

文章编号:1004-7220(2013)04-0350-07

周期性张应变通过活性氧生成促进膝关节骨关节炎患者的软骨细胞发生凋亡

俞超¹, 杨飞¹, 戴尅戎^{1,2}, 张晓玲², 唐坚¹, 朱振安¹

(1. 上海市骨科内植物重点实验室, 上海交通大学医学院附属第九人民医院 骨科, 上海 200011;

2. 上海交通大学医学院 健康科学研究所, 上海 200025)

摘要: **目的** 探讨周期性张应变诱导体外培养的膝关节骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 患者软骨细胞发生凋亡过程中的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的作用机制。 **方法** 对受力组软骨细胞施加频率 0.5 Hz、强度 20% 延伸率的周期性张应变。对照组细胞的培养条件与受力组细胞一致, 但不受力。N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 和丁胱亚磺酰亚胺 (BSO) 干预组的软骨细胞在受力前分别使用 NAC 和 BSO 进行预处理。流式细胞术检测细胞凋亡率, DCFH-DA 为荧光探针检测细胞内 ROS 含量, 分光光度法检测软骨细胞内 caspase-9 活性变化。 **结果** 0.5 Hz、20% 延伸率的周期性张应变可以刺激软骨细胞内 ROS、caspase-9 活性及细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$)。使用 NAC 和 BSO 抑制及升高细胞内 ROS 含量后, 可以明显抑制及促进周期性张应变诱导的软骨细胞的 caspase-9 活性及细胞凋亡率 ($P < 0.05$)。 **结论** 周期性张应变通过促进 ROS 生成, 进而激活 caspase-9 介导膝关节 OA 患者软骨细胞发生凋亡。抑制 ROS 的生成可以减轻周期性张应变导致的软骨细胞凋亡。

关键词: 周期性张应变; 活性氧; 骨关节炎; 软骨细胞; 凋亡

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

Cyclic stretch-induced apoptosis in human osteoarthritic chondrocytes is mediated by reactive oxygen species generation

YU Chao¹, YANG Fei¹, DAI Ke-rong^{1,2}, ZHANG Xiao-ling², TANG Jian¹, ZHU Zhen-an¹ (1. Shanghai Key Laboratory of Orthopaedic Implants, Department of Orthopaedic Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200011, China; 2. Institute of Health Sciences, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of reactive oxygen species (ROS) generation on apoptosis of human osteoarthritic chondrocytes induced by cyclic stretch *in vitro*. **Methods** The human osteoarthritic chondrocytes were subjected to cyclic stretch at the frequency of 0.5 Hz with 20% elongation. The chondrocytes without cyclic stretch were used as a control. ROS generation in chondrocytes was inhibited by the antioxidant, N-acetyl-L-cysteine (NAC) and potentiated by the glutathione depleter, DL-buthionine-[S, R]-sulfoximine (BSO). Apoptosis was detected by flow cytometry. Intracellular ROS was detected using DCFH-DA and caspase-9 activity was measured using spectrophotometry. **Results** The cyclic stretch at the frequency of 0.5 Hz with 20% elongation induced ROS generation, and activation of caspase-9 and apoptosis in human osteoarthritic chondrocytes were significantly increased ($P < 0.05$). The inhibition or potentiation of intracellular ROS by NAC or BSO could obviously inhibit or improve caspase-9 activity and apoptosis in chondrocytes under cyclic stretch ($P < 0.05$).

Conclusions Cyclic stretch-induced apoptosis in human osteoarthritic chondrocytes is mediated by ROS genera-

收稿日期:2013-01-08; 修回日期:2013-03-05

基金项目:上海市骨科内植物重点实验室建设基金(08DZ2230300), 国家自然科学基金资助项目(30973038)。

通信作者:朱振安, 教授, E-mail: zhuzhenan2006@126.com; 唐坚, E-mail: tangjian65@163.com。

tion and activation of caspase-9. Suppression of ROS can prevent chondrocytes from apoptosis induced by cyclic stretch.

Key words: Cyclic stretch; Reactive oxygen species (ROS); Osteoarthritis (OA); Chondrocyte; Apoptosis

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种以关节软骨退行性变和关节周围骨质增生为病理特征的慢性进行性骨关节疾病, 是引起中老年人关节疼痛的常见原因。OA 的致病因素包括多方面, 如应力因素、生化因素以及遗传因素等, OA 的发病是在力学和生物学因素共同作用下, 软骨细胞、细胞外基质及软骨下骨三者降解和合成偶联失衡导致的结果。已经证实关节创伤、肥胖、先天发育不良、关节周围肌群肌力减退等因素造成的生物力学失衡会导致关节应力变化, 从而引起软骨细胞代谢紊乱、损伤及退变。

细胞凋亡 (apoptosis) 是在体内因素触发下, 启动自身内部机制, 在基因调控下所引起的细胞主动死亡过程。研究表明, 软骨细胞凋亡与 OA 进程密切相关, OA 患者关节软骨中的软骨细胞凋亡水平明显高于正常。Hashimoto 等^[1] 采用流式细胞技术检测, 发现 OA 患者的关节软骨中软骨细胞的凋亡率约有 22.3%, 而正常软骨中的软骨细胞凋亡率仅为 4.8%。Kim 等^[2] 也发现, OA 患者关节软骨细胞的凋亡现象明显高于正常组, 并且凋亡的软骨细胞主要集中于软骨表层和中间层, 呈灶性分布。Heraud 等^[3] 采用流式细胞技术、TUNEL 等多种技术方法证实 OA 患者的关节软骨中约有 18%~21% 的软骨细胞表现出凋亡特征, 而正常关节软骨中只有 2%~5% 的凋亡细胞。以上研究结论均提示软骨细胞的过度凋亡可能在骨关节病的发病过程中起到重要作用。对于软骨细胞凋亡的原因, 目前认为异常的应力刺激可能是原因之一。Islam 等^[4] 研究证明持续的流体静压力可以通过上调 TNF- α 和诱导型一氧化氮合酶的表达, 激活 caspase-3 导致软骨细胞凋亡。Mobasher 等^[5] 提出假说, 认为过度的力学负荷可能通过阻断整合素与细胞外基质的互相作用, 引起软骨细胞凋亡。

力学刺激是 OA 发病的重要致病因素, 软骨细胞凋亡是 OA 的重要病理改变特征, 但两者的联系及作用机制目前仍不清晰, 需要进一步深入研究。本研究利用 Flexcell 4000TM 机械张应变加载系统对

膝关节 OA 患者的软骨细胞进行周期性张应变加载, 建立张应力诱导软骨细胞凋亡模型; 并在此基础上, 探讨氧化应激过程中产生的 ROS 及 caspase-9 是否参与该凋亡过程, 分析 ROS 抑制剂 N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 对周期性张应变刺激下软骨细胞的保护作用。明确张应变作用下软骨细胞凋亡机制将有助于揭示张应力刺激软骨细胞退变, 促进 OA 发生发展的致病机理, 为临床治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 软骨细胞的分离与培养

膝关节 OA 患者行全膝关节置换术时收集关节软骨, 生理盐水冲洗血迹, 并迅速移入盛有 30 mL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 (GibcoTM, 加拿大) 中。软骨细胞分离与培养方法参考文献 [6-7]。收集的软骨细胞置于 37 °C、5% CO₂ 细胞孵箱内培养, 72 h 第 1 次换液, 以后每 2~3 d 更换培养液 1 次。软骨细胞接近长满时, 胰酶消化, 软骨细胞以 1×10^5 /孔接种于细胞加力板。

1.2 周期性张应力加载方法

待所培养关节软骨细胞在 Flexcell 4000TM 张应变加载系统 (Flexercell Corporation, 美国) 细胞培养板上长到接近 80% 时, 更换为含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养基进行细胞同步化。受力组对软骨细胞施加强度为 20% 延伸率、0.5 Hz 的周期性张应变 6、12 和 72 h。对照组在同一时间静置培养于细胞加力板但不受力。NAC 和 BSO 干预组在受力前分别使用 2.5 mmol/L 的 NAC (Sigma) 和 1 mmol/L 的 BSO (Sigma) 对软骨细胞进行预处理。

1.3 软骨细胞凋亡流式细胞技术检测

待检测细胞弃去原有培养液, PBS 轻轻吹洗 2 次, 完全洗去残留培养液。用不含 EDTA 的胰酶消化细胞, 1 500 r/min 离心 5 min, 收集细胞于检测管中, 按照 Annexin V-FITC/PI 凋亡染色试剂盒 (BD Bioscience Pharmingen, 美国) 的说明书操作, 依次加入 Annexin V-FITC 和 PI, 流式细胞仪测定细胞凋亡率。

1.4 软骨细胞内 ROS 水平检测

以 DCFH-DA (Beyotime) 为指示细胞内 ROS 含量的荧光探针,检测方法参考文献[8]。用荧光酶标仪测定荧光强度(使用 488 nm 激发波长,525 nm 发射波长),最后用荧光强度值除以蛋白含量(BCA 法测定)。细胞内 ROS 含量以各处理组的测量值相对于对照组测量值的倍数来表示。

1.5 软骨细胞内 caspase-9 活性检测

收集细胞,用 caspase-9 活性检测试剂盒(Beyotime)检测 caspase-9 活性,操作步骤按照试剂盒说明书进行,其原理基于活化的 caspase-9 可以催化底物 Ac-LEHD-pNA 产生黄色的 pNA,应用分光光度计测定样品在 405 nm 处的吸光度。细胞内的 caspase-9 活性以各处理组的测量值相对于对照组测量值的倍数来表示。

1.6 统计学分析

所有试验均作 3 次重复,应用 SAS 6.0 软件进行统计学分析,数据以均数 \pm 标准差表示,比较组间进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 周期性张应变诱导软骨细胞凋亡(见图 1)

20% 延伸率、0.5 Hz 周期性张应变刺激软骨细胞 12 h 后,与对照组相比,两组之间的细胞凋亡率没有明显差异。随着受力时间的延长,在刺激软骨细胞 72 h 后,受力组的细胞凋亡率明显上升,达到 $(20.2 \pm 2.9)\%$, 是对照组细胞凋亡率的 4.4 倍,两者之间有统计学差异($P < 0.05$)。说明周期性张应变诱导软骨细胞发生凋亡具有明显的时间依赖性。

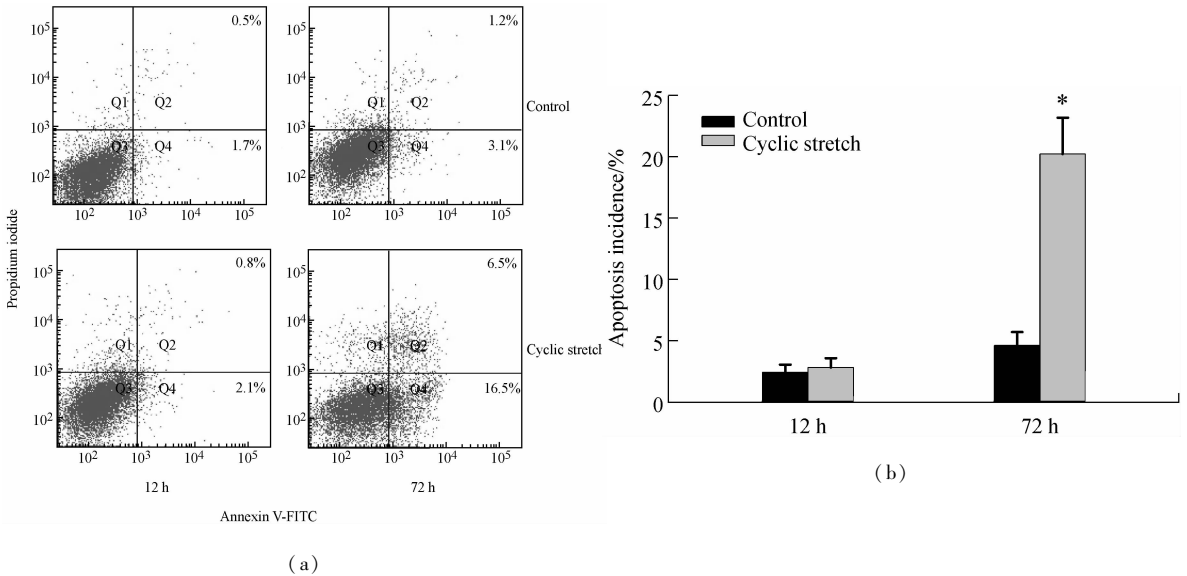


图1 周期性张应变对膝关节 OA 患者软骨细胞凋亡的影响 (a) Annexin V-FITC/PI 染色的代表性流式细胞图片, (b) 周期性张应变刺激软骨细胞 12、72 h 后的细胞凋亡率 (* $P < 0.05$, $n = 3$)

Fig.1 Cyclic stretch induces cell apoptosis in human osteoarthritic chondrocytes (a) Representative graphs obtained by flow cytometry analysis for cell apoptosis after double staining with annexin V-FITC and propidium iodide, (b) Apoptotic incidences of human osteoarthritic chondrocytes induced by the cyclic stretch for 12 h and 72 h, respectively

2.2 周期性张应变刺激软骨细胞 ROS 生成(见图 2)

周期性张应变刺激软骨细胞 6 和 12 h 可以明显增加细胞内 ROS 的含量,分别较对照组增加了 190% 和 542%,其差异具有统计学意义($P < 0.05$),说明周期性张应变可以促进软骨细胞内 ROS 生成。

2.3 周期性张应变刺激软骨细胞 caspase-9 活性表达(见图 3)

周期性张应变刺激软骨细胞 12 h 时的细胞内 caspase-9 活性与对照组无明显差异。继续刺激软骨细胞 72 h 后,受力组细胞内的 caspase-9 活性明显上升,是对照组的 3.1 倍,两者之间有统计学差异

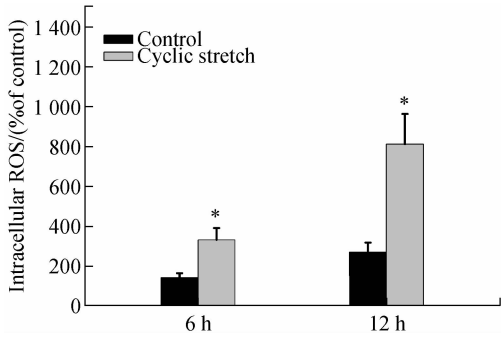


图2 周期性张应变刺激软骨细胞 6、12 h 后细胞内 ROS 变化 (* $P < 0.05, n = 3$)

Fig. 2 The ROS generation in chondrocytes subjected to cyclic stretch for 6 h and 12 h, respectively

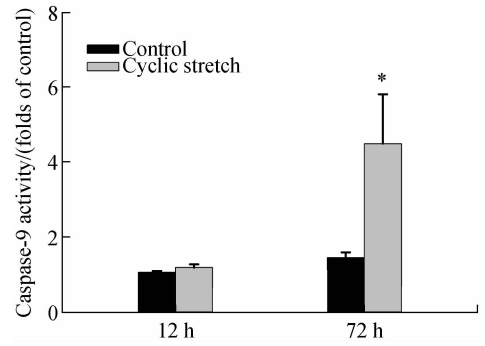


图3 周期性张应变刺激软骨细胞 12 h 和 72 h 后的 caspase-9 活性变化 (* $P < 0.05, n = 3$)

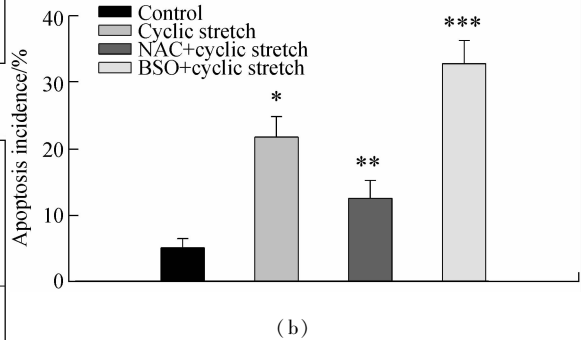
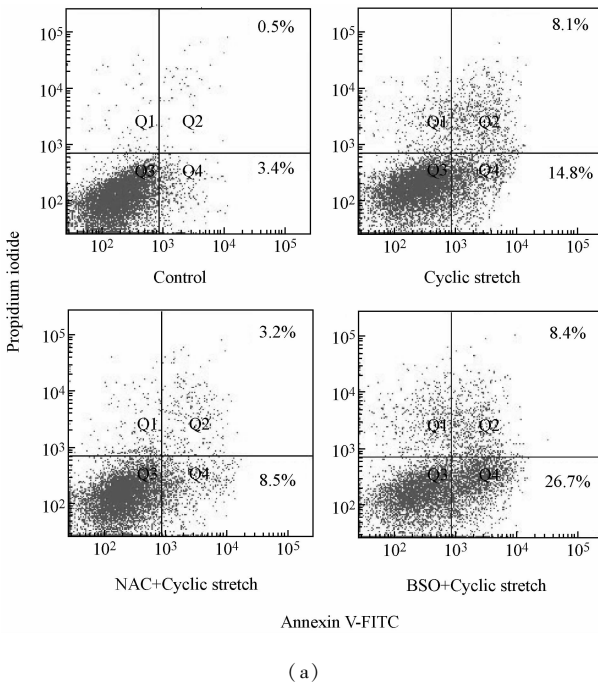
Fig. 3 The caspase-9 activity in chondrocytes subjected to cyclic stretch for 12 h and 72 h, respectively

($P < 0.05$), 说明周期性张应变激活软骨细胞内的 caspase-9 具有时间依赖性。

2.4 NAC 和 BSO 预处理对周期性张应变诱导软骨细胞凋亡的影响 (见图 4)

周期性张应变刺激软骨细胞前使用 2.5 mmol/L

的 NAC 和 1 mmol/L 的 BSO 进行预处理, 可以显著降低和增加受力软骨细胞的凋亡率, 与单纯受力细胞相比, 其差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明 ROS 介导周期性张应变诱导软骨细胞发生凋亡的过程。



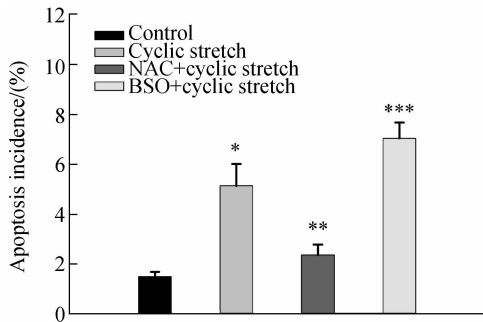
与对照组相比, * $P < 0.05$; 与单纯加力组相比, ** $P < 0.05$; 与单纯加力组相比, *** $P < 0.05$

图4 NAC 和 BSO 预处理对周期性张应变诱导软骨细胞凋亡的影响 (a) Annexin V-FITC/PI 染色的代表性流式细胞图片, (b) NAC 和 BSO 预处理后, 周期性张应变刺激软骨细胞 72 h 后的细胞凋亡率 ($n = 3$)

Fig. 4 The effects of NAC and BSO on the apoptosis of chondrocytes induced by cyclic stretch (a) Representative graphs obtained by flow cytometry analysis for cell apoptosis after double staining with annexin V-FITC and propidium iodide, (b) NAC and BSO suppressed and enhanced the apoptosis of chondrocytes induced by cyclic stretch for 72 h

2.5 NAC 和 BSO 预处理对周期性张应变诱导软骨细胞 caspase-9 活性的影响 (见图 5)

周期性张应变刺激软骨细胞前,使用 2.5 mmol 的 NAC 和 1 mmol 的 BSO 进行预处理,能够显著降低和促进受力软骨细胞内的 caspase-9 活性,与单纯受力组细胞相比,其差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。说明周期性张应变诱导软骨细胞凋亡是通过 ROS 激活 caspase-9 进行。



与对照组相比, * $P < 0.05$; 与单纯加力组相比, ** $P < 0.05$; 与单纯加力组相比, *** $P < 0.05$

图 5 NAC 和 BSO 预处理对周期性张应变诱导软骨细胞 caspase-9 活性的影响 ($n = 3$)

Fig. 5 Effects of NAC and BSO on the caspase-9 activity of chondrocytes induced by cyclic stretch

3 讨论

关节软骨细胞承受的应力形式包括压应力、张应力和剪切力。力学因素在维持软骨内环境稳定以及软骨损伤中都起到重要作用,力学刺激的形式、强度、频率及持续时间可以影响软骨细胞的代谢、炎性介质表达及凋亡的发生。力学刺激可以转化成生物学信号传递至胞内,调整相应基因表达从而适应外部环境变化^[9]。Smith 等^[10]比较间歇性流体静压力 (intermittent hydrostatic pressure, IHP) 与剪应力对骨关节炎软骨细胞的作用,发现剪应力会增加炎症介质 NO 的释放,减少蛋白多糖和 II 型胶原的合成,并且诱导软骨细胞凋亡相关分子的表达,IHP 的作用则相反,提示不同形式力学刺激的生物学效应并不相同。Gassner 等^[11]证实循环张应力 (cyclic tensile stress, CTS) 可以拮抗 IL-1 β 的致炎作用,抑制 IL-1 β 诱导的 NO 合酶生成,并上调蛋白多糖的表达,提示循环张应力对软骨具有保护作用。但是

Matsukawa 等^[12]的研究结论却与此相反,认为 CTS 会促进软骨细胞 NO 的合成,并抑制蛋白多糖的合成。这些结论相反的研究提示力学刺激对软骨细胞的生物学效应还依赖于不同的强度及频率。文献 [13,14] 中采用关节软骨快速加载的静态弹性模型研究发现,关节软骨受压区周围的软骨受到的力是张应力,并证明在关节软骨-软骨下骨界面上的关节软骨所受到的力主要也是张应力,故研究张应力对软骨细胞的作用对于理解 OA 的致病机制十分重要。本研究采用 Flexcell 4000TM 系统,通过计算机控制系统产生不同大小的负压,使亲水性弹性细胞培养膜边缘拉伸,接种附着在培养膜上的软骨细胞可受到各个方向均匀的张应力,施加力值的精确度高、可控性强。结果发现周期性张应变可以诱导 OA 患者膝关节软骨细胞出现凋亡现象,周期性张应变刺激软骨细胞内 ROS 明显增加,并激活 caspase-9 诱导细胞凋亡。实验进一步证实抑制 ROS 的产生可以保护软骨细胞,减少凋亡。

人体在正常情况下,ROS 的产生与清除处于动态平衡。当在病理因素作用下,这一动态平衡可被破坏,导致出现氧化应激。已经证实 ROS 可引起生物膜、蛋白质及核酸的损伤,并与衰老、糖尿病、动脉粥样硬化等多种疾病密切相关。既往研究指出,ROS 参与 OA 的病理过程,在 OA 进展过程中起到重要作用。ROS 可以直接损伤软骨细胞,损害其生理功能,引起软骨细胞凋亡。ROS 还可以通过直接作用或间接作用破坏软骨细胞外基质。Haklar 等^[15]收集 44 例 OA 患者的关节液,发现与健康人相比,伴随软骨损害的 OA 患者的关节液中 ROS 水平明显升高。OA 患者关节中 ROS 是如何产生的呢? Martin 等^[16]指出应力可以刺激软骨细胞产生 ROS。本研究结果显示,20% 的周期性张应变对软骨细胞作用 6 h 后,OA 患者关节软骨中的 ROS 的表达即开始明显上升,随着加载时间的延长,软骨细胞中的 ROS 也逐渐增多,提示周期性张应变是导致 OA 患者软骨细胞中活性氧生成的重要原因。力学刺激可以诱导多种细胞生成 ROS。如 Yamamoto 等^[17]证实周期性张应变可以刺激成骨样细胞 HT-3 产生 ROS,细胞内的 ROS 生成量与受力的强度和作用时间相关。Suzuma 等^[18]证实,周期性张应变可以刺激视网膜毛细血管周细胞产生 ROS,并促进细

胞凋亡。本研究进一步证实,周期性张应变刺激软骨细胞 6 h 导致 ROS 明显升高时,软骨细胞内的 caspase-9 并未激活,此时软骨细胞凋亡率也未明显增加,说明张应变刺激软骨细胞产生 ROS 这一事件在凋亡过程中位于上游阶段。

Caspase 是天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶,在细胞凋亡的过程中起着关键性的作用。Caspase 家族有相似的氨基酸序列、结构和底物特异性,通常以无活性的蛋白酶原形式在细胞内合成和分泌。凋亡发生时,caspase 通过蛋白酶水解去除氨基端的一段序列而被激活。细胞通过线粒体途径发生凋亡时,细胞色素 C 从线粒体释放到胞浆中,和 caspase-9 以及 Apaf-1 形成复合物,同时激活 caspase-9,并通过级联反应进一步活化凋亡执行因子 caspase-3 诱发凋亡。本研究使用 20% 的周期性张应变对软骨细胞作用 12 h 后,软骨细胞中的 caspase-9 未被激活,此时软骨细胞的凋亡率较对照组无明显差异。周期性张应变作用 72 h 后,受力组的软骨细胞中的 caspase-9 活性明显上升,此时的细胞凋亡率也明显增加,提示周期性张应变通过激活 caspase-9 介导凋亡的发生。

为了进一步证实 ROS 在周期性张应变诱导软骨细胞凋亡过程中的作用,加入 NAC 和 BSO 消除或增加软骨细胞中的 ROS,研究软骨细胞凋亡率的变化。NAC 是谷胱甘肽(GSH)合成前体,易于进入细胞内,其在细胞内去乙酰化后生成含有还原型巯基的半胱氨酸,对抗 ROS 的细胞损伤作用。BSO 是谷氨酰半胱氨酸合成酶抑制剂,可以选择性抑制该酶的活性而导致细胞内 GSH 耗竭,使细胞内的 ROS 生成增多。结果发现分别应用 NAC 和 BSO 预处理软骨细胞后,与单独加力组细胞相比,周期性张应变刺激软骨细胞内的 caspase-9 活性表达量及细胞凋亡率也随之变化,NAC 预处理组明显下降,而 BSO 预处理组则明显上升。因此,周期性张应变通过 ROS 激活 caspase-9 来介导软骨细胞的凋亡过程。

4 结论

周期性张应变可以诱导膝关节 OA 患者软骨细胞发生凋亡,其作用机制是通过促进 ROS 生成,进而激活 caspase-9 介导凋亡发生。抑制 ROS 的生成可以减轻周期性张应变导致的软骨细胞凋亡。以上

结论为阐明张应力因素在骨关节炎致病机制中的作用及预防和治疗骨关节炎提供了新思路和新方法。

参考文献:

- [1] Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S, *et al.* Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 1998, 41(9): 1632-1638.
- [2] Kim HA, Lee YJ, Seong SC, *et al.* Apoptotic chondrocyte death in human osteoarthritis [J]. *Rheumatol*, 2000, 27(2): 455-462.
- [3] Heraud F, Heraud A, Harmand MF. Apoptosis in normal and osteoarthritic human articular cartilage [J]. *Ann Rheum Dis*, 2000, 59(12): 959-965.
- [4] Islam N, Haqqi TM, Jepsen KJ, *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.
- [5] Mobasheri A, Carter SD, Martin-Vasallo P, *et al.* Integrins and stretch activated ion channels; putative components of functional cell surface mechanoreceptors in articular chondrocytes [J]. *Cell Biol Int*, 2002, 26(1): 1-18.
- [6] Hashimoto S, Nishiyama T, Hayashi S, *et al.* Role of p53 in human chondrocyte apoptosis in response to shear strain [J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(8): 2340-2349.
- [7] Hu DN, Yang PY, Ku MC, *et al.* Isolation and cultivation of human articular chondrocytes [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2002, 18(3): 113-120.
- [8] Liu Z, Sun L, Zhu L, *et al.* Hydroxytyrosol protects retinal pigment epithelial cells from acrolein-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction [J]. *J Neurochem*, 2007, 103(6): 2690-2700.
- [9] 周薇, 吕永钢, Gurinder K Singh, 等. 周期性机械拉伸对类风湿性关节炎和骨关节炎成纤维样滑膜细胞 BMP-2 表达的影响[J]. *医用生物力学*, 2011, 26(2): 121-127.
Zhou W, Lv YG, Singh GK, *et al.* Effects of cyclic mechanical stretch on BMP-2 expression in RA and OA fibroblast-like synoviocytes [J]. *J Med Biomech*, 2011, 26(2): 121-127.
- [10] Smith RL, Carter DR, Schurman DJ. Pressure and shear differentially alter human articular chondrocyte metabolism: A review [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2004, (427 Suppl): S89-95.
- [11] Gassner R, Buckley MJ, Georgescu H, *et al.* Cyclic tensile stress exerts anti-inflammatory actions on chondrocytes by inhibiting inducible nitric oxide synthase [J]. *J Immu-*

- nol, 1999, 163(4): 2187-2192
- [12] Matsukawa M, Fukuda K, Yamasaki K, *et al.* Enhancement of nitric oxide and proteoglycan synthesis due to cyclic tensile strain loaded on chondrocytes attached to fibronectin [J]. *Inflamm Res*, 2004, 53(6): 239-244
- [13] O'Connor JJ, Johnson I. Transmission of rapidly applied load through articular cartilage: The mechanics of osteoarthritis [M]// Turner-Smith AR, Ed. *Micromovement in Orthopaedics*. Oxford: Clarendon Press, 1993: 244-268.
- [14] Kelly PA, O'Connor JJ. Transmission of rapidly applied loads through articular cartilage. Part 2: Uncracked cartilage [J]. *Proc Inst Mech Eng*, 1996, 210(1): 27-37.
- [15] Haklar U, Yüksel M, Velioglu A, *et al.* Oxygen radicals and nitric oxide levels in chondral or meniscal lesions or both [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2002, 403: 135-142.
- [16] Martin JA, Buckwalter JA. Aging, articular cartilage chondrocyte senescence and osteoarthritis [J]. *Biogerontology*, 2002, 3(5): 257-264.
- [17] Yamamoto N, Fukuda K, Matsushita T, *et al.* Cyclic tensile stretch stimulates the release of reactive oxygen species from osteoblast-like cells [J]. *Calcif Tissue Int*, 2005, 76(6): 433-438.
- [18] Suzuma I, Murakami T, Suzuma K, *et al.* Cyclic stretch-induced reactive oxygen species generation enhances apoptosis in retinal pericytes through c-jun NH2-terminal kinase activation [J]. *Hypertension*, 2007, 49(2): 347-354.

• 致读者 •

医学论文中有关实验动物描述的要求

在医学论文的描述中,凡涉及到实验动物者,在描述中应符合以下要求:(1)品种、品系描述清楚;(2)强调来源;(3)遗传背景;(4)微生物学质量;(5)明确体质量;(6)明确等级;(7)明确饲养环境和实验环境;(8)明确性别;(9)有无质量合格证;(10)有对饲养方式的描述(如饲养类型、营养水平、照明方式、温度、湿度要求);(11)所有动物数量准确;(12)详细描述动物的健康状况;(13)对实验动物的处理方式有单独清楚的交代;(14)全部有对照,部分可采用双因素方差分析。

医学实验动物分为四级:一级为普通级;二级为清洁级;三级为无特定病原体(SPF)级;四级为无菌级(包括悉生动物)。卫生部课题及研究生毕业论文等科研实验必须应用二级以上的实验动物。

本刊编辑部