

· 基础研究 ·

郑氏芪藤软坚散外敷治疗创伤性膝关节僵硬的实验研究

廖莹莹¹, 张鑫¹, 任凯¹, 刘辉¹, 陈科¹, 温呈洪², 税晓平³

(1. 四川省骨科医院, 四川 成都 610041;

2. 成都体育学院附属体育医院, 四川 成都 610041;

3. 绵阳市骨科医院, 四川 绵阳 621000)

摘要 目的: 观察郑氏芪藤软坚散外敷治疗创伤性膝关节僵硬的疗效, 并探讨其可能的作用机制。方法: 从 66 只 8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠中随机选取 18 只纳入空白组, 剩余 48 只建立右侧创伤性膝关节屈曲型僵硬模型, 将造模成功的 41 只大鼠随机纳入模型组(20 只)和软坚散组(21 只)。空白组和模型组大鼠常规饲养, 不予干预; 软坚散组大鼠造模成功后采用郑氏芪藤软坚散外敷, 每天 1 次, 连续治疗 4 周。分别于药物干预开始前、药物干预开始后 2 周、药物干预结束后, 从各组随机选取部分大鼠, 分别进行右侧膝关节活动度测量、膝关节囊厚度测量、膝关节囊组织病理学观察及成纤维细胞计数(HE 染色)、膝关节囊中转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 水平测定(免疫组织化学法)。结果: ①膝关节活动度。在 3 个时间点, 3 组大鼠的膝关节活动度总体比较, 差异均有统计学意义 ($122.43^\circ \pm 4.54^\circ$, $64.78^\circ \pm 2.68^\circ$, $65.13^\circ \pm 4.52^\circ$, $F = 530.817$, $P = 0.000$; $124.50^\circ \pm 5.01^\circ$, $82.83^\circ \pm 6.05^\circ$, $88.67^\circ \pm 8.62^\circ$, $F = 67.404$, $P = 0.000$; $122.33^\circ \pm 4.08^\circ$, $92.50^\circ \pm 2.74^\circ$, $107.13^\circ \pm 7.41^\circ$, $F = 44.886$, $P = 0.000$)。在 3 个时间点, 空白组的膝关节活动度均大于模型组和软坚散组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.000$, $P = 0.000$)。药物干预开始前、药物干预开始后 2 周时, 模型组和软坚散组的膝关节活动度比较, 组间差异均无统计学意义 ($P = 0.857$, $P = 0.154$)。药物干预结束后, 软坚散组的膝关节活动度大于模型组 ($P = 0.000$)。②膝关节囊厚度。在 3 个时间点, 3 组大鼠的膝关节囊厚度总体比较, 差异均有统计学意义 [(0.256 ± 0.020) mm, (0.533 ± 0.024) mm, (0.528 ± 0.012) mm, $F = 412.282$, $P = 0.000$; (0.254 ± 0.036) mm, (0.531 ± 0.018) mm, (0.523 ± 0.019) mm, $F = 125.803$, $P = 0.000$; (0.257 ± 0.028) mm, (0.527 ± 0.017) mm, (0.521 ± 0.014) mm, $F = 211.708$, $P = 0.000$]。在 3 个时间点, 空白组的膝关节囊厚度均小于模型组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$)。药物干预开始前和药物干预结束后, 软坚散组的膝关节囊厚度均大于空白组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$)。药物干预开始后 2 周时, 软坚散组与空白组的膝关节囊厚度的差异无统计学意义 ($P = 0.053$)。在 3 个时间点, 模型组与软坚散组的膝关节囊厚度比较, 组间差异均无统计学意义 ($P = 0.702$, $P = 0.740$, $P = 0.725$)。③膝关节囊组织成纤维细胞计数结果。在 3 个时间点, 3 组大鼠膝关节囊中成纤维细胞数量总体比较, 差异均有统计学意义 [(1.67 ± 0.98) 个, (98.25 ± 17.97) 个, (103.92 ± 11.85) 个, $F = 85.392$, $P = 0.000$; (1.93 ± 1.09) 个, (68.92 ± 17.50) 个, (46.17 ± 7.37) 个, $F = 48.565$, $P = 0.000$; (1.80 ± 0.96) 个, (49.83 ± 11.41) 个, (31.73 ± 10.66) 个, $F = 34.755$, $P = 0.000$]。在 3 个时间点, 空白组膝关节囊中成纤维细胞数量均少于模型组和软坚散组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.000$, $P = 0.000$)。药物干预开始前, 软坚散组和模型组膝关节囊中成纤维细胞数量比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.535$)。药物干预开始后 2 周和药物干预结束后, 软坚散组膝关节囊中成纤维细胞数量均少于模型组 ($P = 0.011$, $P = 0.010$)。④膝关节囊中 TGF- $\beta 1$ 水平。在 3 个时间点, 3 组大鼠膝关节囊中 TGF- $\beta 1$ 水平总体比较, 差异均有统计学意义 [$(0.148 \pm 0.060)\%$, $(2.454 \pm 1.392)\%$, $(2.519 \pm 0.653)\%$, $F = 9.240$, $P = 0.007$; $(0.147 \pm 0.054)\%$, $(1.136 \pm 0.491)\%$, $(0.271 \pm 0.095)\%$, $F = 13.765$, $P = 0.002$; $(0.147 \pm 0.059)\%$, $(0.765 \pm 0.339)\%$, $(0.190 \pm 0.070)\%$, $F = 13.105$, $P = 0.002$]。药物干预开始前, 模型组和软坚散组膝关节囊中 TGF- $\beta 1$ 水平均高于空白组 ($P = 0.005$, $P = 0.004$)。软坚散组与模型组膝关节囊中 TGF- $\beta 1$ 水平的差异无统计学意义 ($P = 0.920$)。药物干预开始后 2 周时, 模型组膝关节囊中 TGF- $\beta 1$ 水平高于空白组和软坚散组 ($P = 0.001$, $P = 0.002$)。软坚散组与空白组膝关节囊中 TGF- $\beta 1$ 水平的差异无统计学意义 ($P = 0.563$)。药物干预结束后, 模型组膝关节囊中 TGF- $\beta 1$ 水平高于空白组和软坚散组 ($P = 0.001$, $P = 0.001$)。软坚散组与空白组膝关节囊中 TGF- $\beta 1$ 水平的差异无统计学意义 ($P = 0.745$)。结论: 早期应用郑氏芪藤软坚散, 可以促进创伤性膝关节僵硬模型大鼠膝关节功恢复, 抑制成纤维细胞增殖和 TGF- $\beta 1$ 表达可能是其作用机制之一。

关键词 膝关节; 关节僵硬; 创伤和损伤; 郑氏芪藤软坚散; 动物实验

基金项目: 四川省中医药管理局科学技术研究专项课题(2020JC0098); 四川省区域中医(专科)诊疗中心建设项目(川中医药函[2018]20号)

通讯作者: 张鑫 E-mail: kangfuke2008@163.com

An experimental study of external application of Zheng's Qiteng Ruanjian San in the treatment of post-traumatic knee joint stiffness

LIAO Yingying¹, ZHANG Xin¹, REN Kai¹, LIU Hui¹, CHEN Ke¹, WEN Chenghong², SHUI Xiaoping³

1. Sichuan Province Orthopedic Hospital, Chengdu 610041, Sichuan, China

2. Affiliated Sport Hospital of Chengdu Sport University, Chengdu 610041, Sichuan, China

3. Mianyang Orthopedics Hospital, Mianyang 621000, Sichuan, China

ABSTRACT Objective: To observe the effect and underlying mechanism of external application of Zheng's Qiteng Ruanjian San in the treatment of post-traumatic knee joint stiffness. **Methods:** Sixty-six 8-week-old male SD rats of SPF grade were enrolled and randomly divided into a blank group ($n = 18$) and an experimental group ($n = 48$). The right post-traumatic knee joint stiffness model of flexion type was induced in 48 rats of the experimental group. Forty-one successful model rats were randomly divided into a model group ($n = 20$) and a Qiteng Ruanjian San group ($n = 21$). Rats in the blank group and the model group were fed routinely without intervention, while those in the Qiteng Ruanjian San group received external application of Qiteng Ruanjian San, once a day for 4 weeks after modeling. Some rats were randomly selected from each group before drug intervention, at 2 weeks of drug intervention, and after drug intervention for the measurement of right knee joint range of motion and knee capsule thickness, histopathological observation of knee capsule, fibroblast count (HE staining), and the determination of transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) level in the knee capsule (immunohistochemistry). **Results:** ① Knee joint range of motion. There were statistically significant differences in the overall knee joint range of motion among the blank group, the model group, and the Qiteng Ruanjian San group at three time points ($122.43^\circ \pm 4.54^\circ$ vs $64.78^\circ \pm 2.68^\circ$ vs $65.13^\circ \pm 4.52^\circ$, $F = 530.817$, $P = 0.000$; $124.50^\circ \pm 5.01^\circ$ vs $82.83^\circ \pm 6.05^\circ$ vs $88.67^\circ \pm 8.62^\circ$, $F = 67.404$, $P = 0.000$; $122.33^\circ \pm 4.08^\circ$ vs $92.50^\circ \pm 2.74^\circ$ vs $107.13^\circ \pm 7.41^\circ$, $F = 44.886$, $P = 0.000$). At the three time points, the knee joint range of motion in the blank group was greater than those in the model group and the Qiteng Ruanjian San group ($P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.000$, $P = 0.000$). There was no significant difference in the knee joint range of motion between the model group and the Qiteng Ruanjian San group before drug intervention and at 2 weeks of drug intervention ($P = 0.857$, $P = 0.154$), and the knee joint range of motion in the Qiteng Ruanjian San group was greater than that in the model group after drug intervention ($P = 0.000$). ② Knee capsule thickness. There were overall statistically significant differences in the knee joint capsule thickness among the blank group, the model group, and the Qiteng Ruanjian San group at three time points (0.256 ± 0.020 vs 0.533 ± 0.024 vs 0.528 ± 0.012 mm, $F = 412.282$, $P = 0.000$; 0.254 ± 0.036 vs 0.531 ± 0.018 vs 0.523 ± 0.019 mm, $F = 125.803$, $P = 0.000$; 0.257 ± 0.028 vs 0.527 ± 0.017 vs 0.521 ± 0.014 mm, $F = 211.708$, $P = 0.000$). At the three time points, the knee capsule thickness of the blank group was smaller than that of the model group ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$), and the knee capsule thickness of the Qiteng Ruanjian San group was greater than that of the blank group before and after drug intervention ($P = 0.000$, $P = 0.000$). There was no significant difference in the knee capsule thickness between the Qiteng Ruanjian San group and the blank group at 2 weeks of drug intervention ($P = 0.053$). At the three time points, there was no significant difference in the knee capsule thickness between the model group and the Qiteng Ruanjian San group ($P = 0.702$, $P = 0.740$, $P = 0.725$). ③ Fibroblast count results of knee capsule tissues. There were statistically significant differences in fibroblast count of knee capsule tissues among the blank group, the model group, and the Qiteng Ruanjian San group at three time points (1.67 ± 0.98 vs 98.25 ± 17.97 vs 103.92 ± 11.85 , $F = 85.392$, $P = 0.000$; 1.93 ± 1.09 vs 68.92 ± 17.50 vs 46.17 ± 7.37 , $F = 48.565$, $P = 0.000$; 1.80 ± 0.96 vs 49.83 ± 11.41 vs 31.73 ± 10.66 , $F = 34.755$, $P = 0.000$). At the three time points, the fibroblast count in knee capsule tissues of the blank group was less than those of the model group and the Qiteng Ruanjian San groups ($P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.000$, $P = 0.000$). There was no significant difference in the fibroblast count in knee capsule tissues between the Qiteng Ruanjian San group and the model group before drug intervention ($P = 0.535$), and the fibroblast count in knee capsule tissues of the Qiteng Ruanjian San group was less than that of the model group at 2 weeks of drug intervention and after drug intervention ($P = 0.011$, $P = 0.010$). ④ TGF- $\beta 1$ levels in the knee capsule. There were statistically significant differences in TGF- $\beta 1$ levels among the blank group, the model group, and the Qiteng Ruanjian San group at three time points (0.148 ± 0.060 vs 2.454 ± 1.392 vs $2.519 \pm 0.653\%$, $F = 9.240$, $P = 0.007$; 0.147 ± 0.054 vs 1.136 ± 0.491 vs $0.271 \pm 0.095\%$, $F = 13.765$, $P = 0.002$; 0.147 ± 0.059 vs 0.765 ± 0.339 vs $0.190 \pm 0.070\%$, $F = 13.105$, $P = 0.002$). Before drug intervention, the TGF- $\beta 1$ levels in the knee capsule of the model group and the Qiteng Ruanjian San group were higher than that of the blank group ($P = 0.005$, $P = 0.004$), and there was no significant difference in the TGF- $\beta 1$ levels in the knee capsule between the Qiteng Ruanjian San

group and the model group ($P=0.920$). At 2 weeks of drug intervention, the TGF- β 1 level in the knee capsule of the model group was higher than those of the blank group and the Qiteng Ruanjian San group ($P=0.001, P=0.002$), and there was no significant difference in the TGF- β 1 levels in the knee capsule between the Qiteng Ruanjian San group and the blank group ($P=0.563$). After drug intervention, the TGF- β 1 level in the knee capsule of the model group was higher than those of the blank group and the Qiteng Ruanjian San group ($P=0.001, P=0.001$), and there was no significant difference in the TGF- β 1 levels in the knee capsule between the Qiteng Ruanjian San group and the blank group ($P=0.745$). **Conclusion:** Early application of Zheng's Qiteng Ruanjian San can improve the knee joint function of rats with post-traumatic knee joint stiffness, and the inhibition of fibroblast proliferation and TGF- β 1 expression may be one of its mechanisms.

Keywords knee joint; joint stiffness; wounds and injuries; Zheng's Qiteng Ruanjian San; animal experimentation

膝关节僵硬是创伤、炎症及退行性变等原因引起关节周围组织挛缩、粘连及纤维化,从而导致膝关节活动受限的一种常见的功能障碍^[1-2]。创伤性膝关节僵硬的形成涉及复杂的病理变化。目前的研究认为,关节囊组织纤维化是关节活动受限的主要原因,与纤维化有关的细胞因子在创伤修复的早期大量释放,促进细胞增殖、分化及胶原形成^[3-5]。膝关节僵硬属中医学“痹证”范畴。郑氏芪藤软坚散是四川省骨科医院的院内制剂,具有活血散瘀、温筋镇痛、软坚散结的功效,对于创伤性关节僵硬具有良好的疗效。为进一步明确郑氏芪藤软坚散治疗创伤性关节僵硬的疗效和可能的作用机制,本研究通过动物实验进行了观察,现总结报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 66 只, 体质量 220 ~ 250 g, 购自成都达硕实验动物有限公司, 动物生产许可证号: SCXK(川)2020-030。实验大鼠统一分笼饲养, 每笼 3 只, 自由进食和饮水, 温度 22 ~ 24 °C、相对湿度 40% ~ 60%。动物饲养及实验在成都体育学院动物房和成都体育学院分子与细胞实验室进行, 实验方案经成都体育学院伦理委员会审查通过(成体伦理[2021]73 号)。

1.2 药品及试剂 郑氏芪藤软坚散(四川省骨科医院, 川药制字 Z20080421), 药物组成包括黄芪 90 g、鸡血藤 90 g、海藻 90 g、川芎 60 g、生南星 60 g、三棱 60 g、莪术 60 g、赤芍 60 g、白芍 60 g、山豆根 60 g、生半夏 30 g、苍术 30 g、生川乌 30 g、生草乌 30 g; 塞来昔布胶囊(石药集团欧意药业有限公司, 国药准字 Q39210301); 阿莫西林胶囊(西南药业股份有限公司, 国药准字 210621)。15% EDTA 脱钙液、苏木精染液、伊红染液(武汉赛维尔生物科技有限公司), PBS 缓冲液、二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色

试剂盒、正常山羊血清、山羊抗兔免疫球蛋白 G 聚合物(北京中杉金桥生物技术有限公司), 转化生长因子 β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1) 抗体(北京博奥森生物技术有限公司)。

1.3 实验仪器 手术器材套装(上海浦伦医疗器械有限公司), 电钻(江苏东成机电工具有限公司), 直径 0.6 mm、0.8 mm 医用克氏针(天津市津东希冀医疗器械厂), 直径 0.8 mm 骨科钻头(广州市华创医疗器械有限公司), 电子螺旋测微仪(东莞三量量具有限公司), 手提式压力蒸汽灭菌器(江阴滨江医疗设备有限公司), Pannoramic250 数字切片扫描仪(匈牙利 3DHISTECH 公司), BA410 显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司)。

2 方法

2.1 分组及造模 所有大鼠适应性喂养 1 周后, 随机选取 18 只大鼠纳入空白组; 剩余 48 只大鼠依据 Hildebrand 等^[6]的方法改良后建立右侧创伤性膝关节屈曲型僵硬模型, 造模成功后随机纳入模型组和软坚散组。

拟造模大鼠禁饮、禁食 4 h 后, 按照 0.005 mL · g⁻¹ 体质量腹腔注射 1% 戊巴比妥钠溶液进行麻醉。在大鼠右侧膝关节上方 0.5 cm、大腿正前方偏外侧 0.3 cm 处沿股骨长轴做长 1 cm 的纵切口, 钝性分离筋膜和肌肉暴露股骨。在膝关节上方 0.5 cm 处用尖刀片在股骨干定位, 以直径 0.8 mm 钻头从定位处垂直打孔, 用直径 0.6 mm 的克氏针自打孔处穿透股骨及对侧皮肤。屈曲大鼠右侧膝关节, 使股骨和胫骨之间成角 45°, 确定该角度下穿过大腿的克氏针穿过小腿两侧的位置并标记。在小腿内侧标记处做长 1 cm 的纵切口, 通过切口以直径 0.8 mm 钻头在胫骨打孔, 将穿过股骨的克氏针经胫骨钻孔处打入并从另一侧标记处穿出。将克氏针股骨端和胫骨端各留 2 mm,

尾部弯折,最终将大鼠右侧膝关节固定于股骨和胫骨成角 45° 位。固定完成后,避开大鼠膝关节外侧副韧带,用直径 1.5 mm 克氏针在股骨外侧髌非关节软骨部分打孔,打孔深度 3 mm,模拟关节内损伤出血。克氏针固定及股骨外侧髌打孔完成后,用生理盐水冲洗切口,以 4-0 可吸收缝线逐层缝合肌肉、筋膜及皮肤。固定 4 周后,二次手术取出克氏针。两次术后均以无菌纱布覆盖切口,观察大鼠右后肢血液循环及肿胀情

况;术后 3 d 内应用阿莫西林和塞来昔布,切口常规消毒。造模手术过程见图 1。造模成功标准为:①固定期间关节无感染、股骨及胫骨无骨折、克氏针无脱出,切口愈合良好,大鼠膝关节屈伸活动受限,肢体跛行。②克氏针固定术后即刻,右侧股骨与胫骨成角 ≤ 50°;克氏针取出术后即刻,右侧股骨与胫骨成角 ≤ 70°^[7]。③克氏针固定术后 3 d,大鼠右膝关节 X 线片示克氏针无断裂、肢体无骨折、关节无脱位。



图 1 大鼠创伤性膝关节屈曲型僵硬造模图片

2.2 药物干预 造模成功后开始进行药物干预。空白组大鼠不进行干预,在笼中自由活动、正常饲养;模型组大鼠造模成功后不进行干预,在笼中自由活动、正常饲养;软坚散组大鼠造模成功后采用郑氏芪藤软坚散外敷。体质量 70 kg 的人郑氏芪藤软坚散用量为每次 30 g,根据人与动物药物剂量换算标准(体表面积)^[8],体质量 0.5 kg 大鼠的用量为每次 1.35 g,据此计算大鼠用量。对大鼠右后肢膝关节进行去毛处理后,将郑氏芪藤软坚散用温水调成糊状,均匀涂抹于泡沫贴上,敷于膝关节处,大鼠颈部戴自制头套防止撕咬(图 2)。敷药后大鼠在笼中自由活动,每天敷药 1 次,每次 6 h,3 h 检查 1 次泡沫贴是否脱落,连续干预 4 周。

厚度测量、膝关节囊组织病理学观察及成纤维细胞计数、膝关节囊中 TGF-β1 水平测定。

2.3.1 膝关节活动度测量 将大鼠麻醉后放置在自制的膝关节角度测试器上,使大鼠右侧膝关节与桌面平行,调整拉力计拉力为 0.7 N^[9-10]、拉力方向垂直于胫骨长轴,将量角器中心置于股骨外侧髌,量角器固定臂平行于股骨长轴、移动臂平行于股骨外侧髌与外踝尖的连线(图 3),记录胫骨和股骨之间的夹角,每只大鼠测量 3 次,取平均值。



图 2 软坚散组大鼠外敷软坚散后外观图片

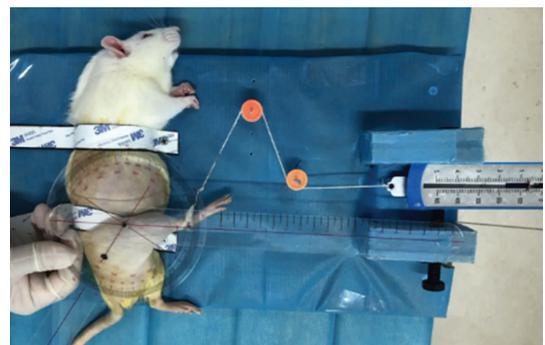


图 3 大鼠膝关节活动度测量方法

2.3 实验指标观察 分别于药物干预开始前、药物干预开始后 2 周、药物干预结束后从各组随机选取部分大鼠,分别进行右侧膝关节活动度测量、膝关节囊

2.3.2 膝关节囊厚度测量 膝关节活动度测量结束后以空气栓塞法处死大鼠,从膝关节上、下各 1 cm 处离断右侧膝关节。将切取的膝关节置于冰盒上,剪除关节周围肌肉后置于 4% 多聚甲醛中固定 36 h,再置于 EDTA 脱钙液中室温脱钙 1 个月,期间每周更换 1 次脱钙液。脱钙后将膝关节沿正中矢状面切为两部分,一部分进行常规石蜡包埋处理;另一部分用刀

片沿胫骨和股骨关节囊附着处剥离,修剪多余的肌肉和韧带,取下后方和后侧方关节囊组织,选择 5 个位置用电子螺旋测微器测量关节囊厚度,结果取平均值。

2.3.3 膝关节囊组织病理学观察及成纤维细胞计数 将经常规石蜡包埋处理的膝关节标本切片,选择其中部分切片经 HE 染色后采用 Panoramic250 数字切片扫描仪进行图像采集,每张切片先在 40 倍下观察全部组织,然后选择关节囊区域分别采集 3 张 100 倍和 400 倍图片进行观察,并在 3 张 400 倍图片中分别进行成纤维细胞计数,结果取平均值。

2.3.4 膝关节囊中 TGF- β 1 水平测定 取部分膝关节标本切片,采用免疫组织化学法测定关节囊中 TGF- β 1 水平。切片经脱蜡至水,抗原修复,过氧化氢阻断内源性过氧化物酶,血清封闭,一抗(TGF- β 1 抗体)孵育,二抗(山羊抗兔免疫球蛋白 G 聚合物)孵育,DAB 显色,苏木精复染,脱水封片处理后,使用显微摄像系统拍照,每张切片先在 100 倍下观察全部组织,然后选择关节囊区域分别采集 100 倍和 400 倍显微图像,各采集 3 张。苏木精染细胞核为蓝色,DAB 显出的阳性表达为棕黄色,使用 Halo 数据分析系统计算每张图像中阳性面积占比。

2.4 数据统计 采用 SPSS26.0 软件进行数据统计分析。3 组大鼠膝关节活动度、膝关节囊厚度、膝关节囊中成纤维细胞数量、膝关节囊中 TGF- β 1 水平的总体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 一般情况 造模过程中 2 只大鼠因麻醉后窒息死亡,1 只发生切口感染,2 只取出克氏针后股骨与胫骨最大成角 $>70^\circ$,2 只发生胫骨骨折,均予以剔除,剩余 41 只大鼠随机纳入模型组(20 只)和软坚散组(21 只)。实验指标观察时,空白组每个时间点各选取 6 只大鼠,软坚散组每个时间点选取 7 只大鼠;模型组药物干预开始前选取 6 只大鼠,其余 2 个时间点均选取 7 只大鼠。

3.2 膝关节活动度 在 3 个时间点,3 组大鼠的膝关节活动度总体比较,差异均有统计学意义。在 3 个时间点,空白组的膝关节活动度均大于模型组和软坚散组($P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000$);药物干预开始前、药物干预开始后 2 周时,模型组和软坚散组的膝关节活动度比较,组

间差异均无统计学意义($P = 0.857; P = 0.154$);药物干预结束后,软坚散组的膝关节活动度大于模型组($P = 0.000$)。见表 1。

3.3 膝关节囊厚度 在 3 个时间点,3 组大鼠的膝关节囊厚度总体比较,差异均有统计学意义。在 3 个时间点,空白组的膝关节囊厚度均小于模型组($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$);药物干预开始前和药物干预结束后,软坚散组的膝关节囊厚度均大于空白组($P = 0.000, P = 0.000$);药物干预开始后 2 周时,软坚散组与空白组的膝关节囊厚度的差异无统计学意义($P = 0.053$);在 3 个时间点,模型组与软坚散组的膝关节囊厚度比较,组间差异均无统计学意义($P = 0.702, P = 0.740, P = 0.725$)。见表 2。

3.4 膝关节囊组织病理学观察及成纤维细胞计数结果 空白组滑膜结构清晰、排列整齐,滑膜层由单层或双层滑膜细胞构成,滑膜下层结构疏松、排列较整齐[图 4(1)]。药物干预开始前模型组和软坚散组的滑膜组织受损较明显,滑膜层滑膜细胞数量增加,滑膜下层有大量纤维组织增生、增生纤维组织较为致密、有炎性细胞浸润,病变严重区域脂肪组织基本消失、关节软骨变薄甚至缺损[图 4(2)、图 4(3)]。药物干预开始后 2 周模型组滑膜组织受损较明显,滑膜细胞分层增加、数量增多、脂肪细胞稀少,滑膜下层被大量纤维组织取代、增生纤维组织内可见新生血管和大量成纤维细胞聚集[图 4(4)];软坚散组滑膜组织受损较明显,滑膜层增厚,滑膜下层较为致密、有纤维组织增生、增生区域血管增多[图 4(5)]。药物干预结束后模型组滑膜组织受损明显,滑膜细胞数量较多,滑膜下层有大量纤维组织增生、增生组织较致密、有淋巴细胞浸润、脂肪细胞萎缩[图 4(6)];软坚散组滑膜组织受损较明显,滑膜层滑膜细胞排列致密、有少量脂肪细胞,滑膜下层纤维组织增生[图 4(7)]。在 3 个时间点,3 组大鼠膝关节囊中成纤维细胞数量总体比较,差异均有统计学意义。在 3 个时间点,空白组膝关节囊中成纤维细胞数量均少于模型组和软坚散组($P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000$);药物干预开始前,软坚散组和模型组膝关节囊中成纤维细胞数量比较,差异无统计学意义($P = 0.535$);药物干预开始后 2 周和药物干预结束后,软坚散组膝关节囊中成纤维细胞数量均少于模型组($P = 0.011, P = 0.010$)。表 3。

表 1 3 组大鼠膝关节活动度

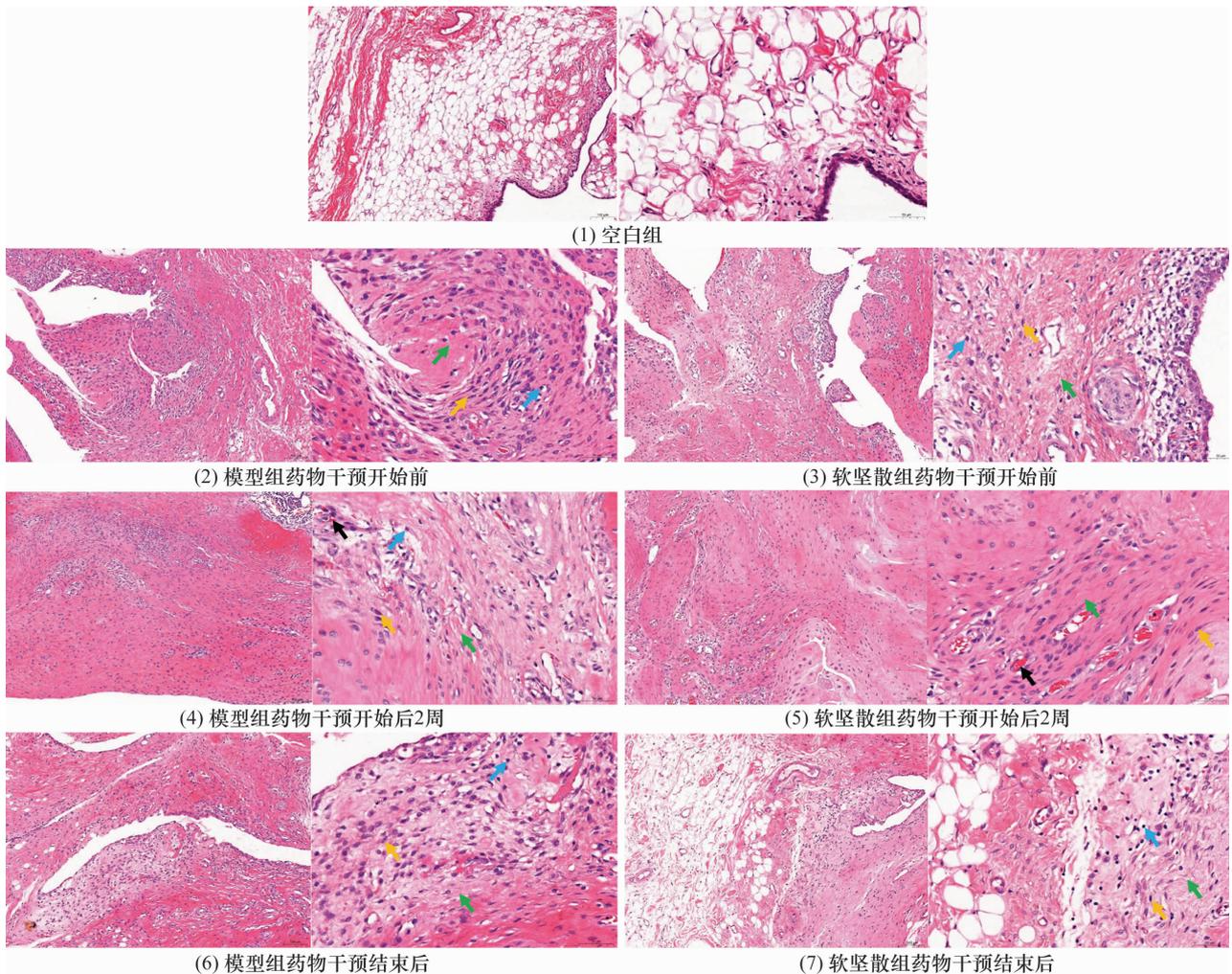
组别	样本量/ 只	膝关节活动度/($\bar{x} \pm s, ^\circ$)		
		药物干预开始前	药物干预开始后 2 周	药物干预结束后
空白组	6	122.43 ± 4.54	124.50 ± 5.01	122.33 ± 4.08
模型组	6 ¹⁾	64.78 ± 2.68	82.83 ± 6.05	92.50 ± 2.74
软坚散组	7	65.13 ± 4.52	88.67 ± 8.62	107.13 ± 7.41
<i>F</i> 值		530.817	67.404	44.886
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

1) 模型组药物干预开始后 2 周和药物干预结束后的样本量均为 7 只。

表 2 3 组大鼠膝关节囊厚度

组别	样本量/ 只	膝关节囊厚度/($\bar{x} \pm s, \text{mm}$)		
		药物干预开始前	药物干预开始后 2 周	药物干预结束后
空白组	6	0.256 ± 0.020	0.254 ± 0.036	0.257 ± 0.028
模型组	6 ¹⁾	0.533 ± 0.024	0.531 ± 0.018	0.527 ± 0.017
软坚散组	7	0.528 ± 0.012	0.523 ± 0.019	0.521 ± 0.014
<i>F</i> 值		412.282	125.803	211.708
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

1) 模型组药物干预开始后 2 周和药物干预结束后的样本量均为 7 只。



绿色箭头指示处为纤维组织,黄色箭头指示处为成纤维细胞,蓝色箭头指示处为淋巴细胞,黑色箭头指示处为血管;各分图中左侧图片放大倍数为 100 倍,右侧图片放大倍数为 400 倍,标尺 = 50 μm 。

图 4 各组大鼠膝关节囊 HE 染色结果

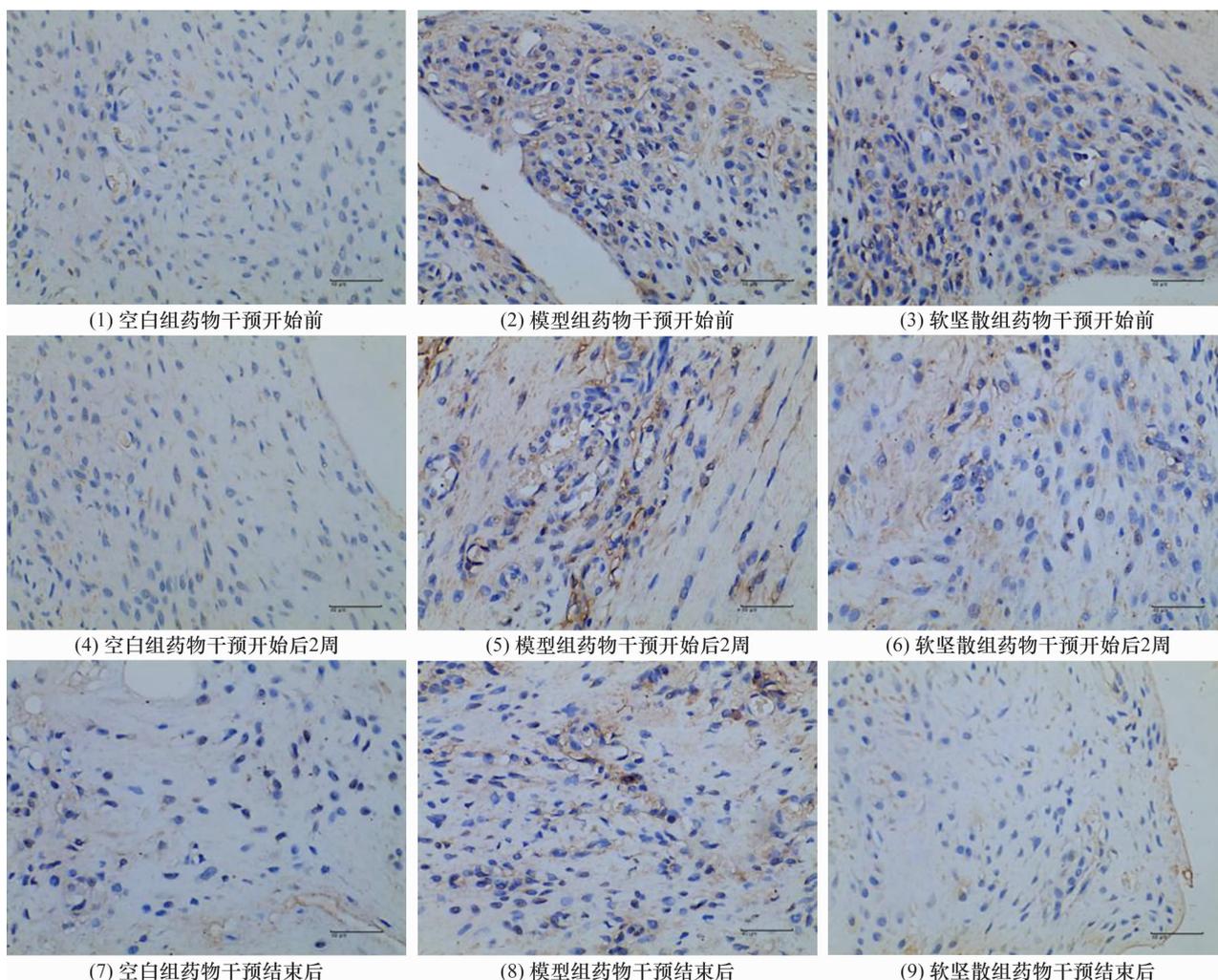
3.5 膝关节囊中 TGF-β1 水平 在 3 个时间点,3 组大鼠膝关节囊中 TGF-β1 水平总体比较,差异均有统计学意义。药物干预开始前,模型组和软坚散组膝关节囊中 TGF-β1 水平均高于空白组 ($P = 0.005, P = 0.004$),软坚散组与模型组膝关节囊中 TGF-β1 水平的差异无统计学意义 ($P = 0.920$);药物干预开始后 2 周时,模型组膝关节囊中 TGF-β1 水平高于空白组

和软坚散组 ($P = 0.001, P = 0.002$),软坚散组与空白组膝关节囊 TGF-β1 水平的差异无统计学意义 ($P = 0.563$);药物干预结束后,模型组膝关节囊中 TGF-β1 水平高于空白组和软坚散组 ($P = 0.001, P = 0.001$),软坚散组与空白组膝关节囊中 TGF-β1 水平的差异无统计学意义 ($P = 0.745$)。见图 5、表 4。

表 3 3 组大鼠膝关节囊中成纤维细胞数量

组别	样本量/只	膝关节囊中成纤维细胞数量/ $(\bar{x} \pm s, \text{个})$		
		药物干预开始前	药物干预开始后 2 周	药物干预结束后
空白组	6	1.67 ± 0.98	1.93 ± 1.09	1.80 ± 0.96
模型组	6 ¹⁾	98.25 ± 17.97	68.92 ± 17.50	49.83 ± 11.41
软坚散组	7	103.92 ± 11.85	46.17 ± 7.37	31.73 ± 10.66
<i>F</i> 值		85.392	48.565	34.755
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

1) 模型组药物干预开始后 2 周和药物干预结束后的样本量均为 7 只。



图中标尺 = 40 μm。

图 5 3 组大鼠膝关节囊中转化生长因子 β1 免疫组织化学染色结果 (×400)

表 4 3 组大鼠膝关节囊中转化生长因子 $\beta 1$ 水平

组别	样本量/ 只	膝关节囊中转化生长因子 $\beta 1$ 水平/ $(\bar{x} \pm s, \%)$		
		药物干预开始前	药物干预开始后 2 周	药物干预结束后
空白组	6	0.148 ± 0.060	0.147 ± 0.054	0.147 ± 0.059
模型组	6 ¹⁾	2.454 ± 1.392	1.136 ± 0.491	0.765 ± 0.339
软坚散组	7	2.519 ± 0.653	0.271 ± 0.095	0.190 ± 0.070
F 值		9.240	13.765	13.105
P 值		0.007	0.002	0.002

1) 模型组药物干预开始后 2 周和药物干预结束后的样本量均为 7 只。

4 讨论

创伤对膝关节结构的破坏和创伤后不当的固定制动是导致创伤后膝关节活动障碍的主要原因。张全兵^[11]的研究表明, 无论是否干预, 关节挛缩的恢复主要发生在解除固定的早期。Zhou 等^[12-13]的研究也表明, 关节挛缩早期关节功能恢复最快。本研究中, 克氏针拆除后模型组和软坚散组大鼠的膝关节活动度均逐渐增大, 至药物干预结束后时软坚散组的膝关节活动度大于模型组。这提示郑氏芪藤软坚散可以促进创伤性膝关节僵硬模型大鼠的膝关节功能恢复。

本研究中, 克氏针拆除后模型组和软坚散组大鼠的膝关节囊厚度改善均不明显。这说明单纯通过自然恢复或郑氏芪藤软坚散外敷对关节囊厚度的改善作用有限, 但郑氏芪藤软坚散外敷可作为改善关节囊厚度的一种重要辅助措施。本研究中取材位置和测量误差也可能对实验数据造成一定影响。

关节滑膜纤维化是关节挛缩发生的主要原因。关节挛缩发生后, 滑膜在组织学上的改变表现为细胞外基质沉积和周围结缔组织增生^[4-5]。本研究中关节囊组织病理学观察显示, 模型组和软坚散组的所有切片均有不同程度的滑膜层脂肪细胞萎缩甚至消失, 滑膜下层可见成纤维细胞增生和新生血管形成, 有部分软骨变薄、软骨组织纤维化的倾向。软坚散组和模型组关节囊的损伤仍然较明显, 与关节活动度的恢复不一致。这说明创伤性关节僵硬中关节囊的损伤, 依靠自然恢复或郑氏芪藤软坚散外敷不能有效改变其病理变化趋势。以往的研究^[12, 14-15]也证实了这一点。

关节僵硬中关节滑膜纤维化是多种细胞因子共同调节、相互作用的结果, 其中 TGF- $\beta 1$ 在纤维化早期的作用最为关键^[5, 16-18], 它可以促进成纤维细胞增殖、分化及 I 型胶原蛋白合成, 而肌成纤维细胞被认

为是关节滑膜纤维化的主要效应细胞^[19]。当创伤发生后, 纤维母细胞被激活, 大量增殖, 分化为成纤维细胞, 使关节内组织发生纤维增生和粘连^[20-22]。已有研究表明, 在关节僵硬发生过程中, 关节滑膜和关节软骨中 TGF- $\beta 1$ 及其受体在 mRNA 水平上的表达水平升高, 通过治疗后纤维化相关基因 (I 型胶原和 TGF- $\beta 1$) 表达减少, 纤维化改善^[6, 23-24]。本研究发现, 解除固定后, 模型组和软坚散组大鼠关节囊中 TGF- $\beta 1$ 水平较高、成纤维细胞数量较多, 二者随时间变化均呈下降趋势, 但软坚散组下降速度更快。

关节僵硬属中医学“痹证”范畴。肢体受到外力损伤后, 局部气血瘀阻, 肢体筋骨失养, 久而关节屈伸不利。郑氏芪藤软坚散中, 三棱破血中之气, 以破血通经, 莪术破气中之血, 以破气消积, 二药合用气血并重, 祛瘀止痛; 海藻利水消肿、软坚散结; 川芎、赤芍活血行气、散瘀止痛; 白蔹、生天南星、生半夏消肿散结; 苍术祛风散寒; 生川乌、生草乌温通经络、利关节; 山豆根清热消肿; 黄芪补气升阳、行滞通痹, 鸡血藤补血行血、舒筋活络, 二者合用补益气血、祛痹扶正。诸药相合, 既可以活血散瘀、温筋镇痛, 又能起到软坚散结的作用。现代医学研究表明, 以上药物中的生物活性物质对膝关节周围炎症反应和纤维化过程都有明显的抑制作用。半夏中的生物碱成分可以有效抑制前列腺素 E2、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 8、细胞间黏附分子 1 的释放, 从而发挥抗炎作用^[25]。黄芪中的黄芪黄酮类化合物可以降低血小板黏附能力、促进血液流动, 改善受伤部位的血液循环, 发挥活血化瘀、消肿止痛的功效; 此外, 黄芪中的生物活性物质对心、肝、肺、肾均有抗纤维化作用^[26]。黄芪、赤芍、三棱、莪术中的生物活性物质能够降低 α 平滑肌肌动蛋白、TGF- $\beta 1$ 及其受体的表达水平, 使细胞外基质的合成减少并加速其降解, 共同抑制组织纤维化^[27-30]。川乌、草乌中的乌头类生物碱能够抑制组胺释放、减轻

组织水肿^[31]。山豆根中的山豆根碱在炎症反应的早期可以提高毛细血管通透性,加速组织代谢,在组织修复后期还可抑制肉芽组织增生,可以有效抑制损伤修复的瘢痕增生^[32]。

本研究的结果提示,早期应用郑氏芪藤软坚散可以促进创伤性膝关节僵硬模型大鼠膝关节功能恢复,抑制成纤维细胞增殖和 TGF- β 1 表达可能是其作用机制之一。

参考文献

- [1] 胥少汀,葛宝丰,徐印坎.实用骨科学[M].4版.北京:人民军医出版社,2019:2263-2264.
- [2] 刘波.常用骨伤康复方案[M].成都:四川大学出版社,2014:208.
- [3] KANEGUCHI A, OZAWA J, MINAMIMOTO K, et al. Active exercise on immobilization-induced contractured rat knees develops arthrogenic joint contracture with pathological changes[J]. J Appl Physiol (1985), 2018, 124(2): 291-301.
- [4] SALIB C G, REINA N, TROUSDALE W H, et al. Inhibition of COX-2 pathway as a potential prophylaxis against arthrofibrogenesis in a rabbit model of joint contracture [J]. J Orthop Res, 2019, 37(12): 2609-2620.
- [5] WANG F, ZHOU C X, ZHENG Z, et al. Metformin reduces myogenic contracture and myofibrosis induced by rat knee joint immobilization via AMPK-mediated inhibition of TGF- β 1/Smad signaling pathway[J]. Connect Tissue Res, 2023, 64(1): 26-39.
- [6] HILDEBRAND K A, ZHANG M, HART D A. Myofibroblast upregulators are elevated in joint capsules in posttraumatic contractures[J]. Clin Orthop Relat Res, 2007, 456: 85-91.
- [7] 田海源.不同时间的静态渐进牵伸对大鼠创伤性膝关节挛缩的影响[D].石家庄:河北师范大学,2017.
- [8] 秦川,魏泓.实验动物学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2015:298-299.
- [9] 王璐,张立宁,何家乐,等.不同时长的静态进展性牵伸对大鼠创伤性膝关节挛缩的治疗效果及其机制研究[J].四川大学学报(医学版),2020,51(2):185-192.
- [10] EFIRD W, KELLAM P, YEAZELL S, et al. An evaluation of prophylactic treatments to prevent post traumatic joint stiffness[J]. J Orthop Res, 2014, 32(11): 1520-1524.
- [11] 张全兵.牵伸联合超短波治疗对兔膝关节挛缩模型中关节功能恢复以及关节囊纤维化影响的初步研究[D].合肥:安徽医科大学,2018.
- [12] ZHOU H, TRUDEL G, GOUDREAU L, et al. Knee joint stiffness following immobilization and remobilization; a study in the rat model[J]. J Biomech, 2020, 99: 109471.
- [13] BARANOWSKI A, SCHLEMMER L, FÖRSTER K, et al. A novel rat model of stable posttraumatic joint stiffness of the knee[J]. J Orthop Surg Res, 2018, 13(1): 185.
- [14] KOJIMA S, HOSO M, WATANABE M, et al. Experimental joint immobilization and remobilization in the rats [J]. J Phys Ther Sci, 2014, 26(6): 865-871.
- [15] KANEGUCHI A, OZAWA J, MINAMIMOTO K, et al. Low-level laser therapy prevents treadmill exercise-induced progression of arthrogenic joint contracture via attenuation of inflammation and fibrosis in remobilized rat knees [J]. Inflammation, 2019, 42(3): 857-873.
- [16] ALBRO M B, NIMS R J, CIGAN A D, et al. Accumulation of exogenous activated TGF- β in the superficial zone of articular cartilage [J]. Biophys J, 2013, 104(8): 1794-1804.
- [17] KANEGUCHI A, OZAWA J. Inflammation and fibrosis induced by joint remobilization, and relevance to progression of arthrogenic joint contracture: a narrative review [J]. Physiol Res, 2022, 71(4): 447-488.
- [18] KANEGUCHI A, OZAWA J, KAWAMATA S, et al. Development of arthrogenic joint contracture as a result of pathological changes in remobilized rat knees [J]. J Orthop Res, 2017, 35(7): 1414-1423.
- [19] SUN Y, LI F, FAN C. Effect of pERK2 on extracellular matrix turnover of the fibrotic joint capsule in a post-traumatic joint contracture model [J]. Exp Ther Med, 2016, 11(2): 547-552.
- [20] WAN Q, LIU F, ZHANG J, et al. Overexpression of laminin α 4 facilitates proliferation and migration of fibroblasts in knee arthrofibrosis by targeting canonical Shh/Gli1 signaling [J]. Connect Tissue Res, 2021, 62(4): 464-474.
- [21] ABDEL M P, MORREY M E, BARLOW J D, et al. Myofibroblast cells are preferentially expressed early in a rabbit model of joint contracture [J]. J Orthop Res, 2012, 30(5): 713-719.
- [22] ITAYA N, YABE Y, HAGIWARA Y, et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound for preventing joint stiffness in immobilized knee model in rats [J]. Ultrasound Med Biol, 2018, 44(6): 1244-1256.
- [23] INOUE S, MORIYAMA H, WAKIMOTO Y, et al. Transcutaneous application of carbon dioxide improves contractures after immobilization of rat knee joint [J]. Phys Ther Res, 2020, 23(2): 113-122.

tive factor analysis[J]. World Neurosurg, 2020, 141: e423 - e430.

[24] ZEHRA U, CHEUNG J, BOW C, et al. Multidimensional vertebral endplate defects are associated with disc degeneration, modic changes, facet joint abnormalities, and pain[J]. J

Orthop Res, 2019, 37(5): 1080 - 1089.

[25] 孙尚, 赵振达, 蒋媛, 等. 力学刺激在椎体软骨终板退变中的作用及机制[J]. 医用生物力学, 2021, 36(4): 652 - 657.

(收稿日期: 2022-07-01 本文编辑: 时红磊)

(上接第 9 页)

[24] MAYR H O, FASSBENDER F F, PRALL W C, et al. Immunohistochemical examination in arthrofibrosis of the knee joint[J]. Arch Orthop Trauma Surg, 2019, 139(3): 383 - 391.

[25] 左军, 牟景光, 胡晓阳. 半夏化学成分及现代药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(9): 26 - 29.

[26] 敬小莉, 孙续禄, 张俊, 等. 黄芪提取物对特发性肺纤维化小鼠的治疗效果及 TGF- β 、VEGF 分析[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(4): 248 - 250.

[27] 傅亮, 李玉杰, 来媛媛, 等. 黄芪注射液联合葛根素注射液对 HK-2 细胞 TGF- β 1/Smads 及 BMP-7/Smad5 信号通路的影响[J]. 环球中医药, 2019, 12(3): 343 - 347.

[28] 张敬博, 陈平平, 于栋华, 等. 黄芩-赤芍药对不同比例配

伍抗大鼠肝纤维化模型作用机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(12): 69 - 77.

[29] 王文文, 程锦国. 温莪术对大鼠肾间质纤维化的保护作用及其机制研究[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(1): 144 - 146.

[30] 黄礼闯, 赵梦亭, 桑夏楠, 等. 三棱-莪术药对化学成分及药理作用研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(11): 6612 - 6616.

[31] 李双, 黎锐, 曾勇, 等. 川乌的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(12): 2433 - 2443.

[32] 航艾, 孙杰, 盛云华, 等. 基于药代动力学的山豆根抗炎作用机制研究[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(5): 645 - 649.

(收稿日期: 2022-08-25 本文编辑: 李晓乐)

· 作者须知 ·

论文中对数据进行统计学处理时需要注意的问题

1 对基线资料进行统计学分析 搜集资料应严格遵守随机抽样设计, 保证样本从同质的总体中随机抽取, 除了对比因素外, 其他可能影响结果的因素应尽可能齐同或基本接近, 以保证组间的齐同可比性。因此, 应对样本的基线资料进行统计学分析, 以证明组间的齐同可比性。

2 选择正确的统计检验方法 研究目的不同、设计方法不同、资料类型不同, 选用的统计检验方法则不同。例如: 2 组计量资料的比较应采用 t 检验; 而多组 (≥ 3 组) 计量资料的比较应采用方差分析 (即 F 检验), 如果组间差异有统计学意义, 想了解差异存在于哪两组之间, 再进一步做 q 检验或 LSD- t 检验。许多作者对多组计量资料进行比较时采用两两间 t 检验的方法是错误的。又如: 等级资料的比较应采用 Ridit 分析或秩和检验或行平均得分差检验。许多作者对等级资料进行比较时采用卡方检验的方法是错误的。

3 假设检验的推断结论不能绝对化 假设检验的结论是一种概率性的推断, 无论是拒绝 H_0 还是不拒绝 H_0 , 都有可能发生错误 (I 型错误和 II 型错误)。因此, 假设检验的推断结论不能绝对化。

4 P 值的大小并不表示实际差别的大小 研究结论包括统计结论和专业结论两部分。统计结论只说明有无统计学意义, 而不能说明专业上的差异大小。 P 值的大小不能说明实际效果的“显著”或“不显著”。统计结果的解释和表达, 应说对比组之间的差异有 (或无) 统计学意义, 而不能说对比组之间有 (或无) 显著的差异。 $P \leq 0.01$ 比 $P \leq 0.05$ 更有理由拒绝 H_0 , 并不表示 $P \leq 0.01$ 时比 $P \leq 0.05$ 时实际差异更大。只有将统计结论和专业知识有机地结合起来, 才能得出恰如其分的研究结论。若统计结论与专业结论一致, 则最终结论也一致; 若统计结论与专业结论不一致, 则最终结论需根据专业知识而定。判断被试因素的有效性时, 要求在统计学上和专业上都有意义。

5 假设检验的结果表达 P 值传统采用 0.05 和 0.01 这 2 个界值, 现在提倡给出 P 的具体数值和检验统计量的具体数值 (小数点后保留 3 位有效数字), 主要理由是: ①以前未推广统计软件之前, 需要通过查表估计 P 值, 现在使用统计软件会自动给出具体的 P 值和检验统计量的具体值 (t 值、 F 值、 χ^2 值等)。②方便根据具体情况判断问题。例如 $P = 0.051$ 与 $P = 0.049$ 都是小概率, 不能简单地断定 $P = 0.051$ 无统计学意义而 $P = 0.049$ 有统计学意义。③便于对同类研究结果进行综合分析。

6 统计学符号的使用 统计学符号的使用应按照 GB 3358—82《统计名词及符号》的规定, 具体可参阅本刊投稿须知中的有关要求。