

黄芪桂枝五物汤对阳虚寒凝型骨关节炎大鼠 免疫及瘀血状态的影响

李艳彦, 赵乐, 王永辉, 陈文超, 马艳苗, 刘佳维, 张若楠, 周然*

(山西中医学院 基础医学院, 太原 030024)

[摘要] **目的:**通过观察大鼠免疫及瘀血状态的变化从而研究黄芪桂枝五物汤对阳虚寒凝型骨关节炎大鼠的影响。**方法:**50 只大鼠随机分为正常组,模型组,塞来昔布组(20.82 mg·kg⁻¹),黄芪桂枝五物汤 7 d 组和黄芪桂枝五物汤 14 d 组(30 g·kg⁻¹)。除正常组外,各造模组大鼠分别采用冷固法加游泳、隔日给食及寒冷环境刺激的方法复制阳虚寒凝型骨关节炎模型。造模结束前最后 2 周,各给药组分别按 6 mL·kg⁻¹ 给药,黄芪桂枝五物汤 14 d 组 *ig* 给药 14 d,其余各给药组分别 *ig* 7 d,正常组及模型组予生理盐水 *ig* 7 d。*ig* 结束后,分别观察各组大鼠一般状态;量取膝关节周长,计算膝关节肿胀度;苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠下肢膝关节的病理变化;取大鼠血液,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血清液肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-1 β (IL-1 β),血浆前列腺素 E₂(PGE₂),血栓素 B₂(TXB₂),6-酮前列腺素 F_{1 α} (6-keto-PGF_{1 α})含量,生化法检测血清超氧化物歧化酶(SOD)水平。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠关节肿胀度明显升高,胶原纤维增粗、血管翳及炎性细胞浸润较为明显,大鼠血清 TNF- α ,IL-1 β ,SOD 及 6-keto-PGF_{1 α} 水平明显降低,PGE₂,TXB₂水平,TXB₂/6-keto-PGF_{1 α} 明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,黄芪桂枝五物汤使造模后大鼠毛色变得柔亮,尾部瘀痕减轻,双下肢活动轻微受限,减少大鼠跛行;关节肿胀度降低,胶原纤维增粗、血管翳及炎性细胞浸润程度减轻,黄芪桂枝五物汤给药后使 TNF- α ,IL-1 β ,SOD 及 6-keto-PGF_{1 α} 水平升高($P < 0.05$),PGE₂,TXB₂水平,TXB₂/6-keto-PGF_{1 α} 降低($P < 0.05$)。**结论:**黄芪桂枝五物汤对阳虚寒凝型骨关节炎疗效确切,黄芪桂枝五物汤的作用效果与用药时间有关,其作用机制与抗炎及改善机体瘀血状态有关,并有可能通过抗炎细胞因子的调节作用影响机体瘀血状态。

[关键词] 黄芪桂枝五物汤; 阳虚寒凝型骨关节炎; 炎性细胞因子; 血栓素 B₂/6-酮前列腺素 F_{1 α}

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)23-0149-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016230149

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160920.0923.034.html>

[网络出版时间] 2016-09-20 9:23

Effect of Huangqi Guizhi Wuwutang on Immunology and Blood Stasis State of Osteoarthritis Rats with Yang Deficiency and Cold Coagulation Symptoms

LI Yan-yan, ZHAO Le, WANG Yong-hui, CHEN Wen-chao, MA Yan-miao,

LIU Jia-wei, ZHANG Ruo-nan, Zhou Ran*

(Basic Medicine School, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, 030024 Taiyuan, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Huangqi Guizhi Wuwutang on immunology and blood stasis state of osteoarthritis rats with Yang deficiency and cold coagulation symptoms. **Method:** Totally 50 rats were randomly divided into normal group, model group, celecoxib group (20.82 mg·kg⁻¹), Huangqi Guizhi Wuwu Tang 7 d group and Huangqi Guizhi Wuwu Tang 14 d group (30 g·kg⁻¹). Except for the normal group, all of the other groups were included in the osteoarthritis model with Yang deficiency and cold coagulation symptoms through cold fix method plus swimming, feeding every two days and cool environment. During the last two weeks before

[收稿日期] 20151218(010)

[基金项目] 山西省科技厅攻关项目(2014011047-1)

[第一作者] 李艳彦,博士,教授,硕士生导师,从事方证相关物质基础的研究,Tel:13935158720,E-mail:liyy1002@163.com

[通讯作者] *周然,博士,教授,博士生导师,从事方剂效用及物质基础研究,Tel:0351-2272390,E-mail:zhou58@sohu.com

successful modeling, all groups were administered with drugs at dose of $6 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$. Huangqi Guizhi Wuwu Tang 14 d group was administered with Huangqi Guizhi Wuwu Tang for 14 days, other groups were given respective drugs for 7 days; meanwhile, normal group and model group were given insaline for 7 days. After intragastric administration, the general state of all of the groups was observed. Efforts were made to calculate the perimeter and swollen of knees. HE was performed to observed pathological changes in knee joint. Tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukins- 1β (IL- 1β), plasma prostaglandin E_2 (PGE $_2$), thromboxane B_2 (TXB $_2$), 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ were tested by ELISA, and superoxide dismutase (SOD) was tested by biochemical method. **Result:** Compared with normal group, model group showed significant increase in joint swelling, PGE $_2$, TXB $_2$, TXB $_2$ /6-PGF $_{1\alpha}$ content in serum, obvious enlargement of collagen fibers, pannus and inflammatory cell infiltration, and significant decrease in TNF- α , IL- 1β , SOD and 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with model group, Huangqi Guizhi Wuwu Tang made the fur smooth and the reduction in tail bruise. Limbers were slightly limited, claudication, swelling of knee joints, collagen fiber, pannus and inflammatory cells in Huangqi Guizhi Wuwu Tang groups were lower than model group. Meanwhile, Huangqi Guizhi Wuwu Tang can significantly increase the content of TNF- α , IL- 1β , SOD and 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ ($P < 0.05$), and decrease the content of PGE $_2$, SOD, TXB $_2$, TXB $_2$ /6-keto-PGF $_{1\alpha}$ ($P < 0.05$). **Conclusion:** Huangqi Guizhi Wuwu Tang has an obvious effect in treating osteoarthritis with Yang deficiency and cold coagulation symptoms, which is correlated with the medication time. Its mechanism is correlated with anti-inflammation and relieve of blood stasis state by regulating anti-inflammatory cytokines.

[**Key words**] Huangqi Guizhi Wuwu Tang; osteoarthritis with Yang deficiency and cold coagulation symptoms; inflammatory factor; thromboxane B_2 /6-keto-PGF $_{1\alpha}$

骨关节炎 (osteoarthritis, OA), 是一种中老年人多发的, 以关节肿胀、变形, 甚至关节畸形为主要临床表现的慢性关节性疾病。随着我国老年人口比重的增加, 本病的发病率有逐年上升的趋势。目前临床常采用^[1]药物、外科手术以及细胞因子制剂、基因工程治疗等诱导骨细胞生成的生物方法治疗本病, 但上述方法无法阻止疾病进展, 而手术治疗成本昂贵, 给患者带来巨大的身心负担。中医认为, 骨关节炎属“骨痹”, 与老年人脏腑亏损, 致正气不足, “不荣则痛”, 以及正气亏虚而更易感受风寒湿等邪气的“不通则痛”关系密切。黄芪桂枝五物汤是《金匱要略》中治疗血痹病的经典方剂, 对于血虚, 阴阳俱微的证型均有良好的效果, 临床研究发现黄芪桂枝五物汤对治疗骨关节炎疗效确切^[2-4]。笔者在前期研究中, 根据证型改良了骨关节炎模型^[5-6], 本研究中笔者在黄芪桂枝五物汤治疗阳虚寒凝型骨关节炎有效性的基础上, 从“荣和通”角度对其作用机制进行了初步研究。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠 50 只, SPF 级, 雌性, 体重 (310 ± 10) g, 中国人民解放军军事医学科学院提供, 合格证号 SCXF (军) 2012-0004。实验室温度 (18 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 湿度 40% ~ 70%, 自然昼夜节律。

1.2 药物及试剂 黄芪桂枝五物汤诸药由同仁堂

药店提供。药材按《金匱要略》原书用量比例分 2 次煎煮, 煮后将 2 次滤液合并, 并浓缩至含生药量 $5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 冰箱保存备用。塞来昔布胶囊 (同仁堂药店提供, 批号 BK1300EK164), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (武汉博士德, 批号 2419520917); 超氧化物歧化酶 (SOD) 测试盒 (南京建成生物工程研究所, 批号 20140313), 白细胞介素- 1β (IL- 1β), 前列腺素 E_2 (PGE $_2$), 血酸素 B_2 (TXB $_2$), 6-酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ (6-keto-PGF $_{1\alpha}$) ELISA 试剂盒 (上海西唐公司, 批号分别为 1309101, 1408251, 1403153, 1406182)。

1.3 仪器 Spectramax190 型连续光谱酶标测试仪 (美国分子仪器公司), UV-1601 型紫外-可见分光光度计 (日本岛津公司), DHP-9082B 型恒温箱 (上海一恒), BS224S 型 1/1 万电子天平 (德国赛多利斯集团)。

2 方法

2.1 分组 参照随机数字表, 将 50 只大鼠随机分为 5 组, 分别为正常组、模型组、黄芪桂枝五物汤 7 d 组、黄芪桂枝五物汤 14 d 组、塞来昔布组。

2.2 造模与给药 采用冷固法^[5]加物理方法复合刺激复制阳虚寒凝型骨关节炎模型。除正常组外, 其余 4 组大鼠造模开始后, 每日上午 8:00 将大鼠放入没入膝关节的水中 6 h, 水温 (6 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$, 6 h 后,

将其双下肢石膏固定,至次日 8:00。造模 4 周后,在上述冷固造模方法的基础上,复加物理刺激的方法,每日下午 4:00 予大鼠游泳刺激,从放入水槽中开始到每组大鼠出现自然沉降的时间为其游泳耐疲劳的时间,当全组 50% 的大鼠出现自然沉降时,全部停止游泳,至造模结束;同时,予大鼠隔日限量给食(饮水不限),并控制实验室温度在(18 ± 2) °C。造模第 5 周开始,各给药组开始 *ig* 给药。除正常组与模型组外,各给药组大鼠按 6 mL·kg⁻¹ 体重 *ig* 给药,连续 7 ~ 14 d,黄芪桂枝五物汤组 30 g·kg⁻¹,塞来昔布组 20.8 mg·kg⁻¹,黄芪桂枝五物汤 14 d 组给药 14,7 d 组及塞来昔布组给药 7 d,正常组和模型组 *ig* 给予同等剂量生理盐水。

2.3 指标检测

2.3.1 观察大鼠一般状态 观察大鼠体征变化。

2.3.2 测量大鼠膝关节周长 计算关节肿胀度。

$$\text{关节肿胀度} = (\text{造模后关节周长} - \text{造模前关节周长}) / \text{造模前关节周长} \times 100\%$$

2.3.3 血清及血浆中的指标检测 *ig* 结束后次日,10% 体积水合氯醛腹腔麻醉,分别取大鼠腹主动脉非抗凝血,及肝素抗凝血。3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,分离血清及血浆,ELISA 法检测血清中 TNF-α, IL-1β 及血浆中 PGE₂, TXB₂, 6-keto-PGF_{1α} 含量,计算 TXB₂/6-keto-PGF_{1α}, 生化法检测血清 SOD 吸光度 *A*, 计算血清中 SOD 活力。

$$\text{SOD 活力} (\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}) = [(A_{\text{空白组}} - A_{\text{测定组}}) / A_{\text{空白组}}] / 50\% \times \text{反应体系的稀释倍数} \times \text{样本测试前的稀释倍数}$$

2.3.4 膝关节病理观察 取血后,取右侧膝关节,生理盐水清洗后,放置于 4% 多聚甲醛溶液中,1 周后,浸泡于 10% 乙二胺四乙酸(EDTA)溶液中,隔 1 周换 1 次 EDTA 溶液,连续浸泡 4 周,至骨关节柔软,针头可轻易穿透,制作病理切片,苏木素-伊红(HE)染色观察膝关节病理改变。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用 LSD-*t* 方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况 造模结束后,观察各组大鼠一般状态。正常组大鼠皮毛光泽、柔顺,色白,纳食如常,活动未受限;模型组大鼠精神疲倦,活动少,毛色较正常组暗淡,无光泽,不柔顺,进食减少,均见便溏,双下肢可见明显肿胀、溃破,活动不灵活,有跛行,尾部

有明显的瘀痕;黄芪桂枝五物汤 14 d 组和塞来昔布组大鼠毛色较模型组有光泽,大便较模型组成形,双下肢活动轻微受限,无跛行,尾部未见明显瘀痕;黄芪桂枝五物汤 7 d 组大鼠少动,皮毛不光泽,便溏较模型组少,双下肢肿胀,肢体活动不利,有跛行,尾部粗大瘀痕较模型组轻。

3.2 对阳虚寒凝型骨关节炎大鼠模型膝关节肿胀度的影响 与正常组比较,模型组大鼠膝关节肿胀度增大($P < 0.01$);与模型组比较,各用药组大鼠膝关节肿胀度均降低($P < 0.05$);各用药组间,膝关节肿胀度变化无显著性差别。见表 1。

表 1 黄芪桂枝五物汤对阳虚寒凝型骨关节炎大鼠模型膝关节肿胀度的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Huangqi Guizhi Wuwu Tang on OA rats' knee swollen degree($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	膝关节肿胀度/%
正常	-	19.3 ± 1.35
模型	-	49.2 ± 3.21 ¹⁾
黄芪桂枝五物汤(7 d)	30	23.3 ± 2.66 ²⁾
黄芪桂枝五物汤(14 d)	30	25.0 ± 1.81 ²⁾
塞来昔布胶囊	0.020 8	36.0 ± 2.83 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

3.3 对阳虚寒凝型骨关节炎大鼠模型膝关节病理形态学的影响 镜下可见,正常组大鼠膝关节面光滑,软骨滑膜完整,软骨细胞及纤维排列整齐;模型组大鼠骨关节表面不平,滑膜层胶原纤维增多、增粗,可见大量软骨细胞被破坏,排列不规则,有局部出血现象,大量血管翳形成,有坏死组织及炎性细胞分布;黄芪桂枝五物汤 7 d 组表面不平,滑膜层可见有胶原纤维增多,仍有软骨细胞被破坏,排列紊乱,仍见炎性细胞浸润,可见血管翳存在;塞来昔布组膝关节表面不平,胶原纤维增粗,可见软骨细胞破坏,排列紊乱,炎性细胞较少。黄芪桂枝五物汤 14 d 组与 7 d 组比较,膝关节面光滑,滑膜层胶原纤维增粗及血管翳均较 7 d 组少,仍存在炎性细胞浸润现象,但分布较少。见图 1。

3.4 对阳虚寒凝型骨关节炎大鼠模型血液 TNF-α, IL-1β, PGE₂, SOD 水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠 TNF-α, IL-1β, SOD 水平减少($P < 0.01$), PGE₂ 含量升高($P < 0.01$);与模型组比较,各用药组大鼠 TNF-α, IL-1β, SOD 水平均升高($P < 0.05$), PGE₂ 含量降低($P < 0.05$),各用药组之间 TNF-α, IL-1β 及 PGE₂ 含量无显著差别,黄芪桂枝五物汤

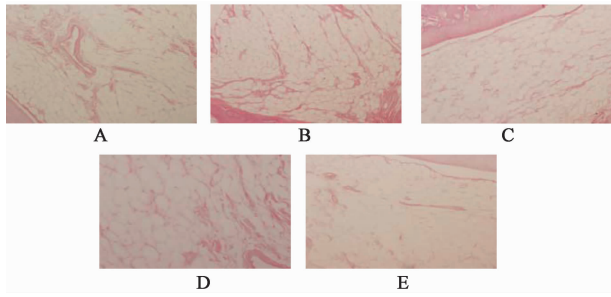


图 1 黄芪桂枝五物汤对阳虚寒凝型骨关节炎大鼠膝关节病理切片的影响(HE, ×400)

Fig.1 Effect of Huangqi Guizhi Wuwu Tang on OA rats'pathological picture(HE, ×400)

表 2 黄芪桂枝五物汤对阳虚寒凝型骨关节炎大鼠模型血液 TNF-α, IL-1β, PGE₂, SOD 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Huangqi Guizhi Wuwu Tang on expression of OA rats' TNF-α, IL-1β, PGE₂ and SOD($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF-α/ng·L ⁻¹	IL-1β/ng·L ⁻¹	PGE ₂ /ng·L ⁻¹	SOD/U·mL ⁻¹
正常	-	49.91 ± 10.54	26.41 ± 8.57	108.17 ± 11.87	182.62 ± 23.53
模型	-	30.62 ± 2.51 ¹⁾	11.08 ± 3.68 ¹⁾	186.71 ± 32.40 ¹⁾	123.95 ± 15.53 ¹⁾
黄芪桂枝五物汤(7 d)	30	41.45 ± 2.92 ²⁾	22.28 ± 7.09 ²⁾	125.18 ± 17.43 ²⁾	156.79 ± 20.71 ²⁾
黄芪桂枝五物汤(14 d)	30	42.49 ± 1.62 ²⁾	20.43 ± 7.01 ²⁾	118.87 ± 32.07 ²⁾	177.42 ± 20.20 ²⁾
塞来昔布胶囊	0.020 8	45.38 ± 10.21 ²⁾	20.57 ± 7.37 ²⁾	140.57 ± 37.70 ²⁾	149.22 ± 10.14 ²⁾

表 3 黄芪桂枝五物汤对阳虚寒凝型骨关节炎大鼠模型血浆 TXB₂, 6-keto-PGF_{1α} 含量及其比值的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of Huangqi Guizhi Wuwu Tang on OA rats'expression in TXB₂, 6-keto-PGF_{1α} and its ratio($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TXB ₂ /ng·L ⁻¹	6-keto-PGF _{1α} /ng·L ⁻¹	TXB ₂ /6-keto-PGF _{1α}
正常	-	173.81 ± 29.52	74.61 ± 8.64	1.89 ± 0.73
模型	-	245.39 ± 42.38 ¹⁾	53.04 ± 9.32 ¹⁾	4.45 ± 1.61 ¹⁾
黄芪桂枝五物汤(7 d)	30	195.42 ± 28.57 ²⁾	60.22 ± 4.07	3.24 ± 0.43
黄芪桂枝五物汤(14 d)	30	181.89 ± 17.38 ²⁾	66.71 ± 3.82 ²⁾	2.54 ± 0.64 ²⁾
塞来昔布胶囊	0.020 8	194.35 ± 19.95 ²⁾	67.78 ± 4.76 ²⁾	2.89 ± 0.48 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾P < 0.05;与模型组比较²⁾P < 0.05。

4 讨论

中医称骨关节炎为骨痹、筋痹、鹤膝风,认为气血不足为致病之本,乃“不荣”则痛;正气不足,邪之所凑,患者易感风寒湿邪,或气血不足引起气滞血瘀为致病之标,乃“不通”则痛,反复发作使骨关节炎逐渐加重。实验中,用冷固法复制骨关节炎的模型,并通过寒冷环境刺激、游泳及隔日限量喂食的方法来复制阳虚寒凝的骨关节炎模型。冷固法基于石膏固定的经典造模方法^[7],并通过一系列的复合刺激模拟人类阳虚寒凝证出现的病因病机,建立阳虚寒凝的证候模型。其中,通过造模过程中持续寒冷环境刺激及冷水站立,并在后期附加游泳刺激,则大鼠易受寒邪侵袭;长期游泳刺激又使大鼠疲劳,导致气

14 d 组较塞来昔布组血清 SOD 水平升高($P < 0.05$)。见表 2。

3.5 对阳虚寒凝型骨关节炎大鼠模型血浆 TXB₂, 6-keto-PGF_{1α} 含量及其比值的影响 与正常组比较,模型组大鼠血浆中 TXB₂ 水平升高($P < 0.05$),6-keto-PGF_{1α} 水平降低($P < 0.05$),TXB₂/6-keto-PGF_{1α} 明显升高($P < 0.05$);各用药组与模型组比较,TXB₂ 水平均较模型组降低($P < 0.05$),黄芪桂枝五物汤 14 d 组和塞来昔布组 6-keto-PGF_{1α} 水平升高($P < 0.05$),TXB₂/6-keto-PGF_{1α} 降低($P < 0.05$),黄芪桂枝五物汤 7 d 组与模型组比较,6-keto-PGF_{1α} 水平及 TXB₂/6-keto-PGF_{1α} 均无显著性差异。见表 3。

虚,隔日限量喂食^[8],则导致大鼠脾胃受损,运化无力,气血乏源。上述的一系列刺激,与产生阳虚寒凝证的病因相似,以此来复制阳虚寒凝的证候模型,造模后模型组大鼠出现精神疲倦,活动量少,毛色不泽,食少便溏,及尾部明显瘀痕的表现,其与阳虚寒凝的证型有一定的吻合性。

笔者从骨关节炎“不荣”和“不通”2 个方面确立治法,通过黄芪桂枝五物汤的益气温阳散寒的功效,在临床治疗骨关节炎中疗效确切。其他临床报道中,黄芪桂枝五物汤对骨关节炎也有确切的疗效^[9]。本方中黄芪、桂枝等药均具有抗炎^[10]、镇痛、抗血小板聚集^[11-12]的作用,并可抑制各类炎症因子的黏附,聚集,削弱炎症反应的进程,同时通过减少

血小板聚集而有效改善骨关节周围微循环,保证软骨及软骨下骨营养,对骨关节的完整性发挥重要作用。

IL-1 被认为是最经典的炎性细胞因子,是调节炎症的始动因素^[13],在膝骨性关节炎的发病过程中起着重要作用,IL-1 与软骨细胞表面高水平表达的 IL-1R 结合,作用于软骨细胞^[14],使软骨细胞合成 II 型胶原减少或合成的 II 型胶原的性质改变,从而引起软骨组织的损伤。TNF- α 表达受 IL-1 的影响,IL-1 β 刺激血清 TNF- α 表达增多^[15],共同促使软骨细胞产生基质金属蛋白酶(MMPs),PGE₂^[16]等,上述物质均可抑制软骨基质蛋白多糖和胶原的合成而造成软骨的损伤。此外,SOD 为超氧阴离子清除剂,可以减轻氧自由基造成的机体组织和细胞的损伤^[17]。

本实验研究发现,黄芪桂枝五物汤组中的 TNF- α ,IL-1 β 及 SOD 含量与模型组比较不降反升,PGE₂ 含量与模型组比较下降。IL-1 β ,TNF- α 含量上升,这与 TNF- α ,IL-1 β 的炎症刺激作用不相吻合,同时 SOD 水平也上升,这也不符合 SOD 的清除氧自由基造成机体损伤的功能。通过文献研究,笔者发现,在疾病的发生、发展过程中,机体免疫能力下降^[18],对炎性细胞因子的调节作用有可能下降;而在用环磷酰胺等复制免疫抑制性的动物模型的实验^[19-20]及脾虚的证候模型中^[21],也发现存在炎性细胞因子的表达降低的现象,提示阳虚寒凝型骨关节炎模型有可能对机体存在免疫抑制的反应。因此具有调节机体免疫作用的炎性因子 IL-1 β ,TNF- α 等的表达可能会呈现负反馈作用机制,而黄芪桂枝五物汤治疗后,免疫抑制状态得到一定的纠正,因而 TNF- α ,IL-1 β 及 SOD 水平上升。位于下游的 PGE₂ 本应当在 IL-1 β 等的调节作用下,与 IL-1 β 等的变化趋势相同,但本研究中,其含量在模型组中上升,用药后下降,说明 IL-1 β ,TNF- α 对 PGE₂ 的调节呈负相关性,提示在 PGE₂ 的调节过程中,还有其他细胞因子参与了炎症反应,减轻软骨及周围组织损伤,从而起到治疗骨关节炎的作用,这有待进一步探讨。

TXA₂ 与 PGI₂ 是属于前列腺素类的两个重要因子,是由细胞膜上的花生四烯酸(AA)经环氧化酶(COX)催化形成的。PGI₂ 主要由内皮细胞上的 COX-2 产生,具有舒张血管、抑制血小板聚集、白细胞黏附及 VSMC 增生的作用^[22-23],TXA₂ 主要由血小板产生,具有收缩血管、促使血小板聚集,VSMC 增生的作用^[24]。TXA₂ 与 PGI₂ 的不平衡与许多血

栓性疾病的病理生理的发生发展有关^[25]。由于 TXA₂ 与 PGI₂ 半衰期短,常通过检测其代谢产物 TXB₂ 与 6-keto-PGF_{1 α} 来反映机体的瘀血状态。

本实验发现,模型组外周血 TXB₂ 与 6-keto-PGF_{1 α} 水平与正常组之间存在显著差异,表明该模型可能存在血液循环障碍,可能与气虚血瘀,寒凝血瘀有密切关系。全身血液瘀滞,可加重局部组织微循环障碍,进一步加重骨关节炎的损伤^[26];在骨关节炎患者中存在高凝状态^[27],通过改善全身血液循环,也可以使骨关节得到有效治疗^[28]。因此,对骨关节炎的治疗需重视从整体出发,外周血 TXB₂ 与 6-keto-PGF_{1 α} 的检测可以提示机体瘀血的状态。黄芪桂枝五物汤 7 d 组较模型组血浆 TXB₂ 含量降低,黄芪桂枝五物汤 14 d 组较模型组血浆 TXB₂ 含量降低,6-keto-PGF_{1 α} 含量升高,TXB₂/6-keto-PGF_{1 α} 降低,而具有间接反应机体瘀血状态的 SOD 水平也升高,说明黄芪桂枝五物汤通过益气温阳散寒,可以调节机体瘀血状态,防止血栓形成,并进一步减轻骨关节炎软骨组织微循环缺血状态,对骨关节炎起到治疗作用。

此外,黄芪桂枝五物汤 14 d 组在关节活动度,及炎性细胞因子的表达和血循环瘀血状态方面优于黄芪桂枝五物汤 7 d 组,说明黄芪桂枝五物汤在治疗阳虚寒凝型骨关节炎时可能与用药时间长短有关。

综上所述,笔者认为,用具有振奋阳气,温运血行功效的黄芪桂枝五物汤治疗阳虚寒凝型骨关节炎具有确切疗效,其疗效与用药时间相关。而且其作用机制与调节免疫功能,改善全身的血循环状态相关。

[参考文献]

- [1] 窦智.膝骨关节炎中西医结合治疗进展[J].实用中医内科杂志,2012,26(3):88-90.
- [2] 陈东亮.电针加隔姜灸治疗阳虚寒凝型膝骨关节炎疗效观察[J].辽宁中医杂志,2012,39(6):1142-1144.
- [3] 陈玉琼.黄芪桂枝五物汤治疗血虚痹证的临床研究[J].中医临床研究,2013,5(13):77-78.
- [4] 张荒生,王艺苑.黄芪桂枝五物汤加味治疗类风湿关节炎临床疗效观察[J].湖北中医杂志,2013,35(2):18-21.
- [5] 陈文超,周然,王永辉,等.骨灵膏及其拆方制剂对骨关节炎氧化损伤及低氧诱导因子的作用[J].世界中西医结合杂志,2014,9(6):651-655.
- [6] 李艳彦,白贇,郭海龙,等.大鼠气虚冻伤模型的建立

- 及黄芪桂枝五物汤与桂枝汤作用比较及机制研究[J]. 微循环杂志, 2010, 20(2): 2313-2316.
- [7] 金刚. 骨关节炎动物模型研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2014(13): 24-26.
- [8] 高秀兰, 赵荣华, 谢鸣. 黄芪对脾虚发热大鼠的作用[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(3): 111-114.
- [9] 钟宝兴. 黄芪桂枝五物汤治疗血虚痹症的临床研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2011.
- [10] 黄家林, 张勇. 黄芪多糖抗炎免疫作用机制研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2013, 11(11): 1374-1376.
- [11] 胡芬, 向继洲. 中药治疗血小板减少性紫癜的药理作用[J]. 医药导报, 2005, 24(6): 480-482.
- [12] 许源, 宿树兰, 王团结, 等. 桂枝的化学成分与药理活性研究进展[J]. 中药材, 2013, 36(4): 674-678.
- [13] 王延涛, 凌云, 欧阳国容, 等. 止痛四物汤对肾虚血瘀型膝骨性关节炎患者关节液中 MMP-3、NO、IL-1 的影响[J]. 中国医学创新, 2014, 11(27): 105-107.
- [14] 谢辉晋, 杜远立. 骨关节炎相关细胞因子作用机制研究进展[J]. 重庆医学, 2011, 40(4): 395-398.
- [15] Zwerina J, Redlich K, Polzer K, et al. TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(28): 11742-11747.
- [16] 窦晓丽, 段晓琴, 夏玲, 等. 骨关节炎: 关节软骨退变的相关研究与进展[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(20): 3763-3766.
- [17] 赵幸熬, 娄玉铃, 张广辉, 等. 健膝丸对大鼠膝骨关节炎 SOD、MDA、NO 的影响[J]. 风湿病与关节炎, 2013, 2(9): 37-41.
- [18] 王慧慧, 陈玉龙, 马俊华. 中医药调节肿瘤患者免疫的分子机制[J]. 中医学报, 2014, 29(10): 1405-1408.
- [19] 吕小华, 陈科, 陈文青, 等. 螺旋藻多糖对免疫低下小鼠的免疫调节作用[J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(19): 1617-1621.
- [20] 奚香君, 张永宁, 袁丽超, 等. 香菇多糖、地黄煎影响小鼠免疫及内分泌功能的比较研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(2): 50-52.
- [21] 刘芬, 刘艳菊, 田春漫. 苍术麸炒前后对脾虚证大鼠免疫系统及胃肠刺激的影响[J]. 上海交通大学学报, 2015, 35(1): 8-12, 28.
- [22] Morita L. Distinct functions of COX-1 and COX-2 [J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002, 68/69: 165-175.
- [23] Hinz B, Brune K. Cyclooxygenase-2-10 years later [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2002, 300(2): 367-375.
- [24] Bunting S, Gryglewski R, Moncada S, et al. Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation [J]. Prostaglandins, 1976, 12(6): 897-913.
- [25] Moncada S. Prostacyclin and arterial wall biology [J]. Arteriosclerosis, 1982, 2(3): 193-207.
- [26] 郭建刚, 王海玲. 骨性关节炎与血瘀 [J]. 安徽中医临床杂志, 1999, 11(6): 432-434.
- [27] 邓忠良, 周言忠, 邓方跃, 等. 原发性骨关节炎的高凝及低纤溶状态 [J]. 西藏医药杂志, 1999, 20(3B): 22-23.
- [28] 徐菊茂, 章红燕, 姜建伟. 中药熏喷联合硫酸氨基葡萄糖胶囊治疗糖尿病并发膝骨关节炎疗效观察 [J]. 中国药物与临床, 2013, 13(5): 666-667.

[责任编辑 周冰冰]