

正常关节和骨关节炎软骨细胞凋亡和超微结构的研究

李雄峰 吴 猛 罗 斌 李建有 陈晓平 周国顺

摘 要 **目的** 探讨正常关节和骨关节炎(OA)软骨细胞凋亡和超微结构的变化,以及正常关节和 OA 关节软骨细胞体外培养的凋亡来分析骨关节炎可能的发病机制。**方法** 胡氏造模法制作新西兰大白兔 OA 模型,3 周后切取关节软骨,末端原位标记染色法分析正常关节软骨,骨关节炎软骨的细胞凋亡。分离关节软骨细胞体外培养,然后通过钙黄绿素和双 FITC - AI 双染色,分析软骨细胞的活力和凋亡情况,同时切取关节软骨细胞行透射电镜分析软骨细胞中一些超微结构的变化。**结果** 发现 OA 组软骨中凋亡细胞(14.32 ± 3.17)比正常组(4.54 ± 1.17)明显增多,两组间比较差异有统计学意义($t' = 15.85, P < 0.05$);而体外培养的软骨细胞中,OA 组分离的软骨细胞存在大量凋亡细胞(83.63 ± 20.11)和正常组(91.45 ± 4.70)比较,差异有统计学意义($t' = 2.07, P < 0.05$)。OA 组部分软骨细胞的活力明显增强,OA 组为 79.45 ± 3.60 ,正常组为 75.60 ± 5.33 ($t = 3.28, P < 0.01$)。在超微结构的研究中,发现大量软骨细胞内的超微结构,有明显的变化,特别是线粒体在正常组为 7.3 ± 2.3 ,而 OA 为 3.4 ± 1.7 ,明显减少,比较差异有统计学意义。OA 组染色质边缘化,空泡化和分布异常也非常明显。**结论** 在 OA 模型中,存在软骨细胞大量凋亡现象,通过超微结构现象分析凋亡细胞增多同时存在染色质的减少和分布异常,以及一些细胞小体的减少,可能和软骨细胞能量过度代谢和线粒体的减少等有密切的关系。

关键词 软骨细胞 凋亡 超微结构

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.02.024

Changes in Ultrastructure Aspects and Apoptosis of Rabbit Normal and Osteoarthritic Chondrocytes. Li Xiongfeng, Wu Meng, Luo Bin, et al. Department of Orthopedics, Huzhou Central Hospital (Zhejiang University Huzhou Hospital), Zhejiang 313000, China

Abstract Objective To compare the ultrastructure changes and apoptosis of chondrocytes in the normal and osteoarthritis articular cartilage in order to investigated the possible pathogenesis of osteoarthritis. **Methods** New Zealand rabbits, Used Hu's osteoarthritis model, detected the apoptosis of chondrocytes both in normal and model articular cartilage and isolated from normal and osteoarthritic articular cartilage cultured in vitro. The apoptosis of articular cartilage detected byTUNEL, Cultured chondrocytes were stained with calcein and Annexin V - FITC/PI to analyzed the viability and apoptosis. Transmission electron microscope(TEM) analyzed the changes of ultrastructure of chondracyte in articular cartilage. **Results** The results showed that apoptosis of cartilage in osteoarthritis group(14.32 ± 3.17) was increased much more than in normal group(4.54 ± 1.17), it had significantly different between the two groups ($t' = 15.85, P < 0.05$). The apoptotic cells stained with Annexin V - FITC/PI in osteoarthritis group (83.63 ± 20.11) was higher than in normal group (91.45 ± 4.70), it had significantly different between the two groups ($t' = 2.07, P < 0.05$). The activity of chondrocytes stained with calcein in osteoarthritis group (79.45 ± 3.60) was stronger than normal group (75.60 ± 5.33), it had significantly different between the two groups ($t = 3.28, P < 0.01$). On the ultrastructural study, we found that there were significant changes in the ultrastructure of cartilage cells, especially the mitochondria significantly reduced in osteoarthritis group(3.4 ± 1.7) compared to normal group(7.3 ± 2.3), chromatin marginalization, vacuolization and abnormal distribution could be seen in osteoarthritis group obviously. **Conclusion** Apoptosis of chondrocyte was increased in osteoarthritis accompanied the changes of ultrastructural and mitochondria reduce maybe related to abnormal energy metabolism in chondrocyte.

Key words Chondrocyte; Apoptosis; Ultrastructure

基金项目:浙江省卫生和计划生育委员会骨干人才基金资助项目(2014RCA028);浙江省实验动物平台项目(2015C37116);浙江省湖州市自然科学基金资助项目(2013YZB01)

作者单位:313000 湖州市中心医院(浙江大学湖州医院)骨科(李雄峰、吴猛、罗斌、李建有、陈晓平、周国顺);湖州市食品药品检验研究院(陈晓平)

通讯作者:周国顺,主任医师,教授,电子信箱:slinfer@126.com

骨关节炎(OA)是一种常见的关节软骨退变性疾病,有证据表明金属基质蛋白酶(MMPs)和凝血酶敏感蛋白(ADAMTS)是导致关节破坏的原因^[1]。OA的发病机制包括软骨细胞表型和细胞骨架的改变,细胞骨架也在调节细胞表型的物理作用和细胞基质之间起重要的调节作用^[2]。在笔者以往的研究中也提

示力学刺激对软骨细胞凋亡和表型稳定的影响,以及 MMPs 的对动物模型中软骨的影响^[3,4]。但目前对 OA 软骨细胞凋亡的机制尚不清楚,可能是多因素和多种凋亡机制导致。本研究旨在分析兔膝关节早期 OA 模型中,软骨细胞凋亡和软骨细胞分离培养后凋亡的情况与正常关节的对比,以及软骨细胞在透射电镜中的超微结构的变化来探讨 OA 可能的发病机制。

材料与方法

1. 实验动物和 OA 模型的建立:健康成年新西兰大白兔,雌雄不限,体重 2.0 ~ 3.0 kg,由浙江中医药大学实验动物中心提供,实验动物合格证号:SCXK(浙)2015-0004,实验期间饲养在湖州市食品药品检验研究院实验动物中心,实验过程中对动物的处置符合 2006 年科技部《关于善待实验动物的指导性意见》的规定^[5]。本次实验共取新西兰大白兔 40 只,随机分为 2 组,每组 20 只,一组为 OA 组,氯胺酮 20 mg/kg,耳缘静脉注射,参照 Hulth 等^[6]的造模方法于无菌条件下切断其左膝内侧副韧带及切除内侧半月板以及前后交叉韧带,另一组为正常组不做任何处理。术后分笼饲养,OA 组每天肌注青霉素钠 20000 U/kg,共 3 天。1 周后拆线,每天驱赶 100 米,共 3 周。

2. 实验试剂和仪器:实验使用的试剂 DMEM 高糖培养基和胰酶(美国 Gibco 公司),Ⅱ型胶原酶(美国 CalBioche 公司);标准胎牛血清(杭州四季青公司产品);Ⅰ型胶原鼠抗单克隆抗体(美国 CalBioche 公司);Ⅱ型胶原鼠抗人单克隆抗体(美国 CalBioche 公司),激光共聚焦荧光显微镜(德国 Lavision Biotec 公司),Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(美国 Invitrogen 公司),钙黄绿素试剂盒(美国 Invitrogen 公司)。

3. 关节软骨的切取:全部动物在第 3 周末取材,每组随机取 4 只兔子,苯巴比妥钠麻醉后,耳缘静脉空气注射法迅速处死,打开左侧膝关节,用锐刀片切取 1 cm × 1 cm 股骨内髁和内侧胫骨平台全层软骨,立即放入 4℃ 的 2% 戊二醛中固定,供透射电镜检测用。另取每组 10 只,将左股骨内髁软骨和内侧胫骨平台的软骨切下后放入 4% 的甲醛溶液中固定后制作成蜡块供 HE 染色和凋亡免疫组化检测用。

4. 软骨细胞的获取、分离和培养:参考周国顺等^[4]提取软骨细胞的方法,剩余的每组 6 只安乐死后的大白兔去除下肢皮毛,然后用大剪刀将整个膝关节连同软组织完整切取(必须保证关解囊完整),放入

75% 乙醇内浸泡 5 ~ 10 min,在细胞培养室的超净工作台上将关节周围软组织去除,暴露关节腔,切取关节软骨将收集的软骨组织放入盛有 PBS 的培养皿中反复漂洗 3 次,将剪碎成 0.5 ~ 1.0 mm 左右的组织块,移入 25 cm² 培养皿中,用含 100 U/ml 青霉素和 100 mg/ml 链霉素的 PBS 冲洗 3 次。加入软骨体积 0.25% 胰酶,37℃ 消化 0.5 ~ 1.0 h 后终止消化,再加入 0.2% Ⅱ型胶原酶,37℃ 消化 4 ~ 6 h,在倒置显微镜下观察,当游离出单个细胞后,加入含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液终止消化并反复吹打。将细胞团吹打成单个细胞后用 200 目滤网过滤,收集滤液,1500 r/min 离心 5 min。弃上清,加入 PBS 液,0.25% 台盼蓝染色,活细胞率 > 90% 则进行培养。原代软骨细分别以 $5 \times 10^5 / \text{cm}^3$ 的高密度接种在 25 ml 的细胞培养瓶中,当单层细胞铺满培养瓶底时用 0.25% 的胰酶加 0.02% 的 EDTA 消化用于进一步检测。

5. 常规软骨 HE 染色的制作:石蜡组织块切片以二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,入苏木素染液 5 min。入 1% 盐水乙醇溶液分化 5 s,入自来水兰化 30 s,入 1% 伊红染色 1 s。梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片观察。

6. 凋亡软骨细胞的末端原位标记染色:细胞切片常规脱蜡入水,双蒸水、PBS 洗 5 min × 3 次,20 μg/ml 蛋白酶 K 37℃ 消化 15 min,PBS 冲洗 5 min × 3 次;3% H₂O₂ - 甲醇中 25 min,PBS 冲洗 5 min × 3 次;TUNEL 反应混合液中 37℃ 90 min,PBS 洗 5 min × 3 次;5% 羊血清室温封闭 20 min;POD 37℃ 孵育 30 min,PBS 洗 5 min × 3 次;DAB 显色,充分洗涤,苏木精复染,流水中蓝化,阴性对照用 PBS 取代 TUNEL 反应液。切片脱水、封片后供观察。

7. 钙黄绿素活细胞染色:用二甲亚砷制备 1 mmol/L 的 Calcein-AM 溶液,并用 PBS 将其稀释制成 1 ~ 50 μmol/L 的 Calcein-AM 溶液。将 1/10 细胞培养基体积的 Calcein-AM 溶液加入到细胞培养基中。在 37℃ 培养细胞 15 ~ 30 min。用 PBS 或适当的缓冲液洗涤细胞两次。用 490 nm 激发波长,515 nm 发射波长的滤光片的荧光显微镜观察细胞。

8. 细胞的免疫荧光染色 Annexin V-FITC/PI 双染色:取培养后的原代软骨细胞,PBS 清洗后用 4% 多聚甲醛固定 20 min,1% Triton 穿孔 15 min,2% BSA 封闭 30 min,加入 1% BSA 稀释的 I 抗(1:100),4℃ 过夜,复温 PBS 漂洗 2 次,每次 5 min,加入 CY3 和 FITC 标记的并用 2% BSA 稀释的二抗(1:100),于 37℃ 杂

交 1h, PBS 漂洗 2 次, 每次 5min, 激光共聚焦显微镜扫描。设空白对照, 用 PBS 代替 I 抗, 其余步骤相同。在加入荧光染色剂的整个操作过程中, 注意细胞样本的避光, 以防荧光抗体淬灭而影响检测结果, 然后上机检测。

9. 透射电镜样品的制备: 2% 戊二醛配制固定 2h, 用 0.1mol/L 磷酸漂洗液漂洗后再用 1% 锇酸固定液固定, 50% ~ 90% 乙醇梯度脱水, 然后 90% 乙醇 90% 丙酮 (1:1) 脱水, 最后 100% 丙酮 3 次脱水 (4℃ 冰箱内完成), 然后包埋固化后超薄切片机切片 50 ~ 60nm, 3% 醋酸铀 - 枸橼酸铅双染色后电镜观察。

10. 实验结果判断: 软骨组织切片细胞凋亡和分离软骨细胞凋亡指数 (AI) 的判定, $AI = \text{阳性细胞数} / \text{软骨细胞数} \times 100\%$, TUNEL 标记阳性细胞均为核着色黄色或棕黄色。分离软骨细胞 Annexin V - FITC 标记细胞膜呈绿色荧光; PI 标记细胞核呈红色荧光。Annexin V (-), PI (-) 为正常软骨细胞; Annexin V (+), PI (-) 为凋亡早期细胞; PI (+) 和 Annexin V (+) 双阳性为凋亡晚期或坏死细胞。选择细胞分布较均匀的高倍视野计数, 计数 30 个视野。钙黄绿素活细胞染色细胞活力越大, 染色越强, 凋亡细胞表现为黑色无显色的细胞影, 将记录的免疫荧光照片, Simple PCI (Version 5.2.1 Hamama Company USA) 对本标进行吸光度测定, 每一组标本随机选择 20 个细胞分布均匀的视野进行检测, 通过光密度分析计算荧光强度, 分析细胞的活性。

11. 统计学方法: 所有得到的数据均导入 Microsoft Excel (2003 版) 做统计分析, 数据均采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。检验方差齐性后, 组间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 软骨 HE 染色结果: 模型组软骨细胞排列紊乱, 柱状排列开始消失, 细胞数量减少, 但潮线仍然清晰可见。而正常组各层软骨细胞的排列与基质的分布有一定的规律, 表层细胞成梭形, 大致成水平排列。中间细胞圆形, 散在分布, 辐射层软骨细胞成柱状排列, 潮线清晰可见, 见图 1。

2. 凋亡软骨细胞的末端原位标记染色结果: 凋亡细胞核呈棕黄色, 正常组软骨浅层较多, 而 OA 组各层均有分布 (图 1)。OA 组的 $AI 14.32 \pm 3.17$, 正常组的 $AI 4.54 \pm 1.17$ 两组间的 AI 比较差异有统计学意义 ($t' = 15.85, P < 0.05$, 图 2)。

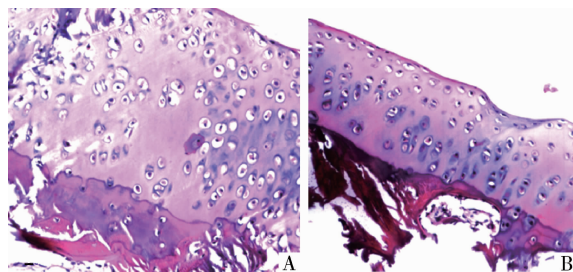


图 1 软骨 HE 染色结果

A. OA 组软骨染色; B. 正常组的软骨染色

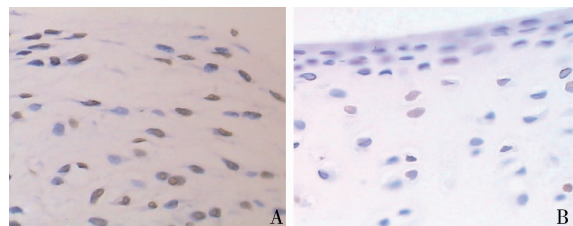


图 2 关节软骨中软骨细胞的凋亡染色

A. OA 软骨染色; B. 正常软骨染色

3. 分离软骨细胞培养凋亡的 Annexin V - FITC/PI 双染色结果: 在 OA 关节中分离的软骨细胞检测后可见大量凋亡的软骨细胞, 而正常组可见少量的凋亡细胞, 正常组为 91.45 ± 4.70 , OA 组为 83.63 ± 20.11 , 组间比较差异有统计学意义 ($t' = 2.07, P < 0.05$), 见图 3。

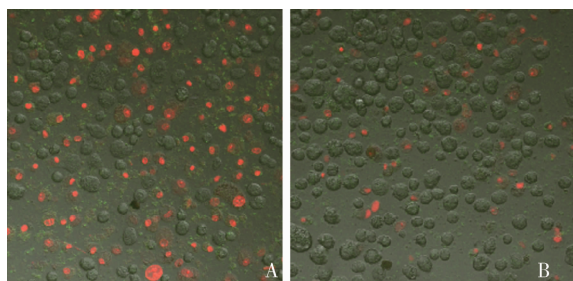


图 3 Annexin V - FITC/PI 双染色激光

共聚焦显微镜观察结果

A. OA 组; B. 正常组

4. 钙黄绿素活细胞染色结果: 正常的关节软骨细胞荧光强度分布比较均匀, 未被染色的软骨细胞比较少见。而 OA 组的软骨细胞染色分布明显的不均匀, 可见较多的未被染色或低染色活力低下的细胞 (一般为凋亡细胞), 而部分软骨细胞活性强度明显增强。经过软件分析荧光强度 OA 组为 79.45 ± 3.60 , 正常组为 75.60 ± 5.33 , 差异有统计学意义 ($t = 3.28, P < 0.01$), 见图 4。

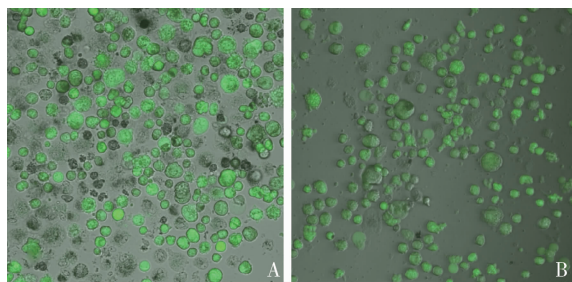


图4 钙黄绿素活细胞染色结果

A. OA组; B. 正常组

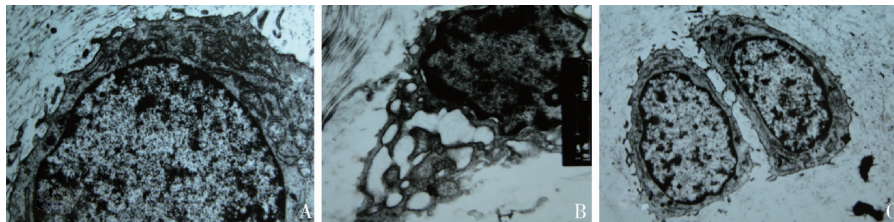


图5 软骨透射电镜观察结果

A. 正常软骨细胞; B. 凋亡软骨细胞; C. 新分裂凋亡的软骨细胞

粗面内质网含量丰富并能分泌物质,线粒体也显示规则的外形。OA软骨细胞中线粒体明显减少,细胞中空泡形成比例增加和染色质边缘化,和正常组比较差异有统计学意义($P < 0.01$,表1),细胞核扩大并呈现波浪形外观,染色质出现部分断裂,浓缩并聚集在核膜边缘,分别见图6。

表1 软骨细胞 TEM 超微结构的分析

超微结构	正常组	OA组
线粒体(每个细胞内个数)	7.3 ± 2.3	$3.4 \pm 1.7^*$
高尔基体(每个细胞内个数)	2.7 ± 1.1	1.8 ± 1.0
空泡化(>5)细胞(%)	5.1 ± 1.4	$4.9 \pm 1.5^*$
染色质边缘化细胞(%)	4.8 ± 1.9	$14.0 \pm 1.8^*$

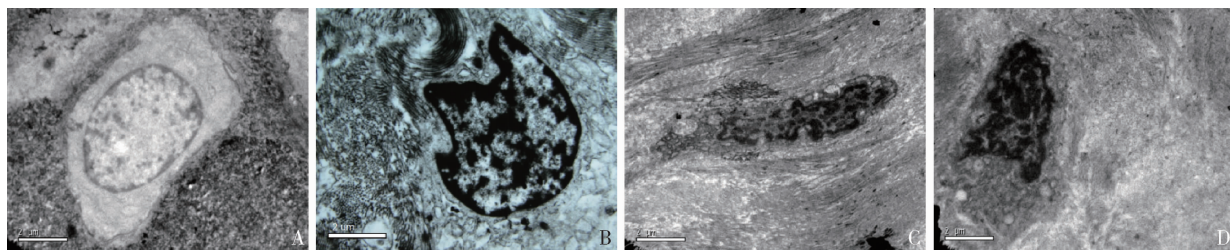
与正常组比较, * $P < 0.05$ 

图6 TEM显示OA软骨细胞染色质多种形态学变化

A. 染色质出现部分断裂; B. 浓缩在细胞外周边缘; C. 细胞中的染色质靠近核被膜; D. 染色质凝集成块均匀分布在细胞核内

讨 论

OA是65岁以上老年人最常见的慢性关节疾病,其特征就是关节软骨的缓慢退变,滑膜炎症和疼痛,有典型的影像学特征,最后导致失能^[7]。各种原因引起的软骨退变是OA关节退变的原因,是直接或非直接调节软骨基质合成和分解代谢失衡导致。关节软骨中的软骨基质是由稀疏分布在其中的软骨细胞合成的,所以软骨细胞的存在可以更好地维持软骨基质,包括软骨的功能和存活状态。在对几内亚猪OA模型的研究中也发现,其软骨渐渐变薄,软骨下骨硬化变厚可能是导致软骨细胞凋亡的原因,所以研究人员也在研究反向的调节来减少软骨细胞的凋亡,从而预防OA的发生^[8]。

本研究通过分析兔骨关节炎模型和正常软骨细胞的免疫组化、透射电镜观察软骨细胞的超微结构,并分别提取骨关节炎和正常软骨中的软骨细胞体外培养后分析其凋亡情况,通过软骨和软骨细胞的凋亡特点和超微结构的变化来分析骨关节炎发病和软骨

细胞凋亡之间的关系。在正常的关节和骨关节炎中,软骨细胞的核是有明显不同的,笔者目前的研究发现,OA 和正常关节软骨细胞的比较,OA 软骨细胞线粒体的数目和高尔基的数目明显减少,细胞内空泡化明显增多,染色质边缘化明显,但有研究提示,经过一定的静水压刺激后,这种情况可能会恢复正常。也有研究提示,连续的低循环压力可以增加细胞代谢的活性^[9]。目前染色质边缘化被报告是一种特别的细胞凋亡的特征,也被一些研究称为凋亡坏死,是骨性关节炎的一个重要的病理特征^[10]。不同的研究证明,软骨细胞数量的减少,归功于软骨细胞凋亡比例的增加,Heraud 等^[11]研究发现,在人骨关节炎软骨中 IL-1 β 的增加会使 18% ~ 21% 的软骨细胞凋亡,并和剂量有密切的关系。

软骨细胞凋亡的机制往往被分成固有通路和线粒体通路,是被细胞内的信号和非固有的或死亡受体通路,往往被细胞的信号激发,包括死亡受体家族的激活^[12]。而这两种凋亡途径往往通过线粒体内质网应激能引起软骨细胞的凋亡,通过投射电镜的研究发现,正常软骨细胞的内质网含量丰富,根据不同的报道,OA 软骨中软骨细胞的凋亡率为 1% ~ 20%,软骨的钙化层相比软骨其他各层其空的腔隙量大大增加,具有活力软骨细胞的量大大减少,并产生有害的影响,特别是在一些疾病的晚期,因为它代表的软骨基质的一些功能,细胞凋亡通常是一个比较快的过程,所以从理论上来说,软骨中细胞较高的凋亡率,也意味着软骨细胞基质的快速降解。

但实际上和 OA 慢性病理变化过程并非如此,凋亡发生在骨关节的软骨中,但有时候很难评估。在 OA 的病理过程中,软骨细胞凋亡发生对骨关节炎究竟产生多大的作用,笔者认为骨性关节炎是由软骨细胞凋亡引起的这种,评估过于简单化,相对于坏死,缺少溶酶体,细胞凋亡后,往往被吞噬体吞噬,但因为缺少巨噬细胞,比如组织依赖型的巨噬细胞,细胞外基质的缺乏,能阻止其他细胞,对凋亡小体的吞噬作用^[13]。其次,坏死在关节软骨中不可避免。最近的研究表明,关节软骨 CD163 阳性细胞数量的增加,能够增强吞噬作用,从退变软骨细胞中分离 II 型胶原阳性的软骨细胞,能够阻止组织的降解^[11,14]。最近研究表明,自噬作用的增强能明显减少新生儿局部低氧缺血模型中的折叠蛋白,明显的显示出内质网应激和自噬机制的关联性,是可能 OA 治疗目标相关的分子机制^[15]。促进自噬作用能直接移除无用的线粒体并和氧化应激相

关,另外关键的自噬蛋白被发现随着年老在 OA 软骨中减少,恢复自噬作用能延缓 OA 的进展,一些研究表明纳巴霉素就用这种作用,并且长期使用可能会使凋亡事件反转,进一步的研究应该可以揭示软骨中的信号通路的其他的分子并可能会影响自噬作用^[16,17]。

各种刺激导致培养的软骨细胞进入凋亡,这种刺激包括培养基血清的缺乏、使用 FAS 配体、CD95 抗体,一氧化氮、星状孢子素等,骨关节炎软骨也会产生大量的一氧化氮(NO),它会抑制软骨基质的合成,以及增强 MMP 的活性^[18]。虽然 NO 不停的刺激会导致培养软骨细胞的凋亡,但实际上,目前对 NO 持续的刺激导致软骨细胞凋亡的机制仍然不是很清楚,因为增加 NO 酶并不导致凋亡的增加。线粒体在细胞的生存和功能上具有重要作用,氧化和打断线粒体的呼吸可以促进细胞的死亡和退变。从 OA 中分离的软骨细胞显示其线粒体在 II 和 III 染色体组电子转移链的活性明显下降,线粒体膜的电位也明显下降导致线粒体肿胀和外膜的破坏^[19]。力学的刺激也可能通过一些细胞因子的改变和调节通过线粒体凋亡途径导致软骨细胞凋亡,最终导致骨关节炎的发生^[20]。也有将狗 OA 模型软骨细胞分离体外培养实验中发现 caspases 抑制剂比如(Z-DEVD-FMK or Z-LEHD-FMK)能明显抑制软骨细胞的凋亡^[21]。

笔者目前研究结果证实,在骨关节炎和正常的关节软骨细胞的细胞核和细胞质超微结构中存在差异,有研究证实 IL-1 β 能诱导软骨细胞的这种超微结构这种的变化,但可以被持续作用的模仿人体正常关节压力的力学刺激抵消^[22]。但这种不同究竟是骨关节炎的结果,还是这种变化最终导致骨关节炎,细胞凋亡和超微结构变化之间的关系是以后进一步需要的研究的目标。在笔者的研究中发现骨关节炎患者的凋亡细胞增多的同时,存活细胞的活力也是明显增强,而线粒体的个数明显减少,所以推测骨关节炎的发病也可能是致病因素导致细胞的活力代谢增强,能量代谢过度的旺盛,最终导致线粒体核糖体等减少,细胞代谢能量供应不足最终导致凋亡,这也是需要进一步研究的目标。

参考文献

- 1 Malemud CJ. The biological basis of osteoarthritis: state of the evidence[J]. Curr Opin in Rheumatol, 2015, 27(3):289-294
- 2 Blain EJ. Involvement of the cytoskeletal elements in articular cartilage homeostasis and pathology[J]. Int J Exp Pathol, 2009, 90(1): 1-15
- 3 黄胜,李雄峰,管国华,等. 实验性骨关节炎 MMP-3 与软骨细

- 胞凋亡[J]. 中医正骨, 2010, 22(11): 19-21
- 4 周国顺, 李雄峰, 管国华. 机械力学刺激对软骨细胞表型稳定性的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2011, 28(7): 1052-1053
 - 5 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见[S]. 2006-9-30
 - 6 Hulth A, Lindberg L, Telhag H. Experimental osteoarthritis in rabbits: preliminary report[J]. Acta Orthopaed Scand, 1970, 41(5): 522-530
 - 7 Glyn-Jones S, Palmer AJR, Agricola R, *et al.* Osteoarthritis[J]. The Lancet, 2015, 386(9991): 376-387
 - 8 Zamli Z, Robson Brown K, Tarlton JF, *et al.* Subchondral bone plate thickening precedes chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in spontaneous animal models of osteoarthritis[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014, 1-10
 - 9 Nerucci F, Fioravanti A, Cicero MR, *et al.* Effects of chondroitin sulfate and interleukin-1 β on human chondrocyte cultures exposed to pressurization: a biochemical and morphological study[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2000, 8(4): 279-287
 - 10 Battistelli M, Salucci S, Olivetto E, *et al.* Cell death in human articular chondrocyte: a morpho-functional study in micromass model[J]. Apoptosis, 2014, 19(10): 1471-1483
 - 11 Heraud F, Heraud A, Harmand MF. Apoptosis in normal and osteoarthritic human articular cartilage[J]. Ann Rheumat Dis, 2000, 59(12): 959-965
 - 12 Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death[J]. Toxicol Pathol, 2007, 35(4): 495-516
 - 13 Chang J, Wang W, Zhang H, *et al.* The dual role of autophagy in chondrocyte responses in the pathogenesis of articular cartilage degeneration in osteoarthritis[J]. Int J Mol Med, 2013, 32(6): 1311-1318
 - 14 Aigner T, Kim HA. Apoptosis and cellular vitality: issues in osteoarthritic cartilage degeneration[J]. Arthritis & Rheum, 2002, 46(8): 1986-1996
 - 15 Carloni S, Albertini MC, Galluzzi L, *et al.* Increased autophagy reduces endoplasmic reticulum stress after neonatal hypoxia-ischemia: role of protein synthesis and autophagic pathways[J]. Exp Neurol, 2014, 255: 103-112
 - 16 Caramés B, Hasegawa A, Taniguchi N, *et al.* Autophagy activation by rapamycin reduces severity of experimental osteoarthritis[J]. Anna Rheum Dis, 2012, 71(4): 575-581
 - 17 Caramés B, Kiosses WB, Akasaki Y, *et al.* Glucosamine activates autophagy in vitro and in vivo[J]. Arthritis Rheum, 2013, 65(7): 1843-1852
 - 18 Pelletier JP, Mineau F, Ranger P, *et al.* The increased synthesis of inducible nitric oxide inhibits IL-1 α synthesis by human articular chondrocytes: possible role in osteoarthritic cartilage degradation[J]. Osteoarthritis Cartilage, 1996, 4(1): 7784-7781
 - 19 Ruiz-Romero C, Calamia V, Mateos J, *et al.* Mitochondrial dysregulation of osteoarthritic human articular chondrocytes analyzed by proteomics: a decrease in mitochondrial superoxide dismutase points to a redox imbalance[J]. Mol Cell Proteomics, 2009, 8(1): 172-189
 - 20 李雄峰, 戴利成, 庄汝杰, 等. 力学刺激对软骨细胞凋亡信号传导分子 Caspase-3 及 bcl-2, bax mRNA 表达的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2012, 29(2): 292-294
 - 21 Pelletier JP, Fernandes JC, Jovanovic DV, *et al.* Chondrocyte death in experimental osteoarthritis is mediated by MEK 1/2 and p38 pathways: role of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase[J]. J Rheumatol, 2001, 28(11): 2509-2519
 - 22 Pascarelli N A, Collodel G, Moretti E, *et al.* Changes in ultrastructure and cytoskeletal aspects of human normal and osteoarthritic chondrocytes exposed to interleukin-1 β and cyclical hydrostatic pressure[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(11): 26019-26034
- (收稿日期: 2017-05-08)
- (修回日期: 2017-05-29)
-
- (上接第 95 页)
- 9 任映, 李瑞晟, 王虹, 等. 姜黄素对 APP/PS1 双转基因小鼠海马神经元 ChAT 表达的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2012, 35(10): 679-682
 - 10 Ono K, Hasegawa K, Naiki H, *et al.* Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro[J]. J Neurosci Res, 2004, 75(6): 742-750
 - 11 Ramassamy C. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets[J]. Eur J Pharmacol, 2006, 545(1): 51-64
 - 12 Mithu VS, Sarkar B, Bhowmik D, *et al.* Curcumin alters the salt bridge-containing turn region in amyloid beta (1-42) aggregates[J]. J Biol Chem, 2014, 289(16): 11122-11131.
 - 13 Sun Q, Jia N, Wang W, *et al.* Activation of SIRT1 by curcumin blocks the neurotoxicity of amyloid beta25-35 in rat cortical neurons[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 448(1): 89-94
 - 14 董云芳, 冯慧利, 何瑛琨, 等. 姜黄素对小鼠海马 A β 生成酶和降解酶的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2016, 39(3): 230-234
 - 15 Choi CH, Lee BH, Ahn SG, *et al.* Proteasome inhibition induced p38MAPK/ERK signaling regulates autophagy and apoptosis through the dual phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 β [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 418(4): 759-764
 - 16 Boonen RA, van Tijn P, Zivkovic D. Wnt signaling in Alzheimer's disease: up or down, that is the question[J]. Ageing Res Rev, 2009, 8(2): 71-82
 - 17 Zhang X, Yin WK, Shi XD, *et al.* Curcumin activates Wnt/ β -catenin signaling pathway through inhibiting the activity of GSK-3 β in APP-swe transfected SY5Y cells[J]. Eur J Pharm Sci, 2011, 42(5): 540-546
 - 18 Benchoua A, Guegan C, Couriaud C, *et al.* Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction[J]. J Neurosci, 2001, 21(18): 7127-7134
 - 19 Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN, *et al.* Life and death in peripheral T cell[J]. Nat Rev Immunol, 2007, 7(7): 532-542
- (收稿日期: 2017-04-05)
- (修回日期: 2017-05-16)