

· 论 著 ·

辛伐他汀对大鼠膝骨性关节炎症状及血清细胞因子水平的影响

杨雪梅¹, 吴良绍², 邱昌建³

1. 湖北省恩施土家族苗族自治州中心医院药剂科, 湖北 恩施 445000;
2. 湖北省恩施土家族苗族自治州中心医院关节外科, 湖北 恩施 445000;
3. 武汉大学人民医院肾内科, 湖北 武汉 430060

摘要: **目的** 探讨在大鼠膝骨性关节炎模型中辛伐他汀对其关节炎指数(AI)、胸腺指数、膝关节伸直方向活动度及血清细胞因子的影响。**方法** 60 只大鼠随机分为正常对照组、模型组、阳性对照组、辛伐他汀组, 每组 15 只。正常对照组灌胃等体积生理盐水, 其余各组通过大鼠膝关节腔内注入木瓜蛋白酶制作骨关节炎病变模型。大鼠造模成功后, 模型组给予等体积生理盐水; 阳性对照组给予扶他林混悬液 10 ml/kg; 辛伐他汀组给予辛伐他汀 20 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, 均灌胃 8 周, 每日 1 次。比较各组大鼠 AI、胸腺指数、膝关节伸直方向活动度和血清白介素-1β(IL-1β)、基质金属蛋白酶(MMP)-3、MMP-9 水平的变化。**结果** 其他三组 AI 和血清 IL-1β、MMP-3、MMP-9 水平高于正常对照组(*P* 均 < 0.05), 胸腺指数低于正常对照组(*P* 均 < 0.05); 模型组和阳性对照组膝关节伸直方向活动度低于正常对照组(*P* 均 < 0.05)。除正常对照组外的三组中, 按模型组、阳性对照组、辛伐他汀组顺序, AI 及血清 IL-1β、MMP-3、MMP-9 水平依次降低, 胸腺指数依次增高, 膝关节伸直方向活动度依次增大, 各指标三组间两两比较差异均有统计学意义(*P* 均 < 0.05), 即辛伐他汀组 AI 和血清 IL-1β、MMP-3、MMP-9 水平最低, 胸腺指数最高, 膝关节伸直方向活动度最大。**结论** 辛伐他汀能改善膝骨性关节炎大鼠的症状, 可能通过降低大鼠血清 IL-1β、MMP-3、MMP-9 水平, 调节机体细胞因子和保护软骨基质而发挥作用。

关键词: 辛伐他汀; 膝骨性关节炎; 关节炎指数; 胸腺指数; 膝关节伸直方向活动度; 细胞因子

中图分类号: R 684.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2016)08-1035-04

Impacts of simvastatin on knee osteoarthritis symptoms and serum cytokine levels in rats

YANG Xue-mei*, WU Liang-shao, QIU Chang-jian

* Department of Pharmacy, the Central Hospital of Enshi Autonomous Prefecture, Enshi, Hubei 445000, China

Abstract: Objective To investigate the effects of simvastatin on arthritis index(AI), thymus index(TI), knee joint range of motion(ROM) in extension direction and serum cytokines levels in rats with knee osteoarthritis. **Method** Sixty rats were randomly divided into normal control group, model group, positive control group and simvastatin group (*n* = 15 each). In addition to normal control group administered by gavage with same volume normal saline, the osteoarthropathy model was established in rest 3 groups by injecting papain into the knee joint cavity of rats. After successful modeling, voltaren suspension (10 ml/kg) was given in positive control group; simvastatin (20 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) was given in simvastatin group; same volume normal saline was given in model group. All rats were administered by gavage medication once a day for eight weeks. The AI, TI, knee joint ROM in extension direction and serum interleukin-1β (IL-1β), matrix metalloproteinase (MMP)-3, MMP-9 levels were compared among all groups. **Results** Compared with normal control group, AI and serum IL-1β, MMP-3, MMP-9 levels significantly increased (All *P* < 0.05); TI significantly decreased in other groups (All *P* < 0.05); knee joint ROM in extension direction significantly decreased in model group and positive control group (All *P* < 0.05). In all groups except normal control group, AI and serum IL-1β, MMP-3, MMP-9 levels decreased in turn; TI increased in turn; knee joint ROM in extension direction increased in turn all in the order of model group, positive control group, simvastatin group; namely, AI and serum IL-1β, MMP-3, MMP-9 levels were lowest; TI was the highest; knee joint ROM in extension direction was the largest in simvastatin group. There were significant differences in aforementioned inde-

xes for pairwise comparison among model, positive control and simvastatin groups (All $P < 0.05$). **Conclusions** Simvastatin can improve the symptoms of knee osteoarthritis rats and it maybe through decreasing serum IL-1 β , MMP-3, MMP-9 levels, regulating cytokines of organism and protecting cartilage matrix.

Key words: Simvastatin; Knee osteoarthritis; Arthritis index; Thymus index; Knee joint range of motion in extension direction; Cytokines

膝骨性关节炎是常见的一种中老年疾病,流行病学调查研究发现膝骨性关节炎发病率呈不断上升趋势^[1]。膝骨性关节炎主要是以膝关节软骨基质的降解、软骨的退变为病理特征的骨关节病^[2]。研究发现白细胞介素-1 β (IL-1 β)、基质金属蛋白酶(MMP)-3、MMP-9 在膝骨性关节炎发病机制中具有重要作用^[3]。近年来研究报道发现辛伐他汀可抑制 IL-1 诱发的软骨细胞衰老和炎症反应,且于大鼠关节腔内注射能够部分阻止关节失稳诱发的大鼠继发性关节炎进程^[4]。本研究旨在探讨在大鼠膝骨性关节炎模型中辛伐他汀对其关节炎症状及血清细胞因子的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料 SPF 级健康 Wista 大鼠,60 只,雌雄各半,体质量(200 \pm 20)g,自由饮食、饮水,维持室温为 23 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 70%,适应性饲养 1 周。辛伐他汀片(生产厂家:北京四环制药有限公司,批准文号:国药准字 H20093221,规格:10 mg)。

1.2 主要试剂和仪器 主要试剂:IL-1 β 试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司,MMP-3 试剂盒购于上海研卉生物科技有限公司,MMP-9 试剂盒购于上海拜力生物科技有限公司。主要仪器:BSA6202S 精密电子天平(北京赛多利斯天平有限公司);CX41 生物显微镜(日本 OLYMPUS 公司)。

1.3 实验分组 60 只大鼠随机分为正常对照组、模型组、阳性对照组、辛伐他汀组,每组 15 只。

1.4 方法

1.4.1 膝骨性关节炎模型制备^[5] 模型组、阳性对照组、辛伐他汀组进行造模,通过大鼠膝关节腔内注入木瓜蛋白酶制作骨关节病变模型。应用 30 mg/kg 戊巴比妥钠静脉注射麻醉后,剃去左后膝关节周围毛,再以 10% 异丙醇消毒皮肤,轻弯曲膝关节,通过关节两侧进针,再采用 4% 木瓜蛋白酶生理盐水溶液 0.3 ml 经大鼠髌上韧带注入膝关节腔,每间隔 3 d 进行 1 次,连续注射 3 次。于大鼠术后持续 1 周每日肌肉注射青霉素 20 万单位以防感染。致炎后第 18 天,大鼠均造模成功。

1.4.2 给药方法 正常对照组灌胃等体积生理盐水,灌胃 8 周,每日 1 次;模型组于大鼠造模成功后灌

胃等体积生理盐水,灌胃 8 周,每日 1 次;阳性对照组于大鼠造模成功后给予扶他林混悬液 10 ml/kg,灌胃 8 周,每日 1 次;辛伐他汀组于大鼠造模成功后给予辛伐他汀 20 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹,灌胃 8 周,每日 1 次。阳性对照组和辛伐他汀组给药剂量:将药物根据成人服用量换算,通过公式 $D1 : D2 = R1 : R2$ (D: 剂量, R: 体表面积)计算大鼠日剂量。

1.4.3 各组大鼠关节炎指数(AI)测定 给药第 65 天,采用关节炎评分记录继发性关节炎病变严重程度,计算 AI 值。以无红肿为 0 分,以足小趾关节红肿为 1 分,以趾关节足跖部均红肿为 2 分,以踝关节以下红肿为 3 分,以踝关节全部红肿为 4 分。数值越大病变越严重。

1.4.4 各组大鼠膝关节伸直方向活动度 取左侧卧位,使大鼠左下肢平贴于试验台的白纸表面,然后分别于大鼠大腿后侧、踝关节后侧及腘窝在白纸上对应位置处做标记点,然后再以大鼠腘窝处的点为顶点,应用量角器量取与其余两点所成角度的大小。

1.4.5 各组大鼠胸腺指数测定 给药第 65 天,断头处死大鼠。取各组大鼠胸腺组织称重,计算胸腺指数,胸腺指数 = 胸腺质量(mg)/体质量(g) \times 100%。

1.4.6 各组大鼠血清 IL-1 β 、MMP-3、MMP-9 含量 第 65 天处死大鼠前,大鼠称重,采用 2.5 ml/kg 戊巴比妥钠腹腔麻醉,腹主动脉取血,分离血清,离心,转速为 3 000 r/min,于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 下保存待测。采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清 IL-1 β 、MMP-3、MMP-9 含量变化,严格按照试剂盒说明书标准操作。

1.4.7 HE 染色检测 于 1.4.6 步骤结束后,切取大鼠整个股骨髁,采用 4% 中性甲醛溶液固定 48 h 后,石蜡包埋、切片,HE 染色后光镜下观察软骨的病理变化。

1.5 统计学处理 运用 SPSS 19.0 软件包处理。计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用多变量方差分析,两两比较采用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 HE 染色病理结果 正常对照组大鼠关节软骨细胞形态完整,分布均匀且排列整齐;模型

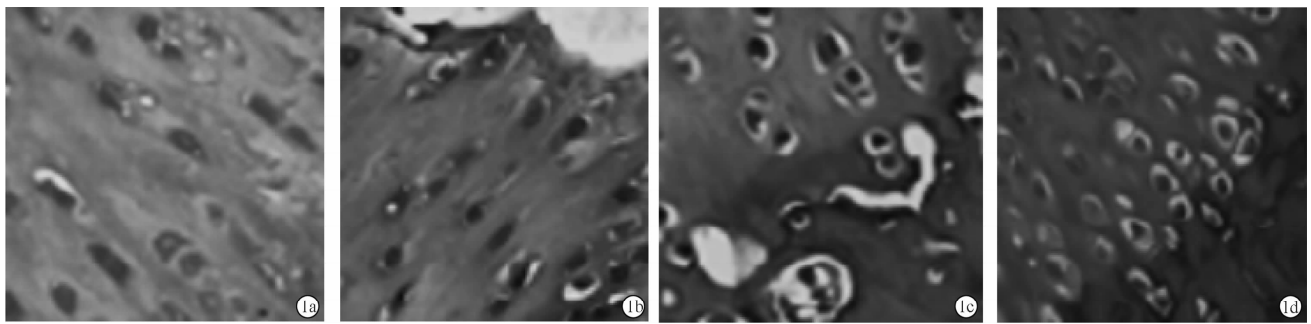
组大鼠软骨明显变薄, 结构不规则且多有裂隙; 阳性对照组和辛伐他汀组较模型组明显改善, 且均可见软骨表层不平整。见图 1。

2.2 各组大鼠 AI 比较 其他三组 AI 明显高于正常对照组 (P 均 < 0.05), 且按模型组、阳性对照组、辛伐他汀组顺序, AI 依次降低 (即辛伐他汀组 AI 最低), 两两比较差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。见表 1。

2.3 各组大鼠胸腺指数比较 其他三组胸腺指数明显低于正常对照组 (P 均 < 0.05), 且按模型组、阳性对照组、辛伐他汀组顺序, 胸腺指数依次增高 (即辛伐他汀组胸腺指数最高), 两两比较差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。见表 1。

2.4 各组大鼠膝关节伸直方向活动度比较 模型组和阳性对照组膝关节伸直方向活动度明显低于正常对照组 (P 均 < 0.05); 且按模型组、阳性对照组、辛伐他汀组顺序, 膝关节伸直方向活动度依次增大 (即辛伐他汀组膝关节伸直方向活动度最大), 两两比较差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。见表 1。

2.5 各组大鼠血清 IL-1 β 、MMP-3、MMP-9 水平变化比较 其他三组血清 IL-1 β 、MMP-3、MMP-9 水平明显高于正常对照组 (P 均 < 0.05), 且按模型组、阳性对照组、辛伐他汀组顺序, 血清 IL-1 β 、MMP-3、MMP-9 水平依次降低 (即辛伐他汀组血清 IL-1 β 、MMP-3、MMP-9 水平最低), 两两比较差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。见表 2。



注: 1a: 正常对照组; 1b: 模型组; 1c: 阳性对照组; 1d: 辛伐他汀组。

图 1 各组大鼠病理结果 (HE 染色, $\times 400$)

表 1 各组大鼠 AI、胸腺指数及膝关节伸直方向活动度比较 ($n = 15, \bar{x} \pm s$)

组别	AI	胸腺指数	膝关节伸直方向活动度($^{\circ}$)
正常对照组	1.48 \pm 0.34	0.18 \pm 0.04	149.83 \pm 5.42
模型组	6.75 \pm 1.45*	0.05 \pm 0.01*	108.79 \pm 4.61*
阳性对照组	3.64 \pm 0.79*#	0.10 \pm 0.02*#	132.97 \pm 5.17*#
辛伐他汀组	2.69 \pm 0.58*#&	0.14 \pm 0.03*#&	140.93 \pm 5.68*#&

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$; 与阳性对照组比较, & $P < 0.05$ 。

表 2 各组大鼠血清 IL-1 β 、MMP-3、MMP-9 水平变化比较 ($n = 15, \bar{x} \pm s$)

组别	IL-1 β (pg/L)	MMP-3(μ g/L)	MMP-9(μ g/L)
正常对照组	0.27 \pm 0.08	0.12 \pm 0.02	0.18 \pm 0.03
模型组	0.67 \pm 0.13*	0.49 \pm 0.06*	0.45 \pm 0.07*
阳性对照组	0.42 \pm 0.12*#	0.26 \pm 0.04*#	0.29 \pm 0.06*#
辛伐他汀组	0.38 \pm 0.09*#&	0.19 \pm 0.03*#&	0.23 \pm 0.05*#&

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$; 与阳性对照组比较, & $P < 0.05$ 。

3 讨论

膝骨性关节炎是以关节疼痛、僵硬、肿胀及畸形为主要特点的一种骨关节病。膝骨性关节炎不仅损害关节软骨, 同时还累及整个关节, 包括关节周围肌

肉、关节囊、滑膜、软骨下骨, 最终造成关节软骨退变及整个关节面的损害^[6-7]。辛伐他汀是一种羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂, 且为一种降脂药物, 由于表现出包括保护软骨细胞等多种降脂以外的作用越来越受到临床医师的重视^[8]。有研究报道显示, 关节腔内注射辛伐他汀能够通过抑制 MMP-3 水平, 部分阻止关节失稳诱发的大鼠继发性关节炎进程^[9]。此外, 他汀类药物能够抑制一些炎症因子的产生, 同时还具有保护软骨细胞基质的作用。本研究结果表明, 辛伐他汀组 AI 最低, 胸腺指数最高, 膝关节伸直方向活动度最大, 提示其不仅可改善大鼠膝骨性关节炎的症状, 且效果优于使用扶他林的阳性对照组。

报道发现细胞因子不仅在维持关节外周和关节软骨的正常功能和结构方面发挥作用, 在骨性关节炎的病理过程中也具有重要作用。其中 IL-1 β 可能在软骨的破坏及修复中扮演重要角色, 且该细胞因子为炎症反应的重要调节剂, 也为调节炎症的始动因素^[10]。IL-1 β 对膝骨性关节炎的影响是全方位的, 从而在改变软骨细胞结构和功能、影响骨代谢等方面均发挥作用^[11-12]。近年来, 研究报道表明以 MMP-3、MMP-9 为代表的 MMPs 家族的异常表达与膝骨性关

关节炎的发病及预后关系密切,特别是 MMP-3、MMP-9 直接作用于关节软骨的细胞外基质,通过对基质中的蛋白多糖和胶原进行降解,破坏关节软骨结构,且能够激活间质胶原酶,从而造成软骨弹性丧失,导致关节肿痛,进一步致使软骨损伤^[13-15]。本研究结果表明,阳性对照组、辛伐他汀组血清 IL-1 β 、MMP-3、MMP-9 水平较模型组显著下降,且辛伐他汀组血清 IL-1 β 、MMP-3、MMP-9 水平低于阳性对照组,提示辛伐他汀可明显降低血清 IL-1 β 、MMP-3、MMP-9 含量,且效果优于使用扶他林的阳性对照组。

综上所述,辛伐他汀能改善膝骨性关节炎大鼠的症状,可能通过降低大鼠血清 IL-1 β 、MMP-3、MMP-9 水平,调节机体细胞因子和保护软骨基质而发挥作用。

参考文献

[1] 郑占乐,孙英彩,张晓然,等. 膝关节炎性关节发病机制的临床影像学研究[J]. 河北医科大学学报,2014,35(5):599-600.

[2] 田少奇,王斌,孙康,等. 青岛地区中老年人膝骨关节炎流行病学研究[J]. 中华关节外科杂志:电子版,2015,9(6):762-766.

[3] 刘洪柏,张鸣生,区丽明,等. 体外冲击波对大鼠膝骨关节炎白细胞介素-1 β 及肿瘤坏死因子- α 表达的影响[J]. 中国康复医学杂志,2014,29(3):208-211,217.

[4] 徐育冬,朱强,李彦琦,等. 辛伐他汀对佐剂性关节炎大鼠膝关节滑膜 VEGF 和 HIF-1 α 表达的影响[J]. 免疫学杂志,2011,27(5):455-458.

[5] 付志媛,欧阳厚涂. 骨炎康颗粒对膝骨性关节炎大鼠血清 II 型胶原、TGF- β 1、IL-1 β 作用的实验研究[J]. 中国骨质疏松杂志,2013,19(12):1275-1277,1310.

[6] 沈明球,刘俊昌,王新军,等. 新疆北疆牧区维、哈、汉族膝骨性关节炎致病因素的流行病学调查[J]. 中国组织工程研究,2015,19(29):4614-4618.

[7] 宰庆书,蒋长伟,岳耀升,等. 鲁西南邹城市膝骨性关节炎的流行病学调查及早期阶梯性治疗[J]. 中国组织工程研究,2015,19(29):4609-4613.

[8] 陈伟玲,梁柳琴,邱茜,等. 辛伐他汀对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞分泌趋化因子的影响及其机制[J]. 中国病理生理杂志,2011,27(10):1972-1976.

[9] 吴银松. 辛伐他汀对骨关节炎软骨保护作用的实验研究[D]. 西安:第四军医大学,2007.

[10] 李强,周国庆,邓紫婷,等. 复元胶囊对膝骨关节炎大鼠 IL-1 β 、OPG 和 OPGL mRNA 表达的影响[J]. 中国老年学杂志,2014,34(14):3930-3933.

[11] 潘建科,罗斌,郭达,等. 龙螯胶囊对膝骨关节炎大鼠 IL-1 β 、IL-6、IL-10 水平的影响[J]. 中华中医药杂志,2015,30(5):1675-1679.

[12] 姚丽,赵婧,周强,等. 祛痰化痰利湿方对大鼠膝骨关节炎滑膜组织和血清 IL-1 β 、MMP-1 及 COMP、CTX-II 的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志,2015,23(11):5-8,14.

[13] 莫汉有,王丽芳,周润华,等. 青蒿琥酯对佐剂性关节炎大鼠血 IL-17、MMP-3 及 MMP-9 的影响[J]. 重庆医学,2011,40(7):628-630.

[14] 戚晴雪,王玉峰,吴忌,等. 低频超声促透通络止痛中药对不同程度膝骨关节炎大鼠模型 CTX-II、COMP 及 MMP-3 的影响[J]. 世界中医药,2015,10(4):564-569.

[15] 麻圣达,卢雄,罗利飞. 玻璃酸钠对膝骨性关节炎患者关节液中基质金属蛋白酶-3、9 水平的影响及疗效观察[J]. 中国现代医生,2014,52(1):42-44.

收稿日期:2016-04-20 修回日期:2016-05-24 编辑:周永彬

(上接第 1034 页)

[16] Um SJ,Choi YJ,Shin HJ,et al. Phase I study of autologous dendritic cell tumor vaccine in patients with non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer,2010,70(2):188-194.

[17] Hoos A,EggermontAM,Janetzki S,et al. Improved endpoints for cancer immunotherapy trials [J]. J Natl Cancer Inst,2010,102(18):1388-1397.

[18] Nishino M,Giobbie-Hurder A,Gargano M,et al. Developing a common language for tumor response to immunotherapy:immune-related response criteria using unidimensional measurements[J]. Clin Cancer Res,2013,19(14):3936-3943.

[19] FDA. Clinical Considerations for Therapeutic Cancer Vaccines:Draft

Guidance[EB/OL]. (2012-09-20). <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/>.

[20] Wheeler CJ,Black KL,Liu G,et al. Vaccination elicits correlated immune and clinical responses in glioblastoma multiforme patients [J]. Cancer Res,2008,68(14):5955-5964.

[21] López MN,Pereda C,Segal G,et al. Prolonged survival of dendritic cell-vaccinated melanoma patients correlates with tumor-specific delayed type IV hypersensitivity response and reduction of tumor growth factor beta-expressing T cells [J]. J Clin Oncol,2009,27(6):945-952.

收稿日期:2016-04-16 修回日期:2016-05-16 编辑:王娜娜