

DOI: 10.19296/j.cnki.1008-2409.2023-05-004

· 论 著 ·

· ORIGINAL ARTICLE ·

兔膝关节炎软骨组织损伤及发病机制的探讨^①

罗晓珊^②, 余立志, 唐青梅, 罗秉庆, 梁伟明^③

(广西科技大学第一附属医院, 广西 柳州 545000)

摘要 目的: 观察兔膝关节炎(KOA)的组织病理变化并探讨其发病机制。方法: 健康雄性新西兰兔膝关节强迫伸直位制动建立KOA模型, 实验设对照组和模型组。4周后造模结束, 取膝关节进行组织HE染色和免疫组织化学检测, 观察并分析膝关节损伤及相关蛋白因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、基质金属蛋白酶-13(MMP-13)、带有血小板凝血酶敏感蛋白样模体的解整链蛋白金属蛋白酶-4(ADAMTS-4)的表达情况。结果: HE染色显示, 模型组膝关节滑膜组织均存在不同程度增生、纤维化、淤血和炎性细胞浸润; 软骨增生、有裂隙, 软骨细胞排列紊乱、簇集, 细胞形态多样, 表层细胞纤维化等。IL-1 β 、MMP-13、ADAMTS-4在对照组、模型组软骨细胞均有表达, 而模型组表达明显高于对照组。结论: 关节软骨的退变、滑膜组织的炎症是KOA的病理学特征, 其发病机制与软骨细胞IL-1 β 、MMP-13、ADAMTS-4蛋白表达异常有关。

关键词: 膝关节炎; 软骨组织损伤; 发病机制

中图分类号: R684.3

文献标志码: A

文章编号: 1008-2409(2023)05-0024-05

Exploration on cartilage tissue injury and pathogenesis of knee osteoarthritis in rabbits^①

LUO Raoshan^②, YU Lizhi, TANG Qingmei, LUO Bingqing, LIANG Weiming^③

(The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Science, Liuzhou 545000, China)

Abstract Objective: To observe the histopathological changes and explore the pathogenesis of knee osteoarthritis (KOA) in rabbits. Methods: A KOA model was established in healthy New Zealand rabbits with knee joint forced extension and immobilization. The experiment was divided into the control group and model group. After 4 weeks of modeling, the knee joint was taken for HE staining and immunohistochemistry, which were used to observe and analyze knee joint injury and expression of related protein factors like interleukin-1 β (IL-1 β), matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) and a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-4 (ADAMTS-4). Results: HE staining showed that there

① 基金项目: 广西科技基地和人才专项资助项目(桂科AD19245017); 广西科技大学博士基金项目(校科博20Z13); 广西卫生健康委员会自筹经费科研项目(Z20211376)。

② 第一作者简介: 罗晓珊, 硕士, 科研助理, 研究方向为分子生物学。

③ 通信作者: 梁伟明, E-mail: liangwm22@icloud.com。

were various degrees of proliferation, fibrosis, congestion, and inflammatory cell infiltration in the synovial tissue of the knee joints in the model group, Cartilage hyperplasia, fissures, clusters of chondrocytes, diverse cell morphology, disordered arrangement, and fibrosis of surface cells. IL-1 β 、MMP-13 and ADAMTS-4 were expressed in both the control group and the model group of chondrocytes, but the model group of expression was significantly higher than that in the control group. Conclusion: The degeneration of articular cartilage and inflammation of synovial tissue are the pathological features of KOA, and the pathogenesis is related to the abnormal expression of IL-1 β , MMP-13 and ADAMTS-4 in chondrocytes.

Keywords: knee osteoarthritis; cartilage tissue injury; pathogenesis

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种慢性、渐进性、退行性关节病变,以关节软骨的退化变性和软骨增生,滑膜及其周围的结缔组织出现不同程度退变、炎症等病理特征为主要病理变化。KOA是以膝关节周围肿胀疼痛、活动功能障碍为主要临床表现的一种疾病^[1-2]。KOA病因虽不同,但生物学、形态学和临床表现相似。KOA在任何年龄均可发病,但以中老年多见,多发于活动负重过度或承重失衡的关节^[3-4]。

KOA的病因与创伤、骨质疏松、年龄老化以及细胞因子、自由基、一氧化氮和基质金属蛋白酶异常有关,但其具体发病机制尚不明确。研究表明,炎症在KOA发病过程起着重要的作用,炎症因子通过信号转导途径诱导细胞因子和酶的产生,对软骨和软骨下骨产生破坏作用,进而加重病情^[5]。被炎症因子活化后的基质金属蛋白酶-13(matrix metalloproteinase-13, MMP-13)、带有血小板凝血酶敏感蛋白样模体的解整链蛋白金属蛋白酶-4(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-4, ADAMTS-4)破坏软骨,恶化软骨细胞的生存环境,促使软骨细胞大量死亡,导致软骨细胞合成和维持软骨基质的能力下降^[6-8]。以上结果提示,白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、MMP-13、ADAMTS-4表达异常可直接反映骨关节的损伤情况。鉴于此,本研究旨在探讨兔膝骨关节炎软骨组织损伤及发病机制。

1 实验材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂、仪器

健康新西兰兔10只(购自湖南太平生物科技有限公司),实验动物生产许可证号:SCXK(湘)2020-0005。雄性,体重2.5~3.0 kg,室温条件下分组饲

养,自由饮食。实验动物经广西科技大学第一附属医院医学伦理委员会审核批准(伦理审批号:2023-DW023)。

10%甲醛,10%硝酸,苏木精/伊红染液,免疫显色试剂盒(购自河南赛诺特生物技术有限公司),兔单克隆抗体IL-1 β 、MMP-13、ADAMTS-4(购自北京博奥森生物技术有限公司)。

兔子饲养架,兔专用固定盒, RM2235型轮转式切片机(德国Leica公司), BX53型正置荧光生物显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 实验动物分组及模型的构建

健康雄性新西兰兔随机分为对照组和模型组,每组5只。①对照组:室温正常饲养,不做任何处理。②模型组:室温正常饲养1周后,新西兰兔置于兔专用固定盒里,右后肢膝关节人为地向前伸直并固定于兔专用固定盒上,每只兔子右后肢膝关节每天固定2次(早、晚各1次),每次60 min,持续4周。

1.3 取材

空气栓塞法分别处死两组兔,离断膝关节,留取胫骨、股骨端,0.9%氯化钠注射液冲洗,放入10%甲醛溶液中固定12 h,放入10%硝酸溶液中脱钙48 h,以矢状面将胫骨、股骨端(包含软骨下骨)分别切取4块骨组织(每块厚2 mm)做石蜡包埋。

1.4 HE染色

取骨组织石蜡标本于石蜡切片机上连续切取3 μ m厚的矢状切面,每隔4张取2张制片行HE染色,每一块骨组织石蜡标本制片1~2张,在显微镜下观察软骨各层结构并记录。

骨组织切片常规脱蜡、水化,苏木素染细胞核5 min,流水冲洗2~3 min,0.5%盐酸乙醇分化5 s,流

水冲洗 5 min。伊红染色液染色 10 min,流水冲洗 5 min,脱水、透明,中性树脂封片,显微镜下观察拍照。

1.5 免疫组织化学

取骨组织石蜡标本于石蜡切片机上连续切取 3 μm 厚的矢状切面,每隔 4 张取 1 张制片做 IL-1β、MMP-13、ADAMTS-4 的免疫组化实验。每一块骨组织石蜡标本制片 1~2 张,光镜下观察模型组的阳性细胞。模型组出现阳性细胞且数量越多,表明 KOA 的发病机制与 IL-1β、MMP-13、ADAMTS-4 的表达越相关。

骨组织切片常规脱蜡、水化,高压蒸汽修复,过氧化物酶封闭剂封闭 5 min,TBS 冲洗 3 次,每次 1 min。滴加一抗,室温孵育 30 min,TBS 冲洗 3 次,每次 1 min。滴加一抗试剂后,室温静止 20 min,TBS 冲洗 3 次,每次 1 min。滴加多聚物,室温静止 20 min,TBS 冲洗 3 次,每次 1 min。DAB 显色 3~5 min,自来水冲洗。苏木素染色 30 s,自来水冲洗,晾干,中性树脂封片,显微镜下观察拍照。

2 结果

2.1 HE 染色结果

HE 染色膝关节滑膜结构如图 1 所示。对照组滑膜平滑或有微小皱褶,在关节边缘处可有小绒毛突起,其内不含血管,滑膜细胞形态大小不一(如梭形、多角形、卵形),总体结构完好,见图 1A。模型组滑膜细胞明显增生并纤维化,见图 1B。模型组滑膜细胞血管增生且血管壁纤维化,见图 1C。模型组滑膜组织充血部分淤血,见图 1D。

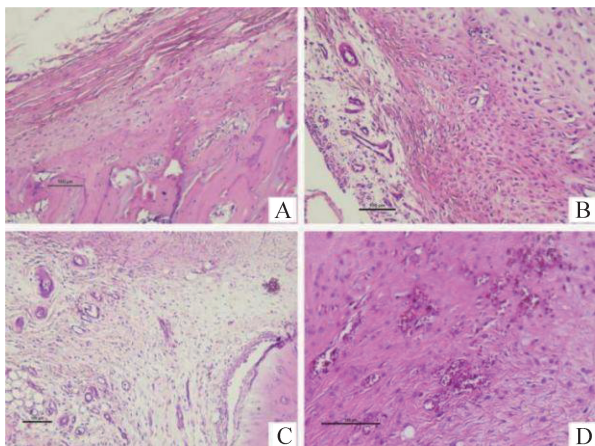


图 1 各组膝关节滑膜组织的病理形态(×100)

HE 染色发现在增生的滑膜组织中,可见大量着色较深圆或卵圆的炎性细胞,表明模型组膝关节滑膜组织有炎性细胞浸润,如图 2A、2B 所示。

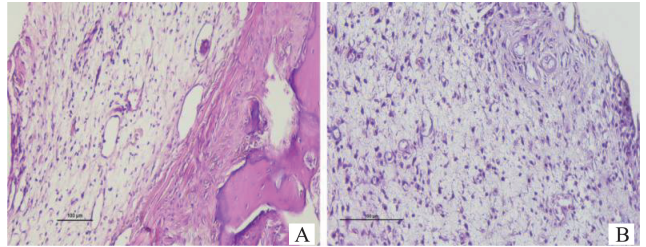


图 2 膝关节滑膜的炎性细胞浸润情况(×100)

HE 染色膝关节软骨结构如图 3 所示。对照组软骨表层平整光滑,缺乏软骨膜,软骨细胞形态、大小、数量正常,分布均匀,排列整齐,软骨 4 层细胞结构清晰可见,由浅到深各层细胞呈逐渐增大,潮线完整。表层细胞较小,呈梭形,长轴与软骨表面平行,中间层细胞较大,多个细胞排列成柱状且垂直于软骨表面;深层细胞肥大,排列紧密,见图 3 A。模型组软骨表层不平整,软骨明显增生,软骨细胞增加且簇集,细胞形态、大小呈多样性、细胞排列不规则,全层软骨组织结构紊乱,潮线不完整,局部有血管穿过潮线,见图 3 B。软骨表层细胞纤维化,有裂隙,裂隙深达放射层或钙化层,软骨细胞明显较少,出现多重潮线,见图 3C、3D。

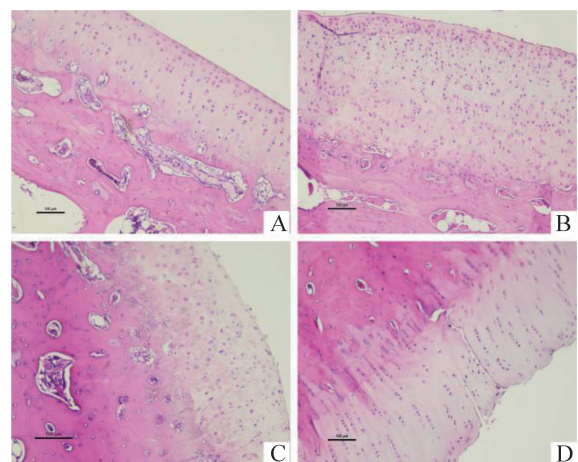


图 3 各组膝关节软骨组织的病理形态(×100)

2.2 免疫组织化学结果

免疫组织化学结果表明,IL-1 β 在模型组和对照组的关节软骨细胞中均有表达,对照组胞质表达较弱,胞核、细胞间质不表达。模型组软骨细胞的胞质、胞核和细胞间质均可见黄色及棕色着色,软骨细胞可见少量棕色颗粒。

MMP-13蛋白在模型组和对照组的关节软骨细胞中均有表达。对照组仅胞质少量表达,呈弱阳性,软骨细胞仅胞质可见淡黄色着色。模型组软骨细胞呈强阳性表达,细胞间质淡黄色着色,胞质、胞核均可见黄色及棕色着色,着色部位以胞质为主,可见少量棕色颗粒分布其中。

ADAMTS-4蛋白在模型组和对照组的关节软骨细胞中均有表达。其中,对照组胞质仅有少量表达,呈浅黄色着色,胞核不表达。模型组的阳性细胞数较多,呈强阳性表达,胞质、胞核均可见黄色及棕色着色,少量棕色颗粒分布其中。

3 讨论

软骨由软骨组织及其周围的软骨滑膜构成,其中软骨组织由软骨细胞和软骨基质组成。软骨组织结构改变,滑膜炎是KOA的主要病理特征。KOA发病过程中逐渐影响关节周围的组织,导致关节肿胀、疼痛,丧失活动能力。研究表明,KOA的发生发展与细胞因子及相关蛋白有关,涉及的研究热点主要有细胞因子、金属蛋白酶、自由基、骨内压增高等,但具体的发病机制尚未完全清楚^[9]。

软骨细胞是具有功能性的细胞,主要维持软骨基质合成与分解代谢之间的动态平衡^[10]。IL-1 β 作为一种炎症因子,是KOA发病过程中最重要的炎症因子,调节软骨细胞的功能,影响软骨细胞外基质的稳定,通过诱导蛋白溶解酶合成,加速软骨基质降解,导致软骨细胞凋亡^[9-11]。研究发现,IL-1 β 通过NF- κ B通路,促进环氧化酶2(COX-2)合成前列腺素2(PEG2),上调MMPs和ADAMTS的表达,活化后的MMPs和ADAMTS导致关节软骨基质降解,恶化软骨细胞的生存环境,诱导软骨细胞死亡。与此同时,MMPs又可诱导IL-1 β 形成瀑布样反应,导致关节变性、退化^[12-13]。

MMPs是降解软骨细胞外基质的主要酶系,具有降解蛋白聚糖、胶原,抑制细胞外基质修复等作用^[14]。MMP-13是目前最有效的II型胶原纤维降解酶,能降解软骨基质中的II型胶原。II型胶原是软骨胶原网的主要成分,它与蛋白聚糖一起使软骨具有弹性及形变能力^[15-16]。当MMP-13过量时会导致软骨降解和退变,进而引起骨关节炎。关节软骨细胞外基质含有大量的聚蛋白多糖,它对于关节的抗压力和张力等物理属性起着重要的作用。ADAMTS-4是聚蛋白多糖酶家族成员之一,在体外试验中是裂解聚蛋白多糖活性最强的聚蛋白多糖酶,其被认为是软骨基质聚蛋白多糖的主要降解酶^[17]。

高戈等^[12]使用白藜芦醇治疗新西兰大白兔骨关节炎。实验结果表明,IL-1 β 在模型组动物的关节软骨细胞中有明显表达,在正常动物的关节软骨组织中,只有极少量的表达。夏睿^[18]通过相关研究,证实了兔骨性关节炎软骨细胞中有MMP-13的异常表达。安帅等^[19-20]进行兔膝关节炎模型实验,发现MMP-13在模型组中表达异常,而药物干预后可抑制MMP-13的表达,进而有利于软骨细胞的修复。

董富强^[21]探讨骨关节炎患者关节滑膜ADAMTS-4的表达。结果表明,实验组滑膜组织ADAMTS-4的含量远高于对照组,并且表达量随着骨关节炎的进展而逐渐增强。孙志涛等^[22]用单味药鹿茸干预骨关节炎新西兰大白兔。结果显示,单味药鹿茸通过抑制ADAMTS-4的分泌,可阻止蛋白聚糖、II型胶原蛋白的降解,起到修复软骨的作用。李瑞涵^[23]通过苍膝通痹胶囊干预SD大鼠膝关节软骨细胞的实验结果与王浩等^[24]用乌头注射液干预兔KOA模型实验结果类似,均表明抑制ADAMTS-4表达,可保护膝关节,起到治疗膝关节骨性关节炎的作用。

综上所述,骨关节炎模型组软骨组织退变,病理结构改变,伴有滑膜炎,IL-1 β 、MMP-13、ADAMTS-4表达异常,经药物干预后表达受抑制,进而对软骨起到保护作用。本研究虽尚未使用药物干预开展实验,但模型组的病理特征与上述结果一致。本实验再次证明骨关节炎具有的病理特征,表明KOA的发病机制与软骨细胞中IL-1 β 、MMP-13、ADAMTS-4的

活化及异常表达密切相关。本研究为后续更深入探索引起 KOA 关节软骨损伤的分子机制,寻找 KOA 发生发展过程中的关键节点提供理论依据,为后续开展 KOA 药物治疗提供实验基础。

参考文献:

- [1] VAN BOSCH M H J. Osteoarthritis year in review 2020: biology[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2021, 29(2): 143-150.
- [2] 李琳慧,何阳梅,周志刚,等.基于 NGF/p38 MAPK/TRPV1 信号通路探讨热敏灸治疗膝骨关节炎的外周敏化效应机制[J].*中华中医药杂志*, 2022, 37(3): 1379-1383.
- [3] 孙洁,姜萍,陈宗锐.骨关节炎不同表型动物模型的选择与制作[J].*山东医药*, 2021, 61(14): 96-99.
- [4] 刘晓辰,付维力.骨关节炎动物模型的选择[J].*中国组织工程研究*, 2020, 24(11): 1769-1776.
- [5] KOBAYASHI M, SQUIRES G R, MOUSA A, et al. Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage [J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52(1): 128-135.
- [6] 胡子昂.通过抑制细胞周期依赖性激酶 9 的活性治疗创伤性骨关节炎的机制研究[D].杭州:浙江大学, 2014.
- [7] 江润,张涛,毛珍,等.温针灸对膝骨关节炎大鼠软骨组织 ADAMTS-4 及 MMPs-3 的影响[J].*吉林中医药*, 2021, 41(8): 1066-1069.
- [8] WU P, HOLGUIN N, SILVA M J, et al. Early response of mouse joint tissue to noninvasive knee injury suggests treatment targets[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2014, 66(5): 1256-1265.
- [9] 祁雷,姚运峰,李子煜,等.大鼠骨关节炎模型的建立及软骨组织中 MMP-13 和 ADAMTS-5 的表达[J].*局解手术学杂志*, 2018, 27(3): 157-163.
- [10] CARNEY S L. Cartilage research, biochemical, histologic, and immunohistochemical markers in cartilage, and animal models of osteoarthritis[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 1991, 3(4): 669-675.
- [11] CARON J P, FERNANDES J C, MARTEL-PELLETIER J, et al. Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis. Suppression of collagenase-1 expression[J]. *Arthritis Rheum*, 1996, 39(9): 1535-1544.
- [12] 高戈,徐克前,田静,等.白藜芦醇对兔实验性骨关节炎白细胞介素-1 β 表达的影响[J].*中国医院药学杂志*, 2012, 32(14): 1083-1088.
- [13] PHAM T M, ERICHSEN J L, KOWAL J M, et al. Elevation of pro-inflammatory cytokine levels following intra-articular fractures: a systematic review [J]. *Cells*, 2021, 10(4): 902.
- [14] CUI N, HU M, KHALIL R A. Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017, 147: 1-73.
- [15] MEHANA E E, KHAFAGA A F, EL-BLEHI S S. The role of matrix metalloproteinases in osteoarthritis pathogenesis: an updated review [J]. *Life Sci*, 2019, 234: 116786.
- [16] 乔磊,邸振宇,乔曼,等.紫丁香苷对前交叉韧带横断诱导的大鼠骨关节炎的影响[J].*局解手术学杂志*, 2022, 31(1): 10-15.
- [17] LI T, PENG J, LI Q Q, et al. The mechanism and role of ADAMTS protein family in osteoarthritis [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(7): 959.
- [18] 夏睿.MMP13 在关节炎软骨中的表达及 RNAi 对其抑制作用的实验研究[D].苏州:苏州大学, 2006.
- [19] 安帅,白荣闯,李格格,等.茯苓丸加减方对兔膝骨关节炎模型 MMP-3、MMP-13 及 TIMP-1 表达水平的影响[J].*上海中医药杂志*, 2021, 55(7): 64-67.
- [20] 李卫平,蹇睿,胥方元.超声波治疗兔膝骨关节炎对 MMP-1 和 MMP-13 表达的影响[J].*重庆医学*, 2012, 41(16): 1564-1566, 1556.
- [21] 董富强.ADAMTS-4、ADAMTS-5 在骨关节炎患者关节滑膜中的表达及意义[D].石河子:石河子大学, 2014.
- [22] 孙志涛,冯华龙,何升华,等.单味药鹿茸调节骨关节炎模型兔软骨细胞外基质主要成分 ADAMTS-4/TIMP-3 基因的表达[J].*中国组织工程研究*, 2018, 22(32): 5133-5138.
- [23] 李瑞涵.苍膝通痹胶囊靶向调控 ADAMTS-4 治疗膝关节炎性骨关节炎的临床研究与机制研究[D].济南:山东中医药大学, 2019.
- [24] 王浩,崔立建,安玉芳.乌头注射液对 KOA 模型兔软骨细胞 ADAMTS-4 ADAMTS-5 表达影响的实验研究[J].*中国中医药科技*, 2020, 27(1): 26-28.

[收稿日期: 2023-04-19]

[责任编辑: 杨建香 英文编辑: 阳雨君]