

· 论 著 ·

独活寄生汤对脂多糖诱导的大鼠软骨细胞炎症模型 IL-1 β 、TNF- α 表达的影响

陈后煌¹ 邵翔¹ 叶蕪芝^{1,2} 李西海¹

【摘要】 目的 观察独活寄生汤水提物对体外培养的炎症模型大鼠软骨细胞 IL-1 β 和 TNF- α 的影响。方法 采用4周龄SD大鼠分离培养体外软骨细胞, II型胶原免疫组织化学染色法对第二代软骨细胞进行鉴定。脂多糖诱导软骨细胞, 建立软骨细胞的炎症模型, 确定最佳干预浓度和时间; 模型复制成功后, 随机分为空白对照组(脂多糖浓度为0 ng/ml)、模型组(脂多糖浓度为10 ng/ml)和独活寄生汤组, 分别干预软骨细胞, elisa法检测各组细胞上清液中白细胞介素1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的表达变化。结果 造模实验中, 各组干预8 h后, 脂多糖浓度为10 ng/ml、100 ng/ml、1 000 ng/ml、2 000 ng/ml时, 细胞上清液中 IL-1 β 和 TNF- α 表达高于空白对照组。脂多糖浓度为10 ng/ml时, IL-1 β 和 TNF- α 表达高于100 ng/ml、1 000 ng/ml、2 000 ng/ml, 差异具有统计学意义($P < 0.01$); 10 ng/ml 脂多糖分别干预软骨细胞4 h, 8 h, 12 h和24 h, 细胞上清液中 IL-1 β ($t = -30.869$, $t = -8.422$, $t = -13.999$, $t = -19.532$, $P < 0.05$)和 TNF- α ($t = -9.441$, $t = -14.053$, $t = -4.238$, $t = -4.124$, $P < 0.05$)的表达均高于空白对照组, 且干预8 h时细胞上清液中 IL-1 β ($F = 21.48$, $P < 0.01$)和 TNF- α ($F = 104.15$, $P < 0.01$)的表达高于4 h, 12 h和24 h。独活寄生汤组应用独活寄生汤干预8 h造模细胞后, 独活寄生汤浓度为100 μ g/ml、200 μ g/ml、300 μ g/ml时, 细胞上清液中 IL-1 β 和 TNF- α 的表达均低于空白对照组, 差异具有统计学意义($F = 323.95$, $F = 2789.80$, $P < 0.01$), 浓度300 μ g/ml时 IL-1 β 和 TNF- α 表达低于100 μ g/ml和200 μ g/ml时, 差异具有统计学意义($F = 34.46$, $F = 4.373$, $P < 0.01$)。结论 脂多糖浓度为10 ng/ml时, 可成功建立体外软骨细胞炎症模型, 独活寄生汤浓度为300 μ g/ml时可有效抑制软骨细胞炎症模型 IL-1 β 、TNF- α 的表达。

【关键词】 骨关节炎; 软骨细胞; 脂多糖; 白细胞介素1 β ; 肿瘤坏死因子 α

Effects of DuhuoJisheng decoction on the expression of IL-1 β and TNF- α of inflammatory Chondrocytes
Chen Houhuang¹, Shao Xiang¹, Ye Hongzhi², Li Xihai¹. ¹Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; ²Fujian Province Key Laboratory of Integrative age-related diseases, Fuzhou 350122, China

Correspondence: Li Xihai, Email: lixihai79dahai@163.com

【Abstract】 Objective To observe the efficacy of Duhuo Jisheng decoction (DHJSD) on the expression of IL-1 β and TNF- α in lipopolysaccharide (LPS)-treated Chondrocytes in vitro. **Methods** Chondrocytes was isolated from 4-week Sprague-Dawley rats and cells were cultured in vitro. The second generation of chondrocytes were identified with Type II collagen immunohistochemical staining. Chondrocytes were incubated with different concentrations of LPS in different time intervals to establish the optimal inflammatory model. Once it was duplicated successfully, three series groups were randomly divided into blank control group (0 ng/ml LPS), model group (10 ng/ml LPS) and DHJSD group to compare the expression levels of IL-1 β and TNF- α using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** In the modeling experiment, each group were initially intervened with different concentrations of LPS (100, 200, 300 μ g/ml) for 8 h. Expression of IL-1 beta and TNF- alpha were detected and higher expression level were observed compare to the blank control group and chondrocytes intervened with 10 ng/ml LPS for 4 h, 8 h, 12

DOI: 10.3877/cma.j.issn.2096-0263.2017.02.003

基金项目: 国家自然科学基金(81573998); 福建省卫生系统中青年骨干人才培养项目(2014-ZQN-JC-29); 福建中医药大学校管课题-科研创新平台专项(X2015021-平台)

作者单位: 350122 福建中医药大学中西医结合研究院¹; 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室²

通讯作者: 李西海, Email: lixihai79dahai@163.com

h and 24 h, the expression of supernatant IL-1 beta ($P<0.01$) and TNF- alpha ($P<0.01$) were all higher than the blank control group, the highest expression level occurred at 8 h after intervention ($P<0.01$). In the DHJSD group, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ and 300 $\mu\text{g/ml}$ DHJSD were used to intervene chondrocytes for 8 h, the expression of supernatant IL-1 beta ($t=-30.869$, $t=-8.422$, $t=-13.999$, $t=-19.532$, $P<0.01$) and TNF- alpha ($t=-9.441$, $t=-14.053$, $t=-4.238$, $t=-4.124$, $P<0.05$) were lower than the blank control group, difference was statistically significant. The expression of supernatant IL-1 beta ($F=21.48$, $P<0.01$) and TNF- alpha ($F=104.15$, $P<0.01$) were higher than 4 h, 12 h and 24 h compared to 8 h. And the expression of IL-1 beta ($F=34.46$, $P<0.01$) and TNF- alpha ($F=4.373$, $P<0.05$) at 300 $\mu\text{g/ml}$ DHJSD was lower than 100 $\mu\text{g/ml}$ and 200 $\mu\text{g/ml}$ ($P<0.01$). **Conclusion** Chondrocyte inflammatory model can establish successfully with 10 ng/mL LPS, and DHJSD can effectively reduce the expression of IL-1 β and TNF- α at 300 $\mu\text{g/ml}$.

【Key words】 Osteoarthritis; Chondrocytes; Lipopolysaccharides; Interleukin- 1beta; Tumor necrosis factor-alpha

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是以软骨退变、骨赘形成以及软骨下骨重建失衡为主要特征的慢性骨关节疾病,病情反复,缠绵难愈,其发病机制尚未完全阐明,但已有研究表明,炎症因子是诱导骨关节炎软骨退变的重要因素^[1-2]。软骨细胞作为软骨中的唯一细胞类型,分散于细胞外基质中,具有维持软骨结构完整性以及软骨负重功能的作用^[3],体内和体外实验证实了白细胞介素 1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)与OA软骨细胞的密切关系^[4-5]。目前国内外多项研究采用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导体外软骨细胞炎症模型,因其具有成本低,造模稳定,成模率高等特点^[6-9]。传统观念认为关节软骨的退变没有炎症因子参与,但近年来的研究表明,代谢性炎症在骨关节炎软骨退变的发生发展中起重要作用^[10]。如果可以找到抑制骨关节炎中炎症因子表达的途径,保护软骨细胞免受炎症因子的刺激,将对治疗骨关节炎有重要意义。

独活寄生汤具有补肝肾、养气血及通络止痛的功效,是治疗肝肾亏虚型骨关节炎的经典方药。有研究表明,独活寄生汤能够延缓软骨退变,抑制软骨细胞的凋亡途径^[11-12]。本研究拟采用不同浓度 LPS 诱导软骨细胞,建立体外软骨细胞炎症模型,通过观察独活寄生汤水提物对软骨细胞表达 IL-1 β 和 TNF- α 的影响,目的在于:(1)明确体外软骨细胞炎症模型的造模方式;(2)探讨独活寄生汤防治骨关节炎的作用机制;(3)为进一步从相关信号通路及基因层面对骨关节炎的深入研究提供理论依据^[13]。

材料与方法

一、实验动物

清洁级,4周龄雄性SD大鼠,体重(200 \pm 10)g,

购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[合格证号:SCXK(沪)2012-0001]。处理实验动物依据《关于善待实验动物的指导性意见》(中华人民共和国科学技术部颁发)。

二、实验药物

LPS的配制:购自美国sigma公司,加入磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)配成10 $\mu\text{g/ml}$ 母液,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

独活寄生汤的提取:独活9 g、桑寄生、茯苓、细辛、肉桂心、防风、川芎、当归、牛膝、秦艽、人参、白芍、熟地黄、杜仲、甘草各6 g,购自福建中医药大学承创堂河洛中医馆,水回流提取2次,每次2 h,合并提取液,离心、抽滤,浓缩成浸膏,60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴蒸干至恒重,取浸膏100 mg,加入PBS 10 ml超声充分溶解,0.22 μm 无菌微孔滤膜过滤,配成10 mg/ml独活寄生汤水提物储存液,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

三、实验方法

(一)软骨细胞的分离、培养

SD大鼠5只脱颈处死,75%酒精浸泡5 min,无菌条件下分离双膝关节,切取关节表面的软骨,不要误带软骨下骨和骨膜,一般以不渗血为度。切取软骨,置入无菌培养皿,用含双抗的PBS液冲洗关节软骨3次,冲洗后加入2.5 g/L的胰蛋白酶,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱消化30 min,终止消化。置入盛有0.2% II型胶原酶的培养皿,放于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中,每45 min取上清,用200目滤网过滤,收集滤液,1 000 r/min离心5 min,收集软骨细胞,并换消化液继续进行消化,重复4次。用低糖完全培养液(含10%胎牛血清、维生素C 50 mg/L、青霉素100 U/ml、链霉素100 $\mu\text{g/ml}$)重悬软骨细胞的沉淀,血球计数板计数后,调整软骨细胞悬液浓度为(2~3) $\times 10^5/\text{ml}$,接种于培养瓶,置

于CO₂培养箱中培养(温度37℃,饱和湿度,体积分数5% CO₂)48 h后首次换液,以后每2 d更换培养液1次,倒置显微镜下观察软骨细胞长满至80%后传代培养,此为原代软骨细胞,待细胞长满至培养瓶底90%左右时,可再次传代培养^[14]。

(二)Ⅱ型胶原免疫组织化学染色鉴定软骨细胞

第2代软骨细胞,室温爬片15 min,培养72 h后,4%多聚甲醛固定30 min, PBS洗3次,0.5% Triton-100处理15 min, PBS洗3次,3% H₂O₂处理15 min, PBS洗3次,山羊血清封闭60 min,吸干封闭液,一抗Collagen Ⅱ(1:200)孵育,阴性对照PBS代替,4℃过夜。PBS洗3次,二抗室温孵育1 h, PBS洗3次, DAB显色液(北京中杉公司)显色10 min后自来水漂洗,晾干,中性树脂封片,光学显微镜观察软骨细胞。

(三)LPS诱导软骨细胞炎症模型

取第1代大鼠软骨细胞消化制备细胞悬液,以 1×10^5 /ml的密度接种于6孔板内,每孔加入含10%胎牛血清的培养基2 ml,每组设3个复孔。软骨细胞在培养24 h后弃培养基, PBS清洗,更换含LPS终浓度为0 ng/ml、10 ng/ml、100 ng/ml、1 000 ng/ml、2 000 ng/ml的培养基,分别干预8 h, elisa法检测各组上清液中IL-1 β 和TNF- α 的表达,确立最佳干预浓度; LPS终浓度为10 ng/ml的培养基,分别干预4 h, 8 h, 12 h和24 h, Elisa法检测各组上清液中IL-1 β 和TNF- α 的表达,确立最佳干预时间。LPS干预浓度及时间参照国内外研究结果,本实验LPS终浓度及干预时间由本课题组前期实验确立^[15-16]。

(四)独活寄生汤水提物对大鼠软骨细胞炎症模型IL-1 β 、TNF- α 的影响

第2代软骨细胞以 1×10^5 /ml的密度接种于6孔板内,培养24 h后弃培养基, PBS清洗,将细胞分为空白对照组、模型组和独活寄生汤组,空白对照组加入正常培养液,模型组加入含LPS终浓度为10 ng/ml的培养液,独活寄生汤组加入含LPS终浓度为10 ng/ml,独活寄生汤终浓度分别为100 μ g/ml, 200 μ g/ml, 300 μ g/ml的培养液,作用8 h后,取细胞上清液, elisa法检测各组上清液中IL-1 β 和TNF- α 的表达。独活寄生汤终浓度参照本课题组的前期研究^[11-12]。

四、统计方法

采用SPSS 20.0(IBM,美国)软件处理数据,文内数据经采用Kolmogorov-Smirnov检验,均符合正

态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示, IL-1 β 和TNF- α 表达量的比较采用方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 α 值取双侧0.05。

结 果

一、软骨细胞形态学观察

原代软骨细胞悬浮于培养液,呈小圆形,24 h软骨细胞开始贴壁,伸展形成伪足,胞核位于胞体中央,呈椭圆形或圆形(图1)。早期软骨细胞多呈多角形或三角形,1~3个核仁为大小和致密程度不等;随着培养,软骨细胞逐渐增大,胞核与核仁也逐渐清晰(图2,3)。第1代软骨细胞,以圆形或椭圆形为主,培养3 d可见细胞融合,出现成簇生长现象,培养6 d细胞平铺呈“铺路石”样(图4)。第2代软骨细胞增殖速度较快,形态结构一致,呈星形、多边形,胞浆丰富,胞核清晰,可见1~2个核仁,逐渐融合为单层,呈不规则“铺路石”样(图5)。第3代软骨细胞增殖速度相对减慢,多出现脂肪粒样“老化”现象(图6)。

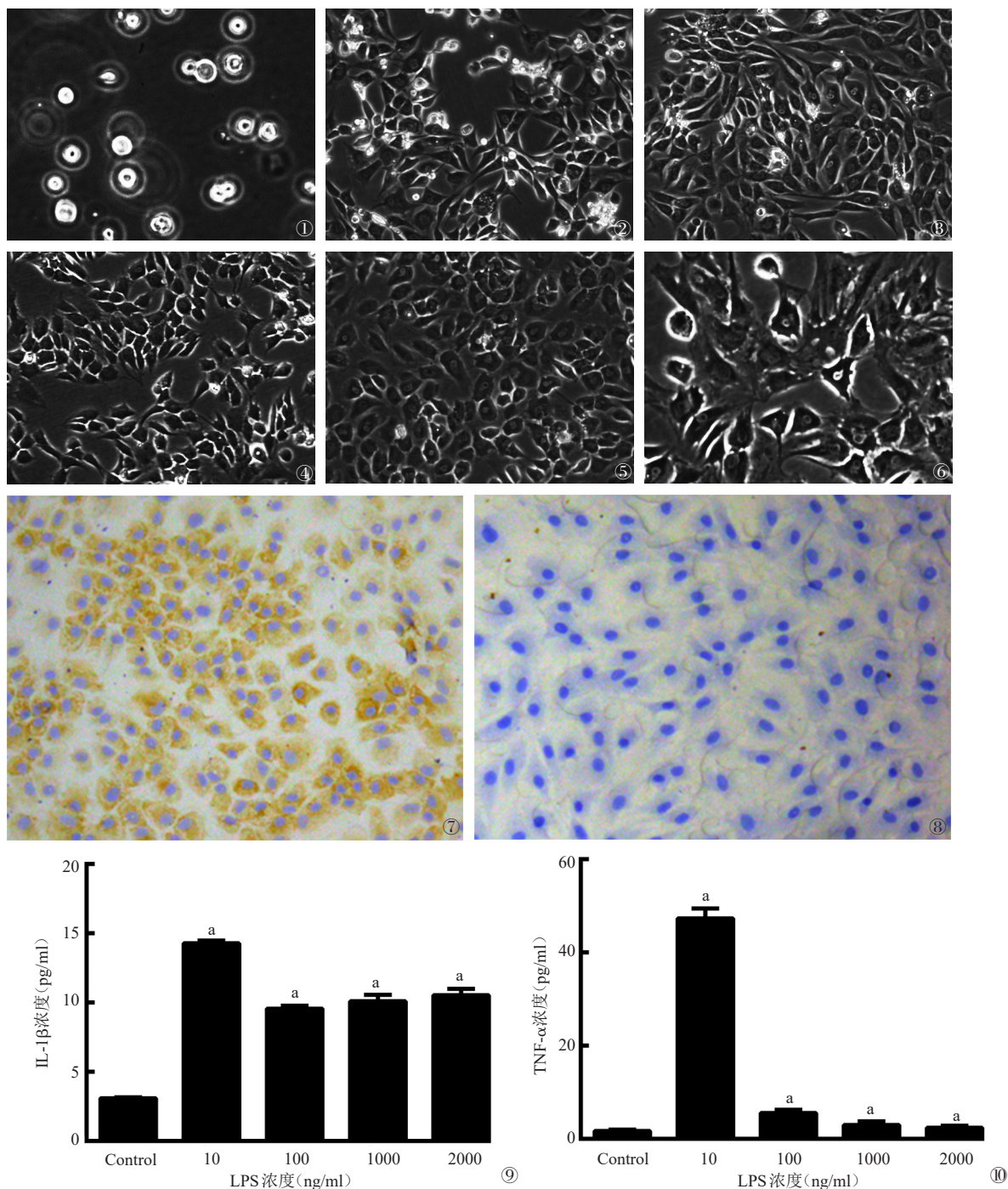
二、软骨细胞的Ⅱ型胶原免疫组化鉴定

Ⅱ型胶原免疫组化染色可见阳性细胞的胞浆呈棕黄色(图7),未见棕黄色为阴性细胞(图8)。

三、LPS诱导软骨细胞炎症的检测

诱导炎症模型实验中,各组干预8 h时, LPS浓度10 ng/ml、100 ng/ml、1 000 ng/ml、2 000 ng/ml细胞上清液中IL-1 β 分别为 (14.61 ± 0.46) pg/ml、 (9.93 ± 0.54) pg/ml、 (10.91 ± 1.15) pg/ml、 (11.34 ± 1.15) pg/ml和TNF- α 分别为 (47.31 ± 3.68) pg/ml、 (5.572 ± 1.23) pg/ml、 (2.98 ± 1.37) pg/ml、 (2.41 ± 0.77) pg/ml的表达高于0 ng/ml,差异具有统计学意义 $[t=-88.74, t=-44.11, t=-17.15, t=-18.21$ (IL-1 β); $t=-18.91, t=-6.21, t=-1.30, t=-1.06$, (TNF- α), $P<0.01]$,且LPS浓度为10 ng/ml时, IL-1 β 和TNF- α 高于100 ng/ml、1 000 ng/ml、2000 ng/ml,差异具有统计学意义 $[t=152.85, t=14.85, t=13.31$ (IL-1 β), $P<0.05$; $t=16.35, t=23.84, t=23.15$ (TNF- α), $P<0.01]$,见表1及图9~10。

脂多糖10 ng/ml分别干预软骨细胞4 h, 8 h, 12 h和24 h,细胞上清液中IL-1 β 分别为 (11.15 ± 0.52) pg/ml、 (14.28 ± 0.33) pg/ml、 (10.75 ± 0.60) pg/ml、 (11.48 ± 0.84) pg/ml和TNF- α 分别为 (13.70 ± 1.92) pg/ml、 (53.16 ± 5.51) pg/ml、 (9.40 ± 1.39) pg/ml、 (5.78 ± 1.08) pg/ml,脂多糖0 ng/ml分别干预软骨细胞4 h, 8 h, 12 h和24 h,细胞上清液中IL-1 β 分别为 $(3.58 \pm$



注: Control 为空白对照组; 与空白对照组相比, a 表示 $P < 0.01$

图1~6 软骨细胞的形态观察($\times 200$)。图1 原代软骨细胞,体外培养1 d,悬浮于培养液,呈小圆形,24 h 软骨细胞开始贴壁,伸展形成伪足,胞核位于胞体中央,呈椭圆形或圆形;图2 原代软骨细胞,体外培养3 d,软骨细胞多呈多角形或三角形,1~3个核仁为大小和致密程度不等;图3 原代软骨细胞,体外培养5 d,随着培养,软骨细胞逐渐增大,胞核与核仁也逐渐清晰;图4 第1代软骨细胞,体外培养3 d,以圆形或椭圆形为主,培养3 d 可见细胞融合,出现成簇生长现象,培养6 d细胞平铺呈“铺路石”样;图5 第2代软骨细胞,体外培养3 d,增殖速度较快,形态结构一致,呈星形、多边形,胞浆丰富,胞核清晰,可见1~2个核仁,逐渐融合为单层,呈不规则“铺路石”样;图6 第3代软骨细胞,体外培养3 d,增殖速度相对减慢,多出现脂肪粒样“老化”现象 图7~8 软骨细胞Ⅱ型胶原免疫组化鉴定($\times 200$)。图7 第2代软骨细胞培养3天,Ⅱ型胶原免疫组化染色可见阳性细胞的胞浆呈棕黄色,为阳性细胞;图8 阴性对照组,软骨细胞胞浆未见棕黄色 图9~10 不同浓度LPS对体外软骨细胞炎症模型IL-1 β 和TNF- α 表达的影响。图9 不同浓度LPS干预软骨细胞8 h后细胞上清液IL-1 β 的表达量;图10 不同浓度LPS干预软骨细胞8 h后细胞上清液TNF- α 的表达量

表1 LPS诱导软骨细胞8 h,细胞上清液IL-1 β 和TNF- α 的表达量

组别	炎症因子表达量(ng/ml, $\bar{x} \pm s$)	
	IL-1 β	TNF- α
Control	3.20 \pm 0.15	1.73 \pm 0.50
LPS10 ng/ml	14.61 \pm 0.46 ^a	47.31 \pm 3.68 ^a
LPS100 ng/ml	9.93 \pm 0.54 ^{ab}	5.572 \pm 1.23 ^{ab}
LPS1000 ng/ml	10.91 \pm 1.15 ^{ab}	2.98 \pm 1.37 ^b
LPS2000 ng/ml	11.34 \pm 1.15 ^{ab}	2.41 \pm 0.77 ^b
F值	153.808	331.105
P值	0.000	0.000

注:Control为空白对照组;LPS为脂多糖;与空白对照组比较,“a” $P<0.05$;与10ng/ml组比较,“ab” $P<0.05$

0.35) pg/ml、(3.10 \pm 0.11) pg/ml、(3.07 \pm 0.35) pg/ml、(3.17 \pm 0.13) pg/ml, TNF- α 分别为(1.57 \pm 0.36) pg/ml、(2.84 \pm 0.82) pg/ml、(5.617 \pm 0.17) pg/ml、(2.69 \pm 0.03)

pg/ml,均低于脂多糖10ng/ml时($P<0.05$)。且干预8 h时,IL-1 β 和TNF- α 的表达量均高于4 h,12 h和24 h [$t=1.53$, $t=1.86$, $t=1.14$ (IL-1 β); $t=8.28$, $t=9.89$, $t=11.22$ (TNF- α), $P<0.01$],见表2及图11~12。

四、独活寄生汤水提物对软骨细胞IL-1 β 、TNF- α 的影响

各组干预8 h,独活寄生汤浓度100 μ g/ml,200 μ g/ml,300 μ g/ml时,细胞上清液中IL-1 β [分别为(7.87 \pm 0.11) pg/ml、(4.78 \pm 0.70) pg/ml、(3.72 \pm 0.84) pg/ml]和TNF- α [分别为(2.42 \pm 0.88) pg/ml、2.31 \pm 0.40) pg/ml、(1.17 \pm 0.24) pg/ml]的表达均低于浓度0 μ g/ml,差异具有统计学意义 [$t=-16.76$, $t=-17.08$, $t=-1.80$ (IL-1 β); $t=-1.77$, $t=-16.79$, $t=0.18$ (TNF- α), $P<0.01$],独活寄生汤浓度300 μ g/ml时IL-1 β 和TNF- α 表达低于100 μ g/ml和200 μ g/ml,差异具有统计学意义 [$t=-9.82$, $t=-1.19$ (IL-1 β); $t=-3.38$, $t=-3.09$ (TNF- α), $P<0.01$],见表3及图13~14。

表2 LPS干预不同时间对体外软骨细胞IL-1 β 和TNF- α 表达的影响

组别	IL-1 β (ng/ml, $\bar{x} \pm s$)				F值	P值
	4 h	8 h	12 h	24 h		
Control	3.58 \pm 0.35	3.10 \pm 0.11	3.07 \pm 0.35	3.17 \pm 0.13	2.415	0.142
LPS(10ng/ml)	11.15 \pm 0.52 ^{ab}	14.28 \pm 0.33 ^a	10.75 \pm 0.60 ^{ab}	11.48 \pm 0.84 ^{ab}	21.475	0.000
t值	-30.869	-8.422	-13.999	-19.532		
P值	0.001	0.014	0.005	0.003		

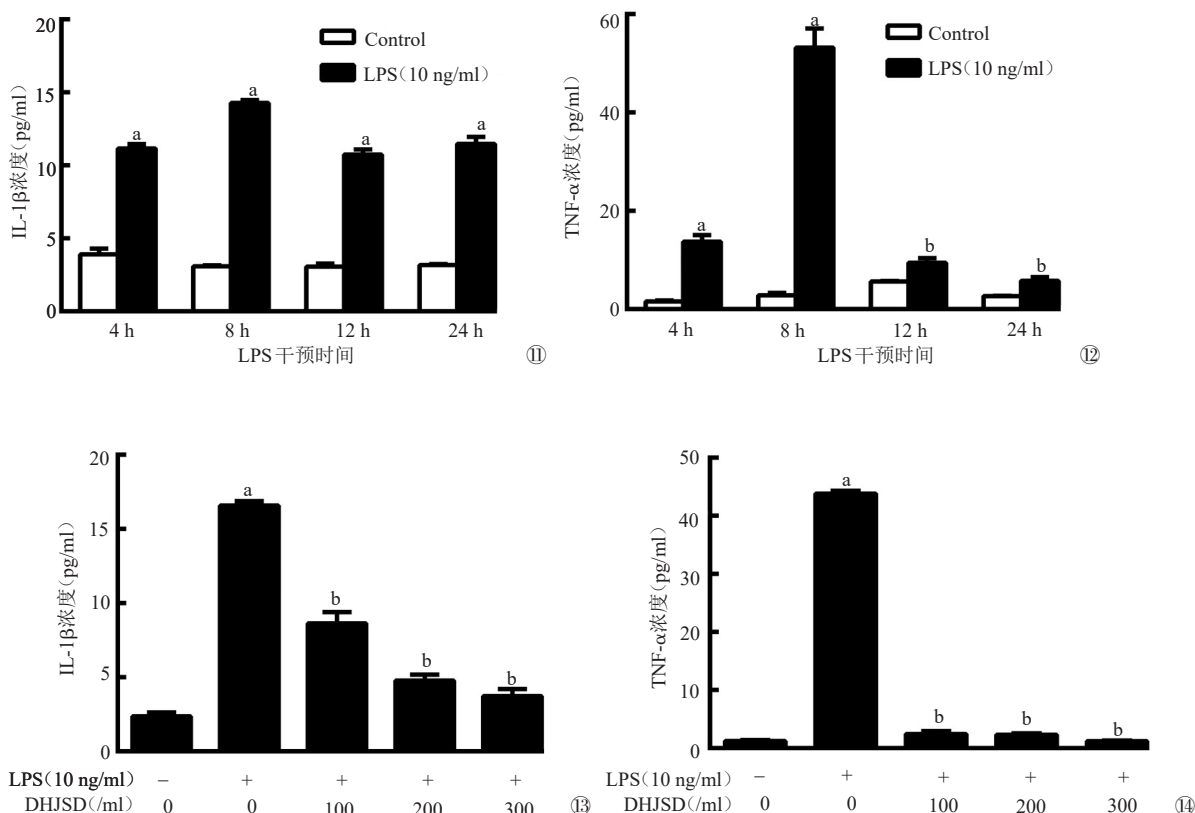
组别	TNF- α (ng/ml, $\bar{x} \pm s$)				F值	P值
	4h	8h	12h	24h		
Control	1.57 \pm 0.36	2.84 \pm 0.82	5.617 \pm 0.17	2.69 \pm 0.03	42.453	0.000
LPS(10ng/ml)	13.70 \pm 1.92 ^{ab}	53.16 \pm 5.51 ^a	9.40 \pm 1.39 ^{ab}	5.78 \pm 1.08 ^{ab}	104.15	0.000
t值	-9.441	-14.053	-4.238	-4.124		
P值	0.011	0.005	0.041			

注:Control为空白对照组;LPS为脂多糖;与空白对照组比较,“a” $P<0.05$;与8 h LPS 10 ng/ml组比较,“ab” $P<0.05$

表3 不同浓度独活寄生汤对体外软骨细胞炎症模型IL-1 β 和TNF- α 表达的影响

组别	炎症因子表达量(ng/ml, $\bar{x} \pm s$)	
	IL-1 β	TNF- α
Control	2.37 \pm 0.46 ^a	1.23 \pm 0.29 ^a
Model	16.24 \pm 0.05	43.80 \pm 0.91
DHJSD 100 μ g/ml	7.87 \pm 0.11 ^{ab}	2.42 \pm 0.88 ^{ab}
DHJSD 200 μ g/ml	4.78 \pm 0.70 ^{ab}	2.31 \pm 0.40 ^{ab}
DHJSD 300 μ g/ml	3.72 \pm 0.84 ^a	1.17 \pm 0.24 ^a
F值	323.945	2789.799
P值	0.000	0.000

注:Control为空白对照组;Model为模型组;DHJSD为独活寄生汤;与空白对照组比较,“a” $P<0.05$;与DHJSD 300 μ g/ml组比较,“ab” $P<0.05$



注: Control为空白对照组; LPS为脂多糖; DHJSD为独活寄生汤; 与空白对照组相比, a表示 $P < 0.01$, b表示 $P < 0.05$

图 11~12 LPS 干预不同时间对体外软骨细胞炎症模型 IL-1β 和 TNF-α 表达的影响。图 11 LPS 10 ng/ml 干预软骨细胞不同时间细胞上清液 IL-1β 的表达量; 图 12 LPS 10 ng/ml 干预软骨细胞不同时间细胞上清液 TNF-α 的表达量 图 13~14 独活寄生汤抑制软骨细胞炎症的最佳浓度。图 13 不同浓度独活寄生汤干预软骨细胞炎症模型细胞上清液 IL-1β 的表达量; 图 14 不同浓度独活寄生汤干预软骨细胞炎症模型, 细胞上清液 TNF-α 的表达量

讨 论

一、中医治疗骨关节炎的机制

骨关节炎属中医学“痹”症范畴, 以肝肾亏虚、筋骨失养致痿为病变的根本, 易感风寒湿邪致痹为外因, 其核心病机为本痿标痹^[17]。根据中医“肝主筋”“肾主骨”理论, 基于骨关节炎本痿标痹的病理特点, 提出补肾柔肝为治疗骨关节炎的根本大法, 辅以祛风除湿散寒。独活寄生汤以独活祛下焦风寒湿邪, 蠲痹止痛, 为君药。防风、秦艽祛风胜湿; 细辛祛寒止痛; 肉桂温里祛寒, 通利血脉, 均为臣药。杜仲、桑寄生、芍药、牛膝补肾柔肝, 强壮筋骨; 当归、干地黄、川芎养血活血; 人参、茯苓、甘草补气健脾, 扶助正气; 以上各药均为佐药。甘草调和诸药, 为使药。诸药合用, 共奏补肾柔肝, 活血祛风之功, 使风寒湿邪俱除, 肝肾强健, 气血充足, 痹痛得以缓解^[18]。

二、独活寄生汤对软骨细胞炎症模型 IL-1β、TNF-α 表达的影响

软骨退变是骨关节炎的主要病理特征, 表现为软骨细胞、软骨基质以及软骨下骨降解与合成偶联正常失衡。软骨细胞为关节软骨中的唯一细胞类型, 本实验采用机械和酶消化结合的方法分离出原代软骨细胞, 通过原代培养和传代, 获取较高纯度体外软骨细胞。Ⅱ型胶原免疫组化显示软骨细胞胞质呈棕黄色, 胞核不显色。

炎症介质是介导骨关节炎软骨退变的关键因素, 在骨关节炎的病理进程中发挥重要调控作用。细胞因子是一组多肽类细胞调节物质的总称, IL-1β 和 TNF-α 是骨关节炎病理过程中促进关节软骨破坏和软骨基质降解的最主要细胞因子, 它们的作用机制是: 增强下游基质金属蛋白酶的表达, 抑制软骨基质主要成分的合成, 促进软骨细胞终末分化, 最终引起软骨基质稳态失衡^[19]; 参与关节滑膜炎症反应, 抑

制蛋白聚糖的合成,促进软骨基质降解^[20];TNF- α 还能调节IL-1 β 的表达,启动骨关节炎细胞因子的级联反应,刺激滑膜细胞与软骨细胞产基质金属蛋白酶,加速软骨基质降解^[21-22]。

LPS 又称内毒素,可以激活 Toll 样受体 4 (TLR4),引起炎症反应,TLR4 识别 LPS 后,招募下游信号分子触发一系列的信号级联反应,最终活化细胞核因子- κ B (NF- κ B),诱导促炎因子 IL-1 β 和 TNF- α 等的表达^[23]。本实验采用 LPS 刺激体外大鼠软骨细胞模拟建立骨关节炎软骨细胞的炎症模型,在细胞水平研究骨关节炎的相关机制^[24]。研究结果表明,LPS 浓度为 10 ng/ml、100 ng/ml、1 000 ng/ml、2 000 ng/ml 时,软骨细胞上清液炎症因子的表达量均明显高于浓度为 0 ng/ml,且 LPS 浓度为 10 ng/ml 时,细胞上清液中炎症因子的分泌最为旺盛;本实验选取终浓度为 10 ng/ml 的 LPS 分别干预软骨细胞 4 h、8 h、12 h 和 24 h,研究结果表明,LPS 干预 8 h 时,软骨细胞上清液炎症因子的表达量明显高于其他干预时间。

临床研究表明,独活寄生汤可抗炎镇痛,改善骨关节炎的临床症状及功能活动,还可控制骨关节炎病情进展,遏制关节结构破坏,远期疗效肯定^[25-26]。独活寄生汤能抑制白细胞介素 6、基质金属蛋白酶等的释放,从而抑制细胞因子对关节软骨的破坏,延缓关节软骨的退变^[27-28]。本实验以独活寄生汤水提取物干预 LPS 诱导的体外软骨细胞炎症模型,发现独活寄生汤水提取物能够降低造模软骨细胞上清液炎症因子的表达,且独活寄生汤浓度为 300 μ g/ml 时,软骨细胞上清液炎症因子的表达量明显低于浓度为 100 μ g/ml 和 200 μ g/ml 时。以上结果表明,10 ng/ml 的 LPS 干预 8 h 能够成功诱导体外软骨细胞炎症模型;独活寄生汤治疗骨关节炎的可能分子机制是通过降低异常升高的 IL-1 β 和 TNF- α 等的水平,减少机体炎症因子的释放,减轻炎症刺激,进而调节基质金属蛋白酶的表达,从而抑制软骨基质的降解,延缓软骨的退变和骨关节炎的进一步发展。

三、本研究的局限性及展望

本研究的不足之处在于检测的炎症指标只涉及到最常见的炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α ,其余相关炎症指标如 IL-6、MMPs 等表达量也有可能发生改变,并且对软骨细胞的形态、活性及功能产生影响;同时,通过体内实验研究,可以更为直观地明确独活寄生汤对关节软骨炎症的影响。从相关信号通路及 Mi-

cro-RNAs 角度进一步探讨独活寄生汤对软骨细胞炎症的影响,将是未来的研究方向。

参 考 文 献

- 1 Kroman SL, Roos EM, Bennell KL, et al. Measurement properties of performance-based outcome measures to assess physical function in young and middle-aged People known to be at high risk of hip and/or knee osteoarthritis: a systematic review [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2014, 22(1): 26-39.
- 2 Li Cheng, Cai Hengxing, Meng Qinggong, et al. IL-1 β mediating high mobility group box protein-1 expression in condylar chondrocyte during temporomandibular joint inflammation [J]. J Oral Pathol Med, 2016, 45(7): 539-545.
- 3 Archer CW, Francis-West P. The chondrocyte [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2003, 35(4): 401-404.
- 4 Song Changzhi, Zhou Xiaoye, Dong Qirong, et al. Regulation of inflammatory response in human chondrocytes by lentiviral mediated RNA interference against S100A10 [J]. Inflamm Res, 2012, 61(11): 1219-1227.
- 5 Li Yan, Li Kang, Hu Yiqin, et al. Piperine mediates LPS induced inflammatory and catabolic effects in rat intervertebral disc [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(6): 6203-6213.
- 6 Campo M, Avenoso Angela, Campo Salvatore, et al. Glycosaminoglycans reduced inflammatory response by modulating toll-like receptor-4 in LPS-stimulated chondrocytes [J]. Arch Biochem Biophys, 2009, 491(1/2): 7-15.
- 7 Campo M, Avenoso Angela, Campo Salvatore, et al. Glycosaminoglycans modulate inflammation and apoptosis in LPS-treated chondrocytes [J]. J Cell Biochem, 2009, 106(1): 83-92.
- 8 刘维, 吴沅峰, 刘晓亚, 等. 痹祺胶囊含药血清对体外培养软骨细胞的保护作用 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(8): 1283-1286.
- 9 袁昊, 曾晖, 肖德明, 等. 白藜芦醇通过 NF- κ B 信号通路抑制软骨细胞炎症因子的表达 [J]. 中华骨与关节外科杂志, 2016, 9(1): 75-79.
- 10 何凡, 丁长海, 徐建华. 代谢性炎症在骨关节炎发病机制中的作用 [J]. 中华风湿病学杂志, 2013, 17(9): 632-635.
- 11 Liu Fayuan, Weng Xiaping, Lin Pingdong, et al. Duhuo jisheng decoction inhibits endoplasmic reticulum stress in chondrocytes induced by tunicamycin through the downregulation of miR-34a [J]. Int J Mol Med, 2015, 36(5): 1311-1318.
- 12 Liu Fayuan, Liu Guozhong, Liang Wenna, et al. Duhuo jisheng decoction treatment inhibits the Sodium nitroprussiate-induced apoptosis of chondrocytes through the mitochondrial-dependent signaling pathway [J]. Int J Mol Med, 2014, 34(6): 1573-1580.
- 13 陈后煌, 邵翔, 马玉环, 等. 独活寄生汤通过 miRNAs 调控炎症性骨关节炎软骨细胞功能改变的机制探讨 [J]. 风湿病与关节炎, 2015, 4(9): 55-59.
- 14 叶锦霞, 吴广文, 李西海, 等. 透骨消痛胶囊对凋亡软骨细胞 Rac1 和 Cdc42 表达的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(42): 6747-6751.
- 15 朱桂军, 孟志强, 刘丽霞, 等. DATS 通过 p38MAPK 通路抑制 LPS 诱导的小鼠 MH-S 细胞 TNF- α 及 IL-1 β 表达 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(9): 1303-1307.
- 16 Campo M, Avenoso Angela, Campo Salvatore, et al. Molecular size

- hyaluronan differently modulates toll-like receptor-4 in LPS-induced inflammation in mouse chondrocytes [J]. *Biochimie*, 2010, 92(2): 204-215.
- 17 李西海, 刘献祥. 骨关节炎的核心病机——本痿标痹 [J]. *中医杂志*, 2014, 55(14): 1248-1249, 1252.
- 18 李西海, 梁文娜, 叶蕙芝, 等. 独活寄生汤调控风寒湿痹型骨关节炎软骨下骨重建失衡的作用机制探讨 [J]. *风湿病与关节炎*, 2014, 3(8): 62-64, 80.
- 19 Dunn SL, Wilkinson JM, Crawford A, et al. Cannabinoid WIN-55, 212-2 mesylate inhibits interleukin-1 β induced matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase expression in human chondrocytes [J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2014, 22(1): 133-144.
- 20 Matuska Andrea, O'shaughnessy Krista, King William, et al. Autologous solution protects bovine cartilage explants from IL-1 α - and TNF α -induced cartilage degradation [J]. *J Orthop Res*, 2013, 31(12): 1929-1935.
- 21 Pecchi E, Priam S, Mladenovic Z, et al. A potential role of chondroitin sulfate on bone in osteoarthritis: inhibition of prostaglandin E₂ and matrix metalloproteinases synthesis in interleukin-1 β -stimulated osteoblasts [J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2012, 20(2): 127-135.
- 22 李西海, 梁文娜, 党传鹏, 等. 补肾壮筋汤抑制炎症细胞因子表达延缓骨关节炎软骨退变的研究 [J]. *风湿病与关节炎*, 2014, 3(5): 20-25.
- 23 Palsson-Medermott EM, O'Neill LA. signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, toll-like receptor-4 [J]. *Immunology*, 2004, 113(2): 153-162.
- 24 Wang Yi, Zhang Jiao, Yang Rong, et al. Lipopolysaccharide-induced expression of FAS ligand in cultured immature boar sertoli cells through the regulation of pro-inflammatory cytokines and miR-187 [J]. *Mol Reprod Dev*, 2015, 82(11): 880-891.
- 25 郑进昌, 徐东明, 许凯洲. 独活寄生汤治疗膝关节退行性关节炎的临床研究 [J]. *中国医药导报*, 2013, 10(3): 123-124.
- 26 雷露, 朱明海. 独活寄生汤治疗膝骨关节炎随机对照临床文献的Meta分析 [J]. *风湿病与关节炎*, 2016, 5(1): 25-28.
- 27 李军, 王朝阳. 独活寄生汤对兔膝骨性关节炎关节液肿瘤坏死因子- α 、白介素-6和基质金属蛋白酶-1水平的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(5): 1002-1003.
- 28 程维, 张玉辉. 独活寄生汤对膝骨性关节炎患者关节滑液中细胞因子的影响 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2011, 13(10): 216-217
- (收稿日期:2016-08-19)
(本文编辑:吕红芝)

陈后煌, 邵翔, 叶蕙芝, 等. 独活寄生汤对脂多糖诱导的大鼠软骨细胞炎症模型IL-1 β 、TNF- α 表达的影响 [J/CD]. *中华老年骨科与康复电子杂志*, 2017, 3(2): 77-84.