

关节腔注射低分子肝素治疗兔膝骨关节炎的研究

张丽娜^{1,2}, 凌沛学^{1,2}, 张天民^{1,2} (1. 山东大学药学院, 山东 济南 250012; 2. 山东省生物药物研究院 博士后科研工作站, 山东 济南 250108)

摘要 目的: 研究低分子肝素与玻璃酸钠复方凝胶注射液和单用低分子肝素注射液治疗骨关节炎的疗效和机制。方法: 12只新西兰白兔左右膝关节腔内各注射 0.4%木瓜酶溶液 0.3 mL, 随机分为 3组。自造模 7 d 后开始给药, 每周 1次, 共 5周。结果: 低分子肝素与玻璃酸钠复方凝胶注射液组、低分子肝素注射液组疗效明显优于生理盐水组。含低分子肝素的注射液能够明显促进滑膜、软骨细胞增生, 降低软骨破坏, 同时抑制肿瘤坏死因子- α 的释放, 调节白介素-6的分泌, 有利于改善骨关节炎症状。结论: 低分子肝素有较好的抗炎作用, 具有安全、方便、行之有效的治疗骨关节炎方法的开发潜力。

关键词 低分子肝素; 玻璃酸钠; 骨关节炎; 木瓜酶; 细胞因子

中图分类号: R684.3 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2008)02-0110-05

Intra-articular low molecular weight heparin injections in treating knee osteoarthritis of rabbits

ZHANG Li-na^{1,2}, LING Pei-xue^{1,2}, ZHANG Tian-min^{1,2} (1. School of Pharmaceutical Science, Shandong University, Jinan 250012, China; 2. Working Station for Postdoctoral Scientific Research, Institute of Biopharmaceuticals of Shandong Province, Jinan 250108, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects and mechanisms of injecting compound low molecular weight heparin / sodium hyaluronate or single low molecular weight heparin into intra-articular for treating osteoarthritis of rabbits **Methods:** Twelve rabbits were randomly divided into normal saline group, compound low molecular weight heparin / sodium hyaluronate group and low molecular weight heparin group after the model of osteoarthritis was established by injecting 0.3 ml of 0.4% papain into knee joint cavities of the rabbits. These three groups respectively received intra-articular injection of normal saline, compound low molecular weight heparin / sodium hyaluronate and low molecular weight heparin weekly for 5 weeks after 7 days from the injection of papain **Results:** The curative effects of compound low molecular weight heparin / sodium hyaluronate and low molecular weight heparin obviously were better than that of normal saline group. As to the two groups including low molecular weight heparin, the degeneration of cartilage was lighter in the pathological sections. Intra-articular the two injections including low molecular weight heparin could obviously promote cellular proliferation of synovial membrane and cartilage. Meanwhile, it could revealed a decrease in tumor necrosis factor- α and a regulation in interleukin-6 expression **Conclusion:** Low molecular weight heparin possesses significant anti-inflammatory properties. There is a potential capacity to develop safe, convenient and efficient methods for the treatment of osteoarthritis

KEY WORDS low molecular weight heparin; sodium hyaluronate; osteoarthritis; papain; cytokine

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种动关节的退行性变和轻度紊乱, 并伴有关节软骨的累进性损伤^[1], 是一组有不同病因但有相似生物学、形态学和临床表现的疾病^[2]。随着人口老龄化的加快, OA 的危害越来越大。

玻璃酸钠 (sodium hyaluronate, SH) 注射液治疗 OA 的研究已有大量报道^[3]。低分子肝素 (low molecular weight heparin, LMWH) 不仅具有抗凝、抗血

栓、降血脂、抗病毒等多种生物活性, 同时还有改善局部血液循环, 加速创面愈合, 促进结缔组织修复、消肿、抗炎、抗过敏等功效^[4]。本研究通过建立 OA 动物模型, 对滑膜、软骨病理切片观察结果的总结, 及对肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6 (IL-6) 的含量测定, 进一步考察关节腔内注射 LMWH 与 SH 复方凝胶 (LMWH-SH) 注射液和 LMWH 注射液治疗 OA 的疗效和作用机制。

1 材料与仪器

1.1 材料 新西兰白兔 (山东省医药工业研究

作者简介: 张丽娜 (1981-), 女, 硕士研究生。

通讯作者: 凌沛学. Tel: (0531) 88937780-1368, E-mail: peixue_ling@bausch.com.

所);木瓜酶(美国 Sigma公司);盐酸半胱氨酸(上海生工生物工程有限公司);LMWH(杭州九源基因工程有限公司);SH(山东福瑞达生物化工有限公司);兔 TNF- α 酶联免疫试剂盒(浙大生物基因工程有限公司);兔 L-6酶联免疫试剂盒(浙大生物基因工程有限公司);其它试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 仪器 Olympus BX50显微镜(Olympus公司);Multiskan MK3 雷勃酶标仪(Thermosystems公司);LGR16-W 低温高速离心机(北京医用离心机厂)。

2 方法与结果

2.1 动物造模 健康新西兰白兔 12只,体重 2.5~3.0 kg,雌雄不限。用 2.0%戊巴比妥经兔耳缘静脉注射麻醉,将兔仰卧固定于实验台上,刮去左右膝关节处毛,常规消毒^[5],各关节腔内注射 0.4%木瓜酶溶液 0.3 mL(1 mL生理盐水中含 4.0 mg木瓜酶,50 mg 盐酸半胱氨酸,该溶液无菌条件下过 0.22 μ m 滤膜)1次,建立 OA 模型。兔随机分为 3组:生理盐水(NS)组、LMWH-SH组、LMWH组。

2.2 玻璃酸钠注射液的制备 称取 LMWH 750抗 F a U溶于 100 mL生理盐水中,溶液过 0.22 μ m 滤膜,高温灭菌,然后加入 SH 1.0 g,流通蒸汽灭菌,即得 LMWH-SH 注射液,同法但不加 SH 制备 LMWH 注射液。

2.3 动物给药 自造模后 7 d开始给药,每次注射药物 0.3 mL,每周 1次,共 5周。

2.4 标本的采集和制备 于第 3次给药后 7 d将各组 1只兔处死,迅速刮去兔膝关节处毛,用锋利刀片取出完整关节滑膜和软骨,按常规进行固定、石蜡包埋、切片及染色等处理,行光镜观察。观察滑膜、软骨表面情况:苏木精-伊红(HE)染色、阿利新蓝-过碘酸希夫(AB-PAS)染色。

于末次给药后 7 d取兔关节滑液 0.5 mL,5 000 r/min离心 30 min,取上清液,分装 Eppendorf管,用于细胞因子(CK)的测定。将各组 3只兔处死,同上操作,取出完整关节滑膜和软骨行病理切片观察。

2.5 关节滑膜和软骨病理切片观察

2.5.1 关节滑膜 HE染色病理切片 滑膜 HE染色病理切片见图 1。

结果表明,NS组给药中期扁平滑膜上皮点、片状脱落;上皮细胞肿胀、层次增厚,细胞呈立方形或多角形;滑膜下正常纤维脂肪组织中有大量红细胞渗出、血管损伤严重;高倍镜下有明显纤维母细胞增生。用药末期滑膜层次消失,滑膜上皮细胞肿胀、透明样变性、分解脱落,不形成典型正常滑膜上皮层次结构;纤维组织增粗肿胀,大量毛细血管扩张,有炎

症反应。

LMWH-SH组给药中期滑膜上皮轻度增生活跃,其表现为上皮多层,细胞层次增加,细胞形态呈不规则或多角型增生,细胞核较大,染色程度增加,胞浆比可为 1:1;滑膜下存在少量浆细胞、淋巴细胞;滑膜下少量纤维组织呈修复性增生,无红细胞渗出,小血管增生活跃,滑膜处于慢性修复状态。给药末期滑膜下点、片状模糊;滑膜上皮点、片状修复,近似于正常组织,处于修复期早期;毛细血管增生,形成毛细血管导管上皮聚集成团。

LMWH组给药中期脱落的滑膜细胞没有完全吸收,细胞不再破坏,处于增生早期,核浆比为 1:0.5。给药末期大量纤维母细胞增生,核模糊不清,细胞形态呈多角形,核较大,淡染,胞浆比例可为 1:1;滑膜下几乎无炎细胞浸入,处于炎症修复期。

2.5.2 关节软骨 HE染色病理切片 软骨 HE染色病理切片见图 2。

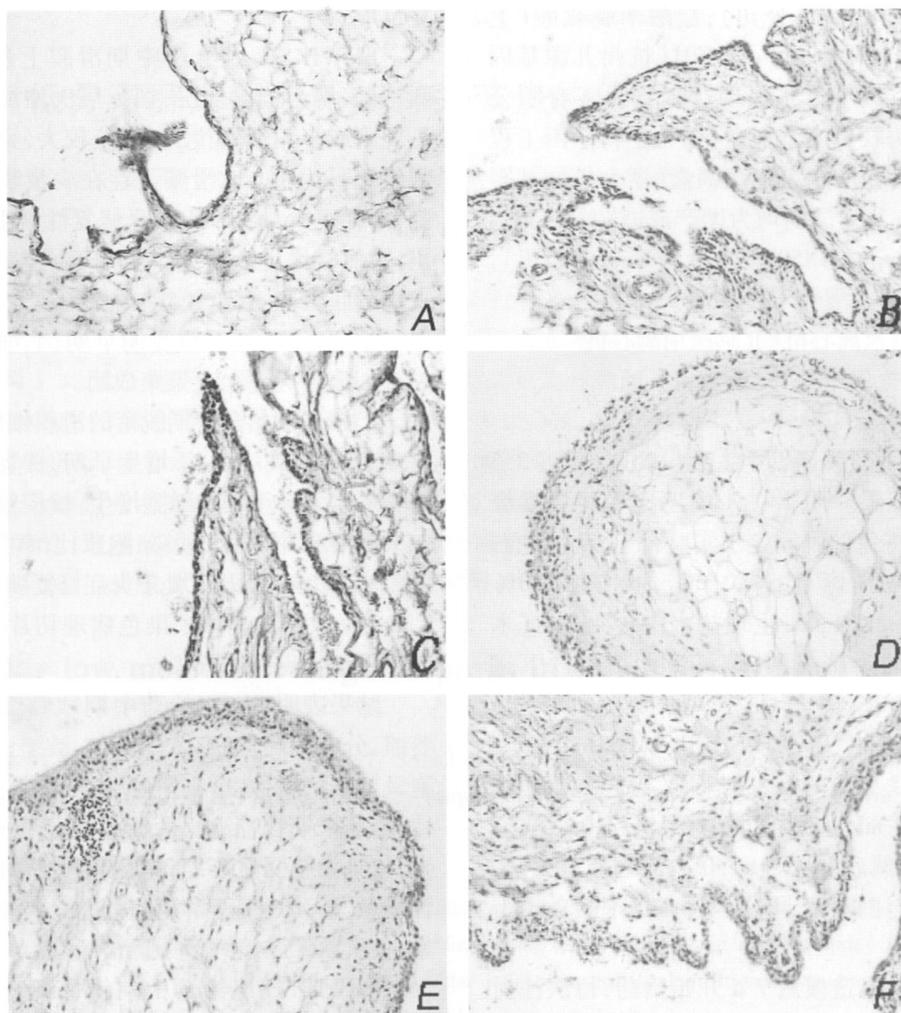
结果表明,NS组给药中期软骨细胞明显减少、萎缩,分布稀疏,细胞体积变小、皱缩;软骨中少量细胞呈节结状增生,个别呈空泡状或存在散在的核碎片;给药末期软骨组织表面纤维组织呈轻度灶状增生,软骨细胞明显萎缩,细胞界限不明显,有灶状软骨坏死,坏死灶偏于滑膜腔;偶见增生细胞核分裂现象,条索状纤维组织多于正常组织。

LMWH-SH组给药中期软骨细胞成团,呈大小不等的节结状增生;软骨细胞呈不规则的圆形或圆缩形淡染,可明显看到染色稍淡的、密集的细胞核,酸性粘多糖增高。给药末期软骨边缘大量毛细血管增生;存在圆形或卵圆形、胞浆透明的,但界限清晰的软骨细胞早期增生,并有散在的、成熟的软骨细胞,软骨表面有轻度中性粘多糖增多现象。

LMWH组给药中期软骨细胞增生较弥散,数目增加,但细胞排列紊乱,可见不同增生时期的软骨细胞核;有条索状中性粘多糖区域。给药末期软骨无明显增生,成熟期与增殖期软骨交织分布,软骨细胞排列紊乱,少有显微肉芽组织。

2.5.3 关节软骨 AB-PAS染色病理切片 软骨 AB-PAS染色病理切片见图 3。

结果表明,NS组给药中期染色程度严重降低;给药末期大量软骨呈陷窝样结构,酸性粘多糖增多,可能处于自身恢复期,靠近软骨边缘处红色较强,软骨细胞周围蓝色较深。LMWH-SH组给药中期着色较 NS组好,且蓝色呈节结状;给药末期染色程度轻度降低,酸性粘多糖降低,软骨细胞分布较多。LMWH组给药中期染色程度较 LMWH-SH组好;给药末期酸性粘多糖较少,细胞较分散。



A-NS组给药中期 (×20); B-LMWH-SH组给药中期 (×20); C-LMWH组给药中期 (×20);
D-NS组给药末期 (×20); E-LMWH-SH组给药末期 (×20); F-LMWH组给药末期 (×20)

图 1 不同给药组、给药时间的关节滑膜 HE染色病理切片

2.6 CK的测定 用 ELISA 双抗体夹心法检测 TNF- 和 L-6的含量。

2.6.1 TNF- 和 L-6的含量测定 分别采用兔 TNF- 与 L-6酶联免疫分析试剂盒测定,具体操作参照试剂盒说明。

2.6.2 统计学方法 CK测定标准曲线采用二次拟合,数据测定结果表示为 ($\bar{x} \pm s$)。P < 0.05被认为有统计学差异。

TNF- 的测定中标准曲线拟合方程为: $Y = -0.000\ 000\ 6X^2 + 0.002\ 6X + 0.012\ 7$, $r = 0.999\ 8$, TNF- 在各组动物中的表达水平见表 1。

表 1 不同动物组膝关节滑液中 TNF- 的含量

动物组别	TNF- 含量 / (pg/mL)
NS组	71.26 ± 9.12
LMWH-SH组	50.21 ± 6.79 ¹⁾
LMWH组	43.54 ± 7.99 ¹⁾

¹⁾ P < 0.05,与 NS组比较。

NS组 TNF- 含量显著升高,这说明关节腔注射 LMWH-SH和 LMWH均能明显降低关节滑液中 TNF- 的含量。

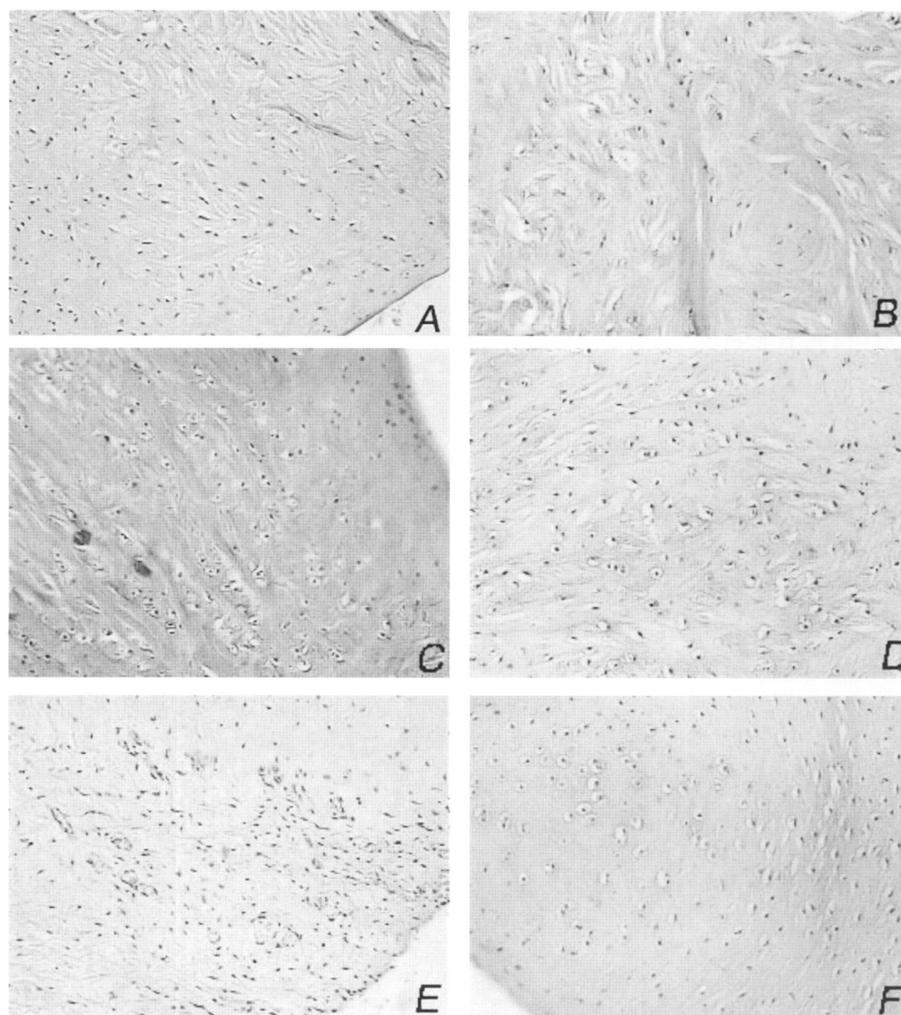
L-6的含量测定中标准曲线拟合方程为: $Y = -0.000\ 000\ 5X^2 + 0.001\ 0X + 0.012\ 1$, $r = 0.998\ 7$, L-6在各组动物中的表达水平见表 2。

LMWH组 L-6含量显著升高,这说明关节腔注射 LMWH注射液能够明显提高关节滑液中 L-6的含量,但 LMWH-SH组 L-6的水平略低于 NS组,差异无显著性意义。

表 2 不同动物组膝关节滑液中 L-6的含量

动物组别	L-6含量 / (pg/mL)
NS组	16.36 ± 1.91
LMWH-SH组	15.48 ± 2.96
LMWH组	33.69 ± 7.30 ¹⁾

¹⁾ P < 0.05,与 NS组比较。



A-NS组给药中期 (×20); B-LMWH-SH组给药中期 (×20); C-LMWH组给药中期 (×20);
D-NS组给药末期 (×20); E-LMWH-SH组给药末期 (×20); F-LMWH组给药末期 (×20)

图 2 不同给药组、给药时间的关节软骨 HE染色病理切片

3 讨论

3.1 含 LMWH的注射液对滑膜和软骨的作用 关节腔注射含 LMWH的注射液能够促进血管、滑膜、软骨增生,减缓、稳定甚至逆转 OA时关节软骨的降解过程,较好改善 OA症状,且 LMWH-SH组疗效较为显著。

3.2 含 LMWH的注射液对关节滑液中 TNF- 和 L-6的作用 OA中除生物力学因素如创伤、肥胖等起重要作用外,CK也发挥着重要作用。CK能够使软骨细胞合成代谢和分解代谢失衡,导致细胞外基质成分进行性丢失和软骨细胞结构功能破坏。

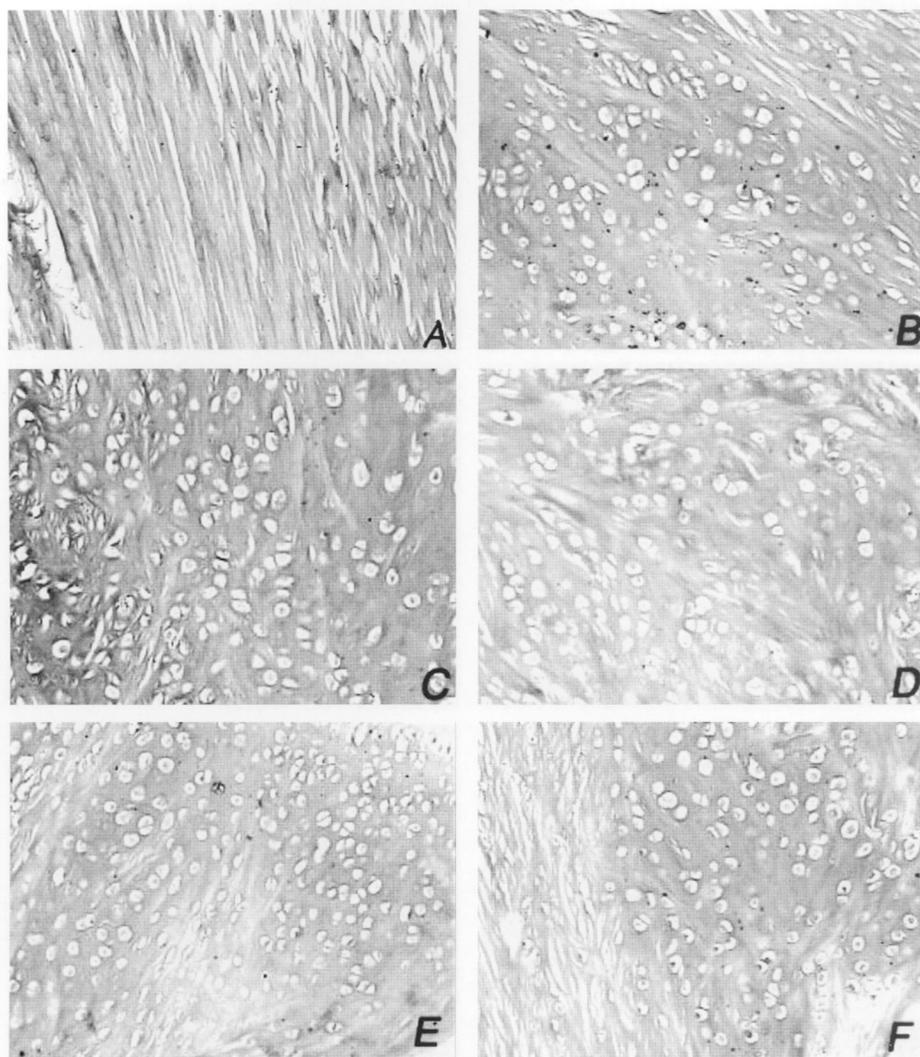
TNF- 是由巨噬细胞、纤维母细胞、软骨细胞等分泌的一种负调节因子,能够引起软骨基质的吸收、破坏^[6],是软骨基质降解的重要介质,在滑膜炎中起重要作用。同时其能激活多型核细胞,刺激滑膜细胞前列腺素 E₂、基质金属蛋白酶 (MMP)及血浆酶

原激活物的产生,促进成纤维细胞增生,使局部血管内皮细胞通透性增加,加重局部炎症浸润和水肿,导致 OA关节的改变。

L-6来源于巨噬细胞、纤维母细胞、软骨细胞、破骨细胞等,能够正向调节金属蛋白酶组织抑制剂 (TMP)的含量,维持 MMP/TMP的平衡,起到保护软骨的作用。L-6对软骨细胞的直接作用是双向的,具有刺激软骨分解代谢和合成代谢的双重作用。

关节腔注射 LMWH-SH注射液和 LMWH注射液能够显著降低关节滑液中 TNF- 的含量,有利于缓解、减轻 OA的炎症反应。LMWH组关节滑液中 L-6的含量明显升高,这可能是通过自分泌或旁分泌机制引起的,而 NS组这种机制丧失。LMWH-SH组关节滑液中 L-6的含量较 NS组略低,其原因尚不明确。

3.3 含 LMWH的注射液治疗 OA的疗效评价 光镜下可观察到 LMWH-SH组和 LMWH组关节软骨



A-NS 组给药中期(×20);B-LMWH-SH 组给药中期(×20);C-LMWH 组给药中期(×20);
D-NS 组给药末期(×20);E-LMWH-SH 组给药末期(×20);F-LMWH 组给药末期(×20)

图 3 不同给药组、给药时间的关节软骨 AB-PAS 染色病理切片

退变延缓,软骨修复程度较高,细胞形态大致正常,疗效优于 NS 组。这说明,关节腔注射含 LMWH 的注射液能够保护软骨细胞,延缓软骨退变,从而达到治疗 OA 的目的。

关节腔注射 LMWH-SH 注射液和 LMWH 注射液能够降低关节滑液中 TNF- α 的含量,从而减轻滑膜炎,降低炎症介质对软骨的破坏,加速软骨的合成代谢,有利于软骨的修复。而由于 L-6 的双重作用,很难用其表达水平来考察 OA 的严重程度。

综合以上结果表明,关节腔注射含 LMWH 的注射液能够促进滑膜、软骨修复,降低关节滑液中的炎症介质,有效改善 OA 症状。LMWH 有较好的抗炎作用,较低的出血率^[4],具有开发安全、方便、行之有效的治疗骨关节炎方法的潜力。

参考文献:

[1] Forsey RW, Fisher J, Thompson J, *et al* The effect of hyaluron-

ic acid and phospholipid based lubricants on friction within a human cartilage damage model[J]. *Biomaterials*, 2006, 27(26): 4581.

[2] Miyazaki T, Wada M, Kawahara H, *et al* Dynamic load at baseline can predict radiographic disease progression in medial compartment knee osteoarthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2002, 61(7): 617.

[3] 东海潮,杨 梁. 玻璃酸钠治疗踝关节骨关节炎的临床观察 [J]. *中国生化药物杂志*, 2006, 27(4): 239.

[4] Preuss JM, Page CP. Effect of heparin on antigen-induced airway responses and pulmonary leukocyte accumulation in neonatally immunized rabbits[J]. *Br J Pharmacol*, 2000, 129(8): 1585.

[5] Pomonis JD, Boulet JM, Gottshall SL, *et al* Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain[J]. *Pain*, 2005, 114(3): 339.

[6] Kobayashi M, Squires GR, Mousa A, *et al* Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage[J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52(1): 128.

收稿日期: 2007-09-03