

# “拔伸松动手法”对膝骨性关节炎兔白细胞介素 1 $\beta$ 和肿瘤坏死因子 $\alpha$ 的影响

王春林 向勇 田启东 胡鸾 赵志勇 邵长丽 董有康 赵永康 林云

**【摘要】 目的** 研究拔伸松动手法对膝骨性关节炎兔关节液中白细胞介素 1 $\beta$  (interleukin 1 beta, IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ ) 的影响。**方法** 采用随机数字表法分为 4 组,即为拔伸松动手法组、注射透明质酸钠组、模型组、正常组。拔伸松动手法组手法治疗,每天一次,治疗十天后休息一天,共治疗 6 周;注射透明质酸钠组注射治疗,每周一次,共治疗 6 周;模型组正常喂养、正常组给正常喂养。**结果** 治疗后各组关节液中 IL-1 $\beta$  浓度平均数值为模型组 > 正常组 > 注射透明质酸钠组 > 拔伸松动手法组;TNF- $\alpha$  浓度平均数值为模型组 > 拔伸松动手法组 > 注射透明质酸钠组 > 正常组。用方差分析及 LSD- $t$  进行两两比较分析显示,拔伸松动手法组、正常组、注射透明质酸钠组两个指标与模型组比较均为  $P < 0.05$ ,差异有统计学意义;拔伸松动手法组、注射透明质酸钠组、正常组之间两两比较比较,两个指标均为  $P > 0.05$ ,差异无统计学意义。**结论** 拔伸松动手法和注射透明质酸钠,均能降低膝骨性关节炎兔关节液中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的浓度,但两种方法之间不能认为有差异。拔伸松动手法可能通过降低膝骨性关节炎兔关节液中的 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  浓度,从而抑制膝骨性关节炎软骨基质降解和关节软骨破坏,对软骨损伤的修复有利。

**【关键词】** 拔伸松动手法; 膝骨性关节炎; 白细胞介素 1 $\beta$ ; 肿瘤坏死因子  $\alpha$

**【中图分类号】** R244.1 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2014.02.002

**Influence on IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  in the knees of rabbits with osteoarthritis by massage manipulation of stretch-pull-loose** WANG Chun-lin, XIANG Dong, TIAN Qi-dong, et al. The department of massage, the First Affiliated Hospital of Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650021, China Corresponding author: WANG Chun-lin, E-mail: 2478026881@qq.com

**【Abstract】 Objective** To study the influence on interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) in the knees of rabbits with osteoarthritis by massage manipulation of stretch-pull-loose. **Methods** Rabbits are randomly divided into four groups-stretch-pull-loose manipulation group (SMG), the sodium hyaluronate injected group (SHG), the model group (MG) and the normal group (NG). Rabbits from SMG received the manipulation of stretch-pull-loose, once daily with a day of break every ten days, for 6 weeks. Rabbits from SHG received sodium hyaluronate injection, once weekly, for 6 weeks. Rabbits from MG and NG were given regular chow. **Results** After the intervention, the average level of IL-1 $\beta$  in joint fluid showed MG > NG > SHG > SMG; and the average level of IL-1 $\beta$  in joint fluid exhibited MG > SMG > SHG > NG. Pairwise comparison among each group was drawn with the method of variance analysis and LSD -  $t$ , which shows the two parameters observed in SMG, SHG and MG were statistically different from those in NG ( $P < 0.05$ ). Further, they were observed to be with no statistically significant differences among SMG, SHG and MG. **Conclusion** Both stretch-pull-loose manipulation and sodium hyaluronate intervention serve to reduce the level of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in the knees of rabbits with osteoarthritis, while no difference can be observed between the two therapies. The mechanism of stretch-pull-loose

基金项目:云南省自然科学基金(2009ZC152M)

作者单位:650021 昆明,云南中医学院第一附属医院推拿科(王春林、向勇、田启东、胡鸾、赵志勇、董有康、赵永康),检验科(林云);云南中医学院针灸推拿学院推拿临床教研室(邵长丽)

作者简介:王春林(1968 - ),本科,教授,主任医师。研究方向:脊柱推拿、膝关节骨性关节炎的中医药治疗。E-mail: 2478026881@qq.com

manipulation's effectiveness in repairing cartilage injuries in osteoarthritis, as is speculated, is by lowering the level of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in knees, which inhibit the degradation of cartilage and the destruction of bone matrix.

【Key words】 Stretch-pull-loose manipulation; Knee of rabbits with osteoarthritis; IL-1 $\beta$ ; TNF- $\alpha$

骨性关节炎(Osteoarthritis, OA)的发病机制至今尚不清楚,现代医学认为其发病与一氧化氮、骨内高压、氧自由基、炎症介质、关节载荷紊乱、自身免疫反应等有关。近年来,细胞因子对 OA 的影响已引起广泛关注,尤其是细胞因子中的白细胞介素(interleukin 1 beta, IL-1 $\beta$ )和肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ ),被认为是骨关节炎病理过程中促进软骨基质降解和关节软骨破坏的两种最重要的细胞因子。本研究旨在研究拔伸松动手法对以家兔下肢关节机械制动造模方法<sup>[1]</sup>制作的兔膝骨性关节炎模型关节液中的 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的影响,从细胞分子水平方面探索拔伸松动手法治疗兔膝骨性关节炎的机理,为该手法治疗膝关节骨性关节炎提供客观依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

健康成年白兔 40 只,体重 1.8~2.5 kg,雌雄不限,重量分布均一。采用随机数字表法分为 4 组,即拔伸松动手法组、注射透明质酸钠组、模型组、正常组。4 组经治疗和观察 6 周后,拔伸松动手法组与注射透明质酸钠组各有 2 只实验兔死亡,与随机选取的模型组与正常组各 8 只实验兔进行相关指标检测。

### 1.2 治疗方法

拔伸松动手法组,以拔伸松动手法治疗兔右膝,专人操作,手法、操作步骤及时间固定。手法为按揉法、拔伸松动手法;取穴膝眼、血海、鹤顶、阳陵泉、阴陵泉、足三里、委中,家兔的取穴方法按《实验针灸学》<sup>[2]</sup>严格取穴。先按揉以上所取诸穴,20 秒/穴,再施以拔伸松动手法:(1)拔伸法施以患膝 10 秒后放松;(2)徐徐拔伸患膝,在拔伸下分别以小鱼际固定于膝关节下缘之内侧和外侧,向对侧推按 5 次(外侧向内侧,内侧向外侧);(3)五指提拿髌骨 10 次,顺时针和逆时针活动髌骨 5 次,再上下左右推动髌骨;(4)屈伸患膝关节 30 次;(5)拔伸患膝 10 秒,在拔伸过程中作膝关节小幅度内旋和外旋运动。手法治疗每天一次,治疗十天后休息一天,共

治疗 6 周。

注射透明质酸钠组,关节腔内注射透明质酸钠(山东正大福瑞达公司生产,国药准字 H10960136,产品批号:2012-01-09)。规格 2 ml:20 mg,按 0.15 ml/kg,每周注射 1 次,共治疗 6 周。

模型组,正常组仅给饲料,喂养 6 周。

### 1.3 观测指标

测定膝关节液中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  含量。采用 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  试剂盒。检测按照 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒酶标仪说明书操作。膝关节液采集施行膝关节穿刺,证实刺入关节腔后,注入 0.9% 的生理盐水 0.5 ml,反复回抽、注入 3 次后,再尽量抽出腔内液体。回收量 0.4~0.6 ml,平均 0.5 ml。采集的膝关节冲洗液按说明采用双抗体夹心(ELISA)法测定。

### 1.4 统计学处理

数据采用 SPSS 17.0 软件进行分析,关节液中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  浓度水平采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,每个指标数据用单因素方差分析做整体分析,用 LSD- $t$  做两两比较。

## 2 结果

4 组白兔试验后膝关节液中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  浓度数据详见表 1。

其中各组 IL-1 $\beta$  浓度平均数值为模型组 > 正常组 > 注射透明质酸钠组 > 拔伸松动手法组,统计学上通过方差分析, $F=8.833$ , $P=0.000$ , $P<0.05$ ,表明四组兔膝关节液中 IL-1 $\beta$  浓度不全相等。用 LSD- $t$  进行两两比较分析,得出正常组与模型组比较  $P=0.001$ ,拔伸松动手法组与模型组比较  $P=0.000$ ,注射透明质酸钠组与模型组比较  $P=0.001$ ,表明拔伸松动手法组、正常组、注射透明质酸钠组与模型组差异皆有统计学意义。拔伸松动手法组与正常组比较  $P=0.289$ ,拔伸松动手法组与注射透明质酸钠组比较  $P=0.575$ ,正常组与注射透明质酸钠组比较  $P=0.668$ ,表明这三组之间两两比较差异无统计学意义。

各组 TNF- $\alpha$  浓度平均数值为模型组 > 拔伸松

动手法组 > 注射透明质酸钠组 > 正常组, 统计学上通过方差分析,  $F = 11.488$ ,  $P = 0.000$ ,  $P < 0.05$ , 表明四组兔膝关节液中  $\text{TNF-}\alpha$  浓度不全相等。用  $\text{LSD-}t$  进行两两比较分析, 得出正常组与模型组比较  $P = 0.000$ , 拔伸松动手法组与模型组比较  $P = 0.001$ , 注射透明质酸钠组与模型组比较  $P = 0.000$ , 表明拔伸松动手法组、正常组、注射透明质酸钠组与模型组差异皆有统计学意义。拔伸松动手法组与正常组比较  $P = 0.151$ , 拔伸松动手法组与注射透明质酸钠组比较  $P = 0.230$ , 正常组与注射透明质酸钠组比较  $P = 0.891$ , 表明这三组之间两两比较差异无统计学意义。

说明通过拔伸松动手法治疗和注射透明质酸钠治疗, 都能降低膝关节液中的  $\text{IL-1}\beta$ 、 $\text{TNF-}\alpha$  浓度, 且两组差异没有统计学意义。表明拔伸松动手法也是一种治疗膝关节骨性关节炎的有效治疗手段。

表 1 白兔试验后膝关节液中  $\text{IL-1}\beta$ 、 $\text{TNF-}\alpha$  浓度 ( $\bar{x} \pm s$ ) ( $n = 8$ )

组名	$\text{IL-1}\beta$ (pg/ml)	$\text{TNF-}\alpha$ (pg/ml)
模型组	$355.39 \pm 58.45$	$2577.02 \pm 538.96$
正常组	$277.12 \pm 37.84$	$1110.70 \pm 521.15$
拔伸松动手法组	$253.83 \pm 33.47$	$1524.40 \pm 679.40$
注射透明质酸钠组	$267.02 \pm 35.96$	$1152.64 \pm 440.75$

### 3 讨论

膝关节骨性关节炎是由于关节滑膜退变, 软骨破坏引起的以膝关节疼痛、僵硬和活动受限为特征的慢性骨关节病, 其中关节软骨退变是 OA 发病的最直接原因, 研究表明膝关节骨性关节炎的发病主要与生物力学因素、生物化学因素、遗传因素、炎症性因素等有关。近年来发现细胞因子  $\text{IL-1}\beta$ 、 $\text{TNF-}\alpha$  是参与骨关节炎进程的重要介质, 是炎症反应的重要调节剂, 是调节炎症的始动因素, 是骨关节炎病理过程中促进软骨基质降解和关节软骨破坏的两种最重要的细胞因子<sup>[3-4]</sup>。Hung 等<sup>[5]</sup>将重组人  $\text{IL-1}\beta$  注入兔膝关节, 发现滑膜内有大量白细胞浸润, 滑膜细胞增生, 滑膜肥厚, 并有关节软骨蛋白多糖合成下降。 $\text{TNF-}\alpha$  在关节炎 (包括 OA) 的发生过程中对关节软骨起着重要的破坏作用。 $\text{TNF-}\alpha$  和  $\text{IL-1}$  的生物学作用相似, 但其生物学活性比  $\text{IL-1}$  约低 100 倍, 在 OA 的发病中与  $\text{IL-1}\beta$  起着协同作用, 动物模型研究也表明关节软骨的破坏主要是由  $\text{IL-1}\beta$

激发的, 并且在早期和  $\text{TNF-}\alpha$  是密切相关的<sup>[6-7]</sup>。

中医药治疗膝关节骨性关节炎有独特的优势, 其中推拿手法治疗本病的研究已取得可喜的进展。近年来的研究证实: 手法的作用和关节被动运动可促进滑液向关节软骨的浸透和扩散, 改善组织的营养代谢, 有助于改善关节周围的血液循环, 降低骨内压, 促进关节周围组织的自身修复, 改善关节软骨的营养和关节的润滑, 并能减轻软骨的退变, 还可增加股四头肌之肌力, 改善关节的活动度<sup>[8-9]</sup>。拔伸松动手法为云南中医学院第一附属医院推拿科治疗膝关节骨性关节炎的经验手法, 该手法将理筋手法与关节松动手法有机结合, 包括拔伸下侧向推按法、髌骨松动手法、拔伸下微旋法和屈伸法四步, 临床研究发现: 该手法能明显改善膝骨性关节炎患者关节活动度, 缓解疼痛<sup>[10]</sup>。课题组在前期的实验研究中亦发现, 拔伸松动手法能明显改善兔膝骨性关节炎模型的关节活动度, 修复退变的软骨组织<sup>[11]</sup>。

本课题将关节腔内注射透明质酸钠设为对照组, 研究结果表明: 治疗后拔伸松动手法组关节液中的  $\text{IL-1}\beta$ 、 $\text{TNF-}\alpha$  浓度与正常兔膝关节液中的浓度无显著差异, 较模型组中兔膝关节液中的浓度低; 拔伸松动手法组和注射透明质酸钠组, 均能降低膝关节液中的  $\text{IL-1}\beta$ 、 $\text{TNF-}\alpha$  浓度, 两组差异没有统计学意义。说明拔伸松动手法可能通过降低兔膝骨性关节炎关节液中的  $\text{IL-1}\beta$ 、 $\text{TNF-}\alpha$  浓度, 达到抑制膝骨性关节炎软骨基质降解和关节软骨破坏的目的, 对软骨损伤的修复有利。

### 参 考 文 献

- [1] 邱贵兴. 兔膝关节制动引起关节软骨退变的实验研究[J]. 中华外科杂志, 1987, 25(3): 175-177.
- [2] 余曙光, 郭义. 实验针灸学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2009: 154-155.
- [3] Solchaga LA, Dennis JE, Goldberg VM, et al. Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue engineered repair of bone and cartilage[J]. J Orthop Res, 1999, 17(2): 205-213.
- [4] Westacott CI, Sharif M. Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction[J]. Semin Arthri Rheum, 1996, 25(4): 254-272.
- [5] Hung GL, Galea Lauri J, Nueller GM, et al. Suppression of Intra-articular responses to interleukin-1 by transfer of the Interleukin-1 receptor antagonist gene to synovium[J]. Gene Ther, 1994, 1(1): 64-69.
- [6] Goldring MB. The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: lessons from animal models[J]. Connet Tiss Res, 1999, 40(1): 1-11.