

· 实验研究 ·

不同年龄兔前交叉韧带切断后关节软骨变化的研究

储 森 孙立胜 蒋 青*

(南京医科大学鼓楼临床医学院关节中心, 南京 210008)

【摘要】 目的 探讨膝关节前交叉韧带(anterior cruciate ligament, ACL)切断对不同年龄兔关节软骨的影响,为临床选择方法和时机处理不同年龄 ACL 损伤的病人提供实验依据。 方法 健康新西兰大白兔 30 只,按照年龄分成 6、12、24 个月组,每组 10 只。每组再随机分为 5 个小组。切断右膝关节 ACL,左膝仅行切开术作为自身对照。分别于术后 5、10、15、20、25 周气栓处死实验动物,大体观察并对股骨关节软骨进行损伤评分,对股骨内髁进行 Masson 染色并显微镜观察,测定软骨含水率。 结果 大体观察和 Masson 染色病理切片显示,12 月龄组兔软骨损伤发展最快,24 月龄组兔发展最慢。术后 25 周时 12 月龄组兔软骨损伤最重,6 月龄组兔次之,24 月龄组兔软骨损伤最轻。随着软骨损伤的发展,右侧 ACL 切断(阳性对照侧)软骨含水率呈现出先升高后降低的趋势。 结论 不同年龄兔 ACL 断裂后软骨损伤存在差异,提示 ACL 断裂后软骨的损伤与年龄有紧密的关系。

【关键词】 前交叉韧带; 骨性关节炎; 软骨; 膝关节

中图分类号:R-332

文献标识:A

文章编号:1009-6604(2012)07-0659-05

Articular Cartilage Changes after Anterior Cruciate Ligament Transection in Rabbits at Different Ages Chu Miao, Sun Lisheng, Jiang Qing. Center of Joints, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing Medical University Clinical College, Nanjing 210008, China

【Abstract】 Objective To study the influence of anterior cruciate ligament (ACL) transection on the changes of the articular cartilage in rabbits at different ages, so that to provide experimental evidence for clinical treatment of patients with ACL injury at different ages. Methods Totally 30 healthy New Zealand rabbits were divided into 6-, 12-, and 24-month groups with 10 in each. All the rabbits received transection of the right ACL, with the left knee received a sham operation as a control. In each group, the animals were divided into five subgroups ($n=2$) to be killed in 5, 10, 15, 20, and 25 weeks. The injury to the articular cartilage of the femoral bone was scored, and Masson straining was made on the medial malleolus to determine the water ratio (WR) of the cartilage. Results Both gross observation and Masson straining showed that cartilage degenerated fastest in 12-month group, and slowest in the 24-month group. In 25 weeks after ACL transection, the cartilage degeneration was slightest in the 24-month rabbits, most serious in 12-month group followed by 6-month group. With the degeneration, the WR of the cartilage was increased and then decreased after ACL transection. Conclusion The significant difference in cartilage changes among rabbits of different ages after ACL transection suggests that the level of cartilage degeneration is related to age.

【Key Words】 Articular cruciate ligament (ACL); Osteoarthritis; Cartilage; Knee joint

前交叉韧带(anterior cruciate ligament, ACL)是膝关节内的强大韧带,对维持膝关节的稳定至关重要,通过防止胫骨在股骨上向前移动或向后移动,同时防止膝关节过度伸直,限制内、外旋和内、外翻活动,是膝关节内最容易损伤的韧带^[1,2]。ACL 断裂后,使平衡能力和本体感觉下降,下肢肌肉的力量和功能也受到影响,使受伤下肢生物力学改变^[3,4],关节软骨压力传导紊乱,增加了软骨磨损,导致关节软骨退行性改变,最终导致骨性关节炎的发生^[5,6]。本研究以 3 个年龄段(6、12、24 个月)新西兰大白兔

为实验对象,通过检测切除兔膝关节 ACL 后不同时间关节软骨的损伤程度,在病理学和含水率 2 个方面观察年龄对 ACL 断裂后软骨损伤的影响,旨在探讨处理不同年龄段患者 ACL 损伤的最佳方法和时机,为临床防止或延缓膝关节软骨退变的发生、发展提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

新西兰大白兔 30 只(为排除性别差异,统一

* 通讯作者, E-mail: jiangqing112@ hotmail. com

性别为雄兔)。6、12、24 月龄各 10 只[南京市鼓楼医院动物中心, SCXK(苏)2007-0004], 按年龄分为 A、B、C 3 组。相同年龄的 10 只兔子, 再随机分为 5 组, 每组 2 只。设置 5 个时间点, 分别为术后 5、10、15、20、25 周。双侧膝关节自身对照, 切断右膝关节 ACL, 以右侧作为阳性对照侧, 左侧膝关节仅行膝关节切开术, 作为假手术阴性对照侧。实验过程中对于动物的处置符合动物伦理学标准。

1.2 方法

1.2.1 手术方法 肌肉注射麻醉(30 g/L 戊巴比妥, 剂量 0.03 mg/kg)后, 将其固定在动物实验手术台上。膝部剃毛, 碘酒、酒精消毒皮肤, 铺洞巾, 严格按无菌操作原则进行手术。右膝关节内侧做切口至关节腔, 切口长约 3 cm, 将髌骨、髌韧带推向外侧, 屈曲膝关节, 暴露 ACL, 用丝线拉起韧带完全切断, 逐层缝合切口; 同样方法显露左膝关节腔, 但不切断 ACL, 作为假手术阴性对照。冲洗关节腔后, 1 号丝线逐层缝合切口。术后 1 周所有实验动物每天肌注 80 万 U 青霉素预防感染^[7]。分笼饲养, 每笼 1 兔, 不做固定处理, 自由进食、活动, 强迫兔子每日活动半小时, 分 2 次驱赶。

1.2.2 标本制作与大体观察 ①大体观察: 分别于术后 5、10、15、20、25 周用空气栓塞法处死各时间点实验兔, 解剖显微镜下观察股骨内髌关节面软骨改变, 按以下原则评分^[8]: 0 分: 关节面光整, 色泽如常; 1 分: 关节面粗糙, 有小的裂隙且色泽灰暗; 2 分: 关节面糜烂, 软骨缺损深达软骨表、中层; 3 分: 关节面溃疡形成, 缺损深达软骨深层; 4 分: 软骨剥脱, 软骨下骨质暴露。②软骨标本的制作: 手术取下膝关节股骨内髌, 固定于 10% 中性福尔马林液中 3 d, 15% EDTA 脱钙、依次酒精脱水、二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片。

1.2.3 Masson 染色步骤 常规脱蜡至蒸馏水洗, 苏木素染 5~10 min, 流水冲洗。1% 盐酸酒精稍分化, 流水冲洗数分钟返蓝。丽春红酸性品红染液染 5~10 min, 蒸馏水快速冲洗。磷钼酸溶液处理约 5 min, 不用水洗直接用苯胺蓝染液复染 5 min。1% 冰醋酸处理 1 min。95% 酒精、无水酒精快速脱水。二甲苯透明, 中性树胶封固。在南京大学模式动物研究所观察 Masson 染色玻片。

1.2.4 软骨生化检查 在各时间点处死动物后立即取下两侧胫骨平台全层软骨, 用滤纸吸干其表面水分, 精确称取湿重。丙酮脱水后在真空干燥器中室温下干燥至恒重, 精确称其干重, 计算含水率。

含水率 = $\frac{\text{湿重} - \text{干重}}{\text{湿重}} \times 100\%$

2 结果

2.1 大体观察评分结果

24 月龄组的兔子 20 周和 25 周组各有 1 只实验动物死亡。观察股骨内髌关节面处, ACL 切断阳性侧: 术后 5 周时 6、24 月龄兔关节面略有粗糙, 有小的裂隙且色泽灰暗, 12 月龄兔可见关节面磨损较明显; 术后 10 周 3 组兔滑膜轻度充血增生, 关节液量少增多, 透明, 关节软骨面出现表、中层的软骨缺损; 术后 15 周 3 组兔病变有加重趋势, 滑膜增生明显, 滑液量少但稍混浊逐渐, 关节面粗糙、软骨小裂隙增多、色泽灰暗, 6、12 月龄组有软骨损伤达深层; 术后 20 周软骨病变更明显, 滑膜部分呈结节样增生, 滑液量少但混浊, 12 月龄组兔软骨损伤较重, 部分软骨下骨暴露, 有少量骨赘形成; 术后 25 周关节面基本糜烂, 软骨缺损可深达软骨中、深层, 滑膜增生、破坏明显, 6 月龄组和 12 月龄组可见软骨剥脱, 骨质暴露, 还有部分骨赘形成。与右侧相比, 假手术阴性对照侧(左侧)的关节软骨改变不明显。表 1 为不同月龄组术后不同时间关节软骨损伤的评分情况, 3 组术后不同时间软骨退变有逐渐加重的趋势, 12 月龄兔发展最快, 基本每 5 周就进展 1 级, 术后 20 周时已经到达最严重的 4 级, 软骨磨损严重, 已有部分骨赘形成; 6 月龄兔进展稍慢, 术后 25 周时到达 4 级; 24 月龄兔进展较慢, 术后 25 周时仍未到达 4 级。

表 1 关节软骨损伤评分情况

时间	6 月龄		12 月龄		24 月龄	
	右侧	左侧	右侧	左侧	右侧	左侧
术后 5 周	1, 1	0, 0	1, 2	0, 0	1, 1	0, 0
术后 10 周	2, 2	0, 0	2, 2	0, 0	2, 2	0, 0
术后 15 周	2, 3	0, 0	3, 2	0, 0	2, 2	0, 0
术后 20 周	3, 3	1, 0	4, 4	0, 0	2	1
术后 25 周	3, 4	1, 0	4, 4	1, 0	3	1

2.2 软骨 Masson 染色结果

①术后 5 周时关节软骨 Masson 染色结果见图 1。6 月龄兔 ACL 切断阳性对照侧: 软骨胶原绿染, 表层软骨细胞密集, 表层略有不光整, 软骨细胞核深染, 退变软骨从潮线升起很多红色火焰状的突起使未钙化软骨出现红染。12、24 月龄兔 ACL 切断阳性对照侧表现与 6 月龄兔大致相同, 但是从潮线升起使未钙化软骨出现红染的红色火焰状突起没有 6 月龄兔明显。②术后 10 周时关节软骨 Masson 染色结果见图 2。6 月龄兔 ACL 切断阳性对照侧: 软骨胶原绿染, 表层不光整明显; 退变软骨从潮线升起很多红色火焰状的突起使未钙化软骨出现红染, 较 5

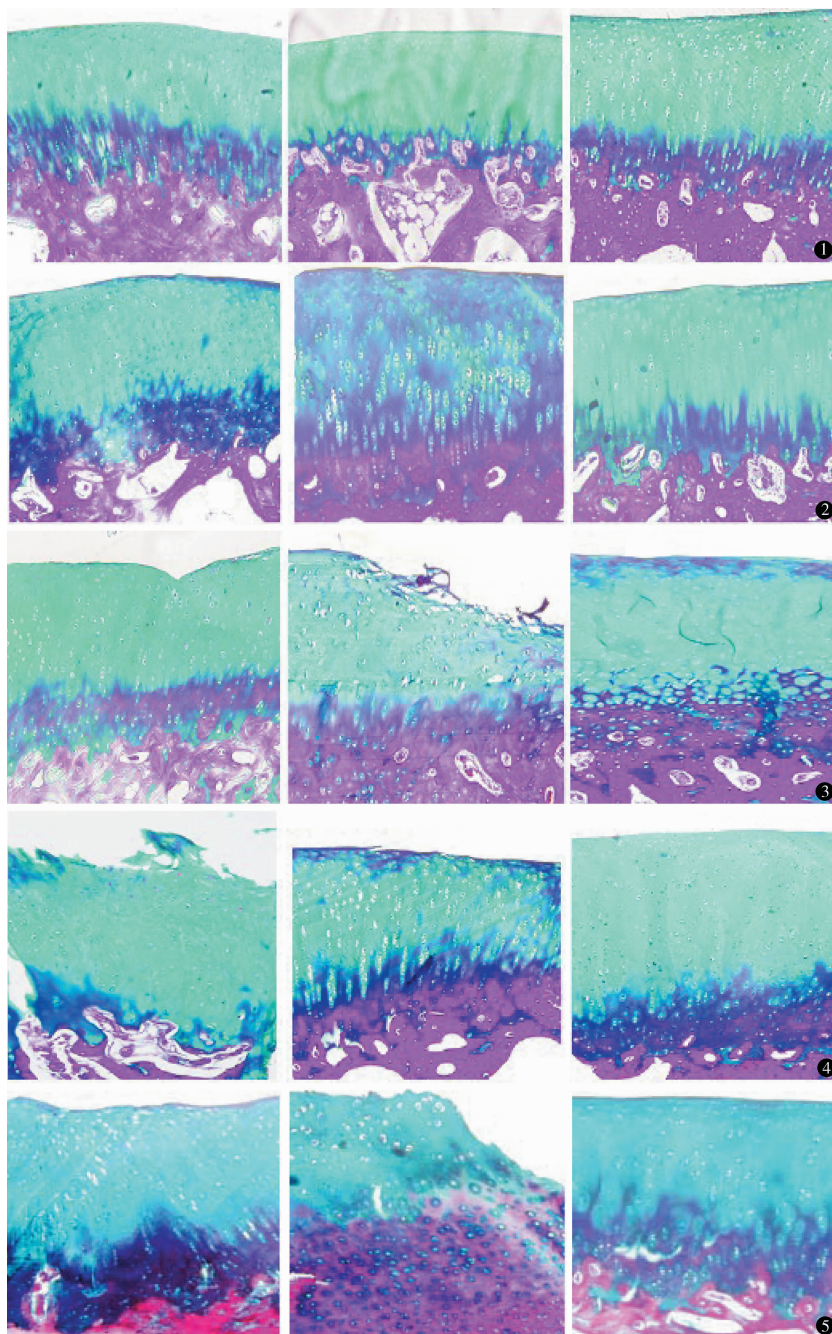


图 1 术后 5 周从左至右依次为 6、12、24 月龄兔右侧 (阳性对照侧) ACL 切断 Masson 染色切片 6 月龄兔 ACL 切断阳性对照侧:软骨胶原绿染,表层软骨细胞密集,表层略有不光整,软骨细胞核深染,退变软骨从潮线升起很多红色火焰状的突起使未钙化软骨出现红染。12、24 月龄兔 ACL 切断阳性对照侧表现与 6 月龄兔大致相同,但是从潮线升起使未钙化软骨出现红染的红色火焰状突起没有 6 月龄明显 Masson 染色 $\times 40$ **图 2 术后 10 周从左至右依次为 6、12、24 月龄兔右侧 (阳性对照侧) ACL 切断 Masson 染色切片** 6 月龄兔 ACL 切断阳性对照侧:软骨胶原绿染,表层不光整明显;退变软骨从潮线升起很多红色火焰状的突起使未钙化软骨出现红染,较术后 5 周时明显且范围广布,可见软骨表层纤维化。12、24 月龄兔 ACL 切断阳性对照侧表现与 6 月龄兔大致相同,12 月龄兔切片中有较多血管翳从潮线通过,侵蚀破坏关节软骨 Masson 染色 $\times 40$ **图 3 术后 15 周从左至右依次为 6、12、24 月龄兔右侧 (阳性对照侧) ACL 切断 Masson 染色切片** 24 月龄兔 ACL 切断阳性对照侧:软骨胶原浅绿染,疏松,表层不光整,有裂口,软骨表层纤维化;6 月龄兔软骨表面出现明显的缺损;12 月龄兔软骨丢失严重 Masson 染色 $\times 40$ **图 4 术后 20 周时从左至右依次为 6、12、24 月龄兔右侧 (阳性对照侧) ACL 切断 Masson 染色切片** 24 月龄 ACL 切断阳性对照侧:软骨胶原浅绿染,血管翳稍有增多,簇集细胞出现频率增加较之 15 周时变化略有增加;6 月龄与 12 月龄兔软骨损伤加重,软骨纤维化与血管翳增生更为明显 Masson 染色 $\times 40$ **图 5 术后 25 周从左至右依次为 6、12、24 月龄兔右侧 (阳性对照侧) ACL 切断 Masson 染色切片** 24 月龄兔 ACL 切断阳性对照侧:软骨胶原浅绿染,疏松且紊乱,潮线模糊不清。6、12 月龄兔软骨损伤更为严重,尤其是 12 月龄兔,损伤最为严重,软骨残余量少,大部分磨蚀、纤维化,细胞数少,钙化层难以分辨 Masson 染色 $\times 40$

周时明显且范围广布,可见软骨表层纤维化。12、24 月龄兔 ACL 切断阳性对照侧表现与 6 月龄兔大致相同,12 月龄兔切片中有较多血管翳从潮线通过,侵蚀破坏关节软骨。③ 术后 15 周时关节软骨 Masson 染色结果见图 3。24 月龄兔 ACL 切断阳性对照侧:软骨胶原浅绿染,疏松,表层不光整,有裂口,软骨表层纤维化;6 月龄兔软骨表面出现明显的缺损;12 月龄兔软骨丢失严重。④ 术后 20 周时关节软骨 Masson 染色结果见图 4。24 月龄 ACL 切断阳性对照侧:软骨胶原浅绿染,血管翳稍有增多,簇集细胞出现频率增加较之 15 周时变化略有增加;6 月龄与 12 月龄兔软骨损伤加重,软骨纤维化与血管翳增生更为明显。⑤ 术后 25 周时关节软骨 Masson

染色结果见图 5。24 月龄兔 ACL 切断阳性对照侧:软骨胶原浅绿染,疏松且紊乱,潮线模糊不清。6、12 月龄兔软骨损伤更为严重,尤其是 12 月龄兔,损伤最为严重,软骨残余量少,大部分磨损、纤维化,细胞数少,钙化层难以分辨。

2.3 含水率的测定

3 组各时间点软骨含水率见表 2。ACL 切断的右侧软骨含水率基本上比左侧高,随着软骨损伤从轻到重的发展,右侧 (ACL 切断,阳性对照侧) 软骨含水率呈现出先升高后降低的趋势。6、12 月龄组兔软骨损伤速度较快,所以在 10~15 周时出现含水率从高点下降的趋势,而 24 月龄兔软骨损伤慢,在 20~25 周时才出现。

表 2 不同年龄组 ACL 切断术后不同时间点左、右两侧软骨含水率 %

组别	侧别	术后时间									
		5 周		10 周		15 周		20 周		25 周	
6 月龄组	右	67.25	66.61	72.22	69.92	66.94	57.50	67.50	68.60	68.37	68.74
	左	66.93	66.43	60.19	60.98	61.93	64.58	60.9	66.67	67.77	65.48
12 月龄组	右	69.35	70.28	73.77	74.59	68.85	68.47	66.15	72.66	67.54	69.50
	左	66.24	67.08	68.33	69.98	62.02	66.42	61.66	61.83	64.07	66.77
24 月龄组	右	63.10	68.83	67.87	68.51	69.54	71.57	73.19	—	68.09	—
	左	66.67	71.01	61.07	61.76	65.64	65.47	69.64	—	67.80	—

3 讨论

ACL 损伤多发生在处于非功能位的膝关节,大部分发生在足球、篮球、滑雪等运动中,当人体在进行急停、扭转、落地或者剪切运动时。当膝关节由屈曲 40°主动伸至完全伸直时,胫骨过度内旋时,膝关节过度外翻及内翻时,ACL 承受最高的负荷^[9]。ACL 损伤后,膝关节不稳定而导致的关节软骨继发性损伤,尤以关节内侧间隙的股骨内髁负重区处极易出现软骨磨损,主要是因为膝关节不稳定,ACL 防止膝关节内旋作用消失,运动时关节的应力中心改变,胫股关节面出现剪力作用^[10,11]。膝关节不稳定,严重影响关节功能,导致活动能力降低,生活也受到影响^[12,13],而且长期以往增加了患膝关节骨性关节炎的风险^[14]。软骨损伤主要还受到年龄因素的影响,不同年龄段,在发生 ACL 断裂后,软骨损伤的程度会不一样。

本研究通过对 6、12、24 个月 3 个不同年龄组的新西兰大白兔进行研究,比较不同年龄兔 ACL 断裂后的软骨损伤情况。不论是从大体的观察、评分,还是从 Masson 染色病理切片的观察,随着时间的推移,3 个年龄段的兔软骨损伤有明显不同的变化。12 月龄兔子软骨损伤最重,到术后 25 周时已经有骨关节炎的表现;6 月龄兔次之,24 月龄兔软骨损伤

进展最慢,磨损最轻。6 月龄兔因为年轻,自身软骨有较强的修复作用,如果时间继续延长,肯定会到达最严重的软骨破坏,导致严重骨性关节炎的发生。ACL 是膝关节稳定的重要结构,损伤后导致股骨、胫骨在负重时易半脱位,使膝关节不稳,造成膝关节的关节面间接触面积及压力改变,致半月板和软骨损伤。半月板损伤后,其对关节软骨的保护作用转变为剪切和磨损作用,使软骨发生软化、龟裂、剥离、脱落,受到破坏的软骨对半月板也会产生一些损害作用,形成恶性循环,时间越长,软骨损伤越严重^[9,15,16]。ACL 损伤致关节不稳定,软骨受力不均匀,易诱导软骨细胞生理性的改变,甚至发生凋亡,从组织学上可见胶原纤维、蛋白多糖减少。在关节运动中因磨损会产生一些微小颗粒,引起关节内滑膜反应,使关节液中出现肿瘤坏死因子和白细胞介素,加剧了软骨的损伤^[17~20]。

关节软骨由软骨细胞和细胞外基质构成。软骨基质主要包括胶原纤维、蛋白多糖和水,三者的有机结合使关节软骨具有承受负荷,抵抗应力、张力及减少摩擦的作用,水在其中所占的比例最大。关节软骨中的水有利于营养和废物的弥散、交换。本研究结果显示在每组每个时间点,ACL 切断阳性对照侧软骨含水率比阴性对照侧高,而且在 3 个年龄组中,随着软骨损伤从轻到重的发展,ACL 切断阳性对照

侧软骨含水率呈现出先升高后降低的趋势。软骨中的水分分为游离水和结合水两部分,游离水主要由关节腔渗透进入,渗透压的大小与蛋白多糖的数量有关;后者与胶原或蛋白多糖内靠着两者之间的水合作用结合^[21]。在软骨破坏较轻阶段,一方面由于软骨结构的破坏,导致胶原纤维结构改变,胶原蛋白含量下降,这些结构的改变导致软骨肿胀,增加了渗透压,从而导致高渗吸水,引起渗透压的持续增大,含水率的增加^[22]。随着软骨磨损的越来越严重,由于新合成的蛋白多糖分子量较小,导致蛋白多糖与胶原生物学性能降低,同时炎症介质释放减少,组织肿胀减轻,水合作用降低,含水率逐渐减小。含水率这一特点也可以使之成为检测软骨损伤程度的指标。阴性对照侧的膝关节软骨也有轻度改变,可能是因为该侧进行了关节切开手术,手术造成出血、损伤、积血,各种因素激发的炎症反应引起了关节软骨应激反应^[23]。

本研究使用新西兰兔作为实验动物,兔膝关节的结构组成、负重情况、生物力学和人有较大差别,而且本实验动物数量有限,无法得出完全肯定的结论,但本实验显示的膝关节软骨损伤和年龄的关系与人可能有一定的共性,可供临床参考。

参考文献

- 胥少汀,葛宝丰,徐印坎,主编.实用骨科学.第3版.北京:人民军医出版社,2009.1841.
- Moeller JL, Lamb MM. Anterior cruciate ligament injuries in female athletes: why are women more susceptible? *Phys Sportsmed*,1997, 25:31-48.
- Ageberg E. Consequences of a ligament injury on neuromuscular function and relevance to rehabilitation-using the anterior cruciate ligament-injured knee as a model. *J Electromyogr Kinesiol*,2002, 12:205-212.
- Ingersoll CD, Grindstaff TL, Pietrosimone BG, et al. Neuromuscular consequences of anterior cruciate ligament injury. *Clin Sports Med*,2008,27:383-404, vii.
- Pennock AT, Robertson CM, Emmerson BC, et al. Role of apoptotic and matrix-degrading genes in articular cartilage and meniscus of mature and aged rabbits during development of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*,2007,56(5):1529-1536.
- Andriacchi TP, Briant PL, Bevell SL, et al. Rotational changes at the knee after ACL injury cause cartilage thinning. *Clin Orthop Relat Res*,2006,442:39-44.
- 方锐,卢勇,孟庆才,等.兔骨性关节炎模型构建及早中晚期的特点. *中国组织工程研究与临床*,2010,14(7):1218-1222.
- Pelletier JP, Jovanovic D, Fernandes JC. Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Arthritis Rheum*,1998,41(7):1275-1286.
- Frank CB, Jackson DW. The science of reconstruction of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg Am*,1997,79(10):1556-1576.
- Lidén M, Sernert N, Rostgård-Christensen L, et al. Osteoarthritic changes after anterior cruciate ligament reconstruction using bone-patellar tendon-bone or hamstring tendon autografts: a retrospective, 7-year radiographic and clinical follow-up study. *Arthroscopy*,2008, 24(8):899-908.
- Smith JP 3rd, Barrett GR. Medial and lateral meniscal tear patterns in anterior cruciate ligament-deficient knees. A prospective analysis of 575 tears. *Am J Sports Med*,2001,29(4):415-419.
- Spindler KP, Warren TA, Callison JC Jr, et al. Clinical outcome at a minimum of five years after reconstruction of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg Am*,2005,87(3):1673-1679.
- Spindler KP, Wright RW. Clinical practice. Anterior cruciate ligament tear. *N Engl J Med*, 2008,359(20):2135-2142.
- Lohmander LS, Englund PM, Dahl LL, et al. The long-term consequence of anterior cruciate ligament and meniscus injuries: osteoarthritis. *Am J Sports Med*,2007,35:1756-1769.
- 徐雁,敖英芳.前十字韧带断裂继发半月板损害的临床研究. *中华骨科杂志*,2002,22:216-219.
- Murrell GA, Maddali S, Horovitz L, et al. The effects of time course after anterior cruciate ligament injury in correlation with meniscal and cartilage loss. *Am J Sports Med*, 2001,29:9-14.
- Bramono DS, Richmond JC, Weitzel PP, et al. Matrix metalloproteinases and their clinical applications in orthopaedics. *Clin Orthop Relat Res*,2004,(428):272-285.
- Pelletier JP, Lascau-Coman V, Jovanovic D, et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental osteoarthritis is associated with reduction in tissue levels of catabolic factors. *J Rheumatol*,1999,26(9):2002-2014.
- Islam N, Haqqi TM, Jepsen KJ, et al. Hydrostatic pressure induces apoptosis in human chondrocytes from osteoarthritic cartilage through up-regulation of tumor necrosis factor-alpha, inducible nitric oxide synthase, p53, c-myc, and bax-alpha, and suppression of bcl-2. *J Cell Biochem*,2002,87(3):266-278.
- 尹昆,卫小春.关节液中多糖含量与关节软骨损伤的关系. *实用骨科杂志*,2006,12(3):216-219.
- Marondas A, Venn M. Chemical composition and swelling of normal and osteoarthrotic femoral head cartilage. *Ann Rheum Dis*,1977,36(5):399-406.
- Saarakkala S, Julkunen P, Kiviranta P, et al. Depth-wise progression of osteoarthritis in human articular cartilage: investigation of composition, structure and biomechanics. *Osteoarthritis Cartilage*,2010,18:73-81.
- 林子洪,傅明,康炎,等.前交叉韧带切除后股骨关节软骨变化的初步实验研究. *中华关节外科杂志(电子版)*,2008,2(5):554-565.

(收稿日期:2011-05-16)

(修回日期:2012-03-18)

(责任编辑:李贺琼)