

· 基础研究 ·

健骨颗粒冲剂对膝骨关节炎大鼠血清和关节液中肿瘤坏死因子- α 及基质金属蛋白酶-3 的影响伍捷进¹, 吴启富¹, 接红宇¹, 戚晶敏¹, 黄绥心², 王繁盛¹

(1. 南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510515; 2. 浙江省新华医院, 浙江 杭州 310005)

摘 要 **目的:**观察健骨颗粒冲剂对膝骨关节炎大鼠血清和关节液中肿瘤坏死因子- α 及基质金属蛋白酶-3 的影响,探讨健骨颗粒冲剂治疗膝骨关节炎的作用机制。**方法:**将 48 只 Wistar 大鼠适应性喂养 1 周后,随机抽取 40 只分为正常组、模型组、双醋瑞因组及健骨颗粒冲剂组,每组 10 只。分组结束后,将模型组、双醋瑞因组及健骨颗粒冲剂组大鼠制作膝骨关节炎动物模型。造模成功后,双醋瑞因组大鼠按 $0.009 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以双醋瑞因溶液灌胃,健骨颗粒冲剂组大鼠按 $2.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以健骨颗粒冲剂溶液灌胃,正常组和模型组给予相应剂量的生理盐水,每日 1 次,连续给药 4 周。药物干预结束后,采用酶联免疫吸附法检测各组大鼠血清和关节液中肿瘤坏死因子- α 及基质金属蛋白酶-3 的含量。**结果:**①血清肿瘤坏死因子- α 含量。各组间含量比较,差异有统计学意义($F=10.056, P=0.008$)。组间两两比较,模型组高于正常组、双醋瑞因组及健骨颗粒冲剂组($P=0.000, P=0.000, P=0.000$);其余各组间比较,差异均无统计学意义。②血清基质金属蛋白酶-3 含量。各组间含量比较,差异有统计学意义($F=8.874, P=0.013$)。组间两两比较,模型组高于正常组、双醋瑞因组及健骨颗粒冲剂组($P=0.000, P=0.000, P=0.000$);其余各组间比较,差异均无统计学意义。③关节液肿瘤坏死因子- α 含量。各组间含量比较,差异有统计学意义($F=10.182, P=0.006$)。组间两两比较,模型组高于正常组、双醋瑞因组及健骨颗粒冲剂组($P=0.000, P=0.000, P=0.000$);其余各组间比较,差异均无统计学意义。④关节液基质金属蛋白酶-3 含量。各组间含量比较,差异有统计学意义($F=8.476, P=0.017$)。组间两两比较,模型组高于正常组、双醋瑞因组及健骨颗粒冲剂组($P=0.000, P=0.000, P=0.000$);其余各组间比较,差异均无统计学意义。**结论:**健骨颗粒冲剂能降低膝骨关节炎大鼠血清及关节液中肿瘤坏死因子- α 及基质金属蛋白酶-3 的含量,从而减轻其对关节软骨基质的损害,直接或间接改善软骨基质代谢,促进软骨修复。

关键词 骨关节炎,膝 肿瘤坏死因子- α 基质金属蛋白酶-3 健骨颗粒冲剂 动物实验

Study on the effect of JIANGU INSTANT GRANULES on tumor necrosis factor- α and matrix metalloproteinase-3 in blood serum and synovial fluid for rats with knee osteoarthritis WU Jie-jin^{*}, WU Qi-fu, JIE Hong-yu, QI Jing-min, HUANG Sui-xin, WANG Fan-sheng. ^{*} Traditional Chinese Medical College of Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China

ABSTRACT **Objective:** To observe the effect of JIANGU INSTANT GRANULES on tumor necrosis factor- α (TNF- α) and matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) in blood serum and synovial fluid for rats with knee osteoarthritis (KOA), and to explore the mechanism of JIANGU INSTANT GRANULES in the treatment of KOA. **Methods:** After 1 week adaptive feeding, 40 rats were selected from 48 Wistar rats and randomly divided into normal group, model group, diacerein group and JIANGU INSTANT GRANULES group, 10 cases in each group. After grouping, rats in model group, diacerein group and JIANGU INSTANT GRANULES group were built KOA animal models. After successful modeling, rats in diacerein group were administrated by gavage with diacerein solution ($0.009 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), rats in JIANGU INSTANT GRANULES group were administrated by gavage with JIANGU INSTANT GRANULES solution ($2.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), while rats in normal group and model group were administrated by gavage with corresponding doses of normal saline, once a day for 4 consecutive weeks. After drug treatment, TNF- α and MMP-3 contents in blood serum and synovial fluid of all the rats were measured through enzyme linked immunosorbent assay. **Results:** ①TNF- α content in blood serum: there was statistical difference in the contents among the 4 groups ($F=10.056, P=0.008$). The content of model group was higher than that of normal group, diacerein group and JIANGU INSTANT GRANULES group ($P=0.000, P=0.000, P=0.000$); while there was no statistical difference in contents between any other groups. ②MMP-3 content in blood serum: there was statistical difference in the contents among the 4 groups ($F=8.874, P=0.013$). The content of model group was higher than that of normal group, diacerein group and JIANGU INSTANT GRANULES group ($P=0.000, P=0.000, P=0.000$); while there was

通讯作者: 吴启富 E-mail: btdy168@163.com

no statistical difference in contents between any other groups. ③TNF- α content in synovial fluid; there was statistical difference in the contents among the 4 groups ($F = 10.182, P = 0.006$). The content of model group was higher than that of normal group, diacerein group and JIANGU INSTANT GRANULES group ($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$); while there was no statistical difference in contents between any other groups. ④MMP-3 content in synovial fluid; there was statistical difference in the contents among the 4 groups ($F = 8.476, P = 0.017$). The content of model group was higher than that of normal group, diacerein group and JIANGU INSTANT GRANULES group ($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$); while there was no statistical difference in contents between any other groups. **Conclusion:** JIANGU INSTANT GRANULES can directly or indirectly improve cartilage matrix metabolism to promote cartilage repair through lowering TNF- α and MMP-3 contents in blood serum and synovial fluid for KOA rats to relieve their damage on articular cartilage matrix.

Key words Osteoarthritis, knee; Tumor necrosis factor - alpha; Matrix metalloproteinase 3; JIANGU INSTANT GRANULES; Animal experimentation

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是一种以关节软骨变性、破坏及骨质增生为主要特征的退行性骨关节疾患, 其发病机制尚未完全明确。近年来的研究表明, 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和基质金属蛋白酶-3 (matrix metalloproteinase-3, MMP-3) 在 KOA 的发病过程中起重要作用^[1]。健骨颗粒冲剂是南方医院中医科治疗 KOA 的经验方, 临床疗效显著, 但其具体作用机制尚不清楚。为此, 我们通过实验对健骨颗粒冲剂对 KOA 大鼠血清和关节液中 TNF- α 及 MMP-3 含量的影响进行了研究, 现总结报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 健康 Wistar 大鼠 48 只, 雌雄各半, 体质量 180 ~ 220 g, 由南方医科大学动物中心提供, 实验动物合格证号: SCXK 粤 2006 - 0015。

1.2 实验药物 健骨颗粒冲剂由南方医院中药房提供, 药物组成: 独活 10 g、淫羊藿 10 g、杜仲 15 g、牛膝 15 g、徐长卿 10 g、秦艽 10 g、丹参 10 g、延胡索 10 g、生地黄 15 g、知母 15 g 等; 双醋瑞因 (每片 50 mg), 由昆明积大制药有限公司提供 (批号: 国药准字 J20060017); 木瓜蛋白酶, 由广州威佳科技公司提供; 酶联免疫吸附试验定量检测试剂盒, 由武汉博士德公司提供。

1.3 实验仪器 美国 Thermo3 - 18K 高速离心机; 美国 Sigma 酶标仪; Olympus LX - 70 倒置显微镜。

2 方法

2.1 分组方法 将 48 只 Wistar 大鼠适应性喂养 1 周后, 随机抽取 40 只分为正常组、模型组、双醋瑞因组及健骨颗粒冲剂组, 每组 10 只。

2.2 造模方法 分组结束后, 将模型组、双醋瑞因组及健骨颗粒冲剂组大鼠按照 Lin 等^[2]的方法制作膝

骨关节炎动物模型: 向大鼠双侧膝关节分别注射 4% 木瓜蛋白酶生理盐水溶液 0.2 mL, 3 d 注射 1 次, 连续注射 3 次。

2.3 干预方法 造模成功后, 双醋瑞因组大鼠按 0.009 g · kg⁻¹ 以双醋瑞因溶液灌胃, 健骨颗粒冲剂组大鼠按 2.7 g · kg⁻¹ 以健骨颗粒冲剂溶液灌胃, 正常组和模型组给予相应剂量的生理盐水, 每日 1 次, 连续给药 4 周。

2.4 标本采集及效应指标测定 4 周后分别将各组大鼠仰卧捆绑于小动物手术台上, 股动脉取血 3 mL 置于 5 mL 试管中, 在 37 °C 温箱中温浴 0.5 ~ 1 h 后以 3 000 r · min⁻¹ 离心 15 min, 然后取血清 1 mL 置于 -20 °C 冰箱保存。按照毕胜等^[3]的方法分别抽取各组大鼠右侧膝关节冲洗液 (无菌蒸馏水冲洗) 1 mL, 以 3 000 r · min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液置于 -20 °C 冰箱保存。待所有标本均采集完毕后, 采用酶联免疫吸附法检测血清和关节液中 TNF- α 及 MMP-3 的含量, 具体操作严格按照试剂盒使用说明书进行。

2.5 统计学方法 采用 SPSS13.0 软件对所得数据进行统计分析, 各组大鼠血清及关节液 TNF- α 和 MMP-3 含量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 血清 TNF- α 、MMP-3 含量 ①TNF- α 含量: 各组 TNF- α 含量比较, 差异有统计学意义。组间两两比较, 模型组高于正常组、双醋瑞因组及健骨颗粒冲剂组 ($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$); 其余各组间比较, 差异均无统计学意义。②MMP-3 含量: 各组 MMP-3 含量比较, 差异有统计学意义。组间两两比较, 模型组高于正常组、双醋瑞因组及健骨颗粒冲剂组 ($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$); 其余各组间比较, 差异均无统计学意义。(表 1)

表 1 各组大鼠血清中 TNF- α 、MMP-3 含量比较 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$

| 组别 | TNF- α | MMP-3 |
|---------|------------------|------------------|
| 正常组 | 13.52 \pm 2.31 | 71.24 \pm 3.23 |
| 模型组 | 25.74 \pm 2.31 | 92.38 \pm 4.22 |
| 双醋瑞因组 | 16.92 \pm 3.51 | 79.52 \pm 3.56 |
| 健骨颗粒冲剂组 | 17.35 \pm 1.17 | 79.92 \pm 2.63 |
| F 值 | 10.056 | 8.874 |
| P 值 | 0.008 | 0.013 |

3.2 关节液 TNF- α 、MMP-3 含量 ①TNF- α 含量: 各组 TNF- α 含量比较, 差异有统计学意义。组间两两比较, 模型组高于正常组、双醋瑞因组及健骨颗粒冲剂组 ($P=0.000, P=0.000, P=0.000$); 其余各组间比较, 差异均无统计学意义。②MMP-3 含量: 各组间 MMP-3 含量比较, 差异有统计学意义。组间两两比较, 模型组高于正常组、双醋瑞因组及健骨颗粒冲剂组 ($P=0.000, P=0.000, P=0.000$); 其余各组间比较, 差异均无统计学意义。(表 2)

表 2 各组大鼠关节液中 TNF- α 、MMP-3 含量比较 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$

| 组别 | TNF- α | MMP-3 |
|---------|------------------|------------------|
| 正常组 | 9.41 \pm 1.86 | 51.36 \pm 2.86 |
| 模型组 | 22.74 \pm 3.78 | 93.22 \pm 3.74 |
| 双醋瑞因组 | 13.52 \pm 2.36 | 78.41 \pm 2.45 |
| 健骨颗粒冲剂组 | 14.68 \pm 1.47 | 81.68 \pm 3.96 |
| F 值 | 10.182 | 8.476 |
| P 值 | 0.006 | 0.017 |

4 讨论

OA 的发生发展与关节软骨分子水平的炎症引起软骨损伤有密切关系, 长期异常的机械应力会使处于低代谢状态的关节软骨细胞活化, 并刺激细胞产生一系列炎症介质, 这些炎症介质是机体处于炎症或损伤情况下由巨噬细胞所释放的^[4], 其中 TNF- α 、MMP-3 是参与 OA 发病过程的重要介质。OA 的发生与关节滑膜细胞增殖旺盛, 分泌过多的 TNF- α 并释放入血有关。TNF- α 能激活多型核细胞、刺激滑膜细胞产生前列腺素 E2、促进软骨基质金属蛋白酶合成和分泌, 引起关节软骨吸收、降解和破坏^[5]。Haynes 等^[6]的研究表明, TNF- α 主要影响滑膜炎症和免疫学反应, 能诱发抗自身软骨的自身免疫反应。基质金属蛋白酶是参与关节组织损伤的主要因素, 可以促进骨基质的降解, 抑制软骨细胞合成具有透明软骨特性的蛋白聚糖和 II 型胶原, 促进生成有纤维母细胞特性的 I 型胶原, 从而使软骨细胞变性, 引起软骨缺损和软骨的生物力学性能改变^[7]。MMP-3 是金属蛋白酶的主要成员之一, 主要在 OA 患者的滑膜细胞中表达, 软

骨细胞和单核细胞中也有少量的表达。张亚峰等^[8]的研究表明, MMP-3 是 OA 发病过程中重要的生物学标志物, OA 患者血清及关节液中 MMP-3 含量与病情密切相关。

按照中医理论, KOA 的病因主要有虚、瘀、湿 3 方面, 以虚为本, 湿、瘀及其互结为标。健骨颗粒冲剂中的杜仲、独活、淫羊藿、牛膝、生地黄、知母补益肝肾、强筋壮骨; 徐长卿、秦艽祛湿通络; 丹参、延胡索活血化瘀、通络止痛; 诸药合用, 共奏补益肝肾、行气活血、祛湿通络之功。

从实验结果可以看出, 健骨颗粒冲剂能降低 KOA 大鼠血清及关节液中 TNF- α 和 MMP-3 的含量, 从而减轻其对关节软骨基质的损害, 直接或间接改善软骨基质代谢, 促进软骨修复。研究结果同时也说明, 健骨颗粒冲剂和双醋瑞因降低 KOA 大鼠血清及关节液中 TNF- α 和 MMP-3 含量的疗效相当, 且均能使 KOA 大鼠的这两项指标降至正常水平。本研究只是初步揭示了健骨颗粒冲剂治疗 KOA 的作用机制, 其确切机理有待进一步研究。

5 参考文献

- [1] 周江涛, 刘献祥. 骨性关节炎软骨破坏机制及治疗研究进展[J]. 中医正骨, 2004, 16(11): 56-58.
- [2] Lin YS, Huang MH, Chai CY. Effects of helium-neon laser on the mucopolysaccharide induction in experimental osteoarthritic cartilage [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2006, 14(4): 377-383.
- [3] 毕胜, 王福根, 侯京山, 等. 细胞因子在膝下脂肪垫损伤动物模型中的变化[J]. 中国疼痛医学杂志, 2000, 6(2): 85-88.
- [4] 尹若峰, 邱贵兴. 骨关节炎发生发展的分子机制[J]. 中国骨与关节外科, 2009, 2(1): 71-73.
- [5] Bondeson J, Wainwright SD, Lauder S, et al. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2006, 8(6): R187.
- [6] Haynes MK, Hume EL, Smith JB. Phenotypic characterization of inflammatory cells from osteoarthritic synovium and synovial fluids [J]. Clin Immunol, 2002, 105(3): 315-325.
- [7] 姚如愚, 张晓. 基质金属蛋白酶与骨关节炎[J]. 国外医学: 内科学分册, 2001, 28(4): 159-162.
- [8] 张亚峰, 蒋青, 王骏飞, 等. 基质金属蛋白酶与骨科疾病[J]. 国际骨科学杂志, 2006, 27(4): 251-253.

(2012-01-04 收稿 2012-04-05 修回)