

骨质疏松大鼠膝关节组织总胶原、I型及II型胶原蛋白的含量变化★

赵良军¹, 彭芬芬², 庄薇², 汤晓正¹

Fluctuation of total collagen, type I and II collagen protein contents in the knee joint of osteoporotic rats

Zhao Liang-jun¹, Peng Fen-fen², Zhuang Wei², Tang Xiao-zheng¹

Abstract

BACKGROUND: Studies demonstrated that collagen protein plays an important role in osteocytes proliferation and differentiation, sclerotic formation and absorption, as well as matrix mineralization.

OBJECTIVE: To observe the fluctuation of total collagen, type I and II collagen protein contents in knee joint of osteoporotic rats.

METHODS: Totally 40 female Sprague Dawley rats were randomly assigned into the experimental and control groups. In the experimental group, rat knee joint cartilage and cruciate ligament were harvested at 16 weeks after bilateral ovariectomy. The protein contents of total, type I and II collagen were measured by micro-hydroxyproline assay and enzyme linked immunosorbent assay.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the control group, the protein contents of total, type I and II collagen were notably decreased ($P < 0.05$), and the type I/II collagen ratio was also declined in the experimental group ($P < 0.05$). The results suggested that osteoporosis leads to fluctuations of total collagen, type I, II collagen protein contents and type I/II collagen ratio in knee joints, which closely relates to knee osteoarthritis.

Zhao LJ, Peng FF, Zhuang W, Tang XZ. Fluctuation of total collagen, type I and II collagen protein contents in the knee joint of osteoporotic rats. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;14(2): 205-207.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 目前研究认为胶原蛋白在骨细胞的增殖与分化、骨质的形成和吸收、骨基质矿化等过程中起着非常重要的作用。

目的: 观察骨质疏松模型大鼠膝关节组织总胶原、I型及II型胶原蛋白含量变化。

方法: SD雌性大鼠40只随机分为实验组和对照组,实验组大鼠行双侧卵巢切除16周后,取膝关节软骨和交叉韧带,采用微量羟脯氨酸测定法及酶联免疫吸附法测定大鼠膝关节软骨及前交叉韧带组织总胶原、I型及II型胶原蛋白含量。

结果与结论: 骨质疏松膝关节模型大鼠膝关节软骨、前交叉韧带总胶原、I型及II型胶原蛋白含量明显下降($P < 0.05$), I型/II型胶原比值也显著降低($P < 0.05$),提示骨质疏松可引起膝关节内组织总胶原、I型及II型胶原含量及其比值改变,与膝关节骨性关节炎的发生密切相关。

关键词: 骨质疏松; 大鼠; 总胶原; I型胶原蛋白; II型胶原蛋白

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.02.004

赵良军, 彭芬芬, 庄薇, 汤晓正. 骨质疏松大鼠膝关节组织总胶原、I型及II型胶原蛋白的含量变化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(2):205-207. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

随着中国社会步入老年化,老年骨质疏松症的发病率急剧上升,膝关节是最早出现退行性改变的关节之一。

骨质疏松症系体内雌激素分泌减少、激素调节失衡等多种原因引起的骨细胞形成降低或吸收亢进引起骨量丢失,关节软骨及韧带组织出现相应退行性改变。

国内对动物骨质疏松模型的研究主要集中在生物力学方面,对膝关节软骨及韧带组织胶原蛋白含量及其分型研究较少^[1]。

关节软骨及韧带组织的基质主要由水、胶原蛋白和蛋白多糖构成。本次实验通过建立动物骨质疏松膝关节模型,对大鼠膝关节软骨及

前交叉韧带组织的总胶原、I型及II型胶原蛋白含量进行测定,探讨骨质疏松与膝关节退变的相关性。

1 材料和方法

设计: 随机分组设计、对照动物实验。

时间及地点: 于2009-10/2010-05在江西省干细胞重点实验室完成。

动物: 选用体质量200~250 g,八九个月龄清洁级雌性SD大鼠40只,由南昌大学实验动物中心提供,合格证号: FU(赣)0526036。

动物在光照充足、室温、湿度30%~50%的环境下饲养,实验过程中对动物处置符合科技部2006年《关于善待实验动物的指导性意见》的要求^[2]。

¹Department of Orthopaedics,
²Department of Nephrology, Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Zhao Liang-jun★, Studying for master's degree, Physician, Department of Orthopaedics, Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
zhaoliangjun163@163.com

Correspondence to: Tang Xiao-zheng, Chief physician, Professor, Master's supervisor, Department of Orthopaedics, Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
nanchang2006@yahoo.cn

Received: 2010-07-19
Accepted: 2010-08-25

江西省人民医院,
¹骨科, ²肾内科,
江西省南昌市
330006

赵良军★, 男, 1985年生, 湖南省永州市人, 汉族, 南昌大学医学院在读硕士, 医师, 主要从事骨创伤及骨病方面的研究。
zhaoliangjun163@163.com

通讯作者: 汤晓正, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 江西省人民医院骨科, 江西省南昌市 330006
nanchang2006@yahoo.cn

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2011)02-00205-03

收稿日期: 2010-07-19
修回日期: 2010-08-25
(20100522006/YJ-Z)

试剂和仪器:

试剂及仪器	来源
标准羟脯氨酸	Sigma 公司, 美国
大鼠 I 型、II 型胶原酶联免疫分析试剂盒	大连泛邦化工技术开发有限公司
Multiskan MK3 全自动酶标仪	Thermo 公司, 芬兰

方法:

分组: 将SD大鼠随机分成实验组和对照组, 各20只, 组间月龄及体质量差异无显著性意义($P > 0.05$), 摄食及饮水等饲养条件一致。

建模: 动物手术前用氯氨酮(0.1 g/kg)腹腔麻醉, 实验组经腰背侧切口进入腹腔, 摘除双侧卵巢^[3]。对照组仅行腰背部手术切除小部分脂肪组织。两组大鼠饲养16周后以腹主动脉放血法处死大鼠^[3-4], 取大鼠膝关节软骨及前交叉韧带进行测定。

羟脯氨酸及总胶原的测定: 标本常规脱脂干燥, 将10 mg标本加入EP管中研磨碎, 加入0.3 mL蒸馏水、6 mol/L盐酸0.3 mL离心均匀。用针头在EP管盖上扎一小孔, 置入120 °C高压锅中水解2 h, 用蒸馏水稀释至1.5 mL, 12 000 r/min离心15 min。

取待测液50 μL, 加入0.05 mol/L CuSO₄溶液25 μL、10%NaOH溶液25 μL及屠体积分数6% H₂O₂溶液25 μL, 置于60 °C水浴振荡10 min。加入6 mol/L盐酸50 μL及5%对二甲氨基苯甲醛溶液50 μL, 置于50 °C水浴15 min, 冰上冷却后, 用酶标仪测定波长560 nm的值, 计算羟脯氨酸含量^[5]。按Grant^[6]的方法, 计算胶原含量: 胶原(%)=羟脯氨酸(%)×7.46。

I 型、II 型胶原含量测定: 取标本10 mg, 脱水脱脂, 0.4 mol/L乙酸浸泡过夜, 在冰浴下制备成匀浆, 以盐析法提取胶原^[7]。酶联免疫吸附法测定 I, II 型胶原在波长450 nm的吸光度值, 计算 I 型、II 型胶原含量。

主要观察指标: 改良羟脯氨酸测定法和酶联免疫吸附试法测定大鼠膝关节软骨及前交叉韧带中的总胶原、I 型及II型胶原蛋白的含量。

设计、实施、评估者: 设计为第四作者, 实施为第一、二、三作者、评估为第一、第四作者, 经过正规培训, 采用盲法评估。

统计学分析: 采用SPSS 10.0统计软件(SPASS公司, 美国)进行统计分析, 用配对t 检验对两组数据进行分析, 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 所有40只大鼠均进入结果分析。

2.2 两组大鼠膝关节软骨总胶原及 I 型、II 型胶原变化 实验组大鼠膝关节软骨总胶原、I型及II型胶原蛋白明显低于对照组($P < 0.05$); I 型/II 型胶原比值下降($P < 0.05$), 见表1。

表1 大鼠膝关节软骨总胶原及 I, II 型胶原含量变化
Table 1 Variation of rat articular cartilage total collagen and type I, II collagen contents ($\bar{x} \pm s, n=20$)

Item	Experimental group	Control group
Total collagen (mg/g)	42.79±2.42	47.41±3.16
Type I collagen (mg/g)	0.48±0.03 ^a	0.72±0.07
Type II collagen (mg/g)	4.61±0.37 ^a	5.39±0.14
Type I/II collagen ratio	0.10±0.02 ^a	0.14±0.05

^a $P < 0.05$, vs. control group

2.3 两组大鼠前交叉韧带总胶原及 I 型、II 型胶原变化 实验组大鼠前交叉韧带总胶原、I 型及II型胶原蛋白明显低于对照组($P < 0.05$); I 型/II 型胶原比值下降($P < 0.05$), 见表2。

表2 大鼠前交叉韧带总胶原及 I, II 型胶原含量变化
Table 2 Variation of rat anterior cruciate ligament total collagen and type I, II collagen contents ($\bar{x} \pm s, n=20$)

Item	Experimental group	Control group
Total collagen (mg/g)	34.27±2.51 ^a	41.58±2.93
Type I collagen (mg/g)	2.31±0.19 ^a	5.27±0.24
Type II collagen (mg/g)	0.29±0.07 ^a	0.47±0.02
Type I/II collagen ratio	8.39±1.53 ^a	12.47±2.16

^a $P < 0.05$, vs. control group

3 讨论

胶原蛋白是构成组织框架的主要成分, 由胶原纤维、弹性纤维和网状纤维组成; 胶原纤维在载荷下维持组织的强度和刚度, 弹性纤维使组织具有延伸性, 网状纤维提供容积^[8]。胶原蛋白能促进钙、磷等无机矿物质在骨骼上的沉积, 修复组织, 与蛋白多糖在组织中相互作用, 阻止细胞基质的钙化, 使软骨及韧带组织富有弹性, 在保持软骨及韧带组织整体功能方面发挥着极其重要的生物学作用^[8-9]。I 型和II型胶原构成关节软骨及韧带胶原的主要成分之一, 在人体中分布不同。I 型胶原主要作用是吸收和传递应力, 适合于牵拉变形、维持张力, 但耐受压力的作用较弱; II 型胶原主要是承受和吸收压力, 维持组织抗压应力, 关节软骨外基质的主要成分由II型胶原构成, 其在关节软骨中排列成网状, 中间容纳蛋白质分子, 构成具有黏弹性的结构, 起到缓冲垫的作用, 赋予关节以抗压耐磨的特性^[10]; 韧带组织主要由I 型胶原构成, I 型较II型有更好的抗张力性能及刚度, 二者的比值反应组织的退变程度, 比值下降越低则说明组织退变越严重, 组织抗张力性能及刚度下降越明

显^[10-11]。

朱庆三等^[12]研究发现人类随着年龄的增长, 正常关节软骨中胶原含量逐渐降低, 胶原蛋白与膝关节的退变可能有一定关系。生理状态下, 人体组织胶原蛋白的生成与降解保持相对平衡, 当人或动物步入老年阶段后, 全身激素水平逐渐降低, 关节软骨及韧带组织基质合成和分解失衡, 引起组织弹性下降, 随之发生裂缝, 组织完整性遭到破坏, 逐步形成骨性关节炎, 严重影响人们的日常生活。Raisz^[13]研究表明绝经后骨质疏松患者体内雌激素水平下降, 骨髓中细胞因子的调节平衡被扰乱, 同时雌激素启动破骨细胞凋亡的作用丧失, 使生成的胶原被过度地降解。II型胶原是软骨组织最主要的成分, 可作为软骨的表型标记, 决定了关节软骨特性, 是评价软骨修复质量的标志之一^[14]; 本次实验显示骨质疏松大鼠膝关节软骨总胶原及II型胶原蛋白含量显著降低, I型/II型的比值降低, II型胶原含量的下降导致了关节软骨抗压力性、强度下降, 软骨的弹性、柔韧度及耐磨性也下降, 可加速膝关节退变。有研究表明一氧化氮可诱导动物模型退变膝关节软骨修复过程中II型胶原合成增强, II型胶原可维持软骨的生理功能^[14-15]。而本组骨质疏松组大鼠膝关节前交叉韧带总胶原、I型及II型胶原蛋白含量较对照组低, I型/II型的比值也降低, 说明骨质疏松后膝关节交叉韧带胶原蛋白及基质遭到破坏, 胶原的强度及抗张力性降低, 可致膝关节前交叉韧带变薄、变硬、变短, 弹性及柔韧度下降, 逐渐退变、变脆, 抗拉力减弱。相关研究发现植入外源性I型胶原蛋白可增强早期韧带组织的力学强度, 延缓韧带的退变^[16], I型胶原在修复韧带组织过程中具有重要调节作用^[17]。综上, 膝关节软骨及前交叉韧带组织生物化学含量及结构的改变构成了膝关节退变的基础。

4 参考文献

- [1] Hao YQ, Dai KR. Zhongguo Guzhi Shusong Zazhi. 2005;11(3):273-277.
郝永强, 戴尅戎. 骨质疏松性骨折愈合与骨量、骨结构及力学性能相关性的实验研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2005, 11(3):273-277.
- [2] 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.
- [3] Li CY, Jee WS, Chen JL, et al. Estrogen and "exercise" have a synergistic effect in preventing bone loss in the lumbar vertebra and femoral neck of the ovariectomized rat. Calcif Tissue Int. 2003;72(1):42-49.
- [4] Hao YQ, Dai KR. Zhongguo Jiaoxing Waikexue Zazhi. 2002;9(6):569-572.
郝永强, 戴尅戎. 骨质疏松性骨折实验模型的设计与建立[J]. 中国矫形外科杂志, 2002, 9(6):569-572.
- [5] Yang XY, Du GH. Zhongguo Yaolixue Tongbao. 2004;20(7):836-837.
杨秀颖, 杜冠华. 组织羟脯氨酸含量微量测定方法及应用[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(7):836-837.
- [6] Grant RA. Estimation of hydroxyproline by the autoanalyser. J Clin Pathol. 1964;17:685-686.
- [7] Yongji Y, Tengben DSL. Shanghai: Shanghai University of Traditional Chinese Medicine Press, 1992:32-35.
永井裕, 滕本大三郎. 胶原蛋白实验方法[M]. 刘平译. 上海: 上海中医药大学出版社, 1992:32-35.
- [8] Zhang C, Chen FY, Xia J, et al. Fudan Xuebao: Yixue Ban. 2009;36(4):440-444.
张超, 陈飞雁, 夏军, 等. 三羟基异黄酮对关节软骨细胞合成胶原和蛋白多糖的影响[J]. 复旦学报: 医学版, 2009, 36(4):440-444.
- [9] Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. J Exp Med. 2000;191(2):275-286.
- [10] Kaneyama S, Doita M, Nishida K, et al. Thoracic myelopathy due to ossification of the yellow ligament in young baseball pitchers. J Spinal Disord Tech. 2008;21(1):68-71.
- [11] Wang CF, Jia LS, Wei MY. Zhongguo Jizhu Jisui Zazhi. 2005;15(8):486-488.
王长峰, 贾连顺, 魏梅洋. 颈椎黄韧带退变和脊髓型颈椎病的相关性研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2005, 15(8):486-488.
- [12] Zhu QS, Yang YG, Jiang HZ, et al. Zhonghua Yixue Zazhi. 1993;73(3):148-150.
朱庆三, 杨有庚, 姜鸿志, 等. 正常人关节软骨胶原含量测定的研究[J]. 中华医学杂志, 1993, 73(3):148-150.
- [13] Raisz LG. Estrogen and bone: new pieces to the puzzle. Nat Med. 1996;2(10):1077-1078.
- [14] Sun W, Wang JX, Jin DD, et al. Shiyong Guke Zazhi. 2009;15(2):106-107, 114.
孙炜, 王吉兴, 金大地, 等. iNOS抑制剂对兔关节软骨修复组织胶原表达的影响[J]. 实用骨科杂志, 2009, 15(2):106-107, 114.
- [15] Brittberg M. Autologous chondrocyte implantation—technique and long-term follow-up. Injury. 2008;39 Suppl 1:S40-49.
- [16] Fang Y, Yang ZM. Zhongguo Xiufu Chongjian Waikexue Zazhi. 2005;19(4):318-321.
方跃, 杨志明. 复合胶原的组织工程肌腱力学性能的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2005, 19(4):318-321.
- [17] Scheffler SU, Clineff TD, Papageorgiou CD, et al. Structure and function of the healing medial collateral ligament in a goat model. Ann Biomed Eng. 2001;29(2):173-180.

来自本文课题的更多信息一

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的意义: 了解膝关节动物模型组织中胶原蛋白的分型及其含量变化, 在膝关节退变, 尤其是发生了膝关节炎的患者, 可补充外源性I、II型胶原以及增加骨量来预防骨质疏松症和治疗骨性关节炎, 延缓关节退变和延迟临床上膝关节置换的年龄。

课题评估的“金标准”: 课题主要结果指标评价公认的“金标准”是通过测定组织羟脯氨酸含量来计算胶原蛋白含量, 本课题已应用。

设计或课题的偏倚与不足: 可适当增加样本量, 设置雌激素类药物对骨质疏松大鼠模型膝关节胶原的含量变化的影响。

提供临床借鉴的价值: 预防和治疗老年骨质疏松症提供膝关节组织胶原蛋白的生化参数, 为药物预防和控制骨质疏松和骨性关节炎提供依据。