

实验研究

活血膏对膝骨性关节炎大鼠关节软骨
Wnt/ β -catenin 信号通路的影响

周伟 吴进 林晓光 林凯 郑红波

(广西柳州市人民医院中医骨伤科,柳州,545000)

摘要 目的:观察活血膏对骨性关节炎模型大鼠运动能力的干预效应,同时评估其对关节软骨超微结构以及 Wnt/ β -catenin 信号通路标志性蛋白表达的影响。方法:将 30 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组以及活血膏组,每组 10 只。其中模型组及活血膏组大鼠接受 4% 木瓜蛋白酶关节腔注射以复制骨性关节炎模型,随后活血膏组大鼠接受活血膏外用涂抹,连续干预 14 d,比较 3 组大鼠关节腔软骨下骨组织形态学、软骨形态以及软骨组织 Wnt-2、 β -catenin 含量的变化。结果:1) 接受造模的大鼠膝关节活动度明显低于空白组,其中活血膏组大鼠膝关节活动度大于模型组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。2) 模型组大鼠胫骨小梁出现明显硬化现象,局部存在断裂,骨小梁排列顺序紊乱,可见骨赘形成,活血膏组大鼠胫骨小梁排列明显较模型组整齐,断裂现象明显减少。接受造模大鼠 BS/BV 较空白组升高,Tb.Th 及 Tb.N 均较空白组下降,其中活血膏组较模型组改善,差异均有统计学意义($P < 0.05$);3) HE 染色显示空白组大鼠软骨面形态正常,基质着色均匀正常,潮线清晰可见;模型组大鼠软骨出现不同程度的纤维化,软骨细胞数量减少,潮线模糊不清;活血膏组软骨细胞较模型组增多,可见部分潮线。4) Western Blot 检测法提示模型组软骨组织 Wnt-2、 β -catenin 含量较空白组明显升高,活血膏组虽较空白组上调但较模型组明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论:活血膏对骨性关节炎大鼠的软骨及软骨下骨有保护效应,其作用机制可能与抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路表达有关。

关键词 膝骨性关节炎;大鼠;软骨;软骨下骨;活血膏;Wnt-2; β -catenin

Effect of Huoxue Ointment on Wnt/ β -catenin Signaling Pathway in Articular Cartilage of Knee Osteoarthritis Rats

Zhou Wei, Wu Jin, Lin Xiaoguang, Lin Kai, Zheng Hongbo

(Department of Chinese Medicine Orthopedics, Liuzhou People's Hospital, Liuzhou 545000, China)

Abstract Objective: To observe the intervention effect of Huoxue ointment on the motor function of osteoarthritis rats, and to evaluate its effect on the ultrastructure of articular cartilage and the expression of Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Methods:** A total of 30 SD rats were randomly divided into blank group, model group and Huoxue ointment group, with 10 rats in each group. The model group and Huoxue plaster group were treated with intra-articular injection of 4% papain to replicate the osteoarthritis model, then Huoxue ointment group were treated with external application of Huoxue ointment, intervention for 14 consecutive days. Rat articular subchondral bone tissue morphology, cartilage morphology and cartilage tissue Wnt-2, beta-catenin of three groups were compared. **Results:** 1) The activity of the knee joint in the model rats was significantly lower than that in the blank group, and the motion range of the knee joints in Huoxue ointment group was greater than that in the model group. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). 2) The trabecular bone showed obvious hardening phenomenon in the model group. There were local fractures. The trabecular arrangement was disorder. The formation of osteophyte was observed. The bone trabecular arrangement in Huoxue ointment group was significantly more than that in the model group, and the fracture phenomenon was significantly reduced. BS/BV of rats with model establishment elevated significantly compared with control group, and Tb.Th and Tb.N were lower than that in blank group. The huoxue ointment group improved compared with the model group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). 3) HE staining showed that the rats in cartilage matrix of the blank group had normal morphology, and uniform coloring was normal with visible and clear tide line. The cartilage in model group showed different degrees of fibrosis, and the number of cartilage cells was decreased. The tidal line was blurred; Chondrocytes of Huoxue ointment group increased in comparison with the model group, and part of the tidal line was visible. 4) Western Blot test showed that the Wnt-2 and β -catenin levels of cartilage tissue in model group were significantly higher than those in blank group, while Huoxue ointment group was higher than that in blank group. It was significantly lower than that in model group, and the difference was sta-

基金项目:广西壮族自治区卫生和计划生育委员会自筹经费科研课题项目(Z20170705)

作者简介:周伟(1982.07—),男,研究生,主治医师,研究方向:中医骨伤,E-mail:1570882128@qq.com

tistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Huoxue ointment can protect cartilage and subchondral bone in osteoarthritis rats, and its mechanism may be related to inhibiting the expression of Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key Words Knee osteoarthritis; Rats; Cartilage; Subchondral bone; Huoxue ointment; Wnt/ β -catenin

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2018.06.046

当关节软骨产生退行性改变或继发性骨质增生后导致骨性关节炎的形成 (Knee Osteoarthritis, KOA), 明显降低了生命质量, 因膝关节是 KOA 最易受累的关节, 故又称膝骨性关节炎^[1-2]。尽管 KOA 具有极高的发病率, 但治疗方法确明显滞后于其他类型的关节炎, 目前以非甾体消炎药为主, 虽在一定程度上可减轻患者的临床症状, 但其对消化道破坏的不良反应严重影响了治疗依从性。中医药以其疗效显著、不良反应少的优势逐渐受到临床工作者的青睐, 其在 KOA 领域的疗效临床亦不乏报道^[3-5]。KOA 属于中医学“骨痹”“痛痹”范畴, 肝肾不足, 气滞血瘀是膝骨关节炎的主要病机, 因此补益肝肾, 益气活血化瘀是其治疗的原则。本团队经过临床不断实践总结出活血膏, 其以外用的形式对 KOA 进行治疗, 获得明显的临床疗效, 但其作用机制目前尚未明了, 基于此我们以 4% 木瓜蛋白酶关节腔注射以复制骨性关节炎模型大鼠, 以微观 CT、HE 染色及 Western Blot 检测法为手段, 对活血膏的作用机制进行探析, 具体报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 购买 30 只雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠, 进行为期 7 d 适应性喂养, 体重 278 ~ 308 g, 平均体重 (281 ± 19.28) g。所有大鼠均购自上海 SLAC 实验动物有限责任公司提供 (合格证号: SCXK (沪) 2007—0005)。饲养温度 20 ~ 23 °C, 实验湿度 50% ~ 55%, 所有大鼠均只有饮水饮食。昼夜 12 h/12 h 交替。

1.1.2 药物 活血膏 (当归 15 g、赤芍 15 g、川芎 15 g、红花 20 g、土鳖虫 20 g、龙血竭 2 g、白芍 15 g、威灵仙 15 g、桑寄生 20 g、宽筋藤 15 g、乳香 15 g、白及 15 g、乌药 15 g、冰片 2 g), 所有中药饮片由医院中药房提供, 将上述药物按比例配伍混匀, 60 °C 干燥, 粉碎研磨成微细颗粒, 与加热的凡士林搅拌均匀成糊状。

1.1.3 试剂与仪器 4% 木瓜蛋白酶 (购自上海生工生物公司), Mnt-2、 β -catenin 一抗抗体 (购自美国 CST 公司), 碱性磷酸酶标记的羊抗鼠抗体 (购自 Cell Signaling 公司), 10% 水合氯醛 (购自凯福达化工有限公司), SDS-PAGE 电泳胶及电泳槽 (购自碧

云天公司), BCA 蛋白试剂盒 (购自西安晶彩生物有限公司), 显微 CT 扫描仪 (德国 YxLON 公司生产)。

1.2 方法

1.2.1 分组与造模方法 将 30 只大鼠适应性喂养 1 周, 随机分为空白组、模型组及活血膏组, 每组 10 只。3 组大鼠均将膝关节及其周围毛发剔除, 模型组及活血膏组大鼠在造模第 1 天、第 4 天及第 7 在接受右侧膝关节关节腔注射 4% 木瓜酶溶液 50 μ L, 空白组大鼠在相同时间内注射等剂量的生理盐水。

1.2.2 干预方法 在模型制备的同时给药, 空白组及模型组大鼠在膝关节及其周围涂抹凡士林, 活血膏组涂抹事先制备的活血膏, 1 次/d, 持续 6 ~ 8 h, 连续干预 14 d。

1.3 观察指标与方法

1.3.1 膝关节活动度 由同一个实验员于室温下测试各组大鼠膝关节活动度, 将各组大鼠膝关节等距离处垂直施予等力度的牵拉回缩大鼠右侧膝关节, 用测量器测量伸展之回缩的角度, 连续测量 3 次计算平均值。

1.3.2 显微 CT 扫描观察关节软骨下骨形态学 随机抓取各组 3 只大鼠, 脱颈处死后将右侧髌关节至踝关节处充分分离, 将肌肉等组织剔除后固定于 4% 多聚甲醛液体 3 d, 随后用显微 CT 仪对右膝关节进行扫描。参数设定: 电流 44 μ A, 能量 80 kVp, 积分时间 600 ms, 体素 14 μ m。对胫骨平台及股骨内外侧髁的股形态参数进行观察。记录骨表面积与体积比 (BS/BV)、骨小梁厚度 (Tb. Th) 及骨小梁数量 (Tb. N)。

1.3.3 HE 染色观察关节软骨形态 随机抓取各组 3 只大鼠, 脱颈处死后取胫骨平台软骨, 修剪成大小约 0.5 cm $\times$ 0.5 cm $\times$ 0.5 cm, 固定于 4% 多聚甲醛液体 3 d, 随后进行常规脱水、脱钙、石蜡包埋、修切、脱蜡, 随后将切片固定 10 ~ 30 s, 再用苏木精-伊红染色, 用高倍显微镜观察不同组别膝关节软骨的形态。

1.3.4 Western blot 检测 Mnt-2、 β -catenin 蛋白表达

随机抓取各组 3 只大鼠, 以 0.3 mL/Kg 比例腹腔注射 10% 水合氯醛进行麻醉, 脱颈处死后取胫骨平台软骨, 修剪成重量约 50 mg, 加入 1 mL 蛋白裂解液充分裂解组织, 随后进行高速离心, 吸取上清液,

用 DAB 试剂盒进行蛋白定量,将样本进行蛋白变性,随后将样本加入电泳凝胶中进行蛋白分离,截取目的蛋白胶体后进行转膜,封闭后加入 Mnt-2、 β -catenin 及 β -actin 抗体,孵育过夜后用 TBS 冲洗,加入碱性磷酸酶标记的羊抗鼠抗体后室温下孵育 2 h,用 TBS(Tris-HCl 缓冲盐溶液)清洗条带后进行显色测定,计算出最终 OD 值。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件对本研究所得数据进行分析,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对数据进行正态分布检测,符合正态分布用 T 检验,不符合正态分布用秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠膝关节活动度比较 接受造模的大鼠膝关节活动度明显低于空白组,其中活血膏组大鼠膝关节活动度大于模型组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组关节活动度比较($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	关节活动度
空白组	147 $\pm$ 16.85
模型组	98 $\pm$ 10.28
活血膏组	122 $\pm$ 11.27
<i>t</i>	2.38
<i>P</i>	0.031

2.2 各组关节软骨下骨的形态学变化 通过 CT 扫描可知模型组大鼠骨小梁出现明显硬化现象,局部存在断裂,骨小梁排列顺序紊乱,可见骨赘形成,活血膏组大鼠骨小梁排列明显较模型组整齐,断裂现象明显减少。接受造模大鼠 BS/BV 较空白组升高, Tb. Th 及 Tb. N 均较空白组下降,其中活血膏组较模型组改善,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1、表 2。

2.3 各组膝关节软骨形态学变化 HE 染色显示空白组大鼠软骨面形态正常,基质着色均匀正常,潮线清晰可见;模型组大鼠软骨出现不同程度的纤维化,软骨细胞数量减少,潮线模糊不清;活血膏组软骨细胞较模型组增多,可见部分潮线。见图 2。

表 2 各组软骨下骨参数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	BS/BV(L/mm)	Tb. Th(μ m)	Tb. N(L/mm)
空白组(<i>n</i> = 3)	15.01 $\pm$ 0.61	139.2 $\pm$ 4.78	4.09 $\pm$ 0.18
模型组(<i>n</i> = 3)	17.23 $\pm$ 2.52	126.25 $\pm$ 2.18	3.26 $\pm$ 0.11
活血膏组(<i>n</i> = 3)	16.23 $\pm$ 0.87	130.34 $\pm$ 3.11	3.89 $\pm$ 0.17
<i>t</i>	2.38	3.91	2.69
<i>P</i>	0.025	0.018	0.027

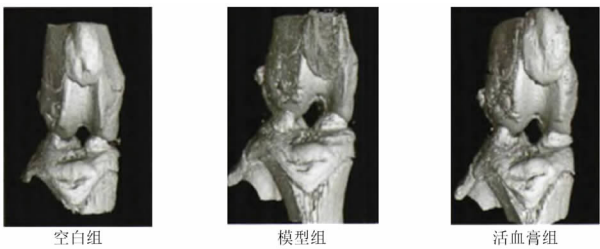


图 1 各组大鼠软骨下骨图 CT 扫描征象

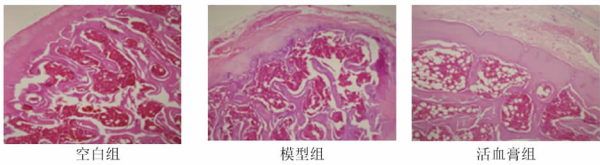


图 2 各组大鼠软骨 HE 结果

2.4 各组关节软骨 Wnt-2、 β -catenin 含量变化 Western Blot 检测法提示模型组软骨组织 Wnt-2、 β -catenin 含量较空白组明显升高,活血膏组虽较空白组上调但较模型组明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3、图 3。

表 3 各组软骨组织 Wnt-2、 β -catenin 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	Wnt-2/内参 OD 比值	β -catenin/内参 OD 比值
空白组(<i>n</i> = 3)	0.76 $\pm$ 0.03	0.65 $\pm$ 0.06
模型组(<i>n</i> = 3)	2.42 $\pm$ 0.16	1.48 $\pm$ 0.29
活血膏组(<i>n</i> = 3)	1.59 $\pm$ 0.11	1.04 $\pm$ 0.12
<i>t</i>	2.73	3.76
<i>P</i>	0.016	0.033

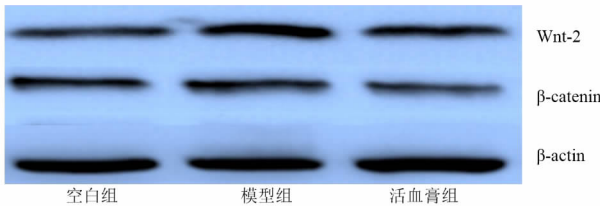


图 3 各组大鼠软骨 Western Blot 结果

3 讨论

骨性关节炎属于中医学“骨痹”“筋痹”等范畴,与肝肾关系极为密切,肾主骨生髓,在体合骨^[6-7]。《素问·痹论》中言:“肾者,水脏也,今水不胜火,则骨枯而髓虚,故是不任厚,发为骨痛”,《素问·六节藏象论》中写到“肾,其充在骨”,肾精充足,骨髓生化有源,骨骼得到髓的滋养,坚固有力,故肾气旺盛,肾精充足则骨骼强健,生发有力。肝主藏血,在体合筋,肝精肝血充足,筋得其养,机体运动灵活有力,《素问·阴阳应象大论》称为“肝主筋”,乃“罢极之本”。如若肝精亏虚,筋不得濡养,则可出现筋力虚弱,运动不利^[8-9]。肝肾亏虚加之寒湿之邪侵袭,筋骨骨节气血凝滞,不通则痛,或劳倦内伤,气血津液耗伤,进一步加剧气血瘀滞之势,经络痹阻而发本

病,正如清代医家张璐在《张氏医通·诸痛门》中描述:“膝者,筋之府,无有不因肝肾虚者,虚者风寒湿袭之”,故补益肝肾,活血化瘀是治疗本病的关键。

活血膏是我院前辈专家留下的验方,经改良研发而成。采取中药药膏外敷治疗膝关节骨性关节炎操作简单、疗效明显,不良反应小,安全性高,其与西医方法进行有机结合,对于缓解膝关节疼痛,促进肢体功能恢复,提高患者生命质量,不仅具有重要的临床价值,而且有良好的应用前景。方中当归性温,是活血补血之良品;赤芍可凉血活血,二药合用共奏缓急止痛之功^[10-12]。川芎是血中之气药,可温经行气活血,又有祛风止痛的作用;红花有理想的温经活血、祛瘀止痛的作用,正如《本草正义》写到:“性本温和气兼辛散,凡瘀滞内积及经络不利诸证,皆其专之”。土鳖虫及血竭可破血散瘀,使筋骨间瘀血散而止痛。白芍可养血柔肝,肝血旺则可缓筋骨拘挛止痛。威灵仙具祛风除湿、通络止痛之功效。桑寄生有补益肝肾之功,与宽筋藤合用,即可补益肝肾又可祛风舒筋。乳香是“定诸经之痛”之良品,与白及合用,共奏消肿生肌之功。乌药行气止痛,温肾散寒。冰片芳香走窜,消肿止痛,同时增强外用药渗透作用。整方共奏补益肝肾、活血化瘀之功^[13-14]。本研究数据显示活血膏组大鼠不论在改善膝关节活动度方面还是改善关节相关组织的形态学方面均明显优于模型组,这说明活血膏确对膝骨性关节炎有理想疗效,对膝关节软骨及软骨下骨均有明显的修复效应。

在对活血膏作用机制的探讨中我们对各组大鼠膝关节软骨的 Wnt/ β -catenin 通路标志性蛋白表达水平进行检测。膝骨性关节炎 Wnt/ β -catenin 通路可维持软骨细胞外基质降解及骨赘形成的动态平衡,Wnt/ β -catenin 通路激活后软骨细胞病理性成熟增强,生理性凋亡被制止,则关节的稳态受破坏,软骨细胞外基质被过度降解,从而导致软骨细胞肥厚以及软骨退化,最终形成骨赘^[15-18]。因此抑制 Wnt/ β -catenin 通路过表达是治疗膝骨性关节炎的关键。研究中我们对各组大鼠膝关节软骨组织的 Wnt-2、 β -catenin 含量进行测定,结果显示模型组软骨组织 Wnt-2、 β -catenin 含量较空白组明显升高,活血膏组虽较空白组上调但较模型组明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),这说明膝骨性关节炎发病后的确存在 Wnt/ β -catenin 通路被激活现象,而活血膏可明显抑制这一过程。

综上所述,Wnt/ β -catenin 通路被激活可能是膝骨性关节炎发生发展的机制之一,而活血膏可能正是通过这一途径发挥临床治疗效应。

参考文献

- [1] 郑维蓬,魏宏伟,万雷,等.膝骨性关节炎中医证型与关节镜下滑膜病变的相关性研究[J].广州中医药大学学报,2016,33(6):765-768.
- [2] 张师饶,关雪峰.中医外治法治疗膝骨性关节炎最新进展[J].中国骨质疏松杂志,2016,22(7):907-911.
- [3] 李宁,王拥军.施杞从肝肾论治膝骨性关节炎[J].中医杂志,2013,54(3):197-200.
- [4] 周绍文,沈潜,廖奕歆,等.推拿配合中药足浴熏洗治疗膝骨性关节炎的临床研究[J].中国中西医结合杂志,2012,32(8):1060-1063.
- [5] 杜传宝,黄丹,陈建文,等.中药熏蒸联合手法推拿、股四头肌锻炼对膝骨性关节炎患者关节液内脂肪因子 visfatin 及 chemerin 含量的影响[J].广州中医药大学学报,2017,34(3):353-357.
- [6] 陈利军,刘文刚,高伟,等.不同中医证型的膝骨性关节炎的 X 线平片表现[J].广东医学,2014,35(8):1255-1256.
- [7] 肖丽娜,肖汉希.三联序贯特色疗法联合中医康复对老年膝骨性关节炎患者关节功能的影响[J].中国老年学杂志,2014,34(5):1183-1184.
- [8] 李建,樊炜骏,孙鹏.独活寄生汤联合硫酸氨基葡萄糖治疗膝骨性关节炎的临床观察[J].中国药房,2017,28(14):1955-1958.
- [9] 曹锐,杨红玲,何润东.针刺治疗膝骨性关节炎 45 例临床观察[J].中医杂志,2016,57(13):1133-1136.
- [10] 张满臣,赵颖林,宋铁兵,等.活络止痛软膏治疗膝骨性关节炎 87 例[J].陕西中医,2012,33(8):1008-1009.
- [11] 王平,古恩鹏,曹因喆.活血化瘀膏对早中期膝骨性关节炎关节液 NO 和 MMP-13 的影响研究[J].天津中医药,2010,27(3):192-193.
- [12] 董焘,沈玉杰,李玉久.活血通络膏联合西药治疗膝骨性关节炎的疗效观察[J].陕西中医,2016,37(6):695-696.
- [13] 丁铜,曹向阳.活血化瘀膏治疗膝骨性关节炎临床研究[J].中医学报,2012,27(4):506-507.
- [14] 刘峰.活血止痛膏治疗膝痹病瘀血痹阻证的临床研究[D].南京:南京中医药大学,2016.
- [15] 彭杨茜子,刘庆梅,马彦云,等.R 脊椎蛋白 1 协同 Wnt3A 通过 Wnt/ β -联蛋白信号通路促进成骨细胞分化[J].中华风湿病学杂志,2016,20(6):400-404,后插 1.
- [16] 李盛村,鲍捷,王国祥.Wnt/ β -连环蛋白信号通路在骨关节炎发生过程中的作用[J].中国组织工程研究,2012,16(13):2407-2410.
- [17] 吴疆,吴龙,马龙,等.SOST 和 β -catenin 在不同分期膝骨关节炎患者软骨及软骨下骨表达的研究[J].中国骨质疏松杂志,2016,22(6):689-694.
- [18] 高宁阳,曹月龙,刘婷,等.Wnt 信号通路与骨关节炎[J].中国骨伤,2010,23(4):320-323.