

实验研究

寒湿痹发病机理的实验研究

中国中医研究院骨伤科研究所 易宪文 房世源 孙树椿

痹证是指由于风寒湿邪侵袭人体，闭阻经络，气血运行不畅所导致的以肌肉、筋骨、关节发生疼痛、麻木、沉重、活动受限为主要临床表现的病证。对于痹证的成因，祖国医学认为：

“风寒湿三气杂至合而为痹也，其风气胜者为行痹，寒气胜者为痛痹，湿气胜者为着痹也。”不少学者强调了寒湿在痹证发病过程中的作用。南宋张从正指出：“此疾之作，多在四时阴雨之时，及太阴寒水用事之月，故草枯水寒为甚或濒水之地，劳力之人，辛苦失度，触冒风雨，寝处潮湿痹从外入”。^[1]我们通过中医研究院图书情报中心电子计算机检索了近几年有关痹证的文献，大量现代中医临床报道表明，在各种痹证中以寒湿痹较为多见。如杜善颖治疗220例痹证，^[2]其中与寒湿有关的痹证占总数的93.6%。严肃云治疗痹证116例，^[3]其中痛痹加着痹共69例，占总数的59%。陈三才对200例痹证病人进行病因调查，^[4]除去很难找到诱因的62人外，剩下137人中有94人是因寒湿发病的，占总数的68.4%。因此舒尚义认为寒湿痹是痹证的基本型，临床最为多见。^[5]国外学者也意识到寒湿对关节炎的影响，据统计80—90%的关节炎患者对天气变化尤其是寒冷和潮湿的影响较大。^[6]

根据上述中医理论与临床调查结果，本实验从两个方面探讨寒湿对痹证的作用：一方面是给予动物后肢短期寒湿刺激后，通过形态学观察，探讨寒湿对关节软骨结构的影响；另一方面是给予动物后肢短期寒湿刺激后继以木瓜蛋白酶关节腔内注射，通过形态学观察，探讨寒湿对木瓜酶诱发实验性关节炎的影响。骨关节炎属痹证范畴。本实验拟通过以上形态学观察，对寒湿痹病

因病机提供实验依据，并通过实验对寒湿痹（骨关节炎型）动物模型的建立进行探讨。

材料与方方法

选用健康、雄性Wistar大白鼠40只，体重100克左右。实验期间，首先给予寒湿刺激，每日将大白鼠两后肢浸入 $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 恒温水中半小时，然后将大鼠送回笼内自然晾干。寒湿处理10天后，经3%戊巴比妥钠麻醉和局部皮肤消毒后，向作为寒湿—木瓜酶组实验侧的左膝关节腔内注射10%木瓜蛋白酶溶液0.1毫升〔Fluka AG产品，瑞士包装， $\sim 0.5\text{u}/\text{mg}$ ；以无菌0.1M磷酸缓冲液（PH 6.5）配成溶液〕，和0.75M左旋半胱氨酸溶液0.05毫升〔E·Merck产品，亦溶于上述缓冲液〕。向作为寒湿木瓜酶组对照侧的右膝关节腔内，半数动物注射0.15毫升0.1M磷酸缓冲液，半数动物不予注射。所有注射均隔天注射一次，共注射5次。另选大鼠70只，除不予上述寒湿刺激外，其它方法同上，作为单纯木瓜酶组的实验侧与对照侧。

实验动物于末次注射后第3、7、14和28天分批行颈椎脱臼法处死或造成下肢瘫痪，立即取材，制成光镜与电镜标本。

1.石蜡切片标本制作：取胫骨平台立即固定于10%中性福尔马林（PH7.2，含1%溴代十六烷吡啶以利于保存糖胺多糖），EDTA脱钙，梯度乙醇脱水，石蜡包埋。切片分别作H·E染色、Mallory染色、藏红O染色（染液PH值分别为4.5与6.0）和甲苯胺蓝染色。

2.扫描电镜标本制作：先以3%戊二醛关节腔注射，然后暴露关节面，反复冲洗后入3%戊

学和病理学知识来探讨，不难发现本病有类似西医学中的“半脱位”，“关节滑膜嵌顿”，“关节交锁”，“关节紊乱”等症的改变，错骨缝一病的发生、演变等内在机理有待于进一步的研究和阐明。

参考文献：

(1) 魏指薪：中医伤科关节复位法，上海市伤科

研究所《伤科论文汇编第一辑》1958年10月第一版。

(2) 叶衍庆：魏指薪医师的伤科手法的应用及疗效机制，上海伤科研究所《伤科论文汇编第三辑》1964年8月第一版。

(3) 冯天有：《中西医结合治疗软组织损伤》，人民卫生出版社1977年。

(4) 田纪钧《错骨缝的诊断与治疗》，山西科学教育出版社，1987年。

二醛于4°C固定,以0.1M磷酸缓冲液(含0.2M蔗糖)浸洗,入1%钨酸后固定,再浸洗,经梯度丙酮脱水,乙酸异戊酯过渡,在日立HCP-2型临界点干燥器中干燥,DM-200型高真空离子溅射镀膜制成样品,用日立S-520与Jeol's型扫描电镜观察。断面标本在前固定后,用液氮冷冻断裂,再行后固定,其它程序同表面标本。

3.透射电镜标本制作:取材前用3%戊二醛关节腔注射。取材后入3%戊二醛液继续固定,经EDTA脱钙,1%钨酸后固定,梯度丙酮脱水,Epon812包埋,LKB型超薄切片机切片,厚度约500埃,以醋酸双氧铀及枸橼酸铅双染色后,用日立600型透射电镜观察。

结 果

一、寒湿一木瓜酶组实验侧与木瓜酶组实验侧共同病理变化:

1.光镜下,可见到关节软骨表面磨损,有的部位则由于软骨基质肿胀而表面隆起,软骨基质中纤维排列疏松。软骨产生裂缝,轻者出现在表层,重者可深达移行层和辐射层。软骨基质糖胺多糖减少,用藏红O染色或甲苯胺蓝染色,可见基质红色或紫色进行性变浅。中层软骨细胞发生变性和坏死,在坏死细胞附近细胞代偿性增生,有的趋向形成克隆,克隆中细胞的软骨囊着色深。在软骨表层和移行层,可见软骨细胞有丝分裂相。软骨下骨区血管与骨髓组织侵驻辐射层。

2.透射电镜下,可见到早期变性软骨细胞的胞质内有大量溶酶体样结构,脂滴增多,微丝增多,线粒体发生退行性改变,粗面内质网扩张并脱颗粒,并见核固缩。软骨中层一些细胞坏死,而另一些软骨细胞中粗面内质网与线粒体有增多的趋势。有丝分裂的软骨细胞较易发现。胶原纤维排列混乱,直径相差很大,一些很细,另一些则超过正常纤维直径。

3.扫描电镜下,可见到软骨关节面凹凸不平,出现大量小丘和混乱排列的纤维束,以及大量火山口样结构。断面标本上可见到纵行的裂缝。

二、寒湿一木瓜酶组实验侧与木瓜酶组实验侧病变的区别:

寒湿一木瓜酶组实验侧虽与木瓜酶组实验侧均出现上述病理变化,但寒湿一木瓜酶组实验侧的病理变化有以下不同的表现:

1.病理变化出现率高且病变严重:例如木瓜酶组常表现为零星细胞坏死,较少出现大片坏死区,而寒湿一木瓜酶组常出现大片坏死区。寒湿一木瓜酶组软骨基质糖胺多糖丢失更为严重,以同一时期取材的标本经藏红O染色后比较,寒湿一木瓜酶组软骨基质红色明显浅于木瓜酶组。木瓜酶组软骨层裂缝较少、较浅,一般仅达到表层与

移行层,而寒湿一木瓜酶组裂缝数目较多,很多达到移行层,有的深达辐射层。用扫描电镜观察软骨关节面与断面,寒湿组亦可见到较多的裂缝,并常见到表面严重磨损、剥脱以致暴露软骨细胞与陷窝,这些现象在木瓜酶组极少见到。透射电镜下可见到大量变性坏死细胞,变性细胞胞质内似溶酶体结构,脂滴和微丝增多更明显。基质中胶原纤维扭曲变形,粗细差异更大。软骨下骨区血管与骨髓组织侵驻辐射层现象在寒湿一木瓜酶组较为普遍。通过观察对比可发现,寒湿一木瓜酶组病理变化的发生率高于木瓜酶组,即较多的动物实验侧出现病变。我们对关节软骨中层出现细胞坏死的动物例数进行抽样统计,结果见表I

表1 木瓜酶实验侧与寒湿一木瓜酶实验侧软骨细胞坏死发生例数

	发 病	不发病	合 计
木 瓜 酶 侧	11	17	28
寒湿一木瓜酶侧	16	4	20
合 计	27	21	48

$x^2 = 7.8585$

$P < 0.01$ 差别有高度显著性

结果表明寒湿一木瓜酶组出现细胞坏死的例数显著高于木瓜酶组。

为了全面比较两组间的不同,我们按照Mankin氏人体骨关节炎组织学与组织化学分级方法,^[7]采用随机的方式从两组各选20例,即每个取材日期5例,对其病理变化进行累计分级统计(即动物例数乘以分级),结果见图I和表II。

从图I与表II可见:无论在总体上或在每一个取材日期,寒湿一木瓜酶组病理变化均较木瓜酶组严重。

2.病理变化出现较早:寒湿一木瓜酶组比木

表2 木瓜酶实验侧与寒湿一木瓜酶实验侧病变程度累计分级

日期(日)	木瓜酶实验侧	寒湿一木瓜酶实验侧
3	24	41
7	54	68
14	91	114
28	119	133

• 各选20例,每个取材日期各5例。

木瓜酶组达到累计分级的同一水平时间要短。又如在实验中发现,寒湿一木瓜酶组先于木瓜酶组一

周左右出现细胞坏死。

三、单纯寒湿对关节软骨的影响：

为了了解单纯寒湿对关节软骨有无影响，我们对未经寒湿刺激的木瓜酶组对照侧与经寒湿刺激的寒湿—木瓜酶组对照侧发生细胞坏死的例数进行抽样，经统计学处理后进行比较，见表Ⅲ。

表3 木瓜酶对照侧与寒湿—木瓜酶对照侧坏死细胞发病例数

	发 病	不发病	合 计
木瓜酶对照侧	2	25	27
寒湿—木瓜酶对照侧	5	23	28
合 计	7	48	55

$$X^2 = 1.35$$

$P > 0.05$ 差别无显著性

结果表明：木瓜酶组对照侧与寒湿—木瓜酶组对照侧在细胞坏死例数上无显著差异。也就是说单独采用本实验的寒湿条件尚不足以普遍造成痹证。但从表Ⅲ可见，动物经单独寒湿处理后关节软骨发生细胞坏死的例数成倍高于未经寒湿处理者，虽在统计学上无显著差异，却值得注意。

讨 论

单用寒湿刺激造成关节软骨的病理改变，国内尚未见报道。我们通过实验发现，单纯短期寒湿刺激，造痹效果不很明显，28例中仅5例造成了关节软骨的病变，用统计学处理与对照组无显著性差异。但是寒湿组的发病率仍成倍高于对照组，有着发病的趋势与可能性。是否在改变实验条件与方法后，单独寒湿刺激就可致痹，有待进一步研究。

本实验给予寒湿刺激加以木瓜酶关节腔注射，则使骨关节炎的发病率增加和病变加重，明显超过单用木瓜酶组。可见寒湿在痹证发生发展中具有重要作用，这进一步证实了祖国医学关于痹证病因病机的学说。

关于寒湿致痹的机理，祖国医学认为：寒主凝滞收引，湿性重着粘滞。“血得热则行，遇寒则凝泣”。“寒气入经稍迟，泣而不行，客于脉外

则血少，客于脉中则气不通，故卒然而痛”。^[8]意指寒湿影响了血液循环。И. И. Заболотных 通过观察长期与冷水接触的人，发现他们肢端血流明显改变，血管张力下降，肢端供血减少，他推测由于血供减少，继而使滑膜受损，软骨营养障碍，最后导致软骨细胞死亡，形成退行性骨关节炎。^[9]在本实验中，我们观察到寒湿—木瓜酶组变性坏死的软骨细胞明显多于单纯木瓜酶组，进一步在形态学方面证实了上述学者的推测。通过影响血液供应加重细胞的变性坏死过程可能是造成痹证的重要因素之一。

参 考 文 献

- [1] 张从正：《儒门事亲》梁园节署排印1909年版。
- [2] 杜善颖：辨证治疗痹证220例疗效观察。中医函授通讯(5)：762，1986
- [3] 严肃云：痹证116例的辨证施治。浙江中医杂志，20(7)：327，1985
- [4] 陈三才：200例类风湿关节炎诱因调查。上海中医药杂志(7)：29，1981
- [5] 舒尚义：类风湿性关节炎分型辨证体会——附90例疗效分析。云南中医杂志(5)：15，1984
- [6] Joyce, M. Loet al. Influence of Weather on osteoarthritis. Soc. Sci. Med. 23(6)：549—554，1986
- [7] Mankin, H. J. et al. Biochemical and Metabolic Abnormalities in Articular Cartilage from Osteoarthritic Human Hips. J. Bone Joint Surg. 53A：523—527，1971
- [8] 《素问·举痛论》人民卫生出版社 1983年6月第1版第5次印刷。
- [9] И. И. Заболотных, Охлаждение в развитии первичного деформирующего остеоартроза. Советская Медицина (5)：75—78，1986

承丁继华教授、朱云龙副主任医师、韩凤岳副教授对此文提出宝贵意见，李茂林、王来鸿、刘恩三位同志参加部分技术工作，特此志谢。

由于制版原因，图片未能发表请读者见谅——编辑部