

## 木瓜蛋白酶对兔膝关节骨关节炎滑膜病变的诱导作用

张 林, 张 兵, 李 博, 康 晋

西安医学院第二附属医院 骨外科, 陕西 西安 710038

**摘要:** **目的** 探讨木瓜蛋白酶诱导兔膝关节骨关节炎模型的滑膜病理变化。**方法** 纳入 30 只新西兰大白兔, 随机分为对照和模型组, 模型组动物均采用木瓜蛋白酶注射方式制备膝关节骨关节炎模型, 术后 2、4、6 周, 分别取两组各 5 只动物, 处死后获得滑膜组织标本, 观察一般情况, 对两组不同时间的滑膜进行 Mankin 评分; 苏木精-伊红 (HE) 染色观察病理变化; 酶联免疫法检测滑膜血管内皮生长因子 (VEGF) 和白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 表达水平。**结果** 木瓜蛋白酶单次注射后第 2 周, 对模型组动物进行病理观察, 可见膝关节出现严重的滑膜炎性反应, 滑膜细胞与下层疏松纤维及血管组织均明显增生, 并存在大量淋巴浆细胞浸润; 随着时间推移, 炎性反应逐渐减轻。随着注射时间的延长, 模型组 Mankin 评分、VEGF 和 IL-1 $\beta$  表达水平均呈下降趋势, 对照组无明显变化; 模型组木瓜蛋白酶注射后 2、4 周的 Mankin 评分、VEGF 和 IL-1 $\beta$  表达水平均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 注射后 6 周的 Mankin 评分、VEGF 和 IL-1 $\beta$  表达水平与对照组比较差异无统计学意义。**结论** 木瓜蛋白酶可以诱导兔膝关节骨关节炎模型, 木瓜蛋白酶单次注射后第 2 周, 兔膝关节滑膜炎性反应严重, 第 4、6 周时炎性反应逐渐减轻。

**关键词:** 膝关节; 骨关节炎; 木瓜蛋白酶; 动物模型; 滑膜; 血管内皮生长因子 (VEGF); 白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2018)01-0078-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.01.013

## Induction of papain on pathological changes of rabbit synovium in knee osteoarthritis model

ZHANG Lin, ZHANG Bing, LI Bo, KANG Jin

Department of Orthopaedics Surgery, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an 710038, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of papain on pathological changes of synovial membrane in knee osteoarthritis rabbit model. **Method** Totally 30 New Zealand white rabbits were randomly divided into control group and model group with 15 rabbits in each group. Two groups of five animals were sacrificed to, obtain membrane tissue for observation in two, four and six weeks after operation. Two groups of synovium were evaluated by Mankin score at different time. Hematoxylin eosin (HE) staining was used to observe pathological changes. The expression level of vascular endothelial growth factor (VEGF) and interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) in synovial membrane were detected by ELISA. **Results** Papain once injection after two weeks, the animals of model group were observed. The visible knee appeared serious inflammatory reaction, synovial cells, lower loose fibrous tissue, and blood vessels were significantly hyperplasia, and there was a large amount of lymphoplasmacytic infiltration. As time goes on, the inflammatory response was gradually reduced. With the extension of injection time, Mankin score, VEGF and IL-1 $\beta$  expression levels of model group showed a declining trend, but no apparent change in the control group. Mankin score, VEGF and IL-1 $\beta$  expression levels of model group after two and four weeks papain injection were significantly higher than those in control group ( $P < 0.05$ ). Six weeks after the injection, Mankin score, VEGF and IL-1 $\beta$  expression levels had no significant difference compared with control group. **Conclusion** Papain can induce knee osteoarthritis in rabbit models. Two weeks after a single injection of papain, the inflammatory reaction of knee joint synovitis is serious in rabbits, and the inflammatory reaction is gradually alleviated after four and six weeks.

**Key words:** knee joint; bone arthritis; papain; animal model; synovial; vascular endothelial growth factor (VEGF); interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ )

骨关节炎是一种慢性关节疾病, 以关节软骨退行性变以及继发性骨质增生为主要特征<sup>[1]</sup>。以往对

骨关节炎的研究大多集中在关节软骨以及软骨细胞和软骨下骨等方面<sup>[2-4]</sup>, 但越来越多的资料表明, 关

收稿日期: 2017-10-09

第一作者: 张 林 (1978—), 男, 汉族, 陕西西安人, 硕士研究生学历, 主治医师, 研究方向为脊柱及关节。E-mail: zhanglinlibo@sina.com

节周围的滑膜与疾病之间存在十分密切的关系。木瓜蛋白酶注射方式诱导膝关节骨关节炎是常用的模型制备方法,具有操作简单等优点<sup>[5]</sup>,但关于其诱导膝关节骨关节炎模型对滑膜病理作用的相关问题,报道较少。本实验利用新西兰大白兔,采用木瓜蛋白酶注射方式制备膝关节骨关节炎模型,通过对注射后不同时间动物滑膜进行 Mankin 评分和血管内皮生长因子(VEGF)和白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )表达水平检测,探讨木瓜蛋白酶诱导膝关节骨关节炎模型兔滑膜病的作用机制。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

30只新西兰大白兔,雌性,体质量约2kg,健康状况良好,均由山东省农科院提供,动物许可证号SCXK(鲁)2010-0025。本次研究相关方案均提交本院医学伦理部门审核,并经批准,符合相关伦理学要求。

### 1.2 药物及主要试剂

木瓜蛋白酶,批号Z26149871,规格500mL,上海子起生物科技有限公司;乙醇,北京绿源大德生物科技有限公司;磷酸缓冲(PBS)液,上海心语生物科技有限公司;VEGF酶联免疫试剂盒,上海恒远生化试剂有限公司;IL-1 $\beta$ 酶联免疫试剂盒,北京绿源大德生物科技有限公司;中性甲醛,上海瑶韵生物科技有限公司;盐酸乙醇,上海研盟生命科学发展有限公司;匀浆器,北京明阳科华生物科技有限公司;光学显微镜,北京五洲东方科技发展有限公司。

## 2 方法

### 2.1 动物分组及膝关节骨性关节炎模型<sup>[6-8]</sup>的制备

30只动物随机分为2组:对照组、模型组,每组15只。模型组动物均采用木瓜蛋白酶注射制备膝关节骨关节炎模型,选择兔左膝关节进行常规备皮和乙醇消毒,屈曲45°,利用注射器进行4%木瓜蛋白酶水溶液注射。进针点为髌骨下极髌腱外缘,注射中向髌间窝方向进针,达到股骨髌后回撤2mm,注射溶液0.1mL。术后观察动物注射侧情况,如果出现明显的肿胀,存在屈伸功能障碍,则视为建模成功。经观察,本次模型组15只动物均建模成功。对照组不予以特殊处理,术后对两组动物置于相同的环境下喂养。

### 2.2 术后标本获取<sup>[9]</sup>

木瓜蛋白酶注射后第2、4、6周,各组分别取5只动物,麻醉后处死。即刻切取髌下脂肪垫处滑

膜组织约0.3mm。利用PBS液对组织标本进行洗涤,平均分为两份,一份用于滑膜组织病理观察与Mankin评分,另一份用于酶联免疫法检测VEGF和IL-1 $\beta$ 水平。

### 2.3 滑膜组织病理观察与Mankin评分<sup>[10-11]</sup>

取滑膜组织,参照文献对滑膜病变组织学情况进行评分<sup>[12]</sup>,总分13分,具体标准见表1。

表1 Mankin's评分原则  
Table 1 Scoring principles of Mankin's

项目	评分原则	评分
软骨组织结构	排列紊乱但层次可分	1
	排列明显不规则,层次紊乱	2
	严重紊乱	3
AB-PAS染色	正常	0
	轻度降低	1
	中度降低	2
	重度降低	3
	不着色	4
细胞数量	正常	0
	轻度增生	1
	中度增生	2
	重度增生	3
潮线	正常	0
	多层次	1
	模糊	2

10%中性甲醛固定,12~24h后取出,常规制备切片。对切片进行苏木精-伊红(HE)染色,置于光学显微镜下观察。

### 2.4 VEGF和IL-1 $\beta$ 水平酶联免疫法检测<sup>[13-15]</sup>

取滑膜组织标本,匀浆器充分匀浆后离心,收集上清液。利用酶联免疫试剂盒,检测VEGF和IL-1 $\beta$ 水平,严格按照试剂盒说明书进行操作。

### 2.5 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用SPSS 18.0软件配对 $t$ 检验进行统计学分析。

## 3 结果

### 3.1 膝关节骨性关节炎模型兔滑膜一般情况

模型组15只动物均未出现死亡和滑膜脱落现象,木瓜蛋白酶注射后2周获得各组膝关节滑膜组织,大体观察可见模型组较对照组明显肿胀,滑膜增生充血,颜色鲜红,且关节腔内存在大量积液。注射后4周获得标本进行观察,对照组未出现变化,模型组较注射后2周肿胀和增生程度减轻,积

液量减少。注射后 6 周，对照组未出现变化，模型组存在轻微肿胀和滑膜增生以及少量积液，滑膜呈暗红色。

3.2 木瓜蛋白酶注射后不同时间滑膜病理变化

对照组不同时间滑膜组织均未出现异常变化，

无增生、炎性反应。木瓜蛋白酶注射后，对模型组动物进行病理观察，可见膝关节出现严重的滑膜炎性反应，滑膜细胞与下层疏松纤维及血管组织均明显增生，并存在大量淋巴浆细胞浸润。随着注射时间推移，炎性反应逐渐减轻，结果见图 1。

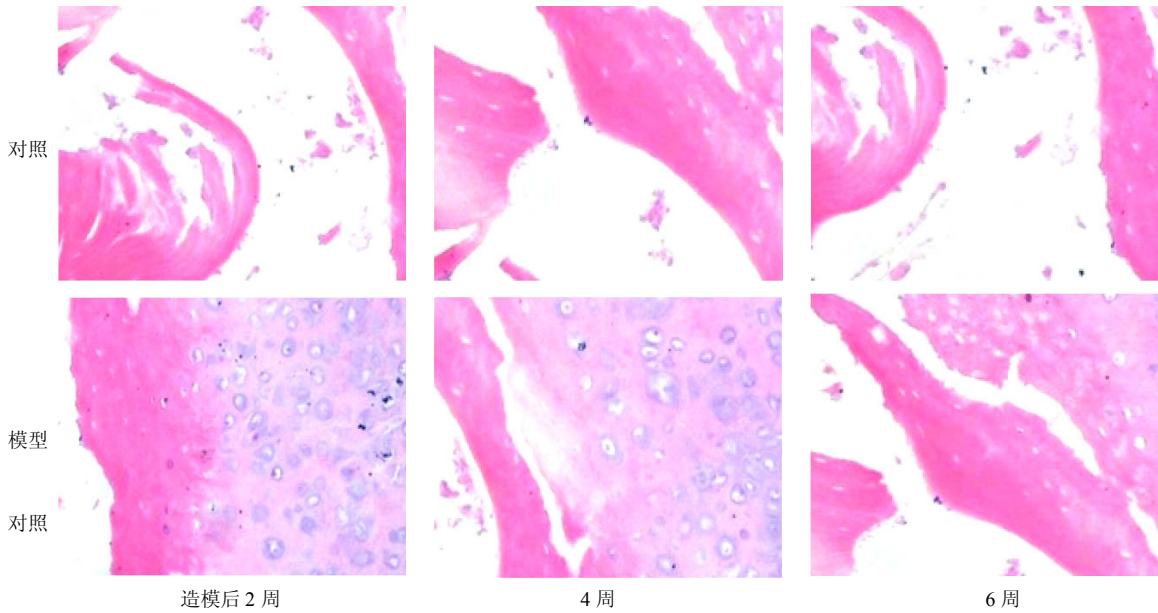


图 1 各组滑膜病理变化 (×100)

Fig. 1 Pathological changes of synovium in each group (×100)

3.3 各组不同时间 Mankin 滑膜病变组织学评分

对两组不同时间的滑膜进行 Mankin 评分，随着注射时间的延长，模型组 Mankin 评分呈现出不断下降趋势，对照组无明显变化。模型组木瓜蛋白酶注射后 2、4 周的 Mankin 评分均显著高于对照组 (P<0.05)，注射后 6 周的 Mankin 评分与对照组比较差异无统计学意义。结果见表 2。

3.4 各组不同时间滑膜病变组织 VEGF 和 IL-1β 表达水平

如表 3 所示，对两组不同时间的滑膜 VEGF 和 IL-1β 表达水平进行检测，随着时间的延长，模型组 VEGF 和 IL-1β 表达水平均呈现出不断下降的情况，对照组无明显变化。模型组木瓜蛋白酶注射后

2、4 周的 VEGF 和 IL-1β 表达水平均显著高于对照组 (P<0.05)，注射后 6 周的 VEGF 和 IL-1β 表达水平均与对照组化比较差异无统计学意义。

表 2 各组不同时间 Mankin 滑膜病变组织学评分变化情况 (x̄ ± s, n = 15)

Table 2 Histologic Mankin score of synovitis at different time in each group (x̄ ± s, n = 15)

组别	Mankin 评分		
	注射后 2 周	注射后 4 周	注射后 6 周
对照	1.52 ± 1.31	1.53 ± 1.25	1.52 ± 1.34
模型	7.25 ± 2.15*	4.23 ± 1.03*	2.12 ± 1.25

与对照组比较: \*P<0.05

\*P<0.05 vs control group

表 3 各组不同时间滑膜病变组织 VEGF 表达水平 (x̄ ± s, n = 15)

Table 3 Expression level of VEGF in different groups of synovium at different time (x̄ ± s, n = 15)

组别	VEGF/ (μg·L <sup>-1</sup> )			IL-1β/ (ng·L <sup>-1</sup> )		
	注射后 2 周	注射后 4 周	注射后 6 周	注射后 2 周	注射后 4 周	注射后 6 周
对照	142.13 ± 3.25	145.15 ± 4.21	143.11 ± 3.10	18.01 ± 0.85	19.02 ± 0.74	18.05 ± 0.81
模型	219.12 ± 5.13*	176.35 ± 4.12*	151.23 ± 3.19	42.15 ± 1.23*	30.12 ± 2.15*	20.34 ± 1.03

与对照组比较: \*P<0.05

\*P<0.05 vs control group

#### 4 讨论

骨关节炎是一种常见的退行性关节疾病,导致关节疼痛,严重者甚至会导致患者残疾<sup>[16-17]</sup>。其中,膝关节骨关节炎具有很高的发病率。膝关节骨关节炎属于全关节疾病,关节软骨无血管和神经,因此,病变关节周围滑膜组织的病理改变与疾病进展可能存在一定关系<sup>[18]</sup>。

滑膜是一种特殊的半透膜,可以对各种分子进出关节腔隙予以合理控制,维持滑液的有效成分以及关节表面的各项功能属性<sup>[19]</sup>。滑膜不仅能分泌滑液减少关节表面的摩擦力,防止表面粘连,还为关节软骨提供营养成分、排泄废物等。滑膜炎是导致骨性关节炎病理改变的重要因素,受到多种因素的影响。如关节软骨出现降解,软骨碎片并会与滑膜接触<sup>[20-21]</sup>,在人体免疫系统的作用下,滑膜细胞受到刺激,分泌炎症介质,引发发生炎症反应的出现,加速软骨退化<sup>[22]</sup>。本实验中,利用木瓜蛋白酶注射方式制备膝关节骨关节炎动物模型,模型组15只动物均建模成功。木瓜蛋白酶注射之后,会对动物的滑膜组织产生一定的影响<sup>[23]</sup>。研究木瓜蛋白酶对滑膜组织影响时,选择病理观察与细胞因子检测。IL-1 $\beta$ 是一种重要的细胞因子,会对关节软骨细胞产生旁分泌和自分泌作用,加快骨关节炎病程的发展<sup>[24]</sup>。VEGF是一种重要的促进血管生成因子,会对内皮细胞的生长产生促进作用,提高血管的通透性、促进血管的生成。而滑膜的不断增生以及大量新生血管的形成会导致血管翳的出现,血管翳具有侵袭性,对关节产生严重的损伤<sup>[25]</sup>。本实验结果显示,木瓜蛋白酶注射后第2周,对模型组动物进行病理观察,可见膝关节出现严重的滑膜炎性反应,滑膜细胞与下层疏松纤维及血管组织均明显增生,并存在大量淋巴浆细胞浸润。通过对相关指标检测发现,模型组木瓜蛋白酶注射后2、4周的Mankin评分和VEGF和IL-1 $\beta$ 表达水平均显著高于对照组。上述结果表明,在木瓜蛋白酶注射后第2周,滑膜组织的炎症反应最为明显。在注射的早期阶段,还会导致VEGF和IL-1 $\beta$ 表达水平的显著上升,加速疾病的进展<sup>[26]</sup>。结果还显示,随着注射时间推移,炎症反应逐渐减轻。模型组Mankin评分、VEGF和IL-1 $\beta$ 表达水平均呈现出不断下降趋势。注射6周后,模型组的Mankin评分、VEGF、IL-1 $\beta$ 表达水平与对照组比较差异无统计学意义。上述结果显示,木瓜蛋白酶可以诱导兔膝关节骨关节炎模型,

但随着时间的推移,炎症反应逐渐减轻。

本实验证实,木瓜蛋白酶注射可成功诱导兔膝关节骨关节炎模型,导致滑膜病理改变的出现。其中,木瓜蛋白酶注射后第2周滑膜炎性反应最严重,在开展相关动物实验的时候,可选择在注射后第2周进行研究。

#### 参考文献

- [1] 孙鲁宁,赵燕华,黄桂成,等.木瓜蛋白酶诱导膝关节骨关节炎模型兔滑膜病理变化与药物注射时间的关系[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(50):9311-9313.
- [2] 荣向路,吴清和,黄萍,等.骨仙片治疗兔膝关节骨关节炎组织病理学研究[J].中药材,2005,28(10):923-927.
- [3] Lechner M, Steirer I, Brinkhaus B, et al. Efficacy of individualized chinese herbal medication in osteoarthritis of hip and knee: a double-blind, randomized-controlled clinical study [J]. J Altern Complement Med, 2011, 17(6): 539-547.
- [4] Li X, Lang W, Ye H, et al. Tougu Xiaotong capsule inhibits the tidemark replication and cartilage degradation of papain-induced osteoarthritis by the regulation of chondrocyte autophagy [J]. Int J Mol Med, 2013, 31(6): 1349-1356.
- [5] Scher C, Craig J, Nelson F, et al. Bone marrow edema in the knee in osteoarthritis and association with total knee arthroplasty within a three-year follow-up [J]. Skeletal Radiol, 2008, 37(7): 609-617.
- [6] 韩冠英,凌沛学,王凤山,等.不同浓度木瓜蛋白酶建立兔膝关节骨关节炎模型比较研究[J].中国骨伤,2012,25(5):424-429.
- [7] 吴权,李启运,周旭光,等.四黄散对木瓜蛋白酶诱导的兔急性滑膜炎疗效及作用机制研究[J].中国骨伤,2008,21(1):42-45.
- [8] 帅明,林荔军,林昭伟,等.IL-1 $\beta$ 、HIF-1 $\alpha$ 和VEGF在兔膝关节骨性关节炎模型滑膜中的表达[J].中国老年学杂志,2013,33(10):2311-2313.
- [9] 尹学永,谷宁飞,王志文,等.抗骨增生片对兔骨关节炎滑膜病理形态及uPA、uPAR表达的影响[J].中国中医急症,2011,20(7):1097-1098.
- [10] 张镇,李辉,焦海胜,等.三种不同浓度木瓜蛋白酶建立SD雌性大鼠膝关节骨关节炎模型比较研究[J].世界科技研究与发展,2015,37(5):570-574,610.
- [11] 孙必强,张鸣,李美珍,等.威灵仙注射液关节腔离子导入对骨关节炎软骨和滑膜组织形态以及软骨MMP-1的影响[J].中医临床研究,2014(17):1-3.

- [12] Mankin H J, Dorfman H, Lippillo L, et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data [J]. *J Bone joint Surg (Am)*, 1971, 53(3): 523-537.
- [13] 钮 铭. 羌活膏摩治疗木瓜蛋白酶诱导兔膝关节炎性滑膜炎的实验研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2014.
- [14] 庄 超, 徐南伟, 高 翔, 等. 骨关节炎动物模型中血清透明质酸的变化及其意义 [J]. *中华风湿病学杂志*, 2013, 17(12): 833-835.
- [15] Shishkin V I, Kudriavtseva G V, Riabkov A B, et al. A pH-dependent mechanism of energy transformation in joint fluid cells in osteoarthritis of the knee joint and benefits of chondroitin sulfate [J]. *Терапевтический архив*, 2005, 77(10): 79-82.
- [16] Men'shikova I V, Makolkin V I, Sugurova Iu et al. Using hyaluronic acid drugs in local intra-articular therapy of osteoarthritis in the knee joint [J]. *Терапевтический архив*, 2007, 79(5): 31-35.
- [17] 段文秀, 汪宗保, 张 浩, 等. 木瓜蛋白酶诱导早期膝骨关节炎模型大鼠软骨超微结构的动态变化 [J]. *中国组织工程研究*, 2015(18): 2789-2793.
- [18] 彭 诗, 刘 娟, 朱兆荣, 等. 电针对木瓜蛋白酶致骨关节炎模型犬血清中 IL-1、TNF- $\alpha$ 、SP 的影响 [J]. *中国兽医杂志*, 2014, 50(6): 52-54.
- [19] 梁 霄. 关节腔内注射不同浓度木瓜蛋白酶建立小鼠膝骨关节炎模型的研究 [D]. 南京: 广西中医药大学, 2014.
- [20] Noskova A S, Krasivina I G, Dolgova L N, et al. Abdominal obesity--factor contributing to osteoarthritis of the knee joints [J]. *Терапевтический архив*, 2007, 79(5): 29-31.
- [21] Chen Y H, Carrino J A, Raman S P, et al. Atraumatic lateral collateral ligament complex signal abnormalities by magnetic resonance imaging in patients with osteoarthritis of the knee [J]. *J Comput Assist Tomogr*, 2008, 32(6): 982-986.
- [22] Camejo F, Almeida L E, Doetzer A D, et al. FasL expression in articular discs of human temporomandibular joint and association with osteoarthritis [J]. *Oral Pathol Med*, 2014, 43(1): 69-75.
- [23] Kavchak A J, Fernándezdelaspeñas C, Rubin L H, et al. Association between altered somatosensation, pain, and knee stability in patients with severe knee osteoarthritis [J]. *Clin J Pain*, 2012, 28(7): 589-594.
- [24] 李石胜, 吴耀持, 张峻峰, 等. 长针透刺膝骨关节炎模型大鼠滑膜组织中基质金属蛋白酶 3 的变化 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(50): 9415-9418.
- [25] 唐和斌, 李婷婷, 杨燕京, 等. 木瓜蛋白酶诱导骨关节炎模型中病理指标的动态变化 [J]. *中南民族大学学报: 自然科学版*, 2013, 32(4): 41-45.
- [26] 吴红娟, 孙必强, 朱传湘, 等. 盐酸青藤碱对家兔骨关节炎关节液 IL-1 $\beta$ 、PGE2 生成与关节组织结构的影响 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2010, 30(9): 84-86.