

白花丹止痛喷雾剂对兔膝关节炎软骨组织病理形态及 TNF- α 、IL-6、MDA、SOD 的影响

杜以宽*, 曾广龙, 谭志超, 袁胜超, 蔡立民*

广州中医药大学附属东莞市中医院, 东莞 523000

摘要:本研究旨在用膝关节炎新西兰兔模型, 观察白花丹止痛喷雾剂对关节软骨组织形态学改变及炎症细胞因子、自由基表达的影响, 探讨白花丹及其新式外用方法在骨性关节炎中作用, 为其临床应用提供相应的药效基础。采用 Muehleman 木瓜蛋白酶膝腔内注射法造模, 随机分为正常组、模型组、扶他林组、白花丹喷雾剂高、中、低剂量组(分别为 2、1、0.5 mg/mL), 给药 6 周后, ELISA 法测定血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素 6(IL-6)的含量; 关节滑膜组织匀浆作丙二醛(MDA, TBA 法)、总超氧化物歧化酶(SOD, 羟胺法)检测; 取胫骨平台关节软骨制作石蜡切片, 并行 HE 染色及甲苯胺蓝染色观察, 以改良 Mankin's 标准进行评分。结果表明白花丹止痛喷雾剂可有效降低新西兰兔膝关节炎模型血清炎症因子 TNF- α 、IL-6 值($P < 0.05$); 并有效降低滑膜 MDA 值、升高 SOD 值($P < 0.05$); 有效降低新西兰兔膝关节炎模型的平均关节炎指数($P < 0.05$); 且高、中剂量组在软骨结构、软骨细胞、甲苯胺蓝基质染色、潮线的完整性等项目评分中均优于扶他林组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。由此提示, 白花丹止痛喷雾剂可有效抑制骨关节炎的发展, 改善膝关节软骨组织病理形态, 并能抑制炎症因子, 同时可抗氧化, 进而起到治疗作用。

关键词: 白花丹; 骨关节炎; 关节软骨病理; 炎症细胞因子; 抗氧化

中图分类号: R274.9

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.12.007

Effects of *Plumbago zeylanica* Analgesic Spray on Cartilage Histopathology of Rabbit Knee Osteoarthritis and the Expression of TNF- α , IL-6, MDA and SOD

DU Yi-kuan*, ZENG Guang-long, TAN Zhi-chao, YUAN Sheng-chao, CAI Li-min*

Dongguan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Dongguan 523000, China

Abstract: The purpose of this study was to observe the effect of *Plumbago zeylanica* analgesic spray (PZAS) on the morphological changes of articular cartilage and the expression of inflammatory cytokines and free radicals by using the New Zealand rabbit model of knee osteoarthritis, and to explore the effect of *P. zeylanica* and its new external method on osteoarthritis, and hence to provide the corresponding pharmacodynamic basis for clinical application. After the successful model of the knee cavity injection of papain, the rabbits were randomly divided into normal control group, model group, voltaren (diclofenac diethylamine) emulgel group, *P. zeylanica* spray group with high dosage (2 mg/mL), medium dosage (1 mg/mL) and low dosage (0.5 mg/mL). After 6 weeks of drug delivery, the content of serum TNF- α and IL-6 was determined by Elisa, and the articular synovial tissue homogenate was used as MDA (Malondialdehyde, TBA method) and increased SOD (Superoxide dismutase, Hydroxylamine method), the tibial plateau articular cartilage was prepared by paraffin section, and HE staining and toluidine blue staining were observed using Mankin's standard. The results showed that the analgesic aerosol spray can effectively reduce the inflammatory factor TNF- α and IL-6 value ($P < 0.05$) in the model of knee arthritis in New Zealand rabbits, effectively reduce the value of MDA and increased SOD value ($P < 0.05$) in the synovial membrane; the mean arthritis index was effectively reduced ($P < 0.05$); The high and medium dosage groups were better than the voltaren emulgel group in the cartilage structure, chondrocyte, toluidine blue staining and the integrity of the tidal line ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). It is suggested that *P. zeylanica* analgesic spray can

effectively inhibit the development of osteoarthritis, improve the pathological morphology of articular cartilage, and inhibit inflammatory factors, also can resist oxidation, and thus play a

收稿日期: 2017-06-05 接受日期: 2017-09-01

基金项目: 东莞市社会科技发展项目(2013108101044)

* 通信作者 E-mail: dgcaillimin@163.com

therapeutic role.

Key words: *Plumbago zeylanica*; osteoarthritis; cartilage pathology; inflammatory factors; anti-inflammatory

白花丹 (*Plumbago zeylanica* Linn.) 为石竹亚纲白花丹目 (又称蓝雪目) 植物, 为多民族药材, 别名众多, 广泛应用于中国壮、瑶、傣、维、藏、黎及东南亚、南亚地区的传统医学中^[1], 味辛苦涩、性微温、内服有毒, 可祛风活络、止痛消肿。本课题组应用白花丹止痛剂外用治疗膝关节炎, 进行疗效综合/总体评价、Lequesne 指数评分及安全性指标评价, 证实疗效确切^[2]。白花丹化学成分和药理活性的研究, 印度等国相对我国更为活跃。本次开发研究的白花丹止痛喷雾剂主要成分是干品白花丹根部的乙醇提取物^[3], 其中分离最多的是萘醌类, 此类成分的主要骨架类型为 1,4-萘醌, 如研究最多的重要活性成分 5-Hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone (plumbagin, 白花丹素(醌)、矾松素、蓝(兰)雪醌、蓝(兰)雪精)^[4,5], 现有谭明雄的研究称白花丹素与白花丹醌 (plumbazeylanone) 的分子式并不相同^[3,6]。本实验过程中以中国药品生物制品检定所的标准品 5-羟基-2-甲基-1,4-萘醌 ($C_{11}H_8O_3$, plumbagin) 为对照, 高效液相法检测, 严格控制样品浓度, 观察白花丹止痛喷雾剂 (*Plumbago zeylanica* analgesic spray, PZAS) 对兔膝关节炎的关节软骨病理组织形态学及炎性细胞因子、自由表达的影响, 探讨其治疗膝关节炎的可能作用机制。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

普通级雄性新西兰兔 42 只, 2~2.5 kg, 动物合格证编号: 44007600003844; 动物实验证明: 00161972, 由广州中医药大学实验动物中心提供。

1.2 实验药物及试剂

白花丹止痛喷雾剂 (高、中、低剂量分别为 2, 1, 0.5 mg/mL), 东莞市中医院本院制剂, 批号: 160402; 双氯芬酸二乙胺乳胶剂 (扶他林), 规格: 20 g: 0.2 g (以双氯芬酸钠计), 北京诺华制药有限公司, 批号: VP0307。

木瓜蛋白酶, SIGMA, 批号: 031M0542V; L-半胱氨酸, Sigma, 批号: SLBQ04050V; 盐酸赛拉嗪注射液 (速眠新 II), 吉林省敦化市圣达动物药业有限公司, 批号: 20160201。

兔白介素 6 (IL-6) ELISA 试剂盒, Lot:

X07013960, 兔肿瘤坏死因子 ((TNF- α) ELISA 试剂盒, Lot: X06013958, 均为武汉华美生物工程有限公司; 总超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒, Lot: 20160718, 丙二醛 (MDA) 试剂盒, Lot: 20160716, 均为南京建成生物工程研究所。

1.3 实验仪器

DG5033A 型酶标仪, 南京华东电子集团医疗装备有限责任公司; Ultra Pure UF 型泰凯弗隆实验室纯水系统, 上海和泰仪器有限公司; UV-7504 型单光束紫外可见分光光度计, 上海欣茂仪器有限公司; TGL-16M 型高速离心机, 长沙平凡仪器仪表有限公司; CU-420 型电热恒温水浴箱, 上海一恒科技有限公司。

2 实验方法

2.1 实验分组

选用符合要求的新西兰兔, 随机选取 7 只作正常组, 其余的造模观察 2 周后, 选取造模成功的 35 只新西兰兔随机分为模型组、扶他林组、白花丹喷雾剂高、中、低剂量组 (简称高、中、低剂量组, 下同), 每组 7 只。

2.2 给药剂量确定

根据白花丹素 (plumbagin) 的研究文献^[7,8], 结合本课题组前期的临床及毒理等试验, 依据人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值表^[9], 分别给予高、中、低浓度 (2, 1, 0.5 mg/mL) 的白花丹止痛喷雾剂 2 mL 均匀喷涂, 2 次/d (高剂量组相当于同等体表面积成人外用剂量的 3 倍); 正常组: 给予生理盐水 2 mL 均匀喷涂, 2 次/d; 扶他林组: 给予扶他林乳膏约 2 g 均匀涂抹实验兔右膝关节, 3 次/d, 连续 6 周^[10]。

2.3 造模

Muehleman 木瓜蛋白酶法^[11], 常规麻醉、消毒等无菌操作, 轻度弯曲实验兔右膝关节, 经髌韧带内侧凹陷处进针, 注射无菌 2.0% 木瓜蛋白酶生理盐水溶液 (含盐酸半胱氨酸 50 mg/mL) 0.3 mL, 1 周后再注射 1 次, 2 周后可见退行性关节炎进行性发展, 定性标准: 造模侧出现肿胀、屈伸功能障碍为造模成功^[12]。

2.4 观察指标

2.4.1 关节炎症状观察评分

分别观察造模后和治疗后各关节肿胀度, 按 0-

4 评分。0 分:无关节炎;1 分:关节有红色斑点或轻度肿胀;2 分:关节中度红肿;3 分:关节重度红肿;4 分:关节严重红肿且不能负重。计算平均关节炎指数 MAI (mean arthritis index) = 各组分数总和/各组动物数。

2.4.2 动物取材及检验项目

给药 6 周后,兔子耳中央动脉采血,ELISA 法测定血清 TNF- α 、IL-6 的含量;采血后动物空气栓塞法处死,取右膝关节滑膜组织匀浆作 MDA(TBA 法)、SOD(羟胺法)检测。

2.4.3 病理检查

用手术刀切下胫骨平台的关节软骨,制作石蜡切片。HE 染色观察软骨表面是否平整,有无裂隙

及程度(深达移行层、辐射层、钙化层,甚或脱落),细胞的分布、数量及排列是否规则,潮线完整程度;甲苯胺蓝染色观察软骨基质失染程度。并以改良 Mankin's 标准进行评分^[13,14]。

2.5 统计分析

应用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本均数比较采用单因素方差 LSD 检验。

3 实验结果

3.1 动物平均关节炎指数观察结果

造模 2 周后,造模各组动物可见右膝关节明显肿大,屈伸功能障碍,家兔有意识避免患肢用力



图 1 造模后双膝关节的对比观察及放大图

Fig. 1 Contrast observation and enlargement of the double knees after modeling

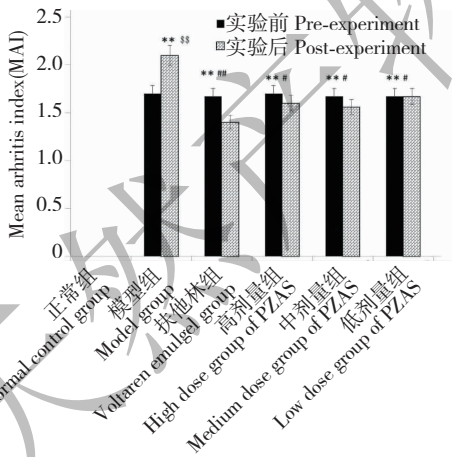


图 2 各组动物平均关节炎(MAI)指数比较结果

Fig. 2 Comparison of mean arthritis index in each group

注:白花丹止痛喷雾剂高、中、低剂量组与正常组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$;与扶他林组比较,\$ $P < 0.05$,\$\$ $P < 0.01$

Note: Compared with normal control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$; Compared with model group,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$; Compared with voltaren emulgel group,\$ $P < 0.05$,\$\$ $P < 0.01$

支撑,见有跛行(如图 1 所示);平均关节炎指数与正常组相比差异极显著($P < 0.01$),造模组各分组之间无显著性差异($P > 0.05$)。治疗后取材时观察,平均关节炎指数与模型组比较,扶他林组差异极显著($P < 0.01$),白花丹高、中、低剂量组差异显著($P < 0.05$)(如图 2,3 所示)。给药期间,各组动物整体外观体征、腺体分泌、呼吸情况、粪便、精神状态均无明显异常。

3.2 各组动物血清 TNF- α 、IL-6 的检测结果

经治疗后,各给药组的血清 TNF- α 值降低,与模型组比较,差异显著($P < 0.05$);与正常组比较,无显著性差异($P > 0.05$)。白花丹止痛喷雾剂各组与扶他林组比较,无显著性差异($P > 0.05$),高剂量组、中剂量组值降低更明显(如图 4、表 1 所示)。

各给药组的血清 IL-6 值降低,与模型组比较,差异显著($P < 0.05$);与正常组比较,无显著性差异($P > 0.05$)。模型组与白花丹止痛喷雾剂各组比较,差异显著($P < 0.05$);而与扶他林组比较,差异极显著($P < 0.01$);白花丹止痛喷雾剂各组与扶他

林组比较,无显著性差异($P > 0.05$)。高剂量组、中剂量组值降低更明显(如图4、表1所示)。

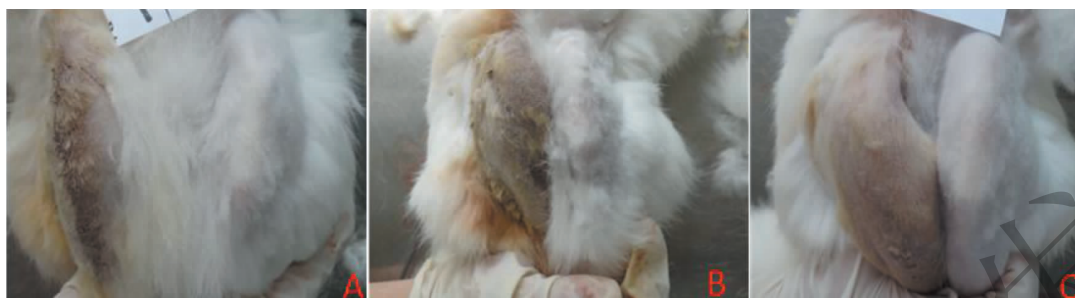


图3 取材时白花丹止痛喷雾剂高(A)、中(B)、低(C)组膝关节对比观察情况

Fig. 3 Contrast observation of the knee joint after treatment with high (A), medium (B) and low (C) dose of *P. zeylanica* analgesic spray

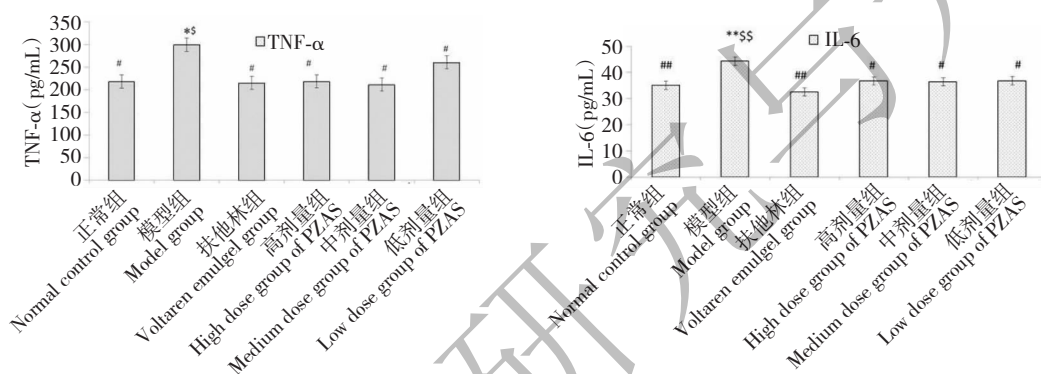


图4 各组动物血清 TNF- α 、IL-6 的检测结果比较 (pg/mL)

Fig. 4 Comparison of serum TNF- α and IL-6 in each group (pg/mL)

注:白花丹止痛喷雾剂高、中、低剂量组与正常组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与扶他林组比较, § $P < 0.05$, §§ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with normal control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; Compared with voltaren emulgel group, § $P < 0.05$, §§ $P < 0.01$

表1 各组动物血清 TNF- α 、IL-6 的检测结果比较 (pg/mL)

Table 1 Comparison of serum TNF- α and IL-6 in each group (pg/mL)

组别 Group	n	TNF- α	IL-6
正常组 Normal control group	7	218.58 \pm 60.26 [#]	35.08 \pm 6.50 ^{##}
模型组 Model group	7	299.77 \pm 111.09 ^{* §}	44.26 \pm 9.49 ^{** § §}
扶他林组 Voltaren emulgel group	7	215.31 \pm 57.15 [#]	32.57 \pm 3.36 ^{##}
白花丹止痛喷雾剂高剂量组 High dose group of PZAS	7	218.61 \pm 64.90 [#]	36.74 \pm 3.43 [#]
白花丹止痛喷雾剂中剂量组 Medium dose group of PZAS	7	211.58 \pm 53.73 [#]	36.43 \pm 4.22 [#]
白花丹止痛喷雾剂低剂量组 Low dose group of PZAS	7	260.70 \pm 90.48 [#]	36.80 \pm 6.63 [#]

注:白花丹止痛喷雾剂高、中、低剂量组与正常组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与扶他林组比较, § $P < 0.05$, §§ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with normal control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; Compared with voltaren emulgel group, § $P < 0.05$, §§ $P < 0.01$

3.3 各组动物滑膜组织 MDA、SOD 的检测结果

各给药组的滑膜组织 MDA 降低,与正常组比

较,无明显差异($P > 0.05$);白花丹止痛喷雾剂各组,与模型组比较,差异显著($P < 0.05$),且与扶他

林组比较,无显著性差异($P > 0.05$),高剂量组、中剂量组值降低更明显(如图5、表2所示)。

各给药组的滑膜组织 SOD 值,与模型组比较,

均有升高,且高剂量白花丹止痛喷雾剂组差异显著($P < 0.05$);白花丹止痛喷雾剂各组,与扶他林组比较,无显著性差异($P > 0.05$)(如图5、表2所示)。

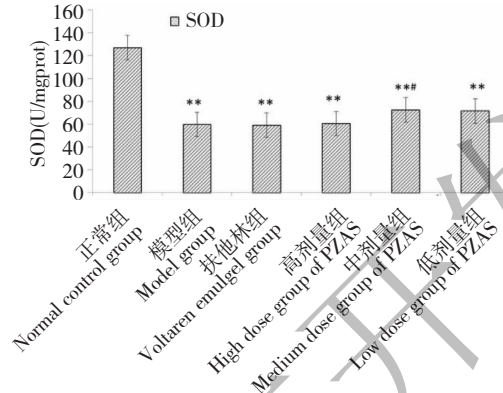
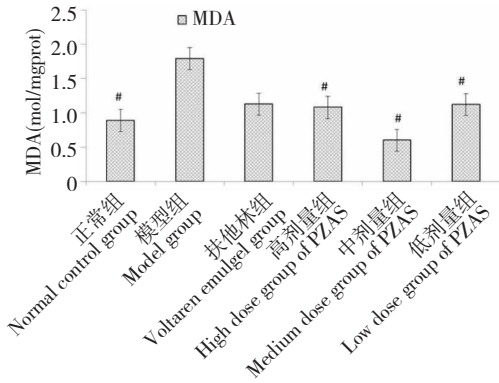


图5 各组动物滑膜组织 MDA、SOD 的检测结果

Fig. 5 Comparison of MDA and SOD in synovial tissue of each group

注:白花丹止痛喷雾剂高、中、低剂量组与正常组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,### $P < 0.01$;与扶他林组比较,\$ $P < 0.05$,\$\$ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with normal control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with model group, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$; Compared with voltaren emulgel group, \$ $P < 0.05$, \$\$ $P < 0.01$

表2 各组动物滑膜组织 MDA、SOD 的检测结果比较

Table 2 Comparison of MDA and SOD in synovial tissue of each group

组别 Group	n	MDA (nmol/mgprot)	SOD (U/mgprot)
正常组 Normal control group	7	0.89 ± 0.49 [#]	127.17 ± 16.20
模型组 Model group	7	1.79 ± 0.79	59.74 ± 5.94 ^{**}
扶他林组 Voltaren emulgel group	7	1.13 ± 0.69	59.25 ± 7.13 ^{**}
白花丹止痛喷雾剂高剂量组 High dose group of PZAS	7	1.08 ± 0.64 [#]	60.49 ± 6.15 ^{**}
白花丹止痛喷雾剂中剂量组 Medium dose group of PZAS	7	0.60 ± 0.48 [#]	72.60 ± 11.64 ^{**#}
白花丹止痛喷雾剂低剂量组 Low dose group of PZAS	7	1.12 ± 0.69 [#]	71.59 ± 13.06 ^{**}

注:白花丹止痛喷雾剂高、中、低剂量组与正常组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,### $P < 0.01$;与扶他林组比较,\$ $P < 0.05$,\$\$ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with normal control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with model group, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$; Compared with voltaren emulgel group, \$ $P < 0.05$, \$\$ $P < 0.01$

3.4 病理检查结果

镜下观察结果:正常组软骨表层光滑,平整,软骨细胞分布均匀,序列整齐,层次清楚,潮线完整,基质染色正常;模型组软骨表层纤维化深及骨化层,表面不平整,软骨细胞增生排列杂乱,软骨细胞数量减少,软骨基质有裂隙,潮线消失,血管伸入骨区形成血管翳,甲苯胺蓝染色可见基质失色明显,潮线消失,血管侵入潮线;扶他林组软骨表层不规则,偶见裂隙,软骨表层轻微纤维化,软骨细胞减少明显,基质失色中度,潮线不规则;高剂量组多例软骨表面光

滑,平整,软骨细胞有些减少,偶见软骨表层纤维化,基质轻度失色,潮线正常;中剂量组多例软骨表面不光滑,可见裂隙深达辐射层,软骨细胞弥漫增生,基质失色,潮线不规则;低剂量组多例软骨表层不规则偶见裂隙,软骨表层轻微纤维化,软骨细胞出现明显减少,基质中度失色,潮线不规则(如图6、7所示)。

改良 Mankin's 评分结果分析(如表3所示),各治疗组在软骨结构、软骨细胞、甲苯胺蓝染色、潮线的完整性等项目评分中均低(优)于模型组,高(差)于正常组。在软骨结构项目评分中,与扶他林

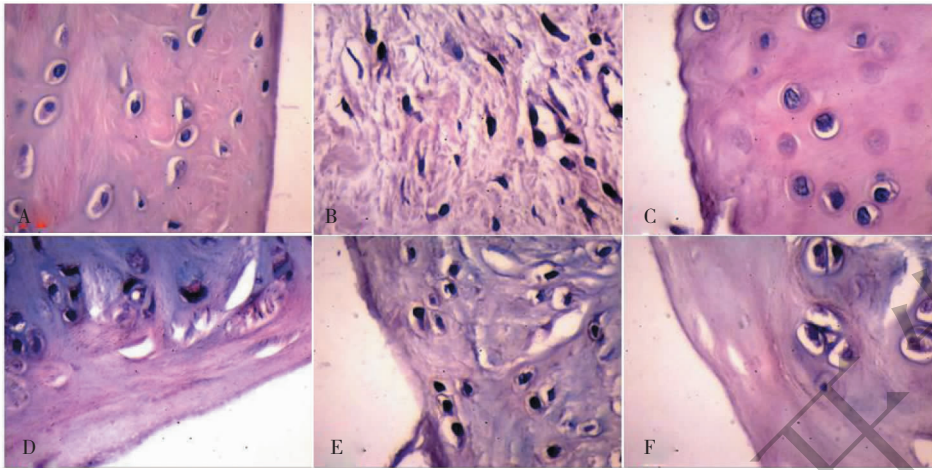


图6 正常组(A)、模型组(B)、扶他林组(C)、白花丹止痛喷雾剂高低剂量组(D)、中低剂量组(E)及低剂量组(F)胫骨平台的关节软骨观察(HE染色,400 \times)

Fig. 6 Articular cartilage observation of tibial plateau from normal control group (A), model group (B), voltaren emulgel group (C), PZAS high dosage group (D), medium dosage group (E) and low dosage group (E) (HE staining, 400 \times)

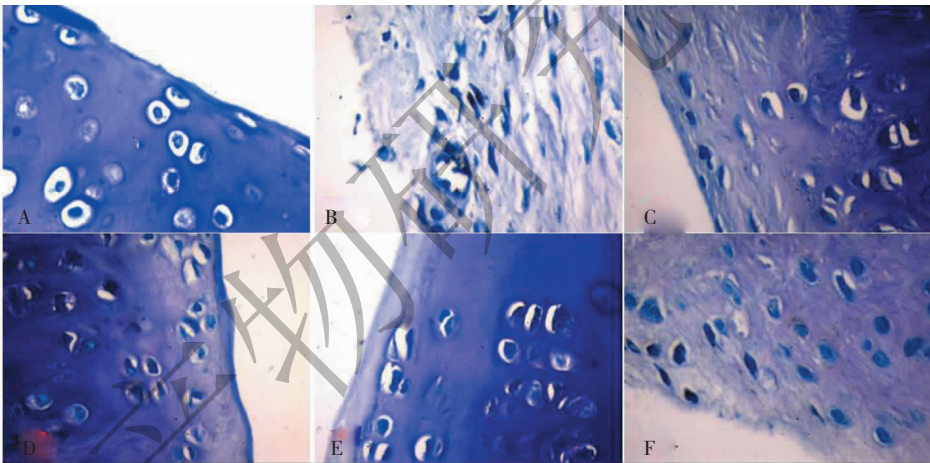


图7 正常组(A)、模型组(B)、扶他林组(C)、白花丹止痛喷雾剂高低剂量组(D)、中低剂量组(E)及低剂量组(F)胫骨平台的关节软骨观察(甲苯胺蓝染色,400 \times)

Fig. 7 Articular cartilage observation of tibial plateau from normal control group (A), model group (B), voltaren emulgel group (C), PZAS high dosage group (D), medium dosage group (E) and low dosage group (E) (toluidine blue staining, 400 \times)

组比较,高、中剂量组明显较低分,差异极显著和显著($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$),且各剂量组与模型组比较差异极显著($P < 0.01$);在软骨细胞项目评分中,与模型组比较,高、中剂量组差异极显著($P < 0.01$)且低剂量组差异显著($P < 0.05$),与扶他林组比较,高、中剂量组明显较低分,差异极显著($P < 0.01$);在甲苯胺蓝染色项目评分中高、中剂量组差异极显著($P < 0.01$),与扶他林组比较,高、中剂量组明显较低分,差异极显著和显著($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$);

在潮线的完整性项目评分中,与模型组比较,高、中剂量组差异极显著($P < 0.01$),低剂量组差异显著($P < 0.05$),与扶他林组比较,高、中剂量组明显较低分,差异显著($P < 0.05$)。

4 讨论与结论

骨性关节炎是一种发病机制复杂、多因素共同作用的一种慢性疾病。单方或复方应用白花丹可有效缓解关节肿痛^[15-17]。而白花丹素(plumbagin),具

表3 Mankin's 评分结果比较

Table 3 Comparison of Mankin's scoring results in each group

组别 group	软骨结构 cartilage structure	软骨细胞 chondrocyte	甲苯胺蓝染色 toluidine blue staining	潮线的完整性 integrity of tidal line
正常组 Normal control group	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.22 ± 0.67	0.00 ± 0.00
模型组 Model group	3.40 ± 1.35 * *	2.70 ± 0.48 * *	2.20 ± 0.42 * *	1.60 ± 0.52 * *
扶他林组 Voltaren emulgel group	2.78 ± 1.39 * *	2.44 ± 0.73 * *	1.89 ± 0.33 * *	1.11 ± 0.60 * * #
白花丹止痛喷雾剂高剂量组 High dose group of PZAS	0.60 ± 0.70 * * # # \$ \$	0.90 ± 0.57 * * # # \$ \$	1.10 ± 0.57 * * # # \$ \$	0.60 ± 0.52 * * # # \$ \$
白花丹止痛喷雾剂中剂量组 Medium dose group of PZAS	1.56 ± 1.33 * * # # \$ \$	1.33 ± 0.71 * * # # \$ \$	1.33 ± 0.50 * * # # \$ \$	0.67 ± 0.50 * * # # \$ \$
白花丹止痛喷雾剂低剂量组 Low dose group of PZAS	2.00 ± 0.71 * * # #	2.00 ± 0.87 * * #	2.00 ± 0.50 * *	1.11 ± 0.33 * * #

注:白花丹止痛喷雾剂高、中、低剂量组与正常组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$;与扶他林组比较,\$ $P < 0.05$,\$\$ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with normal control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; Compared with voltaren emulgel group, \$ $P < 0.05$, \$\$ $P < 0.01$.

有抗炎止痛作用,有效地降低促炎性细胞因子的产生,抑制促炎性介质一氧化氮合酶、环加氧酶2的表达,还可以抑制转录因子蛋白家族NF- κ B p65亚族的磷酸化^[18,19];抑制基质金属蛋白酶2(MMP-2)和MMP-9 mRNA的表达^[20]。同时白花丹素等乙醇提取物具有强大的抗氧化作用,有效清除超氧阴离子自由基、羟基自由基过氧化氢、DPPH、有机过氧基和脂过氧自由基,具有良好的损伤修复能力^[8,21]。这与骨性关节炎的分子生物学机制等研究高度契合^[22,23],而TNF- α 、IL-6为其重要炎性介质,与滑膜组织的氧自由基SOD以及MDA同为经典相关检测指标。

白花丹乙醇提取物主要成分为白花丹素等1,4-萘醌,易升华,对酸、碱、氧较为敏感,故喷雾剂型相对稳定,并可减少胃肠道刺激,便于控制给药剂量、时间,强调发挥中医外治局部用药特点。本实验结果表明白花丹止痛喷雾剂有效降低新西兰兔膝关节模型血清炎性因子TNF- α 、IL-6值,显示其较好的抗炎作用;并有效降低滑膜MDA(丙二醛)值、升高SOD(超氧化物歧化酶)值,提示其较好的抗氧化作用。

膝关节病理切片观察,结合Mankin's评分分析:白花丹止痛喷雾剂高、中剂量组在软骨结构、软骨细胞、甲苯胺蓝染色、潮线的完整性等项目评分中均优于扶他林组。同时,高、中、低剂量均能有效降低新西兰兔膝关节模型的平均关节炎指数。这也充分证实我们前期临床研究的疗效。

综上所述,白花丹止痛喷雾剂组可有效抑制兔骨关节炎的发展,改善膝关节软骨组织病理形态,并能抑制炎性因子,同时可抗氧化,进而起到治疗作用。本开发研究的实验设计难点是局部用量一致性、准确的控制及安全性评价。因此,课题组已在继续研究其急性、长期毒性及给药时间、剂量等,以进一步保证临床广泛用药的安全性及合理性。由此,本课题探究了白花丹及其新式外用方法在骨性关节炎中作用,为其临床应用提供了相应的药效基础。

参考文献

- 1 Aziz MH, Dreckschmidt NE, Verma AK. Plumbagin, a medicinal plant-derived naphthoquinone, is a novel inhibitor of the growth and invasion of hormone refractory prostate cancer. *Cancer Res*, 2008, 68: 9024-9032.
- 2 Zeng GL (曾广龙). Observation of the curative effect in treatment of knee osteoarthritis with Baihuadan Analgesic Ointment. Guangzhou, Guangzhou University of Chinese Medicine (广州中医药大学), MSc. 2016.
- 3 Tan MX (谭明雄), Wang HS (王恒山), Chen ZF (陈振锋), et al. Advances in studies on chemical constituents and pharmacological activities of *Plumbago zeylanica*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2007, 38: 289-283.
- 4 Sand JM, Hafeez BB, Jamal MS, et al. Plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1, 4-naphthoquinone), isolated from *Plumbago zeylanica*, inhibits ultraviolet radiation induced development of squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis*, 2012, 33: 184-190.

- 5 Jiao T(焦涛), Liu C(刘超), Wu XL(吴春蕾), *et al.* Studies on the chemical constituents of *Plumbago zeylanica* L. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2008, 19: 2993-2994.
- 6 Tan MX(谭明雄). Synthesis, antitumor activity and DNA interaction of metal complexes with bioactive constituent plumbagin from Chinese traditional medicine *Plumbago zeylanica*. Changsha: Central South University (中南大学), PhD. 2008.
- 7 Shi QH(史琴慧). The study of *Plumbago zeylanica* L. for the treatment of rheumatoid arthritis experimental. Guangzhou, Guangzhou University of Chinese Medicine (广州中医药大学), MSc. 2016.
- 8 Sujin JKT, Balavigneswaran CK, Prakash S, *et al.* Excision wound healing and antioxidant activity of different root extract of *Plumbago indica*. *Med Plant Res*, 2013, 3:13-19.
- 9 Xu SY(徐叔云), Bian RL(卞如濂), Chen X(陈修). Experimental methodology of pharmacology (药理实验方法学). Beijing: People's Medical Publishing House, 2005. 906-916.
- 10 Zhang Yi(章寅), Xu DR(许丁锐), Wang F(王峰), *et al.* Effects of Xiaoyu Jiegu powder on expression of IL-1 β , TNF- α , TGF- β 1 in synovial fluid of knee osteoarthritis model rabbits. *Clin J Tradit Chin Med* (中医药临床杂志), 2015, 27: 1726-1728.
- 11 Han GY(韩冠英), Ling PX(凌沛学), Wang FX(王凤山), *et al.* Comparison study on knee osteoarthritis in rabbits induced by different concentrations of papain. *China J Orthop Trauma* (中国骨伤), 2012, 25: 424-429.
- 12 Sun LN(孙鲁宁), Huang GC(黄桂成), Zhao YH(赵燕华), *et al.* Relationship of synovium interleukin-1, interleukin-6 and leukotriene level changes to injection timing in rabbits with papain-induced knee osteoarthritis, *Chin J Tis Eng Res* (中国组织工程研究), 2012, 16: 6184-6187.
- 13 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 Bone Joint Surg Am*, 1971, 53: 523-537.
- 14 Zhuang C(庄超), Liu RP(刘瑞平), Xu NW(徐南伟), *et al.* Dynamic observation of inflammation index in osteoarthritis rabbit model. *J Nanjing Med Univ* (南京医科大学学报, 自科版), 2013, 31: 369-372.
- 15 Gu TL(顾庭兰), Gu MK(顾铭康). Anti-ache and arthralgia spasm effects of *Plumbago zeylanica*. *Jiangxi Tradit Chin Med* (江西中医药), 1995, Suppl: 8888.
- 16 Lin JL(林金莲), Zhong EX(钟峨祥). Treatment of 30 cases of bone and joint diseases with compound *Plumbago zeylanica* powder. *Railway Med J* (铁道医学), 2001, 29: 344.
- 17 Zhu ZY(朱兆云), Zhao Y(赵毅), Wang JK(王京昆). Iconography of Yunnan Naturally Occurring Drugs, First Roll (云南天然药物图鉴, 第一卷). Kunming: Yunnan technology Publishing Company, 2003. 143.
- 18 Checker R, Patwardhan RS, Sharma D, *et al.* Plumbagin, a vitamin K3 analogue, abrogates lipopolysaccharide-induced oxidative stress, inflammation and endotoxic shock via NF- κ B suppression. *Inflammation*, 2014, 37: 542.
- 19 Luo P, Wong YF, Ge L, *et al.* Anti-inflammatory and analgesic effect of plumbagin through inhibition of nuclear factor- κ B activation. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 335: 735-742.
- 20 Shih YW, Lee YC, Wu PF, *et al.* Plumbagin inhibits invasion and migration of liver cancer HepG2 cells by decreasing productions of matrix metalloproteinase-2 and urokinase-plasminogen activator. *Hepatol Res*, 2009, 39: 998-1009.
- 21 Tilak JC, Adhikari S, Devasagayam TP. Antioxidant properties of *Plumbago zeylanica*, an Indian medicinal plant and its active ingredient, plumbagin. *Redox Rep*, 2004, 9: 219-227.
- 22 Yuan PW(袁普卫), Li XQ(李小群), Kang WL(康武林), *et al.* Impact of Juanbi Jiaonang on articular cartilage tissue form and expression of Toll-like receptor 4, NF- κ B p65 and tumor necrosis factor-alpha in synovium in guinea pigs with knee osteoarthritis. *J Trad Chin Orthop Trauma* (中医正骨), 2016, 9: 5-12.
- 23 Wu B(吴斌), Zhu N(朱宁), Deng MY(邓明艳), *et al.* Effects of sodium hyaluronate on the content of TNF- α , HS-CRP and MMP-3 in articular fluid of patients with osteoarthritis. *J Pract Med* (实用医学杂志), 2011, 27: 4138-4139.