

## · 临床研究 ·

补肾除湿联合富血小板血浆调控血清 TGF- $\beta$ 1 及 Smad-1 水平治疗膝骨关节炎

邸冬雪,艾奇,闫奇,李彦,张洪美,陈玲,唐新宁  
(中国中医科学院望京医院骨关节一科,北京 100102)

**【摘要】 目的:**探讨补肾除湿联合富血小板血浆(platelet-rich plasma,PRP)治疗早中期膝骨关节炎(knee osteoarthritis,KOA)的临床疗效及对患者血清中转化生长因子- $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1,TGF- $\beta$ 1)和 Smad-1 水平的影响。**方法:**选取 2020 年 5 月至 2022 年 4 月收治的 45 例早中期 KOA 患者,分为对照组和观察组。对照组 30 例,男 12 例,女 18 例;年龄 43~69(57.3 $\pm$ 6.5)岁;Kellgren-Lawrence(K-L)分级 I 级 8 例,II 级 13 例,III 级 9 例;病程 1.5~5.0(3.8 $\pm$ 1.7)年;分别于 1、3 周时向患膝关节腔注射 5 ml 的 PRP 1 次,共 2 次。观察组 15 例,男 7 例,女 8 例;年龄 45~70(56.7 $\pm$ 6.2)岁;K-L 分级 I 级 4 例,II 级 9 例,III 级 2 例;病程 1.8~5.7(4.0 $\pm$ 1.8)年;注射 PRP 5 ml,时间、次数与对照组相同,同时口服补肾除湿方水煎剂,每日 1 剂,共 28 剂。两组疗程均为 4 周。分别于治疗前后采用疼痛视觉模拟评分(visual analogue scale,VAS)和 Lequesne MG 评分评估患膝疼痛及关节功能改善情况。分别于治疗前、治疗结束后 1 d 采用酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)检测 TGF- $\beta$ 1、Smad-1 的含量,并观察两组患者并发症发生情况。**结果:**45 例患者获得随访,时间 26~30(28.0 $\pm$ 0.6) d。治疗前两组 VAS 和膝关节 Lequesne MG 评分比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ );治疗结束后 1 d,两组 VAS 和膝关节 Lequesne MG 评分均低于治疗前( $P<0.05$ );治疗结束后 1 d,观察组 VAS 和膝关节 Lequesne MG 评分低于对照组( $P<0.05$ )。两组治疗结束后 1 d,TGF- $\beta$ 1 含量均较治疗前降低( $P<0.05$ );治疗结束后 1 d,观察组 TGF- $\beta$ 1 含量低于对照组( $P<0.05$ )。两组治疗结束后 1 d 的 Smad-1 含量与治疗前比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ );治疗结束后 1 d,观察组 Smad-1 含量高于对照组( $P<0.05$ )。两组并发症情况比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论:**补肾除湿联合关节腔注射 PRP 治疗早中期 KOA 疗效确切,优于单纯关节腔内注射 PRP,并在一定程度上降低患者血清 TGF- $\beta$ 1 水平,升高 Smad-1 水平,抑制炎症反应,促进软骨修复,这可能是补肾除湿联合 PRP 治疗 KOA 的作用机制之一。

**【关键词】** 补肾除湿方; 富血小板血浆; 转化生长因子- $\beta$ 1; Smad-1; 膝骨关节炎; 中医疗法  
中图分类号:R684.3

DOI:10.12200/j.issn.1003-0034.2023.07.010

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



**Effect of Bushen Chushi(补肾除湿) decoction combined with platelet-rich plasma on regulating TGF- $\beta$ 1 and Smad-1 expression in serum of knee osteoarthritis patient**

DI Dong-xue, AI Qi, YAN Qi, LI Yan, ZHANG Hong-mei, CHEN Ling, TANG Xin-ning (The First Department of Bone and Joint, Wangjing Hospital, Chinese Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102)

**ABSTRACT Objective** To investigate the effect of Bushen Chushi decoction combined with platelet-rich plasma (PRP) to treat knee osteoarthritis (KOA) in early and middle stage and its regulation on TGF- $\beta$ 1 and Smad-1 expression in serum. **Methods** Total of 45 patients with KOA in early and middle stage from May 2020 to April 2022 were treated and divided into control group and observation group. In control group, there were 30 patients including 12 males and 18 females, aged from 43 to 69 years old with an average of (57.3 $\pm$ 6.5) years old and disease duration ranged from 1.5 to 5.0 years with an average of (3.8 $\pm$ 1.7) years, and there were 8 cases in grade I, 13 cases in grade II, and 9 cases in grade III according to Kellgren-Lawrence Grade, PRP 5 ml was injected into knee joint on the first day of No.1, 3 week together for 2 times. In the observation group, there were 15 cases including 7 males and 8 females, aged from 45 to 70 years old with an average of (56.7 $\pm$ 6.2) years old and disease duration ranged from 1.8 to 5.7 years with an average of (4.0 $\pm$ 1.8) years, there were 4 cases in grade I, 9 cases in grade II and 4 cases in grade III according to the Kellgren-Lawrence Grade, PRP 5 ml were injected into knee joints that

基金项目:首都卫生发展科研专项项目(编号:首发 2020-2-4161);中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目(编号:C12021A02005)

Fund program:Capital Health Research and Development of Special(No. 2020-2-4161)

通讯作者:张洪美 E-mail:wangjingzhm@sina.com

Corresponding author:ZHANG Hong-mei E-mail:wangjingzhm@sina.com

the time and frequency were the same as those in the control group, and at the same time Bushen Chushi decoction orally were taken 1 dose per day with a total of 28 doses. All patients were treated for four weeks. Visual analogue scale (VAS) and Lequesne MG score before and after treatment were used to evaluate improvement of knee pain and joint function. The TGF- $\beta$ 1 and Smad-1 levels in serum were measured before and after treatment in two groups. The incidence of complications in two groups was observed. **Results** All patients were followed up for 26 to 30 days with an average of (28.0 $\pm$ 0.6) days. There was no significant difference in VAS and knee Lequesne MG scores between two groups before treatment ( $P>0.05$ ). The scores of VAS and knee Lequesne MG on the first day after treatment in both groups were lower than those before treatment ( $P<0.05$ ). The VAS and knee Lequesne MG scores in observation group were lower than those in control group ( $P<0.05$ ) on the first day after treatment. The TGF- $\beta$ 1 level in serum after treatment were higher significantly than that before treatment in two groups ( $P<0.05$ ). After treatment, TGF- $\beta$ 1 level in serum in observation group were lower than those in control group with statistically significant differences ( $P<0.05$ ). The Smad-1 levels in serum after treatment in observation group were higher significantly than that in control group ( $P<0.05$ ). The levels of Smad-1 were not statistically significant between before and after treatment ( $P>0.05$ ). There was no significant difference in postoperative complications between two groups ( $P>0.05$ ). **Conclusion** The efficacy of Bushen Chushi decoction combined with PRP in treatment of early and middle KOA is better than that of PRP injection alone. The combined treatment could reduce TGF- $\beta$ 1 level and increase Smad-1 level in serum, which may be a mechanism to inhibit inflammation and alleviate cartilage degeneration to some extent.

**KEYWORDS** Bushen Chushi Decoction; Platelet rich plasma; Transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1; Smad-1; Knee osteoarthritis; Traditional Chinese Medicine therapy

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种以膝关节软骨退行性病变及关节边缘和软骨下骨骨质增生为特征的慢性关节炎性疾病<sup>[1]</sup>。转化生长因子(transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )超家族分子在骨关节炎(osteoarthritis, OA)软骨细胞表型、胞外基质、软骨下骨重塑、骨赘形成、关节滑膜纤维化及炎症反应等各个阶段都发挥了重要作用<sup>[2-3]</sup>。因此,其是治疗 OA 的关键靶点。富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)是由全血经多次离心后所得的血小板浓缩浆,富含生长因子,可减轻膝关节炎反应并参与组织修复,现已广泛运用于治疗 OA、软组织损伤、半月板及软骨损伤等<sup>[4-5]</sup>。中医学认为 OA 的病机与风、寒、湿三气入侵有关,本课题组经长期临床实践将其进一步明确为筋痿、骨痿为本,本痿标痹,提出“补肾除湿”的治法,并总结出“补肾除湿方”。补肾除湿方由左归丸化裁而来,其功能主要为补肝肾、祛风湿、止痛。前期研究证实,补肾除湿方可以抑制患者血清中白介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和基质金属蛋白酶-1、3、13(matrix metalloproteinase-1、3、13, MMP-1、3、13)的表达,且补肾除湿方联合 PRP 在降低关节液 IL-1 $\beta$ 、MMP-1 表达方面较单纯 PRP 更具优势<sup>[6-7]</sup>。本研究进一步探讨补肾除湿方联合富血小板血浆对早中期 KOA 患者血清中 TGF- $\beta$ 1、Smad-1 水平的影响。

## 1 资料与方法

### 1.1 病例选择

**1.1.1 诊断标准** (1)西医诊断标准。采用中华医学会骨科学分会制定的《中国骨关节炎诊疗指南

(2018 年版)》<sup>[8]</sup>中关于 KOA 的诊断标准:①近 1 个月内反复膝关节疼痛;②膝关节负重位 X 线片示关节间隙变窄、软骨下骨硬化和(或)囊性变、关节缘骨赘形成;③年龄 $\geq 50$ 岁;④晨僵时间 $\leq 30$ min;⑤活动时有关节摩擦音(感)。满足诊断标准①+②条或①+④+⑤条或①+③+④+⑤条,即可诊断。

(2)中医诊断标准。参考《中药新药临床研究指导原则(试行)》<sup>[9]</sup>中肝肾不足型膝骨关节炎的辨证标准。主症:膝软膝酸,关节疼痛;次症:动作牵强,活动不利;舌脉:苔薄白,舌质偏红,脉弦或滑。

**1.1.2 纳入标准** (1)符合上述诊断标准。(2)符合所研究诊疗技术适应证要求。(3)单侧 KOA。(4)符合 KELLGREN-LAWRENCE<sup>[10]</sup>制定的 Kellgren-Lawrence(K-L)分级 I-III 级。(5)身体质量指数(body mass index, BMI) $<30$  kg $\cdot$ m<sup>-2</sup>。(6)近 3 个月内未接受治疗者。(7)签署知情同意书。

**1.1.3 排除标准** (1)不符合上述诊断标准和纳入标准者。(2)已接受其他有关治疗,可能影响本研究的效应指标观测者。(3)膝周韧带功能不全、膝关节不稳者。(4)存在严重内科疾病。(5)存在全身骨代谢性疾病或有精神障碍者。(6)合并骨肿瘤、关节结核者。(7)存在发热、寒战等全身症状或患膝局部红肿等。(8)血小板计数低于  $15\times 10^9$ /L 者。(9)血红蛋白含量 $<110$  g/L 者。

### 1.2 临床资料

2020 年 5 月至 2022 年 4 月收治 45 例 KOA 患者分为对照组和观察组。对照组 30 例,男 12 例,女 18 例;年龄 43~69(57.3 $\pm$ 6.5)岁;病程 1.5~5.0(3.8 $\pm$ 1.7)年;左侧 16 例,右侧 14 例;BMI 19.3~25.8(22.6 $\pm$

1.8) kg·m<sup>-2</sup>;K-L 分级 I 级 8 例, II 级 13 例, III 级 9 例。观察组 15 例, 男 7 例, 女 8 例; 年龄 45~70 (56.7±6.2) 岁; 病程 1.8~5.7 (4.0±1.8) 年; 左侧 7 例, 右侧 8 例; BMI 19.5~25.4 (22.3±2.0) kg·m<sup>-2</sup>; K-L 分级 I 级 4 例, II 级 9 例, III 级 2 例。两组患者性别、年龄、病程、BMI 和 K-L 分级等基线资料比较, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 具有可比性, 见表 1。患者均签署知情同意书, 本研究经中国中医科学院望京医院医学伦理委员会批准实行 (编号: WJEC-KT-2020-003-P005)。

1.3 治疗方法

1.3.1 对照组 分别于第 1、3 周首日, 即每 2 周注射 1 次, 共注射 2 次, 疗程为 4 周。PRP 制备遵循通用方法, 患者在静脉血采集前 2 周内无抗栓药物治疗、输血治疗或其他影响血液采集的治疗史。无菌注射器抽取 45 ml 自体肘正中静脉血, 混合 9:1 枸橼酸钠后置于 PRP 离心机离心套管中, 1 500 r/min 离心 10 min, 全血分为红细胞层、贫血小板血浆层及 PRP 层。去除下层沉积红细胞, 余下部分 2 000 r/min 离心 10 min, 再次去除下层红细胞, 留取中间层即为 PRP; 45 ml 自体静脉血制备得到 10 ml PRP, PRP 内血小板浓度为全血血小板浓度的 5 倍。PRP 膝关节腔注射方法: 于髌外侧常规消毒, 2% 利多卡因局麻, 穿刺成功后尽量抽净关节积液, 最后注入 PRP 5 ml。

1.3.2 观察组 予补肾除湿方口服联合 PRP 注射治疗。PRP 制备和注射同对照组。补肾除湿方: 熟地黄 15 g, 茯苓 15 g, 山萸肉 12 g, 元胡 10 g, 川牛膝 9 g, 泽泻 9 g, 炒白术 9 g, 千年健 9 g, 威灵仙 9 g, 甘草 6 g。统一由本院煎药室煎煮, 每剂药煎煮 300 ml, 采用真空、无菌包装分装 2 袋, 每袋 150 ml, 嘱患者于早晚隔水加热温服, 1 袋/次。4 周为 1 个疗程。

1.4 观察项目与方法

1.4.1 临床疗效 分别于治疗前及治疗结束后 1 d 采用视觉模拟评分<sup>[11]</sup> (visual analogue scale, VAS) 对疼痛进行评价, 0 分表示无痛, 10 分表示剧烈疼痛, 分数越高提示疼痛越严重。并采用 LEQUESNE<sup>[12]</sup> 制定的国际膝关节功能评定标准 Lequesne MG 评分对

膝关节功能进行评价, 包括膝关节的休息痛、运动痛、压痛、肿胀、晨僵及行走能力, 分数越高代表患者病情越严重。

1.4.2 血清 TGF-β1 及 Smad-1 水平 采集两组患者治疗前及治疗结束后 1 d 空腹静脉血 3 ml, 自行凝固后离心 (3 000 r/min, 15 min) 取上清, 依据酶联免疫吸附试验法测定 TGF-β1、Smad-1 水平。

1.4.3 并发症 治疗期间观察 2 组患者出现的并发症情况。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析, 符合正态分布的定量资料以均数±标准差 ( $\bar{x}±s$ ) 表示, 组间比较采用成组设计定量资料的 *t* 检验; 定性资料比较采用  $\chi^2$  检验。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

45 例患者均获得随访, 时间 26~30 (28.0±0.6) d。

2.1 VAS 评分比较

治疗前两组 VAS 比较, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 治疗结束后 1 d, 两组 VAS 低于治疗前 ( $P<0.05$ ), 且观察组 VAS 低于对照组 ( $P<0.05$ )。见表 2。

2.2 Lequesne MG 评分比较

治疗前两组膝关节 Lequesne MG 评分比较, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 治疗结束后 1 d, 两组膝关节 Lequesne MG 评分均低于治疗前 ( $P<0.05$ ), 且观察组膝关节 Lequesne MG 评分低于对照组 ( $P<0.05$ )。见表 3。

2.3 血清 TGF-β1 和 Smad-1 比较

治疗前两组血清 TGF-β1 水平比较, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 治疗结束后 1 d, 两组血清 TGF-β1 水平与治疗前比较, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 观察组血清 TGF-β1 低于对照组 ( $P<0.05$ )。治疗前两组血清 Smad-1 水平比较, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 治疗结束后 1 d, 两组血清 Smad-1 水平与治疗前比较, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 而观察组血清 Smad-1 高于对照组 ( $P<0.05$ )。见表 4。

2.4 并发症发生情况

对照组 2 例出现轻度局部肿胀不适, 联合治疗

表 1 两组膝骨关节炎患者治疗前一般资料比较

Tab.1 Comparison of general data before treatment between two groups of patients with knee osteoarthritis

组别	例数	性别/例		年龄 ( $\bar{x}±s$ )/岁	BMI ( $\bar{x}±s$ )/(kg·m <sup>-2</sup> )	病程 ( $\bar{x}±s$ )/年	侧别/例		K-L 分级/例		
		男	女				左侧	右侧	I 级	II 级	III 级
对照组	30	12	18	57.3±6.5	22.6±1.8	3.8±1.7	16	14	8	13	9
观察组	15	7	8	56.7±6.2	22.3±2.0	4.0±1.8	7	8	4	9	2
检验值		$\chi^2=0.020$		$t=0.750$	$t=0.667$	$t=0.734$	$\chi^2=0.198$		$\chi^2=0.418$		
P 值		0.968		0.456	0.508	0.460	0.693		0.839		

表 2 两组膝骨关节炎患者治疗前后 VAS 比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

**Tab.2 Comparison of VAS before and after treatment between two groups of patients with knee osteoarthritis( $\bar{x}\pm s$ )** 单位:分

组别	例数	治疗前	治疗后 1 d	t 值	P 值
对照组	30	6.13±1.26	3.98±1.02	9.308	0.000
观察组	15	6.18±1.27	2.89±0.84	18.544	0.000
t 值		0.684	1.799		
P 值		0.796	0.024		

组 1 例出现轻度局部肿胀不适,均未经任何处理肿胀自行消失。观察组 1 例出现胃肠道反应,调整饮食后胃肠道反应消失。

### 3 讨论

#### 3.1 补肾除湿方对 KOA 患者血清 TGF-β1 及 Smad-1 的作用

研究表明,TGF-β1 在 KOA 病程中的主要作用有:(1)TGF-β1 与 OA 病情严重程度存在相关性,有研究结果证明与对照组(健康者)相比,KOA 患者的 TGF-β1 血清水平显著升高,且 TGF-β1 与 X 线片

证实的 KOA 的严重程度呈正相关<sup>[13]</sup>。在 OA 早期,TGF-β1 的上调刺激软骨细胞的增殖,并试图修复受损的软骨<sup>[14]</sup>,但在疾病晚期,TGF-β1 水平显著降低,而炎性细胞因子(如 IL-1)的表达增加<sup>[15]</sup>。(2)TGF-β1 还可通过诱发滑膜细胞产生炎症因子,如 IL-1 和 TNF-α 等,进一步刺激关节软骨细胞沉积 X 型胶原蛋白,发生末端肥大<sup>[16]</sup>。TGF-β 活化激酶 1 还在 TNF-α 诱导细胞外基质降解酶如聚蛋白多糖酶-4 (polyproteoglycan enzyme-4,ADAMTS-4) 和 MMP-3,疼痛因子如环氧合酶-2(cyclooxygenase-2,COX-2)、膜结合型前列腺素 E2 合酶-1(microsomal prostaglandin E synthase-1,mPGES-1) 和神经生长因子(nerve growth factor,NGF)等相关分子表达中发挥着重要作用<sup>[17]</sup>。(3)TGF-β1 促进 OA 骨量提高、类骨质岛形成和矿化程度的降低,与软骨下骨重塑、骨硬化、骨赘形成和血管生成等病变有关。

补肾除湿方具有补益肝肾、祛风除湿的功效,针对肝肾亏虚、风寒湿痹的证型所创。方中熟地为君药,滋阴补肾、填精益髓;山萸肉为臣药,补益肝肾;

表 3 两组膝骨关节炎患者 Lequesne MG 评分比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

**Tab.3 Comparison of Lequesne MG scores between two groups of patients with knee osteoarthritis( $\bar{x}\pm s$ )** 单位:分

组别	例数	休息痛		运动痛		压痛		肿胀	
		治疗前	治疗后 1 d	治疗前	治疗后 1 d	治疗前	治疗后 1 d	治疗前	治疗后 1 d
对照组	30	1.87±0.33	1.67±0.32 <sup>a1</sup>	2.27±0.32	1.85±0.34 <sup>a2</sup>	1.28±0.22	1.19±0.24 <sup>a3</sup>	1.19±0.16	0.96±0.18 <sup>a4</sup>
观察组	15	1.82±0.33	1.40±0.34 <sup>b1</sup>	2.23±0.38	1.71±0.33 <sup>b2</sup>	1.39±0.28	1.14±0.22 <sup>b3</sup>	1.17±0.22	0.74±0.15 <sup>b4</sup>
t 值		0.149	1.701	0.386	2.807	0.197	1.348	0.613	1.921
P 值		0.857	0.087	0.669	0.008	0.847	0.186	0.524	0.029

  

组别	例数	晨僵		行走能力		总分	
		治疗前	治疗后 1 d	治疗前	治疗后 1 d	治疗前	治疗后 1 d
对照组	30	1.53±0.24	1.48±0.27 <sup>a5</sup>	2.24±0.25	1.93±0.28 <sup>a6</sup>	9.85±1.48	8.97±1.30 <sup>a7</sup>
观察组	15	1.55±0.25	1.34±0.19 <sup>b5</sup>	1.99±0.23	1.71±0.21 <sup>b6</sup>	9.98±1.36	8.03±1.26 <sup>b7</sup>
t 值		0.332	1.711	0.271	1.352	1.321	3.241
P 值		0.733	0.079	0.776	0.175	0.181	0.005

注:与对照组治疗前比较,<sup>a1</sup>t=3.357,P<0.005;<sup>a2</sup>t=3.139,P<0.005;<sup>a3</sup>t=4.366,P<0.005;<sup>a4</sup>t=3.856,P<0.005;<sup>a5</sup>t=3.624,P<0.005;<sup>a6</sup>t=3.366,P<0.005;<sup>a7</sup>t=5.893,P<0.005。与观察组治疗前比较,<sup>b1</sup>t=4.713,P<0.005;<sup>b2</sup>t=4.512,P<0.005;<sup>b3</sup>t=4.709,P<0.005;<sup>b4</sup>t=3.781,P<0.005;<sup>b5</sup>t=3.924,P<0.005;<sup>b6</sup>t=4.712,P<0.005;<sup>b7</sup>t=6.241,P<0.005

表 4 两组膝骨关节炎患者血清 TGF-β1 及 Smad-1 含量比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

**Tab.4 Comparison of serum TGF-β1 and Smad-1 between two groups of patients with knee osteoarthritis( $\bar{x}\pm s$ )** 单位:ng/ml

组别	例数	TGF-β1				Smad-1			
		治疗前	治疗后 1 d	t 值	P 值	治疗前	治疗后 1 d	t 值	P 值
对照组	30	27.90±2.58	16.17±1.05	2.826	0.008	20.70±1.64	28.82±1.88	1.354	0.186
观察组	15	17.71±3.54	12.56±1.23	4.404	0.001	32.36±2.61	42.84±1.96	0.956	0.357
t 值		1.692	2.997			1.327	1.828		
P 值		0.098	0.005			0.191	0.037		

泽泻、白术、茯苓、千年健、川牛膝、威灵仙、延胡索共为佐药,利湿泄浊、健脾益气、祛风除湿止痛;甘草调和诸药为使药。现代药理研究表明:山茱萸总甙能明显促进人 OA 软骨细胞增殖,抑制其凋亡,且呈剂量依赖性;其机制与山茱萸总甙抑制人 OA 软骨细胞 TGF- $\beta$ 1/CTGF 信号通路激活有关<sup>[18]</sup>。牛膝醇提物可增加人 KOA 软骨细胞的增殖活力、降低细胞生长阻滞、增加细胞 DNA 合成、减少细胞凋亡来促进软骨细胞的生长<sup>[19]</sup>。

补肾除湿方相关前期临床及基础研究发现<sup>[6-7,20-21]</sup>:(1)可以改善 KOA 患者 VAS、Lequesne 及 WOMAC 评分。(2)可以抑制炎症因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和基质降解酶 MMP-1、MMP-3 和 MMP-13 的表达水平。(3)可以提高干细胞标志物三磷酸腺苷结合转运蛋白 G2 (ATP binding cassette transporter G2, ABCG-2)、转录因子 OCT-4、BMP-4 和软骨中 II 型胶原和蛋白多糖的表达。(4)补肾除湿方含药血清能改善 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞炎症反应,通过调控蛋白激酶 B (protein kinase B, PK-B) Akt 信号通路抑制软骨细胞凋亡,降低 Bcl-2 关联 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 和半胱氨酸蛋白酶-9 (cysteine protease-9, Caspase-9) 蛋白的表达。本研究结果表明补肾除湿方可以抑制早期患者血清 TGF- $\beta$ 1 的表达,提高 Smad-1 的表达。因此, TGF- $\beta$ 1、Smad-1 蛋白可能是补肾除湿方抑制炎症因子及基质降解酶进而抑制软骨细胞凋亡、维持细胞表型并抑制骨赘形成的关键分子。

### 3.2 PRP 对 KOA 患者血清 TGF- $\beta$ 1 及 Smad-1 的作用

根据白细胞与纤维蛋白的含量比, PRP 可分为富含白细胞的 PRP、贫白细胞的 PRP、富含白细胞的血小板纤维蛋白、纯富血小板纤维蛋白 4 类<sup>[22]</sup>。但无论是哪种 PRP, 其发挥作用的效应原理即在于血小板被激活后分泌的大量发挥生物活性效应的重要因子, 促进血管生成, 调节细胞外基质, 加速细胞募集、增殖和分化, 并抑制软骨细胞凋亡<sup>[23]</sup>, 其中即包含 TGF- $\beta$ <sup>[24]</sup>。TGF- $\beta$ 1 是一种关节软骨细胞的合成因子, 由血小板、巨噬细胞和许多其他类型的细胞分泌, 可以刺激软骨细胞释放细胞外基质。因此, 针对 KOA 发病机制的中心环节 (软骨细胞、细胞外基质和软骨下骨), PRP 对 KOA 的治疗作用主要体现在减少软骨细胞凋亡及肥大化, 抑制炎症因子的产生及释放, 促进细胞外基质分泌以及促进软骨细胞增殖、迁徙。本研究结果显示, PRP 注射治疗后患者血清 TGF- $\beta$ 1 含量降低, Smad-1 含量升高, 考虑为血小板释放的 TGF- $\beta$  主要作用于关节腔局部, 而血液

循环中 TGF- $\beta$  的下降则可能与 PRP 调节炎症因子、维持关节内稳态相关。而 TGF- $\beta$  等蛋白在关节腔中的含量及随时间变化的情况有待于进一步研究, 课题组后续拟对关节液进行质谱分析并对 TGF- $\beta$ 、炎症因子、基质降解酶等进行定性定量检测。

### 3.3 补肾除湿方联合 PRP 治疗 KOA 的增效作用

KOA 中最重要的病理改变是软骨破坏和继发性骨质增生, 软骨细胞的主要功能是维持软骨内环境平衡, 即软骨基质合成和降解之间的平衡。该平衡受到合成代谢和分解代谢因子的严格调控。TGF- $\beta$ 1 与 KOA 发生发展密切相关, 参与调控软骨早期形成、细胞外基质产生与降解、骨赘形成、滑膜炎<sup>[25]</sup>。在疾病的不同阶段, 病理过程各异, TGF- $\beta$ 1 对细胞增生、分化、免疫、炎症过程会产生不同程度的双相作用。大多数中晚期 KOA 患者关节中均有不同程度的滑膜炎或滑膜纤维化, TGF- $\beta$  参与了这些病理变化。腺苷酸环化酶激活剂 Forskolin 可降低 TGF- $\beta$ 1 诱导的 KOA 滑膜细胞增殖和迁移以及 KOA 滑膜细胞肌成纤维细胞样表型<sup>[26]</sup>。此外, BMP-Smad 信号通路被证实参与了软骨损伤动物模型软骨下骨的骨重塑过程, 通过调节该通路可修复软骨<sup>[27-28]</sup>。

本研究提示, 补肾除湿联合 PRP 治疗在改善 VAS、Lequesne 评分方面优于单纯注射 PRP。联合治疗在降低 TGF- $\beta$ 1 表达水平, 提高 Smad-1 表达水平方面较单纯注射 PRP 效果更显著。因此, 其治疗 KOA 可能的机制有:(1) 补肾除湿方协同 PRP 抑制 TGF- $\beta$  信号通路, 进而抑制 IL、TNF 等炎症因子释放和软骨基质 MMPs 水平升高而减少软骨分解代谢。(2) 补肾除湿方协同 PRP 促进 Smad 蛋白的表达, 改善软骨下骨骨重塑, 进而促进关节软骨的再生修复。(3) 补肾除湿方中的有效成分与 PRP-Exos 共同作用于 Akt/Bad/Bcl-2 信号通路, 抑制凋亡相关蛋白的表达, 进而抑制细胞凋亡。

本研究结果证明, 补肾除湿方联合 PRP 临床疗效确切, 其机制可能与其降低血清中 TGF- $\beta$ 1 水平、促进 Smad-1 表达有关。该治疗方法通过抑制炎症反应, 改善软骨内环境, 从而达到缓解疼痛, 改善膝关节功能的效果, 且不良反应发生率较低。

### 3.4 不足与展望

目前, 对于 PRP 的临床应用存在诸多争议, 包括 PRP 的制备材料及设备、制备方式、制品的质量控制及适用人群、治疗方案等。其中, 最值得关注的是 PRP 的质量控制。包括制品中的血小板浓度、白细胞和红细胞混入量检测, 以及进一步的 PRP 中生长因子、细胞因子等生物活性物质检测。采集制备 PRP 的血小板浓度以满足临床治疗需求为准。PRP

的各种适应证所需最佳血小板浓度尚不明确,有待进一步研究确定。此外,不同 PRP 采集制备方法的制品中白细胞混入量差异较大。国内专家共识<sup>[29]</sup>推荐机器单采制备的 PRP 中白细胞混入量 $<1 \times 10^8/L$ ,但其他方法采集制备的 PRP 很难达到此量,故可按临床治疗需要选择用血小板型白细胞过滤器去除 PRP 中的白细胞。另外,白细胞对骨关节炎治疗中利弊仍有争议。因此,如何有效规范统一及进一步探究其有效成分及作用靶点,仍是今后研究的方向。

#### 参考文献

- [1] MAN G S, MOLOGHIANU G. Osteoarthritis pathogenesis-a complex process that involves the entire joint[J]. *J Med Life*, 2014, 7(1): 37-41.
- [2] 张立智, 卫祺, 张世民. 转化生长因子  $\beta$  信号在骨关节炎中的作用[J]. *中华骨与关节外科杂志*, 2019, 12(09): 727-732. ZHANG L Z, WEI Z, ZHANG S M. The role of transforming growth factor- $\beta$  signaling in osteoarthritis[J]. *Chin J Bone Joint Surg*, 2019, 12(9): 727-732. Chinese.
- [3] 张立智, 李双, 吴文美, 等. 转化生长因子  $\beta$  信号与软骨的发生、发育和维持[J]. *中华骨与关节外科杂志*, 2018, 11(7): 556-560. ZHANG L Z, LI S, WU W M, et al. Transforming growth factor-beta signaling and cartilage genesis, development, and maintenance[J]. *Chin J Bone Joint Surg*, 2018, 11(7): 556-560. Chinese.
- [4] 张祥, 冯明利. 关节腔内注射自体富血小板血浆治疗早期骨性关节炎的研究进展[J]. *中国骨与关节损伤杂志*, 2022, 37(8): 890-893. ZHANG X, FENG M L. Research progress of intra-articular injection of autologous platelet-rich plasma in the treatment of early osteoarthritis[J]. *Chin J Bone Joint Injury*, 2022, 37(8): 890-893. Chinese.
- [5] 向成浩, 范成龙, 覃文婕, 等. 关节镜下清理联合富血小板血浆注射治疗 Kellgren-Lawrence 分级 I-III 级膝骨关节炎[J]. *中国骨伤*, 2022, 35(1): 26-32. XIANG C H, FAN C L, QIN W J, et al. Arthroscopic debridement combined with platelet-rich plasma injection in the treatment of Kellgren-Lawrence grade I-III knee osteoarthritis[J]. *China J Orthop Traumatol*, 2022, 35(1): 26-32. Chinese.
- [6] 何名江, 张洪美, 单鹏程, 等. 补肾除湿方治疗早期肝肾亏虚型膝骨关节炎的临床研究[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(4): 2109-2113. HE M J, ZHANG H M, SHAN P C, et al. Clinical study on the treatment of early-stage liver and kidney deficiency type knee osteoarthritis with Bushen Chushi recipe[J]. *Chin J Traditional Chin Med*, 2020, 35(4): 2109-2113. Chinese.
- [7] 荆琳, 潘丽, 王桂彬, 等. 膝痹通方联合富血小板血浆治疗中度膝骨关节炎的临床疗效研究[J]. *海南医学院学报*, 2020, 26(24): 1859-1864. JIN L, PAN L, WANG J B, et al. Clinical study on the treatment of moderate knee osteoarthritis with Xibitong recipe combined with platelet-rich plasma[J]. *J Hainan Med College*, 2020, 26(24): 1859-1864. Chinese.
- [8] 中华医学会骨科学分会关节外科学组. 中国骨关节炎诊疗指南(2018 年版)[J]. *中华骨科杂志*, 2021, 41(18): 1291-1314. JOINT SURGERY GROUP OF ORTHOPAEDIC BRANCH OF CHINESE MEDICAL ASSOCIATION. Guidelines for Diagnosis and Treatment of Osteoarthritis in China (2018 Edition)[J]. *Chin J Orthop*, 2021, 41(18): 1291-1314.
- [9] 国家中医药管理局. 中药新药临床研究指导原则(试行)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002. STATE ADMINISTRATION OF TRADITIONAL CHINESE MEDICINE. Guidelines for Clinical Research of New Drugs of Traditional Chinese Medicine (Trial)[S]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2002.
- [10] KELLGREN J H, LAWRENCE J S. Radiological assessment of osteoarthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 1957, 16(4): 494-502.
- [11] Rivera F, Bertignone L, Grandi G, et al. Effectiveness of intra articular injections of sodium hyaluronate chondroitin sulfate in knee osteoarthritis: a multicenter prospective study[J]. *J Orthop Traumatol*, 2016, 17(1): 27-33.
- [12] LEQUESNE M G. The algofunctional indices for hip and knee osteoarthritis[J]. *J Rheumatol*, 1997, 24(4): 779-781.
- [13] HE J W, CAO W W, AZEEM I, et al. Transforming Growth Factor Beta1 being considered a novel biomarker in knee osteoarthritis[J]. *Clin Chim Acta*, 2017, 472: 96-101.
- [14] ZHEN G H, CAO X. Targeting TGF $\beta$  signaling in subchondral bone and articular cartilage homeostasis[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2014, 35(5): 227-236.
- [15] WU X, KONDRAGUNTA V, KORNMAN K S, et al. IL-1 receptor antagonist gene as a predictive biomarker of progression of knee osteoarthritis in a population cohort[J]. *Osteoarthr Cartil*, 2013, 21(7): 930-938.
- [16] SCANZELLO C R, GOLDRING S R. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis[J]. *Bone*, 2012, 51(2): 249-257.
- [17] UCHIDA K, TAKANO S, MATSUMOTO T, et al. Transforming growth factor activating kinase 1 regulates extracellular matrix degrading enzymes and pain-related molecule expression following tumor necrosis factor- $\alpha$  stimulation of synovial cells: an in vitro study[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2017, 18(1): 283.
- [18] 王冠贤, 李宝林, 唐爱民, 等. 基于 TGF- $\beta$ 1/CTGF 信号通路探讨山茱萸总甙对人骨关节炎软骨细胞增殖和凋亡的影响[J]. *疑难病杂志*, 2021, 20(03): 283-288. WANG G X, LI B L, TANG A M, et al. Effects of total glucosides of *Cornus officinalis* on the proliferation and apoptosis of human osteoarthritis chondrocytes based on TGF- $\beta$ 1/CTGF signaling pathway[J]. *J Difficult Difficult Diseases*, 2021, 20(03): 283-288.
- [19] 廖州伟, 王立新, 胡烈奎, 等. 牛膝醇提物对人膝骨关节炎软骨细胞增殖、周期及凋亡的影响[J]. *世界中西医结合杂志*, 2019, 14(11): 1539-1542. LIAO Z W, WANG L X, HU L K, et al. Effects of alcoholic extract of *Achyranthes* on the proliferation, cycle and apoptosis of chondrocytes in human knee osteoarthritis[J]. *World J Integrative Med*, 2019, 14(11): 1539-1542.
- [20] 张洪美, 李劲, 何名江, 等. 温阳益髓方对兔膝骨关节炎模型骨髓干细胞动员和分化的影响[J]. *中国骨与关节损伤杂志*, 2014, 29(5): 468-471. ZHANG H M, LI J, HE M J, et al. Effects of Wenyang Yisui Recipe on the mobilization and differentiation of bone marrow stem cells in a rabbit knee osteoarthritis model[J]. *Chin J Bone Joint Injury*, 2014, 29(5): 468-471. Chinese.
- [21] 邸冬雪. 基于 PI3K/Akt 信号通路探讨补肾除湿方对软骨细胞

- 凋亡的作用机制及临床研究[D]. 中国中医科学院, 2019.
- DI D X. Based on the PI3K/Akt signaling pathway to explore the mechanism and clinical research of Bushen-Chushi Recipe on chondrocyte apoptosis[D]. China Academy of Chinese Medical Sciences, 2019. Chinese.
- [22] DE VOS R J, WEIR A, VAN SCHIE H T, et al. Platelet-rich plasma injection for chronic Achilles tendinopathy: a randomized controlled trial[J]. JAMA, 2010, 303(2): 144-149.
- [23] TAO S C, YUAN T, RUI B Y, et al. Exosomes derived from human platelet-rich plasma prevent apoptosis induced by glucocorticoid-associated endoplasmic reticulum stress in rat osteonecrosis of the femoral head via the Akt/Bad/Bcl-2 signal pathway[J]. Theranostics, 2017, 7(3): 733-750.
- [24] TORREGGIANI E, PERUT F, RONCUZZI L, et al. Exosomes: novel effectors of human platelet lysate activity[J]. Eur Cell Mater, 2014, 28: 137-151; discussion 151.
- [25] MIYATAKE K, IWASA K, MCNARY S M, et al. Modulation of superficial zone protein/lubricin/PRG4 by kartogenin and transforming growth factor- $\beta$ 1 in surface zone chondrocytes in bovine articular cartilage[J]. Cartilage, 2016, 7(4): 388-397.
- [26] QADRI M M, JAY G D, OSTROM R S, et al. cAMP attenuates TGF- $\beta$ 's profibrotic responses in osteoarthritic synoviocytes: involvement of hyaluronan and PRG4[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2018, 315(3): C432-C443.
- [27] 梁桂洪, 梁祖建, 谢平金, 等. 川芎嗪对膝骨性关节炎大鼠软骨下骨中 miR-20b/VEGF 和 BMP2/Smad1 通路的影响[J]. 中国药房, 2019, 30(4): 448-453.
- LIANG G H, LIANG Z J, XIE P J, et al. Effects of ligustrazine on miR-20b/VEGF and BMP2/Smad1 pathways in subchondral bone of knee osteoarthritis model rats[J]. China Pharm, 2019, 30(4): 448-453. Chinese.
- [28] 曹一汀. FGF2 调控软骨下骨活性促进关节软骨损伤修复的研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2017.
- CAO Y T. The study of the effect of FGF2 on promoting the repair of articular cartilage defect by modulating subchondral bone [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2017. Chinese.
- [29] 单桂秋, 施琳颖, 李艳辉, 等. 自体富血小板血浆制备技术专家共识[J]. 中国输血杂志, 2021, 34(07): 677-683.
- SHAN G Q, SHI L Y, LI Y H, et al. Expert consensus on preparation technology of autologous platelet-rich plasma[J]. China J Blood Transfusion, 2021, 34(07): 677-683. Chinese.
- (收稿日期: 2023-01-13 本文编辑: 李宜)

## 椎体和椎间盘矢状面形态学改变对退变性脊柱后凸畸形的影响

何守玉, 李海东, 闵继康, 罗盛昌, 戴季林

(湖州师范学院附属第一医院脊柱外科, 浙江 湖州 313000)

**【摘要】** 目的: 探讨椎体楔形变和椎间盘退变(塌陷)等形态学改变对成人退变性胸腰椎/腰椎后凸畸形的影响。方法: 回顾性分析 2015 年 8 月至 2020 年 12 月收治的 32 例脊柱退变性胸腰椎/腰椎后凸畸形患者, 其中男 8 例, 女 24 例, 年龄 48~75(60.3 $\pm$ 12.4)岁。在站立位全脊柱正侧位 X 线片上测量脊柱冠状面侧凸 Cobb 角和矢状面胸腰椎/腰椎后凸角(kyphosis angle, KA), 评估顶椎(apex vertebral, AV)及顶椎上下各 2 个椎体(AV-1, AV-2, AV+1, AV+2)与椎间盘(AV-1D, AV-2D, AV+1D, AV+2D)的高度及楔变参数, 包括椎体前缘高度(anterior vertebral body height, AVH), 椎体后缘高度(posterior vertebral body height, PVH), 椎体楔变角(vertebral wedge angle, VWA), 椎体楔变率(ratio of vertebral wedging, RVW); 椎间盘前缘高度(anterior disc height, ADH), 椎间盘后缘高度(posterior disc height, PDH), 椎间盘楔变角(disc wedge angle, DWA), 椎间盘楔变率(ratio of disc wedging, RDW), 椎间盘贡献率(DWA/KA)。结果: 所纳入患者 KA 为(44.2 $\pm$ 19.1) $^{\circ}$ , 后凸节段内椎体前缘高度均显著低于椎体后缘高度( $P < 0.05$ ), 提示椎体发生不同程度楔形变; 而后凸节段内椎间盘前后缘高度差异无统计学意义。后凸节段内椎体楔变率/贡献率分别为 AV-2(14.98 $\pm$ 10.95)%/(14.21 $\pm$ 8.08)%, AV-1(21.08 $\pm$ 12.39)%/(18.09 $\pm$ 7.38)%, AV(26.94 $\pm$ 11.94)%/(25.52 $\pm$ 8.64)%, AV+1(24.19 $\pm$ 8.42)%/(20.82 $\pm$ 8.69)%, AV+2(20.56 $\pm$ 7.80)%/(15.60 $\pm$ 9.71)%, 椎体总贡献率为(94.23 $\pm$ 22.25)%; 后凸节段内椎间盘楔变率/贡献率分别为 AV-2D(2.88 $\pm$ 2.57)%/(5.27 $\pm$ 4.11)%, AV-1D(1.98 $\pm$ 1.41)%/(2.29 $\pm$ 2.16)%, AV+1D(-5.54 $\pm$ 3.75)%/(-0.57 $\pm$ 0.46)%, AV+2D(-8.27 $\pm$ 4.62)%/(-1.22 $\pm$ 1.11)%, 椎间盘总贡献率(5.77 $\pm$ 4.79)%, 且顶椎贡献率明显大于邻近椎体贡献率( $P < 0.05$ )。结论: 椎体楔形变及椎间盘塌陷共同构成了成人退变性胸腰椎/腰椎后凸畸形状态。就对后凸贡献率而言, 椎体形态改变对后凸的贡献要远超椎间盘的贡献, 且顶椎的楔形变对胸腰椎/腰椎后凸的贡献尤为明显。

项目基金: 浙江省医药卫生科技计划项目(编号: 2020KY941)

Fund program: Medicine and Health Science and Technology Plan Project of Zhejiang(No. 2020KY941)

通讯作者: 闵继康 E-mail: mjkk@medmail.com

Corresponding author: MIN Ji-kang E-mail: mjkk@medmail.com