

游泳运动对大鼠膝关节骨关节炎 内质网应激 PERK 表达的影响

谢冰¹, 肖乐¹, 刘超¹, 李元¹, 孔瑛²

【摘要】 目的:通过研究游泳运动对内质网应激 PERK 表达的影响,探讨游泳运动治疗膝关节骨关节炎可能的作用机制。方法:将雄性健康 SD 大鼠 24 只随机分为空白对照组(A组)、假手术组(B组)、模型对照组(C组)和游泳运动组(D组),每组 6 只。A 组笼内自由活动 8 周,B 组假手术后笼内自由活动 8 周,C 组造模后笼内自由活动 8 周,D 组造模后笼内自由活动 4 周后进行游泳训练 4 周。治疗结束后处死大鼠,观察关节内情况,并进行大体评分,行 HE 染色及甲苯胺蓝染色,进行改良 Mankin 评分,免疫组化法检测 PERK 的表达。结果:大体观察及评分、HE 染色、甲苯胺蓝染色显示 C、D 组关节软骨损伤程度较 A 组严重,C、D 组与 A 组评分比较明显增高($P<0.05$);B 组与 A 组比较差异无统计学意义;D 组与 C 组比较评分降低($P<0.05$)。PERK 的表达 C、D 组较 A、B 组增高($P<0.05$);D 组较 C 组 PERK 阳性细胞数降低($P<0.05$);B 组与 A 组比较差异无统计学意义。结论:游泳运动可对膝关节骨关节炎起治疗作用,其作用机制之一可能是通过减少 PERK 的表达,降低内质网应激,减少软骨细胞凋亡实现的。

【关键词】 游泳运动;骨关节炎;PERK;内质网应激

【中图分类号】 R49;R681.5 **【DOI】** 10.3870/zgkf.2018.05.001

Effect of swimming exercise on expression of protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) as a signaling pathway of endoplasmic reticulum stress in rats with knee osteoarthritis Xie Bing, Xiao Le, Liu Chao, et al. Department of Rehabilitation Medicine, the First Hospital of Changsha, Changsha 410001, China

【Abstract】 Objective: To study the possible mechanism of swimming exercise for knee osteoarthritis by investigating the expression of swimming exercise on the expression of protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) as a signaling pathway of endoplasmic reticulum stress. **Methods:** Sprague-Dawley rats were randomly divided into a normal group (group A), sham operation group (group B), model control group (group C), and swimming exercise group (group D). Rats in group A were allowed for free activities in their cage for 8 weeks, and rats in groups B and C were allowed for free activities in their cage for 8 weeks after the sham operation and experimental operation, respectively. Rats in group D were allowed for free activities for 4 weeks after the operation and then underwent swimming exercises for 4 weeks. The cartilage changes, hematoxylin-eosin (HE) staining, toluidine blue staining, immunohistochemical staining, Mankin's grade, gross scores, and the PERK contents in chondrocytes were compared among the groups. **Results:** Cartilage degradation was more severe in groups C and D than in group A as shown by gross observation, gross scores, HE staining, and toluidine blue staining ($P<0.05$). No significant differences were noted between groups A and B. The changes in group D were significantly less severe than those in group C ($P<0.05$). Immunohistochemical staining showed that the expression of PERK in articular cartilage was higher in groups C and D than in groups A and B ($P<0.05$), and lower in group D than in group C ($P<0.05$). **Conclusion:** Swimming exercise can promote the repair of articular cartilage possibly by reducing the expression of PERK, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis rate of chondrocytes.

【Key words】 Swimming; Osteoarthritis; protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase; Endoplasmic reticulum stress

基金项目:国家自然科学基金项目(81201503)

收稿日期:2017-05-11

作者单位:1. 长沙市第一医院康复医学科,长沙 410001;2. 中南大学湘雅二医院,长沙 410001

作者简介:谢冰(1988-),女,住院医师,主要从事骨关节康复方面的研究。

通讯作者:孔瑛,82909546@qq.com

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种常见的慢性进行性肌肉骨骼疾病,以关节软骨退变,软骨下骨硬化,关节边缘骨赘形成为主要特征,使人们的生活质量

下降,给家庭、社会带来了严重的负担。在骨关节炎的发生发展过程中,软骨细胞的凋亡起了重要的作用^[1-2]。骨关节炎病变过程中,软骨细胞凋亡显著增多,软骨细胞大量减少,同时伴有细胞外基质降解,最终导致关节软骨的退变^[3]。引起软骨细胞凋亡的原因有很多种,而通过内质网应激介导的软骨细胞凋亡是目前研究的热点^[4]。已有大量的研究证明骨关节炎患者及大鼠均可见内质网应激引起的软骨细胞的凋亡^[5-6]。而蛋白激酶样内质网激酶(protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)被认为是内质网应激发生的标志^[7]。通过研究骨关节炎内质网应激 PERK 的表达情况,可进一步明确 PERK 在关节软骨退变中的作用,并为骨关节炎的防治提供新的方向及新靶点。

目前治疗骨关节炎的方法有很多种,而游泳运动被认为对骨关节炎的治疗起重要作用^[8]。然而目前对于游泳对骨关节炎的具体作用机制还不明确。本研究通过制造大鼠膝关节骨关节炎模型,同时进行游泳训练,探讨游泳对内质网应激 PERK 表达的影响,明确游泳能否通过影响内质网应激 PERK 的表达,减少软骨细胞凋亡,从而保护关节软骨,防止关节软骨退化,进而明确游泳的治疗效果,为指导进行正确的康复训练提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 ①实验动物与分组:实验动物由湖南省人民医院动物实验室提供的雄性健康 Sprague-Dawley (SD)大鼠 24 只,6~8 周龄,体质量 220~260g。各鼠分笼饲养,进食及饮水符合实验动物标准。适应性饲养 3d 后,采用随机数字表法将大鼠分为空白对照组(A 组)、假手术组(B 组)、模型对照组(C 组)和游泳运动组(D 组),每组 6 只。大鼠笼内自由活动,所有动物均选取右膝关节为实验侧。②主要实验仪器与试剂:游泳池(由湖南省人民医院动物实验中心提供,长 70cm,宽 70cm,高 100cm)、PERK 抗体[兔抗大鼠,浓度(1:50),货号:Sc-13073, Santa Cruz 生物公司]、二抗试剂盒: rabbit ABC staining system[浓度约为 1μg/ml, (货号:Sc-2018, Santa Cruz 生物公司)]。

1.2 方法 ①骨关节炎模型的建立:称重后,10%水合氯醛(0.3ml/100g)腹腔注射麻醉大鼠,备皮消毒后沿髌韧带内侧缘切开皮肤,显露膝关节后将髌骨外翻,打开关节囊,分离前交叉韧带并剪断,行抽屉实验验证是否成功。分离内侧半月板并切除内侧前部半月板。生理盐水冲洗关节腔后逐层缝合,络合碘擦洗伤口,手术当天及术后第 1、2 天肌肉注射 8 万 U 青霉素预防

感染。假手术组只打开关节腔暴露前交叉韧带及半月板后即缝合。待 SD 大鼠清醒后按编号分笼,让其自由活动及进食,同时观察大鼠一般情况并记录。②分组处理:A 组,笼内自由活动 8 周,不予特殊处理;B 组,假手术后笼内自由活动 8 周,不予治疗;C 组,造模后笼内自由活动 8 周,不予治疗;D 组,造模笼内自由活动 4 周后进行游泳训练,每日 1 次,每次 30min,连续 4 周。

1.3 标本采集与处理 ①标本的采集与处理:治疗结束后断颈处死大鼠,切开实验侧膝关节,显露关节软骨,观察关节内软组织、滑膜、关节液、关节软骨等情况,并进行大体评分。观察完毕后,取内侧胫骨端软骨下 2cm 固定、脱钙、包埋切片后作甲苯胺蓝、HE 染色及免疫组织化学染色以进行组织学观察。②软骨病理学观察:打开关节腔后肉眼观察胫骨关节软骨面的大体形态,并按照大体评分标准进行评分^[9],评分越高表明关节软骨损伤越重。③组织学观察:观察 HE 染色及甲苯胺蓝染色结果,评价软骨形态、细胞数量、基质染色、及潮线完整性等情况,采用双盲法对标本按关节软骨光镜改良 Mankin 评分标准^[10]进行评分,评分越高,表明关节软骨损伤越重。④免疫组织化学观察:进行免疫组织化学染色,石蜡切片 60℃ 恒温烤箱烘烤 2h,常规脱蜡至水,3%的过氧化氢灭活内源性的过氧化物酶;滴加胃蛋白酶,37℃ 孵育;滴加透明质酸酶,37℃ 孵育;山羊血清封闭,室温孵育,滴加 PERK 一抗(1:50)50μl,4℃ 冰箱过夜,复温后滴加生物素化二抗工作液 50μl,37℃ 温箱孵育;辣根过氧化物酶标记的链卵白素工作液 37℃ 孵育;二氨基联苯胺染色,镜下控制显色时间;苏木素复染,脱水,透明,中性树脂封片。观察免疫组织化学染色结果,用中倍(×200)镜观察软骨细胞 PERK 的胞浆着色情况。PERK 阳性细胞表现为软骨细胞胞浆呈棕黄色染色。计算阳性率:采用 IPP(Image-Pro Plus6.0)图像分析软件进行分析,测其平均光密度值。每张切片中倍(×200)镜下随机取 5 个视野,分别对各组之间的平均光密度值进行比较。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大体观察及评分 ①大体观察。A 组:软骨表面色泽明亮,为半透明状,光滑,无裂隙、溃疡及破损,轮廓清晰,关节滑膜平整光滑,关节液清亮,关节内无粘连(图 1-a)。B 组:软骨表面色泽较正常组稍暗,为半

透明状,光滑,无裂隙,关节滑膜少有粘连,关节液稍黄,关节内有粘连(图 1-b)。C 组:软骨表面呈灰白色,不透明,软骨面粗糙,凹凸不平,软骨面可见明显的裂隙、糜烂、溃疡,软骨下骨暴露,部分关节边缘可见骨赘形成。关节囊增厚,滑膜不同程度增生、粘连,部分可见滑膜囊肿。关节液浑浊,色泽较黄,关节腔内粘连(图 1-c)。D 组:软骨表面色泽稍暗,透明度下降,软骨表面稍有不平,可见裂隙、溃疡及破损,无骨赘及软骨下骨暴露。滑膜稍有增生,未见囊肿。关节液稍黄,关节腔内有粘连(图 1-d)。

②大体评分:B 组与 A 组比较差异无统计学意义;C、D 组与 A 组比较评分明显增高($P<0.05$);D 组与 C 组比较评分降低($P<0.05$)。见表 1。



图 1a-d 膝关节软骨肉眼观察

表 1 4 组大鼠膝关节软骨大体评分比较 分, $\bar{x} \pm s$

组别	n	大体评分
A 组	6	0
B 组	6	0.1667 ± 0.4083
C 组	6	2.8333 ± 0.7528^a
D 组	6	1.3333 ± 0.5164^{ab}

与 A 组比较, $^a P<0.05$; 与 C 组比较, $^b P<0.05$

2.2 关节软骨光镜下观察及改良 Mankin 评分 ① HE 染色及甲苯胺蓝染色。A 组:软骨表面光滑,细胞排列有序,数目正常,HE 染色软骨基质着色均匀,潮线完整,甲苯胺蓝着色深蓝,染色均匀,无基质失染(图 2-a,图 3-a)。B 组:软骨表面光滑,软骨细胞分布均匀,排列有序,形态正常,甲苯胺蓝着色染色稍有不均,无基质失染(图 2-b,图 3-b)。C 组:软骨表面不规则,部分区域有绒毛,有裂隙,细胞排列紊乱,数目减少,簇集现象明显,周围出现大小不等的空陷窝,潮线模糊、断裂,甚至消失,甲苯胺蓝染色全层基本失染,尤其以表层为重(图 2-c,图 3-c)。D 组:软骨表面较规则,软骨细胞分布欠均匀,排列稍紊乱,可见少量软骨细胞簇,细胞数目稍减少,潮线较完整,甲苯胺蓝染色稍有

不均,表中层可见基质失染(图 2-d,图 3-d)。②各组关节软骨改良 Mankin 评分:B 组与 A 组比较差异无统计学意义;C、D 组与 A 组比较评分明显增高($P<0.05$);D 组与 C 组比较评分明显降低($P<0.05$)。见表 2。

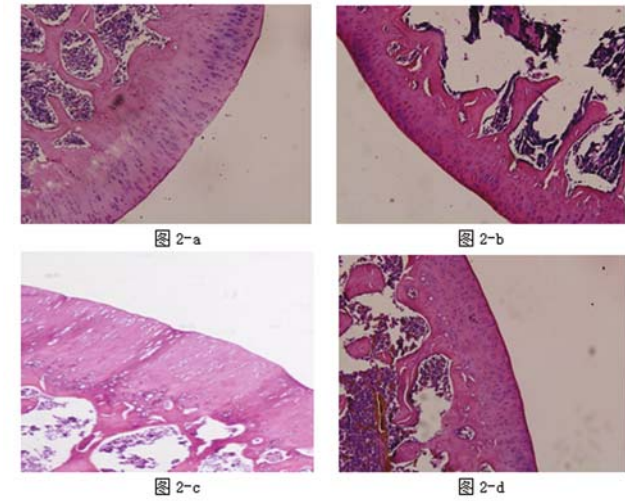


图 2a-d 各组大鼠软骨 HE 染色($\times 100$)

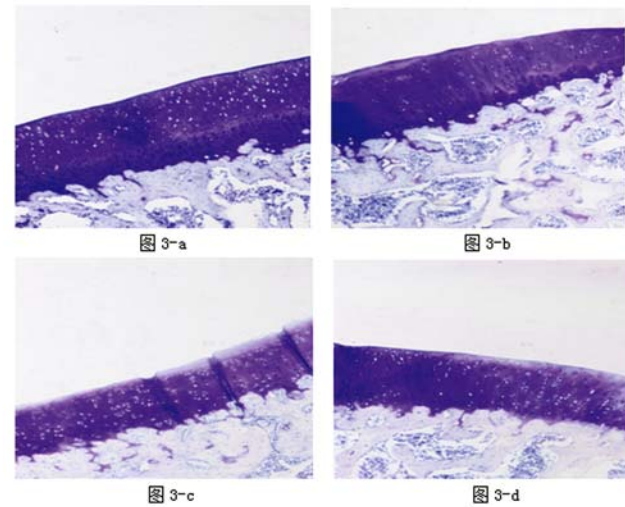


图 3a-d 各组大鼠软骨甲苯胺蓝染色($\times 100$)

表 2 4 组大鼠膝关节软骨改良 Mankin 评分比较 分, $\bar{x} \pm s$

组别	n	Mankin 评分
A 组	6	0
B 组	6	0.5000 ± 0.8367
C 组	6	7.6667 ± 1.0328^a
D 组	6	2.6667 ± 0.8165^{ab}

与 A 组比较, $^a P<0.05$; 与 C 组比较, $^b P<0.05$

2.3 免疫组织化学染色结果 ①软骨细胞 PERK 的胞浆着色情况。PERK 阳性细胞表现为软骨细胞胞浆呈棕黄色染色。采用 IPP 图像分析软件进行分析,测其平均光密度值。A 组:表层偶见少量 PERK 阳性细胞(图 4-a)。B 组:表层可见少量的 PERK 阳性细胞(图 4-b)。C 组:全层有散在分布的 PERK 阳性细胞,尤以表层及中层多见(图 4-c)。D 组:表中层可见散在的 PERK 阳性细胞,较 C 组少(图 4-d)。②各组大鼠

膝关节软骨 PERK 平均光密度值比较: B 组与 A 组比较, PERK 阳性细胞数差异无统计学意义; C、D 组与 A 组比较, PERK 阳性细胞数明显增高 ($P < 0.05$); D 组与 C 组比较, PERK 阳性细胞数降低 ($P < 0.05$)。见表 3。

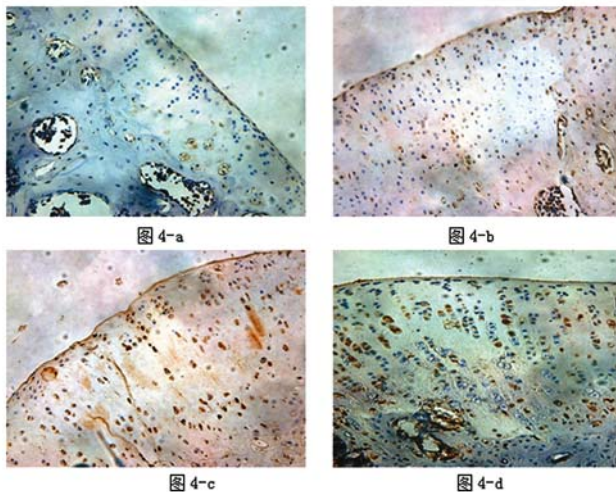


图 4a-d 各组大鼠软骨 PERK 免疫组化染色 ($\times 200$)

表 3 4 组大鼠膝关节软骨 PERK 平均光密度值比较

组别	n	PERK 平均光密度值
A 组	6	0
B 组	6	0.0041 ± 0.0030
C 组	6	0.0701 ± 0.0206^a
D 组	6	0.0200 ± 0.0026^{ab}

与 A 组比较, $^a P < 0.05$; 与 C 组比较, $^b P < 0.05$

3 讨论

随着我国社会人口的老龄化, 骨关节炎引起疼痛及活动受限给社会经济带来了很大的负担, 目前对于人类骨关节炎的发病机制尚不明确, 且无有效的治疗方法, 因此研究有效的治疗骨关节炎的方法越来越迫切。目前骨关节炎的常用的治疗方法包括: 运动治疗、药物治疗、理疗、手术等^[11-12], 而水中运动被强烈推荐用于骨关节炎的治疗^[8]。游泳运动是一种常见的水中运动, 能提高心肺功能及身体素质, 延缓关节退变^[13-14]。同时由于水的浮力可减少运动时由于体重因素造成的对关节的不利影响, 与跑步、骑车等陆地运动相比, 游泳时关节软骨所承受的压力更小, 关节软骨损伤更小^[15]。然而目前对于游泳对骨关节炎的具体作用机制还不明确。基于上述原因, 我们通过制造大鼠骨关节炎模型, 研究游泳训练对关节软骨退化的影响。

研究证明内质网应激介导的软骨细胞凋亡在骨关节炎的发生发展过程中起了重要的作用^[1-2]。发生内质网应激时, PERK 通路是最先激活也是最重要的通

路^[16-17]。PERK 激活后, 阻断错误折叠蛋白的合成, 减少了内质网的负担, 维持了内质网平衡, 使内环境恢复稳态, 挽救损伤的细胞, 促进细胞存活^[18]。但是太强或者太长的内质网应激会激发细胞内的凋亡传导通路, 使细胞发生凋亡。已有研究证明, 在 OA 的关节软骨中, PERK 的表达增加, 且表达水平与骨关节炎严重程度密切相关, 随着 OA 程度的增加而增加^[5]。虽然 PERK 在骨关节炎中的作用已经得到了证实, 但能否通过影响 PERK 的表达对骨关节炎起到治疗作用仍需要充分的研究。本研究中, 通过检测 PERK 探讨游泳运动能否通过影响 PERK 的表达而对骨关节炎关节软骨的退化起保护作用, 从而对骨关节炎起治疗作用。

本研究证实了内质网应激中 PERK 的表达可能与骨关节炎的发生发展密切相关。本研究结果显示: A、B 组仅有少量 PERK 的表达, 而 C 组 PERK 表达明显增多, 与 A 组相比, 差异有统计学意义, 而 C 组的实验结果均显示关节软骨的退化程度较 A 组明显严重, 说明前交叉韧带切断联合内侧半月板部分切除能成功制造骨关节炎模型, 引起关节软骨的损害, 且骨关节炎的发生可能与 PERK 的表达增加密切相关。提示骨关节炎大鼠中可能存在内质网应激, PERK 表达增加, 使软骨细胞发生凋亡, 从而使关节软骨退化。

本研究认为游泳运动可能通过降低 PERK 的表达对骨关节炎起治疗作用。本实验结果显示: 游泳运动治疗后, D 组与 C 组相比, PERK 的表达水平明显下降, 而 D 组的实验结果均显示关节软骨的退化程度较 C 组明显减轻, 提示游泳可以延缓关节软骨的退变, 对骨关节炎起治疗作用, 其作用机制可能为降低内质网应激, 减少 PERK 表达, 减少相关性软骨细胞凋亡, 从而保护软骨细胞, 减轻关节软骨退化。但是游泳运动具体如何使 PERK 表达下降, 而 PERK 通过何种途径影响软骨细胞凋亡、防止软骨退化还不得而知。D 组与 A 组比较, 大体评分、改良 Mankin 评分、PERK 的表达均升高, 差异有统计学意义, 提示每天一次, 每次 30min, 连续 28d 的游泳训练尚不能使骨关节炎关节软骨的损害恢复正常, 使 PERK 的表达降至正常。因此能否通过延长每次训练的时间及治疗周期以改善治疗效果还值得进一步研究。

通过本研究发现, 游泳运动可对骨关节炎可起治疗作用, 其作用可能是通过降低内质网应激 PERK 的表达实现。然而本实验仅选择了每日 1 次, 1 次 30min, 总共 4 周的游泳运动为实验组, 对于更多不同的游泳运动时间、运动频率、运动周期对关节软骨的影响等问题需在今后的实验中进一步探讨研究, 另外, 由

于实验人力、物力、财力等方面的原因,同时动物实验过程中死亡或其他意外发生较多,本实验样本量较小,今后的实验可扩大样本量,同时从关节液、滑膜、软骨下骨及血清学指标的变化等多方面评定、验证疗效,使结果更具有说服力。因内质网应激发生 PERK 表达增加后具体的作用通路,以及通过何种凋亡途径、如何影响软骨细胞的凋亡也没有在实验中进行研究,在以后的实验中我们可从基因水平、细胞水平进一步探讨其具体作用机制。

【参考文献】

- [1] Teeple E, Jay GD, Elsaid KA, et al. Elsaid. Animal models of osteoarthritis: challenges of model selection and analysis[J]. The AAPS Journal, 2013, 15(2): 438-446.
- [2] Appleton CTG, Pitelka V, Henry J, et al. Global analyses of gene expression in early experimental osteoarthritis[J]. Arthritis & Rheumatism, 2007, 56(6): 1854-1868.
- [3] Aades S, Mendonca M, Santos TN, et al. Intra-articular injection of collagenase in the knee of rats as an alternative model to study nociception associated with osteoarthritis[J]. Arthritis Research & Therapy, 2014, 16(1): 10-21.
- [4] Farkas T, Bihari-Varga M, Biro T. Thermoanalytical and histological study of intra-articular papain-induced degradation and repair of rabbit cartilage. II. Mature animals[J]. Annals of the Rheumatic Diseases, 1976, 35(1): 23-26.
- [5] Galba'n CJ, Ling SM, Galba'n CJ, et al. Effects of knee injection on skeletal muscle metabolism and contractile force in rats[J]. Osteoarthritis and Cartilage, 2007, 15(5): 550-558.
- [6] Siebelt M, Groen HC, Koelewijn SJ, et al. Increased physical activity severely induces osteoarthritic changes in knee joints with papain induced sulfate-glycosaminoglycan depleted cartilage[J]. Arthritis Research & Therapy, 2014, 16(1): 32-40.
- [7] Boettger MK, Kümmel D, Harrison A, et al. Evaluation of long-term antinociceptive properties of stabilized hyaluronic acid preparation (NASHA) in an animal model of repetitive joint pain[J]. Arthritis Research & Therapy, 2011, 13(4): 110-118.
- [8] Arun O, Canbay O, Celebi N, et al. The analgesic efficacy of intra-articular acetaminophen in an experimental model of carrageenan-induced arthritis[J]. Pain Res Manag, 2013, 18(5): 63-67.
- [9] Takeshita N, Yoshimi E, Hatori C, et al. Alleviating effects of AS1892802, a Rho kinase inhibitor, on osteoarthritic disorders in rodents[J]. J Pharm Sci, 2011, 115(4): 481-489.
- [10] 吴疆, 吴龙, 马龙, 等. SOST 和 13-catenin 在不同分期膝关节炎患者软骨及软骨下骨表达的研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(6): 689-694.
- [11] Hanprasertpong N, Teekachunhatean S, Chaiwongsa R, et al. Analgesic, Anti-Inflammatory, and Chondroprotective Activities of Cryptolepis buchanani Extract: In Vitro and In Vivo Studies [J]. Biomed Res Int, 2014, 20(4): 978-982.
- [12] Gomis A, Meini S, Miralles A, et al. Blockade of nociceptive sensory afferent activity of the rat knee joint by the bradykinin B2 receptor antagonist fasetibant[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2013, 21(9): 1346-1354.
- [13] Bay-Jensen AC, Nielsen RH, Segovia-Silvestre T, et al. A microarray analysis of full depth knee cartilage of ovariectomized rats [J]. BMC Research Notes, 2011, 4(1): 63-76.
- [14] Høegh-Andersen P, Tankó LB, Andersen TL, et al. Ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoarthritis: validation and application[J]. Arthritis Research & Therapy, 2004, 6(2): 169-180.
- [15] 侯炜, 梁倩倩, 何建新, 等. 益气化瘀方对膝关节炎大鼠关节软骨退变的防治作用[J]. 中西医结合学报, 2009, 7(2): 163-167.
- [16] Wool YJ, Joo YB, Jung YO, et al. Grape seed proanthocyanidin extract ameliorates monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis [J]. Experimental and Molecular Medicine, 2011, 43(10): 561-570.
- [17] Bertolini GRF, Matos CMP, Artifon EL, et al. Functional assessment of knee nociception of rats treated with low-level laser therapy and swimming[J]. Rev Bras Med Esporte, 2011, 17(1): 45-48.
- [18] Barve RA, Minnerly JC, Weiss DJ, et al. Transcriptional profiling and pathway analysis of monosodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats: relevance to human disease[J]. Osteoarthritis and Cartilage, 2007, 15(10): 1190-1198.

作者·读者·编者

《中国康复》杂志实行网站投稿

《中国康复》杂志已经实行网上投稿系统投稿,网址 <http://www.zgkfzz.com>,欢迎广大作者投稿,并可来电咨询,本刊电话:027-69378389, E-mail:zgkf1986@163.com; kfk@tjh.tjmu.edu.cn。