

# 云克针剂诱导兔骨关节炎模型软骨修复的实验研究

曾俊华<sup>1</sup> 何承建<sup>1</sup> 李胜利<sup>1</sup>

**[摘要]** **目的:**建立兔膝骨关节炎模型,通过在兔膝关节腔内注射云克(99TC-MDP)针剂,观察兔膝关节内软骨病理学结构的改变。**方法:**32 只体质量(2.0±0.2)kg 健康新西兰成年大耳雄性白兔随机分为正常组、空白对照组、静脉注射组、关节腔注射组。正常组不予处理,空白对照组、静脉注射组、关节腔注射组通过对兔膝关节内侧半月板前 1/3 切除及前交叉韧带(ACLT)切断制备骨关节炎(OA)模型法造模。静脉注射组模型每日静脉注射云克针剂 0.2 mL,连续 5 周;关节腔注射组模型每周膝关节腔内注射云克针剂 0.2 mL,1 周 1 次,给药 5 周,正常组、模型组不予处理。第 6 周观察各组软骨细胞病理学变化。**结果:**苏木精-伊红染色观察,正常组关节软骨 Mankin 评分高于空白对照组、静脉注射组、关节腔注射组;静脉注射组、关节腔注射组关节软骨病理评分高于空白对照组;静脉注射组、关节腔注射组关节软骨 Mankin 评分差异无统计学意义( $P<0.05$ )。电镜超微结构观察静脉注射组、关节腔注射组细胞形态改变轻于模型组;静脉注射组、关节腔注射组之间形态结构相似。**结论:**云克针剂关节腔内注射与静脉注射均能对兔膝骨关节炎有治疗作用,能有效延缓关节软骨退变进程。

**[关键词]** 云克;骨关节炎;软骨;病理学

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2018)12-0001-04

## Experimental Study on the Repair of Cartilage in Rabbit Osteoarthritis Model Induced by 99TC-MDP Injection

ZENG Junhua<sup>1</sup> HE Chengjian<sup>1</sup> LI Shengli<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hubei Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China.

**Abstracts Objective:** To observe the pathological change of cartilage by injection of 99TC-MDP into knee-joints of rabbit with knee osteoarthritis (KOA). **Methods:** All 32 male New Zealand big-eared white rabbits were randomly divided into normal group, model group, intravenous injection group and intraarticular injection group. No intervention was imposed on the normal group, while other groups received the treatment of the first 1/3 of the medial meniscus resection of the rabbit knee and the anterior cruciate ligament transaction (ACLT). No other treatment on the normal group and model group. The intravenous injection group was daily given 99TC-MDP injection of 0.2 mL into rabbit vein for 5 weeks. The intraarticular injection group was given 99TC-MDP injection of 0.2 mL into rabbit knee-joints once a week for 5 weeks. At the sixth week, the pathological changes were observed under the microscope. **Results:** HE stains showed that normal group was better than the other three groups in Mankin scores. The intravenous injection group and the intraarticular injection group was better than the model group in Mankin scores. There was no statistically significant difference between the intravenous injection group and the intraarticular injection group. Ultrastructure of cartilage cells of the two groups treated by 99TC-MDP was better than the model group. There were no differences between the intravenous injection group and the intraarticular injection group. **Conclusion:** Injection of 99TC-MDP into rabbit knee-joints can be used to treat rabbit osteoarthritis and effectively delay the process of articular cartilage degeneration.

**Keywords:** 99TC-MDP; osteoarthritis; cartilage; pathology

膝骨关节炎(Knee Osteoarthritis, KOA)发病率占全身骨性关节炎的首位,系由老年关节软骨无菌性炎症、慢性退行性变、进行性侵犯等引起的膝关节疾

患。膝关节退变以关节内软骨损伤为主要因素。云克(99TC-MDP)为锝[99Tc]亚甲基二膦酸盐注射液,适用于类风湿性关节炎等自身免疫性疾病及骨科疾病,对关节内软骨修复方面有一定修复作用。目前,临床上主要以静脉注射云克针剂治疗骨关节炎,尚未检索

<sup>1</sup> 湖北省中医院(武汉,430061)

到关节腔内注射云克治疗骨关节炎的相关文献,因此本研究在兔膝骨关节模型中注射云克,通过病理学观察研究关节内软骨的变化,探寻云克针剂关节腔内注射是否能修复兔膝骨关节软骨,为云克关节腔内注射治疗膝骨关节炎临床提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康普通级新西兰成年大耳雄性白兔 32 只,体重(2.0±0.2)kg,由武汉大学动物实验中心提供,动物合格证号:SCXK(鄂)2015-0004. 湖北中医药大学动物实验中心负责喂养,环境温度 20~25℃,湿度 40%~60%. 光照每日 12 h/d,每天用 84 消毒液消毒饲养室 1 次。实验对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》相关规定。

1.2 实验仪器、试剂

仪器:TB-718 生物组织自动包埋机(湖北泰维医疗科技有限责任公司),TK-218II 型恒温摊片烤片机(湖北泰维医疗科技有限责任公司),TC-120S 智能程控生物组织自动脱水机(广州瑞川科学仪器公司),LEICARM 2135 型石蜡切片机(广州三元科技有限公司),Olympus BX-51 显微镜(北京瑞尔欣德科技有限公司),H-600 型透射电镜(日本日立),佳能照相机(日本佳能)。

试剂:生理盐水注射液(中国大冢,批号 4L7Gj2),利多卡因(中国大冢,批号 5F84J1),云克(成都云克药业有限公司,批号:A,150827;B,1509029),庆大霉素(湖北华中,批号 5140718)。

1.3 方法

1.3.1 动物分组 32 只新西兰成年大耳雄性白兔随机分为 4 组,包括:正常组、空白对照组、静脉注射组、关节腔注射组,每组 8 只。

1.3.2 造模方法 空白对照组、静脉注射组、关节腔注射组采用 Hulth 法造模<sup>[1]</sup>。3%戊巴比妥钠静脉麻醉(1 mL/kg),备皮、右后侧膝关节消毒,关节内侧做一纵行 1.5 cm 切口,逐层分离止血,暴露关节腔,双氧水、活力碘、生理盐水冲洗,游离内侧半月板前 1/3 剪除,直视下将前交叉韧带剪断,双氧水、活力碘再次冲洗后逐层缝合。术后庆大霉素 4.0×10<sup>6</sup>U 肌注 3 d 预防感染。

1.3.3 造模后处理 正常组、空白对照组不予处理;

静脉注射组每日静脉注射云克针剂 0.2 mL,连续 5 周;关节腔注射组模型每周膝关节腔内注射云克针剂 0.2 mL,1 周 1 次,给药 5 周。第 6 周处死各组动物。

1.4 观察项目及方法

1.4.1 苏木精-伊红染色观察及方法 取材后,将右膝内侧胫骨平台用 4%多聚甲醛固定,脱钙,脱水,修整成为 5 mm×5 mm×5 mm 大小,石蜡包埋,切片机切成厚度为 4 μm 左右,脱蜡后逐级脱水,苏木精-伊红染色,封片,光镜下观察软骨病理学改变,拍照后按软骨病变组织学 Mankin 评分标准<sup>[2]</sup>评分。

1.4.2 透射电镜观察及方法 取股骨内侧髌关节面约 2 mm 厚关节软骨标本,用 0.1 mol 磷酸缓冲液漂洗 3 次,然后依次用 1%钨酸-1.5%亚铁氰化钠溶液固定 1 h;0.1 mol 磷酸缓冲液漂洗 3 次;使用梯度酒精脱水(50%,70%,80%,95%,100% 2 次),每次 15 min;完成后 60℃环氧树脂浸泡包埋,纯丙酮脱水 2 次,每次 15 min. EPON812:丙酮(1:1)浸透 30 min,纯包埋液浸透 1 h,纯包埋液固化 37℃,24 h 后 60℃48 h,超薄切片机切片,厚 600~700 nm. 最后使用醋酸双氧铀,枸橼酸铅染色。染色完成后在 H-600 型透射式电子显微镜下观察,采集图片。

1.5 统计学方法

数据统计使用 SPSS19.0 软件,关节病变软骨采用 Mankin 评分,变量符合单向有序列联表,数据统计采用秩和检验,四组间采用 Kruskal-Wallis 检验,两两之间采用 Mann-Whitney U 检验。 $P<0.05$  差异有统计学意义<sup>[3]</sup>。

2 结果

2.1 云克关节内注射对兔骨关节炎关节软骨的影响

四组之间采用 Kruskal-Wallis 检验, $H$  值为 24.26, $P<0.01$ ,说明各组之间软骨 Mankin 评分之间差异有统计学意义。两两各组之间比较采用 Mann-Whitney U 检验,空白对照组、静脉注射组、关节腔注射组兔膝关节软骨 Mankin 评分明显比正常组高,差异有统计学意义( $P<0.01$ ),说明 Hulth 法造模后兔关节软骨出现明显病理改变。静脉注射组、关节腔注射组兔膝关节软骨 Mankin 评分又明显低于空白对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),提示静脉内和关节内注射云克针剂可以延缓兔膝关节软骨的病理改变;静脉注射组、关节腔注射组兔膝关节软骨 Mankin 评分之间差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表 1。

表 1 各组兔膝关节软骨病理学 Mankin 评分比较(例)

Mankin 评分标准	正常组	空白对照组	静脉注射组	关节腔注射组	合计
表面完整(1 分)	8	0	0	1	8
表面略粗糙(2 分)	0	0	4	4	9
明显粗糙,糜烂(3 分)	0	2	3	3	8
极度糜烂,软骨下骨暴露(4 分)	0	6	1	0	7

## 2.2 苏木精-伊红染色观察

正常组:关节表面光滑,软骨细胞排列整齐,软骨细胞形态正常,潮线清晰可见,基质完整,见图 1。空白对照组:关节软骨层状结构消失,软骨表面细胞破损严重、出现大量剥脱缺损,已达深层,软骨细胞团状分布,间质内有血管翳生成,见图 2。静脉注射组:软骨表面较连续,软骨细胞增生、肥大,总体形态正常,细胞排列无序,比较紊乱,有细胞成簇现象,有少量血管翳生成,见图 3。关节腔注射组:基本情况同对照组,见图 4。

## 2.3 透射电镜观察

正常组:软骨细胞细胞膜有典型的扇蛤样改变,胞

核为类圆形,染色质分布均匀,细胞器清晰可见,胞质内有粗面内质网、线粒体及高尔基复合体等,见图 5。空白对照组:软骨细胞形态不清晰,部分细胞核有凝固、碎裂现象,细胞器结构不清晰,线粒体肿胀,胞质内有大量囊泡状结构和脂滴,细胞周围胶原纤维排列混乱或减少,见图 6。静脉注射组:软骨细胞形态基本正常,较正常软骨细胞小,细胞核外形不规则,核膜不清晰,有分离现象,胞膜出现不连续现象,胞浆有丢失现象,有粗大的胶原纤维直接紧靠细胞膜,排列紊乱,见图 7。关节腔内注射组:软骨细胞形态基本同对照组,见图 8。

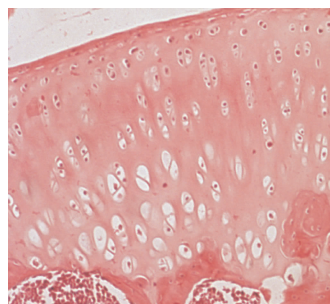


图1 关节表面光滑,软骨细胞排列整齐,软骨细胞形态正常,无软骨细胞聚集,潮线清晰可见,基质完整(40×)

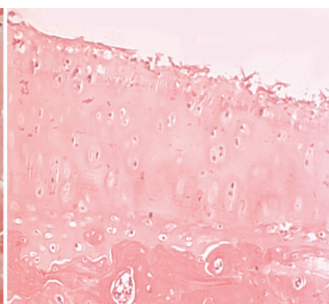


图2 关节软骨层状结构消失,软骨表面细胞破损严重、出现大量剥脱缺损,部分已达深层,软骨细胞团状分布,间质内有血管翳生成(40×)

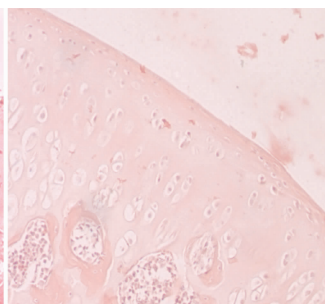


图3 软骨表面较连续,软骨层变薄,软骨细胞增生、肥大,总体形态正常,细胞排列无序,比较紊乱,有细胞成簇现象(40×)

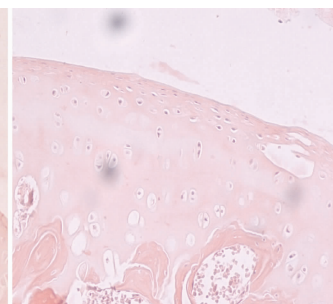


图4 基本情况同图3(40×)

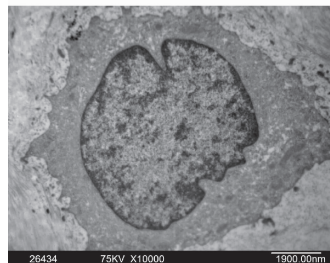


图5 软骨细胞细胞膜有典型的扇蛤样改变,胞核为类圆形,染色质分布均匀,细胞器清晰可见,胞质内有粗面内质网、线粒体及高尔基复合体等(10 000×)

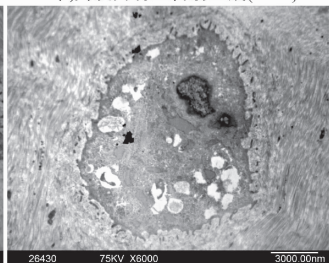


图6 软骨细胞形态不清晰,部分细胞核有凝固、碎裂现象,细胞器结构不清晰,线粒体肿胀,胞质内有大量囊泡状结构和脂滴,细胞周围胶原纤维排列混乱或减少(6 000×)

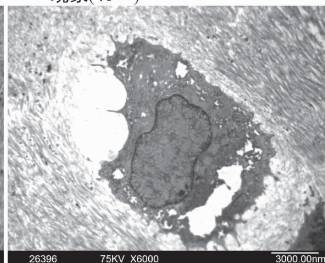


图7 软骨细胞形态基本正常,较正常软骨细胞小,细胞核外形不规则,核膜不清晰,有分离现象,有粗大的胶原纤维直接紧靠细胞膜(6 000×)



图8 软骨细胞形态基本同对照组(6 000×)

## 3 讨论

骨关节炎是一种累及关节软骨、软骨下骨、滑膜组织的退行性疾病,主要病因由遗传、机械性损伤、年龄等因素所致,尚不完全清楚。保守治疗方法很多,但均有一定局限性<sup>[4]</sup>。临床上暂未见有关节腔内注射云克针剂治疗骨关节炎的报道,本研究建立兔骨关节炎模型,通过关节腔内注射云克,取得良好的效果,为云克针剂关节腔内注射治疗骨关节炎提供实验依据。

骨关节炎模型的建立有多种方法<sup>[5]</sup>,大致分为关节制动法、关节腔内药物注射法、前交叉韧带切断法、半月板切除法、Hulth 法、转基因法<sup>[6]</sup>、破坏关节周围血管、肌肉等方法。本实验因不涉及到细胞因子等方面的研究,所以采用了 Hulth 法,即 ACLT 及内侧半月板前 1/3 切除方法。此方法为经典手术造模方式,方锐等<sup>[7]</sup>采用此方法研究发现在不同的时期可以出现不同的关节软骨病理改变,可以比较全面的反映软骨

退变的整个病理过程。本实验模型第 6 周处死后关节面肉眼观察与苏木精-伊红染色均显示 OA 的中期病理改变,软骨病理组织学 Mankin 评分比较,正常组与空白对照组、静脉注射组、关节腔注射组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),说明该制作方法周期短,制作可靠,是研究骨性关节炎软骨退变的理想模型。

云克(99TC-MDP)为高锝[99Tc]酸钠注射液中的锝[99Tc]被注射用亚锡亚甲基二膦酸盐中的亚锡还原后,与亚甲基二膦酸(MDP)形成的络合物。该药具有毒性低、适应症广、起效快等特点,在临床上有广泛的应用<sup>[8]</sup>。Jia 等<sup>[9]</sup>使用 99TC-MDP 来区别骨的不良恶性肿瘤。Su 等<sup>[10]</sup>发现 99TC-MDP 可以通过细胞因子、淋巴细胞来改善类风湿性关节炎的症状,并取得了良好的临床疗效。Zhao 等<sup>[11]</sup>发现 99TC-MDP 配合中药可以治疗骨质疏松症。许雪莲<sup>[12]</sup>联用云克、甲胺嘌呤和来氟米特治疗活动期类风湿性关节炎优良率达到

了76%。胡炳彦等<sup>[13]</sup>用云克针剂治疗骨性关节炎,发现IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 水平明显下降。其可能的机制有:1)防止病理复合物的产生、阻止自由基对人体的破坏;2)通过抑制前列腺素(PGE1、PGE2)和组胺的产生,起到消炎镇痛的效果;3)抑制白介素1(IL-1)的产生,消除炎症;4)降低金属蛋白酶(MMP)的活性,修复软骨组织;5)抑制破骨细胞活性并促进成骨细胞分裂。本实验通过关节内注射,使药物充分的聚集在关节腔内,具有明确的靶向性,云克可以蓄积在关节内长期的发挥治疗作用,为关节腔内注射的可行性提供理论依据。

关节软骨细胞在骨代谢、力学传导及退变过程中发挥着重要作用<sup>[14]</sup>。光镜下观察空白静脉注射组、关节腔注射组软骨细胞形态基本正常;空白对照组软骨细胞明显减少,出现双侧甚至多重潮线,软骨层变薄,软骨基质遭到破坏,损伤明显。代康等<sup>[15]</sup>研究表明,软骨表面损伤后多种细胞因子、自由基等到达软骨细胞周围,进一步加重退变及损伤。电镜超微结构观察到静脉注射组、关节腔注射组软骨细胞大部分形态正常,细胞内细胞器改变轻微,细胞周围胶原纤维较丰富;空白对照组软骨细胞形态不规则,细胞核不规则,体积稍有缩小,细胞器聚集或消失,线粒体肿胀,细胞周围胶原纤维排列混乱或减少。说明软骨细胞已经明显出现代谢异常,随着关节炎进一步进展,软骨细胞会出现固缩、坏死样等不可逆改变,这种软骨细胞的破坏和凋亡对骨关节炎的进展至关重要<sup>[16]</sup>。有研究<sup>[17]</sup>证实云克可促进骨修复并增加动物模型的关节间隙,与本文的结论相一致。静脉注射组、关节腔注射组病理改变上没有明显差异,说明云克针剂关节腔内注射的治疗效果与静脉注射基本相同,这是一种新的给药途径,不仅可以减少药物的使用,减轻药物的不良反应,还可以使药物直达病所,发挥最大治疗效果。本实验从病理学上证实了云克关节腔内注射治疗骨性关节炎能促进损伤软骨的自我修复,延缓兔膝关节模型的关节软骨退变进程,但目前未检索到云克通过某种信号通路调控关节软骨细胞增殖、分化、凋亡的文献,还需设计高质量的随机对照试验,论证云克针剂关节腔内注射治疗骨关节炎的作用机制。

## 参考文献

- [1] 李炳辉,牛东生,孙玺淳,等.直立负重法与Hulth法建立兔膝关节炎模型的对比研究[J].宁夏医科大学学报,2013,35(3):256-258.
- [2] Zhang Q, Lv H, Chen A, et al. Efficacy of infliximab in a rabbit model of osteoarthritis[J]. Connective Tissue Research, 2012, 53(5): 355-358.

- [3] 刘桂芬.医学统计学[M].2版.北京:中国协和医科大学出版社,2007.
- [4] 张杰,王人彦,张玉柱.膝关节炎的治疗进展[J].中医正骨,2015,27(10):68-70.
- [5] 何名江,张洪美,荆琳,等.骨关节炎动物模型:谁最适宜你的研究[J].中国组织工程研究,2013,17(46):8069-8074.
- [6] 曹斌,李彦林,李晓林,等.骨关节炎的转基因动物模型[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(7):1269-1272.
- [7] 方锐,艾力江·阿斯拉,卢勇,等.兔骨性关节炎模型构建及早中晚期的特点[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(7):1218-1222.
- [8] 黄晓杰,黄建敏,解朋.云克临床应用新进展[J].承德医学院学报,2015,36(4):341-344.
- [9] Jia ZY, Deng HF. Preliminary application of <sup>99</sup>Tc(m)-MIBI scintigraphy for judgment of bone malignant and benign lesions[J]. J Sichuan Univ: Med Sci Edition, 2007, 38(4): 689-692.
- [10] Su D, Shen M, Gu B, et al. Tc-methylene diphosphonate improves rheumatoid arthritis disease activity by increasing the frequency of peripheral gammadelta T cells and CD4 CD25 Foxp3 Tregs[J]. Int J Rheum Dis, 2016, 19(6): 586-593.
- [11] Zhao GD, Gao KJ, Tian YM, et al. Experimental study of Gukangling Decoction combined with technetium [<sup>99</sup>Tc] methylene diphosphonate injection in treating osteoporotic rabbits[J]. J Chin Integr Med, 2008, 6(3): 298-303.
- [12] 许雪莲.联用云克、甲胺嘌呤和来氟米特治疗活动期类风湿性关节炎的效果观察[J].当代医药论丛,2015,13(15):173-174.
- [13] 胡炳彦,孟作龙,何柏林,等.<sup>99</sup>Tc-MDP(云克)治疗骨关节炎的临床研究[J].甘肃医药,2015,34(1):31-33.
- [14] 段王平,孙振伟,卫小春.关节软骨中最基本的解剖功能结构:软骨单位[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(24):4557-4560.
- [15] 代康,焦凯,王美青.细胞因子在骨关节炎软骨病变中的作用[J].国际口腔医学杂志,2012,39(4):491-493.
- [16] 沙湖,杨莉.骨关节炎病理变化研究进展[J].实用医院临床杂志,2011,8(2):180-183.
- [17] Zhou Y, Zhuo XX, Luo H, et al. The protective effect on joint destruction of <sup>99</sup>Tc-MDP and its effect on tumor necrosis factor alpha in rat collageninduced arthritis[J]. Clin J Rheumatol, 2007, 11: 280-283.

(收稿日期:2018-07-11)