

阳和汤治疗兔膝关节炎阳虚寒凝证的效果及作用机制

李田花¹, 施珊妮¹, 桂苗¹, 黄泽灵², 邱添华¹, 高弘建¹, 洪振强³

(1. 福建中医药大学中医学院, 福建 福州 350122;

2. 南京中医药大学附属苏州市中医医院, 江苏 苏州 215009;

3. 中医骨伤及运动康复教育部重点实验室, 福建 福州 350122)

摘要 目的:探讨阳和汤治疗兔膝关节炎(knee osteoarthritis, KOA)阳虚寒凝证的效果及作用机制。**方法:**将 24 只新西兰兔随机分为正常对照组和造模组, 正常对照组 6 只, 造模组 18 只。造模组兔采用双侧下肢膝关节腔内注射木瓜蛋白酶建立 KOA 模型, 同时采用薄荷油灌胃联合 4 ℃人工气候箱饲养建立阳虚寒凝证模型。造模成功后将 18 只 KOA 阳虚寒凝证兔随机分为模型组、阳和汤干预组和塞来昔布干预组, 每组 6 只。阳和汤干预组兔按照中药饮片 3 g·kg⁻¹ 的剂量给予阳和汤浓缩剂灌胃, 塞来昔布干预组按照 0.02 g·kg⁻¹ 的剂量给予塞来昔布溶液灌胃, 模型组和正常对照组给予等量生理盐水灌胃。每日给药 1 次, 连续给药 2 周。末次给药后当天, 采用改良版 Lequesne MG 评分标准评价兔膝关节疼痛及功能, 采用桂苗等制定的阳虚证候评分表及寒凝证候评分表评价兔阳虚寒凝证候改善情况。末次给药后禁食不禁水 24 h, 处死兔并取材, 采用 HE 染色观察膝关节滑膜组织病理改变, 采用实时定量 PCR 检测膝关节滑膜组织中 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)、核因子-κB(nuclear factor-κB, NF-κB) 的 mRNA 表达量, 采用蛋白免疫印迹法检测膝关节滑膜组织中 TLR4、NF-κB 的蛋白表达量, 采用酶联免疫吸附法测定膝关节液中白细胞介素(interleukin, IL)-1β、IL-6、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α) 的含量。**结果:**阳和汤干预组和塞来昔布干预组兔膝关节改良版 Lequesne MG 评分、阳虚寒凝证候评分均小于模型组(阳和汤干预组: $P=0.000$, $P=0.000$; 塞来昔布干预组: $P=0.000$, $P=0.000$); 阳和汤干预组兔膝关节改良版 Lequesne MG 评分与塞来昔布干预组的差异无统计学意义($P=0.751$), 阳虚寒凝证候评分小于塞来昔布干预组($P=0.000$); 阳和汤干预组和塞来昔布干预组膝关节滑膜表面较为平整, 衬里层细胞层数较模型组减少, 细胞排列较为紧密; 衬里下层仍可见较多脂肪细胞分布, 可见少量炎性细胞浸润, 纤维组织、血管少量增生; 阳和汤干预组和塞来昔布干预组兔膝关节滑膜组织中 TLR4 和 NF-κB 的 mRNA 表达量及蛋白表达量均小于模型组(阳和汤干预组: $P=0.000$, $P=0.000$; 塞来昔布干预组: $P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$); 阳和汤干预组和塞来昔布干预组兔膝关节液中 TNF-α、IL-1β、IL-6 的含量均小于模型组(阳和汤干预组: $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$; 塞来昔布干预组: $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$)。 **结论:**阳和汤治疗 KOA 阳虚寒凝证, 能够显著缓解膝关节疼痛, 改善膝关节功能、阳虚寒凝证候及膝关节滑膜组织病理表现, 在缓解膝关节疼痛和改善膝关节功能方面与塞来昔布相当, 在改善阳虚寒凝证候方面较塞来昔布更具优势; 其作用机制可能是通过下调 TLR4、NF-κB 的表达, 抑制 TNF-α、IL-6 及 IL-1β 等炎症因子的表达。

关键词 骨关节炎, 膝; 寒凝阳虚; 阳和汤; 模型, 动物; 兔; 信号传导

Efficacy and mechanism of Yanghe Tang(阳和汤) for treatment of syndrome of Yang deficiency due to Yin excess in knee osteoarthritis rabbits

LI Tianhua¹, SHI Shanni¹, GUI Miao¹, HUANG Zeling², QIU Tianhua¹, GAO Hongjian¹, HONG Zhenqiang³

1. School of Traditional Chinese Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, Fujian, China

2. Suzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Suzhou 215009, Jiangsu, China

3. Key Laboratory of Orthopedics&Traumatology and Rehabilitation of Traditional Chinese Medicine of Ministry of Education, Fuzhou 350122, Fujian, China

ABSTRACT Objective: To explore the effects and mechanism of Yanghe Tang (阳和汤, YHT) in treatment of syndrome of Yang

基金项目: 福建中医药大学管理科研项目(X2019006-学科)

通讯作者: 洪振强 E-mail: 594710961@qq.com

deficiency due to Yin excess in knee osteoarthritis (KOA) rabbits. **Methods:** Twenty-four New Zealand rabbits were randomized into normal control group (6 ones) and modeling group (18 ones). The rabbits in modeling group were intervened by knee intra-articular injection of papain into bilateral hind limbs for inducing KOA, followed by intragastric administration with peppermint oil and reared in a 4 °C artificial climate chamber for inducing the syndrome of Yang deficiency due to Yin excess. After successful modeling, the 18 modeled rabbits were randomized into model group, YHT intervention group, and celecoxib intervention group, 6 cases in each group. The rabbits in YHT intervention group were intragastric administrated with YHT concentrate in dosage of 3 g/kg of traditional Chinese medicine decoction pieces, the ones in celecoxib intervention group with celecoxib solution in dosage of 0.02 g/kg, while the ones in model group and normal control group with the same dose of normal saline. All rabbits were intervened once a day for consecutive 2 weeks. On the day of the last intervention, the knee pain and function of the rabbits were evaluated by using the modified Lequesne MG knee assessment scale, and the syndrome alleviation was assessed by using the Yang deficiency and Yin excess scoring scales developed by Gui Miao et al. After the last intervention, the rabbits were deprived of food but water for 24 hours, then they were sacrificed and their knee synovial tissues were harvested and stained with hematoxylin-eosin (HE) for observing the pathological changes. Furthermore, the mRNA and protein expression levels of Toll-like receptor 4 (TLR4) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) in the knee synovial tissues were detected by using real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting, respectively, and the levels of interleukin (IL)-1 β , IL-6, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the knee synovial fluid were detected by using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** The modified Lequesne MG score and syndrome (Yang deficiency due to Yin excess) score were lower in YHT intervention group and celecoxib intervention group compared with that in model group (YHT intervention group: $P = 0.000$, $P = 0.000$; celecoxib intervention group: $P = 0.000$, $P = 0.000$). The comparison of modified Lequesne MG score between YHT intervention group and celecoxib intervention group revealed no significant differences ($P = 0.751$); while, the decreased syndrome score behaved in YHT intervention group compared to celecoxib intervention group ($P = 0.000$). Compared with that in the model group, the knee synovial membrane in YHT intervention group and celecoxib intervention group showed smooth surface with reduced layers of lining cells, compact cell arrangement, existence of adipocytes among sublining cells, infiltration of a small amount of inflammatory cells, and mild proliferation of fibrous tissues and blood vessels. The YHT intervention group and celecoxib intervention group displayed down-regulated mRNA and protein expression levels of TLR4 and NF- κ B in the knee synovial tissues of rabbits (YHT intervention group: $P = 0.000$, $P = 0.000$; celecoxib intervention group: $P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.000$, $P = 0.000$), and lowered levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in the knee synovial fluid of rabbits compared to model group (YHT intervention group: $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$; celecoxib intervention group: $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$). **Conclusion:** YHT can obviously relieve the knee pain and improve the knee function, the syndrome of Yang deficiency due to Yin excess and the pathological manifestations of knee synovial tissues in treating the syndrome of Yang deficiency due to Yin excess of KOA. It is comparable to celecoxib in alleviating knee pain and improving knee function, while, it outperforms celecoxib in mitigating the syndrome of Yang deficiency due to Yin excess. It may exert the effects by inhibiting the expressions of TNF- α , IL-6 and IL-1 β through down-regulating the expressions of TLR4 and NF- κ B.

Keywords osteoarthritis, knee; Yang deficiency due to Yin excess; Yang He Tang; models, animal; rabbits; signal transduction

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是以关节软骨破坏、软骨下骨硬化及滑膜病变为主要病理特点的慢性退行性疾病^[1-2]。滑膜病变存在于 KOA 的各个阶段,是导致 KOA 发生、发展的驱动因素之一^[3]。KOA 属中医学“骨痹”范畴。《中医病证诊断疗效标准》将骨痹分为肾虚髓亏证、阳虚寒凝证和瘀血阻滞证^[4],临床上 KOA 以阳虚寒凝证为常见证型^[5-7]。阳和汤有温阳养血化痰、散寒通滞的功效,主要针对阳虚寒凝证。相关临床研究^[8-9]显示,阳和汤治疗 KOA 疗效良好。然而,目前阳和汤治疗 KOA 的作用机制尚不清楚,相关研究较为有限。本研究通过建立 KOA 阳虚寒凝证兔模型,探究阳和汤治疗 KOA 阳虚

寒凝证的效果及作用机制,以期为临床上治疗 KOA 阳虚寒凝证提供依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 新西兰兔 24 只,雌性和雄性各 12 只,月龄 4~6 个月,体质量 2.0~2.5 kg,购于上海市松江区松联实验动物场[生产许可证号:SCXK(沪)2017-0008],饲养于福建中医药大学实验动物中心[使用许可证号:SYXK(闽)2020-0003]。试验方案经福建中医药大学伦理委员会审查通过,伦理批件号:2021008。

1.2 实验药物 阳和汤,药物组成包括熟地黄 30 g、肉桂 3 g、麻黄 2 g、鹿角胶 9 g、白芥子 6 g、姜炭 2 g、甘

草片 6 g。将上述药物用 500 mL 冷水浸泡 30 min,煎煮 30 min 后倒出药液,再加入 300 mL 冷水,煎煮 30 min。将 2 次煎煮后的药液混合,并通过旋转蒸发器浓缩至 58 mL(按照中药饮片质量计算药物浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$),密封保存于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.3 实验试剂 塞来昔布胶囊(美国瑞辉公司),木瓜蛋白酶(美国 Sigma 公司),薄荷油(上海源叶生物科技有限公司),HE 染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司),白细胞介素(interleukin, IL)- 1β 、IL-6 及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的酶联免疫吸附法检测试剂盒(江苏酶免实业有限公司),兔抗兔 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)、核因子- κB (nuclear factor- κB , NF- κB)一抗(北京博奥森生物技术有限公司)。

1.4 实验仪器 恒温恒湿培养箱(天津宏诺仪器有限公司),ELX800 全自动酶标仪(美国 Bio-Tek 公司),7500 Real-Time PCR 仪(美国 ABI 公司),自动脱水机、石蜡包埋机(孝感市亚光医用电子技术有限公司),倒置显微镜(德国徕卡公司)。

2 方法

2.1 KOA 阳虚寒凝证造模方法 适应性饲养兔子 1 周后,采用关节腔内注射木瓜蛋白酶建立 KOA 模型,同时采用薄荷油灌胃联合 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 人工气候箱饲养建立阳虚寒凝证模型^[10-11]:在第 1 天、第 4 天及第 7 天于兔子双侧后肢膝关节腔注射 0.1 mL 的 4% 木瓜蛋白酶溶液,末次注射后每日驱赶兔子活动 30 min;同时自第 1 天起,按照 $0.65 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量给予薄荷油灌胃,并每天将兔子置于湿度为 50% ~ 60%、温度为 $4 \sim 6 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 的恒温恒湿培养箱中 1.5 h,连续处理 2 周。造模结束后,采用改良版 Lequesne MG 评分标准^[12]鉴定 KOA 模型。改良版 Lequesne MG 评分标准包括疼痛程度、步态改变、关节活动度、关节肿胀度 4 个项目,疼痛程度、步态改变、关节活动度均分为 4 个等级,评分分别为 0 分、1 分、2 分、3 分,关节肿胀度分为 3 个等级,评分分别为 0 分、1 分、2 分;总分 ≥ 4 分提示兔 KOA 模型造模成功。采用桂苗等^[10]制定的阳虚证候评分表及寒凝证候评分表鉴定阳虚寒凝证模型,阳虚证候评分 ≥ 5 分且寒证候评分 ≥ 5 分,或迟证候评分 ≥ 10 分且淡证候评分 ≥ 10 分,则提示兔阳虚寒凝证模型造模成功。

2.2 分组方法 将 24 只兔子称重后按体质量排序

编号,从随机数字表中选取 24 个连续的 2 位数记录在兔子编号下方,再将 24 个随机数字从小到大排序,随机数字排序 1 ~ 6 对应的兔子纳入正常对照组、7 ~ 24 对应的兔子纳入造模组。采用上述造模方法对造模组兔进行造模, KOA 阳虚寒凝证造模成功后,将 18 只 KOA 阳虚寒凝证模型兔称重后按体质量排序编号,从随机数字表中选取 18 个连续的 2 位数记录在模型兔编号下方,再将 18 个随机数字从小到大排序,随机数字排序 1 ~ 6 对应的兔子纳入模型组、7 ~ 12 对应的兔子纳入阳和汤干预组、13 ~ 18 对应的兔子纳入塞来昔布干预组。

2.3 干预方法 阳和汤干预组兔按照中药饮片 $3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量给予阳和汤浓缩剂灌胃,塞来昔布干预组按照 $0.02 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量给予塞来昔布溶液灌胃,模型组和正常对照组给予等量生理盐水灌胃。药物等效剂量均按照人体与新西兰大白兔的体表面积进行换算。每日给药 1 次,连续给药 2 周。

2.4 评价方法 末次给药后当天,采用改良版 Lequesne MG 评分标准^[12]评价兔膝关节疼痛和功能,采用桂苗等^[10]制定的阳虚证候评分表及寒凝证候评分表评价兔阳虚寒凝证候改善情况。末次给药后禁食不禁水 24 h,处死兔子,剥离膝关节滑膜组织,石蜡包埋后切片,采用 HE 染色观察滑膜组织病理改变;取膝关节滑膜组织,提取总 RNA,采用实时定量 PCR 检测滑膜组织中 TLR4、NF- κB 的 mRNA 表达量;取膝关节滑膜组织,提取总蛋白,采用蛋白免疫印迹法检测滑膜组织中 TLR4、NF- κB 的蛋白表达量;抽取膝关节液,采用酶联免疫吸附法测定膝关节液中 IL- 1β 、IL-6、TNF- α 的含量。

2.5 数据统计方法 采用 SPSS23.0 统计软件对所得数据进行统计学分析。膝关节改良版 Lequesne MG 评分、阳虚寒凝证候评分,以及膝关节滑膜组织中 TLR4、NF- κB 的 mRNA 及蛋白表达量,膝关节液中炎症因子含量的组间比较均采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验(方差齐)或 Games-Howell 检验(方差不齐);检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 兔膝关节改良版 Lequesne MG 评分 模型组、阳和汤干预组、塞来昔布干预组兔膝关节改良版 Lequesne MG 评分比较,差异有统计学意义[(4.83 ± 0.75)分, (1.33 ± 1.032)分, (2.00 ± 0.36)分, $F =$

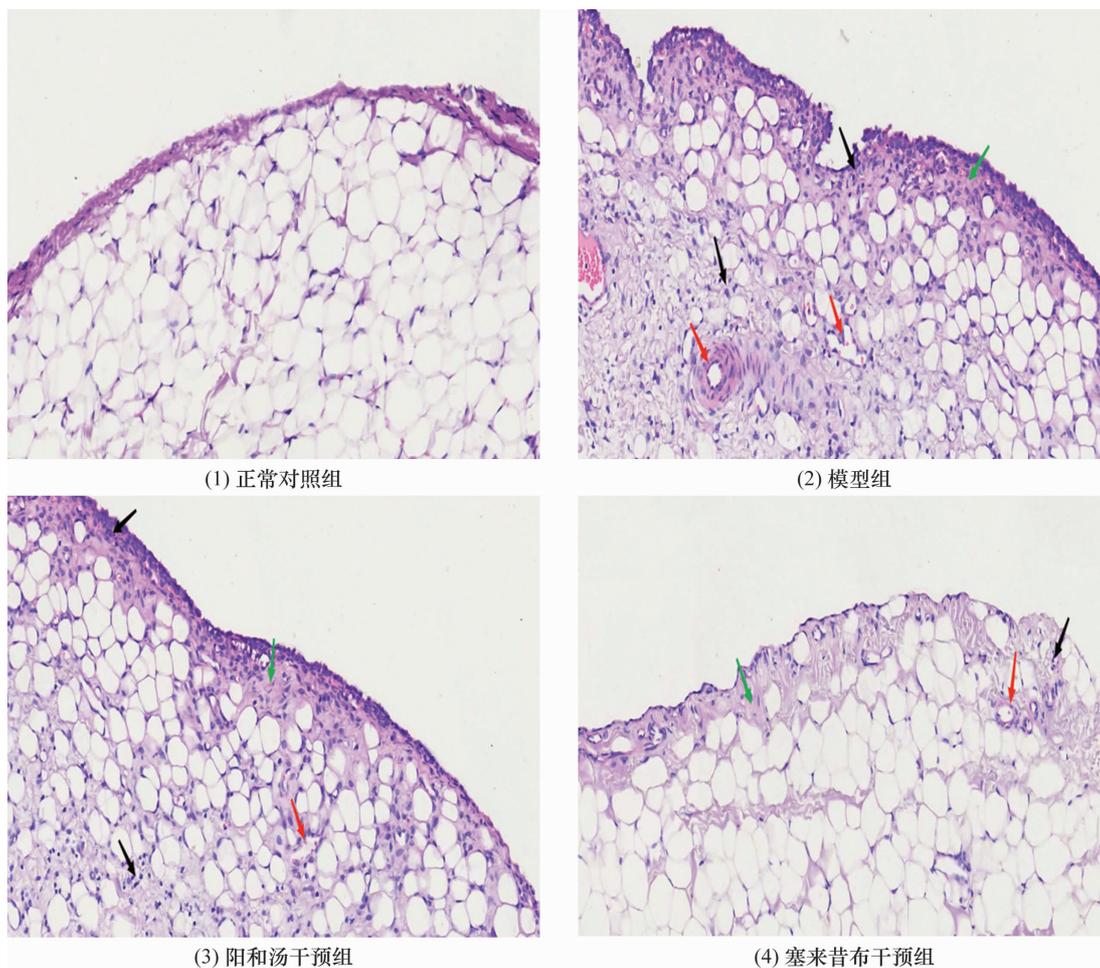
24.680, $P=0.000$]; 阳和汤干预组和塞来昔布干预组兔膝关节改良版 Lequesne MG 评分均小于模型组 ($P=0.000, P=0.000$); 阳和汤干预组兔膝关节改良版 Lequesne MG 评分与塞来昔布干预组比较差异无统计学意义 ($P=0.751$)。

3.2 兔阳虚寒凝证候评分 模型组、阳和汤干预组、塞来昔布干预组兔阳虚寒凝证候评分比较, 差异有统计学意义 [(43.67 ± 3.67) 分, (18.00 ± 2.97) 分, (27.67 ± 4.76) 分, $F=24.680, P=0.000$]; 阳和汤干预组和塞来昔布干预组兔阳虚寒凝证候评分均小于模型组 ($P=0.000, P=0.000$), 阳和汤干预组兔阳虚寒凝证候评分小于塞来昔布干预组 ($P=0.000$)。

3.3 兔膝关节滑膜组织病理检查结果 正常对照组滑膜表面平整, 滑膜衬里层细胞为 1 层, 细胞排列规则、疏松、不连续; 衬里下层细胞分布均匀, 无纤维组织、血管增生及炎性细胞浸润[图 1(1)]。模型组滑膜表面不平整, 衬里层细胞层数增加, 细胞排列紊乱; 衬里下层可见大量炎性细胞浸润, 纤维组织和血管明

显增生[图 1(2)]。阳和汤干预组和塞来昔布干预组滑膜表面较为平整, 衬里层细胞层数较模型组减少, 细胞排列较为紧密; 衬里下层仍可见较多脂肪细胞分布, 可见少量炎性细胞浸润, 纤维组织、血管少量增生[图 1(3)、图 1(4)]。

3.4 兔膝关节滑膜组织中 TLR4 和 NF- κ B 的 mRNA 及蛋白表达量测定结果 正常对照组、模型组、阳和汤干预组、塞来昔布干预组兔膝关节滑膜组织中 TLR4、NF- κ B 的 mRNA 及蛋白表达量比较, 差异均有统计学意义; 正常对照组、阳和汤干预组和塞来昔布干预组兔膝关节滑膜组织中 TLR4 和 NF- κ B 的 mRNA 表达量及蛋白表达量均小于模型组 (mRNA 表达量: $P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000$; 蛋白表达量: $P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000$); 阳和汤干预组、塞来昔布干预组兔膝关节滑膜组织中 TLR4 和 NF- κ B 的 mRNA 表达量及蛋白表达量均高于正常对照组 (mRNA 表达量: $P=0.000, P=0.000; P=0.000,$



黑色箭头所指为炎性细胞浸润, 红色箭头所指为血管增生, 绿色箭头所指为纤维组织。

图 1 兔膝关节滑膜组织病理检查结果 (HE 染色 ×200)

$P=0.000$; 蛋白表达量: $P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000$), 阳和汤干预组兔膝关节滑膜组织中 TLR4 和 NF- κ B 的 mRNA 表达量及蛋白表达量均高于塞来昔布干预组 (mRNA 表达量: $P=0.000, P=0.000$; 蛋白表达量: $P=0.000, P=0.000$)。见表 1、图 2。

3.5 兔膝关节液炎症因子含量测定结果 正常对照组、模型组、阳和汤干预组、塞来昔布干预组兔膝关节液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的含量比较, 差异均有统计学意义; 正常对照组、阳和汤干预组和塞来昔布干预组兔膝关节液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的含量均小于模型组 ($P=0.000, P=0.000, P=0.000$); 阳和汤干预组兔膝关节液中 TNF- α 的含量低于正常对照组 ($P=0.000$), IL-1 β 的含量高于正常对照组 ($P=0.000$), IL-6 的含量与正常对照组的差异无统计学意义 ($P=0.332$); 塞来昔布干预组兔膝关节液中 TNF- α 、IL-1 β 的含量均高于正常对照组 ($P=0.000, P=0.002$), IL-6 的含量与正常对照组的差异无统计学意义 ($P=$

0.104); 阳和汤干预组兔膝关节液中 TNF- α 含量低于塞来昔布干预组 ($P=0.000$), IL-1 β 、IL-6 的含量均高于塞来昔布干预组 ($P=0.036, P=0.029$)。见表 2。

4 讨论

《类证治裁·痹证》载有“诸痹, 良由阳气先虚, 腠理不密, 风寒湿乘虚内袭。正气为邪所阻, 不能宣行, 因而留滞, 气血凝滞, 久而成痹”, 提示痹证的发生与阳气虚衰、风寒湿邪侵袭有关。阳和汤出自《外科证治全生集》, 是临床上攻补兼备、刚柔相济的治痹良方, 具有温补阳气、散寒通滞的作用, 使阳气和、阴寒散, 达到阴阳平和, 可以有效治疗阳虚寒凝证^[13-14]。相关临床研究^[15-16]的结果表明, 阳和汤治疗 KOA 能够有效改善膝关节功能, 缓解膝关节疼痛, 增加关节活动度。我们前期探索建立了 KOA 阳虚寒凝证兔模型^[10], 本研究在此基础上进一步探索阳和汤治疗 KOA 阳虚寒凝证的效果及作用机制。

滑膜组织在维持关节软骨的营养供给和正常代

表 1 兔膝关节滑膜组织中 Toll 样受体 4 和核因子- κ B 的 mRNA 及蛋白表达量

组别	样本量/只	Toll 样受体 4 ($\bar{x} \pm s$)		核因子- κ B ($\bar{x} \pm s$)	
		mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
正常对照组	6	1.064 \pm 0.061	0.135 \pm 0.011	0.986 \pm 0.0480	0.126 \pm 0.022
模型组	6	5.450 \pm 0.386	0.834 \pm 0.069	5.269 \pm 0.205	0.963 \pm 0.026
阳和汤干预组	6	3.400 \pm 0.2211	0.587 \pm 0.003	4.135 \pm 0.0340	0.662 \pm 0.084
塞来昔布干预组	6	2.362 \pm 0.0380	0.418 \pm 0.030	2.023 \pm 0.097	0.404 \pm 0.095
F 值		202.455	180.964	828.676	89.098
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

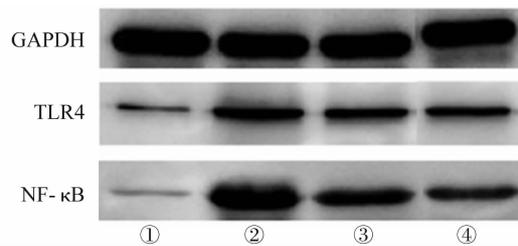


图 2 兔膝关节滑膜组织中 Toll 样受体 4 和核因子- κ B 的蛋白表达蛋白印迹法测定结果

表 2 兔膝关节液中炎症因子含量

组别	TNF- α ¹⁾ / ($\bar{x} \pm s, \text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	IL ²⁾ -1 β / ($\bar{x} \pm s, \text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	IL ²⁾ -6 / ($\bar{x} \pm s, \text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)
正常对照组	896.201 \pm 3.248	82.922 \pm 0.615	182.998 \pm 3.037
模型组	1003.370 \pm 7.931	112.357 \pm 3.786	207.379 \pm 6.411
阳和汤干预组	844.606 \pm 10.070	87.752 \pm 1.368	185.488 \pm 1.306
塞来昔布干预组	963.091 \pm 8.596	85.476 \pm 0.958	178.022 \pm 5.551
F 值	627.739	254.723	53.140
P 值	0.000	0.000	0.000

注: 1) 肿瘤坏死因子- α ; 2) 白细胞介素。

谢及减少关节软骨磨损方面发挥重要作用,而滑膜炎症与关节疼痛、功能障碍关系密切^[17]。TLR4/NF-κB 信号通路参与滑膜的炎性病变^[18-20]。TLR4 是先天免疫系统中重要的模式识别受体,在骨关节炎患者的滑膜组织和软骨组织中高表达,并参与滑膜组织的炎症反应^[21]及软骨组织退变^[22]。TLR4 能够通过激活相关转录因子的表达促进促炎性细胞因子的表达,其中 NF-κB 在 TLR4 信号通路下游起着枢纽作用^[23]。TLR4 在受到刺激后会引发 NF-κB 蛋白复合体释放 NF-κB,游离的 NF-κB 进入细胞核,与相关反应元件结合,激活炎症相关因子的表达,加剧滑膜炎症^[24-25]。NF-κB 活性降低能够引起滑液中 IL-1β 和 TNF-α 的表达水平下降,进而缓解滑膜炎反应,抑制骨关节炎早期软骨组织的退化^[23,26]。王学宗等^[17]研究发现,在早期 KOA 大鼠的滑膜组织中 TLR4、IL-1β、TNF-α 的 mRNA 表达量以及 NF-κB P65 的蛋白表达量均明显增加。本研究结果显示,KOA 阳虚寒凝证兔膝关节滑膜组织中 TLR4、NF-κB 的 mRNA 及蛋白表达量均显著增高,采用阳和汤干预 2 周后,上述指标均显著下调。

本研究结果显示,阳和汤治疗 KOA 阳虚寒凝证,能够显著缓解膝关节疼痛,改善膝关节功能、阳虚寒凝证候及膝关节滑膜组织病理表现,在缓解膝关节疼痛和改善膝关节功能方面与塞来昔布相当,在改善阳虚寒凝证候方面较塞来昔布更具优势;其作用机制可能是通过下调 TLR4、NF-κB 的表达,抑制 TNF-α、IL-6 及 IL-1β 等炎症因子的表达。

参考文献

[1] 中国中医药研究促进会骨伤科分会. 膝关节炎中医诊疗指南(2020 年版)[J]. 中医正骨, 2020, 32(10): 1-14.

[2] 章晓云, 曾浩, 孟林. 膝关节炎疼痛机制及治疗研究进展[J]. 中国疼痛医学杂志, 2023, 29(1): 50-58.

[3] 王斌, 邢丹, 董圣杰, 等. 中国膝骨关节炎流行病学和疾病负担的系统评价[J]. 中国循证医学杂志, 2018, 18(2): 134-142.

[4] 国家中医药管理局. 中医病证诊断疗效标准[M]. 南京: 南京大学出版社, 1994: 30.

[5] 向珍蛹, 茅建春, 徐先国, 等. 膝关节炎中医证型分布的流行病学研究[J]. 上海中医药杂志, 2012, 46(12): 5-8.

[6] 井雨. 北京地区膝骨关节炎的中医证候特征和用药规律研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.

[7] 高山, 王敬威, 孙乾坤, 等. 膝骨关节炎中医辨证分型与

中医体质类型关联性分析[J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(2): 91-95.

[8] 尹润宇, 杨东元, 王世坤, 等. 补肾活血类中成药治疗膝骨性关节炎的有效性和安全性网状 Meta 分析[J]. 中草药, 2023, 54(13): 4266-4277.

[9] 杨晓峰, 徐莲, 裴杰. 玻璃酸钠关节腔注射配合口服阳和汤治疗膝骨关节炎的效果分析[J]. 大医生, 2023, 8(17): 89-91.

[10] 桂苗, 施珊妮, 黄泽灵, 等. 阳虚寒凝型兔膝关节炎模型建立初探[J]. 福建中医药, 2022, 53(8): 32-34.

[11] 何俊君, 黄泽灵, 洪振强. 阳和汤对早期膝骨关节炎模型兔滑膜炎的影响[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(5): 694-699.

[12] 武永利, 李龙, 刘君伟, 等. 温针灸抑制 NLRP3 炎症小体激活改善兔膝关节炎的软骨损伤[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(20): 3202-3208.

[13] 陈扬声, 赵晓, 黄飞麒, 等. 阳和汤治疗膝骨关节炎患者的效果及对炎症指标的影响[J]. 中国医学创新, 2022, 19(36): 91-94.

[14] 胡永召, 徐迎锋, 阮志华, 等. 热敏灸联合温阳散寒、逐瘀通络汤治疗膝骨性关节炎(阳虚寒凝证)的临床研究[J]. 中医药信息, 2022, 39(2): 54-59.

[15] 王丽. 温阳益气法治疗阳虚寒凝型膝骨关节炎的临床疗效观察[D]. 广州: 广州中医药大学, 2013.

[16] XU X, WAN Y, GONG L, et al. Chinese herbal medicine Yanghe decoction for knee osteoarthritis: a protocol for systematic review and meta-analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2020, 99(34): e21877.

[17] 王学宗, 丁道芳, 薛艳, 等. TLR4/NF-κB 通路参与大鼠膝骨关节炎滑膜早期病变的研究[J]. 中国骨伤, 2019, 32(1): 68-71.

[18] HASEGAWA M, YOSHIDA T, SUDO A. Tenascin-C in osteoarthritis and rheumatoid arthritis [J/OL]. Front Immunol, 2020[2023-7-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33101302/>.

[19] 孙桂芳, 张雪峰, 茅瑜, 等. 温针灸治疗轻中度膝骨关节炎疗效观察及其对 TLR4/NF-κB 信号通路的影响[J]. 上海针灸杂志, 2021, 40(12): 1452-1457.

[20] 赵玉伟, 刘志昂, 车文生, 等. 基于 TLR4/NF-κB 炎性轴探讨针灸联合感觉运动训练对膝骨关节炎模型大鼠运动能力的改善作用[J]. 中医学报, 2022, 37(2): 376-382.

[21] RADSTAKE T, ROELOFS M F, JENNISKENS Y A, et al. Expression of toll-like receptors 2 and 4 in rheumatoid synovial tissue and regulation by proinflammatory cytokines interleukin-12 and interleukin-18 via interferon-γ[J]. Arthritis Rheum, 2004, 50(12): 3856-3865. (下转第 24 页)

- 32(9):802-806.
- [9] 刘迪,刘卉,陶艳红,等. 颈部端提手法操作特征的动力学与运动学参数分析[J]. 上海中医药杂志, 2017, 51(12):19-22.
- [10] MOUSAVI S J, TROMP R, SWANN M C, et al. Between-session reliability of opto-electronic motion capture in measuring sagittal posture and 3-D ranges of motion of the thoracolumbar spine[J]. J Biomech, 2018, 79:248-252.
- [11] IN T S, JUNG J H, JUNG K S, et al. Effects of the multidimensional treatment on pain, disability, and sitting posture in patients with low back pain: a randomized controlled trial[J/OL]. Pain Res Manag, 2021 [2023-07-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34306274>.
- [12] 苏少亭. 腰椎定点旋转手法的在体运动力学量化研究[D]. 南宁:广西中医药大学, 2019.
- [13] 薛彬,李飞跃,王玮,等. 魏氏伤科“悬足压膝”手法的运动学规律和机制研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2016, 24(10):5-8.
- [14] 王成远,金添,孙树椿,等. 清宫正骨流派传承对中医骨伤学科发展的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2023, 31(1):81-83.
- [15] 王尚全,孙树椿,陈明,等. 清宫正骨流派学术思想初探[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2017, 25(9):68-70.
- [16] 张怡颖. 基于 IMU 的人体全身运动捕捉技术与装置研究[D]. 杭州:浙江大学, 2018.
- [17] 孙树椿. 清宫正骨手法图谱[M]. 北京:中国中医药出版社, 2012:109-110.
- [18] NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Height and body-mass index trajectories of school-aged children and adolescents from 1985 to 2019 in 200 countries and territories: a pooled analysis of 2181 population-based studies with 65 million participants[J]. Lancet, 2020, 396(10261):1511-1524.
- [19] 李建国,高春雨,高景华,等. 基于运动捕捉系统构建播拔截手法治疗踝关节扭伤动画仿真模型的研究[J]. 中国数字医学, 2021, 16(8):93-97.
- [20] 林东鑫,黄学成,秦庆广,等. 基于运动捕捉技术比较 2 种颈椎手法治疗后颈椎活动范围的差异[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(21):3281-3285.
- [21] 刘元华,冯跃,李庆兵,等. 基于三维运动捕捉技术的踝跷法运动学参数特征研究[J]. 北京中医药大学学报, 2018, 41(3):235-241.
- [22] HUANG X, LIN D, LIANG Z, et al. Mechanical parameters and trajectory of two Chinese cervical manipulations compared by a motion capture system[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2021, 9:714292.
- [23] SÁNCHEZ-ZURIAGA D, LÓPEZ-PASCUAL J, GARRIDO-JAÉN D, et al. Reliability and validity of a new objective tool for low back pain functional assessment[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2011, 36(16):1279-1288.
- (收稿日期:2023-08-03 本文编辑:李晓乐)

(上接第 13 页)

- [23] PERRY J, ROELOFS A J, MENNAN C, et al. Human mesenchymal stromal cells enhance cartilage healing in a murine joint surface injury model[J]. Cells, 2021, 10(8):1999.
- [24] 梁祖建. 补肾活血方调控 Wnt/ β -catenin 信号通路保护关节软骨的机制研究[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(12):2327-2330.
- [25] 孙东东,沈卫星,王卓,等. 补肾活血方中 4 种有效成分对炎性因子释放抑制活性研究[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(8):2674-2677.
- [26] 郑力铭,马佳凯,王威,等. 关节软骨退变相关生物学标志物研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2022, 30(3):78-84.
- [27] YAO X, SUN K, YU S, et al. Chondrocyte ferroptosis contribute to the progression of osteoarthritis [J]. J Orthop Translat, 2020, 27:33-43.
- (收稿日期:2023-09-07 本文编辑:时红磊)

(上接第 19 页)

- [22] KIM H A, CHO M L, CHOI H Y, et al. The catabolic pathway mediated by Toll-like receptors in human osteoarthritic chondrocytes[J]. Arthritis Rheum, 2006, 54(7):2152-2163.
- [23] ZHAO Z, DAI X S, WANG Z Y, et al. MicroRNA-26a reduces synovial inflammation and cartilage injury in osteoarthritis of knee joints through impairing the NF- κ B signaling pathway[J]. Biosci Rep, 2019, 39(4):BSR20182025.
- [24] 曹寅生,邝高艳,危建文,等. 加味独活寄生合剂对兔膝骨关节炎模型软骨 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2023, 18(7):1273-1277.
- [25] 曹寅生,易强,邝高艳,等. 基于 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路探讨追风透骨胶囊减缓兔膝关节关节炎模型软骨退变的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(2):240-248.
- [26] CHOI M C, MARUYAMA T, CHUN C H, et al. Alleviation of murine osteoarthritis by cartilage-specific deletion of I κ B ζ [J]. Arthritis Rheumatol, 2018, 70(9):1440-1449.
- (收稿日期:2023-08-27 本文编辑:吕宁)