

· 论 著 ·

盐酸氨基葡萄糖对绝经后膝骨关节炎患者膝关节软骨下骨骨钙素和Ⅰ型胶原分泌的作用

柳凡 沈景全 池一阳 朱永峰 王玲露 林华

[摘要] **目的** 探究绝经后膝骨关节炎患者运用盐酸氨基葡萄糖治疗后关节软骨下骨钙素和骨Ⅰ型胶原水平的变化。**方法** 选择因膝关节炎实施人工膝关节表面置换术的绝经女性患者50例,根据治疗方法的不同,分为治疗组和对照组各25例。治疗组术前6个月内口服盐酸氨基葡萄糖3个月,对照组不予盐酸氨基葡萄糖治疗。术中均截取两组软骨下骨组织0.6 cm³,并分别行骨组织显微CT扫描、Ⅰ型胶原苦味酸-天狼星红染色、骨钙素免疫组化染色、Western blot检测,比较检测结果。**结果** 骨组织显微CT扫描提示,治疗组软骨下骨小梁相对体积、骨小梁间隙、骨小梁厚度和骨小梁数目比对照组明显改善,差异有统计学意义(t 分别=12.42、15.47、13.04、10.68, P 均<0.05);胶原苦味酸-天狼星红染色和骨钙素免疫组化染色结果提示,治疗组Ⅰ型胶原和骨钙素含量均高于对照组,差异有统计学意义(t 分别=8.24、15.87, P 均<0.05);Western blot检测结果提示,治疗组患者Ⅰ型胶原和骨钙素表达均高于对照组,差异有统计学意义(t 分别=16.04、10.12, P 均<0.05)。**结论** 膝关节炎的绝经后女性患者服用盐酸氨基葡萄糖能促进膝关节软骨下骨的Ⅰ型胶原和骨钙素的产生,且能调整膝关节软骨下骨的微结构,从而改善膝关节软骨下骨的功能。

[关键词] 膝骨关节炎; 盐酸氨基葡萄糖; Ⅰ型胶原; 骨钙素

Effect of glucosamine hydrochloride on type I collagen and osteocalcin expressions of bone articular cartilage in postmenopausal patients with knee osteoarthritis LIU Fan, SHEN Jingquan, CHI Yiyang, et al. Department of Orthopedics, The Traditional Chinese Medicine Hospital of Yongkang, Yongkang 321300, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of glucosamine hydrochloride on type I collagen and osteocalcin expressions of bone articular cartilage in postmenopausal patients with knee osteoarthritis. **Methods** Totally 50 cases of postmenopausal patients who underwent artificial knee surface replacement because of knee arthritis were screened and divided into treatment group ($n=25$) and control group ($n=25$) according to different treatment methods. Six months before operation, the treatment group was given the oral administration of glucosamine hydrochloride for 3 months, but the control group was not given glucosamine hydrochloride. Totally 0.6 cm³ of subchondral bone in two groups were taken intraoperatively. The microscopic CT scan, type I collagen picric acid - sirius red staining, osteocalcin immunohistochemical staining and Western blot were performed. **Results** Microscopic CT scan showed that the relative volume of trabecular bone, trabecular bone thickness, trabecular bone thickness and trabecular bone number were significantly improved compared to the control group, the differences were statistically significant ($t=12.42, 15.47, 13.04, 10.68, P<0.05$). Collagenic acid - sirius red staining and osteocalcin immunohistochemical staining results suggested that the type I collagen and osteocalcin expressions of the treatment group were significantly higher than those of the control group ($t=8.24, 15.87, P<0.05$). Western blot showed that the expressions of type I collagen and osteocalcin of the treatment group were significantly higher than those of the control group ($t=16.04, 10.12, P<0.05$). **Conclusion** The glucosamine hydrochloride can promote the expressions of type I collagen and osteocalcin of the subchondral bone of the knee in postmenopausal women with knee arthritis and regulate the microstructure of the subchondral bone in the knee joint, so that to improve the function of the lower part of the knee cartilage.

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2018.01.003

作者单位: 321300 浙江永康, 永康市中医医院骨科

[Key words] the osteoarthritis of knee; glucosamine hydrochloride; type I collagen; osteocalcin

膝骨关节炎是因过度负重、受凉、外伤等引起的慢性膝关节退行性病变,临床表现主要以膝关节软骨变性、骨质损坏和增生为主,病理表现为局灶性关节软骨的退行性变、软骨下骨质变密、周围性骨软骨骨赘形成伴关节畸形^[1]。近期有文献报道,膝骨关节炎前期即可发生软骨下骨转化水平的增加和骨小梁结构损坏,这样的膝骨关节炎会随着女性绝经后体内激素水平的紊乱而表现的更加突出^[2,3],由于软骨下骨的变化在骨关节炎的发生发展进程中占据主要地位,因此如何修复软骨下骨是近年来膝骨关节炎研究的关键点。骨修复过程有骨基质的形成和骨矿化两个阶段,而在骨基质中含量最高的是 I 型胶原,因此 I 型胶原对骨矿化具有支撑作用^[4,5],其含量和结构的变化往往可影响骨质的韧性和强度。骨钙素对骨组织的能量代谢具有调节作用,常可反映骨更新的速率,并在骨矿化期能产生聚集^[6-8]。近年来,临床上常选取氨基葡萄糖类药物改善关节软骨代谢。本次研究采用口服盐酸氨基葡萄糖治疗绝经后膝骨关节炎患者,在观察 I 型胶原、骨钙素的变化和软骨下骨小梁微结构的变

化后,探究绝经后膝骨关节炎软骨下骨的修复机制,为循证治疗提供理论支持。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2016 年 2 月至 2017 年 7 月永康市中医院骨伤科收治的择期行人工膝关节表面置换术的膝关节炎患者 50 例,纳入标准:①年龄 60~70 岁;②汉族;③绝经女性;④体重指数(body mass index, BMI) < 27 kg/m²;⑤三代内无家族性迁移史;⑥6 个月内无与骨质疏松有关的用药史;⑦无骨质代谢病,或与骨质代谢病相关的用药史。本次研究获本院医学伦理委员会审批通过,全部入选患者均签署知情同意书。根据治疗方法的不同,入选患者分为治疗组和对照组各 25 例。两组患者年龄、BMI、美国特种外科医院膝关节评分(hospital for special surgery knee score, HSS)、美国西部 Ontario 和 McMaster 大学骨关节炎指数评分(the western Ontario and McMaster universities osteoarthritis index, WOMAC)、美国膝关节协会评分(knee society knee score, KSS)见表 1,两组患者基本资料比较,差异均无统计学意义(P 均>0.05)。

表 1 治疗组和对照组患者基本资料比较

组别	<i>n</i>	年龄/岁	BMI/kg/m ²	HSS 评分/分	WOMAC 评分/分	KSS 评分/分
治疗组	25	65.94 ± 2.19	25.09 ± 2.79	48.20 ± 10.15	81.60 ± 26.96	106.29 ± 26.37
对照组	25	67.35 ± 2.81	23.59 ± 2.78	52.39 ± 13.48	78.89 ± 30.09	114.89 ± 24.04

1.2 方法 术前 6 月,治疗组给予双氯芬酸钠(由北京诺华制药生产)25 mg 口服,每天 3 次,联合盐酸氨基葡萄糖(由四川新斯顿制药生产)750 mg 口服,每天 2 次;对照组仅予双氯芬酸钠 25 mg 口服,每天 3 次。两组均治疗 3 个月。两组患者均择期由同一医生实施人工膝关节表面置换术。术后检测两组患者的膝关节软骨下骨 I、III 型胶原和骨钙素的表达。

1.2.1 主要试剂和器材 乙二胺四乙酸二钠由本院实验中心提供;显微 CT 由美国 GE 公司生产;骨钙素多克隆抗体、I 型胶原多克隆抗体和二抗由美国 Abcam 公司生产;放射免疫沉淀法总蛋白提取试剂盒由日本 TaKaRa 公司生产;丙烯酰胺、双丙烯酰胺、考马斯亮蓝由美国 Amresco 公司生产;增强化学发光法(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂盒由美国 BIO-TEK 公司生产;链亲和素-过氧化物酶(streptavidin-peroxidase, SP)免疫组化试剂盒由中国北京中杉金桥生物技术有限公司生产;胶原苦味酸-天狼星红染色试剂盒由中国南京森倍加生物科

技生产。

1.2.2 标本的收集和处置 术中截取膝关节软骨下骨组织一片,大小为 0.6 cm³。将标本快速平均截为两部分:一部分快速留置甲醛溶液中,再行显微 CT 扫描,扫描后留置于甲醛溶液中且留存 3 d,再行乙二胺四乙酸脱钙液脱钙,置于石蜡包埋切片上行胶原苦味酸-天狼星红和骨钙素免疫组化染色;另一部分快速液氮冷冻行 I 型胶原和骨钙素的 Western blot 检测。

1.2.3 检测方法

1.2.3.1 显微 CT 扫描 将软骨下骨标本留放在样品杯中心轴线上,采用 Scan Control 软件进行扫描,采用 eXplore Locus SP 型显微 CT 进行检测,其中分辨率为 14 μm,电压 80 kV,电流 80 μA,旋转角度 360°,旋转角度增量 0.4°,曝光时间 2 960 ms,帧平均数 4,像素组合 1×1。扫描完成后运用 Reconstruction Utility 软件对标本进行重建,再采用相应的定义框,运用 MicroView 软件对重建标本实施三维显

像和观察,最后再通过 Advanced Bone Analysis 骨形态分析软件对观察到的骨质检测,包括骨小梁的相对骨体积、骨小梁厚度、骨小梁数目和骨小梁间隙,以上步骤共检测3次。

1.2.3.2 免疫组化染色法 采集各组股骨头的标本,运用磷酸缓冲盐溶液冲洗后放入10%中性甲醛溶液(0.1 mol/L, pH 7.4)留置并保存3 d,再放于15%乙二胺四乙酸脱钙,每2天更换1次脱钙液。待完全脱钙后,再依次行逐级脱水、二甲苯透明、石蜡包埋等步骤,制成5 μm 的厚切片,放在多聚赖氨酸处理的载玻片上,再留于60 $^{\circ}\text{C}$ 的烤箱2~3 h,然后移至37 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱过夜。取出后采用胶原苦味酸-天狼星红染色试剂盒实施I型胶原染色,至偏光显微镜中观测(I型胶原在苦味酸-天狼星红染色显示红色,III型胶原显示绿色);再实施免疫组化SP法染色,采用鼠抗人骨钙素多克隆抗体检测骨钙素的表达(骨钙素免疫组化染色显示棕黄色为阳性,在骨髓和成骨

细胞附近,骨小梁偶有阳性表达)。检测结果在光镜下拍照后采用FR-200紫外和可见光分析装置图像分析系统来测定图像灰度,积分光密度分析完成后再进行统计学研究,以上步骤共检测3次。

1.2.3.3 Western blot法 采集各组软骨下骨标本,快速置于含液氮的研钵内研碎,并将放射免疫沉淀法裂解液放入在冰上匀浆,待裂解完全后,提炼总蛋白。采用Western blot检测软骨下骨I型胶原和骨钙素的表达,电泳结果采用FR-200紫外和可见光分析装置图像分析系统来对图像灰度进行分析,以上步骤共检测3次。

1.3 统计学方法 采用SPSS 20.0软件统计分析。计量资料的差异对比采用 t 检验或校正 t 检验,率的比较采用 χ^2 检验,等级资料采用秩和检验。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨组织显微CT扫描结果见表2

表2 治疗组和对照组骨组织显微CT扫描结果

组别	n	骨小梁相对骨体积/%	骨小梁间隙/ μm	骨小梁厚度/ μm	骨小梁数目/个
治疗组	25	40.31 $\pm$ 4.29*	429.87 $\pm$ 38.60*	274.28 $\pm$ 30.49*	2.01 $\pm$ 0.18*
对照组	25	28.19 $\pm$ 2.27	676.29 $\pm$ 57.79	190.39 $\pm$ 17.01	0.97 $\pm$ 0.09

注:*,与对照组比较, $P < 0.05$ 。

由表2可见,治疗组骨小梁的相对体积、骨小梁间隙、骨小梁厚度、骨小梁数目比对照组明显改善,差异均有统计学意义(t 分别=12.42、15.47、13.04、10.68, P 均 < 0.05)。

2.2 免疫组化染色结果见封三图1、2

由封三图1可见,对照组骨小梁结构出现明显异常,胶原纤维排列不规整,I型胶原表达量不多,III型胶原表达增多;治疗组骨小梁厚度增加,虽出现胶原持续性断裂,但同对照组相比有改善。

由封三图2可见,对照组中骨钙素表达弱阳性,骨小梁附近成骨细胞少见阳性表达;治疗组骨钙素表达阳性,骨小梁附近成骨细胞可见阳性表达。

2.3 两组膝关节软骨下骨I、III型胶原和骨钙素的表达见表3

表3 两组膝关节软骨下骨I、III型胶原和骨钙素的表达比较

组别	n	I型胶原	III型胶原	骨钙素
治疗组	25	89.69 $\pm$ 8.59*	10.30 $\pm$ 6.49*	0.69 $\pm$ 0.20*
对照组	25	75.49 $\pm$ 6.90	24.50 $\pm$ 8.89	0.19 $\pm$ 0.08

注:*,与对照组比较, $P < 0.05$ 。

由表3可见,治疗组术后I型胶原含量、骨钙素明显高于对照组,III型胶原含量明显低于对照组,差异有统计学意义(t 分别=8.24、15.87、12.22, P 均 < 0.05)。

2.4 两组Western blot检测膝关节软骨下骨I型胶原和骨钙素的表达结果见表4

表4 两组Western blot检测膝关节软骨下骨I型胶原和骨钙素的表达

组别	n	I型胶原	骨钙素
治疗组	25	80.29 $\pm$ 8.59*	0.59 $\pm$ 0.09*
对照组	25	37.28 $\pm$ 6.49	0.20 $\pm$ 0.10

注:*,与对照组比较, $P < 0.05$ 。

由表4可见,治疗组I型胶原和骨钙素的含量均明显高于对照组,差异有统计学意义(t 分别=16.04、10.12, P 均 < 0.05)。

3 讨论

膝骨关节炎是以膝关节软骨退行性改变为特征的一种慢性关节病,常表现为膝关节软骨变性、损坏和骨质增生。过去通常认为骨关节炎的发生

是从关节软骨细胞合成蛋白多糖的含量降低开始的,胶原纤维结构发生紊乱,最终使关节软骨发生退变^[7,9,10]。随着研究的深入,现多数人认为软骨下骨在骨关节炎的发病过程中具有不可替代的作用^[11],绝经后骨质疏松症主要发生在绝经后妇女,由于雌激素缺乏导致骨量减少及骨组织结构变化,骨脆性增加,而部分女性早在围绝经期骨关节炎发生软骨病变前,软骨下骨既已发生骨量和弹性模量的减少。2-氨基-2脱氧-葡萄糖盐酸盐作为盐酸氨基葡萄糖的主要构成部分,它是一种天然的小分子氨基多糖,能提供蛋白多糖合成的前体物质。有文献报道,氨基葡萄糖是蛋白多糖的构成部分^[12-14],它不仅能够增加关节软骨基质中胶原的合成,而且还可刺激软骨细胞的生长,提高其修复能力,从而增强软骨基质的修复和重建,进而能减缓骨关节疼痛发生病理改变及减慢疾病的进展速度,同时能增加关节的活动度,减轻患者的痛苦。有研究报道治疗膝骨关节炎可首选盐酸氨基葡萄糖^[15],但目前有关氨基葡萄糖对软骨下骨结构产生影响的文献仍不多,且其如何作用的机制并未阐述。

骨组织显微CT扫描提示治疗组骨小梁的相对体积、骨小梁间隙、骨小梁厚度、骨小梁数目比对照组明显改善(P 均 <0.05),说明氨基葡萄糖可能对软骨下骨骨质形成和骨矿化有一定的效果。在正常骨组织中,骨基质的有机质由I型胶原和较少的III型、微量的V型、X型等组成,而I型胶原占90%以上。经钙盐矿化后网状型的I型胶原可供给较强的支撑力,改变其含量能对骨的强度和韧性能产生影响。本次研究结果显示,治疗组和对照组的I型胶原纤维均发生结构紊乱,同时出现III型胶原增加。治疗组I型胶原含量比正常范围有所降低,但仍明显高于对照组($P<0.05$),考虑膝骨关节炎的软骨及软骨下骨结构发生变化可能与I型胶原含量和结构的丢失造成骨矿化作用下降、骨小梁致密度降低、骨质疏松微观变化等有关。而治疗组经盐酸氨基葡萄糖治疗后能增强关节软骨下骨基质中胶原的合成能力,并能够修复和重建软骨下骨基质,具有一定的治疗效果。

骨钙素是骨组织中含有比较丰富的成分,其在矿化作用下同羟基磷灰石联合,在骨形成过程中发挥重要功能,可有效促进成骨细胞的分化,故常将其作为成骨细胞分化过程中的主要标记物。本次研究结果表明,对照组中膝关节软骨下骨中骨钙素

成分较治疗组降低($P<0.05$),考虑其原因可能是关节软骨下骨损伤后,成骨细胞和骨细胞的活性下降使骨钙素分泌不足引起的,提示通过运用氨基葡萄糖可增加骨钙素的分泌,加强关节软骨下骨的支撑作用,能有一定的治疗效果。

总而言之,膝骨关节炎软骨下骨生物力学的变化是造成膝骨关节炎发病的主要病理原因,而I型胶原和骨钙素的分泌异常与其关系密切。膝骨关节炎绝经女性患者通过口服盐酸氨基葡萄糖可促进I型胶原和骨钙素的分泌,提高修复受损的软骨下骨微结构的能力,从而促进膝关节软骨下骨功能的改善。但本研究仅停留在病理层面上,尚未涉及基因层面的研究,且未对III型胶原的表达进行检测分析,还需以后进行深入探讨。

参考文献

- 1 Arden NK, Cro S, Sheard S, et al. The effect of vitamin D supplementation on knee osteoarthritis, the VIDEO study: a randomised controlled trial[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2016, 24(11): 1858.
- 2 李西海, 梁文娜. 软骨下骨重塑与骨关节炎的关系[J]. 国际骨科学杂志, 2007, 28(1): 35.
- 3 刘明, 余曦, 黄富国, 等. 组织工程双相支架修复关节软骨及软骨下骨缺损研究进展[J]. 华西医学, 2014, 29(4): 783.
- 4 Manley JR, Perosky JE, Khour BM, et al. Thrombospondin-2 deficiency in growing mice alters bone collagen ultrastructure and leads to a brittle bone phenotype[J]. J Appl Physiol, 2015, 119(8): 872.
- 5 Park YJ, Jung IH, Kim YK, et al. Guided bone regeneration using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) - cross-linked type-I collagen membrane with biphasic calcium phosphate at rabbit calvarial defects [J]. Biomater Res, 2015, 19(3): 15-18.
- 6 车革方. 骨肽联合降钙素治疗原发性骨质疏松症[J]. 中国实用医药, 2014, 9(2): 154-155.
- 7 姜俊良, 周予婧, 林海丹, 等. 膝骨关节炎运动疗法国内研究进展[J]. 华西医学, 2015, 30(12): 2373.
- 8 郭晓强. 骨钙素: 一种重要的能量代谢调节激素[J]. 生命科学, 2011, 23(1): 102.
- 9 Eugene M, Joseph EP, Basma MK, et al. Thrombospondin-2 deficiency in growing mice alters bone collagen ultrastructure and leads to a brittle bone phenotype[J]. J Appl Physiol, 2015, 32(8): 1324-1326.

(下转第24页)

可以避免开放性手术。

综上所述,经支撑喉镜内镜辅助下低温等离子射频消融术治疗早期声门型喉癌的短期疗效确切,较开放性喉裂开术时间短、出血少、疼痛小,而且嗓音恢复情况更优,可成为早期声门型喉癌治疗方案的有益补充。

参考文献

- 徐帅,范崇盛. 显微支撑喉镜CO₂激光治疗早期声门型喉癌临床疗效观察[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2017, 24(7): 379-380.
- 刘敏,牛广宪. 低温等离子射频消融术治疗早期声门型喉癌疗效分析[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2015, 23(4): 422-423.
- 康沙沙. T1期声门区喉癌手术前后喉功能客观评估研究[D]. 山东:山东大学, 2013.
- Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- 王静,李振东,黄冬宁. 根治手术与放疗辅助常规化疗对早期声门型喉癌局部控制率、生存率及并发症的影响[J]. 实用癌症杂志, 2017, 32(6): 1021-1023.
- Adelstein D, Gillison ML, Pfister DG, et al. NCCN guidelines insights: head and neck cancers, version 2. [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2017, 15(6): 761-770.
- Takes RP, Strojan P, Silver CE, et al. Current trends in initial management of hypopharyngeal cancer: the declining use of open surgery[J]. Head Neck, 2012, 34(2): 270-281.
- Khan MK, Koyfman SA, Hunter GK, et al. Definitive radiotherapy for early (T1-T2) glottic squamous cell carcinoma: A 20year cleveland clinic experience[J]. Radiat Oncol, 2012, 19(7): 193.
- 张庆翔,李平栋,胡慧英,等. 累及前连合的早期声门型喉癌经CO₂激光治疗[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2015, 50(4): 286-290.
- Succo G, Fantini M, Rizzotto G. Supratracheal partial laryngectomy: indications, oncologic and functional results [J]. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, 2017, 25(2): 127-132.
- 郑伟昌,张巧真,蒋慈英,等. 低温等离子消融术治疗早期声门型喉癌的疗效分析[J]. 中华全科医学, 2016, 14(4): 561-562.
- Mendelsohn AH, Kiagiadaki D, Lawson G, et al. CO₂ laser cordectomy for glottic squamous cell carcinoma involving the anterior commissure: voice and oncologic outcomes[J]. Eur Arch Oto-rhino-laryngol, 2015, 272(2): 413-418.
- 王浩明,江洋. 全麻支撑喉镜联合电子喉镜行射频治疗早期声门癌的临床观察[J]. 实用癌症杂志, 2015, 30(6): 868-870.

(收稿日期 2017-11-14)

(本文编辑 蔡华波)

(上接第12页)

- Deep K, Picard F, Clarke JV. Dynamic knee alignment and collateral knee laxity and its variations in normal humans [J]. Frontiers Surg, 2015, 23(1): 62-65.
- Zhen GH, Cao X. Targeting TGF β signaling in subchondral bone and articular cartilage homeostasis[J]. Trends Pharmacol Sci, 2014, 35(5): 227-228.
- Henrotin Y, Marty M, Mobasheri A. What is the current status of chondroitin sulfate and glucosamine for the treatment of knee osteoarthritis? [J]. Maturitas, 2014, 78(3): 184-187.
- Kang YH, Park S, Ahn C, et al. Beneficial reward-to-risk action of glucosamine during pathogenesis of osteoarthritis[J]. Eur J Med Res, 2015, 20(4): 89-92.
- Bliddal H, Christensen RD, Kristensen PK, et al. Glucosamine effectiveness in the treatment of knee osteoarthritis. presentation of a cochrane analysis with the perspective on the GAIT trial[J]. Ugeskr Laeger, 2006, 168(50): 4405.
- 中华医学会骨科学分会. 骨关节炎诊治指南: 2007年版[S]. 中华关节外科杂志(电子版), 2007, 1(4): 281.

(收稿日期 2017-06-28)

(本文编辑 蔡华波)