

骨化三醇对大鼠骨性关节炎关节软骨及软骨下骨的影响

杨勇 吴世栋 张小钰 金群华

中图分类号: R31 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)05-0333-05

摘要:目的 观察骨化三醇对大鼠前交叉韧带切断术后膝关节软骨及软骨下骨的影响,探讨软骨下骨在骨性关节炎发病中的作用。方法 取SD大鼠64只分成4组,前交叉韧带切断组(ACLT组)、前交叉韧带切断+骨化三醇给药组(ACLT+cal组)、假手术组(sham组)、假手术+骨化三醇给药组(sham+cal组)。给药术后第2天给骨化三醇 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃,ACLT组和sham组给予安慰剂灌胃,持续2周。每组分别于术后2周和10周取材,胫骨近端切片后,行HE、AB-PAS染色、MMP-13免疫组化及骨形态计量学分析。结果 HE、AB-PAS染色、MMP-13免疫组化及骨形态计量学参数测量显示,2周时ACLT组与sham组相比早期有软骨下骨量减少,ACLT+cal组较ACLT组软骨下骨量增多($P < 0.05$)。10周时ACLT组软骨明显退变改变、软骨下骨增生及MMP-13表达增强,ACLT+cal组软骨退变及软骨下骨增生均较ACLT组减轻($P < 0.01$)。MMP-13表达较ACLT组降低($P < 0.05$)。结论 软骨下骨在骨性关节炎病变进展中发挥重要作用,骨代谢调节剂骨化三醇可减缓OA进展中软骨下骨硬化,对关节软骨有一定保护作用。

关键词: 骨性关节炎; 骨化三醇; 软骨下骨; 骨组织形态计量学

The effect of calcitriol on articular cartilage and subchondral bone changes in rat anterior cruciate ligament transaction YANG Yong, WU Shidong, ZHANG Xiaoyu, et al. Department of Orthopedics, The Affiliated Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

Abstract: **Objective** To observe calcitriol on cartilage and subchondral bone in the rat anterior cruciate ligament transaction model, and assess the role of subchondral bone in the etiology of osteoarthritis(OA). **Method** Sixty-four rats were divided into four groups: anterior cruciate ligament transaction(ACLT), ACLT+calcitriol(ACLT+cal), sham and sham+cal. After operation, rats in group ACLT+cal and sham+cal received calcitriol $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ intragastric administrationally every day for the following 2 weeks. The rats were sacrificed at 2 weeks and 10 weeks postsurgery, and the tibial plates were harvested which were studied in both pathohistological and bone histomorphometric analysis. At the same time Coimmunostaining for matrix metalloproteinase 13(MMP-13) was performed to investigate the progression of cartilage degradation. **Result** At 2 weeks postsurgery, the bone volume in ACLT group is less than Sham group, and the bone volume is more in ACLT+cal group than in ACLT group($P < 0.05$). At 10 weeks postsurgery, degeneration of articular cartilage in ACLT group got worse significantly, and the subchondral bone were hyperostosis. In ACLT+cal group, not only the hyperostosis of subchondral bone are less than in ACLT group, the Mankin score of cartilage are lower as well($P < 0.01$). MMP-13 expressions were significantly higher in ACLT+cal group than those in ACLT group($P < 0.05$). **Conclusion** Subchondral bone plays an important role in the pathogenesis of OA. Calcitriol could be used to aggregate the subchondral bone hyperostosis in the progression of OA. It could also protect the Articular Cartilage partially.

Key words: Osteoarthritis; Calcitriol; Subchondral bone; Histomorphometry

作者单位: 750004 银川,宁夏医科大学在读硕士(杨勇、吴世栋、张小钰),附属医院骨科(金群华)

通讯作者: 金群华, Email: jinqunhua@sina.com

骨性关节炎(osteoarthritis, OA)是中老年最常见的疾病之一,严重影响老年患者生活质量。其病变不仅累及关节软骨,它可累及可动关节周围的几乎全部组织,包括软骨、软骨下骨、滑膜、肌腱韧带等。

最终表现为软骨软化、纤维化、溃疡及软骨下骨硬化象牙化、骨赘形成和软骨下骨囊肿。认识软骨下骨在 OA 发生发展中的变化及作用,有助于进一步了解 OA 的发病机制,为防治提供更多的思路。本实验通过前交叉韧带切断术建立大鼠骨关节炎模型,观察骨代谢调节剂骨化三醇(calcitriol)对大鼠骨关节炎中关节软骨和软骨下骨的影响,探讨软骨下骨在 OA 发病中的作用。

1 材料和方法

1.1 造模及分组

64只20周龄SD大鼠,体重400~450g,购自宁夏医科大学实验动物中心。取其中32只行右膝前交叉韧带切断术,术后随机分为模型组(ACLT)和模型给药组(ACLT+cal),另32只仅打开关节囊,生理盐水冲洗后逐层关闭切口,分为假手术组(sham)和假手术给药组(sham+cal),每组16只。ACLT+cal和sham+cal组于术后第2天给予骨化三醇(上海罗氏制药有限公司)灌胃,剂量 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,Sham组和ACLT组用等体积的谷物油稀释剂(不含VitD及其类似物)灌胃。持续给药2周。自由饮水,标准鼠饲料喂养,自由活动。每组动物分别于术后2和10周随机选取8只处死。

1.2 取材及处理

动物断颈处死后,取膝关节上下各1cm区域的组织,去除皮肤,置于4%多聚甲醛液中4℃下固定24h,固定后标本剔除周围软组织及韧带,PBS充分浸洗,流水冲洗2h,15%的EDTA液加微波脱钙2周,流水冲洗24h,只留胫骨部分,将其沿冠状面分为3等份。修整组织块后石蜡包埋,作冠状面不连续切片,每个标本切9张,间隔100 μm 。各取3张分别行HE、AB-PAS、MMP-13免疫组化染色。

1.3 MMP-13免疫组化染色

切片常规脱蜡入水,过氧化氢封闭,枸橼酸盐缓冲液(pH6.0)微波法修复抗原,加1:200兔抗鼠MMP-13单克隆抗体(美国Santa cruz公司)4℃孵育过夜,PBS洗,加EnVision二抗(上海基因科技有限公司),室温孵育30min,PBS洗,DAB显色,蒸馏水冲洗,苏木素复染,二甲苯透明,封片。阴性对照用PBS代替一抗。结果判定:每张切片由2名病理科医师独立观察具有代表性的5个高倍视野。每个高倍视野计数100个细胞,取观察结果的平均值进行计算,计数阳性细胞的百分率,阳性指数=(阳性细胞数/所计数细胞总数)×100%。阳性指数0~10%

为-,10%~25%为±,≥25%为+,≥50%为++,≥75%为+++。

1.4 软骨组织形态学

HE染色及AB-PAS染色后,采用双盲法由2名病理医师对组织结构进行详细的观察。每张切片选择5个不同的视野,并参照Mankin改良的关节软骨病理评分标准^[1]进行积分统计,满分14分。

1.5 骨组织计量学分析

HE切片在Olympus显微镜40×镜下用Olympus图像采集系统按统一比例在软骨下松质骨内随机取5个视野,用image pro plus图像分析系统(Version6.0,Media Cybernetics,Silver Spring,MD)行骨组织形态计量分析,测量后取平均值。测量参数为:骨体积(BV/TV)测量范围内骨小梁体积占全部骨组织体积的百分比,为骨小梁面积(髓腔+骨小梁面积)×100%,反映骨小梁体积比。

1.6 统计学处理

实验数据采用均数±标准差表示,用SPSS 11.5统计软件包,计量资料方差分析后进行t检验或秩和检验,不同组间的多重比较采用LSD-t检验或两成组资料间的秩和检验,等级资料采用非参数秩和检验。 $P < 0.05$ 时有统计学意义。

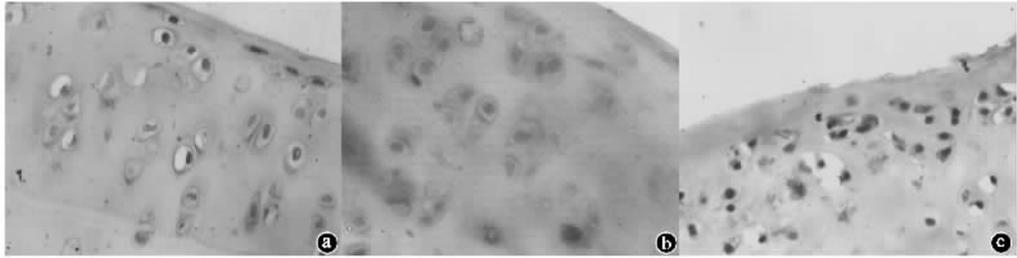
2 结果

2.1 大体标本观察

各组动物恢复良好,术后第2天可正常行走,无一例发生感染。用肉眼及在解剖显微镜下对胫骨平台软骨进行观察。2周时,ACLT组胫骨内髌软骨失去原有光泽,透亮度减低,灰白;sham组、sham+cal组和ACLT+cal组软骨蓝白色、透明、未见明显异常。10周时,sham组大鼠膝关节关节面光滑,有光泽;sham+cal组膝关节大体观与sham组肉眼未见明显差异,关节面光滑有光泽;ACLT+cal组可见软骨面粗糙,关节面失去光泽,局部裂隙溃疡形成;ACLT组软骨面粗糙不平,表面可见较大溃疡糜烂,关节周缘结缔组织增生,软骨边缘可见骨赘形成。

2.2 MMP-13免疫组化结果

术后2周时,关节软骨细胞中MMP-13表达不明显,各组间没有统计学意义上的差别。术后10周时,ACLT组和ACLT+cal组表达明显增强,ACLT组与sham组相比,ACLT+cal组与sham+cal组相比均有统计学意义($P < 0.01$);ACLT组与ACLT+cal组相比,软骨细胞中MMP-13的表达差异有统计学意义($P < 0.05$),见图1。



a. sham 组 10 周软骨细胞未见表达 b. ACLT + cal 组 10 周 MMP-13 在软骨细胞中表达增多 ;
c. ACLT 组 10 周软骨细胞中 MMP-13 表达比 b 中增强
图 1 软骨细胞中 MMP-13 的表达 100 ×

2.3 光镜下观察 Mankin 评分

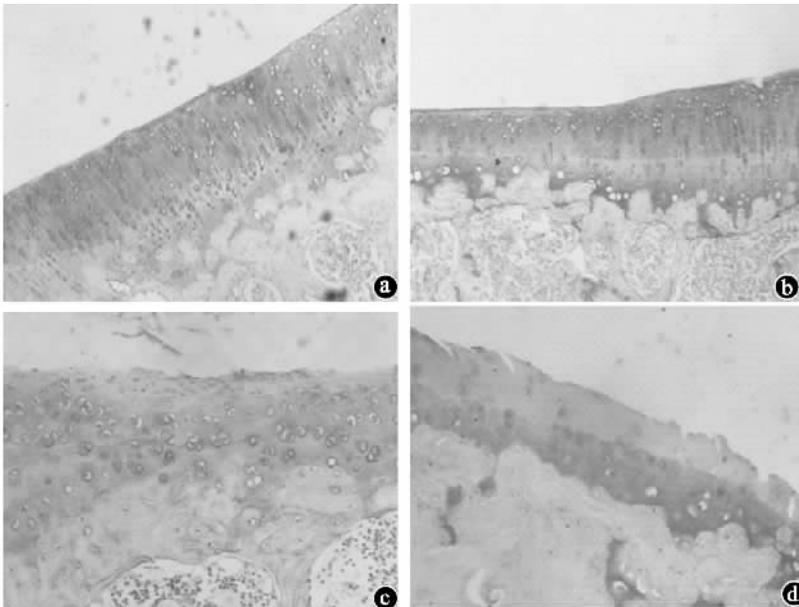
术后 2 周时 :sham 组与 sham + cal 组 HE 染色见软骨表层光滑、平整 软骨细胞分布均匀 ,序列整齐 ,层次清楚 ,无簇集软骨细胞 ,潮线完整 ,AB-PAS 染色均匀 ,无失染 ,两组相比 Mankin 评分差异无统计学意义 ($P > 0.05$) ; ACLT 组、 ACLT + cal 组细胞排列规律性尚在 ,见少量细胞簇集现象 ,分别与 sham 组相比均有统计学意义 ($P < 0.05$) , ACLT 组与 ACLT + cal 组相比差异无统计学意义。 10 周时 :sham + cal 组与 sham 组均未见明显退变表现 ,两组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$) ; ACLT 组以重度软骨损伤为主 ,软骨表层出现较大缺损区 ,细胞排列紊乱 ,软骨细胞层次不清 ,细胞数减少 ,潮线消失 ,部分出现软骨全层缺损 ,钙化层难以分辨 , AB-PAS 染色大部分层次失染 ,伴软骨下骨硬化 ; ACLT + cal 组软骨

表面粗糙、表层裂隙 软骨细胞排列紊乱 ,层次不清 ,部分出现潮线不清晰和中断 , AB-PAS 染色不均匀。 ACLT 组与 sham 组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$) , ACLT + cal 组与 sham + cal 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$) ; ACLT 组与 ACLT + cal 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$) ,见表 1、图 2。

表 1 术后不同时间大鼠关节软骨 Mankin 评分比较

组别	2 周	10 周
sham	0.45 ± 0.07	0.60 ± 0.14
Sham + cal	0.41 ± 0.06	0.57 ± 0.16
ACLT	1.86 ± 0.28	11.28 ± 1.95 [△]
ACLT + cal	1.78 ± 0.32	8.54 ± 1.55 ^{*▲}

注 :与 ACLT10 周组比较 * $P < 0.01$;与 sham10 周组比较[△] $P < 0.01$;与 sham + cal10 周组比较[▲] $P < 0.01$



a. Sham 组 10 周 b. Sham + cal 组 10 周 c. ACLT 组 10 周 d. ACLT + cal 组 10 周

图 2 各组大鼠关节软骨 AB-PAS 染色 × 40

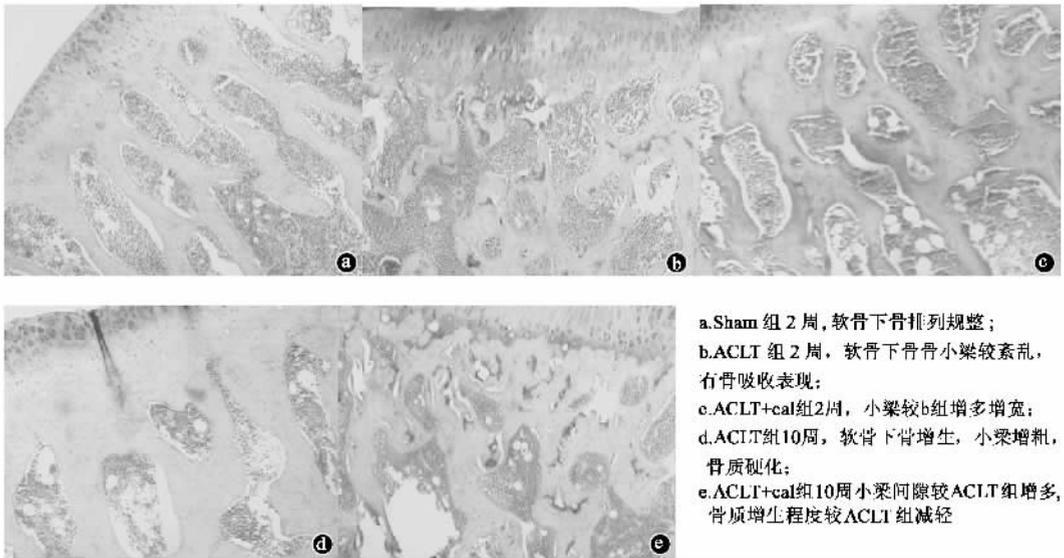


图3 各组大鼠关节软骨下骨 HE $\times 40$

a. Sham 组 2 周, 软骨下骨排列规整;
b. ACLT 组 2 周, 软骨下骨骨小梁紊乱, 有骨吸收表现;
c. ACLT+cal 组 2 周, 小梁较 b 组增多增宽;
d. ACLT 组 10 周, 软骨下骨增生, 小梁增粗, 骨质硬化;
e. ACLT+cal 组 10 周小梁间隙较 ACLT 组增多, 骨质增生程度较 ACLT 组减轻

2.4 骨形态计量学分析

大鼠胫骨软骨下骨组织计量学分析显示(见表 2)。术后 2 周时:大鼠软骨下骨体积分数(BV/TV%) Sham 组明显高于 ACLT 组($P < 0.01$), ACLT + cal 组高于 ACLT 组($P < 0.01$), Sham 组与 sham + cal 组之间无统计学差异。术后 10 周时, ACLT 组骨体积分数(BV/TV%)明显高于 Sham 组($P < 0.01$), ACLT + cal 组低于 ACLT 组($P < 0.01$), sham 组与 Sham + cal 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 见图 3。

表 2 大鼠胫骨近端软骨下骨骨体积分数 (BV/TV) 的比较 (%)

组别	2 周	10 周
sham	34.4 ± 2.8	35.3 ± 3.1
sham + cal	35.7 ± 3.0	35.5 ± 3.5
ACLT	31.7 ± 3.1*	44.2 ± 4.2
ACLT + cal	33.7 ± 2.9 [▲]	38.3 ± 3.8 [△]

注:与 sham 2 周组比较* $P < 0.01$; 与 ACLT 2 周组比较[▲] $P < 0.01$; 与 ACLT 10 周组比较[△] $P < 0.01$

3 讨论

1986 年 Radin 和 Rose^[2]首次提出软骨下骨在骨性关节炎的发生及进展中发挥重要作用。软骨下骨在异常的机械应力作用下密度厚度增加,使其发挥缓冲、吸收应力的作用减弱,对其上的关节软骨产生更大的剪应力,从而促进软骨退变。近年来有较多的文献报道 OA 软骨与软骨下骨的关系。Botter

等^[3]在大鼠骨关节炎动物模型中用 micro-CT 三维成像技术纵向观察造模处骨组织的变化 4 周,发现在模型早期软骨下骨小梁变薄,小梁间的连接变少,体积亦减小。在 Hayami 等^[4]的研究中也发现 OA 早期软骨下骨量减少,骨转换速率加快,骨吸收大于骨形成。随着病程的发展,骨重建骨量增加,软骨下骨硬化,骨赘形成。

我们所用的大鼠前交叉韧带切断模型,反映了软骨下骨的这种变化。在早期(造模术后 2 周)在软骨尚未出现明显退变之前,软骨下骨量减少,骨小梁变细,表明有骨吸收大于骨形成;发展至晚期(造模术后 10 周)软骨出现明显退变表现,软骨下骨体积增加,骨小梁增粗,骨质硬化表现,边缘骨赘形成。在这些骨重建的过程中,生物力学因素,多种炎症因子及细胞因子之间相互作用,其作用结果决定了骨转换速率,并最终影响到 OA 的病情进展。近来有学者对于 OA 软骨下骨进行干预性实验研究。其中 Hayami 等^[5]用骨吸收抑制剂阿仑磷酸钠干预大鼠 OA 的早期软骨下骨吸收,发现其在 OA 的进展中对关节软骨有部分保护作用。Lu 等^[6]使用降钙素试验性治疗大鼠 OA,认为降钙素可以抑制 OA 早期软骨下骨的吸收,并最终延缓软骨下骨硬化。

骨化三醇是维生素 D 的活性代谢产物,主要应用于骨质疏松治疗领域。其作用途径包括直接促进骨形成,增加骨量、间接抑制骨吸收,缓解症状、提高肌力,改善神经肌肉协调性。骨化三醇对成骨细胞起到的是抑制凋亡的作用^[7]。对于体外培养的成骨细胞,骨化三醇可以刺激其产生骨钙素和 ALP,而

促进成骨细胞成熟,加强其功能活性^[8]。另外,还可通过胃肠钙吸收增加,间接抑制PTH分泌以及骨化三醇直接作用于甲状旁腺细胞抑制PTH分泌,以上引起的骨形成超过了破骨细胞介导的骨吸收作用,而保持了骨质量。我们在大鼠造模术后,应用骨化三醇 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃持续2周,给药剂量参考以前的实验^[9],结果在病变早期模型给药组的软骨下骨量较模型组明显增加,表明骨吸收减轻,而到晚期,软骨下骨的增生及硬化程度较未干预组明显减轻。同时骨化三醇的干预对关节软骨似乎具有保护作用,表现在OA晚期模型给药组软骨mankin评分和MMP-13表达均较模型组组低($P < 0.05$)。骨化三醇减缓软骨退变的机制尚不完全清楚,可能包括对软骨的直接作用和间接作用,生物力学因素改变是其中很重要的原因。软骨下骨呈纵向柱状排列,小梁间彼此连接成网状形成缓冲垫与其上的软骨共同吸收能量,并对其上的软骨有一定应力保护作用。OA晚期,软骨下骨质硬化,吸收应力作用减弱,使软骨承受了更大的剪应力,促使其退变。本实验在OA早期软骨下骨吸收时对抗性的使用骨化三醇,抑制软骨下骨吸收,使与骨吸收相耦联的继发性骨质增生和硬化均减缓,间接保护了关节软骨。此外,骨化三醇还可能通过作用于OA软骨及软骨下骨的代谢因素从而影响OA的进展。骨化三醇可调节多种细胞因子、生长因子的信号转导途径^[10-11]。有体外实验表明,骨化三醇能下调骨性关节炎软骨细胞合成前列腺素和基质金属蛋白酶,减少其对关节软骨的损伤,防治骨关节病变^[12]。我们在实验中发现,10周时药物干预组比单纯模型组关节软骨MMP-13表达减低。表明骨化三醇通过某种机制抑制了MMP-13的表达,从而减少了II型胶原的降解,但其调节机制有待更多研究。

本实验通过观察骨化三醇对OA软骨下骨的影响,减缓了软骨的损伤,证实了软骨下骨在OA进展中发挥一定作用。软骨下骨和关节软骨作为一个对立统一的整体,在OA的病理进程中相互作用、相互影响^[13],认识软骨下骨在OA发生发展中的作用及其机制,并针对性地采取干预措施,可为临床提供新的防治方法。

【参 考 文 献】

[1] Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic

human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am*, 1971, 53(3): 523-537.

- [2] Radin EL, Rose RM. Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clin Orthop Relat Res*, 1986, (213): 34-40.
- [3] Botter SM, van Osch G, Waarsing JH, et al. Cartilage damage pattern in relation to subchondral plate thickness in a collagenase-induced model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, 16(4): 506-514.
- [4] Hayami T, Pickarski M, Zhuo Y, et al. Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. *Bone*, 2006, 38(2): 234-243.
- [5] Hayami T, Pickarski M, Wesolowski GA, et al. The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis: reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the rat anterior cruciate ligament transection model. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(4): 1193-1206.
- [6] Lu SJ, Yang SH. Effect of calcitonin on articular cartilage and subchondral bone in rat experimental osteoarthritis. *Chin J Osteoporos*, 2008, 14(3): 183-186 (in Chinese).
- [7] Morales O, Samuelsson MK, Lindgren U, et al. Effects of 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and growth hormone on apoptosis and proliferation in UMR 106 osteoblast-like cells. *Endocrinology*, 2004, 145(1): 87-94.
- [8] Atkins GJ, Anderson PH, Findlay DM, et al. Metabolism of vitamin D3 in human osteoblasts: evidence for autocrine and paracrine activities of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3. *Bone*, 2007, 40(6): 1517-1528.
- [9] Erben RG, Bromm S, Stangassinger M. Therapeutic efficacy of 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and calcium in osteopenic ovariectomized rats: evidence for a direct anabolic effect of 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 on bone. *Endocrinology*, 1998, 139(10): 4319-4328.
- [10] Gruber HE, Hoelscher G, Ingram JA, et al. 1,25(OH)2-vitamin D3 inhibits proliferation and decreases production of monocyte chemoattractant protein-1, thrombopoietin, VEGF, and angiogenin by human annulus cells *in vitro*. *Spine*, 2008, 33(7): 755-765.
- [11] Gurlek A, Pittelkow MR, Kumar R. Modulation of growth factor/cytokine synthesis and signaling by 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D (3): implications in cell growth and differentiation. *Endocr Rev*, 2002, 23(6): 763-786.
- [12] Tetlow LC, Woolley DE. Expression of vitamin D receptors and matrix metalloproteinases in osteoarthritic cartilage and human articular chondrocytes *in vitro*. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2001, 9(9): 423-431.
- [13] Karsdal MA, Leeming DJ, Dam EB, et al. Should subchondral bone turnover be targeted when treating osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, 16(6): 638-646.