

· 基础研究 ·

逍遥散对雌性兔膝关节软骨细胞超微结构的影响

戴七一¹, 文宗振², 辛晓东¹, 覃学流¹, 刘靖³, 腾居赞¹,朱江龙¹, 韩杰¹, 欧国建¹, 袁经阳¹, 郝高庭¹

(1. 广西中医学院附属瑞康医院, 广西 南宁 530011; 2. 广西大学, 广西 南宁 530004;

3. 广西中医学院, 广西 南宁 530001)

摘要 目的:探讨逍遥散对雌性兔膝关节软骨细胞超微结构的影响。**方法:**采用改良 Huith 法对 30 只雌性新西兰兔右膝关节进行膝关节炎造模,造模 1 周后将 30 只实验兔随机分为逍遥丸组、玻璃酸钠组及对照组,每组 10 只。逍遥丸组每天每只给予 8 丸逍遥丸(相当于原药材 3 g),配成 30 mL 液体灌胃,连用 5 周;玻璃酸钠组予以玻璃酸钠注射液 0.15 mL · kg⁻¹ 右膝关节内注射,每周 1 次,连用 5 周;对照组每天予以 30 mL 生理盐水灌胃,连用 5 周。造模后 12 周末处死所有实验兔,取右膝内侧胫骨平台软骨组织切片后透射电镜观察。**结果:**逍遥丸组细胞核正常,核膜完整,核质均匀,线粒体嵴部分模糊,出现空泡化现象,内质网、高尔基体正常,纤维组织稍紊乱,有凋亡小体存在;玻璃酸钠组细胞核正常,核膜完整,核质均匀,线粒体空泡化较轻,内质网、高尔基体正常,纤维组织稍紊乱,有凋亡小体存在;对照组细胞核可见固缩现象,线粒体异常,表现为线粒体嵴模糊、消失,空泡化现象较明显,内质网、高尔基体基本正常,纤维组织紊乱现象较明显,多个标本见凋亡小体。**结论:**逍遥散对雌性兔膝关节软骨细胞具有保护作用。

关键词 骨关节炎,膝 逍遥散 软骨细胞 兔 动物实验

Study on the effect of XIAOYAO POWDERS on ultrastructure of knee-joint chondrocytes in female rabbits

DAI Qi-yi*, WEN Zong-zhen, XIN Xiao-dong, QIN Xue-liu, LIU Jing, TENG Ju-zan, ZHU Jiang-long, HAN Jie, OU Guo-jian, YUAN Jing-yang, HAO Gao-ting. * Ruikang Hospital affiliated to Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530011, Guangxi, China

ABSTRACT Objective: To explore the effect of XIAOYAO POWDERS on the ultrastructure of knee-joint chondrocytes in female rabbits.

Methods: Models of knee osteoarthritis (KOA) were built in right knee joints of 30 female New Zealand rabbits by the improved Huith method. One week after modeling, 30 experimental rabbits were randomly divided into XIAOYAO POWDERS group, sodium hyaluronate group and control group, 10 cases in each group. Every rabbit in the XIAOYAO POWDERS group was intragastric administrated with 30 mL liquid which made from 8 XIAOYAO POWDERS (which dosage was equivalent to that of 3 g original medicine) every day for consecutive 5 weeks. Rabbits in the sodium hyaluronate group were injected with 0.15 mL · kg⁻¹ sodium hyaluronate injection in their right knee joints once a week for consecutive 5 weeks, while the others in the control group were intragastric administrated with 30 mL normal saline every day for consecutive 5 weeks. At the end of 12 weeks after modeling, all the experimental rabbits were executed, and sections from the tibial plateau cartilage tissue inside of their right knees were fetched out to be observed under transmission electron microscope. **Results:** Such situations were found in XIAOYAO POWDERS group as normal cell nucleus, complete nuclear membrane, uniform nucleoplasm, partially obscuring in mitochondrial crista, vacuolation, normal endoplasmic reticulum and Golgi's apparatus, slightly disorder in fibrous tissue and existence of apoptotic bodies. Such phenomena were found in sodium hyaluronate group as normal cell nucleus, complete nuclear membrane, uniform nucleoplasm, lesser vacuolation of mitochondria, normal endoplasmic reticulum and Golgi's apparatus, slightly disorder in fibrous tissue and existence of apoptotic bodies. The conditions appeared in a number of specimens of control group as pycnosis of cell nucleus, abnormal mitochondria shown as blurred or disappeared mitochondrial crista, much more obviously vacuolation of mitochondria, essentially normal endoplasmic reticulum and Golgi's apparatus, much more obviously disorder in fibrous tissue and apoptotic bodies. **Conclusion:** XIAOYAO POWDERS has protective effect on knee-joint chondrocytes in female rabbits.

Key words Osteoarthritis, Knee; XIAOYAO POWDERS; Chondrocytes; Rabbits; Animal experimentation

基金项目: 广西区卫生厅重点课题资助项目(重 200856)

通讯作者: 覃学流 E-mail: Qinxueliu2008@163.com

现代流行病学调查发现,绝经后妇女比同期男性更易出现髌、膝骨关节炎(osteoarthritis, OA)的症状,并且女性髌、膝 OA 进展更快^[1]。因为卵巢功能减退引起雌激素减少是产生更年期综合征的主导因素,这时的女性往往会出现一些神经精神症状,如忧郁、焦虑、多疑等^[2]。这些症状的产生都与中医学的肝郁气滞的病机有关,因此,是否可通过疏肝养血法延缓更年期女性膝 OA 的病情发展?我们通过逍遥散对雌性实验兔膝关节软骨细胞超微结构影响的实验研究,对疏肝养血法治疗膝 OA 的疗效及作用机制进行初步探讨。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 6 月龄雌性新西兰兔 30 只,体质量 2.5 ~ 3 kg,由广西中医学院实验动物中心提供,实验动物使用许可证号:SYXK(桂)2003-0001。

1.2 药物与试剂 逍遥丸,合肥神鹿双鹤九华药业有限责任公司生产,国药准字 Z34020437;玻璃酸钠注射液,山东博士伦福瑞达制药有限公司生产,国药准字 H10960136。

1.3 主要仪器 JEM-1200Ex/s 透射电子显微镜,日本电子株式会社生产。

2 方法

2.1 造模方法 参照改良 Hult 法^[3]进行膝 OA 造模:用 1% 戊巴比妥钠 6 mL,经兔耳缘静脉注射。于无菌条件下切断兔右膝内侧副韧带、前后交叉韧带,并切除内侧半月板,然后缝合切口,无菌敷料覆盖。术后使用青霉素钠 5 万单位·kg⁻¹、链霉素 10 万单位·kg⁻¹,每天 1 次,连用 3 d。术后 1 周开始驱赶兔子每天行走 2 次,共 30 min,连续 4 周。

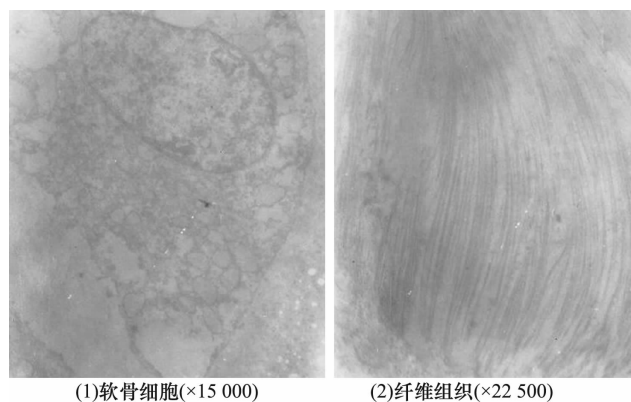
2.2 分组及给药 造模 1 周后将 30 只实验兔随机分为逍遥丸组、玻璃酸钠组及对照组,每组 10 只。逍遥丸组每天每只给予 8 丸逍遥丸(相当于原药材 3 g),配成 30 mL 液体灌胃,连用 5 周;玻璃酸钠组予以玻璃酸钠注射液 0.15 mL·kg⁻¹ 右膝关节内注射,每周 1 次,连用 5 周;对照组每天予以 30 mL 生理盐水灌胃,连用 5 周。

2.3 指标测定 所有实验兔均单笼喂养,造模后 12 周末耳缘静脉空气栓塞处死,解剖右膝关节,肉眼观察关节软骨组织大体变化,用咬骨钳、手术刀取内侧胫骨平台软骨组织放入固定液中固定。将固定后的软骨组织用刀片切成 1 mm³ 的小块,在 3% 戊二醛溶

液中浸泡 2 h,然后脱钙浸泡 3 周,每周换液 1 次。脱钙结束后用 pH7.4 的磷酸缓冲溶液漂洗 2 次,每次 15 min,再用 1% 四氧化锇固定 2 h,然后用 pH7.4 的磷酸缓冲溶液漂洗 2 次,每次 15 min。乙醇梯度脱水 8 次,每个梯度脱水 10 ~ 15 min。再经渗透,epon812 环氧树脂包埋,40 ℃ 聚合 24 h,60 ℃ 聚合 24 h。最后修块,切片,切片厚度 80 nm,再以醋酸铀和柠檬酸铅双染色后上镜观察。

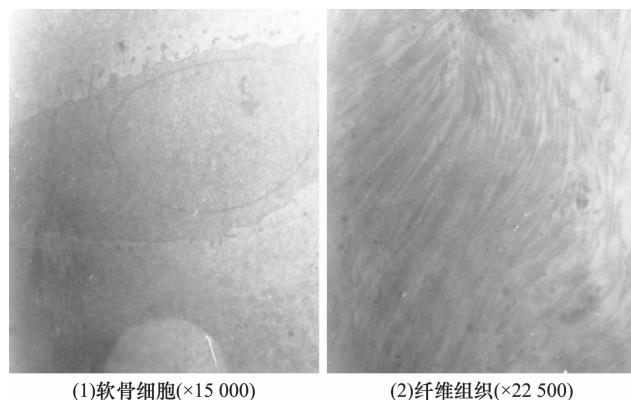
3 结果

逍遥丸组细胞核正常,核膜完整,核质均匀,线粒体嵴部分模糊,出现空泡化现象,内质网、高尔基体正常[图 1(1)],纤维组织稍紊乱[图 1(2)],有凋亡小体存在;玻璃酸钠组细胞核正常,核膜完整,核质均匀,线粒体空泡化现象较轻,内质网、高尔基体正常[图 2(1)],纤维组织稍紊乱[图 2(2)],有凋亡小体存在;对照组细胞核可见固缩现象,线粒体异常,表现为线粒体嵴模糊、消失,空泡化现象较明显,内质网、高尔基体基本正常[图 3(1)],纤维组织紊乱现象较明显[图 3(2)],多个标本见凋亡小体。



(1)软骨细胞(×15 000) (2)纤维组织(×22 500)

图 1 逍遥丸组膝关节软骨组织观察
(醋酸铀和柠檬酸铅双染色)



(1)软骨细胞(×15 000) (2)纤维组织(×22 500)

图 2 玻璃酸钠组膝关节软骨组织观察
(醋酸铀和柠檬酸铅双染色)

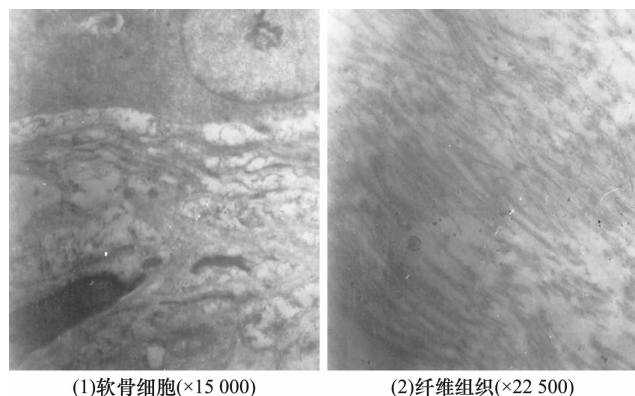


图 3 对照组膝关节软骨组织观察
(醋酸铀和柠檬酸铅双染色)

4 讨 论

膝 OA 是以关节软骨损伤为主要病理改变,波及膝周诸多组织,以膝关节疼痛并活动障碍为特征^[4]的一种骨科常见病、多发病。现代研究认为,膝 OA 是在力学因素和生物学因素的共同作用下,软骨细胞、软骨基质与软骨下骨 3 者间的分解代谢和合成代谢失调的结果。因为正常成熟的关节软骨几乎很少有软骨细胞显示有丝分裂活动的征象^{[5]408},所以如何延缓关节透明软骨的退变或促进透明软骨再生成为目前从本质上防治膝 OA 的关键。

临床上我们曾对随机就诊的 60 例患者进行统计分析,男女比例为 1:3.5,女性明显高于男性^[6]。而更年期的女性常可出现忧郁、焦虑及多疑等中医称之为肝郁气滞的症状,通过疏肝养血法可否影响膝关节软骨细胞的代谢?本实验的结果初步显示:对照组软骨细胞的损伤变化较明显,玻璃酸钠组软骨细胞基本正常,逍遥丸组软骨细胞的损伤变化较轻。这说明关节内注射玻璃酸钠和口服逍遥散都对软骨细胞具有保护作用。

成人软骨组织中没有血液供应,滑液成为最有可能的营养来源,代谢活跃的滑膜产生的滑液通过软骨基质扩散,可以提供给软骨组织足够的营养物质和氧气^{[5]389-390}。透明质酸可以代替关节腔的滑液,为关节软骨提供营养,减轻关节软骨的退变^[7]。逍遥散载于《太平惠民和剂局方》,由柴胡、当归、白芍、茯苓、白术、薄荷、生姜、炙甘草等组成,其中柴胡、薄荷疏肝理气,当归、白芍养血活血,茯苓、白术、炙甘草健脾使营血生化有源。诸药合用,共奏疏肝养血之效,临床主

要用于肝气不舒引起的月经不调。中医学认为:肝主疏泄,肝的生理特点是主升、主动,对气机的疏通畅达是一个重要因素。气的正常出入升降运动是血液循环和津液输布调节的重要因素,也是女性月经正常来潮的重要因素。人静则血归于肝,人动则血流于诸经。血及津液是构成人体和维持生命活动的基本物质之一,所谓“肝受血而能视,足受血而能步,掌受血而能握,指受血而能摄”(《素问·五脏生成篇》),所以“肝生筋”(《素问·阴阳应象大论》),关节的屈伸和转侧功能正常与否取决于筋,筋的正常功能发挥需要肝脏“淫气于筋”(《素问·经别论》)。本实验的结果显示,疏肝养血法对兔膝关节软骨细胞具有一定的保护作用,这可能是逍遥散治疗膝 OA 的作用机制之一。雌激素替代疗法广泛用于治疗绝经相关性疾病,但用于绝经后妇女 OA 的治疗目前仍存在争议。Rossouw 等^[8]研究发现雌激素替代治疗增加了女性患乳腺癌、中风、肺栓塞等的危险性,因此探讨中医基础理论指导下的中医药治疗应该更值得人们重视。

5 参考文献

- [1] 任海龙,邢国胜,白人骁. 雌激素与骨性关节炎[J]. 中国骨伤,2005,18(12):766-768.
- [2] 王泽华. 妇产科治疗学[M]. 北京:人民卫生出版社,2009:734-741.
- [3] 刘献祥,李西海,周江涛. 改良 Hulth 造模法复制膝骨性关节炎的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志,2005,25(12):1104-1108.
- [4] 施桂英. 关节炎概要[M]. 北京:中国医药科技出版社,2002:327.
- [5] Buckwalter JA, Einhorn TA, Simon SR. 骨科基础科学[M]. 陈启明,梁国穗,秦岭,等译. 北京:人民卫生出版社,2001.
- [6] 戴七一,刘百玲,韦家宁,等. 膝骨性关节炎的分型与性别、年龄的关系[J]. 中医正骨,2007,19(10):12-13.
- [7] 代岭辉,杜宁. 关节软骨损伤生物学修复的研究进展[J]. 中国骨伤,2009,22(9):721-724.
- [8] Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial[J]. JAMA, 2002, 288(3): 321-333.

(2010-08-21 收稿 2012-08-29 修回)

反映学术进展 引领学科发展