

欧梁,卢敏,张永辉,等. 基于“虚、瘀、毒”病机理论的膝痹病病证结合模型的建立及评价 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 590–597.

Ou L, Lu M, Zhang YH, et al. Establishment and evaluation of a combination of disease and syndrome model of knee osteoarthritis based on the pathogenesis theory of “Deficiency, Stasis, and Toxicity” [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 590–597.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.05.005

基于“虚、瘀、毒”病机理论的膝痹病病证结合模型的建立及评价

欧梁¹, 卢敏², 张永辉³, 邝高艳², 谭旭仪¹, 匡建军^{1*}

(1. 湖南省中医药研究院, 长沙 410006; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007; 3. 漯河市中心医院, 河南 漯河 462000)

【摘要】 目的 基于膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)“虚、瘀、毒”病机理论,探讨 KOA 病证结合模型的建模方法。方法 将 24 只新西兰大白兔随机分为正常对照(SHAM)组、KOA 模型(MODEL)组、KOA 病症结合模型(TCM + MODEL)组,每组 8 只。SHAM 组正常喂养;MODEL 组采用石膏固定法建立 KOA 模型;TCM + MODEL 组在石膏固定法的基础上,联合氢化可的松灌胃和中医病因因素(风、寒、湿)干预。造模 6 周后,对各组动物进行综合评价,包括中医证候及体征评分、膝关节影像学、关节面大体观察、番红 O-固绿染色、血液及关节液 IL-6 和 TNF- α 表达水平、血液流变学、血清皮质醇(CORT)、睾酮(T)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)表达水平。结果 TCM + MODEL 组兔在中医证候及体征评分、影像学评分、大体观察评分、Mankin 评分、关节液中 IL-6、TNF- α 表达水平、血液流变学指标中的血浆黏度(PV)和红细胞聚集指数(RCAI)、血清 MDA 方面,均明显高于 SHAM 组和 MODEL 组($P < 0.05$);与 MODEL 组比较,TCM + MODEL 组血清 CORT、T、SOD 明显降低($P < 0.05$),而血清 IL-6、TNF- α 含量无明显差异($P > 0.05$)。结论 采用石膏固定法,再结合以氢化可的松灌胃的肾虚证造模方式和中医风、寒、湿病因干预,可复制出具有“虚、瘀、毒”病机特点的 KOA 病证结合模型,为进一步开展中医药对膝痹病的辨证论治研究提供实验基础。

【关键词】 骨关节炎;虚;瘀;毒;病证结合

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 05-0590-08

Establishment and evaluation of a combination of disease and syndrome model of knee osteoarthritis based on the pathogenesis theory of “Deficiency, Stasis, and Toxicity”

OU Liang¹, LU Min², ZHANG Yonghui³, KUANG Gaoyan², TAN Xuyi¹, KUANG Jianjun^{1*}

(1. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, China. 2. the First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007. 3. Luohe Central Hospital, Luohe 462000)

Corresponding author: KUANG Jianjun. E-mail: 13786165656@163.com

【Abstract】 **Objective** To explore a modeling method of the combination of disease and syndrome of knee osteoarthritis KOA based on the pathogenesis theory of “Deficiency, Stasis and Toxicity” in (KOA). **Methods** Overall, 24 New Zealand white rabbits were randomly divided into a SHAM group ($n = 8$), MODEL group ($n = 8$), and TCM +

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81874476, 82174414), 贵州省科技厅基础研究项目(黔科合基础-ZK[2022]一般 479)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (81874476, 82174414), Project of Guizhou Science and Technology Department (ZK [2022] general 479).

【作者简介】 欧梁(1989—), 男, 副主任医师, 博士, 研究方向: 中医药防治骨关节病。Email: ouliang2020@163.com

【通信作者】 匡建军(1973—), 男, 研究员, 博士, 研究方向: 中医药防治骨关节病。Email: 13786165656@163.com

MODEL group ($n = 8$). The SHAM group was fed normally. The MODEL group was established by plaster fixation. In the TCM + MODEL group, we hydrocortisone gavage and TCM etiological factors (wind, cold, and wet) were combined based on plaster fixation. After 6 weeks of modeling, each group was comprehensively evaluated, including the TCM syndrome and sign score, knee imaging, articular surface gross observation, Saffron O-solid green staining, blood and articular fluid IL-6 and TNF- α levels, hemorheology, and serum CORT, T, SOD, and MDA levels. **Results** The TCM symptom and sign score, imaging score, gross observation score, Mankin score, levels of IL-6 and TNF- α in joint fluid, hemorheology indexes (PV and RCAI), and serum MDA in the TCM + MODEL group were significantly higher than those in SHAM and MODEL groups ($P < 0.05$). Compared with the MODEL group, serum CORT, T, and SOD were significantly decreased in the TCM + MODEL group ($P < 0.05$), while serum IL-6 and TNF- α were not significantly different ($P > 0.05$). **Conclusions** By plaster fixation combined with the model of kidney deficiency syndrome gavage with hydrocortisone and etiological treatment with traditional Chinese medicine, including wind, cold, and wet, we reproduced the combination of disease and syndrome model of KOA with the characteristics of “Deficiency, Stasis and Toxicity”, which provides an experimental basis for further research on syndrome differentiation and treatment of KOA by traditional Chinese medicine.

【Keywords】 osteoarthritis; Deficiency; Stasis; Toxicity; combination of disease and syndrome

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是以关节软骨和软骨下骨的变性、破坏、增生和滑膜炎为特征的慢性关节疾病,是临床上最常见的关节炎形式和致残原因^[1]。KOA 属中医“痹证”范畴,针对其复杂的病机,课题组概述了 KOA“虚、瘀、毒”的病机特点,并以“虚、瘀、毒”理论论治本病^[2-6]。“虚”即因脾、肝、肾脏腑虚损,致关节筋骨、肌肉失养,髓枯骨痿,发为本病,即“因虚致痹”;“瘀”即气血亏虚,瘀血内生,即“因瘀致痹”;“毒”即因风、寒、湿等外毒侵袭,以及因机体正气不足,内毒即生,内外之邪毒,痹着筋骨,即“因毒致痹”。其中,“虚”为发病根本,并贯穿疾病始终,“瘀、毒”为致病之标,导致疾病进展,三者可相互影响。

动物模型是深入开展 KOA 病因病机、药物防治等相关研究不可或缺的工具。目前用于研究中药治疗 KOA 的动物模型大多是单一的病理生理模型,而模拟中医证候的病证结合模型报道较少。因此,本研究在“虚、瘀、毒”病机理论的指导下,采用复合造模方法,即石膏固定法,结合氢化可的松灌胃及中医病因因素干预,诱导出具有“虚、瘀、毒”病机特点的膝痹病病证结合模型,并对模型进行综合评价,使模型符合人类自然发生的 KOA 病变特点及兼具中医证候特征,为进一步进行 KOA 的中医证候研究及辨证施治提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

24 只 3 月龄普通级雌性新西兰大白兔,体重

2.5 ~ 3.0 kg,购于湖南太平生物科技有限公司【SCXK(湘)2020-0005】。单笼喂养,室内温度 22 ~ 26℃,相对湿度 45% ~ 60%,饲养于湖南中医药大学动物实验中心【SYXK(湘)2019-0009】。该研究方案经湖南中医药大学动物实验伦理委员会监管和批准实施(202006190001)。

1.1.2 主要试剂与仪器

IL-6 ELISA 试剂盒(森贝伽, SBJ-T0196), TNF- α ELISA 试剂盒(森贝伽, SBJ-T0289), 皮质酮(CORT)试剂盒(三抒, MZ095945), 睾酮(T)试剂盒(三抒, MZ095981), 超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(百奥莱博, SK046-2), 丙二醛(MDA)试剂盒(联迈, LM-OX8006), 台式高速冷冻离心机(湘立, 长沙), 全自动震动切片机(LEICA, 德国), 全自动自清洗血流变仪(普利生, 北京), 倒置相差显微镜(Olympus, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及实验干预

24 只新西兰大白兔按随机数字表法分为 3 组:正常对照(SHAM)组、KOA 模型(MODEL)组、KOA 病症结合模型(TCM + MODEL)组,每组 8 只,适应性喂养 1 周后开始造模处理。SHAM 组:正常喂养。MODEL 组:采取石膏固定法复制模型^[7]:截取高分子夹板适量长度,约从兔腹股沟下 1 cm 至踝关节上 1 cm 处,用石膏从前向后将兔右后肢包裹,松紧宜适度,并固定膝关节于 0°伸直位,待石膏变硬后将兔放回笼中,观察固定后 30 min 内兔脚掌有无肿胀、瘀紫等症状,若有,则立即拆掉石膏待消肿后重新固定,最后,用细铁丝在大腿近段和踝关节处的

石膏外进行捆扎,以防止石膏被啃脱落。每日检查石膏固定情况,连续观察 6 周。TCM + MODEL 组:在 MODEL 组处理方法的基础上,再复合氢化可的松灌胃和中医风、寒、湿病因干预。先根据《中药药理研究方法学》中肾阳虚的造模方法,并参考戴冰等^[8]的研究结果,采用长期大剂量的糖皮质激素灌胃,致使兔出现“肾阳虚损”的表现。具体方法:在伸直石膏固定 1 周后,以氢化可的松 10 mg/kg,每天 1 次,连续 10 d 灌胃。待氢化可的松灌胃结束后,再于第 2 天结合中医“风寒湿三邪杂至,合而为痹”的病因因素干预,即每日上午定时用喷雾瓶通过石膏间隙处向兔患侧膝关节喷 4℃ 冰水约 10 mL,

使局部皮毛微微湿润,再置于距离电风扇前约 10 cm 处吹干(1200 r/min,约 5 min),连续 25 d。以上整个造模周期为 6 周。

1.2.2 动物行为和体征观察

观察动物的精神状态、体重、大便、觅食、毛发、爪甲、舌象、唇周等情况。根据《中药新药临床指导原则(试行)》^[9]中肾虚证和血瘀证的中医症候诊断标准,并参考程志清等^[10]方法制定相应的动物症状及体征评分量表进行评估,见表 1,其中,评分中精神状态、毛发、爪甲、舌象、唇周至少 2 分,缩肩拱背至少 1 分,方可认为模型具有“虚、瘀、毒”的中医证候特点。

表 1 动物行为和体征评分量表

Table 1 Animal behavior and physical rating scale

项目 Items	评分准则 Scoring criterion			
	0 分 0 point	1 分 1 point	2 分 2 points	3 分 3 points
精神状态 Mental state	活泼好动 Lively and active	动作散漫、缺乏灵性 Lazy, slovenly, and lack of flexibility	倦怠乏力、反应不灵敏 Lethargy and unresponsive	精神萎靡、嗜睡 Energielos and somnolence
皮肤毛发 Skin and hair	皮肤紧密、毛发干净柔顺 Tight and the hair is clean and smooth	皮肤略松弛、毛发少光泽 Slightly loose and hair less luster	皮肤松弛明显 背部毛发干枯,无光泽 Loose and the hair on the back is dry and dull	皮下无脂肪、 毛发枯槁脱落 No fat under the skin, and the hair fallen off
体重 Body mass	均匀增长 Grow equally	无明显增长 No significant increased	不增反减 Shrinking, rather than growing	明显消瘦 Severe weight loss
觅食 Foraging	食量正常 Normal	食量减少 1/3 A third of the reduction in intake	食量减少 1/2 Reducing intake by half	不欲食 Don't want to eat
爪甲 Onyx	有光泽 Glossy	无光泽 Lackluster	瘀紫 Stasis purple	枯槁 Withered
大便 Excrement	大便干、成形 Dry and forming	大便粘软有形 Soft and shape	大便不成形 Unformed	大便稀溏 Sloppy
舌象 Tongue	正常 Normal	舌淡 Pale tongue	舌紫暗 Dark-purple tongue	瘀斑 Petechia
唇周 Lip	红润 Ruddy	色淡 Pale	暗红 Dull-red	瘀紫 Stasis purple
缩肩拱背 Arch shoulder and shrink back	无 None	有 Exist	颤抖明显 Shaking noticeably	

1.2.3 兔膝关节影像学检查

造模结束后,按体重给予 3% 戊巴比妥钠进行耳缘静脉麻醉后,仰卧于检查床,使用沙袋分别固定,伸直患肢,行膝关节正位数字 X 线摄影术(digital radiography, DR),观察膝关节影像学变化。摄片参数设置如下:42 kV, 250 mA, 32 ms 和 80 cm 胶片焦距。X 线结果使用 Kellgren-Lawrence(KL)分级量表进行评估^[11],评级标准如下:0 级:无改变(正常);I 级:轻微骨赘;II 级:明显骨赘,但未累及

关节间隙;III 级:关节间隙中度狭窄;IV 级:关节间隙明显变窄,软骨下骨硬化。

1.2.4 关节软骨大体观察

处死后,打开关节囊,充分显露关节腔,观察关节面大体情况,并依据 Pelletier 评分标准进行评估^[12]。评分标准:0 分:关节面光滑,色泽如常;1 分:关节面粗糙,有小的裂隙且色泽灰;2 分:关节面糜烂,软骨缺损深达软骨表层或中层;3 分:关节面溃疡形成,缺损深达软骨深层;4 分:软骨下骨暴露。

1.2.5 关节软骨病理学观察

将兔关节软骨置于 10% 甲醛溶液中固定,脱钙,石蜡包埋,切片,番红 O-固绿染色后,光镜下观察,并参考改良 Mankin 病理评分进行评定^[13]。评分标准如下:(1)软骨结构:光整如常、表面出现不规则裂隙、裂隙深达移行层、裂隙深达辐射层、裂隙深达钙化层、软骨层脱落依次计 0、1、2、3、4、5 分;(2)软骨细胞:数量如常、数量弥散性增多、出现大量簇集样细胞团、数量明显减少依次计 0、1、2、3 分;(3)基质染色:染色正常、染色轻度减退、染色中度减退、染色重度减退、染色完全消失依次计 0、1、2、3、4 分;(4)潮线完整:潮线完整、多重潮线、软骨下血管侵入潮线依次计 0、1、2 分。

1.2.6 血清及关节液 IL-6 和 TNF- α 测定

采用双抗体两步夹心酶联免疫吸附法(ELISA)进行检测,按照说明书操作。

1.2.7 血清 CORT、T 检测

采用放射免疫分析法测定血清中皮质酮(CORT)、睾酮(T)的含量,按说明书操作。

1.2.8 血液流变学检测

经心脏采血 5 mL,置于肝素管中,摇匀,置于全自动自清洗血液流变仪中检测,检测项目包括以下 3 项:血浆黏度(plasma viscosity, PV)、全血低切黏度(whole blood low shear viscosity, WBLSV)和红细胞聚集指数(red cell assembling index, RCAI)。

1.2.9 血清 SOD、MDA 检测

采用分光光度法测定血清超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)的含量,按照说明书操作。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 22.0 软件进行数据分析。计量资料采用平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,若满足正态性和方差齐性检验,多组比较采用单因素方差分析,具有统计学意义则用 LSD-*t* 法进行多重比较;否则采用非参数检验;以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 动物行为及体征评分比较

SHAM 组兔精神良好,反应灵敏,毛发致密,干净有光泽,爪甲、唇色明亮润泽。MODEL 组兔在精神稍差,缺乏灵性,体型适中,背部毛发有光泽,爪甲、唇色均暗红。TCM + MODEL 组兔在给予氢化可的松后,逐渐出现精神倦怠、缩肩拱背、怕冷等症

状,随之体型消瘦,毛发蓬乱无光泽,易脱落,后期出现不同程度的舌质瘀紫,爪甲枯槁等症状,见图 1。造模结束后,MODEL 组和 MODEL + TCM 组的症状及体征评分明显高于 SHAM 组和 MODEL 组($P < 0.05$),见表 2。说明通过多因素(制动 + 药物 + 风、寒、湿环境因素)复合方法造模后,实验兔出现了“虚、瘀、毒”证候特点的表现。



图 1 各组兔一般状态

Figure 1 General state of rabbits in each group

2.2 兔膝关节 DR 片观察

造模 6 周后,SHAM 组兔 X 线显示膝关节间隙均匀,关节面平整。MODEL 组关节间隙稍有变窄,明显骨赘形成。TCM + MODEL 组关节间隙明显变窄,关节面硬化,大量骨赘形成,见图 2A。KL 评分结果显示,与 SHAM 组比较,两模型组关节影像学退变明显加重($P < 0.05$),且 TCM + MODEL 组比 MODEL 组更严重,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

2.3 关节面大体观察

SHAM 组关节面光整,色泽如常,呈淡蓝色。MODEL 组关节面无光泽,呈淡白色,部分软骨部分糜烂。TCM + MODEL 组软骨呈浅黄色,色泽枯槁,关节软骨破坏明显,大量骨赘增生,见图 2B。Pelletier 评分结果显示,与 SHAM 组比较,两模型组评分显著增高($P < 0.05$),且 TCM + MODEL 组明显高于 MODEL 组($P < 0.05$),见表 2。

2.4 关节软骨组织病理学观察

SHAM 组软骨表面平整,基质着色均匀,软骨细胞数量正常,排列整齐,结构层次清晰。MODEL 组软骨厚度较薄,表面存在不规则裂隙,基质染色稍减退,细胞数量弥漫性增多,深层软骨细胞排列不整齐。TCM + MODEL 组软骨层变薄,细胞外基质着色不均,部分区域软骨全层缺失,细胞形态排列紊乱,见图 3。Mankin 评分结果显示,与 SHAM 组比较,两模型组的 Mankin 评分明显升高($P < 0.05$),且 TCM + MODEL 组高于 MODEL 组($P < 0.05$),见表 2。提示多因素复合造模方法会加重关节软骨病理破坏程度。

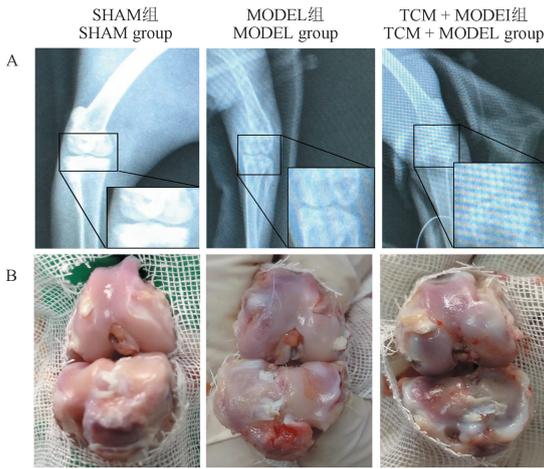


图2 造模后兔膝关节 DR 片和大体观察结果

Figure 2 DR and gross observation results of rabbits' knee after model establishment

2.5 血清及关节液 IL-6、TNF- α 含量

与 SHAM 组比较,两模型组血清和关节液 IL-6、TNF- α 含量升高 ($P < 0.05$);与 MODEL 组比较,TCM + MODEL 组关节液 IL-6、TNF- α 含量明显升高

($P < 0.05$),而血清 IL-6、TNF- α 含量无明显差异 ($P > 0.05$),见表 3。提示多因素复合造模方法可加重关节内炎症反应。

2.6 血清 CORT、T 含量

与 SHAM 组比较,MODEL 组血清 CORT、T 含量无明显差异 ($P > 0.05$),TCM + MODEL 组血清 ACTH、T 含量明显降低 ($P < 0.05$),见表 4。提示多因素复合造模方法可引起反映“肾虚”物质基础的细胞因子含量下降。

2.7 血液流变学指标

与 SHAM 组和 MODEL 组比较,TCM + MODEL 组 PV、RCAI 均明显升高 ($P < 0.05$),见表 4。提示通过复合多因素复合方法造模后,实验动物出现血瘀证的病理改变。

2.8 血清 SOD、MDA 含量

与 SHAM 组和 MODEL 组比较,TCM + MODEL 组血清 SOD 降低 ($P < 0.05$),血清 MDA 增加 ($P < 0.05$),见表 4。提示多因素复合造模方法可引起氧化应激反应产物增加。

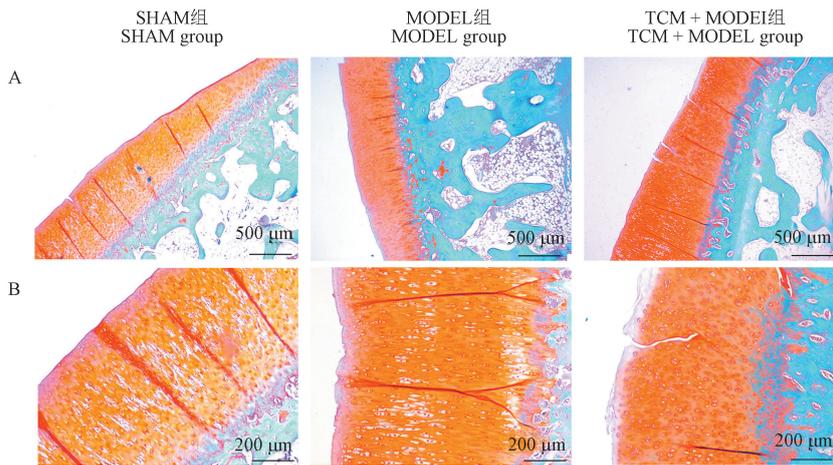


图3 HE 染色观察各组兔关节软骨病理变化

Figure 3 Pathological changes of the articular cartilage in rabbit in each group observed hematoxylin-eosin staining

表2 各组兔中医证候、KL、Pelletier 和 Mankin 评分($\bar{x} \pm s$,分, $n = 8$)

Table 2 TCM syndrome score, KL, Pelletier, and Mankin score in different groups of rabbits ($\bar{x} \pm s$, score, $n = 8$)

组别 Groups	中医证候评分 TCM syndrome score	KL 分级 KL grade	Pelletier 评分 Pelletier score	Mankin 评分 Mankin score
SHAM 组 SHAM group	1.25 \pm 0.71	0.87 \pm 0.46	1.00 \pm 0.38	1.75 \pm 0.70
MODEL 组 MODEL group	7.88 \pm 0.99 *	2.00 \pm 0.75 *	2.00 \pm 0.75 *	6.50 \pm 0.75 *
TCM + MODEL 组 TCM + MODEL group	15.63 \pm 1.41 **	3.00 \pm 0.75 **	3.25 \pm 0.71 **	9.13 \pm 0.83 **

注:TCM:中医药;KL:Kellgren-Lawrence;与 SHAM 组比较, * $P < 0.05$;与 MODEL 组比较, # $P < 0.05$ 。(下表同)

Note. TCM. Traditional Chinese medicine. KL. Kellgren-Lawrence. Compared with the SHAM group, * $P < 0.05$. Compared with the MODEL group, # $P < 0.05$. (The same in the following tables)

表 3 各组兔血清及关节液 IL-6、TNF-α 含量($\bar{x} \pm s$, pg/mL, n = 8)

Table 3 IL-6 and TNF-α in serum and synovial fluid in different groups of rabbits($\bar{x} \pm s$, pg/mL, n = 8)

组别 Groups	血清 Serum		关节液 Synovial fluid	
	IL-6	TNF-α	IL-6	TNF-α
SHAM 组 SHAM group	68.82 ± 5.15	25.92 ± 2.39	65.19 ± 3.69	26.35 ± 3.16
MODEL 组 MODEL group	87.38 ± 4.36*	47.50 ± 4.04*	87.92 ± 3.04*	47.79 ± 3.98*
TCM + MODEL 组 TCM + MODEL group	89.38 ± 5.23*	49.13 ± 4.40*	93.03 ± 3.44*#	52.80 ± 6.43*#

表 4 各组兔血清中 CORT、T、PV、WBLSV、RCAI、SOD、MDA 含量($\bar{x} \pm s$, n = 8)

Table 4 CORT, T, PV, WBLSV, RCAI, SOD and MDA in serum in different groups of rabbits($\bar{x} \pm s$, n = 8)

组别 Groups	CORT(μg/dl)	T(μg/L)	PV(mPa.s)	WBLSV(mPa.S)	RCAI(%)	SOD(ng/mL)	MDA(ng/mL)
SHAM 组 SHAM group	53.40 ± 7.66	7.40 ± 2.55	1.48 ± 0.24	17.37 ± 1.16	4.84 ± 0.42	16.18 ± 0.53	2.72 ± 0.62
MODEL 组 MODEL group	48.85 ± 11.08	6.73 ± 2.42	1.78 ± 0.45*	22.09 ± 1.26*	7.11 ± 0.43*	14.90 ± 0.55*	13.69 ± 1.19*
TCM + MODEL 组 TCM + MODEL group	9.19 ± 6.13*#	2.53 ± 1.61*#	1.93 ± 0.47*#	22.35 ± 1.18*	7.87 ± 0.52*#	10.75 ± 0.97*#	19.56 ± 1.88*#

注:T:睾酮;PV:血浆黏度;WBLSV:全血低切黏度;RCAI:红细胞聚集指数;SOD:超氧化物歧化酶;MDA:丙二醛。

Note. T. Testosterone. PV. Plasma viscosity. WBLSV. Whole blood low shear viscosity. RCAI. Red cell assembling index. SOD. Superoxide dismutase. MDA. Malondialdehyde.

3 讨论

传统及现代中医临床研究已表明,肾虚血瘀是 KOA 的基本病机^[14]。《张氏医通》谓:“膝痛无不有因肝肾虚者,虚则风寒湿气袭之”,《医林改错》中明确提出了“痹有瘀血”,提示痹症日久,可致使脉络瘀阻。导师在多年临证及研习中医理论的基础上,认为 KOA 错综复杂的病机除了“虚”和“瘀”两个根本点之外,“毒”也占据着较为重要的位置,尤其是在疾病的进展阶段。“毒”既是一种致病因素,又是一种病理产物,起着致病的始动与导致复发加重的双重作用。中医“毒”的含义极其广泛,如《金匱要略心典》曰:“毒,邪气蕴结不解之谓”,刘完素谓:“邪盛谓之毒”等。具体到膝骨关节炎之“毒”的认识,笔者主要从以下 4 个方面进行思考:其一是致病之外邪为毒,众所周知,风寒湿邪的侵袭是 KOA 发病及病情加重的重要刺激因素,当风寒湿邪过于亢盛且蕴结难解之时便已升级成了风毒、寒毒、湿毒、甚至转化成热毒等;其二是内生之病理产物为毒, KOA 患者因肝肾亏虚和气血运行失常,代谢产物未能及时、有效排出,郁积而成病理产物,对机体造成损害,如瘀血痹阻日久则成瘀毒,痰湿凝滞日久则成痰毒;其三是代谢异常之细胞因子也为毒,如 IL-6、TNF-α、SOD、MDA 等,这些因子可介导多种分子机制加重关节软骨的退变,促进 KOA 的病理进程,

在此过程中已转化成致病因子,可视为“毒”;其四是临床上 KOA 患者多见关节肿胀、积液甚多、关节灼热之“毒”的表现。综上所述,从“虚、瘀、毒”论治 KOA 具有切实可行的理论根据。

病证结合动物模型结合了现代医学“病”和中医“证”的优势,是当前应用较广泛的中医药科研动物模型^[15-16]。目前, KOA 病证结合动物模型的构建模式主要有以下 3 种^[17]:其一,西医“病”模型在宏观体征中体现了中医证候特点,如摆雪等^[7]利用石膏固定法建立的膝痹病兔模型,由于关节制动致使血流瘀滞,具备血瘀证的特征。其二,西医“病”模型复合中医“证”模式,即在西医疾病模型基础上,如刘振峰等^[18]先利用卵巢去势法建立肾虚模型,8 周后再同时分别复加肾上腺皮质激素和肾上腺素法建立血瘀模型、及 Hulth 法建立膝骨关节炎模型,通过上述“1 + 1 + 1”的方法复合而成的模型既有中医肾虚证及血瘀证的证候特点,又有 KOA 的病理变化。其三,自然形成的中医“证”模型再复合西医“病”模式,如在老年动物的身上,利用其身衰老而表现出来的肾虚症候,再进行西医疾病模型干预^[19]。以上 3 种模式不同之处主要是受研究者思维方式的影响,都具有一定借鉴意义。

本研究采用石膏固定法,结合氢化可的松灌胃与中医风、寒、湿病因多因素复合方式建立兔 KOA 病证结合模型,并以肾虚血瘀证的表征为基础,结

合影像学、大体观察、病理切片、血瘀流变学、细胞因子检测等多种方法对模型进行评判。首先,与空白组比较,两模型组反应 KOA“病模型”的相关指标,如影像学、大体观察、HE 染色、血清及关节液中 IL-6 和 TNF- α 等,均有统计学意义,且复合模型组的退变程度较单纯的石膏固定更严重,说明“虚、瘀、毒”等因素加重了关节的退变。同时,造模过程中观察到复合模型组动物出现明显的精神萎靡,毛发稀疏、脱落明显,爪甲、口唇、舌质瘀紫等症状,符合肾虚血瘀证的证候表现。此外,在复合模型组中,反应肾虚证物质基础的下丘脑-垂体-靶腺轴的功能出现紊乱,如血清中 CORT、T 等激素的含量降低^[8],反应血瘀证病理学改变的血液流变学指标升高,提示血液处于高黏、高聚的状态^[20],反应代谢异常的细胞毒性因子如 SOD 含量降低,MDA 含量升高^[21]。

在本研究中,石膏固定法和大剂量的糖皮质激素灌胃都为西医病理学造模因素,前者是目前公认较好的 KOA 疾病建模方法^[22],后者是经大量研究证实的可靠的肾阳虚造模方法。同时,关节制动和环境干预属中医病因病机造模因素,关节长期制动致脉络运行不畅,脉络瘀滞,形成“瘀积”的病理基础,配合每日给予患侧膝关节周围喷洒 4℃ 冰水,再置于电风扇前吹干,此措施主要是模拟在痹症发病中具有重要作用的外感风寒湿邪。实际上,笔者所构建的病证结合模型涵盖了前面提及的 3 种建模方式。其一,西医“病”模型复合中医“证”模式,体现于在石膏固定法复制 KOA 模型基础上,再用大剂量糖皮质激素法建立肾虚证模型;其二,西医“病”模型本身在宏观体征中体现了中医“证”的特征,体现在血瘀证上,石膏固定法所诱导出来的 KOA 模型,在动物体征表现及血液流变学指标检测方面均符合血瘀证的评判标准,究其发生机制可能是关节长期制动、气机郁滞、血脉运行不畅所致,符合中医病因病机理论;其三,随着疾病的发展而形成的中医“证”模型,体现于模型中“毒”的理解,“毒”既是 KOA 发病过程中产生的病理产物,更是发病后机体存在的一种病理状态。基于上述建模思路所建立的病证结合模型不仅具有 KOA“病”模型的核心病理变化,同时还表现出“虚、瘀、毒”等中医证候特征。因此,该复合造模方法不仅体现中医理论、证候特点,还具有操作相对简单,可靠性和稳定性较好等优点。

综上所述,在 KOA“虚、瘀、毒”病机理论的指导下,采用石膏固定法,再结合以氢化可的松灌胃的肾虚证造模方式和中医风、寒、湿病因干预,可复制出具有“虚、瘀、毒”病机特点的 KOA 病证结合模型,为课题组进一步开展中医药对膝痹病的辨证论治研究提供实验基础。

参 考 文 献(References)

- [1] Hunter DJ, March L, Chew M. Osteoarthritis in 2020 and beyond: a lancet commission [J]. *Lancet*, 2020, 396(10264): 1711-1712.
- [2] 邝高艳,严可,陈国茜,等.从“虚、瘀、毒”论治膝关节骨性关节炎的临床研究[J].*辽宁中医杂志*, 2017, 44(2): 334-336.
Kuang GY, Yan K, Chen GQ, et al. Treatment for knee osteoarthritis under theory of the deficiency, blood stasis and toxin [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2017, 44(2): 334-336.
- [3] 谭旭仪,邝高艳,卢敏.膝骨关节炎的“虚、瘀、毒”病机特点探析[J].*中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(24): 201-206.
Tan XY, Kuang GY, Lu M. Pathogenesis characteristics of “deficiency, stagnation and toxin” in knee osteoarthritis [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2018, 24(24): 201-206.
- [4] 邝高艳,谭旭仪,卢敏,等.基于虚、瘀、毒理论构建慢性筋骨疾病防治体系[J].*湖南中医药大学学报*, 2021, 41(2): 196-199.
Kuang GY, Tan XY, Lu M, et al. Construct the prevention and treatment system of chronic muscles and bones diseases based on the theory of deficiency, blood stasis and toxicity [J]. *J Hunan Univ Chin Med*, 2021, 41(2): 196-199.
- [5] 方仁杰,卢敏,段航.基于虚瘀毒理论探讨从脾论治膝骨关节炎[J].*中医药临床杂志*, 2020, 32(6): 1019-1022.
Fang RJ, Lu M, Duan H. Discussion on treating knee osteoarthritis from spleen based on theory of deficiency and stasis [J]. *Clin J Tradit Chin Med*, 2020, 32(6): 1019-1022.
- [6] 谭旭仪,邝高艳,卢敏.从“虚、瘀、毒”论治膝骨关节炎的研究进展[J].*中医药导报*, 2019, 25(19): 127-130.
Tan XY, Kuang GY, Lu M. Research progress in the treatment of knee osteoarthritis based on deficiency, stagnate and toxin [J]. *Guid J Tradit Chin Med Pharm*, 2019, 25(19): 127-130.
- [7] 摆雪,张洪平,刘俊昌,等.石膏铁丝固定法建立兔膝痹模型[J].*中国组织工程研究*, 2016, 20(18): 2603-2608.
Bai X, Zhang HP, Liu JC, et al. Establishing a rabbit model of knee paralysis by the knee fixation with plaster casts and wire [J]. *J Clin Rehabil Tissue Eng Res*, 2016, 20(18): 2603-2608.
- [8] 戴冰,张嘉妮,杨梦琳,等.氢化可的松致肾虚证小鼠模型的建立及相关指标的评价[J].*中国实验动物学报*, 2017, 25(1): 70-73.
Dai B, Zhang JN, Yang ML, et al. Establishment of a mouse model of kidney deficiency induced by oral administration of

- hydrocortisone and evaluation of related factors [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2017, 25(1): 70-73.
- [9] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则: 试行 [M]. 北京: 中国医药科技出版社; 2002.
- Zheng XY. Guidelines for clinical research of new Chinese medicines: trial implementation [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press; 2002.
- [10] 程志清, 吴玉芙, 唐烨霞, 等. SD 大鼠心气虚证动物模型的建立与评价 [J]. 实验动物科学与管理, 2003, 20(3): 1-6.
- Cheng ZQ, Wu YF, Tang YX, et al. Establishment and evaluation of the animal model of heart qi deficiency syndrome of SD rats [J]. Lab Anim Sci Mgt, 2003, 20(3): 1-6.
- [11] Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteoarthritis [J]. Ann Rheum Dis, 1957, 16(4): 494-502.
- [12] Pelletier JP, Jovanovic D, Fernandes JC, et al. Reduced progression of experimental osteoarthritis *in vivo* by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase [J]. Arthritis Rheum, 1998, 41(7): 1275-1286.
- [13] Sluijs JA, Geesink RG, Linden AJ, et al. The reliability of the Mankin score for osteoarthritis [J]. J Orthop Res, 1992, 10(1): 58-61.
- [14] 余伟杰, 刘爱峰, 陈继鑫, 等. 中医药治疗肾虚血瘀型膝骨关节炎研究进展 [J]. 天津中医药, 2022, 39(2): 266-272.
- Yu WJ, Liu AF, Chen JX, et al. Research progress of traditional Chinese medicine in treating knee osteoarthritis of kidney deficiency and blood stasis [J]. Tianjin J Tradit Chin Med, 2022, 39(2): 266-272.
- [15] 王瑾茜, 蔺晓源, 刘侃, 等. 冠心病气虚血瘀证病证结合大鼠模型的建立研究 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5): 602-609.
- Wang JX, Lin XY, Liu K, et al. Study on the establishment of a rat model of coronary heart disease with qi deficiency and blood stasis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(5): 602-609.
- [16] 张译心, 王鑫, 刘博, 等. 2 型糖尿病气阴两虚病证结合动物模型的制备及评价指标的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 219-229.
- Zhang YX, Wang X, Liu B, et al. Preparation of animal model of type 2 diabetes with Qi-Yin deficiency syndrome and establishment of evaluation index [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(2): 219-229.
- [17] 杨威, 郭斯印, 易志勇, 等. 膝关节关节炎证结合动物模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(3): 139-143.
- Yang W, Guo SY, Yi ZY, et al. Research progress on animal models of a combination of diseases and syndromes of knee osteoarthritis [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(3): 139-143.
- [18] 刘振峰, 方锐, 艾力江·阿斯拉, 等. 肾虚血瘀型膝骨性关节炎大鼠模型的建立 [J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(2): 270-274.
- Liu ZF, Fang R, Ailijiang ASL, et al. Establishment of a rat model of knee osteoarthritis with kidney deficiency and blood stagnation [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2013, 17(2): 270-274.
- [19] 何兴鹏, 郑利钦, 李鹏飞, 等. 两种肾虚证型去势模型大鼠骨小梁微观结构及骨代谢的差异 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(23): 3768-3772.
- He XP, Zheng LQ, Li PF, et al. Differences of trabecular microstructure and bone metabolism in two types of kidney-deficiency ovariectomized rats [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2022, 26(23): 3768-3772.
- [20] 李祥, 张悦, 张文智, 等. 气虚血瘀证动物模型的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(2): 228-234.
- Li X, Zhang Y, Zhang WZ, et al. Animal model of qi deficiency and blood stasis syndrome [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2020, 26(2): 228-234.
- [21] 朱静. 益肾通络解毒汤对气阴两虚兼毒瘀互结型糖尿病肾病疗效及氧化应激的影响 [J]. 实用中医内科杂志, 2020, 34(2): 39-42.
- Zhu J. Effect of yishen Tongluo Jiedu Decoction on clinical efficacy and oxidative stress of qi and Yin deficiency and toxic and malignant diabetic nephropathy [J]. J Practical Tradit Chin Inter Med, 2020, 34(2): 39-42.
- [22] 陈人智, 王明磊, 朱凯, 等. 管型石膏伸直位固定法对兔 KOA 模型膝关节 X 线及 MRI 检查改变的研究 [J]. 宁夏医科大学学报, 2019, 41(5): 446-449.
- Chen RZ, Wang ML, Zhu K, et al. X-ray and MRI changes of knee joint in rabbit KOA model by tubular plaster extension fixation [J]. J Ningxia Med Univ, 2019, 41(5): 446-449.

[收稿日期] 2022-11-29