

# 独活寄生汤治疗肝肾亏虚型膝骨关节炎患者临床疗效及 关节液代谢组学变化

荣兵<sup>1\*</sup>, 李建<sup>1</sup>, 贾峻<sup>1</sup>, 潘明柱<sup>1</sup>, 陈少青<sup>2</sup>, 孙鹏<sup>1</sup>

(1. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193; 2. 内蒙古民族大学附属医院, 内蒙古通辽 028000)

**[摘要]** **目的:**观察独活寄生汤治疗肝肾亏虚型膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)的临床疗效,并分析经独活寄生汤治疗前后关节液中小分子化合物的变化。**方法:**将 73 例天津中医药大学第一附属医院确诊的 KOA 患者随机分为观察组(42 例)及对照组(31 例),观察组给予独活寄生汤 150 mL/次,2 次/d,口服,对照组给予硫酸氨基葡萄糖胶囊 0.5 g/次,3 次/d,口服,两组患者均治疗 1 个月,以膝关节视觉模拟评分法(visual analogue scale score, VAS),西安大略麦马斯特大学骨关节炎指数评分(The Western Ontario and McMaste Universities, WOMAC),自制膝关节肿胀评分及综合疗效治疗反应评价作为临床疗效判定指标;所有 KOA 患者均在治疗前及治疗后抽取关节液,采用超高效液相色谱仪与主成分分析法(principal components analysis, PCA)分析两组患者治疗前后关节液代谢差异物,并用 EZinfo 2.0 软件进行 PCA 潜在差异生物标记物。**结果:**治疗 1 个月后,两组患者 VAS, WOMAC, 自制膝关节肿胀评分均较治疗前有明显改善( $P < 0.05$ );治疗 1 个月与对照组比较,观察组患者 VAS, WOMAC, 自制膝关节肿胀评分、综合疗效治疗反应评价均明显升高( $P < 0.05$ );与治疗前比较,两组治疗后膝关节液液中泛酸、犬尿氨酸、酪氨酸表达降低,苯甲酸、柠檬酸及脯氨酸表达升高( $P < 0.05$ );与对照组治疗后比较,观察组关节液液中泛酸、犬尿氨酸、酪氨酸表达更低,苯甲酸、柠檬酸及脯氨酸表达更高( $P < 0.05$ ),此外观察组关节液中牛磺酸、 $\beta$ -隐黄素及赖氨酸表达明显升高( $P < 0.05$ )。**结论:**独活寄生汤可减少肝肾亏虚型 KOA 患者关节疼痛、肿胀程度,增加活动范围,改善 KOA 患者生活质量;同时随着肝肾亏虚型 KOA 患者症状的改善,关节液中泛酸、犬尿氨酸、酪氨酸、苯甲酸、柠檬酸、脯氨酸、牛磺酸、 $\beta$ -隐黄素及赖氨酸表达出现变化。

**[关键词]** 独活寄生汤; 膝骨性关节炎; 代谢组学; 三羧酸循环; 牛磺酸

**[中图分类号]** R287 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)23-0159-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017230159

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170907.1103.002.html>

**[网络出版时间]** 2017-09-07 11:03

## Clinical Efficacy of Duhuo Jisheng Tang in Treatment of Patients with Liver and Kidney Deficiency Type Knee Osteoarthritis and Changes in Joint Fluid Metabolism

RONG Bing<sup>1\*</sup>, LI Jian<sup>1</sup>, JIA Jun<sup>1</sup>, PAN Ming-zhu<sup>1</sup>, CHEN Shao-qing<sup>2</sup>, SUN Peng<sup>1</sup>

(1. First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 200193, China;

2. Affiliated Hospital of Inner Mongolia University for the Nationalities, Tongliao 028000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the clinical efficacy of Duhuo Jisheng Tang in the treatment of liver-and-kidney-deficiency type knee osteoarthritis (KOA), and analyze the changes in small molecule compounds in synovial fluid before and after treatment with Duhuo Jisheng Tang. **Method:** A total of 73 patients with KOA diagnosed at the First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine were selected and randomly divided into observation group (42 cases) and control group (31 cases). The observation group was treated with Duhuo Jisheng Tang, 150 mL/time, 2 times a day, for oral administration. The control group was given glucosamine sulfate capsules, 0.5 g/time, 3 times a day, for oral administration. Two groups were treated for

**[收稿日期]** 20170405(009)

**[基金项目]** 内蒙古自治区自然科学基金项目(2016MS08125)

**[通讯作者]** \* 荣兵, 主治医师, 从事脊柱、关节病的发病机制与推拿、药物治疗研究, Tel: 13920937418, E-mail: ZYsunpeng@126.com

a month. Visual analogue scale score (VAS), Western Ontario and McMaste Universities (WOMAC), self-made knee joint swelling score and comprehensive therapeutic response were taken as clinical outcome indexes. Synovial fluid of all of the patients with KOA was extracted before and after treatment. Supernatant liquid chromatograph and component analysis were used to analyze the differences in synovial fluid metabolism between two groups before and after treatment. PCA potential difference biomarkers were analyzed by EZinfo 2.0 software. **Result:** After 1 month of treatment, the scores of VAS, WOMAC and knee swelling of the patients in two groups were significantly alleviated compared with those before treatment ( $P < 0.05$ ). After 1 month of treatment, compared with control group, VAS, WOMAC, knee swelling score, comprehensive treatment response evaluation in observation group were significantly higher ( $P < 0.05$ ). Compared with before treatment, in observation group and control group, the levels of pantothenic acid in the knee joint fluid, the expression of tyrosine, tyrosine and the expression of benzoic acid, citric acid and proline were increased after treatment ( $P < 0.05$ ). Compared with control group, the expressions of pantothenic acid, kynurenine and tyrosine in the synovial fluid in observation group were lower, the expressions of benzoic acid, citric acid and proline were higher ( $P < 0.05$ ), and the expressions of taurine,  $\beta$ -cryptoxanthin and lysine in synovial fluid of observation group were significantly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Duhuo Jisheng Tang could reduce joint pain, swelling degree, and improve the range of activities and the quality of life of patients with liver-and-kidney-deficiency type KOA. At the same time, the expressions of pantothenic acid, kynurenine, tyrosine, benzoic acid, citric acid, proline, taurine,  $\beta$ -cryptoxanthin and lysine in synovial fluid were also changed with the improvement of symptoms in liver-and-kidney-deficiency type KOA patients.

[**Key words**] Duhuo Jisheng Tang; knee osteoarthritis; metabolomics; tricarboxylic acid cycle; taurine

膝骨关节炎(KOA)在临床极为常见,世界卫生组织数据显示,超过 60 岁的人群中 KOA 在男性发病率为 9.6%,女性发病率约为 18%<sup>[1]</sup>。发生的主要原因为关节软骨变性及丢失<sup>[2]</sup>。中医认为,膝骨关节炎属于“骨痹”、“膝痹”范畴,现今社会中老年人发病率日益增高<sup>[3]</sup>,中医认为肝肾亏虚、筋骨不荣是其发病机制之一。独活寄生汤出自《备急千金要方》,由独活、桑寄生、防风、当归等 15 味中药组成,是公认治疗“膝痹”的经典方剂<sup>[4]</sup>,目前已有文献报道,主要以探讨独活寄生汤治疗骨关节病的整体临床疗效或对 KOA 滑膜、软骨组织的作用<sup>[3,5-6]</sup>,缺乏该经典方剂对于膝关节各组织代谢场所——关节液的研究。

代谢组学是除基因组学、转录组学、蛋白质组学外的新兴学科,可通过检测生物体内小分子化合物的表达变化来推测生物体或单个细胞的健康状况<sup>[7]</sup>,具有一定的不可替代性。已有研究证实,骨关节软骨细胞主要通过关节液渗透代谢<sup>[8]</sup>,因此可以推测,关节液的成分变化可在一定程度上反应膝关节炎软骨细胞的健康状况。本研究拟通过观察 KOA 患者膝关节炎视觉模拟评分法(VAS),西安大略麦马斯特大学骨关节炎指数评分(WOMAC)评判经独活寄生汤治疗效果,采用液相色谱质谱联用技术检测

KOA 患者经独活寄生汤治疗前后关节液代谢组学变化,挖掘独活寄生汤治疗 KOA 的深层机制,为独活寄生汤临床应用补充理论依据。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取天津中医药大学第一附属医院收治的 KOA 患者 73 例,病程 2~6 年,平均病程 8.4 月,所有患者无脱落情况。按随机数字法分为观察组与对照组,观察组 42 例,男性 19 例,女性 23 例,年龄( $53.68 \pm 8.49$ )岁,对照组 31 例,男性 14 例,女性 17 例,年龄( $53.19 \pm 6.78$ )岁。两组患者性别、年龄、病程无统计学意义,具有可比性。

**1.2 诊断标准** 中医诊断标准,参照国家中医药管理局《22 个专业 95 个病种中医诊疗方案》<sup>[9]</sup>中肝肾亏虚证候诊断标准,主证,膝关节疼痛,双腿无力、酸软,甚则关节肿大,活动受限;次证,头昏耳鸣,无力、畏寒,肢体肌肉不荣,舌苔薄或薄白,舌红,脉弦细。

西医诊断标准,①参照中华医学会骨科学分会制定的《骨关节炎诊断及治疗指南》<sup>[10]</sup>;②近 1 月内出现膝关节疼痛、肿胀、活动受限症状;③X 射线显示关节间隙狭窄,软骨部分出现硬化,关节缘出现骨赘;④活动时摩擦感;⑤年龄 > 40 岁。具备上述 ①,②或①,③,④,⑤即可诊断。

**1.3 纳入标准** ①所有患者符合《骨关节炎诊断

及治疗指南》<sup>[10]</sup> 诊断标准,双膝发病者按症状较重的一侧进行评价;②符合中医膝痹,西医膝骨关节炎诊断;③入组患者年龄 40~80 岁;④关节肿胀、疼痛症状处于发作期;⑤近 2 个月未服用过非甾体抗炎类药。本研究通过天津中医药大学第一附属医院伦理委员会审查,批号 TYLL2016[K]字 012,所有患者均签署知情同意书。

**1.4 排除标准** ①年龄 <40 岁或 >80 岁者;②患者膝骨关节炎为继发性者;③患者症状处于缓解期者;④有多器官衰竭者;⑤治疗过程中出现严重不良反应者;⑥伴有结缔组织病、恶性肿瘤或自身免疫系统疾病患者;⑦治疗过程中服用其他药物者。

**1.5 仪器及试剂** 甲醇,甲酸(Thermo Fisher 公司,批号分别为 M/4050/16, M/4012/16); Milli-Q 型去离子纯水仪(美国 Millipore 公司); Acquity UPLC System 型超高效液相色谱仪, BEH-C<sub>18</sub> 色谱柱(美国 Acquity 公司); G-2S QTOF 型质谱仪(美国 Waters 公司)。

**1.6 药物制备及治疗方法** 独活寄生汤组成:独活 9 g,桑寄生 6 g,当归 6 g,茯苓 6 g,党参 6 g,熟地黄 6 g,防风 6 g,秦艽 6 g,白芍 6 g,牛膝 6 g,川芎 6 g,制川乌 6 g<sup>(先煎)</sup>,细辛 6 g,甘草 6 g。药物购自天津中医药大学第一附属医院中药房,由天津中医药大学第一附属医院中药制剂室药师王晓鹏鉴定为正品,并根据药物制剂标准流程统一批号生产,批号均为 201608。上述药物 1 剂加水 500 mL 煎取 150 mL,观察组给予独活寄生汤 150 mL/次,口服,2 次/d,均早、晚饭后口服,连续口服 4 周。对照组给予硫酸氨基葡萄糖胶囊 0.5 g/次,3 次/d,口服。两组患者基础治疗均参考《22 个专业 95 个病种中医诊疗方案》<sup>[9]</sup>,《骨关节炎诊断及治疗指南》<sup>[10]</sup>,保证基础治疗的规范性和基线均衡。

**1.7 疗效评定指标** 关节疼痛评定指标采用 VAS 评分作为标准;活动与疼痛的关系及功能障碍采用 WOMAC 评分作为标准<sup>[11]</sup>。膝关节肿胀评定指标自行制定,膝关节皮肤无肿胀,1 分;膝关节轻度肿胀、皮肤纹理变浅,2 分;膝关节中度肿胀、皮肤纹理基本消失、骨性标志不明显,3 分;膝关节重度肿胀、局部皮肤紧绷,4 分。

**1.8 综合疗效指标** 治疗 4 周后向患者发放《综合疗效治疗反应评价表》,并指导患者填写<sup>[12]</sup>。满分 4 分;无任何效果,0 分,治疗效果不明显,1 分;治疗效果不明显,仅为缓解,2 分;大部分症状消失,3 分;症状全部消失,4 分。医生对疾病情况的全面评价,

满分 4 分;无任何效果,0 分,治疗效果不明显,1 分;治疗效果不明显,仅为缓解,2 分;大部分症状消失,3 分;症状全部消失,4 分。各组分别于治疗前、治疗后填写,填写完成后收回。

**1.9 样本收集** 各组患者取仰卧位,常规消毒后铺设消毒巾,分别于治疗前、后行常规膝关节穿刺,并抽取关节液 1 mL,完成后再次消毒并用创可贴封闭针孔。将收集关节液置于 -80 ℃ 冰箱保存,待样品集齐后一次性检测。

### 1.10 代谢产物检测

**1.10.1 超高效液相色谱-质谱联用分析条件** 色谱分析条件:柱温 40 ℃,流动相(A)含 0.1% 甲酸的水溶液;(B)甲醇流动相梯度洗脱(1~3 min,8%~85% B;3~6 min,85%~100% B;6~8 min,100% B;8~9 min,100%~8% B;9~11 min,8% B),流速 0.5 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 10 μL。质谱分析条件:采用正、负离子模式,毛细管电压 2.6 kV,锥孔电压 60 V,离子源、雾化温度分别为 110,470 ℃,壳气流速设定为 900 L·h<sup>-1</sup>;毛细管电压 2.6 kV,设定锥孔电压为 40 V,离子源、雾化温度分别为 70,160 ℃,壳气流速 550 L·h<sup>-1</sup>,亮氨酸脑啡肽做为质谱内标,采用甲酸钠校正质量轴。

**1.10.2 代谢产物分析鉴定** 采用 Masslynx V4.1 软件进行峰提取、峰对齐及归一化处理,并用 EZinfo 2.0 软件进行主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘判别分析潜在在差异生物标记物,根据 VIP (VIP > 1.0)和 P (P < 0.05) 筛选出治疗前后具有差异的生物标志物。通过 HMDB (www. hmdb. cn) 及 METLIN (metlin. scripps. edu) 等精确质量检索数据库,筛选出最有可能的一种或几种化合物。

**1.11 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两两比较采用 *t* 检验,多组之间两两比较采用 SNK-*q* 检验,*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 两组患者治疗前后相关评分比较** 与同组治疗前比较,两组治疗后 VAS, WOMAC 评分均明显降低 (*P* < 0.05);与对照组治疗后比较,观察组治疗后 VAS, WOMAC 评分明显降低 (*P* < 0.05)。见表 1。

**2.2 两组患者治疗前后膝关节肿胀程度变化比较** 与同组治疗前比较,治疗后膝关节肿胀水平明显减轻 (*P* < 0.05);与对照组治疗后比较,观察组膝关节肿胀程度减轻更加明显 (*P* < 0.05)。见表 2。

表 1 两组患者治疗前后 VAS, WOMAC 评分变化比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 VAS and WOMAC scores of patients in two groups before and after treatment ( $\bar{x} \pm s$ ) 分

组别	时间	例数	VAS	WOMAC
观察	治疗前	42	7.16 ± 0.95	55.14 ± 7.22
	治疗后		2.13 ± 0.67 <sup>1,2)</sup>	25.80 ± 5.90 <sup>1,2)</sup>
对照	治疗前	31	7.28 ± 1.45	54.93 ± 6.28
	治疗后		3.63 ± 0.52 <sup>2)</sup>	36.58 ± 4.16 <sup>1)</sup>

注:与同组治疗前比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与对照组治疗后比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ (表 2~6 同)。

表 2 两组患者治疗前后膝关节肿胀程度变化比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Changes in knee joint swelling before and after treatment in two groups ( $\bar{x} \pm s$ ) 分

组别	例数	治疗前	治疗后
观察	42	1.85 ± 0.24	0.39 ± 0.09 <sup>1,2)</sup>
对照	31	1.88 ± 0.31	0.78 ± 0.16 <sup>1)</sup>

2.3 两组患者治疗前后综合疗效评分比较 与对照组比较,观察组患者疗效评价与医生疗效评价均高于对照组 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 3 两组患者治疗前后综合疗效评分比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

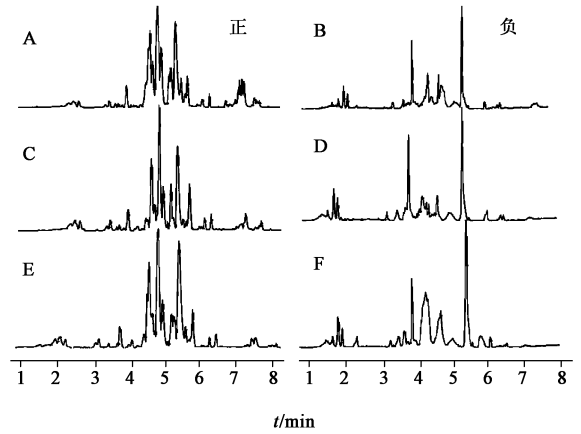
Table 3 Changes in comprehensive curative effect before and after treatment in two groups ( $\bar{x} \pm s$ ) 分

组别	例数	患者疗效评价	医生疗效评价
观察	42	3.94 ± 0.47 <sup>2)</sup>	3.75 ± 0.56 <sup>2)</sup>
对照	31	2.67 ± 0.34	3.19 ± 0.41

2.4 不良反应及安全性评价 除观察组出现 2 例胃部不适,且程度较轻,无需特殊处理;其余入组患者均未发现不良反应,两组受试者治疗前后肝、肾功能及电解质等实验室检测结果均无统计学意义。

2.5 代谢轮廓分析 采用 UPLC-Q-TOF MS 正负离子模式对观察组患者治疗前、后血清进行分析,观察组治疗前、后血清代谢产物分离良好,峰谷清晰。正

离子模式下代谢产物数量及信号强度均大于负离子模式。通过对正、负离子模式下代谢色谱图间进行对比,发现治疗前、对照组治疗后与观察组治疗后存在明显差异,表明检测结果可能具有统计学意义。见图 1。



A, B. 对照组、观察组治疗前; C, D. 对照组治疗后; E, F. 观察组治疗后

图 1 离子色谱模式下正、负离子基峰强度

Fig. 1 Peak intensity of positive and negative ions in ion chromatography

2.6 主要代谢生物标记物的分析 采用 EZinfo 2.0 软件进行 PCA 分析,并用外部模型验证方法排列实验证明模型有效性。在正离子模式 ( $R^2 X = 0.922 8$ ,  $Q^2 = 0.897 4$ ) 和负离子模式 ( $R^2 X = 0.913 5$ ,  $Q^2 = 0.897 3$ ) 下,2 组血清样本本具有明显差异。见图 2,3。

2.7 代谢生物标记物的分析 通过数据库标准图谱比对或标准品对照验证,对照组治疗前后共鉴定出 16 种差异物,其中有效差异物为 6 种(泛酸、苯甲酸、犬尿氨酸、柠檬酸、酪氨酸及亮氨酸),见表 4;观察组治疗前后共鉴定出 26 种差异物,其中有效差异物为 9 种(与对照组相同差异物 6 种,不同差异物分别为牛磺酸、 $\beta$ -隐黄素及赖氨酸),见表 4。与治疗前比较,对照组治疗后泛酸、犬尿氨酸、酪氨酸表达

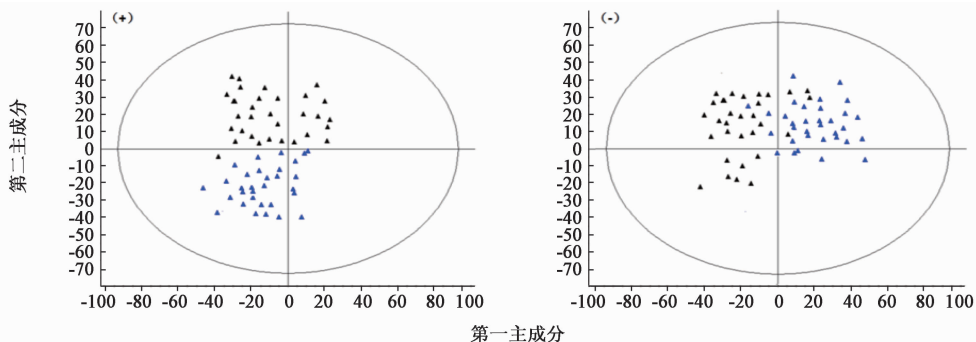


图 2 对照组患者治疗前后血清样本主成分分析

Fig. 2 Principal component analysis on serum samples in control group before and after treatment

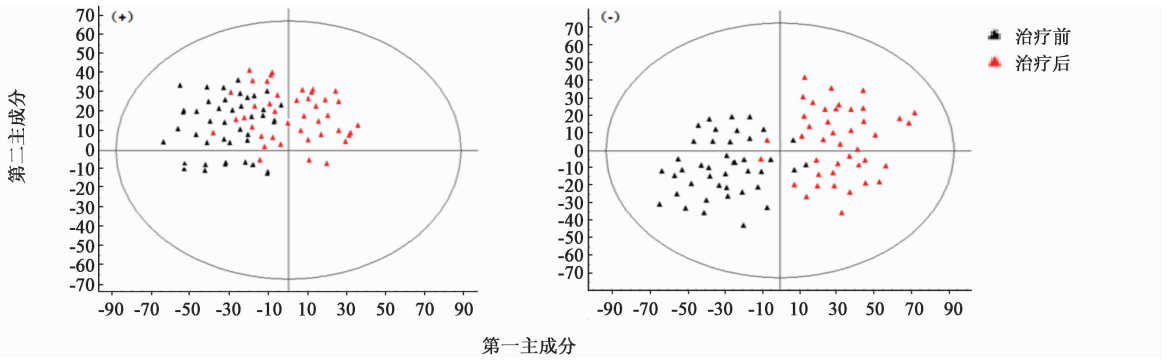


图 3 观察组患者治疗前后血清样本主成分分析

Fig. 3 Principal components analysis on serum samples in observation group before and after treatment

表 4 代谢差异物信息

Table 4 Metabolic information

生物标记物	测定值	理论值	保留时间 /min	化学式
泛酸	218.104 5	219.235 0	4.44	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>5</sub>
苯甲酸	122.029 8	122.121 4	2.37	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>
犬尿氨酸	118.034 7	118.040 0	5.08	C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>
柠檬酸	191.131 1	191.140 0	3.66	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>
酪氨酸	181.189 6	181.189 0	3.16	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>
脯氨酸	131.183 6	131.180 0	1.36	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>
牛磺酸	125.136 7	125.150 0	2.35	C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub> S
β-隐黄素	552.463 6	552.890 0	2.74	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub> O
赖氨酸	146.187 5	146.190 0	4.58	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

降低,苯甲酸、柠檬酸及脯氨酸表达升高 ( $P < 0.05$ );与对照组治疗后比较,观察组泛酸、犬尿氨酸、酪氨酸表达更低,苯甲酸、柠檬酸及脯氨酸表达更高 ( $P < 0.05$ ),见表 5。另外,观察组治疗后与治疗前比较,除上述生物标记物变化外,牛磺酸、β-隐黄素及赖氨酸表达均明显升高 ( $P < 0.05$ ),对照组治疗前后无明显变化。见表 6。

### 3 讨论

随着我国人口结构老龄化严重,KOA 这一老年性疾病已经变成了社会公共健康问题,是影响中老年人独立生活能力的主要因素之一。郑晓辉等<sup>[13]</sup>采用中医生生存质量量表评价 KOA 患者生存质量,研究发现 KOA 患者存在躯体疼痛,生命活力,社会功能、心理健康等多方面问题。KOA 早期症状可表现

表 5 两组患者治疗前后关节液 6 种代谢差异物表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 5 Comparison in expressions of six metabolites in synovial fluid of two groups before and after treatment ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	时间	泛酸	苯甲酸	犬尿氨酸	柠檬酸	酪氨酸	脯氨酸
对照	31	治疗前	38.36 ± 4.68	8.32 ± 1.26	26.73 ± 3.66	5.71 ± 1.03	33.97 ± 5.19	6.37 ± 0.97
		治疗后	18.64 ± 3.14 <sup>1)</sup>	19.27 ± 3.55 <sup>1)</sup>	15.39 ± 2.83 <sup>1)</sup>	26.39 ± 2.88 <sup>1)</sup>	21.27 ± 1.88 <sup>1)</sup>	13.59 ± 2.06 <sup>1)</sup>
观察	42	治疗前	35.89 ± 6.91	8.73 ± 1.33	25.97 ± 4.01	5.93 ± 1.68	32.45 ± 4.39	7.06 ± 0.48
		治疗后	4.36 ± 0.88 <sup>1,2)</sup>	26.89 ± 4.14 <sup>1,2)</sup>	3.46 ± 0.57 <sup>1,2)</sup>	35.49 ± 3.08 <sup>1,2)</sup>	11.06 ± 5.98 <sup>1,2)</sup>	17.08 ± 1.33 <sup>1,2)</sup>

表 6 两组患者治疗前后关节液特有 3 种代谢差异物表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 6 Comparison in expressions of three metabolites in synovial fluid of two groups before and after treatment ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	时间	牛磺酸	β-隐黄素	赖氨酸
对照	31	治疗前	14.99 ± 2.01	2.36 ± 0.53	6.34 ± 0.73
		治疗后	14.37 ± 1.28	2.17 ± 0.28	6.68 ± 0.59
观察	42	治疗前	15.89 ± 2.05	2.08 ± 0.35	6.71 ± 1.85
		治疗后	43.86 ± 5.11 <sup>1,2)</sup>	21.89 ± 4.69 <sup>1,2)</sup>	31.82 ± 4.77 <sup>1,2)</sup>

为活动时隐痛或不适感,随着病情的进展,出现活动时疼痛加重,疼痛性质也可改变为胀痛,严重者可并伴有关节肿胀、肌肉萎缩等症状。中医理论中,肝肾亏虚所致筋骨不荣、易感外邪、气血阻滞是 KOA 的主要内在发病病机,补肾行血代表方剂独活寄生汤是治疗下肢“痹痛”的经典方剂,方中独活、细辛、秦艽、防风长于祛风湿、止痹痛,肉桂散寒邪、温血脉,桑寄生、杜仲、牛膝补肝肾、强筋骨,牛膝可引诸药、血下行,血行痛减,又荣筋骨;党参、茯苓、地黄、芍药、当归、甘草补肾养肝,补血活血,扶助正气。有报道证实,独活寄生汤可降低关节液中白细胞介素(IL)-1 $\beta$ , IL-6 等炎症因子及金属蛋白酶含量<sup>[4,14]</sup>,又可抑制膝关节软骨细胞多条凋亡通路,从而延缓、逆转疾病进展。另有研究报道,独活寄生汤可通过促进软骨细胞再生、抑制软骨细胞衰老等作用起到改善 KOA 症状的作用<sup>[5]</sup>。

本研究发现应用独活寄生汤和硫酸氨基葡萄糖治疗肝肾亏虚型 KOA 后,患者的关节疼痛、肿胀程度与活动范围均有所改善,但独活寄生汤治疗 KOA 患者的关节疼痛、肿胀程度与活动范围改善效果更加明显,这相关研究结果相似<sup>[15]</sup>。另外,本研究还证实独活寄生汤治疗效果更能让患者及医疗工作者满意。

膝关节构造特殊,软骨细胞代谢并不依靠血管及神经,主要通过滑膜分泌的关节液进行渗透代谢,因此分析独活寄生汤对 KOA 患者关节液成分的影响,可能是揭示 KOA 发病机制及独活寄生汤发挥作用的重要环节。代谢组学是检测生物体内整体内源性代谢物变化的学科,可检测生物体内最微小分子的变化<sup>[16]</sup>。研究发现,应用独活寄生汤或硫酸氨基葡萄糖治疗 KOA 均可使关节液中泛酸、犬尿氨酸、酪氨酸表达降低,苯甲酸、柠檬酸及脯氨酸表达升高。泛酸是辅酶的前体,可调控三羧酸循环<sup>[17]</sup>,有报道称,KOA 患者减少泛酸的摄入可加重病情,并出现代谢紊乱<sup>[18]</sup>。柠檬酸是脂肪、蛋白质及糖三大能量物质转化的核心环节,这一复杂的反应被称之为“三羧酸循环”,本研究发现,在 KOA 患者治疗后关节液中柠檬酸表达增高 5~7 倍,推测药物均可能通过一系列复杂的连锁反应影响膝关节软骨细胞能量代谢。犬尿氨酸为色氨酸代谢产物,犬尿氨酸增多可影响蛋白质的合成,抑制细胞增殖<sup>[19]</sup>,可能是加快软骨细胞再生的另一种作用机制,对于缩短患者病程起到一定作用。酪氨酸是人体的必需氨基酸之一,是细胞必不可少的营养物之一,潘哲尔

等<sup>[20]</sup>在家兔 KOA 模型上证实,膝关节软骨细胞缺乏酪氨酸后使细胞中 NO 表达减少,从而加快软骨退变。苯甲酸是苯丙氨酸代谢的重要环节,是马尿酸的上游分子,已有研究证实,苯甲酸表达升高,是泛酸不足的生物标志物,与前文中泛酸降低相佐证两种药物可能通过影响 KOA 患者三羧酸循环达到治疗目的<sup>[21]</sup>。脯氨酸是生物体内天然的渗透压调节剂,可保护、修复细胞膜损伤细胞膜,又减少关节液中氧化自由基的存在,起到稳定细胞膜、抗软骨细胞凋亡的作用<sup>[22]</sup>。对于 KOA 患者关节液成分出现改变,分析其原因认为,硫酸氨基葡萄糖成分单一,独活寄生汤成分复杂,但二者均可影响上述指标的改变,可能是随着肝肾亏虚型 KOA 患者症状的改善,上述指标呈生理性变化;也可能两种药物有共同作用靶点,可影响部分小分子化合物出现表达变化。

另外,独活寄生汤治疗肝肾亏虚型 KOA 后,患者关节液中牛磺酸、 $\beta$ -隐黄素及赖氨酸的表达明显升高,应用硫酸氨基葡萄糖 KOA 患者,治疗后上述化合物并无改变。现已有研究报道,牛磺酸具有抑制骨降解、增加胶原蛋白表达及加快基质形成等作用,并且具有较强的抗氧化作用,并减少多种促炎症因子的表达,具有多种有益于 KOA 患者的生理作用<sup>[23-24]</sup>。 $\beta$ -隐黄素是人体内另一种抗氧化物质,且抗氧化效果极佳,并可通过代谢转化为维生素 A,并且是人体内组织再生的决定性因子<sup>[25]</sup>。赖氨酸可通过增加人体对钙的吸收,促进骨骼生长,加速软骨细胞再生的作用<sup>[26]</sup>。虽然上述化合物经独活寄生汤治疗后出现改变,但中药作用机制复杂,并不能直接认为上述指标和独活寄生汤疗效具有一定相关性,因此本研究结论仅表明随着肝肾亏虚型 KOA 患者症状的减轻,上述指标随之变化。

综上所述,独活寄生汤可有改善肝肾亏虚型 KOA 患者关节疼痛、肿胀、活动受限等症状,并且随着症状的缓解,肝肾亏虚型 KOA 患者膝关节液中泛酸、犬尿氨酸、酪氨酸、苯甲酸、柠檬酸、脯氨酸、牛磺酸、 $\beta$ -隐黄素及赖氨酸出现明显改变。而本研究也有一定局限性,本研究收集样本时间较短、样本量较小,对于患者的长期效果并未跟踪随访。下一步研究,将扩大患者样本量,选取多个时间点观测独活寄生汤对于肝肾亏虚型 KOA 患者临床疗效及关节液代谢成分变化,并观测独活寄生汤的远期疗效。

[参考文献]

[1] Woolf A D, Pfleger B. Burden of major musculoskeletal conditions[J]. Bull World Health Organ, 2003, 81(9):

- 646-656.
- [ 2 ] 张磊,孙德显. 双醋瑞因联合独活寄生汤治疗中老年膝骨性关节炎[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(2):299-302.
- [ 3 ] 兰平文,沈彬. TGF- $\beta$ /BMP 信号通路在骨关节炎软骨细胞退变中的作用机制[J]. 中华关节外科杂志:电子版,2015,9(5):644-647.
- [ 4 ] 冯小波,朱思刚. 独活寄生汤对髌骨软化症髌骨软骨及膝关节液中 IL-1, MMP-1, GAG 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(17):156-160.
- [ 5 ] 车萍,季旭明,梁粟,等. 独活寄生汤对佐剂性关节炎大鼠的抗炎镇痛作用及血清中 5-HTP, 5-HIAA 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(19):170-173.
- [ 6 ] 袁琴,阚卫兵,宋鹏飞,等. 补肾活血方对大鼠膝骨关节炎滑膜细胞  $\beta$ -catenin, MMP-7 的影响[J]. 中国骨伤,2012,25(9):761-765.
- [ 7 ] 李鞠,唐凤英. 原发性肾病综合征患者血清异常代谢通路的代谢组学分析[J]. 山东医药,2016,56(30):1-4.
- [ 8 ] 于清波,邓剑锋,高达新,等. 膝骨关节炎关节液中丙二醛、超氧化物歧化酶在玻璃酸钠注射前后的变化[J]. 中国组织工程研究,2014,18(46):7528-7532.
- [ 9 ] 国家中医药管理局. 22 个专业 95 个病种中医诊疗方案[M]. 北京:中国中医药出版社,2010:129-130.
- [ 10 ] 中华医学会风湿病学分会. 骨关节炎诊断及治疗指南[J]. 中华医学会风湿病分会,2010,14(6):416-419.
- [ 11 ] 解纪惠,刘梅珍,崔丽芹. 清痹汤治疗膝骨关节炎的 VAS 评分 WOMAC 骨关节炎指数的变化[J]. 河北中医学报,2011,26(1):16.
- [ 12 ] 黄肖华,冯英华,李生,等. 疏肝祛瘀方对早中期膝骨关节炎的临床疗效研究[J]. 中药药理与临床,2015,31(4):291-293.
- [ 13 ] 郑晓辉,王建凯,沈泽培,等. 膝骨关节炎患者中医生存质量量表的建立及应用评价[J]. 广州中医药大学学报,2006,23(3):228-231.
- [ 14 ] 陈后煌,邵翔,马玉环,等. 独活寄生汤通过 miRNAs 调控炎症性骨关节炎软骨细胞功能改变的机制探讨[J]. 风湿病与关节炎,2015,7(9):55-59.
- [ 15 ] 张欣欣. 独活寄生汤治疗 52 例膝关节炎性骨性关节炎的临床疗效[J]. 中医临床研究,2012,4(9):65-66.
- [ 16 ] 王曦烨,单晓彤,王伊林,等. 丹参多酚酸盐改善扩张性心肌病心肌功能的作用机制研究[J]. 高等学校化学学报,2016,37(5):844-851.
- [ 17 ] Depeint F, Bruce W R, Shangari N, et al. Mitochondrial function and toxicity: role of the B vitamin family on mitochondrial energy metabolism [ J ]. Chem Biol Interact, 2006, 163(1):94-112.
- [ 18 ] Povorozniuk V V, Grigorieva N V. On the role of nutrition in the development of knee osteoarthritis [ J ]. Gerontologija, 2007, 8(1):26-30.
- [ 19 ] Venqeliene V. Reply to: kynurenic acid and alcohol and cocaine dependence: novel effects and multiple mechanisms? [ J ]. Psychopharmacology, 2017, 234(1):167-168.
- [ 20 ] 潘哲尔,陈乃钱,张纯武,等. 受体酪氨酸激酶抑制剂对兔 OA 模型软骨细胞 NO 的表达及软骨组织形态的影响[J]. 中医正骨,2011,23(5):19-22.
- [ 21 ] Chesna A M, Cox J M, Basso S, et al. Hydrogen-bonded co-crystal structure of benzoic acid and zwitterionic l-proline [ J ]. Acta Crystallogr E Crystallogr Commun, 2017, 73(Pt3):369-371.
- [ 22 ] 廖小欢. 关节液基质金属蛋白酶-和羟脯氨酸水平与 TMD 患者病变程度的关系研究[J]. 海南医学院学报,2016,22(9):886-888.
- [ 23 ] Park S, Kim H, Kim S J. Stimulation of ERK2 by taurine with enhanced alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in osteoblast-like UMR-106 cells [ J ]. Biochem Pharmacol, 2001, 62(8):1107-1111.
- [ 24 ] Huxtable R J. Physiological actions of taurine [ J ]. Physiol Rev, 1992, 72(1):101-163.
- [ 25 ] 盛冉,孙志高,黄巧娟.  $\beta$ -隐黄素的生理活性及其机理研究进展[J]. 食品与机械,2016,32(12):218-223.
- [ 26 ] 魏芹,金虹,任晓妹,等. 羧甲基赖氨酸对人外周血单核细胞破骨样转化的影响[J]. 东南大学学报:医学版,2014,33(3):283-287.

[责任编辑 张丰丰]