

# 骨生注射液对实验性骨性关节炎家兔血浆 SOD 和 MDA 的影响

江中潮<sup>1</sup>, 何洪阳<sup>1</sup>, 刘罡<sup>2</sup>, 邓友章<sup>1</sup>, 黄勇<sup>1</sup>, 刘毅<sup>3</sup>, 肖裕华<sup>3</sup>

(1. 成都中医药大学附属医院骨科, 四川 成都 610072; 2. 成都军区陆军第 42 医院骨科; 3. 成都中医药大学骨科研究生)

**摘要 目的:**探讨骨生注射液对骨性关节炎的治疗作用。**方法:**用日本大耳白兔造成骨性关节炎模型并分组治疗, 观察各组动物的组织学变化并将血浆超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)作为观测指标。**结果:**光镜下显示模型组胫骨侧软骨坏死脱落, 骨质裸露, SOD 下降, MDA 上升。经骨生注射液治疗, 可见蓝绿色胶原保留达 1/2 以上, 血中 SOD 明显升高, MDA 下降。**结论:**骨生注射液能有效对抗关节炎软骨退变, 增强机体清除自由基的能力, 治疗骨性关节炎。

**关键词** 骨性关节炎; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

## Experimental research of the effect of "Gusheng injection" on plasm SOD and MDA of osteoarthritic rabbits

JIANG Zhong-chao, HE Hong-yang, LIU Gang, DENG You-zhang, HUANG Yong, LIU Yi, XIAO Yu-hua. Department of Orthopaedics, the Affiliated Hospital of Chengdu University of TCM (Sichuan Chengdu, 610072, China)

**Abstract Objective:** To explore the effect of "Gusheng injection" (GSI) on the treatment of osteoarthritic (OA). **Methods:** OA experimental models were made in Japanese white rabbits. The rabbits were divided into different groups for different treatment. Histological changes of superoxide dismutase(SOD) and MDA were observed. **Results:** In the model group, necrosis and exfoliation of tibial cartilage and exposed subchondral bone were observed with light microscope. SOD level decreased and MDA level increased in plasm. However, in the GSI group, more than 1/2 collagen were kept. SOD level obviously increased and MDA level decreased in plasm. **Conclusion:** GSI can prevent degeneration of articular cartilage, improve the ability to clear free radical. There is reasonable effect for the treatment of OA.

**Key words** Osteoarthritis; SOD; MDA

骨性关节炎是骨内压力增加导致骨内动脉血灌注减少, 供氧不足, 酸性产物淤积, 滑膜分泌酸性滑液, 从而导致关节软骨营养障碍而发生的退行性病变。本实验是以川芎嗪和丹参酮为主要成份的骨生注射液治疗兔膝骨性关节炎的动物实验。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 实验动物** 6~8 月龄日本大耳白兔 40 只, 体重 2.5~3 kg, 由成都中医药大学动物实验中心提供。

**1.1.2 主要试剂** 超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛

(MDA)测定试剂盒, 由南京建成生物工程研究所提供。

**1.1.3 实验仪器** Olympus 光学显微镜, 组织切片分析系统, 可见光分光光度计。

**1.1.4 主要药物** 骨生注射液以川芎嗪和丹参酮为主要成份, 由成都市药物制剂研究所提供。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 动物造模** 以 6% 异戊巴比妥钠按 45 ml/kg 作静脉注射麻醉。兔呈仰卧位, 随机于左或右腹股沟处作 1 cm 长纵形切口, 紧靠腹股沟韧带分离股静脉并作双重结扎后切断, 并于该侧臀部髌关节后外侧坐骨结节附近作一小切口, 分离出髌内静脉分支、臀下静脉结扎切断。分层缝合消毒后, 用树脂石膏固定该侧膝关节于伸直位。每只实验兔术后肌注青

霉素预防感染。

1.2.2 动物分组及给药 40 只实验兔随机选取 10 只作为空白对照组,其余 30 只用于造模,造模手术成功后将这 30 只实验兔随机分为骨生注射液治疗组、生理盐水组、模型组。骨生注射液组和生理盐水组,每周于手术侧胫骨平台下 1~1.5 cm 内侧做胫骨髓腔穿刺并分别注射骨生注射液或生理盐水 1 ml,每周 2 次。5 周时,各组去除外固定并随机处死 3 只动物,做病理学切片。继续以上实验第 11 周时处死余下动物,做病理学切片。

1.2.3 组织学检查 动物处死后,立即切取胫骨平台内侧关节面的完整软骨及软骨下骨组织标本,用 10% 的甲醛溶液固定 48 h,脱钙 2~3 d,石蜡纵向包埋固定,常规切片,HE 及 Masson 三色染色。观察软骨层坏死脱落程度,软骨细胞增生情况,潮标线和哈氏管的病理改变,软骨中正常的 II 型胶原变性成为 I 型胶原的病理改变程度。

1.2.4 血浆 SOD、MDA 测定 各实验兔分别在 5、8、11 周时于手术侧胫骨平台下 1~1.5 cm 内侧做髓腔穿刺抽取髓血 3 ml,检测血浆 SOD 活力,用化学比色法,单位为 NU/mgprot。检测血浆 MDA 含量用比色法,单位为 nmol/L。

1.2.5 统计学处理:采用 SPSS 统计软件进行统计学处理,各组实验动物所有参数均以均数 ± 标准差表示,组间差异采用方差分析,显著性 t 检验。

## 2 结果

### 2.1 胫骨平台内侧关节面的光镜观察

2.1.1 对照组 对照组各期标本关节软骨细胞排列规则,滑动层、过渡带、放射带、钙化层,四层清晰,潮标明显,无炎细胞浸润。Masson 三色染色正常软骨胶呈蓝绿色,钙化软骨及骨小梁胶原呈红色。在实验期间,病理学检查未见明显变化。

2.1.2 模型组及生理盐水组 5 周时即可见关节软骨细胞排列不规则,软骨表面粗糙,有裂隙,可深达钙化层,软骨层次紊乱,不易辨认,潮标不完整,各层细胞增生,巢状增生也常见。Masson 染色可见蓝绿色(代表正常 II 型胶原)丢失严重,从潮标向上有许多呈火焰状向上升起的红染物,其着色同钙化软骨,系软骨中正常的 II 型胶原变性为 I 型胶原,软骨下哈氏管充血、扩张。随着时间推移,软骨蚀损面积继续,11 周时软骨全层坏死脱落,骨质裸露 Masson 三色染色见软骨浅层仅保留小部分蓝绿色胶原,即绝大多 II 型胶原已变性为 I 型。

2.1.3 骨生注射液治疗组 5 周时关节软骨细胞排列不规则,软骨表面粗糙程度不及模型组及生理盐水注射液组,裂隙较浅,潮标基本完整,Masson 染色见蓝绿色丢失较少,11 周时未出现软骨全层坏死脱落和骨质裸露,软骨正常的 II 型胶原保留达 1/2 以上。

2.2 血浆 SOD 和 MDA 的变化 模型组、生理盐水组髓血中 SOD 活性及 MDA 含量与对照组比较差异有高度显著性(P<0.01),见表 1,2。骨生注射液治疗组与模型组、生理盐水组比较差异有显著性(P<0.05)。说明造模使实验动物自由基清除能力明显下降,符合骨性关节炎病理变化,支持造模成功。经骨生注射液治疗,SOD 明显升高,MDA 下降。说明骨生注射液能增强机体清除自由基的能力。

表 1 血浆 SOD 变化( $\bar{x} \pm s$ , NU/mgprot)

Tab.1 Changes of plasma SOD ( $\bar{x} \pm s$ , NU/mgprot)

组别	5 周	8 周	11 周
对照组	110.5 ± 10.2	108.0 ± 12.3	109.0 ± 13.1
模型组	85.8 ± 15.2 <sup>△△</sup>	88.6 ± 18.1 <sup>△△</sup>	89.0 ± 18.8 <sup>△△</sup>
生理盐水组	86.0 ± 14.6 <sup>△△</sup>	88.0 ± 18.3 <sup>△△</sup>	88.5 ± 18.6 <sup>△△</sup>
骨生注射液组	96.5 ± 14.5 <sup>*△</sup>	98.5 ± 18.3 <sup>*△</sup>	98.5 ± 18.5 <sup>*△</sup>

注:模型组、生理盐水组、骨生注射液组与对照组比较,△P<0.05,△△P<0.01;骨生注射液组与模型组、生理盐水组比较,\*P<0.05,\*△P<0.01。

表 2 血浆 MDA 的变化( $\bar{x} \pm s$ , nmol/L)

Tab.2 Changes of plasma MDA ( $\bar{x} \pm s$ , nmol/L)

组别	5 周	8 周	11 周
对照组	3.0 ± 0.3	3.0 ± 0.3	3.0 ± 0.3
模型组	5.0 ± 0.7 <sup>△△</sup>	5.8 ± 1.1 <sup>△△</sup>	5.6 ± 1.7 <sup>△△</sup>
生理盐水组	4.9 ± 0.8 <sup>△△</sup>	4.8 ± 1.0 <sup>△△</sup>	4.9 ± 1.2 <sup>△△</sup>
骨生注射液组	3.9 ± 0.4 <sup>*△</sup>	3.8 ± 1.0 <sup>*△</sup>	3.8 ± 0.6 <sup>*△</sup>

注:模型组、生理盐水组、骨生注射液组与对照组比较,△P<0.05,△△P<0.01;骨生注射液组与模型组、生理盐水组比较,\*P<0.05,\*△P<0.01。

## 3 讨论

自由基是具有未配对电子的原子、分子或基因,是一种稳定的结构状态,具有活动的化学性质。参与生命现象的自由基,称为生物自由基,人体内总自由基中的 95% 以上是氧自由基,氧自由基往往是其他自由基生成的原因<sup>[1]</sup>,在生物体内主要是活性氧、超氧阴离子自由基等,它们都是引发脂质过氧化反应的氧化剂<sup>[2]</sup>。在正常情况下,由于体内存在自由基清除剂,如超氧化物歧化酶(SOD)及谷胱甘肽过氧化酶及过氧化氢酶等,体内自由基的产生与清除保持相对平衡<sup>[3]</sup>。OA 患者体内氧自由基含量增高,关节内过量的氧自由基抑制软骨细胞增殖引起软骨细

胞死亡,抑制软骨基质蛋白多糖和胶原的合成加速软骨基质的降解,导致软骨细胞损伤。MDA 是脂质过氧化的产物,SOD 是超氧阴离子的清除剂,测定 MDA 和 SOD 的含量可间接的反映体内氧自由基的高低<sup>[4]</sup>。软骨组织由软骨细胞和软骨基质构成,胶原和蛋白多糖是软骨基质的两个主要成分,蛋白多糖是由硫酸骨素和硫酸角质素构成的糖胺多糖,有人<sup>[5]</sup>实验测定软骨细胞的生物合成功能,发现 OA 病变初期,软骨组织中蛋白多糖的含量比正常对照组高 15~25 倍,同时应用同位素掺入放射自显影,推测软骨细胞的数目,发现 OA 软骨组织中细胞数目比正常高 15% 左右,个别标本高 30%,认为 OA 病程初期细胞增生活跃,基质合成增加。活性氧自由基可直接攻击软骨细胞 DNA,使其发生氧化性损伤,数氢氧自由基在 DNA 内引起碱基和糖基的改变,以及核蛋白中 DNA 蛋白交链,从而使软骨胶原蛋白僵硬,失去弹性。氧自由基同时造成 II 型胶原蛋白的氧化损伤,导致氨基酸含量及胶原蛋白的构象改变<sup>[6]</sup>,关节软骨表面胶原纤维的破坏,一方面使蛋白多糖发生流失,另一方面由于失去了正常的弹性,从而不能有效地保护软骨细胞,使软骨发生营养障碍,不再分泌基质,产生胶原纤维,从而使软骨进一步损害。氧自由基对软骨细胞的损害不仅表现在细胞形态和生长状况的改变,也影响到细胞的功能,使软骨细胞合成、分泌蛋白多糖、胶原蛋白的功能发生改变,胶原蛋白和蛋白多糖是软骨基质中的两个主要成分,在维持软骨的强度、关节软骨的弹性方面起着重要作用<sup>[7]</sup>。基质中这两种主要成分的改变,进一步引起软骨细胞的退化和死亡。

祖国医学称骨性关节炎为“骨痹”、“痛痹”。其

病因为肾虚和血瘀两个方面,其中肾虚为本,血瘀为标。治疗多从“补肾”抗衰老和“活血化瘀”两方面着手。骨性关节炎好发于老年患者,有资料表明随着年龄的增长,机体清除自由基的能力逐渐下降,表现为 SOD 降低<sup>[8]</sup>。“补肾”的生物学内涵应该包括提高机体清除自由基的能力,现代有许多关于活血化瘀治疗骨性关节炎的研究,而骨生注射液以川芎嗪和丹参酮为主要成分,具有很强的活血化瘀功效,据现代药理研究,川芎嗪对黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶体系产生的超氧离子自由基具有明显的清除作用<sup>[9]</sup>,丹参不仅对氧自由基具有清除作用,同时还可以提高 SOD 的活性。本实验证实骨生注射液通过提高实验兔对自由基的清除能力,从而预防和延迟了实验兔骨性关节炎的发生和发展。

#### 参考文献

- 1 赵克然 氧自由基与临床 北京:中国医药科技出版社,1999.11
- 2 郑召民,许振华.骨内高压与活血化瘀 中国中医骨伤科杂志,1994,2(3):43-47
- 3 王羽丰,许学猛 补肾活血胶囊影响兔膝关节退变性疾病组织形态学的实验研究 中国中医骨伤科杂志,1999,7(4):9-12
- 4 Miyagi I, Kikuchi H, Hamanishi C. Auto destroyio of the articular cartilage and free radical mediators. J Lab Clin Med, 1998, 131: 146
- 5 Hellio-Le-Graverand Mp, Vignon E, Otteness IG. Early changes in Lapine Menisci during osteoarthritis development; Part 2: molecular alterations. Osteoarthritis-Cartilage, 2001, 9(1): 65-72
- 6 孙刚 骨内静脉瘀滞与骨内高压在骨性关节炎发病中的作用初探 中华骨科杂志, 1991, 11(5): 374-376
- 7 雷载权,张庭模 中华临床中药学 北京:人民卫生出版社,1998 236
- 8 张文彭,王魏,王普桦,等 老年肾虚证血浆过氧化化脂质高密度胆固醇及组分水平变化 中医杂志,1989,30(2):43-46
- 9 张法浩 自由基在大骨节病病理过程中的作用 北京医科大学报, 1989,21(6):475-493.

(收稿日期:2003-01-13 本文编辑:王宏)

## 2005 年征订启事

《中华创伤骨科杂志》(CN44-1568/R,ISSN 1671-7600)为月刊,A4 开本,每期 120 页,铜版纸印刷,每月 15 日出版,每期定价 16 元,由邮局发行,国内邮发代号 46—248,国际 Q1671。本刊编辑部全年接受征订邮购,全年 192 元(免邮费)。地址:广州市广州大道北 1838 号南方医院内《中华创伤骨科杂志》编辑部 邮编:510515 电话:020-61641748 传真:020-61360066 E-mail: gjot@fimmu.com 网址: http://www.chunot.com

《中国脊柱脊髓杂志》为月刊,正文 64 页,每月 10 日出版 全册铜版纸印刷,并附彩色插页。每期定价 9.80 元,全年 117.60 元。全国各地邮局均可订阅,邮发代号 82—457。国外读者订阅请与中国国际图书贸易公司中文报刊科联系(100044,北京车公庄西路 35 号,代号: M6688)。本刊经理部随时为国内外读者代办邮购(平邮免费)。地址:北京市朝阳区樱花园东街中日友好医院内,邮编:100029,电话:(010) 64284923,64206649。E-mail: cspme@263.net.cn

《中国矫形外科杂志》系半月刊,全年 24 期,每期内容同时出版两种版本:胶版纸定价 6.25 元,全年 150 元;铜版纸定价 10 元,全年 240 元。读者可任意选定。凡个人定购者,免费参加本刊“继教”栏目学习,年终可获中华医学会颁发的国家 II 类继续教育分 24 分。邮发代号:24—097,欢迎直接从本刊编辑发行部订购。地址:山东泰安 88 医院全军骨科研究所 邮编:271000 电话/传真:0538-6213228

《临床骨科杂志》(ISSN 1008-0287 CN 34-1166/R)2005 年改为双月刊,国内外公开发行人,为国家科技部中国科技论文统计源期刊(即中国科技核心期刊),中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊。本刊邮发代号:26—147,请在当地邮局订阅。漏订者可直接向本刊编辑部邮购。每本单价 9 元,全年 54 元。联系电话:0551-2923133;传真:0551-3664966;E-mail: gukezhazh@mail.hf.ah.cn