伤科消炎水凝胶贴膏对骨关节炎模型大鼠的改善作用Δ

刘　炜[1]*，邹恺平[1]，王　琼[1]，王荣洲[1]，刘　顺[1]，王　娜[1]，严　然[2]#（1.江苏省中医院/南京中医药大学附属医院制剂部，南京　210029；2.中国药科大学理学院医药生物功能材料重点实验室，南京　211198）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）15-1853-05
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.15.12

摘　要　目的　研究伤科消炎水凝胶贴膏对骨关节炎模型大鼠的改善作用。**方法**　将大鼠随机分为空白组、模型组、扶他林组（200 mg/只）、伤科消炎膏组（500 mg/只，含伤科消炎流浸膏50 mg）和伤科消炎水凝胶贴膏组（200 mg/只，含伤科消炎流浸膏50 mg），每组8只。除空白组外，其余各组通过在大鼠右膝关节腔内注射木瓜蛋白酶和L-半胱氨酸构建骨关节炎模型，然后涂抹相应药物，每天换药1次，连续14 d。检测大鼠膝关节肿胀程度，观察大鼠膝关节磁共振成像特征；检测大鼠血清中白细胞介素1β（IL-1β）、IL-6、IL-18、肿瘤坏死因子α（TNF-α）水平；观察大鼠膝关节组织的病理形态学特征，并进行组织病理学评分及软骨Mankin评分；检测大鼠膝关节组织中IL-1β、IL-6、TNF-α蛋白表达。**结果**　与空白组比较，模型组大鼠膝关节严重肿胀，可见明显关节腔积液，外侧半月板前角呈团片状磨损；血清中IL-1β、IL-6、IL-18、TNF-α水平以及组织病理学评分和Mankin评分均显著升高（$P<0.05$）；膝关节组织中IL-1β、IL-6、TNF-α阳性蛋白表达均增加。与模型组比较，伤科消炎水凝胶贴膏组大鼠膝关节肿胀程度降低，可见少量关节腔积液，半月板形态完全正常；组织病理学评分和Mankin评分均显著降低（$P<0.05$）；血清中上述炎症因子水平均降低（$P<0.05$），膝关节中上述炎症因子蛋白的阳性表达均减少。**结论**　伤科消炎水凝胶贴膏可改善大鼠骨关节炎，其作用机制可能与降低关节组织和血清中炎症因子水平有关。

关键词　伤科消炎水凝胶贴膏；骨关节炎；炎症因子；大鼠

Improvement effects of Shangke xiaoyan hydrogel plaster on osteoarthritis model rats

LIU Wei[1], ZOU Kaiping[1], WANG Qiong[1], WANG Rongzhou[1], LIU Shun[1], WANG Na[1], YAN Ran[2]（1. Dept. of Preparation, Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine/the Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 2. Key Laboratory of Pharmaceutical Biofunctional Materials, School of Science, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the improvement effects of Shangke xiaoyan hydrogel plaster on osteoarthritis（OA）model rats. **METHODS** Rats were randomly divided into blank group, model group, voltaren group（200 mg/rat）, Shangke xiaoyan ointment group（500 mg/rat, containing Shangke xiaoyan fluid extract 50 mg）and Shangke xiaoyan hydrogel plaster group（200 mg/rat, containing Shangke xiaoyan fluid extract 50 mg）, with 8 rats in each group. Except for blank group, OA model was established in the other groups by injecting papain and L-cysteine into the right knee joint cavity of the rats; they applied the corresponding drugs, and changed the dressing once a day, for 14 consecutive days. The degree of knee joint swelling in rats was detected, and the magnetic resonance imaging characteristics of the knee joint in rats were observed; the levels of interleukin 1β（IL-1β）, IL-6, IL-18 and tumor necrosis factor（TNF-α）in rat serum were detected; the pathological and morphological characteristics of knee joint tissue were observed, and the histopathological and cartilage Mankin scores were performed; the protein expressions of IL-1β, IL-6 and TNF-α in knee joint tissue were all detected. **RESULTS** Compared with blank group, severe joint swelling, obvious joint effusion and patchy wear of the anterior horn of the lateral meniscus were observed in model group; the serum levels of IL-1β, IL-6, IL-18 and TNF-α and histopathological score and Mankin score were significantly increased（$P<0.05$）; protein expressions of IL-1β, IL-6 and TNF-α in knee joint tissue were increased. Compared with model group, the knee swelling degree of the rats in Shangke xiaoyan hydrogel plaster group was reduced, a small amount of joint cavity effusion could be seen, and the shape of the meniscus was completely normal; the histopathological score and Mankin score were significantly reduced（$P<0.05$）; the

Δ**基金项目**　江苏省中医院科技项目（No.Y2020CX75）

＊**第一作者**　主管药师，硕士。研究方向：药理学、中药药剂。E-mail：weiliu2007njucm@outlook.com

＃**通信作者**　副研究员，硕士生导师，博士。研究方向：高端制剂。E-mail：frankyan@cpu.edu.cn

levels of inflammatory factors in serum were reduced ($P<0.05$) and those of knee tissue were decreased. **CONCLUSIONS** Shangke xiaoyan hydrogel plaster can improve OA of rats, the mechanism of which may be associated with reducing the levels of inflammatory factors in joint and serum.

KEYWORDS Shangke xiaoyan hydrogel plaster; osteoarthritis; inflammatory factors; rat

骨关节炎（osteoarthritis，OA）是由磨损、年龄、肥胖等因素使关节软骨发生退行性改变的疾病[1]。在中医理论中，OA属中医学“骨痹”“痹症”等范畴。伤科消炎膏是江苏省中医院骨伤科用于治疗OA的著名院内制剂（苏药制字Z04001274，执行标准JSZBZ20091681Z），其处方主要由生草乌、生南星、独活、羌活等药物组成，具有活血化瘀、开窍透骨、祛风散寒、理气散结等功效[2]。尽管伤科消炎膏疗效显著，但其临床使用也存在一些不足：使用前需要护士二次涂布，膏剂受体表温度影响较大，患者依从性差等。因此，本课题组拟通过现代制剂工艺改进剂型，在不削弱药理作用的情况下提高其使用顺应性，从而实现伤科消炎膏这一经典临床经验方的传承与创新。

水凝胶具有较好的生物相容性、生物降解性、亲水性和无毒等特点[3]。近年来，其在中药透皮给药领域中应用广泛。相较于传统贴膏，水凝胶贴膏剂可显著提高药物经皮渗透性、涂布性与黏着性，从而提高治疗效果与患者使用顺应性[4-6]。本课题组在前期研究中制成了基于卡波姆、聚丙烯酸钠等骨架材料的伤科消炎水凝胶贴膏，具有亲肤、稠度适宜、便于保存等特性，极大地提高了伤科消炎膏的使用顺应性，且载药量高达25%。基于此，本研究拟建立OA模型大鼠，从关节形态学、炎症因子水平、血液生化指标、组织病理学等方面考察伤科消炎水凝胶贴膏对大鼠OA的改善作用，以期为该制剂的临床应用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究主要仪器有Power wave x340型酶标仪（美国BioTek公司），BioSpec 94/20 USR型小动物磁共振谱仪（美国Bruker公司），E100型显微镜（日本Nikon公司），Donatello型脱水机（意大利Diapath公司）。

1.2 药品及试剂

伤科消炎水凝胶贴膏、伤科消炎膏（批号分别为2203001、2205008，生药量分别为25%、10%）均由江苏省中医院制剂部提供。聚丙烯酸钠（批号S216233）购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；卡波姆、甘羟铝（批号分别为20210701、SG-0932）均购自上海泛科史康医药科技有限公司；扶他林（1%双氯芬酸二乙胺乳膏剂，批号VP1514）购自北京诺华制药有限公司；木瓜蛋白酶、L-半胱氨酸（批号分别为PAP1105N、CYSL1321M）购自上海源叶生物科技有限公司；兔源白细胞介素1β（interleukin-1β，IL-1β）单克隆抗体、兔源IL-6单克隆抗体、兔源肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G（IgG）二抗（批号分别为GB11113、GB11117、GB11188、GB23303）均购自武汉赛维尔生物科技有限公司；IL-1β、IL-6、TNF-α测定盒购自北京索莱宝科技有限公司。

1.3 实验动物

本研究所用动物为SPF级SD大鼠，雄性，体重为200～220 g，由上海市计划生育科学研究所实验动物经营部提供，动物生产许可证为SCXK（沪）2018-0006。动物实验方案经中国药科大学动物伦理委员会审核批准，批准号为2022-06-018。

2 方法

2.1 伤科消炎水凝胶贴膏的制备

将处方中8味药材置于浸渍桶中并加入适量70%乙醇浸泡15 d，过滤，滤液减压浓缩并回收乙醇得到伤科消炎流浸膏。将聚丙烯酸钠、甘羟铝加入甘油中搅拌均匀，为A相；将卡波姆加适量纯化水充分溶胀后，加入伤科消炎流浸膏混合均匀，为B相；将酒石酸加适量纯化水溶解，为C相。最后，将A、B、C相加入真空搅拌机中搅拌成均匀黏稠的胶体，涂布于贴膏剂背衬纸后固化过夜，待用。

2.2 造模、分组及给药

将大鼠适应性喂养1周后，随机分为空白组、模型组、扶他林组（阳性对照药）、伤科消炎膏组、伤科消炎水凝胶贴膏组，每组8只。大鼠禁食禁水12 h后，在右膝关节周边区域备皮，消毒。弯曲大鼠右膝关节，以髌骨下白色髌腱外缘的膝眼为进针点，向髁间窝方向穿刺进针，抵达股骨髁后撤回少许，以100 μL微量注射器注射木瓜蛋白酶与L-半胱氨酸的混合液（0.1 mL/kg）进行造

模，消毒，常规护理。于造模后第4、7天时，以上述相同方法再次注射木瓜蛋白酶与L-半胱氨酸的混合液进行加强[7]。随后观察大鼠关节肿胀程度（以关节直径计）评估造模进展，并在造模后第21天采用核磁共振技术观察大鼠软骨、半月板损伤程度以及关节腔积液等指标。当大鼠关节可见软骨、半月板磨损以及关节腔积液则表明造模成功[8]。

造模成功后，扶他林组（200 mg/只）、伤科消炎膏组（500 mg/只，含伤科消炎流浸膏50 mg）、伤科消炎水凝胶贴膏组（200 mg/只，含伤科消炎流浸膏50 mg）大鼠分别在右膝涂抹相应药物，给药剂量依据临床等效剂量换算而得，给药面积均为1 cm×2 cm，给药区表面用聚乙烯膜覆盖，每天换药1次，连续14 d。空白组与模型组大鼠右膝相同部位用聚乙烯膜覆盖，但不给药。

2.3 大鼠膝关节形态的观察

造模完成后，分别在给药0、4、7、11、14 d时，采用游标卡尺测量大鼠右膝关节直径，进行膝关节肿胀程度评价。末次给药结束后，使用小动物磁共振谱仪以R2模式扫描大鼠右膝关节，观察其膝关节磁共振成像特征。

2.4 样本采集

末次给药后，对所有大鼠进行眼眶采血，于室温放置分层后，以4 000 r/min离心10 min，取上层血清于−20 ℃保存备用。取血完成后，解剖大鼠，收集肝、肾、右膝关节组织备用。

2.5 大鼠血清中炎症因子水平的检测

取“2.4”项下血清样品，按试剂盒说明书方法操作，测定血清中IL-1β、IL-6、IL-18、TNF-α水平。

2.6 大鼠膝关节组织的病理形态学观察

取3只大鼠的膝关节组织置于恒温摇床脱钙60 d，经脱水浸蜡后进行包埋、切片（4 μm）、烤片；取部分石蜡切片（剩余部分进行免疫组化实验）脱蜡至水，然后进行苏木精-伊红染色和番红-固绿染色，再以中性树胶封片，采用显微镜进行观察，并进行组织病理学评分及软骨Mankin评分[9]。

2.7 大鼠膝关节组织中IL-1β、IL-6、TNF-α蛋白表达的检测

采用免疫组化法进行检测。将“2.6”项下剩余的膝关节组织石蜡切片脱蜡至水，然后进行抗原修复、血清封闭，加入IL-1β、IL-6、TNF-α一抗（稀释比例分别为1∶500、1∶200、1∶200）于4 ℃孵育过夜；以磷酸盐缓冲液（PBS，pH7.4）洗涤后，加入相应二抗，室温孵育2 h；以PBS洗涤后，置于DAB显色液中显色，在显微镜下控制显色时间，以棕黄色为阳性染色。当出现阳性染色时，以自来水冲洗切片终止显色；将终止显色的切片放入苏木素染色液中复染，并进行中性树胶封片，然后置于显微镜下观察相关蛋白的表达情况。

2.8 统计学方法

采用Graphpad Prism 7软件进行数据统计，数据以$\bar{x}\pm s$表示。多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用Tukey检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 伤科消炎水凝胶贴膏对OA模型大鼠膝关节形态的影响

给药14 d后，空白组大鼠膝关节完全正常，模型组大鼠膝关节严重肿胀，各给药组大鼠膝关节肿胀程度均较模型组有不同程度的降低，结果见图1。模型组大鼠膝关节成像可见明显关节腔积液，外侧半月板前角呈团片状磨损；伤科消炎膏组大鼠膝关节成像可见部分关节腔积液，外侧半月板前后角下缘呈线状、点状损伤；扶他林组和伤科消炎水凝胶贴膏组大鼠虽可见关节腔少量积液，但半月板形态完全正常，结果见图2。

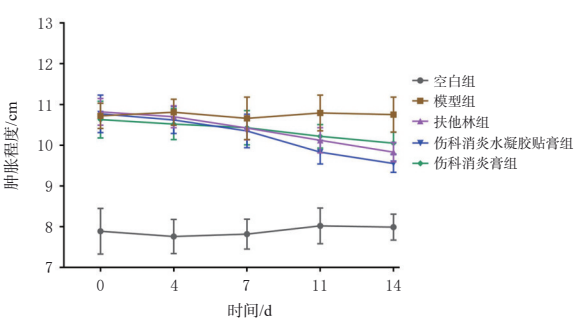


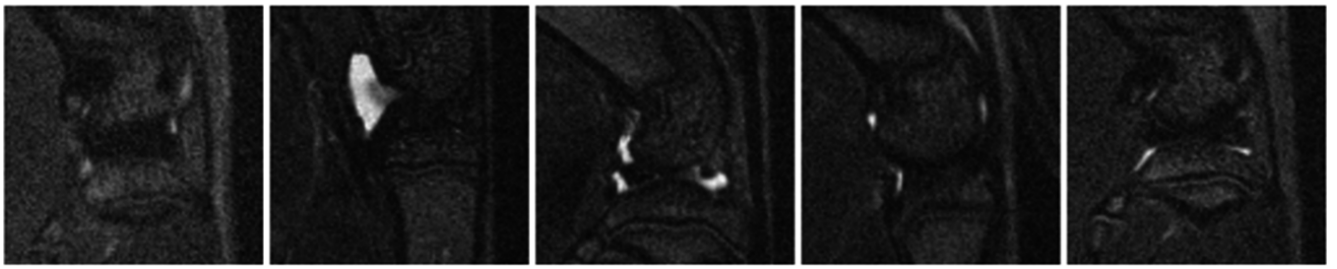
图1 各组大鼠膝关节肿胀程度比较结果（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

3.2 伤科消炎水凝胶贴膏对OA模型大鼠血清中炎症因子水平的影响

与空白组比较，模型组大鼠血清中IL-1β、IL-6、IL-18、TNF-α水平均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，各给药组大鼠血清中上述炎症因子水平均在一定程度上有所降低，其中，伤科消炎水凝胶贴膏组大鼠血清中IL-18、TNF-α水平均显著降低（$P<0.05$）。与伤科消炎膏比较，伤科消炎水凝胶贴膏组大鼠血清中上述指标水平均降低，但差异无统计学意义。结果见表1。

3.3 伤科消炎水凝胶贴膏对OA模型大鼠膝关节组织的病理形态学影响

与空白组大鼠比较，模型组大鼠膝关节组织具有软骨着色减弱、滑膜细胞增生与淋巴细胞浸润等特征，并可观察到损伤已侵及松质骨；伤科消炎膏、扶他林以及



A.空白组　B.模型组　C.扶他林组　D.伤科消炎水凝胶贴膏组　E.伤科消炎膏组

图2　各组大鼠右膝关节磁共振成像结果

表1　各组大鼠血清中炎症因子水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=8$，pg/mL）

组别	IL-1β	IL-6	IL-18	TNF-α
空白组	34.13±15.10	29.78±9.03	13.01±9.48	28.92±9.18
模型组	60.23±13.51[a]	49.35±17.97[a]	32.68±5.21[a]	58.40±12.30[a]
扶他林组	47.31±14.23	40.75±15.71	25.82±8.53	43.26±10.29
伤科消炎膏	51.57±17.01	43.88±16.75	20.22±9.59	47.63±16.35
伤科消炎水凝胶贴膏组	45.83±17.12	37.25±13.04	17.24±13.64[b]	37.61±12.23[b]

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

表2　各组大鼠膝关节组织病理学评分与Mankin评分结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$，分）

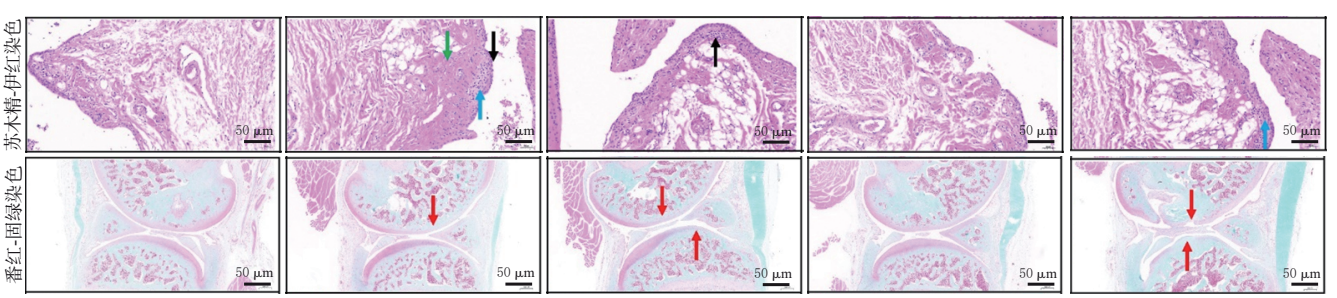
组别	组织病理学评分	Mankin评分
空白组	0.33±0.58	0.33±0.58
模型组	5.67±0.58[a]	10.67±1.53[a]
扶他林组	1.67±1.16[b]	4.67±1.16[b]
伤科消炎膏	2.67±0.58[b]	2.67±0.58[b]
伤科消炎水凝胶贴膏组	1.67±0.58[b]	4.00±1.00[b]

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

伤科消炎水凝胶贴膏均在一定程度上缓解了以上症状，且伤科消炎水凝胶贴膏的作用更好。结果见图3。组织病理学评分和Mankin评分结果显示，与空白组比较，模型组大鼠上述评分均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，各给药组大鼠上述评分均显著降低（$P<0.05$）。结果见表2。

3.4　伤科消炎水凝胶贴膏对OA模型大鼠膝关节组织中IL-1β、IL-6、TNF-α蛋白表达的影响

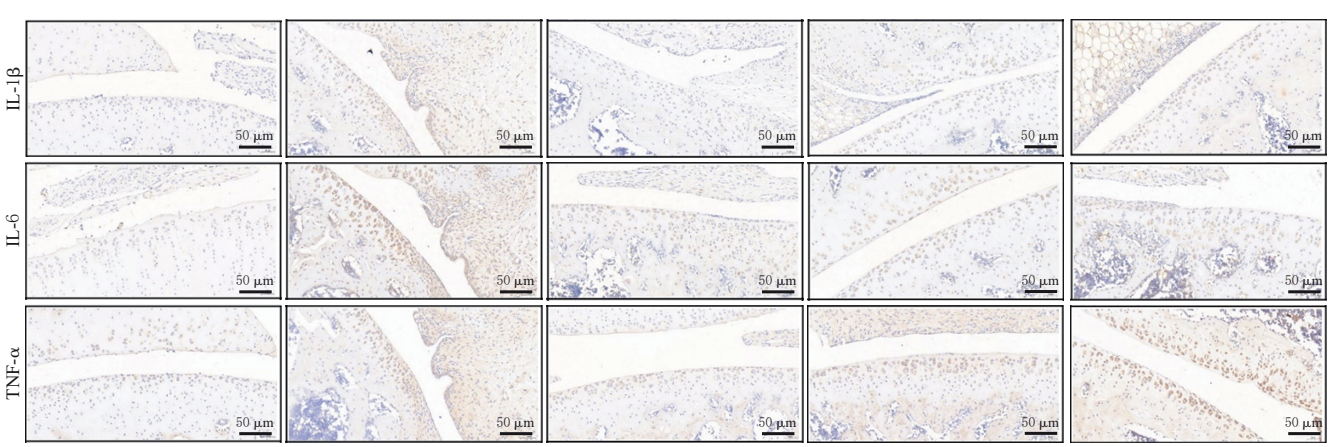
与空白组比较，模型组大鼠膝关节组织中IL-1β、IL-6、TNF-α蛋白阳性表达水平均增加；与模型组比较，各给药组大鼠膝关节组织中上述蛋白阳性表达均减少。结果见图4。



A.空白组　B.模型组　C.扶他林组　D.伤科消炎水凝胶贴膏组　E.伤科消炎膏组

注：黑色箭头为滑膜细胞增生，绿色箭头为软骨表面增生的结缔组织，蓝色箭头为淋巴细胞，红色箭头为软骨着色减弱。

图3　各组大鼠膝关节组织病理形态学的观察结果



A.空白组　B.模型组　C.扶他林组　D.伤科消炎水凝胶贴膏组　E.伤科消炎膏组

图4　各组大鼠膝关节组织中IL-1β、IL-6、TNF-α蛋白表达的免疫组化图

4 讨论

伤科消炎膏在临床已应用十余年，对OA有确切疗效，但该制剂的临床依从性较差，因此限制了其进一步的推广应用。针对以上不足，本研究团队在伤科消炎膏的基础上研发了伤科消炎水凝胶贴膏，现考察其对OA的改善作用，以期为该新剂型的应用提供参考。

关节肿胀是OA的典型症状，通常由关节积液导致。在本研究中体外关节尺寸监测与磁共振成像结果显示，伤科消炎水凝胶贴膏可有效减少关节积液从而缓解关节肿胀程度，且效果优于伤科消炎膏，这直观地体现了伤科消炎水凝胶贴膏对OA主要症状的治疗作用。除了关节肿胀程度与关节积液外，炎症因子水平也是临床诊断关节炎程度的重要指标之一[10]。目前，相关研究发现，OA患者关节软骨、滑膜等组织中IL-1β、IL-18、IL-6以及TNF-α表达明显增高，说明这些炎症因子在OA的发展过程中起到了重要作用[11]。在OA发生发展过程中，炎症因子的成熟和分泌，可引起软骨细胞凋亡，从而破坏关节[12]。本研究结果显示，伤科消炎水凝胶贴膏可降低OA模型大鼠血清中IL-1β、IL-18、IL-6、TNF-α水平和膝关节组织中IL-1β、IL-6、TNF-α水平，且效果与伤科消炎膏相当。

综上所述，伤科消炎水凝胶贴膏可改善大鼠OA的症状，其作用机制可能与降低关节组织和血清中炎症因子水平有关。值得注意的是，伤科消炎水凝胶贴膏不仅优化了伤科消炎膏的剂型，还保留了其药理作用，这也为传统中药的传承与创新提供了新的思路。

参考文献

[1] KATZ J N, ARANT K R, LOESER R F. Diagnosis and treatment of hip and knee osteoarthritis: a review[J]. JAMA, 2021, 325(6): 568-578.

[2] 夏天卫，施乐，樊燕鑫，等. 伤科消炎膏与双氯芬酸二乙胺乳胶剂对比治疗膝关节骨关节炎的临床研究[J]. 世界临床药物，2018，39(10)：677-682.

[3] CAO H, DUAN L X, ZHANG Y, et al. Current hydrogel advances in physicochemical and biological response-driven biomedical application diversity[J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 426.

[4] HU X H, TAN H P, CHEN P, et al. Polymer micelles laden hydrogel contact lenses for ophthalmic drug delivery [J]. J Nanosci Nanotechnol, 2016, 16(6): 5480-5488.

[5] XU J K, LI X S, SUN F Q. Preparation and evaluation of a contact lens vehicle for puerarin delivery[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2010, 21(3): 271-288.

[6] 李栋，唐永和，王海洋，等. D-最优混料设计优化实脾消水凝胶贴膏的处方[J]. 中国药师，2021，24(12)：2249-2252，2292.

[7] AN S B, HU H Y, LI Y S, et al. Pyroptosis plays a role in osteoarthritis[J]. Aging Dis, 2020, 11(5): 1146-1157.

[8] 杨博鸿. 壮骨活血汤对木瓜蛋白酶诱导的KOA大鼠炎症及软骨基质作用机制研究[D]. 北京：北京中医药大学，2020.

[9] 廖太阳，张力，杨楠，等. 基于AMPK/mTOR信号通路研究膝痹宁方对膝骨关节炎模型大鼠的改善作用机制[J]. 中国药房，2023，34(1)：23-28.

[10] WOODELL-MAY J E, SOMMERFELD S D. Role of inflammation and the immune system in the progression of osteoarthritis[J]. J Orthop Res, 2020, 38(2): 253-257.

[11] MOLNAR V, MATIŠIĆ V, KODVANJ I, et al. Cytokines and chemokines involved in osteoarthritis pathogenesis[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(17): 9208.

[12] 朱琳，孙玄静，陈鹏，等. 硫酸氨基葡萄糖联合依托考昔对膝骨性关节炎软骨修复作用机制研究[J]. 疑难病杂志，2020，19(5)：490-495.

（收稿日期：2023-02-13　修回日期：2023-07-07）

（编辑：唐晓莲）