

· 药理学 ·

不同分子量构成的玻璃酸钠对骨关节炎治疗作用的实验研究

路明珠¹, 陆文铨¹, 伊佳², 蔡国君² (1. 第二军医大学长征医院药剂科, 上海 200003; 2. 第二军医大学药学院, 上海 200433)

[摘要] 目的 观察不同分子量构成(分子量 150万 Da以上相对大分子和 150万 Da以下相对小分子)的玻璃酸钠对骨关节炎治疗作用的特点。方法 采用骨关节固定法和木瓜蛋白酶关节腔内注射两种方法造成兔膝关节炎模型, 采用病理学研究以及镇痛实验和毛细血管通透性实验评价两种不同分子量玻璃酸钠对骨关节炎的治疗效果。结果 两种玻璃酸钠对骨关节炎模型关节软骨和滑膜的病变均有不同程度的治疗作用, 均能有效镇痛, 并抑制毛细血管通透性。在木瓜蛋白酶注射法制作的兔膝关节炎模型中, 分子量为 150万 Da以下的相对小分子量玻璃酸钠组在促进软骨组织修复和减少滑膜组织增生方面治疗效果更好。结论 本研究选用的不同分子量玻璃酸钠在治疗骨关节炎方面均有确切疗效, 显示玻璃酸钠治疗骨关节炎安全有效, 而分子量为 80~150万 Da的相对小分子量玻璃酸钠在促进软骨组织修复和减少滑膜组织增生方面略显优势。

[关键词] 骨关节炎; 玻璃酸钠; 分子量

[中图分类号] R965.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2010)01-0019-04

Experimental study of therapeutic effects on osteoarthritis with sodium hyaluronate of different molecular weight

LU Ming-zhu¹, LU Wen-quan¹, YI Jia², CAI Guo-jun² (1. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To study the therapeutic effects of sodium hyaluronate injection of different molecular weight (MW: 800~1500 kDa vs 1500~2500 kDa) on osteoarthritis. **Methods** Two kinds of osteoarthritis models were induced in rabbit's knee joints: long-term immobilization experiment, and intra-articular injection of papain. Pathological study, analgesic effect experiment and capillary permeability experiment were carried out to observe the effects of treatment with intra-articular injection of sodium hyaluronate. **Results** Both of the two kinds of sodium hyaluronate injection of different molecular weight have the ability to resist the pathological changes of cartilage and synovial. They all show significant analgesic effect and inhibit capillary permeability. Furthermore, greater improvement in osteoarthritis models induced by intra-articular injection of papain was achieved by administration of sodium hyaluronate of relatively low molecular weight (MW: 800~1500 kDa). **Conclusion** Sodium hyaluronate of different molecular weight all could improve the outcomes of osteoarthritis. Our findings suggest that sodium hyaluronate treatment of osteoarthritis is a safe, effective therapeutic option, and low molecular weight sodium hyaluronate may have better performance in improving the pathological changes of cartilage and synovial.

[Key words] osteoarthritis; sodium hyaluronate; molecular weight

骨关节炎是一种以关节软骨变性、破坏及骨质增生为特征的慢性关节病, 中老年人多发, 致残率高, 严重影响中老年人的日常生活, 且患者常因缺乏运动而并发其他疾病威胁健康。玻璃酸钠即透明质酸, 是关节液及关节软骨的主要组成成分, 属于粘多糖的一种, 由特定的重复双糖单位构成, 具有良好的生物相容性、自动粘附性和可吸收性, 这对滑膜关节的润滑、软骨的保护以及对关节生物力学特性的维持起着重要作用^[1], 因此, 关节腔内注射玻璃酸钠

被认为是治疗骨关节炎的有效方法^[2,3]。组成玻璃酸钠的基本双糖单位的多少决定了它的分子量大小, 不同分子量的玻璃酸钠在治疗上具有不同的临床意义。本研究即选用不同分子量构成(分子量 150万 Da以上相对大分子和 150万 Da以下相对小分子)的玻璃酸钠, 针对骨关节炎镇痛和修复等治疗作用的特点开展了实验研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物 CR小鼠, 体重 18~20 g, 第二军医大学实验动物中心提供 [许可证号: SCXK(沪)2007-0003], 自由觅食和饮水, 室温(23±2), 自然光照。

[作者简介] 路明珠(1978-), 女, 药师。

[通讯作者] 蔡国君. E-mail: cai_gj@yahoo.com.

新西兰大白兔,体重(2.2 ± 0.2) kg,第二军医大学实验动物中心提供[许可证号:SCXK(沪)2007-0003],自由觅食和饮水,室温(23 ± 2),自然光照。

1.2 药品 玻璃酸钠注射液,分子量 150 ~ 250万 Da(施沛特,博士伦福瑞达,批号:071009011,规格:2 ml:20 mg);玻璃酸钠注射液,分子量 80 ~ 150万 Da(佰备,上海佰加壹医药有限公司,批号:20071208,规格:2.5 ml:25 mg)。

1.3 实验方法

1.3.1 木瓜蛋白酶致兔膝关节炎病理学研究 4组新西兰大白兔,每组 10只,分为两个给药组(大分子量玻璃酸钠组和小分子量玻璃酸钠组)、模型组和生理盐水对照组(NS组)。关节腔内注入木瓜蛋白酶造成骨关节炎病变模型。兔右膝关节腔内注入 1.6%木瓜蛋白酶(Merck产品)生理盐水溶液 0.5 ml,隔 3 d后,再注射第 2次,共注射木瓜蛋白酶 2次。于末次注射后的第 7天,对治疗组和 NS组分别在右膝关节腔内注射药物和生理盐水 0.3 ml,每周 1次,共 5周。于末次注射后的第 7天,将兔处死,打开关节腔进行大体观察后取标本,进行组织学研究。对侧标本作为正常对照。观察指标:膝关节有无积液和滑膜肿胀等滑膜炎表现,并于解剖显微镜下观察股骨内髁关节面的病理改变。按以下标准评分:

- 0分:关节面光滑,色泽如常;
- 1分:关节面粗糙,有小的裂隙且色泽灰暗;
- 2分:关节面糜烂,软骨缺损深达软骨表中层;
- 3分:关节面溃疡形成,缺损深达软骨深层;
- 4分:软骨剥脱,软骨下骨质暴露。

取膝关节股骨髁及部分半月板软骨和滑膜做光镜标本。滑膜行 4%多聚甲醛固定,再按常规脱水、浸蜡、包埋、切片、HE染色观察滑膜形态学变化。软骨标本采用 4%多聚甲醛(pH 7.4)固定 72 h,15%乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙 10周,石蜡包埋,HE染色观察软骨形态学变化。

1.3.2 关节固定法致兔膝关节炎病理学研究 动物分组情况同前,各组兔右膝用石膏固定于伸直位,固定范围上至髌关节下方,下至髁关节上方,6周后去除石膏制成骨关节炎模型。造模结束后第 2天,关节腔注射相应的药物(0.1 ml/只)。每周 1次连续 4次,最后一次注射给药 1周后处死。按照上述方法,打开关节腔进行大体观察后取标本,进行组织学研究。取左侧标本作为正常对照进行比较。

1.3.3 对小鼠镇痛作用的研究 采用扭体法。30只小鼠随机分成 3组(每组 10只),腹腔注射药物 0.1 ml/10 g(小分子量、大分子量、生理盐水),给药 15 min后腹腔注射 0.7%的醋酸(0.1 ml/10 g),

观察记录注射冰醋酸后小鼠开始出现扭体反应的时间(潜伏期)及 15 min内小鼠出现扭体反应的次数。

1.3.4 对小鼠腹腔毛细血管通透性的研究 30只小鼠随机分成 3组(每组 10只),腹腔注射药物 0.1 ml/10 g(小分子量、大分子量、生理盐水),给药 3 h后,尾静脉注射 2%伊文氏兰溶液(0.1 ml/10 g),随即腹腔注射 0.6%的醋酸(0.2 ml/只),20 min后处死小鼠,以 6 ml生理盐水洗腹腔,收集洗液,合并后加入生理盐水至 10 ml,最后离心,取上清液,在 590 nm处测光密度值。

1.4 统计学处理 结果采用 SPSS13.0软件处理,采取单因素方差分析(one-way ANOVA)检验。

2 结果

2.1 玻璃酸钠对木瓜蛋白酶致兔膝关节炎的治疗作用 病理学研究显示,空白组关节软骨排列规整,层次无明显异常(图 1A),模型组滑膜组织增生,血管扩张充血,大量炎细胞浸润(图 1B),大分子量玻璃酸钠组显示滑膜组织增生,炎细胞浸润,但与模型组相比改善显著(图 1C);小分子量玻璃酸钠组关节软骨和滑膜炎症改变较轻,较模型组改善非常显著(图 1D)。表 1病理学评分显示,大、小分子量玻璃酸钠治疗组较模型组均有显著性差异,两种药物治疗效果明确。其中,小分子量玻璃酸钠组较模型组差异非常显著($P < 0.01$),较大分子量玻璃酸钠组也有显著差异($P < 0.05$),表明小分子量玻璃酸钠在改善骨关节炎病理损伤方面治疗效果更为突出。

表 1 木瓜蛋白酶致兔膝关节炎各组股骨内髁关节面的病理学评分

组别	样本数	病理学评分
空白对照组	10	0.3 ± 0.5 ²⁾
模型组	10	3.2 ± 0.6
大分子量玻璃酸钠组	10	2.5 ± 0.8 ¹⁾
小分子量玻璃酸钠组	10	2.1 ± 0.7 ^{2) 3)}

¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$,与模型组比较; ³⁾ $P < 0.05$,与大分子量玻璃酸钠组比较。

2.2 玻璃酸钠对关节固定法致兔膝关节炎的治疗作用 于显微镜下可见,空白对照组关节软骨细胞排列规整,层次无明显异常,滑膜组织被覆单层间皮,其下由脂肪组织构成,其中未见炎细胞浸润(图 2A)。模型组滑膜组织增生,大量炎性细胞浸润(图 2B)。大分子量玻璃酸钠组仍可见滑膜组织增生,局灶性炎性细胞浸润(图 2C);小分子量玻璃酸钠组(图 2D)见滑膜组织水肿,少量炎性细胞浸润。总体上两组治疗组较模型组均有显著改善,病理学评

分较模型组均有显著差异,而大分子量与小分子量

玻璃酸钠组之间比较,未见统计学显著性差异。

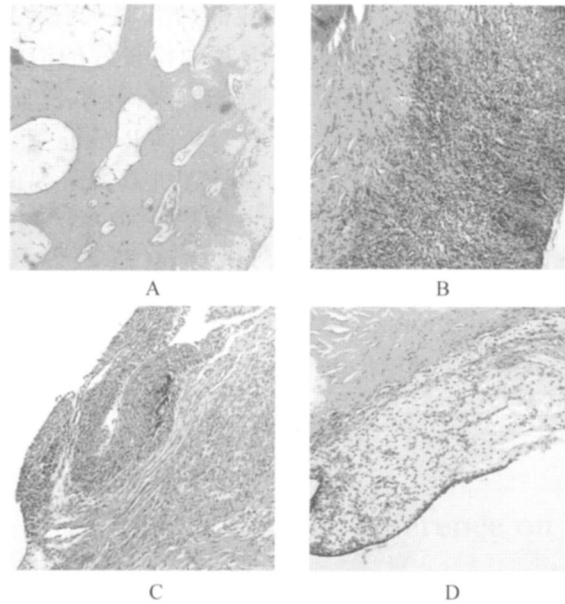


图1 不同分子量玻璃酸钠对木瓜蛋白酶致兔膝关节炎的治疗作用的组织切片

A-空白组,关节软骨排列规整,层次无明显异常;B-模型组,滑膜组织增生,血管扩张充血,大量炎细胞浸润;
C-大分子量玻璃酸钠(施沛特)组,滑膜组织增生,较多炎细胞浸润;D-小分子量玻璃酸钠(佰备)组,滑膜组织增生,水肿,炎细胞浸润。

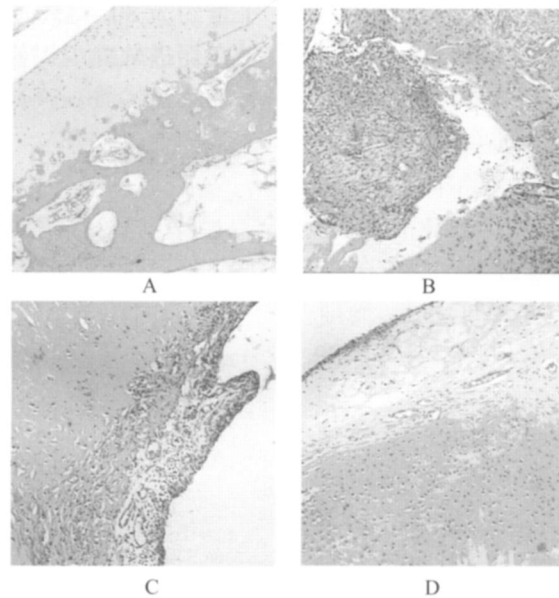


图2 不同分子量玻璃酸钠对关节固定法致兔膝关节炎的治疗作用的组织切片

A-空白组,关节软骨排列规整,层次无明显异常;B-模型组,滑膜组织明显增生,血管扩张充血,大量炎细胞浸润;
C-大分子量玻璃酸钠组,滑膜组织增生,灶性炎细胞浸润;D-小分子量玻璃酸钠组,滑膜组织水肿,少量炎细胞浸润。

表2 关节固定法致兔膝关节炎各组股骨内髌关节面的病理学评分

组别	样本数	病理学评分
空白对照组	10	0.3 ± 0.5 ²⁾
模型组	10	2.6 ± 0.5
大分子量玻璃酸钠组	10	1.8 ± 0.6 ¹⁾
小分子量玻璃酸钠组	10	1.6 ± 0.5 ¹⁾

¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01,与模型组比较。

表3 玻璃酸钠对冰醋酸引起小鼠扭体反应的影响 (n=10)

组别	潜伏期 (s)	扭体次数
生理盐水组	184.1 ± 44.4	40.8 ± 13.8
大分子量玻璃酸钠组	396.3 ± 47.0 ²⁾	17.5 ± 6.1 ²⁾
小分子量玻璃酸钠组	308.5 ± 130.1 ¹⁾	23.6 ± 5.8 ²⁾

¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01,与生理盐水组比较。

2.3 镇痛作用 从表3可以看出,大分子量与小分

子量玻璃酸钠组两种药物均能显著延长醋酸致小鼠疼痛的潜伏期,且减少扭体次数,显示两种药物均有明显镇痛作用。

2.4 对腹腔毛细血管通透性的影响 表 4 结果显示,两种玻璃酸钠注射液均能显著抑制毛细血管通透率,光密度值较生理盐水组均有显著改善,经统计学检验,有显著性差异。

表 4 玻璃酸钠对小鼠腹腔毛细血管通透性的影响 ($n=10$)

组别	光密度 (OD.)	抑制率 (%)
生理盐水组	0.783 ± 0.396	—
大分子量玻璃酸钠组	0.244 ± 0.145 ¹⁾	68.84
小分子量玻璃酸钠组	0.212 ± 0.062 ¹⁾	72.92

¹⁾ $P < 0.01$, 与生理盐水组比较。

3 讨论

自上世纪 70 年代以来,玻璃酸钠应用于临床治疗骨关节炎,疗效确切^[4,5]。关节腔内注射玻璃酸钠能有效地缓解关节疼痛,并能润滑关节、减轻关节运动时的摩擦,同时可包裹和保护受损的软骨,缓冲应力对关节软骨的损害,还可抑制局部炎症的发生,从而延缓关节软骨退行性变的进程,通过遮蔽痛觉感受器以降低痛觉敏感性,缓解关节疼痛^[6]。本实验旨在观察不同分子量构成的玻璃酸钠对骨关节炎的治疗作用及其差异。选用目前国内临床常用的施沛特和佰备这两种不同分子量范围的玻璃酸钠,施沛特玻璃酸钠分子量为 150 ~ 250 万 Da 之间,佰备玻璃酸钠分子量为 80 ~ 150 万 Da 之间,可见,施沛特主要为相对大分子量玻璃酸钠,佰备主要为相对小分子量玻璃酸钠。

研究结果表明,在关节固定法制造的兔膝骨关节炎模型中,应用不同分子量的玻璃酸钠治疗后,总体上两组治疗组较模型组均有显著病理学改善,但大分子量与小分子量玻璃酸钠两组之间比较,未见统计学显著性差异。在木瓜蛋白酶注射法制造的兔膝骨关节炎模型中,骨关节炎病理表现更严重,大分子量与小分子量玻璃酸钠两组药物均显示有明确的治疗作用,其中,小分子量玻璃酸钠组与模型组比较改善更明显,较大分子量玻璃酸钠组也有显著差异,提示小分子量玻璃酸钠可能在促进软骨组织修复和减少滑膜组织增生方面治疗效果较好,优于大分子量玻璃酸钠。可能机制是小分子量玻璃酸钠更容易与纤维母细胞上的蛋白质结合,使纤维母细胞表现出运动活性,向组织损伤处移行,促进愈合,有保证营养物质渗透作用,为损伤细胞增生、合成、分泌胶原提供充

足营养。康建华等^[7]对 352 例膝骨性关节炎患者进行治疗,也发现平均分子量为 90 万 Da 的玻璃酸钠比平均分子量为 180 万 Da 的玻璃酸钠能更早地取得较好的治疗效果,长期应用也有较好的临床效果,且不良反应发生率极低,更为安全有效。美国 Petrella 等^[8]进行了一项为期 16 周的前瞻性随机双盲队列研究,共入选 225 例膝骨关节炎患者,结果显示,分子量为 58 ~ 78 万 Da + 120 ~ 200 万 Da 的玻璃酸钠组较分子量 50 ~ 73 万 Da 玻璃酸钠组和分子量 600 万 Da 玻璃酸钠组治疗骨关节炎疗效更佳。而他所选用的 58 ~ 78 万 Da + 120 ~ 200 万 Da 的玻璃酸钠更接近本实验所选用的佰备组玻璃酸钠。

本研究还在镇痛实验和毛细血管通透性实验中,证实两种玻璃酸钠均能显著延长醋酸致小鼠疼痛的潜伏期,且减少扭体次数,镇痛作用显著;均能显著抑制小鼠毛细血管通透性,进而能有效减缓纤维组织增生和血管翳形成,避免骨关节炎进一步恶化。总之,本研究结果显示,不同分子量玻璃酸钠在治疗骨关节炎方面均有确切疗效,分子量约为 80 ~ 150 万 Da 的相对小分子量玻璃酸钠在促进软骨组织修复和减少滑膜组织增生方面可能略显优势。

【参考文献】

- [1] Hulmes DJ, Marsden ME, Strachan RK, *et al*. Intra-articular hyaluronate in experimental rabbit osteoarthritis can prevent changes in cartilage proteoglycan content [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2004, 12 (3): 232.
- [2] 傅利峰,李华德,林炳远. 不同分子量透明质酸治疗兔膝骨关节炎疗效观察 [J]. *浙江医学*, 2008, 30 (4): 340.
- [3] 周游,王洪,杨述华,等. 透明质酸钠不同给药途径干预早期骨关节炎兔软骨细胞的凋亡 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11 (6): 1013.
- [4] Tascioaglu F, Oner C. Efficacy of intra-articular sodium hyaluronate in the treatment of knee osteoarthritis [J]. *Clin Rheumatol*, 2003, 22 (2): 112.
- [5] 李正南,卫小春,张志强,等. 膝关节液中透明质酸和型胶原羧基末端肽含量与滑膜炎关系的实验研究 [J]. *中国药物与临床*, 2008, 8 (6): 458.
- [6] 凌沛学. 透明质酸 [M]. 北京:中国轻工业出版社 2000: 137.
- [7] 康建华,查振刚,陈仲新,等. 不同分子量的透明质酸钠治疗膝骨性关节炎的疗效分析 [J]. *实用医学杂志*, 2007, 23 (16): 2593.
- [8] Petrella RJ, Cogliano A, Decaria J. Combining two hyaluronic acids in osteoarthritis of the knee: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Clin Rheumatol*, 2008, 27 (8): 975.

【收稿日期】 2009-07-07

【修回日期】 2009-10-12