

p38 丝裂原活化蛋白激酶抑制剂对大鼠骨性关节炎的影响

秦泗通 蒋青 黄际河 刘和风 陈蔚东

中图分类号: R31 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)11-0776-06

摘要:目的 观察 p38 丝裂原活化蛋白激酶抑制剂 SB203580 对大鼠膝关节骨性关节炎关节软骨的影响。方法 40 只 SD 大鼠随机分为 A、B、C、D 4 组。A、B、C 组行单侧膝关节前交叉韧带切除术, A 组于术后行关节腔内注射 0.1 mL 浓度为 100 $\mu\text{m/L}$ SB203580, B 组注射等量生理盐水做为实验对照, C 组不予任何处理为空白对照组, D 组为正常对照组。术后 8 周处死动物。观察各组标本大体评分、Mankin 评分、软骨细胞凋亡指数以及软骨 II 型胶原免疫组化染色。结果 40 只大鼠均纳入结果分析。大体评分及 Mankin 评分显示 A 组软骨退变明显轻于 B、C 组 ($P < 0.05$)。各组均发现有凋亡的软骨细胞, A 组软骨细胞凋亡指数低于 B、C 组 ($P < 0.05$)。D 组软骨细胞凋亡指数明显低于其他 3 组 ($P < 0.05$)。A 组关节软骨 II 型胶原染色吸光度值大于 B、C 组 ($P < 0.05$)。结论 p38MAPK 抑制剂对关节软骨有一定的保护作用, 可以延缓 OA 进程, 对 OA 有一定的治疗作用。

关键词: 骨性关节炎; p38 丝裂原活化蛋白激酶抑制剂; II 型胶原; 软骨细胞凋亡

Effect of intra-articular injection of P38 mitogen activated protein kinase inhibitor on osteoarthritis in rats

QIN Sitong, JIANG Qing, HUANG Jihe, et al. The Center of Diagnosis and Treatment for Joint Disease, Drum Tower Hospital, Affiliated to Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, China

Abstract: **Objective** To observe the influence of p38 mitogen activated protein kinase inhibitor SB203580 on the cartilage in rat osteoarthritis. **Methods** 40 SD rats were randomly divided into group A, B, C, and D. Group A, B, and C underwent unilateral anterior cruciate ligament transection. Rats of group A received 0.1 mL intra-articular injection of SB203580 at concentration of 100 $\mu\text{m/L}$ immediately after surgery, while those in group B received 0.1 mL 0.9% Sodium Chloride. Rats of group C received no treatments and those of group D were normal. At the 8th week after surgery, the rats were sacrificed. Macroscopic and histologic studies, chondrocyte apoptosis index, type II collagen of cartilage were observed and recorded. **Results** All of the 40 SD rats were analyzed. Histological changes observed in group A were slighter than those in group B and C ($P < 0.05$); Apoptotic chondrocytes were observed in all of those groups, and apoptosis index of group A was lower than group B and C ($P < 0.05$), and rats in group D had much lower apoptosis index than the other three groups ($P < 0.05$); More content of type II collagen in group A were observed than in group B and C ($P < 0.05$). **Conclusion** The p38 MAPK inhibitor can protect the articular cartilage and inhibit the development of OA.

Key words: Osteoarthritis; P38 mitogen activated protein kinase inhibitor; Type II collagen; Chondrocyte apoptosis

骨性关节炎 (Osteoarthritis OA) 是一种最常见的关节退行性疾病, 是导致关节疼痛、畸形、甚至病残的主要原因, 发病率也越来越高, 其确切发病机制尚不是十分清楚。目前可以肯定的是软骨细胞外基质

破坏降解以及软骨细胞退变、异常凋亡是 OA 发病的重要机制。p38 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号转导通路属于 MAPK 家族中的应激活化蛋白激酶, 是细胞外引起细胞核内反应的通道之一, 最近研究表明其在 OA 的发病中也扮演着重要的作用^[1-3]。本实验采用切除大鼠前交叉韧带 (anterior cruciate ligament transection, ACLT) 的方法建立 OA 模型, 通过关节腔注射 p38

作者单位: 210008 南京市, 南京大学医学院附属鼓楼医院关节疾病诊治中心

通讯作者: 蒋青, Email: oscarqin@sina.com

MAPK 信号转导途径特异性抑制剂 SB203580, 观察其对大鼠关节软骨细胞凋亡及软骨 II 型胶原的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组

4 月龄 SD 大鼠 40 只(南京鼓楼医院动物实验中心提供), 体质量重 180 ~ 220 g, 雌雄各半。用随机数字表法分为 A、B、C、D 组, 每组 10 只。

1.2 OA 模型制备

乙醚诱导麻醉, 氯胺酮腹腔注射麻醉后, 手术区备皮、消毒、铺巾, 在严格无菌条件下进行。A、B、C 组大鼠右膝经内侧切口切开关节囊, 行膝关节前交叉韧带切除术(ACLT), 术毕逐层关节切口, 无菌敷料包扎。肌注青霉素 2 万 U/(kg·d), 连续 3 d。A 组于术后行关节腔内注射 0.1 mL 浓度为 100 μ m/L p38 阻断剂 SB203580(美国 Biosource 公司), 1 次/周, 连续 7 周; B 组为实验对照组, 注射等量生理盐水; C 组为空白对照组, 不予任何处理; D 组为正常对照组。

1.3 大体观察

术后 8 周处死动物。观察膝关节有无关节腔积液和滑膜肿胀等滑膜炎表现, 并于解剖显微镜下观察股骨内髁关节面的病理改变。按以下原则评分: 0 分: 关节面光整, 色泽如常; 1 分: 关节面粗糙, 有小的裂隙且色泽灰暗; 2 分: 关节面糜烂, 软骨缺损深达软骨表中层; 3 分: 关节面溃疡形成, 缺损深达软骨深层; 4 分: 软骨剥脱, 软骨下骨质暴露。

1.4 组织学观察

股骨内侧髁软骨连同软骨下骨一并切下, 固定, 脱钙, 石蜡包埋, 连续纵向切片, 做 HE 染色, 光镜下观察软骨的组织学变化。

1.5 原位末端标记法检测细胞凋亡

每个样本取 2 张连续切片, 按凋亡检测 TUNEL 试剂盒(美国 Promega 公司)使用说明对软骨组织切片进行染色, 阳性对照滴加 DNase I。荧光显微镜下观察, 细胞核染色成黄色者为阳性细胞, 计算阳性细胞率, 即每张切片随机选取 6 个不重叠高倍视野, 计算出平均阳性细胞百分数。根据公式: 凋亡指数 = 凋亡细胞核数/总细胞核数 $\times$ 100%。

1.6 II 型胶原免疫组织化学染色

切片常规脱蜡入水, 体积分数 3% H_2O_2 乙醇封闭, 质量分数 0.4% 胃蛋白酶(武汉博士德公司)消化。加入 1:250 兔抗大鼠 II 型胶原抗体(美国

Chemicon 公司), 4℃ 过夜; 加羊抗兔 IgG(福建迈新生物技术公司)室温作用 30 min, PBS 洗, 加 PAP(福建迈新生物技术公司)室温作用 30 min, PBS 洗, DAB 显色, 蒸馏水冲洗, 苏木精染色, 水洗, 盐酸酒精分化, 水洗, 反蓝, 逐级酒精脱水。二甲苯透明, 封片。对照组 PBS 代替一抗。免疫组化染色标准: 每个标本选取 2 张连续切片, 随机采集 10 个高倍镜视野, 采用 Image-pro plus 5.0 图像分析软件对阳性染色(棕褐色)的吸光度值进行定量分析。

1.7 统计学处理

应用 SPSS 12.0 软件, 对实验数据进行多个样本的秩和检验、成组比较的 t 检验以及方差分析。 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 大体肉眼观察

A 组大多滑膜增厚, 软骨未见明显缺损, 关节面粗糙, 有小的裂隙且色泽灰暗(图 1); B、C 组滑膜增生明显, 与股骨黏连严重, 关节腔有少许淡黄色积液, 关节面色泽灰暗, 关节面溃疡形成, 软骨缺损, 边



图 1 A 组



图 2 B 组

缘有小骨赘形成(图 2、3);D 组关节软骨表面光滑,呈乳白色或淡蓝色(图 4)。各组大体评分情况见表 1。统计学分析显示 A 组关节软骨大体评分高于 B、

C 组,差异显著($P < 0.05$),B 组与 C 组之间无显著差异($P > 0.05$),D 组评分显著低于其他 3 组($P < 0.05$)。各组大体评分情况见表 1。

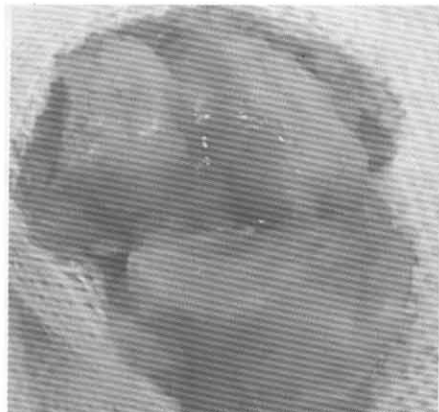


图 3 C 组

表 1 软骨大体评分(n)

组别	n	软骨 OA 评分(分)				
		0	1	2	3	4
A	10	4	4	2	0	0
B	10	0	1	4	5	0
C	10	0	1	5	4	0
D	10	10	0	0	0	0

注:各组间 Kruskal-Wallis 秩和检验结果如下:A 组与 B 组相比, H 值 = 5.147, $P < 0.05$;A 组与 C 组相比, H 值 = 5.125, $P < 0.05$;B 组与 C 组相比, H 值 = 2.210, $P > 0.05$



图 4 D 组

2.2 光镜下组织学观察及 Mankin 评分

A 组软骨和基质分布尚规律,表层少有绒毛状胶原纤维暴露及裂隙形成(图 5)。B、C 组软骨细胞与基质排列分布紊乱,软骨柱状排列消失,软骨细胞呈簇状增生分布,表层区域胶原纤维暴露呈绒毛状,部分有裂隙形成(图 6、7);D 组各层软骨细胞的排列与基质的分布有一定的规律,软骨细胞呈柱状排列(图 8)。

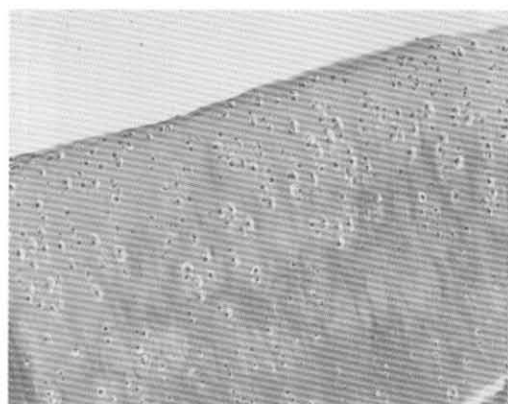


图 5 A 组(HE 200 ×)

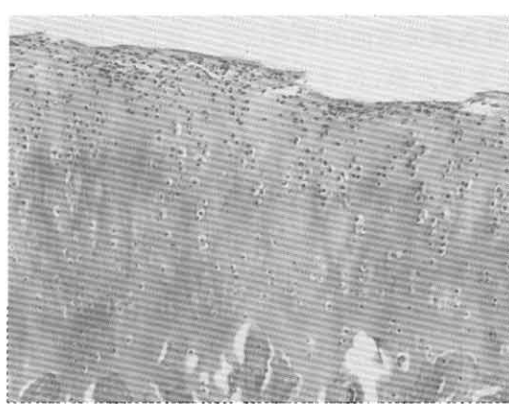


图 6 B 组(HE 200 ×)

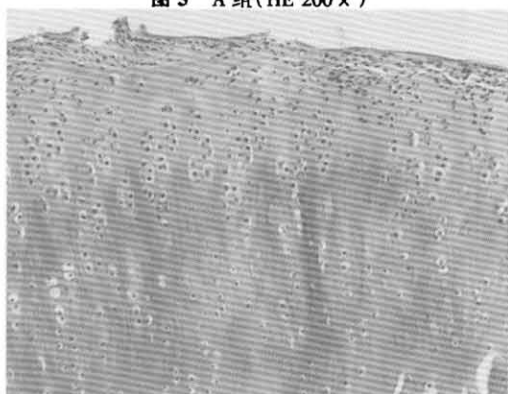


图 7 C 组(HE 200 ×)



图 8 D 组(HE 200 ×)

Mankin 评分是一种反映骨关节炎病变严重程度的定量分析方法,病变越重,分值越大。A 组 Mankin 评分比 B、C 组低,差异具有显著性($P < 0.05$)。D 组 Mankin 评分比其他组都要低,差异具有显著性($P < 0.05$)。各组评分见表 2。

2.3 TUNEL 法检测细胞凋亡结果

A 组关节软骨全层凋亡的软骨细胞较少,主要分布在软骨中层(图 9),软骨细胞凋亡指数显著低于 B、C 组;B、C 组的关节软骨有大量的凋亡软骨细胞,主要分布在软骨的中层(图 10、11);D 组的正常关节软骨也存在凋亡细胞,很非常少见(图 12),凋亡指数显著低于其他组($P < 0.05$)。各组评分见表 2。

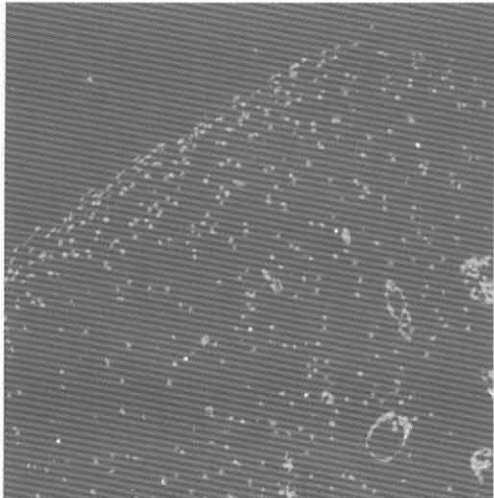


图 9 A 组(TUNEL 染色 200 ×)

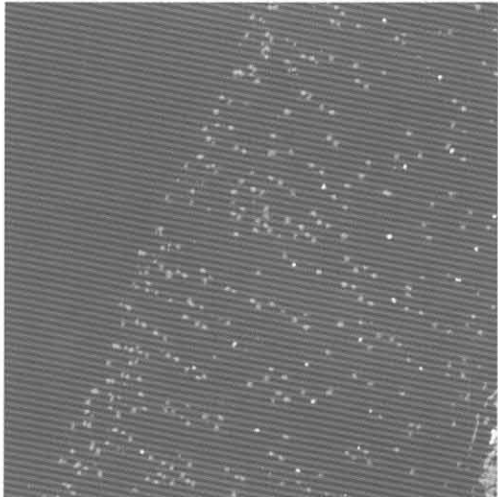


图 10 B 组(TUNEL 染色 200 ×)

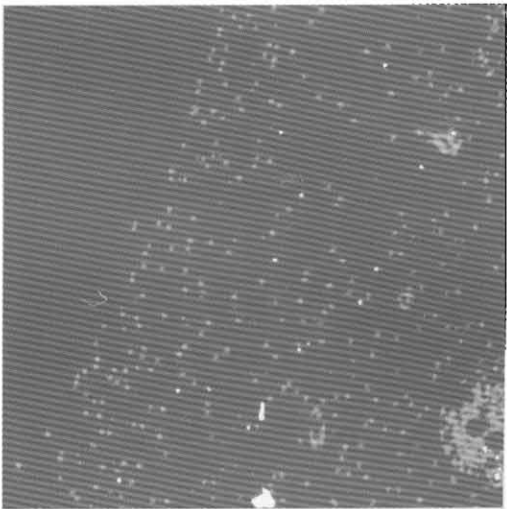


图 11 C 组(TUNEL 染色 200 ×)

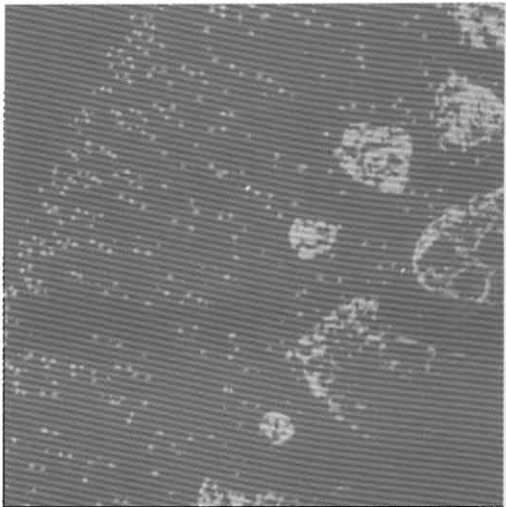


图 12 D 组(TUNEL 染色 200 ×)

表 2 各组软骨 Mankin 评分、软骨细胞凋亡指数、染色吸光度值($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Mankin 评分(分)	凋亡指数(%)	吸光度值(A)
A	10	4.25 ± 0.32	8.42 ± 1.37	0.1598 ± 0.0133
B	10	7.87 ± 0.52	11.02 ± 1.50	0.0917 ± 0.0141
C	10	7.62 ± 0.64	11.31 ± 1.34	0.0967 ± 0.0162
D	10	0.00 ± 0.00	1.48 ± 0.38	0.2364 ± 0.0257

2.4 II 型胶原免疫组织化学染色吸光度值

A 组关节软骨基质染色良好,着色主要分布与表层及中层,细胞簇周围出现深染(图 13),吸光度值高于 B、C 组,差异具有显著性($P < 0.05$);B、C 组关节软骨基质染色很淡,表层有脱色现象,中层及中下层有少量着色(图 14、15);D 组关节软骨基质深

染,主要分布于软骨的表层和表层,分布均匀,深层少有着色(图 16),吸光度值高于其他组,差异有显著性($P < 0.05$)。各组评分见表 2。

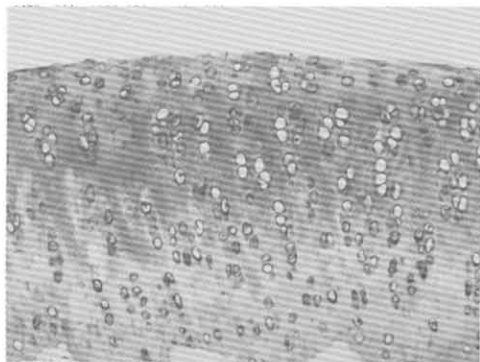


图 13 A 组(Ⅱ型胶原染色 200×)

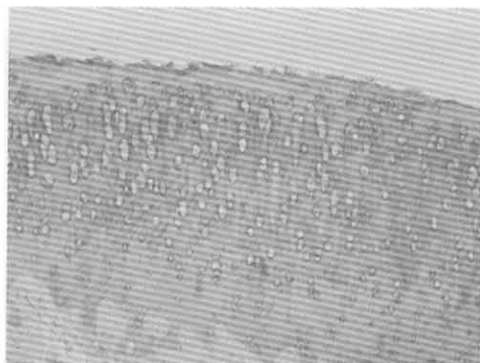


图 14 B 组(Ⅱ型胶原染色 200×)

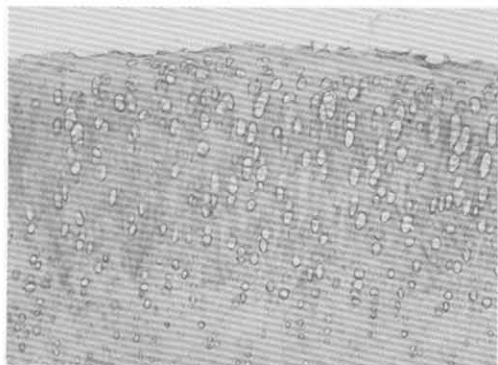


图 15 C 组(Ⅱ型胶原染色 200×)

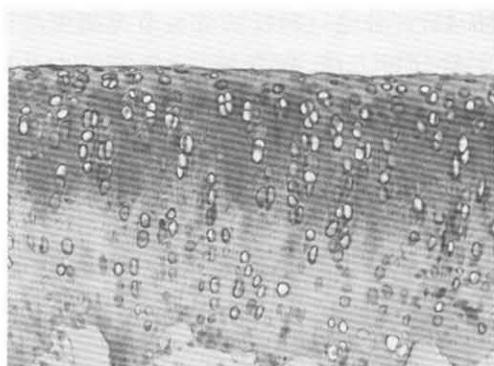


图 16 D 组(Ⅱ型胶原染色 200×)

中软骨细胞外基质的降解及软骨细胞的异常凋亡是一个重要机制,细胞外基质的代谢失衡所致减少导致软骨细胞的外环境紊乱而容易凋亡,而软骨细胞的凋亡又会导致细胞外基质的合成进一步的减少,如此以致形成恶性循环。

p38MAPK 是一种分布于胞浆中具有丝氨酸和酪氨酸双重磷酸化能力的蛋白激酶,其信号转导途径是细胞外信号引起胞内反应的通道之一,可被多种刺激因子激活,可参与细胞的形成、生长、分化、凋亡等多种生理过程。近来的研究发现 p38MAPK 信号转导途径在 OA 的发病过程中也起着重要作用:OA 时在 IL-1、TNF- α 等的诱导下表达增加的基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases MMPs),尤其是其中的 MMP-13,是软骨Ⅱ型胶原的主要降解酶,而研究^[5]表明 p38MAPK 信号转导途径参与了这一过程,p38MAPK 的激活可以诱导 MMP-13 的表达增加导致软骨Ⅱ型胶原的降解增加;还有研究发现 p38MAPK 可以上调在人类 OA 中 NO 的表达量^[6],Wei 等^[3]也发现 Fas 途径介导的软骨细胞凋亡也依赖于 p38MAPK 的活性,而我们知道 NO 途径和 Fas 途径是介导软骨细胞凋亡的两个最重要的途径^[1,7],这说明 p38MAPK 信号转导途径的激活和 OA 时软骨细胞的凋亡有密切的关系;Lee 等^[8]还发现抑制 P38MAPK 活性可以抑制软骨细胞的肥大进程,减少 X 型胶原的合成;Zhen 等^[9]也发现 p38MAPK 在骨髓钙化时对调节生长板处的细胞凋亡和肥大化有着重要作用;p38MAPK 与炎症关系密切,通过激活转录因子而诱导 IL-1、TNF- α 等在 OA 发病中起重要作用的细胞因子的表达;p38MAPK 抑制剂 SB203580 通过作用于其 ATP 结合位点使 p38MAPK 失去与 ATP 结合的能力而失去活性^[10]。

本实验在活体内水平对 p38MAPK 对骨性关节炎

3 讨论

采用 ACLT 法建立 OA 模型是目前国际较通用的方法^[4]。本实验即采用此法建立 OA 模型,对软骨的观察提示符合 OA 的病理改变。既往对 OA 的研究大多数着重于细胞外基质的变化,OA 发病过程

炎关节软骨的影响做了研究,我们的结果显示:大体平及 Mankin 评分显示:A 组大鼠软骨组织病理学改变明显轻于 B、C 组,软骨退变较轻;A 组软骨细胞凋亡指数低于 B、C 组,差异具有显著性,D 组的正常关节软骨也存在着凋亡的软骨细胞,并且 D 组的凋亡指数显著低于其他 3 组;A 组软骨 II 型胶原免疫组织化学染色吸光度值大于 B、C 组,差异有显著性。以上结果表明 p38MAPK 抑制剂可以减少软骨细胞的凋亡、抑制软骨 II 型胶原的降解、减轻软骨的退变,对关节软骨有一定程度的保护作用。其可能的作用机制为:通过抑制 MMPs 的表达来减少其对 II 型胶原的降解;抑制 NO 的表达,而减少通过 NO 途径诱导的软骨细胞凋亡;减少通过抑制 Fas 途径介导的软骨细胞凋亡;抑制软骨细胞的肥大化进程,减少 X 型胶原的合成;抑制 IL-1、TNF- α 等炎症因子的作用。

实验存在的不足之处:实验动物体形较小,手术操作有一定难度。此外关节腔注射的方式也存在一定的软骨损伤的风险。总之,本实验为 p38MAPK 抑制剂在 OA 的预防和治疗中的潜在作用提供了理论依据,有关其减少细胞凋亡、减少软骨 II 型胶原的降解、保护关节软骨的详细机制还有待于进一步的研究。

【参 考 文 献】

[1] Hashimoto S, Setareh M, Ochs RL, et al. Fas/Fas ligand expression and induction of apoptosis in chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 1997, 40 (8): 1749-1755.

[2] Kim SJ, Ju JW, Oh CD, et al. ERK-1/2 and p38 kinase oppositely regulate nitric oxide-induced apoptosis in chondrocytes in association with p53, caspase-3 and differentiation status. *J Biol Chem*, 2002, 277: 1332-1339.

[3] Wei L, Sun XJ, Wang Z, et al. CD95-induced osteoarthritis chondrocyte apoptosis and necrosis: dependency on p38 mitogen-activated protein kinase. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8(2): 37.

[4] Blutea G, Gouttenoire J, Conrozier T, et al. Differential gene expression analysis in a rabbit model of osteoarthritis induced by anterior cruciate ligament (ACL) section. *Biorheology*, 2002, 39(14): 247-258.

[5] Menqshol JA, Vincenti MP, Coon CI, et al. Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum*, 2000, 43(4): 801-811.

[6] Kim SJ, Ju JW, Oh CD, et al. ERK-1/2 and p38 kinase oppositely regulate nitric oxide-induced apoptosis in chondrocytes in association with p53, caspase-3 and differentiation status. *J Biol Chem*, 2002, 277 (2): 1332-1339.

[7] Blanco FJ, Ochs RL, Schwaz H, et al. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol*, 1995, 146(1): 75-78.

[8] Lee-Anne Stanton, Shalev Sabari, Arthur V, et al. p38 MAP kinase signaling is required for hypertrophic chondrocyte differentiation. *J Biol Chem*, 2004, 278(1): 53-62.

[9] Zhen X, Wei L, Wu Q, et al. Mitogen-activated protein kinase p38 mediates regulation of chondrocyte differentiation by parathyroid hormone. *J Biol Chem*, 2001, 276: 4879-4885.

[10] Lisnock J, Tebben A, Frantz B, et al. Molecular basis for p38 protein kinase inhibitor specificity. *Biochemistry*, 1998, 37 (47): 16573-16581.

(收稿日期: 2008-03-11)