

鹿角壮骨胶囊对膝关节炎兔血清及软骨 IL-6、MMP-3 的影响

梁子聪^{1,2,3}, 王 恒¹, 胡先运¹, 江 勇², 胡建山^{2,3}, 陆瑞娜⁴, 刘运麟⁴

(1. 黔南民族医学高等专科学校基础医学部, 贵州 都匀 558000;

2. 黔南州中医医院骨科, 贵州 都匀 558000;

3. 三都爱善医院中医科, 贵州 三都 558100;

4. 黔南州人民医院/黔南医专第一附属医院超声科, 贵州 都匀 558000)

摘要:目的 探讨鹿角壮骨胶囊对膝关节炎兔血清及软骨 IL-6、MMP-3 的影响。方法 采用木瓜蛋白酶右侧膝关节腔内注射诱导建立兔膝关节炎模型, 将 24 只长耳大白兔随机分为正常组、模型组、治疗组, 每组 8 只。正常组和模型组给予蒸馏水灌胃, 治疗组给予鹿角壮骨胶囊灌胃, 治疗 4 周后采用 ELISA 法检测血清 IL-6、MMP-3 的含量, 免疫组化法检测各组兔膝关节软骨 IL-6、MMP-3 的表达。结果 模型组、治疗组血清 IL-6、MMP-3 水平高于正常组, 治疗组血清 MMP-3 水平低于模型组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。模型组和治疗组膝关节软骨 IL-6、MMP-3 表达高于正常组, 治疗组 IL-6、MMP-3 低于模型组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 鹿角壮骨胶囊可通过抑制 IL-6、MMP-3 等致炎因子的表达起到防治膝关节炎的作用。**关键词:** 膝关节炎; 鹿角壮骨胶囊; 血清; 白介素-6; 金属基质蛋白酶; 关节软骨

中图分类号: R684.3

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2020.01.020

文章编号: 1006-1959(2020)01-0061-03

Effects of Lujiao Zhuanggu Capsule on Serum and Cartilage IL-6 and MMP-3 in Rabbits with Knee Osteoarthritis

LIANG Zi-cong^{1,2,3}, WANG Heng¹, HU Xian-yun¹, JIANG Yong², HU Jian-shan^{2,3}, LU Rui-na⁴, LIU Yun-lin⁴

(1. Department of Basic Medicine, Qiannan Medical College for Nationalities, Duyun 558000, Guizhou, China;

2. Department of Orthopaedics, Qiannanzhou Traditional Chinese Medicine Hospital, Duyun 558000, Guizhou, China;

3. Department of Traditional Chinese Medicine, Sandu Aishan Hospital, Sandu 558100, Guizhou, China;

4. Qiannanzhou People's Hospital/Department of Ultrasound, the First Affiliated Hospital of Qiannan Medical College, Duyun 558000, Guizhou, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of Lujiao Zhuanggu Capsule on serum and cartilage IL-6 and MMP-3 in rabbits with knee osteoarthritis. Methods The rabbit knee osteoarthritis model was induced by papain injection into the right knee joint cavity. 24 long-eared white rabbits were randomly divided into normal group, model group and treatment group, 8 in each group. The normal group and the model group were administrated with distilled water. The treatment group was administrated with Lujiao Zhuanggu Capsule. After 4 weeks of treatment, the levels of IL-6 and MMP-3 in serum were detected by ELISA. Expression of IL-6 and MMP-3. Results The serum levels of IL-6 and MMP-3 in the model group and the treatment group were higher than those in the normal group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); the serum MMP-3 levels in the treatment group were lower than the model group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); the expression of IL-6 and MMP-3 in rabbit knee joint cartilage was higher in the model group and the treatment group than in the normal group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); IL-6 and MMP-3 in the treatment group were lower than the model group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Conclusion Lujiao Zhuanggu Capsule can prevent knee osteoarthritis by inhibiting the expression of IL-6, MMP-3 and other inflammatory factors.

Key words: Knee osteoarthritis; Lujiao Zhuanggu Capsule; Serum; Interleukin-6; Metal matrix protease; Articular cartilage

膝关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种好发于中老年人的慢性退行性骨关节病,临床以关节疼痛、肿胀、僵硬为主要症状^[1]。KOA 发病机制十分复杂,目前研究认为 KOA 发病与遗传、细胞因子、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)降解反应、软骨细胞凋亡等因素密切相关^[2]。非甾体类

抗炎药虽然能改善患者临床症状,但其引起的不良反应也给患者身体带来严重的危害^[3]。KOA 属于中医中的“痹症”范畴,中医药治疗 KOA 有其独特的优势,不良反应少。鹿角壮骨胶囊是我院研制的中成药制剂,具有补益肝肾、祛风散寒、强壮筋骨的作用,在治疗 KOA 方面具有较好的疗效。本研究主要探讨鹿角壮骨胶囊对 KOA 模型兔血清及软骨 IL-6、MMP-3 的影响,为鹿角壮骨胶囊治疗 KOA 提供实验支撑。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 选取普通级 4 月龄日本长耳白兔 24 只,均为雌兔,体质量(2.0 ± 0.5)kg,由长沙天勤生物技术有限公司提供,许可证号:SCXK(湘)2014-0010。适应性饲养 1 周,分笼饲养,不限制饮

基金项目:1.国家自然科学基金项目(编号:81860317);2.贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题项目(编号:QZYY-2018-099);3.黔南州科技计划项目(编号:黔南科合[2017]63号);4.黔南民族医学高等专科学校科研基金项目(编号:QNYZ201810)

作者简介:梁子聪(1986.10-),男,广东广州人,硕士,讲师,主要从事骨与关节疾病研究

通讯作者:王恒(1982.4-),男,湖南衡阳人,硕士,副教授,主要从事中药药理学研究

食。按照随机数字表法分为正常组、模型组、治疗组, 每组 8 只。

1.2 仪器 JA10002 型电子天平(上海精天); DDIL-5 型恒温箱(上海安亭); ASP300 S 型全封闭式组织脱水机、RM2265 型全自动轮转式切片机、HI1210 型摊片机、DM750 型光学显微镜(德国 Leica), MR-96A 型酶标仪(深圳迈瑞)。

1.3 药品与试剂 鹿角壮骨胶囊由黔南州中医医院制剂科提供(批准文号: 黔药制 2013003 号, 规格: 0.45 g/粒), 木瓜蛋白酶(北京索莱宝科技有限公司), IL-6、MMP-3 ELISA 试剂盒(北京诚林生物科技有限公司), 封闭液(武汉博士德生物工程有限公司), IL-6、MMP-3 抗体(北京百奥思科生物医学技术有限公司), 通用型 SP 试剂盒、DAB 显色盒(北京中杉金桥生物技术有限公司), 4%多聚甲醛、二甲苯、乙醇、脱钙液由黔南州人民医院病理科提供, 其余试剂均为国产分析纯。

1.4 方法

1.4.1 造模 三组分别行腹腔注射麻醉后, 右侧膝关节备皮消毒。正常组注射 0.5 ml 灭菌注射用水。模型组与治疗组分别用针尖在内侧膝眼进针, 确认进入膝关节腔, 缓慢注射 4%木瓜蛋白酶溶液 0.5 ml。各组被动屈伸右侧膝关节 20 次, 促进溶液在关节腔内均匀扩散。

1.4.2 治疗方法 首次注射后第 2 周, 治疗组给予鹿角壮骨胶囊药粉 0.3 g/kg(参照成人和实验动物等效剂量换算^[4]), 称取体重的相应剂量, 用蒸馏水稀释成 10 ml 后灌胃, 1 次/d, 连续给药 4 周。正常组、模型组给予 10 ml 蒸馏水灌胃。

1.5 观察指标 比较三组血清 IL-6、MMP-3 水平及其免疫组化表达。

1.5.1 血清 IL-6、MMP-3 含量检测 末次给药第 2 天, 麻醉处死所有实验动物。股动脉取血, 以 3000 r/min 离心 15 min, 留取上清液, 采用 ELISA 法以酶标仪检测各组大鼠血清中 IL-6、MMP-3 水平, 严格按照

试剂盒说明书操作。

1.5.2 免疫组化表达 二甲苯透明脱蜡, 修复抗原, PBS 冲洗。滴加一抗(稀释浓度: IL-6、MMP-3 为 1:200), 洗去一抗, 滴加二抗, 滴加辣根酶标记, DAB 显色, 复染, 封片。光学显微镜下摄片观察。每张切片摄取 3 个视野($\times 400$)。运用 Image-Pro Plus 6.0 专业图像分析软件分析, 计算指标平均光密度值。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据处理。采用 Shapiro-Wilk 法作正态性检验, 符合正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 方差齐时采用 LSD-t 检验, 方差不齐时选择 Tamhane 法进行分析。不符合正态分布时选择秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组血清 IL-6、MMP-3 水平比较 模型组、治疗组兔血清 IL-6、MMP-3 水平高于正常组, 治疗组兔血清 MMP-3 水平低于模型组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 三组血清 IL-6、MMP-3 水平比较($\bar{x} \pm s$, ng/ml)

组别	n	IL-6	MMP-3
正常组	8	49.55 \pm 18.06	52.61 \pm 16.89
模型组	8	83.05 \pm 23.69 ^a	134.99 \pm 29.94 ^a
治疗组	8	74.82 \pm 15.79 ^a	88.29 \pm 42.98 ^{ab}

注: 与正常组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$

2.2 三组膝关节 IL-6、MMP-3 免疫组化表达比较 模型组和治疗组兔膝关节软骨 IL-6、MMP-3 表达高于正常组, 治疗组 IL-6、MMP-3 低于模型组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 2、图 2。

表 2 三组膝关节 IL-6、MMP-3 免疫组化表达比较($\bar{x} \pm s$, $\times 10^3$)

组别	n	IL-6	MMP-3
正常组	8	4.47 \pm 0.55	1.04 \pm 0.41
模型组	8	19.6 \pm 7.24 ^a	21.78 \pm 10.31 ^a
治疗组	8	12.87 \pm 3.34 ^{ab}	10.11 \pm 2.86 ^{ab}

注: 与正常组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$

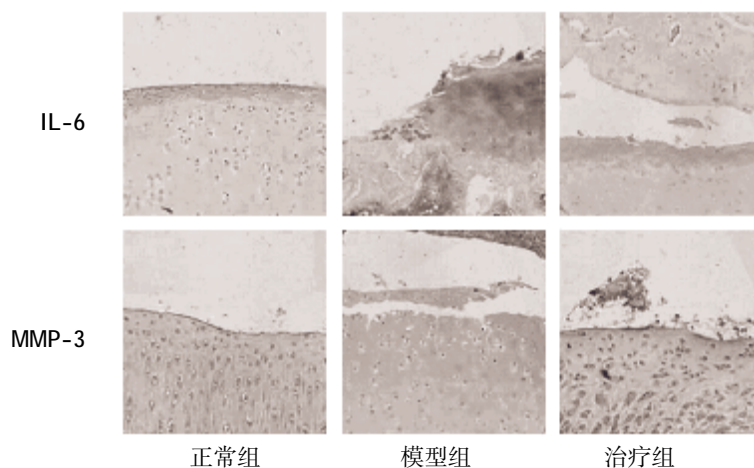


图 1 三组膝关节软骨 IL-6、MMP-3 表达(IHC, $\times 100$)

3 讨论

KOA 在中医学中有“膝痹”“鹤膝风”之称。《素问·痹论》曰：“风、寒、湿三气杂至，合而为痹也。其风气胜者为行痹，寒气胜者为痛痹，湿气胜者为着痹也……以冬遇此者为骨痹。”古代医家强调 KOA 的发病是由于膝关节遭受了风、寒、湿三邪侵袭，导致人体下肢经络血气受阻，引起膝关节疼痛、肿胀、关节功能障碍等临床症状^[9]。当代医家结合自身临床经验，提出了对痹症病因病机新的理解。李西海等^[9]认为，骨关节炎与创伤性关节炎虽同属中医学中“痹症”范畴，但两者应该区别对待，其中创伤性关节炎主要由外伤、外邪侵蚀等外因引起，而骨关节炎多发生于老年人，无明显的外伤病史，往往是内因引起；KOA 病机则为“本痿标痹”，肝肾亏虚是该病发病的核心病机，由于肝肾精血日渐不足，不能濡养筋骨，从而导致慢性肌肉萎缩以及关节活动不利，久而成痹。

现代医学研究认为，KOA 的病程离不开炎症反应导致的关节滑膜增生、软骨退变、骨质增生等病理变化。白细胞介素可通过促进各种 MMPs 的酶原合成、分泌和活性增强，加速基质蛋白多糖、层粘连蛋白等多种基质蛋白的降解^[2]。MMPs 家族能直接降解软骨的蛋白聚糖和 II 型胶原，导致关节软骨纤维结构遭到破坏，弹性丧失，还能令细胞外基质分解，降低软骨细胞的保护能力，引起软骨细胞死亡^[7]。本院自制的鹿角壮骨胶囊以鹿角胶为君药，起到补益肝肾、填精益血、强筋壮骨之功；以骨碎补、黄芪、当归、熟地黄为臣药，起到增强君药补益肝肾之功。苏军等^[9]认为鹿角胶其取自鹿角，为血肉有情之品，主归肝、肾经，具有补肝肾、益精血的功效，较植物类药物更能发挥补益肝肾之功。有研究证实^[9,10]，中药骨碎补可调节 Bax 蛋白、Bcl-2 蛋白及凋亡因子 Caspase-3，从而起到抑制软骨细胞凋亡的作用，而软骨细胞的凋亡与 Bax 蛋白和 Bcl-2 蛋白的基因表达关系密切。Bax 是促细胞凋亡基因，是抗细胞凋亡基因，两者作用相反，Bcl-2 基因大于 Bax 基因时，OA 软骨细胞的寿命相对延长。黄芪中有效成分包括黄芪多糖、黄芪甲苷等。黄芪多糖对炎症模型细胞所释放的炎症因子 IL-6 的表达具有抑制作用^[11]；黄芪甲苷能通过上调 ECM-receptor interaction 信号通路，发挥拮抗软骨细胞凋亡、降低 ECM 降解的作用，促使细胞分泌胶原，实现对软骨细胞外基质的修复作用^[12]。有研究表明^[13]，当归能抑制大鼠炎症模型关节滑膜与血浆中致炎因子 IL-6、MMP-3 的表达。本研究结果显示，模型组、治疗组兔血清 IL-6、MMP-3 水平高于正常组，治疗组兔血清 MMP-3 水平低于

模型组，差异有统计学意义 ($P<0.05$)；模型组和治疗组兔膝关节软骨 IL-6、MMP-3 表达高于正常组，差异有统计学意义 ($P<0.05$)；治疗组 IL-6、MMP-3 低于模型组，差异有统计学意义 ($P<0.05$)，说明鹿角壮骨胶囊可以降低兔膝关节血清 MMP-3、IL-16 的含量，有利于抑制滑膜炎症，抑制软骨细胞的凋亡、降低 ECM 的降解、促进 II 型胶原的合成、提高蛋白多糖的表达。

综上所述，鹿角壮骨胶囊可通过抑制 IL-6、MMP-3 致炎因子的表达起到防治 KOA 的作用。

参考文献：

- [1] Lane NE, Shidara K, Wise BL. Osteoarthritis year in review 2016: clinical [J]. Osteoarthritis and Cartilage, 2017, 25(2): 209-215.
- [2] 谷艳超, 刘世清, 夏韶强, 等. 骨关节炎发病机制和治疗的研究进展 [J]. 中国骨与关节杂志, 2016, 5(10): 770-774.
- [3] 何方舟, 张伟滨. 非甾体类抗炎药对中国骨关节炎患者疗效及胃肠道不良反应的 Meta 分析 [J]. 中华关节外科杂志(电子版), 2018, 12(1): 69-76.
- [4] 陈主初, 吴端生. 实验动物动物学 [M]. 第 4 版. 长沙: 湖南科技出版社, 2001: 321.
- [5] 葛伟韬, 高云, 刘珍珠, 等. 膝骨关节炎中医病名辨识 [J]. 中医杂志, 2016, 57(23): 1989-1992.
- [6] 李西海, 刘献祥. 骨关节炎的核心病机—本痿标痹 [J]. 中医杂志, 2014, 55(14): 1248-1249, 1252.
- [7] Blom AB, Lent P, Libregts S, et al. Crucial role of macrophages in matrix metalloproteinase-mediated cartilage destruction during experimental osteoarthritis: involvement of matrix metalloproteinase 3 [J]. Arthritis & Rheumatology, 2010, 56(1): 147-157.
- [8] 苏军, 陆永刚, 胡建山, 等. 鹿角壮骨胶囊治疗膝骨性关节炎的疗效观察 [J]. 中药药理与临床, 2015, 31(2): 169-170.
- [9] 金连峰. 单味中药骨碎补对兔膝关节软骨细胞凋亡作用的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(7): 1699-1703.
- [10] 金连峰, 韩煜. 骨碎补对兔膝关节软骨细胞凋亡相关因子作用实验研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(11): 42-46.
- [11] 李冬方, 顾宁, 黄伟. 黄芪多糖对 THP-1 巨噬细胞 HSP60 诱导下 IL-6、TNF- α 表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(12): 2830-2832.
- [12] 罗华丽. 黄芪甲苷对骨关节炎保护作用的定量蛋白质组学研究 [D]. 重庆医科大学, 2016.
- [13] 袁立霞. 当归拈痛汤及其拆方对类风湿性关节炎大鼠滑膜组织 MMP-3 调节作用的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(6): 1313-1314.
- [12] 林嘉辉, 陈炳艺, 龙美兵, 等. 龟甲胶和鹿角胶含药血清对豚鼠骨关节炎软骨细胞 JNK 及 p38 MAPK 基因表达的影响 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2016, 24(10): 1-4.
- [13] 陈炳艺, 陈泽华, 林嘉辉, 等. 龟甲胶、鹿角胶调控 MKK 基因表达促进豚鼠 OA 软骨细胞增殖的研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(7): 805-808.

收稿日期: 2019-11-05; 修回日期: 2019-11-15

编辑/杜帆