

• 基础研究 •

膝关节炎前交叉韧带 I 型和 III 型胶原纤维定量分析及组织学相关研究

薛静 刘玉杰 睦祥 周密 李海鹏 李光辉

【摘要】 目的 探讨老年膝关节炎(OA)前交叉韧带(ACL)退变时 I、III 型胶原纤维的分布、含量与组织学改变特点。方法 选择膝关节 OA 患者全膝关节置换术中切取的 ACL 27 例(29 膝)和正常膝关节新鲜 ACL 标本 5 例,采用苦味酸-天狼猩红染色观察并分析 ACL 中 I、III 型胶原纤维的分布、含量和比例改变。HE 染色观察 ACL 的组织学变化。结果 苦味酸-天狼猩红染色发现,正常 ACL 胶原排列整齐,偏振光下呈横纹肌样排列,主要由 I、III 型胶原构成,I 型胶原粗大,含量较多,在韧带内呈弥漫性分布;III 型较少,多分布在各束韧带的内部。OA 患者的 ACL 胶原排列紊乱,III 型胶原含量增多,I 型胶原明显减少。HE 染色组织学观察到 OA 患者 ACL 松散,有不同程度的纤维结缔组织变性,表现为不均匀的纤维细胞数目增多或减少,可见黏液变性、软骨样化生、囊性变及玻璃样变性,并有淋巴细胞浸润。结论 苦味酸-天狼猩红染色可以应用于观察并计算 ACL 中 I、III 型胶原的分布与含量的变化。膝关节 OA 伴有 ACL 退变时 I、III 型胶原纤维的分布与含量有改变,ACL 退变与 OA 具有相关性。

【关键词】 前交叉韧带;骨关节炎;I/III 型胶原;苦味酸-天狼猩红染色

Quantitative analysis and histological observation of collagen types I and III content of human anterior cruciate ligament with osteoarthritic knee

XUE Jing, LIU Yujie, SUI Xiang, et al

Department of Orthopedic Surgery, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853

【Abstract】 Objective To explore the content and distribution changes and histological features of collagen types I and III in anterior cruciate ligament(ACL) with knee osteoarthritis(OA). Methods Twenty-nine ACLs from 27 cases of knee OA who underwent total knee arthroplasty were selected as OA group, 5 normal ACLs from traumatic amputation were selected as control group. All specimens were stained with 1% Sirius Red F3B in saturated carbazotic acid to observe the distribution feature and analyze the content of collagen types I and III in ACL. HE stain was used to observe histological changes. Results By Sirius Red F3B in saturated carbazotic acid stain, observation under polarized light found that, slices of normal ACLs were mainly constructed by collagen types I and III, the collagen fibers were lined up in order just like striped muscle. Among them, collagen type I was thicker and was distributed at most part of ACLs, while collagen type III was less and was only distributed at inner of bundles of the ligaments. In the slices of OA group, the alignment of collagen fibers was disordered and the content of collagen type III increased obviously. Under HE stain, OA slices looked loose, and had different types of fibrous connective tissue degeneration, such as inhomogeneous increase or decrease in fibrocytes, mucinous degeneration, chondroid metaplasia, cystic degeneration or glassy degeneration. Conclusions Sirius Red F3B in saturated carbazotic acid stain is a proper stain method for observing the distribution feature and calculating the content of collagen types I/III in ACLs. The content and distribution of collagen types I/III changed in knee OA combined with ACL degeneration. The degeneration of ACL has relation with OA severity.

收稿日期:2006-08-22

作者单位:100853 北京市,解放军总医院骨科

作者简介:薛静,男,1977年8月生,山西省稷山县人,在读硕士研究生。Tel:13811996232

通讯作者:刘玉杰, Tel:010-66939218

【Key words】 anterior cruciate ligament; osteoarthritis; collagen types I and III; Sirius Red F3B in saturated carbazotic acid stain

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是中老年人最常见的疾病之一^[1, 2], 是65岁以上患者的主要致残原因^[3]。目前认为OA是力学和生物学因素共同作用下导致的软骨细胞、细胞外基质、软骨下骨降解合成失衡的结果^[4], 国内外对OA的基础研究, 多集中于以上几个方面^[5, 6]。交叉韧带之前交叉韧带(anterior cruciate ligament, ACL)和后交叉韧带(posterior cruciate ligament, PCL)作为膝关节重要的关节内结构, 损伤后与OA的发生发展有密切的关系^[7]。虽然通过大量的研究, 已知ACL损伤会导致膝关节OA^[8], 但对于膝关节OA的自然病程中交叉韧带退变的研究, 以及交叉韧带退变与关节的退变之间的相关性研究, 没有得到足够的重视, 有必要深入研究以更全面地了解OA的自然病程^[9]。本研究以OA患者全膝置换术中切取的ACL标本为研究对象, 通过与正常成人ACL标本进行比较, 旨在观察OA患者ACL的组织学改变以及其内部不同胶原纤维的分布与含量的变化, 研究其与OA的相关性。

1 资料与方法

1.1 标本的收集与处理 OA组按收治前后顺序, 非随机收集2005年3~9月期间40例行全膝关节置换术患者的ACL, 其中13例患者术中发现ACL完全断裂, 磨损消失, 故剔出研究对象。本组27例(29膝), 男性8例, 女性19例, 平均年龄(61.8 ± 6.7)岁(50~78岁)。左膝9例, 右膝16例, 双膝2例。对照组来自外伤性截肢5个膝关节。

1.2 临床资料 OA组术前均摄双侧膝关节站立位正侧位片, 按膝关节OA严重程度的放射学诊断指标^[10]进行评分。0分: 正常; 1分: 单纯关节间隙狭窄或单纯骨赘增生; 2分: 关节间隙狭窄伴骨赘增生但股角正常; 3分: 具有上述改变并因关节间隙不对称改变或严重骨磨损造成的股角改变或关节半脱位。

术中观察ACL的大体形态, 对ACL损伤情况进行评分, 0分: ACL完整, 张力良好; 1分: ACL稍松弛, 轻度变细, 少部分纤维磨损断裂; 2分: ACL退变较重, 张力降低, 但未断裂; 3分: ACL断裂, 甚至消失。

术中观察膝关节软骨损伤程度, 以股骨内侧髁负重面软骨损伤程度进行比较, 按Noyes软骨损伤

分级系统分级。具体分级为, I级: 软骨面完整但变软; II级: 软骨有龟裂和纤维化(龟裂和纤维化波及范围<50%软骨层为II A级, >50%为II B级); III级: 骨外露。

1.3 标本处理及统计方法 取标本中段1cm, 以10%福尔马林固定1周后, 常规采用石蜡包埋, 按纵向纤维方向制切片, 行HE染色及苦味酸-天狼猩红染色。切片采用Olympus BX51生物显微镜观察, 采用Olympus DP70数码照相设备进行照相。苦味酸-天狼猩红染色切片采用偏振光下观察, 每张切片随机连续取5个40倍下视野, 在同一曝光条件下照相, 用ImagePro Plus 5.0软件进行图像分析, 计算每张照片中I、III型胶原所占相对面积, 得出III型胶原所占的比例。每张切片取5个视野的平均值作为其III型胶原的含量, 所得结果用SPSS11.0软件进行统计学分析。

2 结果

2.1 临床资料 OA组29例膝关节放射学评分均为中重度(表1), 软骨退变明显(表2), 多数ACL有不同程度的磨损, 表现为变细、松弛或部分断裂(表3)。多数患者内侧半月板磨损殆尽, 仅残留边缘少量组织, 外侧半月板有不同程度的磨损, 但较内侧半月板磨损为轻。

对照组放射学评分均为0分, 软骨无退变, 前交叉韧带完整无损伤。

表1 膝关节放射学评分表

组别	放射学评分			
	0分	1分	2分	3分
对照组	5	0	0	0
OA组	0	0	17	12

注: 0分: 正常; 1分: 单纯关节间隙狭窄或单纯骨赘增生; 2分: 关节间隙狭窄伴骨赘增生但股角正常; 3分: 股角改变或关节半脱位

表2 软骨评分表(按Noyes软骨损伤分级法)

组别	软骨退变分级			
	I级	II A级	II B级	III级
对照组	0	0	0	0
OA组	0	1	9	19

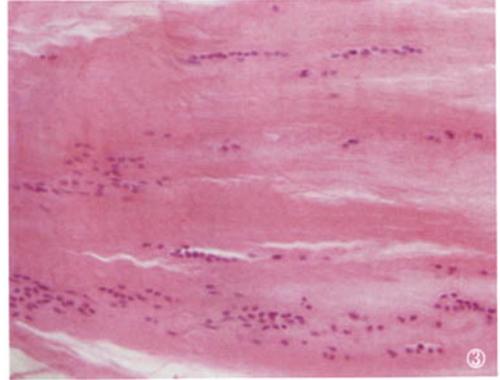
注: * 对照组5例软骨均完整光滑, 无损伤。I级: 软骨面完整但变软; II A级: 龟裂和纤维化波及范围<50%软骨层; II B级: 龟裂和纤维化波及范围>50%软骨层; III级: 骨外露

表3 ACL大体观察评分表

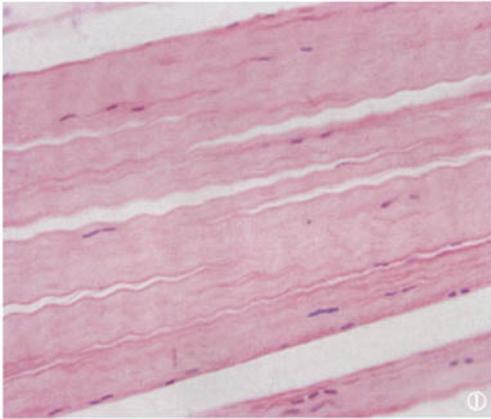
组别	ACL评分			
	0分	1分	2分	3分
对照组	5	0	0	0
OA组	12	13	4	0(13)*

注：*OA组术中发现有13例ACL断裂，甚至消失，无法进行组织学切片观察，剔出OA组。0分：完整，张力良好；1分：稍松弛，轻度变细；2分：退变较重，但未断裂；3分：断裂，甚至消失

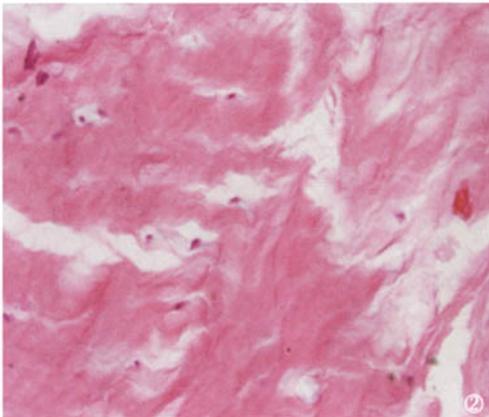
2.2 ACL的组织学观察结果 HE染色：对照组正常ACL胶原纤维呈波浪状紧密排列，纤维细胞核较少呈梭形(图1)。OA组ACL松散，有不同程度的纤维结缔组织变性，表现为纤维细胞数目不均匀，有黏液变性、软骨样化生、囊性变及玻璃样变性，并有淋巴细胞浸润(图2,3)。



卵圆形胞浆淡染的类软骨样细胞明显增多，梭形核细胞减少
图3 退变的ACL(HE, ×40)



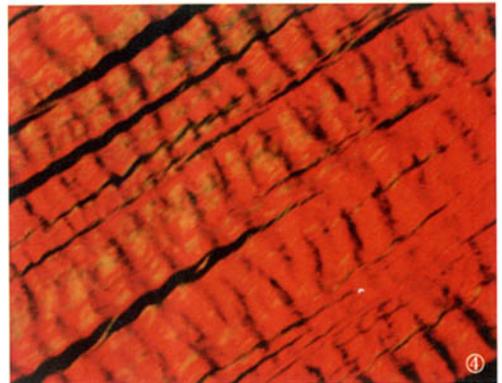
胶原纤维呈波浪状紧密排列，纤维细胞核较少，呈梭形
图1 正常ACL(HE, ×40)



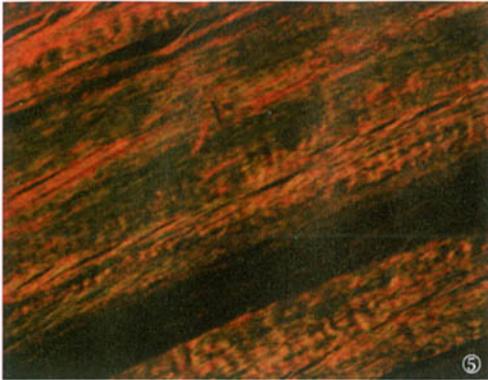
纤维结构松散、断裂，梭形核消失，并出现粘液囊性变
图2 退变的ACL(HE, ×40)

2.3 ACL中I、III型胶原纤维的分布变化 苦味酸-天狼猩红染色用于在偏振光镜下区分I、III型胶原。I型胶原呈黄红色，光谱峰值为700nm，有较强的双折射光，纤维直径越粗，红色越明亮。III型胶原呈绿色，光谱峰值为550nm，应用免疫组化证实与其观察结果一致^[11]。苦味酸-天狼猩红染色偏振光法，同时在一张切片上显示出I、III型胶原纤维，可直接分析不同胶原纤维含量的变化。

正常ACL以I型胶原为主，在韧带内分布广泛，韧带纤维束的边缘仅有I型胶原，无III型胶原。III型胶原在正常ACL中含量较少，分布在韧带部分纤维束的内部(图4)；退变的ACL仍以I型胶原为主，但含量降低，III型胶原含量增多，出现在更多的纤维束中，且在同一交叉韧带的不同纤维束中含量不一，弥漫分布，结构紊乱(图5)。



胶原排列整齐，呈横纹肌样，以I型胶原(红黄色)为主，III型胶原(绿色)分布在韧带束的内部
图4 正常ACL(偏振光，苦味酸-天狼猩红染色, ×40)



胶原分布紊乱,Ⅲ型胶原含量增多
 图5 退变的ACL(偏振光,苦味酸-天狼猩红染色,×40)

2.4 ACL中I、Ⅲ型胶原纤维定量研究 对照组Ⅲ型胶原占I、Ⅲ型胶原总面积的(9.9±3.5)%,OA组占(17.3±13.1)%(表4);经t'检验,得出Ⅲ型胶原的相对面积两组有统计学差异(P=0.0167),即退变的ACL中Ⅲ型胶原含量增加。

OA组Ⅲ型胶原含量变化以65岁以上与以下的年龄组无统计学差异(t检验,P=27);性别之间无统计学差异(t'检验,P=0.7391);侧别不同无统计学差别(t'检验,P=0.4737)。

表4 Ⅲ型胶原含量比较

组别	例数	均数	标准差	95%置信区间	99%置信区间
OA组	29	0.173	0.131	0.12~0.22	0.11~0.24
对照组	5	0.099	0.035	0.06~0.14	0.03~0.17

3 讨论

3.1 膝关节ACL的退变与OA的相关性 电镜显示ACL纤维由波浪状和束状胶原纤维以不同的方向排列,由2种不同直径的胶原纤维组成。众多的成纤维细胞呈纺锤形,并且有分支和短细胞浆突。弹力系统由弹力纤维和耐酸纤维组成。ACL有众多不同走行方向的纤维束,复杂的超微组织结构,以及丰富的弹力结构,使ACL可以承受多轴向的应力和拉伸力^[12]。本体觉在关节活动过程中提供关节的位置和运动信息,其反馈机制在维持关节功能和稳定性中起重要作用。ACL损伤后膝关节的本体觉会减弱或消失^[13, 14],可能加重膝关节不稳,造成进一步的损伤和退变。我们也发现,伴随膝关节的软骨及半月板退变,OA患者的ACL变得松散,胶原纤维发生变性,X线片上显示膝关节退变的越

严重,软骨磨损越重,ACL相对越松散变细,组织学上退变的程度越重,这与关节镜手术中所见符合^[15]。而这一改变必然使ACL的抗拉强度下降、本体觉受损。可能由于软骨及半月板磨损、退变,变薄或消失造成关节间隙狭窄,导致交叉韧带以及关节囊相对松弛,从而使关节活动时不稳,进而加速OA的进展和交叉韧带的退变。这是一个互为因果,相互促进,不断恶化的过程,从而促使OA进展。

ACL的组织学研究,我们的观察结果同Cushner等^[16]的观察结果类似。他们通过对OA患者和正常人的ACL进行组织学比较,认为OA患者的ACL退变程度较正常对照组明显严重,还发现ACL退变与性别无关;正常对照组与65岁以上者之间无统计学差异,ACL不同部位的组织切片显示其退变程度无统计学差异。

ACL退变的最终结果是断裂。Hill等^[9]对360例OA患者行MRI检查,发现ACL断裂者占22.8%,且其中一半以上无明确的损伤史,ACL断裂者膝关节X线片退变更加严重,内侧关节间隙更窄。本研究也有1/3(13/40)的OA患者无明确损伤史,却在手术发现ACL断裂或消失而剔出(因无法进行切片观察)。因此,即便无ACL损伤史,ACL退变甚至断裂与OA之间也有明确的相关性,ACL退变在OA进展中的作用常常被忽视,仍需进一步重视。

3.2 OA患者ACL I型与Ⅲ型胶原含量的变化 有人采用免疫组化法对兔和狗ACL的研究,发现正常ACL中以I型胶原为主,Ⅲ型胶原只在韧带边缘及纤维束内边缘分布^[17, 18]。文献^[19]报道人正常交叉韧带中只有9%~12%的Ⅲ型胶原,我们对苦味酸-天狼猩红染色切片进行图像分析得出正常ACLⅢ型胶原含量为(9.9±3.5)%,无明显差别。通过苦味酸-天狼猩红染色,我们在同一张切片中观察到I、Ⅲ型胶原的分布及相互关系,发现多数退变的ACL中Ⅲ型胶原明显增多,变得弥漫而形态紊乱;I型胶原含量减少。Ⅲ型胶原一般是在损伤组织愈合的早期呈高表达,这是因为Ⅲ型胶原中含有一对半胱氨酸,因此Ⅲ型胶原在形成三螺旋结构时,在C端处出现二硫键,这样Ⅲ型胶原比I型胶原更快形成聚合物,有利于快速填充损伤组织,促进伤口愈合。并且Ⅲ型胶原生物力学强度比I型胶原明显脆弱^[20]。因此,我们认为OA患者的ACL类似于反复损伤的组织表现,Ⅲ型胶原增多,较正常脆弱。但需要注意的是,在本研究中OA组29个ACL标本中有6个标本其Ⅲ型胶原含量<9%,比正常ACL中Ⅲ型胶原含量还少,主要为I型胶原,说明

ACL退变不是简单的都表现为Ⅲ型胶原增多,ACL退变后胶原纤维的变化及原因仍需进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Brooks PM. Impact of osteoarthritis on individuals and society: how much disability? Social consequences and health economic implications. *Curr Opin Rheumatol*, 2002,14;573-577.
- 2 Reginster JY. The prevalence and burden of arthritis. *Rheumatology(Oxford)*, 2002,41;3-6.
- 3 Praemer AP, Furner S, Rice DP. Musculoskeletal conditions in the United States, 2nd ed. Illinois USA: AAOS, 1999. 182.
- 4 陈百成,张静. 骨关节炎. 北京:人民卫生出版社,2004. 2.
- 5 Lavigne P, Benderdour M, Lajeunesse D, et al. Subchondral and trabecular bone metabolism regulation in canine experimental knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2005,13;310-317.
- 6 Joseph AB, Charles S, Thomas B. The impact of osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res*, 2004,427;S6-S15.
- 7 Nebelung W, Wuschech H. Thirty-five years of follow-up of anterior cruciate ligament-deficient knees in high-level athletes. *Arthroscopy*, 2005,21;696-702.
- 8 Dienst M, Burks RT, Greis PE. Anatomy and biomechanics of the anterior cruciate ligament. *Orthop Clin North Am*, 2002,33;605-620.
- 9 Hill Ca L, Seo GS, Gale D, et al. Cruciate ligament integrity in osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum*, 2005,52;794-799.
- 10 吴海山,周维江,张中南. 老年性退变膝——临床分级、关节镜评价与光电镜观察. *中华老年医学*, 1994,13;330-332.
- 11 Nicoletti A, Heudes D, Hinglais N, et al. Left ventricular fibrosis in renovascular hypertensive rats. *Hypertension*, 1995,26;101.
- 12 Strocchi R, De Pasquale V, Gubellini P, et al. The human anterior cruciate ligament——histological and ultrastructural observations. *J Anat*, 1992,180;515-519.
- 13 Fremerey RW, Lobenhoffer P, Zeichen J, et al. Proprioception after rehabilitation and reconstruction in knees with deficiency of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg*, 2000,82;801-806.
- 14 马燕红,程安龙,江澜,等. 前交叉韧带损伤后膝关节本体感觉的改变. *中华物理医学与康复杂志*, 2004,26;242-243.
- 15 刘玉杰,王志刚,李众利,等. 关节镜微创清理工治疗老年膝关节骨性关节炎. *中华老年多器官疾病杂志*, 2004,3;28-30.
- 16 Cushner FD, La Rosa DF, Vigorita VJ, et al. A quantitative histologic comparison: ACL degeneration in the osteoarthritic knee. *J Arthroplasty*, 2003,18;687-692.
- 17 王永健,敖英芳. 自体半腱肌腱移植重建前交叉韧带移植组织学变化的实验研究. *中国运动医学杂志*, 2004,23;609-612.
- 18 蒋青,林共周,曲绵域,等. 前交叉韧带重建后Ⅲ型胶原的表达. *中华骨科杂志*, 1999,19;431-433.
- 19 Ameil D, Frank C, Harwood F, et al. Tendons and ligaments: a morphological and biochemical comparison. *J Orthop Res*, 1984,1;257-265.
- 20 Sluss JR, Liberti JP, Jiranek WA, et al. Collagen type Ⅲ within tendon grafts used for anterior cruciate ligament reconstruction. *J Orthop Res*, 2001,19;852-857.

· 启 事 ·

《中华老年多器官疾病杂志》变更刊期的启事

在总政治部、总后勤部、解放军总医院领导的关心和众多编委、作者、读者的大力支持下,《中华老年多器官疾病杂志》自2002年创刊以来,质量逐年提高,因之,已于2004年加入了中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)。

鉴于来稿数量的逐年增多,为缩短出版周期,加速信息流通,本刊将从2007年起由季刊变更为双月刊,逢双月末出版。每本定价仍为12元。

《中华老年多器官疾病杂志》编辑部