和 DHBV-DNA 水平明显下降,且停药后仍维持在较低水平,提示一定剂量的积雪草苷在体内具有明显的抑制 DHBV 复制作用,且疗效与用药剂量及用药时间相关。拉米夫定(阳性对照)抑制 DHBV 起效较快,在治疗第 14 d 各项指标均降低至较低水平,但停药后又有所回升。积雪草苷组与阳性对照组比较,虽然起效较慢,但其抑制 DHBV 作用平稳而持久。提示积雪草苷组作用机制与拉米夫定可能有所不同。肝脏苏木精 - 伊红染色病理检查发现,积雪草苷组与阳性对照组鸭肝脏炎症有不同程度减轻,病理改变有一定程度改善。在抗肝损伤方面,肝功能 ALT 与 AST 检测显示,积雪草苷高、中剂量组具有改善鸭肝功能的趋势,高剂量组作用明显,提示皂苷还具有保护鸭肝细胞、抗肝损伤的作用。

综上所述,积雪草苷具有抑制 DHBV 复制、减轻病毒性肝损伤等作用,为临床上用于治疗乙型肝炎提供了理论基础,但积雪草苷抗 HBV 作用机制尚待进一步研究。

参考文献

[1] 张定凤. 乙型肝炎抗病毒治疗的前瞻[J]. 中华肝脏病杂志, 2006,14(7):483 - 489.

[2] 宋德平. 区别金钱草正品与同名异物的临床应用[J]. 中国民间疗法,2004,12(8):38 - 39.

[3] 熊墨龙,涂鸣汉,胡鹏,等. 天胡荽愈肝片治疗乙型黄疸型肝炎的临床观察[J]. 中国医药导刊,2009,11(9):1512 - 1512.

[4] Li H,Tian D,Wu H,et al. The effect of Gankang Suppository on duck hepatitis B virus,serum biochemistry and liver histology in ducklings[J]. Journal of Huazhong University of Science and Technology[Medical Sciences], 2008,28:421 - 425.

[5] 黄仁彬,黄权芳,张士军,等. 六月青总皂苷抗鸭乙型肝炎病毒作用研究[J]. 中药药理与临床, 2010,26(1):37 - 39.

[6] Wang S,Li J,Huang H,et al. Anti-hepatitis B virus activities of astragaloside IV isolated from radix *Astragali*[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2009,32(1):132 - 135.

[7] Zhang L,Li H,Gong X,et al. Protective effects of asiaticoside on acute liver injury induced by lipopolysaccharide/D-galactosamine in mice[J]. Phytomedicin, 2010,17(10):811 - 819.

[8] Bishop N,Civitico G,Wang YY,et al. ,Antiviral strategies in chronic hepatitis B virus infection:I. establishment of an *in vitro* system using the duck hepatitis B virus model[J]. Journal of Medical Virology,1990, 31(2):82 - 89.

[9] 徐庆,宋云娟,李丽亚,等. 荔枝核总黄酮的抗鸭乙型肝炎病毒作用[J]. 世界华人消化杂志, 2005,13(17):2082 - 2085.

[10] 丁华,林兴,黄权芳,等. 六月青皂苷抗鸭乙型肝炎病毒及保护肝细胞的研究[J]. 中国新药杂志, 2011,20(2):167 - 169.

[11] 林兴,黄权芳,张士军,等. 山芝麻抗鸭体内乙肝病毒及保肝作用的实验研究[J]. 华西药学杂志, 2012,27(2):134 - 137.

[12] 张士军,陈兆霓,李勇文,等. 六月青乙醇提取物对鸭乙型肝炎病毒抑制作用[J]. 中国公共卫生, 2009,25(5):543 - 543.

收稿日期:2013-11-07　（郑新编校）

· 实验研究 ·

Ⅱ型胶原对 T-2 毒素诱导关节软骨损伤拮抗作用

萨如拉[1],王丽华[2]

摘　要:目的　观察Ⅱ型胶原干预 T-2 毒素诱导大鼠关节软骨早期损伤的作用,为探讨关节软骨损伤的防治措施提供理论依据。**方法**　Wistar 大鼠 40 只,随机分为 4 组,每组 10 只,对照组(常规成品颗粒料),T-2 毒素组(含 100 ng/kg T-2 毒素饲料),Ⅱ 型胶原 0.5、5.0 组(0.5、5.0 g/L)连续处理 5 个月,光镜下观察大鼠透明软骨组织病理学改变,用酶联免疫吸附试验检测大鼠血清 Ⅱ 型胶原羧基端端肽(CTX-Ⅱ)、软骨寡聚基质蛋白(COMP)及尿中吡啶啉(DPD)含量。**结果**　光镜下 T-2 毒素组大鼠关节软骨细胞排列紊乱,软骨细胞变形、变性,可见大面积软骨细胞坏死,而低、高剂量 Ⅱ 型胶原组表现为软骨表面原纤维形成,表层软骨细胞肿胀变圆,扁平的软骨细胞减少,软骨细胞簇集等骨关节炎早期病理改变。对照组,T-2 毒素组,高、低剂量 Ⅱ 型胶原组大鼠血清 CTX-Ⅱ、COMP 含量分别为(25.07 ± 9.17)、(39.17 ± 10.49)、(28.20 ± 9.74)、(29.73 ± 9.32) μg/L 与(6.38 ± 2.23)、(24.53 ± 4.26)、(20.32 ± 4.74)、(19.44 ± 4.92) μg/L,大鼠尿液 DPD 含量分别为(4.14 ± 1.06)、(4.33 ± 3.43)、(5.72 ± 3.89)、(4.23 ± 2.90) μg/L。与对照组比较,模型组大鼠血清 CTX-Ⅱ、COMP 含量明显升高(均 $P < 0.05$),大鼠尿液 DPD 含量无明显改变;与模型组比较,Ⅱ 型胶原组大鼠血清 CTX-Ⅱ、COMP 明显降低(均 $P < 0.05$),大鼠尿液 DPD 含量无明显变化。**结论**　Ⅱ 型胶原能拮抗 T-2 毒素所致软骨损伤作用,延缓关节软骨的破坏进程,其机制可能与降低大鼠血清中 CTX-Ⅱ 及 COMP 含量有关。

关键词:软骨;关节;Ⅱ型胶原;T-2 毒素

中图分类号:R 114　**文献标志码**:A　**文章编号**:1001-0580(2015)05-0603-03　DOI:10.11847/zgggws2015-31-05-18

Protective effect of collagen-Ⅱ on articular cartilage damage induced by

作者单位:1. 内蒙古医科大学卫生管理学院社会医学教研室,内蒙古 呼和浩特 150081;2. 哈尔滨医科大学

作者简介:萨如拉(1984 -),女,内蒙古锡盟人,助教,硕士,研究方向:流行病及人群公共卫生。

通讯作者:王丽华,E-mail:lhwanganna@126.com

数字出版日期:2015 - 3 - 24 15:11

数字出版网址:http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20150324.1511.004.html

T-2 toxin in rats

Sarula*, WANG Li-hua(*Department of Social Medicine, School of Health Management, Inner Mongolia Medical University, Huhehot, Inner Mongolia Autonomous Region 150081, China)

Abstract: Objective To observe protective effect of collagen-Ⅱ on articular cartilage damage induced by T-2 toxin in rats, and to provide a theoretical basis for the control of articular cartilage damage. **Methods** Forty Wistar rats were randomly divided into four groups (10 rats in each group): blank group (fed with standard rat chow), T-2-toxin exposed group (with T-2-toxin of 100 ng/kg), collagen-II exposed group (with collagen-II of 0.5 and 5.0 g/L). After the treatment of 5 months, the articular cartilage was observed with light microscope and the content of serum C-telopeptide of type Ⅱ collagen (CTX-Ⅱ) and cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and urinary deoxypyridinoline (DPD) were determined with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits. **Results** Disarrangement, degeneration, and necrosis of articular chondrocytes were observed in the rats of T-2-toxin exposed group; early pathological changes of osteoarthritis (fibril formation, swelling of chondrocytes on the cartilage surface, and cluster of chondrocytes) were observed in the rats of the two collagen-II exposed groups. The levels of serum CTX-Ⅱ, COMP, and urinary DPD were 25.07 ± 9.17, 6.38 ± 2.23, and 4.14 ± 1.06 μg/L for the blank group, 39.17 ± 10.49, 24.52 ± 4.26, and 4.33 ± 3.43 μg/L for T-2-toxin group, 29.73 ± 9.32, 19.44 ± 4.92, and 4.23 ± 2.90 μg/L for 0.5 g/L collagen-II group, and 33.20 ± 9.74, 20.32 ± 4.74, and 5.72 ± 3.89 μg/L for 5.0 g/L collagen-II group, repectively. Compared with the blank group, the levels of serum CTX-Ⅱ and COMP in the T-2-toxin exposed group increased markedly, with a signigicant difference ($P < 0.05$), and the levels of urinary DPD did not increase significantly. Compared with the model group, the levels of serum CTX-Ⅱ and COMP in the two collagen-II exposed groups decreased markedly, with a signigicant difference ($P < 0.05$), and the level of urinary DPD did not increase significantly. **Conclusion** Collagen-Ⅱ could effectively delay the process of articular cartilage damage induced by T-2 toxin in rats and the mechanism may be related to the reduced CTX-Ⅱ and COMP in serum.

Key words: cartilage; joint; collagen type Ⅱ; T-2 toxin

骨关节炎是一种常见于中老年人的慢性、进展性关节疾病，其最典型的病理特征是关节软骨破坏[1]。T-2 毒素是自然界中毒性最强的真菌毒素之一，对分裂增殖旺盛的细胞具有较强的攻击能力。国内有学者认为，T-2 毒素是地方性骨关节疾病－大骨节病的病因物质[2]，对关节软骨具有较强的损害作用。本研究以 T-2 毒素建立大鼠关节软骨损伤模型，同时给实验动物饲喂Ⅱ型胶原，通过观察关节软骨的组织病理学改变并检测大鼠血清中Ⅱ型胶原羧基端端肽（C-telopeptide of type Ⅱ collagen，CTX-Ⅱ）[3]、软骨寡聚基质蛋白（cartilage oligomeric matrix protein，COMP）[4]及尿中吡啶啉（deoxypyridinoline，DPD）含量变化，探讨Ⅱ型胶原对 T-2 毒素所致关节软骨损伤中的干预作用，为关节软骨损伤疾病的防治提供依据。

1　材料与方法

1.1　*主要试剂与仪器*　Ⅱ型胶原（上海崴达进出口公司，骨胶原含量为 68%）；T-2 毒素（美国 Sigma 公司）；CTX-Ⅱ、COMP、DPD 检测试剂盒（美国 R&D 公司）。NikonYs2-H 型生物显微镜（日本尼康公司）；BIO-RAD680 酶标仪（美国 Bio-Rad 公司）；HZQ-X100 恒温震荡培养箱（哈尔滨东联公司）；显微镜（日本 Olympus 公司）。

1.2　*实验动物*　雄性 Wistar 大鼠（清洁级）40 只，体质量 70～90 g，购于北京维达动物技术中心，许可证号：SCXK（京）2006－0009，分笼饲养。

1.3　*分组与处理*　大鼠按体重随机分为 4 组：对照组，模型组，高、低剂量Ⅱ型胶原组，每组 10 只，对照组大鼠喂常规成品颗粒饲料，其余 3 组饲料中添加 T-2 毒素（100 ng/kg）；模型组与对照组大鼠饮用自来水，低、高剂量Ⅱ型胶原组大鼠饮用含Ⅱ型胶原的自来水（0.5、5.0 g/L），实验期间均自由摄食水。连续 5 个月。大鼠处死前，先用代谢笼采集 24 h 尿液，然后经股动脉采血处死，3 000 r/min 离心 15 min，收集血清，－80 ℃ 保存；取大鼠左、右侧膝关节，分别用 10% 甲醛和 2.5% 戊二醛固定 24 h，常规进行光镜标本制备。

1.4　*指标与方法*　光镜观察：大鼠关节软骨组织用 10% 甲醛固定，经石蜡切片常规光镜标本苏木素－伊红染色（hematoxylin-eosin staining，HE）后，光镜下观察软骨组织；大鼠血清中 CTX-Ⅱ、COMP 和尿中 DPD 含量检测：血清、尿液经 1 000 g 离心 15 min，分装冻存，采用酶联免疫吸附试验检测，分别取 100 μL 血清/尿液，严格按照试剂盒说明书进行血清 CTX-II、COMP 和尿中 DPD 含量检测。

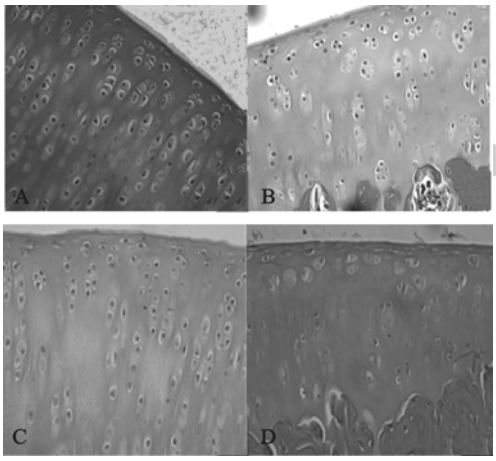
1.5　*统计分析*　数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS 13.0 软件进行统计分析，组间比较采用单因素方差分析，进一步多重比较采用最小显著差法，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　*Ⅱ型胶原对 T-2 毒素染毒大鼠一般状况影响*　大鼠在实验期间无死亡，各组大鼠饮水、进食、活动

情况未见明显差异;对照组大鼠毛色光泽度较好,模型组大鼠在染毒 3 个月后,毛色光泽度较差。各组大鼠体重在整个实验期间均持续增长,组间大鼠体重差异无统计学意义。

2.2　Ⅱ型胶原对 T-2 毒素染毒大鼠关节软骨病理结构影响(图 1)　对照组大鼠关节软骨细胞群排列整齐,层次清晰,结构完好;模型组大鼠软骨细胞排列紊乱,软骨细胞变形、变性、坏死,细胞核固缩,坏死部位细胞明显减少;高剂量Ⅱ型胶原组大鼠软骨细胞变性、增生,低剂量Ⅱ型胶原组大鼠软骨表层扁平软骨细胞减少,细胞肿胀变圆,并可见细胞簇集,软骨基质出现纤维化,细胞减少。



注:A:对照组;B、C:高、低剂量Ⅱ型胶原组;D:模型组。

图 1　Ⅱ型胶原对 T-2 毒素染毒大鼠关节软骨病理结构影响(HE, ×20)

2.3　Ⅱ型胶原对 T-2 毒素染毒大鼠生化指标影响(表 1)　与对照组比较,模型组大鼠血清 CTX-Ⅱ 含量明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,高、低剂量Ⅱ型胶原组大鼠血清 CTX-Ⅱ 含量明显降低(均 $P < 0.05$)。与对照组比较,模型组大鼠血清 COMP 含量明显增加($P < 0.05$);与模型组比较,高、低剂量Ⅱ型胶原组大鼠血清 COMP 明显降低(均 $P < 0.05$)。各组间大鼠尿液 DPD 含量比较,差异均无统计学意义。

表 1　Ⅱ型胶原对 T-2 毒素染毒大鼠生化指标影响($\bar{x} \pm s$, μg/L, $n = 10$)

组别(g/L)	CTX-Ⅱ	COMP	DPD
对照组	25.07 ± 9.17	6.38 ± 2.23	4.14 ± 1.06
模型组	39.17 ± 10.49[a]	24.52 ± 4.26[a]	4.33 ± 3.43
Ⅱ型胶原 5.0	33.20 ± 9.74[ab]	20.32 ± 4.74[ab]	5.72 ± 3.89
0.5	29.73 ± 9.32[ab]	19.44 ± 4.92[ab]	4.23 ± 2.90

注:与对照组比较,a $P < 0.05$;与模型组比较,b $P < 0.05$。

3　讨　论

T-2 毒素最易攻击分裂增殖旺盛的软骨细胞,导致软骨细胞结构和功能改变、细胞变性和坏死,具有极强的软骨细胞毒性,对软骨细胞可造成确切损伤[5]。研究表明,T-2 毒素是地方性骨关节疾病—大骨节病的病因物质[2],对关节软骨具有较强的损害作用。骨关节炎是以关节软骨进行性退变为基本病变的一种慢性疾病,其重要病理基础是关节软骨的缺失[6]。关节软骨由细胞外基质(extracellular matrixc, ECM)和少数软骨细胞组成。正常情况下,ECM 保持良好的降解和修复动态平衡,以维持软骨的正常结构和功能,当某种(些)因素刺激时,这种平衡被打破,ECM 降解加速,最终导致骨关节炎的发生。

CTX-Ⅱ是一种Ⅱ型胶原降解产物,是目前惟一可同时在血液、尿液及关节滑液中检测到的软骨代谢标记物[7],具有良好的稳定性和可靠性,是综合反映关节软骨损伤累计程度的生物标志物,其含量在软骨早期损伤诊断方面有重要意义,可以预测软骨损伤的危险因素。COMP 是近年来新发现的一种细胞外基质蛋白,软骨损伤时会释放到血清中,可作为软骨破坏的生物标志物[8]。本研究结果显示,高、低剂量Ⅱ型胶原组大鼠血清 CTX-Ⅱ、COMP 含量高于对照组,但低于模型组。提示Ⅱ型胶原可下调由 T-2 毒素造成的血清 CTX-Ⅱ、COMP 水平升高,改善软骨 ECM 代谢,减轻软骨损害,对关节软骨损伤具有一定的防治作用。

参考文献

[1] 沙湖,杨莉. 骨关节炎病理变化研究进展[J]. 实用医院临床杂志,2011,8(2):31 – 33.
[2] 李金平,侯海峰,丁国永,等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇对幼鼠关节软骨代谢影响[J]. 中国公共卫生,2013,29(3):347 – 348.
[3] 王丽华,石玉霞. Ⅱ型胶原羧基端端肽和脱氧吡啶啉在实验性大鼠关节软骨损伤中的生物标志物作用[J]. 当代医学,2009,16(6):1 – 3.
[4] 毋斌强,卫小春,王国金. COMP 在骨关节炎早期诊断中的作用[J]. 实用骨科杂志,2007,12(12):731 – 733.
[5] 王丽华,王文革,杨建伯. T – 2 毒素致雏鸡关节软骨损伤的组织化学观察[J]. 中国地方病学杂志,2006,25(3):271 – 274.
[6] 王华伟,杨柳,王富友. 膝关节性骨关节炎钙化层病理改变研究[J]. 中国矫形外科杂志,2009,17(12):925 – 927.
[7] Cahue S, Sharma L, Dunlop D, et al. The ratio of type Ⅱ collagen breakdown to synthesis and its relationship with the progression of knee osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2007, 15(7):819 – 823.
[8] Nakoshi Y, Hasegawa M, Sudo A, et al. Regulation of tenascin-C expression by tumor necrosis factor-alpha in cultured human osteoarthritis chondrocytes[J]. J Rheumatol, 2008, 35(1):147 – 152.

收稿日期: 2014-03-28　（解学魁编辑　郑新校对）