

· 基础研究 ·

加味阳和汤对早期膝骨关节炎兔关节软骨的影响

王文波,董建文,杨振国,王树强,王磊,刘文斌

(山东中医药大学,山东 济南 250355)

摘要 **目的:**观察加味阳和汤对早期膝骨关节炎兔关节软骨的影响。**方法:**将 30 只 6 月龄普通级健康新西兰大白兔随机分为空白组、模型组和实验组,每组 10 只。除空白组外,其余 2 组动物均按照改良 Hulth 法对右侧膝关节进行早期膝骨关节炎造模。造模成功后,实验组动物以加味阳和汤灌胃,模型组动物以等量生理盐水灌胃,连续 4 周。药物干预结束后,对膝关节进行 X 线检查和解剖学大体观察,并于胫骨平台内侧取关节软骨制作 HE 染色切片,光镜下观察软骨改变,按照 Mankin 评分标准进行评分。**结果:**①X 线观察。空白组兔膝关节间隙对称,关节面光滑平整,无明显增生;模型组可见膝关节内侧间隙基本消失,呈内翻畸形,股骨内侧髁变大,胫骨内侧平台不平整,股骨内髁及胫骨内侧平台可见大量增生骨赘;实验组可见膝关节间隙不平整,内侧间隙变窄,程度较模型组轻,股骨内髁、胫骨内侧平台有少量骨赘形成,但较模型组变化小。②大体观察。按软骨形态退化程度由轻至重分级,空白组 I 级 9 只、II 级 1 只,模型组 II 级 3 只、III 级 7 只,实验组 II 级 5 只、III 级 5 只。3 组兔膝关节关节软骨形态比较,空白组最好、实验组次之、模型组最差($\bar{R}_{\text{空白组}} = 5.90, \bar{R}_{\text{模型组}} = 21.35, \bar{R}_{\text{实验组}} = 19.25; \chi^2 = 20.524, P = 0.000$)。③镜下观察。3 组兔关节软骨 Mankin 评分分别为(0.550 ± 0.675)分、(7.950 ± 1.535)分、(4.300 ± 1.337)分,组间比较差异有统计学意义($F = 89.233, P = 0.000$);空白组评分低于模型组和实验组($P = 0.000, P = 0.000$),模型组高于实验组($P = 0.000$)。**结论:**加味阳和汤可抑制早期膝骨关节炎兔关节软骨的退变,这可能是其治疗早期膝骨关节炎的作用机制之一。

关键词 骨关节炎,膝;软骨,关节;加味阳和汤;动物实验

Effect of Jiawei Yanghe Tang(加味阳和汤) on articular cartilage in rabbits with early knee osteoarthritis

WANG Wenbo, DONG Jianwen, YANG Zhenguo, WANG Shuqiang, WANG Lei, LIU Wenbin

Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, Shandong, China

ABSTRACT **Objective:** To observe the effect of Jiawei Yanghe Tang(加味阳和汤, JWYHT) on articular cartilage in rabbits with early knee osteoarthritis. **Methods:** Thirty 6-month-old ordinary healthy New Zealand white rabbits were randomly divided into blank group, model group and experimental group, 10 cases in each group. The early knee osteoarthritis models of right knee joint were built by modified Hulth method in rabbits of model group and experimental group. After that, the rabbits in experimental group were intragastric administrated with JWYHT, while rabbits in model group were intragastric administrated with normal saline for consecutive 4 weeks. After drug intervention, X-ray examination and roughly anatomical observation were performed on knee joints. The cartilago articularis were fetched from medial tibial plateau and were sectioned for HE staining. All the samples were observed under the optical microscope and the cartilaginous changes were evaluated according to Mankin Score. **Results:** Symmetrical knee joint gap and smooth articular surface and no obvious hyperplasia were found in rabbits of blank group. In model group, the medial joint gap almost disappeared and the knee presented with varus deformity; and accrescent medial femoral condyle, rough medial tibial plateau and a large number of osteophytes located at medial femoral condyle and medial tibial plateau were found. In experimental group, the knee joint gap was not smooth and medial knee joint gap became narrow and a few osteophytes were found at medial femoral condyle and medial tibial plateau. In fact, less anatomical changes were found in the experimental group compared to the model group. The cartilage morphology was classified according to its degradation degree, The rabbits belonged to grade I (9) and grade II (1) in blank group, grade II (3) and grade III (7) in model group, grade II (5) and grade III (5) in experimental group. Comparison showed that the blank group was the best, experimental group was good and model group was the worst in knee articular cartilage morphology($\bar{R}_{\text{blank group}} = 5.90, \bar{R}_{\text{model group}} = 21.35, \bar{R}_{\text{experimental group}} = 19.25; \chi^2 = 20.524, P = 0.000$). Mankin scores of cartilago articularis was 0.550 ± 0.675, 7.950 ± 1.535 and 4.300 ± 1.337 points respectively, there was statistical difference between the 3 groups($F = 89.233, P = 0.000$). Mankin scores were lower in blank group compared to model group and experimental group($P = 0.000,$

基金项目:国家自然科学基金项目(81173286);济南市科技发展计划项目(201102063)

通讯作者:董建文 E-mail:dongjianwen2006@sina.com

$P=0.000$), and were higher in model group compared to experimental group ($P=0.000$). **Conclusion:** The JWYHT can inhibit the degeneration of cartilago articularis of rabbits with early knee osteoarthritis, so it may be one of the mechanisms of action for treatment of early knee osteoarthritis.

Key words osteoarthritis, knee; cartilage, articular; Jiawei Yanghe Tang; animal experimentation

膝关节炎属中医学“痹症”“骨痹”等范畴,病程长、病理变化复杂,其病机为肝肾亏虚,外邪乘虚袭于经络,属本虚标实之证^[1-2],早期治疗以补肾活血为主。加味阳和汤是董建文教授根据温补肝肾、活血通络兼以驱邪的治疗原则,结合临床经验在阳和汤的基础进行加减拟定的治疗早期膝关节炎的经验方,取得了满意的临床疗效^[3]。本研究拟从加味阳和汤对早期膝关节炎兔关节软骨的影响入手,探讨其作用机制。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 6 月龄普通级健康新西兰大白兔 30 只,雌雄各半,体质量(2.7 ± 0.3) kg,由山东省动物中心提供,合格证号:SCXX(鲁)2010005。洁净实验室,室温 $15 \sim 25$ °C,湿度 45% ~ 60%,标准饲料喂养,饮普通饮用水。实验获得医学实验动物伦理委员会批准。

1.2 实验药物 加味阳和汤,药物组成包括熟地黄 21 g、鹿角胶 12 g、肉桂 9 g、麻黄 3 g、海风藤 15 g、川牛膝 12 g、白芥子 15 g、鸡血藤 15 g 等,由山东中医药大学第二附属医院中药制剂室统一煎制,浓煎至每 10 mL 相当于生药 12 g。

1.3 试剂与仪器 青霉素(山东鲁抗医药股份有限公司,批号:H37020079),甲苯胺蓝(Biosharp 公司,批号:B0013K040400),甲酸(Biosharp 公司,批号:B0013K040100);石蜡包埋机(Sakura 公司),LKB 超薄切片机、JEM-1200EX 透射电镜、图像数字分析仪(Bio-RAD 公司)。

2 方法

2.1 动物分组及造模 将 30 只成年新西兰大白兔随机分为空白组、模型组和实验组,每组 10 只。除空白组外,其余 2 组动物均按照改良 Hulth 法^[4]进行早期膝关节炎造模,具体方法:用 3% 戊巴比妥耳缘静脉注射麻醉,取右侧膝关节前内侧切口,显露内侧副韧带,并于关节间隙处切断,将内侧半月板取出后离断前交叉韧带,行抽屉试验确认前交叉韧带已完全断裂后关闭伤口。术后常规肌肉注射青霉素预防感

染,每天 50 万单位,连续 5 d。7 d 后开始对所有动物进行驱赶,每天 2 次,每次 30 min,连续 4 周。

2.2 药物干预 造模结束后,空白组动物不进行干预;实验组动物每天下午以加味阳和汤灌胃,每次 20 mL,连续 4 周;模型组动物每天下午以等量生理盐水灌胃,连续 4 周。

2.3 膝关节观察

2.3.1 X 线观察 药物干预结束后,拍摄兔双膝关节 X 线片,观察关节面、关节间隙及周围有无骨赘形成。

2.3.2 大体观察 X 线检查结束后,用 3% 戊巴比妥将动物麻醉,分离兔膝关节软组织,暴露关节面,观察关节形态、关节液及关节软骨。按周效思等^[5]的方法将关节软骨分为 3 级:Ⅰ级,关节面光滑,有光泽,软骨透明,没有明显缺损和新生物;Ⅱ级,关节面欠光滑,色泽暗淡,软骨透明度低,有细小缺损或少许新生物;Ⅲ级,关节面不光滑,无光泽,软骨不透明,可见明显缺损和新生物。

2.3.3 光镜观察 大体观察结束后,用手术刀从股骨内髁取大小约 $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 的软骨组织,将其快速放入 4% 多聚甲酸(PH 7.4)中固定,置于 4 °C 冰箱保存。24 h 后取出,浸入 10% EDTA PBS 液脱钙约 23 d(以针可轻易刺穿软骨组织为准),每周换液 1 次。脱钙完成后以生理盐水冲洗,乙醇梯度脱水,浸蜡后包埋、切片、铺片,苏木素染色,冲洗后以乙醇脱水,伊红染色后 100% 酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂处理后封片。在光学显微镜下观察,并用高分辨率相机摄片,每张图片选取 2 个视野,按照 Mankin 评分标准^[6]对软骨结构、软骨细胞和潮线进行评分。

2.4 数据统计分析 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析,3 组兔关节软骨形态分级的组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验,Mankin 评分的组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 q 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 X 线观察 空白组兔膝关节关节间隙对等,关

节面光滑平整,无明显增生[图 1(1)];模型组可见膝关节内侧间隙基本消失,呈内翻畸形,股骨内侧髁变大,胫骨内侧平台不平整,股骨内髁及胫骨内侧平台可见大量增生骨赘[图 1(2)];实验组可见膝关节关节间隙不平整,内侧间隙变窄,程度较模型组轻,股骨内髁、胫骨内侧平台有少量骨赘形成,但较模型组变化小[图 1(3)]。

3.2 大体观察 空白组兔关节表面光滑整齐,无滑膜增生、骨赘形成;关节液量少、色淡黄清亮;关节软骨为半透明状,色泽明亮,有弹性,没有裂纹、软化

[图 2(1)];模型组关节软骨磨损严重,色泽较暗,部分软骨表面覆盖肌化组织,失去原有正常结构,软骨表面粗糙糜烂,部分区域软骨下骨裸露,以内髁最为显著,软骨边缘有骨赘形成,质地较韧;关节液增多、浑浊[图 2(2)];实验组关节软骨表面粗糙不平、糜烂,未见明显骨质外露,可见滑膜不同程度增生,伴少量骨赘形成;关节液色暗、浑浊,量较模型组少[图 2(3)]。3 组兔膝关节关节软骨形态比较,空白组最好,实验组次之,模型组最差($\bar{R}_{\text{空白组}} = 5.90, \bar{R}_{\text{模型组}} = 21.35, \bar{R}_{\text{实验组}} = 19.25; \chi^2 = 20.524, P = 0.000$)。见表 1。



图 1 3 组兔膝关节 X 线片



图 2 3 组兔膝关节软骨外观

表 1 3 组兔膝关节软骨形态分级结果 只

组别	样本量	I 级	II 级	III 级
空白组	10	9	1	0
模型组	10	0	3	7
实验组	10	0	5	5
合计	30	9	9	12

3.3 光镜观察 空白组幼稚软骨细胞、软骨细胞分层分布,排列整齐,软骨基质无溶解,其下方为潮线,潮线完整[图 3(1)];模型组各层软骨细胞形态改变,排列混乱,软骨基质浑浊,可见增生的纤维结缔组织、多重潮线及软骨下骨增生[图 3(2)];实验组各层软骨细胞形态轻微改变,排列轻度紊乱,软骨下骨改变

不明显[图 3(3)]。各组 Mankin 评分比较,差异有统计学意义[(0.550 ± 0.675)分, (7.950 ± 1.535)分, (4.300 ± 1.337)分, $F = 89.233, P = 0.000$];空白组评分低于模型组和实验组($P = 0.000, P = 0.000$),模型组高于实验组($P = 0.000$)。

4 讨论

膝骨关节炎是老年人常见的关节退行性病变,其病理变化多以关节软骨、软骨下骨板和滑膜等组织逐层受损,特别是关节面和周边软骨的变性及微观新生骨的形成成为主要特征^[7],临床表现多为膝关节疼痛、酸软、肿胀、僵硬及功能障碍,严重者可出现关节畸

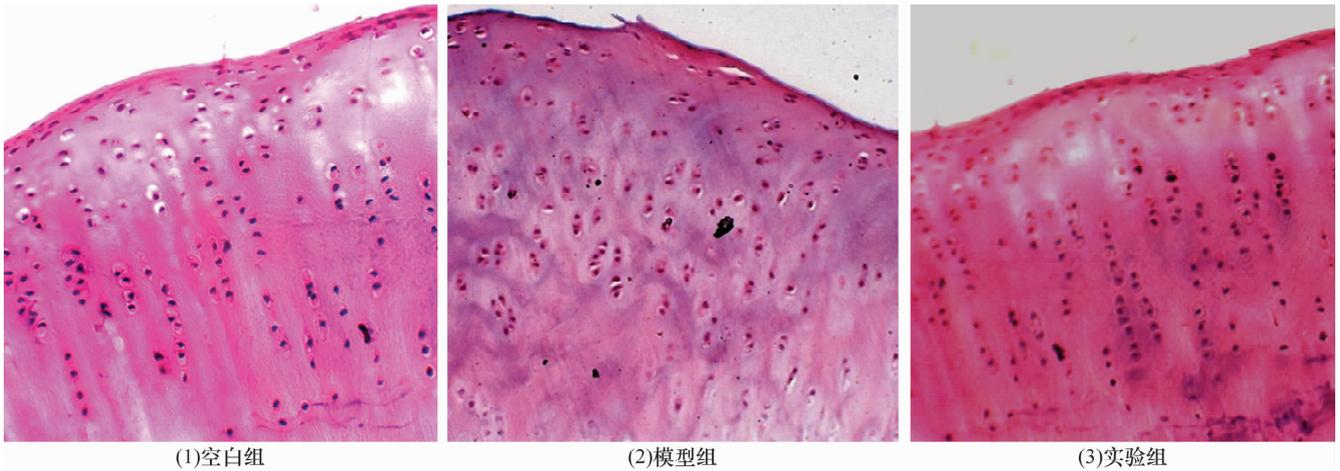


图 3 3 组兔关节软骨光镜下观察结果 (HE 染色 ×100)

形,严重影响患者的生活质量^[8]。目前临床上仍缺乏有效的治疗及预防措施,治疗多以非甾体消炎镇痛药为主,辅以关节软骨保护剂、关节软化剂等,但长期应用不良反应较多^[9-10]。

阳和汤出自《外科证治全生集》,由熟地黄、鹿角胶、麻黄、肉桂、白芥子、姜炭及甘草 7 味中草药组成,具有温阳补血、散寒通滞的功效^[11],主要用于治疗素体阳虚,营血不足,寒凝痰滞引起的阴疽。董建文教授针对骨关节炎的临床特点,对阳和汤进行加减裁定,拟定出具有温阳补血、化痰通络功效的加味阳和汤,从虚、寒、瘀、滞等方面入手治疗早期膝骨关节炎,疗效显著。

现代研究显示,熟地黄可抑制 KOA 动物模型软骨细胞的凋亡,促进软骨修复^[12]。鹿角胶有明显的抗炎、利尿、抗过敏作用^[13],鸡血藤具有扩张血管、抗血小板聚集的作用^[14],而白芥子、麻黄、川牛膝则具有明显的镇痛作用^[15]。这些药物共同作用,可改善局部血液循环,加速病理产物的排泄和吸收,达到消炎止痛,濡养膝关节的功能,从而延缓关节软骨的退变。这与我们实验中观察到的结果相吻合。

本研究的结果提示,加味阳和汤可抑制早期膝骨关节炎兔关节软骨的退变,这可能是其治疗早期膝骨关节炎的作用机制之一。

5 参考文献

[1] 侯德才. 膝关节炎性关节炎的分期治疗[J]. 中医正骨, 2014, 26(1): 3-5.
 [2] 苏泉, 鲁光钱. 针刺配合关节腔注射和中药内服治疗膝骨关节炎 53 例[J]. 中医正骨, 2014, 26(5): 35-36.
 [3] 杨鸿冉, 董建文, 李志超, 等. 加味阳和汤治疗膝骨性关节炎临床研究[J]. 云南中医药杂志, 2014, 35(4): 8-9.

[4] 熊元, 赵振国, 李传郡, 等. 兔膝骨关节炎模型的制备及鉴定[J]. 实验动物学, 2013, 30(3): 31-34.
 [5] 周效思, 周凯, 谭安雄, 等. 威灵仙对兔膝骨关节炎结构和功能的影响[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(10): 2454-2456.
 [6] Van der Sluijs JA, Geesink RG, Van der Linden AJ, et al. The reliability of the Mankin score for osteoarthritis [J]. J Orthop Res, 1992, 10(1): 58-61.
 [7] Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello Let 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.
 [8] 高丕明, 罗小兵, 何栩, 等. 运动干预防治膝骨关节炎的研究进展[J]. 中医正骨, 2014, 26(9): 70-73.
 [9] Schoen RT, Vender RJ. Mechanisms of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric damage [J]. Am J Med, 1989, 86(4): 449-458.
 [10] 张建环, 朱群娣, 钟建明. 我院非甾体抗炎药在治疗膝骨关节炎中的临床应用分析[J]. 广东药学院学报, 2014, 30(4): 486-488.
 [11] 陈朝蔚, 陈永强. 阳和汤治疗兔膝骨性关节炎的作用机制[J]. 中医正骨, 2008, 20(4): 11-12.
 [12] 卢思俭, 姜全心, 王成. 益肾为主对兔膝骨关节炎模型软骨细胞凋亡的影响[J]. 山东中医杂志, 2006, 25(10): 696-698.
 [13] 蒙海燕, 曲晓波, 李娜, 等. 鹿茸及鹿角胶对去卵巢大鼠骨质疏松症的影响[J]. 中药材, 2009, 32(2): 179-182.
 [14] 李小莉, 张迎庆, 黄通华. 白芥子提取物的抗炎镇痛作用研究[J]. 现代中药研究与实践, 2007, 21(6): 28-30.
 [15] 杨丽. 当归、鸡血藤、丹参、红花补血与活血之探讨[J]. 中国中医急症, 2010, 19(9): 1566-1567.

(2014-11-05 收稿 2014-11-26 修回)