

止痛健骨方对兔膝关节炎软骨 IKK α 及 NF- κ B mRNA 的影响

苏新平¹ 朱克俭^{1△} 谭旭仪¹ 何灿宇¹ 黄刚² 张堃³

[摘要] 目的:观察止痛健骨方对兔膝关节炎软骨 IKK α 及 NF- κ B mRNA 的影响。方法:将 90 只白兔随机分为正常对照组、模型对照组、阳性对照组、止痛健骨低剂量组、止痛健骨高剂量组,每组各 18 只,采用木瓜蛋白酶制备兔膝关节炎模型,止痛健骨低剂量组、止痛健骨高剂量组分别给与止痛健骨方低剂量、高剂量药物灌胃,阳性对照组给与盐酸氨基葡萄糖片灌胃,用量 0.067 2 g/kg,正常对照组和模型对照组则给与生理盐水灌胃。在模型组、实验组灌胃第 4 周、第 8 周三个时间点,各组随机选择 6 只白兔,检测软骨 IKK α 及 NF- κ B mRNA 表达水平,进行对比分析。结果:在实验干预前、实验干预第 4 周,与正常对照组比较,模型对照组、阳性对照组、止痛健骨低剂量组、止痛健骨高剂量组软骨 IKK α 及 NF- κ B mRNA 表达增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型对照组比较,阳性对照组、止痛健骨低剂量组、止痛健骨高剂量组第 4 周、第 8 周软骨 IKK α 及 NF- κ B mRNA 表达下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:止痛健骨方能降低兔 KOA 模型关节软骨 IKK α 及 NF- κ B mRNA 表达,这可能为其治疗 KOA 的作用机理。

[关键词] 止痛健骨方;兔;膝关节炎;IKB 激酶 α ;核因子 κ B

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]**1005-0205(2017)10-0001-05

Expression of IKK α and NF- κ B mRNA for Zhitongjiangu Recipe on Cartilage of Knee Osteoarthritis

SU Xinping¹ ZHU Kejian^{1△} TAN Xu yi¹ HE Canyu¹ HUANG Gang² ZHANG Kun³

¹ Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medical Science, Changsha 410006, China;

² Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

³ The First Hospital, Affiliated to Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China.

Abstract Objective: To observe the expression of IKK α and NF- κ B mRNA for Zhitongjiangu recipe on cartilage of knee osteoarthritis(KOA). **Methods:** All 90 rabbits were randomly divided into normal control group, model control group, positive control group, Zhitongjiangu low dose group, and Zhitongjiangu high dose group, with 18 rats in each group. The rabbit model of KOA was successfully established by papain intra-articular injection. The rabbits in Zhitongjiangu low dose group and high dose group were give corresponding Zhitongjiangu recipe intragastric administration. The positive control group were given hydrochloride glucose tablets orally; and the normal control group and model control group were intragastrically administrated with the same dose of normal saline. The expression of IKK α and NF- κ B mRNA in cartilage were detected at baseline and at 4th weeks and 8th weeks after administrating. **Results:** The expression of IKK α and NF- κ B mRNA of model control group, positive control group, Zhitongjiangu low dose group, and Zhitongjiangu high dose group were significantly increased compared with the normal control group at baseline and at 4th weeks after administrating($P<0.05$). The expression of IKK α and NF- κ B mRNA of positive control group, Zhitongjiangu low dose group, and Zhitongjiangu high dose group were significantly decreased compared with the model control group at baseline and at 4th weeks and 8th weeks after administrating($P<0.05$). **Conclusion:** Zhitongjiangu recipe can decrease the expression of IKK α and NF- κ B mRNA on cartilage of KOA, which may be the mechanism for treating KOA.

基金项目:国家自然科学基金项目(81603482)

湖南省自然科学基金项目(2016JJ115)

湖南省中医药科研基金资助项目(2008035)

¹ 湖南省中医药研究院附属医院(长沙, 410006)

² 湖南中医药大学

³ 湖南中医药大学第一附属医院

△通信作者 E-mail: zkj0731@263.net

tongjiangu high dose group were significantly decreased compared with the model control group at baseline and at 4th weeks and 8th weeks after administrating($P<0.05$). **Conclusion:** Zhitongjiangu recipe can decrease the expression of IKK α and NF- κ B mRNA on cartilage of KOA, which may be the mechanism for treating KOA.

Keywords: Zhitongjiangu recipe; rabbit; knee osteoarthritis; IKK α ; NF- κ B

止痛健骨方由当归、白芥子、乳香、没药、丹参、鹿角霜等 12 味中药组成,系本院治疗膝骨关节炎的有效经验方,具有活血祛痰、通络止痛、强筋健骨的功能,前期研究发现该方能抑制滑膜增生,增加非钙化软骨厚度,延缓软骨退变^[1,2]。研究表明,NF-κB 信号通路参与并调控软骨细胞的增殖、分化和凋亡,在膝骨关节炎的发生、发展中扮演着十分重要的角色^[3,4]。因此,本实验拟观察止痛健骨方对兔 KOA 软骨 IKKα 及 NF-κB mRNA 的影响,探讨其对 NF-κB 信号通路的影响,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级新西兰健康成年大耳白兔共 90 只,雌雄各半,体质量约 2.0 kg,动物许可证号:SCXK(湘)2015-0008。

1.2 实验药物

止痛健骨方,当归 12 g,白芥子(炒)12 g,丹参 10.5 g,猪牙皂 1.5 g,鹿角霜 7.5 g,鳖甲 7.5 g,黄芪 9 g,乳香(醋制)7.5 g,没药(醋制)7.5 g 独活 3 g,千年健 9 g,陆英 9 g,共 12 味药,功效为活血祛痰,通络止痛,强筋健骨,从湖南省中医药研究院附属医院一次性购入,加水煎煮、水浴浓缩成分别含止痛健骨方生药浓度为 0.448 g/mL,0.896 g/mL(分别相当于人临床等效剂量的 1,2 倍)。盐酸氨基葡萄糖片(四川新斯顿制药有限公司,规格为 0.24 g×42,产品批号 2015150612)。

1.3 实验试剂

Trizol 总 RNA 提取试剂(北京康为世纪生物科技有限公司,2015F);逆转录试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司,批号 00191507);UltraSYBR 一步法荧光定量 PCR 试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司,批号 2913G);兔 IKKα mRNA 引物-F(南京金斯瑞生物科技有限公司,批号 D18257);兔 IKKα mRNA 引物-R(南京金斯瑞生物科技有限公司,批号 D18257);兔 NF-κB mRNA 引物-F(南京金斯瑞生物科技有限公司,批号 D11585);兔 NF-κB mRNA 引物-R(南京金斯瑞生物科技有限公司,批号 D11585);注射用青霉素钠(华北制药股份有限公司,规格为 80 万单位,产品批号 E1006301)。

1.4 实验方法

1.4.1 分组方法 90 只白兔适应性喂养 1 周后,精确称重,进行排序,按照随机数字表法随机分为正常对照组、模型对照组、阳性对照组、止痛健骨低剂量组、止痛健骨高剂量组,每组各 18 只。

1.4.2 造模方法 模型对照组、阳性对照组、止痛健骨低剂量组、止痛健骨高剂量组白兔均采用木瓜蛋白酶关节腔注射方法制备兔 KOA 模型^[5],方法如下:将兔仰卧位固定,取右后膝关节内侧,理发器备皮,医用碘伏对右后膝关节内侧常规消毒后,用 1 mL 注射器行膝关节穿刺,注射 1.6%木瓜蛋白酶溶液 0.3 mL,在造模开始第 1,4 及 7 天,1 次/d,共注射 3 次。正常对照组白兔右膝关节则给与同剂量生理盐水注射,末次注射木瓜蛋白酶 2 周后即可出现 KOA 改变,在该时间点进行 KOA 模型验证。验证步骤:耳缘静脉空气栓塞。解剖右后膝关节,观察股骨髁、胫骨平台关节面,若关节面出现暗淡,软骨不平整或有溃疡,即可认为造模成功。

1.4.3 实验干预 参照《药理实验方法学》中人-白兔等效剂量折算公式^[6],计算得出止痛健骨低剂量组白兔每 1 kg 体质量灌胃止痛健骨方 4.48 g(即 4.48 g/kg,相当于人临床等效剂量),止痛健骨低剂量组给与每天用含止痛健骨方生药浓度为 0.448 g/mL 灌胃,10 mL/(kg·d),止痛健骨高剂量组每天用含止痛健骨方生药浓度为 0.896 g/mL,10 mL/(kg·d)。阳性对照组每天灌胃盐酸氨基葡萄糖片 0.067 2 g/Kg,灌胃时需溶解到对应体积(10 mL/(kg·d))的生理盐水中,正常对照组和模型对照组则给与生理盐水灌胃,10 mL/(kg·d)。

1.5 观察指标及方法

在实验造模验证(即实验干预前)、干预第 4,8 周时,各组随机选取 6 只白兔,空气栓塞处死,显露出右膝关节,取右股骨外髁软骨,运用实时定量聚合酶链式技术(RT-qPCR)检测右膝关节软骨 IKKα mRNA 及 NF-κB mRNA 表达水平。实验步骤分为 Trizol 提取软骨细胞总 RNA,RNA 的琼脂糖凝胶电泳,RNA 反转录,RT-qPCR 步骤,实时定量 PCR(每个样本每个指标 3 个孔,共 30 μL 体系,每孔 10 μL),检测各组软骨 IKKα mRNA 及 NF-κB mRNA 相对表达量。扩增引物信息见表 1。

表 1 扩增引物信息

引物	上游引物	下游引物	产物大小(bp)
NF-κB	5'-CCCATCGGGTTCCTCCATAAAG-3'	5'-GCCTGAAGCAAATGTTGGCGTA-3'	146
IKKα	5'-GCAGACCGTGAACATCCTCT-3'	5'-TCCAGGACAGTGAACGAGTG-3'	202
actin	5'-CATCCTGCGTCTGGACCTGG-3'	5'-TAATGTACGCACGATTTC-3'	107

1.6 统计学方法

应用 SPSS 16.0 统计学软件对实验中检测的数据

进行统计分析,计量资料满足正态齐性和方差齐性时运用单因素方差分析,组间同一时间点两两比较采用

LSD 检验, 不满足时采用 Dunnett's T3 检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组白兔膝关节软骨 IKK α mRNA 比较

与正常对照组比较, 模型对照组、阳性对照组、止痛健骨低剂量组、止痛健骨高剂量组干预前、实验第 4 周 IKK α mRNA 表达均上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 模型对照组、阳性对照组、止痛健骨低剂量组、止痛健骨高剂量组四组互相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。实验第 4 周, 与模型对照组比较, 阳性对照组、止痛健骨低剂量组、止痛健骨高剂量组 IKK mRNA 表达下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 该三组互相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。实验第 8

周, 与正常对照组比较, 模型对照组、阳性对照组、止痛健骨低剂量组较 IKK α mRNA 表达上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但止痛健骨高剂量组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 与模型对照组比较, 阳性对照组、止痛健骨低剂量组、止痛健骨高剂量组 IKK α mRNA 表达下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。同时, 止痛健骨低剂量组、止痛健骨高剂量实验干预第 4 周、第 8 周 IKK mRNA 表达均较干预前明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明实验干预前兔 KOA 模型 IKK α mRNA 表达较正常白兔明显上升, 经止痛健骨方干预后, IKK α mRNA 表达较模型对照组下降, 至第 8 周时, 止痛健骨高剂量组已恢复至正常白兔水平, 见表 2。

表 2 各组白兔膝关节软骨 IKK α mRNA 结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	干预前	第 4 周	第 8 周
正常对照组		1.01 \pm 0.1	0.98 \pm 0.1	0.93 \pm 0.1
模型对照组		1.83 \pm 0.3 ¹⁾	1.99 \pm 0.3 ¹⁾	2.25 \pm 0.4 ¹⁾
阳性对照组	0.067 2	1.88 \pm 0.4 ¹⁾³⁾	1.52 \pm 0.2 ¹⁾⁴⁾	1.36 \pm 0.1 ¹⁾⁴⁾
止痛健骨低剂量组	4.48	1.85 \pm 0.3 ¹⁾³⁾⁵⁾	1.47 \pm 0.1 ¹⁾⁴⁾⁵⁾⁷⁾	1.35 \pm 0.1 ¹⁾⁴⁾⁵⁾⁷⁾
止痛健骨高剂量组	8.96	1.86 \pm 0.3 ¹⁾³⁾⁵⁾	1.39 \pm 0.1 ¹⁾⁴⁾⁵⁾⁷⁾	1.08 \pm 0.1 ²⁾⁴⁾⁶⁾⁷⁾

注: 组间比较, $F_{\text{干预前}}=8.786, F_{\text{第4周}}=18.734, F_{\text{第8周}}=28.917$; 与正常对照组比较, 1) $P < 0.05$, 2) $P > 0.05$; 与模型对照组比较, 3) $P > 0.05$, 4) $P < 0.05$; 与阳性对照组比较, 5) $P > 0.05$, 6) $P < 0.05$; 组内与干预前比较, 7) $P < 0.05$ 。

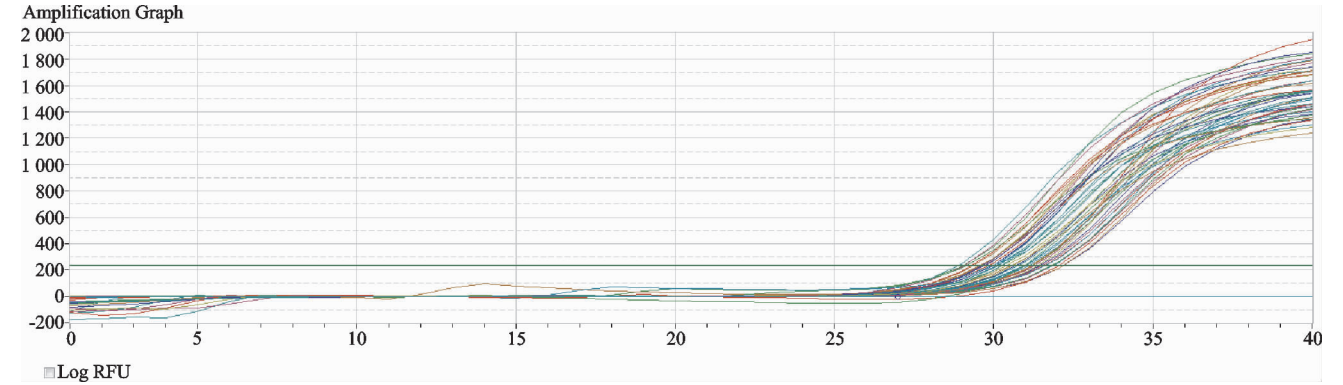


图 1 IKK α mRNA 扩增曲线图

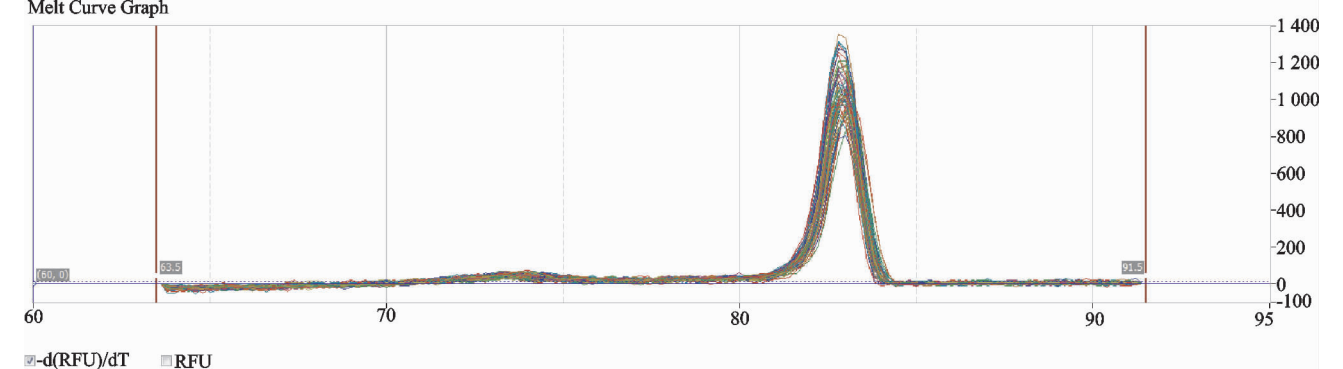


图 2 IKK α mRNA 溶解曲线图

2.2 各组白兔膝关节软骨 NF- κ B mRNA 比较

与正常对照组比较, 模型对照组、阳性对照组、止痛健骨低剂量组、止痛健骨高剂量组干预前、实验第 4 周 NF- κ B mRNA 表达均上升, 差异有统计学意义 ($P <$

0.05), 模型对照组、阳性对照组、止痛健骨低剂量组、止痛健骨高剂量组四组互相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。实验第 4 周, 与模型对照组比较, 阳性对照组、止痛健骨低剂量组、止痛健骨高剂量组 NF- κ B mRNA

表达下降,差异有统计学意义($P<0.05$),该三组互相比
较,差异无统计学意义($P>0.05$)。实验第 8 周,与正常
对照组比较,模型对照组、阳性对照组、止痛健骨低剂量
组较 NF- κ B mRNA 表达上升,差异有统计学意义($P<$
 0.05),但止痛健骨高剂量组差异无统计学意义($P>$
 0.05),与模型对照组比较,阳性对照组、止痛健骨低剂
量组、止痛健骨高剂量组 NF- κ B mRNA 表达下降,差异

有统计学意义($P<0.05$)。同时,止痛健骨低剂量组、止
痛健骨高剂量实验干预第 4 周、第 8 周 NF- κ B mRNA
表达均较干预前明显下降,差异有统计学意义($P<$
 0.05),表明实验干预前兔 KOA 模型 NF- κ B mRNA 表
达较正常白兔明显上升,经止痛健骨方干预后,NF- κ B
mRNA 表达较模型对照组下降,至第 8 周时,止痛健骨
高剂量组已恢复至正常白兔水平,见表 3。

表 3 各组白兔膝关节软骨 NF- κ B mRNA 比较($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量(g/kg)	干预前	第 4 周	第 8 周
正常对照组		1.04 \pm 0.1	0.93 \pm 0.1	0.91 \pm 0.1
模型对照组		1.82 \pm 0.2 ¹⁾	1.96 \pm 0.4 ¹⁾	2.26 \pm 0.4 ¹⁾
阳性对照组	0.067 2	1.78 \pm 0.2 ¹⁾³⁾	1.53 \pm 0.3 ¹⁾⁴⁾	1.38 \pm 0.1 ¹⁾⁴⁾
止痛健骨低剂量组	4.48	1.81 \pm 0.3 ¹⁾³⁾⁵⁾	1.49 \pm 0.1 ¹⁾⁴⁾⁵⁾⁷⁾	1.36 \pm 0.1 ¹⁾⁴⁾⁵⁾⁷⁾
止痛健骨高剂量组	8.96	1.82 \pm 0.3 ¹⁾⁴⁾⁵⁾	1.41 \pm 0.2 ¹⁾⁴⁾⁵⁾⁷⁾	1.06 \pm 0.1 ²⁾⁴⁾⁶⁾⁷⁾

注:组间比较, $F_{\text{干预前}}=11.372,F_{\text{第4周}}=18.734,F_{\text{第8周}}=28.917$;与正常对照组比较,1) $P<0.05$,2) $P>0.05$;与模型对照组比较,3) $P>0.05$,4) $P<0.05$;与阳性对照组比较,5) $P>0.05$,6) $P<0.05$;组内与干预前比较,7) $P<0.05$ 。

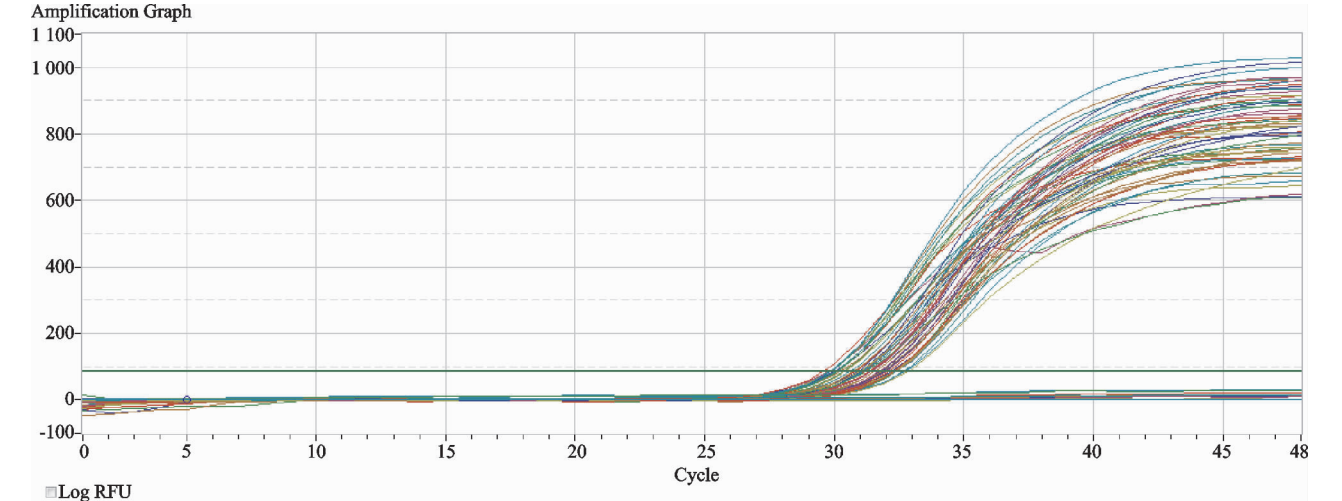


图 3 NF- κ B mRNA 扩增曲线图

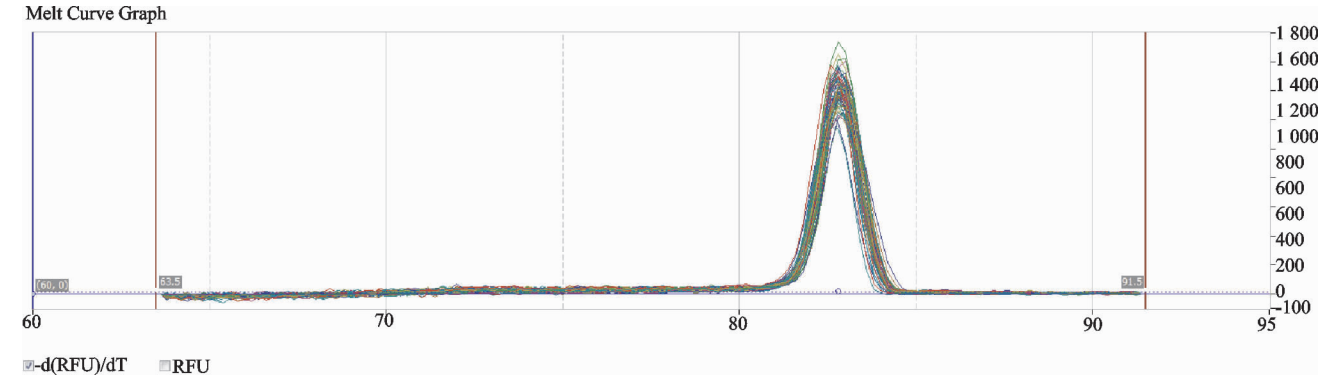


图 4 NF- κ B mRNA 溶解曲线图

3 讨论

临床上,KOA 是一种以由于关节滑膜退变,软骨
破坏引起的以膝关节疼痛、僵硬和活动受限为特征的
慢性骨关节病,但是,关于其具体病因病机尚未完全明
确,多年来的研究认为 KOA 发生是一种多种因素造
成的疾病^[7,8]。为探索 KOA 的发病机制及药物对其
的作用机理,研究者们通过实验干预手段,成功复制出

兔 KOA 动物模型,其中,应用木瓜蛋白酶关节腔内注
射造模所需时间短,可模拟软骨破坏的终末环节,适于
软骨病理、药物防治的研究^[9]。

NF- κ B 是 1986 年 Sen 等首先从 B 淋巴细胞核中
提取的一种核蛋白,后来进一步研究发现 NF- κ B 广泛
存在于真核细胞内,广泛参与调控细胞的多种生理及
病理过程,如炎症反应、细胞分化和生长、免疫应答、细

胞凋亡等^[8,9]。NF- κ B 信号通路参与并调控软骨细胞的增殖、分化和凋亡,在 KOA 的发生、发展扮演着十分重要的角色,在关节软骨中,NF- κ B 信号通路对参与免疫反应的早期和炎症反应各阶段的许多分子具有调控作用,如 TNF- α 、IL-1 及 MMP-1 等,加重局部的炎症反应,并介导关节软骨损伤,最终导致软骨降解关节损伤^[10,11]。软骨细胞通过接受各种刺激并作出应答,表现为通过激活 NF- κ B 信号通路导致的软骨细胞外基质的损伤和关节软骨降解。因此,基于 NF- κ B 信号通路可探讨 KOA 发病机制,评价药物对其的治疗作用^[12,13]。

中医药在防治膝关节骨关节炎方面具有疗效确切、副作用小且价格低廉等优点,临床上报道日益增多^[14-16]。本研究中,止痛健骨方以活血祛痰,通络止痛,强筋健骨为组方原则,由当归、白芥子(炒)、丹参、猪牙皂、鹿角霜、鳖甲、黄芪、乳香(醋制)、没药(醋制)、独活、A 千年健、陆英共 12 味药组成。方中当归、丹参、乳香、没药活血化瘀,消肿止痛,白芥子、独活、千年健、陆英、猪牙皂祛风除湿,涤痰搜风,通痹止痛,以治其标,鹿角霜、鳖甲、黄芪强筋健骨以固其本,标本兼顾。膝骨关节炎属于中医学“骨痹”范畴,笔者结合临证经验,认为痰瘀阻络兼肝肾亏虚是 KOA 最常见证候,治以活血祛痰、通络止痛、强筋健骨,选用止痛健骨方。现代药理研究证明,当归、丹参、乳香、没药具有显著抗炎、镇痛及其他多方面的药理作用,对风湿类实验性关节炎有治疗作用。白芥子、独活、千年健、陆英、猪牙皂有祛痰作用,现代药理有镇痛、镇静和抗炎作用、抗菌等作用。鹿角霜、鳖甲、黄芪免疫调节功效,增强体液免疫和抑制结缔组织增生,有消结块作用。

本研究中,与正常对照组比较,模型对照组白兔膝关节软骨 IKK α 及 NF- κ B mRNA 表达明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),经止痛健骨方干预后,止痛健骨低剂量组、止痛健骨高剂量膝关节软骨 IKK α 及 NF- κ B mRNA 得到下降,表明止痛健骨方能降低兔 KOA 模型关节软骨 IKK α 及 NF- κ B mRNA 表达,这可能为其治疗 KOA 的作用机理。

参考文献

- [1] 苏新平,朱克俭,谭旭仪. 止痛健骨方对兔膝关节模型滑膜及软骨修复的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2016,36(4):11-14.
- [2] 苏新平. 止痛健骨方治疗兔膝关节软骨的 MRI 评价及与 NF- κ B 信号通路的相关性分析[D]. 长沙:湖南中医

药大学,2016:1-91.

- [3] Wang D,Qiao J,Zhao X,et al. Thymoquinone inhibits IL-1 β -induced inflammation in human osteoarthritis chondrocytes by suppressing NF- κ B and MAPKs signaling pathway[J]. Inflammation,2015,38(6):2235-2241.
- [4] 周庄,张柳. NF- κ B 信号通路在骨性关节炎发生发展中作用机制的研究[J]. 中国骨质疏松杂志,2012,18(1):78-82.
- [5] 唐和斌,李婷婷,杨燕京,等. 木瓜蛋白酶诱导骨关节炎模型中病理指标的动态变化[J]. 中南民族大学学报:自然科学版,2013,32(4):41-49.
- [6] 魏伟,吴希美,李元建. 药理实验方法学[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2010:1698.
- [7] 中华医学会骨科分会. 骨关节炎诊治指南(2007 年版)[J]. 中华骨科杂志,2007,27(10):793-795.
- [8] Liu Y,Zhang H,Liang N,et al. Prevalence and associated factors of knee osteoarthritis in a rural Chinese adult population: an epidemiological survey [J]. BMC Public Health,2016,16(1):94.
- [9] Li X,Lang W,Ye H,et al. Tougu Xiaotong capsule inhibits the tidemark replication and cartilage degradation of papain-induced osteoarthritis by the regulation of chondrocyte autophagy[J]. Int J Mol Med,2013,31(6):1349-1356.
- [10] 李本杨,王峰,梁文武. 消瘀接骨散对兔膝关节炎模型关节液中 MMP-1、MMP-3 表达的影响[J]. 安徽中医药大学学报,2015,34(6):66-69.
- [11] 卢敏,谭旭仪,谢心军,等. 伤速康贴膏对兔膝骨性关节炎模型关节液中 IL-1、IL-6 及 TNF- α 水平的影响[J]. 湖南中医药大学学报,2011,31(7):18-21.
- [12] Niederberger E,Geisslinger G. Proteomics and NF- κ B:an update[J]. Expert Rev Proteomics,2013,10(2):189-204.
- [13] Tong W,Geng Y,Huang Y,et al. In Vivo identification and induction of articular cartilage stem cells by inhibiting NF- κ B signaling in osteoarthritis[J]. Stem Cells,2015,33(10):3125-3137.
- [14] 冯伟,石印玉,沈培芝,等. 中药对软骨细胞代谢的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志,2000,8(2):9-11.
- [15] 许学猛,王羽丰,邓晋丰,等. 补肾活血胶囊影响兔膝关节退变性疾病骨内压变化的实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志,2001,9(4):24-27.
- [16] 陈卓夫,刘定安,舒海奇,等. 化痰软坚片治疗骨性关节炎的实验研究[J]. 中医正骨,2002,14(7):3-5.

(收稿日期:2017-02-01)