

# 基于“腠理开阖”理论的黑膏药对寒凝血瘀证膝骨关节炎模型家兔血管反应性研究<sup>△</sup>

王佳婧<sup>1,2\*</sup>, 朱婷<sup>1</sup>, 刘紫衡<sup>1</sup>, 王艳宏<sup>1#</sup>, 李永吉<sup>1#</sup> (1. 黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江中医药大学附属第二医院临床研部, 哈尔滨 150001)

中图分类号 R944;R932 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2022)04-0401-06

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2022.04.004

**摘要** 目的:通过寒凝血瘀证膝骨关节炎模型家兔的血管反应性研究,评价黑膏药促“腠理开阖”的作用机制。方法:选用寒凉刺激与药物诱导结合技术制备寒凝血瘀证膝骨关节炎家兔模型,采用彩色多普勒超声技术并辅以血液流变学指标,密切观察家兔膝周动脉网(股动脉下段、膝上外侧动脉和膝下外侧动脉)血管效应,考察0~15 d三个厂家狗皮膏(厂家一组、厂家二组和厂家三组)与黑膏药基质(基质组)对膝周动脉网的管径、血流速度及血液流变学指标的影响。结果:15 d治疗周期后,厂家一组、厂家二组、厂家三组和基质组家兔股动脉下段、膝上外侧动脉和膝下外侧动脉血管管径均有增加,流速均有提高,全血黏度、红细胞聚集指数均呈现降低趋势,红细胞变形指数呈现升高趋势。结论:黑膏药基质与狗皮膏均表现出显著的诱发膝周动脉网血管效应的作用,提示在促进“腠理开阖”方面,黑膏药基质同样起到了关键作用。

**关键词** 黑膏药;狗皮膏;腠理开阖;寒凝血瘀证膝骨关节炎家兔模型;血管反应性

## Vascular Reactivity of Black Plaster Based on the Theory of “Open-Close in the Interstices” in Knee Osteoarthritis Model Rabbits with Cold Blood Coagulation and Blood Stasis Syndrome<sup>△</sup>

WANG Jiajing<sup>1,2</sup>, ZHU Ting<sup>1</sup>, LIU Ziheng<sup>1</sup>, WANG Yanhong<sup>1</sup>, LI Yongji<sup>1</sup> (1. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2. Dept. of Clinical Research, the Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150001, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To evaluate the mechanism of black plaster based on the theory of “open-close in the interstices” through the study of the vascular reactivity of the knee osteoarthritis model rabbits with cold blood coagulation and blood stasis syndrome. **METHODS:** The rabbit model of knee osteoarthritis with cold coagulation and blood stasis syndrome was prepared by combining cold stimulation with drug induction. Vascular effects of the periprosthetic arterial network (lower femoral artery, lateral superior genicular artery and inferior lateral genicular artery) in rabbits were closely observed by using color Doppler ultrasound techniques and blood flow indicators. Effects of Goupi plaster (manufacturer 1, manufacturer 2 and manufacturer 3 group) and black plaster matrix (matrix group) on the diameter, blood flow velocity and hemorheological indicators of the perigenicular artery network were investigated from 0 d to 15 d. **RESULTS:** After 15 d of treatment, the vascular diameter of the the lower femoral artery, the lateral superior genicular artery and inferior lateral genicular artery of the rabbits in the manufacturer 1, the manufacturer 2 and the manufacturer 3 groups and the matrix group increased, and the blood flow velocity increased, the whole blood viscosity and erythrocyte aggregation indicators showed the decreasing trend, and erythrocyte deformability indicators showed the increasing trend. **CONCLUSIONS:** Both the black plaster matrix and the Goupi plaster have the effects of inducing vascular effects of perigenicular artery network, suggesting that the black plaster matrix also plays a key role in promoting the “open-close in the interstices”.

**KEYWORDS** Black plaster; Goupi plaster; Open-close in the interstices; Knee osteoarthritis model rabbits with cold blood coagulation and blood stasis syndrome; Vascular reactivity

△ 基金项目:国家自然科学基金项目(NO.82074025)

\* 博士研究生。研究方向:中药新剂型与新技术研究。E-mail:wangjiajing1126@163.com

# 通信作者1:教授,博士生导师。研究方向:中药经皮给药和中药药性理论研究。E-mail:wang.yanhong@163.com

# 通信作者2:教授,博士生导师。研究方向:中药新剂型与新技术研究。E-mail:liyongji2009@163.com

黑膏药为传统的外用经典剂型之一,《理渝骈文》中述“膏主通治,统六经”,兼有内治和外治的功效,在促“腠理开阖”和“活血通络”方面受到历代医家的广泛推崇<sup>[1]</sup>。“腠理”是人体皮肤、肌肉和脏腑的纹理,是一身气血津液升降出入的通路<sup>[2-4]</sup>。“腠理开阖”是一个中医特色理论,但国内外鲜有研究。王红<sup>[5]</sup>在《以金黄膏药对配伍规律探究外用中药透皮给药系统的物质基础》的研究中首次提出“腠理”是外用中药的透皮通道,并提出“腠理开阖学说”理论。《素问·阴阳离合论》记载:“是故三阳之离合也,太阳为开,阳明为阖,少阳为枢。”中医一般以皮肤属太阳,肌肉属阳明,腠理属少阳。明代医家汪机注:“太阳居表,在于人身如门之关,使营卫流于外者固;阳明主里,在于人身如门之阖,使营卫守于内者固;少阳居中,在于人身如门之枢,转动由之,使营卫出入内外也。”结合《中医大辞典·基础理论分册》所载内容,本课题组推测,腠理形似多孔的厚壁,“孔隙”收缩受全身机能调控,其间充满液体,是物质代谢的场所,也可缓冲减震<sup>[6]</sup>;其中存在各种黏膜淋巴细胞,参与多种免疫调节,承担“防御”作用的是组织液内的免疫细胞,故腠理的厚薄与疏密可预测卫气强弱及抵御外邪能力。

“腠理开阖”不仅是中医理论中关于患病和治疗过程的共识,而且在现代研究也可以用于表征中药外用制剂的治疗作用。郑培新<sup>[7]</sup>整理的《中医名家学术经验集》中记录:“凡邪居腠理之间,须以辛开腠理,推邪外出。”传统的黑膏药制剂,处方用药性味多为辛温、苦寒,重用“生、毒、烈、香”四类药味,通过调控腠理开阖,以奏拔病外出之效<sup>[8-10]</sup>。然而,目前关于“腠理开阖”的研究仍停留在理论阶段,未见能够表征该理论的实验方法。因此,本实验基于“腠理开阖”理论,探讨黑膏药的作用机制,尝试建立表征“腠理开阖”的实验方法,以期对“腠理开阖”研究提供参考。

狗皮膏是传统黑膏药制剂之一,《中华人民共和国药典:一部》(2020年版)<sup>[11]</sup>中记载其用于风寒湿邪、气血瘀滞所致的痹病,症见四肢麻木、腰腿疼痛、筋脉拘挛等。《黄帝内经》曰:“气血者,喜温而恶寒,寒则泣而不行,温则消而去之。”狗皮膏具有祛风散寒、活血止痛的功效,也与其多用辛热药性的中药有关。寒凝血瘀主要由于寒邪造成血行失常而停滞于脉道之内。本研究依据该理论,以寒凉刺激与药物诱导相结合的方法建立动物模型。由于寒凝血瘀证膝骨关节炎患者会出现膝周血管系统异常变化的病理现象,中医寒凝血瘀证表征与现代医学的血流动力学相似,临床表现为血液呈凝聚浓稠、血流不畅等。故本研究基于彩色多普勒超声技术的血管影像学特征,并辅以血液流变学指标,进行血管反应性研究,探讨黑膏药促“腠理开阖”的作用机制。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

雄性实验用新西兰家兔(体重2.5~3.0 kg),由黑龙江中医药大学实验动物中心提供,合格证号为SYXK(黑)2016-004。

### 1.2 仪器

MyLab™30CV型彩色超声仪(意大利百胜医疗公司);

LBY-N7500B型血流变分析仪(北京普利生公司);ME155DU型微量电子天平(德国Mettler Toledo集团);THP79JU型红外电子耳温枪(江苏鱼跃医疗设备公司);YHW-2型红外电子额温枪(江苏鱼跃医疗设备公司);动物手术器械(泰州百诺医疗器械有限公司)。

### 1.3 药品与试剂

木瓜蛋白酶P3250(Sigma-Aldrich中国公司);狗皮膏1(厂家一,批号为20181004);狗皮膏2(厂家二,批号为180304);狗皮膏3(厂家三,批号为20181003);黑膏药基质(黑龙江中医药大学附属第一医院);脱毛膏(深圳市妮雅丝美容有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 寒凝血瘀证膝骨关节炎家兔模型的制备

构建膝骨关节炎病证结合寒凝血瘀证家兔模型,将家兔随机分空白组与造膜组。空白组家兔每日饲喂并记录体重和体温;造膜组家兔原创性地采用药物诱导叠加寒凉刺激方法,制备家兔的寒凝血瘀证膝骨关节炎模型。模型制备分预试期与造模期,各7 d。预试期每日正常饲喂,记录体重和体温。造模期将造膜组家兔双膝关节脱毛,采用75%乙醇消毒,并保证喂食量不变;配置浓度为5%木瓜蛋白酶的0.9%氯化钠溶液,在第1、4和7日将家兔后肢屈曲45°,以髌骨下极髌腱外缘为进针点,向髌间窝方向进针,抵达股骨髌后回撤2 mm,注入5%木瓜蛋白酶的0.9%氯化钠溶液0.5 mL,双侧各1次。注射后辅助家兔进行后肢膝关节做屈伸运动,使诱导剂可以充分扩散。第1次注射后,每日将家兔的双侧后肢置于0~1℃冰水混合物中1次,每次30 min,反复冷冻7 d后复制出寒凝血瘀证膝骨关节炎家兔模型。

### 2.2 实验动物分组及给药

将造模成功的45只家兔随机分为五组,即狗皮膏厂家一组、厂家二组和厂家三组,基质组、模型组,每组9只。另取9只未造模家兔作为空白组,与模型组在室温(25℃)条件下饲养,不做其他处理。厂家一组、厂家二组、厂家三组和基质组家兔膝关节周围脱毛,分别贴敷3 cm×3 cm狗皮膏1、2、3和黑膏药基质[黑膏药基质,即按照《中华人民共和国药典:一部》(2020年版)<sup>[11]</sup>中狗皮膏制法制备的不含药材的空白基质]。取狗皮膏/黑膏药基质称重并记录为M<sub>1</sub>,将膏体加热软化,少量多次涂抹于家兔预留的靶部位上,覆以背衬层固定;将剩余的狗皮膏/黑膏药基质称重并记录为M<sub>2</sub>,M<sub>1</sub>与M<sub>2</sub>之差即为给药质量,约1.25 g。每贴膏药贴敷60 h,间隔12 h继续贴敷第2贴,连续15 d。

### 2.3 基于彩色多普勒超声技术的膝周动脉网血管影像学特征研究

六组家兔分别于0、1、2、3、4、5、6、7和15 d采用MyLab™30CV彩色超声诊断系统扫描右侧膝周动脉网(股动脉下段、膝上外侧动脉和膝下外侧动脉),各部位血管管径和流速结果见表1—6。

根据表1数据,对各组0~15 d的数据进行统计学检验。0 d组间F检验P>0.05,说明各组在给药0 d时股动脉下段管

表 1 六组家兔股动脉下段血管管径的测量结果( $\bar{x}\pm s, \text{mm}$ )Tab 1 Vascular diameter of lower femoral artery among six groups of rabbits ( $\bar{x}\pm s, \text{mm}$ )

组别	股动脉下段血管管径								
	0 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	15 d
厂家一组( $n=9$ )	1.05±0.10	0.92±0.08 <sup>a</sup>	1.04±0.07	0.94±0.05 <sup>a</sup>	1.06±0.04	0.99±0.03 <sup>ab</sup>	1.14±0.01 <sup>b</sup>	1.04±0.01 <sup>ab</sup>	1.20±0.01 <sup>b</sup>
厂家二组( $n=9$ )	1.05±0.11	1.23±0.09 <sup>bc</sup>	1.28±0.07 <sup>bc</sup>	1.08±0.05 <sup>ab</sup>	1.17±0.03 <sup>b</sup>	1.12±0.04 <sup>bc</sup>	1.06±0.01 <sup>abc</sup>	1.23±0.02 <sup>bc</sup>	1.25±0.02 <sup>bc</sup>
厂家三组( $n=9$ )	1.13±0.07	1.09±0.06	1.08±0.07	1.14±0.06 <sup>bc</sup>	1.09±0.08	1.14±0.07 <sup>bc</sup>	1.07±0.06	0.99±0.04 <sup>a</sup>	1.17±0.05
基质组( $n=9$ )	1.05±0.11	0.98±0.07 <sup>a</sup>	0.95±0.06 <sup>a</sup>	0.90±0.04 <sup>a</sup>	0.94±0.04 <sup>a</sup>	0.89±0.02 <sup>a</sup>	1.00±0.01 <sup>a</sup>	0.98±0.02 <sup>a</sup>	1.12±0.02 <sup>a</sup>
模型组( $n=9$ )	1.25±0.08	1.27±0.07	1.21±0.09	1.29±0.07	1.20±0.08	1.24±0.09	1.24±0.08	1.24±0.06	1.27±0.05
空白组( $n=9$ )	2.10±0.06	2.00±0.08	2.33±0.06	2.03±0.09	2.28±0.08	2.11±0.08	1.98±0.09	1.85±0.11	2.08±0.06

注:除空白组外,与模型组相比,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与黑膏药基质组相比,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与厂家一组相比,<sup>c</sup> $P<0.05$

Note: except for the blank group, vs. the model group, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; vs. the black plaster matrix group, <sup>b</sup> $P<0.05$ ; vs. the manufacturer 1 group, <sup>c</sup> $P<0.05$

径的差异无统计学意义。15 d 组间  $F$  检验  $P<0.05$ ,说明各组在给药 15 d 时的差异有统计学意义,采用 Dunnett's C 基于 Student 极差配对进行方差分析:(1)基质组与模型组相比,差

异有统计学意义( $P<0.05$ );(2)厂家一、二组与基质组相比,差异有统计学意义( $P<0.05$ );(3)厂家一组与厂家二组相比,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

表 2 六组家兔股动脉下段流速的测量结果( $\bar{x}\pm s, \text{mm/s}$ )Tab 2 Flow velocity of lower femoral artery among six groups of rabbits ( $\bar{x}\pm s, \text{mm/s}$ )

组别	股动脉下段流速								
	0 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	15 d
厂家一组( $n=9$ )	185.0±18.0	186.0±14.9	183.2±9.2 <sup>a</sup>	185.1±10.0	184.6±5.7	182.0±5.9 <sup>a</sup>	188.8±1.9 <sup>a</sup>	186.8±2.9 <sup>a</sup>	198.0±2.9 <sup>ab</sup>
厂家二组( $n=9$ )	190.0±19.9	180.0±13.3	175.4±12.0 <sup>a</sup>	193.1±9.6	181.0±6.8	198.8±7.1 <sup>a</sup>	202.9±1.4 <sup>c</sup>	195.7±1.6 <sup>a</sup>	214.9±2.3 <sup>c</sup>
厂家三组( $n=9$ )	180.0±11.0	175.1±9.3	179.1±12.1 <sup>a</sup>	179.9±9.8 <sup>a</sup>	175.5±13.0	176.0±11.0 <sup>a</sup>	183.8±10.3 <sup>a</sup>	179.2±7.3 <sup>ab</sup>	204.7±9.0 <sup>b</sup>
基质组( $n=9$ )	201.7±17.3	174.0±10.8	175.3±16.1 <sup>a</sup>	169.5±9.5 <sup>a</sup>	194.3±13.7	181.8±11.5 <sup>a</sup>	197.3±9.1	205.9±8.2	226.2±7.0
模型组( $n=9$ )	200.2±17.0	190.9±12.6	220.8±10.5	212.2±9.1	191.1±7.7	223.1±7.7	210.3±7.2	212.6±6.5	214.3±6.1
空白组( $n=9$ )	306.4±39.9	295.8±15.4	315.6±12.8	301.2±18.7	316.2±20.8	304.0±10.7	289.6±15.9	283.7±21.6	308.7±26.5

注:除空白组外,与模型组相比,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与黑膏药基质组相比,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与厂家一组相比,<sup>c</sup> $P<0.05$

Note: except for the blank group, vs. the model group, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; vs. the black plaster matrix group, <sup>b</sup> $P<0.05$ ; vs. the manufacturer 1 group, <sup>c</sup> $P<0.05$

根据表 2 数据,对各组 0~15 d 的数据进行统计学检验。0 d 组间  $F$  检验  $P>0.05$ ,说明各组在给药 0 d 时股动脉下段流速的差异无统计学意义。15 d 组间  $F$  检验  $P<0.05$ ,说明各组在给药 15 d 时的差异有统计学意义,采用 Dunnett's C 基于

Student 极差配对进行方差分析:(1)厂家一组与模型组相比,差异有统计学意义( $P<0.05$ );(2)厂家一、三组与基质组相比,差异有统计学意义( $P<0.05$ );(3)厂家一组与厂家二组相比,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

表 3 六组家兔膝上外侧动脉血管管径的测量结果( $\bar{x}\pm s, \text{mm}$ )Tab 3 Vascular diameter of lateral superior genicular artery among six groups of rabbits ( $\bar{x}\pm s, \text{mm}$ )

组别	膝上外侧动脉血管管径								
	0 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	15 d
厂家一组( $n=9$ )	0.60±0.06	0.71±0.03 <sup>ab</sup>	0.66±0.03 <sup>b</sup>	0.62±0.03 <sup>a</sup>	0.78±0.04 <sup>a</sup>	0.63±0.03 <sup>ab</sup>	0.81±0.04 <sup>ab</sup>	0.83±0.03 <sup>ab</sup>	0.96±0.03 <sup>a</sup>
厂家二组( $n=9$ )	0.65±0.05	0.57±0.04 <sup>bc</sup>	0.63±0.05 <sup>b</sup>	0.77±0.05 <sup>ac</sup>	0.65±0.06	0.80±0.07 <sup>abc</sup>	0.66±0.04 <sup>c</sup>	0.68±0.03 <sup>ac</sup>	0.90±0.05 <sup>a</sup>
厂家三组( $n=9$ )	0.55±0.06	0.68±0.04 <sup>ab</sup>	0.66±0.04 <sup>b</sup>	0.67±0.03 <sup>a</sup>	0.68±0.01 <sup>c</sup>	0.55±0.02 <sup>c</sup>	0.58±0.01 <sup>ac</sup>	0.72±0.01 <sup>abc</sup>	0.80±0.01 <sup>abc</sup>
基质组( $n=9$ )	0.50±0.04	0.32±0.02 <sup>a</sup>	0.43±0.02	0.67±0.03 <sup>a</sup>	0.70±0.04	0.49±0.02 <sup>a</sup>	0.56±0.03	0.62±0.02	0.90±0.03 <sup>a</sup>
模型组( $n=9$ )	0.60±0.06	0.46±0.04	0.53±0.04	0.52±0.03	0.63±0.03	0.55±0.02	0.62±0.01	0.56±0.02	0.73±0.02
空白组( $n=9$ )	1.70±0.05	1.59±0.06	1.81±0.08	1.68±0.05	1.51±0.04	1.75±0.03	1.80±0.04	1.76±0.03	1.81±0.02

注:除空白组外,与模型组相比,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与黑膏药基质组相比,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与厂家一组相比,<sup>c</sup> $P<0.05$

Note: except for the blank group, vs. the model group, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; vs. the black plaster matrix group, <sup>b</sup> $P<0.05$ ; vs. the manufacturer 1 group, <sup>c</sup> $P<0.05$

根据表 3 数据,对各组 0~15 d 的数据进行统计学检验。0 d 组间  $F$  检验  $P>0.05$ ,说明各组在给药 0 d 时膝上外侧动脉管径的差异无统计学意义。15 d 组间  $F$  检验  $P<0.05$ ,说明各组在给药 15 d 时的差异有统计学意义,采用 Dunnett's C 基于 Student 极差配对进行方差分析:(1)厂家一组、厂家二组、厂家三组、基质组与模型组相比,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );(2)厂家三组与厂家一组、基质组相比,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。说明在 0.05 的显著性水平下,三厂家狗皮膏及黑膏药基质组在给药 15 d 后,对膝上外侧动脉管径均能产生显著的改善作用,但四组组间比较亦存在差异。

速的差异无统计学意义。15 d 组间  $F$  检验  $P<0.05$ ,说明各组在给药 15 d 时差异有统计学意义,采用 Dunnett's C 基于 Student 极差配对进行方差分析:(1)厂家一组、厂家二组、厂家三组、基质组与模型组相比,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );(2)厂家二组与基质组相比,差异有统计学意义( $P<0.05$ );(3)厂家一组、厂家二组、厂家三组之间的差异有统计学意义( $P<0.05$ )。说明在 0.05 的显著性水平下,三个厂家的狗皮膏及黑膏药基质在给药 15 d 后,对膝上外侧动脉流速均能产生显著改善作用,但四组组间亦存在差异。

根据表 4 数据,对各组 0~15 d 的数据进行统计学检验。0 d 时各组不满足方差齐性,采用 Dunnett's C 基于 Student 极差配对进行方差分析,显示各组在给药 0 d 时膝上外侧动脉流

速的差异无统计学意义。15 d 组间  $F$  检验  $P>0.05$ ,说明各组在给药 0 d 时膝上外侧动脉管径的差异无统计学意义。15 d 组间  $F$  检验  $P<0.05$ ,说明各组在给药 15 d 时差异有统计学意义,采用 Dunnett's C 基于

表4 六组家兔膝上外侧动脉流速的测量结果( $\bar{x}\pm s, \text{mm/s}$ )Tab 4 Flow velocity of lateral superior genicular artery among six groups of rabbits ( $\bar{x}\pm s, \text{mm/s}$ )

组别	膝上外侧动脉流速									
	0 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	15 d	
厂家一组(n=9)	130.1±13.6	120.3±10.3	122.9±9.8	115.6±6.2	113.1±5.8 <sup>a</sup>	123.0±4.0 <sup>a</sup>	127.2±3.0	136.6±4.1 <sup>a</sup>	161.1±4.1 <sup>a</sup>	
厂家二组(n=9)	120.0±12.5	93.9±5.7 <sup>ac</sup>	104.3±5.8 <sup>a</sup>	105.5±4.8 <sup>a</sup>	125.0±2.7	112.4±4.3	114.4±1.1 <sup>abc</sup>	126.9±1.8 <sup>b</sup>	132.5±2.0 <sup>bc</sup>	
厂家三组(n=9)	125.2±12.5	111.7±4.5 <sup>a</sup>	125.0±6.4 <sup>b</sup>	110.7±5.2 <sup>a</sup>	123.4±6.1	115.5±4.7	118.3±5.4 <sup>a</sup>	123.6±4.0 <sup>bc</sup>	146.8±4.8 <sup>ac</sup>	
基质组(n=9)	135.4±10.9	110.5±7.2 <sup>a</sup>	101.4±8.4 <sup>a</sup>	97.2±5.9 <sup>a</sup>	125.2±12.1	112.1±9.2	138.8±9.1	144.1±7.0 <sup>a</sup>	153.2±8.3 <sup>a</sup>	
模型组(n=9)	137.7±11.3	133.6±7.7	136.8±6.5	129.8±5.4	135.4±6.8	108.9±5.0	138.3±6.5	123.2±4.6	124.2±4.7	
空白组(n=9)	208.3±12.4	198.6±9.8	220.1±10.2	210.6±15.2	193.9±7.6	219.0±7.7	228.1±11.1	215.8±6.6	222.3±7.4	

注:除空白组外,与模型组相比,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与黑膏药基质组相比,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与厂家一组相比,<sup>c</sup> $P<0.05$

Note: except for the blank group, vs. the model group, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; vs. the black plaster matrix group, <sup>b</sup> $P<0.05$ ; vs. the manufacturer 1 group, <sup>c</sup> $P<0.05$

表5 六组家兔膝下外侧动脉血管径的测量结果( $\bar{x}\pm s, \text{mm}$ )Tab 5 Vascular diameter of inferior lateral genicular artery among six groups of rabbits ( $\bar{x}\pm s, \text{mm}$ )

组别	膝下外侧动脉血管径									
	0 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	15 d	
厂家一组(n=9)	0.50±0.05	0.73±0.06 <sup>b</sup>	0.65±0.03 <sup>b</sup>	0.63±0.03 <sup>b</sup>	0.60±0.02 <sup>b</sup>	0.63±0.02 <sup>b</sup>	0.68±0.01 <sup>b</sup>	0.70±0.01 <sup>b</sup>	0.83±0.02 <sup>a</sup>	
厂家二组(n=9)	0.60±0.05	0.75±0.04 <sup>b</sup>	0.78±0.04 <sup>abc</sup>	0.73±0.03 <sup>ab</sup>	0.63±0.03 <sup>b</sup>	0.63±0.03 <sup>b</sup>	0.60±0.03 <sup>bc</sup>	0.63±0.02 <sup>c</sup>	0.82±0.03 <sup>a</sup>	
厂家三组(n=9)	0.55±0.06	0.58±0.04 <sup>b</sup>	0.60±0.03 <sup>b</sup>	0.58±0.03 <sup>b</sup>	0.65±0.02 <sup>ab</sup>	0.70±0.02 <sup>bc</sup>	0.65±0.01 <sup>abc</sup>	0.73±0.02 <sup>ab</sup>	0.80±0.01 <sup>a</sup>	
基质组(n=9)	0.55±0.05	0.40±0.03 <sup>a</sup>	0.48±0.04 <sup>a</sup>	0.36±0.01 <sup>a</sup>	0.38±0.02 <sup>a</sup>	0.50±0.01 <sup>a</sup>	0.52±0.01 <sup>a</sup>	0.63±0.01 <sup>a</sup>	0.81±0.01 <sup>a</sup>	
模型组(n=9)	0.65±0.06	0.64±0.05	0.59±0.03	0.60±0.04	0.58±0.02	0.66±0.02	0.61±0.01	0.68±0.01	0.67±0.01	
空白组(n=9)	1.40±0.04	1.59±0.07	1.51±0.04	1.44±0.05	1.72±0.09	1.62±0.06	1.58±0.03	1.46±0.02	1.55±0.04	

注:除空白组外,与模型组相比,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与黑膏药基质组相比,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与厂家一组相比,<sup>c</sup> $P<0.05$

Note: except for the blank group, vs. the model group, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; vs. the black plaster matrix group, <sup>b</sup> $P<0.05$ ; vs. the manufacturer 1 group, <sup>c</sup> $P<0.05$

表6 六组家兔膝下外侧动脉流速的测量结果( $\bar{x}\pm s, \text{mm/s}$ )Tab 6 Flow velocity of inferior lateral genicular artery among six groups of rabbits ( $\bar{x}\pm s, \text{mm/s}$ )

组别	膝下外侧动脉流速									
	0 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	15 d	
厂家一组(n=9)	93.8±9.8	71.6±4.4 <sup>a</sup>	70.0±3.9 <sup>a</sup>	91.0±4.1 <sup>ab</sup>	86.1±1.9 <sup>a</sup>	76.4±2.9 <sup>a</sup>	87.9±0.8 <sup>ab</sup>	88.3±1.2 <sup>ab</sup>	134.4±2.0 <sup>a</sup>	
厂家二组(n=9)	86.9±8.0	75.5±6.2	75.6±4.0	63.5±3.7 <sup>c</sup>	78.9±2.3 <sup>c</sup>	84.1±2.4 <sup>a</sup>	102.6±1.0 <sup>ac</sup>	111.0±1.3 <sup>ac</sup>	147.4±1.6 <sup>abc</sup>	
厂家三组(n=9)	96.3±7.6	60.0±4.3 <sup>ab</sup>	72.2±3.8	64.0±3.7 <sup>ab</sup>	83.2±4.9 <sup>ab</sup>	84.1±3.7 <sup>a</sup>	103.0±2.2 <sup>abc</sup>	106.8±3.3 <sup>ab</sup>	139.5±3.7 <sup>abc</sup>	
基质组(n=9)	92.0±9.9	74.7±4.7 <sup>a</sup>	79.8±3.4	88.4±3.2	97.2±2.7 <sup>a</sup>	79.9±3.1 <sup>a</sup>	46.4±1.0 <sup>a</sup>	86.9±2.1 <sup>a</sup>	98.6±2.6 <sup>a</sup>	
模型组(n=9)	93.5±9.7	93.7±7.0	82.2±3.9	70.6±3.1	73.4±2.1	66.7±1.5	75.2±1.5	65.1±1.5	75.3±1.3	
空白组(n=9)	202.7±15.8	190.5±9.4	187.4±4.7	183.3±5.6	199.3±6.4	178.5±5.0	180.9±4.3	175.2±5.2	185.2±3.2	

注:除空白组外,与模型组相比,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与黑膏药基质组相比,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与厂家一组相比,<sup>c</sup> $P<0.05$

Note: except for the blank group, vs. the model group, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; vs. the black plaster matrix group, <sup>b</sup> $P<0.05$ ; vs. the manufacturer 1 group, <sup>c</sup> $P<0.05$

Student 极差配对进行方差分析:(1)厂家一组、厂家二组、厂家三组、基质组与模型组相比,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );(2)其他组间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

根据表6数据,对各组0~15 d的数据进行统计学检验。0 d时各组不满足方差齐性,采用Dunnett's C基于Student极差配对进行方差分析,显示各组在给药0 d时膝下外侧动脉流速的差异无统计学意义。15 d组间F检验 $P<0.05$ ,说明各组在给药15 d时差异有统计学意义,采用Dunnett's C基于Student极差配对进行方差分析:(1)厂家一组、厂家二组、厂家三组、基质组与模型组相比,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );(2)厂家二组、厂家三组与基质组相比,差异有统计学意义( $P<0.05$ );(3)厂家一组、厂家二组、厂家三组组间的差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

#### 2.4 基于血液流变学指标变化特征的辅助研究

各组家兔分别于0、6和15 d采取耳缘静脉,于LBY-N7500B锥板式血流变分析仪进行全血黏度、红细胞聚集指数和红细胞变形指数检测,见表7。对各组进行统计分析,由全血黏度、红细胞聚集指数和红细胞变形指数3个血液流变学指标数据可知:(1)随给药时间延长,厂家一组、厂家二组、厂家

三组和基质组各指标水平均表现出与0 d时的差异有统计学意义( $P<0.05$ );(2)与模型组相比,厂家一组、厂家二组、厂家三组给药6、15 d时上述指标水平的差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),给药6 d时基质组的红细胞聚集指数与模型组的差异无统计学意义( $P>0.05$ );(3)与基质组相比,厂家二组给药6 d时的全血黏度,厂家一组和厂家三组给药15 d时的红细胞聚集指数的差异均无统计学意义( $P>0.05$ );(4)与厂家一组相比,厂家二组、厂家三组给药6 d时的3个血液流变学指标,厂家三组给药15 d时的全血黏度和红细胞变形指数,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。由以上结果可知,贴敷狗皮膏后可显著改善模型家兔血液黏滞度。

### 3 讨论

目前,对于寒凝血瘀证膝骨关节炎的研究大多为临床观察,如药物<sup>[12]</sup>、手法推拿或两者联合<sup>[13]</sup>等治疗情况,虽得到了有效结论,但均缺少作用机制的研究。本研究从狗皮膏施治特点入手,制备寒凝血瘀证膝骨关节炎模型,考察狗皮膏治疗作用制剂,同时探究黑膏药剂型是否起到一定作用。实验动物选择与人体膝关节结构较为接近的新西兰家兔,模型制备方法采用寒凉刺激与药物诱导结合技术<sup>[14]</sup>。关节内应力分布不均致

表7 六组家兔血液流变学指标变化特征( $\bar{x}\pm s$ )Tab 7 Characteristics of hemorheological indicators of six groups of rabbits ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	指标	时间/d		
		0	6	15
厂家一组(n=9)	全血黏度/(mPa·s)	8.87±0.34	7.54±0.06 <sup>ab</sup>	6.82±0.16 <sup>ab</sup>
	红细胞聚集指数	9.04±0.09	8.68±0.28 <sup>ab</sup>	8.56±0.18 <sup>a</sup>
	红细胞变形指数	0.63±0.01	0.69±0.02 <sup>ab</sup>	0.82±0.02 <sup>ab</sup>
厂家二组(n=9)	全血黏度/(mPa·s)	8.91±0.35	8.08±0.10 <sup>ac</sup>	6.83±0.18 <sup>ab</sup>
	红细胞聚集指数	8.99±0.34	8.46±0.27 <sup>abc</sup>	8.53±0.30 <sup>ab</sup>
	红细胞变形指数	0.58±0.03	0.66±0.02 <sup>abc</sup>	0.83±0.01 <sup>ab</sup>
厂家三组(n=9)	全血黏度/(mPa·s)	8.89±0.24	8.11±0.24 <sup>abc</sup>	6.92±0.20 <sup>abc</sup>
	红细胞聚集指数	9.01±0.33	8.38±0.16 <sup>abc</sup>	8.65±0.24 <sup>a</sup>
	红细胞变形指数	0.56±0.02	0.66±0.01 <sup>abc</sup>	0.78±0.01 <sup>abc</sup>
基质组(n=9)	全血黏度/(mPa·s)	8.90±0.44	7.94±0.29 <sup>a</sup>	6.78±0.32 <sup>a</sup>
	红细胞聚集指数	9.13±0.40	8.93±0.31	8.61±0.33 <sup>a</sup>
	红细胞变形指数	0.61±0.03	0.74±0.03 <sup>a</sup>	0.86±0.03 <sup>a</sup>
模型组(n=9)	全血黏度/(mPa·s)	8.89±0.34	9.00±0.17	8.92±0.21
	红细胞聚集指数	9.04±0.29	9.03±0.26	9.14±0.26
	红细胞变形指数	0.60±0.01	0.62±0.02	0.61±0.02
空白组(n=9)	全血黏度/(mPa·s)	5.65±0.29	5.37±0.31	5.58±0.15
	红细胞聚集指数	7.18±0.01	6.99±0.02	7.10±0.01
	红细胞变形指数	1.01±0.09	1.04±0.04	1.05±0.05

注:除空白组外,与模型组相比,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与基质组相比,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与厂家一组相比,<sup>c</sup> $P<0.05$

Note: except for the blank group, vs. the model group, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; vs. the black plaster matrix group, <sup>b</sup> $P<0.05$ ; vs. the manufacturer 1 group, <sup>c</sup> $P<0.05$

软骨损伤是临床上膝关节炎的发病机制<sup>[15]</sup>。而注射木瓜蛋白酶与人体膝关节炎发病过程略有不同,其通过降低软骨Ⅱ型胶原蛋白含量,致使关节软骨损伤和退变,进而发展成为膝关节炎的病理状态<sup>[16]</sup>。采用注射诱导剂的方法造模成功率高,制备周期短,避免了膝关节因手术或制动造模带来的外伤,局部皮肤完整未破损,因此更适用于后期外治法的研究<sup>[17]</sup>。

寒凝血瘀证的临床表现为血液呈凝聚浓稠,血流不畅。本研究选择股动脉下段、膝上外侧动脉和膝下外侧动脉作为靶血管,观察其管径和血流速情况;收集家兔造模前后血样,观察其血液流变学指标情况。课题组前期工作已证实,空白组饲养7d后与模型组造模7d后的家兔膝关节股动脉下段、膝上外侧动脉和膝下外侧动脉的管径和血流速发生显著性变化,造模后管径明显变窄、血流速明显降低。同时,血样的血液流变学指标也表现出显著性差异,造模后全血黏度和红细胞聚集指数明显升高,红细胞变形指数明显降低。因此,可以用上述指标评估寒凝血瘀证膝关节炎模型家兔“腠理开阖”的变化规律。

有关“腠理开阖”作用的表征,目前多从“腠理”“卫气”和“营气”三方面着手,其中又以“营气”的表征最为常见,表征“营气”可从评价皮下血循环的角度开展。“邪滞肌腠”,患者多见经脉不利、血脉不通,增进血循环能使肢体损伤迅速消除。临床上多借助彩色多普勒超声检查目标血管的参数变化,并辅助血液流变学指标诊断血循环情况。此外,中药复方发挥疗效的载体是剂型<sup>[18]</sup>。因此,本研究依据上述方法尝试表征黑膏药促“腠理开阖”作用,同时为了探究剂型作用,设立了基质

组。根据研究结果可知,15d治疗周期后,厂家一组、厂家二组、厂家三组和基质组家兔3处靶血管的管径均有增加,流速均有提高。在家兔股动脉下段部位,与模型组相比,基质组的管径有显著增加,厂家一组的血流速有显著提高,其他组指标有提高但差异无统计学意义( $P>0.05$ );在家兔膝上外侧动脉部位,与模型组相比,厂家一组、厂家二组、厂家三组和基质组的管径均显著增加,除厂家二组外,其他三组的血流速均显著提高;在家兔膝下外侧动脉部位,与模型组相比,厂家一组、厂家二组、厂家三组和基质组的管径和血流速均显著提高。厂家一组、厂家二组、厂家三组和基质组家兔的血液流变学指标中,全血黏度、红细胞聚集指数均呈现降低趋势,红细胞变形指数呈现升高趋势。并且,与模型组相比,厂家一组、厂家二组、厂家三组和基质组家兔全血黏度、红细胞聚集指数和红细胞变形指数的差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。

“腠理开阖”理论已提出多年,但关于如何表征“腠理开阖”还没有明确的研究成果,仍在不断探索之中。相比解剖学上的组织器官,中医更加注重的是各部分间整体协调的关系<sup>[19]</sup>。因此,欲用现代科学技术证实中医的理论,则要求既尊重中医规律,又符合科学规范。本研究通过对黑膏药血管反应性研究,探讨其促“腠理开阖”的作用机制,试图探索“腠理开阖”的表征方法,为今后该类研究提供指导和方向。

综上所述,贴敷狗皮膏可致目标血管参数发生显著变化,且黑膏药基质也具有诱发膝周动脉网血管效应的作用,提示黑膏药剂型在促进“腠理开阖”方面,基质同样起到了关键作用。

## 参考文献

- 朱婷,李英鹏,吕邵娃,等.经典黑膏药剂型的“方药-效用”特征[J].中成药,2019,41(3):650-653.
- 辞海编辑委员会.辞海[M].上海:上海辞书出版社,1980:1519.
- 吕国安.腠理概念辨析及运用初探[J].亚太传统医药,2020,16(6):183-184.
- 王勇力,周衡,周青,等.基于穹窿三焦理论探讨周衡教授治疗痰饮病[J].四川中医,2021,39(8):1-4.
- 王红.《以金黄膏药对配伍规律探究外用中药透皮给药系统的物质基础》资助项目结题报告[EB/OL].(2013-12-24)[2021-10-26].<https://kd.nsf.gov.cn/finalDetails?id=e6513b00b94dfabbea05de3313a9985b>.
- BENIAS P C, WELLS R G, SACKKEY-ABOAGYE B, et al. Structure and distribution of an unrecognized interstitium in human tissues[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 4947.
- 郑培新.中医名家学术经验集(二):郑惠漆医术汇编[M].北京:中医古籍出版社,2006:26.
- 潘祥龙,郝二伟,谢金玲,等.活血化痰中药调节血瘀证的分子机制研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(24):227-234.
- 朱婷,李永吉.中药辛热药性的表征模式及评价体系[J].科学技术创新,2018(28):21-22.
- 夏律,李铁浪.浅析“辛以润之”临床运用[J].中医学报,2022,37(1):24-58.
- 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].北京:中国医

- [12] 唐芳,周静,陈琳英,等.温经通络方治疗寒凝血瘀型膝关节炎的临床疗效及对血清炎症因子表达的影响[J].中国老年学杂志,2018,38(18):4429-4432.
- [13] 任永红,潘峰.筋骨痛消液烫熨联合推拿治疗膝骨性关节炎寒凝血瘀证的临床观察[J].宁夏医学杂志,2017,39(8):861-862.
- [14] 杨威,郭斯印,易志勇,等.膝骨关节炎中医证候动物模型的研究进展[J].风湿病与关节炎,2021,10(9):68-72.
- [15] MALY M R, ACKER S M, TOTTERMAN S, et al. Knee adduction moment relates to medial femoral and tibial cartilage morphology in clinical knee osteoarthritis[J]. J Biomech, 2015, 48(12): 3495-3501.
- [16] 陈达,彭力平,廖州伟,等.木瓜蛋白酶与石膏制动建立兔膝骨关节炎模型的比较[J].广东医学,2017,38(14):2114-2118.
- [17] AIGNER T, COOK J L, GERWIN N, et al. Histopathology atlas of animal model systems-overview of guiding principles[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2010, 18 Suppl 3: S2-S6.
- [18] 平洋,李英鹏,吕邵娃,等.中药药剂复方药性传递理论的构建[J].中成药,2021,43(7):1823-1829.
- [19] 王晓艳.整体观下的辨证论治和辨病论治关系论[J].中医临床研究,2017,9(28):43-45.
- (收稿日期:2021-10-26 修回日期:2022-01-02)
- 
- (上接第400页)
- [22] NGUYEN N T, NGUYEN T H, PHAM T N H, et al. Autodock vina adopts more accurate binding poses but autodock4 forms better binding affinity[J]. J Chem Inf Model, 2020, 60(1): 204-211.
- [23] MOOERS B H M. Shortcuts for faster image creation in PyMOL[J]. Protein Sci, 2020, 29(1): 268-276.
- [24] 梁志清,白纪红,秦青,等.槲皮素对非酒精性脂肪肝大鼠血清白介素18和白介素10比值的影响[J].时珍国医国药,2013,24(5):1112-1114.
- [25] 张超,李昌平,聂娇.槲皮素对非酒精性脂肪肝模型大鼠硬脂酰辅酶A去饱和酶1和肝X受体 $\alpha$ 表达的影响[J].中国药理学与毒理学杂志,2017,31(8):807-814.
- [26] YANG H, YANG T T, HENG C, et al. Quercetin improves nonalcoholic fatty liver by ameliorating inflammation, oxidative stress, and lipid metabolism in db/db mice[J]. Phytother Res, 2019, 33(12): 3140-3152.
- [27] 罗云,卢珊,周平,等.木犀草素改善高脂诱导的ApoE $^{-/-}$ 小鼠非酒精性脂肪肝及动脉粥样硬化作用研究[J].世界中医药,2015,10(8):1144-1147,1151.
- [28] 王新.木犀草素改善小鼠非酒精性脂肪肝的作用及其分子机制[D].合肥:合肥工业大学,2015.
- [29] 王谦.沙棘籽渣中五种黄酮类化合物对脂代谢的调控及机理探究[D].上海:华东师范大学,2014.
- [30] 张哲,王艳红.单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1/CCL2)与肿瘤关系的研究进展[J].中国临床医学,2008,15(5):735-737.
- [31] KAPLANOV I, CARMY Y, KORNETSKY R, et al. Blocking IL-1 $\beta$  reverses the immunosuppression in mouse breast cancer and synergizes with anti-PD-1 for tumor abrogation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(4): 1361-1369.
- [32] QIU Y Q, YANG X F, WANG L, et al. L-Arginine inhibited inflammatory response and oxidative stress induced by lipopolysaccharide via arginase-1 signaling in IPEC-J2 cells[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(7): 1800.
- [33] NAKAHARA H, SONG J, SUGIMOTO M, et al. Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2003, 48(6): 1521-1529.
- [34] 王爱云,韦忠红,余苏云,等.基于血管新生探讨活血化瘀中药对肿瘤转移的影响[J].世界科学技术-中医药现代化,2019,21(9):1884-1888.
- [35] ZENG F H, HARRIS R C. Epidermal growth factor, from gene organization to bedside[J]. Semin Cell Dev Biol, 2014, 28: 2-11.
- [36] BERGAMASCHI D, SAMUELS Y, O'NEIL N J, et al. iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human[J]. Nat Genet, 2003, 33(2): 162-167.
- [37] WANG W J, ZHAO J F, GUI W F, et al. Tauroursodeoxycholic acid inhibits intestinal inflammation and barrier disruption in mice with non-alcoholic fatty liver disease[J]. Br J Pharmacol, 2018, 175(3): 469-484.
- [38] YAO L Y, ABE M, KAWASAKI K, et al. Characterization of liver monocytic myeloid-derived suppressor cells and their role in a murine model of non-alcoholic fatty liver disease[J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0149948.
- [39] 马巍莎.重组人CXCL8(3-72)/G31P干预小鼠非酒精性脂肪肝研究[D].大连:大连医科大学,2013.
- [40] 沈皓.VEGFA在肝再生及非酒精性脂肪性肝病中的功能及机制研究[D].上海:中国人民解放军海军军医大学,2021.
- [41] EVERS D L, WANG X, HUANG E S. Cellular stress and signal transduction responses to human cytomegalovirus infection[J]. Microbes Infect, 2004, 6(12): 1084-1093.
- [42] YE H C H, STURGIS L, HAIDACHER J, et al. Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor-kappaB transcriptional activation and cytokine secretion[J]. Diabetes, 2001, 50(6): 1495-1504.
- [43] YAMAGISHI S I, MAEDA S, MATSUI T, et al. Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in vascular complications in diabetes[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1820(5): 663-671.
- [44] PALMA-DURAN S A, KONTOGIANNI M D, VLASSOPOULOS A, et al. Serum levels of advanced glycation end-products (AGEs) and the decoy soluble receptor for AGEs (sRAGE) can identify non-alcoholic fatty liver disease in age-, sex- and BMI-matched normoglycemic adults[J]. Metabolism, 2018, 83: 120-127.
- [45] SANTOS J C D F, VALENTIM I B, DE ARAÚJO O R P, et al. Development of nonalcoholic hepatopathy: contributions of oxidative stress and advanced glycation end products[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(10): 19846-19866.
- (收稿日期:2021-09-06 修回日期:2021-12-01)