

补肾活血方干预小鼠膝关节炎软骨修复的机制

李 兴¹, 肖方骏², 李 震², 翁家贤², 罗明辉¹, 潘建科¹, 陈红云¹, 杨伟毅^{1*}
(1. 广州中医药大学第二附属医院运动医学科, 广东 广州 510120; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 观察补肾活血方干预对小鼠膝关节炎模型的影响, 初步探讨其作用机制。**方法** 将 C57BL/6 雄性小鼠, 随机分为假手术组, 模型组, 补肾活血方低、高剂量组。补肾活血方低、高剂量组分别给予相应剂量的补肾活血方灌胃, 模型组、假手术组给予等体积的蒸馏水灌胃, 干预 8 周后取材, 采用 HE 染色及番红 O-固绿染色观察膝关节组织形态学改变并进行 OARSI 评分, RT-qPCR 法检测小鼠软骨中 *iNOS*、*COX-2*、*IL-6*、*TNF-α*、*MMP13* mRNA 表达, 免疫组织化学法检测关节软骨中 II 型胶原蛋白 (Collagen II)、MMP13 表达, Micro-CT 扫描检测关节软骨下骨小梁破坏及附近骨赘增生状况。**结果** 与模型组比较, 补肾活血方组小鼠膝关节组织形态学均明显改善 ($P<0.05$), 膝骨关节组织 *INOS*、*COX-2*、*IL-6*、*TNF-α*、*MMP13* mRNA 表达均降低 ($P<0.05$), Collagen II 表达升高 ($P<0.05$), 且疗效与剂量呈正相关性。**结论** 补肾活血方可以有效减缓膝关节炎的软骨损伤, 其机制可能是通过减少炎症因子的释放, 从而抑制 MMP 的表达, 上调 Collagen II 的表达, 改善关节软骨代谢环境, 进而达到保护关节软骨的作用。

关键词: 补肾活血方; 膝骨关节炎; 关节软骨; 炎症因子

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2022)02-0582-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.02.047

膝骨关节炎好发于中老年人群, 是临床中发病率较高的一种退行性膝关节疾患, 以膝关节软骨的变性、破坏及骨赘形成为主要临床特征, 临床上患者常以膝关节出现反复的疼痛、爬楼梯或下蹲困难为主诉, 严重者, 后期可发展为关节畸形, 致残率高达 53%, 给患者的工作和生活造成了严重的干扰^[1-2]。目前, 针对膝骨关节炎主要治疗包括保守方案及手术方案, 但尚无特效的治疗方法, 而中医药在保守治疗方面有着巨大的潜力。补肾活血方源自于广东省中医院内制剂肾骨安, 前期的研究已证实了其临床疗效^[3-4], 本研究意图借助病理学、分子生物学、影像学等多学科联合手段, 研究补肾活血方对小鼠膝骨关节炎模型的干预作用, 并进一步探究其作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 10 周龄 C57BL/6 雄性小鼠 32 只, 由广东省医学实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号 SCXK (粤) 2018-0034, 饲养于广州中医药大学 SPF 动物实验中心, 实验动物伦理审查号 20200911001, 实验动物使用许可证号 SYXK (粤) 2018-001, 自由饮水饮食, 昼夜节律为 12 h/12 h, 环境温度 (24±2) °C, 相对湿度 55% ~ 68%, 适应性喂养 1 周后开始进行实验研究。

1.2 药物 补肾活血方每剂含丹参 15 g, 巴戟天 10 g, 仙茅 10 g, 熟附子 10 g, 由广州中医药大学第二附属医院提供。

1.3 试剂及仪器 胶原蛋白 II (Collagen II) (货号 gb12021)、基质金属蛋白酶-13 (MMP-13) 抗体 (货号 gb11247) 均购自武汉赛维尔生物科技有限公司; DAB Substrate Kit (货号 8059S) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 番红 O-固绿软骨染色试剂盒 (货号 G1371) 购自北京索莱宝科技有限公司; TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (货号 TRR820A)、Reverse Transcription Kit (货号 TRR820A)、PrimeScript™ RT reagent Kit (货号 RR037A) 均购自日本 Takara 公司。倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); CFX96 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); Micro-CT (型号 Skyscan 1172, 德国 Bruker 公司)。

2 方法

2.1 动物模型建立与分组 按照随机数字表法将 32 只小鼠分为假手术组、模型组、补肾活血方低剂量组和补肾活血方高剂量组, 每组 8 只。根据文献方法制备膝骨关节炎模型^[5-6]小鼠, 腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 (35 mg/kg) 进行全身麻醉, 将小鼠固定、备皮、消毒, 随后使用内侧髌旁入路暴露右膝, 将髌骨后翻, 使膝关节保持最大屈曲状态, 暴露关节腔, 利用显微器械切断膝前交叉韧带, 避免损伤软骨, 切断后用抽厘实验检验前交叉韧带是否被切断。8 周后, 处死小鼠, 取出膝关节并固定在 4% 多聚甲醛中用于后续实验。

2.2 给药方法 造模成功后, 次日开始对给药组进行灌胃

收稿日期: 2021-08-08
基金项目: 广东省自然科学基金-面上项目 (2020A1515011349); 中国博士后科学基金-面上项目 (2019M662876)
作者简介: 李 兴 (1988—), 男, 博士, 副研究员, 从事骨科基础与临床研究。E-mail: liqixi723@126.com
* 通信作者: 杨伟毅 (1978—), 男, 博士, 主任医师, 从事关节运动损伤基础与临床研究。E-mail: czyangwy@163.com

干预，每天1次，每6 d 间歇1 d。补肾活血方低、高剂量组分别给予0.46、0.92 g/mL的补肾活血方进行灌胃，每次每只小鼠灌胃0.3 mL，假手术组及模型组分别给予0.3 mL蒸馏水进行灌胃，连续干预8周。

2.3 组织学观察 将组织样品转移到10% EDTA溶液中进行完全脱钙、脱水和石蜡包埋。在膝关节内侧隔室中沿矢状面方向切成5 μm厚，并用苏木精和伊红（HE）和番红-固绿（safranin O-fast green staining, SO）染色。通过应用OARSI评分系统^[7]评价小鼠关节软骨的退变程度。0分为表面完整，软骨完好无损；1分为表面完整；2分为表面不连续；3分为垂直裂缝；4分为侵蚀；5分为剥蚀；6分为变形。将内侧股骨和胫骨平台分数相加（0~12分）以评价关节软骨退变的程度。

2.4 RT-qPCR 法检测小鼠关节软骨中*iNOS*、*COX-2*、*IL-6*、*TNF-α*、*MMP13* mRNA 表达 按照Trizol法提取总RNA，各组RNA取500 ng按照TaKaRa逆转录试剂盒说明书进行逆转录，并进行RT-qPCR分析，参数为95℃ 30 s，预变性；95℃ 5 s，60℃ 34 s，扩增40个循环。参考熔解曲线为依据进行质控，检测样品中*iNOS*、*COX-2*、*IL-6*、*TNF-α*及*MMP13*的mRNA表达，并以*GAPDH*作为内参，使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析结果。所有引物均由生工生物工程（上海）股份有限公司设计。引物序列见表1。

表1 引物序列

引物		序列(5'→3')
<i>iNOS</i>	正向	GACGAGACGGATAGGCAGAG
	反向	CACATGCAAGGAAGGGAAC
<i>COX-2</i>	正向	TCCTCACATCCCTGAGAACC
	反向	GTCGCACACTCTGTTGTGCT
<i>IL-6</i>	正向	CCGGAGAGGAGACTTCACAG
	反向	TCCACGATTTCACAGAAAC
<i>TNF-α</i>	正向	ACGGCATGGATCTCAAAGAC
	反向	GTGGGTGAGGAGCAGCTAGT
<i>MMP13</i>	正向	TGATGGACCTTCTGCTCTTCTGG
	反向	CATCCACATGGTTGGGAAGTTCT
<i>GAPDH</i>	正向	TGCACCACCAACTGCTTAG
	反向	GGATGCAGGGATGATGTTCT

2.5 免疫组化检测小鼠关节软骨中Collagen II、MMP-13蛋白表达 小鼠组织切片脱蜡、抗原修复、血清封闭后，用兔多克隆抗体工作液稀释的Collagen II、MMP-13抗体（1：100）进行孵育，再将其与二抗工作液一起孵育，最终显色试剂显色，复染苏木精后，切片脱水、封片。镜下观察，并采集图像，然后通过Image J软件对阳性点进行定量，计算每个标本的阳性染色细胞数，每组小鼠取3个连续标本进行分析。

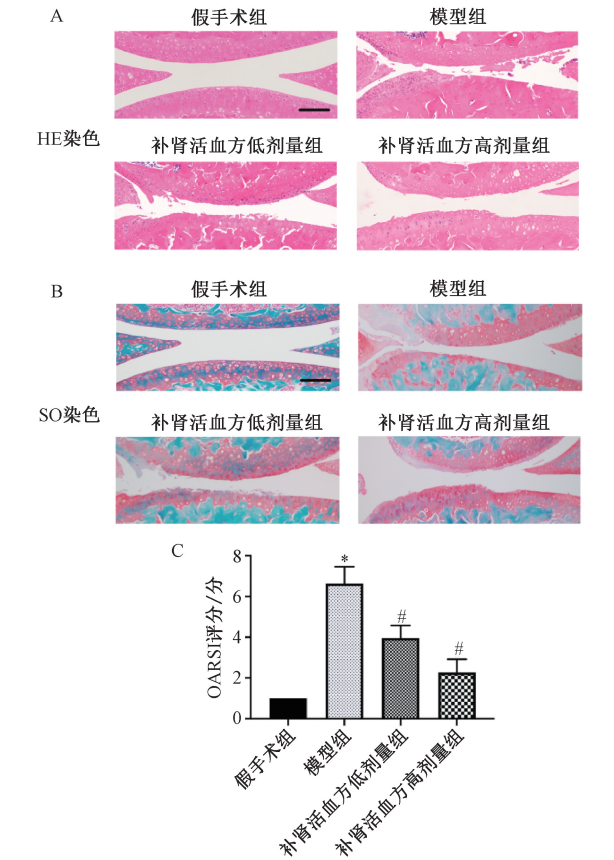
2.6 Micro-CT扫描评价小鼠膝关节中骨小梁破坏及附近骨赘增生状况 将样本置于含有70%乙醇的离心管中，并使用Micro-CT进行扫描^[8-9]。将整个胫骨平台软骨下骨组织设置为兴趣区域(region of interest, ROI),并采集膝关节的解剖结构三维重建的图像,采集相关的组织学参数,骨体积(bone volume, BV)、骨体积/总组织体积(bone volume/total

tissue volume, BV/TV)和骨小梁数量(trabecular.number, Tb.N)、厚度(trabecula.thickness, Tb.Th)和间距(trabecular.separation, Tb.Sp)。

2.7 统计学分析 通过SPSS 20.0软件进行处理，数据以($\bar{x}\pm s$)表示，2组间比较采用*t*检验，多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。P<0.05表示差异具有统计学意义。

3 结果

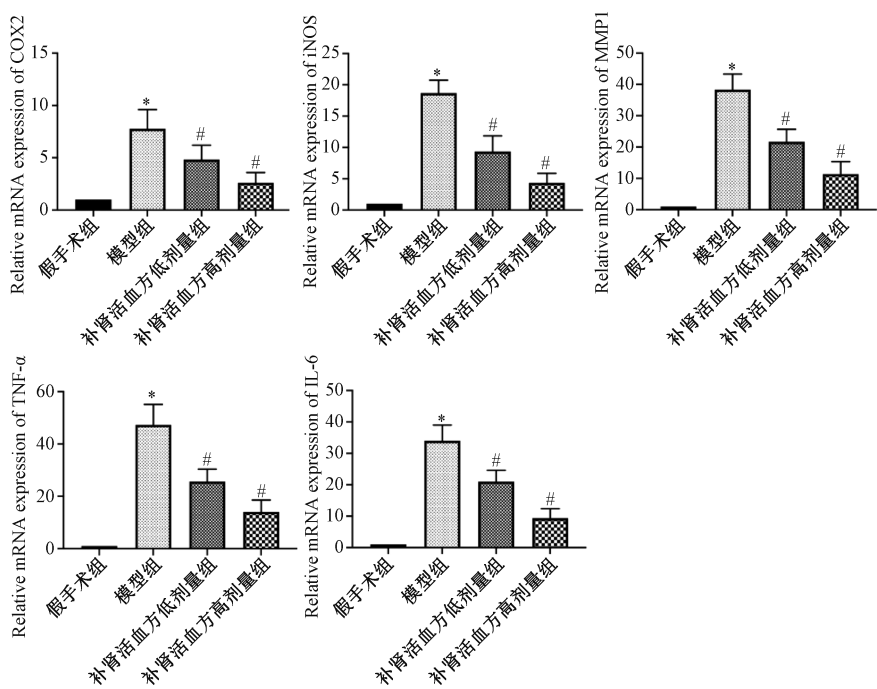
3.1 补肾活血方对小鼠关节软骨病理 HE、SO 染色及评分的影响 如图1A~1B所示，模型组小鼠关节软骨部分区域出现明显缺损，补肾活血方低剂量组小鼠关节软骨表面磨损较模型组有所减轻，而补肾活血方高剂量组小鼠软骨表面可见侵蚀现象明显改善。评分如图1C所示，与假手术组比较，模型组小鼠OARSI评分升高(P<0.05)，提示小鼠造模成功；与模型组比较，补肾活血方低、高剂量组小鼠评分降低(P<0.05)。



注：与假手术组比较，* P<0.05；与模型组比较，# P<0.05。比例尺50 μm。

图1 各组小鼠关节软骨病理染色及评分图 (×20)

3.2 补肾活血方对小鼠关节软骨中*COX-2*、*iNOS*、*MMP13*、*TNF-α*、*IL-6* mRNA 表达的影响 如图2所示，与假手术组比较，模型组小鼠关节软骨中*iNOS*、*COX-2*、*IL-6*、*TNF-α*、*MMP13* mRNA 表达升高(P<0.05)；与模型组比较，补肾活血方低、高剂量组小鼠关节软骨中*iNOS*、*COX-2*、*IL-6*、*TNF-α*、*MMP13* mRNA 表达降低(P<0.05)。



注：与假手术组比较，* $P<0.05$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ 。

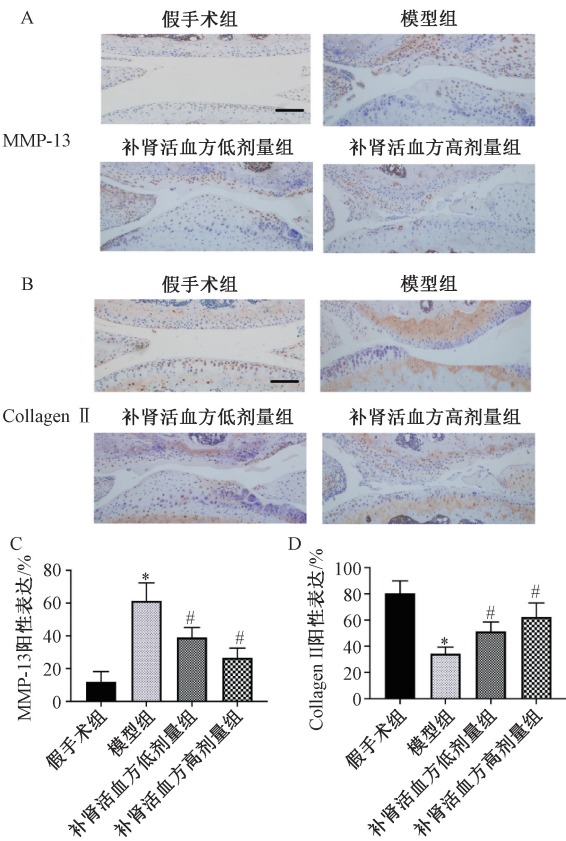
图 2 各组小鼠关节软骨中 *COX-2*、*iNOS*、*MMP13*、*TNF-α*、*IL-6* mRNA 表达

3.3 补肾活血方对小鼠关节软骨中 Collagen II、MMP-13 蛋白表达的影响 如图 3 所示，与假手术组比较，模型组小鼠关节软骨中 MMP-13 的阳性表达增加 ($P<0.05$)，Collagen II 的阳性表达降低 ($P<0.05$)；与模型组比较，补肾活血方低、高剂量组小鼠关节软骨中 MMP-13 的阳性表达降低 ($P<0.05$)，Collagen II 的阳性表达增加 ($P<0.05$)。结果表明，使用补肾活血方后，小鼠关节软骨损伤的现象明显改善。

3.4 补肾活血方提高小鼠膝关节中骨小梁密度及减少关节周围骨赘增生 Micro-CT 扫描三维重建结果如图 4A 所示，假手术组小鼠膝关节软骨均是健康软骨，未见明显的骨质破坏及增生；而模型组及补肾活血方低、高剂量组小鼠膝关节软骨均有不同程度的变化。从膝关节内侧矢状面图像 (图 4B) 分析，假手术组小鼠膝关节下骨小梁连续、密集、完整；模型组小鼠膝关节骨小梁不完整、疏松并断裂；与模型组比较，补肾活血方低、高剂量组小鼠膝关节在矢状位上骨小梁厚度明显增加。从骨计量参数分析的结果 (图 4C) 来看，与假手术组比较，模型组小鼠 ROI 区域的 BV、BV/TV、Tb. Th、Tb. N 水平均下降 ($P<0.05$)，Tb. Sp 水平升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，补肾活血方低、高剂量组小鼠 ROI 区域的 BV、BV/TV、Tb. Th、Tb. N 水平均升高 ($P<0.05$)，Tb. Sp 水平下降 ($P<0.05$)。结果表明，补肾活血方能够改善关节炎小鼠 ROI 区域的 BV、BV/TV、Tb. Sp、Tb. Th、Tb. N 水平。

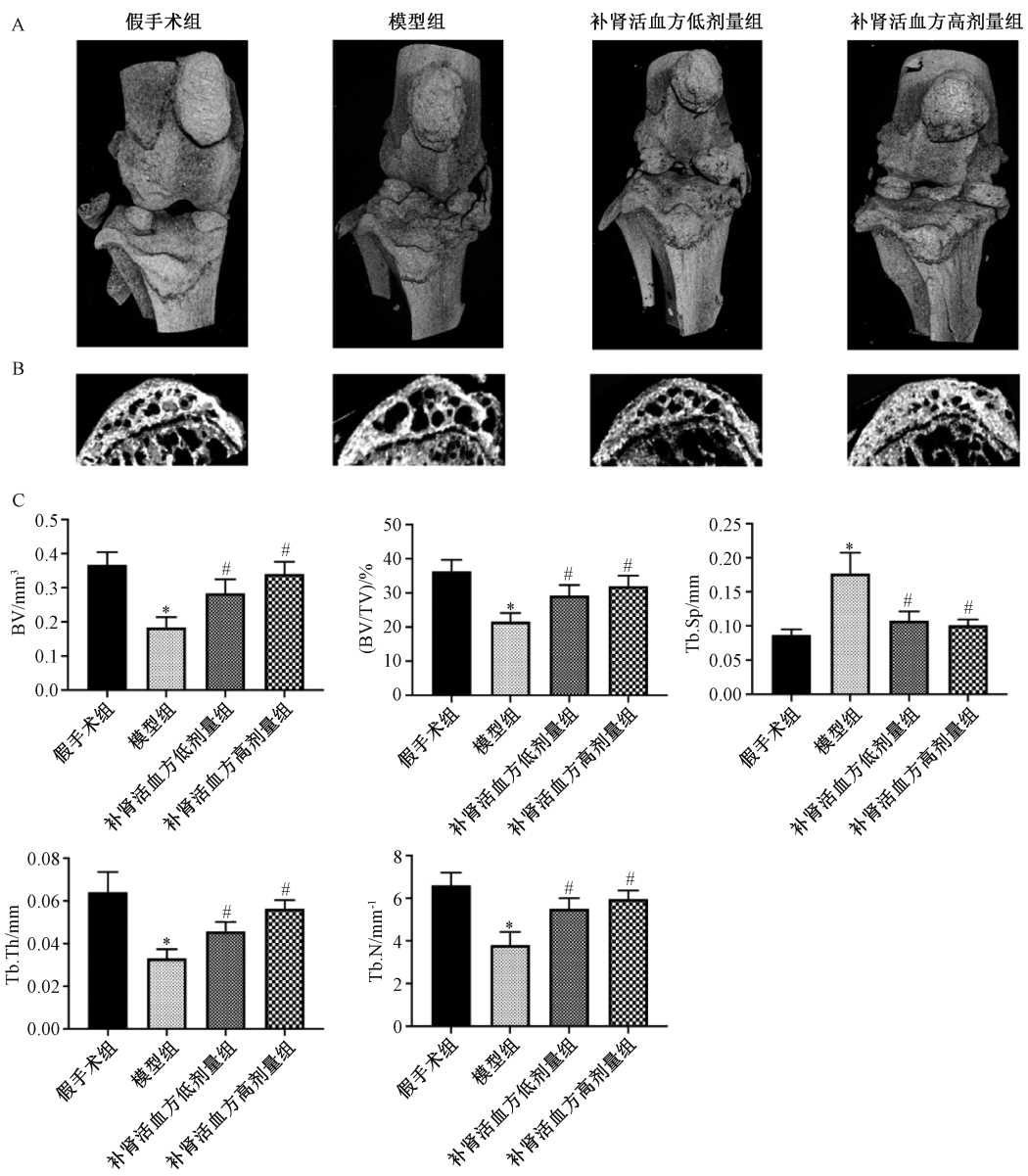
4 讨论

中医古籍中并无膝关节关节炎这一称谓，根据其相关症状，多将其从“骨痹”论治^[10-11]，《素问》中记载，“肝气



注：A~B 为 MMP-13、Collagen II 免疫组化染色，C~D 为 MMP-13、Collagen II 免疫组化染色直方图。与假手术组比较，* $P<0.05$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ 。比例尺 50 μm 。

图 3 各组小鼠关节软骨中 MMP-13、Collagen II 蛋白表达 ($\times 20$)



注：与假手术组比较,**P*<0.05;与模型组比较,#*P*<0.05。比例尺 50 μm。

图 4 各组小鼠关节软骨 Micro-CT 扫描结果

衰，筋不能动，天癸竭，精少，肾脏衰，形体皆极”，首先提出在中老年患者膝骨关节炎中，肝肾不足是其基本病机。同时，气血作为人体的基本营养物质，但凡损伤，必有气血运行障碍，诚如《正体类要》中所言“肢体损于外，则气血伤于内”。因而，当前对膝骨关节炎中医因病机的认识，多以肾虚血瘀为主，以补肾活血法治之^[12-13]。本研究以此为理论基础，采用的补肾活血方是根据广东省名中医邓晋丰教授多年临床经验所创制，全方由巴戟天、丹参、熟附子、仙茅四药组成，寒热兼施，有补肾强筋，活血通络之功效，临床疗效显著^[3-4]。同时，现代药理学研究证实，中药丹参^[14]和附子^[15]的活性成分可以有效抑制炎症因子释放，而其干预膝骨关节炎的机制可能与减少 MMPs 释放，进而抑制关节软骨基质的降解有关。

MMPs 是细胞外基质降解中主要的蛋白酶系统，被认

为是机体生理重建和病理破坏的主要基础因素之一^[16]。MMP-13 作为已知酶系中最高效的胶原酶，可以直接降解软骨基质中的 Collagen II，在膝骨关节炎病理过程中，MMP-13 常呈过表达的状态，造成细胞外基质的过度降解，使软骨的完整性破坏^[17]。因此，理论上来说，软骨破坏程度越严重，MMP13 的表达越高^[18]。同时，既往研究发现，IL-6、TNF-α 等炎症因子可以通过不同途径活化 MMPs^[19-20]。本研究通过实验发现膝骨关节炎模型小鼠关节软骨中 iNOS、COX-2、IL-6、TNF-α 等炎症相关因子与 MMP-13 的 mRNA 表达均有不同程度增高，与文献结果一致。

根据本研究中 HE 染色、SO 染色及 Micro-CT 的结果，发现造模后的 C57BL/6 小鼠出现了显著的关节软骨增生，及软骨下骨破坏的组织学改变，符合膝骨关节炎的特点。补肾活血方干预 8 周后，与模型组比较，补肾活血方低、

高剂量组有着不同程度的改善小鼠膝关节炎组织学形态的作用。同时，RT-qPCR、免疫组化的结果发现，与模型组比较，低剂量组、高剂量组小鼠关节软骨中*iNOS*、*COX-2*、*IL-6*、*TNF-α*、*MMP13* mRNA 表达降低（ $P<0.05$ ），而 Collagen II 表达高（ $P<0.05$ ）。同时，本研究还发现补肾活血方在治疗膝关节炎过程中存在剂量相关性，随着用药剂量增加，膝关节炎小鼠的炎症因子表达降低。

综上所述，本研究发现补肾活血方可以有效减缓膝关节炎的软骨损伤，其机制可能是通过抑制炎症因子的表达，进而减少 MMP-13 的释放，阻止 MMP-13 对软骨基质中 Collagen II 的破坏，从而达到改善关节软骨内代谢环境，保护关节软骨的作用。本研究结果可能是补肾活血方改善膝关节炎的一种新型机制，但未来仍需更多的实验研究及临床论证，来进一步挖掘其更深入的机制。

参考文献：

[1] Bhatia D, Bejarano T, Novo M. Current interventions in the management of knee osteoarthritis[J]. *J Pharm Bioallied Sci*, 2013, 5(1): 30-38.

[2] 许成燕, 陈军香, 王教明, 等. 中国人群膝关节炎危险因素 Meta 分析[J]. 中国循证医学杂志, 2021, 21(7): 772-778.

[3] 王羽丰, 邓晋丰, 谭明生, 等. 肾骨安治疗脊髓型颈椎病疗效及其与血清内皮素关系的实验研究[J]. 中医正骨, 2000, 12(12): 3-6; 63.

[4] 肖志锋, 林定坤, 苏国义, 等. 阿伦磷酸钠联合肾骨安对去势小鼠终板结构和椎间盘退变的影响[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2017, 27(12): 1128-1134.

[5] Si H B, Zeng Y, Liu S Y, *et al.* Intra-articular injection of microRNA-140 (miRNA-140) alleviates osteoarthritis (OA) progression by modulating extracellular matrix (ECM) homeostasis in rats [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2017, 25 (10): 1698-1707.

[6] 郇松玮, 查振刚, 王华军, 等. miR-214 在小鼠骨关节炎软骨及软骨下骨中的表达分析[J]. 中国矫形外科杂志, 2019, 27(7): 641-645.

[7] Glasson S S, Chambers M G, Van den berg W B, *et al.* The OARSI histopathology initiative-recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010, 18(Suppl 3): S17-S23.

[8] Zhou F, Mei J T, Han X G, *et al.* Kinsenoside attenuates osteoarthritis by repolarizing macrophages through inactivating NF-κB/MAPK signaling and protecting chondrocytes [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9(5): 973-985.

[9] Weng T, Xie Y, Yi L, *et al.* Loss of Vhl in cartilage accelerated the progression of age-associated and surgically induced murine osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2014, 22 (8): 1197-1205.

[10] 戴国玮, 王 芳, 郭 信, 等. 宣痹汤加减联合常规治疗对风湿热痹型膝关节炎发作期患者的临床疗效[J]. 中成药, 2021, 43(7): 1974-1976.

[11] 王瑀譔, 曹文富, 崔世奎, 等. 基于 NF-κB 信号通路探讨散寒化痰方外敷对兔模型膝关节炎的影响[J]. 中成药, 2021, 43(7): 1887-1894.

[12] 李 朋, 李 钊, 罗 天, 等. 补肾活血协定方治疗膝关节炎性关节肾虚血瘀证的疗效及机制[J]. 辽宁中医杂志, 2021, 48(7): 96-100.

[13] 王俊峰, 关雪峰, 杨永菊, 等. 补肾活血法治疗膝关节炎实验研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22 (1): 124-127.

[14] 滕 海, 陆惠英, 李俊杰. 丹参注射液治疗对膝骨性关节炎模型兔关节软骨中 TNF-α、IL-6、MMP-3 表达的影响 [J]. 国际免疫学杂志, 2020, 43(1): 20-21; 25.

[15] 朱瑞丽, 易 浪, 董 燕, 等. 附子中 3 种乌头原碱对巨噬细胞的抗炎作用 [J]. 广州中医药大学学报, 2015, 32 (5): 908-913.

[16] Roubille C, Martel-Pelletier J, Pelletier J P. Metabolism of human diseases[M]. Vienna: Springer, 2014: 107-113.

[17] Li Y M, Tang L, Duan Y Z, *et al.* Upregulation of MMP-13 and TIMP1 expression in response to mechanical strain in MC3T3-E1 osteoblastic cells [J]. *BMC Res Notes*, 2010, 3: 309.

[18] 李卫平, 蹇 睿, 胥方元. 超声波治疗兔膝关节炎对 MMP-1 和 MMP-13 表达的影响[J]. 重庆医学, 2012, 41 (16): 1564-1566; 1556.

[19] 王一洲, 赵 强. 摇法对 KOA 兔滑膜 MMPs 分泌功能的作用研究[J]. 天津中医药, 2021, 38(3): 383-386.

[20] Haltmayer E, Ribitsch I, Gabner S, *et al.* Co-culture of osteochondral explants and synovial membrane as *in vitro* model for osteoarthritis[J]. *PLoS One*, 2019, 14(4): e0214709.