

透骨消痛胶囊抑制大鼠骨性关节炎作用研究

陈翔, 汪萍萍*

鄂东医疗集团黄石市中心医院(湖北理工学院附属医院)骨科, 湖北黄石 435000

摘要: 目的 探究透骨消痛胶囊对大鼠骨性关节炎的抑制作用。方法 将大鼠随机分成5组: 对照组、模型组及透骨消痛胶囊低、中、高剂量(0.93、1.86、3.72 g/kg)组, 除对照组外, 采用手术方法构建SD大鼠骨性关节炎模型, 对照和模型组ig给予等量生理盐水, 每天1次, 持续8周。给药结束后, 大鼠眼眶取血后分离血清, 处死大鼠取膝关节软骨。软骨组织HE染色后用改良Mankin评分细则进行评分; 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)和Western blotting检测软骨中基质金属蛋白酶(MMP)-2和MMP-13的表达; ELISA法检测血清炎症介质的表达。结果 与模型组比较, 透骨消痛胶囊0.93、1.86、3.72 g/kg剂量组HE染色评分均显著升高($P < 0.05$), MMP-2、MMP-13 mRNA和蛋白水平均显著降低($P < 0.01$); 血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、血管内皮生长因子(VEGF)、白细胞介素-6(IL-6)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)水平均显著降低($P < 0.01$)。结论 透骨消痛胶囊可以显著抑制大鼠骨性关节炎, 机制与降低MMP-2、MMP-13表达, 降低血清炎症因子TNF- α 、VEGF、IL-6和IL-1 β 水平相关。

关键词: 骨性关节炎; 透骨消痛胶囊; 基质金属蛋白酶

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2020)01-0061-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.01.010

Study on mechanism of TouGu XiaoTong Capsule inhibiting synovitis of osteoarthritis in rats

CHEN Xiang, WANG Pingping

Department of Orthopaedics, Huangshi Central Hospital (Affiliated Hospital of Hubei Institute of Technology), Huangshi 435000, China

Abstract: **Objective** To explore the inhibitory Mechanism of Tou Gu Xiao Tong capsule on rat osteoarthritis synovitis. **Methods** The rats were randomly divided into five groups: control group, model group, low, medium and high dose (0.93, 1.86, 3.72 g / kg) group of Tou Gu Xiao Tong Capsule. Except the control group, SD rats were operated to construct osteoarthritis model. Rats of control group and model group were ig given the same amount of normal saline once a day for 8 weeks. At the end of administration, blood was collected from the orbit of the rats and serum was separated. After HE staining, the cartilage tissue was graded by modified Mankin scoring rules; the expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-13 in cartilage was detected by real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blotting; the expression of serum inflammatory mediators was detected by elasa method. **Results** Compared with the model group, the HE staining scores of 0.93, 1.86 and 3.72 g / kg groups of tgxtc were significantly higher ($P < 0.05$), the levels of MMP-2, MMP-13 mRNA and protein were significantly lower ($P < 0.01$), the levels of TNF - α , VEGF, IL-6 and IL-1 β were significantly lower ($P < 0.01$). **Conclusion** TouGu XiaoTong Capsule can significantly inhibit osteoarthritis in rats, the mechanism is related to the decrease of MMP-2, MMP-13 expression, TNF - α , VEGF, IL-6 and IL-1 - β levels.

Key words: osteoarthritis; synovitis; Tuogu Xiaotong Capsule

骨关节炎是一种常见的关节退行性疾病, 是以慢性进行性关节软骨本身的磨损和软骨细胞外基质的降解为特征的软骨退行性病变^[1]。在中医角度

解读, 膝关节骨性关节炎是一种膝关节的痹症, 是由于老年肾虚之后, 骨髓滋养不足, 软骨和软骨下骨得不到有效的滋养, 进而引起骨性关节炎的发

收稿日期: 2019-10-19

基金项目: 河南省科技发展计划项目(142102310449)

第一作者: 陈翔, 男, 本科, 副主任医师, 研究方向为脊柱外科专业。Tel: 13807232569 E-mail: 2755229172@qq.com

*通信作者: 汪萍萍, 女, 本科, 副主任医师, 研究方向为外科临床。Tel: 18907231539 E-mail: 731069746@qq.com

生^[2]。老年人因为经脉瘀滞,不能正常行气血,气滞血瘀,痹阻经脉而产生膝关节的疼痛。

透骨消痛胶囊由巴戟天、白芍、川芎、肿节风组成,治疗骨性关节炎具有多靶点、多途径等特点,有较好的临床效果^[3]。透骨消痛胶囊以巴戟天为君药,白芍为臣药,川芎活血,肿节风祛湿,具有坚实的中医药理论指导^[4]。本研究构建SD大鼠骨性关节炎模型,探究透骨消痛胶囊抑制大鼠骨性关节炎滑膜炎的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

8月龄雄性SD大鼠,购自济南市实验动物中心,实验动物生产许可证号为SCXK(鲁)20160899,饲养于实验动物研究中心SPF级动物房中,室温为(22.9±4.2)℃,湿度为45%~55%,无菌饲料喂养,每日查看大鼠健康状况,及时清除死亡的大鼠。

1.2 药物及主要试剂

透骨消痛胶囊购自康美药业股份有限公司,批号bz1015167,规格为10 g;DMEM培养液购自美国Gibco公司;鼠源性基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶-13(MMP-13)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、血管内皮生长因子(VEGF)、白细胞介素-6(IL-6)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)ELISA试剂盒,购自美国Abcam公司;Trizol RNA iso(Takara,日本)。

1.3 主要仪器

Applied Biosystems Veriti PCR仪购自美国赛默飞公司。

2 方法

2.1 SD大鼠骨性关节炎模型的建立和分组给药

采用改良的Hulth模型^[5]。取20只8月龄雄性SD大鼠,用100 mg安定、10 mg阿托品与等量的生理盐水混合,5 mL/kg ip麻醉大鼠,在无菌条件下沿膝关节内侧缘纵向切开大鼠的膝关节腔,充分显露膝关节,切断前交叉韧带、内侧副韧带,同时切除内

侧半月板,术后不对大鼠进行固定,im 20万/U抗生素,在造模后第7天,迫使SD大鼠在跑台上奔跑,4周后可得到明显的大鼠骨关节炎模型。

利用随机数字表法,将大鼠随机分成5组:对照组、模型组及透骨消痛胶囊低、中和高剂量组。对照组未做任何处理,透骨消痛胶囊低、中、高剂量组分别ig给予透骨消痛胶囊0.93、1.86、3.72 g/kg,对照和模型组ig给予等量生理盐水,每天1次,持续8周。给药结束后,大鼠眼眶取血后分离血清,处死大鼠取膝关节软骨。

2.2 SD大鼠关节滑膜组织HE染色

取SD大鼠膝关节软骨,4%多聚甲醛固定30 min;脱钙处理4周;过二甲苯I处理15 min,二甲苯II 10 min,二甲苯III 10 min;100%、95%、90%、85%酒精梯度处理各5 min;二甲苯I 15 min,二甲苯II 10 min,二甲苯III 10 min,100%、95%、90%、85%酒精各处理5 min,自来水冲洗5 min,苏木素-伊红染液染色5 min;封片;倒置光学显微镜观察。用改良Mankin评分细则^[6]进行HE染色评分。

2.3 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测

取大鼠软骨组织,加入1 mL的Trizol RNA iso,提取总RNA,检测总RNA的纯度,在1.9~2.0的范围,利用逆转录试剂盒逆转录为cDNA,4℃保存,采用20 μ L反应体系进行荧光定量PCR检测。采用FS2000系统进行分析,反应条件为:95℃ 30 s;95℃ 5 s,60℃ 30 s,40个循环。溶解曲线:95℃ 5 s,60℃ 1 min。降温:50℃ 30 s,1个循环。内参基因为GAPDH,MMP-2、MMP-13的引物由上海生工公司设计(表1)。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法计算相对表达量。

2.4 Western blotting检测

取大鼠软骨组织,加入1 mL RIPA细胞裂解液,冰上裂解30 min,收集入1.5 mL离心管,在4℃离心机中5 000 r/min离心5 min后提取上清,95℃煮沸,4℃保存。按照说明书制备浓缩胶10 mL,分离胶20 mL。上样后电泳分离,转膜,MMP-2和MMP-

表1 目的基因的引物序列
Table 1 Primer Sequences of Target Genes

引物名称	引物序列	
MMP-2	正义链	5'-CAAGAGGTCCTGTCTTCAGATGA-3'
	反义链	5'-TCTGTTTCCGTTTCCTGGTTC-3'
MMP-13	正义链	5'-GTGATAAAGGTTTCGGTTGCTG-3'
	反义链	5'-TGTTTTCTGTGGCTCCTCCTCTGG-3'
hGAPDH	正义链	5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'
	反义链	5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'

13的一抗经一抗稀释液1:10 000稀释后加入样本离子膜,4℃冰箱避光孵育过夜(>12 h),PBST洗膜5 min,重复3次,用山羊抗小鼠IgG二抗经稀释液1:1 000稀释后孵育1.5 h,PBST洗膜5 min,重复3次,用DAB显影液处理样本。Image J软件分析蛋白条带。

2.5 ELISA法检测血清TNF- α 、VEGF、IL-6和IL-1 β 水平

ELISA法检测大鼠血清中TNF- α 、VEGF、IL-6和IL-1 β 水平,严格按照试剂盒说明书操作。

2.6 统计学方法

结果用 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,应用SPSS 16.0软件进行统计学分析,采用单因素方差分析方法,组间的差异分析采用 q 检验。

3 结果

3.1 SD大鼠膝关节滑膜组织HE染色

如图1、表2所示,与对照组比较,模型组HE染色评分显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,透骨消痛胶囊0.93、1.86、3.72 g/kg剂量组HE染色评分均显著升高($P < 0.05$)。

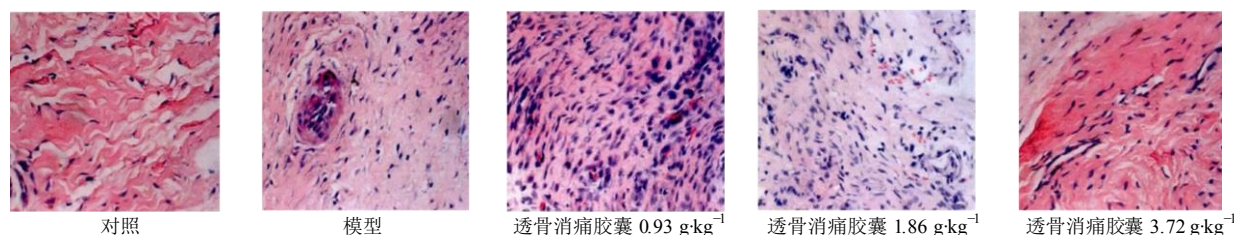


图1 SD大鼠膝关节滑膜组织HE染色

Fig. 1 HE staining of synovium in SD rats

表2 SD大鼠膝关节滑膜组织HE染色评分结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Scoring results of HE staining in synovium of knee joint of SD rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	HE染色评分
对照	—	10.84±6.51
模型	—	3.37±1.32*
透骨消痛 胶囊	0.93	7.01±1.83 [#]
	1.86	8.17±1.54 [#]
	3.72	9.23±2.66 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

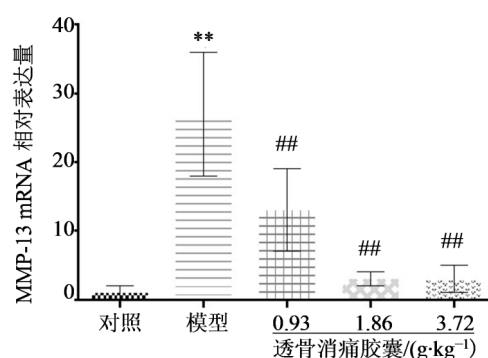
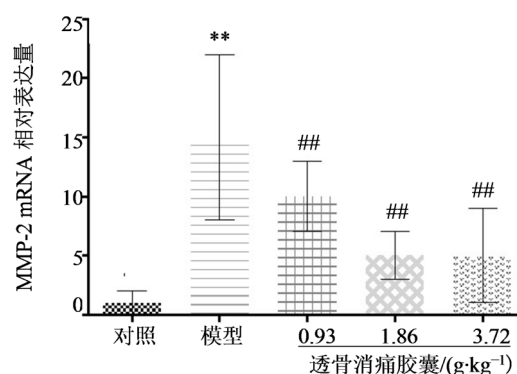
* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group

3.2 对关节滑膜组织MMP-2、MMP-9 mRNA水平的影响

如图2所示,与对照组比较,模型组关节滑膜组织MMP-2、MMP-13 mRNA水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,透骨消痛胶囊0.93、1.86、3.72 g/kg剂量组MMP-2、MMP-13 mRNA水平均显著降低($P < 0.01$)。

3.3 对MMP-2和MMP-13的蛋白表达

如图3所示,与对照组比较,模型组关节滑膜组织MMP-2、MMP-13蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,透骨消痛胶囊0.93、1.86、3.72 g/kg剂量组MMP-2、MMP-13蛋白表达水平均显著降低($P < 0.01$)。

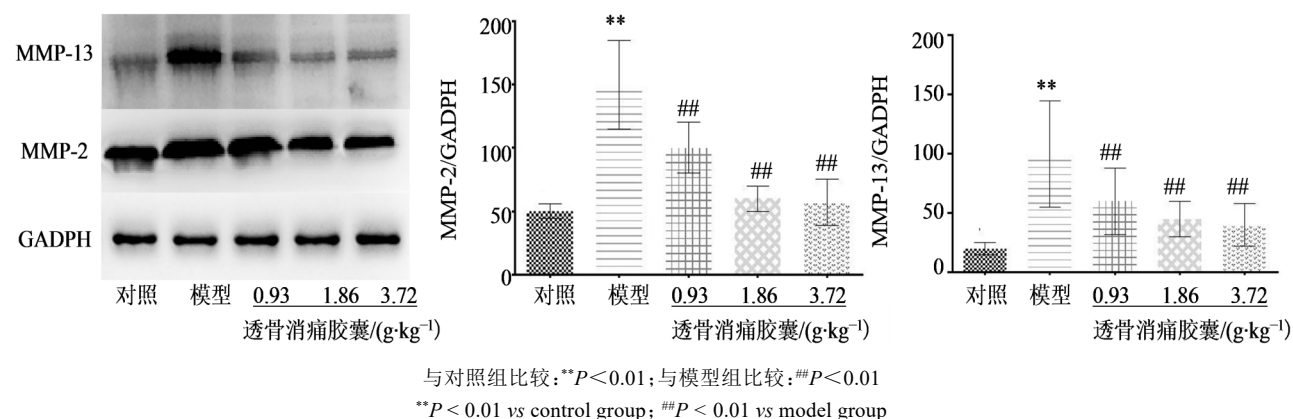


与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group

图2 各组MMP-2、MMP-13 mRNA水平($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Levels of MMP-2 and MMP-13 mRNA in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

图3 Western Blotting法检测MMP-2、MMP-13蛋白表达($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 3 Western blotting for MMP-2 and MMP-13 protein expression ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.4 ELISA法检测TNF- α 、VEGF、IL-6和IL-1 β 的表达水平

如图4所示,与对照组比较,模型组大鼠血清中TNF- α 、VEGF、IL-6和IL-1 β 水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,透骨消痛胶囊0.93、1.86、3.72 g/kg组TNF- α 、VEGF、IL-6和IL-1 β 水平均显著降低($P < 0.01$)。

4 讨论

骨关节炎发病机制十分复杂,发病机制的侧重点不同,研究思路也各有不同^[5],动物模型的制备方法也多种多样,动物模型常被用来研究软骨退变的机制和疾病治疗的方法,是进行骨关节炎机理研究的重要基础^[6]。骨关节炎模型从制作方法上可分为人工诱发和自发模型两类,可通过手术和非手术方法诱导骨关节炎^[7]。本研究中采用手术的方法,对SD大鼠采取膝关节内侧切口,翻开髌骨,尽可能使关节显露,直视下切断前叉韧带,去除内侧副韧带和内侧半月板,并用小鼠跑步仪器加速膝关节的磨损,制备膝关节骨性关节炎模型。

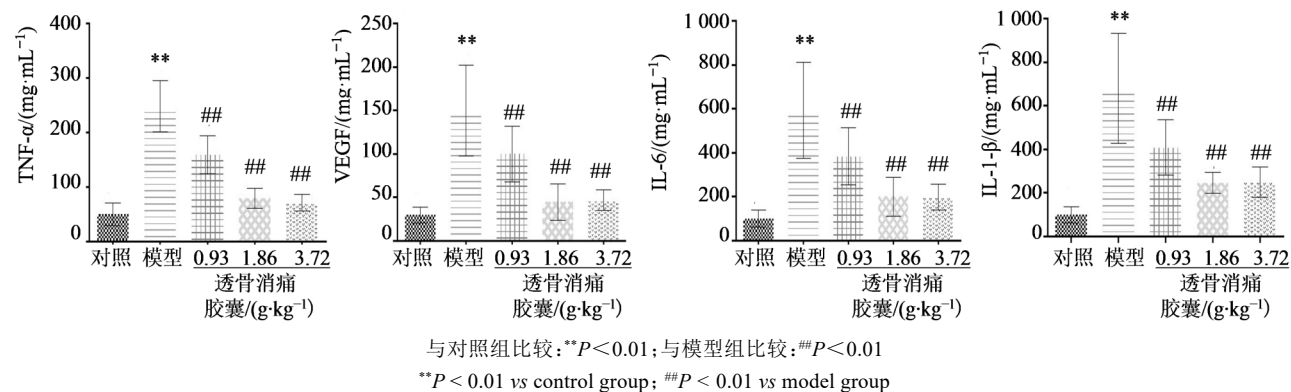
膝关节HE染色Mankin评分^[11]结果表明,模型

组评分与对照组比较评分显著升高($P < 0.05$),从病理角度证明OA关节炎模型构建成功。透骨消痛胶囊显著改善关节炎大鼠病理变化。

研究表明^[8-10],MMP-2、MMP-13对软骨基质降解作用比较明显,造成软骨基质的破坏,检测MMP-2和MMP-13可以作为骨性关节炎模型的指标。本研究利用qRT-PCR和Western Blotting检测软骨组织MMP-2和MMP-13含量,模型组MMP-2和MMP-13的mRNA、蛋白含量与对照组比较显著升高,说明模型组的炎症因子明显增高,证明本研究采取的手术方法造模成功。透骨消痛胶囊治疗后,软骨组织MMP-2和MMP-13含量显著降低,表明透骨消痛胶囊显著改善软骨基质的降解。

本研究除了以MMP-2和MMP-13为炎症指标^[12],还利用ELISA检测血清中TNF- α 、VEGF、IL-6和IL-1 β ^[13]的含量。透骨消痛胶囊治疗后,与模型组比较,血清中TNF- α 、VEGF、IL-6和IL-1 β 的含量显著降低,表明透骨消痛胶囊显著改善骨性关节炎大鼠炎症反应。

透骨消痛胶囊可以显著改善大鼠骨性关节炎,

图4 ELISA法检测血清TNF- α 、VEGF、IL-6和IL-1 β 水平($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 4 Detection of serum TNF- α , VEGF, IL-6 and IL-1 β by ELISA ($\bar{x} \pm s, n=3$)

机制与降低MMP-2、MMP-13表达,降低血清炎症因子TNF- α 、VEGF、IL-6和IL-1- β 水平相关。

参考文献

- [1] Stubbs B, Hurley M, Smith T. What are the factors that influence physical activity participation in adults with knee and hip osteoarthritis? A systematic review of physical activity correlates [J]. Clin Rehabil, 2015, 29(1): 80-94.
- [2] Chen H O, Zhang L, Tang Z Y, et al. MiR-485-5p promotes the development of osteoarthritis by inhibiting cartilage differentiation in BMSCs [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(11): 3294-3302.
- [3] 吴迫乐, 陈星强, 陈春蓉. 等. 透骨消痛胶囊及其拆方对退变软骨细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(24): 3568-3573.
- [4] 吴广文, 叶锦霞, 郑春松. 等. 骨性关节炎模型大鼠关节软骨变化及透骨消痛胶囊干预的作用 [J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(49): 7924-7929.
- [5] Charlton J M, Hatfield G L, Guenette J A, et al. Toe-in and toe-out walking require different lower limb neuromuscular patterns in people with knee osteoarthritis [J]. J Biomech, 2018, 76: 112-118.
- [6] Bendele A M. Animal models of osteoarthritis [J]. Musculoskel Neuron Interact, 2001, 1(4): 368.
- [7] 江捍平, 王大平. 骨关节炎动物模型 [J]. 中国现代医学杂志, 2004, 14(6): 153-156.
- [8] Hou H, Gao F, Liang H, et al. MicroRNA-188-5P regulates contribution of bone marrow-derived cells to choroidal neovascularization development by targeting MMP-2/13 [J]. Exp Eye Res, 2018, 175: 115-123.
- [9] Yu W G, Shen Y, Wu J Z, et al. Madecassoside impedes invasion of rheumatoid fibroblast-like synovial cell from adjuvant arthritis rats via inhibition of NF- κ B-mediated matrix metalloproteinase-13 expression. [J]. Chin J Nat Med, 2018, 16(5): 330-338.
- [10] Jiang Y N, Yan H Q, Huang X B, et al. Interleukin 6 triggered ataxia-telangiectasia mutated activation facilitates lung cancer metastasis via MMP-3/MMP-13 up-regulation [J]. Oncotarget, 2015, 6(38): 40719-40733.
- [11] Tang Z F, Li H Y. Effects of fibroblast growth factors 2 and low intensity Pulsed ultrasound on the repair of knee articular cartilage in rabbits [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(8): 2447-2453.
- [12] Xu H, Ren Y J, Liu K, et al. Correlations of serum VEGF and MMP-2 levels with CLM in CRC patients and effects of TACE on their expressions [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(11): 3394-3401.
- [13] Williams L M, Gibbons D L, Gearing A, et al. Paradoxical effects of a synthetic metalloproteinase inhibitor that blocks both P55 and P75 TNF receptor shedding and TNF alpha processing in RA synovial membrane cell cultures [J]. J Clin Invest, 1996, 97(12): 2833-2841.