骨关节炎中滑膜炎组织病理学评估

梁正洋 王友 安丙辰

摘要 多因素导致、以关节软骨退变为特征的骨关节炎病变不仅局限于关节软骨，还累及滑膜和软骨下骨等结构。越来越多临床关节镜检查中发现无症状的滑膜炎，滑膜炎症在骨关节炎病程中的作用开始受到重视，滑膜炎症组织病理学评估也成为判断骨关节炎严重程度的参考指标。目前多采用滑膜厚度、间质细胞激活和炎症细胞浸润这3个指标来评估滑膜炎症程度，以半定量分析方法应用最多，而计算机辅助信息分析方法最具应用潜力。

关键词 骨关节炎；滑膜炎；组织病理学；评估
DOI：10.3969/j.issn.1673-7083.2011.01.010

骨关节炎(OA)是发病率最高的关节疾病之一，是造成病人功能障碍和肢体残疾的重要原因之一[1]。OA发病因素包括年龄、遗传、体重、激素水平、生物力学等，以关节软骨退行性变为特征，其病理改变累及关节的各个组成部分，绝不仅局限于软骨，还包括软骨下骨、滑膜、半月板和韧带。各组成部分的病理改变相互影响，相互作用，共同加速关节的退变[2]。传统观念认为OA是一种非炎症性关节疾病，一定程度上是由于滑液中白细胞计数(约3000个/ml)较低的缘故，而关节肿胀、渗出、僵硬和偶见的皮肤发红等临床征象，又清楚地表明滑膜炎症的存在。近年研究[3-6]表明，滑膜炎在OA中的发生率高于以往文献报道，在早期OA中的发生率则更高。滑膜炎在OA病理生理中也发挥着一定的作用[7]。

OA中的滑膜炎不同于类风湿关节炎(RA)中的滑膜炎，发生部位(或始发部位)通常局限在出现病理改变的软骨和软骨下骨附近区域，且大多属较轻度炎症；RA中的滑膜炎呈原发性，OA中的滑膜炎一般为继发性，但有研究[8]表明创伤后滑膜炎也会引起进展性髌股关节软骨疾病。软骨退变导致基质破坏，降解片段释放到滑液中并被滑膜细胞，特别是巨噬样细胞吞噬，引起滑膜炎症反应[9,10]和血管增生。炎症反应可易化血管发生，血管发生又促进炎症反应[11]。关节镜下可见滑膜充血、肥大、绒毛形成，甚至血管翳形成；光镜下可观测到滑膜内膜增生、炎症细胞浸润、血管增生、间质细胞增生和纤维化等[12-15]。此外，活化的滑膜细胞分泌大量胶原酶等蛋白水解酶，以及白细胞介素(IL)-1β和肿瘤坏死因子(TNF)-α等炎性介质[16]，反过来促进软骨破坏，这一恶性循环加速了疾病进程。可见，滑膜炎症在OA发病机制中虽不是最关键的因素，但也是必不可少的重要因素之一[7]，且滑膜炎严重程度与OA进展之间存在相关性。

目前对于OA中滑膜炎的研究日趋增多，滑膜炎在OA中的作用日益受到重视。分子生物学实验方法如聚合酶链反应(PCR)、基因芯片等技术的应用，在滑膜炎发病机制及病程进展等研究中发挥了重要作用，但这些方法尚处于试验研究阶段。相比而言，滑膜炎组织病理学评估方法相对简单，可操作性强，易于临床诊断OA、确定OA分期及预测OA进展。此外，对滑膜样本进行基因分析时若能结合病理形态学方面的信息，分析结果将会更有说服力。

1 取样方法

目前用于滑膜取样的方法有盲式细针活检术、关节镜直视活检术、影像引导下活检术和手术中取样。影像引导下活检术相对较新，相关报道还不多，其可靠性尚待验证。手术中取样一般用于施行人工关节置换术时。

盲式细针活检术用于滑膜取样已有几十年历史，其安全性及可行性得到确切验证，且耗费较低，不需要特殊设备，能在大部分医院推广。但盲式细针活检术无法直视活检组织及其部位，一般只用于膝关节髌上囊处取样。关节镜直视活检术不仅能用于膝关节样大关节，还能用于小关节，且能采取同一关节不同部位的组织。但这一技术价格较昂贵，需要特殊设备及一定的操作技巧[17]。部分研究[18,19]表明，采用这两种方法对RA滑膜取样的检测结果之间存在着较好的相关性。但对OA滑膜取样的检测结果是否也如此，还未见报道。至于在局限区域取样的组织学特征能否代表整个滑膜的病理改变，尚待研究。

2 取样处理

取样首先经10%中性福尔马林或4%多聚甲醛缓冲液固定，梯度酒精脱水后行石蜡包埋，然后切成4～6 μm厚的切片，再经常规苏木素-伊红(HE)染色后，即可在显微镜下观察评估。也可用OCT包埋剂包埋取样并投入液氮中速冻，然后用恒温冷冻切片机切成5～6 μm厚的冰冻切片并行HE染色。冰冻切片染色时间较短，可较快得到结果，但切片较石蜡切片厚，所反映的组织形态不如石蜡切片清晰，也不如石蜡切片能在常温下保存，必须置于－80℃深低温冰箱，故不利于长期保存及回顾性研究。

如果取样需要作免疫组织化学染色，那么就要根据检测的抗原特性来确定采用石蜡切片或冰冻切片。石蜡

基金项目：上海市教委重点学科建设基金(J50206)，上海市重点科技支撑计划(08411950400)

作者单位：上海交通大学附属第九人民医院骨科

万方数据

切片一般对抗原的定位较准确，染出的片子的组织细胞形态保持较好，但切片在制作过程中要经过组织固定、脱水、透明、浸蜡、包埋、脱蜡等一系列步骤，容易造成抗原破坏；而冰冻切片能较好地保存组织的抗原免疫活性，且操作步骤也没有石蜡切片那样繁琐，但是冰冻切片有可能因冰晶形成而破坏组织细胞形态，并造成抗原弥散而使定位不准确；此外，冰冻切片一般比石蜡切片厚，这也会影响对组织细胞形态的观察。总之，两种方法各有利弊，实际操作中应视各检测的要求进行选择。

3 取样评估

对滑膜炎的分级依据对各炎症参数的评分，尽管炎症参数已经历一系列改进，但尚未形成最终的统一标准。滑膜炎症参数的确定均取决于其病理特征。

Ostergaard 等[20,21]报道9种评估滑膜炎的病理特征：①内膜下层多形核白细胞浸润；②内膜下层单核细胞浸润；③表层纤维蛋白沉积；④内膜增生；⑤滑膜表面绒毛肥大；⑥血管增生；⑦血管周围水肿；⑧肉芽组织形成；⑨纤维化。Loeuille 等[22]采用6种病理特征来评估滑膜炎：①内膜增生；②内膜下层淋巴细胞和浆细胞浸润程度；③表层纤维蛋白沉积；④充血（与血管扩张有关，至少与血管增生有关）；⑤纤维化；⑥血管周围水肿。以上病理特征评估指标范围分别为0分（正常）、1分（轻度）、2分（中度）、3分（重度）。上述两种评估方法的评估指标较多，能较全面地反映滑膜炎症的各项病理特征。然而，HE染色并非精细的染色方法，它显示的是组织特征的全貌，只能反映整体炎症变化情况，对某些评估指标变化的反应并不十分灵敏（如HE染色切片中无法准确地区分多型核细胞和几个紧挨在一起的单核细胞），因此过分细化评估指标而达到全面评估炎症变化的努力，最终难免会增大误差。另外，很重要的是，评估指标越多，越不容易定量化（如表层纤维蛋白沉积和血管周围水肿），评估者就越难掌握，评估者之间的误差也会越大。

Krenn 等[23,24]报道提出的评估方法被认为适用于RA、OA、银屑病关节炎（PsA）等多种关节疾病的滑膜炎。他们根据炎症滑膜中的三大类细胞群——定居细胞群（包括纤维细胞、成纤维细胞、内皮细胞和巨噬细胞）、迁移细胞群（淋巴细胞和浆细胞）和内膜细胞群，相应地建立了3种炎症特征，即间质细胞激活、炎症细胞浸润和内膜细胞增生，评分范围依次为0分（正常）、1分（轻度）、2分（中度）和3分（重度），然后将3种炎症特征的参数汇总，总分0～1分表示正常，炎症级别为0；总分2～3分为轻度滑膜炎，炎症级别为1；总分4～6分为中度滑膜炎，炎症级别为2；总分7～9分为重度滑膜炎，炎症级别为3。该方法可基本反映出炎症改变的主要特征，评估者容易掌握，易于在临床推广，是目前应用最多的滑膜炎症评估方法。但此方法未将血管增生这一反映炎症变化的重要特征单独列出，而作为内皮细胞激活一并归入间质细胞激活中，认为包括纤维细胞、成纤维细胞、内皮细胞和巨噬细胞在内的所有间质细胞均呈现出成纤维细胞样外观，这可能是将血管增生作为间质细胞的一种变化来评估的缘故。然而，血管增生和间质细胞激活一定是伴发的吗？此外，血管增生是炎症反应中一个非常明显而重要的特征，是反应炎症程度的一个非常有用的指标，两者相辅相成，相互促进[5]，而且血管增生可通过在显微视野下计数血管数量来量化炎症反应，这比通过观察内皮细胞增生程度更能精确地反映炎症情况。

4 评估计分方法

滑膜评估评分方法包括人工计数（MC）、半定量分析（SQA）和计算机辅助信息分析（CAIA）。人工计数方法即计数某一高倍视野下符合要求的细胞数量，数量越多，炎症越明显。人工计数需要一个标有网格线的目镜，网格线既可突出显示切片上固定的区域面积，有可将视野分成小的格子，便于计数。此方法虽然简单，但操作非常艰苦、耗时，很容易引起评估者疲劳（即评估者偏倚），且存在区域选择偏倚（除非计数所有区域，才能得到全面信息），因此不适合大样本研究。

半定量分析是将组织的病理特征评估为0分（正常）、1分（轻度）、2分（中度）和3分（重度），可评估所有滑膜炎症指标。此方法无需特殊设备，在普通显微镜的低倍和中倍视野下即可评估细胞增生数量和组织纤维化程度，并可整体评估整张切片的病理变化情况，因此没有区域选择偏倚，是目前应用最多、最为系统的炎症评估方法[23,24]，也是最快速的炎症评估方法。然而，此方法受评估观测者主观因素的影响也最大（观测者偏倚），通过观测者训练和标准化操作，以及2人以上观测并得出一致结果，则可减少这种主观误差。

计算机辅助信息分析又称数字影像分析（DIA），是一种最新的利用特殊软件对组织病理切片的数字影像进行自动分析、定量评估的方法，可根据设定的程序客观地测量组织结构，精确定量各种不同的细胞形式。此方法已成功地应用于慢性关节炎的评估[25,26]（尽管大部分研究采用的是免疫组织化学染色的切片），因为滑膜炎评估基于内膜厚度和间质细胞、炎症细胞数量，而这些均能在HE染色切片上观测到。测量内膜厚度时需要标出内膜的上界和下界，然后计算机自动测量上下界之间的距离，并通过测量10个点得出内膜的平均厚度。对间质细胞和炎症细胞数量的测量则是全自动化，即根据间质细胞和炎症细胞不同的色彩亮度设置相应阈值，以区分细胞形式并分别计数细胞数量。此方法对炎症变化的反应最为敏感，但也存在观测者对阈值选择和区域选择的偏倚，阈值选择偏倚可通过改进软件编程，或通过人工调整阈值来减少，区域选择偏倚则可通过使用带有马达驱动载物台的显微镜，扫描所有检查区域来消除。总之，采用计算机辅助信息分析方法需要昂贵的设备，还要求操作者具有一定的技术熟练水平。此外，对一些炎症指标，如血管周围的水肿和纤维化，还无法进行评估，因此目前还处于研究推广阶段。

免疫组织化学染色切片研究[25,27-29]显示，上述3种

万方数据

滑膜评估方法之间存在较好的相关性。就HE染色切片评估方法的选择，评估内膜厚度采用人工计数方法和计算机辅助信息分析方法一般较为可靠，评估间质细胞和炎症细胞数量则采用半定量分析方法和计算机辅助信息分析方法较为可行。计算机辅助信息分析方法和人工计数方法对炎症变化的反应比半定量分析方法敏感；半定量分析方法的评估速度最快，人工计数方法最慢；半定量分析方法的观测者偏倚最大，而人工计数方法的区域选择偏倚最大[17]。尽管半定量分析方法是目前应用最多、最为成熟的评估方法，但计算机辅助信息分析方法对炎症变化反应有较高的敏感度、较高的自动化分析程度和较小的误差，是最有潜力的滑膜炎症评估方法。

5 结语

近年OA研究对OA病因、病理有了更全面的认识，一个重要共识是，OA不仅是单一软骨病变，而且是整个关节的病变，软骨、软骨下骨和滑膜都参与OA的病理进程，因此对OA的研究不能仅局限于研究软骨，还要研究关节内其他结构及其之间的相互影响。另一重要认识是，OA不仅是一种退变性关节疾病，炎症在促使OA进展的降解级联反应中也发挥着关键作用，因此对滑膜炎症的准确评估，不仅能与分子生物学方面的研究结果互补，还有助于临床上对OA的诊断分期并制定阶梯化治疗方案。

参考文献

1 Abramson SB, Attur M. Developments in the scientific understanding of osteoarthritis. Arthritis Res Ther, 2009; 11(3):227
2 Abramson SB, Attur M, Yazici Y. Prospects for disease modification in osteoarthritis. Nat Clin Pract Rheumatol, 2006; 2(6):304-312
3 Ayral X, Dougados M, Listrat V, et al. Arthoscopic evaluation of chondropathy in osteoarthritis of the knee. J Rheumatol, 1996; 23(4):698-706
4 Fernandez-Madrid F, Karvonen RL, Teitge RA, et al. Synovial thickening detected by MR imaging in osteoarthritis of the knee confirmed by biopsy as synovitis. Magn Reson Imaging, 1995; 13(2):177-183
5 Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, et al. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. Ann Rheum Dis, 2005; 64(9):1263-1267
6 Rollin R, Marco F, Jover JA, et al. Early lymphocyte activation in the synovial microenvironment in patients with osteoarthritis: comparison with rheumatoid arthritis patients and healthy controls. Rheumatol Int, 2008; 28(8):757-764
7 Krasnokutsky S, Attur M, Palmer G, et al. Current concepts in the pathogenesis of osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage, 2008; 16(Suppl 3):S1-S3
8 Ayral X, Ravaud P, Bonvarlet JP, et al. Arthroscopic evaluation of post-traumatic patellofemoral chondropathy. J Rheumatol, 1999; 26(5):1140-1147
9 Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. Arthritis Rheum, 2001; 44(6):1237-1247
10 Yuan GH, Masuko-Hongo K, Kato T, et al. Immunologic intervention in the pathogenesis of osteoarthritis. Arthritis Rheum, 2003; 48(3):602-611
11 Bonnet CS, Walsh DA. Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. Rheumatology(Oxford), 2005; 44(1):7-16
12 Winkinson LS, Pistsillides AA, Edwards JC. Giant cells in arthritic synovium. Ann Rheum Dis, 1993; 52(3):182-184
13 Goldenberg DL, Egan MS, Cohen AS. Inflammatory synovitis in degenerative joint disease. J Rheumatol, 1982; 9(2):204-209
14 Lindblad S, Hedfors E. Arthroscopic and immuno-histlogic characterization of knee joint synovitis in osteoarthritis. Arthritis Rheum, 1987; 30(10):1081-1088
15 Revell PA, Mayston V, Lalor P, et al. The synovial membrane in osteoarthritis: a histological study including the characterization of the cellular infiltrate present in inflammatory osteoarthritis using monoclonal antibodies. Ann Rheum Dis, 1988; 47(4):300-307
16 Ghosh P, Smith M. The role of cartilage-derived antigens, pro-coagulant activity and fibrinolysis in the pathogenesis of osteoarthritis. Med Hypotheses, 1993; 41(2):190-194
17 Smith MD, Baeten D, Ulfgren AK, et al. Standardisation of synovial tissue infiltrate analysis: how far have we come? How much further do we need to go? Ann Rheum Dis, 2006; 65(1):93-100
18 Bresnihan B, Cunnane G, Youssef P, et al. Microscopic measurement of synovial membrane inflammation in rheumatoid arthritis: proposals for the evaluation of tissue samples by quantitative analysis. Br J Rheumatol, 1998; 37(6):636-642
19 Youssef PP, Kraan M, Breedveld F, et al. Quantitative microscopic analysis of inflammation in rheumatoid arthritis synovial membrane samples selected at arthroscopy compared with samples obtained blindly by needle biopsy. Arthritis Rheum, 1998; 41(4):663-669
20 Ostergaard M, Stoltenberg M, Lovgreen-Nielsen P, et al. Magnetic resonance imaging-determined synovial membrane and joint effusion volumes in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: comparison with the macroscopic and microscopic appearance of the synovium. Arthritis Rheum, 1997; 40(10):1856-1867
21 Ostergaard M, Stoltenberg M, Lovgreen-Nielsen P, et al. Quantification of synovistis by MRI: correlation between dynamic and static gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging and microscopic and macroscopic signs of synovial inflammation. Magn Reson Imaging, 1998; 16(7):743-754
22 Loeuille D, Chary-Valckenaere I, Champigneulle J. Macroscopic and microscopic features of synovial membrane inflammation in the osteoarthritic knee: correlating magnetic resonance imaging findings with disease severity. Arthritis Rheum, 2005; 52(11):3492-3501
23 Krenn V, Morawietz L, Haupl T, et al. Grading of chronic synovitis: a histopathological grading system for molecular and diagnostic pathology. Pathol Res Pract, 2002; 198(5):317-325
24 Krenn V, Morawietz L, Burmester GR, et al. Synovitis score: discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis. Histopathology, 2006; 49(4):358-364
25 Cunnane G, Bjork L, Ulfgren AK, et al. Quantitative analysis of synovial membrane inflammation: a comparison between automated and conventional microscopic measurements. Ann Rheum Dis, 1999; 58(8):493-499
26 Rooney T, Bresnihan B, Andersson U, et al. Microscopic measurement of inflammation in synovial tissue: inter-observer agreement for manual quantitative, semiquantitative and computerized digital image analysis. Ann Rheum Dis, 2007; 66(12):1656-1660
27 Morawietz L, Schaeper F, Schroeder JH, et al. Computer-assisted validation of the synovitis score. Virchows Arch, 2008; 452(6):667-673
28 Youssef PP, Smeets TJ, Bresnihan B, et al. Microscopic measurement of cellular infiltration in the rheumatoid arthritis synovial membrane: a comparison of semiquantitative and quantitative analysis. Br J Rheumatol, 1998; 37(9):1003-1007
29 Kraan MC, Smith MD, Weedon H, et al. Measurement of cytokine and adhesion molecule expression in synovial tissue by digital image analysis. Ann Rheum Dis, 2001; 60(3):296-298

（收稿：2010-09-14）
（本文编辑：林磊）

广告目次

辉瑞制药有限公司（特耐）……（封2）
美精技医疗器械上海有限公司（人工关节）…（插2）
上海铠唏尔医疗器械有限公司（VAC系统）…（插3）
日本旭化成株式会社（益盖宁）……（封3）
辉瑞制药有限公司（西乐葆）……（封底）

万方数据