

## 骨炎方治疗骨感染作用机制的实验研究

赵宝峰<sup>1</sup> 张军<sup>1</sup> 余磊<sup>1</sup> 齐明<sup>1</sup> 孙冶智<sup>1</sup> 梁宏伟<sup>1△</sup>

**[摘要]** **目的:**探讨中药复方骨炎方对家兔慢性骨髓炎的抗炎效应。**方法:**采用家兔右胫骨骨髓腔内注射金黄色葡萄球菌的方式以诱导慢性骨髓炎模型,动物分为模型组、阳性药克林霉素组(60 mg/kg)、骨炎方两个剂量组(生药量分别为 3.6 和 1.8 g/kg)以及假手术组。各组灌胃给药,分别于给药后第 2,4,6 周对右胫骨行 X 线片检查并予诊断分型,采血测定白细胞计数和血沉,取血清测定白介素(IL)-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10 等细胞因子含量。**结果:**骨炎方高剂量组第 2,4,6 周的 X 线片诊断分型与模型组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ );骨炎方低剂量组第 4,6 周的 X 线片诊断分型与模型组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型组比较,骨炎方高、低剂量组白细胞计数和血沉在给药后第 2,4,6 周均有明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型组比较,骨炎方高、低剂量组第 2,4,6 周的促炎细胞因子 IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平均有明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),第 6 周的抗炎细胞因子 IL-4 水平有明显增高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );高剂量组抗炎细胞因子 IL-10 水平则在第 4,6 周有明显增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论:**骨炎方抗家兔慢性骨髓炎的作用机制可能与抑制致病菌、控制炎症反应、恢复促炎/抗炎细胞因子平衡等有关。

**[关键词]** 骨炎方;兔;慢性骨髓炎;炎症反应;促炎/抗炎细胞因子

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2020)09-0012-04

## Mechanisms of Guyan Prescription Research on Experimental Osteomyelitis

ZHAO Baofeng<sup>1</sup> ZHANG Jun<sup>1</sup> YU Lei<sup>1</sup> QI Ming<sup>1</sup> SUN Yezhi<sup>1</sup> LIANG Hongwei<sup>1△</sup>

<sup>1</sup>The Second Surgical Department, Hospital of Beijing Armed Police Forces, Beijing 100027, China.

**Abstract Objective:** To investigate the anti-inflammatory effect of Guyan prescription against rabbits with chronic osteomyelitis (COM). **Methods:** Injection of staphylococcus aureus in the right tibia was used to establish the experimental model of COM. Then rabbits with COM were divided randomly into 5 groups: model, clindamycin (60 mg/kg), Guyan prescription high and low dose (3.6 and 1.8 g/kg, respectively) and sham groups. Animals were treated by oral administration for 6 weeks. The X-ray determination in the right tibia of rabbits were graded, white blood cell count (WBC) and erythrocyte sedimentation rate (ESR) were measured and interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-4, IL-6 and IL-10 levels in sera were determined by ELISA on the 2nd, 4th and 6th week after treatment. **Results:** For Guyan prescription groups (3.6 g/kg on the 2nd, 4th and 6th week and 1.8 g/kg on the 4th and 6th week, respectively), the X-ray grades were significantly improved as compared with the model group ( $P < 0.05$ ). As compared with the model group, WBC and ESR in Guyan prescription groups were markedly decreased on the 2nd, 4th and 6th week respectively ( $P < 0.05$ ). The serum levels of proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$  and IL-6) in Guyan prescription groups (3.6 and 1.8 g/kg) were significantly reduced at the 2nd, 4th and 6th week respectively ( $P < 0.05$ ), while anti-inflammatory cytokine (IL-4) was significantly enhanced on the 6th week ( $P < 0.01$ ). Besides, the serum levels of anti-inflammatory cytokine (IL-10) in Guyan prescription high dose group was markedly increased at the 4th and 6th week respectively ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The mechanism of Guyan prescription against chronic osteomyelitis in rabbits may be related to the inhibition of pathogenic bacteria, the control of inflammatory reaction and the restoration of proinflammatory/anti-inflammatory cytokine balance.

**Keywords:** Guyan prescription; rabbit; chronic osteomyelitis; inflammatory response; proinflammatory and anti-inflammatory cytokines

<sup>1</sup> 武警北京市总队医院外二科(北京, 100027)

<sup>△</sup> 通信作者 E-mail: 158130707@qq.com

骨感染是骨科手术后或外伤常见而严重的并发症,临床多采用抗菌药物的预防应用以控制感染。但长期应用抗菌药物也带来一系列问题,如细菌耐药率的直线上升,尤其是多重耐药菌,是骨科医生面临的最具挑战性的难题之一<sup>[1]</sup>。中医药在骨感染领域所发挥的作用日益受到国内外研究者的重视,有研究表明,中药成分与抗菌药物联合使用对骨科常见耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)具备相加或协同作用<sup>[2]</sup>。本室在传统医学理论上结合多年临床经验自拟中药复方骨炎方,由金银花、蒲公英等 6 味药组成,具有扶正护阴、清热解毒、生肌排脓之效,临床用于慢性骨髓炎、骨膜炎、附骨疽等骨科疾病<sup>[3]</sup>。本研究采用慢性骨髓炎(Chronic Osteomyelitis, CO)家兔模型,探讨骨炎方对骨感染的预防作用及其作用机制,为其临床应用提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

新西兰白兔,雄性,5~6 个月龄,体质量 2~3 kg,由河北省实验动物中心提供,许可证号 SCXK(冀)2013-1-003。单笼饲养,适应 1 周。

### 1.2 药品和试剂

骨炎方(组方:金银花、蒲公英、地丁、白头翁、半枝莲、白花蛇舌草等),本室自制,生药含量 0.18 g/mL;盐酸克林霉素胶囊,由康普药业股份有限公司提供,每片 15 mg;鱼肝油酸钠注射液,由上海信谊金朱药业有限公司提供;金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),ATCC6538P 标准型,由武警北京市总队医院检验科提供;白介素(IL)-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10 酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒,均由南京建成生物工程研究所提供;其他试剂均为化学纯。

### 1.3 仪器设备

X 射线机(IME-100L 型),日本 Toshiba 公司产品;血细胞分析仪(XE2100 型),日本 Sysmex 株式会社产品;光学显微镜(CHK-213 型),日本 Olympus 公司产品;全自动生化分析仪(AU640 型),日本 Olympus 公司产品。

### 1.4 方法

**1.4.1 建立慢性骨髓炎动物模型** 依 Odekerken 等<sup>[4]</sup>方法有所改进:取新西兰白兔,经耳缘静脉注射 3%戊巴比妥钠,麻醉后仰位固定,在右胫骨近端进行常规消毒、备皮,于近端外侧做一约 2 cm 的纵行切口,分离肌肉,暴露出干骺端(胫骨平台),用 2 mm 克氏针在胫骨平台钻两个边缘相互重叠的孔,打通骨髓腔,向腔内注射 0.1 mL 5% 鱼肝油酸钠,继而将浸有 0.5 mL  $1 \times 10^9$  CFU/mL 金黄色葡萄球菌液的胶原蛋白海绵球塞入钻孔处,用骨蜡封闭钻孔,常规止血、封闭

切口。

**1.4.2 分组和给药** 术后将新西兰白兔分为模型组、阳性组(克林霉素 60 mg/kg)<sup>[5]</sup>、骨炎方低剂量组(生药 1.8 g/kg)、骨炎方高剂量组(生药 3.6 g/kg),每组 10 只;另取 10 只新西兰白兔作为假手术组,除将金黄色葡萄球菌液替换成生理盐水外,其他手术操作同上。术后次日开始灌胃给药,假手术组和模型组应用等体积 0.5% CMC-Na,持续给药 6 周。

### 1.4.3 检测指标

**1.4.3.1 X 线片诊断分型:**各组动物分别于给药后第 2, 4, 6 周麻醉,对右胫骨行 X-线拍片,参照 Zhang 等<sup>[6]</sup>方法将 X 线片诊断分型为 3 级:轻度(治愈恢复型)、中度(稳定型和增殖型)、重度(死骨形成型和破坏进展型)。

**1.4.3.2 白细胞计数(WBC)和血沉(ESR):**各组动物分别于给药后第 2, 4, 6 周,禁食不禁水 12 h,自耳缘静脉采血,通过血细胞分析仪测定 WBC 和 ESR。

**1.4.3.3 血清细胞因子:**各组动物分别于给药后第 2, 4, 6 周,禁食不禁水 12 h,离心取血清,采用双抗体夹心 ELISA 法,通过酶标仪测定 IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6 和 IL-10 含量。

### 1.5 统计学方法

计数资料采用秩和检验,两两比较行 Mann-Whitney U 检验;计量资料采用单因素方差分析,两两比较行 Dunnett 检验。通过 SPSS 18.0 软件处理数据,  $P < 0.05$  差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组诊断分型情况

假手术组未见慢性骨髓炎症状。模型组动物胫骨处明显红肿,有破溃窦道和脓肿现象(图 1),X 线片诊断分型以重度为主。各给药组动物胫骨处红肿现象较轻,未见窦道或窦道愈合较快;骨炎方高剂量组 X 线片诊断分型以轻、中度为主,与相应时间点模型组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ );骨炎方低剂量组 X 线片诊断分型在给药后第 4, 6 周与相应时间点模型组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1。

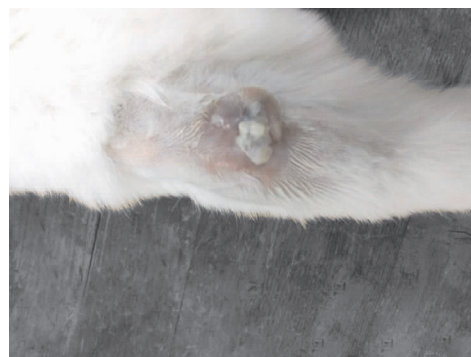


图 1 模型组家兔胫骨

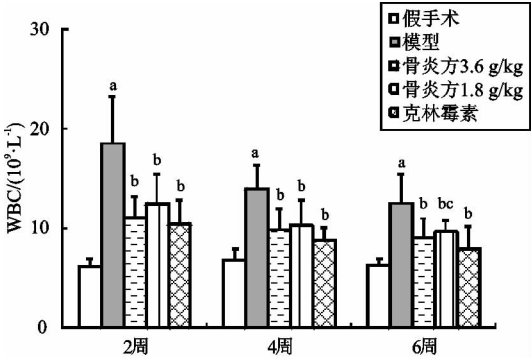
表 1 各组不同时间点 X 线片诊断分型(只)

组别	剂量/ (mg · g <sup>-1</sup> )	诊断分型	2 周	4 周	6 周
模型		轻度	0	0	0
		中度	1	1	2
		重度	9	9	8
高剂量	3.60	轻度	2 <sup>1)</sup>	4 <sup>1)</sup>	6 <sup>1)</sup>
		中度	5 <sup>1)</sup>	3 <sup>1)</sup>	3 <sup>1)</sup>
		重度	3 <sup>1)</sup>	3 <sup>1)</sup>	1 <sup>1)</sup>
低剂量	1.80	轻度	2	3 <sup>2)</sup>	5 <sup>1)</sup>
		中度	3	3 <sup>2)</sup>	3 <sup>1)</sup>
		重度	5	4 <sup>2)</sup>	2 <sup>1)</sup>
克林霉素	0.06	轻度	3 <sup>1)</sup>	3 <sup>1)</sup>	5 <sup>1)</sup>
		中度	5 <sup>1)</sup>	5 <sup>1)</sup>	4 <sup>1)</sup>
		重度	2 <sup>1)</sup>	2 <sup>1)</sup>	1 <sup>1)</sup>

注:与同一时间点模型组比较,1) $P<0.01$ ,2) $P<0.05$ 。

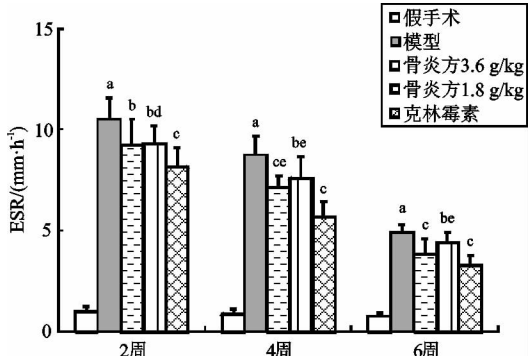
2.2 各组 WBC 和 ESR

与假手术组比较,模型组家兔 WBC 和 ESR 在给药后第 2,4,6 周均有显著增高,差异有统计学意义( $P<0.01$ );骨炎方高、低剂量组和克林霉素组 WBC 和 ESR 在给药后第 2,4,6 周均有明显降低,与模型组比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 2-3。



注:与假手术组比较, a  $P<0.01$ ; 与模型组比较, b  $P<0.01$ ; 与克林霉素组比较, c  $P<0.05$ 。

图 2 各组不同时间点 WBC



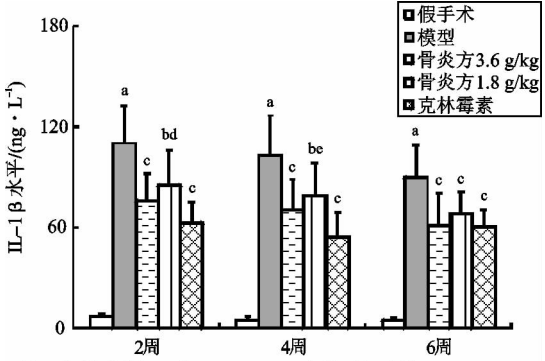
注:与假手术组比较, a  $P<0.01$ ; 与模型组比较, b  $P<0.05$ , c  $P<0.01$ ; 与克林霉素组比较, d  $P<0.05$ , e  $P<0.01$ 。

图 3 各组不同时间点 ESR

3.3 各组血清细胞因子情况

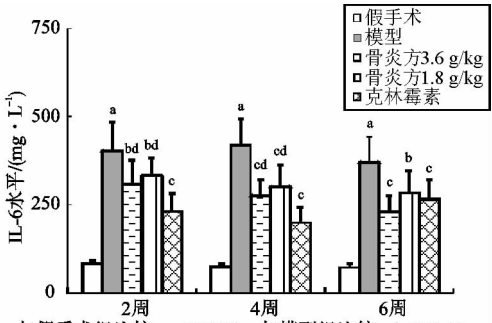
与假手术组比较,模型组家兔促炎细胞因子 IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平在给药后第 2,4,6 周均有显著增高( $P<0.01$ ),抗炎细胞因子 IL-4 和 IL-10 水平分别在给药后第 2,4,6 周和给药后第 6 周有显著增高( $P<$

0.01);与模型组比较,骨炎方高、低剂量组和克林霉素组 IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平在给药后第 2,4,6 周均有明显降低( $P<0.05$ ),骨炎方高、低剂量组 IL-4 水平在给药后第 6 周有明显增高( $P<0.01$ ),骨炎方高剂量组 IL-10 水平在给药后第 4,6 周有明显增高( $P<0.05$ );克林霉素对血清 IL-4 和 IL-10 水平则无显著影响,见图 4-7。



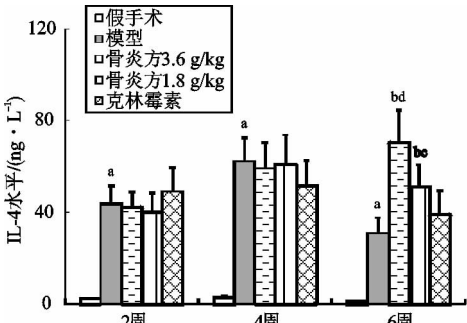
注:与假手术组比较, a  $P<0.01$ ; 与模型组比较, b  $P<0.05$ , c  $P<0.01$ ; 与克林霉素组比较, d  $P<0.05$ , e  $P<0.01$ 。

图 4 各组不同时间点 IL-1 $\beta$  水平



注:与假手术组比较, a  $P<0.01$ ; 与模型组比较, b  $P<0.05$ , c  $P<0.01$ ; 与克林霉素组比较, d  $P<0.01$ 。

图 5 各组不同时间点 IL-6 水平



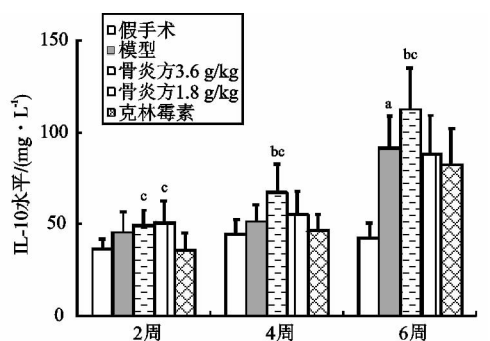
注:与假手术组比较, a  $P<0.01$ ; 与模型组比较, b  $P<0.01$ ; 与克林霉素组比较, c  $P<0.05$ ; d  $P<0.01$ 。

图 6 各组不同时间点 IL-4 水平

3 讨论

慢性骨髓炎最常见的感染部位为下肢,排在首位的致病菌即金黄色葡萄球菌<sup>[7]</sup>,常规治疗手段是手术清除病灶或应用抗菌药物。但长期应用抗菌药物易致耐药菌的产生,使得慢性骨髓炎感染或复发愈加难以控制<sup>[8]</sup>。怎样更好地促进慢性骨髓炎患者骨修复,改善机体全身状况,是骨科领域值得探讨的重要议题。

慢性骨髓炎属中医学“附骨疽”范畴,中医认为该



注: 与假手术组比较, a  $P < 0.01$ ; 与模型组比较, b  $P < 0.05$ ; 与克林霉素组比较, c  $P < 0.01$ 。

图 7 各组不同时间点 IL-10 水平

病与邪毒、湿热关系密切,多因患病后余毒未清或外来伤害感受毒邪,湿热壅盛,邪毒蕴结于筋骨,使经络阻塞,血凝毒聚而成;治法当调补气血,清热解毒,行瘀通络,活血生肌等<sup>[9]</sup>。本研究中骨炎方组方成分(金银花、蒲公英、地丁、白头翁、半枝莲、白花蛇舌草等)皆为苦寒之品,金银花疏散风热,清解血毒,作为君药;白头翁凉血止痢、燥湿杀虫,半枝莲活血祛瘀、利尿消肿,作为臣药;蒲公英、地丁、白花蛇舌草则可消肿散结止痛,利尿通淋解毒,作为佐药;诸药合用,共奏清热解毒、消肿散瘀之功。现代药理学研究亦证实骨炎方组方成分对多种病原微生物尤其是金黄色葡萄球菌具有显著的抑制或杀灭活性<sup>[10-14]</sup>;此外,骨炎方多数成分具有免疫增强活性,提示骨炎方还具有提高机体免疫力、改善内环境等作用。

当下中医药在骨感染领域的研究方兴未艾,而有关中医药抗骨感染的作用机制极少见诸报道,本研究探讨了中药复方骨炎方对家兔胫骨感染的影响及其作用机制。感染性疾病中,血液学指标 WBC 和 ESR 常用于评估炎症的转归,二者与炎症反应程度呈正相关,尤其是 ESR 在慢性骨髓炎的诊疗中具有重要的参考价值<sup>[15]</sup>。本研究中模型组家兔 WBC 在各时间点持续高水平,ESR 随时间推移虽有所降低,与假手术组相比仍有显著性差异,提示慢性骨髓炎家兔的炎性反应较为严重;骨炎方在用药后第 2, 4, 6 周可使 WBC 和 ESR 显著降低,结合胫骨 X 线片诊断分型的结果,说明骨炎方可减轻慢性骨髓炎家兔的炎性反应,缓解由此导致的骨组织破坏,有助于骨组织的修复愈合。

慢性骨髓炎的病理进程伴随有机体免疫紊乱和炎症反应失控,细胞因子尤其是促炎因子与抗炎因子之间的平衡可反映出感染和炎症的程度<sup>[15]</sup>。炎症反应一般是由促炎细胞因子 IL-1 $\beta$ , IL-6 等介导,并刺激其他炎症因子的分泌,这些因子可相互促进,引起炎症级联反应,加重组织损伤,并参与骨组织代谢,导致骨结构的破坏加重<sup>[16]</sup>。据报道,骨髓炎患者血清 IL-6 的表达水平显著高于健康人群,且与病情危重程度呈正

相关<sup>[17]</sup>。本研究中,模型组家兔血清促炎细胞因子 IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平有显著升高,抗炎细胞因子 IL-4 和 IL-10 水平亦有不同程度的升高,这与文献报道的结果有相似之处<sup>[16,18]</sup>。骨炎方高、低剂量组则可在用药后明显降低家兔血清 IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平,用药后第 6 周明显升高 IL-4 水平;高剂量组尚可在用药后第 4, 6 周明显升高 IL-10 水平;提示骨炎方的作用机制之一可能是通过抑制促炎细胞因子并维持促炎与抗炎细胞因子间的平衡,以改善炎症机体的免疫功能,控制过度的炎症反应,缓解骨结构破坏,有助于骨组织病灶的修复及慢性骨髓炎的痊愈。

综上所述,骨炎方对家兔慢性骨髓炎的保护作用可能与抑制致病菌、控制炎症反应、恢复促炎与抗炎细胞因子平衡等途径有关。由于细胞因子功能的多样性和交叉性,要明确骨炎方的作用机制尚需进一步研究。

## 参考文献

- [1] VARDAKAS K Z, KONTOPIDIS I, GKEGKES I D, et al. Incidence, characteristics, and outcomes of patients with bone and joint infections due to community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a systematic review [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2013, 32 (6): 711-721.
- [2] 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.
- [3] 黄楠, 齐明, 张军, 等. 中药骨炎方治疗胫骨慢性骨髓炎的作用机制[J]. *中国药师*, 2019, 22(5): 848-851.
- [4] ODEKERKEN J C, ARTS J J, SURTEL D A, et al. A rabbit osteomyelitis model for the longitudinal assessment of early post-operative implant infections [J]. *J Orthop Surg Res*, 2013, 8: 38.
- [5] 王燕萍, 陈娅, 武新安, 等. 慢性骨髓炎的病原学特点及抗菌药物治疗进展[J]. *中国药房*, 2015, 26(20): 2867-2870.
- [6] ZHANG X, MA Y F, WANG L, et al. A rabbit model of implant-related osteomyelitis inoculated with biofilm after open femoral fracture [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(5): 4995-5001.
- [7] PINCHER B, FENTON C, JEYAPALAN R, et al. A systematic review of the single-stage treatment of chronic osteomyelitis [J]. *J Orthop Surg Res*, 2019, 14(1): 393.
- [8] PRABHOO R, CHADDHA R, IYER R, et al. Overview of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* mediated bone and joint infections in India [J]. *Orthop Rev (Pavia)*, 2019, 11(2): 8070.
- [9] 侯昌华. 慢性骨髓炎患者用中医传统疗法联合 VSD 手段治疗的临床价值[J]. *中国现代药物应用*, 2018, 12(5): 56-57.