

芍药舒筋片对大鼠膝骨关节炎软骨病理、细胞因子及 P II CP 水平的影响

钱春美¹ 袁秀荣¹ 文小平¹ 庞 坚² 陈 博²

(1 上海中医药大学, 上海, 201203; 2 上海中医药大学附属曙光医院石氏伤科医学中心, 上海, 201203)

摘要 目的:探讨芍药舒筋片对大鼠膝骨关节炎软骨病理、血清中前列腺素 2(Prostaglandin E₂, PGE₂)、肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α)及 II 型前胶原羧基端前肽(Carboxyterminal Propeptide of Type II Procollagen, P II CP)水平的影响。方法:将 60 只 SD 大鼠分成假手术组,模型组,阳性药组,受试药高、中、低剂量组,采用经典前交叉韧带切断术(Anterior Cruciate Ligament Transection, ACLT)手术造模,成模后灌胃给药 4 周后处死,分离血清及取术侧膝关节进行 PGE₂、TNF- α 、P II CP 检测和病理观察。结果:光镜下显示关节软骨发生退变,膝骨关节炎模型成功;ELISA 检测血清指标 PGE₂、P II CP 提示,芍药舒筋片受试药组与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而血清 TNF- α 含量与模型组比较,具有降低趋势。结论:芍药舒筋片对大鼠膝骨关节炎有一定的抗炎、延缓软骨退化、保护软骨的作用。

关键词 膝骨关节炎/中医药疗法;芍药舒筋片;PGE₂;TNF- α ;P II CP

Effect of Shaoyao Shujin Tablet on Cartilage Pathology, Cytokines and the Level of P II CP of Rat Model with Knee Osteoarthritis

Qian Chunmei¹, Yuan Xiurong¹, Wen Xiaoping¹, Pang Jian², Chen Bo²

(1 Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China; 2 Shi's Center of Orthopedics and Traumatology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China)

Abstract Objective: To explore the effect of Shaoyao Shujin tablet on the cartilage pathology, PGE₂, TNF- α and the level of P II CP of the rat with knee joint inflammation. **Methods:** Sixty SD rats were divided into the 6 groups: fake surgery group, model group, control group, high-dose test group, mid-dose test group and the low-dose test group. The Anterior Cruciate Ligament Transection, ACLT were given to rats in the latter 5 groups to establish knee osteoarthritis model. Abdominal aortic blood was separated and the surgery side of the knee was taken after 4 weeks of drug administration. The serum with PGE₂, TNF- α and P II CP were checked out after separation. **Results:** The morphological changes of articular cartilage under optical microscope indicated that the model was successful. The concentration of PGE₂ and P II CP showed statistically significant differences between the test groups and the model group. And the concentration of TNF- α in the test groups had a decreasing trend compared with that in the model group. **Conclusion:** Shaoyao Shujin tablet can be anti-inflammatory, delay the degeneration of the knee osteoarthritis articular cartilage and so as to protect the articular cartilage.

Key Words Shaoyao Shujin tablet; Knee Osteoarthritis; PGE₂; TNF- α ; P II CP

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2013.05.024

骨性关节炎是由多种原因引起的与关节软骨完整性受损有关的常见关节疾病,以软骨退行性改变甚至消失为主要病理特征。目前,常用治疗药物为抑制 PGE₂ 合成的非甾体抗炎药。而院内制剂芍药舒筋片是治疗骨性关节炎的有效中药复方,能较有效延缓软骨降解^[1-2]。本实验拟通过大鼠骨关节炎模型,进一步观察芍药舒筋片对血清中的炎症反应介质 PGE₂、TNF- α 、软骨基质代谢标志物 P II CP 的表达变化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物及分组 SD 大鼠 60 只,180~200g,清洁级,购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司,随机分

成假手术组,手术模型组,阳性对照组,芍药舒筋片高、中、低剂量组。每组 10 只,雌雄各半。

1.1.2 药品与试剂 芍药舒筋片(真空干燥粉),批号:20110616,由上海中医大源创科技有限公司提供;维固力胶囊,批号:C11054A,爱尔兰罗达药厂生产。PGE₂、TNF- α 、P II CP ELISA 试剂盒,由上海西唐生物科技有限公司提供。

1.1.3 仪器与设备 AR1140 电子天平,奥豪斯(上海)仪器有限公司;ACS 电子秤,上海东南衡器有限公司;SZ-II 自动纯水蒸馏器,上海嘉鹏科技有限公司;DENLEY DRAGON Wellscan MK 3 酶标仪,Thermo;Olympus(IX71)型倒置相差显微镜,Olympus。

1.2 方法

1.2.1 造模方法 除假手术组外,采用经典 ACLT 手术造模^[3-4],切断大鼠单侧膝关节前交叉韧带、内侧副韧带并缝合。术后连续 5 d 肌注硫酸庆大霉素注射液(8 万单位/只)。假手术组暴露关节腔而不切断前交叉韧带、内侧副韧带,其余步骤同上。

1.2.2 取材及处理 第 1~4 周常规饲养,第 5~8 周灌胃给药。假手术组、模型组分别给予蒸馏水;阳性药组给予维骨力 0.137 g/kg;高、中、低剂量组分别给予芍药舒筋片(生药)5.4 g/kg、2.7 g/kg、1.4 g/kg。末次给药后第 2 d,腹主动脉取血,分离血清于 -80℃ 保存待测。大鼠处死,取术侧关节进行病理学观察。

1.2.3 苏木精/伊红染色(HE 染色)膝关节标本用多聚甲醛固定 24 h 后,常规脱钙,修整组织后石蜡包埋,5 μm 厚度连续切片,HE 染色,在光镜下观察。

1.2.4 ELISA 检测血清 测定血清 PGE₂、TNF-α、P II CP 的含量,具体步骤参照试剂盒说明。

1.3 统计方法 实验数据均以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 15.0 软件对其进行统计。均采用方差分析或非参数检验,LSD 法或 Tamhane 法比较组间差异。

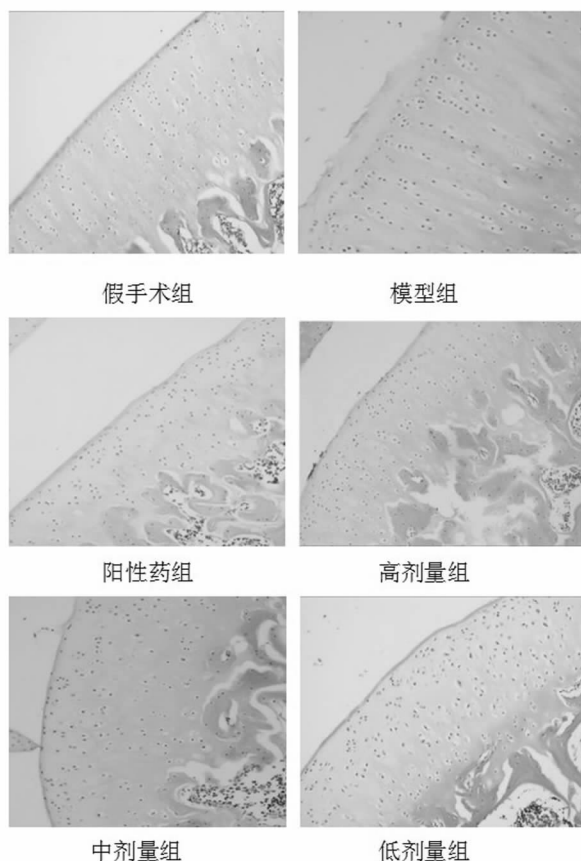


图 1 ACLT 膝关节关节炎模型大鼠关节石蜡切片 HE 染色
(光镜 10×20 倍)

2 结果

2.1 HE 染色 假手术组关节软骨表面较平滑,连续性良好,软骨基质染色均匀,模型组关节软骨表面粗糙,可见剥脱缺损,表层基质有丢失,软骨基质染色不均,细胞分布不均匀,证实模型组关节软骨发生了退变,膝骨关节炎模型成功。阳性药组、受试药高、中、低剂量组软骨表面均较光滑,略不平整,着色、细胞分布较均匀,见图 1。

2.2 ELISA 血清检测

2.2.1 PGE₂ 含量测定 模型组大鼠血清中 PGE₂ 含量与假手术组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);给药组与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示芍药舒筋片能在一定程度上抑制 PGE₂ 的含量,见表 1。

表 1 芍药舒筋片对大鼠血清 PGE₂ 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	鼠数	PGE ₂ 浓度(pg/mL)
假手术组	-	10	389.81 ± 100.46
模型组	-	9	503.54 ± 138.85*
阳性药组	0.137	10	330.60 ± 49.14 [△]
高剂量组	5.4	10	344.03 ± 65.43 [△]
中剂量组	2.7	9	326.82 ± 83.81 [△]
低剂量组	1.35	10	371.53 ± 126.73 [△]

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$ 。

2.2.2 TNF-α 含量测定 模型组血清中 TNF-α 含量与假手术组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);各给药组与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),从趋势上可见给药组中 TNF-α 含量均较模型组低,提示其可在一定程度上抑制 TNF-α 含量,见表 2。

表 2 芍药舒筋片对大鼠血清 TNF-α 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	鼠数	TNF-α 浓度(pg/mL)
假手术组	-	8	167.64 ± 41.59
模型组	-	10	357.18 ± 86.07*
阳性药组	0.137	8	188.92 ± 68.78 [△]
高剂量组	5.4	9	254.08 ± 59.73 [△]
中剂量组	2.7	8	265.43 ± 96.52 [△]
低剂量组	1.35	9	224.59 ± 75.14 [△]

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$ 。

表 3 芍药舒筋片对大鼠血清 P II CP 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	鼠数	P II CP 浓度(ng/mL)
假手术组	-	10	99.58 ± 12.16
模型组	-	8	78.05 ± 9.14*
阳性药组	0.137	10	98.61 ± 25.03 [△]
高剂量组	5.4	10	89.44 ± 17.91
中剂量组	2.7	10	97.35 ± 16.45 [△]
低剂量组	1.35	10	81.32 ± 12.37

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$ 。

2.2.3 P II CP 含量测定 模型组血清 P II CP 含量与假手术组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示大鼠膝关节关节炎模型成功; 给药组与模型组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示芍药舒筋片能在一定程度上延缓软骨退化, 见表 3。

3 讨论

膝关节关节炎发病于中老年以后, 女子六七、男子六八, 虚衰之象渐显, 由“肝气衰, 筋不能动”进而“肾藏衰, 形体皆极”, 临床所见, 呈筋急而挛, 膝软动作牵强等病症。骨关节炎的病理学特征从形态上看, 关节软骨、软骨下骨及滑膜等关节周围组织有慢性炎性反应, 且其软骨面出现微小裂缝等, 软骨面凹凸不平, 最终软骨剥脱露出硬化和致密的骨质^[5]。“养血软坚方”是骨伤科专家石印玉教授长期医疗实践经验方, 由白芍、牡蛎、生甘草、秦艽、全蝎、蜈蚣等组成, 临床研究证实其有效率为 74.4%^[6]。从形态学上观察, 工艺修饰后的芍药舒筋片对 ACLT 手术形成的膝关节关节炎模型有一定的作用, 能延缓或修复关节软骨退化, 保护软骨。

关节软骨主要由软骨细胞和细胞外基质组成, 软骨细胞是关节软骨中唯一的细胞, 合成分泌软骨基质和胶原纤维, 细胞外基质是软骨细胞生存和代谢的场所, 和细胞因子构成软骨细胞的外环境^[7-8]。PGE₂ 是具有多效性作用的炎性反应介质, 可促进血管新生, 在关节炎病理及关节破坏中起重要作用。TNF- α 是关节炎病理过程中促进软骨基质降解和关节软骨破坏的重要细胞因子之一^[9]。现代研究表明^[10], 在致病因素作用下, 炎症性细胞因子介导关节软骨和滑膜中各种蛋白酶表达升高, 能够改变软骨中胶原成分, 促使 II 型胶原合成速度下降, 引起关节软骨基质胶原纤维网及蛋白多糖的降解, 最终导致软骨退变。实验证实, 与假手术组比, 模型组中 PGE₂、TNF- α 炎性细胞因子水平显著升高。在药物的干预下, 给药组细胞因子水平均低于模型组。

II 型胶原是关节软骨细胞外基质的主要组成之一, 由软骨细胞合成前体 II 型前胶原, 释放出胞外后经酶水解去除 C 端与 N 端后形成成熟的 II 型胶原纤维, 对于关节软骨机械性能的维持具有重要的作用。目前认为 II 型胶原总量的丢失是骨关节炎病理演变的关键之一。本研究为了更进一步探讨芍药舒筋片保护软骨的可能作用效应与机制, 选择了具有反映软骨基质合成代谢程度的标志物 P II CP。II 型胶原的含量有赖于合成与降解代谢之间的平衡, 在骨关节炎早期, 两种代谢过程往往都有所加强, 作为一种修复机制, II 型胶原合成略强, 早期骨关节炎患者与模型动物体液中的 P

II CP 的含量有显著升高^[11-12], 而随着疾病的发展, 降解代谢的作用逐渐强于合成代谢^[13]。本实验证实, 与假手术组比较, 模型组 P II CP 的含量显著降低, 而从趋势上发现芍药舒筋片的干预使 P II CP 的含量维持在较正常的水平。有研究显示^[14-15], TNF- α 通过刺激软骨细胞, 刺激滑膜细胞分泌 PGE₂, 引起基质降解酶的产生, 抑制 II 型胶原的合成。

从以上结果看, 抑制 TNF- α 、PGE₂ 的分泌, 促进 II 型胶原的合成, 可能是芍药舒筋片抑制对软骨基质的破坏, 延缓软骨退变的作用机制, 对骨关节炎有一定的保护和促进修复作用。

参考文献

- [1] 曹月龙, 郑显新, 石印玉, 等. 养血软坚胶囊治疗膝关节关节炎疗效及安全性评价的随机对照试验[J]. 中国药物与临床, 2004, 4(6): 423-427.
- [2] 石印玉, 徐荣善, 陈友红. 养血软坚方治疗膝关节关节炎的临床报告[J]. 中国中医骨伤科, 1994, 2(4): 33-36.
- [3] 翟吉良, 翁习生, 邱贵兴. 骨关节炎动物模型的建立及选择[J]. 中国矫形外科杂志, 2007, 15(11): 843-845.
- [4] 王婧, 张忠辉, 孙娇梦, 等. 大鼠骨关节炎三种动物模型的建立与比较[J]. 中国细胞生物学报, 2010, 32(3): 456-460.
- [5] 李文庆, 廉春光, 王定. 骨性关节炎的基础研究进展[J]. 中医正骨, 2009, 21(5): 67-71.
- [6] 郑显新, 蔡锦方, 石印玉. 舒灵胶囊和维骨力治疗膝关节关节炎的临床对比报告[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2000, 8(5): 18-20.
- [7] 曹林忠. 细胞因子对关节软骨损伤修复影响的研究进展[J]. 广州医药, 2009, 40(1): 3-6.
- [8] 马春辉, 蔡国平, 阎作勤, 等. II 型胶原在骨关节炎软骨细胞中的表达[J]. 复旦学报: 医学版, 2009, 36(6): 734-736.
- [9] 季卫锋, 童培建, 袁小凤, 等. 补肾法与活血法对 SD 大鼠膝性关节炎滑膜 IL-1 β 、TNF- α 及软骨 MMP-13、ADAMTS-5 的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2012, 20(2): 143-145.
- [10] 朱长谋, 王洪. 蛋白酶与骨关节炎软骨退变[J]. 国际骨科学杂志, 2007, 28(1): 31-32.
- [11] Hiraku Hotta, Harumoto Yamada, Hironari Takaishi, et al. Type II collagen synthesis in the articular cartilage of a rabbit model of osteoarthritis: expression of type II collagen C-propeptide and mRNA especially during early-stage osteoarthritis. Journal of Orthopaedic [J]. Science, 2005, 10(6): 595-607.
- [12] F Nelson, L Dahlberg, S Laverty, A Reiner, et al. Evidence for altered synthesis of type II collagen in patients with osteoarthritis[J]. J Clin Invest, 1998, 102(12): 2115-2125.
- [13] Lorenz H, Richter W. Osteoarthritis: cellular and molecular changes in degenerating cartilage[J]. Prog Histochem Cytochem, 2006, 40(3): 135-163.
- [14] Hana Hulejova, Veronika Baresova, Zdenek Klezl, et al. Increased level of cytokines and matrix metalloproteinase in osteoarthritic subchondral bone[J]. Cytokine, 2007, 38(3): 151-156.
- [15] 张铁锋, 李景峰. 细胞因子 IL-1 β 和 TNF- α 在骨关节炎软骨中 mRNA 表达的变化及意义[J]. 中国现代医生, 2008, 46(15): 116-117.