

## · 基础研究 ·

# 低强度脉冲超声对兔膝骨性关节炎骨软骨连接血管形成与侵袭的影响

杨怀春 夏鹏 瞿燕萍 任莎莎 林强 程凯 王晓菊 高明霞 李雪萍

**【摘要】目的** 观察低强度脉冲超声(LIPUS)对早期兔膝骨性关节炎骨软骨连接血管形成与侵袭的影响。**方法** 18只新西兰大白兔按随机数字表法分为对照组、模型组和治疗组,每组6只,模型组和治疗组接受前交叉韧带切断法手术,4周后建立早期骨性关节炎疾病模型,而对照组仅接受假手术处理。治疗组接受LIPUS辐射治疗4周,模型组和对照组仅接受LIPUS假辐射。采用番红O-固绿染色比较各组膝关节骨软骨连接血管形成与侵袭情况;采用免疫印迹(Western blot)技术检测各组的整合素 $\beta 1$ 、磷酸化黏着斑激酶(p-FAK)、磷酸化p38、磷酸化c-Jun氨基末端激酶(p-JNK)、血管内皮生长因子(VEGF)及软骨调节素(CHM)-1蛋白表达水平。**结果** 模型组和治疗组与对照组比较,骨软骨连接血管形成明显增多,潮线出现漂移、重复,结构紊乱,甚至消失,部分血管突破潮线,侵入非钙化软骨层,而治疗组较模型组病理改变明显减轻。模型组的整合素 $\beta 1$ 、p-FAK和VEGF表达水平[(0.92±0.07)、(0.83±0.09)和(1.02±0.10)]较对照组[(0.45±0.04)、(0.18±0.03)和(0.35±0.02)]明显增高,且组间差异有统计学意义( $P<0.05$ );模型组的p38和JNK磷酸化水平[(0.99±0.11)和(1.86±0.06)]亦较对照组[(0.31±0.04)和(0.38±0.03)]明显增高( $P<0.05$ );而模型组的ChM-1表达(0.61±0.04)较对照组(1.91±0.08)下降,且差异有统计学意义( $P<0.05$ )。治疗组与模型组比较,治疗组的整合素 $\beta 1$ 和p-FAK表达[(1.10±0.09)和(1.09±0.08)]亦较模型组明显增高,组间差异有统计学意义( $P<0.05$ );但治疗组的VEGF表达(0.58±0.06)较模型组明显降低( $P<0.05$ ),治疗组的p38和JNK磷酸化水平[(0.54±0.09)和(1.29±0.08)]亦较模型组降低,且差异有统计学意义( $P<0.05$ );但治疗组的ChM-1表达(1.09±0.12)较模型组明显升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** LIPUS可以抑制骨性关节炎骨软骨连接血管形成与侵袭,其作用机制可能与LIPUS通过整合素 $\beta 1$ -FAK-p38/JNK-VEGF/ChM-1通路调控血管形成相关因子VEGF和ChM-1的表达有关。

**【关键词】** 骨性关节炎; 血管形成; 血管内皮生长因子; 低强度脉冲超声; 整合素 $\beta 1$

**基金项目:**国家自然科学基金(81272151);南京市医学科技发展基金项目(YKK13113)

**Pulsed ultrasound regulates angiogenesis and vascular invasion of the osteochondral junction in arthritic knee cartilage** Yang Huaichun, Xia Peng, Qu Yanping, Ren Shasha, Lin Qiang, Cheng Kai, Wang Xiaoju, Gao Mingxia, Li Xueping. Department of Rehabilitation Medicine, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China

*Corresponding author:* Li Xueping, Email: lixueping6504@163.com

**【Abstract】 Objective** To observe the effect of low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on angiogenesis and vascular invasion in the osteochondral junctions of rabbits with osteoarthritis. **Methods** Eighteen 2 to 2.5 kg New Zealand rabbits were randomly divided into an early control group (EC), an early osteoarthritis group (EO) and an osteoarthritis plus LIPUS treatment group (ET), each of 6. The rabbits of the EO and ET groups received anterior cruciate ligament resection at their left hind limbs, while those of the EC group were sham-operated. The ET group was exposed to LIPUS radiation four weeks later when osteoarthritis had been established, while the EO and EC groups were exposed to fake LIPUS radiation. After four weeks of treatment the rabbits were sacrificed and pathological changes in the articular surface of the femoral condyle were assessed using Safranin O-fast green cartilage staining. Western blotting was used to examine the expression of integrin  $\beta 1$ , p-FAK, p-JNK, p-p38, VEGF and chondromodulin-1 (ChM-1). **Results** Compared with the EC group, significantly more angiogenesis and vascular invasion was observed in the osteochondral junctions of the EO and ET groups, with more vessels at the osteochondral junction and marked disorder of the tidal line broken up by vessels. The expression of integrin  $\beta 1$ , p-FAK, VEGF, p-p38 and

p-JNK was significantly higher in the EO group than in the EC group, while ChM-1 expression was significantly lower. Compared with the EO group, the expression of integrin  $\beta 1$ , p-FAK and ChM-1 in the ET group was significantly higher, while that of VEGF, p38 and p-JNK was significantly lower. **Conclusions** LIPUS inhibited angiogenesis and vascular invasion in the osteochondral junctions of the osteoarthritic rabbits through activating an integrin  $\beta 1$ -FAK-p38/JNK-VEGF/ChM-1 pathway.

**[Key words]** Osteoarthritis; Angiogenesis; Vascular endothelial growth factor; Ultrasound; Integrin  $\beta 1$

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81272151); Key Project Supported by Medical Science and Technology Development Foundation, Nanjing Department of Health (Ykk 13113)

骨性关节炎 (osteoarthritis) 是一种以关节软骨的损伤、退变及软骨下骨的硬化、增生、囊变, 继而导致关节间隙狭窄为特征的慢性退行性疾病<sup>[1]</sup>。骨软骨连接是软骨与软骨下骨交界的区域, 在骨性关节炎的病理过程中发挥重要作用<sup>[2-6]</sup>。近年来众多研究发现, 在骨性关节炎的发病过程中, 骨软骨连接可观察到血管向软骨内侵袭, 且骨软骨连接血管的形成与侵袭受到多种因素的参与和调控, 并与软骨细胞退变、软骨基质矿化、骨性关节炎疼痛有关<sup>[6-7]</sup>。低强度脉冲超声 (low-intensity pulsed ultrasound, LIPUS) 是近年来新兴的物理治疗因子, 可用于骨性关节炎的治疗, 但其作用机制尚不完全清楚。研究已经证实 LIPUS 可通过软骨表面应力受体整合素  $\beta 1$  介导的力化学传导通路对骨性关节炎软骨细胞凋亡、细胞外基质表达起到调控作用<sup>[8-12]</sup>, 但其对骨性关节炎骨软骨连接血管形成与侵袭的作用及其机制尚未见文献报道。本研究通过构建兔早期骨性关节炎模型, 观察 LIPUS 对骨性关节炎骨软骨连接血管形成与侵袭及其对整合素  $\beta 1$ -黏着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK)-p38/c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 通路及血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、软骨调节素 (chondromodulin, ChM)-1 相关蛋白表达的影响, 旨在探讨 LIPUS 对骨性关节炎骨软骨连接血管形成与侵袭的作用及其可能机制。

## 材料与方法

### 一、实验动物及材料

选取新西兰成年健康雄性大白兔 18 只, 体重 2.5~3.0 kg, 普通级, 购自青龙山动物饲养中心, 24 h 昼夜循环, 不限量供应水和食物于装置内, 饲养于本院动物实验中心。

**主要器材及试剂:** 包括 LIPUS 治疗仪 (HT2009-1 型, 日本伊藤公司), Western 电泳仪 (型号 164-5051, 美国 Bio-Rad 公司), 高速冷冻离心机 (型号 SH03014, 美国科俊仪器公司), 分光光度计 (型号 UV-2540, 日本岛津), 冰冻切片机 (美国 Reichert 公司), 全蛋白提取试剂盒 (凯基生物有限公司), 番红 O-固绿染色试剂盒

(南京森贝伽生物科技有限公司), 整合素  $\beta 1$  抗体 (Abcam 公司), 磷酸化黏着斑激酶 (phosphorylated-focal adhesion kinase, p-FAK) 抗体 (Cell Signaling Technology 公司), p-JNK 抗体 (Abcam 公司), p-p38 抗体 (Santa Cruz 公司), VEGF 抗体 (Abcam 公司), ChM-1 抗体 (Santa Cruz 公司)。

### 二、实验分组及动物模型制作

将 18 只体重相近的健康雄性新西兰大白兔按随机数字表法分成对照组、模型组和治疗组, 每组 6 只, 模型组和治疗组接受前交叉韧带切断法手术, 4 周后建立早期骨性关节炎疾病模型, 而对照组仅接受假手术处理, 即仅行兔左后肢关节囊切开缝合术。

**骨性关节炎模型制作:** 模型组和治疗组采用前交叉韧带切断法制作兔骨性关节炎动物模型<sup>[8]</sup>, 取兔左后肢膝关节为手术关节, 予以 5% 水合氯醛全身麻醉后行局部备皮, 沿膝关节内侧切开皮肤, 逐层分离皮下筋膜、肌肉, 切开关节囊, 找到并剪断前交叉韧带, 予抽屉试验确认完全断裂后, 彻底止血, 生理盐水冲洗关节腔, 逐层缝合关节囊、筋膜、皮肤。术后给予肌肉注射青霉素 20 万 U, 每日 2 次, 共 3 d。3 d 后每日笼外放养 1 h, 使其术侧膝关节主动屈伸。早期骨性关节炎模型于术后 4 周建立 (手术后并没有直接处死兔子, 而是继续接受超声治疗 4 周后才予以处死)。造模成功标准: 可见关节表面明显不平整, 存在多处软骨缺损, 且软骨缺损均未达超过软骨层, 伴有较多关节腔内积液形成<sup>[8,13]</sup>。所有模型组和治疗组均造模成功。

### 三、干预方法

造模术后 4 周, 治疗组接受 LIPUS 辐射, 而对照组和模型组仅接受 LIPUS 假辐射, 无功率输出。

**LIPUS 干预方法:** 干预前, 每只兔肌肉注射地西洋 1 ml 镇静, 并于仰卧位固定, 术侧膝关节内侧备皮, 涂抹耦合剂, 其上放置一水囊, 使得水囊与皮肤紧密接触, LIPUS 治疗仪 (日本伊藤公司) 声头涂抹耦合剂后置于水囊上, 开始行 LIPUS 干预。应用 LIPUS 仪自由模式, 通断比 20%, 频率为 3 MHz, 强度为 40 mW/cm<sup>2</sup>, 时间 20 min, 每日 1 次, 每周 6 d, 持续 4 周<sup>[8,14]</sup>。

#### 四、取材与检测

1. 取材:LIPUS干预4周后,采用空气栓塞法处死所有实验动物,观察各组兔膝关节股骨髁大体改变。可见所有模型组和治疗组股骨髁关节表面明显不平整,存在不同程度的软骨缺损,且软骨缺损均未达超过软骨层,伴有较多关节腔内积液形成,提示早期骨性关节炎改变,分别在无菌条件下取各组实验兔左侧膝关节,取股骨髁软骨备做番红O-固绿染色,取胫骨平台软骨备做免疫印迹。

2. 关节软骨番红O-固绿染色:将各组实验兔取下的股骨髁软骨标本用5%的甲醛固定,10%乙烯二胺四乙酸钠缓慢脱钙3周,脱钙完成后,在髁间嵴处矢状位切开取材,常规酒精脱水、浸蜡、火棉胶石蜡双重包埋和切片(厚度4 $\mu\text{m}$ ),行番红O-固绿染色后准备阅片。所有切片均在同一批完成,采用随机抽样原则,以控制操作中的差别。将切片进行显微镜下的病理学观察,内容包括软骨表面、番红O-固绿染色程度、血管形成与侵袭,骨软骨结构及潮线改变等<sup>[15]</sup>。

3. 免疫印迹(Western blot)法检测:取胫骨平台关节面软骨约50 mg,液氮研磨至粉末状,加裂解液500 $\mu\text{l}$ ,待裂解完全,4℃10 000 r/min(离心半径5 cm)离心5 min,抽取10 $\mu\text{l}$ 上清液并检测蛋白浓度,其余上清液加入上样缓冲液煮沸变性,于-80℃保存。取蛋白总量为20~25 $\mu\text{g}$ 样品采用聚丙烯酰胺凝胶电泳,浓缩胶恒压80 V电泳,分离胶恒压120 V。电泳结束,采用半干转式转移电泳槽以恒流15 V转膜。聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride,PVDF)膜在5%的牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA),恒温37℃中封闭2 h;分别加整合素 $\beta 1$ 、p-FAK、p-p38、p-JNK及VEGF、ChM-1抗体,4℃孵育过夜;用洗膜缓冲液(tris buffered saline with tween, TBST)漂洗滤膜3次,每次10 min;加辣根过氧化物酶标记的二抗,37℃孵育2 h, TBST漂洗滤膜3次,每次10 min;将显影液加于PVDF膜上,采用机器曝光。调整曝光时间,直至出现最佳条

带,然后应用Image Tool 3.0图像分析软件对各组蛋白电泳条带进行灰度分析。

#### 五、统计学方法

使用SPSS 20.0版统计软件对数据进行统计学分析处理。计量数据用( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

## 结 果

#### 一、兔膝关节软骨大体观察

对照组关节表面光滑,未见软骨缺损,软骨表面完整;模型组和治疗组可见明显关节表面明显不平整,存在多处软骨缺损,且软骨缺损均未达超过软骨层,伴有较多关节腔内积液形成,提示早期骨性关节炎改变,骨性关节炎造模全部成功,如图1所示。

#### 二、各组兔膝关节软骨组织病理学观察

对各组兔术侧股骨髁关节软骨行番红O-固绿染色,并在光学显微镜下观察比较各组之间的变化(放大100倍和200倍),可见模型组与对照组比较,软骨表面粗糙,可见较多绿染的胶原纤维,自软骨表层向骨软骨连接可见明显细胞增生,骨软骨连接血管形成明显增多,出现潮线漂移,双重乃至多重潮线,潮线不规则,可见新生血管突破潮线进入非钙化软骨层,潮线附近可见较多肥大软骨细胞,软骨钙化层增厚。对照组关节软骨表面平整,未见骨软骨连接血管形成与侵袭。而治疗组较模型组病理学改变明显减轻,软骨表面绿染的胶原纤维及软骨细胞增生明显减少,骨软骨连接血管形成及血管侵袭明显缓解,如图2所示。

#### 三、各组关节软骨相关蛋白表达比较

3组关节软骨的整合素 $\beta 1$ 、p-FAK、p-p38、p-JNK、VEGF和ChM-1蛋白表达灰度分析的具体数据详见表1。

模型组与对照组比较:模型组的整合素 $\beta 1$ 、p-FAK和VEGF表达较对照组明显增高,组间差异有统计学意义( $P<0.05$ );模型组的p38和JNK磷酸化水

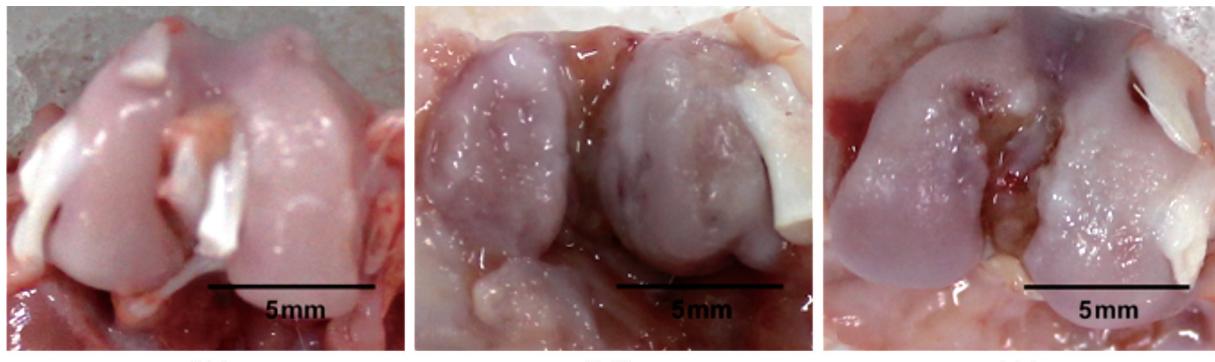
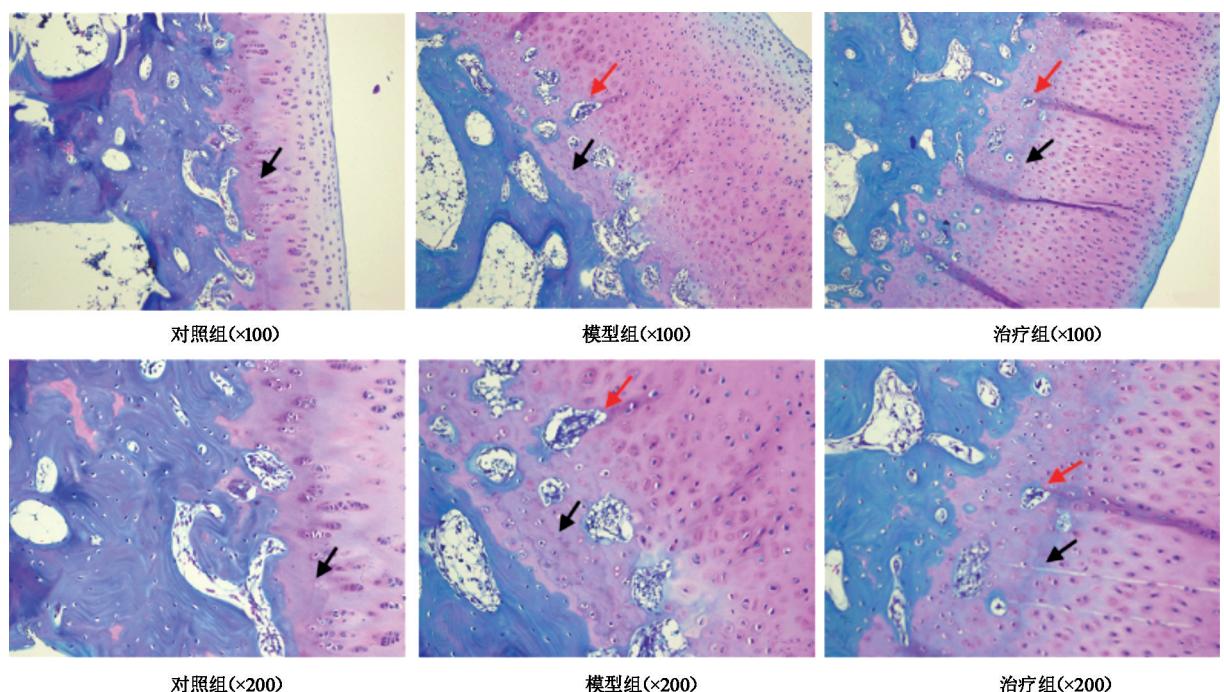


图1 各组兔膝关节软骨大体解剖图



注:图中番红 O-固绿染色,黑色箭头示潮线,红色箭头示血管  
图 2 各组免膝关节软骨组织病理形态学不同放大倍数镜下观

表 1 3 组蛋白表达水平灰度分析比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	整合素 $\beta 1$	p-FAK	p-p38	p-JNK	VEGF	ChM-1
对照组	6	0.45±0.04	0.18±0.03	0.31±0.04	0.38±0.03	0.35±0.02	1.91±0.08
模型组	6	0.92±0.07 <sup>a</sup>	0.83±0.09 <sup>a</sup>	0.99±0.11 <sup>a</sup>	1.86±0.06 <sup>a</sup>	1.02±0.10 <sup>a</sup>	0.61±0.04 <sup>a</sup>
治疗组	6	1.10±0.09 <sup>b</sup>	1.09±0.08 <sup>b</sup>	0.54±0.09 <sup>b</sup>	1.29±0.08 <sup>b</sup>	0.58±0.06 <sup>b</sup>	1.09±0.12 <sup>b</sup>

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ 与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$

平亦较对照组明显增高( $P<0.05$ );而模型组的 ChM-1 表达较对照组下降,且差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

治疗组与模型组比较:治疗组的整合素  $\beta 1$  和 p-FAK 表达亦较模型组增高( $P<0.05$ ),差异有统计学意义( $P<0.05$ );但治疗组的 VEGF 表达较模型组明显降低( $P<0.05$ ),治疗组的 p38 和 JNK 磷酸化水平亦较模型组降低,且差异有统计学意义( $P<0.05$ );但治疗组的 ChM-1 表达较模型组明显升高,且差异有统计学意义( $P<0.05$ ),如图 3 和图 4 示。

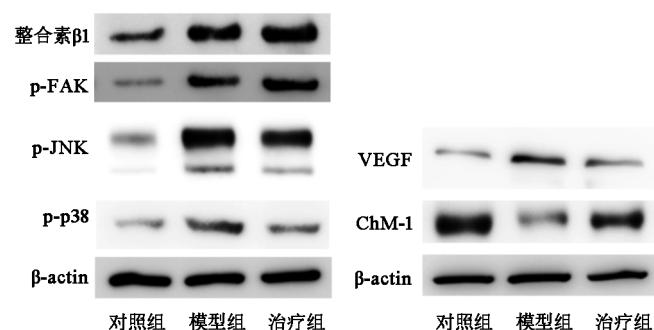
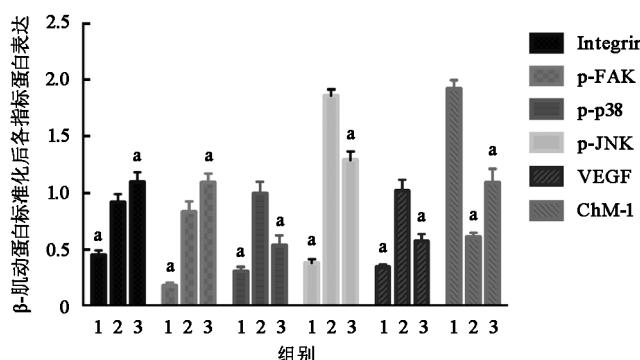


图 3 各组软骨各指标蛋白电泳图



注:1 为对照组,2 为模型组,3 为治疗组;各组间比较,<sup>a</sup> $P<0.05$

图 4 各组  $\beta$ -肌动蛋白标准化后各指标蛋白表达比较

## 讨 论

### 一 骨软骨连接与骨性关节炎

关节软骨分为浅层、过渡层、深放射层和钙化软骨层,前三层又称为非钙化软骨层,软骨深放射层和钙化软骨层之间的边界为嗜碱性潮线,钙化软骨层与软骨下骨板形成一个功能单位,即骨软骨连接<sup>[16-17]</sup>。骨软骨连接在正常关节软骨代谢中起着重要作用,非钙化软骨层细胞可以通过分泌血管形成相关因子使软骨深

放射层转变为钙化软骨层,实现其生理性的软骨内成骨,软骨下骨的终端血管通过骨软骨连接为软骨提供约 50% 的葡萄糖和氧气<sup>[18-19]</sup>。

在骨性关节炎发病过程中,骨软骨连接发生了一系列病理改变,如软骨细胞增生肥大、软骨表面层至骨软骨连接处出现纤维化和裂缝、肥大的软骨细胞周围出现矿化灶、钙化软骨层增厚、潮线外移和多条潮线存在、钙化软骨层内血管生成及向非钙化软骨层侵袭,这一些改变称为骨软骨连接结构重塑<sup>[20-21]</sup>。研究发现,骨性关节炎软骨过量表达 VEGF,并下调 ChM-1 的表达,前者是重要的促进血管形成因子,后者是重要的抑制血管形成因子,二者共同参与骨软骨连接的新生血管形成,其调节失衡可导致骨软骨连接的微血管形成及其向非钙化软骨层的血管侵袭,促进骨软骨连接结构重塑与通透性增加,后者进一步引起非钙化软骨层的退行性变,从而形成恶性循环<sup>[4,6,22-23]</sup>。相关研究已经证实,VEGF 与 ChM-1 表达失衡可促进骨性关节炎患者骨软骨连接血管形成及侵袭<sup>[4,6,23-24]</sup>。

## 二、LIPUS 对骨软骨连接的作用

近年来研究发现,软骨细胞表面整合素受到 LIPUS 照射后,可以激活 FAK,经过一系列的细胞内信号转导最终使 JNK 和 p38 的磷酸化水平增加,提高软骨细胞Ⅱ型胶原、蛋白多糖表达,并可抑制 MMPs 家族蛋白表达<sup>[9,11,25-27]</sup>。进一步的研究发现,p38 及 JNK 也与软骨细胞合成 VEGF、ChM-1 及骨软骨连接血管形成与侵袭及结构重塑有关,炎症、外界异常压力、缺氧等均可以通过增加 p38 及 JNK 磷酸化水平上调 VEGF 表达,后者参与了骨软骨连接新生血管形成及血管向非钙化软骨层侵袭,从而加重骨性关节炎的病理改变<sup>[28-33]</sup>。上述研究显示,LIPUS 介导的整合素 β1-FAK-p38/JNK 通路在骨性关节炎病理过程中起着重要作用,推测 LIPUS 介导的整合素 β1-FAK-p38/JNK 通路可能通过影响 VEGF、ChM-1 代谢对骨软骨连接处血管形成与侵袭产生影响。

本研究显示,模型组较对照组整合素 β1、p-FAK、p-p38、p-JNK、VEGF 表达均明显增加,ChM-1 表达显著下降,且各项指标组间差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示 LIPUS-整合素-FAK-p38/JNK 通路激活,进一步证实该通路骨性关节炎病理改变中的重要作用,并且该通路可能与 VEGF、ChM-1 的表达相关;应用番红 O-固绿染色显示,模型组较对照组的骨软骨连接血管形成及通过潮线侵入非钙化软骨层现象明显增加,进一步证实骨软骨连接处病理改变与 VEGF、ChM-1 表达失衡密切相关;经 LIPUS 治疗后发现,治疗组的整合素 β1、p-FAK 表达较模型组明显增加,p-p38、p-JNK、VEGF 表达明显下降,而 ChM-1 表达明显增高,且各项指标组间差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示 LIPUS 可能通过

激活整合素 β1-FAK-p38/JNK 通路,抑制 VEGF 表达和促进 ChM-1 表达,从而抑制骨软骨连接新生血管形成及侵袭。本研究番红 O-固绿染色还显示,治疗组较模型组的骨软骨连接新生血管明显减少,越过潮线向非钙化软骨层侵袭的血管也明显减少,骨软骨连接结构重塑缓解,从组织学水平提示了 LIPUS 可能通过该通路介导的 VEGF 下调和 ChM-1 上调参与骨性关节炎骨软骨连接处血管形成与侵袭的病理改变,也进一步证实了 LIPUS 对关节软骨的保护作用与整合素-FAK-p38/JNK 通路密切相关,提示 LIPUS 可能通过该通路影响 VEGF、ChM-1 表达参与骨性关节炎软骨血管形成相关因子的调控,进而抑制骨软骨连接血管形成与侵袭,后者在骨性关节炎病理过程中起着重要作用。

## 三、本研究的创新性与局限性

本研究将早期骨性关节炎骨软骨连接血管形成与侵袭相关因子 VEGF、ChM-1 与 LIPUS-整合素 β1-FAK-p38/JNK 信号通路联系在一起,进一步证实了 LIPUS 对早期骨性关节炎软骨有一定的保护作用,提示 LIPUS 可能通过整合素 β1-FAK-p38/JNK 通路影响 VEGF、ChM-1 表达来参与骨性关节炎的修复,这为骨性关节炎的治疗提供了新思路。但由于该研究没有应用相关抑制剂,尚不能直接证明 LIPUS 对于软骨的作用是通过该通路完成的。本研究也没有在细胞水平予以验证,仅选用了早期兔骨性关节炎软骨进行研究,关于 LIPUS 对晚期骨性关节炎软骨是否有同样的作用目前无法证实,因此需要进一步的实验证实。

## 参 考 文 献

- [1] Sovani S, Grogan SP. Osteoarthritis: detection, pathophysiology, and current/future treatment strategies [J]. Orthop Nurs, 2013, 32(1):25-38. DOI: 10.1097/NOR.0b013e31827d96da.
- [2] Driban JB, Ward RJ, Eaton CB, et al. Meniscal extrusion or subchondral damage characterize incident accelerated osteoarthritis: data from the osteoarthritis initiative [J]. Clin Anat, 2015, 28 (6): 792-799. DOI: 10.1002/ca.22590.
- [3] Nguyen US, Zhang Y, Zhu Y, et al. Increasing prevalence of knee pain and symptomatic knee osteoarthritis: survey and cohort data [J]. Ann Intern Med, 2011, 155 (11): 725-732. DOI: 10.7326/0003-4819-155-11-201112060-00004.
- [4] Pesesse L, Sanchez C, Henrotin Y. Osteochondral plate angiogenesis: a new treatment target in osteoarthritis [J]. Joint Bone Spine, 2011, 78 (2):144-149. DOI: 10.1016/j.jbspin.2010.07.001.
- [5] Sepriano A, Roman-Bias JA, Little RD, et al. DXA in the assessment of subchondral bone mineral density in knee osteoarthritis: a semi-standardized protocol after systematic review [J]. Semin Arthritis Rheum, 2015, 45 (3):275-283. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2015.06.012.
- [6] Suri S, Walsh DA. Osteochondral alterations in osteoarthritis [J]. Bone, 2012, 51 (2):204-211. DOI: 10.1016/j.bone.2011.10.010.
- [7] Bonnet CS, Walsh DA. Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation

- [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2005, 44(1): 7-16. DOI: 10.1093/rheumatology/keh344.
- [8] Xia P, Ren S, Lin Q, et al. Low-intensity pulsed ultrasound affects chondrocyte extracellular matrix production via an integrin-mediated p38 MAPK signaling pathway[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2015, 41(6): 1690-1700. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2015.01.014.
- [9] Takeuchi R, Ryo A, Komitsu N, et al. Low-intensity pulsed ultrasound activates the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt pathway and stimulates the growth of chondrocytes in three-dimensional cultures: a basic science study[J]. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10(4): R77. DOI: 10.1186/ar2451.
- [10] Iwabuchi Y, Tanimoto K, Tanne Y, et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on the expression of cyclooxygenase-2 in mandibular condylar chondrocytes [J]. *J Oral Facial Pain Headache*, 2014, 28(3): 261-268. DOI: 10.11607/ofph.1156.
- [11] Cheng K, Xia P, Lin Q, et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on integrin-FAK-PI3K/Akt mechanochemical transduction in rabbit osteoarthritis chondrocytes [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2014, 40(7): 1609-1618. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2014.03.002.
- [12] Li X, Li J, Cheng K, et al. Effect of low-intensity pulsed ultrasound on MMP-13 and MAPKs signaling pathway in rabbit knee osteoarthritis [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2011, 61(2): 427-434. DOI: 10.1007/s12013-011-9206-4.
- [13] Boulocher C, Duclos M E, Arnault F, et al. Knee joint ultrasonography of the ACLT rabbit experimental model of osteoarthritis: relevance and effectiveness in detecting meniscal lesions[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, 16(4): 470-479. DOI: 10.1016/j.joca.2007.07.012.
- [14] Jang KW, Ding L, Seol D, et al. Low-intensity pulsed ultrasound promotes chondrogenic progenitor cell migration via focal adhesion kinase pathway[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2014, 40(6): 1177-1186. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2013.12.007.
- [15] Pesesse L, Sanchez C, Henrotin Y. Osteochondral plate angiogenesis: a new treatment target in osteoarthritis[J]. *Joint Bone Spine*, 2011, 78(2): 144-149. DOI: 10.1016/j.jbspin.2010.07.001.
- [16] Settle S, Vickery L, Nemirovskiy O, et al. Cartilage degradation biomarkers predict efficacy of a novel, highly selective matrix metalloproteinase 13 inhibitor in a dog model of osteoarthritis: confirmation by multivariate analysis that modulation of type II collagen and aggrecan degradation peptides parallels pathologic changes [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(10): 3006-3015. DOI: 10.1002/art.27596.
- [17] Ashraf S, Mapp PI, Walsh DA. Contributions of angiogenesis to inflammation, joint damage, and pain in a rat model of osteoarthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(9): 2700-2710. DOI: 10.1002/art.30422.
- [18] Imhof H, Sulzbacher I, Grampp S, et al. Subchondral bone and cartilage disease: a rediscovered functional unit[J]. *Invest Radiol*, 2000, 35(10): 581-588. DOI: 10.1097/00004424-200010000-00004.
- [19] Aigner T, Dudhia J. Phenotypic modulation of chondrocytes as a potential therapeutic target in osteoarthritis: a hypothesis[J]. *Ann Rheum Dis*, 1997, 56(5): 287-291. DOI: 10.1136/ard.56.5.287.
- [20] Walsh DA, McWilliams DF, Turley MJ, et al. Angiogenesis and nerve growth factor at the osteochondral junction in rheumatoid arthritis and osteoarthritis[J]. *Rheumatology*, 2010, 49(10): 1852-1861. DOI: 10.1093/rheumatology/keq188.
- [21] Lehmann W, Edgar CM, Wang K, et al. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) coordinately regulates the expression of specific matrix metalloproteinases (MMPS) and angiogenic factors during fracture healing[J]. *Bone*, 2005, 36(2): 300-310. DOI: 10.1016/j.bone.2004.10.010.
- [22] Guevremont M, Martel-Pelletier J, Massicotte F, et al. Human adult chondrocytes express hepatocyte growth factor (HGF) isoforms but not HGF: potential implication of osteoblasts on the presence of HGF in cartilage[J]. *J Bone Miner Res*, 2003, 18(6): 1073-1081. DOI: 10.1359/jbmr.2003.18.6.1073.
- [23] Pfander D, Kortje D, Zimmermann R, et al. Vascular endothelial growth factor in articular cartilage of healthy and osteoarthritic human knee joints[J]. *Ann Rheum Dis*, 2001, 60(11): 1070-1073. DOI: 10.1136/ard.60.11.1070.
- [24] Enomoto H, Inoki I, Komiya K, et al. Vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors are expressed in human osteoarthritic cartilage[J]. *Am J Pathol*, 2003, 162(1): 171-181. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63808-4.
- [25] Li X, Lin Q, Wang D, et al. The effects of low-intensity pulsed ultrasound and nanomagnet applications on the expressions of MMP-13 and MAPKs in rabbit knee osteoarthritis[J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2013, 13(1): 722-727. DOI: 10.1166/jnn.2013.7182.
- [26] Namazi H. Effect of low-intensity pulsed ultrasound on the cartilage repair in people with mild to moderate knee osteoarthritis: a novel molecular mechanism[J]. *Arch Phys Med Rehabil*, 2012, 93(10): 1882, 1882. DOI: 10.1016/j.apmr.2012.01.028.
- [27] 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): 361-369. DOI: 10.1002/jor.20995.
- [28] Rosenzweig DH, Ou SJ, Quinn TM. P38 mitogen-activated protein kinase promotes dedifferentiation of primary articular chondrocytes in monolayer culture[J]. *J Cell Mol Med*, 2013, 17(4): 508-517. DOI: 10.1111/jcmm.12034.
- [29] Liu Y, Ge J, Li Q, et al. Anisomycin Induces Apoptosis of Glucocorticoid Resistant Acute Lymphoblastic Leukemia CEM-C1 Cells via Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases p38 and JNK[J]. *Neoplasma*, 2012, 60(1): 101-110. DOI: 10.4149/neo\_2013\_014.
- [30] Miller BW, Hay JM, Prigent SA, et al. Post-transcriptional regulation of VEGF-A mRNA levels by mitogen-activated protein kinases (MAPKs) during metabolic stress associated with ischaemia/reperfusion[J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 367(1-2): 31-42. DOI: 10.1007/s11010-012-1316-9.
- [31] Wang D, Weng Q, Zhang L, et al. VEGF and Bcl-2 interact via MAPKs signaling pathway in the response to hypoxia in neuroblastoma [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2009, 29(3): 391-401. DOI: 10.1007/s10571-008-9331-9.
- [32] Yun SP, Lee MY, Ryu JM, et al. Role of HIF-1alpha and VEGF in human mesenchymal stem cell proliferation by 17beta-estradiol: involvement of PKC, PI3K/Akt, and MAPKs[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, 296(2): C317-C326. DOI: 10.1152/ajpcell.00415.2008.
- [33] Pages G, Berra E, Milanini J, et al. Stress-activated protein kinases (JNK and p38/HOG) are essential for vascular endothelial growth factor mRNA stability[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(34): 26484-26491. DOI: 10.1074/jbc.M002104200.

(修回日期:2015-12-28)

(本文编辑:汪 玲)