

蒙药润僵汤对胶原酶诱导的模型小鼠膝骨性关节炎组织形态学的影响

苏力德*, 那日苏, 关文祥, 阿如恒, 巴虎山#

内蒙古自治区国际蒙医医院骨伤科, 内蒙古 呼和浩特

收稿日期: 2024年12月15日; 录用日期: 2025年1月8日; 发布日期: 2025年1月21日

摘要

目的: 观察蒙药润僵汤对KOA模型小鼠膝关节组织形态学的影响, 探讨其治疗膝骨关节炎的作用机理, 为临床运用以及进一步探索蒙药润僵汤治疗膝骨关节炎的机制提供依据。方法: 将40只C57BL/6小鼠随机分组分为空白组、模型组、实验组(蒙药润僵汤)、阳性对照组(中药海桐皮汤), 每组10只。空白组膝关节腔内注射生理盐水处理, 模型组、实验组、阳性对照组通过膝关节腔内注射胶原酶的方式建立KOA动物模型。术后1周开始用药, 实验组以蒙药润僵汤浸泡治疗, 阳性对照组以中药海桐皮汤浸泡治疗, 空白组及模型组温水浸泡治疗。隔日1次, 连续治疗2周。2周后行小动物膝关节MRI检查并处死动物后取股骨内髌关节软骨及部分软骨下骨标本, 分别经HE染色。结果: 小鼠膝关节MRI显示润僵汤组膝关节结构完整, 关节腔内可见少量液体高信号影, 所见肌肉组织信号正常。HE染色光镜下观察实验组大体同阳性对照组, 关节软骨破坏较模型组明显轻; 结论: 蒙药润僵汤可能减少膝关节处炎症反应, 减轻关节软骨破坏, 减缓软骨下骨硬化, 延缓骨关节炎的发展进程, 但同时也表明其不能停止或逆转关节软骨的退变。

关键词

蒙药润僵汤, 膝骨性关节炎, 关节软骨, 组织形态学

The Effect of Mongolian Medicine Runjiang Tang on the Tissue Morphology of Collagenase Induced Knee Osteoarthritis in Model Mice

Sulide*, Narisu, Wenxiang Guan, Aruheng, Bahushan#

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 苏力德, 那日苏, 关文祥, 阿如恒, 巴虎山. 蒙药润僵汤对胶原酶诱导的模型小鼠膝骨性关节炎组织形态学的影响[J]. 临床医学进展, 2025, 15(1): 990-996. DOI: 10.12677/acm.2025.151132

Department of Orthopedics and Traumatology, International Mongolian Hospital of Inner Mongolia, Hohhot Inner Mongolia

Received: Dec. 15th, 2024; accepted: Jan. 8th, 2025; published: Jan. 21st, 2025

Abstract

Objective: To observe the effect of Mongolian medicine Runjiang Tang on the morphology of knee joint tissue in KOA model mice, explore its mechanism of action in treating knee osteoarthritis, and provide a basis for clinical application and further exploration of the mechanism of Mongolian medicine Runjiang Tang in treating knee osteoarthritis. **Method:** Forty C57BL/6 mice were randomly divided into a blank group, a model group, an experimental group (Mongolian medicine Runjiang Tang), and a positive control group (Chinese medicine Haitong Pi Tang), with 10 mice in each group. The blank group was treated with injecting physiological saline into the knee joint cavity, while the model group, experimental group, and positive control group were established with KOA animal models by injecting collagenase into the knee joint cavity. Medication started one week after surgery. The experimental group was treated with Mongolian medicine Runjiang Tang soaking, while the positive control group was treated with traditional Chinese medicine Haitongpi Tang soaking. The blank group and model group were treated with warm water soaking. Once every other day, continuous treatment for 2 weeks. Two weeks later, a small animal's knee joint MRI examination was performed and the animal was euthanized. The femoral medial condylar joint cartilage and some subchondral bone specimens were taken and stained with HE, respectively. **Result:** MRI of the mouse knee joint showed that the knee joint structure of the Runjiang Tang group was intact, with a small amount of fluid high signal shadows visible in the joint cavity, and normal muscle tissue signals observed. Under the HE staining light microscope, the experimental group was generally the same as the positive control group, and the joint cartilage damage was significantly lighter than that of the model group. **Conclusion:** Mongolian medicine Runjiang Tang may reduce the inflammatory response at the knee joint, alleviate joint cartilage damage, slow down subchondral bone sclerosis, and delay the development process of osteoarthritis. However, it also indicates that it cannot stop or reverse the degeneration of joint cartilage.

Keywords

Mongolian Medicine Runjiang Tang, Knee Osteoarthritis, Joint Cartilage, Organizational Morphology

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

膝关节骨性关节炎(Knee Osteoarthritis, KOA)是一种由于增龄、肥胖、劳损、创伤、关节先天性异常、关节畸形等引起的慢性关节退行性疾病,其病理改变主要是膝关节软骨原发性或继发性退化损伤、关节边缘骨质和软骨下骨反应性增生、韧带松弛或挛缩等[1]。我国骨关节炎的发病率达到 8.1%,呈现性别及地域差异,女性高于男性,西部地区高于东部地区[2],是老年人功能性致残的主要疾病之一,成为当前

社会面临的严重健康问题。蒙药润僵汤是蒙药经典验方忠伦-5 汤的优化方, 多年的临床实践表明, 蒙药润僵汤治疗膝骨性关节炎临床疗效显著[3], 然而目前机制仍不清楚, 本实验设计以膝关节骨关节炎动物模型的方法, 从组织形态学的角度, 研究蒙药润僵汤治疗膝骨关节炎的作用机制, 同时进一步探讨 KOA 的发病机理, 揭示膝骨关节炎的病理生理改变机制。

2. 材料

2.1. 实验动物

8~12 周龄 SPF 级健康雌性 C57BL/6 小鼠 40 只, 体重为 18~20 g (斯贝福(北京)生物技术有限公司提供, 许可证号: SCXK (京) 2019-0010), 天津南开医院动物实验中心 SPF 级动物室内饲养。

2.2. 药物

蒙药润僵汤(梔子、苦参各 50 g、诃子、川楝子各 30、当药 20 g)由内蒙古自治区国际蒙医医院蒙药房提供, 批号: 17042507。海桐皮汤原方(花椒 9 g, 海桐皮、乳香、没药、透骨草各 6 g、酒当归 5 g、白芷、防风、川芎、红花、威灵仙和甘草片各 3 g), 药物剂量出自《医宗金鉴》, 由内蒙古自治区中医医院提供。

2.3. 试剂

造模用胶原蛋白酶 VII (美国西格玛化学公司)。

3. 实验方法

3.1. KOA 动物模型的制备

C57BL/6 小鼠适应性喂养一周后, 通过膝关节腔内注射胶原酶的方式建立 KOA 模型。采用 10%水合氯醛 0.3 mg/kg, 腹腔注射麻醉小鼠。成功麻醉后, 在无菌条件下, 由髌腱外侧向小鼠右膝关节腔内注射 6 μ L 1% (100 mL 里含 1 g 胶原酶)胶原酶 VII, 每天强制让小鼠动物活动 30~60 min, 所有操作均严格遵循实验动物使用与保护条例规定。

3.2. 分组与给药

正常 C57BL/6 小鼠随机分为 4 组, 每组 10 只。除空白组, 其余各组均建立 KOA 动物模型, 每两天膝关节内注射一次 3 μ L 胶原酶 VII。空白组每两天膝关节内注射一次 3 μ L 生理盐水; 每隔 1 天对各组小鼠进行浸泡治疗。其中: 空白组、模型组 10 mL 温开水浸泡治疗; 给药组 10 mL 润僵汤(3 克润僵汤加 7 mL 水)浸泡; 阳性对照组 10 mL 海桐皮汤(3 克海桐皮汤加 7 mL 水)浸泡; 浸泡治疗 2 周。

3.3. 影像学改变检查

各组小鼠造模治疗 2 周后, 每组取 1 只小鼠行右侧膝关节(右后腿)拍摄 MRI 观察。

3.4. 组织形态学变化检查

各组小鼠造模治疗 2 周后, 每组随机取 3 只分别取右侧滑膜层组织, 多聚甲醛进行固定, 石蜡包埋, 切片, 行 HE 染色。

HE 染色具体步骤如下: 各组造模治疗拍摄小动物核磁后, 进行脊髓离断处死, 右膝关节置于新洁尔灭液中浸泡, 于膝关节正中纵行切开皮肤, 分离肌肉, 露出膝盖骨, 继续向下分离, 可见平滑光亮的滑

膜组织,用手术刀分离关节囊的滑膜层和纤维层,然后取出滑膜层组织。将组织置于 40 g/L 多聚甲醛在 4℃冰箱内固定 24 h,然后用去离子水冲洗数遍,洗净多聚甲醛,然后再用浓度为 14%的乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙液在摇床上脱钙三四周,脱钙液更换频率为每 2 d 更换 1 次。脱钙完成后用去离子水冲洗数遍洗净脱钙液,在脱水机上进行脱水。脱水完成后,取出标本,置于石蜡包埋机上的液体蜡池中,将关节内侧面朝向底面矢状面包埋(尽量保持关节平整贴于包埋盒底面)。待包埋后的标本于低温冰台冷却凝固后,置于-20℃冰箱冻存。

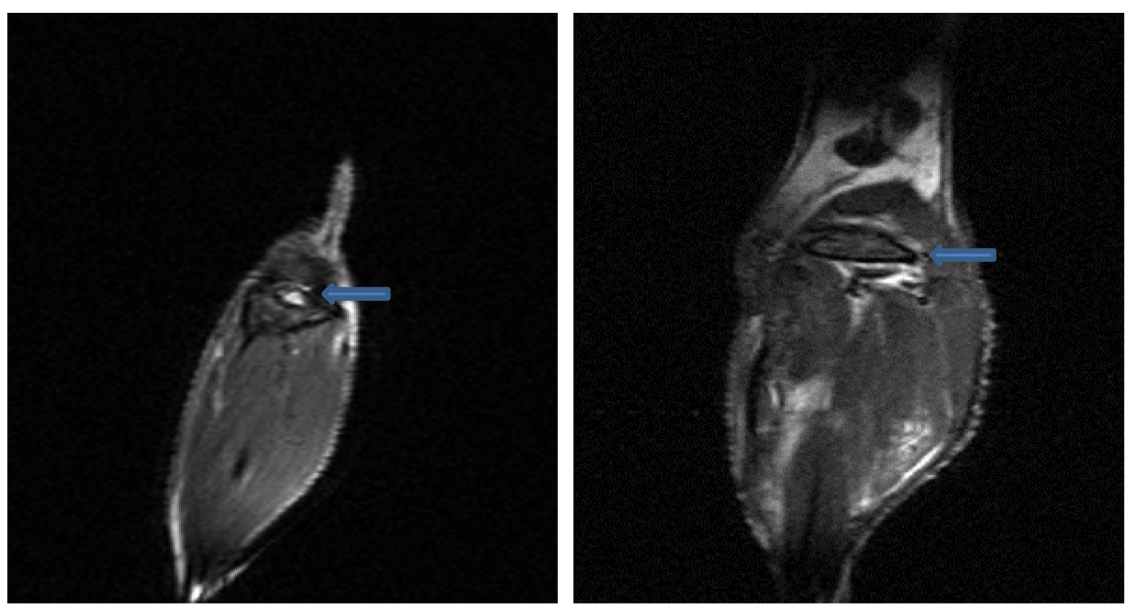
组织切片及脱蜡水化处理:在切片机上对蜡块修整后切片,使用连续切片法对组织标本从内侧面开始连续切片,切片厚度 4 μm,切片完成后置于 37℃恒温箱内过夜干燥。进行切片染色前,将组织切片置于 65℃电热恒温鼓风干燥箱中烤 1 h 左右,然后在二甲苯和梯度乙醇(100%, 100%, 90%, 80%, 70%, 50%)中进行依次脱蜡水化,每次 10 min。

HE 染色:每个样品在镜下挑选包含整个关节面的切片,进行脱蜡水化行 HE 染色,二甲苯透明,最后用中性树胶封固。每个样品取 5 张以上比较典型的矢状切面,光镜下观察切片中关节软骨组织结构的变化情况。

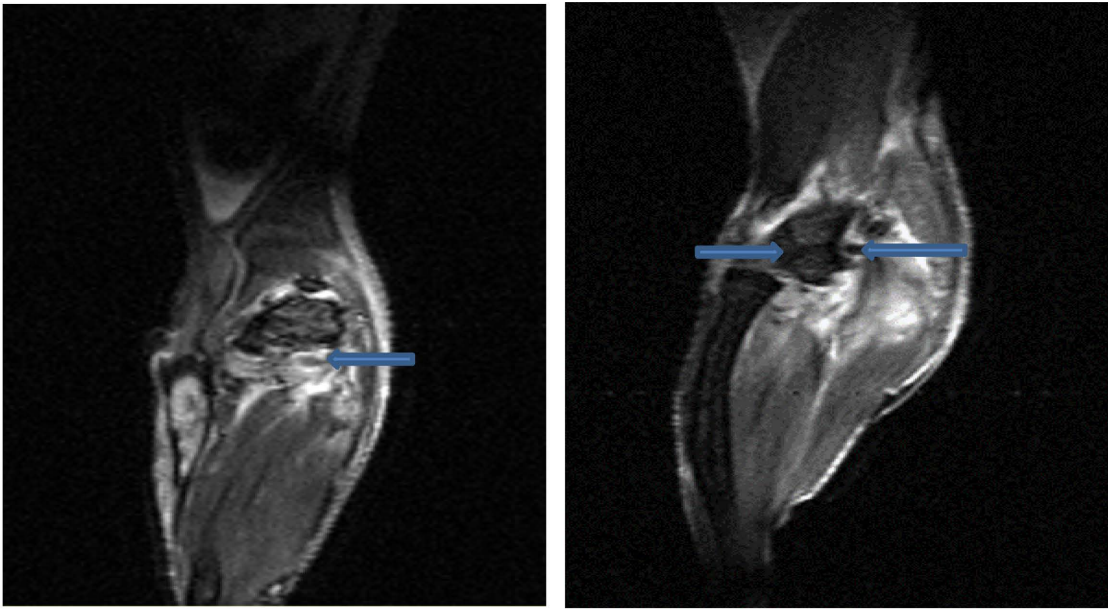
4. 结果

4.1. 各组小鼠 MRI 影像学改变

对膝关节的影响见图 1。空白对照组可见关节间隙正常、关节面平整、光滑;与空白对照组比较,模型对照组关节软骨变薄、可见局部有充盈性缺损,关节腔内积液明显增加。模型组构成膝关节的骨关节骨质可见斑片状高信号影,关节面欠光滑,关节腔内可见大量高信号影韧带结构显示不清,邻近肌肉组织内可见大量混杂条状、斑片状高信号影。阳性对照组构成膝关节的骨关节骨质可见少量高信号影,关节腔内可见液体样高信号影,膝关节邻近肌组织显示明显肿胀并可见少许条状、斑片状混杂高信号影。润僵汤组膝关节结构完整,关节腔内可见少量液体高信号影,所见肌肉组织信号正常。



(1) 空白对照组(正常关节可见明显的滑膜)
(2) 模型对照组 (模型组关节面及周边肌肉组织可观察到炎症浸润)

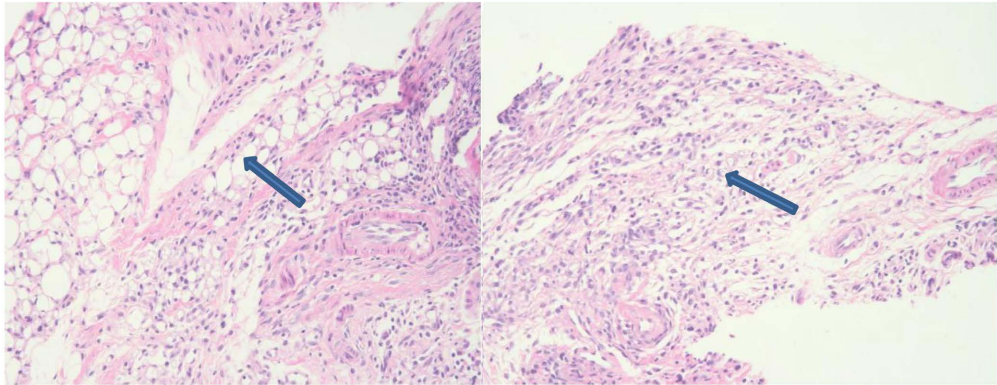


(3) 蒙药润僵汤组 (关节附件有炎性浸润, 关节面及关节腔不明显, 周边肌肉组织炎症不明显) (4) 阳性对照组 (周边关节肌肉组织炎性浸润明显, 关节面及关节腔不明显)

Figure 1. Magnetic resonance imaging of mouse knee joint
图 1. 小鼠膝关节核磁共振图像

4.2. 各组小鼠滑膜层组织病理学改变

空白对照组滑膜整体结构基本正常, 滑膜上皮细胞排列较整齐, 组织脂肪性滑膜脂肪细胞丰富, 组织未见滑膜细胞明显增生, 组织未见明显炎症细胞浸润。模型对照组滑膜整体结构异常, 组织滑膜细胞可见明显增生, 组织可见少量炎症细胞浸润。阳性对照组滑膜整体结构轻度异常, 组织可见滑膜组织结构疏松, 部分滑膜细胞及间质可见疏松水肿, 组织未见滑膜细胞明显增生, 组织未见明显炎症细胞浸润。蒙药润僵汤组滑膜整体结构基本正常, 滑膜上皮细胞排列较整齐, 组织纤维性滑膜纤维结缔组织丰富, 组织未见滑膜细胞明显增生, 组织未见明显炎症细胞浸润。见图 2。



(1) 空白对照组 (空白对照组: 滑膜整体结构基本正常, 滑膜上皮细胞排列较整齐, 组织脂肪性滑膜脂肪细胞丰富, 如图蓝色箭头所示, 组织未见滑膜细胞明显增生, 组织未见明显炎症细胞浸润) (2) 空白对照组 (滑膜整体结构轻度异常, 组织可见滑膜组织结构疏松, 部分滑膜细胞及间质可见疏松水肿, 如图蓝色箭头所示, 组织未见滑膜细胞明显增生, 组织未见明显炎症细胞浸润)

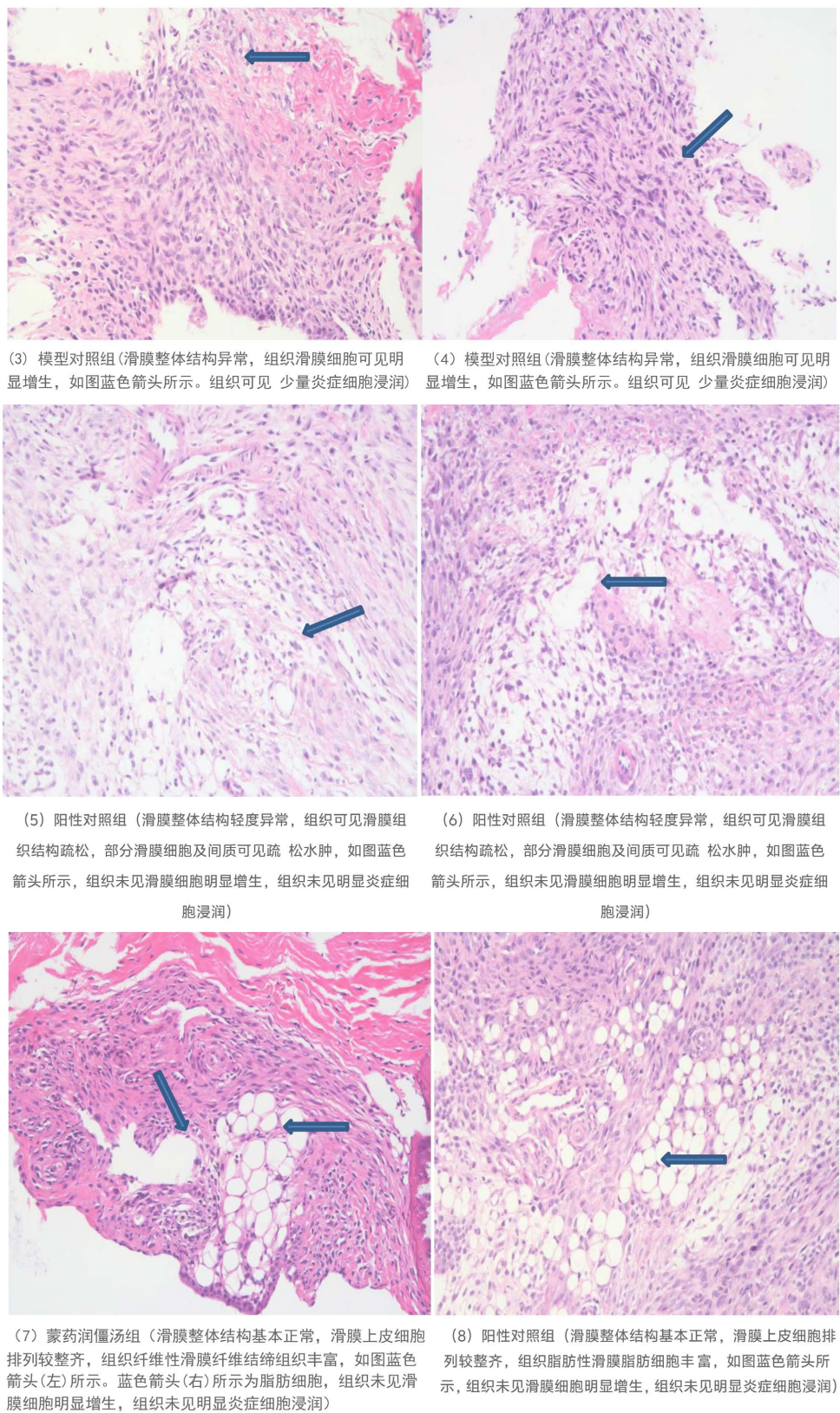


Figure 2. Pathological changes in synovium of KOA model mice (HE × 400)
图 2. KOA 模型小鼠滑膜病理改变情况(HE × 400)

5. 讨论

膝关节骨性关节炎是骨科常见的侵及关节软骨、滑膜的慢性疾病,随着病变的发展,患者晚期可出现膝关节疼痛、畸形以及活动障碍,致使患者的生活质量严重下降[4]。现阶段,确诊膝关节骨性关节炎的患者多已处于病变中晚期,此时关节软骨已存在严重磨损,因此现阶段临床上主要以手术作为主要的治疗手段[5]。随着人口老龄化问题日益严重,骨关节炎患者越来越多[2]。截止到 2019 年,我国每年进行的膝关节置换术已超过 25 万例,给社会医疗、经济带来了巨大压力[6]。随着骨性关节炎发病机制相关的分子生物学研究的不断深入,通过生物学标志物早期诊断膝关节骨性关节炎的猜想越来越多,而寻找合适的靶点蛋白也逐渐成为了研究热点。

蒙医学上 KOA 在“关节协日乌素病”范畴内,原因众多,年老,风寒导致人体三根七素之相对平衡状态失调,希日减弱而巴达干、赫依增盛,从而人体“火”减弱。此时劳动过度,失于“赫依”“血”的滋养,膝关节周围的软骨等组织受损或产生的协日乌素累及膝关节引起该病。蒙药润僵汤配方都是传统植物药,镇痛、抗炎及免疫调节作用明显[7]。比如君药苦参具有促热、发汗、燥黄水等功效,辅药诃子、梔子、川楝子分离病血与体血功效,佐药当药具有清希拉热功效。大量临床研究也表明,润僵汤可通过临床症状,如关节疼痛、晨僵、肿胀、屈伸障碍等方面的改善来体现疗效[8],但并未进一步探讨相关作用途径。

蒙药润僵汤 KOA 小鼠组织形态学的影响 HE 染色显示,模型组关节软骨破坏最为严重。同时,模型组出现明显软骨下骨硬化或囊性变形成,边缘有丘状隆起的骨赘,而对照组和实验组则无明显变化,偶见软骨下骨小梁连续性较差。推测早期应用蒙药润僵汤可以减少软骨下骨硬化,减轻关节软骨的破坏而延缓 KOA 的发展;同时表明关节软骨的损伤程度与软骨下骨的变化有一定的相关性。

基金项目

内蒙古自治区科技成果转化项目(编号:CGZH2018177);内蒙古自治区自然科学基金重点项目(编号:2023ZD29);内蒙古自治区国际蒙医医院蒙医药询证能力建设项目。领军人才项目:国家级非物质文化遗产保护项目(传统蒙医整骨术)。

参考文献

- [1] 孙佳冰,付春江,邹吉龙,等. 膝关节软骨剥脱分期对腓骨近端截骨治疗膝关节骨性关节炎的指导意义[J]. 中华老年骨科与康复电子杂志, 2016, 2(1): 50-53.
- [2] Tang, X., Wang, S., Zhan, S., Niu, J., Tao, K., Zhang, Y., et al. (2016) The Prevalence of Symptomatic Knee Osteoarthritis in China: Results from the China Health and Retirement Longitudinal Study. *Arthritis & Rheumatology*, **68**, 648-653. <https://doi.org/10.1002/art.39465>
- [3] 关文祥,巴虎山. 润僵汤对膝关节骨性关节炎模型小鼠的影响[J]. 中国蒙医药(蒙)杂志, 2023, 18(2): 67-71.
- [4] 马晓军. 老年膝关节骨性关节炎患者全膝关节置换术后的疗效分析[J]. 陕西医学杂志, 2015, 44(8): 986-988.
- [5] 芦丹,汪亚群,俞杭平,董黎强. 膝骨性关节炎临床分期与膝关节角的关系研究[J]. 中华全科医学, 2017, 15(10): 1818-1820.
- [6] Fukuda, M., Yoshizawa, T., Karim, M.F., Sobuz, S.U., Korogi, W., Kobayasi, D., et al. (2018) SIRT7 Has a Critical Role in Bone Formation by Regulating Lysine Acylation of SP7/Osterix. *Nature Communications*, **9**, Article No. 2833. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05187-4>
- [7] 沈敬华,董秋梅,刘慧招,马瑞莲. 五味润僵汤对胶原诱导性关节炎大鼠的治疗[J]. 内蒙古医学院学报, 2011, 33(S1): 527-530.
- [8] 白福贵,巴虎山,全胜,等. 蒙药塔里必古鲁其汤联合玻璃酸钠治疗膝骨性关节炎的临床疗效观察[J]. 中国民族医药杂志, 2018, 24(3): 12-14.