

• 实验研究 •

归龟壮骨片治疗膝骨关节炎的作用机制研究

孔嘉豪¹ 刘光明² 杨佳裕² 孙波^{1,2△}

[摘要] 目的:探讨归龟壮骨片治疗膝骨关节炎模型大鼠的相关作用机制。方法:选取 64 只雄性 SD 大鼠并适应性饲养 1 周,根据手术顺序随机分为干预 28 d 和 56 d 假手术组、模型组、硫酸氨基葡萄糖组、归龟壮骨片组,每组各 8 只。除假手术组和模型组采用生理盐水灌胃,其余各组分别予硫酸氨基葡萄糖和归龟壮骨片水溶剂灌服。采用内侧半月板横断术对大鼠右侧膝关节进行膝骨关节炎造模,术中大鼠内侧半月板明显分离即确认造模成功。各组大鼠分别在造模前及造模后第 0,7,14,21,28,35,42,49,56 天进行足底机械痛阈值评估,并在造模第 28 天和第 56 天后,检测关节灌洗液中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的浓度,及胫骨平台软骨中 MMP-13、ADAMTS-5 蛋白表达,并观察大鼠膝关节冠状面病理情况。选取 10 只雄性新西兰兔制备正常兔血清和含药兔血清,选取 12 只 SD 乳鼠获取原代软骨细胞,观察归龟壮骨片含药兔血清不同浓度和作用时间对软骨细胞活力的影响。结果:模型组大鼠足底机械痛阈值明显低于假手术组,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组总效应比,归龟壮骨片组大鼠的足底机械痛阈值显著高于模型组,差异有统计学意义($P<0.001$)。归龟壮骨片组大鼠关节灌洗液中 IL-1 β 和 TNF- α 的浓度与模型组差异无统计学意义($P>0.05$);仅第 28 天时,归龟壮骨片组大鼠关节灌洗液中 IL-1 β 较模型组显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。相对于模型组,归龟壮骨片组大鼠的膝关节软骨表面大部分光滑整齐,部分软骨表层不规则,软骨细胞有弥散性增多,部分骨髓间充质发生纤维化改变,但边缘骨赘增厚明显;归龟壮骨片干预后国际膝骨关节炎研究学会(OARSI)全关节总分较模型组显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。归龟壮骨片组大鼠第 28 天的胫骨平台软骨中 MMP-13 和 ADAMTS-5 蛋白表达水平较模型组差异无统计学意义($P>0.05$);归龟壮骨片组大鼠第 56 天的胫骨平台软骨中的 MMP-13 和 ADAMTS-5 水平明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。归龟壮骨片含药兔血清能促进原代软骨细胞活力($P<0.01$),呈时序性但不呈浓度梯度依赖性。结论:归龟壮骨片可以通过抑制 MMP-13 和 ADAMTS-5 表达并促进软骨细胞的活力,减轻内侧半月板横断术诱导的软骨退变,起到保护关节软骨的作用,还能提高膝骨关节炎大鼠的足底机械痛阈值。

[关键词] 归龟壮骨片;膝骨关节炎;炎症因子;软骨;金属蛋白酶

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2024)05-0001-08

DOI:10.20085/j.cnki.issn1005-0205.240501

Mechanism of Guigui Zhuanggu Tablet on the Treatment of Knee Osteoarthritis

KONG Jiahao¹ LIU Guangming²YANG Jiayu² SUN Bo^{1,2△}

基金项目:上海市中医优势病种培育项目——膝关节炎

(ZY(2018-2020)-ZYBZ-27)

上海市卫生健康委员会中医药科研基金项目

(2018JP003)

上海市黄浦区医疗卫生重点研究发展专科——

中医骨伤科(HWZFK201808)

上海市中医药领军人才培养计划项目

(ZY(2018—2020)-RCPY-1029)

¹ 上海中医药大学(上海,201203)

² 上海市黄浦区香山中医医院

△通信作者 E-mail:sunbosy@126.com

¹ Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

² Xiangshan TCM Hospital, Shanghai 200020, China.

Abstract Objective: To investigate the mechanism of Guigui Zhuanggu tablet (GZT) on the treatment of knee osteoarthritis (KOA) in rat models and chondrocytes. **Methods:** After adapting for 1 week, 64 male SD rats were randomly divided into the sham group, model group, Glucosamine Sulfate capsule (GSC) group, and GZT group according to the

surgical sequence at treated days 28 and 56. Each group consisted of 8 rats. Except for the sham group and model group were treated with normal saline by intragastric administration, the other groups were given GSC and GZT solution. The medial meniscus transection (MMT) was used to induce KOA in the right knee joint of the rats, and the successful modeling was confirmed by the clear separation of the rat's medial meniscus during the surgery. Each group of rats was subjected to foot mechanical pain threshold assessment before and after modeling at 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 and 56 d. The concentration of IL-1 β and TNF- α in the joint lavage fluid and MMP-13 and ADAMTS-5 protein expression level in the tibial plateau cartilage were detected after 28 d and 56 d of modeling. The pathological changes in the coronal plane of the rat's knee joint were also observed. The study observed the effects of GZT-containing rabbit serum with different concentrations and treatment durations on the viability of primary chondrocytes from 12 SD rat pups, using normal serum and drug-containing serum from 10 male New Zealand rabbits. **Results:** The mechanical pain thresholds of rats in the model group were significantly lower than those in the sham group, with a statistically significant difference ($P < 0.01$). Compared with the overall effect in the model group, the mechanical pain thresholds of rats in the GZT group were significantly higher, with a statistically significant difference ($P < 0.001$). The concentrations of IL-1 β and TNF- α in the joint lavage fluid of rats in the GZT group did not differ significantly from those in the model group ($P > 0.05$), only at 28 d, the concentration of IL-1 β in the joint lavage fluid of rats in the GZT group was significantly reduced compared to that in the model group, with a statistically significant difference ($P < 0.01$). Compared with the model group, most of the surface of the knee joint cartilage in the GZT group rats was smooth and orderly, with irregularities in some parts of the cartilage, diffuse increase in chondrocytes, and fibrotic changes in some bone marrow stromal cells, however, the osteophyte was significantly thickened. The OARSI total joint scores in the GZT group rats were significantly lower than that in the model group after intervention, with a statistically significant difference ($P < 0.05$). There was no significant difference in the expression levels of MMP-13 and ADAMTS-5 in the tibial plateau cartilage of GZT group rats at 28 d compared to those in the model group ($P > 0.05$). The expression levels of MMP-13 and ADAMTS-5 in the tibial plateau cartilage of GZT group rats at 56 d were significantly reduced, with a statistically significant difference ($P < 0.05$). The GZT-containing serum could promote the viability of primary chondrocytes ($P < 0.01$), showing temporal but not concentration-dependent characteristics. **Conclusion:** GZT can protect joint cartilage by inhibiting the expression of MMP-13 and ADAMTS-5 and promoting the vitality of chondrocytes, thus reducing cartilage degeneration induced by MMT surgery. Furthermore, GZT can increase the mechanical pain threshold of rats with knee osteoarthritis.

Keywords: Guigui Zhuanggu tablet; knee osteoarthritis; inflammatory factors; cartilage; metalloproteases

膝骨关节炎(Knee Osteoarthritis, KOA)是由多因素导致膝关节软骨渐进分解的退行性疾病,我国膝骨关节炎患病率约为 15.54%~23.59%^[1]。归龟壮骨片(Guigui Zhuanggu Tablet, GZT)是国家非物质文化遗产施氏伤科疗法多年临证经验的总结,安全有效,具有温肾滋阴、活血通络的功效^[2],可用于肝肾亏虚证的脊柱、关节退行性疾病,但其具体作用机制尚不清楚。内侧半月板横断术(Medial Meniscus Transection, MMT)诱导的膝骨关节炎模型,能模拟缓慢的软骨损伤,也是评价关节疼痛的推荐模型。本研究探讨归龟壮骨片是否通过提高机械疼痛阈值和抑制炎症因子 TNF- α 及 IL-1 β 的表达,来减少关节疼痛;是否抑制 MMP-13 和 ADAMTS-5 的表达,提高软骨细胞活力,从而保护机械应力改变诱导损伤的软骨,延缓膝骨关节炎的进展,为膝骨关节炎临床治疗提供参考,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选取 SPF 级 SD 雄性大鼠 64 只,体重为(190 \pm 10)g, SPF 级 SD 乳鼠 12 只,购自北京维通利华实验

动物技术有限公司;普通级雄性新西兰兔 10 只,体重为 2.0~2.2 kg,购自上海市松江区车墩实验动物良种场有限公司。上海中医药大学动物实验中心饲养,实验动物使用许可证号为 SYXK(沪)2018-0018。动物实验获上海中医药大学实验动物福利与伦理审查批准,审查报告编号为 PZSHUTCM210702009。动物房维持 12 h/12 h 的光暗循环,温度为 20~26 $^{\circ}$ C,湿度为 40%~70%。适应性饲养 1 周后进行后续实验。

1.2 实验药物

归龟壮骨片由淫羊藿、巴戟肉、盐补骨脂、炙益智仁、丹参、当归、威灵仙、紫河车、龟甲胶、知母和制狗脊组成,经煎煮浓缩后制成薄膜衣片。归龟壮骨片(上海市黄浦区香山中医医院,产品批号为 2012001,质控标准为 SYZ-ZF-034-2005)药液制备方法:单片药片净重为 0.3 g,取 31 片溶于 201 mL 生理盐水中,于 37 $^{\circ}$ C 振荡器中摇匀,直至所有药片溶解,获得 46.27 mg/mL 浓度的溶液用于干预实验;另取 1 瓶(50 片)溶于 52 mL 生理盐水中,相同方法配制,获得 288.75 mg/mL 浓度的溶液用于制备血清。硫酸氨基葡萄糖胶囊(浙江海正药业股份有限公司,生产批号为 72103302)

药液制备方法:拆开胶囊称取 3.1 g 粉末,溶于 200 mL 生理盐水中,搅拌促融,获得 15.5 mg/mL 浓度的溶液用于干预实验。

1.3 实验仪器和试剂

大鼠白细胞介素 1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β) ELISA 试剂盒 (Elabscience, E-EL-R0012), 肿瘤坏死因子 α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒 (Elabscience, E-EL-R2856), 甲苯胺蓝染色液 (Solarbio, G2543), 阿利新蓝染色液 (Solarbio, G2542), 环保型透明液 (Servicebio, G1128), 正常山羊血清 (Servicebio, WGAR1009), MMP-13 兔多抗 (ABclonal, A16920), ADAMTS-5 兔多抗 (ABclonal, A2836), HRP 标记山羊抗兔抗体 (Beyotime, A0208), CCK-8 试剂 (Bioscience, C6005); 小动物麻醉机 (Midmark, Matrx VMR 型), Von Frey 纤维丝 (North Coast Medical, NC12775-99 型), 高速冷冻离心机 (Eppendorf, Centrifuge5427R 型), 多功能酶标仪 (Biotek, Synergy 2 型), 显微镜 (ZEISS, Primostar 3 型), 倒置式荧光显微镜 (OLYMPUS, IX71 型)。

1.4 方法

1.4.1 造模方法 术前 24 h 禁食禁水。麻醉备皮, 局部消毒。右膝关节内侧纵切约 2 cm, 逐层切开, 钝性分离暴露关节囊。自髌韧带与内侧副韧带中点, 避开关节囊血管, 沿股骨髁下缘至胫骨内侧髁上缘纵切, 暴露半月板及内侧副韧带。伸直位下, 横断内侧副韧带。45°屈曲位下, 将半月板推至半脱位, 横断半月板最薄处。生理盐水冲洗关节腔后, 依次缝合。假手术组仅暴露内侧副韧带, 不横断内侧副韧带和内侧半月板。

1.4.2 分组方法 将 64 只大鼠按手术顺序采用随机区组设计分为 28 d 的假手术组、模型组、对照组(硫酸氨基葡萄糖胶囊组)和中药组(归龟壮骨片组), 及 56 d 的假手术组、模型组、对照组(硫酸氨基葡萄糖胶囊组)和中药组(归龟壮骨片组), 每组各 8 只。将 10 只新西兰兔分为两组, 正常兔血清组(NOR 组)和归龟壮骨片含药兔血清组(GZT 组)。将 12 只乳鼠分为 3 组, 分批次杀取, CCK-8 实验分为正常兔血清梯度组(5%, 10%, 20%)和归龟壮骨片含药兔血清梯度组(5%, 10%, 20%)。

1.4.3 干预方法 采用灌胃给药方式, 灌胃量为体重的 10%。硫酸氨基葡萄糖和归龟壮骨片给药依据《药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算》^[3] 中人与大鼠的等效剂量折算表计算大鼠每千克用药剂量(硫酸氨基葡萄糖为 154.25 mg/kg, 归龟壮骨片为 162.75 mg/kg), 假手术组和模型组给予等体积生理盐水, 造模后 1 次/d, 根据分组连续 28 d 或 56 d。

1.4.4 关节灌洗液 沿股骨向股四头肌肌腱切开关节囊, 用 300 mL 生理盐水灌洗关节腔, 同时作屈伸和旋转, 使关节液与生理盐水充分混匀。回抽的关节灌洗液 4℃, 1 000g 离心 20 min, 将上清转移至新的离心管, -80℃ 冷冻备用。

1.4.5 膝关节切片 截取胫骨下 1/3 至股骨上 1/3 段, 剔除周围组织保留关节囊。使关节呈 120°角, 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h; 10% EDTA 脱钙 4 周; 完成后修剪组织, 随后脱水浸蜡, 依次经 75% 乙醇 2 h→85% 乙醇 2 h→90% 乙醇 1.5 h→95% 乙醇 2 h→无水乙醇 I 2 h→无水乙醇 II 2 h→乙醇-透明液 40 min→透明液 I 40 min→透明液 II 40 min→65℃ 石蜡 I 30 min→65℃ 石蜡 II 1 h→65℃ 石蜡 III 过夜; 包埋后, 用石蜡切片片机切 4 μ m 的薄片; 载玻片固定薄片, 室温备存。

1.4.6 对照组和含药兔血清 兔血清采用每日灌胃 2 次、连续 3 d 的方式制备, 灌胃量为体重的 10%。归龟壮骨片组予 10 倍正常人剂量的归龟壮骨片浓度, 对照组予等体积生理盐水。家兔麻醉后腹主动脉取血, 室温静置 3 h。4 400 r/min, 4℃ 离心 5 min, 上层淡黄色透明液体即为血清。12 000 r/min, 4℃ 离心 10 min, 以彻底去除血细胞。56℃ 水浴锅中热灭活 30 min, 再用一次性针头滤器过滤除菌, -80℃ 分装储存。

1.4.7 原代软骨细胞提取及鉴定 将 SD 乳鼠乙醇浸泡消毒, 脊椎脱臼法处死, 分离股骨头软骨、膝关节软骨和肋软骨; 剪碎软骨, 在含双抗的 PBS 中洗 3 次, 加胰酶 37℃ 摇床消化 60 min; 去上清, 加 0.02% II 型胶原酶消化过夜。第 2 天吹打细胞, 过 200 目筛; 去上清, 加低糖 DMEM 的完全培养基继续培养 2 代。原代细胞从形态、甲苯胺蓝、阿利新蓝和 II 型胶原免疫荧光染色鉴定阳性后, 可用于 CCK-8 实验。

1.5 观察指标

1.5.1 Von Frey 纤维丝测痛 通过纤维丝末端刺激大鼠术侧足底皮肤, 采用“Up-down”法记录其缩足、舔足反应。分别在造模前和造模后第 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 天检测, 采用“Up-down”法在线机械疼痛阈值数据转换平台^[4], 得到大鼠 50% 缩足阈值。

1.5.2 酶联免疫吸附法检测炎症因子含量 检测采用关节灌洗液原液, 实验前 30 min 取出试剂盒平衡, 操作步骤如下: 加标准品和样品孵育 90 min; 加生物素化抗体孵育 60 min, 洗板 3 次; 加辣根过氧化物酶 (HRP) 结合物孵育 30 min, 洗板 5 次; 加四甲基联苯胺 (TMB) 避光孵育 15 min, 终止反应。最后在酶标仪 450 nm 波长下测定各孔光密度值, 利用 Origin 2021 绘制标准曲线计算样本中 IL-1 β 和 TNF- α 的含量。

1.5.3 免疫组织化学法检测组织蛋白表达 烤片 2 h,依次过透明液Ⅰ和透明液Ⅱ各 15 min,无水乙醇Ⅰ和无水乙醇Ⅱ各 5 min,95%乙醇、90%乙醇、85%乙醇、80%乙醇、70%乙醇各 3 min,流水清洗。置于柠檬酸钠抗原修复液中 60℃水浴过夜;5%正常驴血清室温封闭 30 min;滴加抗 MMP-13 和抗 ADAMTS-5 抗体(1:100)4℃孵育过夜;滴加 3%双氧水溶液室温避光孵育 30 min;PBST 清洗 3 遍,滴加 HRP 标记二抗(1:200)室温孵育 60 min;PBST 清洗 3 遍,DAB 显色 60 s,自来水终止显色;苏木精染色液 5 min→自来水洗 1 min→1%盐酸乙醇分化 2 s→自来水洗 1 min→0.5% Na₂CO₃返蓝 1 min→三级水洗 1 min→60℃烘干 3 min;中性树胶封片。采用 Image J 检测平均光密度值(AOD)。

1.5.4 甲苯胺蓝染色 切片脱蜡至水步骤同上。甲苯胺蓝染液染色 10 min,三级水洗 1 min,60℃烘干 3 min。滴适量透明液浸润,中性树胶封片。显微镜镜检,并进行图像采集分析。评分采用国际膝骨关节炎研究学会(OARSI)大鼠病理评分标准^[5],从软骨退变、骨赘及钙化软骨与软骨下骨三个维度进行评价。

1.5.5 CCK-8 法检测 对数期细胞接种于 96 孔板,

每孔加 5 000 个细胞,孵育过夜。铺板 24 h 后,弃培养基轻洗 2 遍,加 100 μL 预混体系继续孵育。待第 12,24,48,72 h 时,轻洗 2 遍,加含有 CCK-8 的培养基孵育 60 min。取出平衡至室温,在酶标仪 450 nm 波长下测定各孔光密度值,计算细胞活力。

1.6 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.4.0 软件进行统计学分析和图表绘制。Von Frey 纤维丝测痛实验的比较采用双因素混合效应模型,组间两两比较及主效应比较采用 Tukey 法进行,折线图采用 $\bar{x} \pm s$ 形式表示;ELISA 法、OARSI 评分、免疫组化检查(IHC)、CCK-8 的数据符合正态分布,组间比较采用方差分析,方差不齐则采用非参数检验。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠足底机械痛阈值变化

模型组大鼠缩足反应阈值较假手术组均明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。治疗后,对照组大鼠的缩足反应阈值升高,但差异均无统计学意义($P > 0.05$);中药组大鼠的缩足反应阈值升高,其中第 28 天和主效应的差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠缩足反应阈值及主效应比较($n_{0-28}=16, n_{29-56}=8, \bar{x} \pm s, g$)

时间	假手术组	模型组	对照组	中药组
术前	15.00±0.00	15.00±0.00	15.00±0.00	15.00±0.00
第 7 天	9.93±3.04	4.26±2.91 ¹⁾	5.82±3.88 ¹⁾	6.54±5.44
第 14 天	10.40±3.90	4.41±3.63 ¹⁾	5.83±4.54 ¹⁾	7.11±4.42
第 21 天	9.68±2.68	5.35±3.75 ¹⁾	7.58±4.23	6.74±4.88
第 28 天	13.30±2.12	5.16±3.68 ¹⁾	5.29±4.72 ¹⁾	9.90±3.15 ¹⁾²⁾³⁾
第 35 天	13.97±1.11	6.79±4.15 ¹⁾	7.37±2.50 ¹⁾	9.39±3.73
第 42 天	13.94±1.31	6.34±3.87 ¹⁾	8.45±4.98	9.57±3.15
第 49 天	15.00±0.00	5.34±3.58 ¹⁾	5.50±2.78 ¹⁾	6.51±5.43 ¹⁾
第 56 天	14.82±0.51	6.41±3.08 ¹⁾	5.65±2.27 ¹⁾	7.85±4.95
主效应	12.45±3.15	6.66±4.73 ¹⁾	7.57±4.82 ¹⁾	8.85±4.91 ¹⁾²⁾

注:1)与假手术组比较, $P < 0.05$;2)与模型组比较, $P < 0.05$;3)与对照组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 关节灌洗液中 IL-1β 和 TNF-α 的浓度对比

2.2.1 关节灌洗液中 IL-1β 的浓度 第 28 天时,模型组关节灌洗液中 IL-1β 浓度较假手术组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);治疗后,IL-1β 的浓度较模型组明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。第 56 天时,模型组关节灌洗液中 IL-1β 浓度较假手术组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);治疗后,对照组 IL-1β 浓度较模型组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),而中药组治疗后无明显变化,见表 2。

2.2.2 关节灌洗液中 TNF-α 的浓度 第 28 天时,模型组 TNF-α 浓度较假手术组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);治疗后,对照组 TNF-α 的浓度较模

表 2 关节灌洗液中 IL-1β 的浓度($n=6, \bar{x} \pm s, pg/mL$)

组别	第 28 天	第 56 天
假手术组	24.79±1.79	23.74±0.82
模型组	107.06±7.41 ¹⁾	66.74±2.62 ¹⁾
对照组	69.33±2.75 ¹⁾²⁾	104.30±6.13 ¹⁾²⁾
中药组	83.87±3.80 ¹⁾²⁾	67.28±6.97 ¹⁾³⁾

注:1)与假手术组比较, $P < 0.05$;2)与模型组比较, $P < 0.05$;3)与对照组比较, $P < 0.05$ 。

型组降低,中药组 TNF-α 浓度较模型组升高,其中中药组与模型组的差异有统计学意义($P < 0.05$)。第 56 天时,模型组 TNF-α 浓度较假手术组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);治疗后,对照组 TNF-α 浓度较模型组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),而中药组治疗后则无明显变化,见表 3。

表 3 第 56 天关节腔 IL-1 β 和 TNF- α 浓度($n=6, \bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)

组别	第 28 天	第 56 天
假手术组	16.79 \pm 4.12	18.27 \pm 3.29
模型组	121.51 \pm 17.40 ¹⁾	69.88 \pm 13.36 ¹⁾
对照组	92.91 \pm 11.29 ¹⁾	188.42 \pm 7.73 ¹⁾²⁾
中药组	176.57 \pm 8.26 ¹⁾³⁾	69.77 \pm 6.19 ¹⁾³⁾

注:1)与假手术组比较, $P<0.05$;2)与模型组比较, $P<0.05$;
3)与对照组比较, $P<0.05$ 。

2.3 组织病理学观察及 OARSI 评分

2.3.1 第 28 天关节甲苯胺蓝染色及 OARSI 评分 假

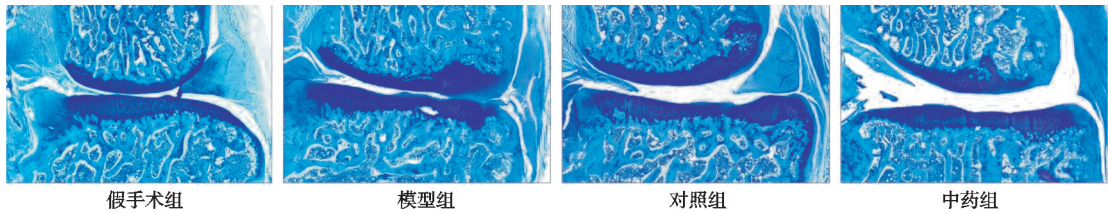


图 1 第 28 天膝关节甲苯胺蓝染色($\times 5$)

表 4 第 28 天各组 OARSI 评分对比($n=5, \bar{x} \pm s$, 分)

组别	退变面积	关节骨赘	钙化软骨下骨
假手术组	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.20 \pm 0.20
模型组	4.80 \pm 0.49 ¹⁾	7.20 \pm 0.20 ¹⁾	4.40 \pm 0.51 ¹⁾
对照组	5.00 \pm 0.45 ¹⁾	6.80 \pm 0.74 ¹⁾	2.40 \pm 0.93
中药组	3.00 \pm 0.32 ¹⁾²⁾³⁾	5.20 \pm 1.24 ¹⁾	2.00 \pm 0.55

注:1)与假手术组比较, $P<0.05$;2)与模型组比较, $P<0.05$;
3)与对照组比较, $P<0.05$ 。

2.3.2 第 56 天关节甲苯胺蓝染色及 OARSI 评分 假手术组软骨结构光滑整齐,软骨细胞数量正常,无边缘

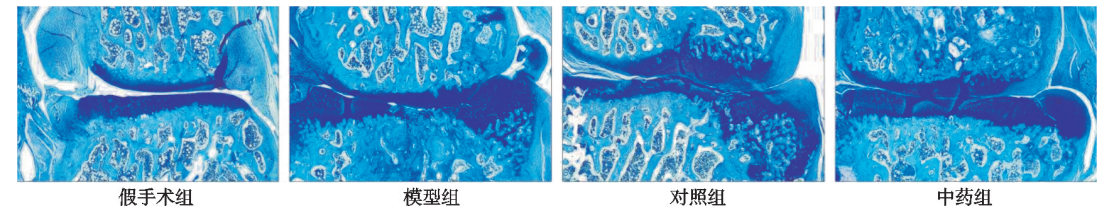


图 2 第 56 天膝关节甲苯胺蓝染色($\times 5$)

表 5 第 56 天各组 OARSI 评分对比($n=5, \bar{x} \pm s$, 分)

组别	退变面积	关节骨赘	软骨下骨
假手术组	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.40 \pm 0.25
模型组	7.60 \pm 0.75 ¹⁾	6.00 \pm 0.45 ¹⁾	6.00 \pm 0.63 ¹⁾
对照组	5.40 \pm 0.93 ¹⁾	6.20 \pm 0.58 ¹⁾	5.80 \pm 0.92 ¹⁾
中药组	4.00 \pm 0.32 ¹⁾²⁾	6.40 \pm 0.51 ¹⁾	4.40 \pm 0.40 ¹⁾

注:1)与假手术组比较, $P<0.05$;2)与模型组比较, $P<0.05$;
3)与对照组比较, $P<0.05$ 。

2.4 关节软骨 MMP-13 和 ADAMTS-5 的平均光密度值对比

2.4.1 胫骨平台软骨 MMP-13 的平均光密度值对比

第 28 天时,模型组和对照组的 MMP-13 表达水平较假手术组均明显升高,其中模型组与假手术组差异有统计学意义($P<0.05$);中药组的 MMP-13 表达水平较对照组明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 6 和图 3。第 56 天时,模型组大鼠胫骨平台软骨的

手术组软骨结构光滑整齐,软骨细胞数量正常,无边缘骨赘形成,潮线完整,伴轻度嗜碱性粒细胞增多,软骨下骨结构无异常。模型组软骨细胞数量减少,边缘骨赘形成,潮线增多,骨髓间充质发生纤维化改变。对照组和中药组较模型组有所改善,软骨数量仍有减少,边缘骨赘形成,潮线增多,骨髓间充质结构异常,见图 1。模型组各项评分较假手术组均明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);中药组治疗后软骨退变面积较模型组和对照组均明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 4。

骨赘形成,潮线完整,伴轻度嗜碱性粒细胞增多,软骨下骨结构无异常。模型组软骨细胞数量明显减少,磨损范围侵入软骨下骨,边缘骨赘形成,潮线不完整,骨髓间充质发生纤维化改变。对照组和中药组软骨软骨表层不规则,软骨细胞数量减少,边缘骨赘明显增厚,潮线不完整,部分骨髓间充质发生纤维化改变,见图 2。模型组各项评分较假手术组均明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);中药组治疗后软骨退变面积较模型组明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 5。

MMP-13 表达水平较假手术组明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);治疗后,中药组 MMP-13 表达水平较模型组明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 6 和图 4。

表 6 胫骨平台软骨中 MMP-13 的平均光密度值对比($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	第 28 天	第 56 天
假手术组	0.31 \pm 0.05	0.30 \pm 0.02
模型组	0.34 \pm 0.03	0.42 \pm 0.05 ¹⁾
对照组	0.38 \pm 0.05 ¹⁾	0.31 \pm 0.01 ²⁾
中药组	0.29 \pm 0.03 ³⁾	0.35 \pm 0.01 ²⁾

注:1)与假手术组比较, $P<0.05$;2)与模型组比较, $P<0.05$;
3)与对照组比较, $P<0.05$ 。

2.4.2 胫骨平台软骨 ADAMTS-5 的平均光密度值对比 第 28 天时,各组 ADAMTS-5 表达水平均没有明显差异,见表 7 和图 5。第 56 天时,模型组大鼠胫

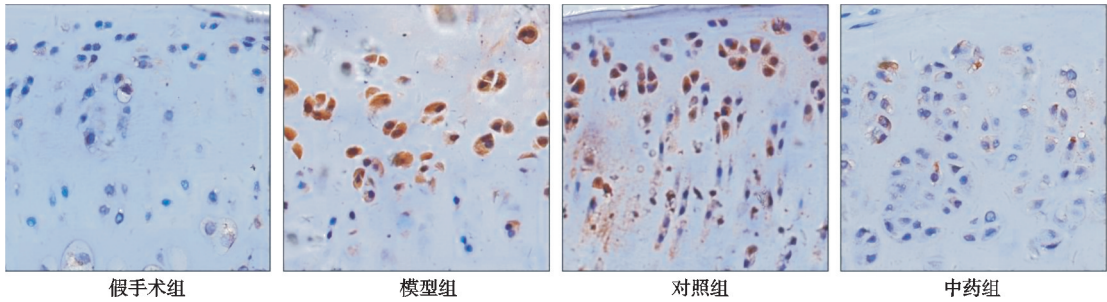


图 3 第 28 天胫骨软骨 MMP-13 免疫组化检查染色(×200)

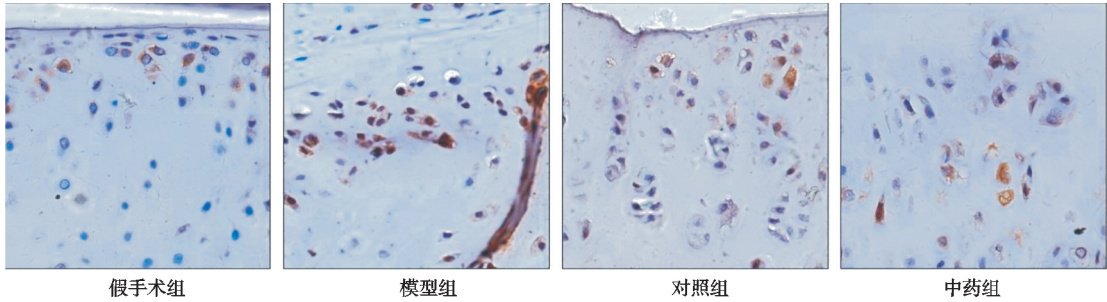


图 4 第 56 天胫骨软骨 MMP-13 免疫组化检查染色(×200)

骨平台软骨的 ADAMTS-5 表达水平较假手术组明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);治疗后,中药组大鼠胫骨平台软骨的 ADAMTS-5 表达水平较模型组明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 7 和图 6。

2.5 含药兔血清对大鼠原代软骨细胞活力的影响

在 72 h 内,不同浓度的归龟壮骨片含药兔血清都

表 7 胫骨平台软骨中 ADAMTS-5 的平均光密度值对比($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	第 28 天	第 56 天
假手术组	0.32 ± 0.01	0.29 ± 0.01
模型组	0.34 ± 0.01	$0.36 \pm 0.02^{1)}$
对照组	0.34 ± 0.01	0.32 ± 0.02
中药组	0.30 ± 0.02	$0.30 \pm 0.01^{2)}$

注:1)与假手术组比较, $P<0.05$;2)与模型组比较, $P<0.05$ 。

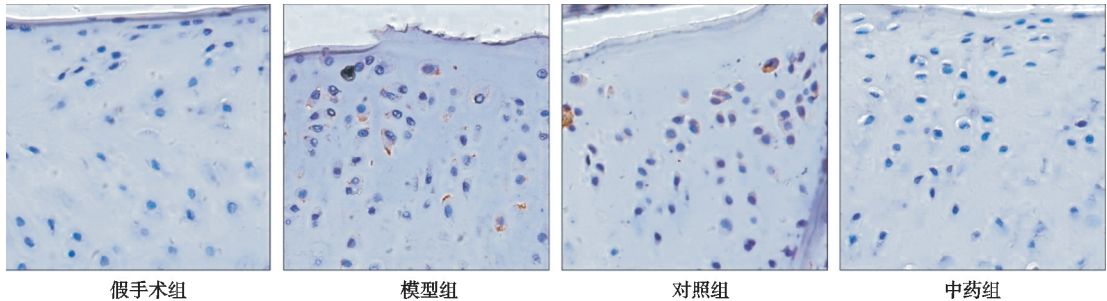


图 5 第 28 天胫骨软骨 ADAMTS-5 免疫组化检查染色(×200)

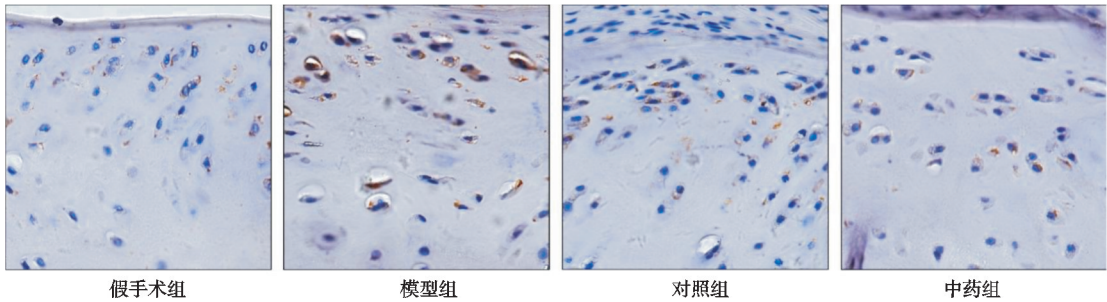


图 6 第 56 天胫骨软骨 ADAMTS-5 免疫组化检查染色(×200)

呈时序性促进原代软骨细胞活力,但不呈浓度梯度依赖性。在各时间点,各含药兔血清浓度组的细胞活力较正常兔血清组显著提高,除 12 h 10%和 20%含药兔血清组外,各组差异均有统计学意义($P<0.05$),说明不同浓度含药兔血清均可提高软骨细胞活力,促进软骨细胞的增殖,见图 7。

3 讨论

膝骨关节炎是一种退行性的疾病,由于年龄的增加,关节退变,造成关节软骨的磨损、关节间隙变窄、骨质增生、滑膜增生,导致膝关节在活动时出现明显的疼痛、肿胀,行走距离变短。关节的慢性疼痛是膝骨关节炎疾病进程中的主要症状,也是评估药物疗效的主要

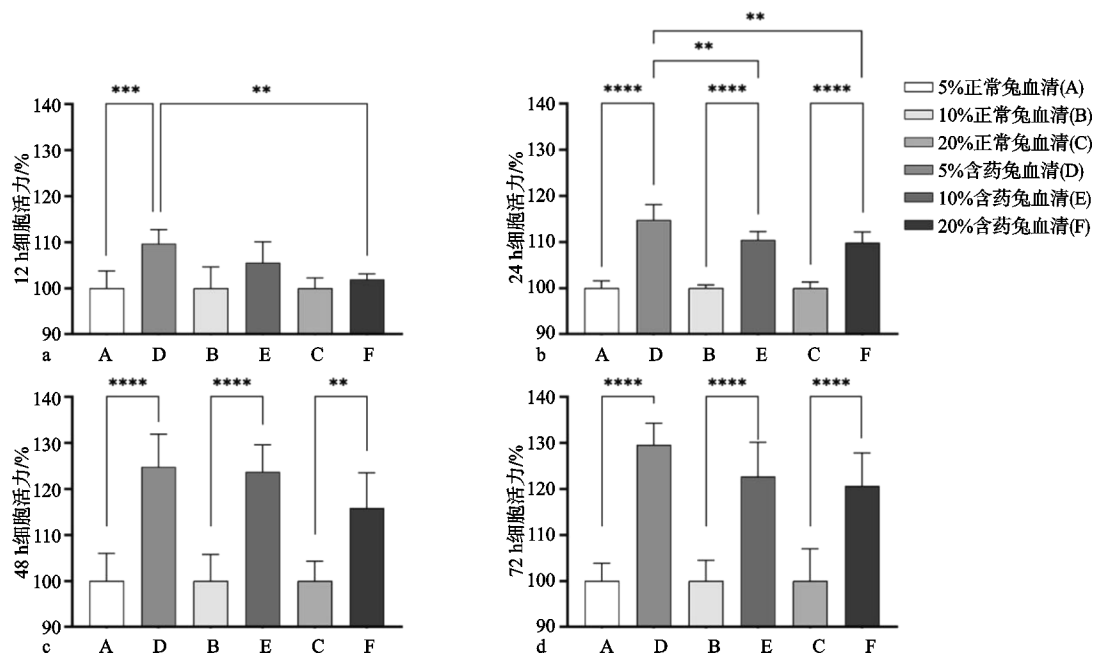


图 7 含药兔血清对大鼠原代软骨细胞活力的影响

指标之一。研究认为在膝骨关节炎中存在三种疼痛类型：伤害性疼痛、炎症性疼痛和神经性疼痛^[6]。最初发生的是机械性疼痛，即关节受损导致力线和应力的改变，这种改变会打开神经末梢上的机械敏感性离子通道，从而刺激感觉神经产生伤害性疼痛^[7]。其次，随着关节软骨的进行性分解，关节腔内损伤的组织和滑膜巨噬细胞可释放炎症介质，形成富含炎症介质的关节内环境。这些介质与暴露的软骨下骨、滑膜和半月板中的感觉神经接触，可诱发炎症性疼痛。随着病程的延长，关节内长期的持续性刺激会导致脊髓背角神经元功能改变，进而导致疼痛敏感性提高和疼痛区域放大等一系列中枢敏化效应，从而放大了疼痛感^[8]。内侧半月板横断术建立的膝骨关节炎模型不仅表现出进行性的软骨损伤，同时对 Von Frey 纤维丝检测的缩足反应阈值变化更为敏感，已成为评估膝骨关节炎疼痛的推荐模型^[9]。通过灌洗液中 TNF- α 及 IL-1 β 蛋白表达水平和足底疼痛阈值的检测，从而进行多方面评价。归龟壮骨片通过温肾滋阴以养“不荣”、活血通络以散“不通”，强骨以利筋，从而改善疼痛症状。归龟壮骨片从组方来看，没有清热与祛风湿类可缓解“红肿热痛”的药物，因此无法抑制关节液中炎症因子 TNF- α 及 IL-1 β ，蛋白水平也正常。但干预后可改善大鼠的机械痛阈值，从而改善疼痛的症状，其内在原因值得深入研究。

在膝骨关节炎的发生和发展过程中，软骨基质合成和分解过程失去平衡，导致软骨细胞数量和功能的下降，以及软骨组织的逐渐退化和破坏。在成年人的关节软骨中，软骨细胞仅占软骨体积的 2%^[10]，胶原纤维和蛋白多糖构成软骨的主要成分。胶原纤维为组织

提供高度的拉伸强度和抗压强度，以 II 型胶原蛋白为主；蛋白多糖则负责吸引水分子形成软骨基质中的水相^[11]，以聚集蛋白聚糖 (Aggrecan) 为主。MMP-13 和 ADAMTS-5 蛋白具有分解骨关节软骨基质的能力，MMP-13 主要降解 II 型胶原，而 ADAMTS-5 则主要降解聚集蛋白聚糖。在膝骨关节炎中，其过度表达会导致软骨缺陷和严重的骨关节破坏。通过抑制 MMP-13 和 ADAMTS-5 的表达，有望减轻骨关节炎的损伤^[12]，结果表明归龟壮骨片通过抑制软骨组织中 MMP-13 和 ADAMTS-5 的蛋白表达，减轻软骨基质的降解，延缓软骨的损伤与退化。

膝骨关节炎是中医临床治疗的优势病种。由于中国古代文献中没有本病的明确记载，一般认为其属于“骨痹”“膝痹”的范畴。中医理论认为关节软骨属“筋”的范畴，肝主筋，软骨失养主要是因为肝血不足，肝精不能濡养局部软骨，导致软骨出现磨损和退行性改变^[13]。而肝肾之间有精血同源、阴阳互滋的关系，又因为肝主筋而肾主骨，骨主强筋，筋主束骨而利关节，故筋骨同源^[14]。若肾精不足，则不能养肝精而化血，肝血不足导致肝藏血功能失常，则筋不受养；肾阴不足，则津液不足以濡养脏腑筋骨关节，关节易出现磨损；肾阳不足，温煦不足气化失常，则津液内停，关节内出现肿胀积液；日久精血衰少，肝肾不足，则关节不利、关节变形。现代中医证型分布研究表明，肝肾亏虚证是我国膝骨关节炎的主要证型分布^[15-16]。因此，膝骨关节炎的中医治疗秉着治病求本的原则，以补益肝肾为本，肝血充足，肾精旺盛，则精血互生，骨健筋强。

归龟壮骨片是国家非物质文化遗产施氏伤科疗法

多年临证经验的总结,并已成为上海市黄浦区香山中医医院的院内制剂。本方以二仙汤为底化裁,攻补相兼,以补为主,全方共奏温肾滋阴、活血通络之效,应用于临床已有三十年余。方中巴戟天和淫羊藿辛温助阳,强筋固肾;狗脊温补固摄,强腰壮膝;益智仁和补骨脂温补脾肾,固精利骨;紫河车和龟甲胶为精血之品大补元阴、填补精血,配伍知母泻肺滋肾,丹参、当归和威灵仙通络活血止痛。季伟等^[17]和詹炜祎等^[18]的临床研究表明,归龟壮骨片在改善肝肾亏虚型和肾阴阳两虚型骨质疏松患者的腰背疼痛、腰膝酸软、乏力等症状方面疗效突出,且安全性较高。膝骨关节炎与骨质疏松症皆见酸痛、乏力症状,基于中医“异病同治”理论,归龟壮骨片强健筋骨、调补肾之阴阳和活血通络的作用,对膝骨关节炎的治疗具有巨大潜力。归龟壮骨片含药兔血清可提高软骨细胞活力,现代药理也证明归龟壮骨片中的多种有效成分可促进软骨增殖,抑制软骨凋亡,从而减缓关节软骨损耗^[19-22]。

综上所述,归龟壮骨片通过提高机械痛阈值,而非降低关节内炎症因子水平,改善疼痛症状;降低膝关节软骨中 MMP-13 和 ADAMTS-5 的表达,抑制关节软骨的分解代谢;促进软骨细胞活力,从而减轻膝关节软骨的损伤,延缓膝骨关节炎的进展。

参考文献

- [1] 张莹莹,李旭东,杨佳娟,等. 中国 40 岁及以上人群骨关节炎患病率的 Meta 分析[J]. 中国循证医学杂志, 2021, 21(4):407-414.
- [2] 孙波,陈建华. 施氏伤科吴云定临证经验集萃[M]. 北京: 科学出版社, 2019:152-157.
- [3] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004(9):1069-1072.
- [4] CHRISTENSEN S L, HANSEN R B, STORM M A, et al. Von frey testing revisited: provision of an online algorithm for improved accuracy of 50% thresholds[J]. Eur J Pain, 2020, 24(4):783-790.
- [5] GERWIN N, BENDELE A M, GLASSON S, et al. The OARSI histopathology initiative-recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2010, 18(Suppl 3):S24-S34.
- [6] 章晓云,曾浩,孟林. 膝骨关节炎疼痛机制及治疗研究进展[J]. 中国疼痛医学杂志, 2023, 29(1):50-58.
- [7] HEPPELMANN B, MCDUGALL J J. Inhibitory effect of amiloride and gadolinium on fine afferent nerves in the rat knee: evidence of mechanogated ion channels in joints[J]. Exp Brain Res, 2005, 167(1):114-118.
- [8] SCHAIBLE H G, RICHTER F, EBERSBERGER A, et al. Joint pain[J]. Exp Brain Res, 2009, 196(1):153-162.
- [9] COPE P J, OURRADI K, LI Y, et al. Models of osteoarthritis: the good, the bad and the promising[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2019, 27(2):230-239.
- [10] POOLE A R, KOJIMA T, YASUDA T, et al. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair[J]. Clin Orthop Relat Res, 2001, 391(Suppl): S26-S33.
- [11] 王毅,巩纯秀. 细胞外基质常见成分调节生长板软骨形成和软骨内骨化机制研究进展[J]. 中国实用儿科杂志, 2022, 37(6):470-475.
- [12] 王海英,丁晓,杨立,等. 不同分期骨关节炎关节液中相关降解酶的表达差异[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(23):3609-3615.
- [13] 李宁,王拥军,施杞. 施杞从肝肾论治膝骨性关节炎[J]. 中医杂志, 2013, 54(3):197-200.
- [14] 李佳,于澜,杨晨,等. 关节筋骨之“肝肾同源”[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(8):3360-3362.
- [15] 王康惠,钟欲权,蔺金华,等. 膝骨关节炎中医证型的研究和临床治疗进展[J]. 中国民间疗法, 2020, 28(5):102-104.
- [16] 陈黎明,郭盛君,许根荣,等. 28 763 例膝骨关节炎患者证候中医特征分析[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(2):1061-1064.
- [17] 季伟,孙波,刘光明,等. 归龟壮骨片治疗肝肾亏虚型骨质疏松症 35 例[J]. 河南中医, 2018, 38(12):1925-1928.
- [18] 詹炜祎,刘光明,杨佳裕,等. 归龟壮骨片治疗女性绝经后骨质疏松症肾阴阳两虚证腰背痛患者 150 例——随机、双盲、安慰剂对照临床研究[J]. 中医杂志, 2022, 63(9):839-844.
- [19] 刘摇摇,刘湘宁,田银平,等. 淫羊藿苷对骨骼系统药理作用机制的研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(12):1516-1520.
- [20] 付长龙,梅阳阳,李民,等. 狗脊多糖对硝普钠诱导退变大鼠软骨细胞氧自由基影响的研究[J]. 风湿病与关节炎, 2018, 7(6):5-9.
- [21] 黄涛,张钢林,李楠. 巴戟天多糖对体外培养兔软骨细胞凋亡的影响[J]. 北京体育大学学报, 2010, 33(8):56-61.
- [22] 郝胜坤,纪斌,石继祥,等. 补肾活血中药治疗膝骨关节炎的作用机制[J]. 中医正骨, 2017, 29(4):31-33.

(收稿日期:2023-10-03)