

补肾壮筋汤对兔早期实验性膝骨关节炎软骨细胞凋亡及增殖细胞核抗原表达的影响

潘浩¹, 胡庆丰¹, 李雄峰², 边红光³, 章煜铭¹

(1. 杭州市中医院骨伤科, 浙江 杭州 310007; 2. 湖州中心医院骨科; 3. 杭州萧山区中心医院骨伤科)

摘要 目的: 探讨以补肝益肾为治疗手段的补肾壮筋汤对兔早期膝关节实验性 OA 的软骨细胞凋亡和增殖细胞核抗原(PCNA)表达的影响。方法: 40 只青紫蓝兔随机分为 4 组, 每组 10 只, 分别为中药组、假模组、模型组、正常组, 参照 Hulth 法造成早期骨关节炎模型。术后第 4 周开始, 中药组、假模组口服补肾壮筋汤, 模型组、正常组口服生理盐水。7 周末取兔膝关节软骨, 肉眼、光镜、透射电镜观察形态学变化, 用原位末端标记法(TUNEL 法), 免疫组化法分别观察软骨细胞凋亡和 PCNA 的表达。结果: 中药组的软骨细胞凋亡指数小于模型组($P < 0.05$); 而中药组的 PCNA 表达要高于其他各组($P < 0.05$)。结论: 补肾壮筋汤减少兔早期膝关节实验性 OA 软骨细胞的凋亡, 促进软骨细胞的增殖, 对早期 OA 有治疗作用。

关键词 补肾壮筋汤; 骨性关节炎, 膝 细胞凋亡; 细胞核增殖抗原

Effects of Bushen Zhuangjin decoction(补肾壮筋汤) on apoptosis of chondrocyte and expression of PCNA in earlier period experimental osteoarthritis of rabbit PAN Hao^{*}, HU Qing-feng, LI Xiong-feng, BIAN Hong-guang, ZHANG Yu-ming. ^{*} Hangzhou Hospital of TCM, Zhejiang Hangzhou, 310007, China

Abstract Objective: To observe the effects of Bushen Zhuangjin decoction(补肾壮筋汤) on apoptosis of chondrocyte, expression of proliferation cell nuclear antigen(PCNA) in earlier period of experimental osteoarthritis of rabbit, and analyze the relation between of them. **Methods:** Forty Livor rabbits were divided into four groups randomly: Normal group, model contrast group, Chinese herb group, sham operation group. There were ten rabbits in every group. OA model was induced in rabbits by Hulth's method. After three weeks Chinese herb group and sham operation group(which only cut out the skin) fed with Bushen Zhuangjin decoction, normal group and model contrast group fed with 0.9% NS at the same time. Specimens were harvested at the 8th week. Cartilage sections were analyzed by immunohistochemistry for the PCNA, TUNEL for apoptosis. Observe the change of morphology of chondrocyte by light microscopic and transmission electron microscopic. **Results:** Apoptosis cell index and cell proliferation index have significant difference between Chinese herb group and model contrast group($P < 0.05$). **Conclusion:** Bushen Zhuangjin decoction can decrease the apoptosis of chondrocyte, increase of proliferation chondrocyte. There was therapeutical effect in the earlier period of experimental osteoarthritis.

Key words Bushen Zhuangjin decoction(补肾壮筋汤); Osteoarthritis, knee; Apoptosis; Proliferation cell nuclear antigen(PCNA)

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种严重慢性进行性骨关节病, OA 的重要病理特征是关节软骨的降解。既往对 OA 的研究, 大多着重于细胞外基质酶性降解和(或)合成新的基质受到抑制而导致软骨破坏, 很少注重软骨细胞的生存或死亡在 OA 关节软骨降解中所起的作用。近年研究表明, OA 的发生、发展与软骨细胞凋亡异常有关^[1, 2]。本实验采用 Hulth

造模法制造兔早期膝关节实验性 OA 模型, 以原位末端标记法(TUNEL 法)对软骨细胞凋亡和用免疫组化的方法对软骨细胞的增殖细胞核抗原(PCNA)的表达进行研究, 旨在观察补肾壮筋汤治疗早期 OA 的疗效, 探讨其治疗骨关节病的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 取自封闭群的 6 个月龄青紫蓝兔 40 只, 体质量(2.50 ± 0.25) kg, 雌雄各半。由浙江中医学院实验动物中心提供。

1.2 实验药品 补肾壮筋汤浓缩液:由熟地、当归、山茱萸、茯苓、续断、牛膝、杜仲、白芍、五加皮、青皮等组成。水煎浓缩,蒸馏水调药物浓度至 100%,每毫升含生药 1 g。4℃冰箱保存备用。盐酸氯胺酮(上海第一生化药业公司,批号 000302)。注射用青霉素(江西东风药业,批号 011012-10)。生理盐水:每瓶 250 ml(石家庄制药集团,批号 000322)。

1.3 实验试剂 第一抗体:购自美国 Zymed 公司。TUNEL 试剂盒:由 DAMO 公司提供。PCNA 单克隆抗体:北京中山生物技术有限公司。

1.4 实验仪器 切片机、烘箱、显微镜、低温冰箱、电炉、透射电镜。

1.5 统计学处理 使用 SPSS 10.0 软件,组间两两比较采用方差分析、*F* 检验,相关性分析采用线性相关分析。

2 动物实验方法和取材

2.1 动物及分组 青紫蓝兔随机分为 4 组,每组 10 只,分别为中药组、假模组、模型组、正常组。

2.2 建立动物模型 氯胺酮 20 mg/kg,耳缘静脉注射麻醉,中药组、模型组参照 Hulth 造模型方法于无菌条件下切断其左膝内侧副韧带及切除内侧半月板以及前交叉韧带。假模组仅作左膝关节内侧皮肤切开缝合,正常组不作任何手术处理。术后分笼饲养,每天肌注青霉素 2×10^4 U/kg,共 3 d。1 周后拆线,然后每天驱赶 100 m,共 2 周。

2.3 给药 根据 Meelr Rubner 公式计算兔的给药剂量。手术后第 4 周中药组、假模组给予补肾壮筋汤,补肾壮筋汤每天相当生药 4 g/kg 配制成 25 ml 溶液,正常组、模型组给予生理盐水 25 ml,每天灌胃 1 次,共 4 周。

2.4 取材 全部动物在 7 周末处死,立即解剖左膝关节,每组随机取 2 只兔子,锐刀片切 1 cm × 1 cm 取股骨内髌全层软骨,立即放入 4℃的戊二醛中固定,供透射电镜观察用(透射电镜制作和观察在浙江大学医学院电镜中心完成)。余下软骨和内侧胫骨平台的软骨切下后放入 10% 的甲醛溶液中固定,供 HE 染色、凋亡、PCNA 测试用。

3 检测

3.1 凋亡软骨细胞的 TUNEL 法 常规脱蜡入水,双蒸水、PBS 洗 5 min × 3 次;20 μg/ml 蛋白酶 K 37℃消化 15 min, PBS 冲洗 5 min × 3 次;3% H₂O₂ 甲醇中 25 min, PBS 冲洗 5 min × 3 次;TUNEL 反应混合液中 37℃ 90 min, PBS 洗 5 min × 3 次;5%

羊血清室温封闭 20 min;POD 37℃孵育 30 min, PBS 洗 5 min × 3 次;DAB 显色,充分洗涤,苏木精复染,流水中蓝化,阴性对照用 PBS 取代 TUNEL 反应液。切片脱水、封片后供观察。

3.2 增殖软骨细胞的免疫组织化学显色 采用 EnVision 二步法。切片脱蜡至水,3% 过氧化氢室温下孵育 10 min, PBS 洗 5 min × 3 次;枸橼酸缓冲液(0.01 M, pH6.0)中 100℃抗原修复 20 min,冷却 20 min, PBS 冲洗 5 min × 3 次;10% 正常山羊血清处理切片 30 min,倾去血清,不洗直接加 1:50 的 PCNA 工作液,4℃过夜, PBS 冲洗 5 min × 3 次;滴加 EnVision 液,室温 30 min, PBS 冲洗 5 min × 3 次;DBA 显色,苏木精复染,常规脱水透明,中性树脂胶封片,光镜下观察结果。

4 结果

4.1 实验结果判断 细胞凋亡指数(AI)和细胞增殖指数(PI)的判定^[3,4],根据下列公式计算 AI 和 PI: AI= TUNEL 标记阳性细胞数/软骨细胞数 × 100%; PI= PCNA 标记阳性细胞数/软骨细胞数 × 100%。

TUNEL 标记和 PCNA 阳性细胞均为核着黄或棕黄色,选择细胞分布较均匀的高倍视野计数,计数软骨细胞 1 000 个以上。

4.2 形态学观测 形态学的变化和肖建德等^[5]的描述基本相似。

(1) 肉眼观测:正常组和假模组兔子的关节面光滑,呈乳白色或淡蓝色,模型组、中药组的兔子关节面色泽暗淡,模型组关节部分软骨面还可见虫蚀样斑点。

(2) 光学显微镜观测:正常组和假模组兔子各层软骨细胞的排列与基质的分布有一定的规律,表层细胞成梭形,大致成水平排列。中间细胞圆形,散在分布,辐射层软骨细胞成柱状排列。而其他两组均可见关节软骨部分区域表层胶原纤维暴露呈绒毛状,软骨柱状排列消失。模型组还可见软骨表面有裂缝形成。中药组部分标本可见软骨细胞呈巢状增生。

(3) 透射电镜观测:正常组和假模组关节软骨细胞形态正常,细胞核完整,核膜清晰,核内染色体均匀分布,粗面内质网呈层状排列,线粒体散在分布,细胞表面有许多微小突起(见图 1);软骨基质胶原纤维非常细,具有周期性横纹(见图 2)。其他两组均可见凋亡细胞,细胞高度固缩,核膜分辨不清,并可以呈锥形,细胞器外形模糊,部分细胞核深度凹陷变形,细胞完成固缩(见图 3);胶原纤维直径增粗,甚

至排列紊乱稀疏,其间可见钙盐沉积(见图 4)。中药组粗面内质网大量增生,富含颗粒,内质网池和网膜非常清晰,可见高尔基复合体。

4.3 TUNEL 的观察和 AI 的统计比较结果 凋亡细胞核呈棕黄色,主要位于软骨浅层,各层均有分布(见图 5)。各组间 AI 比较差异有统计学意义($F=14.36, P < 0.05$);中药组(9.63 ± 2.81)与模型组(13.98 ± 2.98)、正常组(4.44 ± 1.07)、假模组(4.28 ± 1.07)比较, $P < 0.05$;模型组与假模组、正常组比较, $P < 0.05$ 。

4.4 软骨细胞 PCNA 免疫组化的观察和增殖指数

的统计结果 模型组 PCNA 阳性细胞主要位于软骨浅表层;中药组表层和中层 PCNA 染色阳性细胞较多,并可见呈巢样增生的软骨细胞,主要位于软骨中层,染色大多呈阳性(见图 6)。模型组(7.70 ± 1.38)、中药组(12.01 ± 1.39)、假模组(6.68 ± 1.28)、正常组(6.74 ± 1.05)的 PI 比较差异有显著性意义($F=43.36, P < 0.01$),模型组和假模组($F=1.60, P=0.226 > 0.05$)、正常组($F=3.44, P=0.082 > 0.05$)之间比较差异无显著性意义。

4.5 AI 和 PI 的相关性分析 $r = 0.075, P = 0.719$,两者没有相关性。

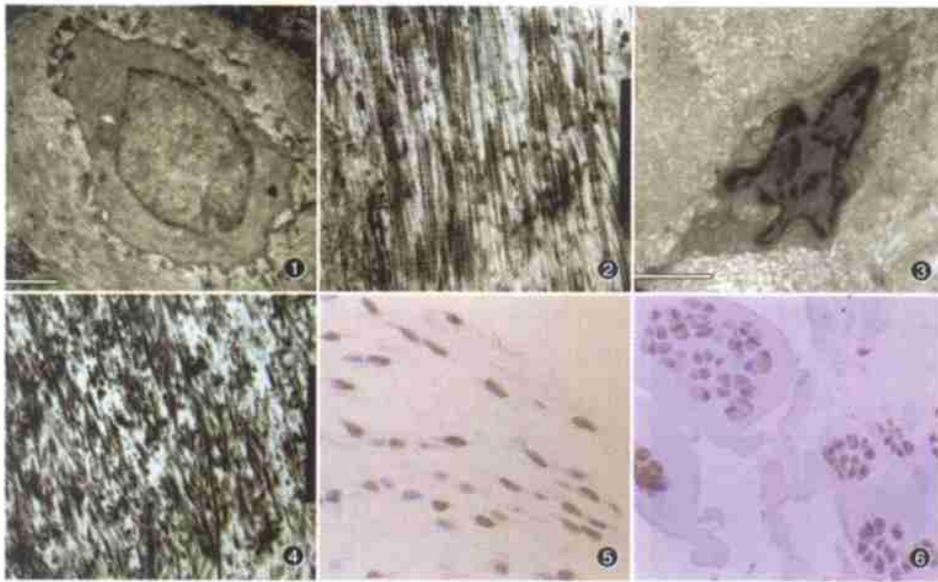


图 1 正常细胞(透射电镜×6 200) 图 2 正常组胶原(×8 900) 图 3 凋亡细胞(透射电镜×8 900) 图 4 模型组胶原(×8 900)
图 5 模型组(TUNEL×40) 图 6 中药组 PCNA 表达(×40)
Fig.1 Normal chondrocyte(TEM×6 200) Fig.2 Normal collagen(×8 900) Fig.3 Apoptosis cell(TEM×8 900) Fig.4 Model group collagen(×8 900) Fig.5 Model group(TUNEL×40) Fig.6 Chinese herb group PCNA expression(×40)

5 讨论

OA 的重要病理特征是关节软骨的降解,关节软骨属透明软骨,是一种无血管、神经及淋巴分布的结缔组织,由软骨细胞和软骨基质组成。研究表明,OA 患者的软骨细胞凋亡明显高于正常组^[2]。本研究从细胞凋亡原位检测发现凋亡软骨细胞主要位于浅层,凋亡细胞数目与 OA 严重程度明显相关。证明软骨细胞凋亡是骨关节炎的重要发病机制。现代药理研究表明:补益肝肾可以改善微循环,防止自由基过量产生,调节内分泌状态,增强免疫功能,使关节软骨退变破损和骨端松质骨囊肿样变等表现得到明显改善和修复。本研究进一步表明:补肾壮筋汤对软骨细胞凋亡潜在调控性,减少软骨细胞的过度

凋亡,可能是补肾壮筋汤治疗骨关节炎的主要机制之一。

PCNA 从 G₁ 后半期到 S 前半期在细胞核内急剧增多,它是与细胞周期相关 36KD 的一种核蛋白,是 DNA 聚合酶的附蛋白,在 S 期参与 DNA 的复制。目前认为它的表达是衡量细胞增殖的重要标记物^[6]。Even 等^[7]提出一个双信号假说,推测介导细胞凋亡和增殖的机制是一耦联的过程,细胞增殖的活化必然启动细胞的凋亡。在许多组织中,细胞的数量决定细胞增殖率及凋亡。这些因素彼此精确平衡,维持稳态。在软骨组织中,软骨细胞的增殖与凋亡也受软骨细胞的长度和细胞数目的调节。但成熟的软骨细胞缺乏有效的分裂增殖、修复软骨缺损的

能力。OA 患者一个重要的现象是关节中正常软骨及非负重区软骨中的软骨细胞数少于正常人关节软骨细胞数。本研究发现补肾壮筋汤能促进实验性骨关节炎软骨细胞增殖,对损伤的软骨有一定的修复功能,但对正常的关节软骨细胞增殖没有促进作用。模型组的软骨细胞的增殖指数并不因为软骨细胞数目的减少而增加,软骨细胞凋亡和增殖之间没有相关性,其原因有待进一步研究。

参考文献

- 1 Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S, et al. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 1998, 41(9): 1632-1638.
- 2 Blaw FJ, Guistian R, Vazquez ME, et al. Osteoarthritis chondrocytes

die by apoptosis: A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum*, 1998, 41(2): 284-289.

- 3 闵大六,王保太,孟刚,等.乳腺癌和癌前病变中细胞凋亡及其与 bcl-2, PCNA 表达的关系. *临床与实验病理学杂志*, 1999, 15(2): 99-102.
- 4 Korkolopoulou P, Oates J, Kittas C, et al. P53, c myc P62 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in non hodgkin's lymphomas. *J Clin Pathol*, 1994, 47: 9-14.
- 5 肖建德,朱通伯,杨家玉,等.实验性关节力学改变引起关节软骨变性的超微结构分析研究. *中华骨科杂志*, 1986, 6(2): 145-148.
- 6 Prelich G, Tan CK, Kostura M, et al. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and DNA polymerase auxiliary protein. *Nature*, 1987, 326: 517.
- 7 Even G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science*, 1998, 281(28): 1317-1322.

(收稿日期: 2004-05-10 本文编辑: 连智华)

• 短篇报道 •

锁骨钩钢板肩峰下撞击征 4 例的临床分析

刘小敏¹, 汤敏予¹, 肖伟平², 彭太平¹

(1. 江西中医学院附属医院骨科, 江西 南昌 330006; 2. 江西中医学院骨科研究生)

我科自 2000 年 7 月 - 2003 年 2 月应用锁骨钩钢板 (CHP) 内固定治疗锁骨肩峰端骨折 (Neer II 型) 和 III 度肩锁关节脱位 (Tosny III) 共 28 例, 其中 4 例出现不同程度的锁骨钩钢板肩峰下撞击征, 现报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料 4 例中男 2 例, 女 2 例; 年龄 20~43 岁, 平均 30.7 岁; 右侧 3 例, 左侧 1 例, 均为单侧; 锁骨肩峰端骨折 1 例, III 度肩锁关节脱位 3 例。

1.2 临床症状与体征 4 例患者在行 CHP 内固定术后进行功能锻炼时渐感患肩前方慢性钝痛, 症状有加重的趋势, 在上举、外展活动时疼痛更加明显。其中 2 例后来出现疼痛弧征阳性, 4 例患肩撞击试验均阳性 (检查者用手向下压迫患侧肩胛骨, 并使患肩高举, 若因肱骨大结节与肩峰撞击而出现疼痛, 即为撞击试验阳性), 行注射试验 (以 1% 利多卡因 10 ml 沿肩峰下面注入肩峰下滑囊) 后患侧肩痛症状得到暂时性完全消失, 肩关节活动正常。摄患肩上臂中立位, 内旋、外旋位的前后位 X 线片示 CHP 的尖钩位于肩峰下, 1 例示肩峰下有钙盐沉积 (该例年龄 23 岁)。

1.3 治疗方法 4 例 CHP 内固定术后出现症状, 患肩给予悬吊制动, 经过肩峰下间隙局部封闭, 口服非甾体类消炎镇痛药和活血通筋止痛中药, 配合物理治疗后, 症状得到缓解, 但反复发作, 呈进行性加重, 4 例均于 CHP 内固定术后 6 个月将 CHP 取出。其中骨折者和 2 例脱位者于取出术后 2 周患肩疼痛症状逐渐缓解, 肩关节活动功能好转, 取出术后 1 个月

复诊见疼痛消失, 肩关节活动正常, 外展、上举可。另 1 例脱位者取出术后仍感患肩前方慢性钝痛, 但症状较取出术前明显减轻, 遂予口服消炎镇痛药和活血止痛中药, 配合物理治疗, 取出术后 2 个月症状逐渐消失, 肩关节活动恢复正常。4 例取出术均随访达 6 个月以上, 症状无复发现象。

2 讨论

锁骨钩钢板肩峰下撞击征是指由于 CHP 的尖钩位于肩锁关节中或肩峰下, 造成肩峰下关节解剖结构异常, 内容物增多, 在肩的外展、上举运动中, 因肩峰下组织与 CHP 的尖钩发生撞击而产生的临床症状。4 例均在 CHP 内固定术后出现症状, 且逐渐加重, 经治疗后仍反复发作, CHP 取出后症状逐渐消失, 无复发现象, 故否认其他原因所致, 属于锁骨钩钢板肩峰下撞击征。

临床上为减少撞击征的产生, 医者应注意以下几点:

①将 CHP 的尖钩植入时, 应避免反复插试, 减少插入的过程中尖钩对肩袖的损伤; ②CHP 的尖钩端尽量置于肩峰的后下方, 减少其对肩袖的影响; ③尽量选用尖钩偏钝、小、薄且与肩峰相吻合的 CHP; ④术中操作动作应轻柔, 降低医源性肩袖损伤的概率; ⑤术后指导患者进行功能锻炼, 嘱患者避免患肩行剧烈的外展、上举运动。若术后一旦出现撞击征, 可按上述治疗方法进行治疗, 并结合 X 线片检查, 锁骨肩峰端骨折者和肩锁关节脱位者可于内固定术后 6 个月将 CHP 取出。

(收稿日期: 2004-12-14 本文编辑: 连智华)