

## “拔伸松动手法”对兔膝骨性关节炎电镜下软骨超微结构的影响\*

王春林<sup>1</sup>, 向 勇<sup>1</sup>, 田启东<sup>1</sup>, 胡 鸾<sup>1</sup>, 邵长丽<sup>2</sup>, 赵志勇<sup>1</sup>,  
董有康<sup>1</sup>, 刘金宸<sup>2</sup>, 张 吉<sup>2</sup>, 钟志上<sup>2</sup>

(1. 云南中医学院第一附属医院, 云南昆明 650021; 2. 云南中医学院针灸推拿康复学院, 云南昆明 650500)

**摘要:** **目的** 研究拔伸松动手法对兔膝骨性关节炎电镜下软骨超微结构的影响。**方法** 采用成年日本大白兔,按 Videman T 的造模方法制作兔膝骨性关节炎模型,随机分成拔伸松动手法组、注射透明质酸钠组、模型组及空白组,观察治疗后兔膝骨性关节炎电镜下软骨超微结构的改变。**结果** 与模型组比较,拔伸松动手法治疗有利于兔膝骨性关节炎损伤软骨细胞的修复,并可促进软骨表面结构的修复。**结论** 拔伸松动手法可促进兔膝骨性关节炎损伤软骨细胞和软骨表面结构的修复,是该法治疗膝骨性关节炎的客观依据。

**关键词:** 拔伸松动手法; 兔膝骨性关节炎; 电镜

**中图分类号:** R274 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2014)05-0006-03

膝骨性关节炎(KOA)是较为难治的一种慢性骨关节病,随着年龄的增长和全球人口老龄化的加剧,KOA 的发病亦呈上升趋势,严重影响中老年人的工作和生活。近年来国内外学者都非常重视对 KOA 的发病机理及防治研究,但目前对 KOA 的发病机理尚未研究清楚,公认的根本病因是关节软骨的退变,对于关节软骨退变的延缓和促进再生是治疗的关键。本课题通过电镜下观察拔伸松动手法治疗后兔膝骨性关节炎软骨组织超微结构的改变,研究拔伸松动手法治疗对兔膝骨性关节炎损伤软骨的影响,为该手法治疗膝骨性关节炎提供客观依据。

### 1 材料

#### 1.1 主要药物

透明质酸钠(山东正大福瑞达公司生产,国药准字 H10960136,批号:2011-03-16),规格 2mL:20mg。

#### 1.2 实验动物

健康成年白兔 46 只(含预实验 4 只、造模确认成功 2 只),由昆明医科大学实验动物中心提供,体质量 1.8~2.5kg,雌雄不限。

### 2 方法

#### 2.1 预实验

先选 4 只实验兔,按 Videman T 造模方法造模,6 周后随机分为 2 组,一组关节腔内注射透明质酸钠,一组实施手法治疗,连续治疗 3 周,观察治疗后兔的健康状态。

#### 2.2 正式实验

##### 2.2.1 制作动物模型

42 只兔雌雄不限,稳定饲养 7d。其中 32 只按 Videman T 的造模方法制作兔膝骨性关节炎模型,具体方法如下:①助手先将兔右后肢中立伸直位固定;②术者用剪刀将兔右后肢的兔毛尽量剪至皮肤暴露再将棉垫平铺其上;③石膏管型固定;④塑型后用绷带缠在石膏上面,松紧度适中;⑤最后在绷带外面缠上铁纱网,然后用小铁丝固定纱网。6 周后随机选取 2 只兔子处死,取关节软骨作光镜检查以观察造模情况,确定造模成功后解除其余 30 只模型动物外固定石膏。

##### 2.2.2 分组

将模型动物随机分 3 组,每组 10 只,即拔伸松动手法实验组、模型组、注射透明质酸钠。余下 10 只为空白组。

##### 2.2.2.1 拔伸松动手法组(8 只)

专人操作,手法、操作步骤及时间固定。

操作方法如下:①手法:按揉法、拔伸松动手法。

\* 基金项目:云南省自然科学基金(2009ZC152M)

收稿日期:2014-06-09

作者简介:王春林(1968-),男,主任医师,云南曲靖人,研究方向:脊柱推拿及膝骨性关节炎的防治。

②取穴：膝眼、血海、鹤顶、阳陵泉、阴陵泉、足三里、委中等。③操作：先按揉以上所取诸穴，20s/穴，再施于以下手法：①拔伸法施以患膝 10s 后放松；②徐徐拔伸患膝，在拔伸下分别以小鱼际固定于膝关节下缘之内侧和外侧，向对侧推按 5 次（外侧向内侧，内侧向外侧）；③五指提拿髌骨 10 次，顺时针和逆时针活动髌骨 5 次，再上下左右推动髌骨；④屈伸患膝关节 30 次；⑤拔伸患膝 10s，在拔伸过程中作膝关节小幅度内旋和外旋运动。手法治疗每天 1 次，治疗 10d 后休息 1d，共治疗 6 周。

#### 2.2.2.2 注射透明质酸钠组(8 只)

具体操作方法：①严格的无菌操作，以 2% 碘伏在兔膝关节外侧常规消毒；②注射部位，兔膝关节被动屈曲，选择膝关节外侧进针，进针点取髌韧带外侧缘关节空虚位置；③严格消毒后斜向关节内侧进针，注射量为： $0.15\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ；④注射后活动关节。每周注射 1 次，共治疗 6 周。

#### 2.2.2.3 模型组(8 只)

仅给饲料喂养 6 周。

#### 2.2.2.4 空白组(8 只)

仅给饲料喂养 6 周。

4 组经治疗和观察 6 周后，拔伸松动手法组与注射透明质酸钠组各有 2 只实验兔死亡，随机选取模型组与正常组各 8 只实验兔，32 只实验兔全部处死，提取软骨标本进行电镜检查。

### 2.3 软骨标本提取及电镜检查

①取耳缘静脉空气栓塞处死兔子；②切开皮肤，皮下组织，将髌骨切除，暴露膝关节；③然后切断十字交叉韧带；④用手术刀切取股骨内侧平台组织  $0.5\text{cm}\times 0.3\text{cm}\times 0.2\text{cm}$  骨块；⑤将切好的骨块放入 4% 多聚甲醛中固定 3d，用 EDTA 脱钙 4 周，流水冲洗 12h，常规脱水，石蜡包埋，切片为  $5\mu\text{m}$ ，常规 HE 染色。将取好的切片进行透视电镜和扫描电镜检查。

## 3 结果

### 3.1 透视电镜下

#### 3.1.1 拔伸松动手法组

软骨细胞大部分正常，细胞呈椭圆形或梭形，胞核完整，细胞核内异染质轻度边集，线粒体散在分布胞浆内(图 1)。

#### 3.1.2 空白组

软骨细胞呈卵圆形，细胞及胞膜完整，表面微绒毛较多，胞质内有丰富的粗面内质网高尔基体，线粒体较少细胞核完整，核内染色质分布均匀(图 2)。

#### 3.1.3 模型组

大部分软骨细胞明显肿胀且形态不规则，细胞周晕消失(代表细胞退变)，微绒毛断裂变短，粗面内质网明显扩张，网膜溶解断裂，胞浆内可见数个脂滴存在，细胞核形态不规则(图 3)。

#### 3.1.4 注射透明质酸钠组

软骨细胞大部分正常，基质致密，线粒体数量多(图 4)。

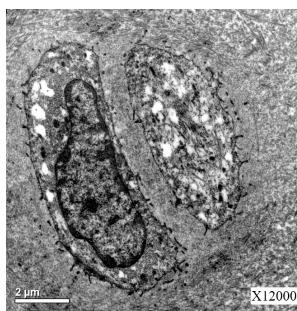


图 1 拔伸松动手法组

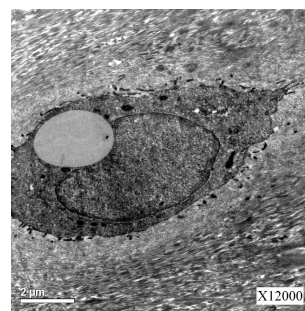


图 2 空白组

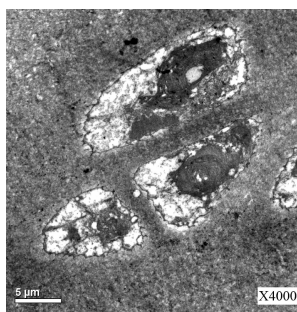


图 3 模型组

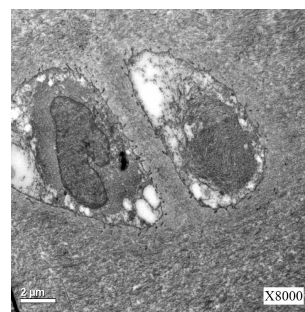


图 4 注射透明质酸钠组

### 3.2 扫描电镜下

#### 3.2.1 拔伸松动手法组

关节软骨表面呈波纹状，有沟峰交错结构，圆形突起多，局部有破坏(图 5)。

#### 3.2.2 空白组

关节软骨表面呈波纹状，有沟峰交错结构，圆形突起多(图 6)。

#### 3.2.3 模型组

圆形突起消失，并出现胶原纤维囊样变(图 7)。

#### 3.2.4 注射透明质酸钠组

软骨表面圆形突起增多，部分表面破损，暴露胶原纤维(图 8)。

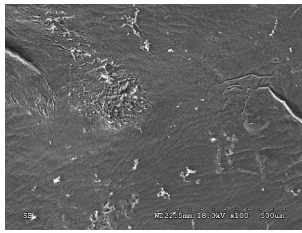


图5 拔伸松动手法组

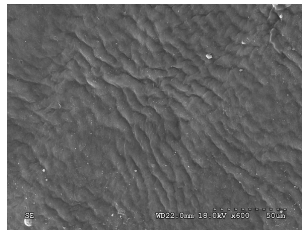


图6 空白组

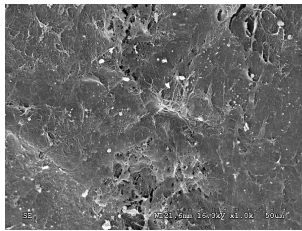


图7 模型组

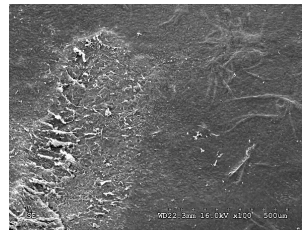


图8 注射透明质酸钠组

以上结果表明,拔伸松动手法有利于兔膝关节损伤软骨细胞的修复,并能促进软骨表面结构的修复。而注射透明质酸钠治疗组对兔膝关节损伤软骨细胞的修复和软骨表面结构的修复有一定的作用。

#### 4 讨论

膝骨性关节炎(KOA)是中老年较常见的疾病之一,其发病率比其它负重关节为高,随着年龄的增长和全球人口老龄化的加剧,KOA的发病亦呈上升趋势,严重影响中老年人的工作和生活。许多学者认为KOA的发病与NO、氧自由基代谢、炎症介质、细胞因子、骨内高压及自身免疫有关<sup>[1-3]</sup>,但公认的根本病因是关节软骨的退变,对于关节软骨退变的延缓和促进再生是治疗的关键。近年来发现细胞因子IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 是参与骨关节炎进程的重要介质,是炎症反应的重要调节剂,是调节炎症的始动因素,是骨关节炎病理过程中促进软骨基质降解和关节软骨破坏的两种最重要的细胞因子<sup>[4-5]</sup>。研究证实中医药治疗具有明显的消除炎症、改善微循环、减轻骨内静脉淤滞、降低骨内压力及关节内压力、延缓关节软骨的退变过程、促进损伤软骨修复的作用。课题组在临床观察中,通过拔伸松动手法治疗膝骨性关节炎30例,并与传统推拿手法治疗组30例对比,发现拔伸松动手法治疗在缓解膝关节疼痛、改善膝关节活动度方面优于传统推拿手法组<sup>[6]</sup>。课题组前期亦开展了实验研究,结果表明:拔伸松动手法能明显改善兔膝骨性关节炎的关节活动度,修复退变的软骨组织<sup>[7]</sup>。

课题组在同期的研究中发现:拔伸松动手法组兔膝关节骨性关节炎关节液中的IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 浓度与正常兔膝关节液中的浓度无显著差异,较模型组中兔膝关节液中的浓度低<sup>[8]</sup>。课题组通过透射电镜和扫描电镜对兔膝骨性关节炎损伤软骨超微结构检测表明,与模型组比较,拔伸松动手法组有利于兔膝关节损伤软骨细胞的修复,并能促进软骨表面结构的修复。其治疗机制可能是通过降低兔膝骨性关节炎关节液中的IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 浓度,达到抑制膝骨性关节炎软骨基质降解和关节软骨破坏,促进兔膝骨性关节炎损伤软骨细胞和软骨表面结构的修复。本课题研究表明:拔伸松动手法可促进兔膝骨性关节炎损伤软骨细胞和软骨表面结构的修复,是该法治疗膝骨性关节炎的客观依据,证实拔伸松动手法是治疗膝骨性关节炎的有效手法。

#### 参考文献:

- [1] 潘海东,曲波,王耶. 参麦注射液对骨关节炎动物模型血清中白细胞介素1水平的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2000,8(1):17-18.
- [2] 许学猛,刘文刚,方旭生,等. 兔退行性膝关节病与血清中NO、SOD、MDA相关性的实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2003,11(4):41-44.
- [3] 马建兵,沙浩渡,李向阳,等. 兔实验性膝关节病的组织病理学及发病机理[J]. 中国矫形外科杂志, 2001,8(1):45.
- [4] Solchaga LA, Dennis JE, Goldberg VM, et al. Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue engineered repair of bone and cartilage[J]. J Orthop Res, 1999,17(2):205-213.
- [5] Westacott CI, Sharif M. Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction [J]. Semin Arthri Rheum, 1996,25(4):254-272.
- [6] 王春林,赵永康,赵志勇,等. 拔伸松动手法治疗膝骨性关节炎的临床观察[J]. 按摩与康复医学, 2011,5(2):23-25.
- [7] 王春林,向勇,田启东,等. 拔伸松动手法治疗兔膝骨性关节炎的实验研究 [J]. 云南中医中药杂志, 2010,31(9):14-16.
- [8] 王春林,向勇,田启东,等. “拔伸松动手法”对膝骨性关节炎兔白细胞介素1 $\beta$ 和肿瘤坏死因子 $\alpha$ 的影响 [J]. 环球中医药杂志, 2014,7(2):85-87.

(编辑:杨阳)

(英文摘要见第12页)

## Effects of Shenmai Injection Zusanli Acupoint Injection on Rats SIRS Inflammatory Factor TNF- $\alpha$

LAN Fei, FU Tian-xiao, HUA Chen, ZHOU Jian, REN Da-wei, FU Yong-qing  
(Zhejiang Chinese Medical University, Zhejiang 310053, China)

**ABSTRACT:** **Objective** To observe the protective effects of Shenmai injection in Zusanli acupoint injection on rats systemic inflammatory response syndrome inflammatory factor TNF- $\alpha$ . **Methods** To establish a comprehensive model of systemic inflammatory response syndrome in rats. Forty SD rats were randomly divided into four groups ( $n=10$ ), including Vacuity-contrast group (VC group)、Acupuncture in Zusanli group (AZ group)、Shenmai injection in Zusanli acupoint injection group (SZ group) and Physiological saline Zusanli point injection group (PZ group). To observed the general condition of rats when modeling success after 1h. After 5D treatment the rats were sacrificed, collect samples, detection of blood(white blood cell count, WBC); arterial blood gas analysis (PCO<sub>2</sub>, PO<sub>2</sub>); serum tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) level. **Results** The WBC、TNF- $\alpha$  levels of the SZ group were significantly lower than the other three group ( $P<0.05$ ). The PCO<sub>2</sub> levels of the SZ group were significantly lower than VC group ( $P<0.05$ ). The PO<sub>2</sub> levels of the SZ group were significantly higher than VC group ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Shenmai injection in Zusanli acupoint injection for treatment of SIRS in rats may reduce the inflammation response, inhibit inflammatory factors, to protect lung function.

**KEY WORDS:** rats; systemic inflammatory response syndrome; Shenmai injection; Zusanli acupoint injection; TNF- $\alpha$

(原文见第 6 页)

## The Influence on Cartilage Ultrastructure in the Rabbit Knee Osteoarthritis under the Electron Microscope by the Massage Manipulation of Stretch Pulls Loose

WANG Chun-lin<sup>1</sup>, XIANG Yong<sup>1</sup>, TIAN Qi-dong<sup>1</sup>, HU Luan<sup>1</sup>, SHAO Chang-li<sup>2</sup>,  
ZHAO Zhi-yong<sup>1</sup>, DONG You-kang<sup>2</sup>, LIU Jin-chen<sup>2</sup>, ZHANG Ji<sup>2</sup>, ZHONG Zhi-shang<sup>2</sup>  
(1. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine First Hospital, Kunming 650021, China; 2. Yunnan University of  
Traditional Chinese Medicine of Acupuncture-Moxibustion-Rehabilitation Academy, Kunming 650500, China. )

**ABSTRACT:** **Objective** To research the influence on cartilage ultrastructure in the rabbit knee osteoarthritis under the electron microscope by the massage manipulation of stretch pull loose. **Methods** The adult Japanese white rabbits which made model of knee osteoarthritis by the building methods of Videman T were randomly divided into the stretch pull loose manipulation group, the sodium hyaluronate injected group, the model group and the blank group. To observe the change in cartilage ultrastructure of the rabbit knee osteoarthritis under the electron microscope after the treatment. **Results** The stretch pull loose manipulation has accurate therapeutic for the repair of damaged cartilage cells of rabbit knee osteoarthritis and it can promote the repair of the surface structure of cartilage. **Conclusion** The stretch pull loose manipulation can promote the repair of injury of knee osteoarthritis chondrocytes and cartilage surface structure, and it is the objective basis for the treatment of knee osteoarthritis.

**KEY WORDS:** Stretch pull loose manipulation; rabbit knee osteoarthritis; electron microscope