

陈元膏摩对膝骨性关节炎大鼠血清 TNF- α 、TGF- β 及软骨基质的影响

马鑫文 沈明球 王新军 刘俊昌

【摘要】 目的 探索陈元膏摩对膝骨性关节炎(knee osteoarthritic, KOA)的作用机制及临床意义,为该法在临床中的应用提供理论依据。**方法** 52 只清洁级雄性 SD 大鼠,分别为空白组、模型组、凡士林手法组、陈元膏摩组,用管型石膏将模型组、凡士林手法组、陈元膏摩组三组大鼠的左下肢膝关节固定 8 周,形成 KOA 中期改变的动物模型。空白组、模型组两组不做干预,凡士林手法组施以凡士林膏结合手法治疗,陈元膏摩组施以陈元膏结合摩法治疗,治疗 8 周;疗程结束后,通过免疫组织化学方法测量大鼠血清中肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、转化生长因子 β (transforming growth factor-beta, TGF- β) 含量水平;HE 染色法观察四组大鼠关节软骨基质的病理变化程度并进行 Mankin 评分。**结果** 凡士林手法组、陈元膏摩组两组的 Mankin 评分及血清 TNF- α 浓度均低于模型组,且陈元膏摩组与凡士林手法组相比 TNF- α 浓度较低($P < 0.05$);凡士林手法组、陈元膏摩组两组的血清 TGF- β 浓度均高于模型组,且陈元膏摩组与凡士林手法组相比 TGF- β 浓度较高($P < 0.05$)。**结论** 陈元膏摩可以减轻 KOA 关节软骨基质的破坏及关节病损,早期应用可抑制炎症细胞因子 TNF- α 的破坏作用,促进转化生长因子 TGF- β 的修复。

【关键词】 膝骨性关节炎; 肿瘤坏死因子 α ; 转化生长因子 β ; 软骨基质

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2014.10.003

Effect of Chenyuan Ointment rubbing on the serum levels of TNF- α , TGF- β and mesenchondrium of rat knee osteoarthritis MA Xin-wen, SHEN Ming-qiu, WANG Xin-jun, et al. College of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China

Corresponding author: LIU Jun-chang, E-mail: xjtcn@126.com

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of action and clinical significant of Chenyuan Ointment for controlling and treating knee osteoarthritis, and to provide the theory evidence for the clinical application. **Methods** Selected 52 apinoid SD rats and divided into 4 groups randomly: normal group, model group, Calligraphy control group and Chenyuan cream group. Fixed every rat's left knee-joint of model group, Calligraphy control group and Chenyuan cream group by closed-plaster method for 8 weeks to induce the knee osteoarthritis (KOA) model. After 8 weeks fixation, the rats in normal group and model group without intervention, the rats in Calligraphy control and Chenyuan cream groups were given Chenyuan cream with manipulation and Vaseline with manipulation on a daily basis. After 8 weeks, detected the serum levels of TNF- α and TGF- β , HE staining, observed the pathological changes of articular cartilage in each groups and Mankin score. **Results** Compared with model group, Calligraphy control and Chenyuan cream groups showed lower Mankin score and the serum levels of TNF- α ($P < 0.01$). Between Calligraphy control and Chenyuan cream groups, Chenyuan cream group showed the lower serum levels of TNF- α ($P < 0.05$). Compared with model group, Calligraphy control group, Chenyuan cream group showed higher the serum levels of TGF- β ($P < 0.01$). Between Calligraphy control group and Chenyuan cream group, Chenyuan cream

基金项目:新疆名医方与特色方剂学实验室开放课题项目(XJDX0910-2011-4);新疆医科大学2012年科研创新基金(XJC2012108)

作者单位:830000 乌鲁木齐,新疆医科大学中医学[马鑫文(硕士研究生)、刘俊昌];新疆名医方与特色方剂学实验室(王新军、刘俊昌);新疆维吾尔自治区中医院(沈明球、王新军、刘俊昌)

作者简介:马鑫文(1984-),2012级在读硕士研究生。研究方向:推拿治疗骨关节疾病的研究。E-mail:86991393@qq.com

通讯作者:刘俊昌(1976-),硕士,副教授。研究方向:推拿治疗骨关节疾病的研究。E-mail:xjtcn@126.com

group showed the higher serum levels of TGF- β . **Conclusion** Chenyuan Ointment rubbing can alleviate the joint cartilage destruction and the joint damage in KOA, which is achieved through reducing the destruction of inflammatory cellular factor TNF- α and promoting the repair of transforming growth cellular factor TGF- β .

【Key words】 Osteoarthritis of knee joint; Tumor necrosis factor alpha; Transforming growth factor-beta; Mesenchondrium

膝关节骨性关节炎(knee osteoarthritic, KOA)是膝关节以损伤、功能丧失并伴有关节周围骨质增生为特点的退行性疾病^[1]。全世界 KOA 患者已超过 3 亿,国内骨性关节炎的患病率也已达到 3% ~ 8.3%^[2]。随着中国老龄化程度的不断加重, KOA 患者的人数不断增加,给社会 and 患者本人带来了巨大的经济负担^[3]。目前针对 KOA 的治疗方法有很多,但是都不理想^[4-6]。膏摩作为一种中医外治法,将外用膏剂的药物作用与推拿手法相结合,能够发挥出更好的治疗作用,近年来有学者研究发现陈元膏摩对 KOA 患者疗效显著^[7],但针对陈元膏摩治疗 KOA 作用机制的实验研究却相对较少,特别是在分子水平研究细胞因子肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) 及转化生长因子 β (transforming growth factor-beta, TGF- β) 方面存在着研究空白。本研究通过观察陈元膏结合推拿手法对 KOA 大鼠血清 TNF- α 、TGF- β 及软骨基质的影响,来探讨其治疗 KOA 的作用机理,为此法在临床中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 SD 雄性大鼠 52 只,清洁级,体重 300 ~ 350 g,由新疆医科大学动物实验中心提供[动物批号:SCX(新)2013-0004]。

1.2 试验药物及制作方法

陈元膏方组成:当归 240 g、秋水仙 80 g、川芎 80 g、黑附片 200 g、细辛 80 g、桂心 80 g、生地黄 240 g、白芷 120 g、朱砂 160 g、干姜 100 g、乌头 50 g、凡士林 1000 g。

制作方法:以羊毛脂做基质,运用现代羊脂软膏制作工艺,委托新疆名医名方重点实验室一次性制作完成、凡士林由新疆名医名方重点实验室一批次提供。

1.3 主要试剂

TNF- α 试剂盒(北京永辉生物科技有限公司,生产批号:20130906)、TGF- β 试剂盒(武汉博士德

生物科技有限公司,生产批号:20130822)、SP-900 免疫组化染色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,生产批号:K1366190)。

1.4 动物分组及动物模型

52 只健康 SD 雄性大鼠普通饲养 1 周,以适应环境,运用随机数字表法将 52 只大鼠分为 4 组,分别为空白组、模型组、凡士林手法组、陈元膏摩组,每组 13 只;用管形石膏将 3 组大鼠的左下肢进行屈曲位固定造模,具体方法如下:用管形石膏将 3 组大鼠的左下肢膝关节固定,固定范围约从踝关节至腹股沟处,并用绷带和铁丝在石膏外施行外固定,防止石膏脱落,在造模期间,每日检查石膏的固定情况,若出现石膏咬损、脱落或下肢肿胀、瘀血等情况,立即重新固定,8 周后,统一拆除 3 组大鼠的固定石膏,造模成功。

1.5 干预方法

造模成功后,空白组、模型组两组大鼠不做处理;凡士林手法组、陈元膏摩组两组大鼠均接受治疗。定期将凡士林手法组、陈元膏摩组两组大鼠左膝关节周围的毛发剔除,分别涂以凡士林膏剂和陈元膏,2 g/只,并对每只大鼠施以手法治疗,每天 1 次,持续 8 周,手法操作由 1 名经专业培训的推拿医师进行,具体步骤如下:(1)操作者用拇指和食指对大鼠膝关节内外侧及髌骨周围的软组织施以摩法,以局部皮肤微热,药物吸收,颜色变浅为度,重复 50 次。(2)操作者手握大鼠足掌,牵动大鼠膝关节进行屈伸运动,以大鼠无嘶叫或挣扎为度,重复 20 次。治疗后,将大鼠放于制动瓶中制动 1 小时,擦尽药渍后放回笼中,防止大鼠舔食残留药物影响吸收。

1.6 取材与标本处理

持续治疗满 8 周后,对 4 组大鼠进行腹腔注射麻醉,并从腹主动脉采血 5 ml,以 1500 r/min 的速度对全血进行离心处理,15 分钟后,取血清。检测采用酶联免疫吸附测定法,操作按照试剂盒说明书要求进行,各细胞因子(TNF- α 、TGF- β)的浓度由全自动酶标仪分别读取,各血清标本均采用复孔检测,均值为终浓度。

采血后,对每只大鼠采用断髓法进行处死,并收集每只大鼠的左膝关节股骨端,4%多聚甲醛固定,48 小时后行脱钙、石蜡包埋及切片,切片厚 5 μm 。HE 染色后,利用普通光镜在放大 400 倍的情况下观察膝关节软骨基质的病理学变化,并进行 Mankin 评分^[8](关节软骨切片的制作及观察均交由新疆医科大学第一附属医院病理科完成)。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,实验数据均采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,每组大鼠所得数据符合方差齐性者进行单因素方差分析的 SNK 法进行检验,以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

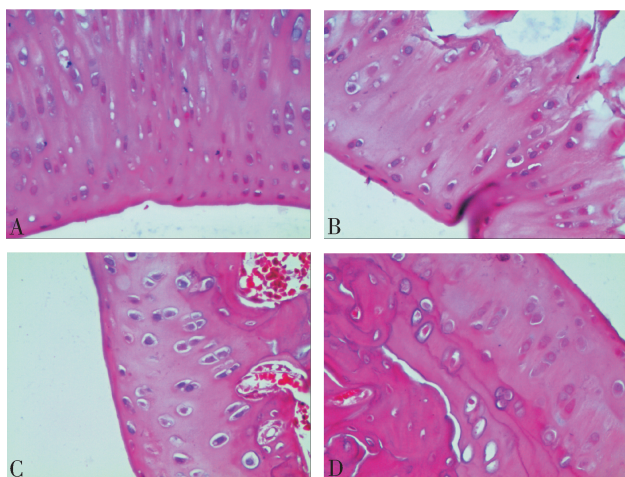
2 结果

2.1 关节软骨整体形态观察

空白组大鼠膝关节内未见关节积液及滑膜增生,关节股骨端软骨面完整光滑;模型组大鼠膝关节内可见关节积液及滑膜增生,关节面溃疡可达基层;凡士林手法组及陈元膏摩组部分大鼠出现关节积液及滑膜增生,关节软骨面改变,糜烂粗糙较明显。

2.2 关节软骨面病理学检查

HE 染色后,光镜下观察,空白组软骨面光滑润洁,细胞完整,排列正常;模型组软骨面溃疡缺损,软骨细胞有显著减少,排列不齐,有渗出;凡士林手法组与陈元膏摩组软骨表面粗糙,细胞数多,排列不整,有少量渗出,见图 1。



A 空白组;B 模型组;C 凡士林手法组;D 陈元膏手法组

图 1 各组大鼠关节软骨面 HE 染色($\times 400$)

2.3 关节软骨 Mankin 评分及大鼠血清 TNF- α 、TGF- β 的水平

四组大鼠的三种数据经检验均符合方差齐性,

故在统计时均采用单因素方差分析的 SNK 法进行差异显著性检验,结果如下:(1) Mankin 评分比较:与空白组相比,其余 3 组大鼠的关节软骨 Mankin 评分明显上升($P < 0.05$);与模型组相比,凡士林手法组与陈元膏摩组的关节软骨 Mankin 评分明显降低($P < 0.05$);与凡士林手法组相比,陈元膏摩组的关节软骨 Mankin 评分明显降低($P < 0.05$)。(2) 大鼠血清 TNF- α 的水平比较:与模型组相比,其余 3 组大鼠的血清 TNF- α 水平明显较低($P < 0.05$);与凡士林手法组相比,陈元膏摩组的血清 TNF- α 水平明显降低($P < 0.05$)。(3) 大鼠血清 TGF- β 的水平比较:与模型组相比,凡士林手法组和陈元膏摩组大鼠的血清 TGF- β 水平明显提高($P < 0.05$);与凡士林手法组相比,陈元膏摩组的血清 TGF- β 水平明显提高($P < 0.05$),具体见表 1。

表 1 四组大鼠关节软骨 Mankin 评分及大鼠血清 TNF- α 、TGF- β 的水平($\bar{x} \pm s$)($n = 13$)

分组	Mankin 评分	TNF- α (ng/l)	TGF- β (pg/ml)
空白组	0.00	168.88 \pm 31.56	42.45 \pm 8.90
模型组	7.85 \pm 2.39 ^a	240.35 \pm 10.35 ^a	54.53 \pm 7.38 ^a
凡士林手法组	5.79 \pm 1.40 ^{ab}	216.72 \pm 31.83 ^{ab}	65.00 \pm 11.89 ^{ab}
陈元膏摩组	4.53 \pm 1.44 ^{abc}	190.90 \pm 3.86 ^{abc}	101.87 \pm 20.05 ^{abc}

注:与空白组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与凡士林手法组比较,^c $P < 0.05$

3 讨论

OA 又称为骨关节炎、退行性关节炎、增生性关节炎或肥大性关节炎^[9-10]。研究显示骨关节炎多以软骨的退变为核心,常累及滑膜及关节的周围组织,其发病机制尚不清楚,多认为与代谢、免疫、外伤、衰老等因素有关^[11]。目前,国内外学者多热衷于通过对细胞因子、自由基等的研究来探讨 KOA 的发病机制^[12],相关研究发现 KOA 的病变程度与血清中细胞因子(TNF- α 、TGF- β)等的含量相关^[13]。TNF- α 是一种由单核-巨噬细胞产生的肽类激素,具有强有力的促炎症作用,可以协同白细胞介素等细胞因子构成炎症介质,促进炎症反应^[14-15]。TNF- α 在 OA 的发生发展过程中可能起着决定性的作用。在本次实验中,陈元膏摩组大鼠在接受治疗后可见该组大鼠的血清 TNF- α 水平有明显下降,关节面的损伤亦有显著地改善,说明陈元膏结合手法治疗可

降低血清 TNF- α 水平,降低其对关节软骨的致炎作用。TGF- β 是合成性细胞因子,在膝关节炎的损伤修复中起着非常重要的作用,它可以显著降低胶原酶对 II 型胶原的降解,同时可以抑制 TNF- α 、基质金属蛋白酶(matrix metal proteinase-9, MMP-9)、MMP-13 的表达,有研究发现,随着年龄的增长,人体 TGF- β 含量逐渐减少,此现象可能是造成 OA 发生的重要因素之一^[16-18]。在实验中可见,陈元膏摩试验组大鼠在接受治疗后,该组大鼠的血清 TGF- β 水平有明显上升,关节面软骨的损伤程度得到显著地改善,说明陈元膏结合手法治疗可通过提高血清 TGF- β 水平,起到修复关节软骨损伤的作用。

本实验模型组 Mankin 评分(7.85 ± 2.33)明显高于其余 3 组,提示:KOA 动物模型复制成功。模型组血清中 TNF- α 的含量明显高于空白组、凡士林手法组及陈元膏摩组;而陈元膏摩组血清中 TGF- β 的含量高于空白组、模型组及凡士林手法组,这也证明了细胞因子 TNF- α 、TGF- β 对 KOA 的发生发展有着重要的意义。通过研究陈元膏摩对 TNF- α 、TGF- β 血清含量的影响,可望阐明 KOA 的发病机制及陈元膏摩的作用机制,为其运用于 KOA 的临床治疗提供理论依据。

通过肉眼及光镜观察各组大鼠的关节软骨及切片,可见凡士林手法组及陈元膏摩组均可使大鼠的软骨退变有不同程度的减轻,陈元膏摩组的作用最为明显,经治疗该组大鼠膝关节软骨细胞数目有所增加,细胞排列较整齐,说明陈元膏结合手法能够较好的抑制关节软骨的破坏,促进软骨细胞的再生,为陈元膏治疗膝骨性关节炎提供形态学的实验研究依据。

陈元膏方由古方陈元膏化裁而来,方中以当归为君药,主要由秋水仙、川芎、黑附片、熟地黄等多种药物组成。“膏摩”法将手法及药物直接作用于大鼠的膝关节局部,透过皮肤可以明显改善膝部周围的营养状况,促进血液循环,消除滑膜炎症,降低骨内压,缓解疼痛,恢复关节功能等作用^[19]。目前,对陈元膏摩治疗膝骨性关节炎的作用机制尚未完全掌握,本课题组将在今后做更进一步的研究,为此法的临床应用提供更加科学的理论依据。

参 考 文 献

- [1] 廖怀章,游叶平,何乐善,等. 膝骨痹康胶囊对膝骨性关节炎大鼠 IL-6、IL-9 影响的实验研究[J]. 世界中西医结合杂志 2012,8(7):658-660.
- [2] 罗云坚,刘茂才. 骨伤科专病膝关节骨关节炎[M]. 北京:人民卫生出版社,1995:291.
- [3] 张建福,罗小鹏,李沛. 骨伤疼痛疾病的中西医诊疗[M]. 北京:中医古籍出版社,1992:526.
- [4] 殷春芳,吕守正. 关节镜联合胫骨近端截骨治疗膝骨性关节炎伴膝内翻[J]. 天津医药,2010,38(9):825.
- [5] 任秀梅,曹锦瑾,沈雪勇,等. 艾灸治疗膝骨性关节炎:按照随机数字表法对照研究. [J]. 中国针灸,2011,31(12):1057-1061.
- [6] 赵明杰,刘斌,周丰慧. 透明质酸钠注射液治疗膝骨性关节炎的临床观察[J]. 实用医学杂志,2006,22(22):2661-2663.
- [7] 刘俊昌,李媛媛,黄银僖,等. 陈元膏膏摩治疗膝骨性关节炎 60 例临床研究[J]. 吉林中医药,2013,33(6):623.
- [8] 王刚,田杰祥,王佳,等. 健步通络熏蒸液对 KOA 大鼠血清和关节液中 TNF- α 、MMP-3 的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志,2011,12(19):7-8.
- [9] 谈超,魏伟. 骨关节炎的病因研究和治疗的进展[J]. 颈腰痛杂志,2002,23(2):166-169.
- [10] 王亚伟,张彦军. 中西医结合治疗膝骨性关节炎疗效观察[J]. 西部中医药,2012,25(5):80-81.
- [11] 高仰贤,江蓉星. 骨性关节炎发病机制的国内研究进展[J]. 中医正骨,2005,17(4):55-57.
- [12] 孙永生,娄思权. 骨性关节炎发病分子机制研究进展[J]. 中国骨与关节损伤杂志,2005,20(8):571-573.
- [13] 焦国良,梁晓龙,王永海,等. 髌状突髓腔信号异常与关节液 TNF- α 、IL-1 β 含量关系的研究[J]. 临床口腔医学杂志,2004,20(6):340-342.
- [14] 林木南,刘鲜样. 骨性关节炎中细胞因子的协同效应[J]. 福建中医学院学报,2006,16(2):69-70.
- [15] 邓廉夫,柴本甫. IL-1、TNF 和 IL-6 与骨性关节炎[J]. 国外医学创伤与外科基本问题分册,1996,17(2):102-106.
- [16] Van Den Berq W B. Anti-cytokine therapy in chronic destructive arthritis[J]. Arthritis Res,2001,3(1):18-26.
- [17] Blaney Davidson EN, Scharstuhl A, Vitters EL, et al. Reduced transforming growth factor beta signaling in cartilage of old mice ; role in impaired repair capacity [J]. Arthritis Res Ther,2005,7(6):R1338-R1347.
- [18] Tcheta E A, Antoniou J, Tanzer M, et al. Transforming growth factor-beta2 suppresses collagen cleavage in cultured human osteoarthritic cartilage, reduces expression of genes associated with chondrocyte hypertrophy and degradation, and increases prostaglandin E(2) production [J]. Am J Pathol, 2006, 168(1):131-140.
- [19] 柴俊飞. 推拿膏摩治疗慢性膝关节骨性关节炎 45 例疗效观察[J]. 新中医,2011,43(6):118-119.
- [20] 赵颖林,李延红,张满臣,等. 活络止痛软膏配合手法和功能锻炼治疗膝骨性关节炎 90 例[J]. 西部中医药,2013,26(10):106-108.

(收稿日期:2014-07-26)

(本文编辑:董历华)