

· 基础研究 ·

超短波和被动运动对兔膝关节骨性关节炎的作用

孔瑛 邹琳 伍刚 张长杰

【摘要】目的 观察超短波和被动运动对兔膝关节骨性关节炎的治疗作用。**方法** 取健康雄性家兔 20 只,采用左膝关节伸直位制动 4 周的方法制作实验性膝关节骨性关节炎(OA)模型,共 20 个膝关节。造模成功后,随机分为对照组(不接受任何治疗)、超短波组(接受超短波治疗)、被动运动组(接受被动运动治疗)、综合组(接受超短波和被动运动治疗),各组均治疗 4 周。分别比较每组治疗前、后 OA 侧膝关节被动关节活动度(PROM)。于治疗 4 周末处死所有兔,肉眼观察 OA 侧膝关节软骨形态学大体变化,取股骨内侧髁软骨进行甲苯胺蓝染色、HE 染色及免疫组化染色,观察蛋白多糖染色情况,分别进行组织形态学评分及诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的阳性细胞分数比较。**结果** ①被动关节活动度:治疗前各组组间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。治疗后对照组与超短波组组间比较,差异无统计学意义($P>0.05$);对照组、被动运动组及综合组组间比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。治疗前、后 PROM 改变值最大的为综合组,其次为被动运动组,对照组、超短波组两组改变值较小。②组织学评分(Mankin 评分):对照组、超短波组、被动运动组、综合组组间比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),评分最高的是对照组,其后依次为超短波组、被动运动组、综合组。③iNOS 表达:对照组、超短波组、被动运动组及综合组组间比较,差异有统计学意义($P<0.05$),评分最高的是对照组,其后依次为超短波组、被动运动组、综合组。**结论** 超短波、被动运动及综合治疗均可减轻和延缓骨性关节炎关节软骨退变;超短波加被动运动治疗的效果优于单纯被动运动治疗和单纯超短波治疗。

【关键词】 骨性关节炎; 关节软骨; 被动运动; 超短波; 诱导型一氧化氮合酶

The effects of ultrashortwave therapy and passive motion on osteoarthritis of the knee joint in the rabbits

KONG Ying*, ZOU Lin, WU Gang, ZHANG Chang-jie. * Department of Rehabilitation Medicine, The 2nd Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of ultrashortwave therapy and passive motion on experimental osteoarthritis caused by immobilization of the joint. **Methods** Twenty healthy male rabbits had their left knee joints fixed in extension for 4 weeks. They were randomly divided into 4 groups: a control group which did not receive any treatment, an ultrashortwave therapy group, a passive motion group, and an ultrashortwave therapy plus passive motion group, and treated accordingly for 4 weeks. The range of motion of the joint before and after treatment was compared in every group. At the end of the 4th week, all the rabbits were sacrificed, and the cartilage at the condylus medialis femoris was sampled and observed with toluidine blue staining, haematoxylin-eosin staining. Its gross appearance was noted and it was also analyzed using immunohistochemical techniques. **Results** ①Passive range of motion (PROM): there were no significant differences among the 4 groups before the treatment. Ultrashortwave therapy per se did not yield significant therapeutic effects in terms of PROM as compared to the controls. However, passive motion alone and in conjunction with ultrashortwave therapy brought about significant improvement of PROM when compared against the control group. The most significant change was seen in the integrated group, followed by the passive motion group. ②The histological scoring system; Mankin's scoring system showed significant differences among all 4 groups. The highest value was the control group, which was followed by the ultrashortwave therapy group, the passive motion group and the integrated group. ③The positive expression rate of inducible nitric oxide synthase: there were significant differences among all 4 groups. The control group had the highest values, followed by the ultrashortwave treated group, the passive motion treated group and the integrated group. **Conclusions** Ultrashortwave therapy, passive motion therapy and integrated therapy combining ultrashortwave therapy with passive motion can all can reduce and prevent the cataplasia of articular cartilage. Integrated therapy is the best treatment method, followed by passive motion therapy, and then ultrashortwave therapy.

【Key words】 Osteoarthritis; Articular cartilage; Passive motion; Ultrashortwave therapy; Inducible nitric oxide synthase

骨性关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种常见的、累及关节软骨和滑膜为主的慢性进行性骨关节疾病,是在力学因素和生物学因素的共同作用下,软骨细胞、软骨基质和软骨下骨三者之间分解与合成代谢失衡的结果^[1]。其病理特点是进行性的关节软骨的退变及关节边缘和软骨下骨质反应性增生。膝关节是人体较大的滑膜关节和承重关节,是 OA 最常累及的关节。由于 OA 具有功能限制性和致残性,故对它的病因研究和治疗也越来越受到重视。目前对 OA 的治疗主要包括药物治疗、康复治疗、外科手术治疗等。物理治疗有直流电离子导入、超短波、红外线、运动治疗等。本实验采用左膝伸直位管型石膏固定建立兔膝关节 OA 模型^[2,3],并给予超短波和被动运动治疗,通过观察兔膝关节活动度的变化、光镜下关节软骨的组织学变化以及诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 的表达强弱来了解其对软骨细胞、软骨基质的作用,以深入探讨其治疗机制。

材料与方法

一、实验动物

纯种雄性健康成年家兔 20 只,兔龄为 3~4 个月,体重为 1.6~2.0 kg。

二、造模方法与分组

各兔均以左后肢为实验侧,采用膝关节伸直位石膏固定制作实验性 OA 模型。制动 4 周后^[3,4],将 20 只兔随机分为对照组、超短波组、被动运动组、综合治疗组,每组 5 只,各包括 5 个兔膝关节。

三、治疗方法

1. 对照组:不以任何治疗,兔笼内自由活动。

2. 超短波组:采用 UWM-02 型超短波治疗仪 (日本产),输出电流 20 mA,振动频率 27.12 MHz,功率 135 W。用电容场法治疗,将两个电极板对置,电极板与皮肤之间间距为 4~5 cm,微热量,每天治疗 1 次,每次 20 min,治疗 4 周。

3. 被动运动组:行被动运动治疗,在 OA 侧膝关节的可活动范围内,温和地进行膝关节反复屈伸的被动运动 (强度以不引起兔子挣扎为宜),来回运动频率为 30 次/min,每天治疗 1 次,第 1 周 200 次/d,以后每周增加 150 次/d,直至 650 次/d,共治疗 4 周^[5]。

4. 综合组:同时给予超短波加被动运动治疗,方法分别同超短波组与被动运动组,治疗 4 周。

四、标本采集

各组兔均于治疗第 4 周末时处死。解剖双膝关节,取 OA 侧股骨内侧髁软骨标本。

五、观测指标

1. 关节活动度测定:用量角器分别测量治疗前

(即造模成功时)以及治疗 4 周后膝关节被动关节活动度 (passive range of motion, PROM) 并记录。

2. 大体观察:将 OA 侧膝关节与健侧相比较,观察患侧膝关节软骨的色泽、轮廓、光滑度等情况及关节滑膜表面的光滑度、有无增生、肿胀等表现,关节内有无粘连。

3. 组织学观察:矢状位切取股骨内侧髁处关节软骨及软骨下骨标本,脱钙后按常规制成切片,分别进行 HE、甲苯胺蓝染色及免疫组织学研究。参照 Mankin 评分原则进行详细的评分^[6]。参照 Ota 等^[7]和 Pelletier 等^[8]的方法对 iNOS 免疫组化结果进行判定、分析与统计。

六、统计学分析

所有统计学分析均用 SPSS 12.0 版软件包进行处理。各组总体均数比较用单因素方差分析,各组组间两两比较用 SNK-q 方法。

结 果

一、关节活动度观察

治疗前 (即造模成功时) 各兔均出现不同程度的关节活动度受限,但各组间 PROM 比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。治疗 4 周后,超短波组与对照组之间相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),其余各组组间两两相比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组兔治疗前、后 PROM 比较 ($^{\circ}$, $\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	治疗前 PROM	治疗后 PROM
对照组	5	62.20 $\pm$ 8.79	3.80 $\pm$ 2.77
超短波组	5	55.60 $\pm$ 8.91	4.40 $\pm$ 3.78
被动运动组	5	54.80 $\pm$ 14.67	12.20 $\pm$ 2.59 ^{abc}
综合组	5	60.00 $\pm$ 9.19	20.40 $\pm$ 5.03 ^{ab}

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与超短波组比较,^b $P < 0.05$;与综合组比较,^c $P < 0.05$

二、大体观察

对照组:关节囊充血、肥厚,周围软组织挛缩、粘连严重,滑膜增生明显。软骨表面变白、失去光滑度及透明度,表面不光整,可见多个软骨凹陷,以股骨内侧髁为甚。关节周边可见大量骨赘形成,关节变形严重。关节滑液黏稠,呈淡黄色。见图 1。

超短波组:关节囊肥厚,周围软组织挛缩、粘连,但程度较对照组轻。滑膜可见点、片状增生。软骨局部有变白情况,有光滑度及透明度,但较差。软骨表面欠光整,可见软骨凹陷。关节周边有骨赘形成,关节有变形,但程度较对照组轻。关节滑液稍稠。见图 2。

被动运动组:关节周围软组织可见挛缩、粘连,但程度较轻。滑膜可见点状增生。软骨局部变白,光泽度及透明度欠佳,表面欠光整,局部粗糙,偶见软骨凹

陷。周边有少量骨赘生成,关节变形不明显。关节滑液稍浑浊。见图 3。

综合组:关节周围软组织可见挛缩、粘连,但程度轻。滑膜可见少量点状增生。软骨光泽度尚可,软骨表面尚光整,部分区域稍粗糙,偶见软骨凹陷。周边偶见骨赘生成。关节滑液清。见图 4。

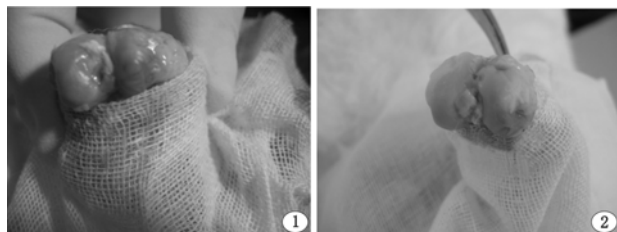


图 1 对照组的大体观察

图 2 超短波组的大体观察

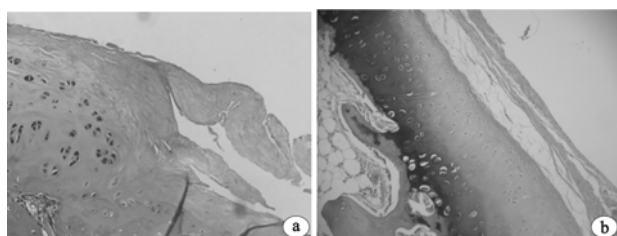


图 3 被动运动组的大体观察

图 4 综合组的大体观察

三、光镜观察

对照组:软骨 4 层结构层次不清,软骨表面不规则,纤维明显增生。全层软骨细胞减少,各层均可见软骨细胞成簇现象,以移行层及放射层为甚。软骨表面可见裂隙,裂隙深入移行层。部分区域可见软骨缺损,软骨下骨暴露。缺损区表面有大量排列紊乱且染色不均的纤维覆盖。可见多重潮线,多处区域因为出现血管翳,潮线断裂。甲苯胺蓝染色示染色不均,以表层、移行层及放射层失染明显,部分区域软骨可见全层失染。软骨成簇处可见软骨陷窝周边深染。见图 5。



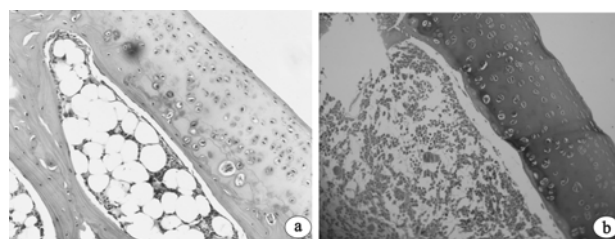
a. HE 染色

b. 甲苯胺蓝染色

图 5 对照组的光镜观察(×100)

超短波组:软骨细胞 4 层结构欠清,但较对照组清晰。软骨表面欠光整,可见纤维增生,部分区域增生明显。软骨细胞数有所减少,部分区域可见细胞成簇现象,以放射层为甚。软骨表面可见小裂隙形成,深入表层。可见双重潮线,部分区域因为血管翳,潮线断裂。

甲苯胺蓝染色示染色不均,未出现全层失染情况。表层、移行层可见失染,部分区域部分放射层也失染。见图 6。

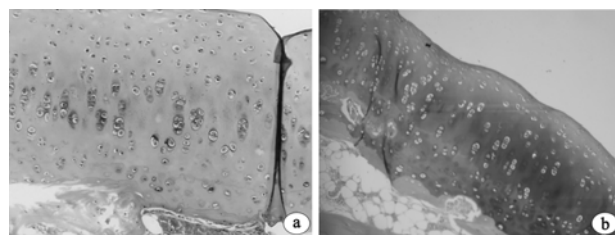


a. HE 染色

b. 甲苯胺蓝染色

图 6 超短波组的光镜观察(×100)

被动运动组:软骨细胞 4 层结构稍欠清晰,软骨表面较光整,可见少量纤维增生。部分区域放射层可见细胞成簇现象。可见双重潮线,少部分区域可见血管翳及潮线断裂。甲苯胺蓝染色示染色不均匀,着色中度减轻,局部表层及部分移行层可见失染情况,未出现全层失染。见图 7。

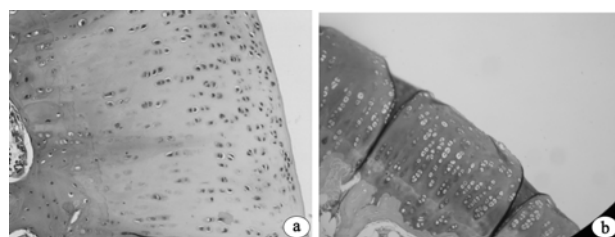


a. HE 染色

b. 甲苯胺蓝染色

图 7 被动运动组的光镜观察(×100)

综合组:软骨细胞 4 层结构基本清晰,软骨表面较规则,未见明显裂隙,偶可见少量纤维增生。放射层可见少量软骨细胞成簇现象。可见双重潮线。甲苯胺蓝较均匀,可见轻度失染情况。见图 8。



a. HE 染色

b. 甲苯胺蓝染色

图 8 综合组的光镜观察(×100)

四、关节组织学评分

4 组软骨标本的 Mankin 评分差异有统计学意义($P < 0.05$),说明不同组的 Mankin 评分不同。各组组间的 Mankin 评分分值进行两两比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。对照组的 Mankin 评分最高,其次是超短波组,再次是被动运动组,最后是综合组。见

表 2。

表 2 各组兔 Mankin 评分、iNOS 阳性细胞计数
评分比较(分, $\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	Mankin 评分	iNOS 阳性细胞计数
对照组	5	11.80 $\pm$ 1.30	6.80 $\pm$ 0.45
超短波组	5	8.20 $\pm$ 1.30 ^{ab}	5.80 $\pm$ 0.45 ^{ab}
被动运动组	5	6.40 $\pm$ 1.14 ^{ab}	5.00 $\pm$ 0.71 ^{ab}
综合组	5	4.80 $\pm$ 0.84 ^{ab}	4.00 $\pm$ 0.71 ^{ab}

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;超短波组、被动运动组、综合组之间两两比较,^b $P < 0.05$

五、免疫组织化学

免疫组化阴性片细胞胞浆中未见棕黄色颗粒,阳性细胞为胞浆中有大量染成棕黄色颗粒的细胞。见图 9。

4 组的 iNOS 阳性细胞计数评分差异有统计学意义($P < 0.05$),说明不同组的 iNOS 阳性细胞计数评分不同。各组组长间的 iNOS 阳性细胞计数评分进行两两比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。对照组的 iNOS 阳性细胞计数评分最高,其次是超短波组,再次是被动运动组,最后是综合组。见表 2。

讨 论

有研究表明,由于伸直位制动限制了关节的活动,同时肌肉及关节囊挛缩,对关节面局部产生过度压力,故能较好地模拟 OA 的发病过程^[3]。Evans 等^[2]的研究表明,当制动时间 > 60 d 时,其引起的关节软骨改变大部分不可逆。如制动时间 < 30 d 时,其引起的病理改变则有恢复的可能^[3,4]。本实验采用兔膝关节伸直位固定 4 周来建立 OA 模型,以观察超短波、被动运动对兔膝关节活动度及关节软骨的影响。

软骨基质是由软骨细胞产生和分泌的,主要由 II 型胶原纤维和蛋白多糖 (proteoglycan, PG) 组成。PG 的合成受各种酶、细胞因子及生物力学等因素的调节。关节活动所产生的应力能刺激软骨细胞不断合成并释放 PG。同时软骨细胞还能合成多种蛋白酶,如基质金属蛋白酶、软骨蛋白多糖酶等,释放到基质中,导致 PG 的降解;还能产生一些细胞因子(如白细胞介素 1

等),直接或间接促进 PG 降解,从而使 PG 的合成与释放达到平衡^[9]。在一定限度内,随应力的增加,关节软骨合成 PG 的能力可相应增加;但应力超过了一定限度时,软骨细胞发生变性,PG 的合成将会逐渐减少^[10]。在 OA 中,这一平衡遭到破坏。关节软骨退变的另一个重要标志是关节软骨细胞的凋亡。Blanco 等^[11]研究认为,与正常软骨相比较,OA 软骨细胞有较高比例的软骨细胞凋亡,高比例凋亡现象的出现主要是因为软骨退变的诱导。NO 通道是 OA 软骨细胞凋亡的主要途径。关节中 NO 的产生主要是来源于关节中增加的炎症因子等其它因子刺激软骨细胞和滑膜细胞表达 iNOS,产生 NO^[12,13]。iNOS 在正常关节软骨中无表达,在 OA 关节软骨的全层中均有表达^[14]。

Kim 等^[15]与 O'Driscoll 等^[16]进行了一系列关于持续被动运动的研究,他们在新西兰大白兔上制造了滑膜关节软骨全层缺损、关节内骨折、急性化脓性关节炎等模型,发现持续被动运动对关节软骨的修复与再生有明显的促进作用。Williams 等^[17]研究发现,持续被动运动有利于减少软骨基质中蛋白多糖的丢失情况。Gassner 等^[18]研究发现,周期性的关节张力变化可以抑制软骨细胞 iNOSmRNA 的表达。Rannou 等^[19]对关节软骨、OA 的回顾性研究发现,制动可以抑制关节软骨基质的合成,适当的周期性循环压力刺激则可促进软骨基质的合成,适宜的运动治疗和持续被动运动对 OA 的恢复是有益的。去除制动后即给予温和适度的关节屈伸活动,可促进滑液向关节软骨的渗透和扩散,有利于改善软骨组织的营养代谢,加快软骨细胞及间质的再生及修复。关节的反复屈伸活动可刺激软骨组织中未分化的间质细胞向软骨细胞分化,加快骨组织的恢复。再者,关节的反复屈伸活动有助于消除关节周围组织粘连,改善血液循环,促进关节周围组织的自身修复。

超短波主要是通过热效应和非热效应来发挥作用,但它的治疗效果目前存在部分争议。Jan 等^[20]认为,超短波治疗可以促进 OA 患者关节软骨的厚度的恢复,还可以减轻患者的疼痛。Laufer 等^[21]认为,超短波对 OA 患者的临床治疗无明显效果。吴并生等^[22]

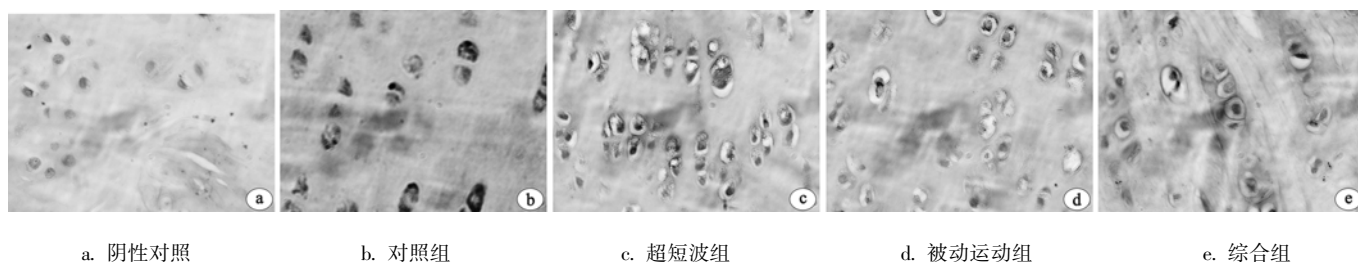


图 9 各组 iNOS 免疫组化染色片 ($\times 400$)

对兔膝关节的研究显示,每天进行 20 min 超短波治疗,持续治疗 1 个月,可延缓骨内高压所致的 OA 病理变化进程。

在本实验中,可观察到对照组的关节活动度恢复最差,iNOS 的表达强度及 Mankin 评分最高。其原因应该是笼内活动空间有限,且在造模成功后,各兔均出现了制动侧膝关节不同程度的活动受限,从而不利于患侧关节软骨细胞摄取营养及交换代谢产物。被动运动组及综合组治疗前、后 PROM 变化程度与对照组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$),均有所改善。且改善的程度是综合组较被动运动组明显。超短波组与对照组相比,PROM 差异无统计学意义($P > 0.05$),其原因应该是关节活动度的恢复更依赖于主动或被动关节活动,反复温和的屈伸活动有助于消除关节周围组织的粘连,有助于关节活动度的恢复。超短波的温热效应对关节活动度的改善具有一定的作用,但单独使用,改善的效果不佳,如与被动运动联合使用时,能更程度地促进关节活动度恢复。在本实验中还能观察到超短波组、被动运动组及综合组的 Mankin 评分、iNOS 的表达强度与对照组比较差异有统计学意义,均有所改善,且改善程度依次是综合组 > 被动运动组 > 超短波组。考虑原因应该是:超短波因其具有非热效应,能增强组织代谢,消除炎症,在一定程度上能减轻关节软骨退变;被动运动可引起交替的关节腔内压力的变化,有利于关节软骨营养代谢的交换,故可延缓骨关节炎的病情发展。由于关节活动是关节软骨获取营养的主要途径,故被动运动组的改善情况较超短波组好。超短波的非热效应有缓解疼痛的作用,将更有利于进行被动运动锻炼,且其也具有一定的促进营养代谢及消除炎症的作用,故当超短波与被动运动联合使用时,可起到很好的协同作用。

参 考 文 献

- [1] Creamer P, Hochberg MC. Osteoarthritis. Lancet, 1997, 350: 503-508. i
- [2] Evans EB, Eggers GWN, Butler JK, et al. Experimental immobilization and remobilization of rat knee joints. J Bone Joint Surg, 1960, 42: 737.
- [3] 陈崇伟,卫小春,杨自权,等. 伸膝制动骨关节炎动物模型软骨内胶原变化的观察. 中华风湿病学杂志, 2003, 7: 332-335.
- [4] 邱宜兴,王桂生. 兔膝关节制动引起关节软骨退变的实验研究. 中华骨科杂志, 1987, 25: 175.
- [5] 黄涛,黄昌林. 运动对制动后骨关节炎的疗效观察. 中国运动医学杂志, 2000, 19: 124-126.
- [6] Mankin HJ, Johnson MF, Lippiello L, et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. III. Distribution and metabolism of amino sugar-containing macromolecules. J Bone Surg Am, 1981, 63: 131-139.
- [7] Ota H, Igarashi S, Sasaki M, et al. Distribution of cyclooxygenase-2 in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and andnomyosis. Hum Reprod, 2001, 16: 561-566.
- [8] Pelletier JP, Lascau-Coman V, Jovanovic D, et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental osteoarthritis is associated with reduction in tissue levels of catabolic factors. J Rheumatol, 1999, 26: 2002-2014.
- [9] Lotz M, Blanco FJ, von Kempis J, et al. Cytokine regulation of chondrocyte functions. J Rheumatol Suppl, 1995, 43: 104-108.
- [10] 亓建洪, 黄煌渊. 低应力对软骨软骨软化基质蛋白多糖含量的影响. 泰山医学院学报, 1997, 18: 26-29.
- [11] Blanco FJ, Guitian R, Vazquez-Mantul E, et al. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis, a possible pathway for osteoarthritis pathology. Arthritis Rheum, 1998, 41: 284-289.
- [12] Shan ZZ, Masuko-Hongo K, Dai SM, et al. A potential role of 15-deoxy-delta (12,14)-prostaglandin J2 for induction of human articular chondrocyte apoptosis in arthritis. J Biol Chem, 2004, 279: 37939-37950.
- [13] Manacu CA, Martel-Pelletier J, Roy-Beaudry M, et al. Endothelin-1 in osteoarthritic chondrocytes triggers nitric oxide production and up-regulates collagenase production. Arthritis Res Ther, 2005, 7: R324-332.
- [14] 唐勇,姜杰,周永红,等. 骨炎对兔实验性膝骨关节炎软骨中 iNOS 表达的影响. 云南中医学院报, 2004, 27: 20-22.
- [15] Kim HK, Kerr RG, Cruz TF, Salter RB. Effects of continuous passive motion and immobilization on synovitis and cartilage degradation in antigen induced arthritis. J Rheumatol, 1995, 22: 1714-1721.
- [16] O'Driscoll SW, Salter RB. The repair of major osteochondral defects in joint surfaces by neochondrogenesis with autogenous osteoperiosteal grafts stimulated by continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. Clin Orthop Relat Res, 1986, 208: 131-140.
- [17] Williams JM, Moran M, Thonar EJ, et al. Continuous passive motion stimulates repair of rabbit knee articular cartilage after matrix proteoglycan loss. Clin Orthop Relat Res, 1994, 304: 252-262.
- [18] Gassner R, Buckley MJ, Georgescu H, et al. Cyclic tensile stress exerts antiinflammatory actions on chondrocytes by inhibiting inducible nitric oxide synthase. J Immunol, 1999, 163: 2187-2192.
- [19] Rannou F, Poiraudou S, Revel M. Cartilage: from biomechanics to physical therapy. Ann Readapt Med Phys, 2001, 44: 259-267.
- [20] Jan MH, Chai HM, Wang CL, et al. Effects of repetitive shortwave diathermy for reducing synovitis in patients with knee osteoarthritis: an ultrasonographic study. Phys Ther, 2006, 86: 236-244.
- [21] Laufer Y, Zilberman R, Porat R, et al. Effect of pulsed short-wave diathermy on pain and function of subjects with osteoarthritis of the knee: a placebo-controlled double-blind clinical trial. Clin Rehabil, 2005, 19: 255-263.
- [22] 吴并生, 薛华新, 刘晋, 等. 超短波对家兔膝关节骨关节炎形成过程的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2003, 25: 7-10.

(修回日期: 2008-07-21)

(本文编辑: 松 明)