

· 方剂纵横 ·

大补阴丸治疗 2 型糖尿病合并骨关节炎的实验研究

吴鑫宇, 关子赫, 张婷婷, 周雪明*

(黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘 要:目的:观察大补阴丸对 2 型糖尿病合并骨关节炎大鼠的治疗作用。方法:50 只雄性 SD 大鼠,随机分为 5 组,每组 10 只,分别为空白组、模型组、阳性药组、大补阴丸高剂量组、大补阴丸低剂量组,连续给药 6 周。检测各组大鼠第 0 周、2 周、4 周、6 周的血糖,骨关节中基质金属蛋白酶-3(MMP-3)含量,关节液中白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及转化生长因子- β 1(TGF- β 1)mRNA 表达量。结果:大补阴丸可降低实验大鼠血糖,给药组与模型组比较差异具有统计学意义($P < 0.01$)。大补阴丸可抑制骨关节中异常增多的 MMP-3,减少关节液中 IL-6、TNF- α 及 TGF- β 1 mRNA 表达,给药组与模型组比较差异具有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结论:大补阴丸可通过有效平稳地降低大鼠血糖,减低骨关节中 MMP-3 含量,减少关节液中 IL-6、TNF- α 及 TGF- β 1 mRNA 表达量,从而控制血糖抑制炎症反应,发挥治疗 2 型糖尿病合并骨关节炎的作用。

关键词:大补阴丸;2 型糖尿病;骨关节炎;实验研究

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1002-2392(2022)01-0052-05

DOI:10.19664/j.cnki.1002-2392.220012

2 型糖尿病合并骨关节炎是一种特殊类型骨关节炎,由于 2 型糖尿病患者血糖异常升高,机体会出现一系列炎症表现,伴随关节软骨的退行性病变^[1]。同时,骨关节炎会严重影响患者的运动生活能力,长期低运动量摄入体内糖分无法通过能量消耗的渠道分解,患者对血糖的调控能力明显减弱。2 型糖尿病与骨关节炎互为因果恶性循环^[2],治疗难度大,引起了广大学者及医务工作者重视。

临床常用的 2 型糖尿病西医用药治疗方案主要为降糖药和胰岛素治疗^[3],骨关节炎西医治疗方案主要有消炎止痛、营养软骨以及关节腔内注射药物。然而针对 2 型糖尿病合并骨关节炎目前西医并没有公认推荐的治疗方案^[4]。临床中治疗该病可采取中医药进行干预,并收到了良好的疗效^[5],大补阴丸作为治阴虚火旺的主方,临床中可用以治疗 2 型糖尿病合并骨关节炎,但目前尚缺少作用机理的实验数据支持。本

实验采用腹腔注射链脲佐菌素(STZ)配合化学损伤法获得 2 型糖尿病合并骨关节炎大鼠模型。以二甲双胍作为阳性对照药,二甲双胍是一线口服降糖药,广泛应用于 2 型糖尿病临床治疗中^[6],二甲双胍能够降低软骨细胞增殖分化活性,有治疗骨关节炎的作用^[7]。以大补阴丸为实验药物,大补阴丸可滋肾阴,降相火,从肾论治本病,以减轻患者临床症状。比较用药前后大鼠随机血糖、基质金属蛋白酶-3(MMP-3)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及转化生长因子- β 1(TGF- β 1)的变化,为大补阴丸治疗 2 型糖尿病合并骨关节炎的作用机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只,体质量(200 ± 20)g,购自黑龙江中医药大学实验动物中心,许可证号:SYXK(黑)2013-012,饲养于黑龙江中医药大学基础医学院中药学实验室,环境湿度(45 ± 5)%,温度(23 ± 2)℃,在实验前普通饲料适应性喂养 1 周,给予大鼠 12 h 昼夜交替照明,自由摄食及饮水。

1.2 药物及制备

大补阴丸中药物购自黑龙江中医药大学附属第一医院,大补阴丸由熟地黄 18 g,炙龟板 18 g,黄柏 12 g,

收稿日期:2021-06-09 修回日期:2021-08-11

基金项目:黑龙江省自然科学基金(YQ2020H027);黑龙江省博士后特别资助(LDH-Z18246)

作者简介:吴鑫宇(1988-),女,博士,讲师,研究方向:方剂学。

*通讯作者:周雪明(1981-),女,博士,副教授,研究方向:中医诊断学。

知母 12 g 组成,上述生药加 6 倍量水浸泡 2 h,炙龟板先煎 20 min,再纳入其余药物,武火加热煮沸后,文火煎煮 30 min,用纱布滤出药液,药渣再加 3 倍水,煎煮 30 min,过滤,2 次药液合并,浓缩得到所需浓度的水煎剂,置于 4 ℃ 冰箱中保存待用。高脂高糖饲料制备:猪油、鸡蛋黄粉、胆固醇、胆酸盐及基础饲料,分别按 15%、10%、2%、0.4%、72.6% 的配比制得高脂高糖饲料。盐酸二甲双胍片(万全万特制药有限公司,国药准字 H35020664),以蒸馏水溶解盐酸二甲双胍片并配制成所需浓度,置于 4 ℃ 冰箱中保存待用。

1.3 主要试剂及仪器

罗氏血糖仪、血糖试纸(批号:07124112,罗氏);全自动生化分析仪(7180);显微摄影成像系统(motacam 3000);德国莱卡切片机(LEICARM 2135);链脲佐菌(购于美国 Sigma 公司);单碘乙酸(上海源叶生物科技有限公司);基质金属蛋白酶-3(MMP-3)(Bioss 公司)。

1.4 方法

1.4.1 造模、分组及给药

将 50 只大鼠随机分为 5 组,每组 10 只,分别为空白组、模型组、阳性药组(二甲双胍)、大补阴丸(高剂量组)及大补阴丸(低剂量组)。空白组大鼠腹腔注射生理盐水 70 mg/kg,以普通饲料喂养。其余各组大鼠腹腔注射链脲佐菌素(STZ) 70 mg/kg,以高脂高糖饲料喂养 3 d,空腹 8 h,尾静脉采血,连续采血 2 d,随机血糖均 ≥ 11.1 mmol/L 视为 2 型糖尿病模型成功。采用化学损伤法造关节炎模型^[8],配制 40 mg/mL 单碘乙酸溶液,弯曲大鼠左膝关节,使关节间隙充分显露,除空白组外其余各组大鼠关节内注射 50 μ L 单碘乙酸溶液诱导骨关节炎,空白组大鼠左膝关节注射等量生理盐水。造模成功后,于次日进行给药,其中空白组和模型组给予生理盐水灌胃,依据人-大鼠体表面积公式折算,阳性药大鼠给药量为 0.14 g/(kg·d),大补阴丸成人每日服药量作为大鼠低剂量,大补阴丸低剂量组大鼠给药量为 1.62 g/(kg·d),高剂量给药量为低剂量的 2 倍,大补阴丸高剂量组大鼠给药量为 3.24 g/(kg·d)。每日上午灌胃 1 次,连续灌胃 6 周。

1.4.2 样本采集

分别于用药前及药物治疗 2 周、4 周及 6 周后采血。末次给药 24 h 后,用 10% 的水合氯醛于大鼠腹腔内注射给药麻醉,注射剂量为 4 mL/kg,颈总动脉取血,于 4 ℃ 静置 1 h 后,3 000 r/min 离心 15 min,取上层血清,-20 ℃ 保存,以备血清学检测。每只大鼠左膝关节腔内注入生理盐水 500 μ L,将生理盐水与关节

液混匀,然后再抽取关节液,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,置于 -20 ℃ 待检测,剥离大鼠左膝关节置于 4% 多聚甲醛内固定。

1.4.3 血糖仪检测大鼠血糖

大鼠尾静脉取血,用血糖仪分别检测第 0 周、第 2 周、第 4 周及第 6 周随机血糖值。

1.4.4 免疫组化检测大鼠骨关节中 MMP-3 含量

将已固定的关节标本取出,经梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋待用。进行免疫组化两步法,常规脱水透明,中性树胶封片、切片,显微镜下观察。

1.4.5 qRT-PCR 检测大鼠关节液中 IL-6、TNF- α 及 TGF- β 1 mRNA 表达水平

以 Trizol 法提取总 RNA,然后按照逆转录试剂盒说明书进行操作。以 qRT-PCR 技术检测 IL-6、TNF- α 及 TGF- β 1 mRNA 表达水平情况。反应结束后,得出 CT 值,并计算基因相对表达量。引物序列信息如表 1。

表 1 PCR 引物序列

引物名称	上游(5' to 3')	下游(5' to 3')
IL-6	TCCTTAGCCACTCCTTCT-GT	CTCATTCTGTCTCGAGC-CCACCA
TNF- α	AAGTTCCCAAATGGCCTC-CCTCTCATC	GGAGGTTGACTTTCTCCTGG-TATGAGA
TGF- β 1	GAGCAGTGGACTCTCATT-GA	TTGGCTTCTTGCGGACCT
GAPDH	TTCCTACCCCCAATG-TATCCG	CCACCCTGTTGCTGTAGCCA-TA

1.5 统计学方法

用 SPSS 20.0 软件处理数据,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠治疗前后血糖数值

空白组大鼠血糖数值在正常值范围,整个实验过程血糖基本保持稳定,其余各组大鼠第 0 周随机血糖数值符合糖尿病大鼠标准(≥ 11.1 mmol/L),此动物模型可靠。空白组与其余各组比较差异具有统计学意义($P < 0.01$)。各给药组自第 2 周起与模型组比较差异具有统计学意义($P < 0.01$)。随着给药过程持续进行,各给药组大鼠血糖均趋于或恢复正常数值,见表 2。

2.2 各组大鼠治疗后骨关节中 MMP-3 含量

比较各组大鼠治疗后骨关节中 MMP-3 含量,空白组 MMP-3 表达量最低,其余各组与空白组相比均

有所升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$),其中模型组升高最为显著,其余各给药组与模型组相比均有所降低,差异具有统计学意义($P < 0.01, P < 0.05$),见表 3。MMP-3 表达阳性的细胞质颜色呈棕黄色,由

图 1 可见,空白组大鼠骨关节中有极其少量的阳性细胞,而模型组棕黄色染色较多,各用药组与模型组相比棕染细胞减少。

表 2 各组大鼠治疗前后血糖的比较 (mmol/L, $n = 10, \bar{x} \pm s$)

分组	剂量(g/kg)	时间			
		0 周	2 周	4 周	6 周
空白组	—	5.33 ± 0.84	6.12 ± 0.91	5.24 ± 0.83	6.97 ± 1.07
模型组	—	26.49 ± 3.97 **	20.39 ± 4.21 **	22.13 ± 3.37 **	27.81 ± 4.01 **
阳性药组	0.14	24.12 ± 3.41 **	9.24 ± 3.14 **##	8.46 ± 2.21 **##	8.29 ± 1.90 *##
大补阴丸低剂量组	1.62	25.05 ± 3.58 **	12.91 ± 2.67 **##	11.54 ± 2.09 **##	11.32 ± 1.71 **##
大补阴丸高剂量组	3.24	24.76 ± 3.72 **	12.79 ± 2.05 **##	10.29 ± 2.42 **##	9.37 ± 1.34 **##

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$ 。

表 3 各组大鼠治疗后骨关节中 MMP-3 含量 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	剂量(g/kg)	MMP-3
空白组	—	698.11 ± 87.27
模型组	—	1892.10 ± 311.92 **
阳性药组	0.14	1472.67 ± 276.10 **##
大补阴丸低剂量组	1.62	1621.09 ± 222.12 **##
大补阴丸高剂量组	3.24	1499.21 ± 233.85 **##

注:与空白组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

2.3 各组大鼠治疗后关节液中 IL-6、TNF-α 及 TGF-β1 mRNA 表达量

比较各组大鼠治疗后关节液中 IL-6、TNF-α 及 TGF-β1 mRNA 表达量,空白组以上 3 组指标表达量最低,与其余各组相比差异具有统计学意义($P < 0.01$)。模型组表达量最高,给药组与模型组比较均有所降低,其中各给药组与模型组相比 IL-6 mRNA 表达量下降更为明显,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。各给药组 TNF-α mRNA 表达量与模型组相比有所下降,差异具有统计学意义($P < 0.01, P < 0.05$)。各给药组 TGF-β1 mRNA 表达量与模型组相比有所下降,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 4。

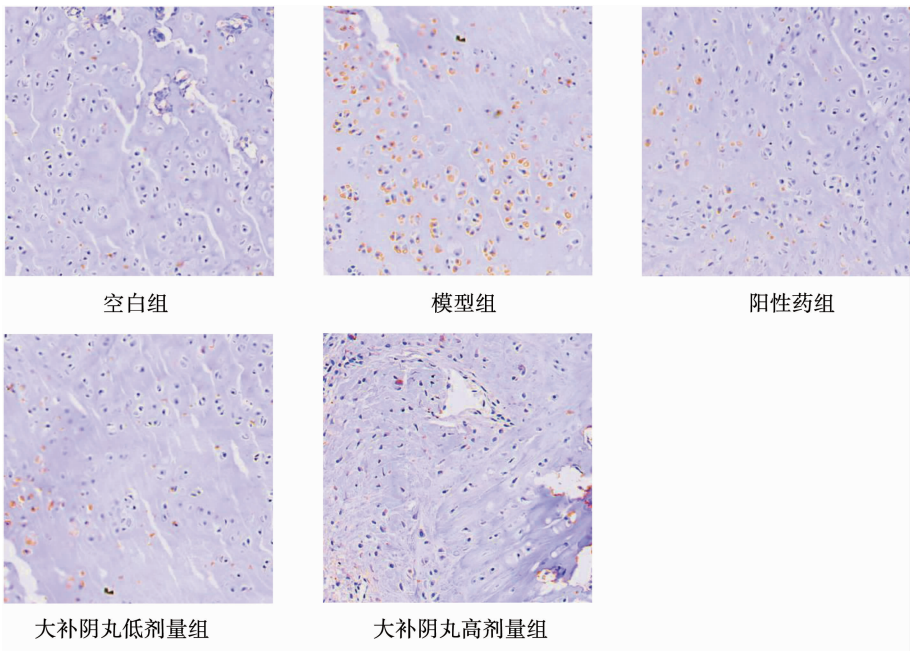


图 1 各组大鼠治疗后骨关节 MMP-3 检测情况 (×400)

表 4 各组大鼠关节液中 IL-6、TNF-α 及 TGF-β1 mRNA 表达结果($\bar{x} \pm s, n = 10, \mu\text{g/mL}$)

分组	剂量(g/kg)	IL-6	TNF-α	TGF-β1
空白组	—	1.13 ± 0.20	0.97 ± 0.12	1.10 ± 0.18
模型组	—	4.91 ± 0.59 **	3.78 ± 0.51 **	2.91 ± 0.33 **
阳性药组	0.14	2.91 ± 0.41 ***	2.28 ± 0.31 ***	2.03 ± 0.25 ***
大补阴丸低剂量组	1.62	3.13 ± 0.44 ***	2.49 ± 0.37 ***	2.21 ± 0.34 ***
大补阴丸高剂量组	3.24	2.82 ± 0.39 ***	2.18 ± 0.29 ***	2.35 ± 0.36 ***

注:与空白组比较, ** $P < 0.01$;与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

3 讨论

通过分析 2 型糖尿病合并骨关节炎的病因病机及证候表现,中医可将其归属于“骨痹”“骨痿”的范畴。糖尿病总的病机是阴虚燥热^[9],病本在肾,肾精虚衰,无以生髓,骨失滋养,骨枯髓减,则可见骨关节病变^[10]。大补阴丸出自《丹溪心法》该方由元代著名医学家朱丹溪创立,以熟地黄、炙龟板为君药,熟地黄滋补真阴,益精填髓;炙龟板滋阴潜阳,补肾健骨,两药相合,共奏补阴固本,滋水制火之效。知母、黄柏为臣药,可清降阴虚之火,清热消炎。全方滋阴补肾为主,降火清源为辅,为补泻并施之方。2 型糖尿病合并骨关节炎患者可见口干体瘦,骨蒸肉烁,关节部位活动不利,疼痛等症状表现^[11]。中医认为治病必求于本,故治宜以补阴清热之法,针对本病的病因病机大补阴丸可起到治疗作用。

糖尿病患者持续在高糖状态下会出现不同程度的炎症反应,而骨关节炎作为一种常见的无菌性炎症,可由糖尿病诱发。临床诊疗案例显示,合并糖尿病的骨关节炎临床治愈难度更大^[12]。高糖环境刺激下软骨细胞会产生过量 MMPs,导致关节液中 MMPs 及其他破坏性酶含量和活性显著增加,MMPs 增加会引起胶原降解和蛋白多糖丢失,破坏胶原网架结构及软骨基质的稳定。其中 MMP-3 是 MMPs 家族中促进细胞外基质降解的重要因子,可以促进软骨基质中蛋白多糖的降解,并激活胶原蛋白酶,从而促进 II 型胶原降解^[13],并且 MMP-3 是关节液中可以反映关节软骨代谢的特定物质,临床常以 MMP-3 含量判断骨关节炎软骨病变的程度^[14]。高糖可通过多种途径诱导炎症因子表达增加,主要表现为 TNF-α、IL-6 等炎症因子水平异常升高^[15]。TNF-α 是一种重要的炎症反应感受调节器,参与细胞的传递与合成。TNF-α 还可以促进破骨细胞的骨吸收,诱导骨母细胞释放破骨细胞因子,同时促进软骨细胞释放胶原酶,破坏骨细胞外基质环境^[16]。在 TNF-α 的作用下,关节组织局部的血管内皮细胞被激活,血管内皮细胞经 TNF-α 刺激

后,通透性增高,部分炎性细胞游出,导致局部组织炎性反应加重,增加其他炎性细胞因子及骨与软骨破坏酶的表达,同时 TNF-α 刺激血管扩张,局部血流增加,也促使局部炎症反应表现增强^[17]。IL-6 活性与关节炎程度相关,关节炎患者关节液、血清和滑膜细胞培养液中可均检测出具有非常高活性的 IL-6^[18]。活化的 IL-6 可增强 TNF-α 活性,与 TNF-α 共同作用促进炎症进展。TGF-β1 既参与炎症反应,又可以促进组织修复^[19]。TGF-β1 可作用于血管内皮细胞,增强血管通透性,使血浆渗出增多,局部肿胀表现严重,并刺激单核细胞、巨噬细胞参与炎症反应。当炎症反应进行一段时间后,TGF-β1 表现出双向调节作用,即调节细胞生长和分化,抑制炎症反应,抑制胶原、胞外基质和蛋白多糖的降解,参与关节修复和重建^[20]。

研究结果显示,大补阴丸可有效平稳地降低糖尿病大鼠血糖,减低实验大鼠骨关节中 MMP-3 含量,减少关节液中 IL-6、TNF-α 及 TGF-β1 mRNA 表达量。即在控制血糖的同时降低了炎症因子表达,减轻骨关节的炎症反应。因此,笔者推测大补阴丸在临床中发挥治疗 2 型糖尿病合并骨关节炎的作用是通过影响 MMP-3、IL-6、TNF-α 及 TGF-β1 等相关因子实现的。本实验虽在一定程度上说明了大补阴丸治疗 2 型糖尿病合并骨关节炎的作用机理,但实验中并未表现出本药与阳性药相比的优势。后续研究欲观察大补阴丸对大鼠其他生理指标改善情况,寻找中药治疗的优点,并进一步验证该药对炎症相关通路的作用机制。加入中西药联合应用实验组,观察联合用药是否可起到增效并降低副作用的效果。

参考文献:

[1] 古剑,林立英,胡燕. 中西医结合治疗 2 型糖尿病合并痛风性关节炎临床疗效观察[J]. 中华全科医学,2021,19(4):656-659.
[2] 王华军,查振刚. 糖尿病对骨关节炎影响的研究进展[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版),2016,37(1):1-6.
[3] 刘小燕,王远征,李航旭. 瑞格列奈联合盐酸二甲双胍治疗 2 型糖尿病的临床效果分析[J]. 中国现代药物应用,2021,15(6):138-

140.

[4] 施伟丽. 2 型糖尿病伴骨关节炎患者血清 VEGF、FGF2、CTGF、TGF- β 水平变化意义及临床实用价值[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2017.

[5] 高希武, 吴疆, 张帅, 等. 膝骨关节炎发生发展与糖尿病的相关性研究[J]. 当代医学, 2021, 27(17): 107-108.

[6] 于通, 谢斯怡, 夏文芳, 等. 二甲双胍影响 T2DM 患者认知功能的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(6): 1333-1337.

[7] 秦夏冰, 文科. 二甲双胍对小鼠骨关节炎保护作用的研究[J]. 广西医科大学学报, 2020, 37(9): 1642-1647.

[8] 吴婷婷, 朱美红, 王国平, 等. Native CT- II 改善单碘乙酸致大鼠膝骨性关节炎实验研究[J]. 中国药业, 2020, 29(21): 15-18.

[9] 赵能江, 张智海, 陈薇, 等. 《中国 2 型糖尿病防治指南(2020 年版)》亮点解读及糖尿病中医指南分析[J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41(6): 652-655.

[10] 潘莉, 刘维忠. 中西医对 2 型糖尿病及其并发症发病机制的认识与治疗进展[J]. 中医药临床杂志, 2021, 33(1): 162-166.

[11] 施松青, 邵永科, 余金聪, 等. 不同剂量二甲双胍用于 2 型糖尿病合并膝关节炎的临床效果观察[J]. 现代实用医学, 2018, 30(10): 1280-1282.

[12] 贾燕午, 李彦. 血糖血脂对骨关节炎的影响[J]. 医学新知杂志, 2019, 29(4): 373-376.

[13] HOHJOH H, HORIKAWA I, NAKAGAWA K, et al. Induced mRNA expression of matrix metalloproteinases Mmp-3, Mmp-12, and Mmp-13 in the infarct cerebral cortex of photothrombosis model mice[J]. Neuroscience Letters, 2020, 739: 135406.

[14] 赵伊婷, 何云, 马洁, 等. 膝骨关节炎患者 TIMP-1、MMP-3 的水平变化与意义[J]. 现代医学与健康研究电子杂志, 2020, 4(22): 68-69.

[15] 宋献美, 许波, 张欢欢, 等. 牛膝总皂苷对类风湿关节炎大鼠 Th17/Treg 平衡和滑膜组织中 IL-2、IL-6、TNF- α 的影响[J]. 中医研究, 2020, 33(3): 70-73.

[16] 周沛, 贾雪芹, 李梓灏, 等. 薏苡汤加味防治大鼠膝骨性关节炎的实验研究[J]. 广州中医药大学学报, 2020, 37(10): 1973-1977.

[17] 马文静, 斯依提·阿木提, 阿地力江·伊明, 等. 复合应激型 ED 大鼠模型促炎细胞因子 IL-6、TNF- α 和 TGF- β 1 水平的研究[J]. 现代生物医学进展, 2021, 21(5): 825-829.

[18] BARATI E, GHAZIZADEH H, SADABADI F, et al. Association of the IL6 gene polymorphism with component features of metabolic syndrome in obese subjects[J]. Biochemical Genetics, 2019, 57(5): 695-708.

[19] 李宁. 龙葵素膏外敷对兔膝关节滑膜炎关节液中 IL-1 β 、TGF- β 表达水平的影响[C]//甘肃省中医药学会 2020 年学术年会论文集. 兰州, 2020: 215-222.

[20] LU N, LU J W, ZHOU C H, et al. Association between transforming growth factor- β 1 gene single nucleotide polymorphisms and knee osteoarthritis susceptibility in a Chinese Han population[J]. The Journal of International Medical Research, 2017, 45(5): 1495-1504.

Experimental Study of Dabuyin Pill in Treating Type 2 DM Complicated with Osteoarthritis

WU Xinyu, GUAN Zihe, ZHANG Tingting, ZHOU Xueming
(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

Abstract: Objective: To observe the therapeutic effect of Dabuyin Pill on type 2 diabetes mellitus (DM) complicated with osteoarthritis in rats. Methods: 50 male SD rats were randomly divided into the blank group, the model group, the positive drug group and the Dabuyin Pill of high-dose and low-dose, with 10 rats in each group. The administration duration was continuous 6 weeks. The blood sugar of rats in each group was measured at 0 w, 2 w, 4 w and 6 w, the content of MMP-3 in bone and joint was detected, and the expressions of IL-6, TNF- α and TGF- β 1 mRNA in synovial fluid were measured. Results: Dabuyin Pill could reduce blood sugar, and the differences between the administration groups and the model group were statistically significant ($P < 0.01$). Dabuyin Pill could inhibit the abnormal increase of MMP-3 in bone and joint, and reduce the expressions of IL-6, TNF- α and TGF- β 1 mRNA; of which there were statistical differences between the administration groups and the model group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Conclusion: Dabuyin Pill can effectively and steadily reduce blood sugar, reduce the content of MMP-3 in bone and joint, reduce the expression of IL-6, TNF- α and TGF- β 1 mRNA in synovial fluid, thereby controlling blood sugar and inhibiting inflammation to play the role in treating Type 2 DM complicated with osteoarthritis.

Key words: Dabuyin Pill; Type 2 DM; Osteoarthritis; Experimental study