

高强度运动对膝关节软骨组织病理学及关节液内生物标记物的影响

常祺 黄昌林 李芳芳

【摘要】 目的 研究高强度运动对关节软骨病理组织学方面的影响,并了解基质金属蛋白酶-1(MMP-1)、基质金属蛋白酶-3(MMP-3)、基质金属蛋白酶抑制因子-1(TIMP-1)作为生物标记物在不同训练阶段的变化及其意义。方法 40只新西兰大白兔随机分为2组,对照组8只,笼内自由活动;训练组32只,每日行电刺激蹦跳训练。训练组动物与对照组动物分期分批抽取关节液并处死取材。应用ELISA方法检测关节液MMP-1、MMP-3、TIMP-1浓度。膝关节软骨做病理组织学检查,分别行光电镜显微观察以及葡萄糖胺聚糖(GAG)、关节软骨及软骨下骨厚度、坏死细胞率、Mankin病理学评分等检测。结果 显微观察显示训练组动物在训练4周时便开始有膝关节软骨过劳性损伤早期改变,8周时损伤改变进一步加重。4周时,训练组GAG含量与软骨下骨厚度明显低于对照组,Mankin评分明显高于对照组;8周时,训练组GAG含量、关节软骨及软骨下骨厚度明显低于对照组,坏死细胞率、Mankin评分明显高于对照组。训练组关节液内MMP-1、MMP-3、TIMP-1浓度在训练4周、8周均高于对照组,各标记物在关节液中浓度与各病理学检测指标间均有显著相关性。结论 高强度重复运动容易产生关节软骨运动性损伤,其启动因素为软骨基质的变性及流失;关节液内MMP-1、MMP-3、TIMP-1浓度变化可以很好地反映关节软骨过劳性损伤病理改变情况。

【关键词】 软骨,关节; 运动损伤; 基质金属蛋白酶; 生物标记物

Effect of high-intensity exercise on histopathology of knee joint cartilage and on levels of cartilage biomarkers in synovial fluid CHANG Qi*, HUANG Chang-lin, LI Fang-fang. *Military Training Medicine Institute, 150th Hospital of PLA, Luoyang 471031, China
Corresponding author: HUANG Chang-lin, Tel: 0086-379-64181789, Email: huangchanglin1945@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To study the effect of high-intensity exercise on histopathology of knee joint cartilage and investigate the changes of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) in synovial fluid at different exercise stages. **Methods** A total of 40 New Zealand white rabbits were divided into control group (n=8) and training group (TG group, n=32). Animals in control group received no intervention but those in TG group were trained jumping in an electric stimulation cage daily. Concentrations of MMP-1, MMP-3, and TIMP-1 in synovial fluid were measured by ELISA assays at 4 and 8 weeks respectively. GAG (glycosaminoglycan) content, thickness of cartilage and subchondral bone, necrotic cell ratio and Mankin grades were measured microscopically respectively. **Results** Microexamination showed early pathological changes of sport injury of articular cartilage in TG at the 4th week, which aggravated at the 8th week. In TG group, GAG content and thickness of subchondral bone were significantly lower but Mankin grades higher than those in control group at the 4th week. At the 8th week, GAG content, thickness of cartilage and subchondral bone, dead cell ratio and Mankin grades in TG group were significantly higher than those in control group. Levels of MMP-1, MMP-3, TIMP-1 and MMP-3/TIMP-1 in synovial fluid in TG group were significantly higher than those in control group at the 4th and 8th weeks. Furthermore, there was statistically significant correlation between biomarker levels in synovial fluid and chondropathological indices. **Conclusions** Repetitive and high-intensity exercises may easily induce sports injury in knee joint cartilage, when the initiating agent is the drain of cartilage matrix. Levels of MMP-1, MMP-3, TIMP-1 and MMP-3/TIMP-1 in synovial fluid can well reflect pathological changes of cartilage injury.

基金项目:全军医药卫生科研基金资助项目(06Q024)

作者单位:471031 洛阳,解放军第一五〇中心医院,全军军事训练医学研究所[常祺(电话:13373774084, Email:changqil127@yahoo.com.cn)、黄昌林];河南师范大学(李芳芳)

通讯作者:黄昌林,电话:0379-64181789,Email:huangchanglin1945@yahoo.com.cn

【Key words】 Cartilage, articular; Athletic injuries; Matrix metalloproteinase; Biological markers

有研究表明,长时间高强度、重复、冲击性、扭转或剪切性的运动容易产生关节运动性损伤^[1,2]。在这些损伤所致关节结构发生退行性改变的过程中,关节软骨及软骨下骨常被破坏,导致关节功能不可逆的进行性减退。前期的一些研究表明,高强度运动后体液中的某些蛋白分子,如基质金属蛋白酶及其抑制因子等的代谢发生明显改变,可直接或间接地反映关节软骨的状况或病变趋势^[1,3]。为此,笔者采用兔高强度蹦跳运动模型,用组织形态学和免疫学技术等方法,研究高强度蹦跳运动对关节软骨病理组织学的影响,以及与关节液内生物标记物水平之间的联系,旨在关节软骨过劳性损伤诱发因素、病理变化及早期诊断方面取得更大的进展,并为其治疗开辟新的有效途径。

1 材料与方法

1.1 动物及实验分组

40 只新西兰大白兔,雌雄不限,10~12 个月龄,体重 2.5~3.0 kg,平均 2.8 kg,随机数字表法分为两组,对照组(8 只)笼内自由活动,不做任何干预处理;训练组(32 只)放入面积为 0.85 m×1.6 m 的高电压低电流脉冲动物刺激笼,训练量为刺激 20 次/min,刺激时间为 0.2~0.5 s,动物受电刺激后蹦跳并在笼内奔跑数步。训练组每日训练各 2 h,中间休息 1 h。对照组于训练组开始训练后 4、8 周抽取关节液,8 周抽取关节液后全部处死。训练组在训练 4 周、8 周时各处死 16 只,每只动物在处死前 1 d 抽取关节液。

1.2 主要仪器及试剂低电流脉冲刺激笼(全军军事训练医学研究所),S-520 型扫描电子显微镜(分辨率 6 nm,日本 Nippon 电子公司),JEM-2000EX 型透射电子显微镜(加速电压 200 kV,分辨率 0.2 nm,日本 Nippon 电子公司),Nikon TE300 倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司);Model 550 型酶标分析仪(美国 BIO-RAD 公司)。金属基质蛋白酶(MMP)-1、MMP-3、基质金属蛋白酶抑制因子(TIM P)-1、ELISA 检测试剂盒(美国 Amersham Pharmacia Biotech 公司)。

1.3 实验步骤

1.3.1 组织学检查(1)组织学观察:在股骨髁负重区采集标本[左侧膝关节做病理切片,右侧提取葡萄糖胺聚糖(GAG)]。大体观察样本厚约 0.5 cm,包括

关节软骨和软骨下骨。电镜观察样本厚度为 1 mm,长宽各为 2 mm。大体观察样本 40 g/L 多聚甲醛固定,盐酸脱钙液脱钙,石蜡包埋,切片,行 HE 及马森三色法染色。电镜观察样本经 25 g/L 戊二醛溶液固定 2 周后行扫描与透射电镜观察。(2)GAG 含量测定:动物处死后以直径 4.5 mm 环锯取股骨髁负重区关节软骨及软骨下骨直至髓腔,液氮速冻后 -70℃ 保存,集中进行提取和测定。将软骨称重后,置于 1 ml 50 mmol/L PBS(pH 6.0,包含 10 mmol/L EDTA、10 mmol/L 半胱氨酸、27 μg/ml 木瓜蛋白酶)中,60℃ 放置 8 h。改良的阿新蓝液法测定 GAG 含量^[4],GAG 含量以 μg/mg 软骨湿重表示。(3)软骨层与软骨下骨厚度测量:在组织切片上,测量软骨层[透明软骨(从软骨表面至潮线表面)+钙化软骨(从潮线表面至钙化软骨与骨交界处)]与软骨下骨层(钙化软骨与骨交界处至髓腔表面)厚度。在 10 倍光镜下,每张切片以股骨髁负重区为中心,选取 20 个等距点(两点相隔 400 μm),应用 10×10 网格目镜测微计测量各点的各层面厚度。(4)软骨细胞损伤观察:对各组软骨块用二乙酸荧光素/碘化丙啶(FDA/PI)双荧光染色法观察软骨细胞比例及分布^[5]。参照 Pelletier 等^[6]的方法,随机选取 6 个高倍镜视野(×400),其中 3 个位于软骨表层和中上层,另 3 个位于中下层和下层。计算每个视野里的死亡细胞数和细胞总数。死亡细胞率=死亡细胞/(死亡细胞+活细胞)×100%。(5)Mankin 评分:所有切片(共 40 张)应用盲法,按照 Mankin 评分标准^[7],从软骨结构、细胞改变、基质染色、潮线完整性四方面评估病变程度,所得分数叠加。

1.3.2 体液标记物含量测定:(1)样本采集:关节液标本采集:自髌下髌韧带旁进针至关节囊内,注入 2 ml 等渗盐水,随后尽量多地抽取关节液。2000 r/min 离心 20 min,抽出上清液,置 -70℃ 深低温冰箱保存。(2)标记物测定:ELISA 法检测关节液 MMP-1、MMP-3、TIMP-1 浓度,抗体均为抗兔多克隆抗体,ELISA 详细步骤见文献[8]。MMP-1 标准样品浓度分为 100~6.25 ng/ml,关节液样本按 1:10 稀释;MMP-3 标准样品浓度分为 120~3.75 ng/ml,样本按 1:50 稀释;TIMP-1 标准样品浓度分为 50~3.13 ng/ml,样本按 1:50 稀释。使用 Model 550 型酶标分析仪在 450 nm 下测吸光度(A)值,根据标准品浓度与 A 值建立标准曲线,查出待测样本相应

浓度。

1.4 统计学分析

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件包分析。组间和组内不同时间点间两两比较采用非参数 Mann - Whitney *U* 检验(双侧)。关节液各标记物水平与软骨病理学各检测指标之间采用 Spearman 相关分析(双侧)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织学观察

2.1.1 大体观察:对照组软骨有光泽,半透明状,表面光滑,关节滑膜表面光滑,关节液黏稠、透明、量少。训练组在 4 周时可见关节滑膜稍毛糙及增厚,轻度充血水肿。关节液黏稠度较低,量较多。训练组在 8 周时关节软骨失去正常光泽,较黯淡,但尚光滑,关节内炎性表现较 4 周时加重,有 2 只可见负重区软骨浅表溃疡,其余各只无明显软骨面破坏及骨

赘形成表现。

2.1.2 显微观察:对照组马森三色法染色软骨基质呈蓝绿色,染色均匀,软骨下骨及骨组织呈红色。细胞排列规则有序。扫描电镜下,软骨表面光滑平整,无胶原及软骨细胞裸露。透射电镜下,正常的软骨细胞表面有突起和皱褶,核呈偏心位,核膜明显。软骨内各层胶原排列整齐、密集。训练组 4 周时可见基质染色不均、淡染,潮线紊乱。3 只软骨表面结构部分破坏丢失。透射电镜下,退变软骨细胞较少见,胶原纤维排列较为紊乱。8 周时,关节软骨表面粗糙不平(图 1a),有时可见明显裂隙(图 1b)。基质染色不均、淡染现象加重,软骨细胞排列紊乱,细胞有簇集或团状增生(图 1c)。扫描电镜下,软骨表面略有凹凸不平(图 1d),有 2 只软骨面出现浅表溃疡,胶原纤维及软骨细胞裸露。钙化带血管增生,有时突破潮线(图 1e)。透射电镜下,可见较多退变软骨细胞,核变形,内质网扩张,异染色质增多及边集,细胞膜微绒毛减少或消失(图 1f)。

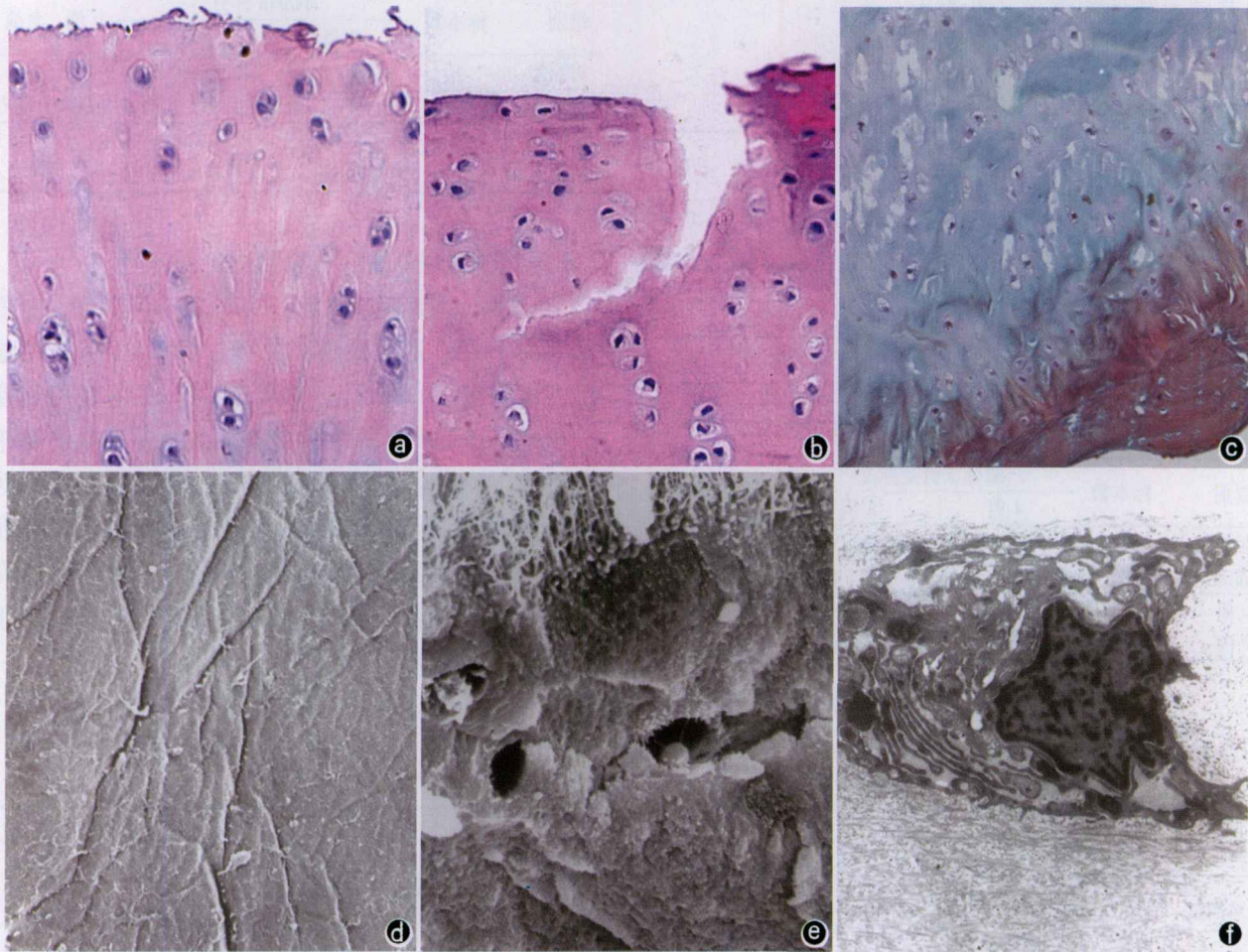


图 1 训练组 8 周时关节软骨显微观察。 a. 关节软骨表面粗糙不平,表面结构丢失 HE $\times 400$; b. 关节软骨表面明显裂隙,软骨细胞分裂相多见 HE $\times 400$; c. 软骨基质蓝绿染色,软骨下骨红染。基质染色不均,淡染,软骨细胞排列紊乱 马森三色法染色 $\times 200$; d. 关节软骨表面粗糙不平 扫描电镜 $\times 1200$; e. 钙化带血管增生,有时突破潮线 扫描电镜 $\times 1500$; f. 退变软骨细胞,核变形,内质网扩张,异染色质增多及边集,细胞膜微绒毛减少或消失 透射电镜 $\times 6000$

2.2 软骨病理学指标检测

2.2.1 GAG 含量:4 周时,训练组 GAG 含量明显低于对照组,8 周时降低更为明显。训练组在 4 周及 8 周 GAG 含量间差异有统计学意义,8 周明显低于 4 周。见表 1。

表 1 葡萄糖胺聚糖(GAG)含量($\mu\text{g}/\text{mg}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	标本数	葡萄糖胺聚糖(GAG)含量		U 值	P 值
		4 周	8 周		
对照组	8	86.13 \pm 5.46	86.13 \pm 5.46	0	0
训练组	16	64.88 \pm 5.97	50.01 \pm 5.34	2	0
U 值		0.000	0.000		
P 值		0.000	0.000		

2.2.2 软骨及软骨下骨层厚度:4 周时,训练组软骨厚度低于对照组,但差异无统计学意义,8 周时,训练组软骨厚度较对照组有显著降低。训练组软骨厚度在 4 周及 8 周间差异无统计学意义。见表 2。
4 周时,训练组软骨下骨厚度明显低于对照组,8 周时降低更为明显。训练组软骨下骨厚度在 4 周及 8 周差异无统计学意义。见表 3。

表 2 软骨层厚度(μm , $\bar{x} \pm s$)

组别	标本数	软骨层厚度		U 值	P 值
		4 周	8 周		
对照组	8	334.09 \pm 37.84	334.09 \pm 37.84	0	0
训练组	16	295.28 \pm 77.15	239.63 \pm 85.93	89.00	0.149
U 值		38.500	20.000		
P 值		0.120	0.006		

表 3 软骨下骨层厚度(μm , $\bar{x} \pm s$)

组别	标本数	软骨下骨层厚度		U 值	P 值
		4 周	8 周		
对照组	8	395.26 \pm 67.21	395.26 \pm 59.21	0	0
训练组	16	336.41 \pm 79.88	283.92 \pm 88.59	80.00	0.073
U 值		30.000	17.000		
P 值		0.120	0.003		

表 6 不同时期关节液内生物标记物水平(ng/ml , $\bar{x} \pm s$)

组别	标本数	MMP-1		MMP-3		TIMP-1		MMP-3/TIMP-1	
		4 周	8 周	4 周	8 周	4 周	8 周	4 周	8 周
对照组	8	46.81 \pm 15.48	54.08 \pm 12.83	566.04 \pm 198.55	517.22 \pm 140.88	527.90 \pm 200.57	457.11 \pm 122.25	1.38 \pm 0.78	1.25 \pm 0.62
		55.85 \pm 12.37	75.45 \pm 8.85*	3946.83 \pm 1537.86#	6705.95 \pm 1848.93#	685.75 \pm 100.91*	863.35 \pm 182.03#	5.72 \pm 1.99#	7.97 \pm 2.81#

与同时相对照组比较: * $P < 0.05$, # $P < 0.01$

2.2.3 死亡细胞率:4 周时,训练组细胞死亡率高于对照组,但差异无统计学意义,8 周时,训练组细胞死亡率较对照组有显著升高。训练组在 4 周及 8 周细胞死亡率间差异有统计学意义,8 周明显高于 4 周。见表 4。

表 4 死亡细胞率($\%$, $\bar{x} \pm s$)

组别	标本数	死亡细胞率		U 值	P 值
		4 周	8 周		
对照组	8	1.72 \pm 1.01	1.72 \pm 1.01	0	0
训练组	16	2.23 \pm 1.45	8.15 \pm 2.79	0.000	0.000
U 值		1950.000	0.000		
P 值		0.133	0.000		

2.2.4 Mankin 评分:4 周时,训练组 Mankin 评分明显高于对照组,8 周时,升高更为明显。训练组在 4 周及 8 周 Mankin 评分差异有统计学意义,8 周明显高于 4 周。见表 5。

表 5 Mankin 评分($\bar{x} \pm s$)

组别	标本数	Mankin 评分		U 值	P 值
		4 周	8 周		
对照组	8	1.25 \pm 0.89	1.25 \pm 0.89		
训练组	16	3.63 \pm 1.09	5.88 \pm 1.41	28.00	0.000
U 值		4.000	0.000		
P 值		0.000	0.000		

2.3 不同时期关节液内生物标记物水平

4 周时,训练组 MMP-1 浓度高于对照组,但差异无统计学意义;8 周时,训练组 MMP-1 浓度明显高于对照组。4 周时,训练组 MMP-3 浓度明显高于对照组;8 周时,训练组 MMP-3 浓度也明显高于对照组。4 周时,训练组 TIMP-1 浓度明显高于对照组;8 周时,训练组 MMP-3 浓度也明显高于对照组。4 周时,训练组 MMP-3/TIMP-1 浓度明显高于对照组;8 周时,训练组 MMP-3 浓度也明显高于对照组。见表 6。

2.4 关节液内生物标记物水平与软骨各指标间相关性

如表 7 所示,除 MMP-1 与软骨下骨厚度、TIMP-1 与关节软骨厚度和软骨下骨厚度无显著相关关系外,其他关节液内生物标记物与软骨各指标间均有显著相关关系。见表 7。

表 7 关节液内生物标记物水平与软骨各指标间相关性(r 值)

指标	GAG 含量	厚度		死亡细胞率	Mankin 评分
		关节软骨	软骨下骨		
MMP-1	-0.683*	-0.347*	-0.304	0.675#	0.570#
MMP-3	-0.763#	-0.480*	-0.528#	0.580#	0.736#
TIMP-1	-0.602#	-0.267	-0.297	0.527#	0.443#
MMP-3/ TIMP-1	-0.675#	-0.448#	-0.484#	0.483#	0.676#

* $P < 0.05$, # $P < 0.01$ 表示生物标记物水平与软骨指标间显著相关

3 讨论

运动训练是提高身体素质的重要途径,不同训练方式及强度,对机体会产生不同的影响,不合理的运动训练甚至容易导致损伤的发生^[9]。本实验中采用大强度蹦跳运动训练模式,对兔进行总共为期 8 周的训练,在 4 周和 8 周时分别观察了膝关节软骨在组织病理学上的改变以及体液内生物标记物的变化,并进一步探讨特定模式训练下关节软骨损伤的发生过程、发生机制,以及与关节液内相关生物标记物代谢之间的联系。

蹦跳运动多见于跳远、跳高、蛙跳以及打篮球等运动项目中,作用于关节软骨表面的应力负荷在极短时间内达到应力峰值,胶原结构承受迅速增加的膨胀性张力,当局部张力超出张力胶原网的承受能力时,就会导致胶原结构的破坏,进一步导致 GAG 等基质成分的流失。训练组 4 周时膝关节软骨 GAG 含量较对照组已有明显下降,8 周时降低更为明显。在训练组 4 周时光镜下可见基质染色不均、淡染,潮线紊乱,这也说明了软骨基质在这种高加载速率、高强度应力负荷下早期即出现损伤变化,关节软骨损伤表现为“软骨基质始动机制”。

训练组膝关节软骨细胞死亡率在训练早期(4 周时)与对照组相比差异无统计学意义,但在 8 周时,则高于对照组。透射电镜下观察,8 周时训练组关节软骨可见较多退变软骨细胞,核变形,内质网扩张,异染色质增多及边集,细胞膜微绒毛减少或消失。这说明在蹦跳训练早期膝关节软骨细胞所受影响并不大,但是随着训练的进行,致伤因素持续存

在,GAG 的合成代谢大幅度下降,软骨基质进一步破坏,导致基质内软骨细胞失去保护屏障,所处力学环境变化加剧。这些都导致软骨细胞在训练后期形态改变,功能下降或丧失。

关节软骨及软骨下骨具有的顺应性是关节得以长久传导载荷而不出现退变的重要基础。对人及短尾猴的研究表明,在早期关节退变过程中,软骨下骨出现增厚现象,这可能为骨性关节炎的早期表现之一^[10]。但本实验以兔为研究对象得出的结果却与之不完全一致,在 4 周时,软骨下骨厚度均值低于对照组,但差异无统计学意义;8 周时,软骨下骨厚度则明显低于对照组。分析其原因可能有以下方面:动物训练过程中基质胶原结构的形变及破坏直接对软骨下骨的结构及承重、负荷传导能力产生了负面的影响;本实验动物兔与先前研究对象在关节软骨及软骨下骨功能结构上存在较大差异;动物训练时间较短,而软骨下骨厚度改变需要较长时间观察,结论存在一定争议。本实验结果还表明,在 4,8 周时,关节软骨厚度均值低于对照组,但差异无统计学意义。这可能与本次实验动物量较少,不能得出有统计学意义的有关。光镜、电镜下可以观察到训练组在训练后期出现关节软骨轻度纤维化,以及表面结构丢失现象,这些都为大强度运动训练导致关节软骨退化及厚度降低提供了依据。

Mankin 评分是国际上惯用的对软骨损伤程度进行评估的一种评分标准。本次实验结果显示,训练组在 4 周、8 周时 Mankin 评分均明显高于对照组。这说明周期性大强度蹦跳运动确能导致膝关节软骨损伤发生,而且通过分析结果还可以发现,随着这种训练周期的延长,关节软骨损伤也有逐渐加重趋势,最后导致不可逆转的结果。

目前,诊断关节软骨损伤主要依靠临床表现和影像学检查,这明显滞后于病变发展^[11],临床上缺乏一个客观指标来反映软骨的病变程度,特别在目前临床上尚无确切有效的软骨保护类药物的情况下,早期诊断、去除致病因素、对高危人群采取适当预防性措施,显得尤为重要。在关节软骨损伤早期,软骨生化代谢加快的同时,必然伴随着软骨基质成分代谢产物进入体液中^[12]。笔者着重研究了训练过程中关节液内标记物蛋白的变化规律,以期针对软骨损伤建立一个敏感稳定的生化联合检测指标。

MMPs 属于一个 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 依赖的蛋白水解酶家族,在软骨基质及软骨细胞破坏的病理过程中起着重要的作用。研究表明,胶原酶类能直接降解 I、

Ⅱ、Ⅲ型胶原,且对蛋白聚糖有高度的裂解活性^[13]。基质金属蛋白酶抑制因子(TIMPs)是MMPs的特异性抑制剂,在正常软骨中,TIMPs和MMPs酶原形态以非共价键形式结合成比例为1:1的复合物,从而阻止酶激活^[14]。另外,就MMP-1,3和TIMP-1的来源,有研究显示在正常和早期退变关节软骨中主要由软骨细胞分泌^[15]。

本研究结果表明,训练组关节液内MMP-1、MMP-3在训练过程中均有过量表达,这可能与关节组织受力异常^[16]、炎症反应及关节软骨细胞代谢活跃有关,TIMP-1水平虽然也有升高,但其升高幅度却远远低于MMP-1与MMP-3,MMP3/TIMP1比值大幅度升高。以上因素导致了软骨组织中Ⅱ型胶原和GAG的降解,软骨细胞受压损伤。关节液内MMP-1、MMP-3以及MMP-3/TIMP-1水平与组织病理学检测结果间的相关性分析结果表明,其水平与GAG含量和软骨下骨层厚度呈显著负相关,与细胞死亡率和Mankin评分呈显著正相关。

以上研究结果表明,蹦跳训练所致早期损伤发生机制是以基质流失为始动因素。本研究结果还证实,关节液中MMP-1、MMP-3、TIMP-1以及MMP-3/TIMP-1水平是反映软骨代谢的良好指标,联合应用这几种生物标记物能够针对软骨损伤的发生、类型、病理改变特点及预后做出很好的预测。但是,由于干扰因素较多,此项技术应用于临床仍需进一步的研究。

参考文献

- [1] Chang Q, Huang CL. Effects of moving training on histology and biomarkers levels of articular cartilage. *J Surg Res*, 2006, 135:352-363.
- [2] Buckwalter JA, Lane NE. Athletics and Osteoarthritis. *Am J Sports Med*, 1997, 25:873-881.
- [3] 常祺, 黄昌林. 应用蛋白芯片技术诊断早期关节软骨损伤的展望. *中华创伤骨科杂志*, 2006, 8:73-98.
- [4] Chandrasekhar S, Esterman MA, Hoffman HA. Microdetermination of proteoglycans and glycosaminoglycans in the presence of guanidine hydrochloride. *Anal Biochem*, 1987, 161:103-108.
- [5] Jones KH, Senft JA. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J Histochem Cytochem*, 1985, 33:77-79.
- [6] 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.
- [7] Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg (Am)*, 1971, 53:523-537.
- [8] Naito K, Takahashi M, Kushida K, et al. Measurement of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in patients with knee osteoarthritis: comparison with generalized osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 1999, 38:510-515.
- [9] Almeida SA, Williams KM, Shaffer RA, et al. Epidemiological patterns of musculoskeletal injuries and physical training. *Med Sci Sports Exerc*, 1999, 31:1176-1182.
- [10] Carlson CS, Loeser RF, Purser CB, et al. Osteoarthritis in cynomolgus macaques. III: Effects of age, gender, and subchondral bone thickness on the severity of disease. *J Bone Miner Res*, 1996, 11:1209-1217.
- [11] Fernandez-Madrid F, Karvonen RL, Teitge RA, et al. MR Features of Osteoarthritis of the Knee. *Magn Reson Imaging*, 1994, 12:703-709.
- [12] Young-Min SA, Cawston TE, Griffiths ID. Markers of joint destruction: principles, problems, and potential. *Ann Rheum Dis*, 2001, 60:545-548.
- [13] Jain A, Nanchahal J, Troeberg L, et al. Production of cytokines, vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 by tenosynovium demonstrates its potential for tendon destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2001, 44:1754-1760.
- [14] Su S, Grover J, Roughley PJ, et al. Expression of the Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMP) Gene Family in Normal and Osteoarthritic Joints. *Rheumatol Int*, 1999, 18:183-191.
- [15] Fosang AJ, Last K, Maciewicz RA. Aggrecan is degraded by matrix metalloproteinases in human arthritis. Evidence that matrix metalloproteinase and aggrecanase activities can be independent. *J Clin Invest*, 1996, 98:2292-2299.
- [16] Handa T, Ishihara H, Ohshima H, et al. Effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis and matrix metalloproteinase production in the human lumbar intervertebral disc. *Spine*, 1997, 22:1085-1091.

(收稿日期:2006-09-07)

(本文编辑:向勇)