

基于MMP-3、MMP-13表达探讨独一味胶囊对大鼠膝骨关节炎的改善作用

刘琴¹, 林春¹, 李媛媛¹, 钟世红^{1,2*}, 曾勇³, 古锐³

(1. 成都医学院药学院, 四川 成都 610500; 2. 西南民族大学药学院, 四川 成都 610200; 3. 成都中医药大学, 四川 成都 611173)

摘要: **目的** 探讨独一味胶囊对大鼠膝骨关节炎的影响及其作用机制。**方法** 将60只大鼠随机分为正常组、模型组、塞来昔布组及独一味胶囊低、中、高剂量组,以木瓜蛋白酶诱导建立膝骨关节炎模型,各组给予相应药物干预6周。检测膝关节肿胀度并进行Lequesne评分,肉眼观察膝骨软骨并进行Pelletier评分,甲苯胺蓝、番红固绿、HE染色观察软骨形态结构并进行Mankin评分,Western blot法检测大鼠软骨组织MMP-3、MMP-13蛋白表达。**结果** 与正常组比较,模型组大鼠膝关节肿胀度、Lequesne评分、Pelletier评分、Mankin评分、软骨组织MMP-3和MMP-13蛋白表达升高($P<0.01$),软骨表面裂隙,细胞形态异常、数量减少,软骨部位出现血瘀、空腔,软骨基质变薄;与模型组比较,独一味胶囊组膝关节肿胀度、Lequesne评分、Pelletier评分、Mankin评分、软骨组织MMP-3和MMP-13蛋白表达均降低($P<0.05$, $P<0.01$),软骨表面光滑且有光泽,软骨基质增厚,软骨结构与细胞形态趋于正常。**结论** 独一味胶囊可以改善大鼠膝骨关节炎症状,其机制可能与下调MMP-3、MMP-13蛋白表达有关。

关键词: 独一味胶囊;膝骨关节炎;木瓜蛋白酶;MMP-3;MMP-13

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)01-0223-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.01.041

膝骨关节炎是一种以膝关节软组织、膝骨、膝骨软骨退行性病变为主,多发于肥胖及60岁以上老年人群,临床常见的慢性疾病^[1]。现阶段主要治疗方式包括改善生活方式、手术及非甾体类抗炎药、皮质类固醇、阿片类镇痛药等药物治疗,但均无法治愈,甚至会加速该病发展进程^[2]。膝骨关节炎主要临床特征为红肿、疼痛、僵硬和残疾,表现为软骨损伤与丢失^[3],在疾病进程中,膝骨软骨受损,释放多种异物因子,刺激基质金属蛋白酶(MMPs)合成,使降解胶原和蛋白多糖的因子MMP-3增多,从而激活MMP-13,降解软骨Ⅱ型胶原,加速软骨损坏^[4,5]。因此,治疗膝骨关节炎的关键在于抑制膝骨软骨损伤。膝骨关节炎属中医学“骨痹”范畴,病因以肝肾亏虚不足为本,风寒湿邪为标,治疗关键在于标本兼治,扶正祛邪^[6]。

独一味胶囊具有活血止血、祛风止痛之功效,临床用于跌打损伤、外伤出血、风湿痹痛、黄水病等证的治疗^[7]。临床研究显示独一味胶囊也可用于膝骨关节炎^[8,9]、骨关节炎^[10]以及四肢骨折^[11]的治疗,但关于独一味胶囊对膝骨关节炎的作用及机制研究尚未见相关报道。本研究通过探索独一味胶囊对木瓜蛋白酶诱导大鼠膝骨关节炎的疗效及对MMP-3、MMP-13蛋白表达的影响,以期为进一步开展独

一味治疗膝骨关节炎的研究提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 60只雄性SPF级SD大鼠,体质量(250±10)g,购自成都达硕实验动物有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(川)2015-030。

1.2 试剂 独一味胶囊(批号1904033302,康县独一味生物制药有限公司)。塞来昔布胶囊(批号AH2066,美国辉瑞公司);木瓜蛋白酶、L-半胱氨酸、高效RIPA组织细胞快速裂解液、5×蛋白上样缓冲液、PMSF、BCA蛋白浓度测定试剂盒、甲苯胺蓝软骨染色液、改良番红O-固绿软骨染色液(货号G8430、C0012、R0010-100、P1040、P0100、PC0020、G2543、G1371,北京索莱宝科技有限公司);蛋白Maker(货号26616,美国Thermo公司);GAPDH一抗(货号6004-1-Ig,武汉三鹰生物技术有限公司);MMP3一抗(货号14351S,美国CST公司);MMP13一抗(货号ab39012,英国Abcam公司);ECL显影液(货号WBKLSO100,美国Millipore公司)。

1.3 仪器 BX63型正置荧光生物显微镜(日本Olympus公司);TK-218型自动轮转切片机、B7126-A型包埋机(德国Leica公司);蛋白电泳仪、化学发光仪(美国Bio-

收稿日期: 2021-05-13

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(81403040);国家科技部重大研发计划课题(2019YFC1712305);四川省科技厅重点研发项目(20ZDYF2376);四川养老与老年健康协同创新中心课题(YLZBZ1809)

作者简介: 刘琴(1996—),女,硕士生,从事中药药理研究。Tel: 18228024020, E-mail: 1651994428@qq.com

* **通信作者:** 钟世红(1980—),女,博士,教授,从事中药资源研究。Tel: (028) 85752465, E-mail: 527455247@qq.com

Rad公司);电子天平(德国赛多利斯公司);ZRD-7230干燥箱(上海智城分析仪器制造有限公司)。

2 方法

2.1 分组与造模 将60只大鼠随机分为正常组(10只)、造模组(50只),使用4%木瓜蛋白酶溶液诱导建立膝关节关节炎模型^[12],由于造模中存在大鼠死亡情况,造模结束将模型大鼠随机分为模型组、塞来昔布组及独一味胶囊低、中、高剂量组,每组8只,另选取正常组8只。

2.2 给药 塞来昔布组每天灌胃给予0.24 mg/kg塞来昔布胶囊;根据人临床用药与动物实验剂量换算方法,独一味胶囊低、中、高剂量组每天灌胃给予4.5、9、13.5 mg/kg独一味胶囊;正常组和模型组灌胃给予生理盐水,连续给药6周。

2.3 肿胀度检测 造模前至给药结束期间,每周用游标卡尺测定各组大鼠膝关节白色韧带处直径,共8次,并计算大鼠膝关节肿胀度,公式为膝关节肿胀度 = [(膝关节直径 - 造模前膝关节直径) / 造模前膝关节直径] × 100%。

2.4 Lequesne 指数评分 造模后、给药3周、给药6周时根据Lequesne评分标准^[13]对大鼠患肢疼痛(3分)、步态改变(3分)、关节活动(3分)、关节肿胀(2分)程度4个方面进行评分(共11分)。

2.5 取材与Pelletier评分 处死大鼠,取膝关节,去除多余组织,暴露软骨,按Pelletier评分标准^[14]根据软骨表面完整、粗糙、糜烂缺损程度、溃疡缺损程度和剥脱5个等级(共5分)进行评分。取膝关节软骨,一部分固定于4%多聚甲醛溶液,另一部分于-80℃冰箱保存。

2.6 病理染色与Mankin评分 膝关节固定48 h,流水冲

洗2 h,于10% EDTA脱钙液中脱钙,每周更换2次脱钙液,共4周,常规石蜡包埋,切片(6 μm)备用,按HE、甲苯胺蓝、番红固绿说明书进行染色,封片,显微镜观察,根据Mankin评分标准^[15]对HE染色的软骨结构(5分)、软骨细胞形态数量(3分)、基质着色(4分)、潮线完整性(2分)4个方面进行评分(共14分)。采用Image-Pro Plus 6.0软件分析甲苯胺蓝、番红固绿染色平均光密度(IOD)值。

2.7 Western blot 法检测软骨组织MMP-3、MMP-13蛋白表达 取适量软骨,于液氮中迅速研磨至粉状,加入高效RIPA裂解液(裂解液:PMSF=100:1),于冰上裂解30 min,12 000 r/min离心5 min,取上清液,BCA法测蛋白浓度,加入5×蛋白上样缓冲液,于100℃金属水浴锅加热10 min。取20 μg总蛋白上样,电泳,转膜,5% BCA封闭,加GAPDH、MMP-3、MMP-13一抗4℃孵育过夜,TBST漂洗,二抗孵育,TBST漂洗,显影,成像,Quantity One软件分析各蛋白的相对表达量。

2.8 统计学分析 通过SPSS 24.0软件进行处理,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,两两间比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 独一味胶囊对膝关节关节炎大鼠膝关节肿胀度的影响 如表1所示,造模后,与正常组比较,模型组及各给药组大鼠膝关节肿胀度均增加($P < 0.01$);给药5、6周,与模型组比较,独一味胶囊各剂量组大鼠膝关节肿胀度均降低($P < 0.01$),并呈剂量依赖性。

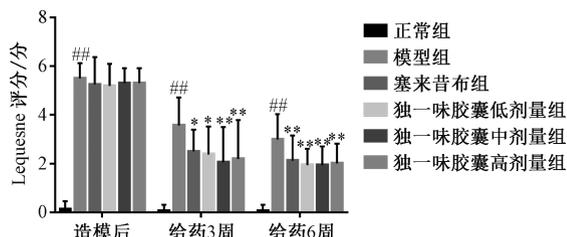
表1 各组大鼠膝关节肿胀度比较(%, $\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

| 组别 | 造模后 | 给药1周 | 给药2周 | 给药3周 | 给药4周 | 给药5周 | 给药6周 |
|-----------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 正常组 | 0.004±0.012 | 0.016±0.016 | 0.009±0.014 | 0.011±0.020 | 0.012±0.020 | 0.008±0.018 | 0.017±0.021 |
| 模型组 | 0.086±0.025 ^{###} | 0.062±0.027 ^{###} | 0.047±0.027 ^{###} | 0.039±0.021 ^{###} | 0.035±0.024 ^{###} | 0.035±0.017 ^{###} | 0.039±0.020 ^{###} |
| 塞来昔布组 | 0.085±0.014 ^{###} | 0.036±0.024 | 0.024±0.018 | 0.026±0.016 | 0.017±0.012 | 0.018±0.014 ^{**} | 0.018±0.018 ^{**} |
| 独一味胶囊低剂量组 | 0.084±0.021 ^{###} | 0.053±0.015 | 0.030±0.024 | 0.021±0.019 | 0.021±0.020 | 0.022±0.018 [*] | 0.020±0.017 ^{**} |
| 独一味胶囊中剂量组 | 0.086±0.027 ^{###} | 0.044±0.029 | 0.029±0.027 | 0.014±0.017 ^{**} | 0.022±0.020 | 0.018±0.022 ^{**} | 0.011±0.022 ^{**} |
| 独一味胶囊高剂量组 | 0.084±0.020 ^{###} | 0.023±0.020 ^{**} | 0.016±0.013 ^{**} | 0.012±0.014 ^{**} | 0.009±0.009 [*] | 0.010±0.016 ^{**} | 0.010±0.018 ^{**} |

注:与正常组比较,^{###} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

3.2 独一味胶囊对膝关节关节炎大鼠Lequesne评分的影响 如图1所示,与正常组比较,造模后,模型组与各给药组大鼠Lequesne评分均升高($P < 0.01$);给药3周后,与模型组比较,各给药组大鼠Lequesne评分均降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);给药6周后,与模型组比较,各给药组大鼠Lequesne评分均降低($P < 0.01$)。

3.3 独一味胶囊对膝关节关节炎大鼠软骨肉眼变化与Pelletier评分的影响 如图2所示,正常组大鼠软骨表面光滑、有色泽;模型组大鼠软骨表面糜烂,有凹陷,光泽暗淡;塞来昔布组大鼠软骨表面光滑,有凹陷,有光泽;独一味胶囊低剂量组大鼠软骨表面凹陷,光泽较好;独一味胶囊中剂量组大鼠软骨表面较为光滑,有凹陷;独一味胶囊高剂量组大鼠软骨表面较光滑、光泽好、基本无凹陷。



注:与正常组比较,^{###} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

图1 各组大鼠Lequesne评分($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

如图3所示,与正常组比较,模型组大鼠软骨Pelletier评分升高($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠软骨Pelletier评分均降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3.4 独一味胶囊对膝关节关节炎大鼠病理变化与Mankin评

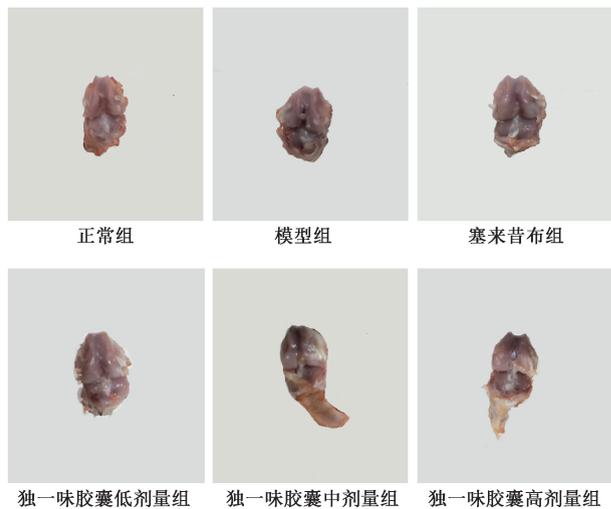
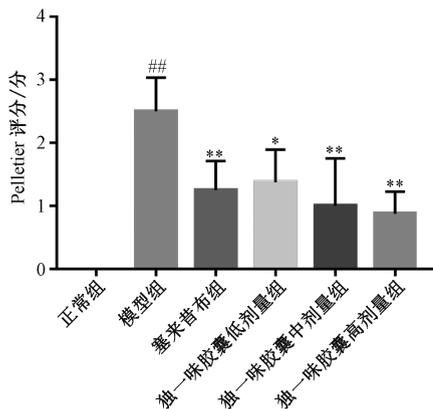


图2 各组大鼠膝关节软骨外观



注：与正常组比较，## $P<0.01$ ；与模型组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图3 各组大鼠膝关节软骨 Pelletier 评分 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

分的影响 如图4所示，正常组大鼠膝关节软骨表面光滑无裂隙，细胞形态及数量正常，基质着色较好，潮线清楚；模型组大鼠软骨表面凹陷，细胞形态异常且聚集成团，细胞数量减少，基质着色较浅，软骨部位出现血癍空腔；塞来昔布组大鼠软骨表面不光滑，细胞形态改变且聚集，部分基质着色良好，部分软骨表现多重潮线；独一味胶囊低剂量组大鼠软骨凹陷，细胞形态改变且部分聚集，软骨有空腔，潮线紊乱；独一味胶囊中剂量组大鼠软骨表面较光滑，细胞数量增加且部分细胞质变大；独一味胶囊高剂量组大鼠软骨表面较光滑，细胞较正常，软骨结构较完整。如图5所示，与正常组比较，模型组大鼠 Mankin 评分升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，各给药组大鼠 Mankin 评分均降低 ($P<0.01$)。

3.5 独一味胶囊对膝骨关节炎大鼠软骨组织甲苯胺蓝、番红固绿染色的影响 如图6~7所示，正常组大鼠膝关节甲苯胺蓝、番红固绿染色软骨较厚，基质着色较好；模型组大鼠软骨厚度变薄，细胞减少，部分基质不着色；塞来昔布组大鼠基质着色较模型组深，软骨厚度增厚；独一味胶囊低剂量组大鼠较模型组着色深，软骨较厚；独一味胶囊

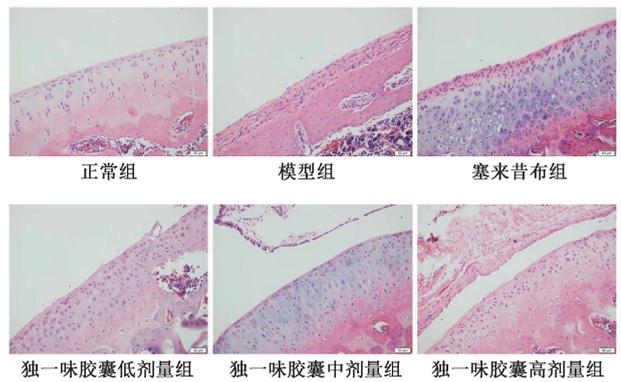
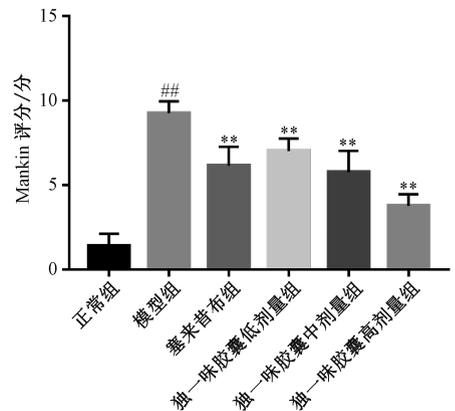


图4 各组大鼠膝关节 HE 染色 ($\times 200$)



注：与正常组比较，## $P<0.01$ ；与模型组比较，** $P<0.01$ 。

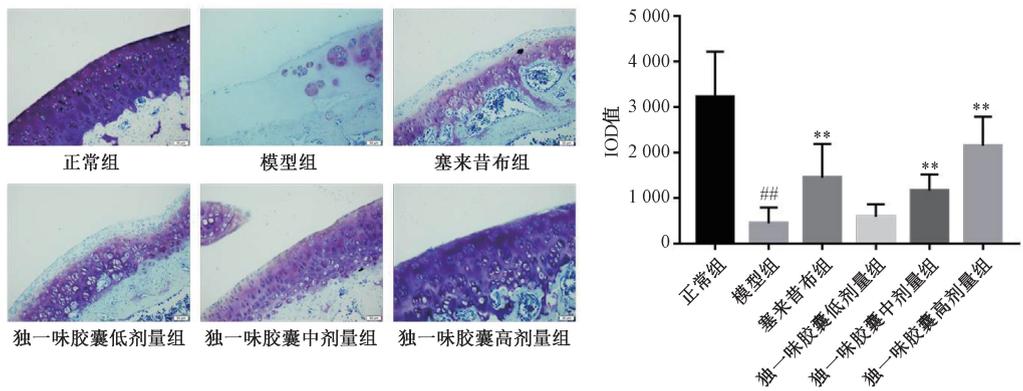
图5 各组大鼠膝关节 Mankin 评分 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

中剂量组大鼠较模型组着色深，软骨较厚，细胞形态较为正常；独一味胶囊高剂量组大鼠较模型组着色深，软骨厚度与正常组相似，细胞形态较为正常。与正常组比较，模型组甲苯胺蓝、番红固绿染色区域 IOD 值均降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，塞来昔布组和独一味胶囊高剂量组甲苯胺蓝、番红固绿染色区域 IOD 值均升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

3.6 独一味胶囊对膝骨关节炎大鼠膝关节软骨组织 MMP-3、MMP-13 蛋白表达的影响 如图8所示，与正常组比较，模型组大鼠软骨组织 MMP-3、MMP-13 蛋白表达升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，独一味胶囊高剂量组 MMP-3 蛋白表达降低 ($P<0.05$)，塞来昔布组和独一味胶囊中、高剂量组 MMP-13 蛋白表达降低 ($P<0.01$)。

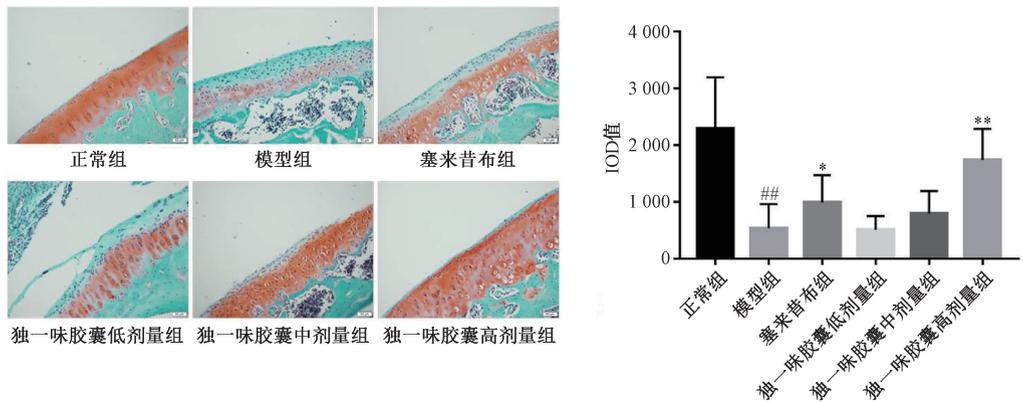
4 讨论

膝骨关节炎具有疼痛强烈、病程长、治愈难、可致残等特点，其发病率逐年增长，严重影响患者生活质量，是残疾、疼痛和社会经济负担的主要来源^[16-17]。中医学认为，膝骨关节炎以肝肾不足为内源病因，风寒湿邪为重要诱因，因此膝骨关节炎治疗应以补肝益肾、祛风活络、活血化瘀、散寒止痛为原则^[18]。研究显示，独一味的扶正固本、抗炎镇痛、化痰活血效果显著，能降低兔骨关节炎中抗炎因子与 MMPs 水平，进而改善兔骨关节炎^[19]。因此，独一味胶囊在膝骨关节炎的治疗中具有潜在价值。



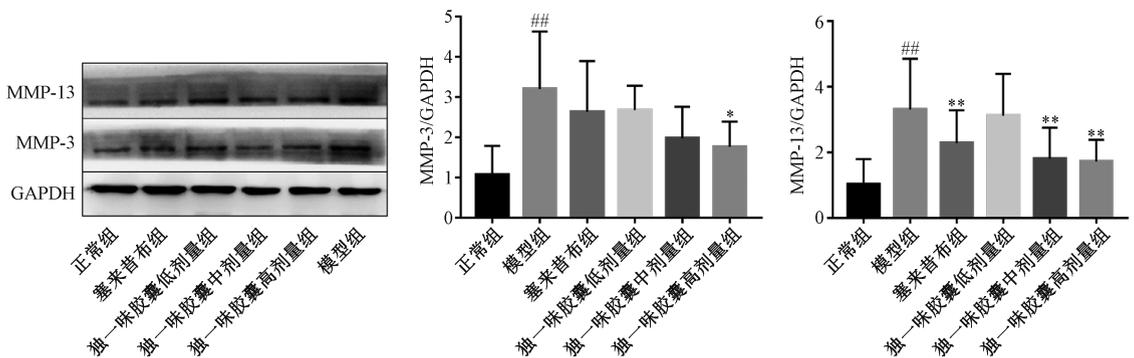
注：与正常组比较，## $P < 0.01$ ；与模型组比较，** $P < 0.01$ 。

图6 各组大鼠膝关节甲苯胺蓝染色 ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n = 8$)



注：与正常组比较，## $P < 0.01$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

图7 各组大鼠膝关节番红固绿染色 ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n = 8$)



注：与正常组比较，## $P < 0.01$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

图8 各组大鼠膝关节软骨组织MMP-3、MMP-13蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

膝关节炎模型的建立方法主要包括手术诱导、关节制动、关节腔内药物注射等^[20]。本研究前期比较了前后交叉韧带切除、木瓜蛋白酶、碘乙酸钠3种方法诱导建立大鼠膝关节炎模型，结果表明，前后交叉韧带切除法技术要求高，操作较复杂，并且容易发生感染；碘乙酸钠法虽然操作简单，但毒性较大，部分大鼠出现尿血现象；8%木瓜蛋白酶溶液诱导浓度过高，大鼠膝关节皮肤过度腐蚀；而4%木瓜蛋白酶溶液诱导基本无皮肤腐蚀现象，HE染色评分结果较好，且操作简单，模型稳定。因此，本实验选

择4%木瓜蛋白酶诱导建立大鼠膝关节炎模型。

实验结果表明，模型组大鼠膝关节肿胀度、Lequesne评分、Pelletier评分、Mankin评分均升高，且软骨表面糜烂、凹陷，病理染色显示软骨表面裂隙，细胞形态异常、数量减少，软骨部位出现血瘀、空腔，软骨基质变薄，表明膝关节炎模型造模成功^[21-22]。塞来昔布组与独一味胶囊高剂量组大鼠膝关节肿胀度、Lequesne评分、Pelletier评分、Mankin评分均降低，软骨表面光滑且有光泽，软骨基质增厚，软骨结构与细胞形态较为正常，提示塞来昔布与

独一味胶囊对于木瓜蛋白酶诱导大鼠膝关节炎均有改善作用,其中独一味胶囊高剂量组疗效较好。

MMPs作为膝关节炎标记蛋白,在膝关节炎发展中起到极为重要的作用,是细胞外基质降解和重塑的关键性蛋白酶。膝关节炎病变时,软骨中MMP-3、MMP-13分泌增加,软骨细胞外基质中蛋白多糖、骨连接蛋白及多种胶原蛋白降解,导致软骨变薄,发生退行性病变^[23-24]。本研究发现,与模型组比较,独一味胶囊高剂量组大鼠软骨组织MMP-3、MMP-13蛋白表达降低,膝关节软骨增厚,说明独一味胶囊可有效改善木瓜蛋白酶诱导大鼠膝关节炎。

综上所述,独一味胶囊可能是通过下调软骨组织MMP-3、MMP-13蛋白表达,从而抑制软骨基质降解,减少软骨破坏,进而缓解膝关节炎发展。

参考文献:

[1] Wang L, Wang Z B, Liu Q Q, *et al.* Effect of whole body vibration on HIF-2 α expression in SD rats with early knee osteoarthritis [J]. *J Bone Miner Metab*, 2020, 38 (4): 491-500.

[2] Wiegant K, van Roermund P M, Intema F, *et al.* Sustained clinical and structural benefit after joint distraction in the treatment of severe knee osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013, 21(11): 1660-1667.

[3] Mandl L A. Osteoarthritis year in review 2018: clinical [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2019, 27(3): 359-364.

[4] Abramoff B, Caldera F E. Osteoarthritis: pathology, diagnosis, and treatment options [J]. *Med Clin North Am*, 2020, 104 (2): 293-311.

[5] 平伟,武智超,张立才,等. 膝关节炎患者关节镜清理前后关节液中MMP1、MMP3、IL-1的变化及意义[J]. 海南医学院学报, 2014, 20(10): 1397-1399; 1402.

[6] 陈飞跃,黄肖华,邹明辉. 膝关节炎的中医药综合疗法研究概况[J]. 医学信息, 2020, 33(19): 41-43; 47.

[7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 1368.

[8] 马利阁,尹万乐,尤笑迎. 独一味胶囊联合塞来昔布治疗膝骨性关节炎的疗效及对血清脂质、载脂蛋白和炎性反应递质的影响[J]. 世界中医药, 2018, 13(11): 2774-2777.

[9] 陈黎明,郭盛君,马玉峰. 肿痛安胶囊治疗痰血瘀滞型膝骨关节炎疗效观察[J]. 中国医药导报, 2012, 9(12): 128-130.

[10] 王小平,郑小清,林羽慧,等. 仙灵骨葆联合独一味治疗

骨关节炎的临床疗效观察[J]. 今日药学, 2015, 25(7): 532-534.

[11] 俞国成,鲁海勤,许海波,等. 鹿瓜多肽注射液联合独一味胶囊治疗四肢骨折疗效观察[J]. 新中医, 2018, 50(8): 106-108.

[12] 汪丽. 关节腔注射玻璃酸钠联合有氧训练对大鼠膝关节炎软骨基质的影响[D]. 泸州: 西南医科大学, 2018.

[13] Lequesne M G, Mery C, Samson M, *et al.* Indexes of severity for osteoarthritis of the hip and knee. Validation-value in comparison with other assessment tests [J]. *Scand J Rheumatol Suppl*, 1987, 65: 85-89.

[14] 邹志余,周劲松,肖昆林,等. 姜黄素对单碘乙酸诱导的膝骨关节炎大鼠的治疗作用[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2020, 41(2): 299-303.

[15] Niazvand F, Khorsandi L, Abbaspour M, *et al.* Curcumin-loaded poly lactic-co-glycolic acid nanoparticles effects on monoiodoacetate-induced osteoarthritis in rats [J]. *Vet Res Forum*, 2017, 8(2): 155-161.

[16] Roato I, Belisario D C, Compagno M, *et al.* Concentrated adipose tissue infusion for the treatment of knee osteoarthritis: clinical and histological observations [J]. *Int Orthop*, 2019, 43 (1): 15-23.

[17] Glyn-Jones S, Palmer A J, Agricola R, *et al.* Osteoarthritis [J]. *Lancet*, 2015, 386(9991): 376-387.

[18] 沈锦涛,张英杰,郑福增,等. 施杞教授以少阳主骨为立论辨治膝关节炎经验[J]. 风湿病与关节炎, 2020, 9 (4): 38-40; 60.

[19] 湛梅圣. 独一味对兔骨关节炎模型关节软骨影响的实验研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2012.

[20] 彭旭,熊华章,杨继滨,等. 不同膝骨关节炎模型兔的构建方法: 合理选择及特点[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(28): 4550-4556.

[21] 阮丽萍,刘健,王亚黎,等. 新风胶囊治疗大鼠骨关节炎[J]. 中成药, 2015, 37(10): 2114-2120.

[22] 唐晓栋,赵庆,兰晓飞,等. 豨莶草调控sirt1/FOXO1通路对膝骨关节炎大鼠软骨损伤的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(4): 439-444.

[23] 许曼珊,姜婷,秦盈盈. 骨关节炎发病机制研究进展[J]. 国际骨科学杂志, 2020, 41(4): 229-233.

[24] Shiomi T, Lemaître V, D'Armiento J, *et al.* Matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases [J]. *Pathol Int*, 2010, 60 (7): 477-496.