

兔后交叉韧带断裂后外侧胫骨平台退变的组织学研究

罗小中¹ 李康华^{2△} 章 灿² 赵瑞波² 廖 瞻²

(1 湖南省湘潭市中心医院 湖南 湘潭 411100 2 中南大学湘雅医院 湖南 长沙 410008)

摘要 目的 探讨兔后交叉韧带(Posterior cruciate ligament ,PCL)断裂对外侧胫骨平台组织学的影响。方法 48 只家兔膝关节随机配对为实验侧和对照侧造模,造模后第 4、8、16、24 周各随机处死 12 只,行外侧胫骨平台大体观察、HE 染色、免疫组化检测基质金属蛋白酶 13 (matrix metalloproteinase-13 ,MMP-13)、基质金属蛋白酶抑制剂 1 (Tissue inhibitor-1 of matrix metalloproteinase1, TIMP-1)表达。结果 ①大体观察 随时间延长,实验组外侧胫骨平台软骨出现磨损,呈灰黄色,弹性差,骨赘形成。②组织学观察,随时间延长,胫骨平台软骨纤维化,细胞排列紊乱,簇聚细胞出现频率增加。③实验组 MMP-13、TIMP-1 表达均高于对照组,有显著性差异 $P<0.05$ 。④实验组 MMP-13、TIMP-1 表达阳性率第 4、8、16 周逐渐升高,24 周下降,各组比较有显著性差异 $P<0.05$ 。结论 ①兔膝关节 PCL 断裂会引起外侧胫骨平台软骨退行性变,且该退变随着时间的推移逐渐加重。② MMP-13 与 TIMP-1 在 PCL 断裂膝关节外侧胫骨平台中的表达呈现先高后低的变化规律,造成 MMP-13 与 TIMP-1 的失衡,加速软骨退变。③ MMP-13 与 TIMP-1 表达增高提示 MMP-13 与 TIMP-1 可能参与了 PCL 断裂后外侧胫骨平台软骨的退变过程。

关键词 后交叉韧带; 外侧胫骨平台; 基质金属蛋白酶 13; 基质金属蛋白酶抑制剂 1

中图分类号 Q95-3 R683 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)18-3438-04

Histology Study of Posterolateral Tibial Plateau Degeneration after Rupture of Posterior Cruciate Ligament in Rabbits

LUO Xiao-zhong¹, LI Kang-hua^{2△}, ZHANG Can², ZHAO Rui-bo², LIAO Zhan²

(1 Xiangtan Central Hospital, Xiangtan, Hunan Province 411100;

2 Department of Orthopedics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha Hunan 410008)

ABSTRACT Objective: To explore the histological influence on lateral tibial plateaus which was caused by rupture of PCL. **Methods:** The modes of lateral tibial plateaus of 48 rabbits were matched in pairs randomly including experiment group which PCL were transacted and control group at the 4th,8th,16th and 24th week, 12 rabbits were sacrificed randomly, then lateral tibial plateaus were observed in general and through HE staining and immunohistochemistry staining, the expression of matrix metalloproteinase-13 (MMP-13)and Tissue inhibitor-1 of matrix metalloproteinase1 (TIMP-1) was detected. **Results:** 1). The observation in general showed that along with the increase of the time, lateral tibial plateaus of experiment group are gradually presented with abrasion, luidity, bad elasticity and formation of osteophytes. 2). Along with the increase of the time, the observation of histology showed fibering of lateral tibial plateau, meanwhile, there are abnormal cell disposition and increasingly clustered cell. 3). Expression of MMP-13 and TIMP-1 was higher in experimental group than that in control group, showing significant difference, $P<0.05$. 4). In experimental group, the positive rate of expression of MMP-13 and TIMP-1 were increased gradually at the 4th,8th and 16th week, and decreased at 24th week, showing significant difference, $P<0.05$. **Conclusions:** 1). Rupture of PCL could cause the degeneration of the lateral tibial plateau. As time goes on, this condition will be aggravated. 2). The expression of TIMP-1 and MMP13 in lateral tibial plateau of ruptured PCL of knee tend to be low→high, causing the unbalance between MMP-13 and TIMP-1.3L, therefore, sped up the degeneration of the cartilage. 3). The increase of the expression of MMP-13 and TIMP-1 indicated that they may participate in the course of degeneration of the lateral tibial plateau cartilage.

Key words: PCL; Tibial plateau; MMP-13; TIMP-1

Chinese Library Classification: Q95-3, R683 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)18-3438-04

后交叉韧带(Posterior cruciate ligament ,PCL)损伤是临床常见的运动损伤。当 PCL 断裂后,由于解剖结构发生变化,膝关节所承担的载荷及应力重新分布,从而引起半月板、关节软骨等损伤。本研究拟通过观察兔膝关节 PCL 断裂后外侧胫骨

平台软骨组织结构的变化及基质金属蛋白酶 13 (matrix metalloproteinase-13 ,MMP-13)、基质金属蛋白酶抑制剂 1 (Tissue inhibitor-1 of matrix metalloproteinase1,TIMP-1)的表达,探讨 PCL 断裂对外侧胫骨平台退变的影响,为临床诊治后交叉韧带损伤提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

作者简介 罗小中(1975-) 男,博士,副主任医师,主要研究方向:

创伤骨科、人工关节 电话:13007323901 E-mail: xdoelxz@163.com

△通讯作者 李康华 E-mail: lkh0807@163.com

(投稿日期: 2011-04-22 接受日期: 2011-05-18)

实验动物 :家兔 48 只 ,雄性 ,6 月龄 ,实验初始体重 $2.6\pm 0.4\text{kg}$,由中南大学动物实验学部提供。抗兔 MMP-13 多克隆抗体、抗兔 TIMP-1 多克隆抗体(均由武汉博士德公司)。

1.2 兔膝关节 PCL 断裂模型的制备及实验分组

双膝关节按简单随机法随机分为实验侧和对照侧配对造模^[1]。家兔耳缘静脉注射麻醉 ,作膝关节髌旁前内侧纵行切口 ,长约 1.5cm。逐层切开进入关节囊 ,脱位髌骨 ,显露 PCL ,将膝关节屈曲至 90° ,在 PCL 中段完全切断。对照侧经同样切口显露 PCL 但不行切断。48 只家兔按 4、8、16、24 周随机分为 4 组 ,每组 12 只 ,各组实验兔按设定时间点分批处死。

1.3 观测指标与方法

1.3.1 显微镜下大体观察 实验兔处死后立即解剖膝关节 ,在 10 倍手术显微镜下观察外侧胫骨平台关节面的病理改变。

1.3.2 显微镜下组织学检查 实验兔处死后切取厚约 5mm 完整外侧胫骨平台(包括部分软骨下骨) ,保持关节面完整 ,甲醛溶液中固定 24h、脱钙、脱水、透明、包埋、切片与烤片 ,HE 染色。

1.4 免疫组化染色及结果判断

按 S-P 免疫组化染色检测试剂盒所附操作程序进行。阳性染色结果为棕褐色染色。形态计量学研究 :参考 Pelletier 等^[2]的方法 ,计算每个视野里的阳性细胞数和细胞总数。表达量用细胞分数即阳性细胞数占细胞总数的百分比来表示。

1.5 统计学方法

SPSS 18.0 统计软件进行统计分析。采用均数 \pm 标准差表示 ,样本均数行单因素方差分析(One-Way ANOVA) ,有方差齐性后采用 SNK-q 检验进行组间两两比较 ,方差不齐性行 Dunnett-T3 检验组间两两比较。P<0.05 有统计学意义。

2 结果

2.1 外侧胫骨平台软骨大体观察结果

实验组 4 周 软骨淡蓝色 ,表面光滑 ,触之有弹性 ;8 周 软骨黄白色 ,表层略不平弹性较差 ,胫骨外侧平台周缘可见骨赘形成 ;16 周 软骨呈灰黄色 ,表面绒毛状 ,弹性差 ,胫骨外侧平台周缘骨赘形成较明显 ;实验组 24 周 软骨呈灰黄色 ,部分软骨有溃疡面 ,胫骨外侧平台周缘骨赘形成明显。

2.2 外侧胫骨平台软骨 HE 染色观察结果

对照组染色均匀一致 ,胶原纤维、软骨细胞形态正常。实验组 4 周 ,染色均匀一致 ,软骨细胞分布均匀 ,无簇集软骨细胞 ,潮线完整 ;8 周 ,染色尚均匀 ,细胞排列欠规整 ,偶见少量簇集的软骨细胞 ;16 周 ,细胞排列紊乱 ,潮线不规则 ,簇聚细胞出现频率增加(图 1) ;24 周 ,可见范围较大的软骨纤维化 ,细胞数减少 ,潮线消失 ,钙化层难以分辨。

2.3 外侧胫骨平台软骨免疫组化观察结果

各时间点 MMP-13 免疫组化阳性表达率及比较如表 1 所示。各时间点 TIMP-1 免疫组化阳性表达率及比较如表 2 所示。对照组 MMP-13 表达 ,表层弱阳性 ,胞浆和基质均无表达。实验组 4 周时 ,表层、基质及胞浆中 MMP-13 均表现为弱阳性 ,部分胞浆表达 ;8 周时表层表达呈阳性 ,基质、胞浆染色稍弱 ;16 周时 ,表层、基质及胞浆中的表达均呈强阳性 ,基质部分降解 ,部分细胞变形(图 2) ;24 周的染色程度较 16 周下降 ,基质降解。对照组 TIMP-1 表达 ,表层弱阳性 ,胞浆和基质均无表达。实验组 4 周时细胞 ,基质 TIMP-1 表达呈弱阳性 ;8 周时可见较多的阳性细胞 ,细胞胞浆与基质深染 ,到 16 周时 ,表层、基质和胞浆均呈强阳性表达 ,基质部分降解(图 3) ;24 周时可见软骨细胞减少 ,胞浆内表达减弱 ,基质降解 ,染色程度亦下降。4、8、16、24 周时实验组 MMP-13、TIMP-1 表达均高于正常对照组 ,均有显著性差异(P<0.05)。对照组间比较无显著性差异(P>0.05) ;从第 4 周至第 16 周 MMP-13、TIMP-1 表达逐渐加强(P<0.05) ,第 24 周 MMP-13、TIMP-1 表达较第 16 周时有所减弱(P<0.01)。

表 1 不同时间点实验组、对照组 MMP-13 阳性表达率($\bar{x}\pm s,\%$)

Tab.1 Positive rate of MMP-13 expression between experimental group and control group at different time points($\bar{x}\pm s,\%$)

Group	4w	8w	16w	24w
Control group	1.05 \pm 0.13	1.10 \pm 0.15	1.15 \pm 0.15	1.18 \pm 0.16
Experimental group	9.65 \pm 1.15	46.76 \pm 2.61	63.08 \pm 2.56	34.66 \pm 2.21
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

表 2 实验组、对照组不同时间点 TIMP-1 阳性表达率($\bar{x}\pm s,\%$)

Tab.2 Positive rate of TIMP-1 expression between experimental group and control group at different time points($\bar{x}\pm s,\%$)

Group	4w	8w	16w	24w
Control group	1.07 \pm 0.11	1.13 \pm 0.11	1.13 \pm 0.15	1.16 \pm 0.15
Experimental group	6.83 \pm 0.82	36.48 \pm 3.34	55.60 \pm 3.79	44.34 \pm 3.38
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

3 讨论

PCL 是膝关节内主要的后向稳定结构之一 ,PCL 损伤后期将导致关节软骨退变 ,出现骨关节炎(Osteoarthrits ,OA) ,并随时间延长日益加重^[3]。MMPs 是依赖 Zn^{2+} 和 Ca^{2+} ,参与降解细胞

外基质(ECM)的蛋白水解酶家族^[4] ,对细胞外基质的生理性和病理性降解过程中起重要作用^[5]。MMP-13 在正常组织中不表达 ,而在 OA 软骨细胞中有高表达 ,MMP-13 是所有已知酶中最有效的 Ⅰ型胶原降解酶。关节软骨细胞外基质主要成分为 Ⅰ型胶原 ,其次为蛋白多糖。MMP-13 可将胶原的三重螺旋结构

进行 α -链解旋,解旋后的胶原更易被降解,使关节软骨基质中的胶原纤维网破坏、抗剪切力作用下降,最终导致关节软骨进行性破坏。吴宏斌等^[6]研究发现 MMP1 和 MMP13 在 OA 早中期软骨、滑膜中的检出率明显高于对照组,随时间延长,MMP1 仍可维持较高的检出率,且表达量持续增高,但 MMP13 的检出率却明显下降,提示 MMP13 主要在 OA 早中期起作用。

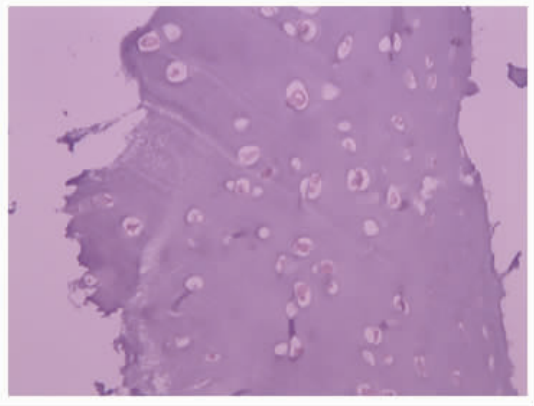


图1 实验组 16 周 HE 染色示软骨细胞排列紊乱,簇聚细胞出现频率增加($\times 40$)

Fig.1 HE staining shows abnormal disposition of cartilage cell and increasingly clustered cell in experimental group at 16th week ($\times 40$)

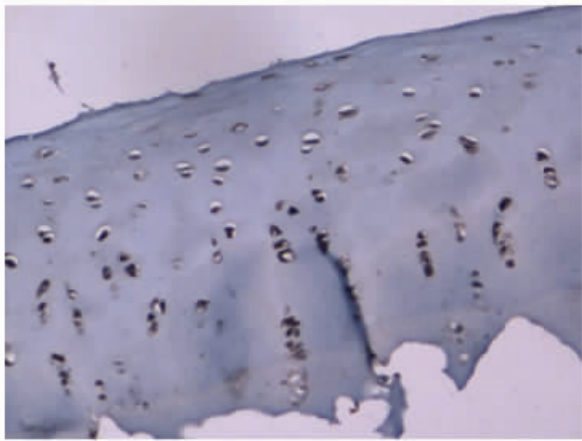


图2 实验组 16 周 MMP-13 表达呈强阳性($\times 40$)

Fig.2 Expression of MMP-13 showed strong positive in experimental group at 16th week($\times 40$)

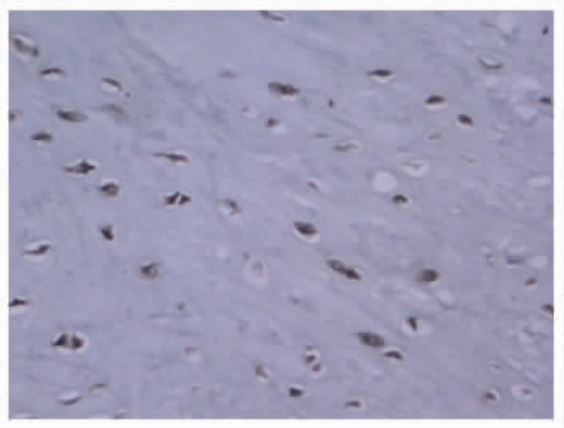


图3 实验组 16 周 TIMP-1 表达呈强阳性($\times 40$)

Fig.3 Expression of TIMP-1 showed strong positive in experimental group at 16th week($\times 40$)

TIMPs 是 MMPs 天然的、特异性的抑制剂,在通常情况下,每一种 TIMP 都可与几种 MMPs 以共价键形式生成 1:1 的复合物,对活性 MMPs 具有专一的抑制作用^[7-10]。众多研究证明 MMP-13 和 TIMP-1 在骨性关节炎滑膜组织及关节滑液中高表达^[11-15]。OA 软骨退变可以说是软骨细胞外基质降解与合成明显失衡引起的病变^[15]。王玉彬等^[11]实验发现 TIMP-1 虽然在 OA 软骨的深层出现了过量表达,但与 MMPs 的升高并不同步,相对 MMPs 仍呈低量表达。在正常关节软骨中 MMPs 和 TIMPs 的分泌水平保持平衡,TIMP-1 基本分泌量对维持关节软骨的完整性具有重要作用。但在 OA 软骨中,由于 TIMP-1 的相对表达量少于 MMPs,这就使得 MMPs 的降解作用过分发挥,所对应的 ECM 组分过量降解,促进软骨退变。

本实验结果显示,随着兔 PCL 断裂时间的延长,外侧胫骨平台软骨的退变呈进行性发展,在 4、8、16 周等时间点上,MMP-13 与 TIMP-1 的表达也逐渐增强,到第 24 周 MMP-13 与 TIMP-1 的表达却减弱,而此时镜下软骨的损伤进一步加重,后期改变可能与较多的软骨细胞凋亡有关。在 4、8、16 周等时间点上,相对 MMP-13,TIMP-1 表达偏低,MMP-13/TIMP-1 比值升高,从而加速细胞外基质降解。兔 PCL 切断后第 8、16 周时软骨退变以 OA 早中期改变为主,24 周时软骨退变则以溃疡形成等 OA 晚期的改变为主。不论从大体观察、显微结构观察还是免疫组化结果均提示兔 PCL 断裂后可引起外侧胫骨平台软骨的退行性变,也提示 MMP-13 与 TIMP-1 可能参与了 PCL 断裂后的外侧胫骨平台软骨退变过程。

参 考 文 献(References)

[1] 贺石林,李元建.医学科研方法学[M].人民军医出版社,第1版,2001:229-232
He Shi-lin, Li Yuan-jian. Medical Research Methodology [M]. People's Military Medical Press, the first edition, 2001:229-232

[2] Pelletier JP,Lascau-Coman V,Javanovic D,et al.Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental oosteoarthritis is associated with reduction tissue levels of catabolic factor [J].Rheumatol, 1999,26:2002-2014

[3] 王健, 敖英芳. 后交叉韧带断裂继发关节软骨退行性变的实验研究 [J].中国运动医学杂志,2004,23(5):474- 479
Wang Jian, Ao Ying-fang. Study on the articular cartilage degeneration secondary to posterior cruciate ligament rupture in rabbit knee [J].Chinese Journal of Sports Medicine.2004, 23(5):474-479

[4] Cotign ola J, Reva B,Mitra N,et al.Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) polymorphisms in patients with cutaneous malignant melanoma [J].BMC Med Genet,2007,8:10

[5] Martel Pelletier J, McCollum R, Fujimoto N, et al. Excess of metalloproteases over tissue inhibitor of metalloprotease may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis [J]. Lab Invest, 1994, 70:807-815

[6] 吴宏斌, 张景辉. 兔前交叉韧带切断骨关节炎模型中 MMP-1-MMP-13 及 TIMP-1 的 mRNA 表达研究[J].中华风湿病学杂志,2002,6:169-173,1001
Wu Hong-bin,Chen An-Min. Expression of MMP-1 MMP-13 and TIMP-1 mRNA in cartilage and synovium of experimentally induced rabbit ACLT osteoarthritis [J]. Chinese Journal of Rheumatology,

2002,6:169-173,1001

[7] Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, et al. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions [J]. Eur J Cell Biol, 1997,74(2):111-122

[8] Ishiguro N, Ito T, Oguchi T, et al. Relationships of matrix metalloproteinases and their inhibitors to cartilage proteoglycan and collagen turnover and inflammation as revealed by analyses of synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2001,44(11):2503-2511

[9] Ogata Y, Miura K, Ohkita A, et al. Imbalance between matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 expression by tumor cells implicated in liver metastasis from colorectal carcinoma [J]. Kurume Med J, 2001,48(3):211-218

[10] Close DR. Matrix metalloproteinase inhibitors in rheumatic diseases [J]. Ann Rheum Dis, 2001,60 Suppl 3:iii62-67

[11] 王玉彬,陈安民,郭风劲,等.基质金属蛋白酶家族在骨关节炎软骨组织中表达的研究[J].中国矫形外科杂志,2007,15(11):853-855

Wang Yu-bin, Chen An-Min,Guo Feng-Jin, et al. Immunohistochemical expression and significance of MMP-7/MMP-9/MMP-13 and TIMP-1 in osteoarthritis [J].Orthopedic Journal of China,2007,15(11):853-855

[12] Xia Rui, Dong Qi-rong. Expression of MMP-13 in the Synovocyte of Osteoarthritis in Human [J]. SUZHOU University journal of Medical Science, 2006, 26 (5):815

[13] 郭静,张娜,闫冰,等.MMP - 13 与 IL - 6 在骨性关节炎相关性表达研究[J].华北煤炭医学院学报,2008,10(3):297-299

Guo Jing,Zhang Na,Yan Bin,et al. Correlational research on expression of MMP-13 and IL-6 in Osteoarthritis [J].Journal of North China Coal Medical College,2008,10(3):297-299

[14] 吴世栋,杨勇,张小钰,等.骨性关节炎中白介素 -7 及基质金属蛋白酶 -13 的表达[J].宁夏医学杂志,2009,31(6): 504-505

Wu Shi-dong,Yang Yong,Zhang Xiao-yu, et al. Expression of interleukin-7 and matrix metalloproteinase 13 in Osteoarthritis [J]. Ningxia Medical Journal,2009,31(6): 504-505

[15] Reddi AH. Aging,osteoarthritis and transforming growth factor-beta signaling in cartilage [J].Arthritis Res Ther,2006,8(1):101

封面说明

共同的画卷 封面设计说明

自 1997 年第一只克隆羊多利的诞生拉开了人造生命的序幕,2010 年,可谓是人造生命科学发展的一个新的里程碑。本刊 2011 年封面设计的灵感来自于人造生命技术的蓬勃发展 ① 封面背景以第三代测序技术即基于纳米孔的单分子实时 DNA 测序技术的研制成功为契机(图中,偏下),这为人造生命及人类健康提供了强有力的技术支撑。② 封面图案以 2010 年诺贝尔生理与医学奖的体外受精技术(即试管婴儿),最强壮晶胚的筛选技术,人工卵巢及人类卵细胞的培育技术为主体(图上,右,中,左),这些不仅为不孕不育患者带来了福音,同时为社会的稳定与和谐贡献了力量。③ 封面图案同时也融合了人造生命的最新研究成果即首个能自我生长,繁殖的人造生命细胞 Synthia 的问世(六边形图,右),由干细胞培育出的肺脏(六边形图,左)等最新研究成果。④ 封面图案同时也展示了人造生命发展的伦理学争议与潜在的危机,关于艾滋病的研究取得了很多成就,但我们还没有攻克艾滋病,特别是 Superbug 耐药性超级细菌的出现,让无数人感到前所未有的恐慌(六边形,中)。⑤ 生命科学的一切研究成果,只不过是生物医学历史的长河中一朵浪花,因此图片采用波浪形设计,如河流奔涌向前,如画卷色彩缤纷,如电影胶片所有的成就与辉煌一闪而过,未来会更加让人期待。新技术新理论的发明与发展,需要有准备的大脑,也需要灵光突闪的思想火花。对于与人类密切相关的生物医学领域,我们如图中的小孩一样,睁大纯真的眼睛,好奇的观察、了解,我们也需要运用一系列的技术手段,面对未知的一个个“黑箱”问题,需要细心大胆的研究、推断,同时我们需要时刻警觉生命科学技术发展应用这把双刃剑潜伏的危机,应当科学探索并利用自然规律来更好的为人类服务。

我们坚信《现代生物医学进展》正是为生物医学领域的科研工作者提供了这样一个可以充分挥洒展示的画卷的平台,不断记录着生物医学领域最新最成功的成果。这是我们共同的画卷,让我们与你们共同分享灵感与喜悦,成功与辉煌!