

# 龟鹿二仙胶及其拆方对去势骨关节炎大鼠血清雌二醇浓度及膝关节软骨细胞Ⅱ型胶原表达的影响

杜江, 黄远鹏, 李奕修, 余添赐, 魏迎辰, 王和鸣, 李楠

(福建中医药大学, 福建 福州 350122)

**摘 要** **目的:**观察龟鹿二仙胶及其拆方对去势骨关节炎大鼠血清雌二醇浓度及膝关节软骨细胞Ⅱ型胶原表达的影响。**方法:**采用抽签法将 168 只 4 月龄雌性 SD 清洁级大鼠随机分为 2 组, 手术造模组 141 只, 假手术组 27 只。切除手术造模组大鼠双侧的卵巢和双侧膝关节的内侧副韧带和前交叉韧带, 制造肝肾亏虚型骨关节炎大鼠模型; 切除假手术组大鼠双侧卵巢附近的脂肪组织。每天驱赶实验大鼠 1 h, 连续驱赶 4 周。4 周后分别从手术造模组与假手术组各取 5 只大鼠, 采用 HE 染色和甲苯胺蓝染色法观察子宫与膝关节软骨的组织形态学变化, 采用甲苯胺蓝染色法观察膝关节软骨基质中糖胺聚糖的表达情况, 采用放射免疫法测定血清雌二醇浓度, 鉴定大鼠模型。造模成功后将假手术组作为空白对照组(空白组), 并将其分为干预 2、4、8 周的 3 小组, 每组 7 只, 留 1 只备用; 采用抽签法将手术造模组随机分为 6 组, 即模型对照组(模型组)、龟鹿二仙胶组(全方组)、龟甲鹿角组(龟鹿组)、龟甲鹿角人参组(龟鹿参组)、龟甲鹿角枸杞组(龟鹿杞组)、盐酸氨基葡萄糖对照组(盐酸氨基葡萄糖组), 再分别将每组分为干预 2、4、8 周的 3 小组, 每组 7 只, 留 10 只备用。参照人与大鼠药物等效剂量换算公式, 将龟甲胶、鹿角胶、人参、枸杞、盐酸氨基葡萄糖分别配成浓度为  $81 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $54 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $10.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $27 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $13.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的药液。各组大鼠均以  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  体质量以各组药液灌胃, 空白组与模型组以生理盐水灌胃; 全方组以配成的龟鹿二仙胶混合液灌胃; 龟鹿组以配成的龟甲胶和鹿角胶混合液灌胃; 龟鹿参组以配成的龟甲胶、鹿角胶与人参混合液灌胃; 龟鹿杞组以配成的龟甲胶、鹿角胶、枸杞子混合液灌胃; 盐酸氨基葡萄糖组以配成的盐酸氨基葡萄糖溶液灌胃。每天灌胃 1 次, 各组分别连续灌胃 2、4、8 周。药物干预结束后, 从腹主动脉抽血后处死大鼠, 取出的血经静置、离心后吸取上层血清, 保存待检; 取出大鼠右侧中下 1/3 段股骨, 制备石蜡标本。采用放射免疫法检测大鼠血清雌二醇浓度, 采用免疫组化染色法观察关节软骨中Ⅱ型胶原的表达。**结果:**①形态观察。手术造模组与假手术组大鼠的子宫与膝关节软骨的组织形态学变化显示手术造模组造模成功。②药物干预前血清雌二醇浓度和膝关节软骨基质中糖胺聚糖含量。药物干预前, 手术造模组的血清雌二醇浓度明显低于假手术组 [ $(87.130 \pm 39.720) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(195.080 \pm 42.449) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $t=4.152$ ,  $P=0.003$ ]; 手术造模组的软骨基质中糖胺聚糖含量低于假手术组 [ $(0.239 \pm 0.066)$ ,  $(0.597 \pm 0.053)$ ;  $t=9.457$ ,  $P=0.000$ ]。显示手术造模组造模成功。③药物干预后血清雌二醇浓度。用药 2 周后, 各组间血清雌二醇浓度比较, 差异有统计学意义 [ $(204.082 \pm 50.995) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(80.191 \pm 29.921) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(129.583 \pm 48.763) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(121.223 \pm 51.514) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(117.582 \pm 50.131) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(128.181 \pm 45.987) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(114.479 \pm 39.346) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $F=4.520$ ,  $P=0.001$ ]。组间两两比较, 空白组高于模型组、全方组、龟鹿组、龟鹿参组、龟鹿杞组、盐酸氨基葡萄糖组 ( $P=0.000$ ,  $P=0.002$ ,  $P=0.001$ ,  $P=0.001$ ,  $P=0.003$ ,  $P=0.001$ ); 模型组低于全方组 ( $P=0.039$ ); 其余各组间血清  $E_2$  浓度比较, 差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。用药 4 周后, 各组间血清雌二醇浓度比较, 差异有统计学意义 [ $(204.819 \pm 53.802) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(91.613 \pm 32.654) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(148.727 \pm 51.860) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(146.576 \pm 32.976) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(145.225 \pm 49.217) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(146.365 \pm 45.800) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(132.197 \pm 46.032) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $F=4.278$ ,  $P=0.002$ ]。组间两两比较, 空白组高于模型组、全方组、龟鹿组、龟鹿参组、龟鹿杞组、盐酸氨基葡萄糖组 ( $P=0.000$ ,  $P=0.022$ ,  $P=0.013$ ,  $P=0.015$ ,  $P=0.013$ ,  $P=0.002$ ); 模型组低于全方组、龟鹿组、龟鹿参组、龟鹿杞组 ( $P=0.027$ ,  $P=0.027$ ,  $P=0.037$ ,  $P=0.027$ ); 其余各组间血清  $E_2$  浓度比较, 差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。用药 8 周后, 各组间血清雌二醇浓度比较, 差异有统计学意义 [ $(192.060 \pm 57.040) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(97.504 \pm 40.006) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(183.140 \pm 50.887) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(130.757 \pm 39.285) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(167.763 \pm 32.878) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(158.112 \pm 48.309) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(112.494 \pm 46.687) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $F=3.296$ ,  $P=0.009$ ]。组间两两比较, 空白组高于模型组、龟鹿组、盐酸氨基葡萄糖组 ( $P=0.000$ ,  $P=0.011$ ,  $P=0.001$ ); 模型组低于全方组、龟鹿参组、龟鹿杞组 ( $P=0.002$ ,  $P=0.005$ ,  $P=0.012$ ); 全方组高于盐酸氨基葡萄糖组 ( $P=0.010$ ); 其余各组间比较, 差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。④药物干预后膝关节软骨基质中Ⅱ型胶原的表达量。用药 2 周后, 各组间膝关节软骨基质中Ⅱ型胶原的表达量比

基金项目: 国家自然科学基金(30772814), 福建省自然科学基金(C0710028), 福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划(闽教科 2007 年 20 号)

通讯作者: 李楠 E-mail: mr.linan@126.com

较,差异有统计学意义 $[(0.598 \pm 0.096), (0.226 \pm 0.113), (0.310 \pm 0.070), (0.310 \pm 0.072), (0.311 \pm 0.075), (0.296 \pm 0.081), (0.389 \pm 0.068); F=33.533, P=0.000]$ 。组间两两比较,空白组高于模型组、全方组、龟鹿组、龟鹿参组、龟鹿杞组、盐酸氨基葡萄糖组 $(P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000)$ ;模型组低于全方组、龟鹿组、龟鹿参组、龟鹿杞组、盐酸氨基葡萄糖组 $(P=0.007, P=0.006, P=0.006, P=0.021, P=0.000)$ ;全方组低于盐酸氨基葡萄糖组 $(P=0.008)$ 。其余各组间比较,差异均无统计学意义 $(P>0.05)$ 。用药 4 周后,各组间膝关节软骨基质中 II 型胶原的表达量比较,差异有统计学意义 $[(0.603 \pm 0.083), (0.223 \pm 0.113), (0.387 \pm 0.090), (0.270 \pm 0.083), (0.371 \pm 0.059), (0.300 \pm 0.081), (0.442 \pm 0.067); F=37.064, P=0.000]$ 。组间两两比较,空白组高于模型组、全方组、龟鹿组、龟鹿参组、龟鹿杞组、盐酸氨基葡萄糖组 $(P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000)$ ;模型组低于全方组、龟鹿参组、龟鹿杞组、盐酸氨基葡萄糖组 $(P=0.000, P=0.000, P=0.011, P=0.000)$ ;全方组高于龟鹿组、龟鹿杞组 $(P=0.000, P=0.003)$ 。其余各组间 Collagen- II 表达量比较,差异均无统计学意义 $(P>0.05)$ 。用药 8 周后,各组间软骨基质中 II 型胶原的表达量比较,差异有统计学意义 $[(0.608 \pm 0.067), (0.217 \pm 0.106), (0.437 \pm 0.065), (0.263 \pm 0.110), (0.380 \pm 0.073), (0.273 \pm 0.081), (0.443 \pm 0.068); F=42.071, P=0.000]$ 。组间两两比较,空白组高于模型组、全方组、龟鹿组、龟鹿参组、龟鹿杞组、盐酸氨基葡萄糖组 $(P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000)$ ;模型组低于全方组、龟鹿参组、盐酸氨基葡萄糖组 $(P=0.000, P=0.000, P=0.000)$ ;全方组高于龟鹿组、龟鹿参组、龟鹿杞组 $(P=0.000, P=0.049, P=0.000)$ ;其余各组间 Collagen- II 表达量比较,差异均无统计学意义 $(P>0.05)$ 。**结论:**在提高血清雌二醇浓度方面,龟甲胶与鹿角胶配伍人参或枸杞均是有效配伍,且用药 2 周时配伍人参和枸杞的效果要优于单独配伍人参或单独配伍枸杞。但随着用药时间的延长,龟甲胶与鹿角胶配伍人参提高雌二醇浓度的效果好还是配伍枸杞的效果好,还是龟鹿二仙胶全方效果好,仍需进一步研究证实。在促进膝关节软骨基质中 II 型胶原表达方面,人参和枸杞在龟鹿二仙胶方中发挥了不可缺少的作用。

**关键词** 骨关节炎 龟鹿二仙胶 拆方研究 雌二醇 胶原 II 型 大鼠

**Effect of GUILU ERXIAN gelatin and its formula components on the concentrations of serum estradiol and expressions of Collagen- II in the chondrocytes of knee joint for ovariectomized rats with osteoarthritis** DU Jiang<sup>\*</sup>, HUANG Yuan-peng, LI Yi-xiu, YU Tian-ci, WEI Ying-chen, WANG He-ming, LI Nan. <sup>\*</sup> Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, Fujian, China

**ABSTRACT** **Objective:** To observe the effect of GUILU ERXIAN gelatin and its formula components on the concentrations of serum estradiol ( $E_2$ ) and expressions of Collagen- II in the chondrocytes of knee joint for ovariectomized rats with osteoarthritis (OA). **Methods:** One hundred and sixty-eight clean female SD rats of 4 months old were randomly divided into 2 groups, 141 cases in operation modeling group, while the others in sham operation group. Rats in operation modeling group were administrated with ovariectomy and removal of medial collateral ligament (MCL) and anterior cruciate ligament (ACL) of bilateral knee joints to build OA models of LIVER-KIDNEY DEFICIENCY type, while the cases in sham operation group were administrated with fat removal around the ovary. The experimental rats were forced to run 1 hour every day for 4 weeks, and then 5 rats were selected from operation modeling group and sham operation group respectively. The histological and morphological changes of uterus and knee articular cartilages were observed through HE staining and toluidine blue staining, the expressions of glycosaminoglycan (GAG) in knee articular cartilages matrix were observed through toluidine blue staining, and the concentrations of serum  $E_2$  were detected through radioimmunoassay to identify the rat models. After successful modeling, sham operation group was referred as blank control group (blank group), then it was further divided into 3 groups according to intervention times of 2, 4 and 8 weeks, 7 rats in each group, and 1 spared rat for resuranc. The operation modeling group was randomly divided into 6 groups, including model control group (model group), GUILU ERXIAN gelatin group (complete formula group), tortoiseshell-deerhorn group (TD group), tortoiseshell-deerhorn-ginseng group (TDG group), tortoiseshell-deerhorn-wolfberry group (TDW group) and glucosamine hydrochloride group (GHC group), and then they were respectively divided into 3 groups according to intervention times of 2, 4 and 8 weeks, 7 rats in each group, and 10 spared rat for resuranc. According to the conversion equation of drug equivalent dose for human and rats, the components as tortoiseshell glue, deerhorn glue, ginseng, wolfberry and GHC were respectively prepared into solution with concentrations of  $81 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $54 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $10.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $27 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  and  $13.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Rats in blank group and in model group were intragastric administrated with normal saline ( $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ); rats in complete formula group were intragastric administrated with mixed liquor ( $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) of GUILU ERXIAN gelatin; rats in TD group were intragastric administrated with mixed liquor ( $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) of tortoiseshell glue and deer-

horn glue; rats in TDG group were intragastric administrated with mixed liquor( $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) of tortoiseshell glue, deerhorn glue and ginseng; rats in TDW group were intragastric administrated with mixed liquor( $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) of tortoiseshell glue, deerhorn glue and wolfberry; while rats in GHC group were intragastric administrated with glucosamine hydrochloride solution( $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). Rats in each group were intragastric administrated once per day for 2, 4 and 8 weeks respectively. After medicine intervention, the rats were executed by drawing blood from abdominal aorta. After standing and centrifuging, the upper serum was sucked from the blood preparation for further inspection. After that, the middle and bottom thirds of right femur of rats were fetched out for paraffin specimen preparation. Concentrations of serum  $E_2$  of rats were detected through radioimmunoassay, and expressions of Collagen-Ⅱ in the articular cartilage were detected through immunohistochemical staining. **Results:** Successful modeling of operation modeling group was shown from the histological and morphological changes of uterus and knee articular cartilages of rats in operation modeling group and sham operation group respectively. Concentrations of serum  $E_2$  of operation modeling group were significantly lower than those of sham operation group [ $(87.130 \pm 39.720) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(195.080 \pm 42.449) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $t=4.152, P=0.003$ ] before medicine intervention; also the GAG content in knee articular cartilages matrix of operation modeling group was lower than that of sham operation group [ $(0.239 \pm 0.066)$ ,  $(0.597 \pm 0.053)$ ;  $t=9.457, P=0.000$ ]. Successful modeling of operation modeling group was shown from above results. There was statistical difference in concentrations of serum  $E_2$  among all the groups after 2 weeks medication [ $(204.082 \pm 50.995) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(80.191 \pm 29.921) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(129.583 \pm 48.763) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(121.223 \pm 51.514) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(117.582 \pm 50.131) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(128.181 \pm 45.987) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(114.479 \pm 39.346) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $F=4.520, P=0.001$ ]. Further pairwise comparison showed that the serum  $E_2$  concentrations of blank group were higher than those of other groups respectively ( $P=0.000, P=0.002, P=0.001, P=0.001, P=0.003, P=0.001$ ), and the serum  $E_2$  concentrations of model group were lower than those of complete formula group ( $P=0.039$ ), while there was no statistical difference in serum  $E_2$  concentrations between any other rest groups ( $P>0.05$ ). There was statistical difference in serum  $E_2$  concentrations among all the groups after 4 weeks medication [ $(204.819 \pm 53.802) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(91.613 \pm 32.654) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(148.727 \pm 51.860) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(146.576 \pm 32.976) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(145.225 \pm 49.217) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(146.365 \pm 45.800) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(132.197 \pm 46.032) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $F=4.278, P=0.002$ ]. Further pairwise comparison showed that the serum  $E_2$  concentrations of blank group were higher than those of other groups respectively ( $P=0.000, P=0.022, P=0.013, P=0.015, P=0.013, P=0.002$ ); and the serum  $E_2$  concentrations of model group were lower than those of complete formula group, TD group, TDG group and TDW group respectively ( $P=0.027, P=0.027, P=0.037, P=0.027$ ); while there was no statistical difference in serum  $E_2$  concentrations between any other rest groups ( $P>0.05$ ). There was statistical difference in serum  $E_2$  concentrations among all the groups after 8 weeks medication [ $(192.060 \pm 57.040) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(97.504 \pm 40.006) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(183.140 \pm 50.887) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(130.757 \pm 39.285) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(167.763 \pm 32.878) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(158.112 \pm 48.309) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(112.494 \pm 46.687) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $F=3.296, P=0.009$ ]. Further pairwise comparison showed that the serum  $E_2$  concentrations of blank group were higher than those of model group, TD group and GHC group respectively ( $P=0.000, P=0.011, P=0.001$ ); the serum  $E_2$  concentrations of model group were lower than those of complete formula group, TDG group and TDW group respectively ( $P=0.002, P=0.005, P=0.012$ ); the serum  $E_2$  concentrations of complete formula group were higher than those of GHC group ( $P=0.010$ ); while there were no statistical difference between any other rest groups ( $P>0.05$ ). There were statistical difference in Collagen-Ⅱ expressions in knee articular cartilages matrix among all the groups after 2 weeks medication [ $(0.598 \pm 0.096)$ ,  $(0.226 \pm 0.113)$ ,  $(0.310 \pm 0.070)$ ,  $(0.310 \pm 0.072)$ ,  $(0.311 \pm 0.075)$ ,  $(0.296 \pm 0.081)$ ,  $(0.389 \pm 0.068)$ ;  $F=33.533, P=0.000$ ]. Further pairwise comparison showed that Collagen-Ⅱ expressions of blank group were higher than those of other groups respectively ( $P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ); Collagen-Ⅱ expressions of model group were lower than those of complete formula group, TD group, TDG group, TDW group and GHC group respectively ( $P=0.007, P=0.006, P=0.006, P=0.021, P=0.000$ ); Collagen-Ⅱ expressions of complete formula group were lower than those of GHC group ( $P=0.008$ ); while there was no statistical difference between any other rest groups ( $P>0.05$ ). There were statistical difference in Collagen-Ⅱ expressions in knee articular cartilages matrix among all the groups after 4 weeks medication [ $(0.603 \pm 0.083)$ ,  $(0.223 \pm 0.113)$ ,  $(0.387 \pm 0.090)$ ,  $(0.270 \pm 0.083)$ ,  $(0.371 \pm 0.059)$ ,  $(0.300 \pm 0.081)$ ,  $(0.442 \pm 0.067)$ ;  $F=37.064, P=0.000$ ]. Further pairwise comparison showed that Collagen-Ⅱ expressions of blank group were higher than those of other groups respectively ( $P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ); Collagen-Ⅱ expressions of model group were lower than those of complete formula group, TDG group, TDW group and GHC group respectively ( $P=0.000, P=0.000, P=0.011, P=0.000$ ); Collagen-Ⅱ expressions of complete formula group were higher than those of TD group and TDG group respectively ( $P=0.000, P=0.003$ ); while there was no statistical difference in Collagen-Ⅱ expressions between any other rest groups ( $P>0.05$ ). There was statistical difference in Collagen-Ⅱ expressions in knee articular

cartilages matrix among all the groups after 8 weeks medication [  $(0.608 \pm 0.067)$ ,  $(0.217 \pm 0.106)$ ,  $(0.437 \pm 0.065)$ ,  $(0.263 \pm 0.110)$ ,  $(0.380 \pm 0.073)$ ,  $(0.273 \pm 0.081)$ ,  $(0.443 \pm 0.068)$ ;  $F = 42.071$ ,  $P = 0.000$ ]. Further pairwise comparison showed that Collagen-Ⅱ expressions of blank group were higher than those of other groups respectively ( $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ); Collagen-Ⅱ expressions of model group were lower than those of complete formula group, TDG group and GHC group respectively ( $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ); Collagen-Ⅱ expressions of complete formula group were higher than those of TD group, TDG group and TDW group respectively ( $P = 0.000$ ,  $P = 0.049$ ,  $P = 0.000$ ); while there was no statistical difference in Collagen-Ⅱ expressions between any other rest groups ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** Tortoiseshell glue and deerhorn glue combined with either ginseng or wolfberry can effectively increase serum  $E_2$  concentrations. Moreover, after 2 weeks medication, the effect of GUILU ERXIAN gelatin, which including tortoiseshell glue, deerhorn glue, ginseng and wolfberry, is better than that of tortoiseshell glue and deerhorn glue combined with either ginseng or wolfberry. However, further research is needed to find out the most effective combination for increasing serum  $E_2$  concentrations as the time of medication is prolonged. Both ginseng and wolfberry play an important role in the formula of GUILU ERXIAN gelatin in the improvement of Collagen-Ⅱ expressions in knee articular cartilages matrix.

**Key words** Osteoarthritis; GUILU ERXIAN gelatin; Formula components analysis; Estradiol; Collagen type Ⅱ; Rats

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 又称退行性关节炎、增生性骨关节炎。该病好发于女性, 尤其是绝经后妇女<sup>[1]</sup>。OA 属中医学“痹证”“痿证”之范畴, 最早记载于《内经》。中医学认为该病是由肝肾亏虚、长期劳损及外感风寒湿邪所致。本研究通过观察龟鹿二仙胶及其拆方对模型大鼠血清雌二醇 (Estradiol,  $E_2$ ) 浓度和膝关节软骨中Ⅱ型胶原 (Collagen-Ⅱ) 表达水平的影响, 对比不同拆方对促进血清雌二醇和软骨基质中Ⅱ型胶原合成的作用及其在全方中的作用。

## 1 材料与仪器

**1.1 实验动物** 4 月龄雌性 SD 清洁级大鼠 168 只, 体质量  $(230 \pm 20)$  g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司 [许可证号: SCXK (沪) 2007-0005], 由福建中医药大学实验动物中心饲养 [许可证号: SYXK (闽) 2009-0001]。

**1.2 实验药物** 龟鹿二仙胶由龟甲胶、鹿角胶、枸杞和人参组成, 龟甲胶、鹿角胶、枸杞和人参均选用培力药业有限公司生产的中药配方颗粒 (批号: A101209-0、A100010-01、A100873-02、A101134-02)。盐酸氨基葡萄糖 (glucosamine hydrochloride capsules, GHC) 由香港澳美制药厂提供 (批号: 1004108)。

**1.3 实验试剂** 兔抗大鼠 Collagen-Ⅱ (北京博奥森生物技术有限公司, 批号: 900102W)、链霉亲和素-生物素过氧化物酶复合物 (strept avidin-biotin complex, SABC) IHC Kit 试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司, 批号: BA1002)、二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 显色试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号: K102427C)、Poly 防脱载玻片 (北京中杉金桥生

物技术有限公司, 批号: 201082 中杉金桥)、多聚甲醛 (天津永大化学试剂有限公司, 批号: 20100326)、乙二胺四乙酸二钠 (ethylene diamine tetra acetic acid disodium salt, EDTA-2Na) (西陇化工股份有限公司, 批号: 1006051)。

**1.4 实验仪器** 医用缝合针 (上海申乐医疗器械有限公司), FJ-2008PS 型  $\gamma$  放射免疫计数器 (西安核仪器厂)、YP202N 型电子天平 (上海精密科学仪器有限公司)、BH3-MJL 型光学显微镜 (OLYMPUS)、BM-VII 型生物组织包埋机 (孝感市宏业医用仪器有限公司)、TS-12U 型生物组织自动脱水机 (孝感市宏业医用仪器有限公司)。

## 2 方法

**2.1 分组方法** 采用抽签法将 4 月龄雌性 SD 清洁级大鼠 168 只随机分为 2 组, 手术造模组 141 只, 假手术组 27 只。造模后分别从 2 组中各取 5 只鉴定大鼠模型。造模成功后将假手术组作为空白对照组 (空白组), 并将其分为干预 2、4、8 周的 3 小组, 每组 7 只, 留 1 只备用; 采用抽签法将手术造模组随机分为 6 组: 模型对照组 (模型组)、龟鹿二仙胶组 (全方组)、龟甲鹿角组 (龟鹿组)、龟甲鹿角人参组 (龟鹿参组)、龟甲鹿角枸杞组 (龟鹿杞组)、GHC 对照组 (GHC 组), 再将每组分为干预 2、4、8 周的 3 小组, 每组 7 只, 留 10 只备用。

**2.2 造模方法** 将大鼠称体质量后, 采用 2% 戊巴比妥钠 ( $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 腹腔注射。麻醉成功后, 切除手术造模组大鼠双侧的卵巢<sup>[2]</sup>和双侧膝关节的内侧副韧带和前交叉韧带<sup>[3]</sup>, 制造肝肾亏虚型去势骨关节炎

大鼠模型<sup>[4]</sup>。对假手术组大鼠,仅切除双侧卵巢附近的脂肪组织。术后将实验大鼠置于约 25 ℃ 的环境中,每天肌肉注射 4 万单位青霉素以预防感染,连续注射 3 d;每天驱赶实验大鼠 1 h,连续驱赶 4 周。

**2.3 模型鉴定** 驱赶实验大鼠 4 周后,分别从手术造模组与假手术组各取 5 只大鼠,采用 HE 染色和甲苯胺蓝染色法观察子宫与膝关节软骨的组织形态学变化,采用甲苯胺蓝染色法观察组织中糖胺聚糖(glycosaminoglycan, GAG)表达情况,采用放射免疫法测定血清 E<sub>2</sub> 浓度,鉴定大鼠模型。

**2.4 干预方法** 大鼠给药剂量参照按体表面积换算的人与大鼠药物等效剂量换算公式<sup>[5]</sup>计算,计算后各药物每天的剂量分别为:龟甲胶 810 mg · kg<sup>-1</sup>,鹿角胶 540 mg · kg<sup>-1</sup>,人参 108 mg · kg<sup>-1</sup>,枸杞 270 mg · kg<sup>-1</sup>,GHC135 mg · kg<sup>-1</sup>,并分别配成 81 mg · mL<sup>-1</sup>、54 mg · mL<sup>-1</sup>、10.8 mg · mL<sup>-1</sup>、27 mg · mL<sup>-1</sup>、13.5 mg · mL<sup>-1</sup> 的药液灌胃。各组均以 10 mL · kg<sup>-1</sup> 体重以各组药液灌胃,空白组与模型组以生理盐水灌胃;全方组以配成的龟鹿二仙胶混合液灌胃;龟鹿组以配成的龟甲胶和鹿角胶混合液灌胃;龟鹿参组以配成的龟甲胶、鹿角胶与人参混合液灌胃;龟鹿杞组以配成的龟甲胶、鹿角胶、枸杞子混合液灌胃;GHC 组以配成的 GHC 溶液灌胃。每天灌胃 1 次,各组分别连续灌胃 2、4、8 周。

**2.5 取材方法** 各组分别于药物干预 2、4、8 周后取材,取材前 24 h 禁食但不禁水。用 10% 水合氯醛(3 mL · kg<sup>-1</sup>)腹腔注射麻醉,从实验大鼠的腹主动脉抽血后处死大鼠。取出的血静置 1 h 后,用离心机离心 10 min(转速 3 000 r · min<sup>-1</sup>,离心半径 13.5 cm),吸取上层血清,将其置入 4 ℃ 冰箱内保存待检。处死大鼠后,立即取出大鼠右侧下 1/3 段股骨,将其置入 4% 中性多聚甲醛溶液中固定 24~48 h,再用 10% EDTA-2Na 脱钙 4~6 周,确认脱钙成功后,切取大鼠右膝关节股骨内侧髌关节面软骨做标本,常规脱水、石蜡包埋后,将蜡块置入 4 ℃ 冰箱内保存待检。

## 2.6 实验指标测定

**2.6.1 放射免疫法检测血清 E<sub>2</sub> 浓度** ①将待检的血清样本取出后置入离心机中离心 10 min(转速 3 000 r · min<sup>-1</sup>,离心半径 13.5 cm),然后抽取样本待检;②根据不同的检测目标,按说明书配制好相应的目标 I 135 抗体、目标抗体、目标标准品和免疫分离

剂;③为各放免试管作标记,并分别加入相应试剂;④加入试剂后,各试管在试管架上按序排好,震荡 10~20 s;⑤将试管盖上保鲜膜后,放入 37 ℃ 水浴锅中静置 1 h;⑥取出试管架后,除 T 管外各加入 500 μL 分离剂,震荡 10~20 s 后,室温静置 15 min;置入离心机中离心 15 min(转速 3 500 r · min<sup>-1</sup>,离心半径 13.5 cm),吸弃上清液;⑦各试管按序放入 γ 放射免疫计数器中测定各管沉淀计数。

**2.6.2 甲苯胺蓝染色法观察膝关节软骨基质中 GAG 的表达** ①将蜡块修切成厚为 4 μm 的切片,常规摊片、烘片、烤片,温度设为 58 ℃,共 2 h;②切片经二甲苯脱蜡 2 次,每次 10 min;③梯度乙醇入水:无水乙醇、95% 乙醇、90% 乙醇、80% 乙醇、70% 乙醇、蒸馏水各 5 min;④放入 0.5% 甲苯胺蓝染液中 20 min;⑤水洗 1 min;⑥放入 0.5% 冰醋酸溶液中分色 2 s;⑦蒸馏水洗 2 次,每次 2 min;⑧梯度乙醇脱水(顺序与入水相反);⑨二甲苯透明 2 次,每次 2 min;⑩中性树胶封片以待观察。

**2.6.3 免疫组化染色法观察膝关节软骨基质中 Collagen-Ⅱ 的表达** ①将蜡块修切成厚度为 4 μm 的切片,常规摊片(需用多聚赖氨酸处理过的载玻片)、烘片、烤片,温度设为 58 ℃,共 2 h;②二甲苯脱蜡 2 次,每次 10 min;③梯度乙醇入水:无水乙醇、95% 乙醇、90% 乙醇、80% 乙醇、70% 乙醇、蒸馏水各 5 min;④用阻水笔在组织周围画封闭的圆,边缘离组织 2~5 mm;⑤滴加 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,室温静置 5~10 min 后用蒸馏水洗 3 次,每次 2 min;⑥滴加胃酶消化液或胰酶消化液(需根据一抗调整),37 ℃ 孵育 5~10 min 后,置入磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer solution, PBS)中洗涤 3 次,每次 2 min;⑦滴加 5% 牛血清白蛋白封闭液,室温静置 20 min 后轻轻甩去多余液体;⑧滴加稀释后的一抗(不同检测指标用不同的一抗,且稀释倍数需做预实验确定),4 ℃ 孵育过夜后用 PBS 洗涤 3 次,每次 2 min;⑨滴加生物素化二抗,37 ℃ 孵育 20 min 后用 PBS 洗涤 3 次,每次 2 min;⑩滴加 SABC 试剂,37 ℃ 孵育 20 min 后用 PBS 洗涤 4 次,每次 5 min;⑪滴加 DAB 试剂(需用现配,避光保存),室温静置 5~30 min(需镜下观察调整)后用蒸馏水洗;⑫苏木精复染 2 min;⑬梯度乙醇脱水(顺序与入水相反);⑭二甲苯透明 2 次,每次 2 min;⑮中性树胶封片以待观察。

**2.6.4 图像分析** 甲苯胺蓝法染色和免疫组化法染色切片均在显微镜下观察,采用 Motic Images Advance 3.2 显微图像处理软件采集图片,每个样品在关节软骨层随机选取 5 个视野( $\times 400$ ),拍照并保存。使用 Image-Pro Plus 6.0 软件对图片进行图像分析<sup>[6]</sup>,测出图像中阳性表达累积光密度(integrated optical density, IOD)、目标组织区域面积(Area),并计算出各图片的平均光密度(ODmean),计算公式如下:  $ODmean = IOD / Area$ 。再计算出每个样品 5 个视野的平均值作为该样品的平均光密度供统计使用。

**2.7 统计学方法** 采用 SPSS16.0 统计软件对所得数据进行统计学处理,各组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,干预前假手术组与手术造模组血清  $E_2$  浓度和软骨基质中 GAG 含量的比较采用 *t* 检验,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

### 3 结果

**3.1 形态观察** 假手术组:关节软骨呈淡蓝色且色泽

清亮,表面光滑无裂纹,未见软骨纤维化和骨赘形成,关节液色清无异味[(图 1(1))];子宫 HE 染色示子宫内膜约占子宫壁的 2/3 且有丰富的血管通过,内膜表面光滑、微有起伏[(图 2(1))];软骨 HE 染色示软骨细胞分布均匀,未见细胞簇积和炎性细胞浸润[(图 3(1))];甲苯胺蓝染色示细胞外基质(extracellular matrix, ECM)中的 GAG 被异染为紫蓝色,细胞核染为蓝色,软骨下骨基质为淡蓝色[(图 3(3))]. 手术造模组:关节软骨色泽灰暗苍白,表面可发现裂纹或缺损糜烂,甚至深达骨质,髁间沟稍变浅,部分软骨边缘有骨赘,关节腔增大且积液明显,关节液色黄且粘稠,可见滑膜增生[(图 1(2))];子宫 HE 染色示子宫内膜变薄,约占子宫壁 1/3,血管少,内膜全层均萎缩且平滑肌萎缩[(图 2(2))];软骨 HE 染色示表面纤维性成分多且凹凸不平,表层细胞明显减少,深层有簇积的软骨细胞[(图 3(2))];甲苯胺蓝染色示 ECM 大面积失染,深度和面积均比正常软骨差,提示 GAG 含量下降[(图 3(4))].

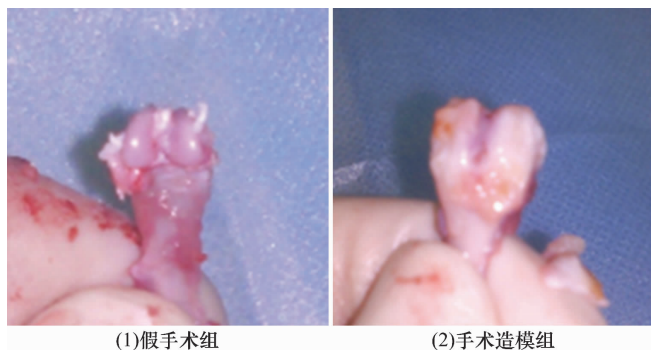


图1 肉眼观察大鼠膝关节形态

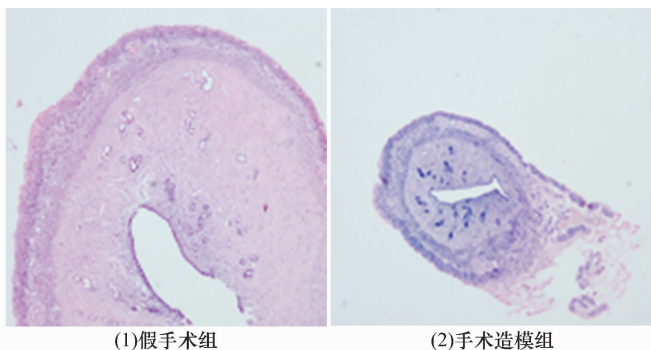


图2 显微镜下观察大鼠子宫内膜形态(HE染色  $\times 100$ )

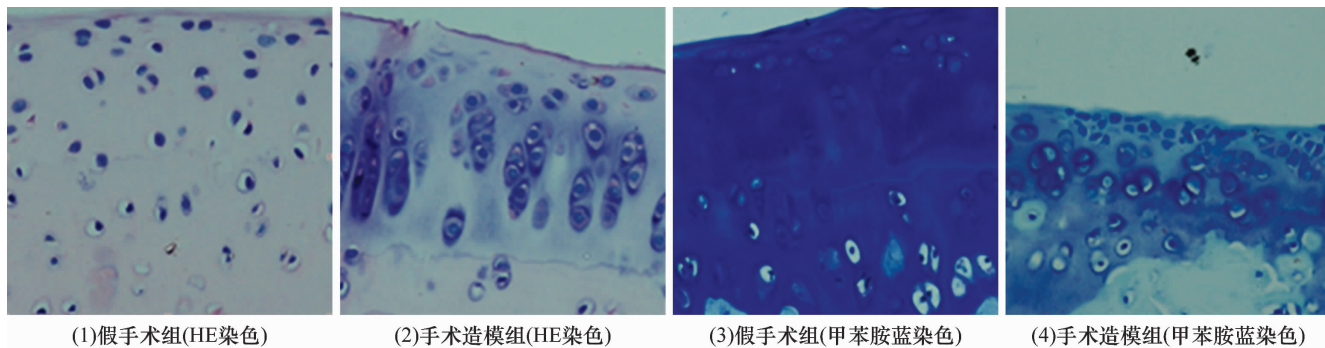


图3 显微镜下观察大鼠膝关节软骨细胞形态( $\times 400$ )

**3.2 药物干预前血清  $E_2$  浓度和膝关节软骨基质中 GAG 含量** 药物干预前,手术造模组的血清  $E_2$  浓度低于假手术组的血清  $E_2$  浓度;手术造模组的软骨基质中 GAG 含量低于假手术组的软骨基质中 GAG 含量(表 1)。

**3.3 药物干预后血清  $E_2$  浓度** ①用药 2 周后:各组

间血清  $E_2$  浓度比较,差异有统计学意义( $F = 4.520$ ,  $P = 0.001$ )。组间两两比较,空白组高于模型组、全方组、龟鹿组、龟鹿参组、龟鹿杞组、GHC 组( $P = 0.000$ ,  $P = 0.002$ ,  $P = 0.001$ ,  $P = 0.001$ ,  $P = 0.003$ ,  $P = 0.001$ );模型组低于全方组( $P = 0.039$ );其余各组间血清  $E_2$  浓度比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。



②用药 4 周后:各组间血清 E<sub>2</sub> 浓度比较,差异有统计学意义( $F=4.278, P=0.002$ )。组间两两比较,空白组高于模型组、全方组、龟鹿组、龟鹿参组、龟鹿杞组、GHC 组( $P=0.000, P=0.022, P=0.013, P=0.015, P=0.013, P=0.002$ );模型组低于全方组、龟鹿组、龟鹿参组、龟鹿杞组( $P=0.027, P=0.027, P=0.037, P=0.027$ );其余各组间血清 E<sub>2</sub> 浓度比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。③用药 8 周后:各组间血清 E<sub>2</sub> 浓度比较,差异有统计学意义( $F=3.296, P=0.009$ )。组间两两比较,空白组高于模型组、龟鹿组、GHC 组( $P=0.000, P=0.011, P=0.001$ );模型组

低于全方组、龟鹿参组、龟鹿杞组( $P=0.002, P=0.005, P=0.012$ );全方组高于 GHC 组( $P=0.010$ );其余各组间血清 E<sub>2</sub> 浓度比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。(表 2)

表 1 药物干预前假手术组与手术造模组大鼠血清 E<sub>2</sub> 浓度和膝关节软骨基质中 GAG 含量比较

组别	例数 (只)	血清 E <sub>2</sub> 浓度 (ng · L <sup>-1</sup> )	软骨基质中 GAG 含量
手术造模组	5	87.130 ± 39.720	0.239 ± 0.066
假手术组	5	195.080 ± 42.449	0.597 ± 0.053
<i>t</i> 值		4.152	9.457
<i>P</i> 值		0.003	0.000

表 2 各组大鼠血清 E<sub>2</sub> 浓度比较

组别	血清 E <sub>2</sub> 浓度 (ng · L <sup>-1</sup> )		
	药物干预 2 周后	药物干预 4 周后	药物干预 8 周后
空白组	204.082 ± 50.995	204.819 ± 53.802	192.060 ± 57.040
模型组	80.191 ± 29.921	91.613 ± 32.654	97.504 ± 40.006
全方组	129.583 ± 48.763	148.727 ± 51.860	183.140 ± 50.887
龟鹿组	121.223 ± 51.514	146.576 ± 32.976	130.757 ± 39.285
龟鹿参组	117.582 ± 50.131	145.225 ± 49.217	167.763 ± 32.878
龟鹿杞组	128.181 ± 45.987	146.365 ± 45.800	158.112 ± 48.309
GHC 组	114.479 ± 39.346	132.197 ± 46.032	112.494 ± 46.687
<i>F</i> 值	4.520	4.278	3.296
<i>P</i> 值	0.001	0.002	0.009

**3.4 药物干预后膝关节软骨基质中 Collagen-Ⅱ 的表达量** ①用药 2 周后:各组间膝关节软骨基质中 Collagen-Ⅱ 的表达量比较,差异有统计学意义( $F=33.533, P=0.000$ )。组间两两比较,空白组 Collagen-Ⅱ 表达量高于模型组、全方组、龟鹿组、龟鹿参组、龟鹿杞组、GHC 组 Collagen-Ⅱ 表达量( $P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$ );模型组 Collagen-Ⅱ 表达量低于全方组、龟鹿组、龟鹿参组、龟鹿杞组、GHC 组 Collagen-Ⅱ 表达量( $P=0.007, P=0.006, P=0.006, P=0.021, P=0.000$ );全方组 Collagen-Ⅱ 表达量低于 GHC 组( $P=0.008$ );其余各组间 Collagen-Ⅱ 表达量比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。②用药 4 周后:各组间膝关节软骨基质中 Collagen-Ⅱ 的表达量比较,差异有统计学意义( $F=37.064, P=0.000$ )。组间两两比较,空白组 Collagen-Ⅱ 表达量高于模型组、全方组、龟鹿组、龟鹿参组、龟鹿杞组、GHC 组 Collagen-Ⅱ 表达量( $P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ,

$P=0.000$ );模型组 Collagen-Ⅱ 表达量低于全方组、龟鹿参组、龟鹿杞组、GHC 组 Collagen-Ⅱ 表达量( $P=0.000, P=0.000, P=0.011, P=0.000$ );全方组 Collagen-Ⅱ 表达量高于龟鹿组、龟鹿杞组( $P=0.000, P=0.003$ );其余各组间 Collagen-Ⅱ 表达量比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。③用药 8 周后:各组间膝关节软骨基质中 Collagen-Ⅱ 的表达量比较,差异有统计学意义( $F=42.071, P=0.000$ )。组间两两比较,空白组 Collagen-Ⅱ 表达量高于模型组、全方组、龟鹿组、龟鹿参组、龟鹿杞组、GHC 组 Collagen-Ⅱ 表达量( $P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$ );模型组 Collagen-Ⅱ 表达量低于全方组、龟鹿参组、GHC 组 Collagen-Ⅱ 表达量( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ );全方组 Collagen-Ⅱ 表达量高于龟鹿组、龟鹿参组、龟鹿杞组 Collagen-Ⅱ 表达量( $P=0.000, P=0.049, P=0.000$ );其余各组间 Collagen-Ⅱ 表达量比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。(表 3、图 4)

表 3 各组大鼠膝关节软骨基质中 Collagen-Ⅱ 表达量比较

组别	Collagen-Ⅱ		
	药物干预 2 周后	药物干预 4 周后	药物干预 8 周后
空白组	0.598 ± 0.096	0.603 ± 0.083	0.608 ± 0.067
模型组	0.226 ± 0.113	0.223 ± 0.113	0.217 ± 0.106
全方组	0.310 ± 0.070	0.387 ± 0.090	0.437 ± 0.065
龟鹿组	0.310 ± 0.072	0.270 ± 0.083	0.263 ± 0.110
龟鹿参组	0.311 ± 0.075	0.371 ± 0.059	0.380 ± 0.073
龟鹿杞组	0.296 ± 0.081	0.300 ± 0.081	0.273 ± 0.081
GHC 组	0.389 ± 0.068	0.442 ± 0.067	0.443 ± 0.068
F 值	33.533	37.064	42.071
P 值	0.000	0.000	0.000

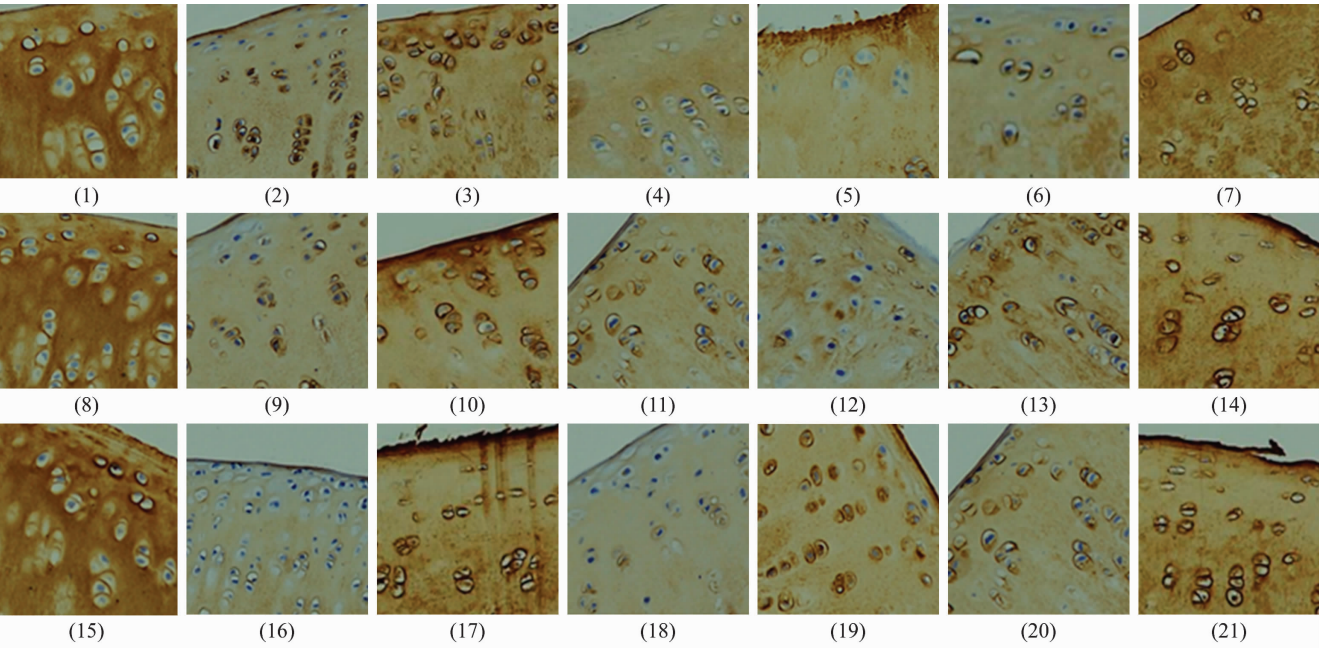


图 4 显微镜下观察各组大鼠膝关节软骨基质中 Collagen-Ⅱ 的表达(免疫组化染色 ×400)

(1)至(7)为药物干预 2 周后图片 (8)至(14)为药物干预 4 周后图片 (15)至(21)为药物干预 8 周后图片  
每行图片从左至右依次为空白组、模型组、全方组、龟鹿组、龟鹿参组、龟鹿杞组、GHC 组

4 讨 论

李楠等<sup>[7-8]</sup>通过观察龟鹿二仙胶及其拆方对大鼠及豚鼠软骨细胞 Collagen-Ⅱ 和 GAG 的表达发现, 龟鹿二仙胶全方可显著促进软骨细胞 Collagen-Ⅱ 和蛋白多糖的表达, 抑制软骨细胞凋亡, 其作用优于各拆方, 而且君药龟甲胶和鹿角胶的作用优于臣药人参和枸杞。李文顺等<sup>[9]</sup>研究证明, 龟鹿二仙胶汤治疗肝肾亏虚型膝骨性关节炎效果肯定。本研究在前期研究的基础上, 根据中医君臣配伍原则再次拆方对比, 比较龟鹿二仙胶中不同臣药与两味君药配伍后在全方中的作用。

E<sub>2</sub> 主要来源于女性卵巢的卵泡、黄体 and 胎盘, 少量来自肝、肾上腺、乳房、睾丸、脂肪细胞<sup>[10]</sup>, 而这些

次要来源对绝经后妇女尤为重要。E<sub>2</sub> 主要负责调节女性特征、附属性器官的成熟和月经-排卵周期, 此外对心脑血管、机体代谢、骨骼的生长和成熟、皮肤等各方面均有影响。E<sub>2</sub> 对软骨细胞增殖和分化有双向调节作用<sup>[11]</sup>, 对软骨代谢和胶原合成有调节作用<sup>[12]</sup>, 与膝骨性关节炎的发生密切相关<sup>[13]</sup>, 对维持关节正常功能有重要意义。

宋述财等<sup>[14]</sup>研究认为, 在龟甲提取物中没有与雌激素受体结合的物质。杨光<sup>[15]</sup>研究发现, 在麋鹿茸中含有 E<sub>2</sub> 等多种激素, 麋鹿角醇提液对性功能障碍有一定保护作用<sup>[16]</sup>, 但鹿角中是否含有 E<sub>2</sub> 未见报道。国燕霞<sup>[17]</sup>研究发现, 枸杞有类雌激素样作用, 人参二醇皂苷可以提高促黄体生成激素水平。从目前



研究来看,在龟甲、鹿角、枸杞、人参 4 种药物中均未发现直接替代  $E_2$  的物质,可见龟鹿二仙胶方的起效机制为刺激肝、肾上腺、脂肪细胞等  $E_2$  的次要来源。本实验结果显示,药物干预 2 周后,只有全方组显示出提高血清  $E_2$  浓度的效果;药物干预 4 周后,4 个中药干预组均显示出提高血清  $E_2$  浓度的效果;药物干预 8 周后,全方组、龟鹿参组与龟鹿杞组依然显示出提高血清  $E_2$  浓度的效果,而且全方提高血清  $E_2$  浓度的效果优于 GHC,而龟鹿组血清  $E_2$  浓度与模型组比较,差异无统计学意义。综合药物干预后 3 个时间点的结果来看,全方组合提高血清  $E_2$  浓度的效果较另外 3 个中药干预组合出现的早,药物干预 4 周后 4 个中药干预组合均能提高血清  $E_2$  浓度,但药物干预 8 周后龟鹿组合提高血清  $E_2$  浓度的效果减弱甚至消失。出现这种结果可能是因为:龟甲胶和鹿角胶配伍人参和枸杞,可以使药物的有效成份更多或更快地发挥作用;相反,仅使用两味君药的龟鹿组合不但显效慢,而且随着用药时间的延长其效果减弱甚至消失。这可能与龟甲胶和鹿角胶过于滋腻粘滞,易妨碍脾胃的运化功能有关,但仍需今后设置低剂量组和配伍理气醒脾药或消食药的药物组对比证实。虽然在药物干预 2 周后,龟鹿参组合与龟鹿杞组合提高血清  $E_2$  浓度的效果不如全方,但在药物干预 4 周和 8 周后效果与全方相同。随着用药时间的延长,龟甲胶与鹿角胶配伍人参提高血清  $E_2$  浓度的效果好还是配伍枸杞的效果好,还是龟鹿二仙胶全方效果好,仍需今后设置更长的干预时间以对比证实。

软骨基质是维持关节正常结构和功能活动的基础条件<sup>[18]</sup>,而软骨基质中 90% 以上是 Collagen-Ⅱ。Collagen-Ⅱ 由软骨细胞分泌产生<sup>[19]</sup>,若 Collagen-Ⅱ 代谢异常,就会破坏软骨基质合成与分解的平衡。故本实验选择 Collagen-Ⅱ 作为观察对象,对比各药物对软骨基质的保护和修复作用。中医认为肾主骨,龟甲胶和鹿角胶可补肾健骨;有研究发现龟甲可促进骨髓间充质干细胞增殖和延缓衰老<sup>[20-21]</sup>,龟甲胶对 Collagen-Ⅱ 的表达有明显促进作用<sup>[7]</sup>;鹿角胶可补气,促进关节软骨细胞 Collagen-Ⅱ 表达和蛋白多糖的合成,且对关节软骨细胞的凋亡有一定的拮抗作用<sup>[22]</sup>,能明显改善机体疲劳<sup>[23]</sup>。人参具有大补元气之效,可增强机体免疫力,清除体内自由基,促进 Collagen-Ⅱ 表达和细胞间质的合成,具有明显抗细胞衰

老的作用<sup>[24-25]</sup>。枸杞具有补益肝肾、明目益精之功能,是抗氧化<sup>[26]</sup>、抗疲劳<sup>[27]</sup>、延缓衰老的理想药物。本实验结果也显示,用药 8 周后,全方组的 Collagen-Ⅱ 表达量高于龟鹿组、龟鹿参组、龟鹿杞组,这说明人参和枸杞在全方中发挥了不可缺少的作用。

综上所述,在提高血清  $E_2$  浓度方面,龟甲胶与鹿角胶配伍人参或枸杞均是有效配伍,且用药 2 周时配伍人参和枸杞的效果要优于单独配伍人参或单独配伍枸杞。但随着用药时间的延长,龟甲胶与鹿角胶配伍人参提高  $E_2$  浓度的效果好还是配伍枸杞的效果好,还是龟鹿二仙胶全方效果好,仍需进一步研究证实。在促进膝关节软骨基质中Ⅱ型胶原表达方面,人参和枸杞在龟鹿二仙胶方中发挥了不可缺少的作用。

## 5 参考文献

- [1] Swoboda B. Epidemiological arthrosis research[J]. Orthopade,2001,30(11):834-840.
- [2] 周丽,邓伟民. 去势雌性大鼠动物模型在绝经后骨质疏松症中的应用[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2008,12(7):1323-1326.
- [3] 江捍平,王大平. 骨关节炎动物模型[J]. 中国现代医学杂志,2004,14(6):153-154,156.
- [4] 韩清民,王跃辉,程慧,等. 肾虚型骨性关节炎造模方法研究[J]. 新中医,2008,40(3):90-92.
- [5] 孙敬方. 动物实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:356-358.
- [6] 杨建茹. 平均光密度在医学图像分析中的定量[J]. 中国医学影像技术,1999,15(4):322.
- [7] 李楠,伊玉彪,雒焕生,等. 龟鹿二仙胶及其拆方对豚鼠软骨细胞Ⅱ型胶原蛋白多糖合成的影响[J]. 中华中医药杂志,2011,26(11):2524-2528.
- [8] 李楠,雒焕生,赵诣,等. 龟鹿二仙胶汤及其拆方对大鼠软骨细胞凋亡基因表达的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志,2011,19(7):1-3.
- [9] 李文顺,李楠,余丹丹,等. 龟鹿二仙胶汤治疗膝骨性关节炎的临床研究[J]. 福建中医学院院报,2005,15(6):30-32.
- [10] Nelson LR, Bulun SE. Estrogen production and action[J]. J Am Acad Dermatol,2001,45(3 Suppl):116-124.
- [11] 邵乐南,程鹏,马绪臣,等. 雌二醇对兔髌突软骨细胞增殖与分化的影响[J]. 同济医科大学学报,2000,29(6):588-591.
- [12] 崔文胜,于学忠,王英振,等.  $17\beta$ -雌二醇对体外培养成年雌兔关节软骨细胞的作用及其与一氧化氮的关系[J]. 首都医药,2004,11(4):28-30.

- [13] 刘献祥. 中医药治疗膝骨性关节炎的研究现状[J]. 中医正骨, 2012, 24(1): 3-7.
- [14] 宋述财, 许华, 周健洪, 等. 龟甲提取物对骨髓间充质干细胞增殖过程中核受体的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2006, 23(2): 95-99, 111.
- [15] 杨光. 麋鹿角、茸、脂药用的历史考证[J]. 北京中医, 2006, 25(1): 39-40.
- [16] 成海龙, 秦红兵, 陆晓东, 等. 麋鹿角醇提液对小鼠应激性功能低下的保护作用及机制研究[J]. 江苏中医药, 2009, 41(11): 71-72.
- [17] 国燕霞. 几种中药的雌激素作用研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2004: 1-47.
- [18] Kim SJ, Ju JW, Oh CD, et al. ERK  $\alpha$ 1/2 and p38 kinase oppositely regulate nitric oxide-induced apoptosis of chondrocytes in association with p53, caspase  $\alpha$ 3, and differentiation status[J]. J Biol Chem, 2002, 277(2): 1332-1339.
- [19] Osaki M, Tan L, Choy BK, et al. The TATA-containing core promoter of the type II collagen gene (COL2A1) is the target of interferon-gamma-mediated inhibition in human chondrocytes; requirement for Stat1  $\alpha$ , Jak1 and Jak2[J]. Biochem J, 2003, 369(Pt 1): 103-118.
- [20] 陈东风, 杜少辉, 李伊为, 等. 龟板对局灶性脑缺血再灌注后 Nestin 表达的影响[J]. 解剖学杂志, 2002, 25(4): 315-319.
- [21] 周健洪, 陈东风, 黎晖, 等. 龟板含药血清对大鼠骨髓间充质细胞体外增殖的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2005, 22(1): 40-43.
- [22] 聂淑琴, 梁爱华, 薛宝云, 等. 鹿角胶新老剂型壮阳、补血作用的比较研究[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(10): 49-52.
- [23] 候晨艳, 高继光, 付尔康. 鹿角胶钙颗粒剂对大鼠实验性骨质疏松症的研究[J]. 中国现代应用药学杂志, 2000, 17(1): 66-68.
- [24] 符路娣, 田丙坤, 蔡海云. 中医药抗衰老的试验研究述评[J]. 四川畜牧兽医, 2006, 33(6): 20-21.
- [25] 杨静, 雷燕, 崔巍, 等. 人参三七川芎提取物延缓内皮细胞复制性衰老的机制研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(12): 1544-1548.
- [26] 杨薛康, 海春旭, 梁欣, 等. 枸杞提取物的抗氧化作用[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(6): 518-520.
- [27] 覃筱燕, 唐丽, 杨林, 等. 枸杞提取物对小鼠抗疲劳作用的实验研究[J]. 中医药学报, 2009, 37(2): 8-10.

(2012-06-19 收稿 2012-07-31 修回)

## · 通 知 ·

## 全国水针刀三氧消融术尸体解剖研修班及中华筋骨三针法学习班通知

水针刀三氧消融术及筋骨针法是由中国骨伤微创水针刀学术委员会会长、张仲景国医学院教授、广东省中医院主任医师吴汉卿教授在水针刀疗法的基础上, 结合三氧治疗仪所研发的新技术, 研制发明的多用系列筋骨针具已获国家专利, 并创立了十大筋骨针法(已编入骨伤教材), 出版了《中华筋骨三针疗法》。该项技术的培训班已举办 180 余期, 来自国内包括台湾、香港等地区及国外(马来西亚、新加坡、韩国)的万余名医生学习、掌握了该技术。为满足广大医师要求, 现继续举办以下研修、学习班:

**水针刀三氧融盘术及尸体解剖研修班:** 由吴汉卿教授主要传授: 水针刀新针法治疗骨伤颈肩腰腿痛病、水针刀三氧融盘术。应用水针刀法结合新鲜尸体详细讲解三针法安全入路法、配合独特松解液及椎间孔扩张术、侧隐窝分离术。新颖的三针法理论、独特的十大针法、结合尸体刀法入路、水针刀挂图, 有专科医院手术病人治疗, 同时讲解影像诊断, 保证每位学员能够独立操作。临床上可治疗腰椎间盘突出症, 对颈肩腰腿痛患者具有较好的疗效。

**中华筋骨三针法学习班:** 中华筋骨三针法是吴汉卿教授在水针刀针法九针疗法基础上, 根据人体生物力学, 提出了人体软组织立体三角平衡学说, 创立了平衡三针法。该班传授筋骨三针法原理、三针定位法、十大针法技巧。该法主要治疗: 颈椎病、颈 1 横突综合症、颈 7 棘突综合症、肩关节周围炎、肌筋膜炎、腰椎间盘突出症、股骨头坏死症、膝关节骨关节炎、神经病、类风湿性关节炎、脊柱相关病等。

**脊柱九病区药磁线植入技术:** 传授独特的脊背九大诊疗区, 临床应用水针刀分离、磁线留置并配合整脊手法, 快速治疗脊柱相关病, 如颈源性心脏病、颈性咽炎、面瘫、三叉神经痛、癫痫、慢性支气管炎、哮喘、胃炎、胃溃疡、结肠炎、生殖疾病等。

**其他:** 参加学习班者将授予国家级中医药 I 类继续教育学分(项目编号: 390206006)

**开学时间:** 3 月 1 日开课, 以后每月 1 日开课, 需提前 2 日报到

**报到地址:** 河南省南阳市仲景路与天山路口(水针刀专科医院)

**邮政编码:** 473000 **联系电话:** 0377-63282507, 13721820657 **联系人:** 黄建

**网址:** www.shuizhendao.com **邮箱:** shuizhendao@163.com