

# 筋骨片对兔骨性关节炎影响的实验研究

郭建生, 欧莉\*, 周军, 郭璇  
(湖南中医学院药学院, 湖南长沙 410007)

**[摘要]** 目的: 观察筋骨片对骨性关节炎(OA)病变发生发展及其修复作用的影响。方法: 用石膏绷带制动膝关节的方法给兔造模, 给筋骨片药液灌胃治疗。连续给药 4 周, 制动时间满 6 周时, 将各组动物解除制动并停止给药。2 周后进行各项指标的测定。结果: 筋骨片对模型兔膝关节活动范围有明显的改善作用, 各剂量组与模型组比较均有显著性差异; 其中、高剂量的 Ca/P 比值也明显升高; 同时筋骨片各剂量组对模型兔膝关节滑膜厚度肿胀有抑制作用, 能较好缓解 OA 的炎症症状, 对制动后膝关节内滑膜及软骨的病理变化也有显著的改善作用。筋骨片中、高剂量组还能明显增强滑膜组织 SOD 的活性, 具有清除氧自由基的能力。结论: 筋骨片减轻关节软骨的退变, 明显抑制滑膜组织的炎症, 提高 SOD 活力使 OFR 代谢恢复平衡, 因而对 OA 具有一定的治疗效果。

**[关键词]** 筋骨片; 骨性关节炎; 超氧化物歧化酶

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)03-0048-04

## Experimental Study on Effect of Jingu Tablet on Osteoarthritis in Rabbit

GUO Jian-sheng<sup>1</sup>, OULi, ZHOU Jun, GUO Xuan

(1. College of Pharmacy of College of Traditional Chinese Medicine of Hunan, Changsha 410007, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the influence of Jin Gu Tablet (JGT) on the development and rehabilitation of osteoarthritis(OA). **Methods:** The knee joint was fixed with the piaster bandage to make the model of rabbit OA, JGT was orally given for 4 weeks. After brake was applied for 6 weeks, the brake was removed 2 weeks later, measurement of indexes was carried out. **Results:** JGT can obviously improve rabbit OA's scope of activity of knee joint, Compared with the model group, the middle, high dosage's Ca/P ratio obviously rises, every dosage group of JGT can inhibit swelling of thickness of slippery membrane of joint, alleviate the inflammation symptom of OA and obviously improve the pathology changing of slippery membrane and cartilage. The middle, high dosage can also obviously strengthen the activation of SOD of slippery membrane. **Conclusion:** JGT can lighten returning becoming of joint cartilage, obviously inhibit the slippery membrane's inflammation and improve SOD activity. The results showed that JGT has effects on OA.

**[Key words]** Jingu Tablet; Osteoarthritis; SOD

筋骨片主要由延胡索、三七、黄芪、白芍、牛膝等组成, 具有活血舒筋, 通脉止痛, 补肾健骨的作用。用于治疗骨性关节炎筋脉瘀滞, 症见关节疼痛、肿胀, 活动不利, 肢体麻木, 腰膝酸痛等。本文利用兔膝关节伸直位石膏绷带制动获得 OA 动物模型, 观

察筋骨片对 OA 兔膝关节活动度, 关节滑膜厚度、Ca/P 比值、SOD 活性以及关节滑膜病理变化等指标的影响, 为筋骨片治疗 OA 提供实验依据。

### 1 实验材料

**1.1 动物** 日本大耳白兔、体重 2.0~2.5kg, 雌雄各半, 由湖南中医学院实验动物中心提供, 合格证号: 湖南省医学实验动物管理委员会医动字 20-003 号。

**1.2 药品** 筋骨片的全方组成为: 延胡索 9g、三七

**[收稿日期]** 2005-04-12

**[通讯作者]** 欧莉, Tel: (0731) 5527314 或 013077311663; E-mail:

Oli999@sina.com 或 tulipOli@sohu.com

6g、黄芪5g、白芍5g、牛膝3g、熟地黄3g、全蝎1g、甘草1g。工艺和质量标准:在醇提工艺条件研究中,以延胡索乙素、人参皂甙Rg1浸出量及浸膏得率为评价指标。在水提工艺条件研究中,以芍药苷及浸膏得率为评价指标。采用薄层层析法对制剂中延胡索、三七、芍药等进行了鉴别,采用HPLC对制剂中延胡索乙素进行了含量测定,并进行了方法学考察,其平均回收率为99.91%,RSD=1.69%。筋骨片实验用流浸膏浓度为12.27g(生药)/g,由湖南中医药研究所提供,批号:20040616。骨刺宁胶囊(阳性对照药)由山西忻州市云中制药厂生产,批号:20040403;考马斯亮兰蛋白测定试剂盒,由南京建成生物工程研究所提供,批号:20040811。SOD测试试剂盒:由南京建成生物工程研究所提供,批号:20040729。

**1.3 仪器** 754型分光光度计,FA104型电子分析天平,SHH.WH-420型高效三用恒温水箱,TDZ4-WS低速自动平衡离心机。

## 2 实验方法

**2.1 对兔骨性关节炎模型的制备<sup>[1]</sup>** 选用健康日本大耳白兔36只,体重2.0~2.5kg,雌雄各半,按体重性别随机分成6组(即空白组、模型对照组、骨刺宁组、筋骨片低、中、高剂量组),每组6只,每笼1兔。除空白对照组外,其余各组每兔用石膏绷带制动左侧膝关节,制动两周后,给药组按10mL/kg体重分别灌胃给予筋骨片低、中、高剂量组药液(即1.59、3.18、6.36g(生药)/kg,分别相当于临床等效剂量的1/2、1、2倍)及骨刺宁药液(剂量为0.336g(生药)/kg,相当于临床等效剂量的2倍),空白对照组和模型组灌胃等容量的蒸馏水,每日给药一次,连续给药4周,制动时间满6周时,将各组动物解除制动并停止给药。2周后进行各项指标的测定。

**2.2 各组动物膝关节活动范围的测定<sup>[1]</sup>** 将兔膝关节伸展,再回缩膝关节,其伸展至回缩的角度用量角器测量,此角度为膝关节活动范围。

**2.3 各组动物心脏采血用全自动生化分析仪测血液中Ca<sup>2+</sup>、P及计算Ca/P比值。**

**2.4 关节滑膜厚度的测定** 处死全部动物,并切取完整的膝关节,立即打开膝关节腔,用螺旋测微器测定关节滑膜厚度。

**2.5 关节滑膜中蛋白含量及SOD活力的测定<sup>[2]</sup>** 用锐利刀片切取膝前正中部的滑膜组织200mg,用

冰冻的生理盐水冲洗血液,滤纸拭干,放入2mL冰生理盐水中。将滑膜组织块取出剪碎,倒入玻璃匀浆管中冰生理盐水下匀浆,制成10%的组织匀浆,以3000r·min<sup>-1</sup>离心10min,取上清液。按照考马斯亮兰蛋白测定试剂盒及SOD测定试剂盒的说明书依次进行检测。

**2.6 滑膜液炎性细胞** 取膝关节滑膜液涂片计数炎性细胞,光镜下观察记录。每张涂片随机观察5个视野(10×40倍),计算每一视野平均炎性细胞数。计数标准:一细胞数为0个/视野(HP),+细胞数<10个/HP,++10~20细胞个/HP,+++细胞数>20个/HP。

**2.7 病理组织学观察记录<sup>[3]</sup>** 膝关节标本用10%福尔马林(包含1%的醋酸与7%的EDTA),脱钙,石蜡包埋后切片(切片部位:胫骨平台取前外象限的1/2交界处,股骨髁标本取外象限中央点处;沿股骨内、外髁最底位的冠状面常规制片),苏木素和伊红染色观察形态学。膝关节分级标准为:0级示滑膜完整,细胞排列整齐,无充血水肿,无炎性细胞浸润;关节软骨完整,无剥离,无坏死;潮线清晰可见。I级示滑膜血管充血水肿,表层细胞增生;骨膜增生,骨质疏松;潮线间断。II级示滑膜细胞显著增生,滑膜内血管增生,肉芽组织形成;关节软骨糜烂;潮线消失。III级示滑膜内肉芽组织纤维化;关节软骨有灶性坏死。

**2.8 统计方法** 计量资料各组实验数据均以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间差异的比较用双侧t检验法分析。等级资料采用Ridit检验分析。

## 3 实验结果

**3.1 筋骨片对模型兔膝关节活动范围、关节滑膜厚度、Ca/P比值的影响** 筋骨片对模型兔膝关节活动范围有明显的改善作用,各剂量组与模型组比较均有显著性差异( $P < 0.01$ );其中,高剂量的Ca/P比值也明显升高( $P < 0.01$ );同时筋骨片各剂量组对模型兔膝关节滑膜厚度肿胀有显著抑制作用( $P < 0.01$ )。结果见表1。

**3.2 筋骨片对骨关节炎模型兔滑膜蛋白含量及SOD活力的影响** 与模型对照组比较,筋骨片中、高剂量组能明显增强滑膜组织SOD的活性( $P < 0.01$ ),具有清除氧自由基、增强机体抗氧化的能力。结果见表2。

**表 1 筋骨片对模型兔膝关节活动范围、关节滑膜厚度、Ca/P 比值的影响**( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量 (g/kg)	膝关节活动范围(度)	关节滑膜厚度(mm)	Ca/P 比值
空白组	0	171.3 ± 4.7 <sup>2)</sup>	1.01 ± 0.06 <sup>2)</sup>	2.24 ± 0.41 <sup>2)</sup>
模型组	0	129.8 ± 8.8	1.45 ± 0.08	1.32 ± 0.11
骨刺宁组	0.336	145.0 ± 8.4 <sup>2)</sup>	1.24 ± 0.09 <sup>2)</sup>	1.54 ± 0.13 <sup>2)</sup>
筋骨片低剂量组	1.59	141.7 ± 8.1 <sup>2)</sup>	1.27 ± 0.13 <sup>2)</sup>	1.37 ± 0.13
筋骨片中剂量组	3.18	149.5 ± 11.3 <sup>2)</sup>	1.26 ± 0.07 <sup>2)</sup>	1.59 ± 0.12 <sup>2)</sup>
筋骨片高剂量组	6.36	153.8 ± 10.5 <sup>2)</sup>	1.22 ± 0.07 <sup>2)</sup>	1.79 ± 0.07 <sup>2)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。下同。

**表 2 筋骨片对骨关节炎模型兔滑膜蛋白含量及 SOD 活力的影响**( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量 (g/kg)	蛋白含量 (g/L)	SOD 活力 (U/mgprot)
空白组	0	0.486 ± 0.045 <sup>2)</sup>	93.14 ± 8.75 <sup>2)</sup>
模型组	0	0.359 ± 0.047	75.88 ± 4.39
骨刺宁组	0.336	0.422 ± 0.044 <sup>2)</sup>	85.75 ± 7.43 <sup>1)</sup>
筋骨片低剂量组	1.59	0.400 ± 0.032 <sup>1)</sup>	82.81 ± 11.57
筋骨片中剂量组	3.18	0.430 ± 0.024 <sup>2)</sup>	83.70 ± 3.55 <sup>2)</sup>
筋骨片高剂量组	6.36	0.458 ± 0.032 <sup>2)</sup>	87.50 ± 7.63 <sup>2)</sup>

**3.3 筋骨片对关节炎模型兔膝关节滑膜液炎性细胞计数的影响** 模型组细胞计数以++、+++ 为主,给药组以+、++ 为主,与模型对照组比较,筋骨片能明显减少滑膜液炎性细胞数。经 Ridit 检验分析,空白组与模型组有明显差异,给药的四组疗效均显著,因为它们  $\bar{R}$  值都大于 0.5,其中筋骨片高剂量组的 95% 可信区间与模型组无重叠,有显著性差异。依 R 值由大到小排列,病变程度由重到轻依次为:模型组> 筋骨片低剂量组> 骨刺宁组> 筋骨片中剂量组> 筋骨片高剂量组> 空白组。结果见表 3。

**3.4 筋骨片对关节炎模型兔滑膜与关节病理改变分级的影响** 模型组病变以 II、III 级为主,给药组以 I、II 级为主。与模型对照组比较,筋骨片能够抑制滑膜内血管增生,肉芽组织形成,减轻关节软骨糜烂或坏死,对制动后膝关节内滑膜及软骨的病理变化有显著的改善作用。经 Ridit 检验分析,空白组与模型组有明显差异,虽然由于样本数偏小,给药各组的 95% 可信区间与模型组有重叠,差异无统计学意义。但给药的四组  $\bar{R}$  值都大于 0.5,依 R 值由大到小排列,病变程度由重到轻依次为:模型组> 筋骨片低剂量组> 骨刺宁组> 筋骨片中剂量组> 筋骨片高剂量组> 空白组。结果见表 4。

**表 3 筋骨片对关节炎模型兔膝关节滑膜液炎性细胞计数的影响**( $n=6$ )

组别	剂量 (g/kg)	炎性细胞计数分级(只)				R 值
		-	+	++	+++	
空白组	0	4	2	0	0	0.2315 <sup>1)</sup>
模型组	0	0	0	2	4	0.8287
骨刺宁组	0.336	1	3	1	1	0.5092
筋骨片低剂量组	1.59	0	3	1	2	0.6366
筋骨片中剂量组	3.18	2	2	1	1	0.4560
筋骨片高剂量组	6.36	2	4	0	0	0.3379 <sup>1)</sup>

**表 4 筋骨片对关节炎模型兔滑膜与关节病理改变分级的影响**( $n=6$ )

组别	剂量 (g/kg)	滑膜与关节病理改变分级(只)				R 值
		0	I	II	III	
空白组	0	6	0	0	0	0.0833 <sup>1)</sup>
模型组	0	0	1	3	2	0.6991
骨刺宁组	0.336	0	3	2	1	0.5324
筋骨片低剂量组	1.59	0	1	4	1	0.6528
筋骨片中剂量组	3.18	0	2	4	0	0.5463
筋骨片高剂量组	6.36	0	3	3	0	0.4862

## 4 讨论

本实验验证了利用关节制动方法可以获得 OA 的动物模型。其机理是<sup>[4]</sup>:限制了关节运动,跨越关节的肌肉、关节囊持续收缩,使关节面的压力增加,造成机械损伤;关节软骨的渗透压力丧失,滑液与软骨及滑膜之间的微循环平衡被打破,影响了软骨的营养;滑膜与软骨粘连,影响滑膜分泌粘蛋白、透明质酸等成分;降低软骨的润滑性,影响软骨摄取营养物质;缺乏正常关节运动的刺激,软骨细胞功能紊乱,合成基质减少;关节局部血流瘀滞,骨内压增高。

OA 的病理特点为关节软骨进行性变性,关节软骨损伤、破坏,关节边缘和软骨下骨反应性增生,骨赘形成。我们应用筋骨片对其进行治疗,结果显示该药对 OA 兔膝关节活动范围有明显的改善作用,抑制滑膜内血管增生、肉芽组织形成,减轻潮线间断或消失、关节软骨糜烂、坏死等病变,且能明显减少滑膜液炎性细胞数。研究发现 20%~30% OA 病人并存骨密度减少<sup>[5]</sup>,而筋骨片各剂量组可明显升高 Ca/P 比值,提示对 OA 兔关节具有保护作用。OA 的患病机体存在着氧自由基(OFR)代谢紊乱,机体清除 OFR 能力降低, OFR 生成增多。超氧化物歧化酶(SOD)是体内主要的 OFR 清除剂,筋骨片能明显增

强滑膜组织 SOD 的活性,清除过多的 OFR,从而可能阻止 OFR 对软骨细胞及其基质的损害,保护软骨,防止退变。

综上所述,筋骨片减轻关节软骨的退变,明显抑制滑膜组织的炎症,提高 SOD 活力使 OFR 代谢恢复平衡,因而对 OA 具有一定的治疗效果。

### [参考文献]

[1] 王耶,刘建宇,宋艳,等.丹参和透明质酸钠注射液对骨性关节炎治疗作用的实验研究[J].中国生化药物杂

志,1998,(19)5:248.

[2] 张劼,张闻生,邹季,等.风湿骨痛药酒药槌外治法治疗兔膝关节骨关节炎的实验研究[J].中医正骨,2001,(13)7:9.

[3] 华英汇,顾湘杰,陈世盖,等.威灵仙注射液对骨关节炎影响的实验研究[J].中国运动医学杂志,2003,(22)4:420.

[4] 聂林,张学义,陈国瑞,等.骨关节炎的模型[J].中华实验外科杂志,1990,7(2):96-97.

[5] 姜玉铃.中国风湿病学[M].北京:人民卫生出版社,2001.2311.