文章编号:1000-5404(2008)08-0687-04

论著

人体正常膝关节钙化软骨层组成成分研究

王富友,杨 柳,段小军,戴 刚,谭洪波,郭 林,陈光兴,李 忠 (第三军医大学西南医院关节外科中心,重庆 400038)

摘 要:目的 分析构成关节软骨钙化层有机成分中胶原蛋白类型与含量及无机成分中羟基磷灰石含量。**方法** 组织库获取20例自愿捐献的人体正常股骨髁新鲜标本,组织切片采用天狼猩红染色和免疫组织化学对胶原蛋白进行定性分析;用氨基酸分析和X-射线衍射法分别对胶原蛋白和羟基磷灰石进行定量分析。**结果** 天狼猩红染色见钙化软骨层与透明软骨层一样黄绿色淡染、弱双折光性;Ⅱ型胶原蛋白免疫组织化学分析,钙化软骨层呈强绿色荧光,潮线附近的胶原蛋白呈板层平行分布;氨基酸定量分析钙化软骨层Ⅱ型胶原蛋白含量占组织干质量的(20.16%±0.96%);X-射线衍射定量分析钙化软骨层中的羟基磷灰石含量占无机成分的(65.09%±2.31%)。**结论** 在关节骨软骨复合组织中,钙化软骨层是位于透明软骨层与软骨下骨之间的界面连接结构,其细胞外基质主要由Ⅱ型胶原蛋白和羟基磷灰石组成。

关键词: 关节软骨;钙化软骨层;成分分析;X-射线衍射
中图法分类号: R322.72;R329;R446.8 **文献标识码:** A

Study on the components of calcified cartilage zone in the normal human knee joint

WANG Fu-you, YANG Liu, DUAN Xiao-jun, DAI Gang, TAN Hong-bo, GUO Lin, CHEN Guang-xing, LI Zhong
(Center for Joint Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To analyze the type and contents of collagen protein in the organic principle of calcified cartilage zone, and the contents of hydroxyapatite in its inorganic composition. Methods The normal human condyles of femur ($n=20$) from tissue bank were donated by the residents of Chongqing city. Their paraffin-embedded sections were prepared after fixation and decalcification. The type of collagen protein in the organic principle of calcified cartilage zone was qualitatively analyzed with the Picrosirius-polarization method and collagen Ⅱ protein with immunohistochemistry analysis, and the contents of collagen protein and hydroxyapatite were quantitatively analyzed with amino acid analysis and X-ray diffraction. Results Same as hyaline cartilage, the calcified cartilage was stained light flavo-green and weak double refraction by the Picrosirius-polarization method. In the immunohistochemistry analysis of collagen Ⅱ protein, the calcified cartilage was stained strong green fluorescence and the collagen protein parallelled in joint surface near the tidemark. The content of collagen Ⅱ protein was (20.16% ±0.96%) of tissue dry weight by amino acid analysis, and that of the hydroxyapatite was (65.09% ±2.31%) of the inorganic composition in calcified cartilage. Conclusion The calcified cartilage zone locates between the hyaline cartilage zone and subchondral bone in the complex tissues of articular cartilage and is mainly composed of collagen Ⅱ protein and hydroxyapatite.

Key words: articular cartilage; calcified cartilage zone; component analysis; X-ray diffraction

---

基金项目: 国家自然科学基金(36070527);全军医学科研"十一五"科技攻关项目(06G079);重庆市科委基金项目(2006BB5357)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (36070527), the Key Research Project of the "Eleventh Five-Year Plan" for Medical Science Development of PLA (06G079) and the Project of Chongqing Scientific Committee (2006BB5357)

作者简介: 王富友,男,内蒙古自治区赤峰市人,博士研究生,主治医师,主要从事骨软骨复合组织工程方面的研究。电话:(023)66355702,E-mail:wfy731023@163.com
通信作者: 杨 柳,E-mail:jointsurgery@163.com

收稿日期: 2007-11-23;**修回日期:** 2008-01-10

由创伤或骨病所致关节骨软骨缺损在临床常见，常表现为关节顽固性疼痛、关节活动受限，严重影响患者的生活质量，已成为目前肢体残障的主要原因[1]。现有的临床治疗措施均存在明显缺陷，而快速发展的组织工程技术，尤其是单一组织工程骨和组织工程软骨构建技术的日趋成熟，为关节骨软骨缺损的再生修复提供了新思路和新技术[2]。关节骨软骨复合组织与单一骨或软骨组织相比具有其特殊的形态结构及组成成分。由于缺乏对界面连接结构——钙化软骨层的深入认识，目前构建的工程化骨软骨复合组织尚存在修复组织质量有缺陷，与宿主界面整合欠佳及缺乏相应力学功能等问题[3]。因此，理想的构建策略，不是将再造的软骨和骨组织简单地缝合或黏合在一起，而应以其正常结构、组成为基础，构建与宿主结构及功能相似的组织工程骨软骨复合组织。

本研究在对人体正常钙化软骨层的形态结构进行研究的基础上，旨在对其主要的组分进行研究，为关节骨软骨缺损的临床治疗，尤其为组织工程骨软骨复合组织的构建与应用提供相关理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验标本

人体正常股骨髁新鲜标本 20 例，由本院人体组织库提供。其中男性 10 例，女性 10 例，年龄 20～45 岁，左侧股骨髁 10 例，右侧 10 例。所取标本均经病理切片证实，无软骨缺损及骨性关节炎等病理改变。

1.2 主要试剂及仪器

天狼猩红染料、兔抗人Ⅱ型胶原多克隆抗体、FITC 标记山羊抗兔 IgG 抗体(Sigma，美国)；纳米羟基磷灰石标准品(南京海泰纳米材料有限公司)；121MB 型氨基酸分析仪(Beckman，美国)；XRD-6000 衍射仪(岛津公司，日本)。

1.3 制备组织切片

取股骨髁新鲜标本 10 例，于负重区骨刀垂直于关节面切取骨软骨组织块，每例标本均切取 2 个组织块，共计 20 个，大小为 0.5 cm×0.5 cm×1.0 cm，保证组织块不出现断裂和分层现象。10% 甲醛固定液固定 24 h，Jenkins 混合酸脱钙液脱钙，常规石蜡包埋，各取 5 例进行纵、横切片，片厚 5 μm。

1.4 胶原蛋白定性分析

1.4.1 天狼猩红染色　按照文献[4]方法进行。取上述制备组织切片脱蜡至水；双蒸水充分洗涤后，浸入 0.5% 天青石蓝液 10 min；双蒸水充分洗涤后，入 0.5% 天狼猩红/饱和苦味酸液 30 min；直接用无水乙醇分化与脱水；二甲苯透明、中性树胶封片，显微镜观察。

1.4.2 Ⅱ型胶原蛋白免疫组织化学(S-P 法)分析　按照文献[5]方法进行。取上述制备组织切片脱蜡至水，0.05% 胰酶 37 ℃消化 20 min；蒸馏水冲洗，PBS 浸泡 5 min；3% ddH_2O 室温孵育 10 min；蒸馏水冲洗，PBS 浸泡 5 min；10% 正常山羊血清封闭，室温孵育 15 min，倾去，勿洗；滴加 1∶50 稀释的兔抗人Ⅱ型胶原多克隆抗体 4 ℃过夜；PBS 冲洗，5 min×3 次；滴加适量 1∶100 稀释的 FITC(绿色荧光)标记山羊抗兔 IgG 二抗，37 ℃孵育 1～2 h；PBS 冲洗，5 min×3 次；甘油封片，荧光显微镜下观察，并以连续切片番红 O^- 固绿染色[6]为对照进行定性分析。

1.5 胶原蛋白定量分析

1.5.1 分离获取钙化软骨层组织　取股骨髁新鲜标本，用手术刀将软骨周边的结蒂组织去除干净，带齿木锉锉取并收集条索状乳白色软骨组织；待接近钙化软骨层时，换用手术刀刮净剩余乳白色组织，暴露灰白色钙化软骨层组织，木锉小心锉取并收集颗粒状灰白色组织，钙化软骨层较薄但质地较硬，当感觉质地变松软时停止收集；修剪去除残留钙化软骨层组织，充分暴露软骨下骨，锉取并收集；－70 ℃冰箱保存。

1.5.2 氨基酸含量分析　按照文献[7]方法进行实验。准确称取各标本 2.0 mg 于水解管内，加入 5 ml 6 mol/L HCl，充氮气 2 min，抽真空封管，置于烤箱内，110 ℃水解 22 h，将水解液置于水浴锅上使 HCl 充分挥发，加超纯水洗涤 3 次，蒸干，用 Na_2S 稀释液定容至 2 ml，再用 0.22 μm 微孔滤膜过滤，121MB 型氨基酸分析仪进行检测。

1.6 冯库萨染色法定性分析钙化软骨层无机成份

取股骨髁新鲜标本，组织切片制备方法基本同 1.3，不同的是要掌握脱钙的时间，标准为软骨下骨脱钙完全，钙化层不完全脱钙；组织切片脱蜡至水，浸入 2% 硝酸银水溶液，置于紫外灯光下照射 60 min；双蒸水充分洗涤后，浸入 5% 硫代硫酸钠水溶液浸泡 2 min；双蒸水充分洗涤后，0.5% 伊红对比染色 2 min；梯度乙醇脱水，二甲苯透明，中性树胶封片，显微镜观察；并以番红 O^- 固绿染色[9]为对照进行定性分析。

1.7 羟基磷灰石定量分析

1.7.1 分离获取钙化软骨层无机成分　取股骨髁新鲜标本，用骨刀将其剪切成 1 cm×1 cm×1 cm 大小，低温冻干后用酒精灯点燃、炭化，去除有机成分；手术刀刮取并收集钙化层和软骨下骨无机成分；玛瑙碾砵中研碎，80 目不锈钢过滤网过滤，分装保存。

1.7.2 X-射线衍射定量分析　XRD-6000 衍射仪，Cu 靶 Kα 射线，电压为 40 kV，电流为 30 mA，扫描速度为 4°/min，扫描范围为 10°～85°，对钙化软骨层无机成分进行衍射分析，通过与 JCPDS 编制的 PDF 标准卡片进行对比，确定其无机成分中晶体性质，并用 k 值法对其进行定量分析[8]。

1.8 统计处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS 13.0 统计软件对透明软骨层、钙化软骨层和软骨下骨中的氨基酸和羟基磷灰石含量分别进行单因素方差分析，比较各层组织之间的含量差异。

2 结果

2.1 天狼猩红染色观察

偏振光显微镜下，可见软骨下骨Ⅰ型胶原蛋白深染黄红色、强双折光性；钙化软骨层胶原蛋白与透明软骨层Ⅱ型胶原

蛋白一样淡染黄绿色、弱双折光性（图 1），结果提示钙化软骨层含有Ⅱ型胶原蛋白。

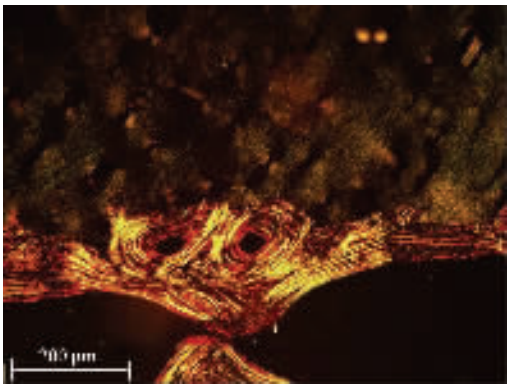


图 1　关节骨软骨天狼猩红染色结果

2.2　Ⅱ型胶原蛋白定性分析

在荧光显微镜下，纵切片钙化软骨层中潮线附近的Ⅱ型胶原蛋呈板层（4～8 层）分布（图 2A）；横切片Ⅱ型胶原蛋白呈绿色荧光（图 2B），以番红 O⁻固绿染色为对照钙化层部位呈红染（图 2C）。

2.3　氨基酸含量分析

钙化软骨氨基酸含量占其干质量（20.16%±0.96%），与透明软骨（61.39%±0.38%）和软骨下骨（13.69%±0.45%）组织间差异显著（$P=0.003$）；钙化软骨氨基酸中羟赖氨酸含量为（2.83%±0.17%），与透明软骨（4.28%±0.04%）和软骨下骨（1.31%±0.01%）差异显著（$P=0.004$）；羟脯氨酸含量各层组织间无显著差异（$P>0.05$，表 1）。

表 1　关节骨软骨各组织层氨基酸含量分析（$\bar{x}\pm s$，%）

组织层	氨基酸总量	羟赖氨酸	羟脯氨酸
透明软骨层	61.39±0.38[a]	4.28±0.04[a]	12.27±0.49
钙化软骨层	20.16±0.96	2.83±0.17	12.65±0.36
软骨下骨层	13.69±0.45[a]	1.31±0.01[a]	12.93±0.49

a：$P<0.01$，与钙化软骨层比较

2.4　冯库萨染色观察

以番红 O⁻固绿染色为对照（图 3），冯库萨染色镜下见，被番红 O 红染的透明软骨呈淡红色，其间可见软骨细胞；被番红 O 红染的钙化软骨呈黑色，边界清晰，上缘以波浪状的潮线结构与透明软骨层紧密连接，下缘以凸凹不平的梳齿状结构与软骨下骨相互锚合；被固绿蓝染的软骨下骨因脱钙完全呈白色，结构显示不清（图 4）。

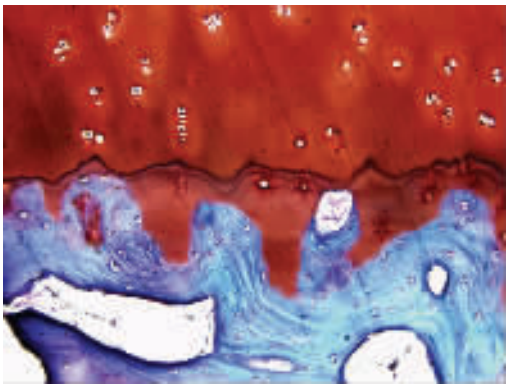


图 3　关节骨软骨番红 O⁻固绿染色结果　（×200）

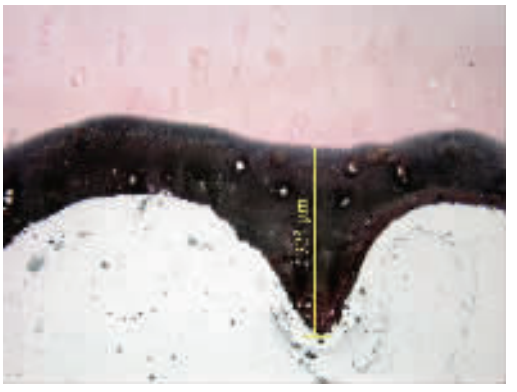
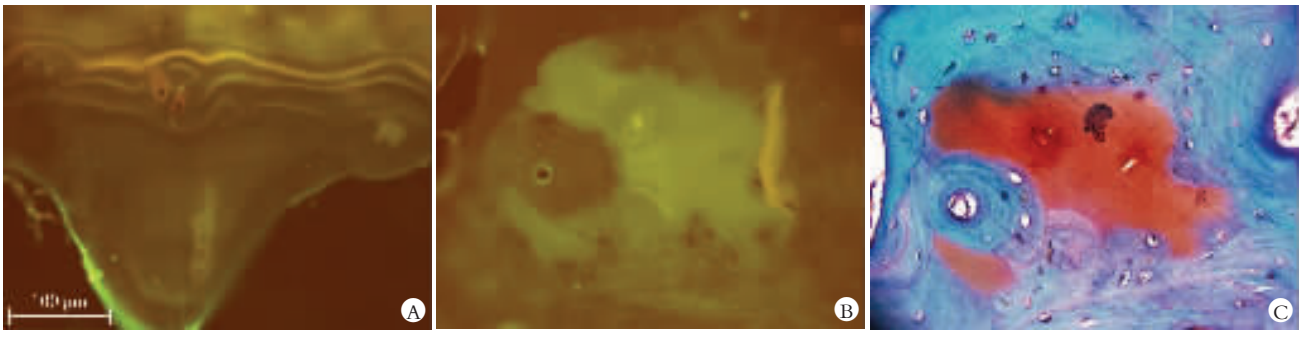


图 4　关节骨软骨冯库萨染色结果

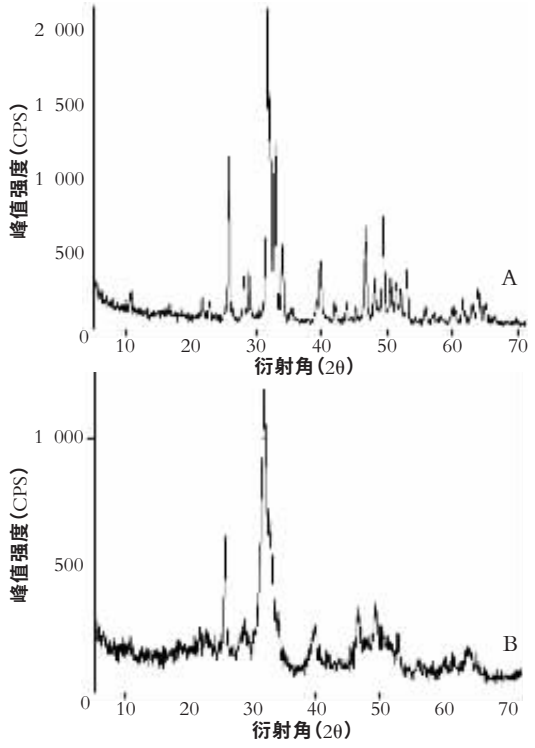
2.5　X-射线衍射法分析

以钙磷比为 1.67 的纳米羟基磷灰石标准粉体为参照，X-射线衍射后各峰位置与 JCPDS 编制的 PDF 标准卡片（9-432）具有良好的对应关系，说明钙化软骨层含有羟基磷灰石晶体成分（图 5）。定量结果表明，钙化软骨层中羟基磷灰石含量占其无机成分的（65.09%±2.31%），明显低于软骨下骨中的羟基磷灰石含量（85.78%±3.42%）（$P=0.003$）。



A：纵切片（S-P×400）；B：横切片（S-P×200）；C：横切片（番红 O⁻固绿染色×200）

图 2　Ⅱ型胶原蛋白定性分析



A:羟基磷灰石标准品;B:钙化软骨层无机成分

图5 羟基磷灰石定性分析 X-射线衍射图谱

3 讨论

骨骼发育成熟之前,关节软骨具有2层软骨细胞增殖区,近关节面浅层增殖区的软骨细胞分裂、增殖,扩大关节端软骨范围;深层增殖区的软骨细胞则以软骨内成骨方式形成软骨下骨。骨骼发育成熟后,深层增殖区的软骨内骨化性生长停止,形成结构致密的钙软骨化层[9]。钙化软骨层由深层增殖区软骨细胞发育而成,具备软骨细胞外基质特性,Ⅱ型胶原蛋白免疫组织化学结果其细胞外基质与透明软骨一样主要为Ⅱ型胶原蛋白,但含量明显低于透明软骨,从而导致两者交界处——潮线结构成为关节骨软骨复合组织中抗剪切力强度最为薄弱的地方。因此,在外伤或炎性病变导致的软骨剥离时,分离的位置往往发生在潮线结构[10]。

钙化软骨层含有大量沉积的钙盐,与软骨下骨一样主要为结晶程度较低的羟基磷灰石晶体,但钙化层中的羟基磷灰石含量明显低于软骨下骨。由于钙化软骨层与软骨下骨具有相同的无机成分,两者之间的界面连接非常紧密,但两者的有机成分——胶原蛋白类型不同,钙化层为Ⅱ型胶原,软骨下骨为Ⅰ型胶原,用番红 O^- 固绿染色方法可以清晰地显示两者之间界线结构——梳齿状黏合线,由此可以推导出粘合线形成机制,在软骨内成骨的过程中,随着血管的长入,钙化的软骨基质逐渐被破骨细胞溶解、吸收,同时成骨细胞生成以血管为中心的环行骨板。但由于血管周围的钙化基质被吸收的较快,未被溶解吸收的钙化软骨基质与环行骨板就形成了梳齿状的界面连接结构。钙化层通过其上界面波浪状潮线结构与透明软骨紧密嵌合,通过其下界面凸凹不平的梳齿状结构与软骨下骨密切锚合,这种特殊的界面连接方式不仅极大地增加了各层组织界面之间的连接面积,同时也增加了界面之间的连接强度,不但可以将关节软骨牢牢地固定在软骨下骨上,而且还有利于来自于软骨的瞬间应力向软骨下骨传导分散。

软骨钙化层结构致密,类似皮质骨,像隔离带一样阻止了髓腔内的液体及小分子有机物质进入软骨非钙化层,从而维持软骨及软骨下骨生理微环境的稳定。钙化层结构一旦遭到破坏,软骨的生理微环境就会受到影响,进而导致透明软骨向纤维软骨发生改变,此机制就是采用微骨折手术治疗软骨缺损却不能形成真正透明软骨的重要原因。由此可见,关节软骨钙化层是关节骨软骨复合组织中的重要功能结构,重建此结构对于治疗软骨缺损、恢复关节功能具有深远意义。

参考文献:

[1] Simon T M, Jackson D W. Articular cartilage: injury pathways and treatment options [J]. Sports Med Arthrosc,2006, 14(3): 146-154.

[2] Verbruggen G, Wittoek R, Groeneboer S, *et al*. Osteochondral repair in synovial joints[J]. Curr Opin Rheumatol,2007,19(3): 265-271.

[3] 杨 柳. 加强软骨与骨组织工程中关键技术的应用[J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22(3): 263-265.

[4] Borges L F, Gutierrez P S, Marana H R, *et al*. Picrosirius-polarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in vesical prolapse lesions[J]. Micron, 2007, 38(6): 580-583.

[5] Dorotka R, Windberger U, Macfelda K, *et al*. Repair of articular cartilage defects treated by microfracture and a three-dimensional collagen matrix[J]. Biomaterials, 2005, 26(17): 3617-3629.

[6] Tcacencu I, Carlsoo B, Stierna P. Structural characteristics of repair tissue of cricoid cartilage defects treated with recombinant human bone morphogenetic protein-2[J]. Wound Repair Regen, 2004, 12(3): 346-350.

[7] Langrock T, Czihal P, Hoffmann R. Amino acid analysis by hydrophilic interaction chromatography coupled on-line to electrospray ionization mass spectrometry[J]. Amino Acids, 2006, 30(3): 291-297.

[8] Kasaboglu O, Er N, Tumer C, *et al*. Micromorphology of sialoliths in submandibular salivary gland: a scanning electron microscope and X-ray diffraction analysis[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2004, 62(10): 1253-1258.

[9] Frisbie D D, Cross M W, McIlwraith C W. A comparative study of articular cartilage thickness in the stifle of animal species used in human pre-clinical studies compared to articular cartilage thickness in the human knee[J]. Vet Comp Orthop Traumatol, 2006, 19(3): 142-146.

[10] Lyons T J, Stoddart R W, McClure S F, *et al*. The tidemark of the chondro-osseous junction of the normal human knee joint[J]. J Mol Histol, 2005, 36(3): 207-215.

(编辑 张 维)