

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.21.005

Native CT-Ⅱ改善单碘乙酸致大鼠膝骨性关节炎实验研究

吴婷婷¹, 朱美红^{2△}, 王国平², 王伙根², 张森林²

(1. 浙江工业大学药学院, 浙江 杭州 310014; 2. 嘉兴恒杰生物制药股份有限公司, 浙江 嘉兴 314005)

摘要:目的 探讨 Native CT-Ⅱ对单碘乙酸所致大鼠膝骨性关节炎(KOA)的改善作用。方法 将72只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、氨基葡萄糖硫酸软骨素钠组、Native CT-Ⅱ高剂量组、低剂量组、阿司匹林组。构建单碘乙酸诱导大鼠 KOA 模型后,给药5周。分析大鼠实时步态、血清炎症因子的含量,采用 HE 染色观察大鼠关节软骨病理变化。结果 步态分析证明,Native CT-Ⅱ对构建大鼠行走有很好的改善作用;病理结果显示,Native CT-Ⅱ组和氨基葡萄糖硫酸软骨素钠组均可不同程度地缓解大鼠 KOA 模型的病理改变;高剂量 Native CT-Ⅱ能显著降低大鼠血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)、转化生长因子 β (TGF- β)、基质金属蛋白酶13(MMP-13)、前列腺素 E_2 (PGE₂)、Ⅱ型胶原交联羧基肽(CTX-Ⅱ)的水平,升高白细胞介素10(IL-10)的水平。结论 Native CT-Ⅱ对单碘乙酸所致大鼠 KOA 模型具有一定治疗作用,其作用机制可能与降低血清中 TNF- α , IL-6, TGF- β , MMP-13, PGE₂, CTX-Ⅱ的水平,升高 IL-10 水平有关。

关键词: Native CT-Ⅱ; 单碘乙酸; 膝骨性关节炎; 炎症因子; 步态分析; 大鼠

中图分类号: R965; R977.6

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)21-0015-4

Improving Effect of Native CT-Ⅱ on the Monoiodoacetic Acid-Induced Osteoarthritis in Rats

WU Tingting¹, ZHU Meihong², WANG Guoping², WANG Huogen², ZHANG Senlin²

(1. College of Pharmacology, Zhejiang University of Technology, Hangzhou, Zhejiang, China 310014; 2. Jiaxing Hengjie Biopharmaceutical Co., Ltd., Jiaxing, Zhejiang, China 314005)

Abstract: Objective To investigate the improving effect of Native CT-Ⅱ on monoiodoacetic acid(MIA)-induced osteoarthritis in rats.

Methods Totally 72 SD male rats were randomly divided into sham-operation group, model group, glucosamine and chondroitin sulfate group, Native CT-Ⅱ high-dose group, low-dose group and aspirin group. The rats were treated with MIA to induce knee osteoarthritis, and then treated with different drugs for 5 weeks. The real-time gait was analyzed, the levels of inflammatory factors in serum were determined, and the pathological changes of articular cartilage were observed by HE staining. **Results** The gait analysis showed that Native CT-Ⅱ had good effect on improving the walking of rats with osteoarthritis. The pathological results showed that Native CT-Ⅱ groups and glucosamine and chondroitin sulfate group could alleviate the pathological changes of osteoarthritis in different degrees. High-dose Native CT-Ⅱ could significantly decrease the levels of tumor necrosis factor(TNF)- α , interleukin(IL)-6, transforming growth factor(TGF)- β , matrix metalloproteinase(MMP)-13, prostaglandin E_2 (PGE₂) and C-terminal crosslinking telopeptide of type Ⅱ collagen(CTX-Ⅱ), but it could significantly increase the level of IL-10. **Conclusion** Native CT-Ⅱ has a certain therapeutic effect on MIA-induced osteoarthritis in rats, and its mechanism may be related to the decrease of the levels of TNF- α , IL-6, TGF- β , MMP-13, PGE₂ and CTX-Ⅱ in serum and the increase of IL-10 level in serum.

Key words: Native CT-Ⅱ; monoiodoacetic acid; osteoarthritis; inflammatory factors; gait analysis; rats

膝骨性关节炎(KOA)也称退行性骨关节病、骨质增生,是一种以膝关节软骨退行性改变为核心,主要表现为膝关节疼痛肿胀、活动受限、膝关节周围骨赘形成为特点的疾病^[1]。KOA发病机制尚不明确,临床症状不尽相同,是常见的慢性关节疾病,是造成成年人膝关节功能障碍、活动障碍及残疾的主要诱因。目前,治疗 KOA 的方案较多,主要有基于功能锻炼为主的非药物保守治疗、基于非甾体抗炎的解热镇痛药物治疗、基于关节腔内注射透明质酸钠或糖皮质激素为主的治疗,以及手术治疗等。以上治疗手段主要用于控制症状,减轻关节疼痛,改善部分关节功能,提高患者的生活质量,但无法改变病情进程及关节软骨病理状态^[2]。自20世纪70年代,欧美、日本等国家兴起“氨糖”疗法,氨糖作为治疗骨

关节炎的首选特异性药物,被广泛应用于骨关节疾病的治疗与预防,并取得显著的成效。氨糖产品包括单纯的氨糖盐酸盐或硫酸盐和加入了二甲基亚砜、硫酸软骨素、胶原蛋白等成分^[3]。Native CT-Ⅱ是一种从动物软骨组织中提取的、完整保留胶原三螺旋结构的非变性Ⅱ型胶原蛋白,相对分子质量在300 000。与目前市场上的胶原蛋白产品相比,其最大的区别在于目前的胶原蛋白产品实质上都是大分子胶原蛋白经酶解后,三、四级结构已完全被破坏的胶原蛋白肽,平均相对分子质量在10 000以下^[4]。本研究中通过构建单碘乙酸诱导的大鼠 KOA 模型,考察 Native CT-Ⅱ对 KOA 的潜在治疗价值,并对比市售氨糖硫酸软骨素钠治疗效果的差异。现报道如下。

第一作者:吴婷婷,女,硕士研究生,研究方向为药理学,(电子信箱)testim225@163.com。

△通信作者:朱美红,女,硕士研究生,研究方向为生物制药,(电子信箱)hjrd@hsnutra.com。

1 动物、试药与仪器

1.1 动物

72只SPF级健康成年雄性SD大鼠,体重为 (150 ± 20) g,由浙江省医科院实验动物中心提供,动物合格证号为SCXK(浙2014-0001)。所有大鼠均于SPF级环境内饲养,12h明/12h暗,自由进食和饮水,适应环境1周后构建KOA模型。

1.2 试药

Native CT-Ⅱ(白色粉末),氨基葡萄糖硫酸软骨素钠[氨基葡萄糖盐酸盐-硫酸软骨素钠(3:1)白色粉末],均购自嘉兴恒杰生物制药股份有限公司;阿司匹林(拜耳医药保健有限公司,批号为20180315);单碘乙酸(上海阿拉丁生化科技公司,纯度为98%);戊巴比妥钠(国药集团化学试剂北京有限公司);酶联免疫白细胞介素10(IL-10)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)、转化生长因子 β (TGF- β)、基质金属蛋白酶13(MMP-13)、前列腺素 E_2 (PGE $_2$)、Ⅱ型胶原交联羧基肽(CTX-Ⅱ)试剂盒,均购自上海酶联生物科技有限公司。

1.3 仪器

全波长酶标仪(美国Biotek公司);BS124S型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司,精度为0.001g);BW-GAL1404型步态实时检测分析处理系统(上海软隆科技发展有限公司);3-18k型低温高速冷冻离心机(美国Thermo Scientific公司);Eclipse E100型正置光学显微镜(日本Nikon公司)。

2 方法与结果

2.1 方法

2.1.1 动物分组与模型建立

将72只SD雄性大鼠,随机分为6组,每组12只,分别为假手术组(A组)、模型组(B组)、氨基葡萄糖硫酸软骨素钠组(C组,GS 100 mg/kg)、Native CT-Ⅱ高剂量组(D $_1$ 组,Native CT-Ⅱ 8 mg/kg)、Native CT-Ⅱ低剂量组(D $_2$ 组,Native CT-Ⅱ 4 mg/kg)、阿司匹林组(E组,Aspirin 75 mg/kg)。分笼饲养。

配制40 mg/mL单碘乙酸生理盐水溶液(MIA溶液)适量,弯曲大鼠左膝关节,使关节间隙充分显露后,除A组外各组大鼠关节内注射50 μ L MIA溶液诱导膝骨关节炎^[5];A组大鼠左膝关节注射50 μ L生理盐水。次日,分别给予动物灌胃不同药物,A、B组灌服等体积生理盐水,每天1次,共5周。

2.1.2 观察指标

大鼠步态分析:给药第5周后,采集无停顿通过走道时的步态数据,包括大鼠瞬时速度、左后足支撑力、左后步幅。步态实时检测分析系统会对采集的数据进行自动分析,并得到一系列静态、动态及协调性等参数,以判断药物对KOA的改善程度。

大鼠血清炎症因子含量测定:麻醉大鼠,经腹主动脉取血,静置45 min以上,于4℃、3 000 r/min条件下离心15 min,分离得血清,分装-80℃冻存。采用ELISA试剂盒测量血清IL-10、TNF- α 、IL-6、TGF- β 、MMP-13、PGE $_2$ 、CTX-Ⅱ水平。

大鼠膝关节软骨病理形态观察:10%水合氯醛经腹腔注射麻醉大鼠,取出左侧膝关节软骨,生理盐水冲洗血水,置4%多聚甲醛固定48 h,然后置含EDTA的脱钙液中脱钙60 d,取出软骨进行HE染色,并观察各组大鼠关节软骨病理形态变化。

2.1.3 统计学处理

采用GraphPad Prism 8.0统计学软件分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本采用单因素方差(One-way ANOVA)分析,组间比较采用Bonferroni校正的 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.2 结果

2.2.1 对大鼠步态的影响

给药第5周后,通过步态实时检测分析,获得大鼠行进的足迹信息;通过测量分析各组大鼠无停顿通过走道时的步态数据,判断Native CT-Ⅱ的药效。结果表明,与A组相比均下降,且与B组差异有统计学意义($P < 0.05$),证明KOA引起动物的行走障碍经药物治疗5周后,在步态各项指标中均表现出明显的修复作用,各组药物对瞬时速度的改善尤为明显,与B组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$),其中,D $_1$ 组药效明显优于C组;在左后步幅指标中,D $_2$ 组与C组药效相当,对大鼠左后步幅均有明显改善,与B组比较有统计学意义($P < 0.05$);对大鼠左后足支撑力指标的分析表明,只有D $_1$ 组有明显改善作用,与B组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。详见图1。

2.2.2 对大鼠血清中炎症因子的影响

与A组相比,B组大鼠血清IL-6、PGE $_2$ 、TNF- α 、TGF- β 、MMP-13、CTX-Ⅱ含量显著升高($P < 0.05$);IL-10显著降低($P < 0.01$)。连续给药5周后,与B组相比,C、D $_1$ 、D $_2$ 、E组的CTX-Ⅱ含量显著降低($P < 0.01$);仅D $_1$ 组和E组TGF- β 显著降低($P < 0.01$),与模型组比较,其余各组呈降低的趋势,却无显著差异($P > 0.05$);IL-6、PGE $_2$ 、TNF- α 、MMP-13、Native CT-Ⅱ均有较好改善。与B组比较,给药5周后,D $_1$ 、D $_2$ 、E组的IL-10含量显著提升,($P < 0.01$)。详见图2。

2.2.3 对单碘乙酸诱导大鼠KOA软骨病理学的影响

各组大鼠关节组织染色切片,显微镜光镜100倍视野下用国际骨关节炎研究学会(OARSI)软骨组织病理学评分系统,由2名独立观察者对软骨组织病理学进行分级评分^[6]。A组大鼠的关节软骨具有完整光滑表面,且未观察到软骨损伤、滑膜侵袭或骨破坏,未观察到炎

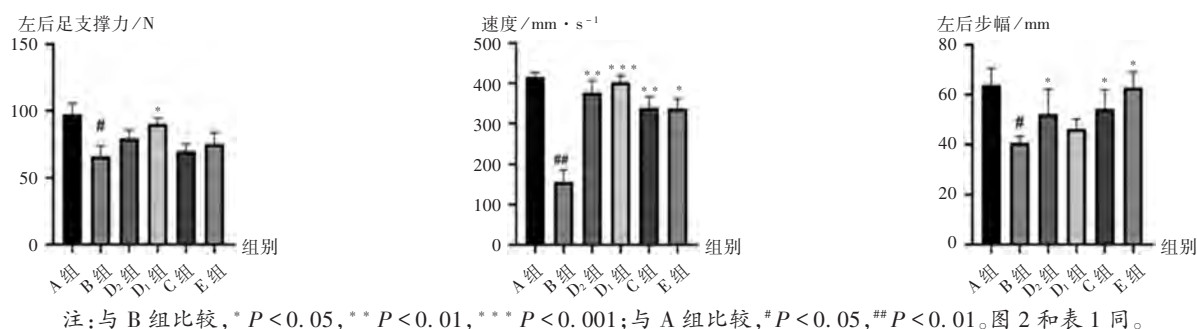


图 1 各组大鼠步态分析

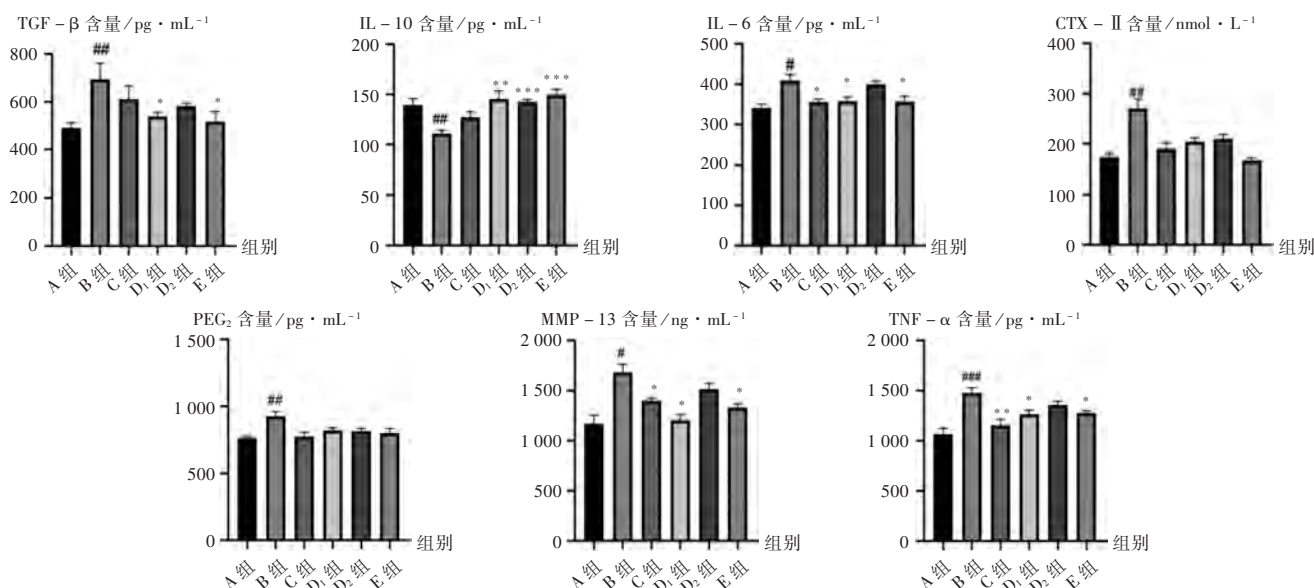


图 2 各组大鼠血清中各炎症因子含量变化

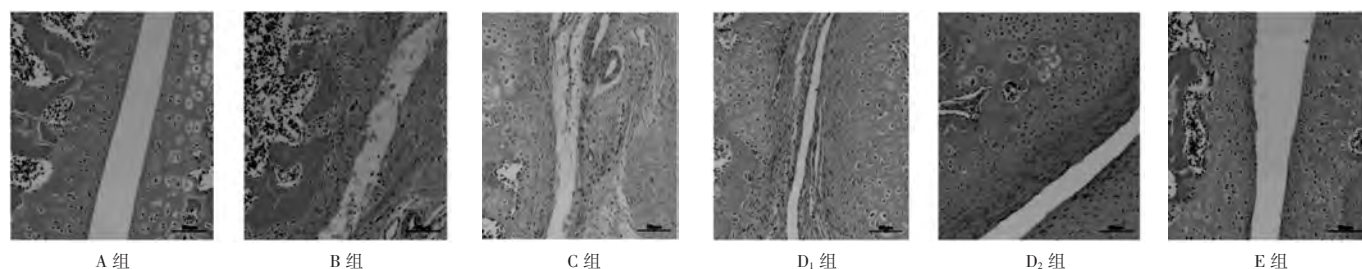


图 3 各给药组对单碘乙酸所致 KOA 大鼠膝关节 HE 染色结果的影响

性细胞浸润。B 组大鼠的膝关节病理组织学图片可见滑膜组织增生,炎性细胞聚集于滑膜组织周围,并向关节腔侵袭,导致关节软骨破坏和骨侵蚀,与 A 组比较,病理学评分有显著差异($P < 0.01$);与模型组相比,E 组可显著缓解 KOA 大鼠滑膜组织的增生,明显减少炎性细胞在滑膜组织周围的聚集,未观察到明显的软骨损伤和骨侵蚀($P < 0.01$);C、D₁、D₂ 组可不同程度地缓解 KOA 大鼠的症状,减少骨侵蚀,抑制滑膜增生,但仍可观察到软骨损伤($P < 0.01$, $P < 0.05$)。病理组织学分析结果表明,Native CT-II 对于 KOA 大鼠的膝关节具有保护作用,但不及阿司匹林。详见图 3 和表 1。

3 讨论

KOA 的治疗原则一般为缓解疼痛,延缓病情进展,

表 1 对单碘乙酸所致 KOA 大鼠膝关节 OARS 病理学评价
($\bar{X} \pm s$, 分, $n = 5$)

组别	术后 5 周	组别	术后 5 周
A 组	0	C 组	$2.6 \pm 0.37^*$
B 组	$3.6 \pm 0.55^{***}$	D ₁ 组	$1.8 \pm 0.84^{***}$
E 组	$1.6 \pm 0.24^{***}$	D ₂ 组	$2.6 \pm 0.54^*$

注:与 A 组比较,*** $P < 0.001$ 。

尽量避免膝关节畸形,改善肢体功能,提升生存质量^[7]。骨关节炎发生时,炎性反应贯穿始终。期间,以 IL-1, TGF- β , IL-6, TNF- α 为主的促炎性因子增多,引起软骨基质降解和软骨细胞损伤;而抗炎细胞因子 IL-4, IL-10, IL-13 等分泌减少,抗炎细胞因子可增强软骨组织的修复能力,促进细胞外基质的合成,抑制促炎细

胞因子的产生,降低软骨组织的损伤^[8-10]。同时,KOA的主要病理特征是大的关节软骨损伤,其特征是软骨稳态、滑膜激活和软骨下骨重建的进行性丧失。MMP-13是靶向软骨降解的主要酶,与其他MMP相比,MMP-13的表达更局限于结缔组织,不仅可降解软骨中的Ⅱ型胶原蛋白,还可降解软骨中的蛋白多糖,Ⅳ型和Ⅸ型胶原蛋白,骨黏连蛋白和基底膜蛋白聚糖,故MMP-13在KOA的软骨降解中扮演着重要角色^[11]。

非变性Ⅱ型胶原蛋白的作用机制是口服后在胃蛋白酶和胃酸作用下,其三螺旋结构分解螺旋为可溶性大分子结构,经肠道内的抗原肽细胞APC在细胞内将外源性抗原非变性Ⅱ型胶原蛋白加工、处理,并形成MHC-抗原肽复合物,然后递呈在APC的表面,激活调节性T淋巴细胞产生抗炎性因子IL-4和IL-10,下调T淋巴细胞攻击关节内胶原活性,从而减轻疼痛和改善炎症^[12-13]。20世纪90年代,已有Ⅱ型胶原蛋白改善关节炎的研究^[14],近年来国内也开展了Ⅱ型胶原蛋白的相关研究^[15]。Native CT-Ⅱ是一种从动物软骨组织中,采用低温提取技术,得到的完整保留大分子胶原蛋白三螺旋结构的非变性Ⅱ型胶原蛋白,相对分子质量为300 000。与目前市场上的胶原蛋白产品相比,其最大的区别在于现的胶原蛋白产品实质上都是大分子胶原蛋白经酶解后,三、四级结构已完全被破坏的胶原蛋白肽,平均相对分子质量在10 000以下。

KOA症状与风湿性关节炎不同,临床多采用阿司匹林治疗,故以阿司匹林为第1组阳性药,目的是以此检测方法的正确性;氨基糖硫酸软骨素钠是目前市售的生物多糖的非处方药,而Native CT-Ⅱ是生物多糖,故设置氨基糖硫酸软骨素钠为第2组阳性药,目的在于比较两类多糖药效的不同。Native CT-Ⅱ干预5周后,3D步态分析结果表明,B组大鼠往往因疼痛形成特有的疼痛步态,如步态瞬时速度缓慢,患足支撑时相时间缩短及患足步幅变窄等,其原因是KOA大鼠通过放慢行动速度来减少单支撑相时间,增加双支撑相时间。Native CT-Ⅱ给药组可增加大鼠的行进速度,进而说明Native CT-Ⅱ可缓解KOA引起的疼痛。血清学指标检测显示,B组大鼠血清中促炎因子TNF- α ,IL-6,TGF- β ,PGE₂的含量显著升高,特定切割破坏Ⅱ型胶原蛋白网状纤维结构的MMP-13含量,以及Ⅱ型胶原蛋白代谢产物CTX-Ⅱ的含量均显著升高,证明KOA模型制作成功。经Native CT-Ⅱ干预5周后,D₁组大鼠血清TNF- α ,IL-6,TGF- β ,PGE₂含量均显著降低,IL-10含量显著升高,MMP-13和CTX-Ⅱ浓度下降,表明大鼠软骨降解的症状得到了改善。同时,病理学结果表明,给药组较模型组大鼠骨关节病理组织损伤有恢复的趋势。

综上所述,Native CT-Ⅱ对单碘乙酸所致大鼠KOA具有良好的改善作用,其作用机制可能与降低血清中TNF- α ,IL-6,TGF- β ,MMP-13,PGE-2,CTX-Ⅱ的水平,升高IL-10水平有关。

参考文献:

- [1] 陈峰,石晓兵. 膝骨性关节炎临床分期的现状和研究进展[J]. 广西医科大学学报,2018,35(3):412-415.
- [2] 赵梓龙,张进宝,邱海彦. 膝骨关节炎治疗概况[J]. 风湿病与关节炎,2013,2(6):59-63.
- [3] 李崇阳,李艳,牟德华. 氨基葡萄糖硫酸软骨素促进骨骼健康作用研究进展[J]. 食品科学,2015,36(23):382-385.
- [4] 王海燕,孙君社,刘爱青,等. 非变性Ⅱ型胶原蛋白改善骨关节炎的研究进展[J]. 食品工业杂志,2019,15(40):329-332.
- [5] 俞光平,邓九零,金王东,等. 白芍木瓜汤对碘乙酸所致大鼠骨性关节炎药效作用的实验研究[J]. 中国中医药科技,2018,1(5):33-37.
- [6] GLASSON SS, CHAMBERS MG, VAN DEN BERG WB, et al. The OARSI histopathology initiative recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse[J]. Osteoarthritis Cartilage,2010,18(Suppl 3):S17-S23.
- [7] 张峰,刘庆春,王春成. 补肾活血汤对大鼠骨性关节炎TNF- α ,IL-1 β ,MMP-1表达的影响[J]. 中华中医药学刊,2019,37(8):1999-2003.
- [8] 代康,焦凯. 细胞因子在骨关节炎软骨病变中的作用[J]. 国际口腔医学杂志,2012,39(4):491-493.
- [9] 陆斌,汤亭亭. 骨关节炎发病机制中的免疫学因素[J]. 国外医学:骨科学分册,2004,25(1):15-17.
- [10] 周梦瑶,于钧. 退行性骨关节炎的研究现状[J]. 中华地方病学杂志,2015,34(7):534-538.
- [11] 马崇文,张小辉,杨信信,等. MMP13在骨关节炎发病机制中的研究进展[J]. 中国矫形外科杂志,2019,27(19):1773-1776.
- [12] DAVID ET, ANDREW DH, ROSELYN AT, et al. Use of undenatured type II collagen in the treatment of rheumatoid arthritis[J]. Clinical Practice of Alternative Medicine, 2001, 2(4):254-259.
- [13] GUPTA RC, BAGCHI D, SKAGGS P, et al. Safety and therapeutic efficacy of undenatured type-II collagen(UC-Ⅱ) in comparison to glucosamine and chondroitin in arthritic horses[J]. Journal of Veterinary Pharmacology & Therapeutics,2010,32(6):577-584.
- [14] BAGI CM, BERRYMAN ER, TEO S, et al. Oral administration of undenatured native chicken type II collagen(UC-Ⅱ) diminished deterioration of articular cartilage in a rat model of osteoarthritis (OA)[J]. Osteoarthritis and Cartilage, 2017, 12(25):2080-2090.
- [15] 李洁,王玉梅. 非变性Ⅱ型胶原生产制备的纯化工艺[J]. 中国组织工程研究,2018,22(34):5496-5500.

(收稿日期:2020-03-10;修回日期:2020-06-24)