

黄芪桂枝五物汤对阳虚寒凝型骨关节炎大鼠免疫相关细胞因子的影响

赵乐^{1,2}, 李艳彦^{2*}, 王永辉², 周然²

(1. 成都中医药大学, 成都 611137; 2. 山西中医学院, 太原 030024)

[摘要] **目的:**研究黄芪桂枝五物汤对阳虚寒凝型骨关节炎大鼠 CD4⁺/CD8⁺ 及相关细胞因子的作用。**方法:**SD 大鼠随机分为正常组、模型组、塞来昔布组、黄芪桂枝五物汤 7 d 组和黄芪桂枝五物汤 14 d 组, 每组 10 只。除正常组外, 各组大鼠均予冷固法复合外界环境刺激的方法复制阳虚寒凝型骨关节炎模型, 共 6 周。造模结束前, 各给药组分别灌胃给药, 黄芪桂枝五物汤 7 d 组或 14 d 组分别给药 7 d 或 14 d (30 g·kg⁻¹), 塞来昔布组给药 7 d (20.82 mg·kg⁻¹), 正常组及模型组予生理盐水灌胃 7 d, 至造模结束。造模结束后, 免疫组化法检测各组大鼠膝关节软骨诱导型一氧化氮合酶 (iNOS), II 型胶原及转化生长因子-β₁ (TGF-β₁) 表达, 取大鼠血液流式细胞法检测 CD4⁺/CD8⁺, 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 法检测各组大鼠血液中白细胞介素-4 (IL-4), C-反应蛋白 (CRP) 及胰岛素生长因子 (IGF), 低氧诱导因子 1α (HIF-1α) 含量。**结果:**与正常组比较, 模型组 CD4⁺ 及 CD4⁺/CD8⁺ 降低 ($P < 0.05$), 各用药组与模型组比较, 黄芪桂枝五物汤 14 d 组和塞来昔布组 CD4⁺ 及 CD4⁺/CD8⁺ 升高 ($P < 0.05$)。与正常组比较, 模型组 IL-4, CRP, HIF-1α 及 iNOS 表达升高 ($P < 0.05$), II 型胶原及 TGF-β 表达降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各用药组 II 型胶原及 TGF-β 表达升高 ($P < 0.05$), IL-4 水平降低 ($P < 0.05$), 黄芪桂枝五物汤 14 d 组 CRP, iNOS 及 HIF-1α 表达降低 ($P < 0.05$), 塞来昔布组 CRP 及 iNOS ($P < 0.05$); 各用药组之间, 与塞来昔布组比较, 黄芪桂枝五物汤 7 d 组和 14 d 组 II 型胶原表达降低 ($P < 0.05$), 黄芪桂枝五物汤 7 d 组 iNOS 表达升高 ($P < 0.05$)。IGF 水平在各组无显著性差别。**结论:**黄芪桂枝五物可以调节机体免疫低下状态, 并通过调节细胞因子 IL-4 及下游细胞因子 iNOS, HIF-1α, TGF-β₁ 等细胞因子水平的变化, 对骨关节炎软骨细胞起正向修复作用。

[关键词] 黄芪桂枝五物汤; 骨关节炎; 免疫低下; 细胞因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)07-0160-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017070160

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170109.1158.030.html>

[网络出版时间] 2017-01-09 11:58

Effect of Huangqi Guizhi Wuwu Tang on Immune Related Cytokines in Rats with Yang Deficiency and Cold Coagulation Type Osteoarthritis

ZHAO Le^{1,2}, LI Yan-yan^{2*}, WANG Yong-hui², ZHOU Ran²

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 611137, China;

2. Shanxi University of TCM, Taiyuan 030024, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Huangqi Guizhi Wuwu Tang on CD4⁺/CD8⁺ and related cytokines in rats with Yang deficiency cold coagulation type osteoarthritis. **Method:** The 50 SD rats were randomly divided into normal group, model group, celecoxib group, Huangqi Guizhi Wuwu Tang 7 days group and Huangqi Guizhi Wuwu Tang 14 days group, $n = 10$ in each group. All the rats except those in the normal group received frozen and physical stimulation methods for 6 weeks to establish Yang deficiency cold coagulation type osteoarthritis models. Before successful modeling, the rats in all groups received gastric administration of corresponding drugs or

[收稿日期] 20160826(008)

[基金项目] 山西省科技厅攻关项目 (2014011047-1); 山西中医学院博士科研启动基金项目

[第一作者] 赵乐, 在读博士, 从事方剂效用及其物质基础研究, Tel: 15135150952, E-mail: zleva2012@126.com

[通讯作者] *李艳彦, 博士, 教授, 从事方剂相关物质基础研究, Tel: 13935158720, E-mail: liyy1002@163.com

saline: 7 days for Huangqi Guizhi Wuwu Tang 7 days group, 14 days for Huangqi Guizhi Wuwu Tang 14 days group ($30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and 7 days for Celecoxib group ($20.82 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). In addition, the rats in normal group and model group received normal saline for 7 days equally. After modeling, the expression levels of (iNOS), collagen type II and ($\text{TGF-}\beta_1$) in knee joints were detected by immunohistochemical method. Blood was taken to test the levels of $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ by using flow cytometry, and detect the levels of interleukin-4 (IL-4), C-reactive protein (CRP), insulinlike growth factors (IGF) and hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) by using ELISA method. **Result:** As compared with the normal group, the ratio of $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ in model group was decreased ($P < 0.05$). As compared with the model group, the expression levels of CD4^+ and the ratio of $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ were increased in Huangqi Guizhi Wuwu Tang 14 days group and celecoxib group ($P < 0.05$). As compared with the normal group, the expression levels of IL-4, CRP, iNOS and HIF-1 α were increased in model group ($P < 0.05$), while the expression levels of Collagen type II and $\text{TGF-}\beta_1$ were decreased ($P < 0.05$). As compared with the model group, the expression levels of Collagen type II and $\text{TGF-}\beta_1$ were increased in various treatment groups ($P < 0.05$), while the level of IL-4 was decreased ($P < 0.05$); meanwhile, the expression levels of CRP, iNOS and HIF-1 α were decreased in Huangqi Guizhi Wuwu Tang 14 days group ($P < 0.05$), and the expression levels of CRP and iNOS in celecoxib group were also decreased ($P < 0.05$). As compared with celecoxib group, the expression level of collagen type II was decreased in Huangqi Guizhi Wuwu Tang 7 days and 14 days groups ($P < 0.05$), and the expression level of iNOS in Huangqi Guizhi Wuwu Tang 7 days group was increased ($P < 0.05$). There was no significant difference in IGF level among 5 groups. **Conclusion:** Huangqi Guizhi Wuwu Tang can regulate the immunosuppressed state and has positive function in repairing the broken chondrocyte to osteoarthritis through the methods of regulating the changes of IL-4 and its downstream cytokines iNOS, HIF-1 α and $\text{TGF-}\beta_1$.

[**Key words**] Huangqi Guizhi Wuwu Tang; osteoarthritis; immunosuppressed state; cytokines

骨关节炎(osteoarthritis, OA),是中老年人常见的疾病之一,因其产生的剧烈疼痛及关节变形,影响患者的正常活动^[1],由于本病发病人群日益扩大的趋势,而临床治疗尚不能有效阻止疾病进程,因此,近年来逐渐成为研究热点。黄芪桂枝五物汤出自《金匮要略》,其应用范畴已超出原书中的痹症,对于气血亏损,筋脉不通证型的慢性心力衰竭^[2-3],胃痛^[4],荨麻疹^[5-6]等均有良好的效果,临床通过黄芪桂枝五物汤的加减,对治疗关节炎也具有确切疗效^[7-8]。现代研究表明,方中各药具有较好的抗炎、镇痛等作用^[9],并可调节机体免疫功能低下状态^[10],而骨关节炎发病与一系列免疫细胞因子水平相关,其中,白细胞介素 1 β (IL-1 β),转化生长因子 β_1 ($\text{TGF-}\beta_1$)等被公认为是骨关节炎的生物标记物^[11],低氧诱导因子-1 α (HIF1 α)对软骨退行性变起重要调节作用^[12],上述细胞因子在 T 细胞介导的免疫反应下,参与骨关节炎的发病过程^[13]。因此,本实验旨在探查黄芪桂枝五物汤对骨关节炎的作用机制是否与上述相关免疫细胞因子有关,从而为进一步研究其作用途径研究提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 50 只 SPF 级 SD 雌性大鼠,体重($310 \pm$

10) g,购自中国人民解放军军事医学科学院,合格证号 SCXK(军)2012-0004。实验室温度(18 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度 40% ~ 70%,自然昼夜节律。本研究获得成都中医药大学实验动物伦理委员会批准。

1.2 药物及试剂 黄芪桂枝五物汤生药材由同仁堂药店提供,药材按《金匮要略》原书用量比例煎煮 2 次,合并并浓缩滤液至含生药剂量 $30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,冰箱保存备用。塞来昔布胶囊(同仁堂药店,批号 BK1300EK164),PE 抗大鼠 CD4 及 FITC 抗大鼠 CD8(美国 BD 公司,批号分别为 17-0040-82, 12-0084-82);兔抗鼠 II 型胶原,一氧化氮合成酶(iNOS), $\text{TGF-}\beta_1$ 免疫组化试剂盒及 IL-4,胰岛素生长因子(IGF)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(武汉博士德公司,批号分别为 10CM222, BA0385, 1714116, 128931319, 999113529);IL-1 β , C-反应蛋白(CRP),低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)ELISA 试剂盒(上海西唐公司,批号分别为 1309101, 1408251, 1408254)。

1.3 仪器 FacsCalibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司),Spectramax190 型连续光谱酶标测试仪(美国分子仪器公司),DHP-9082B 型恒温箱(上海一恒公司),BS224S 型 1/1 万电子天平(德国赛多利斯集

团), DMIL LED 型倒置显微镜(德国莱卡公司)。

2 方法

2.1 分组 50 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后,按照随机数字表法随机分为 2 组,分别为正常组和造模组;灌胃给药前按照随机数字表法将造模组大鼠随机分为模型组,黄芪桂枝五物汤 7 d 组,黄芪桂枝五物汤 14 d 组和塞来昔布组。

2.2 造模与用药 采用冷固法复合外界环境刺激复制阳虚寒凝型骨关节炎模型^[14],除正常组外,其余 4 组大鼠均采取相同造模方法。每日清晨 8:00 将 4 组大鼠放入没入大鼠膝关节的冰水中 6 h,水温(6±0.5)℃;6 h 后,将大鼠双下肢石膏固定,至次日 8:00,反复 4 周。造模 4 周结束后第 5 周开始,在上述冷固造模方法的基础上,复加物理刺激^[15-17]:每日下午 4:00 予大鼠游泳刺激,当全组 50% 的大鼠出现自然沉降时,全部停止游泳,持续 2 周。同时,造模第 1 周开始,各组大鼠予隔日少量给食(饮水不限),室温(18±2)℃。造模第 5 周,将各造模组大鼠分组,除模型组外,各给药组开始灌胃给药。除正常组与模型组给予同等剂量生理盐水外,各给药组大鼠按 6 mL·kg⁻¹ 体重分别灌胃给药,黄芪桂枝五物汤组剂量为 30 g·kg⁻¹,塞来昔布组剂量为 20.8 mg·kg⁻¹,黄芪桂枝五物汤 14 d 组给药 14 d,至造模结束后 1 周,7 d 组及塞来昔布组给药 7 d,至造模结束。

2.3 指标检测

2.3.1 血液内 CD4⁺, CD8⁺ 的检测 造模结束后次日,大鼠乙醚麻醉后眼眶取血,流式细胞法检测血液内 CD4⁺, CD8⁺。流式细胞管底部依次添加外周

血 100 μL, CD3⁺/CD4⁺/CD8⁺ 复合抗体 10 μL 及细胞裂解液 2 mL,静置 10 min 后, PBS 洗涤液 4 mL 洗涤 2 次, 1 000 r·min⁻¹ 离心 4 min 弃上清后再次缓冲液加入 PBS 洗涤液,滤膜过滤 2 次,加入缓冲液 Buffer 300 μL 避光 30 min,上机检测。

2.3.2 血清 IL-4, CPR, HIF-1α, IGF 含量的检测 大鼠 10% 体积水合氯醛腹腔注射麻醉后,腹主动脉取血,静置 30 min 后,以 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,分离血清,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血清 IL-4, CPR, HIF-1α, IGF 含量按照说明书步骤进行。

2.3.3 大鼠膝关节软骨 iNOS, II 型胶原及 TGF-β₁ 蛋白的检测 大鼠麻醉后,取右侧膝关节,生理盐水处理后,分别于 4% 多聚甲醛溶液及 10% 乙二胺四乙酸(EDTA)溶液浸泡组织,制作病理切片,免疫组化 SABC 法检测大鼠膝关节软骨 iNOS, II 型胶原及 TGF-β₁ 的表达,其中 iNOS-抗稀释浓度(1:80), II 型胶原为(1:100), TGF-β₁ 为(1:60),详细步骤参照说明书进行,并随机选取每张切片中的 3 个高倍镜视野,统计切片中平均积分吸光度 IA。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 13.0 软件,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 为差异有统计意义。

3 结果

3.1 对阳虚寒凝型骨关节炎大鼠血液 CD4⁺, CD8⁺ 的影响 与正常组比较,模型组大鼠 CD4⁺ 表达明显降低(*P* < 0.05), CD4⁺/CD8⁺ 也明显降低(*P* < 0.05);与模型组比较,黄芪桂枝五物汤 14 d 组和塞来昔布组较模型组 CD4⁺ 表达明显升高(*P* < 0.05), CD4⁺/CD8⁺ 也明显升高(*P* < 0.05)。见表 1。

表 1 黄芪桂枝五物汤对阳虚寒凝型骨关节炎大鼠 CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ 的影响($\bar{x} \pm s$, *n* = 10)

Table 1 Effect of Huangqi Guizhi Wuwu Tang on CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ in rats with Yang deficiency and cold coagulation type osteoarthritis($\bar{x} \pm s$, *n* = 10)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CD4 ⁺ /%	CD8 ⁺ /%	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
正常	-	35.87 ± 3.03	15.05 ± 1.85	1.80 ± 0.37
模型	-	27.85 ± 4.56 ¹⁾	14.91 ± 3.60	1.33 ± 0.45 ¹⁾
黄芪桂枝五物汤 7 d	30	28.33 ± 6.87	13.86 ± 1.34	1.69 ± 0.36
黄芪桂枝五物汤 14 d	30	34.11 ± 4.12 ²⁾	13.39 ± 2.10	2.54 ± 0.48 ²⁾
塞来昔布	0.020 8	31.43 ± 3.27 ²⁾	14.04 ± 1.99	2.03 ± 0.52 ²⁾

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

3.2 对阳虚寒凝型骨关节炎大鼠血清 IL-4, CPR, HIF-1α 和 IGF 的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清中 IL-4, CRP 和 HIF-1α 表达明显升高(*P* < 0.05);与模型组比较,各用药组 IL-4 均降低(*P* < 0.05),黄芪桂枝五物汤 14 d 组和塞来昔布组 CRP

表达降低(*P* < 0.05),黄芪桂枝五物汤 14 d 组 HIF-1α 表达降低(*P* < 0.05)。IGF 含量在各组均无显著差别。见表 2。

3.3 对阳虚寒凝型骨关节炎大鼠膝关节软骨 II 型胶原及滑膜 iNOS, TGF-β 的影响 与正常组比较,

表 2 黄芪桂枝五物汤对阳虚寒凝型骨关节炎大鼠 IL-4, CPR, HIF-1 α 和 IGF 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Huangqi Guizhi Wuwu Tang on IL-4, CPR, HIF-1 α and IGF in rats with Yang deficiency and cold coagulation type osteoarthritis ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-4/ng·L ⁻¹	CRP/ μ g·L ⁻¹	HIF-1 α /ng·L ⁻¹	IGF/ng·L ⁻¹
正常	-	23.50 \pm 7.53	603.31 \pm 123.88	2 562.60 \pm 395.24	717.57 \pm 75.46
模型	-	48.66 \pm 8.76 ¹⁾	1 188.52 \pm 316.81 ¹⁾	3 301.67 \pm 372.40 ¹⁾	696.11 \pm 33.95
黄芪桂枝五物汤 7 d	30	36.61 \pm 4.82 ²⁾	940.71 \pm 192.30	3 193.91 \pm 360.87	680.73 \pm 54.10
黄芪桂枝五物汤 14 d	30	38.89 \pm 2.32 ²⁾	796.07 \pm 168.98 ²⁾	2 895.30 \pm 204.99 ²⁾	661.09 \pm 32.50
塞来昔布	0.020 8	37.70 \pm 3.46 ²⁾	803.58 \pm 84.57 ²⁾	2 974.41 \pm 304.34	690.03 \pm 70.47

模型组大鼠 II 型胶原及 TGF- β 表达明显下降 ($P < 0.05$), iNOS 表达明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各用药组 II 型胶原及 TGF- β 表达明显升高 ($P < 0.05$), 黄芪桂枝五物汤 14 d 组及塞来昔布组 iNOS 表达明显降低 ($P < 0.05$); 各用药组之间, 黄芪桂枝五物汤 7 d 组和 14 d 组与塞来昔布组比较, II 型胶原表达降低 ($P < 0.05$), 黄芪桂枝五物汤 7 d 组与塞来昔布组比较, iNOS 表达明显升高 ($P < 0.05$)。见表 3。大鼠膝关节软骨 II 型胶原, iNOS 及 TGF- β_1 阳性表达呈棕褐色或淡褐色表达。II 型胶原在正常组表达密集, 且排列整齐, 软骨层均见分布; 模型组 II 型胶原表层表达色淡, 排列不齐, 中下层色深, 有明显缺如现象; 黄芪桂枝五物

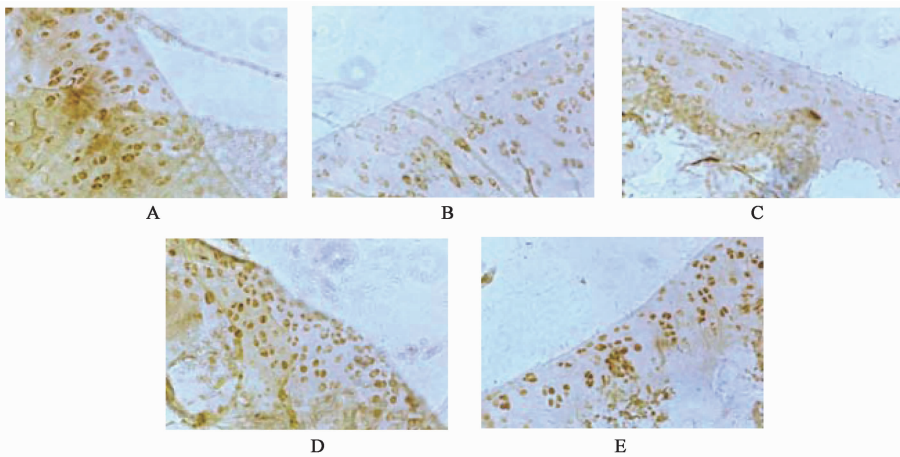
汤 7 d 组表层色淡, 中下层排列不齐, 但较模型组表达增多; 黄芪桂枝五物汤 14 d 组 II 型胶原表达较模型组多, 表层亦见大量分布, 但排列不齐; 塞来昔布组 II 型胶原表达较模型组多, 下层排列紊乱, 表层色深褐色, 有轻度聚集现象。iNOS 主要分布于软骨细胞层。模型组表达密集, 染色较深, 在黄芪桂枝五物汤 7 d 组和塞来昔布组软骨表层分布较少, 软骨下层分布集中, 黄芪桂枝五物汤 14 d 组各层均有分布。TGF- β_1 阳性表达主要在胞浆, 软骨细胞及滑膜细胞均有分布, 但是, 滑膜层分布较多, 且分布分散均匀。模型组阳性表达色淡, 黄芪桂枝五物汤 14 d 组及塞来昔布组见明显棕黄色颗粒状物质。见图 1~3。

表 3 黄芪桂枝五物汤对骨关节炎模型 II 型胶原, iNOS, TGF- β 蛋白 IA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of Huangqi Guizhi Wuwu Tang on type II collagen, iNOS and TGF- β in rats with Yang deficiency and cold coagulation type osteoarthritis ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	II 型胶原 ($\times 10^{-2}$)	iNOS ($\times 10^{-2}$)	TGF- β ($\times 10^{-2}$)
正常	-	45.58 \pm 2.07	39.29 \pm 3.06	30.68 \pm 2.06
模型	-	27.26 \pm 3.16 ¹⁾	47.77 \pm 3.30 ¹⁾	21.19 \pm 3.16 ¹⁾
黄芪桂枝五物汤 7 d	30	34.01 \pm 5.50 ^{2,3)}	43.70 \pm 2.30 ³⁾	24.54 \pm 2.45 ²⁾
黄芪桂枝五物汤 14 d	30	34.01 \pm 5.72 ^{2,3)}	42.26 \pm 1.62 ²⁾	25.19 \pm 2.22 ²⁾
塞来昔布	0.020 8	42.29 \pm 4.38 ²⁾	39.24 \pm 2.27 ²⁾	24.62 \pm 1.59 ²⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$; 与塞来昔布组比较³⁾ $P < 0.05$ 。



A. 正常组; B. 模型组; C. 黄芪桂枝五物汤 7 d 组; D. 黄芪桂枝五物汤 14 d 组; E. 塞来昔布组 (图 2, 3 同)

图 1 黄芪桂枝五物汤对阳虚寒凝型骨关节炎大鼠骨关节软骨 II 型胶原的影响 (免疫组化, $\times 400$)

Fig. 1 Effect of Huangqi Guizhi Wuwu Tang on type II collagen in rats with Yang deficiency and cold coagulation type osteoarthritis (IHC, $\times 400$)

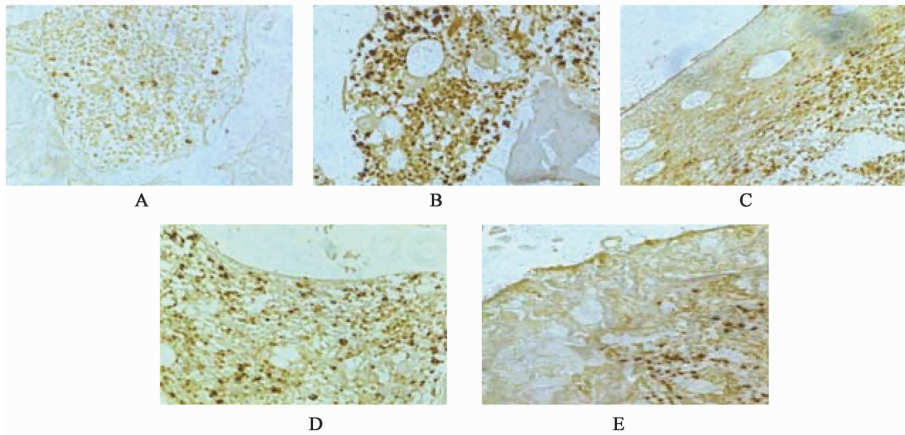


图 2 黄芪桂枝五物汤对阳虚寒凝型骨关节炎 iNOS 的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 2 Effect of Huangqi Guizhi Wuwu Tang on iNOS in rats with Yang deficiency and cold coagulation type osteoarthritis(IHC, ×400)

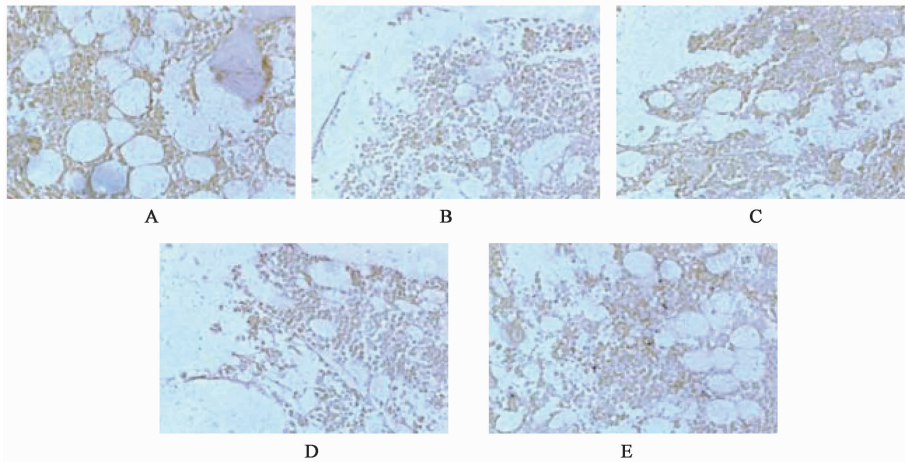


图 3 黄芪桂枝五物汤对阳虚寒凝型骨关节炎 TGF- β_1 的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 3 Effect of Huangqi Guizhi Wuwu Tang on TGF- β_1 in rats with Yang deficiency and cold coagulation type osteoarthritis(IHC, ×400)

4 讨论

骨关节炎的中医证型分类多样,既包括风寒湿痹、气滞血瘀等实证,也包含肝脾肾亏虚所导致的虚证。在众多证型中虚实夹杂者也占一定比重^[18],古代医家巢元方在《诸病源候论》中提到:“今肾虚受风寒,故令膝冷也”,现代临床证型分析结果也表明阳气亏虚夹杂寒湿之邪在虚实夹杂证型中最为常见。根据临床诊治经验,各方医家治疗本病也多以补益气血,扶正祛邪为基本原则来组方用药。在临床用药中,黄芪桂枝五物汤对于骨关节炎也有较好的治疗效果。根据《金匱要略》原方经典用药剂量,在换算为大鼠用量后的前期研究中,发现其对骨关节炎有较好的作用。方中黄芪温阳,桂枝散寒,芍药养阴柔肝,急止痛,生姜、大枣可补益脾胃,使气血生化有源。且黄芪可补气,与白芍相配,酸甘相合,使气血双补;桂枝归心肺经,可解表温经散寒,调和营卫,与黄芪相合,有益气固表,散寒通滞的作用。诸

药相合,通过补气养血,温阳通脉,使气血充足,营卫调和,寒邪外散,诸证自除,亦符合中医各家治疗本病的治则。

本实验中,采用冷固法^[14]复合外界因素刺激的方法,复制阳虚寒凝型骨关节炎模型,是在膝关节石膏制动复制骨关节炎方法的基础上^[19],复合中医理论阳虚寒凝证型产生的病因病机,而建立的阳虚寒凝的动物模型。根据中医理论,长期的饥饱失调会使大鼠脾胃功能受损,机体生化乏源,从而导致气血亏虚;同时给予的游泳刺激,属劳则气耗。因此,通过饮食失调及过度劳动,大鼠气的生成不及伴有损耗过度,导致气虚,气虚日久则阳虚;此外,处于寒冷环境中的大鼠被给予冷水中站立的刺激,使其在阳气不足的基础上,更易受到寒邪侵袭,导致出现阳虚寒凝证型。根据前期研究^[14],笔者发现模型组大鼠关节肿胀度显著大于正常组,且大鼠有跛行现象;HE 染色后,病理切片显示有大量软骨细胞的损伤

和软骨下骨内血管增生,且 X 射线摄像见膝关节关节面粗糙,关节间隙增大,提示造模成功。

根据文献报道,Ⅱ型胶原是骨关节软骨的重要生成物质,CRP 是组织损伤和炎症反应的重要标志物^[20],在骨关节炎的初期即可高水平表达,并在疾病的发展过程中,与关节肿胀度与严重程度呈正相关^[21],iNOS 广泛参与炎症性反应过程^[22]。在本实验中,看到骨关节软骨Ⅱ型胶原的表达在模型组降低,iNOS 及 CRP 水平在模型组升高,说明,此造模方法稳定,可靠,且骨关节炎的病理进程与炎性细胞因子有关。

T 细胞介导的细胞免疫反应,被认为与骨关节炎的发生有密切关系^[23]。T 细胞可以分泌 IL-1 β 等,并在机体级联炎症反应过程中,激发 iNOS, PGE-2 等细胞因子的分泌,并高水平表达 MMPs 等,导致骨关节软骨及软骨外基质的损伤,使骨关节炎进一步加重^[22,24]。与 IL-1 β , iNOS 等作用相反,IL-4, TGF- β_1 , IGF 等可以促进蛋白多糖的生成,抑制 MMPs 表达,以保护骨关节软骨细胞,将之统称为具有细胞保护作用的细胞因子。其中,IL-4 可与 IL-1 竞争性结合 IL-1 受体^[25],从而减轻 IL-1 对软骨细胞的破坏。TGF- β_1 与 IGF 广泛存在于机体组织中,TGF- β_1 可调节成骨细胞和破骨细胞之间增殖和分化的动态平衡^[26],IGF 与 TGF- β_1 作用于局部的关节组织,不仅可促使关节软骨Ⅱ型胶原,蛋白多糖的合成,使软骨细胞增殖,对关节结构和功能的恢复发挥正向调节作用^[27],还可降低 MMPs 的表达,从而减少软骨基质分解^[28-30],达到修复关节软骨的作用。此外,HIF-1 α 被认为与骨关节炎的发生有密切的关系,炎性细胞刺激下,HIF-1 α 在低氧环境下不仅可下调 IGF 与 TGF- β_1 等对软骨细胞的保护作用,还可上调 VEGF 的表达^[31],使软骨下骨血管生成增加,血管翳形成,抑制软骨细胞的生成,最终诱导软骨发生退行性变。

实验过程中,模型组复加寒冷及游泳等物理刺激方法,不仅会导致机体正气不足,同时也是机体处于免疫抑制状态的重要原因^[16-17]。实验结果显示,模型组大鼠在 CD4⁺ 表达降低,CD4⁺/CD8⁺ 升高,说明阳虚寒凝型骨关节炎模型组大鼠处于 T 细胞介导的免疫功能失调的状态。模型组 TGF- β_1 水平低于正常组,IL-4, iNOS 及 HIF-1 α 水平高于正常组,提示在机体炎性级联反应中,IL-1 β 作为炎性反应的启动因子,刺激 iNOS, PGE-2 等的表达,促使软骨的损伤和凋亡,使炎症反应加重,并通过调节 HIF-1 α

水平,诱导其下游 VEGF 的释放,导致软骨下骨小血管生成增加,软骨下骨发生重塑,而发生骨关节炎;用药后,TGF- β_1 升高,IL-4, iNOS 及 HIF-1 α 水平降低,提示机体炎症反应减弱,软骨细胞的损伤及软骨下骨重塑减轻,而 TGF- β_1 等保护软骨细胞的细胞因子则发挥着软骨保护作用,共同达到缓解骨关节炎病理进程,减轻关节炎症状的效果。然而,IGF 水平在各组无显著性差别,笔者推测对骨关节炎具有调节作用的 IGF 主要位于关节局部,血液循环中的 IGF 较少进入关节软骨和滑膜,因此,有必要进一步探讨 IGF 对骨关节炎发挥作用的途径。

此外,虽然黄芪桂枝五物汤对阳虚寒凝型骨关节炎有较好的治疗作用,但根据“未病先防,已病防变”的思想,笔者还希望在同等有效剂量的基础上能够对疾病进行早期预防及治疗。但通过实验结果分析,黄芪桂枝五物汤 14 d 组较 7 d 组虽 IL-4, CRP 等数值有较大的改善,但尚无统计学意义,因此,还需进一步探讨达到“治未病”所需的时间窗范围,以更好的指导临床。

综上所述,黄芪桂枝五物汤通过补益气血、温阳散寒,可以调节骨关节炎大鼠免疫低下状态,并通过调节血液中免疫相关细胞因子 IL-4 等,诱导 HIF-1 α , iNOS 及关节处 TGF- β_1 表达的变化,从而触发机体的信号转导因子调节关节软骨处蛋白多糖的含量,进一步抑制Ⅱ型胶原及软骨下骨的破坏,修复软骨细胞的凋亡,对骨关节炎发挥正向的调节作用。

[参考文献]

- [1] 吕苏梅,张瑞丽.中老年膝骨关节炎的流行病学研究进展[J].中国老年学杂志,2016,36(16):4133-4134.
- [2] 魏本军,陈恒文,张嘉良,等.对冠心病辨病与辩证的几点探讨[J].辽宁中医杂志,2016,43(1):70-71.
- [3] 詹丽娟,白燕.黄芪桂枝五物汤合方治疗慢性心力衰竭气虚血瘀证 60 例[J].宁夏医学杂志,2012,3(12):1320-1321.
- [4] 谭平,管波,刘立华.李寿彭治疗胃脘痛经验[J].实用中医药杂志,2015,31(1):59.
- [5] 杜明雪,李忻红.金匱要略中经方在荨麻疹治疗上的应用[J].云南中医中药杂志,2016,37(5):92-93.
- [6] 赵乐,李艳彦.黄芪桂枝五物汤对 D-半乳糖联合右旋糖酐-40 致小鼠皮肤瘙痒模型 AQP3 的影响[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(4):148-154.
- [7] 李冀,孙新雨,毕珺辉.黄芪桂枝五物汤的临证应用及实验研究进展[J].中医药学报,2014,24(5):108-111.
- [8] 赵统秀,王煜,王自立.王自立主任医师运用黄芪桂枝五物汤化裁验案举隅[J].新中医,2014,46(8):

- 247-248.
- [9] 陈斌,袁普卫,康武林,等. 黄芪桂枝五物汤在骨伤科的应用进展[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2015, 23(5): 71-74.
- [10] 李树义,赵志强,张庆波,等. 黄芪桂枝五物汤中总黄酮对小鼠免疫功能影响的体外研究[J]. 河北中医, 2014, 36(3): 432-434.
- [11] 金合,李彦文,李志强,等. 四神煎影响膝骨性关节炎生物标记物的临床文献分析[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2013, 15(5): 563-568.
- [12] Fernández-Torres J, Martínez-Navaa G A, Gutiérrez-Ruiz M C, et al. Role of hypoxia inducible factor-1 signaling pathway in osteoarthritis: a systematic review [J]. Rev Bras Reumatol, 2016, doi:10.1016/j.rbr.2016.04.006.
- [13] 王晶,董芳芳,李晓锋,等. 益气化瘀方减轻 HIF-1 α 条件性基因敲除小鼠膝关节软骨退变的研究[J]. 中国骨伤, 2013, 26(6): 486-492.
- [14] 陈文超. 骨灵膏及其拆方制剂对骨关节炎软骨细胞凋亡和胞外基质降解的影响[D]. 武汉:湖北中医药大学, 2014.
- [15] 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激素的影响[J]. 上海交通大学学报, 2015, 35(1): 8-12.
- [16] 郭爽,郭景茹,汪志,等. 不同时间强度冷刺激对大鼠血清中炎症相关细胞因子的影响[J]. 中国兽医学报, 2013, 33(3): 352-348.
- [17] 陈引香,陈建发,李萍,等. 复方丹参健力浓缩颗粒对大负荷运动训练小鼠免疫系统的影响[J]. 华南国防医学杂志, 2012, 26(1): 1-4.
- [18] 徐颖鹏,谢利民,王文岳. 中药外治与西药治疗膝骨关节炎疗效及安全性 Meta 分析[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(19): 2977-2984.
- [19] 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.
- [20] 徐萍,李爱艳. MMP-3, IL-6, TNF- α , hs-CRP 技术在膝骨关节炎中的应用[J]. 中国医药指南, 2013, 11(27): 117-118.
- [21] 常英,常红,刘亚彬,等. 针刀疗法对膝关节骨性关节炎患者 C 反应蛋白及白细胞介素-1 的影响[J]. 河北中医, 2013, 35(12): 1846-1848.
- [22] 王声. 一氧化氮合成酶在骨关节炎合成中的新进展[J]. 中国现代药物应用, 2012, 6(19): 117.
- [23] Ponchel F, Burska A N, Hensor E, et al. Changes in peripheral blood immune cell composition in osteoarthritis [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2015, 23(11): 1870-1878.
- [24] 陈宝军,闫虎,林学义,等. 壮骨健膝方对 IL-1 β 诱导后软骨细胞表达 Caveolin-1, p-p38, MMP-3, MMP-13 及 TNF- α 的影响[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(9): 2931-2933.
- [25] 陈文革,杨朝晖,刘清高,等. 骨关节炎严重程度与血清 IL-4 和 sIL-4R 水平的相关性研究[J]. 解放军医学杂志, 2015, 40(1): 63-65.
- [26] 关键中,刘亚军,王照东,等. 联合应用外源性 TGF- β_2 与 IGF-1 对大鼠骨折愈合的影响[J]. 中国矫形外科杂志, 2016, 24(2): 156-170.
- [27] 上官帆帆,汪晖,谭杨,等. 孕期尼古丁暴露致子代宫内发育迟缓大鼠骨关节炎易感[J]. 华中科技大学学报:医学版, 2015, 44(6): 648-655.
- [28] 赵荣兰,彭效翔,宋伟,等. 可磷酸化短肽偶联壳聚糖介导 IGF-1 和 IL-1RA 双基因治疗兔关节软骨损伤[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2015, 31(2): 175-181.
- [29] 张复文,刘德宝,王刚,等. 微骨折技术联合 IGF-1 修复兔关节软骨缺损的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2014, 28(5): 591-596.
- [30] 王景红,夏坤,张志千,等. 骨关节炎相关细胞因子及生物标志物的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(10): 225-230.
- [31] 邵进,张岩,王治,等. 低氧诱导因子-1 α 参与骨发育及骨代谢调控的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(3): 349-355.

[责任编辑 周冰冰]