

小针刀对膝关节骨性关节炎模型兔的实验研究

刘广宇¹ 张晓峰²

(1 黑龙江中医药大学附属第二医院骨二科, 哈尔滨, 150001; 2 黑龙江中医药大学, 哈尔滨, 150020)

摘要 目的:观察小针刀对兔膝骨性关节炎模型组织形态及其关节软骨 MMP-9 及 COX-2 的变化。方法:将 30 只新西兰兔随机分为假手术组、模型组、针刀组,各 10 只。其中模型组及针刀组接受 KOA 模型制作,假手术组及模型组不接受任何干预措施,针刀组在造模第 2 天起利用针刀以纵疏、横剥法为手法对膝关节内外侧副韧带及髌尖下正中点进行松解,每周 1 次,共治疗 4 周,每周每只兔子右膝关节内注射丹参注射液 0.6 mL,连用 4 周(增加丹参注射液的使用)。治疗结束后光镜下观察 3 组兔膝关节组织形态变化,并用 Western blotting 法关节软骨 MMP-9 及 COX-2 浓度变化。结果:1)HE 染色后模型组、针刀组新西兰兔膝关节均有不同程度的水肿、增生,其中针刀组较模型组改善;此外模型组膝关节软骨还可见一定程度退行性改变。2)与假手术组比较,模型组及针刀组兔膝关节软骨 MMP-9 及 COX-2 浓度均升高,其中模型组升高的趋势更明显($P < 0.05$),针刀干预后针刀组上述两指标水平较模型组下降($P < 0.05$)。3)使用 Pearson 法进行 MMP-9、COX-2 浓度变化的相关性分析,结果发现两者呈正相关关系,结论:针刀松解术可明显改善膝关节骨性关节炎模型兔软骨退变,其机制可能与降低 MMP-9 及 COX-2 有关。

关键词 膝关节骨性关节炎;KOA;针刀;MMP-9;COX-2

Experimental Research of Acupotomy on Knee Osteoarthritis Rabbits Models

Liu Guangyu¹, Zhang Xiaofeng²

(1 Department of Orthopedics, Second Affiliated Hospital, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150001, China; 2 Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150020, China)

Abstract Objective: To observe acupotomy on the morphology of knee osteoarthritis rabbits model and the changes of MMP-9 and COX-2 in the articular cartilage. **Methods:** Thirty New Zealand rabbits were randomly divided into a sham-operate group, a model group and an acupotomy group, 10 models in each. The model group and the acupotomy group were made into KOA model, while the sham-operate group and then model group didn't accept any interventions. The acupotomy group released the lateral collateral ligament and the patellar ligament on the second day of molding by acupotomy with vertical and horizontal strip method, once a week, for 4 weeks' treatment. After the treatment, knee histomorphology changes under light microscope of the three groups of rabbits were observed, and concentration changes of articular cartilage MMP-9 and COX-2 were tested by Western blotting. **Results:** 1) After HE dyeing, the model group, the acupotomy group of New Zealand rabbits' knees all have different degrees of edema and hyperplasia, and the improvements in the acupotomy group was better than that in the model group; a certain degree degenerative changes were also visible in the knee joint cartilage of the model group. 2) Compared with the sham-operate group, MMP-9 and COX-2 concentration of articular cartilage increased in both of the model group and the acupotomy group, but the increasing trend of the model group was more obvious ($P < 0.05$). After acupotomy intervention, the above two index levels in the acupotomy group dropped more than those in the model group ($P < 0.05$). 3) Using Pearson method to analyze MMP-9 and COX-2 correlation, the results showed that MMP-9 levels was positively correlated with COX-2 ($P < 0.05$). **Conclusion:** Acupotomy can improve cartilage degeneration of the knee osteoarthritis of model rabbits obviously, and the mechanism maybe related to the reduction of MMP-9 and COX-2.

Key Words Knee osteoarthritis; KOA; Acupotomy; MMP-9; COX-2

中图分类号:R245 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.06.050

膝骨性关节炎(Osteoarthritis, OA)是中老年人常见骨关节疾患,以关节软骨退变及骨赘生成为主要病理特征^[1]。随着我国老龄化社会的到来,OA患者日趋增多,目前针对OA的疗法有保守治疗及手

术治疗2大类,其中药物为主的保守治疗虽可达到一定疗效,但西药的易耐受及中药的疗程长均影响患者的依从性,手术疗法易出现手术残留,对患者身心创伤较大,故一种疗效持续、不易耐受、安全性高

的治疗手段呼之欲出。小针刀结合中医的“针”及西医的“刀”,对膝关节周围的肌腱韧带等软组织的粘连、挛缩和瘢痕等可行横向剥离和纵向疏通,没有严格适应症,费用较手术费用低。因此本研究以 KOA 模型新西兰兔为研究对象,旨在观察小针刀对 OA 的疗效及作用机制。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 取 30 只新西兰兔,平均体重(2.2 ± 0.18)kg,所有动物均由黑龙江中医药大学动物实验中心提供,饲养环境设置:室温 23 ~ 25 ℃,相对湿度(56 ± 6)%。

1.1.2 试剂与仪器 针刀(0.4 × 0.4 mm 汉章医疗器械有限公司),树脂绷带(安平县康利医疗器械有限公司),乙醇(岳阳市君华化工有限公司),苏木素(上海生工生物有限公司),超净工作台(苏州安泰公司),PI3K、AKT、β-actin 抗体、鼠抗兔 HRP-二抗(CST 公司),二甲苯(上海泰正化工有限公司),石蜡(济南鑫厚商贸有限公司),切片机(FS/FAS5030 石蜡切片机,德国 LETIZ 公司),电泳液(碧云天公司),转膜液(碧云天公司),配胶试剂盒(碧云天公司),酶标定量测定仪(Thermo Multiskan AsCant 公司),可调控温度离心机(Eppendorf 公司)。水合氯醛(武汉远成共创科技有限公司),丹参注射液(正大青春宝药业有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 30 只新西兰兔随机分为假手术组、模型组及针刀组,各 10 只。模型组及针刀组兔接受 Vidman 法进行 KOA 模型的制作,将动物用 10% 水合氯醛以 0.3 mL/kg 进行麻醉固定牵拉,使动物处于完全伸直状态,将树脂绷带置于(70 ± 5)℃ 环境下进行浸泡软化,固定于动物腹股沟至脚踝处,使膝关节保持伸直 180° 状态,从动物足趾处观察血供情况,共制动 4 周,制动结束后从模型组及针刀组随机选取 2 只动物进行影像学及形态学评估,提示造模成功后拆除动物树脂绷带。造模过程中若动物出现皮肤感染、肢体溃烂坏死等均予剔除。所有动物置 12/12 昼夜交替灯光周期。

1.2.2 干预方法 假手术组及模型组兔不接受任何干预手段,回笼饲养。针刀组兔接受小针刀松解术,具体操作如下:造模成功后 1 周对兔进行针刀松解术,先将兔麻醉后利用龙胆紫药水标注进针点,以内外侧副韧带及髌尖下正中点为进针点,1)内外侧副韧带:刀口线平行于韧带,并以韧带中点为进针

处,刀体垂直于皮肤迅速刺入直达韧带,分别向韧带起止点方向进行松解;2)髌尖下正中点:刀口线平行于髌韧带,刀体垂直快速刺入皮肤,直入脂肪垫,纵向、横向疏通剥离 1 ~ 3 刀,然后将刀体呈 45° 向下倾斜,刀口深入直达髌骨下极,纵向、横向剥离 1-3 刀,将脂肪垫与髌骨下缘的粘连彻底松解,刀下有松动感后出刀。在内外侧副韧带及髌尖下正中点进针时均采用纵疏横剥离等手法,治疗结束出针时即刻按压数分钟,每周治疗 1 次,共治疗 4 周。每周每只兔子右膝关节内注射丹参注射液 0.6 mL,注射后屈伸膝关节 20 次,连用 4 周。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 一般情况观察评定 干预结束后对各组新西兰兔一般情况进行观察,主要包括动物的反应性、摄食及摄水量,皮毛生长情况及光泽度,肢体活动度,步态。见表 1。

表 1 实验兔一般情况评分

评分	反应性	摄食水	皮毛光泽	活动度	步态
0 分	敏感	正常	皮毛顺,有光泽	敏感	正常
1 分	较好	一般	皮毛整,光泽可	减弱	略跛
2 分	一般	少	皮毛乱,光泽差	差	跛行
3 分	较差	很少	皮毛乱,无光泽	很差	跛行明显

1.2.3.2 取材固定 所有动物在治疗结束 1 周采用空气栓塞法处死,处死后将动物置于超净工作台冰面上,快速取出造模侧股股外侧髁处新鲜软骨 2 块,大小均约 1 × 1 cm,标本 A 快速置于福尔马林中进行固定,标本 B 置于 5% 硝酸溶液。标本 A 固定一周后取出进行常规石蜡包埋、切片,染色,后在光镜下观察形态学情况。标本 B 脱钙 15 d 后取出,用 PBS 冲洗 2 次,10 min/次,后置于 - 80 ℃ 冰箱中备用。

1.2.3.3 Western-blot 检测 MMP-9 及 COX-2 的表达 将收集的 EPCs 细胞收集加入 100 μL 裂解液进行细胞分裂,放入 4 ℃ 振荡器中持续震荡 30 min,并将液体用移液枪转移至事先预冷离心管,再次置于 4 ℃ 离心机中以 5 000 r/min 转速进行离心 15 min,用移液枪将上清液抽取至新的离心管中备用。利用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,并在 100 ℃ 水浴中进行蛋白变性 7 min,并计算上样量。事先配制好 SDS-PAGE 胶体,用移液枪将蛋白加之胶体中进行电泳,随后将蛋白转移至硝酸纤维膜上,随后用脱脂奶粉进行封闭 2 h,用 PBS 清洗 2 次,10 min/次,加加 1:500 稀释的一抗(MMP-9 及 COX-2)及内参抗体(β-actin,1:3 000)室温孵育 2 h,用 PBS 清洗 2 次,10

min/次,随后加入辣根过氧化酶 HRP-二抗,室温下轻摇 2 h 取出继续 PBS 清洗 2 次,10 min/次,最后利用 ECL 显影,拍照,统计分析。

1.3 统计学方法 应用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本均数采用 *t* 检验,两等级资料进行秩和检验,计数资料进行 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组兔一般情况比较 造模后假手术组动物精神情况良好,摄食正常,四肢活动度及反应性较灵敏,且皮毛旺盛有光泽。模型组及针刀组动物造模后均出现不同程度精神疲乏,对外界的刺激反应较造模前减弱,膝关节僵硬活动度差,皮毛较乱且光泽减弱,经过为期 4 周的针刀干预后针刀组实验兔上述情况有明显改善,但与假手术组比较仍存在膝关节活动度较差,步行稍跛行的现象。

2.2 各组组织形态学变化情况 假手术组膝关节软骨形态未发生变化,软骨表面结构及厚度均正常,软骨细胞排列均匀有序,潮线清晰可见。模型组膝关节软骨表面粗糙,厚薄不均,完整性受破坏,软骨细胞不同程度坏死,细胞排列错乱,潮线扭曲断裂甚至重叠。针刀组形态学较模型组有明显改善,但仍可见软骨表面些许破坏,软骨细胞存在一部分排序紊乱,血管数量较模型组增加,偶可见潮线重叠。见图 1。

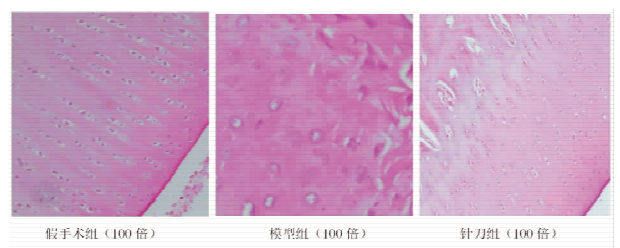


图 1 3 组膝关节软骨组织形态 HE 染色

2.3 各组 MMP-9 及 COX-2 蛋白表达的变化 与假手术组比较,模型组及针刀组兔膝关节软骨 MMP-9 及 COX-2 浓度均升高,其中模型组升高的趋势更明显($P < 0.05$),针刀干预后针刀组上述两指标水平较模型组下降($P < 0.05$)。见表 2、图 2。

表 2 各组 MMP-9 及 COX-2 的表达

组别	例数	MM-9/内参 IOD 比值	COX-2/内参 IOD 比值
空白对照组	10	1.91	2.04
模型组	10	4.93	5.18
针刀组	10	3.36	3.26

2.4 相关性分析 使用 Pearson 法进行 MMP-9、COX-2 浓度变化的相关性分析,结果发现 I 两者呈

正相关关系。见表 3。

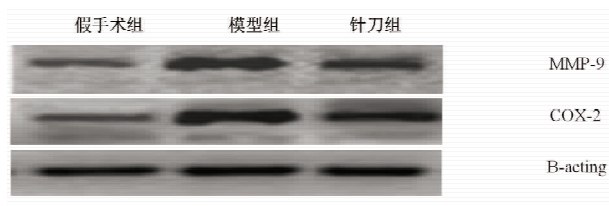


图 2 各组 Western blotting 结果

表 3 相关性分析

参数	MMP-9	
	r	P
COX-2	0.474	0.002

3 讨论

20 世纪 30 年代美国研究者 Bennett 等利用狗髌骨脱位法复制出 OA 模型,之后 Pond 及 Nuki 将实验狗前交叉韧带切断,制备出著名的 Pond Nuki OA 模型,随后不断有研究人员改进 OA 动物模型,但多数 OA 模型需手术实现,关节打开后易对关节软骨及滑膜产生创伤,影响其生化代谢,此外手术可能诱发感染导致关节局部发生一系列病理变化,最终影响实验数据^[2-4]。关节制动可导致关节软骨发生破坏,这为现代研究人员提供了造模新思路。动物关节制动 5~6 周可出现 OA 明显的特征,实现了最大程度还原疾病情况的目的,同时此造模方法规避了麻醉或手术导致的混杂因素,纪斌平等研究人员均制动动物膝关节理想地模拟了 OA 的发病过程,基于此本研究亦采用制动新西兰兔膝关节造模,最大程度避免人为损伤。

小针刀结合中医理论及西医外科手术原理,是中医在现代发展道路上的新产品,中医“阴平阳秘、精神乃治”的阴阳平衡理论及西医闭合性松解术是指导小针刀临床操作的首要方法学。膝关节生理解剖结构复杂,生理动作及关节稳定性主要靠股骨、胫骨、髌骨及其韧带、肌肉实现,膝关节是人体承受重量最大的关节,其运动姿势多样,势必导致膝关节受损的可能性最大,日久耗损膝关节软骨变性,甚至坏死,赘骨生成等,其属于中医学“骨痹”“痹证”范畴,脉络瘀阻是其主要病机,因此松解黏连、疏通经络是其主要治疗原则^[5]。小针刀的治疗点,主要通过触诊,根据中医治法“病在筋,调之筋”,主要是“以痛为腧”,结合临床常见治疗点,确定内外侧副韧带、髌上正中点为治疗点。在本研究中我们发现 KOA 造模后实验兔均出现不同程度的临床症状,经过针刀干预后症状较模型组明显改善,这说明针刀以“以痛为腧”理念下有效改善了模型实验兔的 OA 的症状。

我们在进一步形态学检测后发现,OA 模型动物膝关节的软骨及其滑囊等结果均出现不同程度的病理变化,在光镜下可见软骨表面粗糙,厚薄不均,完整性受破坏,软骨细胞不同程度坏死,细胞排列错乱,潮线扭曲断裂甚至重叠,小针刀疗法明显改善了 OA 的病理学表现,发挥了保护软骨的效应,这一发现与国内外诸多文献结果一致^[6-11]。

在对针刀作用机制的进一步探析中我们对各组实验兔关节软骨的 MMP-9 及 COX-2 进行检测,经过发现 MMP-9 及 COX-2 在 OA 发生后浓度均上调。MMP 家族在细胞外基质降解系统中占据重要位置,MMP-9 是该家族主要成员,承担基质溶解的角色,不但对蛋白多糖、层粘连蛋白、纤维结合素等有溶解效应,还可通过原胶原酶作用而灭除 I、II、III 型胶原的 N、C 末端肽。此外 MMP-9 还可激活其家族另一个成员 MMP-1,导致胶原病理性降解。本研究中我们发现 MMP-9 在 OA 模型中浓度上调,这说明在关节软骨的高表达导致其周围细胞外基质降解明显,从而出现了一系列病理变化^[12-14],而小针刀可一定程度通过松解关节粘连促使 MMP-9 趋于正常水平,纠正病理改变。我们还检测了 COX-2,其乃一类环氧化酶,与疼痛密切相关,当 COX-2 被激活后合成增加,进一步参与了机体炎性反应和应激反应,加剧了疼痛症状,在研究中我们亦发现 COX-2 在 OA 模型动物中有高表达,而随着针刀治疗的继续,其浓度随之降低,我们还发现 MMP-9 及 COX-2 存在一定相关性,说明小针刀可明显改善 OA,这个可能与通过抑制 MMP-9 及 COX-2 表达有关。

参考文献

[1] 石晓明,于占革. 骨关节炎发病机制的研究进展[J]. 中华临床医

师杂志:电子版,2013,7(24):11607-11609.

- [2] Goldring MB. Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases[J]. Best Pract Res Clin Rheumatol,2006,20(5):1003-1025.
- [3] 黄武君,谈志龙,白人骁. 细胞因子与骨性关节炎软骨退变的研究现状[J]. 中国骨伤,2006,19(10):635-637.
- [4] Yasuda T, Poole AR. A fibronectin fragment induces type II collagen degradation by collagenase through an interleukin-1 mediated pathway[J]. Arthritis Rheum,2002,46(1):138-148.
- [5] 黄木全,王勇. 膝关节骨性关节炎中医证素的聚类分析研究[J]. 中医学报,2012,27(9):1134-1135.
- [6] 宋阳春,孙奎,朱俊琛,等. 针刀配合肌力平衡手法治疗膝骨性关节炎的临床研究[J]. 中医正骨,2012,24(9):20-23.
- [7] 周忠良,孙奎,苏国宏,等. 针刀松解联合手法调整肌力平衡治疗膝骨性关节炎的临床研究[J]. 中国中医骨伤科杂志,2012,20(9):25-26.
- [8] 赵军,王庆甫,马玉峰,等. 针刀联合玻璃酸钠与单纯玻璃酸钠治疗膝骨关节炎疗效的 Meta 分析[J]. 中国中医骨伤科杂志,2014,22(2):15-17.
- [9] 刘福水,金德忠,吴翔. 针刀与针灸治疗膝骨关节炎疗效比较的 Meta 分析[J]. 中国组织工程研究,2012,16(44):8235-8239.
- [10] 嵇波,郭长青,钟鼎文,等. 针刀松解法与电针对膝骨关节炎大鼠中枢啡肽类物质影响的比较研究[J]. 上海中医药大学学报,2011,25(4):83-85.
- [11] 郭长青,嵇波,钟鼎文,等. 针刀松解法对膝骨关节炎大鼠中枢 P 物质的影响[J]. 国际中医中药杂志,2011,33(4):309-312.
- [12] 刘清国,嵇波,覃蔚岚,等. 针刀松解法对骨性关节炎兔血清基质金属蛋白酶 3 和 13 含量的影响[J]. 针刺研究,2008,33(5):306-309.
- [13] 丁琼浩,敖亮,潘正刚,等. 膝骨性关节炎的病因病机及用药分析[J]. 中医临床研究,2014,6(7):14-17.
- [14] 马春辉,阎作勤,郭常安,等. II 型胶原与 Bcl-2 在骨关节炎软骨细胞中的表达[J]. 中国矫形外科杂志,2012,20(19):1786-1789.

(2017-03-06 收稿 责任编辑:徐颖)

(上接第 1412 页)

- [31] Xu J, Yang Y, Qiu G, et al. Stat4 is critical for the balance between Th17 cells and regulatory T cells in colitis[J]. J Immunol,2011,186(11):6597-6606.
- [32] Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system[J]. Nat Rev Immunol,2010,10(7):479-489.
- [33] Sugihara T, Kabori A, Imaeda H, et al. The increased mucosal mRNA expressions of complement C3 and interleukin-17 in inflammatory bowel disease[J]. Clin Exp Immunol,2010,160(3):386-393.
- [34] Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17 + T helper cells[J]. Cell,2006,126(6):1121-1133.

- [35] Huang Z, Xie H, Wang R, et al. Retinoid-related orphan receptor gamma t is a potential therapeutic target for controlling inflammatory autoimmunity[J]. Expert Opin Ther Targets,2007,11(6):737-743.
- [36] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3[J]. Science,2003,299(5609):1057-1061.
- [37] Beissert S, Schwarz A, Schwarz T. Regulatory T cells[J]. J Invest Dermatol,2006,126(1):15-24.
- [38] Hatton RD. TGF- β in Th17 cell development: the truth is out there[J]. Immunity,2011,34(3):288-290.

(2017-05-03 收稿 责任编辑:王明)