

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00329

栀子对兔膝关节炎模型关节软骨病理改变及 IL-1 β 表达的影响

Effect of *Gardenia Gasminoides* Ellis on pathology of articular cartilage and IL-1 β expression in rabbit knee osteoarthritis models

吴 剑¹, 鲍同柱^{1*}, 肖长义², 舒 迅¹, 赵龙桃¹, 鄢 飞¹, 严雪港¹

1. 三峡大学第一临床医学院骨科, 宜昌 443002

2. 三峡大学医学院形态学教研室, 宜昌 443002

[摘要] **目的:**观察栀子浸膏对兔膝关节炎模型中关节软骨病理改变及关节液、血清中 IL-1 β 表达的影响。**方法:**24 只大白兔随机分为给药组、模型组和对照组($n=8$)。给药组、模型组行 Hulth 法复制骨关节炎模型, 术后第 5 周, 给药组以栀子浸膏 600 mg/kg 灌胃, 模型组与对照组给予等量生理盐水灌胃, 给药 3 周后处死动物, 分别对软骨肉眼下行 Pelletier 评分及光镜下行 Mankin 评分, 取股骨内侧髁关节软骨组织块行电镜、H-E 染色观察软骨细胞形态及检测关节液与血清中 IL-1 β 的含量。**结果:**栀子浸膏能延缓骨关节炎模型关节软骨病理损伤, 给药组关节液与血清中 IL-1 β 的含量明显低于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论:**栀子浸膏可能通过降低骨关节炎模型关节液与血清炎症因子 IL-1 β 的表达发挥保护关节软骨的作用, 从而延缓骨关节炎病程的进展。

[关键词] 骨关节炎; 栀子; 关节软骨; 白细胞介素 1 β

[中图分类号] R 684.3

[文献标志码] B

[文章编号] 0258-879X(2009)03-0329-03

骨关节炎(osteoarthritis, OA)的发病机制尚未完全阐明,但有关软骨降解的机制已得到深入研究,目前认为与炎症因子 IL-1 β 有关,它促使软骨细胞、基质的降解以及滑膜炎的形成^[1]。栀子系茜草科植物的成熟果实,可降低类风湿性关节炎(RA)大鼠血清中 IL-1 的水平,抑制缺血性脑损伤中 IL-1 的活性^[2-3]。本研究通过观察栀子浸膏对兔膝关节炎模型关节液 IL-1 β 及软骨细胞形态的影响,探讨栀子浸膏的关节保护作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器 生栀子浸膏的制备:取成熟生栀子果仁 3 000 g(宜昌众生药业公司中药饮片厂生产),用 75% 乙醇提取后浓缩得黏稠浸膏 436 g(6.88 g 生药/g 浸膏);青霉素为华北制药股份有限公司生产;氯胺酮为福建古田药业有限公司。IL-1 β 检测试剂盒为 TBD 生物发展中心产品。Olympus 光学显微镜为日本奥林巴斯公司产品;RM2315 切片机为德国 Leica 公司产品;电子显微镜为日本日立公司产品。

1.2 动物来源及分组 24 只 3~4 个月龄大耳白兔,体质量 2.0~2.5 kg,雌雄各半,由武汉市万千佳禾实验动物养殖有限公司提供(合格证号:0001647)。24 只兔随机分为给药组、模型组和对照组($n=8$),氯胺酮(10 mg/kg)麻醉后,给药组、

模型组行单侧 Hulth 术,即取膝关节内侧长约 4 cm 的纵切口,探查关节腔内无原发病变后切断内侧副韧带、前后交叉韧带;并完整切除内侧半月板,注意勿损伤关节软骨面,彻底止血,冲洗关节腔,行抽屐试验阳性后,逐层缝合关节囊、皮肤,无菌敷料包扎伤处,不予固定;对照组仅打开关节腔,不损伤韧带和半月板,缝合皮肤,无菌敷料包扎伤处。术后每天肌肉注射青霉素 40 万 U/只,伤口换药,连续 7 d 预防感染。根据临床上超疲劳活动容易提前出现 OA 的发病特点^[4],手术 1 周后,每天强迫动物活动 30 min,分 2 次驱赶,4 周后即可获得稳定的 OA 模型。术后第 5 周开始,给药组给予栀子浸膏 600 mg/kg 灌胃,模型组和对照组分别给予等量生理盐水灌胃,给药 3 周。

1.3 样本获取及各指标的检测

1.3.1 IL-1 β 含量的测定 在患侧关节处脱毛,消毒后用装有 1 ml 生理盐水注射器行关节腔穿刺,将 1 ml 生理盐水注入关节腔,反复冲洗后抽出,盛于 2 ml 离心管中,60 000 $\times g$ 下离心 10 min,取上清,按试剂盒方法检测 IL-1 β 含量。取耳中动脉血液,盛于 5 ml 离心管中,60 000 $\times g$ 下离心 10 min,取血清,按试剂盒方法检测 IL-1 β 含量。

1.3.2 病理学观察 沿原切口切至关节腔行大体(肉眼)观察后,以锐利刀片切取股骨内侧软骨,置于 10% 甲醛中固定,系列脱水、脱钙,常规石蜡包埋,切片, H-E 染色,分别对软骨

[收稿日期] 2008-08-12 **[接受日期]** 2008-10-15

[基金项目] 宜昌市 2008 年医疗卫生科技计划(A08302-10)。Supported by 2008 Medical Technological Plan Projects of Yichang(A08302-10)。

[作者简介] 吴 剑, 硕士。E-mail: jianyi8286@163.com

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 0717-6488193, E-mail: baotongzhu1963@163.com

肉眼下行 Pelletier 评分及光镜下行 Mankin 评分^[5]。取股骨内髁关节软骨修成 0.3 cm×0.3 cm×0.2 cm 的全软骨层, 分别以 3% 戊二醛固定 8 h 后置于缓冲液中, 再以锇酸固定、脱水, 环氧树脂包埋, 纵向超薄切片电镜观察。

大体观察按以下原则评分: 0 分为关节面光整, 色泽如常; 1 分为关节面粗糙, 有小的裂隙且色泽灰暗; 2 分为关节面糜烂, 软骨缺损深达软骨表层; 3 分为关节面溃疡形成, 缺损深达软骨深层; 4 分为软骨剥脱, 软骨下骨质暴露^[5]。

1.4 统计学处理 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 大体评分用秩和检验, 其余组间比较用 *t* 检验。

2 结果

2.1 大体观察 给药组软骨改变以糜烂粗糙为主, 部位集中在股骨内髁内侧(图 1A), 其中 2 例出现了内髁内侧缘纤维软骨增生。模型组软骨改变仍集中在股骨内髁关节面, 以溃疡形成为主, 且内髁内侧缘纤维软骨增生更加明显(图 1B), 其中 2 例出现软骨剥脱。对照组软骨表面没有明显改变(图 1C)。给药 3 周后镜下 OA 软骨评分结果(表 1)表明给药组软骨退变明显轻于模型组($P < 0.01$)。



图 1 各组关节软骨大体观察结果

A: 给药组; B: 模型组; C: 对照组

表 1 给药 3 周后解剖显微镜下软骨 OA 评分

(*n*)

组别	评分				
	0分	1分	2分	3分	4分
给药组	0	5	3	0	0
模型组	0	1	1	4	2
对照组	7	1	0	0	0

2.2 光镜观察 给药组软骨表层细胞数弥漫性增多, 并

出现簇集样细胞团, 部分标本软骨表面出现裂隙及深达中层的糜烂, 可见潮线紊乱(图 2A)。模型组大部分软骨表面出现溃烂缺损, 软骨细胞则明显减少, 多见坏死崩解细胞, 潮线紊乱甚至消失(图 2B)。对照组软骨表面光镜下没有明显异常改变(图 2C)。给药 3 周后给药组软骨 Mankin 评分为 638 ± 109 , 明显低于模型组 985 ± 212 , 两者之间有统计学差异($P < 0.01$)。对照组软骨 Mankin 评分 52 ± 14 , 与模型组间有统计学差异($P < 0.01$)。



图 2 各组关节软骨 H-E 染色结果

A: 给药组; B: 模型组; C: 对照组. Original magnification: ×400

2.3 透射电镜观察关节软骨超微结构改变 对照组软骨细胞核呈卵圆形, 细胞表面有细长突起, 胞体及胞膜完整, 胞质内可见丰富的细胞器, 核内染色质分布均匀, 胞内有大量粗面内质网, 基质中胶原纤维排列整齐(图 3A); 模型组软骨细胞明显固缩、部分溶解坏死, 外形不规则, 细胞周晕消失, 核膜不明显, 表面微绒毛突起减少, 胞质内细胞器凝成高电子

密度的片状物不易分辨, 可见数个脂滴存在(图 3B); 给药组软骨细胞的各种细胞器丰富, 细胞核形态正常, 胞质丰富, 染色质较均匀, 细胞表面突起基本消失, 胞内有大量粗面内质网, 胞质中有空泡出现, 细胞周围胶原纤维部分断裂(图 3C)。
2.4 各组关节液、血清 IL-1 β 检测结果 给药组关节液与血清中 IL-1 β 含量明显低于模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 表 2)。

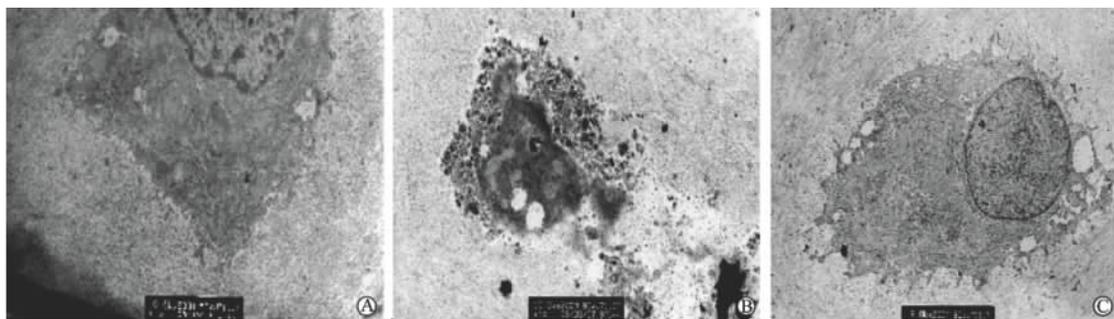


图3 各组关节软骨超微结构

A:对照组;B:模型组;C:给药组. Original magnification: $\times 80\ 000$ 表2 给药3周后各组动物关节液与血清中 IL-1 β 的含量[$n=8, \bar{x} \pm s, \rho_B / (\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1})$]

组别	关节液	血清
给药组	$1.98 \pm 0.93^*$	$1.32 \pm 0.12^{**}$
模型组	3.04 ± 0.83	2.01 ± 0.37
对照组	$1.75 \pm 0.76^*$	$1.16 \pm 0.21^{**}$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与模型组比较

3 讨论

本实验采用 Hulth 法复制动物 OA 模型,通过改变膝关节生物力学状态以诱导关节软骨退变,建立骨关节炎模型。手术由同一操作者完成,我们在制作动物模型时对照组有 1 例出现膝关节感染,经继续注射青霉素 60 万 U/只,连续 4 d 治愈。本实验造模后第 8 周时模型组见软骨表面碎裂、剥脱,软骨细胞簇集和坏死,说明软骨已有明显的组织形态学改变,并处于骨关节炎中晚期,而对照组关节软骨没有明显改变,说明了这一方法确能导致骨关节炎的形成。

给药 3 周后,给药组关节软骨病理损害程度较模型组轻,而没能达到对照组软骨细胞形态,说明药物只能延缓病程进展而不能逆转 OA 的病变进程。模型组家兔患侧关节液中 IL-1 β 含量明显高于对照组,且软骨细胞的破坏程度亦较对照组强,说明造模是成功的。实验结果显示:给药组软骨在病理程度上的改变明显较模型组轻,软骨结构较完整,软骨细胞形态改变较小。这些都表明栀子浸膏在一定程度上保护了软骨细胞,对软骨细胞的退变和软骨细胞的降解起了一定的延缓作用。

IL-1 是最经典的炎症调节剂,是调节炎症的始动因素。有学者^[6]报道培养膝关节滑膜细胞后,其上清液 IL-1 主要以 IL-1 β 为主,炎症情况下,粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)水平升高,它也能促进 IL-1 的上调作用,增加 IL-1 β 的合成,促进软骨和滑膜组织金属蛋白酶的表达,包括基质溶酶、胶原酶、组织纤维蛋白溶酶激活剂等。IL-1 β 可诱发以单核细胞纤维渗出为特征的慢性滑膜炎,软骨基质降解产物的刺激也可引起滑膜的继发炎症。IL-1 β 还可促进软骨细胞分泌 PGE₂,参与关节炎症反应,刺激骨吸收,并可刺激

成骨细胞样细胞增殖,导致关节骨、软骨增生性变化^[7],软骨下骨增厚,边缘长出新骨形成骨赘。IL-1 β 通过 IL-6 介导抑制软骨糖蛋白的合成,促进成纤维细胞合成和基质微分子的降解,加重软骨的损伤。关节内局部高水平的 IL-6 可能与其影响软骨细胞增殖、软骨损伤的反应性和增强关节炎症反应有关。本实验结果显示给药组体内 IL-1 β 的含量较模型组显著降低,软骨细胞破坏程度明显减轻,说明栀子浸膏可通降低体内 IL-1 β 的含量,而起到保护关节软骨的作用。

目前 OA 尚无有效的防治方法,因为很少有药物能改变 OA 进程。我们的研究表明栀子浸膏能明显延缓软骨退变的进程,可起到保护软骨细胞的作用。因此我们认为栀子有可能成为治疗 OA 有效药物,值得进一步临床研究。

[参考文献]

- [1] 王洪,张青松,杨述华,杨超,段德宇,孟春庆,等. IL-1R I, IL-1R II, IL-1RAcP 在骨关节炎滑膜中的表达及其生物学意义[J]. 中华风湿病学杂志, 2006, 8: 470-473.
- [2] 朱江,谢文利,晋玉章,孙文军,高欣. 栀子对类风湿性关节炎(RA)大鼠血清中 IL-1, TNF- α 的影响[J]. 中成药, 2005, 27: 801-803.
- [3] 朱晓磊,张娜,李澎涛,蒋玉凤,徐雅. 栀子苷对脑缺血时脑组织 TNF- α , IL-1 β 和 ICAM-1 含量的影响[J]. 北京中医药大学报, 2004, 27: 13-25.
- [4] 王贤波,蒋青. 大鼠骨性关节炎模型的构建及其稳定性观察[J]. 中国临床康复, 2005, 10: 72-75.
- [5] Pelletier J P, Jovanovic D, Fernandes J C, Manning P, Connor J R, Currie M G, et al. Reduced progression of experimental osteoarthritis *in vivo* by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase[J]. Arthritis Rheum, 1998, 41: 1275-1286.
- [6] Pelletier J P, McCollum R, Cloutier J M, Martel-Pelletier J. Synthesis of metalloproteinases and interleukin 6 (IL-6) in human osteoarthritic synovial membrane is an IL-1 mediated process[J]. J Rheumatol Suppl, 1995, 43: 109-114.
- [7] 邓廉夫. IL-1, TNF- α 和 IL-6 与骨关节炎[J]. 国外医学:创伤与外科基本问题分册, 2003, 17: 102.

[本文编辑] 贾泽军