

揉髌手法对兔膝关节软骨增殖细胞核抗原表达的影响

戴七一¹, 阮萍¹, 袁经阳¹, 覃学流¹, 黎强², 滕居赞¹, 容向宾¹,

韩杰¹, 林光琪², 刘靖², 覃杰¹, 王雄¹, 吴兆沛¹

(1. 广西中医学院附属瑞康医院, 广西 南宁 530011; 2. 广西中医学院, 广西 南宁 530001)

摘要 目的:观察揉髌手法对兔膝关节软骨增殖细胞核抗原表达的影响, 进而探讨揉髌手法治疗膝关节骨性关节炎的可能作用机制。**方法:**采用新西兰兔 50 只, 随机分为手法组、针剂组、模型对照组、假模组和正常组各 10 只。前 3 组通过手术结扎并切断右侧臀下静脉、股静脉和大隐静脉造模, 假模组显露相应血管但不结扎, 正常组不做任何处理。造模 1 周后手法组采用揉髌手法分别施术于兔右下肢 5 周共 17 次; 针剂组右膝关节内每周注射 1 次玻璃酸钠注射液, 连用 5 周。其余 3 组不做任何处理。造模后 8 周末处死所有动物, 取右膝关节内侧胫骨平台软骨组织, 采用免疫组化法检测软骨细胞增殖率, 对所得数据进行统计学处理。**结果:**模型组软骨细胞减少, 增殖率为 $(13.25 \pm 2.66)\%$; 手法组软骨细胞增多, 增殖率为 $(17.90 \pm 2.80)\%$; 针剂组软骨细胞增多, 增殖率为 $(17.13 \pm 4.09)\%$; 假模组软骨细胞增多, 增殖率为 $(12.63 \pm 2.92)\%$; 正常组软骨细胞正常, 增殖率为 $(7.75 \pm 1.39)\%$; 与模型组比较, 手法组、针剂组和正常组 $P < 0.01$, 或 $P < 0.05$, 差异有统计学意义。**结论:**揉髌手法可促进兔膝关节软骨细胞增殖, 降低软骨组织的损伤。

关键词 手法 增殖细胞核抗原 膝关节 按摩 模型, 动物 兔

The Influence Of The Rou-Bin Manipulation To The PCNA Expression With Knee Joint Cartilage In Rabbit

DAI Qi-yi*, RUAN Ping, YUAN Jing-yang, et al. * Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi Traditional Chinese Medical, Nanning 530011, Guangxi, China

ABSTRACT Objective: To observe the Influence Of The Rou-Bin Manipulation To The PCNA Expression With Knee Joint Cartilage In Rabbit, explore the mechanism of action of Rou-Bin manipulation to the knee osteoarthritis. **Methods:** 50 New Zealand rabbits divided randomly into five groups: Manipulation group, Inject group, Model group, dummy-model group and the normal group, 10 rabbits in each group; ligaturing and cutting off the inferior-gluteal vein, femoral vein and great saphenous vein on the right side of the rabbit for the first 3 groups, shows the same veins without cutting off for dummy-model group, no treatment for the normal group. 1 week after modeled, 17 times of Rou-Bin manipulation on each rabbit in manipulation group, the rabbit injection with sodium hyaluronate 5 times in inject group, no special treatment for other rabbits. The 8th weekend after modeled, to take all the rabbit right knee medial tibial plateau cartilage tissue processing, detected chondrocyte proliferation rate by IHCA, statistics processing. **Results:** The amount of model group chondrocyte decreases, with a proliferation rate $(13.25 \pm 2.66)\%$; The amount of manipulation group chondrocyte increase, with a proliferation rate $(17.90 \pm 2.80)\%$; The amount of inject group chondrocyte increase, with a proliferation rate $(17.13 \pm 4.09)\%$; The amount of dummy-model group chondrocyte increase, with a proliferation rate $(12.63 \pm 2.92)\%$; The normal group remain appro the same level, with a proliferation rate $(7.75 \pm 1.39)\%$; To compare with model group, $P < 0.01$ (or $P < 0.05$) for all of the manipulation group, inject group and normal group, has the highly significance difference. **Conclusion:** The Rou-Bin manipulation promote the chondrocyte proliferation rate of rabbit knee joint increase, reduce cartilage tissue damage.

Key words Proliferating cell nuclear aneigen; Knee joint; Massage; Models, Animal

揉髌手法是由捏拿股四头肌、旋转(先顺时针后逆时针)揉按患膝髌骨和屈伸牵张膝关节等手法组成, 因其主要治疗意图在于尽量扩大髌骨活动度、发

挥伸膝装置的力学效益, 故将这一组手法简称为揉髌手法。临床使用治疗膝关节骨性关节炎(简称膝 OA)时疗效颇佳^[1], 采用骨内高压型动物模型进行实验时, 电镜下模型组兔膝关节软骨细胞核多见固缩, 或见细胞核降解及细胞凋亡; 而手法组细胞核多数正常^[2]。本实验以兔右膝关节软骨组织为观察对象, 采

用免疫组化法检测软骨细胞增殖率,进一步探讨揉髌手法对膝 OA 治疗取效的可能作用机制。

1 实验材料

- 1.1 实验动物 6 月龄新西兰兔 50 只,雌雄不分,体重约 2.5 ~ 3 kg,由广西中医学院实验动物中心提供[实验动物使用许可证 SYXK(桂)2003-0001]。
- 1.2 实验仪器 脱水机、包埋机、切片机、生物组织摊片烤片机、电热恒温培养箱、奥林巴斯显微镜。
- 1.3 实验药品 玻璃酸钠注射液(山东博士伦福瑞达制药有限公司,批号:国药准字 H10960136)

2 实验方法

- 2.1 动物分组 将 50 只新西兰兔随机分为手法组、玻璃酸钠组(简称针剂组)、空白对照组(简称模型组)、假模组、正常对照组(简称正常组)共 5 组,每组 10 只。
- 2.2 造模方法 手法组、针剂组、模型组、假模组共 40 只兔均采用 1% 戊巴比妥钠(3 mL · kg⁻¹)兔耳静脉麻醉。前 3 组兔左侧卧位,于右侧髌关节大转子后约 1 cm 处为 midpoint,上下直切口 3 cm,分离髌内静脉属支臀下静脉,双重结扎,结扎线间切断。仰卧位,右侧腹股沟触及动脉搏动处作 1 cm 纵行切口,分别分离股静脉、大隐静脉,分别双重结扎后于结扎线间切断。所有手术切口缝合皮下组织、皮肤后敷盖酒精纱布、棉垫。假模组同样切口显露臀下静脉、股静脉和大隐静脉,但不予结扎和切断,缝合切口,敷料敷盖。正常组不做任何处理。术后连续 3 d,每天每只肌注青霉素(5 × 10⁴ U · kg⁻¹)、链霉素(10 × 10⁴ U · kg⁻¹)。所有动物分笼饲养。
- 2.3 实验方法 造模 1 周后开始。手法组使用捏拿手法由上而下捏拿兔右下肢股四头肌,继先顺时针后逆时针旋转揉按患膝髌骨、屈伸牵张膝关节,每次每只兔子施术 10 min,隔天 1 次,连续治疗 5 周共 17 次。针剂组每周每只兔子右膝关节内注射玻璃酸钠注射液 0.6 mL,注射后屈伸膝关节 20 次,连用 5 周。模型组、假模组及正常组不作任何处理,所有动物同样条件下关养。
- 2.4 取材方法 所有动物于造模后 8 周末取材。耳缘静脉空气栓塞处死,解剖右膝关节,肉眼观察关节软骨组织大体变化,后使用咬骨钳、手术刀取内侧胫骨平台软骨组织,放入 4% 多聚甲醛溶液中固定。

2.5 观察项目及检测方法

2.5.1 HE 染色 右膝内侧胫骨平台软骨组织 4% 多聚

甲醛固定,脱钙,脱水,石蜡包埋,连续切片(厚度 3 μm),苏木精-伊红染色,封片,光镜下观察软骨形态变化。

2.5.2 免疫组化法检测软骨细胞增殖率 切片常规脱腊至水,30% H₂O₂ + 蒸馏水(1:10)混合,室温 10 min 以灭活内源性酶。蒸馏水洗 3 次。将切片浸入 0.01 mol · L⁻¹枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0),微波炉加热至沸腾,后断电,间隔 10 min 后,反复 2 次。冷却后 PBS 洗涤 2 次。滴加体积分数 5% BSA 封闭液,室温 20 min。甩去多余液体,不清洗。滴加适当稀释抗 PCNA 兔抗(1100),37 ℃ 1 h。PBS 液洗 3 次,每次 2 min。滴加生物素化山羊抗兔 IgG,37 ℃ 20 min。PBS 洗 4 次,每次 5 min。取 1 mL 蒸馏水,加 DAB 显色试剂盒(AR1022)中 A,B,C 试剂各 1 滴,混匀后加至切片。室温显色,15 min,蒸馏水冲洗。苏木精轻度复染,脱水,透明,封固,在光学显微镜下观察。选择细胞分布较均匀的高倍视野进行计数。

增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen PCNA)表达率计算方法 光镜下以细胞核中有棕褐色颗粒者为阳性细胞,即 PCNA 表达。每张切片随机检测 10 个视野,分别测定 400 倍镜下每一个计数单位的总细胞数和阳性细胞数。

$$PCNA = \frac{PCNA \text{ 数}}{\text{总细胞数}} \times 100\%$$

2.6 统计学处理方法 采用 SPSS11.0 统计软件进行方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结 果

3.1 光镜观察 手法组见软骨层增厚,表中层细胞增多,排列稍紊乱(图 1A);针剂组软骨层增厚,中层细胞增多,排列稍紊乱,出现簇状增生细胞团(图 1B);模型组软骨层明显变薄,软骨细胞减少,大小不等,簇集现象明显,排列紊乱(图 1C);假模组软骨层增厚,软骨细胞排列紊乱,有簇状增生(图 1D);正常组:细胞大小一致,排列规整(图 1E)。

3.2 软骨细胞增殖率 见表 1。

表 1 软骨细胞增殖率 $\bar{x} \pm s$		
分组	例数	增殖率(%)
手法组	10	17.90 ± 2.80 ¹⁾³⁾⁵⁾
针剂组	8	17.13 ± 4.09 ²⁾⁴⁾⁵⁾
模型组	8	13.25 ± 2.66
假模组	8	12.63 ± 2.92
正常组	8	7.75 ± 1.39 ¹⁾³⁾

注 与模型组比较,1) $P < 0.01$,2) $P < 0.05$;与假模组比较,3) $P < 0.01$,4) $P < 0.05$;与正常组比较,5) $P < 0.01$

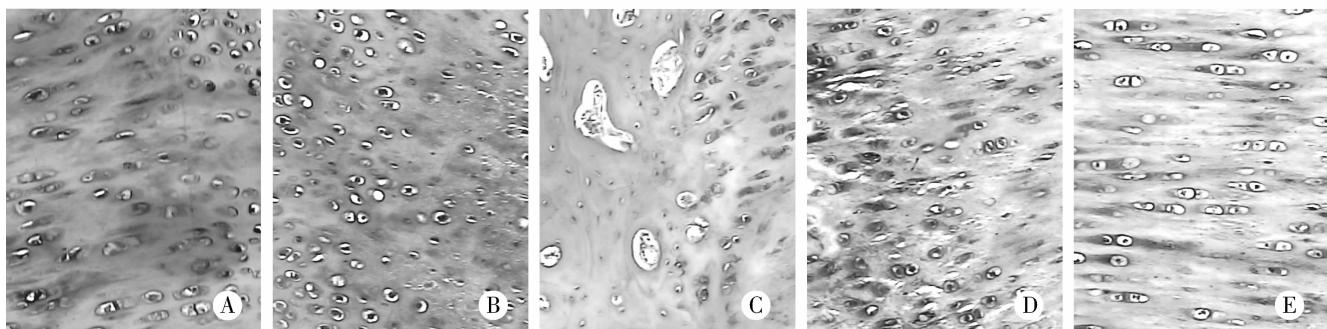


图1 兔右膝关节内侧胫骨平台软骨组织光镜片 HE 染色 $\times 100$

①手法组;②针剂组;③模型组;④假模组;⑤正常组

4 讨论

目前对膝 OA 的病因尚未完全明了,大多数 OA 的发病缺乏已知病因,但该病的始发部位在软骨^[3]。软骨组织的损伤启动并影响着膝 OA 发生、发展的整个病程。现代研究发现:增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen PCNA) 与细胞 DNA 合成关系密切,在细胞增殖的启动上起重要作用。PCNA 是真核生物复制复合体的核心成分,具有特殊的环状三级结构,作为真核细胞 DNA 聚合酶 δ 的推动因子,与不同复制相关蛋白结合,协调 DNA 复制过程,同时 PCNA 还作为功能转换因子,通过不同调控方式与多种细胞因子作用,参与了 DNA 损伤修复^[4],因此可作为评价细胞增殖状态的一个指标。本实验模型组 PCNA 表达率为 $(13.25 \pm 2.66)\%$,手法组 PCNA 表达率为 $(17.90 \pm 2.81)\%$,统计学处理 $P < 0.01$,差异有统计学意义,说明手法组细胞增殖的活性较模型组高。从 HE 染色片可见手法组软骨层增厚,表中层细胞增多;模型组软骨层明显变薄,软骨细胞减少。

本实验采用了骨内高压型动物模型,玻璃酸钠注射液关节内注射并不能降低关节骨内高压,但其 PCNA 表达率为 $(17.13 \pm 4.09)\%$,与模型组比较 $P < 0.05$,差异有统计学意义,原因考虑与玻璃酸钠注射液的营养作用有关。成人软骨组织没有血液供应,滑液成为最有可能的营养来源,代谢活跃的滑膜产生的滑液通过软骨基质扩散,可以提供给软骨组织足够的营养物质和氧^[5]。透明质酸可以代替关节腔的滑液,为关节软骨提供营养,减轻关节软骨的退变^[6]。而手法组取效的原因考虑与其可明显改善关节周围滑膜组织的循环有关。有学者研究证实,OA 与类风湿性关节炎之间炎症组织学参数有一部分相同,但 OA 关节表面的增生滑膜的扩散远比类风湿性关节炎要少。在正

常情况下,滑膜负有营养关节软骨的责任,一旦出现滑膜炎及慢性 OA,滑膜瘢痕化,它就不可能有这些功能^[7]。膝 OA 中医诊为“骨痹”^[8]。所谓痹,风寒湿三气杂至,合而为痹(《素问·痹论》),痹阻经络,气血阻滞不通,不通则痛。中医手法则可“按其经络,以通郁闭之气,摩其壅聚,以散淤结之肿”(《医宗金鉴·正骨心法要旨·手法释义》)。揉髌手法缓解膝周肌肉紧张度,松解髌周软组织粘连,降低关节内压,考虑通过改善胫骨上段、股骨下段及髌骨周围的血液循环,改善膝关节囊滑膜组织的血液循环,促进滑膜组织分泌正常的滑液以供给软骨组织代谢,所以促进了软骨损伤部位的细胞增殖。此外,软骨基质中蛋白多糖有吸水膨胀的特性,关节活动时,关节透明软骨面之间时而压缩时而放松。压缩时,基质内液体溢出;放松时,液体进入基质内。如此反复交替进行,以保持软骨细胞的营养供给^[9]。揉髌手法施术时,兔膝关节软骨组织承受屈伸牵张、揉按等产生的应力,一张一弛,促进软骨代谢物质的交换,应该也是手法组软骨细胞增殖较模型组明显的原因之一。本实验中假模组 PCNA 表达率为 $(12.63 \pm 2.92)\%$,与正常组比较 $P < 0.01$,差异有统计学意义,理论上不应该有这种变化,出现这些变化是否与手术中对臀部浅表血管较多损伤有关,浅静脉阻断后也可造成不同部位的骨内高压的动态变化^[10]。但假模组的损伤程度理论上难以有令人信服的解释,我们将在下次实验中进行探讨。正常组软骨细胞增殖率最低,考虑与其组织处于正常代谢有关。生物局部组织损伤后,可激发机体组织的细胞活性进行修复,所以其它组软骨细胞的增殖均较正常组高。

本实验证实,揉髌手法可明显提高兔膝关节透明软骨细胞的增殖率进而维护软骨组织的(下转第 12 页)

由于腰椎间盘突出症与骶髂关节错位两者症状相似,都表现为腰腿痛,只是病位不同,性质有别。在治疗上两者都以非手术治疗为首选^[11-12],大推拿治疗腰椎间盘突出症实现了牵引、斜扳、按压、抖动等各种组合动作,但费时费力,对医生要求较高,经验不同,效果有别,操作过程与效果均难以复制。骶髂关节错位的复位方法虽然相对简单,但当腰椎间盘突出症与骶髂关节错位同时并发时,则要舍弃单髋过伸复位法,而改用经改良的脊椎定点旋转复位法来达到同时对两者进行治疗整复。然而,三维腰椎牵引床的发明与开发利用,使医生借助高科技手段从笨重的操作中解脱出来,能同时对腰椎间盘突出与骶髂关节错位进行治疗,在治疗中参数的设置以整复关节错位为主,但牵引与整复能同时进行,且能收到好的整复效果,错位关节整复后的牵引则以治疗腰椎间盘突出为主。因此,我们认为在两者的治疗中,利用三维牵引的治疗原则就是“整复为主,牵引为次,即是以整复骶髂关节错位为主,对腰椎间盘突出牵引为次”,这完全符合中医强调的“骨正筋荣”的观点。而三维牵引正是对这两者同时并发时有效的治疗手段之一。

另外,相当大部分患者在治疗期间,由于缺乏锻炼与外固定,复位后的骶髂关节与腰椎后关节出现多次反复错位,而现有腰围只能对腰椎进行固定,骶髂关节与腰骶关节则因关节韧带的松弛处于失控状态,为了克服上述缺陷,我们专门设计并开发了医用腰骶弹力固定带(专利号:2010201688389)。使之与三维牵引合用,成为一个效果很好的治疗组合。

(上接第 8 页)正常结构。其可能的作用机制是改善滑膜组织的扩散功能,促进了滑液的分泌,改善了软组织的物质代谢。

5 参考文献

- [1] 戴七一. 手法治疗髌骨软骨病疗效观察及机理探讨[J]. 广西中医药, 2002, 25(2): 17-18.
- [2] 戴七一, 文宗振, 林光琪, 等. 揉髌手法对兔膝关节软骨细胞凋亡影响的超微结构观察[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2010, 18(6): 1-3.
- [3] 胥少汀, 葛宝丰, 徐印坎. 实用骨科学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2008: 1337-1343.
- [4] 宋楠萌, 桑建利, 徐恒. 增殖细胞核抗原的分子结构及其生物学功能研究进展[J]. 自然科学进展, 2006, 16(10): 1201-1209.

6 参考文献

- [1] 龙层花, 钟士元, 王廷臣. 骨盆旋移综合征[J]. 颈腰痛杂志, 2004, 25(3): 198-202.
- [2] 孙峰. 香港中医门诊腰腿痛病人就诊病种统计分析[J]. 中医药通报, 2009, 8(1): 36-39.
- [3] 国家中医药管理局. 中医病症诊断疗效标准[S]. 南京: 南京大学出版社, 1994: 201-202.
- [4] 王兵, 王军, 王辰英, 等. 骨科手法治疗学[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2002: 169-171.
- [5] 梁伍, 卢柳霞, 王青松, 等. 三维牵引治疗骶髂关节错位 68 例的临床研究[J]. 山东中医杂志 2009, 28(6): 406-408.
- [6] 陈忠和. 下位胸椎与腰骶部常见损伤诊治经验[J]. 广西中医药, 1999, 10(5): 8-10, 12.
- [7] 梁伍, 卢柳霞, 王青松, 等. 三维牵引治疗腰椎间盘突出症伴骶髂关节错缝的临床研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2009, 17(6): 43-44.
- [8] 王平. 颈肩腰腿痛特效手法治疗图解[M]. 北京: 人民军医出版社, 2009, 114-124.
- [9] 高群兴, 张盛强, 朱干, 等. 腰椎间盘突出症治疗方法与腰椎生理曲度变化的相关性研究[J]. 中医正骨, 2006, 18(5): 13-14, 16.
- [10] 冯天有. 损伤性脊柱疾病诊治的中西医结合临床研究[J]. 空军总医院学报, 1997, 13(2): 63-66.
- [11] 黄仕荣, 詹红生, 石印玉. 腰椎间盘突出症腰腿痛与腰椎功能的相关性研究[J]. 颈腰痛杂志, 2006, 27(4): 273-275.
- [12] 朱才兴, 焦伟国, 成忠实, 等. 骶髂关节错位误诊单纯腰椎间盘突出症原因分析[J]. 中国康复理论与实践, 2004, 10(4): 234-235.

(2010-06-10 收稿 2011-01-08 修回)

- [5] Joseph A. Buckwalter, MD, MS Thomas A, 等. 骨科基础科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001, 389-390.
- [6] 代岭辉, 杜宁. 关节软骨损伤生物学修复的研究进展[J]. 中国骨伤, 2009, 22(9): 721.
- [7] 娄思权. 骨关节炎的病理和发病因素[J]. 中华骨科杂志, 1996, 16(1): 56-59.
- [8] 戴七一, 张坤赐, 陈秋顺, 等. 膝关节骨痹的分型与 X 线影像关系的临床研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2007, 15(7): 23-32.
- [9] 孟和, 顾志华. 骨伤科生物力学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 310.
- [10] 郭开今, 王业华, 周冰, 等. 静脉回流对膝关节骨内压影响的动态观察[J]. 徐州医学院学报, 1995, 15(4): 389.

(2010-12-21 收稿 2011-04-15 修回)