

骨关节炎发病机理的实验研究

中国中医研究院骨伤科研究所 易宪文 房世源 孙树椿

Papain induced osteoarthritis—an experimental study

Yi Xian-wen et al. Laboratory of Morphology
Institute of Orthopaedics and Traumatology
China Academy of TCM

This is an experimental observation of osteoarthritis(OA) induced with papain injection into the knee joints of Wistar rats. Light microscopy (LM) was done following histochemical stainings for different enzymes including LDH, SDH, G6PDH, NsEase, ACPase and ALPase. The specimens were prepared and studied under scanning and transmission electron microscopes. Remarkable OA changes were observed two weeks after the injection of papain, in comparison with the contralateral knee which was injected with PBS and used as control. The effect of intra-articular injection of papain was the destruction of the cartilage matrix by reduction of the proteoglycans. This is a good animal model for the study of the pathogenesis of OA.

摘 要

本实验运用基质组织化学和酶组织化学的方法,通过光镜、扫描电镜和透射电镜对木瓜蛋白酶诱发的实验性骨关节炎关节软骨形态变化进行观察,发现早期变性软骨细胞中溶酶体样结构大量增多,溶酶体酶活性增强,而软骨基质糖胺多糖成份明显减少,进而产生一系列早期骨关节炎特征性损害。结果表明:糖胺多糖的减少与溶酶体酶活性升高有关。因而认为溶酶体酶活性增高是骨关节炎病变发展的机制之一。

随着骨关节炎研究不断取得进展,关节软骨中酶的活性变化在这一退行性疾病中的作用,引起愈来愈多学者的重视。但在这方面生物化学文献较多,而组织化学方面的研究报道尚不多见。我们试图运用基质组织化学和酶组织化学的方法,通过光镜、扫描电镜与透射电镜对木瓜蛋白酶诱发的实验性骨关节炎的关节软骨组织化学成份变化,组织结构和超微结构的变化进行观察,以便进一步阐明骨关节炎的发病机制。

材 料 与 方 法

一、实验动物与分组

选用健康、雄性Wistar大白鼠70只,体重100克左右,均采用自身对照,即左膝关节为实验侧,右膝关节为对照侧。分别用3%戊巴比妥钠麻醉,局部皮肤消毒后,向实验侧关节腔内注射10%木瓜蛋白酶溶液0.1毫升和0.75M左旋半胱氨酸溶液0.05毫升。向对照侧关节腔,半数动物注射0.15毫升0.1M磷酸缓冲液作为溶剂对照,半数动物不予注射作为空白对照。所有注射均隔一天注射一次,共注射五次。木瓜蛋白酶[Fluka AG产品,瑞士包装。纯,~0.5u/mg(1:350accNF)]用灭菌的0.1M磷酸缓冲液(pH 6.5)配成10%木瓜蛋白酶溶液,过滤后使用。左旋半胱氨酸(E. Merck产品)亦溶于上述缓冲液。

二、取材与标本制作

实验动物于末次注射后第3、7、14和28天分批行颈椎脱臼法处死或将大鼠下部颈椎拉断,使动物下肢瘫痪但未死亡,立即取材,制成光镜与电镜标本。

1. 石蜡切片标本制作:取胫骨平台,立即固定于10%中性福尔马林(pH7.2),EDTA脱钙,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,切成5微米切片,H.E, Mallory, 藏红O, 甲苯胺蓝染色。

2. 恒冷箱切片标本制作:取胫骨平台不经固定立即放入-20℃恒冷箱内冻结,切成8—10微米切片,实验侧与对照侧裱于同一张载玻片,以便使孵育时间与其它处理条件完全相同。分别进行H·E, 藏红O, 以及以下各种酶的组织化学反应。乳酸脱氢酶(LDH), 琥珀酸脱氢酶(SDH), 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH), 非特异性酯酶(NsEase), 酸性磷酸酶(ACPase), 碱性磷酸酶(ALPase)。

3. 扫描电镜标本制作:取材前以3%戊二醛关节腔注射,取材后入3%戊二醛继续固定,1%锇酸后固定,梯度丙酮脱水,在日立HCP-2型临界点干燥器中干燥,DM-200型高真空离子溅射镀膜制成样品,用日立S-520型和Jeol型扫描电镜观察。断面样本在前固定后,经液氮冷冻断裂,再行后固定,其它程序同表面标本。

4. 透射电镜标本制作:取材前先将3%戊二醛关节腔注射,取材后入戊二醛继续固定,经固定脱钙混合液继续固定并脱钙,1%锇酸后固定,梯度丙酮脱水,Epon812包埋,LKB型超薄切片机制切片,厚度约500埃,经醋酸双氧铀和枸橼酸铅双染色后,用日立800型透射电镜观察。

结 果

一、肉眼观察

实验侧膝关节肿大,切开关节囊可见股骨髁边缘变钝,严重者扭曲变形。剥离半月板后可见胫骨平台

表面不平,失去光泽,颜色发黄。对照侧无变钝与变形情况,软骨呈白色,有光泽。

二、组织学与基质组织化学光镜观察

1. 对照侧:依照结构特点将关节软骨分成四层。第一层通称表层,该层细胞为扁平梭形,其长轴与关节面平行。第二层是移行层,软骨细胞较大,呈圆形或椭圆形,排列无规则。第三层为辐射层,细胞亦较大,常呈柱状排列,垂直于关节面。因第二层与第三层在结构与功能方面有许多共同之处,故常合称中层。第四层叫钙化层,基质中有钙盐沉着。软骨基质主要由胶原纤维与酸性糖胺多糖组成,由于二者有同样的折光率,故呈均质状。H·E染色时呈粉红色,用藏红O或甲苯胺蓝染色时分别呈红色或紫色。

2. 实验侧:①可见到关节软骨表面有不定形物附着,原纤维形成。软骨表面因磨损而凹凸不平。软骨基质肿胀使表面隆起,用 Mallory 染色观察肿胀区,可见软骨基质染色较浅,纤维排列稀疏,间隙增大。软骨出现裂缝,先出现于表层,继而延至移行层和辐射层。②基质糖胺多糖减少,用藏红O染色的标本,可见基质红色进行性变浅,严重者潮线以上甚至软骨全层均着复染之绿色。用甲苯胺蓝染色的标本,则见到基质紫色变浅。③细胞变性坏死,多首先出现在受力部位的软骨辐射层。④软骨细胞代偿性增生,多发生在软骨中层及坏死细胞附近,软骨细胞常呈多细胞状态,趋向形成克隆,软骨囊着色深。在软骨表层与移行层,软骨细胞出现有丝分裂相。⑤软骨下骨区血管与骨髓组织侵驻软骨钙化层,甚至穿过潮线侵驻辐射层。

为了更客观地反映木瓜蛋白酶诱发的大白鼠骨关节炎关节软骨病理变化及其严重程度,我们随机抽样20例,按照Mankin等提出的人体骨关节炎病理表现与分级标准,将实验侧出现各种病理改变的例数与对照侧的情况进行对比,结果见表I。又将实验侧在结构、细胞、基质藏红O染色与潮线完整性等四个方面的累计分级(即动物例数乘以分级)和对照侧进行比较,结果见表I。

从以上表可看出,实验侧比对照侧病变严重。

三、透射电镜观察

1. 对照侧:软骨细胞表面有许多突起伸向外周,表层细胞线粒体数量少而且体积小,粗面内质网较少。移行层与辐射层软骨细胞线粒体较大,高尔基复合体较发达,粗面内质网丰富,溶酶体很少,微丝较少,一般较难见到脂滴,细胞核呈圆形或卵圆形,轮廓较平滑,核仁明显,一般有1—2个。钙化层细胞器较少,细胞晕较清晰。胶原纤维的粗细与分布在各层不同。表层纤维较细,平行于关节表面。中层纤维直径较粗,交织成网,同期性横纹不清晰。下层纤维较粗,常呈束状,多垂直于关节表面。

2. 实验侧:软骨细胞的病理变化包括两方面,即变性坏死过程和代偿性机能增强及代偿性增生过

表 1 骨关节炎组织学与组织化学分级及标本的分布※

	分级	实验侧	对照侧	
1. 结构.	a. 正常	0	4	16
	b. 表面不规则	1	2	3
	c. 翳与表面不规则	2	7	1
	d. 裂缝到移行层	3	3	0
	e. 裂缝到辐射层	4	2	0
	f. 裂缝到钙化层	5	1	0
	g. 结构破坏	6	1	0
2. 细胞.	a. 正常	0	4	18
	b. 弥漫性多细胞状态	1	9	2
	c. 细胞克隆形成	2	4	0
	d. 少细胞状态	3	3	0
3. 藏红O染色.	a. 正常	0	1	16
	b. 轻度减少	1	4	3
	c. 中度减少	2	10	1
	d. 严重减少	3	4	0
	e. 不着色	4	1	0
3. 潮线完整性.	a. 完整	0	11	19
	b. 血管越过	1	9	1

※ 实验侧和对照侧各20例及第28天取材时的状况

表 2 木瓜酶实验侧与对照侧组织学与组织化学累计分级

分 级	实验侧	对照侧
1	44	5
2	26	2
3	40	5
4	9	1

程。早期变性软骨细胞的胞质内有大量溶酶体样结构(图3)。脂滴增多(图4)。微丝增多,尤其多分布在细胞核周围。线粒体发生退行性改变,粗面内质网扩张并脱颗粒,可见细胞核固缩。(图1)在软骨中层可见到坏死细胞,在坏死细胞周围可见到一些软骨细胞增大,粗面内质网与线粒体均有增多的趋势。有丝分裂的细胞较易发现,这现象显然与光镜下所见的软骨细胞弥漫性增多及克隆形成之代偿性增生相当。

软骨基质的病理改变是:软骨表面不规则,有不定形物质覆盖表面,有的渗入表层。软骨基质中胶原纤维排列混乱,直径相差很大,一些纤维变得很细,而另一些却变得很粗,超过了正常纤维的直径。中层胶原纤维周期性横纹较为清晰(图2)。



图 1 实验组 软骨细胞内粗面内质网扩张，脱颗粒，细胞核浓缩。透射电镜×15000



图 2 实验组 软骨基质中胶原纤维排列混乱，直径粗细差异增大。透射电镜×50000 (3、4从略)

四、扫描电镜观察

实验侧软骨关节面出现大量小丘，可见混乱排列的纤维束，表面肿胀，高低不平，可见到火山口样结构和裂缝。断面观察可见软骨囊纤维不清晰，胶原纤维结构破坏。尚可见到纵行的裂缝。

五、软骨细胞酶组织化学光镜观察

LDH: 实验侧表层与中层一些软骨细胞 LDH 反应颗粒少，显色浅，有一些细胞则完全不见反应颗粒，但仍能见到细胞轮廓，而对照侧很难找到无反应颗粒的细胞。其余的细胞 LDH 反应两侧无明显差别。

SDH: 实验侧软骨中层一些细胞看不到反应颗粒，但细胞轮廓仍依稀可见。在这些细胞附近，尚可见到一些细胞反应强，着色深。对照侧 SDH 显色较均匀，很少见到无反应颗粒的细胞。

NsEase: 实验侧软骨中层一些细胞 NsEase 反应强，显色深，明显强于对照侧。

ALPase 和 ACpase: 它们均来自早期标本，反应了病变早期酶的变化。可见实验侧中层及下层一些软骨细胞显色较深，而对照侧软骨细胞显色均匀，颜色较淡。

G-6-PDH: 其实验侧与对照侧显色深浅差别不明显。

讨 论

关节软骨主要靠无氧酵解提供能量。正是靠乳酸脱氢酶反应，糖酵解产生的 NADH 重新氧化才得以完成。NAD 是糖胺多糖合成所必需的，因此乳酸脱氢酶的缺乏将会阻断糖酵解过程与糖胺多糖的生物合成。向动物关节腔内注射糖酵解抑制剂，可诱发产生骨关节炎。因此我们推测，当各种原因使软骨细胞受损害时，乳酸脱氢酶活性下降，导致软骨细胞能量障碍，反过来促进细胞变性坏死；并使糖胺多糖合成减少，促进骨关节炎的发生与发展。不过我们认为 LDH 活性降低是骨关节炎的“促进剂”，而不是始动因素。

软骨表面见到的火山口样结构，对于它的形成尚存在不同看法。I. C. Clark 认为是位于软骨表层的软骨陷窝收缩牵扯而造成的塌陷。韩、陈氏等认为是动物种属不同或年龄不同所致，是随着年龄增长表面基质丢失使表层纤维束暴露而致表面不规则。Ghadially 等认为是制作样品过程不慎而造成的假象。在我们实验中，实验侧关节软骨表面火山口样结构增多，结合其它病理改变，有可能是关节软骨退变的表现。但不能把该现象看做骨关节炎特有的病理变化。

木瓜蛋白酶是一种蛋白酶分解，我们用与注射关

(下转13页)



图2 “腰痛I号”对体外血栓形成重量的影响

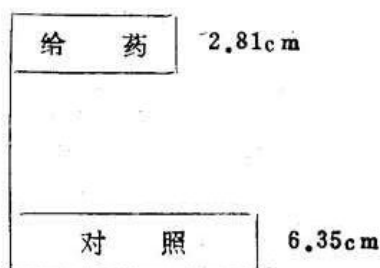


图3 “腰痛I号”对血栓形成长度的影响

2. 毛细血管通透性: 见表3

表3 “腰痛I号”对小鼠毛细血管通透性的影响

组别	皮肤兰染出现时间 $\bar{x} \pm SD$ (秒)
对照	136.8 ± 6.14
给药	173.2 ± 7.82 $p < 0.005$

3. 血中肾上腺素含量: 见表4

上述指标经重点实验, 结果一致。表明该药能够显著抑制血栓形成, 增加血中肾上腺素含量, 降低毛

表4 “腰痛I号”对小鼠血中肾上腺素的影响

组别	结果 ($\mu g\%$)	$\bar{x} \pm SD$
对照	13.38 ± 1.64	
给药	40.65 ± 7.22	$p < 0.005$

细血管通透性。

“腰痛I号”的方意是: 活血化瘀、理气软坚。临床使用于椎间盘源性急性腰腿疼病人取得了较满意的疗效。在其治疗模拟神经根炎的实验研究中, 也证实了它可以减轻炎症反应程度⁽²⁾。本实验从非特异性炎症及其抗炎机制研究的角度, 进一步探讨了“腰痛I号”对炎症的影响。

炎症本身是一个比较复杂的生理生化反应过程。不同致炎物质具有不同的炎症反应机制, 分别与白细胞趋化、前列腺素、组织胺、5-羟色胺、各种酶类等相关⁽³⁾。实验中发现该药的抗炎作用与血中肾上腺素水平增高有关, 这提示我们这个药物的抗炎消肿作用至少有一方面是通过增高血中肾上腺素含量从而影响到血管和血流, 使毛细血管通透性降低, 血液凝集状态减轻—血栓形成减小—血流通畅而引起作用的。当外周血中肾上腺素含量增高时, 使肿胀局部毛细血管收缩, 通透性降低, 减少充血, 控制了水肿发生的程度。继而, 肾上腺素又会增加局部的血流量⁽⁴⁾, 这对炎症的吸收又是有益的。药物通过肾上腺素对血管和血流量的这种“潮式”调节, 可能是其作用机制之一。

参 考 文 献

1. Э.м.МАТПИНА: ПАВР.дея., 5:26, 1961.
2. 蒋位庄等: 中西医结合杂志, 特1集:124, 1988.
3. 周重楚: 药理学进展, 抗炎免疫分册, 1982 P91.
4. H.O.席尔德: 应用药理学, 人民卫生出版社, 1983.

(上接6页)

节腔内同等浓度和pH值的木瓜蛋白酶溶液对关节软骨进行体外孵育, 然后用藏红O染色, 通过软骨基质颜色的变化估计基质糖胺多糖的减少程度, 发现30分钟左右酶作用达到高峰, 软骨层大部分变绿, 延长孵育时间, 颜色改变不明显。因此我们认为: 关节腔内注射的木瓜蛋白酶, 其主要作用限于使关节软骨基质糖胺多糖减少, 削弱了基质的抗压强度, 从而诱发骨

关节炎。但它不是一个持续存在的因素, 随着关节液与血液的交换, 它逐渐被廓清, 自身也不断代谢分解而失活。在我们实验中, 糖胺多糖的减少初期并不明显, 但呈逐渐减少的趋势, 在达到二周或二周以上才达高峰, 这种变化趋势与体外孵育是不同的, 因而也表明糖胺多糖的减少还与其它因素有关, 即可能与内源性水解酶活性升高有关。此外, 软骨细胞坏死使糖胺多糖的合成与分泌减少也是一个因素。