

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.30.002

## 破骨细胞在骨关节炎中的增殖变化及意义\*

肖 壮<sup>1</sup>, 唐 涛<sup>2,5△</sup>, 朱成华<sup>3</sup>, 孙先润<sup>4</sup>, 李亚国<sup>5</sup>, 李晓云<sup>2</sup>, 李莲娥<sup>5</sup>

(1. 云南省第一人民医院药学部, 昆明 650034; 2. 云南省第一人民医院康复科, 昆明 650034;

3. 云南新昆华医院药学部, 昆明 650300; 4. 云南省第一人民医院骨科, 昆明 650034;

5. 昆明理工大学医学院康复医学教研室, 昆明 650500)

**[摘要]** **目的** 探讨破骨细胞(OC)在骨关节炎(OA)各个时期中的增殖变化及临床意义。**方法** 20只健康成年SD雄性大鼠用改良Hulth手术方法造模,左膝为对照组,右膝为OA模型组。分别于术后1、2、4、8周时采集全膝关节( $n=5$ ),并置于4℃多聚甲醛(PFA)液固定,石蜡包埋切片,抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)、甲苯胺蓝(TB)及番红-O快绿染色,观察软骨形态学改变并半定量TRAP染色阳性的OC数量,通过Mankin's评价OA软骨破坏的进展,采用SPSS17.0统计软件进行统计分析。**结果** 两组间OC均呈快速增高,然后下降的一过性增殖变化。对照组(左膝)在1周时OC数量为 $(65.20 \pm 4.12)$ 个/ $\text{mm}^2$ ,2、4周时逐渐减少,分别为 $(47.20 \pm 4.31)$ 个/ $\text{mm}^2$ 、 $(26.20 \pm 3.87)$ 个/ $\text{mm}^2$ ,8周时几乎看不到,细胞数为 $(7.00 \pm 2.28)$ 个/ $\text{mm}^2$ ;OA模型组(右膝)在1周时OC数量为 $(70.40 \pm 5.46)$ 个/ $\text{mm}^2$ ,2周时增加至 $(86.20 \pm 5.42)$ 个/ $\text{mm}^2$ ,4周时减少至 $(38.00 \pm 3.16)$ 个/ $\text{mm}^2$ ,8周时几乎看不到,细胞数为 $(6.21 \pm 2.93)$ 个/ $\text{mm}^2$ 。模型组OC数量在2、4周时明显高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 大鼠膝关节OA实验的早中期OC大量增殖,OC可能参与了骨关节炎的形成。

**[关键词]** 破骨细胞;骨关节炎;关节软骨;软骨下骨;关节损伤**[中图分类号]** R684.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)30-4181-04

## Proliferation change and significance of osteoclasts in osteoarthritis\*

Xiao Zhuang<sup>1</sup>, Tang Tao<sup>2,5△</sup>, Zhu Chenghua<sup>3</sup>, Sun Xianrun<sup>4</sup>, Li Yaguo<sup>5</sup>, Li Xiaoyun<sup>2</sup>, Li Liane<sup>5</sup>

(1. Department of Pharmacy, Yunnan Provincial First People's Hospital, Kunming, Yunnan 650034, China;

2. Department of Rehabilitation, Yunnan Provincial First People's Hospital, Kunming, Yunnan 650034, China;

3. Department of Pharmacy, New Kunhua Hospital, Kunming, Yunnan 650300, China;

4. Department of Orthopedics, Yunnan Provincial First People's Hospital, Kunming, Yunnan 650034, China;

5. Teaching and Researching Section of Rehabilitation, Medical College of Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650500, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the proliferative changes and clinical significance of osteoclasts (OC) in various stages of osteoarthritis (OA). **Methods** Twenty healthy adult male SD rats were made the model by modified Hulth procedure, the left knee served as the control group and the right knee as the OA model group. The total knee joint ( $n=5$ ) was collected at postoperative 1, 2, 4, 8 weeks, fixed at 4℃ 4% poly formaldehyde (PFA) liquid, embedded by paraffin for conducting sections, and stained by TRAP, toluidine blue (TB) and safranin O (Saf O) fast staining. Then the cartilage morphology change was observed and OC positive cells number with TRAP staining were semi-quantitatively detected, the OA cartilage destruction progression was evaluated by Mankin's method and SPSS17.0 statistics software was used to conduct statistical analysis. **Results** OC in the two groups showed the transient change of rapidly increasing and then decreasing. The OC number at 1 week in the control group (left knee) was  $(65.20 \pm 4.12)$  cells/ $\text{mm}^2$ , and was gradually reduced at 2, 4 weeks, which were  $(47.20 \pm 4.31)$  cells/ $\text{mm}^2$  and  $(26.20 \pm 3.87)$  cells/ $\text{mm}^2$ , which at 8 weeks was almost invisible, the number of cells was  $(7.00 \pm 2.28)$  cells/ $\text{mm}^2$ ; the OC number at 1 week in the OA model group (right knee) was  $(70.40 \pm 5.46)$  cells/ $\text{mm}^2$ , increased to  $(86.20 \pm 5.42)$  cells/ $\text{mm}^2$  at 2 weeks, reduced to  $(38.0 \pm 3.16)$  cells/ $\text{mm}^2$  at 4 weeks, was almost invisible at 8 weeks, the number of cells was  $(6.21 \pm 2.93)$  cells/ $\text{mm}^2$ . The OC number at 2, 4 weeks in the model group was significantly higher than that in the control group, the difference had statistical significance ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Large numbers of osteoclasts are proliferated in the early and middle stages of rat knee osteoarthritis, which indicating that OC might be involved in the formation of osteoarthritis.

**[Key words]** osteoclast; osteoarthritis; articular cartilage; subchondral bone; joint injury

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是临床常见多发疾病之一,以老年患者多见,具有较高的发病率和致残率<sup>[1]</sup>;主要病理改变是软骨的进行性蜕变及破坏,风险因素包括年龄、负重改变及外伤等,但发病机制仍不清楚。基础和临床研究多集中于软

骨细胞凋亡<sup>[2]</sup>与细胞因子[如白细胞介素(IL)-1、IL-18、肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 、基质金属蛋白酶(MMPs)家族]等方面<sup>[3]</sup>,对破骨细胞(osteoclast, OC)在OA整个发病过程中的增殖变化与临床防治意义方面的关注甚少。本研究拟通过观察OC

在大鼠 OA 模型中各时期的增殖变化,探讨 OA 的相关发病机制,为临床更合理地预防和治疗 OA 提供一定的实验理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 无特殊病原体(SPF)级 8 周龄雄性 SD 大鼠 20 只(体质量 240~260 g)用于本次实验,均由昆明理工大学动物实验室提供。

**1.2 主要试剂及仪器** 抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)试剂盒;番红-O 快绿染色剂;生物组织包埋机;光学显微镜(日本 O-LYMPUS 公司);滑片式组织切片机(日本 Funakoshi 公司)。

## 1.3 方法

**1.3.1 大鼠 OA 模型的制备** 采用改良 Hulth<sup>[4]</sup>手术方法制造 OA 动物模型:大鼠左右膝关节经剃毛、消毒后,右膝关节切断内侧副韧带(MCL)、前交叉韧带(ACL)并切除内侧半月板(MM),行抽屉实验确认,用无菌生理盐水冲洗关节腔,消毒并缝合术口;左膝关节仅切开关节腔,不伤及 MCL、ACL、MM,然后用无菌生理盐水冲洗关节腔,消毒、缝合术口。自然喂养,手术当天和术后第 1 天给予抗菌药物预防感染。

**1.3.2 标本收集及检测方法** (1)分别于术后 1、2、4、8 周时,选 5 只大鼠,乙醚麻醉后置于组织摄片机下,X 射线对膝关节进行组织摄片。(2)组织摄片完成后处死大鼠,取全膝关节( $n=5$ )。去皮后快速置入 4℃,4%多聚甲醛(PFA)中固定。左侧膝关节为对照组;右侧膝关节为模型组。经 20%乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙后,将全膝关节沿髌尖韧带正中线矢状面一分为二切开,常规系列脱脂、脱水、石蜡包埋,切片厚 5 μm 于 4℃冷藏备用<sup>[5]</sup>。(3)TRAP、甲苯胺蓝(TB)及番红-O 快绿染色:切片脱蜡至水,蒸馏水浸洗,TRAP 染色,浸入 TRAP 液避光孵育 1 h(按试剂盒说明书操作);TB 染色,浸入 TB 5 min;番红-O 快绿染色,浸入番红-O 液 5 min 后迅速浸入快绿液。蒸馏水 3 次浸洗多余染液;逐级乙醇(70%、75%、80%、90%、100%)脱水,二甲苯透明,中性树脂封片备查。

**1.3.3 OC 半定量** 对软骨下骨组织中 TRAP 染色阳性的 OC 进行分析测定:200 倍镜下选取不相重叠的 5 个代表性视野,测量单位面积阳性细胞个数(红色区域内核数量大于或等于 2 个且紧密堆积细胞核团计为 1 个 OC),见图 1。

**1.3.4 关节软骨形态学变化-Mankin's 评分标准** 关节软骨 Mankin's 评分标准:(1)软骨结构,光滑整齐如常为 0 分;表面

出现不规则裂痕为 1 分;裂痕深达辐射层为 2 分;裂痕深达移行层为 3 分;裂痕深达钙化层为 4 分;软骨脱落为 5 分。(2)软骨细胞,数量正常为 0 分;数量弥漫性增多为 1 分;出现大量簇集样细胞团为 2 分;数量减少 3 分。(3)番红-O 快绿染色,正常染色为 0 分;染色轻度减少为 1 分;染色中度减少为 2 分;染色重度减少为 3 分;染色完全消失为 4 分。(4)TB 染色,正常染色为 0 分;染色轻度减少为 1 分;染色中度减少为 2 分;染色重度减少为 3 分;染色完全消失为 4 分。(5)潮线完整性,完整为 0 分;多重潮线为 1 分;软骨下骨血管入侵潮线为 2 分。

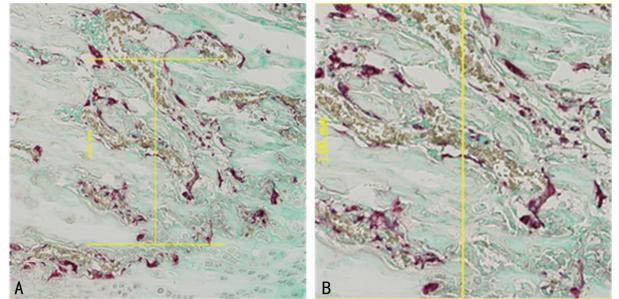


图 1 OC TRAP 染色(A)及阳性细胞半定量(B)示意图

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,比较采用  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

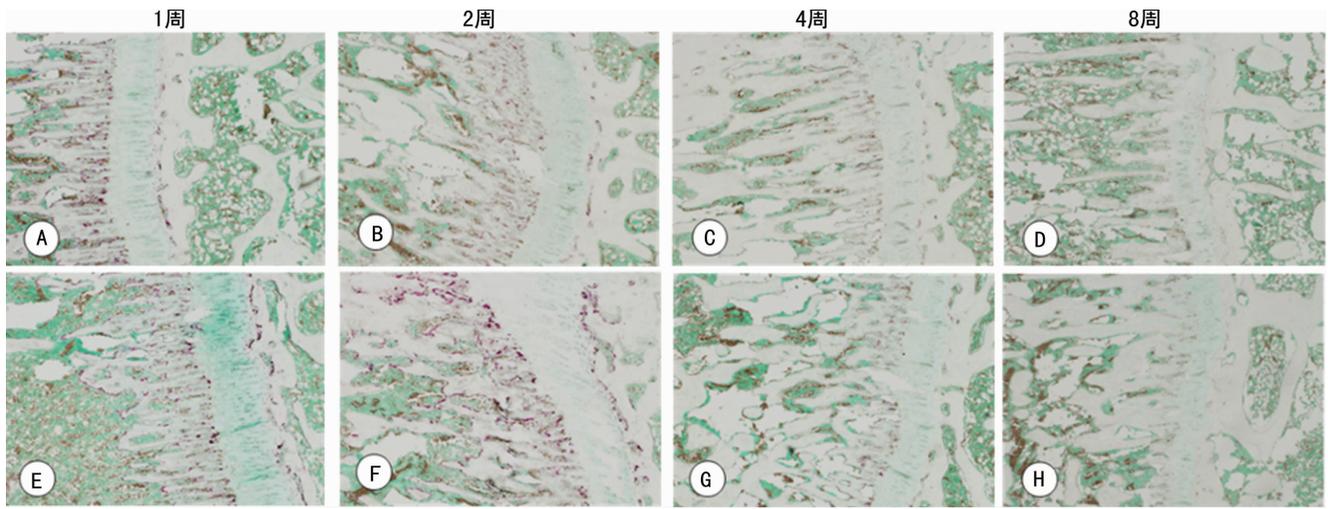
**2.1 膝关节 X 射线摄片** 通过 X 射线摄片观察(1、2 周 X 射线摄片观察未发现关节有明显变化,故省略),模型组 8 周时呈现 OA 的典型表现:关节表面不平整、关节间隙狭窄、骨质密度增加和囊性变,骨质增生并伴骨赘形成(图 2)。

**2.2 TRAP 染色及 OC 数量变化** 胫骨软骨下骨 TRAP 染色结果显示:对照组在 1 周时可见大量 TRAP 染色阳性的 OC,2 周时开始逐渐减少,8 周时几乎看不到;模型组在 1 周时可见大量 OC,2 周时明显增加,4 周时开始减少,8 周时几乎看不到。1、2、4、8 周时 OC 数量分别为:对照组(65.20 ± 4.12)个/mm<sup>2</sup>、(47.20 ± 4.31)个/mm<sup>2</sup>、(26.20 ± 3.87)个/mm<sup>2</sup>、(7.00 ± 2.28)个/mm<sup>2</sup>;模型组(70.40 ± 5.46)个/mm<sup>2</sup>、(86.20 ± 5.42)个/mm<sup>2</sup>、(38.00 ± 3.16)个/mm<sup>2</sup>、(6.21 ± 2.93)个/mm<sup>2</sup>,模型组 OC 数量在 2、4 周时高于对照组,两组之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 3。



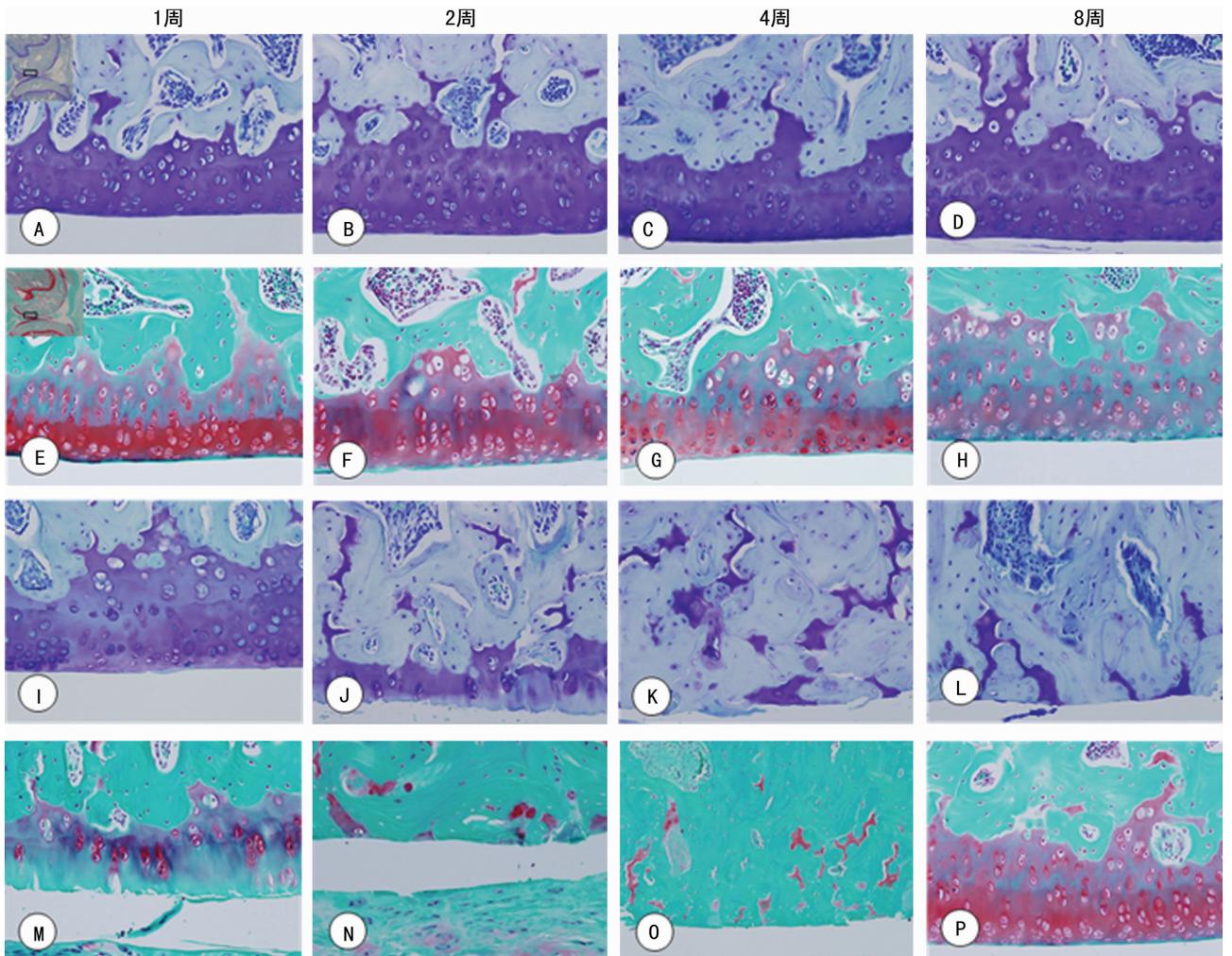
图 2 膝关节 X 射线摄片 A:对照组 4 周;B:模型组 4 周;C:对照组 8 周;D:模型组 8 周,模型组 8 周时呈现典型的 OA 表现:骨面粗糙(a),骨质密度增加、硬化(b),骨质增生(c),囊腔形成(d),关节间隙变窄(e)

图 2 膝关节 X 射线摄片



A、B、C、D:对照组;E、F、G、H:模型组

图 3 胫骨下骨 TRAP 染色(×40)



A、B、C、D:对照组 TB 染色;E、F、G、H:对照组番红-O 快绿染色;I、J、K、L:模型组 TB 染色;M、N、O、P:模型组番红-O 快绿染色

图 4 膝关节胫骨软骨面 TB 及番红-O 快绿染色(×100)

**2.3 关节软骨的破坏及 Mankin's 评分** 胫骨关节软骨面经 TB 及番红-O 快绿染色后,光镜观察:对照组软骨表面光滑,软骨 4 层结构清晰可见,在 1~8 周的观察中变化很小,TB 和番红-O 快绿染色正常;模型组在第 1 周时与对照组相当,但在第 2 周时软骨细胞即大量减少,表面出现不规则裂痕,染色中重度减少。至 4 周时软骨几乎全部脱落,染色消失,软骨下骨血

管侵入至潮线。各期 Mankin's 评分为:对照组 1 分(1 周)、2 分(2 周)、5 分(4 周)、6 分(8 周);模型组 3 分(1 周)、10 分(2 周)、17 分(4 周)、17 分(8 周),2、4、8 周时两组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 4。

### 3 讨论

笔者通过手术切断大鼠右膝关节 MCL、ACL、MM 建立

OA 疾病模型<sup>[4]</sup>,与同体异肢未伤及韧带的左膝关节(对照组)进行对照,模型组关节软骨的破坏程度明显高于对照组,8 周时 X 射线摄片呈典型的 OA 病理改变。实验结果表明,切断关节韧带会导致 OA 的形成。软骨下骨 TRAP 染色结果显示,对照组与模型组在术后 1 周时 OC 数量分别为(65.20±4.12)个/mm<sup>2</sup>和(70.40±5.46)个/mm<sup>2</sup>,两组间差异无统计学意义( $P>0.05$ );第 2 周时对照组 OC 数量减少至(47.20±4.31)个/mm<sup>2</sup>,模型组则增加至(86.20±5.42)个/mm<sup>2</sup>,差异有统计学意义( $P<0.05$ );第 4 周时,对照组为(26.20±3.87)个/mm<sup>2</sup>,模型组也减少至(38.00±3.16)个/mm<sup>2</sup>( $P<0.05$ );至第 8 周时,对照组为(7.00±2.28)个/mm<sup>2</sup>,模型组为(6.21±2.93)个/mm<sup>2</sup>( $P>0.05$ ),两组 OC 数量均明显减少,镜下几乎看不到。OC 在关节损伤后大量增殖,与 Bertuglia 等<sup>[6]</sup>的研究结果一致。不过,本实验还观察到关节损伤-康复的整个周期中 OC 的增殖呈早期快速增高,然后下降的一过性变化,模型组 OC 的增殖比对照组多,持续时间更长。

OC 是一种巨大的多核细胞,起源于单核巨噬细胞/单核系造血前体细胞,具有重要的骨吸收功能,其骨吸收作用与成骨细胞的骨形成作用维持着骨代谢的动态平衡,是人体维系正常骨组织更新,维持骨骼的正常硬度与弹性的关键。OC 的形成、活化及凋亡受体众多因素的调节,为尽量规避大鼠个体间差异的影响,本实验采用同体异肢进行对照。关节经手术造成损伤后,局部炎症形成,大量的炎症因子和细胞因子聚集、形成,促进 OC 大量增殖、分化、成熟和活性增加<sup>[7-9]</sup>。随着损伤的逐步修复,炎症减轻,OC 的增殖也逐渐降低。模型组 OC 的增殖更多,持续时间更长的原因,可能是切断 MCL、ACL、MM 后创伤更大、炎症更重,导致 OC 增殖、分化更多;同时,韧带切断后关节不稳定,恢复较对照组慢,大鼠活动时即以对照侧为主要支撑,模型侧处于失重状态,力学刺激减少,OC 形成和活化,OC 增殖进一步增加<sup>[10-11]</sup>。

OC 大量形成与活化,骨吸收作用极大增强,软骨下骨基质及钙化层中有机质和无机矿物质被大量降解,骨质破坏,吸收陷窝形成,骨面坑洼不平,不能将软骨所承受的压力均匀分散与传递,软骨在外压力下直接受损、破裂,局部炎症形成,炎症因子和细胞因子等形成并聚集,软骨代谢改变,软骨内形成骨化点,次级骨化中心形成<sup>[12]</sup>。另一方面,软骨下骨连接着骨与软骨,具有传导垂直应力、抵抗剪切应力等作用<sup>[13]</sup>,其结构改变将直接影响所支撑的软骨的结构和功能,导致软骨钙化增加及软骨损伤。大量 OC 增殖和活化,打破了软骨下骨的代谢平衡,促使软骨下骨重塑增加。软骨下骨的代谢改变及重塑与 OA 的发生、发展密切相关,软骨和软骨下骨相互作用,形成恶性循环,贯穿 OA 病程始终<sup>[14-15]</sup>。

结合实验结果,笔者认为,OC 大量增殖和活化后,骨吸收大幅增加,骨质被破坏,骨基质表面不平导致关节软骨受压而直接损伤,以及由骨吸收病理性增加导致的软骨下骨骨代谢动态平衡改变,骨重塑增加,是形成 OA 的又一原因。在严重关节损伤的临床治疗中,应注意对 OA 早期的预防处理。OC 在早中期 OA 中的一过性高增殖,为 OA 防治提供了新的靶点,也为选择防治的最佳时间提供了科学、合理的实验理论依据。早期预防性使用 OC 抑制剂或许是防治 OA 的又一有效方法。

综上所述,大鼠膝关节骨关节炎实验的早中期 OC 大量增殖,表明 OC 可能参与了骨关节炎的形成。

## 参考文献

- [1] 李宇华. 中老年人骨关节炎的流行病学特征[J]. 中国临床康复, 2005, 38(9): 133-135.
- [2] Palmieri B, Lodi D, Capone S. Osteoarthritis and degenerative joint disease: local treatment options update[J]. Acta Biomed, 2010, 81(2): 94-100.
- [3] 谢辉晋, 杜远立. 骨关节炎相关细胞因子作用机制研究进展[J]. 重庆医学, 2011, 40(4): 395-398.
- [4] Stoop R, Bnma P, Van der Kraan PM, et al. Type II collagen degradation in articular cartilage fibrillation after anterior cruciate ligament transection in rats[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2001, 9(4): 308-315.
- [5] Tang T, Muneta T, Ju YJ, et al. Serum keratin sulfate transiently increases in the early stage of osteoarthritis during strenuous running of rats: protective effect of intraarticular hyaluronan injection[J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10(1): R13.
- [6] Bertuglia A, Lacourt M, Girard C, et al. Osteoclasts are recruited to the subchondral bone in naturally occurring post-traumatic equine carpalosteoarthritis and may contribute to cartilage degradation[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2016, 24(3): 555-566.
- [7] Zhao Q, Shao J, Chen W, et al. Osteoclast differentiation and gene regulation[J]. Front Biosci, 2007, 1(12): 2519-2529.
- [8] 谭春秋, 王迪, 张玉英, 等. 破骨细胞功能及影响因素的研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志, 2013, 21(3): 135-136.
- [9] Kim JH, Jin HM, Kim K, et al. The mechanism of osteoclast differentiation induced by IL-1[J]. J Immunol, 2009, 183(3): 1862-1870.
- [10] Trüssel A, Müller R, Webster D. Toward mechanical systems biology in bone[J]. Ann Biomed Eng, 2012, 40(11): 2475-2487.
- [11] 王晓楠, 孙联文, 樊瑜波. 微重力对骨组织细胞功能的影响[J]. 中华航空航天医学杂志, 2012, 23(2): 151-156.
- [12] Burr DB, Radin EL. Microfractures and microcracks in subchondral bone: are they relevant to osteoarthritis? [J]. Rheum Dis Clin North Am, 2003, 29(4): 675-685.
- [13] Iijima H, Aoyama T, Ito A, et al. Immature articular cartilage and subchondral bone covered by menisci are potentially susceptible to mechanical load[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2014, 26(15): 101.
- [14] Wang T, Wen CY, Yan CH, et al. Spatial and temporal changes of subchondral bone proceed to microscopic articular cartilage degeneration in guinea pigs with spontaneous osteoarthritis [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2013, 21(4): 574-581.
- [15] Lories RJ, Luyten FP. The bone-cartilage unit in osteoarthritis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2011, 7(1): 43-49.