

·基础研究·

体外冲击波对大鼠膝骨性关节炎中基质金属蛋白酶-1、3、13表达的影响

刘洪柏¹ 张鸣生¹ 区丽明¹

摘要

目的:观察体外冲击波(ESW)对大鼠膝骨性关节炎(OA)中基质金属蛋白酶-1、3、13表达的影响,探讨ESW治疗膝骨性关节炎的可能机制。

方法:将18只SD大鼠随机分为ESW组、模型组、对照组,每组6只。ESW组和模型组采用单侧后肢跟腱切除法建立膝OA模型,对照组不作任何处理。治疗组造模术后4周造模成功立即给予ESW治疗1次,能量1.5bar,冲击次数1000次。各组大鼠分别于治疗后4周处死,取各组软骨予以HE和甲苯胺蓝染色,免疫组化行MMP-1、3、13分析,观察软骨Mankin评分的改变,MMP-1、3、13表达的变化。

结果:HE和甲苯胺蓝染色结果采用Mankin评分在ESW组、模型组高于对照组,差异有显著性意义($P < 0.01$),ESW组低于模型组比较,差异有显著性意义($P < 0.01$);软骨免疫组化MMP-1、3、13测定,ESW组、模型组低于对照组,差异均有显著性意义($P < 0.01$),ESW组高于模型组,差异有显著性意义($P < 0.05$)。

结论:体外冲击波通过减少骨性关节炎软骨细胞中MMP-1、3、13的表达,进而减少对Ⅱ型胶原和氨基多糖等细胞外基质的降解,从而延缓骨性关节炎的发展。

关键词 体外冲击波;骨性关节炎;基质金属蛋白酶

中图分类号:R684.3, R454 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2014)-11-1016-04

Influence of extracorporeal shock wave on the expressions of MMP1, 3, 13 in the cartilage of rats with knee osteoarthritis/LIU Hongbai, ZHANG Mingsheng, OU Liming//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2014, 29(11): 1016—1019

Abstract

Objective: To investigate the effects of extracorporeal shock wave(ESW) on the expressions of MMP1, 3, 13 in cartilage in rats with experimental knee osteoarthritis(OA).

Method: In this study 18 male Sprague-Dawley rats with body weights ranging from 200 to 250g were used and randomly divided into three groups, with 6 rats in each group. The control group received neither surgery nor ESW. The model group underwent the heel tendon resection of unilateral hind limb to established the knee OA model, but received no ESW. The ESW group underwent the modeling surgery and received ESW one time at 4 weeks after the surgery. Then 6 rats from each group were sacrificed at 4 weeks later. Evaluation parameters included Mankin score and the expressions of MMP1, 3, 13 using histopathological examination and immunohistochemical methods were analysed.

Result: The model group and ESW group showed significant higher Mankin score and lower levels of MMP1, 3, 13 in articular cartilage compared with the control group ($P < 0.01$). The ESW group showed significant lower Mankin score and higher levels of MMP1, 3, 13 in the articular cartilage compared with the model group ($P < 0.05$).

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2014.11.004

1 广东省人民医院(广东省医学科学院)康复科,广州,510080

作者简介:刘洪柏,男,主治医师;收稿日期:2013-12-21

1016 www.rehabi.com.cn

Conclusion: ESW showed chondroprotective effect, could delay the development of knee OA by reducing cartilage MMP-1, 3, 13 levels.

Author's address Guangdong General Hospital, Guangzhou, 510080

Key word extracorporeal shock wave; osteoarthritis; matrix metalloproteinase

骨性关节炎(osteoarthritis, OA)是一种退行性关节疾病,其基本病理改变是软骨的退变和损伤。近年研究发现骨性关节炎关节软骨细胞外基质合成与降解失衡是造成软骨变性的主要原因之一,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)起决定性作用。

体外冲击波治疗近年来被广泛应用于运动医学领域,由于体外冲击波治疗时,关节常常被暴露于冲击波的治疗范围,因此其对关节软骨的影响也引起了关注。尽管现有的国内外许多研究表明低能量ESW能够促进软骨细胞的增殖和细胞外基质的表达,但目前缺乏低能量ESW对骨性关节炎中MMPs家族影响的研究,特别是对研究最多的MMP-1、3、13表达的影响。因此本实验应用低能量ESW治疗实验性大鼠膝OA,观察ESW治疗对其表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康清洁级SD大鼠18只,体重约200—250g,购于中山大学医学部动物实验中心。实验动物质量合格证号:SCXK(粤)2011-0029,动物实验室:中山大学医学部动物实验中心。标准饲料饲养,自由饮水。室温控制在15—18℃,湿度70%左右。

1.2 主要药物实验试剂和仪器

大鼠抗MMP-1(产品编号:BA1270-1)和MMP-3(产品编号:BA1531-1)、MMP-13(产品编号:BA2204-1)ELISA试剂盒购自武汉博士德生物有限公司。切片机(厂家:Leica,型号:RM2245),显微镜(OLYMPUS,型号:BX51123),染色机(厂家:SAKURA,型号:Tissue-Tek DRS 2000),体外冲击波(瑞士DolorClast型),Image-Pro Plus软件系统。

1.3 动物分组

将18只大鼠按数字随机分成ESW组、模型组和对照组,每组6只。ESW组和模型组采用单侧左后肢跟腱切除法^[1],均建立膝OA模型,术后4周造模成功。对照组为未采取任何干预措施。

1.4 干预

治疗组给予体外冲击波治疗1次,能量1.5bar,冲击次数1000次。模型组和对照组均不给予干预治疗。

1.5 关节取材

分别于ESW治疗后4周大鼠称重,腹腔注射10%氯胺酮0.1ml/100g麻醉,仰位固定,沿左侧后膝关节正中纵行切开皮肤,直至暴露出以膝关节为中心约3cm×3cm的区域,沿髌骨上沿约0.3—0.4cm处向下切割直至髌骨,再分别沿髌骨两侧向下分离至胫骨,打开膝关节腔。然后收集每只大鼠左后肢膝关节股骨端软骨,10%甲醛溶液固定24h以上,再用混合酸脱钙液脱钙10d。再将标本脱水、透明、浸蜡及包埋,制成石蜡标本,经切片机切成5μm厚的石蜡切片。

1.6 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评分标准进行评分。

1.7 免疫组织化学染色

组织切片暴露抗原,二甲苯脱蜡,梯度乙醇组织切片水化,抗原修复,过氧化物酶阻断剂抑制内源性过氧化物酶。蛋白阻断剂孵育,一抗孵育,依次滴加抗MMP-1、3、13生物素标记的二抗孵育,DAB工作液显色,苏木素复染,二甲苯透明,60℃烤箱烤干脱水,中性树胶封片。观测指标:每张免疫组化玻片取软骨组织的不同区域采图三张,用Image-Pro Plus软件计算每张图免疫组化表达部分的灰度值,取三张图的灰度值平均值作为该标本的免疫组化灰度值。

1.8 统计学分析

计量资料以均数±标准差表示。采用SPSS 19.0统计软件分析处理,组间两两比较采用配对t检验。

2 结果

2.1 常规染色结果

对照组:软骨表面光滑,四层结构及潮线清晰可见,基质染色无减退。模型组:软骨层变薄,细胞排列紊乱,基质染色明显减退,潮线不完整。ESW组:软骨层变薄,细胞排列紊乱,基质染色略减退,潮线不清。三组软骨 Mankin 评分见表1,ESW组同模型组评分相比差异有显著性意义($P < 0.05$)。

2.2 免疫组织化学染色结果

对照组软骨细胞 MMP-1、3、13 均呈弱阳性表达,仅在表层软骨细胞内偶见少许胞质棕褐色颗粒;模型组 MMP-1、3、13 均呈强阳性表达,软骨基质、胞浆中均有,全层可见,尤以表、中层密度最高,为深棕褐色颗粒;ESW组软骨组织中 MMP-1、3、13 均较模型组表达降低,主要是软骨组织的表、中层减少,为浅棕褐色颗粒,其比较结果见表2。ESW组的 MMP-1、13 表达较模型组下调($P < 0.01$),ESW组的 MMP-3 表达较模型组下调($P < 0.05$),差异均有显著性意义。

表1 软骨组织 Mankin 评分 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	平均积分(分)
对照组	6	2.00±0.89
模型组	6	11.50±1.52 ^①
ESW组	6	8.16±1.17 ^{①②}

①与对照组比较, $P < 0.05$;②与模型组比较, $P < 0.05$

表2 各组软骨 MMP-1、3、13 灰度值的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	MMP-1	MMP-3	MMP-13
对照组	6	162.67±3.07	128.16±6.85	148.66±6.15
模型组	6	135.33±9.20 ^①	97.16±10.36 ^①	116.16±8.32 ^①
ESW组	6	155.00±0.77 ^{①②}	110.67±3.88 ^{①②}	130.11±6.14 ^{①②}

①与对照组比较, $P < 0.05$;②与模型组比较, $P < 0.05$

3 讨论

基质金属蛋白酶是水解所有细胞外基质的一种蛋白水解酶,被认为是机体生理重建和病理破坏的主要基础因素之一,在软骨基质大分子(包括二型胶原和氨基多糖)细胞分裂中起重要作用,破坏关节软骨细胞外基质结构和功能的完整性。MMPs对关节软骨的影响及其在OA发生发展中的作用倍受关注,其中主要的是MMP-1、MMP-3和MMP-13。

MMP-1和MMP-13两者均属于MMPs中的胶原酶亚型,可直接降解软骨基质中最具特征、含量也

最多的Ⅱ型胶原,并且其他许多的MMPs亚型对Ⅱ型胶原的降解需要通过它们起作用。因此,可以认为MMP-1、13的变化最能反映出软骨基质的代谢变化。MMP-1、MMP-13在OA不同时期的表达情况不同,在软骨不同层次的表达情况也不同。王玉彬等^[2]研究发现,正常情况下MMP-13只在表层软骨细胞中有表达;而在骨性关节炎软骨中,MMP-13不仅是在表层,甚至在中层以及深层的簇积软骨细胞中均较有正常软骨细胞的过表达。吴宏斌等^[3]研究兔膝关节前交叉韧带切断(anterior cruciate ligament transaction, ACLT)骨性关节炎模型时发现,MMP-1在造模4周和8周都有很高的检出率,并且其表达量逐渐增高,而MMP-13在造模4周时表达率明显增高,8周时表达率却明显下降。杨丰建等^[4]也发现MMP-13及其蛋白在实验性兔OA造模后4、8周持续升高,但在第12周时表达下降,而MMP-1及蛋白在第4、8、12周时持续升高。马文明等^[5]在实验性大鼠OA模型中也发现类似的现象。任志伟等^[6]在IL-1 β 刺激体外培养的软骨细胞研究中,发现MMP-1 mRNA的增加存在着正向相关的时间依赖关系,而MMP-13 mRNA并不随着时间延长持续升高,而是升高后维持在高水平内。上述已有的研究提示,MMP1、13在OA发病过程中的不同阶段起着不同的作用,MMP-13可能主要在OA的早中期起作用,而MMP-1则在OA发病的整个过程中起持续作用。

MMP-3属于MMPs中的基质溶解酶亚型,对软骨的Ⅱ型胶原N、C末端肽和蛋白聚糖分别有胶原肽酶、裂解作用,MMP-3是MMPs家族中少数几个能在退变早期高表达的蛋白之一。目前认为MMP-3也是软骨退变中的一个关键调控因子,Ni等^[7]的研究表明在大鼠的关节内注射MMP-3抑制剂I对软骨具有保护作用,邢丹等^[8]认为OA时可以通过MMP-3以及TIMP-3两个途径共同加速软骨的退变。胡阿威等^[9]采用Hulth法建立兔OA模型,4周后发现MMP-3阳性细胞弥散于软骨细胞四层结构,主要在软骨中层表达明显。赫淑倩等^[10]研究中发现,在ACLT模型第4周软骨MMP-3表达量明显升高,而且随着造模时间延长软骨损害加重,表达量持续升高。在免疫组化检测中,MMP-3阳性细胞弥散于

软骨细胞四层结构,未发现表达部位与病变时相有明显关系。夏睿等^[11]在大鼠佐剂性关节炎研究中,发现MMP-3在造模后第1、5、7周持续高表达,说明MMP-3在软骨破坏过程中起到持续作用。Freemont^[12]在人类OA标本发现MMP-3主要在深层表达较高,而且在OA早期和晚期表达较高,这可能与不同物种的差异有关。

体外冲击波属于一种特殊形式的机械波,具有高压强,短周期(仅10 μ s)的特点,频率为16—20MHz,可在三维空间传播,传播速度随压力的增加而加快。目前关于ESW延缓膝OA退变的作用机制仍然不十分明确。王明波等^[13]利用体外培养兔膝关节软骨细胞,使用ESW干预后发现Ⅱ型胶原表达增多,并且处于增殖期的细胞更多,还发现ESW促进软骨细胞促增殖因子bFGF、CTGF表达。赵喆等^[14]研究也有类似的发现,但是随着ESW压强、次数升高,软骨细胞增殖活性明显下降。Wang等^[15]通过切断鼠膝关节前交叉韧带建立OA动物模型,ESW治疗治疗后12周,发现减少了的软骨剥蚀现象和增加软骨细胞活性。Wang等^[16-17]进一步实验显示ESW的软骨保护作用具有时间依赖性,最佳治疗效果在治疗后第4周,并且在治疗后第12周仍然显示出治疗效果,但是其研究显示,如果每周ESW治疗3次,反而会导致MMP-13表达增加和Ⅱ型胶原减少。赵喆等^[18]利用ESW干预治疗实验性兔膝OA模型后,发现在治疗后4周时和8周时,ESW都能使关节液中NO的水平明显下降,进而调节炎症反应,抑制软骨细胞的凋亡,减轻关节软骨的破坏。在最近的一项随机人体实验中,发现ESW治疗膝骨性关节炎后12周,明显减轻患者关节疼痛,改善步行功能^[19]。我们在前期试验中也发现ESW干预后可以减少OA中软骨细胞凋亡,并且减少IL-1 β 或TNF- α 的表达^[20-21],这与Hagai^[22]和Moretti B等^[23]实验结果相似。

为进一步研究ESW延缓骨性关节炎的作用机制,我们选择MMP中对OA细胞外基质有较大影响的MMP-1、3、13作为观察目标。本实验发现,MMP-1、3、13在对照组可见散在少数软骨细胞胞浆中,呈现弱阳性表达,而在模型组中软骨全层均呈强阳性表达,在软骨细胞胞浆和细胞核中均见深棕褐

色颗粒,其中MMP-13比MMP-1的表达更强,而MMP-3的表达最强。这证明MMPs对骨性关节炎的发生发展起到促进作用。同时实验进一步发现,经过ESW干预治疗后,MMP-1、3、13在软骨组织的表层表达减少,这说明ESW主要作用于软骨组织的浅层,发挥抑制MMP-1、3、13作用,减少Ⅱ型胶原和氨基多糖的降解,以延缓关节软骨的破坏。

目前国内外有关ESW治疗骨性关节炎的资料绝大多数基于细胞实验和动物实验上,缺乏由前瞻临床随机对照试验获得的结果。因此,将ESW运用于治疗临床OA患者时,还需要研究ESW的最佳治疗剂量和频率,同时还应该进一步在循证医学的基础上客观评价ESW对骨性关节炎不同时期治疗的疗效。而且由于OA病因复杂,单一治疗方法并不能取得非常好的效果,还需要进一步研究ESW联合药物治疗OA的可行性。

参考文献

- [1] 王道海,包飞,吴志宏,等.针刺对膝骨性关节炎大鼠软骨白介素-1 β 及肿瘤坏死因子- α 表达的影响[J].中国骨伤,2011,24(9):775—778.
- [2] 王玉彬,陈安民,郭风劲,等.基质金属蛋白酶家族在骨性关节炎软骨组织中表达的研究[J].中国矫形外科杂志,2007,15(11):853—855.
- [3] 吴宏斌,杜靖远,胡勇,等.兔前交叉韧带切断骨性关节炎模型中MMP-1 MMP-13及TIMP-1的mRNA表达研究[J].中华风湿病学杂志,2002,6(3):169—173.
- [4] 杨丰建,俞永林,乔健,等.兔骨性关节炎模型的建立以及关节炎软骨组织中MMP-1/-13的表达[J].复旦学报(医学版),2007,34(4):563—567.
- [5] 马文明,董启榕,谢宗刚,等.MMP-1、MMP-13在大鼠骨性关节炎软骨中的表达[J].中国现代医药杂志,2011,13(3):5—7.
- [6] 任志伟,俞永林,杨丰建,IL-1 β 对兔关节软骨细胞MMP-1/-13mRNA表达和NO的影响[J].复旦学报(医学版),2008,35(2):167—170.
- [7] Ni GX, Zhan LQ, Gao MQ, et al. Matrix metalloproteinase-3 inhibitor retards treadmill running-induced cartilage degradation in rats[J]. Arthritis Res Ther, 2011, 13(6):192—196.
- [8] 邢丹,马信龙,马剑雄,等.不同强度运动对大鼠膝关节软骨MMP-3、COL-Ⅱ、TIMP-3表达的影响[J].中华骨科杂志,2013,33(2):171—177.
- [9] 胡阿威,喻爱喜,吴刚.兔骨性关节炎中基质金属蛋白酶-1、3与白介素-1表达及关节软骨细胞凋亡的研究[J].中华实验外科杂志,2012,29(11):2277—2279.
- [10] 赫淑倩,王海斌,孙青,等.兔前交叉韧带切断骨性关节炎模型软骨MMP-1、MMP-3及诱导型一氧化氮合酶表达的研究[J].中华风湿病学杂志,2007,11(5):284—287.
- [11] 夏睿,董启荣,戴剑英,等.大鼠佐剂性关节炎中MMP3、MMP9、

(下转第1030页)