

麝香乌龙丸对兔膝关节炎软骨组织形态 及 p38MAPK, Caspase-3 表达的影响

高润成¹, 王志文^{1*}, 袁强², 张爱国², 杨雨旻¹, 李怡良¹, 项南¹

(1. 河北联合大学, 河北 唐山 063000; 2. 河北联合大学附属医院, 河北 唐山 063000)

[摘要] 目的: 观察兔膝关节炎(KOA)软骨组织形态及 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)、半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 3(Caspase-3)的表达, 探讨麝香乌龙丸治疗兔 KOA 的作用机制。方法: 将 40 只成年雄性大耳白兔, 随机分为正常组(A)10 只, 造模组 30 只。采用关节腔内注射 1.6% 木瓜蛋白酶方法建立兔 KOA 模型, 造模成功后随机分为模型组(B)、麝香乌龙丸低、高剂量组(C, D, $n = 10$), ig 给予麝香乌龙丸 $0.6, 1.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 灌胃 4 周后处死动物切取软骨组织, 观察软骨组织形态变化, 免疫组化染色检测关节软骨细胞中 p38MAPK, Caspase-3 的表达。结果: 麝香乌龙丸低、高剂量组均能减轻兔软骨的病理损害, 与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 麝香乌龙丸低、高剂量组均能降低软骨中 p38MAPK 及 Caspase-3 表达, 与模型组比较具有显著差异($P < 0.01$)。结论: 麝香乌龙丸能够减轻兔骨关节炎软骨病理损害; 麝香乌龙丸治疗骨关节炎的机制, 与其能降低 p38MAPK, Caspase-3 的表达, 抑制软骨细胞过度凋亡有关。

[关键词] 麝香乌龙丸; 骨关节炎; 软骨; p38 丝裂原活化蛋白激酶; 半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 3

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0228-04

[doi] 10.11653/syfy2013110228

Effect of Shexiang Wulong Pill on Pathomorphology and Expression of p38 MAPK and Caspase-3 of Cartilage in Rabbits with KOA

GAO Run-cheng¹, WANG Zhi-wen^{1*}, YUAN Qiang², ZHANG Ai-guo²,

YANG Yu-yang¹, LI Yi-liang¹, XIANG Nan¹

(1. Hebei United University, Tangshan 063000, China;

2. The Affiliated Hospital of Hebei United University, Tangshan 063000, China)

[Abstract] **Objective:** To study expression of p38 mitogen-activated proteinkinase (p38 MAPK) and Caspase-3 in cartilage of the rabbit of knee osteoarthritis (KOA), and discuss the possible mechanisms by Shexiang Wulong pill in treatment of osteoarthritis. **Method:** Forty only adult male rabbits were randomly divided into 4 group he control group, the model group, high dose group and low dose group of Shexiang Wulong pill ($n = 10$). 1.6% papain protein was injected to the rabbit knee joint cavity to establish rabbit knee osteoarthritis model, Shexiang Wulong pill groups were ig treated with Shexiang Wulong pill $0.6, 1.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ for 4 weeks. To observe the pathomorphology of cartilage HE staining was used and the expression levels of p38MAPK and caspase-3 was detected by immunohistochemistry technology. **Result:** Shexiang Wulong pill could alleviate the rabbit cartilage pathological changes. Compared with the model group, Shexiang Wulong pill could reduce the expression of p38MAPK and Caspase-3 in cartilage tissue ($P < 0.01$). **Conclusion:** The Shexiang Wulong pill may reduce expression of p38MAPK and Caspase-3, and inhibit excessive cartilage cell apoptosis-related.

[Key words] Shexiang Wulong pill; knee osteoarthritis; cartilage; p38MAPK; Caspase-3

[收稿日期] 20121123(012)

[第一作者] 高润成, 硕士生, 医师, 从事中医药防治风湿免疫疾病研究, Tel:15031584382, E-mail:runcheng321@126.com

[通讯作者] * 王志文, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 从事中医药防治风湿免疫疾病的基础与临床研究, Tel:0315-3726325; E-mail:wangzhiwen_1955@163.com

麝香乌龙丸是在宋·许叔微《普济本事方》“麝香圆”的基础上,结合多年临床经验和反复制剂工艺研究而成的纯中药制剂,其抗炎镇痛作用肯定^[1],在临床上对于膝关节炎患者治疗有满意疗效。为明确其作用机制,为临床应用提供更可靠的依据,本研究通过建立兔膝关节炎模型,观察麝香乌龙丸对关节软骨细胞中 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)、半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 3(Caspase-3)的表达的影响,以探讨麝香乌龙丸治疗膝关节炎的机制是否与抑制 p38MAPK, Caspase-3 的表达有关。

1 材料

1.1 药物 麝香乌龙丸(河北联合大学附属医院研制)药物组成:人工麝香、制川乌、生地龙、生全蝎、生黑豆;药物外观、崩解度、成分含量、质量、卫生学检查各项指标符合国家《药典》规定;批号冀药制字 Z20051581。

1.2 动物 健康雄性日本大耳白兔 40 只,体重(2.5±0.2)kg。分笼饲养,标准饲料喂养(河北联合大学实验动物中心提供)。饲养条件:温度(18~26℃)、相对湿度 50%~60%。

1.3 仪器及试剂 石蜡组织切片机(天津天利航空机电有限公司),光学显微镜(日本 Olympus 公司)。木瓜蛋白酶(天津市诺奥科技发展有限公司,活力 200 万单位/g),p38MAPK, Caspase-3 免疫组化试剂盒(北京博奥森生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组及造模 将 40 只实验白兔按体重从小到大进行编号,随机抽取 10 只作为正常组,其余 30 只进行造模。参照鬼头康彦^[2]等的兔膝关节炎的造模方法,于膝关节腔内注射 1.6% 木瓜蛋白酶生理盐水溶液 0.5 mL,于实验第 1,4,7 天各注射 1 次。造模成功后随机分成 3 组:模型对照组为 B 组,麝香乌龙丸低剂量组(简称麝低组)为 C 组,麝香乌龙丸高剂量组(简称麝高组)为 D 组,每组各 10 只。期间动物常规饲养。

2.2 给药 实验第 8 天起开始给药,C,D 组分别给予每只兔麝香乌龙丸 0.6, 1.2 g·kg⁻¹·d⁻¹。溶于 10 mL 生理盐水中 ig 4 周。期间 A,B 两组灌入等剂量生理盐水。

2.3 标本采集 灌胃结束后,切开右膝关节前正中区滑膜组织,以矢状位切取胫骨内侧髌软骨,取出软骨组织。4% 多聚甲醛溶液固定后,石蜡包埋,切片,作 HE 染色及免疫组织化学观察。

2.4 免疫组化流程 采用 PV 二步法,石蜡切片脱蜡;复合消化酶进行抗原修复;PBS 缓冲液洗涤 3 min×3 次;0.3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶,室温 10 min;PBS 缓冲液洗涤 3 min×3 次;滴加 p38MAPK, Caspase-3 抗体,4℃ 孵育过夜;PBS 缓冲液洗涤 3 min×3 次;滴加 PV6001 试剂盒中的试剂(抗兔抗体酶复合物),37℃ 孵育 30 min;PBS 缓冲液洗涤 3 min×3 次;DAB 镜检控制显色;流水冲洗 3 h 以上,以去除 DAB 残留物;苏木素复染,脱水、透明封片。

2.5 指标检测

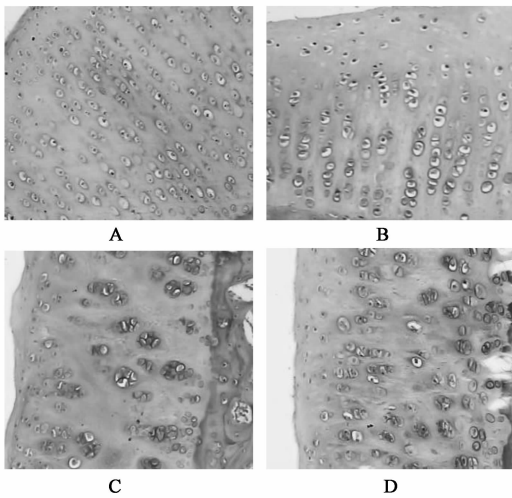
2.5.1 软骨病理形态评级 按关节软骨的破坏程度分 4 级,标准如下:Ⅰ级:关节软骨面光滑,未见软骨破坏及炎细胞浸润。Ⅱ级:关节软骨面粗糙,软骨细胞减少并见炎细胞浸润。Ⅲ级:关节软骨表层缺损,软骨结构较完整,软骨细胞缺失、排列紊乱。Ⅳ级:关节软骨面剥脱,软骨结构破坏,软骨下骨暴露。

2.5.2 软骨免疫组化 阳性表达均为棕黄色染色。采用 MOTIC6.0 图像采集与分析系统对 p38MAPK, Caspase-3 的表达进行分析,在 200 倍光镜下,每张切片随机取 6 个视野(其中 3 个位于软骨表层和中上层,3 个位于软骨中下层和下层),测定每个视野中 p38MAPK, Caspase-3 的阳性染色平均吸光度(A)。

2.6 数据处理 建立数据库,采用统计学软件 SPSS 16.0 进行分析,软骨病理评级的比较采用秩和检验;免疫组化结果所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,各组间比较方差齐性用 LSD 法检验,方差不齐采用 Dunnett 法检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 软骨形态学改变 A 组软骨细胞排列整齐,未见裂纹或缺损,未见软骨细胞变性、增生,潮线完整;B 组软骨层变薄,软骨细胞数量明显减少,以表层较甚,软骨有破碎现象,细胞排列紊乱,可见明显溃疡病变,少数可见潮线不完整或潮线上涨;C 组及 D 组可见软骨表面轻度的缺损现象,软骨细胞数量较 B 组增多,排列较整齐,潮线尚完整。见图 1。麝香乌龙丸低、高剂量组均能减轻兔软骨的病理改变,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),麝香乌龙丸低、高剂量组之间差异无统计学意义。见表 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 麝香乌龙丸 0.6 g·kg⁻¹ 组;
D. 麝香乌龙丸 1.2 g·kg⁻¹ 组 (图 2~3 同)

图 1 麝香乌龙丸对兔软骨组织形态学的影响 (HE, ×200)

表 1 麝香乌龙丸对兔关节软骨组织形态改变的影响 (n = 10) 只

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	关节软骨病理分级			
		I	II	III	IV
正常	-	10	0	0	0
模型	-	0	1	5	4 ¹⁾
麝香乌龙丸	0.6	0	6	3	1 ^{1,2)}
	1.2	0	7	2	1 ^{1,2)}

注:与正常组比较¹⁾ P < 0.01; 与模型组比较²⁾ P < 0.05, ³⁾ P < 0.01 (表 2 同)。

3.2 p38MAPK, Caspase-3 的表达水平 麝香乌龙丸低、高剂量组均能降低软骨中 p38MAPK、Caspase-3 表达,与模型组比较具有显著差异 (P < 0.01)。见表 2, 图 2~3。

表 2 麝香乌龙丸对 Caspase-3, p38MAPK 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) A

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Caspase-3	p38MAPK
正常	-	0.302 ± 0.027 ¹⁾	0.306 ± 0.023 ³⁾
模型	-	0.462 ± 0.034	0.477 ± 0.028
麝香乌龙丸	0.6	0.376 ± 0.027 ¹⁾	0.371 ± 0.035 ³⁾
	1.2	0.351 ± 0.030 ¹⁾	0.343 ± 0.036 ³⁾

4 讨论

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 典型的病理改变是关节软骨退行性改变和关节边缘新骨的形成^[3]。它的发生发展是一个长期、渐进的过程,涉及许多因素,其中细胞凋亡是 OA 关节软骨生物学反应的中心性特征,其对 OA 软骨破坏起着支配性的作用。软骨细胞凋亡是细胞在一定的生理或病理条件下,

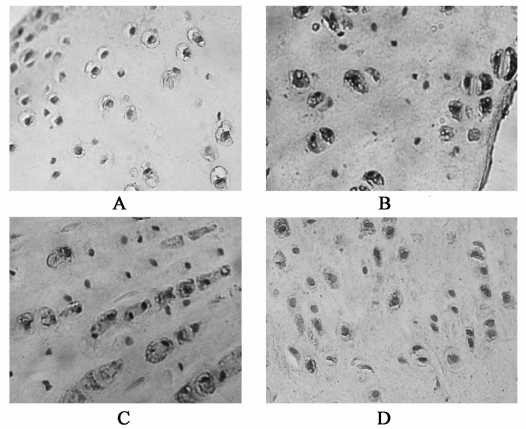


图 2 麝香乌龙丸对兔软骨 Caspase-3 表达的影响 (免疫组化, ×200)

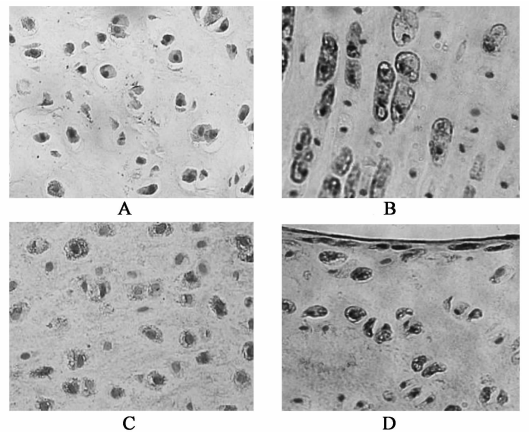


图 3 麝香乌龙丸对兔软骨 p38MAPK 表达的影响 (免疫组化, ×200)

遵循自身的程序,自主性死亡的过程,其发生是一个复杂的 Caspase 家族引导的蛋白酶级联反应过程。丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 活化后启动凋亡信号传导通路,作为凋亡程序中最后的执行者 Caspase-3 发挥重要的枢纽作用^[4-5],磷酸化的 p38MAPK 能够激活 Caspase-3 的活性,启动了凋亡通路^[6-7],活化的 Caspase-3 又进一步切割不同的底物,导致蛋白酶级联切割放大,最终促使细胞凋亡。p38 信号转导途径是 MAPK 途径的一种,被认为是细胞信息传递的交汇点和共同通路^[8-9]。在 CD45 诱导的软骨细胞凋亡中,p38 可激活 Caspase-3 介导软骨细胞凋亡信号的转导。此外,软骨细胞中的 p38 MAPK 可以被多种细胞因子、机械因素等所激活,它与软骨细胞表型的保持和分化、软骨细胞的肥大和钙化、凋亡、软骨基质金属蛋白酶的合成、软骨炎性细胞因子的产生等有密切关系,可能在关节炎的发生发展中发挥了重要作用^[10]。近年来的研究一致认为 p38 信号通路是关节软骨细胞凋亡的上游信号通路之一,

NO^[11], IL- β 均可以通过激活 p38 来诱导软骨细胞的凋亡, 阻断 p38 可以明显阻断骨性关节炎软骨细胞的凋亡。软骨细胞凋亡作为 OA 的发病机制的研究为防治 OA 提供了一个新的途径。

OA 归属于中医学“痹症”、“骨痹”等范畴,《内经》说:“风寒湿三气杂至, 合而为痹”。《类证治裁·痹症》:“诸痹……良由营卫先虚, 腠理不密, 风寒湿乘虚内袭。正气为邪阻, 不能宣行, 因而留滞, 气血凝涩, 久而成痹”; 均提示 OA 基本病机为正虚, 邪气滞留, 气血凝滞, 不通则痛。契合这一基本病机, 本院研制的麝香乌龙丸由人工麝香、制川乌、生地龙、生全蝎、生黑豆组成, 具有补益肝肾、行血通络、消肿止痛、温阳散寒、驱风解痉之功效, 药简而力专, 临床治疗 OA 疗效满意。

本实验显示麝香乌龙丸低、高剂量组均能降低软骨中 p38MAPK, Caspase-3 的表达, 与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。实验研究表明, 麝香乌龙丸能改善兔膝关节软骨病理损害, 降低兔膝关节炎组软骨细胞中 p38MAPK、Caspase-3 的表达, 抑制软骨细胞过度凋亡, 延缓软骨退变, 促进软骨修复, 缓解骨关节炎疼痛。本实验存在的不足: 抑制软骨细胞过度凋亡的程度与麝香乌龙丸剂量高低的关系尚未明确, 本实验未显示有统计学差异, 以后可采取麝香乌龙丸多剂量组进一步探讨剂量高低对软骨细胞凋亡的影响。

[参考文献]

- [1] 王志文, 张爱国, 袁强, 等. 麝香乌龙丸抗炎及镇痛药理研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(3): 584.
- [2] Kitoh Y, Katsuramaki T, Tanaka H, et al. Effect of SL-1010 (Sodium hyaluronate with high molecular weight) on experimental osteoarthritis induced by intra-articularly

- applied papain in rabbits[J]. Folia Pharmacol Japon, 1992, 100(1): 67.
- [3] 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.
- [4] 张伟, 周初, 陈培辉. 人类 caspase 家族蛋白酶与凋亡[J]. 国外医学: 遗传学分册, 1999, 22(6): 290.
- [5] Eamshaw W C, Martins M, Kaufmann S H. Mammalian caspase; structure, activation, substrates, and functions during apoptosis[J]. Annu Rev Biochem, 1999, 68(1): 383.
- [6] Wang M, Tsai B M, Turrentine M W, et al. p38 mitogen activated protein kinase mediates both death signaling and functional depression in the heart[J]. Ann Thorac Surg, 2005, 80(6): 2235.
- [7] Hattori H, Shibata M, Sugaya T, et al. Delayed phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase in the AT1 a knock-out mouse striatal neurons during middle cerebral artery occlusion and reperfusion[J]. Neurosci Lett, 2003, 341(1): 9.
- [8] 孙佳, 赵冬耕, 王明艳, 等. 槲皮素对 SMMC-7721 肝癌细胞 PI3K/AKT 信号通路影响的探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(18): 223.
- [9] 刘斌, 毛文静, 李爱春, 等. 参芎化瘀胶囊对血管性痴呆大鼠海马 CA1 区 p38 丝裂原活化蛋白激酶表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(8): 161.
- [10] 王贤波, 蒋青. p38MAPK 信号转导途径在关节软骨细胞中的激活和作用[J]. 细胞生物学杂志, 2005, 27(1): 48.
- [11] 潘会君, 唐宁, 华晓东, 等. 中药调控一氧化氮合酶—一氧化氮系统的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(12): 202.

[责任编辑 聂淑琴]