

加味阳和汤对不同时时期膝骨关节炎兔关节软骨结构的影响

高伟华¹ 李玉杰¹ 杨鸿冉¹ 李志超¹ 齐鲁¹ 刘文斌¹ 王文波^{1△} 董建文^{1△}

[摘要] 目的:观察加味阳和汤对膝骨关节炎兔关节软骨结构的影响。方法:将 60 只健康新西兰大白兔随机分为正常组、模型组和实验组。除正常组外,其余两组动物均按照改良 Hulth 法进行膝骨关节炎造模后,分组处理,4,6 及 8 周后取材,制作标本,采用 X 线、光学显微镜、透射电镜等观察关节软骨中超微结构的变化。结果:在干预的 4,6 及 8 周的不同时间内,模型组和实验组均可见膝关节滑膜增生,内侧间隙变窄,并见增生骨赘,同一时间段内实验组程度较模型组轻;两组均出现关节软骨光滑度降低、软骨细胞排列紊乱、软骨细胞数量减少、粗面内质网数量减少、胶原蛋白的排列紊乱及细胞核膜部分破裂等变化,同一时间段内模型组表现更重,同一组内骨性关节炎时间越久,则表现越重。结论:加味阳和汤可抑制不同时间段内兔膝骨关节炎关节软骨的退变,减轻软骨细胞的退变、减轻内质网的退变、延缓胶原蛋白的紊乱,这可能是其治疗膝骨关节炎的作用机制之一。

[关键词] 膝骨关节炎;软骨;加味阳和汤;动物实验研究

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2019)05-0007-07

Study on the Effect of Jiawei Yanghe Decoction on Articular Cartilage Structure of Rabbits with Knee Osteoarthritis at Different Stages

GAO Weihua¹ LI Yujie¹ YANG Hongran¹ LI Zhichao¹ QI Lu¹
LIU Wenbin¹ WANG Wenbo^{1△} DOGN Jianwen^{1△}

¹ Orthopedics Department, the Second Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250001, China.

Abstract Objective: To observe the impact of Jiawei Yanghe decoction on the osteoarthritis knee cartilage of rabbit. **Methods:** 60 healthy New Zealand white rabbits were randomly divided into three groups, normal group, control group and the experimental group. In addition to the normal group, the others were given modified Hulth method of modeling, driving to get early osteoarthritis model for 4,6 and 8 weeks, observing the changes on the microstructure according to modeling, X-ray, light microscope, transmission electron microscope. **Results:** In the interfering weeks of 4,6 or 8, there were some different changes of different kinds of symptoms in both model group and experimental group. **Conclusion:** Jiawei Yanghe decoction delay degeneration osteoarthritis knee, of the rabbit and effectively improve the rabbit knee function, and delay cartilage degeneration and alleviate the degeneration of chondrocyte and endoplasmic reticulum at different times.

Keywords: knee osteoarthritis; articular cartilage; Jiawei Yanghe decoction; animal experimental study

膝骨关节炎属中医学“痹症”“骨痹”“膝痹”等范畴,病程长,病机相对复杂,其病机为肝肾亏虚,外邪乘虚袭于经,属本虚标实之证^[1,2],治疗以补肾活血为

主。加味阳和汤是董建文教授从虚、寒、瘀、滞等方面入手治疗膝痹病,加加减减,温阳补血又能化痰通络,益精气,扶阳气,化寒凝,通经络,治疗膝骨关节炎的经验方,取得了满意的临床疗效^[3,4]。但其治疗的现代机理尚不清楚,本研究拟从加味阳和汤对不同时时期膝骨关节炎兔关节软骨的影响入手,探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6 个月龄普通级健康新西兰大白兔 60 只,雄性,体质量(2.70±0.32)kg,由济南跑马岭动物繁殖中心

基金项目:国家自然科学基金项目(8150150763,81173286)

山东省中医药科技发展计划(2013ZDZK-069)

济南市科技发展计划项目(201102063)

¹ 山东中医药大学第二附属医院骨科(济南,250001)

[△]通信作者 E-mail:董建文 dongjianwen2006@sina.com

王文波 wangwenbo@126.com

提供,合格证号为 SCXK(鲁)2010005。

1.2 饲养条件

动物实验均在山东中医药大学附属医院实验动物中心进行,饲养条件:室温控制在 15~25℃,相对湿度维持在 45%~60%,动物自由摄食和饮水,动物饲料均由济南跑马岭动物繁殖中心提供。

1.3 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。

1.4 试剂与仪器

3%戊巴比妥(山东省立医院动物中心提供),青霉素(鲁抗制药, H37020079), EDTA 脱钙液(博士德公司, 09L22C71), 4%多聚甲醛(博士德公司), 甲苯胺蓝(Biosharp 公司, B0013K040400), 甲酸(Biosharp 公司, B0013K040100); 石蜡切片机(Leica 公司), 透射电镜(日本电子株式会社 JEM-1200EX), 石蜡包埋机(Sakura 公司), LKB 超薄切片机、图像数字分析仪(Bio-RAD 公司)。

1.5 方法

1.5.1 分组及造模方法 将 60 只成年新西兰大白兔随机分为三组,正常组、实验组和模型组,每组 20 只。实验组和模型组均给以手术制作骨性关节炎模型。

造模方法:采用改良 Hulth 法造模^[5],将新西兰大白兔一侧膝关节前交叉韧带、内侧副韧带及内侧半月板切除。方法:称重后,采用 3%戊巴比妥耳缘静脉注射 2~3 mL 麻醉,麻醉成功后,常规剃毛、碘伏消毒,取一侧膝关节前内侧切口,长约 1.5 cm,依次切开皮肤及皮下组织,显露内侧副韧带,与膝关节关节平面处,予以外翻膝关节后,去除内侧半月板,切断前交叉韧带,采用前抽屉试验确认前交叉韧带完全断裂后逐层关闭伤口。

术后常规给予青霉素 50 万单位肌注 3 d,每天酒精擦拭手术切口处防止感染。术后 1 周开始驱赶动物,2 次/d,每次 30 min,4 周后造模成功。

1.5.2 药物干预方法 造模成功后,中药制备及灌胃方法。

按照 Meeh-Rubner 公式:新西兰兔所需药物剂量(g)=人所需药物剂量×兔体表面积 A, $A=K \times W^{2/3} \times 10^{-4}$, W 为兔体质量, K 为常数(家兔为 10, 人为 10.6), 计算出大鼠给药剂量作为大鼠与成人的等效剂量。每只 2.5 kg 兔每次服用生药量为 12 g,浓煎为 20 mL。

实验组:每天定时给予加味阳和汤灌胃,每周灌胃 6 d,休息 1 d,直至动物被处死。

模型组:给予等量生理盐水灌胃,每周灌胃 6 d,休

息 1 d,直至动物被处死。

正常组:不予处理。

1.5.3 取材方法 各组于灌胃后第 4、6 及 8 周分别于拍片前处死 6 只动物。解剖膝关节后,大体观察膝关节变化,并进行取材和制备标本。

1.6 观察指标

1.6.1 X 线观察 于处死动物前拍摄兔患膝关节 X 线正侧位片,观察关节组成增生情况、关节间隙变化情况。

1.6.2 大体观察 解剖兔膝关节后,肉眼观察关节滑膜、关节大体形态、关节增生情况及关节软骨的退变的情况。

1.6.3 光学显微镜观察 取患膝胫骨平台处全厚软骨,立即放入 4%中性多聚甲醛中固定,放于 4℃冰箱。固定 24 h 后取出, PBS 冲洗后,放置于 EDTA 脱钙液,脱钙,脱钙时间约 30 d(以大头针可轻易刺穿软骨组织为准),每 4 d 换液 1 次,直至脱钙完成,生理盐水冲洗标本。乙醇梯度脱水,二甲苯透明、浸蜡后包埋后行连续 4 μm 切片。行苏木精-伊红染色,烤片过夜、脱蜡、苏木素染色 20 min,冲洗后给予盐酸酒精分色,冲洗后伊红染色 1 min, 100%酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶处理封片。光学显微镜下观察关节软骨及软骨细胞的变化情况。

1.6.4 透射电镜观察 取膝关节股骨远端关节面,迅速切取约 0.5 cm² 大小关节面,在 4℃条件下, 3.5%戊二醛溶液中固定过夜,并将标本修正成 1 mm² 大小,环氧丙烷透明液脱钙浸泡 3 周,且每周换液 1 次。脱钙结束后用 PBS 液漂洗 2 次,各漂洗 15 min, 1%四氧化锇固定 2 h,再用 0.1 mmol/L 的 PBS 漂洗 2 次,各 15 min。然后乙醇梯度脱水 8 次,每次脱水时间在 10~15 min。再经渗透, epon812 环氧树脂包埋, 40℃聚合 24 h, 60℃聚合 24 h。最后修块,切片,切片厚度 80 nm,最后行醋酸铀和柠檬酸铅双染色,电镜下观察并拍片。

2 结果

2.1 大体观察

4 周时正常组关节滑膜无充血及增生;关节液量不多,颜色呈淡黄色;关节软骨表面光滑整齐,半透明状,未见明显裂纹及剥脱;关节周围未见明显增生及骨赘生成。模型组和实验组均存在滑膜轻度充血、水肿,关节液增多,色暗,实验组较模型组轻;两者均存在一定程度的关节面粗糙、不光滑,模型组关节面局部剥脱,并出现不同程度骨赘,而实验组没有骨赘或者骨赘较少(见图 1-3)。

6 周时正常组未见明显变化。模型组关节滑膜增生明显,关节液浑浊;软骨不平整、磨损较重,色泽较暗,部分软骨表面覆盖肌化组织,丧失正常的软骨结

构,部分区域软骨剥脱,出现软骨下骨外露,关节增生较明显,以内髌为显著,有骨赘形成。实验组和模型组相比,在滑膜增生、关节面剥脱、增生骨赘等方面较轻,关节面尚光滑,局部有剥脱,增生骨赘较少(图 4-5)。

8 周时正常组未见明显变化。模型组滑膜增生较

明显,软骨明显不平整、磨损严重,色泽较暗,软骨剥脱严重,部分丧失正常的软骨结构,软骨下骨外露;关节增生明显,内侧较多骨赘形成。实验组滑膜存在一定的增生、部分兔关节面剥脱、关节面不光滑,仍存在正常软骨结构;骨赘增生较模型组明显减轻(图 6-7)。

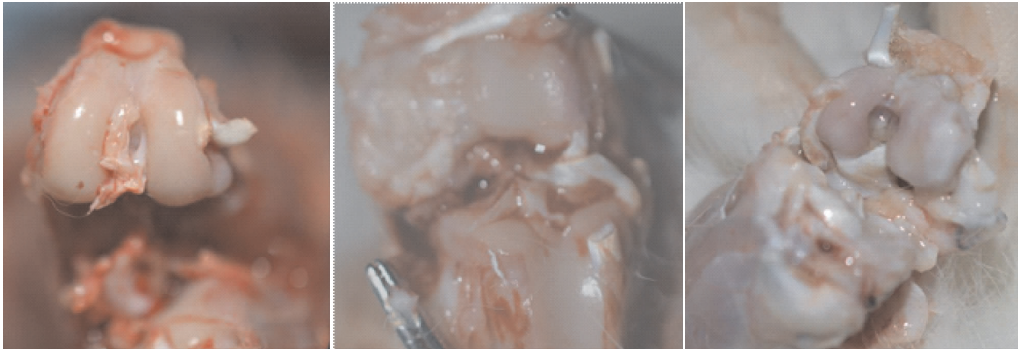


图 1 正常组

图 2 模型组 4 周

图 3 实验组 4 周

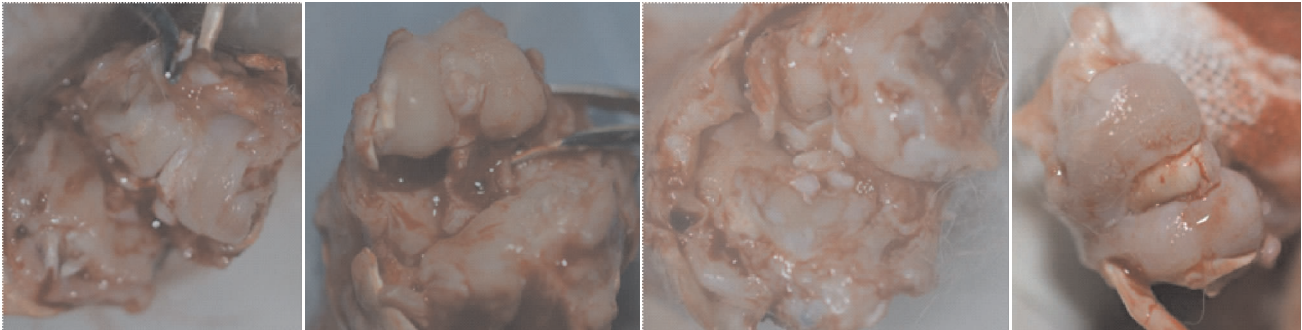


图 4 模型组 6 周

图 5 实验组 6 周

2.2 X 线观察

给药 4 周后,正常组兔膝关节关节间隙对等,膝关节关节面光滑平整,无明显增生现象;模型组可见膝关节内侧间隙变窄,呈内翻畸形,关节软骨下骨硬化,股骨内髌及胫骨平台内侧缘骨赘形成;实验组可见膝关节内侧间隙变窄,关节面轻微硬化,股骨内髌、胫骨内侧平台部分有小骨赘形成,但较模型组变化小(见图 8-11)。

给药 6 周后,正常组未见明显变化;模型组可见膝关节内侧间隙明显变窄,呈内翻畸形,股骨内侧髌变大,胫骨内侧平台不平整,关节软骨下骨硬化增生,股

骨内髌及胫骨平台内侧缘骨赘较大;实验组可见膝关节关节间隙不平整,内侧间隙变窄,关节面硬化较模型组轻,股骨内髌、胫骨内侧平台部分有骨赘形成,但较模型组变化小(见图 12-13)。

给药 8 周后,正常组未见明显变化;模型组可见膝关节内侧间隙基本消失,呈内翻畸形,股骨内侧髌变大,胫骨内侧平台不平整,股骨内髌及胫骨平台内侧缘可见大量增生骨赘;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,关节面硬化也较模型组轻,股骨内髌、胫骨内侧平台部分有骨赘形成,但较模型组变化小(见图 14-15)。



图 8 造模后驱赶 4 周正侧位

图 9 正常兔子正侧位



图 10 模型组 4 周时正侧位



图 11 实验组 4 周时正侧位



图 12 模型组 6 周时正侧位



图 13 实验组 6 周时正侧位



图 14 模型组 8 周时正侧位



图 15 实验组 8 周时正侧位

2.3 光学显微镜检查结果

正常组关节软骨组织表面光滑,软骨细胞各层结构清晰、均匀,表层细胞小而扁平呈水平排列,深层细胞增大排列,整齐呈柱状,潮线完整(见图 16)。

给药 4 周后,模型组可见软骨表面不光滑,有浅表裂隙,软骨细胞排列欠规则,深层软骨细胞簇状增生,潮线欠完整。实验组软骨表面尚光滑,软骨细胞排列整齐呈柱状,细胞增生显著,但成簇现象少,潮线比较完整(见图 17-18)。

给药 6 周后,正常组未见明显变化。模型组关节软

骨表面粗糙不平,各层结构不易分辨,软骨细胞排列紊乱,增生、肥大,有细胞成簇现象,潮线多不完整。实验组各层组织尚清晰,但有软骨细胞排列不规则现象,出现细胞成簇现象,但较模型组轻,潮线尚存在(见图 19-20)。

给药 8 周后,正常组未见明显变化。模型组软骨组织表层明显变薄甚至消失,软骨细胞分布不规则,各层细胞排列紊乱,细胞簇集,还可看到坏死固缩软骨细胞,潮线消失。实验组各层组织尚能辨认,软骨细胞排列多不规则,存在细胞成簇现象,但较模型组轻,潮线尚存在(见图 21-22)。

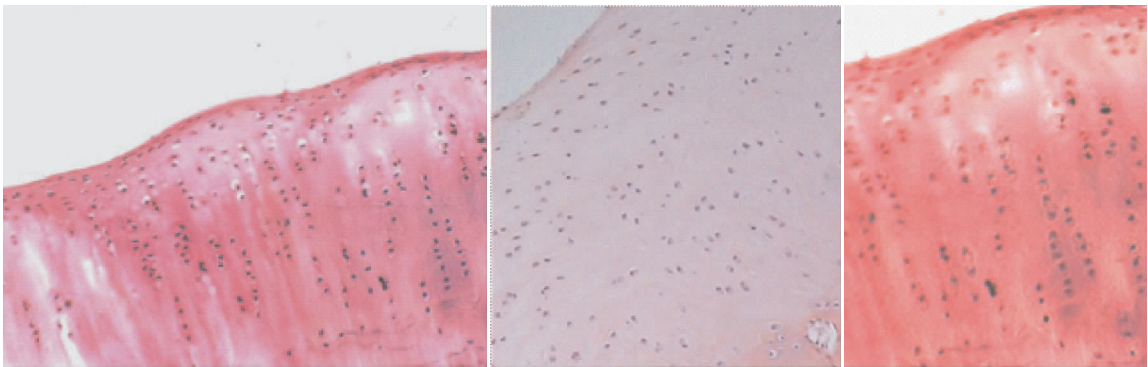


图 16 正常组(100×)

图 17 模型组 4 周(100×)

图 18 实验组 4 周(100×)

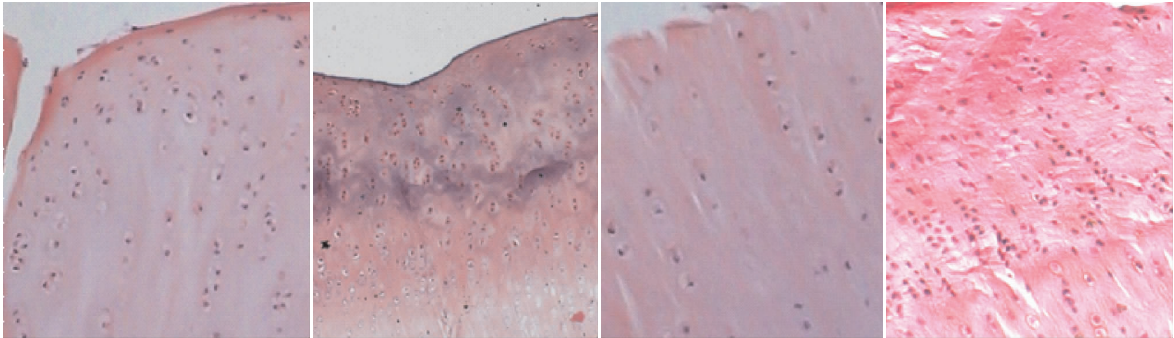


图 19 模型组 6 周(100×)

图 20 实验组 6 周(100×)

图 21 模型组 8 周(100×)

图 22 实验组 8 周(100×)

2.4 透射电镜检查结果

正常组软骨细胞为椭圆形、近圆形，细胞核较大，核膜清晰且表面有突起和皱褶。粗面内质网丰富，并可见高尔基复合体，线粒体正常(见图 23-24)。细胞周基质为半透明的环形带，基质中胶原纤维细而密，排列整齐呈空织状。

给药 4 周后模型组细胞膜部分不清晰，可见细胞核固缩现象，核膜局部分辨不清，线粒体膜部分分辨不清、嵴膜模糊，存在空泡化现象，粗面内质网较正常组少，可见池状扩大并脱颗粒表现，周围可见胶原纤维束，纤维组织比较稀疏，未见明显凋亡小体，细胞质中可见少量病理性蛋白颗粒(见图 25-26)。实验组给药 4 周后细胞核基本正常，核膜尚完整，核质均匀，线粒体膜尚清晰，线粒体嵴可见，内质网较模型组丰富，部

分细胞可见内质网池状扩张，未见脱颗粒现象，且纤维组织排列尚整齐，高尔基体正常(见图 27-28)。

给药 6 周后模型组细胞膜、核膜结构较前分辨不清，嵴膜模糊，粗面内质网池状扩大及脱颗粒现象加重，胶原纤维进一步稀疏并紊乱(见图 29-30)；而实验组细胞核尚正常，核膜相对完整，核质均匀，部分核膜不清，线粒体嵴尚可见，部分线粒体膜不完整，细胞可见内质网池状扩张，少量脱颗粒现象，纤维组织排列部分紊乱(见图 31-32)。

给药 8 周后模型组细胞膜及核膜不清晰，细胞核固缩进一步加重，脱颗粒现象明显存在并加重，粗面内质网明显减少，胶原纤维紊乱(见图 33-34)。实验组细胞核膜存在脱颗粒现象，部分分辨不清，内质网减少，部分池状扩张，纤维组织稀疏，部分紊乱(见图 35-36)。

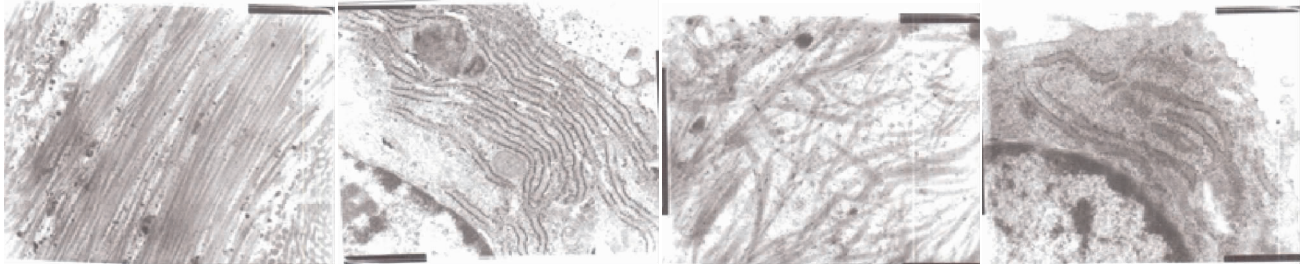


图 23 正常组(7 500×)

图 24 正常组(12 500×)

图 25 模型组 4 周(7 500×)

图 26 模型组 4 周(12 500×)

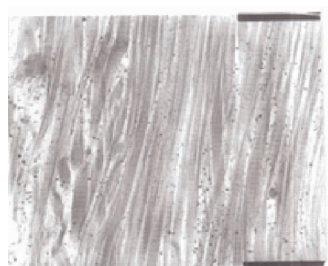


图 27 实验组 4 周(7 500×)

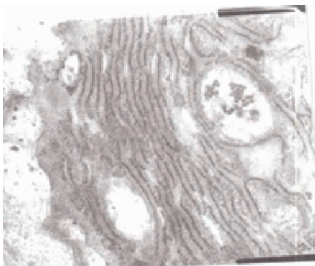


图 28 实验组 4 周(12 500×)

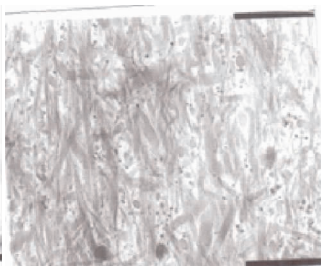


图 29 模型组 6 周(7 500×)

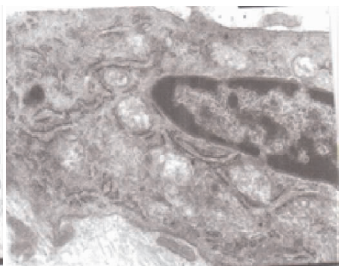


图 30 模型组 6 周(12 500×)

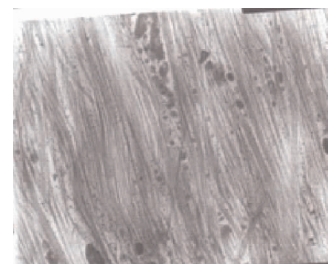


图 31 实验组 6 周(7 500×)

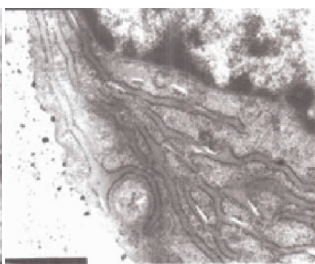


图 32 实验组 6 周(12 500×)

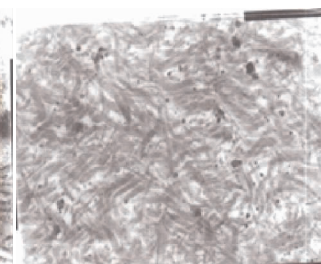


图 33 模型组 8 周(7 500×)

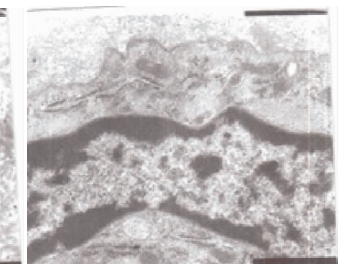


图 34 模型组 8 周(12 500×)

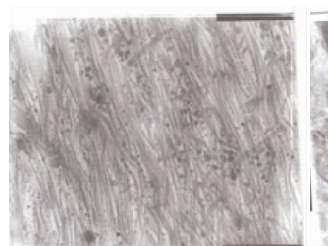


图 35 实验组 8 周(7 500×)

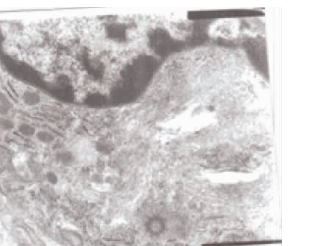


图 36 实验组 8 周(12 500×)

3 讨论

加味阳和汤是全国名中医药专家董建文教授根据多年临床经验在阳和汤基础上加减而成的,该方主要组成:熟地、鹿角胶、麻黄、白芥子、川牛膝、鸡血藤、肉桂、川断、海风藤、甘草等。董建文教授针对骨性关节炎的临床特点,从虚、寒、瘀、滞等方面入手,加减裁定,温阳补血又能化痰通络,益精气,扶阳气,化寒凝,通经络,益气温阳补血以治本,散寒祛湿通络以治标,用于治疗膝骨性关节炎,效果明显。

方中鹿角胶填精补髓,强筋壮骨、熟地可养血滋阴,补精益髓,两者合用,温阳养血,以治其本,共为君药。川牛膝、鸡血藤、肉桂、川断、海风藤为臣药,辅助君药温阳补血,散寒通滞;肉桂为温里药,散寒止痛,温通经脉,助君药滋补之力,补一身之阳气,阳气盛寒气自祛;川牛膝、川续断,补肝肾、强筋骨,不仅助君药滋补肝肾之亏,牛膝还能活血通经,补而不滞,引药下行;鸡血藤、海风藤,活血通络,祛风湿之气,一能调节全方补中有行,二能助祛风寒湿邪,邪去正自安;六味药共为臣药,去骨痹之痹痛,散机体风寒湿邪。方中佐以麻黄、白芥子通经活络,相辅相成,和诸温之和药相伍,开腠理、散寒结,引领阳气由里至表,散行周身。甘草生用为使,解毒而调诸药。

现代医学认为膝骨性关节炎既是一种老年退变性

的疾病,在生物学及力学的多种作用下,引起软骨代谢及重建失衡,导致本病的发生^[6-8],本病多在中年以后发病,早期病理改变以关节软骨表面的胶原纤维化为主^[9],软骨胶原纤维化后其耐磨性能、抗撞击能力及抗压力负荷能力均减弱^[10]。随着病变的进展,软骨的各层结构中均出现软骨细胞的丧失,而我们在实验中也明确的观察到这一点,关节软骨病理染色显示:随着骨性关节炎时间的延长,关节软骨开始出现裂隙,软骨细胞排列出现异常,逐渐出现成簇排列,排列紊乱等情况,并出现软骨细胞分解吸收后遗留的软骨陷窝^[11]。软骨细胞作为软骨内唯一的细胞,在骨性关节炎发病过程的作用也越来越受到重视,虽然软骨细胞仅占软骨组织总容积的 1% 左右^[12],但是软骨细胞是软骨的核心,不仅能够感知软骨微环境的改变,而且能够调控软骨机制的变化^[13],其病理改变对于软骨组织的退变起到至关重要的作用,因此最近研究将软骨细胞作为重中之重^[9]。笔者通过对骨性关节炎兔灌胃加味阳和汤发现,加味阳和汤能够明显延缓软骨细胞的退变过程,和同一时间段的模型组相比较,实验组的软骨细胞无论在数量还是在形态,以及排列顺序上均有明显好转,证明加味阳和汤对于缓解软骨细胞退变有重要的作用,这与国内相关研究有相似之处^[14]。

内质网是真核生物细胞内重要的细胞器,它为由膜性扁囊、小管或小泡构成的三维网状膜结构^[15]。内质网分为粗面内质网和滑面内质网,两者在功能及机构上有不同的分工,滑面内质网主要功能是合成磷脂质和胆固醇,参与脂类合成与运输等;而粗面内质网主要参与蛋白质合成、翻译及修饰,以及降解非正确折叠的蛋白。笔者在兔软骨透射电镜检查中发现骨性关节炎时软骨细胞出现了内质网数量及形态的变化,这种

变化随着时间延长而加重,从内质网的池状扩张到数量的减少,并逐渐出现细胞核核膜的完整性破坏,而同一时间段内实验组相对较轻,并且在透射电镜观察中发现胶原纤维的排列随着骨性关节炎的延长而变得更加紊乱,而加味阳和汤能够明显缓解胶原蛋白排列顺序,减缓其退变。因此笔者推测加味阳和汤能够从某种程度上减轻内质网的退变及坏死,这可能是其治疗骨性关节炎起效的一个方面,但其具体机制需要进一步探讨。

参考文献

- [1] 刘德玉,吕水英,袁普卫.辨证、辨位、辨病法在膝骨性关节炎诊疗过程中的应用[J].中国中医骨伤科杂志,2012,20(9):70-72.
- [2] 张清,杨功旭,钟传棋,等.基于数据挖掘的杨功旭治疗膝关节炎骨性关节炎用药规律研究[J].中国中医骨伤科杂志,2018,26(9):46-49.
- [3] 王文波,董建文,杨振国,等.加味阳和汤对早期膝骨关节炎兔关节软骨的影响[J].中医正骨,2015,27(1):1-4.
- [4] 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].云南中医中药杂志,2014,35(4):8-10.
- [5] 肖春苟,邹锦慧,李力强,等.以改良 Hulth 法建立兔膝骨性关节炎关节软骨的病理变化[J].中国中医骨伤科杂志,2014,22(12):1-3.
- [6] MAHMOUDIAN A,VAN DIEEN J H,BAERT I A,et al. Changes in proprioceptive weighting during quiet standing in women with early and established knee osteoarthritis compared to healthy controls[J]. Gait Posture, 2016,44:184-188.
- [7] OK S M,JEONG S H,AHN Y W,et al. Effect of stabilization splint therapy on glenoid fossa remodeling in temporomandibular joint osteoarthritis [J]. J Prosthodont

Res,2016,60(4):301-307.

- [8] SABERI HOSNIJEH F,SIEBUHR A S,UITTERLIN-DEN A G,et al. Association between biomarkers of tissue inflammation and progression of osteoarthritis. evidence from the Rotterdam study cohort[J]. Arthritis Res Ther, 2016,18(1):81-89.
- [9] MADRY H,KON E,CONDELLO V,et al. Early osteoarthritis of the knee[J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc,2016,24(6):1753-1762.
- [10] ABDEL KADER T,KUBOTA S,NISHIDA T,et al. The regenerative effects of CCN2 independent modules on chondrocytes in vitro and osteoarthritis models in vivo [J]. Bone,2014,59:180-188.
- [11] ABOUHEIF M M,NAKASA T,SHIBUYA H,et al. Silencing microRNA-34a inhibits chondrocyte apoptosis in a rat osteoarthritis model in vitro[J]. Rheumatology (Oxford),2010,49(11):2054-2060.
- [12] ACAR N,BALKARLI H,SOYUNCU Y,et al. The determination of apoptosis rates on articular cartilages of ovariectomized rats with and without alendronate treatment[J]. Histol Histopathol,2016,31(6):635-645.
- [13] 余光书,熊国胜,熊圣仁,等.基于质谱技术分析软骨细胞线粒体蛋白质及细胞凋亡机制[J].中国中医骨伤科杂志,2018,26(1):1-4.
- [14] 赵林灿,李薇薇,吴毅明,等.独活寄生汤对膝骨关节炎模型大鼠 PERK/Bip 信号通路的影响[J/OL].中国实验方剂学杂志,2019,23(2):1-7.
- [15] WU H,NG B S,THIBAUT G. Endoplasmic reticulum stress response in yeast and humans[J]. Biosci Rep,2014,34(4):e00118.

(收稿日期:2019-02-13)