

● 论 著 ●

黄板树根提取液对白细胞介素-18 在骨性关节炎滑液中的表达影响及意义 *

王凤龙¹ 肖智青¹ 朱锦忠¹ 王爱明¹ 徐洲发¹ 张火林¹ 江建明²
(1 广东省河源市中医院 河源 517000; 2 南方医科大学附属南方医院 广东广州 517515)

摘要:目的:了解使用黄板树根提取液外用熏洗对骨性关节炎(osteoarthritis,OA)患者白细胞介素-18(Interleukin 18,IL-18)在滑液中表达的影响及意义。方法:观察正常膝关节滑膜组织与 OA 病变滑膜组织在组织形态及病理切片的差异,对 OA 患者(n=30)使用黄板树根提取液熏洗治疗,分别提取治疗前后的关节滑液,采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)定量检测熏洗治疗前后关节滑液中 IL-18 蛋白的表达水平,并比较其表达的差异。结果:正常滑膜组织肉眼观为淡红色或瓷白色,OA 滑膜组织多为粉红色;病理切片显示:相比正常滑膜组织,OA 滑膜组织出现明显的血管增生和炎细胞浸润,符合组织慢性炎症病变特征;ELISA 检测治疗前 OA 患者滑液中 IL-18 的表达含量为(52.625± 11.336) pg/ml,治疗后 OA 患者滑液中 IL-18 的表达含量为(22.512± 2.021) pg/ml,两者之间具备统计学差异(P<0.05)。结论:黄板树根提取液熏洗治疗可以使 OA 关节滑液中炎性因子 IL-18 表达水平下降,提示黄板树根提取液可能对 OA 有一定的治疗作用。

关键词:骨性关节炎;黄板树根提取液;白细胞介素-18;滑液

The Expression and Significance of Huangban Tree Extract for IL-18 in Synovial Fluid of Patients with Osteoarthritis

WANG Feng-long¹, XIAO Zhi-qing¹, ZHU Jin-zhong¹, WANG Ai-ming¹, XU Zhou-fa¹, ZHANG Huo-lin¹, JIANG Jian-ming²
(1Heyuan hospital of Traditional Chinese Medicine of Guangdong Province, Heyuan517000;
2South Medical University Affiliated Nanfang Hospital, Guangzhou510515)

Abstract: Objective: To explore the expression and significance of Huangban tree extract for IL-18 in synovial fluid of patients with osteoarthritis (OA). Methods: Observed the open and pathological difference between normal synovium and OA synovium. Gathered the primary synovial fluid from OA patients (n=30), and then treated those patients with Huangban tree extract, taken the synovial fluid again after treatment, The concentrations of IL-18 were measured in human OA synovial fluid by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), compared the difference. Results: The normal synovium was light red or white porcelain, while the OA synovium was pink. The pathological section of synovium showed: compared to normal synovium, the OA synovium had evident hyperplasy in vessel and infiltrating by inflammatory factors. This was the character of chronic inflammation. The average value of IL-18 in OA before treatment was (52.625± 11.336) pg/ml. The average value after treatment was (22.512± 2.021) pg/ml. There was a significant statistics difference between them (P<0.05). Conclusion: After the treatment of Huangban tree extract IL-18 is lower expressed in synovial fluid of OA patients, it may play an important role in the treatment of OA.

Key words: Osteoarthritis; Huangban tree extract; Interleukin 18; Synovial fluid

中图分类号:R684.3

文献标识码:B

doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2015.09.001

在中老年人发病排行上,骨性关节炎(osteoarthritis,OA)仅次于心脑血管疾病,排于第二位,它是一种十分常见的老年骨关节退行性病变^[1]。它的发病机制主要是由于抗炎因子与促炎因子失衡,从而导致关节软骨破坏和滑膜炎反应。随着社会生活节奏的不断加快以及人口老龄化的迅速发展,各种因素造成的骨关节损伤和退变已经成为骨科医师面临的最普遍、最严峻的问题。从病因学方面来讲,骨性关节炎主要表现在两大方面:一是各种原因造成的软骨细胞性状改变,最后导致关节软骨发生破坏;二是滑膜组织发生炎症反应致使滑膜细胞受到炎性刺激,继而释放大量的炎症介质。通过既往研究发现,滑膜细胞可以释放的炎性介质有多种,白细胞介素-18(IL-18)是近年来人们通过研究发现的一种新的致炎细胞因子^[2],它的生物学功能

主要为介导组织炎症反应,并且与一些自身免疫性疾病有关联。多年来,医学研究工作者都在不断探索寻找一种积极而有效的治疗 OA 的方法,西医治疗从早期的口服药物治疗和关节腔注射,到中期的关节镜治疗,以至于终末期的人工关节置换术。虽然在关节疾病发生发展的某一过程中上述治疗都起到了一定的效果,但同时漫长的病程及高额的医疗费用也给患者及家属带来沉重的心理压力和经济损失。所以,寻找一种廉价、方便、且有效的骨性关节炎治疗方法,成为医学界的共识^[3]。

中医学按辨证论治将骨性关节炎分为三种证型:风寒湿痹证、瘀血痹阻证和肝肾不足证。中医认为,本病的发生以肾精亏虚为本,还与外邪侵袭、劳损过度、外伤等有关。本病基本病因病机为虚、瘀、湿、热,而精血亏虚、肝肾阴虚是发病的关键。病位在

* 基金项目:国家自然科学基金(编号:30571890)
广东省河源市社会发展科技计划项目(编号:2013054)

筋骨,与肝、肾密切相关。病性多为本虚标实,发作期以标实为主,缓解期以本虚为主。相对于西医不同阶段对症施治来讲,中医药^[4-5]一般多采用综合治疗的方法来对骨性关节炎进行辨证施治,主要包括全身中成药物治疗为主,局部手法按摩、针灸、熏药及功能锻炼等为辅的多方法综合治疗体系,具有自己独特的治疗优势。本院以往采用黄板树根提取液治疗慢性骨髓炎患者取得满意疗效,因黄板树根为独味中药,费用低廉,且其作用机制鲜见报道。故本研究旨在通过对骨性关节炎患者使用黄板树根提取液熏洗治疗,并分别提取治疗前后关节滑液,用 ELISA 法定量检测治疗前后滑液中炎症因子 IL-18 蛋白的表达水平,并比较其表达是否存在差异,明确黄板树根提取液在 OA 中的作用及意义,为 OA 患者提供一种“简、便、廉、验”的临床治疗方法。

1 对象与方法

1.1 研究对象 OA 滑膜标本主要取自南方医科大学附属南方医院脊柱骨病科收治的髌膝关节 OA 行关节置换术患者,患者诊断均采用美国风湿病学会 (ARA) 2001 年诊断标准,并排除其它疾病所导致的关节炎。正常关节滑膜标本取自创伤后截肢病人,所有取材均排除 OA 病史,术前均已告知患者,并取得患者知情同意;同时收集 2013 年 6 月~2014 年 12 月在河源市中医院骨伤科因膝关节骨性关节炎进行保守治疗的患者 30 例,其中男 17 例,女 13 例,年龄 41~85 岁,平均 (60.2 ± 11.3) 岁,分别抽取其治疗前后的关节滑液。所有 OA 患者诊断标准采用美国风湿病学会于 2001 年提出的膝 OA 诊断标准,具体如下:临床诊断+放射学标准:(1)前月大多数时间有膝痛;(2)骨赘形成;(3)年龄 <40 岁;(4)晨僵时间 <30 min;(5)有骨摩擦音。满足(1)+(2)条或(1)+(3)+(5)条,或(1)+(4)+(5)条者作为膝骨关节炎诊断,本研究得到所有对象的知情同意。

1.2 主要试剂及器材 黄板树根提取液,EP 管,离心管,倒置相差显微镜 (Olympus),超净工作台,组织切片设备,人白细胞介素 -18,ELISA Kit (Usnlife Science & Technology Company,武汉中美科技有限公司进口组装)。

1.3 滑膜组织病理切片及 HE 染色

1.3.1 组织病理切片法 (1)取材:分别取 OA 滑膜组织及正常滑膜组织,组织块大小为 $2.0\text{ cm} \times 2.0\text{ cm} \times 0.3\text{ cm}$;(2)组织固定:新鲜取材后,即刻以 10% 甲醛固定液固定组织块 12 h;(3)脱水透明:脱水步骤:80%、90%、95%、100%乙醇各 2 h;透明步

骤:二甲苯 I、二甲苯 II 各 1.5 h;(4)浸蜡、包埋、切片。

1.3.2 HE 染色法 (1)贴片与烤片;(2)切片在二甲苯中脱蜡 5~10 min;(3)移入二甲苯和纯酒精 (1:1) 混合液中 5 min 左右;(4)入 100%、95%、85%、70%乙醇,各级为 2~5 min,最后经蒸馏水转入染液;(5)苏木精染液染色 5~15 min;(6)水洗玻片上多余染液,0.5%~1%盐酸酒精 (70%酒精配制)分色片刻。镜检控制,直至细胞核及核内染色质清晰为止,约数 10 s;(7)流水冲洗 15~30 min,或者在碳酸锂饱和液中短时间碱化或蓝化,即细胞核呈蓝色;(8)蒸馏水短洗;(9)0.1%~0.5%伊红染液染色 1~5 min;(10)依次经 70%、85%、95%、100%乙醇脱水各 2~3 min;(11)二甲苯透明 (2 次),共约 10 min;(12)封片及镜检:擦去切片周围多余二甲苯,切勿干涸,迅速滴加适量中性树胶,再加盖玻片封固,在光镜下做病理学观察。

1.4 关节滑液中上清液收集 对 OA 患者治疗前抽取关节滑液 3 ml,分别编号,并置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用;对 OA 患者经黄板树根提取液熏洗 1 个疗程 (7 d) 后,再分别抽取其关节滑液 3 ml,对应编号,并置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用;

1.5 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测 将 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存的关节滑液放于冰盒完全解冻后,按 ELISA 检测试剂盒说明操作:加样,分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。除空白孔外,余孔分别加标准溶液或待测样品 $100\text{ }\mu\text{l}$,注意不要有气泡,轻轻混匀,酶标板加上盖, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 120 min,弃去液体,甩干,不用洗涤。每孔加检测溶液 A 工作液 $100\text{ }\mu\text{l}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,60 min。洗板 3 次, $350\text{ }\mu\text{l}$ /每孔,甩干。每孔加检测溶液 B 工作液 $100\text{ }\mu\text{l}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,60 min 洗板 5 次,甩干。依序每孔加底物溶液 $90\text{ }\mu\text{l}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光显色 30 min (此时肉眼可见标准品的前 3~4 孔有明显的梯度兰色,后 3~4 孔梯度不明显)。依序每孔加终止溶液 $50\text{ }\mu\text{l}$,终止反应 (此时兰色立转黄色)。用酶联仪在 450 nm 波长依序测量各孔的光密度 (OD 值)。

1.6 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件,对黄板树根提取液治疗前后 OA 患者关节滑液中 IL-18 含量进行比较,采用方差不齐的 t 检验进行分析,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 滑膜组织形态及病理切片观察 收取的 OA 滑膜组织与正常滑膜组织在外观上差异不大,肉眼观正常滑膜组织为瓷白色或淡粉色 (图 1),而 OA

滑膜组织多为粉红色(图 2)。病理切片 HE 染色显示:相比正常滑膜组织(图 3),OA 滑膜组织出现明显的血管扩张和炎细胞浸润(图 4 箭头所示),符合慢性炎症表现。



图 1 正常滑膜组织外观像



图 2 OA 滑膜组织外观像

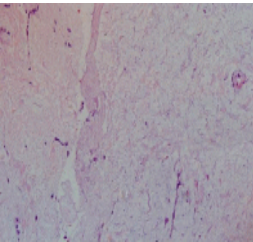


图 3 正常滑膜组织病理切片图
HE 染色(× 400)

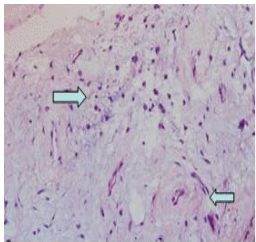
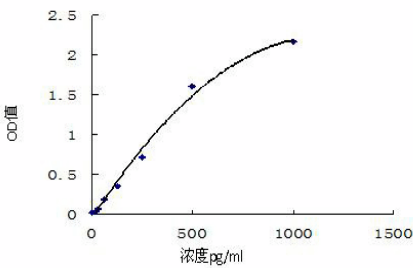


图 4 OA 滑膜组织病理切片图
HE 染色(× 400)

2.2 ELISA 法检测关节滑液中 IL-18 含量 根据酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(OD 值),以及 IL-18 标准曲线(图 5),计算待测标本浓度。对 OA 患者黄板树根提取液治疗前后关节滑液 IL-18 含量进行检测后进行统计学分析, $t=8.052, P<0.001$,治疗前后 IL-18 含量比较差异有统计学意义。见表 1。



回归方程: $y=-2E^{-06}x^2+0.003\ 9x-0.047\ 1, R^2=0.992$
图 5 IL-18 在关节滑液中的表达 ELISA 标准曲线

表 1 治疗前后 IL-18 含量比较(pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

时间	n	IL-18	t 值	P 值
治疗前	30	52.625± 11.336	8.052	0.000
治疗后	30	22.512± 2.021		

3 讨论

骨性关节炎是中老年人中最常见的疾病。目前据世界卫生组织调查,OA 的发病人口已占世界人口总数的 10%左右,多数学者认为 OA 的发病是多

因素的,虽然对于骨性关节炎的发病机理已有大量的研究报道,但目前学术界仍未有一个明确的共识;骨性关节炎的典型特征为骨赘的形成和软骨下骨的硬化^[6]。虽然骨性关节炎的发病也有一些易感因素,例如性别、肥胖,但是骨性关节炎最主要的易感因素是年龄^[7],Murphy 等^[8]研究显示接近 50%的成年人在 85 岁之前发展成有症状的骨性关节炎,这主要是随着年龄逐渐增加,对关节软骨有保护作用的蛋白多糖会逐渐减少,胶原纤维和糖化作用终末产物的交联显著增加,使这种老化软骨变成更脆弱和易受损伤而关节结构受破坏^[9-10],但这些都是骨性关节炎病变的终末期表现,要想真正延缓和控制骨性关节炎的发病,还要从关节早期的微小病变研究做起。从目前对于骨性关节炎的研究情况表明,大多数学者在骨性关节炎早期的病变过程中均涉及滑膜炎这一病理改变,滑膜发生炎症使其产生的滑液中释放大量的细胞因子,其中部分细胞因子均有诱导炎症发生发展的作用,目前研究较多的细胞因子主要有:IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12、肿瘤坏死因子、一氧化氮及前列腺素 E₂ 等,它们主要是通过直接起效、与其他炎性因子结合或通过其分解转化的代谢产物发生炎性作用。

本研究先从收集的滑膜组织肉眼形态观察及镜下病理切片观察两个方面进行研究对比,收取的 OA 滑膜组织与正常滑膜组织在外观上差异不大,肉眼观正常滑膜组织为瓷白色或淡粉色,而 OA 滑膜组织多为粉红色,病理组织切片 HE 染色显示相比正常滑膜组织,OA 滑膜组织中出现明显的血管扩张和炎细胞浸润,完全符合慢性炎症的表现,OA 滑膜组织肉眼观察色泽较正常滑膜组织深,可能与其炎症反应血管扩张及充血水肿有一定关系,这也在一定程度上证明了在 OA 滑膜组织中炎症反应及炎性介质的参与。

IL-18 是近年来研究学者新发现且越来越被重视的一种致炎因子,它具有多种生物学功能参与多种炎症反应过程,且在不同的炎症反应中发挥不同的生物学效应。IL-18 最初是由国外研究学者从注射脂多糖的小鼠肝脏及热灭活丙酸杆菌中提取一种能诱导 Th1 产生干扰素- γ 的细胞因子^[11],它在结构上与 IL-1 相类似,但在功能上又与 IL-12 大近相同。目前有研究表明 IL-18 隶属于 IL-1 家族,因为其在发挥生物学效应时的受体和转导途径与 IL-1 完全相同。有研究表明:在发挥炎症效应方面,IL-18 一方面可以通过协同 IL-12 一起发挥作用,然后诱导

TNF- α 的表达,而 TNF- α 已被研究证实对骨关节炎的发生和滑膜组织的增生发挥促进作用;另一方面,IL-18 可以对关节软骨细胞 COX-2、iNOS 等基因的表达产生直接刺激作用,从而诱导软骨细胞产生大量炎性介质,如 PGE₂、NO 等,从而参与关节的炎症、损伤及退行性变等过程^[12]。此外,在对类风湿性关节炎的研究过程中发现,类风湿性关节炎患者关节滑液和血清中 IL-18 表达水平较其他组织明显增高,且在治疗过程中通过试验性使用 IL-18 结合蛋白及 IL-18 单克隆抗体进行治疗,炎症的发展可被明显控制,上述研究表明 IL-18 可作为治疗类风湿性关节炎的临床疗效和预后判断的一个重要指标。有研究表明,在局部滑膜炎中 IL-18 表达能明显提高和扩增 TNF- α 及 IL-1 β 的表达水平,且在疾病的不同阶段这种扩增效应不同,在炎症急性期这种效应尤为明显,这表明 IL-18 可能是骨关节炎起病及发生过程中最初的、主要的一种细胞因子^[13-14]。

中医中药防治骨关节炎具有悠久历史,并且其具有独特的疗效。膝骨关节炎属中医“痹证”范畴,基本病机特点为“本虚标实、虚实夹杂”,《素问·痹论》“风寒湿三气杂至,合而为痹也”,感受风、寒、湿、之邪,使气血运行不畅,经络痹阻,而形成痹证。黄板树根是在吸收河源民间疗法的基础上发掘的单方验方,该药性平,味甘微涩,长期临床实践和民间考察发现该药具有活血止痛、祛风湿通经络、清热解毒等作用,《内经》中记载:“其有邪者,渍形以为汗”,故选用熏洗疗法,局部吸收,直达病所,达到祛风除湿、活血止痛之效,能扩张血管,促进患处局部的血液循环,有利于炎症介质吸收,以缓解疼痛,滑利关节,从而达到改善关节功能的作用^[15]。因黄板树根取自民间经验方,目前对其研究报道仅见于其治疗慢性骨髓炎的实验研究^[16],对于其在骨性关节炎中所起的生物学机理有待课题组进一步研究。

本研究通过对 OA 患者使用黄板树根提取液熏洗治疗,并比较治疗前后关节滑液中 IL-18 的表达水平,统计学显示黄板树根熏洗治疗前后关节滑液中 IL-18 表达含量比较差异有统计学意义。这也从一方面证实了黄板树根提取液熏洗治疗后可以使 OA 关节滑液中炎性因子 IL-18 表达下调,能更直接地反映出黄板树根提取液对于 OA 病变过程中炎性因子 IL-18 的表达有一定的干预控制作用,从而达到治疗骨关节炎的作用。本研究期间未发生并发症,说明黄板树根提取液熏洗治疗安全性高,价格低廉,效果确切,操作简单,易于推广。但因骨关节炎病理

机制复杂,因此对黄板树根提取液抑制 IL-18 表达治疗骨关节炎的作用机制需做更进一步的研究,从而明确黄板树根提取液消炎止痛的作用机制,为临床治疗 OA 提供更多理论依据。

参考文献

[1]Hamerman D.Aging and osteoarthritis: basic mechanisms [J].J Am Geriatr Soc,1993,41(7):760-770

[2]Ushio S,Namba M,Okura T,et al.Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor,expression in Escherichia coli,and studies on the biologic activities of the protein[J].Immunol,1996,156(11):4274-4279

[3]张福强,吴明霞,刘献祥,等.福州市中老年人骨性关节炎的性别和年龄分布[J].福建中医学院学报,2009,19(1):43-46

[4]李西海,陈文列,刘献祥.补肾柔肝法防治骨性关节炎作用机制探讨[J].福建中医药大学学报,2011,21(2):66-69

[5]朱江伟,朱伟南,李锐健.补肾活血法防治关节软骨退变的研究进展[J].广东医学,2010,31(3):389-391

[6]Loeser RF.Age-related changes in the musculoskeletal system and the development of osteoarthritis [J].Clin Geriatr Med,2010,26(3):371-386

[7]Zhang Y,Jordan JM.Epidemiology of osteoarthritis [J].Clin Geriatr Med,2010,26(3):355-369

[8]Murphy L,Schwartz TA,Helmick CG,et al.Lifetime risk of symptomatic knee osteoarthritis [J].Arthritis Rheum,2008,59:1207-1213

[9]Verzijl N,DeGroot J,Bank RA,et al.Age-related accumulation of the advanced glycation endproduct pentosidine in human articular cartilage aggrecan:the use of pentosidine levels as a quantitative measure of protein turnover[J].Matrix Biol,2001,20(7):409-417

[10]DeGroot J,Verzijl N,Wenting-van Wijk MJ,et al.Accumulation of advanced glycation end products as a molecular mechanism for aging as a risk factor in osteoarthritis [J].Arthritis Rheum,2004,50(4):1207-1215

[11]Okamura H,Tsintsi H,Komatsu T,et al.Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells [J].Nature,1995,378(6552):88-91

[12]Dai SM,Shan ZZ,Nishioka K,et al.Implication of interleukin-18 in production of matrix metalloproteinases in articular chondrocytes in arthritis:direct effect on chondrocytes may not be pivotal [J].Ann Rheum Dis,2005,64(5):735-742

[13]Joosten L,Radstake T,Lubberts E,et al.Association of interleukin-18 expression with enhanced levels of both interleukin-1 [beta] and tumor necrosis factor [alpha] in knee synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis[J].Arthritis Rheum,2003,48(2):339-347

[14]王凤龙,江建明,肖军,等.IL-18 在骨性关节炎滑膜细胞中的表达及意义[J].中华风湿病学杂志,2010,14(4):260-262

[15]陈海东,王培民,范竟,等.膝骨关节炎外敷中药方关联规则的研究[J].中医正骨,2012,24(1):32-34

[16]肖智青,张雄辉,朱锦忠,等.黄板树根治疗慢性骨髓炎的疗效观察[J].中国中医骨伤科杂志,2011,11(19):17-18

(收稿日期: 2015-04-13)