

· 基础研究 ·

药物干预对去卵巢大鼠关节软骨代谢的影响

高峰¹, 杜宁²

(1. 上海交通大学医学院附属瑞金医院伤科, 上海 200025; 2. 上海市伤骨科研究所)

【摘要】 目的: 观察仙灵骨葆、戊酸雌二醇片、盐酸雷洛昔芬片和硫酸氨基葡萄糖胶囊对去卵巢大鼠关节软骨代谢标志物的影响及软骨病理改变, 为临床防治妇女绝经后骨性关节炎的药物选择提供理论依据。方法: 实验采用雌性去卵巢 SD 大鼠, 分别给予仙灵骨葆、雌激素、雌激素受体调节剂、硫酸氨基葡萄糖干预, 并设假手术组。收取初始及去势后 3、5、7 周尿液, 酶联免疫吸附法测定尿中 II 型胶原 C 端肽含量。11 周后处死取膝关节做病理切片观测关节软骨面病变情况。结果: 大鼠去势后 3、5 周尿中 CTX-II 含量与去势前比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 3、5 周时雌激素组、雌激素受体调节剂组, 与模型组 CTX-II 含量比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 仙灵骨葆组与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 硫酸氨基葡萄糖组与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。病理学观察显示假手术组及各药物干预组关节软骨面病变程度与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 大鼠去势后尿中 CTX-II 含量明显增加 ($P < 0.01$), 予雌激素替代疗法、雌激素受体调节剂, 可以显著降低去势后 CTX-II 的代谢峰 ($P < 0.01$), 有雌激素样作用的中成药仙灵骨葆同样有此作用 ($P < 0.05$), 而硫酸氨基葡萄糖则无此作用。以上药物均可缓解去势后大鼠关节软骨的退变。

【关键词】 软骨, 关节; 骨关节炎; 骨质疏松, 绝经后; 中药疗法

Study on change of metabolism of articular cartilage in ovariectomized rats in the intervention of different drugs

GAO Feng*, DU Ning. *Department of Traumatology, the Ruijin Hospital Affiliated to Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China

ABSTRACT Objective: To study the influence of metabolism of articular cartilage in ovariectomized rats in the intervention of different drugs. **Methods:** Sixty-six virgin female Sprague-Dawley rats were randomly stratified into six groups: sham operation (SHAM) group, ovariectomized (OVX) group, estrogen replacement therapy (ERT) group, estrogen receptor modulator (ERM) group, Xianling Gubao (仙灵骨葆, XLGB) group, and glucosamine sulfate (GS) group. One group subjected to standard sham operation and the remaining five groups were ovariectomized. The five ovariectomized groups received treatment either with the vehicle or different drugs given as an oral suspension in the vehicle. Urine samples were obtained at initial time and weeks 3, 5 and 7 after ovariectomy. ELISA method was used to measure the concentration of collagen II degradation products (CTX-II) in the urine. At study termination, histological analysis of the knee joint was used to assess the pathological changes of the articular cartilage. **Results:** Compared with the baseline, the concentration of CTX-II at weeks 3 and 5 after ovariectomy were obviously different ($P < 0.05$). Compared with the OVX group, concentration of CTX-II in the ERT group and ERM group were significant different ($P < 0.01$). XLGB group also was obviously different with the OVX group at the two points ($P < 0.05$). And interestingly in the histological examination in the OVX group was different with all the other groups. **Conclusion:** The study indicates that estrogen deficiency accelerates destructive turnover of the collagen II in articular cartilage. The ERT, ERM, XLGB can relieve the effect. And all the drugs can delay the cartilage degradation caused by that effect.

Key words Cartilage, articular; Osteoarthritis; Osteoporosis, postmenopausal; Treatment with Chinese herbs

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2008, 21(3): 196-199 www.zggszz.com

骨性关节炎 (osteoarthritis, OA) 是中老年最常见的骨关节疾病, 流行病学研究发现: 绝经后妇女发病率显著高于男性,

低雌激素水平妇女 OA 发病率增加, 接受雌激素替代疗法 (estrogen replacement therapy, ERT) 者较未行 ERT 者发病率降低。OA 最早期病理表现为关节软骨基质的破坏。II 型胶原 C 端肽 (CTX-II, collagen II degradation products) 是 II 型胶原

通讯作者: 杜宁 Tel: 021-64370045-663336 E-mail: duning@vip.163.com

蛋白在体内的特异性代谢产物,可反映关节软骨 II 型胶原代谢情况。

本实验通过对去卵巢大鼠分别给予雌激素、雌激素受体调节剂、硫酸氨基葡萄糖以及有雌激素样作用的中成药仙灵骨葆,动态观察不同时段尿液中 CTX-II 含量变化,并观察膝关节软骨的病理学改变。比较不同干预措施对去卵巢大鼠关节软骨基质代谢情况的影响,为临床预防及缓解妇女绝经后 OA 选择经济高效的防治措施。

1 材料与方 法

1.1 动物 6 月龄雌性 SD 大鼠 66 只,由中科院上海生命科学院实验动物中心提供,体重(320±20)g。

1.2 药物 戊酸雌二醇片(Progynova,法国 Schering S.A 生产,批号 072A-2),盐酸雷洛昔芬片(Evisa,西班牙 Lilly S.A 生产,批号 A208711),仙灵骨葆胶囊(贵州同济堂制药有限公司,批号 060361),硫酸氨基葡萄糖胶囊(Viartril-S,爱尔兰罗达药厂生产,批号 C06026A)。

1.3 主要试剂及仪器 Urine Pre-clinical(PC) Cartilaps ELISA 试剂盒(Nordic Bioscience Diagnostics A/S,2CAL4000),酶标仪(Molecular Devices Corporation, BD03315),多功能生化仪(Beckman coulter,DXC800),(Leica,model:RM2235)石蜡切片机,Axionplan 2 Imaging 显微图像分析系统(Axionplan 2 多功能自动荧光显微镜,KS400 图像分析系统 Ver 3.0,AxioCam 数码相机,分辨率 3 900×3 090)。

1.4 动物分组与造模 66 只 SD 大鼠随机分 6 组,每组 11 只,分别为:假手术(SHAM)组,模型(OVX, ovariectomized)组,ERT 组,雌激素受体调节剂(ERM, estrogen receptor modulator)组,仙灵骨葆组,硫酸氨基葡萄糖(GS, glucosamine sulfate)组。除 SHAM 组外全部摘除卵巢,造成绝经后低雌激素水平模型。

1.5 各组干预方式 药物溶媒选择 1%羧甲基纤维素钠(CMC-Na),SHAM 组及 OVX 组以溶媒灌胃。药物组分别取以下剂量溶解于溶媒后灌胃:ERT 组,戊酸雌二醇片 0.8 mg·kg⁻¹·d⁻¹;ERM 组,盐酸雷洛昔芬片 3 mg·kg⁻¹·d⁻¹;GS 组,硫酸氨基葡萄糖胶囊 240 mg·kg⁻¹·d⁻¹;XLGB(仙灵骨葆)组,仙灵骨葆胶囊 270 mg·kg⁻¹·d⁻¹。各组大鼠在去卵巢前及干预后 3、5 及 7 周用代谢笼收集大鼠尿液-20℃冰箱保存。11 周后处死取右侧膝关节投入 4%多聚甲醛做病理切片。

1.6 检测指标及方法

1.6.1 CTX-II 测定 采用 Urine Pre-clinical (PC) Cartilaps ELISA 试剂盒,酶联免疫吸附(ELISA,enzyme linked immunosorbent assay)竞争法测定尿液中 CTX-II 浓度,多功能生化仪测定尿液中肌酐(Crea, creatinine)浓度,采用以下公式矫正 CTX-II 含量:

$$\text{矫正 CTX-II}(\text{mg}/\text{mmol}) = \text{CTX-II}(\mu\text{g}/\text{L}) / \text{Crea}(\text{mmol}/\text{L})$$

1.6.2 膝关节病理学观察 大鼠膝关节以 4%多聚甲醛固定 48 h,15% EDTA 脱钙 15 d,石蜡包埋,以内侧副韧带为标志作冠状面切片,甲苯胺蓝染色,图像分析软件测量股骨内外侧髁、胫骨平台内外侧 4 个关节负重区软骨面病变区(图 1,2),计算百分比:

$$\text{关节面病变百分比} = \text{病变区长度} / \text{负重关节面总长度} \times$$

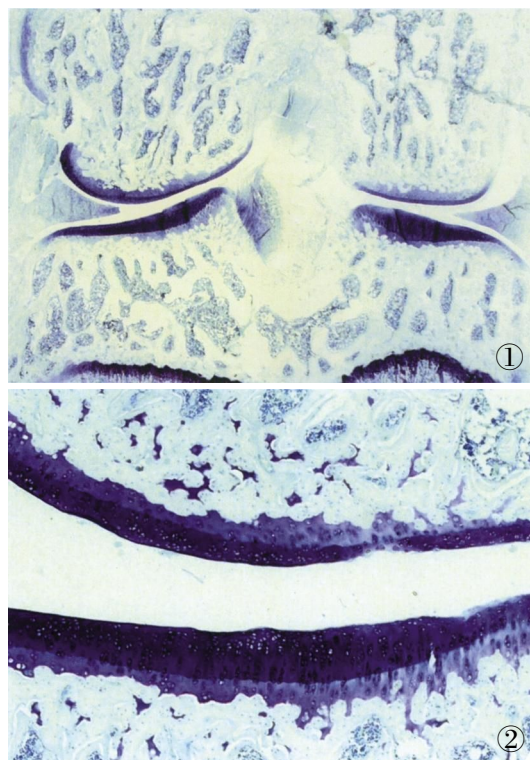


图 1,2 关节病理切片甲苯胺蓝染色 图 1 1 倍物镜,显示股骨、胫骨、半月板 图 2 5 倍物镜,显示关节面缺损

Fig.1,2 Pathological sections of knee stained with Toluidine blue Fig.1 1xObj, showed the femur, tibia, meniscus Fig.2 5xObj, showed the surface erosion

100%。

1.7 统计学处理 以 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析,各组间差异采用方差分析,各组与模型组比较、各组与假手术组比较采用 Dunnett 法,各组间比较采用 S-N-K 法。

2 结果

2.1 实验前后大鼠体重及子宫湿重 实验前后称量大鼠体重,处死取材同时取子宫称重,结果如表 1。

实验结果提示:假手术组子宫湿重组内差异大,考虑是处于不同月经周期所致。实验前后各组间体重差异无统计学意义。去势处理各组与假手术组子宫湿重差异有统计学意义($P < 0.01$),提示卵巢摘除成功。假手术组及雌激素替代组子宫湿重与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),其他处理组与模型组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),提示雌激素对子宫有刺激作用,而其他各组则无明显子宫刺激作用。

2.2 CTX-II 变化情况 由于组内个体差异较大,尿液中 CTX-II 浓度以基线浓度矫正。计算 3、5、7 周 CTX-II 浓度基线比值,各组不同时段尿液中 CTX-II 基线比值如表 2。去卵巢后各组 CTX-II 浓度基线百分比变化趋势如图 3 所示。

实验结果提示:大鼠去卵巢后尿中 CTX-II 含量明显增加($P < 0.01$),关节软骨代谢旺盛,但在 7 周内逐渐回到基线水平,予雌激素替代疗法、雌激素受体调节剂,可以显著压低下去势后 CTX-II 的代谢峰($P < 0.01$)。有雌激素样作用的中成药仙灵骨葆同样有此作用($P < 0.05$),但作用相对较弱。而硫酸氨基葡萄糖则无此作用,说明去势后雌激素水平的突然下降所引

表 1 实验前后大鼠体重及子宫湿重($\bar{x}\pm s$)

Tab.1 Body weight at start and end & uterus weight ($\bar{x}\pm s$)

组别	初体重(g)	终体重(g)	子宫湿重(g)
假手术组(SHAM 组)	329.1±4.9	362.9±7.4	0.988±0.111 ^{△△}
雌激素替代疗法组(ERT 组)	322.8±3.4	360.8±8.1	0.418±0.023 ^{**△△}
盐酸雷洛昔芬片组(ERM 组)	320.9±7.3	348.4±7.6	0.238±0.014 ^{**}
硫酸氨基葡萄糖胶囊组(GS 组)	323.6±4.9	370.5±8.7	0.142±0.020 ^{**}
仙灵骨葆组(XLGB 组)	319.1±7.0	361.2±4.5	0.180±0.013 ^{**}
模型组(OVX 组)	320.0±7.1	358.0±9.3	0.124±0.009 ^{**}

注:与假手术组比较, ** $P<0.01$, * $P<0.05$;与模型组比较, ^{△△} $P<0.01$, [△] $P<0.05$

Note: Compared with SHAM group, ** $P<0.01$, * $P<0.05$; compared with OVX group, ^{△△} $P<0.01$, [△] $P<0.05$

表 2 各组不同时间点尿液中 CTX-II 基线比值($\bar{x}\pm s$)

Tab.2 Ratio of CTX-II baseline level in the 6 groups at different points ($\bar{x}\pm s$)

组别	CTX-II 基线比值		
	3 周	5 周	7 周
SHAM	2.208±0.564 ^{**}	1.989±1.049 ^{**}	1.330±0.705
ERT	2.930±0.616 ^{**△△}	2.529±0.574 ^{**}	1.611±0.480
ERM	3.693±0.591 ^{**△△△}	2.293±0.483 ^{**}	0.981±0.248
GS	7.485±1.061 ^{△△}	4.727±0.796 ^{△△}	2.074±0.624
XLGB	5.696±1.210 ^{*△△}	3.431±0.796 ^{*△}	1.487±0.379
OVX	9.254±0.895 ^{△△}	6.906±3.808 ^{△△}	2.571±0.311

注:与同时点模型组比较, ** $P<0.01$, * $P<0.05$;与同组基线比较, ^{△△} $P<0.01$, [△] $P<0.05$

Note: Compared with OVX group at the same point, ** $P<0.01$, * $P<0.05$; compared with baseline level in the same group, ^{△△} $P<0.01$, [△] $P<0.05$

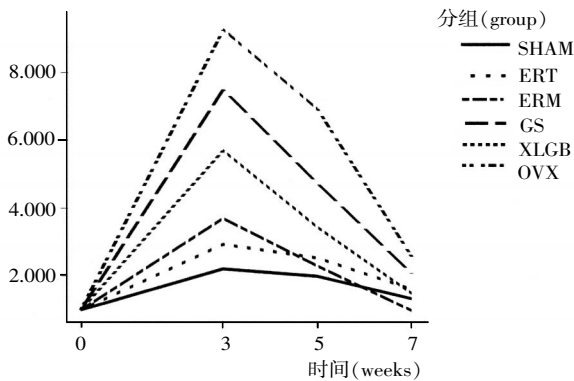


图 3 各组 CTX-II 基线比值变化情况(注:与同时点模型组相比较, ** $P<0.01$, * $P<0.05$)

Fig.3 Ratio of CTX-II baseline level at different points (note: compared with OVX group at the same point, ** $P<0.01$, * $P<0.05$)

起的 II 型胶原破坏,可能为 OA 发病的始动因素之一,而雌激素替代疗法以及有雌激素样作用雌激素受体调节剂和中成药有预防及缓解此病理过程的作用。

2.3 病理学观察 膝关节关节面破坏百分比结果如下: SHAM 组为 2.781±0.483, ERT 组为 4.171±0.723, ERM 组为 5.412±0.830, GS 组为 4.937±0.446, XLGB 组为 5.411±0.527, OVX 组为 7.721±0.530。实验结果提示:大鼠去势后,关节软骨退变加重($P<0.01$)。各药物组均可延缓关节软骨的退变,与模型组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 关节软骨代谢标志物 CTX-II 软骨由软骨细胞、基质、

水分构成。软骨基质包括胶原、蛋白聚糖和非胶原蛋白。主要为 II 型胶原,且几乎只存在于软骨中,为软骨的主要结构成分,当组织重建或修复状态时,II 型胶原降解代谢加快,在蛋白酶的作用下,II 型胶原裂解产生 C-端肽(CTX-II),且其完全来自成熟的结构性胶原(非新合成的),以小肽形式进入尿液。EKGDP 小肽(Cartilaps)源自 CTX-II 的中间区域,是蛋白溶解产生的有 6 个氨基酸序列的线性表位,只存在于 II 型胶原。通过测量体液中 EKGDP 小肽的浓度可了解 CTX-II 水平,从而间接反映软骨代谢状况^[1]。

3.2 雌激素与骨性关节炎 绝经后妇女 OA 发病率高于男性,低雌激素水平妇女 OA 发病率增加,提示雌激素在 OA 发病中起作用^[2]。而对于雌激素替代疗法(ERT),Ham 等长期观察雌性去卵巢猕猴模型,发现长期的 ERT 可缓解 OA,但认为其主要是通过抑制软骨下骨及干骺端骨转换指数来起作用的,而对关节软骨的直接作用不明显^[3]。Høegh-Andersen 等^[4]观察到去卵巢大鼠尿中 CTX-II 含量明显增多,且 ERT、ERM 可抑制 II 型胶原的降解。中成药仙灵骨葆胶囊主要治疗肝肾不足、瘀血阻络所致骨质疏松症,其有效成分为植物雌激素淫羊藿苷,研究表明其可提高性腺及促进性激素的反应性。有报道其有缓解摘除卵巢所诱导的大鼠髌关节肌肉骨骼组织退变的作用,而对子宫无作用^[5],对关节软骨的直接作用缺乏相关报道。

3.3 硫酸氨基葡萄糖 为临床对骨性关节炎疗效较为确切的口服药物,主要作用于软骨基质蛋白多糖,其有介导抑制 IL-1、NO、iNOS、COX-2 及 IL-6 的作用,且能诱导基底膜蛋白多糖和聚集蛋白聚糖 mRNA 的水平上升,还能温和而持久地

人工髋关节置换术后的临床康复体会

赵雪圆, 李瓦里, 房伟

(天津中医药大学第一附属医院骨科, 天津 300193)

关键词 关节成形术, 置换, 髋; 康复; 手术后并发症

Clinical studies on postoperative rehabilitation for total hip replacement ZHAO Xue-yuan, LI Wa-li, FANG Wei. Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China

Key words Arthroplasty, replacement, hip; Rehabilitation; Postoperative complications

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2008, 21(3):199-201 www.zggszz.com

随着人工全髋关节置换术(THR)的广泛应用, 术后康复日益受到重视, 精湛的手术技术只有结合完美的术后康复治疗^[1], 才能获得最理想的效果。THR 术后康复是很复杂的问题, 它不但与疾病本身有关, 也与手术操作技术、患者的信心、精神状态以及对康复治疗的配合程度密切相关。

THR 术后康复措施的目的在于促进患者恢复体力, 增强肌力, 增大关节活动度, 恢复日常生活活动的协调性。康复计划的制订必须遵循个体化、渐进性、全面性 3 大原则^[2]。功能锻炼时应注意运动量的控制, 一般认为功能锻炼后如局部出现疼痛、肌肉僵硬, 经休息 30 min 或服用阿司匹林仍不能缓解, 应考虑活动过量。

1 康复前的评价

由于手术本身直接影响术后康复计划, 康复人员必须了

解手术的详细情况^[3]。

1.1 假体的位置 假体应按正常解剖位置放入, 理想的髋臼假体位置是前倾 $15^{\circ} \pm 10^{\circ}$, 外翻 $40^{\circ} \pm 10^{\circ}$, 股骨假体旋前 $5^{\circ} \sim 10^{\circ}$ 。如髋臼前倾过多, 则在外旋、内收伸直位时不稳; 如髋臼前倾不够, 则在屈曲、内收内旋位时不稳; 如髋臼外翻过多, 则在屈曲 60° 、内收内旋位时不稳; 如髋臼外翻不够, 则在极度屈曲内收内旋位时易发生假体间撞击。如股骨假体前倾过多, 则在伸展、内收和外旋位时不稳。如股骨假体前倾不够, 则在极度屈曲内收和内旋位时不稳。康复训练人员, 只有了解假体位置的优劣, 才能很好地指导患者活动, 因而能避免训练时发生脱位等并发症。

术中置入假体后, 应常规检查屈曲、外展及外旋 3 方向上髋关节的稳定性, 如在某方向上不稳, 术中应立即寻找原因

降低人 OA 软骨细胞中 MMP-3 mRNA 的表达^[6], 最近有学者通过体外实验发现其通过抑制脂肪氧化酶作用防止软骨细胞胶原降解^[7]。其对雌激素水平下降所致软骨降解代谢影响研究较少。

本实验证实了雌激素骤然下降会引起软骨 II 型胶原降解增加的观点, 该效应可能为绝经后妇女 OA 发病的始动因素之一, 而 ERT 抑制此效应作用明显, 但对子宫刺激作用大。同时观察到 ERM 及富含植物雌激素的中成药仙灵骨葆对该效应亦有抑制作用, 且对子宫无明显刺激作用, 为临床工作中观察到对软骨保护作用提供支持。而硫酸氨基葡萄糖对该效应则无明显抑制作用。后期关节软骨的病理改变可能为此效应基础上关节应力等多种因素的结果, 因此观察到硫酸氨基葡萄糖虽然对去势后 II 型胶原降解一过性增加无抑制作用, 但可缓解后期关节软骨的病理改变, 其可能是通过其他途径作用, 而各药物的作用机制, 尚有待进一步研究。

参考文献

1 Lohmander LS, Atley LM, Pietka TA, et al. The release of crosslinked peptides from type II collagen into human synovial fluid is increased soon after joint injury and in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(11):3130-3139.

2 Sowers MR, McConnell D, Jannausch M, et al. Estradiol and its metabolites and their association with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(8):2481-2487.

3 Olson EJ, Lindgren BR, Carlson CS. Effects of long-term estrogen replacement therapy on the prevalence and area of periarticular tibial osteophytes in surgically postmenopausal cynomolgus monkeys. *Bone*, 2007, 41(2):282-289.

4 Høegh-Andersen P, Tankó LB, Andersen TL, et al. Ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoarthritis: validation and application. *Arthritis Res Ther*, 2004, 6(2):R169-180.

5 Qin L, Zhang G, Hung WY, et al. Phytoestrogen-rich herb formula "XLCB" prevents OVX-induced deterioration of musculoskeletal tissues at the hip in old rats. *J Bone Miner Metab*, 2005, 23 Suppl:55-61.

6 Dodge GR, Jimenez SA. Glucosamine sulfate modulates the levels of aggrecan and matrix metalloproteinase-3 synthesized by cultured human osteoarthritis articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 2003, 11(6):424-432.

7 Tiku ML, Narla H, Jain M, et al. Glucosamine prevents in vitro collagen degradation in chondrocytes by inhibiting advanced lipoxidation reactions and protein oxidation. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9(4):R76.

(收稿日期: 2007-12-05 本文编辑: 李为农)