

# 关节腔内注射IGF-1修复关节软骨缺损及预防骨关节炎的实验研究

[ 作者: 梅海龙 孔抗美 王梅 齐伟力 郑浩 ]

THE EXPERIMENTAL STUDY ON THE REPAIR OF ARTICULAR CARTILAGE DEFECTS AND THE PREVENTION OF OSTEOARTHRITIS BY INTRA-ARTICULAR INJECTION OF IGF-1  
MEI Hailong, KONG Kangmei, WANG Mei, et al

**【摘要】**目的 探讨关节腔内注射胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 对修复关节软骨缺损及预防骨关节炎的作用。方法 20只雄性成年新西兰大白兔随机分成A、B、C、D 4组, 每组5只, A、B、C三组分别在膝关节滑车处钻孔造成关节软骨全层缺损, 以右膝为实验侧, 术后向关节腔内注射1 mg/ml 的IGF-1 0.1 ml, 每周1次; 左膝为对照侧, 与实验组同一时间注射等量生理盐水; D组为正常对照组, 不作任何处理。术后1、4、8周分别取材进行大体观察, HE和Safranin O染色评分, 同时运用免疫组织化学方法观察IGF-1及IGF-1R的表达情况。结果 各组实验侧软骨缺损处组织的修复情况均优于对照侧, 并且实验侧在各组软骨缺损周围的正常软骨未发生明显退变, 而对照侧周围软骨在4、8周时发生了不同程度的退变, 周围软骨中IGF-1的表达实验侧与正常组比较无统计学意义 ( $p > 0.05$ ), 而对照侧4、8周与正常组比较差异有显著性 ( $p < 0.01$ ); IGF-1R的表达在各组实验侧和对照侧与正常组比较均无统计学意义 ( $p > 0.05$ )。结论 IGF-1在关节软骨缺损早期即行关节腔内注射可有效的促进关节软骨缺损的修复, 并延缓周围软骨的退变, 从而预防骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 的发生。

**【Abstract】** Objective To investigate the effect of insulin-like growth factor-1 on the repair of articular cartilage defects and the prevention of osteoarthritis by intra-articular injection. Methods A total of 20 healthy matured New Zealand rabbits were divided into 4 groups randomly. The cartilage damage model was established by drilling on the knee joint trochlea zone with group A, B and C. On the right knee, 0.1 ml IGF-1 was injected into the knee cavity every week, while on the left knee the defect was left as a control and 0.1 ml normal saline was injected in the same time. Nothing was done with the group D. The animals were killed respectively after 1, 4, 8 weeks, and then the macroscopic examination, hematoxylin and eosin stain, safranin o stain, IGF-1 and IGF-1R immunohistochemical examination were performed. Results The regeneration tissue of the experiment side was better than the control side in each group. Besides, the cataplasia didn't find in the normal cartilage around the defect on the experiment side, but different degrees cataplasia were found on the control side in group B and C. There wasn't statistical difference ( $p > 0.05$ ) between the experiment side and the normal group with the expression of IGF-1 in the normal cartilage around the defect, but there was a significant statistical.

**【Key words】** insulin-like growth factor-1. Articular Cartilage, osteoarthritis

**【Author's address】** The Second Affiliated Hospital, Shantou University Medical College, Guangdong 515041, PRC

临床上由于创伤和各种疾病如骨关节炎、骨坏死等造成的关节软骨缺损很常见, 关节软骨缺损后的修复现已成为近年来骨科及相关领域基础和临床研究的热点和难点。目前研究表明多种生长因子在软骨缺损的修复中发挥重要作用, 包括IGF-1, FGF, TGF- $\beta$ , HGF, PDGF, BMP等。其中IGF-1是软骨细胞增殖分化中已知的作用最强的因子之一。它能够与软骨细胞膜上的受体结合, 也可以通过旁分泌和自分泌的形式发挥作用, 从而促进软骨细胞合成II型胶原和蛋白多糖, 抑制软骨基质的降解, 加快软骨细胞的有丝分裂。多数学者研究发现软骨损伤后将促进关节退变, 最终导致OA的发生。本实验拟通过建立创伤性关节软骨缺损动物模型, 局部运用IGF-1行关节腔内注射, 观察IGF-1对关节软骨缺损的修复作用, 并了解周围软骨的退变情况。

## 1 材料与方法

1.1 主要试剂和材料 IGF-1蛋白; SP免疫组化超敏试剂盒、DAB显色试剂盒、胃蛋白酶Pepsin; IGF-1及IGF-1R单克隆抗体、多聚赖氨酸和APES。

1.2 动物分组、处理及模型的建立 20只雄性成年新西兰大白兔随机分成A、B、C、D 4组, 每组5只, A、B、C三组用3%的戊巴比妥钠按1 mg/Kg沿兔耳缘静脉麻醉, 仰卧位固定于动物手术台上, 双侧膝关节手术区域备皮, 常规消毒、铺巾, 取膝关节前内侧纵行切口, 长约3 cm, 依次切开皮肤、皮下组织和关节囊, 保持髌韧带完整性, 将髌骨翻向外侧, 显露股骨髁, 在股骨髁间凹中部关节软骨面上用直径4 mm的角膜环钻以垂直于关节面的方向向下钻孔, 平均深度3 mm, 以可见软骨下骨渗血为标准。用5-0的无损伤缝合线依次关闭关节囊, 缝合肌肉, 丝线缝合皮肤。术后笼中饲养, 自由活动。术前和术后连续3 d行肌肉注射青霉素钠针40万单位/只, 每天1次。皮肤伤口每天用碘伏消毒两次, 连续7 d, 预防感染。以右膝为实验侧, 术后向关节腔内注射1 mg/ml 的IGF-1 0.1 ml, 每周1次; 左膝为对照侧, 与实验组同一时间注射等量生理盐水。D组为正常对照组, 不作任何处理, 择期处死动物, 标本行大体观察后依次经过4%多聚甲醛固定24 h, 15%EDTA脱钙6 w, 常规脱水、石蜡包埋、5  $\mu$ m 厚度切片, HE和Safranin O染色评分及免疫组织化学

会员登陆

用户名

密码

验证码

确认

免费会员注册

## 历年期刊

- 2008年3月第8卷第3期
- 2008年2月第8卷第2期
- 2008年1月第8卷第1期
- 2007年12月第7卷第12期
- 2007年11月第7卷第11期
- 2007年10月第7卷第10期
- 2007年9月第7卷第9期
- 2007年8月第7卷第8期
- 2007年7月第7卷第7期
- 2007年6月第7卷第6期

更多

## 本刊信息

方法检测IGF-1及IGF-1R的表达。

1.3 免疫组织化学检测步骤 常规SP法：石蜡切片二甲苯脱蜡，梯度乙醇水化后，用胃蛋白酶37℃孵育15 min，依次滴加过氧化酶阻断液，非免疫动物血清封闭液，一抗，二抗，链霉素抗生物素-过氧化物酶溶液，二氨基联苯胺（DAB）显色，苏木素复染，脱水，透明，封片。

1.4 评价指标 ①大体观察膝关节有无挛缩、粘连和血肿形成；关节液的颜色和量；缺损处修复组织的厚度、表面规则性、光泽度以及与周围软骨的结合情况；缺损周围软骨的色泽和表面平整性。②光镜组织学观察：将标本常规固定、脱钙、包埋、切片后行HE和Safranin O染色，采用盲法对标本的修复组织行Waki tani法 [1] 评分，对缺损周围的软骨行改良的Mankin法 [2] 评分，评分数据以均数±标准差（ $\bar{X} \pm s$ ）表示，结果用SPSS13.0统计软件经正态性和方差齐性检验后做配对设计的t检验，以  $p < 0.05$  视为有统计学意义， $p < 0.01$  为有高度统计学意义。③免疫组织化学检测：光镜下细胞中有棕色颗粒者为阳性细胞，每张切片随机选取5个视野，计数阳性细胞总数，结果以均数±标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示。同上用SPSS13.0统计软件将各时期实验侧和对照侧分别与正常对照侧比较，采用单因素多样本均数两两比较的Dunnett t检验，以  $p < 0.05$  视为有统计学意义， $p < 0.01$  为有高度统计学意义。

## 2 结果

2.1 大体观察 A组：实验侧和对照侧关节内无粘连，周围未见血肿，关节液较浑浊，缺损处被暗红色纤维肉芽组织覆盖，表面明显低于周围正常软骨，周围软骨表面光滑，与D组比较无明显差异。B组：实验侧关节无挛缩和粘连，关节液清亮，软骨缺损区已被修复组织完全充填，部分高出周围软骨面，修复组织呈白色半透明状，表面平坦，与周围组织分界清楚，周围组织色泽光亮，表面光滑；对照侧有2膝关节内有少许粘连，关节液较正常增多，浑浊，软骨缺损区修复组织低于周围软骨，仍可见明显凹陷，周围软骨表面较粗糙，色泽较黯淡。C组：实验侧关节内无粘连和挛缩，关节液清亮，软骨缺损区修复组织充填完全，与周围软骨基本持平，颜色也与周围软骨较接近，边缘分界较模糊；对照侧基本被修复组织填平，中央有小的凹陷，与周围组织分界明显，周围软骨表面粗糙，色泽黯淡，部分有小的缺损。D组：关节液量不多，呈无色透明、粘稠状，关节软骨表面光滑，外观呈乳白色，有光泽，无裂纹，触之较硬。

2.2 光镜观察及组织学评分 H.E染色见正常组关节软骨表面平整，四层结构清晰可见，软骨细胞排列规则，全层未见细胞簇集和减少。A组实验侧缺损处修复组织较对照侧充填完全，而对照侧仍遗留较大缺损，修复组织中间含有较多的梭形纤维细胞和小血管，未见软骨样细胞，周围软骨结构清晰，与正常软骨无明显差别。B组实验侧缺损处修复组织表面较平，部分高出周围软骨，主要为纤维组织，内含大量软骨样细胞团，周围软骨表面平整，细胞排列较整齐，对照侧大部分由纤维样组织充填，缺损处中央凹陷，未见软骨样细胞，周围软骨表面粗糙。C组实验侧软骨缺损区已被软骨样细胞充填完全，表面基本与周围软骨相平并融合，分界不明显，周围软骨部分有散在增生，对照侧缺损区由纤维组织充填，表面不平，内含少量散在的片状软骨样组织，周围软骨表面粗糙并有龟裂。Waki tani 评分结果见表1，各组实验侧得分均优于对照侧，两两比较差别有统计学意义（ $p < 0.05$ ）。Safranin O染色Mankin评分结果见表1，A组实验侧与对照侧比较无统计学意义（ $p > 0.05$ ），而B组和C组对照侧评分均高于实验侧，差别有统计学意义（ $p < 0.05$ ）。

2.3 免疫组化结果 统计结果见表2，各组实验侧和对照侧【CM(81.5mm)侧IGF-1和IGF-1R阳性细胞数分别与正常组同侧阳性【CM】】

表1 Waki tani 评分和Mankin 评分结果

组别	n	Waki tani 评分		Mankin 评分	
		对照侧	实验侧	对照侧	实验侧
A组	5	11.8±1.30	12.8±0.84	0.4±0.55	0.2±0.45
B组	5	6.6±1.14	12.8±1.30	0.6±0.89	4.2±1.30
C组	5	3.8±0.84	7.6±1.14	1.2±0.84	6.8±0.84

注:1)与对照侧比较  $p > 0.05$ , 2)与对照侧比较  $p < 0.01$

细胞数相比较，发现B组和C组对照侧IGF-1与正常组同侧比较存在高度显著性差异（ $p < 0.01$ ），而实验侧各时期和A组对照侧分别与正常组比较无统计学意义（ $p > 0.05$ ），IGF-1R的表达各时期实验侧与对照侧分别与正常组比较无统计学意义（ $p > 0.05$ ）（见图1-图4）。

表2 各组IGF-1和IGF-1R阳性细胞数比较结果（ $\bar{X} \pm s$ ）

组别	n	IGF-1		IGF-1R	
		对照侧	实验侧	对照侧	实验侧
A组	5	55.20±9.52	55.20±9.52	63.20±9.68	63.20±9.68