

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.22.012

陈元膏摩法对阳虚寒凝型膝骨性关节炎模型兔关节软骨细胞凋亡、基质金属蛋白酶及血清炎症因子的影响



古来撒尔·艾克拜尔¹, 刘俊昌^{1,2}✉, 王忆葑³, 买合热衣·亚迪⁴,
何静⁵, 卢旭昇¹, 张晓婷¹, 郭蕾²

1. 新疆医科大学, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市水磨沟区尚德北路 567 号, 830017; 2. 新疆医科大学附属中医医院; 3. 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市第一人民医院分院; 4. 新疆医科大学附属哈密市中心医院; 5. 新疆维吾尔自治区伊犁州友谊医院

[摘要] **目的** 探讨陈元膏摩法治疗阳虚寒凝型膝骨性关节炎(KOA)的效用及可能作用机制。**方法** 60只新西兰大白兔随机分为正常组、模型组、手法组、陈元膏组、陈元膏摩法组及扶他林组, 每组10只。模型组和各干预组采用高分子绷带屈曲位固定+薄荷油、气候箱法建立兔阳虚寒凝型KOA模型。造模8周后, 正常组和模型组不作干预; 手法组给予单纯推拿手法; 陈元膏组涂抹陈元膏剂; 陈元膏摩法组在陈元膏组基础上行推拿手法治疗; 扶他林组涂抹扶他林软膏, 每日1次, 连续6周。最后一次干预后次日进行取材, HE染色观察软骨、滑膜组织病理学变化并将切片进行病理学Mankin软骨组织学评分; ELISA法检测血清中炎症因子白细胞介素1 β (IL-1 β)、白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素10(IL-10)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平; Western Blot法检测B淋巴细胞瘤2(Bcl-2)、B淋巴细胞瘤2相关X蛋白质(Bax)水平; 免疫组化法及qRT-PCR法测定关节软骨组织中金属蛋白酶抑制剂1(TIMP-1)、基质金属蛋白酶13(MMP-13)、基质金属蛋白酶3(MMP-3)蛋白及mRNA表达水平。**结果** 病理结果显示, 正常组兔关节软骨细胞排列有序, 基质均匀一致, 滑膜组织结构正常, 滑膜细胞排列整齐。模型组软骨基质失去均质性, 部分区域软骨细胞崩解、消失、排列紊乱, 滑膜细胞增大, 层数增加, 间质纤维组织增生伴部分玻璃样变性, 较多慢性炎症细胞浸润。手法组、陈元膏组、陈元膏摩法组软骨细胞损伤均有不同程度改善, 且陈元膏组及陈元膏摩法组改善程度优于手法组。与正常组比较, 模型组兔关节软骨组织Mankin评分升高, 血清IL-1 β 、TNF- α 、IL-6水平升高, 软骨组织Bcl-2蛋白表达及Bcl-2/Bax值降低, Bax、MMP-13蛋白表达升高, MMP-3、MMP-13 mRNA表达升高, TIMP-1 mRNA表达降低($P<0.05$)。与模型组比较, 陈元膏摩法组兔关节软骨组织Mankin评分降低; 各干预组血清IL-1 β 水平及软骨组织中MMP-3、MMP-13 mRNA水平降低, TIMP-1 mRNA水平升高; 陈元膏摩法组、扶他林组IL-10水平、Bcl-2蛋白表达、Bcl-2/Bax值升高, Bax蛋白表达、MMP-13、TIMP-1蛋白表达降低($P<0.05$)。与扶他林组比较, 陈元膏摩法组Mankin评分降低, Bax蛋白表达、MMP-13 mRNA表达升高($P<0.05$), 两组各炎症因子水平差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 陈元膏摩法可改善软骨、滑膜病理组织形态, 具有抗炎、抗软骨基质降解及抗软骨细胞凋亡作用, 从而减轻关节软骨损伤, 延缓阳虚寒凝型KOA病程进展。

[关键词] 膝骨性关节炎; 阳虚寒凝; 陈元膏; 推拿疗法; 炎症因子; 基质金属蛋白酶; 细胞凋亡

膝骨性关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种以关节软骨退行性病变为主要病理特征的多因素肌肉骨骼疾病^[1], 属中医学“膝痹”“筋痹”范畴。研究^[2]表明, 炎症介质是骨性关节炎病理进

展和疼痛的重要驱动因素。在炎症刺激下, 关节内微环境稳态失衡, 诱导软骨细胞、成纤维样滑膜细胞和巨噬细胞异常释放基质金属蛋白酶类(MMPs)、聚蛋白多糖酶(ADAMTS)等蛋白水解酶, 激发胶原、蛋白多糖等细胞外基质(ECM)过度降解, 抑制软骨特异性基质成分的合成, 促进软

基金项目:国家自然科学基金(81760897)

✉ 通讯作者:625854402@qq.com, (0991)2110286

骨细胞凋亡,直接或间接造成关节软骨不可逆性损伤^[3],加快骨关节炎疾病进展。“陈元膏摩法”是将陈元膏剂与推拿手法相结合的中医外治法。陈元膏方由《千金翼方》苍梧道士陈元膏化裁而来,方含当归、黑顺片、干姜、细辛、白芷。课题组在原处方论证基础上结合新疆地域特色,添加维吾尔药苏仁江,使用现代工艺制备成外用制剂^[4]。课题组前期流行病学调查研究^[5]结果表明,新疆北疆牧区 KOA 患者以阳虚质为主,且以阳虚寒凝型高发为特点。本研究基于新疆人群发病特点及陈元膏摩法治疗 KOA 有效性研究^[6]的基础上开展实验研究,拟通过观察陈元膏摩法对阳虚寒凝型 KOA 模型兔软骨降解相关标志物表达水平的影响,探讨其治疗阳虚寒凝型 KOA 的潜在作用机制,为临床拓宽其应用提供实验依据。本研究经新疆医科大学动物实验伦理委员会审查和批准(许可证号: IACUC-20170222026)。

1 材料与方法

1.1 动物

雄性新西兰大白兔 90 只,6 月龄,体质量(2.50±0.52) kg,由新疆医科大学实验动物中心提供,实验动物使用许可证号: SYXK(新) 2018-0003。每只单笼喂养,12 h 光/暗循环下自由摄食饮水,给予常规饲料,温度 20~25 °C,湿度 45%~65%。研究严格遵循《实验动物福利审查指南》^[7]。

1.2 药物

陈元膏组成: 当归 15 g、苏仁江 10 g、黑顺片 16 g、干姜 16 g、细辛 10 g、白芷 10 g、凡士林和羊毛脂(2:1),委托新疆名医名方与特色方剂学实验室制备(批号: XJMF20140305,专利号: 201510145716.5)。根据《药理实验方法学》^[8]人与实验动物按体表面积比等效剂量换算比率表,折算出实验兔所需的陈元膏膏剂有效剂量为 2 g/只(相当于原生药 3.12 g),相当于成人临床用量。扶他林软膏(北京诺华制药有限公司,批号: vp0678 201909)。

1.3 主要试剂及仪器

薄荷油(上海源叶生物科技有限公司,批号: S24778); 苏木素染液(批号: CTS-1097)、DAB 显色试剂盒(批号: DAB-1031),福州迈新生物技术有限公司; 伊红染液(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号: ZLI-9613); 白细胞介素 1 β (IL-1 β , 批号: S13016752)、白细胞介素 6(IL-6, 批号: S12016754)、白细胞介素 10(IL-10, 批号: S14016753)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α , 批号:

S07016755) 试剂盒,武汉华美生物工程有限公司; 兔抗 B 淋巴细胞瘤 2(Bcl-2) 抗体(批号: bs-4563R)、兔抗 B 淋巴细胞瘤 2 相关 X 蛋白质(Bax) 抗体(批号: bs-0127R)、兔抗金属蛋白酶抑制剂 1(TIMP-1) 抗体(批号: bs-0415R)、兔抗基质金属蛋白酶 13(MMP-13) 抗体(批号: bs-0575R),博奥森生物技术有限公司; 基质金属蛋白酶 3(MMP-3) 抗体(Affinity 公司,批号: AF0217); M5 HiClear DL2000 DNA marker(聚合美生物科技有限公司,批号: MF025); TRIzol(Ambion 公司,批号: 15596026); E vaGreen Express 2 $\times$ qPCR(ABI 公司,批号: MasterMix-EL); 4% 多聚甲醛(成都市科隆化学品有限公司,批号: 2019121201); RIPA 裂解液(博士德生物工程有限公司,批号: AR0105); BCA 试剂盒(全式金生物技术股份有限公司,批号: DQ111-01)。

高分子绷带(泰州医疗科技有限公司,批号: 201600163,规格: 15 cm $\times$ 18 cm); 人工气候箱(上海德洋意邦仪器有限公司,型号: PRX-1250B); 高速低温离心机(美国 Sigma 公司,型号: 3-18KS); 显微镜(Nikon 公司,型号: E200); 酶标仪(型号: xMarkTM)、PCR 仪(型号: MyCycler Thermal Cycler),Bio-Rad 公司; 化学发光成像仪系统(上海勤翔科学仪器有限公司,型号: Chemiscope 3000); 电泳仪(北京六一仪器厂,型号: DYCZ-24DN); 免疫组化染色孵育盒(福州迈新生物技术开发有限公司,型号: BOX-1001); 微量分光光度计(杭州奥盛仪器有限公司,型号: Nano-100); 实时 PCR 仪(ABI 公司,型号: 7500 Fast)。

1.4 造模及分组

90 只雄性新西兰大白兔适应性饲养 1 周后,采用随机数字表法分为正常组、模型组、手法组、陈元膏组、陈元膏摩法组、扶他林组,每组 15 只。除正常组外,其余各组兔参照课题组前期研究造模方法高分子绷带屈曲位固定+薄荷油、气候箱法制备兔阳虚寒凝型 KOA 模型^[9]。具体步骤如下: 准备 12 cm $\times$ 6 cm 和 6 cm $\times$ 3 cm 的高分子绷带各 2 块,水浴加热至 70 °C,待其变软后,用镊子夹出并用纱布吸去表面水分。伸直兔左侧膝关节,取较长一块高分子绷带包绕膝关节上 1 cm 至腹股沟处,较短一块高分子绷带包绕膝关节下 1 cm 处,并留出足趾端以便观察血供情况。待高分子绷带两侧边粘连牢固后,再用剩余两块高分子绷带(长、短两块高分子绷带用法同上),将一颗长螺钉(7 cm)两头分别固定于股骨与胫骨端高分子绷带表面,使兔

膝关节呈 $(75\pm 3)^\circ$ 的夹角,并在最外层缠绕铁丝加固,以防被兔啃脱,有效制动 8 周。每日检查高分子绷带固定情况及兔造模肢体有无肿胀、发绀、充血等。制动 4 周后在此基础上,将兔放入 4°C 、无照明、湿度 40% 的人工气候箱中,模拟反复、间断性寒冷刺激的发病环境,每日 1 次。最后 2 周,取适量薄荷油外涂兔两耳背侧,每日 1 次。造模 8 周后拆除高分子绷带,各组采用随机数字表法抽取 2 只兔,空气栓塞法处死后取膝关节软骨组织进行病理形态学观察,若模型组 Mankin 软骨组织学评分显著高于正常组,差异有统计学意义,说明造模成功^[10]。

1.5 干预方法

造模成功后,正常组与模型组常规抓取、束缚,不予特殊治疗,其余四组兔定期剔除毛发,暴露左侧膝关节。手法组具体操作步骤如下:用食指、中指摩法在兔膝关节周围操作 3~5 min,以局部皮肤表面微微发热为宜;点按膝关节周围“内膝眼”“外膝眼”“曲泉”“委中”“阳陵泉”“足三里”穴,每穴约 1 min;用拇指、食指拿揉髌骨,顺膝关节两侧以双手掌根夹持做由上至下揉法,反复施术约 1 min;一手握踝关节,另一手握大腿部,屈曲左侧膝关节,然后再将下肢缓慢拉直,如此反复操作 20 次。陈元膏组每只兔取 2 g 陈元膏,均匀涂抹在以髌骨为中心的膝关节周围 $6\text{ cm}\times 4\text{ cm}$ 的区域。陈元膏摩法组均匀涂抹陈元膏后并在涂药部位行手法干预,操作手法同手法组。扶他林组每只兔以扶他林软膏在相同部位 1 g 涂抹。待药物吸收后,用无菌无纺布擦拭干净放回笼中;为确保操作手法均一性及有效性,手法操作由经专业培训的实验员进行,每日 1 次,共 6 周。

1.6 观察指标及方法

最后一次干预后次日,麻醉各组兔,耳缘静脉取血 4 ml,在 4°C 、3000 r/min 离心 10 min (离心半径为 16 cm) 后取血清, -20°C 保存;处死各组兔分别于股骨头、髌骨与股骨交界处取关节软骨、滑膜组织,一部分组织直接固定于 4% 多聚甲醛中,剩余组织立即置于液氮中速冻,保存于 -80°C ,待测。

1.6.1 组织学观察 取置于 4% 多聚甲醛中的关节软骨和滑膜组织进行石蜡包埋,制备 $5\text{ }\mu\text{m}$ 切片,苏木素-伊红染色,光镜下观察各组兔膝关节组织形态学病理变化,并根据 Mankin 软骨组织学评分^[10] 评估软骨组织病理损伤程度,1) 软骨结构:光整如常计 0 分,表面出现不规则裂隙计 1 分,裂隙深达移行层计 2 分,裂隙深达辐射层计 3 分,裂

隙深达钙化层计 4 分,软组织层脱落计 5 分;2) 软骨细胞:数量如常计 0 分,数量弥散性增多计 1 分,出现大量簇集样细胞团计 2 分,数量明显减少计 3 分,染色完全消失计 4 分;3) 基质染色:染色正常计 0 分,染色轻度减退计 1 分,染色中度减退计 2 分,染色重度减退计 3 分;4) 潮线的完整性:潮线完整计 0 分,多重潮线计 1 分,软骨下血管侵入潮线计 2 分。计算总评分,评分越高,病理损伤越严重。

1.6.2 ELISA 法检测兔血清炎症因子 IL-1 β 、IL-6、IL-10 和 TNF- α 表达 取各组兔血清样品,严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作,使用酶标仪测定各孔 450 nm 最大吸收波长的 OD 值,绘制标准曲线并计算样品中 IL-1 β 、IL-6、IL-10、TNF- α 浓度。

1.6.3 Western Blot 检测兔关节软骨组织中 Bcl-2、Bax 蛋白表达 每组采用随机数字表法选取 3 只兔关节软骨检测,使用 RIPA 裂解液提取各组兔关节软骨样本总蛋白,根据 BCA 蛋白质检测试剂盒说明书测定蛋白质浓度;通过 SDS-PAGE 电泳分离 $60\text{ }\mu\text{g}$ 蛋白质样品,转移至 PVDF 膜;随后,室温下用 5% 脱脂奶粉闭膜 1 h,加入 Bcl-2、Bax 一抗 (1:500) 孵育过夜,二抗 (1:5000) 室温下孵育 1 h 后用 TBST 冲洗;滴加 2 ml 显色液,化学发光仪显影、拍照,获取目的蛋白显色条带,以 β -actin 为内参分析各组兔软骨组织中凋亡蛋白 Bcl-2、Bax 相对表达水平。

1.6.4 免疫组化法检测兔关节软骨组织中 MMP-3、MMP-13 和 TIMP-1 蛋白表达 各组兔关节软骨组织切片置于 65°C 恒温箱中烘烤 1.5~2 h,脱蜡,水化,抗原修复;后浸入去离子水中,阻断内源性过氧化物酶, PBS 洗 3 遍,加 MMP-3 (1:120)、MMP-13 (1:200) 和 TIMP-1 (1:200) 一抗, 4°C 过夜;滴加辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:200) 室温孵育 20 min,用 DBA 显色液避光显色处理 3~10 min,中性树胶封片, 37°C 烤片过夜,在光学显微镜下观察、摄片;采用免疫组织化学评分半定量法,即染色阳性细胞比例与染色强度等级之乘积,分析各组兔关节软骨和滑膜组织中 MMP-3、MMP-13 及 TIMP-1 蛋白表达水平。

1.6.5 qRT-PCR 法检测兔关节软骨组织中 MMP-3、MMP-13、TIMP-1 mRNA 表达水平 各组兔软骨组织在液氮包围的情况下,研磨成粉,取 100 mg 加入有 1 ml TRIzol 的离心管中提取软骨组织总 RNA,经反转录实验得到 cDNA;按说明书配置体系设置

反应参数，进行荧光定量 PCR 反应；以 GAPDH 为内参基因，使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 MMP-3、MMP-13、TIMP-1 基因相对表达水平，所用引物序列见表 1。

表 1 荧光定量 mRNA 检测引物信息表

引物名称	序列 (5' to 3')	引物大小 (bp)
MMP-3	上游 GCCATCTCTCTTCAGCAGT	136
	下游 GGTGTGGATGCTTCTGGGTA	
MMP-13	上游 TCTACACCTACACCGCAAGAGTC	163
	下游 CGGAGACTGGAATGGCATCAAGG	
TIMP-1	上游 GACTTGCAGTTTCGTGGTTCC	187
	下游 GAAGCCCTTGTGAGAGCCTAG	
GAPDH	上游 AAGGCCATCACCATCTTCCAG	195
	下游 GTTCACGCCCATCACAACAT	

注：MMP-3，基质金属蛋白酶 3；MMP-13，基质金属蛋白酶 13；TIMP-1，金属蛋白酶抑制剂 1。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计描述与统计分析。并用 GraphPad prism 5.0 软件对数据分析结果进行可视化。计量资料若均符合正态性及方差齐性，以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 进行描述，多组间比较采用单因素方差分析法，组间两两比较采用 LSD 检验；若不满足正态分布，以中位数（四分位数间距）表示，采用秩和检验进行多组间比较，组间两两比较采用独立样本 KW 秩检验，均以 $P<0.05$ 视为差异有统计学意义。

2 结果

实验过程中，各组兔因腹泻、适应能力差等原因死亡 11 只，7 只左侧膝关节出现红肿化脓性感染，共脱失 18 只，最终各组均有 10 只纳入统计。

2.1 各组兔关节软骨组织及滑膜组织形态学观察结果

正常组兔关节软骨结构大体正常，细胞排列有序，基质均匀一致，软骨面较光滑。模型组软骨基质失去均质性，部分胶原纤维显现，部分区域软骨细胞崩解、消失、排列紊乱，部分软骨面糜烂、粗糙或呈裂隙样，部分软骨边缘发生骨化。与模型组比较，扶他林组病变改善不明显；手法组、陈元膏组、陈元膏摩法组软骨细胞坏死减少，排列紊乱程度减轻，软骨基质较均匀，胶原纤维减少，软骨面糜烂程度减轻；陈元膏组及陈元膏摩法组病变改善程度优于手法组。表 2 示，与正常组比较，模型组、手法组和扶他林组兔关节软骨组织 Mankin 评分显著升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，陈元膏摩法组兔关节软骨组织 Mankin 评分显著降低 ($P<$

0.05)；各干预组兔关节软骨组织 Mankin 评分组间比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

正常组兔关节滑膜组织结构正常，滑膜细胞排列整齐，由单层扁平或立方上皮构成；模型组滑膜细胞增大，层数增加，间质纤维组织增生伴部分玻璃样变性，较多慢性炎性细胞浸润，部分区域可见较多嗜酸性粒细胞浸润，部分滑膜组织增生呈绒毛-结节状；与模型组比较，手法组、陈元膏组、陈元膏摩法组、扶他林组病变情况均有所改善，滑膜细胞层数减少，间质纤维组织增生及炎性细胞浸润程度减轻；手法组与陈元膏组病变改善程度优于扶他林组和陈元膏摩法组。各组兔软骨组织及滑膜组织彩色病理图片见附图 1（请扫描本文二维码获取）。

表 2 各组兔关节软骨组织 Mankin 评分比较

[分, $M(P_{25}, P_{75})$]

分组	兔数	Mankin 评分
正常组	10	0
模型组	10	6.5 (4.0, 8.0) ^{a)}
手法组	10	3.5 (2.0, 6.0) ^{a)}
陈元膏组	10	3.0 (2.0, 4.0)
陈元膏摩法组	10	1.5 (1.0, 5.0) ^{b)}
扶他林组	10	6.0 (4.0, 7.0) ^{a)}

注：a)与正常组比较， $P<0.05$ ；b)与模型组比较， $P<0.05$ 。

2.2 各组兔血清炎性因子水平比较

表 3 示，与正常组比较，模型组兔血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平升高 ($P<0.05$)，而 IL-10 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与模型组比较，各干预组兔血清 IL-1 β 水平降低，陈元膏组 IL-6、TNF- α 水平降低，手法组、陈元膏摩法组、扶他林组 IL-10 水平升高 ($P<0.05$)。与手法组比较，陈元膏组、陈元膏摩法组、扶他林组兔血清 IL-1 β 、TNF- α 水平降低，陈元膏组 IL-6、IL-10 水平降低，陈元膏摩法组 IL-10 水平亦降低 ($P<0.05$)。与陈元膏组比较，扶他林组 IL-6、IL-10 水平升高，陈元膏摩法组 IL-10 水平亦升高 ($P<0.05$)。扶他林组和陈元膏摩法组各炎性因子水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.3 各组兔关节软骨组织中 Bcl-2、Bax 蛋白表达水平比较

表 4 示，与正常组比较，模型组软骨组织 Bcl-2 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 值降低，Bax 蛋白表达升高 ($P<0.05$)。与模型组比较，手法组、陈元膏摩法组及扶他林组 Bcl-2 蛋白表达升高，陈元膏组、陈元膏摩法组及扶他林组 Bax 蛋白表达降低，陈元膏

表3 各组兔血清 IL-1 β 、IL-6、IL-10、TNF- α 水平比较(pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

分组	兔数	IL-1 β	IL-6	IL-10	TNF- α
正常组	10	7.388 $\pm$ 1.420	30.881 $\pm$ 9.991	124.497 $\pm$ 38.797	144.918 $\pm$ 83.396
模型组	10	48.444 $\pm$ 21.640 ^{a)}	122.785 $\pm$ 46.779 ^{a)}	162.606 $\pm$ 68.025	627.923 $\pm$ 237.027 ^{a)}
手法组	10	26.463 $\pm$ 4.960 ^{b)}	127.025 $\pm$ 34.767	326.744 $\pm$ 62.200 ^{b)}	682.262 $\pm$ 147.444
陈元膏组	10	15.805 $\pm$ 3.444 ^{b) c)}	55.725 $\pm$ 21.527 ^{b) c)}	188.894 $\pm$ 56.159 ^{c)}	407.566 $\pm$ 154.973 ^{b) c)}
陈元膏摩法组	10	13.750 $\pm$ 5.491 ^{b) c)}	88.152 $\pm$ 43.928	260.616 $\pm$ 87.846 ^{b) c) d)}	508.068 $\pm$ 250.069 ^{c)}
扶他林组	10	17.544 $\pm$ 4.469 ^{b) c)}	99.019 $\pm$ 30.269 ^{d)}	274.157 $\pm$ 42.887 ^{b) d)}	471.118 $\pm$ 189.286 ^{c)}

注: IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; IL-6, 白细胞介素 6; IL-10, 白细胞介素 10; TNF- α , 肿瘤坏死因子 α 。a) 与正常组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与手法组比较, $P<0.05$; d) 与陈元膏组比较, $P<0.05$ 。

表4 各组兔关节软骨组织中 Bcl-2、Bax 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 值比较

($\bar{x}\pm s$)

分组	兔数	Bcl-2/ β -actin	Bax/ β -actin	Bcl-2/Bax 值
正常组	3	0.472 $\pm$ 0.041	0.353 $\pm$ 0.020	1.341 $\pm$ 0.175
模型组	3	0.342 $\pm$ 0.035 ^{a)}	0.691 $\pm$ 0.010 ^{a)}	0.495 $\pm$ 0.057 ^{a)}
手法组	3	0.410 $\pm$ 0.051 ^{b)}	0.661 $\pm$ 0.030	0.619 $\pm$ 0.061
陈元膏组	3	0.404 $\pm$ 0.058	0.647 $\pm$ 0.032 ^{b)}	0.623 $\pm$ 0.014
陈元膏摩法组	3	0.448 $\pm$ 0.014 ^{b)}	0.619 $\pm$ 0.016 ^{b) c)}	0.724 $\pm$ 0.018 ^{b)}
扶他林组	3	0.488 $\pm$ 0.034 ^{b) c) d)}	0.553 $\pm$ 0.019 ^{b) c) d) e)}	0.859 $\pm$ 0.292 ^{b) c) d)}

注: Bcl-2, B淋巴细胞瘤 2; Bax, B淋巴细胞瘤 2 相关 X 蛋白质。

a) 与正常组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与手法组比较, $P<0.05$; d) 与陈元膏组比较, $P<0.05$; e) 与陈元膏摩法组比较, $P<0.05$ 。

摩法组及扶他林组 Bcl-2/Bax 值升高 ($P<0.05$)。与手法组比较, 陈元膏摩法组 Bax 蛋白表达降低, 扶他林组 Bcl-2 蛋白表达、Bcl-2/Bax 值升高, Bax 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。与陈元膏组比较, 扶他林组 Bcl-2 蛋白表达、Bcl-2/Bax 值升高, Bax 蛋白表达降低 ($P<0.05$), 且扶他林组 Bax 蛋白表达低于陈元膏摩法组 ($P<0.05$)。各组兔关节软骨组织中 Bcl-2、Bax 蛋白电泳图见图 1。

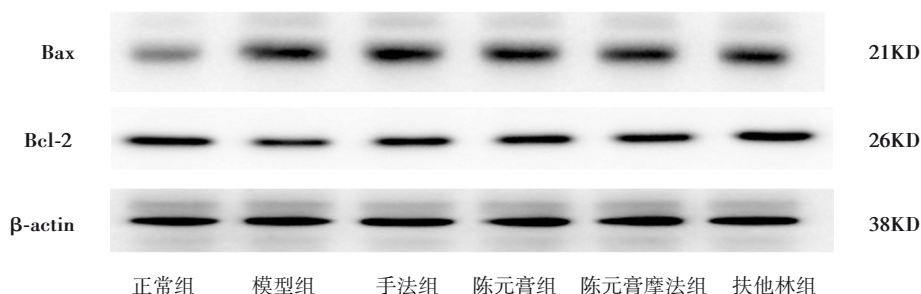
2.4 各组兔关节软骨组织中 MMP-3、MMP-13、TIMP-1 蛋白表达比较

各组兔关节软骨细胞基质中均可见 MMP-3、MMP-13、TIMP-1 蛋白强弱不同的免疫阳性反应, 阳性软骨细胞胞浆呈棕褐色, 形态多为卵圆形或不规则形, 详见附图 2 (请扫描本文二维码获取)。表 5 示, 各组兔关节软骨组织中 MMP-3 蛋白表达差

异均无统计学意义 ($P>0.05$)。与正常组比较, 模型组兔关节软骨组织中 MMP-13 蛋白表达升高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 陈元膏摩法组和扶他林组兔关节软骨组织中 MMP-13 蛋白表达降低, 陈元膏组、陈元膏摩法组和扶他林组 TIMP-1 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。与手法组比较, 陈元膏摩法组、扶他林组 MMP-13 蛋白表达均降低 ($P<0.05$)。与陈元膏组比较, 陈元膏摩法组 MMP-13 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。

2.5 各组兔关节软骨组织中 MMP-3、MMP-13、TIMP-1 mRNA 表达比较

表 6 示, 与正常组比较, 模型组兔关节软骨组织中 MMP-3、MMP-13 mRNA 表达升高, TIMP-1 mRNA 表达降低 ($P<0.05$)。与模型组比较, 各干预组兔关节软骨组织中 MMP-3、MMP-13 mRNA 表



注: Bcl-2, B淋巴细胞瘤 2; Bax, B淋巴细胞瘤 2 相关 X 蛋白质。

图1 各组兔关节软骨组织中 Bcl-2、Bax 蛋白电泳图

表5 各组兔关节软骨组织中MMP-3、MMP-13、TIMP-1
蛋白免疫组化半定量结果比较 (x̄±s)

分组	兔数	MMP-3	MMP-13	TIMP-1
正常组	10	1.300±0.949	3.300±1.494	1.600±1.578
模型组	10	1.500±0.972	5.600±2.591 ^{a)}	1.400±0.516
手法组	10	1.750±1.389	6.750±2.121	1.250±0.707
陈元膏组	10	1.154±0.376	4.769±3.745	1.000±0.000 ^{b)}
陈元膏摩法组	10	1.000±0.000	1.875±1.808 ^{b)c)d)}	1.000±0.000 ^{b)}
扶他林组	10	1.300±0.949	2.900±2.079 ^{b)c)}	0.900±0.316 ^{b)}

注：MMP-3，基质金属蛋白酶3；MMP-13，基质金属蛋白酶13；TIMP-1，金属蛋白酶抑制剂1。
a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与手法组比较， $P<0.05$ ；d) 与陈元膏组相较， $P<0.05$ 。

达降低，TIMP-1 mRNA 表达升高 ($P<0.05$)。陈元膏组、扶他林组 MMP-13 mRNA 表达均低于手法组 ($P<0.05$)，扶他林组 MMP-13 mRNA 表达低于陈元膏摩法组 ($P<0.05$)。各干预组 MMP-3、TIMP-1 mRNA 表达组间比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

表6 各组兔关节软骨组织中MMP-3、MMP-13、
TIMP-1 mRNA 比较 (2^{-ΔΔCt}，x̄±s)

分组	兔数	MMP-3	MMP-13	TIMP-1
正常组	10	0.837±0.154	0.790±0.176	1.240±0.290
模型组	10	1.432±0.369 ^{a)}	1.277±0.350 ^{a)}	0.689±0.162 ^{a)}
手法组	10	0.958±0.165 ^{b)}	0.948±0.204 ^{b)}	1.073±0.242 ^{b)}
陈元膏组	10	0.824±0.214 ^{b)}	0.704±0.244 ^{b)c)}	1.172±0.215 ^{b)}
陈元膏摩法组	10	0.940±0.231 ^{b)}	0.904±0.216 ^{b)}	1.146±0.327 ^{b)}
扶他林组	10	0.771±0.165 ^{b)}	0.673±0.171 ^{b)c)d)}	1.060±0.294 ^{b)}

注：MMP-3，基质金属蛋白酶3；MMP-13，基质金属蛋白酶13；TIMP-1，金属蛋白酶抑制剂1。
a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与手法组比较， $P<0.05$ ；d) 与陈元膏摩法组比较， $P<0.05$ 。

3 讨论

陈元膏摩法是集药物疗法、推拿疗法、药物透皮吸收、物理刺激等于一体的一种具有显著特色的中医外治法。陈元膏方中诸药以辛温为主，契合阳虚寒凝型KOA风寒湿邪瘀阻经络的病机，配合摩擦类、运动关节类等推拿手法，共奏温经通络、祛风散寒、蠲痹扶阳之功。陈元膏中君药当归主要活性成分阿魏酸钠通过抑制肿瘤坏死因子(TNF)/肿瘤坏死因子受体信号转导途径(TNRF)减少炎症及软骨细胞凋亡^[11]；维吾尔医学认为，苏仁江属性为二级干、三级热，具有消炎止痛、祛寒助阳的功效^[12]；黑顺片温阳逐寒、通血脉；细辛、干姜、白芷辛温通络，散寒止痛。前期临床研究^[6,13]表明，陈元膏摩法可显著改善KOA患者的临床症状

及关节功能，并具有较好的即时止痛作用。

已知各种炎症和免疫过程与KOA发病、进展密切相关，IL-1β和TNF-α是参与KOA发生发展的主要促炎细胞因子，IL-1β通过自分泌或旁分泌的方式激活多种信号级联，刺激不同的分解代谢途径，增加软骨细胞和成纤维样滑膜细胞基质中MMPs含量，并与其相应的受体结合，介导促炎因子IL-6的释放^[14-15]，而IL-10经负反馈效应抑制促炎因子分泌^[16]。本实验结果表明，与正常组比较，IL-1β、TNF-α、IL-6在模型组兔血清中表达量均发生了显著变化，部分滑膜组织区域可见炎性细胞、嗜酸性粒细胞浸润，提示阳虚寒凝型膝痹的病变过程与此三种促炎因子具有一定相关性。陈元膏摩法干预后，滑膜间质纤维组织增生及炎性细胞浸润程度减轻，血清中IL-1β、TNF-α水平较模型组和手法组均明显降低，表明陈元膏摩法可有效调控促炎细胞因子IL-1β、TNF-α，且与单纯的推拿手法相比，具有一定的优越性。本研究选用临床常用的外用消炎镇痛药物扶他林软膏作为阳性对照药，结果显示，陈元膏摩法组各炎性因子水平与扶他林组相比差异无统计学意义，提示陈元膏摩法可发挥与扶他林软膏相似的抗炎作用。

在KOA早期阶段，关节软骨细胞分泌过量MMPs，打破ECM代谢动态平衡，分解代谢活性的增加抑制软骨的自我修复，最终导致软骨失去其正常厚度和表面弹性、纤维化及退化^[17]。MMP-13是软骨降解网络的中心节点，其活性受到金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPs)的调节^[18]。TIMPs同激活的MMPs同比例结合而抑制MMPs过量表达，使ECM代谢转化维持正常状态^[19]。既往研究^[20]表明，基质金属蛋白酶特别是MMP-3、MMP-13水平与软骨降解严重程度呈正比。本研究结果显示，阳虚寒凝型KOA模型组兔关节软骨组织中MMP-3、MMP-13 mRNA 表达量升高，TIMP-1 mRNA 表达量显著降低；组织病理学分析显示，模型组兔软骨基质失去均质性，部分胶原纤维显现，软骨面糜烂，Mankin评分较正常组升高。经陈元膏摩法干预后，与模型组比较，兔关节软骨损伤程度减轻、Mankin评分降低，软骨组织中MMP-3、MMP-13 mRNA 水平显著降低、TIMP-1 mRNA 水平显著增高。采用免疫组化法分析，在蛋白水平上也表明陈元膏摩法对软骨组织中MMP-13水平具有良性调节作用，提示陈元膏摩法可能通过有效地恢复ECM组成和结构，从而减缓阳虚寒凝型KOA的进展。

锚定依赖现象表明，细胞-基质的相互作用对

软骨细胞的存活至关重要^[21]。当 ECM 因机械负荷或分子代谢失衡而受损时, 软骨细胞可能发生凋亡, 扰乱纤维-细胞-基质网络稳定性, 加剧现有软骨基质的破坏^[22]。Bcl-2 家族成员通过调节线粒体外膜通透性和细胞色素 C 释放的抗凋亡蛋白家族调控细胞凋亡信号^[23]。Bax 是 Bcl-2 家族中的促凋亡成员, Bcl-2 与 Bax 的比率可用于评价细胞凋亡情况^[24]。本研究结果表明, 陈元膏摩法可减少软骨细胞坏死, 显著上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达, 下调促凋亡蛋白 Bax 表达, 提高 Bcl-2/Bax 值, 提示陈元膏摩法可能通过调控 Bcl-2、Bax 蛋白表达, 抑制软骨细胞损伤, 发挥其抗凋亡效应。

综上所述, 陈元膏摩法可在一定程度上改善关节软骨、滑膜病理组织形态学, 其机制可能与调控炎症因子, 抑制参与软骨细胞外基质动态平衡紊乱的分解代谢因子表达和软骨细胞过度凋亡有关, 在抗炎、抗软骨基质降解及软骨细胞凋亡方面发挥协同作用。然而, 软骨基质降解及软骨细胞凋亡是一种受多种信号转导通路调控的复杂病理过程, 陈元膏摩法通过何种信号通路对 KOA 进行调控是本课题组后续研究重点关注的方向。

参考文献

- [1] WALLACE IJ, WORTHINGTON S, FELSON DT, et al. Knee osteoarthritis has doubled in prevalence since the mid-20th century [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(35):9332-9336.
- [22] ZENG CY, ZHANG ZR, TANG ZM, et al. Benefits and mechanisms of exercise training for knee osteoarthritis [J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 794062. doi: 10.3389/fphys.2021.794062.
- [3] JENEI-LANZL Z, MEURER A, ZAUCKE F. Interleukin-1 β signaling in osteoarthritis-chondrocytes in focus [J]. *Cell Signal*, 2018, 53: 212-223. doi: 10.1016/j.cell-sig.2018.10.005.
- [4] 刘俊昌, 刘俊瑞, 张超凡, 等. 陈元膏膏摩对 KOA 大鼠血清 NO 和 PGE-2 及下肢功能的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(19): 129-132.
- [5] 刘俊昌, 木合塔尔·阿尤甫, 王新军, 等. 新疆北疆牧区维吾尔族、哈萨克族及汉族 KOA 人群的中医体质特点调查 [J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(11): 4157-4160.
- [6] 刘俊昌, 李媛媛, 黄银僊, 等. 陈元膏膏摩治疗膝骨性关节炎 60 例临床研究 [J]. *吉林中医药*, 2013, 33(6): 623-624.
- [7] 中国国家标准化管理委员会. 实验动物福利审查指南 [S]. 北京: 全国实验动物标准化技术委员会, 2018: 6-7.
- [8] 徐淑云. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 203.
- [9] 郭蕾, 张赫, 刘俊昌, 等. 薄荷油叠加气候箱建立阳虚寒凝型膝痹模型兔 [J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(23): 3696-3701.
- [10] MANKIN HJ, JOHNSON ME, LIPPIELLO L. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. III. Distribution and metabolism of amino sugar-containing macromolecules [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 1981, 63(1): 131-139.
- [11] 宋学文, 谢兴文, 黄晋, 等. 当归及其提取物对骨性关节炎的作用机制 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(98): 238-240.
- [12] 徐芳, 何江, 陈燕, 等. 维药秋水仙与其误用品新疆贝母的鉴别研究 [J]. *中药材*, 2010, 33(02): 205-207.
- [13] 买合热衣·亚迪. 陈元膏摩疗法治疗瘀血闭阻型膝痹即时止痛作用的观察 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2021.
- [14] ZACHARJASZ J, MLECZKO AM, BAKOWSKI P, et al. Small noncoding RNAs in knee osteoarthritis: the role of microRNAs and tRNA-derived fragments [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 5711.
- [15] FEI J, LIANG B, JIANG C, et al. Luteolin inhibits IL-1 β -induced inflammation in rat chondrocytes and attenuates osteoarthritis progression in a rat model [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 1586-1592. doi: 10.1016/j.biopha.2018.09.161.
- [16] BARKER T, ROGERS VE, HENRIKSEN VT, et al. Circulating IL-10 is compromised in patients predisposed to developing and in patients with severe knee osteoarthritis [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 1812.
- [17] TRACHANA V, MOURMOURA E, PAPATHANASIOU I, et al. Understanding the role of chondrocytes in osteoarthritis: utilizing proteomics [J]. *Expert Rev Proteomics*, 2019, 16(3): 201-213.
- [18] LI H, WANG D, YUAN Y, et al. New insights on the MMP-13 regulatory network in the pathogenesis of early osteoarthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2017, 19(1): 248.
- [19] PRIMORAC D, MOLNAR V, ROD E, et al. Knee osteoarthritis: a review of pathogenesis and state-of-the-art non-operative therapeutic considerations [J]. *Genes*, 2020, 11(8): 854.
- [20] GUILAK F, NIMS RJ, DICKS A, et al. Osteoarthritis as a disease of the cartilage pericellular matrix [J]. *Matrix Biol*, 2018, 71-72: 40-50. doi: 10.1016/j.matbio.2018.05.008.
- [21] ZAMLI Z, SHARIF M. Chondrocyte apoptosis: a cause or consequence of osteoarthritis? [J]. *Int J Rheum Dis*, 2011, 14(2): 159-166.
- [22] GRASSEL S, ZAUCKE F, MADRY H. Osteoarthritis: novel molecular mechanisms increase our understanding of the disease pathology [J]. *J Clin Med*, 2021, 10(9):

1938. (1):128.
- [23] BANJARA S, SURaweera CD, HINDS MG, et al. The Bcl-2 family: ancient origins, conserved structures, and divergent mechanisms [J]. Biomolecules, 2020, 10 (11):26035-26054.

Effects of Tuina plus *Chenyuangao* (陈元膏) on the Apoptosis, Matrix Metalloproteinases and Serum Inflammatory Factors in Knee Osteoarthritis Model Rabbit with Yang Deficiency and Congealing Cold Syndrome

AIKEBAIER Gulaisaer¹, LIU Junchang^{1,2}, WANG Yifeng³, YADI Maihereyi⁴, HE Jing⁵, LU Xusheng¹, ZHANG Xiaoting¹, GUO Lei²

1. Xinjiang Medical University, Urumqi, 830017; 2. Xinjiang Medical University Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine; 3. Branch of Urumqi First People's Hospital; 4. Hami Central Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University; 5. Yili Friendship Hospital

ABSTRACT Objective To observe the effect of tuina plus *Chenyuangao* (陈元膏) in the treatment of knee osteoarthritis (KOA) with yang deficiency and congealing cold syndrome, and to explore its potential mechanism. **Methods** Sixty New Zealand white rabbits were randomly divided into six groups, namely the normal group, model group, tuina group, *Chenyuangao* group, tuina plus *Chenyuangao* group and voltaren group, with ten rabbits per group. The model group and all intervention groups were treated by polymer bandage fixation at flexion angle combined with peppermint oil and climate box to establish rabbit model of KOA with yang deficiency and congealing cold syndrome. After eight weeks of modeling, the normal group and the model group were given no intervention. Tuina group was administered with tuina manipulation only, and *Chenyuangao* group was applied with ointment only, while tuina plus *Chenyuangao* group performed tuina based on the ointment *Chenyuangao*. The voltaren group was treated with voltaren ointment. Treatment was given once a day for 6 weeks. On the second day after the last intervention, samples were collected. Using HE staining to observe histopathological changes of cartilage and synovial membrane microscope, and the pathological Mankin score of the sections was assessed. Serum levels of inflammatory factors interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10) and tumor necrosis factor α (TNF- α) were detected by ELISA. Western Blot was used to detect the levels of B-lymphoma 2 (Bcl-2) and B-lymphoma 2-associated X protein (Bax). The protein and mRNA expression levels of metalloproteinase inhibitor 1 (TIMP-1), matrix metalloproteinase 13 (MMP-13) and matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) in articular cartilage tissue were determined by immunohistochemistry and qRT-PCR. **Results** The pathological results showed that the articular chondrocytes of the rabbits in the normal group were arranged in an orderly manner, and the matrix was uniform, with normal synovial tissue structure and neatly arranged synovial cells. In the model group, the cartilage matrix lost its homogeneity, and the chondrocytes disintegrated, disappeared and disordered in certain areas, with increased synovial cells and number of layers, interstitial fibrous tissue proliferated with partial hyaline degeneration, and more chronic inflammatory cells infiltrated. The injury of cartilage cells in the tuina group, the *Chenyuangao* group and tuina plus *Chenyuangao* group were improved to varied degrees, and more changes were seen in the latter two groups. The model group had higher articular cartilage tissue Mankin score, higher levels of IL-1 β , TNF- α , and IL-6, lower expression of Bcl-2 protein and Bcl-2/Bax value in the cartilage tissue, higher protein expressions of Bax and MMP-13, higher mRNA expressions of MMP-3 and MMP-13, and lower mRNA expression of TIMP-1 than the normal group ($P<0.05$). Compared to those in the model group, the Mankin score in the tuina plus *Chenyuangao* group significantly decreased; the serum IL-1 β level and mRNA levels of MMP-3 and MMP-13 in cartilage tissue in other intervention groups significantly decreased, while the mRNA level of TIMP-1 increased; the IL-10 level, the expression of Bcl-2 protein and the Bcl-2/Bax value in the tuina plus *Chenyuangao* group and the voltaren group significantly increased, while the protein expression of Bax, MMP-13 and TIMP-1 decreased ($P<0.05$). Compared to those in the voltaren group, the Mankin score in the tuina plus *Chenyuangao* group was reduced, while the expressions of Bax protein and MMP-13 mRNA increased ($P<0.05$), and there was no significant difference between groups in the levels of inflammatory factors ($P>0.05$). **Conclusion** Tuina plus *Chenyuangao* can improve the histopathology of cartilage and synovial membrane, and has the functions of anti-inflammatory, anti-cartilage matrix degradation and anti-chondrocyte apoptosis, thereby reducing the damage of articular cartilage and delaying the progression of KOA with yang deficiency and congealing cold syndrome.

Keywords knee osteoarthritis; yang deficiency and congealing cold; *Chenyuangao* (陈元膏); tuina; inflammatory factors; matrix metalloproteinase; apoptosis

(收稿日期: 2022-04-22; 修回日期: 2022-06-28)

[编辑: 邓媛]