

传统中药补肾固筋方对膝骨性关节炎 IL-1、TNF- α 的作用机制

张冲, 王恒树, 阚秀莲, 李健, 郭梅, 祁永玲, 韩艳丽, 杨瑞成

(河北省中医院骨三科, 河北医科大学第二医院, 石家庄 050011)

【摘要】 目的 观察补肾固筋方对兔膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)血清及关节液 IL-1、TNF- α 的表达影响及调节机制。方法 新西兰兔 76 只, 随机分为正常组、模型组、西药组、中药组, 除正常组外均用改良 Hult 法造, 取血清及膝关节前方部分滑膜组织、股骨内髁关节软骨及软骨下骨, ELISA 法 IL-1、TNF- α 含量。结果 西药组关节间隙狭窄, 介于模型组和中药组之间, 关节面粗糙, 骨赘明显; 中药组关节间隙稍窄, 关节面稍粗糙伴轻微骨赘。模型组血清及关节液 IL-1、TNF- α 含量比正常组升高 ($P < 0.01$)。两个给药组血清及关节液 IL-1、TNF- α 含量比模型组降低 ($P < 0.01$), 两给药组之间差异无显著性。结论 补肾固筋方通过降低骨关节炎中 IL-1、TNF- α 的分泌水平促进软骨修复, 为临床应用提供科学的实验依据。

【关键词】 兔膝骨性关节炎; 补肾固筋方; 关节滑液; 白细胞介素-1; 肿瘤坏死因子- α ; 治疗

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 03-0312-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.03.017

Effect of the traditional Chinese medicine Bushen Gujin prescription on the expression of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α in rabbit models of knee osteoarthritis

ZHANG Chong, WANG Heng-shu, ZHANG Yong-hua, LI Jian, GUO Mei, QI Yong-ling

(The Third Department of Orthopaedics, TCM Hospital of Hebei Province, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

【Abstract】 Objective To explore the effect of traditional Chinese medicine (TCM) Bushen Gujin prescription on the expression of interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the serum and synovial fluid of rabbit models of knee osteoarthritis. **Methods** Seventy-six healthy 8-month old male SPF New Zealand white rabbits were randomly divided into normal, model, western medicine (meloxicam) and TCM groups ($n = 19$ in each group). The rabbit models of knee osteoarthritis were generated by Hurth procedure, and were given respective drug treatment for consecutive 8 weeks. The expression of IL-1 and TNF- α in serum and synovial fluid was detected by ELISA assay. **Results** All the experimental rabbits showed narrowed knee articular space, rough articular cartilage surface, and obvious bone spur formation. The width of articular space of the meloxicam-treated rabbit models was between those of the model group and Chinese medicine-treated group. The expression of IL-1 and TNF- α in the serum and synovial fluid was increased in the rabbits of model groups, decreased in the two drug-treated groups (both $P < 0.01$), but not significantly different between the two drug-treated groups ($P > 0.01$). **Conclusions** The traditional Chinese medicine Bushen Gujin prescription can effectively inhibit synovial inflammation and reduce the expression of IL-1 and TNF- in the serum and synovial fluid. Our results provide experimental support for the use of this Chinese medicine in the treatment of knee osteoarthritis in clinics.

【Key words】 Bushen Gujin prescription; Rabbit; Knee osteoarthritis; Meloxicam; Chondrocytes; Interleukin-1; Tumor necrosis factor- α ; Synovial fluid; Therapy

[基金项目] 河北省中医药类科研计划指导性课题(No. 2014172)。

[作者简介] 张冲(1976-), 博士, 副教授, 研究方向: 骨关节微创技术, E-mail: 199876m@sina.cn。

膝骨性关节炎(knee osteoarthritis, KOA)以关节软骨变性和软骨下骨象牙样硬化为病理特征的退行性疾病。《内经·素问·痹论》：“风寒湿三气杂至合而为痹也^[1]”。临床多用非甾体类药物或胫骨高位截骨术、人工关节置换术，患者难以接受^[2]。中药多取补肾壮骨、活血止痛之效，如熟地、枸杞、杜仲、川牛膝等对 KOA 疗效确切，延缓骨关节炎的发展、促进关节软骨修复^[3]。本研究拟通过检测 IL-1、TNF- α 的表达阐明补肾固筋方与骨关节炎的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

76 只 SPF 级新西兰兔，雄性，3 月龄，体重大于或等于 1.5 kg，购于上海斯莱克实验动物有限责任公司[SCXK(沪)2013-0011]，实验、取材及标本测定在河北医科大学实验动物中心进行[SYXK(冀)2013-1-004]。

1.2 主要试剂及仪器

兔 IL-1、TNF- α ELISA 试剂盒(IL-1 ELISA kit, tumor necrosis factor- α , TNF- α ELISA kit, 规格:96T, Abcam US, 型号:AB2202);酶联免疫检测仪(型号:ELX800 BioTek, US.);Retsch 干燥箱(型号:TG10, 产地:德国 Hahn, Dusseldorf, 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);荧光显微镜系统(Leica AF6000, Germany);全自动图像分析系统(Tanon1600, 中国上海);723 分光光度计(ELX8086 型,美国宝特公司);数码 X 光机(GEx86 型,美国 GE 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型制备

76 只新西兰兔随机分成 4 组(正常组、模型组、西药组及中药组)，每组 19 只。造模过程 2~3 周内各组均死亡 1 只后每组各 18 只。严格无菌、微创操作术后抗炎处理。

除正常组外均采用 Hulth 法造模^[4]。术前一晚禁食，配制成 3% 戊巴比妥钠按 20mg/kg 兔耳缘静脉麻醉，先注射总量的 2/3 随后根据情况追加 10% 直至麻醉成功。常规消毒趋血。右后肢膝关节内侧纵切口长约 2.5~3 cm，明确关节腔无原发病变后，切断内侧副韧带(medial collateral ligament, MCL);完全切断前十字韧带(anterior cruciate ligament,

ACL);完整切除内侧半月板但保留后十字韧带(posterior cruciate ligament, PCL)三个手术步骤造成力线内移及膝关节不稳。胫股关节面由正常外翻 10°变为内翻，X 线片后肢力线内移、跛行明显;膝关节内侧应力集中继发骨小梁改变;膝关节不稳及长期被迫运动造成软骨损伤及退变。术侧肢体不固定，头孢曲松钠注射液每次 0.5×2 g/d，肌注，连续 7 d。术后第 7 天即强迫兔奔跑(0.5 h/d)，活动范围约每日 2h/800m 左右。造模 2 周软骨改变，6 周进入平台期，10 周出现典型的晚期 OA 改变，13 周可获得典型的 KOA 模型。兔跛行严重每日行走≤300m、X 线片显示胫股关节内翻 10°，前抽屉实验和内侧应力实验阳性即表示造模成功。造模成功率为 81.3%。

1.3.2 干预方法

补肾固筋方(熟地 18 g、杜仲 20 g、桑寄生 20 g、巴戟天 15 g、川牛膝 16 g、鸡血藤 15 g、丹参 12 g、木瓜 12 g)加减，根据饮食情况，精神状态，活动自如，喜暖恶寒，被毛光滑有光泽，四肢各关节无红肿，活动自如等情况中医辨证加减，风寒湿痹加防风、黄芪、羌活;风湿热痹加秦艽、羌活;瘀血闭阻证加桃仁、红花;肝肾亏虚偏阴虚者加枸杞子、山茱萸;偏阳虚者加菟丝子、肉桂;每剂取汁 400 mL。浓缩后加蒸馏水配制成 6~8g/10 mL;美洛昔康每粒 7.5 mg，四川宝光药业股份有限公司，国药准字: H20010209 批次号: 120502770265;戊巴比妥钠(pentobarbital sodium, 美国 Sigma, 货号:P3809)。

造模 3 周后开始干预，按照人及动物之间药物剂量换算: Meeh-Rubner 氏公式 $A = K \times (W^{2/3} \div 10\ 000)$ ，美洛昔康每日 8 mg/kg，每日补肾固筋方 53 g/kg，正常组、模型组生理盐水 15mL 灌胃，2 次/日;连续干预 8 周一疗程。

1.3.3 观察指标

(1)步态观察: Coderre T. 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)X 线检查:处死动物前拍摄兔膝关节正位 DR 片，观察膝关节 X 线表现。X 线损伤情况按改良的 David T^[6]法分级，0 度:关节面光滑无骨赘;I 度:关节外侧间隙轻度狭窄;II 度:关节面粗糙明显变形伴可疑骨赘;III 度:关节间隙明显狭窄，骨赘清晰可见。

(3)形态学观察:1 mL 生理盐水灌洗关节腔,取胫骨内侧软骨面,肉眼观察兔膝关节软骨面情况,切取膝关节前方、内侧滑膜组织和股骨内髁及内髁前方两侧关节软骨及软骨下骨,剪成约 0.6 cm × 0.6 cm × 0.6 cm 大小均匀组织小块,病理切片、组织染色处理,观察关节软骨的层次组成、软骨细胞变化移行及软骨下骨的情况。

(4)IL-1、TNF- α 检测:实验结束造模后药物干预 8 周空腹处死动物后,立即心脏取血 5 mL,3000 r/min 离心 10 min 分离出血清及关节滑液 -60℃ 冰冻保存;5000 r/min 分离出关节软骨及滑液后, -80℃ 超低温冰箱保存 24h 后再放入液氮(-196℃)保存。ELISA 法(enzyme-linked immunosorbent assay)检测。

1.4 统计学分析

SPSS 17.0 统计,数据采用均数标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间样本差异比较采用 F 检验,各样本均数间两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学

意义。

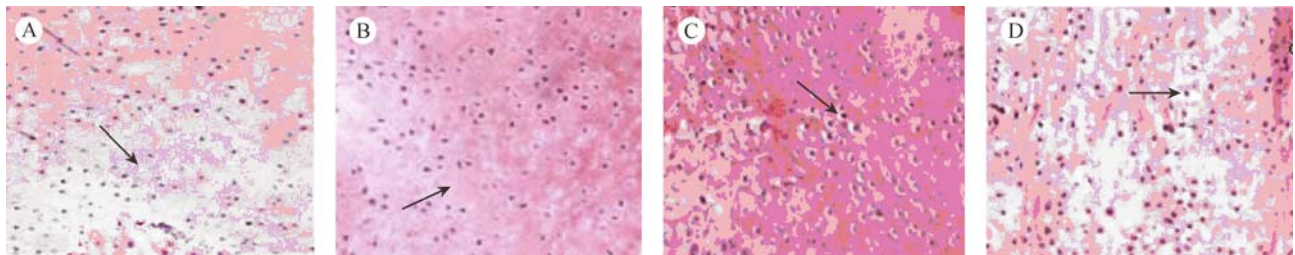
2 结果

2.1 肉眼及镜下观察

正常组膝关节内外侧间隙光滑平整,软骨色泽蓝白色透明,关节液量适中;模型组膝关节内侧间隙变窄,滑膜肿胀,软骨面不光滑与滑膜纤维性粘连凹凸不平,软骨剥脱;镜下见软骨细胞大小不均深层排列,软化灶形成;两个给药组关节软骨大体观察呈淡蓝半透明白色,表面平整光滑,滑膜乳白色淡黄黏稠的关节液含量较正常组稍多,镜下西药组软骨细胞排列欠完整,簇状增生;中药组关节面光滑平整软骨细胞排列完整(图 1)。

2.2 IL-1、TNF- α 含量比较

模型组含量升高($P < 0.01$)。两个给药组与模型组比较含量降低($P < 0.01$),两给药组之间比较差异无显著性($P > 0.05$)(表 1)。



注:A.正常组;B.模型组;C.西药组;D.中药组。箭头标明软骨细胞簇状增生情况。

图 1 各组软骨细胞镜下观察(HE × 40, 20 μ m/cm)

Note. The arrangement of chondrocytes and arrows addicate the chondrocyte proliferation clustered. A: A rabbit of the normal group; B: A rabbit of the model group; C: A rabbit of the meloxicam group; D: A rabbit of the Chinese medicine group

Fig. 1 Histological appearance of the cartilage of rabbits in different groups. HE staining. ×40

表 1 各组血清及关节液 IL-1、TNF- α 含量比较($\bar{x} \pm s, n = 18$)

Tab. 1 Comparison of interleukin-1, tumor necrosis factor- α in the rabbit serum and synovial fluid

分 组 Groups	血清 Serum		关节液 Synovial fluid	
	IL-1 ng/L	TNF- α pg/L	IL-1 ng/L	TNF- α pg/L
正常组 Normal	512.8 ± 38.61 *	192 ± 18.23 *	49 ± 0.64 **	33.2 ± 0.84 *
模型组 Model	866 ± 44.23 *	436 ± 24.17 *	92.8 ± 0.64 *	91.4 ± 0.66 *
中药组 Chinese medicine	644.2 ± 36.24 *	43.9 ± 21.01 *	61.4 ± 0.85 *	54.2 ± 0.87 *
西药组 Meloxicam	650.1 ± 35.3 *	203 ± 16.85 *	57.2 ± 0.69 *	45.4 ± 0.58 *

注:与模型组比较,* $P < 0.01$ 。Note. Compared with the model group, * $P < 0.01$ 。

3 讨论

Perlman^[7]报道在类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)中有 IL-1 的存在。IL-1 通过激活血管内皮细胞,增强内皮细胞粘附分子的分泌,促进血液中白细胞与粘附分子结合聚集在关节腔^[8,9],刺激

骨小梁重塑及成骨细胞聚集增生,软骨下骨萎缩。骨质异常增生或囊性变形成骨赘,生物力学的作用使之再苏醒最终形成关节变形功能缺失^[10,11]。炎性介质促进细胞浸润增加炎症反应及组织损伤,特别是 IL-1 正向促使 PGE₂ 及 TNF- α 在细胞质中的释放,这种表达强度及严重程度呈现递增改变^[12];研

究证实 TNF- α 通过促使关节软骨面滑膜中的成纤维细胞增殖纤维素样变性及多形核细胞分泌破坏骨关节面软骨和软骨下骨,同时 IL-1、TNF- α 协同作用裂解蛋白多糖、降解胶原片段活性,加快软骨基质剥脱骨质暴露^[13,14]。

治则温经活血、补益肝肾。君药熟地、杜仲、桑寄生,熟地微温味甘,滋阴养血、益肾填精;杜仲甘温,用于肾虚腰痛,筋骨无力;桑寄生苦甘平治风湿痹痛,腰膝酸软,筋骨无力,《本草再新》:寄生补气温中,治阴虚、壮阳道、利骨节。君药配伍促进血液循环改善关节腔内微循环,降低骨内压减轻疼痛;《纲目拾遗》:丹参性凉,味甘,通经络,和血脉^[15]。臣药巴戟天、川牛膝和丹参配和君药使用可减缓关节软骨细胞的坏死、增强超氧化物歧化酶的活性反应,加速软骨细胞合成及滑液吸收^[16],阻断了骨关节炎发病过程中氧自由基的释放及恶性循环减缓软骨退变的目的^[17];佐使药鸡血藤行气活血,通络、善治手足麻木、肢体瘫痪,风湿痹痛及促进静脉系统血液返流加速代谢的作用^[18]。补肾固筋方通过抑制 IL-1、TNF- α 的分泌来改善滑膜液性反应,可以有效修复软骨破裂控制软骨退变、缓解软骨细胞降解及增强滑膜渗透作用,促进软骨修复。

参 考 文 献

- [1] 国家中医药管理局. 中华人民共和国中医药行业标准. 中医病证诊断疗效标准[M]. 南京,南京大学出版社,1999.
- [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 [J]. Arthritis Care Res, 2012, 64(11):1673-1680.
- [3] 崔向宁,李玉波,李妍,等. 活血、利水中药对脑出血大鼠脑组织肿瘤坏死因子- α 、核转录因子 KB 及水通道蛋 4 表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 2(17):513-515.
- [4] Rogart JN, Barrach HJ, Chichester CO. Articular collagen degradation in the Hulth-Telhag model of osteoarthritis [J]. Osteoarthritis Cartilage, 1999, 7(6):539-547.
- [5] Coderre TJ, Wall PD. Ankle joint urate arthritis in rats provides a useful tool for the evaluation of analgesic and anti-arthritis agents

- [J]. Pharmacol Biochem Behav. 1988, 29(3):461-466.
- [6] Felson DT, Naimark A, Anderson J, et al. The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly[J]. Arthritis Rheum. 1987, 30(8):914-918.
- [7] Perlman H, Geroganas C, Pagliari LJ, et al. Bcl-2 expression in synovial fibroblast is essential for maintaining mitochondrial homeostasis and cell viability[J]. J Immunol 2000, 164(10):5227-5235.
- [8] Parmelee PA, Harralson TL, McPherron JA, et al. The structure of affective symptomatology in older adults with osteoarthritis. Int J Geriatr Psychiatry, 2013, 28(4):393-401.
- [9] Venkataramanan V, Gignac MA, Dunbar M, et al. The importance of perceived helplessness and emotional health in understanding the relationship among pain, function, and satisfaction following revision knee replacement surgery[J]. J Osteoarthritis Cartilage, 2013, 21(7):911-917.
- [10] 梁秀军,翟泽玲,董文娟,等. 胶原性关节炎大鼠炎症细胞因子的动态观察[J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(3):57-60.
- [11] 王晓冬,王庚启. 双醋瑞因对骨关节炎患者血清白细胞介素 1、肿瘤坏死因子 α 的影响和临床疗效[J]. 中国医药导报, 2013, 10(21):102-103.
- [12] 张立国,马东升,程佳佳,等. 中药挥发油、水提物的抗炎、免疫及骨细胞修复活性的比较[J]. 中药新药与临床药理, 2015, 1:34-39.
- [13] 唐晶晶,梁德,江晓兵,等. 改良半椎板切除法建立大鼠腰神经根压迫模型[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(2):48-51.
- [14] Olajide OA, Bhatia HS, de Oliveira, et al. Inhibition of neuroinflammation in LPS-activated microglia by cryptolepine[J]. Evidence-Based Compl Alt Med, 2013, 459723.
- [15] 郑进昌,徐东明,许凯洲. 独活寄生汤治疗膝关节退行性关节炎的临床研究[J]. 中国医药导报, 2013, 10(3):102-103.
- [16] 裴凌鹏,白岩,惠伯棣. 虾青素对骨关节炎软骨细胞氧化损伤及炎性的影响[J]. 中国老年学杂志. 2012, 32(23):5182-5184.
- [17] 谢平,董少梅,陈付强,等. 低浓度臭氧联合玻璃酸钠治疗膝关节关节炎的临床观察[J]. 中国疼痛医学杂志, 2012, 18(7):404-405.
- [18] 周光皎,孙宜坤,王超群. 鸡血藤中总黄藤的聚酰胺树脂纯化工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(12):34-37.

[收稿日期] 2015-01-20