

· 论 著 ·

亚甲蓝兔膝关节腔内注射的安全性研究

郑佳鹏,丁真奇,孟加榕,刘良田

[摘要] 目的 观察不同剂量亚甲蓝兔膝关节腔内注射后对兔全身及局部的影响。方法 将 48 只兔随机分成 0.5 mg/kg 组、1 mg/kg 组、2 mg/kg 组和对照组,每组 12 只,分别按 0.5、1、2 mg/kg 的剂量向膝关节腔内注射亚甲蓝溶液和等量 0.9% 氯化钠,观察各组兔注射前及注射后不同时期血液学参数、血液生化指标及注射后 12 周膝关节内组织病理学变化。结果 与对照组相比,不同剂量亚甲蓝组兔全身情况、血液学参数、血液生化指标无明显改变,≤1 mg/kg 剂量亚甲蓝兔膝关节腔内注射对兔关节软骨、滑膜、交叉韧带、半月板无明显病理性改变。结论 亚甲蓝≤1 mg/kg 剂量兔膝关节腔内注射对兔的全身及局部无明显毒性作用。

[关键词] 亚甲蓝;安全性;关节腔内;注射

[中图分类号] R965.1 [文献标志码] A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2013.03.007

Experimental study of methylene blue intraarticular injection on knee joint of rabbit

ZHENG Jia-peng, DING Zhen-qi, MENG Jia-rong, LIU Liang-tian. Department of Orthopaedic, 175 Hospital of PLA, Zhangzhou, Fujian 363000, China

[Abstract] Objective To study the safety of the methylene blue (MB) that intraarticular injected on knee joint of rabbit limb. Methods 48 rabbits were randomly divided into experimental group and control group. Experimental group were received 0.5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg MB by intraarticular injection on knee joint and control group received the same amount of physiologic saline. Blood test was examined before and after injection. Pathological examination of articular tissue was taken after sacrificed (12 weeks after injection). Results Compared to control group, blood tests showed no changes in experimental group, and there were no significant difference of articular tissue when the dosage of MB was ≤1 mg/kg. Conclusion The dosage of MB ≤1 mg/kg intraarticular injection on knee joint of rabbit is no significant toxicity and safe.

[Key words] methylene blue; safety; intraarticular; injection

急性膝关节疼痛是平时军事训练及野战环境常见运动损伤。近年研究显示亚甲蓝 (methylene blue, MB) 具有明确的长效镇痛作用。本研究以不同剂量亚甲蓝对兔膝关节腔内注射,对兔的关节局部及全身影响进行观察,寻找安全剂量。

1 材料与方法

1.1 材料 选择 6 月龄,雄性,体重 2.0~2.5 kg,清洁级 Sprague-Dawley (SD) 新西兰兔 48 只[购自厦门大学实验动物中心,实验动物许可证号:SYXK (闽)2007-0003],分笼饲养,自由饮水,自由活动。亚甲蓝 (江苏济川制药有限公司,规格:2 ml/20 mg)。

1.2 实验方法 将 48 只实验兔随机分成 3 个实验组 (即 0.5 mg/kg 组、1 mg/kg 组、2 mg/kg 组) 及对照组,每组 12 只,实验组分别按 0.5、1、2 mg/kg 的剂量注入单膝内,对照组注射等量 0.9% 氯化钠。

注射后 12 周处死。

1.3 观察指标与方法

1.3.1 全身情况 观察兔的精神、皮毛、进食、粪便、体重变化、注射部位的皮肤、行走及奔跑步态。

1.3.2 血液检查 注射前、注射后 3 d 和处死前经耳缘静脉取 2~5 ml 血液,检测白细胞 (WBC)、红细胞 (RBC)、血红蛋白 (Hb)、血小板 (PLT)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、尿素 (UREA)、肌酐 (CRE)。

1.3.3 组织学观察 注射后 12 周处死,取股骨髁部位的软骨、髌上囊部位滑膜、前后交叉韧带、内外侧半月板行病理学观察。滑膜、交叉韧带及半月板标本用 4% 甲醛固定,再按常规脱水、浸蜡包埋、切片、HE 染色,光学显微镜观察组织学变化。软骨标本采用 4% 多聚甲醛固定,15% 乙二胺四乙酸 (EDTA) 脱钙 10 周,浸蜡包埋、切片、HE 染色,光学显微镜观察组织学变化。软骨 AB-PAS 染色观察多糖着色,行 Mankin 评分^[1]。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件进行

统计分析,计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 全身情况 所有实验兔均存活,未见脱毛,注射前后精神及进食状况未见明显改变,未见腹泻;实验组和对照组兔体重无明显差异,均随喂养体重渐增加。注射部位均自然愈合,无感染及破溃出现;实验组兔注射后前 3 d 内较对照组存在多卧少动,但 3 d 后各组在活动及步态上无明显差异。

2.2 血液检查 所有兔在注射前、注射后 3 d 和处死前(12 周)经耳缘静脉取 2 ~ 5 ml 血液,进行血液检查。各检测值每组行单因素方差分析,结果显示不同剂量注射组与对照组没有明显差别($P > 0.05$),见表 1。

2.3 组织学观察及 Mankin 评分 实验组与对照组注射后 12 周膝关节内组织肉眼均未观察到明显病理性改变。实验组及对照组滑膜肉眼及 HE 染色光镜下均未见充血水肿表现,厚度及光泽正常,无淋巴细胞浸润及血管增生。与对照组相比,1 mg/kg 组及 2 mg/kg 组镜检滑膜细胞略减少,仅为 1 或 2 层,形态正常见图 1。实验组及对照组关节软骨肉眼下完整,光泽正常,光镜下 0.5 mg/kg 组、1 mg/kg 和对照组软骨层次清楚,形态正常见图 2 中 A ~ C,2 mg/kg 组软骨细胞略少但形态正常,HE 染色略减退,其中 1 个标本出现软骨表层缺损见图 2D。0.5 mg/kg 组、1 mg/kg 组、2 mg/kg 组、对照组 Mankin 评分分别为(5.40 ± 1.43)、(5.47 ± 2.13)、(7.13 ± 2.56)、(5.32 ± 1.51),2 mg/kg 组与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

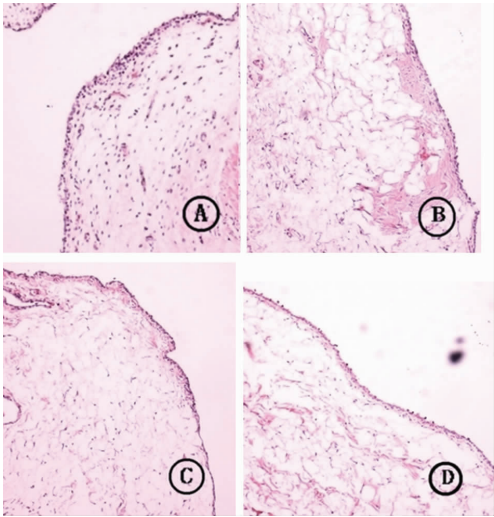


图 1 注射亚甲蓝 12 周兔膝滑膜组织染色(HE ×100)
A:对照组;B:0.5 mg/kg 组;C:1 mg/kg 组;D:2 mg/kg 组。C、D 组滑膜细胞数略减少

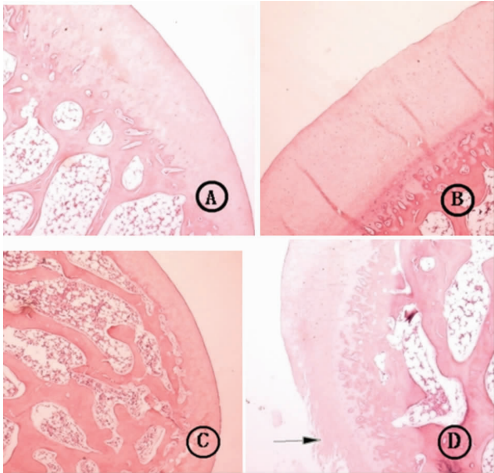


图 2 注射亚甲蓝 12 周兔膝软骨细胞染色(HE ×100)
A:对照组;B:0.5 mg/kg 组;C:1 mg/kg 组;D:2 mg/kg 组。D 组软骨表层缺损(箭头所示)

表 1 4 组兔血细胞及血生化检测结果 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别		WBC($\times 10^9/L$)	RBC($\times 10^9/L$)	PLT($\times 10^9/L$)	ALT(U/L)	AST(U/L)	UREA($\mu\text{mol/L}$)	CRE($\mu\text{mol/L}$)
0.5mg/kg 组	注射前	9.40 ± 2.43	5.19 ± 0.78	367.42 ± 58.42	38.23 ± 5.13	37.32 ± 6.44	4.83 ± 1.43	69.41 ± 8.13
	注射后 3 d	10.10 ± 1.78	5.36 ± 0.56	313.17 ± 79.46	42.15 ± 7.42	40.27 ± 6.73	4.50 ± 1.52	74.45 ± 6.27
	注射后 12 周	9.56 ± 2.13	6.12 ± 1.42	379.87 ± 110.91	43.44 ± 7.37	44.10 ± 5.92	41.54 ± 0.91	69.75 ± 4.43
1mg/kg 组	注射前	9.85 ± 1.38	5.48 ± 0.73	324.04 ± 89.42	39.43 ± 7.36	40.44 ± 8.34	4.90 ± 1.23	78.44 ± 8.43
	注射后 3 d	9.99 ± 1.49	5.10 ± 1.01	389.67 ± 76.89	41.42 ± 7.44	39.59 ± 7.43	42.64 ± 8.10	82.45 ± 6.34
	注射后 12 周	10.20 ± 2.01	5.40 ± 0.63	329.81 ± 67.44	39.52 ± 5.79	41.71 ± 8.10	42.92 ± 6.14	77.87 ± 7.24
2mg/kg 组	注射前	10.24 ± 0.93	5.20 ± 0.64	345.02 ± 76.71	37.67 ± 7.62	39.76 ± 6.41	40.19 ± 8.72	69.65 ± 3.17
	注射后 3 d	9.98 ± 0.77	5.19 ± 0.83	319.67 ± 78.92	39.91 ± 5.87	42.58 ± 7.71	39.91 ± 6.94	87.30 ± 5.66
	注射后 12 周	9.43 ± 0.83	5.28 ± 0.73	379.24 ± 72.28	41.62 ± 9.10	44.14 ± 5.78	43.37 ± 7.01	76.70 ± 6.41
对照组	注射前	9.76 ± 0.93	5.28 ± 0.44	378.32 ± 67.91	39.70 ± 7.93	38.81 ± 7.56	38.13 ± 9.67	82.44 ± 5.19
	注射后 3 d	9.49 ± 0.53	5.80 ± 0.77	392.24 ± 55.37	37.87 ± 8.57	42.04 ± 2.43	39.17 ± 7.43	67.80 ± 8.43
	注射后 12 周	9.66 ± 0.49	6.01 ± 1.23	356.41 ± 77.14	38.40 ± 8.44	39.91 ± 8.14	41.44 ± 7.41	79.46 ± 4.47

注:同组间不同时期各检测项目比较差异均无统计学意义($P > 0.05$);不同组间同时期各检测项目比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)

3 讨 论

亚甲蓝本身系氧化剂,临床用于治疗高铁血红蛋白血症,并作为氰化物中毒的解毒剂,也常用于组织染色、手术前标识及窦道灌注等。近年发现亚甲蓝与神经组织有较强的亲和性,可作用于神经末梢,改变神经末梢内外酸碱平衡和膜电位,影响神经纤维内的一氧化氮/环鸟核糖单磷酸盐系统的兴奋起阻断痛学传导的作用,可长期缓解或永久消除疼痛,特别是难治性神经痛^[2]。电子显微镜下观察到皮内注射亚甲蓝能毁灭皮肤神经末梢,损害程度随亚甲蓝浓度的不同而有差异,浓度越高损害越大,越接近神经破坏药^[3]。亚甲蓝作为长效止痛剂被运用于肛门手术止痛已有多年历史,亚甲蓝还被用于三叉神经痛的局部阻滞、胸部手术术后镇痛及治疗神经性皮炎,运用亚甲蓝进行椎管麻醉也有研究^[4]。Peng 等^[5-6]将 1 ml 亚甲蓝注进退变的椎间盘,通过随机双盲的临床对照试验表明满意率达到 91.6%,且没有出现不良反应或并发症,证实亚甲蓝注射治疗椎间盘源性腰痛是一种安全有效的治疗方法。多种疼痛因子刺激关节内的痛觉敏感神经末梢是关节疼痛的主要原因^[7]。由此,我们提出假设:向关节腔内注射亚甲蓝,灭活关节内的神经末梢,这可能是治疗关节疼痛的有效办法。然而,亚甲蓝关节腔内注射对全身及关节的安全性如何则是需要解决的问题。

亚甲蓝性质温和、刺激性小,经静脉注射后作用迅速,基本不经过代谢即随尿排出。人体静脉注射剂量过大(500 mg)时,可引起恶心、腹痛、心前区痛、眩晕、头痛、出汗和神志不清等反应。本实验中,实验组关节腔内注射亚甲蓝后未见兔有任何食欲减退、呕吐或腹泻等胃肠道反应,连续监测体重无下降,并随喂养渐增加,监测白细胞、红细胞及血小板数量实验组及对照组无明显差异,说明关节腔内注射亚甲蓝对兔全身状况无影响或影响甚微。亚甲蓝关节腔注射创伤小,注射部位皮肤均自然愈合,局部注射具有安全性。本实验使用剂量较小,通过关节腔缓慢释放到全身,证实了小剂量关节腔内注射对兔肝肾功能无影响。

亚甲蓝对增殖活跃的多种细胞具有细胞毒性。Lee 等^[8]发现亚甲蓝对人神经母细胞瘤 SK-N-MC 及人星形细胞瘤 U373-MC 呈现细胞毒性,可用于人脑肿瘤细胞的治疗。亚甲蓝对体外培养的人大肠癌细胞具有明显的体外杀伤和抑制作用,其作用机制为干扰癌细胞 NAD(P)H 递氢过程及氧化还原平

衡,引起癌细胞呼吸能量代谢障碍而抑制和杀伤癌细胞^[9]。本实验重点是观察亚甲蓝对关节腔内组织的影响,特别是对软骨细胞及滑膜细胞的长期影响。关节软骨深埋于软骨基质之中,营养代谢来源于关节滑液通过软骨基质扩散,少量来自软骨下骨。药物或营养通过软骨基质扩散受到分子的大小和分子空间结构的限制,具有相对封闭的特点,不易受到药物影响。本研究证实 ≤ 1 mg/kg 剂量亚甲蓝兔膝关节腔内注射 12 周后未发现肉眼及光镜下病损,软骨 Mankin 评分与对照组差别无统计学意义,可以认为 ≤ 1 mg/kg 剂量亚甲蓝关节腔内注射对兔关节软骨无影响或影响甚微。滑膜细胞增殖相对活跃,本实验证实 ≥ 1 mg/kg 剂量亚甲蓝兔关节腔内注射可抑制滑膜细胞增殖。这为治疗众多因滑膜炎增生而引起疼痛的关节疾病,如急性慢性滑膜炎、色素沉着绒毛结节性滑膜炎、类风湿关节炎等,提供了一种新的思路。不足之处,本研究未做进一步的毒性实验,应以更大剂量的关节腔内注射直至出现毒不良反应,以此确定实验使用的最大剂量。

【参考文献】

- [1] 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(3): 523-537.
- [2] 陈斯琴, 王英伟. 亚甲蓝临床应用进展[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2008, 6(2): 206-208.
- [3] 刘义明, 黄祖仁, 张绵宏. 大硬膜外腔注入不同浓度亚甲蓝后组织细胞超微结构的变化[J]. 中华麻醉学杂志, 1996, 6(2): 911.
- [4] Varghese P, Abdel-Rahman AT. Methylene blue dye: a safe and effective alternative for sentinel lymph node localization[J]. Breast J, 2008, 14(1): 61-67.
- [5] Peng B, Zhang Y, Hou S, et al. Intradiscal methylene blue injection for the treatment of chronic discogenic low back pain[J]. Eur Spine J, 2007, 16(1): 33-38.
- [6] Peng B, Pang X, Wu W, et al. A randomized placebo-controlled trial of intradiscal methylene blue injection for the treatment of chronic discogenic low back pain[J]. Pain, 2010, 149(1): 124-129.
- [7] 长传开, 宋一平. 关节腔内注射加关节囊封闭治疗膝骨性关节炎[J]. 东南国防医药, 2003, 5(1): 33-35.
- [8] Lee YS, Wurster RD. Methylene blue induces cytotoxicity in human brain tumors cells[J]. Cancer Lett, 1995, 82(1): 141-146.
- [9] Wang H, Shah V, Lanks KW. Use of oxidizing dyes in combination with cyanocinnamic acid to enhance hyperthermic cytotoxicity in L929 cells[J]. Cancer Research, 1987, 47(5): 33-41.

(收稿日期: 2012-05-24; 修回日期: 2012-09-19)

(本文编辑: 黄攸生; 英文编辑: 王建东)