

灵仙通络方对 C518 大鼠膝关节退变软骨细胞增殖、II 型胶原及基质金属蛋白酶-13 表达的影响

林 强¹, 祁文兵¹, 白明华¹, 王明怀¹, 于继岗¹, 彭 页²

(1.陕西省宝鸡市中医医院, 陕西 宝鸡 721000; 2.人民解放军空军总医院, 北京 100142)

【摘要】目的 探讨灵仙通络方对 C518 大鼠膝关节退变软骨细胞增殖、II 型胶原(COL-II)及基质金属蛋白酶-13(MMP-13)的影响。**方法** 选取 C518 大鼠膝关节软骨细胞株, 随机分为中药组(灵仙通络方)、西药组(氨糖美辛)和对照组(氯化钠溶液), 进行培养、诱导退变等处理, 于给药后第 1、2、3 d, 分别检测中药组、西药组和对照组不同浓度下对软骨细胞增殖、COL-II 及 MMP-13 表达的影响。**结果** 同一时间点的中药组、西药组不同浓度之间噻唑蓝(MTT)值差异有统计学意义($P<0.01$)。对照组不同浓度氯化钠溶液的 MTT 值差异不具有统计学意义($P>0.05$)。在 COL-II 免疫组化染色中, 中药组与西药组和对照组相比差异有统计学意义($P<0.01$), 且中药组优于西药组(染色指数 $\chi^2=16.26$, $df=2$, $P<0.01$)。在 MMP-13 免疫组化染色中, 对照组较中药组、西药组差异有统计学意义($P<0.01$), 且中药组优于西药组(染色指数 $\chi^2=54.31$, $df=2$, $P<0.01$)。**结论** C518 大鼠膝关节退变软骨细胞经灵仙通络方干预后能够促进其增殖, 调节 COL-II、MMP-13 的表达, 延缓膝关节骨性关节炎疾病的发展进程。

【关键词】 膝关节退变; 软骨细胞; II 型胶原; 基质金属蛋白酶-13; 软骨细胞增殖; 灵仙通络方

【中图分类号】R285.5 **【文献标识码】**A **【文章编号】**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.09.005

Effect of Lingxian Tongluo Prescription on the Expression of Cartilage Cell, COL-II and MMP-13 in C518 Rats with Knee Joint Degeneration

LIN Qiang¹, QI Wenbing², BAI Minghua¹, WANG Minghuai¹, YU Jigang¹, PENG Ye²

(1 Baoji City Chinese Medicine Hospital, Baoji, Shanxi 721000, China; 2 Air Force General Hospital, Beijing 100142, China)

【Abstract】Objective To investigate the effect of Lingxian Tongluo prescription on the expression of cartilage cell, COL-II and MMP-13 in C518 rats with knee joint degeneration. **Methods** Selected C518 rat knee cartilage cell line as the object, which were randomly divided into the Chinese medicine group (Lingxian Tongluo decoction) and Western medicine group (indometacin and glucosamine) and control group (sodium chloride solution), and then the above groups were treated with culture and induced degeneration. On the 1st d, 2nd d, 3rd d after administration, and then the expression of cartilage cell, COL-II and matrixmetalloproteinase-13 (MMP-13) in rats with knee joint degeneration was detected. **Results** At the same time point, the MTT values of the Traditional Chinese medicine group and Western medicine group had significant difference ($P<0.01$). The MTT values of the control group were not statistically significant ($P>0.05$). Compared with the Western medicine group and the control group, the COL-II immunohistochemical staining of Traditional Chinese medicine group were statistically significant ($P<0.01$), and the Traditional Chinese medicine group was better than the Western medicine group (dyeing index $\chi^2=16.26$, $df=2$, $P<0.01$). The MMP-13 immunohistochemistry staining in the control group was significant comparing with the Traditional Chinese medicine group and the Western medicine group, with statistical significance ($P<0.05$), and the Western medicine group compared with the Traditional Chinese medicine group was significantly different ($P<0.05$), and the traditional Chinese medicine group was better than that of the Western medicine group (dyeing index $\chi^2=54.31$, $df=2$, $P<0.05$). **Conclusion** The knee degenerative cartilage cells of C518

【收稿日期】2016-05-10

【基金项目】中国博士后科学基金第八批特别资助(2015T81110)。

【作者简介】林 强,男,主治医师,硕士,研究方向:骨创伤,E-mail:llqq585@163.com。

rats intervened by Lingxian Tongluo prescription can promote its proliferation, regulate the expression of COL-II and MMP-13, and delay the development of knee osteoarthritis disease.

[**Keywords**] knee joint degeneration; cartilage cells; collagen Type II; matrixmetalloproteinase-13; cartilage cell proliferation; Xianling Tongluo prescription

膝关节骨性关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是临床常见的严重骨关节疾病^[1], 多发于中老年, 然而其发病机制尚不明确。目前, 临床用于治疗 KOA 的方法有很多种, 大部分与细胞因子的合成及分解代谢有关^[2], 价格昂贵, 不良反应较多, 不适合患者长期应用。中医药在治疗 KOA 方面具有价廉、安全性高的优势^[3], 深受广大患者青睐。为此, 笔者采用灵仙通络方对 C518 大鼠膝关节退变软骨细胞进行干预, 观察其对软骨细胞增殖、II 型胶原 (COL-II) 及基质金属蛋白酶-13 (MMP-13) 表达的影响, 为临床治疗 KOA 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品 灵仙通络方 (方药组成: 威灵仙、白芍、防己、黄芪、延胡索、全蝎、蜈蚣, 由我院药房提供), 上述诸药加水煎煮、抽滤、蒸发浓缩成水煎剂 (相当于生药 1.90 g/mL)。氨糖美辛肠溶片由广东逸舒制药有限公司提供, 批准文号为国药准字 H44022796。

1.1.2 试剂 H_2O_2 由苏州市博洋化学品有限公司提供, DMEM 培养基由上海钰博生物科技有限公司提供, 青-链霉素由上海基免生物技术有限公司提供, FBS 由上海乔羽生物科技有限公司提供, 0.25% 胰蛋白酶由上海研谨生物科技有限公司提供, 噻唑蓝 (MTT) 由上海丰寿实业有限公司提供, 二甲基亚砜 (DMSO) 由上海乔羽生物科技有限公司提供。COL-II、MMP-13 的 I 抗以及 II 抗均购自上海基免生物技术有限公司。

恒温水浴箱由江苏省金坛市环宇科学仪器厂提供, HSX-150 细胞培养箱由上海和呈仪器制造有限公司提供, 多功能生化酶标仪由上海益联医学仪器发展有限公司提供, ST16R 台式高速冷冻离心机 Thermo 由北京联合科力科技有限公司提供, 奥林巴斯 CKX41 倒置显微镜由上海泽途机电设备有限公司提供。

1.2 实验动物

C518 大鼠膝关节软骨细胞株由中国药科大学生命科学院提供。wistar 大鼠, 15 只, 体质量为 (180±

20) g 由山东鲁抗医药有限公司提供, 生产许可证号: SCXK (鲁) 20130001。

1.3 分组、给药及含药血清制备

将上述大鼠随机分为中药组 (灵仙通络方组)、西药组 (氨糖美辛) 和对照组 (氯化钠溶液), 每组 5 只。中药组大鼠给予灵仙通络方水煎液 (200 mg/kg, 生理盐水配置), 灌胃给药; 西药组给予氨糖美辛 (200 mg/kg, 生理盐水配置), 给药途径同灵仙通络组, 对照组仅给予同体积的氯化钠溶液 (蒸馏水配置)。连续给药 3 天后, 将所有大鼠麻醉, 舌下静脉取血, 离心, 取上层血清, 高温灭活, 低温保存备用。

1.4 MTT 实验

1.4.1 细胞培养 在 C518 大鼠膝关节软骨细胞株加入含有 1% 青-链霉素和 10% FBS 的 DMEM 培养基中培养。培养过程中, 3 d 更换 1 次培养液, 当瓶底被细胞铺满时, 进行传代。

1.4.2 诱导细胞退变 上述细胞培养 6 h 后, 用含有 300 μ L H_2O_2 的 DMEM 培养基培养 4 d, 观察显微镜下细胞形态, 确认诱导细胞退变成功。

1.4.3 MTT 操作步骤 将诱导退变成功的细胞以每孔 1.0×10^5 cell/mL 细胞种植于 3 个 96 孔培养板中, 继续用无血清培养基培养 24 h, 分为 3 组: 灵仙通络方组 [含药血清 (2.5%、5% 和 10%) 的培养基]、氨糖美辛组 [含药血清 (2.5%、5% 和 10%) 的培养基]、氯化钠溶液组 [含氯化钠血清 (2.5%、5% 和 10%) 的培养基], 每组中每个浓度培养 4 孔, 每组 12 孔, 1 个 96 孔板培养 36 个孔, 继续培养, 分别在给药第 1 d、2 d 和 3 d 后, 分别每孔加入 20 μ L MTT 溶液 (5 mg/mL), 继续培养 4 h。终止培养, 吸去培养液, 每孔加入 150 μ L DMSO, 低速振荡 10 min, 充分溶解。采用多功能生化酶标仪波长为 490 nm 处测量各孔的吸光度。

1.5 免疫组化检测

1.5.1 免疫组化染色 将上述诱导退变成功的软骨细胞分别植于培养板内的盖玻片上, 待细胞贴壁后再用含 3 组药物的血清培养基培养 3 d, 之后用 PBS 冲洗, 加入 4% 多聚甲醛固定, 0.5 h 后用 PBS 冲洗。随后用 85%、95%、100% 的乙醇溶液脱水, 脱水结束,

用PBS冲洗,再用0.3%的H₂O₂浸泡,0.5 h后用PBS冲洗,37℃下用封闭液封闭20 min,吸去封闭液,分别滴加COL-Ⅱ、MMP-13 I抗,过夜。于第2日,再用PBS冲洗,滴加COL-Ⅱ、MMP-13 II抗,37℃温度下孵育,之后用PBS缓冲液冲洗,滴加抗生物素链菌素,再用PBS洗涤,滴加显色液显色,镜下观察,待其显色时用PBS洗涤终止上述反应。然后,滴加苏木素,用双蒸水洗涤,滴加盐酸-乙醇进行分化,再次用95%、100%的乙醇脱水,封片,将其置于倒置显微镜下,观察并用图像分析系统采片。

1.5.2 免疫组化结果统计 每张切片镜下随机取5个高倍视野(×400),记录每张切片的染色程度以及染色范围。其中,染色程度分为弱(+)、中(++)、强(+++)3个等级。染色范围分为染色范围占视野<1/4(+)、1/4~2/4(++)、2/4~3/4(+++)、>3/4(++++)。将染色程度和染色范围换算成染色指数,染色指数=染色程度×染色范围,其中将“+”、“++”、“+++”、“++++”分别按1、2、3、4分计算。

1.6 统计学处理

采用SPSS 20.0软件进行分析,MTT结果为计量资料,属正态分布,方差齐,用多组间均数两两比较的方差分析(LSD检验),免疫组化染色结果用Kruskal-Wallis检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组别药物对C518大鼠膝关节退变软骨细胞增殖的影响

在同一时间点上,分别在2.5%、5%、10%浓度中,中药组较西药组、对照组MTT差异均有统计学意义(P<0.01),西药组较对照组MTT差异均有统计学意义(P<0.01)。在同一的时间点上,中药组、西药组中,10%浓度较5%、2.5%浓度的MTT差异均有统计学意义(P<0.01),5%浓度较2.5%浓度MTT差异均有统计学意义(P<0.01);在对照组中,2.5%、5%、10%浓度三者之间MTT差异均有统计学意义(P>0.05)。结果见表1。

表1 不同组别药物对C518大鼠膝关节退变软骨细胞增殖的影响

($\bar{x} \pm s$, MTT值)

组别	浓度(%)	第1天	第2天	第3天
中药组	2.5	0.423±0.021 ^{△△}	0.636±0.038 ^{△△}	1.369±0.024 ^{△△}
	5	0.626±0.058 ^{△△}	0.848±0.034 ^{△△}	1.558±0.036 ^{△△}
	10	0.812±0.051 ^{△△}	1.086±0.092 ^{△△}	1.829±0.017 ^{△△}
西药组	2.5	0.238±0.023 ^{***▲▲△△}	0.451±0.022 ^{***▲▲△△}	0.782±0.076 ^{***▲▲△△}
	5	0.389±0.041 ^{***▲▲△△}	0.678±0.037 ^{***▲▲△△}	1.064±0.021 ^{***▲▲△△}
	10	0.496±0.092 ^{***▲▲△△}	0.786±0.042 ^{***▲▲△△}	1.352±0.043 ^{***▲▲△△}
对照组	2.5	0.145±0.015 ^{**}	0.263±0.021 ^{**}	0.341±0.023 ^{**}
	5	0.144±0.011 ^{**}	0.271±0.043 ^{**}	0.331±0.035 ^{**}
	10	0.152±0.026 ^{**}	0.253±0.022 ^{**}	0.352±0.023 ^{**}

注:与同一时间点不同浓度中药组相比,**P<0.01;与同一时间点不同浓度对照组相比,▲▲P<0.01;同组各浓度两两比较,△△P<0.01。

2.2 COL-Ⅱ和MMP-13免疫组化结果

COL-Ⅱ免疫组化显示,中药组细胞显示强阳性,细胞质、细胞膜均呈现棕黄色;西药组细胞显示阳性,细胞质、细胞膜呈现黄色;对照组细胞显示弱阳性,细胞质、细胞膜呈现淡黄色。MMP-13免疫组化显示,中药组细胞显示弱阳性,细胞核呈现淡黄色;西药组细胞显示阳性,细胞核呈现黄色;对照组细胞显示强阳性,细胞核呈现棕黄色。结果见图1-2。

2.3 COL-Ⅱ和MMP-13免疫组化染色Kruskal-Wallis检验结果

COL-Ⅱ免疫组化染色Kruskal-Wallis检验结

果如下:中药组与西药组及对照组相比,差异有显著统计学意义(P<0.01),且中药组优于西药组(染色指数 $\chi^2=16.26$,df=2,P<0.01)。MMP-13免疫组化染色Kruskal-Wallis检验结果如下:对照组与中药组、西药组比较,差异有统计学意义(P<0.01),且中药组优于西药组(染色指数 $\chi^2=54.31$,df=2,P<0.01)。结果见表2。

3 讨论

膝关节骨性关节炎(KOA)是一种临床常见的、可导致膝关节软骨结构发生改变的退变性疾病^[4]。软骨细胞是存在于关节软骨中的唯一细胞,其功能

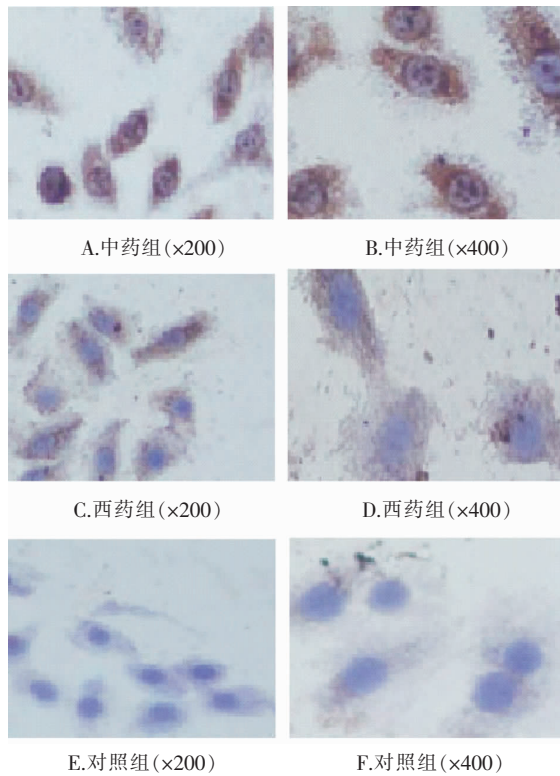


图 1 COL-II 免疫组化结果

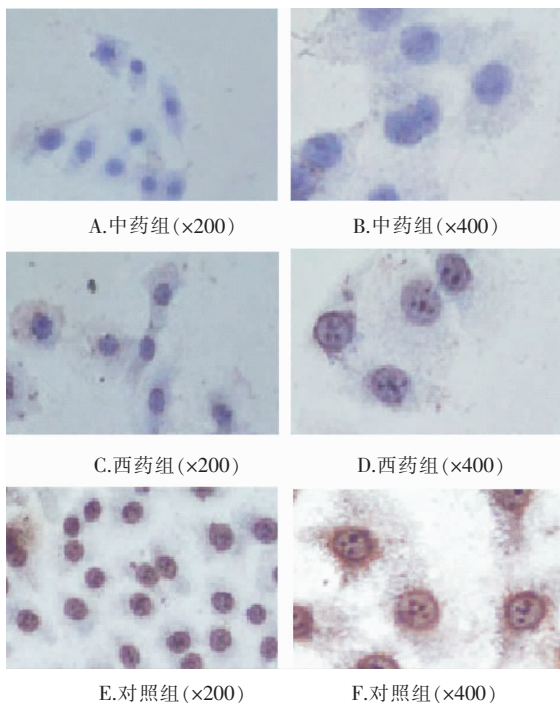


图 2 MMP-13 免疫组化结果

表 2 COL-II、MMP-13 Kruskal-Wallis 检验

组别	COL-II		MMP-13	
	阳性细胞数	秩均值	阳性细胞数	秩均值
中药组	46	51.37**▲▲	6	3.52**▲▲
西药组	35	37.56**	16	14.78**
对照组	5	2.54	58	52.37

注:与对照组相比,** $P < 0.05$;与西药组相比,▲▲ $P < 0.05$ 。

的异常是导致 KOA 发生的关键^[5]。越来越多的研究证实^[6],在 KOA 发生过程中,细胞因子起着决定性的作用^[6]。蛋白胶原是组成膝关节软骨的主要物质,COL-II 又是其中最重要的胶原之一,在正常状态下,它们的存在能够维持膝关节软骨正常的组织形态^[7]。研究发现,在关节软骨发生退变时,软骨细胞中的一些细胞因子也将随之变化^[8]。KOA 初期,COL-II 染色就会发生变化,表层 COL-II 染色下降,深层染色加深^[9]。研究认为,基质金属蛋白酶(MMPs)对软骨基质巨分子的分解起着主要作用^[10],其中,MMP-13 是裂解 COL-II 最强的酶^[11],由软骨细胞产生,可降解细胞外基质中的蛋白聚糖及 COL-II^[12]。有专家研究表明^[13],在 KOA 病变部位的软骨中才发生 COL-II 降解,在正常区域未见变化^[14]。另外,研究发现,KOA 关节软骨中还能检测到 MMP-13,且 MMP-13 基因表达高于正常组织^[15]。因此,检测 COL-II、MMP-13 的表达对于评判软骨细胞退变意义重大。

膝关节骨性关节炎在中医学中属“骨痹”的范畴^[16]。中医认为,肝脾肾虚,风寒湿邪闭阻经络^[17],气血不通则导致 KOA 的关键病机,因此,治以调补肝脾肾虚、阻碍风寒湿邪入侵^[18]。本研究所用灵仙通络方,具有活血化瘀止痛、消肿解毒之功效,方中威灵仙具有祛风湿、通络止痛之功效,配伍白芍以平抑肝阳、养血收阴,配伍防己以行水、泻下焦湿热,方中黄芪具有补气固表、利水退肿、托毒排脓之功效,配伍延胡索以活血、利气、止痛,配伍全蝎、蜈蚣以息风止痉^[19]。本方配伍合理,诸药相合共奏化瘀止血、活血止痛、解毒消肿之功效。现代研究表明,灵仙通络方具有抗炎、抗风湿的作用,对关节病变具有较好的治疗作用^[20]。

本组研究结果显示,在不同组别药物对 C518 大鼠膝关节退变软骨细胞增殖的影响上,在同一时间点的不同浓度中,各组之间均有差异;在同一时间点的灵仙通络组、氨糖美辛组中,各浓度之间亦具有差异。上述结果说明灵仙通络方对软骨细胞有明显的增殖作用。在 COL-II 免疫组化染色中,中药组与西药组及对照组相比差异有统计学意义,而西药组较对照组差异有统计学意义,且中药组优于西药组;在 MMP-13 免疫组化染色中,对照组较中药组、西药组差异有统计学意义,而西药组较中药组差异有统计学意义,且中药组优于西药组。上述结果提示灵仙通络方能够通过调节 COL-II、MMP-13 表达来

延缓 KOA 的发生。

综上所述,C518 大鼠膝关节退变软骨细胞经灵仙通络方干预后能够促进其增殖,调节 COL-II、MMP-13 的表达,延缓 KOA 疾病的发展进程。

参考文献:

- [1] Payne KA, Lee HH, Haleem AM, et al. Single intra-articular injection of adeno-associated virus results in stable and controllable in vivo transgene expression in normal rat knees [J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2011, 19(8): 1058-1065.
- [2] 闫虎,苏友新,林学义,等.II型胶原酶消化法培养兔关节软骨细胞[J].*中国组织工程研究*,2013,17(50):8647-8648.
- [3] Kumari RR, More AS, Gupta G, et al. Effect of alcoholic extract of *Entada pursaetha* DC on monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis pain in rats[J]. *Indian J Med Res*, 2015, 141(4): 454-462.
- [4] 涂意辉,薛华明,夏志道,等.乳铁蛋白对骨关节炎软骨细胞增殖活力及细胞外调节蛋白激酶表达的影响[J].*中华实验外科杂志*,2012,29(7):1242-1244.
- [5] Chen YJ, Tsai KS, Chiu CY, et al. EGb761 inhibits inflammatory responses in human chondrocytes and shows chondroprotection in osteoarthritic rat knee[J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2013, 31(7): 1032-1038.
- [6] Caroline Bublitz, Carla Medalha, Poliani Oliveira, et al. Low-level laser therapy prevents degenerative morphological changes in an experimental model of anterior cruciate ligament transection in rats[J]. *Lasers in Medical Science*, 2014, 29(5): 1669-1678.
- [7] 张磊,曾炎,扶世杰,等.C518 大鼠膝关节正常和退变软骨细胞形态特征观察[J].*中华临床医师杂志(电子版)*,2015,9(2):4606-4607.
- [8] Wang F, Wu LH, Li LF, et al. Monotropein exerts protective effects against IL-1 β -induced apoptosis and catabolic responses on osteoarthritis chondrocytes[J]. *International Immunopharmacology*, 2014, 23(2): 575-580.
- [9] Tobias Schneider, Pia Welker, Kai Licha, et al. Influence of dendritic polyglycerol sulfates on knee osteoarthritis: an experimental study in the rat osteoarthritis model [J].*BMC Musculoskeletal Disord*, 2015, 16(1): 387-388.
- [10] 姜辉,夏伦祝,李颖,等.三七总皂苷对肝纤维化大鼠基质金属蛋白酶-13 及其抑制因子-1 表达的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2013,38(8):1206-1207.
- [11] Korochina KV, Polyakova VS, Korochina IE. Influence of dendritic polyglycerol sulfates on knee osteoarthritis: an experimental study in the rat osteoarthritis model[J]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2016, 160(3): 376-380.
- [12] 陈文晓,单方军,金红婷,等.基质金属蛋白酶-13 的测定在骨关节炎中作用的研究进展[J].*中国骨伤*,2014,27(7):617-618.
- [13] Schneider T, Welker P, Kai L, et al. Influence of dendritic polyglycerol sulfates on knee osteoarthritis: an experimental study in the rat osteoarthritis model [J]. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 2015, 16: 1-11.
- [14] 马丽艳,宋旭东,张德新,等.MMP-13 和 Gxlectin-3 在骨性关节炎滑膜组织中的临床意义[J].*中国骨与关节杂志*,2013,2(5):280-284.
- [15] Lee SW, Rho JH, Lee SY, et al. Leptin protects rat articular chondrocytes from cytotoxicity induced by TNF- α in the presence of cyclohexamide[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2015, 23(12): 269-278.
- [16] Assisa L, Milaresa LP, Almeida T, et al. Aerobic exercise training and low-level laser therapy modulate inflammatory response and degenerative process in an experimental model of knee osteoarthritis in rats[J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2016, 24(1): 169-177.
- [17] 张磊,曾炎,扶世杰,等.灵仙通络胶囊对 C518 大鼠膝关节退变软骨细胞 II 型胶原和 MMP-13 表达的影响[J].*中华临床医师杂志(电子版)*,2015,9(2):4611-4612.
- [18] 李坤,肖四旺,陈孟交,等.丹紫康膝冲剂对大鼠膝骨性关节炎软骨细胞凋亡的影响[J].*湖南中医药大学学报*,2014,34(3):20-22.
- [19] 张磊,曾炎,扶世杰,等.灵仙通络胶囊对 C518 大鼠膝关节退变软骨细胞增殖的影响[J].*中华临床医师杂志(电子版)*,2014,8(17):3143-3144.
- [20] 扶世杰,张磊,汪国友,等.云南白药胶囊对 C518 大鼠膝关节退变软骨细胞增殖和 COL-II、MMP-13 表达的影响[J].*成都中医药大学学报*,2013,36(4):10-12.

(本文编辑 匡静之)