

# 断藤益母汤对佐剂性关节炎大鼠骨破坏的干预作用

刘清平<sup>1\*</sup>, 李楠<sup>2</sup>, 孙骏炜<sup>2</sup>, 雷旭杰<sup>1</sup>, 何俊华<sup>2</sup>, 韩玉凤<sup>2</sup>

(1. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405;

2. 广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510405)

**[摘要]** **目的:**探讨断藤益母汤抗炎、抗骨质破坏的作用,及其抑制骨质破坏的机制。**方法:**72只SD大鼠分成9组,即正常组、模型组、甲氨喋呤组(MTX, 1.06 mg·kg<sup>-1</sup>)、南蛇藤高、中、低剂量组(47, 23.5, 4.7 g·kg<sup>-1</sup>)、断藤益母汤高、中、低剂量组(94, 47, 9.4 g·kg<sup>-1</sup>)。除正常组外,其余各组给药完全弗氏佐剂建立模型,造成佐剂性关节炎(AA)模型后,MTX每周ig给药1次,其余各组每天ig给药1次,连续36d,观察足肿胀度,检测血清I型胶原羧基末端肽(CTX-I),I型前胶原氨基端前肽(PINP)水平,组织病理切片及踝关节X射线。**结果:**与正常组比较,模型组足肿胀度、血清CTX-I水平和踝关节X射线评分均明显增高( $P < 0.01$ ),血清PINP水平无统计学差异;与模型组比较,各给药组足肿胀度、血清CTX-I水平和踝关节X射线评分均明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),且断藤益母汤各剂量组均优于单方南蛇藤各剂量组及氨甲喋呤组,血清PINP水平无统计学差异。病理结果显示,各给药组大鼠关节滑膜细胞增生、炎症细胞浸润、血管翳形成、软骨破坏均较模型组减轻,且断藤益母汤组对滑膜增生和软骨破坏的改善较南蛇藤组效果更优。**结论:**断藤益母汤能减轻AA大鼠关节炎、抑制骨破坏的作用机制与抑制血清CTX-I水平有关。

**[关键词]** 类风湿性关节炎; 断藤益母汤; I型胶原羧基末端肽; 骨破坏

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)10-0146-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015100146

**Effect of Duanteng Yimu Decoction on Bone Destruction in Rats with Adjuvant Arthritis** LIU Qing-ping<sup>1\*</sup>, LI Nan<sup>2</sup>, SUN Jun-wei<sup>2</sup>, LEI Xu-jie<sup>1</sup>, HE Jun-hua<sup>2</sup>, HAN Yu-feng<sup>2</sup> (1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2. The First Clinical Medical College of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of duanteng Yimu decoction (DTYM) on anti-inflammation and counteracting bone destruction, and to investigate its mechanism of counteracting bone destruction of adjuvant arthritis in rats. **Method:** Seventy-two SD rats were divided into nine groups; the normal group, the model group, the methotrexate group (MTX, 1.06 mg·kg<sup>-1</sup>), the high-, medium-, low-dose celastrus orbiculatus groups (47, 23.5, 4.7 g·kg<sup>-1</sup>) and the high-, medium-, low-dose DTYM groups (94, 47, 9.4 g·kg<sup>-1</sup>). The rats except the normal group were induced by injecting complete Freund's adjuvant to establish adjuvant arthritis rat model. After intragastrical administration of the corresponding medicines once daily for 36 days, the feet swelling degrees, ankle X-ray, C-terminal telopeptide of type I collagen (CTX-I) and N-terminal propeptide of type I collagen (PINP) serum concentration, and ankle pathological were observed. **Result:** Compared with the normal group, the feet swelling degrees, CTX-I and ankle X-ray score increased significantly in the model group ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the feet swelling degrees, CTX-I and ankle X-ray score decreased significantly in all treatment groups ( $P < 0.01$ ). No statistically significant differences in PINP were found between any two groups. Pathological study showed that there were less synovial cell hyperplasia, inflammatory cell infiltrations, pannus formation and cartilage destruction in all treatment groups. Moreover, the above results were better in the DTYM groups. **Conclusion:** The mechanism of DTYM decoction in improving arthritis and bone destruction may be

**[收稿日期]** 20140821(016)

**[基金项目]** 广东省科技计划项目(2012B031800211)

**[通讯作者]** \*刘清平,博士,副主任医师,从事中医临床与教学工作,从事中医药治疗风湿病的临床和实验研究, Tel: 15918738456, E-mail: FROG424@163.com

related to inhibiting the level of CTX-I.

[Key words] rheumatoid arthritis; duantengyimu decoction; C-terminal telopeptide of type I collagen; bone destruction

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种严重影响人类健康的慢性自身免疫性疾病,其病因及发病机制至今尚不完全清楚。西医所用传统抗风湿药物如非甾体抗炎药、慢作用药、糖皮质激素等,难以抑制骨破坏,而生物制剂,多能预防或缓解骨破坏,能够起到骨修复甚则完全阻断骨破坏的研究少有报道<sup>[1]</sup>。断藤益母汤以南蛇藤为主药,配伍续断和益母草,续断具有补肝肾,强筋骨的功效,配伍后能降低南蛇藤对雄性大鼠的生殖毒性,益母草活血利水,化瘀通经,前期研究发现,断藤益母汤对活动期具有改善关节功能及降低炎症指标的作用<sup>[2]</sup>。但是,至目前为止,针对南蛇藤抑制骨质破坏作用的客观评价研究鲜见,其作用机制多集中在免疫调节和炎症介质方面,限制了南蛇藤进一步的推广应用。本研究从动物实验角度,客观评价断藤益母汤抗炎抗关节破坏的作用,并通过对血清I型胶原羧基末端肽(C-terminal telopeptide of type I collagen, CTX-I)和I型前胶原氨基端前肽(N-terminal propeptide of type I collagen, PINP)的检测,探讨其抑制关节炎症,抗骨破坏的作用及对骨代谢指标的影响。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级雌性SD大鼠72只,体重(200±20)g,购自广州中医药大学实验动物中心,动物合格证号SCXK(粤)2013-0034。

**1.2 药物及试剂** 南蛇藤(广州岭南中药饮片有限公司,批号140301),益母草(广东省药材公司中药饮片厂,批号85313711),续断(康美药业股份有限公司,批号140107421),甲氨蝶呤片(上海信谊药厂有限公司,批号036130706),完全弗氏佐剂(美国Sigma公司),CTX1-ELISA试剂盒及PINP-ELISA试剂盒(武汉华美公司)。

**1.3 仪器** FA204B型电子精密天平(上海皖衡电子仪器有限公司),680型酶标仪(美国Bio-Rad公司),PV-200型足趾容积测量仪(成都泰盟科技有限公司),EQ.0.5 pb/40KY型钼靶机(意大利吉特公司),LAB-Y01型高速低温离心机(广州天臣实验室有限公司),IX70-81FZ型倒置显微镜(日本Olympus公司)。

## 2 方法

**2.1 药物的制备** 单方和复方的高、中、低剂量组分

别予临床等效剂量换算后的10,5,1倍药量,其中单方为南蛇藤煎剂,复方为断藤益母汤煎剂。单方的高、中、低剂量组给予南蛇藤47,23.5,4.7 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,复方高、中、低剂量组给予南蛇藤47,23.5,4.7 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>+续断16,8,1.6 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>+益母草31,15.5,3.1 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>。煎煮方法:南蛇藤先煎3.5 h,加入续断和益母草同煎1 h,由广州中医药大学煎药室煎至特定用量,装瓶放置于4℃冰箱中保存备用。MTX组予MTX片1.06 mg·kg<sup>-1</sup>,溶于生理盐水配至所需用量。

**2.2 动物模型的分组与制作** 将SD大鼠随机分为9组,即正常组、模型组、氨甲喋呤组(MTX,1.06 mg·kg<sup>-1</sup>)、南蛇藤高、中、低剂量组(47,23.5,4.7 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)、断藤益母汤高、中、低剂量组(94,47,9.4 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。每组均为8只。适应性喂养3 d。参照文献方法,除正常组外,余大鼠于右足趾*ih*完全弗氏佐剂0.15 mL<sup>[3]</sup>。

**2.3 给药** 造模当天开始*ig*给药。正常组、模型组给予生理盐水10 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,中药组予对应中药10 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,MTX组没有给予MTX水溶液10 mL·kg<sup>-1</sup>。连续给药36 d。

**2.4 关节肿胀的观察** 容积法测量并计算关节肿胀度。

$$\text{关节肿胀度} = (\text{注射后所测值} - \text{注射前所测值}) / \text{注射前所测值} \times 100\%$$

**2.5 血清CTX-I, PINP检测** 给药36 d后,腹主动脉采血,采用ELISA的方法检测血清CTX-I, PINP。

**2.6 组织病理学观察** 大鼠处死后立即取致炎足踝关节,10%福尔马林固定后进行脱钙,常规石蜡包埋切片,HE染色,光镜下进行组织形态学观察。

**2.7 踝关节X射线片评价** 取大鼠右足,钼靶X射线检测,由影像学医生盲法阅片后评分。评分标准采用美国风湿病学会推荐的放射学评分标准,0分,正常;1分,表现X射光线检查无破坏性改变,可见骨质疏松;2分,表现骨质疏松,可有轻度软骨破坏,有或没有轻度的软骨下骨质破坏,可见关节活动受限,但无畸形;3分,骨质疏松加上软骨或骨质破坏,关节畸形,无纤维性或骨性强直;4分,纤维性或骨性强直。

**2.8 统计学分析** 采用SPSS 17.0统计学软件,统

计方法采用两独立样本  $t$  检验, 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对大鼠足踝关节肿胀的影响** 与正常组比较, 模型组大鼠关节肿胀度明显升高 ( $P < 0.01$ ); 给药 36 d 后, 与模型组比较, 大鼠关节肿胀度明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 并且断藤益母汤各剂量组优于南蛇藤各剂量组。见表 1。

表 1 断藤益母汤对大鼠关节肿胀度评分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )  
Table 1 Effects of Duanteng Yimu decoction on score of joint swelling degree ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	给药前/%	给药后/%
正常	-	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
模型	-	86.8 $\pm$ 6.3	86.5 $\pm$ 6.2 <sup>2)</sup>
南蛇藤	4.7	84.5 $\pm$ 5.8	66.7 $\pm$ 4.7 <sup>3)</sup>
	23.5	84.6 $\pm$ 7.9	59.4 $\pm$ 7.8 <sup>4)</sup>
	47	79.8 $\pm$ 9.6	42.6 $\pm$ 9.4 <sup>4)</sup>
断藤益母汤	9.4	79.0 $\pm$ 6.7	53.2 $\pm$ 4.9 <sup>4)</sup>
	47	82.2 $\pm$ 4.3	50.5 $\pm$ 5.8 <sup>4)</sup>
	94	81.6 $\pm$ 10.7	43.2 $\pm$ 4.7 <sup>4)</sup>
MTX	1.06 $\times 10^{-3}$	84.1 $\pm$ 8.8	66.9 $\pm$ 9.8 <sup>3)</sup>

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$  (表 2, 图 2 同)。

**3.2 对血清 CTX1, PINP 水平的影响** 与正常组比较, 模型组 CTX-I 水平明显升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 南蛇藤高剂量组、断藤益母汤低、中、高剂量组显著降低 CTX-I 水平 ( $P < 0.01$ ), MTX 组、南蛇藤低、中剂量组明显降低 CTX-I 水平 ( $P < 0.05$ )。各组间 PINP 水平无统计学差异。见表 2。

表 2 断藤益母汤对大鼠血清 CTX1, PINP 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )  
Table 2 Effects of Duanteng Yimu decoction on CTX-I and PINP ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	CTX-I/ $\mu g \cdot L^{-1}$	PINP/ $\mu g \cdot L^{-1}$
正常	-	12.35 $\pm$ 0.98	14.54 $\pm$ 2.57
模型	-	17.76 $\pm$ 1.53 <sup>2)</sup>	15.57 $\pm$ 2.21
南蛇藤	4.7	16.46 $\pm$ 0.59 <sup>3)</sup>	13.63 $\pm$ 3.26
	23.5	15.71 $\pm$ 1.37 <sup>3)</sup>	14.49 $\pm$ 3.34
	47	15.66 $\pm$ 1.27 <sup>4)</sup>	16.69 $\pm$ 2.11
断藤益母汤	9.4	14.88 $\pm$ 0.59 <sup>4)</sup>	16.25 $\pm$ 1.49
	47	13.92 $\pm$ 1.17 <sup>4)</sup>	16.64 $\pm$ 0.89
	94	13.52 $\pm$ 0.74 <sup>4)</sup>	16.71 $\pm$ 2.87
MTX	1.06 $\times 10^{-3}$	15.69 $\pm$ 1.60 <sup>3)</sup>	14.51 $\pm$ 3.26

**3.3 对足踝关节组织的影响** 模型组见大量炎症细胞浸润, 大量滑膜细胞增生, 血管翳形成。正常组大鼠足部切片中未见炎症细胞浸润、滑膜增生和软骨破坏等异常改变。经过南蛇藤组干预的大鼠关节病理见较多慢性炎症细胞浸润、滑膜细胞增生不明显及局部血管翳。经过断藤益母汤组干预的大鼠关节滑膜组织仅见炎症细胞浸润及少数的新生血管。见图 1。

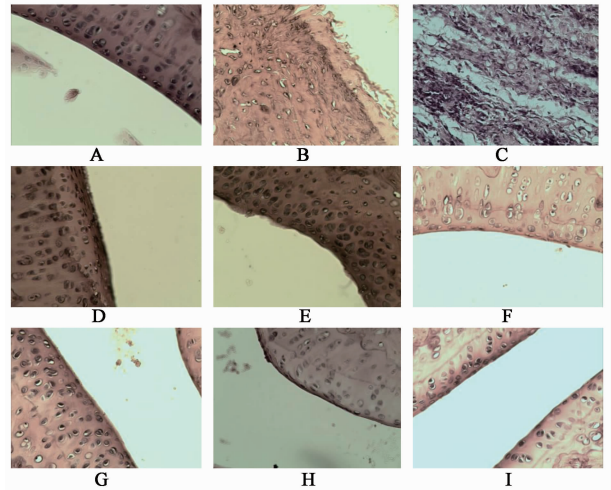


图 1 断藤益母汤对足踝关节组织的影响 (HE,  $\times 200$ )  
Fig. 1 Effects of Duanteng Yimu decoction on ankle tissue (HE,  $\times 200$ )

**3.4 对足踝关节损伤的影响** 踝关节 X 射线片显示, 各组与正常组比较均出现明显的关节破坏 ( $P < 0.01$ ), 严重的出现纤维性或骨性强直。与模型组比较, 各给药组均能明显改善关节破坏 ( $P < 0.05$ ), 其中南蛇藤高剂量组、断藤益母汤高剂量组有非常显著性差异 ( $P < 0.01$ )。见图 2。

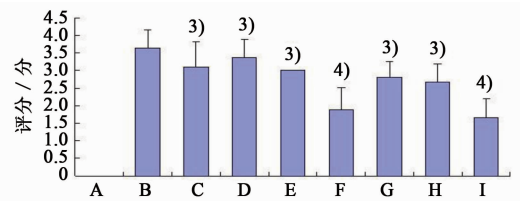


图 2 断藤益母汤对足踝关节组织的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )  
Fig. 2 Effects of Duanteng Yimu decoction on damage of ankle tissue ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

### 4 讨论

与人 RA 在临床表现、病理、免疫有着相似或相

近的特点,是研究 RA 的较理想模型<sup>[4]</sup>。本实验动物造模后第2天即出现足肿胀,至第7天达到高峰,后逐渐下降,病理切片见大量炎症细胞浸润,大量滑膜细胞增生,血管翳形成,结合 X 射线提示关节破坏明显,提示造模成功。本研究显示,在改善足肿胀度、踝关节病理及 X 射线关节破坏上,各给药组与模型组比较均有统计学差异,其中复方组较单方组起效更早、作用更显著,呈剂量依赖关系,表明南蛇藤配伍续断、益母草能有效缓解大鼠关节肿胀症状,减轻影像学骨破坏。

研究表明,相对于关节影像学检查和骨密度仪检查来说,骨代谢生化标志物的检测能更快速、动态地反映骨代谢转换的情况<sup>[5]</sup>。在所有骨代谢标志物中,CTX-I 和 PINP 敏感性相对较好<sup>[6]</sup>。PINP 可较长时间存在于血循环中,较稳定地反映骨形成的水平。CTX-I 其释放速率可有效地反映破骨细胞的活性<sup>[7]</sup>。成骨细胞的衰老<sup>[8]</sup>、凋亡增加<sup>[9]</sup>及过度活化的破骨细胞系统,使得骨质重建的平衡大大偏向骨质丢失的一端。研究证实,RA 发病早期的天然免疫应答过程被激活,产生一系列炎症相关因子如肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ),核转录因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 和基质降解酶等,介导炎症与内皮细胞互相作用,导致关节进行性破坏<sup>[10]</sup>。

另外,给药组能有效地降低大鼠血清 CTX-I 水平,抑制破骨细胞的活性,其中复方高、中、低剂量组和单方高剂量组与模型组比较有显著统计学意义,表明南蛇藤对骨代谢指标的影响与剂量、配伍相关。给药组与模型组比较 PINP 无统计学意义。结合实验结果表明,断藤益母汤减轻大鼠关节影像学破坏的作用机制可能与抑制血清骨破坏因子 CTX-I 水平有关。

实验研究南蛇藤具有抗炎镇痛及免疫调节作用<sup>[11]</sup>。对于南蛇藤研究,多是针对其抗炎镇痛及免疫调节机制,抗骨破坏研究少有报道,尤其从骨代谢标志物方面未见文献报道。本实验证实,经过南蛇藤单方及配伍续断、益母草复方高中低剂量连续给药 36 d 后,大鼠足肿胀度、影像学骨破坏都得到明显改善,血清学检测也显示血清 CTX-I 的水平明显降低,与模型组比较有显著差异。总结本次实验表明,南蛇藤能改善 AA 大鼠关节肿胀度,抑制血清破骨细胞活性,明显减轻 AA 大鼠关节滑膜的炎症反

应和影像学骨破坏。南蛇藤配伍续断、益母草后对关节破坏的抑制作用更明显,且呈剂量依赖关系,这为中成药抗 RA 作用机制提供一定依据。

#### [参考文献]

- [1] 罗丹,王敏智,何小鹏,等. 治疗类风湿关节炎骨破坏的生物制剂研究进展[J]. 中日友好医院学报,2014,28(1):49-52.
- [2] 林昌松,梁红,刘风震,等. 断藤益母汤治疗类风湿关节炎的临床疗效观察[J]. 广州中医药大学,2012,29(6):632-637.
- [3] 刘琼,王晨瑶,方剑乔. 类风湿性关节炎动物模型的研究进展[J]. 医学综述,2006,12(5):313-316.
- [4] 张玲玲,沈玉先,魏伟. 类风湿性关节炎动物模型与临床的关系[J]. 中国药理学通报,2002,18(5):502-506.
- [5] Garnero P, Rousseau J C, Delmas P D. Molecular basis and clinical use of biochemical markers of bone cartilage and synovium in joint diseases[J]. Arthritis Rheum, 2000, 43(5):953-968.
- [6] 欧阳霞,戴冽,朱浪静. 骨代谢标志物的检测在类风湿关节炎中的临床意义[J]. 新医学,2012,43(2):71-74.
- [7] Ivaska K K, Hellman J, Likojarvi J, et al. Identification of novel proteolytic forms of osteocalcin in human urine[J]. Biochem Biophys Res Commu, 2003, 306(4):973-980.
- [8] Yudoh K, Matsuno H, Osada R, et al. Decreased cellular activity and replicative capacity of osteoblastic cells isolated from the periarticularbone of rheumatoid arthritis patients compared with osteoarthritis patients[J]. Arthritis Rheum, 2000, 43(10):2178-2188.
- [9] Chen S, Guttridge D C, Tang E, et al. Suppression of tumor necrosis factor-mediated apoptosis by nuclear factor kappaB-independent bone morpho-genetic protein/Smad signaling[J]. J Biol Chem, 2001, 276(42):39259-39263.
- [10] Ejtehadi H D, Fremimanis G L. The potential role of human endogenous retrovirus K10 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis a preliminary study[J]. Ann Rheum Dis, 2006, 65(6):612-616.
- [11] 杨蒙蒙,佟丽. 南蛇藤化学成分及药理研究的进展[J]. 中药新药与临床药理,2004,15(3):222-224.

[责任编辑 周冰冰]