

## 消肿方对骨关节炎家兔软骨细胞凋亡及同源细胞群数量的影响\*

李 亮, 刘安平, 周正新, 周章武, 江树连, 盛炎炎

(安徽中医药大学第一附属医院骨伤科, 安徽 合肥 230031)

**摘要:** **目的** 观察消肿方对兔骨关节炎软骨细胞凋亡及同源细胞群数量和 BCL-2 阳性细胞百分比的影响。**方法** 取新西兰大耳白兔复制膝关节骨关节炎模型,连续灌胃给药治疗 28d 后处死动物,取膝关节软骨镜下观察软骨细胞形态、计数同源细胞群数量,原位缺口末端标记法检测骨关节炎动物模型软骨细胞凋亡,免疫组化检测 BCL-2 阳性细胞并计算其百分比。**结果** 骨关节炎动物模型软骨细胞发生过度凋亡、同源细胞群下降及 BCL-2 阳性细胞百分比下降,消肿方能抑制软骨细胞凋亡,升高同源细胞群数量及 BCL-2 阳性细胞百分比。1. 在软骨同源细胞群数量方面:模型组降低,在治疗早期(4 周),消肿方由低剂量组到中剂量组增加时,其升高幅度加大,除高剂量治疗组由 4 周延长至 8 周时,其增加不明显外,其余各组随时间延长,出现同源细胞群数量明显增加。2. 在软骨细胞凋亡指数(AI)方面:治疗后,AI 下降,而且随中药剂量增大,其下降幅度加大,空白组 AI 在 12 周时明显升高,模型组和阳性对照组 AI 在 8 周时明显升高,超过 8 周后,升高不明显,治疗后,AI 下降,在各剂量治疗组,随治疗时间延长时,其下降幅度加大。3. 在软骨细胞 BCL-2 阳性细胞百分比方面:模型组百分比最低,经治疗后,百分比逐渐升高,随中药剂量增大,其升高幅度加大,随时间延长,各组百分比均明显升高。**结论** 消肿方可抑制骨关节炎动物模型软骨细胞凋亡,升高同源细胞群数量及 BCL-2 阳性细胞百分比。

**关键词:** 消肿方; 补肾活血利水法; 骨关节炎; 软骨细胞凋亡; 同源细胞群; BCL-2 阳性细胞; 兔

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2015)05-0022-07

有研究表明,软骨细胞凋亡是骨关节炎(Osteoarthritis, OA)关节软骨退变的关键因素之一<sup>[1]</sup>,软骨细胞过度凋亡,数量过少,引起细胞外内环境稳态的改变,又使软骨细胞的凋亡增加,形成恶性循环,从而导致 OA 的发生<sup>[2]</sup>,消肿方是根据我院骨伤科国家级名老中医丁镠教授根据“补肾活血利水”法组成的中药复方,以补肾活血利水为主,临床用于治疗 OA,多年的临床观察结果显示其有较理想的治疗效果<sup>[3]</sup>。前期研究显示:补肾活血利水法具有促进软骨细胞增殖、抑制其凋亡、调控滑膜组织基因表达谱及多种细胞信号通路等多种作用<sup>[4]</sup>,为了进一步探讨其疗效机制,揭示其发挥疗效的药理作用特点或靶点,本研究通过建立兔 OA 动物模型,观察不同浓度消肿方对动物模型的软骨细胞凋亡及同源细胞群数量的影响,现报道如下。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物

6 月龄体重 2.6~3.2kg 的新西兰大耳白兔 36

只,雌雄各半,随机分为 6 组(模型组、空白组、阳性对照组,中药消肿方低剂量组(40g/kg)、中剂量组(80g/kg)、高剂量组(160g/kg),每组 6 只,实验动物均购自安徽中医药大学动物实验中心,普通级,实验动物许可证号:SYXK(皖)2013-0126。

#### 1.2 主要试剂与仪器

##### 1.2.1 主要试剂

Bcl-2、Bax 免疫组化试剂盒和软骨细胞凋亡检测试剂盒(武汉博士德公司)。

##### 1.2.2 主要仪器

37℃温箱(上海三发科学仪器有限公司 型号:GNP-9160 型),干燥箱(上海精宏实验设备有限公司 型号:DHG-9140 型),石蜡切片机(Leica2135),BM-II 型病理组织包埋机(安徽省电子科学研究所),ZT-RP 生物组织脱水机、QP 切片漂烘温控仪(湖北省孝感市亚光医用电子技术有限公司),88-1 大功率磁力搅拌器、QT-1 漩涡混合器(上海琪特分析仪器有限公司),LX-100 手掌型离心机(上海市

\* 基金项目:安徽省教育厅高校自然科学基金项目(KJ2012Z215)

收稿日期:2015-04-18

作者简介:李亮(1979-),男,安徽舒城人,主治医师,研究方向:中医药治疗骨关节炎。

麒麟医用仪器厂),Nikon80 荧光显微镜(新飞达光学仪器公司)。

### 1.3 实验药物

消肿方剂生药饮片由安徽中医药大学第一附属医院中药房提供(怀牛膝 15g,茯苓皮 20g,黄芪 15g,当归 10g,莪术 8g,草薢 10g,红花 2g 组成),将生药饮片 80g 加入 920g 水中制备成中剂量组,低、高剂量组分别将生药饮片 40g、160g 加入 960、840g 水中制备成低、高剂量组;盐酸氨基葡萄糖规格:0.24g\*28 片/盒,四川新斯顿药业生产,产品批号为:141004。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 造模

除空白组外,所有动物采用改良 Hulth 法<sup>[9]</sup>制作膝关节 OA 动物模型,麻醉生效后,常规消毒、铺巾,取兔膝关节前内侧髌旁入路,切开皮肤及皮下组织后,内侧支持带及关节囊后,将髌骨向外侧脱位,显露膝关节腔,显露内侧半月板及前交叉韧带,依次切除内侧半月板,切断内侧副韧带,切断前交叉韧带(改良 Hulth 法),再逐层关闭关节囊、皮下组织、皮肤,敷料包扎切口,不予外固定,建模后连续 4d 青霉素  $3 \times 10^4$ U 肌肉注射,10d 后开始每天强迫兔活动 40min,连续 6 周。

#### 1.4.2 实验分组与给药

随机分为 6 组后,根据人与兔体表面积比值,人与兔药物剂量比值为 1/3,分别对消肿方低剂量组、中剂量组、高剂量组采用 40、80g/kg 以及 160g/kg 的消肿方煎剂 20mL 灌胃,空白组灌服等容积生理盐水,阳性对照组灌服溶有 6 片硫酸氨基葡萄糖的生理盐水溶液(1d 分 3 次),连续治疗 4 周。

#### 1.4.3 检测指标和检测方法

##### 1.4.3.1 组织形态学检查

光镜下观察软骨细胞、软骨陷窝、软骨囊、同源

细胞群及软骨细胞间质形态、结构和数量的变化,在  $10 \times 40$  光镜视野下观察,任选 5 个视野观察,每个视野计数同源细胞群数量。

##### 1.4.3.2 细胞凋亡检测

采用 TUNEL 法(原位缺口末端标记法)在  $10 \times 40$  光镜视野下观察,任选 5 个视野观察,平均计数 100 个软骨细胞中细胞核染色成棕色颗粒的细胞数目即为凋亡指数(AI)。

##### 1.4.3.3 免疫组化检测

标本石蜡切片,免疫组织化学染色(三步法):石蜡切片脱蜡至水,3%  $H_2O_2$  室温孵育 5~10min,以消除内源性过氧化物酶的活性。PBS(磷酸盐缓冲液)浸泡 5min $\times$ 2 次,5%~10%正常山羊血清(PBS 稀释)封闭,室温孵育 10min,倾去血清,勿洗。滴加一抗工作液,37℃孵育 1~2h 或 4℃过夜。PBS 冲洗,5min $\times$ 3 次。滴加适量生物素标记二抗工作液,37℃孵育 10~30min。PBS 冲洗,5min $\times$ 3 次。滴加适量的辣根酶或碱性磷酸酶标记的链霉卵白素工作液,37℃孵育 10~30min。PBS 冲洗,5min $\times$ 3 次。显色剂显色 DAB(磷酸缓冲液)3~15min 自来水充分冲洗,复染,脱水,透明,封片。在光镜下观察 Bcl-2 蛋白阳性表达为浆黄色颗粒,试验以已知阳性染色切片作为阳性阳性对照,以磷酸缓冲液代替第一抗体作为阴性阳性对照,在 400 倍放大率下,任选 5 个高倍镜视野,计算 Bcl-2 阳性细胞所占百分比。

### 1.5 统计方法

所有数据应用 SPSS 17.0 软件包进行统计学分析,参数值用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。组间比较采用单因素方差分析,两组间均数比较采用  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 兔膝关节软骨细胞形态学观察(HE 染色, $10 \times 40$ 倍)

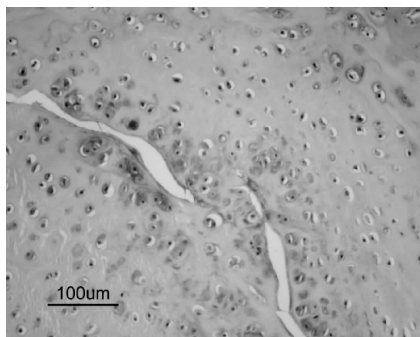


图1 空白组

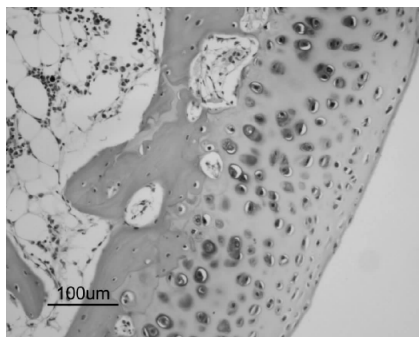


图2 模型组

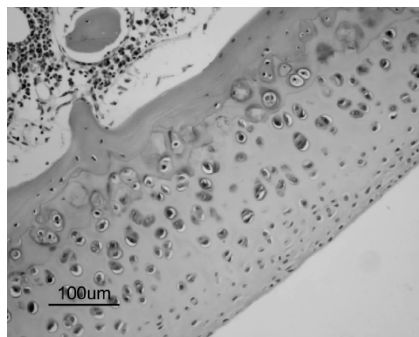


图3 阳性对照组

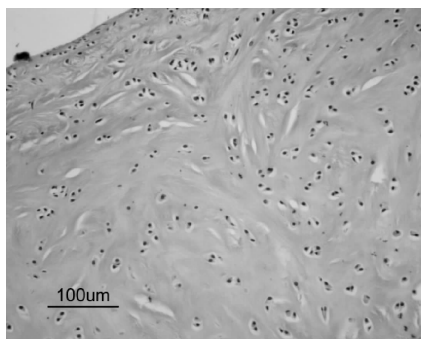


图 4 治疗组(低剂量组)

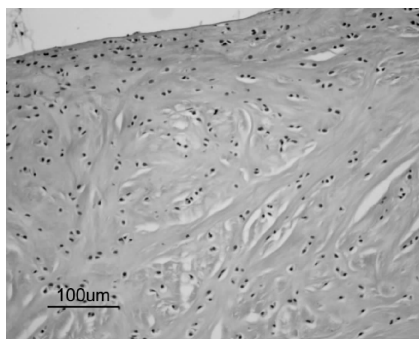


图 5 治疗组(中剂量组)

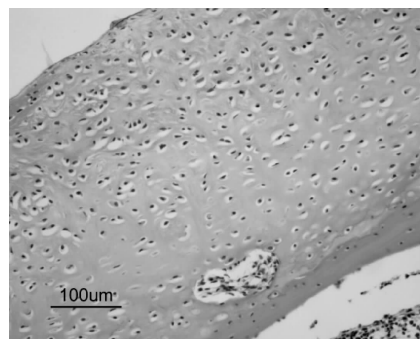


图 6 治疗组(高剂量组)

由图 1-6 可知,空白组:软骨细胞结构清晰、排列规则,软骨陷窝及软骨同源细胞群数量多,软骨细胞间质少,模型组:软骨细胞形态不规则、排列杂乱,软骨陷窝及软骨同源细胞群数量很少;软骨细

胞间质很多,治疗组:软骨细胞结构较清晰、排列较规则,软骨陷窝及软骨同源细胞群数量少,软骨细胞间质多,介于空白组和模型组之间。

## 2.2 软骨同源细胞群数量比较

表 1 软骨同源细胞群数量比较

| 组别     | 软骨同源细胞群数量    |                 |                | P     |
|--------|--------------|-----------------|----------------|-------|
|        | 4 周          | 8 周             | 12 周           |       |
| 空白组    | 28.167±1.472 | 27.000±1.549**  | 26.333±1.633*  | 0.000 |
| 模型组    | 20.000±0.894 | 19.333±1.033*   | 18.500±1.049** |       |
| 阳性对照组  | 20.167±0.753 | 21.833±1.169**  | 23.000±1.414** |       |
| 低剂量治疗组 | 21.333±1.211 | 24.000±0.894*** | 25.333±1.211** |       |
| 中剂量治疗组 | 23.667±1.211 | 25.000±1.414*   | 26.333±1.633*  |       |
| 高剂量治疗组 | 24.000±1.095 | 25.167±1.169    | 27.167±1.169** |       |

注:\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ 。表中所标注的\*、\*\*、\*\*\*为同一组不同时间两两比较的结果,而后方P值为上下两组同一时间两两比较的结果。

由表 1 统计结果显示:同一时间段,在不同组别两两比较,高剂量治疗组与中剂量治疗组相比较时, $P>0.05$ ,4 周时阳性对照组与模型组比较时, $P>0.05$ ,8 周及 12 周时中剂量治疗组与低剂量治疗组相比较时, $P>0.05$ ,其他组别两两比较时, $P<0.05$ 。统计结果表明:模型组软骨同源细胞群数量降低,治疗后,软骨同源细胞群数量升高,在治疗早期(4 周),随中药剂量由低剂量组到中剂量组增加时,其升高幅度加大,有统计学意义,但经过治疗 8 周及 12 周后,随中药剂量增加时,虽升高幅度加大,无统计学意义。

在各组随时间变化(4 周,8 周,12 周)两两比较后统计结果为:空白组( $P<0.05$ ),模型组( $P<0.05$ ),阳性对照组( $P<0.01$ ),治疗组(低剂量组)( $P<0.01$ ),治疗组(中剂量组)( $P<0.05$ ),治疗组(高剂量组)为 0.058,0.003,0.005,实验结果表明:除高剂量治疗组

由 4 周延长至 8 周时,软骨同源细胞群数量增加不明显外,其余各组实验动物随时间延长,出现软骨同源细胞群数量增加,有统计学意义。

## 2.3 采用 TUNEL 法检测软骨细胞凋亡指数

由表 2 可知,在同一时间软骨细胞凋亡指数随不同组别变化两两比较后统计结果为:4 周、8 周、12 周时  $P<0.05$ 。实验结果表明:模型组软骨细胞凋亡指数明显升高,而经过中药消肿方治疗后,软骨细胞凋亡指数下降,而且随中药剂量增大,其下降幅度加大,有统计学意义。

在各组随时间变化(4 周,8 周,12 周)两两比较软骨细胞凋亡指数后统计结果为:空白组 8 周与 4 周相比, $P=0.175$ ,12 周与 8 周相比, $P=0.025<0.05$ ,模型组和阳性对照组 8 周与 4 周相比, $P=0.025<0.05$ ,12 周与 8 周相比, $P=0.695$ ,在低、中、高剂量治疗组 8 周与 4 周相比,12 周与 8 周相比, $P<0.05$ 。实

表 2 软骨细胞凋亡指数

| 组别     | 凋亡指数        |                |               | P                 |
|--------|-------------|----------------|---------------|-------------------|
|        | 4 周         | 8 周            | 12 周          |                   |
| 空白组    | 0.065±0.010 | 0.068±0.007    | 0.075±0.010*  | 0.000             |
| 模型组    | 0.288±0.015 | 0.295±0.010*   | 0.297±0.016   |                   |
| 阳性对照组  | 0.255±0.010 | 0.240±0.010**  | 0.230±0.013   |                   |
| 低剂量治疗组 | 0.218±0.015 | 0.200±0.014*** | 0.183±0.014** | 0.000(12 周 0.003) |
| 中剂量治疗组 | 0.188±0.015 | 0.173±0.012**  | 0.158±0.015** | 0.000(12 周 0.004) |
| 高剂量治疗组 | 0.173±0.012 | 0.155±0.010*** | 0.140±0.011** | 0.000(12 周 0.012) |

注: \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ 。表中所标注的\*、\*\*、\*\*\* 为同一组不同时间两两比较的结果,而后方 P 值为上下两组同一时间两两比较的结果。

验结果表明:空白组软骨细胞凋亡指数在 12 周时明显升高,模型组和阳性对照组软骨细胞凋亡指数在 8 周时明显升高,超过 8 周后,升高不明显,治疗后,软骨细胞凋亡指数下降,在各剂量治疗组,随治疗时间由 4 周逐渐延长至 8 周、12 周时,其下降幅度加大,有统计学意义。(见图 7-12)

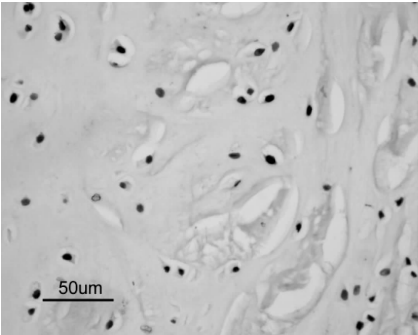


图 7 空白组

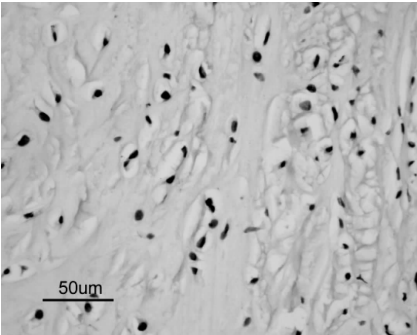


图 8 模型组

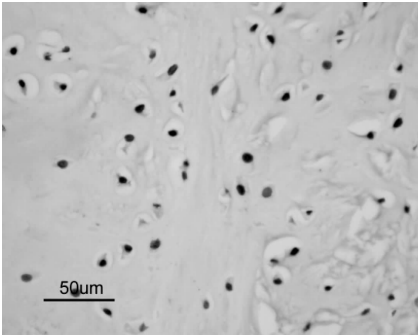


图 9 阳性对照组

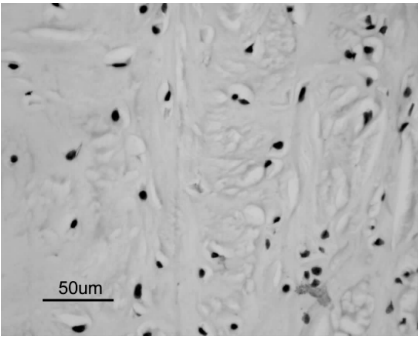


图 10 低剂量治疗组

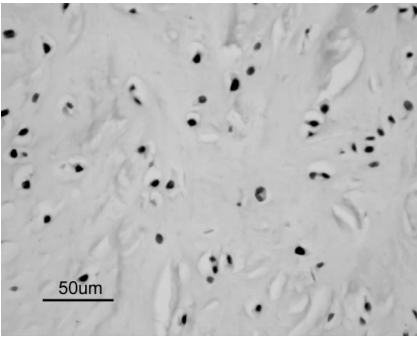


图 11 中剂量治疗组

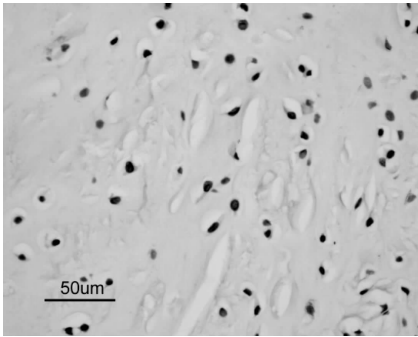


图 12 高剂量治疗组

2.4 BCL-2 阳性细胞百分比

由表 3 可知,在同一时间软骨细胞 BCL-2 阳性细胞百分比随组别变化两两比较后统计结果为:4 周、8 周、12 周时  $P<0.05$ 。实验结果表明:模型组 BCL-2 阳性细胞百分比最低,随组别变化至阳性对照组、低、中、高剂量治疗组时,软骨细胞 BCL-2 阳性细胞百分比逐渐升高,而且随中药剂量增大,其

升高幅度加大,有统计学意义。  
在各组随时间变化(4 周、8 周、12 周)两两比较后统计结果为:空白组 12 周与 8 周相比,  $P<0.05$ ,其余 5 组 8 周与 4 周相比,12 周与 8 周相比,  $P<0.05$ 。实验结果表明:随时间延长,各组实验动物均出现 BCL-2 阳性细胞百分比明显升高,有统计学意义。(见图 13-18)

表 3 BCL-2 阳性细胞百分比

| 组别     | BCL-2 阳性细胞百分比 |              |               | P                 |
|--------|---------------|--------------|---------------|-------------------|
|        | 4 周           | 8 周          | 12 周          |                   |
| 空白组    | 0.175±0.010   | 0.158±0.012  | 0.150±0.009** | 0.000             |
| 模型组    | 0.100±0.014   | 0.093±0.010* | 0.083±0.010** |                   |
| 阳性对照组  | 0.123±0.010   | 0.137±0.008* | 0.143±0.008** | 0.000             |
| 低剂量治疗组 | 0.137±0.010   | 0.148±0.008* | 0.170±0.013** | 0.001(12 周 0.005) |
| 中剂量治疗组 | 0.152±0.015   | 0.165±0.014* | 0.185±0.019** | 0.007(8 周 0.011)  |
| 高剂量治疗组 | 0.162±0.015   | 0.173±0.012* | 0.197±0.016** | 0.004(12 周 0.001) |

注: \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。表中所标注的 \*、\*\* 为同一组不同时间两两比较的结果,而后方  $P$  值为上下两组同一时间两两比较的结果。

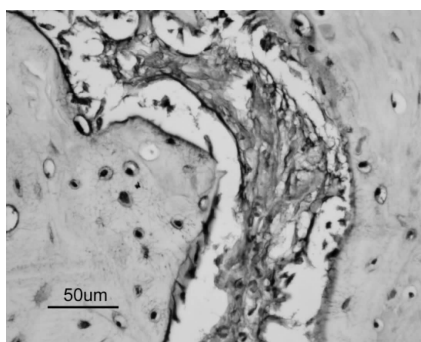


图 13 空白组

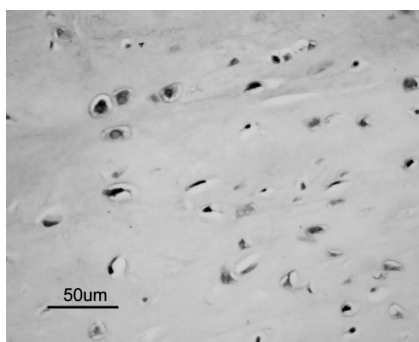


图 14 模型组

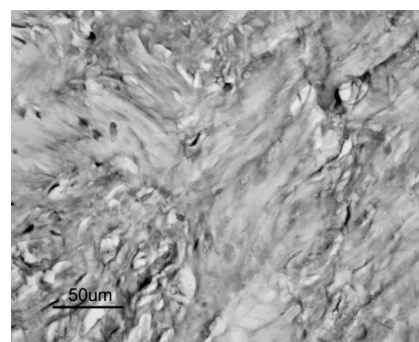


图 15 阳性对照组

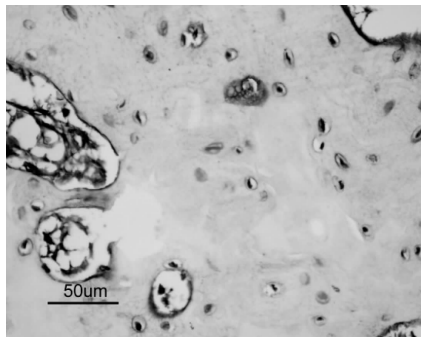


图 16 低剂量治疗组

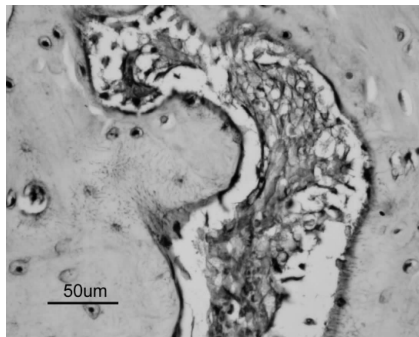


图 17 中剂量治疗组

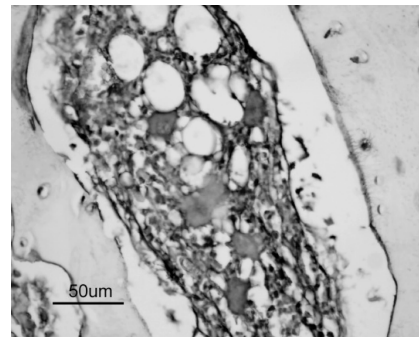


图 18 高剂量治疗组

### 3 讨论

OA 发病率高, 是老年人的最常见的慢性关节疾病, 尤以膝关节 OA(KOA) 常见。北京市区的调查结果显示 60 岁以上老年人膝关节 X 线 OA 患病率女性为 42.8%, 男性为 21.5%; 临床 KOA 患病率女性为 15%, 男性为 5.6%<sup>[6]</sup>。

OA 指由多种因素引起关节软骨纤维化、皲裂、溃疡、脱失而导致的关节疾病。目前病因尚不明确, 其发生与年龄、肥胖、炎症、创伤及遗传因素等有关。其病理特点为软骨蛋白多糖含量减少, 导致软骨破坏, 进而全层软骨消失, 深达骨质, 关节边缘骨赘形成, 软骨下骨增厚、囊性变、硬化, 滑膜呈慢性

炎症改变, 同时滑膜释放细胞因子, 进一步破坏软骨<sup>[7]</sup>, 其病变涉及整个滑液关节, 包括软骨、滑膜和软骨下骨, 其发病过程最主要的特点是以膝关节软骨的退行性改变和继发性骨质增生为主要病理改变, 表现为关节间隙变窄, 软骨下骨硬化<sup>[8]</sup>, OA 的发病机制尚不完全清楚, 研究表明细胞外基质的降解、软骨细胞凋亡等是该病发生的重要因素。

同源细胞群是由一个软骨细胞分裂增殖形成的软骨细胞群, 位于软骨组织的中部。每个同源细胞群有 2~8 个软骨细胞, 包含在一个大的软骨陷窝内, 后者又分成几个小的陷窝, 各含一个软骨细胞。软骨的同源细胞群深层的软骨组织内软骨陷窝较

少,但形态较大,内含多个软骨细胞,但细胞较成熟,代谢缓慢,越靠近软骨的中部,同源细胞群的数目越多,反映了软骨细胞外基质的生长,同源细胞群的数目下降,则表明细胞外基质的降解,目前对于同源细胞群数目的相关研究较少,因此关于这方面的研究有待进一步开展。

软骨细胞凋亡在 OA 病理过程中发挥的作用越来越受到重视<sup>[9]</sup>,细胞凋亡(细胞程序性死亡)是一个主动的、信号依赖的过程,并由基因控制的主动的、高度有序的死亡过程。线粒体凋亡、内质网应激性凋亡、细胞自噬在 OA 的发病过程中发挥重要的调控作用<sup>[10]</sup>。因此关于软骨细胞凋亡的实验研究成为目前的热点之一。目前有研究表明 Bcl-2 家族是调节细胞凋亡相关蛋白中的关键调因子,其抗凋亡与促凋亡成员协调作用<sup>[11]</sup>,Bcl-2 家族蛋白的一个显著特征是具有 Bcl-2 同源结构域,主要体现在 4 个保守的区域,即 BH1、BH2、BH3、BH4 结构域,典型的抗凋亡成员如 Bcl-2、Bcl-XL、Mcl-1、Bcl-W 等含有 4 个短的保守的 BH 结构域和一个 C 端疏水尾状结构,即跨膜结构域,这类成员具有抗凋亡活性,在免疫调节中发挥重要作用。

KOA 属中医“痹证”范畴,是临床难治性疾病之一,晚期致残率高,多数患者最终需要人工关节置换以改善功能,所以本病治疗的关键在于早期防治<sup>[12]</sup>,从西医来说,即使仅以缓解症状、改善功能为目的,也缺少疗效更好、不良反应更少的治疗方法,因此中医药治疗骨关节炎已经逐渐受到重视。中医对其认识历史悠久,治疗手段多样,有临床效果好、副作用少等优势<sup>[13]</sup>。中医认为中老年膝关节炎的主要病机是肝肾不足,气虚血瘀,虚损与瘀实并存,虚损为本,成其病,瘀实为标,其病在筋骨,与肝肾密切相关<sup>[14]</sup>,消肿方是根据我院骨伤科国家级名老中医丁镗教授根据“补肾活血利水”法组成的中药复方,有补肾利水、活血化瘀之功,对痰、瘀、水互阻所致的骨关节炎能起较好的治疗作用<sup>[15]</sup>。

氨基葡萄糖是构成关节软骨的内源性物质,可刺激黏多糖的生化合成及增加骨骼钙质的摄取,以提高骨与软骨组织的代谢功能和营养,同时改善与增强滑膜液的黏稠度,增加滑膜液合成,提供关节润滑功能,还可阻断 OA 的病理过程,防止疾病进展,抑制和消退关节变性形成,从而有效修复软骨关节,持久缓解疼痛,阻止疾病进展,具有优越的耐受性和安全性,临床广泛用于骨关节炎的治疗,是

第一个经临床证明的骨关节炎疾病改善药物<sup>[16]</sup>,因此在本研究中作为阳性对照药物。

在制作模型方法上,本研究采用经典的改良 Hulth 法建立骨关节炎家兔模型,通过切除内侧半月板,切断前交叉韧带、内侧副韧带造成膝关节的不稳,使关节软骨承受了异常的机械压力,从而导致软骨退变及破损<sup>[17]</sup>,并且采取强迫活动方式诱导模型建立。兔膝骨关节炎模型中关节内手术方法,如改良 Hulth 法等模型诱导成功率高,稳定性好,应用广泛,特别适用于膝关节内注药预防和减轻 OA 病理改变的研究<sup>[18]</sup>。

本实验研究表明:空白组软骨细胞凋亡指数在 12 周时明显升高,模型组和阳性对照组软骨细胞凋亡指数在 8 周时明显升高,超过 8 周后,升高不明显,而经过中药消肿方治疗后,软骨细胞凋亡指数下降,其下降幅度与治疗时间以及中药剂量有相关性,消肿方具有抑制软骨细胞凋亡作用;模型组软骨同源细胞群数量降低,在治疗早期(4 周),随中药剂量由低剂量组到中剂量组增加时,其升高幅度加大,有统计学意义,但经过治疗 8 周及 12 周后,随中药剂量增加时,虽升高幅度加大,无统计学意义,除高剂量治疗组由 4 周延长至 8 周时,软骨同源细胞群数量增加不明显外,其余各组实验动物随时间延长,出现软骨同源细胞群数量增加,有统计学意义,表明消肿方能增加软骨同源细胞群数量,并与治疗时间以及中药剂量有相关性;模型组 BCL-2 阳性细胞百分比最低,通过消肿方治疗后,软骨细胞 BCL-2 阳性细胞百分比逐渐升高,表明消肿方能升高 BCL-2 阳性细胞百分比,并且其升高幅度与治疗时间以及中药剂量有相关性;但其抑制软骨细胞凋亡与升高同源细胞群数量及 BCL-2 阳性细胞百分比内在关系以及是否通过某些信号通路发挥其干预作用,尚有待进一步研究证实。

#### 参考文献:

- [1] Kim HA, Blanco FJ. Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage. *Curr Drug Targets*, 2007, 8 (2): 333-345.
- [2] 庞坚,曹月龙,石印玉. 骨关节炎软骨下骨研究进展[J]. 中国骨伤, 2011, 24(8): 702-704.
- [3] 李亮,刘安平,周正新,等. 消肿方治疗膝关节骨关节炎疗效观察[J]. 安徽中医学院学报, 2012, 3(31): 24-25.
- [4] 李亮,刘安平,周正新,等. 补肾活血法治疗膝关节骨关节炎的作用机制研究进展 [J]. 中医药临床杂志, 2014, 26 (5): 548-550.

- [5] Hulth A, Lindberg L, Telhag H. Experimental osteoarthritis in rabbits[J]. Acta Orthop Scand, 1970, 41(2): 522-530.
- [6] 陆艳红, 石晓兵. 膝关节炎国内外流行病学研究现状及进展[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2012, 20(6): 81-84.
- [7] 李谋山. 关节镜下膝关节骨性关节炎 48 例关节清理术的临床疗效观察[J]. 当代医学, 2013, 19(5): 90-91.
- [8] 潘刘英. 中西医结合治疗膝关节骨性关节炎临床观察[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(3): 682-684.
- [9] 许媛, 赵明才. 骨关节炎软骨细胞凋亡及其信号通路的研究进展 [J]. 中华临床医师杂志 (电子版), 2014, 3(6): 1165-1167.
- [10] 刘发元, 李西海, 叶蕪芝, 等. 独活寄生汤干预骨关节炎软骨细胞凋亡的机制[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(7): 2165-2168.
- [11] 丛义梅, 刘鹏, 金大鹏. BCL-2 家族与细胞凋亡的关系 [J]. 中华医学研究杂志, 2008, 8(2): 125-127.
- [12] 方涛. 独活寄生汤加减联合塞来昔布治疗轻中度膝骨关节炎的疗效观察[J]. 云南中医学院学报, 2014, 37(4): 65-67.
- [13] 朱小虎, 万超, 王刚. 膝关节骨性关节炎辨证要素积分表的建立及信度分析[J]. 云南中医学院学报, 2014, 37(1): 49-52.
- [14] 洪海平, 徐国权, 朱首豪. “石氏中医药”综合疗法治疗膝骨关节炎的临床疗效分析[J]. 云南中医学院学报, 2015, 38(1): 75-77.
- [15] 李亮, 刘安平, 周正新, 等. 消肿方对骨关节炎兔软骨下骨成骨细胞 OPG 及 RANKL mRNA 表达的影响[J]. 安徽中医药大学学报, 2015, 34(2): 60-63.
- [16] Marliese ANNEFELD. 硫酸氨基葡萄糖: 第 1 个经临床证明的骨关节炎疾病改善药物 [J]. 中国新药与临床杂志, 2005, 24(4): 259-262.
- [17] 王桂芳, 李晓君, 杨栋慧, 等. 蚁龙通痹汤对兔膝关节炎软骨细胞凋亡调控基因表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(13): 246-249.
- [18] 熊元, 赵振国, 李传郡, 等. 兔膝关节炎模型的制备及鉴定[J]. 实验动物科学, 2013, 30(3): 31-33.

(编辑: 杨阳)

### Experimental Study on the Effect of Xiaozhong Decoction on Apoptosis of Chondrocyt-Es and the Number of Isogenous Groups of Rabbits for Animal Models of Osteoarthritis

LI Liang, LIU Anpin, ZHOU Zhengxin, ZHOU Zhangwu, JIANG Shulian, SHENG Yanyan  
(Orthopedics&Traumatology Department of the First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

**ABSTRACT:** **Objective** To observe the effect of Xiaozhong decoction on apoptosis of chondrocytes and the number of isogenous groups of rabbits for animal model of osteoarthritis. **Methods** Thirty-six seven-month-old New Zealand rabbits with the weight of 2.6-3.2 kg, female in half, were made for animal models of osteoarthritis. All rabbits were equally randomized into six groups, model group, blank group (the same volume of normal saline), contrast group (saline dissolved with glucosamine tablets), low-concentration decoction group (40g/kg), middle-concentration decoction group (80g/kg) and high-concentration decoction group (160g/kg). All rabbits were medicated by gavage at  $4\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ . After gastric gavage for 28 days, cartilage of knee of rabbits were taken to observe by optical microscope. The number of isogenous groups was counted in every light microscopic view. The apoptosis of chondrocytes of rabbits for animal models of osteoarthritis was checked by TUNEL, the percent of BCL-2 positive chondrocytes was checked by immunohistochemical method. **Results** There was excessive apoptosis of chondrocytes in animal models of osteoarthritis, meanwhile isogenous groups and the percent of BCL-2 positive cells was declined. Xiaozhong decoction could inhibit the apoptosis of chondrocytes and raise the number of isogenous groups and the percent of BCL-2 positive chondrocytes. 1. The number of isogenous groups declined in model group while increased with decoction concentration from low turned middle after treated 4 weeks, and the differences between the two groups were significant. The differences of high-concentration decoction group from 4 weeks to 8 weeks was insignificant, while the number of isogenous groups of all other groups rose as time went on the differences between all other groups were significant. 2. AI declined after treated by Xiaozhong decoction, especially, AI declined much more with decoction concentration rose. The differences among the decoction groups were significant. AI of blank group rose significantly after 12 weeks, however, AI of model group and contrast group rose significantly in 8 weeks, rose insignificant beyond 8 weeks. AI declined treated by Xiaozhong decoction as time went-on from 4 weeks to 8 weeks and 12 weeks, the differences among three periods were significant. 3. The percent of BCL-2 positive chondrocytes of model group was lowest among all groups. It rose gradually with decoction concentration from low turned middle to high, and the differences among the decoction groups were significant. It rose gradually as time went-on from 4 weeks to 8 weeks and 12 weeks, and the differences among three periods of all groups were significant. **Conclusions** Xiaozhong decoction could inhibit the apoptosis of chondrocytes and exert effect on up-regulating the number of isogenous groups and the percent of BCL-2 positive chondrocytes of rabbits for animal models of osteoarthritis.

**KEY WORDS:** Xiaozhong decoction; BushenLishuiHuoxue therapeutic method; osteoarthritis (OA); apoptosis of chondrocytes; Isogenous groups; BCL-2 positive chondrocyt; rabbits