

膝舒方防治阳虚寒凝型膝骨关节炎的实验研究

葛炎¹ 田松云² 刘鑫鑫¹ 崔建博¹ 张国斌^{1△}

[摘要] 目的:观察中药膝舒方对阳虚寒凝型膝骨关节炎(KOA)兔的防治作用,探讨其作用机制。方法:采用木瓜蛋白酶注射的方式制备膝骨关节炎兔模型,薄荷油灌胃联合气候箱营造湿冷环境的方式诱导阳虚寒凝证型。实验兔随机分为5组(每组各12只):模型组、阳性组(塞来昔布100 mg/kg)、膝舒方高剂量组(生药16 g/kg)、膝舒方低剂量组(生药8 g/kg)、空白组。分别于给药前、给药3周后、给药6周后评价奎森(Lequesne)膝关节功能演算指数(Lequesne指数),并进行中医证候评分;给药6周后,制备膝关节软骨苏木精-伊红(HE)染色切片,光学电子显微镜下观察组织形态学病理并进行改良Mankin's病理评分;ELISA法检测血清促炎细胞因子白介素1 β (IL-1 β)、IL-6及抗炎细胞因子IL-4、IL-10水平;RT-qPCR法检测关节软骨基质金属蛋白酶1(MMP-1)、MMP-3、组织金属蛋白酶抑制因子1(TIMP-1)基因表达。结果:给药3周后或6周后,膝舒方高、低剂量组实验兔患肢肿胀和压痛反应显著减轻;膝关节活动范围及跛行现象均有所改善;Lequesne指数与同时段模型组相比均有显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);中医证候评分与同时段模型组相比均有显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。给药6周后,与模型组相比,膝舒方高、低剂量组关节软骨的改良Mankin's评分明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$);血清IL-1 β 和IL-6水平均有显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$);IL-4和IL-10水平均有显著增高,差异有统计学意义($P<0.01$);关节软骨MMP-1和MMP-3 mRNA相对表达量显著下调,差异有统计学意义($P<0.01$),关节软骨TIMP-1 mRNA相对表达量则无明显变化。结论:膝舒方通过一定程度上纠正促炎/抗炎细胞因子及MMPs/TIMPs的失衡状态,以减轻阳虚寒凝型膝骨关节炎兔关节腔的炎症反应,纠正关节基质代谢紊乱,改善膝关节功能及软骨损伤。

[关键词] 膝舒方;膝骨关节炎;阳虚寒凝证;促炎/抗炎细胞因子;基质金属蛋白酶

[中图分类号] R684.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2024)07-0018-06

DOI: 10.20085/j.cnki.issn1005-0205.240703

Experimental Study of Xishu Decoction on Knee Osteoarthritis with Syndrome of Yang Deficiency and Cold Coagulation

GE Yan¹ TIAN Songyun² LIU Xinxin¹ CUI Jianbo¹ ZHANG Guobin^{1△}

¹ Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;

² Xuchang Renhe Orthopedic Hospital, Xuchang 461000, Henan China.

Abstract Objective: To evaluate the effect of Xishu decoction on knee osteoarthritis (KOA) with syndrome of Yang deficiency and cold coagulation (KOA-YDCC) in rabbits and investigate its mechanisms. **Methods:** The KOA rabbits were established by papain injection, and the syndrome of Yang deficiency and cold coagulation was induced by peppermint oil gavage combined with a wet and cold environment created by climate box. The experimental rabbits were divided at random into 5 groups (12 cases in each group): model, positive control (celecoxib 100 mg/kg), Xishu decoction high and low

dose (16 and 8 g/kg, respectively) and normal control groups. The Lequesne algofunctional index was evaluated before, 3 weeks after and 6 weeks after of gavage administration, and the traditional Chinese medicine syndrome score was made. After 6 weeks of gavage administration, HE-stained sections of knee cartilage were prepared; the histo-

基金项目:河南省高校科技创新人才支持计划(15HASTIT041)

¹ 河南中医药大学(郑州,450046)

² 许昌仁和骨伤医院

[△]通信作者 E-mail: z-g-b@126.com

morphology of knee cartilage was observed under light microscope, and modified Mankin's scores were evaluated. The expression levels of proinflammatory cytokines (IL-1 β and IL-6) and anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-10) in sera were measured by ELISA, and the relative gene expression of MMP-1, MMP-3 and TIMP-1 in articular cartilage of KOA-YDCC rabbits was detected by RT-qPCR. **Results:** After 3 or 6 weeks of gavage administration, the swelling and pain response of the limbs were significantly reduced in Xishu decoction high and low dose groups; the range of motion of the knee joints and lameness were improved; the Lequesne index was significantly reduced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the traditional Chinese medicine syndrome scores were markedly decreased ($P < 0.01$) compared with those of the model group in the same period of time. After 6 weeks of gavage administration, compared with the model group, the modified Mankin's scores of knee cartilage in Xishu decoction high and low dose groups were significantly decreased ($P < 0.01$); the levels of serum IL-1 β and IL-6 were significantly decreased ($P < 0.01$); the levels of serum IL-4 and IL-10 were markedly increased ($P < 0.01$); the relative gene expression of MMP-1 and MMP-3 in articular cartilage was significantly down-regulated ($P < 0.01$), while the relative gene expression of TIMP-1 showed no significant change. **Conclusion:** Xishu decoction treatment could alleviate the inflammatory reaction, correct the disorder of metabolism of the joint matrix, and improve the function of the knee joint and cartilage damage in rabbits with KOA-YDCC.

Keywords: Xishu decoction; knee osteoarthritis; syndrome of Yang deficiency and cold coagulation; proinflammatory and anti-inflammatory cytokines; matrix metalloproteinase

膝关节炎(Knee Osteoarthritis, KOA)是一种慢性退行性关节疾患,严重影响患者的劳动能力及生活质量;流行病学调查显示,我国40岁以上人群膝关节炎发病率高达46.3%^[1]。临床上西医针对膝关节炎主要采用抗炎镇痛或改善病情的药物、软骨移植修复术、关节置换术等治疗手段,同时存在药物毒副作用明显、治疗成本较为高昂、手术易致后遗症等缺陷。中医药凭借其辨证施治、不易耐药等自身优势,在膝关节炎等慢性病的防治领域发挥重要作用^[2]。据报道阳虚寒凝型是膝关节炎人群中较为多发的证型^[3],膝舒方以“补肝肾亏虚、调气血失和、祛寒湿瘀痹”为治则组方,临床应用多年,疗效确切^[4]。本研究通过建立阳虚寒凝型膝关节炎实验兔模型,从分子水平及基因水平探讨膝舒方的作用环节和作用机制,以期为其临床应用及深入研发提供参考,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康清洁级新西兰兔,雌雄各半,体重为(2.2 \pm 0.2)kg,由郑州市兔尔康牧业有限公司提供,许可证号为SCXK(豫)2021-0001;置于标准动物房分笼饲养,自由摄食、饮水。实验动物相关操作严格遵循河南中医药大学动物伦理规定。

1.2 药物和试剂

膝舒方(组方:狗脊20g,熟地20g,当归15g,党参15g,杜仲12g,淫羊藿12g,土元10g,制鳖甲15g,独活12g,威灵仙12g,川牛膝20g)饮片由河南中医药大学第二附属医院中药房提供,并制成生药含量1.6g/mL的水煎液。塞来昔布胶囊(商品名为西乐葆,规格为200mg/粒),美国辉瑞制药有限公司。

木瓜蛋白酶,美国Sigma-Aldrich公司。薄荷油(纯度99%),上海易恩化学技术有限公司。苏木精-伊红(HE)染色试剂盒,北京索莱宝科技有限公司。白介素1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-4、IL-6、IL-10酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒,美国R&D Systems公司。Trizol试剂、逆转录试剂盒及RT-qPCR试剂盒,美国Applied Biosystems公司。引物:基质金属蛋白酶1(Matrix Metalloproteinase-1, MMP-1)、MMP-3、组织金属蛋白酶抑制因子1(Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases-1, TIMP-1)及内参GAPDH由上海生工生物工程股份公司提供。

1.3 仪器设备

微量移液器,德国Eppendorf公司。Forma 702型超低温冰箱,美国Thermo Fisher Scientific公司。CSI-TE014-5000型人工气候箱,上海诚卫仪器科技(德国)有限公司。Universal 320R型高速冷冻离心机,德国Hettich公司。BX41型光学显微镜,日本Olympus公司。DNM-9602G型酶联免疫检测仪,美国Bio-Rad公司。Mx3000P型实时荧光定量PCR仪,美国Agilent公司。

1.4 方法

1.4.1 阳虚寒凝型膝关节炎模型的建立 采用木瓜蛋白酶、薄荷油联合气候箱的方法^[5]造模。简言之,实验兔的右膝关节提前备皮,麻醉后仰位固定,膝关节消毒,于髌韧带上方进针,向关节腔内注入4%木瓜蛋白酶溶液0.3mL,注射后再次消毒,屈伸数次膝关节使木瓜蛋白酶在关节腔内充分浸润;每隔3d注射1次,共注射3次。自第1周开始,每日将实验兔置于温度4 $^{\circ}$ C、湿度50%的人工气候箱内,每次时长2h,持续5周。自第3周开始,实验兔每日予以0.65mL/kg

薄荷油灌胃 1 次,连续 3 周。5 周后对实验兔进行奎森膝关节功能演算指数 (Lequesne Algofunctional Index)^[6] 评分,评估造模情况;并随机选取 2 只实验兔处死,打开右膝关节腔,可见关节软骨变薄、色泽暗淡、表面粗糙或有裂隙,滑膜组织明显充血,则可确定模型建立成功。

1.4.2 分组和干预 将模型兔分为 4 组(每组 12 只):模型组(等体积溶液),阳性组(塞来昔布 100 mg/kg)^[7],膝舒方高、低剂量组(按人体表面积换算成兔等效剂量,生药量分别为 16 和 8 g/kg)。另取未造模的正常新西兰兔 12 只,作为空白组(等体积溶液)。各组灌胃给药 1 次/d,持续 6 周。

1.4.3 观察指标

1.4.3.1 膝关节功能:各组实验兔分别于给药前、给药 3 周后、给药 6 周后评价 Lequesne 指数,从疼痛、肿胀、步态及关节活动范围等方面评估实验兔的膝关节功能。由两名研究者根据评分标准^[6] 独立进行评价,评分越高膝关节功能越差。

1.4.3.2 中医证候评分:各组实验兔分别于给药前、给药 3 周后、给药 6 周后根据中医基础理论评价实验兔的证候,同时参照《辨证论治实验方法学》^[8] 对实验兔的阳虚证(体重降低、心率减慢、倦怠嗜卧、唇/爪/尾/耳色淡、小便色淡、毛发无/少光泽等)及寒凝证(体温降低、呼吸减弱、精神萎靡、反应迟钝、蜷缩发抖、爪/尾凉等)进行评分。评价由两名研究者独立进行,评分越高症状越重。

1.4.3.3 膝关节软骨组织病理变化:末次给药后,各组实验兔禁食不禁水 12 h,采用空气栓塞法处死,解剖右膝关节,取软骨组织,经 4% 多聚甲醛固定后制备切片,行 HE 染色,光镜下观察关节软骨的组织形态学病理变化。由两名病理分析师按照改良 Mankin's 评分法^[9] 对切片进行评分,分数越高表示关节软骨损伤越严重。

1.4.3.4 血清细胞因子表达:实验兔处死后自腹主动脉采血,静置 20 min,4 °C 离心分离出血清。双抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)具体操作按试剂盒说明书进行,血清样品用酶联免疫检测仪测定 450 nm 下吸光度(OD)值,并根据标准曲线计算血清

中促炎细胞因子 IL-1 β 、IL-6 及抗炎细胞因子 IL-4、IL-10 浓度。

1.4.3.5 关节软骨 MMP-1、MMP-3、TIMP-1 基因表达:实验兔处死后,解剖右膝关节,取股骨内侧髁负重区,置于液氮中冻存。于液氮环境下剥离股骨内侧髁负重区的关节软骨并研磨,实时荧光定量 PCR 具体操作按试剂盒说明书进行,Trizol 试剂法提取总 RNA,经逆转录反应获得 cDNA,按说明书设置反应参数,通过 MMP-1、MMP-3、TIMP-1 引物行 RT-qPCR 反应,分析获得样本基因 Ct 值后,以 GAPDH 为内参基因,应用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算样本基因的相对表达水平。引物序列如下:MMP-1,上游 5'-TCAGTTCGTCCTCAC-TCCAG-3',下游 5'-TTGGTCCACCTGTCATCTTC-3'; MMP-3,上游 5'-GCCAAGAGATGCTGTTGATG',下游 5'-AGGTCTGTGAAGGCGTTGTA-3'; TIMP-1,上游 5'-GCAACTCCGACCTTGTCATC-3',下游 5'-AGCGTAGGTCTTGGTGAAGC-3'; GAPDH,上游 5'-TC-ACCATCTTCCAGGAGCGA-3',下游 5'-CACAATGC-CGAAGTGGTCGT-3'。

1.5 统计学方法

数据导入 SPSS 22.0 软件进行处理,多组间采用单因素方差分析,两两比较方差齐者采用 SNK 检验,方差不齐者采用 Dunnett 检验;同一指标的不同时段采用重复测量方差分析, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 膝舒方对阳虚寒凝型膝骨关节炎兔膝关节功能的影响

空白组表现正常,膝关节功能未受影响。自造模后至给药 6 周后,模型组实验兔膝关节肿胀和压痛明显,骨性标记变浅,膝关节活动范围变小,明显跛行;Lequesne 指数维持较高的数值,与空白组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)。膝舒方高、低剂量组及阳性组(塞来昔布组)实验兔患肢肿胀和压痛反应显著减轻,骨性标记、膝关节活动范围及跛行现象均有所改善;给药 3 周后或 6 周后,Lequesne 指数与同时段模型组相比均有显著降低,组间差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见表 1。

表 1 膝舒方对阳虚寒凝型膝骨关节炎兔 Lequesne 指数的影响($n=12, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g · kg ⁻¹)	Lequesne 指数		
		给药前	给药 3 周后	给药 6 周后
空白组		0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
模型组		7.42 ± 1.44 ¹⁾	8.00 ± 1.76 ¹⁾	7.25 ± 2.05 ¹⁾
膝舒方低剂量组	8.0	7.67 ± 1.92	6.08 ± 1.78 ²⁾³⁾	4.67 ± 1.72 ⁴⁾
膝舒方高剂量组	16.0	7.58 ± 1.88	6.25 ± 1.54 ²⁾³⁾	4.17 ± 1.47 ⁴⁾
阳性组	0.1	7.33 ± 2.15	4.33 ± 1.23 ⁴⁾	4.00 ± 1.41 ⁴⁾

注:同时段下,1)与空白组比较, $P < 0.01$;2)与模型组比较, $P < 0.05$;3)与阳性组比较, $P < 0.01$;4) $P < 0.01$ 。

2.2 膝舒方对阳虚寒凝型膝骨关节炎中医证候的影响

空白组个别实验兔偶发症状,与其机体状态有关,非骨关节炎引发。与空白组比较,模型组实验兔自造模后至给药 6 周后均出现阳虚寒凝症状,中医证候评分均显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。膝舒

方高、低剂量组及阳性组给药 3 周后或 6 周后的中医证候评分与同时段模型组相比均有显著降低,组间差异均有统计学意义($P < 0.01$);给药 6 周后,膝舒方高、低剂量组的中医证候评分与阳性组比较有显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 2。

表 2 膝舒方对阳虚寒凝型膝骨关节炎兔中医证候评分的影响($n=12, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g · kg ⁻¹)	中医证候评分		
		给药前/分	给药 3 周后/分	给药 6 周后/分
空白组		0.33 ± 0.49	0.17 ± 0.39	0.33 ± 0.65
模型组		14.92 ± 4.10 ¹⁾	16.08 ± 2.75 ¹⁾	16.42 ± 2.11 ¹⁾
膝舒方低剂量组	8.0	15.17 ± 3.30	11.67 ± 3.17 ²⁾	8.83 ± 2.79 ²⁾³⁾
膝舒方高剂量组	16.0	16.00 ± 2.98	9.92 ± 3.09 ²⁾	7.00 ± 2.98 ²⁾³⁾
阳性组	0.1	15.42 ± 3.63	10.25 ± 2.93 ²⁾	9.92 ± 2.84 ²⁾

注:同时段下,1)与空白组比较, $P < 0.01$;2)与模型组比较, $P < 0.01$;3)与阳性组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 膝舒方对阳虚寒凝型膝骨关节炎兔关节软骨形态学的影响

空白组组织结构正常,软骨细胞排列整齐,潮线清晰。模型组软骨退变明显,组织结构受损,基质染色不均匀,软骨细胞排列紊乱,潮线破坏严重。膝舒方高、低剂量组及阳性组的关节软骨在结构完整性、细胞排列、基质、潮线等方面均有不同程度的改善,见图 1。

与空白组比较,模型组关节软骨改良 Mankin's 评分显著增高,差异有统计学意义($P < 0.01$);膝舒方高、低剂量组可明显降低改良 Mankin's 评分,与模型组比较组间差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 3。

2.4 膝舒方对阳虚寒凝型膝骨关节炎兔血清细胞因子的影响

与空白组相比,模型组实验兔血清促炎细胞因子

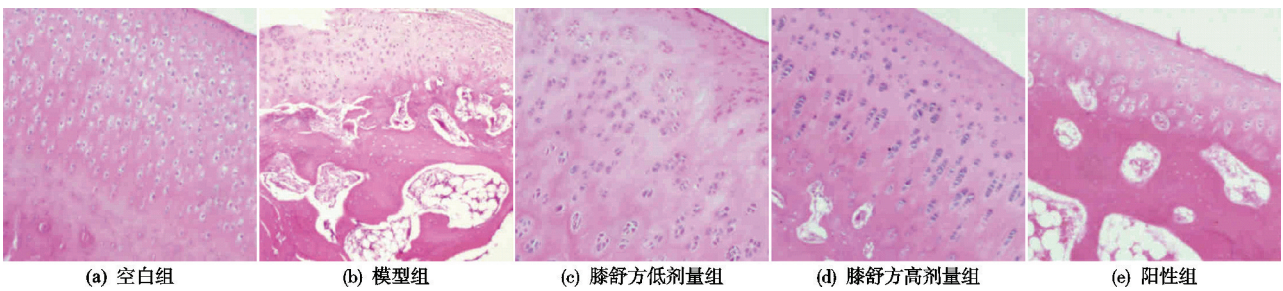


图 1 各组关节软骨形态学代表性图片(HE, ×100)

表 3 膝舒方对阳虚寒凝型膝骨关节炎兔关节软骨改良 Mankin's 评分的影响($n=12, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g · kg ⁻¹)	改良 Mankin's 评分/分
空白组		0 ± 0
模型组		7.58 ± 0.79 ¹⁾
膝舒方低剂量组	8.0	4.83 ± 0.94 ²⁾
膝舒方高剂量组	16.0	4.67 ± 0.78 ²⁾³⁾
阳性组	0.1	5.55 ± 0.90 ²⁾

注:1)与空白组比较, $P < 0.01$;2)与模型组比较, $P < 0.01$;3)与阳性组比较, $P < 0.05$ 。

表 4 膝舒方对阳虚寒凝型膝骨关节炎兔血清促炎/抗炎细胞因子的影响($n=12, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g · kg ⁻¹)	促炎细胞因子		抗炎细胞因子	
		IL-1β/(ng · L ⁻¹)	IL-6/(mg · L ⁻¹)	IL-4/(ng · L ⁻¹)	IL-10/(ng · L ⁻¹)
空白组		6.53 ± 1.49	48.06 ± 10.77	3.14 ± 0.78	35.69 ± 7.81
模型组		97.05 ± 19.22 ¹⁾	214.38 ± 43.36 ¹⁾	40.85 ± 10.03 ¹⁾	58.92 ± 8.40 ¹⁾
膝舒方低剂量组	8.0	60.17 ± 13.81 ²⁾³⁾	131.04 ± 33.98 ²⁾³⁾	87.44 ± 21.25 ²⁾³⁾	113.05 ± 28.46 ²⁾³⁾
膝舒方高剂量组	16.0	52.85 ± 14.24 ²⁾³⁾	109.55 ± 18.72 ²⁾³⁾	95.06 ± 19.91 ²⁾³⁾	124.99 ± 32.83 ²⁾³⁾
阳性组	0.1	36.58 ± 9.30 ²⁾	85.43 ± 20.18 ²⁾	46.59 ± 8.36	56.47 ± 11.25

注:1)与空白组比较, $P < 0.01$;2)与模型组比较, $P < 0.01$;3)与阳性组比较, $P < 0.01$ 。

IL-1β、IL-6 及抗炎细胞因子 IL-4、IL-10 水平均有明显增高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。给药 6 周后,与模型组相比,膝舒方高、低剂量组 IL-1β、IL-6 水平均有显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);IL-4 和 IL-10 水平均有显著增高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。阳性组血清 IL-1β 和 IL-6 表达较模型组显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);IL-4 和 IL-10 表达与模型组相比差异无统计学意义,见表 4。

2.5 膝舒方对阳虚寒凝型膝骨关节炎兔 MMP-1、MMP-3 和 TIMP-1 基因表达的影响

与空白组相比,模型组实验兔关节软骨 MMP-1、MMP-3 和 TIMP-1 mRNA 相对表达量均有明显上调

表 5 膝舒方对阳虚寒凝型膝骨关节炎兔关节软骨 MMP-1、MMP-3 和 TIMP-1 mRNA 相对表达量的影响($n=12, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g · kg ⁻¹)	MMP-1	MMP-3	TIMP-1
空白组		1.02 ± 0.18	0.84 ± 0.12	1.19 ± 0.36
模型组		2.94 ± 0.25 ¹⁾	5.13 ± 0.67 ¹⁾	3.92 ± 0.96 ¹⁾
膝舒方低剂量组	8.0	2.16 ± 0.62 ²⁾	2.87 ± 0.81 ²⁾	4.10 ± 0.74
膝舒方高剂量组	16.0	2.03 ± 0.29 ²⁾	3.02 ± 0.55 ²⁾	3.87 ± 0.92
阳性组	0.1	1.85 ± 0.44 ²⁾	2.90 ± 0.39 ²⁾	4.05 ± 0.68

注:1)与空白组比较, $P<0.01$;2)与模型组比较, $P<0.01$ 。

3 讨论

膝骨关节炎属中医学“骨痹”“历节病”等范畴,多因外邪凝滞于络,经脉痹阻不通,致膝关节及周围肌肉出现肿胀、疼痛、僵硬、屈伸不利等症状;阳虚寒凝型患者则因阳气不足,自体虚弱,外感风寒湿邪,同时伴有神疲倦怠、不欲饮食、形寒肢冷、苔白舌淡等症状^[10]。本研究采用关节腔注射木瓜蛋白酶的方式建立膝骨关节炎兔模型,实验兔的关节腔可见炎症反应、滑膜充血等现象,关节切片形态学观察可见软骨受损明显,结合反映膝关节功能的 Lequesne 指数,提示模型建立成功;采用寒凉之品薄荷油灌胃联合气候箱营造湿冷环境的方式诱导实验兔的阳虚寒凝证^[5,11],根据实验兔整体表现及中医证候积分,其基本符合阳虚寒凝的证候特征,能够一定程度上模拟疾病状态。

阳虚寒凝型膝骨关节炎主要内因为肝肾亏虚、气血失和,主要外因为外感风寒湿邪、筋脉痹阻不通。膝舒方用狗脊、熟地为君,补肝肾,强筋骨;当归、党参为臣,以补益气血,助君益气;一佐杜仲、淫羊藿温阳散寒,祛风除湿;二佐土元、鳖甲活血通络,软坚散结;三佐独活、威灵仙祛寒除湿,通络镇痛;川牛膝逐瘀通络,引药下行为使;诸药合用,共奏“补肝肾亏虚、调气血失和、祛寒湿瘀痹”之功。临床研究表明,膝舒方口服可显著降低膝骨关节炎膝关节疼痛视觉模拟量表(VAS)评分及Lequesne指数评分,改善患者的临床症状特征^[12]。

免疫炎症过程与膝骨关节炎病理进展及关节软骨的退行性改变密切相关,促炎/抗炎细胞因子在该过程中发挥举足轻重的作用。IL-1 β 和 IL-6 作为主要的炎症介质,参与膝骨关节炎发生发展的整个过程,不仅介导关节腔的炎症级联反应,还可刺激多种蛋白酶的激活,影响软骨细胞的合成/凋亡,导致关节软骨破坏^[13];有研究指出膝骨关节炎患者关节液和血清中 IL-1 β 、IL-6 水平与其病程发展正相关,可作为判断病情的生物标志物^[14]。抗炎细胞因子 IL-4 和 IL-10 一方面增强机体天然免疫力,经负反馈效应抑制促炎因

($P<0.01$)。给药 6 周后,膝舒方高、低剂量及塞来昔布可使 MMP-1、MMP-3 mRNA 相对表达量显著下调,与模型组比较差异均有统计学意义($P<0.01$),对 TIMP-1 mRNA 相对表达量则无明显影响,见表 5。

子的过度释放,另一方面可保护软骨和维持关节结构的完整性,有利于软骨细胞的修复^[15];据报道将 IL-4 和 IL-10 融合蛋白应用于膝骨关节炎动物模型,能减轻机体的疼痛症状,改善膝关节功能,说明抗炎细胞因子疗法具有潜在的临床应用价值^[16-17]。本研究中模型组膝骨关节炎兔血清促炎细胞因子 IL-1 β 、IL-6 及抗炎细胞因子 IL-4、IL-10 水平比空白组正常兔均有明显增高,说明这些细胞因子与阳虚寒凝型膝骨关节炎的病变进程存在相关性;给药 6 周后,膝舒方各剂量组 IL-1 β 和 IL-6 水平均有显著降低,IL-4 和 IL-10 水平均有显著增高,提示膝舒方可能是通过纠正促炎/抗炎细胞因子间的失衡,改善关节腔内炎症反应,维持关节微环境稳态,进而减轻软骨的退变,促进骨组织的修复;塞来昔布对血清 IL-4 和 IL-10 表达无显著影响,提示其抗膝骨关节炎作用环节与膝舒方有所不同。

关节软骨由软骨细胞和细胞外基质构成,正常情况下细胞外基质的合成与降解处于平衡状态;当膝骨关节炎发生时,软骨细胞过量分泌基质金属蛋白酶(MMPs),打破了基质金属蛋白酶与组织金属蛋白酶抑制因子(TIMPs)之间的动态平衡,从而引发细胞外基质的过度降解,促使软骨细胞过度凋亡,直接或间接造成软骨的破坏和缺损^[18]。其中 MMP-1 对细胞外基质最具特征、含量最多的 II 型胶原的降解起主导作用, MMP-3 参与降解细胞外基质、基质膜成分及骨有机质,还能激活其他基质金属蛋白酶相关因子,引起级联效应;多项研究^[19-20]均表明, MMP-1 和 MMP-3 在膝骨关节炎患者的关节软骨组织及滑膜液中表达明显增高,其持续表达贯穿病程始终,抑制因子 TIMP-1 水平变化虽与 MMP-1 和 MMP-3 的表达正相关,但基质金属蛋白酶/组织金属蛋白酶抑制因子总体上呈现失衡状态。叶超等^[21]研究指出,基质金属蛋白酶和组织金属蛋白酶抑制因子-1 等不仅可作为膝骨关节炎诊断、病情严重程度及疗效评估的指标,还与膝骨关节炎中医辨证分型有一定相关性。本研究结果显示,阳虚寒凝型膝骨关节炎模型兔关节软骨中 MMP-1、MMP-3

和 TIMP-1 mRNA 相对表达量均有明显上调,说明模型兔的关节软骨组织处于过度降解状态,这与上述文献报道的结论类似;给药 6 周后,膝舒方高、低剂量可显著下调 MMP-1 及 MMP-3 mRNA 相对表达量,对 TIMP-1 mRNA 相对表达量则无明显影响,结合关节软骨形态学病理研究结果,提示膝舒方的作用环节之一是通过调控 MMP-1 和 MMP-3 释放,纠正基质金属蛋白酶/组织金属蛋白酶抑制因子的失衡状态,抑制关节基质降解,延缓软骨退变。

综上所述,膝舒方一定程度上可减轻阳虚寒凝型膝骨关节炎兔关节组织的炎症反应,维持软骨细胞赖以生存的微环境,并可纠正关节基质代谢紊乱,促进软骨修复,改善膝关节功能及软骨损伤。鉴于膝骨关节炎病理进程涉及因素的复杂性及相关因子的关联性,膝舒方是通过何种信号通路干预膝骨关节炎,有待进一步研究。

参考文献

[1] 薛庆云,王坤正,裴福兴,等. 中国 40 岁以上人群原发性骨关节炎患病状况调查[J]. 中华骨科杂志, 2015, 35(12):1206-1212.

[2] 中国中医药研究促进会骨伤科分会. 膝骨关节炎中医诊疗指南(2020 年版)[J]. 中医正骨, 2020, 32(10):1-14.

[3] 李名,蒋鼎,谭则成,等. 膝骨关节炎患者中医证素及证型分布特征研究[J]. 广州中医药大学学报, 2022, 39(10):2231-2237.

[4] 王永生,盛儒丹,杨德钱. 膝舒方辅治膝关节炎骨性关节炎疗效观察[J]. 实用中医药杂志, 2018, 34(10):1207-1208.

[5] 桂苗,施珊妮,黄泽灵,等. 阳虚寒凝型兔膝骨关节炎模型建立初探[J]. 福建中医药, 2022, 53(8):32-34.

[6] FRANCHIGNONI F, SALAFFI F, GIORDANO A, et al. Psychometric properties of self-administered Lequesne algofunctional indexes in patients with hip and knee osteoarthritis: an evaluation using classical test theory and Rasch analysis[J]. Clin Rheumatol, 2012, 31(1):113-121.

[7] MA T, CHEN H, RUAN H, et al. Natural product, bilobalide, improves joint health in rabbits with osteoarthritis by anti-matrix degradation and antioxidant activities[J]. Front Vet Sci, 2022, 9:1034623.

[8] 方肇勤,卢文丽. 辨证论治实验方法学:实验小鼠诊疗与辨证[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2006:110-112.

[9] ASJID R, FAISAL T, QAMAR K, et al. Effect of platelet-rich plasma on Mankin scoring in chemically-induced animal model of osteoarthritis[J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2019, 29(11):1067-1071.

[10] 毛珍,江润,刘永红,等. 固本通络针法联合热敏灸对阳虚

寒凝证膝骨关节炎患者骨关节功能评分的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41(7):790-794.

- [11] 郭蕾,张赫,刘俊昌,等. 薄荷油叠加气候箱建立阳虚寒凝型膝痹模型兔[J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(23):3696-3701.
- [12] 黄肖华,冯英华,周祥兴,等. 壮药“膝痹外洗方”结合“膝舒方”治疗膝骨关节炎的临床研究[J]. 中医药导报, 2019, 25(23):61-63.
- [13] KOYAMA T, UCHIDA K, FUKUSHIMA K, et al. Elevated levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in the synovial tissue of patients with labral tear: a comparative study with hip osteoarthritis[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2021, 22(1):33.
- [14] KUMAGAI K, FUJIMAKI H, YAMADA S, et al. Changes of synovial fluid biomarker levels after opening wedge high tibial osteotomy in patients with knee osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2021, 29(7):1020-1028.
- [15] VAN HELVOORT E M, VAN DER HEIJDEN E, VAN ROON J A G, et al. The role of interleukin-4 and interleukin-10 in osteoarthritic joint disease: a systematic narrative review[J]. Cartilage, 2022, 13(2):19476035221098167.
- [16] STEEN-LOUWS C, POPOV-CELEKETIC J, MASTBERGEN S C, et al. IL4-10 fusion protein has chondroprotective, anti-inflammatory and potentially analgesic effects in the treatment of osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2018, 26(8):1127-1135.
- [17] VAN HELVOORT E M, POPOV-CELEKETIC J, EIJKELKAMP N, et al. Canine IL4-10 fusion protein provides disease modifying activity in a canine model of OA: an exploratory study[J]. PLoS One, 2019, 14(7):e0219587.
- [18] KO J H, KANG Y M, YANG J H, et al. Regulation of MMP and TIMP expression in synovial fibroblasts from knee osteoarthritis with flexion contracture using adenovirus-mediated relaxin gene therapy[J]. Knee, 2019, 26(2):317-329.
- [19] SHI L, WANG K, YU J, et al. Relationship between magnetic resonance T2-mapping and matrix metalloproteinase 1, 3 in knee osteoarthritis[J]. Indian J Orthop, 2020, 55(4):974-982.
- [20] 罗媚,杜信眉,周学东. 基质金属蛋白酶与骨关节炎发生发展关系的研究进展[J]. 四川大学学报(医学版), 2023, 54(1):77-82.
- [21] 叶超,陈婧,刘向春,等. 不同证候膝骨关节炎患者证候程度评分与关节液炎症指标的典型相关分析[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2021, 29(3):17-20, 26.

(收稿日期:2023-12-08)