rh-aFGF 对创伤性关节炎早期大鼠软骨与滑膜中 MMP1 表达的影响

王 宁,白祥军,易成腊,廖忆刘,胡 崙,陈继革
(华中科技大学同济医学院附属同济医院创伤外科,武汉 430030)

[摘 要] **目的** 观察实验性创伤性关节炎早期大鼠软骨和滑膜组织中基质金属蛋白酶 1(MMP1)的表达,以及关节腔注射重组人酸性成纤维细胞生长因子(rh-aFGF)对其表达的影响。**方法** 雄性 SD 大鼠 24 只,随机分为空白组、对照组和实验组,每组 8 只 。对照组和实验组大鼠采用切断右侧膝关节内侧副韧带和切除部分内侧半月板的方式建立大鼠创伤性关节炎模型。实验组大鼠在造模术中及术后 1 周分别在手术侧关节腔注入 rh-aFGF 1 μg。2 周后处死大鼠,采用苏木精-伊红(HE)染色观察各组大鼠关节软骨和滑膜组织结构变化,采用免疫组织化学染色法检测各组大鼠的关节软骨和滑膜内 MMP1 表达。**结果** 与空白组比较,对照组大鼠关节软骨和滑膜中的 MMP1 表达明显增高,而实验组大鼠关节软骨和滑膜中的 MMP1 表达则较对照组减少。**结论** rh-aFGF 关节腔注射可以减少创伤性关节炎早期大鼠关节软骨和滑膜组织中 MMP1 的表达,从而在创伤性关节炎的发生过程中对关节软骨的退变和滑膜组织的炎症发挥一定的抑制作用。

[关键词] rh-aFGF;基质金属蛋白酶;关节炎,创伤性;免疫组织化学染色
[中图分类号] R977;R684.3 [文献标识码] A [文章编号] 1004 - 0781(2010)03 - 0289 - 04

Effect of Intra-articular Injection of Recombinant Human Acidic Fibroblast Growth Factors on Expression of Matrix Metalloproteinases-1 in Cartilage and Synovium of Early Traumatic Arthritis Model in Rats

WANG Ning, BAI Xiang-jun, YI Cheng-la, LIAO Yi-liu, HU Duan, CHEN Ji-ge(*Department of Traumatic Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan* 430030, *China*)

ABSTRACT **Objective** To explore effect of intra-articular injection of recombinant human acidic fibroblast growth factors on the expression of matrix metalloproteinases-1 in cartilage and synovium of early traumatic arthritis(TA) model in male SD rats. **Methods** 24 male SD rats were randomly divided into blank group (n = 8), experimental group (n = 8) and drug interventional group (n = 8). The animal models of TA were developed through transection of the medial collateral ligament plus partial medial meniscectomy in male SD rats. 1 μg rh-aFGF was injected into articular cavity during or one week after operation. Two weeks after the operation, rats were sacrificed, HE staining was applied to observe the changes of the structure of cartilage and synovium, and immunohistochemical staining was applied to detect MMP-1 expression in cartilage and synovium. **Results** The expression of MMP-1 in cartilage and synovium in the experimental group increased significantly as compared with the blank group, while the expression of which in articular cartilage and synovial membrane was abated. **Conclusion** Intra-articular injection of rh-aFGF can reduce the expression of MMP1 in articular cartilage and synovial tissue of early traumatic arthritis rats, and inhibit the degeneration of articular cartilage and inflammation of the synovial tissues.

KEY WORDS rh-aFGF; MMP1; Traumatic arthritis; Immunohistochemical staining

创伤性关节炎(TA)是继发于关节创伤的骨关节炎(OA),受伤后发病时间长短不一,临床主要表现为受累关节的疼痛、不同程度的关节活动障碍,严重者有畸形改变,甚至致残。其病理学表现为关节软骨破坏、软骨下骨改变,伴随有或无关节滑膜炎症[1]。基质金属蛋白酶 1(matrix metalloproteinases-1,MMP-1)主要参与Ⅱ型胶原的降解,在创伤性关节炎中的表达增加,与创伤性关节炎的发病机制和进程密切相关。笔者通过研究重组人酸性成纤维细胞生长因子(rh-aFGF)关节腔注射对创伤性关节炎大鼠关节和滑膜组织中 MMP1 表达的影响,旨在探讨 rh-aFGF 在修复创伤性关节炎受损的关节软骨,抑制滑膜炎症,延缓创伤性关节炎进程中的作用。

[收稿日期] 2009 - 06 - 07 [修回日期] 2009 - 09 - 27

[作者简介] 王 宁(1983 -),男,河南洛阳人,硕士,从事骨与关节损伤、严重多发伤的研究。电话:027 - 83663813,E-mail:wangning0379@163.com。

[通讯作者] 白祥军(1963 -),男,教授,主任医师,博士生导师,主要从事脑脊髓损伤、严重多发伤的研究。电话:027 - 83663813,E-mail:baixiangjun@hotmail.com。

1 材料与方法

1.1 *实验分组和模型建立* 华中科技大学同济医学院动物实验中心提供的雄性 SD 大鼠 24 只,每只体质

量约250 g。随机分3组:空白组、对照组和实验组,每组8只。对照组和实验组大鼠用10%水合氯醛腹腔麻醉成功后,用切断右侧膝关节内侧副韧带和切除部分内侧半月板的方式建立大鼠创伤性关节炎模型[2,3]。实验组大鼠在造模术中及术后1周分别在手术侧关节腔注入rh-aFGF 1 μg(200 μL)。

1.2 取材　术后2周处死大鼠,收集各组大鼠的软骨和滑膜组织,行苏木精-伊红(HE)染色和免疫组织化学染色。滑膜取材:取髌骨下极向下延续的平滑光亮呈淡黄色的滑膜组织。用眼科直镊钝性分离关节囊的滑膜层和纤维层,完整剥离滑膜组织,用眼科剪完整剪下;软骨取材:矢状位切取股骨内髁软骨退变区带软骨下骨质的软骨标本,标本厚约2 mm,大小约4 mm × 4 mm。

1.3 HE染色　软骨和滑膜组织常规固定,脱钙(滑膜组织无需脱钙),经过脱蜡,洗净,核染色,洗净,分化,返蓝,亲和,对比染色,分化脱水,透明等步骤后,封固切片。

1.4 免疫组织化学染色(SABC法)　软骨和滑膜组织常规固定、脱钙(滑膜组织无需脱钙),梯度脱水,透明,浸蜡包埋,连续切片,贴片于涂有多聚赖氨酸的载玻片上,然后脱蜡、水化和抗原修复。封闭,一抗结合(抗MMP1多克隆抗体1∶500)。漂洗,二抗结合。SABC孵育,DAB显色,苏木素复染。最后脱水,透明,封片,显微镜观察。

1.5 计量学方法　形态计量学研究:参考PELLETIER等[4]的方法,软骨切片随机选取6个高倍镜视野(400倍),其中3个位于软骨表层和中上层,另3个位于软骨中下层和下层,标本应注意选取邻近退变缺损部位但具有完整4层软骨结构的区域进行观测。滑膜标本则随机选取5个位于衬里细胞层的高倍视野(400倍),计算每个视野里的阳性细胞数和细胞总数。MMP-1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,其最大值为100%。每块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,取二者均值为最后的得分。

1.6 统计学方法　实验结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS13.0统计学软件对数据进行处理,均数间差异性比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 软骨组织的改变　HE染色可见:空白组可见正常的软骨组织结构;对照组软骨表面不整齐,软骨发生退变,表面软骨纤维化,软骨下骨侵入软骨层,髓腔出现硬化;实验组表面软骨少许纤维化;软骨层变薄不明显,软骨细胞排列层次紊乱,但软骨表面相对平整。

免疫组化染色可见:空白组软骨见极少量MMP1阳性细胞,基本为背景着色;对照组软骨4层结构中均可见到胞质染成深棕色的阳性细胞,但以表层及中上层更为显著;实验组软骨的表层及中上层中阳性细胞较对照组明显减少,深层结构MMP1阳性细胞数量不多。

2.2 滑膜组织的改变　HE染色可见:空白组为正常的滑膜组织;对照组可见滑膜细胞增生,滑膜肥厚,滑膜组织纤维化明显,血管增生,呈现肉芽组织样改变;而实验组主要表现为表层滑膜组织增生,滑膜组织纤维化不明显。

免疫组化染色可见:空白组滑膜仅见少数MMP1阳性的滑膜衬里层细胞表达;对照组滑膜可见大量胞质着色的滑膜衬里层细胞,分布范围较广;实验组可见滑膜衬里细胞层的阳性细胞数量较对照组明显减少,主要集中在滑膜表层。

2.3 软骨及滑膜中MMP-1细胞百分数的变化　见表1。

表1　各组大鼠软骨及滑膜中MMP-1细胞百分数的变化

Tab.1　The percentage of MMP1 cells in cartilage and synovium in rats　　%　$\bar{x} \pm s$

组别	大鼠/只	MMP1细胞分数	
		软骨	滑膜
实验组	8	32.0±14.8*1	24.0±13.5*1
对照组	8	60.0±26.6*2	52.0±24.6*2
空白组	8	3.0±1.2	5.0±2.2

与对照组比较,*1$P<0.05$;与空白组比较,*2$P<0.05$

Compared with control group,*1 $P<0.05$; Compared with blank group,*2$P<0.05$

对照组大鼠软骨和滑膜组织中MMP1阳性细胞数和空白组差异有显著性,说明造模成功;对照组与实验组比较,$P<0.05$,差异有显著性,说明rh-aFGF关节腔注射后,创伤性关节炎大鼠软骨和滑膜组织中MMP1阳性细胞数明显减少,rh-aFGF对延缓创伤性关节炎进程有效。

3 讨论

酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)为成纤维细胞生长因子(FGF)大家族两个成员,它们作用相似,都具有较强的、广谱的有丝分裂原作用。目前认为,所有源于内胚层和神经外胚层的细胞都经aFGF或bFGF的刺激而分化,其中aFGF在胚胎发生、发育、血管发生和创伤愈合等方面具有重要的作用,这与其促分裂特性有关[5]。FGF能刺激成骨细胞和软骨细胞的增殖和分化,还能促进

关节软骨细胞 TGFβ$_1$ 表达及基质合成,从而刺激软骨细胞蛋白多糖的合成,可促使体外软骨细胞前质的分化和软骨细胞的增殖与成熟,推迟关节软骨细胞成熟,维持软骨细胞表型[6]。

创伤性关节炎早期,软骨中水的成分增加导致胶原结构改变,紧接着胶原网的细胞外基质中蛋白多糖发生改变并最终造成丢失。蛋白多糖的丢失预示着基质稳态的丧失,合成和分解代谢间的平衡被打破,分解代谢占了主导地位。早期,软骨企图通过增加基质大分子的合成完成自我修复[7]。尽管如此,这种修复通常是不成功的,很可能是因为氨基葡聚糖(GAG)的构成及分布的改变,以及 GAG 与透明质酸聚合能力的改变。随病程进展,小颗粒(particles)从受损关节面释放,引起滑膜的炎性改变,从而引起轻微的滑膜炎症和渗出。

MMP-1 属于基质金属蛋白酶家族(MMPs)中的胶原酶亚族,能切断软骨的Ⅱ型胶原。Ⅱ型胶原是软骨胶原网的主要成分,与蛋白多糖一起赋予软骨弹性及形变能力。如果胶原网被破坏,则明显削弱软骨抵抗外界应力的能力,而且还会使软骨细胞暴露于众多炎性因子的攻击之下,使软骨基质成分游离出软骨,导致软骨破坏[8]。因此,软骨和滑膜组织中 MMP1 的表达水平在一定程度上能够反映创伤性关节炎的进程,通过免疫组化的方法检测 MMP1 的表达也可以反映关节软骨退变和滑膜炎症。WU 等[8]发现在兔创伤性关节炎中,MMP1 主要在软骨和滑膜的表层表达,与本研究结果一致。本研究中关节腔注射 rh-aFGF 剂量参考吴 昊等[9]及徐卫东等[10]的研究。

软骨细胞周围基质的完整性是通过分解代谢性细胞因子和合成代谢性细胞因子间的平衡来实现的,前者如 IL-1α、IL-1β 和肿瘤坏死因子 α(TNFα),它们诱导产生了具有基质降解作用的 MMP,从而进行基质的降解;后者如胰岛素样生长因子(IGF)和转化生长因子 β(TGFβ),它们诱导产生组成软骨、胶原、蛋白多糖等的大分子物质,进行软骨的自我修复。这一平衡系统进一步被组织金属蛋白酶抑制剂和其他的细胞因子及其抑制剂调控,细胞因子网络中任何一种因子浓度的改变都可能改变这种平衡,从而引起基质蛋白的过量产生或降解[11]。FGF 能促进关节软骨细胞 TGFβ$_1$ 表达及基质合成,从而刺激蛋白多糖的合成,而 TGFβ 作为一种合成代谢性细胞因子,在软骨自我修复有重要作用。本研究中 rh-aFGF 是否通过促进 TGFβ$_1$ 的表达而降低 MMP1 表达水平,有待进一步的研究。

创伤性关节炎发生后,关节腔内酸性产物堆积,关节滑液由正常的碱性变为酸性,bFGF 对酸性环境很敏感,而 aFGF 则稳定得多,更容易发挥其生物学活性,因此推测,rh-aFGF 的临床应用可能更广泛[12],在治疗创伤性关节炎方面可能发挥作用。笔者在本实验中通过观察在创伤性关节炎大鼠关节腔注射 rh-aFGF 对关节软骨和滑膜中 MMP1 表达的影响,在一定程度上证实了 rh-aFGF 在修复创伤性关节炎受损的关节软骨,抑制滑膜炎症,延缓创伤性关节炎进程中的积极作用。

aFGF 可以促进软骨退行性变的修复,因此将 rh-aFGF 应用于创伤性关节炎的治疗是完全有可能的,其在修复及构建软骨领域中的作用越来越引起学者的重视[13]。但其作为一种创伤性关节炎治疗药物尚受到临床用药剂量、给药方式及其远期效应评价等方面的限制,需要做进一步的深入研究。

[DOI] 10.3870/yydb.2010.03.005

[参考文献]

[1] MARTIN J A. Post-traumatic osteoarthritis: the role of stress induced chondrocyte damage[J]. *Biorheology*, 2006,43(3-4):517-521.

[2] JANISZ M J, BENDELE A M, BROWN K K, *et al*. Induction of osteoarthritis in the rat by surgical tear the meniscus: inhibition of joint damage by a matrix metalloproteinase inhibitor[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002, 10(10): 785-791.

[3] 陈连旭,傅 欣,于长隆,等. 内侧副韧带切断合并半月板部分切除对大鼠膝关节软骨、滑膜和细胞因子的影响[J]. 中国运动医学杂志, 2006,25(6):655-662.

[4] PELLETIER J P, LASCAU-COMAN V, JOVANOVIC D, *et al*. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental oateoarthritis is associated with reduction in tissue levels of catabolic factors[J]. *J Rheumatol*,1999,26(9):2002-2014.

[5] PANDIT A, ASHAR R, FELDMAN D, *et al*. Investigation of acidic fibroblast growth factor delivered through a collage scaffold for the treatment of full thickness skin defects in a rabbit model[J]. *Plast Reconstr Surg*, 1998, 101(3): 766-775.

[6] FOLKMAN J, KLAGSBRUN M. Angiogenic factor[J]. *Science*,1987,235(4787):442-447.

[7] BUCKWALTER J A, BROWN T D. Joint injury, repair, and remodeling: roles in post-traumatic osteoarthritis[J]. *Clin Orthop*, 2004,423(1):7-16.

[8] WU Hong-bin, DU Jing-yuan, ZHENG Qin-xin. Expression of MMP1 in cartilage and synovium of experimentally induced rabbit ACLT traumatic osteoarthritis: immunohistochemical study[J]. *Rheumatol Int*, 2008,29(1):31-36.

[9] 吴　昊,姚　平,刘　宁,等. 重组人酸性成纤维细胞生长因子关节腔注射预防骨关节炎软骨退行性变[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007,11(32):6394 - 6396.

[10] 徐卫东,吴岳嵩,赵定麟,等 成纤维细胞生长因子对兔关节软骨损伤修复作用的初步探讨[J]. 中华风湿病学杂志, 1998,2(3):150 - 151.

[11] CAROLE I, WESTACOTT , MOHAMMED S. Cytokine in osteoathritis: mediators or markers of joint destruction[J]. *Semi Arth Rheu* , 1996,25(4) :254 - 272.

[12] 李亦武,李桂玲,向继洲,等 重组人酸性成纤维细胞生长因子促进烧伤与创伤愈合作用机制的研究[J]. 医药导报,2005,24(11):978 - 980.

[13] MARTIN I, SUETTERLIN R, BASCHONG W, *et al*. Enhanced cartilage tissue engineering by sequential exposure of chondrocytes to FGF-2 druing 2D expansion and BMP-2 during 3D cultivation[J]. *J Cell Biochem*, 2005, 83 (1): 121 - 128.

乌蕨总黄酮体外抗氧化活性的研究

吴晓宁[1,2], 余陈欢[1], 徐静红[2]

(1. 浙江中医药大学药学院,杭州　310053;2. 浙江医学高等专科学校药学系,杭州　310053)

[摘　要] **目的**　研究乌蕨总黄酮体外抗氧化活性。**方法**　采用分光光度法,测定乌蕨总黄酮对羟自由基、脂质过氧化的清除能力、总还原力和总抗氧化作用,并通过多元线性回归分析,考察了乌蕨总黄酮含量及其体外抗氧化活性的相关性。**结果**　乌蕨总黄酮具有较强的抗氧化性能、自由基清除能力和一定的还原力,可有效抑制脂质过氧化,且抗氧化作用与乌蕨总黄酮含量呈正相关。**结论**　乌蕨总黄酮具有显著的抗氧化活性,黄酮类化合物可能是其抗氧化作用的主要物质基础。

[关键词]　乌蕨;总黄酮;抗氧化

[中图分类号]　R282.71;R285.5　　[文献标识码]　A　　[文章编号]　1004 - 0781(2010)03 - 0292 - 03

Antioxidant Activity of Flavonoids from *Stenoloma chusanum*(L). Ching *in vitro*

WU Xiao-ning[1,2], YU Chen-huan[1], XU Jing-hong[2] (1. *School of Pharmacy* , *Zhejiang Chinese Medical Univeisity*, *Hangzhou* 310053, *China*; 2. *Department of Pharmacy* , *Zhejiang Medical College* , *Hangzhou* 310053, *China*)

ABSTRACT　**Objective**　To investigate the antioxidant activity of flavonoids from *Stenoloma chusanum* (L.) Ching *in vitro*. **Methods**　The radical scavenging, total antioxidant and reducing capacity of hydroxy radicals and lipid peroxides by the total flavonoids from *Stenoloma chusanum*(L.)Ching were detected and analyzed by using spectrophotometry and multiple linear regression analysis. The correlation between contents of total flavonoids and their antioxidant activity *in vitro* was surveyed. **Results**　The extracts showed strong antioxidant activities, free radical clearance and some reduction ability, by efficiently inhibiting lipid peroxidation in a dose dependent manner. **Conclusion**　The total flavonoids may be the main active component of *Stenoloma chusanum* (L.) Ching which exerting an antioxidative activity.

KEY WORDS　*Stenoloma chusanum*(L.)Ching; Total flavonoids; Antioxidant activity

乌蕨[*Stenoloma chusanum*(L.)Ching]为鳞始蕨科植物乌蕨的全草,又名野鸡尾、金花草、中华金粉蕨,具有清热、解毒、利湿、止血的功效[1]。其主要含有芳樟醇、松油醇和香叶醇等挥发性成分以及木犀草素、牡荆素等黄酮类化合物[2~4]。据报道,乌蕨具有抑菌、护肝、止血、解毒等作用,且安全,无毒副作用[5~7]。目前国内研究主要集中在乌蕨抗菌作用,笔者未见对其抗氧化作用的报道。为了合理利用该植物资源并确定其主要抗氧化活性成分,笔者对其进行了体外抗氧化研究,现报道如下。

[收稿日期]　2009 - 04 - 29

[作者简介]　吴晓宁(1974 -),女,浙江人,讲师,在读博士,从事天然药物的开发与研究。电话:0571 - 87692684,E-mail:wxn1974168@126.com。

1　仪器与试药

1.1　仪器　BS224S 精密电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),TU-1900 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司),KQ-5000 超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

1.2　试药　乌蕨药材于 2008 年 10 月采自杭州九溪,经熊耀康教授鉴定为乌蕨[*Stenoloma chusanum*(L.)Ching]的地上部分,阴干,粉碎,备用。芦丁标准品购自中国药品生物制品检定所(批号:100080-20030);大豆卵磷脂购自 Sigma 公司(批号:F20070207);其他试