

## 活血软膏对兔膝关节损伤所致骨关节炎的影响

沈鸿<sup>1</sup>, 刘婷<sup>1</sup>, 汪芳<sup>1</sup>, 李玉彬<sup>2</sup>, 张东<sup>1</sup>, 回连强<sup>1</sup>, 谢利民<sup>2\*</sup>

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 中国中医科学院 广安门医院, 北京 100053)

**[摘要]** 目的:观察活血软膏对兔膝关节损伤所致骨关节炎的治疗作用和抗炎镇痛作用。方法:采用大耳白兔 60 只,雌雄各半,按体质量随机选取 10 只兔,设为正常组,余下兔在右后腿膝关节的股骨内踝关节面造成关节软骨损伤并剪断前交叉韧带,建立兔膝骨关节炎动物模型。正常组则切开皮肤后立即缝合。手术 2 周后,按体质量区组随机将兔分为模型组,阳性药物扶他林组( $1\text{ cm}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ )组,活血软膏高、中、低剂量组( $6, 3, 1.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ),每组 10 只。测定兔关节腔液及外周血中细胞因子白细胞介素- $1\beta$ (IL- $1\beta$ ),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )及一氧化氮(NO)含量,并对兔关节软骨进行病理组织学检查,研究活血软膏对兔膝关节炎的治疗作用。采用醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性增高模型和角叉菜胶所致大鼠足肿胀的动物模型,测定小鼠腹腔液吸光度和大鼠足肿胀值,研究活血软膏的抗炎作用。采用热水法致小鼠疼痛甩尾和角叉菜胶致大鼠足压痛的动物模型,记录小鼠甩尾时间和大鼠足压痛的时间,研究活血软膏的镇痛作用。选取 SPF 级 ICR 小鼠 120 只,SD 大鼠 60 只,雌雄各半,按体质量区组随机将小鼠分为模型组,扶他林组( $3\text{ cm}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ),活血软膏高、中、低剂量组( $16, 8, 4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ),每组 12 只,大鼠随机分为模型组,扶他林组( $2\text{ cm}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ),活血散高、中、低剂量组( $8, 4, 2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ),每组 10 只。结果:与模型组比较,活血软膏所试剂量,可不同程度地降低兔血清和关节液中的 IL- $1\beta$ , TNF- $\alpha$ , NO 的水平,且高剂量组作用明显( $P < 0.05$ );病理学检查,活血软膏所试剂量,膝关节软骨组织和滑膜组织病变明显轻于模型组( $P < 0.05$ );活血软膏大中剂量组腹腔液浓度值、足肿胀值明显降低( $P < 0.05$ ),小鼠甩尾镇痛作用,活血软膏大剂量组痛阈率明显高于模型组( $P < 0.05$ ),镇痛作用可持续 4 h,活血软膏高、中剂量组的大鼠足压痛值明显升高( $P < 0.05$ )。结论:活血软膏对兔膝关节损伤所致骨关节炎,具有明显的关节修复和抗炎镇痛作用。

**[关键词]** 活血软膏; 膝骨关节炎; 白细胞介素- $1\beta$ ; 肿瘤坏死因子; 一氧化氮

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)18-0077-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20201765

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200619.1012.002.html>

**[网络出版日期]** 2020-6-19 11:35

### Effect of Huoxue Ointment on Osteoarthritis Caused by Knee Joint Injury in Rabbits

SHEN Hong<sup>1</sup>, LIU Ting<sup>1</sup>, WANG Fang<sup>1</sup>, LI Yu-bin<sup>2</sup>, ZHANG Dong<sup>1</sup>, HUI Lian-qiang<sup>1</sup>, XIE Li-min<sup>2\*</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the efficacy and anti-inflammatory and analgesic effect of Huoxue ointment on osteoarthritis of the knee caused by knee joint injury in rabbits. **Method:** A total of 60 big ear white rabbits were selected, with half male and half female. Ten rabbits were randomly selected by weight and set as normal control group. For the remaining rabbits, the injury of articular cartilage and anterior cruciate ligament were caused in the femoral ankle joint surface of the right hind knee joint, so as to establish an animal model of knee osteoarthritis in rabbits. For the normal control group, the skin was cut open and immediately sutured. Two weeks after the operation, rabbits were randomly divided into model control group according to

**[收稿日期]** 20191217(018)

**[基金项目]** 北京市科学技术委员会资助“十病十药”项目(Z161100001816017)

**[第一作者]** 沈鸿,副研究员,从事中药药理及新药研发, Tel:010-84024841, E-mail:hshen@icmm.ac.cn

**[通信作者]** \* 谢利民,主任医师,从事关节疾病中西医结合治疗, Tel:010-88001011, E-mail:drxlm@126.com

body weight, positive voltaren group ( $1 \text{ cm} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), and high-dose ( $6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), medium-dose ( $3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) and low-dose ( $1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) Huoxue ointment groups, with 10 animals in each group. Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in rabbit articular cavity fluid and peripheral blood were measured, contents of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and free radical nitric oxide (NO), rabbit articular cartilage was examined by histopathology, in order to study the efficacy of Huoxue ointment on rabbit knee arthritis. The model of increased permeability of capillaries in abdominal cavity of mice induced by acetic acid and the model of foot swelling of rats induced by carrageenan were used to determine the absorbance of mice peritoneal fluid and the rat foot swelling value, and study the anti-inflammatory effect of huoxue ointment. A total of 120 SPF ICR mice and 60 SD rats were selected, with half male and half female. The mice were randomly divided according to body weight into model control groups, positive Voltaren group ( $3 \text{ cm} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), and high-dose ( $16 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), medium-dose ( $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), low-dose ( $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) Huoxue ointment groups, with 12 animals in each group. The rats were randomly divided into the model control group, positive voltaren group ( $2 \text{ cm} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), and high-dose ( $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), medium-dose ( $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), low-dose ( $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) Huoxue ointment groups, with 10 animals in each group. **Result:** The tested dose of Huoxue ointment, the levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and NO in rabbit serum and joint fluid were decreased to varying degrees, and the effect was significant in the high-dose group ( $P < 0.05$ ). According to the pathological examination, the tested dose of Huoxue ointment, knee cartilage and synovial tissue lesions were significantly lower than those of the model control group ( $P < 0.05$ ), the value of peritoneal fluid concentration and the foot swelling in medium and high-dose Huoxue ointment groups were significantly lower than those in the model control group ( $P < 0.05$ ). The analgesic effect of tail shaking in mice, and the pain threshold rate of the high-dose Huoxue ointment group were significantly higher than those of the model control group ( $P < 0.05$ ), the analgesic effect lasted for 4 hours, the foot tenderness of rats in the large and medium-dose Huoxue ointment groups was significantly higher than that in the model control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Huoxue ointment has obvious joint repair and anti-inflammatory and analgesic effects on osteoarthritis of knee caused by knee joint injury in rabbits.

**[Key words]** Huoxue ointment; knee osteoarthritis; interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ); tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); nitric oxide(NO)

膝骨关节炎(KOA)是以膝关节软骨的变性、破坏及骨质增生为特征的慢性关节病<sup>[1]</sup>,临床上以关节肿痛、骨质增生及活动受限为主要症状。现代医学认为KOA发病与年龄、性别、职业、种族、体质量、遗传及过量运动等因素有关,发病率逐年上升,临床上缺乏有效的西药治疗,已上市中药品种,存在一定的局限性,亟需有效的治疗药物。活血软膏来源于临床经验方,原方出自于中国中医科学院广安门医院名老中医杜自明先生的活血散,是该院第一批院内制剂,具有温经散寒祛湿,活血消肿止痛功能。临床应用于KOA的治疗,有近60年历史。大量的临床验证证实,该方疗效确切,患者乐于接受,可以避免口服药物治疗KOA的副作用及手术治疗的风险。但原处方药味较多,剂型是外用散剂,存在着携带使用不便,用量大,且药物利用不充分等问题。为此,本研究团队对活血散处方进行了优化,经临床实践筛选,得到精简的活血软膏处方,在

治疗KOA取得较好的临床疗效<sup>[2]</sup>。通过对活血软膏制剂工艺、质量标准、药效学 and 安全性研究,为其今后的研发提供了可行性。本研究利用动物实验研究活血软膏对膝关节损伤所致兔KOA模型、醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性增高、小鼠热水法致小鼠疼痛甩尾、角叉菜胶致大鼠足肿胀及压痛的影响,探讨其治疗KOA的作用及可能的机制。

## 1 材料

**1.1 受试样品** 活血软膏,由羌活、独活、乳香、没药、香附等中药组成,药材经水浸泡后,采用提取挥发油加水煎煮、减压浓缩的方法,制成每克软膏含生药2.3 g( $2.3 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ )的中药制剂,由中国中医科学院广安门医院大兴制剂中心提供,批号20171126。制剂的质量标准和稳定性由中国中医科学院中药研究所青蒿素中心张东副研究员负责,对本品中独活、香附等药材,建立了薄层色谱鉴别方法,对本品中蛇床子素含量建立了高效液相色谱的测定方法,

确保了活血软膏的质量可控性。

**1.2 动物** 日本大耳白兔,体质量2.5~2.7 kg,购自北京金牧阳实验动物养殖有限责任公司,许可证号为SYXK(京)2016-0013。ICR小鼠,体质量19~21 g和SD大鼠,体质量150~170 g,均由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号分别为SYXK(京)2013-0035和SCXK(京)2016-0011。动物饲养在屏障环境,实验动物使用许可证号SYXK(京)2008-0023。以上所有动物的给药剂量,是根据人与动物体表面积折算的等效剂量,经皮给药。所有动物实验部分均符合中国中医科学院中药研究所动物伦理委员会要求。

**1.3 试剂** 扶他林软膏(北京诺华制药有限公司,批号vp0678 201909);伊文思兰(上海化学试剂采购供应站试剂厂,批号);冰乙酸(北京化工厂,批号980219);脱毛膏NAIT Hair Remover lotion(美国奈尔公司,批号LL6125);白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),一氧化氮(NO)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海泛柯实业有限公司,批号分别为PI1846-003R, PT1846-142R, FN1846-073R);苏木素-伊红(HE)染色液(上海信帆生物科技有限公司提供,批号20180426)。

**1.4 仪器** Sartorius BSA 3202S-CW型电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];YLS-3E型大鼠压痛仪(济南益延科技发展有限公司);PV-200型足趾容积测量仪(成都泰盟科技有限公司);Thermo Varios Kan Flash型多功能酶标仪(美国热电公司);DR-HW-2型电热恒温水浴锅(北京医疗设备厂);自动ASP300型脱水机,DM2500型显微数字照像生物显微镜(德国Leica仪器公司)。

## 2 方法

### 2.1 活血软膏对兔膝关节损伤所致KOA的影响

取大耳白兔60只,雌雄各半,随机选取兔10只,设为正常组,余下兔进行造模,在兔右后腿膝关节的股骨内踝关节面造成关节软骨损伤并剪断前交叉韧带后,逐层缝合切口,纱布包裹伤口<sup>[3-4]</sup>。正常组则切开皮肤后立即缝合。手术结束2周后,将兔随机分为模型组,扶他林组(1 cm $\cdot$ kg<sup>-1</sup> $\cdot$ d<sup>-1</sup>),活血散高、中、低剂量组(6,3,1.5 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup> $\cdot$ d<sup>-1</sup>)。经皮给药,连续6周。在给药结束当日晚上,兔禁食禁水12 h。次日早上,所有兔称质量,耳静脉取血后,空气栓塞处死动物,对兔膝关节进行解剖,抽取关节液,对兔关节腔液及外周血中IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , NO的水平采用ELISA进行检测。同时对兔关节软骨进行HE染色

观察,取膝关节放入10%甲醛固定液中,作为病理标本。病理观察软骨形态、组织结构、细胞数量和损伤程度,并采用Mankin's法对关节软骨组织进行评分,评价其损伤程度。

### 2.2 活血软膏的抗炎作用

**2.2.1 对小鼠毛细血管通透性增高的影响<sup>[5]</sup>** 取ICR小鼠60只,按体质量随机分为模型组,扶他林组(3 cm $\cdot$ kg<sup>-1</sup> $\cdot$ d<sup>-1</sup>);活血软膏高、中、低剂量组(16,8,4 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup> $\cdot$ d<sup>-1</sup>);每组12只。各组经皮给药,模型组涂抹赋形剂,其他各组经皮涂抹不同的药物,每日给药1次,连续给药4 d。于末次药后60 min,各组均腹腔注射1%冰乙酸生理盐水溶液,于注射冰乙酸生理盐水溶液后30 min,所有动物尾静脉注射0.5%伊文思兰溶液,20 min后脱颈椎处死。收集腹腔液,用多功能酶标仪比色,读取吸光度 $A$ 。并以不同浓度的伊文思兰溶液为标准,绘制标准曲线,计算腹腔中伊文思兰的含量。

**2.2.2 对角叉菜胶所致大鼠足肿胀的影响<sup>[5]</sup>** 取SD大鼠60只,按体质量随机分为正常组,模型组,扶他林组(2 cm $\cdot$ kg<sup>-1</sup> $\cdot$ d<sup>-1</sup>);活血软膏高、中、低剂量组(8,4,2 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup> $\cdot$ d<sup>-1</sup>)剂量组;每组10只。除正常组、模型组涂抹赋形剂外,其他各组经皮涂抹不同的药物,每日给药1次,连续给药4 d。于末次药后1 h,以1%角叉菜胶致炎,分别测量致炎前后1,2,4,6 h大鼠足跖容积。肿胀率=(致炎后足跖容积-致炎前足跖容积)/致炎前足跖容积 $\times$ 100%,抑制率=(正常组平均肿胀率-给药组平均肿胀率)/正常组平均肿胀率 $\times$ 100%

### 2.3 活血软膏的镇痛作用

**2.3.1 对热水所致小鼠疼痛(甩尾)的影响<sup>[6]</sup>** 取ICR小鼠60只,将小鼠尾尖3 cm侵入48 $^{\circ}$ C恒温水浴锅中,记录其甩尾的潜伏期为痛阈指标,测2次(间隔10 min),求其平均值,取平均值 $>$ 5 s和 $<$ 30 s的小鼠纳入分组。24 h后进行实验,取合格小鼠随机分为正常组,扶他林组(3 cm $\cdot$ kg<sup>-1</sup> $\cdot$ d<sup>-1</sup>);活血软膏高、中、低剂量组(16,8,4 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup> $\cdot$ d<sup>-1</sup>)剂量组;每组12只。除正常组涂抹赋形剂外,其他各组均经皮涂抹不同的药物,每日给药2次,连续给药4 d。于末次药后1,2,4 h,测定各组小鼠的甩尾潜伏期的变化。药前平均痛阈=(第1次痛阈+第2次痛阈)/2,痛阈提高率=(给药后痛阈-药前平均痛阈)/药前平均痛阈 $\times$ 100%

**2.3.2 对角叉菜胶所致大鼠足压痛的影响<sup>[7]</sup>** 大鼠分组和给药方法同大鼠抗炎实验2.2.2项,于末次药

后1 h,以1%角叉菜胶致炎,用Randall-Selitto反应侧痛仪,测定致炎前大鼠的基础痛阈及药后1,2,4,6 h的压力缩足反射阈。

**2.4 统计学分析** 采用SPSS 20.0进行数据统计,数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,比较采用单因素方差法进行处理,组间两两比较,方差齐时用LSD方法分析,方差不齐时用Dunnetts方法分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。对KOA兔血清和关节液中IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$ ,NO水平及活血软膏的抗炎作用、镇痛作用

进行统计。

### 3 结果

**3.1 对KOA兔血清和关节液中IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$ ,NO水平的影响** 与正常组比较,模型组兔血清和关节液中IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$ ,NO的水平明显升高( $P<0.05$ );与模型组比较,活血软膏高、中剂量组明显降低兔血清和关节液中IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$ ,NO的水平( $P<0.05$ ),活血软膏低剂量组明显降低兔血清中TNF- $\alpha$ ,NO的水平( $P<0.05$ )。见表1。

表1 活血软膏对KOA兔血清和关节液中IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$ ,NO水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 1 Effect of Huoxue ointment on IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$ ,NO in KOA rabbit of serum and joint fluid( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IL-1 $\beta$ /μg·L <sup>-1</sup>		TNF- $\alpha$ /μg·L <sup>-1</sup>		NO/μmol·L <sup>-1</sup>	
		血清	关节液	血清	关节液	血清	关节液
正常	-	14.18±3.77	15.84±1.91	132.15±17.07	138.55±29.52	8.21±1.11	7.85±1.01
模型	-	20.19±2.12 <sup>1)</sup>	19.82±2.06 <sup>1)</sup>	181.73±24.32 <sup>1)</sup>	188.00±31.02 <sup>1)</sup>	9.69±1.21 <sup>1)</sup>	9.65±1.19 <sup>1)</sup>
扶他林	1 cm	17.21±2.72 <sup>2)</sup>	17.64±2.58 <sup>2)</sup>	154.23±32.82 <sup>2)</sup>	142.05±31.22 <sup>2)</sup>	8.45±1.28 <sup>2)</sup>	8.12±1.54 <sup>2)</sup>
活血软膏	6.0	17.07±2.53 <sup>2)</sup>	16.93±2.01 <sup>2)</sup>	151.18±20.14 <sup>2)</sup>	153.41±27.59 <sup>2)</sup>	8.11±1.73 <sup>2)</sup>	8.28±1.50 <sup>2)</sup>
	3.0	18.43±2.37	16.04±3.21 <sup>2)</sup>	157.79±19.26 <sup>2)</sup>	157.00±25.10 <sup>2)</sup>	8.33±1.58 <sup>2)</sup>	8.23±1.49 <sup>2)</sup>
	1.5	17.89±3.61	18.00±2.66	156.73±25.86 <sup>2)</sup>	166.50±23.97	7.78±1.08 <sup>2)</sup>	9.71±1.79

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ (表1~6,8同)。

**3.2 对KOA兔膝关节病理学变化的影响** 病理切片可见,正常组软骨光滑,表层软骨细胞排列整齐,软骨基质无黏液变性,潮线完整,无滑膜和血管增生。模型组兔软骨和滑膜病变严重,表现为表层软骨细胞重度增生,排列重度紊乱,软骨基质重度黏液变性,潮线模糊,滑膜下血管重度增生,有中等量一多量的肉芽组织形成,但未见炎细胞浸润。扶他林组和活血散高剂量组,兔软骨和滑膜病较轻,表现为表层软骨细胞轻度增生,扶他林组有个别出现轻度软骨细胞排列紊乱,而活血散大剂量组无软骨细胞排列紊乱现象发生,潮线完整。软骨基质有轻度黏液变性,软骨细胞无缺失,高剂量组滑膜血管无增生,扶他林组个别动物出现滑膜血管轻度增生的现象,有少量的肉芽组织形成,但未见炎细胞浸润。活血软膏中、低剂量组兔,有少量动物出现中等程度的软骨和滑膜病变,软骨细胞增生,排列较紊乱,但层次可区分,潮线完整,基质轻度黏液变性,软骨细胞有轻度缺失,血管和滑膜有中度有增生,少量肉芽组织形成,其他大部分动物病变程度较轻。见表2,图1。

### 3.3 活血软膏的抗炎作用

**3.3.1 对小鼠毛细血管通透性增高的影响** 与模型组比较,活血软膏高、中剂量组明显降低毛细血

表2 活血软膏对兔KOA膝关节Mankin's评分比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 Effect of Huoxue ointment on Mankin's score comparison of rabbit KOA of knee joint( $\bar{x}\pm s$ ) 分

组别	n	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	软骨组织	滑膜组织
模型	9	-	14.11±4.11 <sup>1)</sup>	5.33±1.32 <sup>1)</sup>
扶他林	10	1 cm	2.00±1.05 <sup>2)</sup>	2.60±1.51 <sup>2)</sup>
活血软膏	10	6.0	2.90±1.73 <sup>2)</sup>	3.60±1.90 <sup>2)</sup>
	10	3.0	2.60±2.67 <sup>2)</sup>	3.20±2.53 <sup>2)</sup>
	10	1.5	7.90±5.28 <sup>2)</sup>	3.00±2.45 <sup>2)</sup>

注:正常组膝关节Mankin's评分为0。

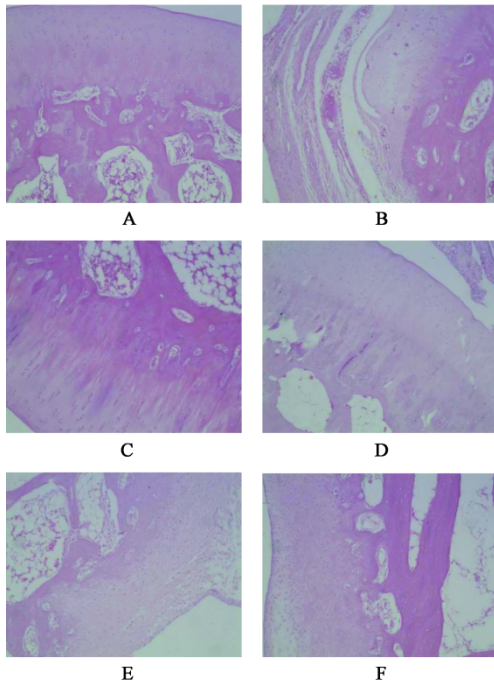
管通透性( $P<0.05$ )。见表3。

表3 活血软膏对小鼠毛细血管通透性增高的影响( $\bar{x}\pm s, n=12$ )

Table 3 Effect of Huoxue ointment on increased capillary permeability in mice( $\bar{x}\pm s, n=12$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	浓度值/mg·L <sup>-1</sup>
模型	-	17.65±6.58
扶他林	3 cm	9.86±5.28 <sup>2)</sup>
活血软膏	16.0	11.25±4.11 <sup>2)</sup>
	8.0	13.01±4.37 <sup>2)</sup>
	4.0	15.16±5.24

**3.3.2 对角叉菜胶所致大鼠足肿胀的影响** 与正常组比较,模型组不同时间大鼠足肿胀明显升高( $P<0.05$ );与模型组比较,活血软膏高、中剂量组明



A. 正常组; B. 模型组; C. 扶他林组; D. 活血软膏高剂量组; E. 活血软膏中剂量组; F. 活血软膏低剂量组

图1 活血软膏对兔KOA膝关节病理组织学的影响(HE, ×100)

Fig. 1 Effect of Huoxue ointment on histopathology of rabbit KOA of knee joint(HE, ×100)

显降低不同时间大鼠足肿胀( $P<0.05$ )。见表4。

### 3.4 活血软膏的镇痛作用

#### 3.4.1 对热水所致小鼠疼痛(甩尾)的影响 与正

常组比较,活血软膏高剂量组明显升高1,2,3,4 h药后痛阈提高率,活血软膏中剂量组明显升高1,2 h药后痛阈提高率,活血软膏低剂量组明显升高2 h药后痛阈提高率( $P<0.05$ )。见表5。

3.4.2 对角叉菜胶所致大鼠足压痛的影响 与正常组比较,模型组1,2,4 h大鼠药后压痛值明显降低( $P<0.05$ );与模型组比较,活血软膏高、中、低剂量组明显升高1,2,4 h大鼠药后压痛值,活血软膏高剂量组明显升高6 h大鼠药后压痛值( $P<0.05$ )。见表6。

## 4 讨论

KOA发病率随年龄增加而增高,迁延日久可影响负重及行走,甚至可致残,是一种长期危害人类健康的骨关节疾病<sup>[8]</sup>。据报道,随着我国人口老龄化的发展,60岁以上人群中骨关节炎患病率为20%,而其中KOA患病率为78.5%<sup>[9]</sup>,据世界卫生组织估计KOA使60岁以上人群中至少10%的人丧失劳动能力<sup>[10]</sup>。目前西医对KOA尚无特异性药物治疗,临床多采用非甾体抗炎药、镇痛药、皮质激素等缓解症状,但存在严重不良反应,如胃肠道刺激和心血管病等<sup>[4]</sup>。手术治疗是以人工关节置换术为主要治疗手段,但患者的经济成本较高,并有可能发生严重的并发症,如假体周围组织感染、人工关节松动、深静脉栓塞和肺栓塞等<sup>[2]</sup>。传统的中医药在治疗KOA方面优势显著,在减轻临床症状、调节身

表4 活血软膏对角叉菜胶所致大鼠足肿胀的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	1 h	2 h	4 h	6 h
正常	-	0.07±0.19 <sup>1)</sup>	0.01±0.20 <sup>1)</sup>	0.08±0.22 <sup>1)</sup>	0.02±0.24 <sup>1)</sup>
模型	-	0.41±0.19	0.49±0.21	0.46±0.19	0.40±0.27
扶他林	2 cm	0.18±0.20 <sup>1)</sup>	0.26±0.16 <sup>1)</sup>	0.20±0.10 <sup>1)</sup>	0.16±0.21 <sup>1)</sup>
活血软膏	8.0	0.18±0.20 <sup>1)</sup>	0.23±0.14 <sup>1)</sup>	0.14±0.27 <sup>1)</sup>	0.15±0.16 <sup>1)</sup>
	4.0	0.17±0.10 <sup>1)</sup>	0.24±0.18 <sup>1)</sup>	0.21±0.16 <sup>1)</sup>	0.26±0.24
	2.0	0.26±0.24	0.31±0.36 <sup>1)</sup>	0.42±0.46	0.40±0.25

表5 活血软膏对小鼠甩尾的影响

Table 5 Effect of Huoxue ointment on tail shaking in mice

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	药后痛阈提高率/%				
		1 h	2 h	3 h	4 h	6 h
正常	-	5.56	7.37	7.12	6.87	7.26
扶他林	3 cm	35.40 <sup>1)</sup>	38.81 <sup>1)</sup>	50.59 <sup>1)</sup>	54.12 <sup>1)</sup>	24.28
活血软膏	16.0	46.70 <sup>1)</sup>	76.97 <sup>1)</sup>	51.96 <sup>1)</sup>	44.59 <sup>1)</sup>	16.57
	8.0	41.02 <sup>1)</sup>	50.28 <sup>1)</sup>	31.92	33.54	12.61
	4.0	13.90	42.71 <sup>1)</sup>	36.02	21.08	9.65

表 6 活血软膏对角叉菜胶所致大鼠足压痛的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 6 Effect of Huoxue powder ointment on rat foot tenderness induced by carrageen vegetable glue( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	药后压痛值/g			
		1 h	2 h	4 h	6 h
正常	-	421.87±107.97 <sup>1)</sup>	471.75±124.31 <sup>1)</sup>	438.74±66.06 <sup>1)</sup>	413.45±48.02
模型	-	183.72±15.14	187.40±23.34	177.44±18.75	363.92±40.03
扶他林	2 cm	481.93±155.89 <sup>1)</sup>	421.11±64.86 <sup>1)</sup>	491.45±94.95 <sup>1)</sup>	432.57±104.56 <sup>1)</sup>
活血软膏	8.0	472.73±93.73 <sup>1)</sup>	489.23±90.99 <sup>1)</sup>	501.06±79.74 <sup>1)</sup>	452.50±44.77 <sup>1)</sup>
	4.0	407.10±85.27 <sup>1)</sup>	417.87±58.97 <sup>1)</sup>	425.07±62.84 <sup>1)</sup>	405.11±55.79
	2.0	363.33±205.58 <sup>1)</sup>	351.00±45.10 <sup>1)</sup>	379.72±72.07 <sup>1)</sup>	377.54±59.46

体机能、延缓或减轻、消除病症等方面有较好的疗效。KOA 属中医学“痹证”“骨痹”范畴,多为正气虚弱,肝肾亏虚,筋骨失养,风寒湿邪痹阻经络而发病。其发病根本原因是肾虚,关键因素是瘀血阻络<sup>[11]</sup>。因此,中医药治疗 KOA,以活血通络止痛、补益肝肾、祛风散寒除湿为治则<sup>[12]</sup>,已在临床上广泛应用。徐颖鹏等<sup>[13]</sup>研究发现,中药外治治疗 KOA 近期疗效优于西药,外用药可直接作用于患病部位,经皮吸收,起到改善血液循环,活血通络镇痛的作用<sup>[14-15]</sup>。包芸等<sup>[16]</sup>采用痹痛液,对下肢及双足进行浸泡,治疗 KAO,总有效率为 92.5%,明显优于口服镇痛消炎对照组的药物(美洛昔康)。李永昭<sup>[17]</sup>自拟中药骨痹洗方,处方由生草乌、川草乌、桂枝、海桐皮等中药组成,治疗 KOA 患者 300 例,结果痊愈 175 例,显效 62 例,有效 51 例,总有效率为 96%。郝巍<sup>[18]</sup>用活血化瘀中药外洗治疗 KOA 患者 46 例,临床效果显著,其中临床控制 16 例,显效 17 例,有效 12 例,无效 1 例,总有效率为 97.8%。

现代研究认为,KOA 病变机制与人体关节内应力平衡失调有关<sup>[19]</sup>,原因在于细胞因子引起了关节软骨降解,细胞因子是 KOA 软骨组织炎性破坏降解的重要介质,它可以抑制软骨组织成分的合成,也可以参与软骨组织的破坏分解,使关节周围软组织萎缩、粘连,如长期得不到改善而导致发病<sup>[20-22]</sup>。药理研究表明,细胞因子如 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  等,可特异性作用于软骨细胞和滑膜细胞,影响胶原蛋白和蛋白多糖的合成,从而导致关节软骨的破坏<sup>[23-25]</sup>。另外, KOA 中自由基代表物 NO, 氧自由基等<sup>[26]</sup>,也是抑制软骨细胞 DNA, 胶原以及基质蛋白多糖合成的重要因素,能促进胶原和基质蛋白多糖的降解,也可以引起软骨细胞膜性结构的损伤。邵敏<sup>[27]</sup>运用兔软骨细胞培养技术研究发现,补肾活血中药能阻止氧自由基的生成,抑制一氧化氮合酶(NOS)的活性,减少 NO 生成,阻止 NO, 氧自由基对软骨细胞

结构的损伤及破坏。朱太咏等<sup>[28]</sup>运用兔 KOA 模型研究发现,提高兔血清中超氧化物歧化酶(SOD)活性,降低兔血清中脂质过氧化的产物丙二醛(MDA), NO 的含量;可起到保护关节软骨,减轻其病理改变,延缓关节软骨退变的作用。KOA 产生的直接因素是外伤磨损,赵定麟等<sup>[29]</sup>通过建立兔退行性 KOA 的动物模型实验研究,发现机体在生长发育停止后,在自然退变基础上,任何增加关节负荷、强度、频率的因素,都可导致 KOA 的发生发展,出现软骨细胞变性,甚至坏死等 KOA 症状。本研究采用兔膝关节损伤所致 KOA 的动物模型,模拟了机体 KOA 发生发展的过程,研究结果显示,活血软膏高、中剂量组,能明显降低兔外周血液和关节液中 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , NO 的水平,与模型组比较,具有统计学意义。病理学观察,给药组兔膝关节软骨组织和滑膜组织病变程度明显轻于模型组,说明活血软膏具有修复兔膝骨关节损伤的作用。作用机制可能与降低兔血液和关节液中细胞因子 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  及 NO 的水平有关,从而减轻了关节软骨及滑膜的病理损伤。KOA 疼痛的主要原因,是由于关节内应力平衡失调造成骨内高压而引起的<sup>[30-32]</sup>, BADALAMENTE 等<sup>[33]</sup>研究发现骨内压增高后会伴随着毛细血管增生,毛细血管的增生会促进神经纤维的生长,由于神经纤维的作用,导致骨内血管的神经反应而产生疼痛。KOA 患者临床表现是关节红肿,疼痛,活动不便等炎症反应。运用中药活血化瘀的功效,在临床上多用于炎症消肿,疼痛缓解等疾病治疗,这是中药抗炎镇痛的作用机制之一,也是中药治疗 KOA 的作用机制之一。活血软膏能显著抑制小鼠毛细血管通透性增高及大鼠足跖炎性肿胀,提高小鼠甩尾痛阈率和大鼠足压痛值,说明活血软膏具有明显的消炎镇痛作用。活血软膏可促进患处血液运行、毛细血管扩张和新陈代谢,对抑制局部组织的炎症性渗出、水肿吸收,疼痛减

轻<sup>[34]</sup>,起到了明显的治疗作用,有利于损伤组织的修复。说明活血软膏的消炎镇痛作用,可能是其治疗KOA的作用机制之一。

综上所述,本研究提示活血软膏具有修复兔膝关节损伤的作用,以及较好的抗炎、镇痛作用,为临床进一步应用提供了参考和依据。

[参考文献]

[1] 中华医学会风湿病学分会. 骨关节炎诊断及治疗指南[J]. 中华风湿病学杂志, 2010, 14(6): 2887-2888.

[2] 李玉彬, 谢利民, 于潼, 等. 活血散精筒方治疗膝关节骨关节炎的临床疗效研究[J]. 中国全科医学, 2018, 21(19): 2357-2360.

[3] 吴剑. 栀子浸膏治疗兔膝骨性关节炎的实验研究[D]. 武汉: 三峡大学, 200903.

[4] 乙军, 周业庭, 潘武等. 独活挥发油关节腔注射对实验性兔膝骨性关节炎的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2014, 13(20): 1670-1672.

[5] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 305, 364.

[6] 徐叔云, 卞如廉, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 906-916.

[7] 李习雄, 胡冠英, 苗维纳. 胆舒胶囊抗炎镇痛作用的实验研究[J]. 湖南中医杂志, 2016, 32(4): 163-165.

[8] 董华, 韩锁, 董清平. 髌周环刺配合中药熏洗治疗膝关节炎60例[J]. 中医药信息, 2009, 26(6): 96-97.

[9] 杨峰. 中医治疗膝关节炎性进展的分析[J]. 中国医药指南, 2012, 10(10): 638-639.

[10] LIDREN L. The global economic and health care burden of musculoskeletal disease [J]. J Rheumatol Suppl, 2003, 67: 4-5.

[11] 李福儒. 老年膝骨关节炎的临床研究进展[J]. 中西医结合心血管病杂志: 电子版, 2014, 2(3): 133-135.

[12] 中国中医药研究促进会骨科专业委员会, 中国中西医结合学会骨伤科专业委员会关节工作委员会. 膝骨关节炎中医诊疗专家共识[J]. 中医正骨, 2015, 27(7): 4-5.

[13] 徐颖鹏, 谢利民, 王文岳. 中药外治与西药治疗膝骨关节炎疗效及安全性 Meta 分析[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(19): 2977-2984.

[14] 白雪, 王志强, 刘杰, 等. 关节镜下关节清理微创微骨折术后配合运动疗法治疗中老年膝骨关节炎临床疗效观察[J]. 中国矫形外科杂志, 2011, 19(5): 435-438.

[15] 刘小立, 孟庆云. 应重视老年膝骨性关节炎疼痛的诊疗[J]. 实用疼痛学杂志, 2010, 6(2): 85-87.

[16] 包芸, 包毅敏, 咏梅. 痹痛液药浴治疗膝骨性关节炎临床疗效观察[J]. 内蒙古中医药, 2008, 27(2): 7-8.

[17] 李永昭. 中药熏洗治疗膝关节炎300例[J]. 中国中医药现代远程教育, 2010, 8(14): 25.

[18] 郝巍. 活血化瘀方外洗治疗膝关节炎46例临床观察[J]. 河北中医, 2013, 35(12): 1791-1792.

[19] 方斌, 刘文刚, 赵自明, 等. 参麦注射液关节内注射治疗兔膝骨关节炎的实验研究[J]. 风湿病与关节炎杂志, 2013, 2(8): 27-30.

[20] FERNANDES J C, MARTEL-PELLETIER J, PELLETIER J P. Theroleof cytokines in osteoarthritis pathophysiology [J]. Biorheology, 2002, 39 (1/2) : 237-246.

[21] 郝一勇, 卫小春. 膝关节液透明质酸含量与关节软骨损伤的关系[J]. 中国骨伤, 2004, 1(6): 321-324.

[22] 王国文, 潘海乐, 曲波, 等. 参麦注射液对骨关节炎模型动物关节软骨胶原含量的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2001, 9(2): 14-16.

[23] 蒋云霞, 胡志俊, 唐占英, 等. 益气化瘀补肾方对兔膝骨关节炎关节软骨细胞胶原和基质金属蛋白酶 mRNA 表达的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2013, 27(1): 74-77.

[24] 廖怀章, 游叶平, 何乐善, 等. 膝骨痹康胶囊对膝骨关节炎大鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、转化生长因子- $\beta_1$ 的影响[J]. 中医正骨, 2011, 23(10): 3-6.

[25] 汤剑斌, 圣小平, 樊天佑. 电针治疗对膝骨关节炎兔膝骨关节软骨细胞凋亡的影响[J]. 中医正骨, 2012, 24(4): 12-15.

[26] 王敏龙, 叶正从, 沈钦荣. 中药治疗膝骨关节炎实验研究进展[J]. 中国中医药科技, 2016, 23(3): 377-378.

[27] 邵敏. 补肾活血中药对体外培养软骨细胞SOD、NOS的影响[J]. 福建中医药, 2006, 7(4): 48-49.

[28] 朱太咏, 赵延朋, 谢艳. 桃仁膝康丸对膝骨关节炎大鼠血清SOD、MDA、NO的影响[J]. 风湿病与关节炎, 2012, 1(1): 36-40.

[29] 赵定麟, 陈泳莲. 退变性髌股关节炎的实验研究[J]. 中华外科杂志, 1990, 28(2): 69.

[30] AMOLDI C C. Patellar pain [J]. Acta Orthop Stand, 1991, 62(244): 1-29.

[31] 陈清汉, 许振华, 刘家勇, 等. 膝部疼痛与骨内压关系的临床研究[J]. 中华骨科杂志, 1996, 16(1): 25-27.

[32] 韦文武, 王大伟. 补气活血法治疗膝骨关节炎的实验研究[J]. 广西中医药杂志, 2004, 27(5): 46-48.

[33] BADALAMENTE M A, CHERNEY S B. Periosteal and vascular innervation of the human patella in degenerative joint disease [J]. Semin Arthritis Rheum, 1989, 18(Suppl2): 61-66.

[34] 谢利民, 沈鸿, 姚祥珍, 等. 活血散消肿止痛作用的实验研究[J]. 中医正骨, 1994, 6(4): 7-8.

[责任编辑 周冰冰]