

## ·基础研究·

## 雌兔去势对膝关节软骨及关节液和血清中透明质酸的影响

包芸<sup>1</sup> 包毅敏<sup>2</sup> 常虹<sup>1</sup> 赵建民<sup>2</sup>

**摘要** 目的:观察雌激素水平变化对兔膝关节软骨及关节液和血清中透明质酸的影响。方法:56只雌兔随机分为4组,A组正常对照,B组关节固定,为OA模型组,C组切除卵巢后不补充雌激素,D组切除卵巢后补充雌激素,分别于第2、4、6、8周抽血和关节液,测定HA水平,并取右股骨内侧髁软骨组织进行光镜和电镜观察。结果:B、C组关节液HA均下降,血清HA均上升,与A组比较差异有显著性意义( $P<0.05$ ),D组关节液和血清HA与A组比较均无显著性差异( $P>0.05$ );标本观察显示,B、C两组关节软骨均有OA改变,但B组重于C组,D组软骨退变程度较C组轻。结论:雌激素水平下降,可致软骨退变,关节液及血清HA水平发生变化,其比值下降明显。雌激素水平下降可能关系到OA的发生发展,关节液HA及血清HA比值下降,血清HA升高可能是OA的重要指标。

**关键词** 骨关节炎;透明质酸;雌激素;膝关节软骨;关节液

中图分类号:R684,R49 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2007)-05-0410-04

Effect of ovariectomy on the knee cartilage and hyaluronic acid in serum and synovia in rabbits/BAO Yun, BAO Yimin, CHANG Hong, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(5): 410—413

**Abstract Objective:** To explore the changes of knee cartilage, and the changes of hyaluronate acid(HA) in serum and joint synovia and HA ratio in osteoarthritis (OA) and ovariectomized rabbits. **Method:** Fifty six female rabbits were randomly divided into four groups: 8 rabbits as control (Group A), 16 rabbits' knee fixed as an OA model (Group B), 16 rabbits with ovariectomy (Group C) and 16 rabbits ovariectomy with estrogen (Group D). HA in serum and joint synovia were measured by radio-immunity technique at the 2nd, 4th, 6th, 8th week after ovariectomy, partial cartilage on internal condyle of right femur were observed by light and electron-microscopy. **Result:** HA of joint synovia decreased and that of serum increased in Group B and C, there was difference compared with Group A ( $P<0.05$ ); and there was no significant change in Group D in all time points ( $P>0.05$ ). Under microscope the cartilage specimens showed that there were OA changes in Group B and C, but in Group B that was more severe than in Group C; and in Group D that was lighter than in Group C. **Conclusion:** The estrogen deficiency could be related to OA development. HA in serum and joint synovia changed, and HA ratio decreased significantly. There could be important markers of OA and have relative value in clinic for diagnosis, prevention and treatment of OA.

**Author's address** Dept. of Traditional Chinese Medicine, Affiliated Hospital, Inner Mongolia Medical College, Huhhot, 010050

**Key words** osteoarthritis; hyaluronic acid; estrogen; knee cartilage; joint synovia

骨性关节炎(osteoarthritis, OA)是一种始于或重在关节软骨病损的原发性或继发性慢性骨关节病,多见于中老年人,流行病学调查显示,OA发病率和患病率女性明显高于男性,尤其是绝经后妇女<sup>[1]</sup>。雌激素水平变化长期以来一直被认为是引起OA的全身因素之一。

透明质酸(hyaluronic acid, HA)是构成关节滑液以及软骨基质的重要成分,目前实验研究认为,HA是反映OA病变相对独立的炎性反应指标<sup>[2]</sup>。本实验通过雌兔去势来模拟绝经期的体内环境,研究雌激素水平变化对血清及关节液中HA的影响,以期对OA的发病机制进行探讨,为OA的早期诊断及防治提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象及材料

研究对象为6个月龄雌性大耳白兔56只,体重2.3—2.8kg(内蒙古医学院动物中心提供);透明质酸放射免疫分析测定盒(河南解放免疫诊断试剂研究所生产,批号041125);GC-911型放射免疫计数器,LD4-8型离心机(内蒙古医学院附属医院核医学科提供)。

1 内蒙古医学院附院中医科,呼和浩特,010050

2 内蒙古医学院附院骨科

作者简介:包芸,女,硕士研究生,主治医师

收稿日期:2006-07-27

## 1.2 动物分组及模型制作

56 只兔, 经过 1 周的适应性饲养后, 随机分为 4 组。A 组 8 只, 作为正常对照; B、C、D 组各 16 只, B 组采用关节制动方法造成 OA 模型(取兔右后肢, 膝关节伸直位管型石膏固定), C、D 组行去势手术, 先将兔固定, 以 8% 硫化钠下腹正中脱毛, 然后, 盐酸氯胺酮(15mg/kg)肌注, 麻醉成功后, 常规消毒, 铺手术巾, 在耻骨联合与脐之间作纵行 3cm 切口, 暴露双角子宫, 子宫角末端可见灰白色肾形卵巢, 表面有多个白色泡状隆起, 分离并结扎蒂部血管, 完整切除卵巢, 逐层缝合切口, 术中辅助乙醚吸入麻醉。术毕肌注青霉素 20 万 U, 5d, C 组术后不补充雌激素, D 组术后第三天起肌肉注射苯甲酸雌二醇, 每周 2 次, 每次 0.5mg/kg。

## 1.3 标本制备

分别于术后 2、4、6、8 周, 随机抽取 A 组 5 只兔, B、C、D 组各 10 只兔, 抽取耳中央动脉血 2ml; 将 1ml 生理盐水注入右膝关节腔内, 活动关节, 反复回抽注入共 3 次, 尽量将关节液与生理盐水混匀, 抽取关节液。将标本离心后, 取血清及关节液上清液, -20℃冰箱保存备用(B 组兔先拆除膝关节石膏, 抽取关节液后, 仍以伸直位管型石膏固定)。同时, 随机抽取 A 组 1 只兔, B、C、D 组各 2 只兔, 经过量戊巴比妥钠处死, 立即取右膝关节股骨内侧髌软骨组织 2 块, 分别于 10% 中性福尔马林和 2.5% 戊二醛中固定。光镜标本, 福尔马林固定后, 软骨用 5% 硝酸脱钙, 酒精脱水, 石蜡包埋, HE 染色; 电镜标本, 5% 硝酸脱钙, 1% 锇酸后固定, 逐级酒精-丙酮脱水, E-pon812 包埋, 常规聚合。

## 1.4 统计学分析

所得数据以均数±标准差表示, 显著性标准  $\alpha=0.05$ 。各组不同时间段及组间同一时间段分别用单因素方差分析。采用 SPSS11.0 统计软件包。

## 2 结果

### 2.1 组织形态学观察

光镜观察: A 组(正常对照组)软骨细胞排列有序, 细胞形态正常, 可见完整潮线, 不同时间段无明显差别(图 1, 见前置彩色插页 9)。B 组(OA 模型组)2 周时, 细胞排列无序, 潮线尚完整; 4 周时, 软骨表层轻度纤维化, 细胞数目减少; 6 周、8 周, 软骨变薄粗糙, 纤维化程度加重, 软骨细胞数目明显减少, 潮线断裂, 基质内淋巴细胞、浆细胞浸润(图 2, 见前置彩色插页 9)。C 组(卵巢切除组)2 周、4 周变化不明显; 6 周、8 周, 软骨变薄, 层次紊乱, 细胞排列无序, 数目减少, 潮线不完整, 软骨表层纤维化(图 3, 见前置彩色插页 9)。D 组(补充激素组)软骨在前 4 周内变化不明显; 6、8 周, 软骨有变薄趋势, 细胞数目稍有减少, 有个别的空细胞陷窝, 细胞的柱状排列欠完整, 潮线欠平整(图 4, 见前置彩色插页 9)。

电镜观察 A 组, 软骨细胞呈卵圆形或扇贝形, 细胞膜完整, 细胞表面有短小的微绒毛状突起, 胞浆内可见分布均匀的粗面内质网, 核内染色质分布均匀, 基质胶原纤维排列整齐, 成平行走向(图 5, 见前置彩色插页 9)。B 组 8 周时, 细胞体积明显增大, 细胞表面微绒毛状突起消失, 细胞核被挤向一侧, 细胞器也几近消失(图 6, 见前置彩色插页 9)。C 组 8 周时, 软骨细胞外形不规则, 出现变性, 细胞核呈不规则形, 偏向一侧, 有固缩性改变, 呈浓密深染状态, 胞浆中粗面内质网扩张, 基质内胶原纤维增粗(图 7, 见前置彩色插页 9)。D 组 8 周时, 软骨可见胶原纤维增粗现象, 细胞空泡及核深染程度轻于 C 组(图 8, 见前置彩色插页 9)。

### 2.2 HA 检测结果

2.2.1 关节液 HA 测定结果: A、B、C、D 各组在 2、4、6、8 周时关节液 HA 测定结果见表 1。由表 1 可以看出, 关节固定和卵巢切除后, 对关节液中 HA 有显著

表 1 关节液中 HA、血清中 HA 水平检测结果及比值

| 组别               | 2 周                        | 4 周                      | 6 周                        | 8 周                       |
|------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 关节液 HA 水平        |                            |                          |                            |                           |
| A 组              | 479.68±143.42              | 441.21±71.96             | 456.82±138.57              | 430.78±86.94              |
| B 组              | 646.60±122.39 <sup>①</sup> | 353.97±147.14            | 338.01±108.57 <sup>①</sup> | 257.83±78.20 <sup>②</sup> |
| C 组              | 471.65±109.10 <sup>③</sup> | 458.86±117.77            | 382.52±76.98               | 305.53±91.11 <sup>①</sup> |
| D 组              | 463.60±146.63 <sup>③</sup> | 483.04±141.76            | 441.36±129.66              | 349.12±119.28             |
| 血清中 HA 水平        |                            |                          |                            |                           |
| A 组              | 4.54±1.37                  | 4.71±1.12                | 4.32±1.19                  | 4.23±0.67                 |
| B 组              | 5.26±1.20                  | 6.35±1.83 <sup>①</sup>   | 7.09±1.74 <sup>②</sup>     | 9.05±2.03 <sup>②</sup>    |
| C 组              | 4.78±0.90                  | 4.94±0.98 <sup>③</sup>   | 5.53±1.41 <sup>③</sup>     | 6.04±1.60 <sup>④</sup>    |
| D 组              | 4.47±1.60                  | 4.59±1.28 <sup>③</sup>   | 5.01±1.39 <sup>③</sup>     | 5.11±1.63 <sup>④</sup>    |
| 关节液 HA 与血清 HA 比值 |                            |                          |                            |                           |
| A 组              | 106.78±18.62               | 95.74±15.66              | 105.64±14.58               | 102.25±17.75              |
| B 组              | 120.59±18.40               | 72.06±14.36 <sup>②</sup> | 47.44±9.80 <sup>②</sup>    | 30.68±13.39 <sup>②</sup>  |
| C 组              | 98.33±15.76                | 92.93±17.57              | 72.17±18.79 <sup>②</sup>   | 51.71±16.36 <sup>②</sup>  |
| D 组              | 106.05±17.07               | 105.62±13.81             | 91.64±14.96 <sup>①</sup>   | 69.45±13.25 <sup>②</sup>  |

与 A 组比较: ① $P<0.05$ , ② $P<0.01$ ; 与 B 组比较: ③ $P<0.05$ , ④ $P<0.01$

影响, 8 周时, B 组与 A 组比较  $P < 0.01$ , C 组与 A 组比较  $P < 0.05$ , 补充雌激素后关节液 HA 与正常比较差异无显著性意义。

**2.2.2 血清 HA 测定结果:** A、B、C、D 各组在 2、4、6、8 周时血清 HA 测定结果见表 1。说明关节固定和卵巢切除后血清 HA 均有升高, 8 周时, B 组与 A 组比较  $P < 0.01$ , C 组与 A 组比较  $P < 0.05$ , 而关节固定较卵巢切除血清 HA 升高更为明显, 补充雌激素后血清 HA 与正常比较差异无显著性意义。

**2.3.3 关节液 HA 与血清 HA 比值:** 2、4、6、8 周时, 关节液 HA 与血清 HA 比值结果见表 1。关节液与血清 HA 比值变化较关节液 HA 或血清 HA 变化更为显著, B 组与 A 组比较, 4 周时  $P < 0.01$ , C 组与 A 组比较, 6 周时  $P < 0.01$ , D 组与 A 组比较, 6 周时,  $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

#### 3.1 OA 模型的选择

目前国内外制作 OA 动物模型的常用方法大致可分为两大类型。其一为诱发模型, 即通过各种操作方法如制动、手术、关节内注射药等诱导 OA 产生; 另一类为自发模型, 即不用任何外界干预, 动物自发 OA, 如 C57 黑鼠等<sup>[3]</sup>。手术方法造模稳定性好, 但手术中出血及炎症因素对 OA 早期软骨和滑膜生化代谢会产生影响, 而关节制动方法可以避免这一影响, 关节在制动状态下, 软骨的负重区和非负重区均发生退行性病变, 以负重区发生得更早、更快。有学者认为, 将兔膝关节于伸直位制动 5—6 周, 即可得到 OA 动物模型<sup>[4]</sup>。本实验采用右膝关节伸直位管型石膏固定制作 OA 模型, 8 周后, 光镜及电镜观察均证实造模成功。

#### 3.2 雌激素对关节软骨的作用

近年来研究表明, 雌激素受体存在于关节软骨细胞、滑膜组织以及骨细胞和骨组织中<sup>[5]</sup>, 雌激素通过传统的核受体和膜介导途径作用于软骨细胞, 来影响软骨的代谢<sup>[6]</sup>。既往许多研究显示, 雌激素能直接抑制多种炎性细胞因子, 也能通过糖皮质激素的介导, 对炎性细胞因子产生间接抑制, 从而对软骨起到保护作用; 雌激素还可通过抗氧化作用, 抑制氧自由基对组织细胞的损伤, 防止其对关节软骨基质蛋白多糖合成的抑制, 起到对关节损伤的保护作用<sup>[7]</sup>。许多流行病学调查都显示, 在绝经后妇女中, 不仅 OA 患病率明显增加, 而且其程度也较为严重<sup>[1,8]</sup>。据此推测, 雌激素水平变化, 可使其对软骨的保护作用下降甚至丧失, 软骨发生退变。

补充雌激素, 可以延缓或减轻 OA 的发生和发展进程。Ham 等<sup>[9]</sup>对卵巢切除的恒河猴予以雌激素替代治疗 3 年, 通过评定软骨病变程度, 并测量软骨及软骨下骨的面积和厚度, 发现雌激素替代治疗能明显降低 OA 动物模型软骨损伤的严重程度。

本实验通过雌兔切除卵巢, 来模拟绝经期的体内环境, 光镜及电镜观察结果证实: 雌激素骤降, 软骨变薄, 软骨细胞数目减少, 细胞核有固缩性改变, 粗面内质网扩张, 基质内胶原纤维增粗, 与关节固定组病理改变相似, 但病变程度较轻, 补充雌激素后, 关节软骨的损伤程度减轻, 证实了雌激素对关节软骨的保护作用, 并由此可说明, 雌激素与 OA 的发生发展密切相关, 补充雌激素, 能够减轻关节软骨的退变程度, 延缓 OA 的发展进程。

#### 3.3 HA 对关节软骨的作用

关节中的 HA 对关节软骨的营养和代谢发挥着重要作用, OA 软骨退变时, HA 在关节内的产生和代谢发生异常, 其浓度和分子量明显降低<sup>[10]</sup>。Manicourt 等<sup>[11]</sup>动物实验结果表明: 切断受试狗的膝关节前交叉韧带后, 关节软骨负重区的 HA 含量呈现进行性下降趋势, 非负重区则显示代谢活跃。近 20 年, 随着 HA 特异、敏感的新检测方法的建立, 对关节液及血清中 HA 含量的检测大量见于 OA 的临床研究。目前已证实<sup>[12-13]</sup>, OA 患者关节液中的 HA 浓度、分子量及黏滞性均低于正常, 关节内注射透明质酸钠可显著改善膝 OA 患者的运动障碍、关节疼痛、关节积液及晨间僵硬等症状, 且透明质酸钠的分子量越大, 其抑制软骨退变的作用越明显。

我们通过对 HA 的检测发现, 去势 8 周后关节液 HA 水平较正常明显下降 ( $P < 0.05$ ), 血清 HA 有上升趋势, 关节固定组更为明显。以上说明, HA 水平变化与 OA 发病有关。体外研究证明, IL-1 可抑制 HA 的合成。Silva 等<sup>[14]</sup>亦发现切除卵巢可导致雌性大鼠膝 OA 模型内肉芽组织 IL-1 产生明显增多, 而 IL-1 能减少关节软骨中蛋白多糖和胶原的合成, 还能诱导金属蛋白酶的合成和释放, 导致基质降解, 软骨退变。宋亦军等<sup>[15]</sup>, 采用 RT-CPR 法对去势兔膝关节滑膜组织 IL-1 $\beta$ mRNA 表达水平进行半定量测定得出, 去势组滑膜 IL-1 $\beta$  表达增加, 补充雌激素对 IL-1 $\beta$  的表达有抑制作用。据此推测, 去势后雌激素水平骤降, 可能对某些炎性细胞因子如 IL-1、PGE<sub>2</sub>、TNF- $\alpha$  等的抑制作用减弱, 通过一种或多种细胞因子的作用, 使滑膜 B 细胞及其他细胞产生大量低分子量 HA, 而低分子量 HA 活动度高, 可通过淋巴管道较多地进入血液循环, 致使关节液 HA 降低, 血清



HA 升高。本实验对关节液 HA 和血清 HA 的测定证实了上述观点。

关节液中 HA 主要通过附近的淋巴管道进入外周血液循环,再经肝内皮细胞破坏清除。关节内 HA 生成增多,进入血液循环 HA 量增加,血清 HA 含量之所以在 OA 早期就出现升高,与关节软骨的代谢异常,以及滑膜炎性反应等相关。但血清 HA 含量的变化,也可受肝肾功能损害、某些药物如皮质激素、时间及运动等其他因素的影响,说明单独的血清 HA 水平并不能很好地反映 OA 的病变程度。本实验发现,卵巢切除组在 6 周、8 周时,关节液 HA 与血清 HA 比值有显著下降,关节固定组 HA 比值下降更为明显。而补充激素组,虽然在 8 周时单纯的关节液或血清 HA 与正常比较无显著性差异,但其 HA 比值在 6 周时与正常比较已有显著性差异。刘清源等<sup>[16]</sup>实验发现,OA 患者血清 HA 的浓度较正常人显著升高,关节液 HA 浓度下降,关节液 HA 与血清 HA 比值明显降低。由于血清 HA 主要来源于关节液且血清 HA 水平升高与关节液 HA 水平降低相关,因此,关节液 HA 与血清 HA 比值较血清 HA 能更敏感地反映早期 OA 的病变程度,临床上可将 HA 比值作为反映 OA 病变相对独立的炎症反应指标。

我们实验发现,关节固定组在 2 周时关节液 HA 水平明显升高,然后逐渐下降。这与 OA 中 HA 聚合减少和浓度降低的普遍观点不相符合。实际上,病变组织与正常组织代谢率的比较一直是骨关节炎性软骨生物化学中最有争议的问题之一,骨关节炎性关节软骨的代谢活性要比正常的活跃得多。有研究表明,在关节疾病发展的早期阶段,HA 的合成显著升高,这被认为是细胞修复基质的一个机制,但合成的 HA 分子量较正常低,使其不能与蛋白多糖聚合<sup>[17]</sup>,HA 升高,继而由于某些溶酶体及透明质酸酶活性增加,HA 的分解率和从基质迁移出的速率逐渐增加,HA 水平下降。另外,关节制动造成滑膜炎性反应,释放许多蛋白降解酶、氧自由基和炎症细胞因子等,可分解或促进分解蛋白多糖,蛋白多糖降解后不能再与 HA 结合,而使 HA 增多。因此,软骨基质的维持在于合成与分解丢失之间的平衡,软骨退行性变是一种失衡。我们认为,关节固定组 2 周时关节液 HA 水平明显升高,是合成与分解代谢失衡的表现。

#### 4 结论

雌激素对关节软骨有重要的调节作用。雌激素

水平骤降是 OA 发生的一个病理因素。雌激素替代治疗能延缓 OA 的发生与发展。但 OA 作为一种多因素所致的疾病,雌激素水平变化和增龄并不是其发生的必然因素,故目前在疾病诊断上还有一定的盲目性,因此,特别是对于绝经后女性,关节液 HA 与血清 HA 比值可能作为 OA 早期诊断和疾病监测的指标之一。

#### 参考文献

- [1] Swoboda B. Epidemiological arthrosis research [J]. Orthopade, 2001, 30(11):834.
- [2] Goldberg RL, Huff JP, Lenz ME, et al. Elevated plasma level of hyaluronate in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 1991, 34(7):799—807.
- [3] 汪青春, 沈培芝, 王海彬. 骨关节炎动物模型的建立及选择[J]. 中医正骨, 1998, 10(3):39—40.
- [4] Vide man T. Experimental osteoarthritis in the rabbit comparison of different periods repeated immobilization [J]. Acta Orthop Scand, 1982, 53:339.
- [5] Nasalzy E, Schwarzl Z, Soskolne WA, et al. Evidence for receptors specific for 17 beta-estradiol and testosterone in chondrocyte cultures[J]. Connect Tissue Res, 1994, 30:277—294.
- [6] Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily[J]. Science, 1988, 240:889—895.
- [7] 郭世绂. 性激素和细胞因子与骨关节炎及骨质疏松的关系[J]. 国外医学·内分泌学分册, 2003, 23(2):98—100.
- [8] Zhang Y, Xu L, Nevitt MC, et al. Comparison of the prevalence of knee osteoarthritis between the elderly Chinese population in Beijing and White in the United States. The Beijing Osteoarthritis Study[J]. Arthritis Rheum, 2001, 44:2065—2071.
- [9] Ham KD, Loeser RF, Lindgren BR, et al. Effects of long-term estrogen replacement therapy on osteoarthritis severity in cynomolgus monkeys [J]. Arthritis Rheum, 2002, 46 (7):1956—1964.
- [10] Jahn M, Baynes JW, Spiteller G. The reaction of hyaluronic acid and its monomers, glucuronic acid and N-acetylglucosamine, with reactive oxygen species [J]. Carbohydr Res, 1999, 321(3—4):228.
- [11] Manicourt DH, Pita JC. Progressive depletion of hyaluronic acid in early experimental osteoarthritis in dogs [J]. Arthritis rheum, 1988, 31:538—544.
- [12] McCarty MF. Enhanced synovial production of hyaluronic acid may explain rapid clinical response to high-dose glucosamine in osteoarthritis[J]. Med Hypotheses, 1998, 50:507—510.
- [13] Frizziero L, Govoni E, Bacchini P. Intra-articular hyaluronic acid in the treatment of osteoarthritis of the knee: clinical and morphological study [J]. Clin Exp Rheumatol, 1998, 16: 441—449.
- [14] Silva JA, Colville-Nash P, Spector TD, et al. Inflammation-induced cartilage degradation in female rodents [J]. Protective role of sex hormones Arthritis Rheuma, 1993, 36(7):1007.
- [15] 宋亦军, 吴志宏, 林守清, 等. 雌、孕激素对兔膝关节滑膜中金属蛋白酶及其组织抑制物和白细胞介素-1β mRNA 表达的影响[J]. 中华医学杂志, 2003, 83(6):498—503.
- [16] 刘清源, 于清宏, 施桂英, 等. 骨关节炎患者血清及滑液透明质酸的变化[J]. 中华风湿病杂志, 1998, 2(1):25.
- [17] 陈启明, 梁国德, 秦岭, 等译. 骨关节肌肉系统生物学和生物力学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001, 412—420.