

# 止痛健骨方对兔膝关节炎模型滑膜及软骨修复的影响

苏新平<sup>1,2</sup>, 朱克俭<sup>2\*</sup>, 谭旭仪<sup>2</sup>

(1.湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2.湖南省中医药研究院附属医院, 湖南 长沙 410006)

**[摘要]** **目的** 观察止痛健骨方对兔膝关节炎模型滑膜及软骨修复的影响。**方法** 建立兔膝关节炎模型, 将兔随机分为正常对照组, 模型对照组, 骨刺宁组, 止痛健骨低、中、高组共6组, 每组6只, 止痛健骨低、中、高剂量组分别给予4.48、8.96、17.92 g/kg止痛健骨方灌胃, 骨刺宁组给予0.504 g/kg骨刺宁胶囊灌胃, 正常对照组、模型对照组给予蒸馏水灌胃, 每次10 mL/kg, 每日1次, 连续给药4周, 检测各组兔右膝关节屈曲活动度、关节滑膜厚度及软骨未钙化厚度/钙化厚度, 以及膝关节滑膜液炎性细胞, 并进行比较。**结果** 实验4周后, 模型对照组较正常对照组膝关节屈曲活动度、软骨未钙化厚度/钙化厚度明显减少, 关节滑膜厚度、滑膜液炎性细胞明显增加( $P<0.05$ )。与模型对照组比较, 止痛健骨低、中、高剂量组膝关节屈曲活动度、软骨未钙化厚度/钙化厚度均明显增加, 关节滑膜厚度、滑膜液炎性细胞减少, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 止痛健骨方能抑制滑膜增生, 增加非钙化软骨厚度, 延缓软骨退变, 增加关节屈曲活动度, 这可能是其治疗膝关节炎的作用机制。

**[关键词]** 止痛健骨方; 膝关节炎; 兔; 滑膜; 软骨; 当归; 白芥子; 丹参

**[中图分类号]** R285.5; R681

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.04.003

## Effects of Zhitong Jiangu Decoction on Synovial and Cartilage Repair in Rabbit Models of Knee Osteoarthritis

SU Xinping<sup>1,2</sup>, ZHU Kejian<sup>2\*</sup>, TAN Xuyi<sup>2</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

2. The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the effect of Zhitong Jiangu decoction on synovial and cartilage repair in rabbit models of knee osteoarthritis. **Methods** The rabbits were randomly divided into normal control group, model control group, Gucining group, and low, medium and high dose of Zhitong Jiangu groups, six rabbits in each group, after rabbit models of knee osteoarthritis were successfully established. Rabbits of low, middle, high dose of Zhitong Jiangu were given 4.48, 8.96 17.92 g/kg Zhitong Jiangu decoction, respectively. Gucining group was given 0.504 g/kg Gucining capsule, while normal control group and model control group were given 10 mL/kg distilled water for once per day, continuously administration for 4 weeks. Then right knee flexion mobility, synovium thickness and ratio of noncalcified cartilage with calcified, and synovial fluid inflammatory cells were observed and compared. **Results** After 4 weeks, compared with normal control group, the right knee flexion mobility and ratio of noncalcified cartilage with calcified of the model control group was decreased, while its synovium thickness and synovial fluid inflammatory cells was increased ( $P<0.05$ ). Compared with model control group, the knee flexion mobility and ratio of noncalcified cartilage with calcified of Zhitong JianGu groups were increased, while their synovium thickness and synovial fluid inflammatory cells were decreased, the differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Zhitong Jiangu decoction could inhibit the synovium hyperplasia, thicken noncalcified cartilage, delay cartilage degeneration and increase knee flexion mobility, it may be a mechanism for the treatment of knee osteoarthritis.

**[Keywords]** Zhitong Jiangu decoction; knee osteoarthritis; rabbits; synovium; cartilage; *Angelica sinensis*; mustard; *Salvia miltiorrhiza*

**[收稿日期]** 2015-09-28

**[基金项目]** 湖南省中医药科研基金资助项目(2008035)。

**[作者简介]** 苏新平, 男, 主任医师, 在读博士研究生, 主要从事骨关节病研究。

**[通讯作者]** \* 朱克俭, 男, 博士研究生导师, E-mail: zkj0731@263.net。

止痛健骨方由当归、白芥子、丹参、乳香、没药等12味中药组成,具有活血祛痰、通络止痛、强筋健骨的功能,临床上对膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)具有较好的疗效。本文观察止痛健骨方对KOA滑膜、软骨等影响,探讨其对膝骨关节炎的作用机制,为临床上治疗KOA提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

成年日本大耳白兔38只,雌雄各半,体质量2.0~2.5 kg,由湖南中医药大学实验动物中心代购,动物许可证号:SCXK(湘)2009-0012。

### 1.2 药物与试剂

止痛健骨方由湖南省中医药研究院中药所提供,药物由当归、白芥子、丹参、猪牙皂、鹿角霜、鳖甲、黄芪、乳香、没药、独活、千年健、陆英12味组成。骨刺宁胶囊(功效为活血化瘀、通络止痛功效,山西忻州市云中制药厂生产,批号:20000225)。

### 1.3 动物分组及模型制备

将38只白兔按照体质量分层随机分为正常组7只,模型组31只。模型组白兔参照关节制动制作骨关节炎动物模型方法<sup>[1]</sup>,采用石膏将兔右后膝关节伸直位固定,6周后在正常组、模型组各随机选择1只白兔,处死,打开右膝关节,验证模型组白兔右后膝骨关节炎模型制备成功。此时将模型组剩余的30只白兔随机分为模型对照组,骨刺宁组,止痛健骨低、中、止痛健骨高剂量组共5组,每组6只,正常对照组为之前正常组剩余的6只白兔。

### 1.4 药物干预

根据兔与人体表面积方法<sup>[2]</sup>,计算得出止痛健骨低、中、高剂量组分别给予止痛健骨方4.48、8.96、17.92 g/kg灌胃(分别相当于人临床等效剂量的1、2、4倍)。骨刺宁组给予骨刺宁胶囊0.504 g/kg灌胃(相当于人临床等效剂量的2倍),正常对照组、模型对照组给予蒸馏水灌胃,10 mL/kg。每日给药1次,连续给药4周。

### 1.5 观察指标及方法

1.5.1 右膝关节屈曲活动度 各组白兔在造模6周后(即实验干预前)、实验干预4周后采用双臂式量角器测量右膝关节活动度,方法如下:以双臂式量角器测定轴心对准关节中心点,两臂对准肢段轴线,膝

关节伸直位为0°。

1.5.2 膝关节滑膜厚度及软骨未钙化厚度/钙化厚度 实验干预4周后,耳缘静脉空气栓塞处死全部动物,立即打开各组白兔右后膝关节腔,用螺旋测微器测定关节滑膜厚度,然后将切取软骨作HE染色区别钙化与未钙化部分,并分别测量其厚度,计算软骨未钙化厚度与钙化厚度的比值。

1.5.3 膝关节滑膜液炎性细胞 提取右后膝关节滑膜液涂片计数炎性细胞,光镜下观察记录。每张涂片随机观察5个HP(10×40倍)视野,计算每一视野平均炎性细胞数。计数标准:细胞数为0个/HP为“-”,细胞数<10个/HP为“+”,10~20个细胞/HP“++”,细胞数>20个/HP为“+++”。

### 1.6 统计学方法

采用SPSS 16.0统计学软件对实验数据进行分析,计量资料满足方差齐性和正态齐性时,组间比较采用单因素方差分析(LSD法),组内治疗前后比较采用配对 $t$ 检验,多组间等级资料采用Kruskal-wallis H检验,以 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组右膝关节屈曲活动度比较

各组白兔均完成了4周时间的实验干预,实验期间无死亡。在实验干预前对各组白兔右后膝关节屈曲活动度进行测量,模型对照组、骨刺宁组、止痛健骨低、中、高剂量组分别与正常对照组比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),提示兔膝骨关节炎模型活动度较正常减少。实验干预4周后,骨刺宁组、止痛健骨低、中、高剂量组较干预前有增加,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),而正常对照组、模型对照组无明显变化( $P>0.05$ )。实验干预后组间比较,骨刺宁组、止痛健骨低、中、高剂量组分别与模型对照组比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),提示经止痛健骨方干预后,右膝关节屈曲活动度得到明显增加,见表1。

### 2.2 各组右膝关节滑膜厚度、软骨未钙化厚度/钙化厚度比较结果

实验干预4周后,与正常对照组比较,模型对照组、骨刺宁组、止痛健骨低、中、高剂量组关节滑膜厚度有明显增加,软骨未钙化厚度/钙化厚度有减少,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。骨刺宁组、止痛健骨低、中、高剂量组较模型对照组比较,关节滑膜厚度

表1 各组右膝关节屈曲活动度比较

( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量(g/Kg)	干预前(°)	干预后(°)	t值	P值
正常对照组		145.61±5.3	146.13±4.9	-0.925	0.623
模型对照组		101.72±6.1 <sup>#</sup>	101.92±8.6 <sup>△</sup>	-1.012	0.571
骨刺宁组	0.504	102.52±5.8 <sup>#</sup>	120.48±10.3 <sup>△▲☆</sup>	31.240	0.000
止痛健骨低剂量组	4.48	103.05±5.9 <sup>#</sup>	119.70±10.4 <sup>△▲☆</sup>	29.547	0.000
止痛健骨中剂量组	8.96	102.41±6.0 <sup>#</sup>	126.85±10.0 <sup>△▲☆</sup>	33.876	0.000
止痛健骨高剂量组	17.92	101.95±5.4 <sup>#</sup>	130.24±8.9 <sup>△▲☆</sup>	52.268	0.000
F值		576.883	562.818		
P值		<0.01	<0.01		

注:干预前,与正常对照组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,模型对照组、骨刺宁组、止痛健骨低、中、高剂量组五组两两互相比,  $P>0.05$ ;干预后,与正常对照组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ,与模型对照组比较,<sup>▲</sup> $P<0.05$ ,止痛健骨低、中、高剂量组三组两两互相比,  $P=0.000$ 。组内干预前后比较,<sup>☆</sup> $P<0.05$ 。

有减少,软骨未钙化厚度/钙化厚度有增加( $P<0.01$ )。与骨刺宁组比较,止痛健骨低、中剂量组在该两项指标无明显差异( $P>0.05$ ),但止痛健骨高剂量组有统计学差异( $P<0.01$ ),表明止痛健骨方对兔KOA模型滑膜厚度肿胀有抑制作用,能增加软骨未钙化与钙化厚度的比值,见表2。

表2 各组右膝关节滑膜厚度、软骨未钙化厚度/

钙化厚度比较 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量(g/Kg)	钙化厚度比较	
		关节滑膜厚度(mm)	软骨未钙化厚度/钙化厚度
正常对照组		1.03±0.07	8.32±0.73
模型对照组		1.54±0.12 <sup>#</sup>	5.11±0.64 <sup>#</sup>
骨刺宁组	0.504	1.22±0.09 <sup>*#</sup>	7.88±0.78 <sup>*#</sup>
止痛健骨低剂量组	4.48	1.23±0.03 <sup>*#</sup>	7.85±0.79 <sup>*#</sup>
止痛健骨中剂量组	8.96	1.24±0.10 <sup>*#</sup>	7.86±0.85 <sup>*#</sup>
止痛健骨高剂量组	17.92	1.18±0.03 <sup>*#▲</sup>	8.11±0.81 <sup>*#▲</sup>
F值		85.499	104.211
P值		<0.01	<0.01

注:与正常对照组比较,<sup>#</sup> $P=0.000$ ;与模型对照组比较,<sup>\*</sup> $P=0.000$ ;与骨刺宁组比较,<sup>▲</sup> $P<0.05$ 。

### 2.3 各组右膝关节滑膜液炎性细胞计数比较

实验干预4周后,各组右膝关节滑膜液炎性细胞计数,模型对照组较正常对照组滑膜液炎性细胞明显增加,骨刺宁组,止痛健骨低、中、高剂量组较模型对照组明显减少( $P<0.05$ ),表明止痛健骨方能较好地缓解兔KOA模型膝关节滑膜的炎性症状,见表3。

## 3 讨论

KOA主要表现为膝关节部位疼痛、活动不利等,好发于中老年人,对日常生活与活动有较大

表3 各组右膝关节滑膜液炎性细胞计数比较 ( $n=6$ )

组别	滑膜液炎性细胞计数			
	+++	++	+	-
正常对照组	0	1	3	2
模型对照组	6	0	0	0
骨刺宁组	1	2	3	0
止痛健骨低剂量组	0	0	6	0
止痛健骨中剂量组	2	1	1	2
止痛健骨高剂量组	0	0	2	4

注:经多组间等级资料比较, $\chi^2=19.564$ ,模型对照组与正常对照组比较, $P<0.05$ ,骨刺宁组,止痛健骨低、中、高剂量组分别与模型对照组比较, $P<0.05$ 。

影响<sup>[3-4]</sup>。随着我国社会老龄化进程加快,本病的发病率逐年上升<sup>[5]</sup>。有关中医药治疗本病的研究与临床观察报道也较多。一般认为,中医药治疗骨性关节炎疗效与西医相比副作用少而疗效巩固,因此国内外市场也对治疗本病的中医药产品有较好的认同<sup>[6]</sup>。

有关KOA的具体发病机制仍未完全明了,实验研究发现本病主要病理特点是软骨退变、破坏,并伴关节滑膜增生,这在人体和动物实验中均得到可靠证实。在KOA软骨病理切片中,非钙化软骨厚度下降,钙化软骨厚度反而增加,软骨未钙化厚度/钙化厚度比值下降<sup>[7]</sup>。中医学中并无KOA病名,但根据其症状特点,将KOA归属“膝痹”范畴<sup>[8]</sup>,如《素问·脉要精微论》云:“膝者,筋之府,屈伸不能,行则倮附,筋将惫矣。”本病日久不愈,常有关节肿胀、积液之症,更为痰瘀阻络,其舌质暗或有瘀斑、瘀点,舌苔滑或腻等皆为痰瘀之证。由此可见,痰瘀阻络,肝肾亏虚,属本虚标实之证<sup>[9]</sup>。正如《丹溪心法》云:“肥人肢节痛,多是风湿与痰饮流注经络而痛。”因

此,对本病的治疗,应痰瘀兼顾。

为探讨止痛健骨方对 KOA 的作用机制,本课题在成功制备兔 KOA 模型基础,观察其对兔 KOA 模型滑膜及软骨修复的影响。该方原系湖南省民间以补肾活血为主要功能治疗骨质增生症的经验方,经湖南省中医药研究院朱克俭教授根据其临床经验及对骨关节炎病因病机、证候辨治特点,从痰瘀阻络,兼肝肾不足立法,对方用药进行了较大调整,临床应用用于治疗腰、膝等多部位骨性关节炎多年,通过初步临床观察,提示该方有止痛作用显著且见效较快、作用较为持久等特点。方中以当归活血祛瘀,通络止痛,白芥子豁痰通经、消肿止痛,二味共为君药;方中丹参活血祛瘀止痛,用之以加强当归活血通络止痛功能;猪牙皂通窍涤痰,用之以加强白芥子祛痰通经的功能;鹿角霜补肝肾以强筋骨,兼顾其本虚。以上三味为臣药。方中鳖甲滋补肝肾,通络散结。用之佐助君臣药肝肾、强筋骨,且通络而止痛;黄芪健脾而资气血生化之源,用以补虚损而佐助行血气、强筋骨;乳香、没药二药并用,凡心胃胁腹肢体关节诸疼痛皆能治之,二味进一步增强全方行血通络止痛效果;独活、千年健、陆英功能通经络,消肿痛。七药皆能佐助君臣药改善症状,故以为佐药。全方合用,共奏活血祛瘀,通络止痛,强筋健骨之效,故对骨性关节炎痰瘀阻络兼肝肾不足所致腰膝酸胀疼痛、乏力,关节肿胀麻木,活动不利等症有效。

现代药理学研究发现,方中药物具有多种药理效应,如抗血小板聚集、抗炎、镇痛、增强机体免疫力等作用<sup>[10-12]</sup>。本实验结果提示,止痛健骨方能抑制滑膜增生和炎症症状,增加非钙化软骨厚度,延缓软骨

退变,增加关节屈曲活动度,且随着止痛健骨剂量的增加,各指标改善明显,这可能是其治疗 KOA 的作用机制。然止痛健骨方通过何种信号通路达到对 KOA 的作用,有待下阶段进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 张洪,江捍平,王大平.关节制动制作骨性关节炎动物模型的探讨[J].中国现代医学杂志,2006,16(12):1 843-1 844.
- [2] 魏伟,吴希美,李元建.药理实验方法学·第四版[J].北京:人民卫生出版社,2010:1 698.
- [3] 中华医学会骨科分会.骨关节炎诊治指南(2007年版)[J].中华骨科杂志,2007,27(10):793-795.
- [4] Silva FS, Melo FE, Amaral MM, et al. Efficacy of simple integrated group rehabilitation program for patients with knee osteoarthritis: Single-blind randomized controlled trial[J]. J Rehabil Res Dev, 2015, 52(3):309-22.
- [5] 高仰贤,江蓉星.骨性关节炎发病机制的国内研究进展[J].中医正骨,2005,17(4):55-57.
- [6] 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):2 977-2 984.
- [7] 白希壮,王星铎.实验性骨关节炎中关节软骨钙化层厚度测定及其意义[J].中华骨科杂志,1996,16(1):40-43.
- [8] 唐皓,蒋盛昶,陈坚,等.红外热成像技术在膝关节骨性关节炎中医证型诊断中的意义[J].湖南中医药大学学报,2015,35(2):43-45,48.
- [9] 龚志贤,谭旭仪,卢敏.小针刀配合针灸辨证治疗膝骨性关节炎的临床观察[J].湖南中医药大学学报,2011,31(1):69-72.
- [10] 刘如秀,刘宇,汪艳丽,等.当归的药理作用[J].西部中医药,2014,27(11):153-156.
- [11] 王炜辰,吴学辉,郑芳.丹参药理学研究进展[J].海峡药学,2013,25(10):24-25.
- [12] 范莉,李林,何慧凤.独活挥发油抗炎、镇痛药理作用的研究[J].安徽医药,2009,13(2):133-134.

(本文编辑 杨 瑛)