

健步关节胶囊对家兔骨关节病模型相关因子的影响

鲍蕾蕾, 陈海飞, 卞俊, 袁兵 (解放军第411医院药学科, 上海 200434)

[摘要] 目的 初步观察健步关节胶囊对实验性兔膝骨关节病的治疗作用, 并初步探讨其作用机制。方法 将30只健康的新西兰大白兔分成5组, 每组6只, 分别为模型组(蒸馏水)、阳性药组(硫酸氨基葡萄糖胶囊)、健步关节胶囊低、中、高剂量组。家兔膝关节注射木瓜蛋白酶建立膝关节病模型。造模第2天开始给药, 6周后心脏取血, 测定血清中NO和SOD的含量。同时处死动物, 取膝关节滑膜制成病理切片, 观察药物对关节滑膜的影响。结果 健步关节胶囊各剂量组能不同程度的提高兔膝关节病血清中的SOD活性, 中、高剂量组和阳性药组SOD活性与模型组相比, 有显著性差异($P < 0.05$); 健步关节胶囊低、中、高剂量组血清NO水平较模型组有不同程度的提高, 其中中剂量组和阳性药组有极显著性差异($P < 0.01$)。结论 健步关节胶囊能显著提高实验性兔膝关节病模型家兔血清中SOD的活性和NO的含量, 并能显著改善模型家兔膝关节的病理性改变。

[关键词] 健步关节胶囊; 骨关节病; 一氧化氮; 超氧化物歧化酶

[中图分类号] R956.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)03-0211-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.03.014

The effect of Jianbu Guanjie Capsule on level of correlative ingredients in osteoarthropathy model of rabbit

BAO Lei-lei, CHEN Hai-fei, BIAN Jun, YUAN Bing (Department of Pharmacy, NO. 411 Hospital of PLA, Shanghai 200434, China)

[Abstract] **Objective** To discuss the protection and mechanism of Jianbu Guanjie Capsule (JBGJ capsule) to the knee osteoarthritis of rabbit. **Methods** Thirty healthy New Zealand rabbits were divided into five groups randomly with parallel control methods. The five groups were model group, positive group, low dose group, middle dose group and high dose group, respectively. The osteoarthropathy of knee joint model was built according to the Japanese KangYan standard. The rabbits were given the drug in the next day after the model establishment. After six weeks, animal serum and slippery membranes were collected to be detected. **Results** The activity of SOD in serum was improved in the middle, high dose group and positive group, which had significant different with the model group ($P < 0.05$). The nitric oxide (NO) in serum was raised in low, middle and high dose group. The middle dose group had significant different with the model group. **Conclusion** JBGJ capsule could improve the activity of Superoxide dismutase (SOD) in serum and the level of NO, which could obviously improved the pathological alteration in osteoarthropathy model of rabbit.

[Key words] Jianbu Guanjie capsule; osteoarthritis; NO; SOD

骨关节病 (osteoarthritis, OA) 是骨科常见病, 多发于中年以后的慢性、进行性疾病。临床表现有受累关节疼痛, 活动加重, 休息后缓解, 久不活动有僵硬感以及骨肥大和晚期功能受限。现已发现有几种因素和本病的发生密切相关, 包括年龄、关节软骨基质的变化、关节软骨细胞活性的变化、滑液中化学递质变化、损伤和未知的免疫反应。从现代医学研究表明此病的发展同细胞因子、生长因子、免疫因素有关, 如超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、一氧化氮 (nitric oxide, NO)、透明质酸 (HA)、白介素-6、白介素-1、转化生长因子 (TGF-1)。本实

验通过兔膝骨关节病模型观察健步关节胶囊对兔膝骨关节病血清NO含量、SOD活性的影响。

1 材料和仪器

1.1 动物 4~10月龄的健康新西兰大白兔30只, 雌雄各半, 体重1.6~2.0 kg, 各组大白兔实验前在动物房饲养1周, 实验动物购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。许可证号: SCXK(沪)2007-0005。

1.2 药物 健步关节胶囊 (0.3克/粒, 解放军第411医院, 批号100122), 由淫羊藿、生地等10味中药组方。阳性药硫酸氨基葡萄糖胶囊 (0.3 g/粒, 重庆太极集团, 批号100202)。

1.3 试剂 木瓜蛋白酶 (sigma, 由贝基分装); 一氧化氮 (NO) 试剂盒 (批号20080418)、超氧化物歧化酶 (SOD) (批号20080418) 均由南京建成生物工程

[基金项目] 上海市虹口区卫生局医学科研资助重点项目 (0702-16-151号)。

[作者简介] 鲍蕾蕾 (1979-), 女, 硕士, 主管药师。Tel: (021) 65283984, E-mail: annabao212@hotmail.com。

研究所提供。

1.4 仪器 DK-8AD型电热恒温水槽(上海一恒科学仪器有限公司); TJL-16C离心机(上海安宁科学仪器厂制造); 半自动生化测定仪 screen master 3000 (HOSPITEX公司)。

2 实验方法

2.1 动物饲养 各组兔均在温度(20±5)℃, 湿度(40±10)%条件下自由饮水、摄食。

2.2 动物分组及给药 按组间均衡一致的原则, 将30只大白兔随机分为模型组、阳性药组、低剂量组、中剂量组、高剂量组, 每组6只。临床成人日用量为2.7g, 按体表面积折算成家兔的剂量约为0.15g/kg。将临床治疗量作为本实验的低剂量, 即健步关节胶囊低剂量组为0.15g/kg。中剂量和高剂量设为低剂量的3倍及6倍, 即中剂量组为0.45g/kg, 高剂量组为0.90g/kg。术后第2天开始ig给药, 每天1次, 连续给药6周。

2.3 动物造模 参考文献, 并加以改进^[1]: 兔膝关节腔内注射木瓜蛋白酶, 造成骨关节病变模型方法。将兔弯曲膝关节, 经关节正中或两侧进针将1.6%木瓜蛋白酶生理盐水溶液0.5ml通过髌上韧带注入兔膝关节腔, 分别于实验的第1、4天注入兔膝关节中。

2.4 检测指标 6周后心脏取血, 测定血清中NO和SOD的含量, 同时处死动物, 取膝关节滑膜制成病理切片。

2.5 数据处理与统计学检验 所有实验数据均采用SPSS 13.0软件进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 组间差异采用LSD-t法进行比较, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 健步关节胶囊对兔膝关节病体重的影响 经t检验, 低、中、高剂量组体重变化与模型组相比, 无显著性差异, 提示健步关节胶囊毒性较低或无毒性作用, 具体数据见表1。

表1 健步关节胶囊对兔子体重的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量(g/kg)	体重(kg)
模型组	-	2.56 ± 0.14
阳性药组	0.06	2.60 ± 0.30
低剂量组	0.15	2.38 ± 0.36
中剂量组	0.45	2.53 ± 0.19
高剂量组	0.90	2.62 ± 0.37

3.2 健步关节胶囊对兔膝关节病血清NO含量的影响 健步关节胶囊低、中、高剂量组均能不同程

度提高兔膝关节病血清中NO的含量, 同模型组相比, 中剂量组有极显著差异($P < 0.01$)。具体数据见表2。

表2 健步关节胶囊对兔膝关节病血清NO含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量(g/kg)	NO含量(μmol/L)
模型组	-	53.33 ± 14.11
阳性药组	0.06	78.33 ± 18.60 ²⁾
低剂量组	0.15	73.43 ± 15.88 ¹⁾
中剂量组	0.45	79.72 ± 12.44 ²⁾
高剂量组	0.90	67.78 ± 20.83 ¹⁾

t检验: ¹⁾ $P < 0.05$, 与模型组比较; ²⁾ $P < 0.01$, 与模型组比较。

3.3 健步关节胶囊对兔膝关节病血清SOD含量的影响 健步关节胶囊中、高剂量组血清SOD活力较模型组均显著升高, 阳性药和低剂量组的SOD活力均数较模型组高, 但无显著性差异。提示健步关节胶囊对血清SOD活性的升高作用强于阳性药硫酸氨基葡萄糖。具体数据见表3。

表3 健步关节胶囊对兔膝关节病血清SOD含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量(g/kg)	SOD含量(U/ml)
模型组	-	88.52 ± 4.07
阳性药组	0.06	95.41 ± 6.99 ¹⁾
低剂量组	0.15	99.11 ± 11.60
中剂量组	0.45	98.63 ± 7.43 ¹⁾
高剂量组	0.90	99.45 ± 7.93 ¹⁾

t检验: ¹⁾ $P < 0.05$, 与模型组比较。

3.4 组织学观察 可见模型组软骨呈变性改变, 滑膜增生, 充血, 且表层可见较多炎细胞浸润; 健步关节低剂量组表层亦有较多炎细胞浸润, 但随着剂量增加, 可见炎细胞浸润逐渐减少, 见图1。表明健步关节胶囊对实验性家兔骨关节病有一定的改善作用。

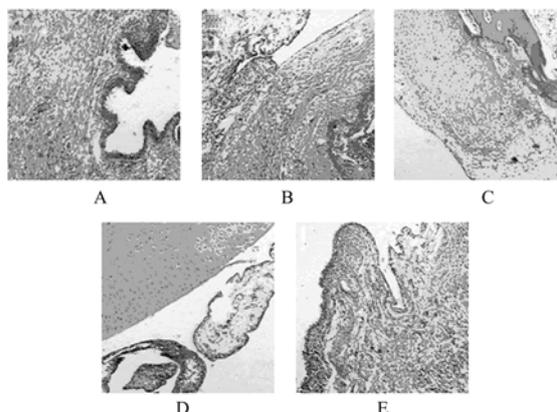


图1 健步关节胶囊对家兔骨关节病模型的组织形态学影响(He染色, 放大100倍)

A-低剂量组; B-中剂量组; C-高剂量组; D-阳性药组; E-模型组

(下转第215页)

噻托溴铵作为长效抗胆碱能药物,对于中、重度 COPD 有比较好的治疗效果,且副作用少,具有良好的安全性和耐受性。但其长期的治疗效果及安全性尚有待于大样本,长时间的研究。

【参考文献】

[1] 闫莉,吕妍琨. 国产噻托溴铵对稳定期慢性阻塞性肺疾病患者的影响[J]. 中国新药杂志, 2010, 19(2): 127.

[2] 杜昆钰,戴路明. 噻托溴铵在慢性阻塞性肺疾病治疗中的研究进展[J]. 中外医疗, 2009, 15(11): 179.
[3] Iwanaga Y, Nishi I, Furuichi S, et al. B-type natriuretic peptide strongly reflects diastolic wall stress in patients with chronic heart failure; comparison between systolic and diastolic heart failure [J]. *Jam Coll Cardiol*, 2006, 47(4): 742.

[收稿日期] 2012-03-28

[修回日期] 2012-04-18

(上接第 212 页)

4 讨论

本方选用淫羊藿、生地、山茱萸、杜仲、楮实子、川芎、延胡索、牛膝、制香附、路路通 10 味中药组方,其中主用淫羊藿、生地以补肾益精,加山茱萸、杜仲、楮实子更能加强补肾,填骨髓,再加入川芎、延胡索具有活血化瘀、辅以牛膝、制香附引药下行,行气解郁,路路通则通行十二经穴,共同达到补益肝肾,活血化瘀止痛、强筋骨之功效。现代药理学研究表明,含有淫羊藿和生地的补肾壮骨中药能显著提高去势大鼠骨小梁体密度和面密度,增加成骨细胞体密度和数密度,抑制破骨细胞体密度和数密度,提示淫羊藿和生地作为补肾壮骨中药的主要药材可能通过抑制骨吸收,促进骨组织形成的作用预防和治疗骨关节退行性病变^[2]。

传统治疗骨关节病使用非甾体类抗炎药,此类药物对骨关节病患者的炎性症状,如关节疼痛、肿胀及活动受限等有较好的治疗作用,但是非甾体类抗炎药对软骨基质的合成有抑制作用,长期应用虽可改善关节疼痛,但骨关节病的基本病理变化会加重,导致关节过度使用而加重软骨损伤。硫酸氨基葡萄糖可减轻关节疼痛的症状,减缓和改变骨关节的病理进程。其作用机制是硫酸氨基葡萄糖形成的蛋白聚糖胶体复合物附着在基质胶原网架上,与胶原网架结构构成一个弹性体,起承载压力、传导和缓冲应力、保护软骨结构和软骨下骨的作用^[3~5],是目前治疗骨关节退行性病的常规治疗药物,所以本实验选择硫酸氨基葡萄糖胶囊作为阳性对照药。

氧自由基对生物体有较大的破坏作用,它对氨基酸、多肽和蛋白质进行化学修饰,改变其结构和功能,并增加对蛋白水解酶的敏感性,促进其降解,使细胞膜发生脂质过氧化,因而成为许多疾病的基础。实验研究发现氧自由基可抑制软骨细胞 DNA、基质蛋白多糖及胶原的合成,促进后两者的降解,同时引起细胞膜性结构的严重损伤^[6]。本实验结果提示,健步关节胶囊能提高血清 SOD 的活性,提示其可能通过提

高 SOD 的活性,增强清除体内过多氧自由基的能力,从而抑制氧自由基对软骨细胞、基质蛋白多糖及胶原的损害作用,保护软骨和基质,延缓关节软骨的退变,防止膝关节炎的进一步发展。NO 可抑制软骨细胞增殖,促进软骨细胞凋亡,抑制软骨细胞胶原的合成,促使其分解,这些变化可能导致关节软骨修复能力下降,增加软骨破坏,加速软骨退变^[7]。但也有人持不同意见。Clements 等^[8]在骨关节病动物模型中去除 iNOS 基因,发现关节软骨退变加速,认为 NO 可能对维持软骨基质内环境稳定具有重要意义。表明 NO 在软骨基质中可能存在复杂的双重作用机制。本实验结果显示,健步关节胶囊能够提高兔膝关节血清 NO 的含量,提示,健步关节胶囊可能是通过稳定和维持软骨机制的内环境而发挥作用。

【参考文献】

[1] 梁平,李胜利,方苏亭,等. 骨炎痛定方对实验性兔膝关节病血清中 NO 和 SOD 含量的影响[J]. 中国中医骨伤杂志, 2006, 14(6): 50.
[2] 沈有亮,邓伟民,韦嵩,等. 补肾壮骨中药对去势雌性大鼠胫骨上端细胞立体计量学的影响[J]. 中国临床康复, 2006, 27(1): 42.
[3] 茹靖涛,曹靖,任秀花,等. 硫酸氨基葡萄糖对佐剂关节炎大鼠镇痛作用及 IL-6 表达影响[J]. 中国医疗前沿, 2010, (5): 20.
[4] Reginster JY, Bruyere O, Neuprez A. Current role of glucosamine in the treatment of osteoarthritis [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2007, 46(5): 731.
[5] Scholtissen S, Bruyere O, Neuprez A, et al. Glucosamine sulphate in the treatment of knee osteoarthritis: costeffectiveness comparison with paracetamol [J]. *Int J Clin Pract*, 2010, 64(6): 756.
[6] Wei XQ, Wright GC, Sokoloff L. The effect of sodium selenite on chondrocytes in monolayer culture [J]. *Arthritis Rheum*, 1996, 29(11): 660.
[7] 茅文斌,邵增务. 一氧化氮与骨性关节炎研究进展[J]. 国际骨科学杂志, 2006, 27(4): 232.
[8] Fermor B, Weinberg JB, Pisetsky DS, et al. Effect of cyclic mechanical strain and tumor necrosis factor alpha on the response of cells of the meniscus [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2004, 12(12): 974.

[收稿日期] 2012-03-09

[修回日期] 2012-04-11