

·基础研究·

# 丹参对兔骨性关节炎关节软骨白介素-1 $\beta$ 、白介素-6和胰岛素样生长因子-I 表达的影响\*

白 斌<sup>1</sup> 李燕琴<sup>2</sup> 李曙明<sup>1</sup> 赵为公<sup>1</sup> 王坤正<sup>3</sup>

## 摘要

**目的:**探讨丹参对兔骨性关节炎(OA)模型关节软骨退变的保护作用及其机制。

**方法:**将24只大白兔随机分成2组,即对照组和实验组,每组12只。所有兔通过手术建立右膝关节OA动物模型,对照组的所有兔的右膝关节腔内注射生理盐水0.5ml/kg,实验组所有兔的右膝关节腔内注射丹参注射液0.5ml/kg,手术完毕后当天就注射1次,以后每4天注射1次。在动物OA模型建立后的第10周,将兔处死,收集右侧股骨内侧髁标本,用光学显微镜和透射式电子显微镜观察关节软骨形态学结构改变,用免疫组化技术检测关节软骨组织中IL-1 $\beta$ 、IL-6和IGF-I蛋白的表达。

**结果:**实验组兔的关节软骨破坏程度明显轻于对照组( $P < 0.05$ )。IL-1 $\beta$ 、IL-6和IGF-I蛋白阳性免疫反应物主要定位于细胞浆,为粗细较为一致的淡红色颗粒。实验组IL-1 $\beta$ 蛋白阳性染色强度明显低于对照组( $P < 0.05$ )。实验组IL-6和IGF-I蛋白阳性染色强度明显高于对照组( $P < 0.05$ )。

**结论:**丹参能调节OA关节软骨组织中IL-1 $\beta$ 、IL-6和IGF-I蛋白的异常表达,对关节软骨具有保护作用。

**关键词** 丹参;关节软骨;白细胞介素-1 $\beta$ ;白细胞介素-6;胰岛素样生长因子-I

**中图分类号:**R684.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2015)-10-990-05

Effects of danshen on expressions of interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6 and insulin like growth factor-I in articular cartilage of rabbits with osteoarthritis/BAI Bin, LI Yanqin, LI Shuming, et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2015, 30(10): 990—994

## Abstract

**Objective:** To study the effects of danshen in preventing articular cartilage degeneration of rabbits with osteoarthritis(OA).

**Method:** Twenty-four rabbits were randomly divided into 2 groups, control group and experimental group ( $n=12$ ). The models of OA were established by operation in right knee joints of rabbits. Saline solution (0.5ml, per kg body weight) was infused into the articular cavities of right knee, one times per 4 days in control group. Danshen solution (0.5ml, per kg body weight) was infused into the articular cavities of right knees, one times per 4 days in experimental group. Ten weeks after establishing OA model, all rabbits were sacrificed and the medial condyles of right femurs were collected. The morphological and histological changes of articular cartilages were observed by light microscope and electron microscope. The expressions of interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6(IL-6) and insulin like growth factor-I (IGF-I) were probed by immunohistochemistry technique.

**Result:** The morphological changes of articular cartilage in control group were severer than those in experimen-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2015.10.003

\*基金项目:陕西省科技攻关项目(2008K14-01)

1 西安交通大学第一附属医院骨科,西安,710061; 2 西安交通大学医学部公共卫生学院流行病与卫生统计学系; 3 西安交通大学第二附属医院骨科

作者简介:白斌,男,博士,主治医师; 收稿日期:2014-09-27

tal group ( $P < 0.05$ ). The IL-1 $\beta$ , IL-6 and IGF- I positive staining were red granule and located in cytoplasm of cartilage cell. The positive staining intensity of IL-1 $\beta$  in experimental group was lower than that in control group ( $P < 0.05$ ). The positive staining intensity of IL-6 and IGF- I in experimental group were higher than that in control group ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** Danshen possesses protective role on early cartilage degeneration by regulate the expressions of IL-1 $\beta$ , IL-6 and IGF- I in articular cartilage of osteoarthritis.

**Author's address** The First Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, 710061

**Key word** danshen; cartilage; interleukin-1 $\beta$ ; interleukin-6; insulin-like growth factors- I

骨性关节炎(osteoarthritis, OA)是常见的骨与关节疾病,病因尚不清楚。大量的研究表明细胞因子白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ),白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和胰岛素样生长因子-I(insulin-like growth factors- I, IGF- I)的调控异常在OA软骨破坏与修复过程中起着重要作用<sup>[1-3]</sup>。目前,尚无有效的方法抑制关节软骨退变,OA的治疗是以缓解临床症状,改善患者的生存质量为主。丹参是一种经典的中草药,丹参注射液能有效地防治OA,然而其作用机制尚不完全清楚,有待进一步深入的研究<sup>[4-9]</sup>。本研究采用免疫组化方法观察丹参对OA动物模型关节软骨IL-1 $\beta$ ,IL-6和IGF- I蛋白表达的影响,来探讨丹参防治关节软骨退变的机制,为丹参注射液治疗OA提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和药品

月龄为4—6个月,平均4.8个月;体重为(1.80 $\pm$ 0.20)kg,雌雄各半的健康大耳白兔24只,由西安交通大学医学实验动物中心提供。丹参注射液,每支10ml,相当于原药材15g,正大青春宝医药有限公司生产,国药批准文号Z33020177。IL-1 $\beta$ ,IL-6和IGF- I的一抗(兔抗兔)和二抗(羊抗兔IgG)均为博士德产品。浓缩型SAP试剂盒也为博士德产品。AEC显色剂为Vecter公司产品。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 动物模型建立:**24只兔随机分成2组,即对照组和实验组,每组12只兔。实验组和对照组兔均通过改良的Hulth法<sup>[10]</sup>手术方法建立右膝关节OA动物模型。建立膝关节OA动物模型手术方法如下:将外侧副韧带在关节间隙水平横行切断约2/3,将前、后交叉韧带切断约1/3,摘除内侧半月板的前脚。

**1.2.2 给药方法与剂量:**术后所有兔接受肌肉注射青霉素预防感染,40万U/次,2次/d,共5d。对照组的所有兔右侧膝关节腔内注射生理盐水0.5ml/kg,手术完毕后当天注射1次,以后每4天注射1次;实验组所有兔右侧膝关节腔内注射丹参注射液0.5ml/kg,手术完毕后当天注射1次,以后每4天注射1次。

**1.2.3 标本的收集和处理:**在造模手术后第10周处死所有兔子剪取右股骨内髁组织,HE染色和免疫组化标本放入10%的多聚甲醛溶液中固定48h。透射电镜标本放入2.5%戊二醛溶液中固定12h。

### 1.3 形态学观察

**1.3.1 光学显微镜观察:**关节软骨标本行HE染色,采用双盲法,由两位病理科医生用光学显微镜对关节软骨形态学结构改变进行Mankin评分<sup>[11]</sup>。

**1.3.2 透射式电子显微镜观察:**将包埋聚合后的标本1—2 $\mu$ m半超薄切片,美兰染色后光学显微镜下定位,瑞典LKB-V型超薄切片机进行50—70nm超薄切片,醋酸铀、柠檬酸铅染色后,日本日立H-600透射式电子显微镜下观察、拍照。

### 1.4 免疫组织化学染色

采用SAP免疫组化技术检测IL-1 $\beta$ ,IL-6和IGF- I蛋白的标的。阴性对照:用PBS液替代一抗作阴性对照。对阳性标记强度的评价采用强度和密度结合的方法进行综合计量积分,数值<1.0者为(+),1.0—1.5者为(++),>1.5者为(+++)。

### 1.5 统计学分析

计数等级资料组间比较用秩和检验Nemenyi法。实验组与对照组间Mankin评分比较采用非参数Mann-Whitney检验。

## 2 结果

### 2.1 关节软骨组织学改变

对照组总体表现为软骨表面重度缺损,有裂隙向深层延伸,软骨全层变薄,细胞数目明显减少,大小不等,排列紊乱,有细胞聚集成簇现象,正常细胞少见,部分细胞碎裂,消失,留下空陷窝,空泡变,基质变薄,染色不均且着色浅,软骨下骨板较厚而致密,骨小梁粗大,与骨板融合成片,可见成骨和破骨细胞(图1A);而实验组总体表现为软骨表面轻度缺损,关节表面可有裂隙,软骨全层轻度变薄,细胞数目轻度减少,软骨细胞大小不等,排列紊乱,但四层结构尚能辨认,可见细胞增生成簇,但仍可见正常细胞,部分细胞碎裂,软骨下骨板轻度增厚(图1B)。同时,根据 Mankin 评分法,将 OA 动物模型关节软骨进行评分(表1)。采用非参数 Mann-Whitney 检验对2组兔子的关节软骨 Mankin 评分进行比较,实验组兔子的关节软骨 Mankin 评分明显低于对照组( $P < 0.05$ ),说明对照组关节软骨破坏程度明显重于实验组。

2.2 透射式电子显微镜观察结果

对照组表现为部分软骨细胞不规则,细胞表面突起减少,细胞膜厚度增加,细胞内粗面内质网脱颗粒且呈池样扩张,池内充满细颗粒样物质,线粒体肿胀,嵴溶解消失,呈空泡样改变,细胞核不规则,体积缩小,核内染色质轻度凝集,另有部分细胞肿胀,电子密度降级,细胞膜部分溶解、消失,连续性中断,粗面内质网扩张,细胞周围的胶原纤维细小、数量减

少、分布散乱(图2)。而实验组表现为软骨细胞形态接近正常,细胞内可见较多轻度扩张的粗面内质网,细胞内线粒体轻度肿胀,细胞核不规则,体积稍有缩小,核内染色质分布基本均匀,有个别软骨细胞呈固缩、坏死样改变,形成一个电子密度较高的细胞团块,细胞结构不清晰,细胞周围有较多的胶原纤维,排列凌乱(图3)。

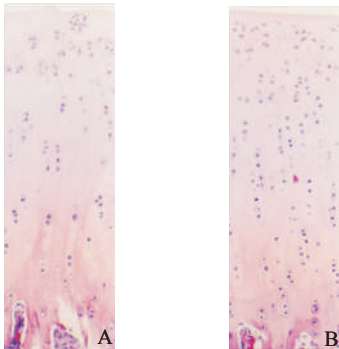
2.3 免疫组化染色结果

2.3.1 IL-1 $\beta$ , IL-6 和 IGF- I 免疫反应复合物的定位和分布: IL-1 $\beta$  和 IL-6 免疫反应物阳性染色为红色,主要定位于细胞浆,呈弥散性,为粗细不太一致的红色颗粒。IGF- I 免疫反应物阳性染色为淡红色,主要定位于细胞浆,呈散在分布,为粗细较为一致的淡红色颗粒。IL-1 $\beta$ , IL-6 和 IGF- I 阳性表达主要分布在关节软骨的上层和中层(图4)。阴性对照试验均无阳性信号出现。

2.3.2 IL-1 $\beta$ , IL-6 和 IGF- I 蛋白在关节软骨组织中阳性表达强度: 对照组 IL-1 $\beta$  蛋白表达主要为强阳性(7只, 58.33%), 实验组 IL-1 $\beta$  蛋白表达主要为弱阳性(11只, 91.67%); 对照组 IL-6 蛋白表达主要为弱

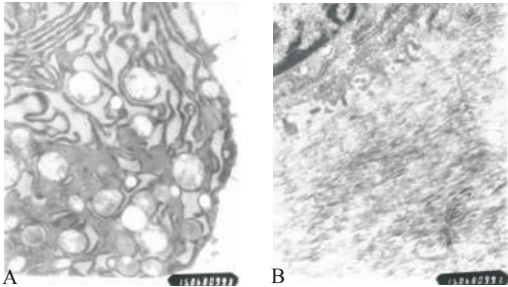
| 表1 关节软骨退变的 Mankin 评分 <span style="float:right">(x±s)</span> |           |
|-------------------------------------------------------------|-----------|
| 组别                                                          | Mankin 评分 |
| 对照组                                                         | 6.74±0.49 |
| 实验组                                                         | 4.55±0.38 |

图1 关节软骨 HE 染色



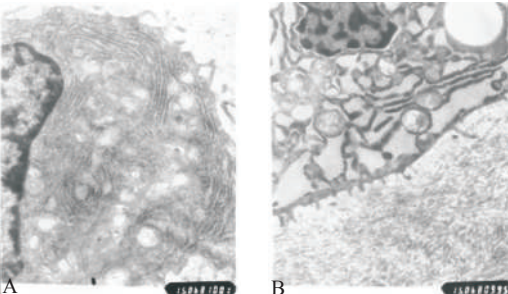
注:A 为对照组;B 为实验组

图2 对照组超微结构改变

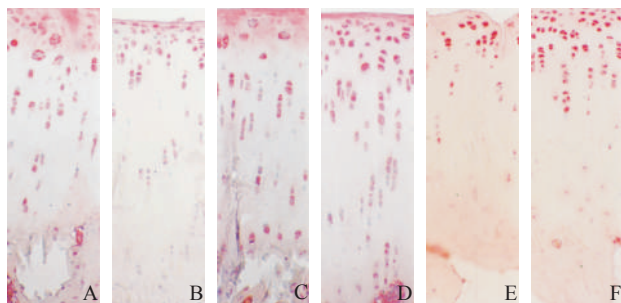


注:A 为软骨细胞内细胞器改变;B 为软骨细胞周围胶原纤维的分布

图3 实验组超微结构改变



注:A 为软骨细胞内细胞器改变;B 为软骨细胞周围胶原纤维的分布

图4 IL-1 $\beta$ ,IL-6和IGF- I 蛋白表达

注:A对照组IL-1 $\beta$ ;B实验组IL-1 $\beta$ ;C对照组IL-6;D实验组IL-6;E对照组IGF- I ;F实验组IGF- I

阳性(7只,58.33%),实验组IL-6蛋白表达主要为强阳性(8只,66.67%);对照组IGF- I 蛋白表达主要为弱阳性(10只,83.33%),实验组IGF- I 蛋白表达主要为强阳性(6只,50%)。用秩和检验Nemenyi法对实验组和对照组IL-1 $\beta$ ,IL-6和IGF- I 阳性表达程度的等级分布情况进行比较,结果二者存在显著性差异( $P < 0.05$ ),即实验组IL-1 $\beta$ 阳性表达强度明显低于对照组,而实验组IL-6和IGF- I 阳性表达强度明显高于对照组(表2)。

表2 IL-1 $\beta$ ,IL-6和IGF- I 蛋白阳性表达强度等级分布(例)

| 蛋白           | 对照组 |    |     | 实验组 |    |     |
|--------------|-----|----|-----|-----|----|-----|
|              | +   | ++ | +++ | +   | ++ | +++ |
| IL-1 $\beta$ | 2   | 3  | 7   | 11  | 1  | 0   |
| IL-6         | 7   | 5  | 0   | 1   | 3  | 8   |
| IGF- I       | 10  | 2  | 0   | 3   | 3  | 6   |

### 3 讨论

OA的病理生理过程十分复杂,典型的病理生理过程包括关节软骨的破坏和修复过程。当关节软骨受损发生破坏时,机体会积极主动调动各种因素来参与关节软骨的修复,保护关节软骨。当机体修复关节软骨的能力与破坏关节软骨的能力失衡时,关节软骨就发生退变。然而,关节软骨破坏和修复受体内多种细胞因子的调控,IL-1 $\beta$ 、IL-6和IGF- I 就是其中的三个重要的细胞因子。IL-1 $\beta$ 能干扰软骨细胞的正常代谢活动,使Ⅱ型胶原合成减少,强度降低;同时能促进胶原酶对胶原的降解、金属蛋白酶对基质蛋白多糖的消化,是一种促进关节软骨破坏的因子<sup>[12-15]</sup>。IL-6能刺激合成基质金属蛋白酶抑制剂,抑制基质金属蛋白酶对软骨的破坏;同时参与软骨细胞的增殖和分化,是一种促进关节软骨修复的

调节因子<sup>[16-18]</sup>。IGF- I 能刺激软骨细胞的分裂增殖,使软骨细胞合成蛋白聚糖和Ⅱ型胶原增加;能抑制基质金属蛋白酶的活性,使基质蛋白聚糖降解减少,是一种促进关节软骨修复的调节因子<sup>[18-24]</sup>。正常关节软骨组织中IL-1 $\beta$ 、IL-6和IGF- I 蛋白和基因表达极低,而OA患者关节软骨和OA动物模型关节软骨组织中存在IL-1 $\beta$ 、IL-6和IGF- I 蛋白和基因的表达异常升高<sup>[15,19,22,24]</sup>。OA关节软骨组织中IL-1 $\beta$ 蛋白和基因的表达越高,说明其对关节软骨的破坏性越强;OA关节软骨组织中IL-6和IGF- I 蛋白和基因的表达越高,说明其促进关节软骨修复的能力越强。

丹参是一种经典的中草药,现代医学认为丹参具有清除氧自由基、抗菌、抗血小板聚集和促进组织修复与再生的作用。近年来,虽然丹参对骨性关节炎的防治作用引起了广大学者的研究兴趣,取得了一些研究成果,但其机制仍然很不清楚,尚未见到丹参对OA关节软骨组织内IL-1 $\beta$ 、IL-6和IGF- I 蛋白表达影响的相关研究报道。

在本研究中,我们将丹参注射液直接注射到实验组OA动物模型关节腔内,在造模后第10周时,研究发现实验组兔子的关节软骨Mankin评分明显低于对照组( $P < 0.05$ ),这说明实验组关节软骨破坏程度比对照组轻。电子显微镜观察结果也说明实验组兔子的关节软骨的超微结构改变明显轻于对照组。可见将丹参注射液直接注射到实验组OA动物模型关节腔内,可以缓解关节软骨退变进程,对关节软骨起到保护作用,这与其他研究结果相一致<sup>[5,7]</sup>。同时,本研究发现在造模后第10周时,实验组和对照组OA动物模型关节软骨组织中IL-1 $\beta$ 、IL-6和IGF- I 蛋白均为阳性表达,且实验组关节软骨组织中IL-1 $\beta$ 蛋白阳性表达强度明显低于对照组( $P < 0.05$ ),实验组关节软骨组织中IL-6和IGF- I 蛋白阳性表达强度明显高于对照组( $P < 0.05$ )。实验组关节软骨IL-1 $\beta$ 蛋白阳性表达强度明显低于对照组,说明丹参可以抑制关节软骨IL-1 $\beta$ 蛋白阳性表达强度,从而降低IL-1 $\beta$ 对关节软骨的破坏作用,起到保护关节软骨的作用。实验组关节软骨IL-6和IGF- I 蛋白阳性表达强度明显高于对照组,说明丹参可以增强关节软骨IL-6和IGF- I 蛋白阳性表达强度,从而增强IL-6

和IGF- I 对关节软骨的修复作用,起到保护关节软骨的作用。

本研究结果表明,将丹参注射液直接注射到OA 兔子动物模型关节腔内,药物可直接作用于关节软骨组织,能缓解关节软骨退变的进程,起到保护关节软骨的作用,其可能的机制与丹参影响关节软骨组织中IL-1 $\beta$ ,IL-6 和IGF- I 蛋白的异常表达有关,但其详尽的作用机制尚待研究。

## 参考文献

- [1] Lis K. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and growth hormone (hGH) as the markers of osteoarthritis[J]. Chir Narzadow Ruchu Ortop Pol, 2008, 73(1):49—52.
- [2] Haas S, Straub RH. Disruption of rhythms of molecular clocks in primary synovial fibroblasts of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis, role of IL-1 $\beta$ /TNF[J]. Arthritis Res Ther, 2012, 14(3):R122.
- [3] Porée B, Kypriotou M, Chadjichristos C, et al. Interleukin-6 (IL-6) and/or soluble IL-6 receptor down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes requires a decrease of Sp1.Sp3 ratio and of the binding activity of both factors to the COL2A1 promoter[J]. J Biol Chem, 2008, 283(8):4850—4865.
- [4] 赵忠,刘德春,宋阳春.丹参注射液对大鼠关节软骨细胞合成胶原和蛋白多糖的影响[J].现代中药研究与实践,2013,27(1):36—39.
- [5] 段戡,袁长深,刘宇翔,等.丹参加玻璃酸钠预防性关节内注射对兔膝关节软骨退行性变的影响[J].时珍国医国药,2012,23(1):77—79.
- [6] 程义权,郭振河,杨家辉,等.丹参对体外关节软骨细胞抗氧化氢损伤实验研究[J].重庆医学,2008,37(10):1030—1032.
- [7] 冯秋珍,李曼君,叶根梅,等.丹参注射液对体外培养家兔关节软骨细胞的影响[J].湖北中医学院学报,2003,5(3):17—18.
- [8] 陈建鸿,杜建.丹参注射液关节腔内注射合中药熏洗治疗膝骨性关节炎30例[J].福建中医药,2006,37(6):18—19.
- [9] 邓物鲜.丹参注射液关节腔内注射治疗骨性关节炎55例临床观察[J].中医药导报,2006,12(1):47—48.
- [10] Rogart JN, Barrach HJ, Chichester CO. Articular collagen degradation in the Hulth-Telhag model of osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 1999, 7(6):539—547.
- [11] Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data[J]. J Bone Joint Surg Am, 1971, 53(3):523—537.
- [12] Tang X, Zhou Z, Shen B, et al. Serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , COMP, and CTX-II in patients with Kashin-Beck disease in Sichuan, China[J]. Rheumatol Int, 2012, 32(11):3503—3509.
- [13] Dinarello CA. A clinical perspective of IL-1 $\beta$  as the gatekeeper of inflammation[J]. Eur J Immunol, 2011, 41(5):1203—1217.
- [14] de Isla NG, Stoltz JF. In vitro inhibition of IL-1 $\beta$  catabolic effects on cartilage: a mechanism involved on diacerein anti-OA properties[J]. Biorheology, 2008, 45(3—4):433—438.
- [15] David F, Farley J, Huang H, et al. Cytokine and chemokine gene expression of IL-1 $\beta$  stimulated equine articular chondrocytes[J]. Vet Surg, 2007, 36(3):221—227.
- [16] Ahn JK, Huang B, Bae EK, et al. The role of  $\alpha$ -defensin-1 and related signal transduction mechanisms in the production of IL-6, IL-8 and MMPs in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes[J]. Rheumatology (Oxford), 2013, 52(8):1368—1376.
- [17] Santos ML, Gomes WF, Pereira DS, et al. Muscle strength, muscle balance, physical function and plasma interleukin-6 (IL-6) levels in elderly women with knee osteoarthritis (OA)[J]. Arch Gerontol Geriatr, 2011, 52(3):322—326.
- [18] Woźniak W, Wierusz-Kozłowska M, Markuszewski J, et al. Monitoring of IL-6 levels in patients after total hip joint replacement[J]. Chir Narzadow Ruchu Ortop Pol, 2004, 69(2):121—124.
- [19] Chen B, Qin J, Wang H, et al. Effects of adenovirus-mediated bFGF, IL-1Ra and IGF-1 gene transfer on human osteoarthritic chondrocytes and osteoarthritis in rabbits[J]. Exp Mol Med, 2010, 42(10):684—695.
- [20] Zhang M, Zhou Q, Liang QQ, et al. IGF-1 regulation of type II collagen and MMP-13 expression in rat endplate chondrocytes via distinct signaling pathways[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2009, 17(1):100—106.
- [21] Lis K, Odrowaz-Sypniewska G, Nowacki W. Evaluation of IGF-1 concentration in serum and synovial fluid in women with different type coxarthrosis[J]. Chir Narzadow Ruchu Ortop Pol, 2005, 70(6):407—410.
- [22] Blumenfeld I, Livne E. The role of transforming growth factor (TGF)- $\beta$ , insulin-like growth factor (IGF)-1, and interleukin (IL)-1 in osteoarthritis and aging of joints[J]. Exp Gerontol, 1999, 34(7):821—829.
- [23] Olney RC, Tsuchiya K, Wilson DM, et al. Chondrocytes from osteoarthritic cartilage have increased expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-3 (IGFBP-3) and -5, but not IGF-II or IGFBP-4[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1996, 81(3):1096—1103.
- [24] Middleton J, Manthey A, Tyler J. Insulin-like growth factor (IGF) receptor, IGF-I, interleukin-1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ), and IL-6 mRNA expression in osteoarthritic and normal human cartilage[J]. J Histochem Cytochem, 1996, 44(2):133—141.