

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.37.007 [http://www.crter.org]
郭华, 夏璐, 周君, 陈世菊, 何成奇. 超声对软骨细胞凋亡、caspase-8和caspase-3表达的影响[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(37):6580-6586.

超声对软骨细胞凋亡、caspase-8和caspase-3表达的影响☆◆

郭华^{1,2}, 夏璐^{1,2}, 周君^{1,2}, 陈世菊^{1,2}, 何成奇^{1,2} (¹四川大学华西医院康复医学科, 四川省成都市 610041; ²四川省康复医学重点实验室, 四川省成都市 610041)

文章亮点:

1 caspase-3 和 caspase-8 蛋白和基因的表达在骨关节炎关节软骨明显增加, 与骨关节炎的严重程度相关。实验结果证明了在兔骨关节炎模型软骨中, 细胞凋亡指数和 caspase 3 和 caspase-8 的表达水平较高。

2 在软骨细胞凋亡、免疫印迹和 RT-PCR 实验中, 发现 caspase-3 及 caspase-8 蛋白质和基因的变化趋势是一致的, 与正常软骨表达对比, 在骨关节炎软骨增加, 超声治疗后表达减少。提示超声治疗骨关节炎模型软骨是有效的。

关键词:

组织构建; 软骨组织构建; 骨关节炎, 膝关节; 软骨细胞; 超声; 细胞凋亡; caspase-3; caspase-8; 基因

主题词:

骨关节炎; 软骨细胞; 超声治疗; 细胞凋亡; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶

摘要

背景: 超声治疗能够缓解疼痛, 改善膝关节炎患者的运动功能, 但目前关于超声治疗的文献缺乏一致性。

目的: 进一步验证超声治疗的膝关节炎有效性。

方法: 24 只兔子随机分为 3 组, 正常组不干预; 模型组兔行前交叉韧带离断诱导膝骨关节炎, 不接受任何治疗; 超声组兔建模后接受超声波治疗 10 min/次, 1 次/d, 0.3 W/cm², 1 MHz, 共治疗 10 次。采用苏木精-伊红染色进行兔关节软骨组织学观察, 运用免疫印迹和 RT-PCR 技术检测兔软骨中的 caspases3 和 caspases8 的表达, TUNEL 技术检测兔膝骨关节软骨细胞凋亡率。

结果与结论: 正常兔软骨组织软骨细胞呈柱状整齐的排列, 模型中软骨层变薄, 软骨细胞排列无序而少。超声治疗后软骨细胞重新排列, 趋于整齐, 细胞数增加。模型组为膝骨关节炎模型; 与正常组比较, 模型组和超声组改良 Mankin 评分较高, 模型组和超声组软骨细胞凋亡指数更高, 模型组高于超声组。与正常组比较, 模型组和超声组 caspase-3 和 caspase-8 表达较高, 超声治疗后两项指标表达下降。结果表明, 超声可以改善软骨组织结构、降低 caspase-3、caspase-8 的表达, 降低软骨细胞凋亡。提示超声治疗膝骨关节炎是有效的。

Ultrasound effects on chondrocyte apoptosis and the expressions of caspase-8 and caspase-3

Guo Hua^{1,2}, Xia Lu^{1,2}, Zhou Jun^{1,2}, Chen Shi-ju^{1,2}, He Cheng-qi^{1,2} (¹Department of Rehabilitation Medicine, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China; ²Sichuan Provincial Key Laboratory of Rehabilitation Medicine, Chengdu 610041, Sichuan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Ultrasound therapy can relieve pain and improve the movement function in patients with knee osteoarthritis, but there lacks of consistency in the literatures of ultrasound therapy.

OBJECTIVE: To further identify the effectiveness of ultrasound therapy in the treatment of knee osteoarthritis.

METHODS: Twenty-four rabbits were randomly divided into three groups: normal group, model group and ultrasound group. The rabbit in the normal group received no intervention; rabbits in the model group received anterior cruciate ligament transaction to establish the knee osteoarthritis model without any treatment; the rabbit in the ultrasound group received ultrasound therapy after modeling for 10 minutes once time, once per day, 0.3 W/cm², 1 MHz and treated for 10 times. Hematoxylin-eosin staining was conducted for histological observation of rabbit articular cartilage; western blot and reverse transcription PCR assessment were used to assess the expressions of caspases-3 and caspases-8 in rabbit articular cartilage, while Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling was used to assess the ratio of chondrocytes apoptosis of rabbit knee articular cartilage.

RESULTS AND CONCLUSION: The normal rabbit cartilage tissues and chondrocytes were neatly arranged in column; the middle cartilage layer of the model was thin; the chondrocytes were arranged disorderly and became less. After ultrasound therapy, the chondrocytes were rearranged neatly, and the number was increased. Compared with the normal group, the Mankin scores in the model group and ultrasound group were higher; the apoptotic rate of chondrocytes was higher in the model group and ultrasound group than in the normal group,

郭华☆, 女, 1979 年生, 2012 年四川大学毕业, 博士, 医师, 主要从事进行性骨关节病的基础与临床研究。

huaguo2006@163.com

通讯作者: 何成奇, 博士, 主任医师, 博士生导师, 硕士生导师, 四川大学华西医院康复医学科, 四川省成都市 610041; 四川省康复医学重点实验室, 四川省成都市

610041

hechqi@yahoo.com.cn,

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2013)37-06580-07

收稿日期: 2013-04-14

修回日期: 2013-04-24

(2013041420W · C)

Guo Hua☆, M.D., Physician, Department of Rehabilitation Medicine, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China; Sichuan Provincial Key Laboratory of Rehabilitation Medicine, Chengdu 610041, Sichuan Province, China huaguo2006@163.com

Corresponding author: He Cheng-qi, M.D., Chief physician, Doctoral supervisor, Master's supervisor, Department of Rehabilitation Medicine, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China; Sichuan Provincial Key Laboratory of Rehabilitation Medicine, Chengdu 610041, Sichuan Province, China hechqi@yahoo.com.cn

Received: 2013-04-14

Accepted: 2013-04-24

and was also higher in the model group than in the ultrasound group. Compared with the normal group, the expressions of caspases-3 and caspases-8 were higher in the model group and the ultrasound group, while decreased after ultrasound therapy. The results indicate that ultrasound can improve the structure of cartilage tissues, decrease the expressions of caspases-3 and caspases-8 and reduce the apoptosis rate of chondrocytes. It is effective for the treatment of knee osteoarthritis with ultrasound therapy.

Subject heading: osteoarthritis; chondrocytes; ultrasonic therapy; apoptosis; caspases

Guo H, Xia L, Zhou J, Chen SJ, He CQ. Ultrasound effects on chondrocyte apoptosis and the expressions of caspase-8 and caspase-3. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(37):6580-6586.

0 引言 Introduction

骨关节炎是一种慢性退行性关节疾病, 对患者的生活质量产生巨大影响, 临床表现为: 关节受损, 严重疼痛和最终可导致残疾^[1]。虽然骨关节炎的病因现在还不清楚, 但年龄, 遗传因素和机械力作为公认的主要危险因素^[2]。有证据表明, 老龄化之前, 关节炎可导致关节软骨细胞凋亡增加^[3]。据报道, 软骨细胞凋亡与动物和人类骨关节炎相关^[4]。

近几年, 作为信号转导过程中不可或缺的组成部分半胱氨酸蛋白酶的作用广泛研究, 对了解细胞凋亡的分子机制已取得重大进展^[5]。它已证明, 在凋亡全过程中, caspase-3 的是半胱氨酸酶中最重要的执行者之一^[6]。在最近的免疫组织化学研究中, 在骨关节炎关节软骨中, caspase-3 的表达明显增加, 并且与骨关节炎严重程度相关^[7]。细胞凋亡发起者半胱氨酸蛋白酶, 如 caspase-8, 是可以通过激活半胱氨酸蛋白酶执行者, 如 caspase-3 水解蛋白^[8]。蛋白 caspase-8 激活后, 细胞凋亡发生, 而随后活化半胱氨酸蛋白酶(外在)或之后引发 caspase9 激活(内在), 通过这两个途径相互作用^[9]。caspase-8 或 caspase9 被激活和启动, 启动下游半胱氨酸蛋白酶效应器层叠, 如 caspase-3, 劈开多种酶, 导致细胞死亡的执行^[10]。

超声普遍认为是安全的, 非常适合在日常临床实践中使用, 价格低廉, 便携和易用。超声潜在的治疗效果, 是通过颗粒震荡, 生热, 如神经鞘热振荡^[11]。目前关于超声研究很多, 表明其在膝关节炎患者, 用于治疗疼痛和促进结缔组织愈合是极为有价值的^[12]。然而, 超声的不足之处目前的文献也有相关报道, 其疗效缺乏一致性^[13]。

实验根据细胞凋亡、caspase-3 和 caspase-8 在兔膝骨关节炎软骨的表达, 来评估超声作用。这项实验结果将揭示超声治疗膝关节炎患者可能有效。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2008年3月至2009年1月在四

川大学华西临床医学院/华西医院科研基地完成。

材料: 24只新西兰白兔, 雌雄各半, 3月龄, 体重2.0-2.5 kg。由四川省成都市武侯区华西实验动物中心提供, 合格证号: SCXK(川)2004-14。

所有的动物独立饲养, 光照和黑暗时间为12 h 更替, 统一自由饮食和饮水。在建立膝骨关节炎兔模型, 遵循中华人民共和国实验动物道德委员会关于动物保护和相关法规的指导方针下进行。

超声软骨细胞凋亡、caspase-8 和 caspase-3 影响实验所用主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
TUNEL (G3250)	Promega 公司, 美国
TRIzol 试剂	Invitrogen 公司, 美国
超声治疗仪(ES-2 型)	OG GIKEN 公司, 日本

实验方法:

膝骨关节炎模型建立: 体积分数5%水合氯醛(3 mL/kg)腹腔注射到兔子。麻醉完全后, 固定于新西兰大白兔专用手术台。备皮, 0.5%碘伏消毒, 无菌纱布铺巾, 取右膝切口, 暴露前交叉韧带, 剪断前交叉韧带, 前抽屉试验阳性; 用无菌生理盐水冲洗手术野, 复位髌骨, 依次缝合关节囊、皮下组织、皮肤, 0.5%碘伏消毒皮肤切口。术后允许笼内自由活动。并按每天15 mg/kg 的剂量肌注庆大霉素(40 g/L), 预防感染, 连用5 d。术后6周兔膝骨关节炎模型成功建立。

动物分组:

24只新西兰白兔随机被分为3组, 每组8只。

正常组: 没有膝关节炎家兔健康正常兔, 没有接受任何治疗。

模型组: 正常健康兔行前交叉韧带离断术诱导膝骨关节炎, 没有接受任何治疗。

超声组: 正常健康兔行前交叉韧带离断诱导膝骨关节炎, 经过6周的造模恢复, 接受超声波治疗10 min/次, 1次/d, 0.3 W/cm², 1 MHz, 膝关节暴露。共治疗10次, 连续治疗5 d后中间停止治疗2 d再连续治疗5 d。

组织学观察: 各组兔子均于造模后8周后处死, 软骨组织是在体积分数4%甲醛固定, 石蜡包埋。5 μm 分别作苏木精-伊红染色, 安装在光镜下观察软骨细胞形态。

采用改良Mankin评分系统进行骨关节炎软骨组织病理评分^[14]。

TUNEL法检测软骨细胞凋亡: 软骨细胞的凋亡程度按照制造商的指示采用TUNEL法检测。切片标本干燥后入二甲苯中固定10 min, PBS清洗3次, 5 min/次, 浸入体积分数3%过氧化氢的PBS中5 min, 取出后用PBS洗2次, 5 min/次, 用滤纸吸去载玻片上细胞周围的多余的液体, 浸入0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0), 微波炉加热至沸腾, 后断电, 间隔10 min, 反复2次, 冷却后PBS洗涤3次, 5 min/次; 滴加一抗50 μ L/片, 置湿盒中于37 $^{\circ}$ C反应1 h; 后用PBS洗3次, 35 min/次, 用滤纸吸去载玻片上细胞周围的多余的液体, 滴加50 μ L生物素化山羊抗小鼠IgG(二抗)37 $^{\circ}$ C反应30 min; 再用PBS清洗2次, 5 min/次; 光学显微镜观察下滴加联苯二胺(DAB), 反应显色完全后用蒸馏水洗4次, 2 min/次, 再于室温用甲基绿复染15 min, 染后用流水漂洗, 干燥后用二甲苯脱水透明, 树脂封固。在荧光显微镜下在(520 \pm 20) nm和620 nm, 暗室内荧光显微镜在波长520 nm波长620 nm条件下观察, 迭加后, 红色背景下的显示黄色\淡黄色\黄绿色\绿色的细胞即为凋亡的软骨细胞。利用图像处理软件Image-Pro 6.0得到细胞凋亡指数(AI)。

免疫印迹检测兔关节软骨caspase-3 and caspase-8 的蛋白表达: 剪碎软骨组织并与裂解液以1:5的体积比混合, 冰上匀浆; 将匀浆后的悬浊液4 $^{\circ}$ C离心, 15 000 r/min 1 h, 取上清; 对所得上清液进行蛋白浓度测定; 灌制12%的分离胶和4%的浓缩胶; 将蛋白样品放入100 $^{\circ}$ C的离子浴中5 min; 按每泳道等量蛋白配置相应的上样体系; 向各泳道中加入蛋白样品及分子量Marker; 电泳条件: 浓缩胶80 V 15 min, 分离胶120 V 55 min; 剥胶, 放入转印缓冲液中振荡15 min; 取较凝胶稍大的转印膜, 放入甲醇中振荡15 min后, 与凝胶一同振荡; 将滤纸用转印缓冲液润湿后, 按阴极-滤纸-凝胶-膜-滤纸-阳极顺序组装, 进行湿转, 60 V 120 min; 取出转印膜, TTBS洗5 min \times 2次, TBS洗5 min \times 1次, 用含有0.10 kTween-20的5%脱脂奶粉4 $^{\circ}$ C封闭过夜; 取出转印膜, TTBS洗5 min \times 2次, TBS洗5 min \times 1次, 1:200倍稀释一抗并将稀释液与转印膜共同孵育, 室温2 h; 取出转印膜, TTBS洗5 min \times 2次, TBS洗5 min \times 1次, 1:5 000倍稀释二抗并将稀释液与转印膜共同孵育, 室温2 h; 取出转印膜, TTBS洗5 min \times 2次, TBS洗5 min \times 1次, 在暗室中进行ECL显色, 依据转印膜的大小, 分别取A液、B液相同滴数, 混匀, 加至转印膜上, 发光2 min, 用保鲜膜覆盖后, 置入X暗盒内进行曝光3-5 min。一次性完成显影、定影。

RT-PCR检测: 用TRIzol试剂提取各软骨组织中RNA。经2.5 g/L胰蛋白酶消化2 min, 收集于离心管中,

2 000 r/min离心5 min, pH 7.3的PBS洗涤、7 000 r/min离心10 min。每个离心管中加入TRIzol液1 mL, 室温下静置5 min。①分离: 每个离心管中加入氯仿0.4 mL, 混匀, 室温下3 min。4 $^{\circ}$ C 10 000 r/min离心15 min。留取上层无色液相。②mRNA沉淀: 将上层无色液相转入另一清洁离心管中, 加入1 mL异丙醇, 室温下10 min, 在4 $^{\circ}$ C 10 000 r/min离心10 min, 弃上清。③mRNA洗涤: 每个离心管中加入体积分数75%乙醇4 mL, 4 $^{\circ}$ C 7 500 r/min离心5 min。④mRNA溶解: 空气中干燥10 min, 将mRNA溶解于DEPC水中, -20 $^{\circ}$ C保存。mRNA浓度测定。⑤mRNA反转录(RT): 使用QIAGEN反转录试剂盒(OmniscriptTM Reverse Transcriptase for cDNA synthesis)在冰浴的微量离心管中加入10 \times Buffer RT 2.0 μ L、dNTP 2.0 μ L、Oligo-dT引物2.0 μ L、RNA酶抑制剂1.0 μ L、反转录酶1.0 μ L、DEPC水12 μ L, 共20 μ L。置于ASTEC BI-525 恒温孵育器中37 $^{\circ}$ C 60 min, 93 $^{\circ}$ C 5 min, 立即4 $^{\circ}$ C保存。⑥PCR扩增: 在微量离心管中加入DEPC水16 μ L、10 \times 缓冲液3 μ L、dNTP 2 μ L、25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μ L、引物各1 μ L, cDNA 2 μ L、Taq酶2.5 μ L共30 μ L。使用PERKIN ELMER 2400 PCR 扩增仪, 94 $^{\circ}$ C预变性10 min; 94 $^{\circ}$ C变性30 s、55 $^{\circ}$ C退火1 min、72 $^{\circ}$ C延伸2 min, 共30个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min, 4 $^{\circ}$ C保存。PCR产物电泳: 将PCR产物在1.2%琼脂糖凝胶上电泳, 样品加样量为10 μ L, 在1 \times TBE中100V电泳30 min, 用天能凝胶图像处理仪紫外光下检测PCR扩增产物的长度, 读取各条带灰度值并拍照。

引物序列及PCR产物长度:

Primer	Sequence 5-3' direction	产物长度 (bp)
Caspase-3	上游 5'-TAT TCC ACA GCA CCT GGT TA -3'	208
	下游 5'-CAA TAC ATG GAA TCT GTT TCT T -3'	
Caspase-8	上游 5'-GAT GAG GCA GAC TTT CTG CT -3'	163
	下游 5'-CAT AGT TCA CGC CAG TCA GGA T -3'	
GAPDH	上游 5'-GCC ATC ACT GCC ACC CA -3'	134
	下游 5'-CAG TGA GCT TCC CGT TC -3'	

主要观察指标: ①兔关节软骨组织苏木精-伊红染色结果。②兔关节软骨组织软骨细胞凋亡结果。③兔关节软骨组织caspase-3和caspase-8的免疫印迹检测结果。④RT-PCR检测caspase-3及caspase-8结果。

统计学分析: 使用统计软件SPSS 17.0分析, 测量数据表示为 $\bar{x}\pm s$ 。正常组, 模型组和超声组的评估用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用大白兔24只, 分为3组, 无脱失, 全部进入结果分析。

2.2 兔关节软骨组织苏木精-伊红染色结果 见图1, 2。见表1。

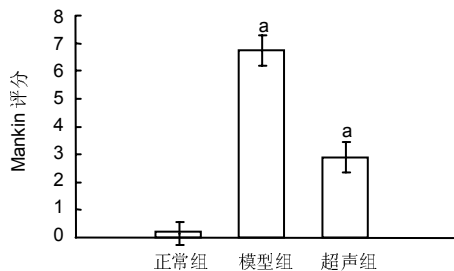


A: 正常组 B: 模型组 C: 超声组

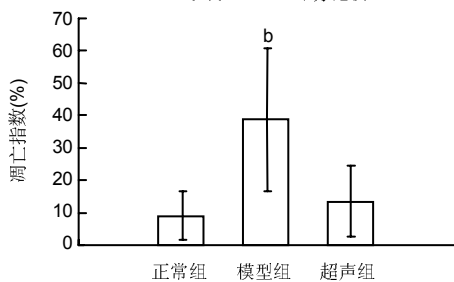
注: 模型组为膝骨关节炎模型; 由图可见正常兔软骨组织软骨细胞呈柱状整齐的排列, 模型中软骨层变薄, 软骨细胞排列无序而少; 超声治疗后软骨细胞重新排列, 趋于整齐, 细胞数增加。

图 1 正常组、模型组及超声组兔膝关节软骨组织苏木精-伊红染色结果(×400)

Figure 1 Hematoxylin-eosin staining of cartilage tissues of rabbit knee joint in the normal group, model group and ultrasound group (×400)



A: 改良 Mankin 评分比较



B: 细胞凋亡指数比较

与正常组比较, ^a $P < 0.01$; ^b $P < 0.05$ 。

注: 模型组为膝骨关节炎模型; 与正常组比较, 模型组和超声组改良 Mankin 评分较高, 模型组和超声组软骨细胞凋亡指数增高, 模型组高于超声组。

图 2 正常组、模型组及超声组改良 Mankin 评分及软骨细胞凋亡指数比较

Figure 2 Modified Mankin score and apoptosis rate of chondrocytes in the normal group, model group and ultrasound group

表 1 正常组、模型组及超声组膝关节改良 Mankin 评分及关节软骨细胞凋亡指数比较

Table 1 Modified Mankin score and apoptotic rate of chondrocytes in the normal group, model group and ultrasound group ($\bar{x} \pm s$)

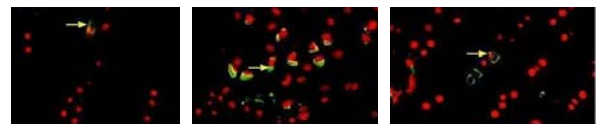
组别	Mankin 评分	细胞凋亡指数(%)
正常组	0.25±0.46	9.01±7.54
模型组	6.75±0.89 ^a	38.71±22.12 ^b
超声组	2.88±0.64 ^a	13.44±11.32

与正常组改良 Mankin 评分比较, ^a $P < 0.01$; 与正常组凋亡指数比较, ^b $P < 0.05$ 。

注: 模型组为膝骨关节炎模型; 与正常组比较, 模型组和超声组改良 Mankin 评分较高, 模型组和超声组软骨细胞凋亡指数更高, 模型组高于超声组。说明超声能降低关节软骨细胞凋亡。

可见正常兔软骨组织切片, 显示出厚厚的一层软骨, 软骨细胞呈柱状整齐的排列, 但在该模型中, 软骨层变薄, 软骨细胞变成无序而少。经过10 d的治疗, 软骨细胞重新排列, 趋于整齐, 细胞数增加。与正常组比较, 模型组, 超声组改良 Mankin 评分显著增高($P < 0.01$)。

2.3 兔关节软骨组织软骨细胞凋亡结果 软骨细胞凋亡 TUNEL 法检测表明, 与正常组比较, 模型组和超声组软骨细胞凋亡指数更高, 模型组更显著($P < 0.05$)。见图3。



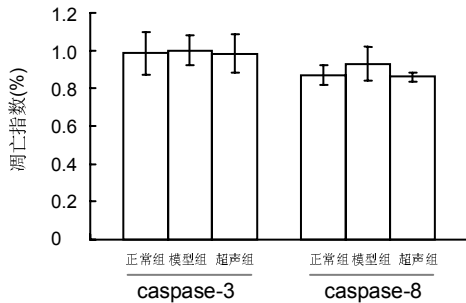
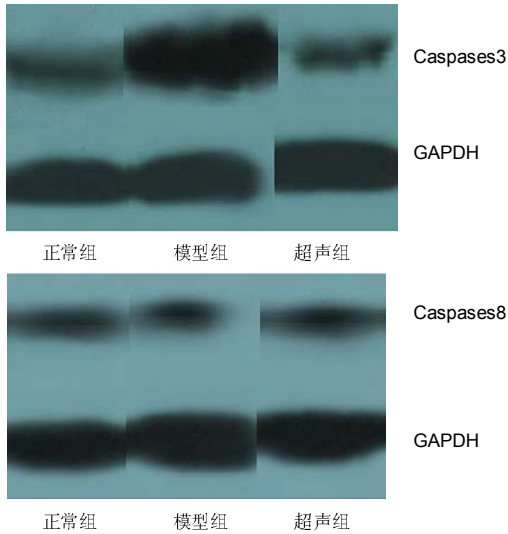
A: 正常组 B: 模型组 C: 超声组

注: 模型组为膝骨关节炎模型; 与正常组比较, 模型组和超声组软骨细胞凋亡数量更多, 模型组多于超声组。

图 3 正常组、模型组及超声组兔膝关节软骨组织细胞凋亡结果(箭头所示凋亡细胞, ×1 000)

Figure 3 Apoptosis of cartilage tissues of rabbit knee joint in the normal group, model group and ultrasound group (Arrows show the apoptosis cells, ×1 000)

2.4 兔关节软骨组织 caspase-3 和 caspase-8 的免疫印迹检测结果 目标蛋白 caspase-3 及 caspase-8 与内参 GAPDH 比率, 在正常组、模型组和超声组显示了关节软骨 caspase-3 及 caspase-8 蛋白表达, 见图4。与正常组比较, 模型组 caspase-3 和 caspase-8 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), 经超声治疗后两项指标表达下降。见表2。



注: caspase-3/GAPDH 和 caspase-8/GAPDH 数值高说明他们的表达量高。与正常组比较, caspase-3 或 caspase-8 在模型组表达较高, 而在超声组表达比模型组低。

图 4 免疫印迹法分析正常组, 模型组, 超声组兔关节软骨 caspase-3 和 caspase-8 的蛋白表达

Figure 4 Expressions of caspases-3 and caspases-8 of chondrocytes in the normal group, model group and ultrasound group with western blot assay

表 2 正常组、模型组及超声组膝关节软骨 caspase-3 和 caspase-8 的免疫印迹检测结果

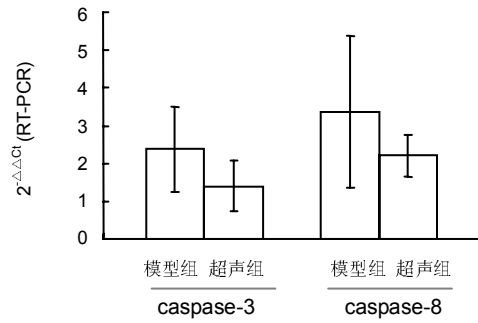
Table 2 Expressions of caspases-3 and caspases-8 of chondrocytes in the normal group, model group and ultrasound group with western blot assay ($\bar{x} \pm s$)

组别	caspase-3/GAPDH	caspase-8/GAPDH
正常组	0.98±0.11	0.87±0.05
模型组	1.00±0.08	0.93±0.10
超声组	0.98±0.11	0.86±0.03

注: 模型组为膝关节炎模型; 模型组 caspase-3 和 caspase-8 蛋白表达高于正常组, 超声组两项指标表达低于模型组。

酸脱氢酶(GAPDH)作为参考基因使基因表达(cycle threshold, Ct)值标准化。 $\Delta Ct = Ct_{\text{gene}}(Caspae-3 \text{ or } Caspae-8) - Ct(GAPDH)$; $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct(\text{模型组或超声组}) - \Delta Ct$ 。

计算出 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 值意味着相对参照基因表达的基因表达。见图5。在caspase-3 caspase-8中 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 的值大, 意味着更高的表达。



注: caspase-3 和 caspase-8 的 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 结果说明值越大表达量越多。超声组的 caspase-3 和 caspase-8 表达均低于模型组 ($\Delta Ct = Ct$ 目标基因(Caspae-3 或 Caspae-8))-CtGAPDH); $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct(\text{模型组或超声组}) - \Delta Ct$ 。

图 5 用 RT-PCR 分析正常组、模型组和超声组兔关节软骨 caspase-3 和 caspase-8 的基因表达

Figure 5 Gene expressions of caspases-3 and caspases-8 of chondrocytes in the normal group, model group and ultrasound group with reverse transcription PCR

表 3 比较正常组、模型组和超声组 caspase-3 和 caspase-8 的 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ (每个样品的基因表达与正常平均量的相对表达)

Table 3 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ value of caspases-3 and caspases-8 in the normal group, model group and ultrasound group (the gene expression of each sample and the relative expression of normal average reference gene)

组别	$2^{-\Delta \Delta Ct}$ caspase-3	$2^{-\Delta \Delta Ct}$ caspase-8
模型组	2.38±1.13	3.37±2.01
超声组	1.40±0.66	2.20±0.27

注: caspase-3 和 caspase-8 的 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 结果说明值越大表达量越多。超声组的 caspase-3 和 caspase-8 表达均低于模型组 ($\Delta Ct = Ct$ 目标基因(Caspae-3 或 Caspae-8))-CtGAPDH); $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct(\text{模型组或超声组}) - \Delta Ct$ 。

2.5 RT-PCR检测caspase-3及caspase-8结果 定量分析caspase-3 及caspase-8基因的表达。用甘油三磷

3 讨论 Discussion

因为caspase-3和caspase-8是在所有已知的死亡

受体信号转导的重要组成部分^[15], 细胞凋亡可在膝骨关节炎中发挥重要作用。实验观察了 caspase-3 和 caspase-8 及蛋白和基因表达, 以确定这些酶是否在兔膝骨关节炎模型中发挥作用。实验的目的是通过理解细胞凋亡的分子机制, 以确定超声在对膝骨性关节炎治疗的成效。

实验苏木精-伊红染色结果发现软骨细胞造模细胞数目变少, 超声治疗后细胞数量增加。改良 Mankin 评分可以反映慢性骨关节炎发展进程。在软骨细胞凋亡、免疫印迹和 RT-PCR 实验中, 发现 caspase-3 及 caspase-8 蛋白质和基因的变化趋势是一致的, 与正常软骨表达对比, 在骨关节炎软骨增加, 超声治疗后表达减少。caspase-3 和 caspase-8 蛋白和基因的表达在骨关节炎关节软骨明显增加, 与骨关节炎的严重程度相关。所有的结果是一致的。结果证明了在兔骨关节炎模型软骨中, 细胞凋亡指数和 caspase 3 和 caspase-8 的表达水平较高, 而他们在超声干预兔骨关节炎模型低表达。结果表明, 超声是一种治疗膝骨关节炎的有效方法。

有证据表明, 软骨细胞凋亡的促进了进程, 细胞凋亡在骨关节炎发展进程中具有重要作用^[16-17]。半胱氨酸蛋白酶家族, 涉及细胞凋亡的启动和执行^[18]。Pelletier 等^[19]证明了 caspase 3 选择性抑制剂, 减少 caspase 3 表达, 减少软骨细胞凋亡, 其表达与软骨细胞凋亡和骨关节炎病变相关。caspase-3 是细胞凋亡最重要的半胱氨酸蛋白酶的执行蛋白, 已证实人类的骨关节炎和手术引起的啮齿类骨关节炎, caspase-3 的表达增加^[20]。然而, 细胞凋亡可能是参与关节软骨的病理病变的重要组成部分, 在骨关节炎进程中, 上调凋亡可能是骨关节炎疾病的晚期阶段^[21]。Robertson^[22]曾报道说, 在人或动物模型的骨关节炎软骨中观察 caspase-3 和 caspase-8 的表达。caspase-3 通过 caspase-8 激活, 是由膜上死亡受体或线粒体释放细胞色素 C 有活性的^[23]。caspase-8 是所有已知的死亡受体在信号转导中的重要组分, 在软骨细胞凋亡中发挥重要作用^[24]。唐伟等^[25]发现的 caspase-8 活化, 从而激活下游 caspase 3, 并确认了 caspase-8 在细胞凋亡中的作用。蛋白裂解可描述在细胞凋亡中, 据报 caspase-3 和 caspase-8 在凋亡相关涉及蛋白裂解, 而在骨关节炎高 caspase-3 的表达调节蛋白裂解^[26-28]。所有的研究可以告诉提示, 细胞凋亡率和 caspase-3 和 caspase-8 蛋白的表达, 反映了骨关节炎发展进程, 因此他们可以反映骨关节炎治疗的效果。

关节炎的治疗可分为 4 个部分: ①疼痛治疗。②骨骼结构不稳。③营养不良。④激素不平衡。骨关节炎的物理治疗多样, 包括运动, 超音波, 短波透热疗法, 冷冻疗法, 手法, 经皮神经电刺激, 针灸等^[29]。超声是由 1 MHz 和 3 兆高频声波, 声能转换成电能, 然后转换成能, 因为它通过对不同抗性组织改变阻抗^[30]。

近 40 年, 仅限于 0.5-2.5 W/cm² 包括热效应和非热性能强度的超声, 已广泛使用, 以治疗肌肉骨骼疾病, 如肌腱炎, 腱鞘炎和骨关节炎等^[31]。超声被推荐应用急性疼痛, 炎症和活动受限^[32]。

实验的骨关节炎造模采用的是可以导致真正不稳定的以及严重的软骨退变前交叉韧带离断手术方式, 这种方法通常用来模拟真实发生在狗和人中的骨关节炎情况^[33-34]。这种模型在模拟发生的疾病和治疗的发病机制情况下为研究骨关节炎提供了一个机会。

实验表明, 超声治疗骨关节炎模型软骨是有效的, 使用超声对骨关节炎患者的临床治疗可能是有效的。

作者贡献: 设计、实施、评估为本课题组成员, 均受过专业培训。

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。

学术术语: caspase- 全称为含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cysteiny l aspartate specific proteinase), 是一组存在于细胞质中具有类似结构的蛋白酶, 其与真核细胞凋亡密切相关, 并参与细胞的生长、分化与凋亡调节。

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 References

- [1] DeGroot J, Verzijl N, Budde M, et al. Accumulation of Advanced Glycation End Products Decreases Collagen Turnover by Bovine Chondrocytes. *Experimental Cell Res.* 2001; 266:303-310.
- [2] Goldring MB, Goldring SR. Osteoarthritis. *J Cell Physiol.* 2007; 213:626-634.
- [3] Adams CS, Horton WE Jr. Chondrocyte apoptosis increases with age in the articular cartilage of adult animals. *Anat Rec.* 1998; 250:418-425.
- [4] Horton WE Jr, Yagi R, Laverty D, et al. Overview of studies comparing human normal cartilage with minimal and advanced osteoarthritic cartilage. *Clin Exp Rheumatol.* 2005; 23:103-112.
- [5] Lockshin RA, Zakeri Z. Caspase-independent cell death? *Oncogene.* 2004; 23: 2766-2773.
- [6] Sandmark H, Hogstedt C, Vingard E, et al. Osteoarthritis of the knee in men and women in association with overweight, smoking, and hormone therapy. *Ann Rheum Dis.* 1999; 58: 151-155.
- [7] Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in. CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature.* 1998; 391:96-99.

- [8] Matsuo M, Nishida K, Yoshida A, et al. Expression of Caspase-3 and-9 relevant to cartilage destruction and chondrocyte apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Acta Med Okayama*.2001; 55:333-340.
- [9] Colussi PA, Harvey NL, Shearwin-Whyatt LM, et al. Conversion of proCaspase-3 to an autoactivating caspase by fusion to the Caspase2 prodomain. *J Biol Chem*.1998; 273: 26566-26570.
- [10] Chrysis D, Zaman F, Chagin AS, et al. Dexamethasone Induces Apoptosis in Proliferative Chondrocytes through Activation of Caspases and Suppression of the Akt-Phosphatidylinositol 3_-Kinase Signaling Pathway. *Endocrinology*. 2004; 146(3):1391-1397.
- [11] Klaiman MD, Shrader JA, Danoff JV, et al. Phonophoresis versus ultrasound in the treatment of common musculoskeletal conditions. *Med Sci Sports Exerc*. 1998; 30:1349-1355.
- [12] R Marks, S Ghanagaraja, M Ghassemi. Ultrasound for Osteo-arthritis of the Knee. *Physiotherapy*. 2000; 86(9): 452-463.
- [13] Srbely JZ. Ultrasound in the management of osteoarthritis: part I: a review of the current literature. *J Can Chiropr Assoc*. 2008; 52(1):30-37.
- [14] Mankin HJ, Johnson ME, Lippiello L. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. III. Distribution and metabolism of amino sugar-containing macromolecules. *J Bone Joint Surg Am*. 1981; 63: 131-139.
- [15] Matsuda N, Takano Y, Kageyama S, et al. Silencing of caspase-8 and caspase-3 by RNA interference prevents vascular endothelial cell injury in mice with endotoxic shock. *Cardiovascular Research*. 2007; 76:132-140.
- [16] D'Lima DD, Hashimoto S, Chen PC, et al. Human chondrocyte apoptosis in response to mechanical injury. *Osteoarthritis Cartilage*. 2001; 9 (8):712-719.
- [17] Aigner T, Kim HA. Apoptosis and cellular vitality: issues in osteoarthritic cartilage degradation. *Arthritis Rheum*.2002; 46(8):1986-1996.
- [18] Alnemri ES. Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem*. 1997; 64:33-42.
- [19] Pelletier JR, Jovanovic DV, Lascau-Coman V, et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces progression of experimental osteoarthritis in vivo. Possible link with the reduction in chondrocyte apoptosis and caspase-3 level. *Arth Rheum*.2000; 43:1290-1299.
- [20] Matsuo M, Nishida K, Yoshida A, et al. Expression of caspase-3 and-9 relevant to cartilage destruction and chondrocyte apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Acta Med Okayama*. 2001; 55:333-340.
- [21] Héraud F, Héraud A, Harmand MF. Acknowledgments Apoptosis in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Ann Rheum Dis* 2000; 59:959-965.
- [22] Robertson CM, Pennock AT, Harwood FL, et al. Characterization of pro-apoptotic and matrix-degradative gene expression following induction of osteoarthritis in mature and aged rabbits. *Osteoarthritis Cartilage*.2006; 14(5): 471-476.
- [23] Ashkenazi A, Dixit VM. Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science*. 1998; 281(5381):1305-1308
- [24] Matsuda N, Takano Y, Kageyama S, et al. Silencing of caspase-8 and caspase-3 by RNA interference prevents vascular endothelial cell injury in mice with endotoxic shock. *Cardiovascular Research*. 2007;76: 132-140.
- [25] Tang W, Liu Q, Wang X, et al. Involvement of Caspase-8 in Apoptosis Induced by Ultrasound-Activated Hematoporphyrin in Sarcoma 180 Cells In Vitro. *J Ultrasound Med*. 2008; 27: 645-656.
- [26] Hashimoto M, Inoue S, Ogawa S, et al. Rapid fragmentation of vimentin in human skin fibroblasts exposed to tamoxifen: a possible involvement of caspase-3. *Biochem Biophys Res Commun*.1998; 247: 401-406.
- [27] Morishima N. Changes in nuclear morphology during apoptosis correlate with vimentin cleavage by different caspases located either upstream or downstream of Bcl-2 action. *Genes Cells*. 1999; 4: 401-414.
- [28] Sharif M, Whitehouse A, Sharman P, et al. Increased apoptosis in human osteoarthritic cartilage corresponds to reduced cell density and expression of caspase-3. *Arthritis Rheum*. 2004; 50: 507-515.
- [29] Goyal L. Cell death inhibition: keeping caspases in check. *Cell*. 2001;104(6):805-808.
- [30] Rufus Adesoji Adedoyin, Matthew O B Olaogun, Oluwatosin Olutola, et al. Effect of Interferential Current Stimulation in Management of Osteoarthritic Knee Pain. *Physiotherapy*. 2002; 188(8):493-499.
- [31] Kozanoglu E, Basaran S, Guzel R, et al. Short term efficacy of ibuprofen phonophoresis versus continuous ultrasound therapy in knee osteoarthritis. *Swiss medical weekly*.2003; 133: 333-338.
- [32] Sharma L. Nonpharmacologic management of osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2002;14:603-607.
- [33] Marshall KW, Chan AD. Arthroscopic anterior cruciate ligament transection induces canine osteoarthritis. *J Rheumatol*. 1996; 23:338-343.
- [34] Visco DM, Hill MA, Widmer WR, et al. Experimental osteoarthritis in dogs: a comparison of the Pond-Nuki and medial arthrotomy methods. *Osteoarthritis Cartilage*. 1996; 4:9-22.