

阿仑磷酸钠联合透明质酸钠在膝关节细胞凋亡中作用的初步研究

马钢 刘勇 任明姬

【摘要】 目的 观察大鼠OA模型中Caspase-3、Caspase-12的表达及阿仑磷酸钠和透明质酸钠的干预效果。方法 选取健康Wistar大鼠50只,随机选取10只作为空白对照组,剩余40只,采用双后肢手术横断前交叉韧带并每日驱赶,持续6周。将造模成功的大鼠随机分为4组:模型对照组;阿仑磷酸钠(AL)组:灌服阿仑磷酸钠混悬液2 ml(1.75 mg/ml);透明质酸钠(HA)组:关节腔注射透明质酸钠0.1 ml;联合用药组:灌服阿仑磷酸钠混悬液同时关节腔注射玻璃酸钠。各组灌服药1次/d,关节腔注射药物1次/周,未给药的均予同体积生理盐水对照。上述实验持续6周,于末次给药后1周处死,解剖双侧膝关节观察软骨大体形态,分别采用免疫组化法及Western blot法检测软骨细胞中Caspase-3、Caspase-12的表达情况。结果 模型对照组较AL组、HA组及联合用药组各表现均加重,外观Mankin评分:模型对照组(3.30±0.41)分,AL组(2.33±0.36)分,HA组(2.10±0.34)分,联合用药组(1.36±0.50)分,空白对照组(0.54±0.50)分,各组间差异有统计学意义($P<0.05$)。光镜组织学观察:模型对照组软骨表层细胞纤维变性,部分区域形成糜烂、溃疡,中间层细胞呈特征性簇状排列,软骨空陷窝率较高;HA组表层及中间层细胞轻度减少,深层细胞肥大呈特征性柱状排列,AL组表层及中间层细胞减少,深层细胞肥大成分分布,联合用药组各层细胞均轻度减少,软骨空陷窝率明显降低($P<0.05$)。免疫组化法示:各用药组软骨细胞中Caspase-3、Caspase-12表达较模型对照组差异有统计学意义($P<0.05$),联合用药组比单纯用药组Caspase-3、Caspase-12表达减少($P<0.05$)。Western blot法检测表明:各组比较,模型组Caspase-3、Caspase-12蛋白表达明显增高($P<0.05$),各用药组比较,联合用药组Caspase-3、Caspase-12蛋白表达减低($P<0.05$)。结论 OA软骨细胞凋亡在各组之间存在差异($P<0.05$),其中模型对照组细胞凋亡的表达最高,其次为HA组>AL组>联合用药组,提示:AL或HA均有减缓OA软骨细胞凋亡的作用,若两种药联合应用效果更好,为临床KOA治疗提供科学的实验依据。

【关键词】 骨关节炎; 细胞凋亡; 透明质酸; 阿仑磷酸钠

Preliminary research of alendronate joint hyaluronate acid to treat chondrocytes apoptosis in osteoarthritis

MA Gang, LIU Yong, REN Ming-ji. The School of Basic Medical Sciences of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010010, China

Corresponding author: REN Ming-ji, Email: mingjir@sina.com

【Abstract】 Objective To observe the expression of Caspase-3, Caspase-12 in osteoarthritis (OA) and the effect of Alendronate and Hyaluronic Acid. **Methods** We randomly divided healthy 50 Wista Rats aged 5 months into two groups. One group was 40 rats that were underwent the transecting operation on anterior cruciate ligament of bilateral hindlimbs and were driven 30 minutes after operation. Another group was 10 rats named control group. Then 40 rats that underwent operation were randomly divided into four groups. The operation model group; Alendronate (AL) group were given alendronate suspension fluid 2 ml(1.75 mg/ml) by irrigating stomach method; Hyaluronic Acid(HA) group were injected hyaluronate acid 0.1 ml into double knee intra-articular joints; Combined treatment group were given alendronate suspension fluid 3.5 mg/2 ml by irrigating stomach method and were injected hyaluronate acid 0.1 ml into double knee intra-articular joints. All animals were irrigated stomach once a day and injected drugs once a week. The experimental period was 6 weeks. Dissected the double knee to observing general form of cartilage and then fixed the femoral condyle and tibial plateau cartilage to HE staining

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.21.057

作者单位: 010010 呼和浩特, 内蒙古医科大学基础医学院(马钢), 组织学与胚胎学教研室(任明姬); 内蒙古医科大学第二附属医院关节外科(马钢); 巴彦淖尔市市医院骨科(刘勇)

通讯作者: 任明姬, Email: mingjir@sina.com

after the last druged 1 week. Adopted the light microscope to examining the pathology chang of cartilage cell; the immunohisto chemical method and the Western blot method were used to examining the expression of caspase-3 and caspase-12 in cartilage cell. **Results** The index of model group was more serious than other groups. The Mankin score were (3.30 ± 0.41) in model group, (2.33 ± 0.36) in AL group, (2.10 ± 0.34) in HA group, (1.36 ± 0.50) in combined treatment group, (0.54 ± 0.50) in control group; There were statistical significance between model group and each drug experimental group ($P < 0.05$). The light microscope displayed that The articular surface cell fibrosis, erosion, ulcer or rared, and layer cells presented characteristic clumps arrangement with mast cells disappeared or the rate of empty cartilage lacuna increased in model group; The number of Surface layer and layer cells decreased partly and deeper cells presented characteristic columnar arrangement in HA group; The number of Surface layer and layer cells decreased and deeper cells presented clouds distribution in AL group; Each layer of cells light decrease or the rate of empty cartilage lacuna decrease in Combined treatment group. There were statistical significance between model group and each drug experimental group ($P < 0.05$). The results of immunohistochemical method indicated that the positive expression of Caspase-3 and Caspase-12 in all group rats cartilage cells existed Statistical differences ($P < 0.05$). By contrast with simple treatment group, the expression of Caspase-3 and Caspase-12 abated obviously in combined treatment group and existed Statistical differences ($P < 0.05$). The results of Western blot showed that the expression of Caspase-3 and Caspase-12 protein was highest and existed Statistical differences ($P < 0.05$) compared with other group rats ($P < 0.05$). The expression of Caspase-3 and Caspase-12 protein in combined treatment group was lowest. **Conclusions** The research showed that AL and HA all had anti-apoptosis effect. AL together HA presented the remarkable effect in OA treatment much better than used alone. These proofs provided new mentality in treating KOA.

【Key words】 OSTEOARTHRITIS; Apoptosis; Hyaluronic acid; Alendronate

膝关节骨性关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种累及膝关节的慢性、退行性疾病,临床上以关节疼痛、肿胀、活动受限、关节畸形等为主要表现。骨性关节炎随年龄增大,患病率迅速上升,在我国 KOA 患病率高达 9.56%。KOA 发病的危险因素包括年龄、遗传、体质、肥胖、解剖结构异常、过度负重及创伤等导致关节软骨损伤或退化有关。KOA 病因复杂,其发病机制尚不明确,但与软骨细胞凋亡密切相关^[1-2]。

内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)是近几年发现的不同于经典细胞凋亡的通路,过度的 ERS 反应使细胞表达 ERS 蛋白如半胱氨酸天冬氨酸水解酶(CysteinyI aspartate specific proteinase, Caspase) 12 等,介导软骨细胞凋亡^[3-5]。Caspase-12 被激活后,与其余的 ERS 分子协同使 Caspase-9 激活,并贯续激活 Caspase-3 等效应 Caspase。其中 Caspase-12 为 ERS 的特异性蛋白,而 Caspase-3 为所有凋亡通路的最终执行因子。根据 ERS 机制及细胞内的自我调控机制,可以针对 Caspase-12, Caspase-3 采取一些新的干预和治疗措施,达到防治骨性关节炎的目的。

阿仑磷酸钠作为第三代二磷酸盐类药物,临床常用来预防骨质疏松及治疗股骨头坏死,它可以抑制破骨细胞活性,有效抑制骨吸收,同时促进成骨细胞增殖分化。目前已有研究证实,阿仑磷酸钠具有抗细胞凋亡的作用,并对软骨有一定的保护作用^[6],本实验通过检测不同药物干预下 Caspase-3、Caspase-12 的表

达,探讨阿仑磷酸钠、透明质酸钠是否通过抗细胞凋亡作用达到治疗 KOA 作用,目前鲜见阿仑磷酸钠联合透明质酸钠防治 KOA 机制的报道,本实验结果将为临床防治 KOA 提供新的思路。

材料与方法

一、实验动物

健康 5 月龄 Wistar 大鼠 50 只,体重 (320 ± 10) g,雌雄不限,全部由内蒙古大学动物实验中心提供,实验期间不限制饮食。

二、主要试剂

Caspase-3 兔单克隆抗体(碧云天生物技术研究所), Caspase-12 兔多克隆抗体(上海生工生物工程有限公司),山羊抗兔 IgG (HRP conjugated, 北京博奥森生物技术有限公司), DAB 显色试剂盒(北京中美迈新生物技术开发有限公司); RIPA 裂解液、BCA 法蛋白定量试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司), β -Tublin 兔多克隆抗体、预染蛋白质分子量标准(碧云天生物技术研究所)。

三、实验方法及步骤

1. 骨性关节炎动物模型制作及给药:随机选取 10 只作为空白对照组,剩余 40 只采用 Hulth 改良手术法造模^[7]。术前 12 h 禁食,0.3% 戊巴比妥 30 mg/kg 腹腔注射麻醉,双下肢术区剃毛,乙醇消毒铺洞巾,取髌旁内侧入路纵行切口,长约 0.6~0.7 cm,切开皮肤、

关节囊,行前交叉韧带横断术,抽屉试验(+)即为手术成功,逐层缝合。术后每日大腿外侧肌肉注射青霉素 10 万 IU,连续 5 d。于内蒙古医科大学动物饲养中心分笼进行标准喂养,双后肢不做固定,允许其在笼内自由活动,每日驱赶 30 min 强迫活动。术后 6 周,将造模的大鼠随机分为 4 组:手术模型组灌服生理盐水 2 ml,双侧膝关节腔内注射生理盐水 0.1 ml;阿仑磷酸钠(AL)组灌服阿仑磷酸钠混悬液 2 ml (1.75 mg/ml)^[8],关节腔内注射生理盐水 0.1 ml;透明质酸钠(HA)组灌服生理盐水 2 ml,关节腔内注射玻璃酸钠 0.1 ml^[9];AL+HA 为联合用药组,灌服阿仑磷酸钠混悬液 2 ml (1.75 mg/ml),关节腔内注射玻璃酸钠 0.1 ml。各组灌服药 1 次/d,双膝关节腔注射用药 1 次/周。上述实验持续 6 周,所有大鼠均建模成功,于末次给药后 1 周处死,解剖双侧膝关节观察软骨大体形态,取双侧股骨髁及胫骨平台软骨,常规制作切片、染色,通过光镜观察软骨细胞形态结构;采用免疫组化法及 Western blot 法检测软骨细胞中 Caspase-3、Caspase-12 的蛋白表达。

2. HE 染色和免疫组化:断颈法处死选一侧膝关节取材,肉眼观察并记录股骨髁及胫骨平台软骨外观、质地,色泽, Mankin 评分。纵行剖开胫骨及股骨,立即投入 10% 中性甲醛,固定,脱钙,浸蜡,包埋,制备蜡块。将蜡块标本均行 4 μ m 连续切片,脱蜡入水后,以 3% 过氧化氢阻断内源性酶并行抗原热修复。HE 染色后,光镜下观察指标:软骨层薄厚,各层软骨细胞的排列及形态,按改良 Mankin 评分,满分 12 分。并观察细胞核的形态、大小、胞核染色的程度和软骨细胞空陷窝率等变化。软骨空陷窝百分率,即在 40 \times 10 倍放大倍率下,随机选 3 个高倍镜视野,每个视野计数 50 个软骨陷窝,分别数出软骨空陷窝数,求出平均软骨空陷窝率。采用免疫组织化学 SABC 法,一抗采用兔抗 Caspase-3 单克隆抗体(1:300)、Caspase-12 多克隆抗体(1:300);二抗采用即用型 SABC 免疫组化试剂盒。DAB 显色,苏木素复染,磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗做空白对照。随后严格按试剂配套说明书中 SABC 法工作流程操作。软骨细胞中胞质染色成棕黄色颗粒的细胞即为阳性。每只大鼠选取的 1 张切片,在 200 倍下观察,每张切片选取 5 个有代表性视野,对呈阳性表达的细胞胞质内的着色成分采图进行吸光度(A)值分析,计算其平均 A 值作为最后阳性结果的表示,吸光度值与阳性表达程度成反比,吸光度值越大说明胞质中该因子阳性表达程度越弱,反之吸光度值越小反映出胞质中该因子阳性表达程度越强。

3. Western blot:截取另一侧膝关节,立即置于-80 $^{\circ}$ C 深低温冰箱保存,供 Western blot 法检测用。锋利手术刀片削取胫骨及股骨软骨组织,液氮中研磨粉碎,加入 RIPA 裂解液,匀浆后 4 $^{\circ}$ C, 14 000 \times g 离心 5 min,取上清测定蛋白浓度,确定上样量。参照文献^[10]每例样品取 50 μ g,总蛋白经 12% SDS-PAGE 分离,将蛋白转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉 TBST 溶液封闭抗体 1 h,滴加一抗(按 1:300,用 0.01 mol/L TBST 稀释),室温反应 1 h,4 $^{\circ}$ C 封闭过夜。弃一抗,用 0.01 mol/L TBST 洗膜,加入辣根过氧化物酶偶联的二抗(按 1:500 稀释比例,用 0.01 mol/L TBST 稀释),室温 2 h;弃二抗,用 0.01 mol/L TBST 洗膜,加入 ECL 显色液:AB(发光液)液混合,暗室压片 30 min,显影 5 min,水洗,定影 1 min,立即将膜转至水中。膜置于滤纸上干燥,照相分析结果。以 β -Tubulin 蛋白作为上样量参照。内参标记:以兔 β -Tubulin 多克隆抗体(1:1000)为一抗。采用图像分析软件分析显影后的条带的 A 值,用 Caspase-3、Caspase-12 的 A 值与 β -Tubulin 的 A 值相比表示其表达的相对水平。

四、统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件对实验数据进行统计学分析,结果用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用方差分析,组间比较采用 Student Newman Keuls 检验和秩和检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

结 果

一、大体标本形态观察及评分

空白对照组膝软骨关节面光滑,呈半透明乳白色(图 1A);模型对照组软骨表面粗糙糜烂,色泽暗淡,甚至可见软骨剥脱,暴露出软骨下骨(图 1B);联合用药组软骨面尚光滑,色暗,有小的裂纹(图 1C);HA 组软骨面仍光滑,色暗,大部分可见小的裂纹,少见糜烂(图 1D);AL 组软骨光泽度差,色较暗,可见糜烂区(图 1E)。各实验组按照软骨标本 Mankin 评分结果见表 1。方差分析检验显示,模型对照组与空白对照组比较,差异有统计学意义($P = 0.000$, $P < 0.05$),联合用药组与各单纯用药组比较,差异有统计学意义($P = 0.012$, $P < 0.05$; $P = 0.021$, $P < 0.05$)。AL 组与 HA 组评分较为接近($P = 0.128$, $P > 0.05$)。

二、HE 染色病理学观察

空白对照组表层细胞较小,排列密集,其长轴平行于软骨表面,中间层细胞较大呈圆形或椭圆形,双细胞呈“背靠背”分布,深层软骨细胞肥大,呈团分布,软骨空陷窝少(图 2A);模型对照组软骨层变薄,表层软骨纤维化变性,中间层软骨细胞排列紊乱,深

表1 软骨标本外观 Mankin 评分 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Mankin 评分
空白对照组	10	0.54±0.50
模型对照组	10	3.30±0.41 ^a
HA 组	10	2.10±0.34 ^{ab}
AL 组	10	2.33±0.36 ^{ab}
HA+AL 组	10	1.36±0.50 ^{abcd}

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$;与模型对照组比较,^b $P<0.05$;与HA组比较,^c $P<0.05$;与AL组比较,^d $P<0.05$

层软骨细胞肥大,甚至变成空泡状,软骨空陷窝较多(图2B)。HA组软骨层变厚,中间层软骨细胞有簇聚倾向,深层软骨细胞肥大变厚,细胞呈柱状排列,间隙大,软骨空陷窝略多(图2C)。AL组软骨略变薄,表层软骨排列稀疏,部分区域纤维变性,中间层软骨细胞排列不规则,深层细胞肥大成团分布,软骨空陷窝略多(图2D)。联合用药组表层细胞排列密集,中间层细胞可见“背靠背”及簇聚现象交替,深层细胞肥大,成团分布,软骨空陷窝少(图2E)。结果见表2,3。

表2 各组软骨镜下 Mankin 评分 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Mankin 评分
空白对照组	10	0.63±0.37
模型对照组	10	10.50±0.65 ^a
HA 组	10	4.53±0.48 ^{ab}
AL 组	10	4.93±0.38 ^{ab}
HA+AL 组	10	3.00±0.31 ^{abcd}

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$;与模型对照组比较,^b $P<0.05$;与HA组比较,^c $P<0.05$;与AL组比较,^d $P<0.05$

表3 各组软骨空陷窝率(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	软骨空陷窝率
空白对照组	10	17.8±4.9
模型对照组	10	58.7±5.6 ^a
HA 组	10	40.4±4.3 ^{ab}
AL 组	10	49.2±5.1 ^{ab}
HA+AL 组	10	30.6±5.1 ^{abcd}

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$;与模型对照组比较,^b $P<0.05$;与HA组比较,^c $P<0.05$;与AL组比较,^d $P<0.05$

三、免疫组化检测 Caspase-3、Caspase-12 的表达

1. Caspase-3 在膝 OA 软骨细胞中的表达:空白对照组软骨细胞 Caspase-3 阳性表达较少,位于表层,少见于中间层(图3A);模型对照组软骨细胞表层、中间层均有 Caspase-3 阳性表达,并且表达较强(图3B);HA 软骨细胞中间层 Caspase-3 阳性表达增高,表层表达减少(图3C);AL 组软骨细胞表层及中间层 Caspase-3 阳性表达(图3D);联合用药组软骨细

胞表层及中间层 Caspase-3 阳性表达明显减少,与正常对照组更接近(图3E)。与模型对照组比较,联合用药组、AL 组、HA 组的 Caspase-3 阳性表达明显减少,差异有统计学意义($P=0.000$, $P<0.05$; $P=0.022$, $P<0.05$; $P=0.026$, $P<0.05$),联合用药组与 AL 组、HA 组比较, Caspase-3 阳性表达减少,差异有统计学意义($P=0.033$, $P<0.05$; $P=0.042$, $P<0.05$),HA 组与 AL 组较接近($P=0.113$, $P>0.05$)。见表4。

表4 各组 Caspase-3、Caspase-12 在软骨中吸光度值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Caspase-3	Caspase-12
空白对照组	10	168.30±5.90	173.75±6.56
模型对照组	10	99.05±7.65 ^a	115.50±6.31 ^a
HA 组	10	141.35±4.46 ^{ab}	145.23±3.93 ^{ab}
AL 组	10	143.42±3.52 ^{ab}	147.42±3.59 ^{ab}
HA+AL 组	10	158.46±6.96 ^{abcd}	162.19±6.51 ^{abcd}

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$;与模型对照组比较,^b $P<0.05$;与HA组比较,^c $P<0.05$;与AL组比较,^d $P<0.05$

2. Caspase-12 在膝 OA 软骨细胞的表达:空白对照组软骨表层偶见 Caspase-12 阳性表达(图4A);模型对照组软骨细胞表层剥脱,中间层、软骨下骨层 Caspase-12 阳性表达增强,深层肥大的软骨细胞消失(图4B);HA 组软骨细胞表层 Caspase-12 阳性表达减少,中间层表达增多,深层肥大的软骨细胞柱状排列(图4C);AL 组软骨细胞表层、中间层 Caspase-12 阳性表达增加(图4D);联合用药组软骨细胞 Caspase-12 阳性表达明显减少,与正常组更接近(图4E)。与模型对照组比较,联合用药组、AL 组、HA 组 Caspase-12 阳性表达明显减少,差异有统计学意义($P=0.000$, $P<0.05$; $P=0.011$, $P<0.05$; $P=0.002$, $P<0.05$),联合用药组与 AL 组、HA 组比较, Caspase-12 阳性表达减少($P=0.029$, $P<0.05$; $P=0.033$, $P<0.05$)。见表4。

本实验通过检测 Caspase-3 与 Caspase-12 表达结果显示:大鼠 KOA 中,膝关节软骨中 Caspase-3 的表达明显增高, Caspase-12 表达也相应升高。但相对于 Caspase-3, Caspase-12 表达较低,推断大鼠 KOA 中软骨细胞凋亡通路可能至少包含内质网通路。

四、Western blot 法检测凋亡蛋白 Caspase-3、Caspase-12 的表达

空白对照组、模型对照组及治疗各组软骨细胞中 Caspase-3、Caspase-12 蛋白的表达,模型对照组蛋白表达最高,依次高于联合用药组、AL 组、HA 组及空白对照组,两者差异具有统计学意义($P=0.000$, $P<0.05$; $P=0.037$, $P<0.05$; $P=0.021$, $P<0.05$; $P=0.000$, $P<0.05$)见图5,表5。

表5 Western blot 法检测不同组 Caspase-3、Caspase-12 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Caspase-3	Caspase-12
空白对照组	10	0.77±0.09	2.18±0.18
模型对照组	10	0.26±0.10 ^a	1.34±0.27 ^a
HA 组	10	0.47±0.08 ^{ab}	1.74±0.20 ^{ab}
AL 组	10	0.41±0.13 ^{ab}	1.70±0.19 ^{ab}
HA+AL 组	10	0.61±0.11 ^{abcd}	1.91±0.13 ^{abcd}

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$;与模型对照组比较,^b $P<0.05$;与HA组比较,^c $P<0.05$;与AL组比较,^d $P<0.05$

讨 论

有研究推断,Fas 途径可能是与滑膜炎症有关的细胞凋亡途径,而线粒体途径可能是与退行性病变有关的软骨细胞凋亡途径。ERS 是独立的凋亡途径,在应激条件下,细胞可以整合应激反应,调动应激反应蛋白,减轻应激因素对细胞的损伤,使内质网适应新的内环境要求;同时细胞表达的 ERS 蛋白如 GADD153, Caspase-12 等,也可以启动细胞凋亡来处理损伤的细胞。ERS 介导细胞凋亡调节的一个主要因素是 Caspase-12。有研究发现^[11],Caspase-12 缺陷小鼠对 ERS 诱导的细胞凋亡敏感性下降,但对其他死亡刺激仍然敏感。证明 Caspase-12 是 ERS 激活的,而非死亡受体或线粒体所介导的凋亡传导信号激活的。这种凋亡信号传导途径最终会导致 Caspase-3 活化,提示 ERS 最后被传到线粒体,线粒体有可能在这种死亡途径中起综合和放大的作用。

通过抑制 Caspase-3 等凋亡因子,可以抑制软骨细胞的凋亡^[12]。本研究中,与模型对照组比较,药物治疗各组中,Caspase-12 阳性细胞及蛋白表达均减低,有显著差异($P<0.01$),说明在大鼠 KOA 软骨细胞凋亡中存在 Caspase-12 的表达增高,通过药物干预治疗,可以抑制 Caspase-12 的表达,提示在某种程度上可能减缓 KOA 的进展。目前临床采用关节腔内注射 HA 已经作为治疗 KOA 的常规手段。已有研究证实,HA 也有抗细胞凋亡的作用^[13]。AL 作为第三代二磷酸盐类药物,可以抑制破骨细胞的活性,有效抑制骨吸收,促进成骨细胞增殖分化,被用来防治各种因素引起的骨质疏松。近年来,对骨性关节炎治疗作用潜能已逐渐成为研究热点,多数研究认为其防治骨性关节炎的作用为抑制软骨下骨的骨转换,防止软骨下骨硬化,进而改善或维持关节软骨的营养代谢及生物力学环境。但是有研究显示,AL 有抗细胞凋亡的作用,可以降低 Caspase-3、Bcl-2 的表达,并且对软骨细胞有保护作用^[14]。

本研究中,对 KOA 大鼠进行早期药物干预,在单

纯使用 AL 和 HA,或两种药物联合使用后,分别检测各组 Caspase-3、Caspase-12 阳性表达,结果显示:单纯使用 AL 或 HA,都可以降低 Caspase-3、Caspase-12 表达,说明两种药物都有抗软骨细胞凋亡的作用,其中,HA 的抗软骨细胞凋亡的作用比 AL 略明显。其原因可能为:(1)HA 为关节腔内给药,作用直接,本身与软骨成分相同,发挥药效快,易被吸收利用;而 AL 经胃灌服,吸收入血后经血液作用全身,而软骨中无血管分布,AL 只能通过软骨膜中的毛细血管扩散到软骨组织后发挥作用,所以作用间接,发挥药效较慢。(2)AL 主要作用于软骨下骨及骨细胞^[15],发挥抗凋亡作用;HA 本身为软骨基质的组成成分,通过营养软骨基质,减慢基质的丢失及破坏,同时促进基质的合成,减轻异常机械负荷,维护细胞-基质的稳定性,从而起到抗细胞凋亡的作用。(3)HA 直接作用于软骨细胞抗凋亡。而 AL 抗软骨细胞凋亡的作用,是通过增强软骨细胞中 II 型胶原基因和蛋白的表达,同时降低 MMP-13 的表达,并且可能通过影响软骨细胞中 β -catenin 的表达及其所介导的通路改变来实现。所以给予不同的药物干预后,出现了不同结果,HA 组中,HA 注入关节腔后,直接作用于软骨表层及中间层,表现为表层及中间层软骨细胞凋亡减少,而深层细胞肥大呈柱状增厚,推断 HA 通过直接和间接作用抗软骨细胞凋亡,使得表层及中间层凋亡的软骨细胞相对减少,更多的中间层细胞移行为深层肥大的软骨细胞,在异常负荷的刺激下,肥大的软骨细胞代偿性增生,出现成团分布或柱状排列。而 AL 组中,表层和中间层细胞凋亡表达较 HA 组明显,推断 AL 经灌胃给药吸收入血后,首先作用于软骨膜内毛细血管,再通过扩散作用于软骨组织,发挥抗细胞凋亡的作用,使软骨表层和中间层细胞凋亡较模型组明显减少,但不如 HA 组明显。由于表层及中间层细胞的凋亡相对较多,移行为深层肥大的软骨细胞的数量就少,尽管有异常负荷的刺激,但未出现柱状排列现象。而模型对照组中,除了异常负荷刺激,没有 HA 及 AL 的药物作用,出现软骨层变薄,表层及中间层凋亡细胞增多,凋亡蛋白表达增多,深层肥大的软骨细胞减少,甚至形成空泡,为凋亡前的改变。而联合用药组,各层细胞及软骨下骨都有不同程度的改变,但这些改变都是使软骨向好的方向即抗细胞凋亡方向发展,表层及中间层细胞凋亡减少,深层细胞肥大、成团分布,略有柱状排列倾向,属于一种代偿性生长。

综上所述,AL 和 HA 均为临床上常用的防治骨关节病的药物,都有抗软骨细胞凋亡的作用,但两种药物的作用不同,靶向不同,联合使用效果优于单独使



图1 大体外观Mankin评分。1A: 空白对照组; 1B: 模型组; 1C: AL组; 1D: HA组; 1E: 联合用药组

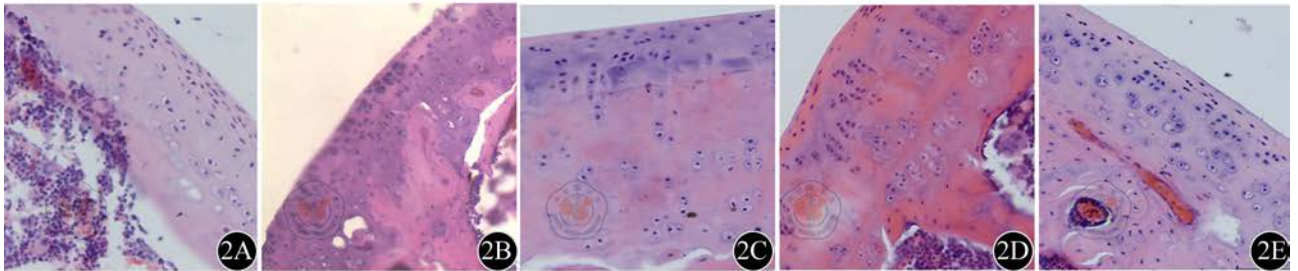


图2 软骨组织的组织病理学(HE×200)。2A: 空白对照组; 2B: 模型组; 2C: AL组; 2D: HA组; 2E: 联合用药组

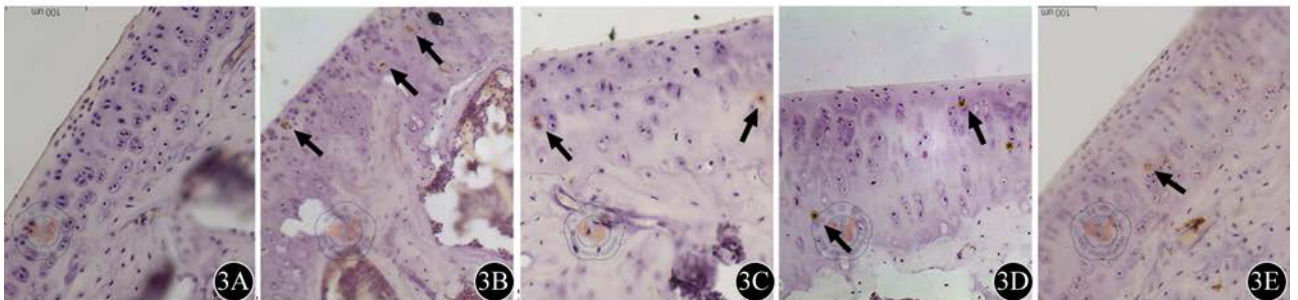


图3 Caspase-3的表达(×200)。3A: 空白对照组; 3B: 模型组; 3C: AL组; 3D: HA组; 3E: 联合用药组

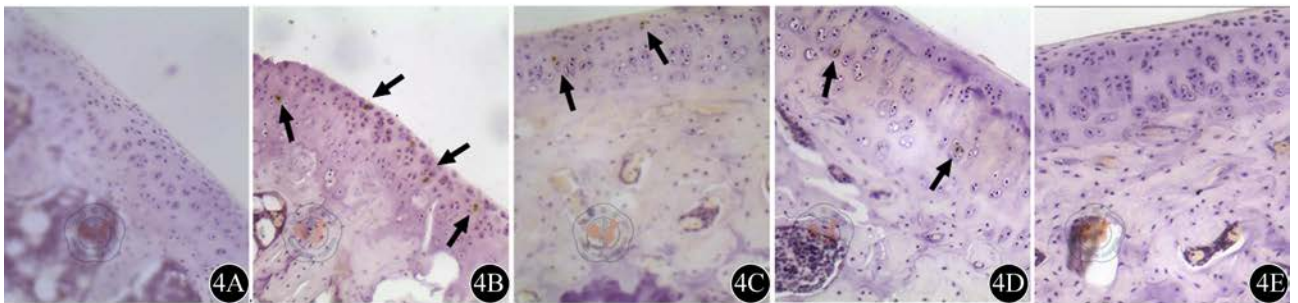


图4 Caspase-12的表达(×200)。4A: 空白对照组; 4B: 模型组; 4C: AL组; 4D: HA组; 4E: 联合用药组

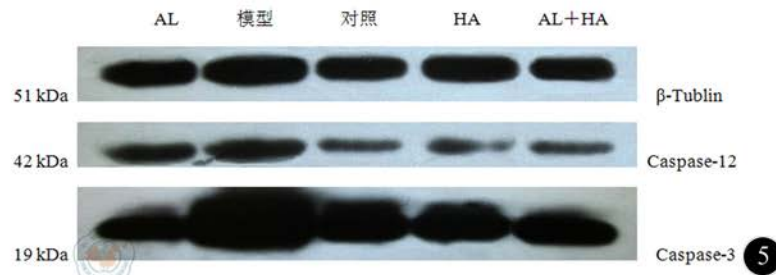


图5 各组Western blot条带

用。至于两种药物是相互协同或是相互影响,其具体机制目前尚不十分明确,还有待于进一步的研究。由于本研究样本数量不大,存在一定的偏倚和误差,同时在成模和药物干预阶段,如果连续监测各凋亡因子

表达的变化,有助于我们更清晰地了解疾病变化,我们将在以后的研究中进一步完善。

参 考 文 献

[1] Goldring MB. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular

- cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 2012, 4: 269-285.
- [2] Wang M, Sampson ER, Jin H, et al. MMP13 is a critical target gene during the progression of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*, 2013, 15: R5.
- [3] Li H, Zhang XY, Wu TJ, et al. Endoplasmic reticulum stress regulates rat mandibular cartilage thinning under compressive mechanical stress. *Biol Chem*, 2013, 288: 18172-18183.
- [4] Takada K, Hirose J, Senba K, et al. Enhanced apoptotic and reduced protective response in chondrocytes following endoplasmic reticulum stress in osteoarthritic cartilage. *Exp Pathol*, 2011, 92: 232-242.
- [5] Yamabe S, Hirose J, Uehara Y, et al. Intracellular accumulation of advanced glycation end products induces apoptosis via endoplasmic reticulum stress in chondrocytes. *FEBS*, 2013, 280: 1617-1629.
- [6] Wang Z, Wang W, Zhang L, et al. Effect of alendronate on interleukin-1beta induced chondrocytes of rat in vitro. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2011, 25: 50-55.
- [7] 周景辉, 吴耀持, 李石胜, 等. 鼠类膝关节炎模型的评价. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14: 6206-6209.
- [8] Iqbal MN, Haidri FR, Motiani B, et al. Frequency of factors associated with knee osteoarthritis. *Pak Med Assoc*, 2011, 61: 786-789.
- [9] 暴淑英, 赵庆国, 毕黎琦, 等. 激素性股骨头坏死早期凋亡相关基因表达及阿仑磷酸钠的干预. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12: 9095-9099.
- [10] Tormanen-Napankangas U, Soini Y, Kahio K, et al. Expression of caspases-3, -6 and -8 and their relation to apoptosis in non-small cell lung carcinoma. *Int J Cancer*, 2001, 93: 192.
- [11] Tait SW, Green DR. Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene*, 2008, 27: 6452-6461.
- [12] Na JY, Kim S, Song K, et al. anti-apoptotic activity of ginsenoside rb1 in hydrogen peroxide-treated chondrocytes: stabilization of mitochondria and the inhibition of Caspase-3. *Ginseng Res*, 2012, 36: 242-247.
- [13] Peng H, Zhou JL, Liu SQ, et al. Hyaluronic acid inhibits nitric oxide-induced apoptosis and dedifferentiation of articular chondrocytes *in vitro*. *Inflamm Res*, 2010, 59: 519-30.
- [14] 王哲彦, 王文雅, 张柳, 等. 阿仑磷酸钠对 IL-1 β 体外诱导培养的大鼠膝关节软骨细胞影响的实验研究. *中国修复重建外科杂志*, 2011, 25: 50-55.
- [15] Zhu S, Chen K, Lan Y, et al. Alendronate protects against articular cartilage erosion by inhibiting subchondral bone loss in ovariectomized rats. *Bone*, 2013, 53: 340-349.

(收稿日期: 2013-08-16)

(本文编辑: 戚红丹)

马钢, 刘勇, 任明姬. 阿仑磷酸钠联合透明质酸钠在膝关节细胞凋亡中作用的初步研究 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7(21): 9642-9648.

