

· 基础研究 ·

膝骨痹康胶囊对膝骨关节炎大鼠肿瘤坏死因子- α 、转化生长因子- $\beta 1$ 的影响

廖怀章¹, 游叶平¹, 何乐善¹, 孙炜¹, 刘绪银¹, 李智雄², 肖磊², 田丽君²

(1. 湖南省邵阳正骨医院, 湖南 新邵 422900; 2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410007)

摘要 目的:通过研究膝骨痹康胶囊对膝骨关节炎大鼠肿瘤坏死因子- α 、转化生长因子- $\beta 1$ 的影响,探讨膝骨痹康胶囊治疗膝骨关节炎的作用机制。**方法:**取 60 只健康清洁级 SD 大鼠,随机选取 10 只纳入空白对照组,其余 50 只采用单侧跟腱切除法制造大鼠膝骨关节炎模型,造模成功后将其随机分为模型对照组、抗骨质增生胶囊组、膝骨痹康胶囊低剂量组、膝骨痹康胶囊中剂量组、膝骨痹康胶囊高剂量组,每组 10 只。药物干预 30 d 后采用免疫组织化学法观察大鼠膝关节软骨中肿瘤坏死因子- α 、转化生长因子 $\beta 1$ 的表达。**结果:**①肿瘤坏死因子- α 。各组阳性细胞平均光密度比较,差异有统计学意义($F=9.740, P=0.000$)。组间两两比较:空白对照组平均光密度小于模型对照组、膝骨痹康胶囊低剂量组和中剂量组($P=0.000; P=0.001; P=0.012$),模型对照组平均光密度大于抗骨质增生胶囊组、膝骨痹康胶囊低剂量组、中剂量组和高剂量组($P=0.000; P=0.015; P=0.001; P=0.000$),膝骨痹康胶囊低剂量组平均光密度大于高剂量组($P=0.024$),其余各组比较,差异均无统计学意义。②转化生长因子- $\beta 1$ 。各组阳性细胞平均光密度比较,差异有统计学意义($F=11.526, P=0.000$)。组间两两比较:空白对照组平均光密度大于其余 5 组($P=0.000; P=0.000; P=0.001; P=0.036; P=0.000$),模型对照组平均光密度小于膝骨痹康胶囊低剂量组和中剂量组($P=0.011; P=0.000$),抗骨质增生胶囊组平均光密度小于膝骨痹康胶囊中剂量组($P=0.011$),膝骨痹康胶囊中剂量组平均光密度大于高剂量组($P=0.007$),其余各组比较,差异均无统计学意义。**结论:**膝骨痹康胶囊可能是通过下调膝骨关节炎患者关节软骨中肿瘤坏死因子- α 的表达,同时上调转化生长因子 $\beta 1$ 的表达来发挥治疗作用的。

关键词 骨关节炎,膝 膝骨痹康胶囊 肿瘤坏死因子 α 转化生长因子 $\beta 1$

Effect of QIGUBIKANG capsules on tumor necrosis factor - α and transforming growth factor beta1 in the rats with knee osteoarthritis LIAO Huai - zhang*, YOU Ye - ping, HE Le - shan, et al. *Shaoyang Orthopedic - Traumatological Hospital, Xinshao 422900, Hunan, China

ABSTRACT Objective:To explore the mechanism of action of QIGUBIKANG capsules in the treatment of knee osteoarthritis(KOA) through the study of its effect on tumor necrosis factor- α (TNF- α) and transforming growth factor beta1(TGF- $\beta 1$) in the rats with knee osteoarthritis. **Methods:**Ten cases were randomly selected from the sixty healthy SD rats of clean grade and were enrolled into the blank control group, while the others were made into KOA models with excision of unilateral achilles tendon. After the successful modeling, the 50 KOA models were randomly divided into model control group, anti-hyperostosis capsules group, low-dose-QIGUBIKANG-capsule group, medium-dose-QIGUBIKANG-capsule group and high-dose-QIGUBIKANG-capsule group, 10 cases in each group. After 30 days of drug intervention, the expressions of TNF- α and TGF- $\beta 1$ in rat knee cartilage were observed through immunohistochemical method. **Results:**①TNF- α : There was statistical difference in the average optical of positive cells among the 6 groups($F=9.740, P=0.000$); the average optical of positive cells in the blank control group was smaller than that of model control group, low-dose-QIGUBIKANG-capsule group and medium-dose-QIGUBIKANG-capsule group respectively($P=0.000; P=0.001; P=0.012$), and the average optical of positive cells in the model control group was higher than that of anti-hyperostosis capsules group, low-dose-QIGUBIKANG-capsule group, medium-dose-QIGUBIKANG-capsule group and high-dose-QIGUBIKANG-capsule group respectively($P=0.000; P=0.015; P=0.001; P=0.000$); and the average optical of positive cells in the low-dose-QIGUBIKANG-capsule group was higher than that of high-dose-QIGUBIKANG-capsule group($P=0.024$); while there was no statistical difference in the average optical of positive cells compared between any other groups. ②TGF- $\beta 1$: There was statistical difference in the average optical of positive cells among the 6 groups($F=11.526, P=0.000$); the average optical of positive cells in the blank control group was higher than that of the other 5 groups respectively($P=0.000; P=0.000; P=0.001; P=0.036; P=0.000$); the average optical of positive cells in model control group was smaller than that of low-dose-QIGUBIKANG-capsule

基金项目:湖南省中医药科研计划项目(2009096)

通讯作者:廖怀章 E-mail:liuxy-0506@163.com

group and medium-dose-QIGUBIKANG-capsule group respectively ($P=0.011$; $P=0.000$), and the average optical of positive cells in anti-hyperostosis capsules group was smaller than that of medium-dose-QIGUBIKANG-capsule group ($P=0.011$), and the average optical of positive cells in medium-dose-QIGUBIKANG-capsule group was higher than that of high-dose-QIGUBIKANG-capsule group ($P=0.007$); while there was no statistical difference in the average optical of positive cells compared between any other groups. **Conclusion:** QIGUBIKANG capsules can exert its therapeutic effects on KOA through the down-regulation of TNF- α expression in joint cartilages and the up-regulation of TGF- $\beta 1$ expression.

Key words Osteoarthritis, knee; QIGUBIKANG capsules; Tumor necrosis factor-alpha; Transforming growth factor beta1

膝骨痹康胶囊是根据已故全国老中医药专家、湖南省名中医孙广生主任医师经验方研制开发的治疗膝关节关节炎(knee osteoarthritis, KOA)的中药制剂,临床疗效满意。我们对膝骨痹康胶囊对 KOA 大鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor beta1, TGF- $\beta 1$)的影响进行了研究,现总结报告如下。

1 材料与设备

1.1 实验动物 健康清洁级 SD 大鼠 60 只,雌雄各半,体质量(170 ± 10)g,由湖南中医药大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(湘)2006-0001。

1.2 药物与试剂 ①膝骨痹康胶囊,方中包括黄芪、当归、薏苡仁、白茅根、续断、骨碎补、牛膝、甘草等 18 味中药。由湖南邵阳正骨医院制剂科制备,每粒胶囊含生药 4 g。②抗骨质增生胶囊,由江苏康缘药业股份有限公司提供,国药准字 Z10980006,批号:081207。③Rabbit anti-TGF- $\beta 1$,武汉博士德生物工程有限公司提供。④Rabbit anti-TNF- α ,武汉博士德生物工程有限公司提供。⑤即用型 SABC 试剂盒,武汉博士德生物工程有限公司提供。

1.3 实验设备 ①JY3002 型电子天平,上海精密科学仪器有限公司生产。②HHS-2 电子恒温不锈钢水浴锅,上海南阳仪器有限公司生产。③德国 LEICA DM LB2 型双目显微镜。④Haier 医用微波炉。⑤MIAS 医学图像分析系统,北航公司生产。⑥S2-93 自动双重纯水蒸馏器,上海亚荣生化仪器厂生产。⑦Shandon325 型石蜡切片机,英国 Shandon 公司生产。⑧DNP-9162 型电热恒温培养箱,上海精宏实验设备有限公司生产。⑨Motic B5 显微摄像系统,麦克奥迪实业集团有限公司生产。

2 方法

2.1 分组及造模 从 60 只大鼠中随机选取 10 只纳

入空白对照组,其余 50 只按照单侧跟腱切除法^[1]切断大鼠左侧后肢跟腱造模。4 周后将 50 只大鼠随机分为 5 组,即模型对照组、抗骨质增生胶囊组、膝骨痹康胶囊低剂量组、膝骨痹康胶囊中剂量组和膝骨痹康胶囊高剂量组,每组 10 只。

2.2 药物干预 采用灌胃法给药,以 60 kg 人为标准,参照剂量-体表面积换算方法^[2]计算大鼠给药量。先将药粉从胶囊中取出,以蒸馏水配成抗骨质增生胶囊混悬液($5.33 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、膝骨痹康胶囊低剂量混悬液($1.06 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、膝骨痹康胶囊中剂量混悬液($5.32 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)及膝骨痹康胶囊高剂量混悬液($10.70 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$),然后以相应的混悬液按 $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 体质量给各组大鼠灌胃,空白对照组、模型对照组给予同等体积蒸馏水,每天 1 次,连续喂养 30 d。

2.3 标本制作 药物干预后采用断髓法处死大鼠,收集每只大鼠左侧后肢膝关节股骨端软骨,用 4% 多聚甲醛固定,梯度乙醇逐级脱水,透明,石蜡包埋切片,厚度 $5 \mu\text{m}$ 。石蜡切片脱蜡至水,用 PBS 液($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH7.4)冲洗 3 次,每次 5 min。然后在 3% H_2O_2 室温孵育 10 min,用蒸馏水冲洗 3 次,滴加 5% BSA 封闭液,室温孵育 20 min。倾去多余液体,滴加按 1:100 比例稀释的相应一抗试剂(Rabbit anti-TGF- $\beta 1$ 或 Rabbit anti-TNF- α), 37°C 孵育 1 h,冲洗 3 次,每次 5 min。滴加第 2 代生物素标记二抗工作液, 37°C 孵育 30 min, PBS 液冲洗 3 次,每次 5 min。滴加 SABC 工作液, 37°C 孵育 30 min, PBS 液冲洗 3 次,每次 5 min。DAB 显色剂显色,自来水充分冲洗,苏木素复染,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。

2.4 TNF- α 和 TGF- $\beta 1$ 测定 采用 Motic B5 显微摄像系统显色物质(本实验阳性染色呈棕黄色),选取不同的视野观察并照相。在每张切片上随机选出

1 个视野用 MIAS 医学图象分析系统测定软骨内反应产物的平均光密度值。

2.5 统计学方法 采用 SPSS17.0 统计软件对所得数据进行统计分析,6 组 TNF- α 和 TGF- β 1 比较,采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结 果

3.1 TNF- α 各组阳性细胞平均光密度比较,差异有统计学意义($F=9.740, P=0.000$)。组间两两比较:空白对照组平均光密度小于模型对照组、膝骨痹康胶囊低剂量组和中剂量组($P=0.000; P=0.001; P=0.012$),模型对照组平均光密度大于抗骨质增生胶囊组、膝骨痹康胶囊低剂量组、中剂量组和高剂量组($P=0.000; P=0.015; P=0.001; P=0.000$),膝骨痹康胶囊低剂量组平均光密度大于高剂量组($P=0.024$),其余各组比较,差异均无统计学意义(表 1)。

3.2 TGF- β 1 各组阳性细胞平均光密度比较,差异有统计学意义($F=11.526, P=0.000$)。组间两两比较:空白对照组平均光密度大于其余 5 组($P=0.000; P=0.000; P=0.001; P=0.036; P=0.000$),模型对照组平均光密度小于膝骨痹康胶囊低剂量组和中剂量组($P=0.011; P=0.000$),抗骨质增生胶囊组平均光密度小于膝骨痹康胶囊中剂量组($P=0.011$),膝骨痹康胶囊中剂量组平均光密度大于高剂量组($P=0.007$),其余各组比较,差异均无统计学意义(表 1)。

表 1 各组大鼠标本平均光密度测定结果		
组别	TNF- α	TGF- β 1
空白对照组	11.34 \pm 2.53	39.40 \pm 5.44
模型对照组	22.20 \pm 3.58	20.23 \pm 4.83
抗骨质增生胶囊组	14.53 \pm 2.32	25.19 \pm 3.77
膝骨痹康胶囊低剂量组	17.73 \pm 3.20	28.07 \pm 2.27
膝骨痹康胶囊中剂量组	15.96 \pm 1.21	33.06 \pm 5.05
膝骨痹康胶囊高剂量组	13.62 \pm 2.72	24.75 \pm 4.86
F 值	9.740	11.526
P 值	0.000	0.000

4 讨 论

KOA 是一种严重危害健康的慢性进行性疾病,属中医学“骨痹”范畴,主要表现为膝部疼痛和关节功能受限。它是在力学和生物学因素共同作用下导致软骨细胞、细胞外基质以及软骨下骨三者降解和合成正常偶联失衡的结果。《内经》指出:“风寒湿三气杂至合而为痹。”中医学认为 KOA 的发生与脾、肝、肾虚

弱及风寒湿邪侵袭等密切相关。脾主运化,主肌肉,为气血生化之源,运化水谷精气以化生气血,充养筋骨肌肉。肝藏血,主疏泄、主筋,能调节血液分布,保证筋骨的血供。肾藏精,精生髓以充骨。脾、肝、肾共同维持膝部筋骨的生理功能。中老年人脾、肝、肾功能衰退,势必生化不足,气血亏虚,以致膝部骨节筋脉失养而筋骨软弱。风寒湿邪壅滞膝部,以致膝部筋脉瘀滞,不通则痛。故治疗应从脾入手,以益气血、补肝肾、化瘀湿为法。李华章等^[3]采用药物铺灸疗法通过补益肝肾、强筋壮骨、活血化瘀、散寒除湿、祛痰通络治疗 KOA 患者,取得了较好疗效。王定等^[4]对行关节镜清理术后的 KOA 患者采用益气温经通络中药,取得了满意的疗效。

膝骨痹康胶囊由黄芪、当归、薏苡仁、白茅根、续断、骨碎补、牛膝、甘草等 18 味中药组成。具有益气血、补肝肾、壮筋骨、化水湿、通经络之功,主治正虚(气血亏虚、肝肾不足)夹瘀湿阻滞证,能明显缓解 KOA 患者膝关节疼痛、肿胀、乏力、活动不利等症状。

现代医学认为 TNF- α 和 TGF- β 1 在骨关节炎发病中有重要作用。Serra 等^[5]的研究发现,缺乏 TGF- β 1 的基因突变转基因小鼠软骨细胞终末分化加强,形成骨关节病样退行性变。马少云等^[6]的研究表明,KOA 患者血清中 TGF- β 1 含量明显低于健康人。TNF- α 属于介导软骨损伤的炎症细胞因子,来源于软骨细胞、成纤维细胞、巨噬细胞等。它不仅能选择性地抑制软骨胶原的产生和蛋白聚糖的合成,而且也是促进软骨基质降解的重要介质。陈巍等^[7]的研究表明,TNF- α 在 KOA 的发病和病情发展过程中起重要作用,其表达情况可作为评估病情严重程度的有效依据。此外,TNF- α 还是诱导软骨细胞凋亡的重要因素,参与滑膜炎症,阻止损伤关节软骨的修复。

分析本实验的结果:①TNF- α 。空白对照组平均光密度小于模型对照组、膝骨痹康胶囊低剂量组和中剂量组,模型对照组平均光密度大于抗骨质增生胶囊组、膝骨痹康胶囊低剂量组、中剂量组和高剂量组,膝骨痹康胶囊低剂量组平均光密度大于高剂量组,其余各组比较,差异均无统计学意义。说明各剂量的膝骨痹康胶囊和抗骨质增生胶囊均能下调 KOA 大鼠关节软骨 TNF- α 的表达,其中以高剂量膝骨痹康胶囊和抗骨质增生胶囊作用最强。②TGF- β 1。空白对照组平均光密度大于其余 5 组,模型对 (下转第 9 页)