

文章编号:1001-6880(2014)7-1081-05

冠盖藤水提物对大鼠膝骨性关节炎 COX₂、NO、iONS 表达及关节组织形态学的影响

叶丽芝^{1,2},秦莉花^{3,4},陈晓阳^{1,2*},李晟^{2,4*},黄宽^{1,2},吴奇峰⁵,唐文富⁵,刘容⁵,贺立娟⁵¹湖南中医药大学药学院; ²中药现代化教育厅重点实验室; ³中药药性与药效国家中医药管理局重点实验室;⁴湖南中医药大学护理学院; ⁵湖南中医药大学中西结合学院,长沙 410208

摘要:研究冠盖藤水提物对膝骨性关节炎大鼠血液及关节液 COX₂、NO、iONS 含量的影响。将 SD 大鼠分为正常对照组、模型组、阳性组(硫酸氨基葡萄糖组)、冠盖藤中、高剂量组,制备 4% 木瓜蛋白酶溶液与 0.3 mol/L 半胱氨酸溶液(1:1)的混合液,分别于第 1、3、7 d 注入 SD 大鼠右膝关节造模,每次 20 μL。冠盖藤中、高剂量组以 4.62 g 生药/kg、9.24 g 生药/kg,阳性组以 0.133 mg/kg 硫酸氨基葡萄糖分别灌胃,正常对照组和模型组分别予以等量蒸馏水;连续给药 4 周后,进行指标测定。与模型组比较,冠盖藤中、高剂量组血液及关节液中 COX₂、iONS、NO 含量明显降低,能有效抑制关节软骨组织形态的改变,间接保护软骨细胞和促进受损软骨细胞恢复的作用。冠盖藤能有效抑制关节液中 COX₂、NO、iONS 表达,保护软骨细胞和促进受损软骨细胞恢复的作用,是延缓关节软骨退变的机制之一。

关键词:冠盖藤;骨性关节炎;COX₂;NO;iONS;软骨组织形态**中图分类号:**R9**文献标识码:**A

Effects of *Pileostegia viburnoides* Water Extract on the Expression of COX₂, NO, iONS and Joint Histomorphology of Rats with Knee Osteoarthritis

YE Li-zhi^{1,2}, QIN Li-hua^{3,4}, CHEN Xiao-yang^{1,2*}, LI Sheng^{2,4*},HUANG Kuan^{1,2}, WU Qi-feng⁵, TANG Wen-fu⁵, LIU Rong⁵, HE Li-juan⁵¹College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine; ²Key laboratory of education department on Chinese medicine modernization; ³Key laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine on drug properties and effects; ⁴College of Nursing, Hunan University of Chinese Medicine; ⁵College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: In this study, the effect of *Pileostegia viburnoides* water extract on the contents of COX₂, NO, iONS in blood and joint fluid of rats with knee osteoarthritis was studied. The SD rats were randomly divided into 5 groups: normal control group, model group, GS-positive group (glucosamine sulfate group), *P. Viburnoides* middle dose group and *P. viburnoides* high dose group. The rat model with knee osteoarthritis was built by injecting a mixture of 4% papain solution and 0.3 mol/L cysteine solution (1:1) into the right knee joint of SD rat at the first, 3rd and 7th days, 20 μL at a time. The *P. viburnoides* middle, high dose groups were intragastrically administrated with 4.62 g/kg and 9.24 g/kg of *P. viburnoides* water extract. The GS-positive group was intragastrically administrated with 0.133 mg/kg of glucosamine sulfate. The normal control and model groups were intragastrically administrated with the same volume of distilled water. After 4 weeks treatment, the contents of COX₂, NO, iONS in the blood and joint fluid in *P. viburnoides* middle and high dose groups were decreased significantly compared with that of model group. In addition, the results showed that *P. viburnoides* can effectively inhibit the histomorphologic changes of articular cartilage tissue, indirectly protect cartilage cells and stimulate the recovery of damaged cartilage cells. *P. viburnoides* can effectively inhibit the expression of COX₂, NO, iONS in

收稿日期:2013-11-25

接受日期:2014-04-29

基金项目:湖南省中医药管理局项目(2009033;201232);湖南省大学生创新课题(2013-119)

* 通讯作者 Tel:86-015974203263; E-mail:cxy53@126.com; 479157643@qq.com

synovial fluid and it is one of the mechanisms of delaying the degeneration of articular cartilage.

Key words: *Pileostegia viburnoides*; osteoarthritis; COX₂; NO; iONS; cartilage histomorphology

膝骨性关节炎(knee osteoarthritis, KOA), 主要病变为关节软骨退行性病变和继发性骨质增生, 严重影响患者的活动功能, 降低了生活质量。尽管膝骨性关节炎是一种最普遍的关节疾患, 而其治疗方法却滞后于其他关节炎性疾病。医学研究认为, 此病引起疼痛的原因可能与滑膜炎、骨增生、骨内和关节内静脉压升高、关节囊牵张、软骨下骨骨折等有关, 但这些原因直接或间接涉及关节内局限性炎症的基本病理变化。虎耳草科冠盖藤^[1], 具祛风除湿、散瘀止痛、解毒消肿功效, 民间常用作关节炎的治疗, 疗效显著。课题组前期对冠盖藤进行生药学鉴定^[2], 并观察冠盖藤水提液对骨关节炎大鼠模型血常规、白介素、肿瘤坏死因子等含量的影响, 初步证实柔毛冠盖藤的抗炎镇痛效应; 本实验旨在进一步探讨其抑制关节软骨退变的作用机理。

1 材料与仪器

1.1 动物

清洁级成年 SD 大鼠 50 只, 2 月龄雌雄各半, 体重 300 ± 20 g, 长沙市天勤生物技术有限公司提供, 合格证号: SCXK(湘)2009-0012。

1.2 药物

冠盖藤在湖南省怀化市沅陵采集, 经湖南中医药大学药学院中药鉴定教研室鉴定为柔毛冠盖藤, 制备成水煎液, 称取冠盖藤药材 1500 g, 分 3 次提取, 最后浓缩成 1 g 生药/mL 的药液, 备用。硫酸氨基葡萄糖胶囊(爱尔兰罗达药厂, 注册证号 H20090797 批号:C11006A)。

1.3 主要仪器及试剂

酶标仪(352 型, 芬兰 Labsystems Multiskan MS); 电子天平(德国 Sartorius 公司产品, 型号: BP211D); 电热三用水箱(北京市医疗设备厂); TGL-16 高速台式离心机(江苏大地自动化仪器厂); 数码显微成像系统(Motic—ba200); 数码显微镜(SXJ—2)。木瓜蛋白酶(北京索莱宝科技有限公司); 半胱氨酸(国药集团化学试剂有限公司, 批号:F20111010)。COX₂、iNOS、NO 试剂盒(美国 RD 公司)。

2 实验方法

2.1 造模、分组及给药

将 SD 大鼠以随机数字表法分组, 即: 正常对照组、模型组、阳性组、冠盖藤中剂量组(简称 GGT 中剂量组)、冠盖藤高剂量组(简称 GGT 高剂量组),

每组各 10 只。参照文献^[3], 制备大鼠膝骨性关节炎模型: 4% 木瓜蛋白酶溶液 0.3 mol/L 及半胱氨酸溶液的 1:1 混合液, 混置 0.5 h 后, 各组(除空白对照组外)均在第 1、3、7 d, 水合氯醛腹腔麻醉, 于右膝关节腔内注射混合液 20 μL。5 组大鼠正常饮食, 模型制备成功后, 用药各组按 1 mL/100 g 灌胃给予相应药液(冠盖藤中、高剂量组分别以 4.62 g 生药/kg、9.24 g 生药/kg, 硫酸氨基葡萄糖组以 0.133 mg/kg), 正常对照组、模型组给予等体积的蒸馏水, 每日 1 次。治疗 4 周后处理大鼠, 测定相关指标; 取材前禁饮食 24 h。

2.2 观察指标

2.2.1 关节活动度

将大鼠右膝关节伸展, 回缩膝关节, 用量角器测量其伸展至回缩的角度。

2.2.2 血液

水合氯醛腹腔麻醉, 麻醉成功后, 腹部正中切口, 仔细分离腹主动脉, 常规腹主动脉采血, 置于 15 mL 离心管中, 37 °C 恒温水浴箱放置 30 min, 3000 rpm 离心 30 min。吸取上层血清, -20 °C 保存备用。采用 ELISA 法, 按说明书操作检测 COX₂、NO、iNOS 的含量。

2.2.3 关节液

取膝关节髌韧带的外侧, 常规备皮消毒。以 5 mL 医用无菌注射配用 1 mL 医用无菌注射针头, 行右膝关节腔穿刺术, 先注入 0.9% 生理盐水 1.5 mL 后, 反复活动膝关节 20 次, 缓慢抽取关节液, 并放入 1.5 mL EP 管中, 3000 rpm 离心 30 min, 取上清液于 1.5 mL EP 管, -20 °C 保存、备用。采用 ELISA 法, 按说明书操作检测 COX₂、NO、iNOS 含量。

2.3 组织病理学检测

取胫骨平台关节软骨, 修成约 0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm, 4% 多聚甲醛固定。常规系列脱水、脱钙, 石蜡包埋切片, 脱蜡入水, PBS 冲洗, HE 染色, 充分冲洗, 室温干燥, 中性树脂封片, 光学显微镜下观察各组关节软骨形态结构。按照 Mankin 软骨组织形态学改变的组织学分级标准, 0 级: 滑膜完整, 细胞排列整齐, 无充血水肿, 无炎性细胞浸润。关节软骨完整, 无剥离, 无坏死; 潮线清晰可见。I 级: 滑膜血管充血水肿, 表层细胞增生, 骨膜增生, 骨质疏松, 潮线间断。II 级: 滑膜细胞显著增生, 滑膜内血管增生, 肉芽组织形成, 关节软骨糜烂, 潮线消失。III 级: 滑膜内肉芽组织纤维化, 关节软骨有灶性坏死。评

分越高,表明软骨退变越严重。

2.4 滑膜液炎性细胞计数

取右膝关节滑膜液涂片计数炎性细胞,光镜(10×40倍)下观察记录。每张涂片随机观察5个视野(HP),计算每一视野平均炎性细胞数。计数标准为“-”细胞数为0个/HP,“+”细胞数为10个/HP,“++”细胞数为10~20个/HP,“+++”细胞数为20个/HP。

2.5 统计学分析

实验数据均用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用SPSS17.0进行统计分析。进行正态性检验;多组计量资料采用one-way ANOVA,方差齐时采用LSD和SNK法,方差不齐时采用Tamhane's T2或Dunnett's T3法。等级资料采用Ridit分析, $P < 0.05$ 有统计学意义或检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 实验结果

3.1 关节活动范围

冠盖藤对大鼠膝关节活动范围有明显改善,结果如表1。各剂量组连续给药4周后,空白对照组、

阳性组、GGT中剂量组、GGT高剂量组与模型组比较,均有显著差异, $P < 0.01$ 。

表1 各组关节活动度检测结果($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Testing results of joint range motion ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 Dose	关节活动度 Joint range motion
正常对照组 Normal	-	134.13 ± 2.70°
模型组 Model	-	50.74 ± 5.26°
阳性组 Positive control	0.133	79.26 ± 5.44° **
中剂量组 GGT Middle dose	4.62	67.16 ± 6.30° **
高剂量组 GGT High dose	9.24	76.64 ± 6.24° **

注:与模型组比较,* $P < 0.05$;** $P < 0.01$ 。下同。

Note: Compare with model, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. Same as below.

3.2 血液中 COX₂、NO、iNOS 含量的变化

模型组血液中 COX₂、NO、iNOS 的含量,显著高于空白对照组及其他用药组,结果见表2。血液中 COX₂ 含量,阳性组显著低于 GGT 中、高剂量组;血液中 NO 含量,阳性组与 GGT 中、高剂量组无显著差异,表达水平接近;血液中 iNOS 含量,阳性组明显低于 GGT 中剂量组,与高剂量组无统计学意义表达水平接近。

表2 血清中 COX₂、NO、iNOS 含量的变化($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Contents of COX₂, NO, iNOS in serum of different groups ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 Dose	COX ₂ (U/L)	NO (U/L)	iNOS (pg/mL)
正常对照组 Normal	-	77.97 ± 6.30	22.87 ± 2.62	361.33 ± 17.65
模型组 Model	-	174.29 ± 6.54	50.83 ± 4.71	652.55 ± 16.57
阳性组 Positive control	0.133	113.80 ± 7.49 **	30.52 ± 3.50 **	420.82 ± 17.71 **
中剂量组 GGT Middle dose	4.62	137.48 ± 8.95 **	33.87 ± 3.08 **	455.11 ± 20.61 **
高剂量组 GGT High dose	9.24	127.34 ± 8.11 **	31.42 ± 3.15 **	428.34 ± 17.18 **

3.3 关节液 COX₂、NO、iNOS 含量的变化

模型组关节液中 COX₂、NO、iNOS 的含量显著高于空白对照组及其他用药组,结果见表3。冠盖

藤各治疗组可降低关节液中 COX₂、NO、iNOS 的含量,尤以高剂量组疗效显著,与对照组接近。

表3 关节液 COX₂、NO、iNOS 含量的变化($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Table 3 Content s of COX₂, NO, iNOS in joint fluid of different groups ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 Dose	COX ₂ (U/L)	NO (U/L)	iNOS (pg/mL)
正常对照组 Normal	-	102.34 ± 5.72	23.38 ± 2.79	407.55 ± 7.35
模型组 Model	-	192.09 ± 8.37	51.93 ± 4.35	708.22 ± 8.97
阳性组 Positive control	0.133	116.74 ± 7.34 **	28.49 ± 2.67 **	473.26 ± 8.19 **
中剂量组 GGT Middle dose	4.62	131.92 ± 5.05 **	33.46 ± 4.14 **	514.85 ± 6.87 **
高剂量组 GGT High dose	9.24	122.83 ± 9.96 **	31.98 ± 3.45 **	504.23 ± 7.86 **

3.4 关节软骨组织形态学改变

在光镜下观察,结果如图1。空白对照组,关节软骨基质染成粉红色,着色均匀,四层结构清晰,软骨表面光滑,表层细胞呈梭形,近似水平排列,中间层细胞圆形,散在分布,柱状层细胞排列呈柱状,如图1(A);模型组,关节软骨表层变薄层、部分区域

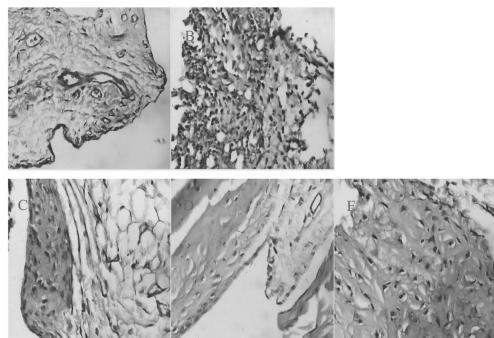


图1 SD大鼠关节软骨病理切片(HE, $\times 200$)

Fig. 1 Articular cartilage pathological section of SD rats (HE, $\times 200$)

呈绒毛状,软骨细胞数目减少,细胞排列紊乱,软骨细胞坏死,碎裂,关节软骨潮线不清晰,如图1(B);阳性组,关节软骨表面较规则,排列较整齐,少量肉芽组织,毛细血管增生,四层结构存在,关节软骨层变薄,如图1(C);GGT中剂量组、GGT高剂量组,关节软骨层变薄,表浅层软骨细胞消失,各层细胞分布不均,关节软骨的退变程度介于模型组与阳性组之间,如图1(D)、(E)。

3.5 软骨组织形态学改变的组织学分级

由Ridit分析显示,R由大到小排列、病变程度由重至轻依次为:模型组>GGT中剂量组>GGT高剂量组>阳性组>空白对照组(总R=0.50)。同时LSD和SNK两两间比较,阳性组、GGT中剂量组、GGT高剂量组与模型组比较均为P<0.01。提示冠盖藤能够抑制滑膜内血管增生及肉芽组织形成,抑制关节软骨糜烂或坏死,对造模后膝关节内滑膜及软骨的病理变化有明显的改善作用(表4)。

表4 膝骨性关节炎各组Mankin评分($n=10$)

Table 4 Mankin scores of rat knee osteoarthritis

组别 Group	Mankin评分 Mankin scores				
	0	I	II	III	R
正常对照组 Normal	10	0	0	0	0.16
模型组 Model	0	0	3	7	0.87
阳性组 Positive control	3	5	2	0	0.42 * *
中剂量组 GGT Middle dose	1	4	5	0	0.56 * *
高剂量组 GGT High dose	2	5	3	0	0.48 * *

3.6 滑膜液炎性细胞计数

由Ridit分析显示,R由大到小排列、病变程度由重至轻依次为:模型组>GGT中剂量组>GGT高剂量组>阳性组>空白对照组(总R=0.50),同

时LSD和SNK两两间比较,阳性组、GGT中剂量组、GGT高剂量组与模型组比较均为P<0.01,有显著差异。提示冠盖藤能较好缓解OA的炎性症状。结果如表5。

表5 膝骨性关节炎各组滑膜液炎性细胞计数($n=10$)

Table 5 The count of inflammatory cell in joint fluid of rat knee osteoarthritis ($n=10$)

组别 Group	炎性细胞计数分级 Counts and sorts of inflammatory cell in joint fluid				
	-	+	++	+++	R
正常对照组 Normal	6	4	0	0	0.15
模型组 Model	0	0	3	7	0.82
阳性组 Positive control	0	5	5	0	0.46 * *
中剂量组 GGT Middle dose	0	3	5	2	0.58 * *
高剂量组 GGT High dose	0	5	4	1	0.49 * *

4 讨论

骨性关节炎,在病理过程中会出现炎症因子大量释放,造成滑膜和关节周围组织炎症、软骨破坏及增生等病变。前列腺素 E2(PGE2)是参与此病理变化的主要介质,它可激活破骨细胞。破坏骨与软骨,并激惹血管新生,介导疼痛、炎症和发热等反应。环氧化酶(COX)在正常组织细胞内的活性极低,只有受到诱导才能大量产生。金荣忠等^[4]的临床研究,表明 COX₂ 在膝关节 OA 软骨组织中表达增加。

NO 是一种高反应性细胞毒的自由基,受许多因子调节,但在许多疾病中对组织造成损伤已得到了证实。它在 OA 的软骨组织中自发地产生,是重要的信号分子和效应分子,广泛参与 OA 软骨细胞和软骨基质的代谢过程,与 OA 的发病密切相关,其量与病情的严重度呈正相关。大量统计资料表明,单味中药、中药有效部位或有效成分具有直接抑制 COX-2 的活性或抑制 COX-2 mRNA 及蛋白表达等方面来干扰其功能,达到抗炎效果。孙炜等人^[5]实验证明,iNOS 抑制剂能影响关节软骨修复和组织胶原的表达,可明显增加 I 型胶原表达和软骨厚度。因此,抑制 iNOS 的表达对于维持软骨表达有积极意义。由于前期试验,参考《中华本草》冠盖藤生药材:成人 1 日用量为 50 g,按动物与人体临床用量系数换算,以人体等效剂量的 1、4、8 倍量作为动物的低、中、高剂量。研究结果显出冠盖藤毒性低,高、中剂量组在镇痛、抗炎有较为显著的作用,但低剂量组效果不明显。因此,本实验主要考察中、高剂量的抗炎作用。对照药硫酸氨基葡萄糖胶囊作为第 1 个经临床证明的骨关节炎改善药,除改善关节软骨组织形态外,也与氨基葡萄糖具有抗氧化作用,从而减少受 L-1 刺激的酶的表达(如 MMP-3、iNOS、COX₂)^[6],但抗炎作用方面,就本实验而言,由于实验时间的局限性,通过短期观察冠盖藤用药组的抗炎作用优于硫酸氨基葡萄糖用药组。对于后期抗炎效果的比较还需进一步试验观察。炎症损伤常引起渗出、增生,在 OA 血瘀证的病理改变中有着重要的意义。炎症可能导致瘀血也可能由瘀血引发炎症。

与血瘀证在病理病机方面存在正密切关系,在之后的科研工作中可进行进一步的探索。

本实验显示,冠盖藤水提物能消除关节肿胀,明显改善大鼠关节活动范围;模型组的血液及关节液中 COX₂、NO、iNOS 含量均呈高表达,而 3 个用药组均可使此值降低,冠盖藤高剂量组疗效接近硫酸氨基葡萄糖对照组。冠盖藤水提液,能有效抑制关节组织形态的改变,起到对软骨外结构的调节作用,并起到间接保护软骨的作用。实验结果提示,抑制 COX₂、NO、iNOS 表达是冠盖藤水提物控制 OA 炎症,以缓解疼痛、延缓关节软骨的退变的作用机理之一。这为临床推广应用提供了理论依据,也为冠盖藤新药开发提供了实验资料。

参考文献

- 1 Cai GX (蔡光先). Hunan Pharmaceutical Journal. Changsha:Hunan science and Technology Press(湖南科学技术出版社),2004. 3360.
- 2 Chen XY(陈晓阳),Zhong HM(钟华美),Wu YF(吴艳飞), et al. Pharmacognostical studies on medicinal parts of *Pileostegia viburnoides*. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药),2012,23:901.
- 3 Sun LN(孙鲁宁),Zhao YH(赵燕华),Huang GC(黄桂成), et al. Relationship between synovium pathological change and injection timing in rabbits with papain-induced knee osteoarthritis. *J Clin Rehab Tiss Eng Res*(中国组织工程研究与临床康复),2011,15:9311-9313.
- 4 Jin RZ(金荣忠),Tan GM(谈国明),Hu HD(胡辉东). Expressions of cyclooxygenase-2 gene in cartilaginous tissue of knee joint osteoarthritis and its clinical value. *Orthopaedic Biomech Mater Clin Study*(生物骨科材料与临床研究),2010,7:18-20.
- 5 Sun W(孙炜),Wang JX(王吉兴),Jin DD(金大地), et al. Sirius-red staining study the effect of collagen expression in articular cartilage repair tissue by inducible nitric oxide synthase inhibitor. *J Prac Orthopaedics*(实用骨科杂志),2009,15:106-114.
- 6 Annefeld M. Glucosamine sulfate: the first clinical proven disease modifying drug for osteoarthritis. *Chin J New Drugs Clin Remedies*(中国新药与临床杂志),2005,4:259-262.