

# 舒筋汤对兔膝关节挛缩模型关节功能 及 TGF-1 表达的影响

陈文瑶<sup>1</sup>, 李新志<sup>1\*</sup>, 郑之和<sup>1</sup>, 孟琳<sup>1</sup>, 张建华<sup>1</sup>, 严中甲<sup>2</sup>

(1. 三峡大学仁和医院骨科, 湖北 宜昌 443001; 2. 当阳市人民医院, 湖北 当阳 444100)

**[摘要]** 目的: 观察舒筋汤对兔膝关节挛缩模型关节囊病理改变及关节液 TGF-1 表达的影响。方法: 24 只大白兔按 Hildebrand 法固定右膝关节复制创伤后关节挛缩模型, 造模成功后随机分为舒筋汤组、模型组和正骨水组 ( $n=8$ )。分别予以舒筋汤、正骨水溶液薰洗, 模型组不予用药处理, 各组均辅以功能锻炼。给药 3, 6 周末分别测量关节挛缩程度和关节液中 TGF-1 含量。6 周末处死动物, 对关节囊厚度进行测量, Masson 染色进行关节胶原纤维表达定量测定。结果: 舒筋汤组与正骨水组和模型组比较, 在关节囊厚度、关节挛缩程度、胶原蛋白和关节液中 TGF-1 的表达等方面均有差异。结论: 舒筋汤辅助功能锻炼能有效减轻关节囊挛缩、恢复关节功能。其作用可能是通过减少 TGF-1 的表达而实现的。

**[关键词]** 关节挛缩; 舒筋汤; 关节囊; 转化生长因子 1

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)04-0138-04

关节挛缩是创伤后常见的并发症, 关节囊的改变是关节挛缩发生最主要的因素。尽管其发生的分子机制尚未完全明确, 但目前的研究公认 TGF-1 是关节挛缩形成的关键因素, 它促进肌成纤维细胞的增殖、影响胶原代谢及促进平滑肌动蛋白(SMA)的合成, 从而促进关节囊的纤维化, 最终发生

挛缩。本研究拟通过观察验方“舒筋汤”对兔膝关节挛缩模型功能恢复、关节滑液中 TGF-1 表达及关节囊形态的影响, 探讨舒筋汤对创伤后关节挛缩的治疗作用及初步作用机制。

## 1 材料和方法

**1.1 主要试剂和仪器** 舒筋汤(当归, 红花, 川断, 乳香, 透骨草, 花椒, 伸筋草, 海桐皮, 羌活等)来自三峡大学仁和医院药房, 每包加水 5 000 mL 水煎备用; 正骨水来自广西玉林制药有限责任公司, 批号 97062703, 以 15 mL  $\times$  2 瓶加水 5 000 mL 备用; 青霉素为华北制药股份有限公司生产, 批号 050811; 氯胺酮为福建古田药业有限公司生产, 批号国药准字 H35020148; 医用 1.6 mm 克氏针为苏州市康力骨科

有抗炎和镇痛作用, 有望成为治疗前列腺炎的临床药物。

## [参考文献]

- [1] 戴岳, 祁公任, 林已茏, 等. 泽桂癭爽胶囊对大鼠前列腺炎的抑制作用[J]. 中成药, 2001, 23(12): 896.
- [2] 戴苏林, 朱进, 魏秀德, 等. 前列腺康栓对大鼠实验性非菌性前列腺炎的抑制作用[J]. 中成药, 1990, 12(8): 27.
- [3] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 911, 918, 882.

## 3 讨论

慢性前列腺炎属中医学“淋浊”、“劳淋”、“白浊”等范畴, 认为本病之发, 或肾虚, 或湿热, 或血瘀, 肾虚精关不固为发病之本, 下焦湿热蕴结为致病之标, 而气滞血瘀是疾病进一步发展的病理反映, 三者相夹为患, 互为影响, 致使病情复杂, 迁延难愈。治当清热利湿, 化瘀解毒。花川保列颗粒正是根据这一中医药理论研制而成的中药制剂。本实验研究表明, 花川保列颗粒明显减少角叉菜胶所致急性前列腺炎大鼠前列腺液中白细胞数, 提高低下的卵磷脂小体密度, 显著降低大鼠慢性前列腺间质炎细胞浸润和成纤维细胞增生程度。此外, 花川保列颗粒具

**[收稿日期]** 2010-01-05

**[基金项目]** 宜昌市 2008 年医疗卫生科技计划(A08302-43)。

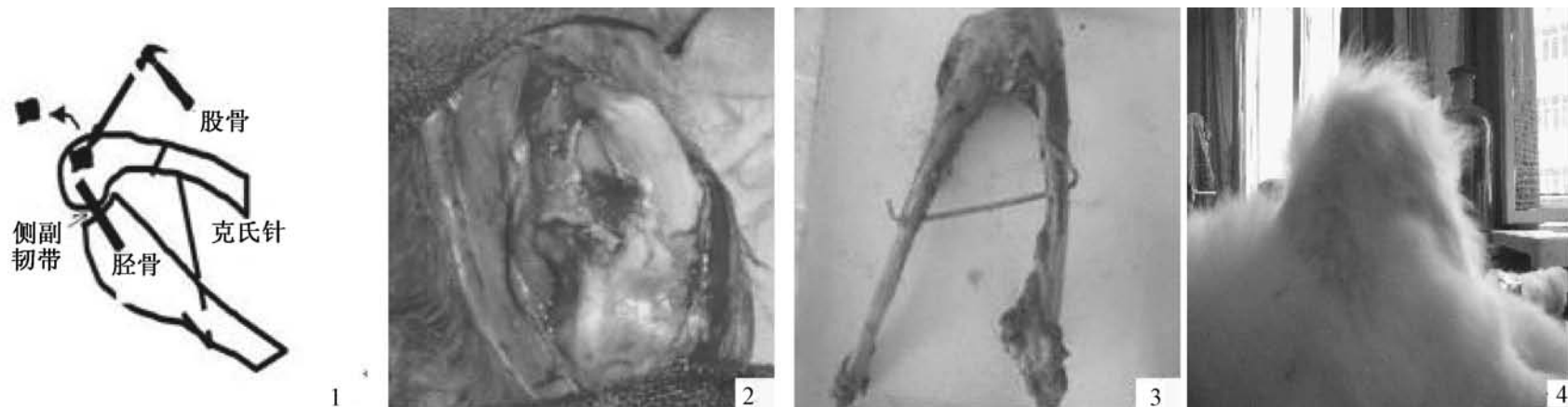
**[第一作者]** 陈文瑶, 硕士, Tel: 13872605628, E-mail: yc117193@163.com

**[通讯作者]** \* 李新志, 博士, 副教授, 脊柱, 骨肿瘤, Tel: 13972518057, E-mail: Lixpj@163

器械有限公司生产; TGF-1 检测试剂盒为南京建成生物工程研究所产品。其他研究所需材料均来自三峡大学免疫学实验室。

**1.2 动物来源及分组** 24 只 3~4 个月龄雄性大耳白兔, 体重 2.0~2.5 kg, 由武汉市万千佳禾实验动物养殖有限公司提供(合格证号 0003606)。24 只兔均予于造模, 氯胺酮(10 mg/kg) 麻醉后, 参照 Hildebrand<sup>[1]</sup> 法, 即取右膝关节外侧长约 2 cm 的纵切口, 切开发节囊, 在外侧副韧带上方约 0.5 cm 处, 避开负重面及髌面关节软骨, 用骨凿凿出约 5 mm<sup>2</sup> 的骨皮质缺损面, 直至骨窗面出血, 以模拟骨关节损伤。关节囊不予缝合, 消毒冲洗后直接缝合皮肤。再选择胫骨前沿中点处切开约 1 cm, 剥离骨膜至骨面, 屈曲膝关节至 150°; 手摇钻钻入克氏针从胫骨中部进入直至股骨中段穿出, 注意克氏针必须从膝关

节外通过, 股骨前外侧切开, 剪断克氏针并折弯, 试活动右下肢固定牢固, 常规消毒缝合(图 1)。术后自由活动, 每天肌肉注射青霉素 40 万 U/只, 伤口每日观察并涂擦碘伏, 连续 7 d 直至拆线。术后第 8 周末, 手术拆除内固定, 麻醉后分别沿原切口切开, 从股骨后侧剪断克氏针后拔出, 常规冲洗缝合, 术后抗菌、换药、拆线。术后随机分为给药组、模型组和对照组( $n=8$ ), 并以对侧正常关节作为正常组。伤口愈合后于第 5 周开始, 将家兔前肢及身体悬于铁架上, 电热恒温水箱下给药组和对照组分别予以 43 舒筋汤、正骨水药液浸泡治疗, 双后肢膝关节上 2~3 cm 浸泡于药液中, 每日给薰洗 2 次, 每次 30 min, 薰洗过后驱赶强迫兔活动约 30 min 以模拟功能锻炼, 模型组不予薰洗但给予驱赶功能锻炼, 共 6 周。



注: 1. 示意图; 2. 股骨髌上骨缺损; 3. 克氏针位置; 4. 拆除固定后关节位置, 可见关节处于严重屈曲挛缩状态

图 1 模型示意图

**1.3 样本获取及各指标的检测**

**1.3.1 关节活动范围测量** 拆除固定后处理 3 周和 6 周末麻醉后关节置于水平位, 固定股骨及膝关节, 弹簧称于兔踝关节处垂直胫骨, 约 0.5 N 的力予于关节伸展牵拉, 以股骨纵轴向远端的延长线为 0 度, 量角器测量此线与胫骨的夹角, 角度越大代表屈曲挛缩程度越重。同时测量对侧正常关节角度和右侧造模后的角度。

**1.3.2 关节腔 TGF-1 含量的测定** 拆除固定即刻、处理 3 周末和 6 周末分别在关节处脱毛、消毒后用装有 0.5 mL 生理盐水注射器行关节腔穿刺, 将 0.5 mL 生理盐水注入关节腔, 反复冲洗并活动关节后抽出, 盛于 2 mL 离心管中, 60 000 r·min<sup>-1</sup> 下离心 10 min, 取上清, 按试剂盒方法检测 TGF-1 含量。

**1.3.3 病理学组织学及形态学观察** 空气栓塞处死动物, 沿原切口扩大进入, 观察骨窗愈合情况, 剔除关节后侧的血管神经等结构, 完整暴露关节囊, 观察关节囊形态, 并适度活动关节触摸后侧关节囊活动

状态。锐利刀片从股骨及胫骨上切下关节囊, 观察关节囊质地, 置于 10% 甲醛中固定 20 h。取固定后的关节囊在螺旋测微器下取最薄处与最厚处测量, 平均值为关节囊厚度。系列脱水, 常规石蜡包埋, 切片, HE 及 Masson 染色。Masson 染色下每切片随机取 5 个视野, 在 Q500DMRCH 图像分析系统上计算绿色区面积百分比, 以此行胶原纤维含量分析。

**1.4 统计学处理** 数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组比较用方差分析。

**2 结果**

**2.1 功能观察** 关节挛缩程度测量结果见表 1。

表 1 关节挛缩程度 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	时间		
	处理前	3 周	6 周
正常	9.5 ± 6.3 <sup>2)</sup>	9.8 ± 7.3 <sup>2)</sup>	10.2 ± 6.8 <sup>1)</sup>
模型	44.2 ± 6.9	37.4 ± 6.0 <sup>1)</sup>	22.0 ± 4.2 <sup>2)</sup>
舒筋汤	45.6 ± 6.7	30.3 ± 5.3	14.6 ± 3.7
正骨水	44.6 ± 6.0	35.3 ± 6.4 <sup>1)</sup>	19.6 ± 4.6 <sup>1)</sup>

注: 与舒筋汤组比较, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (下同)

**2.2 大体观察** 创面无感染。所有关节囊切口均愈合, 关节囊光滑, 切口线未见明显瘢痕组织形成, 股骨髁部骨缺损愈合, 缺损处平整光滑。屈膝状态下各组后侧关节囊柔软, 膝关节伸展受限, 伸展状态下后侧关节囊有紧张感。取下关节囊后见正常组、舒筋汤组关节囊柔韧性好, 关节滑膜红润; 正骨水组及模型组关节囊质韧, 触之略僵硬。关节囊厚度见表 2。

表 2 关节挛缩程度(  $\bar{x} \pm s, n=8$  )

组别	关节囊厚/mm	绿区面积/%
正常	0.53 ±0.10 <sup>2)</sup>	28.2 ±3.52 <sup>1)</sup>
模型	0.69 ±0.07 <sup>1)</sup>	36.73 ±3.23 <sup>2)</sup>
舒筋汤	0.62 ±0.08	30.21 ±3.77
正骨水	0.73 ±0.07 <sup>2)</sup>	34.29 ±3.76 <sup>2)</sup>

**2.3 HE 和 Masson 染色组织切片观察**( 见图 2 )  
左侧正常关节囊组织胶原排列规律均匀; 关节滑膜光滑, 滑膜内壁厚度一致。模型组及对照组可见胶原增生明显, 排列较紊乱, 关节滑膜内壁可发现皱缩、增厚、成角及萎缩等改变。舒筋汤组可见关节囊纤维化明显, 关节滑膜改变介于正常关节囊与模型、正骨水组之间。染色代表胶原总含量的绿色区百分比( 表 2 )。

**2.4 各组关节液 TGF- 1 检测结果**( 表 3 ) 给药组关节液 TGF- 1 在处理第 3 周含量明显低于对照组和模型组间(  $P < 0.01$  ), 但随着治疗及时间的延长, 差异有缩小的趋势, 表明 TGF- 1 由高表达到低表达渐趋于正常。

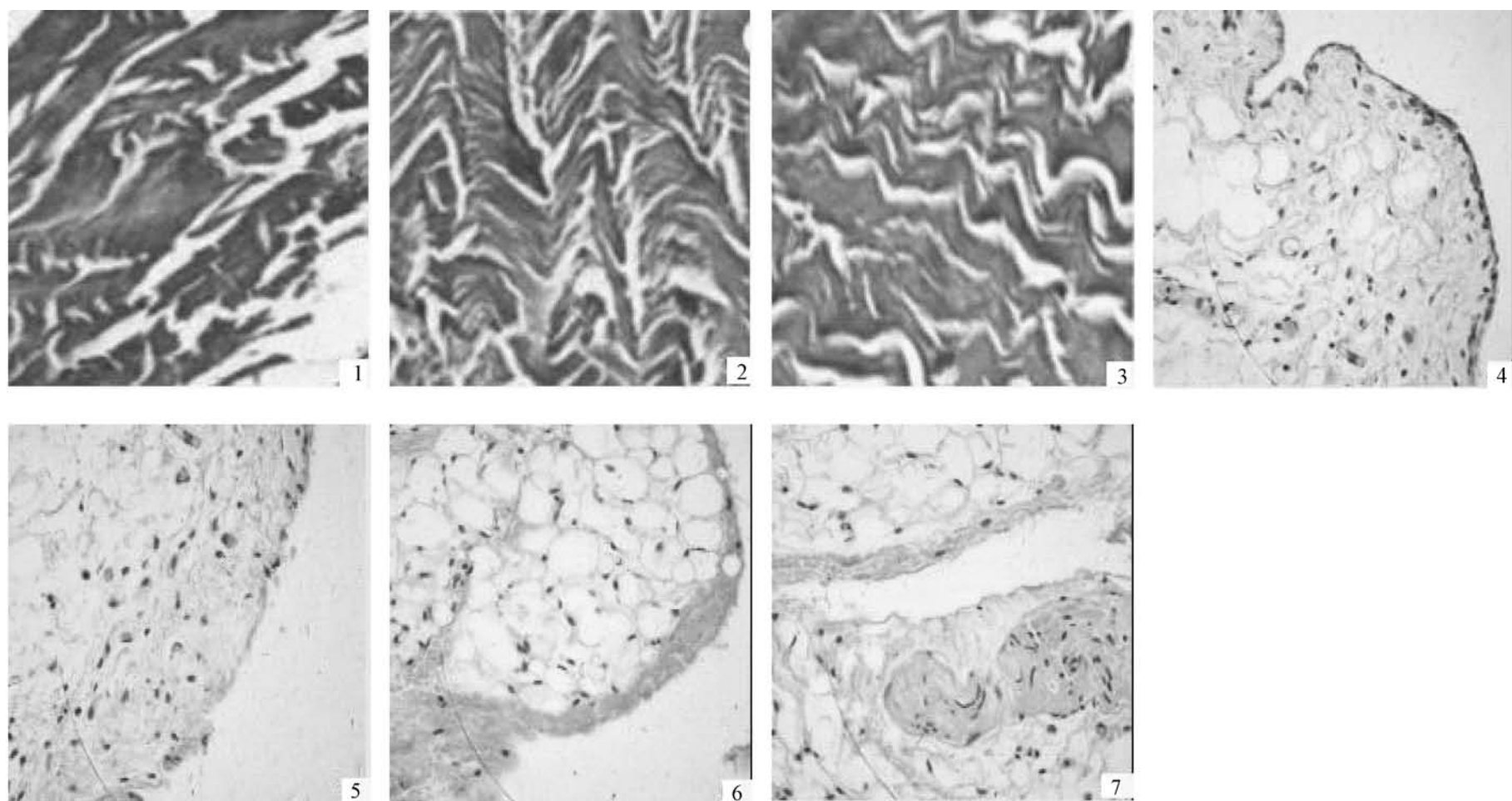


图 2 关节滑膜组织切片观察

注: 1 ~3 为 Masson 染色, 4 ~7 为 HE 染色。1. 舒筋汤组与 2. 正骨水组和 3. 模型组比较, 代表胶原表达的绿色区明显较少; 4. 为正常滑膜组织, 滑膜内层边缘光整, 厚薄均匀; 5. 为舒筋汤组, 可见滑膜厚薄不匀, 局部有萎缩现象, 滑膜下层细胞排列紊乱; 6. 正骨水组 7. 模型组, 可见滑膜内层增厚明显, 局部有皱缩, 滑膜下层可见纤维化。

表 3 TGF- 1 检测结果( /ng/mL,  $\bar{x} \pm s, n=8$  )

组别	时间		
	处理前	3 周	6 周
模型	0.94 ±0.04	0.61 ±0.03 <sup>2)</sup>	0.25 ±0.04 <sup>1)</sup>
舒筋汤	0.96 ±0.03	0.64 ±0.05 <sup>2)</sup>	0.26 ±0.03 <sup>2)</sup>
正骨水	0.95 ±0.03	0.42 ±0.04	0.21 ±0.03

### 3 讨论

关节挛缩的动物模型, 国内用关节血肿模型<sup>[2]</sup>或闭合骨折模型<sup>[3]</sup>, 并采用外固定, 笔者曾在预实验

中采用闭合骨折外固定方法, 结果证实外固定法由于动物活动及撕咬, 难以维持, 反复外固定调整使模型缺乏均一性, 而闭合骨折模型也难于控制创伤的一致性。本研究所采用动物模型通过破坏关节囊内骨结构模拟关节内创伤, 采用克氏针牢固固定模拟关节创伤后的固定过程, 较好还原了关节挛缩发生的过程。研究证实该模型兔膝关节的组织学与分子学改变与人类肘关节创伤后挛缩相似<sup>[4]</sup>。实验取出内固定时无明显松动滑脱, 所有动物关节活动均严

重受限,说明造模成功。造模中固定关节时要注意克氏针稍远离膝关节,一是防止针穿入关节,二是防止固定力矩过小在股四头肌牵拉下引起骨折;注意控制膝关节屈曲 150°;保证模型的一致,也可防止屈曲角过小时关节受力发生松动骨折。

影响关节挛缩的因素包括肌肉、关节囊和关节软骨等因素,关节囊的纤维化是最主要原因。包括滑膜内衬细胞、成纤维细胞、单核细胞和细胞外基质在内的多种关节囊组织细胞增殖,关节囊发生纤维化、粘连等是关节活动障碍的主要原因<sup>[5]</sup>。TGF-在促进胶原形成和基质沉积方面显示出多种的生物学活性,其中 TGF-1 是纤维化中最重要的细胞因子,广泛参与组织器官纤维化的形成<sup>[6-7]</sup>。也是关节囊纤维化较早表达的细胞因子之一,其作用表现在对基质金属蛋白酶及其抑制酶(MMPs、TIMPs)、平滑肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)和结缔组织生长因子(CTGF)等多种细胞因子、酶的表达产生影响,影响胶原的合成与代谢<sup>[4]</sup>。关节挛缩发生过程中关节囊和关节液内的 TGF-1 均上升,向关节腔内注入 TGF-1 可导致滑膜粘连肥厚,关节活动受限<sup>[8]</sup>。因此,TGF-1 与胶原纤维的共同构成关节挛缩重要的上游和下游因素。

处理 3 周后各组关节挛缩程度均获得较大程度的改善,处理 6 周时舒筋汤组关节功能明显好于正骨水组和模型组,同时正骨水组与模型组也获得了明显的功能改善,说明舒筋汤可以加速关节功能的康复,同时关节的功能锻炼在关节挛缩的治疗中具有不可替代的作用。舒筋汤组在与功能相对应的关节囊厚度、胶原纤维表达上也较正骨水组和模型组低,胶原纤维的增多增加了关节囊的厚度,致使关节僵硬发生,功能受限。TGF-1 在用药组早期及后期均呈较低水平表达,说明舒筋汤有助于 TGF-1 表

达水平下调,这种作用很可能是其促进挛缩关节功能恢复的机制之一。

#### [参考文献]

- [1] Hildebrand K A, Sutherland C, Zhang M. Rabbit knee model of post-traumatic joint contractures: the long-term natural history of motion loss and myofibroblasts[ J]. *J Orthop Res*, 2004, 22: 313.
- [2] 苗明山. 实验动物和动物实验技术[ M]. 北京: 中国中医药出版社, 1997: 260.
- [3] 俞力行, 张友定, 姜宏. 熏洗方对大鼠骨折后期僵硬关节滑膜型胶原 mRNA 及 TGF 表达的影响[ J]. *中医正骨*, 2005, 17(1): 79.
- [4] Kevin A. Hildebrand, Mei Zhang, Niccole M. Gernscheid. Cellular, matrix, and growth factor components of the joint capsule are modified early in the process of posttraumatic contracture formation in a rabbit model[ J]. *Acta Orthopaedica*, 2008, 79(1): 116.
- [5] Trudel G, Uthoff H K. Contractures secondary to immobility: is the restriction articular or muscular. An experimental longitudinal study in the rat knee[ J]. *Arch Phys Med Rehabil*, 2000, 81: 6.
- [6] Borde W A, Noble N A. Transforming growth factor in tissue fibrosis[ J]. *N Engl J Med*, 1994, 331: 1286.
- [7] Shah M, Foreman D M, Ferguson M W. Neutralization of TGF-1 and TGF-2 or exogenous addition of TGF-3 to cutaneous rat wounds reduces scarring[ J]. *J Cell Sci*, 1995, 108: 985.
- [8] Yoshihiro Hagiwara, Eiichi Chimoto, Ichiro Takahashi, *et al.* Expression of Transforming Growth Factor-1 and Connective Tissue Growth Factor in the Capsule in a Rat Immobilized Knee Model Expression of transforming growth factor[ J]. *Upsala J Med Sci*, 2008, 113(1): 221.