

温肾宣痹方对大鼠膝骨关节炎软骨的保护作用研究

樊燕鑫¹ 夏天卫¹ 沈计荣^{1△}

[摘要] **目的:**探究温肾宣痹方对大鼠膝骨关节炎(Osteoarthritis,OA)的作用效果及机制。**方法:**建立前交叉韧带切断的大鼠骨性关节炎动物模型,实验组给予温肾宣痹方灌胃 8 周,对照组、空白组给予纯净水灌胃 8 周。观察各组大鼠的国际骨关节炎研究协会(Osteoarthritis Research Society International,OARSI)评分以及软骨组织中 MMP-1、MMP-13 的基因的相对表达、滑膜组织中 miR-146a 的相对表达。**结果:**温肾宣痹方组的 OARSI 评分较对照组低、软骨组织中 MMP-1、MMP-13 的相对表达量较对照组低、滑膜组织中 miR-146a 的相对表达量较对照组高,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**灌胃温肾宣痹方水煎剂对大鼠骨性关节炎具有一定的软骨保护效果,可延缓 OA 进程,机制与增加滑膜组织中 miR-146a 的表达相关。

[关键词] 温肾宣痹方;骨性关节炎;炎症;评分

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2021)06-0005-04

The Study of Protective Efficacy of Wenshenxuanbi Decoction on Chondrocyte of Knee Osteoarthritis in Rats

FAN Yanxin¹ XIA Tianwei¹ SHEN Jirong^{1△}

¹Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China.

Abstract Objective: To investigate the efficacy and potential mechanism of Wenshenxuanbi decoction (WSXBD) on knee osteoarthritis (OA) in rats. **Methods:** Rats model of anterior cruciate ligament (ACL) transection were established. The experimental group was given WSXBD for 8 weeks, while the control group and the blank group was given pure water for 8 weeks. The Osteoarthritis Research Society International (OARSI) score, the relative expression of MMP-1, MMP-13 in cartilage and miR-146a in synovium were observed. **Results:** The OARSI score of WSXBD was lower than that in control group, the relative expression of MMP-1 and MMP-13 was lower than that in control group, and the relative expression of miR-146a was higher than that in control Group. **Conclusion:** WSXBD has a protective efficacy on the cartilage of rat osteoarthritis, which can delay the progress of OA. The mechanism is related to the increase of miR-146a expression.

Keywords: wenshenxuanbi decoction; osteoarthritis; inflammation; score

膝骨关节炎(Osteoarthritis,OA)在骨科临床常见,其发病机制仍不明确且无良好疗法^[1]。温肾宣痹方是诸方受教授创制的名方,临床应用广泛^[2-4]。其治疗骨与关节退行性疾病^[5-7],及膝骨关节炎有较好疗效,但作用机制尚不清晰。膝骨关节炎的主要病理特征是软骨破坏,研究表明基质金属蛋白酶在膝骨关节炎关节软骨细胞外基质的降解及重构过程中发挥重要作用^[8],且前人发现 miR-146a 高表达能抑制 NF- κ B 信号通路,延缓 OA^[9-10],故设计实验探讨温肾宣痹方

治疗膝骨关节炎的潜在分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠(200~220 g)24 只,上海西普尔-必凯实验动物有限公司(中国),动物许可证批号为 SCXK(沪)-2018-0006。

1.2 实验药物及试剂

水合氯醛(C104202,阿拉丁试剂(上海)有限公司,中国);4%多聚甲醛(G1101,武汉谷歌生物科技,中国);PBS(G002,赛维尔生物科技有限公司,中国);番红-固绿染液(G1005,武汉谷歌生物科技,中国);油红 O(A600395,生工生物工程上海(股份)有限公司,中国);异丙醇(A0004338,上海润捷化学试剂有限公司,中国);无水乙醇(A0010074,上海润捷化学试剂有

基金项目:江苏省中医院 2018 年院级创新发展基金专项课题

(Y2018CX54)

¹ 南京中医药大学附属医院/江苏省中医院(南京,210029)

[△]通信作者 E-mail:joint66118@sina.com

限公司,中国);二甲苯(A0000542,上海润捷化学试剂有限公司,中国);中性树脂(E675007,生工生物工程上海(股份)有限公司,中国);0.9%生理盐水(H37022337,辰兴药业股份有限公司,中国)。纯净水(LA0727,飞净生物科技有限公司,中国)。温肾宣痹方:附子、桂枝、狗脊、细辛、茯苓、生薏苡仁、木香、天麻、山茱萸、泽泻、白术、生甘草的比例为10:10:10:10:12:15:10:10:10:10:10:10,由江苏省中医院制剂部提供。

1.3 实验仪器

microCT(skyscan1172,Bruker,比利时);X-线放射仪(MX-20,Faxitron,美国);生物洁净安全柜(BHC-1300 II A/B3,苏州净化设备有限公司,中国);脱水机(JJ-12J,武汉俊杰电子有限公司,中国);包埋机(JB-P5,武汉俊杰电子有限公司,中国);病理切片机(RM2016,徕卡仪器有限公司,德国);冻台(JB-L5,武汉俊杰电子有限公司,中国);组织摊片机(KD-P,浙江省金华市科迪仪器设备有限公司,中国);烤箱(DHG-9140A,上海慧泰仪器制造有限公司,中国);载玻片及盖玻片(10212432C,江苏世泰实验器材有限公司,中国);倒置荧光显微镜(ECLIPSE Ni,Nikon,日本);载玻片和盖玻片(10212432C,江苏世泰实验器材有限公司,中国);电子天平(JA2003,上海舜宇恒平科学仪器有限公司,中国);EDTA(E112486,阿拉丁试剂(上海)有限公司,中国);NaOH(S140903,阿拉丁试剂(上海)有限公司,中国)。

1.4 方法

1.4.1 造模与分组 采用改良 Hulth 法。首先将 24 只大鼠分为 3 组:空白组,实验组,对照组,每组各 8 只。实验组与对照组按大鼠体重质量,用水合氯醛行腹腔注射麻醉,常规备皮、消毒,右侧髌旁内侧直切口逐层分离、切开右膝关节,打开关节腔,显露膝关节,将髌骨向外侧脱位后显露前交叉韧带,用手术刀前端切断前交叉韧带,并摘除内侧半月板。术中避免损伤软骨面,彻底止血后复位髌骨,逐层闭合切口。术后大鼠置于 3~10℃环境中,相对湿度保持在 70%以上,每天活动 6 h 以上。

1.4.2 制作温肾宣痹方水煎剂 将上述药物按照处方比例投料,加 10 倍量水,水煎 1 次过滤药渣,冷凝浓缩至每毫升含温肾宣痹方 1 g,如 10 g 温肾宣痹方饮片浓缩成 10 mL 煎液。依据相关文献把人的临床剂量转换为大鼠的给药剂量^[11],若人的临床剂量为 x mg/kg,则大鼠的给药剂量 = x mg/kg \times 70 kg \times 0.018/200 g = $6.3x$ mg/kg。因温肾宣痹方临床使用日剂量为 127 g,故确定温肾宣痹方实验组的给药剂量 11 g/(kg \cdot d)。

1.4.3 干预方法 完成造模后的第 2 天开始,实验组给予温肾宣痹方灌胃处理,每次灌胃含温肾宣痹方水溶液(给药体积 11 mL/kg),每日一次,持续 8 周。对照组、空白组在每次给药处理时,灌胃给予相同剂量的纯净水(给药体积 11 mL/kg),1 次/d,持续 8 周。

1.4.4 标本制作方法 完成 8 周灌胃后的第 2 天,处死大鼠。每组各随机选取 3 只大鼠的膝关节,放入 4% 多聚甲醛保存,准备做病理。用手术刀片离断每组剩余 5 只大鼠膝关节的周围组织、前后交叉韧带,暴露胫骨平台,切取软骨、滑膜,并将软骨组织与滑膜组织放入冻存管, -80℃ 保存。准备进行病理检查的大鼠膝关节依次行多聚甲醛固定、脱钙、梯度脱水、透明、组织切片(切片厚度 10 μ m)、番红-固绿染色,进行镜下观察。

1.5 实验指标测定

每个膝关节组织选取至少 5 张切片,每张切片分别由两名研究者对大鼠切片进行国际骨关节炎研究协会(Osteoarthritis Research Society International, OARSI)评分。最后对每个膝关节组织切片的 OARSI 评分结果取平均值并汇总统计。按照 Trizol 法提取总 RNA,从软骨与滑膜组织里各提取 1 μ L RNA,按照 TAKARA 逆转录试剂盒说明书进行逆转录,并进行荧光定量。PCR 荧光定量参数为 95℃,扩增 40 个循环。检测软骨组织中 MMP-1 和 MMP-13 的表达量以及滑膜组织中 miR-146a 的表达量。

1.6 统计学方法

统计方法:使用 SPSS25.0 软件进行数据分析。实验数据中的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据满足正态性和方差齐性检验,组间比较采用单因素方差分析,组间差异有统计学意义,则进一步采用 LSD 法进行两两比较, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

24 只大鼠造模后均存活,并完成全部给药工作。

2.2 组织病理学结果

膝关节软骨组织切片($\times 100$)番红-固绿染色结果显示:空白组膝关节关节面基本平滑,番红-固绿染色较深、均匀,软骨面无明显裂隙,OARSI 评分较低(见图 1)。实验组膝关节软骨表面基本平滑,软骨基质内较多空泡,番红染色较浅。OARSI 评分较对照组低(见图 1)。对照组膝关节软骨面接近剥脱,透明软骨几乎全部糜烂,软骨下骨暴露,番红染色缺失较多。局部可见软骨下骨增生,OARSI 评分较高(见图 1)。

2.3 大鼠膝关节软骨 PCR 检测结果

提取各组大鼠膝关节软骨组织,行 PCR 检测,结果显示:实验组和对照组软骨组织中 MMP-1 表达水平相较空白组显著增加,实验组软骨组织中 MMP-1

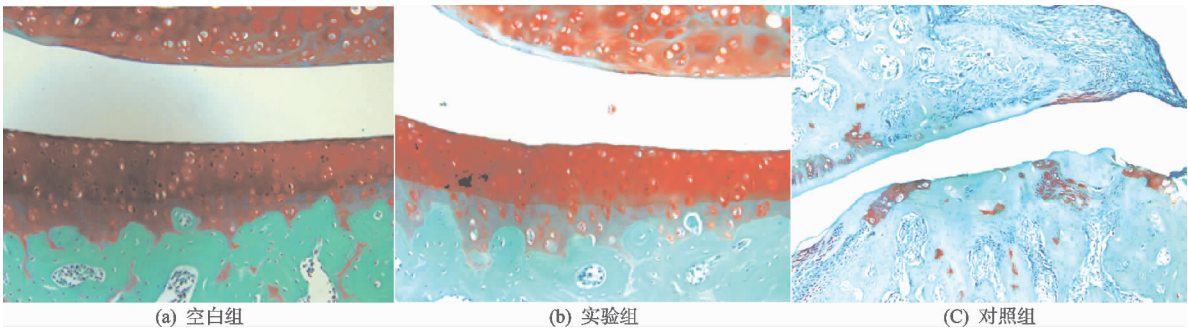


图 1 各组大鼠灌胃 8 周膝关节软骨组织切片番红-固绿染色结果比较(×100)

基因的相对表达量相比对照组 MMP-1 基因的相对表达量降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。实验组和对照组软骨组织中 MMP-13 表达水平相较空白组显著增加,实验组软骨组织中 MMP-13 基因的相对表达量相比对照组 MMP-13 基因的相对表达量降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。实验组和对照组滑膜组织中 miR-146a 表达水平相较空白组显著降低,实验组滑膜组织中 miR-146a 的相对表达量相比对照组 miR-146a 的相对表达量显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 三组大鼠的 OARSI 评分及软骨组织中 MMP-1 基因、MMP-13 基因、miR-146a 相对表达量($\bar{x}\pm s$)

组别	OARSI 评分	MMP-1 相对表达量	MMP-13 相对表达量	miR-146a 相对表达量
空白组	3.53±0.17	1.00±0.08	0.99±0.14	1.00±0.08
实验组	7.78±0.85	2.55±0.13	3.25±0.13	0.75±0.13
对照组	13.78±0.57	3.28±0.40	5.45±0.24	0.51±0.17
<i>F</i>	292.644	87.215	639.504	14.086
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
LSD	A<B<C	A<B<C	A<B<C	A>B>C

3 讨论

骨性关节炎是一种以软骨损伤为基本病理改变的退行性疾病,与炎症密切相关。目前现代医学尚无有效的软骨保护相关药物。温肾宣痹方由桂枝附子汤、五苓散、麻杏薏甘汤加减而成。以桂枝、附子二药为君,助阳化气,温经散寒止痛;狗脊祛风除湿,补益肝肾;泽泻渗湿宣痹;茯苓、薏苡仁健脾利湿;白术、天麻益气健脾,祛风通络;木香行气止痛;山萸肉滋肾填精;细辛加强止痛之效力;甘草调和诸药,缓急止痛。全方共奏温补肾阳、宣痹通络、除湿散寒止痛之功。江苏省中医院已运用该方治疗骨性关节炎 60 余年,疗效确切。本研究前期研究发现温肾宣痹方中君药桂枝的活性成分桂皮醛在 IL-1 β 诱导的 SW1353 细胞与人软骨细胞炎症中,能够发挥抗炎、软骨保护效果^[7]。此外,温肾宣痹方中君药附子,臣药细辛、狗脊、薏苡仁,使药甘草也有一定的抗炎作用。

改良 Hulth 法是经典的骨性关节炎造模方法,该方法通过切断大鼠前交叉韧带与内侧半月板,破坏大鼠膝关节的稳定性达到诱发大鼠骨性关节炎的目的。本研究采用该法造模取得成功,并且本研究显示持续 8 周、灌胃温肾宣痹方的复方煎剂能够降低改良 Hulth 法建立的骨性关节炎大鼠膝关节的 OARSI 评分,减少软骨组织 MMP-1、MMP-13 的表达,保护关节软骨。

前期研究提示温肾宣痹方及其君药桂枝治疗骨性关节炎的作用机制与 miRNA、TLRs/ NF- κ B 等炎症相

关信号通路相关^[9]。miR-146a 被发现可调节免疫系统的微小 RNA,其在骨性关节炎发病中的作用已被诸多研究证实^[9]。研究显示关节滑膜组织中存在巨噬细胞,巨噬细胞中 miR-146a 可负反馈循环控制 TLRs/NF- κ B 信号通路,抑制细胞因子与金属蛋白酶表达^[10]。并且有研究发现在巨噬细胞中 miR-146a 低表达可激活经典的炎症信号转导通路 NF- κ B 加剧炎症反应^[11],如在小鼠过敏性鼻炎中 miR-146a 上调可通过抑制 TLR4/ TRAF6/NF- κ B 信号通路发挥抗炎作用^[12]。活化的转录因子 NF- κ B 迁移至核内,与基因上的 κ B 位点发生特异性结合,从而促进各种炎症因子的转录,释放大量炎症细胞因子,产生级联炎症反应。此外多项研究表明 miR-146a 下调参与促进 M1 巨噬细胞的极化,会加剧青少年特发性关节炎等疾病^[13-14]。这提示温肾宣痹方可能通过增加关节滑膜组织里巨噬细胞中 miR-146a 的表达,抑制下游炎症通路,发挥治疗骨性关节炎作用。本研究显示持续 8 周、灌胃温肾宣痹方的复方煎剂能够增加滑膜组织中 miR-146a 的表达,是其保护软骨的作用机制。这提示下一步,在基础研究方面,可聚焦 miR-146a,结合其上游的 LncRNA PVT1 及其下游的 NF- κ B 信号通路,对温肾宣痹方治疗骨性关节炎的具体作用机制展开深入探讨。此外,考虑到温肾宣痹方目前尚未制成成药,下一步可对温肾宣痹方进行现代剂型改革方面的研究。

总之,灌胃温肾宣痹方水煎剂对大鼠骨性关节炎

软骨具有一定的保护效果,可延缓 OA 进程,具体机制与增加滑膜组织中 miR-146a 的表达、抑制炎症相关。

参考文献

- [1] 袁普卫,康武林,李小群,等.骨性关节炎发病机制及相关细胞因子的研究进展[J].中国矫形外科杂志,2016,24(11):1010-1015.
- [2] 刘志队,史丽璞,桂银莉,等.补脾温肾宣痹汤对强直性脊柱炎(AS)患者疗效及生活质量的影响[J].数理医药学杂志,2017,30(8):1215-1216.
- [3] 曾秋萍,戴琴香.温肾宣痹汤与物理因子治疗骨质增生腰痛 51 例小结[J].亚太传统医药,2008,4(7):55-56.
- [4] 魏成建.诸方受运用温肾宣痹汤经验举隅[J].辽宁中医杂志,2006,33(6):744-745.
- [5] ZHOU G W, LI R Q, XIA T W, et al. Utilizing network pharmacology to explore the underlying mechanism of cinnamomum cassia presl in treating osteoarthritis[J]. International Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2019, 12(12): 13359-13369.
- [6] XIA T W, HUAN D W, MAO G Q, et al. Utilizing network pharmacology to explore the underlying mechanism of cinnamomum cassia presl in treating osteoarthritis[J]. International Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2020, 13(10): 7427-7436.
- [7] XIA T W, GAO R Z, ZHOU G W, et al. Trans-cinnamaldehyde inhibits IL-1 β -stimulated inflammation in chondrocytes by suppressing NF- κ B and p38-JNK pathways

and exerts chondrocyte protective effects in a rat model of osteoarthritis[J]. BioMed Research International, 2019; 4039472.

- [8] 黄聪琳,李晓东,谢兴文,等.膝关节关节炎生物标记物研究进展[J].中国中医骨伤科杂志,2019,27(4):81-84.
- [9] 周圆家,邹磊,董金波,等. miR-146a/27a 在 SD 大鼠 OA 软骨、滑膜组织中的表达及意义[J].安徽医科大学学报,2015,50(3):275-279.
- [10] 王欢,唐学章,丁海涛,等.桂皮醛对 miRNA-146a 干扰的骨关节炎滑膜炎性反应影响的实验研究[J].世界中医药,2017,12(10):2408-2413.
- [11] FUNAHASHI Y. MiR-146a targeted to splenic macrophages prevents sepsis-induced multiple organ injury[J]. Lab Invest, 2019, 99(8): 1130-1142.
- [12] WANG J. MiR-146a mimic attenuates murine allergic rhinitis by downregulating TLR4/TRAF6/NF- κ B pathway [J]. Immunotherapy, 2019, 11(13): 1095-1105.
- [13] ZHANG J. MiR-146a promotes oligodendrocyte progenitor cell differentiation and enhances remyelination in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. Neurobiology of Disease, 2019, 125: 154-162.
- [14] LI D, DUAN M Y, FENG Y, et al. MiR-146a modulates macrophage polarization in systemic juvenile idiopathic arthritis by targeting INHBA[J]. Mol Immunol, 2016, 77: 205-212.

(收稿日期:2021-02-04)

(上接第 4 页)

- [9] 胡元亮.实验动物针灸手册[M].北京:中国农业出版社,2003:288-291.
- [10] ONUOR A, SARA H. Osteoarthritis: molecular imaging detects activated macrophages[J]. Nature Reviews Rheumatology, 2016, 12(6): 313-315.
- [11] OZEKI N, MUNETA T, KOGA H, et al. Not single but periodic injections of synovial mesenchymal stem cells maintain viable cells in knees and inhibit osteoarthritis progression in rats[J]. Osteoarthritis & Cartilage, 2016, 24(6): 1061-1070.
- [12] SCANZELLO C R, GOLDRING S R. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis[J]. Bone, 2012, 51(2): 249-257.
- [13] BERENBAUM F. Osteoarthritis as an inflammatory disease osteoarthritis is not osteoarthritis[J]. Osteoarthritis and Cartilage, 2013, 21(1): 16-21.
- [14] ROEMER F W, GUERMAZI A, FELSON D T, et al. Presence of MRI-detected joint effusion and synovitis increases the risk of cartilage loss in knees without osteoarthritis at 30-month follow-up: the MOST study[J]. Ann Rheum Dis, 2011, 70(10): 1804-1809.
- [15] KAWAI T, AKIRA S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors[J]. Nat Immunol, 2010, 11(5): 373-384.

- [16] GARCÍA-ARNANDIS I, GUILLÉN M I, GOMAR F, et al. High mobility group box 1 potentiates the proinflammatory effects of interleukin-1 β in osteoarthritic synovio-cytes[J]. Arthritis Res Ther, 2010, 12(4): R165.
- [17] VAN LENT P, BLOM A B, SCHELBERGEN R F P, et al. Active involvement of alarmins S100A8 and S100A9 in the regulation of synovial activation and joint destruction during mouse and human osteoarthritis [J]. Arthritis Rheum, 2012, 64(5): 1466-1476.
- [18] PICCININI A M, MIDWOOD K S. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling[J]. Mediators Inflamm, 2010. DOI: 10.1155/2010/672395.
- [19] BRIKOD C, O'NEILL L A. Signaling of Toll-like receptors[J]. Handb Exp Pharmacol, 2008, 183: 21-50.
- [20] SIDIMPOULOS P I, GULIELMOS G, VOLOUDAKIS G K, et al. Inflammasomes and rheumatic diseases: evolving concepts[J]. Ann Rheum Dis, 2008, 67(10): 1382-1389.
- [21] 刘苗苗,韦芳,潘超安,等.电针对膝骨关节炎 MIA 模型大鼠滑膜组织中 MMP-3/TIMP-1 表达的影响[J].针灸临床杂志,2014,30(6):70-74.
- [22] 王道海,孙华,包飞,等.电针对膝骨关节炎大鼠软骨 bFGF 表达的影响[J].医学研究杂志,2010,39(12):106-109.

(收稿日期:2020-10-06)