

电针对兔膝关节炎软骨细胞基质金属蛋白酶-13表达的影响*

蹇睿¹ 胥方元^{1,2} 李卫平¹ 郭声敏¹

摘要

目的:探讨电针对兔膝关节炎(KOA)模型软骨细胞基质金属蛋白酶-13(MMP-13)表达的影响。

方法:30只新西兰大耳兔随机分为正常组、模型组及电针治疗组。正常组不造模,模型组和电针治疗组均采用左膝关节伸直位管型石膏固定法,建立KOA模型。喂养6周后,电针组电针治疗10d。各组均取股骨内侧髁软骨,观察软骨细胞及MMP-13的变化。

结果:按Mankin评分比较软骨结构,各组间差异有显著性($P<0.05$)。正常组MMP-13未检出,模型组MMP-13检出率较高,电针治疗组MMP-13检出率下降。MMP-13在KOA软骨细胞中的表达与正常组差异有显著性意义,电针治疗组与模型组差异有显著性意义($P<0.01$)。

结论:电针治疗促使兔膝关节炎模型软骨细胞重新排列,减少软骨细胞中MMP-13表达,对OA治疗有一定作用。

关键词: 电针; 骨关节炎; 软骨细胞; 基质金属蛋白酶-13

中图分类号:R246.2,R684 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2011)-09-0799-04

Effect of electroacupuncture on expression of matrix metalloproteinase-13 in cartilage cells of rabbit knee osteoarthritis model/JIAN Rui, XU Fangyuan, LI Weiping, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2011, 26(9): 799—802

Abstract

Objective: To study the effect of electroacupuncture (EA) on expression of matrix metalloproteinase-13(MMP-13) in cartilage cells of rabbit knee osteoarthritis(KOA) model.

Method: Thirty New Zealand big ear rabbits were divided into normal, model and EA group randomly. The left knees of model group and EA group were positioned with straight bit in plaster casts to create osteoarthritis(OA), the normal group did not. After 6 weeks, EA group was carried on EA treatment for 10d. Then cartilage cells and MMP-13 changes of femoral medial condyle cartilage were observed in every group.

Result: According to Mankin's grading to compare cartilage structure of 3 groups, there were significant differences ($P<0.05$). In normal group MMP-13 had not picked out. In model group detection rate of MMP-13 was high. In EA group detection rate of MMP-13 dropped. There were statistical significant differences of cartilage cell's MMP-13 expressions between model group and normal group, between EA group and model group($P<0.01$).

Conclusion: EA can promote rabbit KOA model cartilage cells rearrangement, reduce the expression of cartilage cells' MMP-13, and has certain effect on OA treatment.

Author's address Department of Rehabilitation Medicine, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, 646000

Key word electroacupuncture; osteoarthritis; cartilage cells; matrix metalloproteinase-13

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2011.09.001

*基金项目:四川省卫生厅科研基金资助项目(050075)

1 四川省泸州医学院附属医院康复医学科,泸州,646000; 2 通讯作者

作者简介:蹇睿,女,住院医师,硕士研究生; 收稿日期:2010-12-01

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种以关节软骨降解、滑膜炎为特征的退行性关节疾病,尤以膝关节最易受累,其发病率在人群中呈逐年上升趋势,亦成为导致中老年人病残的主要原因之一。OA在中医上属“痹症”范畴,而针灸具疏通经络之作用,临床上多取膝周穴位,行普通针刺、电针、小针刀等方法治疗,已取得较好疗效^[1-3]。目前已有研究表明,基质金属蛋白酶-13(matrix metalloproteinase-13, MMP-13)参与关节软骨的损伤和破坏过程^[4]。本实验通过建立兔膝关节炎模型,观察治疗前后软骨细胞中MMP-13的表达,探讨电针干预后,对骨关节炎软骨修复的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

健康新西兰大耳兔30只,雌雄不拘,体重2.0—2.5kg,6月龄。泸州医学院动物实验中心购买,动物合格证:SCXK[川] 2008-17。随机分为正常组、模型组及电针治疗组3组。

模型组及电针组采用伸膝位管型石膏固定法^[5]制备左膝OA模型。将兔固定于实验固定台,左后肢处于伸直位,至左后肢腹股沟以下1.5cm至踝关节下3cm(趾端)约15cm石膏绷带包裹,管型固定,松紧适中。固定6周后,随机从模型组中抽出1只以空气栓塞法处死,取左膝关节软骨做病理检查,确定造模成功^[6]后去除石膏外固定。正常组不造模。

1.2 实验仪器与试剂

MMP-13免疫组化试剂盒(购于北京博奥申生物工程有限公司),5%硝酸脱钙液,多聚赖氨酸,伊红,苏木素,PAS缓冲液(泸州医学院病理教研室提供),华佗牌电子针灸仪(苏州医疗用品厂有限公司,SDZ-II型)。

1.3 治疗方法

电针组穴位定位参照《动物针灸学》,选取膝周4个固定穴位:“梁丘”、“足三里”(后三里)、“血海”、“阳陵泉”。以30号一寸毫针刺后,针柄连接于SDZ-II型治疗仪上,疏密波刺激,疏波4Hz,密波20Hz,脉冲宽度0.5ms,每日1次,每次20min,连续治疗10次。模型组与正常组不予任何处理。

1.4 组织切片制作

实验结束后,各组兔均通过耳缘静脉注入30ml空气处死,取左侧股骨内髁顶点钙化层以上软骨0.5cm×0.5cm×0.5cm制作标本。经中性甲醛固定,5%硝酸脱钙,常规石蜡包埋,切片,分别予HE染色,免疫组化测定MMP-13。软骨病理改变参考Mankin评分,MMP-13形态计量学研究:对每张软骨切片随机取3个高倍镜视野(200倍),且具有完整4层软骨结构的区域进行观测。计算每个视野里的阳性细胞数和细胞总数。MMP-13表达量用细胞分数,即阳性细胞数占细胞总数的百分比来表示,其最大值为100%。

1.5 统计学分析

所有数据以均数±标准差表示,采用SPSS 10.0统计软件对数据进行方差分析。

2 结果

2.1 病理切片观察

软骨大体观察:正常对照组左膝关节无明显关节积液,外观软骨面光滑呈蓝白色,色深明亮,无缺损及新生物,无水肿充血表现。模型组左膝关节大部分出现关节积液,关节面粗糙,部分部位出现糜烂,所有软骨表面呈灰黄色,光泽度降低。电针治疗组部分出现关节积液及滑膜增生,软骨改变以粗糙为主,但程度较轻;电针治疗组与模型组按Mankin评分比较软骨结构,差异有显著性意义($P<0.05$)。见表1。

表1 各组Mankin软骨结构评分结果比较 ($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	兔数	软骨结构Mankin评分
正常组	10	0
模型组	10	4.30±0.67
电针组	10	2.50±0.85 ^①

①与模型组对比 $P<0.05$

2.2 光镜观察

HE染色光镜(100倍)下可见正常组软骨层较厚,软骨着色均匀,软骨细胞排列整齐,细胞饱满。Mankin软骨细胞评分均为0分(见图1)。模型组软骨明显变薄,可见裂隙,部分深达软骨下骨,基质染色明显变浅,有较薄的钙化层,局部有破坏,软骨细胞局部排列紊乱,细胞簇集,多个软骨细胞聚集一起,细胞核浓缩(见图2)。电针治疗组染色显示软骨

图1 正常组软骨细胞排列整齐
(×100, HE染色)

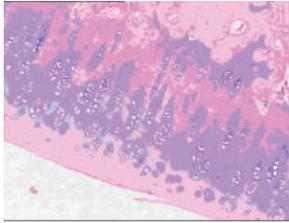


图2 模型组软骨细胞排列紊乱
(×100, HE染色)

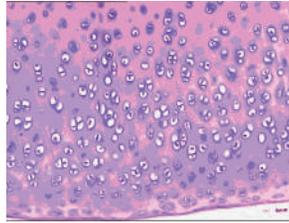
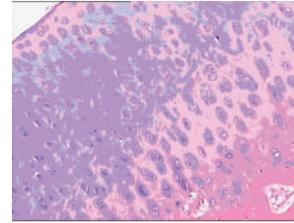


图3 电针组软骨细胞排列较整齐
(×100, HE染色)



层较模型组增厚,表面光滑,偶见小的裂隙形成,着色尚均匀,软骨细胞排列整齐,细胞饱满,偶见多个软骨细胞聚集一起,细胞核浓缩(图3)。电针治疗组与模型组按Mankin评分比较软骨细胞,差异有显著性意义($P<0.05$)。见表2。

表2 各组Mankin软骨细胞评分结果比较 ($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	兔数	软骨结构Mankin评分
正常组	10	0
模型组	10	2.70 ± 0.48
电针组	10	1.20 ± 0.42 ^①

①与模型组对比 $P<0.05$

2.3 免疫组化MMP-13表达

镜下MMP-13表达阳性结果主要表现为软骨细胞内可见棕褐色颗粒。在正常对照组MMP-13无表达;模型组呈强阳性表达,软骨基质、胞浆中均有MMP-13表达,全层可见;电针治疗组软骨组织中MMP-13较模型组表达降低。模型组及治疗组MMP-13表达阳性细胞分数与正常对照组比较有显著性差异($P<0.01$)。见表3。

表3 各组测定MMP-13结果比较 ($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	标本数	MMP-13
正常组	30	0
模型组	30	19.60 ± 1.51
电针组	30	16.51 ± 0.80 ^①

①与模型组对比: $P<0.01$

3 讨论

目前研究认为:基质金属蛋白酶家族(matrix metalloproteinases, MMPs)参与骨关节炎的软骨损伤破坏的病理过程。现有研究^[7]证实在正常软骨中,软骨细胞合成的大量II型胶原、蛋白多糖等物质分泌到细胞外基质(extracellular matrix, ECM)中,构成细胞外纤维网架,为细胞提供支持与保护。这些物

质最终在MMPs的作用下降解。当软骨受损后,软骨细胞中MMPs表达发生改变,导致ECM产生与降解之间的平衡被打破,ECM中II型胶原,蛋白多糖被大量降解,软骨细胞周围的环境和胶原网络遭到了破坏,是发生骨关节炎的基本环节。

MMP-13属于MMPs中的胶原酶亚型,其对软骨基质中II型胶原裂解活性最强^[4],而且降解效率也最高,它可直接降解II型胶原,其他MMPs亚型对II型胶原的降解过程需要通过它们起作用。因此,理论上MMP-13等胶原酶的变化最能反映出软骨基质中II型胶原的代谢变化。MMP-13在OA病变软骨里,其增高程度和软骨组织的破坏程度一致,即破坏程度越严重酶的表达越高^[8]。关节发生炎性损伤时可引起滑膜及软骨细胞产生IL-1 β ^[9-11],可以促进成骨细胞样细胞的增殖和骨吸收,参与骨质增生和软骨下骨囊形变的形成。经过IL-1 β 诱使软骨细胞中MMP-13 mRNA表达量明显上升,且呈持续性,刺激产生的MMP可促进滑膜成纤维细胞合成I型胶原,增加OA滑液中纤维素的含量,从而直接降解ECM。

针刺可疏通膝部气血,电针治疗选取膝周穴位,可刺激局部肌肉收缩,改善局部血液循环,有利于渗出液吸收。本实验模型组中兔膝关节软骨层变薄,软骨细胞排列紊乱,MMP-13表达较正常组明显增加。电针治疗后见软骨层增厚,细胞重排,软骨细胞中MMP-13表达下降,表明软骨破坏受到一定程度的抑制。治疗依近部取穴原则选取膝周穴位,通过疏密电刺激,可能促进蛋白多糖合成增加,增强局部血液循环,促进炎性因子吸收,使关节液中TNF- α 和IL-1 β ^[3,12]含量下降,MMP-13 mRNA^[13]表达量降低,对蛋白聚糖水解减少,减轻滑膜炎,促进软骨细胞重排与再生,使软骨修复,防止和延缓病变发

展。本研究表明,电针可作为临床治疗骨关节炎的基础措施之一。

参考文献

- [1] 胥方元,何成松,干锦华,等.针灸结合股四头肌训练治疗膝骨性关节炎[J].中国康复理论与实践,2003,9(12):709—710.
- [2] 严兴科,张燕,于璐,等.温通针法与电针治疗膝骨性关节炎的临床对照研究[J].中国康复医学杂志,2010,25(5):447—450.
- [3] 胥方元,干锦华,李卫平,等.电针对膝关节骨关节炎患者血清IL-1 β 及TNF- α 水平的影响[J].中国针灸,2009,29(7):529—531.
- [4] 乔长峰,杨开舜.MMP-13、TIMP-1在兔骨关节炎模型的表达及其意义[J].中国现代医生,2009,47(3):39—41.
- [5] 张洪,江捍平,王大平.关节制动制作骨性关节炎动物模型的探讨[J].中国现代医学杂志,2006,16(12):1843—1848.
- [6] 葛广勇,赵建宁,刘刚.膝骨性关节炎模型的分期特征[J].中国临床康复,2006,10(4):47—49.
- [7] 王玉彬,陈安民,郭风劲,等.基质金属蛋白酶家族在骨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.
- [8] 张超,王旭,姜建元,等.MMP-1、13mRNA和DDR2表达与关节软骨退变的关系[J].复旦学报(医学版),2007,34(1):126—128.
- [9] 刘永刚,鲍隽君,邢自宝,等.骨性关节炎与细胞因子相关性研究进展[J].骨科,2010,1(2):105—107.
- [10] 黄金刚,童海骏,刘宏强,等.IL-1 β 和TNF- α 对软骨细胞基质降解的影响及相关机制研究[J].上海交通大学学报(医学版),2010,30(9):1084—1089.
- [11] Zwerina J, Redlich K, Polzer K, et al. TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(28):11742—11747.
- [12] 黄剑,卓廉士,王永渝,等.电针对膝骨性关节炎兔模型白介素-1 β 和肿瘤坏死因子- α 的影响[J].针刺研究,2007,32(2):115—118.
- [13] Li T, Xiao J, Wu Z, et al. Transcriptional activation of human MMP-13 gene expression by c-Maf in osteoarthritic chondrocyte[J]. Connect Tissue Res, 2010, 51(1):48—54.

首届全国脑外伤治疗与康复学术大会精彩荟萃

在金桂飘香的金秋时节,首届全国脑外伤治疗与康复学术大会将于2011年11月3—6日在杭州第一世界大酒店召开。这将是中华康复医学会、中国医师协会康复医师分会、中华医学会物理医学与康复学分会在2011年的主要学术活动之一,是我国脑外伤治疗与康复领域多学科合作的重要开端,体现康复医学、神经外科、重症医学、急救医学、神经心理学、护理学、高压氧治疗等多学科的紧密合作。

大会邀请了国际脑外伤学会的主席 Nathan Zasler教授出席,并进行精彩讲座,同时主持其主编的脑外伤医学中译本的首发式。

大会还邀请我国著名神经外科专家凌峰和江基尧、重症医学专家邱海波以及康复医学专家王茂斌、励建安、李玲教授等作主题学术报告,也将邀请各个相关学科的学术带头人进行精彩的讲座。

大会将举办首届脑外伤康复培训班,由Nasler教授和其他国内著名专家亲自传授国际脑外伤医学的最新经验和科研成果。

会议时间:2011年11月3—6日; 截稿时间:2011年10月15日; 网上优惠注册截止时间:2011年10月15日。

会议网站:www.bim2011.org