



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104922199 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 23

(21) 申请号 201510412697. 8

A61P 19/02(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 07. 14

A61K 31/7008(2006. 01)

A61K 31/737(2006. 01)

(71) 申请人 无限极(中国)有限公司

地址 529156 广东省江门市新会区会城镇七堡工贸城北区三号

(72) 发明人 施斌 郭晓蕾 马忠华 张薇
罗珍

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 赵青朵

(51) Int. Cl.

A61K 36/481(2006. 01)

A61K 38/39(2006. 01)

A23L 1/29(2006. 01)

A61P 19/08(2006. 01)

A61P 19/10(2006. 01)

权利要求书2页 说明书10页

(54) 发明名称

一种保护骨关节组合物及其应用

(57) 摘要

本发明涉及药物领域,特别涉及一种保护骨关节的组合物及其应用。该组合物以杜仲、牛膝、黄芪、川芎四种中草药配合共用,通过多种途径、多层次达到增强骨密度、预防和/或改善骨质疏松;抑制破骨细胞的活性、促进骨细胞的功能、增加钙化骨的形成;促进软骨修复、延缓关节衰退、修复关节损伤的功效。在此基础上,增加盐酸氨基葡萄糖、硫酸软骨素和/或胶原蛋白,能够显著增强骨密度、预防和/或治疗骨质疏松;显著抑制破骨细胞的活性、促进骨细胞的功能、增加钙化骨的形成,促进软骨修复,延缓关节衰退、修复关节损伤的功效。

1. 一种保护骨关节组合物,其特征在於,包括杜仲、黄芪、牛膝和川芎。
2. 根据权利要求 1 所述的组合物,其特征在於,以质量份计,包括如下组分:

杜仲	2~40 份
黄芪	1~30 份
牛膝	5~40 份
川芎	1~30 份。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的组合物,其特征在於,还包括盐酸氨基葡萄糖。
4. 根据权利要求 1 至 3 任一项所述的组合物,其特征在於,以质量份计,包括如下组分:

杜仲	2~40 份
黄芪	1~30 份
牛膝	5~40 份
川芎	1~30 份
盐酸氨基葡萄糖	1~20 份。

5. 根据权利要求 1 至 4 任一项所述的组合物,其特征在於,还包括硫酸软骨素。
6. 根据权利要求 1 至 5 任一项所述的组合物,其特征在於,以质量份计,包括如下组分:

杜仲	2~40 份
黄芪	1~30 份
牛膝	5~40 份
川芎	1~30 份
盐酸氨基葡萄糖	1~20 份
硫酸软骨素	1~20 份。

7. 根据权利要求 1 至 6 任一项所述的组合物,其特征在於,还包括胶原蛋白。
8. 根据权利要求 1 至 7 任一项所述的组合物,其特征在於,以质量份计,包括如下组分:

杜仲	2~40份
黄芪	1~30份
牛膝	5~40份
川芎	1~30份
盐酸氨基葡萄糖	1~20份
硫酸软骨素	1~20份
胶原蛋白	1~10份。

9. 根据权利要求 1 至 8 任一项所述的组合物在制备增加骨密度、预防和 / 或治疗骨质疏松的药物、食品和 / 或保健品中的应用。

10. 根据权利要求 1 至 8 任一项所述的组合物在制备延缓关节衰退、修复关节损伤、增加骨关节灵活度的药物、食品和 / 或保健品中的应用。

一种保护骨关节组合物及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及药物领域,特别涉及一种保护骨关节组合物及其应用。

背景技术

[0002] 我国正步入世界老龄化国家的行列,骨质疏松与骨关节炎的发生率持续上升。目前我国初步调查骨关节炎发生率为3%,即有3600万病人,与美国发生率相似。而骨质疏松症患者9000万,占总人口的7.1%,预计到2050年将增加到2.2亿,那时全世界一半以上的骨质疏松性骨折将发生在亚洲,绝大部分在我国。为了保护骨关节,延缓骨质疏松、关节老化进程,降低骨折、骨关节炎发生的风险,应当进行早期预防。

[0003] 中医学中无“骨质疏松”、“骨关节炎”这一病名,但根据其病因病机和临床表现,它与中医文献中记载的“骨枯”、“骨痿”、“骨痹”和“骨蚀”等极为相似。中医理论认为骨的盛衰与肾、肝、脾有密切的联系。肾藏精,精生髓,髓生骨,故骨者肾之所合也;髓者,精之所生也,精足则髓足,髓在骨内,髓足者则骨强。肝藏血,肝血足则筋脉强健,束骨而利关节。而脾为后天之本,为人体气血生化之源,脾胃又为气机升降之枢纽,交通上下,灌溉四旁,从而维持气、血、精、液的相互转化。

[0004] 若肾亏虚,则卫阳空疏,屏障失固;又若肝肾亏虚,无以主骨养筋,筋骨失荣痿弱,关节屈伸不利,筋脉痹阻,发为骨痹。正气存内邪不可干,邪之所凑,其气必虚,所以肝肾亏虚,寒湿趁虚入侵,寒凝经脉则气滞血瘀,则进一步导致肝肾亏损。而寒湿入内困脾或脾失健运,痰湿内生,后天之精生化无源,枢机滞塞,血不能化精,则骨骼因精微不能灌溉,血虚不能营养、气虚不能充达,无以生髓养骨而致骨痿。因此,从中医理论上说,可以采用调补肝肾、行气活血健脾自拟组方来预防、改善骨质疏松和骨关节炎。

[0005] 西医理论则认为,随着年龄的增长,关节软骨细胞功能、化学组分、对细胞因子和生长因子的反应都发生了改变,关节逐渐老化。与预防关节损伤的神经、机械保护机制也逐渐削弱,如肌肉和外周神经功能减退,导致神经和肌肉运动不协调,肌肉力量降低,导致更加容易发生关节损伤,从而加重关节的退行性老化,甚至出现骨关节炎。而骨质疏松的主要病理改变是骨矿含量和骨矿密度下降,骨的微结构紊乱和破坏。尽管骨关节炎与骨质疏松的主要病理改变存在差异性,但骨关节炎与骨质疏松均为退行性疾病,且发病率均与增龄成正相关,临床上这两种疾病常常并存出现。

[0006] 因此,提供一种保护骨、关节的组合物具有重要的现实意义。

发明内容

[0007] 有鉴于此,本发明提供一种组合物及其应用。该组合物以杜仲、牛膝、黄芪、川芎四种中草药配合共用,通过多种途径、多层次达到增强骨密度、预防和/或治疗骨质疏松;促进软骨修复、抑制破骨细胞的活性、促进骨细胞的功能、增加钙化骨的形成延缓关节衰退、修复关节损伤的功效。

[0008] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0009] 本发明提供了一种组合物,包括杜仲、黄芪、牛膝和川芎。

[0010] 在本发明的一些具体实施方案中,组合物以质量份计,包括如下组分:

[0011]

杜仲	2 ~ 40 份
黄芪	1 ~ 30 份
牛膝	5 ~ 40 份
川芎	1 ~ 30 份。

[0012] 杜仲甘温入肝肾,为治腰痛之要药,有补益肝肾,强壮筋骨之效;经酒制后的牛膝,其补肝肾,益精填髓,强筋骨功效更强。二者合用以温补肾阳为本、兼有平补肝肾,以达壮筋强骨之效,共为君药。臣药川芎辛温香窜,能上行巅顶,下达血海,旁通四肢,外至皮毛,散风止痛,为活血行气之良药;佐以甘温、归肺脾肝肾经的“补气圣药”黄芪,补中益气健脾,使脾胃所化生的水谷精气以滋养肾之元气,充分发挥肾主骨的作用;兼可化气助阳,使气旺血行。诸药合用,补肝肾,壮筋骨,益气健脾,活血化瘀,以达标本兼治之功。

[0013] 在本发明的另一些具体实施方案中,组合物还包括盐酸氨基葡萄糖。

[0014] 盐酸氨基葡萄糖是关节间润滑结缔组织的主要成分,是修复关节软骨、提高关节滑液的粘性和改善关节软骨的代谢的必需物质。还具有舒缓关节炎引起的疼痛,具有明显的消炎镇痛的作用。

[0015] 在本发明的一些具体实施方案中,组合物以质量份计,包括如下组分:

[0016]

杜仲	2 ~ 40 份
黄芪	1 ~ 30 份
牛膝	5 ~ 40 份
川芎	1 ~ 30 份
盐酸氨基葡萄糖	1 ~ 20 份。

[0017] 在本发明的另一些具体实施方案中,组合物还包括硫酸软骨素。

[0018] 硫酸软骨素是关节间润滑结缔组织的主要成分,直接补充软骨基质,缓解软骨降解。也可促进软骨细胞代谢活性,促进 II 型胶原的合成,恢复软骨细胞基质分泌功能;抑制关节内水解酶的活性,保护软骨。

[0019] 在本发明的一些具体实施方案中,组合物以质量份计,包括如下组分:

[0020]

杜仲	2 ~ 40 份
黄芪	1 ~ 30 份
牛膝	5 ~ 40 份
川芎	1 ~ 30 份
盐酸氨基葡萄糖	1 ~ 20 份
硫酸软骨素	1 ~ 20 份。

[0021] 在本发明的另一些具体实施方案中,组合物还包括胶原蛋白。

[0022] 胶原蛋白则常见于骨、皮肤、腱和角膜中和软骨、椎间盘和玻璃体中。所以,胶原蛋白可作为上述组织的细胞外基质的直接补充。另外,还有研究表明,口服 II 型胶原蛋白能消除关节疼痛。

[0023] 在本发明的一些具体实施方案中,组合物以质量份计,包括如下组分:

[0024]

杜仲	2 ~ 40 份
黄芪	1 ~ 30 份
牛膝	5 ~ 40 份
川芎	1 ~ 30 份
盐酸氨基葡萄糖	1 ~ 20 份

[0025]

硫酸软骨素	1 ~ 20 份
胶原蛋白	1 ~ 10 份。

[0026] 本发明还提供了所述组合物在制备增加骨密度、预防和 / 或治疗骨质疏松的药物、食品和 / 或保健品中的应用。

[0027] 本发明还提供了所述组合物在制备延缓关节衰退、修复关节损伤、增加骨关节灵活度的药物、食品和 / 或保健品中的应用。

[0028] 本发明的组合物以杜仲、牛膝、黄芪、川芎四种中草药配合共用,通过多种途径、多层次达到增强骨密度、预防和 / 或治疗骨质疏松;促进软骨修复、抑制破骨细胞的活性、促进骨细胞的功能、增加钙化骨的形成延缓关节衰退、修复关节损伤的功效。

[0029] 在此基础上,增加盐酸氨基葡萄糖、硫酸软骨和 / 或胶原蛋白,能够显著增强骨密度、预防和 / 或治疗骨质疏松;显著促进软骨修复、抑制破骨细胞的活性、促进骨细胞的功能、增加钙化骨的形成、延缓关节衰退、修复关节损伤的功效。

具体实施方式

[0030] 本发明公开了一种组合物及其应用,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了

描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0031] 本发明提供的具有保护骨、关节的组合物,通过常规工艺,可以制成药剂学上所说的多种剂型,如胶囊剂、片剂、粉剂或颗粒剂等,本发明在此不做限定。

[0032] 本发明提供的组合物及其应用中所用原料及试剂均可由市场购得。

[0033] 下面结合实施例,进一步阐述本发明:

[0034] 实施例 1

[0035] 准确称取杜仲 40g、牛膝 40g、黄芪 30g、川芎 30g、盐酸氨基葡萄糖 1g、硫酸软骨素 1g、胶原蛋白 1g,混合即得。

[0036] 实施例 2

[0037] 准确称取杜仲 30g、牛膝 30g、黄芪 25g、川芎 10g、盐酸氨基葡萄糖 2g、硫酸软骨素 2g、胶原蛋白 2g,混合即得。

[0038] 实施例 3

[0039] 准确称取杜仲 20g、牛膝 24g、黄芪 15g、川芎 7g、盐酸氨基葡萄糖 2g、硫酸软骨素 3g、胶原蛋白 4g,混合即得。

[0040] 实施例 4

[0041] 准确称取杜仲 21g、牛膝 40g、黄芪 20g、川芎 10g、盐酸氨基葡萄糖 14g、硫酸软骨素 10g、胶原蛋白 20g,混合即得。

[0042] 实施例 5

[0043] 准确称取杜仲 21g、牛膝 30g、黄芪 40g、川芎 15g、盐酸氨基葡萄糖 20g、硫酸软骨素 50g、胶原蛋白 10g,混合即得。

[0044] 实施例 6

[0045] 准确称取杜仲 2g、黄芪 30g、牛膝 5g、川芎 30g、盐酸氨基葡萄糖 1g、硫酸软骨素 10g、胶原蛋白 10g,混合即得。

[0046] 实施例 7

[0047] 准确称取杜仲 40g、黄芪 1g、牛膝 22g、川芎 16g、盐酸氨基葡萄糖 20g、硫酸软骨素 20g、胶原蛋白 1g,混合即得。

[0048] 实施例 8

[0049] 准确称取杜仲 20g、黄芪 16g、牛膝 40g、川芎 1g、盐酸氨基葡萄糖 11g、硫酸软骨素 1g、胶原蛋白 5g,混合即得。

[0050] 实施例 9

[0051] 准确称取杜仲 2g、黄芪 30g、牛膝 5g、川芎 30g,混合即得。

[0052] 实施例 10

[0053] 准确称取杜仲 40g、黄芪 1g、牛膝 22g、川芎 16g,混合即得。

[0054] 实施例 11

[0055] 准确称取杜仲 20g、黄芪 16g、牛膝 40g、川芎 1g,混合即得。

[0056] 实施例 12

[0057] 准确称取杜仲 2g、黄芪 30g、牛膝 5g、川芎 30g、盐酸氨基葡萄糖 1g,混合即得。

[0058] 实施例 13

- [0059] 准确称取杜仲 40g、黄芪 1g、牛膝 22g、川芎 16g、盐酸氨基葡萄糖 20g,混合即得。
- [0060] 实施例 14
- [0061] 准确称取杜仲 20g、黄芪 16g、牛膝 40g、川芎 1g、盐酸氨基葡萄糖 11g,混合即得。
- [0062] 实施例 15
- [0063] 准确称取杜仲 2g、黄芪 30g、牛膝 5g、川芎 30g、盐酸氨基葡萄糖 1g、硫酸软骨素 10g,混合即得。
- [0064] 实施例 16
- [0065] 准确称取杜仲 40g、黄芪 1g、牛膝 22g、川芎 16g、盐酸氨基葡萄糖 20g、硫酸软骨素 20g,混合即得。
- [0066] 实施例 17
- [0067] 准确称取杜仲 20g、黄芪 16g、牛膝 40g、川芎 1g、盐酸氨基葡萄糖 11g、硫酸软骨素 1g,混合即得。
- [0068] 实施例 18 对比实施例
- [0069] 对比例 1 :黄芪 30g、川芎 40g、盐酸氨基葡萄糖 1g、硫酸软骨素 1g,胶原蛋白 1g,混合即得。
- [0070] 对比例 2 :淫羊藿 3g,枸杞 3g,黄芪 30g,川芎 30g,盐酸氨基葡萄糖 1g,硫酸软骨素 1g,胶原蛋白 1g,混合即得。
- [0071] 保护骨关节的试验
- [0072] 实验一增强骨密度、预防骨质疏松的动物功效实验
- [0073] 1 实验样品
- [0074] 1.1 实验组 :本发明组合物 :实施例 9 提供的组合物,批号 :0816 ;成人推荐用量 :2.88g/d。
- [0075] 样品低剂量组 :大鼠每天的灌胃量相当于成人推荐用量 (折算为每公斤体重的剂量) 的 10 倍,即 0.048g/100g。
- [0076] 样品高剂量 :大鼠每天的灌胃量相当于成人推荐用量 (折算为每公斤体重的剂量) 的 30 倍,即 0.144g/100g。
- [0077] 1.2 对照组 :对比实施例样品 :对比实施例 1、对比实施例 2 组合物,成人推荐用量以及大鼠灌胃量同实验组。
- [0078] 阳性对照品及剂量 :戊酸雌二醇片,生产厂家 :拜耳医药保健有限公司广州分公司,批号 :J20130009,规格 :0.1g/片,大鼠每天的灌胃量为 0.1mg/100g。
- [0079] 2 试剂与仪器
- [0080] 主要仪器 :电子天平 :PUT,深圳市安普特电子科技有限公司 ;电子天平 :mettler Toledo,型号 :p1303 ;A4 原子吸收光谱仪 (美国 Thermo 公司) ;通用公司 GE Lunar Prodigy DXA 骨密度仪 ;DHG-9053 电热恒温鼓风干燥箱,上海三法科学仪器有限公司 ;DZF-6020 真空干燥箱,上海齐欣科学仪器有限公司 ;固定笼 ;手术器械 ;注射器等。
- [0081] 主要试剂 :硝酸 (优级纯,广州化学试剂厂) ;乙二胺四醋酸二钠 (广州化学试剂厂) ;钙标准液 (介质 5% HCl,浓度 1000ug/ml) 购自国家钢铁材料测试中心研究总院。
- [0082] 3 实验动物
- [0083] SPF 级 SD 大鼠,雌性,购入时周龄 :6 周龄左右,体重为 220 ~ 250g。

[0084] 4 实验结果统计学处理

[0085] 采用方差分析,先进行方差齐性检验,计算F值, $F \text{ 值} < F_{0.05}$,表明各组均数间差异无显著性; $F \text{ 值} \geq F_{0.05}$, $P \leq 0.05$,用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计;对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换,待满足正态或方差齐要求后,用转换后的数据进行统计;若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的,改用秩和检验进行统计。

[0086] 5 实验方法和结果

[0087] 5.1 实验方法

[0088] 参考《保健食品检验与评价技术规范(2003版)》的方法进行,取SD大鼠,体重220-250g,在实验环境下(屏障系统)正常喂养检疫观察3天。大鼠经腹腔注射350mg/kgBW的水合氯醛溶液麻醉,腹位固定后于腹中线距阴道口3-4cm处去毛,分别用碘酒和酒精消毒,待稍干后切开皮肤和腹肌约2-3cm,切口视野可见白色脂肪,拨开脂肪层找到子宫后,轻轻将一侧子宫角拉出,在其末端可见被脂肪团包裹的卵巢。分离脂肪团,便可见到粉红色或黄红色的卵巢,以止血钳夹住卵巢,然后将卵巢下输卵管(包括脂肪)用丝线结扎,剪除卵巢(检查是否完全剪除),顺势将子宫角送回腹腔中,同法剪除另一侧卵巢。腹肌和皮肤分层缝合后,再次消毒。最后经后肢肌肉注射2万U青霉素。也可经背部肋脊角切口行卵巢切除术。为保证手术成功,大鼠摘除卵巢后5天,进行阴道涂片检查(用滴管吸取少量生理盐水,轻轻插入阴道1-2cm,冲洗数次后吸出,涂于玻片上,镜下观察),每天一次,连续5天,以检查大鼠卵巢是否完全摘除;如涂片呈动情反应(镜下见大量半透明、扁平的表皮细胞),表明动物卵巢切除不完全,应弃去不用。假手术组为非切除卵巢大鼠12只,其他受试药品组经术后筛查出切除卵巢模型成功大鼠在实验环境下(屏障系统)正常观察3天后,随机分成8组,每组12只,分别为模型对照组,阳性药对照组,样品低剂量组,样品高剂量组,假手术组和模型组每天灌胃给予蒸馏水,其余样品组分别给予相应剂量的试药样品,每天喂食1次,喂食3个月。

[0089] 5.2 观察指标

[0090] 5.2.1 一般状态观察

[0091] 每天观察动物的状态(外观体征、行为活动、粪便性状、摄食情况等)。并于每喂食一周后称重观察动物的生长情况。

[0092] 5.2.2 骨钙测定

[0093] 5.2.2.1 样品采集与骨钙测量

[0094] 用原子吸收火焰法检测,参数如下:燃烧气乙炔流量为1.4ml,火焰高度为8.6cm,检测波长422nm;取大鼠一侧股骨在105℃烘箱中烘干至恒重后,称量骨干重,取大鼠腿骨称重后用硝酸溶解并定容至10ml,取0.10ml用0.02M乙二胺四乙酸二钠溶液稀释700倍后进样分析;

[0095] 5.2.2.2 骨密度测定

[0096] 用通用公司GE Lunar Prodigy DXA骨密度仪测定两侧股骨的骨密度。定位对两侧股骨进行测定。

[0097] 5.3 实验结果

[0098] 5.3.1 一般状态观察

[0099] 与假手术组比较,喂食及造模各组动物毛发稍欠光滑,其它外观体征、行为活动、粪便性状等未见明显差异。与模型对照组比较,受试品样品组、对比例 1、对比例 2 及阳性对照组其外观体征、行为活动、粪便性状等未见明显差异。

[0100] 在体重方面,喂食 12 周后,受试品、对比例 1、对比例 2 及阳性对照组动物的体重显著高于假手术组,但低于模型组。

[0101] 5.3.3 对大鼠左股骨骨钙含量及骨密度的影响

[0102] 表 1 对大鼠左股骨骨钙含量及骨密度的影响 ($\bar{x} \pm s$, N = 12)

[0103]

组别	骨密度 BMD(g/cm ³)	骨钙含量 (mg/g)
假手术组	0.212±0.008	193.9±38.8
模型对照组	0.195±0.010#	135.4±24.8#
阳性对照组	0.207±0.010**	178.2±29.3**
对照组	对比例1低剂量组	0.197±0.013
	对比例1高剂量组	0.199±0.011
	对比例2低剂量组	0.198±0.009
	对比例2高剂量组	0.200±0.009*
实验组	受试样品(实施例9)低剂量组	0.202±0.011*
	受试样品(实施例9)高剂量组	0.204±0.008*

[0104] 注 :# 为与假手术组比 $P < 0.01$;* 为与模型组比 $P < 0.05$, ** 为与模型组比 $P < 0.01$ 。

[0105] 由表 1 可见,与假手术组相比,模型对照组股骨骨密度值、骨钙含量明显降低,表明大鼠的骨质疏松模型造模成功。

[0106] 与模型对照组相比,样品低、高剂量组的骨密度值明显升高 ($P < 0.05$)、骨钙含量也明显升高 ($P < 0.05$)。阳性对照组骨密度、骨钙含量值也显著高于模型对照组 ($P < 0.01$)。

[0107] 与模型对照组相比,对比例 1 的骨钙含量、骨密度均有升高的趋势,但无统计学差异 ($P > 0.05$)。对比例 2 高剂量组的骨密度有明显升高 ($P < 0.05$),但骨钙含量仅有升高的趋势 ($P > 0.05$)。

[0108] 与阳性对照组相比,受试样品高、低剂量组股骨密度值和骨钙含量均显著降低 ($P < 0.01$);与对比例组 1 高、低剂量组相比,受试样品高、低剂量组股骨密度值和骨钙含量均显著升高 ($P < 0.05$);与对比例 2 组低剂量组相比,受试样品高、低剂量组股骨密度值和骨钙含量均显著升高 ($P < 0.05$);与对比例 2 组高剂量组相比,受试样品高剂量组股骨密度值和骨钙含量显著升高 ($P < 0.05$)。

[0109] 上述数据表明,样品有升高骨钙含量和增加骨密度的作用,可以用于改善骨质疏

松,而对比例组 1 和对比例组 2 则改善骨质疏松的作用不明显。

[0110] 样品高剂量组改善骨质疏松的能效要优于对比例组 1 高、低剂量组和对比例组 2 的高、低剂量组。样品低剂量组改善骨质疏松的能效要优于对比例组 1 高、低剂量组和对比例组 2 低剂量组。取实施例 1 至实施例 8、实施例 10 至实施例 17 制备的组合物进行上述实验,实验结果与实施例 9 制备的组合物的效果相同或相近,无显著差异 ($P > 0.05$)。表明本发明实施例 1 至实施例 17 制备的组合物均具有增加骨密度功能作用。

[0111] 实验二修复关节的动物功效试验

[0112] 1 实验样品

[0113] 1.1 实验组:本发明组合物:实施例 9 提供的组合物,批号:0816,成人推荐用量:2.88g/d。

[0114] 样品剂量:新西兰兔每天的灌胃量相当于成人推荐用量(折算为每公斤体重的剂量)的 30 倍,即 0.144g/100g。

[0115] 1.2 对照组:对比实施例样品:对比实施例 1、对比实施例 2 组合物,成人推荐用量以及新西兰兔同实验组。

[0116] 正常对照组:即非手术组,给予蒸馏水,用量同其他组别。

[0117] 2 试剂与实验仪器

[0118] 实验仪器:Olympus 光学显微镜照相系统(BH-2 型);德国 ZEISS(蔡司)Axiotron 研究型显微镜。

[0119] 主要试剂:EDTA(成都化学试剂公司);多聚甲醛(北京化学试剂公司);AB-PAS 染色试剂;木瓜蛋白酶(sigama 公司)等。

[0120] 3 实验动物

[0121] 健康的新西兰大白兔,体重 2.5-3.0Kg,雄性,标准饲料喂养,自由摄食、饮水。

[0122] 4 实验结果统计学处理

[0123] 采用方差分析,先进行方差齐性检验,计算 F 值, $F \text{ 值} < F_{0.05}$, 结论:各组均数间差异无显著性; $F \text{ 值} \geq F_{0.05}$, $P \leq 0.05$, 用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计;对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换,待满足正态或方差齐要求后,用转换后的数据进行统计;若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的,改用秩和检验进行统计。

[0124] 5 实验方法和结果

[0125] 5.1 实验方法

[0126] 按照文献的方法,通过兔膝关节腔内注入木瓜蛋白酶,造成骨关节病变模型。将兔用戊巴比妥钠(30mgk/g,静脉注射)麻醉后对左后腿膝关节周围剃毛,轻弯曲膝关节,经关节两侧进针,将 4%木瓜蛋白酶生理盐水溶液 0.3ml 通过髌上韧带注入兔膝关节腔,隔 3 天 1 次。连续注射 3 次(注:正常对照组的新西兰兔则无需进行此项手术)。在末次注入木瓜蛋白酶结束后 2 周开始给予样品,连续给予样品(模型组和正常对照组则连续给予蒸馏水)6 周后将各组新西兰兔全部处死,然后以锐利刀片切取正常对照组膝关节及其余各组造模的左侧膝关节股骨内侧髌,肉眼观察大体观察滑膜及软骨情况,采用软骨 AB-PAS 染色,光镜下观察关节软骨形态结构及软骨基质中蛋白多糖的染色变化。用改良的组织学-组织化学分级系统(HHGS)对各标本的关节软骨进行病理学分级评分。

[0127] 5.2 观察指标

[0128] 5.2.1 一般状态观察

[0129] 每天观察动物的状态（外观体征、行为活动、粪便性状、摄食情况等）。并于每周称量动物的体重。

[0130] 5.2.2 软骨观察

[0131] 5.3 实验结果

[0132] 5.3.1 一般状态观察

[0133] 实验期间见正常组新西兰兔精神状态良好，毛色无异常变化，但造模后的各组新西兰兔均有不同程度跛行，自发活动明显减少，膝关节活动明显受限。

[0134] 在体重方面，喂食 12 周后，受试品、对比例 1、对比例 2 及阳性对照组动物的体重显著低于正常对照组，但高于模型组。

[0135] 5.3.2 软骨观察

[0136] 正常组兔膝关节软骨外观呈蓝白色，色泽明亮，无裂纹、软化或缺损，触之较硬，关节液量较少，质地清澈透明。造模 8 周后，各组膝关节的损伤严重，表现为关软骨面明显凹凸不平，甚至软骨断裂缺损，其中模型组的软骨情况较其他组破坏更严重。

[0137] AB-PAS 染色时软骨基质中酸性粘多糖呈蓝色，中性粘液物质呈红色。正常组 AB-PAS 染色可见软骨染色清晰且均匀，无失染现象，软骨细胞分布均匀，无软骨细胞簇聚，软骨表层光滑、平整。造模 8 周后的模型组可见软骨表层出现失染现象，染色不均匀，软骨表面不平整。其余各样品组可见软骨染色不均且模糊，软骨细胞及基质的形态不清，表层和深层甚至深层有大量失染区域，伴出现不同程度软骨裂隙或缺损。其评分如下：

[0138] 表 2AB-PAS 染色病理评分比较表 ($\bar{x} \pm s$, N = 6)

[0139]

组别	AB-PAS 的评分
模型组	11.30±0.91#
正常对照组	0.55±0.61
对照组	
对比例 1 组	10.77±1.07
对比例 2 组	10.38±0.95
实验组	
受试样品组	8.85±0.81*

[0140] 注：# 为与正常对照组比 $P < 0.05$ ；* 为与模型组比 $P < 0.05$ 。

[0141] 与模型组相比，实验组的病理评分均较模型组有降低 ($P < 0.05$)，对比例 1、对比例 2 组有降低的趋势，但无显著性差异 ($P > 0.05$)。实验组与正常对照组、对比例 1 组、对比例 2 组相比，有显著性差异 ($P < 0.05$)。这表明实验组能提高软骨基质的蛋白多糖含量，促进关节的修复，但对比例 1 组、对比例 2 组则无此功效，且实验组的效果优于对比例 1 组、对比例 2 组。

[0142] 取实施例 1 至实施例 8、实施例 10 至实施例 17 制备的组合物进行上述实验，实验结果与实施例 9 制备的组合物的效果相同或相近，无显著差异 ($P > 0.05$)。表明本发明实施例 1 至实施例 17 制备的组合物均具有改善关节活动能力的功效。

[0143] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。