

治疗型关节炎护膝对膝骨关节炎兔关节液中转化生长因子 β 及胰岛素样生长因子的影响

林木南¹, 刘献祥², 李西海², 张朝春¹, 刘建华¹, 郭健红¹

(1. 中国人民解放军南京军区福州总医院, 福建 福州 350025;

2. 福建中医药大学, 福建 福州 350108)

摘 要 **目的:**观察治疗型关节炎护膝对膝骨关节炎兔关节液中转化生长因子- β 及胰岛素样生长因子的影响,探讨治疗型关节炎护膝治疗膝骨关节炎的可能作用机制。**方法:**采用抽签法将 54 只日本大耳白兔随机分为 6 组,正常组 10 只,模型组 9 只,对照组 9 只,实验 1 组 9 只,实验 2 组 8 只,实验 3 组 9 只。用改良 Hulth 法对模型组、对照组、实验 1 组、实验 2 组及实验 3 组实验兔的右膝关节进行造模。造模后正常组及模型组常规喂养,不进行干预;对照组采用微波仪治疗;3 个实验组均采用治疗型关节炎护膝治疗,其中实验 1 组选用疏密波模式,实验 2 组选用热疗模式,实验 3 组选用疏密波+热疗模式。造模后第 16 周分别拍摄各组实验兔双膝正位 X 线片,观察其膝关节的宏观结构,同时采用放射免疫分析法测定造模侧关节液中转化生长因子 β 和胰岛素样生长因子的含量。**结果:**①X 线片表现。正常组膝关节内外侧间隙正常,关节表面光滑平整,边缘规则整齐,软骨下骨密度均匀;模型组膝关节内侧间隙明显变窄,关节表面变形,关节边缘可见明显骨赘,软骨下骨密度明显增高;对照组关节变化情况介于实验 1 组和实验 3 组之间;实验 1 组关节变化基本与模型组相同;实验 2 组关节变化情况介于实验 1 组和实验 3 组之间;实验 3 组膝关节内侧间隙变窄,关节面变形,关节边缘可见轻微骨赘形成,软骨下骨密度增高。②转化生长因子 β 含量。各组间转化生长因子 β 含量比较,差异有统计学意义($F=23.757, P=0.000$)。组间两两比较,正常组低于模型组、对照组、实验 1 组、实验 2 组及实验 3 组($P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$);模型组低于对照组、实验 2 组及实验 3 组($P=0.000, P=0.000, P=0.000$);实验 1 组低于对照组、实验 2 组及实验 3 组($P=0.028, P=0.007, P=0.002$);其余各组间比较,差异均无统计学意义。③胰岛素样生长因子含量。各组间胰岛素样生长因子含量比较,差异有统计学意义($F=9.074, P=0.000$)。组间两两比较,正常组低于模型组、对照组、实验 1 组、实验 2 组及实验 3 组($P=0.040, P=0.000, P=0.027, P=0.000, P=0.000$);模型组低于对照组、实验 2 组及实验 3 组($P=0.012, P=0.004, P=0.000$);实验 1 组低于对照组、实验 2 组及实验 3 组($P=0.026, P=0.010, P=0.001$);其余各组间比较,差异均无统计学意义。**结论:**治疗型关节炎护膝治疗膝骨关节炎的机制可能是提高关节滑膜和关节软骨中转化生长因子 β 及胰岛素样生长因子的表达水平,促进软骨细胞增殖分化及细胞外基质合成,同时抑制滑膜炎反应,从而起到延缓关节软骨退变、促进关节软骨修复的作用。

关键词 骨关节炎, 膝 转化生长因子 β 胰岛素样生长因子 动物实验

Effect of therapeutic knee-pads for arthritis on transforming growth factor- β and insulin-like growth factors in joint fluid of rabbits with knee osteoarthritis LIN Mu-nan^{*}, LIU Xian-xiang, LI Xi-hai, ZHANG Chao-chun, LIU Jian-hua, GUO Jian-hong. ^{*}Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of the People's Liberation Army, Fuzhou 350025, Fujian, China

ABSTRACT **Objective:** To observe the effect of therapeutic knee-pads for arthritis on transforming growth factor- β (TGF- β) and insulin-like growth factors (IGF) in joint fluid of rabbits with knee osteoarthritis (KOA), and to explore the possible mechanism of therapeutic knee-pads for arthritis in the treatment of KOA. **Methods:** Fifty-four Japanese white rabbits were randomly divided into 6 groups, 10 cases in normal group, 9 cases in model group, 9 cases in control group, 9 cases in experimental group 1, 8 cases in experimental group 2 and 9 cases in experimental group 3. The rabbits were operated on the right knee-joint to build models of knee osteoarthritis using the modified Hulth method in model group, control group, experimental group 1, experimental group 2 and experimental group 3. After modeling, rabbits in normal group and model group were administrated with conventional feeding without intervention; rabbits in control group were administrated with microwave apparatus treatment; rabbits in experimental group 1 were administrated with therapeutic knee-pads for arthritis in the

基金项目:福建省中西医结合老年性疾病重点实验室开放课题(2008J1004-57),陈可冀中西医结合发展基金资助项目(CKJ2008094),

福建省中医药科研重点课题(WZZG0603)

通讯作者:刘献祥 E-mail:liuxianxiang@163.com

mode of density wave; rabbits in experimental group 2 were administrated with therapeutic knee-pads for arthritis in the mode of thermotherapy; rabbits in experimental group 3 were administrated with therapeutic knee-pads for arthritis in the mode of density wave and thermotherapy. The macrostructure of knee joints of the rabbits in the 6 groups were observed through the X-ray pictures of their both knees photographed in the anteroposterior position at the 16th week after modeling. Meanwhile, the contents of TGF- β and IGF in the fluid of modeling joints were measured through radioimmunoassay. **Results:** ① X-ray picture: Such situations as normal medial and lateral knee joint gap, smooth joint surface, intact regular edges of joint and uniform subchondral bone were found in normal group. Obvious narrow medial knee joint gap, deformed surface of joint, phanic osteophyma on the edge of joint and obviously increased density of subchondral bone were found in model group. The changes of knee joint of patients in control group lay somewhere between those of experimental group 1 and experimental group 3. The changes of knee joint of patients in experimental group 1 were same as those of model group basically. The changes of knee joint of patients in experimental group 2 lay somewhere between those of experimental group 1 and experimental group 3. Narrow medial knee joint gap, deformed surface of joint, un conspicuous osteophyma on the edge of the joint and increased density of subchondral bone were found in experimental group 3. ② TGF- β content: There was statistical difference in TGF- β contents among the 6 groups ($F=23.757$, $P=0.000$). TGF- β contents of normal group were lower than those of model group, control group, experimental group 1, experimental group 2 and experimental group 3 respectively ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$). TGF- β contents of model group were lower than those of control group, experimental group 2 and experimental group 3 respectively ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$). TGF- β contents of experimental group 1 were lower than those of control group, experimental group 2 and experimental group 3 respectively ($P=0.028$, $P=0.007$, $P=0.002$). There was no statistical difference between any other couple groups. ③ IGF content: there was statistical difference in IGF contents among the 6 groups ($F=9.074$, $P=0.000$). TGF- β contents of normal group were lower than those of model group, control group, experimental group 1, experimental group 2 and experimental group 3 respectively ($P=0.040$, $P=0.000$, $P=0.027$, $P=0.000$, $P=0.000$). TGF- β contents of model group were lower than those of control group, experimental group 2 and experimental group 3 respectively ($P=0.012$, $P=0.004$, $P=0.000$). TGF- β contents of experimental group 1 were lower than those of control group, experimental group 2 and experimental group 3 respectively ($P=0.026$, $P=0.010$, $P=0.001$). There was no statistical difference between any other couple groups. **Conclusion:** The mechanism of therapeutic knee-pads for arthritis in the treatment of KOA maybe rely on the raise of expression levels of TGF- β and IGF in articular synovium and articular cartilage, and on the promotion of cartilage cells proliferation and differentiation and synthesis of extracellular matrix as well on the restraintment of inflammatory reaction in the synovium on the purpose of slowing down the regression of articular cartilage and improving its repair.

Key words Osteoarthritis, knee; Transforming growth factor beta; Insulin-like growth factors; Animal experimentation

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是一种常见的慢性进行性骨关节疾病, 多见于中老年人^[1]。治疗型关节炎护膝的前期临床试验表明, 它具有消肿止痛、改善关节功能的功效^[2]; 动物实验表明, 治疗型关节炎护膝能有效延缓膝关节软骨宏观形态、软骨细胞及软骨基质的退变^[3]。为进一步深入探讨治疗型关节炎护膝防治膝骨关节炎的作用机制, 本研究观察了治疗型关节炎护膝对膝骨关节炎兔关节液中转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 及胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factors, IGF) 的影响, 现总结报告如下。

1 材料与设备

1.1 实验动物 健康 6 月龄日本大耳白兔 54 只, 雌雄各半, 体质量 2 ~ 2.2 kg。由无锡市惠山江南动物实验中心提供, 实验动物合格证号: SCXK (苏) 2002 -

0006。

1.2 试剂与仪器 TGF- β 、IGF 试剂盒 (上海西唐生物科技有限公司)、DU-640 型蛋白核酸分析仪 (美国贝克曼公司)、DDL-5 型低速冷冻离心机 (上海安亭科学仪器厂)、ELX808U 型酶标仪 (美国宝特公司)、TGL-16G 型离心机 (上海安亭科学仪器厂)。

2 方法

2.1 分组方法 采用抽签法将 54 只日本大耳白兔随机分为 6 组, 正常组 10 只, 模型组 9 只, 对照组 9 只, 实验 1 组 9 只, 实验 2 组 8 只, 实验 3 组 9 只。

2.2 造模方法 采用改良 Hulth 法^[4]对模型组、对照组、实验 1 组、实验 2 组、实验 3 组实验兔的右膝关节进行造模, 具体方法如下: 常规消毒, 采用膝关节内侧入路, 打开关节腔, 依次切断内侧副韧带, 摘除内侧半月板及切断前交叉韧带。术后连续 3 d 肌肉注射

青霉素 2×10^5 U, 每日 2 次。

2.3 干预方法 正常组及模型组常规喂养, 不进行干预; 对照组采用微波仪治疗, 每次 30 min, 每天 1 次; 3 个实验组均采用治疗型关节炎护膝治疗, 其中实验 1 组选用疏密波模式, 每次 30 min, 每天 1 次; 实验 2 组选用热疗模式, 每次 30 min, 每天 1 次; 实验 3 组选用疏密波 + 热疗模式, 每次 30 min, 每天 1 次。所有动物均单笼喂养, 1 周后开始每日强迫各组实验兔活动 30 min, 第 16 周进行相应指标测定。

2.4 效果观察

2.4.1 膝关节 X 线片 分别拍摄各组实验兔双膝正位 X 线片(南京军区福州总医院医学影像中心), 观察其膝关节的宏观结构。

2.4.2 TGF- β 及 IGF 含量 将实验兔麻醉成功后, 在造模侧髌韧带附着点外上方约 0.5 cm 处备皮消毒, 以 5 mL 医用注射器连接 10 mL 医用注射器的针头刺入关节腔内, 先注入生理盐水 1.5 mL, 反复活动关节 30 次后抽取关节液, 并置于 EP 管中。采用放射免疫分析法(radio immunoassay, RIA)测定关节液中 TGF- β 和 IGF 的含量: 取关节液 2 mL 注入试管, 待凝固后于 4 °C 以 1 000 rbp 离心 10 min, 取上清液(如需临时保存, 置于 -20 °C 冰箱保存, 测定前使样本置于室温

或冷水中复融)。将上清液再次于 4 °C 以 1 000 rbp 离心 5 min, 取上清液。取聚苯乙烯试管并编号, 按标准 RIA 加液程序操作, 充分混匀后于 4 °C 温育 24 h 以上, 加入免疫分离剂, 再次充分混匀, 室温放置 20 min, 然后于 4 °C 以 3 500 rpm 离心 25 min, 吸弃上清液, 测定各管沉淀放射性计数, 最后计算出相应的值。

2.5 统计学方法 采用 SPSS11.0 统计软件对所得数据进行统计分析, 各组间 TGF- β 、IGF 含量的比较采用方差分析, 组间两两比较采用 q 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结 果

3.1 X 线表现 正常组膝关节内外侧间隙正常, 关节表面光滑平整, 边缘规则整齐, 软骨下骨密度均匀[图 1(1)]; 模型组膝关节内侧间隙明显变窄, 关节表面变形, 关节边缘可见明显骨赘, 软骨下骨密度明显增高[图 1(2)]; 对照组关节变化情况介于实验 1 组和实验 3 组之间[图 1(3)]; 实验 1 组关节变化基本与模型组相同[图 1(4)]; 实验 2 组关节变化情况介于实验 1 组和实验 3 组之间[图 1(5)]; 实验 3 组膝关节内侧间隙变窄, 关节面变形, 关节边缘可见轻微骨赘形成, 软骨下骨密度增高[图 1(6)]。

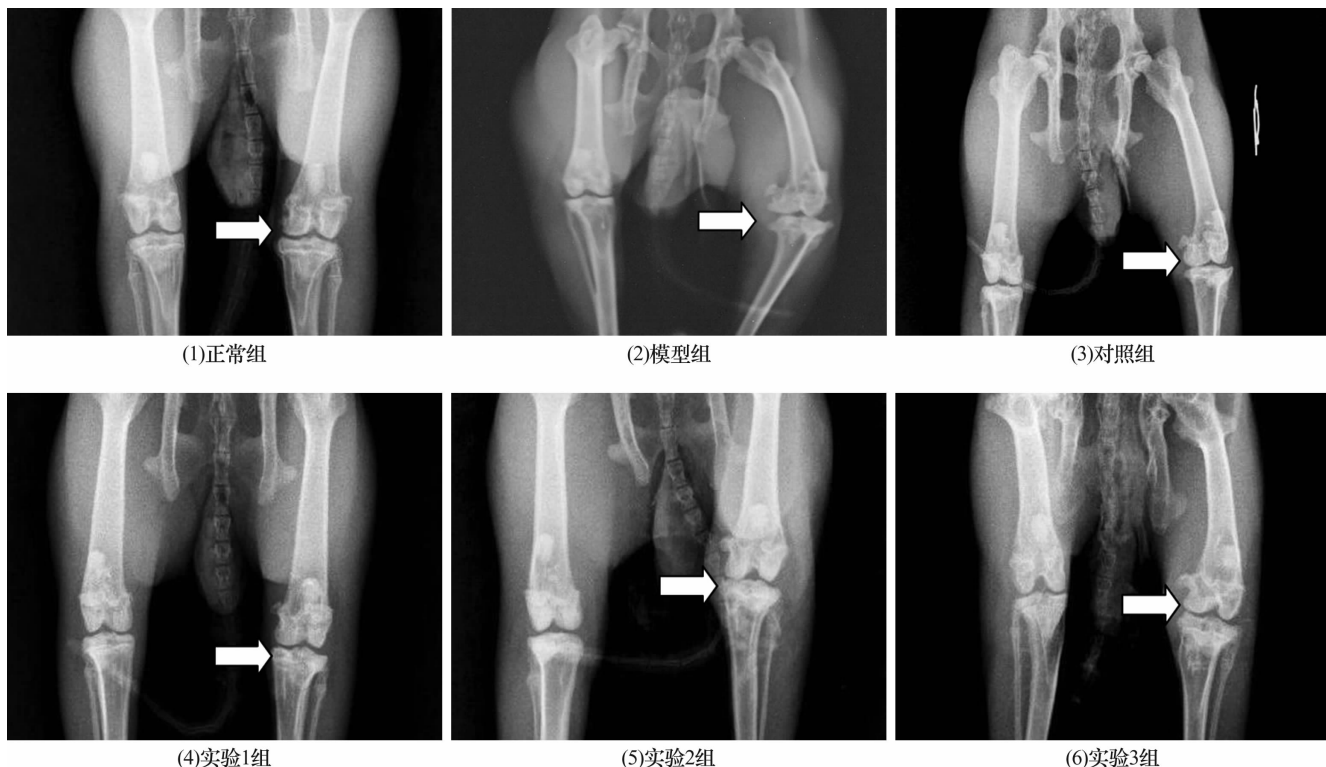


图 1 各组实验兔第 16 周膝关节正位 X 线片

3.2 TGF-β 及 IGF 含量 ①TGF-β 含量: 各组间 TGF-β 含量比较, 差异有统计学意义 ($F = 23.757, P = 0.000$)。组间两两比较, 正常组低于模型组、对照组、实验 1 组、实验 2 组及实验 3 组 ($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$); 模型组低于对照组、实验 2 组及实验 3 组 ($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$); 实验 1 组低于对照组、实验 2 组及实验 3 组 ($P = 0.028, P = 0.007, P = 0.002$); 其余各组间比较, 差异均无统计学意义。②IGF 含量: 各组间 IGF 含量比较, 差异有统计学意义 ($F = 9.074, P = 0.000$)。组间两两比较, 正常组低于模型组、对照组、实验 1 组、实验 2 组及实验 3 组 ($P = 0.040, P = 0.000, P = 0.027, P = 0.000, P = 0.000$); 模型组低于对照组、实验 2 组及实验 3 组 ($P = 0.012, P = 0.004, P = 0.000$); 实验 1 组低于对照组、实验 2 组及实验 3 组 ($P = 0.026, P = 0.010, P = 0.001$); 其余各组间比较, 差异均无统计学意义。(表 1)

表 1 各组实验兔关节液中 TGF-β 和 IGF 的含量 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$

组别	TGF-β	IGF
正常组	2.91 ± 0.49	2.13 ± 0.93
模型组	4.74 ± 0.79	2.95 ± 0.82
对照组	6.12 ± 0.36	3.97 ± 0.83
实验 1 组	5.30 ± 0.75	3.04 ± 0.69
实验 2 组	6.35 ± 1.17	4.16 ± 0.77
实验 3 组	6.52 ± 0.88	4.47 ± 0.98
<i>F</i> 值	23.757	9.074
<i>P</i> 值	0.000	0.000

4 讨论

治疗型关节炎护膝所采用的动态干扰变频脉冲疗法, 是以中医针灸理论为基础, 将经络理论与高压变频脉冲相结合, 将疏密波和热疗有效结合, 从而达到综合治疗的效果。采用 PIC16F630 单片机作为系统的控制平台, 通过键盘的按钮控制输出信号的强度、波形及工作时间。采用皮肤电极对膝关节周围各个穴位进行电刺激, 从而达到疏导瘀滞、行气活血、通经活络的功效^[2]。

关节滑膜及软骨组织中含有众多细胞因子及其受体, 可通过自分泌或旁分泌的方式发挥对关节软骨形成和修复的调节作用, 维持关节软骨的正常结构与功能。细胞因子活性的异常改变可引起关节软骨基质成分的进行性丢失和破坏。在关节软骨的微环境中, 多种生长因子参与调控软骨细胞的代谢。

TGF-β 是具有多种生物学活性的多肽生长因子,

可促进巨噬细胞和成纤维细胞的聚集, 激活基质金属蛋白酶抑制因子 (tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMP) 的活性^[5] 及抑制基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 的活性。正常情况下, 关节软骨基质合成和分解代谢的平衡是通过合成性与分解性细胞因子之间的平衡来调节的。关节滑膜细胞和软骨细胞分泌合成性因子 TGF-β, 刺激产生 TIMP, 从而抑制 MMP 活性, 并促进胶原蛋白合成^[6]。同时, TGF-β 在软骨细胞生长过程中也具有重要的调控作用。它可促进软骨细胞增殖和细胞外基质的合成, 参与关节软骨的形成, 还可促进关节滑膜细胞的增殖、增生, 抑制细胞凋亡。因此, TGF-β 的表达可作为衡量骨关节炎的病理改变和治疗效果的重要指标。

IGF 是在软骨代谢过程中发挥重要作用的细胞因子, 它能有效促进软骨细胞的有丝分裂和功能分化, 同时调节细胞外基质的合成。软骨生长板内的软骨细胞存在着丰富的 IGF 受体, 所以 IGF 能促进软骨细胞合成蛋白多糖及软骨基质^[7-8]。

本研究结果显示, 模型组及各实验组 X 线表现明显重于正常组, 表明骨性关节炎的动物模型建立成功; 实验 3 组 (疏密波 + 热疗)、实验 2 组 (热疗)、对照组 (微波仪) 的治疗效果明显优于实验 1 组 (疏密波)、模型组, 其中实验 3 组的效果最好, 提示多种物理疗法的有效组合可能是一种较好的治疗方法。

治疗型关节炎护膝治疗膝骨关节炎的机制可能是通过疏密波 + 热疗的综合作用, 提高关节滑膜和关节软骨中 TGF-β 及 IGF 的表达水平, 促进软骨细胞增殖分化及细胞外基质合成, 同时抑制滑膜炎反应, 从而起到延缓关节软骨退变、促进关节软骨修复的作用。

5 参考文献

[1] 刘献祥, 林木南, 杜民, 等. OA 护膝对膝骨性关节炎关节滑液细胞因子影响的实验研究[J]. 福建中医学院学报, 2006, 16(6): 18-21.

[2] 林木南, 刘献祥, 刘建华, 等. OA 护膝干预膝骨性关节炎的临床效应分析[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2007, 15(11): 12-15.

[3] 林木南, 刘献祥, 李西海, 等. 治疗型关节炎护膝对实验性骨关节炎组织形态学的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(4): 611-616.

[4] Sharif M, George E, Shepstone L, et al. Serum hyaluronic acid level as a predictor of disease progression in osteoarthritis of the knee[J]. Arthritis Rheum, 1995, 38(6): 760-767.

(上接第 14 页)

- [5] Blaney Davidson EN, van der Kraan PM, van den Berg WB. TGF- β and osteoarthritis [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2007, 15(6): 597-604.
- [6] Attur MG, Palmer GD, Al-Mussawir HE, et al. F-spondin, a neuroregulatory protein, is up-regulated in osteoarthritis and regulates cartilage metabolism via TGF- β activation [J]. FASEB J, 2009, 23(1): 79-89.
- [7] Madsen SH, Sondergaard BC, Bay-Jensen AC, et al. Carti-

lage formation measured by a novel PIINP assay suggests that IGF-I does not stimulate but maintains cartilage formation ex vivo [J]. Scand J Rheumatol, 2009, 38(3): 222-226.

- [8] Sun T, Hunziker EB, Morales TI. Subcellular distribution of the insulin-like growth factor (IGF) binding proteins (IGFBPs) 2 and 3 in articular chondrocytes [J]. J Orthop Res, 2008, 26(11): 1421-1427.

(2011-08-18 收稿 2011-12-12 修回)