

兔关节内积血对关节软骨影响的实验研究

张继春¹ 陈金栋¹ 陈百成¹ 田德虎¹

摘要 目的: 探讨短期关节内积血对关节软骨基础研究的影响。**方法:** 新西兰大白兔 36 只随机分为 2 组。A 组: 右后膝关节内注入自体静脉血 4ml, 左后膝关节作为空白对照, 在第 3 天重复一次, 剂量同前。B 组: 右后膝关节内注入自体静脉血 4ml, 左后膝关节 2ml, 其余步骤与 A 组完全相同。分别于第 1 周、4 周、8 周取材, 测定水、胶原含量的改变, 同时进行大体及光镜观察。**结果:** ①受出血影响, 第 1、4 周含水率都明显增加(均为 $P<0.05$), 第 8 周时与对照组比较无明显差异($P>0.05$)。胶原含量在第 1 周低于对照组($P<0.05$), 4ml 组低于 2ml 组($P<0.05$)。第 4、8 周与对照组比较均无明显差异($P>0.05$)。②HE 染色结果: 实验侧软骨表面不光滑, 细胞排列欠整齐, 潮线变模糊。4ml 侧比 2ml 侧变化明显。**结论:** 不同量的关节内出血对关节软骨的影响不同, 量大者对含水率、蛋白多糖、胶原的影响大于量小者。

关键词 关节软骨; 关节内积血; 含水率; 胶原

中图分类号: R684.R49 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2007)-01-0031-03

Experimental study on blood-induced damage to articular cartilage in hemarthrosis/ZHANG Jichun, CHEN Jindong, CHEN Baicheng, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(1): 31-33

Abstract Objective: To explore the blood-induced damage to articular cartilage in hemarthrosis. **Method:** Thirty-six rabbits were randomly divided into 2 groups. In group A, fresh autologous blood (4ml) was injected into the right knee posteriorly at day 1. The same volume of blood was injected into the same knee at day 3. Contralateral (left) knee were not injected at all to act as control. In group B, 4ml and 2ml blood was injected into right knee and left knee respectively to observe the destruction on cartilage by different amount of blood. The animals of each sub-group were sacrificed at the 1st, 4th and 8th week respectively. The contents of water and collagen were compared, and the changes of pathology were observed. **Result:** ①Water content increased significantly at the 1st week and 4th week compared with the control group ($P<0.05$). There was no difference of water content at the 8th week ($P>0.05$). The collagen content was lower than the control at the 1st week and higher at the 4 week and 8th week than at the 1st week ($P<0.05$). The collagen content in 4ml group was lower than that in 2ml group at the 1st week ($P<0.05$). There was no difference between two groups at the 4th week and 8th week ($P>0.05$). ② Light microscope(HE) observation: The articular cartilage of experimental side became rough with more division cells. The tidemark became unclear. All of these appearances were more apparent in 4ml group than in 2ml group. **Conclusion:** Different amounts of blood results in different damage to articular cartilage. More blood can cause more changes of the content of water, proteoglycan (PG) and collagen. More attention should be paid to joint bleeding. Blood should be cleared off through puncture to decrease the damage to articular cartilage.

Author's address Department of Joint Surgery, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, 050051

Key words articular cartilage; hemarthrosis; water content; collagen

关节内出血在运动损伤中非常多见, 如肌腱韧带拉伤、关节囊撕裂伤、关节脱位、关节内无移位骨折等, 常常造成关节内出血, 使关节软骨暂时处于一种血液浸润的环境。临床上多予以保守治疗而令血液自行吸收, 这样使关节发生骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 的几率明显增加^[1]。国外已有学者用细胞培养的方法对相似的病理过程进行了研究, 软骨细胞与血液接触几个小时就会对软骨细胞造成严重的损害^[2]。但血液导致关节软骨损害的机制及与时间的关系还不是十分清楚。本实验旨在探讨其发生机制, 为治疗关节内出血, 保护关节功能提供

理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验动物为 8 月龄新西兰大白兔 36 只, 雌雄不限, 分笼喂养, 体重 $2.5\pm 0.2\text{kg}$, 河北医科大学动物实验中心提供。

1 河北医科大学第三医院手外科, 河北省石家庄市自强路 139 号, 050051

作者简介: 张继春, 男, 教授, 主任医师, 博士

收稿日期: 2005-12-20

1.2 主要试剂

氯代十六烷基吡啶, 鼠抗人 II 型胶原抗体, SP 试剂盒 (含封闭用山羊血清、生物素标记的羊抗人 IgG1 单抗、辣根酶标记的链酶卵蛋白素)、DAB 显色剂、羟脯氨酸、二甲氨基苯甲醛。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组及模型制作:将 36 只实验动物随机分为 2 组。A 组于第 1 天, 用 3% 戊巴比妥钠 30mg/kg 行静脉注射麻醉。预先在右后膝关节内侧髌股间隙放置一头皮针, 然后从颈静脉采自体静脉血 4ml, 自体血不使用抗凝剂, 经头皮针注入关节内。此时可观察到关节腔髌骨两侧呈对称性膨胀, 证明自体血准确无误地注入关节腔。于第 3 天重复注射自体血一次, 剂量同前。左后膝作为空白对照组。B 组: 每只动物的右后膝关节内每次注入 4ml 自体静脉血, 左后膝关节每次注入 2ml, 其余步骤与 A 组完全相同。

1.3.2 组织学取材与固定:A 组和 B 组再各随机分为 3 组, 每组 6 只, 分别于 1 周、4 周、8 周处死动物后立即取材。在取材时行大体观察, 观察内外髌关节软骨的色泽、质地、表面光滑程度。于内髌取材一块, 取材部位位于股骨内髌后部负重区的内缘与外缘中点, 此点距内髌后缘 3mm, 宽约 2mm。将关节软骨连同软骨下骨一同取下。用手术刀小心将关节软骨剥下, 避免带上软骨下骨质, 以免影响结果的准确性。一半用于含水率的测定, 一半用于胶原含量的测定。去除多余软骨下骨, 置入含有 1% 氯代十六烷基吡啶的 10% 中性甲醛溶液固定 48h, 用于组织切片。

1.4 统计学分析

结果用均值±标准差表示, 采用 SPSS10.0 统计软件, 同一组内不同时间点的比较采用方差分析, 两组之间同一时间点的比较采用配对 *t* 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 大体观察

正常关节软骨表面十分光滑, 均匀一致, 有光泽, 呈瓷白色。实验侧关节软骨色泽稍暗, 表面粗糙。术后第 1 周最为明显, 第 4 周渐好转, 第 8 周恢复至正常光泽。4ml 组比 2ml 组变化稍明显。

2.2 HE 染色

正常关节软骨表面光滑, 软骨细胞分布均匀, 无簇聚软骨细胞, 潮线清晰完整。实验组软骨表面不光滑, 可见细小碎屑。细胞排列欠整齐, 细胞分裂相增多, 可见软骨细胞簇聚, 潮线变模糊。4ml 侧比 2ml

侧变化稍明显。

2.3 含水率的改变

实验组关节软骨的含水率在第 1 周及第 4 周显著增加, 与空白对照组比较 $P<0.05$ 。第 8 周时与对照组无明显差异 ($P>0.05$); 第 4 周的含水率低于第 1 周 ($P<0.05$), 第 8 周含水率低于第 4 周 ($P<0.05$) (见表 1)。

4ml 与 2ml 两实验侧在第 1、4 周, 两侧的含水率有显著性差异, 4ml 侧大于 2ml 侧 (均 $P<0.05$)。在第 8 周两侧比较无显著性差异 ($P>0.05$) (见表 2)。

2.4 胶原含量的改变

4ml 与 2ml 两侧在第 1 周胶原含量经配对 *t* 检验有显著性差异 ($P<0.05$), 4ml 侧低于 2ml 侧。两侧在第 4 周及第 8 周比较无显著性差异 ($P>0.05$)。

表 1 两组不同时间的含水率比较 ($\bar{x}\pm s$, %)

	含水率	
	实验组	空白对照组
第 1 周	80.76±5.33 ^①	67.03±5.21
第 4 周	73.83±4.51 ^①	66.90±4.04
第 8 周	67.11±4.79	67.50±7.03

①相同时间比较 $P<0.05$

表 2 4ml 组与 2ml 组不同时间的含水率比较 ($\bar{x}\pm s$, %)

	含水率	
	右侧(4ml)	左侧(2ml)
第 1 周	80.71±3.31 ^①	78.10±3.29
第 4 周	74.12±2.85 ^①	69.65±2.97
第 8 周	66.43±4.86	67.02±5.59

①相同时间比较 $P<0.05$

表 3 4ml 组与 2ml 组不同时间的胶原含量比较 ($\bar{x}\pm s$, mg/g)

	胶原含量	
	右侧(4ml)	左侧(2ml)
第 1 周	360±40 ^①	385±23 ^①
第 4 周	459±45	449±55
第 8 周	466±44	454±40

①相同时间比较 $P<0.05$

3 讨论

反复关节内出血在临床上较常见, 临床医生多采取保守的治疗方法, 而最终会导致关节软骨的损害, 这已为临床学者所公认。然而在关节软骨代谢活动改变之时与可被 MRI、放射检查、关节镜检查发现之时相距一定的时间, 在若干年后, 受损关节表现出退行性改变, 这已引起临床学者们的重视。有些学者认为关节内出血首先对滑膜产生影响, 滑膜吸收血液后产生的炎症介质再作用于关节软骨, 引起继发性损害^[3]。另有一些学者则认为, 关节内出血可直接对关节软骨造成损害^[4], 因为在滑膜产生病理改变之前, 关节软骨已有所改变。不管何者在先何者在后, 关节软骨都将产生一定病理变化。主要变化主要集中在软骨细胞、胶原、蛋白多糖和水含量与其功能的改变上。

3.1 关节内出血对关节软骨含水率的影响

水在关节软骨中所占的比例最大。关节软骨中的水有利于气体、营养和废物的弥散,在软骨细胞和周围营养丰富的滑液之间相互交换。水与基质中的胶原和蛋白多糖结合成凝胶状,既维持了关节软骨基质的正常结构,同时又参与软骨组织中的流体静压力的形成,与关节软骨生物力学性能密切相关。本实验表明出血后第 1 周含水率明显增多,以后随着时间的推移而下降,至第 8 周降至正常水平。含水率的影响因素较复杂,和胶原含量及结构、亚成分变化均有关系。关节软骨中的水可分为游离水和结合水两部分,前者主要靠渗透现象由关节腔进入,渗透压的大小主要取决于蛋白多糖的数量多少;后者多与胶原或蛋白多糖内的阴离子呈非共价结合,主要靠胶原或蛋白多糖的水合作用形成^[9]。因此渗透与水合作用的变化将引起软骨内含水率的改变,这种改变可随病理过程的不同而不同。在关节内出血早期,虽然蛋白多糖和胶原含量下降,但组织损害加重,组织渗透性、电荷密度和应力改变引起炎症介质释放,软骨细胞合成和增生反应性下降,蛋白多糖聚集体减少,小分子量单体增多,引起渗透压的持续增大,关节软骨内的水有增加的趋势,从而导致含水率的增加^[6]。至后期,虽然蛋白多糖和胶原合成有所增加,但其新合成的蛋白多糖分子量较小,蛋白多糖与胶原生物学性能下降,同时炎症介质减少,组织肿胀减轻,导致水合作用降低,含水率逐渐减小。本实验发现出血 4ml 组较 2ml 组在相同时间点上的含水率增加显著,说明出血量的多少对关节软骨有明显的影响,因此含水率的多少可作为关节软骨病理改变的一项灵敏指标。

3.2 关节内出血对胶原含量的影响

本实验表明关节内出血后仅在第 1 周胶原含量减少,至第 4 周时已恢复至正常水平。说明关节内出血对胶原的影响较对蛋白多糖和水的影响小。其原因可能是因为胶原分子的半衰期比蛋白多糖的半衰期长,其减少部分可能是已经降解的胶原,短期少量出血尚不足以引起胶原网络的广泛破坏。胶原在第 4 周已无可探测到的明显变化,但并不能说明胶原

网络的结构及其功能完全恢复正常,因同时伴有含水率及蛋白多糖的变化,其功能是作为一个整体而发挥作用的。

3.3 对关节内出血是否进行穿刺抽吸在目前仍存在着争论

对血友病患者进行穿刺有可能造成进一步的损伤^[7],一些学者认为少量关节内出血很快会吸收,不会造成软骨损害,且穿刺有招致关节内感染的可能。本实验研究结果表明短期,关节内出血造成关节软骨一段时间的病理变化,并且其病理变化与关节内出血量的多少有关,这与 Mulder 等^[8]的报道相一致,他们认为,单次关节内出血在若干年后会不可避免地造成关节退变。所以关节内出血应尽量穿刺抽吸,减少关节内血液的残留,这对于干预退变性骨关节炎的发生有一定的临床意义。

总之,不同量的关节内出血对关节软骨的影响不同,量大者对含水率、胶原的影响大于量小者。临床上应对关节内出血引起重视,在条件允许的情况下,尽量进行穿刺,以减少血液对关节软骨的影响。

参考文献

- [1] Lohmander LS, Roos H. Knee ligament injury, surgery and osteoarthritis: truth or consequences[J]? Acta Orthop Scand, 1994, 65:605—609.
- [2] Hooiveld M, Roosendaal G, Vianen M, et al. Blood-induced joint damage: Longterm effects human in vitro and in vivo [J]. J Rheumatol, 2003, 30(2):339—44.
- [3] Hakobyan N, Kazarian T, Valentino LA. Synovitis in a murine model of human factor VIII deficiency [J]. Haemophilia, 2005, 11(3): 227—32.
- [4] Tan AH, Mitra AK, Chang PC, et al. Assessment of blood-induced cartilage damage in rabbits knees using scanning electron microscopy[J]. J Orthop Surg, 2004, 12(2):199—204.
- [5] Marondas A, Venn M. Chemical composition and swelling of normal and osteoarthrotic femoral head cartilage[J]. Ann Rheum Dis, 1997, 36:399—406.
- [6] 曹月龙, 石印玉, 张戈, 等. 兔骨关节炎关节软骨含水率随时间变化的实验研究[J]. 中华风湿病学杂志, 2001, 5:332—333.
- [7] Ribbans WJ, Giangrande P, Beeton K. Conservative treatment of hemarthrosis for prevention of hemophilic synovitis [J]. Clin Orthop Rel Res, 1997, 343:12—18.
- [8] Mulder K, Llinas A. The argetjoint [J]. Haemophilia, 2004, 10, (suppl4):152—156.