

# 大鼠内侧半月板切除后髌骨的组织学变化及疼痛发生的机制

任建华<sup>1</sup>, 金文涛<sup>1</sup>, 朱 蕾<sup>2</sup>, 张荣凯<sup>3</sup>, 曾 春<sup>1</sup>, 王 昆<sup>1\*</sup>

(中山大学附属第三医院 1.骨科, 2.整形外科, 广东 广州 510630;

3.中山大学附属第五医院骨科一区, 广东, 珠海 519000)

**摘要:**【目的】分析大鼠内侧半月板切除后髌骨的组织学改变,并探讨髌骨疼痛产生的机制。【方法】大鼠分为实验(MMx)组( $n=30$ ),假手术(Sham)组( $n=30$ )和对照(Control)组( $n=30$ )。实验组切除右膝内侧半月板及内侧副韧带,Sham组仅暴露半月板,Control组未予手术。术前1d及术后第1、2、4、7、14、21及28天测量各组大鼠右后肢机械刺激撤足阈值。术后第1、2和4周各组分别杀死10只大鼠,取右侧髌骨,分析其大体改变以及软骨和软骨下骨的组织病理学变化,并测量软骨下骨增生的血管。同时,应用免疫组化技术检测髌骨中血管内皮生长因子(VEGF)、神经生长因子(NGF)、P物质和肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF)的表达和分布。【结果】①术后MMx组右后肢的机械刺激疼痛阈值显著下降并维持在较低水平至实验结束,且显著低于Sham组和Control组。术后1周内Sham组右后肢痛阈下降但2周左右恢复到术前水平;实验过程中Control组痛阈无变化。②术后第1周开始MMx组髌软骨发生退变,且随时间而不断加重,Mankin's评分也逐渐增加。术后第2周MMx组软骨下骨出现重塑,第4周更加显著:软骨下骨增生的血管突破潮线侵蚀深层软骨,呈多重潮线和潮线中断,软骨下骨平均厚度显著下降。Sham组与Control组各时间点髌软骨及软骨下骨无显著退变,Mankin's评分无明显变化改变。③免疫组化显示MMx组术后髌软骨中VEDF和NGF的表达较Sham组和Control组显著增强,且随时间逐渐增强。MMx组术后髌骨中TNF- $\alpha$ 和P物质的表达显著增强,且主要分布于增生的血管壁周围基质和软骨细胞中。Sham组和Control组上述各因子表达微弱。【结论】①内侧半月板及内侧副韧带切除后髌骨有逐渐加重的骨关节炎改变,患肢有骨关节炎疼痛反应;②软骨内上调的VEDF和NGF与软骨退变、软骨下骨重塑及血管增生相关;③软骨下骨增生的血管及其周围上调的疼痛相关分子可能导致膝关节痛阈下降。髌骨软骨下骨也应作为骨关节炎疼痛的治疗靶点。

**关键词:**髌骨;疼痛;肿瘤坏死因子 $\alpha$ ;血管内皮生长因子;神经生长因子;P物质

中图分类号:R363

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2011)03-0303-08

## Analysis of Histological Change of Patella from Meniscectomized Rats and Study of Mechanism of Pain

REN Jian-hua<sup>1</sup>, JIN Wen-tao<sup>1</sup>, ZHU Lei<sup>2</sup>, ZHANG Rong-kai<sup>3</sup>, CENG Chun<sup>1</sup>, WANG Kun<sup>1\*</sup>

(1.Department of Orthopedics, 2.Department of Plastic Surgery, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; 3.Section 1, Department of Orthopedics, The Fifth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, China)

**Abstract:**【Objective】To analyze histological change at patella from meniscectomized rats and subsequently to study the mechanism of pain from patella.【Methods】Rats were divided into 3 groups: operation (MMx)group ( $n=30$ ), sham-operation (Sham) group ( $n=30$ ), and normal (Control) group ( $n=30$ ). Medial meniscus and medial collateral ligament (MCL) of right knee was resected in MMx group while reserved after being exposed in Sham group. No surgery in Control group. Then mechanical thresholds of pain were tested and histological change of cartilage and subchondral bone at patella were evaluated on 1, 2, and 4 weeks post-operation. Angiogenesis at the subchondral bone was measured and molecules such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), vascular endothelial growth factor (VEDF), nerve growth factor (NGF), substance P were detected by immunohistochemistry.【Results】(1)

收稿日期:2010-12-23

基金项目:广东自然科学基金(8151008901000049)

作者简介:任建华,硕士研究生,E-mail:renjianhua001@126.com; \*通信作者:王昆,主任医师,研究方向:骨关节炎,E-mail:dr\_wangkun333@163.com

The pain thresholds in MMx group declined dramatically after surgery and remained at lower level than that in Sham and Control group. (2) The patella cartilage degenerated more in MMx group in accordance with Mankin's score of cartilage after surgery. Subchondral bone remodeling occurred 2 weeks post surgery and significant change appeared 4 weeks later: blood vessels crossing the osteochondral junction, breaching tidemarks and eroded deep cartilage. The tidemarks doubled and disappeared. The thickness of subchondral bone decreased. The cartilage and subchondral bone appeared normally in Sham and Control group. (3) VEDF and NGF were identified at cartilage and TNF- $\alpha$  and substance P were expressed excessively around neo-vascularization at osteochondral junction in MMx group. All cytokines were detected weakly in Sham and Control group. 【Conclusions】 (1) The patella from rats with MCL and medial meniscus resection presents change of osteoarthritis(OA) and the model imitate OA pain of knee joint; (2) Up-regulation of VEDF and NGF correlate with the degeneration of cartilage, remodeling of subchondral bone and angiogenesis; (3) Neo-vascularization along with pain-related molecules induce mechanical hyperalgesia in the knee. Subchondral bone of patella should also be the therapeutic target of OA pain.

**Key words:** patella; pain; tumor necrosis factor- $\alpha$ ; vascular endothelial growth factor; nerve growth factor; substance p

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(3):303-310]

膝关节骨性关节炎(osteoarthritis, OA)是常见的慢性疾病,疼痛是其最主要的症状,严重影响关节功能,降低患者生活质量。目前对该类疼痛发病机制的认识存在很大分歧<sup>[1]</sup>,其中探讨软骨下骨重塑与疼痛之间的联系是一个重要的方向<sup>[2]</sup>。经典的 OA 研究将胫股关节的软骨退变、骨赘增生和滑膜改变作为指标,但这些指标往往与临床症状的严重程度不一致。最近从影像学,组织及代谢学等方面的研究证实软骨下骨在 OA 发病和疼痛产生中有重要作用<sup>[3-5]</sup>,但到目前为止这些研究主要以胫股关节为主要靶组织,长期以来忽视膝关节的重要结构—髌骨<sup>[6]</sup>。正常情况下髌骨处于高压的力学环境中,膝关节结构一旦受到破坏将直接影响到髌股关节的生物力学,从而导致髌股关节痛。临床报道膝关节 OA 的疼痛在髌股关节间室发生率最高且症状最严重<sup>[7]</sup>。此外部分膝关节置换术后仍存有髌骨疼痛也说明髌骨在膝疼痛中起重要作用<sup>[8]</sup>。既往研究表明肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)和 P 物质在 OA 患者表达显著增高<sup>[9]</sup>。VEGF 和 NGF 与软骨退变及血管异常增生密切相关,而 NGF、TNF- $\alpha$  和 P 物质则在炎症性疼痛及神经病理性疼痛中发挥重要作用<sup>[10]</sup>。因此,本实验将建立 OA 疼痛模型,把膝关节的重要结构—髌骨和 OA 研究的焦点部位—软骨下骨联系起来,分析大鼠 OA 模型中髌骨的组织学改变,并检测疼痛相关因子在髌骨中的表达,从而探讨髌骨疼痛的产生机制,为膝关节 OA 疼痛的病理生理过程提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物选择和分组

本实验使用 10 周龄雄性 SD 大鼠,体质量 200 ~ 250 g,由中山大学动物实验中心提供,并饲养于该实验中心 SPF 级屏蔽环境中,大鼠分笼饲养,自由饮水和进食。大鼠按体质量分层后随机分为实验(MMx)组( $n = 30$ ),假手术(Sham)组( $n = 30$ )和空白对照(Control)组( $n = 30$ )。

### 1.2 试剂及仪器

大鼠肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )抗体、血管内皮生长因子(VEGF)抗体和 P 物质(substance-P)抗体均购于 Santa Cruz 公司。CD34 抗体,神经生长因子(NGF)抗体及以上抗体的二抗均购于 Boster 公司。DAB 显色液(DAB kit,康为世纪),蛋白酶 K (Sigma, USA), EDTA (Sigma, USA)等。SX 手术显微镜(安信化学仪器制造有限公司上海)、石蜡切片机(Leica, German)、正置荧光显微镜(Nicon, Japan)。

### 1.3 内侧半月板切除模型的建立

使用 100 g/L 的水合氯醛麻醉大鼠(0.4 mL/100 g),常规备皮消毒右侧膝关节,取髌旁内侧切口显露膝关节后将髌骨向外侧脱位,保护髌骨面,分离内侧组织,MMx 组分离切断内侧副韧带,直视下切断并取出内侧半月板,冲洗关节腔后将髌骨复位,逐层缝合。Sham 组暴露内侧副韧带及内侧半月板后即缝合。Control 组除手术外给与相同的处理。术后 10 min 及第 1 天肌肉注射青霉素 4 万单位预防感染。待麻醉苏醒后腹腔注射曲马多止痛(1 mg/100 g)。

## 1.4 标本处理及实验观察指标

1.4.1 大鼠术侧肢体疼痛行为学测量 于术前1d及术后第1、2、4、7、14、21及28天测量大鼠右后肢50%机械刺激撤足阈值。每次测试前将大鼠置于玻璃观察箱中适应10min,待大鼠安静后采用使用von Frey hair,按照Up-Down法测试:以中等强度(4.31g)的hair为起始持续刺激大鼠足心,持续6~8s,观察有无频繁缩足、抬足、舔足等反应,若无反应,则改为高一等级刺激强度;若出现反应,则改为低一级刺激强度,两次刺激之间至少间隔5s以上。按照Chaplan等<sup>[11]</sup>的计算方法得出50%机械刺激撤足阈值(50% withdrawal threshold): $50\% \text{ withdrawal threshold} = 10^{[Xf+\delta]/10000}$ 。式中Xf=最末次测试强度的对数值; $\kappa$ 值根据撤足反应模式查表得出; $\delta=10$ 支von Frey hair之间对数差值的均值。

1.4.2 髌骨取材和大体观察 术后1、2及4周各组随机选取10只大鼠解剖右膝观察关节有无关节积液、滑膜、胫骨和股骨髌软骨的改变,修剪游离髌骨(图1A),在解剖显微镜下对关节面进行观察。大体观察按以下标准评分:0分:关节面光滑,色泽如常;1分:关节面光滑,色泽灰暗;2分:软骨略显粗糙,未见糜烂;3分:软骨轻度糜烂,未形成溃疡;4分:软骨溃疡形成,软骨轻度剥脱。

1.4.3 髌骨组织处理和观察 大体观察后立即将髌骨置100g/L多聚甲醛固定48h,后经200mL/L EDTA脱钙4周,沿矢状面或水平面将髌骨剖开(图1B,C)。常规脱水、浸蜡后包埋,每隔10 $\mu$ m切片一次,每张切片厚度5 $\mu$ m,行苏木精-伊红染色,甲苯胺蓝及番红O-固绿(Safranin O-fast green)染色各2张。按Mankin's评分原则为软骨评分<sup>[9]</sup>。使用Image-Pro Plus 6.0软件分析计算软骨层和软骨下骨厚度。软骨下骨板异常增生的血管密度为光镜下整个髌骨横切面中突破骨软骨结合面或者存在于该结合面以上的血管数量<sup>[12]</sup>。血管由常规染色结合抗血管内皮细胞(CD34)的免疫组化片联合判断。

1.4.4 免疫组化检测 每块髌骨组织取5张切片(每张厚度5 $\mu$ m,相距10 $\mu$ m)行免疫组化检测:采用SABC(链霉亲和素生物素酶复合物)法,阴性对照以PBS代替一抗。切片常规脱蜡至水后30mL/L双氧水封闭15min,蛋白酶K修复抗原后加一抗4 $^{\circ}$ C下孵育过夜,将带辣根过氧化物二抗

37 $^{\circ}$ C下孵育20min,DAB溶液光镜下控制显色。漂洗后脱水、透明,中性树脂封片,在显微镜下观察摄片。使用软件Image-Pro Plus 6.0分析计算软骨和软骨下骨恒定面积内抗原表达情况( $\times 400$ ,取5个视野)。通过检测血管内皮细胞标记物CD34来确认血管存在。检测VEGF、NGF、TNF- $\alpha$ 和P物质在髌骨的表达和分布。

## 1.5 统计学处理

实验数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。采用SPSS16.0统计软件进行统计学分析。行为学测试数据采用Wilcoxon秩和检验和Mann-Whitney U-test。组间差异的比较采用配对t检验。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 术侧肢体机械刺激疼痛阈值的改变

术后MMx组和Sham组大鼠右侧肢体有疼痛表现:肢体轻触笼底,步态异常。1周后两组大鼠步态即无明显异常。机械刺激检测实验结果(图2)显示:MMx组和Sham组患肢机械刺激阈值均显著下降,MMx组在第1周内轻度上升后维持在较低水平直至实验结束( $P < 0.05$ );而Sham组机械刺激阈值术后第14天基本正常( $P > 0.05$ )。同时,通过对术后某一时点的组间对比发现,术后第7、14、21和28天,MMx组阈值比Sham组更低( $P < 0.05$ ),表明该组的机械性刺激痛觉过敏程度更严重。Control组未见显著改变。

### 2.2 大体观察

术后1周MMx组关节有少量积液及滑膜增生,10例中有7例髌软骨色泽改变;术后2周8例髌软骨略显粗糙,滑膜呈袖口状轻度包裹髌骨;术后4周有10例中6例髌软骨轻度糜烂改变,滑膜增生严重,髌软骨大体评分逐渐升高。同时时间内侧胫股关节软骨退变更严重。术后Control组及Sham组关节无积液或滑膜增生,软骨面光滑,呈蓝白色。

### 2.3 软骨评分

术后各时间点Control组和Sham组镜下软骨有典型的4层结构,基质染色均匀。潮线连续,钙化软骨层和软骨下骨完整(图3A,4A,5A),各时间点软骨评分无明显差异( $P > 0.05$ )。术后第1周MMx组光镜下可见软骨表面尚光滑,但表层软骨

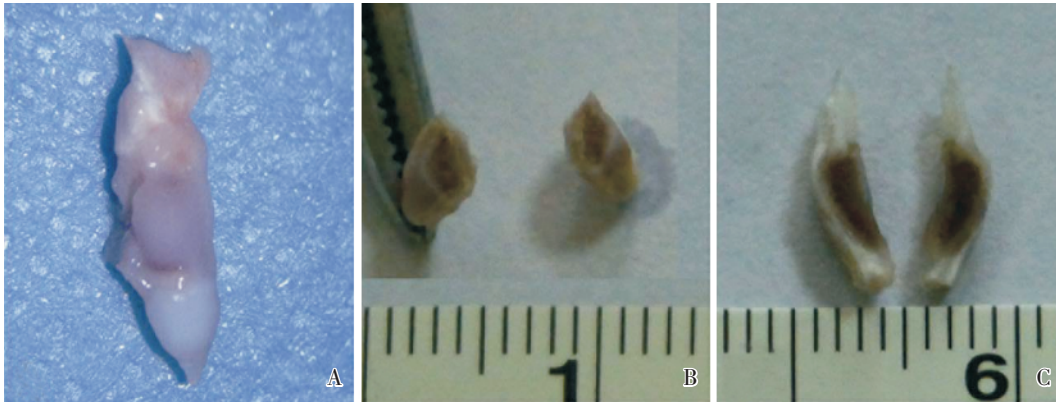


图 1 新鲜分离及处理后的髌骨

Fig.1 The macrostructure of patella

A: The fresh separated patella; B and C represent the longitudinal section and cross-section of patella after decalcification individually (The calibrations represent millimeters)

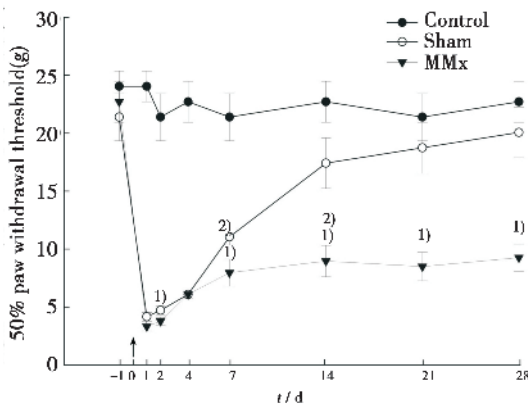


图 2 各组手术前后 50% 机械性刺激撤足阈值的变化

Fig.2 Operation induced significant changes in 50% paw withdrawal thresholds (PWT)

Mechanical allodynia was assessed using von Frey monofilaments on 1 day before and 1,2,4,7,14,21 and 28 days post-op. Statistically significant differences were determined by *t* test. (1) $P < 0.05$  vs PWT of pre-operation, (2) $P < 0.05$  vs Sham group at 1,2 week post operation,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

细胞数量弥漫性增多且细胞变圆, 过渡层软骨细胞簇集, 基质甲苯胺蓝和番红 O-固绿染色不均匀, 特别是表层染色减退, 但潮线尚完整(图 3B, 4B, 5B); 到术后第 2 周软骨表面略显粗糙, 表层和过渡层软骨细胞较少, 且排列不规则, 整个软骨层基质染色减弱, 部分潮线中断(图 3C, 4C, 5C); 到术后第 4 周, 纤维组织覆盖软骨面, 表层软骨细胞消失, 过渡层细胞数量弥漫性增多但排列紊乱, 基质番红 O 和甲苯胺蓝染色极深浅不均, 局部染色重度减退甚至消失, 未见潮线(图 3D, 4D, 5D)。术后软骨 Mankin's 评分(图 6)显示: MMx 组评分在

3 个时间均比 Sham 组和 Control 组高 (均  $P < 0.05$ ); 另外 MMx 组评分随时间逐渐增高。

### 2.4 软骨下骨的厚度和增生的血管

术后 MMx 组甲苯胺蓝染色和番红 O-固绿染色可以很好得显示软骨和软骨下骨分界。软骨下骨轮廓随时间变的不规则, 平均厚度逐渐下降。切片中检查到软骨下骨异常增生的血管, 通过 CD34 免疫组化验证了这些血管的存在。可见增生的血管突破骨软骨结合面, 直接侵蚀深层软骨, 部分血管直接出现在软骨层中。软骨下骨血管密度统计(图 7) 显示: 术后第 1 周各组软骨下骨的血管密度相近, 但术后第 2 周 MMx 组增生的血管密度明显升高, 到第 4 周时最高 ( $P < 0.05$ )。Control 组和 Sham 组各时点软骨下骨厚度及血管密度无显著改变。

### 2.5 免疫组化结果

2.5.1 VEGF 和 NGF 术后 Sham 组和 Control 组 VEGF 和 NGF 表达微弱, 阳性细胞散在分布于表层软骨细胞且随时间无明显改变(图 8A, B)。术后第 1 周仅在 MMx 组表层软骨检测到少量的 VEGF 和 NGF 阳性细胞, 到第 2 周时阳性细胞比例升高并成簇出现在软骨过渡层, 到术后第 4 周阳性细胞分布于整个软骨层, 特别是在有血管侵蚀的深层软骨区, 阳性细胞百分率显著高于其他部位, 且增生的血管越密集, 上述因子在细胞的表达越强(图 8D, E, G, H)。

2.5.2 TNF- $\alpha$  和 P 物质 术后 Sham 组和 Control 组 TNF- $\alpha$  和 P 物质的阳性细胞散在分布于骨软骨结合处, 且随时间无明显改变(图 8C)。术后第 1

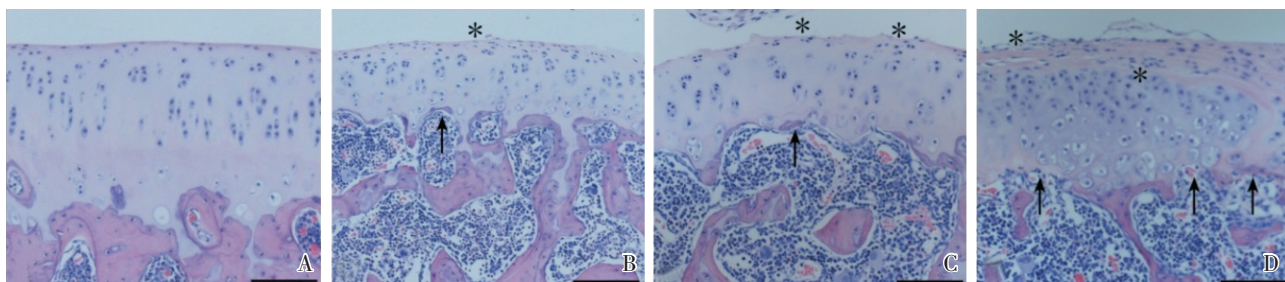


图 3 髌骨横切面 H/E 染色的显微结构

Fig.3 The cross-section of patella

A,B,C,D represent 0,1,2,and 4 weeks post-op individually. Small asterisks indicate disruption of the articular surface, the decreased superficial chondrocyte density and fibrillations on the cartilage surface. Arrows show neo-vascularization at subchondral bone. Staining, H/E. Scale bars = 100  $\mu$ m

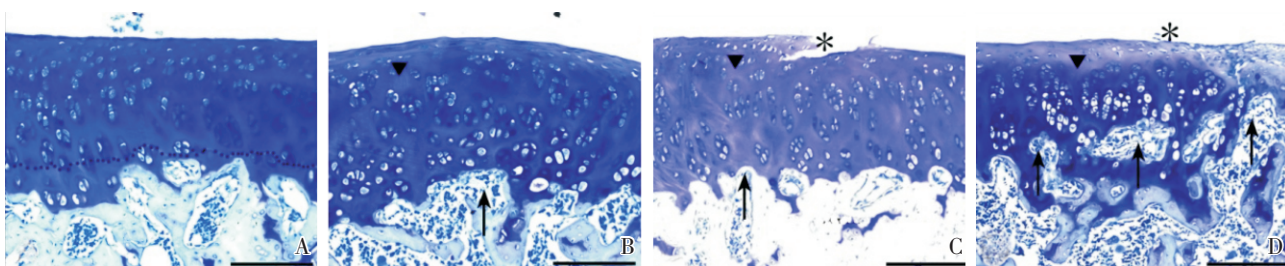


图 4 髌骨横切面甲苯胺蓝染色的显微结构

Fig.4 The cross-section of patella

A,B,C,D represent 0,1,2,and 4 weeks post-op individually. Dotted line shows the tidemarks. Arrowheads showing decreased thickness of cartilage and proteoglycan loss. Toluidine blue staining, Scale bars = 100  $\mu$ m

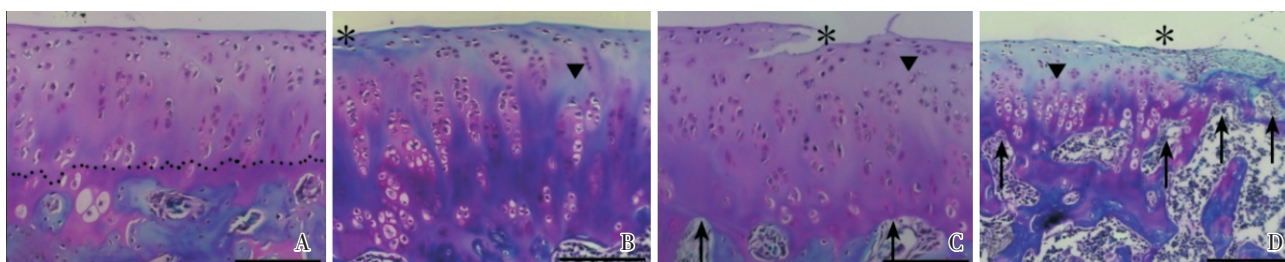


图 5 髌骨横切面番红 O 染色的显微结构

Fig.5 The cross-section of patella

A,B,C,D represent 0,1,2, and 4 weeks post-op individually. Arrowheads showing cell cluster and loss of matrix. Staining, Safranin O-Fast green. Scale bars = 100  $\mu$ m

周仅在 MMx 组部分骨软骨结合处检测到少量散在 TNF- $\alpha$  和 P 物质阳性细胞,到第 2 周时随着软骨下血管的增生并对深层软骨的侵蚀,上述因子表达增强且主要分布于增生的血管壁周围基质和软骨细胞,到术后第 4 周过渡层和表层软骨也出现阳性细胞(图 8F,I)。

### 3 讨 论

疼痛是膝关节 OA 患者就诊的首要原因,关

节内发生病变的各种结构均可能是 OA 疼痛的初始部位<sup>[2]</sup>。因此,建立准确的 OA 疼痛模型对深入探讨 OA 疼痛发生的病理生理过程具有重要意义。虽然多种因素均可促使 OA 发生,但目前实验多以破坏关节结构造成生物力学紊乱来构建 OA 模型,该类模型与人类 OA 的病理改变相似<sup>[13]</sup>。随着 OA 疼痛研究的发展,OA 疼痛模型逐渐得到认可<sup>[11]</sup>。本实验采用的模型术后髌软骨退变逐渐加重,且患肢痛阈显著下降。

Fernihough 和 Bove 等发现只切除内侧半月板

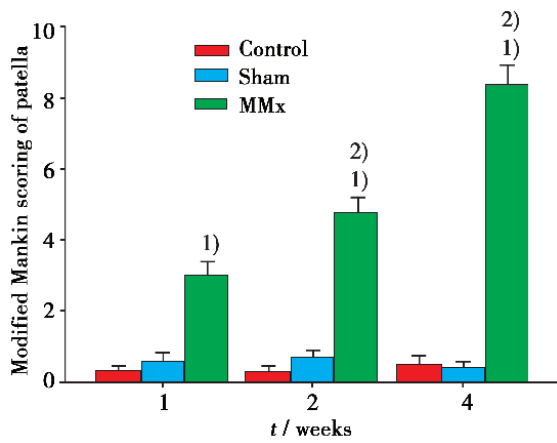


图 6 术后不同时间点各组髌骨 Mankin's 评分

Fig.6 Modified Mankin's scoring of patella for Control, Sham, and MMx group at different time points

1)  $P < 0.05$  vs Sham or Control group at the same time point, 2)  $P < 0.05$  vs score of MMx group 1 week post-op,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$

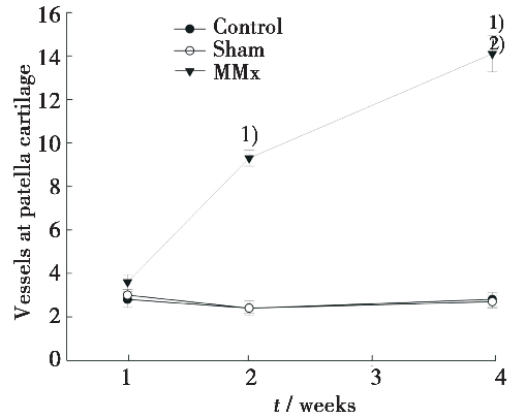


图 7 术后不同时间点各组侵蚀髌骨软骨的血管密度

Fig.7 The vessels at osteochondral junction of the patella from Control, Sham and MMx group at different time points

1)  $P < 0.05$  vs Sham or Control group at the same time point, 2)  $P < 0.05$  vs vascular densities of MMx group 1 week post-op,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$

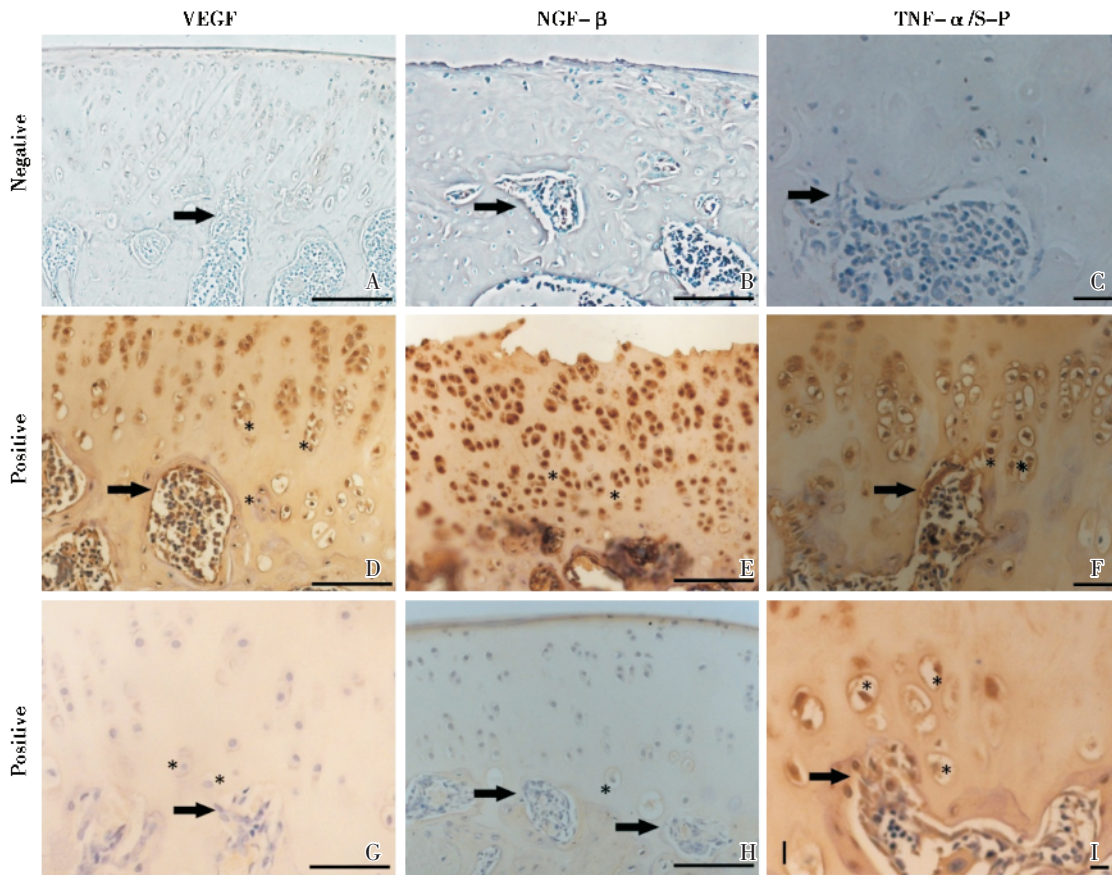


图 8 髌骨免疫组化显示 VEGF, NGF, TNF-α 和 substance-P 的表达和分布, 以及与增生血管的位置关系

Fig.8 The detection of VEGF, NGF, TNF-α, and substance-P at cartilage and subchondral bone of patella after MMx

Positive immunoreactivity is indicated by red-brown color (asterisk, D-I). Blood vessels crossing the osteochondral junction and eroding deep cartilage (arrow, D-I). Positive staining chondrocytes with VEGF and NGF locating in degenerated cartilage (D, G and E, H respectively), while TNF-α and substance-P surrounding the base of neo-vascularization (F and I respectively). Sections incubated without any primary antibody showed no specific staining in the negative control group(A, B, C). Scale bars = 100 μm

或内侧副韧带后胫股关节软骨都有破坏,但是前者患肢疼痛轻微,后者的疼痛在术后1周即缓解;如果联合切除上述两种结构,患肢则有持续的痛阈下降,原因在于联合切除术导致关节严重不稳,病变不仅累及胫股关节,且造成髌股关节紊乱,组织学提示三个间室的关节面均有不同程度的退变,生物力学实验证实联合切除上述结构造成髌股关节应力的显著改变,这可能是引发关节疼痛的重要起源之一<sup>[11,14]</sup>。由于膝关节结构和疼痛症状的复杂性,目前动物实验测量疼痛的仪器采用机械刺激或者热刺激法,甚至记录膝关节传入神经电位的变化也不能区分膝关节疼痛的部位<sup>[14]</sup>。国内外文献未见只涉及髌股关节病变的动物模型,髌股关节的相关研究只能作为膝关节整体病变的一部分来研究<sup>[6]</sup>。另外临床上髌股关节相关疼痛发病率高,是最常见的运动相关症状。虽然大量文献从体格检查、影像学和关节镜下对该类患者进行详细的相关性分析,但对髌股关节相关疼痛的认识仍然不足<sup>[7]</sup>。本实验将临床上髌股关节的疼痛症状推广至实验动物,即大鼠膝关节严重不稳导致肢体痛阈下降,其中髌股关节疼痛即使不是主要原因,也占有部分原因,故本实验通过组织学改变来验证这一观点,进一步研究髌骨疼痛的产生机制。

MMx组术后髌软骨退变逐渐严重,从术后第1周的软骨基质染色不均到第4周的软骨层溃疡形成、纤维组织增生和潮线消失,这与Bendele报道的胫股关节软骨退变相似,但Mankin's评分相对较低,这可能与髌软骨特殊的抗压性能和生化组分有关<sup>[15]</sup>。此外我们发现术后2周髌软骨下骨出现明显重塑,则与Hayami对胫骨平台软骨下骨报道相似<sup>[13]</sup>。

目前研究多提示软骨下骨在OA病程中有重要作用,特别是软骨下骨增生的血管密度和关节疼痛密切相关<sup>[4]</sup>。最近越来越多的影像学资料指出OA病程中软骨下骨髓的MR信号最先改变,且该信号区大小与患者疼痛症状密切相关<sup>[2]</sup>。Intema对大鼠膝关节软骨下骨的Micro-CT检查提示早期OA的软骨下骨逐渐变薄但密度增加,这可能导致其缓冲能力下降,加速了软骨退变<sup>[3]</sup>;来自Hayami对OA中骨代谢的研究揭示软骨下骨骨转换率显著增加,提出了软骨下骨形态改变的病理原因<sup>[4]</sup>;Ogino在对OA股骨髌标本的详细研究后发现关

节软骨下骨血管神经异常增生,甚至突破潮线进入软骨层,Ogino根据免疫组化结果提出在增生的血管壁有神经纤维支配,且为P物质类免疫原性无髓鞘感觉神经,另外在该纤维周围还富含疼痛相关因子<sup>[5]</sup>。本实验首次报道膝关节疼痛模型中髌骨软骨下骨也出现类似异常增生的血管,且该类血管密度逐渐升高,到术后第4周最高。Mapp等认为OA标本中异常增生的血管突破潮线造成软骨细胞内环境的改变,导致软骨退变,另外增生的神经沿血管壁进入软骨层感受软骨异常的应力,这可能是造成OA关节疼痛的病理基础。最近的动物实验证实使用MMP相关抗体抑制血管增生或骨转换可以有效改善OA病情并缓解疼痛<sup>[11,12]</sup>。此外我们也在髌软骨检测到多种与血管增生和疼痛相关的细胞因子,可以从分子水平分析髌骨相关改变。

我们在术后1周MMx组退变的表层软骨检测到VEGF和NGF阳性细胞,该因子随后在深层软骨特别是在增生的血管周围细胞及基质中大量表达,VEGF阳性细胞百分比与软骨退变及增生血管的密度相关。对照组软骨细胞也少量表达VEGF,表明其对维持软骨正常功能起一定作用。Murata研究表明OA时VEGF不但影响软骨细胞的代谢,且改变细胞外基质的结构促进内皮细胞生长,造成血管异常增生和血管通透性的增强<sup>[9]</sup>,这提示VEGF是软骨退变和软骨下骨血管的增生的原因之一。正常情况下血管内皮细胞分泌NGF促进神经纤维在血管壁的生长,更重要的是NGF作用受体可敏化外周神经末梢导致病理性疼痛。Lane的动物和人体试验发现外源性的NGF引起关节严重痛觉,基因敲除其受体TrkA则导致小鼠感觉缺失<sup>[15]</sup>。McNamee在小鼠OA软骨细胞检测到高表达的NGF,而且使用NGF中和抗体tanezumab可有效缓解OA的顽固性疼痛<sup>[15]</sup>。本实验在术后第4周MMx组深层软骨细胞特别是软骨内增生的血管周围检测到高表达的NGF,该因子可能促进髌骨软骨下骨神经的异常增生。本实验在术后第1周MMx组及其他对照组的软骨仅检测到微量的VEGF和NGF表达,可见术后第2、4周MMx组中大量上述因子阳性细胞可能由病理状态下的软骨细胞或内皮细胞表达上调所致。

另外我们在术后第2、4周MMx组重塑的软骨下骨、增生的血管周围细胞和基质中检测到大量的TNF- $\alpha$ ,该因子在神经源性疼痛中有重要调

节作用,主要通过促使神经异常放电产生机械刺激痛觉过敏,使用该因子抑制剂干预的动物实验可以有效下调并中和 TNF- $\alpha$ ,缓解 OA 疼痛,此外 TNF- $\alpha$  和 NGF 可以相互调节,形成恶性循环,加重病理性疼痛的程度<sup>[16]</sup>。本实验中术后第 4 周软骨下骨增生的血管周围有大量 TNF- $\alpha$  和 NGF 表达,可以推测他们改变了软骨局部内环境,敏化了增生的感觉神经末梢,造成了患肢痛阈的显著下降<sup>[16]</sup>。另外 P 物质为传入神经纤维分泌的递质,通过检测他可追踪感觉神经纤维的分布,而且 P 物质还是炎症反应中引起痛觉的主要因子。Suri 在 OA 股骨软骨下骨结合处可检测到 P 物质免疫反应性神经纤维,推测其为是 OA 疼痛的结构基础<sup>[17]</sup>。本实验虽未检测到明显的神经纤维,但在增生的血管壁也检测到 P 物质,提示该血管壁也有感觉神经纤维的支配,感受软骨层异常的应力和内环境并向中枢传导形成痛觉。综上可见增生血管周围上调的 VEGF、NGF、TNF- $\alpha$  和 P 物质交互作用,不但导致软骨退变,促使软骨下骨重塑导致血管异常增生,还敏化了神经末梢导致痛患肢阈下降。

总之本实验建立的大鼠 OA 模型模拟了 OA 疼痛的发生,分析了髌软骨和软骨下骨的病理改变,以及血管增生及疼痛相关因子的免疫组化结果,从而为揭示髌骨在膝关节 OA 疼痛发生机制中的重要作用提供了实验依据。

(致谢:感谢中山大学疼痛研究中心信文君副教授,刘翠翠博士对疼痛行为学实验的帮助)

#### 参考文献:

- [1] Mcdougall JJ. Pain and OA. *J Musculoskelet Neuronal Interact*[J], 2006, 6(4): 385-386.
- [2] Dieppe PA, Lohmander LS. Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis[J]. *Lancet*, 2005, 365(9463): 965-973.
- [3] Intema F, Hazewinkel HA, Gouwens D, et al. In early OA, thinning of the subchondral plate is directly related to cartilage damage: results from a canine ACLT-menisectomy model[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010, 18(5): 691-698.
- [4] Hayami T, Pickarski M, Wesolowski GA, et al. The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis: reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the rat anterior cruciate ligament transection model [J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(4): 1193-1206.
- [5] Ogino S, Sasho T, Nakagawa K, et al. Detection of pain-related molecules in the subchondral bone of osteoarthritic knees [J]. *Clin Rheumatol*, 2009, 28(12): 1395-1402.
- [6] Clark AL. Osteoarthritis: what we have been missing in the patellofemoral joint[J]. *Exerc Sport Sci Rev*, 2008, 36(1): 30-37.
- [7] Thompson LR, Boudreau R, Hannon MJ, et al. The knee pain map: reliability of a method to identify knee pain location and pattern[J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 61(6): 725-731.
- [8] Parvizi J, Rapuri VR, Saleh KJ, et al. Failure to resurface the patella during total knee arthroplasty may result in more knee pain and secondary surgery[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2005, 438: 191-196.
- [9] Murata M, Yudoh K, Masuko K. The potential role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage: how the angiogenic factor could be involved in the pathogenesis of osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, 16(3): 279-286.
- [10] 臧颖,何昕华,庞瑞萍,等.肿瘤坏死因子 $\alpha$ 对背根神经节电压门控性钠通道表达的影响[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2010, 31(5): 597-601.
- [11] Fernihough J, Gentry C, Malcangio M, et al. Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee[J]. *Pain*, 2004, 112(1-2): 83-93.
- [12] Mapp PI, Walsh DA, Bowyer J, et al. Effects of a metalloproteinase inhibitor on osteochondral angiogenesis, chondropathy and pain behavior in a rat model of osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010, 18(4): 593-600.
- [13] Hayami T, Pickarski M, Zhuo Y, et al. Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis [J]. *Bone*, 2006, 38(2): 234-243.
- [14] Bove SE, Laemont KD, Brooker RM, et al. Surgically induced osteoarthritis in the rat results in the development of both osteoarthritis-like joint pain and secondary hyperalgesia [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006, 14(10): 1041-1048.
- [15] Lane NE, Schnitzer TJ, Birbara CA, et al. Tanezumab for the treatment of pain from osteoarthritis of the knee [J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(16): 1521-1531.
- [16] Guler YM, Allaart CF, Watt I, et al. Treatment with TNF-alpha inhibitor infliximab might reduce hand osteoarthritis in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010, 18(10): 1256-1262.
- [17] Suri S, Gill SE, Massena DC, et al. Neurovascular invasion at the osteochondral junction and in osteophytes in osteoarthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2007, 66(11): 1423-1428.