

· 论 著 ·

低强度脉冲超声波对髁突软骨细胞炎症状态的作用研究

李 静, 丁思琪, 蓝 鹏, 李 琼*

(内蒙古医科大学附属医院 口腔科, 内蒙古 呼和浩特 010050)

【摘要】目的 观察低强度脉冲超声波对白介素-1 β 制造的大鼠髁突软骨细胞炎症模型中MAPK信号通路相关因子磷酸化的表达变化。方法 二次酶消化法分离髁突软骨细胞并完成鉴定。将分离出的大鼠髁突软骨细胞随机分为3组,加入3种不同浓度的IL-1 β 处理并进行II型胶原与MMP-13免疫细胞化学染色,筛选出最佳致炎浓度。再次将所提取的大鼠髁突软骨细胞随机分为3组:NC组、OA组、LIPUS组,处理后对II型胶原、p38、p-p38、ERK1/2、p-ERK1/2进行免疫细胞化学染色,观察蛋白表达情况。结果 (1)成功提取大鼠髁突软骨细胞。(2)IL-1 β :10 ng/mL组II型胶原表达量降低最明显,差异有统计学意义($P < 0.05$),MMP-13表达量升高最明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。 (3)OA组与LIPUS组II型胶原表达量均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),OA组降低更明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。3组的p38、ERK1/2表达量无明显差异($P > 0.05$)。OA组与LIPUS组p-p38、p-ERK1/2表达量均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),OA组升高更明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 (1)二次酶消化法成功提取大鼠髁突软骨细胞。(2)10 ng/mL为IL-1 β 最佳致炎浓度。(3)LIPUS处理可减少炎症髁突软骨细胞中II型胶原的降解,抑制了MAPK通路相关因子p38、ERK1/2的磷酸化。

【关键词】颞下颌关节骨关节炎;低强度脉冲超声波;髁突软骨细胞;免疫细胞化学染色;MAPK通路

中图分类号: R783

文献标识码: A

文章编号: 2095-512X(2024)01-0001-06

STUDY ON THE EFFECT OF LOW INTENSITY PULSED
ULTRASOUND ON THE NEW STATE OF CONDYLAR
CHONDROCYTES

LI Jing, DING Siqi, LAN Peng, LI Qiong*

(Department of stomatology, The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China)

【Abstract】 Objective To observe the effect of low-intensity pulsed ultrasound on the expression of phosphorylation of MAPK signaling pathway-related factors in the inflammatory model of rat condylar chondrocytes induced by interleukin-1 β . **Methods** Condylar chondrocytes were isolated by secondary enzymatic digestion and identified. The isolated condylar chondrocytes were randomly divided into 3 groups, and treated with three different concentrations of IL-1 β , and immunocytochemistry staining of type II collagen and MMP-13 was performed to screen out the optimal inflammatory concentration. The extracted rat condylar chondrocytes were randomly divided into 3 groups: NC group, OA group and LIPUS group. After treatment, type II collagen, p38, p-p38, ERK1/2 and p-ERK1/2 were stained by immunocytochemistry to observe the protein expression. **Results** (1)Condylar chondrocytes were successfully isolated. (2)IL-1 β : The expression of type II collagen in 10 ng/mL group decreased most significantly ($P < 0.05$), and the expression of MMP-13 increased most significantly ($P < 0.05$). (3)The expression of type II collagen in OA group and LIPUS group decreased ($P < 0.05$), and the decrease in OA group was more obvious ($P < 0.05$). There was no significant difference in the expression of p38 and ERK1/2 among the three groups ($P > 0.05$). The expression of p-p38 and p-ERK1/2 in the OA group and the LIPUS group increased ($P < 0.05$), and the increase in the OA group was more significant ($P < 0.05$). **Conclusions** (1)Rat condylar chondrocytes were successfully extracted by secondary enzyme digestion. (2)10 ng/mL was the optimal concentration of IL-1 β . (3)LIPUS treatment can reduce the degradation of type II collagen in inflammatory condylar chondrocytes and inhibit the phosphorylation of MAPK pathway-related factors p38 and ERK1/2.

【Keywords】 temporomandibular joint osteoarthritis; low intensity pulsed ultrasound; condylar chondrocytes; immunocytochemical staining; MAPK pathway

收稿日期: 2023-04-18; 修回日期: 2023-07-22

基金项目: 内蒙古医科大学科技百万工程联合项目[YKD2020KJBW(LH)009]

第一作者: 李静(1996—), 女, 硕士, 医师。研究方向: 口腔种植。E-mail: 1738862947@qq.com

*通信作者: 李琼, 女, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师。研究方向: 口腔种植。E-mail: 184907833@qq.com

颞下颌关节是颌面部最重要的大关节,与口腔科的治疗关系密切。在口腔科的治疗中,种植及修复后咬合恢复不当,正畸治疗失败后出现咬合紊乱,以及长时间的口腔操作患者张口时间过长,均会诱导颞下颌关节发生不适。其中颞下颌关节骨关节炎(temporomandibular joint osteoarthritis, TM-JOA)是一类较为严重的颞下颌关节疾病,影响着全球8%~16%的人口,每年总医疗费用超过800亿美元^[1]。其主要临床表现为关节区弹响、杂音、疼痛和功能障碍,给患者的生活带来严重的影响。其临床治疗方法多种多样,主要分为无创治疗、微创治疗及有创治疗。目前临床上出现了很多针对骨关节炎的新型疗法,对颞下颌关节的治疗有启发作用^[2]。

大量研究^[3]证实白介素-1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β)是引起骨关节炎的关键促炎因子,可诱导细胞外基质发生降解,这种降解作用在加入IL-1 β 抑制剂之后有所缓解,因此在有关骨关节炎(osteoarthritis, OA)的体外实验中,IL-1 β 常被用来诱导软骨细胞发生炎性改变^[4]。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)通路广泛存在于真核细胞生物中,参与调节细胞的各项生命活动,其家族主要包括p38、ERK1/2等因子,其作用是接收细胞外信号转而传递到胞内,引起相关生物反应^[5]。已有研究^[6]证实,当软骨细胞发生炎性改变时,p38、ERK1/2磷酸化增强,诱导基质金属蛋白酶表达上调,MAPK信号通路被激活,引起II型胶原发生降解,加剧软骨细胞的破坏。软骨细胞是机械敏感细胞,可感知机械刺激诱发细胞内信号分子改变,维持细胞的正常生长和正常功能发挥^[7]。目前超声已经成为一种传递机械应力的技术。

低强度脉冲超声波(low intensity pulse ultrasound, LIPUS)是近年来新兴的一种机械治疗手段,具有操作方便、成本低廉、靶向性好等优点^[8-9]。此前已有相关研究^[10]证明,LIPUS对膝关节骨关节炎有治疗作用,可促进软骨细胞内II型胶原及蛋白多糖的合成,增加细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的表达,刺激软骨细胞增殖,进而促进软骨细胞的修复与再生。LIPUS能通过其特有的机械传导效应作用于软骨细胞,增强胞膜表面应力受体的表达,通过细胞内一系列的反应,抑制MAPK信号通路相关因子(p38、ERK1/2)的磷酸化,促进膝关节软骨细胞的修复^[11-12]。相关实验^[13]表明LIPUS对炎症状态的髌突软骨细胞有类似的治疗作

用,但这种作用是否仍与MAPK信号通路有关还有待考证。本次研究通过分离出大鼠髌突软骨细胞进行体外培养,利用IL-1 β 这一重要的促炎因子,建立髌突软骨细胞体外炎症模型,通过免疫细胞化学染色法观察。LIPUS作为一种机械刺激形式,对髌突软骨细胞中II型胶原、MAPK信号通路相关因子p38、ERK1/2磷酸化的影响,从而了解LIPUS对TMJOA中髌突软骨细胞的治疗机制,探究这种治疗作用是否亦与MAPK信号通路有关。

1 材料与方法

1.1 材料

3~4周龄SD(SPF级)雄性大鼠(内蒙古医科大学实验动物中心提供)DMEM培养基,胎牛血清,PBS缓冲液,0.25%胰蛋白酶,青-链霉素溶液,II型胶原酶(均购于Gibco公司),甲苯胺蓝染色液(Solarbio),免疫组化HRP试剂盒(福州迈新),Collagen II抗体,MMP-13抗体(均购于Bioss公司),p38抗体,磷酸化p38抗体,ERK1/2抗体,磷酸化ERK1/2抗体(均购于Affinity公司)。

1.2 方法

1.2.1 髌突软骨细胞分离、培养及鉴定 断颈处死3~4周龄SD雄性大鼠后,在无菌的条件下,取下颌骨双侧髌突软骨移入培养皿,用含1%PS的PBS溶液冲洗后,仔细刮下髌突软骨表面细胞。离心后使用0.25%胰蛋白酶重悬细胞,在培养箱中(37℃,5%CO₂)消化10 min。完全培养基(79%DMEM+20%FBS+1%PS)终止消化,离心后使用0.2%II型胶原酶重悬细胞进行二次消化,培养箱培养2 h,并每隔0.5 h震荡1次。离心后加入完全培养基重悬细胞,入培养箱等待细胞贴壁,后期根据细胞状态进行传代。

甲苯胺蓝染色:自然环境下晾干细胞爬片,4%多聚甲醛常温下固定1 h,自来水轻柔冲洗玻片15 min,双蒸水冲洗5 min,晾干。加入甲苯胺蓝染色液染色5 min,之后加入等量蒸馏水轻吹混匀,继续染色15 min。双蒸水充分冲洗,去除多余染液,晾干,中性树胶封片,显微镜下观察。

II型胶原免疫细胞化学染色:自然环境下晾干细胞爬片,4%多聚甲醛常温下固定1 h,0.5%的TritonX-100(PBS配制)室温下通透20 min,PBS冲洗。3% H₂O₂溶液室温下灭活15 min,PBS冲洗。加入blocking buffer(封闭缓冲液)(88% PBS,10%羊血

清,2%的10% TritonX-100 配制)室温下封闭1 h, PBS冲洗。滴加一抗(Ⅱ型胶原1:500),4℃过夜。回收一抗,PBS洗涤。滴加二抗,室温下孵育20 min, PBS冲洗。滴加DAB显色剂,镜下5~10 min显色(避光观察),摄片。自来水冲洗5 min。苏木素染液复染10 min,自来水冲洗5 min,去除多余染液。晾干,中性树胶封片,摄片。

1.2.2 免疫细胞化学染色筛选IL-1 β 的最佳致炎浓度 六孔板内提前放置盖玻片,按(1~5) $\times 10^5$ cells/孔密度接种P2细胞,分为3组:0、5、10 ng/mL IL-1 β 组。贴壁60%~70%后更换为无血清培养基进行12 h饥饿处理,后更换为含有0、5、10 ng/mL IL-1 β 的无血清培养基处理24 h,弃培养基,PBS冲洗后晾干。4%多聚甲醛常温下固定1 h,0.5%的TritonX-100室温下通透20 min,PBS冲洗。3% H₂O₂溶液室温下灭活15 min,PBS冲洗。加入blocking buffer(封闭缓冲液)(室温下封闭1 h,PBS冲洗。滴加一抗(Ⅱ型胶原1:500、MMP-13 1:500),4℃过夜。回收一抗,PBS洗涤。滴加二抗,室温下孵育20 min,PBS冲洗。滴加DAB显色剂,镜下5~10 min显色(避光观察),摄片。自来水冲洗5 min,去除多余染液,封片。按上述方法,用PBS代替一抗工作液重复上述步骤,作为阴性对照。

1.2.3 分组照射后免疫细胞化学染色 六孔板内提前放置盖玻片,按(1~5) $\times 10^5$ cells/孔密度接种P2细胞,分为3组:NC组、OA组、LIPUS组。贴壁60%~70%后更换为无血清培养基进行12 h饥饿处理后,OA组与LIPUS组加入含有10 ng/mL IL-1 β 的无血清培养基,NC组加入等量的无血清培养基处理24 h。LIPUS组进行干预治疗,20 min/d,共6 d。工作强度为45 mW/cm²(频率1.5 MHz,通断比20%)。其余两组细胞常规培养6 d,不予干预。6 d后,3组细胞同时染色。弃培养基,PBS冲洗后晾干。4%多聚甲醛常温下固定1 h,0.5%的TritonX-100室温下通透20 min,PBS冲洗。3% H₂O₂溶液室温下灭活15 min,PBS冲洗。加入blocking buffer(封闭缓冲液)室温下封闭1 h,PBS冲洗。滴加一抗(Ⅱ型胶原1:500、p38 1:200、p-p38 1:200、ERK1/2 1:500、p-ERK1/2 1:200,4℃过夜。回收一抗,PBS洗涤。滴加二抗,室温下孵育20 min,PBS冲洗。滴加DAB显色剂,镜下5~10 min显色(避光观察),摄片。自来水冲洗5 min,去除多余染液,封片。按上述方法,用PBS代替一抗工作液重复上述步骤,作为阴性对照。

1.2.4 统计学方法 同一拍摄条件下,在高倍镜下

取每个样本区域大致相同的5个随机区域,利用Image Pro Plus软件,通过测量出每张图片阳性表达的积分光密度值(IOD)以及区域面积Area值,再计算出平均积分光密度值(AIOD=IOD/Area),此值反映了目标蛋白的单位面积浓度^[14]。采用SPSS 26.0软件进行统计学处理,最终数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用单因素方差分析3组间是否有差异,组间比较采用事后LSD-*t*检验,检验水准为 $\alpha=0.05$,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 髌突软骨细胞形态及鉴定

体外培养的大鼠髌突软骨细胞前3 d生长缓慢,5~6 d后进入对数生长期,细胞呈“多角形”或“星形”,细胞质丰富,细胞核大且圆,10 d后细胞间广泛接触,排列紧密,呈“铺路石”样改变,符合髌突软骨细胞形态(光镜表现见图1A~1D)。当细胞传至第4代,细胞生长速度减慢,漂浮死细胞增多,细胞多呈“长梭形”,出现“去极化”表现。

甲苯胺蓝染色结果呈阳性,胞核呈深蓝色,胞质呈淡蓝色,细胞间可见丰富的深蓝色蛋白多糖颗粒(光镜表现见图1E)。

Ⅱ型胶原免疫细胞化学染色结果呈阳性,胞浆着棕黄色,经苏木素复染后胞核着深紫色(光镜表现见图1F)。

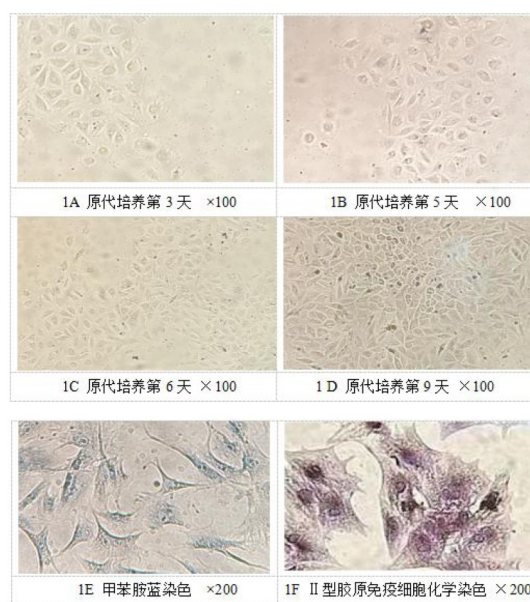


图1 光镜下细胞图片

Fig.1 cell image under light microscope

2.2 各组中Ⅱ型胶原、MMP-13的蛋白表达

Ⅱ型胶原免疫细胞化学染色显示:0 ng/mL组镜下可见棕褐色强阳性染色细胞;5 ng/mL组可见棕黄色阳性染色细胞;10 ng/mL组可见淡黄色弱阳性染色细胞。单因素方差分析后 $P < 0.05$, 认为3组间平均积分光密度值有明显差异。LSD-*t*组间比较后,5、10 ng/mL组Ⅱ型胶原表达量较0 ng/mL组降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),其中10 ng/mL组降低更明显,与5 ng/mL组组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)(见表1,图2)。

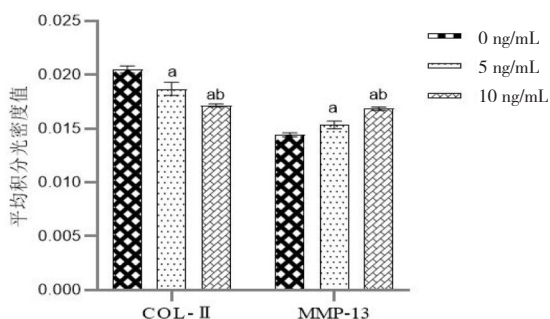
MMP-13免疫细胞化学染色显示:0 ng/mL组镜下可见淡黄色弱阳性染色细胞;5 ng/mL组可见黄色阳性染色细胞;10 ng/mL组可见棕黄色强阳性染色细胞。单因素方差分析后 $P < 0.05$, 认为3组间平均积分光密度值有明显差异。LSD-*t*组间比较后,5、10 ng/mL组MMP-13表达量较0 ng/mL组均升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),其中10 ng/mL组升高更明显,与5 ng/mL组组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)(见表1,图2)。

表1 各组软骨细胞Ⅱ型胶原与MMP-13的平均积分光密度值($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 The average integrated optical density of type II collagen and MMP-13 of chondrocytes in each group value ($\bar{x} \pm s$)

| 处理浓度 (ng/mL) | 样本 | Ⅱ型胶原 | MMP-13 |
|--------------|----|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 0 | 15 | 0.020 480 ± 0.001 273 | 0.014401 ± 0.000739 |
| 5 | 15 | 0.018 668 ± 0.002 364 [#] | 0.015323 ± 0.001384 [#] |
| 10 | 15 | 0.017 147 ± 0.000 522 ^{#Δ} | 0.016 837 ± 0.000 597 ^{#Δ} |

注:与0 ng/mL组相比, $P < 0.05$;与5 ng/mL组相比, $P < 0.05$ 。



注:a:与0 ng/mL相比, $P < 0.05$;b:与5 ng/mL相比, $P < 0.05$

图2 各组软骨细胞内COL-Ⅱ、MMP-13平均积分光密度值的表达量

Fig.2 The expression of COL-Ⅱ and MMP-13 in chondrocytes of each group

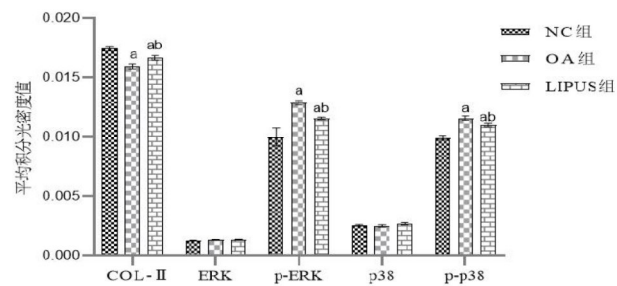
2.3 各组Ⅱ型胶原、ERK1/2、p-ERK1/2、p38、p-p38的蛋白表达比较

Ⅱ型胶原免疫细胞化学染色显示:NC组镜下可见棕褐色强阳性染色细胞;OA组镜下可见淡棕黄

色弱阳性染色细胞;LIPUS组可见棕黄色阳性染色细胞。单因素方差分析后 $P < 0.05$, 可认为3组间平均积分光密度值有明显差异。LSD-*t*组间比较后,OA组与LIPUS组Ⅱ型胶原表达量较NC组均降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),其中OA组降低更明显,与LIPUS组组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)(见表2,图3)。

p38、ERK1/2免疫细胞化学染色显示:各组髌突软骨细胞细胞浆中均看到淡黄色阳性染色,但未见明显差异。单因素方差分析后 $P > 0.05$, 可认为3组间平均积分光密度值差异无统计学意义(见表2,图3)。

p-p38、p-ERK1/2免疫细胞化学染色显示:NC组镜下可见淡黄色弱阳性染色细胞;OA组可见棕黄色强阳性染色细胞;LIPUS组可见黄色阳性染色细胞。单因素方差分析后 $P < 0.05$, 可认为三组间平均积分光密度值有明显差异。LSD-*t*组间比较后,OA组与LIPUS组p-p38、p-ERK1/2表达量较NC组均升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),其中OA组升高更明显,与LIPUS组组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)(见表2,图3)。



注:a:与NC组相比, $P < 0.05$;b:与OA组相比, $P < 0.05$

图3 各组软骨细胞内COL-Ⅱ、ERK1/2、p-ERK1/2、p38、p-p38平均积分光密度值的表达量

Fig.3 The expression of COL-Ⅱ、ERK1/2、p-ERK1/2、p38 and p-p38 in chondrocytes of each group

3 讨论

髌突软骨细胞受由蛋白多糖和Ⅱ型胶原组成的细胞外基质保护^[15],故需用二次酶消化法提取原代髌突软骨细胞,此法提取的髌突软骨细胞状态良好,增殖活力较强,镜下观察细胞形态符合髌突软骨细胞表现,染色结果为阳性,鉴定所提细胞为髌突软骨细胞。本次提取髌突软骨细胞成功,可作为后续进一步实验的细胞。

调查显示TMJOA患者滑膜液中的促炎因子IL-1 β 含量高于未患病人群,IL-1 β 的升高会促进MMP-13的表达,从而引起软骨细胞的Ⅱ型胶原与

表2 各处理组相关因子的平均光密度值($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 The average optical density value of the related factors in each treatment group($\bar{x} \pm s$)

| 处理因素 | 样本量 | II型胶原 | ERK1/2 | p-ERK1/2 | p38 | p-p38 |
|-------|-----|-------------------------|-------------|-------------------------|-------------|-------------------------|
| NC | 15 | 0.017 428 ± | 0.001 244 ± | 0.009 986 ± | 0.002 509 ± | 0.009 906 ± |
| | | 0.000 773 | 0.000 123 | 0.002 893 | 0.000 269 | 0.000 636 |
| OA | 15 | 0.015 904 ± | 0.001 301 ± | 0.012 852 ± | 0.002 457 ± | 0.011 470 ± |
| | | 0.000 793 [#] | 0.000 169 | 0.000 717 [#] | 0.000 376 | 0.000 701 [#] |
| LIPUS | 15 | 0.016 623 ± | 0.001 337 ± | 0.011 528 ± | 0.002 655 ± | 0.010 973 ± |
| | | 0.000 797 ^{#Δ} | 0.000 102 | 0.000 370 ^{#Δ} | 0.000 360 | 0.000 603 ^{#Δ} |

注:与NC组相比,[#] $P < 0.05$;与OA组相比,^Δ $P < 0.05$ 。

蛋白多糖的分解,造成二者含量下降,继而损伤软骨细胞^[16]。本次实验将第二代髌突软骨细胞分为3组,加入0、5、10 ng/mL IL-1 β 处理24 h,对3组细胞内II型胶原与MMP-13的表达进行免疫细胞化学染色,探究不同浓度的IL-1 β 对髌突软骨细胞的影响,本实验发现,当添加10 ng/mL的IL-1 β 时,II型胶原表达量下降最显著($P < 0.05$),MMP-13表达量升高最显著($P < 0.05$),可以认为此浓度下髌突软骨细胞内细胞外基质降解最显著,细胞炎性程度最明显,可作为实验三进行炎症造模的最佳浓度。

大量研究^[17]表明,LIPUS对软骨细胞有治疗作用,这在本次实验中也得到了证实。p38、ERK1/2等是MAPK家族的主要成员,参与多种炎症的发生发展过程,既往病理研究发现,炎症状态时MAPK信号通路被激活,p38、ERK1/2磷酸化增加,软骨细胞损伤^[18-19]。LIPUS对膝关节骨关节炎软骨细胞的治疗作用在新西兰兔的实验中得到证实,并与MAPK通路的抑制有关。本次实验是通过检测3组髌突软骨细胞中II型胶原、MAPK信号通路相关因子的表达,来探究LIPUS对TMJOA的作用机制。结果显示相对于LIPUS组,OA组II型胶原表达量减少($P < 0.05$),磷酸化p38与ERK1/2蛋白表达升高($P < 0.05$)。而相对于OA组,LIPUS干预后的炎症细胞内II型胶原的表达量增多($P < 0.05$),磷酸化p38与ERK1/2表达量减少($P < 0.05$),各组p38、ERK1/2表达量均未见明显差异($P > 0.05$)。这证实LIPUS可以减少TMJOA软骨细胞中II型胶原的降解,抑制MAPK信号通路相关因子的磷酸化,提示LIPUS可能通过抑制MAPK通路的激活发挥对TMJOA的治疗作用,这种抑制作用同膝关节骨关节炎中相类似。

综上所述,本研究发现LIPUS照射可以减少炎症髌突软骨细胞内II型胶原的降解,同时可以减少MAPK相关因子的磷酸化,提示LIPUS可以减缓炎性软骨细胞的破坏,对髌突软骨细胞有保护作用。但本实验存在一定局限性,如LIPUS作用于细胞后,在何种作用机制下调了MAPK相关因子磷酸化的过

程尚未明确。细胞内的信号调控是彼此交联、错综复杂的,本次实验未用MAPK信号通路相关抑制剂来反向验证这种治疗作用与MAPK通路的抑制确实相关,这一部分机制还需要进一步的研究来实证。本次实验仅涉及细胞的免疫细胞化学染色,对相关蛋白的检测仅为半定量分析,对具体的蛋白表达及基因表达未进行具体研究,之后考虑采用Western Blot、q-PCR法进行蛋白及mRNA表达的定量分析,探讨其具体的作用机制。

参考文献

- [1]DONGYUN W, YAJIE Q, YANG Z, et al. Recent advances in animal models, diagnosis, and treatment of temporomandibular joint osteoarthritis[J]. Tissue Engineering, 2022, 65: 1-45.
- [2]牛荣,赵壮.中药熏洗联合腔内注射治疗膝关节炎的临床疗效[J].内蒙古医科大学学报,2022,44(6):566-568+576.
- [3]LI Y Y, SUN H F, LIU X, et al. Transglutaminase 2 inhibitors attenuate osteoarthritic degeneration of TMJ-osteoarthritis by suppressing NF- κ B activation[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 114: 109486.
- [4]邱红生,薄占东.Ghrelin、IL-1 β 和TNF- α 在膝骨关节炎不同Mankin病理分级软骨及滑膜中的表达及其意义[D].南宁:广西医科大学,2018.
- [5]LIU F, LI L, LU W, et al. Scutellarin ameliorates cartilage degeneration in osteoarthritis by inhibiting the wnt/beta-catenin and MAPK signaling pathways[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 78: 105954:1-8.
- [6]郭牧笛,赵华强,宋辉.低强度超声对体外骨关节炎状态下的颞下颌关节软骨细胞的保护作用[D].济南:山东大学,2017.
- [7]MUTSUMI F, MINAMI S S, EIJI T, et al. Protective effects of low-intensity pulsed ultrasound on mandibular condylar cartilage exposed to mechanical overloading[J]. Ultrasound in Med. & Biol, 2018, 12(6): 1-10.
- [8]WANG W, CHEN J L, LUO D, et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on myelosuppression of rats induced by chemotherapy drugs with cell cycle specificity[J]. Journal of Ultrasound in Medicine, 2020, 40(9): 1811-1822.
- [9]GUO S, MAN J W, JIANG C R, et al. Research progress on

(下转第10页)

果,我们可以得出敲减PLAU可以抑制HNSCC细胞的迁移和侵袭。而过表达PLAU可以促进HNSCC细胞的迁移和侵袭。与此同时,PLAU还与EMT过程中的其他调节因子(N-Cad、Vimentin、Slug)有明显的正相关性。结果与BLASI等^[8]的研究结果一致,他们构建了COX回归模型并验证了GEO数据库中的生存结果。多种类型的PLAU基因型改变,包括mRNA上调、扩增和错义突变等,均可以在很大程度上导致PLAU的过度表达。这些结果与我们的观察结果一致,表明在HNSCC中PLAU诱导的EMT过程需要N-钙黏蛋白、锌指转录蛋白、波形蛋白参与^[9]。本研究可以明确PLAU在HNSCC中起到致癌基因和有效生物标志物的作用,且通过HNSCC中的EMT过程调节增殖和迁移。因此,我们可以根据PLAU表达水平的依赖性来制定HNSCC的个体化医疗策略。

综上所述,我们可以得出PLAU在HNSCC中表达上调,促进HNSCC肿瘤的侵袭和迁移,并且与EMT过程中的关键蛋白成正相关性;通过敲低PLAU可以显著抑制肿瘤细胞的侵袭和转移,并抑制肿瘤细胞的EMT过程。本研究表明PLAU是HNSCC的促癌基因之一,且可能通过诱导上皮细胞-间充质转化过程促进HNSCC的迁移和侵袭,可作为HNSCC患者潜在治疗靶点和一种新的生物诊断标志物。

(上接第5页)

- biophysical effects and related mechanisms of low-intensity pulsed ultrasound[J]. Chinese Journal of Medical Physics, 2019(5):605-609.
- [10]郭霜,满江位,姜春倩,等.低强度脉冲超声的生物物理学效应及相关机制的研究进展[J].中国医学物理学杂志,2019,36(5):605-609.
- [11]PENG X, SHIHAO S, XUEPING L, et al. Low-intensity pulsed ultrasound treatment at an early osteoarthritis stage protects rabbit cartilage from damage via the integrin/focal adhesion kinase/mitogen-activated protein kinase signaling pathway[J]. Ultrasound Med, 2015,34:61-69.
- [12]FEI S, JIN X, WEN CJ, et al. Low-intensity pulsed ultrasound alleviates osteoarthritis condition through focal adhesion kinase-mediated chondrocyte proliferation and differentiation [J]. CARtilAge, 2020,12(3):196-203.
- [13]AKEMI K A, IKUO Y, TAKASHI O, et al. Low-intensity pulsed ultrasound stimulation for mandibular condyle osteoarthritis lesions in rats [J]. Oral Diseases, 2018,24:600-610.
- [14]WANG Y, WU C F, QIN Y, et al. Multi-angle investigation of the fractal characteristics of nanoscale pores in the lower cambrian niutitang shale and their implications for CH₄

参考文献

- [1]张志愿,孙树洋.转化医学视角下头颈癌源性肿瘤异种移植瘤模型队列的研究愿景[J].华西口腔医学杂志,2021,39(6):617-623.
- [2]XIA C, DONG X, LI H. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants[J]. Chin Med J, 2022,135(5):584-590
- [3]李冬梅,吕祎梅,道日娜.窄带成像内镜技术对于喉部增生性病变筛查的意义.内蒙古医科大学学报,2020,42(5):459-463.
- [4]BREDEMEIER M, EDIMIRIS P, MACH P, et al. Gene expression signatures in circulating tumor cells correlate with response to therapy in metastatic breast cancer[J]. Clin Chem, 2017,63(10):1585-1593
- [5]刘复生,刘彤华.肿瘤病理学[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1997:188
- [6]ARGIRIS A. Head and neck cancer[J]. Lancet,2008,371(9625):1695-1709
- [7]卢兴国,徐根波,王彩花,等.癌症患者尿激酶型纤溶酶原激活物及其受体检测的临床意义[J].实用癌症杂志,2002,17(5):530-532
- [8]BLASI F, SIDENIUS N. The urokinase receptor: focused cell surface proteolysis, cell adhesion and signaling[J]. FEBS Lett, 2010,584(9):1923-1930
- [9]BURKLY L C, MICHAELSON J S, ZHENG T S. TWEAK/Fn14 pathway: an immunological switch for shaping tissue responses [J]. Immunol Rev, 2011,244(1):99-114
- adsorption[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2021,21:156-167.
- [15]廖建钊,夏天.细胞外基质在骨关节炎发生、发展中的作用及临床研究价值 [J]. 中国组织工程研究, 2022, (4): 1937-1943.
- [16]DENG J, FUKUSHIMA Y, NOZAKIKI, et al. Anti-inflammatory therapy for temporomandibular joint osteoarthritis using mRNA medicine encoding interleukin-1 receptor antagonist[J]. Pharmaceutics, 2022,14(1785):1-14.
- [17]WU Z Y, LUAN Z W, ZHANG X H, et al. Chondro-protective effects of polydatin in osteoarthritis through its effect on restoring dysregulated autophagy via modulating MAPK, and PI3K/Akt signaling pathways [J]. Scientific Reports, 2019,9:13906.
- [18]YAN X, WANG W Y. The effect of calcitonin on chondrocyte inflammatory response and p38 MAPK signaling pathway[D]. North China University of Science and Technology, 2015.
- [19]ZHANG Z Y, YUAN L C, LIU Y F, et al. Integrated cascade nanozyme remodels chondrocyte inflammatory microenvironment in temporomandibular joint osteoarthritis via inhibiting ROS-NF-κB and MAPK pathways[J]. Adv Healthc Mater, 2023,12(10):e2203195.