**重 庆 医 科 大 学**

**博 士 学 位 论 文**

|  |  |
| --- | --- |
| 论文题目 | **低强度脉冲聚焦超声治疗膝骨关节炎安全性、有效性**  **随机对照临床试验及作用机制研究** |

|  |  |
| --- | --- |
| 作者姓名 | **贾 朗** |

|  |  |
| --- | --- |
| 指导教师姓名（职称、单位名称） | **陈文直 教授** |
| **重庆医科大学生物医学工程学院** | |
| **超声医学工程省部共建国家重点实验室培育基地** | |
| **超声医学工程重庆市重点实验室** | |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 申请学位级别 | **博** 士 | 学科、专业名称 | **物理医学** |

|  |  |
| --- | --- |
| 论文答辩年月 | **2015 年 5 月** |

2015 年 5 月

**重 庆 医 科 大 学**

**博 士 学 位 论 文**

|  |  |
| --- | --- |
| 论文题目 | **低强度脉冲聚焦超声治疗膝骨关节炎安全性、有效性**  **随机对照临床试验及作用机制研究** |

|  |  |
| --- | --- |
| 作者姓名 | **贾 朗** |

|  |  |
| --- | --- |
| 指导小组成员（职称） | **陈文直 教授** |
|  | **陈锦云 副教授** |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 申请学位级别 | **博** 士 | 学科、专业名称 | **物理医学** |

|  |  |
| --- | --- |
| 论文答辩年月 | **2015 年 5 月** |

2015年5 月

目 录

[英汉缩略语名词对照](#_Toc686205719) 4

[摘 要](#_Toc686205720) 9

**[4](#_Toc686205721)** [结论](#_Toc686205721) 10

**[Abstract](#_Toc686205722)** 11

[前](#_Toc686205723)[言](#_Toc686205723) 12

[参考文献](#_Toc686205724) 13

[第一部分](#_Toc686205725) **[FLIPUS](#_Toc686205725)**[治疗](#_Toc686205725)**[KOA](#_Toc686205725)**[安全性和有效性的随机对照临床试验](#_Toc686205725) 14

**[1.1](#_Toc686205726)** [研究对象](#_Toc686205726) 14

**[1.2](#_Toc686205727)** [研究方法](#_Toc686205727) 15

**[1.3](#_Toc686205728)** [统计分析](#_Toc686205728) 18

**[2](#_Toc686205729)** [结果](#_Toc686205729) 18

**[2.1](#_Toc686205730)** [患者一般资料](#_Toc686205730) 18

**[2.2.](#_Toc686205731)** [患者基线资料](#_Toc686205731) 20

**[2.3](#_Toc686205732)** [疗效评价](#_Toc686205732) 22

**[2.4](#_Toc686205733)** [安全性评价结果](#_Toc686205733) 34

**[3](#_Toc686205734)** [讨论](#_Toc686205734) 36

**[3.1](#_Toc686205735)****[KOA](#_Toc686205735)**[的病理Th理特征与超声波物理参数的选择](#_Toc686205735) 36

**[3.2](#_Toc686205736)****[FLIPUS](#_Toc686205736)** [治疗](#_Toc686205736)**[KOA](#_Toc686205736)**[患者的临床有效性](#_Toc686205736) 36

**[3.3](#_Toc686205737)****[FLIPUS](#_Toc686205737)**[对](#_Toc686205737)**[KOA](#_Toc686205737)**[患者Th活质量的改善情况](#_Toc686205737) 37

**[3.4](#_Toc686205738)****[FLIPUS](#_Toc686205738)**[治疗](#_Toc686205738)**[KOA](#_Toc686205738)**[患者的安全性](#_Toc686205738) 37

**[3.5](#_Toc686205739)** [本研究的不足之处](#_Toc686205739) 37

[参考文献](#_Toc686205740) 38

[第二部分](#_Toc686205741) **[FLIPUS](#_Toc686205741)**[治疗](#_Toc686205741)**[KOA](#_Toc686205741)**[作用机制研究](#_Toc686205741) 39

[第一节 膝骨关节炎动物模型的建立及鉴定](#_Toc686205742) 39

**[1](#_Toc686205743)** [材料与方法](#_Toc686205743) 39

**[1.1](#_Toc686205744)** [实验材料](#_Toc686205744) 39

**[1.2](#_Toc686205745)** [实验方法](#_Toc686205745) 40

**[1.3](#_Toc686205746)** [统计分析](#_Toc686205746) 42

**[2](#_Toc686205747)** [结果](#_Toc686205747) 42

[2.1 术后动物模型行为学观察](#_Toc686205748) 42

**[2.2](#_Toc686205749)****[OA](#_Toc686205749)**[模型软骨损伤评价](#_Toc686205749) 42

**[2.3](#_Toc686205750)****[OA](#_Toc686205750)**[模型骨赘测定](#_Toc686205750) 47

**[2.4](#_Toc686205751)****[OA](#_Toc686205751)**[模型软骨下骨损伤评价](#_Toc686205751) 48

**[2.5](#_Toc686205752)** [评价者一致性及](#_Toc686205752)**[MRI](#_Toc686205752)**[与大体观察评价软骨损伤分级相关性分析](#_Toc686205752) 51

[参考文献](#_Toc686205753) 52

**[1](#_Toc686205754)** [材料与方法](#_Toc686205754) 55

**[1.1](#_Toc686205755)** [实验材料](#_Toc686205755) 55

**[1.2](#_Toc686205756)** [实验方法](#_Toc686205756) 55

**[1.3](#_Toc686205757)** [统计分析](#_Toc686205757) 57

**[2](#_Toc686205758)** [结果](#_Toc686205758) 57

**[2.1](#_Toc686205759)** [软骨基质中蛋白聚糖含量](#_Toc686205759) 57

**[2.2](#_Toc686205760)** [软骨基质中](#_Toc686205760)**[II](#_Toc686205760)**[型胶原含量](#_Toc686205760) 58

**[3](#_Toc686205761)** [讨论](#_Toc686205761) 58

**[3.1](#_Toc686205762)** [超声的参数选择](#_Toc686205762) 59

**[3.2](#_Toc686205763)****[FLIPUS](#_Toc686205763)**[对关节软骨的Th物学效应与作用机制](#_Toc686205763) 59

**[3.3](#_Toc686205764)****[FLIPUS](#_Toc686205764)**[干预后软骨基质主要成分含量的变化规律](#_Toc686205764) 59

[参考文献](#_Toc686205765) 59

**[1](#_Toc686205766)** [材料与方法](#_Toc686205766) 61

**[1.1](#_Toc686205767)** [实验材料](#_Toc686205767) 61

**[1.2](#_Toc686205768)** [实验方法](#_Toc686205768) 62

**[1.3](#_Toc686205769)** [统计分析](#_Toc686205769) 64

**[2](#_Toc686205770)** [结果](#_Toc686205770) 64

**[2.1](#_Toc686205771)** [病理组织学观察](#_Toc686205771) 64

**[2.2](#_Toc686205772)** [免疫组化法检测软骨细胞增殖情况](#_Toc686205772) 66

**[2.4](#_Toc686205773)** [凋亡细胞原位检测](#_Toc686205773)**[(Tunel)](#_Toc686205773)** 67

**[2.5](#_Toc686205774)** [流失细胞仪检测软骨细胞早期凋亡情况](#_Toc686205774) 67

**[3](#_Toc686205775)** [讨论](#_Toc686205775) 68

**[3.1](#_Toc686205776)****[FLIPUS](#_Toc686205776)**[对软骨细胞增殖与凋亡的影响](#_Toc686205776) 68

**[3.2](#_Toc686205777)****[FLIPUS](#_Toc686205777)**[影响软骨细胞增殖](#_Toc686205777)**[-](#_Toc686205777)**[凋亡的作用机制](#_Toc686205777) 68

[参考文献](#_Toc686205778) 68

**[1](#_Toc686205779)** [材料与方法](#_Toc686205779) 69

**[1.1](#_Toc686205780)** [实验材料](#_Toc686205780) 69

**[1.2](#_Toc686205781)** [实验方法](#_Toc686205781) 69

**[1.3](#_Toc686205782)** [统计学分析](#_Toc686205782) 71

**[2](#_Toc686205783)** [结果](#_Toc686205783) 71

**[2.1](#_Toc686205784)** [造模后膝关节积液量基线对比](#_Toc686205784) 71

**[2.2](#_Toc686205785)** [各组实验兔关节积液治疗前后自身对比](#_Toc686205785) 71

**[2.3](#_Toc686205786)** [治疗后各组实验兔膝关节积液量对比](#_Toc686205786) 72

**[2.4](#_Toc686205787)****[FLIPUS](#_Toc686205787)**[干预后各组关节积液前列腺素](#_Toc686205787)**[E2](#_Toc686205787)**[含量的变化](#_Toc686205787) 73

**[2.5](#_Toc686205788)****[FLIPUS](#_Toc686205788)**[干预后各组关节积液](#_Toc686205788)**[NO](#_Toc686205788)**[含量的变化](#_Toc686205788) 73

**[3](#_Toc686205789)** [讨论](#_Toc686205789) 74

**[3.1](#_Toc686205790)** [关节滑液的Th理功能及滑膜炎性渗出对](#_Toc686205790)**[KOA](#_Toc686205790)**[关节的影响](#_Toc686205790) 74

**[3.2](#_Toc686205791)** [关节积液中炎症因子检测的选择](#_Toc686205791) 74

**[3.3](#_Toc686205792)****[FLIPUS](#_Toc686205792)**[对关节积液中](#_Toc686205792)**[NO](#_Toc686205792)**[、](#_Toc686205792)**[PGE2](#_Toc686205792)**[含量变化的影响](#_Toc686205792) 75

**[3.4](#_Toc686205793)****[FLIPUS](#_Toc686205793)**[缓解炎症反应、减少关节积液的可能机理](#_Toc686205793) 75

[参考文献](#_Toc686205794) 75

[全文总结](#_Toc686205795) 77

[附图](#_Toc686205796) 77

[第一部分 附图](#_Toc686205797) 77

[第二部分 第一节附图](#_Toc686205798) 78

[文献综述](#_Toc686205799) 83

**[1](#_Toc686205800)** [致炎细胞因子](#_Toc686205800) 83

**[1.1](#_Toc686205801)** [白细胞介素](#_Toc686205801)**[1(Interleukin-1,IL-1)](#_Toc686205801)** 84

**[1.2](#_Toc686205802)** [肿瘤坏死因子](#_Toc686205802)**[(Tumor necrosis](#_Toc686205802)** [factor-α,TNF-α](#_Toc686205802)**[)](#_Toc686205802)** 84

**[1.3](#_Toc686205803)** [白细胞介素](#_Toc686205803)**[-17 (Interleukin-17,IL-17)](#_Toc686205803)** 84

**[1.4](#_Toc686205804)** [白细胞介素](#_Toc686205804)**[-18(Interleukin-18,IL-18)](#_Toc686205804)** 84

**[1.5](#_Toc686205805)** [前列腺素](#_Toc686205805)**[E2 (Prostaglandin E2,PGE2)](#_Toc686205805)** 84

**[1.6](#_Toc686205806)** [一氧化氮](#_Toc686205806)**[(NO)](#_Toc686205806)** 84

**[2](#_Toc686205807)** [软骨修复和Th长因子](#_Toc686205807) 85

**[2.1](#_Toc686205808)** [转化Th长因子](#_Toc686205808)**[-](#_Toc686205808)**[β](#_Toc686205808)**[(Transforming growth factor](#_Toc686205808)**[-β,TGF-β](#_Toc686205808)**[)](#_Toc686205808)** 85

**[2.2](#_Toc686205809)** [胰岛素样Th长因子](#_Toc686205809)**[(Insulin-like growth factor,IGF)](#_Toc686205809)** 85

**[2.3](#_Toc686205810)** [骨形态发Th蛋白](#_Toc686205810)**[(Bone morphogenetic protein,BMP)](#_Toc686205810)** 85

[小 结](#_Toc686205811) 85

[参考文献](#_Toc686205812) 86

[攻读博士期间发表的文章](#_Toc686205813) 88

# 英汉缩略语名词对照

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **英文缩写** | **英文全称** | **中文全称** |
| OA | Osteoarthritis | 骨关节炎 |
| KOA | Knee osteoarthritis | 膝骨关节炎 |
| FLIPUS | Focused low intensity pulsed ultrasound | 低强度脉冲聚焦超声 |
| VAS | Visual analogue scale/score | 视觉模拟评分法 |
| WOMAC | Xi'an Western Ontario and McMaster  University osteoarthritis index | 西安大略和麦克马斯特  大学骨关节炎指数 |
| LI | Lequesne index | 勒凯纳指数 |
| MWS | Maximum walking speed | 最大速度步行法 |
| ROM | Range of motion | 关节活动度 |
| RCT | Randomized controlled trial | 随机对照试验 |
| CONSORT | Consolidated standards for reporting of trials | 临床试验报告统一标准 |
| ACLT | [Anterior cruciate ligament](http://www.iciba.com/anterior_cruciate_ligament) transection | 前交叉韧带断离 |
| PBS | Phoshpate buffered saline | 磷酸盐缓冲液 |
| AOD | Average optical density | 平均光密度 |
| PGs | Proteoglycans | 蛋白聚糖 |
| CS | [Chondroitin sulfate](http://www.iciba.com/chondroitin_sulfate) | 硫酸软骨素 |
| HS | [Heparin sulfate](http://www.iciba.com/heparin_sulfate) | 硫酸肝素 |
| DS | [Dermatan sulfate](http://www.iciba.com/dermatan_sulfate) | 硫酸皮肤素 |
| KS | [Keratan sulfate](http://www.iciba.com/keratan_sulfate) | 硫酸角质素 |
| COL II | Collagen type II | II 型胶原 |
| Tunel | TdT-mediated dUTP nick end labeling | 脱氧核糖核苷酸末端转  移酶介导的缺口末端标记法 |
| HRP | Horse-radish peroxidase | 辣根过氧化酶 |
| DAB | [Diaminobenzidine](http://www.iciba.com/diaminobenzidine) | 二氨基联苯胺 |
| PCNA | [Proliferating cell nuclear antigen](http://www.iciba.com/proliferating_cell_nuclear_antigen) | 增殖细胞核抗原 |
| PS | Membrane phosphatidyl serine | 膜磷脂酰丝氨酸 |
| PI | Propidium Iodide | 碘化丙啶 |
| PCD | Programmed cell death | 细胞程序性的死亡 |
| ECM | Extracellular matrix | 细胞外基质 |
| FAK | Focal adhesion kinase | 黏着斑激酶 |
| MAPK | Mitogen activated protein kinase | 丝裂原活化蛋白激酶 |
| PI3K | Phosphatidylinositol-3-kinase | 磷脂酰肌醇-3 激酶 |
| iNOS | Isoforms of nitric oxide synthase | 一氧化氮合酶亚型 |
| COX | Cyclooxygenase | 环氧合酶 |
| NO | [Nitric oxide](http://www.iciba.com/nitric_oxide) | 一氧化氮 |
| iNOS | Inducible nitric oxide synthase | 诱导性一氧化氮合酶 |

1

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| PGE2 | [Prostaglandin E](http://www.iciba.com/prostaglandin_E)2 | 前列腺素 E2 |
| ELISA | [Enzyme linked immunosorbent assay](http://www.iciba.com/enzyme_linked_immunosorbent_assay) | 酶联免疫吸附试验 |
| OD | Optical density | 光密度值 |
| MMP | [Matrix metalloproteinase](http://www.iciba.com/matrix_metalloproteinase) | 基质金属蛋白酶 |
| [NSAID](http://www.iciba.com/NSAID)s | [Non-steroidal Anti-inflammatory Drug](http://www.iciba.com/non-steroidal_anti-inflammatory_drug) | 非甾体抗炎药 |
| IL | [Interleukin](http://www.iciba.com/interleukin) | 白细胞介素 |
| TNF-α | [Tumor necrosis factor](http://www.iciba.com/tumor_necrosis_factor)-α | 肿瘤坏死因子-α |
| MMPs | Matrix metalloproteinases | 基质金属蛋白酶 |
| TIMPs | Tissue inhibitor of metalloproteinases | 基质金属蛋白酶抑制剂 |
| TGF-β | Transforming growth factor-β | 转化生长因子-β |
| IGF | Insulin-like growth factors | 胰岛素样生长因子 |
| BMP | Bone morphogenetic protein | 骨形态发生蛋白 |

2

**低强度脉冲聚焦超声治疗膝骨关节炎安全性、有效性随机对照临床试验及作用机制研究**

摘 要

**背景**

骨性关节炎(Osteoarthritis, OA)好发于人体承重关节，以膝骨关节炎(Knee osteoarthritis, KOA)最为多见。该病以关节软骨完整性破坏以及关节边缘软骨下骨板病变，导致关节症状和体征的一组异质性、慢性关节疾病。现阶段，骨性关节炎的治疗目的在于缓解疼痛、延缓疾病的进展、保护关节功能、改善生活质量。OA治疗包括患者健康教育、运动及生活指导、物理治疗、药物治疗及手术治疗等。然而目前传统药物及手术治疗存在副作用多、创伤大、医疗成本高等缺点。因此，目前急需一种安全、有效、便捷的治疗方法，以改善治疗现状。

传统非聚焦超声应用于骨关节炎的治疗已有60余年，多采用较高的频率（兆赫级）、较高的声强（W/cm2），连续的能量输出方式作用于关节周围软组织通过温热效应发挥作用，也称为深部热疗。而OA病变核心在于关节软骨的退变，因为软骨位置较深，较高频率的非聚焦超声穿透能力差，在传播过程中能量发生衰减，很少有超声能量进入到关节间隙内，难以直接作用于关节软骨，导致治疗效果不确定。国际骨关节炎研究学会（OARSI）发布的2014版指南也将治疗超声判定为疗效“不确定”。因此，需要从超声物理特性和生物学效应方面考虑选择

基金资助：国家重点基础研究发展计划（973计划）（编号: 2011CB707900）

3

更适合深达关节软骨治疗KOA的超声治疗技术。本研究基于前期基础研究的结果选择声强120mW/cm2、频率0.6MHz的脉冲式聚焦超声(Focused low intensity pulsed ultrasound, FLIPUS)治疗KOA，通过随机对照试验验证FLIPUS治疗KOA临床安全性和有效性，形成可行的超声治疗方案，并为临床治疗提供科学依据。

**目的**

1.评价FLIPUS治疗KOA的临床安全性及有效性。

2.通过病理学观察明确新西兰兔骨关节炎模型的发病特点与人类

KOA的发病特点是否一致。借鉴人类KOA软骨损伤的MRI评价标准，建立该动物模型软骨损伤的MRI评价标准，为评价不同发病阶段的动物模型提供一种无创的方法。

3.通过研究软骨基质中II 型胶原及蛋白聚糖含量的变化，阐明

FLIPUS对软骨细胞基质环境的影响。

4.通过研究关节腔积液量的变化以及滑液中PGE2、NO含量变化，阐明FLIPUS对软骨细胞滑液环境的影响。

5.通过研究FLIPUS对软骨细胞增殖及凋亡的影响，阐明FLIPUS

改善软骨基质代谢紊乱的机理。

**方法**

1.根据入选标准及排除标准选择100例KOA受试者，将受试者随机分为A组（FLIPUS+双氯芬酸钠缓释片组）、B组（假FLIPUS +双氯芬酸钠缓释片组）。A组每天接受FLIPUS治疗1次，每次20min，10次一个疗程；B组超声治疗不启动开始按钮，实行假超声治疗，每天治疗1次，

4

每次20min，10次一个疗程。2组均口服双氯芬酸钠缓释片75mg，一日一次，10天一个疗程。评价治疗前基线情况，分别与治疗第3次、第6次及第10次观察其疗效，统计各时间点总有效率及不良事件发生率。治疗结束后4周及12周各随访一次，评价随访疗效。

2.采用Hulth法建立成年雄性新西兰兔双膝骨关节炎模型。术前、术后2周、4周及8周进行MRI扫描，处死动物后取软骨标本进行大体观察。通过大体观察及多序列MRI扫描连续地的动态观察其软骨、软骨下骨损伤情况，骨赘大小的变化，阐明其病理学改变规律。

3.选择发病早期的新西兰兔KOA模型为超声干预对象。30只模型兔根据超声干预时间不同分为2周组、4周组及8周组（2周组、4周组及8周组即超声分别干预2周、4周、8周），每组10只。15只正常兔作为空白对照，空白对照组也分为2周组、4周组及8周组，每

组5只，随机选择治疗侧和对照侧后肢。术后4周开始对治疗侧股骨内髁予以声强120mW/cm2、频率0.6MHz的FLIPUS体外治疗，每周

5天，每天1次，每次20min。对照侧予以假超声治疗。各组实验兔分别于治疗后2周、4周和8周处死，采用番红O-固绿染色及II型胶原免疫组化分析评价软骨基质中蛋白聚糖及II型胶原含量变化；采用病理组织学观察、免疫组织化学分析及细胞生物学手段观察FLIPUS对软骨细胞增殖-凋亡影响；通过MRI扫描定量分析关节积液变化，

ELISA及硝酸还原酶法测定PGE2及NO含量变化阐明FLIPUS对滑液环境的影响。

5

**结果**

1. A组在治疗后第6次、第10次2个评价时间点的WOMAC、VAS评分优于B组(*p*＜0.05)。A组在治疗后第10次的Leguesne指数评分优于B组(*p*＜0.05)。A组在治疗结束后膝关节活动度大于B组，差异无统计学意义(*p*＞0.05)，但A组在治疗后膝关节活动度改善值优于B组(*p*＜0.05)。

A组在治疗结束后步行速度大于B组(*P*＜0.05)。在改善患者生活质量方面，A组在一般健康情况、生理机能、社会功能、躯体疼痛、活力及精神健康改善评分要优于B组(*P*＜0.05)。治疗第3次、第6次及第10次，A组与B组的在改善关节功能方面的总有效率分别为42.86%、97.96%、

97.96%及6.25%、58.33%、77.08%；A组与B组的在缓解关节疼痛方面的总有效率分别为38.78%、91.84%、100%及14.58%、75%、81.25%。

A组在各疗效评价时间点的总有效率均高于B组(*p*＜0.05)。治疗结束后4

周及12周随访，A组在VAS评分及Leguesne评分方面均优于B组（*P*＜

0.05）. 在治疗过程中，无一例不良事件与超声治疗有关。

2. Hulth 法建立实验兔双膝骨关节炎模型，通过大体观察及多序列

MRI扫描观察软骨、软骨下骨损伤及骨赘的动态变化规律。结果显示随着造模时间的延长，软骨及软骨下骨损伤程度逐渐加重(*p*=0.000)，关节内侧部分软骨损伤较外侧部分严重(*p*=0.000)，骨赘逐渐增大

（*p*=0.000），表明该动物模型能高度模拟人类KOA软骨损伤特点。

3. 2周组、4周组及8周组FLIPUS侧II型胶原及蛋白聚糖含量明显高于对照侧，但仍低于正常侧(*p*＜0.05)。随着治疗时间延长，各组FLIPUS侧和对照侧的II型胶原及蛋白聚糖含量均进行性的减少，但FLIPUS侧

6

的减少程度更轻，即丢失更少，提示FLIPUS能延缓KOA病变程度。

4. 2周组中FLIPUS侧软骨细胞增殖率高于对照侧及空白侧，差异具有统计学意义(*p*＜0.05)。4周组及8周组中，FLIPUS侧软骨细胞增殖率与对照侧相比，差异无统计学意义。各组FLIPUS侧软骨细胞凋亡率均低于对照侧，但仍高于空白侧(*p*＜0.05)。

5. 2周组、4周组及8周组FLIPUS侧关节积液量明显少于对照侧，但仍较正常侧关节积液量多，差异具有统计学意义(*p*＜0.05)。各组FLIPUS侧关节积液中PGE2及NO含量明显少于对照侧，但仍高于正常侧PGE2及NO含量，差异具有统计学意义(*p*＜0.01)。

**4** 结论

1. 临床研究结果表明，FLIPUS治疗KOA安全、有效。

2. MRI能准确反映软骨及软骨下骨损伤程度，可以通过借鉴人类

KOA软骨损伤的MRI分级标准评价该动物模型软骨损伤程度，为选择不同疾病阶段的KOA动物模型提供一种无创评价的方法。

3. FLIPUS通过降低关节腔积液量及积液中炎症因子(PGE2、NO)水平，早期刺激软骨细胞增殖并持续延缓软骨细胞凋亡，从而延缓软骨基质中II型胶原及蛋白聚糖丢失，达到缓解KOA临床症状，保护关节软骨目的。

**关键词**：骨关节炎； 低强度脉冲聚焦超声； 软骨细胞凋亡； 安全性； 有效性

7

**SAFTY, EFFECTS AND MECHANISM OF FOCUED ULTRASOUND ON KNEE OSTEOARTHRITIS: A STUDY OF RANDOMISED, DOUBLE BLIND, PLACEBO CONTROLLED TRIAL AND EXPERIMENTAL ANIMALS**

**Background**

**Abstract**

Osteoarthritis(OA) results from an imbalance between breakdown and repair of the tissues in the synovial joint organ and occurs as a result of multiple risk factors including trauma, overuse, and genetic predisposition. Knees is most commonly affected. Clinical practice guidelines for OA recommend self-management programs, including body-strengthening, low-impact aerobic exercises, neuromuscular education, weight loss, nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and tramadol for most patients who suffer less severe OA. Surgery is reserved for patients whose symptoms have not responded to other treatments. Guideline recommendations are imperfect, often expensive, and invasive if surgery is involved, and NSAIDs side effects present other issues. Therefore, innovative and cost-effective approaches to prevent development and progression of OA are urgently needed.

Ultrasound (US) treatment has been used as a non-invasive modality for management of OA over the past 60 years, but clinical efficacy for this

8

Is controversial. In order to give full play to ultrasound characteristics and effect, whether lower frequency and intensity pulse focused ultrasound(FLIPUS) is more effective on KOA is needed to elucidate. We investigated the mechanism, safety and effects of FLIPUS on knee osteoarthritis by experimental animals and a randomized controlled trial.

**Objective**

1. To investigate the safety and effect of FLIPUS in the treatment of osteoarthritis of the knee.

2. To assess changes in osteophytic, chondral, and subchondral structures in a surgically-induced osteoarthritis rabbit model in order to correlate MRI findings with the macroscopic progress of OA and to define the timepoint for disease status in this OA model.

3. To study mechanical effect of FLIPUS on cartilage matrix micro- environment by measuring expression of type II collagen (COL II) and proteoglycan (PGs).

4. To study mechanical effect of FLIPUS on chondrocyte proliferation and apoptosis.

5. To study mechanical effect of FLIPUS on synovia microenviron- ment by measuring knee effusion volume, PGE2 and NO in the synovial fluid.

**Materials and methods**

1. A total of 100 subjects with bilateral knee OA (grade I-III) were

9

Randomized sequentially into 2 groups (groups A and groups B). Group A received FLIPUS+Diclofenac Sodium Sustained Release Tablets; group B received sham FLIPUS+Diclofenac Sodium Sustained Release Tablets. The therapeutic effects of the interventions were evaluated by changes in VAS, Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC) score, Lequesne's index after the third, sixth and tenth times of treatment, knee range of motion, ambulation speed and quality of life after tenth times of treatment and at follow up 4weeks and 12weeks later.

2. The OA model was constructed by surgery in thirty rabbits with ten normal rabbits serving as controls (baseline). High-resolution three- dimensional MRI using a 1.5-T coil was performed at baseline, two, four, and eight weeks postsurgery. MRIs of cartilage lesions, subchondral bone lesions, and osteophyte formations were independently assessed by two blinded radiologists. Ten rabbits were sacrificed at baseline, two, four, and eight weeks post-surgery, and macroscopic evaluation was independently performed by two blinded orthopedic surgeons.

3. OA model New Zealand White (NZW) rabbits (N=30) and 30 normal rabbits were randomized into three groups (2-, 4-, and 8-week groups; N=10 each). A knee from each rabbit was randomly selected to receive FLIPUS and the other knee received a sham treatment as a control. Another 30 normal rabbits were blank controls. The efficacy of FLIPUS treatment was measured via type II collagen and proteoglycan expression

10

And measuring PGE2 and NO. Also, we calculated the ratio of chondrocyte anti-proliferating cell nuclear antigen and apoptosis as well as measured joint effusion volume via MRI evaluation.

**Results**

1. Patients in group A exhibited increased ambulation speed, quality of life and significantly reduced pain and disability after treatment and at followup compared to group B.

2. The signal intensities and morphologies of chondral and subchondral structures by MRI accurately reflected the degree of OA. MRI and macroscopic grading showed that the scores and grades of cartilagenous and subchondral bone defects progressively increased over time, and cartilagenous lesions remained higher in the medial compartment (*p*<0.05). This result indicates that the animal model can duplicate the characteristics of OA in humans.

*3.* COL II losses in the ECM were significantly decreased after FLIPUS (0.13±0.02, 0.06±0.01, and 0.03±0.01) compared to controls (0.07±0.01, 0.03±0.01, and 0.01±0.01; *p*<0.05) at 2, 4, and 8 weeks after the intervention, but these significantly increased compared to blanks (*p* <0.01). PGs loss in the ECM was significantly decreased after FLIPUS (0.11±0.004, 0.06±0.01, and 0.03±0.01) compared to controls (0.06±0.01, 0.04±0.01, and 0.01±0.003) at 2, 4, and 8 weeks after the intervention ( *p*

<0.05), but this significantly increased compared to blanks (*p* <0.01). COL

11

II and PGs were both lost after FLIPUS and in controls, but the losses were slighter after FLIPUS treatment.

4. The ratio of chondrocyte proliferation after FLIPUS (21.10±1.52%) was significantly greater than those of controls and blanks (4.20±1.93% and 0.31±0.20%) at 2 weeks after the intervention (*p*＜0.01). However, no

Significant changes were seen after FLIPUS treatment (14.50±7.56% and 9.95±4.47%) and in controls (11.44±5.79% and 9.30±5.08%) at 4 and 8 weeks after the intervention (*p*＞0.05). Ratios of apoptotic chondrocytes

After FLIPUS (27.82±5.25% and 41.40±6.89% and 45.54±5.16%) were

Significantly less than in controls (41.74±3.43%, 49.76±7.05%, and 56.83±5.32%) at 2, 4, and 8 week after the intervention ( *p*＜0.01), but significantly higher ratios of apoptotic chondrocytes were observed compared to blanks (*p*＜0.01).

5. Knee effusion volumes were significantly decreased after FLIPUS (0.76±0.46 ml, 0.68±0.42 ml, and 0.86±0.43 ml; *p*＜0.05) compared to control (1.15±0.70 ml, 1.34±0.55 ml, and 1.70±0.68 ml); however, effusion volumes increased compared with no treatment (*p*＜0.01) at 2, 4,

And 8 weeks after the intervention. Despite variations in data of knee effusion volumes after FLIPUS over time, the difference was not statistically significant (*p*＞0.05). Data show that FLIPUS decreased knee

Effusion volumes, and maintained these volumes at a relatively low level over time.

12

**Conclusions**

1. FLIPUS therapy is a safe and effective treatment modality for pain relief and that it improves function in patients with knee OA.

2. Serial observations revealed that MRI can accurately detect the progression of cartilage lesions and subchondral bone edema over an eight-week period but may not be accurate in detecting osteophyte sizes. This result provide a basis for early or later stages of KOA identification in animal models by non-invasive method.

3. FLIPUS improved the chondrocyte survival microenvironment by reducing inflammatory mediators, decreasing knee effusion, and collagen and proteoglycan loss.

**Key words**: Osteoarthritis; Focused low intensity pulsed ultrasound; Apoptosis; Safety; efficacy

13

**低强度脉冲聚焦超声治疗膝骨关节炎安全**

**性、有效性随机对照临床试验及作用机制研究**

前 **言**

骨性关节炎(Osteoarthritis, OA)好发于人体承重关节，以膝骨关节炎(Knee Osteoarthritis, KOA)最为多见。该病以关节软骨完整性破坏以及关节边缘软骨下骨板病变，导致关节症状和体征的一组异质性、慢性关节疾病。该病常好发于中老年人，根据流行病学调查，45～65岁的人群发病率达30%，65岁以上人群发病率更是高达50%[1]。现阶段，骨性关节炎的治疗目的在于缓解疼痛、延缓疾病的进展、

改善受累关节功能、提高患者生活质量。治疗OA的方法包括患者健康教育、运动及生活指导、物理治疗、药物治疗及手术治疗等方面。目前药物及外科手术治疗存在副作用多，创伤大，医疗成本高等缺点。因此，目前急需一种安全、有效、便捷的治疗方法，以改善治疗现状。

超声作为一种机械波，具有无创、操作简便等优点。一定剂量的超声波作用于生物体系可以导致该生物体系的不同结构层次上的各种生物效应。超声的物理学特性包括机械效应、温热效应及空化效应。超声的机械效应来源于超声声场的行波和驻波，温热效应与超声剂量、频率及传播介质有关，而理化效应则是超声的机械效应及温热效应的继发作用[2]。超声早在1952年即应用于骨关节炎的治疗

[3]，一直以来多采用频率为1-1.5MHz，声强为1-2.5W/cm2的非聚焦超声，采用连续

能量输出方式[4-7, 10, 11]，作用部位多在关节周围的肌肉及软组织[5, 7]。此时的超声的生物学效应为温热效应[10, 11]，主要利用超声的温热效应达到缓解关节周围肌肉及软组织痉挛的目的。而OA病变核心在于退变的关节软骨，由于软骨处于关节内部，位置较深，较高频率的非聚焦超声穿透能力差，在传播过程中能量发生衰减，很少有超声能量进入到关节间隙内，难以直接作用于关节软骨。由于皮肤对超声能量刺激比较敏感，不能通过单纯提高超声能量达到治疗目的。

14

超声的频率越低，穿透能力越强，为了使超声波直接作用于关节软骨表面，本研究采用更低强度，更低频率的脉冲式聚焦超声(Focued low intensity pulsed ultrasound, FLIPUS)治疗KOA。较低的超声能量不会引起治疗处皮肤的疼痛不适，同时较低频率的聚焦超声穿透能力较强，能量衰减小，保证足够的超声能量直接作用退变软骨及软骨细胞的微环境。目前，已有FLIPUS治疗骨缺损的研究报道，认为FLIPUS能刺激细胞增殖加速骨缺损处的愈合[12]。然而，FLIPUS对退变软骨作用机制研究目前还未见报道。在临床研究中，我们首次运用FLIPUS技术治疗膝骨关节炎，证实了脉冲聚焦超声能有效缓解受累关节疼痛，肿胀及活动受限[13]。但该研究的不足之处在于治疗处皮肤可能出现疼痛等不良事件，不适合长期使用，我们推测与超声能量过大有关。因此，我们重新制定超声治疗方案，采用更低能量的脉冲聚焦超声治疗KOA，通过RCT研究观察其临床安全性及有效性。在机制研究方面，本课题组前期已筛选出后续实验的适宜超声参数，证实频率为0.6MHz的超声较1.0MHz和1.5MHz的超声更能有效地促进实验兔全层软骨损伤的修复[14]，并初步证实频率为0.6MHz、占空比为20%的低强度脉冲超声对膝关节软骨具有保护作用，可以通过改善软骨营养，促进美兰向软骨内渗透，从而延缓实验性骨关节炎自然病程[15,16]。我们在此基础上进一步进行深入研究，参考Hulth法建立新西兰兔膝骨关节炎模型，通过该动物模型与人类KOA的发病特点进行比较，借鉴人类KOA病变中软骨损伤MRI评价标准，建立一种无创地评价不同发病阶段的KOA动物模型方法，并采用该方法选择早期病变的KOA动物模型用于下一步实验；通过FLIPUS干预早期KOA动物模型，研究FLIPUS能否通过减少关节腔积液，促进积液中炎症因子代谢，从而促进软骨细胞增殖和/或延缓软骨细胞凋亡，进而改善软骨基质代谢紊乱，延缓早期实验性KOA病变。通过本研究，形成可行的超声治疗方案，并为临床治疗提供科学依据。

15

参考文献

[1] Woolf A, Pfleger B. Burden of major musculoskeletal conditions[J]. Bull World Health Organ. 2003, 81(3): 646-56.

[2] 周永昌, 郭万学. 超声医学(第四版)[M]. 北京: 科学技术文献出 版社. 2003, 1710-1711.

[[3] Preux TD](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=PREUX%20TD%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=14904920). Ultrasonic wave therapy in osteoarthritis of the hip joint[J][. Br J Phys Med](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14904920). 1952, 15(5): 14-19.

[4] Cetin N, Aytar A, Atalay A, et al. Comparing hot pack, short-wave diathermy, ultrasound, and TENS on isokinetic strength, pain, and functional status of women with osteoarthritic knees: a single-blind, randomized, controlled trial[J]. Am J Phys Med Rehabil. 2008, 87(6): 443-451.

[5] Falconer J, Hayes KW, Chang RW. Effect of ultrasound on mobility in osteo- arthritis of the knee. A randomized clinical trial[J]. Arthritis Care Res. 1992, 5(4): 29-35.

[6] Ozgonenel L, Aytekin E, Durmusoglu G. A double-blind trial of clinical effects of therapeutic ultrasound in knee osteoarthritis[J]. Ultround Med Biol. 2009, 35(2): 44-49.

[7] Huang M, Lin Y, Lee C, et al. Use of ultrasound to increase effectiveness of isokinetic exercise for knee osteoarthritis[J]. Arch Phys Med Rehabil. 2005, 86(3): 1545.

[8] Huang M, Chen T, Weng M, Wang Y. In: Peek WJ, Lankhorst GJ, Eds. Effects of Pulse Sonication on Functional Status of Patientswith Knee Osteoarthritis. International Society of Physical and Rehabilitation Medicine. Amsterdam, The Netherlands: Monduzzi. 2001, 297-300.

[9] Huang MH, Yang RC, Lee CL, et al. Preliminary results of integrated therapy for patients with knee osteoarthritis[J]. Arthritis Rheum. 2005, 53(4): 812-820.

[[10] Cakir S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Cakir%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24322433), [Hepguler S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hepguler%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24322433), [Ozturk C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Ozturk%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24322433), et al. Efficacy of therapeutic ultrasound for the management of knee osteoarthritis: a randomized, controlled, and double-blind study[J]. [Am J Phys Med Rehabil](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24322433). 2014, 93(5): 405-12.16

[[11] Ulus Y,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Ulus%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22462424) [Tander B,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Tander%20B%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22462424) [Akyol Y](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Akyol%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22462424), et al. Therapeutic ultrasound versus sham ultrasound for the management of patients with knee osteoarthritis: a randomized double-blind controlled clinical study[J]. [Int J Rheum Dis](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Therapeutic%2Bultrasound%2Bversus%2Bsham%2Bultrasound%2Bfor%2Bthe%2Bmanagement%2Bof%2Bpatients%2Bwith%2Bknee%2Bosteoarthritis%3A%2Ba%2Brandomized%2Bdouble-blind%2Bcontrolled%2Bclinical%2Bstudy). 2012, 15(2): 197-206.

[12] Jung YJ, Kim R, Ham HJ, et al. Focused Low-Intensity Pulsed Ultrasound Enhances Bone Regeneration in Rat Calvarial 1 Bone Defect throughEnhancement of Cell Proliferation[J]. Ultrasound Med Biol. 2015, 41(4): 999–1007.

[[13] Yang PF,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Yang%20PF%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22009649) [Li D,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Li%20D%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22009649) [Zhang SM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Zhang%20SM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22009649), et al. Efficacy of ultrasound in the treatment of osteoarthritis of the knee[J]. [Orthop Surg.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22009649) 2011, 3(3): 181-187.

[14] 贾小林, 陈文直, 司海鹏, 等. 超声对兔关节软骨损伤的修复作用[J]. 中华创伤杂志, 2004, 20(2): 97-99.

[15] 周崑, 周伟, 贾小林, 等. 超声对实验性早期兔膝关节骨关节炎的作用[J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(1): 6-8.

[16] [周崑](http://210.41.208.102/rewriter/16/http/vvv9bmjh9mds/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e5%91%a8%e5%b4%91&amp;code=14347368%3B08809867%3B15262601%3B15191411%3B)[, 周伟](http://210.41.208.102/rewriter/16/http/vvv9bmjh9mds/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e5%91%a8%e4%bc%9f&amp;code=14347368%3B08809867%3B15262601%3B15191411%3B), [陈文直](http://210.41.208.102/rewriter/16/http/vvv9bmjh9mds/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e9%99%88%e6%96%87%e7%9b%b4&amp;code=14347368%3B08809867%3B15262601%3B15191411%3B), 等. 低强度脉冲超声对美蓝渗入正常兔膝关节软骨的作用[J]. 重庆医科大学学报, 2012, 37(2): 121-124.

17

# **第一部分** **FLIPUS**治疗**KOA**安全性和有效性的随机对照临床试验

膝骨关节炎（Knee osteoarthritis, KOA）是中老年人群中常见的关节疾患[1]，主要临床表现为受累关节疼痛且逐渐加重、功能障碍、病情进展可引起畸形，严重影响患者的日常生活与工作[2-3]。对早中期症状较轻的患者而言，非手术治疗是

KOA重要的治疗手段，治疗目的是减轻疼痛、改善关节功能、减缓病情发展、改善生活质量。非手术治疗方法包括非甾体类消炎药（Non-steroid anti-inflammatory

drug, NSAIDs）、关节腔内注射药物治疗、理疗等。随着疾病进展KOA 晚期关节间隙明显狭窄、关节面严重硬化、有大量骨赘形成以及关节肥大及明显畸形[1]，非手术治疗已不能获得明显的效果，往往需要关节置换术等大型、昂贵的手术治疗。因此，骨性关节炎应予早期积极治疗。超声波作为重要的物理因子，治疗KOA的历史已有60余年。超声波是一种机械波，与生物组织相互作用产生的生物学效应包括温热效应、机械效应和空化效应等。传统的治疗采用非聚焦超声，频率较高（兆赫级）、声强较高（W/cm2）的连续的能量输出方式，主要作用于关节周围软组织通过温热效应发挥作用，也称为深部热疗。然而OA病变的核心在于退变的关节软骨，因为软骨位置较深，较高频率的非聚焦超声穿透能力差，在传播过程中能量发生衰减，超声能量极少进入到关节间隙内，难以直接作用于关节软骨，导致治疗效果不确定。国际骨关节炎研究学会（OARSI）发布的2014版指南也将治疗超声判定为疗效“不确定”[4-5]。本研究拟采用穿透性更好的低频聚焦超声，以脉冲输出方式，利用超声波的机械效应治疗KOA，即采用低强度的脉冲聚焦超声（Focused low intensity plused ultrasound, FLIPUS）治疗早中期KOA患者，通过临床随机对照试验（RCT）评价FLIPUS临床治疗KOA的安全性及有效性。

**1材料与方法**

### **1.1** 研究对象

2014年2月至2014年12月，重庆医科大学附属第二医院康复医学科的门诊就诊患者。

18

#### **1.1.1** 诊断标准

参照美国风湿病学会于1995年制定的KOA诊断标准：

①近1月大多时间有膝痛。

②X线示骨赘形成。

③关节腔积液检查符合骨性关节炎。

④年龄大于或等于40岁。

⑤晨僵时间小于或等于30min。

⑥关节活动时有骨摩擦音。

满足①+②条或①+③+⑤+⑥条或①+④+⑤+⑥条者，可诊断为KOA。

#### **1.1.2** 纳入标准

①符合上述诊断标准。

②患者年龄≥40岁，性别不限。

③符合放射学病情分级标准(KelIgren& Lawrence法) I-III级。(见KelIgren&

Lawrence分级)

④6个月内未使用过皮质激素类药物。

⑤2周内未使用非甾体抗炎药、玻璃酸钠、全身慢作用药等相关治疗方案者。

⑥签署受试者知情同意书。

根据临床试验方案中合格受试对象入选标准．受试者上述6项均为“是”，方可入选为本次临床试验的合格受试者。

#### **1.1.3** 排除标准

①风湿和类风湿关节炎、感染性关节炎、痛风性关节炎等其他关节疾患；

②膝关节局部皮肤破溃、皮肤感染、严重手术或外伤性瘢痕、关节局部恶性肿瘤及关节置换术患者。

③排除其他原因引起的关节疼痛及功能障碍的患者。

④伴有活动性消化道溃疡及出血、严重肾、肝功能不全或凝血功能障碍出血倾向的患者。

⑤患有严重器质性心脏病，如心肌梗塞、心力衰竭、严重心律失常、心脏起搏器植入的患者及未经治疗或药物不能控制的高血压患者。

⑥合并严重神经、精神疾病不能配合医生治疗的患者。

19

⑦合并全身胶原结缔组织疾病患者，如系统性红斑狼疮等。

⑧无法理解问卷调查的患者。

附KelIgren&Lawrence分级

|  |  |
| --- | --- |
| 0级 | 正常 |
| 1级 | 关节间隙可疑狭窄，可能有骨赘 |
| 2级 | 关节间隙轻度狭窄，有明显骨赘 |
| 3级 | 关节间隙狭窄明确，关节面硬化，有中等骨赘形成、以及关节可疑变形 |
| 4级 | 关节间隙明显狭窄、关节面严重硬化、有大量骨赘形成以及关节肥大及明显畸形 |

### **1.2** 研究方法

研究流程：

病例诊断

符合排除标

符合纳入标准

FLIPUS+双氯芬酸钠

假 FLIPUS+双氯芬酸钠

随机

治疗后第 3,6,10 次 WOMAC,VAS, Lequesne 评价；治疗前后行关节活动度，步行速度及生活质量评价

治疗后 1,3 月 VAS，Lequesne 随访

数据锁定和统计分析

安全性评价

结局指标评价

20

#### **1.2.1** 研究设计和分组

研究设计：单中心随机对照临床试验。

**分组**：采用随机数字法随机分配受试者至试验组及对照组，两组比例1: 1。**对照组设定**：A组为试验组：FLIPUS+双氯芬酸钠缓释片组，B组为对照组：

假FLIPUS+双氯芬酸钠缓释片组。

**样本量的确定**：根据两样本观察频率比较时样本量估计公式计算样本含量，确定两组样本量共计100例，实验组和对照组各50例。具体如下：



当显著性水平α=0.05，β＝0.10，N为每组所需样本量，根据查阅文献后得知对双氯芬酸钠治疗骨关节炎有效率为76.67%,估计超声+双氯芬酸钠治疗骨关节炎有效率可达到96%。通过公式计算可得：N=45，在受试者中可能有中途失访及各种原因终止的概率，故须增加10%-15%的样本量，校正样本含量N=50，即每组50例患者，故确定2组患者样本量为100例。

**随机方法**：采用计算机软件生成含100个数字的随机数字表，患者就诊序号对应100个随机数字，奇数进入A组（FLIPUS+双氯芬酸钠缓释片组）；偶数进入B组

（假FLIPUS +双氯芬酸钠缓释片组）。若其中一组病例数已经达到50例，则余下的全部归入另一组。

**分配隐藏、盲法设计及实施：**本研究由研究者招募受试者，患者知情同意后由第三方拆封后按照分配方案实施治疗。采取三个层次的盲法。第一，盲受试者。入组受试者不清楚自己的分组情况。此外，每组受试者采用单间治疗室隔开，避免彼此间的交流。第二，盲评价者。评价者由非本次研究人员参与，其本身不清楚分组情况及其意义，并减少与受试者进行不必要的交流。第三，盲统计者。本研究统计者不知晓分组情况及其意义。

**伦理审批：**本研究通过重庆医科大学伦理委员会评审，符合医学伦理学要求，同意进入临床试验，审批号：2014年审（2014005）号（图1-2）。

**临床试验注册**：本研究在WHO国际临床试验注册平台注册中国临床试验注册中心注册，网址：[http: //www. chictr. org. cn/index. aspx](http://www.chictr.org.cn/index.aspx)，注册号：ChiCTR-IPR-

14005748.

21

#### **1.2.2** 研究设备和药品

**超声治疗仪器：**CZG200型超声关节治疗仪（重庆融海超声医学研究中心有限 公司）, 仪器配置有4个可移动调节间距的治疗超声换能器（治疗头），同时发射超声波。换能器频率0.6MHz，重复频率300Hz，额定输出声功率0.6W，治疗头焦平面距离28mm。

**药品：**双氯芬酸钠缓释片（扶他林），北京诺华制药有限公司生产，剂量为75mg/

片。

#### **1.2.3** 治疗方案

###### （1）治疗方法

超声治疗方法：根据患者膝关节大小调整4个超声治疗头的位置，使之分别对应双膝关节内外膝眼及内外侧关节缝隙，治疗采用固定法，治疗档选用康复模式（图1-1），开启功率源，每次治疗20min，设备自动计时。

药物治疗：双氯芬酸钠缓释片，75mg，一日一次，早餐后服用。

###### （2）分组治疗方案

A组：试验组（FLIPUS+双氯芬酸钠缓释片组），采用FLIPUS+双氯芬酸钠缓释片治疗。超声治疗每天1次，每次20min，10次一个疗程，同时口服双氯芬酸钠缓释片75mg，一日一次。

B组：对照组（假FLIPUS +双氯芬酸钠缓释片组），采用与试验组同样程序，不启动功率源，为假超声治疗每天1次，每次20min，10次一个疗程，同时口服双氯芬酸钠缓释片75mg，一日一次。

在整个研究期内，两组受试者均要求不服用其他非甾体抗炎药、玻璃酸钠、氨基葡萄糖等药物，不接受其他物理治疗。

#### **1.2.4** 疗效评价指标

##### **1.2.4.1** 关节疼痛程度判断

采用视觉模拟评分法（Visual Analogue Scale/Score, VAS））评价20m步行疼痛程度。具体做法是：采用10cm长的直尺，直尺的一端为0，表示无痛；直尺的另一端为10，表示剧痛；中间的刻度表示疼痛的不同程度。让病人根据实际疼痛程度在直尺上做记号，表示疼痛评分。

##### **1.2.4.2** **KOA**病情严重程度**WOMAC**评价

22

采用西安大略和麦克马斯特大学骨关节炎调查量表（WOMAC VA3.1）评价关节结构及功能状态。从关节功能、关节僵硬程度和关节疼痛三大方面共24个项目评估KOA的严重程度。分数记录时可以使用VAS （visual analog scale）尺度或0～

4五级尺度。

##### **1.2.4.3** **KOA**病情严重程度**LI**评价

采用勒凯纳指数（Lequesne index, LI）从受累关节的休息痛、运动痛、压痛、行走能力、晨僵及肿胀6个方面评价KOA患者关节疼痛及关节功能受限的情况。LI总分从0分到23分，得分越高，说明病变程度越重。

##### **1.2.4.4** 膝关节活动度测定

采用膝关节伸展-屈曲角度测定膝关节活动范围。患者俯卧位，髋、膝关节伸展。量角器轴心位于腓骨小头，股骨长轴与固定臂保持平行，腓骨长轴与移动臂保持平行。膝关节完全伸直为0°，正常最大屈曲角度为135°。记录患者膝关节最大伸展角度及最大屈曲角度，最大屈曲角度与最大伸展角度之差为膝关节活动范围。

##### **1.2.4.5** 步行速度测定

采用10 m最大速度步行法（maximum walking speed, MWS）测定步行速度。让患者以最快速度行走10米距离，用秒表记录步行时间并精确到0.1秒，共测试3 次取平均值，并以m/min描述MWS评测值。

##### **1.2.4.6** Th活质量评价

采用SF-36健康调查简表评价患者的生活质量。从一般健康状况、生理职能、生理机能、躯体疼痛、社会功能、活力、精神健康以及情感职能等8个维度全面评价KOA患者的生活质量。

#### **1.2.5** 疗效评价标准

按照《新药（西药）临床研究指导原则汇编》中治疗风湿病药物临床研究指导原则的标准对疗效进行综合判断。主要观察指标为VAS评分，以评价FLIPUS 对

OA 患者疼痛的改善情况。次要观察指标为WOMAC 量表分值变化，以评价

FLIPUS对OA患者膝关节功能障碍的改善情况。改善率为治疗后的改变量与治疗前分值的比值；总有效率为显效、有效、好转例数在总样本中所占比例，具体如下：

23



显效：改善率≥75％；有效：75％＞改善率≥50％；好转：50％＞改善率≥

30％；无效：改善率＜30％。



#### **1.2.6** 安全性评价指标

##### **1.2.6.1** 超声治疗相关不良事件

###### （1）皮肤毒性：治疗区疼痛、皮肤红斑、灼伤等表现；

###### （2）神经毒性：髌下小腿内侧面及足内侧缘的皮肤感觉障碍等表现。

##### **1.2.6.2** 药物相关不良事件

（1）头痛、眩晕、皮疹、荨麻疹、药热、血小板减少症或出现原因不明的青肿或出血；

（2）肝、肾功能异常；

（3）恶心、呕吐、腹痛、腹泻、消化不良、食欲减退、消化道溃疡、胃肠道出血、呕血、便血等。

##### **1.2.6.3** 其他意外事件

研究期内出现与研究干预措施无关的其他所有意外事件，如发生全身性疾病及意外伤害等。

研究期间出现以上任何不良事件者，都应详细记录、观察并随访，内容包括出现的不良事件是否与超声治疗及服用双氯芬酸钠缓释片具有量效关系；停止治疗后症状是否缓解或消失；是否进行过相应处理等。

#### **1.2.7** 安全性评价标准

##### **1.2.7.1** 不良事件评价标准

（1）参考《医疗器械监督管理和评价》标准评价严重不良事件的种类、严重程度和发生率。严重的不良反应是指一种伤害或疾病，包括：

①危及生命；

②导致机体功能的永久性伤害或者机体结构的永久性损伤；

24

③必须采取医疗措施才能避免上述永久性伤害或者损伤。

（2）参考SIR分类法（国际介入放射治疗协会，Sacks D et al. JVIR. 2003）评价重要不良事件及一般不良事件的发生率和严重程度：

A：无需治疗，无不良后果

B：有简单的治疗，观察，无不良后果 C：有必要的住院治疗，住院时间不长（＜48h） D：有重要的治疗，护理等级增加，住院时间延长（＞48h）E：永久性后遗症

F：死亡

##### **1.2.7.2** 不良事件与干预措施的相关性评价

不良事件的因果判定：肯定有关、可能有关、无法判定、可能无关和肯定无关5级，前3级总和除以受试者人数，求得不良反应的发生率。具体标准如下：

①可疑不良事件出现与开始治疗时间有无合理的先后关系。

②该治疗方法已知的不良事件类型与发生的可疑不良事件是否符合。

③能否用患者临床症状、合并疗法或其他药物的影响来解释可疑不良事件。

④可疑不良事件在停止治疗后是否减轻或消失。

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 项 目 | 指 标 | | | | |
| ① | ② | ③ | ④ | ⑤ |
| 肯定有关 | ＋ | ＋ | － | ＋ | ＋ |
| 可能有关 | ＋ | ＋ | － | ＋ | ？ |
| 无法确定 | ＋ | ＋ | ± | ± | ？ |
| 可能无关 | ＋ | － | ± | ± | ？ |
| 肯定无关 | － | － | ＋ | － | － |

⑤再次实施该疗法后是否重新出现同样的不良事件。判断标准：按以上5项顺序判断，见下表。

注：＋：肯定；－：否定；±：难以肯定或否定；？：情况不明

25

#### **1.2.8** 观察时点和评价内容

观察时点：治疗前、治疗第3、6、10次后及疗程结束后4周、12周。评价内容：

（1）治疗前、治疗第3、6、10次后，采用VAS、WOMAC、LI评价患者疼痛及关节功能障碍改善情况。

（2）治疗前、治疗第10次后，采用关节活动度及10m步行速度评价关节功能改善情况。

（3）治疗前、治疗第10次后，采用SF-36健康状况调查问卷评价患者生活质量改善情况。

（4）治疗前、疗程结束后4周、12周，采用VAS、Lequesne评分评价远期疗

效。

### **1.3** 统计分析

运用SPSS19.0统计软件进行分析，计量资料以均数±标准差( *x**s*)表示，正态分布资料用独立样本t检验；非正态分布资料用Kruskal-wallis H检验，两两比较采用方差分析方法进行统计分析；计数资料用Chi-Square检验，*P*＜0.05为差异有统计学意义。

## **2** 结果

从2014年2月到2014年12月，根据纳入标准和排除标准共纳入患者100例，因药物不良事件脱落2例，脱落率2%；因违背治疗方案剔除1例，剔除率1%，最终纳入试验共计97例患者，按照研究方案完成治疗和随访。

### **2.1** 患者一般资料

97例患者中男性26例、女性71例；平均年龄为60.08±10.95（40.00-80.00）岁；体重指数（Body mass index, BMI）为24.98±3.02(17.72-31.48)；A组（FLIPUS+双氯芬酸钠缓释片组）和B组（假FLIPUS+双氯芬酸钠缓释片组）两组比较差异均无统计学意义（*P*＞0.05）。KelIgren& Lawrence病情分级，A组1级、2级、3级分别为9例(18.37%)、35例(71.43%)、5例(10.20%)；B组1级、2级、3级分别为12例(25%)、

30例(62.5%)、6例(12.5%)，两组比较差异无统计学意义（*P*=0.496），见表1.1。

26

**表1.1 患者的一般资料**

**Table** **1.1** **Demographic characteristics of two groups**

| 项目 | A 组 | B 组 | P 值 |
| --- | --- | --- | --- |
| 例数 | 49 | 48 |  |
| 性别 男/女 | 10/39 | 16/32 | 0.151 |
| 年龄（岁） | 62.22±10.83 | 57.94±10.75 | 0.074 |
| 体重指数（kg/m2） | 24.79±3.14 | 25.17±2.92 | 0.348 |
| 病程（月） | 144.50±92.12 | 122.78±94.88 | 0.265 |
| 收缩压(mmHg) | 124.25±9.75 | 126.59±10.19 | 0.642 |
| 舒张压(mmHg) | 75.15±6.85 | 74.88±6.98 | 0.705 |
| 空腹血糖(mmol/L) | 10.69±7.54 | 9.67±7.92 | 0.148 |
| KelIgren&Lawrence 病情分级 | | | |
| 1级 | 9(18.37%) | 12(25%) |  |
| 2级 | 35(71.43%) | 30(62.5%) | 0.496 |
| 3级 | 5(10.20%) | 6(12.5%) |  |
| 注：两组比较，差异均无统计学意义（P＞0.05）。 | | |  |

### **2.2.** 患者基线资料

#### **2.2.1** 病情严重程度评价

97例患者治疗前WOMAC 评分为43.38±10.11(15.00-69.00)；LI评分为

7.33±2.44(2.00-15.00)；VAS评分为6.87±1.04（4.00-10.00）；关节活动度为

127.55±6.52（105.00-135.00）；步行速度0.63±0.26(0.25-1.25)。A组与B组两组比

较差异均无统计学意义（*P*＞0.05），见表1.2。

27

**表1.2 治疗前WOMAC, LI, VAS评分,关节活动度及步行速度组间对比**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | A组 | B组 | *P* |
| WOMAC | 44.34±10.79 | 42.42±9.39 | 0.173 |
| LI | 7.56±2.73 | 7.10±2.12 | 0.460 |
| VAS评分 | 6.98±1.06 | 6.76±1.02 | 0.396 |
| 关节活动度 | 127.42±6.36 | 127.68±6.75 | 0.848 |
| 步行速度 | 0.61±0.05 | 0.65±0.29 | 0.871 |
| 注：两组比较，差异均无统计学意义（*P*＞0.05）。 | | |  |

**Table** **1.2** **Comparisons of WOMAC, LI, VAS, ROM and ambulation speed between two groups before Intervention**

#### **2.2.2** Th活质量**SF-36**评价

97例患者治疗前SF-36量表评价一般健康情况、生理机能、生理职能、情感职能、社会功能、躯体疼痛、活力、精神健康8个维度评分，A组与B组两组比较差异均无统计学意义（*P*＞0.05），见表1.3。

**表1.3** **治疗前SF-36量表评价生活质量评分组间对比**

**Table** **1.3** **Comparisons of quality of life between two groups before Intervention**

|  | A组 | B组 | P |
| --- | --- | --- | --- |
| 一般健康情况 | 40.64±13.58 | 43.14±17.12 | 0.506 |
| 生理机能 | 54.30±12.12 | 57.60±14.75 | 0.099 |
| 生理职能 | 38.50±29.11 | 42.90±29.90 | 0.431 |
| 情感职能 | 48.67±22.14 | 43.33±13.88 | 0.335 |
| 社会功能 | 54.75±14.70 | 51.75±13.83 | 0.331 |
| 躯体疼痛 | 31.30±13.03 | 34.46±13.11 | 0.220 |
| 活力 | 44.00±15.12 | 40.80±11.44 | 0.208 |
| 精神健康 | 42.64±13.51 | 41.36±10.74 | 0.603 |
| 注：两组比较，差异均无统计学意义（P＞0.05）。 | | |  |

28

### **2.3** 疗效评价

#### **2.3.1** 关节疼痛评分比较

采用视觉模拟评分法（Visual Analogue Scale/Score, VAS)）评价KOA患者20m

步行疼痛程度。VAS评分结果显示：治疗前A组分值为（6.98±1.06）、B组分值为

（6.98±1.06），两组比较差异无统计学意义（*P=*0.396）。治疗后第3次、第6次、第10次后评价，两组分值均逐渐降低，组内治疗前后比较差异有统计学意义

（*P=*0.000）。治疗第6次后，A组分值为（3.12±1.36）、B组分值为（3.68±1.20），两组比较差异有统计学意义（*P=*0.023）；治疗第10次后，A组分值为（1.54±0.81）、

B组分值为（2.28±1.01），两组比较差异有统计学意义（*P=*0.000）；治疗第10次后分值与治疗前比较，A组改变量为（5.44±0.84）、B组改变量为（4.48±0.84），两组改变量比较差异有统计学意义（*P=*0.000），A组改变量高于B组。见表1.4。

**表1.4 两组各疗效评价时间点VAS评分比较**

**Table** **1.4** **VAS scores of two groups at different time points**

| 组别 | 例数 | 治疗前 | 第 3 次后 | 治疗后  第 6 次后 | 第 10 次后 | 改变量 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| A 组 | 49 | 6.98±1.06 | 5.24±1.30 | 3.12±1.36 | 1.54±0.81 | 5.44±0.84 |
| B 组 | 48 | 6.76±1.02 | 5.48±1.20 | 3.68±1.20 | 2.28±1.01 | 4.48±0.84 |
| P |  | 0.396 | 0.348 | 0.023 | 0.000 | 0.000 |

注：改变量为最后一次评价值与治疗前评价值之差

#### **2.3.2** **KOA**病情严重程度**WOMAC**评价

采用西安大略和麦克马斯特大学骨关节炎调查量表（WOMAC VA3.1）评价

KOA患者关节结构及功能状态。WOMAC评分结果显示：治疗前A组分值为（44.34

±10.79）、B组分值为（42.42±9.39），两组比较差异无统计学意义（*P=*0.173）。治疗后第3次、第6次、第10次后评价，两组分值均逐渐降低，组内治疗前后比较差异有统计学意义（*P=*0.000）。治疗第6次后，A组分值为（19.96±10.03）、B组分值为（23.72±6.51），两组比较差异有统计学意义（*P=*0.003）；治疗第10次后，A组分值为（10.92±8.57）、B组分值为（15.88±5.26），两组比较差异有统计学意义

（*P=*0.000）；治疗第10次后分值与治疗前比较，A组改变量为（33.42±7.99）、B

29

组改变量为（26.54±5.85），两组改变量比较差异有统计学意义（P=0.000），A组改变量高于B组。见表1.5。

**表1.5 两组各疗效评价时间点WOMAC量表评分值**

**Table** **1.5** **WOMAC scores of two groups at different time points**

| 组别 | 例数 | 治疗前 | 第 3 次后 | 治疗后  第 6 次后 | 第 10 次后 | 改变量 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| A组 | 49 | 44.34±10.79 | 32.10±10.66 | 19.96±10.03 | 10.92±8.57 | 33.42±7.99 |
| B组 | 48 | 42.42±9.39 | 32.70±7.73 | 23.72±6.51 | 15.88±5.26 | 26.54±5.85 |
| P |  | 0.173 | 0.689 | 0.003 | 0.001 | 0.000 |

注：改变量为最后一次评价值与治疗前评价值之差

#### **2.3.3** **KOA**病情严重程度Lequesne评价

采用勒凯纳指数（Lequesne index, LI）评价KOA患者关节疼痛及关节功能受限的情况。Lequesne评分结果显示：治疗前A组分值为（7.56±2.73）、B组分值为

（7.10±2.12），两组比较差异无统计学意义（*P=*0.460）。治疗后第3次、第6次、第10次后评价，两组分值均逐渐降低，组内治疗前后比较差异有统计学意义

（*P=*0.000）。治疗第10次后，A组分值为（1.82±1.44）、B组分值为（2.66±1.12），两组比较差异有统计学意义（*P=*0.000）；治疗第10次后分值与治疗前比较，A组改变量为（5.74±1.99）、B组改变量为（4.44±1.39），两组改变量比较差异有统计学意义（P=0.000），A组改变量高于B组。见表1.6。

**表1.6** **两组各疗效评价时间点**Lequesne**评分**

Table 1.6 LI scores of two groups at different time points

| 组别 | 例数 | 治疗前 | 第 3 次后 | 治疗后  第 6 次后 | 第 10 次后 | 改变量 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| A组 | 49 | 7.56±2.73 | 5.42±2.30 | 3.42±1.99 | 1.82±1.44 | 5.74±1.99 |
| B组 | 48 | 7.10±2.12 | 5.24±1.79 | 3.72±1.57 | 2.66±1.12 | 4.44±1.39 |
| P |  | 0.460 | 0.764 | 0.280 | 0.000 | 0.000 |

注：改变量为最后一次评价值与治疗前评价值之差

30

#### **2.3.4** 膝关节活动度治疗前后变化情况

采用膝关节伸展-屈曲角度测定KOA患者膝关节活动范围。结果显示：治疗前

A组膝关节活动范围为（127.42±6.36）度、B组膝关节活动范围为（127.68±6.75）度，两组比较差异无统计学意义（*P=*0.848）。治疗后第10次后评价，两组膝关节活动范围均有所增加，组内治疗前后比较差异有统计学意义（*P=*0.000）。治疗第

10次后，A组膝关节活动范围为（130.78±5.20）度、B组膝关节活动范围为（129.14

±6.27）度，两组比较差异无统计学意义（*P=*0.066）；治疗第10次后膝关节活动范围测量值与治疗前比较，A组改变量为（3.36±2.95）度、B组改变量为（1.46±1.97）度，两组改变量比较差异有统计学意义（P=0.001），A组改变量高于B组。见表1.7。

**表1.7 两组膝关节活动度对比（度）**

**Table 1.7 Comparisons of knee** [**joint range of motion**](http://www.iciba.com/joint_range_of_motion) **between two groups(degree)**

| 组别 | 例数 | 治疗前（度） | 治疗第10次后（度） | 改变量（度） |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| A组 | 49 | 127.42±6.36 | 130.78±5.20 | 3.36±2.95 |
| B组 | 48 | 127.68±6.75 | 129.14±6.27 | 1.46±1.97 |
| P |  | 0.848 | 0.066 | 0.001 |
| 注：改变量为治疗后评价值与治疗前评价值之差 | | | |  |

#### **2.3.5** 步行速度治疗前后变化情况

采用10 m最大速度步行法（maximum walking speed, MWS）测定KOA患者步行速度。结果显示：治疗前A组MWS值为（0.61±0.05）m/min、B组MWS值为

（0.65±0.29）m/min，两组比较差异无统计学意义（*P=*0.871）。治疗后第10次后评价，两组步行速度均有所增加，组内治疗前后比较差异有统计学意义（*P=*0.000）。治疗第10次后，A组MWS值为（0.91±0.26）m/min、B组MWS值为（0.74±0.32）

m/min，两组比较差异有统计学意义（*P=*0.006）；治疗第10次后步行速度测量值与治疗前比较，A组改变量为（0.30±0.16）m/min、B组改变量为（0.12±0.12）m/min，两组改变量比较差异有统计学意义（P=0.001），A组改变量高于B组。见表1.8。

31

**表1.8** **两组步行速度（MWS）对比(m/min)**

Table 1.8 Comparisons of ambulation speed between two groups(m/min)

| 组别 | 例数 | 治疗前(m/min) | 治疗第10次后(m/min) | 改变量(m/min) |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| A组 | 49 | 0.61±0.05 | 0.91±0.26 | 0.30±0.16 |
| B组 | 48 | 0.65±0.29 | 0.74±0.32 | 0.12±0.12 |
| P |  | 0.871 | 0.006 | 0.000 |
| 注：改变量为治疗后评价值与治疗前评价值之差 | | | |  |

#### **2.3.6** Th活质量治疗前后变化情况

采用SF-36量表评价KOA患者治疗前后生活质量变化情况。SF-36量表包括一般健康情况、生理机能、生理职能、情感职能、社会功能、躯体疼痛、活力、精神健康8个维度评分。结果如下：（1）一般健康情况，治疗前A组分值为（40.64

±13.58）、B组分值为（43.14±17.12），两组比较差异无统计学意义（*P=*0.506）。

治疗第10次后，两组分值均有所提高，A组分值为（57.22±10.37）、B组分值为（45.60

±16.55），两组比较差异有统计学意义（*P=*0.007）；治疗第10次后分值与治疗前比较，A组改变量为（16.58±9.29）、B组改变量为（2.46±5.68），两组改变量比较差异有统计学意义（*P*=0.000），A组改变量高于B组。（2）生理机能，治疗前A组分值为（54.30±12.12）、B组分值为（57.60±14.75），两组比较差异无统计学意义

（*P=*0.099）。治疗第10次后，两组分值均有所提高，A组分值为（81.20±11.50）、

B组分值为（73.00±11.56），两组比较差异有统计学意义（*P=*0.000）；治疗第10次后分值与治疗前比较，A组改变量为（26.90±13.32）、B组改变量为（15.40±12.32），两组改变量比较差异有统计学意义（*P*=0.000），A组改变量高于B组。（3）生理职能，治疗前A组分值为（38.50±29.11）、B组分值为（42.90±29.90），两组比较差异无统计学意义（*P=*0.431）。治疗第10次后，两组分值均有所提高，A组分值为

（51.50±26.37）、B组分值为（55.23±19.72），两组比较差异无统计学意义

（*P=*0.873），B组高于A组；治疗第10次后分值与治疗前比较，A组改变量为（13.00

±16.24）、B组改变量为（12.33±17.69），两组改变量比较差异无统计学意义

（*P*=0.631）。（4）情感职能，治疗前A组分值为（48.67±22.14）、B组分值为（43.33

±13.88），两组比较差异无统计学意义（*P=*0.335）。治疗第10次后，两组分值均有

32

所提高，A组分值为（63.20±33.16）、B组分值为（58.21±25.52），两组比较差异无统计学意义（*P=*0.485）；治疗第10次后分值与治疗前比较，A组改变量为（14.53

±12.13）、B组改变量为（14.88±25.03），两组改变量比较差异无统计学意义

（*P*=0.803）。（5）社会功能，治疗前A组分值为（54.75±14.70）、B组分值为（51.75

±13.83），两组比较差异无统计学意义（*P=*0.331）。治疗第10次后，两组分值均有所提高，A组分值为（81.00±15.00）、B组分值为（71.25±14.34），两组比较差异有统计学意义（*P=*0.001）；治疗第10次后分值与治疗前比较，A组改变量为（26.25

±17.34）、B组改变量为（19.50±15.19），两组改变量比较差异有统计学意义

（*P*=0.047），A组改变量高于B组。（6）躯体疼痛，治疗前A组分值为（31.30±13.03）、

B组分值为（34.46±13.11），两组比较差异无统计学意义（*P=*0.220）。治疗第10次后，两组分值均有所提高，A组分值为（68.31±11.56）、B组分值为（55.22±11.32），两组比较差异有统计学意义（*P=*0.000）；治疗第10次后分值与治疗前比较，A组改变量为（37.01±14.44）、B组改变量为（20.76±9.49），两组改变量比较差异有统计学意义（*P*=0.000），A组改变量高于B组。（7）活力，治疗前A组分值为（44.00

±15.12）、B组分值为（40.80±11.44），两组比较差异无统计学意义（*P=*0.208）。

治疗第10次后，两组分值均有所提高，A组分值为（65.62±11.39）、B组分值为（56.70

±10.86），两组比较差异有统计学意义（*P=*0.000）；治疗第10次后分值与治疗前比较，A组改变量为（21.62±12.35）、B组改变量为（15.90±9.41），两组改变量比较差异有统计学意义（*P*=0.024），A组改变量高于B组。（8）精神健康，治疗前A组分值为（42.64±13.51）、B组分值为（41.36±10.74），两组比较差异无统计学意义

（*P=*0.603）。治疗第10次后，两组分值均有所提高，A组分值为（68.06±10.45）、

B组分值为（59.60±10.39），两组比较差异有统计学意义（*P=*0.000）；治疗第10次后分值与治疗前比较，A组改变量为（23.64±12.42）、B组改变量为（18.66±7.55），两组改变量比较差异有统计学意义（*P*=0.007），A组改变量高于B组。见表1.9。

33

**表1.9** **两组生活质量SF-36量表八个维度评分组间对比**

**Table** **1.9** **Comparisons of quality of life items between two groups**

| SF-36维度 | A组 | B组 | P |
| --- | --- | --- | --- |
| 例数 | 49 | 48 |  |
| 一般健康情况 |  |  |  |
| 治疗前 | 40.64±13.58 | 43.14±17.12 | 0.506 |
| 治疗第10次后 | 57.22±10.37 | 45.60±16.55 | 0.007 |
| 改变量 | 16.58±9.29 | 2.46±5.68 | 0.000 |
| 生理机能 |  |  |  |
| 治疗前 | 54.30±12.12 | 57.60±14.75 | 0.099 |
| 治疗第10次后 | 81.20±11.50 | 73.00±11.56 | 0.000 |
| 改变量 | 26.90±13.32 | 15.40±12.32 | 0.000 |
| 生理职能 |  |  |  |
| 治疗前 | 38.50±29.11 | 42.90±29.90 | 0.431 |
| 治疗第10次后 | 51.50±26.37 | 55.23±19.72 | 0.873 |
| 改变量 | 13.00±16.24 | 12.33±17.69 | 0.631 |
| 情感职能 |  |  |  |
| 治疗前 | 48.67±22.14 | 43.33±13.88 | 0.335 |
| 治疗第10次后 | 63.20±33.16 | 58.21±25.52 | 0.485 |
| 改变量 | 14.53±12.13 | 14.88±25.03 | 0.803 |
| 社会功能 |  |  |  |
| 治疗前 | 54.75±14.70 | 51.75±13.83 | 0.331 |
| 治疗第10次后 | 81.00±15.00 | 71.25±14.34 | 0.001 |
| 改变量 | 26.25±17.34 | 19.50±15.19 | 0.047 |
| 躯体疼痛 |  |  |  |
| 治疗前 | 31.30±13.03 | 34.46±13.11 | 0.220 |
| 治疗第10次后 | 68.31±11.56 | 55.22±11.32 | 0.000 |
| 改变量 | 37.01±14.44 | 20.76±9.49 | 0.000 |

34

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |
| **活力** |  |  |  |  |
| 治疗前 | 44.00±15.12 | 40.80±11.44 | 0.208 |  |
| 治疗第10次后 | 65.62±11.39 | 56.70±10.86 | 0.000 |  |
| 改变量 | 21.62±12.35 | 15.90±9.41 | 0.024 |  |
| **精神健康** |  |  |  |  |
| 治疗前 | 42.64±13.51 | 41.36±10.74 | 0.603 |  |
| 治疗第10次后 | 68.06±10.45 | 59.60±10.39 | 0.000 |  |
| 改变量 | 23.64±12.42 | 18.66±7.55 | 0.007 |  |
| 注：两组治疗后SF-36各项评分均较治疗前明显改善，差异具有统计学意义（*P*＜  0.05). 治疗后除生理职能和情感职能外，其他六个维度A组均优于B组，差异具有统计学意义(*P*＜0.05)。在一般健康情况，生理机能，社会功能，躯体疼痛， 活力及精神健康维度治疗后的改变量，A组优于B组，差异具有统计学意义（*P*＜  0.05)。 | | | | |

#### **2.3.7** 症状改善规律

以VAS评分为评价指标计算总有效率，评价FLIPUS对KOA患者疼痛改善的规律。结果显示，A组治疗后第3次、第6次、第10次后评价，总有效率分别为38.78%、

91.84%、100%；B组分别为14.58%、75%、81.25%，A组均优于B组（*P*＜0.05）。

A组治疗6次即可明显缓解关节疼痛，且疗效稳定。见表1.10。

**表1.10** **VAS量表评价治疗总有效率(%)**

Table 1.10 Total efficiency of two groups evaluated by VAS scores

| 第 3 次后 | | | 第 6 次后 | | | 第 10 次后 | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 总有效(%) | 无效(%) |  | 总有效(%) | 无效(%) |  | 总有效(%) | 无效(%) |
| A 组 | 19(38.78) | 30(61.22) |  | 45(91.84) | 4(8.16) |  | 49(100) | 0(0) |
| B 组 | 7(14.58) | 41(85.42) |  | 36(75) | 12(25) |  | 39(81.25) | 9(18.75) |
| P | 0.007 | | 0.025 | | | 0.001 | | |

35

以WOMAC量表评分为评价指标计算总有效率，评价FLIPUS对KOA患者膝关节功能改善的规律。结果显示，A组治疗后第3次、第6次、第10次后评价，总有效率分别为42.86%、97.96%、97.96%；B组分别为6.25%、58.33%、77.08%，A组均优于B组（P＜0.05）。A组治疗6次即可明显改善膝关节功能，且疗效稳定。见表

1.10.

**表1.11** **WOMAC量表评价治疗总有效率(%)**

Table 1.11 Total efficiency of two groups evaluated by WOMAC scores

| 第 3 次后 | | | 第 6 次后 | | | 第 10 次后 | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 总有效(%) | 无效(%) |  | 总有效(%) | 无效(%) |  | 总有效(%) | 无效(%) |
| A 组 | 21(42.86) | 28(57.14) |  | 48(97.96) | 1(2.04) |  | 48(97.96) | 1(2.04) |
| B 组 | 3(6.25) | 45(93.75) |  | 28(58.33) | 20(41.67) |  | 37(77.08) | 11(22.92) |
| P | 0.000 | | 0.000 | | | 0.002 | | |

#### **2.3.8** 远期疗效评价

在疗程结束后4周、12周，通过电话或门诊就诊方式随访患者，采用VAS、

Lequesne评分评价远期疗效。VAS评分结果显示，随着疗程结束时间延长，两组疼痛症状均呈加重趋势，疗程结束后4周、12周A组分值分别为（2.36±1.22）、（6.42

±1.57）；B组分别为（4.12±0.75）、（7.18±0.94），但A组均明显低于B组（*P*＜0.05）。

Lequesne评分结果显示，随着疗程结束时间延长，两组KOA病情均呈加重趋势，疗程结束后4周、12周A组分值分别为（2.76±1.71）、(6.78±2.48)；B组分别为（3.96

±0.90）、（7.84±1.56），但A组均明显低于B组（*P*＜0.05）。

**表1.13** **治疗结束后4周及12周随访情况**

Table 1.13 VAS and Leguesne scores follow-up at 4 and 12week after intervention

|  | VAS评分 |  | Leguesne评分 | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 4周 | 12周 |  | 4周 | 12周 |
| A组 | 2.36±1.22 | 6.42±1.57 |  | 2.76±1.71 | 6.78±2.48 |
| B组 | 4.12±0.75 | 7.18±0.94 |  | 3.96±0.90 | 7.84±1.56 |
| P | 0.000 | 0.007 |  | 0.000 | 0.006 |

36

### **2.4** 安全性评价结果

按研究方案入组并接受治疗的99例患者中，研究期内未发生危及生命、导致机体功能的永久性伤害或者机体结构的永久性损伤的严重不良事件，2例患者因消化道不良事件，退出研究。99例患者中，不良事件发生率19.19%（19/99），其中A组9例发生不良事件，发生率为18.00 %，分别为头晕头痛1例（2.00%）、眩晕1例（2.00%）、上腹部疼痛、恶性呕吐等消化道症状7例（14.00%）；B 组

10例发生不良事件，发生率为20.41%，分别为眩晕1例（2.04%、转氨酶升高 1

例（2.04%）、上腹部疼痛、恶性呕吐等消化道症状8例（16.33%）；两组不良事

件发生率无统计学意义（*P*＞0.05）。19例不良事件均与服用双氯芬酸缓释片（扶他林）肯定相关，与FLIPUS治疗肯定无关。按照国际介入放射治疗协会SIR分类法评价，19例不良事件均为需简单治疗或观察处理，属B类，见表1.14。

**表1.14** **2组受试者不良事件发生情况**

**Table** **1.14** **Situation of adverse events in two groups**

| 不良事件表现 | A组（n=50） | | B组（n=49） | | 与扶他林相关性 | 与 FLIPUS  相关性 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 例数  （N, %） | SIR  分类 | 例数  （N, %） | SIR  分类 |
| 头晕，头痛 | 1(2.00%) | B | 0(0.00%) |  | 肯定相关 | 肯定无关 |
| 眩晕 | 1(2.00%) | B | 1(2.04%) | B | 肯定相关 | 肯定无关 |
| 转氨酶升高 | 0(0.00%) |  | 1(2.04%) | B | 肯定相关 | 肯定无关 |
| 消化道症状 | 7(14.00%) | B | 8(16.33%) | B | 肯定相关 | 肯定无关 |

37

## **3** 讨论

膝骨关节炎（Knee osteoarthritis, KOA）的主要临床表现为关节疼痛及功能障碍，是影响人类健康和引起生理功能障碍的最常见原因之一。世界卫生组织（WHO）制定的“骨与关节10年（2000-2010年）行动计划”中指出必须立即行动，积极预防和治疗肌肉骨骼疾病。在过去的10余年，各国政府投入大量的人力、物力致力于攻克这一国际性的医学难题。遗憾的是，迄今为止，仍没有一种治疗方案能逆转骨关节炎的病程发展。2013年，美国骨科医师协会（AAOS）颁布了《膝关节骨关节炎循证医学指南》（第2版），除了明确推荐自我管理项目，包括力量训练、低强度有氧运动、神经肌肉训练和体力活动外，明确强烈推荐使用非甾体类抗炎药

（Non-steroid anti-inflammatory drug, NSAIDs）治疗症状性膝骨关节炎患者，也即除非出现明确的令人信服的替代方案，临床医生应遵循该项建议。同时，AAOS制定该指南的工作组强调为明确膝关节骨关节炎的治疗需要更好的科学研究。

超声波作为一种物理因子，与药物及手术治疗相比，具有无创，副作用小等优点，早在1952年即应用于OA的治疗[6]。尽管有meta分析认为超声治疗可以缓解膝骨关节炎疼痛，改善膝关节功能[7]，然而传统的超声治疗疗效备受质疑[8, 9]。国际骨关节炎研究学会（OARSI）发布的2014版指南也将治疗超声判定为疗效“不确定”[4, 5]。因此需要从超声波的生物学效应和物理参数作进一步的研究，以寻求骨关节炎治疗的有效方法。

本研究采用低强度的脉冲聚焦超声(Focused low intensity plused

ultrasound, FLIPUS)治疗早中期KOA患者，通过临床随机对照试验(RCT)评价

FLIPUS临床治疗KOA的安全性及有效性。鉴于本研究采用了全新的超声参数，对

FLIPUS治疗KOA有效性尚不明确，因此遵照AAOS指南推荐的药物治疗方案，本研究设定实验组为(FLIPUS+ NSAIDs)治疗与对照组（假FLIPUS+ NSAIDs）进行对比，而非单纯FLIPUS与假FLIPUS进行对比，符合指南和伦理学要求。

### **3.1** **KOA**的病理Th理特征与超声波物理参数的选择

超声波作为一种物理因子，具有良好的聚焦性、穿透性和能量沉积性。超声波在介质中传播，与生物组织相互作用产生机械效应，温热效应及空化效应等生物学效应。超声波的物理学特性随着其物理学参数的变化有较大的差异。超声波

38

的频率和强度是影响超声生物学效应的最重要的参数。研究表明，0.5～13MHz频段内的超声在生物组织内传播时，超声衰竭与超声频率大致呈线性关系，即频率越低，在生物组织中传播时超声衰减越少，穿透力越强[19]。频率为1MHz的超声穿透组织深度约为3-5cm[20]. [Clement [](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hynynen%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12030552)21]等研究表明频率为0.74MHz超声可穿透颅骨。贾小林[22]等的研究也证实0.6MHz的超声较1.0MHz和1.5MHz的超声能更好地促进关节软骨全层损伤的修复。周崑[23]等采用0.6MHz的超声波作用于关节软骨证实0.6MHz的超声波可以穿透关节软骨，通过机械作用促进葡萄糖等小分子物质向软骨内透入。

膝骨关节炎的病理生理学基础是机械性和生物性因素相互作用，使关节软骨细胞、细胞外基质和软骨下骨合成与降解失去平衡，导致关节软骨的软化、纤维化、溃疡、减少、软骨下骨的硬化与象牙化，骨赘形成和软骨下骨囊肿。治疗膝骨关节炎的重点应关注关节软骨。传统非聚焦超声治疗KOA多采用强度为1-2.5W/cm2[9,11-17]，频率为1-1.5MHz[9,11-17]连续的能量输出方式进行治疗，作用机理是利用超声照射关节周围肌肉等软组织，利用超声的温热效应缓解关节周围肌肉等软组织痉挛。虽然该治疗方法取得一定的疗效，但关节周围软组织痉挛仅为继发性表现，而病变的原发病灶关节软骨未得到有效的治疗，也导致临床疗效不确定。从皮肤到关节软骨解剖层次复杂，超声波需要通过皮肤、皮下组织、浅筋膜、深筋膜、肌肉、关节囊、韧带等组织才能达到关节软骨，同时膝关节软骨其周围具有天然的髌骨等骨骼所遮挡，严重影响超声的穿透。加之超声波在穿过各层解剖结构时会发生不同程度的衰减，因此需要从超声波的物理学特性和生物学效应选择适当的超声参数和方法对病变的关节软骨部位进行治疗。

本研究利用超声波的机械效应对关节软骨进行“按摩”治疗。因此，选择超声声强仅为120 mW/cm2，频率为0.6 MHz，甚至远低于多普勒超声声强及频率。Atkins and Duck[18]报道，多普勒成像模式下（3 MHz, 290 mW/cm2）作用10min，软组织升温仅0.21℃。加之本研究采用脉冲输出方式，其温热效应可以忽略不计。单独利用机械效应，减少热效应，可有效降低超声波通道皮肤的能量沉积而避免相应的副作用。

### **3.2** **FLIPUS** 治疗**KOA**患者的临床有效性

KOA主要的临床表现为受累关节疼痛及功能障碍，通过0.6 MHz、120 mW/cm2

39

的FLIPUS联合NSAIDs治疗KelIgren& Lawrence病情I-III级的KOA患者的研究结果表明，FLIPUS联合NSAIDs治疗在减轻疼痛、改善关节功能、减缓病情发展方面优于单独NSAIDs治疗。以VAS评分为评价指标计算总有效率，FLIPUS联合NSAIDs治疗6次即可明显缓解关节疼痛，且疗效稳定。治疗后第6次、第10次评价，总有效率达到91.84%、100%，优于单独NSAIDs治疗的75%、81.25%。以WOMAC量表评分为评价指标计算总有效率，A组治疗6次即可明显改善膝关节功能，且疗效稳定，治疗后第6次、第10次评价，总有效率达到97.96%、97.96%，优于B组的58.33%、

77.08%。

KOA引起受累关节疼痛及功能障碍的原因有以下几点[24]：（1）软骨基质丢失；

（2）内翻或外翻畸形造成关节内侧部位或外侧部位的机械性压迫；（3）关节变形对内侧或外侧副韧带的牵拉；（4）软骨下骨微骨折；（5）关节腔积液对关节囊机械性压迫；

（6）炎症因子刺激关节周围滑囊发生鹅足滑囊炎、髌前滑囊炎等。以上因素相互作用，导致关节内及关节周围韧带、关节囊等结缔组织纤维化，挛缩从而引发受累关节活动受限，功能障碍[17]。在以上众多因素中，关节腔积液及炎症因子刺激被认为是引起KOA疼痛的重要原因之一。目前认为在KOA患者中存在两种性质的疼痛，分别为机械性疼痛与炎症性疼痛[25]。KOA患者由于滑膜炎症导致滑液分泌-吸收平衡障碍而导致关节腔积液，关节腔积液被认为同时参与这两种性质的疼痛。一方面，关节腔积液通过扩张关节囊，能潜在地压迫血管，刺激关节囊压力感受器和支配受压血管的神经而引起机械性疼痛[26-28]。另一方面，关节滑液同时也是炎性物质的储存库，其中的炎症因子（PGE2、NO等）存留在滑膜腔中，持续不断地刺激滑膜伤害性感受器，并刺激关节囊周围的传入神经，参与诱导炎症性疼痛

[29]. 滑液渗出扩张关节囊常常会压迫关节结构，限制关节功能，因此缓解滑膜炎

症，减少关节腔积液及积液中的炎症因子对调节OA病程，缓解疼痛，改善临床症状有主要意义。本研究中，研究组（FLIPUS+双氯芬酸钠缓释片组）与对照组

（FLIPUS+双氯芬酸钠缓释片组）均可以通过减少关节腔积液及积液中的炎症因子而减轻疼痛症状，缓解滑膜炎症。在疗程中治疗第6次后，试验组显示出疗效优势，推测与超声的机械作用有关。超声作用于关节组织中各质点交替压缩与伸张形成交变声压，使组织细胞产生容积和运动的变化，引起较强的细胞浆运动，改变膜电位，促进关节局部的血液和淋巴循环，达到改善新陈代谢、改善滑液循环[23]，

40

促进含有大量炎症物质的关节积液吸收而达到缓解临床症状的目的。此外，超声能通过改善软骨营养，促进软骨基质中II型胶原及蛋白多糖的分泌达到保护关节软骨的目的[23]。

总之，FLIPUS治疗KOA患者临床有效。单独FLIPUS治疗与单独NSAIDs的有效性比较还需要进一步研究。

### **3.3** **FLIPUS**对**KOA**患者Th活质量的改善情况

KOA患者由于膝关节疼痛及功能障碍导致生活质量下降[30,31]。通过0.6 MHz、

120 mW/cm2的FLIPUS联合NSAIDs治疗KelIgren& Lawrence病情I-III级的KOA患者的研究结果表明，FLIPUS联合NSAIDs治疗和单独NSAIDs治疗均可以改善KOA患者生活质量，FLIPUS联合NSAIDs治疗优于单独NSAIDs治疗。

LIPUS能从一般健康情况、躯体疼痛、社会功能、生理机能、活力以及精神健康6个维度改善患者的生活质量。从评价的内容来看，一般健康情况、躯体疼痛、社会功能、生理机能、活力评价均涉及到患者对疼痛及个体活动的评分，而疼痛则是引起焦虑和抑郁障碍的主要原因[32,33]，与精神健康直接相关。疼痛的缓解有助于减轻患者焦虑和抑郁。同时FLIPUS治疗的应用为患者选择治疗方式有个新的希望，可以改善患者由于疾病进展和缺乏理想的治疗方式及担心药物副作用所带来的焦虑情绪，有利于改善患者精神健康。在课题组之前的基础研究证实FLIPUS可以通过改善滑膜分泌与吸收平衡[32]，减少关节腔积液。在临床试验中则表现为患者VAS，WOMAC及LI评分改善优于单独NSAIDs。以上结果表明FLIPUS主要通过缓解KOA患者躯体疼痛，改善关节功能，达到在多个维度改善KOA患者生活质量的目的。

### **3.4** **FLIPUS**治疗**KOA**患者的安全性

本研究采用的0.6 MHz、120 mW/cm2的FLIPUS，其强度甚至低于彩色多普勒超声，因此，理论上是安全的。研究结果证明，FLIPUS作为增加的治疗方法，没有引起不良反应数量和程度的增加。研究中发生的不良事件包括头痛、头晕、眩晕及胃肠道症状，均与服用双氯芬酸钠缓释片肯定有关，与超声治疗肯定无关。

FLIPUS治疗KOA患者是安全的。

进一步的单独FLIPUS治疗KOA患者的研究可进一步验证其安全性，同时建立

41

的循证医学证据为改变KOA的治疗现状，减少非甾体药物的使用，从根本上避免非甾体药物的副作用提供有价值的手段。

### **3.5** 本研究的不足之处

本研究的不足之处在于：（1）研究方案设计研究组干预措施为（FLIPUS+

NSAIDs）而非单独FLIPUS，这一设计方案满足了临床指南和伦理学要求，但研究结果不能回答FLIPUS与NSAIDs治疗KOA，哪一种方法更优。需要进一步研究；（2）超声参数，本研究紧根据超声物理特性和关节软骨病理生理与病理解剖的特殊性选择了频率0.6 MHz、声强120 mW/cm2，是否这一参数最佳尚需进一步比较研究；

#### （3）超声治疗疗程：本研究均采用治疗10次，1次/日的治疗方案。方案的最优设置、患者的依从性和疗程的间隔等还需要进一步研究。（4）本研究选择

KelIgren&Lawrence病情I-III级的KOA患者作为研究对象，对各个分级的疗效差异尚未纳入分析研究，以及对Ⅳ级患者治疗的可行性也需要进一步研究。

#### **4** 小结

FLIPUS能明显缓解KOA受累关节疼痛，改善膝关节功能，增加步行速度并提高患者生活质量，在超声治疗中并无不良事件发生，并且不会增加不良事件的发生率。研究结果表明FLIPUS治疗KOA安全，有效。

42

参考文献

[1] Hamerman D. Aging and osteoarthritis: basic mechanisms[J]. J Am Geriatr Soc 1993, 41: 760-770.

[2] Creamer P, Hochberg MC. Osteoarthritis[J]. Lancet. 1997, 16: 503-508.

[3] McAlindon T, Dieppe P. The medical management of osteoarthritis of the knee: an inflammatory issue[J]. BrJRheumatol. 1990, 29: 471-473.

[[4] Zhang W](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Zhang%20W%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17719803), [Moskowitz RW](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Moskowitz%20RW%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17719803), [Nuki G](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Nuki%20G%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17719803), et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, part I: critical appraisal of existing treatment guidelines and systematic review of current research evidence[J]. [Osteoarthritis Cartilage.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17719803) 2007, 15(9): 981-1000.

[[5] Zhang W](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Zhang%20W%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17719803), [Moskowitz RW](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Moskowitz%20RW%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17719803), [Nuki G](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Nuki%20G%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17719803), et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. [J]. [Osteoarthritis Cartilage.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17719803) 2008, 16(2): 137-162.

[[6] Preux TD](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=PREUX%20TD%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=14904920). Ultrasonic wave therapy in osteoarthritis of the hip joint[J][. Br J Phys Med](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14904920). 1952, 15: 14-19.

[7] A. Loyola-Sánchez, J. Richardson, N. J. MacIntyre. Efficacy of ultrasound therapy for the management of knee osteoarthritis: a systematic review with meta-analysis[J]. Osteoarthritis and Cartilage. 2010, 18: 1117-1126.

[8] Ulus Y, Tander B, Akyol Y. Therapeutic ultrasound versus sham ultrasound for the managementofpatientswith knee osteoarthritis: arandomizeddoble-blind controlled clinical study[J]. Int J Rheum Dis. 2012, 15(2): 197-206.

[9] Welch V, Brosseau L, Peterson J, et al. Therapeutic ultrasound for osteoarthritis of the knee[J]. Cochrane Database Syst Rev. 2001, (3): CD003132.

[10] 周永昌, 郭万学. 超声医学(第四版)[M]. 北京: 科学技术文献出 版社. 2003, 1716-1725.

[[11] Huang MH,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Huang%20MH%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16084806) [Lin YS](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lin%20YS%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16084806), [Lee CL](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lee%20CL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16084806), [Yang RC](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Yang%20RC%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16084806). Use of ultrasound to increase effectiveness of isokinetic exercise or knee osteoarthritis[J]. Arch Phys Med Rehabil. 2005, 86: 1545-1551.43

[[12] Park K,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Park%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17207905) [Hoffmeister B,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hoffmeister%20B%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17207905) [Han DK,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Han%20DK%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17207905) [et](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hasty%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17207905) al. Therapeutic ultrasound effects on interleukin-1beta stimulated cartilage construct in vitro[J]. Ultrasound [Med Biol](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17207905). 2007, 33: 286-295.

[[13] Cakir S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Cakir%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24322433), [Hepguler S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hepguler%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24322433), [Ozturk C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Ozturk%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24322433), [et](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Atamaz%20FC%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24322433) al. Efficacy of therapeutic ultra- sound for the management of knee osteoarthritis: a randomized, controled, and double-blind study[J]. [Am J Phys Med Rehabil](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24322433). 2014, 93: 405-412.

[[14] Cetin N](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Cetin%20N%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18496246), [Aytar A,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Aytar%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18496246) [Atalay A,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Atalay%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18496246) [et](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Akman%20MN%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18496246) al. Comparing hot pack, short-wave diathermy, ultrasound, and TENS on isokinetic strength, pain, and functional status of women with osteoarthritic knees: a single-blind, randomized, controlled trial[J]. Am J Phys Med Rehabil. 2008, 87: 443-451.

[[15] Falconer J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Falconer%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=1581369), [Hayes KW](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hayes%20KW%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=1581369), [Chang RW](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Chang%20RW%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=1581369). Effect of ultrasound on mobility in osteo- arthritis of the knee. A randomized clinical trial[J]. Arthritis Care Res. 1992, 5: 29-35.

[[16] Ulus Y](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Ulus%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22462424), [Tander B,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Tander%20B%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22462424) [Akyol Y](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Akyol%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22462424), et al. Therapeutic ultrasound versus sham ultrasound for the management of patients with knee osteoarthritis: a randomized double-blind controlled clinical study[J]. Int J Rheum Dis. 2012, 15: 197-206.

[17] Ozgönenel L, Aytekin E, Durmuşoglu G. A double-blind trial of clinical effects of [therapeutic ultrasound in knee osteoarthritis[J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18829151) Ultrasound Med Biol. 2009, 35: 44-49

[18] Atkins TJ, Duck FA. Heating caused by selected pulsed Doppler and physiotherapy ultrasound beams measured using thermal test objects[J]. Eur J Ultrasound. 2003, 16: 243-252.

[19] Zhou YC, Guo WX. Ultrasonic medicine. 4th ed[M]. Peking: Science and Technology Literature Press. 2001.

[20] Gann N. Ultrasound: current concepts[J]. Clin Manage. 1991; 11: 64-69.

[[21] Clement GT](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Clement%20GT%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12030552), [Hynynen K](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hynynen%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12030552). A non-invasive method for focusing ultrasound through the human skull[J]. Phys Med Biol. 2002; 47(8): 1219-1236.

[22] 贾小林, 陈文直, 司海鹏, 等. 超声对兔关节软骨损伤的修复作用[J]. 中华创伤杂志, 2004, 20(2): 97-99.

[23] [周崑,](http://210.41.208.102/rewriter/16/http/vvv9bmjh9mds/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e5%91%a8%e5%b4%91&amp;code=14347368%3B08809867%3B15262601%3B15191411%3B) [周伟,](http://210.41.208.102/rewriter/16/http/vvv9bmjh9mds/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e5%91%a8%e4%bc%9f&amp;code=14347368%3B08809867%3B15262601%3B15191411%3B) [陈文直](http://210.41.208.102/rewriter/16/http/vvv9bmjh9mds/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e9%99%88%e6%96%87%e7%9b%b4&amp;code=14347368%3B08809867%3B15262601%3B15191411%3B), 等. 低强度脉冲超声对美蓝渗入正常兔膝关节软骨的作用[J].

44

重庆医科大学学报,2012,37(2):121-124.

[[24] Huang MH,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Huang%20MH%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16342083) [Yang RC](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Yang%20RC%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16342083), [Lee CL,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lee%20CL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16342083) et al. Preliminary Results of Integrated Therapy for Patients With Knee Osteoarthritis. Arthritis Rheum. 2005, 15; 53(6): 812-820.

[25] Chan KKW, Chan LWY. A qualitative study on patients with knee osteoarthritis to evaluate the influence of different pain patterns on patients' quality of life and to find out patients' interpretation and coping strategies for the disease[J]. Rheumatology Reports. 2011, 3: 9-15.

[[26] Schaible HG,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Schaible%20HG%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=4078610) [Schmidt RF](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Schmidt%20RF%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=4078610). [Effects of an experimental arthritis on the sensory properties of fine articular afferent units[J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4078610) J Neurophysiol. 1985, 54(5): 1109-1022.

[27] Grigg P, Schaible HG, Schmidt RF. [Mechanical sensitivity of group III and IV afferents from posterior articular nerve in normal and inflamed cat knee[J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3701397) J Neurophysiol. 1986, 55(4): 635-643.

[28] Schaible HG, Neugebauer V, Schmidt RF. [Osteoarthritis and pain[J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2543081) Semin Arthritis Rheum. 1989, 18(4 Suppl 2): 30-34.

[[29] Smith WL.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Smith%20WL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=1324603) Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action[J]. Am J Physiol. 1992, 263(2): 181-191.

[30] Dawson J, Linsell L, Zondervan K, et al. Impact of persistent hip or knee pain on overall health status in elderly people: a longitudinal population study[J]. Arthritis Rheum. 2005, 53(3): 368-374.

[[31] Palmer KT](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Palmer%20KT%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17114191), [Reading I,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Reading%20I%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17114191) [Calnan M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Calnan%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17114191), et al. Does knee pain in the community behave like a regional pain syndromeProspectivecohortstudyofincidenceandpersistence[J]. AnnRheumDis. 2007, 66(9): 1190-1194.

[32] Kim SH, Kang S. Prevalence and predictors of anxiety and depression among cervical cancer survious in Korea[J]. Int J Gynecol Cancer. 2010, 20(60): 1017-1024.

[33] McDonald MV, Passik SD, Dugan W, et al. Nurses recognition of depression in their patients with cancer[J]. Oneol Nuts Forum. 2009, 26(3): 593-599．

45

# **第二部分** **FLIPUS**治疗**KOA**作用机制研究

骨关节炎(Osteoarthritis, OA)是生物性因素和机械性相互作用，使关节软骨细胞，软骨基质及软骨下骨合成与降解失衡结果。人类OA的复杂病理形态学改变需要几十年才能逐渐展现出现，因此人类早期OA病理变化并不容易被观察到。目前在临床中，我们所面临的问题在于难以对OA进行早期诊断，从而难以进行早期干预治疗。随着病情发展，受累关节出现滑膜炎症，软骨细胞大量凋亡，软骨组织难以再生，导致在病变中晚期保守治疗效果不佳，往往通过外科手术方法进行治疗，导致创伤大，医疗费用高等弊端。

由于保守治疗对晚期OA疗效不佳，因此本研究重点关注超声对早期OA的作用机制。为了研究早期OA的发病机理及病理改变，评价干预措施对早期OA的治疗效果，建立一个稳定而可靠的动物模型是前提。然而，目前还没有建立OA动物模型不同疾病分期的MRI评价标准，这为我们无创地选择早期OA动物模型带来困难。本部分研究旨在通过大体观察明确该动物模型软骨损伤特点与人类OA软骨损伤特点是否一致，同时评价大体观察与MRI评价软骨损伤分级的相关性，从而明确能否借鉴人类OA软骨损伤MRI分级标准评价该动物模型软骨损伤程度，为后续实验选择早期OA动物模型进行超声提供一种无创的评价手段。在此基础上，进一步研究低强度脉冲聚焦超声对退变早期关节软骨的作用机制。

## 第一节 膝骨关节炎动物模型的建立及鉴定

目前的动物模型虽然很难精确地再现人类OA自然病程，但已经足以显示人类OA的许多病理学特征。在众多的建模方法中，Hulth法被证实能导致实验兔膝关节软骨退变[1]。然而值得注意的是，目前报道的Hulth法造成关节失稳所致的KOA模型建模周期不尽相同，观察建模的方法各异[2-7]。既往研究均是通过X线测量关节间隙的狭窄程度来评价该膝关节炎病情严重程度。但X线对软骨显像不敏感，不能发现早期软骨的损伤。鉴于MRI技术无辐射，多序列、多方位成像，软组织对比分辨率高，是观察关节软骨早期病变的理想手段。然而，目前只有大体观察评价该

46

动物模型软骨损伤分级的标准，还没有建立该动物模型的软骨损伤MRI分级评价标准，难以通过无创的手段来选择不同发病阶段的动物模型。因此，我们希望借助

MRI技术无创地评价OA动物的软骨损伤分级。我们借鉴人类软骨损伤MRI分级标准评价该OA动物模型软骨损伤情况的前提是该动物模型能高度复制人类OA的发病，软骨损伤病理特点与人类相一致。因此，本部分采用Hulth法建立新西兰兔OA模型，通过大体观察，把握OA动物模型软骨损伤特点及变化规律，并与与人类OA软骨损伤特点相对比，同时评价大体观察与MRI评价软骨损伤分级的相关性。本节研究希望建立一种无创地鉴定OA动物模型疾病分期的方法，并为下一步实验选择

OA早期病变的动物模型提供依据。

### **1** 材料与方法

### **1.1** 实验材料

#### **1.1.1** 实验动物

6～7月龄成年雄性新西兰兔40只，体重2～2.5kg，各实验兔健康情况良好，双耳及脚趾无体癣，四肢活动灵活，饮食正常，无腹泻，由重庆医科大学动物实验中心提供，生产许可证号：SCXK（渝）2012-0001，使用许可证号：SYXK（渝）2012-0001。各实验兔均单笼饲养，自动饮水，营养颗粒饲料喂养，笼舍温度

20-26℃，12-12小时昼夜循环。

#### **1.1.2** 实验设备及器械

TOMY ES-315高压蒸汽灭菌器（Tokyo，日本）CS101-3EB电热鼓风干燥箱（重庆永恒实验仪器厂）手术器械包（上海医疗器械（集团）有限公司）

1.5T磁共振成像系统（西门子（中国）有限公司）

Digital Diagnost数字化成像系统（飞利浦（中国）投资有限公司）

#### **1.1.3** 实验试剂及药品

注射用青霉素钠粉针（西南药业股份有限公司，重庆，中国）庆大霉素（西南药业股份有限公司，重庆，中国）

戊巴比妥钠（中国医药集团上海化学试剂公司，上海，中国）

75%消毒酒精（重庆天圣制药有限公司，重庆，中国）

47

0.5%碘伏（重庆天圣制药有限公司，重庆，中国）

0.9%生理盐水（重庆天圣制药有限公司，重庆，中国）

### **1.2** 实验方法

#### **1.2.1** 动物分组情况

40只实验兔随机分为正常空白组10只，不造模。手术造模组30只，30只模

型兔分为2周组、4周组及8周组（即2周组、4周组、8周组分别是造模后2周、

4周、8周），每组10只。

#### 1.2.2 手术器械备制

术前24小时将手术刀柄、止血钳、持针器、眼科剪、眼科镊、手术洞巾等器械打包后进行高温高压消毒，高压蒸汽灭菌器温度150℃，持续30min。消毒完毕后取出手术包，放置电热鼓风干燥箱内通风干燥4-6h，待器械干燥后取出备用。

#### **1.2.3** 膝骨关节炎动物模型建立

采用Hulth法[1]建立双膝骨关节炎动物模型（图2-1A-H）。具体方法如下：

3%戊巴比妥钠按1ml/kg剂量经兔耳缘静脉注射，待麻醉满意后仰卧位固定实验兔，双膝关节脱毛，暴露手术区域皮肤，常规碘伏、酒精消毒、铺无菌洞巾。定位准确后，髌韧带内侧旁开1-2cm做一长约2cm纵行切口，依次逐层切开皮肤、皮下至关节囊。然后沿股骨下端及胫骨平台之间缝隙做一横行切口，剪断内侧副韧带，暴露关节囊，直视下小心游离内侧半月板，将其完整取出，眼科剪小心剪断前后交叉韧带。手术过程中严格遵循无菌操作，动作轻柔，避免伤及大血管及关节软骨面。术毕行前后抽屉试验，验证前后交叉韧带已完全断离。0.9%生理盐水冲洗关节腔，直至冲洗液清亮无血液渗出，庆大霉素4万单位关节腔内灌注。逐层缝合关节囊，皮下组织及皮肤。术后青霉素10万U/kg剂量肌肉注射，连续5天，待动物清醒后送回饲养房。

#### 1.2.4 术后动物处理及观察

术后各实验兔双下肢不固定，不限制活动。每日观察动物饮食情况、精神状态、大小便及伤口情况。

#### 1.2.5 动物模型鉴定方法

##### 1.2.5.1 多序列MRI扫描参数

术后2周、4周及8周，各实验兔双膝关节行MRI检查，评价软骨、软骨下

48

骨损伤分级及测量骨赘宽度。Siemens公司1.5T磁共振成像系统扫描参数：应用Flex Loop Small线圈，矢状面扫描；T2-FI3D-we-sag序列评价软骨损伤分级及骨赘形成（TR 19ms, TE 9.5ms，翻转角40°，层厚1mm, FOV read 160mm, FOV phase

100%，扫描矩阵512×512，Voxel size:0.6×0.6×1.0mm，平均激励1次，扫描时间3min25s）；A sagittal 2-D fast spin echo sequence (FSE) with fat saturation序列评价软骨下骨损伤分级(TR: 3000 ms; TE: 98 ms; flip angle: 90°; slice thickness: 1 mm; FOV: 10 cm; matrix size: 384; NEX: 2)[8]. 所得MRI图像由2名独立的，高年资放射科医师分别评价软骨，软骨下骨损伤分级及测量骨赘宽度。

##### **1.2.5.2** 半定量评价软骨损伤分级

将膝关节承重关节面分为内外侧股骨髁前部，中后部及侧部；内外侧胫骨平台前部，中后部及侧部和滑车13个亚分区评价软骨损伤分级，计算各亚分区分级之和为该膝关节软骨损伤的总分。内侧股骨髁及内侧胫骨平台定义为膝关节内侧部分，外侧股骨髁及外侧胫骨平台定义为膝关节外侧部分。软骨损伤分级标准参考Recht标准[9](表2.1)。

**表2.1** **MRI软骨损伤分级标准**

**Table** **2.1** **MRI features of cartilage lesions grading scheme**

| 分级 | MRI 表现 |
| --- | --- |
| 0 | 正常软骨 |
| 1 | 软骨表面光滑，软骨内有异常信号（高信号或低信号） |
| 2 | 软骨表面中度不规则和/或局部软骨丢失小于软骨厚度的 50% |
| 3 | 软骨表面严重度不规则和/或局部软骨丢失大于软骨厚度的 50%但小于  100% |
| 4 | 关节软骨完全丢失，软骨下骨暴露 |

##### **1.2.5.3** 定量测量骨赘大小

在MRI冠状成像面上分别测量内外侧胫骨平台边缘处骨赘最大宽度。取内外侧胫骨平台骨赘宽度的平均值作为该膝关节骨赘宽度。

##### **1.2.5.4** 半定量评价软骨下骨损伤分级

将膝关节分为内外侧股骨髁，内外侧胫骨平台及滑车5个亚分区评价软骨下骨损伤分级，各亚分区选取MRI信号最强处评价软骨下骨损伤情况，计算各亚分区分

49

级之和为该膝关节软骨下骨损伤的总分。内侧股骨髁及内侧胫骨平台定义为内侧部分，外侧股骨髁及外侧胫骨平台定义为外侧部分。软骨下骨损伤分级标准参考Peterfy & Eckstein标准[10, 11](表2.2)。

**表2.2** **MRI评价软骨下骨损伤分级标准**

**Table** **2.2** **MRI features of Subchondral bone edema grading scheme**

| 分级 | MRI 表现 |
| --- | --- |
| 0 | 正常 |
| 1 | 高信号区域面积小于亚分区表面面积的 1/3 |
| 2 | 高信号区域面积小于亚分区表面面积的 2/3 |
| 3 | 高信号区域面积大于亚分区表面面积的 2/3 |

##### **1.2.5.5** 大体观察

完成MRI扫描后，立即给予空气栓塞法处死各组动物，完整取出模型动物膝关节由2名独立的高年资骨外科医生评价软骨损伤情况。大体观察软骨损伤分级标准参考Outerbridge[12]分级标准（表2.3）。用游标卡尺分别测量内外侧胫骨平台处骨赘的最大宽度，取内外侧骨赘最大宽度的平均值作为该膝关节骨赘宽度。

**表2.3 大体观察软骨损伤分级标准**

**Table** **2.3** **macroscopic examination of cartilage lesions grading scheme**

| 分级 | 大体观察表现 |
| --- | --- |
| 0 | 正常软骨 |
| 1 | 软骨变软和/或肿胀 |
| 2 | 软骨表面中度纤维化和/或局部软骨丢失小于软骨厚度的 50% |
| 3 | 软骨表面严重纤维化和/或局部软骨丢失大于软骨厚度的 50%，但未暴  露软骨下骨 |
| 4 | 关节软骨完全丢失，软骨下骨暴露 |

### **1.3** 统计分析

所有数据以均数±标准差( *x**s*)表示，运用SPSS19.0统计软件进行分析，P

50

＜0.05有统计学意义。正态分布的资料采用单因素方差分析；非正态分布的资料采用非参数检验。Weighted kappa检验验证观察者对MRI及大体观察评价软骨损伤分级之间的一致性。Kappa值＜0.00提示一致性差；0.00＜Kappa值＜0.20提示轻度一致；0.21＜Kappa值＜0.40提示大致一致；0.41＜Kappa值＜0.60提示中度一致；0.61

＜Kappa值＜0.80提示大部分一致；0.81＜Kappa值＜0.10提示几乎完全一致；Kappa值＞1.00提示完全一致[13]。

### **2** 结果

### 2.1 术后动物模型行为学观察

通过对疼痛反应，步态及关节肿胀程度观察术后动物的行为及活动能力。术后2周，各实验兔受累关节屈曲（10/10实验兔），关节肿胀致骨性标志物消失（10/10实验兔），不能行走（10/10实验兔）；术后4周，各实验兔受累关节屈曲（10/10实验兔），关节肿胀严重致骨性标志物消失（8/10实验兔），全身颤抖及跛行（10/10实验兔）；术后8周，各实验兔受累关节严重屈曲（10/10实验兔），关节畸形（10/10实验兔），跛行（10/10实验兔）。

### **2.2** **OA**模型软骨损伤评价

MRI图像显示最早在术后2周即可观察到软骨损伤。此时，软骨损伤主要发生在內侧股骨髁及内侧胫骨平台。随着时间的延长，MRI影像及大体观察均可以发现软骨损伤逐渐加重（图2-2,2-3）。术后8周，膝关节的各亚分区均存在软骨损伤，但仍然是内侧部位损伤较外侧严重。见表2.4，2.5。

**表2.4** **MRI成像评价软骨损伤分级及评分**

**Table** **2.4** **Cartilage Lesion Grades and Scores Measured by Magnetic Resonance Imaging**

|  | n | 股骨髁及  滑车 | 胫骨平台 | 内侧部位 | 外侧部位 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 基线  评分分级 | 20 |  |  |  |  |
|  | 2.00±1.00  0.10±0.30 | 1.50±0.71  0.15±0.43 | 2.50±0.71  0.10±0.30 | 1.50±0.71  0.05±0.22 |
| 2 周 | 20 |  |  |  |  |
| 评分 |  | 24.33±2.08  (20:20:20) | 25.50±2.12  (20:20:20) | 26.00±1.41  (20:20:20) | 23.00±1.41  (20:20:20) |
| 分级 |  | 1.22±0.42 | 1.27±0.45 | 1.30±0.46 | 1.15±0.36 |

51

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |
| **4 周** | 20 |  |  |  |
| 评分 | 38.00±4.36\* (20:20:20) | 39.23±2.83 ▲  (20:20:20) | 39.00±1.41 ▼  (20:20:20) | 33.50±0.71 †  (20:20:20) |
| 分级 | 1.90±0.71 ● | 1.94±0.56 ◤ | 1.97±0.46 Ф | 1.90±0.55‡ |
| **8 周** | 20 |  |  |  |
| 评分 | 64.33±3.06 §  (20:20:20) | 67.50±2.12 ¶★  (20:20:20) | 65.00±2.83 ■  (20:20:20) | 62.50±3.54 ▴  (20:20:20) |
| 分级 | 3.12±0.74 # | 3.35±0.75 ￡ | 3.25±0.78 ʄ | 3.00±0.82 ₤ |

股骨髁及滑车软骨损伤评分：8周与4周及2周对比，§*p*=0.000; 4周与2周对比, \**p*=0.02. 股骨

髁及滑车软骨损伤分级：8周与4周及2周对比, #*p*=0.000; 4周与2周对比, *p*=0.000.

胫骨平台软骨损伤评分：8周与4周对比, ¶*p*=0.002; 4周与2周对比，▲*p*=0.022; 8周与2周对比,

★*p*=0.001. 胫骨平台软骨损伤分级： 8 周与4 周及2 周对比，￡*p*=0.000; 4 周与2 周对比,

◤*p*=0.000.

内侧部位软骨损伤评分：8周与4周及2周对比，■*p*=0.000; 4周与2周对比，▼*p*=0.022. 内侧部

位软骨损伤分级：8周与4周及2周对比, ʄ*p*=0.000; 4周与2周对比，Ф*p*=0.022.

外侧部位软骨损伤评分：8周与4周及2周对比，◆*p*=0.000; 4周与2周对比, †*p*=0.022. 外侧部位软骨损伤分级, ₤*p*=0.000; 4周与2周对比，‡*p*=0.022.括号数字表示软骨损伤发生率.

**表2.5 大体观察评价软骨损伤分级及评分**

**Table** **2.5** **Cartilage Lesion Grades and Scores Measured by Macroscopic Examination**

|  | n | 股骨髁及  滑车 | 胫骨平台 | 内侧部位 | 外侧部位 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 基线  评分分级 | 20 |  |  |  |  |
|  | 2.67±0.58  0.12±0.32 | 2.60±0.71  0.20±0.41 | 3.50±0.71  0.18±0.38 | 2.50±0.71  0.08±0.27 |
| 2 周 | 20 |  |  |  |  |
| 评分 |  | 27.67±2.52  (20:20:20) | 25.55±2.52  (20:20:20) | 29.00±1.41  (20:20:20) | 26.00±1.41  (20:20:20) |
| 分级 |  | 1.35±0.48 | 1.42±0.50 | 1.40±0.50 | 1.30±0.46 |
| 4 周 | 20 |  |  |  |  |
| 评分 |  | 38.67±1.53\* (20:20:20) | 39.50±3.54 ▲  (20:20:20) | 41.00±1.41 ▼  (20:20:20) | 37.50±0.71 †  (20:20:20) |
| 分级 |  | 1.93±0.66 ● | 1.98±0.53 ◤ | 2.00±0.66 Ф | 1.88±0.52‡ |
| 8 周 | 20 |  |  |  |  |
| 评分 |  | 68.00±1.73 §  (20:20:20) | 69.00±1.41 ¶★  (20:20:20) | 69.50±0.71 ■  (20:20:20) | 67.50±0.71 ▴  (20:20:20) |
| 分级 |  | 3.47±0.57 # | 3.45±0.5 ￡ | 3.55±0.55 ʄ | 3.38±0.49 ₤ |

股骨髁及滑车软骨损伤评分：8周与4周及2周对比，§*p*=0.000; 4周与2周对比, \**p*=0.000. 股骨

髁及滑车软骨损伤分级：8周与4周及2周对比, #*p*=0.000; 4周与2周对比，●*p*=0.000.

胫骨平台软骨损伤评分：8周与4周对比, ¶*p*=0.001; 4周与2周对比，▲*p*=0.022; 8周与2周对比,

★*p*=0.001. 胫骨平台软骨损伤分级： 8 周与4 周及2 周对比，￡*p*=0.000; 4 周与2 周对比,

◤*p*=0.000.

52

内侧部位软骨损伤评分：8周与4周及2周对比，■*p*=0.000; 4周与2周对比，▼*p*=0.022. 内侧部位软骨损伤分级, ʄ*p*=0.000; 4周与2周对比，Ф*p*=0.000.

外侧部位软骨损伤评分：8周与4周及2周对比，◆*p*=0.000; 4周与2周对比, †*p*=0.022. 外侧部

位软骨损伤分级：8周与4周及2周对比, ₤*p*=0.000; 4周与2周对比, ‡*p*=0.000.

### **2.3** **OA**模型骨赘测定

通过观察发现骨赘形成最明显的部位位于内外侧胫骨平台边缘。术后4周，所有OA模型动物均可发现骨赘形成，随着术后时间发展，骨赘宽度显著增加。见表2.6。

**表2.6** **MRI成像及大体观察测定骨赘宽度**

**Table** **2.6** **Osteophyte Size Measured by MRI & Macroscopic Examination**

|  | n | 胫骨平台内侧  (mm) | 胫骨平台外侧  (mm) | 平均宽度  (mm) |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 基线  MRI 测定  大体观察测定 | 20 |  |  |  |
|  | 0.00  0.00 | 0.00  0.00 | 0.00  0.00 |
| 2 周 | 20 |  |  |  |
| MRI 测定 |  | 1.06±0.34 | 0.87±0.33 | 0.97±0.35 |
| 大体观察测定 |  | 1.43±0.32 | 1.19±0.32 | 1.31±0.34 |
| 4 周 | 20 |  |  |  |
| MRI 测定 |  | 1.87±0.30\* | 1.24±0.38 ▲ | 1.55±0.47 ◤ |
| 大体观察测定 |  | 2.34±0.52 ● | 1.67±0.37 ⊕ | 2.00±0.56 ▽ |
| 8 周 | 20 |  |  |  |
| MRI 测定 |  | 3.21±0.51 § | 2.21±0.47 ¶ | 2.71±0.70 ★ |
| 大体观察测定 |  | 3.73±0.43 # | 2.82±0.45 ￡ | 3.27±0.63 ▼ |

胫骨平台内侧MRI骨赘测定，8周与4周及2周对比，§*p*=0.000; 4周与2周对比, \**p*=0.000. 胫骨平台内侧大体观察骨赘测定，8周与4周及2周对比, #*p*=0.000; 4周与2周对比，●*p*=0.000.

胫骨平台外侧MRI骨赘测定，8周与4周及2周对比, ¶*p*=0.000; 4周与2周对比，▲*p*=0.000. 胫骨平台外侧大体观察骨赘测定，8周与4周及2周对比， ￡*p*=0.000; 4周与2周对比，⊕*p*=0.000.

胫骨平台内侧MRI测定骨赘平均值，8周与4周及2周，★*p*=0.000; 4周与2周对比，◤*p*=0.000. 胫骨平台外侧MRI测定骨赘平均值，8周与4周及2周，▼*p*=0.000; 4周与2周对比，▽*p*=0.000.

### **2.4** **OA**模型软骨下骨损伤评价

软骨下骨损伤在MRI中T2序列表现为长T2信号，术后2周即可在內侧股骨髁及内侧胫骨平台处观察到，其损伤分级及评分随时间增加而逐渐加重（表

2.7）。最初的损伤部分出现在内侧股骨髁及胫骨平台的后部，随着时间推移，外侧股骨髁及外侧胫骨平台均可以发现软骨下骨损伤。然而，内侧部位损伤分级及评分仍高于外侧部位（图2.2）。

53

**表2.7** **MRI评价软骨下骨损伤分级及评分**

**Table** **2.7** **Subchondral Bone Lesion Scores and Grades Measured by MRI**

|  | n | 股骨髁及  滑车 | 胫骨平台 | 内侧部分 | 外侧部分 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 基线  评分分级 | 20 |  |  |  |  |
|  | 0.00  0.00 | 0.00  0.00 | 0.00  0.00 | 0.00  0.00 |
| 2 周 | 20 |  |  |  |  |
| 评分 |  | 15.67±1.53  (17:14:16) | 17.00±1.41  (18:16) | 17.50±0.71  (17:18) | 15.00±1.41  (14:16) |
| 分级 |  | 0.78±0.42 | 0.85±0.36 | 0.90±0.33 | 0.88±0.30 |
| 4 周 | 20 |  |  |  |  |
| 评分 |  | 25.33±2.08\* (20:20:20) | 31.50±2.12 ▲  (20:20) | 30.00±4.24 ▼  (20:20) | 26.5±4.95† (20:20) |
| 分级 |  | 1.27±0.45 ● | 1.58±0.64 ◤ | 1.50±0.64 Ф | 1.33±0.47‡ |
| 8 周 | 20 |  |  |  |  |
| 评分 |  | 40.33±2.52 §  (20:20:20) | 43.00±4.24 ¶★  (20:20) | 44.50±2.12 ■  (20:20) | 39.00±1.41 ▴  (20:20) |
| 分级 |  | 2.01±0.65 # | 2.15±0.74 ￡ | 2.23±0.53 ʄ | 1.95±0.60 ₤ |

股骨髁及滑车软骨下骨损伤评分：8周与4周及2周对比，§*p*=0.000; 4周与2周对比, \**p*=0.001. 股骨髁及滑车软骨下骨损伤分级：8周与4周及2周对比, #*p*=0.000; 4周与2周对比，●*p*=0.000.

胫骨平台软骨下骨损伤评分：8周与4周对比, ¶*p*=0.028; 4周与2周对比，▲*p*=0.015; 8周与2周对比，

★*p*=0.003. 胫骨平台软骨下骨损伤分级：8周与4周及2周对比，￡*p*=0.000; 4周与2周对比，

◤*p*=0.000.

内侧部位软骨下骨损伤评分：8周与4周及2周对比，■*p*=0.000; 4周与2周对比，

▼*p*=0.018. 内侧部位软骨下骨损伤分级, ʄ*p*=0.000; 4周与2周对比，Ф*p*=0.002.

外侧部位软骨下骨损伤评分：8周与4周及2周对比，◆*p*=0.000; 4周与2周对比, †*p*=0.002. 外侧部位软骨下骨损伤分级, ₤*p*=0.000; 4周与2周对比, ‡*p*=0.002.

### **2.5** 评价者一致性及**MRI**与大体观察评价软骨损伤分级相关性分析

通过Weighted kappa检验，2名放射科医师在基线, 2,4,8周评价MRI软骨损伤分级的kappa值分别为1.000, 0.824, 0.835及0.841 (*P*=0.000)；2名高年资骨科

医师在基线, 2,4,8周评价评价大体观察软骨损伤分级的kappa值分别为1.000，

0.861, 0.822及0.822(*P*=0.000)，提示评价者之间具有良好的一致性。MRI评价软骨损伤分级与大体观察一致，2种评价方法具有良好的相关性(*P*=0.000)。见图2-4。

54

**3讨论**

人类骨关节炎的病理形态学改变要经过几十年才能逐渐表现出来，并且还受到遗传、体重、激素水平、患者职业等诸多因素的影响。显而易见的是，人类骨关节炎的自然病变过程不可能在动物模型上精确的复制出来。尽管目前的动物模型还不完善，但已能体现出人类疾病的病理学体征。骨关节炎可累及多个部位关节，其中膝关节由于负重大，活动多成为骨关节炎主要好发部位。因此我们选择最具有代表性的膝骨关节炎作为研究对象。

骨关节炎动物模型的建立需要考虑以下问题：①动物品系；②模型建立的方法；③造模方法的可行性；④造模的周期及成功率；⑤造模方法对诱导的骨关节炎病变是否可逆；⑥如何验证造模成功。

从动物品系来说，适合建立骨关节炎的动物有大型动物，如犬类、猪、羊、马、猴等以及小型啮齿类动物，如鼠类、兔等。一般认为大型动物骨关节炎模型要优于啮齿类动物。人的关节解剖学特征与大型动物，如羊、猴的解剖学特征基本一致，半月板功能相似。但是大型动物生命周期长，活动范围大，容易受到资金、饲养场地和伦理的限制及无法控制的环境因素的影响。在啮齿类动物中，大鼠、小鼠的膝关节小，并且大鼠的骨骺软骨终身不闭合，因此天生就具有抵抗骨关节炎形成的能力，两者都不利于后期超声干预及进行影像学（如MRI、X线等）检查。兔性格温顺，膝关节较大，解剖结构与人类膝关节相近，软骨发生骨关节炎的生化指标与人类一致，为建立骨关节炎模型理想的动物选择。

从模型建立方法来看，目前主流的方法有以下几种：

（1）关节腔内注射化合物诱发骨关节炎：此类化合物包括碘乙酸、皮质类固醇药物、蛋白水解酶（包括木瓜蛋白酶、胶原酶、胰蛋白酶及透明质酸酶）等。然而，向关节腔注射蛋白水解酶一类的药物能诱发急性炎症反应，就能导致软骨破坏，这与人类的骨关节炎发病机理有着明显的区别。有的实验中，向动物关节腔内注射高剂量皮质类固醇药物可以诱发关节病。然而，相反的是，在碘乙酸诱发的骨关节炎实验中，类固醇药物氟羟强泼尼松龙却能减轻软骨纤维化和骨赘形成，同时给豚鼠关节腔注射甲基强的松龙没有发现对关节软骨有明显的破坏作用

[14]. 何况，目前还没有明确的报道说明，要注射多大剂量，持续注射多长时间才

能造成软骨不可逆性的损伤。

55

（2）关节制动诱发骨关节炎模型：目前公认的观点是维持关节软骨的正常结构和功能需要保证关节的正常活动与负重[15-17]。固定肢体使关节制动可以诱发关节软骨变薄[15, 16]、水肿[16-19]、蛋白聚糖含量下降[15-24]、结构改变[16,17,19,23]。这与人类骨关节炎的病理改变相似，故可用于软骨退变的实验研究。然而，该方法的缺点是当夹板或石膏长期牢固固定肢体，容易引起固定肢体的缺血坏死，动物死亡率高。如果允许制动肢体小范围活动，软骨的退变范围又将明显减少[18]。使造模成功率明显降低。

（3）自发性骨关节炎模型：此类模型动物多为小鼠、猪及猴类。因为小鼠关节较小，不适合后期超声干预及MRI观察。猪和猴属于大型动物，本次研究由于受到饲养条件、饲养场地及伦理和资金条件等限制，也不适合作为本次研究对象。

（4）交叉韧带横断及半月板切除术诱导骨关节炎模型：交叉韧带为膝关节内重要的稳定结构，防止胫骨平台向前或者向后滑动。内侧半月板为一月牙形结构，位于股骨髁及胫骨平台之间，具有重要的力学功能，并能增加关节的稳定性和协调性。通过手术方式横断交叉韧带和/或完全切除半月板，改变了膝关节的正常力学结构，使股骨髁软骨面与胫骨平台软骨面直接摩擦，关节软骨局部应力过高导致早期出现软骨退变和其后的骨关节炎形成。研究发现，一方面，小动物的前交叉韧带横断后呈现软骨损伤和滑膜炎病程进展较大动物更为迅速，符合科学研究中在合理的时间内形成骨关节炎病变的实验要求[25, 26]。另一方面，通过手术方式改变了关节正常生物力学结构，骨关节炎的程度只会越来越重，不可逆转。因此，该法技术成熟可靠，动物死亡率低，造模成功率高，是建立骨关节炎动物模型的理想选择。

综合以上的造模方法，根据本实验的具体条件、目的与要求，我们选用了经典的Hulth骨关节炎动物模型，即横断前后交叉韧带及内侧副韧带，完整取出内侧半月板。该造模方法加剧了关节不稳定性，出现大范围的骨赘形成及软骨全层剥脱为特征的进行性骨关节炎病变。该方法最早由Hulth及同事于1970年报道，在术后最早2周即可观察到软骨退变的病理变化，在4周时软骨退变更加明显，可见浅层的软骨剥脱、并出现深达深层的斜行裂隙，关节边缘骨赘形成[1]。同样，Telhag and Lindberg[27]采用Hulth法建立成年家兔骨关节炎模型，观察到最早10天时可以出现骨赘；1个月则出现关节软骨病变，3个月时病变深达钙化层。软骨

56

损伤分级大体观察评价标准已广泛应用于判断OA动物模型的疾病分期[28, 29]。结合之前的研究结果，我们选择术后2周、4周及8周通过大体观察及MRI观察动物模型软骨及软骨下骨损伤程度。通过观察软骨损伤程度、部位及规律我们发现，术后2周即可在所有承重关节面的亚分区发现软骨损伤，软骨损伤分级从2周的

1.30–1.35级，到4周的1.88–2.00级（软骨表面不完整，发生肿胀[12]，再到8周的3.38–3.55级（提示软骨严重损伤，广泛剥落）。说明该动物模型随时造模时间的延长，软骨损伤逐渐加重，并且关节内侧软骨损伤较外侧严重，骨赘逐渐增大，符合人类KOA的发病中软骨损伤的特点。表明该动物模型与人类KOA软骨退变的病理特点类似，能高度复制人类KOA的发病过程。因此，可以借鉴人类软骨损伤MRI分级标准评价该动物模型软骨损伤程度。

在之前的流行性病学研究及临床实验中，通常是通过测量X片上关节间隙的狭窄程度来评价OA的病情严重程度分级，由关节间隙狭窄程度间接评价软骨损伤程度[30-32]。虽然通过X线评价OA分级是目前公认的“金标准”，然而由于X线对软骨组织的不敏感性决定了它只能间接的反应OA病变过程中软骨的丢失程度[33]。一方面，鉴于MRI技术无辐射，多序列、多方位成像，软组织对比分辨率高，在软骨成像中具有不可比拟的优势[34, 35]。另一方面，动物模型在进行影像学检查时处于麻醉状态而无法处于负重状态，多序列MRI成像技术尤其适合于对OA动物模型在非负重条件下进行软骨病变分级评价。

鉴于fat suppressed three dimensional spoil gradient-recalled序列对软骨损坏有较高的敏感性及特异性，在之前的研究中大多数采用此序列评价关节软骨的退变情况[34,36-40]。然而该序列的不足之处在于扫描及成像时间过长（25min或者更长）[39]，麻醉中的动物在较长的成像过程中可能因为MRI噪音而苏醒，关节活动导致成像质量差，图像模糊。为了克服以上缺点，我们选用T2-FI3D-we sag sequence序列，该序列既对软骨损伤有较高的敏感性及特异性，成像时间又短（3mim25s），较传统的成像序列有明显优势。

MRI成像技术已成功运用在ALCT犬OA模型[42]及豚鼠自发性OA模型[43]中评价关节结构变化。然而，运用多序列MRI成像评价新西兰兔OA模型中软骨，软骨下骨及骨赘的病变过程还未见报道。由于之前ACLT犬OA模型建立方法仅仅切断前交叉韧带，相对于本研究OA模型的病情进展要更为缓慢。因此，考虑到兔的体

57

型小，成本低，OA病变程度较快，符合科学研究中需要在短时间内形成OA的要求，该新西兰兔OA模型在将来的科学研究中能极大的缩短实验时间及节约实验经费。

在该动物模型中，软骨损伤在OA病变过程中最早被发现。通过weighted kappa检验，2名放射科医师在基线，2,4,8周评价MRI软骨损伤分级的kappa值分别为1.000, 0.824, 0.835及0.841(*P*=0.000)，提示评价者之间具有良好的一致性[13]。术后2周，软骨损伤几乎在所有承重关节面的亚分区上均可发现，软骨损伤分级从第2周的1.15-1.30级（提示软骨组织肿胀，有少量丢失）到第8周的3.00-3.35级（提示软骨损伤严重，软骨广泛剥落），说明各亚分区的早期软骨损伤分级及评分随着时间推移而逐渐加重，这些MRI表现与大体观察结果相一致。本研究中，T2-FI3D-we sag

sequence序列上发现早期OA病变中软骨发生水肿而肿胀，该研究结果与Calvo等人

[41]在兔半月板切除所致OA模型及Boileau等[42]在ACLT犬OA模型中的研究结果一

致。目前研究证实，在膝关节中软骨损伤的严重程度与骨赘大小成正比[44]。目前的研究结果表明胫骨平台软骨损伤的程度较股骨髁及滑车严重，并且内侧胫骨平台及內侧股骨髁的软骨损伤较外侧部分严重，这一结果与在之前的人类OA临床研究相一致，在人类OA受累的承重关节面上，同样是内侧胫骨平台及內侧股骨髁软骨损伤较外侧部分严重[45-48]。

目前研究认为，软骨下骨损伤（软骨下骨水肿）是引起OA疼痛及疾病进展的重要原因之一。在对OA患者的研究中发现，软骨下骨水肿的范围及严重程度与软骨损伤的程度呈正比[49**]**。此外，在对ACLT犬OA模型中研究发现，软骨下骨水肿的部位与骨髓坏死，纤维化以及骨异常重建的区域密切相关，而这些区域同样位于软骨损伤发生较为严重的内侧部位[42]。这一研究结果也提示软骨下骨水肿与软骨损伤发生具有密切关系。本研究中软骨下骨水肿发生在术后2周，随着时间推移，发生病灶的区域、范围及程度不断增加。软骨下骨损伤分级从基线的0级，到2周的0.78-0.90级，到4周1.27-1.58级，最后到8周1.95-2.23级。然而在2周时，我们观察到软骨下骨水肿阳性率要低于软骨损伤的阳性率，因此可以推断软骨损伤要先于软骨下骨水肿的发生。值得注意的是，在该OA模型中，关节内侧部位的软骨损伤和软骨下骨水肿分级及评分均为大于关节外侧部分。正常兔的膝关节受力方式为关节外侧部位大于内侧部位，这与人的膝关节受力方式不同。之所以该动物模型所表现出来的关节内侧部位损伤程度较外侧部位严重，是因为我们通过手术破

58

坏了兔正常膝关节的解剖结构从而改变了其受力方式，让其与人类膝关节受力方式相一致，因此更好地模拟了人类OA发病过程。

骨赘是OA的典型表现，与关节间隙狭窄、软骨下骨硬化及疼痛密切相关[50-52]。目前有研究证实，在胫股关节与髌股关节中，骨赘发生与软骨损伤密切相关[53]。本研究结果显示，发生于胫骨平台的骨赘宽度要大于发生在股骨髁及滑车的骨赘，并且内侧胫骨平台的骨赘要大于外侧胫骨平台。术后2周、4周、8周，我们通过MRI测量OA模型的骨赘大小要小于实际测量的骨赘大小，这一结果也提示了MRI不能准确评估骨赘大小。

根据Potter [54]等学者的研究表明，软骨损伤0级和1级被认为是OA病变的早期阶段，而2、3、4级被认为是OA病变的中晚期阶段。基于此，我们可以借鉴人类软骨损伤MRI分级标准评价该动物模型软骨损伤程度，明确其KOA的疾病分期，从而为下一步我们选择KOA早期病变的动物模型提供依据。

我们研究的不足之处在于：1.本实验中没有涉及比较MRI与CT或者X线在评价

OA的优点及缺点，在将来的临床实验中将完善这部分内容。2.本研究没有定量测定软骨损伤体积及损伤的面积，在将来的研究中应该对此加以完善。3.本研究没有涉及对OA动物行为学特征的半定量测定，因此在将来的研究中应该对MRI或大体观察软骨损伤分级与OA动物行为学的相关性进行研究分析。

**4小结**

我们采用Hulth法建立实验兔双膝骨关节炎模型，通过大体观察及多序列MRI扫描观察软骨损伤，软骨下骨水肿及骨赘的动态变化。结果提示该动物模型高度模拟人类KOA发病特点，可以通过借鉴人类KOA软骨损伤的MRI分级标准，建立该动物模型的MRI分级标准评价软骨损伤程度，鉴定该动物模型的疾病分期，为下一步实验选择早期病变的KOA模型进行超声干预提供依据。

59

参考文献

[1] Hulth A, Lindberg L, Telhag H. Experimental osteoarthritis in rabbits. Preliminary report[J]. Acta Orthop Scand. 1970, 41: 522-530.

[2] 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[J]. Osteoarthritis Cartilage. 2007, 15: 543-549.

[3] Anetzberger H, Mayer A, Glaser C, et al. Meniscectomy leads to early changes in the mineralization distribution of subchondral bone plate[J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2014, 22: 112-119.

[4] Rijk PC, Tigchelaar-Gutter W, Bernoski FP, et al. Histologic changes in articular cartilage after medial meniscus replacement in rabbits[J]. Arthroscopy. 2004; 20: 911–917.

[5] Messner K, Fahlgren A, Persliden J, et al. Radiographic joint space narrowing and histologic changes in a rabbit meniscectomy model of early knee osteoarthrosis[J]. Am J Sports Med. 2001; 29: 151–160.

[6] Jiang D, Zhao LH, Tian M, et al. Meniscus transplantation using treated xenogeneic meniscal tissue: Viability and Chondroprotection Study in Rabbits[J]. Arthroscopy. 2012, 28: 1147–1159.

[7] Wachsmuth L, Keiffer R, Juretschke HP, et al. In vivo contrastenhanced micro MRI-imaging of experimental osteoarthritis in the rabbit knee joint at 7.1T1[J]. Osteoarthritis Cartilage. 2003, 11: 891–902.

[8] Boileau C, Martel-Pelletier J, Abram F, et al. Magnetic resonance imaging can accurately assess the long-term progression of knee structural changes in experimental dog osteoarthritis[J]. Ann Rheum Dis. 2008, 67: 926-932.

[9] Recht MP, Kramer J, Marcelis S, et al. Abnormalities of articular cartilage in the knee: analysis of available MRI techniques[J]. Radiology. 1993, 187: 473-478.

[10] Peterfy CG, Guermazi A, Zaim S, et al. Whole-Organ Magnetic Resonance Imaging Score (WORMS) of the knee in osteoarthritis[J]. Osteoarthritis

60

Cartilage.2004,12: 177-190.

[11] Eckstein F, Cicuttini F, Raynauld JP, et al. Magnetic resonance imaging (MRI) of articular cartilage in knee osteoarthritis (OA): morphological assessment[J]. Osteoarthritis Cartilage. 2006, 14 Suppl A: 46-75.

[12] Outerbridge RE. The etiology of chondromalacia patellae[J]. 1961. Clin Orthop Relat Res. 2001: 5-8.

[13] Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data[J]. Biometrics. 1977, 33: 159-174.

[14] Williams JM, Brandt KD. Triamcinolone hexacetonide protects agaist fibrillation and osteophyte following chemically induced articular cartilage damage[J]. Arthritis Rheum. 1985, 28: 1267.

[15] Palmoski MJ, Colyer RA, Brandt KD. Joint motion in the absence of normal loading does not maintainning articular cartiage[J]. Arthritis Rheum. 1980, 23: 325.

[16] Palmoski MJ, Brandt KD. running inhibits the reversal of atrophic changes in canine knee cartilage after removal of a leg cast[J]. Arthritis Rheum. 1981, 24: 1329.

[17] Palmoski MJ, Perricone E, Brandt KD. Development and reversal of a proteoglycan aggregation defect in normal canine knee cartilage after immoboilization[J]. Arthritis Rheum. 1979, 22: 508.

[[18] Behrens F,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Behrens%20F%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2703926) [Kraft EL,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kraft%20EL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2703926) [Oegema TR Jr.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Oegema%20TR%20Jr%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2703926) Biochemical changes in articular cartilage after joint immobilization by casting or external fixation[J]. J Orthop Res. 1989, 7(3): 335-343.

[[19] Tammi M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Tammi%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=6221879), [Säämänen AM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=S%C3%A4%C3%A4m%C3%A4nen%20AM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=6221879), [Jauhiainen A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Jauhiainen%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=6221879), et al. Proteoglycan alterations in rabbit knee articular cartilage following physical exercise and immobilization[J]. [Connect Tissue Res.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=(Tammi%2BM%5BAuthor%5D)%2BAND%2BSaamanen%2BAM%5BAuthor%5D%2Band%2Bjauhianen%2BA) 1983, 11(1): 45-55.

[20] Cater B, Lowther DA. Change in the metabolism of the proteoglycans from sheep articular cartilage in ressponse to mechanical stress[J]. Biochim Biophys Acta. 1978, 540: 412.

[[21] KivirantaI,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kiviranta%20I%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=3619962) [JurvelinJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Jurvelin%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=3619962), [TammiM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Tammi%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=3619962), etal. Weightbearingcontrols

61

Glycosaminoglycan concentration and articular cartilage thickness in the knee joints of young beagle dogs[J]. Arthritis Rheum.1987,30(7):801-809.

[[22] Paukkonen K,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Paukkonen%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=3708985) [Jurvelin J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Jurvelin%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=3708985), [Helminen HJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Helminen%20HJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=3708985). Effects of immobilization on the articular cartilage in young rabbits. A quantitative light microscopic stereological study[J]. [Clin Orthop Relat Res.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3708985) 1986, 206: 270-280.

[[23] Säämänen AM,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=S%C3%A4%C3%A4m%C3%A4nen%20AM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2952453) [Tammi M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Tammi%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2952453), [Kiviranta I](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kiviranta%20I%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2952453), et al. Maturation of proteglycanmatrixin articular cartilage under increased and decreased joint loading. A study in young rabbits[J]. Connect Tissue Res. 1987, 16(2): 163-175.

[[24] Videman T](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Videman%20T%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=7211310), [Eronen I](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Eronen%20I%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=7211310), [Friman C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Friman%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=7211310). Glycosaminoglycan metabolism in experimental osteoarthritis caused by immobilization. The effects of different periods of immobilization and follow-up[J]. [Acta Orthop Scand.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7211310) 1981, 52(1): 11-21.

[25] Telhag H, Linderberg L. A method for inducing osteoarthritic changes in rabbits knees[J]. Clinical orthopaedics and related research. 1972, 86: 214-223.

[26] Ehrlich MG, Mankin HJ, Jones H, et al. Biochemical confirmation of an experimental osteoarthritis model[J]. J Bone and Joint Surg. 1975, 57(3): 392-396．

[27] Mankin HJ. The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis[J]. N Engl J Med. 1974, 291: 1335-1340.

[28] Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Otterness IG., et al. Effects of tenidap on canine experimental osteoarthritis. I. Morphologic and metalloprotease analysis [J]. Arthritis Rheum. 1995, 38: 1290–1303.

[29] Pelletier JP, Jovanovic D, Fernades JC, et al. Reduced progression of experimental osteoarthritis *in vivo* by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase[J]. Arthritis Rheum. 1998, 41: 1275–1286.

[30] Wluka AE, Davis SR, Bailey M, et al. Users of oestrogen replacement therapy have more knee cartilage than non-users[J]. Ann Rheum Dis. 2001, 60: 332–336.

[31] Bruyere O, Genant H, Kothari M, et al. Longitudinal study of magnetic resonance imaging and standard X-rays to assess disease progression in osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage. 2007, 15: 98-103.

[32] Guermazi A, Zaim S, Taouli B, et al. MRI finding in knee osteoarthritis[J]. Eur

62

Radiol.2003,13: 1370-1386.

[33] Lund F, Nilsson BE. Radiologic evaluation of chondromalacia patellae[J]. Acta Radiol Diagn (Stockh). 1980, 21: 413–416.

[34] Potter HG, Linklater JM, Allen AA, et al. Magnetic resonance imaging of articular cartilage in the knee. An evaluation with use of fast-spin echo imaging[J]. J Bone Joint Surg Am. 1998, 80: 1276–1284.

[35] Recht MP, Resnick D. MRI imaging of articular cartilage: current status and future directions[J]. AJR Am J Roentgenol. 1994, 163: 283-290.

[36] Sonin AH, Pensy RA, Mulligan ME, et al. Grading articular cartilage of the knee using fast spin-echo proton density-weighted MRI imaging without fat suppression[J]. AJR Am J Roentgenol. 2002, 179: 1159–1166.

[37] Disler DG, McCauley TR, Kelman CG, et al. Fat-suppressed threedimensional spoiled gradient-echo MRI imaging of hyaline cartilage defects in the knee: comparison with standard MRI imaging and arthroscopy[J]. AJR Am J Roentgenol. 1996; 167: 127- 132.

[38] Disler DG. Fat-suppressed three-dimensional spoiled gradient recalled MRI imaging: assessment of articular and physeal hyaline cartilage[J]. AJR Am J Roentgenol. 1997, 169: 1117-1123.

[39] Dupuy DE, Spillane RM, Rosol MS, et al. Quantification of articular cartilage in the knee with three-dimensional MRI imaging[J]. Acad Radiol. 1996, 3: 919-924.

[40] Sittek H, Eckstein F, Gavazzeni A, et al. Assessment of normal patellar cartilage volume and thickness using MRI: an analysis of currently available pulse sequences[J]. Skeletal Radiol. 1996, 25: 55–62.

[[41] Calvo E](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Calvo%20E%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11467895), [Palacios I](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Palacios%20I%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11467895), [Delgado E](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Delgado%20E%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11467895), et al. High-resolution MRI detects cartilage swelling at the early stages of experimental osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage. 2001, 9(5): 463-472.

[42] Boileau C, Martel-Pelletier J, Abram F, et al. Magnetic resonance imaging can accurately assess the long-term progression of knee structural changes in experimental dog osteoarthritis[J]. Ann Rheum Dis. 2008, 67: 926-932.63

[43] Tessier JJ, Bowyer J, Brownrigg NJ, et al. Characterisation of the guinea pig model of osteoarthritis by in vivo three-dimensional magnetic resonance imaging[J]. Osteoarthritis Cartilage. 2003; 11: 845–853.

[44] Ding C, Garnero P, Cicuttini F, et al. Knee cartilage defects: association with early radiographic osteoarthritis, decreased cartilage volume, increased joint surface area and type II collagen breakdown[J]. Osteoarthritis Cartilage. 2005, 13: 198–205.

[45] Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Otterness IG, et al. Effects of tenidap on canine experimental osteoarthritis. I. Morphologic and metalloprotease analysis[J]. Arthritis Rheum. 1995, 38: 1290–1303.

[46] Caron JP, Fernandes JC, Martel-Pelletier J, et al. Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis. Suppression of collagenase-1 expression[J]. Arthritis Rheum. 1996, 39: 1535–1544.

[47] Jovanovic DV, Fernandes JC, Martel-Pelletier J, et al. In vivo dual inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase by ML-3000 reduces the progression of experimental osteoarthritis: suppression of collagenase 1 and interleukin-1beta synthesis[J]. Arthritis Rheum. 2001, 44: 2320–2330.

[48] Pelletier JP, Raynauld JP, Berthiaume MJ, et al. Risk factors associated with the loss of cartilage volume on weight-bearing areas in knee osteoarthritis patients assessed by quantitative magnetic resonance imaging: a longitudinal study[J]. Arthritis Res Ther. 2007, 9: R74.

[49] Raynauld JP, Martel-Pelletier J, Berthiaume MJ, et al. Correlation between bone lesion changes and cartilage volume loss in knee osteoarthritis patients as assessed by quantitative MRI over a 24 month period[J]. Ann Rheum Dis. 2008, 67: 683–688.

[50] Dieppe PA, Cushnaghan J, Shepstone L. The Bristol‗OA500' study: progression of osteoarthritis (OA) over 3 years and the relationship between clinical and radiographic changes at the knee joint[J]. Osteoarthritis Cartilage. 1997, 5: 87–97.

[51] Cicuttini FM, Baker J, Hart DJ, et al. Association of pain with radiological

64

Changes in different compartments and views of the knee joint[J]. Osteoarthritis Cartilage.1996,4: 143–147.

[52] Lanyon P, O'Reilly S, Jones A, et al. Radiographic assessment of symptomatic knee osteoarthritis in the community: definitions and normal joint space[J]. Ann Rheum Dis. 1998, 57: 595–601.

[53] Boega'rd T, Rudling O, Petersson IF, et al. Correlation between radiographically diagnosed osteophytes and magnetic resonance detected cartilage defects in the tibiofemoral joint[J]. Ann Rheum Dis. 1998, 57: 395–407.

[54] Potter HG, Linklater JM, Allen AA, et al. Magnetic resonance imaging of articular cartilage in the knee. An evaluation with use of fast-spin echo imaging[J]. J Bone Joint Surg Am. 1998, 80: 1276–1284.

65

第二节FLIPUS对软骨细胞外基质的作用研究

骨关节炎以关节透明软骨发生进行性退变，进而出现关节软骨破坏为主要特征表现的一种关节软骨的慢性疾病。透明软骨(Hyaline cartilage)是可动关节表面形成的的一种特有的生物学结构。它可以精确地调控关节软骨及周围组织的之间的相互作用，当关节运动时将关节损伤降到最低。关节软骨由细胞外基质([Extracellular matrix](http://www.iciba.com/extracellular_matrix), ECM)和软骨细胞([Chondrocyte](http://www.iciba.com/chondrocyte))所构成。细胞外基质主要由胶原和蛋白聚糖构成。在我们前期的研究中，通过组织学及组织化学观察，业已证实超声能延缓实验性骨关节炎的自然病程[1]。然而，FLIPUS通过何种途径延缓骨关节炎的病程？不同时间的超声干预对细胞外基质中两大主要组成部分——胶原及蛋白聚糖含量的变化有何影响？正是本部分研究的主要内容。

### **1** 材料与方法

### **1.1** 实验材料

#### **1.1.1** 实验动物

本研究选择KOA发病早期的动物模型进行超声干预。根据第二部分第一节的研究结果，采用Hulth法建立新西兰兔双膝骨关节炎模型，纳入30只造模后MRI显示软骨损伤为1级的动物模型为实验对象。

#### **1.1.2** 实验设备及器械

CZG200型超声关节治疗仪（重庆融海超声医学研究中心有限公司）, 仪器配置有1个动物实验专用超声换能器（治疗头），同时发射超声波。换能器频率0.6MHz，重复频率300Hz，额定输出声功率0.6W，治疗头焦平面距离28mm。

医用超声耦合剂TM-100型（南开区成信医用辅助材料厂，中国）石蜡切片机(RM2l35)（Lerca, Germany）

YD-6DL智能型生物组织包埋机机（浙江省金华市益迪医疗设备厂，中国）YD-A智能型生物组织摊片机（浙江省金华市益迪医疗设备厂，中国）

光学显微镜（Olympus, Japan）电子显微镜（Olympus, Japan）

66

#### **1.1.3** 实验试剂及药品

番红O（Amresco, 美国）固绿（Amresco, 美国）

小鼠抗兔II型胶原一抗（Novus，美国）

PV9002二步法免疫组化检测试剂盒（北京中杉金桥生物技术有限公司，中国）复合消化液（博士德生物工程有限公司，中国）

40%甲醛（重庆川东化工有限公司，中国）NaCl（重庆川东化工有限公司，中国）KCl（重庆川东化工有限公司，中国）

Na2P04·12H 2O（重庆川东化工有限公司，中国）

KH2P04（重庆川东化工有限公司，中国）HCl（重庆川东化工有限公司，中国）

无水乙醇（重庆川东化工有限公司，中国）二甲苯（上海化学试剂总厂，中国）

#### **1.1.4** 主要试剂配制

(1) 0.01M PBS: NaCl 8 g, KCl 0.2 g, KH2PO4 0.24g, Na2PO4·12H 2O 3.63 g，

加三蒸水配成1000 ml溶液，PH值7.2～7.4。

（2）4%甲醛溶液：40%甲醛10ml, 0.01M PBS 90ml。

（3）0.05%固绿溶液：固绿0.05g，蒸馏水100ml。

（4）0.1%番红O溶液：番红0.1g，蒸馏水100ml。

（5）1%盐酸酒精分化液：纯HCl1份，95%乙醇99份。

### **1.2** 实验方法

#### **1.2.1** 动物分组

30只模型兔根据超声干预时间不同分为2周组、4周组及8周组（即2周组、

4周组、8周组分别接受超声治疗2周、4周、8周），每组10只。15只正常兔作为空白对照，空白对照组也分为2周组、4周组及8周组，每组5只。

#### **1.2.2** 超声治疗方法

专用兔台固定各组实验兔，暴露双膝关节。选取右侧膝关节为治疗侧，左侧膝关节为对照侧，并作标记。治疗时将超声治疗头紧贴实验兔的治疗侧膝关节髌

67

韧带两侧凹陷部，皮肤与超声头之间涂以超声耦合剂，治疗过程中不移动治疗头的位置。对照侧膝关节髌韧带两侧凹陷部皮肤涂以超声耦合剂，将超声治疗头紧贴该处，进行假治疗。空白对照组不治疗。定期予以治疗部位皮肤脱毛，以免影响超声波穿透组织（图3-1A, B）。

FLIPUS治疗参数为：强度120mW/cm2，频率0.6MHz，脉冲宽度200μs，重复频率300Hz，治疗头焦平面距离28mm，治疗时间每周5天，每天1次，每次20min。

#### **1.2.3** 标本采集

各个组实验兔按设计治疗结束后，耳缘静脉注射空气处死实验兔，取股骨内髁上软骨及胫骨平台上软骨。股骨内髁软骨置于4％甲醛溶液中在室温下固定24小时后，石蜡包埋切片。胫骨平台软骨标本放入3%戊二醛固定，备下一部分透射电镜之用。

#### **1.2.4** 石蜡切片制作

###### （1）标本固定、脱钙及冲洗：4%甲醛溶液4℃固定股骨内侧髁标本24小时，

5%硝酸脱钙，当针尖能轻松穿透骨质为脱钙终点。蒸馏水浸泡后自来水冲洗24小时；

###### （2）脱水：50%乙醇（1h）→75%乙醇（1h）→85%乙醇（1h）→95%乙醇（1-1.5h）

→100%乙醇(1h)；

###### （3）透明：二甲苯/无水乙醇（1:1）混合溶液浸泡20min→二甲苯浸泡30min；

###### （4）浸蜡：组织块浸入石蜡I(52-60℃) 30min→石蜡II(52-60℃) 30min→石蜡III

（52-60℃）30min；

###### （5）包埋：切面向下，每个蜡块包埋一个标本，将热包埋蜡倒入纸盒内，用眼科镊摆好标本后迅速冷却，等表面凝固后将蜡盒转移至冰面加速凝固；

（6）切片、展片及烤片：将蜡块修成正方形，受刀面平行，将修好的蜡块牢固地粘到木板上，木板固定于石蜡切片机，调节切片厚度为5μm，切下蜡片置于生物组织摊片机（预热至40℃），水浴展开后拨去多余的蜡。防脱玻片捞取组织，一张载玻片放1-3块蜡片，放置37℃烘箱烘干。将烘干的玻片置于60℃烤箱内30～

60min烤片后室温保存，以备HE染色、番红O-固绿染色及免疫组织化学检查。

#### **1.2.5** 番红**O-**固绿染色

（1）石蜡切片脱蜡至水；

68

（2）Weigert's苏木素液中染色10min；

（3）蒸馏水充分洗涤10min，去除残留苏木精；

（4）1%盐酸酒精分化15-30s；

（5）蒸馏水充分洗涤以去除残留染液；

（6）0.05%固绿水溶液染色3min；

（7）1%冰醋酸洗涤切片，去除残留固绿；

（8）0.1%番红O染色3min；

（9）95%酒精浸洗，洗去残留番红O；

（10）95%酒精、无水酒精脱水、二甲苯透明，中性树胶封片。

#### **1.2.6** **II**型胶原免疫组织化学

（1）取材及石蜡切片制作同前；

（2）免疫组织化学染色：一抗为小鼠抗兔II型胶原抗体，采用小鼠超敏两步法，具体步骤如下：

①石蜡切片脱蜡至水制作同前；

②根据所应用的一抗的特殊要求，对组织切片进行预处理；

③取出切片，甩掉并擦干切片上组织周围的液体，滴加3%H2O2去离子水孵育10min，以阻断内源性过氧化物酶。自来水冲洗后将切片置入0.01M PBS缓冲液中浸泡5min×3次，取出切片后擦干组织周围的液体，放置于湿盒中；

④抗原修复：滴加复合消化液覆盖组织，将切片放入湿盒内37℃温箱中消化

5～30min，0.01M PBS冲洗3min×3次；

⑤滴加正常ft羊血清封闭液，室温孵育10min；

⑥滴加50～100微升II型胶原一抗工作液，阴性对照加0.01M PBS缓冲液。室温孵育1～2小时或4℃过夜，0.01M PBS冲洗2min×3次；

⑦擦干组织周围PBS，滴加试剂一（Polymer Helper），37℃孵育10～20min，0.01M PBS冲洗，2min×3次；

⑧滴加试剂二（poly-HRP anti-Mouse IgG），室温孵育10～20min，0.01M PBS

冲洗，2min×3次；

⑨擦干组织周围PBS，加预备好的DAB溶液显色，显微镜下观察显色情况，显色后蒸馏水冲洗切片5min；

69

⑩复染、脱水及封片：滴加苏木素染液染色2min，蒸馏水充分冲洗后，入盐酸酒精分色20s，然后蒸馏水冲洗，返蓝液返蓝5min，然后自来水冲洗5～10min。依次将组织玻片放入梯度酒精脱水，二甲苯脱蜡。中性树胶封片，显微镜下观察并摄像。

#### **1.2.7** 光镜观察及分析

将切片置于光学显微镜下观察，关节软骨中细胞外基质被番红O染成红色，软骨下骨区骨细胞外基质被染成蓝色，II型胶原阳性表达为细胞间质成棕黄色或黄褐色。每组各时间点每只实验兔随机选取5张相同组织部位的番红O-固绿、II型胶原免疫组化切片，每张切片随机选取5个高倍视野(10×20)进行分析，应用Image-pro plus 6.0软件对图像进行平均光密度值(average optical density value, AOD value)测定。

### **1.3** 统计分析

所有数据以均数±标准差( *x**s*)表示，运用SPSS19.0统计软件进行分析。正态分布的资料采用单因素方差分析；非正态分布的资料，采用非参数检验，*P*＜0.05为差异有统计学意义。

### **2** 结果

### **2.1** 软骨基质中蛋白聚糖含量

关节软骨细胞外基质中的蛋白聚糖被番红O染成红色（图3-2 A-F）。各组

FLIPUS侧蛋白聚糖含量明显高于对照侧，但仍低于正常侧，差异具有统计学意义

（*P*＜0.05）。随着治疗时间延长，各组FLIPUS侧和对照侧的蛋白聚糖均进行性的减少，但FLIPUS侧的减少程度更轻，即丢失更少。见表3.1。

**表3.1 各组蛋白聚糖含量表达对比**

**Table** **2.1** **Comparison of PGs Expression after Intervention**

| 组别 | N | 蛋白聚糖 AOD 值 | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| FLIPUS 侧▴ | 对照侧▼ | 空白侧 |
| 2 周组 | 10 | 0.11±0.004¶ϼ | 0.06±0.01 | 0.15±0.03 |
| 4 周组 | 10 | 0.06±0.01δψ | 0.04±0.01 | 0.16±0.03 |
| 8 周组 | 10 | 0.03±0.01ЗЯ | 0.01±0.003 | 0.15±0.03 |

蛋白聚糖AOD值：与对照侧相比，¶*P*=0.000；与空白侧相比，ϼ*P*=0.000；与对照侧相比，

δ*P*=0.019；与空白侧相比，ψ*P*=0.000；与对照侧相比，З*P*=0.013；与空白侧相比，Я*P*=0.000。

70

2周，4周，8周组FLIPUS侧蛋白聚糖AOD值对比，◆*P*＜0.01; 2周，4周，8周组对照侧蛋白聚糖AOD值对比，▼*P*＜0.01。

### **2.2** 软骨基质中**II**型胶原含量

关节软骨细胞外基质II型胶原阳性表达为细胞间质成棕黄色或黄褐色（图3-3 A-F）。各组FLIPUS侧II型胶原含量明显高于对照侧，但仍低于正常侧，差异具有统计学意义(*P*＜0.05)。随着治疗时间延长，各组FLIPUS侧和对照侧的II型胶原进行性的减少，但FLIPUS侧的减少程度更轻，即丢失更少。见表3.2。

**表3.2 各组II型胶原含量表达对比**

**Table** **3.1** **Comparison of COL II Expression after Intervention**

| 组别 | N | II 型胶原 AOD 值 | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| FLIPUS 侧■ | 对照侧△ | 空白侧 |
| 2 周组 | 10 | 0.13±0.02※§ | 0.07±0.01 | 0.17±0.03 |
| 4 周组 | 10 | 0.06±0.01ξσ | 0.03±0.01 | 0.18±0.03 |
| 8 周组 | 10 | 0.03±0.01ЭК | 0.01±0.01 | 0.18±0.03 |

II型胶原AOD值：与对照侧相比，※*P*=0.000；与空白侧相比，§*P*=0.000；与对照侧相比，ξ*P*=0.018；与空白侧相比，σ*P*=0.000；与对照侧相比，Э*P*=0.009；与空白侧相比，К*P*=0.000.2周，4周，

8周组FLIPUS侧II型胶原IOD值对比，■*P*＜0.01; 2周，4周，8周组对照侧II型胶原AOD值对比，

△*P*＜0.01.

### **3** 讨论

骨关节炎的主要病变部位在关节软骨，其特征之一即是关节软骨的退变和丢失。关节软骨由软骨细胞及软骨基质构成，其中软骨基质中大部分是水，占据软骨容量的65%～80%[2]。细胞外基质的其他主要成分则由蛋白聚糖和各型胶原构成，使关节面具有刚性与抗变形能力。其中，胶原占关节湿重的30%，胶原中约90%为II型胶原[3, 4]，其余为IX型及XI型等胶原。软骨中的II型、IX型及XI型胶原连接形成纤维网，构成软骨基质的结构支架，是关节软骨的主要成分和抗张力及抗剪切力的决定性因素，因此本次实验主要测量II型胶原含量变化反映胶原含量的变化。

人类骨关节炎最显著的特征是II型胶原和与之相关联的软骨纤维的丢失，而蛋白聚糖的丢失也被认为是骨关节炎的的病理指标[8]。II型胶原的断裂与丢失被认为在OA发病中起到主要作用，也被认为是OA进展链中的关键步骤[10]。蛋白聚糖作为软骨基质的另一重要组成部分，随着OA病情进展而进行性衰竭，并与

71

疾病的严重程度相平行[9]。蛋白聚糖(Proteoglycans, PGs)是一种蛋白核心与糖胺聚糖链[硫酸肝素(HS)、硫酸软骨素(CS)、硫酸皮肤素(DS)或硫酸角质素(KS)]相连接的巨型复合型分子，它散布于II型胶原所构成的纤维网中，约占关节软骨干重的一半，使得关节软骨具有抵抗压力和分散负荷的能力[5]。聚集蛋白聚糖（Aggrecan）是关节软骨可见的蛋白聚糖的主要形式，因其带有负电荷、分子间隙内的渗透力和其在溶液里吸收溶液的倾向，因此聚集蛋白聚糖具有强大的吸水性，吸收水分的重量可超过自身的50倍[6]。聚集蛋白聚糖吸水的特性使之成为一个高度水合的基质，具有水合作用及膨胀压[7]，这一生物学特性赋予软骨以压缩硬度并有抵抗变形和消散负荷的能力。

目前认为终身适度地使用关节是不会引起关节的退变的[10,11]，这是由于软骨基质在降解与修复过程中存在一个动态地平衡。正常情况下，软骨细胞能产生新的软骨基质来代替退变的基质，并维持终身。当外界因素造成软骨细胞外基质的破坏大于软骨细胞的代偿能力时，软骨开始出现进行性退变，这个过程大致分为三个阶段：软骨基质损伤或改变；软骨细胞对软骨损伤的反应及软骨细胞反应消失[12-20]，以上三个阶段可相互重叠。软骨基质的退化主要由蛋白酶引起，也可由软骨细胞释放的基因引起[21]。当软骨发生降解时，II型胶原降解[22]，大分子网状结构断裂或者改变，基质中水分增加，聚集蛋白聚糖迅速消失[23, 24]。这些改变增加了软骨的通透性，降低了其弹性，引起进一步损伤。

### **3.1** 超声的参数选择

作为一种物理因子，超声的生物学效应与其频率、强度、干预时间及占空比息息相关。本实验选用的FIPUS治疗参数为：声强120mW/cm2，频率0.6MHz，脉冲宽度200μs，重复频率300Hz，治疗头焦平面距离28mm，每组5次，每次20min。在超声频率的选择上，考虑到由于超声作用的组织器官为膝关节软骨，其周围具有髌骨等骨骼所遮挡，严重影响超声的穿透，同时关节软骨周围还被组织致密的关节囊、韧带、肌肉等层层包裹。研究表明，0.5～13MHz频段内的超声在生物组织内传播时，超声衰竭与超声频率大致呈线性关系，即频率越低，在生物组织中传播时超声衰减越少，穿透力越强[25]。在我们前期结果表明频率为0.6MHz的超声刺激明显优于频率为1.0MHz和1.5MHz的超声刺激，修复组织中PGs和COL II含量明显较高[26]，提示更低频率的超声能更有效地促进关节软骨全层缺损的修复。因

72

此选用较低频率的超声对处于较深位置的关节软骨有着重要意义。在强度参数的选择上，强度为100-400mW/cm2作用于动物或者人体软骨细胞，能刺激软骨细胞分泌COL II和PGs，降低MMP-1含量[27-32]。在作用时间的选择上，每天20min的超声刺激可促进骨折愈合，治疗骨不连。研究表明超声促进骨折愈合的一个重要方面即是加速了软骨内成骨的过程[33]，因此20min的超声刺激是适宜的[34]。研究发现占空比为20%的超声能促进胶原沉积，并增加愈合组织的抗拉强度[35]。最后，研究发现脉冲超声较连续超声对治疗骨关节炎有更好的疗效[36]。超声在穿过各层解剖结构时都会有不同程度的能量衰减，真正到达关节软骨的能量明显低于皮肤表面的能量。而皮肤对超声能量刺激相对敏感，不可能通过提高皮肤表面的投射能量来达到治疗的目的。故本研究采用低频脉冲聚焦超声技术，在不增加皮肤表面能量沉积的情况下，将足够的超声能量沉积在位置较深的关节软骨表面，达到治疗目的。因此本研究选用的FLIPUS刺激参数为声强120 mW/cm2, 频率0.6 MHz，占空比20%，每天治疗20min。

### **3.2** **FLIPUS**对关节软骨的Th物学效应与作用机制

超声具有机械效应、温热效应及空化效应三大作用。我们在本实验中选用的

FLIPUS采用了间歇地能量输出的方式，能够尽可能地减少超声的温热效应[37,38]。而本实验选用的超声频率(0.6MHz)产生空化效应所需强度则需要100-400W/cm2[26]，这一强度远远超过我们实际使用的强度(120mW/cm2)。因此本实验所采用的

FLIPUS主要作用是其机械效应。

软骨细胞对其所处环境的机械压力非常敏感，关节软骨间断负荷可刺激软骨细胞代谢，引起软骨基质合成增加，从而达到保护软骨基质的目的[5,6,39,40]。贾小林[41]等研究证实超声的机械作用对全层关节软骨缺损修复有促进作用，能促进软骨缺损修复组织中蛋白多糖的合成与释放。Slowman及Allan[42, 43]等学者研究证实施加20秒钟5～15MPa生理范围内的流体静压可促进蛋白多糖和II[胶原](http://www.iciba.com/collogen)的合成长达

2小时，促进SOX-9表达的同时，抑制IL-1β的表达。因此，本研究中的FLIPUS的机械效应所产生的机械应力作用于软骨细胞，是促进其合成软骨基质的主要原因之一。在本实验中研究也发现，经FLIPUS干预后，II型胶原及蛋白多糖含量明显高于对照侧，但仍未达到正常侧水平。随着治疗时间延长，虽然FLIPUS侧和对照侧的II型胶原及蛋白多糖均进行性的减少，但FLIPUS侧的减少程度更轻，说明软

73

骨基质的主要成分丢失更少，软骨退变的程度更轻。该结果提示FLIPUS能增加II型胶原及蛋白多糖的分泌及释放，保护关节软骨，延缓KOA的病变程度。

### **3.3** **FLIPUS**干预后软骨基质主要成分含量的变化规律

软骨基质中的蛋白多糖带有负电荷，番红O才能与蛋白多糖中的硫酸角质素和硫酸软骨素结合，而不与胶原结合。番红O能近乎正染的形式对蛋白多糖着色，只有一个最大吸收光谱，着色的深浅与多聚阴离子的浓度成正比，因此可以间接反映软骨基质中蛋白多糖的含量和分布。当软骨发生进行性退变时，蛋白多糖含量下降，分布发生变化，此时番红O可呈现淡染甚至失染，与之相反，固绿可以胶原纤维结合，不易褪色[44]。免疫组织化学技术，是应用抗原与抗体特异性结合，通过化学反应使[标记抗体](http://baike.baidu.com/view/190475.htm)的[显色剂](http://baike.baidu.com/view/1342816.htm)显色来确定组织细胞内抗原，对其进行定位、定性及半定量的研究。通过染色的深浅程度反映蛋白多糖及II型胶原的含量。我们通过图像分析软件，测定蛋白多糖及II胶原的平均光密度值，达到对蛋白多糖及II胶原的半定量分析。

在本研究发现经FLIPUS干预后，蛋白多糖及II胶原含量明显高于对照侧，但仍低于正常侧。随着治疗时间延长，尽管FLIPUS侧和对照侧的软骨中蛋白多糖及II胶原的含量随时间的延长而逐渐减少，但FLIPUS可明显的延缓其减少的速度。由于软骨基质由软骨细胞分泌，我们推测其原因可能与FLIPUS机械应力刺激促进软骨细胞增殖和/或减少软骨细胞凋亡，改善软骨细胞的功能有关。

**4小结**

FLIPUS（强度120 mW/cm2, 频率0.6 MHz，占空比20%）作用于关节软骨，主要通过其机械效应，能明显延缓OA模型兔软骨基质的主要成分——COL II 及

PGs丢失，达到保护关节软骨，延缓OA自然病程的目的。

74

参考文献

[1] 周崑, 周伟, 贾小林, 等. 超声对实验性早期兔膝关节骨关节炎的作用[J]. 重庆医科大学学报. 2008, 33(1): 6-8.

[2] mankin HJ, Mow VC, Buckwalter JA. et al. Formation and function of arthcular cartilage. In: shldon R, Simon MD, eds. Orthopaedic Basic science. Rosemeont, IL, American Acadamy of Orthopaedic Surgeons, 1994, p1-44.

[[3] Muir H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Muir%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=365155). Cartilage structure and metabolism and basic changes in degenerative joint disease[J]. [Aust N Z J Med.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/365155) 1978, Suppl 1: 1-5.

[[4] Kuettner KE,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kuettner%20KE%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2027129) [Aydelotte MB,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Aydelotte%20MB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2027129) [Thonar EJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Thonar%20EJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2027129). Articular cartilage matrix and structure: a mini review[J]. [J Rheumatol Suppl.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2027129) 1991, 27: 46-8.

[[5] Muir H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Muir%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=365155). Cartilage structure and metabolism and basic changes in degenerative joint disease[J]. [Aust N Z J Med.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/365155) 1978, 8(1): 1-5.

[[6] Allan DA.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Allan%20DA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9646744) Structure and physiology of joints and their relationship to repetitive strain injuries[J]. [Clin Orthop Relat Res.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9646744) 1998, 351: 32-38.

[[7] MaroudasA.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Maroudas%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=5046151) Physicalchemistry andthestructureofcartilage[J]. J Physiol. 1972, 223(1): 21-22.

[8] 陆芸, 张丰春, 李世民, 等. 关节炎与相关疾病[M]. 天津: 天津科技翻译出版公司. 2010, p2107.

[9] Hough AJ. pathology of osteoarthritis[M]. in: Koopman WJ, ed. Arthritis and alliedconditions, 14th ed. Philadephia: Lippincott Williams& Wilkins. 2001, p2167-2194.

[[10] Lane NE,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lane%20NE%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=8210578) [Buckwalter JA](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Buckwalter%20JA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=8210578). Exercise: a cause of osteoarthritis[J][. RheumDisClinNorthAm.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8210578) 1993; 19(3): 617-33.

[[11] Buckwalter JA](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Buckwalter%20JA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=8210578), Lane NE. Aging, sports and osteoarthritis[J]. Sports Med Arthritis Rev. 1996, 4: 276-287.

[12] BuckwalterJA, martinJA. Degenerativejointdisease[M]. Inclinical Symposia. Summit, NJ, Ciba Geigy, 1995, p2-32.

[[13] Lippiello L,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lippiello%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=845251) [Hall D,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hall%20D%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=845251) [Mankin HJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mankin%20HJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=845251). Collagen synthesis in normal and osteoarthritic

75

Human cartilage[J]. [J Clin Invest.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=(Lippiello%20L%5BAuthor%5D)%20AND%20Hall%20D%5BAuthor%5D) 1977,59(4):593-600.

[14] Martin HJ. The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis[J]. N Engl J Med. 1974, 291: 1335-1340.

[15] Hellio Le Graverand MP, Reno C, Hart DA. [Influence of pregnancy on gene expression in rabbit articular cartilage[J]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10197169). Osteoarthritis Cartilage. 1998, 6(5): 341- 350.

[[16] Mankin HJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mankin%20HJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=5580011), [Dorfman H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Dorfman%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=5580011), [Lippiello L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lippiello%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=5580011), et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data[J]. [J Bone Joint Surg Am.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5580011) 1971, 53(3): 523-537.

[[17] Mankin HJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mankin%20HJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=4246573), [Lippiello L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lippiello%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=4246573). Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips[J]. J Bone Joint Surg Am. 1970, 52(3): 424-434.

[[18] Mankin HJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mankin%20HJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=1123375), [Thrasher AZ.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Thrasher%20AZ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=1123375) Water content and binding in normal and osteoarthritic human cartilage[J]. J Bone Joint Surg Am. 1975, 57(1): 76-80.

[[19] Tsuchiya K,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Tsuchiya%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9066532) [Maloney WJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Maloney%20WJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9066532), [Vu T](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Vu%20T%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9066532), et al. Osteoarthritis: differential expression of matrix metalloproteinase-9 MRINA in nonfibrillated and fibrillated cartilage[J]. [J Orthop Res.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9066532) 1997, 15(1): 94-100.

[[20] Mankin HJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mankin%20HJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=7451514), [Johnson ME](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Johnson%20ME%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=7451514), [Lippiello L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lippiello%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=7451514). Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. III. Distribution and metabolism of amino sugar-containing macromolecules[J]. J Bone Joint Surg Am. 1981, 63(1): 131-139.

[[21] Tiku ML,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Tiku%20ML%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2114447) [Liesch JB,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Liesch%20JB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2114447) [Robertson FM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Robertson%20FM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2114447). Production of hydrogen peroxide by rabbit articular chondrocytes. Enhancement by cytokines[J]. J Immunol. 1990, 145(2): 690-696.

[[22] Billinghurst RC](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Billinghurst%20RC%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10728761), [Wu W](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Wu%20W%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10728761), [Ionescu M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Ionescu%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10728761), et al. Comparison of the degradation of type II collagen and proteoglycan in nasal and articular cartilages induced by interleukin-1 and the selective inhibition of type II collagen cleavage by collagenase[J]. Arthritis Rheum. 2000, 43(3): 664-672.76

[[23] Dingle JT](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Dingle%20JT%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=127555), [Horsfield P](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Horsfield%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=127555), [Fell HB](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Fell%20HB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=127555), et al. Breakdown of proteoglycan and collagen induced in pig articular cartilage in organ culture[J]. [Ann Rheum Dis.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/127555) 1975, 34(4): 303-311.

[[24] Cawston TE,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Cawston%20TE%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=7575616) [Ellis AJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Ellis%20AJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=7575616), [Humm G](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Humm%20G%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=7575616), et al. Interleukin-1 and oncostatin M in combination promote the release of collagen fragments from bovine nasal cartilage in culture[J]. [Biochem Biophys Res Commun.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7575616) 1995, 215(1): 377-385.

[25] 周永昌, 郭万学. 超声医学(第四版)[M]. 北京: 科学技术文献出 版社. 2003, 1716-1725．

[26] 贾小林. 低强度脉冲超声促进兔膝关节软骨缺损修复的实验研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2003: 45.

[27] Min BH, Woo JI, [Cho HS](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Cho%20HS%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16882596), et al. Effects of low-intensity ultrasound (LIUS) stimulation on human cartilage explants[J]. Scand J Rheumatol. 2006, 35: 305-311.

[28] Choi BH, Woo JI, Min BH, et al. Low-intensity ultrasound stimulates the viability and matrix gene expression of human articular chondrocytes in alginate bead culture[J]. J Biomed Mater Res A. 2006, 79: 858-864.

[29] Min BH, Choi BH, Park SR. Low intensity ultrasound as a supporter of cartilage regeneration and its engineering[J]. Biotechnol Bioprocess Eng. 2007, 12: 22-31.

[30] Ebisawa K, Hata K, Okada K, et al. Ultrasound enhances transforming growth factor beta-mediated chondrocyte differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. Tissue Eng. 2004, 10: 921-929.

[31] Nishikori T, Ochi M, Uchio Y, et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on proliferation and chondroitinsulfate synthesis of cultured chondrocytes embedded in Atelocollagen gel[J]. J Biomed Mater Res. 2002, 59: 201-206.

[32] Korstjens CM, van der Rijt RH, Albers GH et al. Lowintensity pulsed ultrasound affects human articular chondrocytes in vitro[J]. Med Biol Eng Comput. 2008; 46: 1263-1270.

[33] Azuma Y, Ito M, Harada Y, et a1. Low intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reactions in the fracture. Callus. J Bone Miner Res. 2001, 16: 671-679.77

[[34] Busse JW](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Busse%20JW%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19251751), [Kaur J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kaur%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19251751), [Mollon B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mollon%20B%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19251751), et al. Low intensity pulsed untrasonography for fractures: systematic review of randomised controlled trials[J]. [BMJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Busse%2C%2BJ.W.%2C%2BKaur%2C%2BJ.%2C%2BMollon%2C%2BB.%2C%2BBhandari%2C%2BM.%2C%2BTornetta%2CP.%2C3rd%2C%2BSchunemann%2C%2BH.J.%2C%2BGuyatt%2C%2BG.H.%2C%2B2009.%2BLow%2Bintensity%2Bpulsed%2Bultrasonography%2Bfor%2Bfractures%3A%2Bsystematicreview%2Bof%2Brandomised%2Bcontrolled%2Btrials.%2BBMJ%2C%2B338%3Ab351). 2009, 27: b351.

[35] Robertson VJ, Kerry G, Baker. A Review of therapeutic ultrasound: effectiveness studies[J]. Phys Ther. 2001, 81: 1339-1350.

[[36] Huang MH,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Huang%20MH%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16084806) [Lin YS,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lin%20YS%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16084806) [Lee CL](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lee%20CL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16084806), [et](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Yang%20RC%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16084806) al. Use of ultrasound to increase effectiveness of isokinetic exercise or knee osteoarthritis[J]. Arch Phys Med Rehabil. 2005, 86(8): 1545-1551.

[37] Weishaupt D, Schweitzer ME, Rawool NM, et a1. Effects of low-intensity ultrasound on the diffusion rate of intravenously administered Gd-DTPA in healthy volunteers[J]. Investigative Radiology. 2001, 36(8): 493-499.

[38] Speed CA. Therapeutic ultrasound in soft tissue lesions. Rheumatology. 2001, 40: 1331-1336．

[[39] Treadwell BV,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Treadwell%20BV%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=3536250) [Mankin HJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mankin%20HJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=3536250). The synthetic processes of articular cartilage[J]. [Clin Orthop Relat Res.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3536250) 1986, (213): 50-61.

[[40] Weiss C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Weiss%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=450396). Normal and osteoarthritic articular cartilage[J]. [Orthop Clin North Am.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Weiss%2BC%5BAuthor%5D%2Band%2Bnormal%2Band%2Bostroarthritic) 1979, 10(1): 175-189.

[41] 贾小林, 陈文直, 司海鹏, 等. 超声对兔关节软骨损伤的修复作用[J]. 中华创伤杂志, 2004, 20(2): 97-99.

[[42] Hall AC](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hall%20AC%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=1984038), [Urban JP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Urban%20JP%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=1984038), [Gehl KA](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Gehl%20KA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=1984038). The effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis in articular cartilage[J]. [J Orthop Res.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1984038) 1991, 9(1): 1-10.

[[43] Takahashi I,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Takahashi%20I%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9645953) [Nuckolls GH](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Nuckolls%20GH%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9645953), [Takahashi K,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Takahashi%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9645953) et al. Compressive force promotes sox9, type II collagen and aggrecan and inhibits IL-1beta expression resulting in chondrogenesis in mouse embryonic limb bud mesenchymal cells[J]. J Cell Sci. 1998, 30(111): 2067-2076.

[44] 姬瑞娟, 孙爱军, 施丽英, 等. 番红O-固绿染色在关节组织学应用的改进[J]. 解剖学杂志. 2001, 34(5): 716-718.

78

第三节FLIPUS对软骨细胞增殖-凋亡的作用研究

骨关节炎软骨中细胞数量少，增殖能力差，因此软骨细胞凋亡在骨关节炎发病机制中占有重要的意义。细胞凋亡是指细胞程序性死亡，在骨关节炎的发病中，普遍认为凋亡是OA炎症过程的结果，而不是OA的初始特点。目前已经在骨关节炎患者的软骨中发现了凋亡现象，尤其在软骨表层最为突出[1]，研究认为软骨细胞的凋亡与软骨基质的降解存在关系[2]。

软骨细胞作为关节软骨内的唯一细胞，起到合成与降解细胞外基质的重要作用。当关节软骨受到损伤导致关节软骨基质改变，蛋白聚糖含量降低，胶原纤维网络断裂，软骨细胞能做出适当反应，试图通过增殖和增加软骨基质合成量来修复组织损伤。可以说，软骨基质的合成取决于软骨细胞的―质‖与―量‖上。

在上一节的研究中，我们观察到FLIPUS侧COL II及PGs含量明显高于对照组。我们推测可能与超声刺激后软骨中尽可能多地保留了具有分泌COL II及PGs功能的软骨细胞有关。即超声干预以后，软骨细胞的―量‖可能发生变化。我们推测

FLIPUS是否通过促进软骨细胞增殖，延缓软骨细胞凋亡，尽可能的保留具有分泌功能的软骨细胞数量有关？本节通过免疫组化分析、光镜电镜观察及细胞生物学手段观察FLIPUS对软骨细胞增殖-凋亡影响。

### **1** 材料与方法

### **1.1** 实验材料

#### **1.1.1** 实验动物

同第二部分第二节

#### **1.1.2** 实验设备及器械

CZG200型超声关节炎治疗仪同第二部分第二节

医用超声耦合剂TM-100型（南开区成信医用辅助材料厂，中国）石蜡切片机(RM2l35)（Lerca, Germany）

YD-6DL智能型生物组织包埋机机（浙江省金华市益迪医疗设备厂，中国）

YD-A智能型生物组织摊片机（浙江省金华市益迪医疗设备厂，中国）光学显微镜（Olympus, Japan）

79

电子显微镜（Olympus, Japan）

ITACHI-7500透射电镜(日立，JAPAN)

流式细胞仪(FACSVantage SE,美国)

#### **1.1.3** 实验试剂及药品

小鼠抗兔PCNA一抗（Abcam，美国）

Tunel原位凋亡试剂盒（Roche，美国）

PV9002二步法免疫组化检测试剂盒（北京中杉金桥生物技术有限公司，中

国）

Annexin V-FITC/PI双染法细胞凋亡检测试剂盒（Roche，美国）复合消化液（博士德生物工程有限公司，中国）

40%甲醛（重庆川东化工有限公司，中国）NaCl（重庆川东化工有限公司，中国）KCl（重庆川东化工有限公司，中国）

Na2P04·12H2O（重庆川东化工有限公司，中国）KH2P04（重庆川东化工有限公司，中国）HCl（重庆川东化工有限公司，中国）

无水乙醇（重庆川东化工有限公司，中国）二甲苯（上海化学试剂总厂，中国）

二甲胂酸钠（上海化学试剂总厂，中国）

3%戊二醛（重庆川东化工有限公司，中国）

1%锇酸（重庆川东化工有限公司，中国）醋酸铀（重庆川东化工有限公司，中国）枸橼酸铅（重庆川东化工有限公司，中国）

#### **1.1.4** 主要试剂配制

(1) 0.01M PBS: NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na2P04·12H2O 3.63 g, KH2P04 0.24g，

加三蒸水配成1000ml溶液，PH值7.2～7.4.

###### （2）1%盐酸酒精分化液：纯HCl1份，95%乙醇99份。

###### （3）0.1mmol/L二甲胂酸钠：二甲胂酸钠42.8g，加蒸馏水至1000ml，得到

0.2mol/L的二甲胂酸钠溶液；再取HCl1.7ml加蒸馏水至1000ml，配成0.1N，最

80

后取0.2mol/L二甲胂酸钠溶液500ml及0.1N HCl28ml混合，加蒸馏水至1000ml。

### **1.2** 实验方法

#### **1.2.1** 动物分组

同第二部分第二节。

#### **1.2.2** 超声治疗方法

同第二部分第二节。

#### **1.2.3** 标本采集及检测

同第二部分第二节。

#### **1.2.4** 石蜡切片制作

同第二部分第二节。

#### **1.2.5** **HE**染色

###### （1）二甲苯I脱蜡10min—二甲苯II脱蜡5min；

###### （2）无水乙醇洗去二甲苯1min×2次—95%乙醇1min—90%乙醇1min—85%

乙醇1min—蒸馏水洗2min；

###### （3）苏木精液染色1～5min，流水稍洗去苏木精液1min；

###### （4）1%盐酸乙醇分化20s，蒸馏水洗1min，1%氨水返蓝30s, 蒸馏水冲洗

1min；

###### （5）0.5%伊红液染色20s-5min，蒸馏水稍洗30s；

###### （6）85%乙醇脱水20s—90%乙醇30s，95%乙醇I 1min—95%乙醇II 1min—

100%乙醇I 2min—100%乙醇II 2min；

###### （7）二甲苯Ⅰ2min—二甲苯Ⅱ2min—二甲苯Ⅲ2min；

###### （8）中性树胶封固。

#### **1.2.6** 透射电镜标本制作

透射电镜观察需要的超薄切片由重庆医科大学电镜室制作。具体步骤如下：

###### （1）取材：从内侧胫骨平台软骨面损伤周围削下大小约1×1×1mm 3软骨碎片，迅速投入3%戊二醛4℃固定2～4小时，固定液用0.1mmol/L二甲胂酸纳缓冲液配置，pH值7.3；

###### （2）同上缓冲液漂洗4h以上，4℃，换5次漂洗液。分出小部分软骨碎片保留备用；

81

###### （3）固定：1%锇酸-0.1mmol/L二甲胂酸钠缓冲液固定2小时；

###### （4）用缓冲液或双蒸馏水漂洗5min；

###### （5）脱水：50%、70%、80%、90%乙醇各10min，换90%丙酮10min，纯丙酮10min×3次；

###### （6）浸透：临时配置环氧树脂包埋剂。按下列浓度浸透，丙酮：包埋剂=1: 1，浸透1h，丙酮：包埋剂=1: 3，浸透3h或过夜；纯包埋剂浸透1h；

###### （7）包埋：用新配放胶囊或平板内包埋标本，加上标号标签；

###### （8）聚合：35℃过夜，65℃24～58h；

###### （9）切片：先切1-2μm半薄切片，对照定位后，行60～80nm超薄切片；

（10）染色：醋酸铀饱和水溶液染色后，枸橼酸铅染色；

（11）电镜观察：先熟悉软骨组织的超微结构和超微病理变化特点，选好范围并摄像，做好观察记录。

#### **1.2.7** **PCNA**免疫组织化学制作

（1）取材及石蜡切片制作同前。

（2）免疫组织化学染色：一抗为小鼠抗兔PCNA抗体，采用小鼠超敏两步法，具体步骤如下：

①脱蜡、水化组织切片制作同前；

②根据所应用的一抗的特殊要求，对组织切片进行预处理；

③取出切片，甩掉并擦干切片上组织周围的液体，滴加3%H2O2去离子水孵育10min，以阻断内源性过氧化物酶。蒸馏水冲洗后再将切片置入0.01M PBS缓冲液中浸泡5min×3次，擦干组织切片周围的液体后放于湿盒中；

④抗原修复：滴加复合消化液覆盖组织，将切片放入湿盒内37℃温箱中消化5～30min，0.01M PBS冲洗3min×3次；

⑤滴加正常ft羊血清封闭液，室温孵育10min；

⑥滴加50～100微升PCNA一抗工作液，阴性对照不加一抗工作液，而加

0.01M PBS缓冲液。室温或37℃孵育1～2小时或4℃过夜，0.01M PBS冲洗，

2min×3次；

⑦擦干组织周围PBS，滴加试剂一（Polymer Helper），37℃孵育10～20min，0.01M PBS冲洗，2min×3次；

82

⑧滴加试剂二（poly-HRP anti-Mouse IgG），37℃孵育10～20min，0.01M PBS

冲洗，2min×3次；

⑨擦干组织周围PBS，加预备好的DAB溶液显色，显微镜下观察显色情况，显色后蒸馏水冲洗切片5min；

⑩复染、脱水及封片，显微镜下观察并摄像。

#### **1.2.8** 脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法

Tunel(TdT-mediated dUTP nick end labeling)细胞凋亡检测是用来检测组织细胞在凋亡早期过程中细胞核DNA的断裂情况。其原理是荧光素标记的dUTP在脱氧核糖核苷酸末端转移酶的作用下，可以连接到凋亡细胞中断裂DNA的3‘-OH末端，并与连接辣根过氧化酶(horse-radish peroxidase, HRP)的荧光素抗体特异性结合，后者又与HRP底物二氨基联苯胺(DAB)反应产生深棕色的颜色反应，特异准确地定位正在凋亡的细胞。具体操作步骤如下：

（1）将软骨组织石蜡切片置于染色缸中，二甲苯5min×2次；

（2）分别用梯度酒精浸洗脱水，每次3～5min；

（3）用Proteinase K工作液在室温下处理软骨组织15～30min；

（4）PBS漂洗组织切片2次；

（5）FLIPUS组用TdT50μl +荧光素450μl标记的dUTP液混匀；而阴性对照组仅加荧光素50μl标记的dUTP液，阳性对照组先加入DNase1100μl，15～25℃环境中反应10min；

（6）加TUNEL反应混合液50μl（阴性对照组仅加荧光素标记的dUTP 液

50μl）于软骨组织上，置于湿盒中载室温下反应1h；

（7）PBS漂洗组织切片3次；

（8）擦干玻片后在标本上加converter-POD50μl，置于暗湿盒中在室温下反应30min；

（9）PBS漂洗3次；

（10）在软骨组织处加DAB底物50～100μl，置于15～25℃环境中反应10min；

（11）PBS漂洗3次；

（12）软骨组织复染，蒸馏水冲洗，梯度酒精脱水、二甲苯透明、封片。

83

#### **1.2.9** 切片观察及拍照

显示PCNA和Tunel阳性表达即为突出背景的棕黄色颗粒，均定位于细胞核。各组每只动物随机选取5张相同组织部位的免疫组化切片，每张切片随机选取5个视野(10×20)进行分析，应用Image-Pro Plus 6.0软件分析，计算各视野下阳性细胞数。

#### **1.2.10** **Annexin V-FITC/PI**双染法检测软骨细胞早期凋亡率

磷脂酰丝氨酸只分布在正常细胞的细胞膜脂质双层的内侧，在凋亡细胞的最早期，膜磷脂酰丝氨酸(PS)由脂膜内侧翻向外侧。AnnexinV可通过细胞外侧暴露的PS与凋亡早期细胞的胞膜结合，因此被作为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一。碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)是一种核酸染料，能够透过细胞膜而使细胞核染红。因此，将Annexin V与PI联合使用时，PI则被排除在活细胞和早期凋亡细胞之外，晚期凋亡细胞和坏死细胞同时被FITC和PI结合染色呈现双阳性(Annexin V+/PI+)。流式细胞仪的检测下细胞应可分成三个亚群：极晚期凋亡细胞有绿色和红色荧光双重染色，凋亡细胞有较强的绿色荧光，活细胞仅有很低的荧光强度。

具体操作步骤如下：

（1）无菌操作下切取股骨內髁及内侧胫骨平台软骨，宽约2～3mm，置于离心管中，磷酸盐缓冲液冲洗，2000γ/min离心10min去除上清液；

（2）0.25%的胰蛋白酶消化30 min，2000γ/min离心10min去除上清液。0.2%II型胶原酶，在37℃恒温培养箱内消化，每隔1 h吹打1次，4～6 h软骨碎片完全溶解，再经过滤、漂洗、调整细胞浓度为l×10 6个/ml；

（3）取100μl的细胞悬液于5ml流式管中，加入5μl Annexin V- FITC和10μl PI溶液，混匀后室温避光孵育15min，反应管中加400μl PBS，准备进行流式细胞仪检测；

（4）上样未经染色的软骨细胞，圈出目标细胞群体；

（5）建立LogFL1-LogFL2双参数点图并分析以上光散射图中设门的细胞；保证＞98%的细胞处于在X、Y轴Log 1为边界的左下象限中心区域；

（6）上样染色软骨细胞，检测Annexin V-FITC单染及PI单染的细胞；

（7）设定十字门的位置，设定FL1及FL2标尺位置。识别位于散点图的右下方

（ANN+/PI-）及右上方（ANN+/PI+）的两群细胞。

本实验将获取的数据用散点图进行分析，X轴表示Annexin V-FITC荧光强度

84

（FLl），Y轴表示PI荧光强度(FL2). 用十字标记将图像分为4个象限，左下象限为Annexin V-FITC(-) /PI (-)的活细胞，右下象限为Annexin V-FITC (+) /PI (-)的早期凋亡细胞，右上象限为Annexin V-FITC (+) /PI (+)的晚期凋亡细胞，左上象限为Annexin V-FITC (-) /PI (+)的坏死细胞。

### **1.3** 统计分析

所有数据以均数±标准差( *x**s*)表示，运用SPSS19.0统计软件进行分析。正态分布的资料采用单因素方差分析；非正态分布的资料，采用非参数检验，*P*＜0.05为差异有统计学意义。

### **2** 结果

### **2.1** 病理组织学观察

#### **2.1.1** 光镜观察

将软骨组织切片行HE染色后通过光镜观察发现，随着时间的延长，两组软骨表面损伤程度逐渐加重，基质染色变浅，软骨细胞排列逐渐紊乱，数量逐渐减少。但FLIPUS侧软骨损伤较对照侧更轻。见表4.1。

**表4.1 软骨组织HE染色表现**

**Table** **4.1** **Cartilage HE staining**

| 组别 | 光镜下 HE 染色表现 |
| --- | --- |
| 正常侧 | 软骨的 4 层结构清晰可辨，分别为浅表层（S）、移形层(T)、上放射层（U）、下放射层（L）、潮线（TM）和钙化层（CC）。软骨基质染成粉红色，着色均匀，软骨细胞核被苏木精染成鲜明的蓝色。表层软骨细胞扁平，有数层细胞与关节面水平排列； 中间层（包括移形层和放射层）软骨细胞为圆形，被细胞外基质所围绕，排列无序；钙化层软骨细胞体积最小，呈柱状排列，与  关节面垂直，其下方可见潮线(图 4-1) |

85

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  |  |
|  | 2 周组FLIPUS 侧 | 软骨 4 层结构清晰可辨，软骨浅表层基本光滑，未见溃疡及裂隙形成，软骨细胞正常、排列规则有序，潮线规则、清晰可见，  基质染色正常(图 4-2A) |
|  | 2 周组对照侧 | 软骨 4 层结果依稀可辨，软骨浅表层不平整，可见溃疡及裂隙形成，裂隙深至中间层，浅表层软骨细胞减少，偶见散在、簇集的软骨细胞，分布紊乱，潮线基本规则。基质染色较试验组  变浅(图 4-2B) |
|  | 4 周组FLIPUS 侧 | 大多数软骨 4 层结构容易分辨，大多数软骨浅表层光滑，偶见表面粗糙。软骨细胞大多排列有序，仅有少量软骨细胞形态不规则，排列紊乱，浅表层及移行层出现软骨细胞簇增生，聚集  成团。潮线清晰规则，基质染色变浅(图 4-2C) |
|  | 4 周组对照侧 | 软骨 4 层结构不易分辨，软骨浅表层可见明显缺损、锯齿状改变，纵行裂隙深达下放射层，并出现软骨面剥脱。在纵行裂隙周围边缘可见小的成簇的软骨细胞，软骨细胞簇增生形成所谓的―育囊‖，残存的软骨细胞形态改变，排列不规则，细胞数量较试验组明显减少，损伤严重的区域甚至细胞消失。关节软骨  纤维化、基质失染(图 4-2D) |
|  | 8 周组FLIPUS 侧 | 大多数软骨 4 层结构依稀可辨，软骨表面有明显的缺失和纵行裂隙，深至放射层，关节软骨纤维化。损伤区域周围软骨细胞形态改变、排列紊乱、细胞数量减少，细胞聚集增生现象出现  在中间层。潮线多数不完整。软骨基质失染(图 4-2E) |

#### **2.1.2** 电镜观察

通过电镜观察软骨细胞的超微结构我们发现，随着时间的延长，两组软骨细胞形状逐渐出现不规则，细胞周晕消失，线粒体结构不清，细胞质溶解，出现空泡样变性，并出现明显髓鞘样结构，但FLIPUS侧软骨细胞出现退变表现更晚，损伤较对照侧轻。见表4.2。

86

**表4.2** **软骨细胞超微结构表现**

**Table** **4.2** **Chondroctye electron microscope observation**

| 组别 | 软骨超微结构表现 |
| --- | --- |
| 正常侧 | 正常软骨细胞外形呈椭圆形或梭形，核膜清晰而完整，染色质分布均匀，粗面内质网呈层状排列，线粒体散在分布，细胞内  可见脂滴。细胞表面的微绒毛及细胞周晕均清晰可见(图4-3) |
| 2周组FLIPUS侧 | 软骨细胞形态正常，核膜完整而清晰，线粒体丰富，可见发达的粗面内质网。细胞表面的微绒毛及细胞周晕均清晰可见  (图4-4A) |
| 2周组对照侧 | 软骨细胞外形基本正常，可见软骨细胞胞浆轻度溶解，并可见髓鞘样结构，出现细胞质溶解，细胞核正常，微绒毛变钝扭曲  (图4-4B) |
| 4周组FLIPUS侧 | 软骨细胞形态正常，细胞核膜完整清晰，粗面内质网轻度扩张， 未见细胞内空泡样变性。细胞周晕及细胞周边微绒毛清晰可见  (图4-4C) |
| 4周组对照侧 | 软骨细胞肿胀，细胞周晕逐渐消失，胞核致密，外形不规则， 有时核膜不清，核异染色质，囊膜皱缩伴粗面内质网数目减少。核糖体及线粒体结构不清，无法辨认。细胞质溶解严重，出现  大量的空泡样变性(图4-4D) |
| 8周组FLIPUS侧 | 软骨细胞外形基本正常，核膜清晰完整，核染色质轻度凝集， 可见线粒体及粗面内质网扩张，开始出现小范围细胞质溶解，  细胞周晕及细胞周边微绒毛清晰可见(图4-4E) |
| 8周组对照侧 | 软骨细胞皱缩明显，细胞核形状不规则、细胞周晕消失，线粒体结构不清，细胞质溶解、破坏，细胞内可见大量脂滴，明显髓鞘样结构，有的软骨细胞的电子密度明显增加，胞核、胞质  结构无法辩认，可见凋亡小体(图4-4F) |

### **2.2** 免疫组化法检测软骨细胞增殖情况

PCNA阳性表达即为突出背景的棕黄色颗粒，定位于细胞核。见图4-5 A-F.2

周组中FLIPUS侧软骨细胞增殖率高于对照侧及空白侧，差异具有统计学意义（*P*＜

87

0.05）.4周组及8周组中，FLIPUS侧软骨细胞增殖率与对照侧相比，差异无统计学意义(*P*＞0.05)。见表4.3。

**表4.3 各组软骨细胞增殖阳性表达的变化**

**Table** **4.3** **Comparisons of Proliferation Percentage after Intervention**

| 组别 | N | 软骨细胞增殖率(%) | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | FLIPUS 侧■ | 对照侧△ | 空白侧 |
| 2 周组 | 10 | 21.10±1.52 ※§ | 4.20±1.93 | 0.30±0.48 |
| 4 周组 | 10 | 14.50±7.56 ξσ | 11.44±5.79 | 0.40±0.70 |
| 8 周组 | 10 | 9.95±4.47 ЭК | 9.30±5.08 | 0.50±1.08 |

软骨细胞增殖率(%):与对照侧相比，※*P*=0.008；与空白侧相比，§*P*=0.000；与对照侧相比，ξ*P*=0.225；与空白侧相比，σ*P*=0.000；与对照侧相比，Э*P*=0.713；与空白侧相比，К*P*=0.000.2周，4周，8周组FLIPUS侧软骨细胞增殖率对比，■*P*＜0.01; 2周，4周，8周组对照侧软骨细胞增殖率对比，

△*P*＜0.01.

### **2.4** 凋亡细胞原位检测**(Tunel)**

Tunel阳性表达即为突出背景的棕黄色颗粒，定位于细胞核（图3-6 A-F）。各组

FLIPUS侧软骨细胞凋亡率均低于对照侧，但仍高于空白侧，差异具有统计学意义

（*P*＜0.05）。见表4.4.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组别 | n | 软骨细胞凋亡率(%) | | |
| FLIPUS 侧 | 对照侧▼ | 空白侧 |
| 2 周组 | 10 | 27.82±5.25¶ϼ | 41.74±3.43 | 1.49±1.38 |
| 4 周组 | 10 | 41.40±6.89δψ▴ | 49.76±7.05 | 1.29±1.07 |
| 8 周组 | 10 | 45.54±5.16ЗЯ | 54.83±5.32 | 1.38±1.42 |

**表4.4** **Tunel法检测各组软骨细胞凋亡阳性表达的变化Table 4.4 Comparisons of Apoptosis Percentage after Intervention**

软骨细胞凋亡率(%):与对照侧相比, ¶*P*=0.000； 与空白侧相比，ϼ*P*=0.000；与对照侧相比，

δ*P*=0.002; 与空白侧相比，ψ*P*=0.000；与对照侧相比，З*P*=0.000; 与空白侧相比，Я*P*=0.000.4周，8

周组FLIPUS侧软骨细胞凋亡率对比，◆*P*＞0.05; 2周，4周，8周组对照侧软骨细胞凋亡率对比，

▼*P*＜0.05.

### **2.5** 流失细胞仪检测软骨细胞早期凋亡情况

比较各组软骨细胞凋亡率发现：在干预的各时间段，FLIPUS侧软骨细胞凋亡率均低于对照侧，但仍高于空白侧(P＜0.01)。见表4.5，图4-7, 4-8, 4-9。

88

**表4.5** **Annexin V-FITC/PI双染法检测软骨细胞早期凋亡率**

**Table** **4.5** **Comparisons of Apoptosis Percentage measured byAnnexin V-FITC/PI**

| 组别 | n | 软骨细胞凋亡率(%) | | |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| FLIPUS 侧 | 对照侧▼ | 空白侧 |
| 2 周组 | 10 | 7.32±4.23 ¶ϼ | 14.74±5.43 | 3.49±2.58 |
| 4 周组 | 10 | 15.40±4.69 δψ▴ | 29.76±5.35 | 2.29±2.07 |
| 8 周组 | 10 | 45.56±4.56 ЗЯ | 62.45±4.02 | 2.38±1.55 |

软骨细胞凋亡率(%):与对照侧相比, ¶*P*=0.000； 与空白侧相比，ϼ*P*=0.000；与对照侧相比，δ*P*=0.002；与空白侧相比，ψ*P*=0.000；与对照侧相比，З*P*=0.000； 与空白侧相比，ЯP=0.000.4周，8周组FLIPUS侧软骨细胞凋亡率对比，◆*P*＞0.05; 2周，4周，8周组对照侧软骨细胞凋亡率对比，▼*P*＜0.05。

### **3** 讨论

骨关节炎软骨中细胞数量少，分布稀疏而分散，丝分裂活性低，代谢缓慢增殖能力差，因此细胞凋亡在骨关节炎发病机制中占有重要的意义。一旦到了成年，仅随年龄的增长而不伴发其他疾病时，软骨细胞的数量很少发生变化[3]。当软骨基质损伤后，软骨细胞靠有限地增殖与增加软骨基质的合成很难完全修复受损软骨组织。当功能性的软骨基质不能在保护软骨细胞，在众多细胞因子等病理因素的作用下，软骨细胞开始发生凋亡，随后软骨细胞的增殖与合成能力很快消失。软骨细胞不能有效地分泌软骨基质，功能性地软骨基质反过来不能保护软骨细胞，导致恶性循环加重，软骨退行性变难以逆转。

既然软骨细胞很难像其他细胞一样，可以通过增殖来增加细胞的数量。那么，通过减少细胞的凋亡来保存现有的细胞数量，也不失为一种保证软骨细胞―量‖的有效方法。基于软骨细胞数量少，有丝分裂活性低的特点，如何延缓软骨细胞凋亡，尽量保存现有的具有正常功能的软骨细胞成为目前研究的难点与热点。

### **3.1** **FLIPUS**对软骨细胞增殖与凋亡的影响

关节软骨由软骨细胞、软骨基质及水构成，COL II与PGs是构成软骨基质的主要成分。当关节软骨受到损伤导致关节软骨基质改变，PGs含量降低，胶原纤维网络断裂，软骨细胞能做出适当反应，试图通过增殖和增加软骨基质合成量来修复组织损伤。可以说，软骨的自我修复取决于软骨细胞的―质‖与―量‖。软骨细胞的―质‖即细胞功能可以体现在其分泌的COL II与PGs的含量，软骨细胞的―量‖即细胞数量可以体现在细胞的增殖与凋亡。

89

本研究发现，与正常侧软骨细胞比较，FLIPUS侧和对照侧均有软骨细胞凋亡的增加，这可能是与造模后创伤的反应有关。然而，与对照侧比较，在早期，FLIPUS侧软骨细胞凋亡明显更少。在后期，其主要表现为凋亡细胞减少。而对照侧凋亡的软骨细胞随时间推移进行性的明显增加。本实验中发现软骨细胞的增殖和凋亡同时存在，这可能是软骨对创伤的修复和创伤持续存在的结果。通过软骨细胞超微结构观察也可发现，FLIPUS干预后软骨细胞出现发达的粗面内质网，线粒体丰富，细胞表面的微绒毛及细胞周晕均清晰可见，表明受损细胞对外界作用因子的反应能力增强，显示短暂的代谢旺盛。对照组出现大量空泡样变形，提示软骨细胞受损后发生退变。FLIPUS仅在初期（2周）可提高软骨细胞的增殖，增殖率为21.10±1.52%，通过连续观察2周、4周、8周可发现，与对照侧软骨细胞相比，

FLIPUS可持续减少软骨细胞的凋亡。同时，Annexin V-FITC/PI双染色法定量测定也提示干预2周、4周、8周后，FLIPUS能有效地减少软骨细胞的早期凋亡。这一结果提示减少软骨细胞凋亡是FLIPUS维护软骨细胞量的主要途径。

### **3.2** **FLIPUS**影响软骨细胞增殖**-**凋亡的作用机制

本研究中采用的FLIPUS主要发挥其机械效应，可以对关节软骨产生一定的机械压力。目前研究认为，软骨细胞膜上因具有应力感受器而对机械刺激非常敏感。一方面，超声作用于软骨，因机械效应所产生的“细胞按摩”作用于软骨细胞表面应力受体整合素，其通过细胞外基质(Extracellular Matrix, ECM) /整合素/细胞骨架蛋白形成的黏着斑，通过将力学刺激转化为化学信号进而调控软骨细胞的分化及增殖[4]。其作用的关键信号通路及分子靶点还需进一步研究。另一方面，众多炎症因子与骨关节炎发病密切相关，如PGE2和NO在介导炎症反应，诱导软骨细胞凋亡方面扮演着重要地角色。Weishaup[5]等学者研究发现低强度脉冲超声（强度30

mW/cm2，频率1.5MHz）能促进小分子量物质(Gd-DTPA，分子量为393)从血管向滑液内弥散，并能增加滑液的渗出，提示超声能改善滑液循环。本研究中FLIPUS采用间断的能量输出形式，存在机械应力作用-缺如的周期性变化，从而使关节腔内压力发生周期性改变，这种改变能够使液体流动[6]。同时，超声波还能造成质点的位移，改变细胞、微粒等的运动状态，有利于使液体内的物质向组织内的弥散和渗入[6]。与由此推断，FLIPUS可能通过改善滑液循环，促进炎症因子代谢，达到抗凋亡的目的。

90

#### **4** 小结

FLIPUS在早期能有效地刺激软骨细胞增殖，并延缓软骨细胞凋亡。主要通过减少软骨凋亡维持有效软骨细胞数量，起到延缓软骨退变的目的。

参考文献

[[1] Blanco FJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Blanco%20FJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9485086), [Guitian R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Guitian%20R%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9485086), [Vázquez -Martul E](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=V%C3%A1zquez-Martul%20E%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9485086), et al. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology[J]. Arthritis Rheum. 1998, 41(2): 284-289.

[[2] Hashimoto S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hashimoto%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9663485), [Takahashi K](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Takahashi%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9663485), [Amiel D.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Amiel%20D%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9663485) Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis[J]. Arthritis Rheum. 1988, 41(7): 1266-1274.

[[3] Aigner T](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Aigner%20T%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11407689), [Hemmel M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hemmel%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11407689), [Neureiter D,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Neureiter%20D%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11407689) et al. Apoptotic cell death is not a widespread phenomenon in normal aging and osteoarthritis human articular knee cartilage: a study of proliferation, programmed cell death (apoptosis), and viability of chondrocytes in normal and osteoarthritic human knee cartilage[J]. Arthritis Rheum. 2001, 44(6): 1304-1312.

[4] Kim SH, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signaling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor Receptor[J]. J Endocrinol. 2011, 209: 139-151.

[5] Weishanpt D, Schweitzer ME, Rawool NM, et a1. Effects of low-intensity ultrasound on the diffusion rate of intravenously administered Gd-DTPA in healthy volunteers. Investigative Radiology. 2001, 36(8): 493-499．

[6] 周永昌, 郭万学. 超声医学(第四版)[M]. 北京: 科学技术文献出版社. 2003, 1716-1725.

91

**第四节FLIPUS对软骨细胞Th存滑膜/滑液环境的作用研究**

人类骨关节炎发病中，OA受累关节普遍存在非侵蚀性滑膜炎，与关节软骨直接相邻的滑膜炎症最为明显[1, 2]，临床表现之一即为关节腔积液，滑膜炎的程度可以直接影响OA关节病理改变与进展。滑膜与滑液共同构成了软骨细胞生存的滑膜

/滑液环境。在炎症相关的细胞因子中，NO与PGE2介导炎症反应，能直接诱导软骨细胞凋亡方面，在OA发病中扮演重要的角色。

在第二部分第三节中，我们研究发现FLIPUS能延缓软骨细胞凋亡，其可能机制与超声的机械作用有关。由于软骨细胞生存离不开周围滑膜/滑液环境的影响，我们设想，FLIPUS是否通过改变软骨细胞生存的滑膜/滑液环境，改善滑液循环，减少关节腔积液、加速炎症因子代谢，来达到延缓软骨细胞凋亡、改善关节功能的目的？本章主要从FLIPUS对软骨细胞生存的滑膜/滑液环境影响的角度出发，研究FLIPUS延缓软骨细胞凋亡的机制。

### **1** 材料与方法

### **1.1** 实验材料

#### **1.1.1** 实验动物

同第二部分第二节。

#### **1.1.2** 实验设备及器械

CZG200型超声关节炎治疗仪同第二部分第二节

医用超声耦合剂TM-100型（南开区成信医用辅助材料厂，中国）各种规格微量加样器（Eppendorf, 德国）

5804R 型低温离心机（Eppendorf, 德国）Thermo Scientific NanoDrop 2000

分光光度计（Thmero，美国）

ELX-800型酶标仪（BIO-TEK公司，美国）

ZD-600电热恒温水浴箱（北京长源实验设备厂，中国）

-80℃超低温冰箱（海尔，中国）

92

1.5T磁共振成像系统（西门子，德国）

#### **1.1.3** 实验试剂及药品

前列腺素E2(PGE2) ELISA试剂盒（上海沪尚生物科技有限公司，中国）一氧化氮（NO）测试盒（南京建成生物工程研究所，中国）

0.9%生理盐水（西南药业股份有限公司，中国）

### **1.2** 实验方法

#### **1.2.1** 动物分组

同第二部分第二节。

#### **1.2.2** 超声治疗方法

同第二部分第二节。

#### **1.2.3** 标本采集

##### **1.2.3.1** 膝关节**MRI**扫描

待2周组、4周组、8周组动物治疗完毕后，行双膝关节MRI扫描。Siemens公司1.5T磁共振成像系统扫描参数：应用Flex Loop Small线圈，矢状面扫描；T2-FI3D-we-sag序列主要参数为TR 19ms, TE 9.5ms，翻转角40°，层厚1mm, FOV read 160mm, FOV phase 100%，扫描矩阵512×512，Voxel size:0.6×0.6×1.0mm，平均激励1次，扫描时间3min25s。

##### **1.2.3.2** 关节液采集

待各组动物治疗完成并行MRI扫描后，取双膝关节髌韧带外侧凹陷处为穿刺点，用2ml注射器抽吸1ml生理盐水注入关节腔。反复被动活动膝关节后，回抽关节腔液体，约为1.5ml，放置无菌EP管中，编号后放置-80℃冰箱低温保存。

#### **1.2.4** 标本检测

##### **1.2.4.1** **MRI**评价关节积液量

各组动物双侧膝关节MRI图像采集完毕后，采用HIFU-3D-TPS图像软件分析关节积液情况。关节积液在T2-FI3D-we-sag序列上呈高信号表现，在图像上各层面点击绘制积液高信号轮廓，完毕后软件自动计算出积液的体积(ml)。

##### **1.2.4.2** 关节液**PGE2**含量测定

采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测关节液中PGE2的含量。具体步骤如下：

###### （1）倍比稀释标准品；

93

###### （2）每个样品孔、标准品孔及空白孔均做复孔；

（3）加样：1）空白孔：空白对照孔加显色剂A&B和终止液，其余操作步骤相同；2）标准品孔：加入50μl标准品，50μl链霉素-HRP；3）样品孔：加入40μl样本，然后各加入10μl抗-PGE2抗体、50μl链酶亲和素-HRP，盖上封板膜，室温缓解中温育60min；

（4）配液：蒸馏水稀释30倍浓缩洗涤液备用；

（5）洗涤：揭开封板膜，弃去液体，甩干后每孔加满洗涤液，静置30s后弃去，重复5次；

（6）显色：每孔先加入50μl显色剂A，再加入50μl显色剂B，震荡混匀后室温避光显色10min；

（7）终止：每孔加50μl终止液，终止反应；

（8）测定：以空白孔调零，10min以内采用450nm波长依序测量各孔的吸光度（OD值）；

（9）计算出标准曲线的直线回归方程，计算出对应的样品浓度。

##### **1.2.4.3** 关节液**NO**含量测定

采用硝酸酶还原法测定关节液中NO含量，由于NO化学性质活泼，体内代谢转化为亚硝酸盐(NO2-)和硝酸盐(NO3-)，关节液中NO2-与NO3-浓度之和(NO2-+ NO3-)，才能准确代表关节液中NO水平。方法与步骤严格按NO试剂盒说明书进行，所测NO含量最后以μmol/L表示。具体步骤如下：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 空白管 | 标准管 | 测定管 |
| 双蒸馏水(ml) | 0.1 |  |  |
| 100μmol/L标准应用液（ml） |  | 0.1 |  |
| 关节液样本（ml） |  |  | 0.1 |
| 试剂一（ml） | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| 试剂二（ml） | 0.2 | 0.2 | 0.2 |

混匀，室温下水浴60min

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 试剂三（ml） | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| 试剂四（ml） | 0.1 | 0.1 | 0.1 |

充分旋涡混匀30秒，室温静置10min，3500～4000转/分，离心10min，取上清显色。

94

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 上清（ml） | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| 显色剂（ml） | 0.6 | 0.6 | 0.6 |

混匀，室温静置10min，蒸馏水调零，550nm，0.5cm光径，测各管吸光度(OD值)。

NO计算公式

××

### **1.3** 统计学分析

所有数据以均数±标准差( *x**s*)表示，运用SPSS19.0统计软件进行分析。正态分布的资料采用单因素方差分析；非正态分布的资料，采用非参数检验，*P*＜0.05为差异有统计学意义。

### **2** 结果

### **2.1** 造模后膝关节积液量基线对比

造模后2周，实验兔左膝关节积液量为2.41±1.07ml，右膝关节积液量为2.87±1.67ml，双膝关节积液量对比差异无统计学意义(*P*＞0.05)。造模后4周，实验兔左膝关节积液量1.59±0.82ml，右膝关节积液量为1.49±0.71ml，双膝关节积液量对比无统计学差异(*P*＞0.05)。说明治疗前双膝关节积液量基线一致，具有可比性。

从时间上来看，左膝关节在造模后2周积液量由2.41±1.07ml降至造模后4周

1.59±0.82ml，差异具有统计学意义(*P*＜0.01)。右膝关节在造模后2周积液量由

2.87±1.67ml降至造模后4周1.49±0.71ml，差异具有统计学意义(*P*＜0.01)。说明随着造模时间的延长，在未干预的条件下，关节积液量有自发性减少的趋势。见表5.1。

**表5.1 造模后2周、4周膝关节积液量对比**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 时间 | n | 左膝 | 右膝 | *P* |
| 造模后 2 周 | 30 | 2.41±1.07 | 2.87±1.67 | 0.241 |
| 造模后 4 周 | 30 | 1.59±0.82 | 1.49±0.71 | 0.522 |
| *P* |  | 0.000 | 0.000 |  |

**Table** **5.1** **Comparison of knee Effusion Volume(ml) Among All Groups at week 2 and week4 After Surgery**

95

### **2.2** 各组实验兔关节积液治疗前后自身对比

治疗前2周组、4周组及8周组FLIPUS侧关节积液量与治疗后积液量对比，差异具有统计学意义(*P*＜0.05)。见表5.2。治疗前2周组、4周组及8周组对照侧关节积液量与治疗后积液量对比，差异无统计学意义(*P*＞0.05)（表5.3）。

**表5.2** **FLIPUS侧关节积液量(ml)治疗前后自身对比**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组别 | n | 治疗前 | 治疗后 | *P* |
| 2 周组 | 10 | 1.62±0.75 | 0.76±0.46 | 0.001 |
| 4 周组 | 10 | 1.33±0.68 | 0.68±0.42 | 0.009 |
| 8 周组 | 10 | 1.58±0.75 | 0.86±0.43 | 0.011 |

**Table** **5.2** **Comparison of knee Effusion Volume(ml) in FLIPUS Side Before and After Intervention**

**表5.3 对照侧关节积液量治疗前后自身对比**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组别 | n | 治疗前 | 治疗后 | *P* |
| 2 周组 | 10 | 1.75±0.80 | 1.15±0.73 | 0.105 |
| 4 周组 | 10 | 1.55±0.80 | 1.34±0.55 | 0.223 |
| 8 周组 | 10 | 1.46±0.93 | 1.70±0.68 | 0.213 |

**Table** **5.3** **Comparison of knee Effusion Volume(ml) in Control Side Before and After Intervention**

### **2.3** 治疗后各组实验兔膝关节积液量对比

治疗后膝关节积液三位重建图像见图5-1，2周组FLIPUS侧膝关节积液量

0.76±0.46ml，对照侧膝关节积液量为1.15±0.73ml，空白组膝关节滑液量为

0.27±0.07ml (*P*＜0.05)。4周组FLIPUS侧膝关节积液量0.68±0.42ml，对照侧膝关节积液量为1.34±0.55ml，空白组膝关节滑液量为0.27±0.06ml (*P*＜0.01)。8周组FLIPUS侧膝关节积液量0.86±0.43ml，对照侧膝关节积液量为1.70±0.68ml，空白组膝关节滑液量为0.28±0.06ml (*P*＜0.01)。2周组、4周组、8周组FLIPUS侧关节积液量对比无统计学意义(*P*＞0.05)，对照侧关节积液量对比无统计学意义(*P*＞0.05)。见表5.4。

96

**表5.4** **各组实验兔治疗后膝关节积液量(ml)对比**

**Table** **5.4** **Comparison of knee Effusion Volume(ml) Among All Groups After Intervention**

| 组别 | n | FLIPUS 侧 | 对照侧 | 空白侧 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 2 周组 | 10 | 0.76±0.46 ▲■ | 1.15±0.73 ▲△ | 0.27±0.07 ▲ |
| 4 周组 | 10 | 0.68±0.42 ▼■ | 1.34±0.55 ▼△ | 0.27±0.06 ▼ |
| 8 周组 | 10 | 0.86±0.43 ▴■ | 1.70±0.68 ▴△ | 0.28±0.06 ▴ |

▲*P*=0.009，▼*P*=0.011，▴*P*=0.009，■*P*=0. 531, △*P*=0.105

### **2.4** **FLIPUS**干预后各组关节积液前列腺素**E2**含量的变化

建立标准曲线后计算曲线方程：y=59.837x2+131.09x+4.7106

R2=0.9996

将所测样本OD值代入曲线方程，计算出样本PGE2浓度，并换算成单位pg/ml。

2周组、4周组及8周组FLIPUS侧关节积液PGE2浓度均低于对照侧，差异有统计学意义（*P*＜0.01），但仍高于空白组（*P*＜0.01）。2周组、4周组及8周组FLIPUS侧关节积液PGE2浓度随时间增加（*P*＞0.05），而2周组、4周组及8周组对照侧关节积液PGE2浓度随时间增加而升高（*P*＜0.05）。见表5.5，图5-2。

**表5.5** **治疗后各组膝关节积液PGE2(pg/ml)含量对比**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组别 | n | FLIPUS 侧 | 对照侧 | 空白侧 |
| 2 周组 | 10 | 51.55±10.45 **※†** | 66.50±8.15 **Ф** | 22.50±0.95 |
| 4 周组 | 10 | 56.66±9.01 **ξ‡** | 81.94±7.41 **₤** | 23.55±1.26 |
| 8 周组 | 10 | 56.50±12.01 **Э** | 138.35±27.01 | 22.17±0.61 |

**Table** **5.5** **Comparsions of Concentrations of PGE2(pg/ml) in the Synovial Fluid after Intervention**

2周组FLIPUS侧与对照侧及空白侧对比，※*P*=0.000,0.000;

4周组FLIPUS侧与对照侧及空白侧对比，ξ*P*=0.000,0.000;

8周组FLIPUS侧与对照侧及空白侧对比，Э*P*=0.000,0.000;

2周组FLIPUS侧与4周组及8周组LIPUS侧对比，†*P*=0.289,0.304;

4周组FLIPUS侧与8周组FLIPUS侧对比, ‡*P*=0.974;

2周组对照侧与4周组及8周组对照侧对比，Ф*P* =0.048,0.000;

4周组对照侧与8周组对照侧对比，₤*P*=0.000.

97



**图5-2** **FLIPUS治疗后各组关节积液PGE2含量对比图**

**2周组：\**P*=0.000，\*\**P*=0.000, \*\*\* *P*=0.000; 4周组：\**P*=0.000，\*\**P*=0.000, \*\*\* *P*=0.000; 8**

**周组：\**P*=0.000, \*\**P*=0.000, \*\*\* *P*=0.000.**

**Fig 5-2 Expression of PGE2 in Joint effusion of each group after FLIPUS treatment.**

**2 weeks group: \**P*=0.000, \*\**P*=0.000, \*\*\* *P*=0.000; 4 weeks group: \**P*=0.000, \*\**P*=0.000, \*\*\***

***P*=0.000; 8 weeks group: \**P*=0.000, \*\**P*=0.000, \*\*\* *P*=0.000.**

### **2.5** **FLIPUS**干预后各组关节积液**NO**含量的变化

2周组、4周组及8周组FLIPUS侧关节积液NO浓度均低于对照侧，差异有统计学意义（*P*＜0.01），但仍高于空白组（*P*＜0.01）。2周组、4周组及8周组FLIPUS侧关节积液NO浓度随时间增加（P＞0.05），而2周组、4周组及8周组对照侧关节积液

NO浓度随时间增加而升高(P＜0.05)。见表5.6，图5-3。

**表5.6** **治疗后各组膝关节积液NO(μm/L)含量对比**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组别 | n | FLIPUS 侧 | 对照侧 | 空白侧 |
| 2 周组 | 10 | 40.40±9.03 ¶▴ | 54.59±5.71 ▲ | 29.17±3.76 |
| 4 周组 | 10 | 52.15±8.20δ★ | 103.57±24.26 ● | 28.61±5.71 |
| 8 周组 | 10 | 59.56±7.78 З | 180.00±20.11 | 31.94±3.00 |

**Table** **5.6** **Comparsions of Concentrations of NO(μm/L) in the Synovial Fluid after Intervention**

2周组FLIPUS侧与对照侧及空白侧对比，，¶*P*=0.001，0.000；

4周组FLIPUS侧与对照侧及空白侧对比，δ*P*=0.000, 0.000；

8周组FLIPUS侧与对照侧及空白侧对比，З*P*=0.000, 0.000；

2周组FLIPUS侧与4周组及8周组FLIPUS侧对比，◆*P*=0.004, 0.000;

4周组FLIPUS侧与8周组FLIPUS侧对比，★*P*=0.058;

2周组对照侧与4周组及8周组对照侧对比，▲*P* =0.000，0.000；

4周组对照侧与8周组对照侧对比，●*P*=0.000.

98



**图5-3** **治疗后各组关节积液PGE2含量对比图**

**2周组：\**P*=0.001，\*\**P*=0.000, \*\*\* *P*=0.000; 4周组：\**P*=0.000，\*\**P*=0.000, \*\*\* *P*=0.000; 8**

**周组：\**P*=0.000, \*\**P*=0.000, \*\*\* *P*=0.000.**

**Fig5-4 Expression of NO in Joint effusion of each group after FLIPUS treatment**

**2 weeks group: \**P*=0.001, \*\**P*=0.000, \*\*\* *P*=0.000; 4 weeks group: \**P*=0.000, \*\**P*=0.000, \*\*\***

***P*=0.000; 8 weeks group: \**P*=0.000, \*\**P*=0.000, \*\*\* *P*=0.000.**

### **3** 讨论

软骨细胞处于软骨基质的保护之中，其合成与代谢均受到周围微环境影响。总的说来，软骨细胞生存的微环境包括滑膜/滑液环境、基质环境、低氧环境与力学环境[3]，上述微环境相互影响，相互作用，共同调节软骨细胞的新陈代谢。滑液主要为软骨细胞的合成提供营养；滑膜产生的透明质酸能保护关节软骨，维持关节正常功能；低氧环境能刺激软骨细胞的增殖和Ⅱ型胶原、Ⅸ型胶原的分泌，延迟I型胶原的表达[4]，稳定软骨细胞表型[3]；正常的力学环境可以维持软骨正常表型，促进滑液渗入软骨，为软骨营养提供动力，防止软骨发生退变[3]。本节内容着重研究FLIPUS对滑膜/滑液环境的影响。

### **3.1** 关节滑液的Th理功能及滑膜炎性渗出对**KOA**关节的影响

滑液为血浆的超滤液，由B型滑膜细胞产生。正常滑液通过3种主要途径发挥其生理功能：（1）通过关节软骨表面的孔隙给软骨细胞提供营养物质，同时清理代谢废物；（2）提供一种柔性、低摩擦衬材；（3）维持关节稳定性。滑液的产生决定于Starling假说的几种压力[5]，滑液量随着滑膜间质、滑液和血浆的渗透压以及动脉流体静力学压力的变化而变化[6, 7]。人正常膝关节内滑液容量仅有3～

4ml，并且不能完全抽出。在人类KOA的发病中，由于关节软骨的磨损颗粒和其

99

他降解产物可刺激滑膜细胞分泌炎性细胞因子，从而增强了周边滑膜组织炎症，与关节软骨直接相邻的滑膜炎最为明显[8, 9]。当发生滑膜炎时，由于滑膜的通透性增加导致滑液的分泌-吸收平衡破坏，从而出现大量滑液聚积在关节腔内，成为关节积液。由于积液量的减少与临床症状的改善成正相关，因此可以通过测量积液量作为评价关节炎治疗效果的一种手段。

在该动物模型中，一方面，由于术中不可避免伤及关节腔内小血管，尽管在我们在术中给予止血、术毕给予生理盐水关节腔冲洗，但术后关节腔内可能仍有少量渗血，而关节内出血则被认为是导致滑膜炎的主要因素[10-12]。另一方面，由于造模后膝关节不稳，软骨面缺乏半月板缓冲导致软骨面之间直接摩擦，产生软骨的磨损颗粒和其他组织的降解产物可以刺激滑膜分泌炎性细胞因子，从而增强了周边滑膜组织的炎症，因此出现与人类KOA发病高度一致的关节积液表现。关节滑液作为一种运输介质，除了能够运输营养、代谢废物及气体外，还能

在软骨和滑膜之间往返运送炎症介质，因而成为炎性物质的储存库。这些炎症物质长期存在关节腔中，反复刺激炎症反应，一方面滑膜大量炎性渗出能够通过扩张关节囊及限制关节功能引起疼痛；另一方面，关节腔积液扩张关节囊，能潜在地压迫血管和支配受压血管的神经，刺激关节囊压力感受器及伤害感受器而引起疼痛[13-15]。因此，去除含有大量炎症介质的积液也不失为一种缓解疼痛，改善关节功能行之有效地方法。

运用MRI评价关节腔积液量的准确性及有效性已经被证实，并将MRI测量积液量的变化作为评价炎症性关节疾病严重程度的指标之一[16]。本研究运用MRI无创评价关节腔积液量，实验兔左膝关节在造模后2周积液量由2.41±1.07ml降至造模后4周1.59±0.82ml (*P*＜0.01)。右膝关节在造模后2周积液量由2.87±1.67ml降至造模后4周1.49±0.71ml (*P*＜0.01)。说明随着造模时间的延长，在未干预的条件下，关节积液量有自发性减少的趋势。随着FLIPUS开始干预，2周组、4周组及8周组FLIPUS侧积液量较对照侧明显降低，治疗前后自身对比，FLIPUS侧积液量也明显较少(*P*＜0.01)，但治疗后仍未达到正常关节腔内滑液量(0.2～0.4ml)。就2周组，4周组及8周组FLIPUS侧积液量对比而言，积液量有小幅波动，在4周时关节积液量最少，但差异并无统计学意义，可能与样本量较少(10只)有关，但根据变化趋势可提示FLIPUS不仅可以减少积液，并可能维持在一个

100

相对低的稳定水平，即FLIPUS治疗2周即可显效，治疗4周时效果最佳。而各组对照侧积液量治疗前后变化无统计学差异，随着时间的延长，积液量有增多的趋势。

在临床治疗上，对于有明显关节腔积液的患者，通常采用穿刺抽出多余的积液来达到治疗目的。这种操作具有以下明显的缺点：首先，穿刺作为一种侵入性操作，会带来关节腔感染的风险，关节腔一旦感染，治疗将非常棘手；其次，仅仅单纯抽吸多余的积液，而不恢复滑膜的分泌-吸收平衡，积液将在短时间内重新聚集，而反复地穿刺又大大增加关节腔感染的风险。而FLIPUS则完全为无创治疗，无关节感染之虞，并通过改善滑膜分泌-吸收达到减少关节积液的目的，标本兼治，疗效确切，较传统关节腔穿刺具有明显优势。

### **3.2** 关节积液中炎症因子检测的选择

OA的发病不仅与关节生物力学异常有关，细胞因子在其发病中起到主要作 用。在50余种已阐明的炎症细胞因子中，其中近十种炎症细胞因子与OA发病有关。多种炎症细胞因子相互影响，相互协同、相互拮抗，发挥广泛而复杂的生物学效应（图5-4）。在众多的炎症细胞因子中，NO、PGE2在整个环节中处于重要位置，在软骨细胞外基质丢失、软骨退变、直接诱导软骨细胞凋亡等方面做起重要作用。

NO是一种自由基，在一氧化氮合酶催化下产生，在受累关节的关节液中，

NO主要由滑膜产生，主要通过三个方面诱导软骨细胞凋亡，导致软骨破坏：

①NO下调聚集PGs和胶原的生物合成及提高基质金属蛋白酶([matrix metallo](http://www.iciba.com/matrix_metalloproteinase) [proteinase](http://www.iciba.com/matrix_metalloproteinase)s, MMPs)活性来降解OA软骨细胞[17-19]和诱导软骨细胞凋亡来介导炎症反应及组织毁损；②NO通过PGE2抑制软骨细胞的增殖[20]；③NO抑制软骨细胞外基质中蛋白聚糖的合成[21]。关节液中的NO含量与疾病程度呈正相关，即关节液中的NO含量越高，症状越重。

前列腺素(PG)为花生四烯酸的代谢产物，环氧化酶(COX)启动前列腺素的合成，PGE2介导炎症反应，可调控软骨细胞的合成活性，直接影响软骨重塑。另外，PGE2还能刺激关节周围的感觉神经末梢，引起外周感受器敏化从而引起关节疼痛。

101



**图5-4** **各种细胞因子相互作用示意图(红色字体表示软骨破坏性因素) Table 5-4 Diagram of interaction among various cytokines**

### **3.3** **FLIPUS**对关节积液中**NO**、**PGE2**含量变化的影响

本研究发现，经FLIUPS干预后，2周组、4周组及8周组FLIPUS侧积液中

NO、PGE2 含量较对照侧明显降低(*P*＜0.05)，但仍未下降至正常关节滑液中的

NO、PGE2含量水平。FLIPUS治疗2周，4 周及8周，FLIPUS侧关节积液中NO、

PGE2含量无显著增高(*P*＜0.05)。而对照侧NO、PGE2含量随时间增加呈增长趋势(*P*＞0.05)。说明经FLIPUS干预后，积液中NO、PGE2含量能维持在相对低的水平，减轻炎症反应，延缓了骨关节炎的病情发展。

2013年，美国骨科医师协会（AAOS）颁布了《膝关节骨关节炎循证医学指南》（第2版），明确强烈推荐使用非甾体类抗炎药（Non-steroid anti-inflammatory

drug, NSAIDs）治疗症状性膝骨关节炎患者。[NSAID](http://www.iciba.com/NSAID)s的药理作用即是抑制炎症部位环氧酶，降低E族前列腺素合成达到抗炎镇痛的目的。环氧酶有两种形式，即环氧酶-1(COX-1)和环氧酶-2(COX-2)。目前抑制COX-1的[NSAID](http://www.iciba.com/NSAID)s的副作用主要为胃肠道（消化性溃疡、胃炎）和肾脏（间质性肾炎、肾功能不全）等不良反应，本课题RCT研究结果显示服用NSAIDs（双氯芬酸钠缓释片）10天后，与服用药物相关的不良事件发生率为19.19%。骨关节炎患者服用NSAIDs 1年后，严重胃肠道并发症的年发生率为0.7%[22]，每年因NASIDs诱导胃肠道损伤而导致的死亡率约为0.22%，即每年死亡人数超过16500人[22, 23]。而选择性抑制COX-2的新一代[NSAID](http://www.iciba.com/NSAID)s药物虽然胃肠道副作用发生率大大下降，但是又有心脏病发作和卒中

102

风险。从流行性学上看，骨关节炎主要好发于老年人，老年人中心脑血管疾病、胃肠道疾病及肝肾功能不全的发生率又较高，因此患有骨关节炎的中老年患者不适合长时间服用[NSAID](http://www.iciba.com/NSAID)s药物。本研究发现，FLIPUS可以减少关节积液，有利于缓解骨关节炎的机械性疼痛，其机理可能与改善滑液循环有关[24]；同时，FLIPUS减少关节液内的PGE2、NO等炎性介质，为减轻骨关节炎炎症性疼痛创造了条件。总之，FLIPUS既能缓解KOA机械性疼痛，又能减轻KOA炎症性疼痛，即FLIPUS有双路径止痛的作用，同时没有非甾体抗炎药的副作用。

### **3.4** **FLIPUS**缓解炎症反应、减少关节积液的可能机理

（1）超声的机械作用使关节组织中各质点交替压缩与伸张形成交变声压，使组织细胞产生容积和运动的变化，引起较强的细胞浆运动，改变膜电位，促进关节局部的血液和淋巴循环[25]，达到改善新陈代谢、恢复滑膜分泌-吸收平衡，促进含有大量NO、PGE2、IL-1、TNF-α等炎症物质的关节积液吸收而达到治疗目的。

（2）超声的弥散作用可以提高生物膜的通透性，促进生物膜内外的物质交换，进而加速代谢，改善组织营养，尤其在炎症部位的组织代谢中表现尤为明显，同样达到促进关节积液、炎症物质吸收的目的[25]。

（3）炎症反应大多伴有组织酸化，超声可以使组织中的pH值向碱性方面转化，缓解关节局部酸中毒，达到治疗炎症的目的[25]。

FLIPUS侧关节积液量、NO及PGE2含量并未下降至正常水平，分析其原因，有以下可能：（1）本动物模型采用手术方法破坏了正常膝关节的解剖结构，改变了关节的生物力学的受力方式。因此，退行性变及滑膜炎症只会逐渐加重，超声也只能最大程度地延缓其病变过程，而不能逆转其发展，因此难以恢复至正常水平。（2）本研究样本量较少，观察时间也较短（最长时间为治疗8周，即造模后12周），为了进一步观察FLIPUS对滑液量、NO及PGE2含量的变化，有必要增加样本量和延长观察时间。

#### **4** 小结

FLIPUS通过减少OA关节积液量，缓解关节内压力，加速积液中的NO、PGE2等炎症因子代谢从而缓解炎症反应，达到改善软骨细胞生存的微环境，延缓软骨细胞凋亡，保护关节软骨及恢复关节功能的目的。

103

参考文献

[[1] Lindblad S,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lindblad%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=3314876) [Hedfors E](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hedfors%20E%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=3314876). Arthroscopic and immunohistologic charaterization of knee joint synovitis in osteoarthritis[J]. Arthritis Rheum.1987,30(10):1081-1088.

[[2] Myers SL,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Myers%20SL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2084242) [Brandt KD,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Brandt%20KD%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2084242) [Ehlich JW](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Ehlich%20JW%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2084242), et al. Synovial inflammation in patients with early osteoarthritis of the knee[J]. J Rheumatol.1990,17(12):1662-1669.

[3]李伟，肖德明. 关节软骨细胞生存微环境研究[J]. 国外医学·骨科学分

册.2005,26(5):290-292.

[[4] Hansen U,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hansen%20U%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11410177) [Schünke M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sch%C3%BCnke%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11410177) [Domm C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Domm%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11410177), et al. Combination of reduced oxygen tension and intermittent hydrostatic pressure: a useful tool in articular cartilage tissue engineering[J]. [J Biomech.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=((Hansen%2BU)%2BAND%2BSchunke%2BM)%2BAND%2BDomm%2BC) 2001,34(7):941-949.

[[5] Simkin PA](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Simkin%20PA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2302271), [Benedict RS](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Benedict%20RS%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2302271). Hydrostatic and oncotic determinants of microvascular fluid balance in normal canine joints[J]. [Arthritis Rheum.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2302271) 1990,33(1):80-86.

[[6] Levick JR](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Levick%20JR%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=7794053), [McDonald JN](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=McDonald%20JN%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=7794053). Fluid movement across synovium in healthy joints: role of synovial fluid macromolecules[J]. [Ann Rheum Dis.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7794053) 1995,54(5):417-423.

[[7] Levick JR](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Levick%20JR%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=7794053). Synovial fluid and trans-Synovial and moving joints. In: Helminen H, Kivirata I, Tammi M, et al, eds. Joints Loading: Biology and Health of Articular Strcutures. Bristol, Wright &Sons,1987, p149-186.

[[8] Lindblad S,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lindblad%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=3314876) [Hedfors E.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hedfors%20E%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=3314876) Arthroscopic and immunohistologic characterization of knee joint synovitis in osteoarthritis[J][. Arthritis Rheum.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3314876) 1987,30(10):1081-1088.

[[9] Myers SL,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Myers%20SL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2084242) [Brandt KD](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Brandt%20KD%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2084242)[, Ehlich JW](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Ehlich%20JW%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2084242), et al. Synovial inflammation in patients with early osteoarthritis of the knee[J][. J Rheumatol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=(Myers%2BSL%5BAuthor%5D)%2BAND%2BBrandt%2BKD%5BAuthor%5DAND%2Behlich%2Bjw%5BAuthor%5D) 1990,17(12):1662-1669.

[[10] Abatangelo G,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Abatangelo%20G%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2924476) [Botti P](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Botti%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2924476), [Del Bue M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Del%20Bue%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2924476), et al. Intraarticular sodium hyaluronate injections in the Pond-Nuki experimental model of osteoarthritis in dogs. I. Biochemical results[J]. [Clin Orthop Relat Res.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=((Abatangelo%20G%5BAuthor%5D)%20AND%20Botti%20P%5BAuthor%5D)%20AND%20Del%20Bue%20M%5BAuthor%5D) 1989,241:278-285.

[[11] Schiavinato A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Schiavinato%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2466597), [Lini E](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lini%20E%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2466597), [Guidolin D](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Guidolin%20D%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2466597), et al. Intraarticular sodium hyaluronate injections in the Pond-Nuki experimental model of osteoarthritis in dogs. II. Morphological findings[J]. [Clin Orthop Relat Res.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2466597) 1989,241:286-299.

[[12] Gardner DL,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Gardner%20DL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=6398167) [Bradley WA](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Bradley%20WA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=6398167), [O'Connor P,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=O%27Connor%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=6398167) et al. Synovitis after surgical division of

104

The anterior cruciate ligament of the dog[J]. [Clin Exp Rheumatol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=((Gardner%20DL%5BAuthor%5D)%20AND%20Bradley%20WA%5BAuthor%5D)%20AND%20o%27connor%20p) 1984, 2(1): 11-15.

[[13] Schaible HG,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Schaible%20HG%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=4078610) [Schmidt RF](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Schmidt%20RF%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=4078610). Effects of an experimental arthritis on the sensory properties of fine articular afferent units[J]. J Neurophysiol. 1985,54(5): 1109- 1122.

[[14] Grigg P,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Grigg%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=3701397) [Schaible HG,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Schaible%20HG%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=3701397) [Schmidt RF](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Schmidt%20RF%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=3701397). Mechanical sensitivity of group III and IV afferents from posterior articular nerve in normal and inflamed cat knee[J]. [J Neurophysiol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=((Grigg%20P%5BAuthor%5D)%20AND%20Schaible%20HG%5BAuthor%5D)%20AND%20Schmidt%20RF%5BAuthor%5D) 1986,55(4):635-643.

[[15] Schaible HG](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Schaible%20HG%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2543081), [Neugebauer V](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Neugebauer%20V%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2543081), [Schmidt RF](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Schmidt%20RF%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2543081). Osteoarthritis and pain[J]. [Semin Arthritis Rheum.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2543081) 1989,18(2):30-34.

[[16] Ostergaard M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ostergaard%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=8533046) [Stoltenberg M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Stoltenberg%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=8533046) [Henriksen O,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Henriksen%20O%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=8533046) [et](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lorenzen%20I%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=8533046) al. The accuracy of MRI- determined synovial membrane and joint effusion volumes in arthritis. A comparison of pre- and post-aspiration volumes. Scand J Rheumatol. 1995, 24(5): 305-311.

[[17] Taskiran D,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Taskiran%20D%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=7513156) [Stefanovic-Racic M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Stefanovic-Racic%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=7513156), [Georgescu H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Georgescu%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=7513156), et al. Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1[J]. [Biochem Biophys Res Commun.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7513156) 1994,200(1):142-148.

[[18] Häuselmann HJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=H%C3%A4uselmann%20HJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=7926002), [Oppliger L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Oppliger%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=7926002), [Michel BA](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Michel%20BA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=7926002). Nitric oxide and proteoglycan biosynthesis by human articular chondrocytes in alginate culture[J]. FEBS Lett. 1994, 352(3): 361- 364.

[[19] Evans CH,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Evans%20CH%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=8791639) [Watkins SC](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Watkins%20SC%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=8791639), [Stefanović-RacićM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Stefanovi%C4%87-Raci%C4%87%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=8791639). Nitric oxide and cartilage metabolism[J]. [Methods Enzymol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8791639) 1996,269:75-88.

[20] Blanco FJ, Lotz M. IL-1 induced nitric oxide inhibits chondrocyte proliferation via PGE2 [J]. Exp Cell Res.1995,218(1):319-325.

[21] Stefanovic RM, Morales TI, Taskiran D, et al. The role of nitric oxide in proteglycan turnover by bovine articular cartilage organ cultures[J]. J Immunol. 1996, 156 (3):1213-1220.

[[22] Singh G](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Singh%20G%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10225536)[, Triadafilopoulos G](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Triadafilopoulos%20G%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10225536). Epidemiology of NSAID induced gastrointestinal complications[J]. [J Rheumatol Suppl.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10225536) 1999,56:18-24.

105

[23] [Wolfe MM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Wolfe%20MM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10369853), [Lichtenstein DR](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lichtenstein%20DR%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10369853), [Singh G.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Singh%20G%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10369853) Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs[J]. N Engl J Med.1999,340(24):1888-1899.

[24][周崑，](http://210.41.208.102/rewriter/16/http/vvv9bmjh9mds/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e5%91%a8%e5%b4%91&amp;code=14347368%3B08809867%3B15262601%3B15191411%3B)[周伟，](http://210.41.208.102/rewriter/16/http/vvv9bmjh9mds/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e5%91%a8%e4%bc%9f&amp;code=14347368%3B08809867%3B15262601%3B15191411%3B)[陈文直，](http://210.41.208.102/rewriter/16/http/vvv9bmjh9mds/KCMS/detail/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20/kcms/detail/search.aspx?dbcode=CJFQ&amp;sfield=au&amp;skey=%e9%99%88%e6%96%87%e7%9b%b4&amp;code=14347368%3B08809867%3B15262601%3B15191411%3B)等. 低强度脉冲超声对美蓝渗入正常兔膝关节软骨的作用

[J]. 重庆医科大学学报,2012,37(2):121-124.

[25]周永昌，郭万学。超声医学（第四版）[M]. 北京：科学技术文献出版社.2003,1716-1725.

106

### 全文总结

KOA发病率高，无法治愈，传统治疗方法存在药物副作用大，创伤大，医疗成本高，经济负担重等诸多弊端。传统非聚焦超声治疗KOA历史悠久，一直以来多采用频率为1-1.5MHz，声强为1-2.5W/cm2的非聚焦超声，采用连续能量输出方式，作用部位多在关节周围的肌肉及软组织，主要利用超声的温热效应缓解关节周围肌肉及软组织痉挛，虽然取得了一定的临床疗效，但其疗效存始终存在争议。

由于OA病变核心在于退变的关节软骨，软骨处于关节内部，位置较深，传统的较高频率的非聚焦超声穿透能力差，在传播过程中能量发生衰减，很少有超声能量进入到关节间隙内，难以直接作用于关节软骨。因此我们通过改变超声的治疗参数从而改变其物理特性，运用更低频率(0.6MHz)，更低强度(120mW/cm2)的脉冲聚焦超声技术直接作用于关节软骨，观察其临床安全性有效性，并探索其机制。

研究结果如下：

（1）FLIPUS能明显缓解KOA疼痛症状，改善膝关节功能障碍，提高KOA患者生活质量，无与FLIPUS相关的不良事件发生。表明FLIPUS治疗KOA安全，有效。

（2）通过Hulth法建立新西兰兔KOA模型，通过大体观察及多序列MRI扫描观察软骨、软骨下骨损伤及骨赘大小的动态变化。结果提示该动物模型能高度模拟人类KOA发病特点，可以借鉴人类KOA软骨损伤的MRI分级标准，建立该动物模型的MRI分级标准评价软骨损伤分级，鉴定该动物模型的疾病分期，为选择不同发病阶段的KOA模型提供一种无创评价的方法。

（3）FLIPUS主要利用其机械效应，作用于软骨能明显延缓KOA模型兔软骨基质的主要成分——PGs及COL II的丢失，达到保护关节软骨基质的目的。

（4）FLIPUS在早期能有效地刺激软骨细胞增殖，并延缓软骨细胞凋亡。主要通过减少软骨凋亡维持有效软骨细胞数量，起到延缓软骨退变的目的。

（5）FLIPUS通过改善滑液循环，减少关节积液量，加速关节积液中的NO、PGE2的代谢从而缓解炎症反应，改善软骨细胞生存的微环境，达到延缓软骨细胞凋亡，缓解关节内压力，保护关节软骨及恢复关节功能的目的。

107

### 附图

# 第一部分 附图



**图1-1 FLIPUS治疗KOA：四个超声头分别定为与内外侧膝眼，内外侧关节间隙。**

**Fig 1-1 Procedure for use of therapeutic ultrasound equipment: the knee eyes, interior and lateral knee joint spaces have been marked and the heads fixed to the knee eyes and the knee joint space.**



**图1-2** **伦理学批件**

**Fig 1-2 The Ethics Committee of Chong Qing Medical University Approval Notice**

108

# 第二部分 第一节附图



**图2-1. Hulth法建立新西兰兔膝骨关节炎模型步骤。MCL:内侧副韧带; ACL:前交叉韧带; Medial femoral condyle:股骨內髁；Meniscus medialis:内侧半月板。**

**Fig 2-1. The OA model was constructed by surgery in New Zealand rabbits. MCL: Medial collateral ligament; ACL: Anterior cruciate ligament.**

109



**图2-2. 术后2周-8周，模型兔膝关节MRI表现。上排图像：Representative T2-FI3D-we-sag sequence MRI序列显示术后2-8周内侧股骨髁及胫骨平台软骨损伤情况。箭头提示术后2周，软骨变薄（软骨损伤1级），术后4周软骨肿胀，软骨表面不完整（软骨损伤1-2级），术后8周软骨大量缺损（软骨损伤3-4级）。下排图像：Representative sagittal spoiled gradient sequence MRI序列显示术后2-8周股骨髁及胫骨平台软骨下骨高信号。A，前；P，后；圆圈提示软骨下骨损伤部位（mm）。**

**Fig 2-2. Representative Magnetic Resonance Images (MRI) of Rabbit Knees from Weeks Two through Eight Post-Surgery. Upper panels: Representative T2-FI3D-we-sag sequence MRI showing cartilage defects on the medial femoral condyles and tibial plateaus. Arrows indicate cartilage thickening (grade one) at week two post-surgery, cartilage edema or thickening with an intact surface (grades one to two) at week four post-surgery, and loss of cartilage (grades three to four) at week eight post-surgery. Lower panels: Representative sagittal spoiled gradient sequence MRI of femoral condyles, trochlea, and tibial plateaus showing the evolution of subchondral bone hypersignal from weeks two through eight post-surgery. A, anterior; P, posterior; circles indicate lesion areas (mm).**

110



**图2-3. 造模后2-8周软骨标本大体观察：L，外侧；M，内侧。红色圆圈提示软骨损伤部位(mm). Fig 2-3. Macroscopic Appearance of Osteoarthritic Cartilage from Weeks Two through Eight Post-Surgery. L, lateral; M, medial. Circles indicate lesion areas (mm).**



**图2-4.基线，2周，4周及8周软骨损伤MRI评分与大体观察评分相关性评价（n=20膝关节）Fig2-4. Correlations between Magnetic Resonance Imaging and Macroscopic Lesion Grading at Different Time Points (n=20 knees).**

111

**第二部分第二节附图**



**图3-1. CZG200型超声关节治疗仪及KOA动物模型治疗情况。**

**Fig 3-1. The Model CZG200 Model Ultrasound Therapeutic Device for Arthritis. KOA model was selected randomly to receive FLIPUS.**



**10×20**

**图3-2. 蛋白聚糖染色显示为红色。A: FLIPUS干预2周组; B: 假FLIPUS干预2周组; C:**

**FLIPUS干预4周组; D: 假FLIPUS干预4周组; E: FLIPUS干预8周组; F: 假FLIPUS干预8周组**

**(N =10).**

**Fig 3-2. PGs postive expression appeared red in the each group, ×200 magnification. A: FLIPUS intervention for 2 weeks; B: Sham intervention for 2 weeks; C: FLIPUS intervention for 4 weeks; D: Sham intervention for 4 weeks; E: FLIPUS intervention for 8 weeks; F: Sham intervention for 8 weeks (n =10 each).**

112



**10×20**

**图3-3.胶原阳性表达为棕色(×200 ). A: FLIPUS干预2周组; B: 假FLIPUS干预2周组; C:**

**FLIPUS干预4周组; D: 假FLIPUS干预4周组; E: FLIPUS干预8周组; F: 假FLIPUS干预8周组. (n =10).**

**Fig 3-3. COL II postive expression appeared brown in the each group, ×200 magnification. A: FLIPUS intervention for 2 weeks; B: Sham intervention for 2 weeks; C: FLIPUS intervention for 4 weeks; D: Sham intervention for 4 weeks; E: FLIPUS intervention for 8 weeks; F: Sham intervention for 4 weeks.**

113

**第二部分第三节附图**



**10×10**

**图4-1正常软骨的HE染色：S浅表层；T移形层；U上放射层；L 下放射层；TM潮线和CC 钙化层。**

**Fig 4-1 HE staining of articular cartilage: S superficial zone; T transitional zone; U upper radial zone; L lower radial zone; TM Tidemark; CC calcified cartilage.**

114



**10×10**

**图4-2 各组软骨不同时间点HE染色：A 2周组FLIPUS侧；B 2周组对照侧；C 4周组FLIPUS侧；D 4周组对照侧；E 8周组FLIPUS侧；F 8周组对照侧。黑色箭头提示增生软骨细胞簇（育囊），黄色箭头提示软骨裂隙。**

**Fig 4-2 HE staining of articular cartilage at different time points. A FLIPUS side at week 2; B control side at week 2; C FLIPUS side at week 4; D control side at week 4; E FLIPUS side at week 8; F control side at week 8. Black arrows indicate chondrocyte clusters, yellow arrows indicate cartilage fissures.**

115



**×6000×10000**

**图4-3正常软骨细胞超微结构：红色星号代表细胞核；黑色箭头提示软骨细胞微绒毛；绿色箭头提示粗面内质网；红色箭头提示脂滴。**

**Fig 4-3 The cellular structure of normal chondrocytes: red asterisk indicate nucleus; black arrows indicate microvilli; green arrows indicate rough surfaced endoplasmic reticulum; red arrows lipid droplet.**

116



**×10000**

**图4-4各组软骨细胞超微结构：A：2周组FLIPUS侧；B：2周组对照侧；C：4周组FLIPUS侧；D: 4周组对照侧；E：8周组FLIPUS侧；F：8周组对照侧。黑色箭头提示髓鞘样变，红色箭头提示软骨空泡样变性。**

**Fig 4-4 The cellular structure of chondrocytes at different time points. A FLIPUS side at week 2; B control side at week 2; C FLIPUS side at week 4; D control side at week 4; E FLIPUS side at week 8; F control side at week 8. Black arrows indicate** [**myelin figure**](http://www.iciba.com/myelin_figure)**, red arrows indicate vacuolar degeneration.**

117



**10×20**

**图4-5** **黑色箭头提示PCNA阳性细胞。A: 2周组FLIPUS侧; B: 2周组对照侧; C: 4周组FLIPUS**

**侧; D: 4周组对照侧; E: 8周组FLIPUS侧; F: 8周组对照侧(n =10)。**

**Fig4-5 PCNA postive expression in the each group, ×200 magnification. Blank arrows indicate positive cells. A: FLIPUS intervention for 2 weeks; B: Sham intervention for 2 weeks; C: FLIPUS intervention for 4 weeks; D: Sham intervention for 4 weeks; E: FLIPUS intervention for 8 weeks; F: Sham intervention for 8 weeks**



**10×20**

**图4-6 黑色箭头提示Tunel阳性细胞。A: 2周组FLIPUS侧; B: 2周组对照侧; C: 4周组FLIPUS**

**侧; D: 4周组对照侧; E: 8周组FLIPUS侧; F: 8周组对照侧。**

**Fig 4-6 Apoptosis postive expression in the each group, ×200 magnification. Red arrows indicate positive cells. G: FLIPUS intervention for 2 weeks; H: Sham intervention for 2 weeks; I: FLIPUS intervention for 4 weeks; J: Sham intervention for 4 weeks; K: FLIPUS intervention for 8 weeks; L: Sham intervention for 4 weeks. (n =10 each)**

118



**图4-7** **2周组Annexin V-FITC/PI双染法检测软骨细胞早期凋亡率：A FLIPUS侧；B对照侧**

**Fig4-7 Expression of apoptosis in chondrocytes were measured by flow cytometry (Annexin V-FITC/PI ) at 2 weeks: A FLIPUS side; B control side.**



**图4-8** **4周组Annexin V-FITC/PI双染法检测软骨细胞早期凋亡率：A FLIPUS侧；B 对照侧。**

**Fig4-8 Expression of apoptosis in chondrocytes were measured by flow cytometry (Annexin V-FITC/PI ) at 4 weeks: A FLIPUS side; B control side.**



**图4-9 8周组Annexin V-FITC/PI双染法检测软骨细胞早期凋亡率：A FLIPUS侧；B 对照侧。**

**Fig4-9 Expression of apoptosis in chondrocytes were measured by flow cytometry (Annexin V-FITC/PI ) at 8 weeks: A FLIPUS side; B control side.**

119

**第二部分第四节附图**



**图5-1膝关节积液三维重建图像， 红色影像为膝关节积液. A: 2周组FLIPUS侧；**

**B: 2周组对照侧; C: 4周组FLIPUS侧; D: 4周组对照侧; E: 8周组FLIPUS侧; F: 8周组对照侧(n =10).**

**Fig 5-1 Three-dimensional reconstruction of the knee effusion imaging, red imaging indicate knee effusion. A: FLIPUS intervention for 2 weeks; B: Sham intervention for 2 weeks; C: FLIPUS intervention for 4 weeks; D: Sham intervention for 4 weeks; E: FLIPUS intervention for 8 weeks; F: Sham intervention for 8 weeks. (n =10 each).**

120

### 文献综述

**细胞因子在骨关节炎发病中的作用研究进展**

**【摘要】**骨关节炎(Osteoarthritis, OA)是一种以关节软骨破坏，软骨下骨和滑膜炎症为特征的慢性疾病。目前认为OA是生物性因素与机械性因素相互作用，使软骨细胞，软骨基质及软骨下骨合成与降解的平衡失常的结果[1]。细胞因子在其发病过程中扮有重要角色，了解相关细胞因子在骨关节炎发病中的作用机制，将对骨性关节炎诊断、治疗及预后评价有指导意义。

**【关键词】**骨性关节炎；细胞因子；软骨细胞；软骨基质；软骨下骨 **前言**

骨性关节炎( Osteoarthritis, OA)又称退行性关节病，好发于人体承重关节，以关节软骨完整性破坏以及关节边缘软骨下骨板病变，导致关节症状和体征的一组异质性、慢性关节疾病。该病常好发于中老年人，根据流行病学调查，45～65岁的人群发病率达30%，80岁以上人群发病率为53-55%[1]。随着全球人口老龄化进程加快，OA患病率也呈现直线上升的趋势。该病引起关节疼痛、功能障碍，严重影响患者生活质量。目前越来越多研究表明细胞因子在骨性关节炎发病中起到重要作用。在50余种已阐明的细胞因子中，其中近十种细胞因子与骨性关节炎发病有关。细胞因子作用机制复杂，且相互影响。现将几类主要细胞因子及其在骨关节发病中的作用机制综述如下。

### **1** 致炎细胞因子

### **1.1** 白细胞介素**1(Interleukin-1, IL-1)**

IL-1可分为IL-1α和IL-Iβ两种亚型，由活化的滑膜衬里层细胞，单核细胞及软骨细胞分泌。IL-1能诱导软骨细胞和滑膜细胞产生其它细胞因子，如IL-6,8以及刺激蛋白酶和前列腺素E2(PGE2)的生产。在体外研究中，IL-1β也被证明能增加破骨细胞活性，促进骨吸收，加剧软骨下骨破坏[2]。通过阻断IL-1的活性及采用IL-1受体拮抗剂能减少滑膜成纤维细胞分泌其他致炎因子[3]。总的说来，IL-1

121

可以通过以下途径对OA的发病产生影响。

#### **1.1.1** 对基质金属蛋白酶**(Matrix metallo proteinases, MMPs)**的影响

软骨细胞及滑膜细胞合成，激活和抑制MMPs的表达能在多个层面上紧密调节并维持软骨基质分解代谢与合成代谢的平衡。MMPs的过度表达导致软骨肿胀，破坏软骨基质及关节正常结构。在OA软骨中存在胞浆素原激活物(plasminogenal activator, PA)能增加MMPs的活性。同时，胞浆素原激活物抑制物-1(plasminogenal activator inhibitor 1, PAI-1)能抑制PA表达[4]。目前研究认为IL-1可刺激PA的分泌，并抑制PAI-l的合成。故在OA软骨中高表达的IL-1通过刺激PA分泌，激活各关节组织中MMPs，使其高表达。与此同时，IL-1抑制金属蛋白酶组织抑制剂（tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMPs）的表达，导致MMPs/TIMPs平衡失调引起软骨基质破坏。

#### **1.1.2** 对白细胞介素**1**受体**(Interleukin-1**[**receptor**](http://dict.youdao.com/w/receptor/)**, IL-1R)**的影响

在软骨细胞与滑膜细胞中，IL-1的生物活性通过与特定表面受体IL-1R结合实现。在已知的两种受体中，IL-1主要与IL-1RI结合。在OA中，软骨细胞和滑膜细胞中的I型IL-1R高表达，导致软骨细胞及滑膜细胞对IL-l具有高度敏感性，增加了他们分泌MMPs及其他致炎因子介导关节破坏的可能。

#### **1.1.3** 对前列腺素**E2(Prostaglandin E2, PGE2)**的影响

IL-1有强大的促炎症作用[8]，可刺激滑膜细胞合成和释放PGE2. COX-2调节并产生PGE2. IL-1通过刺激COX-2的过量表达，使PGE2合成增加。PGE2通过细胞间环腺苷酸积累，直接参与诱导软骨细胞凋亡，同时加重滑膜炎性反应，诱发疼痛。此外，PGE2还能增加破骨细胞形成，参与软骨下骨重塑[5]。

#### **1.1.4** 对软骨的影响

软骨是由少量的软骨细胞及细胞外基质构成，因此细胞外基质破坏意味着软骨的破坏。软骨细胞分泌II型胶原及蛋白聚糖对维持细胞外基质有重要意义。OA软骨细胞表面有高水平的IL-1R，导致软骨细胞与IL-1有高度亲和性。IL-1对软骨基质的影响主要通过干扰软骨细胞正常代谢来实现。一方面，IL-1抑制胶原及蛋白聚糖的合成，同时抑制软骨细胞增殖[6]，使培养的关节软骨细胞内SA-β-Gal的活性增高，促进关节软骨细胞内caveolin-1表达增高而诱导关节软骨细胞发生过早衰老

122

[7]；另一方面，IL-1通过刺激软骨细胞及滑膜细胞产生大量的MMPs破坏软骨基质[8]，最终导致软骨基质丢失，发生进行性退变，促进OA的发展。

#### **1.1.5** 对滑膜的影响

由于滑膜衬里层细胞分泌IL-1使得OA滑膜细胞中IL-1表达十分活跃。IL-1可刺激滑膜成纤维增殖，提高纤维素分泌量，产生胶原酶及PGE2，使单核细胞浸润，促进滑膜细胞黏附因子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)的表达[9]，通过各种炎症介质的合成增加从而加重滑膜炎症反应。

### **1.2** 肿瘤坏死因子**(Tumor necrosis** factor-α, TNF-α**)**

TNF-α被认为是导致基质降解和促进滑膜炎症反应的重要细胞因子。TNF-α是以一种前体蛋白的形式合成的，其包含76个氨基酸。溶蛋白水解发生在细胞表面，通过ADAM亚族的TNF-α细胞表面转化酶TACE[10]来完成。有研究发现OA软骨中TACE mRNA上调，并认为该酶的参与TNF-α受体脱落导致OA发生[11]。TNF-α可以结合两个特殊膜受体——TNF-R55和TNF-R75[12-14]，分子量分别为55～60 kD和75～80 kD [15,16]。有报道称在OA软骨细胞和滑膜成纤维细胞中TNF-R55呈高表达[17, 18]，因而认为TNF-R 55是介导TNF-α活性的主要受体。虽然认为TNF-R55主要与OA多种细胞的生物特性相关，但TNF-R55和TNF-R75均积极参与信号转导[17,19-22]，共同参与调节TNF-α表达[23]。

TNF-α可以从促进软骨基质降解和抑制软骨细胞合成两个方面对OA的病变产生作用，表现为：(1) TNF-α通过增加MMPs的活性来抑制软骨基质中胶原及蛋白聚糖的合成，抑制软骨细胞线粒体的活性，进而影响软骨基质的修复[24]；(2) TNF-α可促进成纤维细胞和软骨细胞合成PGE-2和多种胶原酶[25]，上调蛋白水解活性受体mRNA的表达[26]，加速软骨基质破坏。(3) TNF-α能增强滑膜细胞mRNA表达，促进滑膜成纤维细胞增殖，使滑膜组织纤维性变从而改变软骨细胞的生活微环境诱发软骨细胞凋亡[27]。(4) TNF-α在OA软骨下骨中可诱发骨母细胞产生破骨细胞活化因子，激活破骨细胞促进骨吸收并抑制骨形成和骨钙化，进一步加剧对软骨下骨的破坏[27]。

### **1.3** 白细胞介素**-17 (Interleukin-17, IL-17)**

IL-17不是单一的细胞因子，而是一种细胞因子家族。作为一种炎症前细胞因

123

子，在骨关节炎早期中发挥重要作用。CAI等[28]发现IL-17可诱发并加重小鼠膝OA中滑膜炎症和关节破坏。Bush等[29]发现阻断LI-17能够减轻自身免疫反应、缓解关节损伤程度，减少滑膜释放IL-6及I型胶原降解标志物(C-telopeptide)从而保护关节软骨。Honorati等[30]发现IL-17能上调并释放IL-8、生长相关基因α，同时促进IL-lβ的合成。有研究结果证实IL-17能活化NF-KB，上调软骨中NO的表达[31]。并证实

OA软骨细胞中NO的增加水平与IL-17水平呈正相关，并与TNF-α、IL-1β、前列腺素E2发生协同效应[32, 33]。基于以上发现，IL-17从以下多个方面参与骨关节炎的发生和发展：①IL-17与TNF-α、IL-1β等协同刺激关节滑膜细胞分泌多种炎症因子，加重炎症反应，加速关节软骨的降解。②增加iNOS及NO水平，诱导软骨细胞凋亡。

③上调关节组织中基质金属蛋白酶(MMP-1, 3, 13)的表达，增强胶原酶和蛋白聚糖酶活性，促进软骨基质降解，抑制软骨细胞合成蛋白聚糖，加剧软骨基质的破坏[22]。

④与TNF-α或IL-10产生协同作用，上调COX-2的表达，增加软骨细胞和滑膜细胞合成PGE2，介导炎症反应及疼痛发生[33]。⑤增强破骨细胞分化因子基因表达，诱导破骨细胞祖细胞向成熟破骨细胞分化，加剧软骨下骨破坏[34]。⑥促进骨关节炎中软骨血管生成[34]。

### **1.4** 白细胞介素**-18(Interleukin-18, IL-18)**

IL-18主要由活化巨噬样细胞和Kupffer细胞等细胞产生前炎症细胞因子，与IL-1结构相似，与IL-1有及其相似的信号传导途径。Gracie等[35]发现OA患者滑膜、滑液中IL-18水平明显要高于正常人，并认为IL-18可能加速了滑膜炎症反应并诱导软骨细胞调亡。IL-18能促进单核细胞产生的TNF-α和IL-1β，同时刺激巨噬细胞、T细胞、单核细胞及其他组织产生IL-8、IL-1β、TNF-α和PGE2等致炎细胞因子。在体外，IL-1β、TNF-α可以上调IL-8的表达，暗示IL-18与TNF-α在骨关节炎发展中起正循环作用[36]。总之，IL-18通过刺激滑膜细胞和软骨细胞产生MMP-1, 3, 13参与降解软骨基质，最终破坏关节正常结构。

### **1.5** 前列腺素**E2** [**(Prostaglandin**](http://dict.youdao.com/w/prostaglandin/) **E2, PGE2)**

PGE2是花生四烯酸的代谢产物，由环氧酶(COX)启动前列腺素的生物合成。在骨关节炎滑膜炎症中，约有30%PGE2是通过COX-1途径产生[37]。但是，PGE2的产生主要还是由COX-2来调节。COX-2的过量表达可由炎症前因子IL-1β、

124

TNF-α、IL-18等诱导。PGE2介导炎症反应，对结缔组织细胞发挥多种作用。Mccoy等[38]研究表明在关节炎组织中存在PGE2受体，与PGE2结合发挥作用，调控软骨细胞的合成活性，直接影响软骨重塑。一方面，高水平的PGE2可导致胶原破坏，蛋白聚糖丢失、软骨发生退变[38]。另一方面，PGE2同时能增加破骨细胞形成，加速软骨下骨破坏，并直接诱导软骨细胞凋亡，抑制软骨修复[41]。另外，PGE2还能刺激关节周围的感觉神经末梢，引起外周感受器敏化从而引起关节疼痛。

### **1.6** 一氧化氮**(NO)**

NO是一种无机自由基，在调节OA软骨代谢中发挥一定作用。NO由L-精氨酸经一氧化氮合酶(NOS)催化生成。NOS包括结构型(cNOS)和诱导型(iNOS)两种形式。Grabowsky[39]等研究证实与正常软骨相比，OA软骨细胞能自发地或在致炎因子刺激下产生大量NO. NO主要通过三个方面诱导软骨细胞凋亡，导致软骨破坏：

（1）NO下调聚集PGs和胶原的生物合成及提高MMPs活性来降解OA软骨细胞

[16-18,24,26,40]和诱导软骨细胞凋亡来介导炎症反应及组织毁损；(2) NO通过PGE2抑制

软骨细胞的增殖[41]；（3）NO抑制软骨细胞外基质中蛋白聚糖的合成[42]。

### **2** 软骨修复和Th长因子

### **2.1** 转化Th长因子**-**β**(**[**Transforming**](http://dict.youdao.com/w/transforming/) [**growth**](http://dict.youdao.com/w/growth/) [**factor**](http://dict.youdao.com/w/factor/)-β, TGF-β**)**

TGF-β属于[TGF超家族](http://baike.baidu.com/view/3848164.htm)蛋白，是促进软骨合成能力最强的生长因子之一。目前发现TGF-β参与OA中组织的修复，促进软骨基质合成，减轻组织炎症反应，并诱导软骨前体细胞分化为软骨细胞。在关节软骨增殖方面，TGF-β主要表现为促进

DNA合成增强，细胞数量增加，抑制软骨细胞向肥大细胞分化。Boumediene K[43]等在实验中也证实在OA的早期阶段TGF-β可以促进软骨细胞的合成。在维持关节软骨基质方面，TGF-β能调节细胞外胶原分子和蛋白聚糖的表达，在转录水平上激活I，II，III型胶原的表达。与此同时，TGF-β还能降低基质中金属蛋白酶(MMPs)的含量，以达到保护软骨细胞外基质的目的。Shlopov BV[44]等研究表明TGF-β干预OA软骨细胞时MMP-1, 9, 13的mRNA表达水平降低，MMPs的蛋白表达下降。TGF-β还可以通过调节TIMPs的表达从而保护关节软骨。由此看来，TGF-β可能通过维持

MMPs和TIMPs表达的平衡来抑制关节软骨基质的病理性降解[45]。

125

### **2.2** 胰岛素样Th长因子**(Insulin-like growth factor, IGF)**

IGF由IGF-I和IGF-Ⅱ两种相关多肽构成，参与软骨基质分子的合成代谢。其中，IGF-I能促进软骨细胞生长[46]。当蛋白酶及胶原酶激活导致软骨基质降解，软骨遭受破坏时，关节滑膜各层细胞、软骨细胞和成骨细胞能够分泌IGF-I并使其活化。

IGF通过促进软骨细胞增殖、加强蛋白聚糖及胶原的合成，以维持内环境的稳定。研究表明IL-1诱导的软骨蛋白聚糖的丢失能被滑膜细胞表达IGF-I部分逆转，IGF-1联合IL-IRa治疗甚至能完全恢复已丢失的软骨蛋白聚糖水平[47]。此外，IGF-1可以抑制MMP-13的表达，达到抑制软骨基质降解，护软骨细胞基质的目的[48]。

### **2.3** 骨形态发Th蛋白**(Bone morphogenetic protein, BMP)**

BMP最早由美国的Marshall R. Urist教授于1963年发现。迄今为止，已发现BMP家族包括40余种蛋白，除BMP-1外，均属于TGF-β基因超家族成员，因此与TGF-β有及其相似的信号传导途径。BMP能多途径抑制OA软骨破坏、修复缺损的OA关节软骨、诱导软骨细胞的形成。以上积极作用均在基础实验中等到证实：Fowler[49]等发现，在OA动物模型中给予BMP可以加速局部受损软骨的愈合。Marinova-

Mutafchiveva[50]等也发现BMP-7通过抑制小鼠成纤维细胞对软骨组织的浸润达到延缓软骨基质降解的目的。Sellers[51]等在兔双侧髌股关节面软骨缺损区注入(rhBMP-2) /Pluronic复合物，可观察到I型胶原纤维和成熟的软骨细胞生成。田洪涛

[52]等研究证实BMP可以定向诱导OA动物关节的间充质细胞向软骨细胞分化，且

BMP的浓度与类型直接影响软骨细胞的成熟程度。由此推测，BMP修复OA软骨的机制可能是促进软骨细胞分化，提高TIMPs含量或活性，抑制MMPs对软骨基质的降解，达到保护关节软骨的目的。

**3抑制分解代谢和对抗致炎细胞因子**

这些因子包括IL-4,10,13以及白细胞介素1受体拮抗剂（IL-1Ra）。IL-4,10,13由滑膜和软骨细胞合成，通过减少致炎细胞因子的生成来发挥拮抗剂的作用。

Obacz及Hegemann[53,54]实验证明，IL-4, 10能够抑制相关胶原酶及蛋白酶的mRNA的表达，并能抵抗致炎细胞因子对软骨的负性作用。IL-IRa作为IL-lR的竞争抑制剂，不与IL-1结合，能阻断滑膜细胞合成PGE2，促进软骨细胞分泌胶原以及抑制软骨基质的降解。总而言之，这些细胞因子的抗炎特性包括上调IL-lRa 及

126

TIMPs的表达，同时减少MMPs, IL-1, TNF-α的产生，并抑制PGE2释放，从而保护关节软骨。

**4调节性细胞因子**

白细胞介素6(IL-6)又称为B细胞分化因子，在IL-1、TNF-α等致炎因子的诱导下由巨噬细胞、纤维母细胞、软骨细胞、破骨细胞等产生。Bjornsson[41]等人发现IL-6在OA的全层软骨及滑膜中均呈现高表达，提示IL-6在骨性关节炎的发病中起到一定作用。一方面，Sakao[42]等认为IL-6通过激活滑膜内B及T淋巴细胞，引起自身免疫应答，诱导炎性反应，并通过自分泌形式作用于软骨细胞，影响软骨细胞的正常增殖，同时还能上调MMPs的表达和抑制蛋白聚糖产生，产生软骨破坏。另一方面，Lotz等[55]发现IL-6能诱导产生TIMPs参与保护软骨基质，并发现滑液中蛋白聚糖含量与IL-6含量存在正相关。故IL-6被认为与限制软骨基质分解损伤的负反馈机制有关。因而IL-6被认为具有调节软骨细胞合成代谢和分解代谢的双重作用。

## 小 结

综上所述，多种细胞因子相互影响，相互协同、相互拮抗，在OA发生及发展过程中发挥广泛而复杂的生物学效应。在众多的致炎细胞因子中，IL-1、NO、PGE2在整个环节中处于重要位置，在软骨基质丢失、软骨退变、直接诱导软骨细胞凋亡，诱发疼痛等方面做起重要作用。因此，深刻了解各种细胞因子在OA发病中的作用机制，从复杂的相互作用中找到规律，把握主要矛盾，将相关蛋白，细胞因子在细胞水平，组织水平及器官水平的相互作用联系起来，为OA的发病机理提供依据，为OA的治疗提供全新的途径。

127

参考文献

[1] Creamer P, Hochberg MC. Osteoarthtitis[J]. Lancet.1997,350:503-508.

[[2] Bertolini DR](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Bertolini%20DR%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=3511389), [Nedwin GE](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Nedwin%20GE%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=3511389), [Bringman TS](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Bringman%20TS%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=3511389), et al. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors[J]. Nature. 1986,319 (6053):516–518.

[3] Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis[J]. Annu Rev Immunol. 1996,14:397–440.

[4] Fujita Y, Shiomi T, Yanagimoto S, et a1. Tetraspanin CDl51 is expressed in osteoarthritic cartilage and is involved in pericellular activation of pro-matrix metalloproteinase 7 in osteoarthritic chondrocytes[J]. Arthritis

Rheum.2007,54(10): 3233-3244．

[5] Kwan Tat S, Pelletier JP, Lajeunesse D, et a1. The differential expression of osteoprotegerin(OPG) and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand(RANKL) in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts is an indicator of the metabolic state of these disease cells[J]. Clin Exp

Rheumatol.2008,26(2):295-304．

[6] Raymond L, Eck S, Hays E, et a1. RelA is required for IL-1 beta stimulation of Matrix Metalloproteinase 1 expression in chondroeytes[J]. Osteoarthritis and Cartilage.2007,15(4):431.

[7]赵东宝，单琤琤，戴生明.白细胞介素-1β诱导关节软骨细胞发生过早衰老的机制

[J].中华风湿病学杂志.2009,7(13):451-454.

[8]谢辉晋，杜远立. 骨关节炎相关细胞因子作用机制研究进展[J]. 重庆医学.2011,40(4)：395-398.

[9]邹国耀，张林。骨性关节炎中损伤细胞因子的研究进展[J]. 华夏医学.2009,22(5):987-990.

[[10] Black RA,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Black%20RA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9034190) [Rauch CT,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Rauch%20CT%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9034190) [Kozlosky CJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kozlosky%20CJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9034190), et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells[J]. Nature. 1997,385(6618):

729-33.

[[11] Amin AR](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Amin%20AR%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10419777). Regulation of tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor

128

Converting enzyme in human osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cart. 1999,7(4): 392-394.

[[12] Digel W,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Digel%20W%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2169926) [Schöniger W,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sch%C3%B6niger%20W%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2169926) [Stefanic M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Stefanic%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2169926), et al. Receptors for tumor necrosis factor on neoplastic B cells from chronic lymphocytic leukemia are expressed in vitro but not in vivo[J]. Blood. 1990,76(8): 1607–1613.

[[13] Scheurich P,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Scheurich%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=3029221) [Thoma B,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Thoma%20B%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=3029221) [Ucer U](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ucer%20U%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=3029221), et al. Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor (TNF) -alpha: induction of TNF receptors on human T cells and TNF-alpha-mediated enhancement of T cell responses[J]. J Immunol. 1987, 138(6):1786-1790.

[[14] Shalaby MR](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Shalaby%20MR%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=3031189), [Palladino MA Jr](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Palladino%20MA%20Jr%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=3031189), [Hirabayashi SE](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hirabayashi%20SE%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=3031189), et al. Receptor binding and activation of polymorphonuclear neutrophils by tumor necrosis factor-alpha[J]. J Leukoc Biol. 1987,41(3):196-204.

[[15] Loetscher H,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Loetscher%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2158862) [Pan YC](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Pan%20YC%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2158862), [Lahm HW](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lahm%20HW%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2158862), et al. Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor[J]. Cell. 1990,61(2):351-359.

[[16] Schall TJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Schall%20TJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2158863), [Lewis M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lewis%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2158863), [Koller KJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Koller%20KJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2158863), et al. Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor[J]. Cell.1990, 61 (2):361–370.

[[17] Alaaeddine N,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Alaaeddine%20N%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9330943) [DiBattista JA](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=DiBattista%20JA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9330943), [Pelletier JP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Pelletier%20JP%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9330943), et al. Osteoarthritic synovial fibroblasts possess an increased level of tumor necrosis factor-receptor 55 (TNF-R55) that mediates biological activation by TNF-alpha[J]. J Rheumatol.1997,24(10): 1985–1994.

[[18] Westacott CI,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Westacott%20CI%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=7799355) [Atkins RM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Atkins%20RM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=7799355), [Dieppe PA](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Dieppe%20PA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=7799355), et al. Tumour necrosis factor-alpha receptor expression on chondrocytes isolated from human articular cartilage[J]. J Rheumatol. 1994,21 (9):1710–1715.

[[19] Hohmann HP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hohmann%20HP%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2176217), [Brockhaus M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Brockhaus%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2176217), [Baeuerle PA,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Baeuerle%20PA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2176217) et al. Expression of the types A and B tumor necrosis factor (TNF) receptors is independently regulated, and both receptors mediate activation of the transcription factor NF-kappa B. TNF alpha is not needed for induction of a biological effect via TNF receptors[J]. J Biol Chem.1990,265(36):22409–22417.

[[20] Naume B,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Naume%20B%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=1707931) [Shalaby R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Shalaby%20R%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=1707931), [Lesslauer W](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lesslauer%20W%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=1707931), et al. Involvement of the 55- and 75-kDa tumor

129

Necrosis factor receptors in the generation of lymphokine-activated killer cell activity and proliferation of natural killer cells[J]. J Immunol. 1991,146 (9): 3045–3048.

[[21] Shalaby MR,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Shalaby%20MR%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2172437) [Sundan A,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sundan%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2172437) [Loetscher H,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Loetscher%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2172437) et al. Binding and regulation of cellular functions by monoclonal antibodies against human tumor necrosis factor receptors[J]. J Exp Med.1990, 172 (5):1517–1520.

[[22] Thoma B,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Thoma%20B%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2170559) [Grell M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Grell%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2170559) [Pfizenmaier K,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Pfizenmaier%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=2170559) et al. Identification of a 60-kD tumor necrosis factor (TNF) receptor as the major signal transducing component in TNF responses[J]. J Exp Med. 1990,172 (4):1019–1023.

[[23] Tartaglia LA,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Tartaglia%20LA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=8395508) [Pennica D](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Pennica%20D%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=8395508), [Goeddel DV.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Goeddel%20DV%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=8395508) et al. Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor[J]. J Biol Chem. 1993,268 (25): 18542–18548.

[24] Lopez-Armada MJ, Carames B, Martin MA, et al. Mitochondrial activity is modulated by TNF-alpha and IL-1 beta in normal human chondrocyte cells[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2006, 14(10):1011-1022.

[25] Ahramson SB, Amin A. Blocking the effects of IL-I in rheumatoid arthritis protects bone and cartilage[J]. Rheu matulogy.2002,41(9):972-980.

[26] Xiang Y, Masuko-Hongo K, Sekine T, et al. Expression of proteinase activated recepton(PAR) -2 in articular chondrocytes is modulated by IL-1beta, TNF-alpha and TGF-beta. Osteoarthritis Cartilage.2006,14(11):1163-1173.

[[27] Nakamura S,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Nakamura%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=8630101) [Kamihagi K](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kamihagi%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=8630101), [Satakeda H,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Satakeda%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=8630101) et a1. Enhancemant of SPARC(osteonetin) synthesis in arthritic cartilage．Increased levels in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and regulation by growth factors and cytokines in chondrocyte cultures[J]. Arthritis Rheum.1996,39:539-551．

[28] Cai L, Yin JP, Starovasnik MA, et al. Pathways by which interleukin-17 induces articular cartilage breakdown in vitro and in vivo[J]. Cytokine. 2001,16(1):10-21.

[29] Bush KA, Farmer KM, Walker JS, et al. Reduction of joint inflammation and bone erosion in rat adjuvant arthritis by treatment with interleukin-17 receptor IgGI Fe fusion protein[J]. Arthritis Rheum. 2002,46(3):802-805.

130

[30] Honorati MC, Bovara M, Cattini L, et al. Contribution of interleukin-17 to human cartilage degradation and synovial inflammation in osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage. 2002,10(10):799-807.

[31] Attur MG, Patel RN, Abramson SB, et al．Interleukin-17 upregulation of nitric

Oxide production in human osteoarthritis cartilage[J]. Arthritis Rheum.1997, 40(6):1050.

[32] Martel-Peltetier J, Mineau F, Jovanovic D, et al. Mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappaB together regulate interteukin-17-induced nitric oxide production in human osteoarthritic chondrocytes: possible role of transactivating

Factor mitogen-activated protein kinase-activated proten kinase(MAPKAPK) [J]. Arthritis Rheum.1999,42(11):2399-2409.

[33] LeGrand A, Fermor B, Fink C, et al. Interleukin-1, tumor necrosis factor alpha and interleukin-17 synergistically upregulate nitric oxide and prostaglandin E2 production in explants of human osteoarthritic knee menisci[J]. Arthritis Rheum.2001,44(9):2078-2083.

[34]董军峰，郑之和。骨关节炎与白细胞介素17 的关系[J]. 中国临床 康

复.2006,10(12):136-138.

[35] Gracie JA, Forsey RJ, Chan WJ, et al. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. J Clin Invet. 1999,104(10):1393-1401.

[36]彭成忠，肖涛.白细胞介素18 和前列腺素E2 与骨关节炎[J].中国临床康

复.2006,10(16):117-120.

[37] Knorth H, Dorfmuller P, Lebert R, et al. Participation of cyelooxygenase-l in prostaglandin E2 release from synovitis tissue in primary osteoarthritis in Vitro[J]. Osteoarthritis Cartilage.2004,12(8):658-666.

[38] McCoy JMi, Wicks JR, Audoly LP. The role of prostaglandin E2 receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. J Clin Invest.2002,110(5):651-658.

[39] Grabowski P S, Raiston S H, Macpherson H. Nitric oxide production in cells derived from the human joint[J]. Br J Rheumatol.1996,35:207-212．

[[40] Nakamura S,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Nakamura%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=8630101) [Kamihagi K](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kamihagi%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=8630101), [Satakeda H,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Satakeda%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=8630101) et a1. Enhancemant of SPARC(osteonetin)

131

Synthesis in arthritic cartilage．Increased levels in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and regulation by growth factors and cytokines in chondrocyte cultures[J]. Arthritis Rheum.1996,39:539-551．

[41] Bjornsson GL, Thorsteinsson L, Gudmundsson KO, et al. Inflammatory cytokines in relation to adrenal response following total hip replacement[J]. Stand Immuno. 2007, 65(1):99-104．

[42] Sakao K, Takahashi KA, Mazda O. et a1. Enhanced expression of interleukin-6, matrix metalloproteinase-13 and receptor active tor of NF-kappa B ligand in cells derived from osteoarthritic subchondral bone[J]. Orthop Sci.2008,13(3):202-210．

[43] Boumediene k. Vivien D, Macro M, et al. Modulation of rabbit articular chondrocyte (RAC) proliferation by TGF-beta isoforms. Cell Prolif.1995, 28(4): 221-234.

[[44] Shlopov BV](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Shlopov%20BV%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10211886), [Smith GN Jr](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Smith%20GN%20Jr%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10211886)[, Cole AA](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Cole%20AA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10211886), et al. Differential patterns of response to doxycycline and transforming growth factor beta1 in the down-regulation of collagenases in osteoarthritic and normal human chondrocytes[J]. Arthritis Rheum. 1999,42(4):719-727.

[45]吴忆贫，杨晓. TGF-β 在骨关节炎发生中的可能作用[J].生物工程进展.2001,

21(5):36-39.

[46]刘瑾春，刘霞.胰岛素样生长因子和胰岛素样生长因子结合蛋白在软骨细胞生长和发育过程中的调控作用研究进展[J]. 组织工程与重建外科杂志.2011, 7(1)：41-44.

[47] Nixon AJ, Hanpt JL, Frisbie DD, et al. Gene-mediated restoration of cartilage matrix by combination insulin-like growth factor-I/interleukin-1 receptor angst therapy [J]. Gene Ther.2005,12(2):177-186．

[[48] Im HJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Im%20HJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12734180), [Pacione C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Pacione%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12734180), [Chubinskaya S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Chubinskaya%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12734180). et al. Inhibitory effects of insulin-like growth factor-1 and osteogenic protein-1 on fibronectin fragment- and interleukin-1 beta stimulated matrix metalloproteinase-13 expression in human chondrocytes[J]. [J Biol Chem.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12734180) 2003,278(28):25386-25394.

[49] Fowler MJ, Neff MS, Borghaei RC, et a1. Induction of bone morphogenetic

132

Protein-2 by interleukin-1 in human fibroblasts [J]. Biochem Biophys Res Commun. 2005,248: 450-453.

[50] Marinova-Mutafchieva L, Taylor P, Funa K. et al. Mesenchymal cells expressing bone morphogenetic protein receptors are present in the rheumatoid arthritis joint[J]. Arthritis Rheum.2007,43:2046-2055．

[51] Sellers RS, Peluso D, MRIris EA, et a1. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2(rhBM P-2) on the healing of full thickness defects of articular cartilage[J]. Bone Joint Surg.2007,79:1452．

[52]田洪涛，杨述华，徐亮，等.骨形态发生蛋白-13 促进小鼠骨髓干细胞的软骨分化

[J].中国药师.2007,10(7):23-26．

[53] Bobacz K. Cruber R. soleiman A. et al. Expression of bone morphogenetic protein 6 in healthy and osteoarthritic human articular chondrocytes and stimulation of matrix synthesis in vitro. Arthritis Rheum.2003,48(9):2501-2508.

[[54] Hegemann N,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hegemann%20N%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16594200) [Wondimu A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Wondimu%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16594200), [Kohn B,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kohn%20B%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16594200) et al. Cytokine profile in canine immune- mediated polyarthritis and osteoarthritis[J]. Vet Comp Orthop Traumatol. 2005,18(2):67-72.

[55] Lotz M, Gueme PA. Interleukin-6 induces the synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases-1/erythriod poten- tiating activity (TIMP-1/EPA) [J]. J Biol Chem. 1991,266(4):2017-2020.

133

致 谢

三年的求学生涯已近尾声，回首三年前再次踏入校门时的情景，往事仍历历在目。在此论文即将完成之际，回想往事，百感交集。借此机会，我想对曾经在学习工作中给予我无私帮助与关心的老师，同学，同事，家人及朋友致以我诚挚的谢意！

首先衷心地感谢我的导师陈文直教授，本研究从基础实验的设计、临床方案的制定、数据的整理分析，最后到论文的撰写，无处不倾注其全部的心血与汗水。导师严谨的科学态度、敏锐的思维方式、开阔的国际化视野、勇于创新的科学精神着实令人敬佩。

特别感谢指导老师陈锦云副教授，在整个课题设计，实施到最后论文撰写过程中，陈老师不厌其烦、认真细致指导，才使得我及时发现诸多漏洞并及时加以改正，本研究才能顺利进行并最终完成。

本课题的完成得益于超声医学工程重庆市重点实验室的各位老师大力支持。在此，感谢王智彪教授、邹建中教授、白晋教授、李发琪教授、杜永洪副教授、王嫣副教授，乔海、王琦、刘映江、徐杰、李崇雁、王翠萍、冉成聃等老师以及彭松博士、张勇博士、邵如月博士、程重庆博士、肖智博博士、张愉硕士、任毅硕士、周微尘硕士给予我的无私帮助。

特别感谢重庆医科大学附属第二医院康复医学科的虞乐华教授、宋琦教授、贾功伟博士、殷樱博士、黄荣忠博士、吴丹冬博士、王瑛博士、赵若谷主治医师、邓艳业医师等在临床研究中给予的大力支持！没有各位领导、同事的理解与支持，我无法如期完成本课题的临床研究，更无法坚持完成学业！

感谢我的父母、爱人和朋友，你们永远是我最坚强的后盾！在我最困难的时候如果没有家人体谅和支持，没有朋友的关心和无私帮助，我很难想象独自一人将如何度过这三年的博士生活。

最后感谢为科研献身的实验动物，它们为人类的健康和进步做出了不可磨灭的贡献！

134

### 攻读博士期间发表的文章

[1] Jia L, Chen J, Wang Y, Liu Y, Zhang Y, et al. Magnetic Resonance Imaging of Osteophytic, Chondral, and Subchondral Structures in a Surgically-Induced Osteoarthritis Rabbit Model. PLoS ONE.2014,9(12): e113707.

[2] Lang Jia, Jinyun Chen, Yan Wang, Yu Zhang, Wenzhi Chen. Focused low-intensity pulsed ultrasound affects extracellular matrix degradation via decreasing chondrocyte apoptosis and inflammatory mediators in a surgically induced osteoarthritic rabbit model. Ultrasound Med Biol(Received).

135