

蕲蛇水提液对大鼠骨性关节炎疼痛模型的作用研究

王蔡未¹, 郁玲莹¹, 严莉¹, 严波¹, 方慧¹, 张纪达¹, 单乐天^{1*}, 童培建¹, 俞光平², 王春雷³(1.浙江中医药大学, 杭州 310053; 2.仙居县中医院, 浙江 台州 317300; 3.浙江省肿瘤医院, 杭州 310053)

摘要: 目的 研究蕲蛇水提液对大鼠骨性关节炎(osteoarthritis, OA)的药效作用。方法 将SD大鼠随机分为正常组、模型组、蕲蛇组, 每组10只, 除正常组外均采用碘乙酸关节腔注射法(50 μ L)建立OA疼痛模型。造模48 h后, 蕲蛇组大鼠关节腔注射蕲蛇水提液(100 μ g·mL⁻¹), 模型组大鼠注射等量生理盐水, 1周1次, 连续4周。每周测量大鼠足耐压痛、热痛阈的数值变化, 观察大鼠膝关节的疼痛改善情况; 4周后取关节进行病理切片SO染色, 观察膝关节的组织病理改变。培养大鼠原代软骨细胞, 以CCK-8法评价蕲蛇对软骨细胞的增殖作用。结果 OA大鼠造模成功。与模型组相比, 蕲蛇组压痛和热痛的痛阈值显著回升($P<0.01$); 软骨基本恢复正常, 软骨细胞和软骨基质接近正常水平, 仅有少量肥大软骨细胞; Mankin评分显著降低($P<0.01$); 软骨细胞活力显著升高($P<0.01$), 各项指标基本到达正常水平。结论 蕲蛇水提液可显著改善OA大鼠关节疼痛, 并修复软骨损伤, 其机制与促进软骨细胞增殖有关。

关键词: 蕲蛇; 骨性关节炎; 碘乙酸; 水提液

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)03-0292-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.03.007

引用本文: 王蔡未, 郁玲莹, 严莉, 等. 蕲蛇水提液对大鼠骨性关节炎疼痛模型的作用研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(3): 292-296.

Study on the Effect of Agkistrodon Aqueous Extract on Pain Model of Osteoarthritis in Rats

WANG Caiwei¹, YU Lingying¹, YAN Li¹, YAN Bo¹, FANG Hui¹, ZHANG Jida¹, SHAN Letian^{1*}, TONG Peijian¹, YU Guangping², WANG Chunlei³(1.Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2.Xianju County Chinese Medicine Hospital, Taizhou 317300, China; 3.Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the pharmacological effect of Agkistrodon aqueous extract on osteoarthritis(OA) in rats. **METHODS** SD rats were randomly divided into 3 groups: normal group, model group and Agkistrodon group, 10 rats in each group. Except the normal group, the OA pain model was established by using the iodoacetic acid to inject the joint cavity(50 μ L). After 48 h, the Agkistrodon group were injected with Agkistrodon aqueous extract(100 μ g·mL⁻¹) in articular, and the model group were injected with the same amount of saline, once a week, for four consecutive weeks. The numerical changes of the paw withdrawal thermal latency of the rats were measured every week, and observed the pain of the knee joint. After 4 weeks, the joint was taken for pathological section with staining so that the pathological changes of the knee joint were observed. The rat chondrocytes were cultured and the effect of Agkistrodon aqueous extract on the proliferation of cartilage cells was evaluated by CCK-8 method. **RESULTS** The OA pain model was established successfully. Compared with model group, the threshold of pressing pain and heat pain in Agkistrodon group were significantly increased($P<0.01$); cartilage basically returned to normal, chondrocytes and cartilage matrix closed to normal levels, only had a small amount of hypertrophic chondrocytes; Mankin score significantly decreased($P<0.01$); the chondrocyte viability significantly increased($P<0.01$). The above index in Agkistrodon group were closed to normal group. **CONCLUSION** Agkistrodon acutus aqueous extract can significantly ameliorate joint pain and repair cartilage injury in OA rats. The mechanism is related to the promotion of cartilage cell proliferation and can be used in clinical OA auxiliary intervention.

KEYWORDS: Agkistrodon; osteoarthritis; iodoacetic acid; aqueous extract

骨性关节炎(osteoarthritis, OA)亦称膝关节退行性关节炎, 是以关节软骨退行性病变为主要特征的严重影响人类健康的最常见关节疾病之一。主要特征表现为局部炎症、关节疼痛、关节失用

等行为功能障碍^[1-3]。40岁后妇女和老人患病较多, 全球60岁以上老年人OA发病率高达80%, 患者总数约占全球人口的15%。OA不仅影响老年人的生活品质, 还造成了各种经济损失, 严重威

基金项目: 国家自然科学基金项目(81774331、81673997); 浙江省自然科学基金项目(LY14H270009); 浙江省科技厅重大科技专项社会发展项目(2014C03035); 浙江省中医药卫生科技计划项目(2016ZZ011); 浙江省中医药科技计划项目(2016ZQ010)

作者简介: 王蔡未, 女, 硕士生 Tel: 17757122267 E-mail: 1002817815@qq.com ***通信作者:** 单乐天, 男, 博士, 副研究员 Tel: (0571)86623684 E-mail: 516122864@qq.com

胁人类健康^[4-5]。

蕲蛇 *Agkistrodon acutus* (Guenther), 又名五步蛇、白花蛇, 尖吻蝮属。中药药材蕲蛇为其除去内脏的干燥全体, 味甘咸, 性温, 有毒, 归肝脾经, 具有祛风湿、通经络、镇痉攻毒之效。《本草蒙荃》中记载“止风痛甚速, 性窜而然; 去风毒弥佳, 力倍故尔”。临床常用于祛风疮, 攻毒散结, 治疗风湿顽痹, 中风口眼喎斜, 半身不遂, 抽搐偏瘫等^[6-7]。现代研究认为, 蕲蛇的作用与其抗炎镇痛的药理性质密切相关。本实验通过动态研究蕲蛇水提液对 OA 大鼠的足耐压痛、热痛程度和滑膜组织病理变化的影响, 为寻找治疗 OA 的最佳药物资源提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

8 周龄 SPF 级的 SD 大鼠 30 只, ♂, 体质量 (150±20)g, 由浙江中医药大学动物实验中心提供, 实验动物许可证号: SCXK(沪)2013-2016。室温 (22±2)℃ 于动物实验中心适应性喂养 1 周, 精确称重, 准确记录。随机分为正常组、模型组、蕲蛇组, 每组 10 只, 并用苦味酸做好标记。

1.2 药物制备

蕲蛇购自浙江中医药大学饮片厂, 经浙江中医药大学葛尔宁教授鉴定为科动物五步蛇 *Agkistrodon acutus* (Guenther) 的干燥体。水煎煮制备蕲蛇水提液, 将蕲蛇干加水 10 倍, 煎煮 2 次, 每次 1.5 h, 合并滤液, 减压旋转浓缩即得(含生药量 1.0 g·mL⁻¹), 4℃ 保存备用。

1.3 试剂与仪器

碘乙酸(monoiodoacetic acid, MIA, Sigma 公司, 批号: BCBL3682V); 戊巴比妥钠(德国 Merck 生物科技公司, 批号: 120505); YLS-3E 电子压痛测定仪(安合盟天津科技发展有限公司); RTY-3 自动热痛测量仪(西安峰岚仪器厂)。

1.4 造模

大鼠适应性喂养 1 周后, 除正常组外, 其余 2 组均采用关节腔注射 MIA 进行造模: 用 3% 戊巴比妥钠 1.5 mL·kg⁻¹ 腹腔注射麻醉, 仰卧固定, 用剃毛机剃除膝关节附近鼠毛, 并用 75% 酒精进行消毒, 屈起大鼠膝关节, 用微量注射器注射 50 μL 的 MIA(40 mg·mL⁻¹) 进入大鼠膝关节腔内。

1.5 给药干预

造模 48 h 后开始给药。膝关节处剃除新生毛

发, 能清楚地触摸到关节腔隙。用 75% 酒精消毒后, 触摸找准位置, 蕲蛇组关节腔注射 50 μL 蕲蛇提取液(100 μg·mL⁻¹), 模型组注射同剂量的生理盐水, 正常组不做处理。此后每周给药 1 次, 连续 4 周。

1.6 压痛测定

每次给药前, 进行大鼠足压痛测定实验。将大鼠固定, 抓握应放松大鼠足部。利用 YLS-3E 电子压痛测定仪上的感应针头按压大鼠足趾表面, 当达到一定压力时, 大鼠疼痛开始挣扎, 立即暂停, 记录数据。待大鼠安静后再次测量, 测 3 次取平均值作为本次测量最终结果, 并绘制效果-时间曲线。

1.7 热痛测定

每周给药 1 次, 4 周后进行大鼠足底部热痛实验。将大鼠置于独立暗格中, 先让其自由活动 5 min, 使其适应环境。测定时大鼠置于底部为 2 mm 厚的玻璃板, 加热仪置于玻璃板下, 将热刺激仪放在大鼠足底部, 大鼠足部有收缩动作立即停止, 记录下显示器上的数值, 待大鼠安静后再次测量, 测量 3 次, 取平均值作为本次测量结果, 并绘制效果-时间曲线。在安静环境下测量, 测量过程中要保持大鼠足底干燥。

1.8 病理切片观察

给药 4 周后, 处死大鼠后取下膝关节, 将多余的肌肉组织剔除, 用 4% 甲醛溶液浸泡固定。1 周后去除 4% 甲醛溶液, 用蒸馏水冲洗, 再用 EDTA 溶液进行脱钙处理, 定期更换脱钙液。完成脱钙后按常规操作脱水、包埋、切片、Masson(SO)染色, 置光镜下对其组织结构进行详细的观察, 并参照 Mankin 关节软骨病理评分标准进行积分统计。Mankin 评分标准: 正常 0 分; 表面不规则 1 分, 血管翳 2 分, 血管翳和表面不规则 3 分, 到过渡带的裂隙 4 分, 到放射带的裂隙 5 分, 到钙化带的裂隙 6 分; 细胞评分: 正常 0 分, 弥漫性细胞过多 1 分, 局部细胞增多 2 分, 细胞过少 3 分; 基质染色: 正常 0 分, 轻度减少 1 分, 中度减少 2 分, 重度减少 3 分, 未着色 4 分; 潮线完整性: 完整 0 分, 被血管破坏 1 分; 总分 14 分。

1.9 软骨细胞试验

1.9.1 软骨细胞分离和培养 取 3~4 周龄的大鼠脱颈处死, 剃毛, 用 75% 酒精消毒背部及四肢皮肤。无菌操作取下双侧股骨头及膝关节(保留周围肌肉, 软骨不能暴露)75% 酒精浸泡 5 min, 剔除关

节周围附着的软组织, 打开髌、膝关节, 用尖刀削取关节软骨组织, 置入装有 PBS 缓冲液的无菌培养皿, 防止软骨组织被风干。PBS 缓冲液充分漂洗软骨小块 3 次, 然后用小剪刀将软骨块切碎至约 1 mm^3 大小。再次用 PBS 缓冲液冲洗 3 次, 滤干, 将细小的软骨块置入放有 0.2% 的 II 型胶原酶 3 mL 的广口瓶里, 摇匀后置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡箱中消化, 40 min 后将上层消化液转移至 15 mL 规格离心管中, $800\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 收集细胞(沉淀物), 加入含 10% 的胎牛血清 DMEM 培养液 4 mL 并吹打混匀, 制成软骨细胞混悬液。把消化所得的软骨细胞混悬液收集于离心管中, 经滤网过滤后用细胞计数板计数, 并把细胞混悬液密度调整为 $2\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$ 接种于 25 cm^2 规格的培养瓶中。将培养瓶放置于 CO_2 培养箱内。培养条件为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 。未消化完的软骨小块继续用 II 型胶原酶如上法消化, 直至软骨块基本消失。每日在倒置显微镜下观察软骨细胞生长情况。

1.9.2 软骨细胞的 CCK 实验 取原代软骨细胞, 消化、吹打后, 调整细胞浓度至 $4\times 10^7\cdot\text{L}^{-1}$, 在 96 孔板中接种软骨细胞悬液(每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$)。将培养板放在培养箱中预培养 24 h($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2)。移除 96 孔板中 IMDM 培养液, 随机分为正常组、模型组和实验组, 正常组加入 IMDM 培养液, 模型组每孔加入 MIA($0.75\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) $100\text{ }\mu\text{L}$, 实验组每孔加入 MIA 后, 再分别加入低、中、高不同浓度的蕲蛇水提液每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$ (40, 80, $160\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 培养箱中孵育 48 h 后; 向每孔加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ CCK 溶液, 注意不要在孔中生成气泡, 会影响 A 值的读数; 将培养板在培养箱内孵育 2 h, 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度(A_{450}), 按公式计算细胞活力, 检测不同浓度的蕲蛇水提液对软骨细胞增殖的影响, 重复操作 3 次。

细胞活力(%)=[(实验组平均 A_{450} 值-正常组平均 A_{450} 值)/正常组平均 A_{450} 值] $\times 100\%$ 。

2 结果

2.1 蕲蛇提取液对大鼠足压痛程度的影响

造模 2 d 后检测压痛数据, 给予大鼠足部一定压力, 与正常组相比, 造模组大鼠受到压力后痛阈值显著降低($P<0.01$), 表明 MIA 造模成功; 蕲蛇组与模型组比较, 压痛值显著升高($P<0.05$ 或 <0.01); 随着蕲蛇水提液给药天数的增加, 大鼠腿部疼痛状况也在逐渐改善, 与正常组比较, 虽有

差异, 但与造模前期相比较, 差异逐渐减小, 结果见图 1。

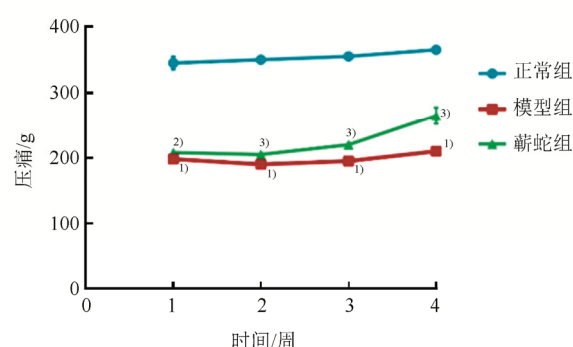


图 1 蕲蛇水提液对 OA 大鼠足压痛影响
与正常组比较, $^1P<0.01$; 与模型组比较, $^2P<0.05$, $^3P<0.01$ 。

Fig. 1 Effect of Agkistrodon aqueous extract on pressing pain of OA rats

Compared with normal group, $^1P<0.01$; compared with model group, $^2P<0.05$, $^3P<0.01$.

2.2 蕲蛇提取液对大鼠足热痛程度的影响

造模 1 周后, 各造模组大鼠对热痛阈值与正常组相比显著降低($P<0.01$); 蕲蛇组较模型组疼痛缓解, 热痛阈值明显延长, 热痛数据大幅提升($P<0.01$)。结果见图 2。

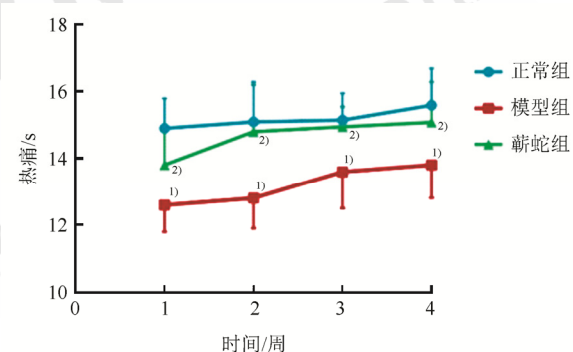


图 2 蕲蛇水提液对大鼠足热痛影响
与正常组比较, $^1P<0.01$; 与模型组比较, $^2P<0.01$ 。

Fig. 2 Effect of Agkistrodon aqueous extract on heat pain of OA rats

Compared with normal group, $^1P<0.01$; compared with model group, $^2P<0.01$.

2.3 SD 大鼠膝关节组织学病理切片结果

与正常组相比, 模型组大鼠膝关节软骨表面明显缺损, 软骨基质降解、软骨细胞丢失, 蛋白聚糖降解, 呈现典型 OA 退变; 蕲蛇组软骨基本恢复正常, 软骨细胞和软骨基质接近正常水平, 仅有少量肥大软骨细胞, 结果见图 3。与正常组相比, 模型组 Mankin 评分明显增高($P<0.01$), 蕲蛇组 Mankin 评分与模型组比较显著降低($P<0.01$), 且接近正常水平, 结果见图 4。



图3 蕲蛇水提液对 OA 大鼠骨关节的病理观察(SO, 100×)
Fig. 3 Histopathological observation of OA rat bone joint after treat with Agkistrodon aqueous extract(SO, 100×)

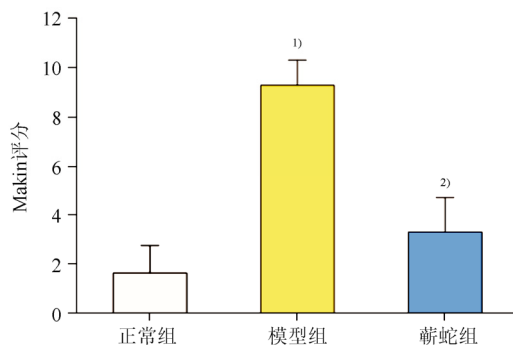


图4 蕲蛇水提液对 OA 大鼠骨关节的病理 Mankin 评分与正常组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.01$ 。
Fig. 4 Histopathological Mankin scoring of OA rat bone joint after treat with Agkistrodon aqueous extract Compared with normal group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with model group, ²⁾ $P < 0.01$.

2.4 CCK-8 法检测不同浓度蕲蛇水提液对软骨细胞增殖影响

软骨细胞培养 48 h 后, 与正常组相比, 模型组细胞活力明显下降($P < 0.01$), 低、中、高浓度(40, 80, 160 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)蕲蛇干预后的软骨细胞活力均显著高于模型组($P < 0.01$), 基本到达甚至超过正常水平。结果见图 5。

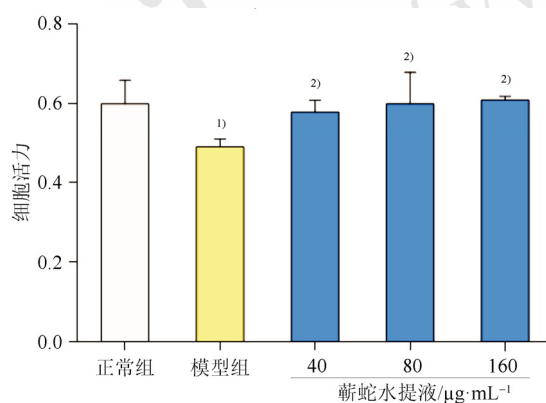


图5 蕲蛇水提液对软骨细胞增殖影响
与正常组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.01$ 。
Fig. 5 Effect of Agkistrodo aqueous extract on cartilage cell proliferation Compared with normal group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with model group, ²⁾ $P < 0.01$.

3 讨论

OA 是多种致病因素作用下, 打破软骨细胞基质合成与分解的动态平衡, 以致关节软骨纤维化及退行性变, 软骨硬化进而形成骨赘、软骨下囊肿。关节软骨是由 99% 的软骨基质和 1% 的软骨细胞组成的, 其中基质由胶原、蛋白多糖和水组成。软骨细胞主要负责软骨基质的维持和产生, 并能控制软骨基质的分布。OA 分为原发性和继发性, 对于原发性 OA 的发病机制尚未清楚。OA 的严重程度常与肿瘤坏死因子(TNF- α)的增高相平行, TNF- α 可刺激地诺前列酮的产生, 加强对软骨的破坏。白细胞介素(IL)-1 促进地诺前列酮和胶原酶的释放, 进而产生强大的促炎作用。IL-1 α 、IL-1 β 水平与 OA 病情程度呈正相关。蕲蛇效用繁多, 能治疗各种顽固风疾、攻毒散结、祛风除湿、止痉定搐等。蕲蛇入药, 自古有之, 现代临床应用也很广泛, 如治疗过敏性皮炎、湿疹等皮肤疾病; 在肿瘤治疗中也有显著疗效; 蕲蛇在临床上治疗风湿疾病疗效显著, 得到了普遍认可。谷恒存等^[8]研究发现, 蕲蛇水提液能显著降低佐剂性关节炎大鼠右后足跖肿胀度, 降低大鼠血清中炎症细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的水平。此外, 柴士伟等^[9]应用柱前衍生化 RP-HPLC 对蕲蛇中的 4 种主要氨基酸类成分进行了检测; 蕲蛇的有效成分为其中的蛋白类成分, 由胃肠道消化, 吸收进入人体后发挥作用。但从蛋白质的消化与吸收过程发现, 蛋白质只有在胃肠道中被分解为氨基酸才能被吸收和利用。而文献却未见报道具有特殊药理活性的氨基酸类成分。王晓辉等^[10]实验证明, 从尖吻蝮蛇毒中通过电泳获得的分子量为 1.2 万的蛇毒蛋白质对小鼠具有较高的镇痛作用。张纪达等^[11]研究发现, 蕲蛇水提液可以下调 CIA 大鼠血清中 TNF- α 含量, 上调 IL-10 含量, 显著减轻其踝关节肿胀程度和关节炎指数。此外, 谷恒存等^[12-13]通过限制性胃蛋白酶酶解法从蕲蛇中提取得到 II 型胶原蛋白, 并且通过进一步研究发现, 其确实具有显著降低胶原诱导性关节炎大鼠右后足跖肿胀程度、CD4⁺T 细胞水平, 具有改善大鼠踝关节病理形态的作用。本实验采用 MIA 制备大鼠 OA 疼痛模型, 相较于切除半月板交叉韧带的造模方法, 此方法建模周期短且重现性好。本实验

结果表明,蕲蛇水提液可以明显缓解 OA 大鼠骨关节的疼痛,并修复受损的软骨细胞,具体的作用机制与其能促进软骨细胞的增殖,提高软骨细胞的活力有关。模型组大鼠的热痛阈值在实验 2 周后有明显的恢复,但与实验组相比,还有一定的差距,其具体原因有待进一步的研究。

REFERENCES

- [1] 黄涛. 骨性关节炎病因和发病机制研究进展[J]. 福建中医药, 2005, 36(4): 57-58.
- [2] 张梅, 韩明向. 骨关节炎从络论治思想探讨[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(4): 92.
- [3] 陈柏成, 张静. 骨关节炎[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 3, 452-456.
- [4] 朱辰蕾. 烟碱对大鼠膝骨关节炎软骨的保护作用及其机制研究[C]. 2012: 380-381.
- [5] KINNE R W, STUHL MULLER B, BURMESTER G R. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis: macrophages [J]. Arthritis Res Ther, 2007(9): 224.
- [6] AGARWAL S, MISRA R, AGGARWAL A. Intedeukln 17 levels are inceraised in juvenile diopathic arthritis synovial fluid and induce synovial fibroblasts to produce proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases [J]. J Rheumatol, 2008, 35(3): 515.
- [7] 阴健, 郭力弓. 中药现代研究与临床应用[M]. 北京: 学苑出版社, 1994: 382-383.
- [8] GUO H C, DING Z X, MA Z L. Immunomodulatory effects of aqueous extract of Agkistrodon acutus on adjuvant arthritis rats [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2012, 27(10): 2676-2678.
- [9] CHAI S W, DONG G Y, QU J T. Optimization of decoction process of Agkistrodon by orthogonal experiment [J]. China Pharm(中国药房), 2015, 26(25): 3569-3571.
- [10] WANG X H, WANG H L, LI X. Studies on the agonist of opioid receptor from the Snake venom of Agkistrodon acutus [J]. Chin J Biochem Pharm(中国生化药物杂志), 2001, 22(4): 198-199.
- [11] ZHANG J D, FAN Y S, WEN C P. Effect of extractive from Agkistrodon acutus on serum TNF- α , IL-6 and IL-10 levels on rats with type II collagen-induced arthritis [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2012, 27(5): 97-99.
- [12] 谷恒存, 胡金波, 丁志山, 等. 蕲蛇 II 型胶原蛋白的提取和鉴定表征 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(21): 3672-3675.
- [13] GU H C, HU J B, DING Z S, et al. Therapeutic effect of collagen type II of Agstrodon acutus on collagen-induced arthritis in rat [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(华中医药学刊), 2013, 31(10): 2207-2209.

收稿日期: 2018-01-16

(本文责编: 曹粤锋)

勘误:

本刊 2019 年第 1 期第 33 页“2.3”项下“分别称取 IMC 亚微乳胶和市售 IMC 乳膏 0.2 g”中“0.2 g”是作者数据错误, 现正式更正为“0.5 g”。特此声明。