

# 活血、温经、补益肝肾类中药对 膝关节炎兔关节软骨形态的影响

吴权<sup>1</sup>, 李启运<sup>1</sup>, 王素英<sup>2</sup>, 龙树明<sup>1</sup>, 柯高峰<sup>3</sup>

(1. 浙江省宁波市中医院, 浙江 宁波 315010; 2. 浙江省宁波市病理中心, 浙江 宁波 315031; 3. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

**摘要 目的:**观察活血、温经及补益肝肾 3 类中药对膝关节炎兔关节软骨形态的影响。**方法:**将 62 只新西兰白兔随机分为 6 组, A 组 12 只, B、C、D、E 和 F 组各 10 只。采用关节制动法对 B、C、D、E 和 F 组动物左后腿进行膝关节炎造模。造模成功后进行药物干预, A、B 组以 10 mL 蒸馏水灌胃, C 组以 10 mL 丹参和当归药液灌胃, D 组以 10 mL 桂枝和防风药液灌胃, E 组以 10 mL 杜仲和怀牛膝药液灌胃, F 组以 10 mL 金乌骨通胶囊水溶液灌胃。各组动物均在每天上午 10 时给药 1 次。分别于药物干预 21 d 和 42 d 后分 2 批处死动物, 取左后腿股骨外髁关节软骨及软骨下骨, 制成组织切片后分别进行 HE 染色和阿利辛蓝-过碘酸雪夫氏染色, 采用 Mankin 软骨组织学评分法进行评分。**结果:**①动物一般情况。造模结束时, B、C、D、E 和 F 组动物膝关节肿胀, 屈伸活动不利, 行走呈跨越步态。造模期间共有 9 只动物因拒绝进食死亡。②Mankin 评分。药物干预后 21 d, 各组动物膝关节软骨 Mankin 评分比较, 差异有统计学意义[(0.67±0.82)分, (13.00±1.63)分, (4.75±2.22)分, (6.75±0.96)分, (8.25±1.26)分, (9.75±2.36)分,  $F=34.904, P=0.000$ ]。组间两两比较, A 组评分小于 B、C、D、E 和 F 组( $P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.009$ ); B 组大于 C、D、E 和 F 组( $P=0.001, P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ); C 组小于 E 组和 F 组( $P=0.005, P=0.000$ ); D 组小于 F 组( $P=0.015$ ); 其余各组间两两比较, 差异均无统计学意义。药物干预后 42 d, 各组动物膝关节软骨 Mankin 评分比较, 差异有统计学意义[(0.67±1.03)分, (13.25±1.50)分, (3.00±0.81)分, (4.50±1.73)分, (4.00±1.10)分, (4.75±1.71)分,  $F=44.868, P=0.000$ ]。组间两两比较, A 组评分小于 B、C、D、E 和 F 组( $P=0.000, P=0.014, P=0.000, P=0.001, P=0.000$ ); B 组大于 C、D、E 和 F 组( $P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ); 其余各组间两两比较, 差异均无统计学意义。E 组和 F 组干预后 42 d 的膝关节软骨 Mankin 评分小于干预后 21 d 的膝关节软骨 Mankin 评分( $t=5.112, P=0.001; t=3.532, P=0.017$ ), 其余各组药物干预后 21 d 和 42 d 膝关节软骨 Mankin 评分比较, 差异均无统计学意义。**结论:**活血、温经及补益肝肾 3 类中药均能改善膝关节炎兔膝关节软骨形态, 达到保护软骨、延缓软骨退变的目的, 但不能阻断和逆转软骨退变的进程。

**关键词** 骨关节炎, 膝 软骨, 关节 活血 温经 补益肝肾 动物实验

**Effect of three kinds of traditional Chinese drug including activating blood agents, warming meridians agents and reinforcing liver&kidney agents on articular cartilage morphology in rabbits with knee osteoarthritis** Wu Quan<sup>\*</sup>, Li Qiyun, Wang Suying, Long Shuming, Ke Gaofeng. <sup>\*</sup> Ningbo Hospital of Traditional Chinese Medicine, Ningbo 315010, Zhejiang, China

**ABSTRACT Objective:** To observe the effect of three kinds of traditional Chinese drug (TCD) including activating blood agents, warming meridians agents and reinforcing liver&kidney agents on articular cartilage morphology in rabbits with knee osteoarthritis (KOA). **Methods:** Sixty-two New Zealand white rabbits were randomly divided into 6 groups, 12 cases in group A and 10 cases in each of the rest groups. The rabbits in group B, C, D, E and F were administrated with immobilization in the left hind legs to build models of KOA. Then, the rabbits in group A and B were intragastric administrated with distilled water (10 mL), while the rabbits in group C, D, E and F were intragastric administrated with solution of salvia miltiorrhiza and angelica (10mL), solution of cassia twig and saposhnikovia divaricata (10 mL), solution of eucommia ulmoides and bidentata blume (10 mL) and JINWU GUTONG solution (10 mL) respectively. The rabbits in each group were dosed with drug once a day at 10 am. The rabbits were executed in 2 batches at 3 and 6 weeks after the beginning of the drug intervention, and their lateral condyle articulars cartilago and subchondral bone in the left hind leg were fetched out. Their histologic sections were received HE staining and Alcian blue-periodic acid Schiff staining respectively and were evaluated according to Mankin cartilage histological score. **Results:** After the modeling, the knee of the rabbits in group B, C, D, E and F were swollen and were unfavourable for extension -

flexion. The rabbits showed steppage gait. Nine rabbits died of hunger strike during the modeling period. There was statistical difference in Mankin scores between the 6 groups at 21 days after the beginning of the drug intervention ( $0.67 \pm 0.82, 13.00 \pm 1.63, 4.75 \pm 2.22, 6.75 \pm 0.96, 8.25 \pm 1.26, 9.75 \pm 2.36$  points,  $F = 34.904, P = 0.000$ ). Further pairwise comparison showed that the score of group A was less than those of group B, C, D, E and F ( $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.009$ ), the score of group B was greater than those of group C, D, E and F ( $P = 0.001, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$ ), the score of group C was less than those of group E and F ( $P = 0.005, P = 0.000$ ), and the score of group D was less than that of group F ( $P = 0.015$ ), while there was no statistical difference in Mankin scores between the rest paired groups. There was statistical difference in Mankin scores between the 6 groups at 42 days after the beginning of the drug intervention ( $0.67 \pm 1.03, 13.25 \pm 1.50, 3.00 \pm 0.81, 4.50 \pm 1.73, 4.00 \pm 1.10, 4.75 \pm 1.71$  points,  $F = 44.868, P = 0.000$ ). Further pairwise comparison showed that the score of group A was less than those of group B, C, D, E and F ( $P = 0.000, P = 0.014, P = 0.000, P = 0.001, P = 0.000$ ), the score of group B was greater than those of group C, D, E and F ( $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$ ), while there was no statistical difference in the scores between the rest paired groups. The Mankin scores of group E and F were less at 42 days compared to 21 days after the beginning of the drug intervention ( $t = 5.112, P = 0.001; t = 3.532, P = 0.017$ ), while there was no statistical difference in the scores between the two time points for the other groups. **Conclusion:** All the three kinds of TCD, including activating blood agents, warming meridians agents and reinforcing liver&kidney agents, can ameliorate articular cartilage morphology in rabbits with KOA, so as to protect the cartilage and delay cartilage degeneration. However, it can't interdict and reverse the process of cartilage degeneration.

**Key words** Osteoarthritis, knee; Cartilage, articular; Activating blood; Warming meridians; Reinforcing liver&kidney; Animal experimentation

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 的核心病变是软骨裂解、丧失, 观察软骨组织学改变可以判断软骨的退变程度及药物干预后的修复程度。OA 属中医“骨痹”范畴, 其内因为肝肾亏虚, 外因为血液瘀滞和寒湿痹阻, 制宜补益肝肾、活血温经。本研究从病理角度观察了中医治疗 OA 最常用的活血、温经及补益肝肾 3 类中药对 OA 软骨组织形态的影响, 现报告如下。

## 1 材料与仪器

**1.1 实验动物** 普通级 8 月龄健康新西兰白兔 62 只, 雌雄各半, 体质量  $2 \sim 2.5$  kg。由浙江中医药大学实验动物中心提供, 实验动物许可证号: syxk (浙) 2008-0116。

**1.2 实验药物** 丹参 760 g、当归 380 g、桂枝 380 g、防风 320 g、杜仲 580 g、怀牛膝 580 g, 由宁波鄞州医药公司提供, 宁波中医院统一浓煎 1 600 mL, 生药含量分别为  $0.475 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.238 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.238 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.200 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.363 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.363 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。金乌骨通胶囊 (每粒 0.35 g), 贵州盛世龙方制药有限公司生产, 批号: 120813。

**1.3 实验仪器** 自动煎药机 (东华原医疗设备有限责任公司), OLYMPUS BX53 光学显微镜 (奥林巴斯公司), LEICA RM2235 切片机 (LEICA 公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组与造模** 将 62 只白兔随机分为 6 组, A 组 12 只, B、C、D、E 和 F 组各 10 只。采用关节制动

法<sup>[1-2]</sup>对 B、C、D、E 和 F 组白兔进行膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 造模, 即将兔左后膝关节在伸直位以管型石膏固定 6 周, 以获得 KOA 模型。

**2.2 药物干预** 6 周后取下石膏, 自由活动, 次日起进行药物干预。参考《药理实验方法学》的动物给药方法, 兔子服用 10 mL 药物相当于成人服用 200 mL 药物<sup>[3]</sup>。A、B 组以 10 mL 蒸馏水灌胃, C 组以 10 mL 事先煎好的丹参和当归药液灌胃, D 组以 10 mL 事先煎好的桂枝和防风药液灌胃, E 组以 10 mL 事先煎好的杜仲和怀牛膝药液灌胃, F 组以 10 mL 金乌骨通胶囊水溶液灌胃 (1/2 颗胶囊溶于 10 mL 蒸馏水中)。各组动物均在每天上午 10 时给药 1 次。

**2.3 取材及病理观察** 分别于药物干预 21 d 和 42 d 后分 2 批采用放血法处死动物, 切开左膝关节, 以环锯一次性完整切取出股骨外髁关节软骨及软骨下骨, 用 10% 福尔马林液固定常温保存。标本经脱钙→脱水→石蜡包埋→切片→烘片处理, HE 染色后观察软骨分裂、排列、软骨潮线和血管增生情况; 阿利辛蓝-过碘酸雪夫氏 (Alcian blue - periodic acid Schiff, AB-PAS) 染色后观察软骨基质着色情况。由 2 位中级以上职称病理科专业医师按 Mankin 软骨组织学评分标准<sup>[4]</sup>单独读片、打分, 取平均值作为最终得分。

**2.4 数据统计学处理** 采用 SPSS19.0 软件对所得数据进行统计分析, 药物干预后 21 d 和 42 d 时各组动物关节软骨 Mankin 评分的总体比较采用方差分

析,组间两两比较采用 LSD- $t$  检验,各组干预后 2 个时点之间软骨 Mankin 评分的组内比较采用  $t$  检验,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

### 3 结果

**3.1 动物一般情况** 造模结束时,B、C、D、E 和 F 组动物膝关节肿胀,屈伸活动不利,行走呈跨越步态。造模期间共有 9 只动物因拒绝进食死亡,其中 B、C、D 和 F 组在造模开始后 21 d 内和 21 d 后各死亡 1 只,E 组在造模开始后 21 d 内死亡 1 只。

**3.2 病理观察结果** ①肉眼观察:A 组软骨光滑、透明、呈浅蓝色,取软骨时软骨下骨质地坚硬;B 组软骨呈浅黄色,厚度明显变薄,可见散在软骨缺损,表面粗糙,不透明,软骨下骨松脆易折;C、D、E 和 F 组软骨变化明显好于 B 组,但与 A 组相比均存在不同程度

退变。②HE 染色:A 组细胞排列整齐,无明显增生分裂,潮线规整[图 1(1)];B 组细胞排列紊乱,分裂增生,潮线不清晰[图 1(2)];C 组药物干预 21 d 和 42 d 时细胞轻度分裂,排列尚整齐,潮线尚清晰[图 1(3),图 1(4)];D 组药物干预 21 d 时细胞中度分裂,排列中度紊乱[图 1(5)],干预 42 d 时仍中度分裂[图 1(6)];E 组药物干预 42 d 时细胞未见明显分裂,排列整齐,潮线清晰,较 21 d 时明显好转[图 1(7),图 1(8)];F 组药物干预 21 d 和 42 d 时均见细胞轻度分裂,排列欠整齐,潮线不清晰[图 1(9),图 1(10)]。③AB-PAS 染色:A 组着色良好[图 2(1)],B 组着色明显减退[图 2(2)],C 组[图 2(3),图 2(4)]和 D 组[图 2(5),图 2(6)]着色情况优于 B 组,但不及 E 组[图 2(7),图 2(8)]和 F 组[图 2(9),图 2(10)]。

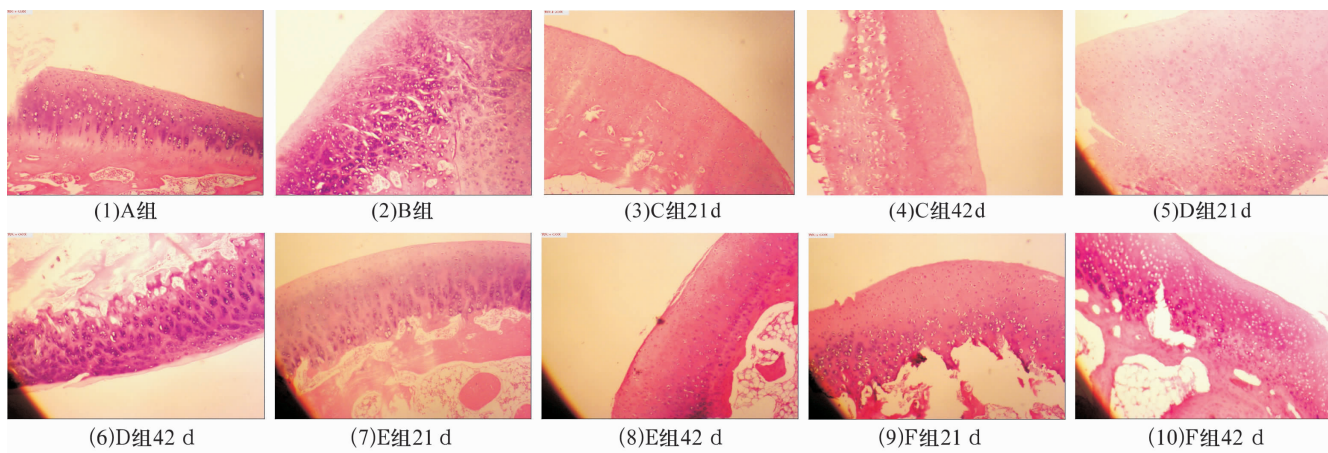


图 1 各组动物膝关节软骨病理检查结果(HE 染色  $\times 40$ )

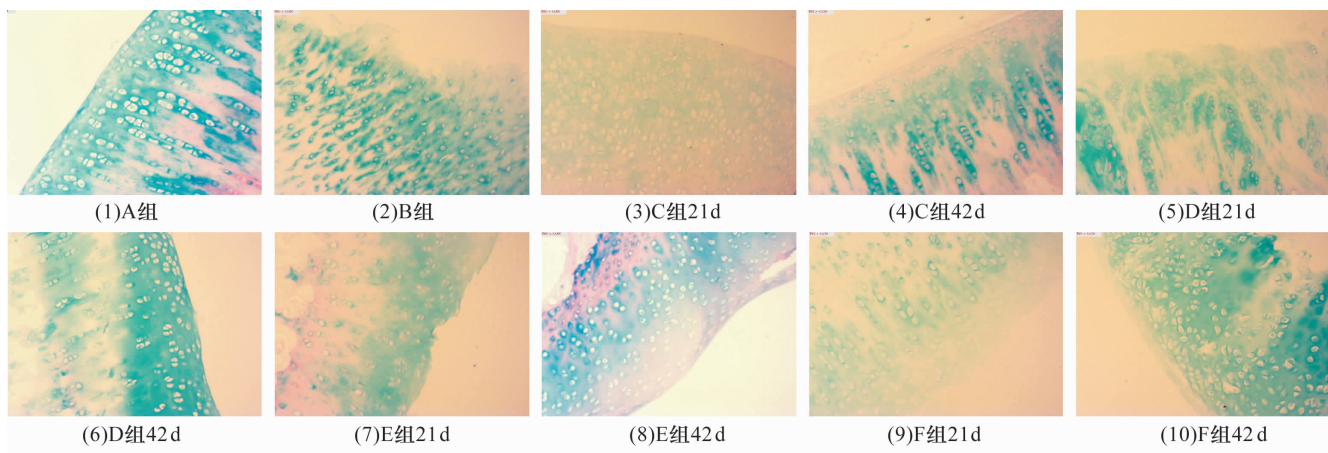


图 2 各组动物膝关节软骨病理检查结果(AB-PAS 染色  $\times 100$ )

**3.3 Mankin 评分评定结果** 药物干预后 21 d,各组动物膝关节软骨 Mankin 评分比较,差异有统计学意义。组间两两比较,A 组评分小于 B、C、D、E 和 F 组 ( $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.009$ );B 组大于 C、D、E 和 F 组 ( $P = 0.001$ ,  $P =$

$0.000$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ );C 组小于 E 组和 F 组 ( $P = 0.005$ ,  $P = 0.000$ );D 组小于 F 组 ( $P = 0.015$ );其余各组间两两比较,差异均无统计学意义。药物干预后 42 d,各组动物膝关节软骨 Mankin 评分比较,差异有统计学意义。组间两两比较,A 组评分小于 B、C、

D、E 和 F 组 ( $P = 0.000, P = 0.014, P = 0.000, P = 0.001, P = 0.000$ ); B 组大于 C、D、E 和 F 组 ( $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$ ); 其余各组间两两比较, 差异均无统计学意义。E 组和 F 组干预后 42 d 的膝关节软骨 Mankin 评分小于干预后 21 d 的膝关节软骨 Mankin 评分, 其余各组药物干预后 21 d 和 42 d 膝关节软骨 Mankin 评分比较, 差异均无统计学意义(表 1)。

表 1 药物干预后 21 d 和 42 d 各组动物膝关节  
软骨 Mankin 评分比较 分

组别	膝关节软骨 Mankin 评分		<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
	药物干预后 21 d	药物干预后 42 d		
A 组	0.67 ± 0.82	0.67 ± 1.03	0.000	1.000
B 组	13.00 ± 1.63	13.25 ± 1.50	0.225	0.829
C 组	4.75 ± 2.22	3.00 ± 0.81	1.481	0.189
D 组	6.75 ± 0.96	4.50 ± 1.73	2.274	0.063
E 组	8.25 ± 1.26	4.00 ± 1.10	5.112	0.001
F 组	9.75 ± 2.36	4.75 ± 1.71	3.532	0.017
<i>F</i> 值	34.904	44.868		
<i>P</i> 值	0.000	0.000		

4 讨 论

通过关节制动限制关节活动, 可使跨越关节的肌肉及关节囊持续收缩, 关节面的压力持续增加, 导致软骨细胞发生退变。采用关节制动法制作 KOA 模型不会干扰关节内解剖结构, 有利于观察软骨结构的变化<sup>[1,5]</sup>。B、C、D、E 和 F 组造模后肉眼可见软骨变薄, 颜色晦暗, 周围滑膜水肿增生, 符合骨关节炎软骨病理变化。由于该造模方法长时间限制动物关节活动, 对动物食欲影响较大, 容易造成动物死亡, 本组 9 只动物均因拒食而死亡, 因此可人工被动喂食以降低动物死亡率。

6 周内通过制动获得的 KOA 模型, 可以认为是早期 KOA 模型。在这一时期, 病变关节周围血流速度变慢, 发生瘀滞, 且存在明显炎症。C 组动物在药物干预后 21 d 时的膝关节软骨 Mankin 评分小于 E 和 F 组, 可能是由于活血类中药早期干预改善了膝关节周围的血液瘀滞状态, 阻断了 OA 发病过程中微循环障碍—氧自由基—OA 的恶性循环, 控制了滑膜炎症, 减缓了软骨退变<sup>[6]</sup>。结合组织学观察结果, 我们发现活血类中药主要通过控制表层软骨细胞分裂增生、改善软骨细胞排列、减少血管增生, 达到减缓软骨退变的目的。

E 组动物在药物干预后 42 d 时的 Mankin 评分低于干预后 21 d 时的评分, 提示补益肝肾类中药在治疗较长时间后可以改善 KOA 软骨病理损害。从 AB-PAS 染色结果来看, E 组软骨基质着色良好, 说明

补益肝肾类中药可以减少软骨基质中的中性蛋白多糖和酸性蛋白多糖的丢失, 减缓软骨基质的裂解, 从而达到保护软骨的目的<sup>[7]</sup>。F 组治疗后的结果与 E 组较为相似, 可能是由于金乌骨通胶囊的组成以补益肝肾类中药为主。

D 组动物药物干预后的 Mankin 评分结果说明了温经类中药可以改善 KOA 软骨退变。但由于本实验造模时没有施加“寒”的外因, 如吹风、暴露于低温环境等, 因此, 温经类中药在治疗 KOA 中的效果还需要进一步完善实验方案来验证。

从药物干预后各组动物的膝关节软骨 Mankin 评分来看, 活血、温经、补益肝肾 3 类中药及金乌骨通胶囊均能改善 KOA 动物膝关节软骨形态, 达到保护软骨、延缓软骨退变的目的。但至治疗结束时, C、D、E 和 F 组评分仍大于 A 组, 说明药物干预只能减缓病变关节软骨退变, 而无法阻断和逆转软骨退变的进程。

综上所述, 活血、温经及补益肝肾 3 类中药均能改善 KOA 动物膝关节软骨形态, 达到保护软骨、延缓软骨退变的目的, 但不能阻断和逆转软骨退变的进程。活血类中药主要通过抑制软骨细胞分裂增生来保护软骨, 起效较快; 补益肝肾类中药主要通过抑制软骨基质蛋白多糖分解来保护软骨, 起效较慢。

5 参考文献

[1] 邱贵兴, 王桂生. 兔膝关节制动引起关节软骨退变的实验研究[J]. 中华骨科杂志, 1987, 25(3): 175.

[2] Videman T. Experimental osteoarthritis in the rabbit: comparison of different periods of repeated immobilization[J]. Acta Orthop Scand, 1982, 53(3): 339-347.

[3] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 202-204.

[4] Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data[J]. J Bone Joint Surg Am, 1971, 53(3): 523-537.

[5] 聂林, 张学义, 陈国瑞, 等. 骨关节炎的动物模型[J]. 中华实验外科杂志, 1990, 7(2): 96-97.

[6] 王文瑞, 刘宏泽, 卫小春, 等. 川芎嗪防治膝关节软骨退变的实验研究[J]. 中国骨伤, 2004, 17(2): 80-82.

[7] 董妙珠, 肖萍, 叶于薇, 等. PAS、AB 染色法在软骨蛋白多糖检测中的运用[J]. 上海预防医学杂志, 2004, 16(9): 419-420.