

牛膝醇提物对急性软骨损伤兔软骨的影响

彭力平^{1*} 马笃军² 裴军宇³ 林栋栋³ 何升华¹ 王立新¹ 余 闾¹

(1. 广州中医药大学附属深圳医院, 广东省深圳市福华路 1 号, 518033;

2. 湖南中医药大学; 3. 广州中医药大学)

* 通讯作者: plp001@sina.com, 13662689418

[摘要] 目的 观察牛膝醇提物对急性软骨损伤兔软骨病理学的影响。方法 将 24 只新西兰大白兔随机分为对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组各 6 只, 采用锐器刻痕法进行急性软骨损伤模型造模后, 低、中、高剂量组分别给予牛膝醇提物 1、3、6 g/(kg·d) 灌胃, 对照组给予等量蒸馏水, 每日 2 次, 共灌胃 4 周。采用免疫组织化学方法检测 II 型胶原表达, 并进行软骨 HE 染色和改良 Mankin's 评分。结果 高、中、低剂量组 II 型胶原表达阳性百分率明显高于对照组, 改良 Mankin's 评分低于对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 并且高剂量组 II 型胶原表达阳性百分率亦高于中、低剂量组, 改良 Mankin's 评分低于中、低剂量组 ($P < 0.05$); 中剂量组 II 型胶原表达阳性百分率高于低剂量组, 改良 Mankin's 评分低于低剂量组 ($P < 0.05$)。结论 牛膝醇提物能有效刺激急性软骨损伤兔软骨细胞增殖, 提高 II 型胶原表达, 修复软骨损伤, 并且呈剂量依赖性。

[关键词] 牛膝; 醇提物; 软骨; II 型胶原

Effect of Alcohol Extract of *Achyranthes* on the Cartilage in Rabbits with Acute Cartilage Damage

PENG Liping¹, MA Dujun², PEI Junyu³, LIN Dongdong³, HE Shenghua¹, WANG Lixin¹, YU Tian¹

(1. Shenzhen Hospital Affiliated to Guangdong University of Chinese Medicine; 2. Hunan University of Chinese Medicine; 3. Guangdong University of Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of alcohol extract of *Achyranthes* (*Radix Achyranthis Bidentatae*) on the cartilage in rabbits with acute cartilage damage. **Methods** Twenty-four New Zealand white rabbits were randomized into the control group, low-dose group, middle-dose group and high-dose group, with 6 in each. The acute cartilage damage models were established with sharp indentation. The low-dose, middle-dose and high-dose groups were gavaged with 1, 3 and 6 g/(kg·d) alcohol extract of *Achyranthes*. The control group was given same amount of distilled water. The intragastric administration was given to each group twice daily for 4 weeks. The expression of type-II collagen was detected by immunohistochemistry. The cartilage HE staining and modified Mankin's score was observed. **Results** Comparing with the control group, the percentage of positive expression of type-II collagen was significantly increased but the modified Mankin's score was significantly decreased in the high-dose, middle-dose and low-dose groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), especially in the high-dose group ($P < 0.05$). Comparing with the low-dose group, the percentage of positive expression of type-II collagen was significantly increased but the modified Mankin's score was significantly decreased in the middle-dose group ($P < 0.05$). **Conclusion** The alcohol extract of *Achyranthes* can effectively stimulate chondrocyte proliferation, increase type-II collagen expression and repair cartilage damage with a dose-dependent manner.

Keywords *Achyranthes*; alcohol extract; cartilage; type-II collagen

急性关节软骨损伤在运动员中非常多见, 基于关节软骨的再生能力有限, 损伤后修复困难^[1], 从而继发骨关节炎(OA), 给患者、家庭、社会带来了巨大经济负担。本课题组前期实验^[2]发现, 中药牛膝醇提物能够显著提高兔 OA 模型的软骨细胞数目及增加 II 型胶原表达量, 本研究利用牛膝醇提物体内干预急性软骨损伤兔模型, 观察软骨病理结构改变。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康新西兰大白兔 24 只, 平均体重 (2.47 ±

0.38) kg, 3~4 月龄, 雌雄不限, 广东省实验动物中心提供, 动物合格证号: SCXK(粤)2008-0002。

1.2 主要试剂及仪器

怀牛膝 (*Radix Achyranthis Bidentatae*, 产地河南) 由深圳市中医院药剂科提供, 依据《中华人民共和国药典》浸渍法制备^[3], 每毫升相当原药材 1g。3% 戊巴比妥钠 (上海化学试剂分装厂, 批号 010615), 10% 甲醛标本固定液 (上海溶剂厂, 批号 H31020858), II 型胶原免疫组化试剂盒 (鼠抗兔 I 抗、山羊抗鼠 II 抗, Merck Millipore 公司, 批号 CP18-

100UG),注射用青霉素钠(山东鲁抗医药股份有限公司,批号 S060717)。显微镜(奥林巴斯,BX53)。

1.3 造模方法

将 24 只实验兔用 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)耳缘静脉麻醉,仰卧于手术台上固定,右膝关节局部脱毛,备皮,严格无菌操作。从膝关节髌骨内侧入路,长约 5 cm 的纵切口,探查关节腔内无原发病变后模拟软骨裂伤机制采用关节软骨损伤锐器划痕法^[4],即用 23 号手术刀片沿膝关节矢状面划伤股骨内侧髌负重关节软骨面,长 1 cm,深度 1~2 mm,勿伤及软骨下骨、交叉韧带、半月板,彻底止血,冲洗关节腔,行抽屉试验阴性后,逐层缝合关节囊以及其它软组织;无菌敷料包扎伤处,不予固定。术后每天臀大肌肌肉注射青霉素钠 20 万单位,每天 2 次,常规伤口换药,连续 7 天以预防感染。术后 2 周拆线。每天记录实验兔伤口愈合情况,若发现伤口辅料松动、脱落,立即重新换药固定固定。若发现伤口感染予剔除实验。

1.4 动物分组及给药

造模后按随机数字表法将实验兔分为对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组各 6 只。《中药学》^[5]牛膝常规最高用量 15 g,按照药理试验中动物与人体间的等效剂量进行换算^[6],实验兔每日用量约 1 g/kg。按照常规用药量的 1、3、6 倍,予低剂量组 1 g/(kg·d)、中剂量组 3 g/(kg·d)、高剂量组 6 g/(kg·d),每日灌胃 2 次,每次灌胃时用蒸馏水配成 10 ml,连续用药 4 周。对照组灌胃等量蒸馏水,每次 10 ml,每日 2 次,连续 4 周。

1.5 观察指标及方法

灌胃 4 周后,将全部实验兔空气栓塞法处死,沿兔右膝髌骨内侧原切口疤痕纵行切开,剔除交叉韧带、内外侧半月板、部分关节囊等附属软组织,暴露右膝股骨内侧髌关节面,行膝关节标本大体观察,取股骨内侧髌中心区软骨面同部位 3 mm×3 mm 软骨组织,新鲜标本以 10% 甲醛标本固定液固定 48 h,

然后常规脱水,石蜡包埋,连续切片,厚 3~4 μm,留做 Envision 法免疫组化染色,测定 II 型胶原蛋白表达含量情况^[7],每张切片随机选取 10 个高倍视野,用图像分析系统计算阳性细胞数占总细胞数的比例,即用阳性百分率表示,阳性百分率值越高证明 II 型胶原蛋白表达越高;再将临近同一部位取 3 mm×3 mm 全层软骨一并切除,置于 10% 甲醛标本固定液中固定 48 h,3% 硝酸溶液脱钙 24~36 h,以骨组织变软有弹性、针刺易穿透为度,然后常规脱水、包埋,连续切片,厚 4~5 μm,进行 HE 染色,光镜下观察组织形态变化,采用改良 Mankin's 法^[8]对结构、细胞、染色以及潮线的完整性评分,评分越高说明软骨病变越严重,见表 1。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件分析。计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对所测定结果进行正态性及方差齐性检验,不满足方差分析时用非参数检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组兔 II 型胶原表达情况比较

图 1 示,对照组 II 型胶原表达减少,结构纹理欠清晰,软骨表面裂纹清晰可见;低、中、高剂量组 II 型胶原表达量明显增加,结构纹理清晰,软骨表面裂纹呈修复状态。

表 2 示,高、中、低剂量组 II 型胶原表达阳性百分率明显高于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);并且高剂量组 II 型胶原表达阳性百分率亦高于中剂量组和低剂量组,中剂量组 II 型胶原表达阳性百分率高于低剂量组($P<0.05$),说明具有一定的剂量依赖性。

2.2 各组兔改良 Mankin's 评分比较

图 2 示,对照组见软骨表面可见不规则裂隙,达钙化层,软骨细胞数目减少,基质染色呈浅红色,潮线重构;低、中、高剂量组见局部软骨表面可见不规则裂隙,达钙化层,软骨细胞数量增多,基质染色呈浅红色,潮线结构稍正常。

表 1 切片关节软骨组织学改良 Mankin's 评分表

软骨结构	评分	软骨细胞	评分	基质染色	评分	潮线的完整性	评分
光整如常	0	数量如常	0	正常	0	完整	0
表面出现不规则裂隙	1	数量弥漫性增多	1	染色轻度减退	1	多重潮线	1
裂隙深达移行层	2	出现大量簇集样细胞团	2	染色中度减退	2	软骨下血管入侵潮线	2
裂隙深达辐射层	3	数量明显减少	3	染色重度减退	3		
裂隙深达钙化层	4	染色完全消失	4				
软骨层脱落	5						

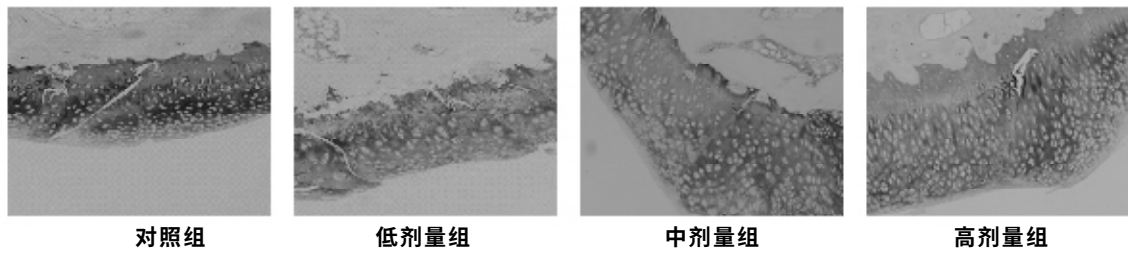


图 1 各组兔Ⅱ型胶原表达情况(免疫组化染色, ×100)

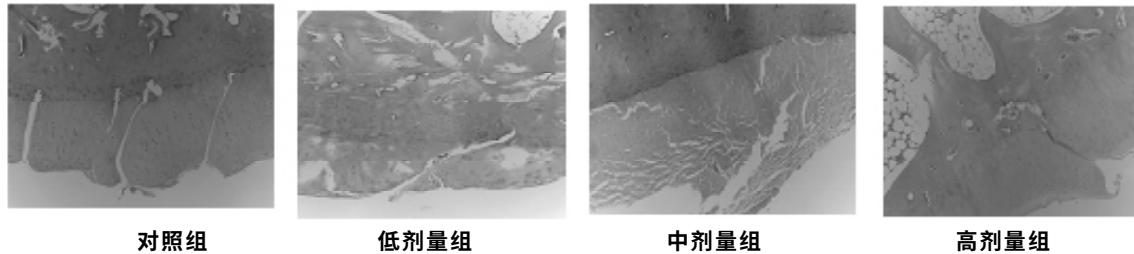


图 2 各组兔软骨组织 HE 染色结果(×100)

表 2 示,高、中、低剂量组改良 Mankin's 评分明显低于对照组($P < 0.05$);并且高剂量组改良 Mankin's 评分亦低于中剂量组和低剂量组,中剂量组改良 Mankin's 评分低于低剂量组($P < 0.05$),说明具有一定的剂量依赖性。

表 2 各组兔Ⅱ型胶原表达阳性百分率和改良 Mankin's 评分比较($\bar{x} \pm s$)

组别	兔数	Ⅱ型胶原表达阳性百分率(%)	改良 Mankin's 评分(分)
对照组	6	24.38 ± 5.21	8.24 ± 0.61
低剂量组	6	$28.23 \pm 6.57^*$	$7.86 \pm 0.57^*$
中剂量组	6	$33.81 \pm 4.35^{*\Delta}$	$7.45 \pm 0.61^{*\Delta}$
高剂量组	6	$38.25 \pm 6.35^{**\Delta\blacktriangle}$	$6.93 \pm 0.82^{**\Delta\blacktriangle}$

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$;与中剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

3 讨论

软骨细胞具有合成、分泌并维持细胞外基质的功能,是软骨基质生化代谢的主要来源。胶原和蛋白多糖是关节软骨基质的主要成分,其中Ⅱ型胶原蛋白量占软骨胶原总量的绝大多数,对维持软骨的生物力学功能起决定性作用^[9]。组织移植法是目前研究的热点课题,有自身组织移植、同种异体移植,有些借助支架结构辅助移植来修复软骨组织缺损,但因为存在移植组织与原有组织难以愈合、支架结构难以维持良好形态等原因,致使目前组织移植修复软骨损伤收效不佳,还有待进一步的研究^[10]。本研究结果显示,兔膝关节急性软骨损伤模型用牛膝醇提物干预后高、中、低剂量组 HE 染色显示软骨基质染色正常,软骨细胞数量较对照组增多,结构纹理

变整齐,改良 Mankin's 评分明显降低,并且以高剂量组明显,表明牛膝醇提物能有效刺激软骨细胞增殖,维持软骨基质成分,能有效促进软骨损伤修复过程。在免疫组化中,高、中、低剂量组结果提示Ⅱ型胶原阳性表达量明显增加,结构纹理清晰,表明牛膝醇提物能增加软骨Ⅱ型胶原表达,维持软骨基质成分,加快软骨病变的修复,并且以高剂量作用明显,呈一定的剂量依赖性。但其药量大剂量使用尚缺乏安全性评价,有研究报道牛膝醇提物大剂量时对实验小动物心脏有抑制作用^[5],其具体作用机理尚待进一步研究。

急性软骨损伤属于中医筋骨损伤范畴,现代研究已经证实许多补肾类、活血类中药对筋骨损伤的各个病理环节都能起到重要作用^[11-14]。明代《本草纲目》曰:“牛膝乃足厥阴、少阴之药。所主之病,大抵得酒则能补肝肾,生用则能去恶血,二者而已”。因此我们借助牛膝醇提工艺来增加牛膝作用效果,通过实验证实了牛膝醇提物能有效刺激急性软骨损伤病损软骨细胞增殖,提高软骨Ⅱ型胶原表达,维持软骨基质成分,修复软骨损伤,与中药学牛膝能“补肝肾,强筋骨”的中医理论相符合,但其促进软骨细胞增殖、提高Ⅱ型胶原表达的具体机制以及其有效成分尚需进一步探讨。

参考文献

- [1]王东明,卫小春. 膝关节软骨钝性损伤的研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2005, 13(16): 1263-1265.

(下转第 1526 页)

温阳散寒作用^[6]。

三阴三阳作为人体六系统,与五脏五系统一样,都是客观存在的,二者具有相关性,但各有特点,都在从不同角度阐述人体的生命活动。三阴三阳六系统在人体健康情况下总体功能上是统一的,但他们并不是一一对应的,六系统既有统一性,又有特殊性。三阴三阳各系统功能不平衡,决定了人群体质可划分为三阴三阳六个类型。即太阳体质、阳明体质、少阳体质、太阴体质、少阴体质、厥阴体质。针对少阴体质之人,我们认为,“可分为少阴阳虚之人、少阴阴虚之人、少阴阴阳俱虚之人。少阴阳虚之人,体质虚弱,平素畏寒,腰膝酸冷,性功能减退,发病易表现为畏寒肢冷、腰膝冷痛、神疲思睡,甚至可见四肢厥冷、冷汗淋漓等阳衰危证(少阴寒化证),即四逆汤证、真武汤证、附子汤证等^[7]。既然少阴有体质的概念,那么少阴阳虚体质之人不管是感受外邪还是内伤七情,均可表现为肝气郁结的四逆散证。如果阳虚体质由于外界诱因转化为阳虚的病理状态,则势必不能温化水饮,水邪变动不居,横窜三焦,而成“或咳、或悸、或小便不利、或腹中痛、或泄痢下重”。因此,治疗上既要疏肝理气,又须兼顾阳虚体质,所以或然证所用桂枝、干姜、附子、薤白、茯苓有温阳散寒利水作用。

也有学者已认识到四逆散证的形成与体质相关,如马小娜^[8]认为,“四逆散证当以阳虚为本,阳郁为标,是因阳虚在前,才有阳郁在后的阳虚兼郁之

证。故而方后化裁所用药多性偏温热,正是针对四逆散证机中之阳虚而设”。

综上所述,阳郁论、肝脾不和论、枢机论从不同角度探析了四逆散的证治,丰富了经方的研究思路,但是用以解释《伤寒论》第 318 条依据不足。热厥论、寒厥论则误读了《伤寒论》,陷入了“四逆”非寒即热、非热即寒的困局。本文提出四逆散证为少阴阳虚体质基础上所形成的肝气郁滞证,既解决了诸家对于四逆散证缘何为少阴病的困惑,又阐明了其或然证所用温、热药物的理由。

参考文献

- [1]王琦. 伤寒论讲解[M]. 郑州:河南科学技术出版社, 1988;325.
- [2]李宇航. 论四逆散开阖以运枢机[J]. 北京中医药大学学报, 1998, 21(4):11.
- [3]熊曼琪. 伤寒学[M]. 2 版. 北京:中国中医药出版社, 2007;237-259.
- [4]邓中甲. 方剂学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2003;84.
- [5]畅洪昇,王庆国,梁吉春. 《伤寒论》四逆散证治及组方研究[J]. 北京中医药大学学报, 2004, 27(5):3.
- [6]赵进喜,王富龙. 伤寒论与中医现代临床[M]. 北京:人民军医出版社, 2006;260.
- [7]赵进喜. 《伤寒论》“六经钤百病”探识[J]. 中医药学刊, 2005, 23(2):211.
- [8]马小娜. 《伤寒论》四逆散证病机探析[C]. 咸阳:中华中医药学会第十七届仲景学说学术研讨会论文集, 2009.

(收稿日期:2013-03-26;修回日期:2013-04-19)

[编辑:黄 健]

(上接第 1506 页)

- [2]彭力平,马笃军,林栋栋,等. 牛膝醇提物体内诱导兔骨关节炎模型软骨修复的病理学观察[J]. 湖南中医杂志, 2013, 29(2):126-129.
- [3]赵佳,杨桂枝,田汉文. 牛膝醇提物对佐剂性关节炎模型大鼠滑膜病理的影响[J]. 西部医学, 2008, 20(3):485-487.
- [4]Marijnissen AC, van Roermund PM, TeKoppele JM, et al. The canine ‘groove’ model, compared with the ACLT model of osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2002, 10(2):145-155.
- [5]高学敏. 中药学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2002; 384.
- [6]熊远珍. 实验动物与人用药量的新换算[J]. 江西医学院学报, 1997(4):41.
- [7]张尚普. 强力霉素对实验性骨关节炎软骨退变的影响[D]. 石河子:石河子大学, 2009;6.
- [8]Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology

with biochemical and metabolic data[J]. J Bone Joint Surg Am, 1971, 53 (3):523-537.

- [9]王东明. 钝性损伤后关节软骨的变化[D]. 太原:山西医科大学, 2011;10-12.
- [10]陈康,王大平,朱伟民. 关节软骨损伤临床治疗新进展[J]. 中国临床解剖学杂志, 2012, 30(4):476-478.
- [11]孙奋勇,潘秋辉,洪岸. 牛膝促进成骨细胞增殖的作用与机理研究[J]. 中药材, 2004, 27(4):264-266.
- [12]尚平,贺宪,安耀武,等. 骨碎补总黄酮对骨关节炎家兔骨髓间充质干细胞软骨定向分化的实验研究[J]. 生物骨科材料与临床研究, 2009, 6(6):10-13.
- [13]修忠标,林建华,吴朝阳,等. 鹿茸多肽对兔骨髓间质干细胞体外软骨表型诱导分化的影响[J]. 中国骨伤, 2007, 20(1):31-33.
- [14]黄勇,黄秀深,胡一梅. “左归丸”配伍规律对骨髓源成体干细胞定向分化的调控作用[J]. 成都中医药大学学报, 2010, 33(1):48-52.

(收稿日期:2013-01-24;修回日期:2013-05-05)

[编辑:邓 媛]