

低强度脉冲超声和吡格列酮对脂多糖诱导的 OA 软骨细胞 IGF-1/mTOR/PGE2 通路的影响

张婷婷, 李雪萍

【摘要】 目的:探讨低强度脉冲超声(LIPUS)和吡格列酮对脂多糖(LPS)诱导的骨关节炎(OA)软骨细胞经雷帕霉素靶蛋白(mTOR)途径的软骨保护作用比较。方法:于新西兰大白兔膝关节软骨提取正常软骨细胞,分别进行体外培养并按数字表法随机分为4组:正常组、LPS组、LIPUS组(LPS+LIPUS)、吡格列酮组(LPS+吡格列酮, Pioglitazone组)各6只。LIPUS干预选取40 mW/cm²强度,每次照射20min,1次/d,共7d。Pioglitazone组的软骨细胞在含有100μM吡格列酮培养基中连续培养7d。于第7天应用CCK-8检测各组软骨细胞增殖活性,免疫细胞化学染色法检测各组软骨细胞的II型胶原(COL2)的表达情况,ELISA技术检测胰岛素生长因子1(IGF-1)、前列腺素E2(PGE2)的表达水平,RT-PCR和Western blot技术检测mTOR mRNA表达水平和蛋白含量。结果:①免疫细胞化学染色:正常组软骨细胞内的COL2表达较LPS组高($P<0.05$)。②CCK-8:100μM吡格列酮对软骨细胞的增殖作用较1μM,10μM,50μM吡格列酮强($P<0.05$)。③ELISA:与LPS组相比,Pioglitazone组和LIPUS组的软骨细胞IGF-1表达水平均上升($P<0.05$),并且LIPUS组较Pioglitazone组上升明显($P<0.05$)。与LPS组相比,LIPUS组和Pioglitazone组的软骨细胞PGE2表达水平明显下降($P<0.05$);且Pioglitazone组PGE2水平较LIPUS组下降明显($P<0.05$)。④RT-PCR和Western blot:与LPS组相比,LIPUS组和Pioglitazone组的软骨细胞mTOR mRNA水平和蛋白含量明显下降($P<0.05$),且Pioglitazone组mTOR mRNA水平和蛋白含量较LIPUS组明显下降($P<0.05$)。结论:LIPUS与吡格列酮可能通过IGF-1/mTOR/PGE2信号通路上调软骨细胞IGF-1的水平,下调PGE2和mTOR的表达,加强软骨细胞自我保护作用。

【关键词】 低强度脉冲超声;吡格列酮;骨关节炎;脂多糖

【中图分类号】 R49;R681 **【DOI】** 10.3870/zgkf.2018.03.001

Effect of LIPUS and pioglitazone on IGF-1/mTOR/PGE2 pathway in LPS-induced OA chondrocytes Zhang Tingting, Li Xueping. Department of Rehabilitation Medicine, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China

【Abstract】 Objective: To investigate the protective effect of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) and pioglitazone on lipopolysaccharide (LPS)-induced OA chondrocytes through mammalian target of rapamycin (mTOR) signal. **Methods:** The normal chondrocytes were extracted from the knee of New Zealand rabbits and randomly divided into four groups: normal group, LPS group, LIPUS group (LPS+LIPUS), pioglitazone group (LPS+pioglitazone). The LIPUS group received LIPUS intervention with intensity of 40 mW/cm², 20 min every day for 7 days. The chondrocytes in pioglitazone group were incubated with pioglitazone for 7 days. On the 7th day, the proliferation of chondrocytes was measured by CCK-8 assay. The expression of type II collagen (COL2) in chondrocytes was detected by immunocytochemistry. The levels of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and prostaglandin (PG) E2 in the supernatants of chondrocytes were quantified by ELISA. The mTOR mRNA and protein expression was detected by RT-PCR and Western blot respectively. **Results:** ① Immunocytochemical staining: The expression of COL2 in chondrocytes of normal group was higher than LPS group. ② CCK-8: The proliferation of chondrocytes in 100 μM pioglitazone group was stronger than 1 μM, 10 μM, and 50 μM pioglitazone groups. ③ ELISA: Compared with LPS group, the expression of IGF-1 in pioglitazone group and LIPUS group increased with the difference being statistically significant ($P<0.05$), and the LIPUS group had a significant increase compared with the pioglitazone group. Compared with LPS group, the expression of PGE2 in LIPUS group and pioglitazone group was significantly decreased ($P<0.05$), and PGE2 level in pioglitazone group was significantly lower than that in LIPUS group. ④ RT-PCR and Western blot: Compared with LPS group, mTOR mRNA and protein ex-

基金项目:国家自然科学基金(81772437)

收稿日期:2017-12-14

作者单位:南京医科大学附属南京医院(南京市第一医院)康复医学科,南京210006

作者简介:张婷婷(1991-),女,在读硕士,主要从事骨科康复方面的研究。

通讯作者:李雪萍,lixueping6504@163.com

pression in LIPUS group and pioglitazone group was significantly decreased ($P < 0.05$), and the expression was significantly lower than that of the LIPUS group. **Conclusion:** Both LIPUS and pioglitazone can increase the level of IGF-1 of cartilage cells and decrease the expression of PEG2 and mTOR through the IGF-1/mTOR/PGE2 signaling pathway, enhance the self-protection of chondrocytes.

【Key words】 Low intensity pulsed ultrasound; Pioglitazone; Osteoarthritis; Lipopolysaccharide

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种以关节软骨基质、滑膜以及关节周围组织退变为特征,涉及生化、机械和遗传因素的复杂作用疾病^[1-2]。不仅包括细胞分解代谢反应的增加,如 II 型胶原和 I 型胶原的净分解代谢,以及细胞外基质合成反应的减少,从而使软骨关节面出现纤维化,形成基质裂缝和垂直裂隙^[3]。低强度脉冲式超声(Low intensity pulsed ultrasound, LIPUS)作为一种局部机械刺激,可增加软骨细胞的迁移率和增殖率、外基质蛋白多糖的合成以及促进骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化,具有软骨保护作用^[4-5]。吡格列酮是临床上较为常用的降糖药物,可以调节细胞内脂质代谢、能量平衡、炎症反应等^[6]。近年来研究发现吡格列酮可以激活细胞过氧化物酶体增殖剂激活受体 γ (Peroxisome proliferator activated receptors γ , PPAR γ),上调自噬相关蛋白(autophagy-related proteins, Agt)、微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)等表达,促进自噬活动,减少炎症因子的累积,起到软骨保护作用^[7-8]。研究表明,肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、多种白细胞介素(interleukin, IL)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)在体内外中被认为是软骨组织中较为常见的促炎性细胞因子^[9],这些刺激物通过刺激软骨细胞生成基质蛋白酶及其他炎症产物加速 OA 病理生理进展过程。因此,本研究通过胰岛素生长因子 1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)/雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)/前列腺素 E2(prostaglandin E2, PGE2)途径探讨吡格列酮和 LIPUS 对 LPS 诱导的 OA 软骨细胞的作用比较。

1 材料与方 法

1.1 材料 ①实验细胞:所有软骨标本均取自健康新西兰大白兔膝关节。②试剂与设备:胰蛋白酶、高糖完全 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)培养基、II 型胶原(Type II Collagen, COL2)抗体(中国 武汉博士生物工程有 限 公 司)、mTOR 抗 体、GAPDH 抗 体(Abcam 公 司)、实时聚合酶链式反应(realtime polymerase chain reaction, RT-PCR)相关试剂(美国 Invitrogen 公 司)、细胞活性检测试剂盒(Cell Counting Kit-8, CCK-8)、IGF-1、PGE2 酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay,

ELISA)试剂盒(中国 南京建成生物工程研究所)、免疫化学染色试剂盒(中国 福州迈新生物科技有限公司)、全蛋白提取试剂盒、LPS、吡格列酮(美国 sigma 公 司)、Western 电泳仪、湿式电转移槽(美国 Bio-Rad 公 司)。

1.2 方法 ①软骨细胞的分离和培养:取 24 只体质量约为 2.0~3.0kg 的健康成年雄性新西兰大白兔,从膝软骨标本表面完好部分提取正常软骨细胞。将膝软骨标本用 PBS 液冲洗 3 次并切碎至 1.0mm³ 的小碎片,移入 15ml 离心管,加入 2ml 0.25% 胰蛋白酶于 37℃ 恒温箱中消化 30min,移去胰蛋白酶液,加入 3ml 0.25% II 型胶原酶和 3ml 完全高糖 DMEM 培养基(含 10% 的胎牛血清),静置于 37℃ 恒温箱中过夜。次日,取出上清,离心 10min(转速 1200r/min),弃上清,加入完全高糖 DMEM 培养基吹打均匀后将细胞种植于培养瓶中,置于 37℃ 恒温箱中。每天用光学显微镜观察细胞生长情况,待细胞铺满瓶底 90% 左右时传代^[4]。②实验分组:选取最佳吡格列酮干预浓度:用 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M 不同浓度的吡格列酮分别干预 LPS 诱导的 OA 软骨细胞,应用 CCK-8 检测技术,测定各组软骨细胞的增殖能力,选取增殖能力最强的吡格列酮干预浓度,用于下一步研究。实验分为 4 组,每组 6 只,正常组、LPS 组、LIPUS 组(LPS+LIPUS)、吡格列酮组(LPS+100 μ M 吡格列酮, Pioglitazone 组)4 组, LIPUS 组和 Pioglitazone 组干预前 4h 给予 LPS 预处理,剂量同 LPS 组(2 μ g/ml)。③LIPUS 及吡格列酮干预软骨细胞:将 LIPUS 探头涂抹耦合剂后置 于 培 养 瓶 底 部,自 由 模 式,通 断 比 20%, 频 率 为 3MHz, 强 度 为 40mW/cm², 每 次 照 射 20min, 1 次/d, 共 7d^[10-11]。吡格列酮干预的细胞在含有 100 μ M 吡格列酮培养基中连续培养 7 天,每 2 天更换一次含有 100 μ M 吡格列酮的培养基。④LPS 诱导 OA 软骨细胞方法^[12-13]。本研究使用含 2 μ g/ml LPS 加入培养基中培养软骨细胞 4h 建立 OA 模型。

1.3 检测指标 ①CCK-8 检测增值率:取各组软骨细胞进行消化、计数,配制细胞悬液 1.2 \times 10⁵ 个/ml, 96 孔细胞培养板中每孔加入 100 μ l 细胞悬液。根据 CCK-8 试剂盒说明书进行增殖率测定。②ELISA 检测 IGF-1 和 PGE2 的浓度:取各组软骨细胞培养上清液,分别根据 ELISA 试剂盒说明书进行浓度测定。③免疫化学染色法测定 COL2 表达:每张爬片滴加 2 滴

3% H₂O₂-甲醇溶液,室温封闭 10min。滴加即用型山羊血清,室温孵育 20min。滴加 COL2 抗体(1:100 稀释)50~100ul,室温孵育 2h,PBS 浸洗 3 次。滴加增强剂,室温湿盒孵育 30min。PBS 浸洗 3 次。滴加通用型 IgG 抗体-Fab 段-HRP 多聚体 50ul,室温孵育 30min。PBS 浸洗 3 次。每张片子加 2 滴新鲜配制的二氨基联苯胺溶液。自来水冲洗,将切片放入苏木素染液,染色 10min,蒸馏水冲洗,用二甲苯浸泡 10min。晾干后在切片上加中性树胶,加盖玻片。光学显微镜下观察软骨细胞中 COL2 的表达情况,拍照保存。④免疫蛋白印迹法测定 mTOR 含量:提取细胞蛋白:取出长满软骨细胞的培养皿,去除培养液,用 PBS 洗一遍,在培养皿中加入 1ml 的裂解液,充分晃动均匀,使裂解液和细胞充分接触。在冰上裂解 20min 后用细胞刮将细胞刮下,将细胞移入 EP 管,放入 4℃ 离心机,15min,12000 转。取上清至新的 EP 管,加入 5xSDS-PAGE 蛋白上样缓冲液。混合后,放入 100℃,加热 15min。用于下一步聚丙烯酰胺凝胶电泳。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳,湿式电泳槽转膜,聚偏二氟乙烯膜在 5% 的封闭液中常温震荡封闭 2h,分别加 mTOR 抗体、GAPDH 抗体(1:1000),4℃ 孵育过夜,缓冲液洗膜 3 次,加二抗,常温孵育 2h,缓冲液洗膜 3 次,显影液显影,机器曝光。⑤RT-PCR 测定 mTOR 含量。按照 PCR 试剂盒说明书进行软骨细胞的 mTOR,GAPDH 的 RT-PCR 检测。GAPDH 作为内参基因。利用 2-ΔΔCT 法进行分析软骨细胞 mTOR 基因表达。引物信息见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

基因	引物序列	扩增片段长度(bp)
mTOR	正义:5-AAAGACGACTGGCTGGAGTG-3'	135
	反义:5-AGCAGCATTGAAGAGGTCCC-3'	
GAPDH	正义:5-AGACACGATGGTGAAGGTCG-3'	101
	反义:5-TGATGGCGACAACATCCACT-3'	

1.4 统计学方法 采用 SPSS 18.0 软件对实验数据进行统计学分析。计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常组与模型组软骨细胞比较与鉴定 免疫细胞化学染色示正常软骨细胞 COL2 染色均成阳性,细胞胞浆内有棕黄色颗粒,胞核基本无着色(图 1A)。LPS 组 LPS 诱导的软骨细胞 COL2 呈弱阳性,细胞胞浆内颗粒少且淡黄,胞核基本无着色(图 1B)。

2.2 CCK-8 证实吡格列酮促进软骨细胞增殖 与正常组相比,1uM 组软骨细胞增殖活力无明显变化,

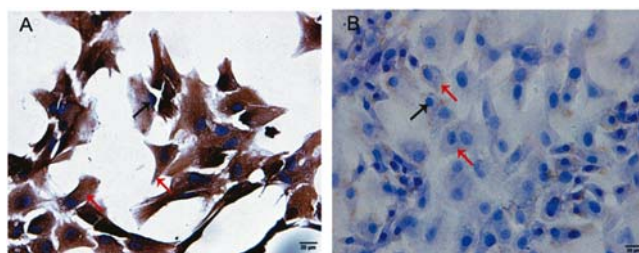


图 1A 正常组软骨细胞 COL2 染色形态学表现(×400)

图 1B LPS 组软骨细胞 COL2 染色形态学表现(×400)
(软骨细胞核用黑色箭头表示,细胞内外所表达的 COL2 染色阳性用红色箭头表示)

10uM 组,50uM 组,100uM 组软骨细胞增殖活力较强(均 $P < 0.05$)。其中,100uM 组软骨细胞增殖活力较 10uM、50uM 组强(均 $P < 0.05$)(图 2A)。因此,本研究选取 100uM 吡格列酮与 LIPUS 进行研究对比。

2.3 ELISA 证实吡格列酮和 LIPUS 对 LPS 诱导的 OA 软骨细胞 IGF-1、PGE2 的表达作用 干预后,与正常组相比,LPS 组的 IGF-1 表达水平明显降低($P < 0.05$),而 LIPUS 组的 IGF-1 表达水平明显上升($P < 0.05$),而 Pioglitazone 组无明显变化。与 LPS 组相比,Pioglitazone 组和 LIPUS 组的软骨细胞 IGF-1 表达水平均上升(均 $P < 0.05$)。与 LIPUS 组相比,Pioglitazone 组 IGF-1 水平明显下降($P < 0.05$)(图 2B)。与正常组对比,其余各组 PGE2 均升高,但仅 LPS 组和 LIPUS 组差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与 LPS 组相比,LIPUS 组和 Pioglitazone 组的软骨细胞 PGE2 表达水平明显下降(均 $P < 0.05$);与 LIPUS 组相比,Pioglitazone 组 PGE2 明显下降($P < 0.05$)(图 2C)。

2.4 RT-PCR 和 Western blot 证实 LIPUS、吡格列酮对 LPS 诱导的 OA 软骨细胞 mTOR 的作用 干预后,与正常组对比,LPS 组和 LIPUS 组软骨细胞 mTOR mRNA 水平和蛋白含量均升高(均 $P < 0.05$),Pioglitazone 组的软骨细胞 mTOR mRNA 水平和蛋白含量降低(均 $P < 0.05$);与 LPS 组相比,LIPUS 组和 Pioglitazone 组的软骨细胞 mTOR mRNA 水平和蛋白含量明显下降(均 $P < 0.05$);与 LIPUS 组相比,Pioglitazone 组 mTOR mRNA 水平和蛋白含量明显下降(均 $P < 0.05$)(表 2,图 3,图 4)。

表 2 各组软骨细胞 mTOR 蛋白 Western blot 检测结果比较 $\bar{x} \pm s$

组别	n	mTOR
正常组	6	0.37 ± 0.05
LPS 组	6	0.82 ± 0.10 ^a
LIPUS 组	6	0.66 ± 0.05 ^{ab}
Pioglitazone 组	6	0.22 ± 0.02 ^{abc}

与正常组比较,^a $P < 0.05$;与 LPS 组比较,^b $P < 0.05$;与 LIPUS 组比较,^c $P < 0.05$

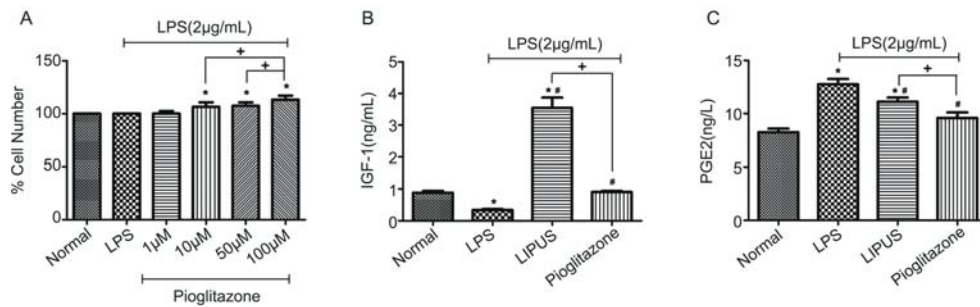


图2 各组软骨细胞增殖活力以及 IGF1、PGE2 表达水平

(* 表示与正常组比较, $P < 0.05$, # 表示与 LPS 组比较, $P < 0.05$, + 表示与 Pioglitazone 组比较, $P < 0.05$)

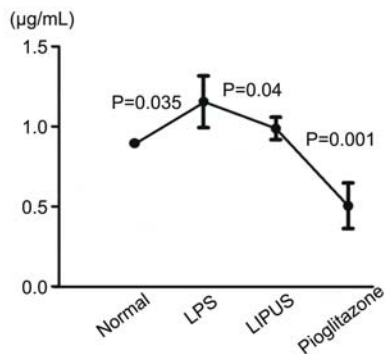


图3 RT-PCR 检测各组软骨细胞 mTOR 的 mRNA 表达水平比较

(所有数据均以 GAPDH 为参数)

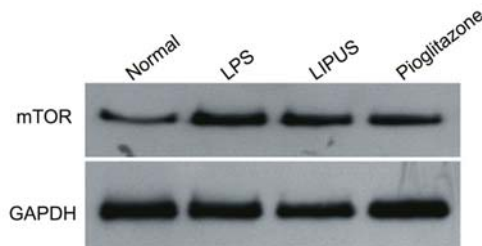


图4 Western blot 检测各组软骨细胞 mTOR 蛋白含量比较

(所有数据均以 GAPDH 为参数)

3 讨论

本研究结果显示, LIPUS 可以增加 LPS 诱导的 OA 软骨细胞 IGF-1 的表达增高, 且作用较吡格列酮强。IGF-1 作为软骨细胞的合成性细胞因子, 是各种生长因子中第一个被确认对关节软骨中有分泌调节作用的细胞因子, 发挥合成代谢作用, 在促进细胞的生存、生长和代谢中起着至关重要的作用, 其分泌减少与 OA 的发生发展密切相关^[14-15]。IGF-1 在软骨组织工程研究中起到相当重要的角色, 主要与抑制软骨细胞内多个信号通路, 如: 磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphoinositide 3-kinases, PI3K)/ 蛋白激酶(Akt)/mTOR 和 Ras/Raf-1/ERK 信号通路, 通过有丝分裂、抗凋亡作用和刺激软骨细胞外基质的合成有关^[16-17]。Li 等^[18]用 3D 技术培养体外软骨细胞证明 IGF-1 可以促进 COL2 的表达, 并且认为 $\leq 100\text{ng/ml}$ 的 IGF-1 可以促进关节软骨细胞增

殖, 呈剂量依赖性。Ikeda 等^[19]将 IGF-1 基因转染到人滑膜间充质干细胞, 发现其成软骨能力、增殖能力均明显增强, 并且呈现出高营养和成骨特性, 极大的促进了对受损软骨细胞的修复作用。研究者用吡格列酮治疗 30 例胰岛素抵抗的多囊卵巢综合征患者后发现血清 IGF-1 水平显著增加, 这可能与直接或间接改善胰岛素敏感性有关^[20]。而关于 LIPUS 对软骨细胞 IGF-1 的影响研究甚少, LIPUS 可以上调骨髓来源的 ST2 细胞的骨钙蛋白和 IGF-1, 并刺激 ST2 细胞的向软骨细胞分化^[21]。Tang 等^[22]利用超声微泡转染 IGF-1cDNA 至软骨细胞提高大鼠跟腱损伤愈合速度。

本研究结果显示, LIPUS 可以降低 LPS 诱导的 OA 软骨细胞 PGE2 的表达增高, 但吡格列酮作用较 LIPUS 强。PGE2 被认为是骨关节炎的促炎症细胞因子和分解代谢介质, 可以促进基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinases, MMPs)的合成, 抑制 COL2 和蛋白多糖的生成, 从而改变软骨基质修复和降解的平衡状态, 加重关节退化和临床症状^[23]。王涛等^[24]使用聚焦超声单次治疗慢性软组织 30min 后出现受损组织的 PGE2 含量降低, 提示超声可以较快缓解组织炎症。而在成骨细胞中, LIPUS 可以导致 PGE2 的释放增加以及环氧合酶的表达上调^[25]。Chen 等^[26]用高糖诱导人软骨细胞 PGE2, IL-6, MMP-13 高表达, 但这些被吡格列酮所逆转, 且呈剂量依赖性。

mTOR 是一种存在于哺乳动物中的 Ser/Thr 激酶, 阻断各种对软骨细胞的生长刺激信号, 负性调控软骨细胞的生长代谢, 参与 OA 的病理学进展^[27-28]。超声治疗可以选择性抑制巨噬细胞磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)/mTOR 信号通路起到抑制炎症、抗凋亡、抗脂质聚集作用^[29]。而吡格列酮通过 PPAR α 和 PPAR γ 依赖性自噬途径增加细胞脂肪分解, β -氧化和自噬减轻肝脏脂肪变性^[30]。本研究结果显示, LIPUS 和吡格列酮分别可以减少 LPS 诱导的 OA 软骨细胞 mTOR 的表达。因此, 我们猜测 LIPUS 和吡格列酮可能通过抑制 IGF-1/mTOR/PGE2 信号途径减轻软骨细胞炎症反应, 促进受损软骨组织修复,

阻断关节软骨退变或骨关节炎的发生^[31]。

综上所述,LIPUS 和吡格列酮可能通过 IGF-1/mTOR/PGE2 信号通路上调 LPS 诱导的 OA 软骨细胞 IGF-1 的表达,同时抑制 PGE2 表达,起到 OA 软骨细胞保护作用。LIPUS 促进 LPS 诱导的 OA 软骨细胞 IGF-1 的表达作用较吡格列酮强,而吡格列酮抑制 PGE2 的表达作用较 LIPUS 强。

【参考文献】

- [1] Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, et al. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2005, 64(9):1263-1267.
- [2] Goldring MB, Goldring SR. Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 119(2): 230-237.
- [3] Antoniou J, Steffen T, Nelson F, et al. The human lumbar intervertebral disc: evidence for changes in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration[J]. *J Clin Invest*, 1996,98(4):996-1003.
- [4] 夏鹏,李雪萍,林强,等.低强度脉冲超声对兔膝骨性关节炎软骨细胞整合素-局部粘着斑激酶-促分裂原活化蛋白激酶力化学转导通路相关蛋白表达的影响[J].*中华物理医学与康复杂志*,2014,36(3):165-170.
- [5] Uddin SM, Richbrough B, Ding Y, et al. Chondro-protective effects of low intensity pulsed ultrasound[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016,24(11):1989-1998.
- [6] Li Y, Zhang Y, Chen C, et al. Establishment of a rabbit model to study the influence of advanced glycation end products accumulation on osteoarthritis and the protective effect of pioglitazone[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016,24(2):307-314.
- [7] Hsiao PJ, Chiou HC, Jiang HJ, et al. Pioglitazone Enhances Cytosolic Lipolysis, beta-oxidation and Autophagy to Ameliorate Hepatic Steatosis[J]. *Sci Rep*, 2017,7(1):9030-9037.
- [8] Cheng NT, Meng H, Ma LF, et al. Role of autophagy in the progression of osteoarthritis: The autophagy inhibitor, 3-methyladenine, aggravates the severity of experimental osteoarthritis[J]. *Int J Mol Med*, 2017,39(5):1224-1232.
- [9] Nguyen QT, Jacobsen TD, Chahine NO. Effects of Inflammation on Multiscale Biomechanical Properties of Cartilaginous Cells and Tissues[J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2017,3(11):2644-2656.
- [10] 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.
- [11] 瞿燕萍,程凯,林强.低强度脉冲超声经整合素-FAK-p38 MAPK 通路对膝关节脂肪垫共培养下软骨细胞的影响[J].*中华物理医学与康复杂志*,2017,39(4):241-246.
- [12] Campo GM, Avenoso A, Campo S, et al. Molecular size hyaluronan differently modulates toll-like receptor-4 in LPS-induced inflammation in mouse chondrocytes[J]. *Biochimie*, 2010,92(2):204-215.
- [13] Campo GM, Avenoso A, Campo S, et al. Purified human plasma glycosaminoglycans reduced NF-kappaB activation, pro-inflammatory cytokine production and apoptosis in LPS-treated chondrocytes[J]. *Innate Immun*, 2008,14(4):233-246.
- [14] Tuncel M, Halici M, Canoz O, et al. Role of insulin like growth factor-I in repair response in immature cartilage[J]. *Knee*, 2005,12(2):113-119.
- [15] Blunk T, Sieminski AL, Gooch KJ, et al. Differential effects of growth factors on tissue-engineered cartilage[J]. *Tissue Eng*, 2002,8(1):73-84.
- [16] 任莎莎,李雪萍,林强,等.低强度脉冲超声经 PI3K/Akt 通路调控兔膝骨性关节炎软骨细胞凋亡的作用机制研究[J].*中国康复*,2015,30(2):83-87.
- [17] Cailotto F, Bianchi A, Sebillaud S, et al. Inorganic pyrophosphate generation by transforming growth factor-beta-1 is mainly dependent on ANK induction by Ras/Raf-1/extracellular signal-regulated kinase pathways in chondrocytes[J]. *Arthritis Res Ther*, 2007,9(6):122-129.
- [18] Li Y, Fan Q, Jiang Y, et al. Effects of insulin-like growth factor 1 and basic fibroblast growth factor on the morphology and proliferation of chondrocytes embedded in Matrigel in a microfluidic platform[J]. *Exp Ther Med*, 2017,14(3):2657-2663.
- [19] Ikeda Y, Sakaue M, Chijimatsu R. IGF-1 Gene Transfer to Human Synovial MSCs Promotes Their Chondrogenic Differentiation Potential without Induction of the Hypertrophic Phenotype[J]. 2017,20(7):58041-58047.
- [20] Glinborg D, Stoving RK, Hagen C, et al. Pioglitazone treatment increases spontaneous growth hormone (GH) secretion and stimulated GH levels in polycystic ovary syndrome[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005,90(10):5605-5612.
- [21] Naruse K, Mikuni-Takagaki Y, Azuma Y, et al. Anabolic response of mouse bone-marrow-derived stromal cell clone ST2 cells to low-intensity pulsed ultrasound[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000,268(1):216-220.
- [22] Tang Y, Leng Q, Xiang X, et al. Use of ultrasound-targeted microbubble destruction to transfect IGF-1 cDNA to enhance the regeneration of rat wounded Achilles tendon in vivo[J]. *Gene Ther*, 2015,22(8):610-618.
- [23] Koch B, Baum W, Burmester GR, et al. [Prostaglandin E2, interleukin 1 and gamma interferon production of mononuclear cells of patients with inflammatory and degenerative joint diseases][J]. *Z Rheumatol*, 1989,48(4):194-199.
- [24] 王涛,苏静,陈文直,等.聚焦超声单次治疗慢性软组织损伤兔局部肌组织前列腺素 E2、pH 值以及血浆 β-内啡肽的变化[J].*中国组织工程研究与临床康复*,2008,12(13):2451-2454.
- [25] Kokubu T, Matsui N, Fujioka H, et al. Low intensity pulsed ultrasound exposure increases prostaglandin E2 production via the induction of cyclooxygenase-2 mRNA in mouse osteoblasts[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999,256(2):284-287.
- [26] Chen YJ, Chan DC, Lan KC, et al. PPARgamma is involved in the hyperglycemia-induced inflammatory responses and collagen degradation in human chondrocytes and diabetic mouse cartilages[J]. *J Orthop Res*, 2015,33(3):373-381.
- [27] Carames B, Taniguchi N, Otsuki S, et al. Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage, and its aging-related loss is linked with cell death and osteoarthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2010,62(3):791-801.
- [28] 王浩,曹飞,斯海波,等.雷帕霉素调控自噬在骨关节炎软骨细胞退变中的机制研究[J].*中华骨与关节外科杂志*,2017,10(3):248-253.
- [29] 王和峰,翟纯刚,庞文会,等. PI3K/Akt/mTOR 信号通路在巨噬细胞自噬及动脉粥样硬化斑块不稳定中的作用[J].*中国病理生理杂志*,2013,29(3):390-397.
- [30] Zheng L, Li Y, Li X, et al. Combination of Hydroxyl Acetylated Curcumin and Ultrasound Induces Macrophage Autophagy with Anti-Apoptotic and Anti-Lipid Aggregation Effects[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016,39(5):1746-1760.
- [31] Ouyang J, Jiang H, Fang H, et al. Isoimperatorin ameliorates osteoarthritis by downregulating the mammalian target of rapamycin C1 signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2017,16(6):9636-9644.