

适度。氟比洛芬酯是一种新型非甾体抗炎药,具有抗炎、镇痛及解热作用。氟比洛芬酯脂微球载体注射液,采用微球载体技术,通过脂微球对其所包裹的药物氟比洛芬酯来达到靶向性,控制包裹药物的释放,易于跨越细胞膜从而促进包裹药物的吸收来进一步缩短起效时间,静脉滴注 5~10min 血药浓度可达峰值,药效持续时间更长,可达 6h 以上^[3]。其用于术后镇痛,优点在于没有中枢抑制作用,不会产生阿片类镇痛药的不良反应,不影响处于麻醉状态患者的苏醒,可在术后立即使用。采用 PCIA 模式给药可提供稳定的血药浓度,避免消化道局部刺激,而且可以自我控制,用于小儿术后镇痛具有一定优势。本研究发现 A、C 两组应用氟比洛芬酯术后镇痛效果良好,VAS 评分均小于 4 分,但 12h 内 A 组 VAS 评分比 C 组高、患儿 PCA 需求次数比 C 组多及术后不良反应(恶心、呕吐)发生率高。原因可能是非甾体类抗炎药的镇痛作用具有“封顶效应”,单独使用往往不能充分缓解大手术后早期的疼痛,大剂量的应用会增加不良反应发生^[4]。

舒芬太尼是临床常用的镇痛药,镇痛效价是芬太尼的 7~10 倍,但大剂量使用时存在嗜睡、呼吸抑制、恶心呕吐、尿滞留、皮肤瘙痒等不良反应^[5,6]。因小儿中枢神经系统发育不完善,呼吸中枢对阿片类药物敏感,病情变化快,采用舒芬太尼静脉自控镇痛,大剂量可能增加术后呼吸道梗阻及误吸等不良反应的发生率,用量小则易致镇痛不足,存在有一定顾虑,限制了其在临床上的广泛使用。本研究结果显示单独使用舒芬尼组的不良反应嗜睡、呼吸抑制发生率高于氟

比洛芬酯联合舒芬太尼镇痛组,结果与孙福德等研究结果一致^[7]。本研究采用氟比洛芬酯联合舒芬太尼持续静脉镇痛减少了舒芬太尼用量,患儿恶心、呕吐、嗜睡及呼吸抑制的发生率明显低于单纯舒芬太尼镇痛组。提示应用氟比洛芬酯联合舒芬太尼的镇痛方案,在减少阿片类药物用量的基础上,能达到与单用舒芬太尼相当的镇痛作用而减少了不良反应发生率。

综上所述,氟比洛芬酯联合舒芬太尼用于小儿术后持续静脉镇痛是安全有效的,联合用药既利用药物的相互作用,使术后镇痛更加迅速、平稳,最大程度地降低药物单独使用出现的不良反应,又提高了术后镇痛效果,值得临床推广应用。

参考文献

- 1 段砺瑕,李晓玲.氟比洛芬酯注射液的药理作用及临床应用[J],中国新药杂志,2004,13(9):851-852
- 2 罗爱伦,张亚军.要重视小儿术后疼痛管理.中华麻醉学杂志,1999,19(3):133
- 3 卞新荣.氟比洛芬酯脂微球注射液及其临床应用.实用肿瘤学杂志,2007,21(2):173-175
- 4 Moote C. Efficacy of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the management of postoperative pain[J]. Drugs,1992,44 (Supp 15):14-30
- 5 余守章.新型阿片类药物在患者自控镇痛治疗中的研究进展.广东医学,2005,26(10):1330
- 6 Scott Li,Perry C M. Tramadol:a review of its use in perioperative pain [J]. Drug,2000,60(1):139-176
- 7 孙福德,唐祖恩,吴文双.舒芬太尼用于小儿术后静脉镇痛最佳剂量研究.重庆医学,2009,38(11):1400

(收稿:2010-07-03)

(修回:2010-09-20)

电针对膝骨关节炎大鼠软骨 bFGF 表达的影响

王道海 孙 华 包 飞 吴志宏 王凤琴 张云祥

摘 要 目的 探讨电针对骨关节炎(OA)软骨修复的影响。**方法** 40 只 SD 雌性大鼠随机分为正常组、模型组、治疗组、对照组各 10 只。采用单侧后肢跟腱切除法建立 OA 动物模型,即:切除右侧后肢跟腱,建立左侧后肢膝骨关节炎模型。术后 4 周对治疗组非手术侧(左侧)和对照组手术侧(右侧)膝关节采用电针治疗 2 周。实验第 7 周收集每只动物左侧膝关节股骨端软骨,组织病理切片行免疫组化染色,观察碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)在软骨组织中表达的特点。**结果** 治疗组软骨 bFGF 的表达增强,较其他三组有非常显著差异($P < 0.01$)。**结论** 电针对 OA 大鼠膝关节软骨 bFGF 的表达具有上调作用,提示电针可能具有促进软骨修复作用。

作者单位:100730 中国医学科学院/北京协和医学院北京协和医院中医科(王道海、孙华、包飞、王凤琴、张云祥);骨科(吴志宏)

通讯作者:包飞,电子邮箱:zengfei68@tom.com

关键词 电针 骨关节炎 碱性成纤维细胞生长因子

Influence of Electro - acupuncture on bFGF Expression in the Cartilage of Knee Osteoarthritic Rats. Wang Daohai, Sun Hua, Bao Fei, Wu Zhihong, Wang Fengqin, Zhang Yunxiang. Department of Traditional Chinese Medicine, Peking Union Medical College Hospital, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

Abstract Objective To study the influence of electro - acupuncture on renovation of osteoarthritic cartilage. **Methods** 40 female SD rats were randomly divided into four groups: the normal, model, treatment and control group. Using the method of heel tendon resection for unilateral hind limb, we established the OA animal model, that was cutting off the heel tendon of right hind limb to establish the knee OA model of left hind limb. The left knees (no operation side) of treatment group and right ones (operation side) of control group were treated by electro - acupuncture for two weeks from the fifth week since operation. We collected cartilage of all rats' left knees at the seventh week since the beginning of experiment. We used immunohistochemical staining to observe bFGF expression in cartilage. **Results**

bFGF expression in treatment group was very significantly stronger than the other three groups ($P < 0.01$). **Conclusion** Electro - acupuncture up - regulates the level of bFGF in cartilage of knee osteoarthritic rats. It indicates that electro - acupuncture is probably effective in promoting cartilage renovation.

Key words Electro - acupuncture; Osteoarthritis; bFGF

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是以关节软骨降解为特征的退行性关节疾病,临床以膝骨关节炎最为常见。针灸具有疏通经络、调和阴阳的作用,对 OA 具有镇痛、消肿、改善关节活动功能的作用。关节软骨是自我修复能力有限的组织,针灸能促进皮肤、肌肉、肌腱、韧带、神经及骨组织损伤、断裂的修复和再生,但有否促进软骨修复作用,尚有待研究。碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 可以刺激间质细胞、成纤维细胞、骨髓基质细胞、软骨细胞和成骨细胞的分裂,对 OA 软骨损伤的修复具有重要意义。为探讨电针对 OA 软骨修复的影响,笔者采用单侧后肢跟腱切除法制备大鼠膝 OA 模型,进行电针治疗后,采用免疫组化染色法,观察 bFGF 在膝关节软骨组织表达的特点。

材料与方法

1. 实验动物与分组:健康雌性清洁级 SD 大鼠 40 只,6~7 周龄,体重 $190 \pm 10\text{g}$,由维通利华实验动物有限公司提供。按照随机数字表随机分配到正常组、模型组、治疗组、对照组各 10 只。动物实验室:北京协和医院动物实验室。

2. 主要试剂和仪器:鼠抗 bFGF 单克隆抗体 (美国 Santa 公司)。针具:汉医牌直径 $0.20 \times 13\text{mm}$ 无菌针灸针,北京汉医医疗器械中心。电针仪:长城牌 KWD - 808 II 全能脉冲电疗仪。生物组织自动脱水机、石蜡包埋机、切片机、展片机、烤片机;LEICA, West - Germany。光学显微镜:Nikon eclipse 80i, Japan,连接 Nikon CCD DS - SMC 照相机。

3. 动物模型制备:采用单侧后肢跟腱切除法,切除右侧后肢跟腱,术后自由活动、进食、饮水,4 周后造模成功^[1]。

4. 干预方法:①正常组无处理;②模型组造模术后不予治疗;③治疗组于造模术后第 5 周开始治疗,取左侧膝前、后三里 (膈穴定位参照林文注主编《实验针灸学》,上海科学技术

出版社,1994),穴位常规消毒,针刺入穴位后,行平补平泻手法,得气后接电针仪,采用连续波刺激 20min,频率 2Hz,强度以局部肌肉出现收缩为度。每日 1 次,5 次为 1 疗程,疗程间休息 2 天,治疗 2 个疗程;④对照组取右侧膝前、后三里穴,其余条件同治疗组。

5. 标本处理:实验第 7 周采用断髓法处死全部动物,收集每只动物左侧膝关节股骨端软骨,用 4% 多聚甲醛固定,10% 甲醛浸泡,15% EDTA 浸泡,石蜡包埋。

6. FGF - 2 免疫组织化学染色:切片层厚 $5\mu\text{m}$,暴露抗原,二甲苯脱蜡,梯度乙醇组织切片水化,抗原修复,过氧化物酶阻断剂抑制内源性过氧化物酶,蛋白阻断剂孵育,一抗孵育,一抗后封闭剂孵育,二抗孵育, DAB 液显色,苏木素复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

7. 图像分析:①先在 10 倍物镜下确定股骨软骨面内、外侧髁顶点,换 20 倍物镜,在内、外侧髁顶点及附近区域各取 2 个视野,共 4 个视野。显微镜物镜固定为 20 倍,应用彩色图像采集软件 NIS - Elements F 摄取图像;②采用 Image - Pro Plus 5.0 专业图像分析软件进行图像分析,测定 FGF - 2 表达阳性细胞的光密度值 (indicator optic density, IOD)。

8. 统计学处理:bFGF 表达阳性细胞 IOD 值以 $\bar{x} \pm s$ 表示。统计分析采用 SPSS11.0 for Windows 软件,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 q 检验。

结 果

1. HE 染色结果:正常组软骨表面光滑,表层细胞呈梭形,近似水平排列,中间层细胞圆形,散在分布,柱状层细胞排列呈柱状,软骨细胞簇少量。模型组关节软骨变薄,表面欠光滑,软骨细胞数目减少,细胞排列紊乱,有较多软骨细胞簇出现。治疗组软骨细胞增生明显,大量软骨细胞成簇出现。对照组软骨变薄,软骨细胞数目减少,细胞排列紊乱,可见较多软骨细胞簇。

2. 免疫组织化学染色结果:正常组软骨细胞偶见浅棕黄色 bFGF 弱阳性染色。模型组和对照组软骨细胞可见少量浅棕黄色 bFGF 弱阳性染色。治疗组可见大量软骨细胞呈棕黄色 bFGF 阳性染色。4 组软骨组织 bFGF 免疫组化染色结果($\times 200$),见图 1 ~ 图 4。

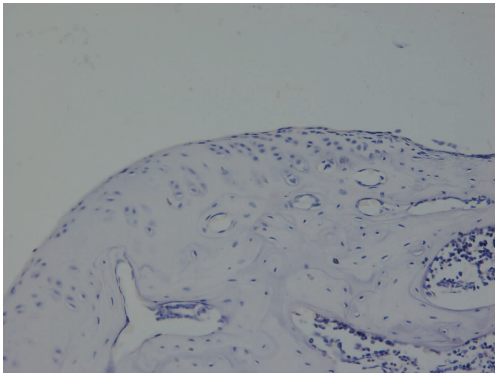


图 1 正常组软骨细胞偶见浅棕黄色弱阳性染色

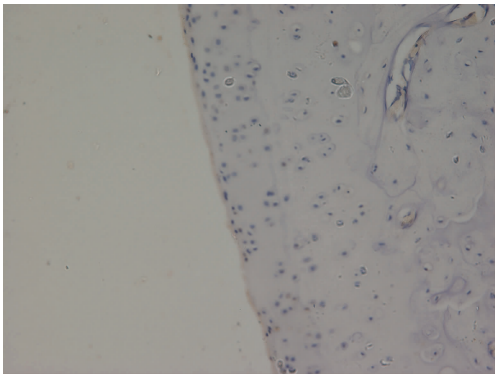


图 2 模型组软骨细胞可见少量浅棕黄色弱阳性染色

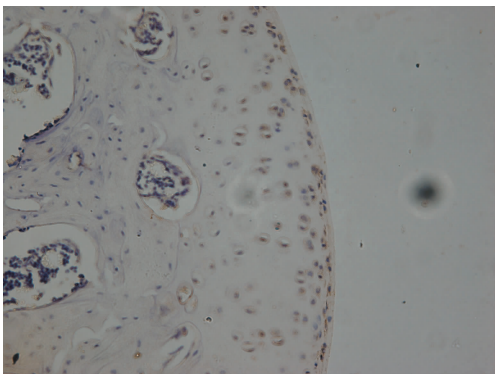


图 3 治疗组可见大量软骨细胞呈棕黄色阳性染色

3. 图像分析结果:4 组软骨 bFGF 阳性表达细胞 IOD 值比较,见表 1。由表 1 可知,4 组组间差异非常显著。正常组 bFGF 的表达较其他 3 组有非常显著

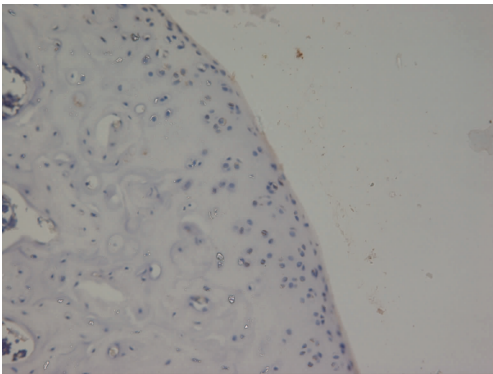


图 4 对照组软骨细胞可见少量浅棕黄色弱阳性染色

差异($P < 0.01$),治疗组与模型组和对照组间都有非常显著性差异($P < 0.01$),而模型组与对照组间差异不显著($P > 0.05$)。

表 1 4 组软骨 bFGF 阳性表达细胞 IOD 值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠(只)	IOD
正常组	10	811.02 $\pm$ 143.15
模型组	10	1540.30 $\pm$ 505.53 *
治疗组	10	3698.16 $\pm$ 928.31 * Δ #
对照组	10	1966.84 $\pm$ 431.67 *

与正常组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$;与对照组比较, # $P < 0.01$

讨 论

1. OA 动物模型的制备:OA 多累及负重关节和手小关节,临床以膝关节炎最为常见,女性多于男性。异常高应力是导致关节软骨退变的重要因素之一,故本研究选用雌性大鼠单侧后肢跟腱切除法制备膝 OA 动物模型^[2]。一侧后肢跟腱切除后,对侧后肢负重代偿性增加,膝关节应力异常增高。电镜观察,造模术后 1 周软骨表面光整,无凹陷无裂隙^[1]。术后 2 周软骨表面出现凹陷和小裂隙,胶原纤丝裸露。术后 4 周,软骨表面的许多部位出现裂隙,部分裂隙较宽大,纵横交错,属 OA 中期病理改变。跟腱切除法属 OA 的关节外诱发模型,膝关节结构和稳定性未遭破坏,较切断膝关节交叉韧带、半月板、关节内注射药物等关节内干预法更接近人类 OA 的形成过程,且方法简单,创伤小,成功率高^[3]。本研究无动物死亡发生。该法只改变后肢的负重,不影响肢体活动,将负重和活动二因素分开,有助于着重研究负重增加对关节软骨的影响。

2. OA 软骨 bFGF 表达的意义:骨关节炎首先表现为基质的变性,继而导致软骨细胞的变性和坏死,

从软骨的浅层发展到深层,直至出现软骨全层的消失及软骨下骨增生。早期基质破坏轻,软骨细胞虽有坏死但以变性为主,存在活跃的增生与再生、合成与分泌。随着病变发展,基质破坏严重以致消失,软骨细胞的死亡与再生、基质的降解与合成之间的平衡被打破,机体只有靠纤维组织和骨组织增生来修补软骨的缺损^[4]。成纤维细胞生长因子(FGF)是一个能调节细胞增生、分化和功能的多肽家族,包括 9 个成员,由于能明显促进成纤维细胞增生而得名^[5]。bFGF 是一种多功能非特异性活性多聚肽物质,广泛存在于机体组织,能促进来源于中胚层和神经外胚层细胞的分裂增生,具有很强的促进间质细胞、成纤维细胞、骨髓基质细胞、骨原细胞、成骨细胞、成软骨细胞的分裂增生作用,能诱导间质细胞分化为软骨细胞并通过软骨内骨化形成骨组织,并能促进毛细血管内皮细胞增生,因而可能在骨关节炎的基质合成、软骨修复、纤维组织填充及骨赘形成过程中发挥重要作用^[6-8]。

3. 电针对 OA 软骨 bFGF 表达的影响:骨关节炎属中医“痹症”范畴,针灸治疗痹症历史悠久,具有镇痛、消肿、改善关节活动功能的作用^[9]。本实验针灸处方选用膝前、后三里穴,并加以电刺激。膝前相当于人体犊鼻穴,是根据近部取穴原则选取,可直接刺入关节腔,作用于受损关节软骨局部;后三里相当于人体足三里穴,也是根据近部取穴原则选取,同时,针对痹症本虚的特点,可激发多气多血的阳明经补益膝关节局部气血;将微量电流通过针体导入关节腔,可加强针感,控制刺激参数。

正常软骨细胞合成基质的速度很慢。本实验中正常组软骨 bFGF 偶见弱阳性表达,模型组软骨细胞有少量浅棕色弱阳性染色,说明受损的关节软骨具有一定的修复能力,能代偿性地合成和分泌 bFGF,但数量较少,显示其自然修复能力有限。而治疗组则有大量软骨细胞呈棕黄色 bFGF 阳性染色,说明电针刺激可促进 bFGF 的合成与分泌。电针对照组取穴与治疗组同名异侧,结果对照组与模型组 bFGF 的表达无差异,而治疗组则较两者均明显增强,说明电针上调 bFGF 的表达主要是通过局部作用来实现的,提示临床 OA 针灸处方应以近部取穴原则为主。造模术后 4 周病变处于中期阶段,该期软骨基质的降解与合成逐渐失衡,软骨修复能力渐弱,纤维组织逐渐增生,趋向填充软骨裂隙。由于 bFGF 的多功能非特异性,这一

系列的微环境病理改变都有可能与 bFGF 的参与有关。本实验只是对 OA 中期病变针灸治疗机制的初步探讨,观察到电针干预促进了 bFGF 的分泌与合成,但其进一步的调节机制是恢复基质降解与合成的平衡从而强化软骨的自我修复能力,还是增加纤维组织增生,加速软骨裂隙的填充修补,尚不可知。结合同期实验观察到的电针促进 TGF- β_1 大量而广泛的分泌与合成,由于 TGF- β_1 是促进软骨修复的重要因子,此期电针同时促进了 TGF- β_1 与 bFGF 的分泌与合成,故我们推论两者可能共同参与促进基质合成和软骨细胞的分裂增生,从而促进软骨的修复,但以 TGF- β_1 为主导^[10]。若病变继续发展至软骨修复渐不可能,则有可能 bFGF 发挥主导作用,刺激成纤维细胞大量分裂增生,从而机体以纤维组织替代软骨填补软骨缺损。是否如此尚有待深入的研究加以证实。但本研究结果已能说明局部电针刺激对受损关节软骨具有一定的保护作用,可能是早中期治疗骨关节炎的有效方法之一,而对晚期病变的影响尚有待进一步研究。

参考文献

- 顾延,戴尅戎,裘世静,等. 异常高应力导致关节软骨退变机理的形态学研究[J]. 中华外科杂志,1995,33(10):597-560
- Marks R. Obesity profiles with knee osteoarthritis: correlation with pain, disability, disease progression [J]. Obesity, 2007, 15(7): 1867-1874
- 欧云生,安洪. 鼠骨关节炎动物模型建立的现状[J]. 中国比较医学杂志,2004,14(1):41-44
- 吴志宏,邱贵兴. 骨关节炎髌骨软骨中 II 型胶原的表达和超微结构研究[J]. 中华骨科杂志,2005,5(25):311-315
- 钟洪兰. 成纤维细胞生长因子的临床应用研究[J]. 现代医院,2003,3(4):17-19
- 徐虎,孙东升,胡蕴玉. 重组牛碱性成纤维细胞生长因子在创面愈合中的应用[J]. 中华创伤杂志,2000,16(61):314
- Gong ZY, Zhou SX, Gu XM, et al. Effect of recombinant human basic fibroblast growth factor on angiogenesis during mandible fracture healing in rabbits[J]. Chin J Traumatol,2003,6(4):242-244
- 孙永生,温建民,吴林生,等. 骨折三期治疗对骨生长因子 FGF-2 表达影响的实验研究[J]. 中国骨伤,2004,17(4):222-226
- 吴志宏,包飞. 电针治疗膝骨关节炎临床对照试验[J]. 中国骨伤,2008,21(3):170-172
- 包飞,王道海,王凤琴,等. 电针对实验性膝骨关节炎大鼠软骨 TGF- β_1 表达的影响[J]. 中国康复理论与实践,2008,14(4):345-346

(收稿:2010-06-29)