节有无关节积液和滑膜肿胀及关节软骨的变化。用手术刀将家兔右侧膝关节离断, 小心取出膝关节股骨内侧端和胫骨内侧端软骨组织, 置于冰块中保存。

1.5 观察项目与方法 用肉眼观察软骨的大体改变。采用常规 HE 染色、番红 O 染色在光镜 (×400) 下观察软骨表面的组织形态学。采用 Mankin 改良的关节软骨病理评分标准^[7]对软骨进行病理评分。采用硝酸还原法 (测定原理是 NO 半衰期短, 仅数秒, 遇氧或水生成硝酸盐, 硝酸盐与磺胺及萘乙二胺反应生成粉红色偶氮化合物) 通过比色可间接测定软骨中 NO 的浓度。采用免疫组化技术测量软骨中各指标的阳性细胞胞浆平均光密度值。采用 RT-PCR 技术, 测定软骨中各指标的相对表达量。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。RT-PCR 数据先采用相对定量 2- $\Delta\Delta$ CT 法分析数据, 再进行统计学分析, 组间比较采用独立样本 *t* 检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨关节炎大体改变 实验组第 2 周可见关节液略显浑浊, 关节软骨表面不光滑, 股骨内髌关节和胫骨负重部弹性减退明显; 第 4 周可见关节软骨表面粗糙、变薄, 出现微小不规则的小裂隙; 第 8 周时关节面可见软化灶, 关节液减少, 偶尔有溃疡形成。对照组第 2 周标本关节面失去原有光泽, 但尚无溃疡、裂纹; 第 4 周标本可见关节滑膜充血增生, 股骨内髌软骨部分可见少量骨赘; 第 8 周标本关节软骨有剥脱, 软骨下骨质暴露并有骨赘形成, 关节液浑浊。

2.2 组织形态学变化

2.2.1 光镜观察结果 实验组第 2 周细胞轻度增生, 软骨表面平整, 潮线尚完整 (图 1a, 2a); 第 4 周细胞轻度增生和聚集, 软骨面略不平整, 偶有小裂隙 (图 1c, 2c); 第 8 周细胞排列紊乱并有聚集软骨细胞簇, 软骨面裂隙可达中深层, 潮线多断裂或双重潮线 (图 1e, 2e)。对照组第 2 周细胞排列尚规律, 偶有少量细胞簇集现象 (图 1b, 2b); 第 4 周软骨中度损伤, 出现钙化层裂隙, 细胞簇集出现的频率增加, 部分出现潮线不清晰或中断 (图 1d, 2d); 第 8 周软骨变薄, 裂隙深达软骨下, 潮线消失 (图 1f, 2f)。

2.2.2 Mankin 改良的关节软骨病理评分 由不同的实验者对软骨标本进行观察,按照 Mankin 改良的关节软骨病理评分标准^[7]进行评分,取平均值。分别对实验组和对照组第 2、4、8 周后的改良 Mankin 评

分进行比较,结果显示经过相同治疗时间的实验组损伤程度较对照组轻,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

2.3 阳性细胞胞浆平均光密度值(AOD)的免疫组

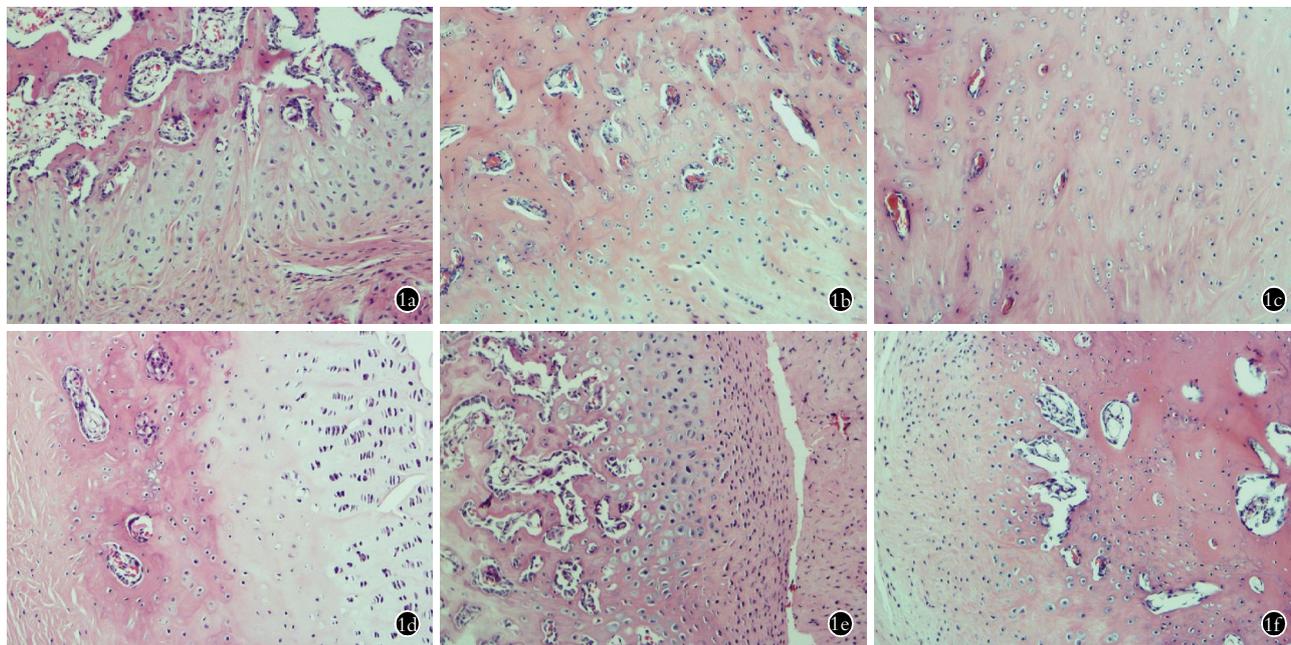


图 1 两组组织形态学变化 HE 染色($\times 400$) **1a, 1b.** 治疗后第 2 周,实验组软骨细胞表层光滑(1a);对照组细胞排列基本规律(1b) **1c, 1d.** 治疗后第 4 周,实验组软骨细胞表层略不光滑(1c);对照组软骨细胞中度损伤(1d) **1e, 1f.** 治疗后第 8 周,实验组细胞排列紊乱(1e);对照组软骨细胞重度损伤(1f)

Fig.1 Changes of histomorphology by HE staining between two groups ($\times 400$) **1a, 1b.** At the 2nd week after treatment, surface of cartilage cells was smooth in experimental group(1a) and arrange of cells was regular in control group(1b) **1c, 1d.** At the 4th week after treatment, surface of cartilage cells was unsmooth slightly in experimental group (1c) and cartilage cells with moderate damage in control group(1d) **1e, 1f.** At the 8th week after treatment, arrange of cells was abnormality in experimental group (1e) and cells with serious damage in control group (1f)

表 1 两组不同时期的 Mankin 关节软骨病理评分和阳性细胞胞浆平均光密度值比较($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of Mankin scores of cartilage cells in knee osteoarthritis and average optical density of positive cytoplasm between two groups in different times($\bar{x} \pm s$)

组别	兔数	Mankin 评分(分)	阳性细胞胞浆平均光密度值				
			MMP-3	MMP-7	MMP-13	蛋白多糖	II 型胶原
实验组第 2 周	10	2.90±0.99 ^{a1}	0.15±0.02 ^{b1}	0.17±0.01 ^{c1}	0.14±0.02 ^{d1}	0.31±0.01 ^{e1}	0.30±0.02 ^{f1}
对照组第 2 周	10	6.60±1.35	0.22±0.02	0.23±0.01	0.19±0.01	0.26±0.01	0.24±0.02
实验组第 4 周	10	5.60±1.17 ^{a2}	0.21±0.02 ^{b2}	0.23±0.02 ^{c2}	0.19±0.02 ^{d2}	0.25±0.01 ^{e2}	0.24±0.02 ^{f2}
对照组第 4 周	10	8.90±1.20	0.29±0.02	0.28±0.01	0.27±0.01	0.18±0.01	0.17±0.01
实验组第 8 周	10	8.00±1.25 ^{a3}	0.28±0.01 ^{b3}	0.30±0.02 ^{c3}	0.26±0.01 ^{d3}	0.18±0.01 ^{e3}	0.16±0.01 ^{f3}
对照组第 8 周	10	12.10±1.66	0.37±0.02	0.36±0.01	0.33±0.02	0.14±0.02	0.12±0.01

注:与对照组第 2 周比较,^{a1} $t=6.979, P=0.000 < 0.01$; ^{b1} $t=8.631, P=0.000 < 0.01$; ^{c1} $t=12.279, P=0.000 < 0.01$; ^{d1} $t=6.840, P=0.000 < 0.01$; ^{e1} $t=8.932, P=0.000 < 0.01$; ^{f1} $t=6.511, P=0.000 < 0.01$ 。与对照组第 4 周比较,^{a2} $t=6.224, P=0.000 < 0.01$; ^{b2} $t=10.909, P=0.000 < 0.01$; ^{c2} $t=7.505, P=0.000 < 0.01$; ^{d2} $t=11.463, P=0.000 < 0.01$; ^{e2} $t=13.287, P=0.000 < 0.01$; ^{f2} $t=10.298, P=0.000 < 0.01$ 。与对照组第 8 周比较,^{a3} $t=6.236, P=0.000 < 0.01$; ^{b3} $t=12.671, P=0.000 < 0.01$; ^{c3} $t=8.980, P=0.000 < 0.01$; ^{d3} $t=9.755, P=0.000 < 0.01$; ^{e3} $t=5.842, P=0.000 < 0.01$; ^{f3} $t=6.393, P=0.000 < 0.01$

Note: Compared with control group at the 2nd week after treatment, ^{a1} $t=6.979, P=0.000 < 0.01$; ^{b1} $t=8.631, P=0.000 < 0.01$; ^{c1} $t=12.279, P=0.000 < 0.01$; ^{d1} $t=6.840, P=0.000 < 0.01$; ^{e1} $t=8.932, P=0.000 < 0.01$; ^{f1} $t=6.511, P=0.000 < 0.01$. Compared with control group at the 4th week after treatment, ^{a2} $t=6.224, P=0.000 < 0.01$; ^{b2} $t=10.909, P=0.000 < 0.01$; ^{c2} $t=7.505, P=0.000 < 0.01$; ^{d2} $t=11.463, P=0.000 < 0.01$; ^{e2} $t=13.287, P=0.000 < 0.01$; ^{f2} $t=10.298, P=0.000 < 0.01$. Compared with control group at the 8th week after treatment, ^{a3} $t=6.236, P=0.000 < 0.01$; ^{b3} $t=12.671, P=0.000 < 0.01$; ^{c3} $t=8.980, P=0.000 < 0.01$; ^{d3} $t=9.755, P=0.000 < 0.01$; ^{e3} $t=5.842, P=0.000 < 0.01$; ^{f3} $t=6.393, P=0.000 < 0.01$

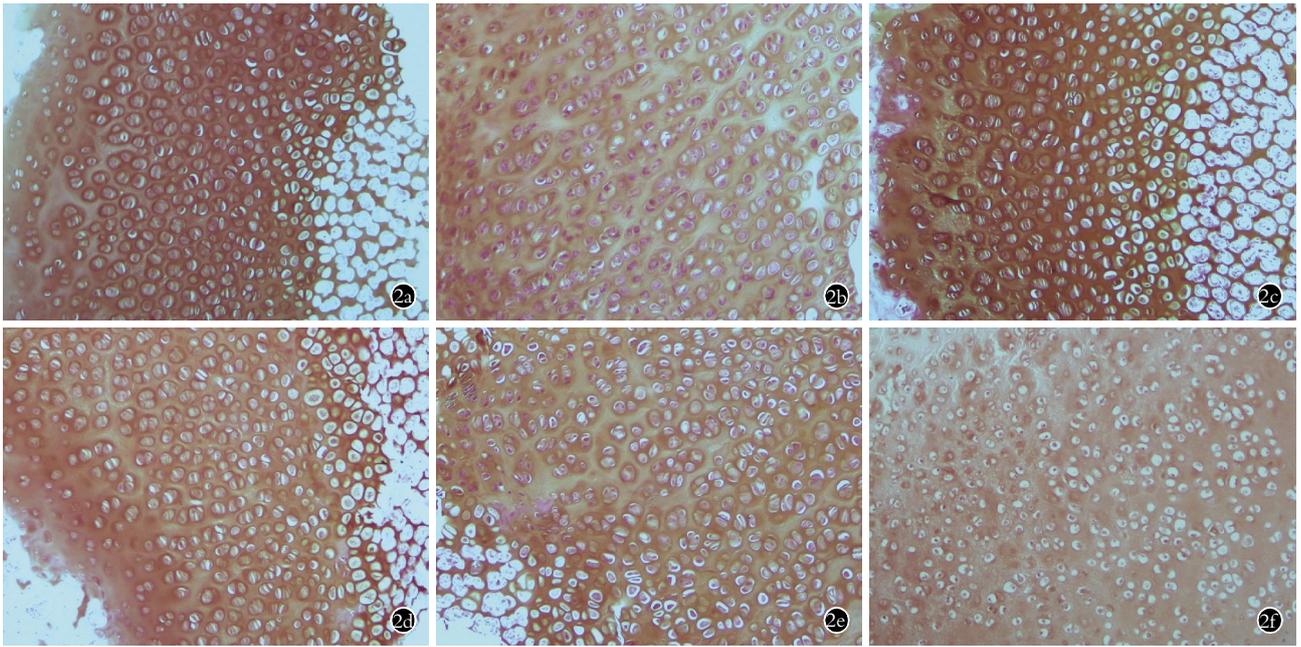


图 2 两组组织形态学变化番红 O 染色($\times 400$) **2a, 2b.** 治疗后第 2 周, 实验组细胞密集, 排列均匀, 细胞数量正常(2a); 对照组细胞稀疏, 排列紊乱, 细胞数量轻度减少(2b) **2c, 2d.** 治疗后第 4 周, 实验组细胞稀疏, 排列紊乱, 细胞数量轻度减少(2c); 对照组部分细胞组织结构分解, 完整性消失, 有部分细胞坏死, 细胞数量中度减少(2d) **2e, 2f.** 治疗后第 8 周, 实验组部分细胞组织结构分解, 完整性消失, 有部分细胞坏死, 细胞数量中度减少(2e); 对照组细胞排列紊乱, 可见大量细胞坏死区, 细胞数量重度减少

Fig. 2 Changes of histomorphology by Safranin O staining between two groups($\times 400$) **2a, 2b.** At the 2nd week after treatment, arrange of cells was uniform and dense with normal number in experimental group (2a); arrange of cells was disordered and sparse, and cells number slightly reduced in control group (2b) **2c, 2d.** At the 4th week after treatment, arrange of cells was disordered and sparse, and cells number slightly reduced in experimental group (2c); structure of some cell tissue was decomposed, integrity disappeared, and some cell necrosis and number moderately reduced in control group (2d) **2e, 2f.** At the 8th week after treatment, structure of some cell tissue was decomposed, integrity disappeared, and some cell necrosis and number moderately reduced in experimental group (2e); arrange of cells was disordered, large necrosis cells were found and cell number severely reduced in control group (2f)

化染色检测结果

2. 3. 1 MMP-3、MMP-7 和 MMP-13 的免疫组化结果 分别对实验组和对照组第 2、4、8 周后的阳性细胞胞浆平均光密度值(AOD)进行两两比较, 发现实验组软骨中 MMP-3、MMP-7 和 MMP-13 的阳性细胞胞浆 AOD 均低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 见表 1。

2. 3. 2 PG 和 II 型胶原的免疫组化结果 分别对实验组和对照组第 2、4、8 周后的阳性细胞胞浆 AOD 进行两两比较, 发现实验组软骨中 PG 和 II 型胶原的阳性细胞胞浆 AOD 均高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 见表 1。

2. 4 相对表达量的 RT-PCR 技术检测

2. 4. 1 MMP-3、MMP-7 和 MMP-13 的 RT-PCR 结果 分别对实验组和对照组第 2、4、8 周后的相对表达量进行两两比较, 发现实验组软骨中 MMP-3、MMP-7 和 MMP-13 的相对表达量均低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 见表 2。

2. 4. 2 PG 和 II 型胶原的 RT-PCR 结果 分别对实验组和对照组第 2、4、8 周后的相对表达量进行比

较, 发现实验组软骨中 PG 和 II 型胶原的相对表达量均高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 见表 2。

2. 5 软骨中 NO 含量的检测结果 分别对实验组和对照组第 2、4、8 周后的 10% 组织匀浆浓度进行比较, 发现实验组软骨中 NO 的 10% 组织匀浆浓度低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 见表 2。

3 讨论

近年来各种研究发现, 导致关节软骨退变的主要原因是胞外基质中 II 型胶原和 PG 的合成减少、降解增加。胶原尤其是 II 型胶原是软骨中重要组成部分, 胶原分子高度有序地排列成胶原纤维网架结构, 使软骨具有独特的弹性和高抗压性。PG 是由蛋白质与糖胺聚糖以共价键结合而形成的一类糖蛋白, 具有维持关节软骨弹性、抵抗压力和润滑等重要作用。II 型胶原质和量的改变及 PG 的流失是导致关节软骨伤痛及退变的直接原因^[8-9], 其变化与 KOA 有着密切关系。本实验结果显示, 对照组 II 型胶原的表达随着 KOA 病变的发展而逐渐减少, 而实验组 II 型胶原的表达随着治疗时间的增加有逐渐增强的趋势, 且经过相同的治疗时间, 实验组 II 型胶原的含量

表 2 两组不同时期的相对表达量(2ΔΔCT)(RT-PCR)和关节软骨中 NO 浓度比较(̄x±s)

Tab.2 Comparison of the relative expression amount(2ΔΔCT)(RT-PCR)and the concentration of NO in articular cartilage between two groups(̄x±s)

组别	兔数	相对表达量(2ΔΔCT)					关节软骨中 NO 浓度(%)
		MMP-3	MMP-7	MMP-13	蛋白多糖	II 型胶原	
实验组第 2 周	10	0.90±0.07 ^{a1}	0.85±0.11 ^{b1}	0.90±0.09 ^{c1}	1.24±0.20 ^{d1}	1.21±0.21 ^{e1}	23.270±3.647 ^{f1}
对照组第 2 周	10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	29.470±3.512
实验组第 4 周	10	0.58±0.06 ^{a2}	0.60±0.15 ^{b2}	0.62±0.10 ^{c2}	1.69±0.38 ^{d2}	1.70±0.49 ^{e2}	18.970±3.066 ^{f2}
对照组第 4 周	10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	34.130±3.132
实验组第 8 周	10	0.40±0.11 ^{a3}	0.31±0.05 ^{b3}	0.37±0.12 ^{c3}	2.58±0.97 ^{d3}	2.60±0.46 ^{e3}	15.350±2.708 ^{f3}
对照组第 8 周	10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	32.930±3.570

注:与对照组第 2 周比较,^{a1}t=4.667, P=0.000<0.01; ^{b1}t=4.251, P=0.000<0.01; ^{c1}t=3.493, P=0.003<0.01; ^{d1}t=3.887, P=0.001<0.01; ^{e1}t=3.259, P=0.004<0.01; ^{f1}t=3.872, P=0.001<0.01。与对照组第 4 周比较, ^{a2}t=22.429, P=0.000<0.01; ^{b2}t=8.404, P=0.000<0.01; ^{c2}t=12.352, P=0.000<0.01; ^{d2}t=5.766, P=0.000<0.01; ^{e2}t=4.537, P=0.000<0.01; ^{f2}t=10.939, P=0.000<0.01。与对照组第 8 周比较, ^{a3}t=18.119, P=0.000<0.01; ^{b3}t=42.495, P=0.000<0.01; ^{c3}t=16.220, P=0.000<0.01; ^{d3}t=5.136, P=0.000<0.01; ^{e3}t=11.007, P=0.000<0.01; ^{f3}t=12.406, P=0.000<0.01

Note: Compared with control group at the 2nd week after treatment, ^{a1}t=4.667, P=0.000<0.01; ^{b1}t=4.251, P=0.000<0.01; ^{c1}t=3.493, P=0.003<0.01; ^{d1}t=3.887, P=0.001<0.01; ^{e1}t=3.259, P=0.004<0.01; ^{f1}t=3.872, P=0.001<0.01. Compared with control group at the 4th week after treatment, ^{a2}t=22.429, P=0.000<0.01; ^{b2}t=8.404, P=0.000<0.01; ^{c2}t=12.352, P=0.000<0.01; ^{d2}t=5.766, P=0.000<0.01; ^{e2}t=4.537, P=0.000<0.01; ^{f2}t=10.939, P=0.000<0.01. Compared with control group at the 8th week after treatment, ^{a3}t=18.119, P=0.000<0.01; ^{b3}t=42.495, P=0.000<0.01; ^{c3}t=16.220, P=0.000<0.01; ^{d3}t=5.136, P=0.000<0.01; ^{e3}t=11.007, P=0.000<0.01; ^{f3}t=12.406, P=0.000<0.01

高于对照组,PG 也有相同的现象,这与诸多离体实验^[10-11]和在体实验^[12-13]研究结果一致,说明 LIPUS 能促进 II 型胶原和 PG 的表达,但具体机制尚不清楚。LIPUS 可能通过促进 II 型胶原和 PG 的表达,从而延缓 KOA 关节软骨退变的进展。

MMPs 是一种蛋白水解酶,在 KOA 发病过程中起着重要作用。MMP-3 是基质降解酶,对 PG 有高度的裂解活性。MMP-3 由软骨细胞分泌,在 OA 病变部位的关节软骨里,MMP-3 的表达明显增高^[14]。MMP-3 除了能降解 PG,还可以激活其他的 MMPs 酶原,形成瀑布效应^[15]。本实验对照组中 MMP-3 的表达随着 KOA 病变的发展而逐渐增加,而实验组 MMP-3 的表达随着治疗时间的增加有逐渐减少的趋势,且经过相同的治疗时间,实验组 MMP-3 的含量低于对照组,说明 LIPUS 能降低 MMP-3 的表达。MMP-7 又叫基质水解酶,主要作用底物也是 PG,同时还可以降解 II 型胶原。本实验 MMP-7 的结果与 MMP-3 相同,说明 LIPUS 能降低 MMP-7 的表达。目前在体实验研究 LIPUS 对 MMP-7 影响的相关实验较少。MMP-13 则几乎能降解所有胞外基质成分,尤其对 II 型胶原有很强的降解能力,它的表达会导致 II 型胶原降解,因此 MMP-13 的变化可反映关节软骨胞外基质中 II 型胶原的代谢变化^[16]。本实验 MMP-13 的结果与 MMP-3、7 相同,说明 LIPUS 能降低 MMP-13 的表达,这一发现与诸多在体实验^[12]和离体实验^[17]均取得了一致的结果。从本实验结果中分析可知:LIPUS 通过降低 MMP-3、7 的表达,减弱

其对 PG 的裂解能力,保持 PG 的完整性;通过降低 MMP-3 的表达减弱其对其他 MMPs 的激活作用,延缓胶原的病理性降解和一系列瀑布效应;通过降低 MMP-13 的表达,还可以减少 II 型胶原的降解。说明 LIPUS 可能通过降低 MMP-3、7、13 的表达,延缓 PG 和 II 型胶原的降解,从而发挥延缓 KOA 关节软骨退变的作用,促进损伤关节软骨的修复。

NO 作为关节损伤和抑制基质合成的介质,参与 KOA 关节软骨细胞和基质的代谢过程,在 KOA 发病中的作用日益受到重视。NO 能促进各种炎性细胞因子释放,并能上调 MMPs 的活性和表达,从而加重 KOA 的炎症反应,抑制软骨细胞分泌胞外基质和合成 II 型胶原,导致了软骨的进行性退变^[18]。NO 从多种途径干预软骨细胞和胞外基质的生理代谢,影响 KOA 病变的转归。从本实验中可以发现,对照组 NO 的表达随着 KOA 病变的发展而逐渐增加,而实验组 NO 的表达随着治疗时间的增加有逐渐减少的趋势,经过相同的治疗时间,NO 的表达量实验组低于对照组,说明 LIPUS 能抑制 NO 的分泌,同时发现 LIPUS 并不能逆转 KOA 的软骨损伤病理学改变,只能通过抑制 NO 的表达来延缓 PG 和 II 型胶原的降解,降低 MMPs 的表达,从而间接促进损伤软骨的修复。

虽然动物模型并不能完全模拟人体 KOA 的自然病理过程,LIPUS 对人体 KOA 的治疗效果还需更多临床试验加以验证,但 LIPUS 因其安全无创、穿透性强,能量能集中于病变部位而成为物理疗法中被广泛注目的手段,有望成为临床上治疗 KOA 的重要

保守治疗方法。LIPUS 治疗 KOA 的相关机制尤其是对软骨细胞本身的作用有待进一步证实, 临床上最佳治疗参数也有待确认和优选。

参考文献

- [1] 朱振安. 重视膝关节骨关节炎的早期防治[J]. 中国骨伤, 2010, 23(12): 887-889.
Zhu ZA. Pay attention to early diagnosis and treatment of knee osteoarthritis[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2010, 23(12): 887-889. Chinese.
- [2] 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.
- [3] Min BH, Woo JI, Choi BH, et al. Effects of low-intensity ultrasound (LIUS) stimulation on human cartilage explants[J]. Scand J Rheumatol, 2006, 35(4): 305-311.
- [4] 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.
- [5] Min BH, Choi BH, Park SR, et al. Low-intensity ultrasound as a supporter of cartilage regeneration and its engineering[J]. Biotechnol Bioprocess Eng, 2007, 12(1): 22-31.
- [6] Hulth A, Lindberg L, Telhag H, et al. Experimental osteoarthritis in rabbits. Preliminary report[J]. Acta Orthop Scand, 1970, 41(5): 522-530.
- [7] Van der Sluijs TA, Geesink RG, Van der Linden AJ. The reliability of the Mankin score for osteoarthritis[J]. Orthop Res, 1992, 10(1): 58-61.
- [8] 卫晓恩, 杨庆铭, 邓廉夫, 等. 骨关节炎软骨基质蛋白多糖变化的实验研究[J]. 中华风湿病学杂志, 2002, 6: 25-27.
Wei XE, Yang QM, Deng LF, et al. Changes of proteoglycan in articular cartilage matrix of osteoarthritis in rabbits[J]. Zhonghua Feng Shi Bing Xue Za Zhi, 2002, 6: 25-27. Chinese.
- [9] Dejica VM, Mort JS, Laverty S, et al. Cleavage of type II collagen by cathepsin K in human osteoarthritic cartilage[J]. Am J Pathol, 2008, 173(1): 161-169.
- [10] 蒋恺, 崔维顶, 任科伟, 等. 低强度脉冲式超声波对大鼠软骨细胞增殖和基质合成的影响[J]. 江苏医药, 2011, 37(12): 1391-1393.
Jiang K, Cui WD, Ren KW, et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on the cell proliferation and synthesis of extracellular matrix of rat chondrocyte[J]. Jiang Su Yi Yao, 2011, 37(12): 1391-1393. Chinese.
- [11] 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.
- [12] 王小红, 王洪, 杨述华, 等. 低强度脉冲式超声对实验性兔骨关节炎软骨损伤修复的影响[J]. 国际骨科学杂志, 2009, 30(3): 191-193.
Wang XH, Wang H, Yang SH, et al. Effect of low-intensity pulsed ultrasound in repairing rabbits cartilage injury caused by experimental osteoarthritis[J]. Guo Ji Gu Ke Za Zhi, 2009, 30(3): 191-193. Chinese.
- [13] 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]. Orthop Res, 2010, 28(3): 361-369.
- [14] 胡阿威, 喻爱喜, 吴刚, 等. 兔骨关节炎中基质金属蛋白酶-1、3与白细胞介素-1 β 表达及关节软骨细胞凋亡的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2012, 29(11): 2277-2279.
Hu AW, Yu AX, Wu G, et al. Expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-3, interleukin-1 β and chondrocyte apoptosis in rabbit osteoarthritis[J]. Zhonghua Shi Yan Wai Ke Za Zhi, 2012, 29(11): 2277-2279. Chinese.
- [15] 董刚, 周辉. 金属蛋白酶在骨关节炎软骨内环境中的表达与调控[J]. 中国骨伤, 2009, 22(2): 156-159.
Dong G, Zhou H. Expression and regulation of matrix metalloproteinases in osteoarthritic cartilage[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2009, 22(2): 156-159. Chinese with abstract in English.
- [16] 王玉彬, 陈安民, 郭风劲, 等. 基质金属蛋白酶家族在骨关节炎软骨组织中表达的研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2007, 15(11): 853-855.
Wang YB, Chen AM, Guo FJ, et al. Immunohistochemical expression and significance of MMP-7, MMP-9, MMP-13 and TIMP-1 in osteoarthritis[J]. Zhongguo Jiao Xing Wai Ke Za Zhi, 2007, 15(11): 853-855. Chinese.
- [17] 安恒远, 李雪萍, 王大新. 低强度脉冲超声波对软骨细胞中金属蛋白酶-13与II型胶原的影响[J]. 中国康复医学, 2011, 26(3): 226-231.
An HY, Li XP, Wang DX, et al. Effects of low intensity pulsed ultrasound on MMP-13 and type II collagen of chondrocytes[J]. Zhongguo Kang Fu Yi Xue, 2011, 26(3): 226-231. Chinese.
- [18] 滕海, 白希壮, 周毅, 等. 几种细胞因子在骨关节炎病理生理中的作用[J]. 解剖科学进展, 2004, 10(1): 76-79.
Teng H, Bai XZ, Zhou Y, et al. The effects of several cytokines in osteoarthritis pathophysiology[J]. Jie Pou Ke Xue Jin Zhan, 2004, 10(1): 76-79. Chinese.

(收稿日期: 2014-03-17 本文编辑: 李宜)