

补肾活血中药对膝骨关节炎患者经典 Wnt/ β -catenin 通路调控作用的临床研究

唐萌芽,倪慧英,张学民,邵丽芳

(浙江省富阳市中医骨伤医院,浙江 富阳 311400)

摘要 目的:观察补肾活血中药治疗膝骨关节炎的临床疗效及其作用机制。方法:纳入研究的膝骨关节炎患者 30 例,采用口服补肾活血中药治疗。比较治疗前及治疗后 12 周,膝骨关节炎患者的 JOA 评分和 WOMAC 评分;并采用实时荧光定量聚合酶链式反应检测 Wnt-5a、 β -catenin、BMP-2 mRNA 表达的变化情况。结果:治疗后 12 周,JOA 评分较治疗前明显提高[(62.01 ± 11.79)分,(80.90 ± 6.90)分, $t=4.767$, $P=0.001$];WOMAC 评分较治疗前明显降低[(43.20 ± 10.89)分,(19.20 ± 5.43)分, $t=4.535$, $P=0.002$];Wnt-5a、 β -catenin、BMP-2 mRNA 表达量较治疗前均降低(2.74 ± 0.69,1.44 ± 0.29, $t=4.874$, $P=0.001$;3.21 ± 1.13,1.45 ± 0.32, $t=5.574$, $P=0.001$;3.55 ± 1.38,1.33 ± 0.53, $t=4.235$, $P=0.003$)。结论:采用补肾活血中药治疗膝骨关节炎,能改善膝关节功能,缓解患者疼痛;降低 Wnt-5a、 β -catenin、BMP-2 mRNA 表达量,这可能是补肾活血中药防治骨关节炎的可能作用机制。

关键词 骨关节炎,膝 补肾活血 Wnt 信号通路 β 连环素 骨形态发生蛋白-2

Clinical study on the role of reinforcing kidney activating blood drugs(TCD) in the regulation of classic Wnt/ β -catenin pathway in patients with osteoarthritis Tang Mengya*, Ni Huiying, Zhang Xuemin, Shao Lifang. * Fuyang TCM Orthopedic-Traumatological Hospital, Fuyang 311400, Zhejiang, China

ABSTRACT **Objective:** To observe the clinical curative effect of reinforcing kidney activating blood drugs(TCD) on knee osteoarthritis (KOA) and to study its mechanism of action. **Methods:** Thirty patients with KOA were enrolled in the study and were treated with oral reinforcing kidney activating blood drugs(TCD). The JOA scores and WOMAC scores were compared between pretreatment and post-treatment, and the expression of Wnt-5a mRNA, β -catenin mRNA and BMP-2 mRNA were detected through real-time fluorescence quantitative PCR. **Results:** After twelve-week treatment, the JOA scores increased significantly (62.01 ± 11.79 vs 80.90 ± 6.90 points, $t=4.767$, $P=0.001$), while the WOMAC scores decreased significantly (43.20 ± 10.89 vs 19.20 ± 5.43 points, $t=4.535$, $P=0.002$), and the expression of Wnt-5a mRNA, β -catenin mRNA and BMP-2 mRNA were down-regulated (2.74 ± 0.69 vs 1.44 ± 0.29, $t=4.874$, $P=0.001$; 3.21 ± 1.13 vs 1.45 ± 0.32, $t=5.574$, $P=0.001$; 3.55 ± 1.38 vs 1.33 ± 0.53, $t=4.235$, $P=0.003$). **Conclusion:** In the treatment of KOA, oral application of reinforcing kidney activating blood drugs(TCD) can improve the knee joint functions, relief the knee pain and down-regulate the expression of Wnt-5a mRNA, β -catenin mRNA and BMP-2 mRNA, so it may be the mechanism of action of reinforcing kidney activating blood drugs(TCD) in the prevention of KOA.

Key words Osteoarthritis, knee; Reinforcing kidney activating blood; Wnt signaling pathway; Beta catenin; BMP-2

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是常见的关节退行性疾病之一,随着年龄增加发病率增高,多发生在 65 岁以上,膝关节常常受累,临床主要表现为慢性疼痛,关节不稳,僵硬和关节间隙狭窄等,是中老年人致残的常见原因^[1]。经典 Wnt/ β -catenin 通路是调控骨代谢的重要途径,对骨组织的形成、发育及重建起关键作用,其与 OA 的发生发展有密切的关系^[2-4]。2011 年 1 月至 2013 年 12 月,我们采用补肾活血中药治疗膝骨关节炎 30 例,取得了较好的疗效,同时通过观察治疗前后经典 Wnt/ β -catenin 通路相关分子的变化,探索其防治膝 OA 的可能作用机制。

1 临床资料

1.1 一般资料 本组 30 例患者均明确诊断为膝 OA。男 18 例,女 12 例。年龄最小 47 岁,最大 76 岁,平均(50.6 ± 14.9)岁,最短病程 2 个月,最长 6 年,平均(3.5 ± 2.1)年。

1.2 诊断标准 参照美国风湿病协会 1995 年诊断标准^[5]:①近 1 个月大多数时间有膝痛;②X 线片示有骨赘形成;③关节液检查符合骨性关节炎;④年龄 ≥ 40 岁;⑤晨僵 ≤ 30 min;⑥有骨摩擦音。满足① + ②条或① + ③ + ⑤ + ⑥条或① + ④ + ⑤ + ⑥条者即诊断膝骨关节炎。

1.3 纳入标准 ①根据诊断标准,明确诊断为膝 OA;②愿意接受本法治疗,并签署知情同意书者;③单侧膝关节患病;④具有较好依从性,能够坚持按规定方法治疗并能配合医生的治疗调查。

1.4 排除标准 ①合并严重的心肝肾等重要脏器损伤等影响疗效观察者;②服用中药过敏者;③过去 6 个月内关节腔内注射皮质类固醇激素,包括关节手术或局部用药;④不符合纳入标准者。

2 方 法

2.1 治疗方法 所有患者均口服补肾活血中药。补肾活血方药用:熟地 15 g、怀牛膝 15 g、鸡血藤 15 g、山药 10 g、山茱萸 5 g、枸杞 10 g、炙甘草 5 g、杜仲 10 g、肉桂 5 g、制附子 5 g、桃仁 10 g、红花 5 g、当归 10 g、赤芍 10 g、党参 10 g、茯苓 10 g、白术 10 g、木香 5 g。上述中药饮片加水 1 000 mL,煎取 100 mL,分早晚 2 次服用。每日 1 剂,14 剂为 1 个疗程,停药 3 d 后,服第 2 个疗程,共 6 个疗程。所有中药饮片的采购、鉴定及质量控制参考国家中医药管理局制定的《医院中药饮片管理实施办法(2007)》实施。

2.2 疗效观察 治疗前及治疗后 4 周分别对两组患者行日本骨科学会膝关节 JOA 评分^[6]及 WOMAC 骨关节炎指数评分^[7]。JOA 评分内容包括疼痛,能步行、疼痛,能上下楼梯、屈曲角度及强直、肿胀 4 方面,满分 100 分,分值越小表示功能障碍越严重;WOMAC 评分则通过疼痛、僵硬、关节功能三方面来评估膝关节的结构和功能,总分 96 分,分值越大,表明骨关节炎程度越严重;问卷由患者自行填答,并在 5~10 min 内完成。

2.3 疗效评定 疗效评定参考《中药新药临床研究指导原则》^[8]。临床痊愈:疼痛、肿胀等症状、体征积分减少 $\geq 95\%$,关节活动正常;显效:疼痛、肿胀等症状、体征积分减少 $\geq 70\%$,关节活动不受限;有效:疼痛、肿胀等症状、体征积分减少 $\geq 30\%$, $< 70\%$ 关节活动改善;无效:疼痛、肿胀等症状、体征积分减少不足 30%,关节活动无变化。满意率(%)=(痊愈+显效)/总数 $\times 100\%$ 。

2.4 Wnt-5a、 β -catenin、BMP-2 mRNA 表达检测

取治疗前及治疗后 12 周患者静脉血各 5 mL,置于无菌 EDTA-Na₂ 抗凝管中,利用实时荧光定量 PCR 检测 Wnt-5a、 β -catenin、BMP-2 mRNA 表达。以 β -actin 作内参,定量目的基因,60℃ 检测荧光值得到 CT 值,

根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算获得相对定量结果。本检测委托杭州荧光泰生物技术有限公司操作。

2.5 统计学方法 研究数据利用 SPSS13.0 软件进行统计分析,计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)描述,组间比较采用独立样本 t 检验,结果以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结 果

本组 30 例患者全部得获随访,随访时间 5~8 个月,中位数 6.5 个月。治疗后患者膝关节 WOMAC、VAS 评分均有明显改善,见表 1、表 2。临床疗效评价:痊愈 11 例,显效 13 例,有效 5 例,无效 1 例,总有效率 80.0%。经典 Wnt/ β -catenin 通路相关分子 Wnt-5a、 β -catenin、BMP-2 mRNA 表达呈下调趋势。

表 1 治疗前后 JOA 及 WOMAC 评分变化

时间段	JOA 评分	WOMAC 评分
治疗前	62.01 \pm 11.79	43.20 \pm 10.89
治疗后 12 周	80.90 \pm 6.90	19.20 \pm 5.43
t 值	4.767	4.535
P 值	0.001	0.002

表 2 治疗前后 Wnt-5a、 β -catenin、BMP-2 mRNA 表达变化

时间段	Wnt-5a、	β -catenin、	BMP-2
治疗前	2.74 \pm 0.69	3.21 \pm 1.13	3.55 \pm 1.38
治疗后 12 周	1.44 \pm 0.29	1.45 \pm 0.32	1.33 \pm 0.53
t 值	4.874	5.574	4.235
P 值	0.001	0.001	0.003

4 讨 论

骨关节炎指由多种因素导致的关节软骨纤维化、破裂、溃疡、脱落而导致的关节疾病,可分为原发性和继发性两类,前者多发生于中老年,无明确的全身或局部诱因,与遗传和体质因素有一定的关系。而后者可发生于青壮年,可继发于创伤、炎症、关节不稳定、慢性反复的积累性劳损或先天性疾病等。而两者的病理特点则较为一致,即关节软骨变性破坏、软骨下骨硬化或囊性变、关节边缘骨质增生、滑膜增生、关节囊挛缩、韧带松弛或挛缩、肌肉萎缩无力等^[9-10]。以中老年患者多见,女性多于男性,65 岁以上的人群中患病率可达 50%,70 岁以上的人群中则达 70%。该病的致残率可高达 53%。OA 好发于负重、活动多的关节,如膝、脊柱、颈椎和腰椎、髋、踝、手等关节。临床主要表现为慢性疼痛,关节不稳,僵硬和关节间隙狭窄。目前尚无有效的干预手段去减

缓骨性关节炎的进程或者阻止不可逆的膝关节软骨退变^[11]。

膝 OA 当属中医“痹症”中的“骨痹”范畴,肾虚血瘀是主要病机之一。老年人肾精气亏损,精髓不足,筋骨失养,阳气亏虚不能温通经脉,寒气内生,加之外感寒湿,寒湿阻滞,致血脉不利。《病因脉治》曰:“肾痹证,即骨痹也……,精痹之成,非尽由于风寒湿也,夫肾虽寒脏,而其中原自有火,有火则水不寒,而风寒湿无从而入。无奈人过于作强,将先天之水,日日奔泄,水去而火亦随流而去使生气之原,竟为藏冰之窑,火不能敌寒而寒邪侵入矣,寒气直入于肾宫,以邪招邪,而风湿寒相因而至,则痹证生矣。”全国痹证学组对痹证分型时,首分“瘀血痹”,提出“即虚且瘀”,“痛则多瘀”的病因病机。故膝骨关节炎的治疗应以补肾为主、佐以活血化瘀通络为主。本研究中的补肾活血方主要有由地黄、怀牛膝等补肾药物以及当归、鸡血藤等活血药物组成。据现代药理学研究表明:生地能扩张血管,减低毛细血管的通透性,抑质血管内皮炎症,抑制大鼠实验性关节滑膜肿胀炎症^[12]。牛膝根提取液有较强的抗炎消肿作用,可提高机体免疫功能,增强对细菌的吞噬能力以及扩张血管、改善循环、促进炎症病变吸收等作用^[13]。当归对大鼠 ADR 和胶原诱导的血小板凝聚有明显的抑制作用,当归多糖及其硫酸酯也有显著延长凝血时间、缩短出血时间、延长凝血酶时间和活化部分凝血活酶时间等作用^[14]。我们的研究表明,治疗后患者膝关节 WOM-AC、VAS 评分均有明显改善,临床总有效率 80.0%,提示补肾活血中药对膝骨关节炎具有较好的临床疗效,能改善膝关节功能,缓解疼痛。

目前已证实骨形成及重建与经典 Wnt/ β -catenin 通路有密切关系^[15-16]。Wnt 蛋白与细胞膜受体卷曲蛋白和辅助受体脂蛋白受体相关蛋白 5/6 (lipoprotein receptor related protein 5/6, LRP5/6) 结合,活化 Fz 受体,通过骨架蛋白 (dishevelled, Dv) 和酪蛋白激酶 1 (casein kinase 1, CK1) 传递信号,活化由轴蛋白 (axin), 结肠腺瘤性息肉病蛋白 (adenomatous polyposis coli, APC) 和糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3, GSK-3 β) 组成的复合物,激活细胞内信号通路。当无 Wnt 信号发生时, GSK-3 β 磷酸化 β -catenin, β -catenin 通过泛素/蛋白酶体途径降解。而当有 Wnt 信号刺激时,蛋白复合物解离不发生磷酸

化, β -catenin 在胞浆中积聚并转位入核,与转录因子 T 细胞因子/淋巴细胞增强因子 (T cell factor/lymphoid enhancer factor, TCF/LEF) 结合启动靶基因激活下游靶基因,包括 BMP-2、c-myc, cyclin D1 的转录转录,参与软骨细胞分化、骨重塑^[17]。由此可见, Wnt-5a、 β -catenin、BMP-2 在软骨基质的合成和分解中发挥独特作用^[18]。本研究结果发现治疗前膝 OA 患者 Wnt-5a、 β -catenin、BMP-2 mRNA 表达处于较高水平,治疗后呈现明显下降趋势,提示补肾活血中药可能是通过调节经典 Wnt/ β -catenin 通路相关分子,包括 Wnt-5a、 β -catenin、BMP-2 表达来发挥缓解膝 OA 的效用。

5 参考文献

- [1] 原涛,章祖林. 透明质酸钠联合补肾活血方药改善膝骨关节炎患者生活质量的调查研究[J]. 中医正骨, 2013, 25(5): 25-27.
- [2] Nusse RV. Wnt signaling in disease and in development [J]. Cell Research, 2005, 15: 28-32.
- [3] Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease [J]. Cell, 2012, 149: 1192-1205.
- [4] Glass DA, Karsenty G. In vivo analysis of Wnt signaling in bone [J]. Endocrinology, 2007, 148(6): 2630-2634.
- [5] Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee: 2000 update. American College of Rheumatology Subcommittee on Osteoarthritis Guidelines [J]. Arthritis Rheum. 2000, 43(9): 1905-1915.
- [6] 代亚林, 吴迪, 郝颖. 膝关节内注射丹参、玻璃酸钠, 以及关节内封闭治疗膝关节炎的临床比较[J]. 中国现代药物应用研究, 2009, 3(9): 64-65.
- [7] Nadrian H, Moghimi N, Nadrian E, et al. Validity and reliability of the Persian versions of WOMAC osteoarthritis Index and Lequesne Algofunctional Index [J]. Clin Rheumatol, 2012, 31(7): 1097-1102.
- [8] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则[S]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 130-131.
- [9] 高文香, 郝军. 筋病理论指导下中医综合疗法治疗膝骨关节炎[J]. 中医正骨, 2014, 26(1): 60-62.
- [10] 孙艳, 陈立忠, 王海燕, 等. 增液润节汤和美洛昔康片治疗膝骨关节炎的对比研究[J]. 中医正骨, 2014, 26(1): 21-23.
- [11] Krasnokutsky S, Samuels J, Abramson SB. Osteoarthritis in 2007 [J]. Bulletin of the NYU Hospital for Joint Disease, 2007, 65: 222-228.
- [12] 王朴. 牛地黄的现代药理研究与临床应用[J]. 中国中医药现代远程教育, 2008, 6(8): 986.

(下转第 17 页)

(上接第 14 页)

- [13] 李献半,刘世昌. 四大怀药对家蚕寿命及生长发育的影响[J]. 中国中药杂志,1990,15(9):563.
- [14] 刘芳. 当归的心脑血管药理作用研究进展[J]. 威宁学院学报医学版,2010,24(6):551 - 553.
- [15] Glass DA, Karsenty G. In vivo analysis of Wnt signaling in bone[J]. Endocrinology, 2007, 148(6):2630 - 2634.
- [16] Kennell JA, Machougald OA. Wnt signaling inhibits adipogenesis through beta-catenin - dependent and independent mechanisms[J]. J Biol Chem, 2005, 280(25):24004 -

24010.

- [17] Zhu M, Tang D, Wu Q, et al. Activation of beta-catenin signaling in articular chondrocytes leads to osteoarthritis - like phenotype in adult beta-catenin conditional activation mice [J]. J Bone Miner Res, 2009, 23(1):12.
- [18] Miclea RL, Siebelt M, Finos L, et al. Inhibition of Gsk3 β in cartilage induces osteoarthritic features through activation of the canonical Wnt signaling pathway[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2011, 19(11):1363.

(2014-04-06 收稿 2014-07-28 修回)

反映学术进展 引领学科发展