

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.05.015

益肾蠲痹丸对肾虚胶原诱导性关节炎大鼠踝关节骨质破坏的影响

陶黎¹, 刘梅洁², 薛欣¹, 潘静华², 刘红², 李艳², 李玉梅¹, 肖诚³, 鞠大宏², 赵宏艳^{2*}

(1. 中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京市东城区东直门内南小街 16 号, 100700; 2. 中国中医科学院医学实验中心; 3. 中日友好医院临床医学研究所)

摘要 目的 探讨益肾蠲痹丸改善骨质破坏的可能作用机制。方法 将 106 只 SD 大鼠随机分为空白对照组 10 只、假手术组 10 只、肾虚关节炎组 10 只、肾虚关节炎 + 西药组 10 只、肾虚关节炎 + 中药组 11 只、关节炎组 9 只、关节炎 + 西药组 10 只、关节炎 + 中药组 10 只。肾虚关节炎组、肾虚关节炎 + 西药组、肾虚关节炎 + 中药组大鼠采用去卵巢和 II 型胶原免疫诱导建立肾虚关节炎模型, 关节炎组、关节炎 + 西药组、关节炎 + 中药组大鼠采用 II 型胶原免疫诱导建立关节炎模型。关节炎 + 中药组和肾虚关节炎 + 中药组大鼠给予益肾蠲痹丸 2.20 g/(kg·d) 灌胃。关节炎 + 西药组和肾虚关节炎 + 西药组大鼠给予戊酸雌二醇 0.092 mg/(kg·d) 灌胃。每天 1 次, 连续 28 天。给药后测定大鼠血清雌二醇 (E_2) 含量, 观察踝关节病理损伤情况, 检测踝关节破骨细胞数量。结果 关节炎组大鼠可见不同程度滑膜细胞增生, 滑膜组织充血水肿, 关节腔内有剥脱的关节软骨及滑膜组织。肾虚关节炎组大鼠可见骨小梁稀疏变细, 间隙增大。关节炎 + 中药组及肾虚关节炎 + 中药组大鼠滑膜组织增生及滑膜组织充血水肿明显减轻, 血管增生和浸润炎细胞数量及血管翳形成有不同程度减轻。与肾虚关节炎组比较, 肾虚关节炎 + 西药组、肾虚关节炎 + 中药组大鼠破骨细胞数量减少, E_2 含量升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与关节炎组比较, 关节炎 + 中药组大鼠破骨细胞数量降低, E_2 含量升高 ($P < 0.05$)。与肾虚关节炎 + 中药组比较, 关节炎 + 中药组大鼠破骨细胞数量降低, E_2 含量升高 ($P < 0.01$)。结论 肾虚可加重关节炎引起的骨质破坏, 益肾蠲痹丸可以减轻关节炎及肾虚关节炎大鼠关节骨质破坏程度, 可能与抑制踝关节局部破骨细胞的数量、升高血清 E_2 含量有关。

关键词 胶原诱导性关节炎; 益肾蠲痹丸; 肾虚; 骨质破坏; 类风湿关节炎; 破骨细胞

我国类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 患病率为 0.28%, 该病多发生于女性, 尤其是更年期女性发病率更高^[1]。本课题组实验研究发现, 卵巢切除可明显加重胶原诱导性关节炎 (CIA) 小鼠/大鼠关节局部病理改变^[2-3], 而雌激素替代治疗能降低 RA 发生、发展的危险性, 改善其临床症状^[4-5]。中医学认为, 肾虚在 RA 发展中起着重要的作用, 补肾是 RA 的基本治疗法则^[6-7]。研究发现, RA 病灶部位有大量成熟的破骨细胞及破骨细胞前体^[8], 其过度增殖和异常活跃打破了骨代谢平衡, 使骨破坏占优势, 从而完成了由滑膜炎到骨质破坏的病理转变^[9]。研究发现, 肾虚可通过

影响破骨细胞的功能而使骨重建发生改变^[10-12]。基于此, 本研究以破骨细胞为切入点, 以卵巢切除及 II 型胶原免疫诱导制作 RA 肾虚病证结合动物模型, 采用益肾蠲痹丸进行干预, 探讨肾虚对 RA 骨破坏的影响及益肾蠲痹丸改善骨破坏的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雌性 SD 大鼠 106 只, 8 周龄, 体重 210 ~ 230 g。由中国食品药品检定研究院提供, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2009-0017, 饲养于中国中医科学院中医基础理论研究所动物实验室。

1.2 药物

益肾蠲痹丸 (批号: 140305), 江苏正大清江制药有限公司; 戊酸雌二醇片 (批号: 106A2), 拜耳医药保健有限公司。

基金项目: 国家自然科学基金 (81573845, 81373773); 中国中医科学院基础所自主选题项目 (YZ-1405)

* 通讯作者: zhaohongyan1997@163.com, (010) 64089528

1.3 主要试剂及仪器

牛Ⅱ型胶原 (批号: 110120)、不完全弗氏佐剂 (批号: 130319), 均为美国 Chondrex 公司产品; 大鼠雌二醇 (E_2) ELISA 试剂盒 (批号: ESG4616), 美国 Calbiotech 公司; TRAP 染色试剂盒 (批号: SLBJ8585V), 美国 Sigma-Aldrich 公司; 戊巴比妥钠, 北京鸿润佑达生物科技有限公司分装; 4% 多聚甲醛 (批号: 20130321)、EDTA (批号: 20131115), 均为国药集团化学试剂有限公司; HE 染色液 (批号: 0707A14), 北京雷根生物技术有限公司。Finesse ME⁺ 型轮转式切片机、3120061 型烤片机、3120059 型展片机、histocentre 3 全自动组织包埋机, 均为美国 Thermo 公司; CTR6000 型显微镜, 德国 Leica 公司; T10BASIC 型手持式分散机, 德国 IKA 公司; SE6000F 型电子称: 奥豪斯仪器 (上海) 有限公司。

1.4 动物分组及处理方法

106 只 SD 大鼠采用 Excel 2010 中的 rand 函数方法按体重随机分为空白对照组 10 只、假手术组 10 只、去卵巢组 50 只和Ⅱ型胶原免疫组 36 只。去卵巢组大鼠按文献 [3] 方法制备肾虚大鼠模型。大鼠以 45 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 然后行双侧卵巢切除手术; 假手术组大鼠的手术过程同去卵巢组, 但不切除卵巢, 只摘除卵巢周围的脂肪组织。术后第 5 天开始制作阴道涂片, 观察造模后大鼠的动情周期, 每天 1 次, 连续 5 天, 无明显动情周期的大鼠为去卵巢手术成功的大鼠 [4]。手术过程中假手术组死亡 1 只; 去卵巢组死亡 3 只, 造模未成功 2 只, 造模成功 45 只。将造模成功大鼠依体重随机取 10 只为肾虚组, 其余 35 只大鼠和 36 只Ⅱ型胶原免疫组大鼠按文献 [5] 免疫制作关节炎模型。取适量Ⅱ型胶原溶液逐滴加入至等容积的不完全弗氏佐剂中, 冰浴中用匀浆器充分乳化, 取乳化后的混合物按 200 μ g Ⅱ型胶原于尾根部皮下注射。第一次免疫 7 天后按 100 μ g Ⅱ型胶原, 于尾根部皮下加强免疫 1 次。

免疫第 15 天, 剔除关节炎指数 (AI) [4] < 1 的大鼠, 35 只去卵巢组大鼠造模成功 31 只, 36 只Ⅱ型胶原免疫组大鼠造模成功 29 只。将 31 只造模成功的去卵巢关节炎大鼠随机分为肾虚关节炎组 10 只、肾虚关节炎 + 西药组 10 只、肾虚关节炎 + 中药组 11 只; 将 29 只造模成功的Ⅱ型胶原免疫大鼠分为关节炎组 9 只、关节炎 + 西药组 10 只、关节炎 + 中药组 10 只。关节炎 + 中药组和肾虚关节

炎 + 中药组大鼠给予益肾蠲痹丸 2.20 g/(kg · d) 灌胃。关节炎 + 西药组和肾虚关节炎 + 西药组大鼠给予戊酸雌二醇 0.092 mg/(kg · d) 灌胃。各组每天灌胃 1 次, 灌胃体积均为 1 ml/100 g, 连续灌胃 28 天。空白对照组、假手术组、肾虚组、关节炎组大鼠灌胃等体积纯净水。

1.5 观察指标及方法

给药结束 1 h 后, 用 45 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 腹主动脉取血, 分离血清, -80℃ 保存。再将大鼠迅速处死, 取踝关节置于 4% 多聚甲醛中固定, 用于病理损伤评价及破骨细胞观察。

1.5.1 体重 给药后每周用电子秤称量大鼠体重。

1.5.2 关节炎指数 (AI) 评分 [4] 于给药前、给药 6、12、18、24、27 天观察关节病变程度, 将 2 只后踝关节的病变程度累计积分, 计算 AI。0 分: 无关节炎; 1 分: 小趾关节轻度肿胀; 2 分: 小趾关节和足跖肿胀; 3 分: 踝关节以下的足爪肿胀; 4 分: 包括踝关节在内全部关节肿胀。

1.5.3 关节病理损伤 踝关节在 4% 多聚甲醛固定 3 天后, 10% EDTA 脱钙, 酒精逐级脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片, 常规 HE 染色。光镜下观察滑膜、软骨、骨的病理改变, 并进行关节病理损伤半定量分析 [7]。评价方法: 0 分: 关节结构正常, 关节间隙均匀, 软骨、骨无损伤, 滑膜组织无炎症、增生等; 1 分: 关节结构基本正常, 有滑膜增生, 血管数量增加, 可见少量炎细胞浸润, 软骨表层轻度破坏; 2 分: 关节软骨有明显的侵蚀破坏, 血管翳形成, 炎细胞浸润明显, 无骨破坏, 关节间隙基本正常; 3 分: 有大量血管翳形成, 广泛软骨侵蚀破坏, 可见骨破坏, 关节结构遭破坏。

1.5.4 踝关节破骨细胞数量 按 TRAP 染色试剂盒说明书进行染色, 采用 Leica Qwin V3 图像分析系统计算踝关节中所有破骨细胞的数量。

1.5.5 血清 E_2 含量 腹主动脉取血后 8 h 内分离血清, -20℃ 保存, 采用 ELISA 法测定血清 E_2 含量。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件处理数据, 若数据呈正态分布, 结果用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析; 方差齐者, 组间两两比较采用 LSD 检验; 方差不齐者, 采用 Dunnett's T3 (3) 检验。若数据呈非正态分布, 结果用 $M (P_{25}, P_{75})$ 表示, 采用 Mann-Whitney 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

给药过程中, 关节炎 + 中药组大鼠灌胃时死亡 1 只, 解剖后发现为灌胃时中药误入气管所致。

2.1 各组大鼠给药后不同时间体重比较

因本实验做的是去势手术, 故设立假手术组以排除手术因素对 CIA 建模的影响。因为假手术组与空白对照组差异无统计学意义, 所以本研究将各组与假手术组比较。表 1 示, 肾虚组、肾虚关节炎组、肾虚关节炎 + 西药组、肾虚关节炎 + 中药组大鼠各时间点体重均明显高于假手术组 ($P < 0.01$)。与假手术组比较, 关节炎组各时间点大鼠体重下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 给药 14 天起, 与假手术组比较, 关节炎 + 西药组大鼠体重下降 ($P < 0.05$)。与肾虚组比较, 肾虚关节炎组、肾虚关节炎 + 西药组、肾虚关节炎 + 中药组大鼠各时间点体重降低 ($P < 0.01$)。给药期间, 肾虚关节炎组与肾虚关节炎 + 西药组、肾虚关节炎 + 中药组比较, 体重差异无统计学意义; 关节炎 + 西药组、关节炎 + 中药组与关节炎组比较, 体重差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 各组大鼠给药前后不同时间 AI 评分比较

表 2 示, 与假手术组、空白对照组、肾虚组比

较, 其余各组大鼠 AI 评分均增加 ($P < 0.01$)。其余各组各时间点大鼠 AI 评分差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠踝关节病理损伤情况比较

图 1 示, 空白对照组和假手术组大鼠关节结构正常, 滑膜组织无充血水肿, 滑膜细胞无增生, 无血管翳形成, 关节软骨表面光滑平整, 无剥脱, 关节软骨下骨小梁大小、排列正常。肾虚组大鼠关节结构正常, 滑膜组织无充血水肿, 关节软骨表面光滑平整, 无剥脱, 关节软骨下骨髓腔内可见有不同程度的脂肪细胞增生, 骨小梁稀疏变细, 间隙增大。关节炎组大鼠可见不同程度的滑膜细胞增生, 排列紊乱, 滑膜组织充血水肿, 毛细血管增生, 并可见炎细胞浸润; 增生的滑膜组织形成绒毛状, 可伸向关节腔深处, 或向软骨面爬行形成血管翳; 在血管翳覆盖下的软骨表层可见组织变性、坏死。关节软骨面剥脱, 可见关节腔内有脱剥的关节软骨及滑膜组织。肾虚关节炎组大鼠除关节炎组病理表现外, 可见有关节软骨下骨髓腔内不同程度的脂肪细胞增生, 骨小梁稀疏变细, 间隙增大。关节炎 + 西药组及肾虚关节炎 + 西药组大鼠滑膜细胞增生略有减轻, 滑膜组织充血水肿稍有减轻, 血管增生和浸

表 1 各组大鼠给药后不同时间体重比较 (g, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	给药 7d	给药 14d	给药 21d	给药 28d
空白对照组	10	267.10 ± 13.31	272.30 ± 13.25	277.30 ± 14.18	283.40 ± 14.77
假手术组	9	268.11 ± 13.66	273.89 ± 14.66	278.44 ± 14.76	283.67 ± 13.89
肾虚组	10	303.20 ± 17.07**	314.00 ± 15.74**	324.60 ± 14.97**	336.10 ± 15.23**
肾虚关节炎组	10	285.50 ± 11.83**△△	293.70 ± 10.95**△△	297.00 ± 9.12**△△	303.90 ± 10.56**△△
肾虚关节炎 + 西药组	10	286.00 ± 15.20**△△	290.00 ± 13.53**△△	294.10 ± 14.44**△△	300.30 ± 14.61**△△
肾虚关节炎 + 中药组	11	288.55 ± 16.77**△	295.55 ± 14.69**△△	300.18 ± 11.85**△△	306.82 ± 10.65**△△
关节炎组	9	254.56 ± 6.95**△△	257.33 ± 7.78**△△	260.33 ± 9.34**△△	265.78 ± 10.62**△△
关节炎 + 西药组	10	257.10 ± 9.72△△	261.00 ± 8.55**△△	264.40 ± 9.77**△△	271.10 ± 9.72**△△
关节炎 + 中药组	9	259.70 ± 11.54△△	263.10 ± 7.50△△	265.44 ± 6.84**△△	270.78 ± 5.80**△△

注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与肾虚组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$

表 2 各组大鼠给药前后不同时间 AI 评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	给药前	给药 6d	给药 12d	给药 18d	给药 24d	给药 27d
空白对照组	10	0	0	0	0	0	0
假手术组	9	0	0	0	0	0	0
肾虚组	10	0	0	0	0	0	0
肾虚关节炎组	10	5.50 ± 2.72*	6.70 ± 1.42*	6.80 ± 1.40*	6.60 ± 1.35*	6.50 ± 1.08*	6.10 ± 1.52*
肾虚关节炎 + 西药组	10	5.70 ± 2.71*	5.60 ± 2.50*	5.90 ± 2.33*	5.60 ± 2.41*	5.60 ± 2.41*	5.50 ± 2.51*
肾虚关节炎 + 中药组	11	5.82 ± 2.64*	6.55 ± 1.63*	6.73 ± 1.42*	6.36 ± 1.69*	5.82 ± 2.23*	5.36 ± 2.29*
关节炎组	9	3.60 ± 2.99*	5.00 ± 2.55*	5.56 ± 2.19*	5.33 ± 2.35*	5.44 ± 2.35*	5.44 ± 2.30*
关节炎 + 西药组	10	4.20 ± 2.82*	4.60 ± 2.50*	5.50 ± 1.96*	5.50 ± 2.01*	4.90 ± 2.08*	4.60 ± 2.12*
关节炎 + 中药组	9	4.00 ± 2.62*	5.00 ± 2.21*	5.30 ± 2.21*	5.40 ± 2.07*	5.00 ± 1.73*	4.89 ± 1.83*

注: 与假手术组比较, * $P < 0.01$

润炎细胞数量略有减少,血管翳形成减少,关节软骨面可见扁平层剥脱;而且肾虚关节炎+西药组大鼠骨髓腔内可见有不同程度的脂肪细胞增生。关节炎+中药组及肾虚关节炎+中药组大鼠滑膜组织增生及滑膜组织充血水肿明显减轻,血管增生和浸润炎细胞数量及血管翳形成有不同程度减轻;除此之外肾虚关节炎+中药组大鼠骨髓腔内有不同程度的脂肪细胞增生。

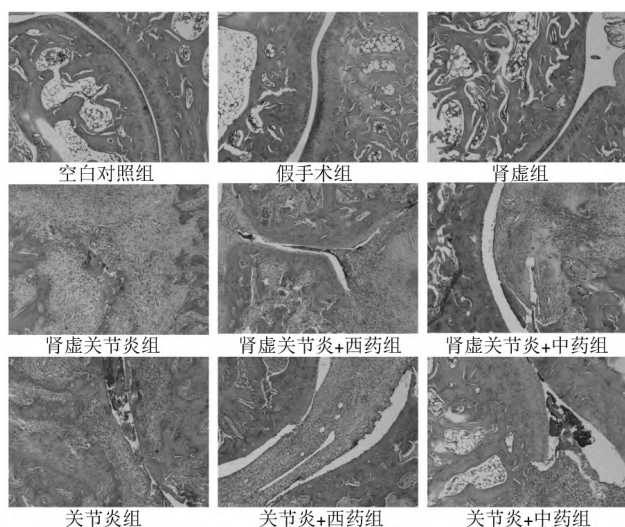


图1 各组大鼠踝关节病理图(HE染色,×40)

表3示,与假手术组和肾虚组比较,除空白对照组外,其余各组关节病理积分均增加($P < 0.01$);与相应模型组比较,肾虚关节炎+中药组、关节炎+中药组大鼠关节病理积分均减少($P < 0.05$)。

表3 各组大鼠踝关节病理积分比较
[$M(P_{25}, P_{75})$]

组别	鼠数	病理积分(分)
空白对照组	10	0(0,0.13)
假手术组	9	0(0,0.25)
肾虚组	10	0(0,0.50)
肾虚关节炎组	10	2.50(2.38,3.00) **△△
肾虚关节炎+西药组	10	2.25(1.88,3.00) **△△
肾虚关节炎+中药组	11	2.00(1.50,2.50) **△△▲
关节炎组	9	2.50(1.75,3.00) **△△
关节炎+西药组	10	2.00(1.50,2.63) **△△▲
关节炎+中药组	9	2.00(1.50,2.00) **△△▲#

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与肾虚组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$;与肾虚关节炎组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$;与关节炎组比较,# $P < 0.05$

2.4 各组大鼠踝关节破骨细胞及血清 E_2 含量比较

表4示,与假手术组比较,肾虚组、肾虚关节炎组、肾虚关节炎+西药组、肾虚关节炎+中药组破骨细胞数量增加、 E_2 含量降低,且关节炎组、

关节炎+西药组破骨细胞数量增加,关节炎+西药组、关节炎+中药组 E_2 含量升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与肾虚组比较,肾虚关节炎组破骨细胞数量升高($P < 0.01$),关节炎+中药组与关节炎+西药组破骨细胞数量减少,肾虚关节炎+西药组、关节炎组、关节炎+西药组、关节炎+中药组 E_2 含量升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与肾虚关节炎组比较,肾虚关节炎+西药组、肾虚关节炎+中药组大鼠破骨细胞数量减少, E_2 含量升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与关节炎组比较,关节炎+中药组大鼠破骨细胞数量降低,关节炎+西药组 E_2 含量升高($P < 0.05$)。与关节炎组比较,肾虚关节炎组破骨细胞数量增加, E_2 含量降低($P < 0.01$)。肾虚关节炎+西药组与肾虚关节炎+中药组比较,关节炎+西药组与关节炎+中药组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。与肾虚关节炎+西药组比较,关节炎+西药组、关节炎+中药组大鼠破骨细胞数量均降低, E_2 含量均升高;与肾虚关节炎+中药组比较,关节炎+中药组大鼠破骨细胞数量降低, E_2 含量升高($P < 0.01$)。

表4 各组大鼠踝关节破骨细胞数及血清 E_2 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	破骨细胞数(个)	E_2 (ng/ml)
空白对照组	10	29.84 ± 7.39	85.58 ± 16.91
假手术组	9	33.51 ± 5.42	87.34 ± 15.20
肾虚组	10	46.74 ± 7.47 **	42.81 ± 12.50 **
肾虚关节炎组	10	55.74 ± 5.28 **△△	38.90 ± 10.17 **
肾虚关节炎+西药组	10	49.40 ± 7.45 **▲	59.98 ± 13.08 **△△▲▲
肾虚关节炎+中药组	11	46.09 ± 6.45 **▲▲	51.54 ± 12.58 **▲
关节炎组	9	43.04 ± 5.72 **▲▲	80.54 ± 15.95 △▲▲
关节炎+西药组	10	41.02 ± 5.62 *△▲▲	96.80 ± 16.86 △▲▲△○
关节炎+中药组	9	36.13 ± 5.20 △▲▲△○	89.18 ± 11.76 △▲▲△○

注: E_2 ,雌二醇;与假手术组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与肾虚组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$;与肾虚关节炎组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$;与关节炎组比较,# $P < 0.05$;与肾虚关节炎+西药组比较,& $P < 0.01$;与肾虚关节炎+中药组比较,○ $P < 0.01$

3 讨论

国医大师朱良春认为,RA病变在骨,骨为肾所主,该病的治疗原则是益肾壮督治其本,蠲痹通络治其标,从而研制出益肾蠲痹丸。益肾蠲痹丸方中熟地黄、淫羊藿、骨碎补等补肝肾而扶正气;乌梢蛇、僵蚕、全蝎、露蜂房等具有蠲痹通络、搜剔病邪的作用。诸药相合,而达到温补肾阳、益肾壮督、搜风剔邪、蠲痹通络之功效。临床和实验研究

证明,该药有补肾通络作用,能调节免疫功能并缓解 RA 引起的骨质破坏^[18-20]。本实验结果发现,从给药第 7 天起,关节炎组大鼠体重明显下降,益肾蠲痹丸治疗对其体重并无明显改变。给药前大鼠 AI 评分显著增加,经戊酸雌二醇和益肾蠲痹丸治疗后,大鼠 AI 评分有降低趋势,但差异无统计学意义。病理积分结果显示,经益肾蠲痹丸治疗后,关节炎组及肾虚关节炎组大鼠关节损伤均明显减轻,说明益肾蠲痹丸能够减轻骨质破坏。

RA 的主要特征是关节滑膜的炎症和软骨、骨的进行性破坏。骨质破坏及由此产生的功能障碍是 RA 致残的主要原因,多种细胞参与该过程,其中破骨细胞的过度活化、增殖在 RA 骨破坏进程中起着关键作用^[21]。破骨细胞是一种组织特异性的多核巨噬细胞,来源于骨髓造血单核巨噬细胞系统。基质细胞与骨髓细胞的紧密接触是破骨细胞形成的必要条件^[22-23]。骨髓基质细胞能产生刺激破骨细胞分化的因子。在 RA 增生滑膜组织中滑膜巨噬细胞、成纤维细胞、激活的 T 淋巴细胞在炎症的刺激下,也可以产生促进破骨细胞分化成熟的分化因子及生长因子^[24-26]。TRAP 为破骨细胞的特异性标志酶,TRAP 染色后破骨细胞全部或大部分胞质酶活性部位形成不溶性紫红色颗粒样沉淀。本实验结果发现,关节炎组大鼠及肾虚关节炎组大鼠滑膜组织及骨髓腔内均见有大量 TRAP 染色的破骨细胞,与假手术组比较明显升高。肾虚关节炎组大鼠破骨细胞数量明显高于关节炎组大鼠,说明肾虚可加重 CIA 大鼠骨质的破坏。

大量研究发现,肾虚可以影响破骨细胞的功能,具有补肾作用的药物可通过调节破骨细胞的功能而改善骨重建^[10-11,27-29]。本实验结果显示,肾虚组、关节炎组及肾虚关节炎组大鼠破骨细胞数量均明显增加,说明肾虚及关节炎均可以促进破骨细胞的生成,经益肾蠲痹丸治疗后,关节炎+中药组及肾虚关节炎+中药组大鼠踝关节破骨细胞数量均明显降低,结合病理学结果分析,提示益肾蠲痹丸对破骨细胞的生成及骨破坏功能具有抑制作用。肾虚女性患者卵巢功能均有不同程度的减退, E_2 水平下降是肾虚证的表现^[30]。本实验结果显示,肾虚组大鼠 E_2 含量显著降低,说明此肾虚动物模型造模成功。与肾虚关节炎组比较,肾虚关节炎+西药组、肾虚关节炎+中药组 E_2 含量升高,与关节炎组比较,关节炎+中药组大鼠 E_2 含量有升高的趋势,关节炎+西药组大鼠 E_2 含量升高,说明益肾

蠲痹丸对肾虚关节炎大鼠的补肾作用更为明显。

综上,肾虚可加重 RA 所引起的骨破坏,具有益肾通络作用的益肾蠲痹丸可以减轻关节炎及肾虚关节炎大鼠踝关节炎细胞浸润、滑膜增生,从而减轻大鼠关节骨质破坏,这可能与抑制踝关节局部破骨细胞的生成有关。

参考文献

- [1] LI R, SUN J, REN LM, et al. Epidemiology of eight common rheumatic diseases in China: a large-scale cross-sectional survey in Beijing [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2012, 51(4): 721-729.
- [2] 艾景录, 吕爱平, 徐世杰, 等. 性腺功能异常型肾虚痹证发生机理的实验研究 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 1995, 1(1): 42-44.
- [3] 王燕, 赵宏艳, 鞠大宏, 等. 试论肾虚在痹证(类风湿性关节炎)发生发展中的作用 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2009, 15(12): 892-895.
- [4] PULLERITS R, D'ELIA HF, TARKOWSKI A, et al. The decrease of soluble RAGE levels in rheumatoid arthritis patients following hormone replacement therapy is associated with increased bone mineral density and diminished bone/cartilage turnover: a randomized controlled trial [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2009, 48(7): 785-790.
- [5] STUBELIUS A, ANDRÉASSON E, KARLSSON A, et al. Role of 2-methoxyestradiol as inhibitor of arthritis and osteoporosis in a model of postmenopausal rheumatoid arthritis [J]. *Clin Immunol*, 2011, 140(1): 37-46.
- [6] 蔡晓路, 谢晴宇, 孟庆刚. “诸寒收引皆属于肾”对类风湿性关节炎治疗的指导价值 [J]. *中华中医药学刊*, 2015, 33(3): 599-603.
- [7] 孟彪, 赵和平, 高立珍. 类风湿关节炎从肾虚痰瘀论治 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2013, 30(3): 111.
- [8] LI P, SCHWARZ EM, O'KEEFE RJ, et al. RANK signaling is not required for TNFalpha-mediated increase in CD11(hi) osteoclast precursors but is essential for mature osteoclast formation in TNFalpha-mediated inflammatory arthritis [J]. *J Bone Miner Res*, 2004, 19(2): 207-213.
- [9] ASAGIRI M, TAKAYANAGI H. The molecular understanding of osteoclast differentiation [J]. *Bone*, 2007, 40(2): 251-264.
- [10] 曾天舒, 陈璐璐, 夏文芳, 等. 补肾壮骨中药对大鼠去卵巢后早期白细胞介素 6 介导的骨髓源性破骨细胞形成的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2005, 25(2): 143-146.
- [11] HE JIANQUAN, CHEN JIAN, ZHENG SUYU, et al. Effect of morinda officinalis - containing serum on the mRNA expression of RANK and CAII in primary osteoclasts in ovariectomized rats [J]. *Chin J Osteoporos*,

- 2013, 19(5): 469-475.
- [2] HSIEH TP, SHEU SY, SUN JS, et al. Icarin inhibits osteoclast differentiation and bone resorption by suppression of MAPKs/NF- κ B regulated HIF-1 α and PGE(2) synthesis [J]. *Phytomedicine*, 2011, 18(2-3): 176-185.
- [3] 鞠大宏, 赵宏艳, 王燕, 等. 不同时间去势对大鼠 CIA 发病情况的影响 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2010, 16(8): 658-661.
- [4] BUTCHER RL. Effect of reduced ovarian tissue on cyclicity, basal hormonal levels and follicular development in old rats [J]. *Biol Reprod*, 1985, 32(2): 315-321.
- [5] ZHAO H, LI J, HE X, et al. The protective effect of yishenjuan bi pill in arthritic rats with castration-induced kidney deficiency [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 212: 102641. doi: 10.1155/2012/102641.
- [6] LIN B, ZHAO Y, HAN P, et al. Anti-arthritic activity of *Xanthium strumarium* L. extract on complete Freund's adjuvant induced arthritis in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(1): 248-255.
- [7] LIN B, ZHANG H, ZHAO XX, et al. Inhibitory effects of the root extract of *Litsea cubeba* (Lour.) pers on adjuvant arthritis in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 147(2): 327-334.
- [8] 王晶晶, 刘静, 裴天仙, 等. 益肾蠲痹丸对 II 型胶原致关节炎大鼠踝关节组织病理改变的影响及其机制研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(17): 3064-3069.
- [9] PERERA PATHIRAGE-KAMAL, PENG CHENG, LV XUE, et al. Effects of Yishen Juanbi (YJB) Pill on Experimental Rheumatoid Arthritis [J]. *Chin J Nat Med*, 2010, 8(1): 57-61.
- [10] 张波, 张继平, 周少雄, 等. 益肾蠲痹丸对类风湿性关节炎患者抗 CCP 抗体及 AKA 抗体的影响 [J]. *广东医学*, 2009, 30(1): 137-140.
- [11] DEAL C. Bone loss in rheumatoid arthritis: systemic, periarticular, and focal [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2012, 14(3): 231-237.
- [12] TAKAHASHI N, AKATSU T, UDAGAWA N, et al. Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation [J]. *Endocrinology*, 1988, 123(5): 2600-2602.
- [13] SUDA T, UDAGAWA N, MIYAURA C. Modulation of osteoclast differentiation by local factors [J]. *Bone*, 1995, 17(2): 87-90.
- [14] ONAL M, XIONG J, CHEN X, et al. Receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) protein expression by B lymphocytes contributes to ovariectomy-induced bone loss [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(35): 29851-29860.
- [15] KIM KW, KIM HR, PARK JY, et al. Interleukin-22 promotes osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis through induction of RANKL in human synovial fibroblasts [J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(4): 1015-1023.
- [16] LAM J, TAKESHITA S, BARKER JE, et al. TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand [J]. *J Clin Invest*, 2000, 106(12): 1481-1488.
- [17] 刘梅洁, 鞠大宏, 赵宏艳, 等. “肾主骨”的机理研究—左归丸含药血清对破骨细胞分化调控因子 OPG、RANKL 蛋白表达的影响 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2009, 15(3): 184-187.
- [18] 赵宏艳, 鞠大宏, 刘梅洁, 等. 左归丸含药血清对破骨细胞骨吸收功能的影响以及成骨细胞对其的介导作用 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2006, 12(9): 662-664.
- [19] 付小卫, 宋长恒, 张治国, 等. 从 OPG-RANKL 破骨细胞调控通路和 Wnt 成骨细胞调控通路探讨“肾主骨”的性别差异及其机制 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2016, 22(1): 66-72.
- [20] 赵蓉, 陈大蓉. 更年期妇女中医辨证分型与雌二醇、卵泡刺激素及黄体生成激素相关性研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2008, 23(2): 171-173.

Impact of *Yishen Juanbi Wan* (益肾蠲痹丸) on Ankle Bone Destruction of Kidney Deficiency Collagen-induced Arthritis rats

TAO Li¹, LIU Meijie², XUE Xin¹, PAN Jinghua², LIU Hong², LI Yan², LI Yumei¹, XIAO Cheng³, JU Da-hong², ZHAO Hongyan²

(1. Institute of Basic Theory of Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medicine Science, Beijing, 100700; 2. Medical Experiment Centre, China Academy of Chinese Medicine Science; 3. Institute of Clinical Medicine, China-Japan Friendship Hospital)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Yishen Juanbi Wan* (益肾蠲痹丸) in improving bone destruction. **Methods** One hundred and six Sprague Dawley (SD) rats were randomized into blank control group (n = 10), sham operation group (n = 10), kidney deficiency arthritis group (n = 10), kidney deficiency arthritis + western medicine group (n = 10), kidney deficiency arthritis + Chinese medicine group (n = 11), arthritis group (n = 9), arthritis + western medicine group (n = 10) and arthritis + Chinese medicine group (n = 10). Rats in the kidney deficiency arthritis group, the kidney deficiency arthritis + western medicine group and the kidney deficiency arthritis + Chinese medicine group were made kidney deficiency arthritis models by ovariectomy and immune

induction of type II collagen. Rats in the arthritis group, the arthritis + western medicine group and the arthritis + Chinese medicine group were made arthritis models by immune induction of type II collagen. Rats in the arthritis + Chinese medicine group and the kidney deficiency arthritis + Chinese medicine group were given *Yishen Juanbi Wan* 2.20 g/(kg · d) by gavage. Rats in the arthritis + western medicine group and the kidney deficiency arthritis + western medicine group were given estradiol valerate 0.092 mg/(kg · d) by gavage, once every day for 28 days. After medication, serum estradiol (E_2) level was detected. Pathological injury of ankle joint was examined. The number of ankle osteoclasts was detected. **Results** Different levels of synovial cell proliferation, synovial hyperemia and edema, as well as exfoliated articular cartilage and synovial tissue in articular cavity were found in the arthritis group rats. Bone trabecular thinning and gap increase were found in the kidney deficiency arthritis group rats. Synovial tissue proliferation and synovial hyperemia and edema seemed reduced in the arthritis + Chinese medicine group rats and the kidney deficiency arthritis + Chinese medicine group rats. Vascular proliferative, infiltrating inflammatory cell number and pannus formation decreased in varying degrees. Compared with the kidney deficiency arthritis group, rats' osteoclasts decreased and E_2 increased in the kidney deficiency arthritis + western medicine group and the kidney deficiency arthritis + Chinese medicine group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the arthritis group, rats' osteoclasts decreased and E_2 increased in the arthritis + Chinese medicine group ($P < 0.05$). Compared with the kidney deficiency arthritis + Chinese medicine group, rats' osteoclasts decreased and E_2 increased in the arthritis + Chinese medicine group ($P < 0.01$). **Conclusion** Kidney deficiency might exacerbate bone destruction caused by arthritis. *Yishen Juanbi Wan* might reduce joint bone destruction of arthritis and kidney deficiency arthritis rats, which might relate to inhibiting ankle local osteoclast number and increasing serum E_2 level.

Keywords collagen-induced arthritis; *Yishen Juanbi Wan*; kidney deficiency; bone destruction; rheumatoid arthritis; osteoclast

(收稿日期: 2017-07-05; 修回日期: 2017-12-11)

编辑: 王利芬

欢迎订阅 2018 年 《中医杂志》

《中医杂志》(ISSN 1001-1668, CN 11-2166/R) 是由中华中医药学会和中国中医科学院主办的全国性中医药综合性学术期刊。1955 年创刊以来始终坚持“以提高为主, 兼顾普及”的办刊方针, 是我国中医药界创刊早、发行量大、具有较高权威性和学术影响力的国家级中医药期刊之一, 是中文核心期刊和科技核心期刊、中国精品科技期刊、首届国家期刊奖获得者和中国期刊方阵双奖期刊、新中国 60 年有影响力的期刊、中国百强科技期刊、中国百种杰出学术期刊, 荣获第二届、第三届、第四届新闻出版政府奖期刊奖提名奖。

《中医杂志》主要栏目中当代名医和临证心得分别介绍名老中医和临床医生辨证用药治疗疑难病的经验; 临床研究介绍中医药治疗的新方法、新成果; 学术探讨、思路与方法、专家论坛、病例讨论、综述、百家园等栏目, 提供最新学术观点、研究成果与治疗方法, 成为学习中医药、研究中医药, 不断提高临床及研究水平的良师益友。

《中医杂志》为半月刊, 每月 2 日和 17 日出版, 每期定价 20.00 元, 全年 480 元。读者可以到全国各地邮局办理订阅手续(邮发代号: 2-698), 也可以与本刊读者服务部联系邮购, 邮购免邮费。电话: 010-64035632, 010-64089195。国外发行: 中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱, 邮编: 100044, 代号: M140)。本社地址: 北京市东城区东直门内南小街 16 号, 邮政编码: 100700。

网址: <http://www.jtcm.net.cn>

扫一扫 关注

