

超声波对实验性兔膝关节炎软骨细胞基质金属蛋白酶-1表达的影响

李卫平¹ 蹇睿¹ 胥方元^{1,2}

摘要

目的:探讨超声波治疗对兔膝关节炎(KOA)模型软骨细胞基质金属蛋白酶-1(MMP-1)表达的影响。

方法:30只新西兰大白兔随机分为正常对照组、模型组和超声波治疗组,每组10只。将模型组和超声波治疗组的兔左膝于伸直位石膏固定6周制作KOA模型。造模后超声波治疗组实施超声波治疗2周。8周后取各组软骨观察膝软骨病理学形态改变、MMP-1表达的变化。

结果:采用Mankin评分比较病理学形态改变,正常对照组与模型组、模型组与超声波治疗组间比较,差异均有显著性意义($P<0.01$)。软骨免疫组化MMP-1测定,正常对照组与模型组、模型组与超声波治疗组间比较,差异均有显著性意义($P<0.01$)。

结论:超声波能有效治疗膝骨性关节炎,其作用机制可能与减少软骨细胞MMP-1的含量而利于软骨细胞的修复有关。

关键词 骨关节炎;软骨细胞;超声波;基质金属蛋白酶-1

中图分类号:R493, R684 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2011)-10-0911-04

The effect of ultrasonic therapy on expression of matrix-metalloproteinase-1 in cartilage cells of rabbit with knee osteoarthritis/LI Weiping, JIAN Rui, XU Fangyuan//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2011, 26(10): 911—914

Abstract

Objective: To study the effect of ultrasound therapy on expression of matrix-metalloproteinase-1(MMP-1) in cartilage cells of rabbit with knee osteoarthritis(KOA).

Method: Thirty healthy New Zealand white rabbits were randomly divided into 3 groups: normal control group contained 10 rabbits, not modeling; the other 20 rabbits were randomly divided into model group and ultrasonic experimental group, being created osteoarthritis. The rabbits' left knees were fixed within plaster cast in stretch position for 6 weeks to created KOA models. Then ultrasonic, experimental group was given ultrasonic treatment for 2 weeks. After 8 weeks cartilage changes on pathological morphology and expression of MMP-1 were observed in all groups.

Result: By Mankin's score the severity of pathological lesion in model group was higher than that in normal control group and ultrasonic experimental group ($P<0.01$). The expression of MMP-1 in model group was higher than that in normal control group and ultrasonic experimental group, the difference was significant ($P<0.01$).

Conclusion: The ultrasonic treatment can effectively improve the rabbits' KOA, and its mechanism probably is correlated with reducing MMP-1 level in cartilage cells, which will be helpful for repairing cartilage cells.

Author's address Department of Rehabilitation Medicine, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, 646000

Key word osteoarthritis; cartilage cells; ultrasound; matrix metalloproteinase-1

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2011.10.005

1 四川省泸州医学院附属医院康复科,泸州,646000; 2 通讯作者

作者简介:李卫平,女,主治医师; 收稿日期:2010-12-29

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种常见的关节退化、关节软骨破坏、膝关节周围软组织退变的慢性关节病,随着人口老龄化趋势的发展,发病率也明显上升。我们通过建立兔膝骨关节炎动物模型,应用超声波治疗,通过免疫组化检测治疗前后基质金属蛋白酶-1(matrix metalloproteinase-1, MMP-1)的表达,了解超声波对关节软骨细胞MMP-1表达的影响并探讨其可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康新西兰兔30只,雌雄随机,体重2.0—2.5kg,5月龄,由泸州医学院动物实验中心提供。动物合格证:SCXK[川] 2008-17。30只兔随机分为正常对照组、模型组和超声波治疗组,每组10只兔。

1.2 仪器和试剂

10%中性甲醛、5%硝酸脱钙液、二甲苯、多聚赖氨酸、伊红、苏木素、甲苯胺蓝、PAS缓冲液、MMP-1免疫组化试剂盒(北京博奥申生物工程有限公司),HS-501型超声波治疗仪(韩国)。

1.3 实验方法

1.3.1 造模方法:于模型组及超声波治疗组制造KOA模型。将兔左膝于伸直位固定于实验固定台上,在左后肢腹股沟以下1.5cm至踝关节上3cm用管型石膏绷带包扎固定制动6周制作KOA模型,成功后解除石膏外固定。

1.3.2 治疗方法:在造模6周后,超声波组采用频率为3MHz,脉冲式超声波直接接触移动法作用于左膝关节进行治疗,剂量0.25W/cm²,每次治疗10min,每日1次,连续治疗14d。

1.3.3 标本取材:以空气栓塞法处死兔,取股骨内侧切口打开膝关节观察股骨内髁关节面的病理改变,切取股骨内侧髁0.5cm×0.5cm×0.5cm关节软骨标本,经5%硝酸脱钙液脱钙,至大头针能轻松穿透标本后,石蜡包埋标本,垂直软骨表面5μm切片。

1.3.4 软骨病理学检测:HE染色和甲苯胺蓝染色后光镜观察,HE染色观察软骨表面是否规则、有无裂隙,细胞数量、分布、排列是否规则,潮线是否完整;甲苯胺蓝染色观察软骨基质失染程度。参考Mankin^[1]评分标准进行评分。

1.3.5 软骨免疫组化MMP-1测定:①将软骨标本用中性缓冲甲醛液固定48h,脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋;②连续切片4μm,贴片于多聚赖氨酸防脱处理过的载玻片上,切片脱蜡至水,3% H₂O₂室温10min灭活内源性过氧化物酶;③冲洗后PBS浸泡5min复合消化液修复抗原活性;④正常血清封闭,滴加1:100稀释抗兔MMP-1抗体,4℃孵育过夜;⑤PBS冲洗3次,5min/次,滴加生物素标记的二抗,37℃孵育20min;⑥PBS冲洗5min,3次,滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,37℃孵育20min;⑦PBS冲洗5min,3次,二甲基联苯胺(DAB)室温下显色至满意,自来水终止显色反应;⑧苏木素复染细胞20s,洗去多余染液,酒精梯度脱水后封片。

1.3.6 结果观察:参照Pelletier^[2]的方法在软骨切片中随机选取6个视野(400倍),计算每个视野里的阳性细胞数和细胞总数,显微镜下胞浆或胞膜有褐色颗粒为阳性细胞。用细胞分数即阳性细胞数占细胞总数的百分比来表示MMP-1表达量。每张切片的细胞计数分别由两个独立的观察者进行,其评分误差率控制在5%以内,取二者均值为最后得分。

1.4 统计学分析

用SPSS 13.0软件进行统计学分析。所有数值结果均用均数±标准差表示。对兔软骨结构、软骨细胞、潮线评分结果采用 t 检验进行两两比较,对甲苯胺蓝染色Mankin评分结果和免疫组化MMP-1的统计结果采用单因素方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 大体观察

正常对照组左膝关节未见明显关节积液,软骨面外观光滑、透明,呈蓝白色,色深明亮,无缺损及新生物,无水肿充血表现。模型组左膝关节大部分出现关节积液,软骨表面色泽暗,呈灰黄色,光泽度降低,表面略有不平,较粗糙,有不规则压迹,糜烂与溃疡。超声波治疗组部分有少量关节积液,软骨表面有少许溃疡,部分无明显关节积液,软骨表面光滑,软骨欠透明,光泽较正常对照组稍差。

2.2 光镜观察

2.2.1 HE染色结果:正常对照组软骨层较厚,软骨着色均匀,软骨细胞排列整齐,细胞饱满,潮线清晰

(图1);模型组软骨明显变薄,可见裂隙,部分深达软骨下骨,基质染色明显变浅,细胞簇集,有较薄的钙化层,局部有破坏,软骨细胞局部排列紊乱,多个软骨细胞聚集一起,细胞核浓缩,潮线紊乱(图2);超声波治疗组染色显示软骨层较模型组增厚,表面光滑,偶见小的裂隙形成,着色尚均匀,软骨细胞排列整齐,细胞饱满,偶见多个软骨细胞聚集一起,细胞核浓缩,潮线紊乱(图3)。

2.2.2 甲苯胺蓝染色结果:正常对照组染色均匀,9只无基质失染,1只有轻度减轻(图4);模型组软骨层失染,以表层、中层尤为明显(图5);超声波治疗组染色轻度减退(图6)。

2.2.3 Mankin 评分结果:模型组评分明显高于正常对照组($P<0.01$),超声波治疗组明显低于模型组($P<0.01$),(见表1—2)。

2.3 免疫组化染色结果:在正常对照组 MMP-1 呈弱阳性表达,仅在表层软骨细胞内偶见少许胞质棕褐色颗粒;模型组呈强阳性表达,软骨基质、胞浆中均有 MMP-1 表达,全层可见,尤以表、中层密度最高,成熟软骨细胞中较多,为深棕褐色颗粒。超声波治疗组软骨组织中 MMP-1 较模型组表达降低,主要是软骨组织的表、中层减少,为浅棕褐色颗粒(见表3)。

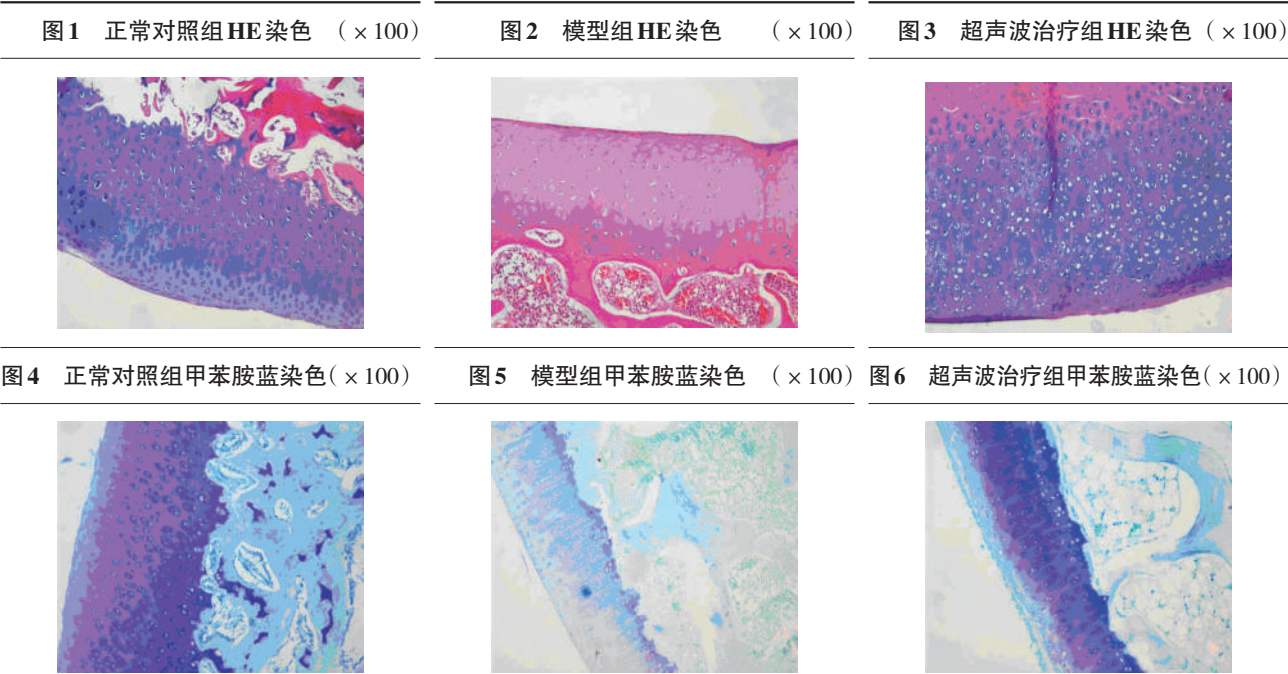


表1 超声波治疗组与OA模型组关节软骨 Mankin 评分比较 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	软骨结构	软骨细胞	潮线完整性
模型组	2.80 ± 0.63	2.80 ± 0.52	1.80 ± 0.42
超声波治疗组	1.40 ± 0.52 ^①	1.20 ± 0.42 ^①	1.00 ± 0.00 ^①

①模型组与超声波治疗组比较 $P<0.01$

表2 各组软骨 Mankin 评分比较 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	甲苯胺蓝染色	Mankin 评分
正常对照组	0.10 ± 0.32 ^①	0.10 ± 0.32 ^①
模型组	2.70 ± 0.48	9.90 ± 1.73
超声波治疗组	1.20 ± 0.42 ^②	4.81 ± 1.23 ^②

正常对照组与模型组比较:① $P<0.01$;超声波治疗组与模型组比较:② $P<0.01$

表3 各组软骨 MMP-1 表达的比较 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	标本数	MMP-1
正常对照组	60	13.89 ± 3.10 ^①
模型组	60	54.65 ± 9.27
超声波治疗组	60	31.64 ± 6.69 ^②

正常对照组与模型组比较:① $P<0.01$;超声波治疗组与模型组比较:② $P<0.01$

3 讨论

KOA 以关节软骨进行性变性和破坏及骨赘形成病理特点,尽管其病因复杂,但最终均通过影响软骨细胞和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)导致软骨细胞坏死,软骨基质过度降解而发挥作用。

软骨基质主要包括胶原纤维和蛋白多糖,由软骨细胞分泌,正常的软骨细胞所分泌蛋白多糖甲苯胺蓝染色呈均匀的蓝紫色。在OA关节软骨中,软骨基质的降解与合成之间平衡失调,软骨细胞功能丧失,软骨细胞变性或坏死,不能分泌或分泌异常的蛋白多糖^[3],因此甲苯胺蓝染色失染或者染色不均。本试验结果与之相符。

MMPs是一类广泛存在于结缔组织中结构相似的蛋白酶家族,能降解几乎所有的软骨细胞外基质。OA的病理过程中^[4],关节滑膜细胞及软骨细胞分泌过量的MMPs,打破MMPs及基质金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)的平衡,在力学负荷和炎症因子的作用下,导致软骨破坏。MMPs的不同亚型对各基质成分的降解能力存在很大的差异,有学者将MMP-1作为OA新的标志指标^[5],其对于Ⅱ型胶原的降解起了启动及影响其降解速率的作用,在OA软骨基质降解中占有主导地位。MMP-1又名间质胶原酶,其作用对象主要是新生成的Ⅱ型胶原。在病理状态下,软骨细胞大量产生MMP-1并激活,作用于软骨基质Ⅱ型胶原 α 链上的Gly775—Leu / Ile776位点,使Ⅱ型胶原裂解,网架结构破坏,固相结构中的蛋白多糖流失或分解,软骨基质降解速度加快,软骨发生破坏和缺损,导致OA发病^[6-7]。Tchvetverikov等^[8]对OA患者和正常对照滑膜积液的MMP-1免疫测定结果表明随着OA的发展MMP-1的含量增多且活性增强。Dahlbe等^[9]在做体外培养时发现,只有抑制了MMP-1的活性后,培养基中新合成的Ⅱ型胶原才明显增加。

有研究证实,超声波能促进细胞增殖、蛋白质合成、刺激胶原和细胞因子生成^[10]。胥方元等临床实验证明超声波对膝OA有良好疗效^[11],可以促进软骨、韧带和肌腱等组织损伤的修复。由于兔膝关节较表浅,选用频率为3MHz的超声波治疗,深度达1—2cm,利用脉冲式超声波的非热效应^[12],使用0.25W/cm²的低强度超声波治疗,将其热效应最低化,避免热效应对挫伤肌腱、韧带及骨软骨的损害。本实验中,MMP-1在正常对照组呈弱阳性表达,仅表层软骨细胞内偶见MMP-1弱阳性表达,为胞质内少许棕褐色颗粒。模型组中软骨基质、胞浆中均有MMP-1表达,全层可见,尤以表层、中层密度最高,

成熟软骨细胞中较多,为深棕褐色颗粒;超声波治疗组软骨表层散在的软骨细胞胞浆中存在MMP-1表达,为浅棕褐色颗粒。超声波治疗组软骨组织中MMP-1均较模型组表达降低,且主要是软骨组织的表层、中层表达量减少,说明超声波能抑制兔膝骨性关节炎软骨组织中MMP-1的表达,可能具有增强促进软骨的再生能力,减轻软骨的破坏,促进胶原及蛋白多糖增多,减轻软骨基质损害的作用。其对OA的治疗机制可能是通过有效降低软骨MMP-1的表达,实现对MMP-1/TIMP-1整体抑制作用,减轻MMP-1的破坏作用,促进蛋白多糖的合成,以利于软骨的修复,从而达到治疗OA的目的。

参考文献

- [1] Henry J, Mankin, Howard Dorfman, et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips[J]. J Bone Joint Surg(Am), 1971, 53(3):523.
- [2] Pelletier JP, Lascau-Coman V, Jovanovic D, et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental osteoarthritis associated with reduction in tissue levels of catabolic factors[J]. J Rheumatol, 1999, 26(9):2002—2014.
- [3] Alsalameh S, Amin R, Gemba T, et al. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage[J]. Arthritis Rheum, 2004, 50(5):1522—1532.
- [4] Conway JG, Andrews RC, Beaudet B, et al. Inhibition of tumor necrosis factor- α (TNF- α) production and arthritis in the rat by GW3333, a dual inhibitor of TNF- α -converting enzyme and matrix metalloproteinases[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2001, 298(3):900—908.
- [5] Elliott S, Hays E, Mayor M, et al. The triterpenoid CDDO inhibits expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-13 and Bcl-2 in primary human chondrocytes[J]. Arthritis Res Ther, 2003, 5(5):R285—291.
- [6] 姚如愚,张晓.基质金属蛋白酶与骨关节炎[J].国外医学·内科学分册,2001,28(4):159—162.
- [7] 管剑龙,施桂英.基质金属蛋白酶与骨关节炎[J].中华风湿病学杂志,2000,4(1):54—55.
- [8] Tchvetverikov I, Lohmander LS, Verzijl N, et al. MMP protein and activity levels in synovial fluid from patients with joint injury, inflammatory arthritis, and osteoarthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2005, 64(5):694—698.
- [9] Dahlberg L, Billingham RC, Manner P, et al. Selective enhancement of collagenase-mediated cleavage of resident type II collagen in cultured osteoarthritic cartilage and arrest with a synthetic inhibitor that spares collagenase 1 (matrix metalloproteinase 1)[J]. Arthritis Rheum, 2000, 43(3):673—682.
- [10] Fu SC, Shum WT, Hung LK, et al. Low-intensity pulsed ultrasound on tendon healing: a study of the effect of treatment duration and treatment initiation[J]. Am J Sports Med, 2008, 36(9):1742—1749.
- [11] 胥方元,何成松,余茜,等.超声波结合股四头肌肌力训练治疗老年膝关节骨关节炎[J].中华物理医学与康复杂志,2003,25(9):541—543.
- [12] Speed CA. Therapeutic ultrasound in soft tissue lesions[J]. Rheumatology (Oxford), 2001, 40(12):1331—1336.