

骨关节炎兔软骨细胞凋亡与八味柔肝散的抑制效应*★

刘 淼, 陈世荣, 刘 伟, 徐西东, 斯海波

Inhibitory effects of *Bawei Rougan* powder on chondrocytes apoptosis in rabbits with osteoarthritis

Liu Miao, Chen Shi-rong, Liu Wei, Xu Xi-dong, Si Hai-bo

Abstract

BACKGROUND: Traditional Chinese Medicine (TCM) has analgesic effects on osteoarthritis, but whether TCM can protect articular cartilage and through which mechanism are rarely reported.

OBJECTIVE: To observe the effects of *Bawei Rougan* powder on chondrocytes apoptosis in rabbits with osteoarthritis.

METHODS: New Zealand adult white rabbits were randomly divided into three groups: normal, model, and treatment groups. Osteoarthritis models were established in model and treatment groups according to Hurth technique. At 1 week after modeling, rabbits in the normal and model groups were treated with saline solution, and the treatment group was treated with the powder extract. At 8 weeks after modeling, characteristics of cartilage histological were observed by Mankin method. Activity of nitric oxide (NO) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in synovial fluids were measured by nitrate reductase assay, and apoptosis index of chondrocytes in all groups were measured by TUNEL (TdT-mediated biotinylated-dUTP nick end labelling method).

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the model group, Mankin's score, activity of NO and iNOS and apoptosis index of chondrocytes were decreased in the treatment group ($P < 0.05$). It is confirmed that *Bawei Rougan* powder can suppress the apoptosis of chondrocytes in rabbits with osteoarthritis.

Liu M, Chen SR, Liu W, Xu XD, Si HB. Inhibitory effects of *Bawei Rougan* powder on chondrocytes apoptosis in rabbits with osteoarthritis. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2012;16(2): 227-230.

[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 传统中药对骨关节炎具有镇痛等治疗作用, 但对关节软骨是否有保护作用及其通过何种机制起作用少有报道。

目的: 观察八味柔肝散对兔骨关节炎软骨细胞凋亡的影响。

方法: 将新西兰大白兔随机分为正常组、模型组和治疗组, 模型组和治疗组行 Hurth 法骨关节炎造模。建模后 1 周, 正常组和模型组每天生理盐水灌胃, 治疗组行八味柔肝散水提液灌胃。建模后 8 周行组织学观察 Mankin's 评分, 硝酸还原酶法测定关节液一氧化氮、诱导型一氧化氮合酶活性, 原位末端转移酶标记技术检测软骨细胞的凋亡指数。

结果与结论: 结果显示, 治疗组关节软骨 Mankin's 评分, 关节液一氧化氮、诱导型一氧化氮合酶活性, 关节软骨细胞凋亡指数均低于模型组($P < 0.05$)。证实八味柔肝散对兔骨关节炎软骨细胞凋亡有抑制作用。

关键词: 八味柔肝散; 骨关节炎; 一氧化氮; 诱导型一氧化氮合酶; 软骨; 凋亡; 组织构建

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.02.008

刘淼, 陈世荣, 刘伟, 徐西东, 斯海波. 骨关节炎兔软骨细胞凋亡与八味柔肝散的抑制效应[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(2): 227-230. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

骨关节炎是一种常见的关节退行性病变, 发病率随年龄的增长而增加, 40岁人群的患病率为10%~17%, 60岁以上为50%, 75岁以上人群则高达80%^[1]。

骨关节炎以关节疼痛、功能受限为主要临床表现, 关节软骨损伤及骨赘形成为基本病理变化。近期研究发现, 骨关节炎的发生与一氧化氮参与介导的关节软骨的细胞凋亡密切相关^[2-3]。现代药理研究提示, 中药可以改善软骨的代谢^[4-5], 但尚缺乏其对骨关节炎关节软骨凋亡的保护作用的系统研究。

实验旨在观察八味柔肝散对骨关节炎兔关节液一氧化氮和诱导型一氧化氮合酶

(inducible nitric oxide synthase, iNOS)的水平变化, 软骨细胞凋亡的影响及其作用机制。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于 2011-05/10 在重庆医科大学动物中心、生物工程系实验室完成。

材料

实验动物: 健康成年清洁级新西兰大白兔24只, 体质量(2.5±0.3) kg, 雌雄不限, 购自重庆医科大学实验动物中心, 动物许可证号: SCXK(渝) 2007-0002。

实验对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》^[6]。

Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University
Chongqing 400010, China

Liu Miao★, Studying for master's degree, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University
Chongqing 400010, China
blue_ivyer@sina.com

Correspondence to: Chen Shi-rong, Associate professor, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University
Chongqing 400010, China
chensr128@126.com

Supported by: Traditional Chinese Medicine Research Program of Second Affiliated Hospital Chongqing Municipal Health Bureau in 2010, No. 2010-2-37*

Received: 2011-10-19
Accepted: 2011-12-07

重庆医科大学第二附属医院, 重庆市 400010

刘淼★, 男, 1985年生, 河南省南阳市人, 汉族, 重庆医科大学第二附属医院在读硕士。
blue_ivyer@sina.com

通讯作者: 陈世荣, 副教授, 骨科主任, 重庆医科大学第二附属医院, 重庆市 400010
chensr128@126.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2012)02-0027-04

收稿日期: 2011-10-19
修回日期: 2011-12-07
(20111019011/WJ-G)

试剂及药品:

试剂及药品	来源
八味柔肝散水提液(主要成分包括白芍, 生地黄, 枸杞子, 制首乌, 当归, 木瓜, 川芎, 怀牛膝)	重庆桐君阁大药房
一氧化氮、一氧化氮合成酶测试盒	南京建成生物工程研究所
细胞凋亡检测试剂盒	武汉博士德生物工程有限公司

分组及骨关节炎兔模型的制备:将新西兰大白兔 24 只, 随机分为正常组、模型组及治疗组, 每组 8 只。模型组和治疗组造模, 正常组不造模。

使用改良 Hulth 法^[7]进行动物造模: 体积分数 3% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔麻醉, 取兔右膝关节内侧入路, 切断内侧副韧带, 摘除内侧半月板, 切断前交叉韧带。建模时注意保护关节软骨面不受损伤; 彻底止血, 逐层缝合关节囊、皮下和皮肤等组织, 不予固定。建模后连续 3 d 青霉素 2×10^4 U 肌肉注射, 1 周后开始每天强迫兔活动 30 min, 连续 7 周。以膝关节内侧间隙明显变窄、关节软骨粗糙、骨赘形成、软骨细胞萎缩为建模成功的标准。

全部动物于造模后 1 周开始灌胃给药: 正常组和模型组每天 6 mL 生理盐水灌胃; 治疗组行八味柔肝散水提液灌胃。将中药饮片制成水提剂, 含生药 2 g/mL。根据临床用药剂量及 Meeh-Rubner 公式^[8]计算兔的有效剂量为 4.8 g/(kg·d), 即水提液 6 mL/d。全部动物第 8 周处死, 采集右侧股骨内髁软骨及右膝关节液。

光镜观察兔关节软骨组织形态:切取关节软骨标本, 甲醛固定, 脱钙, 石蜡包埋连续切片。切片依次置于二甲苯 I 液和 II 液、体积分数 95% 乙醇 I 液和 II 液、体积分数 80% 乙醇及蒸馏水, 再分别置于苏木精染液、伊红染液, 各级乙醇脱水, 二甲苯透明, 树胶封固, 在光学显微镜下按照 Mankin's 评分标准进行评分。

关节液一氧化氮和 iNOS 检测:关节液样本采用硝酸还原酶法测定一氧化氮和 iNOS 活性^[9]: 按照一氧化氮和 iNOS 测定试剂盒说明书要求设标准管和空白管, 空白管调零, 紫外分光光度计在 530 nm 波长下测定吸光度值(A)。

$$\text{标本一氧化氮浓度}(\mu\text{mol/L}) = \text{测定管 A} / \text{标准管 A} \times 100$$

TUNEL 法检测软骨细胞的凋亡:软骨标本石蜡包埋切片, 常规脱蜡至水, 蛋白酶 K 消化, 加入 TdT, DIG-d-UTP 标记, 生物素标记的抗地高辛抗体 37 °C 反应 30 min, 辣根过氧化物酶 37 °C 反应 30 min, 滴加 DAB 显色, 苏木精复染, 中性树胶封固, 显微镜下观察。细胞核有

黄绿色者为凋亡细胞, 任选 5 个 40×10 视野观察, 平均计数每 100 个细胞中凋亡细胞的数量即为凋亡指数^[10-11]。

主要观察指标:各组兔关节软骨的 Mankin's 评分以及软骨细胞的凋亡指数, 关节液中一氧化氮、iNOS 活性。

统计学分析:计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计学分析。软骨细胞的凋亡指数, 关节液中一氧化氮、iNOS 活性的组间差异显著性检验采用 SNK 检验。正常组与模型组、模型组与治疗组的 Mankin's 评分差异显著性检验用 Wilcoxon 秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 纳入新西兰大白兔 24 只, 全部进入结果分析, 无脱落。

2.2 骨关节炎模型兔软骨大体形态 正常组: 软骨表面光滑, 半透明, 有光泽, 无糜烂、剥脱, 无骨赘形成, 滑膜未充血增生, 关节液清亮。模型组: 软骨表面不光滑, 表面有不规则裂隙, 色泽灰暗, 关节面糜烂, 可见明显骨赘形成, 滑膜充血增生, 关节液浑浊。治疗组: 软骨表面较光滑, 有光泽但稍暗, 软骨表面可见少量软化, 骨赘生成较少, 滑膜轻度增生, 关节液较清亮。

2.3 骨关节炎模型兔关节液一氧化氮、iNOS 活性 硝酸还原酶法测定关节液一氧化氮水平, 模型组一氧化氮和 iNOS 活性均高于正常组 ($P < 0.05$)。治疗组一氧化氮和 iNOS 活性均低于模型组 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组兔关节液一氧化氮、iNOS 活性变化
Table 1 Activity changes of nitric oxide (NO) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in synovial fluids ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Group	NO ($\mu\text{mol/L}$)	iNOS ($\mu\text{kat/L}$)
Normal	55.65 $\pm$ 4.20	393.6 $\pm$ 48.2
Model	89.23 $\pm$ 6.26 ^a	788.2 $\pm$ 48.3 ^a
Treatment	65.04 $\pm$ 3.85 ^b	499.4 $\pm$ 65.3 ^b

^a $P < 0.05$, vs. normal group; ^b $P < 0.05$, vs. model group

2.4 骨关节炎模型兔软骨组织形态 关节软骨切片行甲苯胺蓝染色, 按照 Mankin's 评分系统进行量化评估。正常组关节软骨表面连续性好, 层次清晰, 潮线完整, 细胞排列整齐, 分布均匀, 见图 1a, b。模型组关节软骨中重度破坏, 表面糜烂, 软骨变薄, 软骨细胞肿胀, 排列不均匀, 基质异染性明显降低, 软骨下骨囊肿形成, 见图 1c, d。治疗组关节软骨轻度损伤, 表面连续性尚可, 软骨稍变薄, 层次尚清晰, 基质异染性降低不明显。见图 1e, f。

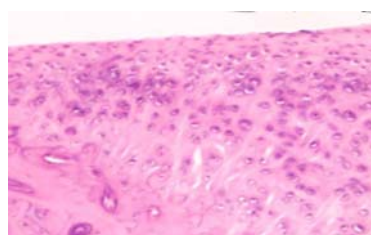
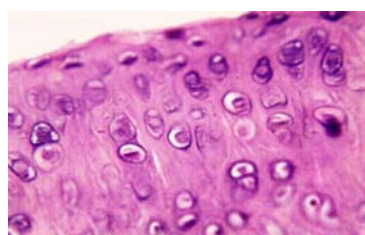
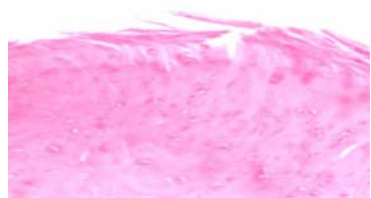
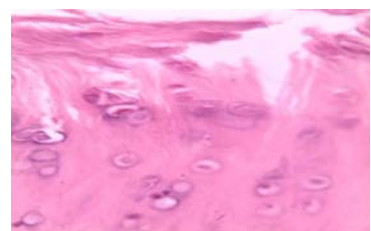
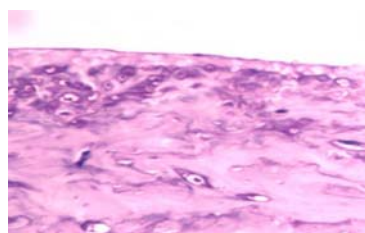
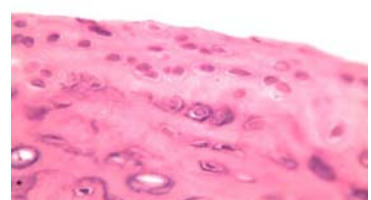
a: Normal group ($\times 100$)b: Normal group ($\times 400$)c: Model group ($\times 100$)d: Model group ($\times 400$)e: Treatment group ($\times 100$)f: Treatment group ($\times 400$)

Figure 1 Cartilage morphology of the rabbits with osteoarthritis (Hematoxylin-eosin staining)
图 1 骨关节炎模型兔软骨组织形态(苏木精-伊红染色)

2.5 骨关节炎模型兔关节软骨细胞凋亡指数 正常组: 软骨表层少量软骨细胞弱阳性表达。模型组: 软骨移行层、辐射层也有凋亡细胞, 且凋亡指数(27.11 ± 5.79)明显高于正常组(3.50 ± 0.52 , $P < 0.05$)。治疗组: 在表层和移行层虽然也有阳性细胞表达, 但凋亡指数(12.36 ± 3.01)明显低于模型组($P < 0.05$)。

3 讨论

骨关节炎的基础病理变化是关节软骨糜烂退变、软骨下骨质囊性变和关节边缘骨赘形成。软骨细胞合成细胞外基质, 维持基质的完整^[12]。关节软骨的退变是整个退变过程的始动因素, 是整个疾病发生过程中的关键环节^[13-14]。

近年研究发现, 软骨细胞的过度凋亡是关节软骨退变的重要因素, 这种过度凋亡也是骨关节炎的重要发生机制^[15-16]。一氧化氮是一种骨关节炎病理过程中重要的炎症介质^[17], 是由 NOS 与 L-精氨酸反应合成的。抑制体内 iNOS 可以降低一氧化氮活性, 从而延缓关节软骨的破坏和骨关节炎的进程。ERK1/2, p38 信号通路软骨细胞凋亡有密切关系^[18-19], 而一氧化氮可以激活此通路^[20], 促进软骨凋亡和骨关节炎的发生。

实验结果提示八味柔肝散对骨关节炎的软骨退变有保护作用。大体观察模型组关节软骨表面不光滑且有不规则裂隙形成, 色泽灰暗, 关节面糜烂, 可见明显骨赘形成, 滑膜充血增生, 关节液浑浊。而治疗组软骨表面较光滑, 有光泽但稍暗, 软骨表面可见少量软化, 骨赘生成较少, 滑膜轻度增生, 关节液较清亮。组织学观察 Mankin's 评分: 模型组的评分比正常组升高, 提示在模型组关节退变已经出现而且比较严重; 而治疗组与模型组比较评分降低, 说明中药治疗对于软骨退变有保护作用。

这种保护作用可能是减少了关节液中 iNOS 及一氧化氮活性, 抑制了关节软骨细胞凋亡而产生的。比较三组软骨细胞的凋亡指数, 模型组的凋亡指数比正常组显著升高, 而治疗组与模型组相比则显著降低, 说明治疗组的软骨凋亡受到抑制。比较 3 组的关节液 iNOS、一氧化氮活性, 模型组比正常组显著升高, 而治疗组与模型组相比则显著降低, 说明治疗组中凋亡减少是由于炎症介质一氧化氮受到抑制的结果。

实验结果表明, 改良 Hulth 法造模过程可以使模型组兔 Mankin's 评分、关节液 iNOS、一氧化氮活性以及软骨细胞凋亡指数显著升高。八味柔肝散治疗组虽然也会出现关节软骨的组织学变化和关节液 iNOS、一氧化氮和软骨细胞凋亡指数的上升, 但是与模型组相比较, 治疗组关节液 iNOS、一氧化氮和软骨细胞凋亡指数有明显减低。

综上所述, 八味柔肝散可以减轻骨关节炎关节软骨的病理改变, 降低关节液 iNOS、一氧化氮水平和软骨细胞凋亡指数, 抑制骨关节炎兔软骨细胞的凋亡, 减缓骨关节炎病变的发展。

4 参考文献

- [1] Zhonghua Yixuehui Fengshibingxue Fenhui. Zhonghua Fengshibingxue Zazhi. 2010;14(6):416-419.
中华医学会风湿病学分会. 骨关节炎诊断及治疗指南[J]. 中华风湿病学杂志, 2010, 14(6):416-419.
- [2] Maneiro E, De Andres MC, Fernandez-Sueiro JL, et al. The biological action of hyaluronan on human osteoarthritic articular chondrocytes. The importance of molecular weight. Clin Exp Rheumatol. 2004;22(3):307-312.
- [3] Kim HA, Lee YJ, Seong SC, et al. Apoptotic chondrocyte death in human osteoarthritis. J Rheumatol. 2000;27(2):455-462.
- [4] Shao M, Niu W, Hhuang WJ. Zhongguo Linchuang Kangfu. 2006; 10(19):50-52.
邵敏, 牛维, 黄杰文. 补肾活血中药促进体外培养软骨细胞增殖和蛋白质合成的作用[J]. 中国临床康复, 2006, 10(19):50-52.
- [5] Feng W, Shi YY, Shen PZ, et al. Zhongguo Zhongyi Gushang Zazhi. 2000;8(2):9-11.
冯伟, 石印玉, 沈培芝, 等. 中药对软骨细胞代谢的影响[J]. 中国中医骨伤杂志, 2000, 8(2):9-11.
- [6] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.
- [7] Rogart JN, Barrach HJ, Chichester CO. Articular collagen degradation in the Hulth-Telhag model of osteoarthritis. Osteoarthritis and Cartilage. 1999;7(6):539-547.
- [8] Zhao W, Sun GZ, Xumu Shouyi Keji Xinx. 2010;(5):52-53.
赵伟, 孙国志. 不同种实验动物间用药量换算[J]. 畜牧兽医科技信息, 2010, (5):52-53.
- [9] Ding TM, Chen J, Zhang ZH, et al. Yaoxue Jinzhan. 2005; 29(05). 221-226.
定天明, 陈坚, 张正行, 等. 生物体内一氧化氮的检测方法及其应用[J]. 药学进展, 2005, 29(05):221-226.
- [10] Gao C, Hua ZC. Zhongguo Xibao Shengwuxue Xuebao. 2011; 33(5):564-569.
高超, 华子春. 细胞凋亡检测方法新进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2011, 33(5):564-569.
- [11] Wang ZW, Zhao X, Bao JP, et al. Shizhen Guoyi Guoyao. 2009; 20(11):2893-2894.
王志文, 赵鑫, 鲍际鹏, 等. 麝香乌龙丸对兔骨关节炎软骨细胞凋亡的影响[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(11):2893-2894.
- [12] Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. Nature. 2003;423(6937):332-336.
- [13] Garstang SV, Stitik TP. Osteoarthritis: epidemiology, risk factors, and pathophysiology. Am J Phys Med Rehabil. 2006;85(11): S2-S11.
- [14] Sha H, Yang L. Shiyong Yiyuan Linchuang Zazhi. 2011;8(2): 180-183.
沙湖, 杨莉. 骨关节炎病理变化研究进展[J]. 实用医院临床杂志, 2011, 8(2):180-183.
- [15] Pennock AT, Robertson CM, Emmerson BC, et al. Role of apoptotic and matrix-degrading genes in articular cartilage and meniscus of mature and aged rabbits during development of osteoarthritis. Arthritis Rheum. 2007;56(5):1529-1536.
- [16] Kawaguchi H. Endochondral ossification signals in cartilage degradation during osteoarthritis progression in experimental mouse models. Mol Cells. 2008;25(1):1-6.
- [17] Pelletier JP, Jovanovic DV, Lascau-Coman V, et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces progression of experimental osteoarthritis in vivo: possible link with the reduction in chondrocyte apoptosis and caspase-3 level. Arthritis Rheum. 2000;43(6):1290-1299.
- [18] Kuhn K, Shikhman AR, Lotz M. Role of nitric oxide, reactive oxygen species, and p38 MAP kinase in the regulation of human chondrocyte apoptosis. J Cell Physiol. 2003;197(3):379-387.
- [19] Robbins JR, Thomas B, Tan L. Immortalized human adult articular chondrocytes maintain cartilage-specific phenotype and responses to interleukin-1 beta. Arthritis Rheum. 2000;43(10): 2189-2201.
- [20] Kim SJ, Ju JW, Oh CD, et al. ERK-1/2 and p38 kinase oppositely regulate nitric oxide-induced apoptosis of chondrocytes in association with p53, caspase-3, and differentiation status. J Biol Chem. 2002;277(2):1332-1339.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 2010 年重庆市卫生局中医药科研计划项目, 编号(2010-2-37), 项目名称:《八味柔肝散对兔骨关节炎软骨损伤修复的实验研究》。

作者贡献: 陈世荣、刘淼进行实验设计, 实验实施为刘淼, 实验评估为刘伟, 资料收集为徐西东, 陈世荣、刘淼成文。斯海波审校, 陈世荣、刘淼对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 实验对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》。

文章创新性:

提供证据: 检索 pubmed 数据库, 检索时间不限, 检索关键词设定为中药名 Baweirougansan, 检索到相关文献 0 篇。检索万方中文数据库, 检索时间不限, 检索关键词设定为中药名八味柔肝散, 检索到相关文献 0 篇。最终检索认定文章具先进性。

创新点说明: 骨关节炎在中医属于“痹症”的范畴, 其病机为肝肾亏虚、筋失濡养。实验具有理论创新, 国内同类研究多集中于补肾类药物的治疗作用, 本实验使用补肾中药的同时强调柔肝, 取得了较好的治疗效果。同时分析了关节液诱导性一氧化氮合酶、一氧化氮和软骨细胞凋亡指数的关系, 找到了八味柔肝散治疗骨关节炎的机制, 为方法创新。