

# 青藤碱对膝骨性关节炎实验兔关节液及血清中 TNF- $\alpha$ 水平的影响

杨惠琴 陈礼荣

**【摘要】目的** 观察向膝关节腔内注射青藤碱对膝骨性关节炎实验兔关节液及血清中肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )表达的影响。**方法** 本研究共选取 36 只实验兔,采用后肢膝关节伸直位石膏管型固定法将其制作成膝骨性关节炎动物模型。将造模成功的实验兔随机分为青藤碱组、透明质酸组及模型组,另同时选取 4 只正常实验兔纳入空白对照组。于造模成功后向青藤碱组实验兔膝关节腔内注射青藤碱,透明质酸组及模型组实验兔关节腔内则分别注射等量透明质酸和生理盐水,每周注射 1 次,空白对照组不给予特殊处理。分别于药物注射前及注射 5 周后检测各组实验兔关节液及血清中 TNF- $\alpha$  水平。**结果** 青藤碱组及透明质酸组实验兔经相应药物注射后,其血清及关节液中 TNF- $\alpha$  表达水平均明显下降,骨性关节炎症状也得到显著缓解;进一步分析后发现,青藤碱组 TNF- $\alpha$  表达下降幅度明显大于透明质酸组( $P < 0.05$ )。**结论** 青藤碱能显著降低 OA 实验兔关节液及血清中 TNF- $\alpha$  表达水平,其抗炎功效明显优于透明质酸。

**【关键词】** 骨性关节炎; 青藤碱; 肿瘤坏死因子- $\alpha$

**The effects of sinomenine on TNF-alpha expression in the synovial fluid and serum of rabbits with experimentally induced osteoarthritis** YANG Hui-qing, CHEN Li-rong. Department of Rheumatology, Wuhan First Hospital, Wuhan 430022, China

**【Abstract】Objective** To investigate the influence of an intra-articular injection of sinomenine (SN) on the expression of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in synovial fluid and serum during osteoarthritis (OA). **Method** A rabbit model of degenerative osteoarthritis was created in the knee joint by applying a full extension plaster cast. The animals were randomly divided into a sinomenine group, a hyaluronic acid group, a model group and a blank control group. Six weeks after the model had been established, intra-articular injections of SN, hyaluronic acid, or normal saline were administered once a week for 5 weeks to the members of the sinomenine, hyaluronic acid and model groups. The blank control group received no treatment. The levels of TNF-alpha in the synovial fluid of the knee and in the serum were measured before and after treatment. **Result** TNF-alpha in synovial fluid and serum was significantly decreased in the sinomenine and hyaluronic acid groups compared with the model group. A significant difference in TNF-alpha expression in the synovial fluid and serum was found between the sinomenine group and hyaluronic acid group. **Conclusion** Sinomenine can inhibit expression of TNF-alpha in synovial fluid and serum during the early stage of traumatic OA, and it was more effective than hyaluronic acid.

**【Key words】** Osteoarthritis; Sinomenine; TNF- $\alpha$

骨性关节炎(osteoarthritis, OA)是一种以关节软骨退变和关节周围骨质增生为主要病理特征的慢性进行性骨关节疾病,是影响人类健康较常见的关节疾患之一。关节软骨退变是导致膝骨性关节炎最直接的原因之一,如何减轻关节软骨受损、并尽可能延缓软骨退变是目前临床 OA 研究的重点内容。相关研究发现,OA 患者软骨细胞能产生肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor-alpha, TNF- $\alpha$ ),在软骨破坏环节中具有重要作用<sup>[1]</sup>。近年来采用中药手段治疗 OA 取得了一系列重大进展,为 OA 患者治疗提供了新的途径。本研究通过观察膝关节腔内注射青藤碱对 OA 实验兔的治疗作

用,以及青藤碱对实验兔关节液及血清中 TNF- $\alpha$  表达水平的影响,从而探讨青藤碱治疗 OA 的可能机制。现报道如下。

## 材料与方法

### 一、实验动物

共选取健康 5~6 月龄日本大耳白兔 46 只,雄性,体重 2.2~2.6 kg(平均 2.5 kg),由湖北省实验动物研究中心提供。

### 二、主要实验仪器及药品

主要实验仪器:美国酶标仪(MK3 型)、法国台式离心机(B4 型)及上海电热恒温水箱等;主要实验药品:TNF- $\alpha$  酶联免疫检测试剂(购自上海西唐生物科

项目编号:武汉市科技攻关重点项目(武科技(2005)128 号)

作者单位:430022 武汉,武汉市第一医院风湿免疫科

技有限公司,批号:0510118),青藤碱注射剂(每支 25 mg/ml,由湖南正青集团公司生产,产品批号:050912032),施沛特(每支 10 mg/ml,由山东正大福瑞达制药公司生产,产品批号:051006031)。

### 三、关节制动模型的建立

参照 Videman 法<sup>[2]</sup>并加以改进,选用管型石膏伸直位制动法将 42 只实验兔左后肢腹股沟以下 1.5 cm 至踝关节下 3 cm(趾端)部位用石膏管型固定于伸直位,期间保持兔踝关节背屈 30~40°。造模结束后采用一笼一兔方式喂养,每日检查石膏固定情况并及时进行调整,分别于管形石膏固定 2,4,6 周时随机选取 2 只造模兔处死进行病理检查,观察造模情况。

### 四、分组及治疗方法

根据 Videman 法<sup>[2]</sup>判断标准,共有 36 只实验兔于管形石膏固定 6 周后发现膝 OA 造模成功。将上述造模成功实验兔随机分为青藤碱治疗组(青藤碱组)、透明质酸组及模型组,每组 12 只;另同时选取 4 只正常实验兔纳入空白对照组。

青藤碱组实验兔每周向膝关节腔内注射青藤碱 0.2 ml,透明质酸组及模型组均分别同期注射等量透明质酸和生理盐水,每周注射 1 次,连续注射 5 周,空白对照组实验兔期间不给予任何特殊处理。

### 五、检测指标及检测方法

所有实验兔分别于造模结束时及注射药物 5 周后各取膝关节液 0.2 ml、耳缘静脉血 0.5 ml,将静脉血分离血清后置于 -20℃ 冰箱内保存待检 TNF-α 水平。TNF-α 含量检测采用 ELISA 双抗体夹心法,检测步骤严格按照试剂盒说明书进行操作,采用酶标仪检测 450 nm 处的标本吸光度值(optical density, OD 值),并计算相应的 TNF-α 含量水平。

### 六、统计学分析

本研究所得数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 13.0 版统计学软件进行分析,选用方差分析进行组间比较, $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 结 果

### 一、各组实验兔药物注射前、后膝关节液中 TNF-α 检测结果比较

青藤碱组药物注射前、后膝关节液中 TNF-α 含量比较,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ );透明质酸组药物注射前、后膝关节液中 TNF-α 含量比较,差异亦有统计学意义( $P < 0.05$ );模型组及空白对照组药物注射前、后膝关节液中 TNF-α 含量均无明显改变( $P > 0.05$ );进一步分析发现,药物注射后青藤碱组膝关节液中 TNF-α 含量较透明质酸组明显降低,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示青藤碱与透明质酸均能下

调膝 OA 实验兔膝关节液中 TNF-α 含量,且以青藤碱对膝 OA 实验兔关节液中 TNF-α 的抑制作用更为显著,其抑制效应优于透明质酸。

表 1 各组实验兔药物注射前、后膝关节液中 TNF-α 含量水平比较( $\mu\text{g/ml}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组 别	只数	关节液中 TNF-α 含量	
		药物注射前	药物注射后
青藤碱组	12	23.37 ± 0.58 <sup>a</sup>	16.58 ± 0.26 <sup>abcd</sup>
透明质酸组	12	23.61 ± 0.18 <sup>a</sup>	19.61 ± 0.19 <sup>abd</sup>
模型组	12	24.12 ± 0.03 <sup>a</sup>	24.19 ± 0.98 <sup>a</sup>
空白对照组	4	11.28 ± 0.01	11.32 ± 0.06

注:与空白对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与治疗前比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与透明质酸组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>d</sup> $P < 0.05$

### 二、各组实验兔药物注射前、后血清中 TNF-α 检测结果比较

青藤碱组药物注射前、后血清中 TNF-α 含量比较,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ );透明质酸组药物注射前、后血清中 TNF-α 含量比较,差异亦有统计学意义( $P < 0.05$ );模型组及空白对照组药物注射前、后血清中 TNF-α 含量均无明显改变( $P > 0.05$ );进一步分析发现,药物注射后青藤碱组血清中 TNF-α 含量较透明质酸组明显降低,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示青藤碱与透明质酸均能下调膝 OA 实验兔血清中 TNF-α 含量,且以青藤碱对膝 OA 实验兔血清中 TNF-α 表达的抑制作用更为显著,其抑制效应优于透明质酸。

表 2 各组实验兔药物注射前、后血清中 TNF-α 含量水平比较( $\mu\text{g/ml}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组 别	只数	血清中 TNF-α 含量	
		药物注射前	药物注射后
青藤碱组	12	15.51 ± 0.20 <sup>a</sup>	11.62 ± 0.17 <sup>abcd</sup>
透明质酸组	12	15.58 ± 0.16 <sup>a</sup>	13.48 ± 0.11 <sup>abd</sup>
模型组	12	15.57 ± 0.02 <sup>a</sup>	15.62 ± 0.19 <sup>a</sup>
空白对照组	4	9.38 ± 0.01	9.44 ± 0.10 <sup>a</sup>

注:与空白对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与治疗前比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与透明质酸组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>d</sup> $P < 0.05$

## 讨 论

OA 主要病变包括关节软骨丢失、软骨下骨重建和骨赘形成等,同时伴有软骨修复、重建以及软骨下骨硬化,有时还可形成软骨下囊性变及关节周缘骨赘形成等。目前细胞因子在骨性关节炎发病过程中的作用已受到高度重视,软骨基质的完整性是由分解类与合成类细胞因子所介导的相关反应来维持,分解类细胞因子能诱导具有降解基质功能的基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)产生,合成类细胞因子则能诱导 II 型胶原、蛋白多糖和基质大分子合成<sup>[8]</sup>;其中 TNF-α 在 OA 发病过程中具有重要作用;相

关研究证实,OA 患者关节液中白细胞介素-1 (interleukin-1, IL-1)、TNF- $\alpha$  等细胞因子水平明显升高<sup>[3]</sup>。TNF- $\alpha$  可促进前列腺素 E (prostaglandin E, PGE) 产生,并且可诱导软骨细胞产生过氧化反应,与 IL-1 共同促进软骨吸收,从而导致 OA 软骨破坏。有研究对 OA 动物模型软骨组织进行免疫组化染色,发现其基质及细胞中 TNF- $\alpha$  和受体均呈现阳性反应,且强度、范围与 OA 严重程度呈正相关<sup>[4]</sup>。本实验采用管形石膏制动法进行膝 OA 造模,具有造模时间短、操作简单、可重复性强、动物死亡率低等优点,与药物注射和手术类膝 OA 模型比较,更接近人类膝 OA 患者自然发病过程。

青藤碱为青风藤的提取物,现代药理研究认为,青藤碱具有镇痛、抗炎、调节免疫功能等作用<sup>[5]</sup>。青藤碱对佐剂性关节炎大鼠原发性病变和继发性病变均具有显著治疗作用,且能抑制角叉菜胶所致大鼠足趾肿胀及琼脂肉芽肿形成,表明青藤碱对急、慢性炎症均有明显改善作用<sup>[6]</sup>。相关研究发现,青藤碱可下调单核/巨噬细胞核转录因子(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)活性,干预 NF- $\kappa$ B 信号传导通路中的某些环节,抑制细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 IL-10 mRNA 的表达及合成,从而发挥抗炎效应<sup>[7]</sup>。本研究结果再次证实了 TNF- $\alpha$  在 OA 发病过程中具有重要作用,同时发现向膝 OA 实验兔模型膝关节腔内注射青藤碱后,其关节腔滑液及血清中 TNF- $\alpha$  含量均明显降低,表明青藤碱可减轻关节炎性反应,能在一定程度上抑制 TNF- $\alpha$  表达,其抗炎功效显著优于透明质酸,推测青藤碱可能是通过

减少 TNF- $\alpha$  分泌,从而延缓及减轻软骨老化,并对膝 OA 发挥治疗作用,其确切的药理作用机制还有待进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] Melchiorri C, Melicon R, Frizziero L, et al. Enhanced and coordinated in vivo expression of inflammatory cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 1998, 41: 2165-2174.

[2] Videman T. Experimental osteoarthritis in the rabbit: comparison of different periods of repeated immobilization. *Acta Orthop Scand*, 1982, 53: 339-347.

[3] Kobayashi M, Squire GR, Mousa A, et al. Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum*, 2005, 52: 128-135.

[4] Ncidel J, Sihulze M, Sova L, et al. Practical significance of cytokine determination in joint fluid in patients with arthrosis or rheumatoid arthritis. *Z Orthop Ihre Grenaged*, 1996, 134: 381-385.

[5] 王岩. 青风藤的研究进展. *中药材*, 2002, 9: 211.

[6] 罗烈, 杨剑, 宋金春, 等. 苯甲酰青藤碱的镇痛抗炎作用. *中国医院药学杂志*, 2005, 25: 196-198.

[7] 王勇, 方勇飞, 周新, 等. 青藤碱对佐剂性关节炎大鼠腹腔巨噬细胞表达细胞因子的影响. *中中华风湿病杂志*, 2003, 7: 415-418.

[8] Caron JP, Fernandes JC, Martel P, et al. Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis: suppression of collagenase-1 expression. *Arthritis Rheum*, 1996, 39: 1535-1544.

(收稿日期: 2008-04-20)  
(本文编辑: 易 浩)

· 短篇论著 ·

上肢断肢再植的康复治疗

王志红 胡靳乐 常利 曹建业

我国断肢再植成功率为 90% ~ 95%, 但优良率仅 50% ~ 70% 或更低<sup>[1]</sup>。断肢再植不是简单地追求再植的成功,而是要以恢复其功能为目的<sup>[2]</sup>。自 2000 至 2005 年,我科收治上肢离断伤再植患者 9 例,经综合康复治疗,取得了较好效果。现报道如下。

一、资料与方法

(一) 临床资料

入选者为上肢完全离断伤在我院行断肢再植后转入我科行康复治疗的 9 例患者,均为男性,年龄 18 岁 ~ 37 岁,不合并臂丛神经牵拉伤。离断部位:上臂 2 例,前臂 7 例。致伤原因:

锐性剪切伤 4 例,钝性挤压伤 4 例,旋转撕脱伤 1 例。内固定选择:1 例前臂离断伤使用 2 枚克氏针固定尺桡骨,其余 8 例均采用钢板固定。所有患者均行急诊清创,根据具体情况适当缩短骨干内固定,血管、神经、肌腱或肌肉一期修复,术后用石膏托或支具保护。伤口愈合情况:7 例患者创口甲级愈合;1 例创口感染,换药后肉芽组织新鲜,行游离植皮后创面愈合;1 例因组织坏死钢板外露,行皮瓣转移术。所有患者创口愈合后转入我科,康复介入时间最早为术后 16 d,最晚为术后 63 d,进科时患者再植肢体存活,肢体远端血运良好。

(二) 康复治疗方法

1. 手法治疗:患者入住我科时间最早为术后 16 d,此时吻合的肌肉和肌腱已有部分连接。对于上臂离断伤再植患者行肩、腕、指关节被动活动,以保持关节活动度;对于前臂离断伤

作者单位:050000 石家庄,河北医科大学附属第三医院康复科(王志红、常利、曹建业);长江水利委员会长江医院康复科(胡靳乐)