

跌打通痹膏对兔膝关节炎关节软骨 MMP-13、 II 型胶原 mRNA 表达的影响

龚志贤¹, 罗凌威², 卢敏¹, 邝高艳², 范杰², 银丝丝²

(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007; 2. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208)

〔摘要〕 目的 观察跌打通痹膏对兔膝骨性关节炎关节软骨基质金属蛋白酶-13 (MMP-13)、II 型胶原 mRNA (COL-II mRNA) 表达的影响。方法 选用 65 只新西兰兔随机分成正常对照组、假手术组、模型组、跌打通痹膏组、骨通贴组, 每组 13 只。模型组、跌打通痹膏组、骨通贴组采用改良 Hulth 造模法, 正常组、假手术组不予处理, 模型组、跌打通痹膏组、骨通贴组分别用胶带、跌打通痹膏、骨痛贴膏贴敷 4 周, 观察治疗后各组实验兔关节软骨改变情况, 并检测关节软骨中 MMP-13、COL-II mRNA 的表达。结果 (1) 组织学关节软骨评分: 跌打通痹膏组评分较模型组低 ($P < 0.05$)。 (2) MMP-13 mRNA 检测: 模型组 MMP-13 表达较正常对照组显著提高 ($P < 0.01$), 跌打通痹膏组 MMP-13 mRNA 表达较模型组降低 ($P < 0.01$)。 (3) COL-II mRNA 检测: 跌打通痹膏组 COL-II 表达较模型组升高 ($P < 0.01$)。结论 跌打通痹膏能通过降低 II 型胶原降解, 抑制 MMP-13 mRNA 表达, 从而有效保护膝骨性关节炎模型兔关节软骨, 延缓关节软骨退变。

〔关键词〕 膝骨性关节炎; 跌打通痹膏; MMP-13 mRNA; II 型胶原 mRNA

〔中图分类号〕 R274.3; R285.5

〔文献标识码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.11.005

The Effects of Dieda Tongbi Emplastrum on MMP-13, Collagen II mRNA Expression in the Knee Osteoarthritis Model Rabbits

GONG Zhixian¹, LUO Lingwei², LU Min¹, KUANG Gaoyan², FAN Jie², YIN Sisi²

(1. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

〔Abstract〕 Objective To observe the effects of Dieda Tongbi emplastrum on MMP-13 (matrix metalloproteinase-13), COL-II mRNA expression in the knee osteoarthritis model rabbits. **Methods** The 65 healthy New Zealand rabbits were randomly divided into normal control group, sham-operation group, modeling group, Dieda Tongbi emplastrum group, Gutong patch group, 13 rabbits in each group. The model group, Dieda Tongbi emplastrum group, Gutong emplastrum group were built by improved Hulth molding method. The normal group and sham-operation group were opened the joint cavities without any treatment. The model group, Dieda Tongbi emplastrum and Gutong patch group were treated with adhesive tape, Dieda Tongbi emplastrum and Gutong patch for 4 weeks, respectively. The changes of joint cartilage in all model rabbits were observed, and the expressions of MMP-13 and COL-II mRNA in joint cartilage were detected. **Results** (1) The histologic articular cartilage score of Dieda Tongbi emplastrum group was lower than model group ($P < 0.05$). (2) MMP-13 mRNA test: the MMP-13 expression in model group was increased than that in normal control group ($P < 0.01$). The MMP-13 mRNA expression of Dieda Tongbi emplastrum group were lower than that in model group ($P < 0.01$). (3) COL-II mRNA test: the expression of COL-II in Dieda Tongbi emplastrum group was increased than that in model group ($P < 0.01$). **Conclusion** Dieda Tongbi emplastrum can protect the articular cartilage in knee osteoarthritis model rabbits and delay the course of knee joint degeneration by reducing COL-II degradation and inhibiting the expression of MMP-13.

〔Keywords〕 knee osteoarthritis; Dieda Tongbi emplastrum; MMP-13 mRNA; Collagen II mRNA

〔收稿日期〕 2015-09-28

〔基金项目〕 湖南省教育厅优秀青年科研课题项目(13B085)。

〔作者简介〕 龚志贤, 男, 副主任医师, 研究方向: 骨与关节及创伤修复, E-mail: 26134591@qq.com。

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是中老年常见病之一,其主要表现为关节疼痛、僵硬、功能障碍,属于中医“痹症”范畴^[1-2]。流行病学资料表明随着现代社会平均寿命的增长, KOA 在 40~80 岁的人群中,已成为一种有较高发病率的骨科疾病^[3-4]。关节软骨退变的主要原因为关节软骨细胞外基质降解异常,而软骨细胞外基质为软骨细胞存活所依靠的主要环境。基质金属蛋白酶(MMPs)在维持其降解和合成的过程中表现出重要作用。因此,本课题以兔膝骨关节炎模型为受试对象,以 MMPs 学说为切入点,观察跌打通痹膏是否通过调节兔膝骨关节炎软骨细胞基质金属蛋白酶-13(matrix metalloproteinase-13, MMP-13)及 II 型胶原 mRNA(Collagen II, COL-II) mRNA 表达,达到减缓膝骨关节炎疾病发展的作用,为跌打通痹膏治疗 KOA 提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 65 只清洁级成年新西兰白兔(雌性,体质量 1.8~2.5 kg),由湖南中医药大学动物实验中心代购,动物许可证编号:SKYK(湘)2013-0005。

1.1.2 实验药物 跌打通痹膏,由湖南省中医药大学第一附属医院药剂科提供,规格:7 cm×10 cm,批号:20140809;骨痛贴膏,桂林天和药业股份有限公司,规格:7 cm×10 cm,产品批号:20140709。

1.1.3 主要试剂 TRIZOL 试剂(购自美国 Invitrogen 公司)、Reverse Transcription System、Go Taq Green MasterMix(均购自美国 Promega 公司);0.9%氯化钠注射液(100 mL,四川科伦药业股份有限公司,批号:H141009C)。

1.1.4 主要仪器 4℃台式离心机、水平电泳仪、移液枪、美国 Bio-Rad Molecular Imager Gel Doc XR 凝胶成像系统;Beijing Liuyi instrument Factory PCR 仪,37℃恒温箱(均由湖南中医药大学中医实验室中心提供)。

1.2 实验方法

1.2.1 分组方法 将 65 只新西兰白兔按体质量编号,参照随机数字表进行分组实施动物分组,随机分为正常对照组、假手术组、模型组、跌打通痹膏组、骨痛贴组五组,各组 13 只,分笼饲养,定时、定量、定人饲养,按照兔标准饲料配制饲料。

1.2.2 造模方法 模型组、跌打通痹膏组、骨痛贴

组兔膝骨关节炎模型采用 Hulth 造模法进行造模,具体方法如下:由耳缘静脉注射入麻醉药物(20%乌拉坦,4 mL/kg),取右后膝关节内侧入路,切口周围 5 cm 脱毛、络合碘消毒、铺无菌孔巾。以右后膝关节内侧作一长约 3 cm 的切口,逐层分离软组织,依次暴露内侧副韧带,切断内侧副韧带。小心摘除内侧半月板,后用尖刀切断前交叉韧带,术后行抽屈实验,若阳性则表示造模手术完成。术后给予肌肉注射青霉素 20 万 U,每天 1 次,连续 3 d,维持伤口干洁,分笼喂养,术后 2 周伤口拆线。正常对照组不进行造模处理,假手术组则在麻醉后打开关节腔,不做处理后直接缝合。造模期间各组白兔伤口均愈合,无感染发生,无白兔死亡。在造模手术后第五周时,此时在各组随机选取 1 只白兔处死,打开右膝关节腔,验证模型制备成功,进行实验干预。

1.2.3 实验干预 按照成人每次贴敷膏药需求量,采用体表面积 Meeh-Rubner 公式:体表面积(m²)=k(系数)×[(W(体质量 g)^{2/3})]/10000,计算实验兔每次使用膏药大小为 2 cm×4 cm。正常对照组、假手术组不予以治疗,模型组用胶带固定,跌打通痹膏组用跌打通痹膏贴敷,骨痛贴组用骨痛贴膏贴敷,胶带、跌打通痹膏、骨痛贴膏均裁剪为 2 cm×4 cm 大小,固定于右后膝关节,膏药固定后再以绷带捆扎预防实验兔撕咬膏药,捆扎绷带后检查肢端血运,以不影响血运为宜。膏药敷贴连续 4 周,每天 1 次,每天 8 h(每日 08:00-16:00,自敷药后每隔 4 h 前往实验室观察,检查膏药是否固定,敷药 8 h 后拆除膏药)。

1.3 观察指标及方法(标本均送至中南大学湘雅二医院中心实验室进行检测)

1.3.1 关节软骨观察 实验干预 4 周后,采用空气栓塞法处死实验兔,处死后解剖右膝关节,打开关节腔,分离股骨远端及胫骨平台周围软组织,先取股骨远端标本,制备切片,行 HE 常规染色后在光镜(放大倍数 400 倍)下观察,将光镜下所见关节软骨组织形态改变,按照关节软骨改良 Mankin 评分^[5]进行评分。评分准则详见表 1。

1.3.2 关节软骨中 MMP-13、COL-II 的 mRNA 的表达

取各组白兔右胫骨平台(保持完整关节软骨,修整骨端周围肌肉等组织),收集后将标本置于-10℃低温冰冻保存。待实验结束后应用 RT-PCR 技术(按说明书)检测关节软骨中 MMP-13、COL-II mRNA 表达情况。

1.4 统计学方法

检测所得所有数据用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。数据使用 SPSS 17.0 软件进行处理。多组样本均数比较用方

差分析,组间比较采用单因素方差分析,数据满足正态性和方差齐性的采用 LSD 法,方差不齐则采用 Dunnett's T3 法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 关节软骨改良 Mankin 评分法

项目	评分准则					
	0分	1分	2分	3分	4分	5分
软骨结构	光整如常	出现不规则裂隙	裂隙深达移行层	裂隙深达辐射层	裂隙深达钙化层	软骨层脱落
软骨细胞	数量如常	数量弥漫性增多	大量簇集样细胞团	数量明显减少	数量明显减少	数量明显减少
基质染色	正常	染色轻度减退	染色中度减退	染色中度减退	染色完全消失	染色完全消失
潮线完整性	正常	多重潮线	软骨下入侵潮线	软骨下入侵潮线	软骨下入侵潮线	软骨下入侵潮线

2 结果

各组白兔在实验干预时无死亡,均完成疗程,结果如下。

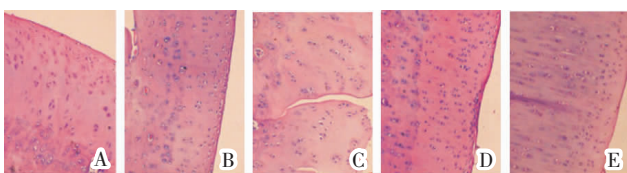
2.1 跌打通痹膏对关节软骨形态学影响

对各组关节软骨切片进行光镜观察,对光镜下关节软骨形态学改变进行 Mankin 评分,各组评分均满足方差齐性($P<0.01$),组间差异有统计学意义。跌打通痹膏组、骨痛贴组与模型组比较($P<0.05$),正常对照组与假手术组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。跌打通痹膏组与骨痛贴组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。评分结果详见表 2、图 1。

表 2 各组实验兔关节软骨 Mankin 评分结果比较 ($\bar{x}\pm s$,分)

组别	n	Mankin 评分
正常对照组	12	0
假手术组	12	0.42±0.15
模型组	12	3.33±0.22*
跌打通痹膏组	12	2.83±0.21*#
骨痛贴组	12	2.67±0.19*#

注:与正常对照组对比,* $P<0.05$;与模型组对比,# $P<0.05$ 。



A 空白组;B 假手术组;C 模型组;D 跌打通痹膏组;E 骨痛贴组

图 1 各组关节软骨形态学观察(HE×400)

2.2 跌打通痹膏对关节软骨中 MMP-13mRNA 表达的影响

对照组与假手术组 MMP-13 表达差异无统计学意义($P>0.05$)。模型组、跌打通痹膏组、骨痛贴组

与正常对照组比较,MMP-13 表达显著提高 ($P<0.01$)。跌打通痹膏组、骨痛贴组与模型组比较 MMP-13 表达降低($P<0.01$)。跌打通痹膏组与骨痛贴组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

2.3 跌打通痹膏对关节软骨中 COL-Ⅱ mRNA 表达的影响

模型组、跌打通痹膏组、骨痛贴组与正常对照组比较,COL-Ⅱ 表达显著降低($P<0.01$)。跌打通痹膏组与模型组比较 COL-Ⅱ 表达升高($P<0.01$)。跌打通痹膏组与骨痛贴组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 3 各组 MMP-13mRNA、COL-Ⅱ mRNA 表达比值

组别	n	结果比较 ($\bar{x}\pm s$)	
		MMP-13/ β -actin	COL-Ⅱ/ β -actin
正常对照组	12	0.9785±0.0362	1.860 3±0.202 4
假手术组	12	0.9829±0.0668	1.840 0±0.228 3
模型组	12	1.2325±0.1069**	0.999 0±0.093 2**
跌打通痹膏组	12	1.1595±0.0494***	1.290 8±0.155 4***
骨痛贴组	12	1.1632±0.0728***	1.295 6±0.124 8***

注:与正常对照组对比,** $P<0.01$;与模型组对比,## $P<0.01$ 。

3 讨论

KOA 在中医学中并无确切病名,将其归为“痹证”范畴,主要是依照 KOA 的临床症状。痹,即堵塞不通。痹证是指外邪留于经脉,导致以疼痛、肿胀、为主要症状表现在膝关节及关节周围肌肉的一种疾病。有关痹症的记载,首先见于《内经》。书中指出:“风寒湿三气杂至,合而为痹”^[6]。中医学认为,气血失和、肝肾亏虚为膝痹病的主要内因。外感风寒湿邪,筋脉气血阻滞为膝痹病的主要外因。内亏外邪导致膝关节不荣则痛,不通则痛^[7]。目前,对于未严重影响生活质量的非晚期 KOA 患者仍以保守治疗为

主,中药虽起效较慢,但以整体调节为主,作用温和、持久,能够显著改善病人自觉症状,提高生活质量,容易被患者接受^[8]。根据临床病例发现 KOA 患者多以局部症状突出,故临床上多采用外治法治疗 KOA。所以贴敷膏药的方法以其使用方便的优点已成为治疗 KOA 的一种重要治疗方法。

KOA 主要病变部位为关节软骨,细胞外基质和软骨细胞室构成关节软骨的主要两种成分。几乎所有的软骨外基质都能被 MMPs 降解,KOA 的发生主要是因为软骨基质被大量降解,破坏了胶原网络和软骨细胞周围的环境。MMPs 中胶原酶亚型—MMP-13,可以优先分解 COL-Ⅱ,对软骨基质 COL-Ⅱ分解能力最强^[9]。COL-Ⅱ 占总胶原量中的 90%~95%,是正常关节软骨基质内的主要胶原成分。软骨破坏主要是因为细胞外基质降解和合成之间的平衡无法维持。通过其他文献表明,可通过测定 MMP-13、COL-Ⅱ 的 mRNA 的表达间接反映出来。本次实验中,对兔 KOA 软骨进行研究,实验结果表明模型组指标 MMP-13 的 mRNA 表达较空白组显著升高, COL-Ⅱ 的 mRNA 表达较空白组明显降低。

跌打通痹膏(原名伤速康贴膏)系本院临床应用四十余年的协定方——消炎散,进行剂型改变,将其制成更为简单实用的巴布剂,改善了消炎散作用时间短,不宜固定等缺点。通过长期的临床使用证明跌打通痹膏外敷患处具有较好的活血化瘀、散瘀止痛的功效。其治疗 KOA 的主要功效为清热活血、祛瘀止痛活络,该药对于 KOA 中瘀阻脉络证及气滞血瘀证等相关证型疗效尤佳,药方主要由栀子、赤芍、蒲公英、金银花、大黄、羌活、当归、薄荷、白芷、香附十一味中药组成。药方中金银花、蒲公英、栀子、大黄均为君臣寒凉之药清热祛瘀;为增强其活血通络、散瘀止痛之作用加入佐使药,分别为香附、白芷、羌活、姜黄、赤芍、当归等行气活血之品;为增加药物透皮性加入芳香之薄荷。俱药合用,使血活归正路,散瘀有途径,共奏宁络清热、散瘀活血之功。君臣药凉血清热、祛瘀活血,凉血与散瘀相辅,辛温与寒凉相制。

现代药理学研究发现,跌打通痹膏方中大黄有降低 PLT 聚集与粘附,并延长 TT、PT、PTT 的作用以起到

活血祛瘀的作用^[10],并可通过抑制下丘脑中 cAMP 含量达到解热作用^[11]。蒲公英提取物能降低炎症细胞中 COX-2 的表达,进而起到抗炎镇痛的功效^[12]。课题组前期实验研究发现,跌打通痹膏可有效降低兔膝关节炎模型中关节液 IL-1、IL-6 及 TNF- α 的含量,对膝骨性关节炎具有防治作用^[13]。本实验结果显示,经跌打通痹膏治疗后的兔膝关节炎模型,能降低关节软骨 Mankin 评分和 MMP-13 mRNA 表达,增加 COL-Ⅱ mRNA 表达,与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.01$),提示跌打通痹膏能通过减少 COL-Ⅱ 降解,抑制 MMP-13 mRNA 表达,从而有效保护膝骨性关节炎模型兔关节软骨,延缓关节软骨退变,这可能是其治疗本病的作用机制。

参考文献:

- [1] 吴林生,金嫣莉.膝痛[M].北京:人民卫生出版社,2010:347.
- [2] 陈百成,张 静.骨关节炎[M].北京:人民卫生出版社,2011:1.
- [3] Rousseau JC, Delmas PD. Biological markers in osteoarthritis [J]. Nature Clinical Practice Rheumatology, 2007, 3(6):346-356.
- [4] Wieland HA, Michaelis M, Kirschbaum BJ, et al. Osteoarthritis an untreatable disease? [J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2005, 4(4): 331-344.
- [5] Jiang HP, Wang DP. Osteoarthritis creatural model [J]. China Journal of Modern Medicine, 2004, 14(6): 153-156.
- [6] 李西海, 陈文列, 刘献祥. 补肾柔肝法防治骨性关节炎作用机制探讨[J]. 福建中医药大学学报, 2011, 21(2):66-69.
- [7] 王凡星,姜翠花,杨军用,等.按摩配合乌芍止痛酊外涂治疗增生性膝关节炎 50 例[J]. 中医外治杂志, 2010, (2):33-33.
- [8] 秦莉花,吴奇峰,陈晓阳,等.中药内服外治膝骨性关节炎的研究概述[J]. 湖南中医药大学学报, 2013, 33(7):109-112.
- [9] 乔长峰,杨开舜. MMP-13、TIMP-1 在兔骨关节炎模型的表达及其意义[J]. 中国现代医生, 2009, 47(3): 39-41.
- [10] 黄政德, 蒋孟良, 易延彦, 等. 酒制丹参、大黄对大鼠血小板功能及抗凝血作用的研究[J]. 中成药, 2001, 23(5):341-342.
- [11] 隋 峰, 闫美娟, 林 娜, 等. 大黄不同炮制品解热作用及机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15):167-170.
- [12] Koh Y, Cha D, Ko J, et al. Anti-inflammatory effect of Taraxacum officinale leaves on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells [J]. Journal of medicinal food, 2010, 13(4): 870-878.
- [13] 卢 敏, 谭旭仪, 谢心军, 等. 伤速康贴膏对兔膝骨性关节炎模型关节液中 IL-1、IL-6 及 TNF- α 水平的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2011, 31(7):18-21.

(本文编辑 李 杰)