

- factor 4 and Krüppel-like factor 5 on the promoter of the Krüppel-like factor 4 gene (J). *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 2736-41.
- 26 Chen ZY, Shie JL, Tseng CC. STAT1 is required for IFN- γ -mediated gut-enriched Krüppel-like factor expression (J). *Exp Cell Res*, 2002; 281: 19-27.
- 27 Dang DT, Mahatan CS, Dang LH. Expression of the gut-enriched Krüppel-like factor (Krüppel-like factor 4) gene in the human colon cancer cell line RKO is dependent on CDX2 (J). *Oncogene* 2001; 20: 4884-90.
- 28 Deaton RA, Gan Q, Owens GK. Sp1-dependent activation of KLF4 is required for PDGF-BB-induced phenotypic modulation of smooth muscle (J). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296: H1027-37.
- 29 Moustakas A, Pardali K, Gaal A *et al.* Mechanisms of TGF- β signaling in regulation of cell growth and differentiation (J). *Immunol Lett*, 2002; 82: 85-91.
- 30 Li HX, Han Mei, Michel Bernier *et al.* Krüppel-like factor 4 promotes differentiation by transforming growth factor- β receptor-mediated Smad and p38 MAPK signaling in vascular smooth muscle cells (J). *J Biol Chem* 2010; 285: 17846-56.
- 31 Zheng H, Pritchard DM, Yang XD *et al.* KLF4 gene expression is inhibited by the notch signaling pathway that controls goblet cell differentiation in mouse gastrointestinal tract (J). *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296: 490-8.
- 32 Ghaleb AM, Aggarwal G, Bialkowska AB *et al.* Notch inhibits expression of the Krüppel-like factor 4 tumor suppressor in the intestinal epithelium (J). *Mol Cancer Res* 2008; 6: 1920-7.
- 33 Wang C, Han M, Zhao XM *et al.* Krüppel-like factor 4 is required for the expression of vascular smooth muscle cell differentiation marker genes induced by all-trans retinoic acid (J). *J Biochem* 2008; 144: 313-21.
- 34 Feinberg MW, Cao Z, Wara AK *et al.* Krüppel-like factor 4 is a mediator of proinflammatory signaling in macrophages (J). *J Biol Chem* 2005; 280: 38247-58.
- 35 Chen ZY, Shie J, Tseng C. Up-regulation of gut-enriched Krüppel-like factor by bama in human colon carcinoma cells (J). *FEBS Lett* 2000; 477: 67-72.
- 36 Chen ZY, Rex S, Tseng CC. Krüppel-Like Factor 4 is transactivated by butyrate in colon cancer cells (J). *J Nutr* 2004; 134: 792-8.
- 37 Liu S, Zhang HT, Zhu LY. Krüppel-Like Factor 4 is a novel mediator of selenium in growth inhibition (J). *Mol Cancer Res* 2008; 6: 306-13.
- 38 Garvey SM, Sinden DS, Schoppee Bortz PD *et al.* Cyclosporine up-regulates Krüppel-like factor-4 (KLF4) in vascular smooth muscle cells and drives phenotypic modulation in vivo (J). *JPET* 2010; 333: 34-42.

(2012-01-31 收稿 2012-10-10 修回)

(编辑 曹梦园)

低频脉冲超声对骨关节炎中软骨细胞的影响

张永晟 陈 健¹ 何剑全 (厦门大学 福建 厦门 361000)

(关键词) 低频脉冲超声; 骨关节炎; 软骨细胞

(中图分类号) R68 (文献标识码) A (文章编号) 1005-9202(2013)10-2477-03; doi: 10.3969/j.issn.1005-9202.2013.10.134

超声被广泛应用于临床的诊断和治疗,但是临床上低频脉冲超声(LIPU)的应用却非常有限。在实验中,LIPU的应用却是很广泛。在许多的动物实验中证实,LIPU对许多结缔组织疾病有一定疗效。

骨关节炎(OA)是以关节软骨细胞、细胞外基质、软骨下骨等合成与分解代谢失衡,关节软骨损坏为特征的全关节疾病。OA是临床上最常见的一类关节疾病,已成为老年人致残的一个主要原因。据初步调查我国OA的发病率随着增龄而增加,40岁以上人群骨关节炎患病率为27.8%,70岁以上为46.6%^[1]。美国的调查数据显示,OA是导致50岁以上男性丧失工作能力的第2号杀手,仅次于心血管疾病^[2]。随着我国老龄化加速,OA已经成为医患及社会关注的焦点。透明软骨是一种特殊组

织,透明软骨中包含大量的水分、致密的细胞外基质以及包被在其中的软骨细胞。在透明软骨中,没有血管,软骨细胞所需要的营养全靠周围的滑液来供给。软骨细胞合成细胞外基质,维持基质的完整。关节软骨的退变是整个退变过程的始动因素,是整个疾病发生过程中的关键环节^[3,4]。透明软骨的生物学作用取决于细胞外基质的结构及构成,细胞外基质占总重量的90%,主要由II型胶原、蛋白多糖及水构成。正是由于这种特殊的结构,妨碍了透明软骨的修复,加速了骨关节炎的发展。

以往的研究发现,低频脉冲超声具有提高细胞内DNA和蛋白质的合成,改变细胞膜的渗透率以及对骨科某些疾病也有一定的作用,因此提出LIPU可能是一种治疗软骨病损的新方法。基于LIPU能够对骨关节炎进展中的软骨细胞、细胞外基质代谢产生各种影响,因此笔者从软骨细胞及基质代谢作一综述。

1 LIPU对软骨细胞生长、增殖的影响

以往的研究表明,在动物模型中LIPU对软骨细胞具有保护作用,并且能够促进软骨细胞的修复。但是,软骨细胞的生存也受到其他因素的影响,比如细胞的繁殖以及细胞外基质的

基金项目:国家自然科学基金资助(81272168)

1 厦门大学附属中山医院康复医学科

通讯作者:陈 健(1964-),男,博士,主任医师,硕士生导师,主要从事骨与关节疾病康复研究。

第一作者:张永晟(1987-),男,在读硕士,主要从事骨与关节疾病康复研究。

生成。软骨细胞在体外培养主要有两种方法,分别是单层培养和模拟体内生长环境的 3D 模式培养。根据不同的体外细胞培养方式进行了研究,但是由于 LIPU 所涉及的参数较多,如强度、频率、作用时间及脉冲比等,所得的结果不同,甚至是相反的。有些实验结果表明,LIPU 能够极大促进软骨细胞的增殖,细胞外基质(ECM)的合成以及增加蛋白多糖(PG)的比值。同时,也有实验结果却得出了相反的结论,指出 LIPU 对软骨细胞毫无作用。Boopalan 等⁽⁵⁾的实验中,用新西兰兔作为实验对象,分为实验组和对照组。实验组经过 LIPU 频率为 1Hz,电压为 20 V,电流为 ± 30 mA,每天 1 h 处理 6 w 后,发现兔膝关节软骨细胞数量比对照组数量明显增加。而在 Schmidt-Rohlfing 等⁽⁶⁾的实验中得出的结果是 LIPU 对软骨细胞没有作用。

在体内实验中,Dunkin Hartley 豚鼠是很好的骨关节炎动物模型。这种豚鼠能够自发产生骨关节炎,在组织学上 3 个月就能在胫骨平台上观察到组织学上的改变,并且在今后的 9 个月,软骨的退行性改变能够一直进展下去,所以该豚鼠是很好的骨关节炎模型。通过 LIPU 对患有骨关节炎豚鼠的治疗,Ciomboretal 等⁽⁷⁾的实验结果表明,经过 LIPU 治疗的豚鼠,软骨组织的厚度明显高于非治疗组。LIPU 对软骨细胞增殖的作用机制可能存在以下方面:磁场直接作用于细胞膜改变跨膜电位,引起其离子通道活性改变,致使 Ca^{2+} 内流,细胞内 Ca^{2+} 浓度增加激活细胞内其他信号通路⁽⁸⁾;增加细胞内第二信使 cAMP 的浓度,由于磁场引起细胞跨膜电位改变而引起细胞内部分离子浓度的改变,触发 cAMP-蛋白激酶 A 信号转导通道,引起细胞功能的改变⁽⁸⁾;在磁场洛仑兹力的作用下,细胞核内带电的氢离子运动轨迹发生改变,部分氢离子可在不同的碱基对之间转移,进而使 DNA 中某些位置的碱基序列发生,从而改变细胞内某些基因的表达水平⁽⁹⁾。通过体内、体外实验的研究表明,LIPU 在一定的强度、频率、处理时间下对软骨细胞有保护作用,并能够促进软骨细胞增殖。

2 LIPU 对软骨细胞凋亡的影响

骨关节炎作为一种退行性病变,软骨细胞的代谢起到了重要的作用。在生理情况下,软骨细胞的分解代谢和合成代谢处于平衡状态,维持软骨细胞外基质结构和功能的完整性,而软骨细胞凋亡既可以维持这种平衡,也可以破坏这种平衡。Hashimoto 等⁽¹⁰⁾用流式细胞技术检测到 OA 软骨细胞 22.3% 发生凋亡,而正常软骨细胞为 4.8%。Héraud 等⁽¹¹⁾采用荧光激活细胞分类法(FACS)、原位杂交及脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)等方法观察人正常和 OA 股骨头关节软骨,发现 OA 患者中有 18%~21% 软骨细胞表现出凋亡特征,而正常关节软骨中只有 2%~5% 凋亡细胞。国内学者秦泗通等⁽¹²⁾通过对大鼠行单侧膝关节前交叉韧带切除术(ACLT)造模后与正常组比较,凋亡指数分别为 $(11.31 \pm 1.34)\%$ 和 $(1.48 \pm 0.38)\%$ 。综上所述,尽管软骨细胞的凋亡比例各家报道略有差别(差异可能与检测方法或实验对象不同有关),但均证实了 OA 关节软骨细胞的凋亡高于正常关节软骨细胞。因此,阐明骨关节炎发生过程中软骨细胞凋亡的机制对于骨关节炎的防治有重要意义。与一般细胞凋亡相比,OA

软骨细胞凋亡有其独特性:①将关节软骨基质泡分离出来连同正常的软骨细胞以及软骨细胞诱生的凋亡小体进行三磷酸核苷酸磷酸脱氢酶(NTPPH)的活性检测,发现 NTPPH 在软骨细胞间隙内或软骨基质间凋亡小体内的活性明显升高,由于 NTPPH 与钙化沉积和骨的钙化有关,因此凋亡小体可能有加速关节软骨钙化的功能⁽¹³⁾;②由于关节软骨中无血管分布,当软骨细胞发生凋亡时,凋亡小体无法被巨噬细胞带走而滞留在关节软骨内,影响关节软骨正常生理功能,只有当软骨基质发生降解,凋亡小体才有可能被释放到关节间隙中而被清除;③软骨细胞凋亡与基质降解密切相关⁽¹⁴⁾,当关节软骨细胞过度凋亡时,由软骨细胞合成的基质减少,破坏其生存环境,形成恶性循环。现在对软骨细胞的凋亡研究都集中在凋亡途径上。软骨细胞的凋亡主要有 NO 和 Fas 两种途径介导,是由 Hashimoto 最先阐明的。另外软骨细胞的凋亡也与原癌基因的表达有关,软骨细胞的存活依赖于癌基因之间的平衡,Bcl22 基因家族、P53 基因、ICE 基因家族、c-myc 基因等均可调控软骨细胞凋亡途径,其中 Bcl22 基因家族和 P53 基因研究较为深入。通过对凋亡过程中胞内信号转导途径与级联反应中关键步骤的研究深入,利用药物切断其信号传导途径抑制软骨细胞凋亡,已成为目前的研究重点。

3 LIPU 对软骨细胞基质的影响

软骨细胞被包被在细胞基质当中,这就构成了软骨细胞中的微环境。因此,软骨中细胞基质的多少直接影响了软骨细胞的功能。关节软骨中的基质蛋白合成和分解平衡是维系正常关节功能的重要因素。其中,蛋白多糖和 II 型胶原是关节软骨的两种重要成分。两种成分的减少在骨关节炎进展中显得非常重要^(15,16)。因此,也有大量研究集中于 II 型胶原、蛋白多糖的合成代谢等⁽¹⁷⁻¹⁹⁾。在许多动物实验和体外细胞培养中发现,LIPU 能够增加蛋白多糖和 II 型胶原的表达。在体外的细胞培养中,笔者通过 RT-PCR 分析发现,LIPU 能够增加基质蛋白的表达水平,但是由于受到外部条件的影响,基质蛋白的表达并不是很稳定。在人关节炎软骨细胞的培养中,经过 200 mW/cm² LIPU 的作用下,基质蛋白的合成有明显的增加⁽¹⁸⁾。在一些实验中,通过免疫组化分析也能够发现蛋白多糖和 II 型胶原在一些特定的部位有明显的增加。在 De Mattei 等⁽²⁰⁾的实验中,不同频率的 LIPU 均对蛋白多糖的表达有不同程度的增加。另外,金属蛋白酶(MMPs)和金属蛋白酶抑制剂(TIMPS)在骨关节炎中也扮演着重要的角色。二者的平衡在骨关节炎的进展中也起到了重要的作用。因此,改变金属蛋白酶和金属蛋白酶抑制剂的平衡也就成为了骨关节炎治疗的一条重要途径。在 BYoung-Hyun 等⁽²¹⁾的实验中,LIPU 抑制了 MMP1 的表达,同时 TIMP-2 的表达增加。在 Ito 等⁽²²⁾的实验中,在不同强度的 LIPU 作用下,MMP1 和 MMP13 的 mRNA 表达都有所增加。以上研究都表明了 LIPU 能够减少关节软骨中基质蛋白的丢失以及增加基质的完整性。

4 总结

LIPU 在低强度的磁场(0.1 W/cm²)能够促进组织的修

复⁽²³⁾ 并被应用于临床⁽²⁴⁾ 作为一种无创的治疗方法, LIPU 对软骨细胞及其基质具正向调节作用潜能。近年来研究表明, LIPU 有利于提高软骨细胞修复后的组织学质量, 一定强度、一定条件下的 LIPU 对软骨细胞活性无影响并促进细胞分泌基质等, LIPU 可能是一种治疗软骨病损的新方法, 为关节软骨病损的无创修复带来新的希望。LIPU 能够影响软骨细胞的生长、繁殖及凋亡, 影响细胞外基质的代谢, 但是由于磁场的生物学效应复杂且受到场强、磁场频率和刺激时间的共同影响^(25 26), 寻找安全有效的磁场参数, 深入探究其机制, 还有待进一步的研究。

5 参考文献

- 1 王伟, 王坤正, 党小谦, 等. 中老年人人群骨关节炎的流行病学研究 (J). 中国老年学杂志 2007; 27(3): 566-8.
- 2 叶春婷, 黄耀熊, 杨小红, 等. Caspase3 siRNA 抑制关节软骨细胞的凋亡 (J). 中国组织工程研究与临床康复 2009; 13(50): 9832-6.
- 3 Garstang SV, Stitik TP. Osteoarthritis: epidemiology, risk factors, and pathophysiology (J). Am J Phys Med Rehabil 2006; 85(11): S2-S11.
- 4 沙湖, 杨莉. 骨关节炎病理变化研究进展 (J). 实用医院临床杂志. 2011; 8(2): 180-3.
- 5 Boopalan PR, Arumugam S, Livingston A, et al. Pulsed electromagnetic field therapy results in healing of fullthickness articular cartilage defect (J). Intern Orthop 2011; 35(1): 143-8.
- 6 Schmidt-Rohlfing B, Silny J, Woodruff S, et al. Effects of pulsed and sinusoid electromagnetic fields on human chondrocytes cultivated in a collagen matrix (J). Rheumatol Intern 2008; 28(10): 971-7.
- 7 Ciombor DM, Lester G, Aaron RK, et al. Low frequency EMF regulates chondrocyte differentiation and expression of matrix proteins (J). Orthop Res 2002; 20(1): 40-50.
- 8 任凯, 吴华, 赵文春, 等. 工频电磁场对体外培养的小鼠骨髓间充质干细胞增殖与分化的影响 (J). 中华物理医学与康复杂志, 2004; 26(7): 385-7.
- 9 Focke F, Schuermann D, Kuster N, et al. DNA fragmentation in human fibroblasts under extremely low frequency electromagnetic field exposure (J). Mutat Res 2010; 63(1-2): 74-83.
- 10 Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S, et al. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis (J). Arthritis Rheum 1998; 41(9): 1632-8.
- 11 Héraud F, Héraud A, Harmand MF. Apoptosis in normal and osteoarthritic human articular cartilage (J). Ann Rheumatic Dis 2000; 59(12): 959-65.
- 12 秦泗通, 蒋青, 黄际河, 等. p38 丝裂原活化蛋白激酶抑制剂对大鼠骨关节炎软骨细胞凋亡的影响 (J). 山东医药 2008; 48(6): 628.
- 13 Hashimoto S, Ochs RL, Rosen F. Chondrocyte derived apoptotic and calcification of articular cartilage (J). Proc Nat Acad Sci U S A 1998; 95(6): 3094-9.
- 14 Thomas CM, Fuller CJ, Whittles CE. Chondrocyte death by apoptosis is associated with cartilage matrix degradation (J). Osteoarthritis Cartilage 2007; 15(1): 27-34.
- 15 Hollander AP, Heathfield TF, Webbe RC. Increased damage to type II collagen in osteoarthritic articular cartilage detected by a new immunoassay (J). Clin Invest 1994; 93(4): 1722-32.
- 16 Hollander AP, Pidoux I, Reiner A, et al. Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration (J). J Clin Invest 1995; 96(6): 2859-69.
- 17 Korstjens CM, vander Rijt RHH, Albers GHR, et al. Low-intensity pulsed ultrasound affects human articular chondrocytes invitro (J). Med Biol Eng Comput 2008; 46(12): 1263-70.
- 18 Min BH, Woo JI, Cho HS. Effects of low-intensity ultrasound (LIUS) stimulation on human cartilage explants (J). Scand J Rheumatol 2006; 35(4): 305-11.
- 19 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). J Orthop Res 2010; 28(3): 361-9.
- 20 De Mattei M, Fini M, Setti S, et al. Proteoglycan synthesis in bovine articular cartilage explants exposed to different low frequency low energy pulsed electromagnetic fields (J). Osteoarthritis Cartil 2007; 15(2): 163-8.
- 21 BYoung-Hyun M, Byung HC, So RP. Low intensity ultrasound as a supporter of cartilage regeneration and its engineering (J). Biotechnol Bio-process Eng 2007; 11(1): 22-31.
- 22 Ito A, Aoyama T, Yamaguchi S, et al. Low-intensity pulsed ultrasound inhibits messenger RNA expression of matrix metalloproteinase-13 induced by interleukin-1 β in chondrocytes in an intensity-dependent manner (J). Orig Contrib 2012; 38(10): 1726-33.
- 23 Khanna A, Nelmes RTC, Gougoulas N, et al. The effects of LIPUS on soft-tissue healing: A review of literature (J). Brit Med Bull 2009; 89(1): 169-82.
- 24 Watanabe Y, Matsushita T, Bhandari M, et al. Ultra-sound for fracture healing: Current evidence (J). J Orthop Trauma 2010; 24: S56-S61.
- 25 Pezzetti F, De Mattei M, Caruso A, et al. Effects of pulsed electromagnetic fields on human chondrocytes: an in vitro study (J). Calcif Tissue Int 1999; 65(5): 396-401.
- 26 Cakir DU, Yokus B, Akdag MZ, et al. Alterations of hematological variations in rats exposed to extremely low frequency magnetic fields (50 Hz) (J). Arch Med Res 2009; 40(5): 352-6.

(2012-11-13 收稿 2013-03-20 修回)

(编辑 曲莉)