

骨炎方抗家兔慢性骨髓炎的实验研究

张军¹ 黄楠¹ 武永刚¹ 齐明¹

[摘要] 目的:观察骨炎方对家兔慢性骨髓炎的作用。方法:家兔右胫骨骨髓腔内注射金黄色葡萄球菌建立慢性骨髓炎模型,分为正常对照组、模型组、庆大霉素组(60 mg/kg)、骨炎方高剂量组(生药 3.6 g/kg)、骨炎方低剂量组(生药 1.8 g/kg),每组 10 只,灌胃给药,术后第 6 周对右胫骨行 X-线检查并做 Laurence 评分;术后第 2,4 及 6 周采血测定白细胞计数、血清溶菌酶、血清 TNF- α 和 IL-6 含量。结果:模型组家兔均有典型骨髓炎表现,骨炎方高、低剂量组对家兔骨髓炎症状有显著缓解,Laurence 评分与模型组比较差异均有统计学意义(P 值分别为 0.000,0.001);与模型组比较,骨炎方高剂量组白细胞计数在第 2,4 及 6 周均有明显降低,差异有统计学意义(P 值分别为 0.015,0.012,0.001),低剂量组白细胞计数在第 2,4 及 6 周均有明显降低,差异有统计学意义(P 值分别为 0.013,0.008,0.036),高剂量组血清溶菌酶含量在第 2,4 及 6 周均有明显升高,差异有统计学意义(P 值分别为 0.033,0.002,0.003),低剂量组血清溶菌酶含量在第 2,4 及 6 周亦有明显升高,差异有统计学意义(P 值分别为 0.048,0.028,0.024),高剂量组血清 TNF- α 含量在第 2,4 及 6 周均有明显降低,差异有统计学意义(P 值分别为 0.031,0.003,0.000),低剂量组血清 TNF- α 含量在第 2,4 及 6 周均有明显降低,差异有统计学意义(P 值分别为 0.032,0.008,0.000),高剂量组血清 IL-6 含量在第 2,4 及 6 周均有明显降低,差异有统计学意义(P 值分别为 0.004,0.000,0.000);低剂量组血清 IL-6 含量在第 2,4 及 6 周均有明显降低,差异有统计学意义(P 值分别为 0.009,0.000,0.000)。结论:骨炎方对家兔慢性骨髓炎的防护作用可能与抑制致病菌、提高机体免疫力、下调炎性因子等途径有关。

[关键词] 骨炎方;兔;骨髓炎;溶菌酶;炎性细胞因子

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2018)09-0014-05

Experimental Study of Guyan Prescription on Chronic Osteomyelitis in Rabbits

ZHANG Jun¹ HUANG Nan¹ WU Yonggang¹ QI Ming¹

¹Second Hospital of Beijing Armed Police Forces, Beijing 100027, China.

Abstract Objective: To investigate the effects of Guyan prescription (GP) against chronic osteomyelitis in rabbits. **Methods:** Chronic osteomyelitis model of rabbits were prepared by intra-shinbone marrow injection of *Staphylococcus aureus*. Fifty rabbits were divided randomly into five groups ($n=10$), i. e. normal, model, gentamicin (60 mg/kg), GP high and low dose groups (3.6 and 1.8 g/kg, respectively). Drugs were orally administrated after the operation. X-ray examination of the right shinbone at the sixth week after operation was done and Laurence score were calculated. At the second, fourth and sixth week after operation, blood was collected to determine the leukocyte count, serum lysozyme, serum TNF- α and IL-6 levels. **Results:** Rabbits in the model group all showed typical osteomyelitis. The high- and low-dose groups of GP significantly alleviated the symptoms of osteomyelitis in the rabbits, and the Laurence scores were statistically significant compared with the model group (P values were 0.000, 0.001, respectively). Compared to model group, leucocyte count of the high-dose GP group had a significant decrease at the second, fourth and sixth weeks ($P=0.015, 0.012, 0.001$), so did the low-dose GP group ($P=0.013, 0.008$ and 0.036 , respectively). Serum lysozyme levels increased significantly both in the high-dose group (P values were 0.033, 0.002, and 0.003, respectively) and low dose group ($P=0.048, 0.028$ and 0.024 , respectively) at the 2nd, 4th, and 6th weeks. The levels of serum TNF- α both in the high-dose group and in the low-

dose group ($P=0.032, 0.008$ and 0.000 , respectively)

decreased significantly at the 2nd, 4th, and 6th week, and the

¹ 武警北京市总队第二医院外科(北京, 100027)

difference was statistically significant(P values were 0.031,0.003,and 0.000,respectively). The serum IL-6 levels both in the high-dose group(P values were 0.004,0.000,and 0.000,respectively)and in the low-dose group(P values were 0.009,0.000,0.000 respectively)were significantly lower at the second,fourth,and sixth weeks. **Conclusion:** The protective effect of GP on osteomyelitis seems to be associated with inhibition of pathogenic bacteria,improvement of immune function and down regulation of inflammatory cytokines.

Keywords: Guyan prescription;rabbit;osteomyelitis;lysozyme;inflammatory cytokines

慢性骨髓炎(Chronic Osteomyelitis)发病复杂,被认为是医学界的顽疾之一^[1]。抗菌药的应用常常贯穿于骨髓炎治疗的全过程,但近年来由于金黄色葡萄球菌中多重耐药菌的产生以及检出率的不断攀升,导致骨髓炎的感染控制更为困难^[2]。中医药疗法在骨科慢性病领域的应用越来越受到重视,据报道部分中药在抑制耐药性金黄色葡萄球菌方面与抗菌药联合使用有协同或相加作用^[3,4]。本室应用祖国医学理论结合长期临床实践自拟骨炎方,由金银花等六味中药成份组成,具有清热解毒、散瘀消肿、护阴扶正、排脓生肌等功效,用于治疗慢性骨髓炎,经临床验证安全有效,然其作用机制尚未阐明。本研究通过建立家兔慢性骨髓炎模型,探讨了骨炎方的作用机制,旨在为临床应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

新西兰白兔 50 只,雄性,5~6 月龄,体质量 2~3 kg,由河北省实验动物中心提供,合格证号 SCXK(冀)2013-1-003。单笼适应性饲喂 1 周。

1.2 药物和试剂

骨炎方(主要组成:金银花、蒲公英、地丁、半枝莲、白头翁、白花蛇舌草等),本室自制,含生药量 0.18 g/mL。硫酸庆大霉素片,浙江万邦药业有限公司产品,配制时先去包衣,碾碎后以生理盐水配成所需浓度的混悬液。金黄色葡萄球菌为 ATCC6538P 标准型。5% 鱼肝油酸钠注射液,上海信谊金朱药业有限公司产品。医用骨蜡,上海三友医疗器械有限公司产品。溶菌酶、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白介素-6(IL-6)酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒,均为南京建成生物工程研究所产品。其他试剂均为化学纯。

1.3 方法

1.3.1 造模方法 依文献^[5]方法建立兔胫骨慢性骨髓炎模型。取新西兰白兔,耳缘静脉注射戊巴比妥钠麻醉后,仰卧固定,右胫骨近端处常规备皮、消毒,取右胫骨近端外侧纵行切口,显露出胫骨平台(干骺端),用 2.0 mm 克氏针钻孔,打通骨髓腔,用穿刺针向骨髓腔内依次注入 0.1 mL 5% 鱼肝油酸钠和 0.1 mL 含菌 1×10^8 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌液。另取 10 只兔向骨髓腔内依次注入 0.1 mL 5% 鱼肝油酸钠和

0.1 mL 生理盐水,其他操作同上,作为正常对照组。各组均以骨蜡封闭穿刺孔,常规消毒、缝合。术后动物单笼饲喂。

1.3.2 分组及用药 取建立慢性骨髓炎模型的家兔 40 只,随机分为 4 组,每组 10 只:1)骨炎方高剂量组(生药 3.6 g/kg);2)骨炎方低剂量组(生药 1.8 g/kg);3)庆大霉素组(60 mg/kg);4)模型组(等体积生理盐水);5)另 10 只正常对照兔作为正常组(等体积生理盐水)。术后当天开始灌胃给药,1 次/d,连续 6 周。

1.4 检测指标

1.4.1 大体情况 术后观察动物饮食、精神状态、活动、切口及其周围肿胀和各组存活等情况。

1.4.2 X-线检查 6 周后试验结束前各组动物麻醉,对右胫骨上 X 线机(日本东芝公司)进行拍片检查,曝光条件:45 kV,50 mA,0.08 s。各组 X-片按改良的 Laurence 法进行分级评分^[6]:包含骨膜反应、骨破坏、病变范围 3 个标准,每个标准下按严重程度进行 0~4 评分,3 个标准评分相加为最后得分。

1.4.3 白细胞计数 各组动物均于术后第 14,28 及 42 天(即术后第 2,4 及 6 周)空腹 12 h 后自耳缘静脉采血,上血细胞分析仪(日本希森美康株式会社)进行白细胞计数。

1.4.4 血清溶菌酶的测定 各组动物均于术后第 2,4 及 6 周空腹 12 h 后自心脏采血,离心取血清,采用双抗体夹心 ELISA 法上酶标仪(瑞士帝肯公司)测定溶菌酶含量,具体步骤按试剂盒说明书执行。

1.4.5 血清 TNF- α 和 IL-6 含量的测定 各组动物均于术后第 2,4 及 6 周取血清,采用双抗体夹心 ELISA 法上酶标仪测定 TNF- α 和 IL-6 的表达水平,具体步骤按试剂盒说明书执行。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件对所得数据进行统计处理,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 q 检验,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大体情况比较

正常对照组各方面表现正常。术后 1 周内,模型组有 1 只感染严重的兔死亡,模型组和给药组动物均有不同程度的进食减少、精神萎靡及右足跛行。术后

第2周至第6周,模型组动物切口周围有明显红肿,部分出现破溃窦道和脓肿(见图1);庆大霉素组或骨炎方组动物饮食、精神及活动等方面有不同程度的改善,切口周围红肿现象较轻,未形成窦道或窦道愈合较快。



图1 模型组术后造模部位

2.2 各组X线片评分比较

正常对照组无骨髓炎表现,不参与统计分析;模型组除1只感染严重的兔死亡外,其余成活动物均有典型慢性骨髓炎表现,包括骨质增生、骨质破坏或死骨形成、出现软组织包块影等;骨炎方高、低剂量组对家兔慢性骨髓炎症状有明显缓解,Laurence评分与模型组比较差异均有统计学意义(P 值分别为0.000,0.001),见图2。

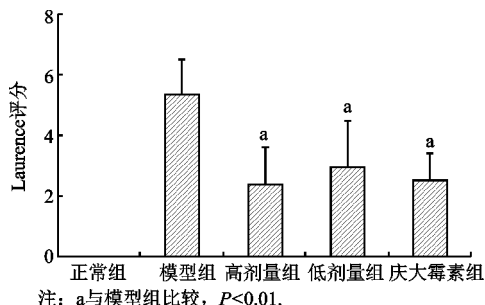


图2 各组X线片评分比较

2.3 各组白细胞计数比较

与正常对照组比较,模型组兔的白细胞计数在各时间点均有显著升高,差异有统计学意义(P 值均低于0.001);骨炎方高剂量组的白细胞计数在第2,4及6周均有明显降低,与模型组比较差异有统计学意义(P 值分别为0.015,0.012,0.001);骨炎方低剂量组的白细胞计数在第2,4及6周均有明显降低,与模型组比较差异有统计学意义(P 值分别为0.013,0.008,0.036),见图3。

2.4 各组血清溶菌酶比较

与正常对照组比较,模型组兔的血清溶菌酶含量在各时间点均有显著降低,差异有统计学意义(P 值均低于0.001);与模型组比较,骨炎方高剂量组的血清

溶菌酶含量在第2,4及6周均有明显升高,差异有统计学意义(P 值分别为0.033,0.002,0.003),低剂量组血清溶菌酶含量在第2,4及6周亦有明显升高,差异有统计学意义(P 值分别为0.048,0.028,0.024);庆大霉素则对血清溶菌酶含量没有明显影响,组间差异无统计学意义($P > 0.05$),见图4。

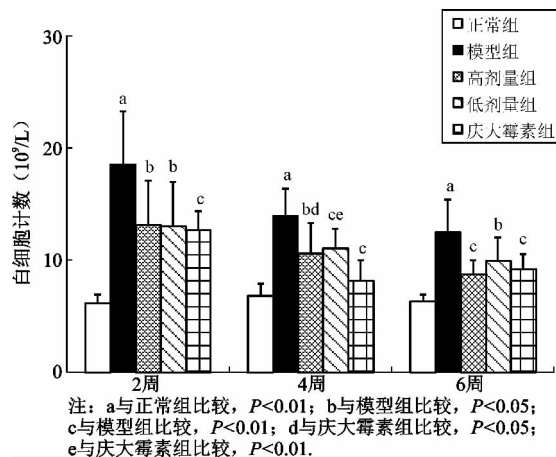


图3 各组不同时间点白细胞计数比较

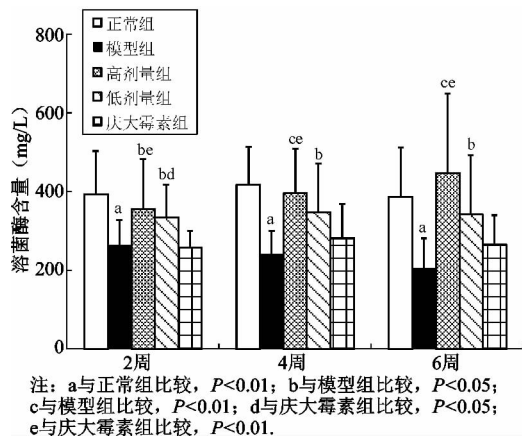


图4 各组不同时间点血清溶菌酶比较

2.5 各组血清TNF- α 和IL-6比较

与正常对照组比较,模型组兔的血清TNF- α 和IL-6含量在各时间点均有显著升高,差异有统计学意义(P 值均低于0.001);与模型组比较,骨炎方高剂量组血清TNF- α 含量在第2,4及6周均有明显降低,差异有统计学意义(P 值分别为0.031,0.003,0.000),血清IL-6含量在第2,4及6周均有明显降低,差异有统计学意义(P 值分别为0.004,0.000,0.000);与模型组比较,骨炎方低剂量组血清TNF- α 含量在第2,4及6周均有明显降低,差异有统计学意义(P 值分别为0.032,0.008,0.000),血清IL-6含量在第2,4及6周均有明显降低,差异有统计学意义(P 值分别为0.009,0.000,0.000),见图5-6。

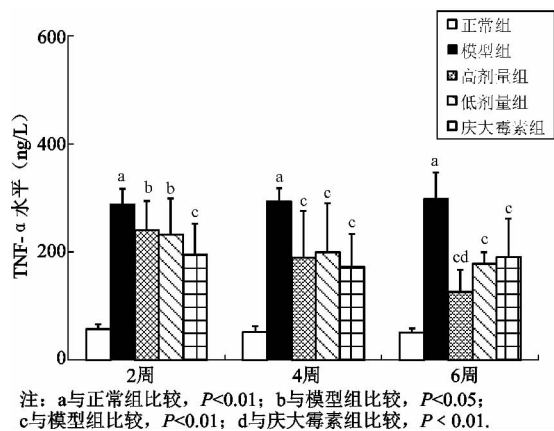


图 5 各组不同时间点血清 TNF- α 水平比较

3 讨论

金黄色葡萄球菌是慢性骨髓炎最常见的致病菌^[7],近年来由于抗菌药的广泛使用甚至滥用,导致耐药菌株日益增多,仅依靠抗菌药或手术治疗难以控制骨髓炎的感染或复发^[8]。慢性骨髓炎属中医学“附骨疽”范畴,中医认为该病的致病因素是热毒;当身体虚弱,热毒窜入,凝滞筋骨,蕴积成脓;因此,治法多采用清热解毒、散瘀消肿、排脓生肌^[9]。本研究骨炎方主要药物成分金银花、蒲公英、地丁、半枝莲、白头翁、白花蛇舌草等皆为苦寒之品,可实现清热解毒,散瘀消肿之功效;现代药理学研究表明,骨炎方诸药物成分均具抗菌活性,尤其是对金黄色葡萄球菌具有显著的抑制或杀灭作用^[10-14];此外,骨炎方多数药物成分具有免疫增强作用,或提高巨噬细胞吞噬率,或增加淋巴细胞转化率,进而显著增强机体的免疫功能^[15-19]。

中医药治疗慢性骨髓炎的临床研究成果斐然,但关于中药治疗该病的作用机制研究报道较少。本研究通过家兔胫骨注射金黄色葡萄球菌的方法建立慢性骨髓炎模型,探讨骨炎方的作用机制。白细胞计数可反映机体的炎症状态,本研究中模型组白细胞计数一直维持在比较高的水平,说明模型组动物的炎症反应较为严重;与模型组比较,骨炎方则可在用药后第 2、4 及 6 周显著减少白细胞计数,同时可显著降低胫骨 X 线片的 Laurence 评分,说明骨炎方能够明显缓解骨髓炎动物的炎症反应。感染性疾病发生时,溶菌酶由机体单核细胞分泌释放,其水平高低是了解机体抗感染功能的重要指标^[20];本研究中,模型组家兔血清溶菌酶一直处于较低水平,可能是局部骨感染病变使机体防御功能下降以及大量溶菌酶消耗于局部病灶区所致;与模型组比较,骨炎方则可在用药后显著提高血清溶菌酶水平,原因可能是该药能激活单核细胞的分泌功能,促使溶菌酶大量释放,进而增强巨噬细胞的吞噬功能。据报道,巨噬细胞在完成吞噬、清除坏死组织后可转化为纤维母细胞,形成纤维结缔组织,有助于组织修

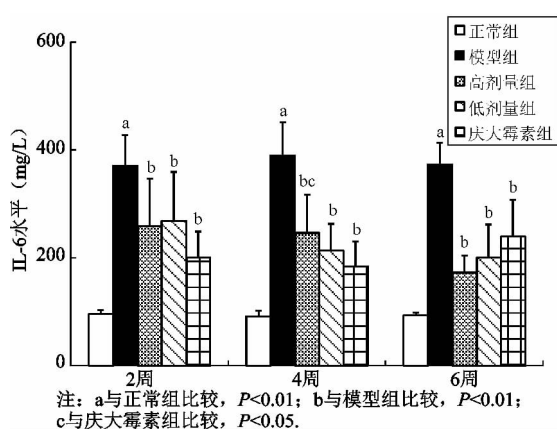


图 6 各组不同时间点血清 IL-6 水平比较

复^[21]。本研究结果提示骨炎方一方面抑制致病菌,另一方面提高机体免疫力、改善内环境,从而实现抗感染及修复病灶的效果;此外,庆大霉素对血清溶菌酶水平影响不显著,提示庆大霉素难以影响单核细胞的溶菌酶分泌,难以有效改善巨噬细胞的吞噬能力,其作用机制与骨炎方有所不同。

骨髓炎是由病原菌诱发同时伴有机体免疫紊乱和炎症反应失控的生理病理过程。TNF- α 与 IL-6 作为机体主要的炎性因子,当机体遭病原菌侵袭时,二者的分泌和释放增多,局部暂时性的炎性因子对机体有利,但持续性过量的炎性因子则会加重炎症反应,抑制滑膜细胞凋亡及成纤维细胞增殖,浸润炎症组织,妨碍新生血管形成,导致软骨及骨的损伤加重^[22]。据临床报道,骨髓炎患者血清 TNF- α 和 IL-6 的含量或阳性率显著高于正常健康人群,其病情的危重程度与二者的表达水平呈正相关^[23]。本研究中,模型组家兔血清 TNF- α 和 IL-6 含量持续性升高,这与文献报道的结论是一致的;骨炎方则可在用药后显著降低家兔血清 TNF- α 和 IL-6 含量,提示骨炎方的作用机制之一可能是通过调节血清炎性因子的含量,以改善炎症机体的免疫功能,减轻由过度炎症反应导致的骨组织破坏,有助于骨组织的修复及骨髓炎的愈合。

总之,骨炎方对家兔慢性骨髓炎的防护作用可能与抑制致病菌、提高机体免疫力、下调炎性因子等途径有关,其具体作用环节尚需深入调查研究。

参考文献

- [1] Walter G, Kemmerer M, Kappler C, et al. Treatment algorithms for chronic osteomyelitis[J]. Dtsch Arztebl Int, 2012, 109(14): 257-264.
- [2] Dym H, Zeidan J. Microbiology of acute and chronic osteomyelitis and antibiotic treatment[J]. Dent Clin North Am, 2017, 61(2): 271-282.
- [3] 韩宗其, 左国营, 郝小燕. 中药成分联合抗生素抗 MRSA 作用的研究进展[J]. 中草药, 2012, 43(12): 187-195.
- [4] 顾卓珩, 顾维凤, 吴飞跃, 等. 医院感染病原菌中药与抗菌

- 药物联合治疗的研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(10): 2236-2238.
- [5] Strelkov NS, Kiryanov NA, Shklyayev PO, et al. Pathologic morphology of acute experimental osteomyelitis[J]. Bosn J Basic Med Sci, 2013, 13(3): 153-157.
- [6] Dahners LE, Funderburk CH. Gentamicin-loaded plaster of Paris as a treatment of experimental osteomyelitis in rabbits[J]. Clin Orthop Relat Res, 1987, 219(3): 278-282.
- [7] Kalinka J, Hachmeister M, Geraci J, et al. Staphylococcus aureus isolates from chronic osteomyelitis are characterized by high host cell invasion and intracellular adaptation, but still induce inflammation[J]. Int J Med Microbiol, 2014, 304(8): 1038-1049.
- [8] Ulug M, Ayaz C, Celen MK. A case report and literature review: osteomyelitis caused by community-associated methicillin resistant Staphylococcus aureus[J]. J Infect Dev Ctries, 2011, 5(12): 896-900.
- [9] 刘振云. 中医三联疗法治疗慢性骨髓炎 200 例[J]. 湖南中医杂志, 2014, 30(8): 95-96.
- [10] 崔玉莹, 王宪贝, 李玉坤, 等. 金银花、连翘水煎液对金黄色葡萄球菌的抑制作用研究[J]. 光明中医, 2017, 32(18): 2637-2638.
- [11] 霍佳楠, 姜晓文, 许晶, 等. 蒲公英水提物对体外金黄色葡萄球菌生物膜形成的影响[J]. 中兽医医药杂志, 2015(1): 12-15.
- [12] 杨明炜, 陆付耳, 徐丽君, 等. 紫花地丁对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药质粒的消除作用[J]. 中西医结合研究, 2009, 1(1): 27-28.
- [13] 陈柳萌, 曹树稳, 余燕影. 白花蛇舌草-半枝莲药对提取物抑菌活性部位研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(1): 93-95.
- [14] 郑险峰, 张金艳, 邵淑娟, 等. 白头翁对金黄色葡萄球菌和产气肠杆菌抑菌作用的研究[J]. 牡丹江师范学院学报: 自然科学版, 2011(2): 29-30.
- [15] 周秀萍, 李争鸣, 刘志杰, 等. 金银花对大鼠免疫功能影响的研究[J]. 实用预防医学, 2011, 18(2): 214-216.
- [16] 高慧婕, 李晓, 李春霞, 等. 蒲公英多糖对免疫抑制小鼠的免疫增强作用及对 TNF- α 的调节[J]. 济宁医学院学报, 2016, 39(6): 391-394.
- [17] 宋高臣, 于英君, 王喜军. 半枝莲多糖的抗肿瘤作用及其调节免疫的实验研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2011, 13(4): 641-643.
- [18] 杨小龙, 李世朋, 王舳舳, 等. 白头翁醇提取物对小鼠免疫功能的影响[J]. 河南科技大学学报: 医学版, 2011, 29(4): 249-250.
- [19] 孟玮, 刘志强, 邱世翠, 等. 中药白花蛇舌草对小鼠免疫功能影响的初步研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2005, 14(2): 163-164.
- [20] 沈芑. 溶菌酶抗菌作用及其在防控医院感染中的应用[J]. 中国消毒学杂志, 2014, 31(10): 1089-1091.
- [21] Novak ML, Koh TJ. Macrophage phenotypes during tissue repair[J]. J Leukoc Biol, 2013, 93(6): 875-881.
- [22] Jiang N, Qin CH, Hou YL, et al. Serum TNF- α , erythrocyte sedimentation rate and IL-6 are more valuable biomarkers for assisted diagnosis of extremity chronic osteomyelitis[J]. Biomark Med, 2017.
- [23] Jiang N, Ma YF, Jiang Y, et al. Clinical characteristics and treatment of extremity chronic osteomyelitis in southern china: a retrospective analysis of 394 consecutive patients[J]. Medicine(Baltimore), 2015, 94(42): e1874.

(收稿日期: 2018-02-07)

(上接第 13 页)

- [10] 祁雷, 姚运峰, 荆珏华. 基质金属蛋白酶抑制剂在骨关节炎治疗中应用的研究进展[J]. 齐鲁医学杂志, 2017, 32(1): 111-114.
- [11] 刘志伟, 严伟洪, 孙晓亮, 等. 软骨代谢标志物 COMP 对骨关节炎软骨改变的反应[J]. 实用骨科杂志, 2007, 13(8): 469-471.
- [12] Larsson E, Erlandsson HH, Larsson A, et al. Corticosteroid treatment of experimental arthritis retards cartilage destruction as determined by histology and serum COMP[J]. Rheumatology(Oxford), 2004, 43(4): 428-434.
- [13] 李具宝, 张磊, 屈尚可, 等. 膝骨关节炎近 10 年文献中内服方药功效和中医证型分析[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2014, 22(3): 20-21.
- [14] 张璇, 肖玉梅, 王茹, 等. 淫羊藿苷对胶原支架中软骨细胞生长及胞外基质分泌的影响[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(6): 25-27.
- [15] 鲍远. 淫羊藿苷促进关节软骨细胞增殖和表型维持及相关机制研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2016.
- [16] 高堪达. 淫羊藿苷对骨关节炎小鼠软骨下骨的保护作用及其机制研究[D]. 南京: 南京医科大学, 2016.
- [17] 郑婧, 张贵君, 韦敏, 等. 五加皮药材基原、化学成分及药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(8): 104-107.
- [18] 陈泽华. 龟甲胶、鹿角胶含药血清对豚鼠关节软骨细胞活性的影响[D]. 福州: 福建中医药大学, 2016.
- [19] 金连峰. 单味中药骨碎补对兔膝关节炎软骨细胞凋亡作用的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(7): 1699-1703.
- [20] 陈达, 廖州伟, 马笃军, 等. 牛膝醇提物对兔骨关节炎模型的疗效比较[J]. 中国医药导报, 2016, 13(25): 21-24.

(收稿日期: 2018-04-01)