

持续被动运动对兔骨关节炎软骨细胞中 Akt 活性及细胞凋亡的影响

张云¹, 王艳², 张京², 阿依夏木古丽², 熊道海²

1. 新疆维吾尔自治区第一济困医院康复科, 新疆 乌鲁木齐 830017;

2. 新疆医科大学第五附属医院康复科, 新疆 乌鲁木齐 830011

摘要: **目的** 观察持续被动运动(CPM)对兔骨关节炎(OA)软骨细胞 Akt 活化情况及凋亡情况的影响。**方法** 36 只新西兰大白兔随机分为 3 组, 每组 12 只: A、对照组, B、模型组, C、治疗组。B 组和 C 组采用 Huulth 方法进行造模, C 组兔子在术后第 1 天即开始进行持续被动运动(CPM)治疗, 8 h/d, 连续 8 周, 8 周后处死所有兔子。观察关节软骨形态并进行苏木精—伊红染色法(HE)染色观察软骨组织形态。流式细胞术检测关节软骨细胞凋亡情况。Western blot 方法检测关节软骨细胞 Akt 磷酸化活化情况。**结果** 同对照组相比, 治疗组兔膝关节软骨大体评分情况明显改善, 同时软骨组织形态也出现明显的改善。流式细胞染色结果显示, 与模型组软骨细胞凋亡率(39.85 ± 9.93)% 相比, 治疗组软骨细胞凋亡率(11.98 ± 4.38)% 显著降低($P < 0.01$)。Western blot 结果显示, 对照组软骨细胞 Akt 活化水平为(6.85 ± 1.16)%, 模型组软骨细胞 Akt 活化水平为(1.46 ± 0.37)%, 治疗组软骨细胞 Akt 活化水平为(5.95 ± 1.48)%, 与模型组相比, 治疗组软骨细胞 Akt 活化水平显著升高($P < 0.01$)。**结论** CPM 可通过影响兔 OA 膝关节软骨细胞的 Akt 通路活化水平, 进而降低软骨细胞的凋亡情况, 从而改善 OA 病情。

关键词: 持续被动运动; 骨关节炎; 软骨细胞; 凋亡; Akt

中图分类号: R-332 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2016)03-0381-03

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种与年龄相关的退行性疾病, 临床表现为缓慢发展的关节疼痛、压痛、僵硬、关节肿胀、活动受限和关节畸形等^[1-3]。OA 可能会影响到多个关节, 尤其是负重关节如膝关节。据估计, 9.6% 的男性, 18% 的女性会在 60 岁以上出现膝部和臀部的 OA 症状^[4]。细胞凋亡是由多个信号通路调控的一个程序性细胞死亡过程。软骨细胞凋亡所致的软骨退变在 OA 发生发展中起重要作用, 并且成为目前临床治疗 OA 的潜在靶标之一^[5]。已知持续被动运动(continuous passive motion, CPM)在 OA 治疗中具有显著的疗效。然而, CPM 治疗 OA 的机制目前还不是很清楚。据此, 本研究首先观察 CPM 治疗兔 OA 的疗效, 并观察 CPM 对兔 OA 软骨细胞 Akt 活化情况及凋亡情况的影响, 以研究 CPM 治疗 OA 的机制。结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 健康雄性新西兰大白兔 36

只, 购自重庆医科大学实验动物中心(许可证: SYXK(渝)20070001; 动物合格证号: SCXK(渝)20020001)。体重 2.0 ~ 2.5 kg, 随机分为 3 组: 对照组(A 组)、模型组(B 组)、治疗组(C 组), 每组 12 只。A 组兔子仅手术切开关节囊而不损伤关节软骨, 术后笼内自由活动; B 组和 C 组按照文献报道方法进行造模^[6], B 组兔子术后笼内活动; C 组兔子在术后第 1 天即开始进行 CPM 治疗, 8 h/d, 连续 8 周; 8 周后处死所有兔子。

1.2 关节软骨形态学评分标准 关节软骨完整且有光泽(0 分); 关节软骨表面粗糙, 光泽差(1 分); 关节软骨表面糜烂, 软骨缺损深达表层和中层(2 分); 关节软骨表面溃疡, 软骨缺损达到深层(3 分); 关节软骨剥落, 软骨下骨暴露(4 分)。

1.3 组织化学染色方法 切片依次置于二甲苯(I、II)中各 10 min; 95% 乙醇(I、II)中各 3 min; 80% 乙醇中 1 min; 蒸馏水中 1 min; 苏木精液染色 15 min; 流水冲洗切片 3 s; 1% 盐酸乙醇 3 s; 水洗 30 s; 促蓝液反蓝 30 s; 流水冲洗切片 10 min; 蒸馏水洗 2 s; 0.5% 伊红液染色 3 min; 蒸馏水洗 2 s; 80% 乙醇洗涤 2 s; 95% 乙醇(I、II)中各 3 min; 无水乙醇 10 min; 二甲苯(I、II、III)中各 5 min。

1.4 软骨细胞获取方法 获取的软骨组织采用眼科

剪碎,采用 Hank's 液清洗 2 次,随后加入 0.25% II 型胶原酶在 37 °C 消化 1 h,采用 100 目孔径滤网过滤,收集滤过液,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液收集细胞。

1.5 凋亡染色方法 获取的软骨细胞以 RPMI-1640 重悬并计数。采用 Annexin V/7-AAD 方法检测细胞凋亡情况。具体操作方法参见试剂盒说明书。

1.6 Western-blot 方法 软骨细胞提取蛋白经 10% SDS-PAGE 分离胶和 5% 浓缩胶分离后,通过湿转的方法将蛋白转印至 PVDF 膜上,PVDF 膜以含 5% BSA 的 TBST 室温封闭 2 h,加入 p-Akt 抗体 4 °C 过夜孵育。次日采用 0.1% TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,加入山羊抗兔 IgG 的 HRP 标记二抗,室温旋转孵育 1 h。0.1% TBST 洗膜后,PVDF 膜以 Supersignal West Femto Pico 化学发光底物对条带进行显色。Actin 作为内参对照。所有实验至少重复 3 次。

1.7 统计学方法 采用 Graphpad 软件进行数据分析。多组数据间比较采用 Anova 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

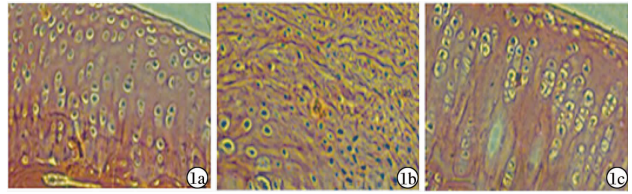
2 结果

2.1 关节软骨大体评分结果 对照组关节软骨完整,表面光滑,且有光泽,大体评分为 0 分;模型组关节软骨不透明,表面有糜烂,且无光泽,大体评分为 (3.03 ± 0.81) 分;治疗组关节软骨透明度稍差,表面基本光滑,无糜烂,大体评分为 (1.48 ± 0.88) 分。治疗组评分低于模型组 ($P < 0.01$)。

2.2 关节软骨 HE 染色结果 如图 1 所示,对照组的软骨细胞分布均匀,基质染色均匀;模型组软骨细胞出现明显的纤维化情况,且基质染色不均匀;治疗组软骨细胞较模型组分布均匀,基质染色均匀。

2.3 软骨细胞凋亡检测结果 流式细胞染色结果显示,对照组软骨细胞凋亡率为 $(6.97 \pm 1.18)\%$,模型组软骨细胞凋亡率为 $(39.85 \pm 9.93)\%$,治疗组软骨细胞凋亡率为 $(11.98 \pm 4.38)\%$,与模型组相比,治疗组软骨细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.01$)。见图 2。

2.4 软骨细胞 Akt 活化情况检测结果 对照组软骨细胞 Akt 磷酸化水平为 $(6.85 \pm 1.16)\%$,模型组软骨细胞 Akt 磷酸化水平为 $(1.46 \pm 0.37)\%$,治疗组软骨细胞 Akt 磷酸化水平为 $(5.95 \pm 1.48)\%$,与模型组相比,治疗组软骨细胞 Akt 磷酸化水平显著升高 ($P < 0.01$)。见图 3。



注:1a:对照组;1b:模型组;1c:治疗组。

图 1 软骨组织病理图(HE 染色,×100)

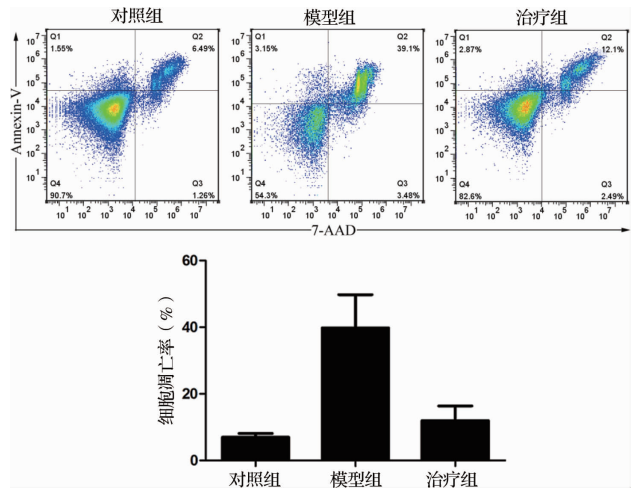


图 2 Anenxin-V 和 7-AAD 染色检测软骨细胞凋亡情况

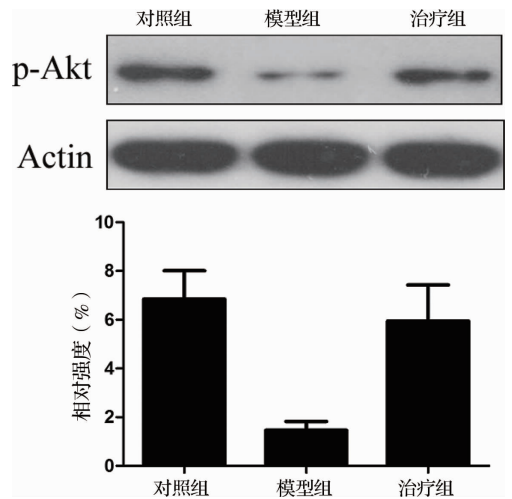


图 3 Western blot 检测软骨细胞 Akt 磷酸化情况

3 讨论

OA 是世界范围内最常见的关节疾病之一。除了疼痛,由于活动受限、药物副作用和关节相关的手术并发症使得 OA 成为严重的健康问题。目前 OA 公认的治疗方案包括患者教育、减轻体重、身体康复和锻炼等^[7-8]。非类固醇抗炎药(NSAID)是目前临床广泛应用的 OA 治疗药物,但治疗效果并不明显,并可能导致严重的副作用^[9]。多种非药物治疗方法已广泛应用至 OA 治疗中。CPM 在全膝关节置换术恢复治疗中疗效显著,在 OA 治疗中也取得一定的成果^[10]。本研究采用兔 OA 模型,观察了 CPM 治疗兔 OA 的疗效。结果显示,CPM 可明显改善兔膝关节软

骨大体评分情况,同时增进兔膝关节软骨组织学染色结果。提示,CPM 对兔 OA 具有显著的治疗作用,该结果与文献报道结果相一致。

软骨细胞凋亡所致的软骨退变在 OA 发生发展中起重要作用^[11-12]。然而,软骨细胞凋亡的机制至今尚未完全研究清楚,软骨细胞凋亡可能与多种信号通路相关,其中 PI3K/AKT 信号通路被认为是抗软骨细胞凋亡的重要信号通路^[13]。已知,紫草素可通过调节 PI3K/AKT 信号通过,从而降低白细胞介素-1 β 诱导的软骨细胞凋亡^[14]。那么,CPM 是否可通过调节 PI3K/AKT 信号通路,进而降低软骨细胞凋亡,从而对兔 OA 发挥治疗作用。本研究首先观察了 CPM 对兔软骨细胞凋亡情况的影响,结果显示,与模型组相比,治疗组软骨细胞凋亡率显著降低。进一步的机制研究显示,与模型组相比,治疗组软骨细胞 Akt 磷酸化水平显著升高。

综上所述,本研究结果证实 CPM 对兔 OA 具有明显的治疗作用,CPM 改善兔 OA 病情的机制可能是通过激活 PI3K/AKT 信号通路,进而降低软骨细胞凋亡,从而对兔 OA 发挥治疗作用。

参考文献

[1] García-Padilla S, Duarte-Vázquez MA, Gonzalez-Romero KE, et al. Effectiveness of intra-articular injections of sodium bicarbonate and calcium gluconate in the treatment of osteoarthritis of the knee: a randomized double-blind clinical trial[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2015, 16: 114.

[2] Osajie FE, Yakubu K. A retrospective non-comparative analysis of the quality of care for osteoarthritis at the general out-patient department of Jos University Teaching Hospital, Nigeria[J]. J Family Med Prim Care, 2015, 4(2): 217 - 220.

[3] Tsohis KC, Bei ES, Papatianasiou I, et al. Comparative proteomic analysis of hypertrophic chondrocytes in osteoarthritis[J]. Clin Proteomics, 2015, 12(1): 12.

[4] Woolf AD, Pfleger B. Burden of major musculoskeletal conditions [J]. Bull World Health Organ, 2003, 81(9): 646 - 656.

[5] Thomas CM, Fuller CJ, Whittles CE, et al. Chondrocyte death by apoptosis is associated with the initiation and severity of articular cartilage degradation [J]. Int J Rheum Dis, 2011, 14(2): 191 - 198.

[6] Xie GP, Jiang N, Wang SN, et al. Eucommia ulmoides Oliv bark aqueous extract inhibits osteoarthritis in a rat model of osteoarthritis [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 162: 148 - 154.

[7] Hochberg MC, Altman RD, Brandt KD, et al. Guidelines for the medical management of osteoarthritis. Part II. Osteoarthritis of the knee. American College of Rheumatology [J]. Arthritis Rheum, 1995, 38(11): 1541 - 1546.

[8] Wittenberg RH, Schell E, Krehan G, et al. First-dose analgesic effect of the cyclo-oxygenase-2 selective inhibitor lumiracoxib in osteoarthritis of the knee: a randomized, double-blind, placebo-controlled comparison with celecoxib [NCT00267215] [J]. Arthritis Res Ther, 2006, 8(2): R35.

[9] MacAuley D. Managing osteoarthritis of the knee [J]. BMJ, 2004, 329(7478): 1300 - 1301.

[10] Kitay GS, Koren MJ, Helfet DL, et al. Efficacy of combined local mechanical vibrations, continuous passive motion and thermotherapy in the management of osteoarthritis of the knee [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2009, 17(10): 1269 - 1274.

[11] Chen Q, Zhang B, Yi T, et al. Increased apoptosis in human knee osteoarthritis cartilage related to the expression of protein kinase B and protein kinase Ca in chondrocytes [J]. Folia Histochem Cytobiol, 2012, 50(1): 137 - 143.

[12] Huang JG, Xia C, Zheng XP, et al. 17 β -Estradiol promotes cell proliferation in rat osteoarthritis model chondrocytes via PI3K/AKT pathway [J]. Cell Mol Biol Lett, 2011, 16(4): 564 - 575.

[13] Tong KM, Shieh DC, Chen CP, et al. Leptin induces IL-8 expression via leptin receptor, IRS-1, PI3K, Akt cascade and promotion of NF κ B/p300 binding in human synovial fibroblasts [J]. Cell Signal, 2008, 20(8): 1478 - 1488.

[14] Wang L, Gai P, Xu R, et al. Shikonin protects chondrocytes from interleukin-1 β -induced apoptosis by regulating PI3K/Akt signaling pathway [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(1): 298 - 308.

收稿日期: 2015 - 10 - 25 修回日期: 2015 - 12 - 02 编辑: 周永彬

(上接第 380 页)

[4] Lencioni R, Llovet JM. Modified RECIST (mRECIST) assessment for hepatocellular carcinoma [J]. Semin Liver Dis, 2010, 30(1): 52 - 60.

[5] 付红伟, 孙涛, 井明晰. 贝伐单抗联合化学药物治疗晚期胃癌的疗效观察 [J]. 国际病理科学与临床杂志, 2013, 33(1): 42 - 46.

[6] Kerbel RS. Tumor angiogenesis [J]. N Engl J Med, 2008, 358(19): 2039 - 2049.

[7] 汪楠, 袁苏徐, 胡文杰, 等. 贝伐单抗联合 FOLFOX4 方案治疗 12 例初治失败转移性结肠癌的临床观察 [J]. 实用癌症杂志,

2012, 27(4): 376 - 378.

[8] 段仁慧, 孙晓琴, 赵九红. OHLF3 方案治疗晚期胃癌的临床观察 [J]. 肿瘤防治杂志, 2005, 12(15): 1180 - 1182.

[9] 刘德玲, 吴田, 张雪玲. 贝伐单抗联合 OHLF3 方案治疗晚期胃癌疗效观察 [J]. 中国保健营养, 2013, 2(下): 836.

[10] 马宁, 周云. 贝伐单抗联合 OHLF3 方案治疗晚期胃癌疗效观察 [J]. 中国实用医药, 2014, 9(29): 175 - 176.

收稿日期: 2015 - 10 - 10 编辑: 王国品