

大强度力竭运动和 PDTC 干预对大鼠关节软骨损伤的影响及 NF- κ B 信号途径的探讨

黄伟

(郑州大学 体育学院, 河南 郑州 450044)

摘 要: 观察一次大强度力竭运动和补充 NF- κ B 抑制剂——吡咯烷二巯基氨甲酸(PDTC)对大鼠膝关节软骨诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、一氧化氮(NO)含量, 基质金属蛋白酶-13 酶原(pro-MMP-13)和活性 MMP-13(active-MMP-13)的影响, 探讨过度运动诱导 iNOS 表达上调并造成软骨损伤的可能机制。将 40 只 SD 大鼠随机分为 4 组: 对照组(C 组)、给药组(P 组)、运动组(E 组)、运动+给药组(EP 组)。C 组给予 1 mL 生理食盐水腹腔注射, P 组给予 200 mg/kg PDTC 腹腔注射, E 组腹腔注射 1 mL 生理盐水后进行 1 次大强度力竭运动, EP 组腹腔注射 PDTC 后进行 1 次力竭运动。实验后 2 h, 提取关节液, 硝酸还原酶法测定 NO 含量; HE 染色观察软骨形态学变化并进行 Mankin's 评分; 实时荧光定量 PCR 检测 iNOS 和 MMP-13 mRNA 水平; western blot 法测定 iNOS、pro-MMP-13 和 active-MMP-13 蛋白表达量; 凝胶电泳迁移率分析(EMSA)测定 NF- κ B 与 DNA 结合活性。结果显示与 C 组比较, E 组和 EP 组 Mankin's 评分、关节液 NO 含量、iNOS 和 MMP-13 mRNA 水平、iNOS 和 active-MMP-13 蛋白水平以及 NF- κ B 与 DNA 结合活性均非常显著性升高($P < 0.01$); 与 E 组比较, EP 组上述指标均非常显著性降低($P < 0.01$)。pro-MMP-13 蛋白水平在各组均无显著性差异($P > 0.05$)。结果说明一次大强度力竭运动通过 NF- κ B 信号途径介导 iNOS 表达上调, 促进 NO 大量释放和 MMP-13 激活, 从而参与了软骨损伤的过程。

关键词: 运动医学; 力竭运动; 核因子- κ B; 诱导型一氧化氮合酶; 软骨; 创伤性骨关节炎; 大鼠
中图分类号: G804.5 文献标志码: A 文章编号: 1006-7116(2014)01-0138-07

Effects of high intensity exhaustive exercise and PDTC intervention on rat's articular cartilage injury as well as NF- κ B signal pathway exploration

HUANG Wei

(School of Physical Education, Zhengzhou University, Zhengzhou 450044, China)

Abstract: In order to observe the effects of one-time high intensity exhaustive exercise and pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC, an NF- κ B inhibitor) supplementation on rat's knee articular cartilage inducible nitric oxide synthase (iNOS), nitric oxide (NO) content, matrix metalloproteinase-13 proenzyme (pro-MMP-13) and active-MMP-13, so as to probe into a possible mechanism of over-exercise inducing iNOS expression increase and causing cartilage injury, the author divided 40 SD rats randomly into 4 groups, namely, a control group (group C), a PDTC fed group (group P), an exercise group (group E), and an exercise + PDTC fed group (group EP), injected 1 mL of normal saline into the abdominal cavity of the rats in group C, injected 200 mg/kg of PDTC into the abdominal cavity of the rats in group P, injected 1 ml of normal saline into the abdominal cavity of the rats in group E and then let them do an one-time high intensity exhaustive exercise, injected PDTC into the abdominal cavity of the rats in group EP and then let them do an one-time exhaustive exercise, 2 h after the experiment, extracted synovia, measured NO content by using the nitrate reductase method, observed morphological cartilage changes by means of HE dyeing and de-

terminated Mankin's scores, measured iNOS and MMP-13 mRNA levels by means of real-time fluorescent quantification PCR, measured iNOS, pro-MMP-13 and active-MMP-13 protein expression levels by using the western blot method, measured the activity of combination of NF- κ B and DNA by means of electrophoretic mobility shift assay (EMSA), and revealed the following findings: comparing the rats in groups E and EP with the rats in group C, Mankin's scores, synovial NO content, iNOS and MMP-13 mRNA levels, iNOS and active-MMP-13 protein levels, and the activity of combination of NF- κ B and DNA increased very significantly ($P < 0.01$); comparing the rats in group EP with the rats in group E, all the said indexes decreased very significantly ($P < 0.01$); there was no significant difference in protein pro-MMP-13 level between the rats in various groups. The said findings indicated that one-time high intensity exhaustive exercise mediated iNOS expression increase via NF- κ B signal pathway, boosted the mass discharge of NO and the activation of MMP-13, thus participated the process of cartilage injury.

Key words: sports medicine; exhaustive exercise; NF- κ B; iNOS; cartilage; traumatic osteoarthritis; rat

在竞技体育中,特别是足、篮、排球等频繁跑跳的项目,膝关节最易发生运动创伤。运动员在大强度训练或比赛后常出现关节疼痛、僵硬、酸软等临床症状,一般认为长期大强度训练将增加骨关节炎(osteoarthritis, OA)的危险,称为创伤性骨关节炎(Traumatic Osteoarthritis, TOA)^[1],其主要病理变化是关节软骨退化损伤和软骨下骨反应性增生。TOA 不仅影响运动员的竞技状态和运动成绩,严重者会出现关节僵直畸形甚至致残^[1]。临床研究发现,OA 患者关节滑液中一氧化氮(NO)含量明显升高,而应用诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)抑制剂可对软骨产生保护效应^[2],提示 iNOS/NO 系统在 OA 中起关键作用^[3]。研究证实,iNOS 催化 L-精氨酸产生 NO^[4],NO 可诱导软骨细胞凋亡^[5]以及通过上调基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)表达^[6-8]造成软骨基质降解。核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)是炎症和免疫反应调控过程中的核心转录因子^[9],同时生物信息学研究表明,iNOS 基因启动子序列包含 NF- κ B 结合位点^[10],提示 iNOS 是 NF- κ B 下游的靶基因。TOA 的发生是在关节创伤未完全恢复的情况下多次剧烈运动积累的结果^[1],但是一次大强度力竭运动是否通过激活 NF- κ B 上调 iNOS 并参与了 TOA 的形成,目前尚无报道。本研究拟观察一次急性大强度力竭运动和补充 NF- κ B 抑制剂——吡咯烷二巯基甲酸(pyrrrolidine dithiocarbamate, PDTC)对大鼠膝关节软骨 NF- κ B、iNOS、NO 和 MMP-13 的影响,探讨过度运动诱导软骨损伤的可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

3 月龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只,体质量 240~300 g,购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,分笼饲养,饲养笼选择塑料制品,并配有不锈钢

罩、塑料吸水瓶和金属吸水管,环境温度为 15~16 °C,国家标准固体混合饲料喂养,自由进食水。

1.2 分组及实验干预

所有大鼠安静饲养 3 d,以适应新环境;然后进行 3 d 适应性跑台运动(10 m/min, 15 min/d);休息 1 d 后开始实验。

将动物随机分为 4 组:对照组(C 组)、PDTC 给药组(P 组)、大强度力竭运动组(E 组)、大强度力竭运动+PDTC 给药组(EP 组)。C 组给予 1 mL 生理食盐水腹腔注射后安静休息;P 组给予 200 mg/kg PDTC(美国 Sigma 公司)腹腔注射后处于安静状态;E 组腹腔注射 1 mL 生理食盐水,1 h 后在低电流脉冲动物刺激笼中进行一次大强度跳跃运动(参照文献报道的“电刺激跳跃”法^[11-13]并稍作改进),刺激时间为 0.2~0.5 s,每 15 s 刺激 1 次,直至力竭(动物不能继续完成跳跃);EP 组腹腔注射 PDTC 溶液(200 mg/kg),1 h 后进行 1 次力竭运动,运动方式同 E 组。

1.3 组织取材和 HE 染色

实验结束后 2 h,用质量分数为 3%巴比妥钠腹腔麻醉大鼠,进行以下操作:(1)关节液的提取。右膝关节剪毛、消毒,于髌韧带外侧用 1 mL 注射器施行膝关节穿刺证实刺入关节腔后,注入生理盐水 0.5 mL,反复回抽 3 次后,将液体抽出并注入 EP 管内,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,-20 °C 保存待测 NO 含量。(2)于右侧膝关节切开关节囊,精心剥离膝关节周围的肌肉和韧带等组织,用咬骨钳将股骨、胫骨内外侧软骨取下,注意不要伤及软骨表面。生理盐水冲洗后,将组织分为 2 份,一份用液氮预冷后转入-80 °C 低温冰箱冻存待测基因表达;另一份用质量分数为 4%多聚甲醛固定 48 h 后常规脱钙液(质量分数为 10%EDTA)脱钙,梯度酒精脱水,二甲苯透明,浸蜡包埋。沿标本纵轴切片,4 μ m 连续切片。HE 染色,光镜观察软骨形态学变化(软骨表面是否规则、有无裂隙,细胞

数量、分布、排列是否规则,潮线是否完整)并参考 Mankin's 评分标准^[14]对 HE 染色标本进行评分(分别由 3 名病理学专家单独评分,取均值)。

1.4 关节液 NO 浓度测定

取出装有关节液的 EP 管,采用硝酸还原酶法测定 NO 浓度,试剂盒购自南京建成生物工程研究所,严格按照试剂盒说明操作,测试仪器:722 型分光光度计(上海市第三分析仪器厂)。单位: $\mu\text{mmol/L}$ 。

1.5 iNOS 和 MMP-13 mRNA 表达水平测定

iNOS 和 MMP-13 mRNA 表达用实时荧光定量 PCR 技术测定。方法为:称取 100 mg 软骨组织匀浆后用

RNA 提取试剂盒(美国 Promega 公司; Trizol 法)抽提细胞总 RNA,反转录得到 cDNA(逆转录试剂盒购自美国 Promega 公司)。利用 Primer 5.0 设计上下游引物,见表 1。将 cDNA 样品配置于 Real-time PCR 20 μL 反应体系中,混合离心后置于 7500 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)中进行扩增反应,反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min,40 个 PCR 循环(94 $^{\circ}\text{C}$, 20 s; 58 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 10 s),最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。依据循环阈值(CT 值)计算各基因的相对表达量(C 组的倍数)。 β -actin 为内参基因。

表 1 引物序列

基因名称	引物序列	扩增片段大小
iNOS	上游: 5' -CCAACAACACAGGATGACC-3'	603bp
	下游: 5' -CCTGATGTTGCCACTGTTAG-3'	
MMP-13	上游: 5' -GGTCCCAAACGAACTTAACCTTACA-3'	445bp
	下游: 5' -CCTTGAACGTCATCATCAGGAAGC-3'	
β -actin	上游: 5' -GGCTGTGTTGTCCTGTAT-3'	351bp
	下游: 5' -CCGCTCATTGCCGATAGTG-3'	

1.6 iNOS、MMP-13 蛋白表达水平测定

iNOS、MMP-13 酶原(pro-MMP-13)和活性 MMP-13(active-MMP-13)蛋白表达用蛋白质印迹(western blot)法测定。方法为:称取 100 mg 软骨组织匀浆后用细胞质裂解液裂解细胞,BCA 法测定蛋白浓度,取 50 μg 蛋白上样到质量分数 10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶,电泳,转移至 PVDF 膜,质量分数 5%BSA 室温下封闭 2 h,加一抗(iNOS 稀释 1:1 000,pro-MMP-13、active-MMP-13 和 β -actin 均为 1:2 000)(美国 Santa cruz 公司)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,PBS 洗膜 3 次。二抗用 HRP 标记的 IgG(1:2 000 稀释)(美国 Santa cruz 公司),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,PBS 洗膜 3 次,转膜、显色。用 Image Quant TL 软件对目的蛋白进行光密度分析,计算各蛋白的相对表达量(C 组的倍数)。 β -actin 为内参蛋白。(稀释均为体积比)

1.7 NF- κ B 与 DNA 结合活性测定

用凝胶电泳迁移率分析(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)测定 NF- κ B 与 DNA 结合活性。方法为:首先按照细胞核提取试剂盒(美国 Pierce 公司)提取核蛋白,然后根据 EMSA 试剂盒(美国 Pierce 公司)说明进行。20 μg 核蛋白和生物素标记的含有公认的 NF- κ B 结合位点的 DNA 探针(正义链:5' -AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC-3',反义链 3' -TCAACTCCCCTGAAAGGCTCCG-5')(上海博尚生物技术有限公司合成)混合,总体积 20 μL ,室温静置

20 min。采用 6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(100 V, 1 h),转移到尼龙膜上,紫外灯下交联 15 min,洗膜,滴加化学发光底物,在暗室中把 X 光片曝光并洗像观察结果,以积分灰度值表示 NF- κ B 与 DNA 的结合活性(C 组的倍数)。样本中同时设立阴性对照(反应体系中未加核蛋白,只有标记的 DNA 探针)作为探针位置的标志和冷探针竞争对照(在 C 组中加入过量的未标记的 NF- κ B 竞争探针)以验证探针与 NF- κ B 结合的特异性。

1.8 统计学处理

数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 14.0 统计软件进行数据统计分析。组间比较使用单因素方差分析(one-way ANOVA),Bonferroni 进行多重比较。 $P < 0.05$ 为显著性水平, $P < 0.01$ 为非常显著性水平。

2 结果及分析

2.1 实验动物数量

实验过程中,E 组出现 1 只动物拒跑,EP 组出现 1 只拒跑、1 只死亡。因此,最终纳入数据统计分析的样本量分别为:C 组($n=10$ 只),P 组($n=10$ 只),E 组($n=9$ 只),EP 组($n=8$ 只)。

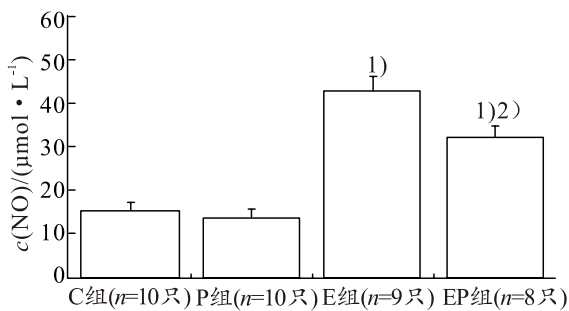
2.2 HE 染色和 Mankin's 评分

C 组为正常软骨组织,表面平整光滑无破损,软骨细胞核呈蓝色、排列整齐,基质呈淡粉色,着色均匀,潮线清晰 Mankin's 评分(0.85 ± 0.04);P 组形态

学表现同 C 组, Mankin's 评分(0.76 ± 0.06)与 C 组无显著性差异; E 组可见软骨表面粗糙, 细胞出现轻度变形或排列紊乱, 孔隙不均匀增大, Mankin's 评分(3.12 ± 0.14)高于 C 组和 P 组($P < 0.01$); EP 组较 E 组稍有减轻, Mankin's 评分(2.55 ± 0.10)低于 E 组($P < 0.01$), 但仍高于 C 组($P < 0.01$)。

2.3 各组关节液 NO 浓度的变化

P 组关节液 NO 浓度与 C 组无显著性差异($P > 0.05$); E 组和 EP 组关节液 NO 浓度较 C 组分别升高了 176.6% ($P < 0.01$)和 118.1% ($P < 0.01$); EP 组关节液 NO 浓度较 E 组降低了 23.9% ($P < 0.01$) (见图 1)。

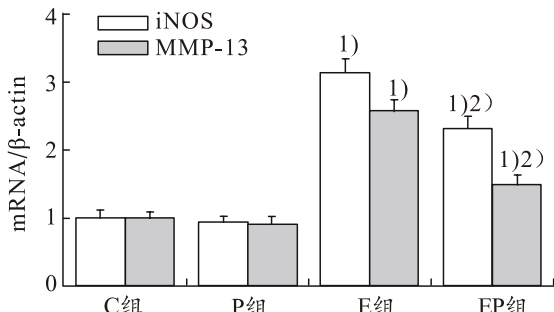


1) 与 C 组比较, $P < 0.01$; 2) 与 E 组比较, $P < 0.01$

图 1 各组关节液 NO 浓度的比较

2.4 各组 iNOS 和 MMP-13 mRNA 表达的变化

各组 iNOS 和 MMP-13 mRNA 表达的变化规律基本一致, 即 P 组与 C 组无显著性差异($P > 0.05$); E 组(iNOS: +215%, $P < 0.01$; MMP-13: +158%, $P < 0.01$)和 EP 组(iNOS: +132%, $P < 0.01$; MMP-13: +49%, $P < 0.01$)较 C 组显著升高; EP 组较 E 组显著性下降(iNOS: -26.3%, $P < 0.01$; MMP-13: -42.2%, $P < 0.01$) (见图 2)。



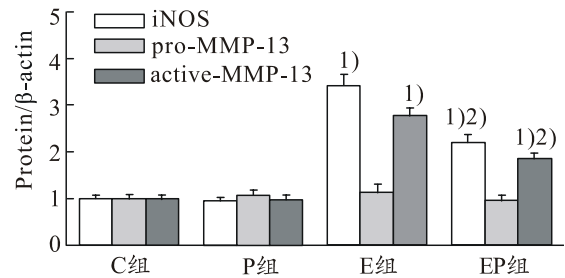
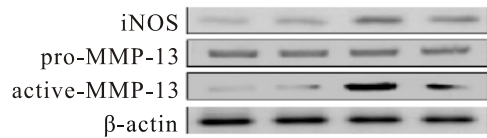
1) 与 C 组比较, $P < 0.01$; 2) 与 E 组比较, $P < 0.01$

图 2 各组 iNOS 和 MMP-13 mRNA 表达的比较

2.5 各组 iNOS、pro-MMP-13 和 active-MMP-13 蛋白表达的变化

pro-MMP-13 蛋白水平在各组均无显著性差异。

iNOS 和 active-MMP-13 的变化趋势一致, 即 P 组与 C 组无显著性差异($P > 0.05$); E 组(iNOS: +242%, $P < 0.01$; active-MMP-13: +179%, $P < 0.01$)和 EP 组(iNOS: +121%, $P < 0.01$; active-MMP-13: +87%, $P < 0.01$)较 C 组显著升高; EP 组较 E 组显著性下降(iNOS: -68.0%, $P < 0.01$; active-MMP-13: -33.0%, $P < 0.01$) (见图 3)。

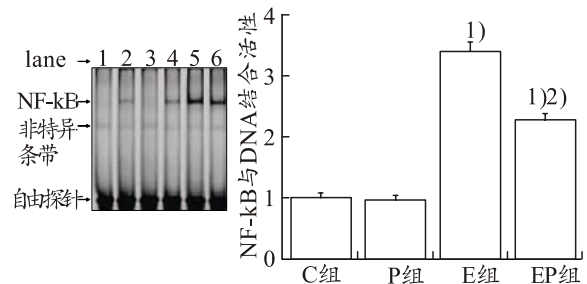


1) 与 C 组比较, $P < 0.01$; 2) 与 E 组比较, $P < 0.01$

图 3 各组 iNOS、pro-MMP-13 和 active-MMP-13 蛋白表达的比较

2.6 各组 NF-κ B 与 DNA 结合活性的变化

EMSA 图像显示, 有浓黑的生物素标记探针自由带 (lane 1~6) 及深浅不一的蛋白质-DNA 结合条带 (lane 2、4、5、6), 游离的生物素标记 DNA 探针在电泳图的最下端。样本中无核蛋白的阴性对照 (lane 1) 仅有自由带, 无结合带。C 组 (lane 2) 在电泳图中部出现一条蛋白与 DNA 探针结合后的阻滞带。冷探针竞争对照 (lane 3) 为 C 组加过量非标记探针做竞争实验, 在原来出现蛋白-DNA 结合带的位置无条带出现, 说明此带是 NF-κ B 与 DNA 结合的特异带。P 组 (lane 4) 与 C 组光密度值无显著性差异 ($P > 0.05$), E 组 (lane 5) 和 EP 组 (lane 6) 显著高于 C 组 (E 组: +240%, $P < 0.01$; EP 组: +127%, $P < 0.01$), EP 较 E 组显著性下降 (-33.2%, $P < 0.01$) (见图 4)。



1) 与 C 组比较, $P < 0.01$; 2) 与 E 组比较, $P < 0.01$; lane 1: 阴性对照; lane 2: C 组; lane 3: 冷探针竞争对照; lane 4: P 组; lane 5: E 组; lane 6: EP 组

图 4 各组 NF-κ B 与 DNA 结合活性的比较

3 讨论

3.1 运动性关节炎软骨损伤模型的建立

关节负重和运动对于维持正常关节软骨的结构和功能是必不可少的,但当负重强度和频率超出或低于允许的范围时,关节软骨的合成与降解失去平衡,导致软骨组成与超微结构发生变化^[1]。关于运动与 OA 的关系,已有的证据证实,适度运动特别是中等强度耐力训练能增强关节功能,但不会导致 OA 发生^[11-15];而大强度超负荷运动与 OA 的关系尚有争论,多数研究认为,关节长期受到高强度冲击力、剪切应力和扭转负荷可增加患 OA 的风险(如足、篮、排球运动),但这种危险性的增加主要是由关节损伤引起的,即 TOA^[11-15]。本研究 HE 染色显示, E 组出现软骨损伤, Mankin's 评分较 C 组升高,说明本研究成功建立了一次大强度力竭运动诱导关节软骨损伤模型。PDTC 给药后,组织学表现较 E 组稍有减轻, Mankin's 评分低于 E 组,但仍高于 C 组,提示 PDTC 未完全逆转力竭运动诱导的软骨损伤。研究表明,机械因素对关节软骨的损伤不仅取决于负荷强度,而且取决于作用时间(或频率)。因此,我们认为,一次大强度力竭运动可造成关节软骨损伤,若机体得不到充分恢复,多次超负荷运动的积累效应最终形成 TOA。

3.2 iNOS/NO/MMPs 信号途径在 TOA 发病机制中的作用

OA 最重要的病理改变是软骨组织(包括软骨细胞和软骨基质)的破坏,而 iNOS/NO/MMPs 在此过程中起关键作用。NO 由一氧化氮合酶(NOS)催化 L-精氨酸产生。NOS 家族包括 3 个成员:神经型 NOS(nNOS),诱导型 NOS(iNOS)和内皮型 NOS(eNOS),三者虽然在分子结构上具有高度同源性,但在基因定位、组织分布、离子依赖活性以及病理生理功能上存在显著差异,软骨细胞则以表达 iNOS 为主^[3]。关于 NO 在对软骨的作用,研究发现,低浓度的 NO 作为信号分子具有免疫调节、抗炎和抗凋亡作用^[16],其机制与低浓度 NO 负反馈调节 iNOS 基因表达有关^[17],而高浓度 NO 可转变为自由基(过氧亚硝酸盐)并造成炎症反应和细胞凋亡^[16]。OA 患者 iNOS 过表达、内源性 NO 产生增加^[18],提示过量产生的 NO 是 OA 发病机制的重要环节。本研究同样发现, E 组 iNOS mRNA 和蛋白水平以及 NO 含量均高于 C 组。由于 iNOS 常与炎症因子共表达,故 iNOS 表达上调常被认为是组织分解代谢的标志,结合前人的研究^[19],我们推测,力竭运动诱导关节软骨损伤时产生促炎症因子(IL-1 β 、TNF- α 等)和氧自由基(ROS),诱导软骨细胞表达 iNOS 并大量合成 NO。NO 可通过 cGMP-PKG 介导的信号途径^[20]以及直接对靶蛋白的硝基化作用^[6]激活 MMP-13(最重要的胶原酶),从而导致软骨基质降

解。本研究还发现, E 组 pro-MMP-13 蛋白水平与 C 组无显著性差异,而 active-MMP-13 蛋白含量则高于 C 组,这是因为,各种 MMPs 由软骨细胞以酶原(pro-MMPs)形式(即无活性的蛋白前体)分泌到细胞外,通过前肽裂解而激活(active-MMPs,即具有生物学活性的 MMPs)^[21],因此,运动对 MMP-13 的激活与 pro-MMP-13 总体水平变化无关,active-MMP-13 而非 pro-MMP-13 的变化才具有病理生理意义。同时提示,在本研究的动物模型中,运动诱导产生的 NO 并未上调 pro-MMP-13 蛋白表达量,而是在翻译水平上(磷酸化或硝基化)直接激活 MMP-13(即 active-MMP-13)。此外,过量的 NO 还可在 ROS 作用下形成过氧亚硝酸盐,诱导软骨细胞凋亡,参与对软骨组织的破坏^[22]。总之,力竭运动诱导的软骨损伤激活了 iNOS/NO/MMPs 信号通路,这是造成软骨基质降解进而发展为 TOA 的重要分子机制。

3.3 一次力竭运动通过 NF- κ B 信号途径介导 iNOS 表达上调

NF- κ B 是由 p50 和 p65 亚基构成的异源二聚体,是细胞信号转导通路中的重要转录因子。生理条件下 NF- κ B 与其抑制蛋白 I κ B 在胞浆中结合,从而抑制 NF- κ B 的核转位,使其处于失活状态。当细胞受到刺激时,I κ B 被上游的 I κ B 激酶(IKK)磷酸化而降解,I κ B 与 NF- κ B 分离,NF- κ B 激活并转移至胞核内促进众多基因转录,参与调控机体的免疫应答、炎症反应和细胞的生长发育等过程。

NF- κ B 的适度表达在维持生理稳态中是必要的,当 NF- κ B 出现调节异常或持续激活时,则导致机体出现慢性炎症性以及相关疾病,如 OA。既往运动与 NF- κ B 的研究主要集中在骨骼肌组织^[23],研究显示,急性亚极量运动可暂时性地激活 NF- κ B 信号转导通路,运动后数小时恢复至安静水平^[24];长期规律的有氧运动能够降低 NF- κ B 的活性,降低炎症反应,是机体对运动的适应性反应^[25];急性大强度离心训练可导致肌细胞 NF- κ B 信号激活,下游炎症因子基因表达增多,是肌肉疲劳、运动性肌肉损伤和延迟性肌肉酸痛的重要原因^[26];长期剧烈运动(加之间歇时间不足)可持续提高 NF- κ B 活性,这是急性大强度运动的积累效应,从而造成肌肉炎症性损伤和蛋白质降解^[27]。上述研究提示,NF- κ B 的间歇式激活对于肌肉是有益的,促进机体对运动的适应,但 NF- κ B 的慢性持续激活对机体是有害的,若恢复时间不足,肌肉无法产生适应性变化甚至出现应激损伤。运动与软骨组织的研究较为少见,且主要是离体实验研究。利用血流切应力模拟运动负荷对体外培养的软骨细胞实施干预

后发现,低切应力(低强度)可抑制软骨降解^[28],而高切应力(高强度)则使 MMPs 表达上调,软骨细胞出现凋亡、基质降解^[29],同时伴随 NF- κ B 活性升高和 iNOS 表达上调^[30],说明运动对软骨细胞的作用具有运动强度依赖性,NF- κ B 和 iNOS 可能起关键作用。本研究于在体水平对力竭运动诱导软骨损伤的机制进行了初探并发现,与 C 组比较,E 组 NF- κ B DNA 结合活性明显升高,iNOS mRNA 和蛋白水平分别升高了 215% 和 242%;使用 NF- κ B 抑制剂——PDTC 后,与 E 组比较,EP 组 NF- κ B DNA 结合活性降低、iNOS 表达量减少,说明运动对 iNOS 信号途径的激活作用可被 PDTC 逆转,提示力竭运动上调 iNOS 表达至少部分是通过活化 NF- κ B 实现的。PDTC 抑制 NF- κ B 活性的具体机制尚不完全明确,可能与抑制 p65 亚基、抑制 I κ B 降解以及减少 NF- κ B 核移位有关。此外,EP 组 NO 含量和 active-MMP-13 表达量降低,说明 PDTC 可能具有潜在的抗 TOA 作用。

关节软骨内高浓度 NO 是造成软骨细胞凋亡和软骨基质降解的重要机制^[3],而力竭运动时软骨细胞 iNOS 表达上调是 NO 大量产生的主要原因,本研究则证实,NF- κ B 对于 iNOS 表达的转录调控是运动诱导 NO 过量产生的关键环节。最近的研究发现,过量的 NO 反过来又可激活 p38-MAPK,p38-MAPK 通过磷酸化 IKK 继续活化 NF- κ B^[31-32],从而形成对 NF- κ B 的正反馈调节。因此,NF- κ B 信号途径参与了运动诱导软骨损伤的病理过程。

当然,运动对 iNOS 的调控除了 NF- κ B 信号途径外,还可能存在其他不依赖于 NF- κ B 的信号通路,尚待深入研究。本研究一方面提示,运动员在训练中要适时监控训练负荷,同时采取必要措施减少关节损伤,降低关节退行性变(TOA)的危险性;另一方面,在大强度超负荷训练后,可采取各种手段抑制 NF- κ B/iNOS/NO/MMPs 信号通路的过度激活,促进出现微损伤的关节软骨结构和功能的恢复,iNOS 成为 OA 治疗的靶点已被临床实验所证实,而 NF- κ B 抑制剂——PDTC 可能也具有潜在的抗 OA 作用,但这一药理作用尚未在人体试验得到证实。因此,需要进一步的临床实验研究。今后的研究应探索大强度运动后软骨组织 NF- κ B 的变化规律以及恢复手段对 NF- κ B 的影响,为制定适宜的运动负荷、确定大强度运动后的间歇时间、加快机体恢复以及预防关节损伤和 TOA 发生提供理论依据。

力竭运动造成的关节损伤是 TOA 形成的重要原因。一次大强度力竭运动通过 NF- κ B 信号途径介导

iNOS 表达上调,促进 NO 大量释放和 MMP-13 激活,从而参与了软骨损伤的过程。

参考文献:

- [1] Molloy M G, Molloy C B. Contact sport and osteoarthritis[J]. *Br J Sports Med*, 2011, 45(4): 275-277.
- [2] 孙炜,王吉兴,金大地,等. 一氧化氮合酶抑制剂对软骨修复组织胶原表达的影响[J]. *中华关节外科杂志: 电子版*, 2009, 3(6): 745-749.
- [3] Abramson S B. Osteoarthritis and nitric oxide[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, 16(Suppl 2): S15-20.
- [4] Cheng A W, Stabler T V, Bolognesi M, et al. Selenomethionine inhibits IL-1beta inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase 2 (COX2) expression in primary human chondrocytes[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2011, 19(1): 118-125.
- [5] Zhong M, Carney D H, Jo H, et al. Inorganic phosphate induces mammalian growth plate chondrocyte apoptosis in a mitochondrial pathway involving nitric oxide and JNK MAP kinase[J]. *Calcif Tissue Int*, 2011, 88(2): 96-108.
- [6] Lizarbe T R, Garcia-Rama C, Tarin C, et al. Nitric oxide elicits functional MMP-13 protein-tyrosine nitration during wound repair[J]. *FASEB J*, 2008, 22(9): 3207-3215.
- [7] Yang L, Guo A, Gu J C. c-Jun N-terminal kinase and nuclear factor kappaB mediate nitric oxide-induced expression of matrix metalloproteinase-13[J]. *Int Orthop*, 2011, 35(8): 1261-1266.
- [8] Zaragoza C, Lopez-Rivera E, Garcia-Rama C, et al. Cbfa-1 mediates nitric oxide regulation of MMP-13 in osteoblasts[J]. *J Cell Sci*, 2006, 119(Pt 9): 1896-1902.
- [9] Hayden M S, Ghosh S. NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions[J]. *Genes Dev*, 2012, 26(3): 203-234.
- [10] Ruimi N, Rwashdeh H, Wasser S, et al. Daedalea gibbosa substances inhibit LPS-induced expression of iNOS by suppression of NF-kappaB and MAPK activities in RAW 264.7 macrophage cells[J]. *Int J Mol Med*, 2010, 25(3): 421-432.
- [11] 胡亚哲, 扈盛. 大鼠跟腱末端病的细胞凋亡的检测[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2000, 8(1): 9-11.
- [12] 戴国钢, 刘波, 罗小兵, 等. 兔膝关节软骨表面形态在短时非周期大强度运动训练后的变化[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(36): 7146-7148.

- [13] 刘波, 戴国钢, 马建, 等. 大强度运动和中医治疗对兔膝关节软骨 IL-1、TNF、PGE2 的影响[J]. 中国运动医学杂志, 2004, 23(3): 304-306.
- [14] Moody H R, Heard B J, Frank C B, et al. Investigating the potential value of individual parameters of histological grading systems in a sheep model of cartilage damage: the Modified Mankin method[J]. *J Anat*, 2012, 221(1): 47-54.
- [15] 高丽霞, 张奉春. 运动与骨关节炎[J]. 中华风湿病学杂志, 2007, 11(2): 114-117.
- [16] Kim H A, Lee K B, Bae S C. The mechanism of low-concentration sodium nitroprusside-mediated protection of chondrocyte death[J]. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7(3): R526-535.
- [17] Chang K, Lee S J, Cheong I, et al. Nitric oxide suppresses inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting post-translational modification of IkappaB[J]. *Exp Mol Med*, 2004, 36(4): 311-324.
- [18] Maki-Petaja K M, Cheriyan J, Booth A D, et al. Inducible nitric oxide synthase activity is increased in patients with rheumatoid arthritis and contributes to endothelial dysfunction[J]. *Int J Cardiol*, 2008, 129(3): 399-405.
- [19] 夏志, 汪清祥, 黄涛, 等. 一氧化氮和一氧化氮合酶与运动训练[J]. 首都体育学院学报, 2009, 21(1): 83-87.
- [20] Lopez-Rivera E, Lizarbe T R, Martinez-Moreno M, et al. Matrix metalloproteinase 13 mediates nitric oxide activation of endothelial cell migration[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(10): 3685-3690.
- [21] Iyer R P, Patterson N L, Fields G B, et al. The history of matrix metalloproteinases: milestones, myths, and misperceptions[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012, 303(8): H919-930.
- [22] Zhao Z, Ji H, Jing R, et al. Extracorporeal shock-wave therapy reduces progression of knee osteoarthritis in rabbits by reducing nitric oxide level and chondrocyte apoptosis[J]. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2012, 132(11): 1547-1553.
- [23] 陈艳梅, 郝选明. 运动训练对核转录因子 kappaB 信号通路及炎症基因影响的研究进展[J]. 体育学刊, 2011, 18(3): 140-144.
- [24] Ji L L, Gomez-Cabrera M C, Steinhafel N, et al. Acute exercise activates nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in rat skeletal muscle[J]. *FASEB J*, 2004, 18(13): 1499-1506.
- [25] Brooks S V, Vasilaki A, Larkin L M, et al. Repeated bouts of aerobic exercise lead to reductions in skeletal muscle free radical generation and nuclear factor kappaB activation[J]. *J Physiol*, 2008, 586(16): 3979-3990.
- [26] Liao P, Zhou J, Ji L L, et al. Eccentric contraction induces inflammatory responses in rat skeletal muscle: role of tumor necrosis factor-alpha[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2010, 298(3): R599-607.
- [27] Jimenez-Jimenez R, Cuevas M J, Almar M, et al. Eccentric training impairs NF-kappaB activation and over-expression of inflammation-related genes induced by acute eccentric exercise in the elderly[J]. *Mech Ageing Dev*, 2008, 129(6): 313-321.
- [28] Leong D J, Li Y H, Gu X I, et al. Physiological loading of joints prevents cartilage degradation through CITED2[J]. *FASEB J*, 2011, 25(1): 182-191.
- [29] Fan Z, Tardif G, Hum D, et al. Hsp90{beta} and p130(cas): novel regulatory factors of MMP-13 expression in human osteoarthritic chondrocytes[J]. *Ann Rheum Dis*, 2009, 68(6): 976-982.
- [30] Islam N, Haqqi T M, Jepsen K J, et al. Hydrostatic pressure induces apoptosis in human chondrocytes from osteoarthritic cartilage through up-regulation of tumor necrosis factor-alpha, inducible nitric oxide synthase, p53, c-myc, and bax-alpha, and suppression of bcl-2[J]. *J Cell Biochem*, 2002, 87(3): 266-278.
- [31] 王今越, 丁树哲, 王小虹, 等. p38、NF-κB、IL-6 在长期大强度运动诱导大鼠骨骼肌发生中的作用[J]. 体育科学, 2010(2): 75-82.
- [32] Kim S J, Hwang S G, Shin D Y, et al. p38 kinase regulates nitric oxide-induced apoptosis of articular chondrocytes by accumulating p53 via NFkappa B-dependent transcription and stabilization by serine 15 phosphorylation[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(36): 33501-33508.