

兔骨关节炎滑膜组织血管内皮生长因子mRNA表达及透明质酸钠的影响[☆]

周建林, 刘世清, 邱波

Effect of sodium hyaluronate on vascular endothelial growth factor mRNA expression of the synovium in rabbits with osteoarthritis

Zhou Jian-lin, Liu Shi-qing, Qiu Bo

Abstract

BACKGROUND: Pathogenesis of osteoarthritis is poorly understood, however, studies have demonstrated that vascular endothelial growth factor (VEGF) is involved in the progression of osteoarthritis.

OBJECTIVE: To detect the changes of VEGF mRNA expression of synovium in rabbit osteoarthritis and to evaluate the effect of sodium hyaluronate on its expression.

METHODS: Twenty four white rabbits were divided into the normal control, physiologic saline, and sodium hyaluronate groups. The unilateral anterior cruciate ligament transection (ACL) was performed in the physiologic saline and sodium hyaluronate groups. At weeks 4 after operation, rabbits in the physiologic saline group were injected 0.3 mL physiologic saline, and in the sodium hyaluronate group received 10 g/L sodium hyaluronate injection, once per week for 5 successive weeks. All the animals were sacrificed at week 10 after operation. The cartilage changes on the medial femoral condyles were graded separately. VEGF expression of synovium was detected by using real time polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS AND CONCLUSION: The macroscopic score showed that the cartilage degeneration in the physiologic saline group was significantly more severe than that of the normal control and sodium hyaluronate groups ($P < 0.05$). The expression of VEGF mRNA was obviously decreased in the physiologic saline group than that of the normal control group ($P < 0.05$), of which was increased in the sodium hyaluronate group, but still smaller than the normal control group ($P < 0.05$). The results demonstrated that the decreased VEGF expression in synovium may involved in the progression of osteoarthritis, and sodium hyaluronate has protective effect on articular cartilage by up-regulating the VEGF expression.

Department of Bone Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hebei Province, China

Zhou Jian-lin[☆], Studying for doctorate, Physician, Department of Bone Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hebei Province, China
Zhoujianlin2005@sina.com

Received: 2009-07-31
Accepted: 2009-09-25

Zhou JL, Liu SQ, Qiu B. Effect of sodium hyaluronate on vascular endothelial growth factor mRNA expression of the synovium in rabbits with osteoarthritis. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(11): 1983-1986. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 骨关节炎的发病机制目前还未完全清楚, 研究发现血管内皮生长因子参与骨关节炎的发生发展。

目的: 观察血管内皮生长因子在滑膜组织表达的改变及透明质酸钠对滑膜血管内皮生长因子基因表达的影响。

方法: 24 只大耳兔随机正常对照组、生理盐水组和透明质酸钠组行单膝前交叉韧带切断术, 4 周后生理盐水组关节腔注射生理盐水 0.3 mL, 透明质酸钠组注射等量的高分子量 10 g/L 透明质酸钠, 1 次/周, 连续 5 周。第 10 周处死动物, 比较各组股骨内髌关节软骨的大体变化, 采用实时定量聚合酶链反应方法检测滑膜 VEGF mRNA 的表达水平。

结果与结论: 大体评分显示生理盐水组软骨退变的程度明显重于正常对照组和透明质酸钠组 ($P < 0.05$); 生理盐水组滑膜血管内皮生长因子 mRNA 表达较正常组显著下降 ($P < 0.05$), 透明质酸钠组滑膜血管内皮生长因子 mRNA 表达较生理盐水组有升高, 但比正常对照组低 ($P < 0.05$)。结果表明, 滑膜组织血管内皮生长因子表达下降可能参与透明质酸钠的发生发展, 关节腔注射透明质酸钠对透明质酸钠滑膜组织血管内皮生长因子表达有上调作用, 有利于滑膜组织修复, 可能是其治疗透明质酸钠机制之一。

关键词: 透明质酸钠; 血管内皮生长因子; 滑膜; 组织构建

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.11.021

周建林, 刘世清, 邱波. 兔骨关节炎滑膜组织血管内皮生长因子 mRNA 表达及透明质酸钠的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(11):1983-1986. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

武汉大学人民医院
骨科, 湖北省
武汉市 430060

周建林[☆], 男, 1980 年生, 湖北省鄂州市人, 汉族, 武汉大学在读博士, 医师, 主要从事骨关节炎研究。
Zhoujianlin2005@sina.com

中图分类号: R684.3
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225
(2010)11-01983-04

收稿日期: 2009-07-31
修回日期: 2009-09-25
(20090731007/WZ)

0 引言

膝关节骨关节炎一种慢性进行性骨关节病, 包括关节软骨的退变和滑膜炎及滑膜细胞的凋亡^[1], 但目前发病机制仍不明确。滑膜作为完整关节系统的一部分, 对软骨的营养代谢极为重要作用, 包括: 具有清除作用, 如吞噬并降解关节腔内的异物及细胞碎片等; 合成作用, 如合成透明质酸、纤维结合素、I 型、II

型胶原、潜在的胶原酶蛋白酶促进因子、中性蛋白酶的抑制剂、润滑素以及其他小的未确定的基质成分, 参与滑膜免疫应答; 保持关节结构稳定; 分泌滑液营养和润滑关节软骨; 重吸收滑液, 保持关节腔内环境稳定^[2]。在受到病理因素刺激下, 滑膜细胞出现凋亡现象, 尤其是滑膜内衬细胞转换频率明显增高^[1], 不仅减少关节软骨营养的供给和代谢物的吸收, 而且释放有害因子, 共同引起关节软骨进行性改变而促进关节骨关节炎的发生。但关节骨关节炎

滑膜细胞发生凋亡的机制还不明确。关节骨关节炎的发生发展的具体病因仍是国内外研究的热点。

研究发现血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)参与了骨关节炎的发生发展过程^[3-7], 血清VEGF的水平与关节炎的严重程度相关^[8]。VEGF可以抑制滑膜细胞凋亡, 促进增殖^[9], 参与了类风湿关节炎滑膜细胞的增生和血管翳的形成^[10]。而关于VEGF在关节骨关节炎滑膜组织表达及作用的研究较少。关节腔内注射透明质酸钠已经证实为治疗骨关节炎的有效药物^[11], 并且可以上调VEGF mRNA的表达^[12]。因此作者采用兔前交叉韧带切断的方法建立关节骨关节炎模型, 观察VEGF在滑膜组织表达的改变, 并在关节腔注射透明质酸钠探索其对滑膜VEGF基因表达的影响, 进一步探讨透明质酸钠治疗关节骨关节炎的机制。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2006-10/2008-04在武汉大学人民医院中心实验室完成。

材料: 清洁级新西兰大耳白兔24只, 雌雄不分, 体重2.4~2.8 kg, 由武汉大学人民实验动物中心提供(许可证号: SCXK(鄂)2003-0003)。随机将动物分为正常对照组、生理盐水组和透明质酸钠组, 每组8只。实验过程中对动物处置符合2006年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[13]。

实验方法:

各组处理: 生理盐水组和透明质酸钠组在氯胺酮(1.0 mg/kg)麻醉下, 每只兔单侧膝关节行前交叉韧带切断, 术后第5周开始生理盐水组关节腔注射生理盐水0.3 mL, 透明质酸钠组关节腔内注射等量的10 g/L透明质酸钠, 每周重复1次, 连续5周。术后不作固定, 分笼饲养, 术后第10周空气栓塞法处死动物, 收集标本。

大体观察: 解剖显微镜下观察股骨髁关节面病理变化, 按以下原则评分^[14]: 0分: 关节面光滑, 色泽正常; 1分: 关节面粗糙, 有小的裂隙, 色泽灰暗; 2分: 关节面糜烂, 软骨缺损达软骨表层或中层; 3分: 关节面溃疡形成, 缺损达软骨深层; 4分: 软骨剥脱, 软骨下骨质暴露。

实时定量PCR检测:

引物设计及合成:

GAPDH(140 bp):

上游 5' -CCA CTT TGT GAA GCT CAT TTC CT -3',
下游 5' -TCG TCC TCC TCT GGT GCT CT -3';

VEGF(361 bp):

上游 5' -GAA GTC TAC CGG CGC AGC TA -3',
下游 5' -GCA CGC AGG AAG GCT TGA -3'。
均由上海生工生物工程公司合成。

Real Time PCR 反应: 用Trizol试剂提取滑膜组织总RNA, RNA的浓度和纯度用分光光度计测定, 根据说明书用RT-PCR试剂盒中相关试剂将mRNA转录成cDNA, 存储于-20 °C冰箱备用。定量的PCR扩增用美国ABI 7900HT快速PCR扩增仪, RT-PCR的反应体系为预先混合SYBR的Taq 酶5 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各0.2 μL, 50×ROX校正液0.2 μL, cDNA模板1 μL, 添加水至10 μL 总体积。PCR 反应条件为95 °C 预先变性10 s, 再95 °C 5 s, 最后60 °C 30 s, 共循环40次。用5倍稀释的cDNA做模板建立稳定的可信的标准曲线。GAPDH作为内参来估计VEGF mRNA的初始拷贝数, 通过这种方法得到基因的表达水平和变化趋势, 反应的特异性通过溶解曲线来分析, 空白管作为阴性对照, 管重复3次。计算机分析Ct值, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。

主要观察指标: ①各组动物软骨标本大体观察。②实时定量PCR结果。

设计、实施、评估者: 实验设计为第二作者, 实施和评估为第一和第三作者, 均接受过培训。

统计学分析: 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用SPSS 13.0软件包进行统计学处理, 大体评分用H检验, mRNA相对表达量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 用t 检验。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 实验选入白兔24只, 分为3组, 无脱失, 全部进入结果分析。

2.2 各组动物软骨大体观察 正常对照组关节面光滑, 色泽正常; 生理盐水组软骨病变以粗糙不平、糜烂为主; 透明质酸钠组病变则以缺损溃疡为主。生理盐水组、透明质酸钠两组大体评分差异无显著性意义($P > 0.05$); 生理盐水组软骨退变的程度明显重于正常对照组和透明质酸钠组($P < 0.05$), 提示透明质酸钠可以缓解关节软骨退变。各组软骨大体评分见表1。

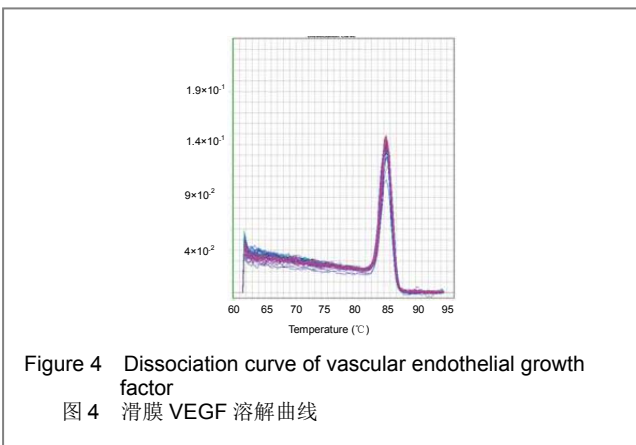
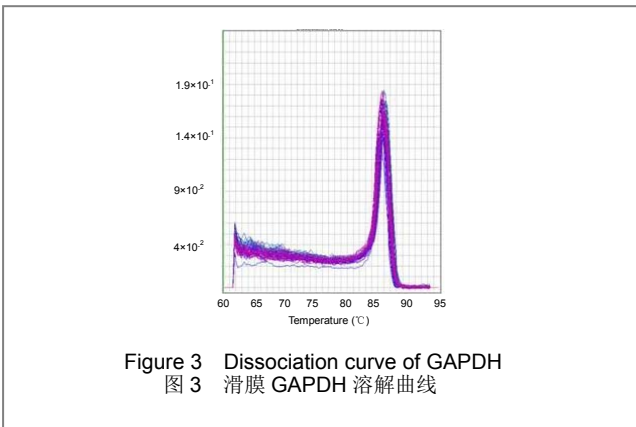
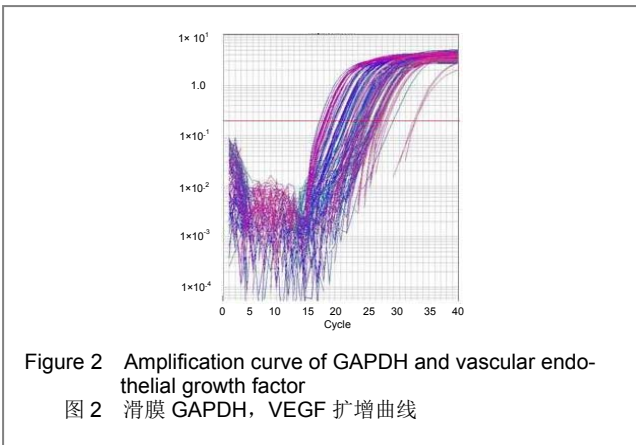
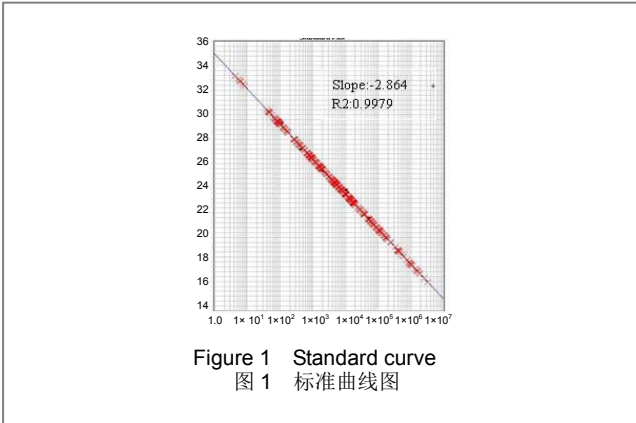
Group	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4
Normal control	6	2	0	0	0
Physiologic saline	0	1	1	3	3
Sodium hyaluronate	0	5	2	1	0

^a $P < 0.05$, vs. normal control and sodium hyaluronate group

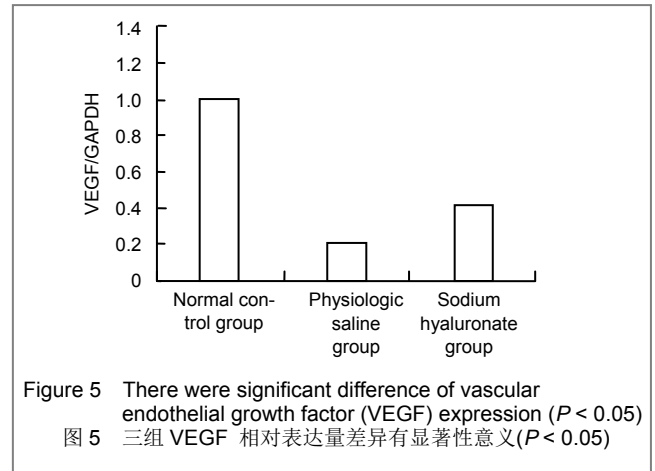
2.3 实时定量PCR结果

标准曲线的建立: 见图1。Slope:-2.864; R2:0.997 9。

滑膜组织VEGF mRNA的表达: VEGF基因的表达通过GAPDH校正, 见图2~4。



生理盐水组滑膜 VEGF mRNA 表达较正常组显著下降 ($P < 0.05$), 透明质酸钠组滑膜 VEGF mRNA 表达较生理盐水组有升高 ($P < 0.05$), 但比正常对照组正常值低 ($P < 0.05$)。见图 5。



3 讨论

VEGF 是胚胎发育和创伤愈合过程中启动血管形成的一个高度特异的有丝分裂原, 也是有效的血管通透性诱导因子^[15]。人 VEGF 基因定位于染色体 6p21.3, 由 8 个外显子、7 个内含子组成, 全长约 14 kb。由于 mRNA 剪接方式不同, 可产生 5 种不同形式的蛋白分子: VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189, VEGF206, 其中 VEGF165 是主要的作用因子^[16]。在内风湿性关节炎滑膜中 VEGF 表达明显高于正常组和关节骨关节炎滑膜组织, 白细胞介素 1 β 和白细胞介素 6 可以诱导体外培养的内风湿性关节炎滑膜细胞表达 VEGF^[17], VEGF165 可以与 NP-1 结合, 抑制滑膜细胞凋亡, 为其提供营养, 促进其增殖, 分泌的 VEGF 增加, 正反馈地加速了血管翳的形成采用。SiRNA 干扰后, 滑膜细胞出现凋亡^[2]。而在关节骨关节炎滑膜细胞发生凋亡, 其 VEGF 的表达如何? 实验结果发现关节骨关节炎滑膜组织 VEGF mRNA 表达明显下降, 所以关节骨关节炎滑膜细胞的凋亡可能与 VEGF mRNA 表达下降有关, 这也可能是 VEGF 参与关节骨关节炎发生发展的机制之一。

关节腔内注射高分子透明质酸作为治疗关节骨关节炎的有效方法^[18-22], 可以抑制滑膜中基质金属蛋白酶 3 和白细胞介素 1 的表达^[23]; 抑制滑膜及半月板一氧化氮的产生^[24]; 可以预防滑膜切除导致的关节软骨退变^[25], 作者前期报道了透明质酸对关节炎软骨 VEGF 的表达没有影响^[26], 但关于透明质酸对滑膜 VEGF 表达的影响未见报道。实验通过关节腔内注射补充外源性高分子透明质酸来观察其对 VEGF mRNA 表达的影响, 结果发现关节骨关节炎的滑膜 VEGF mRNA 表达明显下降, 给予外源

性透明质酸后表达明显上升, 其作用机制还不清楚, Halici等^[12]研究外源透明质酸可以增加VEGF的表达, 与本实验结果相同。然而, 以前许多研究证实高分子透明质酸具有抗血管生成作用, 其代谢产物可以诱导血管生成^[27-29], 可能是因为透明质酸的半衰期很短, 一般几个小时到几天时间, 7 d完全从体内清除干净^[30], 作者采用每周注射1次的方法, 而且关节骨关节炎滑膜细胞凋亡分泌透明质酸量下降, 加速了外源透明质酸的代谢, 其产物可以增加VEGF的表达, 从而抑制滑膜细胞凋亡, 促进增生, 恢复关节营养等功能, 这有可能是透明质酸治疗关节骨关节炎的机制之一, 但还需要进一步研究。

4 参考文献

- [1] Qiu XQ, Zhou JN. Hunan Yike Daxue Xuebao. 1999;24(5):441-444. 邱续强, 周江南. 关节滑膜内衬细胞凋亡在骨关节炎发生机制中的作用[J]. 湖南医科大学学报, 1999, 24(5):441-444.
- [2] Shi GY, Su ZG. Beijing: Zhongguo Yiyao Keji Chubanshe. 2002:165. 施桂英, 粟占国. 关节炎概要[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 165.
- [3] Kubo S, Cooper GM, Matsumoto T, et al. Blocking vascular endothelial growth factor with soluble Flt-1 improves the chondrogenic potential of mouse skeletal muscle-derived stem cells. Arthritis Rheum. 2009;60(1):155-165.
- [4] Fay J, Varoga D, Wruck CJ, et al. Reactive oxygen species induce expression of vascular endothelial growth factor in chondrocytes and human articular cartilage explants. Arthritis Res Ther. 2006; 8(6):R189.
- [5] Honorati MC, Cattini L, Facchini A. VEGF production by osteoarthritic chondrocytes cultured in micromass and stimulated by IL-17 and TNF-alpha. Connect Tissue Res. 2007;48(5):239-245.
- [6] Matsumoto T, Cooper GM, Gharraibeh B, et al. Blocking VEGF as a potential approach to improve cartilage healing after osteoarthritis. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2008;8(4):316-317.
- [7] 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? Osteoarthritis Cartilage 2008;16:279-286.
- [8] Gaëlle C, Natacha B, Delphine L, et al. Angiogenesis markers (VEGF, soluble receptor of VEGF and angiopoietin-1) in very early arthritis and their association with inflammation and joint destruction. Clin Immunol. 2007;124(2):158-164.
- [9] Kim WU, Kang SS, Yoo SA, et al. Interaction of Vascular Endothelial Growth Factor 165 with Neuropilin-1 Protects Rheumatoid Synovial Cells from Apoptotic Death by Regulating Bcl-2 Expression and Bax Translocation. J Immunol. 2006; 177(8): 5727-5735.
- [10] Sundeep B, Peter CT, Petra R, et al. Raised serum vascular endothelial growth factor levels are associated with destructive change in inflammatory arthritis. Arthritis & Rheumatism. 2001; 44(9):2055-2064.
- [11] Day R, Brooks P, Conaghan PG, et al. A double blind, randomized, multicenter, parallel group study of the effectiveness and tolerance of intraarticular hyaluronan in osteoarthritis of the knee. J Rheumatol. 2004;31(4):775-782.
- [12] Halici M, Karaoglu S, Canoz O, et al. Sodium hyaluronate regulating angiogenesis during Achilles tendon healing. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2004;12(6):562-567.
- [13] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30. 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [14] Pelletier JP, Jovanovic D, Fernandes JC, et al. Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. Arthritis Rheum. 1998; 41:1275-1286.
- [15] Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. FASEB J. 1999;13(1):9-22.
- [16] Birk DM, Barbato J, Mureebe L, et al. Current insights on the biology and clinical aspects of VEGF regulation. Vasc Endovascular Surg. 2008;42(6):517-530.
- [17] Berse B, Hunt JA, Diegel RJ, et al. Hypoxia augments cytokine (transforming growth factor-beta (TGF-beta) and IL-1)-induced vascular endothelial growth factor secretion by human synovial fibroblasts. Clin Exp Immunol. 1999;115(1): 176-182.
- [18] Sun SF, Chou YJ, Hsu CW, et al. Hyaluronic acid as a treatment for ankle osteoarthritis. Curr Rev Musculoskelet Med. 2009;2(2):78-82.
- [19] Abate M, Pelotti P, De Amicis D, et al. Viscosupplementation with hyaluronic acid in hip osteoarthritis. Ups J Med Sci. 2008;113(3):261-277.
- [20] Chou CL, Li HW, Lee SH, et al. Effect of intra-articular injection of hyaluronic acid in rheumatoid arthritis patients with knee osteoarthritis. J Chin Med Assoc. 2008;71(8):411-415.
- [21] Jüni P, Reichenbach S, Trelle S, et al. Efficacy and safety of intraarticular hylan or hyaluronic acids for osteoarthritis of the knee: a randomized controlled trial. Arthritis Rheum. 2007;56(11): 3610-3619.
- [22] Mihara M, Higo S, Uchiyama Y, et al. Different effects of high molecular weight sodium hyaluronate and NSAID on the progression of the cartilage degeneration in rabbit OA model. Osteoarthritis Cartilage. 2007;15(5):543-549.
- [23] Takahashi K, Goomer RS, Harwood F, et al. The effects of hyaluronan on matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), interleukin-1beta (IL-1beta), and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene expression during the development of osteoarthritis. Osteoarthritis cartilage. 1999;7(2): 182-190.
- [24] Takahashi K, Hashimoto S, Kubo T, et al. Hyaluronan suppressed nitric oxide production in the meniscus and synovium of rabbit osteoarthritis model. J Orthop Res. 2001; 19(3): 500-503.
- [25] Wang SJ, He YL, Wang YC, et al. Shandong Daxue Xuebao. Yixueban. 2002;40(3):252-254.
- [26] Zhou JL, Liu SQ, Qiu B, et al. Effects of hyaluronan on vascular endothelial growth factor and receptor-2 expression in a rabbit osteoarthritis model. J Orthop Sci. 2009;14(3):313-319.
- [27] Alfredson H, Ohberg L, Forsgren S. In vasculo-neural ingrowth the cause of pain in chronic Achill tendonitis? An investigation using ultrasonography and color Doppler, immunohistochemistry, and diagnostic injections. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2003;11(4):334-338.
- [28] Gomes JA, Amankwah R, Powell-Richards A, et al. Sodium hyaluronate (hyaluronic acid) promotes migration of human corneal epithelial cells in vitro. Br J Ophthalmol. 2004; 88(6):821-825.
- [29] Lees VC, Fan TP, West DC. Angiogenesis in a delayed revascularization model is accelerated by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan. Lab Invest. 1995;73(2):259-266.
- [30] Hagberg L, Gerdin B. Sodium hyaluronate as an adjunct in adhesion prevention after flexor tendon surgery in rabbits. J Hand Surg [Am]. 1992;17(5):935-941.

来自本文课题的更多信息--

利益冲突: 无利益冲突。

课题的意义: 骨关节炎的发病机制目前还不清楚, 血管内皮生长因子参与了骨关节炎的发生发展, 透明质酸钠是治疗骨关节炎的临床药物, 其治疗机制一直是研究热点。实验一方面研究血管内皮生长因子在骨关节炎滑膜中的表达变化, 另一方面还探讨了透明质酸对血管内皮生长因子的影响, 进一步研究透明质酸治疗骨关节炎的作用机制。

课题评估的“金标准”: 实验以实时定量 PCR 作为检测血管内皮生长因子 mRNA 表达的金标准。

设计或课题的偏倚与不足: 实验没有全面研究血管内皮生长因子的亚型表达及透明质酸对血管内皮生长因子亚型的影响。

提供临床借鉴的价值: 透明质酸钠局部注射治疗骨关节炎, 在临床上有一定的效果。透明质酸钠能促进新血管形成, 这已有文献报道。实验在此基础上研究透明质酸钠对滑膜 VEGF 表达的影响, 具有一定的理论价值, 为探索透明质酸钠的治疗作用提供了一个新视角。