

## 抗骨髓炎片对家兔慢性骨髓炎的改善作用研究

邢玉琪<sup>1</sup>, 李冬梅<sup>2</sup>, 张国斌<sup>3\*</sup>

1. 清华大学玉泉医院 药剂科, 北京 100040

2. 北京英智京西康复医院 药房, 北京 100043

3. 河南中医药大学 药学院, 河南 郑州 450046

**摘要:** 目的 观察抗骨髓炎片(KST)对家兔慢性骨髓炎(CO)的改善作用。方法 将金黄色葡萄球菌注入家兔右胫骨骨髓腔内建立CO模型, 将CO家兔分为模型组、庆大霉素(60 mg/kg)组及KST高、低剂量(480、240 mg/kg)组, 另设假手术组, ig给药。术后第2、4、6周对右胫骨行X-线检查并做诊断分型, 采血进行白细胞计数, 取血清检测C-反应蛋白(CRP)含量, 术后第6周取右胫骨检测核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)的阳性表达。结果 KST高、低剂量组术后第2、4、6周的X-片诊断分型与模型组比较均显著改善, 有统计学意义( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); 与模型组比较, KST高、低剂量组的白细胞计数、血清CRP含量、胫骨组织NF- $\kappa$ B表达在第2、4、6周均显著降低( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。结论 KST对CO家兔具有保护作用, 其机制可能与抑制致病菌、缓解炎症反应、下调炎症反应调控因子NF- $\kappa$ B等环节有关。

**关键词:** 抗骨髓炎片; 慢性骨髓炎; 炎症反应; 核因子 $\kappa$ B; 白细胞; C-反应蛋白

**中图分类号:** R978 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2019)06-1115-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.06.011

## Protective effect of Kanggusuiyan Tablet against rabbits with osteomyelitis

XING Yuqi<sup>1</sup>, LI Dongmei<sup>2</sup>, ZHANG Guobin<sup>3</sup>

1. Department of Pharmacy, Tsinghua University Yuquan Hospital, Beijing 100040

2. Pharmacy, Beijing Intech Jingxi Rehabilitation Hospital, Beijing 100043

3. Pharmacy College, He'nan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

**Abstract: Objective** To observe the protective effect of Kanggusuiyan Tablet (KST) against rabbits with chronic osteomyelitis (CO). **Methods** CO model of rabbit was achieved by intra-shinbone marrow injection of *Staphylococcus aureus*. CO rabbits were divided randomly into five groups, including sham group, model group, KST high and low dose (480 and 240 mg/kg, respectively) group and gentamicin (60 mg/kg) group. Drugs were administered orally daily for six weeks. The X-ray of right shinbone in rabbits were evaluated and graded, leucocyte count and level of C-reactive protein (CRP) in serum were examined on the 2nd, 4th and 6th week post-injection, respectively. At the end of the experiment, all the rabbits were sacrificed and the expression of NF- $\kappa$ B in right shinbone was determined by immunohistochemistry. **Results** The grading of X-ray in KST groups (480 and 240 mg/kg) were significantly improved compared with that of model group on the 2nd, 4th and 6th week, respectively ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Comparing to those of model group, leucocyte count and sera CRP levels in KST groups were significantly reduced on the 2nd, 4th and 6th week, respectively ( $P < 0.01$ ). KST (480 and 240 mg/kg) significantly decreased the expression of NF- $\kappa$ B in shinbone compared with that of model group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The protective effect of KST against CO seems to be associated with inhibition of pathogenic bacteria, improvement of inflammation and downregulation of NF- $\kappa$ B, etc.

**Key words:** Kanggusuiyan Tablet; chronic osteomyelitis; inflammation; NF- $\kappa$ B; leucocyte; C-reactive protein

骨感染作为骨科外伤性疾病或手术后最常见和复杂的并发症,是医学界的顽疾之一<sup>[1]</sup>。骨感染的治疗往往需抗菌药物贯穿始终,但目前多重耐药

菌的检出率节节攀升,使得骨感染的控制更为棘手<sup>[2]</sup>。

据报道,有些中药与抗菌药物联合使用在抑制

收稿日期: 2018-11-01

第一作者: 邢玉琪,女,本科,主管药师,医院药学。E-mail: xiaomuniu518@sina.com

\*通信作者: 张国斌(1980-),男,博士,副教授,研究方向为中药活性成分与免疫调节作用。

多重耐药菌方面有相加乃至协同作用<sup>[3-4]</sup>,当前中药疗法在骨感染领域的应用受到国内外学者的肯定。由金银花、蒲公英等6味药组成的中成药抗骨髓炎片(Kanggusuiyan Tablet, KST)具有清热解毒、生肌排脓、扶正护阴等功效,多年来临床用于骨科慢性病(骨髓炎、附骨疽和骨膜炎等),证实安全有效<sup>[5]</sup>,然作用机制尚不清楚。本研究通过家兔慢性骨髓炎(chronic osteomyelitis, CO)模型,观察KST的预防骨感染作用,以期为其临床应用奠定理论基础。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

5~6月龄新西兰白兔,雄性,体质量(2.5±0.5) kg,购自河北省实验动物中心,实验动物生产许可证号SCXK(冀)2013-1-003,置于普通动物房单笼饲养。

### 1.2 药物及主要试剂

KST(莱阳市江波制药有限责任公司,批号060150410,规格:每片0.4 g),以0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)配制成所需浓度;硫酸庆大霉素片(浙江万邦药业有限公司,批号150801,规格:每片20 mg),以0.5% CMC-Na配制成所需浓度;5%鱼肝油酸钠注射液(上海信谊金朱药业有限公司);核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)多克隆抗体p65试剂盒和链霉亲和素-生物素复合物(SABC)法免疫组织化学试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);ATCC6538P标准型金黄色葡萄球菌(北京英智京西康复医院检验科)。

### 1.3 主要仪器

XE2100型血细胞分析仪(日本希森美康株式会社);IME-100L型X线机(日本东芝公司);AU640型全自动生化分析仪、CHK-213型光学显微镜(日本奥林巴斯公司);HMIAS-2000型医学图文分析系统(武汉千屏影像技术有限责任公司)。

## 2 方法

### 2.1 制备兔胫骨CO模型

参照文献方法<sup>[6]</sup>,取新西兰白兔,戊巴比妥钠经耳缘iv麻醉,仰位固定,将右胫骨近端处备皮,于近端外侧做一纵行切口,显现出干骺端(胫骨平台),采用克氏针(规格2 mm)在胫骨平台钻孔,使骨髓腔打通,采用穿刺针向腔内依次注入5%鱼肝油酸钠注射液0.1 mL及金黄色葡萄球菌液0.1 mL(含菌量 $1 \times 10^7$  CFU),常规封闭穿刺孔、缝合切口。另取10只新西兰白兔进行手术,除将金黄色葡萄球菌液

0.1 mL替换成生理盐水0.1 mL外,其他步骤同上,作为假手术组。

### 2.2 分组和治疗

术后将家兔分为:模型组,庆大霉素(阳性药,60 mg/kg)组,KST高、低剂量(480、240 mg/kg)组,假手术组,每组10只。术后当天开始ig用药,模型组和假手术组给予等体积0.5% CMC-Na,治疗持续6周。

### 2.3 观察指标

**2.3.1 整体观察** 术后观察各组兔存活、饮食、活动、精神状态、切口及周围肿胀等情况。

**2.3.2 X-线诊断分型** 各组兔均于术后第2、4、6周麻醉后,对右胫骨行X-线拍片,各组X-片依照文献<sup>[7]</sup>诊断分型方法分为3级:轻度(恢复型)、中度(增殖型和稳定型)、重度(破坏进展型和死骨形成型)。

**2.3.3 白细胞计数** 各组兔均于术后第2、4、6周禁食不禁水12 h后自耳缘静脉采血,白细胞计数采用血细胞分析仪进行。

**2.3.4 血清C-反应蛋白(CRP)的测定** 各组兔均于术后第2、4、6周禁食不禁水12 h后取血清,CRP含量测定采用全自动生化分析仪进行。

**2.3.5 胫骨组织NF- $\kappa$ B表达的测定** 术后第6周各组兔处死,取胫骨病变组织,先后置于4%多聚甲醛液中固定、10%乙二胺四乙酸(EDTA)液中脱钙,行石蜡包埋、冰冻切片。采用免疫组化法检测胫骨组织病变区NF- $\kappa$ B的阳性细胞数(胞浆或胞核呈棕黄色深染),具体步骤依试剂盒说明书执行。每张切片随机选取4个视野,取各视野阳性细胞数平均值为该张切片的阳性细胞表达值。

### 2.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料行秩和检验,计量资料行多组间比较,行单因素方差分析,两两比较行 $q$ 检验,统计学软件采用SPSS 18.0。

## 3 结果

### 3.1 各组X-片诊断分型

大体方面,假手术组家兔表现正常,模型组和给药组家兔均有不同程度的饮食减少、精神萎靡及右足跛行;模型组切口周围有明显红肿,部分出现破溃窦道和脓肿;给药组切口周围红肿现象较轻,未形成窦道或窦道愈合较快。

诊断分型方面,假手术组不参与组间统计学比较,模型组成活家兔均有典型CO表现(因感染严重而死亡1只),术后诊断分型以重度为主;KST高、低

剂量组和庆大霉素组对家兔CO症状有不同程度的缓解,术后第2周诊断分型与模型组比较均有统计学意义( $P < 0.05$ );KST高、低剂量组在术后第4、6周的诊断分型以轻度和中度为主,与模型组比较有统计学意义( $P < 0.01$ )。见表1。

表1 各组不同时间点X-片诊断分型比较

Table 1 Comparison of grading of X-ray between each group

组别	剂量/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	诊断 分型	n/只		
			术后2周	术后4周	术后6周
模型	—	轻度	0	0	0
		中度	1	0	1
		重度	8	9	8
庆大霉素	60	轻度	1*	1**	2
		中度	5*	5**	3
		重度	4*	4**	5
KST	480	轻度	2*	4**	5**△
		中度	4*	4**	5**△
		重度	4*	2**	0**△
	240	轻度	2*	3**	4**
		中度	5*	4**	5**
		重度	5*	3**	1**

与同时段模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ ; 与同时段庆大霉素组比较: △ $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs model at same time point; △ $P < 0.05$  vs gentamicin at same time point

### 3.2 各组白细胞计数

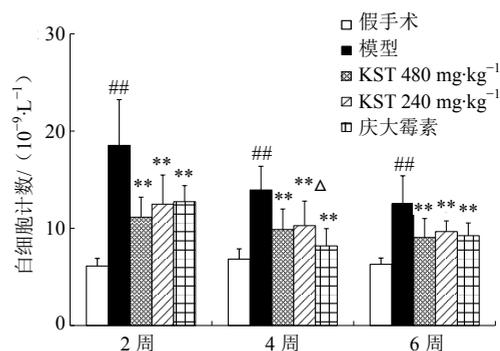
与假手术组比较,模型组家兔的白细胞计数在第2、4、6周均有明显升高( $P < 0.01$ );KST高、低剂量组和庆大霉素组的白细胞计数在第2、4、6周均有显著降低,与模型组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。见图1。

### 3.3 各组血清CRP含量

假手术组血清CRP仅微量表达,与假手术组比较,模型组兔血清CRP含量在术后各时间点均有显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,庆大霉素组、KST高、低剂量组血清CRP含量在术后第2、4、6周均有显著降低( $P < 0.05, 0.01$ )。见图2。

### 3.4 各组胫骨组织NF-κB表达

假手术组胫骨组织NF-κB表达很弱;模型组胫骨组织的NF-κB阳性表达显著增高,与假手术组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ );KST高、低剂量组均可显著下调胫骨组织NF-κB的表达,与模型组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。见图3、4。

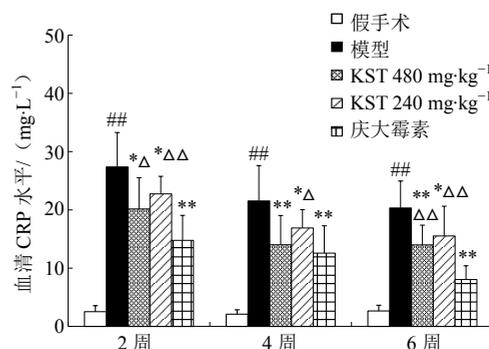


与假手术组比较: ## $P < 0.01$ ; 与模型组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与庆大霉素组比较: △ $P < 0.05$

## $P < 0.01$  vs sham group; \*\* $P < 0.01$  vs model group; △ $P < 0.05$  vs gentamicin group

图1 各组不同时间点白细胞计数比较( $\bar{x} \pm s$ )

Fig. 1 Comparison of leucocyte count between each group at different time points ( $\bar{x} \pm s$ )



与假手术组比较: ## $P < 0.01$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ ; 与庆大霉素组比较: △ $P < 0.05$  △△ $P < 0.01$

## $P < 0.01$  vs sham group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs model group; △ $P < 0.05$  △△ $P < 0.01$  vs gentamicin group

图2 各组不同时间点血清CRP水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

Fig. 2 Comparison of sera CRP level between each group at different time points ( $\bar{x} \pm s$ )

## 4 讨论

CO属骨科常见病,具有病程长、反复感染等特点,最常见的致病菌为金黄色葡萄球菌<sup>[8]</sup>。随着抗菌药物在全球范围内的广泛应用甚至滥用,致使耐药菌株的数量节节攀升,只凭抗菌药物治疗或手术干预很难控制CO的感染或复发<sup>[9]</sup>。怎样更有效的控制感染、减少复发,如何更好的促进骨缺损修复、改善机体全身状况,目前是骨科领域亟需解决的问题之一。CO属祖国医学“附骨疽”范畴,中医认为热毒是其致病因素,热毒趁素体虚弱时侵入,凝滞筋骨而后蕴积成脓,久而元气更虚,溃疡反复;相应的中医药治法当内补五脏之气,外以清热解毒、活血生肌<sup>[10]</sup>。本文KST各成份(金银花、蒲公英、白头翁、半枝莲、地丁、白花蛇舌草)皆为苦寒之

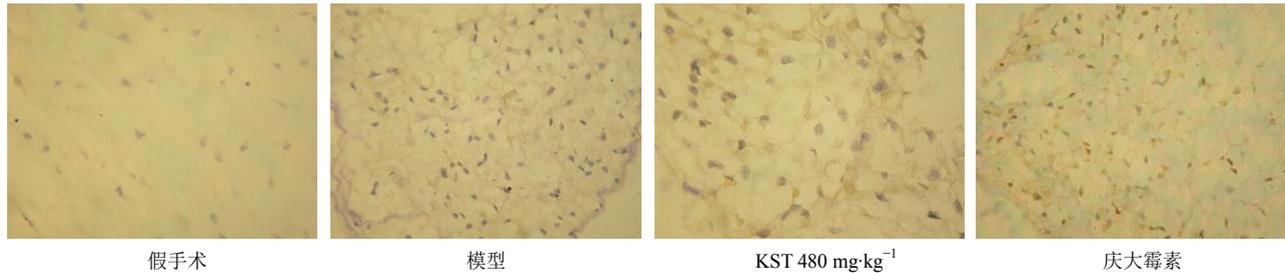
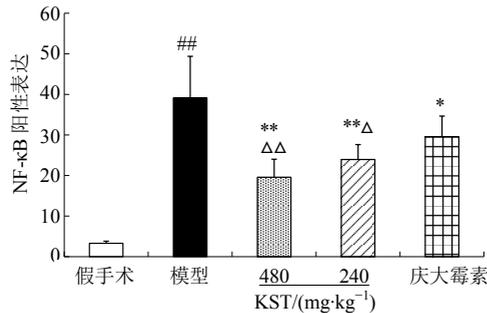


图3 各组胫骨NF-κB阳性细胞表达的代表性图片(×400)

Fig. 3 Representative pictures of NF-κB positive expression (×400)



与假手术组比较:  $^{##}P < 0.01$ ; 与模型组比较:  $^{*}P < 0.05$   $^{**}P < 0.01$ ; 与庆大霉素组比较:  $^{\Delta}P < 0.05$   $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

$^{##}P < 0.01$  vs sham group;  $^{*}P < 0.05$   $^{**}P < 0.01$  vs model group;  $^{\Delta}P < 0.05$   $^{\Delta\Delta}P < 0.01$  vs gentamicin group

图4 各组胫骨NF-κB阳性表达比较( $\bar{x} \pm s$ )Fig. 4 Comparison of positive expression of NF-κB expression in shinbone between each group ( $\bar{x} \pm s$ )

品,共奏清热解毒、消肿散瘀之功;现代药理学研究亦证实KST各成分对多种病原菌特别是金黄色葡萄球菌具有明显的杀灭或抑制活性<sup>[11-15]</sup>;除此之外,KST大多成分具有免疫增强活性,提示KST除了抑制病原菌外,尚具有改善内环境、提高机体免疫力等作用。

治疗CO的中医药研究方兴未艾,然关于中医药治疗CO的作用机制极少见诸报道。本文通过胫骨给予金黄色葡萄球菌的方法建立家兔CO模型,探讨中成药KST的作用机制。CO是由病原菌诱发同时伴有机体免疫紊乱和炎症反应失控的生理病理过程,白细胞计数能够反映出机体的炎症反应状态,本文模型组家兔的术后持续高水平的白细胞计数,提示CO家兔的炎症反应比较严重;与模型组比较,KST在给药后各时间点均可使白细胞计数水平明显降低,结合胫骨X-片诊断分型的结果,提示KST可改善CO家兔的炎症反应。CRP作为细菌感染性疾病的一个炎症标志物,其表达高低与感染的严重程度基本呈正相关<sup>[16]</sup>。本文模型组家兔血清CRP含量在各时间点居高不下,提示感染处于较严重程度;KST可在用药后显著降低家兔血清CRP含

量,从第2周到第6周的血清CRP含量持续下降说明感染逐渐得以控制,提示KST的作用机制之一可能是通过改善炎症机体的免疫功能,减轻由过度炎症反应导致的骨组织破坏,有助于骨组织的修复及CO的痊愈。

NF-κB是炎症反应的关键转录因子,对多种炎症相关蛋白基因的表达起着关键的调控作用。生理情况下,NF-κB以非活性或极微量活化的状态存在于胞浆中;病理情况下,NF-κB大量活化,进入细胞核,启动靶基因(如黏附分子ICAM-1、VCAM-1等,炎症细胞因子IL-6、TNF-α等)的转录,激发一系列级联式炎症反应,这些炎症介质又会反过来激活NF-κB,进一步加重炎症反应,引起组织损伤<sup>[17]</sup>。现已证实NF-κB的失控与炎症、感染及自身免疫性疾病、肿瘤性疾病等均有较大关联,NF-κB在骨科CO发生发展中的作用也越来越受到关注,Shandley等<sup>[18]</sup>研究发现,CO小鼠的胫骨病变程度与其NF-κB受体激活蛋白配体(RANKL)的浓度呈正相关;黄磊等<sup>[19]</sup>研究发现,阻断NF-κB炎症反应信号通路,可有效缓解CO兔胫骨的炎症反应。本文观察到CO家兔胫骨组织中NF-κB阳性细胞数显著增加,这与上述文献报道的结论是一致的;KST高、低剂量组均可显著下调CO家兔胫骨组织NF-κB的表达,提示KST通过下调NF-κB的表达,抑制了NF-κB信号通路的活化及其下游炎症因子的释放,进而减轻胫骨组织的炎症浸润,缓解由过度炎症反应导致的软骨及骨组织破坏,有助于骨组织病灶的修复。

KST对家兔CO的防护作用可能与抑制病原菌、提高机体免疫力、缓解炎症反应、下调炎症反应调控因子NF-κB等途径有关;其具体作用环节及与抗菌药物的联合应用效果尚需深入调研。

#### 参考文献

- [1] Ochsner P E, Hailemariam S. Histology of osteosynthesis associated bone infection [J]. Injury, 2006, 37(Suppl 2): S49-S58.

- [2] Koury K L, Hwang J S, Sirkin M. The antibiotic nail in the treatment of long bone infection: technique and results [J]. *Orthop Clin North Am*, 2017, 48(2): 155-165.
- [3] 韩宗其, 左国营, 郝小燕. 中药成分联合抗生素抗MRSA作用的研究进展 [J]. *中草药*, 2012, 43(12): 187-195.
- [4] 顾卓珺, 顾维凤, 吴飞跃, 等. 医院感染病原菌中药与抗菌药物联合治疗的研究 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2015, 25(10): 2236-2238.
- [5] 田殿兴. 急慢性化脓性骨髓炎的临床初步研究 [A]// 2008年中医外科学术年会论文集 [C]. 济南: 2008.
- [6] Strelkov N S, Kiryanov N A, Shklyayev P O, et al. Pathologic morphology of acute experimental osteomyelitis [J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2013, 13(3): 153-157.
- [7] 李素那, 钱丽旗, 郑彬丽, 等. 中药复方托毒生髓方治疗慢性骨髓炎的实验研究 [J]. *感染·炎症·修复*, 2012, 13(2): 79-82.
- [8] Kalinka J, Hachmeister M, Geraci J, et al. *Staphylococcus aureus* isolates from chronic osteomyelitis are characterized by high host cell invasion and intracellular adaptation, but still induce inflammation [J]. *Int J Med Microbiol*, 2014, 304(8): 1038-1049.
- [9] Uluğ M, Ayaz C, Celen M K. A case report and literature review: osteomyelitis caused by community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *J Infect Dev Ctries*, 2011, 5(12): 896-900.
- [10] 刘振云. 中医三联疗法治疗慢性骨髓炎200例 [J]. *湖南中医杂志*, 2014, 30(8): 95-96.
- [11] 崔玉莹, 王宪贝, 李玉坤, 等. 金银花、连翘水煎液对金黄色葡萄球菌的抑制作用研究 [J]. *光明中医*, 2017, 32(18): 2637-2638.
- [12] 霍佳楠, 姜晓文, 许晶, 等. 蒲公英水提物对体外金黄色葡萄球菌生物膜形成的影响 [J]. *中兽医医药杂志*, 2015, (1): 12-15.
- [13] 杨明炜, 陆付耳, 徐丽君, 等. 紫花地丁对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药质粒的消除作用 [J]. *中西医结合研究*, 2009, 1(1): 27-28.
- [14] 陈柳萌, 曹树稳, 余燕影. 白花蛇舌草-半枝莲药对提取物抑菌活性部位研究 [J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(1): 93-95.
- [15] 郑险峰, 张金艳, 邵淑娟, 等. 白头翁对金黄色葡萄球菌和产气肠杆菌抑菌作用的研究 [J]. *牡丹江师范学院学报: 自然科学版*, 2011, (2): 29-30.
- [16] Lin K H, Wang F L, Wu M S, et al. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection in patients with liver cirrhosis: a systematic review and meta-analysis [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2014, 80(1): 72-78.
- [17] Pasparakis M. Role of NF- $\kappa$ B in epithelial biology [J]. *Immunol Rev*, 2012, 246(1): 346-358.
- [18] Shandley S, Matthews K P, Cox J, et al. Hyperbaric oxygen therapy in a mouse model of implant-associated osteomyelitis [J]. *J Orthop Res*, 2012, 30(2): 203-208.
- [19] 黄磊, 许长鹏, 贾俊杰, 等. 核因子- $\kappa$ B必需调节蛋白结合区多肽在兔胫骨骨髓炎模型中的抗炎效应研究 [J]. *中华创伤骨科杂志*, 2014, 16(5): 415-420.