

·基础研究·

不同强度的主动运动对大鼠膝关节软骨的影响

梁 军¹ 钱 洁² 王惠芳³ 王予彬^{1,4}

摘要

目的:研究不同强度的主动运动对大鼠膝关节软骨的作用。

方法:8周龄雄性SD大鼠40只,随机分为对照组、低强度运动组、中强度运动组、高强度运动组。对照组自由活动,实验组每天按照不同的运动强度进行跑步训练。8周后处死大鼠,切取膝关节关节软骨,以苏木素伊红(HE)及甲苯胺蓝染色、透射电镜等观察不同强度的主动运动对关节软骨形态结构、细胞代谢的影响。

结果:运动8周后,低、中强度运动组软骨表面完整,软骨层的厚度较对照组显著增厚($P < 0.05$);高强度运动组软骨表面部分缺损,表面粗糙,软骨层的厚度较对照组显著降低($P < 0.05$)。HE染色显示低、中强度运动组软骨负重区蛋白多糖分泌较对照组明显增加,而高强度运动组负重区蛋白多糖分泌较对照组明显减少。透射电镜显示:低、中强度组软骨表面可见明显的圆形突起,膜样胶原纤维连续,而高强度运动组软骨表面圆形突起减少,部分表层胶原纤维暴露。

结论:不同强度的主动运动对大鼠膝关节软骨具有不同的作用。低、中强度的主动运动可以增加软骨表面厚度、明显改善关节软骨的代谢,尤以中等强度的作用更明显;高强度的主动运动可能对关节软骨产生破坏效应。

关键词: 大鼠;膝关节;关节软骨;主动运动

中图分类号: S854.5, R493 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2012)-01-0008-04

Effects of active exercise of different-intensity on articular cartilage of knee in rats/LIANG Jun,QIAN Jie, WANG Huifang, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2012, 27(1): 8—11

Abstract

Objective: To research the influences of active exercise of different-intensity on articular cartilage of knee in rats.

Method: Forty 8-week-age male SD rats were randomly assigned into one of four groups: non-exercise control group(CG,n=10), low-intensity exercise group(LG,n=10), moderate-intensity exercise group(MG,n=10) and high-intensity exercise group (HG,n=10).The measurement of exercise intensity was referenced with Bedford-plan. After eight weeks exercise, cartilages of rats knee joints were obtained, cartilage sections were stained with hematoxylin and eosin(HE) and toluidine blue and the structure morphology as well as cell metabolism of cartilages were observed under transmission electron microscope.

Result: After eight weeks exercise, the cartilage surfaces of LG and MG were integrated, and compared with CG the thickness of cartilage layer increased($P < 0.05$); the cartilage surfaces of HG were partly defected,damaged and became rough, and compared with CG the thickness of cartilage layer reduced obviously($P < 0.05$).In HE staining sections, proteoglycan(PG) content in LG and MG was significantly higher than that in CG, while PG content in HG was significantly lower than that in CG. Under transmission of electron microscope,in LG and MG obvious circular tubers on cartilage surfaces, and continuous fibers of collagen were observed; but in HG the circular tubers reduced, and fibers of collagen on surface layer exposed partly.

Conclusion: There were different influences of active exercise of different-intensity on articular cartilage of knee in rats. Low and moderate-intensity exercise could increase the thickness of cartilage layer and improve its cell

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2012.01.004

1 上海东方医院运动医学科,上海,200120;2 上海同济大学生命科学与技术学院;3 上海东方医院康复医学科;4 通讯作者
作者简介:梁军,男,主任医师,博士; 收稿日期:2011-12-17

metabolism, especially after moderate-intensity exercise the effects were more obviously. High-intensity exercise might damage the cartilage.

Author's address Dept. of Sports Medicine, East Hospital Tongji University School of Medicine, Shanghai, 200120

Key word rat; knee joint; articular cartilage; active exercise

关节软骨是关节负重和活动的重要结构,始终处于一定的力学刺激下,骨性关节炎(osteoarthritis, OA)主要累及关节软骨,引起关节软骨的进行性损伤。Cheng等^[1]通过流行病学调查发现跑步运动可以明显导致骨性关节炎的发生,而Sohn等^[2]比较了跑步运动者及游泳运动者,发现中等强度的跑步不会造成膝关节和髋关节骨性关节炎的发病率增加。因此,运动在骨性关节炎发病过程中的作用目前尚存在较大的争议。

我们采用电动大鼠跑步台,研究不同强度的主动运动对大鼠正常膝关节软骨的影响。通过苏木素伊红(HE)及甲苯胺蓝染色、透射电镜等观察不同强度的主动运动对大鼠正常关节软骨厚度、软骨表面形态结构及软骨细胞代谢的影响,探讨主动运动和OA发病的相关性。

1 材料与方法

1.1 实验动物

Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠 40 只, 8 周龄, 体重 200—220g (SPF 级, 同济大学动物实验中心提供)。

1.2 主要仪器

PT98 型电动动物跑台(上海奉贤科技有限公司); Olympus 光学显微镜照相系统(LM)(日本); HE-600 透射电子显微镜(TEM)(日本)。

1.3 方法

1.3.1 实验动物分组:实验动物先进行适应性训练 1 周, 筛选适应性较差的大鼠。40 只 SD 大鼠随机分为对照组、低强度运动组、中强度运动组、高强度运动组, 每组 10 只。实验动物分笼饲养, 自然光照, 自由饮食。实验过程中动物饲养环境温度 20—23℃, 相对湿度 50%—55%。

1.3.2 运动强度:参照 Bedford 方法确定^[3], 低强度组运动速度 15m/min, 中等强度速度为 25 m/min, 而高强度运动速度为 35m/min, 1h/d, 持续 8 周。

1.4 标本取材与处理

1.4.1 大体观察:8 周后分别处死实验大鼠, 打开膝关节, 观察膝关节有无关节积液、滑膜肿胀及关节软骨面形态。

1.4.2 光镜标本的取材与处理:截取股骨髁负重区软骨组织, 经固定、脱钙、脱水、石蜡包埋、切片后用于染色。由两位独立的观察者按 Mankin 评分原则为切片评分, 取两者平均值作为 Mankin 得分。

1.4.3 透射电镜标本:剪取股骨髁负重区软骨组织制成 1mm×1mm×1mm 大小的软骨标本, 固定、脱钙、超薄切片、铀-铅双重染色后透射电镜观察。

1.5 检查项目及方法

1.5.1 苏木素-伊红(HE)、甲苯胺蓝染色, 光镜观察:光镜下观察关节软骨关节面, 软骨细胞、软骨基质、潮线等情况。

1.5.2 软骨层与软骨下骨厚度测量:取膝关节组织切片, 在切片上测量软骨层与软骨下骨的厚度, 软骨层包括透明软骨(从软骨表面至潮线表面)和钙化软骨(从潮线表面至钙化软骨与骨交界处)。在 10 倍光镜下, 每张切片以股骨髁负重区为中心选取 20 个等距点, 两点相距 400μm, 用 10×10 网格目镜测微计测量各点各层面的厚度。每组测量 5 个标本, 每个标本取 3 个视野, 每个视野测定 10 次, 最后取平均值。

1.5.3 透射电镜(TEM)观察:HE-600 透射电镜观察软骨表面结构、细胞、纤维情况。

1.6 统计学分析

SPSS13.0 软件对计量资料进行统计学分析, 计量资料以均数±标准差表示。两组间比较采用 *t* 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 标本大体观察

主动运动训练 8 周后, 对照组及低、中等强度运动组无明显关节积液及滑膜肿胀, 关节软骨表面完整, 未见裂痕及纤维化表现; 高强度运动组轻微的关

节积液,滑膜肿胀,关节软骨表面可见散在的裂痕及纤维化改变。

2.2 组织学观察及测量

低强度运动组:软骨表面完整,软骨细胞排列规则,巢线连续;中等强度运动组:软骨表面完整,软骨层明显增厚,软骨细胞排列规则,软骨细胞外基质分泌明显增多,巢线完整且连续;高强度运动组:软骨表面略粗糙、连续性部分中断,软骨细胞部分丢失、排列不规则,细胞外基质分泌减少,可见多重巢线。

运动8周后各组大鼠膝关节软骨的厚度及Mankin评分^[14]比较见表1。与对照组比较,低中等运动强度的主动运动可以明显增加软骨的厚度($P < 0.05$),而高强度的主动运动可以明显减少软骨厚度($P < 0.05$);低强度组与中等强度组相比,中等强度的主动运动增加软骨厚度的作用更加明显($P < 0.05$)。与对照组比较,低强度组Mankin评分无明显变化($P > 0.05$),中等强度和高强度组则分别明显降低和升高($P < 0.05$),提示中等强度的主动运动可以促进软骨修复、延缓软骨退变,而高强度的主动运动可能促使软骨损伤、退变。

2.3 透射电镜观察

对照组及低、中等强度运动组软骨表面可见明显的圆形突起,膜样胶原纤维连续,细胞增生活跃,线粒体增多;高强度运动组软骨表面圆形突起减少,部分表层胶原纤维暴露,局部细胞固缩,胞浆崩解(图1—2)。

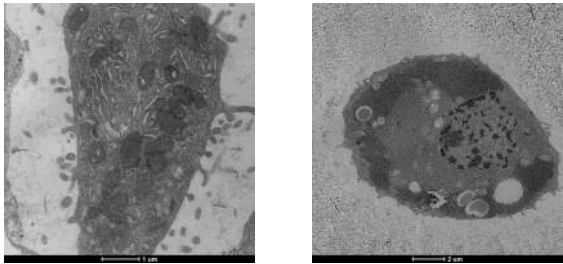
表1 运动8周后各组大鼠膝关节软骨的厚度及Mankin评分比较 ($\bar{x} \pm s$)		
组别	软骨厚度(μm)	Mankin评分
对照组	263 ± 19	1.62 ± 0.78
低强度运动组	295 ± 25	1.59 ± 0.56
中强度运动组	332 ± 29	1.01 ± 0.31
高强度运动组	189 ± 19	5.12 ± 1.35

3 讨论

关节软骨是关节负重和活动的重要结构,对于维持关节的正常功能具有至关重要的作用。关节软骨由软骨基质和软骨细胞构成,软骨基质主要有蛋白多糖和胶原纤维构成(Ⅱ型胶原为主),软骨细胞散在分布于软骨基质中,维持关节软骨的正常代谢。

跑步运动是人的重要运动方式之一,对关节

图1 中等强度主动运动8周后大鼠膝关节软骨 图2 高强度主动运动8周后大鼠膝关节软骨



软骨具有重要的影响^[4]。Oettmeier等^[5]研究发现高强度的运动15周并没有造成犬膝关节骨性关节炎;而Arokoski等^[6]研究发现高强度的运动训练可以降低犬关节软骨蛋白多糖的浓度且以软骨表面蛋白多糖下降最为明显,提示高强度的运动对关节软骨具有损伤作用。因此,主动运动对关节软骨的作用尚有分歧。此外,不同运动方式对关节软骨的作用也各不相同。黄涛等^[7]在研究不同运动方式对关节软骨的影响时发现,不同运动方式均可在某种程度上改善软骨的代谢,对软骨具有保护和修复作用,其效果依次为:主动加被动活动>主动活动>被动活动>自由活动。

本实验中,与对照组相比,低强度运动组、中强度运动组均可增加关节软骨的厚度及软骨全层蛋白多糖的浓度,以中强度组更为明显;Ottemess等^[8]将实验鼠在滚轮中进行适度的跑步训练,结果显示软骨中的蛋白多糖含量增加、软骨破坏减少;Kiviranta等^[9]研究发现中等强度的主动运动可以促进狗关节软骨增厚,软骨全层蛋白多糖分泌增加。结果都表明适度的主动运动对于关节软骨具有保护作用,而且,在一定运动负荷内,运动的强度越大则表现出更好的效果。关节运动对于维持关节的正常功能具有重要的作用^[10],首先在于关节软骨的代谢与关节活动是分不开的,关节软骨的营养来源于关节运动产生的关节滑液,其次,适度的活动可以增强关节功能,减少关节内外粘连,增加周围韧带、关节囊、肌肉的韧性和力量,增强关节稳定性;同时,运动可以降低关节内压力,有利于滑液向软骨表面和细胞间质弥散,提供软骨修复的最佳内环境,促进软骨修复。

在本研究中我们也发现高强度运动组可见软骨表面轻度的纤维化,软骨全层蛋白多糖浓度降低,表

明高强度的主动运动可能在一定程度上造成关节软骨的损害,加重关节软骨的退变。Tang等^[11]报道通过6周、累计30km、每天最多1km、最大速度为20m/min的平板运动可以导致关节软骨的严重破坏;Pap等^[12]的研究也认为大量的运动训练可以导致关节软骨的明显破坏,引起骨性关节炎。此外,流行病学研究发现:随着年龄的增加,运动员更易发生负重关节的骨关节炎;而长跑运动员易发生髌、膝关节骨性关节炎^[13]。但关节软骨对负荷改变有一种潜在的适应性,运动时机体会产生适应运动变化的机制,应对运动中的应激状态,提高对运动的适应而不增加正常关节患骨性关节炎的危险。理论上,关节软骨可能因两种形式损伤而破坏,一种是突发性创伤,另一种是反复性活动超出了关节周围肌肉和韧带的承受能力,造成关节软骨的损伤,因此,在不损伤骨关节的情况下,高强度运动并不一定发生骨关节炎,而超过关节软骨适应限度的运动可以直接加重软骨损伤,加快软骨退变,从而增加产生骨关节炎的风险。

参考文献

- [1] Cheng Y, Macera CA, Davis DR, et al. Physical activity and self-reported, physician-diagnosed osteoarthritis: is physical activity a risk factor[J]. *J Clin Epidemiol*, 2000, 53:315—322.
- [2] Sohn RS, Micheli LJ. The effect of running on the pathogenesis of osteoarthritis of the hips and knees[J]. *Clin Orthop*, 1985, 198: 106—109.
- [3] Bedford TG, Tipton CM, Wilson NC, et al. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures[J]. *J Appl Physiol*, 1979, 47(6):1278.
- [4] Griffin TM, Guilak F. The role of mechanical loading in the onset and progression of osteoarthritis[J]. *Exerc Sport Sci Rev*, 2005, 33:195—200.
- [5] Oettmeier R, Arokoski J, Roth AJ, et al. Quantitative study of articular cartilage and subchondral bone remodeling in the knee joint of dogs after strenuous running training[J]. *J Bone Mineral Res*, 1992, 7 (Suppl 2):S419—424.
- [6] Arokoski JP, Hyttinen MM, Lapveteläinen T, et al. Decreased birefringence of the superficial zone collagen network in the canine knee (stifle) articular cartilage after long distance running training, detected by quantitative polarised light microscopy[J]. *Ann Rheum Dis*, 1996, 55(4):253—264.
- [7] Tao H, Changlin H. The influence of movement on the morphology of the decayed joint cartilage of rabbits[J]. *Chinese Journal of Rehabilitation Medicine*, 1999, 14(5): 198—201.
- [8] Otterness IG, Le Graverand MP, Eckstein F. Allometric relationships between knee cartilage volume, thickness, surface area and body dimensions[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, 16(1): 34—40.
- [9] Kiviranta I, Tammi M, Jurvelin J, et al. Moderate running exercise augments glycosaminoglycans and thickness of articular cartilage in the knee joint of young beagle dogs[J]. *J Orthop Res*, 1988, 6(2):188—195.
- [10] Pedowitz RA, Gershuni DH, Crenshaw AG, et al. Intraarticular pressure during continuous passive motion of the human knee[J]. *J Orthop Res*, 1989, 7:530—541.
- [11] Tao Tang, Takeshi Muneta, Young-Jin Ju, et al. Serum keratan sulfate transiently increases in the early stage of osteoarthritis during strenuous running of rats: protective effect of intraarticular hyaluronan injection[J]. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10(1): R13.
- [12] Pap G, Eberhardt R, Stürmer I, et al. Development of osteoarthritis in the knee joints of Wistar rats after strenuous running exercise in a running wheel by intracranial self-stimulation[J]. *Pathol Res Pract*, 1998, 194(1):41—47.
- [13] Marti B, Knobloch M, Tschopp A, et al. Is excessive running predictive of degenerative hip disease? Controlled study of former elite athletes[J]. *BMJ*, 1989, 299(6691):91—93.
- [14] Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips II: Correlation of morphology with biochemical and metabolic data[J]. *J Bone Joint Surg(Am)*, 1971, 53: 523—537.