

· 论 著 ·

# 超声波治疗兔膝关节炎对 MMP-1 和 MMP-13 表达的影响

李卫平, 蹇 睿, 胥方元<sup>△</sup>

(泸州医学院附属医院康复科, 四川泸州 646000)

**摘要:**目的 探讨兔膝关节炎模型软骨基质金属蛋白酶(MMP)-1、-13 超声波治疗前后在软骨组织中的表达及其作用机制。方法 30 只新西兰大白兔随机分为正常对照组(A组)、模型组(B组)和超声波治疗组(C组), 每组 10 只。B、C 组骨关节炎造模后 6 周, C 组实施超声波治疗, 8 周后取各组软骨予 HE 染色, 免疫组化行 MMP-1 和 MMP-13 分析, 观察软骨 HE 改变、MMP-1 和 MMP-13 表达的变化。结果 HE 染色结果采用 Mankin's 评分比较, A 组与 B 组、B 组与 C 组比较, 差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。软骨免疫组化 MMP-1、-13 测定, A 组与 B 组、B 组与 C 组比较, 差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。结论 超声波能有效治疗膝 OA, 其作用机制可能是减少软骨 MMP-1、-13 的含量, 降低 II 型胶原的降解、促进新的 II 型胶原的生成, 从而有利于软骨细胞外基质的合成, 有利于软骨细胞的修复。

**关键词:**骨关节炎; 软骨细胞; 超声疗法; 基质金属蛋白酶类

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.16.002

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)16-1564-03

## Effect of ultrasonic therapy for treating rabbit knee osteoarthritis on expression of MMP-1 and MMP-13

Li Weiping, Jian Rui, Xu Fangyuan<sup>△</sup>

(Department of Rehabilitation Medicine, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

**Abstract:** **Objective** To research the expression of MMP-1 and MMP-13 of rabbit knee cartilage cells before and after ultrasound therapy and its mechanism. **Methods** The normal control group (group A) contained 10 randomly selected rabbits from 30 healthy New Zealand white rabbits, not modeled, the rest 20 rabbits were randomly picked and equally divided into the model group (group B) and the ultrasonic experimental group (group C), being created osteoarthritis (OA). After 8 weeks, cartilage changes on pathological morphology and immunohistochemical of MMP-1 and MMP-13 from all groups were observed. **Results** In the group A, cartilage surface layer had uniform thickness, cartilage cells were aligned with uniform size, which had a little amount of MMP-1 and MMP-13. The thickness of cartilage in the group B was thinner with significantly less cartilage cells. The clustering MMP-1 and MMP-13 rates were higher. Cartilage layer of the group C was thicker than that of the group A, cartilage cells were arranged neatly, MMP-1 and MMP-13 rates were dropped. By Mankin's score, the degree of pathological lesion in the group B was higher than that of the group A and the group C ( $P < 0.01$ ). The expressions of MMP-1, MMP-13 were higher than those of the group A and the group C too ( $P < 0.01$ ). The differences were significant. **Conclusion** The ultrasonic treatment can effectively improve the rabbit knee OA. The mechanisms are probably reducing cartilage MMP-1 and MMP-13 levels, reducing collagen II degradation, promoting new collagen II formation and promoting the proteoglycan, which will help to repair cartilage cells.

**Key words:** osteoarthritis; chondrocytes; ultrasonic therapy; matrix Metalloproteinases

骨关节炎是一种常见的以关节软骨慢性进行性变性和破坏为特征的关节疾患, 其发病与外伤、炎症、代谢及免疫等因素有关, 目前确切机制未明。近年研究发现骨关节炎关节软骨细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 合成与降解失衡是造成软骨变性的重要原因之一, 基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 可能起决定性作用<sup>[1]</sup>。本组选择其家族中的属于胶原酶亚型的 MMP-1、-13 采用免疫组化方法观察它们在骨关节炎软骨中的表达, 以研究它们与关节软骨退变的关系以及超声波治疗对其表达的影响。

### 1 材料与与方法

**1.1 实验动物与分组** 健康新西兰大白兔 30 只, 雌雄随机, 体质量 2.0~2.5 kg, 5 月龄, 由泸州医学院动物实验中心提供。动物合格证: SCXK[川] 2008-17。随机分为正常对照组 (A 组)、模型组 (B 组) 和超声波治疗组 (C 组), 每组 10 只。A 组不作处理, B、C 组行膝关节炎造模。

**1.2 仪器与试剂** 10% 中性甲醛、5% 硝酸脱钙液、多聚赖氨酸、伊红、苏木素、PAS 缓冲液。MMP-1、MMP-13 免疫组化试剂盒 (北京博奥申生物工程有限公司); HS-501 型超声波治疗仪 (韩国)。

**1.3 造模方法** 取 B、C 两组动物采用膝关节伸直位管型石膏固定法造模。将兔左后肢伸直位固定于实验固定台上, 在左后肢腹股沟以下 1.5 cm 至踝关节以上 3.0 cm 用管型石膏绷带包扎固定, 制动 6 周制作膝关节炎模型。造模 6 周后取兔 2 只, 进行大体形态观察和 HE 染色病理学观察, 大体形态观察显示关节液量增多, 有明显的炎症细胞浸润, 软骨表面有不同程度的糜烂缺损, HE 染色标本显示软骨细胞排列紊乱, 细胞减少, 这些表现与骨关节炎的病理形态学变化相一致, 确立造模成功。成功后解除石膏外固定<sup>[2]</sup>。B 组不治疗, C 组采用频率为 3 MHz、脉冲式超声波直接接触移动法作用于左膝关节进行治疗, 剂量 0.25 W/cm<sup>2</sup>, 每次治疗 10 min, 1 次/d, 连续治疗 14 d。

**1.4 标本取材及检测** A、B、C 组均以空气栓塞法处死, 取股骨内侧切口打开膝关节, 切取股骨内侧髁 0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm 关节软骨标本, 经 5% 硝酸脱钙液脱钙, 至大头针能轻松穿透标本后, 石蜡包埋标本, 垂直软骨表面切片, 切片厚 5 μm。

**1.5 观察指标与方法**

**1.5.1 光镜 HE 染色** 切片置于二甲苯及各级乙醇脱蜡至

<sup>△</sup> 通讯作者, Tel: 13568639470; E-mail: x5144@163.com.

水,再分别置于苏木素染液、伊红染液,盐酸乙醇分化,冲洗,调色脱水,透明,树脂封片。光镜观察软骨表面是否规则、有无裂隙,细胞数量、分布、排列是否规则,潮线是否完整。参考 Mankin's<sup>[3]</sup>评分标准对 HE 染色标本进行评分比较。

**1.5.2 免疫组化分析** 切片脱蜡至水,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline,PBS)浸泡修复抗原活性,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 灭活内源性过氧化氢酶,正常血清封闭孵育,依次滴加抗 MMP-1、抗 MMP-13 生物素标记的二抗,辣根酶标记链霉卵白素工作液,3,3'-二氨基联苯胺显色,苏木素复染,脱水,封片,显微镜下观察检测 MMP-1、MMP-13 含量。参照 Pelletier 等<sup>[4]</sup>的方法在 MMP-1 和 MMP-13 的软骨切片中各随机选取 6 个视野(400 倍),计算每个视野里的阳性细胞数和细胞总数,显微镜下胞浆或胞膜有褐色颗粒者为阳性细胞。用细胞分数即阳性细胞数占细胞总数的百分比来表示 MMP-1、-13 的表达量。每张切片的细胞计数分别由两个独立的观察者进行,其评分误差率控制在 5% 以内,取二者均值为最后得分。

**1.6 统计学处理** 用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,对 Mankin's 评分结果和免疫组化 MMP-1、MMP-13 的统计结果采用单因素方差分析和 *t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 HE 染色结果** 见封 2 图 1。A 组软骨层较厚,软骨着色均匀,软骨细胞排列整齐,细胞饱满,潮线清晰。B 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,细胞簇集,有较薄的钙化层,局部有破坏,软骨细胞局部排列紊乱,多个软骨细胞聚集在一起,细胞核浓缩,潮线紊乱。C 组染色显示软骨层较模型组增厚,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在一起,细胞核浓缩,潮线紊乱。Mankin's 评分比较见表 1。

**2.2 免疫组化染色结果** 见封 2 图 2。A 组软骨细胞 MMP-1、-13 均呈弱阳性表达,仅在表层软骨细胞内偶见少许胞质棕褐色颗粒。B 组 MMP-1 呈强阳性表达,软骨基质、胞浆中均有,全层可见,尤以表、中层密度最高,成熟软骨细胞中较多,为深棕褐色颗粒,MMP-13 呈强阳性表达,主要表达于软骨细胞胞浆内,全层可见,尤以固缩变性的软骨细胞为重。C 组软骨组织中 MMP-1、-13 均较 B 组表达降低,主要是软骨组织的表、中层减少,为浅棕褐色颗粒。其比较结果见表 2。

**表 1 各组软骨 Mankin's 评分比较**

组别	动物例数(只)	Mankin's 评分
A 组	10	0.10 ± 0.32*
B 组	10	9.90 ± 1.73
C 组	10	4.81 ± 1.23*

\*:  $P < 0.01$ ,与 B 组比较。

**表 2 各组软骨 MMP-1、MMP-13 表达的比较**

组别	标本数	MMP-1(%, $\bar{x} \pm s$ )	MMP-13(%, $\bar{x} \pm s$ )
A 组	60	13.89 ± 3.10*	8.29 ± 2.54*
B 组	60	54.65 ± 9.27	17.65 ± 3.27
C 组	60	31.64 ± 6.69*	13.94 ± 2.69*

\*:  $P < 0.01$ ,与 B 组比较。

**3 讨论**

关节软骨是一种无血管、神经及淋巴分布的结缔组织,由 99% 的软骨基质和 1% 的软骨细胞组成。其正常结构和功能的维持有赖于软骨细胞和基质成分在形态与代谢方面的正常与稳定<sup>[5]</sup>。当软骨细胞及基质特别是含量丰富的 II 型胶原破坏时,即发生退行性变。柴本甫和汤雪明<sup>[6]</sup>研究发现,关节软

骨退变后,软骨细胞数目减少,排列紊乱,有不同程度的核凝、核碎裂及核溶等退化坏死现象,软骨基质染色性改变。本实验 HE 染色显示,伴随骨关节炎发生软骨层变薄,基质染色变淡,细胞簇集,排列紊乱,呈明显破坏征象,而在超声波治疗后又出现改善,软骨层较之有增厚,虽然细胞仍有簇集,但软骨细胞排列较之整齐,从而说明超声波治疗对膝骨关节炎的有效性。

MMP 是 ECM 降解最重要的蛋白水解系统,被认为是机体生理重建和病理破坏的主要基础因素之一。在骨关节炎发病过程中,MMP 因能降解几乎所有的软骨 ECM 而被认为起重要作用<sup>[7]</sup>。MMP-1、MMP-13 均属 MMPs 中的胶原酶亚型,可以直接降解软骨基质中最具有特征、含量也最多的 II 型胶原,而许多其他 MMP 亚型对 II 型胶原的降解需要通过它们起作用,因此,理论上 MMP-1、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<sup>[8]</sup>。对于 MMP-1,有的学者将其作为骨关节炎新的标志性指标,其作用对象主要是新生成的 II 型胶原。研究发现,只有控制了 MMP-1 的活性后,培养基中新生成的 II 型胶原才明显增加<sup>[9]</sup>。本实验中也观察到 MMP-1 在 B 组软骨出现破坏时,其表达明显升高,而在 C 组超声波治疗后,软骨层明显改善,MMP-1 表达也随之降低,从而考虑超声波可能通过控制 MMP-1 的活性而促进软骨基质及细胞的修复。

MMP-13 又称为胶原酶-3,是所知的酶中最有效的 II 型胶原纤维降解酶<sup>[10]</sup>。其降解能力是 MMP-1 的 5~10 倍<sup>[11-12]</sup>。MMP-13 在骨关节炎病变部位的软骨里,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<sup>[13-14]</sup>。它和 MMP-1 一起,打破了基质合成、分解的动态平衡,增强了关节软骨中的降解,尤其是 II 型胶原纤维的降解,使软骨的完整性破坏,在骨关节炎发展过程中,MMP-13 发挥的作用比 MMP-1 更强。本实验显示 MMP-13 增高和软骨组织的破坏呈一致性,超声治疗后病变部位软骨组织 MMP-13 表达出现下降。

超声波具有机械效应、温热效应、理化效应<sup>[15]</sup>。超声波治疗即利用其良好的组织穿透性,将能量透过表皮组织,聚焦于特定深度的靶区组织细胞,发生生化反应,使病变组织产生变性,促进细胞增殖、蛋白质合成,刺激胶原和细胞因子生成<sup>[16]</sup>。其通过破坏胶原的交联,使胶原酶解聚和聚合发生变构,将胶原酶的活化中心激活,活性上升,胶原蛋白分解加速<sup>[17]</sup>。胥元等<sup>[18-19]</sup>临床实验证明超声波对膝骨关节炎有良好的疗效,可以促进软骨、韧带和肌腱等组织损伤的修复。本实验选用频率为 3 MHz 的超声波治疗,深度达 1~2 cm,利用脉冲式超声波的非热效应,使用 0.25 W/cm<sup>2</sup> 的低强度超声波治疗,将其热效应最低化,避免热效应对挫伤肌腱、韧带及骨软骨的损害。实验中,MMP-1 和 MMP-13 在 A 组大白兔中仅表层软骨细胞内呈弱阳性表达,B 组全层呈强阳性表达,为深棕褐色颗粒,C 组软骨组织中 MMP-1、-13 均较 B 组表达降低,且主要是软骨组织的表、中层表达量减少,作者认为超声波能抑制兔膝骨关节炎软骨组织中 MMP-1、-13 的表达,可能具有促进软骨再生、减轻软骨破坏、减轻软骨基质损害的作用。其对骨关节炎的治疗机制可能是通过减少软骨 MMP-1、-13 的含量,有效降低软骨 MMP-1、-13 的表达,实现对 MMP/TIMP-1 整体抑制作用,减轻 MMP 的破坏作用,降低 II 型胶原的降解,促进新的 II 型胶原的生成,从而有利于软骨 ECM 的合成,有利于软骨细胞的修复,达到治疗骨关节炎的目的。

**参考文献:**

[1] 董刚,周辉.金属蛋白酶在骨关节炎软骨内环境中的表达

- 与调控[J]. 中国骨伤, 2009, 22(2): 156-159.
- [2] 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.
  - [3] Kuroki H, Nakagawa Y, Mori K, et al. Acoustic stiffness and change in plug cartilage over time after autologous osteochondral grafting: correlation between ultrasound signal intensity and histological score in a rabbit model[J]. Arthritis Res Ther, 2004, 6(6): 492-504.
  - [4] Pelletier JP, Lascau-Coman V, Jovanovic D, et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental osteoarthritis is associated with reduction in tissue levels of catabolic factors [J]. J Rheumatol, 1999, 26(9): 2002-2014.
  - [5] 施桂英, 栗占国. 关节炎诊断与治疗[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 14-21.
  - [6] 柴本甫, 汤雪明. 骨关节炎股骨头肉芽组织的超微结构研究[J]. 中华骨科杂志, 1991, 11(1): 40-42.
  - [7] Buckwalter JA, Martin JA. Osteoarthritis[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2006, 58(2): 150-167.
  - [8] 杨丰建, 俞永林, 夏军, 等. 基质金属蛋白酶-1/13 与信号通路激酶 ERK1/2 在兔骨关节炎软骨中的表达[J]. 老年医学与保健, 2007, 13(6): 338-342.
  - [9] Dahlberg L, Billingham RC. Selective enhancement of collagenase-mediated cleavage of resident type II collagen in cultured osteoarthritic cartilage and arrest with a synthetic inhibitor that spares collagenase 1(matrix metalloproteinase 1) [J]. Arthritis Rheum, 2000, 43(3): 673-682.
  - [10] Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, et al. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage[J]. J Clin Invest, 1996, 97(3): 761-768.
  - [11] Elliott S, Hays E, Mayor M, et al. The triterpenoid CDDO inhibits expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-13 and Bcl-3 in primary human chondrocytes[J]. Arthritis Res Ther, 2003, 5(5): 285-291.
  - [12] 刘志翔, 张柳. 基质金属蛋白酶和骨关节炎的研究进展[J]. 华北煤炭医学院学报, 2007, 9(3): 330-332.
  - [13] 杨丰建, 俞永林, 乔健, 等. 兔骨关节炎模型的建立以及关节炎软骨组织中 MMP-1/-13 的表达[J]. 复旦学报: 医学版, 2007, 34(4): 563-567.
  - [14] 张超, 王旭, 姜建元, 等. MMP-1, 13 mRNA 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.
  - [15] 南登崑. 康复医学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 122-124.
  - [16] Fu SC, Shum WT, Hung LK, et al. Low-intensity pulsed ultrasound on tendon healing: a study of the effect of treatment duration and treatment initiation [J]. Am J Sports Med, 2008, 36(9): 1742-1749.
  - [17] 石秀秀, 朱文, 唐金树, 等. 超声波配合康复治疗肘外伤的临床疗效研究[J]. 中国骨肿瘤骨病, 2008, 7(2): 108-110.
  - [18] 胥方元, 何成松, 余茜, 等. 超声波结合股四头肌肌力训练治疗老年膝关节炎[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2003, 25(9): 541-543.
  - [19] 杨大鉴, 胥方元, 马路, 等. 超声波结合股四头肌肌力训练治疗老年膝骨关节炎[J]. 中国临床康复, 2005, 9(26): 252-254.

(收稿日期: 2011-10-08 修回日期: 2011-12-22)

(上接第 1563 页)

此, 纯粹单体的研究并不能很好地说明中药复方的药理作用机制, 应用膜片钳技术研究确切有效的中药复方, 从细胞、分子水平阐述其作用机制, 为中药复方研究开辟一条新思路, 将极大地拓展中药开发的前景。

#### 参考文献:

- [1] 何昱, 洪筱坤, 王智华. 钩藤及其有效成分的药理研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2003, 37(11): 57-60.
- [2] 石京山, 余俊先, 陈修平, 等. 钩藤总碱、钩藤碱和异钩藤碱的药理作用[J]. 中国药理学报: 英文版, 2003, 24(2): 97-101.
- [3] Zhou J, Zhou S. Antihypertensive and neuroprotective activities of rhynchophylline: The role of rhynchophylline in neurotransmission and ion channel activity[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 132(1): 15-27.
- [4] Hill MA, Yang Y, Ella SR, et al. Large conductance,  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channels ( $BK_{Ca}$ ) and arteriolar myogenic signaling [J]. FEBS Lett, 2010, 584(10): 2033-2042.
- [5] Cheng H, Lederer WJ. Calcium sparks [J]. Phys Rev, 2008, 88(4): 1491-1545.
- [6] 开丽, 王中峰. 钩藤碱对大鼠肺动脉平滑肌细胞钙激活钾通道的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1999, 13(1): 33-36.
- [7] 刘书宏, 曾晓荣, 尹雷. 钩藤碱对人体肠系膜动脉平滑肌细胞大电导钙激活钾通道的影响[J]. 四川生理科学杂志, 2007, 29(3): 97-99.
- [8] Cai F, Li PY, Yang Y, et al. Characteristic of spontaneous transient outward potassium currents in vascular smooth muscle cells of porcine coronary artery [J]. Acta Physiol Sin, 2007, 59(1): 27-34.
- [9] Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, et al. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone [J]. Physiology, 2006, 21(1): 69-78.
- [10] 黄燮南, 石京山, 谢笑龙, 等. 钩藤碱和异钩藤碱对 $^{45}Ca$ 转运的影响[J]. 中国药理学通报, 1993, 9(6): 428-430.
- [11] Wang XL, Zhang LM, Hua Z. Blocking effect of rhynchophylline on calcium channels in isolated rat ventricular myocytes [J]. Acta Pharmacol Sin, 1994, 15(2): 115-118.
- [12] Zhang WB, Chen CX, Sim SM, et al. In vitro vasodilator mechanisms of the indole alkaloids rhynchophylline and isorhynchophylline, isolated from the hook of Uncaria rhynchophylla (Miquel) [J]. Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol, 2004, 369(2): 232-238.
- [13] Hou S, Heinemann SH, Hoshi T. Modulation of  $BK_{Ca}$  channel gating by endogenous signaling molecules [J]. Physiology, 2009, 24(1): 26-35.

(收稿日期: 2011-10-07 修回日期: 2011-12-12)