

• 论 著 •

逐瘀通络汤延缓大鼠骨关节炎软骨退变的实验研究*

李 敏¹, 邱德华², 张鹏翼¹, 于沈敏¹, 傅 隼¹, 桂 璟²
(上海市黄浦区中心医院:1. 骨科;2. 石氏伤科, 上海 200002)

摘 要:目的 研究逐瘀通络汤干预 SD 大鼠膝骨关节炎的作用及机制。方法 选取 30 只 SD 大鼠, 分为健康对照组、模型对照组以及逐瘀通络汤给药组, 每组 10 只。利用 4% 木瓜蛋白酶诱导制作骨关节炎模型。造模后, 逐瘀通络汤给药组用 2 mL/(kg·d) 逐瘀通络汤灌胃, 模型对照组以等量的生理盐水灌胃, 健康对照组常规喂养。持续灌胃 3 个月后, 采用 HE 染色法观察软骨形态结构的变化, 酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测关节液中白细胞介素(IL)-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 以及基质金属蛋白酶(MMP)-3 水平的变化。结果 逐瘀通络汤给药组的软骨退变程度明显好于模型对照组。逐瘀通络汤给药组大鼠关节液中的 IL-1 β (12.13 pg/mL)、TNF- α (13.76 pg/mL) 和 MMP-3 (14.21 ng/mL) 水平较模型对照组 (16.62 pg/mL、18.26 pg/mL、21.57 ng/mL) 显著降低, 差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 逐瘀通络汤具有延缓骨关节炎软骨退变和减轻炎症的作用, 其机制与抑制关节液中炎症因子的表达有关。

关键词:骨关节炎; 逐瘀通络汤; 炎症因子

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.19.006

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)19-2671-03

Zhutan Tongluo Tang ameliorated the degeneration of articular cartilage in a rat osteoarthritis model*

LI Min¹, QIU Dehua², ZHANG Pengyi¹, YU Shenmin¹, FU Sun¹, GUI Jing²

(1. Department of Orthopaedics; 2. Department of Shi's Traumatology, Shanghai Huangpu Center Hospital, Shanghai 200002, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Zhutan Tongluo Tang on the articular cartilage degeneration in a rat osteoarthritis model, and explore the potential mechanism. **Methods** Thirty-healthy SD rats were equally divided into the normal control group, the model control group and Zhutan Tongluo Tang group. Rats were induced osteoarthritis models with 4% mass fraction of papain. After replication of osteoarthritis models, Zhutan Tongluo Tang group were given Zhutan Tongluo Tang with 2 mL/(kg·d), the model control group were given lavage with normal saline, the normal control group with routine feeding. After treatments for 3 months, the cartilage morphology were observed using HE stains, and the expression of IL-1 β , TNF- α and MMP-3 in synovial fluid were measured by ELISA. **Results** The degeneration of cartilage in Zhutan Tongluo Tang group was better than the model control group. Compared with the model control group, the expression levels of IL-1 β (12.13 pg/mL vs. 16.62 pg/mL), TNF- α (13.76 pg/mL vs. 18.26 pg/mL) and MMP-3 (14.21 ng/mL vs. 21.57 ng/mL) in synovial fluid were significantly decreased in Zhutan Tongluo Tang group ($P<0.05$). **Conclusion** Zhutan Tongluo Tang has the function of treating delaying osteoarthritis cartilage degeneration and decreasing inflammation, whose mechanism is related to inhibiting the expression of inflammatory cytokines.

Key words: osteoarthritis; Zhutan Tongluo Tang; inflammatory factors

骨关节炎是一种最常见的关节疾病, 是引起关节疼痛和功能障碍的主要原因, 同样也是造成残疾和医疗成本上升的主要原因, 其发病率呈逐年上升趋势^[1-2]。医疗研究者虽然在了解骨关节炎的病理生理学以及药物开发方面做出了大量努力, 但目前的治疗方式主要以对症治疗为主, 仍然无有效的治疗方法来防止或阻止关节结构退化^[3]。因而, 寻找一种经济、方便、无创的有效疗法是人们迫切的愿望。

骨关节炎的治疗方法包括物理治疗、药物治疗及手术治疗等, 其中中医药在骨关节炎治疗方面历史悠久, 并取得了很好的疗效^[4]。石氏伤科是国家级非物质文化遗产项目, 石氏对伤科的“兼邪”施治, 心得尤多。对于退行性膝关节炎, 针对痰湿致病之因, 采用化痰利湿, 通络散结之法^[5]。逐瘀通络汤由牛蒡子、僵蚕、天南星、泽漆、白芥子、金雀根、丹参、甘草、川牛膝、地龙、威灵仙 11 味中药组成, 具有消除痰湿阻滞, 调节气血失

和, 改善膝关节疼痛的功效。本文以 SD 大鼠骨关节炎模型为研究对象, 旨在观察逐瘀通络汤对大鼠膝骨关节炎软骨组织形态学变化的影响, 检测白细胞介素(IL)-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 以及基质金属蛋白酶(MMP)-3 水平的变化, 探讨逐瘀通络汤治疗大鼠骨关节炎的疗效, 揭示其抗炎作用机制, 并探讨对膝骨关节炎进行中西医结合治疗的临床应用价值。

1 材料与方法

1.1 实验动物 8 周龄雄性清洁级 SD 大鼠 30 只, 体质量约 250 g, 由第二军医大学实验动物中心提供。所有动物饲养于室温及湿度恒定的普通动物房, 有 12 h 的光、暗周期, 自由摄食饮水, 适应性喂养 1 周, 每笼 5 只大鼠。

1.2 药品、试剂与仪器 逐瘀通络汤由牛蒡子、僵蚕、天南星、泽漆、白芥子、金雀根、丹参、甘草、川牛膝、地龙、威灵仙 11 味中药组成, 由上海市黄浦区中心医院提供(沪药制字

* 基金项目: 上海市黄浦区科技计划项目资助课题(HKW201511)。
作者简介: 李敏, 男, 副主任医师, 主要从事骨科诊治相关研究。

Z05060629);木瓜蛋白酶由 Sigma 公司生产;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 IL-1 β 、TNF- α 和 MMP-3 试剂盒均购自美国 R&D 公司。酶标仪购自美国 BIO-RAD 公司。

1.3 方法

1.3.1 动物分组 30 只 SD 大鼠分为健康对照组、模型对照组和逐瘀通络汤给药组,每组各 10 只。

1.3.2 造模方法 造模组通过在大鼠膝关节腔内注射 4%木瓜蛋白酶,建立骨关节炎模型^[6-8]。具体操作方法如下:用 10%水合氯醛(3 mL/kg)腹腔注射麻醉大鼠,将右膝关节周围毛剃光,然后用 75%乙醇消毒皮肤,轻弯右膝关节,在髌韧带附着点外上方约 0.5 cm 处进针,将 4%木瓜蛋白酶溶液 0.2 mL 注入大鼠右膝关节腔,每隔 3 天注入 1 次,连续注射 3 次即成。

1.3.3 干预方法 造模后,逐瘀通络汤给药组以 2 mL/(kg·d)逐瘀通络汤灌胃,模型对照组以等量的生理盐水灌胃,每日 1 次,持续灌胃 3 个月。健康对照组常规喂养。

1.4 检测方法

1.4.1 HE 染色 SD 大鼠用药 3 个月后,取双膝关节股骨髁,用 4%多聚甲醛固定,经过常规脱钙后,依次采用 70%乙醇、80%乙醇、95%乙醇、无水乙醇与正丁醇混合液(1:1)梯度脱水各 1 h,二甲苯透明,以加入 10%含蜂蜡的石蜡浸渍纵向包埋,然后切片,进行 HE 染色。依次通过二甲苯(10 min)、100%乙醇(5 min)、95%乙醇(5 min)、80%乙醇(5 min)、75%

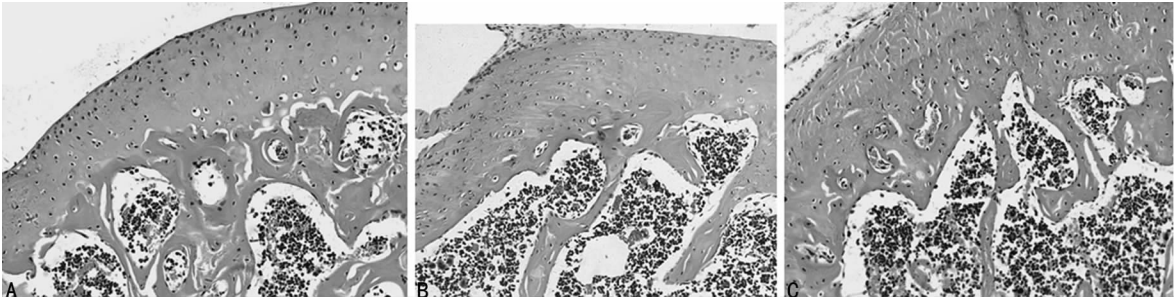
乙醇(5 min)、蒸馏水(2 min)、苏木精染色(5 min)、自来水(1 min)、1%盐酸乙醇分化(30 s)、流水冲洗(5 min)、伊红染色(3 min),然后再依次采用自来水、95%乙醇、100%乙醇、二甲苯,最后用中性树脂封片,观察软骨组织形态及结构的变化。

1.4.2 ELISA 法检测关节液中 IL-1 β 、TNF- α 和 MMP-3 水平 采用 10%水合氯醛(3 mL/kg)腹腔注射麻醉大鼠,来回屈伸活动关节,然后注射生理盐水 2 mL,反复抽吸几遍,抽取关节液转到离心管中后离心,-80℃保存。采用 ELISA 法检测关节液中 IL-1 β 、TNF- α 和 MMP-3 水平。具体操作步骤参照说明书。

1.5 统计学处理 数据结果采用 SPSS17.0 软件进行分析。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,两组数据之间比较采用 Student's *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 逐瘀通络汤抑制骨关节炎的软骨退化 健康对照组中软骨基质着色均匀,软骨表面光滑,软骨细胞排列整齐,四层结构清晰可辨,潮线完整(图 1A)。模型对照组关节软骨破坏较为严重,软骨表面粗糙不整齐,甚至出现明显裂隙深达移行层,软骨细胞排列紊乱,四层结构分辨不清晰(图 1B)。逐瘀通络汤给药组关节软骨内有少许炎细胞浸润,关节软骨细胞有轻度变性,潮线基本完整(图 1C)。逐瘀通络汤给药组软骨形态介于健康对照组和模型对照组之间。



注:A 表示健康对照组;B 表示模型对照组;C 表示逐瘀通络汤给药组。

图 1 3 组软骨组织形态学观察(HE 染色,×200 倍)

2.2 各组大鼠关节液中 IL-1 β 、TNF- α 和 MMP-3 水平 模型对照组与逐瘀通络汤给药组关节液中 IL-1 β 、TNF- α 和 MMP-3 水平较健康对照组中的水平显著升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。但逐瘀通络汤给药组与模型对照组比较,关节液中 IL-1 β 、TNF- α 和 MMP-3 水平则明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠关节液中 IL-1 β 、TNF- α 和 MMP-3 水平($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	IL-1 β (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	MMP-3 (ng/mL)
健康对照组	10	8.78 $\pm$ 1.54	9.63 $\pm$ 1.37	10.36 $\pm$ 1.23
模型对照组	10	16.62 $\pm$ 1.56	18.26 $\pm$ 2.58	21.57 $\pm$ 3.57
逐瘀通络汤给药组	10	12.13 $\pm$ 1.26	13.76 $\pm$ 1.72	14.21 $\pm$ 1.67
<i>F</i>		3.88	3.07	3.23
<i>P</i>		0.018	0.037	0.032

3 讨 论

骨关节炎在传统医学中被认为归属“痹症”范畴,大多是由

于肝脾肾亏虚,经络闭塞,气滞血瘀痰凝、湿邪之气交结于关节而导致骨关节炎的发生^[9]。慢性劳损影响脏腑气血以及筋骨肢节,导致气血呆滞,痰瘀交凝,经络不畅通,膝关节及周围组织失氧,引起关节软骨的退变,导致膝骨关节炎的发生。因此,对于退行性膝关节炎,可以从治疗“痰”入手,采用化痰利湿,通络散结之法。逐瘀通络汤由牛蒡子、僵蚕、天南星、泽漆、白芥子、金雀根、丹参、甘草、川牛膝、地龙、威灵仙 11 味中药组成,方中牛蒡子和天南星祛风化痰,僵蚕和地龙均为虫类药,熄风通络之力极强。全方具有消除痰湿阻滞,调节气血失和,改善膝关节疼痛的功效。

骨关节炎影响关节的所有组织,其中软骨退变是最主要的病理特征^[10-11]。本研究检测了逐瘀通络汤对大鼠膝骨关节炎软骨组织形态学的变化。结果显示,逐瘀通络汤给药组软骨形态介于健康对照组和模型对照组之间,说明逐瘀通络汤具有延缓骨关节炎软骨退变的功效。

最初认为骨关节炎是由于创伤和磨损引起的一种疾病,没有炎症过程的参与,再加上在关节液中只发现少量的白细胞,因此,被列为非炎症性疾病^[12]。越来越多的证据表明,骨关节炎的发生与炎性反应相关。炎症引起关节软骨破坏,破坏后的

软骨润滑作用及承重等能力大大减弱,反过来促进疾病进展^[13]。IL-1 β 主要来源于单核细胞、成纤维细胞、软骨细胞等,主要功能包括促进成纤维细胞因子、趋化因子、MMP 的释放增加。作为一个关键的促炎因子,IL-1 β 是炎症反应和骨关节炎的重要介质^[14]。IL-1 β 和 TNF- α 诱导软骨基质降解和炎症反应,与骨关节炎的发生、发展密切相关。另外,这些炎症因子还参与核因子 κ B(NF- κ B)通路的激活,进而引起炎症反应,增强 MMP-3 表达,抑制软骨基质成分的合成,促进软骨细胞终末分化,引起软骨基质稳态失衡^[15-16]。MMP-3 是细胞外基质降解的一种重要酶,骨关节液中含有高表达的 MMP-3,通过关节液中 MMP-3 的测定有助于监测骨关节炎的病情发展,指导临床治疗^[17]。本研究结果表明,逐瘀通络汤能显著降低关节液中 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-3 的水平,负向调控炎症反应,从而延缓骨关节炎的软骨退变。

总之,逐瘀通络汤通过抑制 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-3 表达来抑制骨关节炎的软骨退变。本研究初步探讨了逐瘀通络汤延缓骨关节炎软骨退变的可能机制,指出逐瘀通络汤具有治疗骨关节炎和抑制炎症的作用。

参考文献

[1] Bannuru RR, Schmid CH, Kent DM, et al. Comparative effectiveness of pharmacologic interventions for knee osteoarthritis: a systematic review and network meta-analysis [J]. *Ann Intern Med*, 2015, 162(1): 46-54.

[2] Murphy L, Helmick CG. The impact of osteoarthritis in the United States: a population-health perspective [J]. *Am J Nurs*, 2012, 112(3 Suppl 1): S13-19.

[3] Roos EM, Arden NK. Strategies for the prevention of knee osteoarthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2016, 12(1): 92-101.

[4] 陆洋, 尹良军. 骨关节炎的临床特征及其治疗进展 [J]. *医学信息*, 2015, 28(7): 335-336.

[5] 洪海平, 徐国权, 朱首豪, 等. “石氏中医药”综合疗法治疗膝骨关节炎的临床疗效分析 [J]. *云南中医学院学报*, 2015, 38(1): 75-77.

[6] Huang MH, Ding HJ, Yang CC, et al. The early evaluation of induced osteoarthritis in rats with Technetium-99m pertechnetate scans [J]. *Nucl Med Comm*, 1996, 17

(6): 529-535.

[7] Bentley G. Papain-induced degenerative arthritis of the hip in rabbits [J]. *J Bone Joint Surg*, 1971, 53(2): 324-337.

[8] Kitoh Y, Katsuramaki T, Tanaka H, et al. Effect of SL-1010 (sodium hyaluronate with high molecular weight) on experimental osteoarthritis induced by intra-articularly applied papain in rabbits [J]. *Fol Pharm Jpn*, 1992, 100(1): 67-76.

[9] 燕炼钢, 韩为, 程红亮. 中医治疗膝骨关节炎研究进展 [J]. *中医药研究进展*, 2009, 2(21): 174.

[10] Hoy DG, Smith E, Cross M, et al. The global burden of musculoskeletal conditions for 2010: an overview of methods [J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73(6): 982-999.

[11] Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, et al. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ [J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(6): 1697-1707.

[12] Dougados M. Dougados Synovial fluid cell analysis [J]. *Baillieres Clin Rheumatol*, 1996, 10(3): 519-534.

[13] 魏丽杰, 王文雅. 炎症引起的软骨细胞外基质的变化对骨关节炎病理进展的作用 [J]. *河北联合大学学报(医学版)*, 2014, 11(2): 170-171.

[14] Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, et al. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2011, 7(1): 33-42.

[15] Wojdasiewicz P, Poniatowski A, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis [J]. *Mediators Inflamm*, 2014, 2014: 561459.

[16] Lianxu C, Hongti J, Changlong Y. NF-kappa B p65-specific siRNA inhibits expression of genes of COX-2, NOS-2 and MMP-9 in rat IL-1beta-induced and TNF-alpha-induced chondrocytes [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006, 14(4): 367-376.

[17] 管兴发, 董金波, 王维山, 等. 骨关节炎患者血清及关节液中 TNF- α 与 MMP-3 水平及临床意义 [J]. *青岛医药卫生*, 2008, 40(1): 9-13.

(收稿日期: 2017-03-18 修回日期: 2017-05-07)

(上接第 2670 页)

[2] 张萍, 李宋萌, 程莉, 等. 32 187 例孕产妇 4 种传染病感染情况调查 [J]. *检验医学与临床*, 2014, 11(1): 93-94.

[3] 周明君, 贺瑜. 产妇乳汁及血清 HBV DNA 相关性分析与母乳喂养探讨 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2013, 21(2): 82-83.

[4] 临床产科编委会. 肝脏疾病与妊娠 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1994: 329.

[5] 罗志舜, 郑逊. HBeAg 阳性产妇母乳喂养与乙型肝炎病毒母婴传播的相关性研究 [J]. *福建医药杂志*, 2010, 32(5): 45-47.

[6] 邓燕玲. 乙型肝炎前 S1 抗原与乙型肝炎五项阳性相关性研究 [J]. *安徽医药*, 2013, 17(6): 1009-1010.

[7] Feinman SV, Berris B, Guha A, et al. DNA:DNA hybriza-

tion method for the diagnosis of HBV [J]. *J Virol Meth*, 1984, 8(3): 199-206.

[8] Qingliang S, Xiaxia Z, Yaoli D. Role of peripheral blood mononuclear cell transportation from mother to baby in HBV intrauterine infection [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2013, 288(6): 1257-1261.

[9] 唐公恩. HBV 感染孕妇肝特异性自身抗体的存在情况及其自身意义 [J]. *中国妇幼保健*, 2014, 29(30): 4905-4907.

[10] 尹玉竹, 周瑾, 张培珍, 等. 影响阻断乙型肝炎病毒母婴传播的危险因素分析 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2013, 21(2): 105-110.

(收稿日期: 2017-03-28 修回日期: 2017-05-17)