文章编号:1000-5404(2006)13-1417-03

论著

基因重组人生长素对关节软骨缺损修复作用的实验研究

董伟强,白 波,陈 艺,余楠生 (广州医学院第一附属医院骨科,广州 510120)

提 要: 目的 探讨基因重组人生长素(recombinant human growth hormone,rhGH)对创伤性关节软骨创伤的修复作用。**方法** 选用大耳白兔25只,随机分成5组,每组5只。在两侧髌股关节股骨侧的关节面中心分别造成直径3.5 mm的全层关节软骨缺损。选择右侧为实验组,自术后起,膝关节内注射0.1 U/kg的r-hGF,每周3次,共4周;左侧为对照组,与实验组同一时间注射等容量生理盐水。于术后4、6、8、12、24周分别取材进行大体、光镜和透射电镜观察。**结果** 实验组修复组织填充快,质量好。4周时缺损区充填完全浅部,再生软骨明显深部纤维组织为主。24周时再生组织与周围正常软骨外观相近,肉眼难以区分;光镜下损伤区基本恢复正常软骨组织结构;电镜下可见到大量,形态成熟为主的软骨细胞。而生理盐水对照组6周时缺损区仍有浅表凹陷,并以纤维组织性修复为主。除术后4周外,其余各期两组的组织学评分均有显著性差异($P<0.01$)。实验同时显示再生软骨于24周后变薄。3例修复软骨较正常薄,2例修复软骨与正常软骨厚度大致相同均无裂隙形成。**结论** rhGF局部关节腔内注射,能促进创伤性关节软骨缺损的修复,为微创性修复关节软骨缺损提供了一条新途径。

关键词: 人生长素;软骨;组织学
中图法分类号: R-332; R684.053; R977 **文献标识码**: A

Recombinant human growth hormone in repairing articular cartilage defects

DONG Wei-qiang, BAI Bo, CHEN Yi, YU Nan-sheng (Department of Orthopaedics, The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510120, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of recombinant human growth hormone (rhGH) in articular cartilage defect repair *in vivo*. Methods The cylindrical, full-thick articular cartilage defects, 3.5 mm in diameter, were made in the knee joints of 25 rabbits. rhGH of 0.1 U/kg was injected into the right knee joints 3 times a week for 4 weeks and equal volume of physiological saline to the left knee joints as control. The animals were killed respectively in 4, 6, 8, 12, 24 weeks, and the macroscopic, histologic and ultrastractural examinations were performed. Results The repairing process in experimental group was faster and better than that in the control. In the experimental groups, the defect was filled on week 4, the regenerated cartilage mainly in the shallow region and fibrous tissue in the deep region; on week 24, the regenerated tissue was morphologically close to the neighbour normal cartilage, hard to differentiate by macroscopy; Light microscopy showed the defect recovered to normal cartilage structure and the electron microscopy showed a large quantity of mature cartilage cells. In the control groups, the defect was of shallow introcession, mainly of fibrous tissue. The histological examination showed the significant difference between experimental and control groups ($P<0.01$), except for the results on week 4. The regenerated cartilage got thinner on week 24, thinner than normal cartilage in 3 cases, close to normal cartilage without fissuration in 2 cases. Conclusion rhGH plays an important role in cartilage metabolism, effectively facilitates the repair of articular cartilage defect and provides a new non-traumatic method for the treatment of articular cartilage defects.

Key words: human growth hormone; cartilage; histology

在临床上由于外伤和疾病造成的关节软骨缺损非常之多,软骨缺损后几乎没有自身修复能力[1]。虽然目前有些方法可用于关节软骨缺损性疾病的治疗,但效果均欠佳[2],基因重组人生长素是从哺乳动物细胞中合成的人生长素,20世纪90年代应用于临床,主要作用是促进人体生长,并且由于软骨细胞,成骨细胞有生长素(growth hormone, GH)受体,生长素通过胰岛

作者简介:董伟强(1968-),男,广东省广州市人,硕士研究生,副主任医师,主要从事骨关节疾病方面的研究。电话:13556010809

收稿日期:2005-05-31;修回日期:2005-07-25

素样生长因子(IGFs)介导,刺激软骨细胞分化、增殖,刺激软骨基质增长[3]。本实验通过制备创伤性关节软骨缺损动物模型,局部应用rhGH,从组织学,电镜超微结构水平观察修复组织的特点。

1 材料与方法

1.1 实验动物与方法

选择健康新西兰种大耳白兔25只(购于广东省卫生厅),月龄4~6个月,体质量2.5~5 kg,雌雄不限,随机分成5组,每组5只。用1%戊巴比妥20 mg/kg耳静脉注射麻醉,用直径3.5 mm钻头在两侧髌股关节股骨侧的关节面中心分别造成全层关节软骨缺损,深度以点状出血为止。术后放置笼内自由活动,常规应用抗生素3 d(肌注青霉素)。选择右膝为实验组,自术后起将0.1 U/kg重组人生长素(金磊赛增,长春金赛药业)关节腔内注射,每周3次,连续4周;左膝为对照组,与实验组同一时间注射等容量生理盐水。分别于术后4、6、8、12、24周处死动物,取材,进行大体、光镜以及透射电镜观察。

1.2 观察内容

1.2.1 膝关节大体变化 大体观察膝关节有无挛缩和粘连及新生物,是否有滑液增多、软骨侵蚀、骨赘形成等骨关节病改变,以及软骨修复组织的平整性光泽度及周围组织的结合情况。

1.2.2 光镜组织学检查 将标本常规固定、脱钙、包埋、切片、伊红染色,进行光镜下组织学观察,并采用盲法对各标本进行组织学评分,评分标准采用Wakitani法(表1)。

表1 软骨缺损的组织学评分标准

指标	组织学表现	评分
细胞形态学	透明软骨	0
	透明软骨为主	1
	纤维软骨为主	2
	少量软量	3
	无软骨	4
基质染色(异染色)	正常	0
	轻度减少	1
	明显减少	2
	无异染性着色	3
表面规则性[a]	光滑(>3/4)	0
	中等(1/2~3/4)	1
	不规则(1/4~3/4)	2
	特别不规则(<1/4)	3
软骨厚度[b]	>2/3	0
	1/3~2/3	1
	<1/3	2
填充体与周围软骨结合度	两边缘结合	0
	一边结合	1
总分	两边未结合	14

a:填充体的光滑表面与软骨缺损总面积比较;b:填充软骨的平均厚度与周围软骨厚度比

1.2.3 透射电镜(JEM-100CX)检查。

1.3 统计学方法

计算各组评分$\bar{x}\pm s$,用SPSS 12.0进行正态性和方差齐性检验,方差齐后计算每个受试对象实验组与对照组得分的差值d,差值均数d及差值的标准差(s_d),采用配对设计的差值均数与总体均数比较的t检验。

2 结果

2.1 大体观察

所有兔膝关节无挛缩、粘连和新物等骨关节病征象;滑膜无水肿,色泽正常。rhGF实验组术后4周可见软骨缺损区完全充填,修复组织呈半透明,白色,有光泽,表面平坦,色泽与周围正常软骨不一致;6周时修复组织略凸于关节面,色泽不均匀;12周时修复组织变得不透明,色泽与周围正常软骨趋于接近,但边缘有一些差别;24周时修复组织与周围软骨的外观相似,难以区分。对照组术后4周缺损区仍有小凹陷,表面不光滑;6周时修复组织仍略凹于周围关节软骨面;12周时缺损区表面平,颜色不均匀;24周时修复组织色泽一致,但易于与周围软骨区分。

2.2 光镜观察及组织学评分

rhGF实验组4周时缺损区充填完全,表浅区再生软骨明显,深部以纤维组织为主,6周时缺损区已完全被再生软骨组织取代;12周时深层再生软骨组织绝大部分已被骨化;24周时修复区已基本恢复正常组织结构,再生软骨层稍薄,3例修复软骨较正常软骨稍薄,2例修复软骨与正常软骨厚度相同,边缘无裂隙。生理盐水对照组4周时缺损区尚未完全充填,充填组织为无异染性着色的纤维组织;6周时接近完全充填,散在片状软骨组织;12、24周时标本充填完全,修复组织以纤维结缔组织为主。将各组评分结果进行统计学处理(表2),经方差齐性检验,数据符合正态性分布且方差齐;计算每个受试对象实验组与对照组得分的差值d,差值均数d及差值的标准差(s_d),采用配对设计的差值均数与总体均数比较的t检验(表3),除术后4周外,其余各个时期实验组得分均优于对照组($P<0.05$)。

表2 光镜组织学评分数据统计结果($\bar{x}\pm s$)

时间(周)	受试组	对照组
4	12.6±0.49	13.6±0.69
6	7.6±0.55	10.8±0.22
8	7.2±0.54	9.8±0.58
12	2.4±0.32	5.0±0.70
24	2.4±0.25	5.0±0.60

表3 受试组与对照组得分差值均数和总体均数比较的t检验

时间(周)	d	(s_d)	t值	P值
4	1.0	1.22	1.83	>0.05
6	3.4	1.14	6.68	<0.01
8	2.8	1.22	5.14	<0.01
12	2.6	1.82	3.20	<0.01
24	2.6	1.82	3.20	<0.01

2.3 电镜观察

实验组4周时标本为纤维细胞特征,6周时可见软骨细胞,以不成熟为主;12周时细胞形态具备透明软骨细胞特征,细胞质内可见粗面内质网和小而圆的线粒体;24周时透明软骨细胞增多形态更为成熟,粗面内质网丰富,网池扩张,可见糖原颗

粒。对照组 4 周时可见大量纤维组织；细胞较少；6、12 周仍为纤维组织特征；24 周时全部为胶原纤维，细胞罕见。

3　讨论

3.1　r-hGF 促进关节软骨缺损的修复

生长素可直接作用于前软骨细胞，使其分化为软骨细胞，并刺激肝脏和局部的 IGF-1 合成，也刺激软骨细胞 IGF-1 受体表达，从而刺激软骨细胞增殖[4]，在本实验中关节软骨缺损后关节内局部间断注射 rhGF，可见实验组修复组织填充快，质量好；而对照组则以纤维组织性修复为主，说明 rhGF 能促进关节软骨缺损的修复。其作用机制估计如下。

生长素是由 191 个氨基酸组成的单链多肽，其作用主要由胰岛素样生长因子（IGFs）介导。GH 与软骨细胞膜上的 GHR 结合后，激活 TYR 激酶 Jak，导致信号转导转录活化因子 STATS，丝裂原蛋白激酶 ERK 的磷酸化及二聚体化，活化的第一信使转运到细胞核内，引起靶基因的转录，发挥生物效应[5]，使关节内 IGF-1 水平升高。IGF-I 对软骨细胞形态发生和有丝分裂有广泛的影响，能大幅缩短软骨细胞有丝分裂的进程，促进增殖[6]，促进关节软骨细胞胶原的合成。

GH 直接作用于软骨细胞软骨基质细胞发挥作用。Kojima 等[7]发现生长素可以直接作用于细胞发挥作用，其作用机制通过细胞周期素 Cyclin D1 的活性，提高细胞的再生率，提高总 RNA 和蛋白质的合成。生长素对软骨修复的作用可能与这一机制有关[7]，但有关证据有待进一步探讨。在本实验中，我们未发现软骨增厚，滑膜增生和骨赘形成，提示 rhGF 对成熟的软骨细胞、滑膜细胞和骨膜细胞无不良影响。

3.2　实验中存在的问题

实验中存在的问题：①关节软骨全层缺损经 6 周的修复，修复软骨变得比周围正常软骨稍厚，此后逐渐变薄，24 周后 3 例再生软骨比正常软骨稍薄，2 例与平常软骨厚度相同。但再生软骨光滑，组织学形态接骨正常，其变薄原因不清楚，可能与深层软骨钙化有关。②局部注射生长素后，关节内生长因子的增加的种类、浓度以及浓度变化有待进一步研究；生长因子最佳作用浓度和时间也需进一步研究[8]。本实验使用的剂量是 0.1 U/kg，每周 3 次，连续 4 周，未见不良反应。③GH 是一种能够调节多系统、多类型细胞生长、运动和形态发生的多功能激素。这一特点使用其缺乏临床应用的专一性，有可能造成较多的副作用。例如血糖升高，影响伤口愈合；局部注射部位有红、肿、热等症状[9]，但本组实验中均未见明显副作用。

3.3　rhGF 局部应用治疗软骨缺损的优越性

目前使用的 rhGF 是第 4 代合成 GH，具有以下特点[3]：①从哺乳动物细胞中合成，而非细菌中；②蛋白质在粗面内质网中进行翻译而非在细菌细胞质中；③双硫键固定位置而非随意形成；④GH 是穿过细胞膜自然分泌而非经细胞裂解或膜渗透以抽提 GH，使用更安全，局部注射可使副作用减少。局部关节内注射给药方便，无须手术，避免了手术并发症的发生。并且软骨的修复在正常关节的生理活动刺激下，软骨内部胶原纤维变形，有利于软骨自身的代谢和功能[10]。在本研究实验组中，12 周后的修复软骨平坦，光泽有弹性，无裂隙与修复软骨适当受压有关。

生长素是软骨细胞生长和分化的重要因子[11]，在体内、外能刺激软骨克隆增殖[3,11]。使用 rhGF 局部关节腔内注射，能促进关节软骨缺损的修复，具有安全、微创、形成的软骨具有弹性好、分布好等特点，为关节软骨缺损的修复提供了新的方法。

参考文献：

[1] GOYTISOLO F A, SAMPER E, MARTIN CABALLERO J, *et al*. Short telomeres result in organismal hypersensitivity to ionizing radiation in mammals [J]. J Exp Med, 2000, 192(11): 1625 - 1636.

[2] 王利刚，李　勇，陈伟高. 鹿茸生长素对家兔关节软骨细胞代谢的影响[J]. 江西医学院学报，2004，144(2)：23 - 25.

[3] 李　堂. 基因重组人生长激素在儿科的临床应用[J]. 青岛大学医学院学报，2002，38(3)：189 - 191.

[4] 汤佳珍，毛季萍. 生长激素与相关骨代谢疾病[J]. 国外医学：生理、病理科学与临床分册，2004，24(2)，116 - 118.

[5] HANSEN T K, DALL R, HOSODA H, *et al*. Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity [J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2002, 56(2): 203 - 206.

[6] 刘　刚，胡蕴玉，马　平，等. 碱性成纤维细胞生长因子及胰岛素样生长因子 - 1 对体外兔关节软骨细胞的生物学效应[J]. 中华创伤杂志，2003，19(4)：218 - 221.

[7] KOJIMA M, HOSODA H, DATE Y, *et al*. Ghrelin is a growth - hormone - releasing acylated peptide from stomach [J]. Nature, 1999, 402(6762): 656 - 660.

[8] 丁小邦，崔　磊，商庆新，等. 生长因子与组织工程软骨种子细胞的研究[J]. 中华整形外科杂志，2003，19(2)：147 - 148.

[9] 李彩霞，李荣山. 重组生长激素在肾脏疾病治疗中的应用[J]. 国外医学：泌尿系统分册，2003，23(6)：751 - 754.

[10] 孟维春，董启榕. 关节软骨受压状态下的组织形态学观察[J]. 苏州大学学报医学版，2002，22(4)：389 - 391.

[11] 高勇义. 生长激素治疗软骨发育不全[J]. 医学综述，2003，9(4)：238 - 240.

（编辑　薛国文）