

壮骨关节胶囊对 SD 大鼠骨性关节炎并骨质疏松症骨密度和雌激素受体表达的影响

马锋, 马敬祖, 巩凡, 高俊

宁夏回族自治区人民医院骨科, 宁夏 银川 750021

摘要: **目的** 建立骨性关节炎 + 骨质疏松症 SD 大鼠模型, 观察壮骨关节胶囊对 SD 大鼠骨性关节炎并骨质疏松症模型骨密度和雌激素受体表达的影响。**方法** 取 30 只雌性未孕 SD 大鼠, 随机分为对照组、骨性关节炎 + 骨质疏松症组(模型组)、骨性关节炎 + 骨质疏松症 + 壮骨关节胶囊组(治疗组), 每组 10 只。模型组及治疗组采用去势法 + 改良 Hulth 法制作骨质疏松症模型 + 骨性关节炎模型, 治疗组建模后 12 周给予壮骨关节胶囊连续 8 周。对照组大鼠仅切除卵巢周围少许脂肪组织和右膝少量滑膜。术后仅予等量生理盐水。8 周后制作右侧股骨髁标本, 光镜观察大鼠右侧股骨内髁关节软骨组织形态学变化, 双能 X 射线观察大鼠右侧股骨骨密度变化, 运用免疫组织化学方法检测雌性大鼠各组骨组织中雌激素受体(ER)的变化。**结果** 光镜下观察模型组大鼠软骨层明显变薄, 软骨细胞少, 结构不规则且多有裂隙, 可见到大量的同源软骨细胞, 治疗组明显好转; 模型组大鼠骨密度较对照组明显下降($P < 0.01$), 治疗组经壮骨关节胶囊干预后骨密度上升($P < 0.05$)。免疫组化结果显示, 按阳性细胞灰度比较, 模型组 ER α 、ER β 表达量较对照组显著降低(P 均 < 0.01), 治疗组与模型组比较, ER α 、ER β 表达量增加(P 均 < 0.01)。**结论** 壮骨关节胶囊对骨性关节炎合并骨质疏松症 SD 大鼠骨密度有上调作用, 并提高成骨细胞 ER α 、ER β 的表达, 但其有效作用机制尚需进一步研究探讨。

关键词: 骨密度; 壮骨关节胶囊; 动物模型; 雌激素受体

中图分类号: R 681 R-33 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2017)03-0391-04

Effect of Zhuangguguanjie capsule on bone mineral density and estrogen receptor expression in SD rats with osteoarthritis and osteoporosis

MA Feng, MA Jing-zu, GONG Fan, GAO Jun

Department of Orthopedics, Ningxia Hui Autonomous Region People's Hospital, Yinchuan,

Ningxia Hui Autonomous Region 750021, China

Abstract: Objective To establish animal model of osteoarthritis (OA) plus osteoporosis (OP) and observe the effects of Zhuangguguanjie on bone mineral density and estrogen receptor (ER) in SD rats with OA and OP. **Methods** Thirty female unpregnant SD rats were selected, and the rats were randomly divided into control group, model group and treatment group ($n = 10$ each). The model of OA plus OP was established by ovariectomy and modified Hulth method in model group and treatment group, and Zhuangguguanjie capsule was given for 8 weeks continuously 12 weeks after modeling in treatment group. In control group, a little fat tissues around the ovary and a small amount of right knee synovium were removed only, and equivalent distilled water was given after operation. Right femoral condyle specimen was prepared to observe morphologic changes of articular cartilage tissues of femoral medial condyle under light microscope. Dual-energy X ray was used to observe the changes of right femur bone mineral density. Immunohistochemical methods was used to detect estrogen receptor (ER) expression in bone tissues. **Results** Findings under light microscope showed that in model group, cartilage layer thinned; chondrocytes decreased; structure was irregular and had many cracks; a large number of homologous chondrocytes can be seen. Aforementioned changes obviously improved in treatment group. X ray examination showed that compared with control group, bone mineral density decreased significantly in model group ($P < 0.01$), while it increased in treatment group after drug intervention ($P < 0.05$). Immunohistochemical results showed that according to the comparison of positive cells grey value, the expression quantities of ER α and ER β in model group decreased significantly compared with control group (all $P < 0.01$), and the expression quantities of ER α and ER β in treatment group increased significantly compared

with model group (all $P < 0.01$). **Conclusion** Zhuangguguanjie capsule can improve cartilage morphology, increase bone mineral density and expressions of ER α and ER β in osteoblasts in SD rats with OA and OP, but its effective mechanism needs to be studied further.

Key words: Bone mineral density; Zhuangguguanjie capsule; Animal model; Estrogen receptor

骨性关节炎和骨质疏松症同为与年龄有关的退行性疾病,涉及到软骨和骨的诸多病变。国内骨性关节炎的发病率为 3.0% ~ 8.3%^[1-2], 55 ~ 64 岁人群达 40%^[3], 骨质疏松症的发病率为 5.6%, 在临床上能见到二者共存于同一患者, 这两种疾病相互促进、发展, 具有正相关的相关性^[4]。随着人口老龄化的加速, 骨质疏松症与骨性关节炎发病率不断升高, 严重影响中老年人的生活质量。壮骨关节胶囊可有效缓解患者疼痛等症状, 改善膝关节功能, 提高生活质量, 具有比较好的临床疗效^[5], 但机制不清, 本实验旨在观察壮骨关节胶囊对骨性关节炎和骨质疏松症的改善作用, 并探讨其可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SD 雌性未孕 6 月龄大鼠 30 只, 由宁夏医科大学实验动物中心提供。

1.2 实验药品 壮骨关节胶囊(华润三九医药股份有限公司提供)。

1.3 主要试剂和仪器 医学图像分析管理系统(北航 CMIAS99 系列); X-RAY 分析仪(规格: carestream FXPRO, 美国 Lunar 有限公司); 兔抗 ER α (MC-20) sc-542 和山羊抗 ER β (L-20) sc-6822 (Santa Cruz 产品); 其余试剂均为国产分析纯试剂。

1.4 动物分组及造模 SD 雌性未孕 6 月龄大鼠 30 只, 饲养于 12 h 交替、室温(24 \pm 2) $^{\circ}$ C 环境中, 按体重编号后随机分为: 对照组、骨性关节炎 + 骨质疏松组(模型组)、骨性关节炎 + 骨质疏松 + 壮骨关节胶囊组(治疗组), 每组 10 只。大鼠分组后, 适应性喂养 1 周后, 8% 水合氯醛(0.5 ml/100 g) 腹腔注射麻醉, 腹位固定, 无菌条件下模型组及治疗组行背部两侧腰椎旁 1.5 cm 处纵行切口入腹, 切除双侧卵巢, 结扎卵巢动脉, 关腹^[6]; 同时无菌条件下行右膝关节交叉韧带切断, 并将半月板摘除, 关闭切口^[7]; 对照组大鼠仅切除卵巢周围少许脂肪组织和右膝少量滑膜。术后连续 3 d 大腿肌肉注射青霉素, 每只大鼠 40 kU/kg。

1.5 壮骨关节胶囊溶液的服用 各组大鼠术后 12 周, 每组分为 2 笼, 每笼 5 只, 观察 1 周。计算每只大鼠每天饮水量(选用盖、嘴完好的 500 ml 鼠用饮水瓶, 用 250 ml 量筒分别加入 200 ml 自来水, 每天换水

一次, 换水时分别量取每瓶中剩余水量, 计算出饮水量)之后, 各组大鼠自由饮水服用药物, 治疗组每只大鼠按体质量自饮药物, 根据大鼠换算出服药量[大鼠剂量(mg \cdot kg $^{-1}$ \cdot d $^{-1}$) = 1 800 mg \times 0.018/0.2] = 162 mg \cdot kg $^{-1}$ \cdot d $^{-1}$, 1 次/d, 连续 8 周。对照组给予等量的蒸馏水。每天上午 9 点开始断水, 至下午 7 点加入各自剂量药物于饮水瓶中, 饮水量为每只大鼠每天饮水量的一半, 至晚上 11 点观察剩余饮水量, 如果基本无剩余, 则补足每只大鼠每天饮水量, 如果剩余较多, 可适当减少, 要确保大鼠在每天下午 7 ~ 10 点的时间内摄取每天所需药量。

1.6 光镜观察 药物处理 8 周后, 取右侧股骨髁标本, 盐酸脱钙 4 周, 石蜡包埋、切片, 裱于干净载玻片上, 60 $^{\circ}$ C 烤片机烤片过夜, 二甲苯脱蜡 5 min, 4 次, 体积分数 100%、95%、90%、85% 乙醇各 5 min, 流水冲洗 5 min, 苏木精 - 伊红染色 5 min。封固后光镜观察。

1.7 骨密度测定

1.7.1 图像拍摄 拍摄视场(fov): 100 mm, 拍摄部位尽量位于视野中间, 曝光时间 2 min 滤膜选择 0.8 mm。

1.7.2 图像处理 打开图片、转化单位、图片放大、选框, 框与骨头要平行, 左右两侧区域大小一致) 骨密度数值测定。

1.8 药物处理 8 周后, 腰椎雌激素受体(ER) α 和 ER β 的免疫组化检测 分离大鼠第一腰椎, 将腰椎上的肌肉剔除, 固定于 10% 的多聚甲醛中, 1 周后放于 8% 的中性 EDTA 中, 4 $^{\circ}$ C 脱钙, 每周更换脱钙液 1 次, 待骨质脱钙完全如橡胶感后, 常规石蜡包埋切片, 切片脱蜡后用 1% 甲醇 - 过氧化氢液处理 30 min 后, 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液(PBS) 冲洗, 将切片放入盛有枸橼酸钠缓冲液的修复盒中, 置微波炉内使容器内液体温度保持在 92 ~ 98 $^{\circ}$ C 并维持 12 min。冷却后经 0.01 mol/L 的 PBS 充分冲洗, 山羊血清处理 30 min 后, 采用 SPTM 试剂盒进行染色, 加入兔抗 ER α 或山羊抗 ER β 后置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜, 再加入生物素标记的二抗(37 $^{\circ}$ C), 60 min 后加入辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素, 孵育 30 min 后, 二甲氨基偶氮苯(DAB) - 过氧化氢显色约 5 min, 用 0.01 mol/L 的 PBS 充分冲洗以终止反应。以上各步骤之间均用

0.01 mol/L 的 PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,阴性对照用 0.01 mol/L 的 PBS 替代第一抗体。每组动物选 5 只,每张切片选 5 个视野,应用医学图像分析仪测定阳性细胞灰度值。

1.9 统计学分析 采用 SPSS 20.0 统计学软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

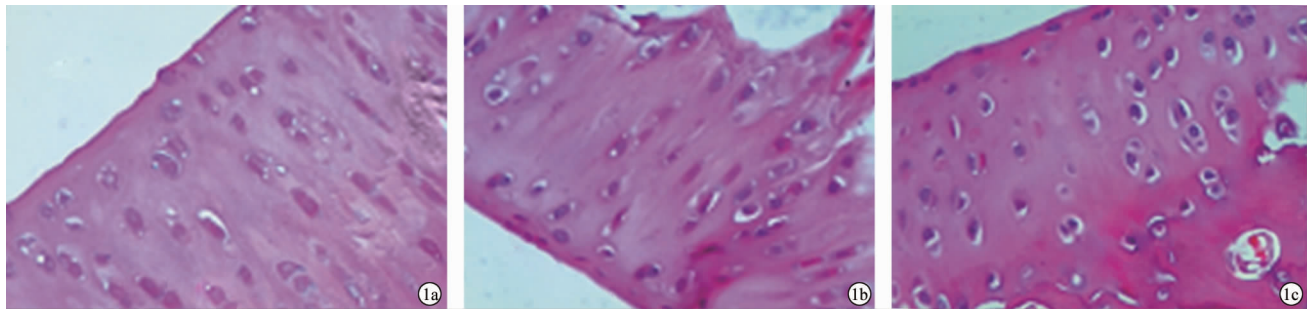
2.1 各组大鼠右股骨髌关节面观察结果

2.1.1 大体观察 对照组:大鼠的右股骨髌可见关节面平整,光泽亮,关节软骨部分轻度退变,无骨赘形成。模型组:大鼠的右股骨髌可见关节面不平整,毛糙模糊,光泽差,颜色发暗红,关节软骨损坏,内髌负重区软骨剥脱,关节边缘有骨赘形成。治疗组:大鼠的右股骨髌可见关节面有轻度不平整,光泽稍差,颜色发暗,关节软骨轻度损坏,内髌负重区软骨有少量剥脱,关节边缘有少量骨赘形成。

2.1.2 光镜观察 对照组软骨 HE 染色后观察,其软骨细胞形态完整,分布均匀且排列整齐,以基质为主;模型组软骨层明显变薄,软骨细胞少,结构不规则且多有裂隙,可见到大量的同源软骨细胞;治疗组均可见软骨表层不平整,中层可见较多增生排列不规则的软骨细胞,常聚集成团。见图 1。

2.2 各组大鼠骨密度测定 对照组、模型组、治疗组右侧股骨近端骨密度分别为 $(8.94 \pm 0.44) \text{ g/cm}^2$ 、 $(5.94 \pm 0.22) \text{ g/cm}^2$ 、 $(6.35 \pm 0.16) \text{ g/cm}^2$ 。与对照组比较,模型组和治疗组骨密度下降(P 均 < 0.05),与模型组比较,治疗组骨密度上升($P < 0.05$)。

2.3 各组大鼠 ER 的表达 免疫组化结果显示,椎体松质骨中 $\text{ER}\alpha$ 、 $\text{ER}\beta$ 主要分布于骨小梁周围的成骨细胞、破骨细胞及骨髓基质细胞中,阳性颗粒为棕黄色,胞浆胞核均有表达,但胞核着色较深。按阳性细胞灰度值,模型组大鼠较对照组 $\text{ER}\alpha$ 、 $\text{ER}\beta$ 阳性表达量明显降低($P < 0.01$),而治疗组与模型组相比显著增加($P < 0.01$)。见表 1。



注:1a:对照组;1b:模型组;1c:治疗组。

图 1 各组大鼠股骨髌病理组织学(HE 染色, $\times 400$)

表 1 各组大鼠骨组织 ER 的表达 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	$\text{ER}\alpha$ 阳性表达	$\text{ER}\beta$ 阳性表达
对照组	138.369 ± 10.249	119.269 ± 6.284
模型组	$103.367 \pm 9.275^*$	$70.629 \pm 6.249^*$
治疗组	$130.245 \pm 7.286^\#$	$99.276 \pm 4.264^\#$

注:与对照组比较, $* P < 0.01$;与模型组比较, $^\# P < 0.01$ 。

3 讨论

在与年龄增加有关的疾病中,以骨性关节炎和骨质疏松症两种疾病最常见,均以疼痛为主要临床表现,发病机制不清,无有效治疗方法,并经常相伴,易造成诊治的混淆和遗漏。人们在研究这两种疾病的时候,发现了一些规律:二者均与年龄有关;女性的患病率均高于男性;流行病学研究发现,两种疾病有一定的比例存在于同一个个体的现象。但越来越多的观点都倾向于认为骨质疏松症是骨性关节炎的病因之一。骨质疏松是因人体内分泌代谢异常,以骨量减少、骨组织微细结构破坏导致骨骼脆性和骨折危险性

增加为特征的一种系统性全身性骨骼疾病。它的发生与激素调控、营养状态、物理因素、免疫机能和遗传等因素的变化密切相关,治疗强调在抑制破骨细胞作用的同时提高成骨细胞的功能,增强肌力协调平衡以预防骨质疏松骨折。骨性关节炎是以软骨改变为主要特征,进而造成软骨下骨坏死,囊性变,骨密度增加和伴发骨赘形成的一种非特异性炎症。骨性关节炎的发生与软骨代谢异常、酶代谢异常、生化学改变、营养学改变、损伤及自身免疫异常等多因素相关,治疗以软骨修复、止痛及关节重建为主要方法。目前临床上一直在寻找一种不仅能抑制破骨促进成骨,而且可促进软骨修复的药物。本研究的落脚点为传统中药复方制剂,探讨其作用及其机制。

Richette 等^[8]研究测定 21 例绝经前后骨性关节炎妇女关节液及血中雌激素水平,结果显示关节液中检测到雌激素并与血液中雌激素水平相关,其中 ER 介导作用有重要的影响,雌激素及 ER 在骨质疏松中

扮演重要角色,软骨下骨的骨吸收抑制可以治疗骨性关节炎的发生^[9]。研究表明,与正常人相对照,骨性关节炎患者骨密度明显下降^[10-11]。SD 大鼠经过 Halth 改良造模 + 去势造模法后,该组大鼠既加速了关节软骨的退变、损坏、骨质异常增生,又有骨密度的明显降低,成功制备了骨性关节炎 + 骨质疏松症模型。国内外学者一致认为,双能 X 射线骨密度仪是测量大鼠骨量的精确、有效的方法,是评估防治药物作用的可靠指标^[12]。骨性关节炎的轻重程度与骨密度值也有关^[13-14]。本实验结果显示,对照组软骨细胞形态完整,分布均匀且排列整齐,模型组软骨层明显变薄,软骨细胞少,结构不规则且多有裂隙,可见到大量的同源软骨细胞;治疗组可见较多增生排列不规则的软骨细胞,常聚集成团,较模型组明显改善,同时治疗组较模型组骨密度有所提高,说明壮骨关节胶囊可以提高因 ER 减少造成骨质疏松症大鼠的骨密度,而且对骨性关节炎导致的软骨损伤具有修复作用。

体外实验的研究证明,雌激素通过其受体对成骨细胞的增殖、分化、对机械应变的适应性应答及其基质蛋白的合成有直接促进作用,而且成骨细胞上 ER 的表达依赖于细胞周期^[15]。雌激素通过 ER 直接诱导破骨细胞的凋亡、抑制破骨细胞的骨吸收活性^[16]。ER 在骨骼细胞水平上主要定位于成骨细胞和生长板的软骨细胞中,胞质、胞核中均有表达,而在破骨细胞和骨细胞中的表达水平较低^[17],对成骨细胞和破骨细胞有双向调节作用。敲除小鼠体内 ER α 基因表达,可以导致小鼠骨密度明显下降^[9,18]。中老年妇女骨质疏松症与雌激素水平有明确关系;而雌激素水平也对中老年妇女骨性关节炎产生影响。因此本实验以 ER 为靶点探讨壮骨关节胶囊对骨质疏松的作用。

骨性关节炎、骨质疏松症同属于中医学的“骨痹”、“骨痿”范畴,祖国医学认为肾主骨而生髓,与骨骼的关系密切,现代医学研究肾的盛衰与骨矿含量密切相关,随着年龄的增长,骨骼中骨矿含量逐渐减少,同时伴随着年老肾虚的发展而发病率逐渐升高。肾气虚会影响钙磷的代谢,出现骨的矿物质代谢异常,骨吸收明显大于骨形成,骨密度下降,导致骨质疏松^[11]。本课题采用的壮骨关节胶囊,其主要成分为:狗脊、淫羊藿、独活、骨碎补、续断、补骨脂、桑寄生、鸡血藤、乳香、没药,正是针对本病的肝肾不足、气滞血瘀、经络痹阻。本实验结果显示壮骨关节胶囊可改善软骨形态,提高骨密度和成骨细胞 ER α 、ER β 的表达,说明其可能是通过多途径来实现其作用,其他机制还需进一步探讨。

参考文献

- [1] 施桂英. 关节炎概要 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005.
- [2] 吴广文, 叶锦霞, 郑春松, 等. 骨性关节炎模型大鼠关节软骨变化及透骨消痛胶囊干预的作用 [J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(49): 7924 - 7929.
- [3] 张凯, 洪汉刚, 孟庆才, 等. 补肾通络法对大鼠骨性关节炎模型、骨质疏松症模型血清雌激素干预实验研究 [J]. 新疆医学, 2014, 44(4): 6 - 11.
- [4] 李毅, 伍骥, 高丽伟, 等. 骨性关节炎与骨质疏松症相关性研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2011, 17(5): 397 - 399, 404.
- [5] 胡滨. 壮骨关节胶囊治疗膝关节骨性关节炎 60 例临床研究 [J]. 中国实用医药, 2015, 10(23): 201 - 202, 203.
- [6] Iwaniec UT, Yuan D, Power RA, et al. Strain-dependent variations in the response of cancellous bone to ovariectomy in mice [J]. J Bone Miner Res, 2006, 21(7): 1068 - 1074.
- [7] 陆圣君, 杨述华. 降钙素对大鼠骨关节炎关节软骨和软骨下骨的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2008, 14(3): 183 - 186, 182.
- [8] Richette P, Laborde K, Boutron C, et al. Correlation between serum and synovial fluid estrogen concentrations: comment on the article by Sowers et al [J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(2): 698 - 699.
- [9] Martin-Millan M, Almeida M, Ambrogini E, et al. The estrogen receptor-alpha in osteoclasts mediates the protective effects of estrogens on cancellous but not cortical bone [J]. Mol Endocrinol, 2010, 24(2): 323 - 334.
- [10] Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, et al. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts [J]. Cell, 2007, 130(5): 811 - 823.
- [11] 史晓, 祁丽丽, 杨文宏, 等. 补肾健脾通络方治疗原发性骨质疏松症的临床研究 [J]. 上海中医药杂志, 2006, 40(7): 45 - 46.
- [12] 卢勇, 孟庆才, 方锐, 等. SD 大鼠骨性关节炎合并骨质疏松症模型的建立 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(46): 9092 - 9096.
- [13] 张玥, 代志, 马志会, 等. 壮骨 1 号方对豚鼠骨性关节炎和大鼠骨质疏松的改善研究 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(5): 681 - 684.
- [14] 孙剑, 裴敏蕾, 何永淮. 金天格胶囊治疗膝关节关节炎合并骨质疏松症的临床疗效观察 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2012, 20(7): 19 - 21.
- [15] 李丽娟, 孙晓丽, 苏海峰, 等. 壮骨伸筋胶囊对泼尼松致骨质疏松模型大鼠的改善作用及其机制研究 [J]. 中国药房, 2016, 27(13): 1788 - 1790.
- [16] Stein B, Yang MX. Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and C/EBP beta [J]. Mol Cell Biol, 1995, 15(9): 4971 - 4979.
- [17] Kusec V, Viridi AS, Prince R, et al. Localization of estrogen receptor-alpha in human and rabbit skeletal tissues [J]. J Clin Endocrinol Metab, 1998, 83(7): 2421 - 2428.
- [18] Høegh-Andersen P. Ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoarthritis: validation and application [J]. Arthritis Res Ther, 2004, 6(2): R169 - R180.