

山药多糖关节腔注射对兔膝关节骨性关节炎 炎症因子及关节软骨代谢的影响

李哲¹, 陈斐斐¹, 韩小康¹, 陈梦晗¹, 杨锋^{1,2*}

(1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712000; 2. 陕西中医药大学附属医院, 陕西 咸阳 712000)

[摘要] 目的:探讨山药多糖关节腔注射对兔膝关节骨性关节炎模型软骨退变的保护机制及抑制炎症因子表达水平的影响,为山药多糖的开发及研究提供相关证据,同时为进一步研究奠定基础。方法:将55只新西兰白兔,用随机数字表法分为5组,每组11只,采用改良Hulth法制备兔膝关节骨性关节炎兔模型,分别为模型组、山药多糖低、中、高剂量(0.7, 1.43, 2.15 mg·kg⁻¹)组、玻璃酸钠(1.00 mg·kg⁻¹)组。造模成功1周后模型组不干预治疗,各组使用相应药物干预5周,1次/周。5周后通过肉眼观察关节大体标本,光镜下观察关节软骨组织苏木素-伊红(HE)染色和甲苯胺蓝(TB)染色病理切片及评分,使用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测兔膝关节液白细胞介素-6(IL-6),白细胞介素-1 β (IL-1 β),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达水平,采用免疫组化法检测关节软骨基质金属蛋白酶-13(MMP-13),转化生长因子- β_1 (TGF- β_1), II型胶原(Col-II)的表达。结果:山药多糖干预5周后,与模型组比较,山药多糖各组关节液中IL-6, IL-1 β , TNF- α 的含量均明显降低($P < 0.05$),关节软骨中MMP-13的表达水平也明显低于模型组($P < 0.05$),而TGF- β_1 和Col-II的含量明显升高($P < 0.05$);与山药多糖低、高剂量组比较,山药多糖中剂量组兔膝关节炎症因子IL-6, IL-1 β , TNF- α 含量明显降低($P < 0.05$),软骨组织中TGF- β_1 和Col-II的含量明显升高($P < 0.05$),MMP-13的含量明显降低($P < 0.05$)。与玻璃酸钠组比较,山药多糖中剂量组兔膝关节炎症因子IL-6, IL-1 β , TNF- α 含量,软骨组织中TGF- β_1 , Col-II和MMP-13含量差异无统计学意义。结论:山药多糖关节腔注射可明显降低兔膝关节液中IL-6, IL-1 β , TNF- α 的表达,并能有效抑制关节软骨中MMP-13表达,使关节软骨胶原的降解得到抑制,促进TGF- β_1 , Col-II的合成,对关节软骨起到保护及修复作用,从而延缓关节软骨的退变。

[关键词] 膝骨性关节炎; 山药多糖; 关节腔注射; 保护机制; 细胞因子

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)23-0088-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212104

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210923.1741.006.html>

[网络出版日期] 2021-09-24 12:45

Effect of Joint Cavity Injection of Dioscoreae Rhizoma Polysaccharides on Inflammatory Factors and Articular Cartilage Metabolism in Rabbit Knee Osteoarthritis

LI Zhe¹, CHEN Fei-fei¹, HAN Xiao-kang¹, CHEN Meng-han¹, YANG Feng^{1,2*}

(1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, China;

2. Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of joint cavity injection of Dioscoreae Rhizoma polysaccharides (DRP) in protecting against cartilage degeneration and inhibiting the expression of inflammatory factors in the rabbit model of knee osteoarthritis to provide relevant references for the development and further research on DRP. **Method:** Fifty-five New Zealand white rabbits were selected for the induction of

[收稿日期] 20210709(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81973889);陕西省重点科技创新团队项目(2013KCT-26);陕西教育厅服务地方科学研究计划项目(19JC013)

[第一作者] 李哲,在读硕士,从事骨关节疾病的基础与临床研究, Tel:029-33320866, E-mail:li12zhe16@163.com

[通信作者] * 杨锋,博士,教授,主任医师,博士生导师,从事骨关节疾病的基础与临床研究, Tel:029-33320866, E-mail:yangfengdudu@163.com

knee osteoarthritis model by the modified Hulth's modeling method. The model rabbits were randomly divided into a model group, a sodium hyaluronate group ($1.00 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), and low- ($0.7 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), medium- ($1.43 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), and high-dose ($2.15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) DRP group according to a random number table. One week after modeling, the rabbits in the groups with drug intervention were treated correspondingly for five weeks, once per week, and no intervention was performed in the model group. Five weeks later, the joint specimens were observed by visual observation. The articular cartilage tissues were observed under the light microscope for pathological sections and scores by hematoxylin-eosin (HE) staining and toluidine blue (TB) staining. The expression levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin- 1β (IL- 1β), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the synovial fluid were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the expression of matrix metalloproteinase-13 (MMP-13), transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1), and type II collagen (Col- II) in the articular cartilage were measured by immunohistochemistry. **Result:** After five weeks of DRP intervention, compared with the model group, the DRP groups exhibited lowered levels of IL-6, IL- 1β , and TNF- α in the synovial fluid ($P<0.05$), reduced expression of MMP-13 in the articular cartilage ($P<0.05$), and increased levels of TGF- β_1 and Col- II ($P<0.05$). Compared with the low-dose and high-dose DRP groups, the medium-dose DRP group showed reduced levels of IL-6, IL- 1β , and TNF- α in the knee joint ($P<0.05$), increased levels of TGF- β_1 and Col- II in cartilage tissues ($P<0.05$), and dwindled level of MMP-13 ($P<0.05$). Compared with the sodium hyaluronate group, the medium-dose DRP group showed no significant differences in IL-6, IL- 1β , and TNF- α in rabbit knee joints, and TGF- β_1 , Col- II, and MMP-13 in cartilage tissues. **Conclusion:** Joint cavity injection of DRP can significantly reduce the expression of IL-6, IL- 1β , and TNF- α in rabbit synovial fluid, effectively inhibit the expression of MMP-13 in the articular cartilage to suppress the degradation of articular cartilage collagen and promote the synthesis of TGF- β_1 and Col- II. Therefore, DRP can protect and repair articular cartilage to delay the degeneration of articular cartilage.

[Keywords] knee osteoarthritis; Dioscoreae Rhizoma polysaccharides; joint cavity injection; protective mechanism; cytokines

膝关节骨性关节炎(KOA)是以膝关节的退行性变化和缓慢累积性损伤引起的疾病,以膝关节软骨病变和破坏、软骨下骨硬化和其他结构的破坏及修复之间的平衡失调为主要病理特征^[1]。随着人类迈入21世纪,社会人口老龄化进度的加快,越来越多的中老年人被KOA所困扰^[2]。近年来,相关研究显示,中医药对于KOA的治疗已取得大量成果^[3-4]。由于中药成分比较复杂,相关作用机制尚不明确。中药发挥抗炎及关节软骨代谢作用的机制复杂,阐明其抗炎及关节软骨代谢作用的机制对指导临床应用药具有重要意义。

《本草经》中记载,山药为薯蓣科植物薯蓣的干燥根茎,谓之“主健中补虚羸、补中益气力、长肌肉。山药,味甘、平、无毒,归肺、脾、肾经。生用功能补肾生精,益肺肾之阴;经麸炒炮制后,补益作用更为显著,可补脾健胃,益肾生精,常被用作臣药来滋阴、补阳。山药作为“补益肝肾,去膝胫酸软”的重要药物。近年来,我国的广大医务工作者对中医有了很大的关注,也证实了中医药在该病治疗方面有

很大的优势,亟待开发,其中山药现代药理学研究显示,山药能促进骨髓间充质干细胞的增殖,这为山药补肾养骨的传统理论提供了依据^[5]。相关研究表明,山药多糖具有抗炎、抗氧化特性,可提高免疫力及延缓细胞衰老,同时对结缔组织萎缩、关节炎等胶原病预防效果更佳^[6]。山药多糖能够与体内矿物质相结合,从而使关节软骨柔韧性增加。山药多糖现代药理学作用已成为多学科研究的热点^[7]。

目前,关于山药多糖关节腔注射治疗KOA,暂无相关文献报导。本次研究旨在通过山药多糖关节腔注射,观察其对兔KOA模型关节液中白细胞介素-6(IL-6),IL- 1β ,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的表达水平及关节软骨中基质金属蛋白酶-13(MMP-13),转化生长因子- β_1 (TGF- β_1),II型胶原(Col- II)代谢作用等多方面的影响,探讨其治疗KOA的作用机制,进一步评价山药多糖在治疗KOA过程中的应用价值,拓展中医药在防治KOA中的积极意义,为KOA的治疗提供一种新思路。

1 材料

1.1 动物 55只SPF级新西兰白兔,3~4月龄,体质量1.8~2.2 kg,成都达硕实验动物有限公司提供,实验动物中心合格证号SCXK(陕)2017-002。SPF级实验室适应性喂养1周,饲养温度(20±2) °C,湿度65%,标准饮食,无不良反应后进行实验。本课题经过陕西中医药大学动物伦理委员会批准。

1.2 药物及试剂 山药多糖(纯度70%,上海源叶生物科技有限公司,批号X11J9C63330);玻璃酸钠注射液(上海景峰制药有限公司,国药准字20160409,批号10960136);10%水合氯醛(中国Wabcan公司,批号20S09X20);10%中性组织固定液(盐城溢之源生物科技有限公司,批号191115);苏木素-伊红(HE)染色液,甲苯胺蓝(TB)染色液(索莱宝科技有限公司,批号分别为G1120,G2543);兔IL-6,IL-1 β ,TNF- α 酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(英国Abcam公司,批号K1051-100);MMP-13,TGF- β_1 ,Col- II试剂盒(美国Proteintech公司,批号分别为30202012,30202083,30202101)。

1.3 仪器 ESCO ACB-4A1型超净工作台(苏州赛恩斯仪器有限公司);LEICA RM2235型切片机,EG1150H型石蜡包埋机(德国Leica公司);OLYMPUSCH-20型光学显微镜(日本Olympus公司);Moticam3000型显微摄影成像系统(美国Motic公司);HH·B11·500型电热恒温培养箱(北京医疗器械厂);Sigma 1-14K型台式离心机(德国Sigma公司);LUMIstar Omega型多功能酶标仪(德国BMG公司)。

2 方法

2.1 模型的制备 5组动物均采用改良Hulth法^[8]构建兔膝关节炎模型。首先经兔耳缘静脉缓慢注射10%水合氯醛,以200 mg·kg⁻¹剂量注射。待兔镇静后,选取右膝关节内侧,将手术部位剃毛,碘伏消毒铺无菌手术巾,术者无菌操作。采用内侧入路,切1~2 cm的纵行切口于髌腱内缘,切开关节囊,切断内侧副韧带,向外侧牵拉髌韧带,充分暴露关节腔,屈曲膝关节,切断前交叉韧带,切除内侧半月板,避免损伤关节面软骨。生理盐水冲洗关节腔,仔细逐层缝合切口,无菌包扎。

2.2 分组及干预 将55只新西兰白兔,用随机数字表法分为5组,每组11只,分别为模型组、山药多糖低剂量组、山药多糖中剂量组、山药多糖高剂量组和玻璃酸钠组。造模后1周开始关节腔内注射给药。实验动物关节内药物用量,按人与大白兔之间

的剂量进行转换。按照临床等效剂量,根据Meeh-Rubner公式计算体表面积: $A(\text{体表面积 m}^2)=K(\text{系数})\times W(\text{体质量})^{2/3}\times 10^{-4}$,动物用量=A(动物)/A(成人) \times 成人用量,兔子的K值=10.1,按2.5 kg计算得A(兔)=0.186 m²,查表得70 kg·170 cm成人体表面积为1.80 m²,成人每次山药多糖注射剂量为2.5 mL:25 mg,兔每次注射剂量应为(0.186/1.80) \times 25=2.5 mg/只;2.5/2.5=1 mg·kg⁻¹。模型组造模成功后,不干预治疗;山药多糖低、中、高剂量组(0.72, 1.43, 2.15 mg·kg⁻¹)和玻璃酸钠组(1 mg·kg⁻¹),2.5 mL,1次/周,连续给药5周。

2.3 山药多糖药液的制备 使用临床无菌生理盐水,山药多糖称量后在超净台用生理盐水充分溶解后,使用0.22 μm 的细胞网筛过滤,使其达到基本无菌的状态,且不会影响山药多糖药效。

2.4 标本制备及指标检测

2.4.1 标本制备及处理 在给药结束后,采用空气栓塞法处死5组实验兔。实验兔处死后,在切开兔膝关节之前,实施膝关节穿刺术,在右膝关节周围用碘伏消毒后,首先向关节腔注射1.0 mL氯化钠注射液,充分活动膝关节并抽取关节液,立刻离心(4 500 r·min⁻¹,4 °C,5 min,离心半径7 cm,下同),取其上清液置入-20 °C冰柜内保存备用。关节液采集完毕后,切开兔右膝关节囊,充分暴露膝关节,大体观察关节面软骨色泽、光滑度、缺损等变化,按PELLETIER等^[9]标准进行评分。然后取大小3 mm \times 3 mm,厚约0.5 mm的股骨髌关节面软骨组织,放入10%中性组织固定液中浸泡24 h,清水冲洗后,浸入缓冲液脱钙20 d后,再进行脱水、透明、浸蜡、包埋和切片。

2.4.2 HE染色观察兔膝关节软骨病理形态学变化

将干预5周后的兔膝关节软骨取出,生理盐水冲洗,10%中性组织固定液固定,取出后适当修整并用蒸馏水冲洗固定液,进行逐步脱水;用二甲苯进行透明处理;用65 °C熔化的石蜡包埋,待石蜡冷凝后切片,用二甲苯溶液脱蜡处理;切片后行HE染色,将染好的切片放置于显微镜下观察,判断各组兔膝关节软骨修复状况。参考MANKIN等^[10]评分评估兔膝关节软骨缺损严重程度,评分越高表示软骨缺损程度越严重。

2.4.3 TB染色观察兔膝关节软骨病理形态学变化

将干预5周后的兔膝关节软骨取出,生理盐水冲洗,10%中性组织固定液固定,取出后适当修整并用蒸馏水冲洗固定液,进行逐步脱水;用二甲苯进

行透明处理;用65℃熔化的石蜡包埋,待石蜡冷凝后切片,用二甲苯溶液脱蜡处理;切片后行TB染色,将染好的切片放置于显微镜下观察,判断各组兔膝关节软骨修复状况。参考MANKIN等^[10]评分评估兔膝关节软骨缺损严重程度,评分越高表示软骨缺损程度越严重。

2.4.4 ELISA测定兔膝关节液中IL-6,IL-1β,TNF-α的含量 首先向关节腔注射氯化钠注射液1.0 mL,充分活动膝关节并抽取关节液,立刻离心,取其上清液置入-20℃冰柜内保存备用。用ELISA检测兔膝关节液中IL-6,IL-1β,TNF-α的含量,参考试剂盒说明书。

2.4.5 免疫组化法测定关节软骨中MMP-13,TGF-β₁,Col-II的表达 首先将切片进行脱蜡水,抗原修复,免疫反应,化学染色,最后在光镜下观察、摄图,使用Mage-Pro Plus 6.0图像分析软件对图片进行分析,计算视野内所有选定阳性细胞平均反应强度的平均积分吸光度。

2.5 统计学方法 应用统计软件SPSS 20.0对实验数据进行统计分析,结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示。用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行多组间比较,以 $P<$

0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 动物一般状态观察 造模完成后随机从5组实验兔中分别选取1只进行处死,以确定造模是否成功。实验期间,共死亡5只实验兔,各组实验兔死亡原因分别为:模型组1只(腹泻),山药多糖低剂量组1只(感冒),山药多糖中剂量组1只(感染),山药多糖高剂量组1只(腹泻),玻璃酸钠组1只(感染)。

3.2 对兔膝关节软骨大体评分的影响 按照Pelletier标准评分,模型组兔关节表面粗糙,可见多处裂纹和不同面积的软骨组织缺损,色泽暗淡,呈淡白色,关节周围有明显骨赘物形成;山药多糖低剂量组表面不平整,不规则,软骨表面可见多处裂纹,部分出现缺损,软骨变薄发暗呈淡黄色,欠光泽;山药多糖中剂量组关节表面平整光滑,软骨表面少有裂纹和缺损,软骨厚度正常而色呈白色,有光泽;山药多糖高剂量组表面尚可整,欠规则,软骨表面可见多处裂纹,可见少量散在的点状凹陷,软骨变薄发暗呈淡黄色,欠光泽;玻璃酸钠组关节表面平整尚光滑,软骨表面少有裂纹和缺损,软骨厚度正常而色呈白色,有光泽。见表1。

表1 山药多糖对兔膝关节软骨大体评分的影响(n=9)

Table 1 Effect of Dioscoreae Rhizoma polysaccharide on gross cartilage score of knee joints in rabbits (n=9)

分

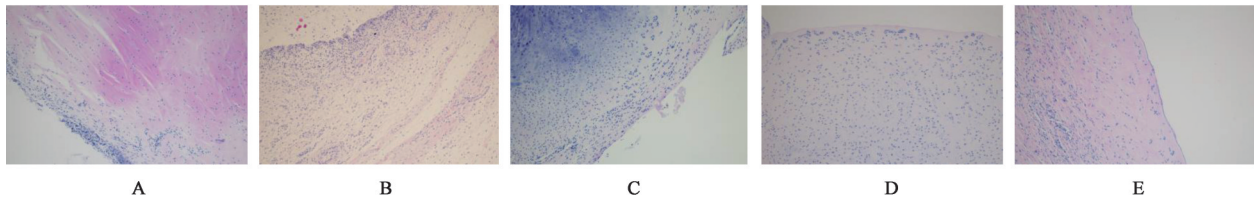
组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Pelletier评分					平均分($\bar{x}\pm s$)
		0	1	2	3	4	
模型		0	0	0	5	4	3.44±0.53
山药多糖	0.72	0	1	3	4	0	2.38±0.75 ¹⁾
	1.43	1	5	3	0	0	1.22±0.67 ^{1,2)}
	2.15	0	4	5	0	0	1.56±0.53 ^{1,3)}
玻璃酸钠	1.00	0	4	4	1	0	1.67±0.71 ^{1,2,4)}

注:与模型组比较¹⁾ $P<0.05$;与山药多糖低剂量组比较²⁾ $P<0.05$;与山药多糖中剂量组比较³⁾ $P<0.05$;与山药多糖高剂量组比较⁴⁾ $P<0.05$ (表2~4同)。

3.3 对兔膝关节软骨标本Mankin's评分的影响 HE染色结果显示,模型组染色不均匀,关节软骨层明显缺损、变薄,部分区域软骨全层丧失,切线层严重破坏,呈斑片状或广泛性碎裂或缺失,大部分可见裂隙深达软骨下骨,细胞减少;山药多糖低剂量组关节软骨层次不完整,切线层不清楚,细胞数量减少,软骨层轻度缺损,部分有裂隙;山药多糖中剂量组关节软骨表层轻度变薄,细胞形态接近于正常,各层界限欠清楚;山药多糖高剂量组着色欠均匀偶有失染现象,关节软骨层次基本完整;玻璃酸钠组关节表层轻度变薄,细胞形态接近于正常,各

层界限欠清楚,细胞染色稍有不均匀且偶有失染现象。见图1。

TB染色结果显示,模型组软骨层明显缺损、浅薄,染色变浅且不均匀,软骨细胞排列紊乱,不规则,有裂隙深达钙化层;山药多糖低剂量组软骨层中度缺损、变薄,软骨染色呈淡蓝色,细胞排列不规则;山药多糖中剂量组软骨层轻度缺损,稍变薄,软骨染色呈淡蓝色,细胞排列稍显不规则;山药多糖高剂量组软骨层轻度缺损,薄厚不均匀,软骨细胞轻度减少,且排列较玻璃酸钠组略显不整齐;玻璃酸钠组软骨层轻度缺损,变薄,软骨染色呈淡蓝色,



A. 模型组; B. 山药多糖低剂量组; C. 山药多糖中剂量组; D. 山药多糖高剂量组; E. 玻璃酸钠组(图2~6同)

图1 山药多糖对兔膝关节组织病理学的影响(HE, ×100)

Fig. 1 Effect of Dioscoreae Rhizoma polysaccharide on histopathology of knee joint in rabbits (HE, ×100)

细胞排列稍显不规则。见图2。

按照 Mankin's 评分标准^[10], 与模型组评分相比较, 山药多糖低、中、高剂量组、玻璃酸钠组评分均明显降低, 其差异具有统计学意义($P < 0.05$); 但山药多糖中剂量组与玻璃酸钠组之间评分无明显差异。见表2。

3.4 对兔膝关节液中 IL-6, IL-1 β , TNF- α 表达水平的影响 与模型组比较, 山药多糖低、中、高剂量组和玻璃酸钠组关节液中 IL-6, IL-1 β , TNF- α 的含量均明显降低($P < 0.05$), 说明山药多糖低、中、高剂量组和玻璃酸钠组均可抑制炎症因子表达, 但与山药多糖高、低剂量组比较, 山药多糖中剂量组和玻璃

表2 山药多糖对兔膝关节软骨标本 Mankin's 评分的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Table 2 Effect of yam polysaccharide on Mankin's score of knee cartilage in rabbits ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Mankin's 评分/分
模型		4.11±0.78
山药多糖	0.72	2.13±0.99 ¹⁾
	1.43	1.56±0.73 ^{1,2)}
	2.15	2.11±1.05 ^{1,3)}
玻璃酸钠	1.00	1.67±0.87 ^{1,2,4)}

酸钠组兔膝关节液中 IL-6, IL-1 β , TNF- α 含量降低更明显($P < 0.05$)。见表3。

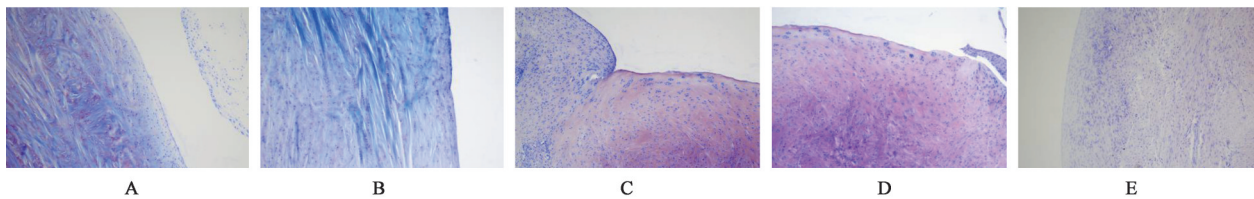


图2 山药多糖对兔膝关节组织病理学的影响(TB, ×100)

Fig. 2 Effect of Dioscoreae Rhizoma polysaccharide on histopathology of knee joint in rabbits (TB, ×100)

表3 山药多糖对兔膝关节液中 IL-6, IL-1 β , TNF- α 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Table 3 Effect of Dioscoreae Rhizoma polysaccharide on IL-6, IL-1 β and TNF- α expression in knee joint fluid of rabbit ($\bar{x} \pm s$, $n=9$) ng·L⁻¹

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	IL-6	IL-1 β	TNF- α
模型		132.61±6.22	102.35±5.51	119.95±6.73
山药多糖	0.72	117.14±4.53 ¹⁾	90.39±2.80 ¹⁾	110.57±3.43 ¹⁾
	1.43	106.60±3.59 ^{1,2)}	82.71±3.21 ^{1,2)}	100.66±3.99 ^{1,2)}
	2.15	115.38±3.14 ^{1,3)}	88.86±4.48 ^{1,3)}	109.04±7.62 ^{1,3)}
玻璃酸钠	1.00	107.94±3.16 ^{1,2,4)}	81.59±2.50 ^{1,2,4)}	97.49±5.31 ^{1,2,4)}

3.5 对兔关节软骨中 MMP-13, TGF- β ₁, Col- II 的表达水平的影响

3.5.1 对兔关节软骨中 MMP-13 的表达水平的影响 模型组关节软骨细胞中可见大量 MMP-13 高表达; 模型组与山药多糖低、中、高剂量组和玻璃酸钠组比较, 关节软骨细胞中 MMP-13 数量最多; 而山药多糖低、高剂量组关节软骨中 MMP-13 的软骨细胞数量相当; 山药多糖中剂量组与玻璃酸钠组软骨中

MMP-13 的软骨细胞数量相当, 但明显低于山药多糖低剂量组与山药多糖高剂量组。见图3。与模型组比较, 山药多糖低、中、高剂量组和玻璃酸钠组关节软骨中 MMP-13 的表达水平均明显降低($P < 0.05$), 但与山药多糖高、低剂量组比较, 山药多糖中剂量组和玻璃酸钠组兔关节软骨中 MMP-13 的表达水平降低更明显($P < 0.05$), 差异有明显统计学意义。见表4。

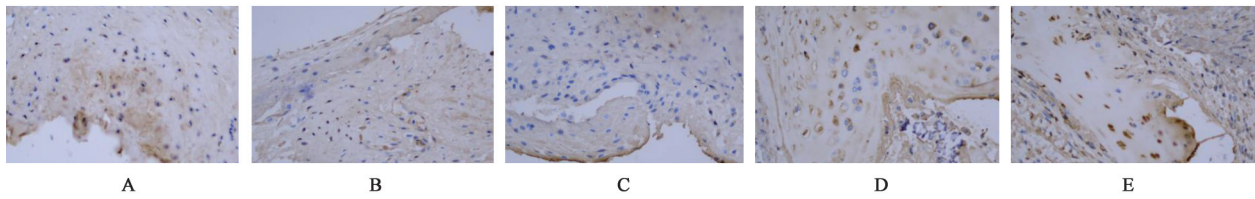


图3 山药多糖对兔膝关节软骨中MMP-13表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 3 Effect of Dioscoreae Rhizoma polysaccharide on MMP-13 expression in knee cartilage of rabbit (IHC, ×400)

表4 山药多糖对兔膝关节软骨中MMP-13, TGF-β₁, Col-II平均积分吸光度的影响(̄x±s, n=9)

Table 4 Effect of Dioscoreae Rhizoma polysaccharide on MMP-13, TGF-β₁, Col-II mean integral absorbance in knee cartilage of rabbits (̄x±s, n=9)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	平均积分吸光度		
		MMP-13	TGF-β ₁	Col-II
模型		0.213±0.011	0.099±0.010	0.044±0.002
山药多糖	0.72	0.203±0.008 ¹⁾	0.117±0.009 ¹⁾	0.506±0.007 ¹⁾
	1.43	0.180±0.008 ^{1,2)}	0.134±0.006 ^{1,2)}	0.593±0.002 ^{1,2)}
	2.15	0.201±0.008 ^{1,3)}	0.114±0.011 ^{1,3)}	0.529±0.002 ^{1,3)}
玻璃酸钠	1.00	0.187±0.006 ^{1,2,4)}	0.138±0.012 ^{1,2,4)}	0.608±0.006 ^{1,2,4)}

3.5.2 对兔关节软骨中TGF-β₁的表达水平的影响

模型组关节软骨细胞中TGF-β₁呈低表达水平;模型组与山药多糖低、中、高剂量组和玻璃酸钠组比较,模型组软骨细胞中TGF-β₁含量最低,而山药多糖低剂量组与山药多糖高剂量组关节软骨细胞中TGF-β₁含量相当,但高于模型组;山药多糖中剂量组与玻璃酸钠组软骨细胞中TGF-β₁含量相当,但明

显高于山药多糖低剂量组与山药多糖高剂量组。见图4。与模型组比较,山药多糖低、中、高剂量组和玻璃酸钠组关节软骨TGF-β₁的表达水平均明显升高(P<0.05)。但与山药多糖高、低剂量组比较,山药多糖中剂量组和玻璃酸钠组兔关节软骨中TGF-β₁的表达水平降低更明显(P<0.05),差异有统计学意义。见表4。

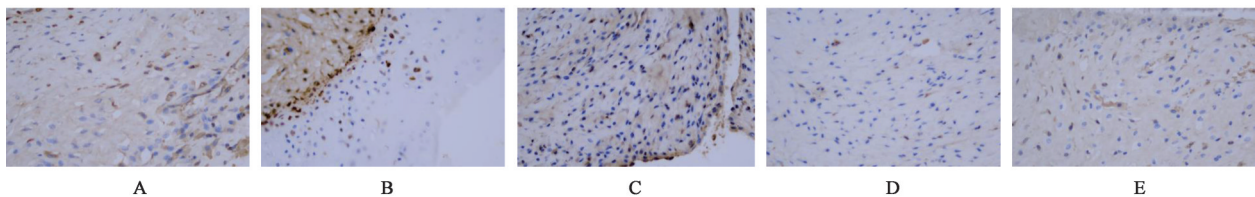


图4 山药多糖对兔膝关节软骨中TGF-β₁表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 4 Effect of Dioscoreae Rhizoma polysaccharide on TGF-β₁ expression in knee cartilage of rabbits (IHC, ×400)

3.5.3 对兔关节软骨中Col-II的表达水平的影响

模型组关节软骨细胞中Col-II呈低表达水平;模型组与山药多糖低、中、高剂量组和玻璃酸钠组比较,模型组软骨细胞中Col-II含量最低;而山药多糖低、高剂量组关节软骨细胞中Col-II含量接近,但高于模型组;山药多糖中剂量组与玻璃酸钠组关节软骨细胞中Col-II含量相当,但明显高于山药多糖低、高剂量组。见图5。与模型组比较,山药多糖低、中、高剂量组、玻璃酸钠组关节软骨Col-II的表达水平明显升高(P<0.05)。但与山药多糖高、低剂量组比较,山药多糖中剂量组和玻璃酸钠组兔关节软骨中TGF-β₁的表达水平降低更明显(P<0.05)。

见表4。

4 讨论

KOA是危害人类健康的重要因素之一,因为大多数活动都是在运动状态下完成的,而膝关节是人体关节活动最频繁的关节之一。由于膝关节活动量大,骨关节摩擦增加,其退化也就最早,但其确切发病机制尚不明确。近年来越来越多的研究证实,KOA关节软骨细胞外基质合成与降解失衡是造成关节软骨变性的重要原因之一^[11-13],其中炎症因子及软骨代谢相关细胞因子在骨关节炎发病中发挥着重要作用^[14-17]。

目前,中西医对于KOA的治疗方法丰富多样,

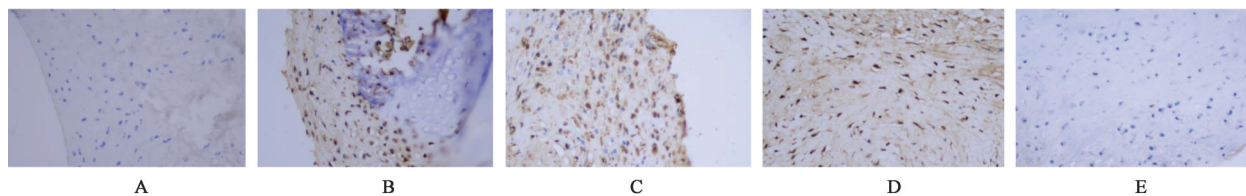


图5 山药多糖对兔膝关节软骨中Col-II表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 5 Effect of Dioscoreae Rhizoma polysaccharide on Col-II expression in knee cartilage of rabbits (IHC, ×400)

但主要以非手术治疗和手术治疗为主。其中非手术治疗主要包括:自我管理教育、康复理疗、功能锻炼、生物力学干预、中医针灸治疗、口服非甾体抗炎药、口服硫酸软骨素、关节腔内注射玻璃酸钠、关节腔内注射糖皮质激素等^[18-19]。而对于晚期KOA的患者,常需要进行关节置换手术进行干预。其中,关节腔注射的主要优势是操作方便,简便快捷,局部治疗精准,能提高局部药物剂量,迅速到达病变部位,可有效的降低治疗周期^[20-21]。膝关节腔内注射药物,可增加关节腔润滑作用,从分子层面促进软骨修复,抑制软骨的分解,也有抗炎、封闭痛觉感受器的作用^[22]。目前关节腔注射主要是缓解症状、改善功能,仍无法促进退变软骨的修复或阻断疾病发展的进程^[23],对于关节腔内注射治疗KOA仍存在较大的争议。目前,中医也在寻求更为安全有效治疗KOA的手段。

随着国内外对中药关节腔注射在KOA防治作用上的研究逐渐深入并取得进展,已有多种中药被制成关节腔注射剂,以补益肝肾、祛风湿类药物多糖成分为主^[24-27],但中药关节腔注射剂在治疗KOA方面起步较晚,以动物实验为主,有研究证实,在关节腔内注射中药对于治疗动物KOA疗效较佳,并明显影响关节软骨代谢水平^[28]。

骨性关节炎发生的主要细胞病变过程以软骨细胞凋亡为主,其中MMP/基质金属蛋白酶组织抑制因子-1(TIMP-1)动态平衡失调可能起着决定作用^[29]。关节软骨在代谢方面MMPs起着重要作用,而MMP-13则是降解胶原的主要酶,其作用最强^[30]。上述MMPs不能单独对软骨的破坏起作用,而是相互协同产生作用。MMP-13可裂解I, II, III型胶原及胶原溶解后初始产物,而关节软骨细胞外基质主要成分之一是Col-II,其次为蛋白聚糖,当II型胶原遭到降解和破坏后,会导致软骨支架结构的崩塌^[31]。TGF- β_1 具有促进骨间充质细胞分化为软骨细胞,并促进I型胶原、骨基质蛋白、蛋白聚糖等软骨细胞基质主要成分的合成^[32-33]。TGF- β_1 可以抑制IL-1对软骨细胞外基质中蛋白多糖的分解及

MMP的产生,从而阻止MMP对软骨细胞基质的破坏^[34-35]。Col-II代谢的异常将会造成软骨基质的降解,因此Col-II可以作为衡量软骨细胞分化异常和损伤的重要依据^[36]。

目前临床上应用较广泛的关节腔注射治疗KOA的药物为玻璃酸钠,但其价格昂贵,属于动物制剂,部分患者有过敏反应,且价格昂贵。而山药多糖属于植物制剂,价格便宜,药源充足,过敏患者较少,弥补了上述药物的不足,对KOA的治疗有一定的积极影响。基于此,开展兔KOA山药多糖的关节腔注射,但这仅是一项探索性研究,尚未进入临床实验阶段。

综上所述,本研究通过比较模型组、山药多糖低、中、高剂量组和玻璃酸钠组兔膝关节液中IL-6, IL-1 β , TNF- α 及关节软骨中MMP-13, Col-II, TGF- β_1 的表达水平,结果显示山药多糖中剂量组能够显著降低关节液中IL-6, IL-1 β , TNF- α ,减缓关节炎性反应,并且抑制MMP-13表达,促进Col-II, TGF- β_1 的分泌,有效的抑制关节软骨细胞的破坏,延缓关节软骨损伤,起到保护软骨细胞的作用。光镜下观察模型组、山药多糖低、中、高剂量组和玻璃酸钠组兔组织形态学改变发现,山药多糖中剂量组有效抑制关节软骨细胞的破坏,对关节软骨具有明显的修复作用。同时研究结果表明,山药多糖关节腔注射对治疗KOA有效,但作用在一定的剂量范围内是否呈现剂量依赖性,尚需后续大量实验加以佐证,且山药多糖在工艺制备方面,尚不完整,需进一步探索。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 中华医学会骨科学分会关节外科学组. 骨关节炎诊疗指南(2018年版)[J]. 中华骨科杂志, 2018, 38(12):705-715.
- [2] CHEUNG P P, GOSSEC L, DOUGADOS M. What are the best markers for disease progression in osteoarthritis (OA)? [J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2010, 24:81-92.

- [3] BIJLSMA J W, BERENBAUM F, LAFEBER F. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice[J]. *Lancet*, 2011, 377: 2115-2126.
- [4] SILVERWOOD V, BLAGOJEVIC-BUCKNALL M, JINKS C, et al. Current evidence on risk factors for knee osteoarthritis in older adults: a systematic review and meta-analysis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2015, 23: 507-515.
- [5] 杨瑞泽. 山药诱导骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化的体外实验研究[D]. 咸阳: 陕西中医药大学, 2018.
- [6] CHEN Y T, LIN K W. Effects of heating temperature on the total phenolic compound, antioxidative ability and the stability of dioscorin of various yam cultivars [J]. *Food Chem*, 2007, 101: 955-963.
- [7] 代荣, 刘如明, 肖建辉. 菌类中药多糖降血糖效应机制研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(2): 174-179.
- [8] 何名江, 张洪美, 荆琳, 等. 骨关节炎动物模型: 谁最适宜你的研究?[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(46): 8069-8074.
- [9] PELLETIER J P, JOVANOVIC D, FERNANDES J C, et al. Reduced progression of experimental osteoarthritis *in vivo* by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase [J]. *Arthritis Rheum*, 1998, 41: 1275-1286.
- [10] MANKIN H J, DORFMAN H, LIPPIELLO L, et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips II . Correlation of morphology with biochemical and metabolic data [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 1971, 53: 523-537.
- [11] 陈高扬, 张桂珍, 王庆宇, 等. 成骨细胞与软骨细胞在骨性关节炎中的相互作用综述[J]. *中国体视学与图像分析*, 2017, 22(2): 230-237.
- [12] 程国良, 姜艳玲, 李冰冰, 等. 归芪活血胶囊对颈椎病模型大鼠软骨细胞的影响[J]. *世界中医药*, 2020, 15(16): 2369-2372.
- [13] 彭婧嫔, 谭桂兰, 赖丽金, 等. 电针对颈椎病大鼠椎间盘软骨细胞及MCP-1/CCR2信号通路的影响[J]. *世界中医药*, 2019, 14(6): 1412-1416.
- [14] KIM J R, YOO J J, KIM H A. Therapeutics in osteoarthritis based on an understanding of its molecular pathogenesis [J]. *Tnt J Mol Sci*, 2018, 19(3): 674.
- [15] MCALINDON T E, BANNURU R R, SULLIVAN M C, et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2014, 22: 363-388.
- [16] 孙海峰, 杨茂伟, 时永臣, 等. 中药淫羊藿苷对TDP-43介导的骨关节炎软骨细胞病变的作用机制[J]. *世界中医药*, 2019, 14(7): 1672-1676.
- [17] 吴越, 刘维. 基于网络药理学探讨四妙丸治疗骨关节炎的作用机制[J]. *世界中医药*, 2020, 15(23): 3604-3611, 3616.
- [18] SAMUEL S, AHMAD R E, RAMASAMY T S, et al. Platelet rich concentrate enhances mesenchymal stem cells capacity to repair focal cartilage injury in rabbits [J]. *Injury*, 2018, 49: 775-783.
- [19] JONITZ-HEINCKE A, KLINDER A, BOY D, et al. *In vitro* analysis of the differentiation capacity of postmortally isolated human chondrocytes influenced by different growth factors and oxygen levels [J]. *Cartilage*, 2019, 10: 111-119.
- [20] XING D, WANG Q, YANG Z Y, et al. Mesenchymal stem cells injections for knee osteoarthritis: a systematic overview [J]. *Rheumatol Int*, 2018, 38: 1399-1411.
- [21] XING D, KWONG J, YANG Z, et al. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells in treating knee osteoarthritis: a systematic review of animal studies [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2018, 26: 445-461.
- [22] HAWKER G A, MIAN S, BEDNIS K, et al. Osteoarthritis year 2010 in review: non-pharmacologic therapy [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2011, 19: 366-374.
- [23] 王希梅, 张睿, 郭玫, 等. 多糖局部给药对骨关节炎作用及机制研究进展[J]. *中国兽医医药杂志*, 2018, 37(2): 22-25.
- [24] YU L, ZHANG J, JIAO J, et al. Effect of nano yam polysaccharide on the blood glucose and blood lipid in rats [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2020, 33: 481-487.
- [25] CHEN Q X, SHAO X T, LING P X, et al. Recent advances in polysaccharides for osteoarthritis therapy [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 139: 926-935.
- [26] 蒋涛, 孔博, 颜威, 等. 基于网络药理学研究络石藤-伸筋草药对治疗骨关节炎的作用机制[J]. *世界中医药*, 2020, 15(24): 3733-3739.
- [27] 郑如庚, 邸玉娜, 丁乾, 等. 针灸、补肾活血方联合双氯芬酸钠治疗骨关节炎的疗效观察[J]. *世界中医药*, 2020, 15(24): 3849-3852.
- [28] RAMAN R, HENROTIN Y, CHEVALIER X, et al. Decision algorithms for the retreatment with viscosupplementation in patients suffering from knee osteoarthritis [J]. *Cartilage*, 2018, 9(3): 263-275.
- [29] ZOU L, LIU J, LU H. Influence of protein kinase

- RIPK4 expression on the apoptosis and proliferation of chondrocytes in osteoarthritis[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(2):3078-3084.
- [30] WOJDASIEWICZ P, PONIATOWSKI L A, SZUKIEWICZ D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis [J]. Mediators Inflamm 2014, 2014: 1e19.
- [31] SONIWALA S, SCINTO K I, SCHOTT E M, et al. Oral hydrolyzed type 2 collagen protects against the OA of obesity and mitigates obese gut microbiome dysbiosis[J]. Osteoarthr Cartilage, 2018, 26:173-174.
- [32] TANG Y, XIAO J, WANG Y, et al. Effect of adenovirus-mediated TGF-beta1 gene transfer on the function of rabbit articular chondrocytes[J]. J Orthop Sci, 2017, 22(1): 149-155.
- [33] WEI J G, WANG X, SU Q L Y, et al. Meta-analysis of the relationship between TGF- β_1 and osteoarthritis[J]. Orthop J Chin, 2017, 25(23):2152-2155.
- [34] WANG R, XU B, XU H G. TGF- β_1 promoted chondrocyte proliferation by regulating Sp1 through MSC-exosomes derived miR-135b [J]. Cell Cycle, 2018, 17(24):2756-2765.
- [35] WANG Q, GU X F, WANG J F. Transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) induces mouse precartilaginous stem cell differentiation through TGFR II -CK1 ϵ - β -catenin signalling [J]. Int J Exp Pathol, 2018, 99: 113-120.
- [36] OROZCO G A, TANSKA P, FLOREA C, et al. A novel mechanobiological model can predict how physiologically relevant dynamic loading causes proteoglycan loss in mechanically injured articular cartilage[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 15599.
- [责任编辑 周冰冰]

·书讯·

卡维地洛治疗无心梗冠心病患者心绞痛的临床观察 ——评《冠心病个体化治疗与调养》(第2版)

卡维地洛是新的第3代肾上腺素能 β 受体阻断药有非选择性阻断 β 受体和阻断 α 受体的作用,还具有钙拮抗、抗氧化、抗细胞增殖及保护细胞等作用。卡维地洛在治疗心力衰竭、高血压等心血管疾病中疗效较好,但治疗心绞痛的报道较少,为了解该药对冠心病心绞痛疗效,过去数年中,很多研究显示卡维地洛能有效地治疗高血压、心力衰竭。此外,实验和临床研究显示,该药通过对心率和血压的联合效应,有助于减少缺血心肌的氧需,改善冠心病患者的预后。

《冠心病个体化治疗与调养》(第2版)梁庆伟主编,由河南科学技术出版社2018年1月出版。第一章基础知识、冠心病常识。第二章冠心病早期检查、诊断方法。第三章中药对冠心病个体化的治疗针对不同证型、中医方剂、中医的辨证施治。第四章西药对冠心病个体化的治疗,包括西医治疗常识、西药和治疗方法。第五章冠心病患者手术治疗常识、手术的危险因素、术后注意事项。第六章冠心病患者饮食调理及防治。第七章冠心病患者运动及保健。该书是一部兼顾学术性和实用性的医学丛书,编著总结了国内外冠心病最新研究成果和发展趋向,并结合临床热点问题予以详尽论述。本书力求作到科学性、先进性及实用性;普及冠心病的防治、保健、康复、健康教育为一体的医疗服务。并较详细的介绍卡维地洛治疗无心梗冠心病患者心绞痛的临床疗效,口服阿司匹林($150\text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$),腹部皮下注射低分子肝素,静滴硝酸甘油,予卡维地洛或美托洛尔(均由 12.5 mg , 2次/d,一周后根据心率血压等病情变化,加量至 25 mg , 2次/d),疗程共4周。卡维地洛是一种新的非选择性的 β 受体阻滞剂,同时还能阻滞 α 受体具有扩血管作用。卡维地洛抗心绞痛作用可能与该药同时具有 α 受体阻滞作用,从而减轻心脏后负荷、防止冠状动脉痉挛有关。据报道,卡维地洛有抗氧化作用,研究结果也证实了这一点。作为第三代 α 受体阻滞剂,卡维地洛不仅具有 β 肾上腺素受体阻滞作用,同时也具有 α 受体阻滞作用。因此,通过降低心率、心肌收缩力(受体阻滞作用)和总外周血管阻力而减少心脏作用,降低心肌耗氧量。在同等条件下,与其他肾上腺素受体阻滞剂,如选择 β 受体阻滞剂倍他乐克,具有更强的心脏保护作用 and 显著的抗缺血作用。大量的实验室研究和临床观察,卡维地洛引起的全身血液动力学效应与其对 α 肾上腺素受体的阻滞作用相一致,但他在阻断B2受体的同时,不会使受体密度上调,同时可以阻滞 α 肾上腺素受体、对血管有扩张作用,减轻了心脏负荷,抵消了阻滞剂对心脏的抑制作用。已有报导在受体阻滞剂中只有卡维地洛能提高心衰患者的生存率。卡维地洛对心脏的保护机制,除了降低RPP外同时具有抗炎症反应、抑制缺血心肌的炎症细胞浸润和脂质过氧化、直接清除氧自由基的形成,从而抑制了缺血心肌的细胞凋亡,这是其它受体阻滞剂所不具备的所以,在治疗SA方面,卡维地洛较其他 β 受体阻滞剂具有更显著的疗效。卡维地洛的抗氧化作用与改善冠状动脉内皮的功能,也是他优于倍他乐克的一个方面。由于该药的 β 受体阻滞作用和血管扩张特性,可显著降低心绞痛患者的收缩压和舒张压心率,从而降低心率血压乘积,显著减少缺氧性心肌的供血,显著减少硝酸甘油的用量,增加患者的运动总时间。

《冠心病个体化治疗与调养》(第2版)简要介绍了冠心病的定义、临床表现、病理病因、基础检查、临床诊断等知识,重点介绍了冠心病的临床早期信号、个体化治疗,包括西药治疗、中成药治疗、饮食调养及运动疗法等。本书内容丰富,科学实用,所述方法简便易学,可供基层医务人员和医学院学生阅读参考。

(作者翁永龙,桐庐县妇幼保健院,浙江桐庐 311500)