鹿角壮骨胶囊对膝骨关节炎兔软骨 iNOS 和 CollagenⅡ表达的影响

梁子聪[1,2]， 王 恒[1*]， 胡建山[2]， 胡先运[3]
(1. 黔南民族医学高等专科学校，贵州 都匀 558000；2. 贵州中医药大学第三附属医院，贵州 都匀 558000；3. 贵州医科大学天然产物化学重点实验室，贵州 贵阳 510014)

摘要：目的 观察鹿角壮骨胶囊对兔膝骨关节炎模型关节软骨中 iNOS 和 CollagenⅡ表达的影响。**方法** 采用木瓜蛋白酶右侧膝关节腔内注射诱导建立兔膝骨关节炎模型，24 只长耳大白兔随机分为正常组、模型组、给药组（鹿角壮骨胶囊 0.3 g/kg），连续灌胃给药 4 周。通过甲苯胺蓝染色观察病理形态，按 OOCHAS 评分标准进行评分，免疫组化检测各组兔膝关节软骨 iNOS 和 CollagenⅡ表达。**结果** 与正常组比较，模型组 OOCHAS 分级和分期的 *R* 值、OOCHAS 评分总分升高（*P*<0.05），膝关节软骨 iNOS 的表达升高（*P*<0.05），CollagenⅡ的表达降低（*P*<0.05）；与模型组比较，给药组 OOCHAS 评分总分降低（*P*<0.05），iNOS 的表达降低（*P*<0.05），而 CollagenⅡ的表达升高（*P*<0.05）。**结论** 鹿角壮骨胶囊可通过降低软骨中 iNOS 的表达，抑制 CollagenⅡ的降解，从而起到保护膝关节软骨，延缓关节退变的治疗效果。

关键词： 鹿角壮骨胶囊；膝骨关节炎；iNOS；Ⅱ型胶原
中图分类号： R285.5 **文献标志码：** A **文章编号：** 1001-1528(2020)02-0329-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.02.012

Effects of Lujiao Zhuanggu Capsules on the expression of iNOS and CollagenⅡ in cartilage of rabbits with knee osteoarthritis

LIANG Zi-cong[1,2], WANG Heng[1*], HU Jian-shan[2], HU Xian-yun[3]
(*1. Qiannan Medical College for Nationalities, Duyun 558000, China; 2. The Third Hospital Affiliated to Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Duyun 558000, China; 3. Key Laboratory of Chemistry for Natural Products, Guizhou Medical University, Guiyang 510014, China*)

ABSTRACT: AIM To observe the effects of Lujiao Zhuanggu Capsules on the expression of iNOS and CollagenⅡ in cartilage of rabbits with knee osteoarthritis (KOA). **METHODS** KOA model was established by intracavitary injection of papain on right knee of rabbit. Twenty-four rabbits were randomly divided into normal group, model group and administration group (Lujiao Zhuanggu Capsules, 0.3 g/kg), and the intragastric drug administration went on for 4 weeks. The pathological morphology was observed by toluidine blue staining, the scores were determined by OOCHAS scoring method, and the expressions of iNOS and CollagenⅡ in knee joint cartilage were detected by immunohistochemistry. **RESULTS** Compared with the normal group, the model group displayed increase in the R-value and the total scores of OOCHAS (*P*<0.05), and in iNOS expression in the knee joint cartilage (*P*<0.05), and decrease in CollagenⅡ expression (*P*<0.05). Compared with the model group, the group dosed with Lujiao Zhuanggu Capsules was observed with decreased total OOCHAS score (*P*<0.05), and iNOS expression (*P*<0.05), and increased CollagenⅡ expression (*P*<0.05). **CONCLUSION** Lujiao Zhuanggu Capsules can inhibit the degradation of CollagenⅡ by reducing the expression of iNOS in cartilage, thereby protecting knee joint cartilage and delaying the joint degeneration.

收稿日期： 2019-06-20
基金项目： 国家自然科学基金地区项目（81860317）；贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题项目（QZYY-2018-099）；黔南州科技计划项目（黔南科合［2017］63 号）；黔南民族医学高等专科学校科研基金项目（QNYZ201716）
作者简介： 梁子聪（1986—），男，硕士，主治医师，从事骨与关节疾病基础与临床研究。Tel：（0854）8280496，E-mail：5304602@qq.com
** 通信作者：** 王 恒（1982—），男，硕士，副教授，研究方向为中药药理学。Tel：（0854）8280496，E-mail：wiuiam@163.com

KEY WORDS: Lujiao Zhuanggu Capsules; knee osteoarthritis (KOA); iNOS; Collagen Ⅱ

膝骨关节炎（knee osteoarthritis，KOA）是一种累及膝关节滑膜、软骨、软骨下骨及关节周围组织的慢性退行性病变，引起老年人膝关节疼痛、畸形及功能障碍的常见疾病[1]。诱导型一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase，iNOS）与 KOA 发病关系密切，能诱导产生大量的 NO，抑制软骨细胞分泌细胞外基质和合成Ⅱ型胶原（Collagen Ⅱ），加速了膝关节的破坏，最终导致 KOA 的发生[2-3]。前期研究[4]显示，鹿角壮骨胶囊能改善 KOA 患者的临床症状，获得较好的效果。本实验通过建立木瓜蛋白酶诱导兔 KOA 模型，观察鹿角壮骨胶囊对关节软骨中 iNOS 和 Collagen Ⅱ表达的影响，进一步了解其对 KOA 的保护作用。

1 材料

1.1 仪器 JA10002 型电子天平（上海精天电子仪器有限公司）；DDIL-5 型恒温箱（上海安亭科学仪器厂）；ASP300S 型全封闭式组织脱水机、RM2265 型全自动轮转式切片机、HI1210 型摊片机、DM750 型光学显微镜（德国徕卡公司）。

1.2 药物与试剂 鹿角壮骨胶囊由黔南州中医医院制剂科提供（批号黔药制 2013003，规格 0.45 g/粒）、木瓜蛋白酶（北京索莱宝科技有限公司，G8430）；甲苯胺蓝染液（北京雷根生物科技有限公司，DA0059）；封闭液（武汉博士德生物工程有限公司）；iNOS、Collagen Ⅱ多克隆抗体（北京百奥思科生物医学技术有限公司，MD4695、MD4781）。通用型 SP 试剂盒、DAB 显色盒（北京中杉金桥生物技术有限公司，SP-9000，ZLI-9017）；4% 多聚甲醛、二甲苯、乙醇、乙二胺四乙酸（Ethylenediaminetetraacetic acid，EDTA）脱钙液由黔南州人民医院病理科提供，其余试剂均为国产分析纯。

1.3 动物 普通级四月龄日本长耳白兔 24 只，雌性，体质量（2.0±0.5）kg，由长沙天勤生物技术有限公司提供，生产许可证号 SCXK（湘）2014-0010。适应性饲养 1 周，分笼饲养，不限制饮食。

2 方法

2.1 造模 24 只兔随机分为正常组、模型组、给药组（鹿角壮骨胶囊），每组 8 只。按 3.5 mL/kg 剂量腹腔注射 10% 水合氯醛溶液麻醉，待完全麻醉后，剪刀于右侧膝关节内侧附近备皮，显露皮肤，碘伏、75% 酒精棉签反复消毒。1 mL 注射器抽取提前配制的 4% 木瓜蛋白酶溶液 0.5 mL，微微弯曲膝关节，针尖分别在模型组与给药组兔内侧膝眼进针，回抽确定进入关节腔后，缓慢注射，棉签轻压针眼，避免溶液溢出。正常组同法注射等体积灭菌注射用水。各组被动屈伸右侧膝关节 20 次，促进溶液在关节腔内均匀扩散。间隔 3 d 重复 1 次，共注射 3 次。末次注射后，各组兔每天驱赶运动 30 min，其余时间笼内自由活动。

2.2 给药 首次注射后第 2 周，给药组给予鹿角壮骨胶囊药粉 0.3 g/kg（参照成人和实验动物等效剂量[5]换算而得），称取体质量的相应剂量，用蒸馏水稀释成 10 mL 后灌胃，1 次/d，连续给药 4 周。其他组给予 10 mL 蒸馏水灌胃。

2.3 动物取材 末次给药第 2 天，麻醉处死所有实验动物。切开关节囊，取下膝关节及滑膜组织标本，置于 4% 多聚甲醛中固定。

2.4 兔膝关节软骨甲苯胺蓝染色 甲苯胺蓝染色，将石蜡切片入二甲苯 2 次，15 min/次，梯度酒精（100% 1 min，90% 1 min，85% 1 min，75% 1 min），自来水冲洗 2 min，甲苯胺蓝染料浸染 15 min，自来水再次冲洗 2 min，丙酮分化至软骨细胞清晰可见，乙醇脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。

2.5 国际骨关节炎研究学会骨关节炎软骨组织病理学评估系统（Osteoarthritis Research Society International Osteoarthritis Cartilage Histopathology Assessment System，OOCHAS）评分 参考文献［6］方法，在光学显微镜下对切片进行 OOCHAS 评分，评分标准见表 1～3。每个样本取 3 次评分的平均值。

2.6 检测兔膝关节 iNOS 和 Collagen Ⅱ表达 采用免疫组化检测。石蜡切片经 60 ℃烘片 1 h，入二甲苯脱蜡 2 次，10 min/次、梯度酒精（100% 3 min，90% 3 min，85% 3 min，75% 3 min，蒸馏水 3 min，PBS 3 min）。将切片置于 pH = 6.0，0.1 mol/L 枸橼酸液修复液中，用微波炉 100 火力 3 min至微微沸腾，再用 50 火力维持 7 min，停止加热后自然冷却 20～30 min。用 PBS 漂洗 3 次，5 min/次。3% H_2O_2 孵育 10 min 以消除内源性过氧化物酶活性。PBS 冲洗 3 次，5 min/次。滴加封闭液（5% BSA），在湿盒中室温 30 min。用滤纸擦去封闭液，滴加适宜浓度的一抗置湿盒中 4 ℃孵

表 1 OOCHAS-分级

Tab. 1 OOCHAS-grading

分级	关键特征	相关标准(组织反应)
0 级	关节面完整,软骨完整	各组织完整,软骨不受累
1 级	表面完整	基质,表层完整、肿胀或纤维化;细胞,增生、肥大
2 级	表面不连续	各组织完整,软骨不受累;伴表层不完整;伴或不伴有上 1/3 基质着色变浅(油红 O 或甲苯胺蓝染色);伴或不伴有软骨细胞极向紊乱
3 级	垂直裂隙	各组织完整,软骨不受累;伴表层不完整;伴或不伴有下 2/3 基质着色变浅(油红 O 或甲苯胺蓝染色);伴或不伴有新的胶原纤维生成
4 级	糜烂	软骨基质丢失,基质内囊肿形成
5 级	缺损	表面覆盖硬化骨或组织修复(包括纤维软骨)
6 级	变形	骨重建;关节面变形(不只是骨赘形成),包括微骨折和组织修复

注:分级=软骨病变深度。

表 2 OOCHAS-分期

Tab. 2 OOCHAS-staging

分期	损伤范围(表面、区域、容积)/%
0 期	无骨关节炎活动
1 期	<10
2 期	10~25
3 期	25~50
4 期	>50

注:分期=关节面受损广度。

表 3 OOCHAS-评分(分)

Tab. 3 OOCHAS-scoring(scores)

分级	分期			
	S1	S2	S3	S4
G1	1	2	3	4
G2	2	4	6	8
G3	3	6	9	12
G4	4	8	12	16
G5	5	10	15	20
G6	6	12	18	24

注:总分=分级(G)×分期(S)。

育过夜(iNOS 为 1∶200,Collagen Ⅱ 为 1∶150),再用 PBS 冲洗 3 次,5 min/次,洗去一抗,用滤纸擦去标本外的 PBS。滴加生物素化二抗工作液,室温置湿盒中孵育 20 min,用 PBS 冲洗 3 次,5 min/次,洗去二抗,用滤纸擦去标本外的 PBS。滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,室温置湿盒中孵育 20 min,用 PBS 冲洗 3 次,5 min/次,用滤纸擦去标本外的 PBS。DAB 显色剂显色,自来水充分冲洗。再进行苏木素复染,脱水,透明,中性树胶封片。光学显微镜下进行观察并摄片保存,每张组织切片在相同部位摄取 3 个视野(×400)。运用 Image-Pro Plus 6.0 专业图像分析软件对图片进行分析,计算相同面积内相关指标阳性表达的平均光密度值(平均光密度值=光密度值/测量面积)。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计分析。采用 Shapiro-Wilk 法作正态检测,Levene 法作方差检测。计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-t 检验。等级资料比较采用 Ridit 分析。$P\leqslant 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

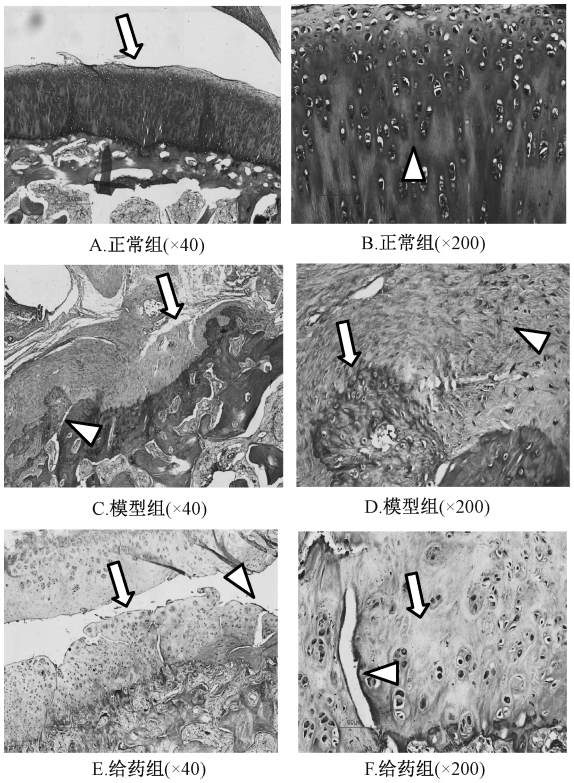
3.1 各组兔膝关节镜下病理观察及 OOCHAS 评分 正常组兔膝关节面完整,软骨不受累,软骨基质未见肿胀及纤维化,软骨细胞正常,排列整齐(图 1A~1B);模型组兔膝关节软骨表面糜烂、缺损,病损广泛,关节面边缘见骨赘形成,关节面缺损处见纤维组织修复、骨质重建,软骨细胞、纤维细胞增生(图 1C~1D);给药组兔膝关节软骨表面不连续,部分关节面软骨出现垂直裂隙,较严重者可见糜烂,病损范围较模型组轻,下 2/3 软骨基质染色变浅,部分见软骨基质内见囊肿形成,软骨细胞肿胀、坏死(图 1E~1F)。与正常组比较,模型组 OOCHAS 分级和分期的 R 值、评分总分升高($P<0.05$);与模型组比较,给药组 OOCHAS 评分总分降低($P<0.05$)。见表 4。

表 4 各组兔膝关节 OOCHAS 评分($\bar{x}\pm s$,$n=8$)

Tab. 4 Rabbit knee joint OOCHAS scores in various groups($\bar{x}\pm s$,$n=8$)

组别	OOCHAS 分级								OOCHAS 分期						总分/分
	0	1	2	3	4	5	6	R 值	0	1	2	3	4	R 值	
正常组	2	3	3	0	0	0	0	0.26±0.11	2	6	0	0	0	0.30±0.14	1.13±0.83
模型组	0	0	0	0	3	4	1	0.62±0.27*	0	0	2	5	1	0.60±0.31*	13.75±4.03*
给药组	0	0	0	3	4	1	0	0.63±0.27*	0	0	4	4	0	0.59±0.23*	9.50±3.21*#

注:与正常组比较,*$P<0.05$;与模型组比较,#$P<0.05$。



A.正常组(×40) B.正常组(×200)
C.模型组(×40) D.模型组(×200)
E.给药组(×40) F.给药组(×200)

注：A（↓关节面完整，软骨不受累），B（△软骨细胞正常，排列整齐），C（↓关节面软骨明显缺损，占关节面面积 25%～50%，△关节面边缘见骨赘形成），D（↓软骨细胞增生，骨质重建，△关节面缺损处见纤维组织修复），E（↓关节面软骨糜烂，占关节面面积 10%～25%，△关节面软骨出现垂直裂隙），F（↓软骨细胞肿胀、坏死，下 2/3 软骨基质染色变浅，△软骨基质内见囊肿形成）。

图 1 各组兔膝关节软骨镜下病理形态观察（甲苯胺蓝染色）

Fig. 1 Pathological changes of rabbit knee articular cartilage in various groups (toluidine blue staining)

3.2 各组兔膝关节 iNOS 和 Collagen Ⅱ 表达 与正常组比较，模型组兔膝关节软骨 iNOS 的表达升高，而 Collagen Ⅱ 的表达降低（$P<0.05$）；与模型组比较，给药组 iNOS 的表达降低，而 Collagen Ⅱ 的表达升高（$P<0.05$）。见图 2、表 5。

表 5 各组兔膝关节 iNOS 和 Collagen Ⅱ 表达（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

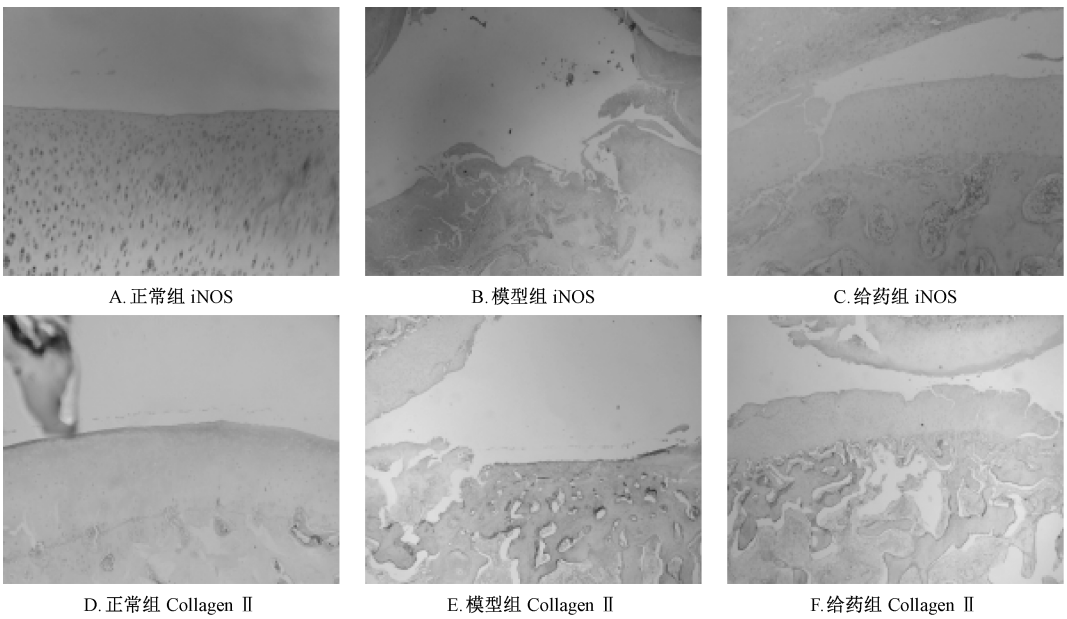
Tab. 5 Expressions of iNOS and Collagen Ⅱ in rabbit knee joints of various groups（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	iNOS(10^{-3})	Collagen Ⅱ (10^{-3})
正常组	60.27±15.56	76.75±20.21
模型组	248.99±53.17*	18.94±7.22*
给药组	160.23±86.28*#	34.16±12.80*#

注：与正常组比较，*$P<0.05$；与模型组比较，#$P<0.05$。

4 讨论

KOA 发病机制十分复杂，目前尚不清楚。但其病理改变包括滑膜细胞增生、慢性炎症细胞浸润，均与炎症因子作用密切相关[7]。一氧化氮合酶分成 3 型，包括 nNOS、eNOS、iNOS，其中 iNOS 与 KOA 的发病关系最密切[8]。iNOS 在 IL-1 等炎症因子作用下，刺激滑膜细胞分泌 PGE_2 和 COX-2，加快关节软骨的破坏；同时亦可加快滑膜成纤维细胞增殖，导致滑膜组织纤维化[9]。iNOS 还可合成大量的 NO，产生氧自由基，促进 Collagen Ⅱ、Ⅲ及基质蛋白多糖、层粘连蛋白等多种基质蛋白的降解，抑制软骨基质的修复[10]。Collagen Ⅱ是关节软骨细胞外基质胶原的主要成分（约占胶原总含有量 90% 以上），其主要作用是维持软骨结构及功能的完整性[11]。当软骨中 CollagenⅡ



A. 正常组 iNOS B. 模型组 iNOS C. 给药组 iNOS
D. 正常组 Collagen Ⅱ E. 模型组 Collagen Ⅱ F. 给药组 Collagen Ⅱ

图 2 各组兔膝关节 iNOS 和 Collagen Ⅱ 表达（IHC，×100）

Fig. 2 Expressions of iNOS and Collagen Ⅱ in rabbit knee joints of various groups (IHC, ×100)

表达减少或网状结构遭到破坏时，可导致软骨基质分泌减少及炎症细胞浸润，从而改变了软骨细胞生存的微环境，加速软骨细胞的凋亡[12]。

OA 属中医学中“痹症”范畴，因此膝骨关节炎可称膝痹。膝骨关节炎可致膝关节肿胀、畸形，形似白鹤的膝关节，故又可称为鹤膝风[13]。中医认为本病因年老体衰、肝肾之气耗竭，不能濡养肌肉及骨髓，导致肌肉萎缩、关节活动不利而发病[14]。治则为滋补肝肾、强筋壮骨。鹿角壮骨胶囊以鹿角胶为君药，主归肝、肾经，起到补肾强骨功效。臣以骨碎补、熟大黄、黄芪、当归增强君药补益肝肾之功，佐以血竭、炒土鳖、锻自然铜、白术、川芎等多味中药共凑活血通经、缓急止痛之功。鹿角胶、骨碎补、熟地黄等现代药理学研究[15-16]显示，鹿角胶含药血清能显著促进软骨细胞 CollagenⅡ的表达，促进关节软骨基质修复；而骨碎总黄酮可降低软骨中 iNOS 的表达，减轻炎症细胞因子对膝关节的破坏。本实验结果显示，与模型组比较，给药组 OOCHAS 评分总分明显降低（$P<0.05$），iNOS 的表达明显降低而 CollagenⅡ的表达明显升高（$P<0.05$），说明鹿角壮骨胶囊可通过降低软骨中 iNOS 的表达，减轻对Ⅱ型胶原的降解作用，从而起到保护膝关节，延缓关节退变的治疗效果。

综上所述，KOA 发病机制复杂，iNOS 的高表达导致的关节软骨破坏和软骨基质降解仅是 KOA 发病的机制之一。虽然鹿角壮骨胶囊在临床上治疗膝骨关节炎获得良好的疗效，但对其治疗作用机制了解尚浅，今后仍需进一步探讨。

参考文献：

[1] 吕苏梅，张瑞丽. 中老年膝骨关节炎的流行病学研究进展[J]. 中国老年学杂志，2016，36(16)：4133-4135.

[2] Pelletier J P，Jovanovic D，Fernandes J C，*et al*. Reduced progression of experimental osteoarthritis *in vivo* by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase[J]. *Arthritis Rheum*，1998，41(7)：1275-1286.

[3] Leonidou A，Lepetsos P，Mintzas M，*et al*. Inducible nitric oxide synthase as a target for osteoarthritis treatment[J]. *Expert Opin Ther Targets*，2018，22(4)：299-318.

[4] 苏 军，陆永刚，胡建山，等. 鹿角壮骨胶囊治疗膝骨性关节炎的疗效观察[J]. 中药药理与临床，2015，31(2)：169-170.

[5] 陈主初，吴端生. 实验动物动物学[M]. 4 版. 长沙：湖南科技出版社，2001：321.

[6] 刘振龙，满振涛，张继英，等. 利用 HHGS 和 OOCHAS 评分评价兔前交叉韧带断裂后膝骨关节炎软骨损伤程度的研究[J]. 中国运动医学杂志，2015，34(2)：103-110.

[7] Lane N E，Shidara K，Wise B L. Osteoarthritis year in review 2016：clinical[J]. *Osteoarthritis Cartilage*，2017，25(2)：209-215.

[8] 付 勇，冒姣娜，陈树涛，等. 热敏灸对膝骨性关节炎兔模型 MMP-13、iNOS 及Ⅱ型胶原的影响[J]. 中华中医药杂志，2018，33(10)：4381-4385.

[9] 巫桁锞，李荣亨，钟 玉. 复元胶囊对兔膝骨关节炎滑膜 IL-1β、MMP-13 及 iNOS 表达的影响[J]. 重庆医科大学学报，2010，35(7)：1004-1009.

[10] 张 冲，高海燕，黄 芸，等. 传统中医药补肾固筋方对中老年膝骨关节炎患者 IL-1、iNOS 水平的影响和临床意义[J]. 中国骨质疏松杂志，2015，21(7)：780-783.

[11] Stoop R，van der Kraan P M，Buma P，*et al*. Denaturation of type Ⅱ collagen in articular cartilage in experimental murine arthritis：evidence for collagen degradation in both reversible and irreversible cartilage damage[J]. *J Pathol*，1999，188(3)：329-337.

[12] 张 猛，周嘉俊，罗宗平. 软骨损伤后Ⅰ、Ⅱ型胶原蛋白的表达[J]. 中国组织工程研究，2014，18(51)：8305-8309.

[13] 葛伟韬，高 云，刘珍珠，等. 膝骨关节炎中医病名辨识[J]. 中医杂志，2016，57(23)：1989-1992.

[14] 李西海，刘献祥. 骨关节炎的核心病机-本痿标痹[J]. 中医杂志，2014，55(14)：1248-1249；1252.

[15] 林嘉辉，陈炳艺，李 楠. 龟鹿二仙胶治疗骨关节炎的研究概况[J]. 中华中医药杂志，2017，32(12)：5509-5512.

[16] 陈昌红，周荣魁，王 宸，等. 骨碎补总黄酮对兔膝骨关节炎细胞因子的影响[J]. 江苏医药，2013，39(18)：2135-2137.