骨科学 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001132

体外冲击波配合穿蛭膏对家兔膝骨关节炎 IL-1β 及 TNF-α 表达的影响分析

邓 尧

（胜利油田中心医院风湿免疫科，东营 257000）

【摘 要】**目的**：探讨体外冲击波（extracorporeal shock wave，ESW）配合穿蛭膏对家兔膝骨关节炎白细胞介素-1β（interleukin-1β，IL-1β）及肿瘤坏死因子-α（tumour necrosis factor-α，TNF-α）表达的影响。**方法**：将 48 只健康新西兰大白兔随机分为对照组、模型组、穿蛭膏治疗组（研究组 A）、ESW+穿蛭膏治疗组（研究组 B），每组各 12 只。除对照组外的大白兔采用 Hulth 法制备骨关节炎模型。研究组 A 在造模后立即给予穿蛭膏外敷，3 次/d；研究组 B 在造模后立即给予 ESW 配合穿蛭膏外敷于膝关节治疗，ESW 治疗的能流密度为 0.1 mJ/mm²，冲击次数为 1 000 次，穿蛭膏外敷 3 次/d。对照组不做任何处理。处理 1 个月后，将 4 组大白兔处死。观察关节软骨大体标本形态学变化，并采用免疫组织化学法和 ELISA 法检测 4 组大白兔关节软骨以及关节液中 IL-1β 和 TNF-α 的水平。**结果**：模型组、研究组 A 和研究组 B 家兔关节软骨及关节液内的 IL-1β 和 TNF-α 水平均较对照组上升（$P<0.05$），研究组 B 的水平较研究组 A 和模型组均下降（$P<0.05$）。**结论**：ESW 配合穿蛭膏能降低家兔 OA 中 IL-1β、TNF-α 的表达。

【关键词】膝骨关节炎；体外冲击波；穿蛭膏；白细胞介素-1β；肿瘤坏死因子-α

【中图分类号】R593 【文献标志码】A 【收稿日期】2016-01-07

Effect of extracorporeal shock wave with Chuan-zhi Plaster on expression of interleukin-1β and tumor necrosisfactor-α in cartilage in rabbits with knee osteoarthritis

Deng Yao

(*Department of Rheumatology, Center Hospital of Shengli Oilfield*)

【Abstract】***Objective***: To explore the effect of extracoporeal shock wave(ESW) with Chuan-zhi plaster on expression of interleukin-1β (IL-1β) and tumor necrosis factor-α(TNF-α) in cartilage in rabbits with knee osteoarthritis. ***Methods***: Totally 48 rabbits were randomly divided into control group, model group, treatment A group and treatment B group, with 12 rabbits in each group. Model of knee osteoarthritis was established in model group, treatment A group and treatment B group with Hulth method. Rabbits in treatment A group was treated with Chuan-zhi plaster, those in treatment B group was treated with ESW(each 1 000 impulse, the energy flux density of 0.1 mJ/mm²) and Chuan-zhi plaster. The rabbits were sacrificed respectively at 4 weeks after ESWT. The articular genurinse solutions were collected from rats; the expressions of IL-1β and TNF-α in synovia were detected by ELISA, and immunohistochemical staining was used to observe the expression characteristics of IL-1β and TNF-α in cartilage of each group; differences were compared among the groups. ***Results***: The expressions of IL-1β and TNF-α were significantly lower in treatment B group than in the model group and treatment A group($P<0.01$). ***Conclusion***: ESW with Chuan-zhi plaster can down-regulate the expression of IL-1β and TNF-α in chondrocytes with osteoarthritis.

【Key words】 osteoarthritis; extracoporeal shock wave; Chuan-zhi plaster; interleukin-1β; tumor necrosis factor-α

作者介绍：邓 尧，Email：dyao222@163.com，

研究方向：类风湿关节炎、系统性红斑狼疮及血管炎等免疫系统疾病。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170103.1610.016.html

（2017-01-03）

骨关节炎(osteoarthritis,OA)是一种好发于中老年人的关节软骨退行性病变,发病原因尚不明确,可能是体内细胞因子失衡所引起的关节软骨分解增加,导致关节软骨破坏,关节畸形,引发患者的运动功能障碍[1]。现已发现参与 OA 患者软骨细胞代谢的细胞因子有白细胞介素-1β(interleukin-1β,IL-1β)和肿瘤坏死因子-α(tumour necrosis factor-α,TNF-α),并且 IL-1β 和TNF-α 是导致软骨细胞降解的始动因子。因此,如何改善关节软骨内 IL-1β 和 TNF-α 的水平是治疗的重点。目前针对 OA 的治疗尚无统一标准,可根据患者的严重程度分级选取不同的治疗方法。对于轻度患者,可予以口服非甾体类抗炎药予以处理;对于重症患者,可考虑手术治疗。体外冲击波(extracorporeal shock wave,ESW)近年来广泛用于运动障碍患者的康复治疗中,它通过改变患处的化学环境而促进抑制疼痛化学物质的释放以及疼痛信号的传递,从而改善患者的症状[2]。OA 在中医辨证论治中属于"瘧症",可予以穿蛭膏外敷。穿蛭膏是由数十类药剂组成的中草药,具有活血化瘀的功效。本研究采用 ESW 联合穿蛭膏作用于家兔膝骨关节炎,探讨中西医结合疗法对家兔关节软骨以及关节液中 IL-1β 和 TNF-α 表达的影响,从而为临床治疗提供参考意见。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康清洁级新西兰大白兔 48 只,由武汉市万千佳兴生物科技有限公司提供,平均体质量为(254.38 ± 43.50) g,平均鼠龄为(11.32 ± 2.49)周。雌雄各半,雌无孕。家兔分笼喂养,正常光照,饮用水为自来水,饮食饲料为标准饲料,饲养房温度 20~25 ℃,湿度 40%~60%。将其随机分为对照组、模型组、穿蛭膏治疗组(研究组 A)、ESW+穿蛭膏治疗组(研究组 B),每组各 12 只。模型组、研究组 A 和研究组 B 制成 OA 模型后,研究组 A 予以穿蛭膏治疗,研究组 B 予以 ESW 联合穿蛭膏治疗,对照组不做任何处理。

1.2 药物与试剂

穿蛭膏由乳香、水蛭、徐长卿、阿魏、三七、没药、甲珠等十余味中草药组成,由吉林医药学院提供;家兔 IL-1β 和 TNF-α ELISA 试剂盒[产品货号:BA2728,EK0393 和BA0131,EK0526,产地:进口分装,厂商:里苏(上海)生物技术有限公司];切片机(型号:RM2245,厂家:Leica);显微镜(型号:BX51123,厂家:OLYMPUS);染色机(型号:Tissue Tek DRS 2000,厂家:SAKURA);ESW(瑞士 DolorClast 型);免疫组化试剂盒由上海经科化学科技有限公司提供;HE 染色试剂由北京蓝博斯特生物技术有限公司提供;ELISA 试剂盒由上海恒远生物公司提供。

1.3 制备 OA 模型

模型组、研究组 A 和研究组 B 的家兔采用 Hulth 法制备新西兰大白兔 OA 模型[3],用 25%的氨基甲酸乙酯 4 mL/kg 经耳缘静脉麻醉家兔后,于仰卧位固定,去除家兔左侧膝关节周围皮毛,常规消毒后,于左膝关节内侧面作一长 5 cm 的纵切口,逐层分离皮肤及软组织肌肉,直至显露膝关节附属韧带,切断韧带并将左侧半月板完全剥离,操作中注意保护关节软骨,用生理盐水反复冲洗伤口直至冲洗液清亮,逐层缝合,无菌敷料包扎。术后连续 7 d 给予 20 万单位青霉素肌注。按照 OA 的起病特点,于术后 1 周进行强迫家兔活动,每天 2 次,每次持续 20 min,连续进行 4 周后,制模完毕。对照组家兔不制模,与其他 3 组在同一条件下喂养,并与其他 3 组进行一样的活动。

1.4 治疗方法

对照组和模型组家兔不予以处理,研究组 A 家兔在造模后立即给予穿蛭膏外敷,3 次/d;研究组 B 家兔在造模后立即给予 ESW 配合穿蛭膏治疗,ESW 治疗 1 次的能流密度为 0.1 mJ/mm²(2.1 bar,8 Hz),冲击次数为 1 000 次,每天 1 次,穿蛭膏外敷,3 次/d。2 种方法协同处理 1 个月。

1.5 关节取材

治疗 1 个月后采用空气栓塞法处死家兔。仰卧位固定,暴露左侧膝关节关节腔,用 1 mL 无菌蒸馏水冲洗关节腔,收集关节腔液 0.5 mL。采用 ELISA 法检测关节腔液中的 IL-1β 和 TNF-α 水平。而后对家兔关节软骨面进行大体观察,取股骨内髁关节软骨,4%多聚甲醛及 70%乙醇固定 24 h,再用 10% EDTA 脱钙 10 d。石蜡包埋切片,切片厚度 5 μm。经 HE 染色后,采用免疫组化法检测关节软骨内的 IL-1β 和 TNF-α 水平。

1.6 观察指标

1.6.1 关节软骨的形态学指标 观察关节腔内关节软骨面的大体情况;观察关节软骨 HE 染色的形态学并根据 Makin 标准[4]评分:显微镜下观察关节软骨组织切片,观察细胞分裂增生情况,正常记 0 分,轻度增生记 1 分,中度增生记 2 分,重度增生记 3 分;观察细胞排列,正常排列记 0 分,稍乱记 1 分,不规则排列记 2 分,严重紊乱记 3 分。

1.6.2 关节腔液内 IL-1β 和 TNF-α 的测定 根据 ELISA 试剂盒的说明书操作。加入标准品和待测样品关节液,37 ℃反应 90 min,加入 IL-1β 和 TNF-α 抗体,37 ℃反应 60 min,加 ABC 工作液,反应 30 min,TMB 显色液 37 ℃避光反应 20 min,加入 TMB 终止液,计算浓度。

1.6.3 免疫组织化学染色 组织切片经二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,双氧水灭活内源性过氧化物酶,滴加正常山羊封闭血清,经过一抗、二抗孵育,滴加 SABC,DAB 显色,苏木素复染色,60 ℃烤箱烤干脱水。每个切片在显微镜下观察,选取 3 个软骨表层和中上层的视野(400×)以及 3 个软骨中下层和下层的视野(400×)[5]。计算每个视野的阳性细胞率,即阳性细胞数占总细胞数的百分比。阳性细胞是指:细胞浆染色中发现棕黄色颗粒沉着,可以代表 IL-1β 和 TNF-α 的表达程度。

1.7 统计学分析

处理本次研究中数据所用的统计学分析选用 SPSS 15.0 软件,计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,先采用单因素

方差分析，多组间的两两比较采用 SNR-q 检验，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 3 组家兔建模情况

在建模成功后处死家兔，采用病理学大体观察评判建模是否成功，具体评分标准[6]如下：0 分，关节面光整，色泽如常；1 分，关节面粗糙，暗淡发黄；2 分，关节面糜烂，软骨缺损深达软骨浅中层；3 分，关节面溃疡形成，缺损深达软骨深层；4 分，软骨剥脱，软骨下骨质暴露。模型组家兔的评分为(3.12 ± 0.21)分；研究组 A 家兔的评分为(3.24 ± 0.15)分；研究组 B 家兔的评分为(3.08 ± 0.24)分。3 组家兔均成功造模。

2.2 关节腔内关节软骨面的大体情况

经过治疗后，打开家兔的关节腔后肉眼观察到各组家兔的关节软骨面情况均不同，对照组基本与正常一样，而模型组其关节面暗淡发黄，可见明显缺损以及大量骨赘形成，关节滑膜充血，粘连，这是典型的 OA 的表现。研究组 A 的关节破坏程度要小于模型组，研究组 B 的破坏程度最小，其表现为关节面发白，可见轻度缺损及少量骨赘形成，少许关节软骨呈丝绒状增生。

2.3 HE 染色结果

对照组基本与正常细胞一致，模型组与对照组相比，其软骨细胞数目明显减少，排列较为紊乱，失去原有的排列，而研究组 A 和研究组 B 的结果要优于模型组，表现为软骨细胞数目少许减少，部分排列整齐，并且研究组 B 的结果要优于研究组 A。

2.4 关节软骨组织 Markin 评分

模型组、研究组 A 和研究组 B 家兔的 Markin 评分均明显高于对照组(P<0.01)，研究组 B 的 Markin 评分明显低于研究组 A 和模型组(P<0.01)，见表 1。

表 1 软骨组织 Markin 评分（n=12，$\bar{x} \pm s$）

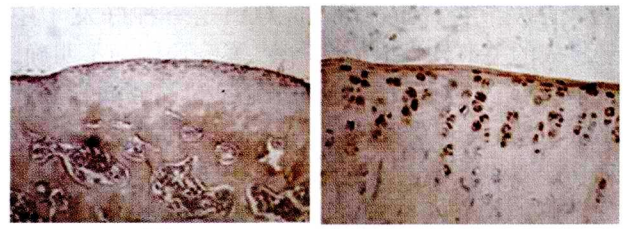
Tab.1 Markin score of cartilage（n=12，$\bar{x} \pm s$）

组别	Markin评分（分）
对照组	1.36 ± 0.58
模型组	10.65 ± 2.06[a]
研究组 A	7.84 ± 1.41[b]
研究组 B	5.32 ± 1.16[c]
F值	17.420
P值	0.010

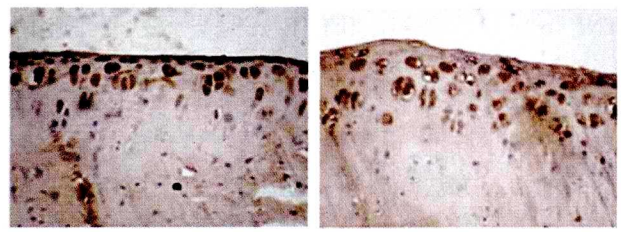
注：a，与对照组比较，q=15.04，P<0.01；b：与模型组比较，q=3.90，P<0.05；c：与研究组 A 比较，q=4.78，P<0.01

2.5 关节软骨内 IL-1β、TNF-α 的水平

为了检测对照组、模型组和研究组 A 和研究组 B 家兔关节软骨细胞内 IL-1β(图 1)、TNF-α(图 2)的表达，采用了免疫组化染色。模型组、研究组 A 和研究组 B 家兔关节软骨内的 IL-1β 和 TNF-α 的水平均较对照组上升(P<0.01)。研究组 B 的水平较模型组和研究组 A 下降(P<0.01)，见表 2。



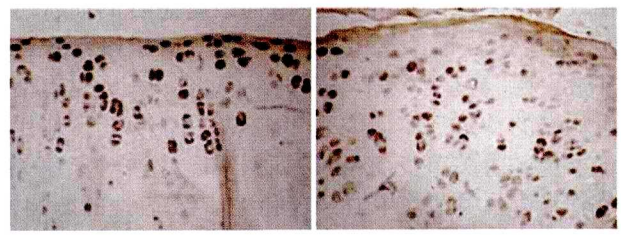
A. 对照组　　B. 研究组 B



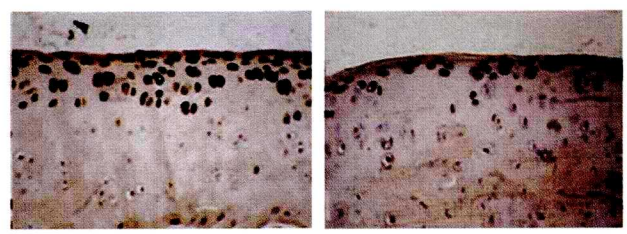
C. 模型组　　D. 研究组 A

图 1 免疫组化检测软骨细胞中 TNF-α 蛋白的表达

Fig.1 Expression of TNF-α protein in chondrocytes



A. 对照组　　B. 研究组 B



C. 模型组　　D. 研究组 A

图 2 免疫组化检测软骨细胞中 TNF-α 蛋白的表达

Fig.2 Expression of TNF-α protein in chondrocytes

表 2 关节软骨内 IL-1β、TNF-α 水平（n=12，$\bar{x} \pm s$，ng/L）

Tab.2 Level of IL-1β and TNF-α in the articular cartilage（n=12，$\bar{x} \pm s$，ng/L）

组别	IL-1β	TNF-α
对照组	4.7 ± 0.6	1.53 ± 0.19
模型组	15.8 ± 2.3[a]	41.87 ± 3.26[a]
研究组 A	9.8 ± 1.2[b]	19.25 ± 2.68[b]
研究组 B	7.4 ± 0.9[c]	14.28 ± 1.57[c]
F值	13.500	11.600
P值	0.100	0.100

注：IL-1β 的水平对比：a，与对照组比较，q=16.18，P<0.01；b：与模型组比较，q=8.01，P<0.01；c：与研究组 A 比较，q=5.54，P<0.01；TNF-α 的水平对比：a，与对照组比较，q=42.79，P<0.01；b：与模型组比较，q=18.57，P<0.01；c：与研究组 A 比较，q=5.54，P<0.01

2.6 关节液中 IL-1β 和 TNF-α 的水平

模型组、研究组 A 和研究组 B 家兔膝关节液中 IL-1β 和 TNF-α 的水平较对照组上升（$P<0.01$）。研究组 B 的水平较模型组和研究组 A 下降（$P<0.01$），详见表 3。

表 3 关节液中 IL-1β 和 TNF-α 的含量比较（$n=12, \bar{x}\pm s$，ng/L）

Tab.3 Comparison of the content of IL-1 β and TNF-α in the synovial fluid（$n=12, \bar{x}\pm s$，ng/L）

组别	IL-1β	TNF-α
对照组	31.18 ± 5.36	24.78 ± 4.21
模型组	68.85 ± 11.25[a]	53.41 ± 7.82[a]
研究组 A	49.53 ± 9.43[b]	42.73 ± 5.41[b]
研究组 B	35.16 ± 8.55[c]	36.24 ± 4.28[c]
F 值	9.630	10.450
P 值	0.020	0.010

注：IL-1 β 的水平对比：a，与对照组比较，$q=10.47$，$P<0.01$；b：与模型组比较，$q=4.56$，$P<0.01$；c：与研究组 A 比较，$q=3.91$，$P<0.05$；TNF-α 的水平对比：a，与对照组比较，$q=11.17$，$P<0.01$；b：与模型组比较，$q=3.89$，$P<0.01$；c：与研究组 A 比较，$q=3.26$，$P<0.05$

3 讨 论

OA 的发病机制尚未明确，可能的原因是：正常软骨细胞在体内的代谢是处于不断分解与不断合成的一个平衡状态[7]，当由于某个原因导致这个平衡被打破，即软骨细胞的分解代谢大于其合成代谢，软骨细胞数目就会下降，而且结构功能被破坏，导致关节功能失调。有报道称，在 OA 发病过程中，IL-1β 和 TNF-α 是导致软骨细胞降解的始动因子[8]。IL-1β 在正常关节软骨组织中含量极少，但其在 OA 患者的关节组织中含量较高。IL-1β 可刺激基质金属蛋白酶（matrix metal proteinase，MMPs）的合成，从而抑制软骨细胞合成蛋白多糖，形成对软骨的破坏。不仅如此，IL-1β 还可刺激一氧化氮的产生以及降低Ⅱ型胶原酶的表达[9]。TNF-α 作用与 IL-1β 类似，也参与关节软骨的破坏。TNF-α 可刺激软骨降解酶的合成及分泌，抑制Ⅱ型胶原的合成。TNF-α 与 IL-1β 有协同作用，TNF-α 可诱导 IL-1β 的产生，IL-1β 又可提高 TNF-α 的表达[10]。因此，限制 OA 患者 IL-1β 和 TNF-α 的表达对于控制患者的症状，改善预后至关重要。本研究探讨了 ESW 配合穿蛭膏的治疗方法对于家兔 IL-1β 和 TNF-α 表达的影响。

ESW 近年来在骨关节修复疾病中应用广泛。ESW 通过空气传导的脉冲声转换为冲击波，分解患处的代谢产物，减轻炎症反应，阻断疼痛的传导通路。有报道称，ESW 作用于大鼠神经胶质细胞瘤 C6 以及作用于进行正畸牙大鼠牙槽骨时，可降低 IL-1β 和 TNF-α 的表达[11]。穿蛭膏中的药材成分阿魏具有止痉挛、镇痛、抗氧化等功效；乳香具有镇痛作用；徐长卿具有改善微循环、增强免疫力作用；没药具有抗炎作用。在本研究中，模型组、研究组 A 和研究组 B 家兔关节软骨及关节液内的 IL-1β 和 TNF-α 水平均较对照组上升，研究组 B 的水平均较模型组和研究组 A 下降，这说明 ESW 配合穿蛭膏的治疗方法可降低 OA 家兔 IL-1β 和 TNF-α 的表达，对关节内炎症有一定的抑制作用，从而减轻 OA 患者关节软骨的破坏，并且说明 ESW 配合穿蛭膏的效果要优于单用穿蛭膏。

综上所述，ESW 配合穿蛭膏可以通过降低关节软骨内 IL-1β 和 TNF-α 的含量来调整软骨细胞的代谢环境，抑制软骨基质的分解代谢，对软骨的退变起到抑制作用，从而减轻关节软骨的损害。

参 考 文 献

[1] 赵 喆，刘冬梅，白晓东，等. 体外冲击波对兔膝软骨细胞增殖的影响[J]. 中国康复理论与实践，2012，18(9)：824-826.

[2] 王道海，包 飞，吴志宏，等. 针刺对膝骨关节炎大鼠软骨白细胞介素-1β 及肿瘤坏死因子-α 表达的影响[J]. 中国骨伤，2011，24(9)：775-778.

[3] 中华医学会风湿病学分会. 骨关节炎诊断及治疗指南[J]. 中华风湿病学杂志，2010，14(6)：416-419.

[4] 沈海丽，夏亚一，王翠芳，等. 骨关节炎的疼痛机制研究进展[J]. 中华风湿病学杂志，2011，14(11)：769-771.

[5] 李 敏，梁 翼，吴晓惠，等. 伴骨髓水肿的膝骨关节炎患者白细胞介素-1β 白细胞介素-6 肿瘤坏死因子-α 的相关性研究[J]. 中华风湿病学杂志，2012，16(2)：107-111.

[6] 周 凯，罗雪梅，朱明双. 鼠类膝骨关节炎模型评价方法现状分析[J]. 风湿病与关节炎，2015，4(7)：66-69.

[7] 伍沪生. 痛风研究正逢其时[J]. 中华风湿病学杂志，2012，16(4)：217-219.

[8] 李 敏，梁 翼，余文景，等. 盐酸氨基葡萄糖联合双醋瑞因在伴骨髓水肿的膝骨关节炎的疗效评估[J]. 华西医学，2012，27(12)：1764-1767.

[9] 青玉凤，周京国. 痛风发病机制及药物治疗研究现状及展望[J]. 中华临床医师杂志，2012，6(10)：2719-2723.

[10] 丁国良. IL-1 和 IL-6 在绝经后骨关节炎患者滑膜上的表达及临床分析[J]. 内蒙古医学杂志，2014，46(4)：399-402，512.

[11] 帅 明，林荔军，林昭伟，等. IL-1β、HIF-1α 和 VEGF 在兔膝关节骨性关节炎模型滑膜中的表达[J]. 中国老年学杂志，2013，33(10)：2311-2313.

（责任编辑：张辉洁）