

· 基础研究 ·

周期性拉伸应力对大鼠软骨细胞代谢及凋亡的影响

何勇槟 刘圣曜 邓淞云 徐绍勇 徐镭 倪国新

【摘要】 目的 探讨周期性拉伸应力对大鼠关节软骨细胞合成、分解代谢及凋亡的影响。**方法** 将原代大鼠软骨细胞接种在 I 型胶原包被的 Bioflex 板中培养 1 d 后,采用 Flexcell-5000T 拉伸装置在拉伸频率为 0.5 Hz 条件下将软骨细胞拉伸 24 h,根据拉伸应变率的大小不同将实验分为对照组(0%拉伸)、2%拉伸组、6%拉伸组、10%拉伸组和 14%拉伸组。拉伸结束后采用 qPCR 技术检测 Col II、Aggrecan、MMP-13 及 ADAMTS-5 的 mRNA 表达水平;使用 ELISA 法检测软骨细胞上清液 NO 及 PGE₂ 含量;同时通过 TUNEL 染色及 Annexin V-FITC/PI 方法检测软骨细胞凋亡。**结果** 与对照组相比,10%和 14%拉伸组 Col II (分别为 0.738 ± 0.11 和 0.58 ± 0.13) 及 Aggrecan mRNA (分别为 0.75 ± 0.11 和 0.55 ± 0.09) 表达量降低 ($P < 0.05$),而软骨细胞 MMP-13 (分别为 2.47 ± 0.47 和 2.88 ± 0.36)、ADAMTS-5 基因表达 (2.39 ± 0.33 和 2.75 ± 0.49) mRNA 表达及上清液 NO (6.96 ± 0.96 和 8.28 ± 0.82)、PGE₂ (6.83 ± 0.66 和 7.15 ± 0.71) 含量均增高 ($P < 0.05$);6%拉伸组的 Col II (1.76 ± 0.30) 及 Aggrecan (1.93 ± 0.14) mRNA 表达量较对照组 (1.00 ± 0.10) 增高,NO 含量 (3.07 ± 0.20) 较对照组 (3.89 ± 0.33) 降低 ($P < 0.05$);2%和 6%拉伸组细胞凋亡 (分别为 0.065 ± 0.013 , 0.063 ± 0.147) 与对照组 (0.045 ± 0.008) 差异无统计学意义 (P 分别为 0.059 和 0.094),而 10%拉伸组 (0.135 ± 0.026) 和 14%拉伸组 (0.184 ± 0.020) 细胞凋亡显著增加 ($P < 0.05$)。**结论** 周期性拉伸应力对体外软骨细胞代谢及凋亡的影响具有拉伸应力大小依赖性,10%及 14%拉伸应变率相应拉伸应力导致软骨细胞分解代谢及凋亡增加,6%拉伸应变率相应拉伸应力可促进软骨细胞合成代谢,而 2%拉伸应变率相应拉伸应力对软骨细胞代谢和凋亡无明显影响。

【关键词】 机械拉伸; 软骨细胞; 凋亡; 代谢; 大鼠

基金项目:国家自然科学基金(81572219);广东省自然科学基金(2014A030313307);福建省自然科学基金(2016J01450)

Effects of cyclic tensile stress on metabolism and apoptosis of chondrocytes in rat He Yongbin*, Liu Shengyao, Deng Songyun, Xu Shaoyong, Xu Lei, Ni Guoxin. * Department of Orthopaedics and Traumatology, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Corresponding author: Ni Guoxin, Email: guoxinni@fjmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect of cyclic tensile stress (CTS) on the metabolism and apoptosis of rat chondrocytes. **Methods** Primary rat chondrocytes were cultured on a Bioflex plate for one day and then stretched cyclically for 24 hours at a frequency of 0.5 Hz using a Flexcell-5000T apparatus. The cells were divided into 5 groups according to their stretching ratio: 0% (the control group), 2%, 6%, 10% and 14%. After the stretching, Col II, Aggrecan, MMP-13 and ADAMTS-5 mRNA were measured using qPCRs, and the NO and PGE₂ levels were measured using ELISA kits. Moreover, TUNEL staining and Annexin V-FITC/PI were used to analyze the apoptosis of chondrocytes. **Results** Compared with the control group, the average levels of Col II and Aggrecan mRNA decreased in 10% and 14% groups [(0.738 ± 0.11) and (0.58 ± 0.13) , (0.75 ± 0.11) and (0.55 ± 0.09)]. In those groups, the MMP-13 [(2.47 ± 0.47) and (2.88 ± 0.36)] and ADAMTS-5 mRNA level [(2.39 ± 0.33) and (2.75 ± 0.49)], the NO [(6.96 ± 0.96) and (8.28 ± 0.82)] and PGE₂ level [(6.83 ± 0.66) and (7.15 ± 0.71)] had increased significantly. In the 6% group the average levels of Col II (1.76 ± 0.30) and Aggrecan mRNA (1.93 ± 0.14) of 6% group were significantly higher than the control group, but the NO level of the former (3.07 ± 0.20) was significantly lower than the control group (3.89 ± 0.33). The apoptosis rate of chondrocytes in 2% and 6% groups were (0.065 ± 0.013) and (0.063 ± 0.147), without significant differences to that of the control group (0.045 ± 0.008).

However, compared with the control group, apoptosis in the 10% and 14% groups [(0.135 ± 0.026) and (0.184 ± 0.020)] increased significantly. **Conclusion** The effect of cyclic tensile stress on chondrocyte metabolism and apoptosis was magnitude-dependent. Ten percent and 14% CTS can increase the catabolism and apoptosis of chondrocytes. Ten percent and 14% strain can increase the catabolism and apoptosis of chondrocytes. Cyclic 6% strain can increase the anabolism of chondrocytes, but 2% strain has no impact on metabolism or apoptosis.

【Key words】 Cyclic tensile stress; Chondrocyte; Apoptosis; Metabolism; Rat

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81572219); Natural Science Foundation of Guangdong Province (2014A030313307); Natural Science Foundation of Fujian Province (2016J01450)

跑步是一项常见的负重运动形式,大量研究结果表明,跑步对关节的影响具有强度依赖性^[1-3],适度强度的跑步被认为对关节无害、甚至有保护作用,而过高的强度跑步会对关节健康产生不利的影响,甚至引起骨关节炎(osteoarthritis, OA)的发生。尽管这些观点得到普遍的认同,但其相关的细胞及分子机制尚不明确。关节软骨在运动状态下主要受到压缩力、剪切力及拉伸应力等影响,以往实验主要探讨压缩力及剪切力对软骨细胞的影响^[4-5],近年来,有研究报道过度拉伸应力对软骨细胞产生不利影响,然而关于不同大小拉伸应力对软骨细胞代谢及凋亡的影响研究尚少。本研究旨在探讨不同大小拉伸应力对大鼠软骨细胞代谢及凋亡的影响,拟为从细胞分子层面探讨不同强度负重运动对关节软骨的影响提供理论基础。

材料与方法

一、软骨细胞培养及鉴定

选取 6~8 周龄雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 16 只,体重 250~300 g(由南方医科大学实验动物中心提供),无菌条件下取双侧膝关节软骨置于 5 ml 无菌离心管,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)漂洗 3 次,剪碎后用 0.25% 的胰蛋白酶消化 30 min 和 0.2% II 型胶原酶消化 2 h, 1000 g 离心 5 min 收集细胞。用含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的杜氏培养液(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)培养基将收集细胞制成细胞悬液,接入 25 cm² 细胞培养瓶中,置于 37 ℃、含 5% CO₂ 孵箱中培养,原代软骨细胞用于本研究。

采用 II 型胶原(type II collagen, Col II)免疫组化鉴定其软骨性能:将 5×10^3 个软骨细胞接种到无菌玻片上,待细胞长至 50%~60% 时,取出细胞爬片, PBS 清洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 30 min 后用 0.1% 聚乙二醇辛基苯基醚(Triton)-PBS 清洗,放置室温 20 min,再用 30% 的 H₂O₂ 室温孵育 10 min,滴加封闭血清, 37 ℃ 孵育 0.5 h 后甩掉多余液体,滴加 Col II 一抗工作液(1:200), 4 ℃ 冰箱过夜。其后加二抗孵育 30 min,加链霉亲和素-生物素复合物(strept avidin-biotin complex, SABC)工作液孵育 20 min, PBS 清洗 5 min×3 次,加 2 滴

二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)工作液, 5 min 后镜下观察,待细胞出现黄褐色改变后封片并拍照。

二、软骨细胞拉伸刺激

将软骨细胞接种在 I 型胶原包被的 6 孔双向应力细胞培养板(Bioflex 板)1 d 后,采用细胞应力加载系统(Flexcell-5000T 拉伸装置)对软骨细胞施加周期性拉伸应力(cyclic tensile stress, CTS)进行拉伸 24 h, 频率为 0.5 Hz。Flexcell-5000T 拉伸装置加载原理是用真空泵抽取 Bioflex 板底部的弹性膜,形成负压使弹性膜产生形变,从而使贴壁(弹性膜)生长的细胞受到拉伸应力的作用;细胞所受力值大小由弹性膜拉伸应变率表示,应变率越大,表示细胞所受拉伸应力越大。根据拉伸应变率的大小不同将实验分为对照组(0% 拉伸)、2% 拉伸组、6% 拉伸组、10% 拉伸组和 14% 拉伸组,每个拉伸组重复 6 次($n=6$)。

三、一氧化氮(nitric oxide, NO)及前列腺素 E₂(prostaglandin E₂, PGE₂)含量测定

拉伸结束后,收集各组软骨细胞上清液,放入 -20 ℃ 冰箱保存待用,择时采用 ELISA 方法检测上清液 NO 及 PGE₂ 含量。

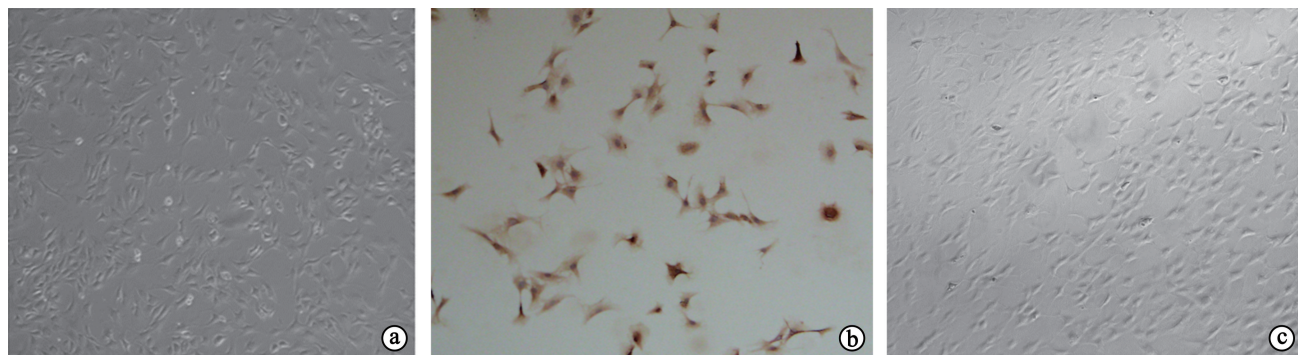
四、细胞凋亡检测

1. 流式细胞仪分析:软骨细胞用不含乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)的胰酶消化、离心, PBS 洗涤细胞后用 500 μl 结合缓冲液(binding buffer)悬浮细胞;再先后加入 5 μl 膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)和 5 μl 碘化丙啶(propidium iodide, PI),避光反应 15 min 后,上机检测细胞凋亡。

2. 原位末端凋亡法(TdT-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL)检测细胞凋亡:细胞固定并用 PBS 漂洗后浸入封闭液中封闭,然后浸入通透液中,冰上促渗 2 min,标记反应。预处理的样本经 PBS 漂洗,滴加脱氧核苷酸末端转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT)反应液,加盖玻片 37 ℃ 避光湿润反应;用异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的荧光抗体进行标记,并在荧光显微镜下拍照分析。

五、实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR)

拉伸后的软骨细胞用 PBS 清洗后加入 500 μl 裂



注:a 原代软骨细胞形态;b 软骨细胞 Col II 免疫组化(图中棕褐色为阳性);c 细胞牵拉后软骨细胞形态

图1 软骨细胞的形态图

解液,收集裂解物提取全细胞核糖核酸(ribonucleic acid, RNA) (Qiagen RNeasy Minikit 试剂盒),测定 RNA 浓度后,取 0.5 μ g 反转录为互补脱氧核糖核酸(complementary deoxyribonucleic acid, cDNA),反应条件为:37 $^{\circ}$ C 15 min, 98 $^{\circ}$ C 5 min, 4 $^{\circ}$ C 终止反应。应用 qPCR 测定各基因 mRNA 表达含量,反应条件为:95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 循环 40 次; 95 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 10 min 终止反应,采用相对定量法采集数据。各基因引物如下。

Col II: 正义序列 5'-CCCAGAACATCACCTAC-CAC-3', 反义序列 5'-GGTACTCGATGATGGTCTTG-3'; 聚蛋白聚糖(Aggregan): 正义序列 5'-GATGTCCCCTG-CAATTACCA-3', 反义序列 5'-TCTGTGCAAGTGAT-TCGAGG-3'; 基质金属蛋白酶 13(matrix metalloproteinase 13, MMP-13): 正义序列 5'-CTCTTGAGCTGGACT-CATTG-3', 反义序列 5'-CTGCAAAGTGAAGTCTTCC-3'; 锌离子依赖的金属蛋白酶 5(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5, ADAMTS-5): 正义序列 5'-TGTGCCGTGATTGAAGATGA-3', 反义序列 5'-TCATGAGAGAGGCCAAGGA-3'; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH): 正义序列 5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3', 反义序列 5'-ATGCTGGTGAAGACGCCAGTA-3'。

六、统计学方法

使用 SPSS 13.0 版统计软件对数据进行统计学分析处理,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析进行比较。若有差异,则再采用 SNK 检验进行组间两两比较, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

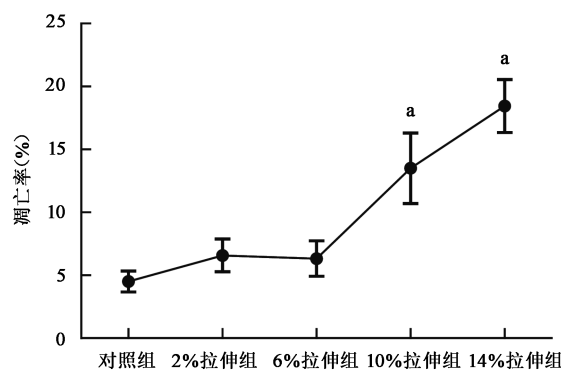
一、大鼠软骨细胞的形态及鉴定

倒置显微镜下观察可见分离培养的原代软骨细胞 10 h 后有部分贴壁; 24 h 后大部分贴壁,少量细胞开始伸展,呈均匀散在生长; 5~7 d 后细胞长满,呈明显的

“铺路石”状外观(图 1a)。图 1b 所示为软骨细胞免疫组化染色,可见 Col II 主要分布在细胞质和细胞膜上,呈阳性表达(黄褐色),软骨细胞中均表达 Col II; 图 1c 所示为拉伸后的软骨细胞形态,可见软骨细胞排列方向一致。

二、软骨细胞凋亡

流式细胞仪检测不同大小 CTS 对软骨细胞凋亡早期、中晚期及坏死比例影响。与对照组相比,10%和 14%的拉伸应力明显增加软骨细胞凋亡率($P < 0.05$),而 2%的和 6%的拉伸应力对软骨细胞凋亡率的影响与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),如图 2 所示。TUNEL 染色则显示 10%和 14%的拉伸应力能显著增加凋亡阳性率(图 3)。



注:与对照组比较, $^a P < 0.05$

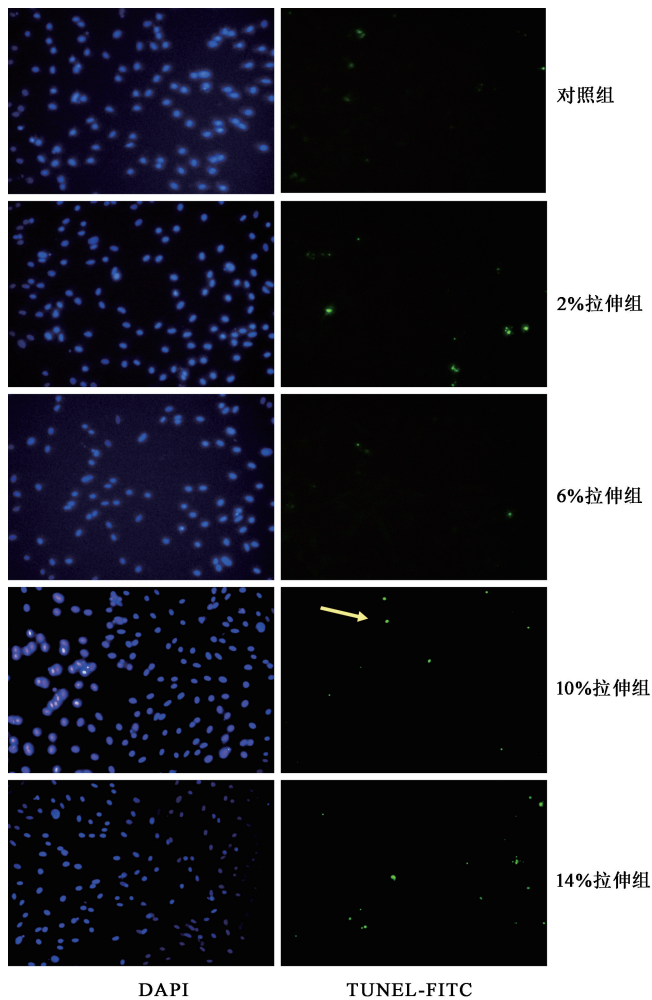
图2 不同大小拉伸应力对软骨细胞的凋亡率比较

三、上清液 NO 及 PGE₂ 含量

10%拉伸组和 14%拉伸组 NO 及 PGE₂ 含量均显著高于对照组($P < 0.01$); 6%拉伸组 NO 含量显著低于对照组,而 PGE₂ 含量高于对照组,组间差异有统计学意义($P < 0.05$); 2%拉伸组 NO 和 PGE₂ 含量与对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。如图 4 所示。

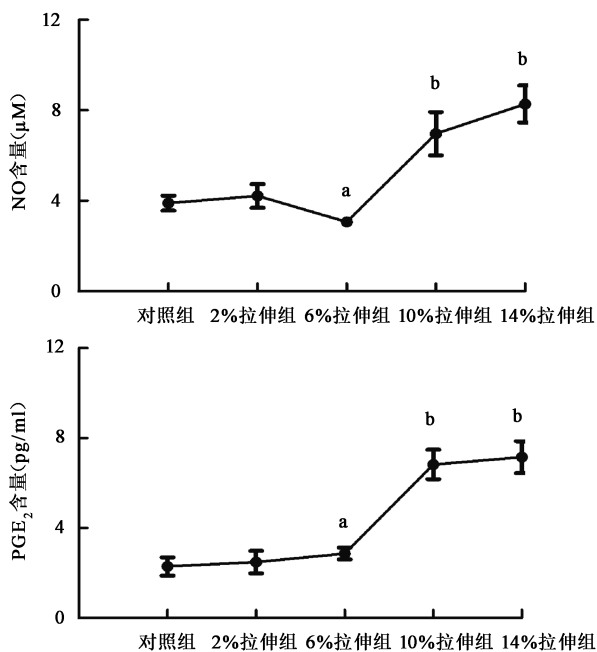
四、软骨细胞相关基因表达

与对照组相比,10%拉伸组和 14%拉伸组 Col II 及 Aggrecan mRNA 相对表达量显著降低($P = 0.001$), 6%拉伸组 Col II 及 Aggrecan mRNA 表达量显著升高



注:箭头所指的绿色荧光为 TUNEL 染色阳性细胞

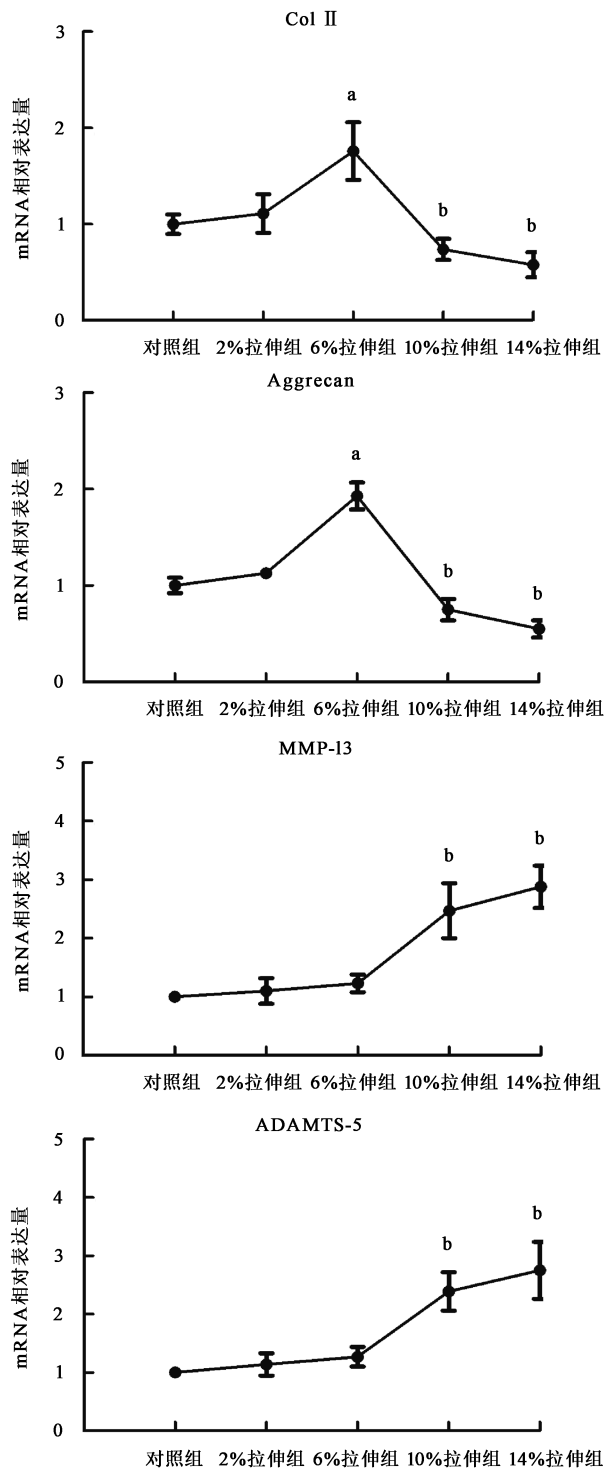
图 3 不同大小拉伸应力对软骨细胞凋亡的影响 (TUNEL 染色, $\times 200$)



注:与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

图 4 各组上清液 NO 及 PGE₂ 含量比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

($P < 0.05$), 2% 拉伸组 Col II 及 Aggrecan 的 mRNA 表达量则无明显变化, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 10% 拉伸组和 14% 拉伸组 MMP-13 及 ADAMTS-5 mRNA 相对表达量显著高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 2% 拉伸组和 6% 拉伸组 MMP-13 及 ADAMTS-5 mRNA 相对表达量均与对照组无统计学差异 ($P > 0.05$)。如图 5 所示。



注:与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

图 5 各组软骨细胞 mRNA 表达量及代谢产物含量

讨 论

关节软骨主要受到压缩力、剪切力及拉伸应力的影响。O'Connor 等^[6]通过建立一个关节软骨快速负重模型发现压缩力主要作用于软骨接触区域,而在接触区以外域主要受拉伸应力影响,而且在骨与软骨接触区域及关节软骨表面会产生拉伸应力;此外,关节受到的剪切力也会部分转变为拉伸应力。Vanderploeg 等^[7]认为,在受损或退变的关节表面会出现裂痕,从而产生更多的拉伸应力。可见拉伸应力在生理及病理情况下都是关节软骨细胞受力的重要形式之一。本研究结果显示,10%和14%拉伸应变率相应拉伸应力导致软骨细胞分解代谢凋亡增加,6%拉伸应变率相应拉伸应力可促进软骨细胞合成代谢,而2%拉伸应变率相应拉伸应力对软骨细胞代谢和凋亡无明显影响,周期性拉伸应力对体外软骨细胞代谢及凋亡的影响具有拉伸应力大小依赖性。

软骨主要由软骨细胞、细胞外基质及水组成,软骨细胞可产生或降解细胞外基质,是关节软骨的主要功能成分。软骨细胞外基质主要包括胶原类和蛋白多糖,Col II 在基质中含量很多,是维持组织强度的来源,且可与其他细胞成分相互作用形成网络系统^[8]。Aggrecan 可与透明质酸连接形成聚合体,为软骨提供渗透性及抵抗压力。Col II 及 Aggrecan 含量的变化能反应拉伸应力对软骨细胞合成代谢的影响。以往有很多研究探讨机械拉伸应力对软骨细胞 Col II 和 Aggrecan 的影响,Shimizu 等^[9]发现7%、10%及15%拉伸应力作用于软骨细胞3h和6h后 Col II 和 Aggrecan 表达含量无明显变化,作用12h后两者均增加;作用24h后7%拉伸组进一步增加 Col II 和 Aggrecan 表达,而15%拉伸组却降低了两者的表达^[9-11]。拉伸时间是影响拉伸应力对软骨细胞合成代谢的一重要因素。本研究发现,同以往研究一致,6%拉伸应变率相应拉伸应力作用24h后能够增加软骨细胞合成;而与 Shimizu 等研究不同,10%及以上拉伸应变率相应拉伸应力作用24h会降低软骨细胞合成,拉伸频率可能是引起这种不一致的原因,Shimizu 等使用的拉伸频率为0.05 Hz,而本研究的拉伸频率为0.5 Hz,一种对应体内为快走或跑步的频率^[12]。

软骨细胞外基质主要由蛋白酶引起降解,MMP-1、MMP-3 和 MMP-13 是常见的胶原酶,可以裂解胶原网状结构。MMP-13 相对其他亚型具备更高的对 II 型胶原酶的亲和力,并且可以在特定部位裂解蛋白聚糖,在导致软骨降解的过程中起重要作用。ADAMTS-4 及 ADAMTS-5 是聚糖蛋白酶,可裂解聚蛋白聚糖。本研究发现10%及14%拉伸应变率相应拉伸应力作用于

软骨细胞后 MMP-13 及 ADAMTS-5 mRNA 表达量表达均增高,而2%和6%拉伸应变率相应拉伸应力对其无明显影响,表明大的拉伸应力会引起软骨细胞基质降解。Bleuel 等^[12]选用0.5 Hz 拉伸频率,发现7%及以上拉伸应变率相应拉伸应力作用12h后软骨细胞分解代谢增长最明显,随着时间延长其分解代谢会逐渐降低。同 Bleuel 等^[12]研究结果一致,本研究10%及14%拉伸组这2种分解酶含量均增高;然而,2%及6%拉伸应变率相应拉伸应力并不影响这两种分解酶含量,拉伸应力过小不足以引起软骨细胞降解及拉伸时间过久使得分解代谢指标恢复至正常水平都可能引起这一结果,今后需进一步研究以探讨更多的拉伸应力大小在不同时间点对软骨细胞的影响。

本研究发现大的拉伸应力会促进软骨细胞产生炎性介质,10%和14%拉伸应变率相应拉伸应力增加 NO 及 PGE₂ 的含量。NO 是一种氧自由基,可通过抑制胶原及 AGG 合成而对软骨代谢起负面作用,且可通过激活 MMP 等引起软骨细胞降解^[14]。有研究表明 OA 患者血清 NO 含量会增加,而使用 NO 抑制剂会延缓 OA 的发生^[13]。PGE₂ 在 OA 的发病中也有重要作用^[15],Kim 等^[16]发现,OA 患者关节软骨、滑膜组织中可检测到 iNOS 和 COX-2 的 mRNA 过度表达及其产物 NO 与 PGE₂ 的大量生成。Bleuel 等在0.5 Hz 拉伸频率下,10%拉伸应变率相应拉伸应力作用12h及24h均会增加 NO 及 PGE₂ 含量,进而引起软骨细胞分解代谢^[12],这与本研究结果一致。同时,本研究表明6%拉伸应变率相应拉伸应力可降低 NO 含量,可通过抑制 NO 炎症因子的产生保护软骨细胞。

凋亡是一种程序性死亡,软骨细胞的凋亡与 OA 发生密切相关,然而体外拉伸应力对软骨细胞凋亡影响的研究尚少。过度的拉伸应力会引起软骨细胞凋亡,从而引起软骨细胞的丢失及 OA 发生^[17-19]。Li 等^[20]发现过度的拉伸应力可以导致细胞氧自由基系统平衡失调,引起细胞毒性作用。此外,Takebe 等^[21]研究表明过度的拉伸应力可通过 P53 通路引起软骨细胞凋亡。本研究发现10%和14%拉伸应变率相应拉伸应力会增加软骨细胞凋亡,而2%和6%拉伸应变率相应拉伸应力对软骨细胞凋亡无明显影响。Agarwal 等^[22]研究表明适量拉伸力可降低炎性状态下软骨细胞凋亡,但对正常软骨细胞无显著影响;本实验研究对象为正常的软骨细胞,6%拉伸应变率相应拉伸应力对软骨细胞凋亡无影响,不同大小的拉伸应力对炎性状态下软骨细胞凋亡的影响将在以后研究中进一步探讨,并深入研究其可能机制。

综上所述,10%和14%拉伸应变率相应拉伸应力对软骨细胞具有破坏作用,能引起软骨降解,增加

软骨细胞凋亡;6%拉伸应变率相应拉伸应力对软骨细胞有保护作用,可以促进软骨细胞合成;而 2%拉伸应变率相应拉伸应力对软骨细胞代谢及凋亡无明显影响,拉伸应力对体外软骨细胞代谢及凋亡的影响具有拉伸应力大小依赖性。不同大小的拉伸应力对软骨细胞代谢及凋亡影响的相关性将在以后的研究中进一步探讨。明确不同大小拉伸应力对软骨细胞的影响,为从细胞分子方面探讨运动强度对关节的影响奠定理论基础,也有助于 OA 预防与治疗中力学刺激的选择与应用。

参 考 文 献

- [1] Krampla WW, Newrkl SP, Kroener AH, et al. Changes on magnetic resonance tomography in the knee joints of marathon runners: a 10-year longitudinal study [J]. *Skeletal Radiol*, 2008, 37 (7) : 619-626. DOI: 10.1007/s00256-008-0485-9.
- [2] Schueller-Weidekamm C, Schueller G, Uffmann M, et al. Does marathon running cause acute lesions of the knee? Evaluation with magnetic resonance imaging [J]. *Eur Radiol*, 2006, 16 (10) : 2179-2185. DOI: 10.1007/s00330-005-0132-y.
- [3] Yokota H, Leong DJ, Sun HB. Mechanical loading: bone remodeling and cartilage maintenance [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2011, 9 (4) : 237-242. DOI: 10.1007/s11914-011-0067-y.
- [4] Grodzinsky AJ, Levenston ME, Jin M, et al. Cartilage tissue remodeling in response to mechanical forces [J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2000, 2: 691-713. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.2.1.691.
- [5] Smith RL, Carter DR, Schurman DJ. Pressure and shear differentially alter human articular chondrocyte metabolism: a review [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2004, 427 (Suppl) : S89-S95.
- [6] O'Connor JJ, Johnson I. Transmission of rapidly applied load through articular cartilage: the mechanics of osteoarthritis [M]. In: Turner-Smith AR. *Micromovement in Orthopaedics*. Oxford: Clarendon Press, 1993: 244-268.
- [7] Vanderploeg EJ, Imler SM, Brodtkin KR, et al. Oscillatory tension differentially modulates matrix metabolism and cytoskeletal organization in chondrocytes and fibrochondrocytes [J]. *J Biomech*, 2004, 37 (12) : 1941-1952. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2004.02.048.
- [8] Valcourt U, Gouttenoire J, Moustakas A, et al. Functions of transforming growth factor- β family type I receptors and Smad proteins in the hypertrophic maturation and osteoblastic differentiation of chondrocytes [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (37) : 33545-33558. DOI: 10.1074/jbc.M202086200.
- [9] Shimizu A, Watanabe S, Iimoto S, et al. Interleukin-4 protects matrix synthesis in chondrocytes under excessive mechanical stress in vitro [J]. *Mod Rheumatol*, 2004, 14 (4) : 296-300. DOI: 10.3109/s10165-004-0312-7.
- [10] Iimoto S, Watanabe S, Takahashi T, et al. The influence of Celecoxib on matrix synthesis by chondrocytes under mechanical stress in vitro [J]. *Int J Mol Med*, 2005, 16 (16) : 1083-1088. DOI: 10.3892/ijmm.16.6.1083.
- [11] Doi H, Nishida K, Yorimitsu M, et al. Interleukin-4 downregulate the cyclic tensile stress-induced matrix metalloproteinases-13 and cathepsin B expression by rat normal chondrocytes [J]. *Acta Med Okayama*, 2008, 62 (2) : 119-126.
- [12] Bleuel J, Zaucke F, Bruggemann GP, et al. Effects of cyclic tensile strain on chondrocyte metabolism: a systematic review [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (3) : e119816. DOI: 10.1371/journal.pone.0119816.
- [13] McCartney-Francis. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase [J]. *J Exp Med*, 1993, 178 (2) : 749-754. DOI: 10.1084/jem.178.2.749.
- [14] Lotz M. The role of nitric oxide in articular cartilage damage [J]. *Rheum Dis Clin North Am*, 1999, 25 (2) : 269-282.
- [15] Takeda K, Lin J, Okubo S, et al. Transient glucose deprivation causes upregulation of heme oxygenase-1 and cyclooxygenase-2 expression in cardiac fibroblasts [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2004, 36 (6) : 821-830. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2004.03.008.
- [16] Kim SJ, Hwang SG, Shin DY, et al. p38 kinase regulates nitric oxide-induced apoptosis of articular chondrocytes by accumulating p53 via NF- κ B-dependent transcription and stabilization by serine 15 phosphorylation [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (36) : 33501-33508. DOI: 10.1074/jbc.M202862200.
- [17] Guilak F, Ratcliffe A, Lane N, et al. Mechanical and biochemical changes in the superficial zone of articular cartilage in canine experimental osteoarthritis [J]. *J Orthop Res*, 1994, 12 (4) : 474-484. DOI: 10.1002/jor.1100120404.
- [18] Loening AM, James IE, Levenston ME, et al. Injurious mechanical compression of bovine articular cartilage induces chondrocyte apoptosis [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 381 (2) : 205-212. DOI: 10.1006/abbi.2000.1988.
- [19] Grodzinsky AJ, Levenston ME, Jin M, et al. Cartilage tissue remodeling in response to mechanical forces [J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2000, 2: 691-713 [J]. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.2.1.691.
- [20] Li R, Chen B, Wang G, et al. Effects of mechanical strain on oxygen free radical system in bone marrow mesenchymal stem cells from children [J]. *Injury*, 2011, 42 (8) : 753-757. DOI: 10.1016/j.injury.2010.11.015.
- [21] Takebe K, Nishiyama T, Hayashi S, et al. Regulation of p38 MAPK phosphorylation inhibits chondrocyte apoptosis in response to heat stress or mechanical stress [J]. *Int J Mol Med*, 2011, 27 (3) : 329-335. DOI: 10.3892/ijmm.2010.588.
- [22] Agarwal S, Long P, Gassner R, et al. Cyclic tensile strain suppresses catabolic effects of interleukin-1 β in fibrochondrocytes from the temporomandibular joint [J]. *Arthritis Rheum*, 2001, 44 (3) : 608-617. DOI: 10.1002/1529-0131 (200103) 44: 3 < 608 : : AID-ANR109 > 3.0.CO; 2-2.

(修回日期:2016-10-10)

(本文编辑:汪 玲)