

# 补肾活血方对兔膝骨性关节炎的治疗作用研究

于娟, 李莎莎, 叶莹仪, 葛鸿庆, 陈文治, 邓晓强, 余宇峰\*

(广东省中医院, 广州 510120)

**[摘要]** **目的:**通过观察补肾活血方对 Hulth 法复制兔膝骨性关节炎模型中软骨组织结构的变化及基质金属蛋白酶-2 (MMP-2)、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )浓度的影响,探讨其对关节炎的治疗作用及机制。**方法:**48只新西兰兔,6只为正常对照,42只用 Hulth 法复制骨关节炎模型,4周后在模型中随机处死6只动物取材光镜下观察,造模成功后将其余36只随机分为治疗组和模型组,治疗组以补肾活血方 15 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>ig,模型组予同体积生理盐水。给药后的第4,6,8周分别在2组随机处死6只动物,取48只动物股骨髁软骨做石蜡切片行 HE 染色、观察软骨细胞形态,用 ELISA 试剂盒检测血清中 IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$  及关节液中 MMP-2。**结果:**与正常组比较,模型组 IL-1 在第4,6,8周显著升高( $P < 0.01$ ),MMP-2,TNF- $\alpha$  在第4,6周显著升高( $P < 0.01$ )。与模型组相比,Mankin's 分数在第8周治疗组显著降低( $P < 0.001$ );IL-1 $\beta$  在第8周治疗组血清中显著降低( $P < 0.05$ );MMP-2 在第6周关节液中显著降低( $P < 0.01$ );TNF- $\alpha$  在第6周血清中显著降低( $P < 0.05$ )。**结论:**补肾活血方可降低 IL-1 $\beta$  含量,在关节炎早期可降低 MMP-2 和 TNF- $\alpha$ ,并可改善软骨组织形态从而保护关节软骨。

**[关键词]** 补肾活血方; 膝骨性关节炎; 炎症细胞因子

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)06-0171-04

**[doi]** 10.11653/syfy2014060171

## Effect of Bushen Huoxue Formulae on Knee Osteoarthritis in Rabbits

YU Juan, LI Sha-sha, YE Ying-yi, GE Hong-qing, CHEN Wen-zhi, DENG Xiao-qiang, YU Yu-feng\*

(Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate pathological changes of the cartilage and concentrations of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), matrix metalloproteinases (MMPs) and blood tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) by Bushen Huoxue formulae in treating rabbit knee osteoarthritis model copied by Hulth surgery. **Method:** Forty-eight rabbits were randomly divided control group with 6 rabbits, and model group are forty-two rabbits. The osteoarthritis model was established by Hulth surgery, among them 6 animals were randomly killed after modeling 4 weeks for microscope observation, and the remaining 36 rabbits were randomly divided into treatment group and model group, treatment group was given 15 g·kg<sup>-1</sup> Bushen Huoxue, the model group was given the same dose of saline. After 4, 6, 8 weeks, 6 animals were killed in each groups respectively to collect the medial femoral condyle to observe chondrocytes morphology by HE staining, meanwhile, the concentrations of IL-1 $\beta$ , MMP-2, TNF- $\alpha$  were assayed. **Result:** Compared with the normal group, in model group, concentration of IL-1 $\beta$  was significantly higher at 4, 6, 8 weeks ( $P < 0.01$ ); the concentration of MMP-2 and TNF- $\alpha$  was significantly higher in the 4th and 6th weeks ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the Mankin's score in treatment group was much significantly lower ( $P < 0.001$ ) in 8 week. the serum concentration of IL-1 $\beta$  significantly was lower ( $P < 0.05$ ) in 8 week, the concentration of MMP-2 in joint fluid was significantly lower ( $P < 0.01$ ) in 6 week, the serum concentrations of TNF- $\alpha$  was significantly lower ( $P < 0.05$ ) in 6 week. **Conclusion:** Bushen Huoxue treatment can reduce the

**[收稿日期]** 20130510005

**[基金项目]** 广东省科技厅项目(2008B030301361)

**[第一作者]** 于娟, 硕士, 研究实习员, 从事实验动物及药理研究, Tel:020-39318876, E-mail: yujuan8350625@163.com

**[通讯作者]** \* 余宇峰, 硕士, 副主任医师, 从事骨病治疗与研究, Tel:13610087365, E-mail: yuf1999@126.com

concentrations of IL-1 $\beta$ , MMP-2 and TNF- $\alpha$ , it can change the form of cartilage tissue so as to protect the articular cartilage in arthritis.

[Key words] Bushen Huoxue formulae; knee osteoarthritis; inflammatory cytokines

膝骨性关节炎(osteoarthritis, OA)是以关节软骨退行性改变为核心,累及骨质,包括滑膜、关节及关节其他结构的不同程度的反复发作的慢性炎症。临床表现多以膝关节疼痛为主,骨科门诊中以膝痛就诊者 50% 都可诊断为骨性关节炎<sup>[1]</sup>。近年来,炎症细胞因子对 OA 的作用成为其病因学方面研究的热点。其中白细胞介素-1(IL-1)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)及肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )是参与骨关节炎进程的重要介质<sup>[2]</sup>。本实验通过 Hulth 法建立兔膝骨性关节炎动物模型,观察复方中药补肾活血方对模型动物不同时期的组织及炎症细胞因子 IL-1, MMP-2 及 TNF- $\alpha$  水平的影响,探讨补肾活血方对该疾病的调控作用。

### 1 材料

**1.1 动物** 普通级新西兰兔 48 只,雄性,体重 2.0 ~ 2.5 kg, 质量合格证号 0049700, 0115216, 0113398, 0115213, 0114105, 0114265, 4407207637, 由广东省医学实验动物中心 [生产许可证号 SCXK(粤) 2008-0002] 及花都花东信华实验动物养殖场 [生产许可证号 SCXK(粤) 2009-0023] 提供。动物实验环境设施为广东省中医院动物实验中心 [使用许可证号 SYXK(粤) 2008-0094]。

**1.2 中药处方组成** 熟附子 15 g, 桂枝 15 g, 防己 15 g, 独活 15 g, 牛膝 15 g, 杜仲 20 g, 骨碎补 20 g, 巴戟天 20 g, 熟地黄 30 g, 白芍 50 g, 三棱 15 g, 莪术 15 g, 红花 15 g, 防风 15 g, 全蝎 10 g, 细辛 3 g, 淫羊藿 20 g, 乌蛇 15 g, 购自广东康美药业股份有限公司。将上述药材制作为质量浓度为 2 g·mL<sup>-1</sup> 药液(含生药)灭菌后, 4℃ 冷藏保存备用。

**1.3 试剂** 兔 IL-1 $\beta$ 、兔 MMP-2、兔 TNF- $\alpha$  酶联免疫分析试剂盒均购置于武汉华美生物制品有限公司(批号 J12011870, D19011871, I14011872)。

**1.4 仪器** DG5033A 型酶标仪(南京华东电子集团医疗装备有限责任公司), Ultra Pure UF 型和泰凯弗隆实验室纯水系统(上海和泰仪器有限公司), CU-420 型电热恒温水浴箱(上海一恒科技有限公司)。

### 2 方法

**2.1 动物模型的建立及分组** 新西兰兔采用 Hulth 法构建膝骨关节炎模型。术前禁食 6 h, 3% 戊巴比

妥钠 ip(0.9 mL·kg<sup>-1</sup>) 麻醉, 选取右侧后肢内侧, 先与髌韧带平行, 纵行向下, 至关节间隙下约 0.5 cm 处弧形向后, 再与关节间隙平行, 延伸至关节间隙后部, 沿关节囊纤维走向切开关节囊, 向外侧推离髌骨造成脱位。依次进入兔膝关节, 屈曲膝关节, 直视下可见膝交叉韧带, 用眼科剪剪断前后交叉韧带并切除内侧半月板, 避免损伤关节面软骨。行前后抽屉实验证实交叉韧带完全切断, 生理盐水清洁关节腔积血、积屑、逐层缝合伤口, 无菌包扎固定。术后所有动物每天驱赶上午、下午各强制运动 30 min。术后 4 周随机抽取 6 只兔膝关节显微镜下观察, 确定造模成功后, 分为补肾活血法治疗组、模型组, 每组再按给药后第 4, 6, 8 周 3 个时间点分配, 每个点 6 只。

**2.2 给药方法** 中药按原方煎制浓缩成 2 g·mL<sup>-1</sup> 的溶液, 按 7.5 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 予兔子连续 ig 剂量为 15 g·kg<sup>-1</sup>, 模型组予同样容量的生理盐水。

### 2.3 观察指标及方法

**2.3.1 股骨髁软骨病理检测** 取股骨内侧髁约 0.5 cm × 0.5 cm × 0.2 cm 组织块标本, 10% 甲醛溶液固定, 脱钙, 石蜡包埋, 4  $\mu$ m 连续切片。苏木素伊红染色, 树胶封片, 光镜下观察。HE 染色按 Mankin's 评分标准进行<sup>[3]</sup>, 见表 1。

表 1 Mankin's 评分标准

记分结构	细胞	染色	潮线
0 正常	正常	正常	完整
1 表层破坏	细胞过多、紊乱	轻染	不完整有血管通过
2 血管壁及表层破坏	细胞呈簇	中等染色	
3 浅层裂隙形成达移行层	细胞少	深染	
4 局限性深达骨质辐射层裂隙		失染	
5 深达骨质钙化层软骨缺损负重区			
6 全层软骨缺损			

**2.3.2 检测 IL- $\beta$ , MMP-2, TNF- $\alpha$  的含量** 于药物治疗后第 4, 6, 8 周处死动物, 通过兔耳缘静脉取血, 分离血清, -20℃ 冻存; 膝关节进行关节液的采集, 取样部位消毒, 切开右膝关节囊, 用 0.5 mL 生理盐

水冲洗关节腔收集关节液,离心收集上清液 -20 ℃ 保存,待测。待所有标本收集完成后,用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测 IL- $\beta$ , MMP-2 和 TNF- $\alpha$  的含量,步骤按说明书进行。

**2.4 统计分析** 采用 SPSS 13.0 统计软件处理数据,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组均数比较进行多因素方差分析,组间两两比较采用 S-N-K 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**3 结果**

**3.1 股骨髌软骨病理** 正常组关节软骨细胞排列整齐、分布均匀,潮线结构完整,细胞着色均匀。关节炎模型组与治疗组相比,4 周组:两组软骨表面均较平整,接近正常,无明显的簇集软骨细胞,潮线完整,软骨细胞排列无明显差异,治疗组软骨细胞分布更均匀,序列更整齐。6 周组:模型组关节软骨轻度损伤,软骨表层不平整,无裂痕,有少量簇集的软骨细胞,染色稍有不均。治疗组软骨表层较平整,无明显的簇集软骨细胞。8 周组:模型组软骨面轻度糜烂,表面不平整,软骨细胞排列紊乱,簇集的软骨细胞增多,治疗组无明显的簇集软骨细胞,染色较均匀。见图 1。

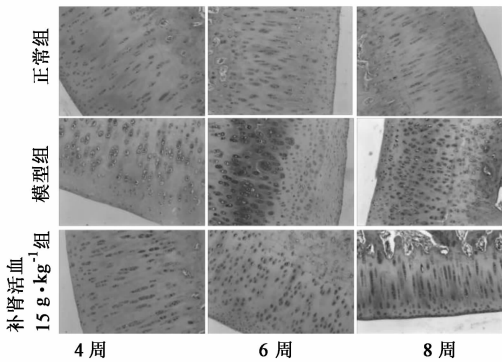
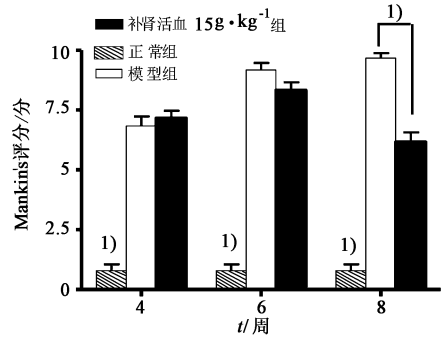


图 1 股骨髌软骨组织切片染色(HE,  $\times 100$ )

**3.2 Mankin's 评分** 与正常组比较,模型组术后 4,

6,8 周 Mankin's 评分显著高于正常组;与模型组比较,术后 6 周,补肾活血方组 Mankin's 评分有降低的趋势,至第 8 周,两组差异非常显著 ( $P < 0.001$ ),提示补肾活血方对于骨性关节炎的修复,随着治疗时间的延长,骨性关节炎修复愈佳。见图 2。



与同期模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.001$

图 2 软骨组织切片 Mankin's 评分 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

**3.3 IL-1 $\beta$ , MMP-2, TNF- $\alpha$  含量检测**

**3.3.1 对血清 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  含量的影响** 与正常组比较,造模 4,6,8 周模型组 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  均显著升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较,补肾活血方 4,6,8 周各时间点 IL-1 $\beta$  显著降低 ( $P < 0.05$ ); TNF- $\alpha$  仅 6 周时显著降低 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

**3.3.2 关节液 MMP-2 含量** 与正常组比较,造模 4,6 周模型组关节液中 MMP-2 显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较在给药第 6 周时,补肾活血方能显著降低 MMP-2 的表达 ( $P < 0.01$ ),在第 4 周和第 8 周两组比较无显著性差异。见表 2。

**4 讨论**

膝骨关节炎不论外伤还是劳损,其发病与肝、脾、肾亏虚,风、寒、湿及瘀血客于局部有关,最终都导致局部血瘀气滞,经络痹阻不通而发病。其主要病机是“虚与阻”,虚主要是肝肾虚、血虚;阻主要是血瘀气滞,寒凝等,为本虚标实之证。治疗宜补益肝

表 2 补肾活血方对 IL-1 $\beta$ , MMP-2, TNF- $\alpha$  含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

时间/周	组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	血清 IL-1 $\beta$ /ng·L <sup>-1</sup>	血清 TNF- $\alpha$ /ng·L <sup>-1</sup>	关节液 MMP-2/ $\mu$ g·L <sup>-1</sup>
4	正常	-	0.95 $\pm$ 0.25	85.61 $\pm$ 15.98	0.17 $\pm$ 0.02
	模型	-	2.24 $\pm$ 0.22 <sup>2)</sup>	190.20 $\pm$ 22.66 <sup>2)</sup>	0.33 $\pm$ 0.04 <sup>2)</sup>
	补肾活血	15	1.76 $\pm$ 0.22	154.70 $\pm$ 13.06	0.29 $\pm$ 0.02
6	模型	-	1.88 $\pm$ 0.08 <sup>2)</sup>	181.90 $\pm$ 10.52 <sup>2)</sup>	0.32 $\pm$ 0.03 <sup>2)</sup>
	补肾活血	15	1.48 $\pm$ 0.21	123.90 $\pm$ 9.92 <sup>3)</sup>	0.18 $\pm$ 0.02 <sup>4)</sup>
8	模型	-	1.81 $\pm$ 0.10 <sup>1)</sup>	107.01 $\pm$ 12.15	0.22 $\pm$ 0.04
	补肾活血	15	0.99 $\pm$ 0.08 <sup>3)</sup>	123.10 $\pm$ 11.28	0.26 $\pm$ 0.04

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ 。

肾、活血化瘀、行气止痛、通经活络为主<sup>[4]</sup>。另一方面,骨关节炎会表现出自我修复的征象,但这种自我修复缺乏适当的调控,常出现矫枉过正或不及的现象,不利的修复会破坏骨关节、限制关节活动、压迫临近组织、导致疼痛和关节功能丧失。因此,相对于手术疗法副作用大、费用高、手术风险大等负面因素,中医药保守疗法针对早、中期病者的治疗有很大的优势,且治疗后复发率较西医疗法低。

本实验通过手术法复制兔膝骨关节炎模型并给予补肾活血中药干预治疗,检测组织结构病变修复及对软骨损伤具有重要作用的炎症细胞因子在病变过程中的表达,以明确补肾活血中药对其的调节作用。结果显示,补肾活血方在软骨修复和 IL-1 $\beta$  表达方面,治疗组与模型组相比,在第 4、6 周虽没有显著性差异,但在第 8 周随着治疗时间的延长治疗组差异逐渐明显,说明补肾活血方能够促进软骨修复,并显著降低了 IL-1 $\beta$  的表达。证实了中药疗法起效虽慢,但作用持久,副作用小,也提示骨关节炎软骨损伤可能与 IL-1 $\beta$  异常高表达有关,防治作用可能是通过抑制 IL-1 $\beta$  的分泌而实现的,这与前人研究结论一致<sup>[5]</sup>。此外,有报道指出基质金属蛋白酶可降解关节中的骨基质<sup>[6-7]</sup>,临床上已证实 MMPs 血清浓度在 OA 患者明显升高<sup>[8]</sup>,而 TNF- $\alpha$  能诱导其他细胞因子,包括 IL-1 的产生,同时 IL-1 又能提高 TNF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  在软骨及滑膜中表达与炎症反应的严重程度呈正相关<sup>[9]</sup>。本实验结果中治疗组在第 6 周 MMP-2, TNF- $\alpha$  的表达显著降低,说明补肾活血方可降低 MMP-2, TNF- $\alpha$  水平,提示关节炎早期治疗的重要性,也进一步证实了前人的研究结论,在 OA 的发病过程中炎症因子发挥了很大的作用,并且 IL-1 $\beta$  的表达与 MMP-2、TNF- $\alpha$  的表达有一定的相关性。本实验中所用补肾活血方是自拟复方中药,此次研究对补肾活血方在临床应用方面有很大

的指导意义,但由于中药成分复杂,除了对炎症细胞因子的调控作用外,更进一步的探索其可能的促进软骨修复的机制是非常必要的。

#### [参考文献]

- [1] 韩国栋,蒋再轶,谭洁,等. 仙灵骨葆胶囊联合盐酸氨基葡萄糖片治疗膝骨性关节炎[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 263.
- [2] 宋震坤,陈文照. 环氧化酶-2 与关节炎[J]. 中国骨伤, 2003, 16(5): 314.
- [3] 周军,刘晓海,宋亚玲,等. 抗骨增生胶囊对大鼠骨性关节炎的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(19): 145.
- [4] 高戈,吴轟,田静,等. 补肾活络祛痹方治疗膝骨关节炎临床疗效及其对血液流变学、抗炎、抗氧化的影响[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(3): 390.
- [5] 黄剑,卓廉士,彭支莲,等. 电针对家兔膝骨关节炎模型关节液中 IL-1、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2007, 15(3): 17.
- [6] Shibakawa A, Yudoh K, Masuko-Hongo K, et al. The role of subchondral bone resorption pits in osteoarthritis: MMP production by cells derived from bone marrow[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2005, 13(8): 679.
- [7] Chang H H, Wu C B, Chen Y J, et al. MMP-3 response to compressive forces in vitro and in vivo [J]. J Dent Res, 2008, 87(7): 692.
- [8] Naito K, Takahashi M, Kushida K, et al. Measurement of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in patients with knee osteoarthritis [J]: Comparison with generalized osteoarthritis. Rheumatology (Oxford), 1999, 38(6): 510.
- [9] 林梓凌,樊粤光,赵京涛. 补肾活血方药对膝关节骨折术后功能恢复的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 6(15): 209.

[责任编辑 聂淑琴]