.基础研究.

体外冲击波对兔膝骨关节炎软骨组织中转化 生长因子 β1 和白介素 1β 表达的影响

邓紫婷1 文丽2 贾英2

¹重庆医科大学附属康复医院,重庆 400016;²重庆医科大学附属第一医院,重庆 400016 通信作者:贾英,Email:617418550@qq.com

【摘要】 目的 观察体外冲击波治疗对兔膝骨关节炎(OA)模型软骨组织中转化生长因子 β1(TGF-β1) 和白介素 1β(IL-1β)的表达影响,并探讨体外冲击波治疗兔膝 OA 的机制。方法 选取雌性新西兰兔 50 只, 采用随机数字表法分别为正常对照组、模型组、冲击波 A 组「能量密度流(EFD)为 0.05(mJ/mm²)]、冲击波 B 组(EFD 为 0.11 mJ/mm²)、冲击波 C 组(EFD 为 0.22 mJ/mm²),每组 10 只新西兰兔。模型组和冲击波 A、 B、C 组均采用 Hulth's 法建立膝 OA 动物模型。造模成功后,冲击波 A、B 和 C 组分别给予对应能量密度流的 体外冲击波治疗,均每7d治疗1次,每次冲击2000下,连续治疗4周。正常对照组和模型组均不给予体外冲 击波治疗。于冲击波 A、B、C 组体外冲击波治疗 4 周后,处死 5 组新西兰兔,取兔右侧膝关节软骨组织,肉眼 观察关节软骨,HE 染色后采用改良 Mankin's 评分评估软骨组织退变情况,采用免疫组化法,蛋白印迹法和实 时荧光定量多聚酶链式反应分别测定兔软骨中 TGF-β1 和 IL-1β 的阳性细胞数、TGF-β1 和 IL-1β 的蛋白量以 及 TCF-β1 和 IL-1β 的 mRNA 表达量。结果 与正常对照组比较,模型组肉眼可见关节软骨退变。模型组改 良的 Mankin's 评分为(7.30±0.45)分,显著高于正常对照组的(0.34±0.06)分,且模型组 TGF-β1 和 IL-1β 的蛋 白和 mRNA 的表达量较正常对照组亦明显升高,差异均有统计学意义(P<0.05)。冲击波 A、B、C 组软骨组织 的改良 Mankin's 评分均显著低于模型组,差异均有统计学意义(P<0.05),冲击波 C 组软骨组织中的 TGF-β1 和 IL-1β 的蛋白和 mRNA 表达量明显低于模型组,差异均有统计学意义(P<0.05)。结论 体外冲击波可降低 兔膝 OA 软骨中 TGF-β1 和 IL-1β 的表达,且治疗效果与体外冲击波的能量密度流呈正相关,提示冲击波可能 通过调节 TGF-β1 的表达来减少炎性因子 IL-1β 的表达,从而达到对 OA 的防治作用。

【关键词】 膝骨关节炎; 冲击波; 转化生长因子 β1; 白介素 1β 基金项目:重庆市渝中区科委项目(20170111) DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2022.01.003

The effects of extracorporeal shock wave treatment on the expression of TGF- β 1 and IL-1 β in the cartilage of an osteaoarthritic knee

Deng Ziting¹, Wen Li², Jia Ying²

¹The Affiliated Rehabilitation Hospital, ²The Affiliated First Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Corresponding author: Jia Ying, Email: 617418550@qq.com

[Abstract] Objective To seek any effect of extracorporeal shockwave treatment on the expression of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and interleukin-1 β (IL-1 β) in the cartilage tissue of rabbits with knee osteoarthritis (OA), and its therapeutic mechanism. **Methods** Fifty female New Zealand rabbits were randomly divided into a normal control group, a model group, and three shockwave groups A, B and C, each of 10. Except for the normal control group, an OA model was established in the other groups using Hulth's method. The shockwave groups were given 2000 shocks in each weekly session over 4 weeks. The energy flow density in group A was 0.05mJ/mm²; in B it was 0.11mJ/mm² and in C 0.22mJ/mm². The normal control and model groups were not shocked. All the rabbits were then sacrificed and their right knee cartilage tissue was sampled to observe any pathological changes and assign improved Mankin scores. Immunohistochemistry was used to count the number of TGF- β 1 and IL-1 β -positive cells in the cartilage. Western blotting and real-time fluorescence quantitative polymerase chain reactions were employed to determine the protein and mRNA expression of IL-1 β and TGF- β 1. **Results** Compared with the normal group, degeneration of articular cartilage was observed in the model group. The average Mankin's score of the model group was significantly higher than that of the normal control group. The average expression of TGF- β 1 and IL-1 β protein and mRNA in the model group had increased significantly compared with the normal control group. The average Mankin's scores of the shock wave groups were all significantly lower than the model group's average. Group C's average expression levels of TGF- β 1 and IL-1 β protein and mRNA were significantly lower than the model group's averages. **Conclusions** Extracorporeal shockwave therapy can reduce the expression of TGF- β 1 and IL-1 β in the cartilage of an arthritic knee, at least in rabbits. Its therapeutic effect is positively correlated with the density of the energy flow, suggesting that shock waves may reduce the expression of inflammatory factor IL-1 β by regulating the expression of TGF- β 1. They should be applied in the prevention and treatment of osteoarthritis.

[Key words] Knee osteoarthritis; Transforming growth factor-β1; Interleukin-1β; Shock wave therapy **Funding**: A Chongqing Yuzhong District Science and Technology Commission Project (20170111) DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2022.01.003

骨关节炎(osteoarthritis,OA)是由多种不同因素引起的以关节疼痛、功能障碍和畸形为主要表现的退行性疾病^[1],其特点为关节软骨退变、软骨下骨增厚和骨赘生物形成,多发生于中老年人,致残率极高^[2]。

转化生长因子 β1(transforming growth factor beta 1, TGF-β1)是 TGF-β 超家族的成员之一,研究表明,TGFβ1 参与了细胞周期的调节、增殖、分化、成熟、凋亡或 免疫活性等活动,可诱导软骨的形成^[3]。研究发现, 在软骨中,TGF-β1 可抵抗白介素 1β(interleukin-1β, IL-1β)表达,而 IL-1β 由多种细胞类型分泌,包括免疫 细胞、上皮细胞和脂肪细胞。OA 软骨组织中的软骨 细胞去分化主要是由促炎性介质如 IL-1β 诱导的,IL-1β 的表达可促进炎症介质和分解代谢因子的产生和 释放,如诱导型一氧化碳合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、选择性环氧化酶-2(cyclo-oxgenase 2, COX-2)、前列腺素 E2(prostaglandin E2, PGE2)、肿瘤 坏死因子 α(tumor necrosis factors-α, TNF-α)和基质金 属蛋白酶(Matrix metalloproteinases, MMPs),这些物质 均可导致软骨细胞功能障碍和细胞外基质降解^[4]。

最近的研究表明,体外冲击波治疗(extra-corporeal shockwave therapy, ESWT)对膝关节早期 OA 的 变化具有软骨保护作用,该研究发现,ESWT 可促进 OA 治疗区域的血管扩张和生成,减轻组织炎症反 应^[5],但对冲击波的治疗机制尚不明确。本研究通 过建立兔膝 OA 模型,观察体外冲击波对软骨组织中 TGF-β1 和 IL-1β 表达的影响,以期探讨冲击波治疗 OA 的可能机制。

材料与方法

一、实验动物和分组

选取月龄4个月,体重2.0~2.5 kg的雌性新西兰 兔50只,由重庆医科大学动物实验中心提供。实验动 物生产许可证号为 SCXK(渝)2017-0001。所有雌性 新西兰兔均在清洁动物房内分笼饲养,期间自由摄食、 饮水,室温(22±2)℃,相对湿度(50±5)%,12h:12h 明暗交替。50只雌性新西兰兔经适应性喂养7d后, 采用随机数字表法将其分为正常对照组、模型组、冲击 波A组[能量密度流(energy flux density, EFD)为 0.05 mJ/mm²]、冲击波B组(EFD为0.11 mJ/mm²)、 冲击波C组(EFD为0.22 mJ/mm²),每组10只。本研 究经重庆医科大学伦理委员会审核批准,伦理学编号 为CQ20201022。

二、主要试剂和仪器

链霉亲和素-生物素复合物 (strept avidin-biotin complex,SABC)试剂盒、二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色剂和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 小鼠单克隆 抗体均购自武汉博士德生物工程有限公司;TGF-B1小 鼠单克隆抗体和 IL-1β 单克隆抗体均购自英国 abcam 公司;十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(sodium dodecyl sulfate polilylamide gelectro phoresis, SDS-PAGE)凝 胶试剂盒和放射免疫沉淀法(radio-Immunoprecipitation assay, RIPA)蛋白提取试剂盒购自上海碧云天生物技 术有限公司;TRIzon 试剂盒、cDNA 第一链合成试剂盒 及 2x SYBR Green gPCR Master Mix 试剂盒均购自美 国 Bimake 公司; TGF-β1、IL-1β 和内参 β-肌动蛋白 (β-actin)引物合成于上海生工生物工程股份有限公 司;BX50型光学显微镜购自日本 Olympus 公司;DNA engine 荧光定量多聚酶链式反应(fluorescence quantitative polymerase chain reaction, Q-PCR) 仪和 BIO-RAD 荧光成像仪购自美国 BIORAD 公司: ST-RZ 型 ESWT 治疗仪购自瑞士 STORZ 公司。

三、造模方法

模型组和冲击波 A、B、C 组均采用改良 Hulth's 法^[6]建立 OA 模型,即采用 10%水合氯醛注射液,按 3.5 ml/kg体重通过兔耳源静脉麻醉新西兰兔,备皮, 碘伏消毒兔右膝局部皮肤,在无菌条件下,切开兔右 膝关节内侧皮肤,暴露关节腔,切断兔右膝关节的内 侧副韧带,并完整切除内侧半月板,剪断前后交叉韧 带,逐层缝合肌肉和皮肤,无菌包扎。模型组和冲击 波 A、B、C 组术后均每日肌注青霉素 800 万 IU 抗感 染,连续肌注 7 d,并于肌注 7 d 后在自制的直径 3 m 环形跑台上每日奔跑 30 min,连续训练 4 周。造模 结束后,取 2 只兔膝关节组织采用 Pelletier-JP 的标 准进行模型鉴定^[7]。正常对照组仅常规饲养,不造模,也不上跑台。

四、干预方法

造模成功后,冲击波 A 组(EFD 为 0.05 mJ/mm²)、 冲击波 B 组(EFD 为 0.11 mJ/mm²)、冲击波 C 组(EFD 为 0.22 mJ/mm²)分别给予对应 EFD 的 ESWT 治疗,均 每 7 d 治疗 1 次,每次冲击 2000 下,连续治疗 4 周。 正常对照组和模型组均不给予 ESWT 治疗。

五、组织取材和肉眼观察

于冲击波 A、B、C 组给予 ESWT 治疗 4 周后,处死 5 组新西兰兔,提取其右膝关节软骨平台和软骨下骨, 组织分为两份,一份标记好后立即置于液氮罐中速冻, 随后转至-80 ℃冰箱内储存待测;另一份则置于 4%多 聚甲醛溶液中固定 24 h,经 10%乙二胺四乙酸二钠 (ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)脱钙 15 d,石 蜡包埋后切片,切片厚度约 5 μm。组织取材后,肉眼 观察和记录 5 组新西兰兔膝关节软骨的关节囊、滑膜、 关节软骨及关节液的病理改变情况。

六、5组新西兰兔膝关节软骨组织的退变程度评估

采用苏木精-伊红(hematoxylin eosin, HE)染色法 观察5组新西兰兔膝关节软骨组织的退变程度。将 5组新西兰兔膝关节软骨石蜡切片依次放入二甲苯 I、二甲苯Ⅱ中各 10 min,再用无水乙醇 I、无水乙醇 Ⅱ各浸泡5 min,然后采用酒精梯度脱水法在 95% 酒 精、90%酒精、80%酒精、70%酒精中各浸泡5 min,蒸 馏水冲洗3次。放入 HE 染色液中染色5 min, 自来水 冲洗干净,用1%盐酸酒精分化3s,自来水冲洗干净, 0.6% 氨水返蓝, 流水冲洗干净后再放入 HE 染液中染 色3 min,将切片脱水透明后晾干,用中性树胶封片。 封片后在 BX50 型光学显微镜下观察切片,依据改良 Mankin's 法^[8] 评分标准对关节软骨的软骨结构、细胞 数量、细胞基质染色和潮线的完整性进行评分,评估膝 关节软骨组织退变程度。评分标准为:0级为软骨结 构光整如常,软骨细胞数量如常,基质染色正常,潮线 完整;1级为软骨结构表现出现不规则裂隙,软骨细胞 数量弥漫性增多,出现大量簇集样细胞团,基质染色染 色轻度减退,多重潮线:2级为软骨结构裂隙深达移行 层,软骨细胞出现大量簇集样细胞团,染色中度减退, 软骨下血管入侵潮线;3级为软骨结构裂隙深达辐射 层,软骨细胞数量明显减少,染色重度减退;4级为软 骨结构裂隙深达钙化层,染色完全消失;5级为软骨层 脱落。

七、免疫组化法检测

采用免疫组化法检测5组新西兰兔膝关节软骨组 织中 TGF-β1 和 IL-1β 的阳性细胞数。将5 组新西兰 兔膝关节软骨石蜡切片脱蜡脱水后,使用3%过氧化 氢灭活内源性过氧化物酶,经胰蛋白酶消化液修复组 织抗原活性,加入1:500的稀释小鼠 TGF-β1 单克隆 抗体和1:1000的稀释小鼠 IL-18 单克隆抗体,在 4℃下孵育过夜。磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 冲洗 3 次, 每次 5 min。滴加辣根过氧化 物酶标记的二抗,37 ℃下孵育 30 min;用 PBS 冲洗 3次,每次5min。DAB室温下显色,自来水冲洗终止 反应。苏木素复染3分钟,盐酸酒精分化2s,碳酸锂 复染1min,酒精脱水后树胶封片,经光学显微镜观察。 每组取5张切片,使用光学显微镜放大200倍,随机选 取5个视野,经Image-Pro Plus 图像分析软件测定关节 软骨组织中 TGF-β1 和 IL-1β 阳性细胞数的积分光密 度值(integral optical density, IOD)。

八、实时荧光定量多聚酶链式反应检测

实时荧光定量多聚酶链式反应(quantitative realtime polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测 5 组新 西兰兔膝关节软骨组织中 TGF-β1 和 IL-1β 的 mRNA 表达情况。取兔膝关节软骨 30 mg,在液氮条件下,研 成粉末状,然后用 TRIzon 提取总 RNA,紫外分光光度 计检测样品吸光度(A),A260/A280 为 1.8~2.0。每组 取 1 μ l 总 RNA,与 5×qRT SuperMix 混合后在 25 ℃条 件下孵育 10 min,并随后在 42 ℃条件下孵育 30 min 进行 cDNA 的延伸,最后在 85 ℃条件下孵育 5 min 结 束反应。成功逆转录为 cDNA 后取 5 μ l 产物于加入 2x SYBR Green qPCRMaster Mix 进行 PCR 反应,反应 结束后用 BRO-RAD 分析软件测定各组目的基因和内 参的扩增曲线,计算 Δ Ct 值差异。引物序列和反应条 件见表 1。

表1 引物序列及反应条件

基因	引物	序列(5'->3')	引物长度	反应条件
TGF-β1	Forward	TGGACTCATTGCTGGTCCCT	80	变性 92 ℃ 30 s,退火 59.5 ℃ 30 s, 延伸 72 ℃ 30 s,共 30 个循环, 72 ℃延伸5 min
	Reverse	GAGCCCGCTGCATTCTTCTT	80	
IL-1β	Forward	TCTGTGACTCGTGGGATGAT	69	
	Reverse	CTTCTTTGGGTATTGTTTGG	69	
ACTIN	Forward	CTAACGGCGCAGAAACGAGA	186	
	Reverse	TCGGCCACATTGCAGAACTT	186	

采用蛋白免疫印迹(Western blot)法检测5组新 西兰兔膝关节软骨组织中 TGF-β1 和 IL-1β 的蛋白表 达。取兔软骨组织,在液氮中研磨成粉末状,与 RIPA 裂解液混合后进行匀浆、离心、提取总蛋白液后测定蛋 白浓度,各样品取50 µg蛋白量上样行电泳分离提取蛋 白,转至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜上, 在 37 ℃条件下经 5% 牛血清白蛋白(bovine albumin, BSA) 封闭 2 h 后, 分别加入 TGF-β1 (1:1000稀释)、IL-1β(1:500稀释)和 GAPDH 抗体 (1:1000稀释)4℃过夜;使用吐温-20三羟甲基氨基 甲烷盐酸盐缓冲溶液 (tris HCl buffered saline with tween20,TBST)洗膜,每次15 min,共3次。加入相应 的辣根过氧化物酶)标记的二抗封闭 2 h,再次使用 TBST 洗膜 3 次, 避光条件下使用 ChemiDoc XRS 凝胶/ 发光图像分析系统对蛋白条带显影,通过 Quantitiy One 软件计算蛋白条带灰度值。

十、统计学分析

计量资料数据均采用(*x*±*s*)表示,应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,计量资料采用 *t* 检验,组间比较采 用单因素方差分析,等级资料用 Ridit 分析,以 *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

结 果

一、5组新西兰兔膝关节软骨组织肉眼观察结果

正常对照组关节软骨光滑平整,淡蓝色,色泽明 亮,无软化灶及裂纹,关节液透明清亮,滑膜无增生;模 型组关节软骨面无光泽,颜色灰暗,出现糜烂,软骨边 缘明显增生,可见些许小溃疡面,滑膜存在粘连及增 生;冲击波A组软骨面粗糙,部分出现裂纹,滑膜可见 少许增厚粘连;冲击波B组软骨面较粗糙,可见少许 裂纹,软骨边缘少许增生;冲击波C组软骨面呈淡黄 色,稍粗糙,软骨边缘可见少许增生,详见图1。

二、5 组新西兰兔膝关节软骨组织的退变程度评 估结果

图 2 可见,正常对照组软骨表层光滑平整,基质染 色均匀,细胞排列整齐,潮线清晰;模型组软骨层变薄, 表层裂隙交错分布,细胞数目较少,排列紊乱,潮线断裂;冲击波A组软骨表面欠光整,细胞层数增多,排列 稍紊乱,潮线部分断裂;冲击波B组染色均匀,细胞层 增生,存在细胞数目增多,潮线稍显紊乱;冲击波C组 细胞表层尚且平整光滑,细胞增生明显,中深层存在少 量细胞簇聚,发现双重潮线。5组新西兰兔膝关节软 骨组织改良的 Mankin's 评分结果见表2。

表 2 5 组新西兰兔膝关节软骨组织改良 Mankin's 评分 和软骨组织中 TGF-β1 和 IL-1β 的阳性细胞表达情况(*x*±*s*)

组别	只数	改良 Mankin 评分(分)	TGF-β1 (IOD 值)	IL-1β (IOD 值)
正常对照组	10	0.34 ± 0.06	0.63 ± 0.02	0.52 ± 0.07
模型组	10	7.30±0.45ª	1.31±0.02ª	1.27 ± 0.09^{a}
冲击波 A 组	10	5.40 ± 0.48^{ab}	0.92 ± 0.03^{ab}	0.89 ± 0.13^{ab}
冲击波 B 组	10	3.80 ± 0.60	$0.85{\pm}0.02^{\rm abc}$	$0.82{\pm}0.11^{\rm abc}$
冲击波 C 组	10	2.10 ± 0.53^{bed}	$0.71{\pm}0.04^{\rm bed}$	$0.73{\pm}0.12^{\rm bcd}$

注:与正常对照组比较,*P<0.05;与模型组比较,*P<0.05;与冲击 波 A 组比较,*P<0.05;与冲击波 B 组比较,dP<0.05

三、5组新西兰兔免疫组化法检测结果

图 3 和图 4 可见,正常对照组的软骨组织表层基 质和细胞胞浆可见少许 IL-1β 阳性表达,在软骨细胞 胞核内可见少许 TGF-β1 的阳性表达;模型组和冲击 波 A、B、C 组的软骨组织各层均可见 TGF-β1 和 IL-1β 的不同程度着色,其中软骨组织的软骨细胞胞核和胞 浆中可见 TGF-β1 黄色颗粒着色,软骨细胞胞浆和软 骨组织基质中可见 IL-1β 的黄色颗粒着色。表 2 可 见,模型组的 TGF-β1 和 IL-1β 的阳性细胞表达较正常 对照组显著增加,差异均有统计学意义(P<0.05);冲 击波 A、B、C 组 TGF-β1 和 IL-1β 的阳性细胞表达 (IOD 值)与模型组比较,均显著减少,且以冲击波 C 组最为显著,差异均有统计学意义(P<0.05);冲击波 A、B、C 组 3 组间 TGF-β1 和 IL-1β 的阳性细胞表达, 差异亦均有统计学意义(P<0.05),且以冲击波 C 组的 阳性细胞表达最低。

四、5 组新西兰兔膝关节软骨组织 RT-qPCR 检测结果

5 组新西兰兔膝关节软骨组织的 mRNA 经逆转录和扩增后,通过图像软件分析结果显示,模型组与正常



正常对照组

模型组 冲击波A组 冲击波B组 图1 5组新西兰兔膝关节软骨组织肉眼观察图

冲击波C组



正常对照组

模型组

冲击波A组

冲击波B组

冲击波C组

冲击波C组

图 2 5 组新西兰兔膝关节软骨组织的软骨退变情况(HE 染色,×200)



图 3 5 组新西兰兔膝关节软骨组织中 TGF-β1 的阳性细胞表达结果(×200)





对照组比较,TGF-β1 和 IL-1β 的 mRNA 表达量显著增 高,差异均有统计学意义(P<0.05);冲击波 C 组 TGFβ1 和 IL-1β 的 mRNA 表达量较模型显著减少,差异均 有统计学意义,(P<0.05);冲击波 A 组和 B 组 IL-1β 的 mRNA 表达量较模型组显著减少,差异均有统计学 意义 P<0.05);冲击波 B 组和 C 组 IL-1β 的 mRNA 表 达量较冲击波 A 组显著减少,差异均有统计学意义, (P<0.05),详见图 5。

五、5组新西兰兔膝关节软骨组织蛋白免疫印迹 法检测结果

图 6 可见,模型组和冲击波 A 组和 B 组的 TGFβ1 和 IL-1β 蛋白表达较正常对照组显著增高,差异均 有统计学意义(P<0.05);与模型组比,冲击波A组 TGF-β1的蛋白表达量明显减少,冲击波 B 组和 C 组 的 TGF-β1 和 IL-1β 蛋白表达量亦明显减少,差异均有 统计学意义(P<0.05):冲击波 B 组和 C 组的 IL-1β 蛋 白表达量较冲击波 A 组显著减少,差异均有统计学意 义(P<0.05);冲击波 C 组的 TGF-β1 蛋白表达量与冲 击波 A 组和 B 组比较,差异均有统计学意义(P< 0.05),详见图 6。

讨 论

本研究结果显示,模型组兔膝骨关节软骨退变程 度与早期骨关节炎的病理改变相符,即造模成功。结 果显示,模型组 TGF-β1 和 IL-1β 的蛋白和 mRNA 的 表达均显著升高,而通过 ESWT 治疗后,冲击波 A、B、 C组TGF-β1和IL-1β的蛋白以及mRNA的表达均有 不同程度降低,其中以冲击波 C 组中下降最为明显, 关节软骨退变程度较模型组显著减轻。该结果表明, ESWT 治疗可有效降低炎性因子水平,改善兔膝 OA 软骨细胞修复能力和重塑作用,同时本研究结果还提 示,ESWT 对 OA 的治疗效果可能与其能量密度流呈 正相关。

OA 因其高发病率和高致残率备受广泛关注,其 最常影响脊柱、手指、膝盖和髋部,可导致整个关节结 构改变,包括软骨退变、骨重塑、骨质形成、滑膜炎症 等^[9]。关节软骨组织是由软骨细胞组成的组织,且软 骨细胞被包裹在胶原蛋白丰富的细胞外基质中,随着



注:A 为 5 组兔膝关节软骨中 TGF- β 1 mRNA 表达量比较,B 为 5 组兔膝关节软骨中 IL-1 β mRNA 表达量比较;与正常对照组比较,^aP<0.05;与模型组比较,^bP<0.05;与冲击波 A 组比较,^cP<0.05;与冲击波 B 组比较,^dP<0.05



图 5 5 组新西兰兔膝关节软骨组织中 TGF-β1 和 IL-1β 的 mRNA 表达

注:A 为 5 组兔膝关节软骨中 TGF-β1 蛋白表达量比较;B 为 5 组兔膝关节软骨中 IL-1β 蛋白表达量比较;与正常对照组比较,^aP<0.05;与模型组比较,^bP<0.05;与冲击波 A 组比较,^cP<0.05;与冲击波 B 组比较,^dP<0.05

图 6 5 组新西兰兔膝关节软骨组织中 TGF-β1 和 IL-1β 的蛋白半定量分析

OA 的发病,软骨细胞出现了异常的增殖分化,且细胞 和细胞外基质中的细胞因子也发生多重变化,从而导 致软骨退变。有研究表明, TGF-β1 在 OA 软骨中具有 双向调节作用,TGF-β1 可以刺激软骨细胞体外和体内 合成胶原蛋白和蛋白聚糖^[10],正常软骨中 TGF-β1 的 表达明显高于晚期骨关节炎,在 OA 早期, TGF-B1 的 表达上调可刺激软骨细胞增殖以修复受损的软骨组 织^[11]。在小鼠膝关节中注射低剂量 TGF-B1 可增加关 节软骨中蛋白多糖含量。因此 TGF-B1 被认为是治疗 OA 的新靶点。然而,TGF-β1 在转基因小鼠膝关节中 的过度表达可以诱导细胞外基质降解酶,例如丝氨酸 蛋白酶 (high temperature requirement A1, HTRA1)、IL-1等,从而引起关节炎样改变[12],导致软骨和软骨下 骨结构异常,发生关节软骨退变。有研究发现,TGFβ1 在小鼠关节发育中可促进软骨组织形成,但在发育 成熟的小鼠关节中 TGF-β1 信号的诱导和激活会引发 并加速关节软骨的变性,最终导致 OA^[13]。IL-1β 是已 知的促炎性细胞因子,在 OA 患者的滑液中检测到高 浓度 IL-18^[14],且 IL-18 可抑制 TGF-8 受体 I/II 活性, 下调性别决定区 Y 框蛋白 9(Sex determining region Y- box protein 9,SOX9)表达,促进基质金属蛋白酶(matrixmetalloproteinases,MMPs)的合成,降解 II 型胶原, 使软骨细胞去分化,从而导致软骨退变^[15]。本研究结 果显示,在模型组的软骨组织中 TGF-β1 和 IL-1β 呈现 高表达量,且模型组中关节软骨退变明显,提示在骨关 节炎的早期病变中,TGF-β1 信号激活,IL-1β 炎症因 子增加,可使关节软骨损伤加重;而经 ESWT 治疗后, TGF-β1 和 IL-1β 在软骨中的表达下调,且以冲击波 C 组的下调最为明显,提示ESWT治疗可诱导关节软骨中 TGF-β1 表达量下调,降低 IL-1β 表达量,从而起到保 护关节软骨的作用。

ESWT 具有无创、无痛、有效、方便和安全的特点, 并发症发生率低^[16]。据报道,ESWT 可通过抗炎、促进 血管形成、骨骼重塑和伤口愈合来改善组织再生^[17]。 有研究表明,ESWT 在骨愈合过程中可诱导特定生长因 子表达,引发 iNOS、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、重组人骨形态发生蛋 白-2(recombinant Human Bone Morphogenetic protein-2, BMP-2)和骨钙素等的生物学效应^[18]。同时,ESWT 还

可抑制软骨细胞的凋亡,促进其增殖、分化,增加细胞 外基质中Ⅱ型胶原与蛋白多糖合成:低能量的ESWT 可调节炎症反应,抑制 MMPs 生成,抑制软骨细胞的 去分化^[19]。研究发现,OA 患者经ESWT治疗 48 h 后, 其软骨细胞中 IL-1β 和 TNF-α 的含量均降低至正常 值^[20]。Kim 等^[21]分别以0.08 mJ/mm²和 0.28 mJ/mm² 为界进行划分冲击波的 EFD, 而 Wang 等^[22]通过比较 不同能量的 ESWT 后发现,高能量的 ESWT 治疗可加 重关节软骨的退变。因此本研究选用 0.05 mJ/mm²、 0.11 mJ/mm²和 0.22 mJ/mm² 作为ESWT的治疗能量密 度流以观察其疗效,结果提示,经 ESWT 治疗后,关节 软骨的退变程度减轻, 而软骨组织中 TGF-B1 和 IL-18 的表达量也降低,其与 Cho^[20]等的研究结果相符;而 随着 ESWT 能量密度流的增加, TGF-1β 和 IL-1β 的表 达量均有不同程度下降,该结果表明,ESWT 可有效抑 制软骨组织中的炎症反应,且其治疗作用在一定程度 上与其能量密度流呈正相关。

本研究通过测定软骨组织中 TGF-β1 和 L-1β 的 表达水平,证实 ESWT 可能是通过调节 TGF-β1 和 IL-1β在体内的表达,减少炎症反应,促进软骨损伤修 复,从而起到延缓 OA 发展进程的作用。本研究的缺 陷在于,未对软骨下骨进行研究,未能阐述 ESWT 是通 过调节哪条通路作用以达到减轻软骨退变和减少炎症 因子作用。

参考文献

- [1] 张洪美.膝骨关节炎的规范诊治与阶梯治疗[J].中国骨伤,2019, 32(5):391-395. DOI:10.3969/j.issn.003-0034.2019.05.001.
- [2] Mandl LA.Osteoarthritis year in review 2018; clinical [J].Osteoarthritis Cartilage, 2019, 27 (3); 359-364. DOI; 10.1016/j.joca.2018.11.
 001.
- [3] Zhang P, Zhong ZH, Yu HT, et al. Exogenous expression of IL-1Ra and TGF-β1 promotes in vivo repair in experimental rabbit osteoarthritis
 [J]. Scand J Rheumatol, 2015, 44 (5): 404-411. DOI: 10.3109/ 03009742.2015.1009942.
- [4] Zheng G, Zhan Y, Tang Q, et al. Monascin inhibits IL-1β induced catabolism in mouse chondrocytes and ameliorates murine osteoarthritis [J].Food Funct, 2018,9(3):1454-1464.DOI:10.1039/c7fo01892d.
- [5] Wang CJ, Huang CC, Yip HK, et al. Dosage effects of extracorporeal shockwave therapy in early hip necrosis[J]. Int J Surg, 2016, 35:179-186.DOI:10.1016/j.ijsu.2016.09.013.
- [6] 夏梦熊,韩海慧,梁倩倩,等.骨性关节炎动物模型研究进展[J]. 实验动物与比较医学,2020,40(2):159-165.DOI:10.3969/j.issn. 1674-5817.2020.02.013.
- Pelletier JP, Jovanovic D, Fernandes JC, et al.Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase [J].Arthritis Rheum, 1998, 41(7): 1275-86.DOI:10.1002/1529-0131(199807)41:7<1275:AID-ART19>3.0. CO;2-T.
- [8] Ryu J, Treadwell BV, Mankin HJ, et al. Biochemical and metabolic ab-

normalities in normal and osteoarthritic human articular cartilage [J]. Arthritis Rheum, 1984, 27 (1): 49-57. DOI: 10. 1002/art. 1780270109.

- [9] Sadatsuki R, Ishijima M, Kaneko H, et al.Bone marrow lesion is associated with disability for activities of daily living in patients with early stage knee osteoarthritis[J].J Bone Miner Metab, 2019, 37(3): 529-536.DOI:10.1007/s00774-018-0950-z.
- [10] van der Kraan PM, van den Berg WB.Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration[J]? Osteoarthritis Cartilage, 2012, 20(3): 223-232. DOI: 10. 1016/j.joca.2011.12.003.
- [11] Zhen G, Cao X.Targeting TGFβ signaling in subchondral bone and articular cartilage homeostasis[J].Trends Pharmacol Sci, 2014, 35(5): 227-236.DOI:10.1016/j.tips.2014.03.005.
- [12] Quan J, Elhousiny M, Johnson NW, et al. Transforming growth factorβ1 treatment of oral cancer induces epithelial-mesenchymal transition and promotes bone invasion via enhanced activity of osteoclasts [J]. Clin Exp Metastasis, 2013, 30 (5): 659-670. DOI: 10.1007/s10585-013-9570-0.
- [13] Fang J, Xu L, Li Y, et al.Roles of TGF-beta 1 signaling in the development of osteoarthritis[J]. Histol Histopathol, 2016, 31(11):1161-1167.DOI:10.14670/HH-11-779.
- [14] Panina SB, Krolevets IV, Milyutina NP, et al. Circulating levels of proinflammatory mediators as potential biomarkers of post-traumatic knee osteoarthritis development [J]. J Orthop Traumatol, 2017, 18 (4):349-357.DOI:10.1007/s10195-017-0473-8.
- [15] Jenei-Lanzl Z, Meurer A, Zaucke F.Interleukin-1ß signaling in osteoarthritis chondrocytes in focus [J]. Cell Signal, 2019, 53: 212-223. DOI:10.1016/j.cellsig.2018.10.005.
- [16] 王斌,邢丹,林剑浩.骨关节炎诊治指南的临床转化应用[J].中华 关节外科杂志(电子版),2017,11(1):104-108. DOI:10.3877/ cma.j.issn.1674-134X.2017.01.021.
- [17] Wang CJ, Yang YJ, Huang CC.The effects of shockwave on systemic concentrations of nitric oxide level, angiogenesis and osteogenesis factors in hip necrosis [J]. Rheumatol Int, 2011, 31(7): 871-877. DOI: 10.1007/s00296-010-1384-7.
- [18] Wang CJ, Huang CY, Hsu SL, et al. Extracorporeal shockwave therapy in osteoporotic osteoarthritis of the knee in rats: an experiment in animals [J]. Arthritis Res Ther, 2014, 16 (4): R139. DOI: 10.1186/ ar4601.
- [19] 刘志成,宋健,张其亮.体外冲击波与膝关节腔内注射透明质酸钠 治疗膝骨关节炎的比较[J].中国组织工程研究,2019,23(15); 2297-2302.DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1165.
- [20] Cho SJ, Yang JR, Yang HS, et al. Effects of extracorporeal shockwave therapy in chronic stroke patients with knee osteoarthritis: a pilot study [J]. Ann Rehabil Med, 2016; 40 (5): 862-870. DOI: 10.5535/arm. 2016.40.5.862.
- [21] Kim JH, Kim JY, Choi CM, et al. The dose-related effects of extracorporeal shock wave therapy for knee osteoarthritis[J]. Ann Rehabil Med, 2015,39(4):616-623.DOI:10.5535/arm.2015.39.4.616.
- [22] Wang CJ, Cheng JH, Huang CY, et al. Medial tibial subchondral bone is the key target for extracorporeal shockwave therapy in early osteoarthritis of the knee[J].Am J Transl Res, 2017,9(4):1720-1731.

(修回日期:2021-12-11) (本文编辑:阮仕衡)