

骨碎补总黄酮对胶原诱导大鼠类风湿关节炎 骨破坏治疗作用的实验研究

高晓珺¹, 解 骏¹, 肖涟波¹, 刘 超¹, 高华利¹,
黄新星¹, 李宁丽², 马丹军¹

(1. 上海长宁区光华中西医结合医院, 上海, 200052; 2. 上海交通大学医学院免疫学研究所, 上海, 200025)

摘要: **目的** 建立模拟类风湿关节炎(RA)发病的胶原诱导关节炎(CIA)大鼠模型,明确骨碎补总黄酮对CIA大鼠关节局部骨破坏的改善作用,为临床提供实验依据。**方法** 利用皮下注射牛Ⅱ型胶原诱导Wistar大鼠发病,建立CIA大鼠模型。将大鼠随机分为正常对照组(10只)、灭菌用水治疗组(10只)、骨碎补总黄酮治疗组(10只)。每只大鼠均在炎症分值达到2分及以上时开始治疗,分别在治疗4周和8周,取胫骨上段做硬组织切片,观察胫骨上段骨小梁变化及骨量变化情况。**结果** 骨碎补总黄酮具有明显抑制CIA大鼠关节周围骨量丢失的作用,且其抑制骨量减少主要是通过抑制骨小梁数量减少来实现的,与抑制骨小梁宽度丢失关系较小。**结论** 骨碎补总黄酮能明显抑制CIA大鼠关节侵蚀及关节周围骨丢失。

关键词: 骨碎补总黄酮; 骨破坏; 类风湿关节炎; CIA

中图分类号: R 593.22 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2013)05-013-05 DOI: 10.7619/jcmp.201305003

Therapeutic effect of drynaria total flavonoids on the bone destruction of CIA rat

GAO Xiaojun¹, XIE Jun¹, XIAO Lianbo¹, LIU Chao¹, GAO Huali¹,
HUANG Xinxing¹, LI Ningli², MA Danjun¹

(1. Guanghua Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai, 200052;
2. Shanghai Institute of Immunology Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200025)

ABSTRACT: Objective: Through the establishment of the collagen induced arthritis (CIA) rat model, we aimed to confirm the potential curative effect of drynaria total flavonoids (DTF) to supply experimental evidence for clinical usage. **Methods** Subcutaneous injection of bovine type II collagen was used to induce Wistar rats to fall ill, and then the CIA rat model was established. The rats are randomly divided into normal control group ($n = 10$), sterilized water treatment group ($n = 10$) and DTF treatment group ($n = 10$). Every rat began to receive treatment while inflammation score reached two points and above. After 4-week and 8-week treatment, we killed the rats, took the left femur and fifth lumbar vertebrae to have bone biomechanics check, scanned proximal tibia by micro-CT, made hard-tissue slices, and then observed the changes in bone biomechanical with femur and lumbar spine of each group, and evaluated trabecular variation and bone quantity changes of proximal tibia of each group. **Results** The DTF group had obvious inhibition on periarticular bone loss of CIA rat and the ability mainly depended on the inhibition on the loss of trabecular bone number, not trabecular width loss. **Conclusion** DTF has obvious inhibition on joint erosion and periarticular bone loss of CIA rat.

KEY WORDS: drynaria total flavonoids; bone destruction; rheumatoid arthritis; collagen induced arthritis (CIA)

收稿日期: 2012-12-08

基金项目: 上海市卫生局资助项目(2010162); 上海市中医药事业发展三年行动计划第二批重大项目(ZYSNXD-CC-ZDYJ054); 第三批上海市中医临床优势专科—骨伤科项目(ZYSNXD-YL-YSZK016); 上海市科委科技创新计划重点项目(12401903700); 上海市中西医结合学会项目(ZXYQ-1224)

通信作者: 肖涟波, Email: 13701888178@163.com; 马丹军, Email: mdjjun1350@126.com

类风湿关节炎(RA)是一种病因不明的自身免疫性疾病,在中国的患病率高达0.4%。由于病因不明,临床上尚缺乏根治方法和预防措施。导致RA患者致残和丧失劳动力的主要病变是关节周围骨破坏,早期出现的全身性的骨量减少也是RA骨破坏其中重要的因素。因此,早期发现和防治RA骨量减少与骨破坏是从根本上缓解RA病情、减少致残、提高患者生活质量的重要途径。本实验采用目前公认的胶原诱导关节炎大鼠(CIA)模型模拟类风湿关节炎,通过灌胃注入骨碎补总黄酮溶液,观察其在体内对CIA大鼠模型关节骨破坏的影响,并初步探讨其可能的作用机制。

1 资料与方法

1.1 材料与试剂

实验动物:7~8周龄雌性Wistar大鼠40只,由中科院上海生命科学院实验动物中心提供,体质量(170 ± 10)g。饲养环境为上海交通大学医学院实验动物科学部SPF级动物房,大鼠自由饮水及进食,室温(24 ± 2)℃。

药物:骨碎补总黄酮:强骨胶囊,国药准字Z20030007,购自北京岐黄制药有限公司。

试剂:牛Ⅱ型胶原蛋白,Chondrex公司;弗式完全佐剂(CFA),美国sigma公司;不完全弗式佐剂(IFA),美国sigma公司;冰醋酸,北京化学试剂公司;苏木素,上海蓝季科技发展有限公司;伊红,购买自中国医药(集团)上海化学试剂公司。

1.2 仪器与设备

实验仪器:超净台,上海瑞仰净化装备有限公司; -80℃深低温冰箱,美国REVCO公司;冰箱,中国海尔公司;高速台式离心机, Eppendorf公司;高速低温离心机, HITACHI公司; AxioCam数码相机, ZEISS公司;酶标仪, Heraus公司;硬组织切片机,德国Exakt 3000CP;磨片机,德国Exakt 4000CP;显微镜,德国Zeiss M1;半自动图像分析仪,美国OsteoMetrics Inc;包埋仪,德国Leica;恒温培养箱,德国Leica;真空干燥器,德国SCHOTT;电子游标卡尺。

1.3 实验方法

1.3.1 CIA模型造模方法:①初次免疫:用2%戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉大鼠(0.3 mL/只),于每只大鼠尾部皮下注射0.12 mL胶原乳剂(含胶原240 μg);②激发免疫:初次免疫后

第7天于大鼠臀背部两侧各皮下注射0.03 mL胶原乳剂(共含胶原120 μg)。

1.3.2 入组标准:炎症评分 ≥ 2 分即随机入组。

1.3.3 分组情况:正常对照组10只,灭菌用水治疗组10只,骨碎补总黄酮治疗组10只。

1.3.4 给药方法及剂量:①正常对照组:无特殊处理。②灭菌用水组:每只大鼠给予灭菌用水1 mL/d灌胃。③骨碎补总黄酮组:强骨胶囊按 $300 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ [含骨碎补总黄酮约 $240 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$]给药,每只大鼠按0.2 kg体质量计算,将强骨胶囊溶于灭菌用水中,配成60 mg/mL浓度,每只大鼠给予1 mL/d灌胃。

1.3.5 关节破坏程度检查方法:胫骨上段松质骨组织形态计量学检查方法。

1.4 组织标本的制备

1.4.1 固定、脱脂、脱水:分别于治疗4周和8周结束当天麻醉处死大鼠,取胫骨上1/3段,剔除软组织,浸入冷丙酮溶液中固定、脱脂脱水,每12 h更换1次丙酮,连续共6次。

1.4.2 浸透:首先配制浸透剂,将BPO(过氧化二苯甲酰)2 g溶于MMA(甲基丙烯酸甲酯单体)30 mL,然后依次加入HEMA(甲基丙烯酸羟乙酯单体)60 mL、HEA(丙烯酸羟乙酯单体)10 mL、正丙醇10 mL,搅拌均匀后将标本浸入,放入真空干燥器内的冰浴中,真空冰浴浸透1 h。

1.4.3 包埋:在冰浴上将BPO 0.4 g溶于MMA 40 mL,然后依次加入HEMA 60 mL、HEA 10 mL、正丙醇10 mL,最后加DMA(二甲苯胺)0.1 mL,经搅拌均匀后将溶液浇注于合适模型中包埋,最后在包埋剂表面滴加一层薄薄的液状石蜡,放入4℃冰箱中让其聚合。

1.4.4 切片:将包埋块脱模后在硬组织切片机上切下5 μm厚切片,在37℃温浴中展平,并在37℃恒温培养箱内烘干。

1.4.5 染色与封固:甲苯胺蓝染色后封固。

1.5 松质骨组织形态计量学参数计算

硬组织切片制备完成,甲苯胺蓝染色后,置于带有专门骨组织形态计量学测量系统软件的半自动图像分析仪上,200倍光镜下,于胫骨上段骨髓线下1~4 mm间次级松质骨区域内每个标本随机选取3个视野,保存待分析。

在半自动图像分析仪上,测量每个视野的总面积即骨组织面积,测量每个视野下骨小梁总周长(P_i)、骨小梁总面积(A_i)。

将测得的上述参数代入表1中计算: 骨小梁面积(A_i)、骨小梁宽度(W_i)、骨小梁数量(N_i)、骨小梁分离度(S_i)。

表1 松质骨组织形态计量学静态计算参数

参数	公式
骨小梁宽度 $W_i/\mu\text{m}$	$(2000/1.199) \times (A_i/P_i)$
骨小梁数量 N_i/mm^{-1}	$(1.199/2) \times (P_i/A_i)$
骨小梁分离度 $S_i/\mu\text{m}$	$(2000/1.199) \times (A_i - A_i/P_i)$

1.6 统计学分析

采用 SPSS 15.0 软件对实验数据进行统计学分析, 数据符合正态分布, 按照(均数 ± 标准差)表示, 若各治疗组方差齐, 采用单因素的方差分析及 LSD- t 检验进行组间的两两比较; 单独两组样本均数比较时, 若方差齐, 采用 t -text, 若方差不齐, 改用 t 检验, $P < 0.05$ 时有统计学意义。

2 结果

骨组织形态计量学参数比较: 分别在治疗4和8周, 各组硬组织切片制作完成后, 甲苯胺蓝染色, 置于带有专门骨组织形态计量学测量系统软件的半自动图像分析仪上, 200倍光镜下, 于胫骨上段骨骺线下1~4mm间次级松质骨区域选取各组视野(见图1), 计算出骨小梁面积(见图2)。治疗4周后, 经统计分析后发现, 骨碎补总黄酮组的骨小梁面积明显高于灭菌用水组($P < 0.05$), 这反映了骨碎补总黄酮具有明显的抑制CIA大鼠炎症关节周围骨量丢失的能力, 与正常组相比, 骨碎补总黄酮组骨小梁面积差于正常组($P < 0.001$)。

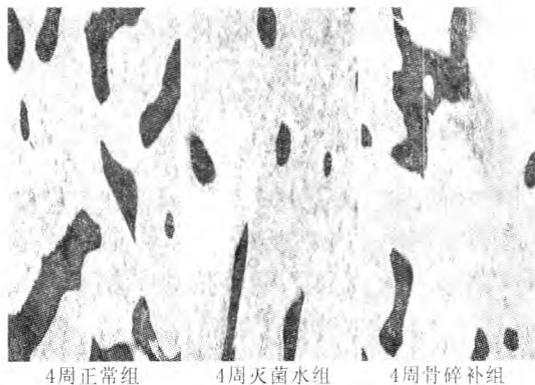
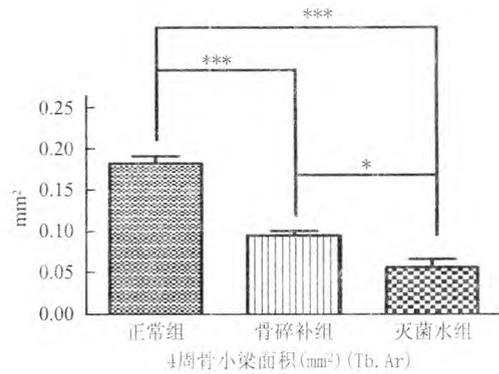


图1 大鼠胫骨上段骨骺线下1~4mm间松质骨组织切片 甲苯胺蓝染色, 200倍

骨小梁面积是评价药物对骨量影响的最重要客观指标, 从数学公式上推算, 它与骨小梁宽度与骨小梁数量的乘积成正比, 即骨量多少由宽度和



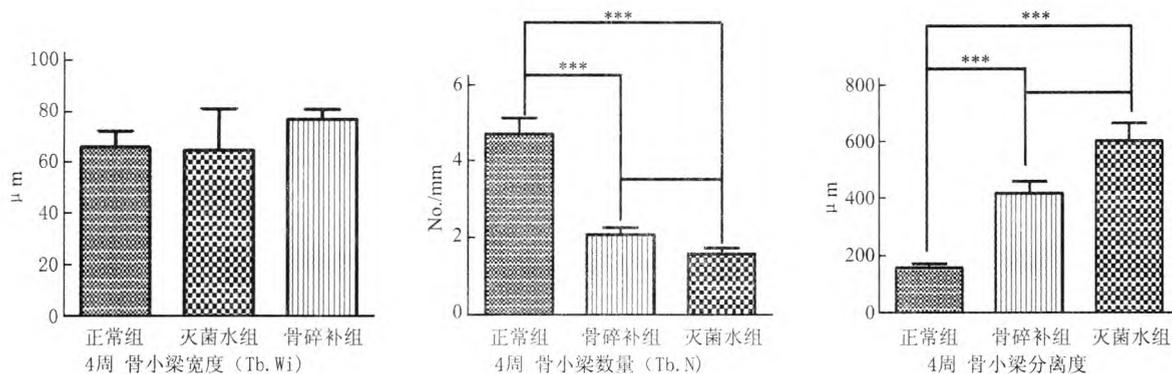
*** $P < 0.001$, * $P < 0.01$, * $P < 0.05$

图2 各治疗组骨小梁面积比较

数量二者共同决定, 骨小梁宽度与数量的变化, 主要用于描述骨小梁形态结构, 解释骨量变化。治疗4周后骨碎补总黄酮组骨小梁宽度与灭菌用水组差异无统计学意义($P > 0.05$), 可以认为骨碎补总黄酮能够明显抑制CIA大鼠炎症关节周围骨小梁数量的减少, 但对骨小梁宽度的影响较小; 同时也说明骨碎补总黄酮抑制骨量减少的作用主要是通过抑制骨小梁数量减少来实现的, 与抑制骨小梁宽度丢失关系较小。在炎症开始的4周内, 骨碎补总黄酮组与正常大鼠比较, 无论在骨小梁面积, 还是骨小梁的数量上差异均有统计学意义($P < 0.001$), 但在骨小梁宽度上则差异无统计学意义($P > 0.05$)。骨小梁分离度是指骨小梁之间的平均距离, 也是用于描述骨小梁形态结构的重要指标。分离度越大, 骨小梁之间的距离就越大, 意味着骨质越疏松。骨碎补总黄酮组骨小梁的分离度与灭菌用水组差异无统计学意义($P > 0.05$), 与正常组相比, 骨小梁分离度明显增大($P < 0.001$)。见图3。

治疗8周后, 同样制作完成各治疗组硬组织切片后, 进行统计分析。骨碎补总黄酮组骨小梁面积明显高于灭菌用水组($P < 0.05$)。此外骨碎补总黄酮组与正常组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。这反映了随着炎症的逐渐控制, 大鼠自身的骨破坏改善明显, 骨碎补总黄酮具有明显的抑制CIA大鼠炎症关节周围骨量丢失的能力, 与正常组比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 表明随着炎症的控制, 骨碎补总黄酮对促进骨的重建效果较明显。见图4、5。

治疗8周后骨碎补总黄酮组骨小梁宽度与灭菌用水组差异无统计学意义; 骨碎补总黄酮组的



*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

图 3 骨组织形态计量学数据比较 甲苯胺蓝染色, 200 倍

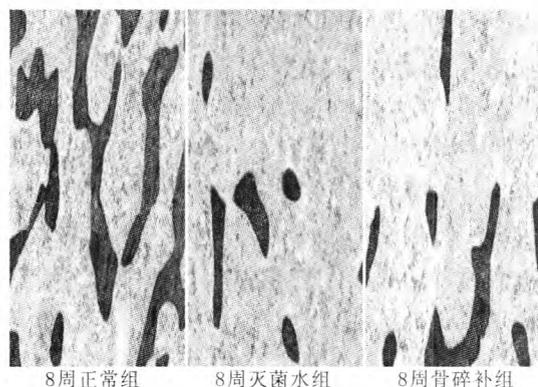
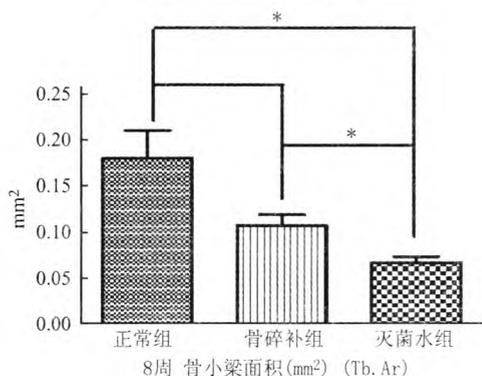


图 4 大鼠胫骨上段骨髓线下 1~4 mm 间松质骨组织切片 甲苯胺蓝染色, 200 倍



*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

图 5 各治疗组骨小梁面积比较

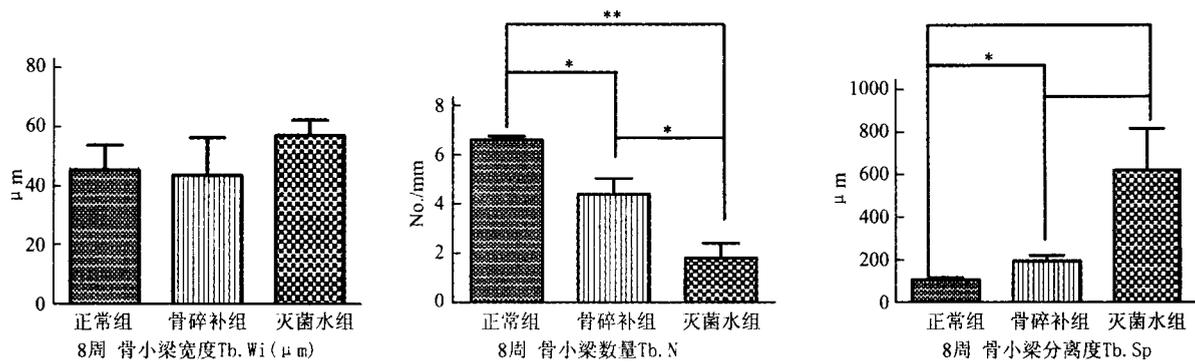
骨小梁数量好于灭菌水组 ($P < 0.05$)。但与正常组比较, 骨碎补总黄酮组骨小梁数量显著下降 ($P < 0.05$), 因此通过 8 周用药, 骨碎补总黄酮能够明显抑制 CIA 大鼠炎症关节周围骨小梁数量的减少, 但对骨小梁宽度的影响较小; 同时, 也再次证明骨碎补总黄酮抑制骨量减少的作用主要是通过抑制骨小梁数量减少来实现的, 与骨小梁宽度关系较小。此外, 实验也表明骨碎补总黄酮对促进骨的重建有明显效果。骨碎补总黄酮组骨小梁的分离度明显低于正常组 ($P < 0.05$); 而骨碎补

总黄酮及灭菌水组之间骨小梁分离度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 6。

治疗 4 周和 8 周的各组数据比较, 可见骨小梁面积和骨小梁宽度各组差异均无明显统计学意义 ($P > 0.05$)。在骨小梁数量比较中, 正常组 8 周比 4 周差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 骨碎补总黄酮组显示 8 周比 4 周差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 而灭菌水组则无差异性 ($P > 0.05$)。在骨小梁分离度比较中, 骨碎补总黄酮组在 8 周均明显小于 4 周 ($P < 0.01$), 而正常组和灭菌水组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。随着鼠龄的增加, 正常的大鼠一般骨量会逐渐增加, 表现为骨小梁数量的增加, 但在灭菌水组的 4 周和 8 周比较中, 骨小梁数量并没有增加, 骨小梁分离度无明显改善, 因此表明类风湿关节炎对于骨小梁数量的增殖有明显的抑制作用, 从而造成继发性的骨破坏。但骨碎补总黄酮能显著地促进骨小梁数量的增殖, 减少骨小梁的分离度, 这也证明了骨碎补总黄酮对于促进骨的重建, 抑制骨破坏有比较好的效果。

3 讨论

类风湿性关节炎是以关节组织慢性炎症性病变为主要表现的全身性疾病^[1-4], 早期有游走性的关节疼痛和活动受限, 中晚期则表现为关节功能障碍, 继则僵硬、变形, 甚至丧失劳动力, 终至残疾。在自身免疫性结缔组织病中患病率列居首位, 中国患病率为 0.4%, 欧美为 0.5%~1.0%, 女性患者约 3 倍于男性^[5]。其发病 2 年内即可能出现全身性骨质疏松和近关节的骨破坏, 进而发生不可逆的关节损伤, 致残率达 50%。骨质破坏是 RA 的一项重要表现, 贯穿于整个 RA 病程之



*** P < 0.001, ** P < 0.01, * P < 0.05

图6 骨组织形态计量学数据比较 甲苯胺蓝染色, 200倍

中,主要表现在炎症关节骨-血管翳交界处、炎症关节软骨下骨处的骨侵蚀和累及全身的骨质疏松。RA 导致的关节畸形极易发脆性骨折,是造成中国人群丧失劳动力和致残的主要病因之一。由于病因不明,临床上尚缺乏根治方法和预防措施。局灶性的关节边缘骨侵蚀被认为是 RA 放射学上的一个特征性标志^[2-4], 并且侵蚀的程度与疾病的严重性相关^[5-6]。

骨碎补总黄酮应用于抑制骨破坏的理论依据是“肾主骨生髓”,肾虚导致骨质疏松骨破坏;“脾为后天之本,主肌肉四肢”,脾虚则肌肉消瘦,肢体活动不利,进而导致骨质疏松骨破坏。根据其病因病机,补肾之法成为治疗骨破坏之主法。史晓林等^[7]运用自拟补肾强骨中药饮片(其主要成分骨碎补),从临床症状、骨密度值(g/cm^3)、愈显率及总疗效等方面观察,发现自拟强骨饮能显著提高骨密度值。谢雁鸣等^[8]通过成骨细胞体外培养技术,对6种植物黄酮进行比较,发现以骨碎补总黄酮对成骨细胞 ALP 活性和 3 h 计数最为强烈,并且从总的实验结果看,总黄酮比黄酮类单体作用要好。在骨组织形态学基础上,又对去卵巢大鼠骨质疏松模型采用双能 X 线骨密度测量仪研究用骨碎补的有效成分骨碎补总黄酮前后的骨密度值,发现骨碎补总黄酮能显著提高模型大鼠的骨密度值,与对照组差异明显^[9]。蔡春水等^[10]选择新西兰兔子以骨碎补总黄酮灌胃 1 h 后,取外周血,分离含药血清,同时制备单核细胞,研究骨碎补总黄酮对受骨水泥微粒刺激的巨噬细胞分泌 TNF- α 、IL-6 水平的影响^[11-14],结果显示骨碎补总黄酮能抑制受到骨水泥微粒刺激的单核细胞分泌 TNF- α 、IL-6 等溶骨性细胞因子。

参考文献

- [1] McInnes I B, O'Del J R. State-of-the-art: rheumatoid arthritis [J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69(11): 1898.
- [2] 唐福林, 吴东海. 临床诊疗指南风湿病分册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
- [3] Sharp J T, Wolfe F, Mitchell D M, et al. The progression of erosion and joint space narrowing scores in rheumatoid arthritis during the first twenty-five years of disease [J]. Arthritis Rheum, 1991, 34: 660.
- [4] Goldring S R, Polissos R P. Bone disease in rheumatological disorders[M]. //edited by Avioli L, Krane S M. Metabolic bone disease 3th. San Diego: Academic Press, 1998: 621.
- [5] Goldring S R, Gravalles E M. Pathogenesis of bone erosions in rheumatoid arthritis[J]. Curr Opin Rheumatol, 2000, 12: 195.
- [6] Van Zeven D, Hazes J M W, Zwiderman A H, et al. Factors predicting outcome of rheumatoid arthritis: results of a followup study[J]. Rheumatol, 1993, 20: 1288.
- [7] 史晓林, 刘康, 李胜利. 自拟强骨饮治疗骨质疏松性骨痛的 44 例临床报告[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2007, 15(2): 9.
- [8] 谢雁鸣, 秦林林, 于向东, 等. 六种黄酮对成骨细胞体外培养作用的比较研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2005, 11(9): 664.
- [9] 谢雁鸣, 许勇钢, 赵晋宁, 等. 骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠骨密度和细胞因子 IL-6、IL-4、TNF- α 水平的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2004, 10(1): 34.
- [10] 蔡春水, 肖平, 张毅, 等. 骨碎补总黄酮对巨噬细胞分泌细胞因子 TNF- α 、IL-6 水平的影响[J]. 中国矫形外科杂志, 2006, 14(15): 1185.
- [11] 余斌, 陈辉强, 卢昌怀, 等. 关节内注射不同浓度臭氧对类风湿关节炎大鼠 TNF- α 、TNFRI 和 TNFRII 的影响[J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(6): 1055.
- [12] 任洁, 李娟, 冯知涛, 等. 类风湿关节炎患者滑液 NK-22 细胞对成纤维样滑膜细胞增殖的影响及其机制研究[J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(4): 661.
- [13] 陶惠红, 陆建民, 褚亚萍, 等. 类风湿关节炎社区防治路径的可行性分析[J]. 中华全科医学, 2011, 9(12): 1912.
- [14] 吉恒东, 邹红梅, 路峰, 等. 类风湿关节炎心脏损害 36 例临床分析[J]. 中华全科医学, 2011, 9(3): 403.