

陈元膏膏摩对膝骨性关节炎大鼠血清 NO 和 PGE₂ 及下肢功能的影响

刘俊昌^{1,2}, 刘俊瑞³, 张超凡¹, 木合塔尔·阿尤甫^{1*}, 王新军¹

(1. 新疆医科大学, 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆名医名方与特色方剂学实验室, 乌鲁木齐 830011;
3. 新疆塔城地区中等职业技术学校, 新疆塔城 834700)

[摘要] 目的: 观察陈元膏膏摩对膝骨性关节炎大鼠血清中一氧化氮(NO)和前列腺素 E₂(PGE₂)及下肢功能恢复的影响, 探讨陈元膏膏摩对膝骨性关节炎是否具有抗炎作用。方法: 将 52 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、陈元膏膏摩组(2 g/只)、和手法对照组(凡士林, 2 g/只), 每组 13 只, 除正常组外, 其余各组采用石膏固定法建立膝骨性关节炎动物模型, 8 周后, 正常组、模型组不作干预, 对陈元膏膏摩组、手法对照组大鼠分别给予陈元膏结合手法和凡士林结合手法治疗, 每日 1 次, 持续 8 周后, HE 染色对各组关节软骨病理改变进行 Mankin 评分, 并检测各组血清中 NO 和 PGE₂ 的浓度水平。结果: 与正常组比较, 模型组软骨病理改变进行 Mankin 评分和血清 NO、PGE₂ 的浓度水平明显升高($P < 0.01$), 其大腿周长和膝关节活动度均有明显降低($P < 0.01$); 陈元膏膏摩组、手法对照组 Mankin 评分和血清 NO、PGE₂ 的浓度水平均低于模型组($P < 0.01$), 其中陈元膏膏摩组的血清 NO、PGE₂ 浓度水平较低($P < 0.05$), 陈元膏膏摩组、手法对照组的大鼠在治疗后, 其大腿周长和膝关节活动度均有明显提高($P < 0.01$), 其中陈元膏膏摩组提高的幅度较大($P < 0.05$)。结论: 陈元膏膏摩疗法可降低 KOA 大鼠血清中 NO 和 PGE₂ 的浓度水平, 更好地促进大鼠大腿肌力和膝关节活动度的改善, 对减轻膝骨性关节炎症状具有一定的作用。

[关键词] 陈元膏膏摩; 膝骨性关节炎; 炎症介质; 一氧化氮; 前列腺素 E₂

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)19-0129-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015190129

Effect of Chenyuan Ointment Rubbing on Serum NO and PGE₂ and Lower Limb Function of Rats with Knee Osteoarthritis LIU Jun-chang^{1,2}, LIU Jun-rui³, ZHANG Chao-fan¹, Muhetaer · Ayoufu^{1*}, WANG Xin-jun¹ (1. Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. Xinjiang Laboratory of Famous Prescription and Characteristic Formulas, Urumqi 830011, China; 3. Xinjiang Tacheng Prefecture Secondary Vocational and Technical School, Tacheng 834700, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Chenyuan ointment rubbing on the serum levels of nitric oxide (NO) and prostaglandin E₂ (PGE₂) of rats with knee osteoarthritis (KOA) and explore its anti-inflammatory effect. **Method:** Totally 52 SD rats were randomly divided into 4 groups: normal group (group A), model group (group B), Chenyuan ointment group (group C, 2 g/rat) and manipulation control group (group D, Vaseline, 2 g/rat), with 13 rats in each group. KOA model was induced by closed-plaster method, except for the normal group. Eight weeks after fixation, groups A and B were given no intervention, the rats in groups C and D were given Chenyuan ointment with manipulation and vaseline with manipulation once a day. After 8 weeks, HE staining was adopted to observe the pathological changes of articular cartilage in each group and Mankin score and detect the serum levels of NO and PGE₂. **Result:** Compared with group A, group B showed significantly higher mankin score and serum NO and PGE₂ ($P < 0.01$) and lower lower limb circumference and knee joint activity ($P < 0.01$). Groups C and D showed lower mankin score and the serum levels of NO and PGE₂ than that of group B ($P < 0.01$). Specifically, group C showed the lower serum levels of NO and PGE₂ ($P < 0.05$). After the

[收稿日期] 20140829(009)

[基金项目] 新疆名医名方与特色方剂学实验室开放项目(XJDX0910-2011-4)

[第一作者] 刘俊昌, 硕士, 副教授, 硕士生导师, 从事推拿治疗骨与关节疾病的基础与临床研究, Tel: 13899969290, E-mail: 625854402@qq.com

[通讯作者] * 木合塔尔·阿尤甫, 硕士, 副主任医师, 从事推拿基础研究, Tel: 0991-5581783, E-mail: xjtem@126.com

treatment, limb circumference and activity of knee joint of rats were significantly improved in groups C and D ($P < 0.01$), particularly group C were improved more greatly ($P < 0.05$). **Conclusion:** Chenyuan ointment rubbing can reduce the concentration level of NO and PGE₂ in serum of KOA rats, and better improve muscle strength of lower limbs and activity of knee joint. Moreover, it has a certain effect in reducing joint inflammation.

[**Key words**] Chenyuan ointment rubbing; osteoarthritis of knee; inflammatory mediator; nitric oxide; prostaglandin E₂

膝骨性关节炎(osteoarthritis of the knee, KOA)以膝关节软骨的退变、软骨基质的降解为主要病理特征,其继发的滑膜炎症和骨质增生所引起的疼痛、肿胀及功能障碍都将影响患者的生存质量。近年来的研究表明:所有引起骨性关节炎疼痛的原因都直接或间接的与关节内局限性炎症有关^[1],而一氧化氮(NO)与前列腺素E₂(PGE₂)这2种炎症介质在KOA发病过程中都起着重要的作用^[2-3]。膏摩是药物与推拿有机结合的疗法,早在东汉张仲景的《金匱要略》中就有其治疗“四肢才觉重滞”的记载^[4],其现已成为中医治疗骨性关节炎的特色疗法。陈元膏是本课题组在临床治疗KOA验证有效并结合新疆地域因素的基础上经过逐步论证而形成的膏摩复方^[5],它源自《千金翼方·卷十六·诸膏第三》,在处方论证的基础上加入特色维族药秋水仙制膏而成。秋水仙为维族药,维吾尔医学理论认为:秋水仙属性为二级干、三级热,具有清除异常黏液质,抽祛机体深层黏稠异常体液,开通黏液性阻滞,消肿止痛功能,用于大小关节骨痛等病症。本实验希望通过观察陈元膏膏摩疗法对KOA大鼠血清中炎症介质NO和PGE₂浓度水平的调节和对大鼠下肢功能恢复的影响,来探讨陈元膏是否具有抗炎作用及其机制,从而为陈元膏膏摩疗法临床治疗KOA提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 健康清洁的SD雄性大鼠52只,体重约300~350g,由新疆医科大学动物实验中心提供,动物合格证号SCXK(新)2011-0004。

1.2 药物及试剂 陈元膏(含当归、川芎、秋水仙、黑附片等药物,以当归为君药,凡士林、羊毛脂为基质,根据现代制药工艺,委托新疆名医名方与特色方剂学实验室一次性制作完成,批号XJMF20140305)、医用凡士林(由新疆名医名方与特色方剂学实验室提供),NO试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号K12707E),PGE₂试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号fk2411Y)。

1.3 仪器 丽珠固宝树脂绷带(珠海丽珠生物材料有限公司),NTY-MV-4000A型光学显微镜(日本

尼康公司),Sunrise型多功能酶标仪(奥地利Tecan公司),photoLab 6100型分光光度计(重庆永恒实验仪器厂)。

2 方法

2.1 分组及造模 52只健康清洁的雄性SD大鼠,适应性喂养3d后随机分为4组:正常组、模型组、陈元膏膏摩组、手法对照组,每组各13只。采用石膏屈曲位固定法进行模型组、陈元膏膏摩组、手法对照组大鼠的KOA造模。方法如下:管型石膏屈曲位固定大鼠左侧下肢膝关节,范围从腹股沟处直至踝关节,并以铁丝和绷带外固定。每日检查石膏固定的情况,若出现石膏脱落、咬损或下肢瘀血、肿胀等情况立即重新固定,满8周后统一拆除石膏^[6]。

2.2 干预方法 正常组和模型组不作处理,陈元膏膏摩组和手法对照组,定期剔除大鼠左侧下肢膝关节周围的毛发,于髌韧带为中心周围约4cm²的范围内,分别涂以陈元膏剂和凡士林2g/只,并均结合手法治疗,每天1次,持续8周。手法由同一名推拿专业医师操作,方法如下:①治疗者分别以拇指和食指按揉膝关节内外侧及髌骨周围的软组织,力量以局部皮肤微热或药物颜色吸收变浅为度,重复50次。②治疗者手持大鼠足掌,带动大鼠膝关节做屈伸运动,屈伸程度以大鼠无嘶叫或挣扎为度,重复20次。③为防止大鼠舔食残留药物影响吸收,将其在制动瓶中制动1h,再擦净药渍放回笼中。

分别于统一拆除石膏后和末次治疗后量取模型组、陈元膏膏摩组和手法对照组大鼠的左侧大腿周长和膝关节的最大伸直位活动角度。测量大腿周长时,以大鼠下肢髌骨直上1cm处的软尺读数为准;测量下肢活动度时,大鼠取左侧卧位,使其左下肢平贴于试验台的白纸表面,分别于腘窝、踝关节后侧和大腿后侧在白纸的对应位置处做标记点,再以腘窝处的点为顶点,用量角器量取其与其余两点所成角度的大小。

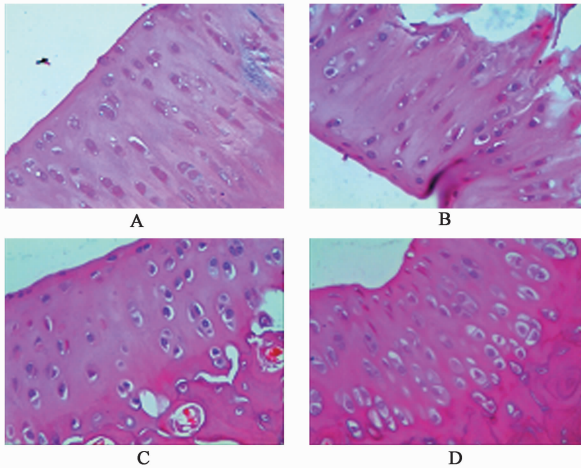
2.3 取材与标本处理 干预8周后,麻醉4组大鼠,通过腹主动脉取血,1500r·min⁻¹的速度离心15min后,取血清。按照试剂盒说明分别采用硝酸

基还原酶法和酶联免疫吸附法测定血清中 NO 和 PGE₂ 的浓度水平。切取大鼠左膝整个股骨髁,4% 多聚甲醛固定 48 h 后,进行脱钙石蜡包埋及切片。HE 染色后光镜下观察软骨的病理变化,并进行 Mankin 评分^[7]。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有数据先进行正态性和方差齐性检验后,再酌情根据单因素方差分析或非参数检验进行组间两两比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对软骨组织病理组织学的影响 正常组关节软骨 HE 染色其软骨细胞形态完整,分布均匀且排列整齐,无同源软骨细胞;模型组软骨层明显变薄,结构不规则且多有裂隙,其中、深层软骨细胞开始萎缩变小且数目明显减少,可见到大量的同源软骨细胞;陈元膏膏摩组和手法对照组均可见软骨表层不平整,中层细胞排列不齐且包含较多的同源软骨细胞,见图 1。模型组 Mankin 评分明显高于正常组 ($P < 0.01$);与模型组比较,陈元膏膏摩组和手法对照组相比也均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 陈元膏膏摩组;D. 手法对照组
图 1 陈元膏膏摩对 KOA 大鼠软骨病理组织学的影响 (HE, $\times 400$)
Fig. 1 Effects of Chenyuan ointment rubbing on cartilage pathological tissue in KOA rats (HE, $\times 400$)

3.2 对 KOA 大鼠血清 NO 和 PGE₂ 的影响 与正常组比较,模型组血清 NO, PGE₂ 含量明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,陈元膏膏摩组及手法对照组血清 NO, PGE₂ 含量明显降低 ($P < 0.01$),2 个治疗组中,陈元膏膏摩组血清 NO, PGE₂ 含量与手法对照组相比有明显降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

3.3 对 KOA 大鼠下肢功能恢复的影响 正常组大

表 1 陈元膏膏摩对 KOA 大鼠软骨病理组织 Mankin 评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 13$)

Table 1 Effects of Chenyuan ointment rubbing on Mankin score of cartilage tissue pathological tissue in KOA rats ($\bar{x} \pm s, n = 13$)

组别	Mankin 评分
正常	-
模型	7.85 \pm 2.33 ¹⁾
陈元膏膏摩	5.08 \pm 2.14 ^{2,3)}
手法对照	5.85 \pm 1.57

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与手法对照组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

表 2 陈元膏膏摩对 KOA 大鼠血清 NO 和 PGE₂ 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 13$)

Table 2 Effects of Chenyuan ointment rubbing on NO and PGE₂ of serum in KOA rats ($\bar{x} \pm s, n = 13$)

组别	NO/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	PGE ₂ / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	7.34 \pm 0.93	7.43 \pm 1.55
模型	8.60 \pm 0.72 ¹⁾	11.04 \pm 1.54 ¹⁾
陈元膏膏摩	6.79 \pm 0.67 ^{2,3)}	5.82 \pm 0.72 ^{2,3)}
手法对照	7.69 \pm 0.71 ²⁾	7.53 \pm 1.54 ²⁾

腿周长及膝关节活动度治疗前后无差别;陈元膏膏摩组、手法对照组大鼠在治疗后大腿周长和膝关节伸直方向活动度与治疗前相比均有明显改善 ($P < 0.05$);而且模型组与陈元膏膏摩组、手法对照组间相比也有显著差异 ($P < 0.01$);其中陈元膏膏摩组和手法对照组组间比较也有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

4 讨论

骨性关节炎早期,各种炎症因子及软骨降解产物可刺激巨噬细胞、滑膜细胞和软骨细胞表达 iNOS,导致 NO 的大量释放^[8]。而产生的 NO 又可进一步促进炎症因子的释放,如此恶性循环就造成了血清和关节液中 NO 浓度升高。高浓度的 NO 可上调基质金属蛋白酶(MMP)的活性^[9],抑制软骨细胞合成软骨基质,增加 II 型胶原裂解,最终抑制软骨细胞的增殖,并协同各种炎症因子增加软骨损害^[10]。同时,NO 浓度过高还可增加血管壁的通透性而引起渗出,导致滑膜肿胀,参与滑膜的充血、渗出等,造成关节腔积液。

PGE₂ 具有持久而广泛的血管扩张和致痛作用,是导致 OA 疼痛的主要原因之一^[11]。PGE₂ 可造成软骨下骨的吸收障碍,影响骨与软骨合成代谢,阻止蛋白聚糖的生化合成,导致 II 型胶原破坏,从而造成关节软骨衰退^[12]。

本实验中模型组 Mankin 评分明显高于其余 3

表 3 陈元膏膏摩对 KOA 大鼠大腿周长及膝关节活动度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 13$)

Table 3 Effects of Chenyuan ointment rubbing on thigh circumference of rats and knee joint mobility in KOA rats ($\bar{x} \pm s, n = 13$)

组别	大腿周长/cm			膝关节伸直方向活动度/度		
	治疗前	治疗后	差值	治疗前	治疗后	差值
正常	7.54 ± 0.36	7.82 ± 0.47	0.32 ± 0.13	143.23 ± 4.56	145.36 ± 5.11	2.38 ± 2.11
模型	6.82 ± 0.55	7.20 ± 0.52 ¹⁾	0.38 ± 0.11	83.85 ± 5.03	119.15 ± 4.28 ¹⁾	35.31 ± 5.25
陈元膏膏摩	7.05 ± 0.56	7.94 ± 0.57 ¹⁾	0.86 ± 0.14 ^{2,3)}	85.00 ± 3.96	140.23 ± 4.25 ¹⁾	55.23 ± 5.45 ^{2,3)}
手法对照	6.94 ± 0.44	7.66 ± 0.41 ¹⁾	0.72 ± 0.12 ²⁾	85.92 ± 4.92	134.39 ± 4.91 ¹⁾	48.46 ± 5.11 ²⁾

注:与治疗前比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与手法对照组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

组,提示笔者已经成功复制出中度 KOA 动物模型;陈元膏膏摩组血清中 NO 和 PGE₂ 的浓度水平明显低于模型组,且与手法对照组相比也具有明显差异,提示陈元膏膏摩疗法可降低 KOA 大鼠血清中 NO 和 PGE₂ 的浓度水平,具有一定的抗炎作用。

股四头肌萎缩是 KOA 最常见和最早发生的临床症状^[13];而手法作为中医治疗 KOA 的特色,可松懈粘连的股四头肌,并通过改善血运来恢复其肌力及肌容积,从而使膝关节的运动力得以恢复平衡^[14]。本实验中的大鼠在造模后也都出现了严重的股四头肌僵硬、萎缩和肌力下降,但在治疗后,手法对照组和陈元膏膏摩组大鼠的大腿周长和关节活动度较模型组都有了显著地提高,并且两组组间也存在明显差异,这提示:与凡士林结合手法对股四头肌的恢复作用相比,陈元膏膏摩可以更好地恢复其关节活动度和肌力,从而更好地改善膝关节的功能。这是因为在先前的结果中,与手法对照组相比,陈元膏膏摩组降低 KOA 大鼠血清中 NO 和 PGE₂ 水平的程度更为显著,从而更好地改善了其大鼠膝关节的疼痛症状,减轻了其膝关节的炎症反应,最终更好地促进了其关节活动度和肌力的恢复。现代医学对骨性关节炎的研究已经深入到分子生物学水平,本实验为初步研究,因此没有设定陈元膏膏摩疗法低、中、高 3 种剂量的分组,今后为更深入的探索膏摩及陈元膏膏摩疗法的治疗机制,笔者将在本研究的基础上,继续开展其他炎症介质如肿瘤坏死因子- α 和转化生长因子- β 以及细胞凋亡和基因等分子水平的研究,希冀为膏摩疗法治疗 KOA 提供更多的实验依据。

[参考文献]

[1] 林木南,刘献祥. 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.
[2] Cuzzocrea S. Role of nitric oxide and reactive oxygen species in arthritis [J]. Curr Pharm Des,2006,12(27):

3551-3570.

[3] McCoy J M, Wicks J R, Audoly L P. The role of prostaglandin E₂ receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. Clin Invest, 2002, 110 (5): 651-658.
[4] 李智,李静. 古代膏摩发展简史[J]. 山东中医药大学学报,2011,5(2):161-165.
[5] 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):623-624.
[6] 股为望. 人类疾病动物模型[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:265.
[7] Mankin H J, Dorfman H, Lippiello L, et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data [J]. J Bone Joint Surg, 1971, 53(3):523-531.
[8] 茅文斌,邵增务. 一氧化氮与骨性关节炎研究进展[J]. 国际骨科学杂志,2006,27(4):232-234.
[9] Abramson S B. Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis [J]. Arthritis Res, 2008, 10(12):1-7.
[10] 孙炜,王吉兴,金大地. 诱导型一氧化氮合酶抑制剂与软骨修复的研究进展[J]. 中华骨科杂志,2001,21(2):119-120.
[11] 王力民,汤慧. 骨性关节炎患者关节囊滑液 MMP-3、PGE₂ 检测的临床意义[J]. 放射免疫学杂志,2010,23(1):60-61.
[12] 王凤龙,江建明,王飞,等. 骨性关节炎体外培养滑膜细胞上清液中前列腺素 E₂ 的表达及意义[J]. 实用医学杂志,2010,26(9):492-494.
[13] Brandt K D, Heilman D K, Slemenda C, et al. Quadriceps strength in women with radiographically progressive osteoarthritis of the knee atosthewith stable radiographic changes [J]. Rheumato, 1999, 26(11): 2431-2437.
[14] 任芳. 膝骨关节炎的治疗研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志,2008,16(4):62-64.

[责任编辑 周冰冰]