

壮骨1号方对大鼠骨性关节炎的抗损伤作用研究

张少卓¹, 钟文婕¹, 周昆¹, 田文全¹, 高文远^{2*}, 柳占彪^{1*}

(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072)

[摘要] 目的:观察壮骨1号方对骨性关节炎的抗损伤作用。方法:选SD大鼠,以泊洛沙姆载药体加载木瓜蛋白酶制成温敏型原位凝胶控释剂,按照0.05 mL(1.6 U)/关节剂量,双侧膝关节注射,50℃环境下作用2 h复制大鼠骨性关节炎模型。实验分为正常对照、模型对照组(等容蒸馏水)、壮骨关节丸(1.10 g·kg⁻¹)组与壮骨1号方(2.20, 1.10, 0.55 g·kg⁻¹)治疗组,氨基葡萄糖(0.03 g·kg⁻¹)阳性药对照组,ig每天1次,连续治疗8周。用酶联免疫吸附(ELISA)法测定关节液中基质金属蛋白酶-3(MMP-3)及其组织金属蛋白酶抑制因子-1(TIMP-1)含量,计算MMP-3/TIMP-1;观察关节软骨病理组织学变化并进行图像分析。结果:治疗8周后,模型组大鼠关节液中MMP-3/TIMP-1为0.092±0.010,与正常组0.062±0.011差异有统计学意义(P<0.05),用壮骨1号方2.20, 1.10, 0.55 g·kg⁻¹剂量治疗8周后,MMP-3/TIMP-1明显降低,分别为0.060±0.016, 0.060±0.028, 0.057±0.027,与模型组比差异有统计学意义(P<0.05或P<0.01)。病理图像分析显示模型组大鼠软骨坏死面积为(37 734±11 504) μm²,与正常组(0.00±0.00) μm²比较差异有统计学意义(P<0.01),壮骨1号方2.20, 1.10 g·kg⁻¹治疗8周后,关节软骨坏死面积为(26 601±6 506), (27 061±10 425) μm²,与模型组比较差异有统计学意义(P<0.05)。结论:壮骨1号方具有一定的抗软骨损伤作用,能延缓骨性关节炎的病程进展。

[关键词] 壮骨1号方; 骨性关节炎; 抗损伤作用

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)06-0132-04

[doi] 10.11653/syjf2014060132

Anti-injury Effect of Zhuanggu Yihao Fang on Osteoarthritis

ZHANG Shao-zhuo¹, ZHONG Wen-jie¹, ZHOU Kun¹, TIAN Wen-quan¹, GAO Wen-yuan^{2*}, LIU Zhan-biao^{1*}

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

[收稿日期] 20131008(002)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2011ZX09201-201-21)

[第一作者] 张少卓, 硕士, 副教授, 从事药理学教学与研究, Tel:022-59596225, E-mail:zhangsz800@sina.com

[通讯作者] *高文远, 博士, 教授, 从事中药新药研发工作, Tel:022-87401895, E-mail:13114944863@163.com

*柳占彪, 硕士, 研究员, 从事中药新药研发工作, Tel:022-59596166, E-mail:634256747@qq.com

[6] 张丽, 张敏, 丁安伟, 等. 荆芥内酯聚乳酸乙醇酸纳米粒的抗炎、镇痛及解热作用[J]. 中国药科大学学报, 2008, 39(5): 433.

[7] 郜新莲, 段红福, 崔瑛, 等. 血热出血模型大鼠血清中鲜地黄高效液相色谱分析[J]. 中医学报, 2011, 26(9): 1067.

[8] 金花, 杨丽敏, 侯咏梅. 蒙医血热证动物模型的建立及实验研究[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2008, 10(1): 122.

[9] 王剑, 徐丹洋, 陈佩东, 等. 黄芩炭对血热出血大鼠止血有效部位研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 153.

[10] 赵素荣, 卢尧伟, 陈金龙, 等. 地黄梓醇降糖作用的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(1): 171.

[11] Recio M C, Giner R M, Manez S, et al. Structural considerations on the iridoids as anti-inflammatory agents [J]. Planta Med, 1994, 60(3): 232.

[12] 瑞军, 吕栋, 廖胜东, 等. 中药提取物水苏糖治疗亚临床肝性脑病 30 例 [J]. 中国新药杂志, 2003, 12(6): 469.

[13] 李丽秋, 桂金秋. 中药提取物水苏糖对实验性肝硬化大鼠血浆内毒素及肠道菌群的影响 [J]. 中国微生态学杂志, 2006, 18(2): 107.

[14] 武卫红. 地黄寡糖的制备工艺及其药理活性研究 [D]. 济南: 山东大学, 2006: 76.

[责任编辑] 聂淑琴

2. School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the anti-injury effect of Zhuanggu Yihao Fang on osteoarthritis (OA).

Method: The OA rat model was induced by sustained releasing agent (4% Papain and poloxamer). 0.05 mL of the sustained releasing agent (4% Papain and poloxamer) was injected into both knee joint compartments of male SD rats to injury cartilage for a period of 2 h at 50 °C. Besides normal group, the rats with osteoarthritis were randomly divided into 6 groups: model group (isovolumic distilled water), glucosamine group (0.03 g·kg⁻¹), Zhuanggu Guanjie pill (1.10 g·kg⁻¹) group and Zhuanggu Yihao Fang (2.20, 1.10, 0.55 g·kg⁻¹) groups. The rats with osteoarthritis received daily oral treatments of drugs for 8 weeks. The normal group and the model group received daily oral treatments of isovolumic distilled water for 8 weeks. The contents of matrix metalloproteinases-3 (MMP-3) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in synovial fluid were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The changes in cartilages were evaluated by histopathology and morphometry. **Result:** MMP-3/TIMP-1 level in normal group was 0.062 ± 0.011, compared with the normal group, MMP-3/TIMP-1 level in the model group was significantly increased to 0.092 ± 0.010 ($P < 0.05$). After 8 weeks' treatment, the MMP-3/TIMP-1 level in Zhuanggu Yihao Fang (2.20, 1.10, 0.55 g·kg⁻¹) groups was 0.060 ± 0.016, 0.060 ± 0.028, 0.057 ± 0.027, respectively. Compared with the model group, Zhuanggu Yihao Fang (2.20, 1.10, 0.55 g·kg⁻¹) treatments significantly reduced the MMP-3/TIMP-1 level ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the normal group, the area of cartilage necrosis in the model group was significantly increased to (37 734 ± 11 504) μm² ($P < 0.01$), Zhuanggu Yihao Fang (2.20, 1.10 g·kg⁻¹) treatments significantly reduced the areas of cartilage necrosis in OA rats, which was (26 601 ± 6 506), (27 061 ± 10 425) μm², respectively ($P < 0.05$). **Conclusion:** Zhuanggu Yihao Fang can protect the cartilage from injury and attenuate the progression of OA.

[Key words] Zhuanggu Yihao Fang; osteoarthritis; anti-injury effect

壮骨关节丸是治疗关节炎的经典方,由熟地黄、补骨脂、淫羊藿、独活、乳香、没药、续断、狗脊、鸡血藤、骨碎补、桑寄生、木香共 12 味组成,具有补益肝肾、养血活血、舒筋活络、理气止痛功能,主要用于肝肾不足、气滞血瘀、经络痹阻所致的各种退行性骨关节痛腰肌劳损等,已在临床广泛应用。但近年来临床上多次出现肝损害的报道^[1-5]。为此,课题组根据文献调研及药性分析,在该方的基础上采用新工艺对乳香、没药、补骨脂^[6-7]的有毒部分进行了减毒处理,制成了壮骨 1 号方(工艺另有报道)。本研究拟观察壮骨 1 号方的抗损伤作用及机制探讨。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠,体重(200 ± 10)g,购自天津市山川红实验动物科技有限公司,许可证号 SCXK(津)2009-0001,生产批号 20120617。

1.2 药物 壮骨关节丸,由熟地黄、补骨脂、淫羊藿、独活、乳香、没药等组成,经水提、过滤、干燥后制成水丸,由深圳华润三九医药股份有限公司提供(批号 1006103);壮骨 1 号方,在壮骨关节丸的基础上,对乳香、没药、补骨脂的有毒部分进行减毒处理

后制成水丸,由深圳华润三九医药股份有限公司提供(批号 1006102);盐酸氨基葡萄糖胶囊(浙江诚意药业有限公司,批号 20090603)。

1.3 试剂 木瓜蛋白酶(美国 Sigma 公司,批号 118K1465),泊洛沙姆(美国 Sigma 公司,批号 P2443),MMP-3 ELISA 检测试剂盒(武汉 cusabio 华美生物工程有限公司,批号 CSB-E07410r),TIMP-1 ELISA 检测试剂盒(美国 R&D 公司,批号 DY580)。

1.4 仪器 FlexStation 3 型多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司),1012 型杂交箱(美国 SHEL LAB),ASP300S 型全自动封闭脱水机(德国 Leica 仪器公司),BMJ-1 型生物组织包埋机(天津航空机电公司),RM2135 型切片机(德国 Leica 仪器公司),Olympus 照相显微镜(日本)。Allegra 64R 快速离心机(美国 Beckman Coulter 公司)。

2 方法

2.1 造模 造模方法为课题组自创,该方法已获发明专利^[8]。大鼠按 0.3 g·kg⁻¹体重 ip 10% 水合氯醛麻醉,以 35% 泊洛沙姆载药体加载 4% 木瓜蛋白酶制成温敏型原位凝胶控释剂,按照 0.05 mL(1.6

U)/关节剂量, 双侧膝关节注射, 50 °C 环境下作用 2 h, 即可造成软骨的损伤。随机抽取 3/10 只大鼠进行病理组织学检查, 复核模型的可靠性及成功率。

2.2 分组与给药 选模型鼠 48 只, 随机分为模型组、壮骨关节丸组、壮骨 1 号方 2.20, 1.10, 0.55 g·kg⁻¹ 治疗组及氨基葡萄糖阳性药对照组, 每组 8 只。另选大鼠 8 只作为正常对照组。壮骨关节丸组按照 1.10 g·kg⁻¹ 剂量 ig 给药, 壮骨 1 号方治疗组分别按照 2.20, 1.10, 0.55 g·kg⁻¹ 剂量 ig 给药, 氨基葡萄糖对照组按照 0.03 g·kg⁻¹ 剂量 ig 给药, 每天 1 次, 连续治疗 8 周, 正常组和模型组 ig 等体积蒸馏水。

2.3 取材 治疗结束后, 将全部动物处死取样。关节液采集: 打开左膝关节腔, 用 1 mL 生理盐水反复冲洗 3 次, 收集关节液, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液, -20 °C 保存备用。病理取材: 取大鼠完整右膝关节, 去除周围皮肤、肌肉, 10% 福尔马林固定。

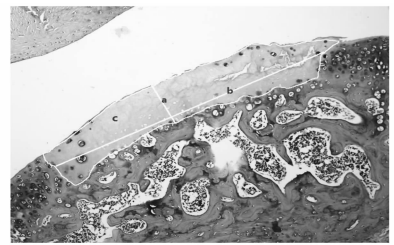
2.4 关节液 MMP-3 和 TIMP-1 含量的测定 采用酶联免疫吸附 (ELISA) 方法, 分别取每份关节液 100 μL, 按试剂盒说明书进行操作。

2.5 关节软骨的病理组织学检查及图像分析 取固定的右膝关节, 脱钙, 常规石蜡包埋, 切片用 HE 染色, 光镜下观察关节的病理组织学变化。采用 DP71 显微照相系统, 100 倍镜下拍摄大鼠关节软骨中坏死区域, 用 IPP6.0 图像分析软件测量关节软骨坏死区域的长、宽及坏死面积 (如图 1 所示)。

2.6 统计学分析 数据用 SPSS 17.0 软件进行统计, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验测定结果各组间比较均采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 OA 大鼠关节液 MMP-3 和 TIMP-1 含量的



a. 测量的宽度; b. 测量的长度; c. 测量的面积
图 1 关节软骨病理组织学测量模式

影响 由表 1 可知, 模型组大鼠关节液中 MMP-3/TIMP-1 升高, 与正常组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 用壮骨关节丸 1.10 g·kg⁻¹ 和壮骨 1 号方 2.20, 1.10, 0.55 g·kg⁻¹ 治疗后, MMP-3/TIMP-1 明显降低, 与模型组比较均有统计学差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果说明壮骨 1 号方可以降低 OA 大鼠关节液中 MMP-3/TIMP-1, 相对提高 TIMP-1 水平, 降低 MMP-3 水平, 从而抑制 MMP-3 对关节软骨基质的降解。

3.2 大鼠关节软骨病理组织学观察及图像分析 模型组 8 只大鼠关节软骨均出现明显的病理改变, 表现为软骨切线层细胞肿大、变性, 继而出现移行层和深层软骨细胞的变性及坏死, 并随时间的延续软骨细胞的坏死越来越多, 其中切线层细胞的坏死相对滞后于移行层和深层软骨细胞的坏死, 至第 8 周软骨全层坏死, 出现裂隙或组织缺失。各治疗组大鼠关节软骨也均呈现明显的病理损伤, 但软骨坏死较模型组减轻, 壮骨关节丸组和壮骨 1 号方 2.20, 1.10 g·kg⁻¹ 治疗组关节软骨坏死面积明显减少, 与模型组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。结果表明壮骨 1 号方和壮骨关节丸有一定的抗损伤作用, 能够延缓 OA 病程的进展。

表 1 壮骨 1 号方对 OA 大鼠关节液 MMP-3 和 TIMP-1 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MMP-3/pg·mg ⁻¹	TIMP-1/pg·mg ⁻¹	MMP-3/TIMP-1
正常	-	0.71 ± 0.30	12.21 ± 4.41	0.062 ± 0.011
模型	-	1.01 ± 0.48	9.51 ± 1.57	0.092 ± 0.010 ¹⁾
壮骨关节丸	1.10	1.34 ± 0.15	20.61 ± 3.22 ³⁾	0.063 ± 0.011 ³⁾
壮骨 1 号方	2.20	1.02 ± 0.49	17.36 ± 6.10	0.060 ± 0.016 ³⁾
	1.10	0.99 ± 0.44	20.83 ± 9.96 ³⁾	0.060 ± 0.028 ³⁾
	0.55	0.89 ± 0.25	15.59 ± 4.07	0.057 ± 0.027 ⁴⁾
氨基葡萄糖	0.03	0.98 ± 0.30	16.89 ± 7.34	0.059 ± 0.018 ³⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

表2 壮骨1号方对OA大鼠软骨损伤的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	关节软骨坏死区长度/μm	关节软骨坏死区宽度/μm	关节软骨坏死区面积/μm ²
正常	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型	-	519.64 ± 139.71 ²⁾	59.37 ± 12.50 ²⁾	37 733.55 ± 11 503.63 ²⁾
壮骨关节丸	1.10	474.30 ± 167.58 ²⁾	57.38 ± 9.49 ²⁾	27 081.22 ± 5 769.66 ³⁾
壮骨1号方	2.20	410.25 ± 116.12 ²⁾	56.92 ± 6.63 ²⁾	26 600.50 ± 6 506.22 ³⁾
	1.10	474.33 ± 112.15 ²⁾	50.76 ± 9.77 ²⁾	27 061.14 ± 10 425.27 ³⁾
	0.55	527.74 ± 138.22 ²⁾	52.24 ± 9.95 ²⁾	29 598.90 ± 10 699.14
氨基葡萄糖	0.03	537.89 ± 123.86 ²⁾	51.60 ± 12.47 ²⁾	27 781.42 ± 6 751.06 ³⁾

4 讨论

本研究选用“用于骨关节炎造模的药物组合物及其制备方法与造模方法”^[8]造模,经实验结束后进行的病理组织学检查,证实所有造模大鼠均出现明显的关节软骨损伤,表明该造模方法确实可靠,成功率高,适合于药物的疗效观察和评价。

MMP-3是基质溶解素中的重要成分,不仅对软骨基质蛋白多糖有高度的裂解活性^[9],还参与胶原酶的激活,加快Ⅱ型胶原的降解^[10],而TIMP-1是MMP-3的特异性抑制剂,它与MMP-3分子结合成不可逆的1:1非共价键结合的复合物,在生理情况下,二者之间水平保持平衡,MMP-3不表现裂解活性,当TIMP-1活性降低时,二者之间水平失衡时,MMP-3表现出裂解软骨细胞外基质的活性^[11]。本实验结果表明壮骨1号方虽然对MMP-3活性没有明显影响,但可降低MMP-3/TIMP-1,从而抑制了MMP-3对关节软骨基质中蛋白多糖的裂解活性,减少软骨基质中Ⅱ型胶原的降解,起到了延缓软骨损伤的作用。

本研究结果表明壮骨关节丸和经过减毒处理后的壮骨1号方均具有抗损伤作用,可为壮骨1号方替代有肝毒性的壮骨关节丸的新药开发提供有价值的形态学资料。

[参考文献]

[1] 邓培媛,蔡皓东. 壮骨关节丸致肝损害30例报告[J]. 中国新药杂志,1996,5(3):212.

[2] 吴卓智,潘蔷. “壮骨关节丸”致急性肝损害4例报告[J]. 北京医学,1994,16(1):58.

[3] 曹淑芬,陈一九,程经华. 壮骨关节丸致肝损害15例[J]. 药物流行病学杂志,1995,4(4):213.

[4] 刘晓彦,张栩,孙花芬. 壮骨关节丸致药物性肝损害2例报告[J]. 宁夏医学杂志,1995,17(5):294.

[5] 李军,施一帆. 壮骨关节丸致肝脏损害8例报告[J]. 中国骨伤,1999,12(2):73.

[6] 周昆,谈英,柳占彪. 乳香没药对大鼠肝脏毒性的比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(6):221.

[7] 邓平香,徐敏. 补骨脂单味应用和复方应用对大鼠肝脏毒性的比较[J]. 广西中医药,2005,28(2):49.

[8] 柳占彪,崔元璐,胡利民. 用于骨关节炎造模的药物组合物及其制备方法与造模方法[P]. 中国专利:CN10258877A,2012-07-26.

[9] Jain A, Nanchahal J, Troeberg L, et al. Production of cytokines, vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 by tenosynovium demonstrates its potential for tendon destruction in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum,2001,44(8):1754.

[10] 王毅,刘长明. 基质金属蛋白酶与骨关节疾病关系的研究进展[J]. 中国骨伤,2003,16(3):190.

[11] McCarthy K, Maguire T, McGreal G, et al. High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 predict poor outcome in patients with breast cancer [J]. Int J Cancer,1999,84(1):44.

[责任编辑 聂淑琴]