

· 基础研究 ·

# 温热疏密波对膝关节炎模型大鼠软骨细胞 RAS/丝裂原活化蛋白激酶信号通路的影响

林木南<sup>1</sup>, 林艳红<sup>2</sup>, 刘献祥<sup>2</sup>, 张朝春<sup>1</sup>, 曾西明<sup>1</sup>, 李西海<sup>2</sup>, 秦茵<sup>1</sup>, 郭健红<sup>1</sup>, 高晖<sup>1</sup>, 陈立典<sup>2</sup>

(1. 中国人民解放军南京军区福州总医院, 福建 福州 350025;

2. 福建中医药大学, 福建 福州 350122)

**摘要** 目的: 观察温热疏密波对膝关节炎(knee osteoarthritis, KOA)模型大鼠软骨细胞 RAS/丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路的影响。方法: 将 120 只 2 月龄 SPF 级健康 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、对照组、实验 1 组、实验 2 组、实验 3 组, 每组 20 只。除空白组外, 其余各组大鼠均通过在右后膝关节腔内注射 4% 木瓜蛋白酶建立 KOA 模型。造模结束后, 空白组和模型组不进行干预; 对照组以 KJ-6200C 微波治疗仪照射右后膝关节, 每日 1 次, 每次 30 min; 实验 1 组、实验 2 组和实验 3 组大鼠均以膝关节治疗仪进行温热疏密波治疗, 分别选择疏密波 1:1 模式、疏密波 2:1 模式、疏密波 1:2 模式, 每日 1 次, 每次 30 min。分别于实验干预开始 4、8 周后, 从各组随机选取 10 只大鼠, 切取右后肢股骨内髌负重面和胫骨平台软骨, 分别采用 Western Blot 法和 Real-time PCR 法测定软骨中 ERK、P38、P53、RAS 蛋白和 mRNA 含量。结果: 干预 4 周后, 模型组、对照组及实验组软骨中 ERK mRNA、P53 mRNA、RAS mRNA 含量比较, 组间差异均无统计学意义; 对照组、实验 2 组、实验 3 组软骨中 P38 mRNA 含量均低于模型组( $P=0.024, P=0.024, P=0.006$ ), 其余各组间两两比较, 组间差异均无统计学意义。对照组、实验 3 组软骨中 ERK 蛋白含量均低于模型组( $P=0.047, P=0.020$ ); 实验 3 组软骨中 P38 蛋白含量低于模型组、实验 1 组和实验 2 组( $P=0.018, P=0.035, P=0.026$ ); 对照组、实验 1 组、实验 2 组、实验 3 组软骨中 P53 蛋白含量均低于模型组( $P=0.029, P=0.012, P=0.003, P=0.002$ ); 对照组、实验 1 组、实验 2 组、实验 3 组软骨中 RAS 蛋白含量均低于模型组( $P=0.002, P=0.000, P=0.001, P=0.000$ )。干预 8 周后, 各组软骨中 ERK mRNA 含量比较, 差异无统计学意义; 实验 2 组、实验 3 组软骨中 P38 mRNA 含量均低于模型组( $P=0.020, P=0.024$ ); 对照组、实验 1 组、实验 2 组、实验 3 组软骨中 P53 mRNA 含量均低于模型组( $P=0.009, P=0.001, P=0.004, P=0.001$ ); 对照组、实验 1 组、实验 2 组、实验 3 组软骨中 RAS mRNA 含量均低于模型组( $P=0.002, P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ), 实验 1 组、实验 3 组软骨中 RAS mRNA 含量均低于对照组( $P=0.043, P=0.031$ )。实验 3 组软骨中 ERK 蛋白含量低于模型组和实验 1 组( $P=0.033, P=0.009$ ), 实验 2 组软骨中 ERK 蛋白含量低于实验 1 组( $P=0.022$ ); 对照组、实验 1 组、实验 2 组、实验 3 组软骨中 P38 蛋白含量均低于模型组( $P=0.008, P=0.008, P=0.005, P=0.000$ ), 实验 3 组软骨中 P38 蛋白含量低于对照组、实验 1 组和实验 2 组( $P=0.014, P=0.015, P=0.022$ ); 实验 1 组、实验 2 组、实验 3 组软骨中 P53 蛋白含量均低于模型组和对照组( $P=0.003, P=0.005; P=0.000, P=0.001; P=0.001, P=0.012$ ); 实验 1 组、实验 2 组、实验 3 组 RAS 蛋白含量均低于模型组( $P=0.000, P=0.030, P=0.000$ ), 实验 1 组和实验 3 组 RAS 蛋白含量均低于对照组( $P=0.000, P=0.000$ ), 实验 3 组 RAS 蛋白含量低于实验 1 组和实验 2 组( $P=0.000, P=0.000$ )。结论: 温热疏密波可通过抑制 RAS 和 ERK 表达, 调节 RAS/MAPK 信号转导通路, 抑制炎症反应引起的软骨细胞凋亡, 从而延缓 OA 软骨退变, 其中疏密波 1:2 模式效果较好, 优于微波治疗。

**关键词** 骨关节炎, 膝; 丝裂原激活蛋白激酶类; 软骨细胞; 信号传导; 温热疏密波; 大鼠, Sprague-Dawley; 动物实验

## Effect of warm sparse - dense wave on RAS/mitogen - activated protein kinase signaling pathway in chondrocytes of knee osteoarthritis rat models

LIN Munan<sup>1</sup>, LIN Yanhong<sup>2</sup>, LIU Xianxiang<sup>2</sup>, ZHANG Zhaochun<sup>1</sup>, ZENG Ximing<sup>1</sup>, LI Xihai<sup>2</sup>, QIN Yin<sup>1</sup>, GUO Jianhong<sup>1</sup>, GAO Hui<sup>1</sup>, CHEN Lidian<sup>2</sup>

1. Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of PLA, Fuzhou 350025, Fujian, China,

2. Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, Fujian, China

**ABSTRACT Objective:** To observe the effect of warm sparse - dense wave on RAS/mitogen - activated protein kinase (MAPK) signaling

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2013J01349); 南京军区福州总医院院内课题(201003)

通讯作者: 陈立典 E-mail: lmnan\_fzzyy@126.com

pathway in chondrocytes of knee osteoarthritis (KOA) rat models. **Methods:** One hundred and twenty healthy 2-month-old SPF-grade SD rats were randomly divided into blank group, model group, control group, experimental group 1, experimental group 2 and experimental group 3, 20 rats in each group. The KOA models were built by intraarticular injecting 4% caroid into the right posterior knee of the rats except those in blank group. The rats in blank group and model group were not be treated after the modeling. The rats in control group were treated with irradiation at right posterior knee by using KJ-6200C microwave therapy apparatus, once a day for 30 minutes at a time; while the rats in experimental group 1, 2 and 3 were treated with warm sparse-dense wave with a ratio of 1:1, 2:1 and 1:2 respectively by using knee arthritis therapy apparatus, once a day for 30 minutes at a time. At 4 and 8 weeks after the beginning of the treatment, 10 rats were randomly selected from each group, and the cartilages were fetched out from the weight-bearing surface of the medial femoral condyle and tibial plateau in the right posterior limbs, then the protein and mRNA contents of ERK, P38, P53 and RAS in cartilages were measured by using Western Blot assays and Real-time PCR assays respectively. **Results:** (1) After 4-week treatment, there was no statistical difference in the contents of ERK mRNA, P53 mRNA and RAS mRNA in the cartilages between model group, control group and experimental groups; and the contents of P38 mRNA in cartilages were lower in control group, experimental group 2 and 3 compared to model group ( $P=0.024$ ,  $P=0.024$ ,  $P=0.006$ ), while there was no statistical difference between the rest paired groups. The contents of ERK protein in cartilages were lower in control group and experimental group 3 compared to model group ( $P=0.047$ ,  $P=0.020$ ). The contents of P38 protein in cartilages were lower in experimental group 3 compared to model group, experimental group 1 and 2 ( $P=0.018$ ,  $P=0.035$ ,  $P=0.026$ ). The contents of P53 protein in cartilages were lower in control group, experimental group 1, 2 and 3 compared to model group ( $P=0.029$ ,  $P=0.012$ ,  $P=0.003$ ,  $P=0.002$ ). The contents of RAS protein in cartilages were lower in control group, experimental group 1, 2 and 3 compared to model group ( $P=0.002$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.001$ ,  $P=0.000$ ). (2) After 8-week treatment, there was no statistical difference in the contents of ERK mRNA in cartilages between different groups. The contents of P38 mRNA in cartilages were lower in experimental group 2 and 3 compared to model group ( $P=0.020$ ,  $P=0.024$ ). The contents of P53 mRNA in cartilages were lower in control group, experimental group 1, 2 and 3 compared to model group ( $P=0.009$ ,  $P=0.001$ ,  $P=0.004$ ,  $P=0.001$ ). The contents of RAS mRNA in cartilages were lower in control group, experimental group 1, 2 and 3 compared to model group ( $P=0.002$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ). The contents of RAS mRNA in cartilages were lower in experimental group 1 and 3 compared to control group ( $P=0.043$ ,  $P=0.031$ ). The contents of ERK protein in cartilages were lower in experimental group 3 compared to model group and experimental group 1 ( $P=0.033$ ,  $P=0.009$ ). The contents of ERK protein in cartilages were lower in experimental group 2 compared to experimental group 1 ( $P=0.022$ ). The contents of P38 protein in cartilages were lower in control group, experimental group 1, 2 and 3 compared to model group ( $P=0.008$ ,  $P=0.008$ ,  $P=0.005$ ,  $P=0.000$ ). The contents of P38 protein in cartilages were lower in experimental group 3 compared to control group, experimental group 1 and 2 ( $P=0.014$ ,  $P=0.015$ ,  $P=0.022$ ). The contents of P53 protein in cartilages were lower in experimental group 1, 2 and 3 compared to model group and control group ( $P=0.003$ ,  $P=0.005$ ;  $P=0.000$ ,  $P=0.001$ ;  $P=0.001$ ,  $P=0.012$ ). The contents of RAS protein in cartilages were lower in experimental group 1, 2 and 3 compared to model group ( $P=0.000$ ,  $P=0.030$ ,  $P=0.000$ ). The contents of RAS protein in cartilages were lower in experimental group 1 and 3 compared to control group ( $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ). The contents of RAS protein in cartilages were lower in experimental group 3 compared to experimental group 1 and 2 ( $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ). **Conclusion:** Warm sparse-dense wave can regulate the RAS/MAPK signaling pathway and inhibit the chondrocyte apoptosis induced by inflammatory reaction through inhibiting the expression of RAS and ERK, thereby it can delay cartilage degeneration in the process of OA. Better effect can be obtained by using warm sparse-dense wave with a ratio of 1:2, which surpasses microwave treatment in curative effect.

**Key words** osteoarthritis, knee; mitogen-activated protein kinases; chondrocytes; signal transduction; warm sparse-dense wave; rats, Sprague-Dawley; animal experimentation

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是一种慢性骨关节疾病, 以关节软骨退变、软骨基质降解为主要病理特征。通过温热疏密波对膝关节进行电刺激, 可下调关节软骨细胞 P53 mRNA 表达, 上调 P21 mRNA、Bcl-2 mRNA 表达, 从而抑制软骨细胞凋亡, 延缓关节软骨细胞及软骨基质退变<sup>[1-2]</sup>。本研究通

过进一步研究温热疏密波对关节软骨 RAS/丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路的影响, 以探讨其作用机理。

## 1 材料与仪器

**1.1 实验动物** 2月龄 SPF级健康SD大鼠120只, 雌雄各半, 购自福建医科大学实验动物中心, 实验动

物许可证号:SCXK(闽)2012-0001。实验方案通过医学实验动物伦理委员会批准。

**1.2 试剂和仪器**  $\beta$ -actin、P53、P38、ERK、RAS 基因 cDNA 引物, TRIZOL (Invitrogen 公司); DEPC 水 (北京鼎国昌盛生物技术科技有限公司);  $\beta$ -actin、P53 抗体 (Santa Cruz 公司); P38、ERK、RAS 抗体 (Cell Signaling Technology 公司); Real-time PCR 试剂盒 (TaKaRa 公司)。64R 型低温高速离心机 (BECKMAN 公司); 9600 型 DNA 扩增仪 (PE 生物系统公司); GEL DOC 2000 型凝胶成像系统、ChemiDoc XRS + 化学发光成像系统 (Bio-RAD 公司); 7900HT Fast 实时荧光定量 PCR 系统 (Applied Biosystems 公司); KJ-6200C 微波治疗仪 (徐州诺万医疗设备公司); 膝关节炎治疗仪 (福建省祥兴电子科技有限公司)。

## 2 方法

**2.1 分组及造模** 将 120 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为空白组、模型组、对照组、实验 1 组、实验 2 组、实验 3 组, 每组 20 只。除空白组外, 其余各组大鼠分别于分组后第 1、4、7 天以水合氯醛 ( $3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 进行腹腔麻醉后, 在右后膝关节腔内注射 4% 木瓜蛋白酶建立 KOA 模型, 每次  $0.1 \text{ mL}^{[3-4]}$ 。

**2.2 实验干预** 造模结束后, 空白组和模型组大鼠常规饲养, 不进行干预; 对照组以 KJ-6200C 微波治疗仪照射右后膝关节, 功率 40 W, 照射距离 3 cm, 每日 1 次, 每次 30 min; 实验 1 组、实验 2 组和实验 3 组大鼠均以膝关节炎治疗仪进行治疗, 治疗时电极片贴于膝关节内外膝眼处, 分别选择疏密波 1:1 模式、疏密波 2:1 模式、疏密波 1:2 模式, 每日 1 次, 每次 30 min。

**2.3 RAS/MAPK 信号通路相关蛋白及 mRNA 表达水平测定** 分别于实验干预开始 4、8 周后, 从各组随机选取 10 只大鼠, 腹腔注射水合氯醛麻醉后, 切取右后肢股骨内髌负重面和胫骨平台软骨置于  $-80^\circ\text{C}$  保存。分别采用 Western Blot 法和 Real-time PCR 法测定 ERK、P38、P53、RAS 蛋白和 mRNA 含量。Real-time PCR 实验按照 Real-time PCR 试剂盒说明书的

操作步骤进行, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 基因作为内参, 以空白组作为标准样本以比较其他各待测样本相对校准样本的表达差异, 即校准样本 ( $\Delta C_T$ ) = 目的基因 (Mean  $C_T$ ) - 内参基因 GAPDH (Mean  $C_T$ ), 待测样本 ( $\Delta C_T$ ) = 目的基因 (Mean  $C_T$ ) - 内参基因 GAPDH (Mean  $C_T$ );  $\Delta\Delta C_T$  = 待测样本 ( $\Delta C_T$ ) - 校准样本 ( $\Delta C_T$ ), 最终各目的基因的表达采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  表示。所用引物序列见表 1。

表 1 Real-time PCR 实验所用引物序列

基因名称		引物序列
EPK	上游	CTGGCTTTCTGACCGAGTATGTG
	下游	CCTTGGTTTTAGAGGGCAGAGACT
P38	上游	GAATGGAAGAGCCTGACCTACGAT
	下游	AGAGGCACCTGAATGGTATTTGGAG
P53	上游	CCATCATCAGCCTGGAAGACTC
	下游	TGGTGGCAGTGCTCTCTTTG
RAS	上游	GGACAATCGTAACAACCCCTT
	下游	GGCACTCTTCCCACGCCTCTA
GAPDH	上游	ACGGCAAGTTCAACGGCACAG
	下游	GAAGACGCCAGTAGACTCCACGAC

**2.4 数据统计分析** 采用 SPSS 17.0 统计软件处理实验数据, 空白组和模型组干预 8 周后各指标的组间比较采用  $t$  检验, 模型组、对照组及 3 个实验组各指标的组间整体比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用  $q$  检验, 检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 3 结果

干预 8 周后模型组软骨中 ERK mRNA、RAS mRNA 的含量均高于空白组; 2 组 P38 mRNA、P53 mRNA 含量比较, 组间差异均无统计学意义 (表 2)。模型组软骨中 ERK、P38、P53、RAS 蛋白的含量均高于空白组 (表 3)。

干预 4 周后, 模型组、对照组及实验组软骨中 ERK mRNA、P53 mRNA、RAS mRNA 含量比较, 组间差异均无统计学意义; 对照组、实验 2 组、实验 3 组软骨中 P38 mRNA 含量均低于模型组 ( $P = 0.024, P = 0.024, P = 0.006$ ), 其余各组间两两比较, 组间差异均无统计学意义 (表 4)。对照组、实验 3 组软骨中 ERK

表 2 干预 8 周后空白组和模型组大鼠关节软骨中 ERK、P38、P53、RAS mRNA 表达水平

组别	样本量(只)	ERK mRNA	P38 mRNA	P53 mRNA	RAS mRNA
空白组	10	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
模型组	10	3.000 ± 0.474	4.052 ± 1.028	8.303 ± 4.400	9.285 ± 3.006
$t$ 值		7.312	1.361	2.875	4.771
$P$ 值		0.018	0.307	0.103	0.041

表 3 干预 8 周后空白组和模型组大鼠关节软骨中 ERK、P38、P53、RAS 蛋白表达水平

组别	样本量(只)	ERK	P38	P53	RAS
空白组	10	0.456 ± 0.023	0.405 ± 0.079	0.382 ± 0.55	0.353 ± 0.106
模型组	10	0.738 ± 0.089	0.720 ± 0.020	0.992 ± 0.167	1.019 ± 0.059
<i>t</i> 值		7.338	9.249	5.104	8.333
<i>P</i> 值		0.018	0.011	0.036	0.014

表 4 干预 4 周后各组大鼠关节软骨中 ERK、P38、P53、RAS mRNA 表达水平

组别	样本量(只)	ERK mRNA	P38 mRNA	P53 mRNA	RAS mRNA
模型组	10	1.732 ± 0.577	6.340 ± 3.161	5.907 ± 4.324	8.044 ± 3.975
对照组	10	0.515 ± 0.589	2.277 ± 1.386	4.715 ± 3.452	6.114 ± 3.702
实验 1 组	10	0.570 ± 0.737	4.132 ± 2.793	2.853 ± 1.639	6.225 ± 4.678
实验 2 组	10	1.032 ± 0.467	2.295 ± 1.600	1.400 ± 0.810	7.393 ± 3.569
实验 3 组	10	0.837 ± 0.236	1.163 ± 0.085	1.662 ± 0.929	6.927 ± 1.813
<i>F</i> 值		2.328	3.350	2.040	2.749
<i>P</i> 值		0.107	0.040	0.145	0.070

蛋白含量均低于模型组( $P = 0.047, P = 0.020$ ),其余各组软骨中 ERK 蛋白含量两两比较,组间差异均无统计学意义;实验 3 组软骨中 P38 蛋白含量低于模型组、实验 1 组和实验 2 组( $P = 0.018, P = 0.035, P = 0.026$ ),其余各组软骨中 P38 蛋白含量两两比较,组间差异均无统计学意义;对照组、实验 1 组、实验 2 组、实验 3 组软骨中 P53 蛋白含量均低于模型组( $P =$

$0.029, P = 0.012, P = 0.003, P = 0.002$ ),其余各组软骨中 P53 蛋白含量两两比较,组间差异均无统计学意义;对照组、实验 1 组、实验 2 组、实验 3 组软骨中 RAS 蛋白含量均低于模型组( $P = 0.002, P = 0.000, P = 0.001, P = 0.000$ ),其余各组软骨中 RAS 蛋白含量两两比较,组间差异均无统计学意义(表 5)。

表 5 干预 4 周后各组大鼠关节软骨中 ERK、P38、P53、RAS 蛋白表达水平

组别	样本量(只)	ERK	P38	P53	RAS
模型组	10	0.307 ± 0.083	0.638 ± 0.136	0.629 ± 0.175	0.535 ± 0.097
对照组	10	0.204 ± 0.061	0.435 ± 0.068	0.288 ± 0.106	0.261 ± 0.072
实验 1 组	10	0.215 ± 0.040	0.532 ± 0.081	0.238 ± 0.123	0.203 ± 0.069
实验 2 组	10	0.246 ± 0.056	0.542 ± 0.046	0.163 ± 0.080	0.248 ± 0.059
实验 3 组	10	0.182 ± 0.033	0.371 ± 0.062	0.136 ± 0.070	0.209 ± 0.017
<i>F</i> 值		3.351	8.392	7.360	14.304
<i>P</i> 值		0.040	0.001	0.002	0.000

干预 8 周后,各组软骨中 ERK mRNA 含量比较,差异无统计学意义;实验 2 组、实验 3 组软骨中 P38 mRNA 含量均低于模型组( $P = 0.020, P = 0.024$ ),其余各组软骨中 P38 mRNA 含量两两比较,组间差异均无统计学意义;对照组、实验 1 组、实验 2 组、实验 3 组软骨中 P53 mRNA 含量均低于模型组( $P = 0.009, P = 0.001, P = 0.004, P = 0.001$ ),其余各组软骨中 P53 mRNA 含量两两比较,组间差异均无统计学意义;对照组、实验 1 组、实验 2 组、实验 3 组软骨中 RAS mRNA 含量均低于模型组( $P = 0.002, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$ ),实验 1 组、实验 3 组软骨中 RAS mRNA 含量均低于对照组( $P = 0.043, P = 0.031$ ),其余各组软骨中 RAS mRNA 含量两两比较,组间差异均无统计学意义(表 6)。实验 3 组软骨中

ERK 蛋白含量低于模型组和实验 1 组( $P = 0.033, P = 0.009$ ),实验 2 组软骨中 ERK 蛋白含量低于实验 1 组( $P = 0.022$ ),其余各组软骨中 ERK 蛋白含量两两比较,组间差异均无统计学意义;对照组、实验 1 组、实验 2 组、实验 3 组软骨中 P38 蛋白含量均低于模型组( $P = 0.008, P = 0.008, P = 0.005, P = 0.000$ ),实验 3 组软骨中 P38 蛋白含量低于对照组、实验 1 组和实验 2 组( $P = 0.014, P = 0.015, P = 0.022$ ),其余各组软骨中 P38 蛋白含量两两比较,组间差异均无统计学意义;实验 1 组、实验 2 组、实验 3 组软骨中 P53 蛋白含量均低于模型组和对照组( $P = 0.003, P = 0.005; P = 0.000, P = 0.001; P = 0.001, P = 0.012$ ),其余各组软骨中 P53 蛋白含量两两比较,组间差异均无统计学意义;实验 1 组、实验 2 组、实验 3 组 RAS 蛋

白含量均低于模型组 ( $P = 0.000, P = 0.030, P = 0.000$ ), 实验 1 组和实验 3 组 RAS 蛋白含量均低于对照组 ( $P = 0.000, P = 0.000$ ), 实验 3 组 RAS 蛋白含

量低于实验 1 组和实验 2 组 ( $P = 0.000, P = 0.000$ ), 其余各组 RAS 蛋白含量两两比较, 组间差异均无统计学意义(表 7)。

表 6 干预 8 周后各组大鼠关节软骨中 ERK、P38、P53、RAS mRNA 表达水平

组别	样本量(只)	ERK mRNA	P38 mRNA	P53 mRNA	RAS mRNA
模型组	10	3.000 ± 0.474	4.052 ± 1.028	8.303 ± 4.400	9.285 ± 3.006
对照组	10	2.398 ± 0.936	3.948 ± 1.922	3.450 ± 1.039	4.666 ± 0.747
实验 1 组	10	1.975 ± 0.778	2.259 ± 0.906	1.779 ± 0.314	2.065 ± 0.794
实验 2 组	10	2.011 ± 1.498	1.689 ± 0.877	2.634 ± 1.188	2.298 ± 1.051
实验 3 组	10	1.474 ± 0.473	1.334 ± 0.767	1.468 ± 0.414	1.851 ± 0.735
F 值		2.099	4.545	5.895	14.038
P 值		0.136	0.015	0.006	0.000

表 7 干预 8 周后各组大鼠关节软骨中 ERK、P38、P53、RAS 蛋白表达水平

组别	样本量(只)	ERK	P38	P53	RAS
模型组	10	0.738 ± 0.089	0.720 ± 0.020	0.992 ± 0.167	1.019 ± 0.059
对照组	10	0.771 ± 0.081	0.510 ± 0.072	0.820 ± 0.198	0.890 ± 0.098
实验 1 组	10	0.778 ± 0.027	0.507 ± 0.050	0.585 ± 0.106	0.392 ± 0.171
实验 2 组	10	0.634 ± 0.066	0.493 ± 0.121	0.369 ± 0.137	0.796 ± 0.061
实验 3 组	10	0.606 ± 0.084	0.317 ± 0.105	0.502 ± 0.058	0.353 ± 0.106
F 值		10.325	8.123	10.808	20.976
P 值		0.001	0.001	0.000	0.000

#### 4 讨论

MAPK 级联是细胞内主要的信号转导系统, 包括 P38、ERK、JNK 等多个亚家族, 在 OA 的发病过程中发挥着重要作用<sup>[5-6]</sup>, 调节 MAPK 信号转导通路可作为治疗 OA 的一个靶点<sup>[7-8]</sup>。P38MAPK 是参与炎症反应调控的重要信号通路, 可被多种因素如炎症因子、应力诱导、高渗液等信号激活, 从而影响多种炎症因素, 在 OA 的发生发展中发挥重要作用<sup>[9-11]</sup>。P53 通过抑制 DNA 复制, 终止细胞的复制, 最终使细胞进入凋亡程序, 加速了软骨退变<sup>[12]</sup>。ERK 信号在 OA 中高表达<sup>[13]</sup>, 其活化始于对 RAS 的激活, RAS 在细胞外信号刺激下转化为激活型 RAS, 后者进一步激活 ERK, 参与调控细胞增殖、分化、炎症反应以及细胞凋亡等, 与 OA 软骨退变密切相关<sup>[14]</sup>。RAS/MAPK 信号转导通路是介导 OA 软骨退变较为主要的一条信号通路, 参与软骨细胞增殖、分化、凋亡及炎症反应作用等多种生理过程, 在炎症因子、机械应力等内外刺激作用下, 通过细胞内的信号转导途径, 将信号传递给各种转录因子, 从而调控软骨退变的病理过程<sup>[15-16]</sup>。

温热疏密波以中医针灸理论为基础, 以经络理论为指导, 通过对膝关节周围穴位进行电刺激, 可达到疏通经络、行气活血等功效<sup>[17-18]</sup>。从实验结果来看, 与模型组相比, 实验干预后对照组和实验组软骨中

ERK、P38、P53、RAS 蛋白和 mRNA 含量均降低, 提示温热疏密波可通过抑制 RAS 和 ERK 表达, 调节 RAS/MAPK 信号转导通路, 抑制炎症反应引起的软骨细胞凋亡, 从而延缓 OA 软骨退变, 其中疏密波 1: 2 模式效果较好, 效果优于微波治疗。本实验只是单纯的动物实验, 具体的临床疗效还有待于后期大样本多中心的随机对照临床试验来验证。

#### 5 参考文献

- [1] 林木南, 刘献祥, 王水良, 等. 治疗型关节炎护膝对实验性骨关节炎软骨细胞凋亡基因 Bcl-2 及 p53 的影响[J]. 中国骨伤, 2009, 22(9): 688-691.
- [2] 林木南, 李西海, 刘献祥, 等. 动态温热疏密波对软骨细胞凋亡调控基因表达的影响[J]. 中医正骨, 2012, 24(8): 3-7.
- [3] 孙鲁宁, 赵燕华, 黄桂成, 等. 木瓜蛋白酶诱导膝关节骨关节炎模型兔滑膜病理变化与药物注射时间的关系[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(50): 9311-9313.
- [4] Pomonis JD, Boulet JM, Gottshall SL, et al. Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain[J]. Pain, 2005, 114(3): 339-346.
- [5] Fecher LA, Amaravadi RK, Flaherty KT. The MAPK pathway in melanoma [J]. Curr Opin Oncol, 2008, 20(2): 183-189.

- [6] Kimura H, Yukitake H, Suzuki H, et al. The chondroprotective agent ITZ-1 inhibits interleukin-1 $\beta$ -induced matrix metalloproteinase-13 production and suppresses nitric oxide-induced chondrocyte death[J]. J Pharmacol Sci, 2009, 110(2): 201-211.
- [7] Hayashi S, Nishiyama T, Miura Y, et al. DcR3 induces cell proliferation through MAPK signaling in chondrocytes of osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2011, 19(7): 903-910.
- [8] Shakibaei M, Mobasheri A, Buhrmann C. Curcumin synergizes with resveratrol to stimulate the MAPK signaling pathway in human articular chondrocytes in vitro[J]. Genes Nutr, 2011, 6(2): 171-179.
- [9] 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.
- [10] 范素芳, 王文雅, 张柳. 丝裂原活化蛋白激酶信号通路对骨关节炎软骨的作用[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(37): 7015-7019.
- [11] 秦泗通, 蒋青, 黄黄河, 等. p38 丝裂原活化蛋白激酶抑制剂对大鼠骨性关节炎的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2008, 14(11): 776-781.
- [12] Hashimoto S, Nishiyama T, Hayashi S, et al. Role of p53 in human chondrocyte apoptosis in response to shear strain[J]. Arthritis Rheum, 2009, 60(8): 2340-2349.
- [13] Wang X, Li F, Fan C, et al. Effects and relationship of ERK1 and ERK2 in interleukin-1 $\beta$ -induced alterations in MMP3, MMP13, type II collagen and aggrecan expression in human chondrocytes[J]. Int J Mol Med, 2011, 27(4): 583-589.
- [14] Karnoub AE, Weinberg RA. Ras oncogenes: split personalities[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(7): 517-531.
- [15] Roskoski R. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation[J]. Pharmacol Res, 2012, 66(2): 105-143.
- [16] 高世超, 殷海波, 刘宏潇, 等. MAPK 信号通路在骨关节炎发病机制中的研究进展[J]. 中国骨伤, 2014, 27(5): 441-444.
- [17] 林木南, 刘献祥, 刘建华, 等. OA 护膝干预膝骨性关节炎的临床效应分析[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2007, 15(11): 12-15.
- [18] 林木南, 刘献祥, 李西海, 等. 治疗型关节炎护膝对膝骨关节炎兔关节液中转化生长因子 $\beta$ 及胰岛素样生长因子的影响[J]. 中医正骨, 2012, 24(1): 11-14.

(2015-09-14 收稿 2015-11-05 修回)

## 《中医正骨》杂志 2014 年重点专栏目录(一)

### 2014 年第 1 期——骨关节炎专栏

- 1 膝关节骨性关节炎的分期治疗  
(述评专家: 辽宁中医药大学附属医院 侯德才教授)
- 2 柔肝和化痰中药复方对膝骨关节炎患者关节功能及关节液软骨寡聚基质蛋白浓度的影响
- 3 增液润节汤和美洛昔康片治疗膝骨关节炎的对比研究
- 4 中药治疗膝骨关节炎临床疗效和安全性的系统评价
- 5 小针刀治疗膝骨关节炎的研究进展
- 6 筋病理论指导下中医综合疗法治疗膝骨关节炎

#### 参考文献著录格式

- [1] 侯德才. 膝关节骨性关节炎的分期治疗[J]. 中医正骨,

2014, 26(1): 3-5.

- [2] 王学宗, 郑昱新, 曹月龙, 等. 柔肝和化痰中药复方对膝骨关节炎患者关节功能及关节液软骨寡聚基质蛋白浓度的影响[J]. 中医正骨, 2014, 26(1): 17-20.
- [3] 孙艳, 陈立忠, 王海燕, 等. 增液润节汤和美洛昔康片治疗膝骨关节炎的对比研究[J]. 中医正骨, 2014, 26(1): 21-23.
- [4] 唐萌芽, 翁祝承, 邵利芳. 中药治疗膝骨关节炎临床疗效和安全性的系统评价[J]. 中医正骨, 2014, 26(1): 43-48.
- [5] 吕帅洁, 孙奇, 杜文喜, 等. 小针刀治疗膝骨关节炎的研究进展[J]. 中医正骨, 2014, 26(1): 49-51.
- [6] 高文香, 郝军. 筋病理论指导下中医综合疗法治疗膝骨关节炎[J]. 中医正骨, 2014, 26(1): 60-62.

#### · 作者须知 ·

### 请作者在写论文时使用参考文献

参考文献不仅增加论文的学术性, 而且表明论文的科学依据, 也是对他人劳动成果的尊重。另外, 凡无参考文献的文章, 国家进行论文统计时不予统计。因此, 希望作者在撰写论文时, 凡在文中引用他人数据或观点时, 应使用参考文献。并希望作者使用参考文献时参照我刊稿约, 按参考文献的书写要求书写完整, 且依论文中引用的先后顺序进行参考文献排序并在论文中作相应标注。参考文献宜选用近 1~2 年内的权威性学术期刊文献。