

• 基础研究 •

骨碎补总黄酮对胶原诱导性关节炎大鼠 关节骨破坏影响的实验研究

高华利¹, 肖涟波¹, 张子峰¹, 欧阳桂林¹, 黄新星¹, 李宁丽², 胡军林¹, 黄志明¹, 黄正¹, 解骏¹

(1. 上海光华中西医结合医院脊柱外科, 上海 200052; 2. 上海市免疫学研究所, 上海 200025)

【摘要】 目的: 通过建立胶原诱导性关节炎(collagen induced arthritis, CIA)大鼠模型, 评价骨碎补总黄酮在抑制 CIA 大鼠关节骨破坏方面的作用及机制。**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。将造模成功且炎症分值在 2 分及以上的大鼠进行随机分组并进行相应治疗, 评价骨碎补总黄酮对关节骨破坏情况的作用。**结果:** 治疗 12 周后, 骨碎补总黄酮组、骨碎补总黄酮加 1/2 依那西普组、依那西普组骨小梁面积百分数及骨小梁数量均明显高于灭菌用水组($P<0.05$); 骨小梁分离度明显小于灭菌用水组($P<0.05$)。**结论:** 骨碎补总黄酮能明显抑制 CIA 大鼠炎症关节骨破坏, 其作用可能与骨小梁数量减少及骨小梁分离度的增大相关。

【关键词】 关节炎, 实验性; 骨碎补; 大鼠; 中草药

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2013.09.015

Experimental study on effect of Rhizoma Drynariae Flavone on bone destruction of collagen induced arthritis rat

GAO Hua-li, XIAO Lian-bo*, ZHANG Zi-feng, OUYANG Gui-lin, HUANG Xin-xing, LI Ning-li, HU Jun-lin, HUANG Zhi-ming, HUANG Zheng, and XIE Jun. *Department of Spinal Surgery, Guanghua Integrated Traditional and Western Medical Hospital, Shanghai 200052, China

ABSTRACT Objective: Through establishing the rat model of CIA to evaluate the effect and mechanism of Rhizoma Drynariae Flavone on bone destruction of CIA rat. **Methods:** Subcutaneous injection of bovine type II collagen was used to induce Wistar rats to fall ill, and then established the rat model of CIA. The rats whose inflammation scores reached to two points or above were randomly divided into four groups, and were treated accordingly. The effect of Rhizoma Drynariae Flavone on bone destruction was evaluated. **Results:** At 12 weeks after treatment, bone trabecular area percentage and bone trabecular number in Rhizoma Drynariae Flavone group, Rhizoma Drynariae Flavone-1/2 Etanercept group, Etanercept group was obviously higher than that of sterilization water group ($P<0.05$); and the trabecular resolving power of these groups was obviously less than that of sterilization water group ($P<0.05$). **Conclusion:** Rhizoma Drynariae Flavone can obviously inhibit inflammation of joint bone destruction of CIA rats, the effect may be related with bone trabecular number reduction and trabecular resolving power increasing.

KEYWORDS Arthritis, experimental; Drynaria Fortunei; Rats; Drugs, Chinese herbal

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2013, 26(9): 764-767 www.zggszz.com

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种病因不明的自身免疫性疾病, 在我国的患病率高达 0.32%~0.36%, 主要表现为关节滑膜的慢性增生, 形成血管翳, 侵犯关节软骨、软骨下骨、韧带和肌腱等, 造成关节软骨、骨和关节囊破坏, 最终导致关节畸形和功能丧失, 是造成我国人群丧失劳动力和致残的主要病因之一^[1]。关节边缘骨破坏被认为是 RA 放射学上的一个特征性标志^[2-3], 并且破坏的程度与疾病的严重性相关^[1,4]。由于病因不明, 临床上尚缺乏根

治方法和预防措施, 因此如何早期发现和防治 RA 关节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。

骨碎补总黄酮是从中药骨碎补中筛选提取出来的有效成分, 目前动物实验已证明其能改善松质骨的超微结构及脯氨酸羟化程度^[5], 提高去势大鼠的骨密度^[6-7]。体外实验也证明骨碎补总黄酮能促进成骨细胞分化和增殖, 抑制破骨细胞成熟, 抑制骨吸收^[8-9]。但骨碎补总黄酮对 RA 炎症及骨破坏的作用如何, 尚缺少相关研究。

依那西普(Etanercept)是全人源化重组 II 型 TNF 受体(TNFR2)与抗体 Fc 所形成的融合蛋白, 它因能够特异性抑制重要的炎症介质 TNF- α , 目前已

基金项目: 上海市科委资助项目(编号: 09411967400)

Fund program: Funded by Shanghai Science and technology Administration(No.09411967400)

通讯作者: 肖涟波 E-mail: xlb@medmail.com.cn

经成为抑制 RA 炎症及骨破坏最有效的药物之一, 但因其价格昂贵, 有并发感染及恶性肿瘤发生率增高的可能性, 以及长期使用安全性尚不确定等因素在一定程度上制约着其普及推广。

本实验选择骨碎补总黄酮治疗胶原诱导性关节炎 (collagen induced arthritis, CIA) 动物模型, 进而研究其在防治 RA 骨破坏中的作用, 同时分析比较应用骨碎补总黄酮、肿瘤坏死因子 (TNF)- α 拮抗剂依那西普、骨碎补总黄酮联合 1/2 依那西普治疗后骨破坏的改善情况, 为临床应用提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 Wistar 大鼠, 雌性, 7~8 周龄, 体重 160~170 g, 每笼 2 只, 分笼饲养, 购自中国科学院上海实验动物中心。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 \pm 2) $^{\circ}$ C, 适应性饲养 1 周后进行实验。

1.2 主要试剂

1.2.1 诱导免疫试剂 牛 II 型胶原蛋白, Chondrex, Inc. 公司; 完全弗式佐剂 (CFA) 及不完全弗氏佐剂 (IFA), 美国 Sigma 公司; 冰醋酸, 北京化学试剂公司。

1.2.2 实验试剂 骨碎补总黄酮 (商品名: 强骨胶囊, 每粒 0.25 g, 每盒 12 粒, 北京岐黄制药有限公司); 依那西普 (商品名: 益赛普, 每瓶 12.5 mg, 上海中信国健药业有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 CIA 模型建立 初次免疫: 将胶原溶液与 CFA 等体积乳化, 使胶原终浓度为 2 mg/ml, 于每只大鼠尾根部皮下注射 0.12 ml (含胶原 240 μ g)。

激发免疫: 将胶原溶液与 IFA 等体积乳化, 使胶原终浓度为 2 mg/ml, 初次免疫后第 7 天于大鼠臀部两侧各皮下注射 0.03 ml (共含胶原 120 μ g)。

1.3.2 实验分组及给药 将造模成功、炎症评分 \geq 2 分的大鼠随机分为 4 组: 灭菌用水组 8 只 (灭菌用水每日 1 ml, 灌胃), 骨碎补总黄酮组 8 只 (骨碎补总黄酮 60 mg, 1 ml 灭菌用水溶解后灌胃), 依那西普组 8 只 (0.8 mg, 2 次/周, 腹腔注射), 骨碎补总黄酮加 1/2 依那西普组 8 只 (骨碎补总黄酮每日 60 mg, 灌胃; 依那西普 0.4 mg, 2 次/周, 腹腔注射)。用药时间为 12 周。

1.4 观察项目与方法

1.4.1 关节炎判定及方法 1 分: 轻度踝关节红肿或个别趾关节红肿; 2 分: 中度的踝关节红肿; 3 分: 整个足爪 (包括趾关节) 严重红肿; 4 分: 肢体严重红肿累及多个关节, 关节活动受限。每只大鼠的关节炎分数为双下肢评分总和。造模成功入组后, 每日

对各组大鼠进行炎症评分, 计入评分表。

1.4.2 关节破坏程度影像学判定方法 治疗 12 周后, 处死大鼠, 取后肢拍摄踝关节 X 线片, 观察各治疗组踝关节结构破坏情况。取胫骨上段去除软组织, 浸入丙酮中固定, 行 micro-CT 扫描, 比较各组治疗后胫骨上段骨破坏及胫骨上段骨骺线下 1~4 mm 间次级松质骨骨小梁变化。

1.4.3 胫骨上段次松质骨区骨组织形态计量学检查方法 治疗 12 周后麻醉处死大鼠, 取胫骨上 1/3 段, 剔除软组织, 制作矢状面硬组织切片, 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, 于胫骨上段骨骺线下 1~4 mm 间次级松质骨区域内每个标本随机选取 5 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 (tissue area, T.Ar); 每个视野下骨小梁总周长 (trabecular perimeter, Tb.Pm), 骨小梁总面积 (trabecular area, Tb.Ar)。将测得的上述参数带入公式^[10]计算: 骨小梁面积百分数 (trabecular area percentage, %Tb.Ar), 骨小梁宽度 (trabecular width, Tb.Wi), 骨小梁数量 (trabecular number, Tb.N), 骨小梁分离度 (trabecular separation, Tb.Sp)。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件对实验数据进行统计学分析, 数据以均数 \pm 标准差表示, 组间两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 关节破坏程度影像学比较 治疗 12 周后, 各组大鼠踝关节摄片 (图 1) 示: 灭菌用水组大鼠踝关节破坏严重, 距骨自颈部断裂塌陷, 跗骨窦消失, 踝部各关节间隙变窄模糊甚至消失, 关节周围骨密度增高, 骨质边缘模糊, 正常空间结构遭严重破坏; 相反, 骨碎补总黄酮组、骨碎补总黄酮加 1/2 依那西普组和依那西普组大鼠踝关节仅有轻微骨侵蚀表现。

治疗 12 周后, micro-CT 扫描 (图 2) 示: 灭菌用水组大鼠胫骨平台前方出现塌陷, 骨骺线向前倾斜, 骨骺线下 1~4 mm 间的次级松质骨骨小梁稀少凌乱; 相反, 骨碎补总黄酮组、骨碎补总黄酮加 1/2 依那西普组和依那西普组大鼠胫骨平台保持正常结构形态, 骨骺线呈正常蝶形、清晰可见, 骨骺线下 1~4 mm 间的次级松质骨骨小梁数量明显多于灭菌用水组, 骨小梁沿垂直应力方向排列较整齐。

2.2 胫骨上段骺线下 1~4 mm 次松质骨区骨组织形态计量学参数比较 治疗 12 周后: 骨碎补总黄酮组、骨碎补总黄酮加 1/2 依那西普组及依那西普组 %Tb.Ar、Tb.N 高于灭菌用水组, 骨碎补总黄酮加 1/2 依那西普组及依那西普组 Tb.Sp 低于灭菌用水



图 1 治疗 12 周后大鼠踝关节 X 线片 1a. 灭菌用水组 1b. 骨碎补总黄酮组 1c. 骨碎补总黄酮加 1/2 依那西普组 1d. 依那西普组

Fig.1 Ankle joint X-rays of rats at 12 weeks after treatment 1a. Sterilization water group 1b. Rhizoma Drynariae Flavone group 1c. Rhizoma Drynariae Flavone-1/2 Etanercept group 1d. Etanercept group

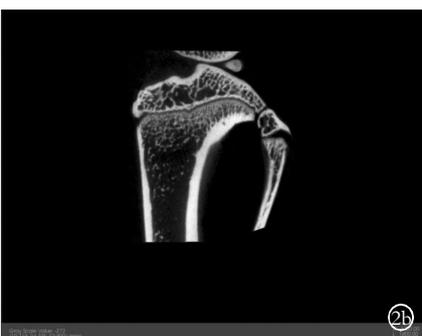
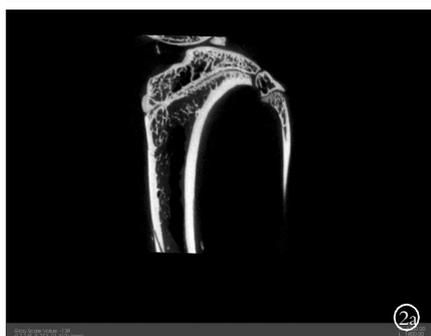
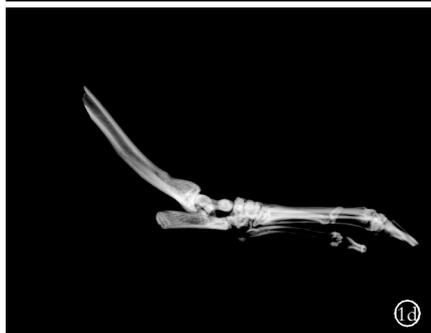


图 2 治疗 12 周后大鼠胫骨上段矢状面 CT 2a. 灭菌用水组 2b. 骨碎补总黄酮组 2c. 骨碎补总黄酮加 1/2 依那西普组 2d. 依那西普组

Fig. 2 Sagittal CT scanning of tibial upper segment of rats at 12 weeks after treatment 2a. Sterilization water group 2b. Rhizoma Drynariae Flavone group 2c. Rhizoma Drynariae Flavone-1/2 Etanercept group 2d. Etanercept group

表 1 治疗 12 周后各组松质骨组织形态计量学静态参数比较($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of static parameter of cancellous bone morphometry among 4 groups at 12 weeks after treatment($\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠(只)	%Tb.Ar	Tb.Wi(μm)	Tb.N (No./mm)	Tb.Sp(μm)
灭菌用水组	5	19.0 \pm 2.5	41.8 \pm 4.3	4.0 \pm 0.4	266.0 \pm 30.7
骨碎补总黄酮组	5	32.5 \pm 1.7 ^{a1}	49.5 \pm 2.5 ^{b1}	6.8 \pm 0.3 ^{c1}	103.5 \pm 3.7 ^{d1}
依那西普组	5	31.3 \pm 1.1 ^{a2}	52.7 \pm 4.9 ^{b2}	6.3 \pm 0.8 ^{c2}	126.0 \pm 16.8 ^{d2}
骨碎补总黄酮加 1/2 依那西普组	5	31.0 \pm 1.2 ^{a3}	51.0 \pm 2.3 ^{b3}	6.0 \pm 0.6 ^{c3}	124.1 \pm 14.3 ^{d3}

注: 与灭菌用水组比较, ^{a1}t=4.433, P=0.004; ^{a2}t=4.360, P=0.012; ^{a3}t=4.460, P=0.011。 ^{b1}t=1.560, P=0.170; ^{b2}t=1.894, P=0.107; ^{b3}t=1.678, P=0.144。 ^{c1}t=5.745, P=0.001; ^{c2}t=2.828, P=0.030; ^{c3}t=2.635, P=0.039; ^{d1}t=0.013, P=0.170; ^{d2}t=4.189, P=0.014; ^{d3}t=4.000, P=0.016

Note: Compared with sterilization water group, ^{a1}t=4.433, P=0.004; ^{a2}t=4.360, P=0.012; ^{a3}t=4.460, P=0.011。 ^{b1}t=1.560, P=0.170; ^{b2}t=1.894, P=0.107; ^{b3}t=1.678, P=0.144。 ^{c1}t=5.745, P=0.001; ^{c2}t=2.828, P=0.030; ^{c3}t=2.635, P=0.039; ^{d1}t=0.013, P=0.170; ^{d2}t=4.189, P=0.014; ^{d3}t=4.000, P=0.016

组;骨碎补总黄酮组、骨碎补总黄酮加 1/2 依那西普组、依那西普组之间差异均无统计学意义。骨小梁宽度比较,4 组之间差异均无统计学意义, 治疗后各组 %Tb.Ar、Tb.Wi、Tb.N 和 Tb.Sp 比较结果见表 1。

3 讨论

在 RA 中,滑膜的持续性增生,大量炎症细胞浸润,软骨及骨的破坏是其重要的病理学特征。为了进一步探讨 RA 的病因、发病机制和探索新的治疗方法,需进行大量的试验,但人类试验是受限制的,因此建立动物模型来替代人类试验是最好的研究 RA 的方法之一。

CIA 是将天然 II 型胶原蛋白 (collagen II) 与弗氏佐剂等量乳化后免疫易感品系动物引起的一类自身免疫性关节炎。该模型为多发性外周关节炎,典型的关节炎体征在初次免疫后 12~16 d 出现,18~24 d 病变最为严重。往往是动物的一侧后肢最先出现典型的红肿现象,随之其余肢体也相继受累。一般前肢炎症发生率,与前肢相比,后肢关节更易受累。肿胀一般持续 5~8 周,最终可导致关节的畸形。疾病过程中,伴有动物的毛发失去光泽,并伴有体重的下降和轻微的脱毛,但无血管炎表现,也无关节症状的反复出现。病理变化主要是增生性滑膜炎,继之关节软骨破坏,直至骨的破坏,单核细胞浸入并持续存在于滑膜中。动物体内存在针对自身 II 型胶原的高滴度 IgG 抗体,提示在疾病的发病中免疫过程是主要的。该模型已成为目前公认的 RA 的较理想模型,特别是在与治疗机制及免疫反应有关的研究中。

本实验通过建立 CIA 大鼠模型,将造模成功后炎症分值在 2 分及以上的大鼠随机分到 4 个治疗组 (灭菌用水组、骨碎补总黄酮组、骨碎补总黄酮加半量依那西普组、依那西普组),证实了骨碎补总黄酮、骨碎补总黄酮加 1/2 依那西普和依那西普组均具有明显抑制 CIA 大鼠炎症关节周围骨量丢失的能力,且其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,与抑制骨小梁宽度丢失关系较小。骨碎补总黄酮加 1/2 依那西普组及依那西普组骨小梁的分离度均明显低于灭菌用水组;且骨碎补总黄酮组、骨碎补总黄酮加 1/2 依那西普组及依那西普组在提高骨小梁面积百分数,抑制骨小梁数量及分离度减少方面作用相当。另外,踝关节 X 线片及胫骨上段 micro-CT 扫描图像也显示了与硬组织切片统计数据较好的一致性。

综上所述,通过本实验发现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。临床上可以考虑骨碎补总黄酮与依那西普减量联合应用,两者在抑制类风湿性关节炎患者关节炎及炎症关节周围骨破坏方面具有协同作用。

参考文献

- [1] 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,2005:1-10.
Tang FL, Wu DH. Clinical Treatment Guidelines Rheumatism Volume[J]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005: 1-10. Chinese.
- [2] Sharp JT, Wolfe F, Mitchell DM, 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: 660-668.
- [3] Goldring SR, Gravallesse EM. Pathogenesis of bone erosions in rheumatoid arthritis[J]. Curr Opin Rheumatol, 2000, 12: 195-199.
- [4] van Zeben D, Hazes JMW, Zwiderman AH, et al. Factors predicting outcome of rheumatoid arthritis: results of a follow-up study[J]. J Rheumatol, 1993, 20: 1288-1296.
- [5] 伍海昭,陈海嘯,朱敏. 骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠骨超微结构及脯氨酸羟化程度的影响[J]. 中国骨伤, 2011, 24(1): 48-50.
Wu HZ, Chen HX, Zhu M. Effects of drynaria fortunei on bone ultrastructure and proline hydroxylation level of ovariectomized rats[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2011, 24(1): 48-50. Chinese with abstract in English.
- [6] 谢雁鸣,鞠大宏,赵晋宁. 骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠骨密度和骨组织形态计量学影响[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(4): 343-345.
Xie YM, Ju DH, Zhang JN, et al. Effect of osteopractic total flavone on bone mineral density and bone histomorphometry in ovariectomized rats[J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2004, 29(4): 343-345. Chinese.
- [7] 刘剑刚,谢雁鸣,徐哲,等. 骨碎补总黄酮的活血化瘀作用及对实验性微循环障碍和骨质疏松症的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2006, 12(1): 46-49.
Liu JG, Xie YM, Xu Z, et al. Effect of assemble flavone of rhizome drynarm on experimental osteoporosis and microcirculation[J]. Zhongguo Gu Zhi Shu Song Za Zhi, 2006, 12(1): 46-49. Chinese.
- [8] 谢雁鸣,秦林林,邓文龙,等. 骨碎补总黄酮对成骨细胞体外培养作用的机制研究[J]. 中华中医药杂志, 2005, 20(3): 161-162.
Xie YM, Qin LL, Deng WL, et al. Effects of Drynaria Rhizome on cultivated osteoblasts in vitro[J]. Zhonghua Zhong Yi Yao Za Zhi, 2005, 20(3): 161-162. Chinese.
- [9] 田坤,尹文哲,刘伟,等. 二磷酸盐和骨碎补总黄酮对诱导后成骨细胞影响的实验研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2007, 13(8): 559-563.
Tian K, Yin WZ, Liu W, et al. Experimental study on the effect of diphosphonate and assemble flavones of drynaria rhizome on the induced osteoblast[J]. Zhongguo Gu Zhi Shu Song Za Zhi, 2007, 13(8): 559-563. Chinese.
- [10] 王洪复. 骨质疏松症药效研究方法与技术[M]. 北京:人民卫生出版社, 2009: 119.
Wang HF. Method and Techniques Pharmacodynamics Research Osteoporosis[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2009: 119. Chinese.

(收稿日期: 2012-10-15 本文编辑: 连智华)