

补肾固筋方对膝骨性关节炎模型兔血清及关节液 IL-1、TNF- α 表达的影响

张冲¹ 黄芸² 张庆祝³ 季亚成⁴ 张英泽⁵

摘要 **目的** 观察补肾固筋方对骨性关节炎(knee osteoarthritis, KOA)模型兔血清及关节液IL-1、TNF- α 表达的影响。**方法** 选取8月龄左右健康雄性新西兰大白兔36只,随机分为正常组、模型组、西药组、中药组,每组10只,除正常组外均采用改良Hulth A造模法造模,西药组给予美洛昔康(每日药量6 mg/kg),中药组给予补肾固筋方每日药量53 g/kg,连续给药8周,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法检测血清及关节液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。与正常组比较,模型组血清及关节液IL-1、TNF- α 含量升高($P < 0.01$)。与模型组比较,两个给药组血清及关节液IL-1、TNF- α 含量降低($P < 0.01$),两给药组之间比较,差异无统计学意义。**结论** 补肾固筋方通过抑制IL-1、TNF- α 的分泌,延缓软骨退变,促进软骨基质的合成和软骨修复。

关键词 补肾固筋方;兔膝骨性关节炎;软骨细胞;白细胞介素-1;肿瘤坏死因子- α

Effect of Bushen Gujin Recipe on Serum and Synovia Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor-alpha of Knee Osteoarthritis Model Rabbits ZHANG Chong¹, HUANG Yun², ZHANG Qing-zhu³, JI Ya-cheng⁴, and ZHANG Ying-ze⁵ 1 Department of Orthopedics, Hebei Provincial Hospital of TCM, Shijiazhuang (050017), China; 2 Department of Crude Drugs, College of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang (050017), China; 3 Department of Surgery, Hebei College of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang (050091), China; 4 Faculty of Human Anatomy, Hebei Medical University, Shijiazhuang (050017), China; 5 Department of Orthopedics, Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang (050012), China

ABSTRACT **Objective** To explore the effect of Bushen Gujin Recipe (BGR) on serum and synovial expression of interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in knee osteoarthritis (KOA) model rabbits. **Methods** Totally 36 8-month-old healthy male New Zealand white rabbits were randomly divided into 4 groups, i.e., the normal control group, the model group, the Western medicine group (Meloxicam, at the daily dose of 6 mg/kg), and the TCM group (BGR, at the daily dose of 53 g/kg), 9 in each group. Modeling was performed in all rabbits except those in the normal control group by using Hulth A method. All medication was performed for 8 consecutive weeks. Contents of IL-1 and TNF- α were detected using ELISA from serum, partial synovial tissue of the front knee joint, cartilage and subchondral bone of the medial femoral condyle. **Results** The joint space became narrowed in the Western medicine group, ranging between the model group and the TCM group. The articular surface was rough with obvious osteophytes. The joint space was slightly narrower in the TCM group; the articular surface was slightly rough with mild osteophytes. Compared with the normal control group, contents of IL-1 and TNF- α in serum and synovial increased in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, contents of IL-1 and TNF- α in serum and the synovial fluid decreased in the two treatment groups

基金项目:河北省中医药管理局指导课题(No. 2013112, No. 2014172)

作者单位:1.河北省中医院骨三科(石家庄 050017);2.河北医科大学药学院生药教研室(石家庄 050017);3.河北中医学院外科教研室(石家庄 050091);4.河北医科大学基础医学院人体解剖教研室(石家庄 050017);5.河北医科大学第三医院骨科(石家庄 050012)

通讯作者:张庆祝, Tel: 0311-66005114, E-mail: 369278072@qq.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.03.0355

($P < 0.01$). There was no statistical difference in contents of IL-1 and TNF- α between the Western medicine group and the TCM group. Conclusion BGR promoted the synthesis of cartilage matrix and cartilage repair through inhibiting the secretion of IL-1 and TNF- α , and prolonging cartilage degeneration.

KEYWORDS Bushen Gujin Recipe; rabbit knee osteoarthritis; chondrocyte; interleukin-1; tumor necrosis factor-alpha

膝骨性关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是以关节软骨退变和关节周围骨质增生为病理特征的一种老年慢性退行性关节病。《素问·痹论》^[1]：“痹之安生？岐伯对曰：风寒湿三气杂至，合而为痹也”。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]。熟地、枸杞子、杜仲、川牛膝等中医药治疗 KOA 疗效确切^[3]。本研究深入观察了补肾固筋方对 IL-1、TNF- α 药理作用和应用调节机制。

材料与方法

1 实验动物 SPF 级雄性新西兰大白兔 36 只，约 6 月龄，体重 2.5 ~ 3.0 kg，河北医科大学实验动物中心提供，合格证号：SKXK(冀)2012-1-004。适应性喂养 1 周，室温 15 ~ 25 ℃，相对湿度 45% ~ 60%，每天正常光照，空气流通，标准饲料(组成：麦麸、玉米、大白菜、芹菜)喂养，自由摄食、饮水。

2 药物 补肾固筋方组成：熟地 20 g、补骨脂 20 g、枸杞子 20 g、巴戟天 15 g、川牛膝 18 g、丹参 15 g、木瓜 10 g、鸡血藤 15 g，按中医辨证加减治疗，风寒湿痹加防风、黄芪、羌活、独活、桂枝；风湿热痹加秦艽、羌活、茯苓、石膏；瘀血闭阻证加桃仁、红花、地龙；肝肾亏虚证偏于阴虚者加山茱萸；偏于阳虚者加菟丝子、制附子、肉桂。根据动物造模后进食情况，如进食欠佳，精神倦怠，喜暖恶寒，毛色是否光泽，活动量的多少等区分中医证型^[4]。以上药量为成人药量，购于河北省中医院药房，制剂室常规煎煮取汁 300 mL。药液浓缩加入蒸馏水后配制成 6 g/mL；美洛昔康胶囊，7.5 mg，四川宝光药业股份有限公司，批号：120502770265，加入蒸馏水配制成 0.5 mg/mL 溶液；注射用青霉素 G 钠(石家庄制药集团有限公司，160 万 IU/支，批号：A091136207)；2%利多卡因，河北医科大学药理实验室制备。

3 试剂及仪器 兔 IL-1、TNF- α ELISA 试剂盒(IL-1 ELISA Kit Human, TNF- α ELISA Kit, 规格：48T/96T)、免疫吸附剂、标记物和显色剂；酶联免疫检测仪(Bio-565)、DNM-9602A 酶标分析仪(规格：DNM-9602A)、微量注射器(针头：33G)、移液器均购自上海酶联生化试剂有限公司；干燥箱(型号：

TG100, 德国 RETSCH 公司)；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(Huu-12A 型, 日本日立公司)；723 分光光度计(ELX8086 型, 美国宝特公司)；数码 X 光机(CEX86 型, 美国 GE 公司)；4%多聚甲醛(山东省寿光市旭东化工有限公司, CAS 号：30525-89-4)；灭菌注射用水(5 mL, 石家庄第四制药有限公司)。

4 动物分组及模型制备 40 只新西兰大白兔随机分为正常组、模型组、西药组及中药组，每组 10 只。除正常组外均采用改良 Hulth A 造模^[5]。2%利多卡因(30 mg/kg)后肢静脉麻醉，常规消毒趋血，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、前交叉韧带(anterior cruciate ligament, ACL)及内侧副韧带(medial collateral ligament, MCL)造成负重线内移及膝关节不稳。术侧肢体不固定，术后肌肉注射青霉素 160 万 IU/(kg·d)，连续 7 天，每隔 1 天观察创口愈合情况，预防感染。术后第 4 天开始强迫兔奔跑(0.5 h/天)。当胫股关节面正常外翻 10°变为内翻，X 线片显示下肢力线改变明显，兔跛行明显，即表示造模成功。本实验造模成功率为 90%。造模后模型组、中、西药组 2 ~ 3 周内各组均死亡 1 只，中药组 1 只造模失败，共剩 36 只，各 9 只。

5 干预方法 造模 2 周后开始干预，参考文献^[6]按体表面积换算：新西兰兔每日药量(2.5 kg) = 成人(65 kg)每日药量 $\times 0.07 \times 2.5 \times 2/3$ ，美洛昔康每日药量约为 6 mg/kg，补肾固筋方每日药量为 53 g/kg，每天两次鼻饲胃管注射；正常组、模型组灌胃 15 mL 生理盐水，2 次/天；连续干预 8 周。

6 检测指标及方法

6.1 步态观察 采用 David Coderre 法步态分级^[7]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。

6.2 兔膝关节 X 线观察 处死动物前拍摄兔膝关节正位 CR 片，观察膝关节 X 线表现。X 线损伤情

况按改良的 David T^[8]法分级,0 度:未见异常;Ⅰ度:可疑;Ⅱ度:肯定;Ⅲ度:明显硬化。

6.3 兔膝关节骨形态学观察 耳缘静脉空气栓塞处死,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×0.5 cm×0.5 cm 组织块,1 min 内置于 10% 中性缓冲甲醛溶液中固定 24 h。用水冲洗 1 h,5% 甲酸甲醛脱钙 2 周;用 75%、85%、95%、100% 各种浓度乙醇进行逐级脱水;石蜡包埋切片(5 μm)。在 70 ℃ 烤箱内烤片 30 min 后 HE 染色,观察关节软骨的层次、软骨细胞及软骨下骨变化。

6.4 血清及关节液 IL-1、TNF-α 检测 药物干预 8 周空腹耳缘静脉空气栓塞处死动物后,立即心脏取血 5 mL,1 000 r/min 离心 10 min,分离血清置于 -60 ℃ 冰箱中冰冻保存。采用 ELISA 法检测兔血清及关节液 IL-1、TNF-α 含量。

7 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用 ANOVA,各组间两两比较采用 *q* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

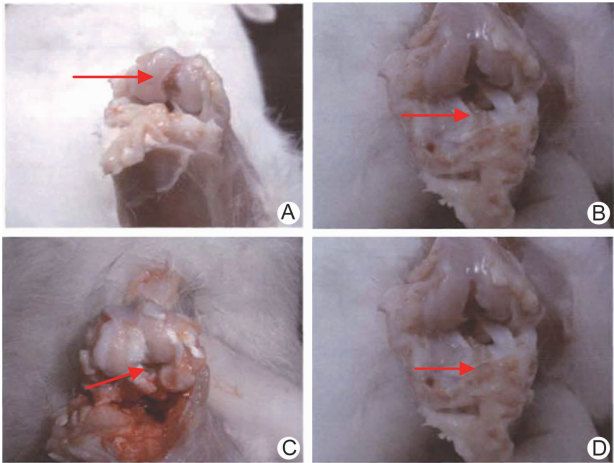
1 各组兔膝关节 X 线结果比较 正常组兔膝关节内外侧间隙均匀一致,关节面平整,边缘整齐规则无骨赘,关节内无游离体;模型组膝关节内侧间隙变窄,外侧间隙增大,骨囊变、骨赘形成;中药组膝关节内侧间隙稍窄,关节面稍粗糙伴轻微骨赘;西药组膝关节内侧间隙介于模型组和中药组之间,骨赘明显。

2 兔膝关节骨形态学结果比较(图 1、2) 正常组软骨蓝白色,色泽透明,软骨表面光滑,触之较硬,关节液量少;模型组滑膜肿胀,软骨表面不光滑,关节边缘与滑膜有少许纤维性粘连凹凸不平;电镜下软骨细胞排列不完整,深层簇聚。西药和中药两组关节软骨呈白色,欠光滑,滑膜轻度增生,关节液较正常组稍多,两组滑膜炎性表现较模型组轻;电镜下西药组软骨细胞排列欠完整,簇状增生;中药组软骨细胞排列完整,相对整齐。

3 各组血清及关节液 IL-1、TNF-α 含量比较(表 1) 与正常组比较,模型组血清及关节液 IL-1、TNF-α 含量升高(*P* < 0.01)。与模型组比较,两个给药组血清及关节液 IL-1、TNF-α 含量降低(*P* < 0.01),两给药组之间比较,差异无统计学意义。

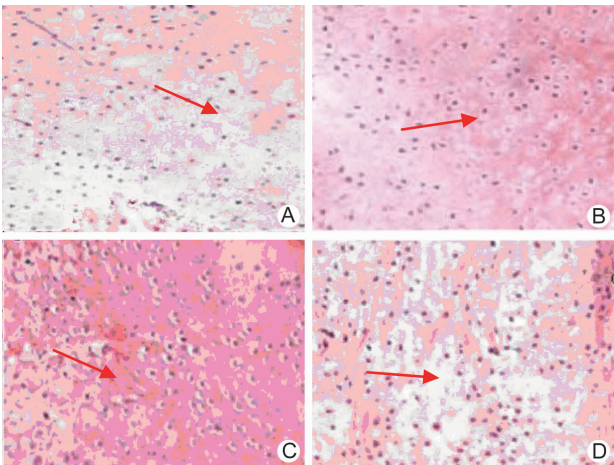
讨 论

KOA 的病理机制是关节软骨退变^[9]。退变的关



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为西药组;D 为中药组;箭头所指为胫骨关节内侧关节软骨面

图 1 各组膝关节软骨面情况



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为西药组;D 为中药组;箭头所指为软骨细胞排列情况

图 2 各组骨形态学结果 (HE, ×40)

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

组别	<i>n</i>	IL-1		TNF-α	
		血清	关节液	血清	关节液
正常	10	256 ± 19 *	24.6 ± 0.3 *	96 ± 9 *	19.6 ± 0.7 *
模型	9	437 ± 22	46.4 ± 0.3	218 ± 12	47.0 ± 0.3
中药	8	322 ± 20 *	32.4 ± 0.3 *	22 ± 10 *	26.4 ± 0.4 *
西药	9	302 ± 18 *	29.8 ± 0.3 *	102 ± 8 *	22.8 ± 0.3 *

注:与模型组比较,**P* < 0.01

节软骨表面不光滑,龟裂缺损范围及深度各异^[10]。Staruch MJ 等^[11]在 1983 年首先报道了类风湿性关节炎(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^[12],促进软骨细胞分泌前列腺素(prostaglandins 2, PGE₂),刺激骨吸收及成骨细胞增生、钙化^[13],软骨下骨增厚骨赘。OA 软骨免疫组化染色的基质及细胞中 TNF- α 及其受体均呈现阳性反应^[14],强度与范围和 OA 严重程度相对应。TNF- α 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^[15];TNF- α 促进滑膜成纤维细胞样细胞增殖,增强 RNA 的表达功能,最终滑膜组织纤维性变性,IL-1、TNF- α 相互协同,加快了膝关节软骨基质的破坏^[16]。

笔者积累多年临床经验参考大量文献自拟补肾固筋方,治则补益肝肾,强筋健骨。方中熟地、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,更有利于促进软骨修复^[17];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,减少或阻断因软骨片丢失刺激滑膜分泌^[18];木瓜、丹参活血化瘀药可以促进关节内外的血液循环,改善静脉瘀滞态,降低骨内压^[19]。治疗 8 周后兔关节积液明显减少,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 IL-1 含量降低,而 TNF- α 对 OA 软骨细胞胶原酶-3 的表达有剂量依赖性^[20],OA 滑膜进一步变性对滑膜增殖及 RNA 的表达有促进作用;西药组则相反。研究表明,补肾固筋方抑制滑膜炎性改变,减少炎性物质对软骨和滑膜的侵害,同时滑膜渗透作用于软骨细胞,增强软骨细胞的代偿能力,对软骨破坏起到一定的延缓作用;补肾固筋方抑制 IL-1、TNF- α 分泌,改善滑膜液性反应,修复并延缓软骨退变、促进软骨修复,本研究虽提供了一定的实验资料及理论依据,阐述了中药复方治疗骨关节炎的作用机制,但仍有不足,还需从分子生物学角度进一步探讨 PGE₂、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)及 IL-1 之间的相互协同作用。这也是下一步工作的研究重点。

参 考 文 献

- [1] 王庆其. 内经选读[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2002: 23-25.
- [2] Saranadasa M, Wang ES. Vascular endothelial growth factor inhibition: conflicting roles in tumor growth[J]. Cytokine, 2011, 53(2): 115-129.
- [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- κ B 及水通道蛋白-4 表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012,

32(2): 203-206.

- [4] 申珊珊, 梁茂新. 功能性消化不良中医辨证存在的问题与对策[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(4): 1019-1022.
- [5] Hulth A, Lindberg L, Telhag H. Experimental osteoarthritis in rabbits. Preliminary report[J]. Acta Orthop Scand, 1970, 41(5): 522-530.
- [6] 刘献祥, 李西海, 周江涛. 改良 Hulth 造模法复制膝骨性关节炎的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(12): 1104-1106.
- [7] Borderie D, Le Marechal H, Ekindjian OG, et al. Nitric oxide modifies glycolytic pathways in cultured human synoviocytes[J]. Cell Biol Int, 2008, 2(5): 285-286.
- [8] David T, Atkins CM, Allen MT, et al. Inhibition of nitric oxide synthesis impairs two different forms of leaning[J]. Neuroreport, 2012, 3(7): 567-570.
- [9] 李旭, 王海立, 朱炼, 等. 单侧髌骨粉碎性骨折行髌骨完全切除后对双侧膝关节远期功能的影响[J]. 中华创伤骨科杂志, 2013, 11(15): 928-931.
- [10] Stannus O, Jones G, Cicuttini F, et al. Circulating levels of IL-6 and TNF- α are associated with knee radiographic osteoarthritis and knee cartilage loss in older adults[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2010, 18(11): 1441-1447.
- [11] Staruch MJ, Wood DD. The adjuvant activity of Interleukin-1 *in vivo* [J]. J Immunol, 1983, 34(130): 2191-2194.
- [12] Goldring MB, Otero M. Inflammation in osteoarthritis[J]. Curr Opin Rheumatol, 2011, 23(5): 471-478.
- [13] Li X, Gibson G, Kim JS, et al. MicroRNA-146a is linked to pain-related pathophysiology of osteoarthritis[J]. Gene, 2011, 480(7): 34-41.
- [14] 任红革, 崔逢德. 细胞因子在骨性关节炎中的表达与应用[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(52): 9828-9835.
- [15] Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, et al. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2011, 7(1): 33-42.
- [16] Zhuo Q, Yang W, Chen JY, et al. Metabolic syndrome meets osteoarthritis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2012, 12(8): 729-737.
- [17] 江锋, 陈巍, 马川, 等. 膝骨性关节炎患者关节滑液肿瘤坏死因子 α 的表达及其临床意义[J]. 实用医学杂志, 2010, 26(2): 246-247.
- [18] 傅涛, 徐永华. 细胞凋亡的信号转导研究进展[J]. 细胞生物学杂志, 2012, 8(4): 153-155.
- [19] 许峰, 章光华, 李欢华. 蠲痹丸治疗绝经后骨质疏松症 37 例[J]. 中医杂志, 2010, 12(3): 117-118.
- [20] Honsawek S, Chayanupatkul M. Correlation of plasma and synovial fluid adiponectin with knee osteoarthritis severity[J]. Arch Med Res, 2010, 41(8): 593-598.

(收稿: 2013-01-06 修回: 2014-03-07)