

# 补肾壮筋汤联合盐酸氨基葡萄糖对大鼠膝软骨缺损修复机制探讨

李宇<sup>1</sup>, 王伟<sup>2\*</sup>, 李爽<sup>1</sup>

(1. 辽宁中医药大学 研究生院, 沈阳 110033;

2. 锦州医科大学 骨外科学研究所, 辽宁 锦州 121000)

**[摘要]** **目的:** 研究中药补肾壮筋汤联合西药盐酸氨基葡萄糖作用于大鼠, 观察大鼠膝软骨缺损修复过程中中西医药物的联合应用是否能够更为有效的促进大鼠膝软骨缺损的修复, 为膝软骨损伤能够得到更好的治疗提供新的理论依据及方法。**方法:** 将 SPF 级大鼠(64 只)随机分为 5 组, sham 组, 模型组, 补肾壮筋汤组(7.5 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), 盐酸氨基葡萄糖组(7.5 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), 补肾壮筋汤联合盐酸氨基葡萄糖组[(7.5+7.5) g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>] 对大鼠进行药物灌胃, 通过大体观察、扫描电镜观察 4, 8, 12 周鼠膝软骨缺损修复情况; 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测各组 II 型胶原 (Collagen II), 聚集蛋白聚糖 (Aggrecan) mRNA 表达; 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 Collagen II 蛋白表达。**结果:** 4, 8, 12 周与模型组比较, 补肾壮筋汤联合盐酸氨基葡萄糖组软骨缺损处透明软骨填充, 钻孔处软骨修复平整、光滑, 与周边软骨组织融合为一体, 明显优于其他各组; Real-time PCR, Western blot 结果显示, 与模型组比较, 4, 8, 12 周各给药组 Collagen II, Aggrecan mRNA 和蛋白的表达显著增高 ( $P < 0.01$ ), 补肾壮筋汤联合盐酸氨基葡萄糖组与补肾壮筋汤组、盐酸氨基葡萄糖组比较增高最为显著 ( $P < 0.01$ ); 通过扫描电镜观察与模型组比较, 补肾壮筋汤联合盐酸氨基葡萄糖组可见软骨缺损处虽然可见缺损边界, 再生软骨组织表面平坦, 基本与周边正常软骨组织融合, 结构形态已趋于正常软骨组织, 明显优于其他各组。**结论:** 中西医药物联合应用能够明显促进大鼠膝软骨缺损的修复, 从 mRNA 及蛋白表达水平及微观结构分析了中西医结合治疗软骨损伤的可能机制。

**[关键词]** 补肾壮筋汤; 盐酸氨基葡萄糖; 关节软骨; II 型胶原; 聚集蛋白聚糖

**[中图分类号]** R2-0; R285.5; R289; R274 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)17-0043-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20191739

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190516.1355.002.html>

**[网络出版时间]** 2019-05-17 10:34

## Effect of Bushen Zhuangjintang Combined with Glucosamine Hydrochloride on Repairing Knee Cartilage Defect in Rats

LI Yu<sup>1</sup>, WANG Wei<sup>2\*</sup>, LI Shuang<sup>1</sup>

(1. Graduate School of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110033, China;

2. Institute of Oral Surgery, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of Bushen Zhuangjintang and glucosamine hydrochloride on the repairing of rat knee cartilage defect, the combined application of traditional Chinese and western medicine can promote the repairing of knee cartilage defect more effectively. To provide a new theoretical basis and method for the treatment of knee cartilage injury. **Method:** SPF rats (64 rats) were randomly divided into 5 groups, sham group, model group, Bushen Zhuangjintang group (7.5 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), and glucosamine hydrochloride group

**[收稿日期]** 20181211(016)

**[基金项目]** 辽宁省自然科学基金项目(201602322)

**[第一作者]** 李宇, 在读博士, 主治医师, 从事中西医结合与临床治疗骨性关节炎研究, E-mail: wwxdoctor@163.com

**[通信作者]** \*王伟, 博士, 二级教授, 博士生导师, 从事骨科创伤修复重建、再生与医学组织工程材料学应用转化研究, E-mail: wei\_wang\_ly@126.com

( $7.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), Bushen Zhuangjin Decoction combined with glucosamine hydrochloride group [ $(7.5 + 7.5) \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ] was administered to rats by drug gavage. The knee cartilage defects were repaired by gross observation and scanning electron microscopy at 4, 8 and 12 weeks. Real-time PCR was used to detect the expression of Collagen II and Aggrecan mRNA in each group. Western blot was used to detect the expression of Collagen II. **Result:** 4, 8, 12 weeks compared with group, Bushen Zhuangjintang combined with hyaluronic acid in the glucosamine hydrochloride group was filled with hyaline cartilage. The cartilage in the drilled area was smooth and smooth, and integrated with the surrounding cartilage tissue, which was superior to other groups. Real-time PCR and Western blot analysis showed that the expression of Aggrecan protein and mRNA were significantly increased at 4, 8 and 12 weeks compared with the blank group ( $P < 0.01$ ). Bushen Zhuangjintang combined with glucosamine hydrochloride group and Bushen Zhuangjintang group, the increase of glucosamine hydrochloride group was the most significant ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, Bushen Zhuangjintang combined with glucosamine hydrochloride showed that the defect was found in the cartilage defect, and the surface of the regenerated cartilage was flat. Normal cartilage tissue fusion, structural morphology has tended to normal cartilage tissue, significantly better than the other groups. **Conclusion:** The combined application of traditional Chinese and western medicine can obviously promote the repair of cartilage defects in the knee of rats. The possible mechanism of the treatment of cartilage injury by the combination of traditional Chinese and western medicine is analyzed from the level of gene protein expression and microstructure.

[ **Key words** ] Bushen Zhuangjintang; glucosamine hydrochloride; articular cartilage; Collagen II; Aggrecan

骨性关节炎(OA)又称骨质增生性关节炎、退行性关节炎等,是一种进行性慢性发展的骨关节疾病<sup>[1]</sup>,其中机械性损伤也较常见,以膝关节发病为多见,关节软骨受损是此疾病的重中之重,其本身缺乏血运、淋巴管及神经组织,而软骨细胞存在于致密的软骨基质中,导致自身的修复能力及对抗外力损伤的能力很弱,因此寻求一种能够更为有效的促进关节软骨及软骨下骨修复的方法,已成为研究的焦点。

目前,治疗软骨损伤的方法中以关节镜下微骨折骨髓刺激术、灌注、清理、自体或异体软骨移植、富血小板血浆(PRP)等技术来治疗,但修复后的软骨组织多以纤维软骨为主,其耐用性及生物力学性能上低于正常的透明软骨结构,而导致OA的发生,加重关节疼痛,有时伴有畸形,功能受限,此病已严重影响了中老年人的正常生活,给社会及家庭的带来严重的经济负担<sup>[2]</sup>。

随着传统中医学的深入研究与现代医学的结合,为OA软骨损伤的患者带来新的希望。中医学中认为,此疾属于“骨痹”“筋痹”等范畴,所谓骨痹主要分为风寒湿证、肝肾亏虚、湿热蕴结、痰湿血瘀、当风寒湿邪入体,阴阳及脏腑失衡,血行不畅而瘀阻,加之肝肾之气不足,而致筋骨不利。补肾壮筋汤首载于清·钱秀昌所著的《伤科补要》,此方诸药配

伍,切中病机,具有补益肝肾、强筋壮骨、活血化痰的功效。国内学者研究,证明肝肾同补则强骨健肢,避免关节软骨过度损伤<sup>[3-4]</sup>,通过现代药理学研究,发现补益肝肾、通络活血可增强软骨细胞的自我修复能力,减少自由基过量产生,抑制关节内滑膜组织炎性改变,延缓软骨细胞发生退变,应用于膝OA的治疗中效果显著<sup>[5]</sup>。但对细胞外基质的合成作用有待进一步的探索。

口服药物中,盐酸氨基葡萄糖(GS)已成为临床应用中0到II级膝OA的常规用药,其治疗效果在临床上已得到公认<sup>[6]</sup>。在软骨基质中分布较广泛,属于一种小分子化合物,不仅能够有效的促进软骨蛋白聚糖的生成,而且也能有效控制炎细胞和介质的扩散<sup>[7]</sup>,降低软骨细胞内毒性,但并不能从根本上解决OA中生化及炎症因子等发病因素,不能兼顾患者体质整体因素的影响,忽视了中医药辨病辨证的重要性,因此联合口服汤剂不仅能够消炎止痛除弊、祛风除湿、强筋壮骨等,而且使全身与局部有机的结合,从而达到标本兼治的目的,为OA的治疗提供新思路、新方法。

本课题组在前期工作中,通过补肾壮筋汤联合盐酸氨基葡萄糖,制备含药血清作用于大鼠膝软骨细胞研究表明,此方法可以明显促进软骨细胞的增殖作用,降低软骨细胞的凋亡率,促进软骨细胞中II

型胶原 (Collagen II) 蛋白的表达,证明了 2 种药物的联合应用具有良好的协同作用,本研究将中西医药物联合应用作用于大鼠关节软骨缺损模型,进一步探讨其修复关节软骨的机制,并与补肾壮筋汤组、盐酸氨基葡萄糖组的对软骨缺损修复方面进行充分的比较,为治疗关节软骨缺损,延缓和治疗骨性关节炎提供一种较为理想的治疗方式。

### 1 材料

**1.1 动物** 本研究选用未交配的 SPF 级 SD 大鼠 64 只,雌雄各半,分笼饲养,体质量(200 ± 20) g,购自锦州医科大学实验动物中心,合格证号 SCXK(辽)2014-0004,动物实验获得锦州医科大学动物伦理委员会批准。

**1.2 药物与制备** 补肾壮筋汤灌胃汤剂制备:熟地黄 12 g,当归 12 g,牛膝 10 g,山萸肉 12 g,茯苓 12 g,续断 12 g,杜仲 10 g,白芍 10 g,青皮 5 g,五加皮 10 g,以上饮片均采购于辽宁中医药大学附属医院,均由辽宁中医药大学基础医学院尚德阳副教授鉴定为正品。水煎浓缩,用蒸馏水调节药物浓度至 100%,制成每毫升含生药 1 g,按照大鼠每日用量为人体 1 kg 每日用药量的 6.3 倍,计算每只大鼠的给药剂量为 7.5 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>。盐酸氨基葡萄糖(北京葡立药业有限公司,批号 H20173212),根据动物与人体 1 kg 体质量剂量折算公式计算大鼠每日灌胃剂量为 0.375 mg,剂量为 7.5 g·kg<sup>-1</sup>。模型组灌胃剂制备,用等量 0.9% 氯化钠注射液(华仁药业股份有限公司,批号 H20023145)。

**1.3 试剂** 胎牛血清(SeraPro 公司,批号 1P1708);青链霉素,胰蛋白酶,DMEM 培养液(HyClone 公司,批号分别为 SV30010,SH30042.01,SH30023.01);2.5% 戊二醛电镜液(上海釜诚生物科技有限公司,批号 GX72-2.5);兔抗 II 型胶原蛋白多克隆抗体,山羊抗兔二抗,β-肌动蛋白(β-actin)内参(Abcam 公司,批号分别为 ab6586,ab150077,ab8226);实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)试剂盒(Takara 公司,批号 DRR036A);SDS-PAGE 凝胶试剂盒、蛋白提取试剂盒、定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为 P0012A,P0013,P0009)。引物序列运用 Primer 5 软件设计引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。见表 1。

**1.4 仪器** FV10C-3 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);DMi8-M 型荧光显微镜(德国 Leica 公司);M200 型紫外分光光度计(瑞士 Tecan 公司);Experion 型全自动电泳仪,C1000 型 PCR 仪(美国

表 1 PCR 引物序列

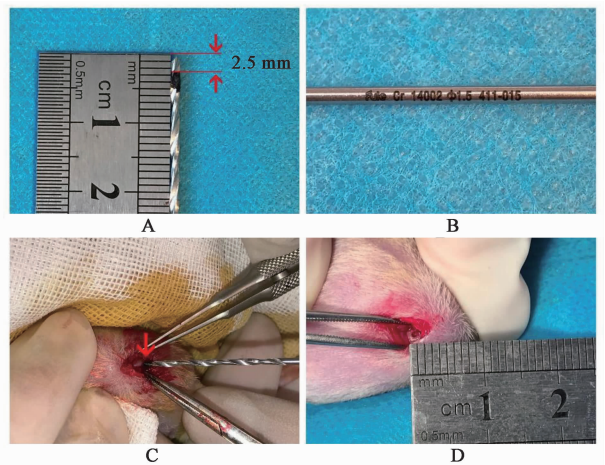
Table 1 Primer sequences of PCR

引物	序列	长度/bp
Collagen II	上游 5'-GCTCCCAGAACATCACCCTACCAC-3'	193
	下游 5'-ATGGTCTTGCCCCACTTACCG-3'	
Aggrecan	上游 5'-ATTGAAGTGACCCTACCACA-3'	139
	下游 5'-CGATTGCTCCAGAAGATTGTCC-3'	
β-actin	上游 5'-ACATCCGTAAGACCTCTATGCC-3'	223
	下游 5'-TACTCTGCTTGTGTATCCAC-3'	

Bio-Rad 公司);JSM-7800F 型超高分辨热场发射扫描电镜(日本电子公司);LyoQuest Plus-55 型冷冻干燥机(西班牙 Telstar 公司)。

### 2 方法

**2.1 造模** 将 16 只大鼠作为 sham 组对照,将 48 只成年 SD 大鼠按照 0.3 mL·100 g<sup>-1</sup> 剂量的 1% 戊巴比妥腹腔注射麻醉,取仰卧位,右膝关节皮后常规消毒,铺无菌巾单,逐层切开皮肤及筋膜,沿髌韧带内侧切开,屈曲膝关节暴露股骨内侧髁。用直径 1.5 mm 电钻钻击造成深度为 2.5 mm 圆形全层软骨缺损,参照 Dausse 等<sup>[8]</sup> 造模方法,造模成功后抗生素注射液冲洗关节腔,逐层缝合。见图 1。将造模成功的大鼠按随机数字表法分为 4 组,为模型组、补肾壮筋汤组、盐酸氨基葡萄糖组、补肾壮筋汤联合盐酸氨基葡萄糖组,分别于 4,8,12 周取材。



A. 标记电钻头深度;B. 电钻直径 1.5 mm;C. 术中造模操作过程;D. 为造模成功后测量软骨缺损

图 1 大鼠关节软骨缺损模型制备过程

Fig.1 Preparation process of rat articular cartilage defect model

**2.2 大鼠膝软骨缺损形态学观察** 每日给药前观察大鼠一般情况,精神状态、饮食、皮毛颜色、切口愈合、步态等情况;持续灌胃 15 d 后停药,无大鼠死亡。分别于 4,8,12 周随机选取大鼠,断颈处死大鼠

后游离膝关节,制备右膝关节标本,进行大体观察。

**2.3 Real-time PCR 检测 Collagen II, Aggrecan mRNA 的表达** 分别取各实验组适量组织,充分研磨匀浆后提取总 RNA,提取步骤参照 RNAiso™ Plus 说明书进行。将提取的总 RNA 定量后,使用 Real-time PCR 试剂盒进行 Real-time PCR 反应,步骤参照其说明书进行。PCR 反应体系 50  $\mu$ L,反应条件为 94  $^{\circ}$ C 2 min,94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,61  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 31 个循环。凝胶成像系统进行扫描分析。

**2.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 Collagen II 蛋白的表达** 取各组软骨组织在液氮中研磨至粉末状,加入裂解液提取总蛋白。将各组蛋白按照 BCA 法调整至相同浓度。每上样孔加入等量蛋白,10%的 SDS-PAGE 胶分离电泳。半干法将蛋白转至 PVDF 膜上,5%的脱脂奶粉室温封闭 1 h。加入一抗(1:1 000)4  $^{\circ}$ C 过夜,次日 TBST 洗膜,加入二抗(1:5 000)室温孵育 1 h。加入 ECL 发光试剂显像,扫描条带并采集图像分析(分析软件为 Image J)。

**2.5 扫描电镜观察大鼠膝关节形态学变化** 12 周时将各实验组大鼠以 1% 戊巴比妥腹腔注射麻醉,剥离大鼠膝关节周围组织,避免损伤关节软骨,用咬骨钳将股骨髁完整取下,生理盐水加压冲洗软骨表面,去除血液及组织液,用电镜液 4  $^{\circ}$ C 避光固定,乙醇梯度脱水后,醋酸异戊酯置换,CO<sub>2</sub> 临界点干燥;镀金后上机检测。

**2.6 统计学分析** 数据分析使用 SPSS 21.0 统计

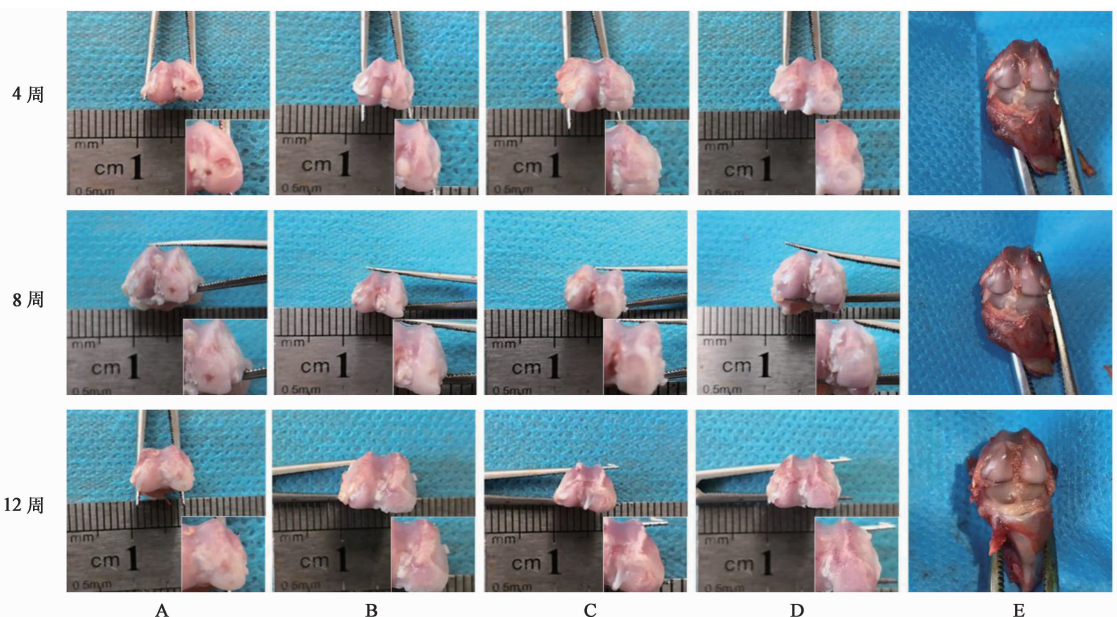
软件,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对大鼠股骨髁软骨缺损处修复组织的影响** 第 4 周时,模型组软骨缺损处清晰可见;补肾壮筋汤组股骨髁软骨缺损有减小,少许纤维组织填充;盐酸氨基葡萄糖组股骨髁软骨缺损部凹陷变浅;补肾壮筋汤联合盐酸氨基葡萄糖组可见股骨髁软骨缺损呈浅凹状,填充物仍为白色纤维组织,与周边软骨组织仍有明显区别;sham 组可见软骨表面光滑完整。

第 8 周时,模型组股骨髁软骨缺损减小,股骨髁内侧髁变宽,有骨赘生长;补肾壮筋汤组股骨髁软骨缺损处凹陷变浅,有白色纤维组织填充;盐酸氨基葡萄糖组股骨髁软骨缺损填充物为透明纤维组织,股骨髁略变宽,有少许骨赘生长;补肾壮筋汤联合盐酸氨基葡萄糖组股骨髁软骨缺损基本填平,填充物为类似透明软骨组织,但仍可见缺损印记;sham 组可见软骨表面光滑完整。

第 12 周时,模型组股骨髁明显呈退变性改变,凹陷较 A8 无明显变化,软骨表面凹凸不平;补肾壮筋汤组股骨髁软骨缺损处填平,股骨髁周边有骨赘生长,盐酸氨基葡萄糖组股骨髁软骨缺损仍可见少许凹陷,填充物为似软骨组织,缺损表面不整;补肾壮筋汤联合盐酸氨基葡萄糖组股骨髁软骨缺损填平,关节软骨修复平整、光滑,与周边软骨组织融合为一体;sham 组可见软骨表面光滑完整。见图 2。



A. 模型组;B. 补肾壮筋汤组;C. 盐酸氨基葡萄糖组;D. 补肾壮筋汤联合盐酸氨基葡萄糖组;E. sham 组

图 2 大鼠软骨缺损修复情况观察

Fig. 2 Gross observation of rat cartilage defect repair

**3.2 对大鼠 Collagen II, Aggrecan mRNA 表达的影响** 第 4 周时,与模型组比较,补肾壮筋汤联合盐酸氨基葡萄糖组显著增高 ( $P < 0.01$ );补肾壮筋汤联合盐酸氨基葡萄糖组与其他各组比较显著增高 ( $P < 0.01$ )。第 8 周时,与模型组比较,显著增高 ( $P < 0.01$ );补肾壮筋汤组与盐酸氨基葡萄糖组比

较无差异;补肾壮筋汤联合盐酸氨基葡萄糖组与其他各组比较显著增高 ( $P < 0.01$ )。第 12 周时,与模型组比较显著增高 ( $P < 0.01$ );补肾壮筋汤组与盐酸氨基葡萄糖组比较无差异;补肾壮筋汤联合盐酸氨基葡萄糖组与其他各组比较显著增高 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

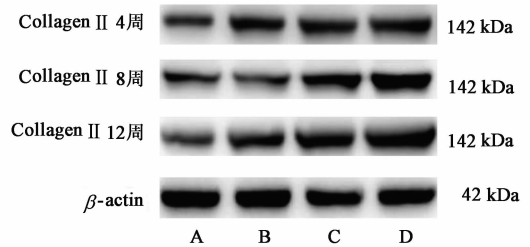
表 2 补肾壮筋汤对大鼠 Collagen II, Aggrecan mRNA 表达增长率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effect of Bushen Zhuangjintang on mRNA growth rate on rat Collagen II and Aggrecan ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	Collagen II			Aggrecan		
		4 周	8 周	12 周	4 周	8 周	12 周
空白	-	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.28	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.05	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.05
补肾壮筋汤	7.5	1.47 ± 0.05	2.01 ± 0.10	2.97 ± 0.32	1.49 ± 0.07	2.03 ± 0.14	3.02 ± 0.40
盐酸氨基葡萄糖	7.5	1.36 ± 0.11	1.94 ± 0.09	2.46 ± 0.08	1.26 ± 0.06	1.94 ± 0.10	2.65 ± 0.20
补肾壮筋汤联合盐酸氨基葡萄糖	7.5 ± 7.5	1.77 ± 0.91 <sup>1,2,3)</sup>	3.36 ± 0.22 <sup>1,2,3)</sup>	4.08 ± 0.28 <sup>1,2,3)</sup>	1.75 ± 0.25 <sup>1,2,3)</sup>	3.36 ± 0.07 <sup>1,2,3)</sup>	4.10 ± 0.07 <sup>1,2,3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ,与补肾壮筋汤组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ,与盐酸氨基葡萄糖组比较<sup>3)</sup> $P < 0.01$ 。

**3.3 对大鼠 Collagen II 蛋白表达的影响** 第 4 周时,补肾壮筋汤组与盐酸氨基葡萄糖组比较无差异;补肾壮筋汤联合盐酸氨基葡萄糖组与其他各组比较显著增高 ( $P < 0.01$ )。第 8 周时,补肾壮筋汤组与盐酸氨基葡萄糖组比较无差异;补肾壮筋汤联合盐酸氨基葡萄糖组与其他各组比较显著增加 ( $P < 0.01$ )。第 12 周时,盐酸氨基葡萄糖组优于补肾壮筋汤组 ( $P < 0.01$ );补肾壮筋汤联合盐酸氨基葡萄糖组与其他各组比较效果最为显著 ( $P < 0.01$ )。见图 3,表 3。



A. 模型组;B. 补肾壮筋汤组;C. 盐酸氨基葡萄糖组;D. 补肾壮筋汤联合盐酸氨基葡萄糖组(图 4 同)

图 3 大鼠 Collagen II 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of protein expression of Collogen II of rats

表 3 补肾壮筋汤对大鼠 Collagen II 蛋白表达增长率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Effect of Bushen Zhuangjintang on expression Collagen II protein expression growth rate of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

模型	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Collagen II /β-actin		
		4 周	8 周	12 周
空白	-	1.00	1.00	1.00
补肾壮筋汤	7.5	11.41 ± 0.01	1.47 ± 0.04	1.58 ± 0.03
盐酸氨基葡萄糖	7.5	11.42 ± 0.02	1.51 ± 0.03	1.83 ± 0.04
补肾壮筋汤联合盐酸氨基葡萄糖	7.5 ± 7.5	11.58 ± 0.04 <sup>1,2)</sup>	1.63 ± 0.02 <sup>1)</sup>	2.29 ± 0.07 <sup>1,2)</sup>

注:与补肾壮筋汤组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ,与盐酸氨基葡萄糖组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

**3.4 对大鼠软骨缺损处修复的微观结构的影响** 第 12 周时,大鼠各组软骨缺损处在扫描电镜下观察修复情况,模型组可见软骨缺损表面隆起,凹凸不平,再生软骨组织呈不规则生长,补肾壮筋汤组可见软骨缺损表面有凹陷,再生的软骨组织结构紊乱,软骨缺损边界仍较清晰,有胶原纤维组织生长;盐酸氨基葡萄糖组可见软骨缺损表面较平坦,较正常软骨组织有明显凹陷,垄沟起伏,缺损边界清晰可见;补

肾壮筋汤联合盐酸氨基葡萄糖组可见软骨缺损处虽然可见缺损边界,但再生软骨组织表面平坦,基本与周边正常软骨组织融合,结构形态已趋于正常软骨组织。见图 4。

#### 4 讨论

膝关节软骨缺损的治疗难题,始终困扰着临床治疗<sup>[9]</sup>。关节软骨的自我修复能力极其有限,无论是 OA、创伤性关节炎,其病变的基础均为关节软骨

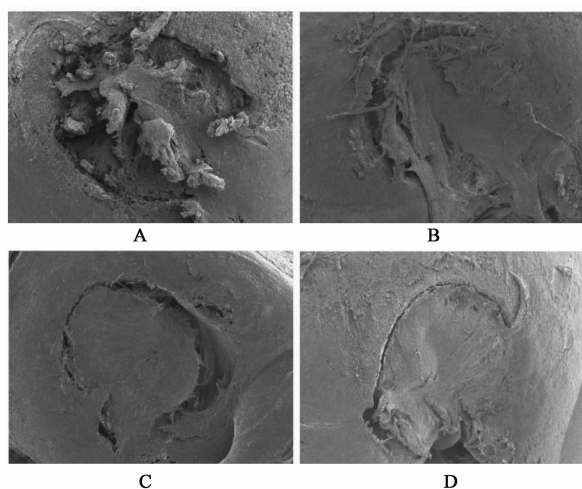


图 4 大鼠关节软骨扫描电镜观察(电镜, ×50)

Fig. 4 Scanning electron microscopic observation of rat articular cartilage(TEM, ×50)

的损伤,因此提高关节软骨及软骨下骨修复始终为医学领域研究的难点<sup>[10]</sup>。本课题采用中西医药物的联合应用来干预大鼠膝关节软骨缺损的治疗,通过观察其修复效果,探讨关节软骨修复过程中的部分机制,为中西医结合的方式治疗膝软骨缺损提供更为有效的治疗方式及新的治疗途径。

补肾壮筋汤传承于《医宗金鉴·正骨心法要旨》中的精辟,清·钱秀昌结合自己的实践经验于1808年所著《伤科补要》记载<sup>[11]</sup>,此方中各味药相辅相成,熟地黄、山茱萸为君药具有填精益髓、肝肾同补的作用;续断、杜仲、五加皮为臣药,增进补益肝肾、强筋壮骨、祛风除湿的作用;当归补血活血,白芍敛阴和营、柔肝止痛,茯苓健脾和胃、化痰除湿,青皮行气疏肝,同为佐药;牛膝补益肝肾、强筋壮骨、活血通经,引火(血)下行,使方中诸药直达病证为使药<sup>[12]</sup>。诸药合用可以达到补益肝肾、强筋壮骨的功效。而膝关节软骨损伤在祖国医学古籍中并无明确记载,但从此疾的病因及症状等应归属于痹证、膝痹、骨痹、痿证等范畴<sup>[13]</sup>。肝主筋,肾主骨,肝肾同源,筋约束骨骼构成关节而产生运动,筋骨是由肝肾的精气和气血来充养的。当肝血不足、肾元亏虚时骨骼也会发生异常的改变,气血不足,导致经络瘀滞,不通则痛,而补肾壮筋汤不仅可以加速局部的血液循环,其强筋壮骨的功效可以使关节退变或损伤的软骨得到改善及修复,从而达到改善和防治 OA 病情发展的目的<sup>[14]</sup>。

既往研究中,研究者认为补肾壮筋汤能够有效抑制 OA 的软骨发生退行性改变,通过抑制软骨基

质中的纤维变性,降低炎症细胞和蛋白多糖的含量,增加透明质酸的含量;同时也是天然产物化合物的特殊子集,因此能够提高细胞抗氧化酶的活动,避免自由基对软骨细胞的病理性损害,从而促进软骨细胞的自我增殖,促进关节软骨的修复<sup>[15]</sup>。

盐酸氨基葡萄糖是一种小分子氨基多糖,是软骨基质糖胺聚糖的主要构成成分,在已受损软骨的修复过程中有着极其重要的作用<sup>[16]</sup>,当关节内软骨因退变或损伤出现裂缝时,可引起肉芽组织增生,软骨基质水解破坏,蛋白多糖的含量也因此而减少<sup>[17]</sup>。氨基葡萄糖不仅能够促进关节软骨基质中胶原的合成,还具有抑制弹性蛋白酶、溶酶体酶等水解酶的释放,促进成纤维细胞、单核巨噬细胞的移动,抑制炎症因子或肉芽组织增生范围继续扩大。盐酸氨基葡萄糖对蛋白多糖的合成有促进作用,蛋白多糖是细胞膜和细胞间质重要的构成成份,能够稳定二者之间的连接<sup>[18]</sup>,给软骨细胞的生长提供稳定环境,关节软骨的代谢活动增强,关节软骨结构得到改善,对关节软骨的修复和保护起着重要的作用<sup>[19]</sup>。

关节软骨是由含量为 99% 的软骨基质及 1% 的软骨细胞组成,为透明软骨结构,而软骨基质主要是由 Collagen II 和蛋白聚糖组成,约占细胞外基质含量的 90% 以上<sup>[20]</sup>,Collagen II 呈网状向不同方向以螺旋形式存在,为关节软骨提供骨性支撑和维持弹性作用,软骨细胞存在于基质中,二者之间相互作用,相互依存;基质为软骨细胞的生存提供生长环境及传递信号,蛋白聚糖富含大量亲水性的支链结构,吸收充足的水分及自由金属离子,从而起到润滑和抗压的作用,并覆盖于 Collagen II 的表面,起到很好的保护作用。当关节软骨损伤后,软骨下骨、软骨细胞、软骨基质的结构平衡丧失<sup>[21]</sup>。本课题应用中西医结合的方式,从软骨基质中的主要成分 Collagen II, Aggrecan mRNA 及蛋白表达水平着手,在结果中可以得出中西药联合应用软骨组织中 Collagen II, Aggrecan mRNA 表达明显优于补肾壮筋汤组、盐酸氨基葡萄糖组, Collagen II 蛋白的表达明显优于其他各组,从 mRNA 及蛋白表达水平探讨中西医结合方式治疗软骨损伤的可能机制,为治疗软骨缺损提供一个的途径。

将传统经方补肾壮筋汤与现代医学药物盐酸氨基葡萄糖联合,制备大鼠膝关节软骨缺损的模型,在组织修复形态学观察中可见,中西药结合组修复软骨缺损明显要优于其他各组,修复的关节表面较光滑,结构清晰,基本与正常关节软骨融合,说明中西结

合方式具有很好的协同作用,其作用机制可能与调节细胞外基质合成,降解导致细胞代谢失衡的相关因素,减轻炎症因子对软骨细胞的影响,为中西医药物联合治疗 OA 提供有价值的综合化治疗方案。

近些年来,研究者对中医药药理作用上有了更深层次的认知和了解,对待患者,辨证施治,中医治病重在辨证与辨病相结合,更加适用于患者本身<sup>[22]</sup>。补肾壮筋汤作为骨伤疾病中的经典方剂在治疗肾虚腰痛、腰椎间盘突出症、退行性骨关节炎、骨质疏松等疾病中已取得了良好的效果。联合现代医学药物盐酸氨基葡萄糖的治疗机制,必然能够进一步提高疗效,为广大患者服务,提高患者生活、工作质量,减轻患者的疼痛,为延缓及治疗 OA 提供更为有效、安全的一种治疗方式。

#### [参考文献]

[1] 贾峻,荣兵,李建,等. 独活寄生汤含药血清对膝骨性关节炎大鼠软骨细胞代谢, BMP-7 及 SIRT1 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(17): 159-165.

[2] 韩广敬,衣玉胜,周凯,等. 金乌骨通胶囊对肾虚血瘀型退行性膝骨性关节炎的治疗及对骨代谢指标的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(20): 168-172.

[3] 刘浩. 补肾壮筋汤治疗膝关节炎骨性关节炎疗效观察[J]. 实用中医药杂志, 2013, 29(7): 543.

[4] 张炳冉. 补肾壮筋汤对膝骨关节炎患者血清肿瘤坏死因子- $\alpha$  与白细胞介素-6 水平的影响[J]. 中草药, 2006, 37(9): 1389-1390.

[5] Sterzi S, Giordani L, Morrone M, et al. The efficacy and safety of a combination of glucosamine hydrochloride, chondroitin sulfate and bio-curcumin with exercise in the treatment of knee osteoarthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study[J]. Eur J Phys Rehabil Med, 2016, 52(3): 321-330.

[6] 周岚,李燕. 氨基葡萄糖对骨关节影响的临床研究进展[J]. 现代预防医学, 2014, 41(21): 4018-4019, 4022.

[7] 冯文哲,陆伟,许鉴,等. 组织工程化软骨细胞移植修复膝关节大面积全层软骨缺损[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(14): 2152-2156.

[8] Dausse Y, Grosse L, Miralles G, et al. Cartilage repair using new polysaccharidic biomaterials: macroscopic, histological and biochemical approaches in a rat model of cartilage defect[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2003, 11(1): 16-28.

[9] 应俊,张元斌,劳杨骏,等. 补肾活血方联合骨髓间充质干细胞-藻酸钙复合体修复关节软骨缺损研究[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(8): 3778-3782.

[10] 袁琴,阚卫兵,宋鹏飞,等. 中医药治疗骨关节炎基础研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(1): 101-104.

[11] 林木南,张亮,武文,等. 补肾壮筋汤治疗肝肾亏虚型膝骨关节炎的临床研究[J]. 风湿病与关节炎, 2017, 6(2): 15-17, 52.

[12] 刘文成,黄相杰. 中医药治疗膝骨性关节炎研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2016, 24(12): 79-82.

[13] 彭时雨,谢雁鸣,黎元元,等. 基于文献计量学方法对中医药治疗膝关节炎骨性关节炎主要流派的研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2016, 24(9): 36-41.

[14] 周国顺,李雄峰,管国华,等. 补肾壮筋汤含药血清对力学刺激诱导软骨细胞凋亡的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(6): 789-792.

[15] 刘洪波,靖春颖,韩平. 驳骨活血方联合盐酸氨基葡萄糖片治疗膝骨性关节炎临床 48 例临床分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(15): 164-167.

[16] Hochberg M C, Martel-Pelletier J, Monfort J, et al. Combined chondroitin sulfate and glucosamine for painful knee osteoarthritis: a multicentre, randomised, double-blind, non-inferiority trial versus celecoxib[J]. Ann Rheum Dis, 2016, 75(1): 37-44.

[17] 郝秀华,韩丛成,杨锦竹,等. 异硫氰酸苯酯柱前衍生化 HPLC 测定盐酸氨基葡萄糖的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4): 116-119.

[18] 韩国栋,蒋再轶,谭洁,等. 仙灵骨葆胶囊联合盐酸氨基葡萄糖片治疗膝骨性关节炎[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 263-265.

[19] Jeong D H, Ullah H M A, Goo M J, et al. Effects of oral glucosamine hydrochloride and mucopolysaccharide protein in a rabbit model of osteoarthritis[J]. Int J Rheum Dis, 2018, 21(3): 620-628.

[20] Brody L T. Knee osteoarthritis: clinical connections to articular cartilage structure and function[J]. Phys Ther Sport, 2015, 16(4): 301-316.

[21] 梁仟,朱飞燕,黄江鸿,等. II 型胶原水凝胶在软骨损伤修复中的研究进展[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2017, 13(4): 228-231.

[22] 赵赫,俞兴,唐向胜,等. 现代骨科临床应用补肾壮筋汤的 Meta 分析[J]. 世界中医药, 2017, 12(10): 2504-2508.

[责任编辑 孙丛丛]