

抗骨增生胶囊对大鼠骨性关节炎的实验研究

周军^{1,2}, 刘晓海^{1,2}, 宋亚玲^{1,2}, 吕耀中^{1,2}, 王振中^{1,2}, 萧伟^{1,2*}

(1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001;

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001)

[摘要] **目的:**探讨抗骨增生胶囊(KGZSJN)对实验性大鼠骨关节炎(OA)的影响。**方法:**大鼠膝关节腔注射 4% 木瓜蛋白酶建立 OA 模型, 50 只大鼠分为 5 组, 即正常组, 模型组, KGZSJN 3 个剂量 ig 给予(0.24, 0.48, 0.96 g·kg⁻¹)。末次注射木瓜蛋白酶 1 周后, 开始给药。6 周后处死动物, 切取膝关节, 进行组织学观察, 并检测关节滑膜超氧化物歧化酶(SOD), 丙二醛(MDA)活性以及血清一氧化氮(NO), 一氧化氮合酶(NOS), 白介素-1 β (IL-1 β), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的水平。**结果:**KGZSJN 可以明显改善 OA 的膝关节病变; KGZSJN 提高关节滑膜 SOD 的活性, 降低关节滑膜 MDA 水平; KGZSJN 降低血清 NO, NOS, IL-1 β , TNF- α 的水平。**结论:**KGZSJN 能有效防治大鼠实验性 OA, 其效应在一定范围内呈剂量依赖性, 其机制可能为提高关节滑膜 SOD 的活性, 降低关节滑膜 MDA, 抑制血清 NO, NOS, IL-1 β , TNF- α 水平。

[关键词] 抗骨增生胶囊; 骨性关节炎; 机制研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0145-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120727.1038.006.html>

[网络出版时间] 2012-07-27 10:38

Effects and Mechanism of Kanggu Zengsheng Jiaonang on Osteoarthritis in Rats

ZHOU Jun^{1,2}, LIU Xiao-hai^{1,2}, SONG Ya-ling^{1,2}, LV Yao-zhong^{1,2}, WANG Zhen-zhong^{1,2}, XIAO Wei^{1,2*}

(1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Company Limited, Lianyungang 222001, China;

2. State Key Laboratory of Pharmaceutical New-tech for Chinese Medicine, Lianyungang 222001, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of Kanggu Zengsheng Jiaonang (KGZSJN) on experimental osteoarthritis in rats. **Method:** Animal models of osteoarthritis were obtained in rats by intra-articular injection of 4% papain for three times. Fifty rats were divided into five groups as normal group, model group, and three KGZSJN treatment groups. The animals began receiving drug orally every day one week after the last injection of papain. Six weeks later, all the animals were sacrificed for analysis. Histological examinations were performed on the articular cartilage. In the same time, the activities of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in synovium were measured, the levels of nitric oxide (NO), nitric oxide synthase (NOS), interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum were measured respectively. **Result:** KGZSJN could significantly reverse cartilage degeneration, and enhanced the activity of SOD in synovium, KGZSJN reduced the activity of MDA in synovium, and the levels of NO, NOS, IL-1 β , TNF- α in serum. **Conclusion:** KGZSJN can provide some protection in a dose-dependent manner in this model. The mechanisms are related to the reduction of expression of MDA, NO, NOS, IL-1 β , TNF- α , and enhance the activities of SOD.

[Key words] Kanggu Zengsheng Jiaonang; osteoarthritis; mechanism

[收稿日期] 20111021(007)

[基金项目] 国家科技“973 计划”项目(2010CB735604)

[第一作者] 周军, 药理学硕士, 工程师, 主要从事新药药理学研究, Tel:0518-85521946, E-mail: zj272000@sohu.com

[通讯作者] * 萧伟, 博士, 研究员, 从事中药制剂的研究与开发, Tel:0518-85521933, E-mail: wzhzh - nj@tom.com

骨关节炎(OA)是一种多发于老年人的慢性退行性骨关节疾病,以关节软骨的退行性变,伴有半月板和滑膜病变为主要病理改变的疾患^[1]。属于中医学骨痹、痹证范畴。近年来,中医药治疗 OA 有很大进展,研究者从不同的侧面、不同的观测指标为中医药治疗 OA 提供了客观依据^[2]。抗骨增生胶囊(KGZSJN)由熟地黄、肉苁蓉、淫羊藿、女贞子、骨碎补和鸡血藤等组成,主要功效为补腰肾,强筋骨,活血止痛,用于 OA 肝肾不足、瘀血阻络证,关节肿胀、麻木、疼痛、活动受限等。目前,KGZSJN 主要用于颈椎病等关节退行性疾病的治疗^[3],但对 OA 研究报道较少,且其作用机制不明。本实验通过建立大鼠 OA 模型,观察 KGZSJN 对 OA 的作用,并探讨其作用机制,为临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠,浙江省实验动物中心,许可证号 SCXK(浙)2008-0033,在标准实验室条件下饲养。

1.2 药品及试剂 KGZSJN(江苏康缘药业股份有限公司,批号 100201),木瓜蛋白酶(Sigma 公司,批号 P3250),超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(20101203),丙二醛(MDA)试剂盒(批号 20101201),一氧化氮(NO)试剂盒(批号 20101229),一氧化氮合酶(NOS)试剂盒(批号

20101227)均由南京建成生物工程研究所提供;肿瘤坏死因子(TNF- α)放免试剂盒(批号 20110105),白细胞介素 1 β (IL-1 β)放免试剂盒提供(批号 20110108),均由北京华英生物技术研究所提供。

1.3 仪器 DNM-9602G 型酶标仪(北京普朗新技术有限公司),UV-2550 型紫外分光光度仪,(日本岛津公司)。

2 方法

2.1 模型的制备、分组及给药 参考文献方法制备 OA 大鼠模型^[4]。SD 大鼠随机分为正常组、OA 模型组、KGZSJN 低、中、高 3 个剂量(0.24,0.48,0.96 g·kg⁻¹),每组 10 只。除正常组外,每鼠双膝关节注射 4% 的木瓜蛋白酶生理盐水溶液 0.15mL,每隔 3 d 注射 1 次,连续 3 次。正常组每鼠双膝关节注射生理盐水 0.15 mL。末次注射木瓜蛋白酶后 1 周,开始给药,KGZSJN 低、中、高剂量组 ig 给予 0.24,0.48,0.96 g·kg⁻¹,正常组和模型组 ig 给予等体积的生理盐水,每天 1 次,连续 6 周。

2.2 检测指标

2.2.1 膝关节形态学观察 实验结束后剖取左膝关节,经 10% 甲醛溶液固定,常规取材,脱水,石蜡包埋,制片(4 μ m 厚),HE 染色,由病理专业人员在光学显微镜下阅片,检查滑膜炎症和软骨的侵蚀等病变,进行软骨 Mankin's 评分^[5],评分标准见表 1。

表 1 关节软骨 Mankin's 评分标准

软骨结构	分值/分	软骨细胞	分值/分	染色程度	分值/分	潮线完整性	分值/分
光整如常	0	数量如常	0	正常	0	完整	0
表面不规则裂隙	1	数量弥漫性增多	1	染色轻度减退	1	多重潮线	1
裂隙深达移行层	2	大量簇集样细胞团	2	染色中度减退	2	软骨血管入侵潮线	2
裂隙深达辐射层	3	数量明显减少	3	染色重度减退	3		
裂隙深达钙化层	4	染色完全消失	4				
软骨层脱落	5						

2.2.2 关节滑膜 SOD 和 MDA 的检测 切开右膝关节,切取关节滑膜,置匀浆管匀浆,-20 $^{\circ}$ C 保存。用紫外分光法测定 SOD 的活性,硫代巴比妥法测定 MDA。

2.2.3 血清细胞因子 NO,NOS,IL-1 β ,TNF- α 的检测 实验结束腹主动脉采血 5 mL,分离血清,-20 $^{\circ}$ C 保存。用硝酸还原酶法测定 NO,紫外分光法测定 NOS,放免法测定 IL-1 β 和 TNF- α 。

2.3 统计学分析 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用统计软件 SPSS 11.5 进行组间 *t* 检验比较。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 膝关节形态学观察以及 Mankin's 评分 正常组关节软骨完整,滑膜组织排列规则。OA 模型组关节软骨表面不平滑,滑膜细胞明显增生,并可见明显的炎细胞浸润。KGZSJN 治疗组形态学变化程度较 OA 模型组有所减轻,主要表现为关节软骨退行性变程度减轻,周围软组织炎症减轻。结果见图 1 和图 2。同时,按 Mankin's 评分标准评分并进行统计,结果显示:与模型组相比 KGZSJN 0.48,0.96 g·kg⁻¹ 组均降低了 Mankin's 评分 ($P < 0.05, P < 0.01$),见表 2。

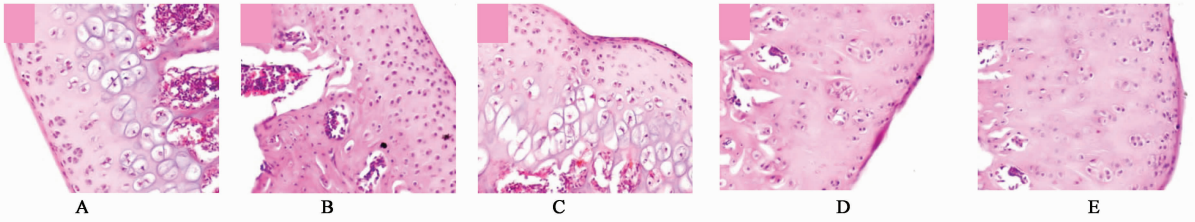
A. 正常组; B. 模型组; C. KGZSJN 0.24 g·kg⁻¹组; D. KGZSJN 0.48 g·kg⁻¹组; E. KGZSJN 0.96 g·kg⁻¹组(图2同)

图1 KGZSJN对OA大鼠膝关节软骨形态学的影响(HE染色, ×200)

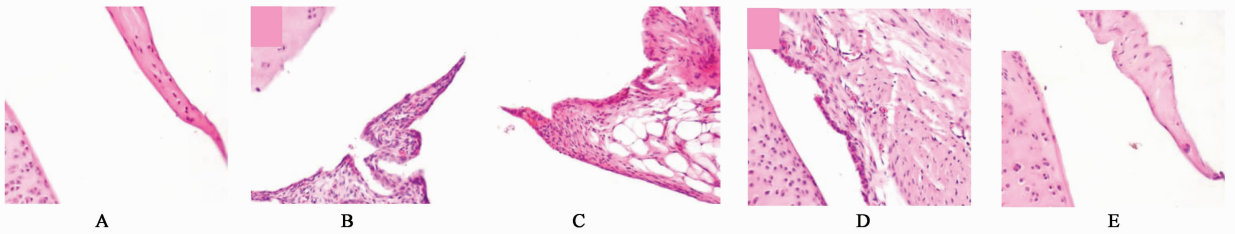


图2 KGZSJN对OA大鼠膝关节滑膜形态学的影响(HE染色, ×200)

表2 各组关节软骨的Mankin's评分($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Mankin's 评分/分
正常	-	0
OA 模型	-	6.14 ± 0.94
OA + KGZSJN	0.24	5.71 ± 1.26
	0.48	4.91 ± 1.09 ¹⁾
	0.96	3.34 ± 1.12 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01。

3.2 KGZSJN对OA大鼠关节滑膜SOD和MDA的影响 模型组大鼠关节滑膜SOD明显降低,与正常组相比差异显著($P < 0.05$)。KGZSJN(0.48, 0.96 g·kg⁻¹)组可以明显提高SOD活性,与模型组相比差异显著($P < 0.05, P < 0.01$);同时模型组大鼠关节滑膜MDA明显升高,与正常组相比差异显著($P < 0.05$)。KGZSJN(0.96 g·kg⁻¹)组可以明显降低MDA的含量,与模型组相比差异显著($P < 0.05$)。见表3。

3.3 KGZSJN对血清细胞因子NO, NOS, IL-1 β ,

表4 KGZSJN对OA大鼠血清NO, NOS, IL-1 β , TNF- α 的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NO/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	NOS/U·mL ⁻¹	IL-1 β / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	TNF- α / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	11.80 ± 1.72	20.28 ± 2.58	0.27 ± 0.02	1.16 ± 0.31
OA 模型	-	13.44 ± 1.59 ¹⁾	23.23 ± 2.20 ¹⁾	0.30 ± 0.03 ¹⁾	1.56 ± 0.37 ¹⁾
OA + KGZSJN	0.24	13.26 ± 2.07	22.93 ± 2.59	0.30 ± 0.06	1.21 ± 0.25 ²⁾
	0.48	11.58 ± 1.93 ²⁾	19.95 ± 2.02 ³⁾	0.26 ± 0.02 ³⁾	0.98 ± 0.34 ³⁾
	0.96	11.11 ± 1.86 ³⁾	19.42 ± 2.16 ⁴⁾	0.25 ± 0.03 ⁴⁾	0.87 ± 0.37 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾P < 0.05;与模型组比较²⁾P < 0.05, ³⁾P < 0.01, ⁴⁾P < 0.001。

4 讨论

目前制作OA动物模型主要有手术方法、药物

表3 KGZSJN对OA大鼠关节滑膜SOD和MDA的影响

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SOD/U·mL ⁻¹	MDA/nmol·mL ⁻¹
正常	-	14.79 ± 0.38	15.33 ± 2.71
OA 模型	-	14.42 ± 0.37 ¹⁾	17.78 ± 2.28 ¹⁾
OA + KGZSJN	0.24	14.39 ± 0.44	17.36 ± 2.96
	0.48	14.91 ± 0.48 ²⁾	15.29 ± 3.03
	0.96	15.05 ± 0.53 ³⁾	14.87 ± 2.79 ²⁾

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

TNF- α 的影响 模型组大鼠血清NO, NOS, IL-1 β , TNF- α 水平明显升高,与正常组相比差异显著($P < 0.05$)。KGZSJN(0.48, 0.96 g·kg⁻¹)可以明显降低NO, NOS, IL-1 β 的活性,与模型组相比差异显著($P < 0.05 \sim P < 0.001$)。KGZSJN 3个剂量组可降低血清TNF- α 的含量($P < 0.05 \sim P < 0.001$),并呈剂量依赖性。见表4。

注射和关节制动等方法。本实验采用膝关节内注入木瓜蛋白酶的方法复制骨关节炎模型,造模后病理

学显示,膝关节软骨表面不平滑,出现多个裂隙,软骨细胞排列不整齐,并可见核固缩或核碎裂;滑膜细胞明显增生、排列紊乱,滑膜组织充血水肿,毛细血管增生,并可见明显的炎细胞浸润,这些改变符合骨性关节炎的病理学特征,提示造模成功。

KGZSJN 由熟地黄、肉苁蓉、淫羊藿、女贞子、骨碎补和鸡血藤等组成,可以清除氧自由基,使退变椎间盘内蛋白质合成增加,修补退变中的胶原纤维;抑制单核细胞和巨噬细胞产生 IL-1,改善软骨细胞功能,推迟细胞退行性病变^[6]。本实验结果表明,OA 大鼠 ig KGZSJN 后,膝关节损伤较模型组明显减轻,主要表现为关节软骨退行性变程度减轻,周围软组织炎症略有减轻,浸润炎细胞数量减少,提示 KGZSJN 具有改善 OA 病变的作用。

OA 的发病机制尚不明确,目前认为它既是一种退行性过程,又有慢性炎症参与^[7]。氧自由基损伤是关节衰老和变性的重要因素,刘春芳等报道,降低血清中 NO 和 MDA 含量,增强 SOD 活性,可以延缓和抑制骨关节炎小鼠软骨退行性改变和滑膜炎症^[8]。本实验结果表明,KGZSJN 可以提高大鼠关节滑膜 SOD 活性,降低关节滑膜 MDA 水平,提示 KGZSJN 通过具有清除氧自由基,从而促进关节软骨退变的恢复的作用。现代分子生物学研究表明,细胞因子在 OA 发病中起着重要的作用^[9]。Antonella Fioravanti 等报道,IL-1 β 可诱导软骨组织的降解并且抑制软骨细胞基质的合成,IL-1 β 也可促进软骨细胞分泌促炎性细胞因子、趋化因子、基质金属蛋白酶 (MMPs) 和 NO 等,加重软骨的破坏^[10]。本实验结果表明,KGZSJN 可以抑制 OA 大鼠血清 NO, NOS, IL-1 β , TNF- α 的表达,从而减轻细胞因子和炎性因子介导的软骨损害。

综上所述,KGZSJN 可以改善 OA 大鼠膝关节的

退行性改变,具有防治 OA 的作用,其机制可能为提高关节滑膜 SOD 的活性,清除氧自由基;降低关节滑膜 MDA 水平,抑制氧化反应;抑制血清炎性因子 NO, NOS, IL-1 β , TNF- α 的表达,减轻 OA 诱发的免疫炎性反应。

[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] 任婕. 消痹灵注射液对退行性骨性关节炎的防治作用及其机理研究[D]. 武汉:湖北中医学院,2009.
- [3] 陈履平,李龙. 抗骨增生胶囊治疗膝骨性关节炎的临床观察[J]. 实用临床医药杂志,2010,14(15):98.
- [4] 胡爱心,陈廖斌,汪晖,等. 黄芪多糖对大鼠骨关节炎的影响[J]. 武汉大学学报:医学版,2008,29(2):157.
- [5] 范李. 辛伐他汀防治骨关节炎的实验研究[D]. 武汉:华中科技大学,2010.
- [6] 赵晓勇,苏江宁,孙喜龙,等. 抗骨增生胶囊与葡立胶囊联用对兔颈椎间盘退变的影响[J]. 中国康复医学杂志,2005,20(12):894.
- [7] 余建华,张衡. 独活寄生汤治疗膝骨关节炎临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(7):215.
- [8] 刘春芳,林娜,陈卫衡,等. 骨痹散防治小鼠膝骨关节炎的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(1):55.
- [9] 吴银松. 辛伐他汀对骨性关节炎软骨保护作用的实验研究[D]. 西安:第四军医大学,2007.
- [10] Antonella F, Giulia C, Angela P, et, al. Effect of hydrostatic pressure of various magnitudes on osteoarthritic chondrocytes exposed to IL-1 β [J]. Indian J Med Res,2010,132:209.

[责任编辑 聂淑琴]