

· 研究简报 ·

古方豨豨丸对膝骨性关节炎模型家兔关节液中 L-1、TNF- α 含量及关节软骨细胞形态学的影响Effect of Xiqian pill (豨豨丸) on L-1 and TNF- α contents in joint fluid and cell morphology of articular cartilage of model rabbits with knee osteoarthritis郭礼跃¹, 胡慧华², 米健国¹

GUO Li-yue, HU Hui-hua, MI Jian-guo

关键词 骨关节炎; 膝; 中药疗法; 动物; 试验 Key words Osteoarthritis, knee; Treatment with Chinese herbs; Animals, laboratory

宋代《证类本草》中收载有一个豨豨丸(即古方豨豨丸),为单一豨豨草的嫩茎叶,经用酒蒸制9次后制备成的蜜丸。豨豨丸最早记载的主治是中风,宋代《南阳活人书》记载:主治风、寒、湿之气,着而成痹,以致血脉凝涩,肢体麻木,腰膝酸痛,二便燥结,无论痛风痛痹,湿痰风热,宜于久服。近代临床已很少用其治疗中风,主要使用其治疗风湿痹痛和肝肾不足、风湿瘀阻所致的骨性关节炎,既可祛风除湿、化痰通痹以治标,又可滋补肝肾、强筋健骨,调除四肢麻痹、腰膝无力以治本。因此下面将要探讨对古老验方豨豨丸治疗实验性膝骨性关节炎的药效、作用机制进行探讨,为豨豨丸治疗骨性关节炎提供实验依据。

1 材料与试剂

1.1 实验动物 长耳大白兔,4月龄,32只,体重为2.5~3.5 kg,雌性。由北京市海淀区通利实验动物养殖场提供,寄养在北京市芳缘园动物饲养厂。合格证号:SCXK(京)2000-0018。

1.2 受试药物 豨豨丸:主要成分为豨豨草嫩茎叶,每颗豨豨丸内含生药9 g,由贵阳医学院第二附属医院自制。制备过程:酒蒸豨豨草嫩茎叶。用20%黄酒拌匀,加盖闷润至酒液吸尽,隔水蒸制30 min,取出,放凉,倒入白瓷盘中晒干,再加入20%黄酒再蒸再晒,如此九蒸九晒,制备成细粉(100目)备用。芬必得,批号:03080422,厂家:中美天津史克制药有限公司。缓释胶囊:每粒0.3 g。家兔用量按人每公斤体重用量的20倍给药。

1.3 石膏管形固定致兔膝骨性关节炎模型造模方法^[1] 取健康家兔,将左侧膝关节伸直,用石膏外周固定1圈,使左侧膝关节不能活动,制作膝骨性关节炎模型。

1.4 实验分组及给药方法 按照组间均衡一致的原则,将32只家兔用完全随机数字法分为4组,每组8只:A为正常对照组,B为模型对照组,C为阳性药组(芬必得:每天0.03 g/kg添加于饲料中喂食),D为豨豨丸组(豨豨丸:每天2 g/kg

添加于饲料中喂食)。

1.5 观察指标与方法 取家兔24只,按上述造模方法造模,另设一正常对照组8只。造模6周后开始给药。将芬必得和酒蒸豨豨草的药粉分别以1:200和1:1的比例添加于饲料配方中自制成饲料,每日早上1次给足一天剂量的含药饲料,待含药饲料吃完后再添加普通饲料,正常饮水。每晚少给普通饲料。A组(正常组)、B组(模型组)同样方法只给普通饲料。

1.5.1 关节液中 L-1、TNF- α 含量检测 连续给药4周(即造模10周)后,处死家兔。去除石膏,打开左侧膝关节囊,取关节液不少于200 μ l, -20 $^{\circ}$ C保存,留待检测其中 L-1 和 TNF- α 含量。白介素的测量方法按药盒说明操作。

1.5.2 光镜标本和电镜标本的制备 上述连续给药4周(即造模10周)的家兔处死后,迅速切取左侧股骨内踝关节软骨,修成5 mm \times 5 mm \times 5 mm大小组织块,于1 min内置于10%甲醛中固定,系列脱水,常规石蜡包埋,切片,HE染色,备片,供光学显微镜观察有关的形态学变化。

迅速切取左侧股骨内踝关节软骨,修成1 mm \times 1 mm \times 2 mm大小长条组织块,投入3%戊二醛酸溶液中固定24 h,用0.1 M磷酸缓冲液冲洗3次,加0.1%四氧化锇固定90 min,去离子水冲洗3次,终止锇酸反应,用不同浓度丙酮逐级脱水,以61G环氧树脂浸透,包埋,硬化修块半薄片定位后,超薄切片,厚度0.05 mm,经电子染色后电镜下观察软骨细胞形态变化及其周围胶原纤维的变化。

1.6 统计学处理 用SPSS 11.0统计软件进行数据处理,实验结果均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用成组设计定量资料的t检验对关节液中 L-1、TNF- α 含量进行统计学分析。

2 结果

2.1 关节液中 L-1、TNF- α 含量检测结果 见表1。结果表明:与正常组比较,模型组关节液中 L-1 和 TNF- α 的含量明显升高,差异有显著性意义($t = 15.06$ 及 $t = 8.04$, $P < 0.01$)。说明造模后关节部位确有炎症发生,而芬必得组与模型组比较差异有显著性意义($t = 5.078$ 及 $t = 3.45$,

1. 贵阳医学院第二附属医院骨科,贵州 贵阳 550000; 2. 北京中医药大学药理学系

$P < 0.01$),说明造模是成功的。豨莶丸组较模型组关节液中 L-1 和 TNF- 含量降低,有统计学意义 ($t = 2.75$ 及 $t = 2.60$, $P < 0.05$),说明古方豨莶丸能降低实验动物关节液中 L-1 和 TNF- 的含量,具有一定的抗炎作用。

表 1 古方豨莶丸对家兔膝骨性关节炎模型关节液中 L-1、TNF- 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (n)	剂量 (g/kg)	L-1 含量 (ng/ml)	TNF- 含量 (ng/ml)
正常组	8	—	3.00 \pm 2.79**	0.11 \pm 0.03**
模型组	8	—	31.17 \pm 4.50	38.39 \pm 13.46
芬必得组	8	0.03	18.51 \pm 5.43**	19.06 \pm 8.38**
豨莶丸组	8	2	24.02 \pm 5.81*	24.26 \pm 7.38*

注:与模型组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 关节软骨切片显微镜下观察 HE染色观察各组软骨变化的结果 正常对照组:软骨膜光滑,表面无裂隙,软骨细胞排列整齐,上横下竖,细胞数量一般,细胞形态类圆形。模型组:软骨膜不完整,表面有裂隙,有些部位有溃烂,有些部位表层细胞形态不规则。表层横向排列细胞数量少,有些无横向排列的细胞,胶原纤维排列有些紊乱。芬必得组:软骨膜光滑,表面无裂隙、无溃烂,软骨细胞数量较多,形态较圆而大,排列正常,但有些细胞核变长,胶原纤维排列有些紊乱。豨莶丸组:软骨膜光滑,表面无裂隙、无溃烂,软骨细胞数量较多,细胞圆形,排列正常。

2.3 关节软骨切片电镜观察 正常对照组:细胞呈卵圆形,表面绒毛较多,胞质内有丰富的粗面内质网和高尔基体,线粒体,胞浆内微丝丰富,环绕细胞核,细胞核完整类圆形,居细胞中央。造模组:细胞形态不规则,有些变扁长,核浆比增大,细胞较小,微丝断裂变短,粗面内质网扩张,网膜溶解断裂,线粒体肿胀,胞浆内可见空洞,细胞核形态不规则,多贴在一侧细胞壁上,核内异染质较多。芬必得组:软骨细胞卵圆形,高尔基体丰富,染色较浅,层状,粗面内质网扩张,细胞浆内微丝排列紊乱,胞浆中有时有空洞。豨莶丸组:软骨细胞略萎缩,胞

核完整,表面有许多微小突起,线粒体散在分布,核内染色体分布均匀。

观察结果显示:豨莶丸能有效地保护软骨细胞及维持软骨的完整性,对骨性关节炎起到一定治疗作用,其对骨性关节炎的组织形态学影响与芬必得相似。

3 讨论

据报道,豨莶草有明显的活血化瘀作用,可能是豨莶丸改善了骨内血流动力学和血液流变学状态,从而起到保护关节软骨、防治骨性关节炎的作用^[2-4]。结合祖国医学理论对骨性关节炎的认识,可以认为骨性关节炎的病因病机以肝肾亏虚、气血不足为本,局部气滞血瘀、经络痹阻为标,其中气滞血瘀是形成骨性关节炎的一个关键因素,而这与骨内微循环障碍的本质是一致的。因此活血化瘀、改善组织微循环状态就成为治疗骨性关节炎的主要环节。本实验结果显示,造模后家兔关节液中两种炎症细胞因子均有显著升高,从而也印证了此造模方法的可靠性。豨莶丸对家兔关节液中此两种炎症因子水平有显著降低作用,为其抗炎功效提供了重要证据。光镜和电镜观察发现,豨莶丸组的关节软骨和正常组相比无明显退变,而模型组的关节软骨则出现明显退行性改变,说明豨莶丸可改善关节固定造成的膝关节面软骨的退行性改变,对处于病变条件下的软骨具有保护作用,对已造成退行性改变的关节软骨有减轻和改善其病变程度的作用。

参考文献

- 1 王耶,刘建宇. 丹参和透明质酸钠注射液对骨性关节炎治疗作用的实验研究. 中国生化药物杂志, 1999, 19(5): 248-250.
- 2 王鹏. 豨莶草乙醇提取物改善微循环及止痒的研究. 医药论坛杂志, 2003, 24(12): 19-21.
- 3 蒋林,林启云,谢金鲜. 豨莶草药理实验研究. 广西中医药, 1990, 3(4): 44.
- 4 蒋林. 豨莶草注射液对实验性微循环障碍影响的观察. 中成药, 1988, 2(9): 45.

(收稿日期: 2005 - 12 - 21 本文编辑:李为农)

第十届全国中西医结合肿瘤学术研讨会 征文通知

根据中国中西医结合学会 2006年学术活动计划安排,中国中西医结合学会肿瘤专业委员会定于 2006年 8月在沈阳召开第十届全国中西医结合肿瘤学术研讨会。现将征文事宜通知如下。

1. 征文内容 近年来中西医结合、中医肿瘤防治工作的新理论、新学说、新进展; 近年来中西医结合、中医肿瘤学的发展与展望; 中西医结合、中医肿瘤规范化治疗与疗效评价标准的探索与研究; 循证医学在中西医结合、中医肿瘤学的应用; 其他相关的临床研究与经验。

2. 征文要求 来稿应实事求是,科学性强,并附单位介绍信或单位盖章; 寄全文(4 000字以内)1份,中英文摘要(800字)各 1份,摘要应以目的、方法、结果、结论顺序表达,必须使用 Word电子文档编辑,附软盘 1张。无摘要者恕不录用; 来稿务必写清作者、单位、邮编,字迹工整,来稿一律不退,请自留底稿。

3. 截稿日期 2006年 6月 30日(以邮戳为准)。

4. 邮寄地址 邮编 110032,中国辽宁省沈阳市皇姑区北陵大街 33号,辽宁中医药大学附院肿瘤科殷东风(收); 或:邮编 100053,北京市宣武区北线阁 5号,中国中医科学院广安门医院肿瘤科花宝金(收)。信封上请注明“肿瘤会议征文”字样。电子信箱: yinwe@online. ln. cn, 或 huabaojin@sohu. com。