

论著·基础研究

骨关节炎 SD 大鼠关节软骨中蛋白多糖与 YKL-40 的相关性\*

陈喜德<sup>1</sup>, 宋丽君<sup>2△</sup>, 魏 波<sup>1</sup>, 刘 军<sup>1</sup>, 林 颖<sup>1</sup>  
(广东医学院附属医院:1. 骨科;2. 生殖中心, 广东湛江 524001)

**摘要:****目的** 通过检测骨关节炎(OA)关节软骨中蛋白多糖与 YKL-40 的表达,探讨 OA 关节软骨中蛋白多糖与 YKL-40 的相关性。**方法** 将 56 只健康 SD 大鼠分为 7 组,每组 8 只。选取一侧膝关节行前交叉韧带离断,建立 OA 模型。分别于手术当天,术后 2、4、8、12、16、20 周随机处死 1 组大鼠,收集不同时间段手术侧关节软骨样本,行番红 O/固绿染色和 HE 染色,根据改良 Mankin 评分对 OA 样本进行病理分期。免疫组织化学染色检测蛋白多糖、YKL-40 在各期 OA 关节软骨中的表达,并分析蛋白多糖与 YKL-40 在 OA 发病过程中的相关性。**结果** 随着 OA 病情加重,蛋白多糖表达逐渐减少,YKL-40 表达均逐渐增多。在 OA 早、中、晚期,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。蛋白多糖与 YKL-40 表达呈负相关( $P<0.05$ )。**结论** 随着 OA 病情加重,软骨蛋白多糖水平进行性减少。蛋白多糖与 YKL-40 水平呈负相关,可在一定程度上反映关节软骨细胞的去分化程度。

**关键词:**骨关节炎;关节;软骨;蛋白多糖;YKL-40

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.10.022      文献标识码:A      文章编号:1671-8348(2014)10-1214-04

Relationship between Aggrecan and YKL-40 in articular cartilage of Sprague-Dawley rats with osteoarthritis\*  
Chen Xide<sup>1</sup>, Song Lijun<sup>2△</sup>, Wei Bo<sup>1</sup>, Liu Jun<sup>1</sup>, Lin Hao<sup>1</sup>  
(1. Department of Orthopaedics; 2. Department of Reproductive Center, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524001, China)

**Abstract:****Objective** To investigate the relationship between aggrecan and YKL-40 in knee articular cartilage of Sprague-Dawley (SD) rats with osteoarthritis (OA). **Methods** Fifty-six healthy SD rats were randomly divided into 7 groups, 8 cases per group. The one side of knee joint was randomly selected for performing the anterior cruciate ligament transection (ACLT) and establishing the OA model. The rats in one group were randomly killed on the day of operation and at postoperative 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20 weeks. The femoral condyle cartilage samples at different time periods in the operated side were collected for conducting safranin O/fast green staining and HE staining. Meanwhile, the OA pathological grade was made out according to the modified Mankin scale. The expression of aggrecan and YKL-40 in the cartilage with different stages of OA were analyzed by the immunohistochemistry method, and the status of expression were measured by average optical density (AOD). The correlation between aggrecan and YKL-40 was analyzed. **Results** With the aggravation of OA, the expression of aggrecan was gradually reduced and the expression of YKL-40 was gradually increased. The differences during the early, middle and late phases of OA had statistical significance ( $P<0.05$ ). The expression of aggrecan was negatively correlated with the expression of YKL-40 ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The level of aggrecan is gradually reduced with the aggravation of OA. Aggrecan is negatively correlated with the YKL-40 level, which may reflect the dedifferentiation degree of joint chondrocyte to some extent.

**Key words:** osteoarthritis; joints; cartilage; aggrecan; YKL-40

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是严重危害人类身体健康的慢性退变性关节疾病,是老年人群中最常见的关节疾病之一。OA 发病机制目前尚不完全明确,在 OA 的病理过程中,细胞外环境异常和遗传等因素导致软骨细胞代谢失衡,甚至影响软骨细胞基因表达及表型改变,软骨细胞可出现去分化<sup>[1]</sup>。蛋白多糖是软骨细胞外的一种基质,其在细胞间信息传递、维持细胞表型及保持组织整体功能等发挥重要生物学功能<sup>[2]</sup>。YKL-40 是一种哺乳动物糖蛋白,其在健康儿童和成人机体中水平很低,但在 OA 患者关节软骨、血清、关节滑膜中的表达则明显增高<sup>[3]</sup>。有研究表明,YKL-40 可促进软骨细胞分化,维持细胞表型<sup>[4]</sup>,促进蛋白多糖合成。本研究于 2011 年 5 月至 2012 年 9 月通过建立 SD 大鼠 OA 模型,检测蛋白多糖及 YKL-40 在关节软骨中表达,探讨随着 OA 病程和病情的变化,蛋白多

糖与 YKL-40 的相关性。现报道如下。

**1 材料与方法**

**1.1 材料** (1)动物:清洁级健康 SD 大鼠 56 只,体质量 160~220 g,雌雄各半,由广东医学院实验动物中心提供(动物合格证号为 A2009029),将 56 只大鼠分成 7 组,每组 8 只,选取 1 组为对照组,另 6 组为实验组。随机选取一侧膝关节作手术侧,行前交叉韧带离断术。(2)药物及试剂:固绿、乙二胺四乙酸(EDTA)购自美国 AMRESCO 公司;多聚甲醛、番红 O 购自美国 SIGMA 公司;抗蛋白多糖抗体购自上海安研商贸有限公司;抗 YKL-40 抗体购自上海翔升生物科技有限公司;DAB 显色试剂盒购自上海长岛生物技术公司。

**1.2 方法**

**1.2.1 样本收集及处理** 分别于术后 2、4、8、12、16、20 周随

\* 基金项目:广东医学院附属医院青年科研基金资助项目(205019010021)。 作者简介:陈喜德(1981—),主治医师,硕士研究生,主要从事骨关节炎诊治研究。△ 通讯作者,Tel:13726902012;E-mail:webjxmc@163.com。

机处死 1 组实验大鼠,对照组大鼠于手术时处死。切取各组 SD 大鼠手术侧股骨髁软骨,行 4%多聚甲醛固定 24 h,10% EDTA 液脱钙 4 周,常规梯度乙醇脱水,二甲苯透明、石蜡浸渍、石蜡包埋,4  $\mu$ m 厚连续切片。

**1.2.2 番红 O/固绿染色** (1)石蜡切片脱蜡至水;(2)染苏木精 3 min 后水洗;(3)1%盐酸乙醇分化 15 s;(4)蒸馏水洗 3 min;(5)0.02%固绿水溶液 3 min;(6)1%冰醋酸漂洗切片;(7)0.1%番红 O 染色 3 min;(8)95%乙醇浸洗;(9)脱水、透明、封片,显微镜下观察。

**1.2.3 HE 染色** (1)染色前切片脱蜡水洗:①二甲苯 I 10 min;②二甲苯 II 5 min;③95%乙醇 I 1~2 min;④95%乙醇 II 1~2 min;⑤自来水洗 1~2 min。(2)染色:①苏木精染液 10 min;②自来水洗 1~2 min;③1%盐酸乙醇分化 15 s;④自来水洗 15 min 以上至泛蓝;⑤伊红水溶液染色 1 min。(3)脱水、透明、封固:①75%乙醇 1~2 min;②85%乙醇 1~2 min;③95%乙醇 1~2 min;④无水乙醇 I 1~2 min;⑤无水乙醇 II 1~2 min;⑥二甲苯 I 2 min;⑦二甲苯 II 2 min;⑧中性树胶封固。

**1.2.4 免疫组织化学染色** (1)脱蜡、水化:脱蜡前,将玻片放在 60  $^{\circ}$ C 恒温箱中烘烤 30 min。置于二甲苯 I 中浸泡 10 min,在二甲苯 II 中再浸泡 10 min;无水乙醇 I 中浸泡 5 min,在无水乙醇 II 中再浸泡 5 min;95%乙醇中浸泡 5 min;85%乙醇中浸泡 5 min;70%乙醇中浸泡 5 min;蒸馏水中浸泡 5 min。(2)蒸馏水中浸泡 5 min。(3)用蒸馏水或 PBS 配置新鲜的 3%  $H_2O_2$ ,室温封闭 10 min,蒸馏水洗 1 次。(4)微波抗原修复:取一定量的 0.01 mol 柠檬酸盐缓冲液(pH6.0)于微波盒中,微波加热至沸腾;将脱蜡水化后的玻片置于耐高温塑料切片架上,放入已沸腾的缓冲液中,中高档继续处理 10~15 min;取出微波盒冷却至室温,取出玻片,先用蒸馏水洗 2 次后用 PBS 洗 5 min。(5)PBS 洗 5 min。(6)滴加正常山羊血清封闭液,室温 10 min。(7)每张切片加 50 L 一抗(蛋白多糖、YKL-40 均为 1:100 稀释),4  $^{\circ}$ C 孵育,过夜。(8)PBS 洗 2 次,各 5 min。(9)滴加生物素化 II 抗,37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min。(10)PBS 洗 2 次,各 5

min。(11)滴加酶标抗体,37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min。(12)PBS 洗 2 次,各 5 min。(13)DAB 显色 5~10 min,在显微镜下掌握染色程度。(14)蒸馏水洗终止染色,苏木素复染、盐酸乙醇分化。(15)脱水、透明、封片、镜检。

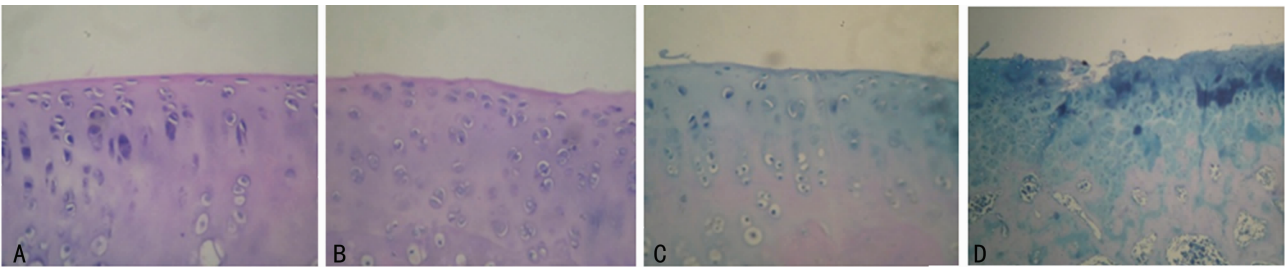
**1.2.5 病理学分期** 根据番红 O/固绿染色和 HE 染色结果,对软骨样本进行改良 Mankin 评分,对软骨样本进行 OA 病理分期。

**1.2.6 免疫组织化学染色结果处理** 免疫组织化学结果以 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统进行分析。每张切片随机采集 4 个高倍视野进行测定,对阳性染色的平均光密度值(AOD)进行半定量分析。所有玻片均在同一放大倍数、同一光强度下分析测量相同面积的 AOD。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS11.5 统计软件进行统计学分析。符合正态分布的数值以  $\bar{x} \pm s$  表示。正态分布,方差齐性的多独立样本定性资料,采用方差分析。相关分析采用 Spearman 相关系数分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

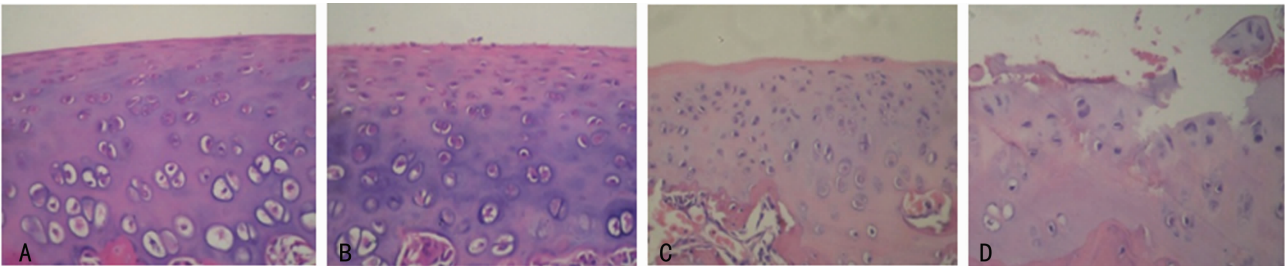
2 结 果

**2.1 关节软骨番红 O/固绿染色及 HE 染色结果** (1)番红 O/固绿染色:对照组关节软骨见软骨着色正常或轻染,呈淡红色(图 1A);早期 OA 组见软骨表浅层红色着色变浅(图 1B);中期 OA 组见软骨表浅层着色呈浅绿色,深层红色变浅(图 1C);晚期 OA 组见软骨面表浅层呈深绿色,深层大部分呈浅绿色(图 1D)。(2)HE 染色:对照组见关节软骨面光滑,颜色红润;或可见软骨表面颜色稍暗淡,无裂隙形成;细胞正常或少量增生,细胞排列规整(图 2A)。早期 OA 组可见关节软骨面裂隙形成,呈糜烂或浅溃疡;软骨面破坏达到移行层或辐射层;关节表浅层细胞部分缺失,深层细胞增生稍紊乱;潮线完整(图 2B)。中期 OA 组主要见关节软骨面裂隙较深,呈溃疡,少量可见软骨面剥脱;软骨面破坏达到辐射层或钙化层;关节表浅层细胞大部分缺失,深层细胞增生紊乱,潮线完整(图 2C)。晚期 OA 组见关节软骨面深溃疡或大部分软骨面剥脱;软骨面破坏达到辐射层或钙化层;关节表浅层细胞大部分缺失,深层细胞增生紊乱;潮线可部分破坏,见图 2 D。



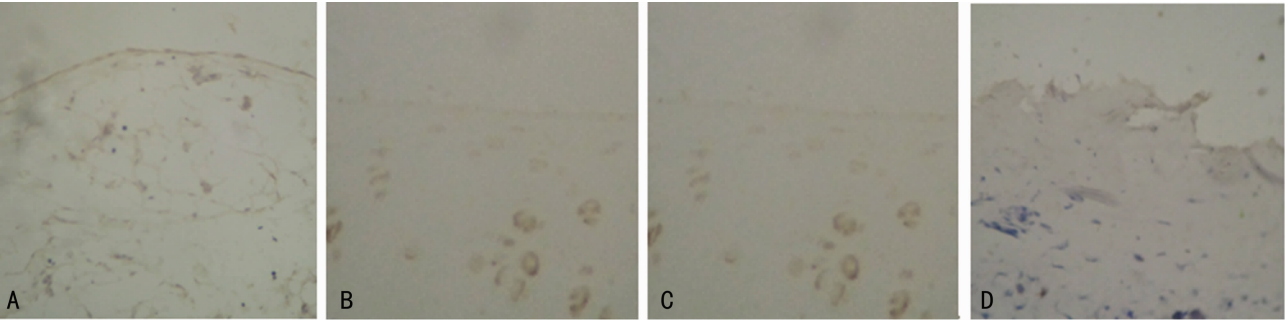
A:对照组;B:早期 OA 组;C:中期 OA 组;D:晚期 OA 组。

图 1 各组大鼠关节软骨番红 O/固绿染色( $\times 400$ )

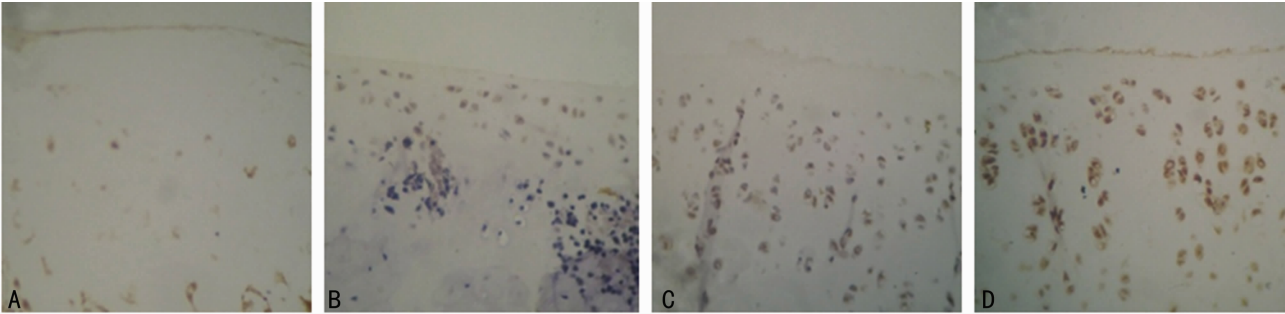


A:对照组;B:早期 OA 组;C:中期 OA 组;D:晚期 OA 组。

图 2 各组大鼠关节软骨 HE 染色( $\times 400$ )



A:对照组;B:早期 OA 组;C:中期 OA 组;D:晚期 OA 组。  
图 3 免疫组织化学染色各组关节软骨蛋白多糖表达(×400)



A:对照组;B:早期 OA 组;C:中期 OA 组;D:晚期 OA 组。  
图 4 免疫组织化学染色各组关节软骨 YKL-40 表达(×400)

**2.2 改良 Mankin 评分结果** 每张切片选取 5 个不同视野,分别在×100 和×400 倍光镜下观察,进行改良 Mankin 评分(正常:0~1 分;早期 OA: >1~5 分;中期 OA: >5~10 分;晚期 OA: >10~14 分)。56 只大鼠中对照组(正常)11 例,Mankin 评分为(0.55±0.52)分;早期 OA 组 25 例,Mankin 评分为(3.56±1.12)分;中期 OA 组 14 例,Mankin 评分为(7.71±0.99)分;晚期 OA 组 6 例,Mankin 评分为(11.17±0.75)分。各组比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

**2.3 蛋白多糖、YKL-40 的表达** (1)蛋白多糖的表达:对照组与 OA 病变组关节软骨基质中蛋白多糖均有表达。随着 OA 关节软骨退变程度加重,蛋白多糖表达逐渐减少(图 3A~D)。对照组和早、中、晚期 OA 组软骨蛋白多糖的 AOD 均呈正态分布,其 Kolmogorov-Smirnov Z 值分别为 0.683 和 0.354、0.686、0.440;双侧检验  $P$  值分别为 0.740 和 1.000、0.735、0.990。经 Levene 方差齐性检验, $P=0.691$ ,方差齐。做完全随机方差分析, $F=141.455$ , $P<0.05$ ,说明各组 AOD 不完全相同。进一步两两比较,选择  $q$  检验,早期 OA 组比对照组蛋白多糖表达减少( $P<0.05$ ),中期 OA 组比早期 OA 组蛋白多糖表达减少( $P<0.05$ ),晚期 OA 组比中期 OA 组蛋白多糖表达减少( $P<0.05$ )。(2)YKL-40 的表达:对照组及 OA 病变组关节软骨中均有 YKL-40 表达,表达部位均位于细胞内。对照组软骨细胞内 YKL-40 表达较低,随着 OA 关节软骨退变程度加重,软骨细胞内 YKL-40 表达逐渐增多(图 4A~D)。对照组和早、中、晚期 OA 组软骨细胞内 YKL-40 的 AOD 均呈正态分布,其 Kolmogorov-Smirnov Z 值分别为 0.760 和 0.779、0.570、0.447;双侧检验  $P$  值分别为 0.610 和 0.578、0.902、0.988。经 Levene 方差齐性检验, $P=0.994$ ,方差齐性。做完全随机方差分析, $F=52.069$ , $P<0.05$ ,提示各组的 AOD

不完全相同。进一步两两比较,选择  $q$  检验,对照组与早期 OA 组比较差异无统计学意义( $P=0.146$ ),中期 OA 组与晚期 OA 组比较差异无统计学意义( $P=0.351$ ),中期 OA 组比早期 OA 组 YKL-40 表达增多( $P<0.05$ ),见表 1。

表 1 各组软骨中蛋白多糖及 YKL-40 的 AOD 比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	<i>n</i>	蛋白多糖	YKL-40
对照组	11	0.248 5±0.011 0	0.286 5±0.013 3
早期 OA 组	25	0.236 2±0.009 4 <sup>a</sup>	0.295 3±0.014 1
中期 OA 组	14	0.183 7±0.013 1 <sup>b</sup>	0.338 9±0.013 7 <sup>b</sup>
晚期 OA 组	6	0.171 8±0.007 6 <sup>c</sup>	0.344 4±0.014 4

<sup>a</sup>: $P<0.05$ ,与对照组比较;<sup>b</sup>: $P<0.05$ ,早期 OA 组比较;<sup>c</sup>: $P<0.05$ ,与中期 OA 组比较。

**2.4 蛋白多糖与 YKL-40 相关性分析** 蛋白多糖为偏态分布资料,YKL-40 为正态分布资料。采用 Spearman 相关系数分析蛋白多糖与 YKL-40 相关性。蛋白多糖与 YKL-40 表达呈负相关( $r=-0.746$ , $P<0.01$ ),见图 5。

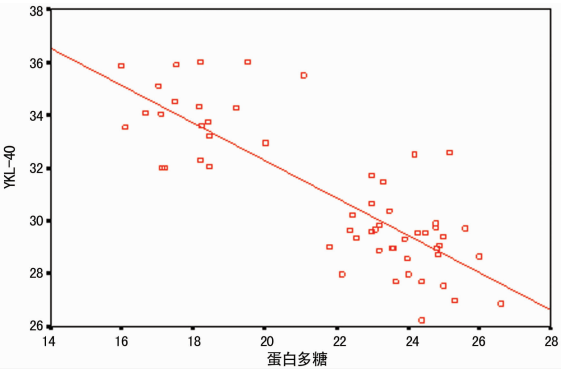


图 5 蛋白多糖与 YKL-40 关系散点图



3 讨 论

蛋白多糖由核心蛋白及糖胺聚糖组成,其与透明质酸非共价结合,是软骨的主要结构成分之一。蛋白多糖在其他组织中仅有少量表达,但在软骨组织中有大量表达,其主要功能为在关节负重时缓冲负荷和压力,保持软骨弹性和一定硬度。在本实验中,随着 OA 病变加重,蛋白多糖表达进行性减少,早期 OA 组比对照组蛋白多糖表达减少,中期 OA 组比早期 OA 组蛋白多糖表达减少,晚期 OA 组比中期 OA 组蛋白多糖表达减少,3 组比较,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。蛋白多糖减少,可能与以下因素有关:(1)OA 病变进展时软骨细胞去分化,功能软骨细胞减少,蛋白多糖合成减少;(2)OA 时金属蛋白酶和软骨蛋白多糖酶增多<sup>[5]</sup>,导致蛋白多糖降解增多;(3)OA 时基质中胶原和蛋白多糖结构破坏,引起免疫反应,导致蛋白多糖进一步降解<sup>[6]</sup>;(4)OA 时一些细胞活性因子激活,直接或间接促进蛋白多糖降解<sup>[7]</sup>;(5)OA 退变时软骨胶原网络崩解,蛋白多糖直接丢失。本实验免疫组织化学染色提示,蛋白多糖减少部位主要位于软骨退变部位的浅层和中层,结果与 Blaw 等<sup>[8]</sup>对关节软骨的研究结果相一致。

软骨细胞在对软骨生物化学环境或生物力学环境变化反应后能够迅速产生大量的 YKL-40。Volck 等<sup>[9]</sup>报道 YKL-40 阳性细胞主要分布于 OA 软骨退变部位的表层及中层,这与本实验中所观察的结果基本一致。在本实验中,YKL-40 表达随着 OA 关节软骨退变程度加重而逐渐增多( $P<0.05$ ),OA 中期以后,YKL-40 的表达呈平缓趋势( $P>0.05$ ),可能和软骨退变时表层软骨细胞丢失,合成 YKL-40 的细胞数减少有关。随着 OA 病变加重,关节软骨退变部位软骨细胞去分化逐渐加重,软骨蛋白多糖减少,软骨细胞外环境紊乱。紊乱的软骨细胞外环境又可进一步诱发软骨细胞去分化,产生异常的细胞外基质,导致软骨退变呈恶性循环。由于 YKL-40 对细胞外基质具有保护性作用<sup>[10]</sup>,且可促进软骨细胞分化或维持软骨细胞表型稳定,提示随软骨细胞外蛋白多糖减少,软骨细胞去分化加重,YKL-40 反应性表达增多,可能在一定程度上有助于维持软骨细胞表型稳定,减缓关节软骨的退变速度。

蛋白多糖作为一种重要的细胞外基质,由正常软骨细胞分泌。OA 时软骨细胞去分化,多种因素导致蛋白多糖减少。而 YKL-40 有维持软骨细胞表型,促进蛋白多糖合成作用。近年来,有学者认为,蛋白多糖可作为 OA 诊断和预后判断的候选生化指标<sup>[11]</sup>,陈喜德等<sup>[12]</sup>研究认为,OA 时 YKL-40 表达可能在一定程度上反映关节软骨细胞的去分化程度。本实验结果提示,蛋白多糖与 YKL-40 水平呈负相关( $r=-0.746$ , $P<0.01$ ),可作为一种反映软骨细胞去分化程度的指标。本文对蛋白多糖、YKL-40 在大鼠模型中所表现的特点以及二者相关性作了初步探讨,但对于二者是否有直接的相互作用,有待于今后的继续研究中深入探讨。

参考文献:

[1] Eyre DR, Weis MA, Wu JJ. Articular Cartilage Collagen;

An Irreplaceable Framework? [J]. Eur Cell Mater, 2006, 12(1):57-63.

[2] Aspberg A. The different roles of aggrecan interaction domains[J]. J Histochem Cytochem, 2012, 60(12):987-996.

[3] Ringsholt M, Høgdall EV, Johansen JS, et al. YKL-40 protein expression in normal adult human tissues-an immunohistochemical study[J]. J Mol Histol, 2007, 38(1):33-43.

[4] Jacques C, Recklies AD, Levy A, et al. HC-gp39 contributes to chondrocyte differentiation by inducing SOX9 and type II collagen expressions[J]. Osteo Arthritis Cartilage, 2007, 15(2):138-146.

[5] Lark MW, Bayne EK, Flanagan J, et al. Aggrecan degradation in human cartilage:evidence for both matrix metalloproteinase and aggrecanase activity in normal, osteoarthritic, and heumatoid joints[J]. J Clin Invest, 1997, 100(1):93-106.

[6] Neame PJ, Sandy JD. Cartilage aggrecan: biosynthesis, degradation and osteoarthritis [J]. J Fla Med Assoc, 1994, 81(2):191-193.

[7] Tnppel SB. Growth factor actions on articular cartilage [J]. J Rheumatol, 1995, 43 Suppl:129-132.

[8] Blaw FJ, Guistian R, Vazquez ME, et al. Osteoarthritis chondrocytes did by apoptosis: A possible pathway for osteoarthritis pathology[J]. Arthritis Rheum, 1998, 41(2):284-289.

[9] Volck B, Johansen JS, Stoltenberg M, et al. Studies on YKL-40 in knee joints of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis: involvement of YKL-40 in the joint pathology[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2001, 9(3):203-214.

[10] De Ceuninck F, Gauffillier S, Bonnaud A, et al. YKL-40 (cartilage gp-39) induces proliferative events in cultured chondrocytes and synoviocytes and increases glycosaminoglycan synthesis in chondrocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 285(4):926-931.

[11] Ratcliffe A, Shurety W, Caterson B. The quantitation of a native chondroitin sulfate epitope in synovial fluid lavages and articular cartilage from canine experimental osteoarthritis and disuse atrophy[J]. Arthritis Rheum, 1993, 36(4):543-551.

[12] 陈喜德, 魏波, 刘军, 等. 骨关节炎大鼠关节软骨中 YKL-40 与Ⅲ型胶原的相关性[J]. 广东医学, 2012, 33(22):3364-3367.

(收稿日期:2013-09-20 修回日期:2013-12-20)

启事:本刊对院士及 863、973 项目文章开通绿色通道, 欢迎投稿。