

# 通络止痛方对人膝骨关节炎关节液 IL-1 $\beta$ , HA 及 NO 的影响

杨黎黎<sup>1</sup> 王庆甫<sup>1 $\Delta$</sup>  王欢<sup>1</sup> 张栋<sup>1</sup> 王伟利<sup>1</sup>  
丁昊彬<sup>1</sup> 甘稳<sup>1</sup> 徐铭康<sup>1</sup> 杜汪洋<sup>1</sup> 郭玉茹<sup>1</sup>

**[摘要]** **目的:**观察通络止痛方对人膝骨关节炎关节液白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、透明质酸(HA)及一氧化氮(NO)含量的影响。**方法:**行关节镜手术患者,在术中抽取关节腔内积液,离心后取上清,加入不同浓度通络止痛方干预,分为高浓度组(2.5 mg/mL)、中浓度组(0.25 mg/mL)、低浓度组(0.025 mg/mL)和对照组(磷酸缓冲盐溶液,PBS)。应用酶联免疫吸附法(ELISA)检测各浓度组对关节液干预后 IL-1 $\beta$ , HA 及 NO 含量的变化。**结果:**高、中、低浓度组较对照组关节液中 IL-1 $\beta$  及 NO 含量明显降低( $P<0.05$ ),且 IL-1 $\beta$  及 NO 的浓度与通络止痛方的浓度呈正相关(IL-1 $\beta$ ,  $r=-0.29$ ,  $P<0.05$ ; NO,  $r=-0.51$ ,  $P<0.05$ )。高、中、低浓度组较对照组关节液中 HA 含量明显升高( $P<0.05$ ),且 HA 的浓度与通络止痛方的浓度呈正相关( $r=0.59$ ,  $P<0.05$ )。**结论:**通络止痛方对关节液中 IL-1 $\beta$  及 NO 有抑制作用,浓度越高抑制程度越大,通络止痛方对关节液中 HA 有促进作用,浓度越高促进程度越大。

**[关键词]** 通络止痛方;关节液;白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ );一氧化氮(NO);透明质酸(HA)

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2017)01-0001-04

## Effect of Tongluozhitong Recipe on Expression of IL-1 $\beta$ , HA and NO in Synovial Fluid of Human Knee Osteoarthritis

YANG Lili<sup>1</sup> WANG Qingfu<sup>1 $\Delta$</sup>  WANG Huan<sup>1</sup> ZHANG Dong<sup>1</sup> WANG Weili<sup>1</sup>  
DING Haobin<sup>1</sup> GAN Wen<sup>1</sup> XU Mingkang<sup>1</sup> DU Wangyang<sup>1</sup> GUO Yuru<sup>1</sup>

<sup>1</sup> The Third Hospital Affiliated to Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China.

**Abstract Objective:** To observe the effect of Tongluozhitong recipe on the expression of interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), hyaluronic acid(HA) and nitric oxide(NO) in synovial fluid of human knee osteoarthritis. **Methods:** Patients who underwent arthroscopic surgery in our hospital were taken. The intra-articular effusion was extracted during the surgery, from which the supernatant was taken after centrifugation, and different concentration of Tongluozhitong recipe were added. The mixture were divided into the high concentration group(2.5 mg/mL), the middle concentration group(0.25 mg/mL), the low concentration group(0.025 mg/mL) and the control group(PBS). The level changes of IL-1 $\beta$ , HA and NO in synovial fluid were observed by enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) after treated with different concentration groups. **Results:** The levels of IL-1 $\beta$  and NO in synovial fluid in the high, middle and low concentration group were decreased significantly compared with the control group( $P<0.05$ ), and the concentration of IL-1 $\beta$  and NO were positively correlated with the concentration of Tongluozhitong recipe(IL-1 $\beta$ ,  $r=-0.29$ ,  $P<0.05$ ; NO,  $r=-0.51$ ,  $P<0.05$ ). The levels of HA in the high, middle and low concentration group were significantly increased compared with the control group( $P<0.05$ ), and the concentration of HA were positively correlated with the concentration of Tongluozhitong recipe( $r=0.59$ ,  $P<0.05$ ). **Conclusion:** The Tongluozhitong recipe has inhibitory effect on the expression of IL-1 $\beta$  and NO in synovial fluid, the higher concentration with greater degree of inhibition. While, which has synergistic effect on the expression of HA in synovial fluid, and the higher concentration with greater degree of promotion.

**Keywords:** Tongluozhitong recipe; synovial fluid; interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ); nitric oxide(NO); hyaluronic (HA)

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81373662)

北京中医药大学自主选题项目(2016-JYB-XS192)

<sup>1</sup> 北京中医药大学第三附属医院(北京, 100029)

$\Delta$ 通信作者 E-mail: qingpu-wang@sohu.com

膝关节炎(Knee Osteoarthritis, KOA)是以关节软骨变性破坏为主并伴有滑膜炎症、关节疼痛、畸形和功能障碍,从而影响患者活动能力的一种退行性病理改变为基础的疾患,严重影响患者的健康和生活质量。但目前为止该病病因尚不明确,也没有一种治疗方法可以从根本上预防、改变或中止 KOA<sup>[1]</sup>。通过检测人膝关节炎关节液中某些间接反映关节软骨代谢状况的特异性分子,可以弥补早期 X 线不明显的缺点,成为 KOA 早期诊断的有效方法。通络止痛方具有通络止痛、活血化淤的功效,通过超声促透外治法治疗 KOA 可有效减轻患者疼痛,改善膝关节功能<sup>[2]</sup>,但其具体作用机制还不清楚。本实验通过研究不同浓度通络止痛方对人膝关节炎关节液中 IL-1 $\beta$ , HA 及 NO 的调节作用,探讨该方的作用机理,为 KOA 早期诊疗提供新的方法和实验支持。

1 材料和方法

1.1 关节液来源

来源于北京中医药大学第三附属医院行关节镜治疗的患者,在行关节镜术时,麻醉,常规消毒,铺单。取髌骨下缘入路行膝关节穿刺抽取关节液原液 5 mL,如患者关节液抽取不足 5 mL,注入生理盐水稀释后抽取,抽取后置于 EP 管中,用 5 000 r/min 离心 5 min,离心后取上清,10 倍稀释,放置-20℃冰箱备用。

1.2 主要试剂及设备

IL-1 $\beta$  人酶联免疫试剂盒,杭州联科生物技术股份有限公司;HA 酶联免疫试剂盒,武汉云克隆科技股份有限公司;NO 检测试剂盒,南京建成生物工程研究所;ELX800 型酶联免疫检测仪,美国生物技术仪器公司;4℃低温高速离心机,美国 Thermo;四环冻干机,北京四环科学仪器厂有限公司。

1.3 药物制备及剂量

通络止痛处方组成:桃仁、红花、桂枝、白芍、制草乌、细辛、川椒、牛膝、乳香、没药,购于北京中医药大学第三附属医院药房。将上述中药饮片按成方比例置煎煮容器内,加水浸泡,煮沸 30 min,弃药渣取汤剂,经过离心机 2 000 r/min 离心,利用冷冻干燥机进行冷冻干燥,粉末状, PBS 溶解,用 0.22  $\mu$ m 微孔滤器过滤除菌,配制成高浓度组(2.5 mg/mL),中浓度组(0.25 mg/mL)和低浓度组(0.025 mg/mL),对照组为磷酸缓冲盐溶液(PBS)。-20℃储存备用。

1.4 观察项目及检测方法

ELISA 检测关节液中 IL-1 $\beta$ , HA 及 NO 浓度的变化。将关节液从冰箱中取出,缓冻,铺板,加入不同浓度通络止痛方,对照组加入等计量 PBS,过夜。采用双抗体夹心酶联免疫吸附法测定 IL-1 $\beta$ , HA 及 NO 的浓度,严格按照试剂使用说明书操作。

1.5 统计学方法

应用 SPSS17.0 软件进行统计学处理, $P<0.05$ 差异有统计学意义,计量资料用  $\bar{x}\pm s$  表示。

2 结果

高、中、低浓度组较对照组关节液中 IL-1 $\beta$  及 NO 含量明显降低( $P<0.05$ ),且 IL-1 $\beta$  及 NO 的浓度与通络止痛方的浓度呈正相关(IL-1 $\beta$ ,  $r=-0.29$ ,  $P<0.05$ ; NO,  $r=-0.51$ ,  $P<0.05$ )。通络止痛方对关节液中 IL-1 $\beta$  及 NO 有抑制作用,浓度越高抑制程度越大。高中低浓度组较对照组关节液中 HA 含量明显升高( $P<0.05$ ),且 HA 的浓度与通络止痛方的浓度呈正相关( $r=0.59$ ,  $P<0.05$ )。通络止痛方对关节液中 HA 有促进作用,浓度越高促进程度越大(见表 1, 2)。

表 1 ELISA 检测关节液 IL-1 $\beta$  及 NO 的含量( $\bar{x}\pm s$ )

组别	样本数	IL-1 $\beta$ 含量(pg/L)	NO 含量( $\mu$ mol/L)
高浓度组	10	17.62 $\pm$ 1.23 <sup>1)</sup>	11.53 $\pm$ 0.36 <sup>1)</sup>
中浓度组	10	18.84 $\pm$ 0.11 <sup>1)2)</sup>	14.74 $\pm$ 0.54 <sup>1)2)</sup>
低浓度组	10	19.01 $\pm$ 1.92 <sup>1)2)</sup>	16.18 $\pm$ 0.57 <sup>1)2)</sup>
对照组	10	20.15 $\pm$ 1.66	20.55 $\pm$ 1.68

注:与对照组比较,1) $P<0.05$ ;与高浓度组比较,2) $P<0.05$ 。

表 2 ELISA 检测关节液 HA 的含量( $\bar{x}\pm s$ )

组别	样本数	HA 含量(ng/mL)
高浓度组	10	0.96 $\pm$ 0.26 <sup>1)</sup>
中浓度组	10	0.74 $\pm$ 0.29 <sup>1)2)</sup>
低浓度组	10	0.35 $\pm$ 0.34 <sup>1)2)</sup>
对照组	10	0.35 $\pm$ 1.42

注:与对照组比较,1) $P<0.05$ ,与高浓度组比较,2) $P<0.05$ 。

3 讨论

膝骨关节炎累及软骨下骨、关节滑膜等多种组织,是关节炎中最常见的疾病。根据人口统计学资料预测,到 2020 年,受关节疾病影响的人口比例将占到全世界人口的 50%,将有 5.7 亿人受到 KOA 的困扰。KOA 是世界上导致残疾的第八大病<sup>[3]</sup>,发病机制复杂,其主要病理特征是关节软骨的退变,而关节液是膝骨关节炎作用于软骨的直接载体。王艳荣等<sup>[4]</sup>的研究显示膝关节骨性关节炎滑液中炎症细胞因子 IL-1, TNF- $\alpha$  和 IL-6 的表达情况与 KOA 病情存在有密切关系。当前 KOA 病情的判断主要依靠患者的主诉及影像学改变,早期的预防和诊断对延缓 KOA 病程的进展和缓解疾病的严重程度极为重要,但是早期 KOA 的 X 片表现不显著,一旦出现明显的影像学改变,疾病往往发展到中晚期。陈志伟等<sup>[5]</sup>研究显示关节液中 COMP 和 MMP-13 水平与 KOA 关节功能和疼痛程度均呈正相关,所以能早期诊断这种疾病,对预防和治疗 KOA 的方法选择相当重要。影像学对 KOA 不具有敏感性和特异性,而 KOA 关节液炎症因子的表达

可动态并且定量反映关节内组织的病理变化。理论上 KOA 关节液早期的生化指标就会有所改变,具有敏感性并且可以定量测量,因而可能成为有助于早期诊断 KOA 的重要指标。

白细胞介素-1(Interleukin-1, IL-1)是一种炎症介导活性和免疫调节作用的细胞因子,是炎症反应出现最早的炎症因子之一,也是细胞因子网络的关键因子,存在方式包括 IL-1 $\alpha$  及 IL-1 $\beta$ ,两者生物活性基本相同,具有多种生物学功能,能够促进软骨细胞及滑膜细胞分泌前列腺素及其他炎症介质,进一步促进滑膜炎症,诱导骨吸收。IL-1 $\beta$  具有高度活性的细胞因子,主要由滑膜细胞、软骨细胞、单核细胞产生。培养骨性关节炎患者的滑膜组织细胞,可在培养液的上清液中发现数量较多的 IL-1 $\beta$ <sup>[6]</sup>。在膝关节炎软骨退变的过程中,IL-1 $\beta$  起着非常重要的作用,可以诱导基质金属蛋白酶(MMPs)家族的合成及 II 型胶原的合成,抑制软骨机制合成,促进软骨凋亡,介导其他炎症因子的表达<sup>[7,8]</sup>。IL-1 $\beta$  加入体外培养的软骨细胞中,可激活诱导型 NO 合成酶(iNOS)产生大量的下游产物,是 IL-1 $\beta$  作用于软骨的主要效应分子。NO 是一种不稳定的自由基,炎症关节局部高浓度细胞因子可以刺激 NO 产生,高浓度 NO 一方面抑制软骨细胞增殖,使软骨细胞修复能力低下;另一方面 NO 还促进软骨细胞糖酵解,产生 ATP,使胞外基质合成减少,无法承载正常的负荷,从而加速软骨破坏<sup>[9]</sup>。透明质酸(Hyaluronic, HA)是关节软骨和关节滑液的主要成分,属黏多糖物质。HA 能与蛋白质结合游离于关节液中,可以滋养软骨并起到润滑作用;与糖蛋白结合附着于关节软骨,起到保护软骨的作用<sup>[10]</sup>。由于膝关节的滑膜、软骨劳损和退行性改变,导致 HA 属性改变或分泌减少,丧失了对软骨的滋养和保护功能,从而继发软骨的退变。研究证明,KOA 患者的关节液中 HA 的黏性、分子量及浓度均低于正常值。因此,利用 KOA 关节液中 IL-1 $\beta$ ,HA 及 NO 含量的变化水平来反映 KOA 病情严重程度具有一定的意义。

通络止痛方是王庆甫教授凭借多年治疗膝骨关节炎的经验总结而成,组成包括:桃仁、红花、桂枝、白芍、制草乌、细辛、川椒、牛膝、乳香、没药。主要功效包括活血化瘀,通络止痛。其中白芍、桂枝为通络止痛汤的君药,桂枝辛甘温,有温通经脉,助阳化气之功效;白芍苦、酸、微寒,有养血敛阴,柔肝止痛之功效。两者合用一敛一散,一补一开,解肌发表,调和营卫,使发汗而不伤阴,气血调而不伤气。两药合用亦可治疗气血不调导致的四肢酸楚、麻木、疼痛等。以桃仁、红花、乳香、没药为臣药,可活血祛瘀、行气止痛、舒筋通络。红花、桃仁为活血化瘀常用药对。红花辛温,主入心、肝经,

散瘀止痛。《医学衷中参西录》云:“乳香、没药,二药并用,为宣通脏腑、流通经络之要药,……具通气活血之力,又善治风寒湿痹,周身麻木,四肢不遂及一切疮疡肿疼,或其疮硬不疼。”这四味药可加强行气活血化瘀的药力,正所谓“治风先治血,血行风自灭”。制草乌、细辛为本方的佐药,具有祛风除湿、温经散寒、消肿止痛之效。川椒为本方的使药,具有活血祛瘀、祛风利湿之效。牛膝“性善下行”,具有良好的引经作用,且有补肝肾、强筋骨之功。全方组成严谨,配伍精湛。

为了证实该方有效,笔者进行了一系列临床及基础研究。临床试验发现,通络止痛外治法治疗可有效减轻 KOA 患者的疼痛并且可以改善膝关节功能<sup>[2]</sup>;动物实验发现,通络止痛外治法能够显著抑制兔 KOA 滑膜细胞炎症因子生成<sup>[11,12]</sup>;作用于大鼠不同程度膝骨关节炎中通过降低血清中软骨基质相关细胞因子 CTX-II,COMP 和 MMP-3 含量可以有效减缓或阻止膝关节软骨的退行性变<sup>[13]</sup>;将该方君药桂枝的有效成分桂皮醛作用于人 KOA 滑膜细胞,证明 DAMPs/Toll 样受体(TLRs)介导的 NF- $\kappa$ B 炎症通路在 OA 滑膜炎中起到重要的调控作用,NF- $\kappa$ B 通路上的许多基因均参与 OA 滑膜炎反应<sup>[14]</sup>。但是该方作为成方进行的研究还没有涉及,作用机制尚不清楚,限制了其在临床的广泛应用。

本实验运用 ELISA 检测技术验证了通络止痛方可有效降低 KOA 关节液中 IL-1 $\beta$  及 NO 的含量并提高 HA 的含量,提示通络止痛方可能通过影响关节液中生物因子来影响患者膝骨关节炎的症状,可作为潜在的具有阻止关节结构损伤和延缓疾病进程的特效药。该研究可为进一步探寻针对 OA 各环节的靶向治疗提供参考。

## 参考文献

- [1] Fawaz-Estrup F. The osteoarthritis initiative:an overview [J]. Med Health RI,2004,87(6):169-171.
- [2] 殷岳杉.低频超声促透通络止痛汤治疗膝关节骨性关节炎 30 例病例报告及促透机理研究[D].北京:北京中医药大学,2012.
- [3] Irchfield PC. Osteoarthritis overview[J]. Geriatr Nurs, 2001,22(3):124-130.
- [4] 王艳荣,马张稳,田红英,等.炎症细胞因子在膝关节骨性关节炎滑液中的表达及临床意义[J].延安大学学报:医学科学版,2015,13(1):16-18.
- [5] 陈志伟,石关桐,胡红艳,等.血清 COMP 和 MMP-13 在膝骨关节炎早期诊断中的应用研究[J].中国中医骨伤科杂志,2016,24(7):23-25.
- [6] Furuzawa-Carballeda J,Macip-Rodriguez PM,Cabral AR. Osteoarthritis and rheumatoid arthritis pannus have similar qualitative metabolic characteristics and pro-inflamma-

tory cytokine response[J]. Clin Exp Rheumatol, 2008, 26 (4):554-560.

[7] Hulejova H, Baresova V, Klezl Z, et al. Increased level of cytokines and matrix metalloproteinase in osteoarthritic subchondral bone[J]. Cytokine, 2007, 38(3):151-156.

[8] 张铁锋, 李景峰. 细胞因子 1L-1 $\alpha$  和 TNF- $\alpha$  在骨关节炎软骨中 mRNA 表达的变化及意义[J]. 中国现代医生, 2008, 46(15):116-117.

[9] 李宁, 王拥军, 施杞. 益肾通痹方对肾虚型大鼠膝骨性关节炎血清 MDA、NO、T-SOD、E2 的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2013, 21(2):1-4.

[10] 李卓东, 曹烈虎, 王思成, 等. 艾灸治疗膝骨性关节炎疗效与血清和关节液中透明质酸含量关系的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(10):883-885.

[11] 王庆甫, 马玉峰, 殷岳杉, 等. 低频超声促透中药对兔膝关节炎细胞因子的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2013, 36 (2):108-112.

[12] 殷岳杉, 王庆甫, 马玉峰, 等. 低频超声促进中药桂枝局部透入的实验研究[J]. 北京中医药大学学报, 2013, 36 (12):825-828.

[13] 戚晴雪, 马玉峰, 吴忌, 等. 低频超声促透通络止痛中药对不同程度膝骨关节炎大鼠模型 CTX-II、COMP 及 MMP-3 的影响[J]. 世界中医药, 2015, 10(4):564-569.

[14] 石鑫超. 通络止痛外治法通过 Toll 样受体通路干预关节炎滑膜炎炎症机制的研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2015.

(收稿日期:2016-07-04)

## 《中国中医骨伤科杂志》第五届编辑委员会

### 顾问 (按姓氏笔画为序排列)

韦贵康      石印玉      刘柏龄      孙树椿      许鸿照      施 杞      诸方受

**郭维淮**      鲁周同      熊敦善

主任委员      朱立国

### 副主任委员 (按姓氏笔画为序排列)

王 平      王和鸣      王拥军      王胜利      刘 军      邬 波      冷向阳  
张 军      张 俐      张玉柱      张晓峰      李先樾      李盛华      杨功旭  
杨海韵      肖鲁伟      赵文海      郭艳幸      高书图      谭远超      樊粤光

主 编      李同生

执行主编      王和鸣      王胜利      石印玉      孙树椿      周重建

### 副主编 (按姓氏笔画为序排列)

方苏亭      王 平      王和鸣      王拥军      王胜利      邓小川      刘 军  
邬 波      冷向阳      张 军      张 俐      张玉柱      张晓峰      李先樾  
李盛华      杨功旭      杨海韵      沈 霖      肖鲁伟      陈志维      胡广州  
赵文海      郭艳幸      高书图      黄桂成      董晓俊      熊昌源      谭远超  
谭明生      樊粤光

### 编 委 (按姓氏笔画为序排列)

马 勇(江苏)	尤全喜(黑龙江)	王 琦(云南)	王人彦(浙江)	王庆甫(北京)
王明喜(山东)	王培民(江苏)	邓友章(四川)	邓素玲(河南)	卢 敏(湖南)
史晓林(浙江)	帅 波(湖北)	白书臣(湖北)	白 玉(河南)	刘元禄(辽宁)
刘建忠(重庆)	刘献祥(福建)	刘德玉(陕西)	孙 捷(浙江)	何 伟(广东)
何 伟(湖北)	何承建(湖北)	吴从俊(湖北)	张进川(河南)	李飞跃(上海)
李沫霖(湖北)	李胜利(湖北)	李 峰(湖北)	李振宇(广东)	李蔷薇(新西兰)
李慧英(河南)	杨凤云(江西)	沈 海(四川)	肖涟波(上海)	陈久毅(贵州)
陈小勇(海南)	周文雄(海南)	周红海(广西)	孟庆才(新疆)	孟和平(重庆)
林定坤(广东)	武 震(黑龙江)	姚啸生(辽宁)	姚新苗(浙江)	咎 强(陕西)
赵 明(辽宁)	郝胜利(北京)	徐展望(山东)	秦克枫(河南)	高 巍(四川)
高景华(北京)	阎兆东(海南)	黄相杰(山东)	彭俊宇(安徽)	童培建(浙江)
谢兴文(甘肃)	詹红生(上海)	雷仲民(北京)	廖怀章(湖南)	熊 辉(湖南)
熊蠡茗(湖北)	樊效鸿(四川)			