

传统中医药补肾固筋方对中老年膝骨关节炎患者 IL-1、iNOS 水平的影响和临床意义

张冲¹ 高海燕² 黄芸² 王宁宁² 李双成² 刘玉杰^{3*}

1. 河北省中医院骨三科,石家庄 050000

2. 河北医科大学,石家庄 050017

3. 解放军总医院骨科,北京 100853

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015) 07-0780-04

摘要: **目的** 观察补肾固筋方治疗膝骨关节炎 IL-1、iNOS 水平的研究。**方法** 实验分两组进行,每组病例各 92 例,治疗 8 周,中药组口服补肾固筋方,西药组口服美洛昔康胶囊。收集患者治疗前后关节滑液及空腹血清,采用酶联免疫吸附法检测 IL-1、iNOS 的水平,观察治疗效果和不良反应。**结果** 治疗前中药组和对照组 IL-1、iNOS 水平较治疗前显著增高;治疗后中药组关节液和血清 IL-1、iNOS 相比对照组显著降低($P < 0.05$);治疗后两组均未见明显血常规和肝肾功能异常。**结论** 补肾固筋方在治疗中降低了 IL-1、iNOS 的水平及比值,不良反应少见,提示中药补肾固筋方通过调节细胞因子的表达水平来调控细胞凋亡和减轻软骨破坏,改善膝关节炎发生及发展。

关键词: 补肾固筋方;膝骨关节炎; IL-1(白介素-1); iNOS(诱导型一氧化氮合酶)

Effect and clinical significance of reinforcing kidney and strengthening ligament prescription on the levels of IL-1 and iNOS in middle and elderly patients with knee osteoarthritis

ZHANG Chong¹, GAO Haiyan², HUANG Yun², WANG Ningning², LI Shuangcheng², LIU Yujie³

1. Department of the Third Orthopedics, TCM Hospital of Hebei Province, Shijiazhuang 050000, China

2. Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

3. Department of Orthopedics, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: LIU Yujie, Email: liuyujie301@163.com

Abstract: Objective To observe the efficacy of reinforcing kidney and strengthening ligament prescription on the levels of IL-1 and iNOS in knee osteoarthritis. **Methods** The experimental subjects were divided into two groups. Each group had 92 patients with the treatment for 8 weeks. Patients in Chinese medicine group received reinforcing kidney and strengthening ligament prescription, while patients in Western medicine group received oral Meloxicam capsules. The joint synovial fluid and fasting serum were collected before and after the treatment. The levels of IL-1 and iNOS were determined using ELISA method. The therapeutic efficacy and adverse reaction were observed. **Results** Before the treatment, the levels of IL-1 and iNOS in TCM group and Western medicine group were significantly higher. After the treatment, the levels of IL-1 and iNOS in serum and synovial fluid in the Chinese medicine group decreased significantly, comparing to those in the Western medicine group ($P < 0.05$). After the treatment, routine blood test and liver and kidney function were normal in both groups. **Conclusion** Reinforcing kidney and strengthening ligament prescription reduces the levels of IL-1 and iNOS and the ratio, with little adverse effect. The results suggest that Reinforcing kidney and strengthening ligament prescription regulates cell apoptosis, reduces the damage of cartilage, and relieves the development of knee joint osteoarthritis by regulating the expression levels of IL-1 and iNOS.

Key words: Reinforcing kidney and strengthening ligament prescription; Knee osteoarthritis; Interleukin-1; Inducible nitric oxide synthase

失影响患者生活质量。发病机制不明确,与环境因素、遗传、细胞因子和炎性介质的参与有关^[1]。射线下见骨质增生、骨赘形成、关节间隙变窄等改变。中医认为膝骨性关节炎属于痹证,风寒湿邪使经络闭阻影响气血运行所致。随着人口老龄化的发展我国的发病率逐年增长。早期关节软骨变黄粗糙变脆失去光泽,继之出现裂纹,软化剥脱骨质裸露,后期骨赘形成软骨下骨质致密硬化关节肥大形成关节积液、畸形、关节内游离体等^[2]。本实验通过检测 IL-1、iNOS 的分泌变化,探讨中药补肾固筋方在膝骨性关节炎中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 一般资料

2012.1-2014.12 河北省中医院骨三科门诊 189 例 KOA 患者,根据就诊顺序随机分为:中药组 95 例,西药组各 94 例,患者依从性差淘汰 4 例、胃肠道反应淘汰 1 例后剩余中药组和西药组各 92 例:男 101 例,女 83 例,男女比 3:4.8;年龄 45~79 岁,平均 64.6 岁;病程 3 月~11 年,平均 3.8 年;单侧发病 127 例,双侧发病 57 例,共 241 个患膝关节。纳入病例西医诊断均为膝关节骨性关节炎,中医辨证均为老年肝肾亏虚型。一般资料比较见表 1。

表 1 中药组和西药组基本资料($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Basic data in TCM and Meloxicam group ($\bar{x} \pm s$)

项目 Project	中药组(n=92) Chinese medicine group(n=92)	西药组(n=92) Western medicine group(n=92)	P
年龄(岁) Age (years old)	67.8 ± 6.2	65.2 ± 7.5	0.43
男:女 Male;female	21/12	10/6	0.3
体重指数(kg/m ²) Body mass index(kg/m ²)	20.2 ± 2.6	21.1 ± 1.8	0.12

诊断标准及入选标准参照根据国家中医药管理局制定的中医病证诊断疗效标准^[3];西医诊断标准参照美国风湿病协会 1987 年修订的膝骨关节炎分类标准。排除类风湿关节炎、强直性脊柱炎等其他免疫性疾病患者。

1.2 实验方法

自拟补肾固筋方(组成:熟地 12 g、木瓜 8 g、桑寄生 12 g、杜仲 8 g、牛膝 12 g、丹参 10 g、补骨脂 10 g、青风藤 12 g),河北省中医院中药房购药并由制剂室煎制,每剂取汁 150 ml,睡前 30 分钟温水送服,日 1 剂。服 5 日休息 2 日,连续治疗 12 周为 1 疗程,2 个疗程后作疗效对比,间隔 1 周后再用药。西药组服用美洛昔康(商品名:统克;7.5 mg × 10/盒,四川宝光药业股份有限公司生产,批准文号:H200102097.5 mg/胶囊,服药方法同上。常规检查血尿常规、肝肾功能。治疗期间,不使用激素和其他药物;尽量避免负重、远行。

1.3 检测指标

取标本后,本实验在河北医科大学中心实验室进行。人 IL-1、iNOS ELISA 试剂盒(规格:96T, Abcam US. 批号分别为:AB22031;AB2901NST)、显色剂显色(DAB 等)、酶联免疫检测仪(ELX-800 US.)、96 孔板(Costar US.)等。收集每位患者治疗前后关节滑液和清晨空腹血清。清晨空腹静脉血 2

~3 ml,抗凝处理后分离血清约 1~1.3 ml,-20℃ 保存;无菌抽取关节滑液 2~5 ml,高速离心(3 000 r/min)后取上清液-70℃ 保存。应用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测样本中 IL-1、iNOS 的分泌水平及变化。加样品之前先在整版加 100 ul 缓冲液,然后加样品和血清(和关节滑液),相当于把样品稀释了 1:2。

1.4 统计学处理

SPSS17.0 统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。一般资料卡方检验。单因素方差分析或 *t* 检验。样本 IL-1、iNOS 水平与病变严重程度 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 认为差异有显著性。

2 结果

2.1 治疗前后 IL-1、iNOS 比较(表 2)

治疗前两组患者的 IL-1、iNOS 比较无显著差异($P > 0.05$);治疗后中药组和西药组血清和滑液 IL-1、iNOS 较正常水平比较明显降低,有显著差异($P < 0.05$);中药组血清和滑液 IL-1、iNOS 水平明显低于西药组,有显著差异($P < 0.05$)。

2.2 治疗后 IL-1、iNOS 变化

Honsawek 等认为 OA 严重程度呈 KL 分级关系。两组患者血清和滑液 IL-1 水平与 OA 严重程度 KL 分级之间呈正相关(图 1 $r = 0.533, P < 0.001$);两

组血清、滑液 iNOS 水平之间相关性分析呈正相关 (图 2 $r=0.514, P<0.001$)。

表 2 中药组治疗前后血清及关节滑液中 IL-1、iNOS 含量比较

Table 2 Comparison of serum and synovial fluid levels of interleukin-1 and iNOS in TCM group before and after the treatment. (IL-1: pg/ml; iNOS: $\mu\text{g/ml}$; $\bar{x} \pm s$)

样本 case	血清中 IL-1 Serum IL-1		血清中 iNOS Serum fluid iNOS		滑液 IL-1 Synovial fluid IL-1		滑液 iNOS Synovial fluid iNOS	
	治疗前 before	治疗后 after	治疗前 before	治疗后 after	治疗前 before	治疗后 after	治疗前 before	治疗后 after
92	20.7 \pm 3.4	15.6 \pm 9.8	23.1 \pm 6.4	15.9 \pm 4.6 ^{*Δ}	21.6 \pm 2.5	20.7 \pm 2.1 [*]	21.7 \pm 3.2	18.5 \pm 1.7
92	16.5 \pm 4.7 ^{*Δ}	13.1 \pm 8.3 [*]	19.4 \pm 6.2	12.8 \pm 5.1 ^{*Δ}	18.9 \pm 2.7 ^{*Δ}	15.1 \pm 4.6 ^{*Δ}	21.4 \pm 4.3 ^{*Δvv}	18.2 \pm 3.1
92	19.6 \pm 3.4	16.3 \pm 7.2 ^{Δ}	27.4 \pm 5.7	16.1 \pm 6.3 [*]	22.4 \pm 6.2	20.9 \pm 4.6	21.7 \pm 3.5	14.8 \pm 2.4 ^{Δ}
92	18.5 \pm 3.6	14.2 \pm 8.1 [*]	25.4 \pm 6.4	16.9 \pm 7.2 [*]	22.5 \pm 3.7 ^{Δ}	17.5 \pm 3.7	24.2 \pm 3.1 ^{Δ}	18.2 \pm 2.6

注:与中药治疗前比较^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与西药组治疗后比较, ^{Δ} $P<0.05$ 。

Note: compared with the traditional Chinese medicine group before treatment. ^{*} $P<0.05$. ^{**} $P<0.01$; Compared with the western medicine group after treatment, ^{Δ} $P<0.05$.

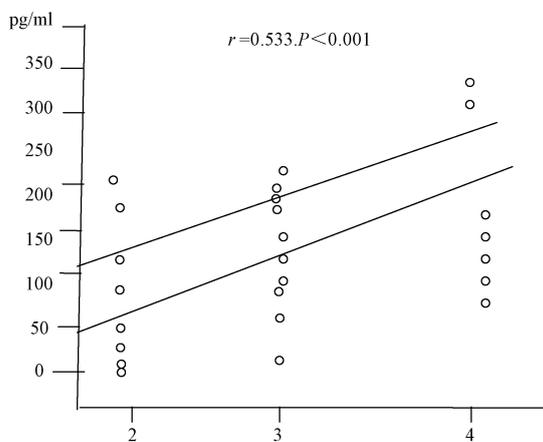


图 1 中药组血清和滑液 IL-1 水平与 KL 分级正相关

Fig. 1 Positive correlation between blood IL-1 and iNOS levels and KL grading in TCM group

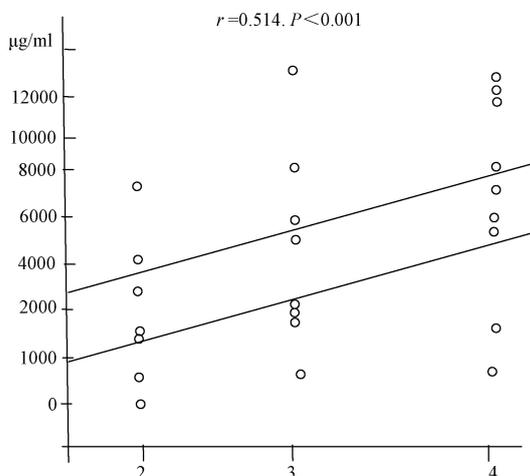


图 2 西药组血清和关节滑液中 iNOS 水平与 KL 分级正相关

Fig. 2 Positive correlation between IL-1 and iNOS levels and KL grading in Western medicine group

3 讨论

骨关节炎以肢体关节疼痛肿胀病情迁延反复, X 射线表现为关节软骨消失和骨质破坏,增生间隙变窄消失,滑膜增厚韧带钙化骨质疏松重则危害患者身心健康。

补肾固筋方熟地 12 g、丹参 10 g、桑寄生 12 g、杜仲 8 g、牛膝 12 g、补骨脂 10 g、木瓜 8 g、青风藤 12 g,病机以肝肾亏虚,治宜补益肝肾,强筋健骨。熟地、补骨脂为君药,熟地性微温、味甘,滋阴养血,补骨脂性大温,是补肾壮阳益精填髓之要药,阴阳互根互补,《灵枢·本脏篇》:“血和则经脉流行,营复阴阳,筋骨劲强,关节清利矣”;桑寄生、枸杞子为臣药,《本草备要》:“桑寄生辛温治风气,脚气。补肾强筋,祛风除湿,”杜仲滋补肝肾,二药温补肾阳,佐助君药补骨脂补肾助阳之功,并能祛除风寒湿

邪^[4]。川牛膝补肝肾且引血下行、消水肿。木瓜祛寒除湿,舒筋活络,善走下肢,青风藤温肾强筋,丹参活血化瘀,安神消痛共为佐使之药,活血力专而不峻,有“一味丹参饮,功同四物汤”之谓^[5,6],全方配伍以补益肝肾为主,兼能益气行血通络,诸药合用,补中有行,共达补肾壮骨、活血止痛之效。补骨脂、桑寄生、川牛膝现代药理研究表明增强膝关节软骨细胞功能促进软骨修复,加强软骨破坏区出现大量幼稚软骨细胞^[7,8],减少或阻断因软骨片丢失造成的降低关节内压力,促进软骨细胞的修复^[9,10]。熟地抗血液凝固、增强 GSH 过氧化物酶的活性,降低氧化脂质,抑制血小板聚集,使红细胞与内皮细胞黏附减少^[11,12];桑寄生强壮身体、增强患者免疫力;木瓜具有消炎抗感染、中枢镇痛的作用;丹参具有改善

微循环,降血脂,抗动脉粥样硬化的作用,丹参中的有效物质通过显著抑制白细胞的运动,阻止白细胞向病灶过度游走防止溶酶体酶^[13]、促进氧化代谢产物的释放^[14],抑制自由基反应,减少脂质过氧化物生成,促进切口愈合;川牛膝的主要成分皂苷、苷元为齐墩果酸,刺激免疫系统中血清 IgG 含量,增加脾细胞 PFC 数,对抗环孢霉素 A 引起的 PFC 及 IgG 的下降^[15,16]。牛膝的浓缩液有较强的抗炎消肿作用,刺激吞噬能力以及扩张血管、改善循环、促进炎症细胞的吸收^[16,17]。

IL-1、iNOS 对蛋白聚糖有高度的裂解性,在关节软骨基质降解中起非常重要的作用,包括降解 II 型、III 型胶原、基质蛋白多糖,层粘连蛋白等多种基质蛋白等^[18],还可激活其它细胞因子如基质金属蛋白酶原破坏软骨。补肾固筋方激活软骨母细胞中的 iNOS 产生大量的 NO 抗炎抗渗抑制炎症性介质或细胞因子的释放,iNOS 在正常软骨组织中不表达,但细胞因子和细菌脂多糖均能刺激 iNOS 的表达使其升高^[19];TNF- α 促进软骨基质蛋白多糖和胶原蛋白的合成,阻断氧自由基维持软骨强度和弹性^[20],对肌腱、韧带、滑膜、滑囊等软组织进行修复,解除关节软组织粘连,减轻关节软骨磨损造成的关节疼痛,激发软骨细胞增殖达到治疗骨关节炎改善关节功能;本研究发现 IL-1、iNOS 表达水平明显降低 ($P < 0.05$),补肾固筋方达不到手术治疗疾病,因此在临床应用有很好的前景,值得推广。

【参 考 文 献】

[1] 李旭,王海立,朱炼,等. 单侧髌骨粉碎性骨折行髌骨完全切除后对双侧膝关节远期功能的影响[J]. 中华创伤骨科杂志, 2013, 11(15): 928-931.
Li Xu, Wang Haili, Zhu Lian. Long-term impact on bilateral knee function after complete resection of unilateral line patella patellar fractures. J Orthopaedic Trauma 2013; 11(15): 928-931.

[2] 许峰,章光华,李欢华. 蠲痹丸治疗绝经后骨质疏松症 37 例[J]. 中医杂志, 2013, 12(3): 117-118.
Xu Feng, Zhang Guanghua, Li Huanhua. Juan hunchback pill treatment of postmenopausal osteoporosis in 37 cases. J Traditional Chinese Medicine, 2013; 12(3): 117-118.

[3] 李丽,邱全瑛,吴王君,等. 化癥蠲痹止痛颗粒对 DTH 小鼠免疫调节作用的实验研究[J]. 北京中医药大学学报, 2013, 22(5): 67-70.
Li Li, Wu wang-Jun. The effect of immunomodulatory DTH particles in mice circulation Juanbi pain. J Beijing University of Traditional Chinese Medicine 2013; 22(5): 67-70.

[4] 包飞,孙华,吴志宏. 针刺对膝骨关节炎大鼠软骨基质金属蛋白酶及其抑制剂表达的影响. 中国针灸, 2011, 11(5): 241-246.

Bao FEI, Sun Hua, Zhi-hong Wu. Acupuncture on knee cartilage in rats expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors osteoarthritis. J Chinese acupuncture 2011; 11(5): 241-246.

[5] 国家中医药管理局. 中华人民共和国中医药行业标准. 中医病证诊断疗效标准[M]. 南京, 南京大学出版社, 1999.
The Administration of TCM. People's Republic of China in the pharmaceutical industry standards. TCM Syndrome Diagnostic efficacy of the standard [M]. Nanjing, Nanjing University Press, 1999.

[6] 马余鸿,叶刚,刘丽娟. 短波及调制中频电联合治疗膝关节炎性关节临床疗效观察. 中国康复. 2011, 21(4): 367-368.
Ma Yu-hong, Ye Gang, Liu Li-uan. Clinical efficacy shortwave and modulation frequency electric combination treatment of knee osteoarthritis. J China Rehabilitation 2011; 21(4): 367-368.

[7] Scanzello CR, Goldring SR. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. J Bone 2012; 51(6): 249-257.

[8] Liu F, Wu X. Therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee. J Arthritis Care Res Hoboken, 2012; 64(2): 455-474.

[9] Zhang Q, Lv H, Chen A. Efficacy of infliximab in a rabbit model of osteoarthritis. J Connect Tissue Res 2012; 53(3): 355-358.

[10] Li H, Feng F, Bingham CO 3rd, Elisseeff JH. Matrix metalloproteinases and inhibitors in cartilage tissue engineering. J Tissue Eng Regen Med 2012; 6(2): 144-154.

[11] Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. Arthritis Rheum, 2012; 64(2): 1697-1707.

[12] Eckstein F, Wirth W, Nevitt MC. Recent advances in osteoarthritis imaging the osteoarthritis initiative. J Nat Rev Rheumatol 2012; 8(4): 622-630.

[13] Hayashi D, Xu L, Roemer FW, et al. Detection of osteophytes and subchondral cysts in the knee using tomosynthesis. J Radiology 2012; 263: 206-215.

[14] Madelin G, Jerschow A, Regatte RR. Sodium relaxation times in the knee joint in vivo at 7T. J NMR Biomed 2012; 25: 530-537.

[15] Hayashi D, Guermazi A, Kwok CK, et al. Semiquantitative assessment of subchondral bone marrow edema-like lesions and subchondral cysts of the knee at 3T MRI: A comparison between intermediate-weighted fat-suppressed spinecho and Dual Echo Steady State sequences. BMC Musculoskelet Disord 2011; 12(4): 198-201.

[16] Roemer FW, Crema MD, Trattnig S, et al. Advances in imaging of osteoarthritis and cartilage. J biology 2011; 260: 332-354.

[17] Newbould RD, Miller SR, Toms LD, et al. T2 measurement of the knee articular cartilage in osteoarthritis at 3T. J Magn Reson Imaging 2012; 35: 1422-1429.

[18] Anandacoomarasamy A, Leibman S, Smith G, et al. Weight loss in obese people has structure-modifying effects on medial but not on lateral knee articular cartilage. J Ann Rheum Dis 2012; 71(3): 26-32.

[19] Raya JG, Horng A, Dietrich O, et al. Articular cartilage: in vivo diffusion tensor imaging. J Radiology 2012; 26(2): 550-559.

[20] Kawaguchi K, Enokida M, Otsuki R. Ultrasonographic evaluation of medial radial displacement of the medial meniscus in knee osteoarthritis. J Arthritis