

· 实验研究 ·

SH 关节腔内注射治疗兔膝关节炎的实验研究

肖德明, 李 伟, 王 巨

(暨南大学医学院附属二院, 深圳市东门北路 518020)

摘要: [目的] 探讨透明质酸钠 (sodium hyaluronate, SH) 关节腔内注射治疗膝骨性关节炎 (OA) 的效果。[方法] 24只兔子建立骨关节炎动物模型, 随机分 OA 组、SH 组、对照组, 观察 3组软骨、滑膜细胞病理切片及软骨 MMP-1 免疫组化, 进行软骨 Mankin 评分, 以及检测血液和关节液的 IL-1 含量的效果。[结果] SH 组可见软骨破坏减轻, 滑膜纤维增生减少, Mankin 评分有明显改善 ($P < 0.05$); 血、膝关节滑液 IL-1 浓度降低 ($P < 0.05$), 但关节软骨中 MMP 表达仍然活跃。[结论] SH 能减少滑液中炎性介质 IL-1 的分泌, 从而减轻滑膜炎, 缓解对软骨细胞的破坏, 延缓 OA 进展, 但仍阻止不了 OA 进展。

关键词: 透明质酸钠; 骨关节炎; 滑膜炎; 白介素-1; 金属蛋白酶-1
中图分类号 R684.3 文献标识码 A

Experimental study of intraarticular sodium hyaluronate injection on the treatment of rabbit osteoarthritis // XIAO Deming, LI Wei, WANG Ju. Department of Orthopaedics, the 2nd Affiliated Hospital of Medical College of Jinnan University (Shenzhen People's Hospital), Shenzhen 518020

Abstract [Objective] To observe the effects of intraarticular sodium hyaluronate injection on treatment of rabbit osteoarthritis (OA). [Method] Twenty-four male rabbits were randomly divided into SH group, OA group and control group after established the model of OA. SH group and control group were received intraarticular SH and physiologic injection one time a week at the same time respectively. The histological examinations of cartilage and synovium, immunohistochemistry of MMP-1 for cartilage, Mankin's scale were performed. The levels of IL-1 of the serum and synovial fluid were determined by ELISA. [Result] In the SH group showed the degeneration of the cartilage and fiber hyperplasia of synovium were lightened in the histological observation and the level of interleukin-1 (IL-1) of the serum and synovial fluid were also decrease ($P < 0.05$). The Mankin's scale of the control group was significantly decreased ($P < 0.05$). The expression of MMP-1 of SH group was active. [Conclusion] SH can relieve inflammation of synovium and reduce the secretion of IL-1 in synovial fluid and serum. So it can lighten the degeneration of the cartilage and alleviate the pathology of OA, but it can not prevent the process of OA.

Key words: Sodium hyaluronate; Osteoarthritis; Synovitis; Interleukin 1; Matrix metalloproteinase 1

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是中老年的最常见关节疾患之一, 是导致人群功能残疾、造成经济损失和影响社会发展的主要疾病之一^[1]。随着我国的老年化的发展, OA 的患病率将更加增高, 它成为骨科研究的热点之一。

治疗 OA 的方法较多, 其中关节腔注射透明质酸钠自 1971 年 Peyron 首次报道以来, 至今国内外已在广泛应用, 在临床上取得良好的效果^[2-3]。动物实验也表明 SH 是治疗 OA 的一种有效药物, 但 SH 治疗 OA 的机理仍不清楚, 本研究从 SH 对兔 OA 病理过程细胞因子的作用及对软骨损害的评估来进一步探讨 SH 治疗 OA 的实际疗效, 为临床的应用提供一定

参考。

1 材料与方

1.1 主要材料、试剂

1.1.1 实验动物

取雄性新西兰兔 24 只, 体重 2.5 kg 左右, 6 个月龄, 清洁级 SD (Sprague Dawley), 购自广州中医药大学实验动物中心。

1.1.2 实验试剂

48 孔板兔 IL-1 β ELISA 定量检测试剂盒, 上海轩昊科技发展有限公司提供; 施沛特 (玻璃酸钠注射液) 2 ml 20 mg 皮山东正大福瑞达制药有限公司; 金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases 1 MMP-1), 购自美国默克公司。

1.2 实验分组与动物模型

作者简介: 肖德明 (1956 年), 男, 湖南益阳人, 医学博士, 主任医师, 博士生导师。研究方向: 骨与关节。电话: 13332980866 E-mail: wju2003@126.com

24只新西兰兔进行右后膝伸直位全长石膏管型固定制成OA动物模型,所有兔均单笼饲养。模型制成后随机分为3个组(OA组、SH组、对照组),每组8只。

1.3 实验动物给药方法及标本处理

1.3.1 给药方法

OA组在OA动物模型形成时处死,SH组于膝关节给予关节腔内注射SH 0.4 ml,对照组于膝关节给予关节腔内注射生理盐水 0.4 ml,每周1次连续4次,让其自由活动。SH组、对照组于最后1次注射后1周处死。

1.3.2 标本处理

所有动物在处死前于耳缘静脉取2 ml血液,静置后取上层血清,处死后取关节液 0.2 ml 血液及关节液 -20℃冰箱保存,留待检测其中IL-1 β 含量。并取膝关节股骨髁及部分滑车部位的软骨和滑膜做光镜标本。滑膜行4%甲醛固定,再按常规脱水、浸蜡、包埋、切片、HE染色观察滑膜形态学变化。软骨标本采用4%多聚甲醛(pH 7.4)固定72h,15%乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙10周,石蜡包埋,HE染色观察软骨形态学变化;ABPAS染色观察多糖着色,按Mankin's评分。

1.4 检测方法

采用ELISA双抗夹心法标记所收集血清、血上清、关节滑液中的IL-1 β ,使呈有色反应,酶标仪450nm处读取OD值,通过绘制标准曲线,计算出其中IL-1 β 含量。

软骨标本制作病理切片后,常规脱腊脱水处理,在湿盒中(武汉博士德生物制品公司)依次进行下列反应:牛睾丸透明质酸酶处理40 min,羊抗兔MMP-1血清孵育18 h,生物素化兔抗羊IgG孵育20 min,二氨基联苯胺染色,苏木素复染。

1.5 统计分析

各组数据采用平均数加减标准差表示,组间差异采用两样本均数的双侧t检验进行判断, $P>0.05$ 为无显著差异, $P<0.05$ 为显著差异, $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 普通光学显微镜观察

OA组:滑膜层约为4~7层,滑膜下层细胞数量明显增加,中间开始有一些疏松结缔组织增生(见图1)。软骨见明显的细胞减少或局部团状增生(图4)。

HA组:滑膜层约为4~7层,滑膜下层细胞数量增多为结缔组织和大量血管增生(图2)。明显见纤维组织大量增生和滑膜细胞(图3)。软骨HE染色示软骨凋亡生成(图5)。

对照组:比HA组均有加重,滑膜下层细胞数量增多,明显见纤维组织大量增生并侵入滑膜下层(图3);软骨HE染色示软骨层变薄,细胞减少、杂乱,软骨表层有血管生成(图6)。

2.2 免疫组化观察

显示3组都有大量MMP-1的表达,其中OA组各层都有

广泛的表达,尤其细胞表层表达强烈(图7);HA的表层和放射层大量生成,在移行层的生成量减少,但呈现明显的增生状态(图8);而对照组只显示表层大量生成,在其它各层数量已经很少(图9)。

2.3 Mankin's评分(表1)

Mankin's评分是一种通过分值的高低,来反应OA病变严重程度定量分析方法,病变越重,分值越大。

表1 各组动物Mankin's评分($\bar{x}\pm s$)

分组	例数	评分
OA组	8	5.88 \pm 1.25
HA** Δ	8	7.75 \pm 1.04
空白组**	8	8.63 \pm 0.52

注: * $P<0.05$ ** $P<0.01$,与OA组相比较; $\Delta P<0.05$ $\Delta\Delta P<0.01$ 与对照组相比较。

2.4 血清IL-1检测(表2)

表2 血清IL-1检测结果($\bar{x}\pm s$ pg/ml)

分组	例数	评分
OA组	8	159.43 \pm 43.84
HA* Δ	8	101.39 \pm 24.56
空白组	8	142.70 \pm 31.07

注: * $P<0.05$ ** $P<0.01$,与OA组相比较; $\Delta P<0.05$ $\Delta\Delta P<0.01$ 与对照组相比较。

2.5 关节液中IL-1检测结果(表3)

表3 关节液中IL-1检测结果($\bar{x}\pm s$ pg/ml)

分组	例数	评分
OA组	8	85.31 \pm 3.23
HA* Δ	8	75.96 \pm 5.47
空白组	8	87.43 \pm 1.81

注: * $P<0.05$ ** $P<0.01$,与OA组相比较; $\Delta P<0.05$ $\Delta\Delta P<0.01$ 与对照组相比较。

3 讨论

关节制动可以导致关节软骨破坏这一现象的发现,为人们制备OA模型提供了新思路。目前在海外,膝关节制动OA模型早已被应用于实验研究之中。该模型最大的优点是无需手术造模,避免了因麻醉或手术给实验带来的各种混杂因素,操作过程也大大简化,并降低了实验成本。在国内,纪斌平等实验研究显示兔膝关节伸直位制动OA模型能较好地模拟OA的发病过程,与药物注射和手术类OA模型相比,可避免人为损伤,更接近自然过程^[4]。本实验的大体标本及病理切片(图4)也显示证实了这一方法确能导致骨关节炎的形成。

在OA的病理过程中,IL-1、TNF- α 和IL-6是参与OA发病进程的重要介质,都对金属蛋白酶(matrix metalloproteinases)

e. MMPs) 和其他蛋白水解酶的合成起重要的调节作用, 它们是引起 OA 炎性病变及软骨降解的重要因素^[5]。其中 IL-1 在 OA 软骨中介导 MMPs 组织抑制因子与 MMPs 之间失衡是 OA 病理发展的主要机理, 它通过生产一氧化氮下调细胞外基质的合成和上调金属蛋白酶的合成引起软骨分解^[5]。IL-1 还促进其它细胞因子生成, 协同关节软骨的分解。实验还表明 IL-1 可促进滑膜细胞和软骨细胞合成并释放前列腺素 E2 (Prostaglandin E2 PGE₂) 和胶原酶产生强大的促炎症作用, 引起滑膜炎和骨的吸收, 而且形成的 PGE 反过来又进一步加强 IL-1 对软骨的分解作用。所以 IL-1 是骨关节炎形成过程的一个关键细胞因子, 对其测定能反映骨关节炎病理进程炎症的存在程度。

透明质酸是一种独特的线性粘多糖, 它由 N-乙酰葡萄糖胺和葡萄糖醛酸二糖单位反复交连所组成。在关节内由滑膜的 B 细胞分泌, 是关节滑液中以及软骨基质内的重要成份, 对滑膜关节的润滑、软骨的保护以及对滑液及软骨粘弹特性的维持均起着重要作用。

随着软骨的退变, 透明质酸在关节内的产生和代谢发生异常, 关节液中透明质酸的含量及分子量明显降低, 由此导致润滑和抵抗机械力作用的生物学功能发生障碍, 使关节软骨应力增加, 引起软骨细胞的损伤, 释放有害的细胞因子降解基质, 进一步造成软骨的损伤, 形成一个恶性循环。本实验定量检测了各组动物 (兔) 血液血清、关节液中 IL-1 β 含量的变化。其中 HA 组家兔血清和关节液中 IL-1 β 的含量最低, 与 OA 组和对照组差异均显著 ($P < 0.05$), 而 OA 组与对照组无显著差异 ($P > 0.05$) (表 2、3)。结合两者病理片显示 HA 组虽然较 OA 组滑膜炎加重, 但由于已经除去石膏固定这个最大的致病因素, 所以 IL-1 含量明显下降; 较对照组相比, 其滑膜炎和纤维增生减轻, 滑膜炎造成的损害也减轻。这显示在骨关节炎形成后, 滑膜炎的病变是炎症存在的重要原因, 而 SH 可延缓骨关节炎病理过程发展。由于 SH 减少了 IL-1 的生成, 相应类似 PGE₂ 等致痛因子含量减少, 这也成为 SH 能在临床上明显减轻疼痛的重要原因。

由于 IL-1 能引起 MMP-1 的升高, 可以在免疫组化显示, 在整个病理过程中, MMP-1 一直对软骨存在损害, 而且对表层的损害一直是持续的 (图 7~9), OA 组和 SH 组显示基质的破坏存在软骨的各层, 而对照组只存在表层。这与 MMP-1 主要由软骨产生, 而对照组软骨中其它层面的软骨已经大部分凋亡有关 (图 9), 只存在于表面的少量细胞。对于 HA 对基质的保护, 现在有的学者还认为 HA 还能延缓基质中蛋白多糖的成分改变从而保护了软骨^[6]。

在其 Mankin's 评分中 HA 组与 OA 组、对照组差异均显著

($P < 0.05$), HA 组与 OA 组相比 Mankin's 评分仍然增高显示虽然有 HA 的治疗, 但关节软骨的病理过程仍继续; 但与对照组相比显示 SH 仍有一定治疗作用, 可以延缓 OA 这个病理过程 (表 1)。在临床上, 从长期看, 这个延缓作用能使患者获得良好的疗效^[7]。

在本实验中, 虽然 SH 的作用是对关节的润滑, 但由于实验兔子笼养的限制, 兔子的活动有限, 所以在正常的骨关节炎的形成过程中, 患者个体软骨的受力, 尤其剪切力是其形成的重要因素, 而 SH 的润滑作用能减轻这种关节运动时的摩擦, 这对延缓骨关节炎的作用也十分重要。

本研究结果显示, 在 3 组的血清 IL-1 β 含量的变化同局部的关节液中 IL-1 β 含量的变化一致, 同时在 HA、对照组可发现大量淋巴细胞增加, 提示 OA 病变很可能涉及到全身免疫系统的相应反应, 而并非以往认识的只发生在病变的局部。而此时滑膜细胞中淋巴细胞便直接分泌出免疫性物质, 可能是为软骨创造了局部的免疫环境。最近一些研究发现, 体液免疫参与 OA 过程, 包括软骨自身抗体的出现^[8]。这有待进一步探索。

(本文附图见加页 2)

参考文献:

- [1] 中华医学会风湿病学分会. 骨关节炎诊治指南 (草案) [J]. 中华风湿病学杂志, 2003 7(11): 702-704.
- [2] Hamberger MI, Lakhana IS, Moor PA, et al. Intra articular hyaluronans: a review of product specific safety profiles [J]. Semin Arthritis Rheum, 2003 32(5): 296-309.
- [3] Tascioglu F, Oner C. Efficacy of intra articular sodium hyaluronate in the treatment of knee osteoarthritis [J]. Clin Rheumatol 2003 22(2): 112-117.
- [4] 纪斌平, 卫小春, 包尚恕, 等. 制动影响关节软骨愈合的实验研究 [J]. 中国矫形外科杂志, 1998 6: 438-439.
- [5] Pelletier JP, Di Battista JA, Routhey P, et al. Cytokines and inflammation in cartilage degradation [J]. Rheum Dis Clin North Am, 1993 19: 545-568.
- [6] Hughes DJ, Marsden ME, Strachan RK, et al. Intra articular hyaluronate in experimental rabbit osteoarthritis can prevent changes in cartilage proteoglycan content [J]. Osteoarthritis Cartilage 2004 12(3): 232-238.
- [7] Tascioglu F, Oner C. Efficacy of intra articular sodium hyaluronate in the treatment of knee osteoarthritis [J]. Clin Rheumatol 2003 22(2): 112-117.
- [8] Sakata M, Tsuruta J, Masuko-Hongo K, et al. Autoantibodies to osteopontin in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis [J]. J Rheumatol 2001 28(7): 1492-1495.

(收稿: 2005-12-09)

SH 关节腔内注射治疗兔膝关节炎的实验研究 (正文见 690 页)

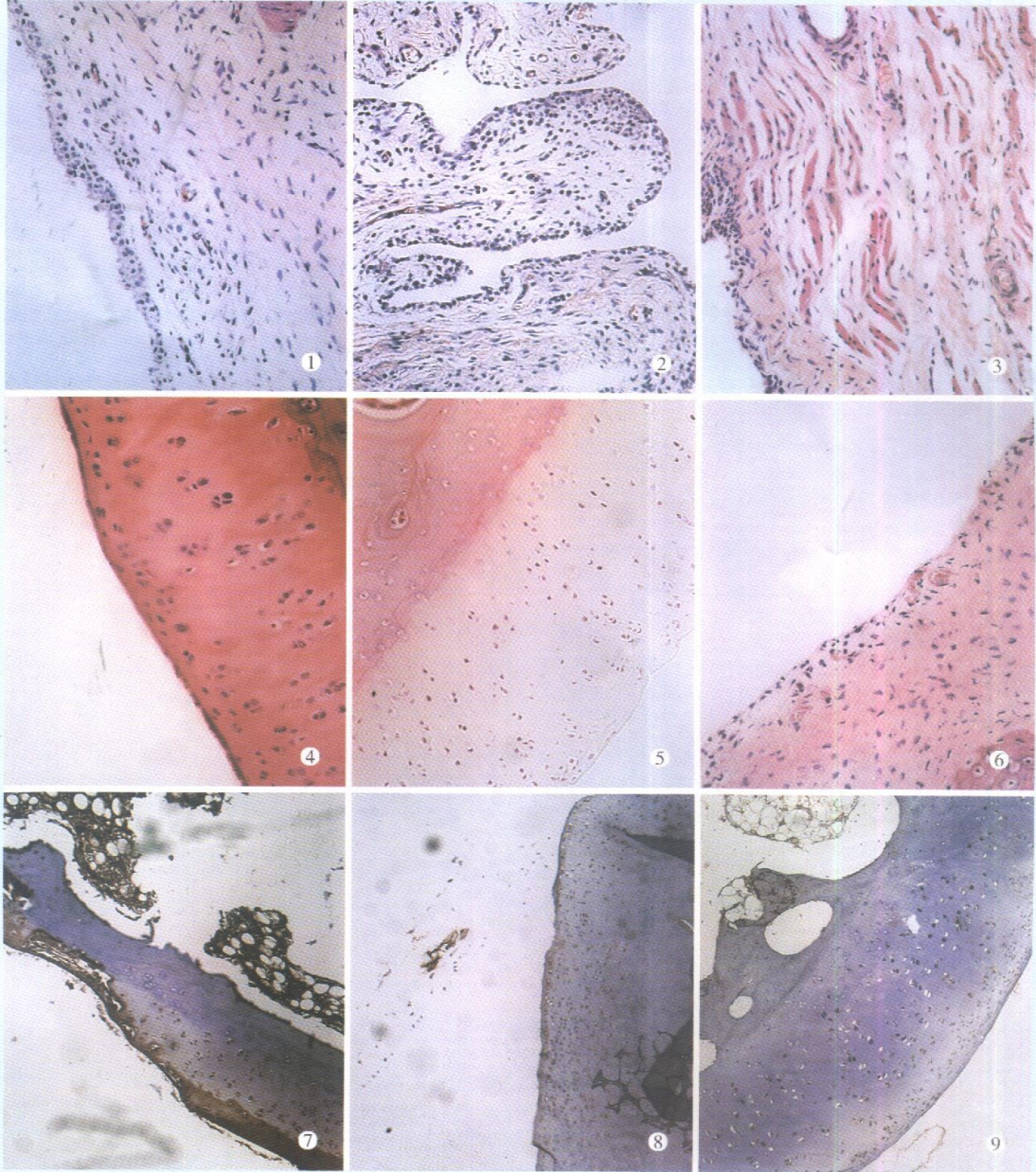


图 1 OA 组滑膜层约 4~7 层, 滑膜下层变薄, 开始有小血管增生 (HE × 200) 图 2 SH 组滑膜层约为 4~10 层, 滑膜细胞大量增生, 滑膜下层开始有纤维组织增生, 并见大量血管增生, 呈乳头状 (HE × 200) 图 3 对照组滑膜下层细胞数量增多, 见广泛地纤维组织增生并侵入滑膜下层, 使滑膜下层增厚, 而滑膜细胞层数减少 (HE × 200) 图 4 OA 组软骨细胞有的局部明显减少或有的局部团状增生 (HE × 200) 图 5 SH 组软骨大量的软骨细胞凋亡, 软骨细胞大量丧失 (HE × 200) 图 6 对照组软骨层变薄, 细胞减少、杂乱, 软骨表层开始有纤维化迹象并有血管生成 (HE × 200) 图 7 OA 组各层都有广泛的棕色颗粒出现, 尤其细胞表层表达强烈 (HE × 100) 图 8 SH 组表层和放射层大量的棕色颗粒, 在移行层的生成量减少 (× 200) 图 9 对照组细胞数量减少, 表层大量的棕色颗粒, 在其他各层数量已经很少 (× 200)

加页 2