基础研究 文章编号:0253-3626(2010)07-1004-06

复元胶囊对兔膝骨关节炎滑膜 IL-1β、MMP-13 及 iNOS 表达的影响

巫桁锞,李荣亨,钟 玉
(重庆医科大学附属第一医院中西医结合科,重庆 400050)

【摘 要】目的:通过观察复元胶囊对实验性兔膝骨关节炎(Osteoarthritis,OA)滑膜组织形态学变化的影响,以及复元胶囊对滑膜白细胞介素 -1β(Interleukin-1β)、基质金属蛋白酶 -13(Matrix metallo proteinase-13)及诱导型一氧化氮合酶(Induced nitric oxide synthase)表达的影响,探讨具有补益肝肾、益气活血作用的复元胶囊对实验性兔膝 OA 的治疗作用及其机理。方法:60 只新西兰兔,随机分为复元胶囊低、中、高剂量组、模型组和正常组,用改良 Hulth 法制造兔膝 OA 模型,中药组给予复元胶囊灌胃,模型组给予生理盐水灌胃,连续分别用药 4、8 周和 12 周。HE 染色光镜观察滑膜组织形态并评分,透射电镜观察滑膜组织超微结构,免疫组化检测滑膜 IL-1β、MMP-13 及 iNOS 的表达。实验后对滑膜评分和 3 个指标(IL-1β、MMP-13、iNOS)进行前后比较和组间比较。结果:复元胶囊低、中、高剂量组 3 个时间段的滑膜炎症明显小于同期模型组($P<0.05$),这 3 个治疗组 3 个时间段的滑膜 IL-1β、MMP-13 及 iNOS 的表达显著低于同期模型组($P<0.05$),中、高剂量组的差异非常显著($P<0.01$)。结论:复元胶囊可明显改善实验性兔膝 OA 滑膜组织形态学的病理改变,显著抑制实验性兔膝 OA 滑膜组织的 IL-1β、MMP-13 和 iNOS 的表达。复元胶囊可改善实验性兔膝 OA 滑膜组织形态学的病理改变的作用与其抑制滑膜组织 IL-1β、MMP-13 和 iNOS 的表达密切相关。

【关键词】骨关节炎;滑膜;复元胶囊;白细胞介素 -1β;诱导型一氧化氮合酶;基质金属蛋白酶 -13
【中国图书分类法分类号】R285.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-12-17

Effects of Fuyuan capsule on expression of IL-1β, MMP-13 and iNOS in synovium in experimental osteoarthritis of rabbits

WU Heng-ke, et al
(*Department of Traditional Medicine Intergrated Western Medicine, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the effects of fuyuan capsule on change of morphology of synovium, expression of IL-1β、MMP-13 and iNOS in synovium in experimental osteoarthritis of rabbits, and investigate the mechanism about the reparation and treatment of fuyuan capsule. *Methods*: Sixty New Zealand rabbits were divided into five groups randomly: normol group, model contrast group, low dose group, middle dose group and high dose group of fuyuan capsule. OA model was induced in rabbits by improved Hulth'S method. Three Chinese herb groups were treated with fuyuan capsule (0.727, 1.453, 4.795 g/(kg·d)), continuously for 4, 8 weeks and 12 weeks, model contrast group was treated with 0.9% NS, ig, at the same time. Synovium sections were analyzed by immunohistochemistry for the IL-1β, MMP-13 and iNOS, observation and measurement of the change of morphology of synovium by light microscopic and transmission electron microscopic. After the experiment, the differences of these indexes between Three Chinese herb groups and model contrast group were compared. *Results*: There are found significant differences about measurement of morphology of synovium between Three Chinese herb groups and model contrast group after the experiment($P<0.05$), especially high and middle dosage of fuyuan capsule group($P<0.01$). It is the same as the comparison of the expression of IL-1β, MMP-13 and iNOS. *Conclusion*: Fuyuan capsule can improve the pathological change of morphology of synovium, and decrease the expression of IL-1β, MMP-13 and iNOS in synovium in experimental osteoarthritis of rabbit. There was therapeutical effect on synovium in experimental osteoarthritis of rabbit.

【Key words】Osteoarthritis; Synovium; Fuyuan capsule; Interleukin-1β; Induced nitric oxide synthase; Matrix metallo proteinase-13

作者介绍:巫桁锞(1973-),男,硕士,
研究方向:中西医结合治疗老年病与肿瘤。
通讯作者:李荣亨,男,教授,E-mail:Lrongheng1231@163.com。

骨关节炎(Osteoarthritis,OA)在老年人群中发病率很高,随着我国进入老龄化社会,OA 的发病人数和发病率逐年升高,因此其防治工作愈来愈受到人们的重视。现代医学对 OA 发病机制的认识并不十分明确,在过去的 30 年间,细胞因子与骨关节炎的关系日益受到重视,其中白细胞介素 -1(Interleukin-1,IL-1)被认为是导致软骨功能衰退最具影响力的细胞因子之一; 由诱导型一氧化氮合酶 (Induced nitric oxide synthase, iNOS)产生的一氧化氮(Nitric oxide,NO),是与 OA 发病相关的非常重要的炎症性因子;基质金属蛋白酶(Matrix metallo proteinase,MMPs)家族是导致 OA 病理改变的重要原因。本研究旨在观察具有补益肝肾、益气活血作用的复元胶囊对实验性兔膝骨关节炎滑膜组织形态学变化, 以及 IL-1β、MMP-13 和 iNOS 表达的影响, 探讨其治疗 OA 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康新西兰大白兔 60 只,雌雄各半,体重(2.5 ± 0.1) kg,购自重庆医科大学动物中心。随机分为 5 组:正常组、模型对照组、复元胶囊低、中、高剂量组,每组再按给药后第 4、8、12 周 3 个时间点分配,每个点 4 只。

1.2 实验药品及试剂

兔抗 NOS2 多克隆抗体、兔抗 IL-1β 多克隆抗体、兔抗 MMP-13 多克隆抗体:武汉博士德生物工程有限公司。DAB 试剂盒、免疫组化染色试剂盒 SP-9000:北京中杉金桥生物技术有限公司。复元胶囊(淫羊藿、鹿茸、黄芪、生晒参、续断、丹参、川芎、枸杞子等):重庆希尔安药业公司加工生产。

1.3 造模方法

取模型对照组和复元胶囊高、中、低剂量组 4 个组动物,均采用改良 hulth 法构建兔膝骨关节炎模型。速眠新Ⅱ 0.2 ml/kg 肌注麻醉,选取左侧后肢内侧,采用髌腱旁纵切口 1 ~ 2 cm 切开关节囊,向外侧推离髌骨造成脱位。依次进入兔膝关节,屈曲膝关节,直视下可见膝交叉韧带,用眼科剪剪断前后交叉韧带并切除内侧半月板,避免损伤关节面软骨。行前后抽屉实验证实交叉韧带完全切断, 生理盐水冲洗关节腔积血、积屑、逐层缝合伤口,无菌包扎固定。术后所有动物每天驱赶 30 min。

1.4 给药方法

根据临床有效剂量,运用 Meeh-Rubner 公式计算出兔的等效剂量, 复元胶囊低剂量组的中药灌胃剂量为 0.727 g/(kg·d),中剂量组为 1.453 g/(kg·d),高剂量组为 4.795 g/(kg·d)(分别为等效剂量的 1/2 倍、1 倍、3.3 倍)。造模后 1 周开始给药,分别将不同剂量的复元胶囊粉末溶解于蒸馏水中,灌胃给药,模型组每天灌予 10 ml 生理盐水,正常组不给予任何药物。每组均连续灌胃 4 ~ 12 周,每天给药 1 次。分别于给药后第 4、8 周和 12 周 3 个时间点处死动物,获取滑膜。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 光镜 切取滑膜标本,4%多聚甲醛固定,脱钙,石蜡包埋,5 μm 连续切片。HE 染色:石蜡切片依次置于二甲苯Ⅰ液和Ⅱ液、95%乙醇Ⅰ液和Ⅱ液、80%乙醇及蒸馏水, 再分别置于苏木素染液、伊红染液,盐酸乙醇分化,冲洗,调色脱水,透明,树胶封片。

1.5.2 透射电镜 2.5%戊二醛液固定,0.1 mol/L PBS 漂洗两次,1%锇酸后固定 2 h,丙酮梯度脱水,浸透,包埋,固化,半薄切片定位,超薄切片,铀染,铅染,日立 H-7500 电子显微镜观察,照相。

1.5.3 免疫组化分析 常规脱腊至水,枸橼酸缓冲液修复抗原,先后加入 3% H_2O_2 消除内源性过氧化物酶活性、正常山羊血清封闭孵育, 依次滴加 IL-1、MMP-13 和 iNOS 一抗,生物素化二抗工作液, 辣根酶标记链霉卵白素工作液,DAB 显色,苏木素复染,脱水,透明,封片。用 PBS 代替第一抗体做阴性对照。

1.6 判断标准

1.6.1 HE 染色评分 各组滑膜组织的光镜表现, 分别按以下 4 项标准来进行 4 级评分,每项进行评分并将每组各项评分累积,如表 1。

1.6.2 免疫组织化学染色分析 形态计量法: 参考 Pelletier 等[1]每张滑膜切片选取 5 个高倍视野(400 倍),计算每个高倍视野里的阳性细胞数和细胞总数,IL-1β、MMP-13、iNOS 的表达量均用阳性细胞数占细胞总数的百分比来表示。计数由 2 个独立观察者实施,取均数为最后得分。形态分析法:送重庆医科大学组织胚胎学教研室,每张切片选取 5 个高倍视野,采用 OlympusBX41 照相显微镜和 GD-8 型病理影像多媒体图文操作系统 (成都金盘电子科大多媒体技术有限公司)进行分析,计算出光密度值(AIOD)。

1.7 统计分析

HE 染色评分用秩和检验,IL-1β、MMP-13、iNOS 的免疫组化染色的阳性细胞率和 AIOD 值均用重复测定的方差分析,在 SASS9.13 版本统计软件上完成。

2 结 果

2.1 光镜下观察

正常组:衬里层由 1 ~ 2 层滑膜细胞组成,较为疏松,不呈连续性,衬里下层有许多脂肪细胞。 模型对照组:滑膜衬里层明显增厚,细胞层数多≥3 层,部分区域的滑膜衬里层细胞达 5 ~ 7 层,伴明显乳头样增生,衬里下层大量炎细胞弥漫浸润,以淋巴细胞为主,脂肪细胞消失,大量纤维组织广泛增生,血管明显增生。 复元胶囊低剂量组:滑膜衬里层少量轻度增厚,衬里下层有较多炎细胞浸润,以淋巴细胞为主,脂肪细胞基本消失,少量纤维组织增生,并有明显血管增生。复元胶囊中剂量组和高剂量组表现相似:滑膜衬里层厚度基本正常,多为 1 ~ 3 层,个别区域有少量轻度增厚,衬里下层有稀疏散在炎细胞浸润和纤维组织增生,仍有较多的血管增生。各组光镜下表现见图 1。对各组滑膜组织的病理改变,分别从以下 4 个指标进行评分和统计学检验, 结果如表 2 所示。

2.2 电镜下观察

正常组滑膜：细胞形态正常，细胞核完整，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，细胞间质中胶原纤维较少。模型对照组滑膜：滑膜细胞数量增多，以 B 型滑膜细胞为主，大约占 80%以上。B 型滑膜细胞中可见丰富发达的粗面内质网，网腔轻度扩张，有些网池显著膨胀，溶酶体、空泡和线粒体较多，高尔基体不多。滑膜细胞处于含有丰富胶原纤维的基质中，胶原纤维明显增加。复元胶囊中剂量组和高剂量组：滑膜细胞增多仍以 B 型滑膜细胞为主。B 型滑膜细胞中粗面内质网仍增多，网腔略有扩张，溶酶体、空泡和线粒体数量均有所减少，未见高尔基体。

2.3 各组滑膜 IL-1β 的表达

正常组未见明显 IL-1β 的阳性表达，在部分区域可见零星散在的阳性表达。模型组滑膜的衬里细胞层、衬里下层的和血管内皮细胞均可见明显的 IL-1β 的表达，为强阳性，着色深，呈棕褐色。复元胶囊低剂量组滑膜衬里细胞层可见较多的 IL-1β 表达，为阳性，着色较深，呈棕黄色。复元胶囊中剂量组和复元胶囊高剂量组表现相似，可见衬里细胞层较少的 IL-1β 表达，为弱阳性，着色较浅，呈黄色（图 2）。

各组滑膜 IL-1β 表达的阳性细胞率及光密度值比较，结果如表 3、4 所示。

（1）组间同期比较

阳性细胞率：复元胶囊高、中剂量组与模型组分别在第 4、8 周和 12 周进行比较，均有非常显著差异（$P<0.01$）；与正常组在第 4、8 周和 12 周比较，均有显著差异（$P<0.05$）。低剂量组与模型组在第 8 周和 12 周比较有显著差异（$P<0.05$），而第 4 周比较没有显著性差异（$P>0.05$）。低、中、高 3 个剂量组在第 4、8 周和 12 周两两比较，均有显著差异（$P<0.05$）。

光密度值：与阳性细胞率基本相同，但低剂量组与模型组在第 4 周比较也有显著差异（$P<0.05$），中、高剂量组在第 12 周比较，没有显著性差异（$P>0.05$）。

（2）组内前后比较

阳性细胞率和光密度值两种方法比较结果相同：正常组在 3 个时间段进行组内前后比较，没有显著性差异（$P>0.05$）。低、中、高 3 个剂量组和模型组在 3 个时间段进行组内前后比较，均有显著差异（$P<0.05$）。

2.4 各组滑膜 MMP-13 的表达

MMP-13 表达情况和 IL-1β 相似，见图 3。

MMP-13 表达的阳性细胞率及光密度值比较，结果如表 5、6 所示。

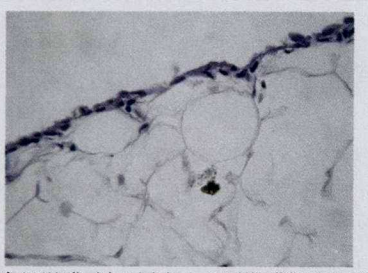
（1）组间同期比较

阳性细胞率：复元胶囊高、中剂量组与模型组分别在第 4、8 周和 12 周比较，均有非常显著差异（$P<0.01$）；与正常组在第 4、8 周和 12 周比较，均有显著差异（$P<0.05$）。低剂量组和正常组分别与模型组在第 4、第 8 周和 12 周比较均有显著差异（$P<0.05$）。低、中、高 3 个剂量组在第 4、8 周和 12 周两两比较，均有显著差异（$P<0.05$）。

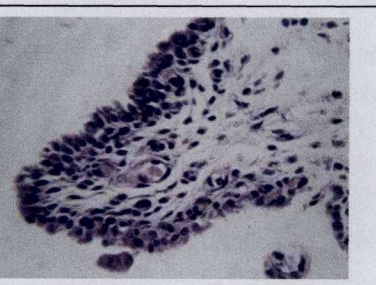
光密度值：与阳性细胞率结果相同。

表 1 各组滑膜 HE 染色评分的 4 项标准

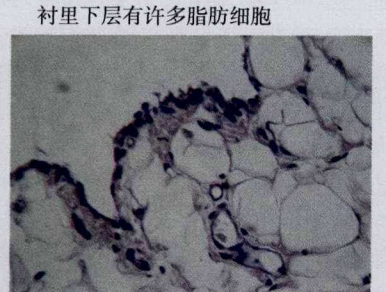
	炎细胞浸润	纤维组织增生	滑膜细胞增生（层数）	血管增生
0 分	无浸润	无增生	无增生（1～2 层）	无增生
1 分	稀疏散在	少量增生	少量增生（3～4 层）	少量增生
2 分	较密集	中等增生	中等增生（5～7 层）	中等增生
3 分	大量弥漫	大量增生	大量增生（≥8 层）	大量增生



正常组滑膜：衬里层由 1~2 层滑膜细胞组成，衬里下层有许多脂肪细胞



模型组滑膜：衬里层明显增厚，细胞层数多≥3 层，衬里下层有大量炎细胞弥漫浸润，以淋巴细胞为主，脂肪细胞消失

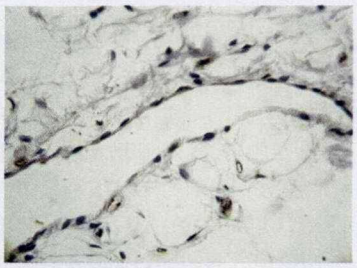


复元胶囊中剂量组：衬里层多为 1~3 层，衬里下层有稀疏散在炎细胞浸润和纤维组织增生，仍有较多的血管增生



复元胶囊高剂量组：与中剂量组表现相似

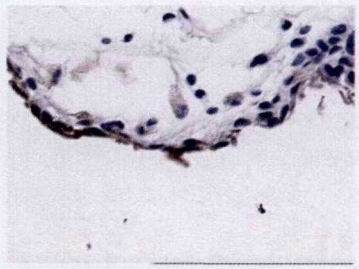
图 1 各组滑膜光镜下表现（HE×400）



正常组：滑膜细胞未见明显 IL-1β 的阳性表达（×100）

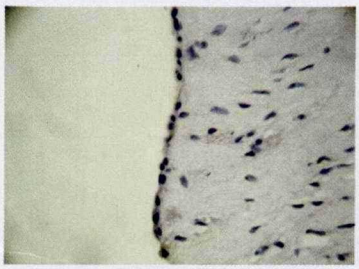


模型组：滑膜细胞可见明显的 IL-1β 的表达（×400）



复元胶囊高剂量组：滑膜细胞可见较少的 IL-1β 表达（×400）

图 2　各组滑膜 IL-1β SP 染色

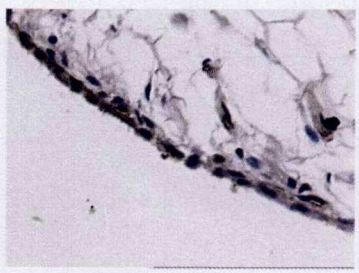


正常组（×100）



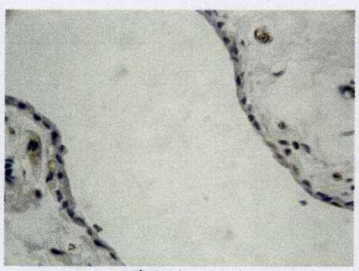
模型组（×400）

各组表现和 IL-1β 相似

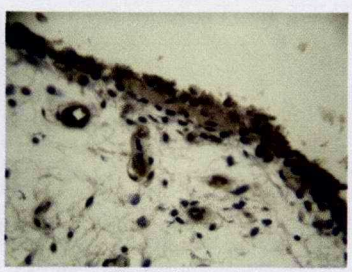


复元胶囊中剂量组（×400）

图 3　各组滑膜 MMP-13 SP 染色



正常组（×100）



模型组（×400）

各组表现和 IL-1β 相似



复元胶囊高剂量组（×400）

图 4　各组滑膜 iNOS SP 染色

表 2　各组滑膜的 4 项组织形态学评分

组别	例数	炎细胞浸润				纤维组织增生				滑膜细胞增生				血管增生			
		0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
模型对照组	12	0	0	5	7	0	0	0	12	0	0	7	5	12	0	0	0
正常组	12	10	2	0	0	12	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0
复元胶囊低剂量组	12	0	7	4	1	0	0	3	9	0	7	5	0	0	0	6	6
复元胶囊中剂量组	12	3	8	1	0	5	6	1	0	5	7	0	0	2	6	4	0
复元胶囊高剂量组	12	3	6	3	0	3	6	3	0	4	5	3	0	1	5	6	0

正常组、复元胶囊低、中、高 3 个剂量组 4 项标准的评分均显著低于模型组（$P<0.01$）；复元胶囊低、中、高 3 个剂量组评分高于正常组（$P<0.05$）

表 3　复元胶囊对兔骨关节炎滑膜 IL-1β 表达的影响（阳性细胞率，%，$\bar{x}\pm s$）

组别	4 周	8 周	12 周
模型组	86.90 ± 4.54	90.40 ± 7.69	91.50 ± 2.48
复元胶囊低剂量组	86.95 ± 7.34	78.70 ± 7.43*	69.55 ± 7.95*
复元胶囊中剂量组	60.30 ± 9.69**	60.10 ± 11.76**	55.90 ± 8.79**
复元胶囊高剂量组	52.86 ± 6.64**	47.36 ± 12.67**	28.71 ± 9.16**
正常组	5.61 ± 1.41*	5.82 ± 1.21*	6.02 ± 1.17*

与同期模型组比较 *$P<0.05$，**$P<0.01$

(2)组内前后比较

阳性细胞率和光密度值两种方法比较结果相同,情况和 IL-1β 相似。

2.5 各组滑膜 iNOS 的表达

iNOS 的表达情况和 MMP-13、IL-1β 相似,见图 4。

各 iNOS 表达的阳性细胞率及光密度值比较,结果如表 7、8 所示。

(1)阳性细胞率和光密度值的组间同期比较结果和 MMP-13 的统计结果相同。

(2)阳性细胞率和光密度值的组内前后比较结果和 MMP-13 的统计结果相同。

3 讨 论

近年来 OA 的炎症表现已引发了广泛关注。OA 中滑膜的病理特点是无菌性慢性滑膜炎,其病理改变包括衬里细胞的增生、淋巴细胞的浸润及血管周围的淋巴细胞聚集。作为最经典的炎性细胞因子,IL-1 在 OA 的发病过程中起着关键作用。IL-1 对 OA 的影响是多方面的。IL-1 可强烈抑制软骨细胞表型的分化,诱导其凋亡,抑制其增殖[2];可引起软骨基质降解,促进软骨变性[3];还可产生强大的促炎作用,引起滑膜炎症,造成关节软骨生存的恶劣微环境,对软骨及滑膜正

表 4 复元胶囊对兔骨关节炎滑膜 IL-1β 表达的影响 (光密度值,$\bar{x} \pm s$)

组别	IL-1β 的光密度值($\times 10^{-2}$)		
	4 周	8 周	12 周
模型组	5.78 ± 0.50	6.78 ± 0.63	7.58 ± 0.75
复元胶囊低剂量组	6.32 ± 0.12*	5.56 ± 0.16*	3.25 ± 0.19*
复元胶囊中剂量组	3.31 ± 0.11**	2.49 ± 0.08**	1.89 ± 0.05**
复元胶囊高剂量组	3.53 ± 0.10**	2.77 ± 0.08**	1.71 ± 0.05**
正常组	0.16 ± 0.05*	0.17 ± 0.04*	0.20 ± 0.02*

与同期模型组比较 $^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$

表 5 复元胶囊对兔骨关节炎滑膜 MMP-13 表达的影响 (阳性细胞率,$\bar{x} \pm s$)

组别	MMP-13 的阳性细胞率(%)		
	4 周	8 周	12 周
模型组	87.90 ± 3.78	88.50 ± 1.90	91.40 ± 3.37
复元胶囊低剂量组	77.75 ± 4.65*	78.00 ± 4.72*	59.88 ± 16.07*
复元胶囊中剂量组	63.25 ± 6.58**	58.69 ± 8.57**	47.63 ± 5.25**
复元胶囊高剂量组	47.50 ± 8.82**	46.50 ± 5.90**	23.13 ± 8.62**
正常组	5.53 ± 1.61*	5.58 ± 1.51*	6.05 ± 1.01*

与同期模型组比较 $^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$

表 6 复元胶囊对兔骨关节炎滑膜 MMP-13 表达的影响 (光密度值,$\bar{x} \pm s$)

组别	MMP-13 的光密度值($\times 10^{-2}$)		
	4 周	8 周	12 周
模型组	4.89 ± 0.21	5.11 ± 0.23	6.32 ± 0.45
复元胶囊低剂量组	4.65 ± 0.12*	4.43 ± 0.11*	3.66 ± 0.08*
复元胶囊中剂量组	4.20 ± 0.16**	3.32 ± 0.10**	1.75 ± 0.05**
复元胶囊高剂量组	4.02 ± 0.14**	3.32 ± 0.09**	2.35 ± 0.08**
正常组	0.65 ± 0.04*	0.58 ± 0.13*	0.47 ± 0.19

与同期模型组比较 $^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$

表 7 复元胶囊对兔骨关节炎滑膜 iNOS 表达的影响 (阳性细胞率,$\bar{x} \pm s$)

组别	iNOS 的阳性细胞率(%)		
	4 周	8 周	12 周
模型组	89.40 ± 3.06	86.50 ± 5.32	90.90 ± 2.64
复元胶囊低剂量组	80.64 ± 7.21*	79.27 ± 6.65*	73.36 ± 3.61*
复元胶囊中剂量组	63.25 ± 6.58**	58.69 ± 8.57**	56.17 ± 8.18**
复元胶囊高剂量组	54.92 ± 6.29**	44.50 ± 7.65**	34.58 ± 8.49**
正常组	5.71 ± 1.24*	5.93 ± 0.67*	6.12 ± 0.93*

与同期模型组比较 $^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$

表 8 复元胶囊对兔骨关节炎滑膜 iNOS 表达的影响 (光密度值 $\bar{x}\pm s$)

组别	iNOS 的光密度值($\times 10^{-2}$)		
	4 周	8 周	12 周
模型组	4.79 ± 0.42	6.10 ± 0.48	7.11 ± 0.56
复元胶囊低剂量组	5.87 ± 0.17*	4.54 ± 0.13*	2.87 ± 0.11*
复元胶囊中剂量组	3.90 ± 0.12**	2.77 ± 0.09**	2.43 ± 0.07**
复元胶囊高剂量组	2.68 ± 0.06**	2.22 ± 0.04**	1.72 ± 0.03**
正常组	0.81 ± 0.15*	0.70 ± 0.25*	0.94 ± 0.05*

与同期模型组比较 $^*P<0.05$，$^{**}P<0.01$

常的修复和代谢功能产生影响，促进 OA 的进展。OA 发生时，在 IL-1 等细胞因子的作用下，主要在诱导型一氧化氮合酶(iNOS)作用下大量合成 NO，可加速软骨基质的降解，抑制软骨基质合成，导致软骨细胞和滑膜组织损伤，诱导软骨细胞凋亡[4]；同时 NO 作为 IL-1 的下游产物，还可减少 IL-1 受体拮抗剂的合成，促进 IL-1 介导的软骨降解作用。基质金属蛋白酶(MMPs)家族构成了细胞外基质降解最重要的蛋白水解系统，能够降解关节组织细胞外基质的所有成分，其中 MMP-13 对构成软骨的Ⅱ型胶原具有最为活跃的降解活性能力。研究证实各种炎症性因子，如 IL-1、NO 等可增加基质金属蛋白酶如 MMP-13 等的活性，从而造成关节软骨的损伤[5]。因此 IL-1、MMP-13 和 iNOS 之间的关系非常密切，且三者的协同效应在 OA 的发病机制中起着非常重要的作用。

中医学认为 OA 属“骨痹”、“痹证”等范畴，主要与年老体衰，长期劳损，外感风寒湿邪有关。《素问·上古天真论》曰：“七八肝气衰，筋不能动……肾脏衰惫，形体皆极”。《素问·宣明五气篇》：“五劳所伤，……久立伤骨，久行伤筋”。《素问·痹论篇》：“风寒湿三气杂至，合而为痹也”。中年以后，肝肾亏虚，肾虚不能主骨，肝虚无以养筋，筋骨失养，风寒湿乘虚而入；而长期劳损或外伤可直接损伤筋骨，血瘀气滞不通，经脉痹阻，不通则痛，均可形成本病。总之，OA 属本虚标实之证，肝肾亏虚是其本，继发性损伤或风寒湿外侵是其标。故治疗应着眼治本，兼治其标，治疗法则多以补益肝肾、强筋壮骨为主，辅以活血化瘀通络，祛风除湿散寒。本研究使用的复元胶囊中采用淫羊藿、鹿茸、续断、枸杞子等补益肝肾，配以黄芪、生晒参、丹参、川芎等益气活血化瘀，既遵循补益肝肾的传统治则，又着重加强了其益气活血作用，全方标本兼治，在临床长期使用，疗效卓著。现代研究涉及相关中药和观察指标的报道很多，如中药柔肝方、益肾方能下调 NOS 和 IL-1 的表达，有降低 OA 中期 NO 趋势，并抑制血清中透明质酸的含量[6]。纯补肾药能减少兔膝 OA 软骨的破坏，有效防治 OA[7]。

我们的实验发现：①通过评分比较，光镜下模型组明显表现为较严重的 OA 慢性滑膜炎，而复元胶囊 3 个剂量组，特别是中、高剂量组的滑膜炎表现比较轻微，而 3 个治疗组之间也存在差异。②各组 IL-1β、MMP-13 和 iNOS 的表达趋势相似，即模型组这 3 个指标的表达显著高于正常组和 3 个治疗组，这与模型组的组织形态学改变相一致，而 3 个治疗组之间这 3 个指标的表达也存在显著差异。这说明复元胶囊治疗实验性 OA 的剂量和最终疗效可能存在正相关性，即其治疗剂量越大，对实验性 OA 的治疗效果越好。③随着实验进程，这 3 个指标在模型组的表达均逐渐增高，而在低、中、高剂量组逐渐降低，差异有显著性。说明复元胶囊治疗实验性 OA 的疗程和最终疗效也可能存在正相关性，即其治疗疗程越长，对实验性 OA 的治疗效果越好。④模型组滑膜病变的组织形态没有随着实验进程进一步加重，但其表达的 IL-1β、MMP-13 和 iNOS 却随病程进展逐渐升高，二者并不一致，说明 OA 滑膜炎症程度可能不仅仅只与细胞因子相关。⑤从治疗组的表现来看，复元胶囊既明显改善滑膜的组织病理改变，又显著降低滑膜的 IL-1β、MMP-13 和 iNOS 的表达，充分证实具有补益肝肾、益气活血作用的复元胶囊对于实验性 OA 的良好治疗效果，其中尤以中、高剂量组的治疗效果最为显著。结果显示复元胶囊治疗实验性 OA，用药剂量越大，时间越长，效果越好，由此推测补肾健骨、益气活血类中药治疗 OA 可能应考虑增加药量、延长用药时间更佳。⑥各治疗组滑膜在第 4 周病理改变已减轻，且并未随实验进程而加重，这表明此类中药治疗实验性 OA 似乎并不存在起效缓慢的问题，可以起到治疗早期实验性 OA，有效控制和防治 OA 进展的作用。

参 考 文 献

[1] Pelletier J P, Lascau-Coman V, Jovanovic D, et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental osteoarthritis is associated with reduction in tissue levels of catalbolic factors[J]. J Rheumatol, 1999, 26(23): 2002-2014.

[2] Heraud F, Heraud A, Harmand M F. Apoptosis in normal and osteoarthritis human articular cantilage[J]. Ann Rheum Dis, 2000, 59(56): 959-965.

[3] Hwang S G, Yu S S, Poo H, et al. c-Jun/activator protein-1 mediates interleukin-1 beta-induced dedifferentiation but not cyclooxygenase-2 expression in articular chondrocytes[J]. J Biol Chem, 2005, 280(33): 29780-29787.

[4] Blanco F J, Galdo F, de Toro F J, et al. Oteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. a possible pathway for osteoarthritis pathology[J]. Arthritis Rheum, 1998, 41(38): 284-289.

[5] Freemont A J, Byers R J, Taiwo Y O, et al. Resurfacing of articular cartilage by genetically-modifiled human chondrocytes in vitro [J]. Ann Rheum Dis, 1999, 58(23): 673-682.

[6] 汪青春，石印玉，沈培芝. 中药对膝骨关节炎小鼠关节软骨 IL-1、iNOS 基因表达的影响[J]. 山西医药杂志，1998，28(5)：381.

[7] 高文香，刘元禄，李永生. 补肾法防治兔膝关节骨性关节炎病理形态学观察[J]. 中医正骨，1999，11(12)：13.

(责任编辑：关蕴良)