

实验研究

通痹外敷散对大鼠弗氏完全佐剂性膝关节炎的实验研究

邹佩霞¹ 李莉² 刘兴林² 陈德森²

(1 湖北医药学院附属太和医院儿科门诊, 十堰, 442000; 2 湖北医药学院机能实验室, 十堰, 442000)

摘要 目的: 观察中药通痹外敷散对弗氏完全佐剂性大鼠急性关节炎的影响, 探讨其作用机制。方法: 大鼠随机分为模型组及治疗组, 分别于右膝关节腔内注射弗氏完全佐剂 0.1 mL, 术前及术后 1 周、2 周、3 周分别测定白细胞介素-1 β 亚型 (IL-1 β)、透明质酸 (HA) 含量; 测量右足趾关节以下部位的容积, 计算各组治疗效果。结果: 治疗 2 周后, 治疗组 IL-1 β 明显降低, HA 含量明显升高, 与治疗前及模型组比较有统计学意义 ($P < 0.05$)。治疗组足肿胀度及消肿时间明显优于模型组 ($P < 0.05$)。结论: 通痹外敷散能有效治疗弗氏完全佐剂性大鼠急性关节炎, 其作用可能是通过抑制 IL-1 β 合成、增加 HA 含量而起到治疗作用。

关键词 通痹外敷散; 膝关节炎; 细胞介素-1 β 亚型; 透明质酸

Laboratory Research of Tongbi Application Powder for Treating Freund's Adjuvant Knee Arthritis in Rats

Zou Peixia¹, Li Li², Liu Xinglin², Chen Desen²

(1 Affiliated Taihe Hospital of Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China;

2 Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China)

Abstract Objective: To observe effect of Tongbi Application Powder on Freund's adjuvant knee arthritis in rats and its mechanism. **Methods:** Rats were randomly divided into model group and treatment group, sc. injected Freund's adjuvant 0.1ml into right knee, then measured interleukin -1 beta (IL-1 β), hyaluronic acid (HA) before surgery, 1wk, 2wk, 3wk after surgery; measured volume below the right toe. **Results:** After wk₂, treatment group had lower IL-1 beta and higher HA levels, significantly different compared with that before treatment and model group ($P < 0.05$). The treatment group's extent of foot swelling and duration was significantly better than that of model group, ($P < 0.05$). **Conclusion:** Tongbi Application Powder is effective for treating Freund's adjuvant arthritis in rats, the effect may be induced by inhibiting IL-1 β synthesis and increasing HA level.

Key Words Tongbi external powder; Knee arthritis; Interleukin -1 subtype; Hyaluronic acid

中图分类号: R332; R274 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2015.01.019

膝关节炎伴关节积液是多发于中年以后的慢性、退行性关节疾病, 由多种疾病或原因引起, 临床以膝关节疼痛、变形和活动受限为特点^[1]。其病因主要为软骨的破坏与变性, 是软骨分解与合成代谢失衡的结果^[2], 目前尚无理想的治疗办法。本实验采取自拟中药通痹散外敷治疗弗氏完全佐剂性大鼠急性关节炎, 旨在挖掘中医药治疗关节炎优势, 探讨其作用机制, 为临床用药提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物 Wistar 大鼠 24 只 (由湖北省实验动物研究中心提供), 雌雄兼用, 体重 (250 $\pm$ 50) g, 采用随机数字表随机分为模型组、治疗组、对照组, 每组各 8 只。

1.2 药品与试剂 生理盐水、弗氏完全佐剂 (上海

实生细胞生物技术有限公司); 自拟通痹外敷散药物组成 (药材由太和医院中药房提供): 三七粉 50 g、生草乌 100 g、洋金花 50 g、生川乌 100 g、三棱 50 g、马钱子 100 g、大黄 60 g、白胡椒 50 g、没药 100 g、乳香 100 g、土鳖虫 60 g、山柰 60 g、松香 50 g、樟脑 60 g, 将上述药物加工成极细的粉末用凡士林调成糊状备用。

1.3 急性关节炎模型制备 碘伏浸泡大鼠右足趾消毒, 模型组及治疗组大鼠于右膝关节腔内注射弗氏完全佐剂 (CFAO) 0.1 mL, 对照组注射等量生理盐水, 每日强迫动物活动 30 min, 14 d 后模型组及治疗组即得到稳定的膝骨关节炎模型^[3], 术后 14 d 开始治疗, 治疗组大鼠于右足趾通痹外敷散包裹 1 d 换药 1 次, 模型组换生理盐水, 于术前及术后 14 d

开始测量 1 周、2 周、3 周各组大鼠右足趾关节以下部位的容积,计算各组动物肿胀百分率;测定右膝关节腔内积液白细胞介素-1 β 亚型(IL-1 β)、透明质酸(HA)含量^[4]。

1.4 足肿胀度的测定 3 组动物均于实验当天测量右足趾关节以下部位的容积,连续 3 次,取平均值为右足容积,计算各组动物足肿胀度。前后容积之差值为肿胀程度,计算足肿百公率:足肿胀度(%)=(造模后容积-造模前容积)/造模前容积 $\times$ 100%,记录各组动物消肿时间。

1.5 IL-1 β 及 HA 检测方法 参照文献采用酶标双抗体夹心 ELISA 法标记所收集关节液中的 IL-1 β 计算 IL-1 β 含量^[5]。用透明质酸放免试剂盒进行序列加样,按试剂盒说明严格操作,加样完毕,离心后取沉渣,放射免疫 γ 射线计数分析关节液标本 HA 含量。

1.6 动物存活情况观察 观察动物是否存活,有无动物死亡,动物的一般情况(包括自洁情况、摄食、饮水量等)。

1.7 数据统计 采用 SPSS 15.0 软件处理,实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,指标比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间差异采用 Dunnett 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义^[6]。

2 结果

2.1 大鼠一般情况的变化 术后 14 d,对照组大鼠体毛有光泽,反应敏捷,饮食正常,无死亡。模型组大鼠体毛无光泽、竖毛、反应迟钝、蜷缩少动、大鼠体重减轻明显,死亡 1 例。治疗组在第 2 周后显著改善以上症状,但与对照组大鼠比较稍差,35% 鼠体毛无光泽,反应一般,饮食正常,无死亡。

2.2 治疗前后骨关节炎白细胞介素-1 β 亚型(IL-1 β)、透明质酸(HA)含量 治疗组 IL-1B 含量在治疗 2 周后开始降低,与治疗前及模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),治疗组透明质酸(HA)含量在治疗 2 周后开始明显升高,与治疗前及模型组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。说明通痹外敷散能有效降低白细胞介素-1 β 亚型(IL-1 β),升高透明质酸(HA)的作用。(见表 1、表 2)

表 1 治疗前后 IL-1 β ($\mu\text{g}/\text{min}$) 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	治疗前	1 周	2 周	3 周
模型组	8	39.19 $\pm$ 0.28	36.94 $\pm$ 0.34	34.01 $\pm$ 0.37	32.23 $\pm$ 0.24
治疗组	8	40.21 $\pm$ 8.31	34.57 $\pm$ 0.15 $^{*}\Delta$	29.21 $\pm$ 0.32 $^{*}\Delta$	21.47 $\pm$ 0.34 $^{*}\Delta$

注:与治疗前比较, $^{*}P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

2.3 治疗前后各组动物足肿胀度(%)对比情况

治疗组在通痹外敷散治疗后 1 周开始消肿,3 周后已接近正常,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),说明通痹外敷散治疗效果显著。(见表 3)

表 2 治疗前后 HA(mg/L) 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	治疗前	1 周	2 周	3 周
模型组	8	1.91 $\pm$ 0.11	2.07 $\pm$ 0.05	1.94 $\pm$ 0.09	1.87 $\pm$ 0.04
治疗组	8	1.87 $\pm$ 0.09	2.04 $\pm$ 0.14	3.01 $\pm$ 0.12 $^{*}\Delta$	7.23 $\pm$ 0.24 $^{*}\Delta$

注:与治疗前比较, $^{*}P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

表 3 各组动物足肿胀度(%)对比($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	治疗前	1 周	2 周	3 周
模型组	8	45.12 $\pm$ 4.57	46.39 $\pm$ 5.31	42.97 $\pm$ 5.01	30.21 $\pm$ 2.28
治疗组	8	46.78 $\pm$ 5.29	36.21 $\pm$ 4.77 $^{*}\Delta$	20.36 $\pm$ 3.11 $^{*}\Delta$	4.51 $\pm$ 1.29 $^{*}\Delta$

注:与治疗前比较, $^{*}P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

3 讨论

膝关节炎的病理变化主要为软骨的破坏与变性,以及继发的滑膜与滑液炎症性改变,是软骨分解与合成代谢失衡的结果^[7]。中医学认为,膝关节受损后,局部气滞血瘀,湿浊痹阻于膝关节,治则当利湿除痹、舒筋通络、活血化瘀、行气止痛^[8-10]。方中生草乌、生川乌散寒祛湿,祛风止痹;没药、乳香为骨伤科要药,乳香调气活血,没药活血祛瘀,但乳香偏于行气、伸筋,而没药善于散血化瘀,两者合用能增强行气活血止痛之功。土鳖虫破血逐瘀,续筋接骨;樟脑、山柰、胡椒、松香辛香走窜、行气止痛;三棱、三七散瘀止血;马钱子、洋金花通络散结、消肿定痛;大黄攻积导滞、通经行瘀;诸药合用共起通痹止痛、散瘀消肿、化湿行气之功效。通过药物外敷,在局部保持一定的浓度,能促进局部组织新陈代谢而达“通则不痛”的功效,并且药物置于体表患部,药力直达病所,起效迅速,痛苦较少,不良反应降低,安全可靠。

本研究结果表明通痹外敷散治疗膝关节炎能有效降低白细胞介素-1 β 亚型(IL-1 β),升高透明质酸(HA)的作用。机制可能为:通过抑制 IL-1 β 产生,减轻关节软骨和滑膜的炎症反应,减轻软骨细胞正常结构和功能的破坏、基质的降解,减轻骨的吸收以及关节软骨周围骨赘的形成,从而减轻关节疼痛的临床症状以及关节软骨的破坏,改善关节功能^[11-12]。正常的关节滑液中仅含有微量的 IL-1 β ,但在骨性关节炎(Osteoarthritis, OA)关节液中 IL-1 β 的含量则异常增高。IL-1 β 作为重要的炎性递质具有细胞破坏能力,其在退行性骨关节病中发挥着重要作用。HA 是由 D-葡萄糖醛酸和 N-乙酰氨基葡萄糖胺二糖单位有规律重复构成的大分子链状多糖,化学本质为糖胺多糖,广泛分布于人及动物的结缔组织、眼玻璃

(下接第 79 页)

- [6]李勇华,袁肇凯,郑景辉,等.养心通脉有效部位方与急性心肌梗死大鼠骨髓间充质干细胞的动员及定向归巢[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(23):4285-4289.
- [7]黄献平,袁肇凯,陈清华,等.养心通脉方主要与次要有效部位交互作用抗心肌缺血的研究[J].现代生物医学进展,2009,9(13):2505-2507.
- [8]秦伯未.谦斋医学讲稿[M].上海:上海科学技术出版社,1978:208.
- [9]简亚平,袁肇凯.养心通脉片治疗老年血脂异常(气虚痰瘀型)临床研究[J].新中医,2011,43(7):36-37.
- [10]简亚平,袁肇凯,张湘东.养心通脉片与绞股蓝总甙片治疗血脂异常伴胰岛素抵抗患者的比较[J].新中医,2012,44(1):27-28.
- [11]袁肇凯,莫莉,黄献平,等.养心通脉有效部位方对心肌梗死大鼠心脏血管内皮细胞血管生成的影响[J].现代生物医学进展,2009,9(8):1405-1407.
- [12]莫莉,袁肇凯,黄献平,等.养心通脉有效部位方促血管生成作用

的实验研究[J].中华中医药学刊,2010,28(1):54-56.

- [13]卢芳国,袁肇凯,黄献平,等.养心通脉片对胰岛素抵抗综合征外周血单核细胞 C-myc 和 PDGF-A mRNA 的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2003,1(8):442-444.
- [14]莫莉,黄献平,袁肇凯,等.养心通脉有效部位方对鸡胚绒毛尿囊膜血管新生的影响[J].中药新药与临床药理,2009,20(4):315-319.
- [15]袁肇凯,莫莉,黄献平,等.养心通脉有效部位方对心肌梗死大鼠心血管内皮细胞血管生成的影响[J].心血管康复医学杂志,2009,18(2):180-184.
- [16]冼绍祥,杨忠奇,汪朝晖,等.黄芪甲苷体外诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞的实验研究[J].广州中医药大学学报,2007,24(1):37-40.
- [17]宋清,张晓文,卢新政,等.参三七皂苷 RgI 预应对 5-氮胞苷诱导大鼠骨髓间充质干细胞向心肌细胞转化的干预[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(24):4693-4697.

(2014-04-02 收稿 责任编辑:曹柏)

(上接第 74 页)

体、软骨和滑液中,是关节滑液和软骨基质的重要组成部分。HA 可减少 OA 关节内炎性递质的扩散,减少滑膜的通透性及关节内渗液。我们认为滑液中 HA 含量升高是由于中药进入机体吸收以后,促使滑膜内衬 B 型滑膜细胞和单核吞噬细胞产生分泌 HA,从而起到润滑关节、保护关节软骨、延缓软骨退变的作用。这是一种“内源性”HA,相对于外源性的 HA 关节腔内注射,其作用时间更为长久^[13]。中医学认为该病属“骨痹”范畴,人至中老年或大病后,精气亏耗,腠理疏松,骨节失密,风寒湿邪入侵而致气滞血瘀寒凝,经络不通,精血不能荣筋主骨,痹阻骨节筋脉而发为骨痹,中药外敷可祛风除湿散寒^[14],活血化瘀通络,消肿止痛,清除关节内炎性因子,改善关节腔内环境从而达到治疗目的。

参考文献

- [1]国延军,牟成林,程杰,等.祛瘀通痹汤治疗原发性膝骨关节炎的临床研究[J].河北中医报,2009,24(4):21-22.
- [2]孙艳,陈立忠,王海燕,等.增液润节汤和美洛昔康片治疗膝骨关节炎的对比研究[J].中医正骨,2014,26(1):21-23.
- [3]张晓轶,节晓光,张雅丽,等.“CHK”术式对兔膝 OA 中 SOD、MDA 及 NO 水平的影响[J].贵州医药,2008,32(8):680-84.
- [4]付德红,钟琴,马武开,等.苗药痛风停汤内服配合水晶膏外敷治疗急性痛风性关节炎疗效观察[J].世界中西医结合杂志,2012,7(6):494-496.

- [5]齐护卿,王金榜,杜双庆,等.养元柔肝汤治疗膝骨关节炎 183 例疗效观察[J].河北中医学报,2009,24(3):14-15.
- [6]张玮,邢练军,季光,等.百令胶囊对慢性乙型肝炎抗肝纤维化的临床研究[J].世界中医药,2007,2(1):13-14.
- [7]钟琴,刘正奇,安阳,等.苗药痛风停汤对急性痛风性关节炎模型大鼠血清 IL-8 的影响[J].风湿病与关节炎,2014,21(1):16-18.
- [8]张拴平,郝阳泉.关节内灌注冲洗并中药熏洗治疗膝骨性关节炎 50 例[J].陕西中医学院学报,2010,33(5):68.
- [9]赵文修,沈丕安,戴琪萍,等.急性痛风性关节炎的中医药治疗研究进展[J].风湿病与关节炎,2013,11(11):72-76.
- [10]陈才兴,孙成长.中药内外兼治合透明质酸钠治疗膝关节炎性骨性关节炎[J].浙江中西医结合杂志,2006,16(7):427-428.
- [11]钟正霞,于泓,袁良东,等.抗痛风胶囊改善急性痛风性关节炎大鼠关节病理学变化[J].遵义医学院学报,2013,36(2):105-107.
- [12]柳景红,祁开泽,吴涛,等.痛风速效灵对急性痛风性关节炎模型大鼠步态和关节组织形态学影响的实验研究[J].现代中西医结合杂志,2007,16(5):592-594.
- [13]马健良,王天理.针灸配合中药熏洗治疗膝关节炎性骨关节炎合并积液的疗效观察[J].北华大学学报:自然科学版,2012,13(3):32.
- [14]姚钜森,张丹娜.中药外敷内服治疗膝骨性关节炎 46 例[J].浙江中西医结合杂志,2014,1(1):72-73.

(2013-11-02 收稿 责任编辑:曹柏)