

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.22.014 [http://www.crter.org]

方航, 张荣凯, 陈郁鲜, 宋炎成, 蔡道章. 机械应力相关基因在骨关节炎软骨下骨的表达[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(22):4084-4090.

机械应力相关基因在骨关节炎软骨下骨的表达*☆

方航¹, 张荣凯², 陈郁鲜¹, 宋炎成³, 蔡道章^{1,3}

1 中山大学附属第三医院骨科, 广东省广州市 510630
2 中山大学附属第五医院骨科一区, 广东省珠海市 519000
3 南方医科大学第三附属医院关节外科, 广东省广州市 510630

文章亮点:

- 1 通过全基因组基因芯片分析大鼠骨关节炎模型软骨下骨基因表达的变化, 发现与机械应力及骨关节炎密切相关的差异表达基因, 为骨关节炎早期诊断及早期治疗靶点的研究提供新的思路。
- 2 发现 3 个重要的与机械应力相关的差异表达基因: Postn, Ihh, Bmp5, 并由 qRT-PCR 得到验证, 可见机械应力因素是骨关节炎发病的重要因素。

关键词:

骨关节植入物; 骨与关节生物力学; 骨关节炎; 软骨下骨; 机械应力; Postn; Bmp5; Ihh; 大鼠骨关节炎模型; 关节不稳; 基因芯片; 全基因组; 863 项目

摘要

背景: 机械应力改变是骨关节炎发生发展的关键因素。

目的: 观察机械应力相关基因在关节不稳所致的骨关节炎大鼠模型中软骨下骨的表达情况, 为阐述机械应力因素在骨关节炎发病中的重要作用提供依据。

方法: 将 SD 大鼠分为实验组和对照组, 每组 30 只。实验组行右膝内侧半月板及内侧副韧带切除术, 对照组仅切开关节囊。分别于术后 1, 2, 4 周取右膝关节标本, 提取软骨下骨的 RNA, 并采用全基因组表达谱芯片技术研究软骨下骨全基因表达, 根据现有文献报道, 探索机械应力相关基因在该大鼠模型软骨下骨中的表达情况, 并通过 qRT-PCR 对结果进行验证。

结果与结论: 发现 3 个重要的与机械应力相关的差异表达基因: Postn, Ihh, Bmp5, 并由 qRT-PCR 得到验证: 实验组中, Postn 在术后第 1 周显著高表达, 与对照组比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 术后第 2 周也出现高表达的趋势, 但与对照组比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。Bmp5 也在术后第 1 周显著高表达, 与对照组比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 第 2 周及第 4 周也有高表达的趋势, 但与对照组比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。Ihh 在术后第 1 周及第 2 周同时出现高表达, 与对照组比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。结果可见机械应力因素是骨关节炎发病的重要因素, 深入研究与其相关的基因或其通路, 可能为揭示骨关节炎发病机制提供更多的依据, 从而发现早期诊断及早期治疗的靶点。

Expression of mechanical stress related genes in subchondral bone of rat osteoarthritis model

Fang Hang¹, Zhang Rong-kai², Chen Yu-xian¹, Song Yan-cheng³, Cai Dao-zhang^{1,3}

1 Department of Orthopedics, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China

2 First District, Department of Orthopedics, the Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China

3 Department of Joint Surgery, the Third Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China

方航☆, 男, 1986 年生, 广东省普宁市人, 汉族, 中山大学在读博士, 主要从事关节炎的早期诊断与早期干预研究。
fanghang@outlook.com

通讯作者: 蔡道章, 博士, 教授, 中山大学附属第三医院骨科, 广东省广州市 510630; 南方医科大学第三附属医院关节外科, 广东省广州市 510630
caidaozhang@gmail.com

中图分类号: R318

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344
(2013)22-04084-07

收稿日期: 2012-08-05

修回日期: 2012-12-07

(20120805007/M-C)

Fang Hang☆, Studying for
doctorate, Department of
Orthopedics, the Third Affiliated
Hospital of Sun Yat-sen
University, Guangzhou
510630, Guangdong Province,
China
fanghang@outlook.com

Corresponding author: Cai
Dao-zhang, M.D., Professor,
Department of Orthopedics, the
Third Affiliated Hospital of Sun
Yat-sen University, Guangzhou
510630, Guangdong Province,
China; Department of Joint
Surgery, the Third Affiliated
Hospital of Southern Medical
University, Guangzhou
510630, Guangdong Province,
China
caidaozhang@gmail.com

Supported by: National
High-tech Research and
Development Program of China
(863 Program),
No.2008AA02Z437*

Received: 2012-08-05
Accepted: 2012-12-07

Abstract

BACKGROUND: Changes of mechanical stress is a key factor for the development of osteoarthritis.

OBJECTIVE: To observe the expression of mechanical stress related genes in subchondral bone of rat osteoarthritis model caused by joint instability, and to provide basis for elaborating the effect of mechanical stress factors in the pathogenesis of osteoarthritis.

METHODS: Sprague Dawley rats were divided into two groups: experimental group and control group, 30 rats in each group. The right knee joints of experimental group underwent both medial collateral ligament resection and medial meniscectomy, while the control group just cut joint capsule. Rats were sacrificed at 1, 2 and 4 weeks after surgery to obtain the right knee joints. Total RNA of the subchondral bone was extracted, and the global gene expression of subchondral bone was researched with DNA microarray technology. The expression of mechanical stress related genes in subchondral bone of rat osteoarthritis model was explored according to the existing literatures, and then the results were identified through quantitative real-time PCR.

RESULTS AND CONCLUSION: Three important mechanical stress related differentially expressed genes included: *Postn*, *Ihh* and *Bmp5*, and were confirmed by quantitative real-time PCR. In the experimental group, *Postn* was significantly expressed at 1 week after operation, and the difference between two groups was significant ($P < 0.05$), and 2 weeks after operation, *Postn* was still highly expressed, but there was no significant difference between two groups ($P > 0.05$). *Bmp5* was significantly expressed at 1 week after operation, but the difference between two groups was significant ($P < 0.05$), and at 2 weeks after operation, *Bmp5* was highly expressed, but there was no significant difference between two groups ($P > 0.05$). *Ihh* was highly expressed at 1 and 2 weeks after operation, and the difference between two groups was significant ($P < 0.05$). Mechanical stress is the key stress in osteoarthritis. Further research of mechanical stress related genes and their pathway might provide more evidence for pathogenesis of osteoarthritis, thus discovering the targets for early diagnosis and early treatment.

Key Words: bone and joint implants; bone and joint biomechanics; osteoarthritis; subchondral bone; mechanical stress; *Postn*; *Bmp5*; *Ihh*; rat osteoarthritis model; joint instability; gene chip; whole genome; 863 program

Fang H, Zhang RK, Chen YX, Song YC, Cai DZ. Expression of mechanical stress related genes in subchondral bone of rat osteoarthritis model. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(22):4084-4090.

0 引言

骨性关节炎是一种退变性关节疾病, 表现为关节软骨退变, 并累及关节的其他组织, 包括滑膜、软骨下骨及肌肉、韧带等。世界卫生组织在1999年将骨性关节炎定义为: 骨性关节炎是由于机械和生物性因素共同作用所导致的关节软骨细胞、细胞外基质、软骨下骨合成和降解动态失衡所致的全关节疾病。由此可见, 机械应力因素及生物性因素在骨性关节炎发生发展中起着重要的作用, 其他各种原因最终也都是通过影响这两个关键性因素而起作用的。

Blagojevic等^[1]在一个综合了36篇文献的Meta分析中发现所有的研究都显示肥胖及超重是膝关节骨性关节炎的危险因素。肥胖所导致的关节软骨及软骨下骨负重增加, 与各种原因导致的关节受力异常(如韧带断裂、半月板损伤等), 被认为是骨性关节炎发病的重要因素^[2]。刘兴漠等^[3]通过观察周期性张应力对兔骨性关节炎软骨细胞中p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)表达及其磷酸化的影响, 发现力学载荷可影响p38 MAPK的表达及磷酸化程度, 提示机械应力在骨性关节炎发生发展中起着重要作用。

此外, 骨性关节炎通常被认为是一种软骨的疾病, 然而越来越多的证据显示骨性关节炎更是一种骨组织的疾病^[4-7]。软骨下骨的改变甚至可能比软骨的降解更早发生, 且随着骨性关节炎的进展而加剧。软骨下骨是人体关节一种有效的机械应力吸收装置, 同时, 其营养或者细胞因子可通过潮线处的裂缝或通道被转运到覆盖其上的软骨, 影响软骨细胞的代谢^[8]。然而在体内, 软骨下骨的改变在骨性关节炎中是否先于软骨仍有待进一步的研究。

因此, 深入了解骨性关节炎早期软骨下骨机械应力相关基因的表达情况, 有助于揭示机械应力在骨性关节炎发生发展中的作用, 从而更深入了解骨性关节炎的发病机制, 为寻找骨性关节炎早期诊断及早期治疗奠定基础。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2010年7月至2011年12月在中山大学北校区实验动物中心及中山大学附属第三医院中心实验室完成。

材料:

骨关节炎软骨下骨中机械应力相关基因的表达实验所用仪器与试剂:

Main reagents and instruments:

仪器、试剂	来源
E.Z.N.A.® Tissue RNA Kit	Omega Bio-Tek, Inc., USA
All-in-One™ qPCR Mix,	Gene Copoeia, USA
All-in-One™ qPCR Primer	
SX 手术显微镜	安信化学仪器制造有限公司
电动磨钻	Strong90, New power, Korea
iQ5 Real Time PCR	Bio-Rad, USA
Detection System	
分光光度计	NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technology, Rockland
安捷伦芯片扫描仪	Agilent p/n G2565BA
杂交箱	Agilent p/n G2534A
杂交炉垫板载玻片	Agilent p/n G2534-60003
杂交炉	Agilent p/n G2545A
安捷伦芯片杂交旋转器	Agilent p/n G2530-60029
磁性搅动棒	Corning p/n 401435
磁性搅动板	Corning p/n 6795-410
染色玻片盘	Thermo Shandon p/n 121
RNasey Mini Kit	Qiagen p/n 74104
Baseline-ZERO DNase	EPICENTRE, Cat. Nos. DB0711K
Agilent Quick Amp	Agilent p/n 5190-0442
One-Color labeling kit	
安捷伦大鼠全基因芯片	Agilent, 4x44K, G4131F
Agilent Gene Expression	Agilent p/n 5188-5242
Hybridization Kit	
基因芯片洗脱液 I	Agilent p/n 5188-5325
基因芯片洗脱液 II	Agilent p/n 5188-5326

实验动物: 从中山大学实验动物中心挑选鼠龄、体质量及大小相近(10周龄, 体质量 300-325 g)的雄性 SD 大鼠 60 只, 并饲养于该中心 SPF 级屏障环境中。动物分笼饲养, 自由饮水及进食。房间温度: (23±3)°C, 相

对湿度: (60±5)%, 照明时间: 12 h/d。

方法:

SD 大鼠骨性关节炎模型的建立及软骨下骨 RNA 的提取: 将动物编号, 并按照随机法将其分为实验组($n=30$)和对照组($n=30$)。SD 大鼠的骨性关节炎造模方法及软骨下骨 RNA 的提取同之前的报道^[9]。实验组大鼠用 10% 水合氯醛(4 mL/kg)腹腔内注射麻醉后, 选取右膝关节, 去毛后, 常规消毒铺巾, 依次切开皮肤、膝关节囊, 行内侧副韧带切断+内侧半月板切除, 用 5-0 可洗手线独立缝合关节囊, 以 5-0 丝线间断缝合伤口。术后肌注 1 次青霉素 4×10^4 U 抗感染, 待麻醉苏醒后腹腔注射曲马多 (10 mg/kg) 止痛。同样的方法处理对照组大鼠, 但不切断内侧副韧带, 也不切除内侧半月板。实验组及对照组各分为 3 个观察时间点: 1, 2, 4 周。每个时间点实验组及对照组大鼠各 10 只, 提取软骨下骨 RNA 后, 其中 5 只用于基因芯片分析, 另外 5 只用于 qRT-PCR 验证, 以保证两部分实验结果的独立性。

软骨下骨 RNA 的纯化、鉴定及标记:

软骨下骨 RNA 的纯化: 使用 RNAeasy Mini Kit 对所提取的 RNA 进行纯化, 软骨下骨总 RNA $\leq 85 \mu\text{L}$, 加入 Reaction buffer 10 μL 、Baseline-ZERO Dnase 5 μL , 加 RNase-free 水, 混合成 100 μL 工作液; 37 °C 水浴 30 min; 加入 350 μL Buffer RLT, 摇匀; 加入 250 μL 无水乙醇, 充分混合; 转入 RNeasy mini 柱子内, $\geq 8\ 000 \times g$ 离心 15 s, 弃去滤过液; 吸取 500 μL Buffer RPE 到 RNeasy mini 柱子内, $\geq 8\ 000 \times g$ 离心洗涤 15 s, 弃去滤过液, 2 次; 转入 2 mL 的收集管, 全速离心 1 min; 转入 1.5 mL 收集管中, 吸取 40 μL RNase free 水, $\geq 8\ 000 \times g$ 离心洗脱 1 min。

软骨下骨 RNA 的鉴定与标记: ①将纯化后的 RNA 2 μL 在体积分数为 0.6% 的甲醛变性琼脂糖凝胶上进行电泳(电压: 180 V, 30 min), 主要观察 RNA 的 28S、18S 及 5S 三个条带是否清晰, 判断 RNA 的完整性及有无 DNA 污染。②用紫外分光光度计测量 RNA 吸光度值及浓度, 比值表示 RNA 的纯度, 该比值位于 1.8-2.0 之间, 说明 RNA 纯度高, 比值低于 1.8, 表明 RNA 存在污染。以生物素 Cy-3 标记纯化的 RNA。

杂交、基因芯片的洗脱及扫描: 采用安捷伦大鼠全基因表达谱芯片(每个芯片含 41 000 个基因探针), 每个标记的 RNA 标本分别对应一个基因芯片进行杂交。先将足量的基因芯片洗脱液预热至 37 °C, 然后按洗涤工作站说明, 进行芯片洗脱。调整好安捷伦基因芯片扫描仪的参数进行芯片扫描。

基因芯片数据的预处理与归一化校正处理: 扫描结果使用数据处理软件 Agilent Feature Extraction Software (version 10.5.1.1), 按照样点的大小和规则度、信噪比、样点周围的背景强度、样点背景的均一程度、信号的饱和程度等决定芯片数据质量的因素进行预处理, 将一些质量很低, 数据可能不准确的点予以滤出, 并对芯片信号强度和各芯片均一性进行评价。芯片数据预处理及芯片数据校正使用 Agilent GeneSpring GX software (version 11.0) 软件系统, 并对芯片数据进行归一化校正处理。根据基因差异表达的倍数、*t* 检验及 *P* 值来确定差异表达基因, 其中, 只有差异表达倍数 > 2 倍, *P* < 0.05 认为差异有显著性意义。

实时荧光定量 PCR: 采用染料法(SYBR Green I)对进行“基因芯片数据的预处理与归一化校正处理”中发现的与机械应力相关的差异表达基因水平进行相对定量分析, 按照 $\Delta\Delta Ct$ 解析法来进行实验设计, 以 GAPDH 作为内参照基因。各基因引物序列如表 1 所示。标本 RNA 反转录、qPCR 反应体系建立实验步骤按试剂盒说明操作。PCR 反应条件, 采用了标准的三步法程序进行反应: 95 °C 预变 10 min 1 个循环; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 10 s 40 个循环。

表 1 Real-time PCR 目的基因及内参 GAPDH 的引物

Table 1 Primers of real-time PCR target genes and internal control GAPDH

基因库编码	符号	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
NM_017008.3	GAPDH	CAG CCG CAT CTT CTT GTG C	GGT AAC CAG GCG TCC GAT A
NM_001108550.1	Postn	AGC ATC TTC CTC AGC CTC CT	TCC CCA ATC AGA ATC TCC CT
NM_053384	Ihh	ACAATC CCG ACA TCA TCT TCA	ATC CCA GCC TTC CGT CAC
NM_001108168	Bmp5	AGA GCA GCC AGC AAA CGG	GAT CGC GGA AAC TCA CAT AGA

主要观察指标: 基因表达的改变及其方向、程度。

统计学分析: 采用 SPSS 19.0 统计软件, 通过 *t* 检验分别对各基因的 qRT-PCR 实验结果进行统计学分析, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 机械应力相关的差异表达基因 通过基因芯片, 筛选出了在骨性关节炎大鼠模型软骨下骨中差异表达的基因, 并通过查阅既往的文献报道, 发现了几个重要

的、可能与骨性关节炎发生发展相关的差异表达基因, 见表 2。

表 2 机械应力相关基因在骨性关节炎大鼠模型软骨下骨中不同时间点的表达

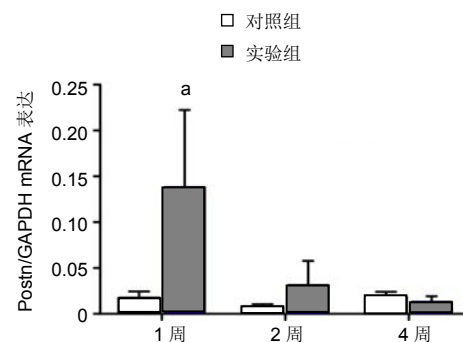
Table 2 Expression of mechanical stress related genes in subchondral bone of rat osteoarthritis model at different time points

基因库编码	符号	描述	倍数		
			1 周	2 周	4 周
NM_001108550.1	Postn	Periostin, osteoblast specific factor	6.34 ^b	3.07 ^a	
NM_053384	Ihh	Indian hedgehog		3.41 ^b	2.32 ^a
NM_001108168	Bmp5	Bone morphogenetic protein 5	2.19 ^b	2.43 ^b	

^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01。

注: 通过基因芯片, 筛选出了 3 个与机械应力密切相关的差异基因。

2.2 qRT-PCR 对差异基因进行验证 针对上面筛选出的 3 个与机械应力密切相关的差异基因, 通过 qRT-PCR 对芯片结果进行验证, 见图 1-3。这 3 个基因的 qRT-PCR 结果与芯片结果虽然不完全符合, 但表达改变的方向及趋势基本一致。实验组中, Postn 在术后第 1 周显著高表达, 术后第 2 周也出现高表达的趋势。Ihh 在术后第 1 周及第 2 周同时出现高表达, 且第 1 周差异表达倍数显著。Bmp5 也在术后第 1 周高表达, 第 2 周及第 4 周也有高表达的趋势, 但其差异表达的水平逐渐下降。

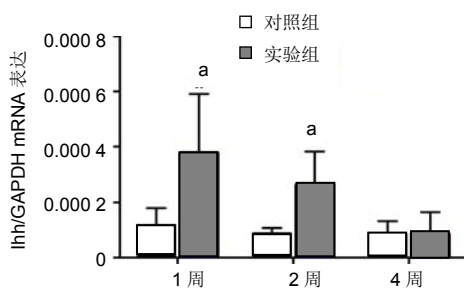


与对照组比较, ^a*P* < 0.05。

注: 实验组骨性关节炎 SD 大鼠中, Postn 在术后第 1 周显著高表达, 术后第 2 周也出现高表达的趋势。

图 1 qRT-PCR 检测 Postn 在各时间点的表达

Figure 1 Expression of Postn at each time point detected by real-time quantitative PCR

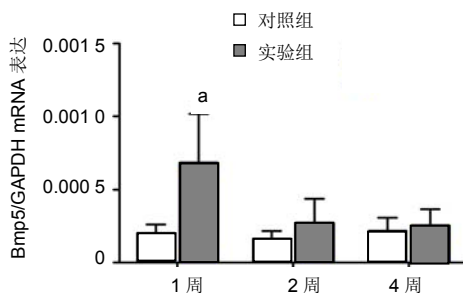


与对照组比较, $^aP < 0.05$ 。

注: 实验组骨性关节炎 SD 大鼠中, Ihh 在术后第 1 周及第 2 周同时出现高表达, 且第 1 周差异表达倍数显著。

图 2 qRT-PCR 检测 Ihh 在各时间点的表达

Figure 2 Expression of Ihh at each time point detected by quantitative real-time quantitative PCR



与对照组比较, $^aP < 0.05$ 。

注: 实验组骨性关节炎 SD 大鼠中, Bmp5 在术后第 1 周高表达, 第 2 周及第 4 周也有高表达的趋势, 但其差异表达的水平逐渐下降。

图 3 qRT-PCR 检测 Bmp5 在各时间点的表达

Figure 3 Expression of Bmp5 at each time point detected by quantitative real-time quantitative PCR

3 讨论

机械应力相关基因在本骨性关节炎模型中造模后第 1 周均出现明显的高表达。而在之前的研究中发现, 造模后 1 周组织学染色分析显示关节软骨尚没有出现明显的病理表现^[10]。一些与机械应力相关的基因(Postn、Ihh 及 Bmp5 等)在骨性关节炎发病中可能起着重要的作用。

其中, Postn 是首先在小鼠成骨细胞中发现的一个蛋白质, 高度保守, 可由转化生长因子 β 诱导, 具有促黏附和移行的功能^[11-12]; 机械应力的刺激亦可引起

Postn 表达水平的变化^[13]。Postn 不仅存在于成骨细胞中, 还存在于许多肿瘤细胞、成纤维细胞、血管平滑肌细胞、损伤部位的血管, 参与肿瘤的血管新生、转移以及细胞移行的过程^[14-17]。在乳腺癌的转移中, 浸润性的肿瘤干细胞通过诱导肺组织基底膜 Postn 的表达, 通过聚集 Wnt 配体, 激活 Wnt 通路, 从而发生乳腺癌的肺转移^[18]。另有研究发现 Postn 在病变的心瓣膜细胞中诱导血管新生和基质金属蛋白酶的产生, 从而参与瓣膜性心脏病的发病过程^[19]。

有趣的是, Wnt 通路及基质金属蛋白酶也参与骨性关节炎的发生发展, 并在这中间起着非常重要的作用^[20-26]。Wnt 通路信号传导非常复杂, 且其下游效应因 Wnt 配体、受体、拮抗物以及最终控制靶基因表达的 β -catenin/转录因子复合物特殊结合的不同而不同。其中, 惟一一个在骨性关节炎骨中被发现表达上调的 Wnt 配体——Wnt5B, 在成骨细胞分化过程中也存在表达上调的情况^[27]。已有研究证实 Wnt5B 编码的蛋白质对骨及软骨细胞都同时具有激活和抑制的效应, 根据其所结合的不同细胞表面受体, 其信号通过经典或非经典的 Wnt 通路传导^[27-29]。除了 Wnt5B 之外, 还有其他重要的 Wnt 通路相关基因被发现在骨性关节炎骨中差异表达。其中, 与对照组相比, 编码 Wnt5B 辅受体 Fzd3 的基因以及细胞外的 Wnt 拮抗物 Sfrp5 呈表达下调的改变, 这个结果也提示 Wnt 信号传导在骨性关节炎中增强, 而持续激活的经典 Wnt/ β -catenin 通路可引起基质的降解^[30]。在体外培养的软骨细胞培养基中加入 Wnt3A 或者诱导 β -catenin 的持续表达可刺激 Mmp3, Mmp13, ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 的表达, 并引起蛋白聚糖的丢失^[31-32]。Thomas 等^[33]在一个研究中于培养的软骨细胞加入 Wnt3A 预激活后, 给细胞加以一定的应力。结果显示机械应力协同 Wnt, 可抑制软骨细胞基质基因的转录, 同时增强分解代谢因子的表达, 破坏软骨的内稳态。

Wnt 及基质金属蛋白酶在骨性关节炎发生发展中的作用从侧面进一步说明了 Postn 在骨性关节炎发病中的重要性。然而, 其表达水平与骨性关节炎发生发展的关系未有报道, 有必要对该蛋白与机械应力两个因素在骨性关节炎发生发展中的作用进一步深入研究。

Ihh 是一个在机械应力信号的转导、软骨细胞增殖的激活过程中起关键作用的传导因子^[34]。重复的机械应力可刺激 Ihh 的表达, 进而反过来激活间充质细胞的增

殖以及软骨的合成^[35]。在骨性关节炎患者中, Hh信号呈激活状态, 且其在软骨细胞中的信号水平的强度与骨性关节炎的严重程度呈正相关。有研究通过阻断Hh信号通路, 发现大鼠骨性关节炎模型中关节软骨退变延缓^[36], 提示该蛋白是一个有潜力的治疗靶点, 而其在软骨下骨中的表达变化及其与骨性关节炎发病的关系未有进一步深入的报道。

Bmp5也在骨骼发育过程中起着重要作用。在大鼠胫骨骺板中, Bmp5的表达引起软骨细胞增殖及软骨基质合成的增加。同时, Bmp信号与骨组织机械应力传导密切相关^[37]。实验发现, 早在术后1周, 软骨组织未有明显组织病理学改变的情况下, Bmp5即已经明显高表达, 其与机械应力在骨性关节炎中的发病作用及骨赘的形成可能密切相关, 对其在软骨下骨中的作用值得进一步的研究。

总之, 机械应力因素在骨性关节炎发生发展中起着重要的作用, 对软骨下骨早期由机械应力诱导高表达的基因进一步的深入研究, 有望发现新的早期干预靶点, 从根本上延缓或阻断骨性关节炎病程的进展。

基金资助: 国家863高技术研究发展计划资助项目(2008AA02Z437)。

作者贡献: 实验设计为蔡道章、方航、张荣凯, 实验实施为方航、张荣凯, 实验评估为蔡道章、方航、陈郁鲜, 资料收集为方航、张荣凯、宋炎成。方航、张荣凯成文, 蔡道章、陈郁鲜审校, 蔡道章、方航对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] Blagojevic M, Jinks C, Jeffery A, et al. Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18(1):24-33.
- [2] Heijink A, Gomoll AH, Madry H, et al. Biomechanical considerations in the pathogenesis of osteoarthritis of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2012;20(3):423-435.

- [3] Liu XM, Xiang YC, Sun Q, et al. *Zhongguo Bingli Shengli Zazhi*. 2012; 28(2):362-365,370.
刘兴漠, 项禹诚, 孙青, 等. 周期性张应力对骨性关节炎软骨细胞 p38 MAPK 表达及其磷酸化的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2012, 28(2):362-365,370.
- [4] Wang XQ, Li QH. *Guowai Yixue: Shengwu Yixue Gongcheng Fence*. 1999;22(2): 100-103.
王序全, 李起鸿. 机械应力异常与关节软骨退变[J]. *国外医学: 生物医学工程分册*, 1999, 22(2): 100-103.
- [5] Dou XL, Duan XQ, Xia L, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2011;15(20):3763-3766.
窦晓丽, 段晓琴, 夏玲, 等. 骨关节炎: 关节软骨退变的相关研究与进展[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(20):3763-3766.
- [6] Zhai Y, Gao GD, Xu SY. *Zhongguo Gushang*. 2012;25(1): 83-87.
翟云, 高根德, 徐守宇. 膝关节骨关节炎的基础研究进展[J]. *中国骨伤*, 2012, 25(1): 83-87.
- [7] Felson DT, Neogi T. Osteoarthritis: is it a disease of cartilage or of bone. *Arthritis Rheum*. 2004;50(2):341-344.
- [8] Mansell JP, Bailey AJ. Abnormal cancellous bone collagen metabolism in osteoarthritis. *J Clin Invest*. 1998;101(8): 1596-1603.
- [9] Zhang R, Fang H, Chen Y, et al. Gene expression analyses of subchondral bone in early experimental osteoarthritis by microarray. *PLoS One*. 2012;7(2):e32356.
- [10] Zhang RK, Fang H, Lu HD, et al. *Zhongguo Bingli Shengli Zazhi*. 2011; 27 (12):2391-2395.
张荣凯, 方航, 卢华定, 等. Mmp3在早期骨关节炎模型软骨下骨的表达及其意义[J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27 (12):2391-2395.
- [11] Takeshita S, Kikuno R, Tezuka K, et al. Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I. *Biochem J*. 1993; 294 (Pt 1):271-278.
- [12] Horiuchi K, Amizuka N, Takeshita S, et al. Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta. *J Bone Miner Res*. 1999;14(7):1239-1249.
- [13] Ma D, Zhang R, Sun Y, et al. A novel role of periostin in postnatal tooth formation and mineralization. *J Biol Chem*. 2011;286(6):4302-4309.
- [14] Lindner V, Wang Q, Conley BA, et al. Vascular injury induces expression of periostin: implications for vascular cell differentiation and migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(1):77-83.
- [15] Gillan L, Matei D, Fishman DA, et al. Periostin secreted by epithelial ovarian carcinoma is a ligand for alpha(V)beta(3) and alpha(V)beta(5) integrins and promotes cell motility. *Cancer Res*. 2002;62(18):5358-5364.
- [16] Bao S, Ouyang G, Bai X, et al. Periostin potentially promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway. *Cancer Cell*. 2004;5(4): 329-339.
- [17] Roy S, Patel D, Khanna S, et al. Transcriptome-wide analysis of blood vessels laser captured from human skin and chronic wound-edge tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(36): 14472-14477.
- [18] Malanchi I, Santamaria-Martinez A, Susanto E, et al. Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature*. 2011;481(7379):85-89.

- [19] Hakuno D, Kimura N, Yoshioka M, et al. Periostin advances atherosclerotic and rheumatic cardiac valve degeneration by inducing angiogenesis and MMP production in humans and rodents. *J Clin Invest.* 2010;120(7):2292-2306.
- [20] 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. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(5):R100.
- [21] Yang J, Shi CH. *Nongken Yixue.* 2009;31(5): 448-451.
杨坚, 史晨辉. MMPs及相关细胞因子在骨性关节炎中的研究进展[J]. *农垦医学*, 2009, 31(5): 448-451.
- [22] Xue SH, Wang ZL, Yang HJ. *Zhongguo Difangbing Fangzhi Zazhi.* 2007; 22(6):420-423.
薛森海, 王治伦, 杨浩杰. 基质金属蛋白酶及细胞因子在骨关节炎发病机制中的研究[J]. *中国地方病防治杂志*, 2007, 22(6): 420-423.
- [23] Song PF, Kan WB, Yuan Q, et al. *Guangdong Yixue.* 2011;32(20): 2736-2738.
宋朋飞, 阚卫兵, 袁琴, 等. 基质金属蛋白酶与骨关节炎的关系[J]. *广东医学*, 2011, 32(20): 2736-2738.
- [24] Li SC, Bao J, Wang GX. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu Zazhi.* 2012;16(13):2407-2410.
李盛村, 鲍捷, 王国祥. Wnt/ β -连环蛋白信号通路在骨关节炎发生过程中的作用[J]. *中国组织工程研究杂志*, 2012, 16(13): 2407-2410.
- [25] Huang JG, Zhang XL. *Zhongguo Yundong Yixue Zazhi.* 2010; 29(4): 490-493.
黄金刚, 张晓玲. Wnt信号与骨关节炎[J]. *中国运动医学杂志*, 2010, 29(4): 490-493.
- [26] Wang ZY, Wang WY, Zhang L. *Zhongguo Jiaoxing Waike Zazhi.* 2009;17(23): 1800-1803.
王哲彦, 王文雅, 张柳. 骨性关节炎的发病机制及其与 Wnt/ β -catenin 信号通路的关系[J]. *中国矫形外科杂志*, 2009, 17(23): 1800-1803.
- [27] Hurson CJ, Butler JS, Keating DT, et al. Gene expression analysis in human osteoblasts exposed to dexamethasone identifies altered developmental pathways as putative drivers of osteoporosis. *BMC Musculoskelet Disord.* 2007;8:12.
- [28] Church V, Nohno T, Linker C, et al. Wnt regulation of chondrocyte differentiation. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 24): 4809-4818.
- [29] Shea CM, Edgar CM, Einhorn TA, et al. BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and osteogenesis. *J Cell Biochem.* 2003; 90(6):1112-1127.
- [30] Wu Q, Zhu M, Rosier RN, et al. Beta-catenin, cartilage, and osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1192:344-350.
- [31] Yuasa T, Otani T, Koike T, et al. Wnt/beta-catenin signaling stimulates matrix catabolic genes and activity in articular chondrocytes: its possible role in joint degeneration. *Lab Invest.* 2008;88(3):264-274.
- [32] Zhu M, Tang D, Wu Q, et al. Activation of beta-catenin signaling in articular chondrocytes leads to osteoarthritis-like phenotype in adult beta-catenin conditional activation mice. *J Bone Miner Res.* 2009;24(1):12-21.
- [33] Thomas RS, Clarke AR, Duance VC, et al. Effects of Wnt3A and mechanical load on cartilage chondrocyte homeostasis. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(6):R203.
- [34] Wu Q, Zhang Y, Chen Q. Indian hedgehog is an essential component of mechanotransduction complex to stimulate chondrocyte proliferation. *J Biol Chem.* 2001;276(38): 35290-35296.
- [35] Ng TC, Chiu KW, Rabie AB, et al. Repeated mechanical loading enhances the expression of Indian hedgehog in condylar cartilage. *Front Biosci.* 2006;11:943-948.
- [36] Lin AC, Seeto BL, Bartoszko JM, et al. Modulating hedgehog signaling can attenuate the severity of osteoarthritis. *Nat Med.* 2009;15(12):1421-1425.
- [37] King JA, Marker PC, Seung KJ, et al. BMP5 and the molecular, skeletal, and soft-tissue alterations in short ear mice. *Dev Biol.* 1994;166(1):112-122.