维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)01-0006-03

超声对实验性早期兔膝关节骨关节炎的作用

周 崑[1],周 伟[2],贾小林[3],王 嫣[4],陈文直[1],王智彪[1]

(1. 重庆医科大学附属第二医院肿瘤中心,重庆 400010;2. 四川省广安市人民医院内三科,广安 638661;
3. 重庆市中山医院骨科,重庆 400013;4. 重庆医科大学医学超声工程研究所,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察低强度脉冲超声对实验性早期兔膝关节骨关节炎的作用。方法:造成实验性早期兔膝关节骨关节炎病变,给予低强度脉冲超声治疗 2、4、8 周,用组织 - 组织化学方法评价治疗效果。结果:组织 - 组织化学评分显示,在各观察时间,治疗组的骨关节炎病变程度均较对照组轻。结论:低强度脉冲超声能延缓实验性早期骨关节炎的病变进展。

【关键词】超声疗法;软骨;关节;骨关节炎
【中国图书分类法分类号】R318 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-07-03

Effect of ultrasound on early experimental osteoarthritis of rabbit knees

ZHOU Kun, et al

(*Clinical Center for Tumor, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the effect of low intensity pulsed ultrasound on early experimental osteoarthritis of rabbit knees. *Methods*: Experimental osteoarthritis of rabbit knees were made by Hulth's method. A total of 30 rabbits were divided averagely into 3 groups randomly. One hind knee of 10 rabbits of each group were treated with LIPU randomly while the others as control for 2、4 and 8 weeks respectively. All animals were sacrificed after LIPU. Then the histo-histochemical changes were evaluated by Mankin's score method. *Results*: Mankin's scores showed that the pathological changes in LIPU group were slighter than those in control group. *Conclusion*: LIPU can slow down the disease progress of experimental osteoarthritis of rabbit knee.

【Key words】 Ultrasound therapy; Cartilage; Articular; Osteoarthritis

关节疾病困扰着全世界数亿人口,造成关节疼痛、失能。骨关节炎(Osteoarthritis,OA)是最常见的关节疾病。随着人口老龄化时代的到来,关节疾病,特别是骨关节炎造成的负担将会引人注目地增加。因此,2000 年到 2010 年这 10 年,被 WHO 命名为“骨关节 10 年 2000~2010”(the Bone and Joint Decade 2000~2010)[1-3]。

低强度脉冲超声(Low intensity pulsed ultrasouhd,LIPU)已经被证明能促进全层关节软骨缺损修复,在缺损部位形成透明软骨样修复组织[4-7]。不过,LIPU 对主要病变局限于关节软骨内的早期骨关节炎有什么作用,目前尚无进一步研究。

作者介绍:周 崑(1974-),男,硕士,
主要研究方向:骨再生,骨肿瘤。
通讯作者:陈文直,男,教授,E-mail:chenwz@haifu.com.cn。
基金项目:国家科技部国科发基字[2003]8 号。

1 材料与方法

1.1 材料

30 只纯种成年健康新西兰兔,雄性,体重 2.0~2.5kg,由重庆医科大学实验动物中心提供。

LIPU 治疗仪由重庆医科大学医学超声工程研究所设计、制造。由电源供给系统、功率发生器(功率源)和超声换能器 3 部分组成。LIPU 信号的强度 10~100mW/cm^2,频率 0.5~3.0MHz,脉冲宽度 200μs,重复频率 1kHz。

1.2 实验方法

按照 Hulth 法[8]制作实验性兔骨关节炎动物模型。术后 2 周,开始 LIPU 治疗。仰卧固定实验兔。随机选取 1 条后肢为治疗侧,另 1 条后肢为对照侧。治疗时将 LIPU 治疗头紧贴兔膝关节股骨内髁部皮肤,治疗头和皮肤之间涂以超声耦合剂,治疗过程中不移动治疗头的位置。对照侧给予假治疗。

1.3 实验分组

根据 LIPU 治疗时间不同,将 30 只实验兔随机分成 2 周、4 周和 8 周共 3 个时间组,每组 10 只。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.4 结果评价

过量戊巴比妥钠静脉注射处死实验兔。取股骨内髁部位的关节软骨做病理切片。每个标本贴片 2 张:1 张 HE 染色,1 张 Weigert's iron hematoxylin-fast green FCF-safranin O 染色。结合组织学和组织化学变化,参考 Mankin's 评分标准[9],采用盲法进行评分。

采用 SPSS 11.0 统计分析软件对所获数据进行配对 t 检验统计学分析,设定 $\alpha=0.05$。

2 结 果

LIPU 治疗后第 2 周,LIPU 组关节软骨表面光滑,或表面不规则,细胞正常或有轻度增生,潮线多完整,或有多重潮线,safranin O 染色色泽深而均匀;对照组的关节软骨表面不规则,或有切线层到过渡层的裂隙,有细胞轻度增生,多重潮线,safranin O 染色轻到中度的减少(图 1~4)。

LIPU 治疗后第 4 周,LIPU 组和对照组的关节



图 1 OA LIPU 组 2 周 HE×100

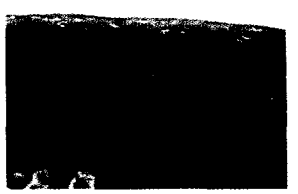


图 2 OA LIPU 组 2 周 safranin-O×100



图 3 OA 对照组 2 周 HE×100



图 4 OA 对照组 2 周 safranin-O×100

软骨退变程度较前加重。LIPU 组关节软骨的裂隙深入,可达切线层到过渡层,出现了细胞增生或轻度细胞克隆化形成的软骨细胞簇,有多重潮线,safranin O 染色轻到中度的减少;对照组关节软骨的裂隙可达放射层,有明显细胞克隆化形成的软骨细胞簇,还可出现细胞减少,多重潮线比较多见,有潮线被毛细血管穿破现象,safranin O 染色中到重度的减少(图 5~8)。

LIPU 治疗后第 8 周,LIPU 组和对照组的关节软骨退变进一步加重。LIPU 组关节软骨的裂隙深入放射层,有细胞克隆化形成的软骨细胞簇,或有细胞减少,有多重潮线和潮线被毛细血管穿破现象,safranin O 染色中到重度的减少;对照组关节软骨



图 5 OA LIPU 组 4 周 HE×100



图 6 OA LIPU 组 4 周 safranin-O×100



图 7 OA 对照组 4 周 HE×100



图 8 OA 对照组 4 周 safranin-O×100

的裂隙可达钙化层,甚至结构被完全破坏,细胞减少,只残留无细胞的 HE 红染物质,软骨下骨增生,safranin O 无染色(图 9~12)。

按照调整后的 Mankin's 评分显示,随着观察时



图 9 OA LIPU 组 8 周 HE×100



图 10 OA LIPU 组 8 周 safranin-O×100



图 11 OA 对照组 8 周 HE×100



图 12 OA 对照组 8 周 safranin-O×100

间的延长,LIPU 组和对照组的关节软骨退变程度逐渐加重。在同一观察时间,LIPU 组的关节软骨退变程度比对照组轻,二者之间差别有统计学意义($P<0.05$)。

见表 1、图 13。

3 讨 论

表 1 治疗组与对照组大体评分表

观察时间	Mankin 评分($\bar{x}\pm s$)		
	LIPU 组	对照组	P
2 周	2.5 ± 1.2	5.4 ± 1.7	<0.05
4 周	5.2 ± 1.3	8.5 ± 1.7	<0.05
8 周	6.8 ± 2.4	11.7 ± 1.8	<0.05

(配对 t 检验,$P<0.05$ 为有统计学差异)

维普资讯 http://www.cqvip.com

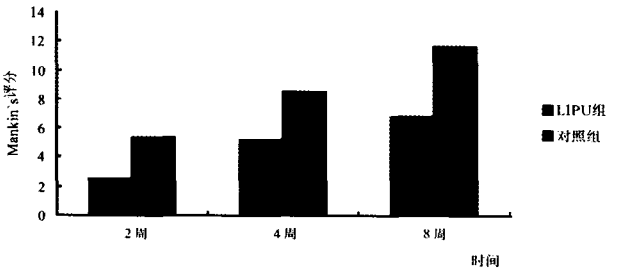


图 13 LIPU 组与对照组 Mankin 评分对比图

骨关节炎是一组不同疾病的总称，它们有完全不同的病因，但有相似的生物学、形态学和临床转归。它们所造成的后果不仅仅影响关节软骨，还累及整个关节，包括软骨下骨、韧带、关节囊、关节滑膜和关节周围肌肉。最终，关节软骨发生退变，逐渐出现纤维化、裂缝、溃疡，直至全层关节软骨丢失[10]。

LIPU 已经被证明能促进全层关节软骨缺损修复，在缺损部位形成透明软骨样修复组织[4-7]。其促进软骨损伤修复的机理有：促进软骨细胞 aggrecan 基因表达，刺激蛋白多糖的合成和释放；促进软骨细胞Ⅰ型和Ⅱ型前胶原 mRNA 表达[11-13]；促进软骨缺损填充组织中的间充质干细胞增殖和定向分化为纤维母细胞和软骨母细胞[6]。

LIPU 对实验性早期骨关节炎的治疗结果表明，LIPU 能延缓骨关节炎的自然病程。表现在关节软骨的结构破坏、细胞的增生－过度增生－减少的过程、软骨基质糖蛋白含量、潮线增生或被血管穿破等组织病理学变化都比对照组出现的时间晚，并且相对而言程度比较轻。

safranin O 能特异性地将软骨基质中的蛋白多糖染成红色或橙红色，能够直观地反映软骨基质中的蛋白多糖含量，在关节软骨病变的组织化学评价中被广泛应用[14]。LIPU 组的关节软骨基质的 safranin O 染色与对照组相比，早期染色比较深而均匀，后期染色减少的程度比较轻，染色减少出现的时间比较晚，说明 LIPU 组软骨基质蛋白多糖含量在骨关节炎病变早期维持正常水平的时间比较长，随后减少的过程比较慢。蛋白多糖由软骨细胞合成和分泌[15]，它是在长的透明质酸大分子上通过许多连接蛋白结合了硫酸软骨素和硫酸角质素等蛋白多糖亚单位而形成的羽毛状大分子结构，能够结合和释放水，对于保持关节软骨基质结构稳定、行使关节软骨功能有重要意义。在骨关节炎病变过程中，蛋白多糖的丢失，蛋白多糖染色的减少是最早的组织学证据之一[16]。研究表明，LIPU 能增强细胞代谢功能[17,18]，促进体外培养的软骨细胞合成蛋白多糖[12]、硫酸软骨素[13]等软骨基质成分。因此，LIPU 治疗造成的蛋白多糖含量变化，是 LIPU 延缓骨关节炎病变演变的重要机制。

LIPU 能够促进血液中的小分子物质向关节滑液内弥散，并可能增加关节滑液的渗出[19]，因此，改善关节软骨的营养也可能是 LIPU 的一个重要机制。不过，LIPU 促进血液中的小分子物质向关节滑液内弥散的机制还不清楚[19]。

与 LIPU 促进全层关节软骨缺损修复的研究比较，2 种关节软骨损伤模型中最突出的不同，就是在全层关节软骨缺损修复过程中，有来自于骨髓和血液中的间充质干细胞的参与。因此，LIPU 作用于间充质干细胞，促使间充质干细胞的分化、增殖，可能是 LIPU 促进全层关节软骨缺损修复的根本原因。而在相对缺乏间充质干细胞来源的实验性骨关节炎病变修复过程中，虽然 LIPU 也有一定的作用，但并没有逆转实验性骨关节炎的持续进展。

参 考 文 献

[1] Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC, et al. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States[J]. Arthritis Rheum, 1998; 41: 778-779.

[2] Hochberg MC, Lawrence RC, Everett DF, et al. Epidemiologic associations of pain in osteoarthritis of the knee. Data from the National Health and Nutrition examination Survey and the National Health and Nutrition Examination-I Epidemiologic Follow-up Survey [J]. Semin Arthritis Rheum, 1989; 18(Suppl 2): 4-9.

[3] Report of the joint disease consensus group. The bone and joint decade 2000 ~ 2010 [J]. Osteoarthritis and cartilage, 1999; 7: 251-254.

[4] Cook SD, Salkeld SL, Popich-Patron LS, et al. Improved cartilage repair after treatment with low-intensity pulsed ultrasound [J]. Clin Orthop, 2001; 391(Suppl): S231-243.

[5] 贾小林，陈文直，周 伟，等. 低强度脉冲超声对关节软骨缺损修复影响的初步观察[J]. 中国超声医学杂志，2004；19(12)：889-891.

[6] 贾小林，陈文直，司海鹏，等. 超声对兔关节软骨损伤的修复作用[J]. 中华创伤杂志，2004；20(2)：97-99.

[7] Jia XL, Chen WZ, Zhou K, et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound in repairing injured articular cartilage[J]. Chin J Traumatol, 2005; 8(3): 175-178.

[8] Hulth A, Linderberg L, Telhag H. Experimental osteoarthritis in rabbits[J]. Acta Orthop Scand, 1970; 41(5): 522-530.

[9] Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips, Ⅱ: correlation of morphology with biochemicaland metabolic data[J]. J Bone Joint Surg, 1971; 53-A: 523-537.

(下转第 17 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

的大小,而且这 2 个测序引物不能满足将文库中所有克隆都能扩增出来的要求,在实验中发现有一些菌落扩增不出相应的片段,而用重新设计的引物扩增出的片段基本上可以认为是文库插入片段的大小。

实验研究表明,实验成功地扩增了 K562 细胞 cDNA 文库,并且已经成功转入了酵母 Y187 细胞,转化效率和文库的多样性均满足实验要求,可用于酵母杂交系统研究,为进一步在活细胞内直接筛选药物作用的靶蛋白和开辟新的分子治疗靶点奠定了实验基础。

参 考 文 献

[1] Zhu y,Lee HC, Zhang L. An examination of heme action in gene expression:heme and heme deficiency affect the expression of diverse genes in erythroid K562 and neuronal PC12 cells[J]. DNA Cell Biol,2002;21(4):333-346.

[2] Pettiford SM,Herbst R. The protein tyrosine phosphatase HePTP regulates nuclear translocation of ERK2 and can modulate megakaryocytic differentiation of K562 cells[J]. Leukemia,2003;17(2):366-378.

[3] Huang M,Wang Y,Collins M,et al. CPEC induces erythroid differentiation of human myeloid leukemia K562 cell through CTP depletion and p38 MAP kinase[J]. Leukemia,2004;18(11):1857-1863.

[4] Takagaki K,Katsuma S,Kaminishi Y,et al. Role of Chk1 and Chk2 in Ara-C-induced differentiation of human leukemia K562 cells[J].Genes to Cells,2005;10(2):97-106.

[5] Chae J,Kim J,Park JK,et al. The antioxidant,rather than prooxidant activities of quercetin on normal cells: quercetin protects mouse thymocytes from glucose oxidase-mediated apoptosis[J]. Exp Cell RES,2003;291(10):386-397.

[6] 赵新汉,王志宇,李 晶,等. 槲皮素诱导人白血病细胞 K562 的凋亡[J]. 第四军医大学学报,2006;27(15):1 395-1 398.

[7] 曹东旭, 元英进. 槐果碱对人红白血病 K562 细胞的增殖抑制和诱导凋亡作用[J]. 天津科技大学学报,2006;21(40):34-36.

[8] 陈建胜, 叶华贞. 南瓜蛋白对慢性粒细胞白血病 K562 细胞增殖的影响[J]. 海峡药学,2006;18(5):180-182.

[9] 张 彦,刘晓珊,许相儒,等.苦参碱对 K562 细胞骨架的作用观察[J]. 重庆医科大学学报, 2002;27(4):386-387.

[10] 刘北忠,蒋纪凯,何於娟,等. 苦参碱诱导 K562 细胞磷脂酶 A_2 活性与表达的改变[J]. 实用癌症杂志,2002;17(5):460-462.

[11] 刘北忠,蒋纪恺,何於娟,等. 苦参碱诱导 K562 细胞酪氨酸激酶与磷酸酶的活性改变[J]. 中草药,2003;34(1):48-51.

(责任编辑:谭乐勤)

(上接第 8 页)

[10] Brandt KD. An atlas of osteoarthritis[M]. New York USA: The Parthenon Publishing Group,2001.1.

[11] Azuma Y,Ito M,Harada Y,et al. Low intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reactions in the fracture callus [J]. J Bone Miner Res,2001;16:671-679.

[12] Parvizi J,Wu CC,Lewallen DG,et al. Low-intensity ultrasound stimulates proteoglycan synthesis in rat chondrocytes by increasing aggrecan gene expression[J]. J Orthop Res,1999;17(4):488-494.

[13] Nishikori T,Ochi M,Uchio Y,et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on proliferation and chondroitinsulfate synthesis of cultured chondrocytes embedded in Atelocollagen gel[J]. J Biomed Mater Res,2002;59(2):201-206.

[14] Rosengerg L. Chemical basis for the histological use of Safranin-O in the study of articular cartilage[J]. J Bone Joint Surg, 1971;53-A:69-82.

[15] Graff RD,Kelley SS,Lee GM. Role of pericellular matrix in development of a mechanically functional neocartilage[J]. Biotechnol Bioeng,2003;82(4):457-464.

[16] Messner K. Healing of articular cartilage injuries[M].3nd. Singapore: Elsevier Science,2001.328-329.

[17] Warden SJ,Favaloro JM,Bennell KL,et al. Low-intensity pulsed ultrasound stimulates a bone-forming response in UMR-106 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun,2001;286(3):443-450.

[18] Naruse K,Mikuni-Takagaki Y,Azuma Y,et al. Anabolic response of mouse bone-marrow-derived stromal cell clone ST2 cells to low-intensity pulsed ultrasound[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000;268(1):216-220.

[19] Weishaupt D,Schweitzer ME,Rawool NM,et al. Effects of low-intensity ultrasound on the diffusion rate of intravenously administered Gd-DTPA in healthy volunteers[J]. Investigative Radiology,2001;36(8):493-499.

(责任编辑:冉明会)