

关于补肾中药防治骨关节炎分子机制的体外实验研究

李佳 朱爱松 谢晚晴 郑洪新*
辽宁中医药大学, 沈阳 110847

中图分类号: R68 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 07-0877-06

摘要: 目的 观察补肾中药单体淫羊藿苷、补骨脂素、齐墩果酸、二苯乙烯苷对间充质细胞中 BMP2、BMP4、RUNX2 表达的影响,以探讨和阐释肾中精气对关节软骨的调控作用及其分子机制,以丰富、补充和发展“肾藏精主骨”脏象理论。方法 取 1 月龄野生型小鼠双侧后肢骨,分离间充质细胞(P₁),分为空白组、对照组、淫羊藿苷组、补骨脂素组、齐墩果酸组和二苯乙烯苷组,实时定量 PCR 法检测 BMP2、BMP4、RUNX2 基因表达;Western-Blotting 法检测 BMP2、BMP4、RUNX2 蛋白表达含量。结果 ①与成骨对照组相比,四个中药组 BMP4、RUNX2 基因表达均显著增高($P < 0.05$),与成骨对照组相比,淫羊藿苷和二苯乙烯苷组 BMP2 基因表达显著增高($P < 0.05$);②与成骨对照组比较,补四个中药组 BMP2、BMP4 蛋白表达均有不同程度增强;淫羊藿苷和二苯乙烯苷组 RUNX2 蛋白表达较对照组增强。结论 ①实验用四种补肾中药单体能够上调 BMP2、BMP4、RUNX2 基因和蛋白表达;②补肾中药对骨关节炎的防治作用可能与本研究的分子机制有关;③“肾主骨”理论包含了肾对关节软骨的调控作用。

关键词: 中医中药;肾;关节软骨;淫羊藿苷;补骨脂素;齐墩果酸;二苯乙烯苷

Study of the mechanism of benefiting kidney herbs in the prevention and treatment of osteoarthritis in vitro

LI Jia, ZHU Aisong, XIE Wanqing, ZHENG Hongxin

Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China

Corresponding author: ZHENG Hongxin, Email: zhenghx2002@126.com

Abstract: Objective To evaluate the effect of icariin, psoralen, oleanolic acid, and TSG on the expression of BMP 2, BMP 4, and Runx2, and to explore the function and molecular mechanism of benefiting kidney herbs in regulation of articular cartilage for extending the conception of kidney governing bone theory in Chinese medicine. **Methods** Mesenchymal cells were collected from the bilateral low extremities of 1-month old wild type mice and divided into blank control, control, icariin, psoralen, oleanolic acid, and TSG groups. The expressions of BMP2, BMP4, and RUNX2 genes were detected using real-time quantitative PCR. Western blotting was performed to examine the protein expression of BMP2, BMP4, and RUNX2. **Results** 1) Comparing with that in control group, gene expression of BMP4 and RUNX2 significantly increased in the 4 herb groups ($P < 0.05$). BMP2 gene expression was higher in icariin group and TSG group ($P < 0.05$). 2) Comparing with that in control group, protein expression of BMP2 and BMP4 increased in different extend. Runx2 protein expression increased in icariin group and TSG group. **Conclusions** 1) Icariin, psoralen, oleanolic acid, and TSG up-regulate the gene and protein expression of BMP2, BMP4, and RUNX2. 2) The function of prevention and treatment of osteoarthritis with benefiting kidney herbs is associated with the molecular mechanism of this study. 3) The kidney governing bone theory involves the regulation of articular cartilage by the kidney.

Key words: Traditional Chinese medicine; Kidney; Articular cartilage; Icariin; Psoralen; Oleanolic acid; TSG

“肾主骨”理论是中医理论体系中的经典内容之一,历代医家对该理论都有不同的发挥,现代中医

研究更有深入的临床及实验研究。关节软骨是骨骼的重要组成部分,肾对骨骼发育和代谢的主宰作用是否包括对“关节软骨”的调控作用尚未有系统的研究和论证。本实验选用小鼠间充质细胞作为研究对象,在体外诱导其成骨方向分化过程中加入补肾阳代表药淫羊藿、补骨脂的有效成分单体淫羊藿苷、

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81403286);辽宁省重点实验室项目(LZ2015052)

* 通讯作者: 郑洪新, Email: zhenghx2002@126.com

补骨脂素,补肾阴代表性药物何首乌、女贞子的成分单体齐墩果酸、二苯乙烯苷,观察补肾中药单体是否对间充质细胞中对关节软骨状态稳定性相关因子 BMP2、BMP4、RUNX2 有所影响,以探讨和阐释肾中精气对关节软骨的调控作用及其分子机制,进而,将肾对骨骼发育的主宰作用外延至肾对关节软骨发育代谢的主宰作用,以丰富、补充和发展“肾藏精主骨”脏象理论。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物:野生型 C57 BL/6 小鼠(同窝 4 只,1 月龄,雄性)购于美国杰克逊实验室。

1.1.2 实验药品:补骨脂素(中国药品生物制品检定所 110739-201115);淫羊藿苷(中国药品生物制品检定所 110737-200415);齐墩果酸(中国药品生物制品检定所 110709-200505);二苯乙烯苷(南京泽朗医药科技有限公司 FY16430226)。

1.1.3 主要试剂:二甲基亚砜(Sigma-D5879)、谷氨酰胺(Sigma-G9422)、维生素 C(Sigma-A8960)、胎牛血清(GIBCO 10099-141)、MEM- α 细胞培养液(GIBCO 12571-063)、RNA 提取试剂盒(QIAGEN 74316)、cDNA 反转录试剂盒(BIO-RAD170-8890)、蛋白印迹发光底物(THERMO 32109)、抗 BMP2 抗体(46kDa, ABCAM ab82511)、抗 BMP4 抗体(47kDa, ABCAMab137743)、抗 RUNX2 抗体(56kDa, ABCAMab76956)、 β -actin 抗体(42kDa, ABCAM ab119716)、抗鼠 IgG 抗体(VECTOR 940101)。

表 1 qPCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for qPCR

基因	引物序列
BMP 2	Fw: ACTTTTCTCGTTTGTGGAGC
	Re: GAACCCAGGTGTCTCCAAGA
BMP 4	Fw: TGAGCCTTTCCAGCAAGTTT
	Re: CTTCCCGGTCTCAGGTATCA
RUNX 2	Fw: CAAGAAGGCTCTGGCGTTTA
	Re: TGCAGCCTTAAATGACTCGG
actin	Fw: GGCTGT ATT CCC CTC CAT CG
	Re: CCA GTT GGT AAC AAT GCC ATG T

1.1.4 主要仪器及设备:二氧化碳细胞培养箱(THERMO FORMA 3110)、PCR 仪(BIO-RAD, C1000)、酶标仪(BIO-TECK Synergy H1)、凝胶成像仪(BIO-RAD, AIK9585)预制胶(BIO-RAD, Mini-PROTEAN™ TGX)、全能型蛋白转印系统(BIO-

RADTrans-Blot Turbo)。

1.2 实验方法

1.2.1 骨髓间充质细胞提取:CO₂ 过量法处死小鼠 4 只,取双侧后肢股骨、胫骨,在超净工作台内,用细胞培养液冲洗骨髓,获取骨髓细胞与 50 ml 离心管中,1 200 g,离心 5 min,弃上清。用 50 ml MEM 细胞培养液(10% 胎牛血清,10U/L 青链霉素),溶悬离心管内细胞,吹打均匀,并计数。将细胞悬液分置于 4 只 10 cm 培养皿中,放于 CO₂ 培养箱内孵育。48~72 小时内查看细胞贴壁情况,并换液,分离出不贴壁的血细胞。覆盖率达 75%~80%,用 PBS 冲洗 2 次,消化并吹打成细胞悬液。将间充质细胞以 1.4×10^5 个/ml 浓度,均匀分置于 12 孔板中,每孔液体体积 1 ml,置于 CO₂ 培养箱中孵育,并观察贴壁及增殖情况。

1.2.2 骨髓间充质细胞分组及干预方法:(1)空白组:细胞培养液成分 MEM- α 培养液,10% 胎牛血清,1 000 U/L 青链霉素;(2)对照组:成骨诱导液(MEM- α 培养液,10% 胎牛血清,1 000 U/L 青链霉素,10 mmol/L 谷氨酰胺,50 μ g/ml 维生素 C);(3)补骨脂素组:成骨诱导液 + 补骨脂素 1×10^{-7} mol/L;(4)淫羊藿苷组:成骨诱导液 + 淫羊藿苷 1×10^{-7} mol/L;(5)齐墩果酸组:成骨诱导液,齐墩果酸 1×10^{-7} mol/L;(6)二苯乙烯苷组:成骨诱导液,二苯乙烯苷 1×10^{-7} mol/L;

1.2.3 检测基因表达量:药物干预 48 小时,提取细胞 RNA,时定量 PCR 检测相关基因(BMP2、BMP4、RUNX2)表达量。

1.2.4 测定蛋白含量:Western-blotting 法测定 BMP2、BMP4、RUNX2 蛋白含量。

1.3 数据处理及统计方法

计量数据采用 SPSS16.0 软件处理,运用 ST 检验和 One-Way ANOVA 进行方差分析,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并以柱状图形式表达, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 四种补肾中药单体对间充质细胞骨向分化过程中 BMP2、BMP4、RUNX2 基因表达的影响(表 2)

与成骨对照组相比,淫羊藿组和二苯乙烯苷组 BMP2 基因表达均显著增高($^{\circ}P < 0.05$),补骨脂素组和齐墩果酸组有升高的趋势,但无统计学意义;淫羊藿苷组 BMP2 基因表达最高($^{\Delta}P < 0.05$)、二苯乙烯苷组高于补骨脂素组和齐墩果酸组($^{\Delta}P < 0.05$)。

对 BMP4 基因表达的影响,补骨脂素组、淫羊藿组、齐墩果酸组和二苯乙烯苷组均高于成骨对照组 1.5 倍以上($\diamond P < 0.05$)。补骨脂组、淫羊藿组、齐墩果酸组、二苯乙烯苷组中 RUNX2 基因表达均有升高的趋势,其中淫羊藿组和齐墩果酸组显著增高($\diamond P < 0.05$),补骨脂素组和二苯乙烯苷组对 RUNX2 基因表达影响低于淫羊藿苷组($\triangle P < 0.05$)和齐墩果酸组($\blacksquare P < 0.05$),淫羊藿苷组与齐墩果酸组无明显差异。

表 2 各组细胞 BMP2、BMP4 基因表达结果

Table 2 Gene expression of BMP2, BMP4, and Runx2 in each group

组别	BMP2	BMP4	RUNX2
成骨对照组	1	1	1
补骨脂素组	1.25 ± 0.14 $\triangle\triangle$	1.47 ± 0.23 \diamond	1.47 ± 0.23 $\triangle\blacksquare$
淫羊藿苷组	2.72 ± 0.17 \diamond	2.50 ± 0.16 \diamond	2.50 ± 0.16 \diamond
齐墩果酸组	1.66 ± 0.20 $\triangle\triangle$	2.19 ± 0.13 \diamond	2.19 ± 0.13 \diamond
二苯乙烯苷组	2.06 ± 0.11 $\diamond\triangle$	1.51 ± 0.34 \diamond	1.51 ± 0.34 $\triangle\blacksquare$

注:与成骨对照组相比,淫羊藿组和二苯乙烯苷组 BMP2 基因表达均显著增高($\diamond P < 0.05$); \triangle :淫羊藿苷组表达最高均高于其他三组 $\triangle P < 0.05$;与成骨对照组相比,补骨脂素组、淫羊藿组、齐墩果酸组和二苯乙烯苷组 BMP4 基因表达均显著增高($\diamond P < 0.05$);与成骨对照组相比,补骨脂素组、淫羊藿组、齐墩果酸组、二苯乙烯苷组 RUNX2 基因表达均有升高的趋势,其中淫羊藿组和齐墩果酸组显著增高($\diamond P < 0.05$);与淫羊藿苷组(\triangle)和齐墩果酸组(\blacksquare)比较,补骨脂素组和二苯乙烯苷组对 RUNX2 基因表达影响减低 $\triangle P < 0.05$, $\blacksquare P < 0.05$

Note: Comparing with control group, BMP2 gene expression was higher in icariin group and TSG group ($\diamond P < 0.05$) and icariin group was higher than the other 3 groups ($\triangle P < 0.05$). BMP4 gene expression significantly increased in the 4 herb groups ($\diamond P < 0.05$). Comparing with control group, Runx2 gene expression showed a trend of increase in 4 herb groups, and the expression in icariin group and oleanolic acid group was significant higher than that in psoralen group and TSG group ($\triangle P < 0.05$, $\blacksquare P < 0.05$)

2.2 四种补肾中药单体对间充质细胞骨向分化过程中 BMP2、BMP4、RUNX2 蛋白表达的影响(图 1)

Western Blotting 结果显示,与成骨对照组比较,补骨脂素组、淫羊藿苷组、齐墩果酸组、二苯乙烯苷组 BMP2、BMP4 蛋白表达均有不同程度增强。淫羊藿苷组和二苯乙烯苷组 RUNX2 蛋白表达较成骨对照组增强,但齐墩果酸组和补骨脂素组未见明显变化。

3 讨论

3.1 实验用补肾中药单体是补肾阴、补肾阳的代表性中药的有效成分

本实验采用补肾阳代表性药物补骨脂、淫羊藿

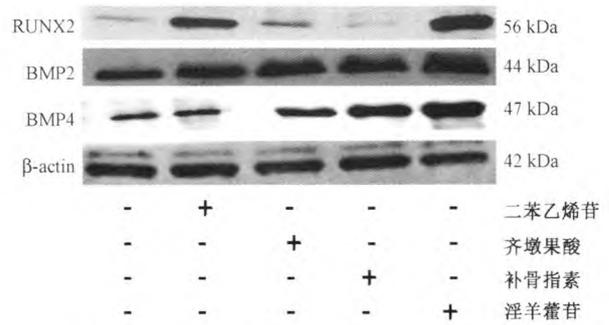


图 1 各组 BMP2、BMP4、RUNX2 蛋白表达结果

Fig. 1 Protein expression of BMP2, BMP4, and RUNX2 in each group

和补肾阴代表性药物女贞子、何首乌,四种中药的有效成分单体补骨脂素、淫羊藿苷、齐墩果酸、二苯乙烯苷。

补骨脂,有温肾助阳、纳气、止泻的功效,该药物主要活性成分主要是补骨脂素和异补骨脂素,有研究表明补骨脂素能促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化,激活生长因子相关信号通路^[1];淫羊藿,有补肾阳,强筋骨,祛风湿的功效,淫羊藿苷是淫羊藿黄酮类主要活性成分中的主要化合物,是药材淫羊藿质量监控的指标,研究显示淫羊藿苷能下调大鼠膝关节炎模型软组织 MMP-1、MMP-3、MMP-13、P-p38、P-ERK1/2、P-JNK 及 β -catenin 的蛋白表达水平^[2];女贞子,有补益肝肾、清虚热、强腰膝、明耳目、乌须发的功效。该药物主要活性成分包括齐墩果酸且含量较高;何首乌,有补肝肾、益精血、强筋骨、乌须发的功效,二苯乙烯苷是何首乌主要化学成分,被用作何首乌以及多种首乌类制品的质量检测指标^[3]。

本研究团队前期也有相关的体内及体外实验证明补肾中药单体能够促进成骨方向的分化^[4,5],从不同角度阐释肾精盛衰对骨骼发育的主导作用,并通过论述肾藏精与干细胞及微环境,以及 NEI 网络的联系,不断充实“肾藏精”的科学内涵,将“肾藏精”“肾主骨”理论的科学内涵上升到全新的高度^[6]。本研究在前期实验解析 BMP2、BMP4 对关节软骨形态维护作用^[7,8]的基础上,继续论述以上四种重要单体对与软骨代谢相关的基因及蛋白表达的影响,进一步探究肾精与关节软组织的联系,以期能对“肾主骨”理论的内涵能继续有所发挥和外延。

3.2 BMP2、BMP4 对关节软骨代谢的影响

骨形成蛋白(BMPs)属于转移生长因子 β (TGF- β)的超家族成员,在软骨内成骨的过程中,与 TGF-

β II型受体结合,并与 I型受体磷酸化后进入细胞内,继而引起 Smad1、Smad5、Smad8 磷酸化,与 Smad4 结合后入核,然后对下游基因进行调控。有研究表明 BMP-Smad 信号通路对长骨软骨成骨发育过程中重要的调控作用,此外,对于后期软骨细胞的增殖与分化,BMPs 也有着重要的调控作用。也有研究如 BMP2、BMP4 基因在生长板区肥大增生的软骨细胞内高表达^[9]; BMP2、BMP4 能够在体外刺激和促进软骨细胞增生,提示 BMP2、BMP4 基因对软骨细胞的增殖和分化的调控作用相似甚至是徒劳的^[10]。然而亦有研究表明 BMP2、BMP4 对于胚胎时期以及出生后早期的长骨发育有调节作用,并对软骨细胞的成熟有稳定和促进作用;BMP2 在 BMPs 家族中对其他成员有上调的作用,而上调 BMP5、BMP7、BMP8 不能纠正 BMP4 缺失而产生的表型。因此可推测 BMP2、BMP4 应是 BMPs 家族在软骨成熟及分化成骨过程中其关键作用的两个基因,并与 Smad1-Runx2、Sox9-Runx2 等介导因子有关。但是对于两个基因在发育完成后对软骨细胞,特别是关节软骨细胞的调控作用,仍未有相关阐释,也没有动物体内实验等研究进行观察。

本研究团队前期参与的实验研究有数据提示 BMP2、BMP4 基因敲除后,使下游 Mmp13、Adamts5、Adamts4 基因上调,并是蛋白表达增强,说明 BMP2、BMP4 的表达对于 TGF- β 信号通路的激活状态有稳定作用,并对此通路稳定关节软骨相关基因的正常表达有正向作用,从而促进关节软骨的稳定,改善关节软骨退化,缓解 OA 的发生与发展。TGF- β 信号通路能够调控对出生后期小鼠关节软骨细胞及基质等结构和形态稳定有促进作用的基因表达,从而维持关节软骨的正常形态。当 TGF- β 信号通路阻断后,Mmp13 和 Adamts5 被启动,开始降解关节软骨包括细胞和胶原、多糖等细胞基质结构,导致关节退变,形成 OA。

关节软骨的分化发育源于长骨骨骼分化和发育的过程,是从间充质干细胞的排列囤积并分化为软骨细胞开始的,发育完成形成关节软骨后,表层软骨细胞不再更新^[11],且与 BMP2、BMP4 基因表达相关,并结合在本研究团队对“肾藏精”与干细胞及微环境的联系等研究和认识等观点。本实验选用小鼠间充质细胞作为研究对象,一定程度上试图在体外模拟伴随 MSC 成骨分化而同时发生的关节软骨的分化及发育,这一受“先天”因素影响的过程,选用补肾阳药(补骨脂、仙灵脾)和补肾阴药(女贞子、何

首乌)的有效代表成分作为干预因素,以观察与“肾精”相关微环境的改变对间充质细胞的影响,特别是与发育后期影响关节软骨形态稳定性的基因 BMP2 和 BMP4 的表达的影响,从而进一步推论“肾藏精”与关节软骨代谢之间的联系。实验结果显示上述四种单体均对小鼠间充质细胞 BMP2 有上调作用,特别是淫羊藿苷(淫羊藿)和二苯乙烯苷(何首乌)($P < 0.05$);对 BMP4 的基因表达比对照组均上调 1.5 倍以上($P < 0.05$);对 BMP2、BMP4 蛋白表达均有不同层度增强。说明肾中精气充盛,对于关节软骨形态的自身稳定性有正向的调节作用,也为临床补肾防治骨性关节炎提供了现代科学依据。

3.3 中医从肾论治骨性关节炎

在环境影响、力学刺激或遗传因素等影响下,导致关节的炎症反应,会引起关节软骨的损伤,如表面粗糙甚至破损等;反之,关节软骨的外力损伤或人体力学结构的改变导致关节软骨变形或损伤,也会引起关节疼痛、肿胀、炎症反应、甚至变型等病理性改变,属于中医学“骨痹”的范畴。

中医重视“肾主骨”理论在该病证治疗中的指导作用,认为“肾”是“骨痹”、“骨痛”、“膝痛”等病证的重要因素。如《素问·长刺节论》:“病在骨,骨重不可举,骨髓酸痛,寒气至,名曰骨痹。”《素问·逆调论》:“岐伯曰:是人者,素肾气胜,以水为事,太阳气衰,肾脂枯不长……肾者水也,而生于骨,肾不生,则髓不能满,故寒甚至骨也,……肾孤藏也,一水不能胜二火,故不能冻慄,病名曰骨痹,是人当挛节也。”《中藏论·论骨痹》:“骨痹者,乃嗜欲不节,伤于肾也。”《证治准绳·杂病》:“(膝痛)有风,有寒,有闪挫,有瘀血,有痰积,皆实也,肾虚其本也。”以上关于病因病机的阐述,说明骨痹的发病与肾密切相关,肾虚是骨痹发病的根本原因和病理基础。《素问·调经论》论及肾之虚实:“志有余则腹胀飧泄,不足则厥。血气未并,五藏安定,骨节有动。”指出“肾经之微邪,肾主骨邪未入藏而薄於骨,故但於骨节之间”,在一定程度上透视肾与关节软骨的关系。

现代中医学研究也提示“肾”对关节软骨的维护和修复有调节作用。有临床研究显示北京三家医院 586 例骨性关节炎患者,其中 389 例为肾气亏虚型^[12];补肾中药能够有效改善膝关节骨性关节炎临床症状^[13];赵文韬等发现临床使用右归饮治疗肾虚型骨性关节炎有很好疗效^[14]。童培建等、肖鲁伟等发现右归饮能够在家兔体内促进干细胞凝胶复合体修复软骨缺损^[15、16];温阳益髓中药治疗兔膝关节

炎能够有效抑制兔骨关节炎软骨基质金属蛋白酶的表达^[7]。此外,先天之精不足,关节软骨化生乏源,也会导致先天性髌关节脱位、髌臼发育不良等疾病。

3.4 肾阴、肾阳与关节软骨的系统联系补充阐释“肾主骨”理论

3.4.1 肾阳与关节软骨:肾阳(又称元阳,真阳,真火,命门真火)为人体阳气之本,其生理功能主要体现在各脏腑组织起着温煦、推动、兴奋和气化作用。其一,肾阳对本脏的作用:肾阳温煦、推动和激发本脏及其所属膀胱、形体官窍,发挥对肾藏精、肾主水、肾主纳气的功能活动;膀胱得以气化,前后二阴得以通利,并开合有度。肾阳的蒸腾气化作用,主宰和调节津液代谢过程。其二,肾阳对全身各脏腑的作用:肾阳为一身阳气之本,推动和激发各脏腑的各种功能,温煦全身脏腑形体官窍。如《景岳全书·传忠录·命门余义》:“五脏之阳气,非此不能发”。肾阳充盛,脏腑形体官窍得以温煦,各种功能旺盛,精神振奋。若肾阳虚衰,推动、温煦等作用减退,则脏腑机能减退,精神不振,发为虚寒性病证。

关节为“枢”、“机关”,是人体活动的重要组织,主动,需要阳气的鼓动和推动作用,肾阳为人体一身阳气之根本,肾阳充盛,则温煦和推动作用能够正常发挥,维持关节的正常运动。另一方面,关节软骨主要受关节内灌注的津液的滋润和濡养,津液的代谢离不开肾阳的温煦、蒸腾和气化作用。《素问·逆调论》:“肾者水藏,主津液”。从病理角度来看,关节退行性病变亦属于“骨痹”的范畴,骨痹、骨痛、关节疼痛的主要病机离不开“寒”、“湿”。“寒”,损伤阳气,或失于阳气的温煦;“湿”,亦损伤阳气,或阳气不足,津液代谢失常而化生。可见,关节软骨的功能和代谢与肾阳有着密切的联系。

3.4.2 肾阴与关节软骨:肾阴(又叫元阴、真阴、真水、肾水)是人体阴液之根,主要体现在对各脏腑组织的濡润、滋养和成形的作用。其一,肾阴对本脏的作用:肾阴滋润和濡养本脏及其所属膀胱、形体官窍,并对肾阳具有制约偏亢的作用。肾藏精得肾阴的宁静、濡养而封藏、闭藏;肾主水得肾阴之宁静而津液气化分清别浊;肾开窍于前后二阴,膀胱得以开阖有度,大肠魄门得以濡润而传导糟粕。其二,肾阴对全身各脏腑的作用:肾阴为一身阴液之本,滋润和濡养各脏腑的功能活动。如《景岳全书·传忠录·命门余义》:“五脏之阴气,非此不能滋”。肾阴充盛,各脏腑形体官窍得以濡养,生理功能正常。

关节软骨分化于胚胎时期长骨发育过程中初级

骨化中心的软骨祖细胞,可以说源于先天之精,主要依赖于“肾阴”的成形作用。另一方面,关节软骨主要受关节腔中灌注的津液的濡养,津液属阴,“肾阴”是其根本。《黄帝内经太素·摄生》:“骨节相属之处无液,故屈伸不利”。可见关节软骨先天形态的化生以及后天的滋养都依赖“肾阴”这一重要的物质基础。

综上所述,“肾阴”和“肾阳”都对关节软骨的化生和代谢有着重要的调控作用:“肾阴”为关节软骨的生成以及后天的滋养提供了物质基础;“肾阳”通过发挥温煦、推动、气化等作用,为关节软骨的代谢提供动力,并主宰其代谢所必需的“津液”,为维持关节软骨功能的发挥提供了保障。

此外,本研究结果中补肾阳药淫羊藿的有效成分单体淫羊藿苷对各个相关同向指标的上调作用均优于其他三种药物单体,补肾阴药何首乌有效成分单体二苯乙烯苷和女贞子有效成分单体齐墩果酸对不同指标的上调作用各有体现。这些结果并不能充分说明“肾阳”或“肾阴”对关节软骨的调控作用会优于另一方,却在一定程度上提示,从“肾精”的层面来理解肾与关节软骨的系统联系可能更为贴切,肾阳、肾阴二者相互制约、相互依存,共同保持着“肾藏精系统”的动态平衡,才实现了肾对关节软骨的调控作用。肾中精气充盛,对关节软骨有较好的保护作用,补肾填精可能是防治 OA 的重要环节,其作用机制与其能够促进 BMP2、BMP4 基因及蛋白表达有关。随着“肾藏象”系统更深入而全面的阐释和现代基础及临床研究对其科学内涵的不断丰富,对于本篇所关注的“中医肾与关节软骨之间的联系”的认识和理解应该展开更准确、更加开阔的视角进行分析和探讨,其理论基础也会得到不断的揭示和充实。

【参 考 文 献】

- [1] 卞琴,刘书芬,黄建华,等. 3种补肾中药有效成分对去卵巢骨质疏松大鼠骨髓间充质干细胞的调控作用. 中华中医药杂志(原中国医药学报),2011(26):889-893.
Bian Qin, Liu Shufen, Huang Jianhua, et al. Regulation of 3 Kinds of Benefitting Kidney Herbs to BMSC of Osteoporosis Rat induced by ovariectomy. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy. 2011(26):889-893. (in Chinese)
- [2] 曾丽. 淫羊藿苷抑制骨关节炎基质金属蛋白酶的机制研究. 博士学位论文. 重庆医科大学,2014.
Zeng Li. Mechanism of Icaritin in Inhibiting OA-related Gene MMP13. PhD Thesis. Chongqing Medical University. 2014 (in Chinese)

- [3] 孙江浩, 袁志芳, 王春英, 等. 何首乌中二苯乙烯苷在大鼠体内的药动学. 中草药, 2005, (3):405-408
Sun Jianghao, Yuan Zhifang, Wang Chunying, et al. Pharmacokinetics of TSG Extracted from Polygonum Multiflorum. Chinese Traditional and Herbal Drugs. 2005; (3):405-408 (in Chinese)
- [4] 高璐, 郑洪新, 陈谊敬, 等. 补肾中药成分配伍调控 RUNX2、OSX 对大鼠 BMSCs 成骨分化的影响. 世界中西医结合杂志. 2014;9(4): 425-429
Gao Lu, Zheng Hongxin, Chen Yijing, et al. Effect of Benefitting Kidney Herbs Extracts Pairs in Osteogenesis differentiation of BMSC by Regulation RUNX2 and OSX. World Journal of Integrated Traditional and Western Medicine. 2014;9(4): 425-429 (in Chinese)
- [5] 陈谊敬. 补肾中药有效成分对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响. 硕士学位论文. 辽宁中医药大学. 2013
Chen Yijing. Effect of Benefitting Kidney Herbs Extracts Osteogenesis differentiation of BMSC. Master Degree Thesis. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine. 2013 (in Chinese)
- [6] 郑洪新, 王拥军, 李佳, 等. “肾藏精”与干细胞及其微环境及 NEI 网络动态平衡关系. 中华中医药杂志. 2012; 27(9): 2267-2270.
Zheng Hongxin, Wang Yongjun, Li Jia, et al. Equilibrium between Stem Cell- micro environment and NEI Network and ‘Kidney stores essence’ Theory. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy. 2012; 27(9): 2267-2270 (in Chinese).
- [7] Shen J, Li J, Wang B, et al. Deletion of the Type II TGF- β Receptor Gene in Articular Chondrocytes Leads to a Progressive OA-like Phenotype in Mice. Arthritis & Rheumatism (2013) 65, 3107-3119.
- [8] Shu B, Zhang M, Xie R, et al. BMP2, but not BMP4, is crucial for chondrocyte proliferation and maturation during endochondral bone development. Journal of cell science 124, 3428-3440.
- [9] Nilsson O., Parker E. A., Hegde A., et al. Gradients in bonemorphogenetic protein-related gene expression across the growth plate. J. Endocrinol. 2007;193, 75-84.
- [10] Clark C. A., Li T. F., Kim K. O., et al. Prostaglandin E2 inhibits BMP signaling and delays chondrocyte maturation. J Orthop Res 2009; 27, 785-792.
- [11] M A R Freeman. Adult Articular Cartilage. Alden & Mowbray Ltd at Alden Press, Oxford. 1973
- [12] 何丽清, 闫立, 杨涛, 等. 586 例膝关节炎中医证型聚类分析及与中医体质的关系. 辽宁中医药大学学报. 2012, 14(7):52-54.
He Liqing, Yan Li, Yang Tao, et al. Clustering Analysis of 586 Osteoarthritis Cases in TCM Syndromes and the inter-relation with Constitution. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine. 2012, 14(7):52-54 (in Chinese)
- [13] 方剑乔, 许兵, 童培建. 骨痹相关疾病“从肾论治”的实验研究进展. 中华中医药学刊. 2011, 29(11):1445-2451.
FANG Jian-li, XU Bin, TONG Pei-jian. Review on Experimental Studies on ‘Treatment targeting on kidney’ Theory applied in Gubi-related Diseases. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine. 2011, 29(11):1445-2451 (in Chinese).
- [14] 赵文韬, 李帆冰, 王琦, 等. 右归饮治疗肾阳虚型膝关节骨性关节炎 65 例. 现代中西医结合杂志, 2009, 18(7):790.
Zhao Wentao, Li Fanbing, Wang Qi, et al. 65 Cases of Kidney yang Deficiency Syndrome of Osteoarthritis Treated with Yougui Decoction. Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine. 2009, 18(7):790. (in Chinese)
- [15] 童培建, 厉驹, 季卫锋, 等. 干细胞凝胶复合体加右归饮修复家兔软骨缺损的实验研究. 中医正骨, 2005, 17(6):323-325.
Tong Peijian, Li Ju, Ji Weifeng, et al. Study on Cartilage Repair induced with Stem Cell Gel Complex and Yougui Decoction in Rabbit. Journal of Traditional Chinese Orthopedics and Traumatology. 2005, 17(6):323-325 (in Chinese)
- [16] 肖鲁伟, 武中庆, 季卫锋, 等. 右归饮诱导胎兔骨髓基质细胞向软骨细胞分化的实验研究. 中国中医药科技, 2005, 12(3): 1541.
Xiao Luwei, Wu Zhongqing, Ji Weifeng, et al. Vitro Study on Yougui Decoction in Inducing Bone Marrow Matrix Cell from Rabbit Differentiating into Chondrocyte. Chinese Journal of Traditional Medical Science and Technology. 2005, 12(3): 1541. (in Chinese)
- [17] 单鹏程, 何名江, 张洪美, 等. 温阳益髓中药干预兔膝关节炎软骨基质金属蛋白酶的表达. 中国组织工程研究. 2014, 18(7):997-1002.
Shan Peng-cheng, He Ming-jiang, Zhang Hong-mei, et al. Effect of Wenyang Yisui Decoction in Regulating MMP13 Expression in Knee Cartilage of Osteoarthritis Rabbit. Chinese Journal of Tissue Engineering Research. 2014, 18(7):997-1002 (in Chinese).

(收稿日期: 2015-12-15)