

防己黄芪消肿方调控滑膜巨噬细胞极化治疗 膝骨关节炎滑膜炎

危一飞¹, 程程¹, 肖潇², 展嘉文^{1,3}, 蒋科卫¹, 银河^{1,3}, 白天宇¹, 梁佩文¹, 赵勇^{1*}

(1. 中国中医科学院望京医院, 北京 100102; 2. 首都医科大学附属北京中医医院, 北京 100010;
3. 中医正骨技术北京市重点实验室, 北京 100102)

[摘要] 目的:观察防己黄芪消肿方(FHDP)对Hulth法膝骨关节炎(KOA)大鼠关节滑膜巨噬细胞极化情况及滑膜炎情况的干预作用。方法:36只大鼠随机分为6组,分别为假手术组、模型组、FHDP高、中、低剂量组(29.16、14.58、7.29 g·kg⁻¹)及洛索洛芬钠组(16.2 mg·kg⁻¹)。采用改良Hulth法造KOA大鼠模型。术后6周根据分组给予高、中、低3个剂量的FHDP药液、生理盐水(NS)及洛索洛芬钠药液进行干预,给药2周后处死动物。苏木素-伊红(HE)染色后观察滑膜及软骨的组织病理学改变,流式细胞术(FCM)及免疫荧光(IF)评估M1/M2巨噬细胞极化情况,分别采用免疫组织化学(IHC)及酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测关节组织和血清中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-10(IL-10)、金属基质蛋白酶-13(MMP-13)等巨噬细胞极化相关蛋白的表达水平。结果:与假手术组比较,模型组Krenn及Mankin评分显著增高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组均能降低Krenn评分($P<0.05$, $P<0.01$),Mankin评分差异无统计学意义。与假手术组比较,模型组M1/m ϕ (CD38⁺)显著升高($P<0.01$),M2/m ϕ (CD206⁺)降低($P<0.05$);与模型组比较,FHDP高、中、低剂量组可降低M1/m ϕ ($P<0.05$, $P<0.01$),各给药组均提高M2/m ϕ ,但差异无统计学意义。与假手术组比较,模型组M1/M2显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各FHDP剂量组M1/M2均显著降低($P<0.01$),FHDP高、中剂量组较洛索洛芬钠组M1/M2更低($P<0.05$)。与假手术组比较,模型组滑膜及软骨中TNF- α 、IL-1 β 、MMP-13的水平显著增高($P<0.01$),IL-10的水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,各给药组均能降低滑膜中TNF- α 、IL-1 β 水平($P<0.05$),对滑膜中MMP-13及IL-10的水平影响差异无统计学意义,各给药组均未能影响软骨中各炎症介质的水平。与假手术组比较,模型组血清TNF- α 、IL- β 水平显著升高($P<0.01$),IL-10水平降低($P<0.05$);与模型组比较,FHDP高剂量组可降低TNF- α 水平($P<0.05$),各给药组均能升高IL-10水平($P<0.05$, $P<0.01$),各给药组IL- β 的水平差异无统计学意义。结论:防己黄芪消肿方可改善KOA大鼠关节滑膜炎,可通过抑制M1巨噬细胞极化影响促炎细胞因子及金属基质蛋白酶的分泌,对M2巨噬细胞极化无明显影响作用,调控巨噬细胞极化失衡是该方缓解滑膜炎治疗KOA的可能机制。

[关键词] 防己黄芪消肿方; 骨关节炎; 巨噬细胞极化; 滑膜炎; 炎症

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)13-0112-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220703

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220124.1721.009.html>

[网络出版日期] 2022-01-25 9:29

Fangji Huangqi Detumescence Prescription Treats Synovitis in Rats with Knee Osteoarthritis by Modulating Polarization of Synovial Macrophages

WEI Yi-fei¹, CHENG Ting¹, XIAO Xiao², ZHAN Jiawen^{1,3}, JIANG Kewei¹, YIN He^{1,3},
BAI Tianyu¹, LIANG Peiwen¹, ZHAO Yong^{1*}

(1. Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China;
2. Beijing Traditional Chinese Medicine (TCM) Hospital Affiliated to Capital Medical University,
Beijing 100010, China; 3. Beijing Key Laboratory of TCM Orthopedics Technology, Beijing 100102, China)

[收稿日期] 2021-10-29

[基金项目] 中国中医科学院骨伤科学重大攻关项目(C12021A02001);国家中医药管理局中医药创新团队及人才支持计划项目(ZYYCXTD-C-202003)

[第一作者] 危一飞, 硕士, 主治医师, 从事骨与关节疾病基础与临床相关研究, E-mail:bjweiyf@126.com

[通信作者] * 赵勇, 博士, 主任医师, 博士生导师, 从事中医骨科学的临床与基础研究, E-mail:Zhaoyong423@163.com

[Abstract] Objective: To assess the curative effects of Fangji Huangqi detumescence prescription (FHDP) on synovitis and polarization of synovial macrophages of knee osteoarthritis (KOA) model in rats induced by Hulth method. **Method:** Thirty-six rats were randomly divided into sham operation group, model group, high-dose, medium-dose, and low-dose (29.16, 14.58, and 7.29 g·kg⁻¹) FHDP groups, and loxoprofen sodium (16.2 mg·kg⁻¹) group. KOA model in rats was induced by modified Hulth method. Six weeks after the operation, rats were given high, medium, and low concentrations of FHDP, normal saline (NS), and loxoprofen sodium according to the group to intervene, and sacrificed after 2-week administration. Synovium and cartilage histopathological changes were observed after hematoxylin-eosin (HE) staining. Flow cytometry (FCM) and immunofluorescence (IF) test were used to evaluate the polarization of M1/M2 macrophages. Immunohistochemistry (IMC) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were used to detect the related protein expression levels of macrophage polarization, such as interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-10 (IL-10), and matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) in joint tissues and serum. **Result:** Compared with the sham operation group, Krenn and Mankin scores in the model group were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, Krenn score was decreased in all administration groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$), but there was no significant difference in Mankin score in any administration groups. Compared with the sham operation group, M1/m ϕ (CD38⁺) ratio in the model group was significantly increased ($P < 0.01$), and M2/m ϕ (CD206⁺) ratio in the model group was decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, M1/m ϕ ratio in the high, medium, and low-dose FHDP groups was decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), but M2/m ϕ ratio was increased in all administration groups (the difference had no statistical significance). Compared with the sham operation group, M1/M2 ratio in the model group was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, M1/M2 ratio in all FHDP groups was significantly decreased ($P < 0.01$), and M1/M2 ratio in the high and medium-dose FHDP groups was lower than that in the loxoprofen sodium group ($P < 0.05$). Compared with the sham operation group, the levels of TNF- α , IL-1 β , and MMP-13 in synovium and cartilage of the model group were significantly increased ($P < 0.01$), the level of IL-10 was significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the levels of TNF- α and IL-1 β in synovium were decreased in all administration groups ($P < 0.05$), but the difference of the levels of MMP-13 and IL-10 in synovium had no statistical significance. The level of inflammatory mediators in cartilage was not affected in all administration groups. Compared with the sham operation group, the levels of TNF- α and IL- β in serum of the model group were significantly increased ($P < 0.01$), the level of IL-10 was decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the level of TNF- α in the high-dose FHDP group was decreased ($P < 0.05$), and the level of IL-10 was increased in all administration groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The difference of the level of IL- β in all administration groups had no statistical significance. **Conclusion:** FHDP attenuated the synovitis of KOA rats. FHDP exert the effect on the releasing of proinflammatory cytokines and MMP by inhibiting the polarization of M1 macrophages in synovium, and had no significant effect on the polarization of M2 macrophages. Modulating the imbalanced polarization of synovial macrophages was a possible mechanism of FHDP on attenuating synovitis and treating KOA.

[Keywords] Fangji Huangqi detumescence prescription (FHDP); osteoarthritis; polarization of macrophages; synovitis; inflammation

膝骨关节炎是中老年人最常见的慢性关节疾病^[1-2],滑膜炎是其重要的病理改变之一。由滑膜炎主导的关节内慢性炎症与KOA的症状、发展速度及发展程度密切相关^[3-8]。巨噬细胞(m ϕ)是OA关节内最主要的免疫细胞^[9-11],分泌肿瘤坏死因子- α

(TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-10(IL-10)、基质金属蛋白酶(MMPs)等,是调控骨关节炎(OA)炎症状态的最关键细胞^[12]。相关研究证实激活的m ϕ 与OA的症状、严重程度^[13]及炎症状态^[14-15]关系密切。M1表型m ϕ 具有促炎作用,M2表

型 $m\phi$ 具有抑制炎症、调节免疫以及促进组织修复的作用,以 M1 占优势的巨噬细胞极化失衡状态是恶化 OA 关节内炎症微环境的重要因素^[16-17],干预其极化状态是治疗 KOA 的重要潜在靶点^[18-19]。

KOA 属中医“痹病”范畴,防己黄芪消肿方(下文简称消肿方)由经方防己黄芪汤合五苓散加减而成,前期研究结果显示该方治疗滑膜炎具有较好临床效果,未见明显不良反应^[20]。现代药理学研究发现该方中药物成分具有较好抗炎作用^[21-26]。认为消肿方可能具有通过调节 $m\phi$ 极化失衡而改善关节内炎症环境治疗 KOA 滑膜炎。本研究拟建立 KOA 大鼠模型,采用组织病理学观察、流式细胞术(FCM)、免疫荧光(IF)、免疫组织化学(IMC)及酶联免疫吸附测定法(ELISA)等检测方法,探讨消肿方对 OA 滑膜炎及软骨退变的干预作用,并评估其对炎性介质及 $m\phi$ 极化情况的干预作用,为该方的临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 SD 雄性大鼠 42 只,SPF 级,体质量 130~150 g,购自北京市昌扬西山养殖场,合格证号 SCXK(京)2019-0010,动物饲养于中国中医科学院骨科研究所实验动物中心,本实验动物及条件符合《实验动物管理条件》要求。本实验涉及的动物实验经中国中医科学院望京医院动物实验伦理委员会审查批准,批准号 WJEC-KT-2020-015-P003。

1.2 药物与试剂 防己黄芪消肿方由黄芪 15 g、防己 12 g、牛膝 9 g、炒白术 15 g、桂枝 10 g、威灵仙 10 g、羌活 10 g、猪苓 20 g、茯苓 15 g、泽泻 10 g、薏苡仁 30 g、炙甘草 6 g 组成,饮片由中国中医科学院望京医院草药房购进,经望京医院程程主任医师鉴定合格;消肿方药液由中国中医科学院望京医院中药制剂室采用常压蒸发法浓缩为含生药质量浓度为 $1.94 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 混悬液(高浓度),收集于干净玻璃瓶中, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷藏备用;洛索洛芬钠片(上海第一三共制药有限公司,国药准字 H20030769),由中国中医科学院望京医院西药房购进;将洛索洛芬钠片碾碎溶于所需计量的纯水中获得药物混悬液。4% 多聚甲醛固定液(武汉博士德生物工程有限公司,批号 11D28C68);苏木素-伊红(HE)染色液(珠海贝索生物技术有限公司,批号 C201203);CD45 抗体、CD86 抗体(美国 Biolegend 公司,批号分别为 202220、200307);CD68/APC 抗体、CD163/FITC 抗体(北京博奥森生物技术公司,批号分别为 bs-20402R-APC、bs-2527R-FITC);CD38 抗体、甘露糖

受体 C1(MRC1)抗体(武汉云克隆科技股份有限公司,批号分别为 PAA752Ra01、PAB542Ra01);TNF- α 抗体、IL-10 抗体、MMP-13 抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为 BA0131、RP1016、A00420-2);F4/80 抗体(6A545)(美国 Santa Cruz 公司,批号 sc-71085);IL-1b 抗体、胶原酶 II、大鼠 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 ELISA 试剂盒(北京索莱宝公司,批号分别为 K107559P、C8150-100mg、SEKR-0009、SEKR-0002、SEKR-0006);荧光素(FITC)偶联亲和纯山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(H+L)二抗、酶标亲和山羊抗兔 IgG(H+L)二抗(美国 Proteintech 公司,批号分别为 SA00007-1、SA00001-2)。

1.3 仪器 R135 型石蜡切片机(湖北 Taiva 公司),JK-6 型生物组织摊烤片机(武汉俊杰电子有限公司),DM2000LED 型显微镜、DMI8 型倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司),10212440C 型盖玻片、188105W 型载玻片(世泰实验器材公司)。

2 方法

2.1 动物分组及造模 适应性喂养 1 周后,精准称质量,按质量由小到大顺序进行编号,采用随机数字表法分成模型组 33 只,假手术组 9 只。模型组采用经典 HULTH 法^[27-28]建立大鼠 KOA 模型:给予大鼠麻醉后常规剃毛消毒,取右膝,于髌骨内侧切开关节囊进入关节。首先切断内侧半月板前角,牵出并切除前半内侧半月板,后以组织剪剪断前交叉韧带做前抽屉试验验证成功后冲洗缝合切口。假手术组同模型组方式切开皮肤及关节囊进入关节腔,生理盐水冲洗后逐层缝合关节囊及皮肤,以排除手术因素的干扰。术后自由活动,术后青霉素连续肌肉注射 3 d,6 周造模结束。随机抽取假手术组大鼠 3 只,模型组大鼠 3 只,采用 7% 水合氯醛腹腔过量注射麻醉处死后,取右膝进行组织病理学检查,并使用 Mankin 评分验证造模结果。造模成功后,将剩余模型大鼠随机分成 5 组:模型组、防己黄芪消肿方高、中、低剂量组(中药高、中、低剂量组)、洛索洛芬钠组(西药组),每组 6 只。

2.2 药物干预 中药药液:实验药物剂量根据人与大鼠体表面积计算,按成人临床用药量的 12.6 倍换算为高剂量($29.16 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、6.3 倍换算为中剂量($14.58 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、3.15 倍换算为低剂量($7.29 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),每日给药 2 次,每次 1.5 mL,给药 2 周。洛索洛芬钠药液:根据人与大鼠体表面积计算,大鼠等效计量剂量为人的 6.3 倍($16.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),每日给药 2 次,每次 1.5 mL,给

药2周。

2.3 指标检验

2.3.1 HE染色观察滑膜及软骨组织病理学改变

取完整膝关节,经固定、脱水、透明、浸蜡、切片、HE染色后,倒置在显微镜下观察各组大鼠滑膜、软骨组织,使用Krenn滑膜炎评分^[29]及软骨退变Mankin评分^[30]评定。

2.3.2 免疫组化检测

石蜡切片经二甲苯脱蜡,梯度乙醇复水后,用3% H₂O₂孵育15 min灭活组织内源性过氧化物酶。用蛋白酶K消化10 min进行抗原修复后再用5% BSA对非特异性位点进行封闭。一抗(1:100)4℃孵育过夜后再用酶标亲和山羊抗兔IgG二抗(1:1000)37℃孵育30 min,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后DAB显色,切片经苏木素复染。常规脱水,透明,中性树胶封片。阴性对照用一抗同源normal IgG代替一抗。

结果采用Image Pro Plus 6软件分析,测算积分吸光度IA值以及检测区域面积(SA),软件以IA值与SA的比值计算得出平均积分吸光度AA表示IL-1β、TNF-α、IL-10及MMP-13的表达水平。

2.3.3 ELISA检测IL-1β、TNF-α、IL-10含量

大鼠血清加入预涂有适当捕获抗体(IL-1β、TNF-α、IL-10)的96孔板中,然后与适当的生物素化检测抗体孵育。向每个孔中加入链霉抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶(HRP)并在室温下温育1 h。使用ELISA酶标仪检测吸光度A,根据公式计算结果。

2.3.4 流式细胞检验CD11b、CD163、CD86表达

将滑膜组织消化成单个细胞后,用10%兔血清封闭30 min,离心弃上清。用PBS 50 μL重悬细胞加入FITC-CD11b(1:200)、APC-CD163和PE-CD86(1:400)抗体10 μL,4℃,避光孵育30 min。PBS洗1次后,加入PBS 100 μL重悬细胞上流式细胞仪检测。

2.3.5 免疫荧光检测

冰冻切片放置在37℃温箱中30 min,PBS清洗2遍,封闭液封闭1 h后,加入一抗(1:100)4℃孵育过夜,清洗2遍后荧光二抗(1:1000)孵育1 h,PBS清洗3遍后滴加含DAPI防淬灭封片剂封片,共聚焦显微镜下拍照。

2.4 统计学分析

采用SPSS 17.0软件版本进行统计学差异分析,数据结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间数据的比较采用独立样本t检验,多组间的差异比较使用One-way ANOVA检验,P<0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对KOA大鼠滑膜组织病理学改变的影响

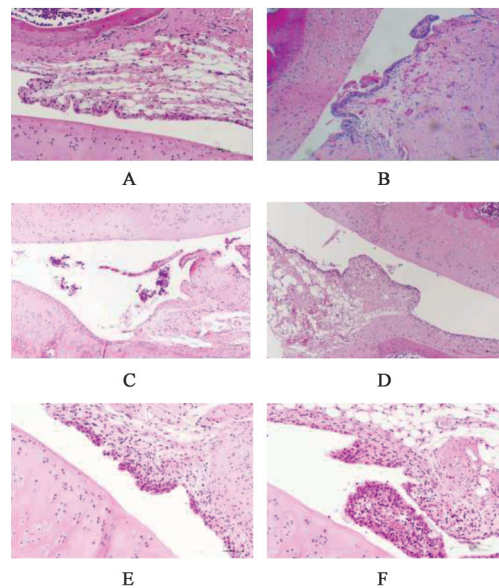
与假手术组比较,模型组评分显著增高(P<0.01),见表1;与模型组比较,各治疗组评分均降低(P<0.05,P<0.01),中药疗效呈剂量依赖性;各治疗组评分组间比较,差异无统计学意义。见表1、图1。

表1 防己黄芪消肿方对滑膜炎Krenn评分的影响($\bar{x}\pm s,n=6$)

Table 1 Effect of Fangji Huangqi detumescence prescription (FHDP) on Krenn score of synovitis ($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	滑膜炎Krenn评分/分
假手术组		0.00±0.00
模型组		5.17±0.98
中药高剂量组	29.16	2.83±0.75 ⁴⁾
中药中剂量组	14.58	3.33±0.82 ⁴⁾
中药低剂量组	7.29	4.00±0.89 ³⁾
西药组	0.16	3.83±0.75 ⁴⁾

注:与假手术组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01;与西药组比较⁵⁾P<0.05(表2-表7同)



注:A.假手术组;B.模型组;C.消肿方高剂量组;D.消肿方中剂量组;E.消肿方低剂量组;F.西药组(图2-图11同)

图1 防己黄芪消肿方对滑膜组织病理学改变的影响(HE,×100)

Fig. 1 Effect of FHDP on histopathological changes of synovium (HE,×100)

3.2 对KOA大鼠软骨组织病理学改变的影响

与假手术组比较,模型组评分显著增高(P<0.01);与模型组比较,各治疗组差异无统计学意义;各治疗组组间比较,差异无统计学意义。见表2、图2。

3.3 对KOA大鼠滑膜及软骨组织中TNF-α、IL-1β、IL-10、MMP-13表达水平的影响

与假手术组比较,模型组滑膜中TNF-α、IL-1β、MMP-13的水平显

表2 防己黄芪消肿方对软骨退变 Mankin's 评分的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2 Effect of FHDP on Mankin's score of cartilage degeneration ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	滑膜炎 Krenn 评分/分
假手术组		0.00±0.00
模型组		5.67±1.03
中药高剂量组	29.16	4.33±1.03
中药中剂量组	14.58	4.50±1.64
中药低剂量组	7.29	4.83±1.47
西药组	0.16	4.83±1.17

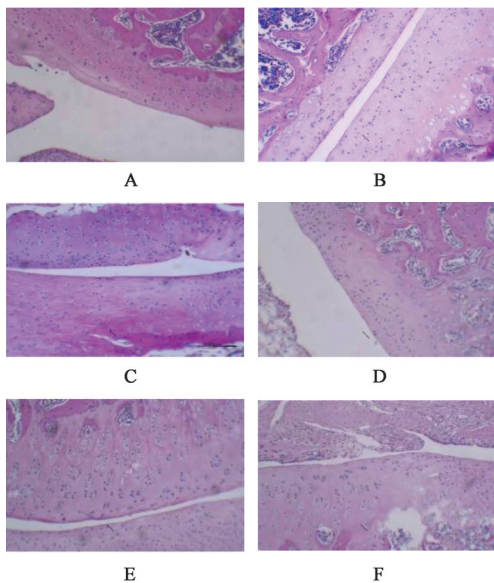


图2 防己黄芪消肿方对软骨组织病理学改变的影响(HE, ×100)

Fig. 2 Effect of FHDP on histopathological changes of cartilage (HE, ×100)

著增高 ($P<0.01$), IL-10 的水平显著降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各治疗组均能降低异常升高的 TNF- α 、IL-1 β 水平 ($P<0.05$), 各治疗组均未能改变 IL-10 及 MMP-13 的水平。见图3、表3、图4~图6。

3.5 对 KOA 大鼠软骨组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、MMP-13 表达水平的影响 与假手术组比较, 模型

表3 防己黄芪消肿方对滑膜组织中炎性介质表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 3 Effect of FHDP on expression level of inflammatory mediators in synovium ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF- α	IL-1 β	IL-10	MMP-13
假手术组		5.18±1.89	4.87±2.53	12.95±7.26	4.18±2.12
模型组		16.72±5.52 ²⁾	23.03±10.59 ²⁾	5.40±1.82 ²⁾	11.34±5.26 ²⁾
中药高剂量组	29.16	10.62±4.43 ^{1,3)}	13.30±4.90 ^{1,3)}	6.22±3.69 ²⁾	8.22±3.12
中药中剂量组	14.58	11.18±4.30 ^{1,3)}	14.75±5.84 ^{1,3)}	7.08±4.18 ¹⁾	7.76±3.51
中药低剂量组	7.29	11.84±4.60 ^{2,3)}	15.15±5.48 ^{2,3)}	5.66±2.46 ²⁾	8.48±3.47 ¹⁾
西药组	0.16	11.20±2.74 ^{1,3)}	14.63±5.06 ^{1,3)}	5.80±2.81 ²⁾	8.14±3.09

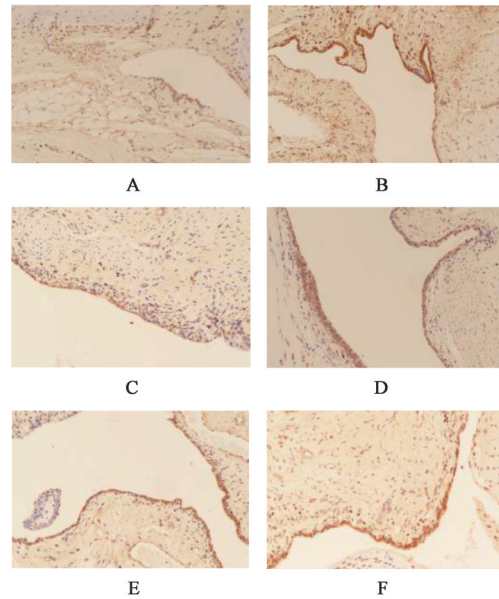


图3 防己黄芪消肿方对滑膜组织中 TNF- α 表达水平的影响(免疫组化, ×100)

Fig. 3 Effect of FHDP on expression level of TNF- α in synovium (IHC, ×100)

组软骨中 TNF- α 、IL-1 β 、MMP-13 的水平显著增高 ($P<0.01$), IL-10 的水平显著降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各治疗组均未能改变 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 及 MMP-13 的水平。见表4、图7~图9。

3.6 对 KOA 大鼠血清中促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 与抗炎因子 IL-10 表达水平的影响 与假手术组比较, 模型组血清中 TNF- α 、IL-1 β 的水平显著增高 ($P<0.01$), IL-10 的水平降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 各治疗组均可一定程度上降低血清中异常升高的 TNF- α 水平, 但只有中药高剂量组比较存在差异 ($P<0.05$), 各治疗组均未能降低异常升高的 IL-1 β 水平, 各治疗组均能升高血清中异常降低的 IL-10 水平 ($P<0.05$, $P<0.01$)。见表5。

3.7 对 KOA 大鼠关节内滑膜巨噬细胞 M1/M2 极化失衡的影响

3.7.1 对 KOA 大鼠滑膜 m ϕ 极化的影响 F4/80⁺ 细

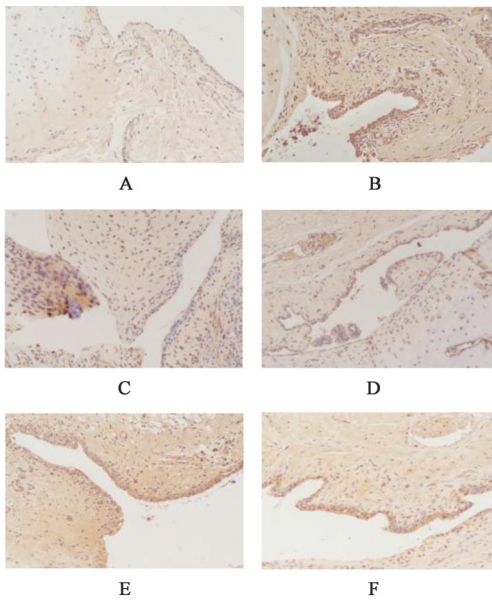


图4 防己黄芪消肿方对滑膜组织中IL-1 β 表达水平的影响(免疫组化, $\times 100$)

Fig. 4 Effect of FHDP on expression level of IL-1 β in synovium (IHC, $\times 100$)

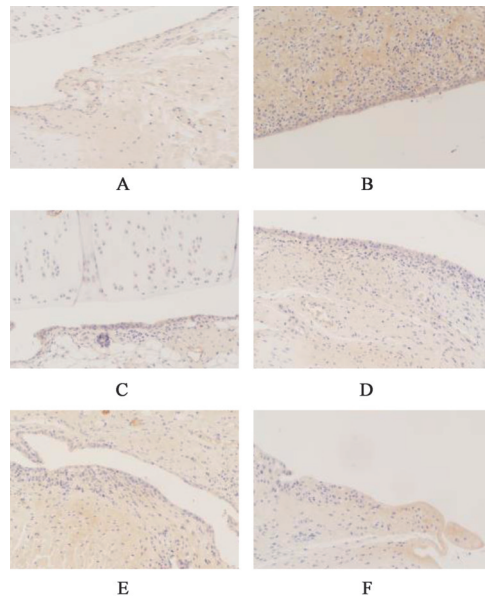


图6 防己黄芪消肿方对滑膜组织中MMP-13表达水平的影响(免疫组化, $\times 100$)

Fig. 6 Effect of FHDP on expression level of MMP-13 in synovium (IHC, $\times 100$)

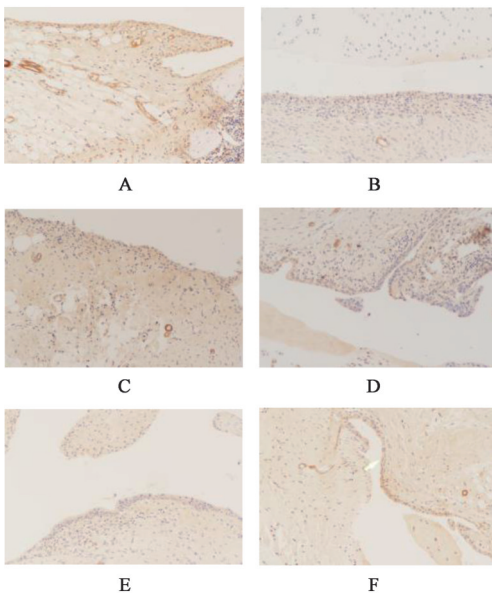


图5 防己黄芪消肿方对滑膜组织中IL-10表达水平的影响(免疫组化, $\times 100$)

Fig. 5 Effect of FHDP on expression level of IL-10 in synovium (IHC, $\times 100$)

胞代表 $m\phi$, CD38⁺细胞代表 M1 型 $m\phi$, CD206⁺细胞代表 M2 型 $m\phi$ 。将 CD38⁺细胞(M1)占 F4/80⁺细胞(M0)比例计为 M1/ $m\phi$, 将 CD206⁺细胞(M2)占 F4/80⁺细胞(M0)比例计为 M2/ $m\phi$ 。与假手术组比较, 模型组滑膜中浸润大量 F4/80 阳性细胞, 代表组织中存在更多 $m\phi$, 模型组 M1/ $m\phi$ 显著升高($P < 0.01$), M2/ $m\phi$ 降低($P < 0.05$); 与模型组比较, 各治疗组均

能一定程度上降低 M1/ $m\phi$, 其中中药高、中剂量组与模型组比较存在差异($P < 0.05$), 各治疗组均未能升高 M2/ $m\phi$; 各治疗组组间比较, 差异无统计学意义。见表6和图11。

3.7.2 对 KOA 大鼠关节 $m\phi$ 极性的影响 CD45⁺细胞代表白细胞, CD68⁺细胞是代表 M1 型 $m\phi$, 而 CD163⁺细胞代表 M2 型 $m\phi$ 。将 CD68⁺细胞占 CD45⁺细胞比例计为 M1/ $m\phi$, 将 CD163⁺细胞占 CD45⁺细胞比例计为 M2/ $m\phi$ 。与假手术组比较, 模型组 M1/ $m\phi$ 及 M1/M2 均显著升高($P < 0.01$), M2/ $m\phi$ 差异无统计学意义; 与模型组比较, 各治疗组 M1/ $m\phi$ 均一定程度降低, 除中药低剂量组外, 各治疗组与模型组比较差异均存在统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$), 各治疗组 M2/ $m\phi$ 与模型组比较, 差异无统计学意义, 各中药治疗组 M1/M2 均较模型组显著降低($P < 0.01$); 与西药组比较, 中药高、中剂量组 M1/M2 更低($P < 0.05$)。见表7、图12和图13。

4 讨论

KOA 是临床最常见的慢性关节疾病, 造成沉重的社会和经济负担^[1-2]。目前尚无有效药物能阻止、减慢或者逆转 KOA 疾病的进展^[31-32]。前期临床研究显示防己黄芪消肿方在治疗 KOA 滑膜炎方面具有的良好效果^[20], 相关研究显示该方中单药具有抑制促炎细胞因子的作用^[33]。 $m\phi$ 是 OA 关节内最主要的免疫细胞^[10-11], 是调控 OA 炎症状态的最关键细胞^[12], 炎症因子如 TNF- α ^[34] 及 IL-1 β ^[35]、IL-10^[36] 均主

表4 防己黄芪消肿方对软骨组织中炎性介质表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of FHDP on expression level of inflammatory mediators in cartilage ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	TNF- α	IL-1 β	IL-10	MMP-13
假手术组		4.95 \pm 2.06	6.71 \pm 2.16	14.39 \pm 5.65	3.60 \pm 1.57
模型组		15.71 \pm 4.51 ²⁾	21.15 \pm 5.81 ²⁾	6.70 \pm 3.39 ²⁾	10.11 \pm 4.52 ²⁾
中药高剂量组	29.16	12.67 \pm 3.86 ²⁾	16.79 \pm 4.14 ²⁾	7.05 \pm 3.68 ²⁾	8.30 \pm 2.73 ²⁾
中药中剂量组	14.58	12.40 \pm 3.45 ²⁾	17.08 \pm 3.46 ²⁾	7.60 \pm 2.84 ²⁾	8.71 \pm 2.57 ²⁾
中药低剂量组	7.29	13.51 \pm 4.00 ²⁾	18.47 \pm 4.69 ²⁾	6.79 \pm 2.67 ²⁾	9.02 \pm 2.44 ²⁾
西药组	0.16	13.32 \pm 3.39 ²⁾	17.29 \pm 4.04 ²⁾	7.19 \pm 2.52 ²⁾	8.92 \pm 2.72 ²⁾

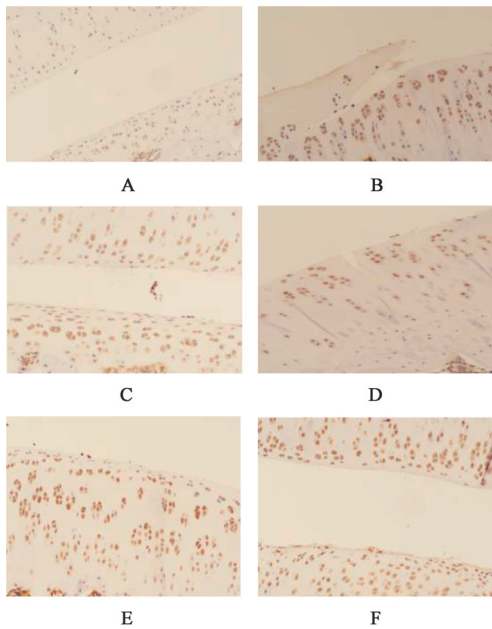


图7 防己黄芪消肿方对软骨组织中TNF- α 表达水平的影响(免疫组化, $\times 100$)

Fig. 7 Effect of FHDP on expression level of TNF- α in cartilage (IHC, $\times 100$)

要由 $m\phi$ 分泌。鉴于此,笔者推测消肿方的治疗作用可能是通过以下逻辑达成的,调控 $m\phi$ 极化失衡 \rightarrow 影响炎症因子分泌 \rightarrow 抑制关节内炎症 \rightarrow 治疗滑膜炎 \rightarrow 延缓软骨退变 \rightarrow 治疗KOA。证实消肿方具有调控巨噬细胞极化、抑制关节内炎症的作用是本研究的目的。

病理学结果显示消肿方各治疗组可减轻KOA滑膜的厚度,并可降低滑膜炎Krenn病理分级程度,中药疗效呈剂量依赖性,结果说明该方具有治疗KOA滑膜炎的作用。结果显示消肿方可降低软骨的Mankin评分,但与模型组比较差异不明显。但根据Mankin的5级分级标准进行比较,则中药治疗具有一定改善软骨退变的作用。理论上炎症的程度应与软骨退变的进展密切相关,抑制炎症应能有效改善软骨的退变程度^[37-38],本实验的阴性结果可能

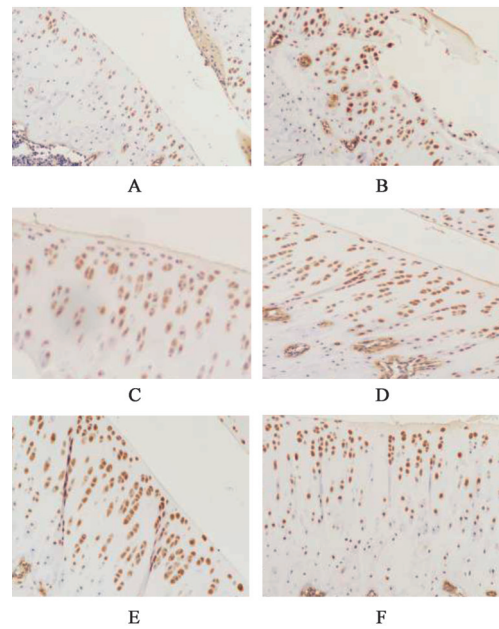


图8 防己黄芪消肿方对软骨组织中IL-1 β 表达水平的影响(免疫组化, $\times 100$)

Fig. 8 Effect of FHDP on expression level of IL-1 β in cartilage (IHC, $\times 100$)

是由于治疗及观察时间偏短所致^[39-41]。

通过ELISA评估血清炎症细胞因子的水平,结果显示高剂量消肿方可降低KOA大鼠促炎细胞因子TNF- α 的水平,各中药组均可提高抗炎细胞因子IL-10的水平。考虑到血清因子的水平不能完全反应关节局部的情况,使用IMC检测关节局部炎症因子的情况,结果显示该方可显著降低滑膜组织内促炎细胞因子IL-1 β 及TNF- α 的水平,但未能改变滑膜MMP-13及IL-10的水平,也未能影响软骨中各炎症介质的情况,这一结果与ELISA基本符合。结果说明该方可以改善KOA大鼠体内炎症因子的分泌情况,主要通过减少促炎细胞因子表达达到抗炎作用。值得注意的是软骨与滑膜IMC的结果差异明显,这可能软骨中的细胞因子来源于滑膜源因子的渗透及软骨细胞自身的分泌,其结果也主要受MLS

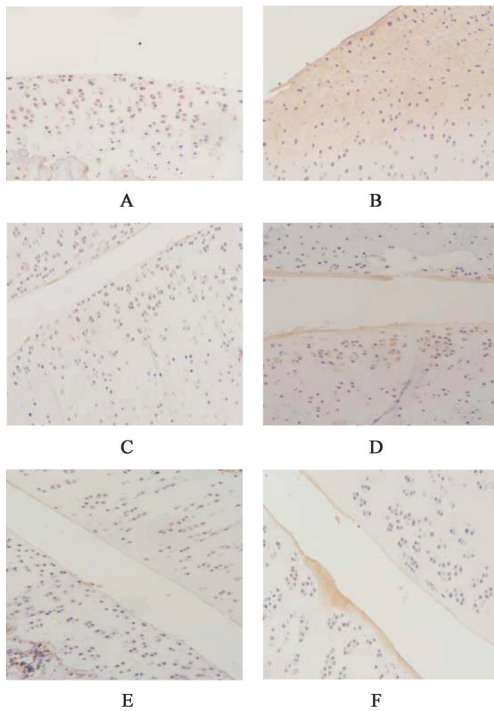


图9 防己黄芪消肿方对软骨组织中MMP-13表达水平的影响(免疫组化, ×100)

Fig. 9 Effect of FHDP on expression level of MMP-13 in cartilage (IHC, ×100)

表5 防己黄芪消肿方对血清细胞因子表达水平的影响(̄x±s, n=12)

Table 5 Effect of FHDP on expression level of cytokines in serum (̄x±s, n=12) ng·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF-α	IL-1β	IL-10
假手术组		5.95±1.61	2.15±0.45	6.07±1.28
模型组		13.01±3.95 ²⁾	5.07±1.60 ²⁾	4.61±0.56 ¹⁾
中药高剂量组	29.16	8.06±1.40 ^{1,3)}	3.67±0.67 ²⁾	7.82±2.68 ³⁾
中药中剂量组	14.58	8.98±2.30 ¹⁾	3.61±0.73 ²⁾	7.45±1.45 ⁴⁾
中药低剂量组	7.29	10.44±2.75 ²⁾	4.14±0.72 ²⁾	6.16±1.13 ³⁾
西药组	0.16	8.97±2.39 ¹⁾	4.01±1.62 ¹⁾	6.29±0.82 ⁴⁾

表6 防己黄芪消肿方对滑膜中M1、M2巨噬细胞在mø巨噬细胞中占比的影响(̄x±s, n=6)

Table 6 Effect of FHDP on proportion of M1 and M2 in mø macrophages in synovium (̄x±s, n=6)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	M1/mø/%	M2/mø/%
假手术组		38.95±9.95	54.48±12.68
模型组		72.24±12.99 ²⁾	40.83±12.09 ¹⁾
中药高剂量组	29.16	53.10±14.00 ³⁾	43.40±5.70
中药中剂量组	14.58	55.31±12.55 ^{1,3)}	43.35±5.55
中药低剂量组	7.29	61.48±11.78 ²⁾	44.16±10.00
西药组	0.16	59.36±15.86 ¹⁾	43.99±11.53

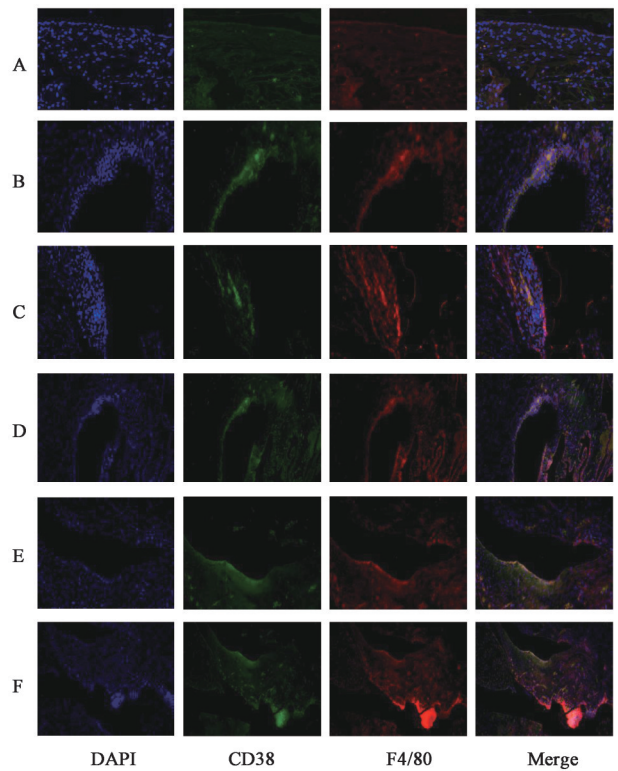


图10 防己黄芪消肿方对滑膜中M1巨噬细胞占比的影响(免疫荧光, ×200)

Fig. 10 Effect of FHDP on proportion of M1 macrophages in synovium (IF, ×200)

状态的影响^[12-15],故其变化相较于滑膜中的变化具有滞后性,这一结果与BLOM的研究结果相符^[42]。

FCM结果显示该方各组均可显著降低M1/mø,中药高剂量组的比率最低。值得注意的是除中药高剂量组以外,模型组及其余各治疗组M1比例均较假手术组更高,说明OA刺激会导致M1mø数量的增加,这与WOOD等^[43]的研究结果相符合。在M2mø极化方面,高剂量组在各组中最低,而中药(中、低)及西药组与模型组比较无差异。由于所取组织样本必然存在的差异性,M1/M2较单纯M1%或M2%能更好地反应巨噬细胞极化的状态,M1/M2结果显示各中药组均较模型组有更低的M1/M2,说明该方具有调控mø极化失衡的作用。

IF可以更好地反映局部M1/M2的失衡状态。结果显示中药高、中剂量组M1/mø均较模型组更低,而各治疗组均不能有效提高造模后异常降低的M2/mø。以上结果说明该方可显著降低M1在M0/mø中的比例,而对M2在M0/mø中的比例则影响较小,可以改善M1/M2的失衡状态,这一结果与流式检测结果相符。IL-1β、TNF-α和IL-10除可反映炎症状态外也是M1和M2/mø的重要标志

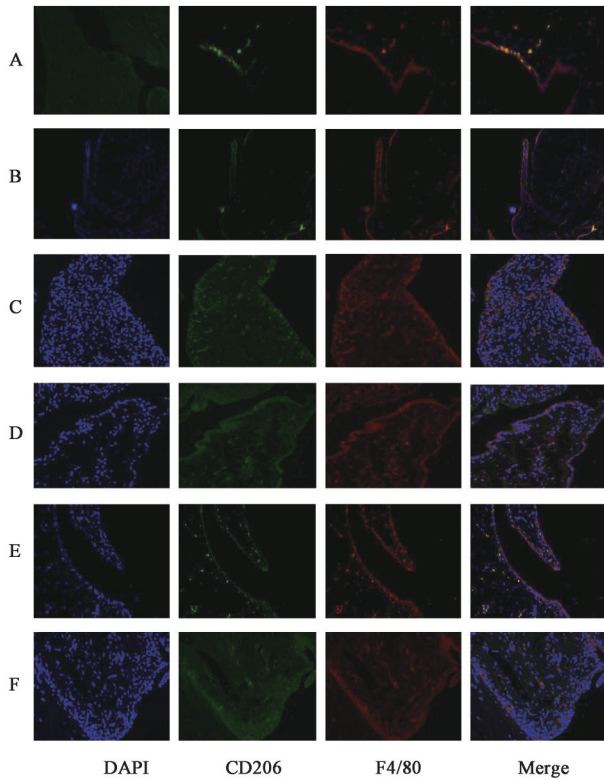


图 11 防己黄芪消肿方对滑膜中 M2 巨噬细胞占比的影响(免疫荧光, ×200)

Fig. 11 Effect of FHDP on proportion of M2 macrophages in synovium (IF, ×200)

表 7 防己黄芪消肿方对滑膜中 M1/M2 巨噬细胞比例的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 7 Effect of FHDP on proportion of M1/M2 macrophages in synovium ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	M1/%	M2/%	M1/M2
假手术组		5.13±1.02	5.97±2.49	0.97±0.37
模型组		15.82±3.07 ²⁾	6.01±1.51	2.75±0.69 ²⁾
中药高剂量组	29.16	5.69±0.70 ⁴⁾	3.73±0.63	1.56±0.27 ^{1,4,5)}
中药中剂量组	14.58	9.69±2.42 ^{1,3)}	6.41±1.71	1.55±0.39 ^{1,4,5)}
中药低剂量组	7.29	10.86±3.99 ²⁾	5.83±2.43	1.91±0.22 ^{2,4)}
西药组	0.16	9.60±1.56 ^{2,3)}	4.55±1.15	2.23±0.63 ²⁾

物^[19,44], 参见 IHC 及 ELISA 的结果与 IF 所反映的情况基本相符。总结 3 项结果说明消肿方主要通过降低 M1 比例这一方式改善 M1/M2 的失衡状态。本研究的结果验证了防己黄芪消肿方具有抑制 KOA 滑膜炎、抑制促炎细胞因子分泌、通过抑制 M1 极化调控 M1/M2 巨噬细胞极化失衡的作用。

本研究存在一定局限性包括样本量偏小, 由于经费限制未使用在定量评估方面更具优势的蛋白免疫印迹法 (Western blot), 未使用实时荧光定量聚

合酶链式反应 (Real-time PCR) 评估基因变化等。展望, 本实验观察到消肿方调控 MLS 极化改善 KOA 关节内炎症环境治疗膝骨关节的作用, 属于药效研究, 尚未涉及上游调控 m ϕ 极化的信号通路 [核转录因子- κ B (NF- κ B)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 等]、基因 (mRNA155 等), 这将是下一步研究的方向。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 黄杰, 黄肖华, 闫连杰, 等. 中医药治疗膝骨关节炎的研究进展 [J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(25): 2835-2838.
- [2] CROSS M, SMITH E, HOY D, et al. The global burden of hip and knee osteoarthritis: Estimates from the global burden of disease 2010 study [J]. Ann Rheum Dis, 2014, 73(7): 1323-1330.
- [3] ISHIJIMA M, WATARI T, NAITO K, et al. Relationships between biomarkers of cartilage, bone, synovial metabolism and knee pain provide insights into the origins of pain in early knee osteoarthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2011, 13(1): R22.
- [4] AHEDI H, AITKEN D, BLIZZARD L, et al. Quantification of hip effusion-synovitis and its cross-sectional and longitudinal associations with hip pain, MRI findings and early radiographic hip OA [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2020, 21(1): 533.
- [5] AYRAL X, PICKERING E H, WOODWORTH T G, et al. Synovitis: A potential predictive factor of structural progression of medial tibiofemoral knee osteoarthritis—results of a 1 year longitudinal arthroscopic study in 422 patients [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2005, 13(5): 361-367.
- [6] MACFARLANE L A, YANG H, COLLINS J E, et al. Association of changes in effusion-synovitis with progression of cartilage damage over eighteen months in patients with osteoarthritis and meniscal tear [J]. Arthritis Rheumatol, 2019, 71(1): 73-81.
- [7] KRASNOKUTSKY S, BELITSKAYA-LÉVY I, BENCARDINO J, et al. Quantitative magnetic resonance imaging evidence of synovial proliferation is associated with radiographic severity of knee osteoarthritis [J]. Arthritis Rheum, 2011, 63(10): 2983-2991.
- [8] SCANZELLO C R, MCKEON B, SWAIM B H, et al. Synovial inflammation in patients undergoing arthroscopic meniscectomy: Molecular characterization

- and relationship to symptoms [J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(2):391-400.
- [9] LINDBLAD S, HEDFORS E. Arthroscopic and immunohistologic characterization of knee joint synovitis in osteoarthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 1987, 30(10):1081-1088.
- [10] REVELL P A, MAYSTON V, LALOR P, et al. The synovial membrane in osteoarthritis: A histological study including the characterisation of the cellular infiltrate present in inflammatory osteoarthritis using monoclonal antibodies [J]. *Ann Rheum Dis*, 1988, 47(4):300-307.
- [11] BENITO M J, VEALE D J, FITZGERALD O, et al. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2005, 64(9):1263-1267.
- [12] ANDERSON P. Intrinsic mRNA stability helps compose the inflammatory symphony [J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(3):233-234.
- [13] KRAUS V B, MCDANIEL G, HUEBNER J L, et al. Direct *in vivo* evidence of activated macrophages in human osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, 24(9):1613-1621.
- [14] PISCAER T M, MÜLLER C, MINDT T L, et al. Imaging of activated macrophages in experimental osteoarthritis using folate-targeted animal single-photon-emission computed tomography/computed tomography [J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(7):1898-1907.
- [15] DAGHESTANI H N, PIEPER C F, KRAUS V B. Soluble macrophage biomarkers indicate inflammatory phenotypes in patients with knee osteoarthritis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2015, 67(4):956-965.
- [16] LIU B, ZHANG M, ZHAO J, et al. Imbalance of M1/M2 macrophages is linked to severity level of knee osteoarthritis [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(6):5009-5014.
- [17] ZHANG H, LIN C, ZENG C, et al. Synovial macrophage M1 polarisation exacerbates experimental osteoarthritis partially through R-spondin-2 [J]. *Ann Rheum Dis*, 2018, 77(10):1524-1534.
- [18] UTOMO L, VAN OSCH G J, BAYON Y, et al. Guiding synovial inflammation by macrophage phenotype modulation: An *in vitro* study towards a therapy for osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, 24(9):1629-1638.
- [19] 张斌,倪振洪,杨鹏,等. 低强度脉冲超声调控滑膜巨噬细胞极化抑制关节滑膜炎 [J]. *第三军医大学学报*, 2019, 41(8):747-756.
- [20] 危一飞,程程,林新晓,等. 自拟消肿方治疗膝骨关节炎并急性滑膜炎的临床研究 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2021, 30(1):44-48.
- [21] 程玥,丁泽贤,张越,等. 茯苓多糖及其衍生物的化学结构与药理作用研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(18):4332-4340.
- [22] 李士旭. 加味防己黄芪汤联合醋酸泼尼松片治疗肾病综合征对肾功能及炎症指标的影响 [J]. *实用中医药杂志*, 2020, 36(5):641-642.
- [23] 覃清霞,何娟,何欢,等. 防己黄芪汤对人类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞功能的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2021, 32(1):24-27.
- [24] 余阆,彭力平,马笃军,等. 牛膝总皂苷对实验兔膝骨关节炎滑膜组织的影响 [J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2017, 25(6):1-5.
- [25] 胡华,李连泰,刘艳伟,等. 四妙散加味对膝关节滑膜炎湿热阻络证患者关节液炎症因子和神经肽物质的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(6):97-102.
- [26] 王蓉,马腾茂,刘飞,等. 防己的药理作用及临床应用研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(4):634-639.
- [27] HULTH A, LINDBERG L, TELHAG H. Experimental osteoarthritis in rabbits. Preliminary report [J]. *Acta Orthop Scand*, 1970, 41(5):522-530.
- [28] 王欢,王庆甫,石鑫超,等. TLRs与NF- κ B在大鼠骨关节炎滑膜中的表达及意义 [J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2016, 24(6):4-8.
- [29] KRENN V, MORAWIETZ L, BURMESTER G R, et al. Synovitis score: Discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis [J]. *Histopathology*, 2006, 49(4):358-364.
- [30] WANG J, DONG F F, LI X F, et al. Effects of Yiqi Huayu prescription on knee cartilage degeneration in HIF-1 α gene knockout mice [J]. *Zhongguo Gu Shang*, 2013, 26(6):486-492.
- [31] XING Y, WANG L, WANG C, et al. Pharmacokinetic studies unveiled the drug-drug interaction between rans-2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -d-glucopyranoside and emodin that may contribute to the idiosyncratic hepatotoxicity of *Polygoni Multiflori Radix* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019;164:672-680.
- [32] SHAKIBAEI M, JOHN T, SCHULZE-TANZIL G, et al. Suppression of NF-kappaB activation by curcumin leads to inhibition of expression of cyclo-oxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human articular chondrocytes: Implications for the treatment of osteoarthritis [J]. *Biochem Pharmacol*, 2007, 73(9):

- 1434-1445.
- [33] 王绪辉,周重建,闵熙敬,等. 防己黄芪汤提取物治疗活动期类风湿性关节炎的临床药效评估[J]. 中医杂志,1993(3):156-158.
- [34] LIU-BRYAN R. Synovium and the innate inflammatory network in osteoarthritis progression[J]. *Curr Rheumatol Rep*,2013,15(5):323.
- [35] FARAHAT M N, YANNI G, POSTON R, et al. Cytokine expression in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis [J]. *Ann Rheum Dis*,1993,52(12):870-875.
- [36] TRIFUNOVIĆ J, MILLER L, DEBELJAK Ž, et al. Pathologic patterns of interleukin 10 expression-a review [J]. *Biochem Med (Zagreb)*, 2015, 25 (1) : 36-48.
- [37] 杨光,惠越,陈奎,等. 苍术内酯Ⅱ对骨关节炎大鼠软骨损伤、血清炎症因子和氧化应激的调节作用及机制研究[J]. 中医学报,2021,36(3):601-607.
- [38] 马威,孙海超,毕荣修. 桂枝芍药知母汤加减对风寒湿痹型膝骨关节炎患者疗效及炎性细胞因子的影响[J]. 广州中医药大学学报,2021,38(2):284-288.
- [39] 耿秋东,张应生,卢文亚,等. 化湿定痛汤对木瓜蛋白酶诱导的膝骨关节炎大鼠血清IL-1、IL-6、IL-10的影响[J]. 中华中医药杂志,2020,35(9):4654-4657.
- [40] 戚晴雪,马玉峰,吴忌,等. 低频超声促透通络止痛方对大鼠不同程度膝骨关节炎的影响[J]. 南京中医药大学学报,2014,30(3):244-248.
- [41] 李梓灏,黄刚,严伟健,等. 肾气丸对膝骨性关节炎模型大鼠炎症因子和软骨基质的影响[J]. 广州中医药大学学报,2021,38(1):129-134.
- [42] BLOM A B, VAN LENT P L, LIBREGTS S, et al. Crucial role of macrophages in matrix metalloproteinase-mediated cartilage destruction during experimental osteoarthritis: Involvement of matrix metalloproteinase 3[J]. *Arthritis Rheum*,2007,56(1):147-157.
- [43] WOOD M J, LECKENBY A, REYNOLDS G, et al. Macrophage proliferation distinguishes 2 subgroups of knee osteoarthritis patients [J]. *JCI Insight*, 2019, 4 (2):e125325.
- [44] BONDESON J, WAINWRIGHT S D, LAUDER S, et al. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis [J]. *Arthritis Res Ther*,2006,8:R187.

[责任编辑 周冰冰]