

毫米波干预软骨细胞 β -catenin 活性作用机制研究

李西海¹, 梁文娜², 刘献祥²

1. 福建中医学院骨伤系, 福州 350108

2. 福建中医学院中西医结合研究院, 福州 350108

摘要 为了探讨毫米波干预软骨细胞 β -catenin 活性的作用机制, 采集雄性 4 周龄 SD 大鼠膝关节软骨, 采用机械-II 型胶原酶消化, 建立体外培养软骨细胞, 甲苯胺蓝染色鉴定。第 2 代软骨细胞培养 48 h, 用不含血清 DMEM 饥饿 24 h, 更换为 10% FBS DMEM, 随机分为 4 组: 正常组、实验 1 组 (毫米波干预 30 min)、实验 2 组 (毫米波干预 60 min) 和实验 3 组 (毫米波干预 120 min)。各实验组毫米波干预后, 培养 24 h, II 型胶原免疫组化观察各组软骨细胞的功能, RT-PCR 检测 β -catenin、GSK-3 β 、CKI ϵ mRNA 表达, Western Blot 检测 β -catenin、GSK-3 β 、CKI ϵ 蛋白表达水平。结果表明, 机械-II 型胶原酶消化法, 能够成功建立体外培养的软骨细胞, 第 2 代软骨细胞培养 3 d, 甲苯胺蓝染色可见软骨细胞内呈紫红色异染颗粒, 细胞周围也出现紫红色异染颗粒, 细胞核呈深蓝色, 以圆形、椭圆形为主; 干预前后, 各组软骨细胞 II 型胶原免疫组化均可见胞浆呈棕黄色, 核呈圆形不着色; 实验 2 组、实验 3 组软骨细胞 β -catenin、CKI ϵ mRNA 表达显著高于正常组 ($P < 0.01$), 实验 2 组、实验 3 组软骨细胞 β -catenin、CKI ϵ mRNA 表达显著高于实验 1 组 ($P < 0.01$), 实验 2 组、实验 3 组软骨细胞 β -catenin、CKI ϵ 蛋白表达水平显著高于正常组 ($P < 0.01$), 实验 2 组、实验 3 组软骨细胞 β -catenin、CKI ϵ 蛋白表达水平显著高于实验 1 组 ($P < 0.01$); 实验 2 组、实验 3 组软骨细胞 GSK-3 β mRNA 表达显著低于正常组 ($P < 0.01$), 实验 2 组、实验 3 组软骨细胞 GSK-3 β mRNA 表达显著低于实验 1 组 ($P < 0.05$), 实验 2 组、实验 3 组软骨细胞 GSK-3 β 蛋白表达水平显著低于正常组 ($P < 0.01$), 实验 2 组、实验 3 组软骨细胞 GSK-3 β 蛋白表达水平显著低于实验 1 组 ($P < 0.01$)。毫米波的能量可通过生物体的谐振而被吸收, 生物系统谐振吸收电磁能量后又产生了不属于温度变化的生物学效应, 干扰生物体的信号传导, 动态调节软骨细胞的生物学功能, 毫米波作用机制可能是通过诱导软骨细胞转录合成 β -catenin、CKI ϵ , 抑制 GSK-3 β 表达, 从而促进 β -catenin 合成、抑制分解, 提高软骨细胞内 β -catenin 的活性, 并且能维持软骨细胞表型的稳定。

关键词 毫米波; 软骨细胞; β -catenin; GSK-3 β ; CKI ϵ

中图分类号 R681.3

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2009)21-0032-07

The Role of Millimeter-wave Intervention for Chondrocyte in β -catenin Activity Mechanism

LI Xihai, LIANG Wenna, LIU Xianxiang

1. Medicine Department of Bone, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China

2. Institute of Integrated Traditional and Western Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China

Abstract To investigate the effects of millimeter wave treatment on the activation of β -catenin in chondrocytes, knee articular cartilages of four-week-old SD rats were extracted and digested with mechanical type II collagens. Cells were identified with toluidine blue staining and the secondary generation chondrocytes were cultured for 48 h, and kept hunger for 24 h in serum-free Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM), which was then replaced by 10% FBS DMEM. The cells were randomly divided into control group, experimental 1 group (receiving millimeter wave signal for 30 minutes), experimental 2 group (receiving millimeter wave signal for 60 minutes) and experimental 3 group (receiving millimeter wave signal for 120 minutes). Treated with millimeter wave, the secondary generation chondrocytes were cultured for 24 h, and the cell function was detected by type II collagen immunohistochemistry, the

收稿日期: 2009-05-25

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2008J0080)

作者简介: 李西海, 博士研究生, 研究方向为中西医结合防治骨性关节炎, 电子信箱: lixihai79dahai@163.com; 刘献祥 (通信作者), 教授, 研究方向为中西医结合防治骨性关节炎, 电子信箱: liuxianxiang@163.com

levels of β -catenin, GSK-3 β and CKI ϵ were detected using RT-PCR and western blotting. With mechanical and chemical isolation methods, the well-distributed second generation cells were shown with purplish red metachromatic granules in cytoplasm, blue nucleus and surrounding of metachromatic granules, which were primarily round and oval. Before and after the intervention of the millimeter wave, for type II collagen immunohistochemistry of all groups, nucleus appeared colorless with brown-yellow cytoplasm, most of which were round. After intervention, mRNA expression of β -catenin and CKI ϵ in cells of experimental 2 and 3 groups were significantly higher than the control group ($P<0.01$), mRNA expression of β -catenin and CKI ϵ in cells of experimental 2 and 3 groups were significantly higher than experimental 1 group ($P<0.01$), the protein levels of phosphorylated β -catenin and CKI ϵ in cells of experimental 2 and 3 groups were significantly higher than the control group ($P<0.01$), the protein levels of phosphorylated β -catenin and CKI ϵ in cells of experimental 2 and 3 groups were significantly higher than experimental 1 group ($P<0.01$). mRNA expression of GSK-3 β in cells of experimental 2 and 3 groups were significantly lower than the control group ($P<0.01$), mRNA expression of GSK-3 β in cells of experimental 2 and 3 groups were lower than experimental 1 group ($P<0.05$), the protein levels of phosphorylated GSK-3 β in cells of experimental 2 and 3 groups were significantly lower than the control group ($P<0.01$), the protein levels of phosphorylated GSK-3 β in cells of experimental 2 and 3 groups were significantly lower than experimental 1 group ($P<0.01$). The energy of the millimeter wave can be absorbed by the organism through resonance. In turn, the energy can be transferred to interfere with the signal transduction in the organism, dynamically regulate metabolism, and regulate biological functions of chondrocytes. Millimeter wave intervention β -catenin activity in chondrocytes may be improved through effectively regulating the expression and activation of β -catenin, CKI ϵ and inhibiting the expression and activation of GSK-3 β , promoting synthesis of β -catenin, inhibiting decomposition, and at the same time, the stable features of chondrocytes are maintained.

Keywords millimeter wave; chondrocyte; β -catenin; GSK-3 β ; CKI ϵ

骨性关节炎的病理改变是软骨基质合成与分解代谢失衡的结果,而这一失衡又是炎性介质、基质成分经与特殊受体结合传递信号进入细胞核,激活软骨细胞中基质金属蛋白酶和炎性基因的转录。骨性关节炎病程中的信号通路非常复杂,目前研究表明,Wnt/ β -连环蛋白信号(catenin)通路在骨性关节炎病程中起着中心作用, β -catenin 可与关节形成必须的转录因子 Sox-9 相关联,调节软骨细胞分化^[1-4]。因此,如何有效调控骨性关节炎 Wnt/ β -catenin 信号通路的作用靶点,可能

是调节软骨代谢失衡的新方法。

Wnt 通路是通过调节 TCF/LEF-1 家族的 DNA 结合蛋白转录性质来调节细胞的生物学功能,其核心是胞质内 β -catenin 的稳定性, β -catenin 在细胞内水平受降解蛋白和拮抗蛋白的功能竞争调节,降解蛋白类为 APC 蛋白复合体,由 GSK-3 β 、Axin 和 APC 蛋白组成;拮抗蛋白为 Dsh、CKI ϵ 、GSK-3 β 结合蛋白 (GBP)^[5-7]。在正常未受刺激的细胞中无 Wnt 信号,胞质内 β -catenin 大部分与细胞膜上钙黏着蛋白结合使之附着于细胞骨架蛋白肌动蛋白上,介导同型细胞间黏附。当 Wnt 通路活化时,Wnt 与 Frizzled 受体结合激活细胞内的 CKI ϵ 。CKI ϵ 使 Dsh 磷酸化,释放 GBP,结合与 Axin 联系的 GSK-3 β ,从而抑制 GSK-3 β 对 β -catenin 的磷酸化降解的作用,使未磷酸化 β -catenin 在胞质中积累并转运到核中,破坏 LEF/TCF 家族与 GRO、GBP 抑制蛋白形成的复合蛋白,激活转录因子,从而调控细胞的生物学功能^[8-9]。

生物体在新陈代谢过程中可激发产生 $0.5\times 10^{10}\sim 3\times 10^{12}$ Hz 的相干振荡,而毫米波的频率 (30~300 GHz) 正好在这一频率范围之内,毫米波的能量可通过生物组织的谐振被吸收,生物系统谐振吸收电磁能量后又产生了不属于温度变化的生物学效应,干扰生物体的信号传导,从而起到有效动态调节生物体的新陈代谢^[10-11]。毫米波能诱导 MSCs 向软骨细胞表型分化并分泌软骨细胞特异性基质,且分化程度随着干预时间的延长而增加,主要通过上调 Cbfa1 mRNA、Sox9 mRNA 的表达,进而促进糖胺聚糖和 II 型胶原基质的表达实现^[12]。为了深入揭示毫米波的作用机制,本实验运用细胞生物学的研究方法,观察毫米波对软骨细胞 β -catenin、GSK-3 β 、CKI ϵ 的影响,旨在从细胞分子水平探讨毫米波调控软骨细胞 β -catenin 活性的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验仪器

KFA-100A 型毫米波段治疗仪 (北京中成康富科技有限公司),荧光倒置显微镜 (日本 Olympus 公司),CO₂ 培养箱 (德国 Heraeus 公司),酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司),9600DNA 扩增仪 (美国 PE 生物系统公司),GEL DOC 2000 凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司),引物合成 (上海生工生物工程技术有限公司)。

1.2 主要试剂

DMEM 培养液、胎牛血清、胰蛋白酶 (美国 HyClone 公司),II 型胶原酶 (美国 Sigma 公司),甲苯胺蓝 (国药集团化学试剂有限公司),总蛋白提取试剂盒 (中国凯基生物公司), β -catenin 抗体、GSK-3 β 抗体、CKI ϵ 抗体、内参 β -actin (美国 Santa Cruz 公司),辣根酶标记兔抗山羊 IgG (北京中衫生物技术有限公司),免疫印迹化学发光试剂 (中国碧云天生物公司),兔抗鼠 II 型胶原单克隆抗体、羊抗兔二抗 IgG、DAB 免疫组化试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司),PVDF 膜 (美国 Millipore 公司)。



1.3 动物来源

雄性 4 周龄清洁级 SD 大鼠 36 只(原代培养和鉴定软骨细胞实验 6 只,毫米波干预实验 10 只,实验重复 3 次),由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。动物合格证号 SCXK(沪)2007-0005。

1.4 软骨细胞体外培养

大鼠断颈处死,75%酒精浸泡 5 min, 无菌条件下分离膝关节,切取软骨,含双抗磷酸缓冲液(PBS)漂洗 3 次,DMEM 漂洗 3 次,剪成大小约 1 mm³,置入盛有 0.2% II 型胶原酶的培养皿,放于 37℃培养箱中,每 60 min 取一次上清液,800 r/min,离心 5 min,收集细胞沉淀,重复 4 次。用 DMEM 完全培养液(含 10% 胎牛血清,维生素 C 50 mg/L 和青链霉素各 100 U/mL)重悬细胞,200 目不锈钢筛网过滤,血球计数板计数调整细胞悬液浓度为 (2~3)×10⁵/mL,接种于培养瓶,37℃ 5% CO₂ 培养箱原代培养,倒置显微镜下观察细胞长满 80%后传代,甲苯胺蓝染色鉴定第 2 代软骨细胞。

1.5 实验分组

第 2 代软骨细胞以 1×10⁵/mL 接种于 25 cm² 培养瓶中,培养 48 h,用不含血清 DMEM 饥饿 24 h,更换为 10% FBS DMEM,随机分为 4 组:正常组、实验 1 组(毫米波干预 30 min)、实验 2 组(毫米波干预 60 min)、实验 3 组(毫米波干预 120 min),各实验组毫米波干预后,培养 24 h,采用 II 型胶原免疫组化观察细胞功能,RT-PCR 检测 β -catenin、GSK-3 β 、CKI ϵ mRNA 表达,蛋白印迹法(Western Blot)检测 β -catenin、GSK-3 β 、CKI ϵ 蛋白表达水平。

1.6 实验指标检测

1.6.1 甲苯胺蓝染色鉴定软骨细胞

第 2 代软骨细胞爬片 72 h,PBS 冲洗,4%中性甲醛固定 30 min,用 1%甲苯胺蓝染色 30 min,迅速用无水乙醇漂洗 1 次,干燥,封片,镜下观察。

1.6.2 II 型胶原免疫组化观察细胞功能

干预前后第 2 代软骨细胞爬片,PBS 冲洗,4%多聚甲醛固定 30 min,含 0.5% H₂O₂ 的甲醇室温处理 30 min,蒸馏水洗 3 次;滴加封闭液,室温 20 min,甩去余液;滴加 5 μ g/mL 浓度的 II 型胶原单克隆抗体,置于湿盒内 4℃过夜,PBS 洗 2 min,3 次;生物素化山羊抗兔 IgG 37℃作用 20 min,PBS 冲洗 2 min,3 次;链霉亲和素-过氧化物酶复合物置于室温 30 min,PBS 冲洗 5 min,4 次;DAB 显色,脱水,透明,封片。每张细胞爬片随机观察 200 倍视野 10 个,采用 Image-Pro Plus 5.0 图像分析软件对 II 型胶原阳性染色(棕褐色)的吸光度值进行定量分析。

1.6.3 RT-PCR 检测细胞 β -catenin、GSK-3 β 和 CKI ϵ mRNA 表达

各组干预后第 2 代软骨细胞,按 Triol 操作说明提取总 RNA,取 1 μ g RNA 逆转录成 cDNA,以此 cDNA 为模板行 RT-PCR 扩增 β -catenin、GSK-3 β 、CKI ϵ ,以 GAPDH 为内参,Primer 5 设计引物序列(表 1)。RT-PCR 扩增反应条件:94℃ 5 min,94℃ 30 s,50℃/50℃/52℃/50℃各 30 s,72℃ 30 s,35 个循环,72℃ 10 min,4℃终止保存。扩增产物经 1.5%琼脂糖电泳,凝胶成像系统分析, β -catenin、GSK-3 β 、CKI ϵ 与 GAPDH 的比值进行定量分析。

表 1 实验相关引物
Table 1 Experiment-related primers

引物	引物序列	引物长度/bp	退火温度/℃	GI 号
β -catenin	S 5'-TCC GCA TGG AGG AGA TAG TTG-3'	337	50	4731568
	A 5'-ACC GAA AGC CGT TTC TTG TAG-3'			
GSK-3 β	S 5'-TAG TCC GAT TGC GGT ATT T-3'	512	50	14091769
	A 5'-CTC CCT TGT TGG TGT TCC T-3'			
CKI ϵ	S 5'-GCC CGC TAT GCC TCT ATC-3'	502	52	13928845
	A 5'-CAC TTC GGA GTC GGT TGG-3'			
GAPDH	S 5'-TGC TGA GTA TGT CGT GGA G-3'	288	50	110347607
	A 5'-GTC TTC TGA GTG GCA GTG AT-3'			

1.6.4 Western Blot 检测细胞 β -catenin、GSK-3 ϵ 、CKI ϵ 蛋白表达水平

各组干预后第 2 代软骨细胞,参照试剂说明书,分组提取总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度。每份样品取 25 μ L((含 20 μ g 总蛋白)进行 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,并转移至 PVDF 膜上,放入封闭液(48 mmol/L Tris,39 mmol/L glycine,0.05% SDS(W/V),5% methanol(V/V))中封闭室温孵育 2~4 h,分别与兔抗 β -catenin、GSK-3 β 、CKI ϵ 、 β -actin 抗体 4℃孵育过夜,抗兔二抗 37℃孵育 2 h,洗涤 10 min,3 次,ECL 底物显色,X 片曝光,Fluor-s 凝胶成像分析系统对蛋白条带

进行分析,数据用样品与 β -actin 的比值表示。

1.7 数据统计分析

SPSS 13.0 统计软件处理数据,计量资料采用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,进行 F 检验和 q 检验。

2 结果与分析

2.1 软骨细胞形态观察和鉴定

接种细胞为小圆形,培养 24 h 后细胞开始贴壁,圆形逐渐增大,细胞伸展形成伪足(图 1(a)),培养 8 d 左右,细胞成簇生长并逐渐融合成单层,呈不规则“铺路石”状(图 1(b))。

第2代软骨细胞形态规则、大小均匀、增殖速度快(图1(c))。第2代软骨细胞培养3 d, 甲苯胺蓝染色可见细胞内呈紫红色异染颗粒, 细胞周围也出现紫红色异染颗粒, 细胞核呈深蓝色, 以圆形、椭圆形为主(图1(d))。

2.2 II型胶原免疫组化观察细胞功能
各组干预前后, 软骨细胞分布均匀、边界清晰, 以多角形为主, 胞浆呈棕黄色, 核呈圆形不着色(图2), II型胶原的吸光度值无明显变化(表2)。

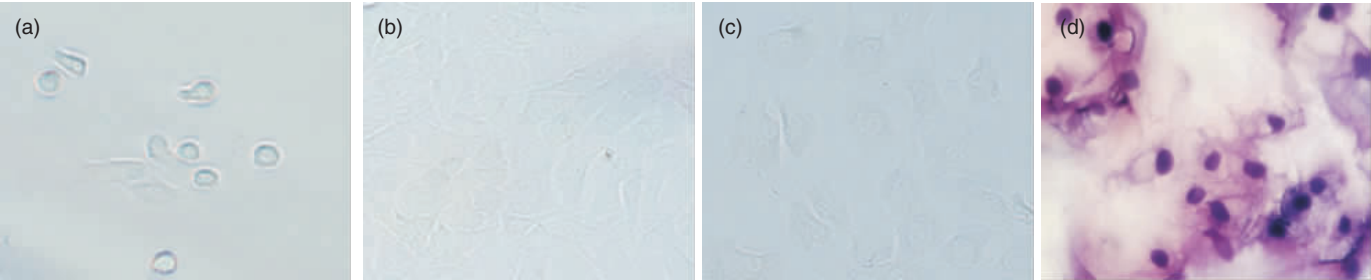


图1 软骨细胞的形态及鉴定(200×)
Fig. 1 Morphology and identification of the chondrocytes(200×)

注: 图(a)为原代软骨细胞培养24 h;图(b)为原代软骨细胞培养第8天;图(c)为第2代软骨细胞培养第3天;图(d)为第2代软骨细胞正常培养第3天甲苯胺蓝染色
Notes: Figure (a) is image of primary cells cultured for 24 h; Figure (b) is image of primary cells cultured for 8 days; Figure (c) is the passage 2 chondrocytes after culture for 3 days; Figure (d) is in situ hybridization of the passage 2 cells cultured for 3 days

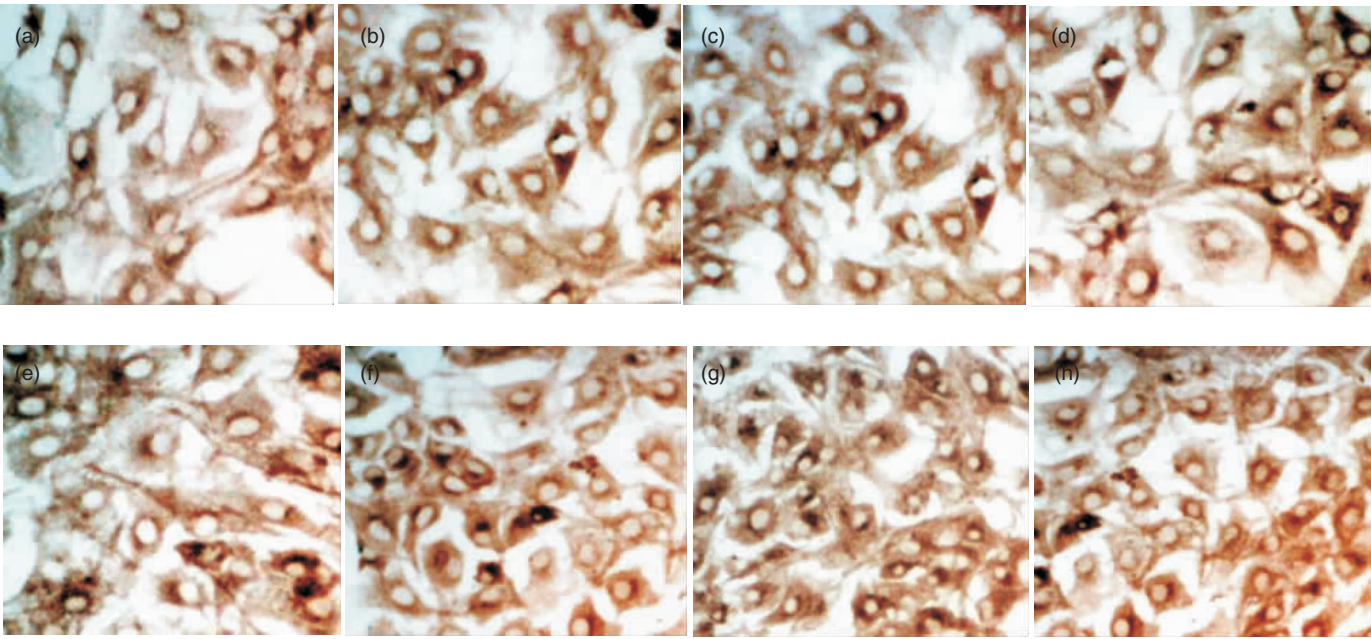


图2 各组软骨细胞II型胶原免疫组化(200×)
Fig. 2 Type II collagen immunohistochemistry in chondrocytes of each group (200×)

注: 图(a)为正常组, 正常培养软骨细胞;图(b)为实验1组, 干预前软骨细胞;图(c)为实验2组, 干预前软骨细胞;图(d)为实验3组, 干预前软骨细胞;图(e)为正常组, 正常培养软骨细胞;图(f)为实验1组毫米波干预30 min 软骨细胞;图(g)为实验2组, 毫米波干预60 min 软骨细胞;图(h)为实验3组, 毫米波干预120 min 软骨细胞
Notes: Figure (a) is morphology of the control cells; Figure (b) is morphology of the experimental group 1 cells before the intervention of millimeter wave; Figure (c) is morphology of the experimental group 2 cells before the intervention of millimeter wave; Figure (d) is morphology of the experimental group 3 cells before the intervention of millimeter wave; Figure (e) is morphology of the control cells; Figure (f) is morphology of the experimental group 1 cells after 30 min the intervention of millimeter wave; Figure (g) is morphology of the experimental group 2 cells after 60 min the intervention of millimeter wave; Figure (h) is morphology of the experimental group 3 cells after 120 min the intervention of millimeter wave.

表 2 各代软骨细胞 II 型胶原免疫组化的光密度值
Table 2 Comparison of the type II collagen signal
in chondrocytes

组名	视野	干预前	干预后
正常组	10	0.37±0.05	0.38±0.04
实验 1 组	10	0.39±0.04	0.38±0.05
实验 2 组	10	0.40±0.04	0.39±0.03
实验 3 组	10	0.38±0.06	0.37±0.05

2.3 RT-PCR 测定干预后软骨细胞 β -catenin、GSK-3 β 和 CK1 ϵ mRNA 表达

各组干预后, 软骨细胞 β -catenin、GSK-3 β 、CKI ϵ mRNA 均有表达 (图 3), 实验 2 组、实验 3 组软骨细胞 β -catenin、CKI ϵ 表达显著高于正常组 ($P=0$)、实验 1 组 ($P=0$); 实验 2 组、实验 3 组软骨细胞 GSK-3 β 表达显著低于正常组 ($P=0.003$, $P=0.001$)、实验 1 组 ($P=0.039$, $P=0.013$) (表 3)。

表 3 RT-PCR 检测干预后软骨细胞 β -catenin、GSK-3 β 和 CK1 ϵ mRNA 表达

Table 3 RT-PCR amplification of β -catenin, GSK-3 β and CK1 ϵ from treated chondrocytes

组名	β -catenin mRNA	GSK-3 β mRNA	CKI ϵ mRNA
正常组	0.58±0.06	0.52±0.07	0.44±0.06
实验 1 组	0.66±0.05	0.48±0.06	0.46±0.04
实验 2 组	1.28±0.08 ^{☆▲}	0.41±0.05 ^{☆△}	0.81±0.08 ^{☆▲}
实验 3 组	1.29±0.09 ^{☆▲}	0.39±0.04 ^{☆△}	0.77±0.05 ^{☆▲}

注:☆为与正常组相比, $P<0.01$;△为与实验1组相比, $P<0.05$;▲为与实验1组相比, $P<0.01$ 。

Notes: ☆, $P < 0.01$ as comparison with control group; △, $P < 0.05$ as comparison with experimental group 1; ▲, $P < 0.01$ as comparison with experimental group 1.

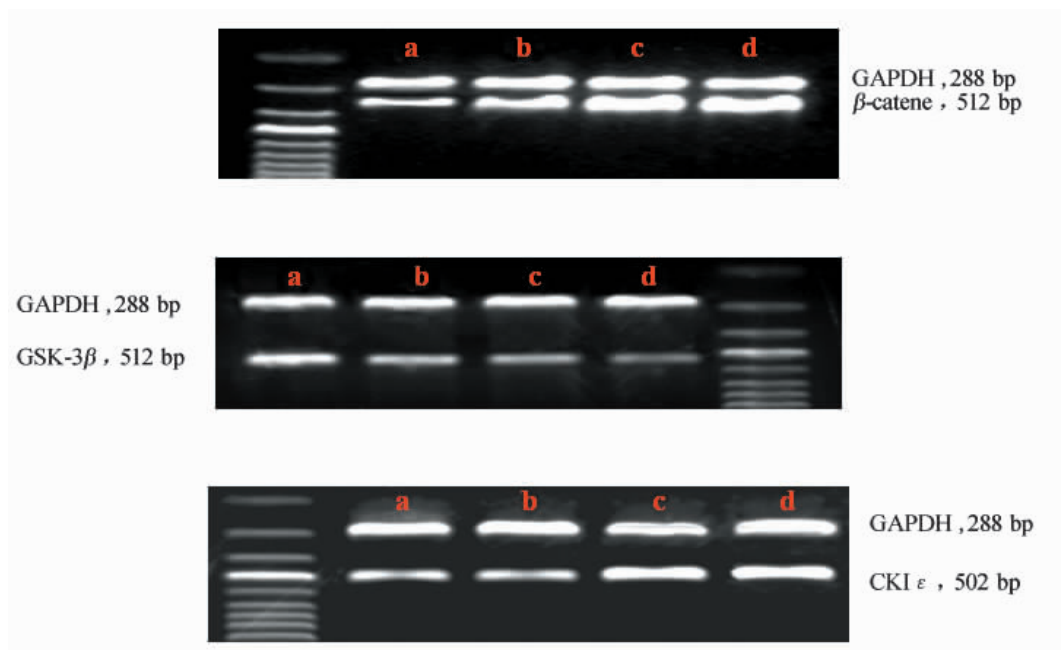


图3 RT-PCR检测干预后软骨细胞 β -catenin、GSK-3 β 和CKI ϵ mRNA表达

Fig. 3 RT-PCR amplification of β -catenin, GSK-3 β and CKI ϵ from treated chondrocytes

注: a 为正常组, 正常培养软骨细胞; b 为实验 1 组, 毫米波干预 30 min 软骨细胞; c 为实验 2 组, 毫米波干预 60 min 软骨细胞; d 为实验 3 组, 毫米波干预 120 min 软骨细胞

Notes: a is morphology of the control cells; b is morphology of the experimental group 1 cells after 30 min the intervention of millimeter wave;
c is morphology of the experimental group 2 cells after 60 min the intervention of millimeter wave;
d is morphology of the experimental group 3 cells after 120 min the intervention of millimeter wave

2.4 Western Blot 测定干预后软骨细胞 β -catenin、GSK-3 β 和 CK1 ϵ 蛋白表达

各组干预后, 软骨细胞 β -catenin、GSK- 3β 和 CKI ϵ 蛋白均有表达(图 4)。

实验 2 组、实验 3 组软骨细胞 β -catenin、CKI ϵ 蛋白表达显著高于正常组($P=0$)、实验 1 组($P=0$);实验 2 组、实验 3 组软骨细胞 GSK-3 β 蛋白表达显著低于正常组($P=0$)、实验 1 组($P=0$)(表 4)。

表 4 Western Blot 检测干预后软骨细胞 β -catenin、GSK-3 β 、CKI ϵ 蛋白表达
Table 4 Western Blot detection of β -catenin, GSK-3 β and CKI ϵ protein from treated chondrocytes

组名	β -catenin	GSK-3 β	CKI ϵ
正常组	0.48±0.06	0.38±0.05	0.17±0.05
实验 1 组	0.54±0.05	0.37±0.06	0.22±0.04
实验 2 组	0.88±0.06 ^{☆▲}	0.23±0.04 ^{☆▲}	0.43±0.07 ^{☆▲}
实验 3 组	0.86±0.08 ^{☆▲}	0.18±0.03 ^{☆▲}	0.41±0.06 ^{☆▲}

注：☆为与正常组相比， $P<0.01$ ；▲为与实验 1 组相比， $P<0.01$ 。
Notes: ☆, $P<0.01$ as compared with the control group; ▲, $P<0.01$ as compared with experimental group 1.

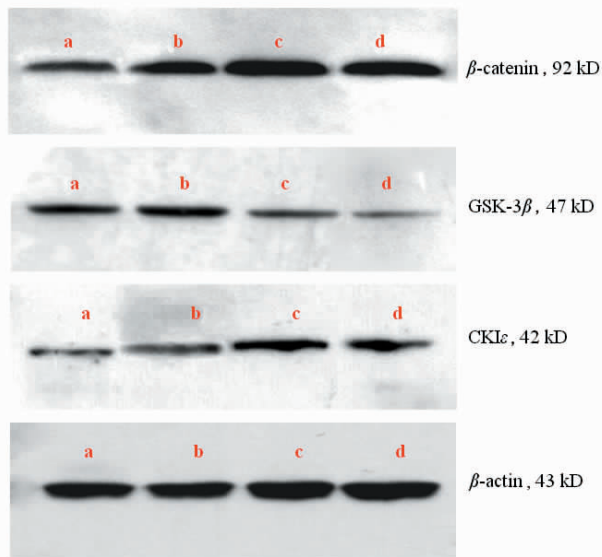


图 4 Western Blot 检测干预后软骨细胞 β -catenin、GSK-3 β 、CKI ϵ 蛋白表达

Fig. 4 Western Blot detection of β -catenin, GSK-3 β and CKI ϵ protein from treated chondrocytes

注：a 为正常组，正常培养软骨细胞；b 为实验 1 组，毫米波干预 30 min 软骨细胞；c 为实验 2 组，毫米波干预 60 min 软骨细胞；d 为实验 3 组，毫米波干预 120 min 软骨细胞

Notes: a is morphology of the control cells; b is morphology of the experimental group 1 cells after 30 min the intervention of millimeter wave; c is morphology of the experimental group 2 cells after 60 min the intervention of millimeter wave; d is morphology of the experimental group 3 cells after 120 min the intervention of millimeter wave.

3 讨论

毫米波指波长为毫米量级的电磁波，波长为 1~10 mm，频率在 30~300 GHz 的高频电磁波。目前研究表明，毫米波可引起生物体的多种生物学效应，这种效应可以是局部的，也

可以是远位的。毫米波频率正好在生物体新陈代谢过程中可激发产生相干振荡 ($0.5\times10^{10}\sim3\times10^{12}$ Hz) 的频率范围之内，毫米波的能量可通过生物体的谐振而被吸收，生物系统谐振吸收电磁能量后又产生了不属于温度变化的生物学效应，干扰生物体的信号传导，动态调节生物体的新陈代谢，从而起到有效调控细胞生物学的功能^[13-14]。

Wnt 信号通路对早期软骨形成及体外软骨细胞分化与成熟具有重要作用。在肢芽间充质细胞发育为成熟骨骼组织过程中，间充质细胞经历的演变：间充质细胞聚集→增殖型软骨细胞→前肥大型软骨细胞→肥大型软骨细胞→软骨细胞凋亡、坏死、血管侵入，软骨内骨化。这一系列连续性变化中，软骨细胞在多个环节被调控，正、负调控机制共同维持着一种动态平衡，保证了骨骼的正常发育形态。Wnt 家族及其信号传导途径中的相关信号分子，如 Frizzled 受体 β -catenin、GSK-3 β 、CKI ϵ 等，对于这种平衡系统的维持发挥着重要的作用^[15-18]。因此，本研究主要观察毫米波对软骨细胞的 β -catenin、GSK-3 β 、CKI ϵ 表达影响，从而探讨毫米波影响软骨细胞 β -catenin 活性的作用机制。

关节软骨由软骨细胞和细胞外基质组成，本研究采用机械-II 型胶原酶消化法，可分离培养出较高纯度的软骨细胞，甲苯胺蓝与第 2 代软骨细胞分泌的蛋白多糖发生耦合反应，聚合成多聚体出现异染性^[19]。软骨细胞在体外培养过程中，随着增殖速度的加快，易发生反分化现象，即出现细胞形态和功能的改变，本研究显示毫米波干预前后软骨细胞表型的稳定，II 型胶原能稳定表达。

软骨细胞发育成熟过程中，在各种生长因子和外界环境变化作用下，会发生明显形态和生化成分的改变，在这一过程中，作为 Wnt/ β -catenin 信号传导通路可能起到了重要的作用。研究表明，Wnt 信号通路对早期软骨形成及体外软骨细胞分化与成熟具有重要作用，Wnt/ β -catenin 信号通路激活后，促使 β -catenin 转移至细胞核内，进而与转录因子 TCF/LEF 结合，调节目基因的表达式^[20]。软骨细胞内 β -catenin 的水平受 CKI ϵ 、GSK-3 β 的动态调控，本研究显示，毫米波干预后能诱导软骨细胞转录合成 β -catenin、CKI ϵ ，抑制 GSK-3 β 表达。

4 结论

毫米波的能量可通过生物体的谐振而被吸收，干预软骨细胞的生物学功能，作用机制可能是通过干预 CKI ϵ 、GSK-3 β 、 β -catenin 之间的动态平衡，从而提高软骨细胞内 β -catenin 水平，推动 β -catenin 进入细胞核内并与 TCF/LEF 结合，并且能维持软骨细胞 II 型胶原持续稳定的表达。

参考文献 (References)

- [1] Blom A B, Brockbank S M, van Lent P L, *et al*. Involvement of the Wnt signaling pathway in experimental and human osteoarthritis: Prominent role of Wnt-induced signaling protein 1[J]. *Arthritis & Rheum*, 2009, 60 (2): 501-512.

- [2] Luyten F P, Tylzanowski P, Lories R J. Wnt signaling and osteoarthritis [J]. *Bone*, 2009, 44(4): 522-527.
- [3] Kawaguchi H. Regulation of osteoarthritis development by Wnt- β -catenin signaling through the endochondral ossification process[J]. *J Bone Miner Res*, 2009, 24(1): 8-11.
- [4] Topol L, Chen W, Song H, *et al.* Sox 9 inhibits Wnt signaling by promoting β -catenin phosphorylation in the nucleus [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(5): 3323-3333.
- [5] Kawasaki Y, Kugimiya F, Chikuda H, *et al.* Phosphorylation of GSK-3 β by cGMP-dependent protein kinase II promotes hypertrophic differentiation of murine chondrocytes [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(7): 2506-2515.
- [6] Chen T, Li M, Ding Y, *et al.* Identification of zinc-finger BED domain-containing 3 (Zbed3) as a novel Axin-interacting protein that activates Wnt/ β -catenin signaling[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(11): 6683-6689.
- [7] Klein T J, Jenny A, Djiane A, *et al.* CKIepsilon/discs overgrown promotes both Wnt-Fz/ β -catenin and Fz/PCP signaling in Drosophila [J]. *Curr Biol*, 2006, 16(13): 1337-1343.
- [8] Jia J, Zhang L, Zhang Q, *et al.* Phosphorylation by double-time/CKIepsilon and CKIalpha targets cubitus interruptus for Slimb/ β -TRCP-mediated proteolytic processing[J]. *Dev Cell*, 2005, 9(6): 819-830.
- [9] Cong F, Schweizer L, Varmus H. Casein kinase Iepsilon modulates the signaling specificities of dishevelled [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(5): 2000-2011.
- [10] Millenbaugh N J, Roth C, Sypniewska R, *et al.* Gene expression changes in the skin of rats induced by prolonged 35 GHz millimeter-wave exposure[J]. *Radiat Res*, 2008, 169(3): 288-300.
- [11] Szabo I, Kappelmayer J, Alekseev S I, *et al.* Millimeter wave induced reversible externalization of phosphatidylserine molecules in cells exposed in vitro[J]. *Bioelectromagnetics*, 2006, 27(3): 233-244.
- [12] Wu G W, Liu X X, Wu M X, *et al.* Experimental study of millimeter wave-induced differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into chondrocytes[J]. *Int J Mol Med*, 2009, 23(4): 461-467.
- [13] Nicolaz C N, Zhadobov M, Desmots F, *et al.* Study of narrow band millimeter-wave potential interactions with endoplasmic reticulum stress sensor genes[J]. *Bioelectromagnetics*, 2009, 30(5): 365-373.
- [14] Zhadobov M, Sauleau R, Le Coq L, *et al.* Low-power millimeter wave radiations do not alter stress-sensitive gene expression of chaperone proteins[J]. *Bioelectromagnetics*, 2007, 28(3): 188-196.
- [15] Zhu M, Tang D, Wu Q, *et al.* Activation of β -catenin signaling in articular chondrocytes leads to osteoarthritis-like phenotype in adult β -catenin conditional activation mice[J]. *J Bone Miner Res*, 2009, 24(1): 12-21.
- [16] Chun J S, Oh H, Yang S, *et al.* Wnt signaling in cartilage development and degeneration[J]. *BMB Rep*, 2008, 41(7): 485-494.
- [17] Kerkhof J M, Uitterlinden A G, Valdes A M, *et al.* Radiographic osteoarthritis at three joint sites and FRZB, LRP5, and LRP6 polymorphisms in two population-based cohorts[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, 16(10): 1141-1149.
- [18] Imai K, Morikawa M, D'Armiento J, *et al.* Differential expression of WNTs and FRPs in the synovium of rheumatoid arthritis and osteoarthritis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 345(4): 1615-1620.
- [19] Karsdal M A, Sumer E U, Wulf H, *et al.* Induction of increased cAMP levels in articular chondrocytes blocks matrix metalloproteinase-mediated cartilage degradation, but not aggrecanase-mediated cartilage degradation [J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(5): 1549-1558.
- [20] Yuasa T, Otani T, Koike T, *et al.* Wnt/ β -catenin signaling stimulates matrix catabolic genes and activity in articular chondrocytes: Its possible role in joint degeneration[J]. *Lab Invest*, 2008, 88(3): 264-274.

(责任编辑 吴晓丽)

·学术动态·



“第4次全国中毒与危重症救治学术会议”征文

为了提高中国中毒与急危重症的救治水平,总结交流近年来的基础和临床经验和学术研究成果,中国毒理学会“第4次全国中毒与危重症救治学术会议”定于2010年3月在广东省深圳市召开。

会议征文内容包括:各种(农药、药物、重金属、有害气体等)中毒救治的基础和临床研究,多脏器功能不全、心衰、肝、肾、呼吸衰竭救治,人工气道管理与呼吸机的应用;危重病各种监测技术和经验交流,急危重病救治的新技术、新药物及新方法,中毒与危重症救治中的组织管理及体会,中毒与危重症的院前急救、现场救治及转运,中毒性疾病的检测与监控,中毒、急危重病救治护理经验介绍,血液净化在中毒及危重症中的应用,中毒及危重症患者的早期营养支持等。

征稿截止日期:2010年1月28日。

联系方式:广东省深圳市宝安区宝城4区龙井二路118号深圳市宝安区人民医院急诊科(518101)张文武;电话:0755-27880712,13923453969;电子信箱:zww-5@163.com。