

补肾固筋方对 SD 大鼠膝骨关节炎 IL-1、iNOS 分泌的抑制作用

张冲¹, 渠玲玲², 王恒树³, 张春利³, 李双成², 黄芸^{2*}, 吴中秋^{4*}¹河北省中医院骨三科, 石家庄 050000; ²河北医科大学;³河北医科大学第二医院, 石家庄 050011; ⁴河北中医学院, 石家庄 050017

摘要: 探讨中药补肾固筋方对 SD 大鼠膝骨关节炎中 IL-1、TNF- α 的抑制作用。44 只 SD 大鼠随机分为正常组、予生理盐水的模型组、美洛昔康组和补肾固筋方组, 除正常组外均采用右后膝改良 Hulth 法造模, 连续干预 12 周, 取血清及股骨内髌关节软骨、滑液及软骨下骨, ELISA 法检测 IL-1 (白细胞介素-1)、iNOS (诱导型一氧化氮合酶) 含量。结果发现美洛昔康组关节间隙狭窄、关节面粗糙, 骨赘明显重于补肾固筋方组; 补肾固筋方组关节间隙稍窄伴轻微骨赘。模型组 IL-1、iNOS 含量较正常组升高 ($P < 0.01$); 补肾固筋方组和美洛昔康组含量比模型组降低 ($P < 0.01$) 且两组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。提示补肾固筋方通过有效抑制 IL-1、iNOS 的分泌促进骨关节炎软骨修复。

关键词: 补肾固筋方; 美洛昔康; 膝骨关节炎; 软骨细胞; 白细胞介素-1; 诱导型一氧化氮合酶

中图分类号: Q939.9

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.07.026

Inhibitory Effect of Bu-Shen Gu-Jin Prescription on Interleukin-1 and Inducible Nitric Oxide Synthase in SD Rat Knee Osteoarthritis

ZHANG Chong¹, QU Ling-ling², WANG Heng-shu³, ZHANG Chun-li³,LI Shuang-cheng², HUANG Yun^{2*}, WU Zhong-qiu^{4*}¹Third Orthopaedics Department of Hebei TCM Hospital, Shijiazhuang 050000, China; ²HebeiMedical University; ³The Second Hospital of Hebei Medical University,Shijiazhuang 050011, China; ⁴Hebei Traditional Chinese Medical University, Shijiazhuang 050017, China

Abstract: The aim of this study was to explore the inhibitory effect of traditional Chinese medicine Bu-Shen Gu-Jin prescription (BSGJP) on the secretion of interleukin-1 (IL-1) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in SD rat knee osteoarthritis. A total of 44 SD rats were randomly divided into normal group, model group, meloxicam model group and BSGJFP group, $n = 11$ for each group. The rats were modeled of improved Hulth method on the right hind limb knee cartilage except for the normal group. After 12 weeks' treatment, the expressions of IL-1, iNOS in serum, synovial fluid and osteoarthritis of rats were detected and compared by means of enzyme-linked immunosorbent assay. The results showed that the articular surface of meloxicam group was rough and joint space of meloxicam group was narrow. The osteophyte of meloxicam group was significantly heavier than that of BSGJP group. The expression of IL-1 and iNOS of model group was significantly higher ($P < 0.01$) than that of normal group, while the levels of IL-1 and iNOS in BSGJP group and meloxicam group were significant lower than those of other groups ($P < 0.01$). No significant difference ($P > 0.05$) of IL-1 and iNOS levels was detected between these two groups. The results demonstrated that BSGJP can play a role in promoting cartilage repair by effectively suppress the secretion of IL-1 and the expression of iNOS. Our study provided a preliminary experimental basis for using BSGJP as a clinical drug.

Key words: Bu-Shen Gu-Jin prescription; meloxicam; knee osteoarthritis; chondrocytes; interleukin-1; inducible nitric oxide synthase

膝骨性关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 软骨下骨萎缩象牙样硬化, 关节囊纤维变性为病理特征的

慢性退行性病变。病变关节肿胀轻度压痛, 伴滑膜炎时可见关节内积液, 严重者有不同程度的肌萎缩或关节畸形。《素问·痹论》: 风寒湿三气杂至, 合而为痹^[1]。临床多用非甾体类药物或胫骨高位截

收稿日期: 2015-01-21 接受日期: 2015-06-03

基金项目: 河北省中医药类科研技术指导性课题 (2014172)

* 通讯作者 E-mail: zhanchg9413@sina.cn; 199876m@sina.cn

骨、人工关节置换术,患者难以接受^[2]。近年有学者研究发现熟地、千年健等中药治疗 KOA 疗效确切^[3]。本实验拟阐明补肾固筋方对 IL-1、iNOS 的调节与 KOA 的作用机制。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

SD 大鼠 44 只,15 月龄,健康,雄性,饲养到 28 月龄体重 350~370 g,根据人鼠龄换算此月龄大鼠与中老年人相近。河北医科大学实验动物中心提供[动物质量合格证号:SYXK(沪)2013-0231]。

1.2 药物

补肾固筋方组:熟地 15 g、补骨脂 12 g、枸杞子 10 g、巴戟天 10 g、牛膝 12 g、丹参 10 g、木瓜 8 g、鸡血藤 10 g,根据进食情况、精神,喜暖恶寒,活动等中医辨证加减治疗,风寒湿痹加防风、羌活;风湿热痹加茯苓、石膏;瘀血闭阻加红花、地龙;肝肾亏虚偏阴虚加山茱萸、牛膝;偏阳虚加附子、肉桂;取汁 300 mL。药液浓缩成 6 g/mL;美洛昔康胶囊,7.5 mg,四川宝光药业,国准字:H20010209,批次:120502770265,配成 0.5 mg/mL 溶液。

1.3 主要试剂及仪器

SD 大鼠 IL-1、iNOS ELISA 试剂盒(规格:96T, Abcam US,批号:AB22031),显色剂显色(DAB 等),采用酶联免疫吸附剂测定法检测血清软骨及滑液标记物;酶联免疫检测仪(ELX-800 US)、96 孔板(Costar US);Retsch 德国干燥箱(型号:TG100, Germany RETSCH Company);恒温水箱(DDIL-5 型,上海安亭科学仪器厂);石蜡切片机(u-641 型,美国贝克曼公司);光学显微镜照相系统(BH-5 型日本 Olympus 公司);全自动图像分析系统(MCS-7200,德国 Leica);723 分光光度计(ELX8086 型,美国宝特公司);数码 X 光机(DR-500,美国 GE 公司)。

2 实验方法

2.1 模型制备

实验动物随机分为正常组、模型组(生理盐水组)、美洛昔康组及补肾固筋方组,每组 11 只,除正常组外均采用改良 Hulth 造模^[4]。10% 水合氯醛,0.3~0.4 mL/100g 腹腔注射麻醉,先注射总量的 2/3 随后根据情况适当追加 10% 水合氯醛 0.2~0.5 mL 直至麻醉成功。右后肢膝关节外侧纵切口长约 5 cm,逐层切开、分离,探查关节腔无原发病变后,完

整切除内侧半月板、ACL(Anterior Cruciate Ligament)及 MCL(Medial Collateral Ligament),造成负重线内移及膝关节不稳。术侧肢体不固定,术后肌注青霉素 160 万 IU/(kg·d),连续 8 d,每隔 1 d 观察创口愈合情况,预防感染。术后第 7 d 开始强迫大鼠奔跑(1.5 h/d)。当胫股关节面正常外翻 10° 变为内翻,X 射线片显示下肢力线改变明显跛行明显,表示造模成功。造模 3 周软骨出现改变,7 周后进入平台期,11 周出现典型的晚期 OA 病理改变。造模成功率为 86%。

2.2 干预方法

造模 3 周后开始干预,人与动物的体表面积计算法换算:SD 大鼠每日药量(2.5 kg) = 成人(60 kg)每日药量 × 0.04 × 2.5 × 1/3,正常组、模型组鼻饲胃管注射 10 mL 生理盐水,2 次/d;美洛昔康每日药量约为 4 mg/kg,补肾固筋方每日药量为 43 g/kg,每天两次鼻饲胃管注射。连续干预 12 周。

2.3 检测指标

2.3.1 步态观察

David Coderre 步态分级^[5]评价。0 级:正常行走,行走时间 > 5 min; I 级:轻微跛行,行走时间 3~5 min; II 级:中度跛行,行走时间 < 3 min。

2.3.2 形态学观察及 IL-1、iNOS 检测

颈椎脱臼法处死后 1 mL 生理盐水灌洗关节腔,取胫骨内侧软骨面,肉眼观察 SD 大鼠膝关节软骨面情况,切取膝关节前方部分滑膜组织和股骨内髁关节软骨及软骨下骨,剪成约 0.5 cm × 0.6 cm × 0.3 cm 组织块,病理切片(5 μm),HE 染色,形态学观察关节软骨的层次、软骨细胞及软骨下骨变化;空腹取血 5 mL,5000 rpm 离心 10 min 分离血清,-60 °C 冰箱保存。

2.4 统计学处理

SPSS17.0 统计软件,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 ANOVA 检验,各样本均数间两两比较采用均值差 *t* 检验,*P* < 0.01 差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 一般状态比较

正常组软骨蓝白色,色泽透明,触之较硬,关节液量少;模型组滑膜肿胀,关节边缘与滑膜有少许纤维性粘连凹凸不平;两个给药组关节软骨呈白色,欠光滑,滑膜轻度增生,关节液较正常组稍多,滑膜炎性表现较模型组轻。

3.2 X 射线比较

颈椎脱臼法处死动物前拍摄 SD 大鼠膝关节正位 DR(Digital Radiography) 片, David T^[6] 法分级: 0 度: 未见异常; I 度: 可疑; II 度: 肯定; III 度: 明显硬化。Lane-Sandhu X 线评分^[7]。正常组大鼠膝关节内外侧间隙均匀一致, 关节面平整, 边缘整齐规则无

骨赘, 关节内无游离体; 模型组膝关节内侧间隙变窄外侧间隙增大, 骨囊变、骨赘形成; 美洛昔康组膝关节内侧间隙介于模型组和中药组之间, 有轻微骨赘形成; 补肾固筋方组膝关节内侧间隙狭窄不明显, 未见明显骨赘形成。

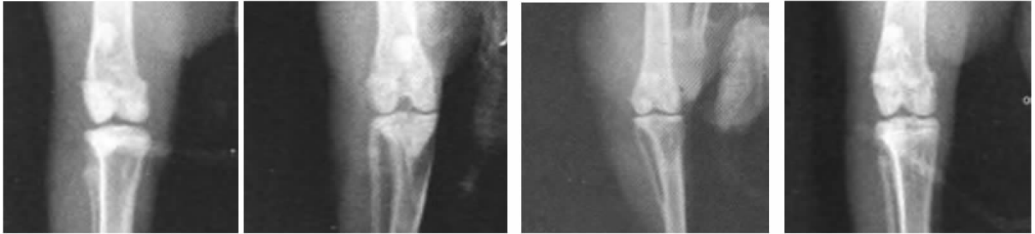


图1 正常组(A)、模型组(B)、美洛昔康组(C)及补肾固筋方组(D)的膝关节正位 DR 片

Fig. 1 Knee anteroposterior X-rays of normal group (A), model group (B), meloxicam group (C) and BSGJP group (D)

表1 造模成功后 6、12 周 Lane-Sandhu X 射线评分 (Mean ± SD, n = 11)

Table 1 Lane-Sandhu X scores at 6, 12 weeks after the modeling (Mean ± SD, n = 11)

造模 Modeling 周 Week	正常组 Normal group	模型组 Model group	美洛昔康组 Meloxicam group	补肾固筋方组 BSGJP group
6	1.5 ± 0.1	8.5 ± 0.6	9.4 ± 0.8 * [△]	13.1 ± 0.5 *
12	2.6 ± 0.4	11.3 ± 0.4	14.7 ± 0.3 * [△]	20.1 ± 0.2 *

注: 表示与补肾固筋方组比较, * $P < 0.001$; *[△]表示与美洛昔康组比较, *[△] $P < 0.001$ 。

Note: Compare with BSGJP group, * $P < 0.001$; Compare with meloxicam group, *[△] $P < 0.001$.

3.3 形态学比较

如图 2 所示, 正常组膝关节软骨蓝白色透明, 表面光滑, 触之适中, 关节液量正常; 模型组滑膜肿胀, 软骨表面浑浊淡黄色不光滑触之较硬, 关节边缘与滑膜有少许纤维性粘连, 镜下软骨细胞排列不完整

呈深层簇聚; 美洛昔康药和补肾固筋方组关节软骨白色光滑, 滑膜轻度增生, 关节液较模型组少, 两组滑膜炎性表现较模型组轻。电镜下模型组较美洛昔康组软骨细胞排列欠规整、簇状增生明显, 补肾固筋方组较正常组软骨细胞完整且排列整齐。

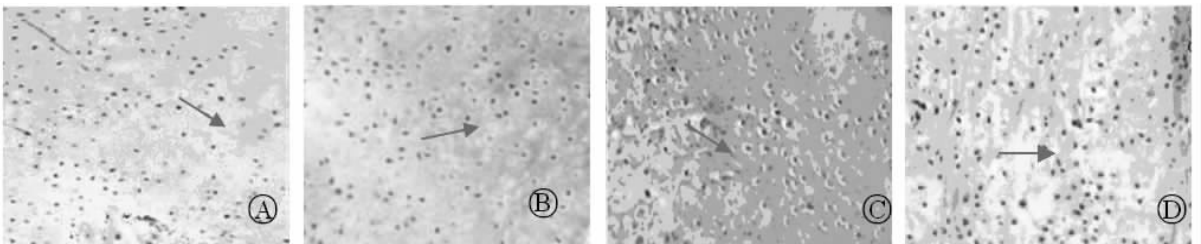


图2 正常组(A)、模型组(B)、美洛昔康组(C)及补肾固筋方组(D)大鼠膝关节胫骨关节内侧关节软骨面情况 (HE, ×40)

Fig. 2 Knee medial tibial articular cartilage of rats from normal group (A), model group (B), meloxicam group (C) and BSGJP group (D) (HE, ×40)

3.4 IL-1、iNOS 比较

与正常组比较, 模型组血清及关节液 IL-1、iNOS 含量升高 ($P < 0.01$)。两个给药组与模型组比较血

清及关节液 IL-1、iNOS 含量降低 ($P < 0.01$), 两个给药组之间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 2)。

表2 血清及关节液 IL-1、iNOS 含量比较 (Mean ± SD)

Table 2 Concentration of interleukin-1, inducible nitric oxide synthase content of serum and synovial fluid (Mean ± SD)

分组 Group	样本数 Sample No. (n)	血清 Serum		关节液 Synovial fluid	
		IL-1 (pg/mL)	iNOS (U/mL)	IL-1 (pg/mL)	iNOS (U/mL)
正常 Normal	11	294.3 ± 20.8 * [△]	220.5 ± 10.1 * [△]	57.3 ± 0.4 * [△]	18.4 ± 0.4 * [△]
模型 Model	11	530.3 ± 24.5 *	358.1 ± 13.3 *	65.5 ± 0.8 *	51.4 ± 0.3 *
美洛昔康 Meloxicam	11	367.5 ± 22.4 *	269.4 ± 9.3 *	51.7 ± 0.3 *	30.7 ± 0.2 *
补肾固筋方 BSGJP	11	382.6 ± 21.6 *	276.3 ± 11.2 *	54.5 ± 0.5 *	46.2 ± 0.4 *

注:与模型组比较, *P < 0.01。

Note: Compare with model group, *P < 0.01.

4 讨论

Evan G 和 Little wood T^[8] 在 1983 年首先报道了在类风湿性关节炎 (Rheumatoid Arthritis, RA) 和骨性关节炎 (Osteoarthritis, OA) 中都可检测到 IL-1 的存在; IL-1 可诱发慢性滑膜炎, 软骨基质降解产物的刺激也可引起滑膜的继发炎症^[9], 促进软骨细胞分泌前列腺素 (PGE₂ Prostaglandins 2)^[10], 刺激骨吸收及成骨细胞增生钙化, 软骨下骨增厚骨赘生成^[11]。OA 软骨免疫组化染色的基质及细胞中 IL-1、iNOS 及其受体均呈现阳性反应, 强度与范围和 OA 严重程度相对应^[12]; IL-1、iNOS 促进多形核细胞, 刺激滑膜细胞的 PGE₂ 分泌, 增加骨软骨的破坏, IL-1、iNOS 促进滑膜成纤维细胞样细胞增殖, 增强 RNA 的表达功能, 最终滑膜组织纤维变性, IL-1、iNOS 相互协同, 加快了膝关节软骨基质的破坏^[13]。

治则补益肝肾, 强筋健骨, 熟地、补骨脂为君药, 熟地性微温、味甘, 滋阴养血, 补骨脂是补肾壮阳益精填髓之要药, 熟地、补骨脂和枸杞子配伍改善微循环与血液流变学, 降低骨内压, 缓解骨和骨髓血流动力学及其引起的代谢异常^[14], 更有利于促进软骨修复; 臣药巴戟天、川牛膝和鸡血藤改善软骨细胞功能, 促进软骨修复, 刺激软骨破坏区产生大量幼稚软骨^[15], 减少或阻断因软骨片丢失刺激滑膜分泌^[16,17]; 木瓜、丹参活血化瘀药可以促进关节内外的血液循环, 改善静脉瘀滞状态, 降低骨内压^[18]。研究中观察到治疗 12 周后羊关节积液明显减少, X 线片示骨端变性, 软骨下骨质萎缩, 狭窄的间隙明显增宽, 中药组滑膜组织 TNF-α、iNOS 含量降低, OA 滑膜进一步变性对滑膜增殖及 RNA 的表达有促进作用; 对照组则相反。补肾固筋方减少 TNF-α、iNOS 的分泌对软骨和滑膜的侵害, 抑制滑膜炎性改变, 同

时滑膜渗透作用于软骨细胞增强软骨细胞的代偿能力, 修复并延缓软骨退变、促进软骨修复。

参考文献

- 1 The Administration of TCM (国家中医药管理局). TCM Syndrome Diagnostic Efficacy of the Standard (中医病证诊断疗效标准). Nanjing: Nanjing University Press, 1999. 48-55.
- 2 Fitzgerald GK, White DK, Piva SR. Associations for change in physical and psychological factors and treatment response following exercise in knee osteoarthritis; an exploratory study. *Arthritis Care Res*, 2012, 64: 1673-1680.
- 3 Cui XN (崔向宁), Li YB (李玉波), Li Y (李妍), et al. The influence of brain tumor necrosis factor-α, nuclear transcription factor-KB and aquaporin-4 expression in rats with cerebral hemorrhage. *Chin Integr Med* (中国中西医结合杂志), 2015, 2: 513-515.
- 4 Hulth A, Lindberg L, Telhag H. Experimental osteoarthritis in rabbits. *J Acta Orthop Scand*, 1970, 41: 522-530.
- 5 Coderre D, Le Marechal H, Ekindjian OG, et al. Nitric oxide modifies glycolytic pathways in cultured human's, iNOS vicytes. *Cell Biol*, 2008, 2: 285-286.
- 6 David T, Atkins CM, Allen MT, et al. Inhibition of nitric oxide synthesis impairs two different forms of learning. *Neuroreport*, 2012, 3: 567-570.
- 7 Bradbury N, Hutchinson J, Hahn D, et al. Clavicular nonunion. 31/32 healed after plate fixation and bone grafting. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 1996, 67: 367-370.
- 8 Wood H, Geroganas C, Pagliari LI, et al. Bcl-2 expression in syvial fibroblast is essential for maintaining mitochondrial homeostasis and cell viability. *J Immunol*, 2000, 164: 5227-5235.
- 9 Parmelee PA, Harralson TL, McPherron JA, et al. The structure of affective symptomatology in older adults with osteoarthritis. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2013, 28: 393-401.

(下转第 1316 页)