

· 基础研究 ·

石氏薰洗方药浴干预兔膝关节炎的效果及作用机制研究

张毓杰, 田飏, 闻胜月, 张旻, 庞坚, 詹红生, 陈博

(上海中医药大学附属曙光医院, 上海 201203)

摘要 目的:探讨石氏薰洗方药浴干预兔膝关节炎(knee osteoarthritis, KOA)的效果及作用机制。方法:将 50 只新西兰兔随机分为假手术组(6 只)、模型组(6 只)、石氏薰洗方浸泡组(16 只)、纯净水浸泡组(16 只)和扶他林组(6 只)。模型组、石氏薰洗方浸泡组、纯净水浸泡组及扶他林组在兔右膝关节腔内注射 0.3 mL 含 0.03 mol·L⁻¹左旋半胱氨酸和 4% 木瓜蛋白酶的生理盐水;假手术组仅穿刺右膝关节腔,不注射药物。分别从各组随机选取 1 只兔,验证造模成功后,将石氏薰洗方浸泡组剩余的 15 只兔随机分为药浴 45℃组、40℃组和 35℃组,每组 5 只,分别用相应温度的石氏薰洗方药液浸泡右膝关节,每次 30 min,每天 1 次;将纯净水浸泡组剩余的 15 只兔随机分为水浴 45℃组、40℃组和 35℃组,每组 5 只,分别用相应温度的纯净水浸泡右膝关节,每次 30 min,每天 1 次;扶他林组免于右膝关节处外涂双氯芬酸二乙胺乳胶剂,每次涂抹 5 min,每天 2 次;各组均连续干预 4 周。模型组与假手术组兔不做任何处理。干预结束后,行右膝关节 X 线检查,观察关节间隙及骨赘形成情况;解剖分离右膝关节,观察软骨表面及软骨下骨暴露情况,评估膝关节软骨退变情况;采用 HE 染色观察右膝关节滑膜组织病理学变化,评估滑膜炎严重程度;采用 ELISA 法检测膝关节液中白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)、环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)、一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)-3、MMP-13 的蛋白表达水平;采用实时定量逆转录 PCR 检测 IL-1 β 、TNF- α 、NF- κ B、COX-2、NOS、MMP-3、MMP-13 的 mRNA 表达水平。结果:①膝关节影像学观察结果。干预结束后,假手术组膝关节间隙正常、无骨赘增生;模型组膝关节间隙明显变窄,有明显骨赘形成;药浴各温度组(45℃、40℃、35℃)相较于同温度水浴组,关节间隙略宽,骨赘体积减小,骨质密度异常区域缩小,且影像灰度层次更清晰;药浴 40℃组相较于药浴 45℃组和 35℃组,关节间隙更宽,骨赘数量更少、体积更小;水浴 40℃组相较于水浴 45℃组和 35℃组,关节间隙略宽,骨赘数量减少、体积减小;扶他林组关节间隙接近正常,骨赘较少,形态接近正常。②膝关节软骨大体观察结果。药浴 40℃组关节软骨退变评分低于药浴 45℃组和 35℃组($P=0.047$, $P=0.028$),水浴 40℃组关节软骨退变评分低于水浴 45℃组和 35℃组($P=0.049$, $P=0.033$),药浴 40℃组关节软骨退变评分低于水浴 45℃组和 35℃组($P=0.007$, $P=0.015$)、与水浴 40℃组的差异无统计学意义($P=0.330$),药浴 40℃组关节软骨退变评分与扶他林组的差异无统计学意义($P=0.083$),水浴 40℃组关节软骨退变评分高于扶他林组($P=0.021$)。③膝关节滑膜组织病理学观察结果。药浴 40℃组滑膜病理学评分低于药浴 45℃组和 35℃组($P=0.047$, $P=0.020$),水浴 40℃组滑膜病理学评分低于水浴 45℃组和 35℃组($P=0.044$, $P=0.002$),药浴 40℃组滑膜病理学评分低于水浴 45℃组、40℃组和 35℃组($P=0.004$, $P=0.037$, $P=0.000$),药浴 40℃组滑膜病理学评分与扶他林组的差异无统计学意义($P=0.679$),水浴 40℃组滑膜病理学评分高于扶他林组($P=0.017$)。④膝关节液中炎症相关因子及基质降解酶的蛋白表达水平检测结果。药浴各温度组(45℃、40℃、35℃)、水浴各温度组(45℃、40℃、35℃)及扶他林组膝关节液中 IL-1 β 、TNF- α 、NF- κ B、COX-2、NOS、MMP-3、MMP-13 的蛋白表达水平均低于模型组(均 $P=0.000$),药浴 45℃组膝关节液中 IL-1 β 、NF- κ B、NOS、MMP-3、MMP-13 的蛋白表达水平均低于药浴 40℃组和 35℃组(IL-1 β : $P=0.001$, $P=0.000$;NF- κ B: $P=0.017$, $P=0.027$;NOS: $P=0.029$, $P=0.002$;MMP-3: $P=0.035$, $P=0.001$;MMP-13: $P=0.045$, $P=0.000$),药浴 40℃组膝关节液中 TNF- α 、COX-2 的蛋白表达水平均低于药浴 45℃组和 35℃组(TNF- α : $P=0.011$, $P=0.017$;COX-2: $P=0.009$, $P=0.002$);药浴 40℃组膝关节液中 IL-1 β 、TNF- α 、NF- κ B、COX-2、NOS、MMP-3、MMP-13 的蛋白表达水平均低于水浴 40℃组($P=0.002$, $P=0.035$, $P=0.000$, $P=0.001$, $P=0.026$, $P=0.005$, $P=0.004$)。⑤膝关节液中炎症相关因子及基质降解酶的 mRNA 表达水平检测结果。药浴各温度组(45℃、40℃、35℃)、水浴各温度组(45℃、40℃、35℃)及扶他林组膝关节液中 IL-1 β 、TNF- α 、NF- κ B、COX-2、NOS、MMP-3、MMP-13 的 mRNA 表达水平均低于模型组(均 $P=0.000$),药浴 40℃组膝关节液中 IL-1 β 、TNF- α 、NF- κ B、COX-2、NOS、MMP-3、MMP-13 的 mRNA 表达水平均低于药浴

基金项目:国家自然科学基金项目(81774340);第七批全国老中医药专家学术经验继承工作指导老师及继承人项目(国中医药人教函[2022]76号);上海市科技计划项目(21Y11921600, 20MC1920600);上海市名老中医学术经验研究工作室建设项目(SHGZS-202238)

通讯作者:陈博 E-mail:cbm818@126.com

45 °C 和 35 °C 组 (IL-1 β : $P=0.000, P=0.000$; TNF- α : $P=0.010, P=0.000$; NF- κ B: $P=0.013, P=0.002$; COX-2: $P=0.000, P=0.013$; NOS: $P=0.024, P=0.018$; MMP-3: $P=0.038, P=0.014$; MMP-13: $P=0.001, P=0.000$), 药浴 40 °C 组膝关节液中 IL-1 β 、TNF- α 、NF- κ B、COX-2、NOS、MMP-3、MMP-13 的 mRNA 表达水平均低于水浴 40 °C 组 ($P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.001, P=0.000, P=0.000$)。结论: 石氏熏洗方药浴能减轻 KOA 模型兔滑膜炎和延缓关节软骨退变, 且在 40 °C 时疗效最佳, 其效果与双氯芬酸二乙胺乳胶剂外涂相当; 其作用机制可能与其能够抑制 IL-1 β 、TNF- α 等促炎性细胞因子, 阻断 NF- κ B 信号通路, 降低 COX-2、NOS、MMPs 的表达有关。

关键词 骨关节炎, 膝; 兔; 石氏熏洗方; 沐浴疗法; 白细胞介素-1 β ; 肿瘤坏死因子- α ; 核因子- κ B; 环氧化酶-2; 基质金属蛋白酶; 一氧化氮合酶

Efficacy and mechanism of Shi's Xunxi Fang(石氏熏洗方) medicated bath therapy against knee osteoarthritis in rabbits: an experimental study

ZHANG Yujie, TIAN Biao, WEN Shengyue, ZHANG Min, PANG Jian, ZHAN Hongsheng, CHEN Bo

Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

ABSTRACT Objective: To investigate the therapeutic efficacy of Shi's Xunxi Fang(石氏熏洗方, SXXF) medicated bath therapy against knee osteoarthritis(KOA) in rabbits, and to explore its underlying mechanism. **Methods:** Fifty New Zealand rabbits were randomly assigned into sham-operated group(6 ones), model group(6 ones), SXXF immersion group(16 ones), purified water immersion group(16 ones), and voltaren group(6 ones). All rabbits but the ones in sham-operated group were treated with intra-articular injection of 0.3 mL normal saline containing 0.03 mol/L L-cysteine and 4% papain into the right knee joints for inducing KOA model, while the ones in sham-operated group only underwent puncture of the right knee joint cavity, without any drug injection. After that, one rabbit was randomly selected from each group to verify whether the KOA models were built successfully. After successful modeling, the remaining 15 rabbits in the SXXF immersion group and 15 ones in the purified water immersion group were further randomized into 45, 40, and 35 °C subgroups, respectively, with 5 ones in each group. The right knee joints of rabbits in the 6 subgroups were immersed in SXXF decoction and purified water, respectively, at their corresponding temperatures, once a day, 30 minutes at a time for consecutive 4 weeks. The rabbits in the voltaren group received external application of diclofenac diethylamine emulgel to the right knee joints, twice a day, 5 minutes at a time for consecutive 4 weeks. The ones in model group and sham-operated group were not given any intervention. After the end of intervention, the joint space and osteophyte formation were observed on the right knee joints by X-ray examination, and the right knee joints were dissected and separated to examine the articular cartilage surface and subchondral bone exposure and evaluate the degree of knee joint cartilage degeneration. Besides, the right knee synovial tissues were harvested and stained with HE staining kit to observe the histopathological changes and evaluate the severity of synovitis. Furthermore, the protein expression levels of interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), nuclear factor- κ B(NF- κ B), cyclooxygenase-2(COX-2), nitric oxide synthase(NOS), matrix metalloproteinase(MMP)-3, and MMP-13 in the knee joint synovial fluid were quantified using enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), and the mRNA expression levels of IL-1 β , TNF- α , NF- κ B, COX-2, NOS, MMP-3, and MMP-13 were detected by real-time quantitative reverse transcription PCR(qRT-PCR). **Results:** ①Post-intervention radiographic observations on knee joint. After the end of the intervention, the rabbits in sham-operated group exhibited normal knee joint space without osteophyte formation. In contrast, the rabbits in model group displayed a significantly narrowed knee joint space, with prominent osteophyte formation. Moreover, compared to the 45, 40, and 35 °C purified water immersion subgroups, the marked changes, manifesting as slightly widened knee joint space, reduced osteophyte volume, diminished areas of abnormal bone density, and improved grayscale resolution on radiographic images, were observed in the rabbits of SXXF immersion subgroups at the corresponding temperatures. Specifically, compared to the 45 and 35 °C SXXF immersion subgroups, wider joint space, fewer osteophytes with smaller volume were observed in rabbits of 40 °C SXXF immersion subgroup. Similarly, compared to the 45 and 35 °C purified water immersion subgroups, the slightly wider joint space and decreased osteophytes with reduced volume were observed in rabbits of 40 °C purified water immersion subgroup. The rabbits in voltaren group presented a joint space approaching normal, with fewer osteophytes and basically normal morphology. ②Gross morphological observation on knee joint cartilage. The degenerative score of joint cartilage was lower in 40 °C SXXF immersion subgroup compared to 45 and 35 °C SXXF immersion subgroups ($P=0.047, P=0.028$). Similarly, the degenerative score of joint cartilage was lower in 40 °C purified water immersion subgroup compared to 45 and 35 °C purified water immersion subgroups ($P=0.049, P=0.033$),

and it was lower in 40 °C SXXF immersion subgroup compared to 45 and 35 °C purified water immersion subgroups ($P = 0.007, P = 0.015$), but the comparison between 40 °C SXXF immersion subgroup and 40 °C purified water immersion subgroup or between 40 °C SXXF immersion subgroup and voltaren group revealed no significant differences ($P = 0.330, P = 0.083$), however, the degenerative score was higher in 40 °C purified water immersion subgroup compared to voltaren group ($P = 0.021$). ③ Pathological observation on knee joint synovial tissues. The pathological score of synovium was lower in 40 °C SXXF immersion subgroup compared to 45 and 35 °C SXXF immersion subgroups ($P = 0.047, P = 0.020$). Similarly, the pathological score of synovium was lower in 40 °C purified water immersion subgroup compared to 45 and 35 °C purified water immersion subgroups ($P = 0.044, P = 0.002$), and it was lower in 40 °C SXXF immersion subgroup compared to 45, 40, and 35 °C purified water immersion subgroups ($P = 0.004, P = 0.037, P = 0.000$). The comparison between 40 °C SXXF immersion subgroup and voltaren group revealed no significant differences ($P = 0.679$), however, the pathological score was higher in 40 °C purified water immersion subgroup compared to voltaren group ($P = 0.017$). ④ The protein expression levels of inflammation-related factors and matrix-degrading enzymes in the knee joint synovial fluid. The protein expression levels of IL-1 β , TNF- α , NF- κ B, COX-2, NOS, MMP-3, and MMP-13 in the knee joint synovial fluid were lower in 45, 40, and 35 °C SXXF immersion subgroups, 45, 40, and 35 °C purified water immersion subgroups, and voltaren group compared to model group (all $P = 0.000$). Furthermore, the protein expression levels of IL-1 β , NF- κ B, NOS, MMP-3, and MMP-13 in the knee joint synovial fluid were lower in 45 °C SXXF immersion subgroup compared to 40 and 35 °C SXXF immersion subgroups (IL-1 β : $P = 0.001, P = 0.000$; NF- κ B: $P = 0.017, P = 0.027$; NOS: $P = 0.029, P = 0.002$; MMP-3: $P = 0.035, P = 0.001$; MMP-13: $P = 0.045, P = 0.000$), while that of TNF- α and COX-2 were lower in 40 °C SXXF immersion subgroup compared to 45 and 35 °C SXXF immersion subgroups (TNF- α : $P = 0.011, P = 0.017$; COX-2: $P = 0.009, P = 0.002$). Additionally, the protein expression levels of IL-1 β , TNF- α , NF- κ B, COX-2, NOS, MMP-3, and MMP-13 in the knee joint synovial fluid were lower in 40 °C SXXF immersion subgroup compared to 40 °C purified water immersion subgroup ($P = 0.002, P = 0.035, P = 0.000, P = 0.001, P = 0.026, P = 0.005, P = 0.004$). ⑤ The mRNA expression levels of inflammation-related factors and matrix-degrading enzymes in the knee joint synovial fluid. The mRNA expression levels of IL-1 β , TNF- α , NF- κ B, COX-2, NOS, MMP-3, and MMP-13 in the knee joint synovial fluid were lower in 45, 40, and 35 °C SXXF immersion subgroups, 45, 40, and 35 °C purified water immersion subgroups, and voltaren group compared to model group (all $P = 0.000$), and they were lower in 40 °C SXXF immersion subgroup compared to 45 and 35 °C SXXF immersion subgroups (IL-1 β : $P = 0.000, P = 0.000$; TNF- α : $P = 0.010, P = 0.000$; NF- κ B: $P = 0.013, P = 0.002$; COX-2: $P = 0.000, P = 0.013$; NOS: $P = 0.024, P = 0.018$; MMP-3: $P = 0.038, P = 0.014$; MMP-13: $P = 0.001, P = 0.000$), and were lower in 40 °C SXXF immersion subgroup compared to 40 °C purified water immersion subgroup ($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.001, P = 0.000, P = 0.000$). **Conclusion:** SXXF medicated bath therapy can mitigate the synovial inflammation and delay the articular cartilage degeneration in KOA model rabbits, with optimal efficacy observed at 40 °C, and its therapeutic effect is comparable to that of external application of diclofenac diethylamine emulgel. It may work by inhibiting the pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF- α , blocking the NF- κ B signaling pathway, and down-regulating the expression of COX-2, NOS, and MMPs.

Keywords osteoarthritis; knee; rabbits; Shi's Xunxi Fang; bath therapy; interleukin-1beta; tumor necrosis factor-alpha; NF-kappa B; cyclooxygenase 2; matrix metalloproteinases; nitric oxide synthase

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是一种常见的慢性退行性骨关节疾病^[1], 其发病与老化、创伤、膝关节脱位、肥胖等因素引起的关节生物力学变化关系密切^[2]。KOA 主要影响中老年人群, 并且是中老年人群致残的主要原因之一^[3]。KOA 患者膝关节疼痛和活动受限, 导致生活质量下降及日常活动困难^[4]。近年来, 全膝关节置换手术数量持续攀升^[5], 这既反映了人口老龄化加剧背景下 KOA 患病率的整体上升^[6], 也凸显了当前在延缓疾病进展方面有效治疗手段的不足。因此, 探索能够有效控制 KOA 病情发展的治疗方法至关重要。

药浴作为中医外治法之一, 是指用药液洗浴全身

或局部的一种疗法。已有学者采用此法治疗 KOA 取得了满意的临床疗效^[7-8]。石氏熏洗方是海派中医临床经验总结的代表性验方, 具有散寒止痛、活血通络的功效。临床上我们采用该方药浴治疗 KOA 效果良好, 但尚缺乏循证医学证据支持。目前, 石氏熏洗方药浴治疗 KOA 的作用机制尚未阐明, 相关研究亦较为有限^[9-11]。为深入探讨石氏熏洗方药浴干预 KOA 的效果及作用机制, 我们开展了此项研究, 现报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

清洁级新西兰兔 50 只, 雌雄各半, 月龄 4 ~ 6 个月, 体质量 (2.19 ± 0.12) kg, 购于上海市松江区

车墩实验动物良种场[动物生产许可证号:SCXK(沪)2017-0003];均于上海中医药大学动物实验中心饲养[动物使用许可证号:SYXK(沪)2014-0008],饲养温度(24 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 55%,明暗交替(12 h/12 h),自由进食饮水。动物实验方案经上海中医药大学实验动物伦理委员会审查通过,伦理批件号:PZSHUTCM190322025。

1.2 实验主要试剂

白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) ELISA 试剂盒(货号:JK-E4962)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒(货号:JK-E4970)、环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2) ELISA 试剂盒(货号:JK-E5010)、一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS) ELISA 试剂盒(货号:JK-E4953)、核因子- κB (nuclear factor- κB , NF- κB) ELISA 试剂盒(货号:JK-E5062)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)-3 ELISA 试剂盒(货号:JK-E5238)、MMP-13 ELISA 试剂盒(货号:JK-E5236)均由上海酶联生物有限公司生产,4%多聚甲醛(货号:P0099-3L,碧云天生物技术公司),逆转录试剂盒(货号:15596-026,美国 Invitrogen 公司),左旋半胱氨酸(货号:C7352)、4%木瓜蛋白酶(货号:P3375)均由美国 Sigma 公司生产。

1.3 实验主要仪器

SL96 PCR 仪(美国 Analytik Jena 公司), Stepone plus q PCR 仪(美国 ABI 公司), EPS100 稳压电泳仪, GIS2009 凝胶成像系统(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 石氏熏洗方药液制备

石氏熏洗方的药物组成为:桂枝 20 g、麻黄 10 g、制天南星 20 g、细辛 10 g、白芷 20 g、威灵仙 20 g、鹿衔草 20 g、花椒 10 g、大黄 20 g。上述药物均由上海中医药大学附属曙光医院制剂中心提供。将上述药物放入水中煎煮,制成药液。兔每次治疗量为 $60 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ (按照人与动物间体表面积换算方法^[12]计算)。

2.2 动物分组与造模

2.2.1 分组方法 在适应性饲养 14 d 后,将 50 只兔按体质量由大到小排序后编号,采用 SPSS24.0 软件生成 50 个连续随机数字,记录在兔编号下方,再将 50 个随机数字由小到大排序,将随机数字排序 1~6 对应的兔纳入假手术组、7~12 对应的兔纳入模型组、13~28 对应的兔纳入石氏熏洗方浸泡组、29~44 对应的兔纳入纯净水浸泡组、45~50 对应的兔纳

入扶他林组。

2.2.2 KOA 模型建立 参照文献[13]建立 KOA 模型。模型组、石氏熏洗方浸泡组、纯净水浸泡组及扶他林组分别于造模开始后第 1 天、第 5 天、第 10 天在兔右膝关节腔内注射 0.3 mL 的含 $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 左旋半胱氨酸和 4% 木瓜蛋白酶的生理盐水;假手术组仅穿刺右膝关节腔,不注射药物。

2.3 模型鉴定

造模开始后第 28 天,分别从各组随机选取 1 只兔,采用过量戊巴比妥钠注射处死。解剖观察各组兔膝关节腔积液、滑膜颜色与形态,以及关节软骨表面光滑度与骨质暴露情况,以鉴定造模是否成功。

2.4 药物干预

造模成功后,参照上述分组方法,将石氏熏洗方浸泡组剩余的 15 只兔随机分为药浴 45°C 组、 40°C 组和 35°C 组,每组 5 只,分别用相应温度的石氏熏洗方药液浸泡右膝关节,每次 30 min,每天 1 次;将纯净水浸泡组剩余 15 只兔随机分为水浴 45°C 组、 40°C 组和 35°C 组,每组 5 只,分别用相应温度的纯净水浸泡右膝关节,每次 30 min,每天 1 次;扶他林组兔于右膝关节处外涂双氯芬酸二乙胺乳胶剂(北京诺华制药有限公司,国药准字:H20020176),每次涂抹 5 min,每天 2 次;各组均连续干预 4 周。模型组与假手术组兔不做任何处理。

2.5 样本采集与处理

干预结束后,先以关节腔穿刺冲洗法采集各组兔右侧膝关节液,置于 -80°C 冰箱保存待测;再腹腔注射过量戊巴比妥钠处死动物,于髌关节处离断右侧下肢,进行影像学观察后,解剖分离右膝关节,进行大体观察后,采集滑膜组织,于 4% 多聚甲醛中固定。

2.6 膝关节影像学观察

取离断的右侧下肢行膝关节 X 线检查,观察各组膝关节间隙及骨赘形成情况。

2.7 膝关节软骨大体观察

观察各组膝关节软骨表面及软骨下骨暴露情况,并参照文献[14]中的评分方法评估膝关节软骨退变情况,具体评分标准如下:0 分,软骨表面光滑、完整、光亮,无磨损及缺损;1 分,软骨表面毛糙,有磨损及细小裂纹,色泽晦暗;2 分,软骨表面出现糜烂,部分软骨缺损,缺损深度达软骨中层;3 分,软骨表面溃烂,软骨缺损深达软骨深层;4 分,关节软骨剥脱分离,软骨下骨暴露。

2.8 膝关节滑膜组织病理学观察

取置于 4% 多聚甲醛中的各组滑膜组织,常规脱水、石蜡包埋、切片,按照 HE 染色试剂盒说明书操作染色。显微镜下观察滑膜组织病理学变化,并按文献[15]中的滑膜病理学评分标准评估滑膜炎严重程度。滑膜病理学评分标准:评分项目包括滑膜衬里层增生层数(滑膜衬里层细胞少于 3 层为 0 分,3~4 层为 1 分,5~6 层为 2 分,超过 6 层为 3 分)、炎症细胞浸润(无炎症细胞浸润为 0 分,炎症细胞散在分布为 1 分,炎症细胞弥漫性分布为 2 分,形成淋巴滤泡或生发中心为 3 分)和血管生成程度(无血管新生为 0 分,轻度血管新生为 1 分,中度血管新生为 2 分,重度血管新生为 3 分);0~2 分为滑膜正常,3~5 分为轻度滑膜炎,6~7 分为中度滑膜炎,8~9 分为重度滑膜炎。

2.9 膝关节液中炎症相关因子及基质降解酶的蛋白表达水平检测

采用 ELISA 法检测各组关节液中 IL-1 β 、TNF- α 、NF- κ B、COX-2、NOS、MMP-3 及 MMP-13 的蛋白表达水平。

2.10 膝关节液中炎症相关因子及基质降解酶的 mRNA 表达水平检测

采用实时定量逆转录 PCR 检测各组关节液中 IL-1 β 、TNF- α 、NF- κ B、COX-2、NOS、MMP-3 和 MMP-13 的 mRNA 表达水平。具体步骤如下:根据 Trizol 操作说明书提取总 RNA,将总 RNA 逆转录为 cDNA,应用 cDNA 模板进行实时定量 PCR 反应。实时定量 PCR 引

物信息见表 1。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目标基因的 mRNA 表达水平。

2.11 数据统计

采用 SPSS24.0 软件进行数据统计分析。9 组兔膝关节软骨退变评分,滑膜病理学评分,膝关节液中 IL-1 β 、TNF- α 、NF- κ B、COX-2、NOS、MMP-3、MMP-13 的蛋白表达水平和 mRNA 表达水平的组间比较均采用单因素方差分析,组间两两比较均采用 LSD-*t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 模型鉴定结果

造模开始后第 28 天,假手术组兔膝关节腔无积液,滑膜颜色和形态正常,关节面光滑无破损;造模的 4 组兔膝关节腔内存在大量积液,滑膜明显充血水肿,关节软骨表面粗糙、部分区域软骨下骨暴露,提示造模成功。见图 1。

3.2 膝关节影像学观察结果

干预结束后,假手术组膝关节间隙正常、无骨赘增生;模型组膝关节间隙明显变窄,有明显骨赘形成;药浴各温度组(45 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C)相较于同温度水浴组,关节间隙略宽,骨赘体积减小,骨质密度异常区域缩小,且影像灰度层次更清晰;药浴 40 $^{\circ}$ C 组相较于药浴 45 $^{\circ}$ C 组和 35 $^{\circ}$ C 组,关节间隙更宽,骨赘数量更少、体积更小;水浴 40 $^{\circ}$ C 组相较于水浴 45 $^{\circ}$ C 组和 35 $^{\circ}$ C 组,关节间隙略宽,骨赘数量减少、体积减小;扶他林组关节间隙接近正常,骨赘较少,形态接近正常。见图 2。

表 1 实时定量 PCR 引物信息

基因名称	引物序列(5'—3')
白细胞介素-1 β	上游引物 GGCCGATGGTCCCAATTACA
	下游引物 TTGCAGAGGACGGGTTCCTC
肿瘤坏死因子- α	上游引物 CGTAGTAGCAAACCCGCAAG
	下游引物 GTGAGTGAGGAGCACGTAGG
核因子- κ B	上游引物 TTACGAGGTCTCTGGTGGGAC
	下游引物 GCTGTCTGGCAGCTCATCTA
环氧合酶-2	上游引物 CTGCTCCTGAAACCCACTCC
	下游引物 GTGATCTGGATGTCAGCAGG
一氧化氮合酶	上游引物 ACACCGATGAGGTTTTTCAGC
	下游引物 GGACACAGCGACAGGACAA
基质金属蛋白酶-3	上游引物 ACCCAGTCTACAACGCCTTC
	下游引物 CTGCGCCAGAAATACCTGT
基质金属蛋白酶-13	上游引物 TAAACAGCCAAAACACCAGAC
	下游引物 GAAGATCATTGTTTCTCCCCGG
甘油醛-3-磷酸脱氢酶	上游引物 AGAGCACAGAGGAGGACGA
	下游引物 TGGGATGGAACTGTGAAGAGG

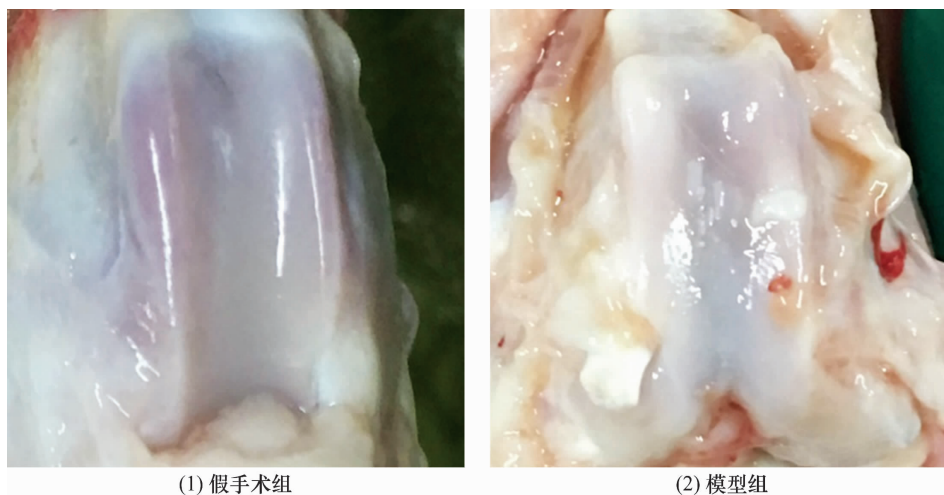


图 1 兔右膝关节大体外观图

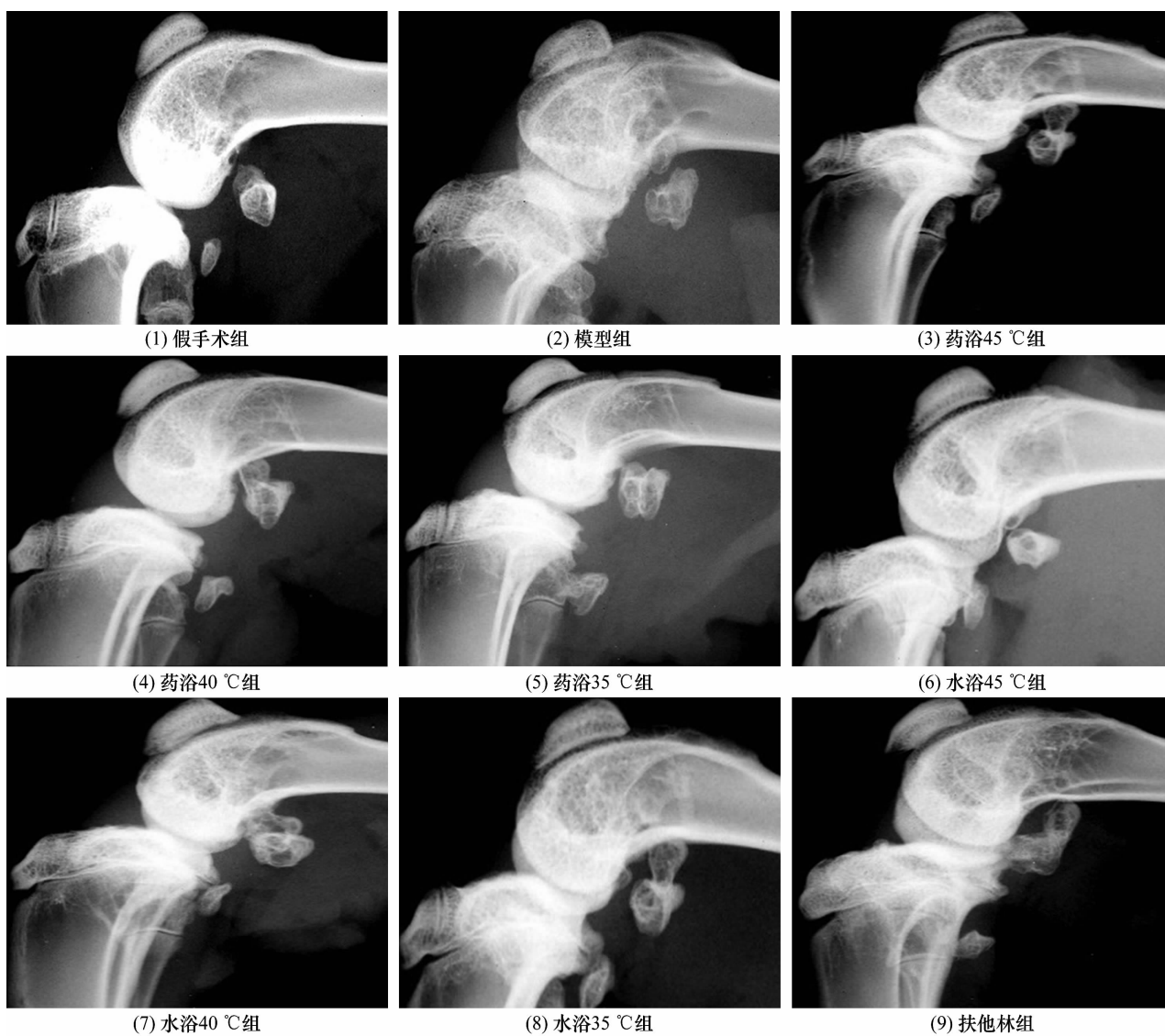


图 2 干预后各组兔膝关节 X 线片

3.3 膝关节软骨大体观察结果

干预结束后,假手术组关节面光滑完整,无破损;模型组关节面粗糙,破损严重;药浴 45 °C 组、40 °C 组

和 35 °C 组关节面轻微磨损,但药浴 40 °C 组关节表面较药浴 45 °C 组和 35 °C 组更光滑;水浴 45 °C 组、40 °C 组和 35 °C 组关节面轻度磨损,其程度较同温度药浴

组严重;扶他林组关节面无破损,但滑膜组织呈浅黄色增生(图 3)。

各组关节软骨退变评分总体比较,差异有统计学意义[(0.33 ± 0.47)分,(2.80 ± 0.40)分,(2.15 ± 0.49)分,(1.65 ± 0.30)分,(2.30 ± 0.55)分,(2.28 ± 0.25)分,(1.85 ± 0.31)分,(2.32 ± 0.38)分,(1.20 ± 0.40)分, $F = 16.641, P = 0.000$]。模型组关节软骨退变评分高于假手术组($P = 0.000$),药浴 45 °C 组、药浴 40 °C 组、水浴 45 °C 组、水浴 40 °C 组及扶他林组关节软骨退变评分均低于模型组($P = 0.049, P = 0.000, P = 0.039, P = 0.003, P = 0.000$),药浴 40 °C 组关节软骨退变评分低于药浴 45 °C 组和 35 °C 组($P = 0.047, P = 0.028$),水浴 40 °C 组关节软骨退变评分低于水浴 45 °C 组和 35 °C 组($P = 0.049, P = 0.033$),药浴 40 °C 组关节软骨退变评分低于水浴 45 °C 组和 35 °C 组($P = 0.007, P = 0.015$)、与水浴

40 °C 组的差异无统计学意义($P = 0.330$),药浴 40 °C 组关节软骨退变评分与扶他林组的差异无统计学意义($P = 0.083$),水浴 40 °C 组关节软骨退变评分高于扶他林组($P = 0.021$)。

3.4 膝关节滑膜组织病理学观察结果

HE 染色结果显示:假手术组滑膜细胞排列整齐,无异常增生和炎症细胞浸润;模型组滑膜细胞排列紊乱伴大量增生,炎症细胞浸润明显;药浴各温度组相较于模型组,滑膜细胞排列较整齐、结构趋于正常,滑膜增生与炎症细胞浸润明显减轻,其中药浴 40 °C 组滑膜细胞排列更有序,细胞形态和大小趋于一致;水浴各温度组较药浴各温度组,滑膜细胞排列密集紊乱伴明显增生,炎症细胞浸润较为明显;扶他林组滑膜细胞排列规则,细胞增生及炎症细胞浸润现象基本消失,与正常滑膜细胞相似。见图 4。

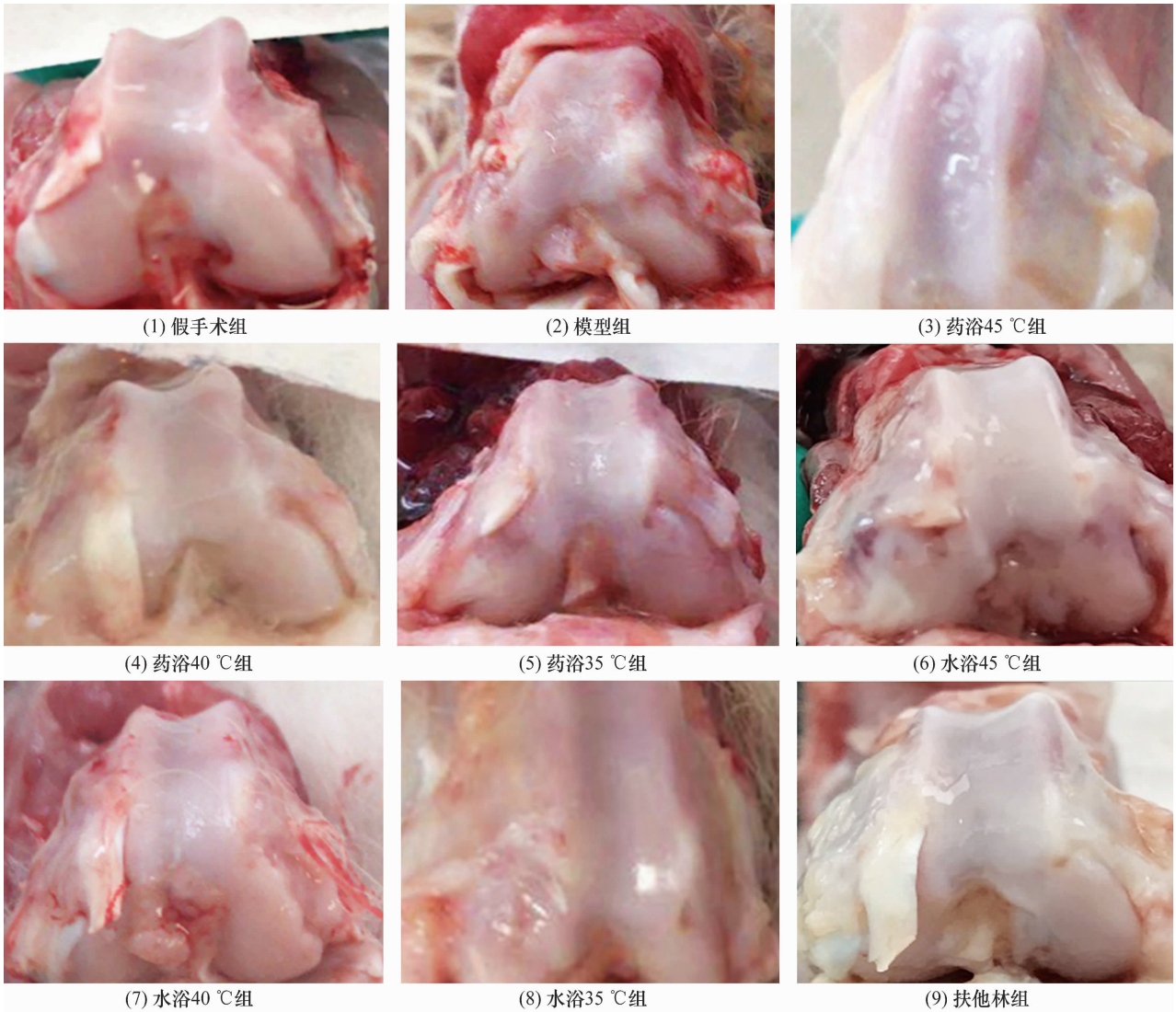


图 3 干预后各组兔膝关节大体外观图

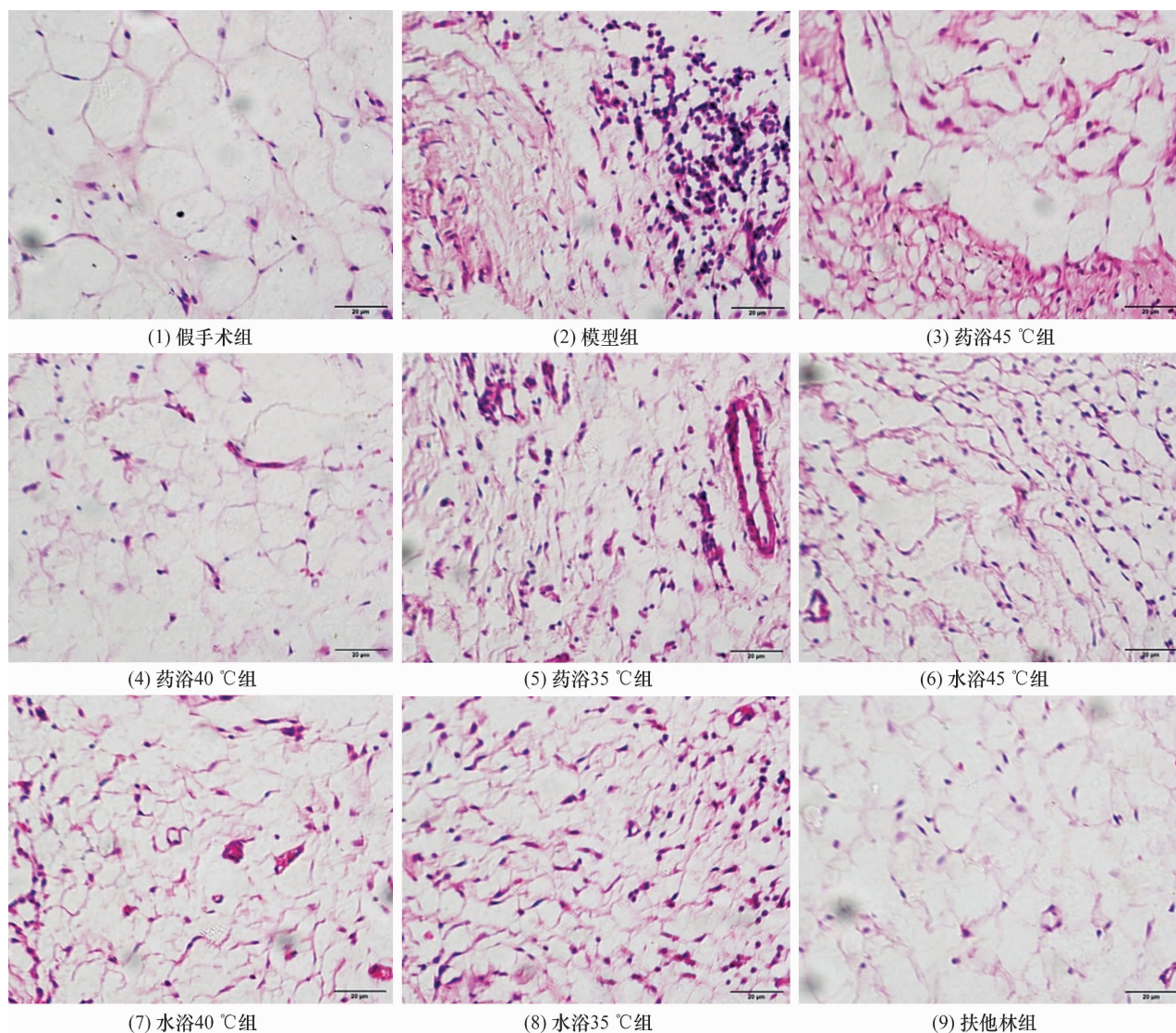


图 4 干预后各组兔膝关节滑膜组织 HE 染色结果 (×400)

各组滑膜病理学评分总体比较, 差异有统计学意义 [(1.40 ± 0.49) 分, (5.40 ± 1.02) 分, (2.55 ± 0.62) 分, (1.83 ± 0.58) 分, (2.86 ± 0.72) 分, (3.13 ± 0.39) 分, (2.59 ± 0.32) 分, (3.53 ± 0.36) 分, (1.67 ± 0.60) 分, $F = 20.170, P = 0.000$]。模型组滑膜病理学评分高于假手术组 ($P = 0.000$), 药浴各温度组 (45 °C、40 °C、35 °C)、水浴各温度组 (45 °C、40 °C、35 °C) 及扶他林组滑膜病理学评分均低于模型组 ($P = 0.001, P = 0.001, P = 0.002, P = 0.001, P = 0.000, P = 0.005, P = 0.000$), 药浴 40 °C 组滑膜病理学评分低于药浴 45 °C 组和 35 °C 组 ($P = 0.047, P = 0.020$), 水浴 40 °C 组滑膜病理学评分低于水浴 45 °C 组和 35 °C 组 ($P = 0.044, P = 0.002$), 药浴 40 °C 组滑膜病理学评分低于水浴 45 °C 组、40 °C 组和 35 °C 组 ($P = 0.004, P = 0.037, P = 0.000$), 药浴 40 °C 组滑膜病理学评分与扶他林组的差异无统计学

意义 ($P = 0.679$), 水浴 40 °C 组滑膜病理学评分高于扶他林组 ($P = 0.017$)。

3.5 膝关节液中炎症相关因子及基质降解酶的蛋白表达水平检测结果

各组膝关节液中 IL-1 β 、TNF- α 、NF- κ B、COX-2、NOS、MMP-3 及 MMP-13 的蛋白表达水平总体比较, 组间差异均有统计学意义。药浴各温度组 (45 °C、40 °C、35 °C)、水浴各温度组 (45 °C、40 °C、35 °C) 及扶他林组膝关节液中 IL-1 β 、TNF- α 、NF- κ B、COX-2、NOS、MMP-3、MMP-13 的蛋白表达水平均低于模型组 (IL-1 β : $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$; TNF- α : $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$; NF- κ B: $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$; COX-2: $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$),

表 3 各组兔膝关节液中炎症相关因子及基质降解酶的 mRNA 表达水平

组别	样本量/ 只	炎症相关因子及基质降解酶的 mRNA 表达水平($\bar{x} \pm s$)						
		白细胞介素-1 β	肿瘤坏死因子- α	核因子- κ B	环氧化酶-2	一氧化氮合酶	基质金属蛋白酶-3	基质金属蛋白酶-13
假手术组	5	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
模型组	5	18.15 \pm 0.24	3.35 \pm 0.21	4.25 \pm 0.48	5.10 \pm 0.44	4.82 \pm 0.19	40.38 \pm 6.21	5.73 \pm 0.12
药浴 45 $^{\circ}$ C 组	5	5.97 \pm 0.42	1.92 \pm 0.20	1.89 \pm 0.08	2.76 \pm 0.40	2.24 \pm 0.21	18.46 \pm 0.25	2.33 \pm 0.22
药浴 40 $^{\circ}$ C 组	5	4.04 \pm 0.51	1.57 \pm 0.10	1.59 \pm 0.12	1.65 \pm 0.10	1.89 \pm 0.13	14.45 \pm 0.61	1.95 \pm 0.25
药浴 35 $^{\circ}$ C 组	5	6.39 \pm 0.19	1.95 \pm 0.10	1.98 \pm 0.12	2.06 \pm 0.30	2.26 \pm 0.18	19.24 \pm 0.71	3.36 \pm 0.19
水浴 45 $^{\circ}$ C 组	5	13.04 \pm 0.50	2.00 \pm 0.20	2.18 \pm 0.09	4.32 \pm 0.10	2.12 \pm 0.13	27.37 \pm 1.01	3.20 \pm 0.26
水浴 40 $^{\circ}$ C 组	5	4.45 \pm 0.34	2.43 \pm 0.10	2.57 \pm 0.03	2.19 \pm 0.10	2.50 \pm 0.24	21.49 \pm 0.73	3.73 \pm 0.07
水浴 35 $^{\circ}$ C 组	5	13.44 \pm 1.44	2.26 \pm 0.10	2.75 \pm 0.15	3.60 \pm 0.16	2.97 \pm 0.25	29.24 \pm 5.80	3.77 \pm 0.17
扶他林组	5	0.32 \pm 0.10	1.23 \pm 0.14	1.34 \pm 0.04	1.10 \pm 0.24	1.37 \pm 0.48	14.25 \pm 1.86	1.44 \pm 0.05
F 值		558.623	150.378	136.065	165.579	108.395	69.763	354.221
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

具有无创、无痛、不良反应少的优势^[17-18]。石氏薰洗方以“温通”立法,契合了“寒者热之”之治则^[19]。方中以麻黄、桂枝为君药,二者相须为用,功擅温通经脉、散寒止痛;其药理机制主要表现为显著抗炎作用^[20]及兼具外周与中枢的双重镇痛活性^[21]。花椒、细辛共为臣药,细辛所含的灯盏乙素可靶向调控 Toll 样受体/NF- κ B 信号通路,改善骨关节炎的病理进程^[22];花椒经炮制后,其挥发油作为主要药效组分,抗炎与镇痛效能显著增强^[23];二者协同发挥解表散寒、祛风除湿之效,具抗氧化和抗炎作用^[24-25]。制天南星散结消肿、燥湿化痰,大黄消肿祛瘀,白芷散寒祛风止痛,鹿衔草补虚益肾、祛风除湿,共为佐药。威灵仙为使药,除具有通络祛湿之效,还可引药下行专攻膝痹。诸药合用,共奏散寒止痛、活血通络之功。临床上采用该方药浴治疗 KOA,能显著缓解膝关节疼痛,延缓疾病进展,且安全性高。

本研究选择双氯芬酸二乙胺乳胶剂作为阳性对照,因其为国内外指南推荐的外用非甾体抗炎药金标准,该药能通过抑制 COX-2 有效减轻 KOA 炎症反应与缓解疼痛。此外,其局部外涂给药方式与石氏薰洗方药浴在经皮药物递送途径上具有相似性。设置不同温度(45 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C)的纯净水浴对照组旨在区分温度效应与药物活性的作用,以排除热疗对疗效评估的潜在干扰。

基于前期研究确定的 40 $^{\circ}$ C 为治疗基础温度^[9],本实验将温度参数扩展至 45 $^{\circ}$ C 和 35 $^{\circ}$ C,进一步评价石氏薰洗方在不同温度下对 KOA 的治疗效果及作用机制。本研究通过建立木瓜蛋白酶诱导的 KOA 兔模型,并在固定药浴时长(30 min)条件下,探究温度变化对石氏薰洗方疗效的影响。结果显示,在 40 $^{\circ}$ C 条件下,石氏薰洗方减轻滑膜炎性反应与减缓关节退变

的效果最佳,其疗效与扶他林疗效相当。40 $^{\circ}$ C 被确定为石氏薰洗方治疗 KOA 的最佳温度,原因如下:该温度接近体表耐受阈值,可避免高温所致血管收缩或组织损伤^[26];有利于提高中药成分的溶解度与生物利用度^[27];契合中医“寒热平衡”理论,既无“过热耗气”之弊,又保留“温通化痰”之效^[28]。在此温度下,石氏薰洗方可下调 IL-1 β 、TNF- α 、NF- κ B、COX-2、NOS、MMP-3 及 MMP-13 的蛋白与 mRNA 表达水平。值得注意的是,在 45 $^{\circ}$ C 水温下,该方对 IL-1 β 、NOS、MMP-3、MMP-13 的蛋白表达抑制更为显著,这可能与高温短暂增强局部渗透性、促进蛋白快速清除有关^[26]。然而,高温亦可能诱发应激反应,反而不利于关节的长期修复^[26],导致该温度组的整体疗效逊于 40 $^{\circ}$ C 组。综上,40 $^{\circ}$ C 为石氏薰洗方发挥最佳治疗效果的理想温度。在此条件下,该方不仅展现出最佳的治疗效果,并能有效调控上述炎症、氧化应激及组织降解相关因子的蛋白与 mRNA 表达水平。

在 KOA 的病理进展过程中,关节软骨破坏会释放 IL-1 β 、TNF- α 等促炎性细胞因子,刺激滑膜细胞异常增生并促进炎症介质过度分泌,导致滑膜积液形成^[3]。而持续的炎症刺激会引起滑膜组织增生肥厚与滑膜液分泌增加,从而升高关节内压力。这些病变进一步加重关节软骨损伤,加速 KOA 的病程进展。本研究表明,石氏薰洗方药浴可减轻 KOA 模型兔滑膜炎和延缓关节软骨退变,其机制为:下调 IL-1 β 、TNF- α 等促炎性细胞因子的基因转录和蛋白表达,抑制级联反应;减少 NF- κ B 抑制蛋白的降解,阻断 NF- κ B 信号通路活化;进而调控下游效应分子——包括降低 COX-2 表达以减少前列腺素合成、抑制诱导型 NOS 活性以减少 NO 生成(阻断 NO 对 NF- κ B 的正反馈激活)、下调 MMP 表达以减轻软骨基质降解。该发

现不仅为石氏熏洗方的治疗机制提供了分子生物学依据,也印证了中医药浴疗法的有效性^[29]。

本研究结果显示,石氏熏洗方药浴能减轻 KOA 模型兔滑膜炎症和延缓关节软骨退变,且在 40 ℃ 时疗效最佳,其效果与双氯芬酸二乙胺乳胶剂外涂相当;其作用机制可能与其能够抑制 IL-1 β 、TNF- α 等促炎性细胞因子,阻断 NF- κ B 信号通路,降低 COX-2、NOS、MMPs 的表达有关。石氏熏洗方的具体作用靶点和分子机制也需进一步验证,未来可结合网络药理学、分子对接技术等进一步深入探索。

参考文献

- [1] 中华中医药学会. 膝关节炎中西医结合诊疗指南(2023 年版)[J]. 中医正骨, 2023, 35(6): 1-10.
- [2] DU X, LIU Z Y, TAO X X, et al. Research progress on the pathogenesis of knee osteoarthritis[J]. Orthop Surg, 2023, 15(9): 2213-2224.
- [3] HEIDARI B. Knee osteoarthritis prevalence, risk factors, pathogenesis and features: part I[J]. Caspian J Intern Med, 2011, 2(2): 205-212.
- [4] 王剑雄,周谋望. 膝关节骨关节炎患者髌周肌肉力量研究[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2014, 36(9): 720-722.
- [5] 陈金龙,任春艳,陈世荣. 全膝关节置换术后感染的诊治的研究进展[J]. 临床医学进展, 2022, 12(3): 2178-2187.
- [6] 朱治龙,黄国鑫,艾金伟,等. 全球膝关节骨性关节炎发病率和患病率分析与趋势预测[J]. 湖北医药学院学报, 2023, 42(6): 647-654.
- [7] 闻胜月,张旻,杜国庆,等. 浴疗法治疗膝关节炎的研究进展[J]. 中医药临床杂志, 2021, 33(12): 2447-2452.
- [8] 张辉,毕春强,杨大伟,等. 中药腿浴疗法治疗膝关节炎的临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(15): 176-180.
- [9] 闻胜月,张旻,杜国庆,等. 石氏熏洗方药浴保护膝关节炎兔模型的关节软骨[J]. 中药材, 2022, 45(9): 2234-2239.
- [10] 闻胜月,庞坚,张旻,等. 石氏熏洗方药浴对膝关节炎兔模型软骨细胞凋亡的影响[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(8): 1841-1844.
- [11] 张燕,田飏,陈博,等. 石氏熏洗方药浴对膝关节炎家兔股动脉血流动力学的影响及温度探索[J]. 上海中医药大学学报, 2022, 36(3): 78-83.
- [12] 魏伟,吴希美,李元建. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2010: 1698.
- [13] 何俊君,黄泽灵,张应生,等. 早期骨关节炎动物模型的建立与评价[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2019, 34(4): 358-360.
- [14] PELLETIER J P, JOVANOVIC D, FERNANDES J C, et al. Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase[J]. Arthritis Rheum, 1998, 41(7): 1275-1286.
- [15] 崔延安,刘钊,刘红霞,等. 骨髓间充质干细胞移植膝类风湿关节炎兔:关节滑膜体积和软骨厚度的 MRI 评价[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(6): 1024-1029.
- [16] 吴朦,柏冬. 中医药浴疗法发展源流与机理探析[J]. 中医药导报, 2021, 27(3): 204-207.
- [17] SHI B, YANG H, JU D, et al. Therapeutic effects of traditional Chinese medicine fumigation therapy on knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis[J/OL]. Asian J Surg, 2024[2025-02-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39278750/>.
- [18] 徐震球. 伤科接骨片联合石氏伤科熏洗剂治疗踝关节外侧副韧带损伤 40 例临床观察[J]. 中医药导报, 2016, 22(2): 64-66.
- [19] 顾莉华,郭晓霞,程鑫,等. “石氏熏洗方”熏蒸治疗膝关节炎的临床研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2011, 19(12): 24-25.
- [20] 王晓明,许良葵,罗佳波. 麻黄-桂枝配伍对抗炎作用的影响及机制研究[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(3): 528-531.
- [21] 王晓明,许良葵,罗佳波. 麻黄-桂枝药对抗炎、镇痛作用研究[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(2): 179-184.
- [22] 郭欣,林珊,吴丽明,等. 灯盏细辛化学成分及药理作用研究进展[J]. 中成药, 2019, 41(2): 393-402.
- [23] 边甜甜,司昕蕾,牛江涛,等. 花椒挥发油部位经清炒法炮制前后在小鼠体内的抗炎与镇痛作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(4): 369-371.
- [24] 李春丽,孟宪华,尚贤毅,等. 花椒化学成分及其抗氧化活性[J]. 中草药, 2021, 52(10): 2869-2875.
- [25] 钟欢,裴鑫,周予婧,等. 中药细辛对兔膝骨性关节炎局部不同组织炎症因子的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41(12): 1496-1501.
- [26] WEN J, LIN Z, CHENG J, et al. Heat acclimation alleviates the heat stress-induced impairment of vascular endothelial cells[J]. Tissue Cell, 2024, 90: 102520.
- [27] 张艳,黄宝银,刘雪松,等. 生物酶法提取中草药活性成分研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2021, 55(3): 69-74.
- [28] 武晏屹,白明,苗明三. 中药外用熏洗(浴)剂的应用现状及特点分析[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(16): 1933-1937.
- [29] 杨军,江帆,彭思敬,等. 中药熏洗对类风湿关节炎有效性及安全性的 Meta 分析[J]. 循证护理, 2025, 11(2): 191-196.

(收稿日期:2025-03-25 本文编辑:时红磊)