

加味阳和汤对膝骨性关节炎软骨细胞凋亡的影响研究

高伟华¹ 李玉杰¹ 杨鸿冉¹ 李志超¹ 杨振国¹ 齐鲁¹ 董建文^{1△} 王文波^{1△}

[摘要] **目的:**观察加味阳和汤对膝骨关节炎兔关节软骨骨形态发生蛋白-2(BMP2)及 Sry 相关组蛋白 9(Sox9)表达的影响。**方法:**将健康新西兰大白兔随机分为正常组、模型组和实验组。除正常组外,其余 2 组动物均按照改良赫尔特法(Hulth 法)制作膝骨关节炎模型后,分组处理,4,6,8 周后取材,制作标本,行免疫组化染色观察Ⅱ型胶原(Col Ⅱ)的变化、实时聚合酶链反应(PCR)监测软骨组织中 BMP2 和 Sox9 的表达情况、TUNEL 监测软骨组织中软骨细胞凋亡情况。**结果:**正常组Ⅱ型胶原的表达量最高,模型组表达量最少,骨性关节炎时间越长阳性染色越浅,同一时间段内实验组染色较好,且分布较均匀;BMP2 在正常软骨中少量表达,而在骨性关节炎软骨中有大量表达,骨性关节炎时间越久,BMP2 的表达量越多,同一时间段内实验组的 BMP2 的表达量比模型组低;而 Sox9 在正常组中有大量表达,而在模型组中表达量明显减少,在同一时间段内实验组均较模型组的表达量增高。正常组软骨中凋亡的软骨细胞数量较少,而在模型组中同一时间段内软骨细胞凋亡数量较正常组明显增加,骨性关节炎时间越久凋亡细胞数量越多,实验组经治疗后细胞凋亡数量减少。**结论:**加味阳和汤能够下调膝关节中 BMP2 的表达量,上调 Sox9 的表达量,从而减缓骨性关节炎软骨退变,促进Ⅱ型胶原的表达,进而减少软骨细胞的凋亡。

[关键词] 膝骨关节炎;加味阳和汤;凋亡;骨形态发生蛋白-2;Sry 相关组蛋白 9

[中图分类号] R684.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]**1005-0205(2021)01-0001-05

Study on the Apoptosis Mechanism of Jiawei Yanghe Decoction on Chondrocytes in Osteoarthritis

GAO Weihua¹ LI Yujie¹ YANG Hongran¹ LI Zhichao¹
YANG Zhenguo¹ QI Lu¹ DONG Jianwen^{1△} WANG Wenbo^{1△}

¹The Second Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250001, China.

Abstract Objective: To observe the effect of Jiawei Yanghe decoction on the expression of bone morphogenetic protein-2 (BMP2) and Sry-related HMG-box gene 9 (Sox9) in articular cartilage of rabbits with knee osteoarthritis. **Methods:** Healthy New Zealand white rabbits were randomly divided into normal group, model group and experimental group. In addition to the normal group, knee osteoarthritis model was made according to the modified Hulth method, after 4, 6 and 8 weeks of treatment, samples were taken and specimens were made, the changes of type II collagen (Col II) were observed by immunohistochemistry, the expression of BMP2 and Sox9 in cartilage was monitored by PCR, and the apoptosis of chondrocytes was monitored by TUNEL. **Results:** The expression of type II collagen was the highest in the normal group, the least in the model group, the longer the osteoarthritis time, the lighter the positive staining, the staining in the experimental group was better in the same period, and more evenly distributed. BMP2 was scarcely present in normal articular

cartilage, but there was a lot of expression in osteoarthritis, the longer the osteoarthritis time, the more BMP2 expression, and the expression of BMP2 in the experimental group was lower than that in the model group in the same period. However, Sox9 was largely expressed in normal articular cartilage, but significantly reduced in the model group, and amount of expression in the experimental group was higher than that in the model group in the same period. The number of apoptotic chondrocytes in the cartilage of the nor-

基金项目:国家自然科学基金项目(81503594, 81800740, 81173286)

济南市科技发展计划项目(201102063)

中国博士后基金项目(2018M630761)

¹ 山东中医药大学第二附属医院(济南, 250001)

[△]通信作者 E-mail: dongjianwen2006@sina.com(董建文)
wangwenbo@126.com(王文波)

mal group was little, but the number of apoptotic chondrocytes in the same period of time in the model group was significantly higher than that in the normal group, the number of apoptosis increased with osteodystrophy time, and the number of apoptosis decreased in the experimental group after treatment. **Conclusion:** Jiawei Yanghe decoction can decrease the expression of BMP2 and up regulate the expression of Sox9 in knee joint, which can slow down the degeneration of osteoarthritis cartilage, promote the expression of type II collagen, and reduce the apoptosis of chondrocytes.

Keywords: knee osteoarthritis; Jiawei Yanghe decoction; apoptosis; bone morphogenetic protein-2 (BMP2); Sry-related HMG-box gene 9 (Sox9)

加味阳和汤是名家名方,是董建文教授从医 40 余载的经验总结,治疗骨性关节炎取得了满意的临床疗效^[1],而且通过动物实验发现,加味阳和汤可抑制膝关节炎兔关节软骨的退变^[2],减轻软骨细胞的退变,延缓胶原蛋白的紊乱^[3],但是对于其起效的分子机制尚不明确。骨形态发生蛋白-2 (Bone Morphogenetic Protein-2, BMP2) 是诱导骨组织形成的关键因子,对骨与软骨的修复有明显的促进作用; Sry 相关组蛋白 9 (Sox9) 在软骨内成骨的过程中起了关键的作用,是调控软骨细胞增殖和分化的核心, Sox9 可促进软骨细胞的生成及发育成熟,还可促进软骨 ECM 的主要组成成分 II 型胶原 (Col II) 的表达^[4]。这与加味阳和汤对于骨性关节炎治疗的现代作用机制相似,因此通过实验设计,观察加味阳和汤对于骨性关节炎中 BMP2 及 Sox9 表达的影响,以探讨其治疗骨性关节炎分子机制。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

60 只 6 月龄雄性普通级健康新西兰大白兔, 体重 (2.70 ± 0.32) kg, 由济南跑马岭动物繁殖中心提供, 合格证号为 SCXK (鲁) 2010005。饲养条件: 室温控制在 15~25 °C, 相对湿度维持在 45%~60%, 动物饲料均由济南跑马岭动物繁殖中心提供, 动物自由摄食和饮水, 饲养及实验地点为山东中医药大学附属医院实验动物中心。

1.2 实验药物

加味阳和汤, 药物组成包括熟地黄 21 g, 肉桂 9 g, 鹿角胶 12 g, 海风藤 15 g, 鸡血藤 15 g, 麻黄 3 g, 川牛膝 12 g, 白芥子 15 g 等, 由山东中医药大学第二附属医院中药制剂室统一煎制。

按照 Meeh-Rubner 公式: 新西兰兔所需药物剂量 = 人所需药物剂量 × 兔体表面积 A, $A = K \times W^{2/3} \times 10^{-4}$, W 为兔体质量, K 为常数 (家兔为 10, 人为 10.6), 计算出大鼠给药剂量作为大鼠与成人的等效剂量。兔每只 2.5 kg 每次服用生药量为 12 g, 浓煎为 20 mL。

其他药物: 3% 戊巴比妥 (山东中医药大学附属医院实验动物中心), 青霉素 (鲁抗制药, H37020079)。

1.3 试剂与仪器

pH8.8 及 pH6.8 的 Tris-Cl, 四甲基乙二胺, 30% 亚甲基双丙烯胺溶液 (Acr/Bis), 10% 过硫酸铵

(APS), 以上均从上海生物工程公司购买。

10 mL 10% 分离胶配置: 蒸馏水 (dH₂O) 4.2 mL, pH8.8 Tris 碱 2.5 mL, 3.3 mL 聚丙烯酰胺, 10% 过硫酸铵 50 μL, 四甲基乙二胺 5 μL。

5 mL 5% 浓缩胶配置: dH₂O 2.75 mL, pH6.8 Tris 碱 1.25 mL, 聚丙烯酰胺 0.83 mL, 2% 过硫酸铵 200 μL, 四甲基乙二胺 5 μL。

转移缓冲液 10×: 甘氨酸 29 g, 十二烷基硫酸钠 3.7 g, Tris 碱 58 g, dH₂O, 定容至 1 000 mL。

洗膜缓冲液 1 000 mL: 缓冲生理盐水 (TBS) 1× 100 mL, 吐温 20 (Tween20) 1 mL, 蒸馏水 899 mL。

缓冲生理盐水 (TBS) 10× 1 000 mL: 12.114 g Tris 碱 + 87.75 g NaCl 蒸馏水定容。

电泳缓冲液 10× pH8.3: 甘氨酸 144 g, 十二烷基硫酸钠 10 g, Tris 碱 30.2 g, dH₂O 800 mL, 定容至 1 000 mL。

青链霉素双抗配制: 青霉素、链霉素浓度均为 100 IU/mL。首先配置母液, 浓度为 2×10^4 IU/mL, 采用 400 万单位的青霉素 1 瓶, 100 万单位链霉素 4 瓶, 加入 200 mL 的双蒸水中, 搅拌溶解即可, -30 °C 保存; 每次使用时在 100 mL 的培养基中加入 0.5 mL 母液, 得到浓度便为 100 IU/mL。

聚合酶链反应 (PCR) 相关试剂: SYBR (DBI 公司, 德国), 6× 上样缓冲液、TRIzol、反转录试剂盒、核酸均购自 TAKALA 公司。焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水 (碧云天), 琼脂糖 (上海生工), Gel Red 购自 Biotium 公司 (美国); PCR 引物均由上海华大基因公司合成; 异丙醇无水、氯仿、乙醇等试剂由山东中医药大学附属医院中心实验室提供。

鼠抗兔单克隆抗体 BMP2, COLL II (武汉博士德生物技术有限公司)。一抗: 兔抗大鼠、小鼠、人多克隆抗体 (武汉博士德生物技术有限公司)。Tunel 细胞凋亡检测试剂盒 (显色法), Wanleibio 免疫组化试剂盒。抗原修复液 (0.01 mol/L, pH6.0 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液), 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗兔 IgG (II 抗) 及高敏过氧化物酶复合物 (SABC), 购自武汉博士德生物工程有限公司。

石蜡切片机 (Leica 公司), 石蜡包埋机 (Sakura 公司), LKB 超薄切片机、图像数字分析仪 (Bio-RAD 公司), 微量

加样器(美国 Eppendorf 公司);离心机(Thermo,美国)。

1.4 方法

1.4.1 动物分组及造模 将 60 只成年新西兰大白兔随机分为三组,正常组、实验组和模型组,每组 20 只。实验组和对照组均给以手术制作骨性关节炎模型。

造模方法:采用改良赫尔特法(Hulth 法)造模^[5],采用 3%戊巴比妥耳缘静脉麻醉后,常规剃毛、碘伏消毒,切皮后将新西兰大白兔一侧膝关节前交叉韧带、内侧副韧带于关节线水平切断并将内侧半月板切除,采用前抽屉试验确认前交叉韧带完全断裂,外翻测试内侧副韧带断裂后逐层关闭伤口。

术后常规给予青霉素 50 万单位肌注 3 d,每天碘伏擦拭手术切口处防止感染。术后 1 周开始驱赶动物,2 次/d,30 min/次,4 周后造模成功。

模型组和实验组:每天定时给予灌胃,实验组给以加味阳和汤灌胃,模型组给以等量盐水灌胃,每周灌胃 6 d,休息 1 d,直至动物被处死。

1.4.2 取材方法及观察指标 各组于灌胃后第 4、6、8 周分别于拍片后处死 6 只动物。解剖膝关节后,取股骨髁的一部分 1 cm 厚的组织块于 4%多聚甲醛溶液中固定,用于组织切片;其余部分及胫骨髁精确取材,将软骨分离后置于冻存管内,液氮储存。用 Trizol 液浸泡,液氮冷冻,用于实时 PCR 检测。

1.4.3 免疫组化监测Ⅱ型胶原表达

1.4.3.1 石蜡切片后常规脱蜡至水,于切片滴加 3% H₂O₂,于湿盒中孵育,PBS 洗 2 遍,每遍冲洗 3 min;采用复合抗原修复液常温修复 10 min,PBS 洗 3 遍,每遍冲洗 5 min;而后用 H₂O₂ 处理标本 10 min,再用 PBS 冲洗 3 遍,每遍 5 min;随后加入稀释的一抗(1:100),置于保湿盒中,4℃下过夜孵育,而后用 PBS 冲洗 3 次后,滴加 HRP 标记的二抗,并置于保湿盒中 37℃孵育 20 min后,PBS 冲洗 3 次,滴加 3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐(DAB),显色。苏木精复染,细自来水流水冲洗,1%盐酸分化液分化,自来水细流水冲洗。脱水、透明,中性树胶封片,光学显微镜观察。

1.4.3.2 实时 PCR 监测软骨组织中 BMP2 和 Sox9 的表达情况 采用 RNeasy Lipid Tissue Mini Kit 试剂盒提取软骨总 RNA,按照说明书中的步骤操作,大体过程如下。匀浆处理:取出液氮中标本,称取 50 mg,于液氮中将组织研磨成粉,然后加入 1 mL 溶液进行研磨、匀浆、静置、振荡、孵育离心后,按照说明书进行置换操作,吸出溶液总 RNA 稀释液,进行 RNA 浓度测定,行 cDNA 的合成、PCR 引物序列扩增(见表 1)、解冻模板、引物及 SYBR。

1.4.4 TUNEL 监测软骨组织中软骨细胞凋亡情况

石蜡切片后常规脱蜡至水后进行 TUNEL 染色:

表 1 引物序列

基因	引物长度/bp	上游引物	下游引物
BMP2	79	CGCCTCAAATC CAGCTGTAAG	GGGCCACAATC CAGTCGTT
Sox9	273	GGTGCTCAAGGGC TACGACT	GGGTGGTCTTT CTTGTGCTG
GAPDH	147	TCGGAGTGAACG GATTTGGC	TGCCGTGGGTG GAATCATAC

滴加 0.1% Triton X-100(0.1%柠檬酸钠盐配制) 50 μL,室温放置 8 min 透化;然后 PBS 漂洗 5 min,3 遍;滴加 3% H₂O₂ 50 μL,室温放置 10 min 进行封闭;然后 PBS 漂洗 5 min,3 遍;滴加 TUNEL 反应液 50 μL,保湿、避光、37℃孵育 60 min,PBS 漂洗 5 min,3 遍;切片取出,擦干周围多余水分,加 DAB 底物 50 μL,待颜色刚刚变深时迅速置于水中终止反应。PBS 漂洗,3×5 min;苏木素复染,脱水、透明、封片。光镜下观察,计算坏死率:各组坏死率=(坏死细胞数/总细胞数)×100%。

2 结果

2.1 软骨组织中Ⅱ型胶原表达情况

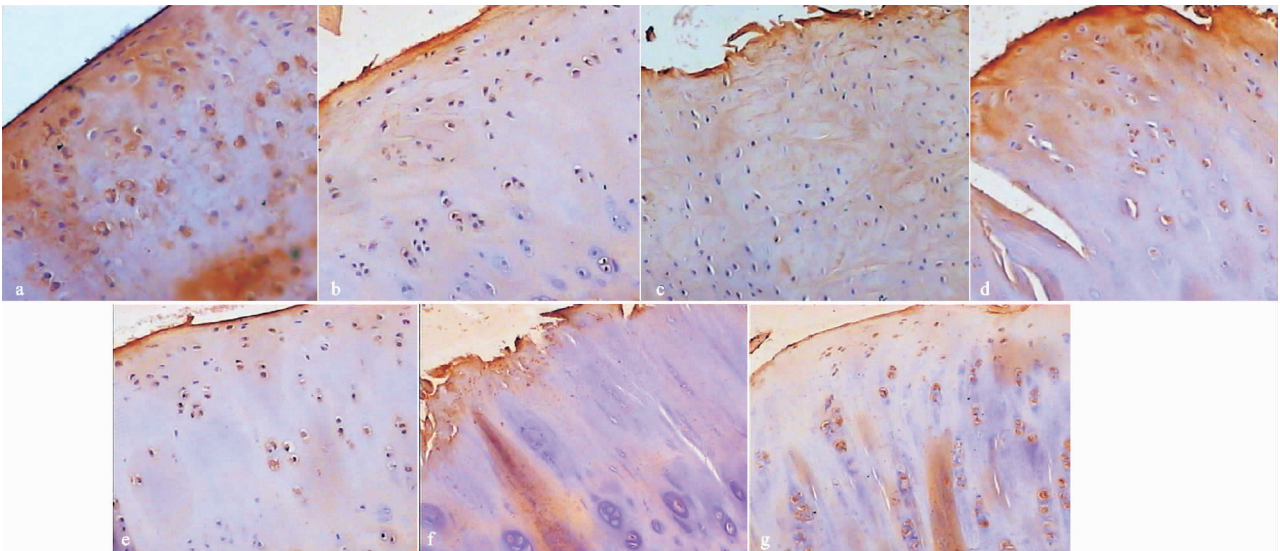
正常组Ⅱ型胶原表达量高,阳性染色分布于关节软骨的各层,而模型组阳性染色分别不均匀,骨性关节炎时间越长阳性染色越浅,而实验组染色好于模型组,且分布较均匀,同一时间段内实验组染色较好,且分布均匀(见图 1)。

2.2 软骨细胞中 BMP2 及 Sox9 表达情况

结果显示:BMP2 在正常软骨中少量表达,而在骨性关节炎的骨中有大量表达,骨性关节炎时间约久,BMP2 的表达量越多,BMP2 的表达量与骨性关节炎的严重程度表现出一致性,而同一时间段内实验组的 BMP2 的表达量和模型组相比降低(见图 2a)。而 Sox9 表达量表现与 BMP 表达量不同。在正常组中均有大量表达,而在模型组中表达量明显减少,骨性关节炎时间越长表达量越低,在同一时间段内,实验组均较模型组的表达量多,而比正常组表达量少(见图 2b)。

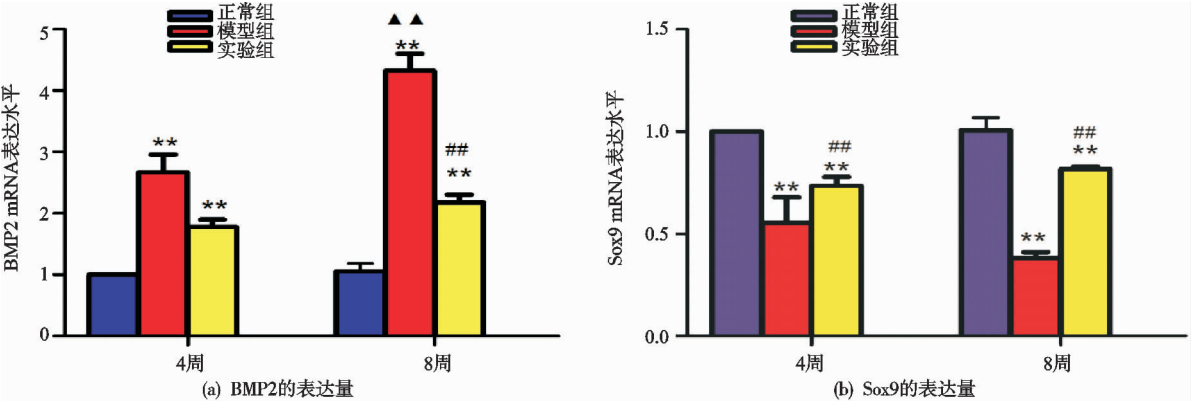
2.3 加味阳和汤对骨性关节炎兔软骨组织细胞凋亡的影响

采用 TUNEL 法检测各组软骨组织中细胞凋亡结果显示:细胞核内含有棕黄色颗粒的细胞为 TUNEL 阳性细胞,正常组软骨中凋亡的软骨细胞数量较少(图 3a),而在模型组中同一时间段内软骨细胞凋亡数量较正常组明显增加,骨性关节炎时间越久凋亡细胞数量越多,实验组经治疗后,细胞凋亡数量减少(图 3b-h)。



(a) 正常组免疫组化, 显示软骨细胞排列整齐, 软骨裂隙较少, 阳性染色均匀分布于各层; (b) 模型组4周的图片, 软骨细胞排列不均匀, 阳性染色较少, 分布于浅层; (c) 治疗4周, 相比模型组, 软骨细胞排列较整齐, 细胞阳性染色存在于各层; (d) 模型组6周, 软骨可见明显裂隙, 软骨细胞数量更加减少, 阳性染色分布于浅层; (e) 实验组6周, 相比(d), 软骨细胞数量更多, 阳性染色范围更广, 集中在软骨的各层; (f) 模型组8周, 软骨存在较多裂隙, 软骨细胞明显减少, 阳性染色范围更小; (g) 实验组8周, 软骨存在较少裂隙, 软骨细胞数量明显增多, 阳性染色范围更广

图 1 II 型胶原免疫组化染色图片 (×200)



注: “和正常组比较, 差异有统计学意义; ”和模型组比较, 差异有统计学意义; “^和4周模型组比较, 差异有统计学意义。

图 2 BMP2 及 Sox9 表达量

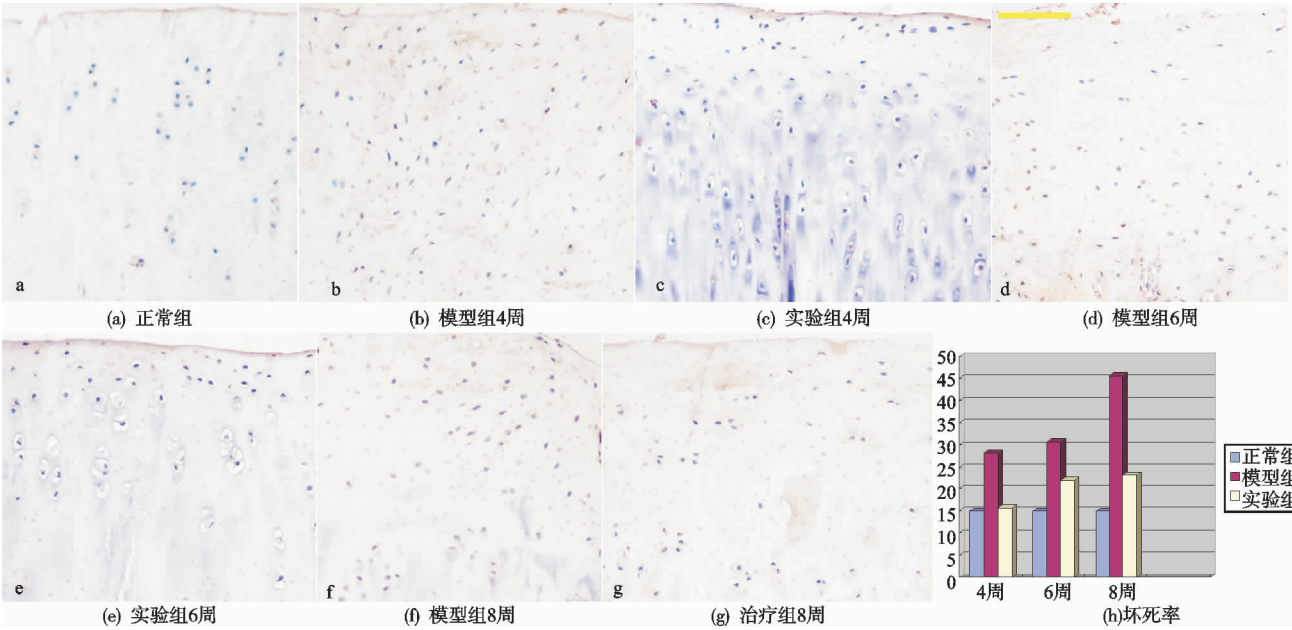


图 3 TUNEL 法软骨组织中细胞凋亡染色结果(细胞核内含有棕黄色颗粒的细胞为 TUNEL 阳性细胞)(×200)

3 讨论

骨性关节炎(Osteoarthritis, OA)是一种常见的慢性退行性骨关节疾病,60 岁以上人群有膝骨性关节炎表现者约 61%^[6],随着老龄社会的进展,骨性关节炎对人类健康的影响越来越大。本病是整个关节功能丧失的疾病,病变涉及到软骨的蜕变与重建、半月板、韧带、滑囊及软骨下骨的改变^[7]。软骨细胞作为软骨内唯一的细胞,在骨性关节炎发病过程的作用也越来越受到重视^[8]。如何减少软骨细胞的坏死,增强软骨细胞的活力,是治疗骨性关节炎的重要方面。在 OA 的药物治疗方面,现代医学缺乏有效的干预手段,而中医、中药在其预防和治疗骨性关节炎方面起到了很好的作用^[9-10]。但是其起效的机制尚不明确。

Sox9 是一个软骨生成的重要调节因子,对于软骨的发育到十分重要的作用,能够调整软骨的成熟与分化,维持软骨的正常表型,促进骨髓间充质干细胞向软骨的分化。是维持软骨细胞形态及功能的重要因子^[4]。研究表明正常的软骨中 Sox9 呈现高表达,而在骨性关节炎中 Sox9 的表达量明显减少^[11],笔者在实验中也观察到这个现象,骨性关节炎越重 Sox9 的表达量越低。而加味阳和汤能够调节骨性关节炎软骨中 Sox9 的表达量。Sox9 的高表达能够在一定程度上缓解软骨细胞的凋亡。Sox9 的表达受到多方面的调控,虽然有的文献观察到 BMP2 能够上调软骨细胞中 Sox9 的表达从而促进 II 型胶原表达^[12],这与笔者的观察结果不一致,这可能由于 BMP2 在骨性关节炎中的不同作用导致。

BMP2 被认为是 BMP 家族内活性最强的因子,在骨生成过程中起到重要的作用,不仅参与了软骨成骨的过程和滑膜关节的形成过程,并且在大鼠关节软骨的形成和维持正常形态方面起到重要的作用^[13],然而 BMP2 在骨性关节炎的发生及发展方面起到的作用目前仍有争议^[14]。研究表明正成人的软骨中 BMP2 的表达量很少^[15],而且在不同时期骨性关节炎软骨中的表达量也不尽相同,BMP2 在骨性关节炎的增生骨赘^[15]、滑膜及半月板^[13]及血液中表达量明显增高^[16],而且骨性关节炎时间越久 BMP2 的表达量越高^[16],这与笔者的观察结果一致。而有的研究显示高表达 BMP2 后并不能引起关节软骨结构的改变^[17];也有部分研究显示 BMP-2 在正常软骨的浅层表达,对于维持关节功能起到重要的作用^[13],BMP2 的高表达在骨性关节炎的发生过程中能够促软骨的修复,促进软骨细胞增殖^[18],能够对骨性关节炎的软骨起到保护作用^[14]。因此,笔者推测对于 BMP2 在维持骨性关节炎正常软骨功能方面有重要的作用,在进展期骨性关节炎的高表达可能与实验取材的部位(例如滑膜、软骨及

增生骨赘)不同及骨性关节炎的造模方法有关系,OA 发病时不同实验出现的 BMP2 不一致变化,可能是实验中仅观察到 BMP2 变化的结果,但其在 OA 发病中的作用还需要进一步研究来明确。

笔者在实验过程中发现了 BMP2 与骨性关节炎的严重程度存在一定的关联性,BMP2 对于维持关节功能有重要的作用,而对于 BMP2 在进展期关节炎的表达增高可能与骨性关节炎期间的骨赘及滑膜增生及细胞外基质退变有关系。笔者推测加味阳和汤能够改善骨性关节炎的分子机制:可能通过下调膝关节中 BMP2 的表达量,从而减缓骨性关节炎期间的骨赘及滑膜增生及细胞外基质蜕变以及上调骨性关节炎软骨中 Sox9 的表达量,促进 II 型胶原的表达,以减少软骨细胞的凋亡;但 BMP2 及 Sox9 在骨性关节炎中的相互关系仍需要进一步研究。

参考文献

- [1] 杨鸿冉,董建文,李志超,等.加味阳和汤治疗膝骨性关节炎临床研究[J].云南中医中药杂志,2014,35(4):8-10.
- [2] 王文波,董建文,杨振国,等.加味阳和汤对早期膝骨关节炎兔关节软骨的影响[J].中医正骨,2015,27(1):1-4.
- [3] 高伟华,李玉杰,杨鸿冉,等.加味阳和汤对不同时期膝骨关节炎兔关节软骨结构的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2019,27(5):7-13.
- [4] SHI S, WANG C, ACTON A J, et al. Role of sox9 in growth factor regulation of articular chondrocytes[J]. J Cell Biochem, 2015, 116(7):1391-400.
- [5] 刘献祥,李西海,周江涛.改良 Hult 造模法复制膝骨性关节炎的实验研究[J].中国中西医结合杂志,2005,25(12):1104-1108.
- [6] 区广鹏,肖军,郑佐勇,等.老年膝骨性关节炎患病危险因素的调查[J].中国组织工程研究,2012,16(50):9463-9470.
- [7] LOESER R. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ[J]. Arthritis Rheum, 2012, 64(6):1697-1707.
- [8] HALL A C. The role of chondrocyte morphology and volume in controlling phenotype-implications for osteoarthritis, cartilage repair, and cartilage engineering[J]. Current Rheumatology Reports, 2019, 21(8):38.
- [9] 张清,杨功旭,钟传棋,等.基于数据挖掘的杨功旭治疗膝骨性关节炎用药规律研究[J].中国中医骨伤科杂志,2018,26(9):46-49.
- [10] 彭时雨,谢雁鸣,黎元元,等.基于文献计量学方法对中医药治疗膝骨性关节炎主要流派的研究[J].中国中医骨伤科杂志,2016,24(9):36-41.
- [11] LEFEBVRE V, DVIR-GINZBERG M. Sox9 and the many facets of its regulation in the chondrocyte lineage[J]. Connective Tissue Research, 2016, 58(1):2-14.