

壮骨 1 号方对豚鼠骨性关节炎和大鼠骨质疏松的改善研究

张 玥¹, 代 志², 马志会¹, 王 勇², 周 昆^{1*}

1. 天津中医药大学 中医药研究院 方剂学教育部重点实验室 天津市中药药理重点实验室, 天津 300193

2. 华润三九医药股份有限公司 研发中心, 广东 深圳 518110

摘 要: **目的** 观察壮骨 1 号方对骨性关节炎和骨质疏松症的治疗作用。**方法** 采用 Harley 豚鼠自发性骨关节炎和大鼠去卵巢造骨质疏松两种动物模型, 观察、测定相应的实验指标。**结果** 壮骨 1 号方能有效地延缓膝关节软骨组织的退变, 并抑制骨密度降低。**结论** 壮骨 1 号方具有防治骨性关节炎的作用, 对豚鼠骨性关节炎和大鼠骨质疏松具有改善作用。

关键词: 壮骨 1 号方; 骨性关节炎; 骨质疏松

中图分类号: R285.5; R286.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2013)05-0681-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.05.006

Improvement of Zhuanggu No.1 Prescription on Harley guinea pigs spontaneous osteoarthritis and rat osteoporosis

ZHANG Yue¹, DAI Zhi², MA Zhi-hui¹, WANG Yong², ZHOU Kun¹

1. Tianjin Key Laboratory of Chinese Medicine Pharmacology, Key Laboratory of Pharmacology of Traditional Chinese Medical Formulae, Ministry of Education, Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Research Center of Sanjiu Medical & Pharmaceutical Co. Ltd., Shenzhen 518110, China

Abstract: **Objective** To evaluate the therapeutic effects of Zhuanggu No.1 Prescription on osteoarthritis (OA) and osteoporosis (OP). **Methods** Spontaneous OA in Harley guinea pigs and ablating bilateral ovaries OP in rat were used to investigate the effect of Zhuanggu No.1 Prescription on the experimental indicators. **Results** Zhuanggu No.1 Prescription could inhibit or delay degeneration of knee cartilage and inhibit the decrease of tibial trabecular bone mineral density significantly in rats. **Conclusion** Zhuanggu No.1 Prescription could prevent OA and achieve obvious role in the treatment of OA and OP.

Keywords: Zhuanggu No.1 Prescription; osteoarthritis; osteoporosis

骨性关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种常见的慢性关节疾病, 其主要病变是关节软骨的退行性病变和继发性骨质增生^[1]。壮骨 1 号方由补骨脂、骨碎补、续断、淫羊藿、独活、木香、鸡血藤和狗脊等药材组成, 主要用于肝肾不足、气滞血瘀、脉络痹阻所致的骨性关节炎和腰肌劳损。本实验采用 Harley 豚鼠自发性骨关节炎和大鼠去势骨质疏松模型, 观察壮骨 1 号方对骨性关节炎和骨质疏松症的改善作用。

1 材料

1.1 动物

Harley 豚鼠, SPF 级, 雌性, 2 月龄, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 合格证号: SCXK (京) 2009-0004; SD 大鼠, SPF 级, 雌性, 2 月龄, 购自中国医学科学院实验动物研究所, 合格证号: SCXK (京) 2009-0007。饲养于天津中医药大学实验动物中心, 保持动物房安静, 通风, 干燥, 室温 18~25℃, 湿度 40%~70%, 自由摄食、饮水。

1.2 药品

壮骨 1 号方由华润三九医药股份有限公司提供, 1 g 壮骨 1 号方相当于生药 1.13 g, 批号为 1006103; 壮骨关节丸由华润三九医药股份有限公司

收稿日期: 2013-07-17

基金项目: 国家重大新药创制科技重大专项 (2011ZX09201-201-21)

作者简介: 张 玥 (1984—), 女, 硕士, 从事中药药理毒理研究。E-mail: zhyjoy1111@126.com

*通信作者 周 昆, 男, 助理研究员, 从事中药的毒性发现、减毒技术研究和新药研发。Tel: (022) 59596163 E-mail: zhouk@tjutc.edu.cn

提供, 水丸, 1 g/丸, 包装规格 500 g, 批号为 1011231S; 实验给药剂量参考壮骨关节丸的临床人用剂量 12 g/d, 实验中的各给药剂量都按照不同种属动物折合成相应的给药剂量。

1.3 试剂

白细胞介素-1 (IL-1, 96T, 批号 E11031707)、白细胞介素-6 (IL-6, 96T, 批号 E11031706)、肿瘤坏死因子 (TNF- α , 96T, 批号 E11031705)、基质金属蛋白酶-1 (MMP-1, 96T, 批号 E101230010)、基质金属蛋白酶-1 抑制剂 (TIMP-1, 96T, 批号 E10123009) 均为 Abnova 公司产品; 碱性磷酸酶 (AKP, 批号 20110309), 南京建成生物工程研究所产品; 苯扎溴铵溶液 (批号 100108), 江西京东药业有限公司产品; 注射用青霉素钠 (批号 08109106), 中诺药业 (石家庄) 有限公司产品。

1.4 仪器

Flex Station 3 多功能微孔分析仪, CisBio 公司产品; JJ3000 电子天平、JJ2000 精密电子天平, 常熟双杰测试仪器厂产品; 外周骨定量计算机断层扫描仪、pQCT 骨密度测试仪, 德国 Stratec 公司产品; MEK—6318K 型血细胞分析仪, 日本光电工业株式会社产品。

2 方法

2.1 对 Harley 豚鼠自发性 OA 的作用

取 Harley 豚鼠, 雌性, 随机分为模型组、壮骨关节丸组 (0.96 g/kg) 和壮骨 1 号方高、中、低剂量 (1.92、0.96、0.48 g/kg) 组, 每组 10 只。待 5 月龄豚鼠自发骨性关节炎模型形成后^[2], 开始给药, 模型组给予相应体积蒸馏水, 连续给药 4 周, 1 次/d。每天观察动物一般状态, 末次给药后腹主动脉取血, 检测血清中 MMP-1、TIMP-1 的水平。动物处死后切取胫骨到股骨之间的关节软骨进行组织病理学检查。

2.2 对去势大鼠骨质疏松症的作用

取 6 月龄大鼠, 雌性, 分为对照组、假手术组、模型组、壮骨关节丸组 (1.10 g/kg) 和壮骨 1 号方高、中、低剂量 (2.20、1.10、0.55 g/kg) 组, 共 7 组, 每组 10 只。给药组和模型组大鼠进行卵巢切除手术, 假手术组切取卵巢附近部分脂肪, 对照组不做任何处理。术后 12 周后开始给药, 1 次/d, 对照组给予相应体积蒸馏水, 连续给药 4 周。每天观察动物一般状态, 末次给药后腹主动脉取血, 检测血清中 AKP、IL-1、IL-6、TNF- α 的水平。处死动物后立即取下左侧胫骨并及时分离、去除骨周围组织, 固定于 70%乙醇中, 测定距骨骺线 3.0 mm 处的骨密度。

2.3 统计学处理

应用 SPSS 12.0 统计学软件处理数据, 实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 对 Harley 豚鼠自发性 OA 的作用

形成自发性 OA 的豚鼠, 连续给药 4 周后, MMP-1、TIMP-1 值均高于模型组, 但差异无显著性, 见表 1。

组织病理学检查显示, 模型组动物膝关节发生明显的软骨组织退行性病变, 如软骨 4 层结构不明显, 表层细胞脱落, 少量炎细胞浸润及软骨细胞坏死等现象; 各给药组与模型组比较, 膝关节软骨退变均被抑制或延缓, 见图 1。

3.2 对去势大鼠骨质疏松症的作用

大鼠切取卵巢造模 3 月后, 模型组动物体质量比假手术组低 30~40 g, 且差异有显著性 ($P < 0.05$), 造模后子宫明显萎缩, 提示卵巢摘除后动物激素水平降低, 骨质疏松模型复制成功^[3]。对照组与假手术组相比, 各项检测结果差异均无显著性, 提示手术本身不是引起统计学差别产生的原因。给

表 1 壮骨 1 号方对豚鼠血清 MMP-1、TIMP-1 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table1 Effect of Zhuanggu No.1 Prescription on MMP-1 and TIMP-1 levels in Harley guinea pigs serum ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组 别	剂量 /(g·kg ⁻¹)	MMP-1 /(ng·mL ⁻¹)	TIMP-1/(ng·mL ⁻¹)
模型	—	13.5±9.0	4.9±2.1
壮骨关节丸	0.96	15.0±10.0	4.5±2.0
壮骨 1 号方	1.92	15.0±7.0	5.7±2.0
	0.96	18.0±8.1	6.1±2.0
	0.48	18.4±4.6	5.9±2.6

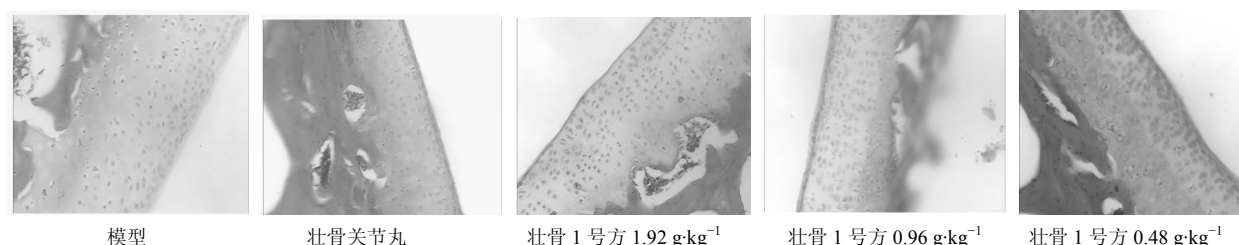


图 1 膝关节软骨组织 HE 染色

Fig. 1 Histopathology of knee joint cartilage by HE staining

药 4 周后, 模型组 IL-1 值显著高于假手术组 ($P < 0.05$), AKP 值也显著高于假手术组 ($P < 0.001$), IL-6 值显著低于假手术组 ($P < 0.01$), 见表 2。给药组与模型组相比, 血清生化各项指标有一定的变化趋势, 其中壮骨 1 号方高、中剂量组可使血清 IL-1 水平降低, 且差异具有显著性 ($P < 0.05$)。

骨密度检测显示, 模型组造模 3 个月后, 总骨密度有所降低, 小梁骨密度降低了约 1/2, 与假手术组比较差异有显著性 ($P < 0.001$)。给药 4 周后, 各给药组的总骨密度和小梁骨密度与模型组相比均有增高的趋势, 其中壮骨 1 号方高、中剂量组对小梁骨密度降低具有明显的抑制作用 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 2 壮骨 1 号方对大鼠血清 IL-1、IL-6、TNF- α 、AKP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 Effect of Zhuanggu No.1 Prescription on IL-1, IL-6, TNF- α , and AKP levels in rat serum ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组 别	剂量 /(g·kg ⁻¹)	IL-1 /(pg·mL ⁻¹)	IL-6 /(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	AKP /(U·L ⁻¹)
对照	—	20 $\pm$ 6	118 $\pm$ 48	30 $\pm$ 3	117 $\pm$ 55
假手术	—	18 $\pm$ 8	116 $\pm$ 36	30 $\pm$ 5	86 $\pm$ 31
模型	—	26 $\pm$ 8*	73 $\pm$ 18**	29 $\pm$ 2	143 $\pm$ 25***
壮骨关节丸	1.10	20 $\pm$ 4 [▲]	74 $\pm$ 33*	32 $\pm$ 6	118 $\pm$ 20* [▲]
壮骨 1 号方	2.20	18 $\pm$ 8 [▲]	70 $\pm$ 30**	33 $\pm$ 7	138 $\pm$ 32**
	1.10	25 $\pm$ 6*	80 $\pm$ 30*	33 $\pm$ 9	149 $\pm$ 73*
	0.55	30 $\pm$ 12*	91 $\pm$ 42	28 $\pm$ 2	132 $\pm$ 58*

与假手术组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: [▲] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs Sham group; [▲] $P < 0.05$ vs model group

表 3 壮骨 1 号方对大鼠胫骨骨密度的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 3 Effect of Zhuanggu No.1 Prescription on bone mineral density of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组 别	剂量 /(g·kg ⁻¹)	骨密度 /(mg·cm ⁻³)		
		总骨密度	小梁	皮质
对照	—	729 $\pm$ 37	404 $\pm$ 45	1 133 $\pm$ 21
假手术	—	730 $\pm$ 40	416 $\pm$ 34	1 117 $\pm$ 20
模型	—	600 $\pm$ 44***	198 $\pm$ 34***	1 135 $\pm$ 32
壮骨关节丸	1.10	613 $\pm$ 34***	232 $\pm$ 38*** [▲]	1 143 $\pm$ 26*
壮骨 1 号方	2.20	614 $\pm$ 38***	241 $\pm$ 27*** ^{▲▲}	1 127 $\pm$ 22*
	1.10	605 $\pm$ 36***	233 $\pm$ 29*** [▲]	1 131 $\pm$ 20**
	0.55	609 $\pm$ 29***	212 $\pm$ 33***	1 139 $\pm$ 27**

与假手术组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: [▲] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs Sham group; [▲] $P < 0.05$ vs model group

4 讨论

对于 OA 的治疗,目前临床上主要采用非甾体抗炎药、软骨保护剂、激素、局部关节腔内注射药物及外科手术等多种方式,这些治疗虽有一定的效果,但副作用大、价格昂贵,且远期疗效不明显。近年来,中医药治疗 OA 的研究取得了一定的进展^[4],本课题组经研究验证,选用补肾固阳、壮筋活血中药补骨脂、骨碎补、续断、淫羊藿、独活、木香、鸡血藤和狗脊等药材制成壮骨 1 号方^[5-8],研究其对 OA 的治疗作用。

目前,OA 的发病原因尚不清楚,而软骨细胞依赖生存的细胞外基质降解异常是导致软骨退变的重要原因之一。研究表明基质金属蛋白酶(MMPs)在关节软骨破坏中起重要作用,其中 MMP1、MMP3 和 MMP13 是关节软骨基质降解中重要的酶,TIMP-1 是 MMP3 的特异性抑制剂,二者之间水平失衡是骨性关节炎软骨降解的关键^[9]。同时,在部分原发性骨关节炎患者滑膜组织及滑液中能检测出种细胞因子,如 IL-1、IL-6、TNF- α 、干扰素 α 和生长因子等^[10-11],这些因子在骨性关节炎的发病过程中也起到了一定作用。本实验选用了 MMP-1、TIMP-1、IL-1、IL-6、TNF- α 等血清生化指标考察软骨病变的严重程度。结果表明给药组与模型组相比,除壮骨 1 号方高、中剂量组中大鼠血清 IL-1 水平显著降低($P<0.05$)之外,其他指标虽有一定的变化趋势,但差异无显著性。组织病理学检查和骨密度检测结果显示,各给药组的关节软骨组织病变程度与模型组相比,都有了明显的改善,可能是由于血清中的检测指标在骨关节病变过程中反应不是很灵敏,后续实验可以考虑检测追踪关节液中各指

标的变化。

本实验研究表明,壮骨 1 号方对豚鼠自发性骨性关节炎和大鼠骨质疏松一定的改善作用,具有一定的防治骨性关节炎的作用。

参考文献

- [1] 袁 锋,尹 峰. 骨性关节炎的病因及治疗进展 [J]. 医学综述, 2011, 17(6): 858-861.
- [2] 肖 萍,董妙珠,叶于薇,等. 不同月龄豚鼠原发性骨关节炎的病理变化 [J]. 环境与职业医学, 2004, 21(6): 459-472.
- [3] 宋 敏,李 晶. 大鼠骨质疏松模型的复制方法及意义 [J]. 当代医学, 2010, 16(15): 16-18.
- [4] 江 艳,李荣亨,曹文富. 骨关节炎中药治疗研究进展 [J]. 实用中医药杂志, 2007, 23(5): 336-337.
- [5] 秦 楚,李 沛. 补肾中药干预骨关节炎的机理研究进展 [J]. 中医学报, 2012, 27(1): 76-78.
- [6] 蔺学燕,董传海,李伟华. 淫羊藿有效成分的药理研究与临床应用 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(9): 917-918.
- [7] 翟远坤,武祥龙,潘亚磊,等. 补骨脂抗骨质疏松研究概况 [J]. 中医杂志, 2012, 53(14): 1244-1248.
- [8] 徐凤玉,徐桃桃. 骨关节炎的中医发病机制及临床研究进展 [J]. 河北中医, 2009, 31(1): 137-140.
- [9] 郭常安,陈峥嵘,张秀荣. 骨关节炎基质金属蛋白酶 1、2、3 及其抑制物的表达与软骨退变的关系 [J]. 复旦学报: 医学版, 2002, 29(4): 244-246.
- [10] Futani H, Okayama A, Matsui K, *et al.* Relation between interleukin-18 and PGE2 in synovial fluid of osteoarthritis: a potential therapeutic target of cartilage degradation [J]. *J Immunother*, 2002, 25(Suppl 1): S61-S64.
- [11] Trippel S B. Growth factor inhibition: potential role in the etiopathogenesis of osteoarthritis [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2004, (427 Suppl): S47-S52.