

# 补肾活血方对膝骨性关节炎模型家兔硫酸软骨素的影响

★ 陈云凤\* 宋春 雷明胜 陈久毅 (江西医学院上饶分院外科教研室 上饶 334000)

**摘要:**目的:探讨补肾活血方对膝骨性关节炎模型家兔关节软骨中硫酸软骨素含量的影响。方法:54只10月龄日本大耳白兔,随机分为正常组、模型组、中药组各18只。采用兔右膝关节腔内注入木瓜蛋白酶建立骨性关节炎模型。造模成功后,模型组给予9.0 g/L氯化钠注射液,中药组给予补肾活血中药灌服,正常组正常饲养。分别于灌胃的4、8、12周后分批取材并测定各组关节软骨中硫酸软骨素含量。结果:模型组硫酸软骨素含量低于正常组,两者差异显著( $P < 0.05$ )。中药组硫酸软骨素含量高于模型组,有显著性差异( $P < 0.05$ );且随着时间延长,中药组硫酸软骨素的含量升高趋势明显,8周与4周的测定值相比、12周与8周的测定值相比有极显著差异( $P < 0.05$ )。结论:补肾活血方可提高膝骨性关节炎模型家兔关节软骨中硫酸软骨素的含量,且随着疗程的延长作用明显,从而起到防治骨性关节炎的作用。

**关键词:**骨性关节炎 硫酸软骨素 补肾活血方

**中图分类号:**R 268.43 **文献标识码:**A

**Abstract:** Objective: To study the effect of BuShenHuoXueFang on chondroitin sulfate in cartilage matrix of rabbit's knee osteoarthritis, at the same time to elucidate the relationship between BuShenHuoXueFang and chondroitin sulfate in articular cartilage matrix of osteoarthritis. Methods: Fifty-four Japan's white rabbits with big ears were divided into three groups on average; each group with eighteen rabbits, the first experimental group and the second experimental group were injected with Papain into the rabbit's knee joint cavity. After the first group and the second group were successfully remodeled osteoarthritis, the first group were poured into stomach with 0.9% NS and the second group were poured into stomach with decoction of BuShenHuoXueFang, the third group were feed commonly. At 4th, 8th, 12th week six rabbits of each group were killed in order to determine the content of chondroitin sulfate in articular cartilage matrix. Result: The contents of chondroitin sulfate in the first group were lower than the third group ( $P < 0.05$ ). The contents of chondroitin sulfate in the second group were higher than the third group ( $P < 0.05$ ). At eighth week the contents of chondroitin sulfate in the second experimental group were higher than those of at fourth week ( $P < 0.05$ ). At twelfth weeks the contents of chondroitin sulfate in the second experimental group were much higher than those of at eight weeks ( $P < 0.01$ ). Conclusion: BuShenHuoXueFang can improve the content of chondroitin sulfate in cartilage matrix of rabbit's knee osteoarthritis, when the time of treatment with decoction of BuShenHuoXueFang is longer, the effect is more obvious.

**Key words:** osteoarthritis; chondroitin sulfate; BuShenHuoXueFang

骨性关节炎(osteoarthritis, OA)是中老年人的常见疾患,主要病理特征是关节软骨的退变。汪晓丹等<sup>[1]</sup>通过对关节软骨生化成份的研究表明:年幼者关节软骨硫酸软骨素含量较高,软骨的刚性与弹性较高;而年长者硫酸角质素和蛋白质的含量及纤维化程度增高;硫酸软骨素减少可能是软骨退变的重要原因之一。补肾活血方在我院既往的骨性关节炎治疗中取得良好的效果,能减轻骨性关节炎的临床症状,改善关节功能。为此笔者通过研究补肾活血方对膝骨性关节炎模型家兔关节软骨中硫酸软骨素

水平的影响,以期阐明其部分作用机理。

## 1 材料

1.1 实验动物 10月龄普通级日本大耳白兔54只,体重2.5~3.5 kg,雌雄不限(由贵阳医学院实验动物中心提供,合格证号:SCXK(黔)2002-0001,饲料由该中心提供标准饲料)。按照组间均衡一致的原则,将54只日本大耳白兔随机分成3组,正常组、模型组、中药组各18只。

1.2 实验主要试剂与仪器 木瓜蛋白酶(Papain):Merk公司产品,批号:10/20002;硫酸软骨素标准

\* 通讯作者:陈云凤(1967-),男,汉族,副教授,硕士。E-mail:ffengyun@126.com。

品:Sigma 公司产品,批号:39455-18-0;胰蛋白酶、胃蛋白酶、HCl、NaOH、高岭土、活性炭、95% 乙醇、乙醚、骨科常用手术器械、温度计、滤纸、分液漏斗、离心机、干燥器、试管、恒温水浴箱、冷冻库、紫外分光光度计、间苯三酚、冰醋酸、超声波清洗机、全自动电子分析天平。

1.3 实验药物 补肾活血方由熟地、淮山药、山萸肉、牛膝、茯苓、当归、桃仁、红花、丹皮、玄胡索、淫羊藿等组成,中药按原方以蒸馏水煎煮 30 min,过滤提纯并浓缩为浓度为 1 g/ml (100%) 的溶液,贮于冰箱中备用。

## 2 方法

2.1 造模 按照日本鬼头康彦等<sup>[2]</sup>的兔膝关节腔内注入木瓜蛋白酶造成骨关节炎病变模型方法,将日本大耳白兔右膝关节腔内注入 1.6% 木瓜蛋白酶生理盐水溶液 0.5 ml,隔 2 d 后再注射第 2 次,再隔 2 d 后注射第 3 次,共注射 3 次。

2.2 给药与取材 54 只健康日本大耳白兔正常饲养 1 周后,模型组和中药组按上述造模方法造模。于末次造模注射后的第 28 d 开始,模型组给予 0.9NS 8.4 ml/(kg·d)灌胃每天一次,中药组给予 1 g/ml (100%) 的补肾活血方中药汤剂 8.4 ml/(kg·d),相当于原生药 8.4 ml/(kg·d)。正常组按正常饲养。4、8、12 周后,正常组、模型组、中药组每次 6 只取软骨后宰杀,留取标本。

2.3 硫酸软骨素的提取 参照邬开朗<sup>[3]</sup>等与罗曼等<sup>[4]</sup>的方法并作改进。

(1)高温蒸煮与碱解:将软骨投入恒温蒸煮器内于 80 ℃煮 4~6 h,蒸馏水洗净,放入冷库于 -25 ℃速冻 6~8 h 后立即绞碎,称重后按原料与 2% NaOH 的比例为 1:6.25 的量加入 2% NaOH,室温提取 1.5 h,然后用 2 mol/L HCl 调 pH 到 6~6.5,定量滤纸、漏斗过滤。留下滤液。滤渣再以 1:0.12 的比例加 2% NaOH,于 40℃下提取 1 h,再用定量滤纸过滤,弃滤渣,取滤液。合并两次滤液,并测量体积待用。

(2)酶解:滤液用 2 mol/L HCl 调 pH 到 8.0~9.0,按滤液与胰蛋白酶 1000:0.5 的比例加入胰酶,于 40~50 ℃水解 1 h 后,再按 1000:0.5 的比例加入胃蛋白酶,40~50 ℃水解 1.5 h。水解完毕后定量滤纸过滤并加入高岭土和活性炭(使其浓度为 0.5%)进行吸附,同时慢速间歇搅拌 4 h,置 4℃下自然澄清,取上清液,弃沉淀。

(3)反萃取:按体积比 1:1 向上清液中加入氯仿充分混合,静置待分层后弃去氯仿层,留水层。

(4)沉淀:将上述水层,调 pH 到 6.8~7.2,再加入 2.5 体积 95% 以上乙醇沉淀,待澄清后,弃清液,以 1 500 r/min 离心 7~10 min,收集沉淀,其沉淀物即为硫酸软骨素。

(5)干燥:将上述沉淀于盛有五氧化二磷的干燥器中即得成品。

2.4 硫酸软骨素质量的测定 参照高华等<sup>[5]</sup>与齐敬总等<sup>[6]</sup>的硫酸软骨素含量测定的方法。

原理:利用硫酸软骨素(CS)与含有间苯三酚的无机酸在 100 ℃反应 30 min,生成有色物质在波长 558 nm 处有最大吸收,通过比色测定硫酸软骨素的含量。

(1)硫酸软骨素标准溶液的配制:准确称取已干燥至恒重的硫酸软骨素 0.25 g,于 25 ml 量瓶中,加蒸馏水使其溶解稀释至刻度并摇匀。

(2)间苯三酚溶液(反应试剂)的配制:取冰醋酸 30 ml,盐酸 40 ml 和 50 mg/ml 间苯三酚乙醇溶液 10 ml 混合(临用时配制)。

(3)吸收光谱的测定:准确吸取硫酸软骨素标准溶液 0.4 ml,置于 10 ml 量瓶中,用蒸馏水稀释至 1.0 ml,加入间苯三酚溶液 3 ml,盖塞后混匀。将量瓶置于沸水浴中加热 30 min 后取出,立即置于冰水浴中冷却 5 min,用冰醋酸稀释至刻度,混匀,以试剂空白为参比,在 400~800 nm 波长范围内扫描。见在波长 558 nm 处有最大吸收。选择波长 558 nm 作为测定波长。

(4)绘制标准曲线:吸收硫酸软骨素标准溶液,分别配制浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.00 mg/ml 溶液,同(3)步操作,在波长 558 nm 处测定吸收度,以吸收度为纵坐标,浓度为横坐标,绘制标准曲线。得其回归方程。

(5)硫酸软骨素(CS)的样品测定:取 105 ℃干燥至恒重的硫酸软骨素(CS)的样品,精密称定其质量,置 100 ml 量瓶中,加蒸馏水适量溶解,并加蒸馏水至刻度,摇匀。取 1 ml 溶液,按上述方法测定。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 统计学软件统计,用 *t* 检验。

## 3 结果

硫酸软骨素的含量模型组与正常对照组相比 4 周有显著差异( $P < 0.05$ ),8、12 周时有极显著差异( $P < 0.01$ );模型组硫酸软骨素的含量呈下降趋势,但 8、12 周的测定值之间无显著差异( $P > 0.05$ )。中药组与模型组相比硫酸软骨素测定值 4、8、12 周时有显著差异( $P < 0.05$ );中药组硫酸软骨素的含量呈上升趋势,8 周与 4 周的测定值之间、12 周与 8

周的测定值之间有显著差异( $P < 0.05$ )。见表1。

表1 硫酸软骨素的含量

| 时间   | 例数(n) | 组别  | 硫酸软骨含量/mg     |
|------|-------|-----|---------------|
| 4周后  | 6     | 正常组 | 9.87 ± 0.30   |
|      | 6     | 模型组 | 7.57 ± 0.25●  |
|      | 6     | 中药组 | 8.25 ± 0.21◆  |
| 8周后  | 6     | 正常组 | 9.81 ± 0.38   |
|      | 6     | 模型组 | 5.47 ± 0.35▲■ |
|      | 6     | 中药组 | 8.87 ± 0.19◆■ |
| 12周后 | 6     | 正常组 | 9.63 ± 0.42   |
|      | 6     | 模型组 | 4.90 ± 0.20▲○ |
|      | 6     | 中药组 | 9.47 ± 0.28☆☆ |

●与正常组比  $P < 0.05$ , ▲与正常组比  $P < 0.01$ , ◆与模型组比  $P < 0.05$ , ☆与模型组比  $P < 0.01$ , ■同组4周与8周比  $P < 0.05$ , \*同组8周与12周比  $P < 0.05$ , ○同组8周与12周比  $P > 0.05$ 。

#### 4 讨论

骨性关节炎的实质是软骨的退行性改变,其中包括软骨结构及成分的改变。一系列的研究证明,无论是人还是动物模型的骨性关节炎病变软骨,软骨基质所含的蛋白多糖渐进性减少,而胶原的含量则相对稳定不变。薛延等<sup>[7]</sup>研究证明,随着年龄的增长软骨基质中蛋白多糖的主要改变表现在:大分子降解成小分子,糖醛的含量减少,硫酸软骨素和半乳糖胺的比例降低,而硫酸角质素和蛋白质的比例增高。

关节软骨由维持功能的细胞外基质及软骨细胞组成,基质占了软骨绝大部分体积,而软骨细胞仅占软骨容积的1%。软骨基质由胶原、蛋白多糖、水三种物质组成。软骨的蛋白多糖主要有4-与6-硫酸软骨素同分异构体、硫酸皮肤素、硫酸角质素三种类型。蛋白多糖的合成中硫酸软骨素在Ser-Gly序列中通过独特的四糖与特定的丝氨酸残基相连。蛋白多糖的分解,核心蛋白的裂解部位位于G1结构域(透明质酸结合区域)和G2结构域(富含硫酸软骨素、富含硫酸角质素区域),把蛋白多糖上的聚合部份与含糖胺聚糖链的部份分解开,这些裂解片区域从软骨中排出,这些片断可以在关节液中找到,并可通过滑膜进入淋巴系统,沿淋巴系统至血液循环,甚至在尿中被发现,在体液、至少在关节液中可以定量分析蛋白多糖片断(硫酸软骨素)的水平,此值可以测定关节软骨的活性与代谢<sup>[8]</sup>。当关节软骨退变时蛋白多糖的分解加快,故我们可以测定关节软骨中硫酸软骨素的含量以了解关节软骨的退变情况。

骨性关节炎属于祖国医学之“痹症”,“骨痹”范围。临床上对该病病机的认识基本趋于一致<sup>[9]</sup>,即“本虚标实”,肝肾亏虚为本、血脉不利为标,故治疗

多以补益肝肾、活血化瘀为法。贵阳中医学院陈久毅教授根据上述理论组成补肾活血方,在临床上取得良好的效果。方中熟地补血滋阴、益精填髓,淮山药补脾养胃、生津益肺、补肾涩精,山萸肉补益肝肾、涩精固涩,淫羊藿补肾阳、强筋骨、祛风湿,当归活血补血,桃仁与红花活血化瘀,赤芍清热凉血、活血化瘀消肿,玄胡索活血行气止痛,牛膝活血补肾并引药下行,诸药合用共奏补益肝肾、活血逐瘀之功,因而取较好的疗效。

本实验采用木瓜蛋白酶所致骨性关节炎模型,测定正常组、模型组、中药组膝骨性关节炎关节软骨中硫酸软骨素的含量,实验所得的数据经统计学处理显示为硫酸软骨素的含量模型组呈下降趋势,中药组硫酸软骨素的含量呈上升趋势,中药组与模型组相比4、8、12周时的测定值有显著差异,故可认为补肾活血方可提高膝骨性关节炎模型家兔关节软骨中硫酸软骨素的含量,且随着疗程的延长作用明显,从而起到防治骨性关节炎的作用。活体内软骨处在不断代谢之中,蛋白多糖、胶原均由软骨细胞合成,分解与合成代谢在正常软骨中维持平衡,骨性关节炎时,分解加强,以致基质丢失,补肾活血方提高实验性膝骨关节炎软骨基质中硫酸软骨素的含量的机制是加快了其合成代谢亦还是抑制了其分解代谢亦或是两者兼而有之,其具体机制值得我们进一步探索。

#### 参考文献

- [1]汪晓丹,杨立民,曾琦,等.不同年龄兔关节软骨生化成分的测定[J].骨与关节损伤杂志,1990,5(2):85-87.
- [2]Kitoh Y, Katsuvamaki T, Tanaka H, et al. Effect of SL-1010 (Sodium hyaluronate with high molecular weight) on experimental osteoarthritis induced by intra-articularly applied papain in rabbits[J]. Folia pharmacol japon, 1992, 100: 67.
- [3]郭开明,邹国林.硫酸软骨素快速提取法研究[J].氨基酸和生物资源,2000,22(37):20-23.
- [4]罗曼,蒋立科.硫酸软骨素快速提取法研究[J].动物学杂志,2000,35(05):37-39.
- [5]高华,刘坤等.间苯三酚分光光度法测定硫酸软骨素的研究[J].中国生化药物杂志,2000,21(5):247-248.
- [6]齐敬总,同晓玲等.硫酸软骨素含量测定方法介绍[J].中国生化药物杂志,2002,23(3):162-163.
- [7]薛延等.人股骨头关节软骨蛋白多糖的研究[J].创伤骨科科学报,1987,1:4.
- [8]赵钟岳,李世民,姜思权,等.关节外科学[M].天津:天津科学技术出版社,2002;1 283-1 308.
- [9]阚卫兵,姜玉祥.补肾活血方治疗膝骨性关节炎56例[J].河南中医杂志,2006,26(12):41.

(收稿日期:2008-10-17)