

黑虎丹治疗兔骨关节炎的实验研究

万荣 杨庆铭 邓廉夫

(上海第二医科大学附属瑞金医院伤骨科研究所, 上海 200025)

【摘要】 目的 观察黑虎丹治疗骨关节炎(OA)的效果及其对OA软骨细胞增殖和凋亡的影响。方法 36只雄性新西兰大白兔切断左膝前、后交叉韧带及内侧半月板,建立兔OA模型。随机分为对照组和用药组,各18只。对照组不用药;用药组术后第13周起口服黑虎丹1粒/天。分别于术后第16、20、24周处死动物,取股骨内髌及胫骨内侧平台软骨标本进行光镜、透射电镜、扫描电镜观察,采用免疫组化、末端原位标记分别观察软骨细胞增殖和凋亡状况。结果 用药组骨关节炎病理表现与对照组无显著差别,用药组软骨细胞增殖和凋亡指数随时间延长而减少,在术后24周时均低于对照组。结论 长期服用黑虎丹能减少晚期OA软骨细胞的凋亡,并维持OA软骨细胞增殖和凋亡的平衡。

【关键词】 骨关节炎 软骨,关节 细胞

Experimental Studies on Therapeutic Effect of HeiHuDan on the Rabbit Models of OA WAN Rong, YANG Qing-ming, DENG Lianfu. Shanghai Institute of Traumatology and Orthopaedics. (Shanghai, 200025)

【Abstract】 Objective To observe the effect of HeiHuDan(HHD) in the treatment of osteoarthritis(OA) and the proliferation and apoptosis of chondrocytes. **Methods** The anterior, posterior Cruciate Ligaments and medial menisci of the left knee in 36 adult New Zealand rabbits were sectioned to produce models of OA; the animals were then randomly divided into test group and control group. HHD 1 tab per day were given to the animals in the test group for 13 weeks after surgery. 16th, 20th, and 24th weeks after operation, the animals were sacrificed respectively and specimens were procured from the medial femoral condylar and the medial plateau of tibia for light microscopic, transmission electron microscopic and scanning electron microscopic study. Immunohistochemical method and in situ end labelling method were used to detect the proliferation and apoptosis of chondrocytes in articular cartilage. **Results** The degenerative changes of cartilage in test group had no significant difference from control's, the apoptosis index and proliferative index of chondrocytes were less than control's ($P < 0.05$) at 24 weeks postoperation. **Conclusion** The study indicated that HHD can decrease the apoptosis of chondrocytes in the late stage of OA and keep the balance of proliferation and apoptosis of OA chondrocytes.

【Key Words】 Osteoarthritis Cartilage, articular Cells

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种多因素引起的以关节软骨退变为主要病理特征的退行性关节疾病。由于对OA的发病机制缺乏足够的了解,目前尚未找到治疗OA的有效方法,但延缓关节软骨退变并促进透明软骨再生是从本质上防治OA的关键。本实验建立兔OA模型,观察中药黑虎丹治疗OA的效果及其对晚期OA软骨细胞增殖和凋亡的影响。

1 材料与与方法

1.1 建立动物模型 健康成年雄性新西兰大白兔36只,体重2.5kg左右。以3%戊巴比妥钠 $30\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 静脉麻醉,参照Hulth的方法于无菌条件下切断其左膝前、后交叉韧带及内侧半月板。术后不固定伤肢,分笼饲养。

1.2 动物分组 造模后将动物随机分为用药组、非用药对照组,各18只。根据Meeh Rubner公式 $A(\text{体表面积 } \text{m}^2) = K$

(系数) $\cdot K(\text{体重 } \text{g})^{2/3} \cdot 10^{-4}$ 计算得出用药组动物服用黑虎丹的剂量约为1粒/日,于术后13周起口服。分别于术后16、20和24周取材。

1.3 光镜标本制备 处死动物后,立即解剖左膝关节,每组随机取1只兔子,以锐利刀片切取 $1\text{mm} \times 1\text{mm}$ 股骨内髌全软骨层标本,供透射电镜观察,并取其胫骨内侧平台作扫描电镜观察。所余之股骨内髌及余兔之股骨内髌、胫骨内侧平台连同软骨下骨一并切下,置于10%中性缓冲甲醛溶液中固定48小时,10%甲酸甲醛脱钙液脱钙10~15天。按常规石蜡包埋, $5\mu\text{m}$ 纵向切片,HE、甲苯胺蓝染色。

1.4 不脱钙透射电镜标本制备 标本置于 4°C 2%戊二醛中固定2小时,PBS缓冲液漂洗,1%锇酸后固定2小时,乙醇逐级脱水后用环氧树脂618包埋,LKB超薄切片机制片,铅、铀染色。Hitachi H 500透射电镜观察。

1.5 扫描电镜标本制备 标本置于 4°C 2%戊二醛中固定24小时,1%四氧化锇后固定2小时,乙醇逐级脱水后临界点干

燥,定向粘附于载物台上,真空喷金后用 Jeol JSM-840 扫描电镜观察。

1.6 增殖软骨细胞的免疫组织化学显色 采用链霉菌—生物素—过氧化酶法观察软骨细胞的增殖状况。每个石蜡标本制成 5μm 厚连续切片 2 张,1 张做免疫组化研究,1 张作为不加一抗的阴性对照。切片脱蜡至水,3% 过氧化氢室温下孵育 5 分钟。5% 正常山羊血清处理切片 10 分钟,依次加入抗增殖细胞核抗原(PCNA)单克隆抗体(北京中山生物技术有限公司),37℃ 湿盒孵育 30 分钟;二抗(生物素标记 IgG)及链霉菌抗生物素蛋白—过氧化酶溶液。DAB 显色,甲基绿复染。

1.7 凋亡软骨细胞的末端原位标记 采用末端原位标记(TUNEL)法观察软骨细胞凋亡状况(Oncoor 公司试剂盒)。石蜡标本制成 5μm 厚连续切片 2 张,1 张进行末端原位标记,1 张为不加核酸末端转移酶的阴性对照。切片脱蜡至水。0.1% 胰蛋白酶室温下消化 30 分钟。3% 过氧化氢室温下孵育 5 分钟。地高辛标记的核酸末端转移酶(TdT)37℃ 湿盒孵育 60 分钟,抗地高辛抗体室温下孵育 30 分钟,DAB 显色,甲基绿复染。

1.8 统计分析 显微镜下计数阳性细胞所占比例,随机检验 10~20 个视野,至少计数 2500 个软骨细胞。采用 Student t 检验进行统计分析。

2 结果

2.1 肉眼观察 对照组 16 周时,软骨负重区出现凹槽样变,表面呈颗粒状突起,色泽暗黄混浊;20 周有骨赘形成;24 周,软骨非负重区凹凸不平,局部软骨缺损。用药组大体形态变化与同期对照组相似。

2.2 光镜下形态变化 16 周时,对照组软骨出现裂隙,深达放射层(图 1);用药组可见大量增生呈巢状的软骨细胞(图 2)。20~24 周,对照组软骨裂隙增多加深,软骨细胞柱状排列消失;用药组与之相比无显著差异。

2.3 超微结构变化 16 周时,对照组软骨细胞核固缩,胞质中可见脂滴,软骨基质中出现致密胶原纤维束;用药组软骨细胞内质网大量增生,富含糖原颗粒,呈分泌旺盛状态。20~24 周,对照组部分软骨细胞坏死崩解,染色质浓集,内质网减少。线粒体肿胀,软骨基质中胶原纤维粗细不等,横带周期消失;用药组与之类似。

2.4 软骨表面变化 16 周时,对照组软骨表面出现裂隙,胶原纤维暴露;用药组软骨表面完整。20~24 周,对照组局部软骨缺损,大量胶原纤维裸露;用药组与之相似。

2.5 免疫组化 PCNA 阳性细胞主要分布于软骨表层(图 3、4)。阳性细胞比例见表 1。

表 1 PCNA 阳性细胞指数 (x̄ ± s)

时间(周)	用药组(n=6)	对照组(n=6)
16	18.5 ± 4.7*	6.2 ± 1.6
20	12.2 ± 1.4	12.7 ± 1.5
24	10.7 ± 3.3*	16.2 ± 4.9

注:PCNA 阳性细胞指数= 阳性细胞数/计数细胞总数 × 100 用药组与对照组比较* P < 0.05, ** P < 0.01

对照组 20 周阳性细胞指数高于 16 周,相比有显著差异

(t = 7.106 P < 0.01), 而与 24 周无差异 (t = 1.649 P > 0.05)。用药组术后 20 周阳性细胞指数低于 16 周,相比有差异 (t = 3.157 P < 0.05), 而与 24 周相比无差异 (t = 0.896 P > 0.05)。术后 16 周,用药组阳性细胞指数明显高于对照组 (t = 6.006 P < 0.01); 而术后 24 周,用药组阳性细胞指数则低于对照组 (t = 2.291 P < 0.05)。

2.6 末端原位标记 凋亡的软骨细胞主要位于软骨浅层(图 5、6), 其比例见表 2。

对照组 24 周凋亡细胞指数明显高于 20 周,相比有显著差异 (t = 4.885 P < 0.01)。用药组 24 周凋亡细胞指数明显低于 16 周相比有显著差异 (t = 11.38 P < 0.01)。用药组 16、20 周凋亡细胞指数与同期对照组比无显著差异 (t = 2.135 P > 0.05; t = 2.158 P > 0.05)。而 24 周凋亡细胞指数则明显低于对照组 (t = 10.86 P < 0.01)。

表 2 凋亡细胞指数 (x̄ ± s)

时间(周)	用药组(n=6)	对照组(n=6)
16	21.8 ± 1.5	17.5 ± 4.7
20	34.6 ± 5.1	25.6 ± 8.8
24	10.5 ± 1.9*	57.5 ± 13.3

注:凋亡细胞指数= 凋亡细胞数/计数细胞总数 × 100 用药组与对照组比较* P < 0.01

3 讨论

正常完整的关节软骨使关节得以低摩擦、低损耗的状态进行活动,并赋予其抵抗压力、张力、剪切力的能力^[1]。OA 患者的关节软骨因各种原因发生退变或损坏后,改变了应力由关节面向骨组织的传导,使关节软骨和软骨下骨发生一系列继发性病变,最终使关节失去正常功能。

黑虎丹是一种由山麻黄、金石斛等十余味中草药制成的片剂,具有引经通络、追风散寒、化湿止痛的功效,它对风湿、类风湿性关节炎及 OA 已显现出较好的临床疗效^[2]。为进一步探讨其疗效发生的机理,本研究参照 Hulth 的方法建立了兔 OA 模型。结果显示对照组在术后 16~24 周中呈现出纤维裂隙增多、加深,大量软骨细胞变性、坏死,局部软骨缺损等典型的晚期 OA 表现。用药组早期(16 周)表现为软骨细胞增生,后期(20~24 周)与对照组无显著差异,提示黑虎丹对晚期 OA 效果有限。这可能由于:(1)软骨细胞的退变过程呈不可逆性,黑虎丹对变性的软骨细胞无效。(2)残存的功能正常的软骨细胞数量过少,即使黑虎丹直接或间接地作用于这些细胞促进其修复活动,也无法恢复软骨降解与合成的平衡关系。

细胞死亡主要有两种形式:细胞坏死和细胞凋亡。前者是病理性死亡,多引起炎症反应。后者是生理性死亡,通常不产生炎症反应和周围组织的次级损伤。细胞凋亡的增多可能是引起某些老年性退形性疾病的原因^[3,4]。凋亡发生后,在核酸内切酶作用下,将 DNA 分解成多个片段,每个片段均含有一个 3' 末端,该末端在末端转移酶作用下可以转上一个 ddUTP,将地高辛标记的 ddUTP 显色,可以反映出细胞凋亡状态^[5,6]。PCNA 是从 G1 期后半至 S 期前半过程中细胞核内急剧增多的一种核蛋白质,分子量 36000,是 DNA 多聚酶 δ 表达活性时的辅助蛋白^[7-9]。免疫组化检测软骨细胞 PCNA

的表达可以反映软骨细胞的增殖状况^[10,11]。实验结果显示凋亡细胞和增殖细胞主要分布在软骨浅层,对照组软骨细胞的凋亡指数随时间的延长而逐渐增多,至 24 周即 OA 晚期时达到最高值。用药组 16、20 周的凋亡细胞指数与对照组相比无差别,但 24 周时却远远低于对照组,提示长期服用黑虎丹能减少晚期 OA 软骨细胞的凋亡。凋亡的减少意味着部分软骨细胞得以保存,在一定程度上能够促进软骨修复。用药组 16 周的增殖细胞指数高于对照组,但随着病程进展增殖细胞数逐渐减少,至 24 周时低于对照组。因而长期使用黑虎丹并不能促进晚期 OA 软骨细胞的增殖。另一方面,用药组 24 周的凋亡细胞指数和增殖细胞指数均低于对照组,提示细胞死亡与细胞增殖之间保持着一定的平衡关系。因此,在保持一定数量软骨细胞的基础上,如何增强单个软骨细胞的合成、分泌功能对治疗 OA 显得尤为重要。

(本文图 1~ 6 见插页 2)

参考文献

[1] Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage. J Bone Joint Surg, 1997, 79 A(2): 600-611.
 [2] 魏指薪. 黑虎丹治疗风湿关节病的疗效初步报告, 上海市伤骨科研究所伤科论文汇编, 第三辑, 1964. 76-80.
 [3] Zakeri Z, Lockshin RA. Physiological cell death during development and its relationship to aging. Ann N. Y. Acad Sci, 1994, 719(1):

212-229.
 [4] Tompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science, 1995, 267(12): 1456-1462.
 [5] Thiry M. Highly sensitive immunodetection of DNA on sections with exogenous terminal deoxynucleotidyl transferase and non isotopic nucleotide analogs. J Histochem Cytochem, 1992, 40(2): 411-419.
 [6] Wijsman JH. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end labelling of fragmented DNA. J Histochem Cytochem, 1993, 41(1): 7-12.
 [7] Takasaki Y, Deng JS, Tan EM. A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation: Its distribution in synchronized cells. J Exp Med, 1981, 154(12): 1899-1909.
 [8] Celis JE, Bravo R, Larsen PM, et al. Cyclin: A nuclear protein whose level correlates directly with the proliferative state of normal as well as transformed cells. Leuk Res, 1984, 8(1): 143-157.
 [9] Fairman MP. DNA polymerase δ /PCNA: actions and interactions. J Cell Sci, 1990, 94(1): F4.
 [10] Hall PA, Levison DA. Assessment of cell proliferation in histological material. J Clin Pathol, 1990, 43(1): 184-192.
 [11] Hall PA, Levison DA, Woods HL, et al. Proliferating cell nuclear antigen(PCNA) immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. J Pathol, 1990, 162(2): 285-294.
 (收稿: 1999-09-08 修回: 2000-04-07 编辑: 房世源)

• 短篇报道

髌骨粉碎性骨折三种固定方法远期疗效比较

王运涛 李坚

(葛洲坝中心医院, 湖北 宜昌 443002)

作者对我院用丝线、钢丝与张力带固定髌骨粉碎性骨折患者远期疗效随访并作对比分析, 结果如下。

1 临床资料

从 1980 年至 1996 年我院手术治疗髌骨粉碎性骨折 147 例, 随访时间 1 年 3 月至 16 年, 平均 7 年 4 月。

2 治疗方法

丝线组: 以双股 7 号或 10 号丝线穿过硬骨上、下横形骨孔捆扎固定。钢丝组: 以 18 号钢丝穿过髌骨上、下横形骨孔捆扎固定。张力带组: 将 2 根 1.5mm 粗克氏针纵行贯穿髌骨, 再以 18 号钢丝环绕成“8”字固定。

3 治疗结果

疗效评定按陆氏^[1]提出的标准, 结果见表 1。并发症: 丝线组: 关节僵硬 2 例, 创伤性关节炎 2 例。钢丝组: 关节僵硬 2 例, 创伤性关节炎 4 例。张力带组: 克氏针尾触痛 11 例。

表 1 三种固定方法治疗结果比较(例)

组别	疗 效			优率(%)
	优	良	差	
丝线	24	13	4	58.54
钢丝	17	12	6	50.00
张力带	32	6	0	84.21

4 讨论

本组术后 1 周开始患膝功能锻炼, X 线检查无 1 例出现骨块分离现象, 均未并发关节僵硬。丝线、钢丝固定髌骨粉碎性骨折效果差。术后石膏外固定至少 8 周。长时间外固定易出现关节僵硬、肌肉萎缩等。本组关节僵硬 2 例, 行股四头肌成形术后功能有所改善。钢丝质硬, 难以完全在骨折块周围塑形, 易受力不均。术中拧紧钢丝及术后张力下, 髌骨关节面易形成“台阶”。本组 4 例术后 X 线提示“台阶”大于 3mm, 均继发创伤性关节炎。同时由于钢丝对骨块的切割作用, 形成附加骨折, 人为延长了术后

外固定时间。本组并发症发生率为 18.58%。其中关节僵硬、创伤性关节炎均发生在丝线、钢丝组。尽管张力带组克氏针尾触痛发生率最高(52.38%), 但术后 X 线提示骨折愈合时及时拔除克氏针, 将不会对患膝功能恢复产生不良影响。本组 11 例均于术后 3 月~ 4 月间手术取出克氏针, 平均 3.3 月。我们认为术中克氏针弯曲以后将针端尽量向内击入, 力求钢丝结扎位于股四头肌深面, 同时克氏针尾露在骨皮质外短于 6mm^[2], 能完全避免此并发症。

参考文献

[1] 陆裕朴, 徐来堂. 部分切除手术治疗髌骨横断及一端粉碎性骨折的远期疗效. 中华骨科杂志, 1985, 5(5): 280-281.
 [2] 周维江, 徐印坎. 克氏针钢丝张力带固定的疗效及并发症. 骨与关节损伤杂志, 1988, 3(4): 214-216.

(编辑: 李为农)

鹿丹通督片对兔脊髓压迫模型神经递质的影响

(正文见 79 页)

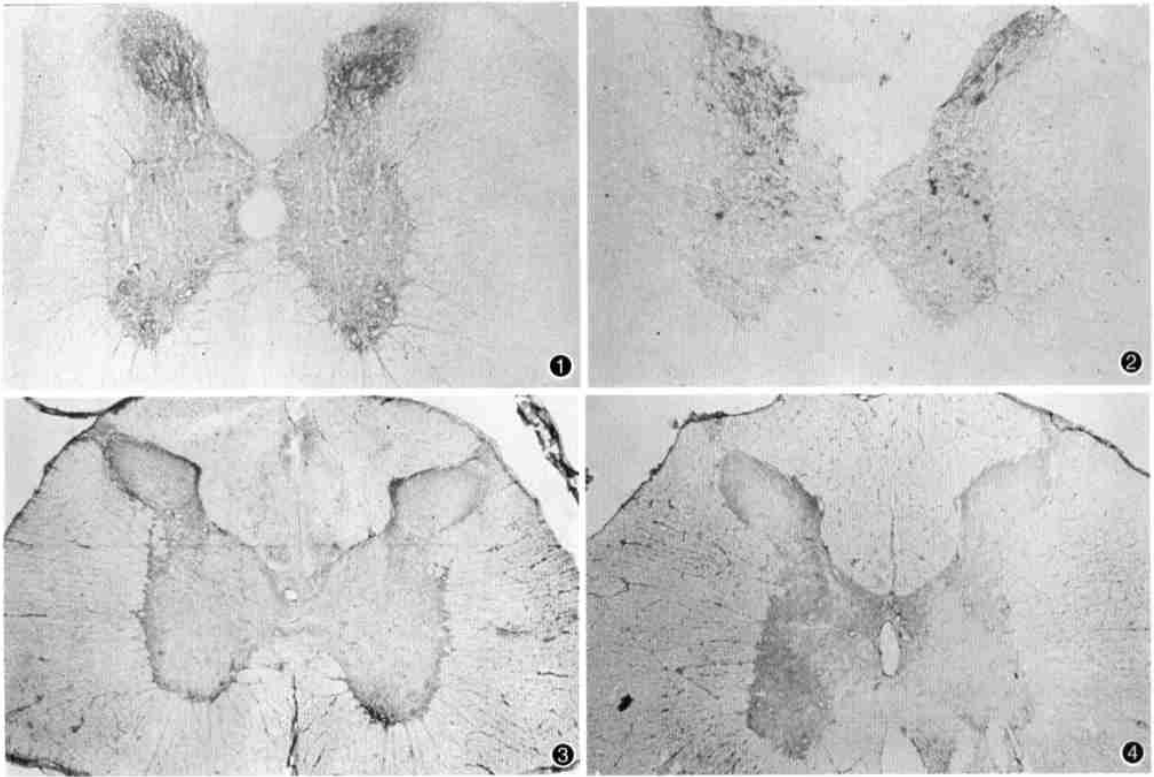


图1 治疗组脊髓组织中 AChE 分布情况。EL-Badawi 及 Schenk 改良法染色 $\times 40$ 图2 对照组脊髓组织中 AChE 分布情况。EL-Badawi 及 Schenk 改良法染色 $\times 40$ 图3 治疗组脊髓组织中 SP 分布情况。免疫组化 Sternberger PAP 技术改良法 $\times 40$ 图4 对照组脊髓组织中 SP 分布情况。免疫组化 Sternberger PAP 技术改良法 $\times 40$

黑虎丹治疗兔骨关节炎的实验研究

(正文见 85 页)

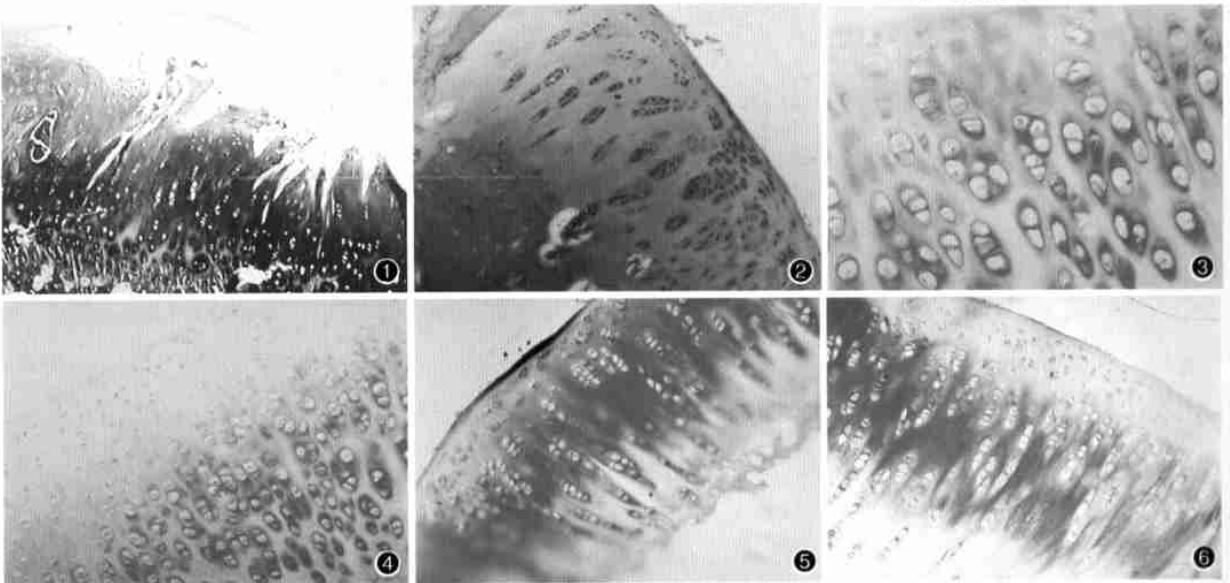


图1 16周时对照组形态学观察,软骨出现裂隙,深达软骨放射层。甲苯胺蓝 $\times 300$ 图2 16周时用药组形态学观察,可见大量增生呈巢状的软骨细胞。HE $\times 300$ 图3 16周时对照组免疫组化染色,见阳性染色物质位于细胞核中。DAB 显色,甲基绿复染 $\times 600$ 图4 16周时用药组免疫组化染色,见 PCAN 阳性细胞主要分布于软骨表层。DAB 显色,甲基绿复染 $\times 600$ 图5 20周时对照组末端原位标记,见凋亡细胞主要分布于软骨表层。DAB 显色,甲基绿复染 $\times 300$ 图6 20周时用药组末端原位标记,见凋亡细胞主要分布于软骨表层。DAB 显色,甲基绿复染 $\times 300$