

骨灵膏及其拆方制剂对骨关节炎软骨细胞凋亡及胞外基质降解的影响

陈文超¹, 周然^{2*}, 王永辉², 李艳彦², 柴智², 高丽²

(1. 湖北中医药大学, 武汉 430065; 2. 山西中医学院, 太原 030024)

[摘要] **目的:**通过骨灵膏及其拆方制剂对骨关节炎(OA)软骨细胞凋亡及胞外基质降解作用的研究,探讨骨灵膏及其拆方制剂对骨关节炎的作用机制。**方法:**选用 60 只雌性 SD 大鼠随机分为骨灵膏、骨膏、灵膏、塞来昔布、模型及正常组 6 组,每组 10 只,采用冷固法建立骨关节炎模型,造模成功后,骨灵膏、骨膏、灵膏均按 $10.41 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (相当于生药量 $33.31 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 灌胃,塞来昔布 $20.83 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃,正常、模型组给予等量生理盐水灌胃,给药 10 周后,取大鼠膝关节软骨组织,分别以苏木精-伊红(HE)、番红-固绿(SA/FG)、番红-阿尔辛蓝(SA/AB)进行组织病理观察,根据改良的 Mankin 关节软骨病理评分标准进行分级评分,采用 Western blot 法检测基因 153(CHOP/GADD153)蛋白的表达,通过荧光定量 PCR 检测软骨细胞 B 细胞淋巴瘤/白血病 2(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax),基质金属蛋白酶-3(MMP-3),基质金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1) mRNA 表达。**结果:**与正常组比较模型组能显著减低 Bcl-2, TIMP-1 mRNA 表达 ($P < 0.01$) 及增加 Bax, MMP-3 mRNA 表达 ($P < 0.01$)。与模型组相比骨灵膏能明显下调 ERS 相关 CHOP/GADD153 蛋白的生成 ($P < 0.01$)、促进抑凋亡基因 Bcl-2 mRNA 表达及降低促凋亡基因 Bax mRNA 表达 ($P < 0.01$), 而上调 Bcl-2/bax, 抑制软骨细胞的异常凋亡;同时,骨灵膏较模型组能显著降低 MMP-3 mRNA 的表达 ($P < 0.01$)、升高 TIMP-1 mRNA 的表达 ($P < 0.01$), 降低 MMP-3 mRNA/TIMP-1 mRNA。**结论:**骨灵膏可能通过降低 ERS 途径相关蛋白 GADD153 的异常生成,进一步调控相关凋亡靶基因的表达而抑制软骨细胞的异常凋亡和阻止细胞外基质异常降解而阻止 OA 关节软骨退行性变,保护了关节软骨,其作用明显优于其拆方制剂骨膏、灵膏。

[关键词] 骨灵膏; 骨关节炎; 凋亡; 细胞外基质

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)01-0143-06

[doi] 10.11653/syfy2014010143

Influence of Guling Grease and Dismantlement Preparations on Extracellular Matrix Degradation and Chondrocyte Apoptosis on Osteoarthritis

CHEN Wen-chao¹, ZHOU Ran^{2*}, WANG Yon-hui², LI Yan-yan², CHAI Zhi², GAO Li²

(1. Hubei University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Wuhan 430065, China;

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

[Abstract] **Objective:** To study the effects of Guling grease (GLG) and dismantlement preparations on extracellular matrix degradation and chondrocyte apoptosis on osteoarthritis (OA), and to discuss the mechanism. **Method:** A total of 60 female SD rats randomly were divided into normal group (NG) and GLG group, Gugao group (GUG), Linggao group (LG), celecoxib (CLXB) group, model group (M), 10 rats in each group osteoarthritis model was established using cold-solid method, after the modeling, LG, GUG, GLG were given according to the dosage of $10.41 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (equivalent to dosage $33.31 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), CLXB was given celecoxib $20.83 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. After 10 weeks, the rat knee cartilage tissue was collected, the staining of Hematoxylin-eosin (HE), safranin-fast green (SA/FG), safranin-alcian blue (SA/AB) were used for histopathological observation, according to the improvement Mankin articular cartilage pathology score standard

[收稿日期] 20130613(001)

[基金项目] 山西省科技厅科技创新重点团队建设项目(2012081018)

[第一作者] 陈文超,在读博士生,医师,方剂学专业, Tel:13223511001, E-mail:cwc8200@hotmail.com

[通讯作者] *周然,博士生导师,教授,中药药理学专业, Tel:13903413552, E-mail:zhour58@sohu.com

conducted classification score, C/EBP homologous protein/growth arrest and DNA damage inducible gene 153, (CHOP/GADD153) protein expression were detected by western blot method, the fluorescence quantitative real time PCR was used to detect the expression of B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), matrix metallo-proteinase-3 (MMP-3), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) mRNA on cartilage cells. **Result:** Compared with the M group GLG group down-regulated endoplasmic reticulum stress (ERS) associated CHOP/GADD153 protein generation obviously ($P < 0.01$), promoted the expression of Bcl-2 mRNA, reduced the expression of apoptosis gene Bax mRNA ($P < 0.01$), then raised the ratio of Bcl-2/Bax; At the same time, compared with M group GLG group reduced the expression of MMP-3 mRNA significantly ($P < 0.01$), increased the expression of TIMP-1 mRNA ($P < 0.01$), reduced the ratio of MMP-3 mRNA/TIMP-1 mRNA. Compared with NG M group reduced the expression of Bcl-2, TIMP-1 mRNA ($P < 0.01$) and increased the expression of Bax, MMP-3 mRNA significantly ($P < 0.01$). **Conclusion:** GLG could regulate GADD153 abnormal formation, further regulate the expression of apoptosis-related target genes and inhibit cartilage cells abnormal apoptosis and block extracellular matrix abnormal degradation, then inhibit OA articular cartilage degeneration, protect articular cartilage, its function is superior than the dismantlement preparatio.

[**Key words**] Guling grease; osteoarthritis; apoptosis; extracellular matrix

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是指关节软骨退行性变继发的一组关节性疾病,又称退行性关节炎、增生性关节炎等。研究表明:关节软骨细胞凋亡贯穿该病的始终,而软骨细胞凋亡又加剧了软骨细胞外基质的降解,二者互相作用,是该病发展变化的主要分子机制。目前研究证实,内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)是有别于线粒体和死亡受体途径的另外一种新的凋亡途径,并且参与多种疾病的病理变化过程^[1],而生长停滞 DNA 损害可诱导基因 153 (C/EBP homologous protein/growth arrest and DNA damage inducible gene 153, CHOP/GADD153) 是 ERS 的经典标志物^[2],因此本实验旨在通过内质网相关凋亡基因蛋白 CHOP/GADD153 及软骨细胞凋亡的相关基因 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2)/Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) mRNA、和软骨细胞外基质降解的主要平衡调控基因基质金属蛋白酶-3 (matrix metalloproteinases-3, MMP-3)、基质金属蛋白酶组织抑制剂-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1) mRNA 的研究,探讨 GLG 及其拆方制剂对 ERS 途径诱导 OA 软骨细胞凋亡和细胞外基质降解的作用。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 大鼠 60 只, 7~8 月龄, 体重 450~455 g, 雌性, 由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供, 许可证号 SCXK (军) 2007-004。

1.2 药物 骨灵膏(由骨碎补 30 g, 威灵仙 30 g, 川芎 20 g, 川牛膝 20 g, 丹参 30 g, 羌活 30 g, 独活 30

g, 巴戟天 15 g, 黄芪 15 g, 党参 10 g, 当归 20 g, 熟地黄 20 g, 白芍 10 g, 枸杞子 30 g, 泽泻 10 g 组成), 骨膏(由巴戟天 36.9 g, 黄芪 36.9 g, 党参 24.6 g, 白芍 24.6 g, 熟地黄 49.2 g, 枸杞子 73.8 g, 骨碎补 73.8 g 组成), 灵膏(由威灵仙 50.4 g, 川芎 33.6 g, 川牛膝 33.6 g, 丹参 50.4 g, 羌活 50.4 g, 独活 50.4 g, 当归 33.6 g, 泽泻 16.8 g 组成), 饮片由北京同仁堂提供; 骨灵膏、骨膏及灵膏等膏滋制剂由山西中医学院附属医院药剂室提供(组方中药加适量水浸泡 1 h, 煎煮 3 次, 每次 3 h, 合并滤取煎液, 静置, 滤器滤净, 将上述滤液加热浓缩, 将浓缩液滴于桑皮纸上至液滴周围无渗出水迹时即得“清膏”, 加入与清膏等量的炼蜜, 加热搅拌, 后在标温为 20℃ 时采用波美计测相对密度为 1.40 即收膏); 塞来昔布胶囊(批号 BK11CCEE171, 厂家 Pfizer Pharmaceuticals LLC)。

1.3 试剂 CHOP/GADD153 鼠单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司), β -actin, SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒、苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)溶液、EDTA 二钠、DAB 显色试剂盒(武汉博士德), 番红-固绿(safranin-fast green, SA/FG)、番红-阿尔辛蓝(safranin-alcian blue, SA/AB)(来自 Schmid GmbH, Solarbio), 总 RNA 提取试剂盒、cDNA 提取试剂盒、FQ-RT-PCR(荧光定量-PCR)扩增试剂盒(TaKaRa 公司), β_2 -微球蛋白(beta-2-microglobulin, β_2m), Bax, Bcl-2, MMP-3, TIMP-1 等引物(上海 Sangon 公司)。

1.4 仪器 ABI Prism 7300 型荧光定量 PCR 仪(美国, 普迪生物公司), MG384 + PCR 基因扩增仪(苏

州阿尔法公司),温度可调控离心机(北京佳源公司),Western blotting 垂直电泳槽、电转仪(北京君意设备公司),OlympusIX70 显微镜(南京远拓仪器公司),恒温烤箱(江苏吴江双龙设备厂)。

2 方法

2.1 动物分组及造模 60 只 SD 大鼠随机分成 6 组,每组 10 只,6 组分别为骨灵膏组(Gulinggao group, GLG)、骨膏组(Gugao group, GUG)、灵膏组(Linggao group, LG)、塞来昔布组(celecoxib group, CLXB)、模型组(model group, M)、正常组(normal group, NG)。除正常组外,其余各组采用寒冷刺激^[3]结合石膏固定^[4]的方法制作 OA 大鼠模型:每天保持大鼠在温度为(6.0 ± 0.5) °C 左右的水中直立 4 h,然后用石膏将大鼠下肢踝关节至膝关节部位全固定制动 4 h,如此重复 6 周。

2.2 动物给药 骨灵膏、骨膏及灵膏组分别给予骨灵膏、骨膏及灵膏制剂均按照 10.41 mL·kg⁻¹·d⁻¹(相当于生药量 33.31 g·kg⁻¹) ig 给药,塞来昔布给予塞来昔布 20.83 mg·kg⁻¹·d⁻¹ ig,模型组和正常组给予等量生理盐水 ig,每天 1 次,共 8 周。

2.3 标本收集 大鼠最后 1 次给药后 4 h 脱臼处死,取膝关节,分离肌肉、韧带及骨关节周围组织,取出软骨,用生理盐水清洗软骨表面组织及血迹,将软骨置于液氮中冷存备用。

2.4 病理组织学检测 每组动物各取双侧膝关节软骨标本,每个标本分别做 2 个切片,切去的部位为双侧膝关节中段正中纵切面。各组标本用 4% 的多聚甲醛溶液固定 24 h,接着分别连续脱钙 14 d,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,切片为 5 μm,脱蜡至水,行 HE,SA/FG,SA/AB 等染色^[5],切片以苏木精、伊红浸染,水洗、透明、封片,观察并据改良的 Mankin 关节软骨病理评分标准进行评定。

2.5 关节软骨 CHOP/GADD153 蛋白的表达 取置于液氮中备用的软骨,具体操作按照 Western blot 法检测试剂盒说明书进行。

2.6 检测关节软骨细胞 Bcl-2, Bax, MMP-3, TIMP-1 mRNA 的表达

2.6.1 组织总 RNA 提取 取软骨组织,具体操作按组织总 RNA 提取试剂盒说明书进行。

2.6.2 合成 cDNA 模板 按照 5 × PrimeScript RT Master Mix (for Real Time) 2 μL, Total RNA 5 μL, Rnase Free d H₂O 3 μL 至总反应体系为 10 μL;然后在 37 °C, 15 min, 85 °C, 5 s, 4 °C 维持的反转录仪上合成 cDNA。

2.6.3 基因扩增 反应体系的配制: SYBR Premix Ex Taq II (Tli RnaseH Plus) 2 ×, 取 10 μL; PCR Forward, Reverse Primer (10 μmol·L⁻¹) 各取 0.8 μL; ROX Reference Dye (50 ×) 取 0.4 μL; template 2 μL; dH₂O (sterile distilled water) 2 μL; Total 20 μL。Bcl-2 上游 5'-ACGAGTGGGATACTGGAGATG-3', 下游 5'-TAGCGACGAGAGAAGTCATCC-3'; Bax 上游 5'-GCCGATGAACTGGACAACAACAT-3', 下游 5'-TAGCAAAGTAGAAAAGGGCAACC-3'; MMP-3 上游 5'-ATGATGAACGATGGACAGATGA-3', 下游 5'-CATTGGCTGAGTCAAAGAGACC-3'; TIMP-1 上游 5'-TGGCATCCTCTTGTGCTATC-3', 下游 5'-CGAATCCTTTGAGCATCTTAGTC-3'; β₂m 上游 5'-TGAGTATGCCTGCCGTGTG-3', 下游 5'-AAAGCAAGCAAGCAGAATTTG-3'。基因扩增条件: Stage 1: Initial denaturation, Repts: 1, 95 °C 30 s; Stage 2: PCR, Repts: 40, 95 °C 5 s, 60 °C 31 s; Stage 3: Dissociation stage, Repts: 1, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s。PCR 扩增产物的测序由上海 Sangon 完成。荧光定量 PCR 得到各个目的基因的 Ct 值,用来自同一 cDNA 模板的目的基因的 Ct 值减去 β₂m 基因的 Ct 算出 ΔCt。分别以各给药组与模型组 ΔCt 的差值算出 -ΔΔCt, 再通过 2^{-ΔΔCt} 方法计算出各目的基因在各组表达的差异。

2.7 统计分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个样本均数比较采用单因素方差分析法取 F 值,多个样本均数间两两比较采用 (Newman-Keuls) 法取 q 值, P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 组织病理观察 NG 组镜下可见软骨组织表面完整、组织结构清晰、潮线完整,软骨细胞呈现出极性排列。M 组软骨表面出现不同程度破坏,潮线呈现波浪状或断裂,可见新生血管通过并连通骨髓腔等改变,软骨细胞肥大增生聚集成簇,排列紊乱,部分细胞自溶,基质外溢,甚至减少消失成空泡状,见图 1, Mankin 骨关节软骨病理评分,见表 1。

3.2 关节软骨 GADD153 蛋白的表达 Western blotting 蛋白印迹实验结果显示各组 GADD153 均有表达,其中 M 组表达最明显; GLG 组 GADD153 蛋白表达最低,较 GUG, LG 及 CLXB 组显著降低; GLG 及其拆方制剂 GADD153 的表达皆明显低于 CLXB 组,见图 2。

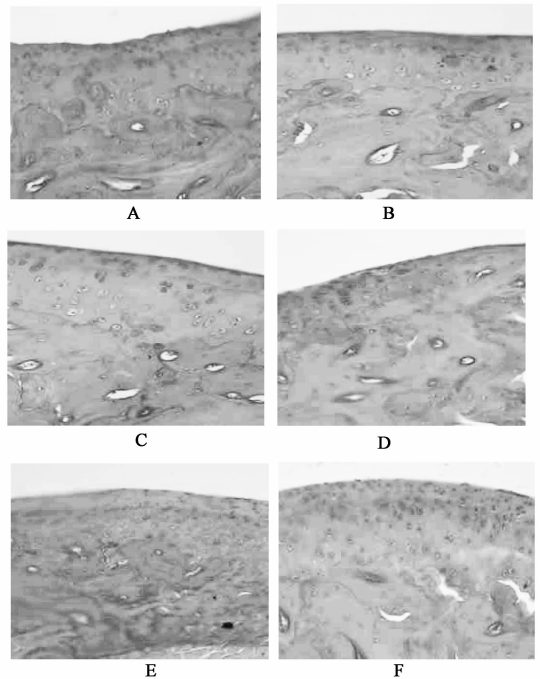
3.3 Bcl-2, Bax, MMP-3, TIMP-1 mRNA 的表达 GLG

表 1 大鼠骨关节 Mankin 评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	动物数/只			Mankin 评分/分	
		正常	轻度病变	中度病变		重度病变
正常	-	10	0	0	0.90 \pm 0.21	
模型	-	0	0	1	9	12.8 \pm 0.63 ¹⁾
骨灵膏	33.31	4	5	1	0	2.70 \pm 2.11 ²⁾
骨膏	33.31	0	3	5	2	7.70 \pm 2.13 ^{2,3)}
灵膏	33.31	0	4	5	1	6.90 \pm 3.48 ^{2,3)}
塞来昔布	20.83 $\times 10^{-3}$	0	2	5	3	8.70 \pm 3.37 ^{2,3)}

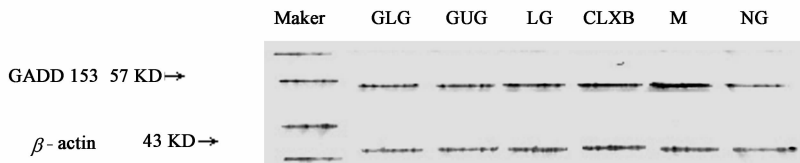
注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与骨灵膏比较³⁾ $P < 0.01$ 。

组 Bcl-2 mRNA, TIMP-1 mRNA 的表达量明显高于 CLXB 组和 M 组 ($P < 0.01$), Bax, MMP-3 mRNA 的表达明显低于 M 组 ($P < 0.01$); GUG 和 LG Bcl-2 mRNA, TIMP-1 mRNA 的表达量高于 M 组 ($P < 0.01$), Bax, MMP-3 mRNA 的表达明显低于 M 组 ($P < 0.01$); GLG 与 GUG 和 LG 比较能更好的增加 Bcl-2 mRNA, TIMP-1 mRNA 的表达和降低 Bax, MMP-3 mRNA 的表达 ($P < 0.05$), 见表 2。



A. 模型组; B. 骨灵膏 33.31 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 组; C. 正常组;
D. 骨膏 33.31 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 组; E. 灵膏 33.31 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 组;
F. 塞来昔布 20.83 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 组

图 1 骨灵膏及其拆方制剂对骨关节炎大鼠膝关节软骨组织形态学变化的影响 (HE 染色, $\times 400$)



Maker. 蛋白质分子量标准; β -Actin. 内参抗体; GADD153. 生长停滞 DNA 损伤可诱导基因 153 抗体; GLG. 骨灵膏 33.31 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 组; GUG. 骨膏 33.31 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 组; LU. 灵膏 33.31 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 组; CLXB. 塞来昔布 20.83 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 组; M. 模型组; NG. 正常组

图 2 骨灵膏及其拆方制剂对骨关节炎大鼠关节软骨细胞 GADD153 蛋白表达的影响 (Western blotting 法检测)

4 讨论

ERS 途径是一种新的凋亡信号传导途径,寒冷刺激、 Ca^{2+} 耗竭等均可导致内质网功能失调^[6], CHOP/GADD153 是 ERS 特异的转录因子^[7-8], 属 C/EBP 转录因子家族成员, 正常情况下, CHOP 在组织中的表达极低, 在 ERS 时, 其表达显著增加, 进而诱导相关细胞凋亡。Bcl-2 是重要的抑制凋亡因子, Bax 和 Bcl-2 基因有 40% 的同源性, Bcl-2/Bax 的比值决定细胞受到刺激信号后是否存活相关。研究证实, 在细胞凋亡异常的疾病中, 存在着 Bax/Bcl-2 比例的异常, 即促凋亡因子 Bax 和凋亡抑制因子 Bcl-2 两者失衡^[9]。吴剑等^[10] 等研究表明: 栀子可以通过上调软骨组织中 Bcl-2 蛋白的表达而下调 Bax 蛋白的表达, 可能是抑制软骨细胞凋亡的机制

之一。

MMP-3 对关节软骨基质中的蛋白多糖具有高度的裂解活性^[11], 是 OA 发生及发展的重要蛋白酶类, TIMP-1 是 MMP-3 的特异性抑制剂。在生理情况下, 两者之间水平保持平衡, MMP-3 不表现裂解活性, 当 TIMP-1 活性降低时, MMP-3 表现出裂解软骨细胞外基质的活性^[12], 诱导或者加剧关节软骨的进行性退变, 加重 OA 的病情。赵东杰等^[13] 研究表明: 银杏叶提取物通过调节受损伤后软骨细胞 MMP-3 和 TIMP-1 生成, 保护 IL-1 β 损伤的膝关节软骨细胞。师咏梅等^[14] 研究表明: 痹祺胶囊使软骨、关节液 MMP-3/TIMP-1 的比值减小, 从而抑制 MMP-3 对关节软骨基质蛋白多糖的裂解活性而起保护作用的。通过 GLG 与其拆方制剂治疗 OA 的研究表

表2 骨灵膏及其拆方制剂对骨关节炎大鼠软骨细胞 Bcl-2, Bax, MMP-3, TIMP-1 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

基因扩增指数

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Bcl-2	Bax	MMP-3	TIMP-1
正常	-	5.39 ± 0.22	1.13 ± 0.09	0.66 ± 0.19	5.81 ± 0.73
模型	-	0.84 ± 0.16 ¹⁾	5.99 ± 0.08 ¹⁾	6.28 ± 0.29 ¹⁾	1.69 ± 0.34 ¹⁾
骨灵膏	33.31	3.51 ± 0.21 ²⁾	1.40 ± 0.08 ²⁾	1.59 ± 0.20 ²⁾	4.67 ± 0.33 ²⁾
骨膏	33.31	2.38 ± 0.17 ^{2,3)}	2.55 ± 0.08 ^{2,3)}	2.70 ± 0.28 ^{2,3)}	3.69 ± 0.33 ^{2,3)}
灵膏	33.31	2.31 ± 0.28 ^{2,3)}	2.99 ± 0.09 ^{2,3)}	2.59 ± 0.30 ^{2,3)}	3.39 ± 0.24 ^{2,3)}
塞来昔布	20.83 × 10 ⁻³	1.84 ± 0.24 ^{2,5)}	4.46 ± 0.07 ^{2,3)}	4.30 ± 0.43 ^{2,5)}	2.49 ± 0.27 ^{2,3)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与骨灵膏组比较³⁾ $P < 0.01$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

明^[15]:GLG在改善OA患者临床症状上明显优于以单独补益脏腑的制剂GUG和单独活血化瘀的制剂LG。

CHOP/GADD153为促凋亡转录因子,当组织细胞受到外部各种刺激如氧化应激、ERS等,该因子表达明显增加^[16-17],可同Jun/Fos或者C/EBP等蛋白生成杂二聚体,从而调控其他凋亡基因的表达,导致细胞凋亡^[18]。本实验研究表明软骨组织中CHOP/GADD153蛋白在各组皆有表达,其中M组表达最显著,NG组表达最弱,GLG组与GUG, LG, CLXB组比较明显减低。GLG, GUG, LG, CLXB均能促进Bcl-2基因的表达,抑制Bax基因的表达,提高Bcl-2/Bax,进而抑制细胞凋亡,其中GLG与GUG, LG, CLXB组比较升高Bcl-2/Bax最为突出($P < 0.01$),因此在抑制OA关节软骨细胞凋亡方面,GLG优于各治疗组。GLG与M组比较能显著降低MMP-3基因的表达($P < 0.01$)、增加TIMP-1基因的表达($P < 0.01$),从而降低MMP-3/TIMP-1,进而保护软骨细胞外基质,阻止其异常降解。GLG在阻止细胞外基质降解方面比GUG, LG, CLXB作用明显($P < 0.01$)。

因此,GLG可能通过降低ERS途径相关蛋白CHOP/GADD153的异常生成,上调其下游相关凋亡靶基因Bcl-2/Bax的比值,起到降低软骨细胞凋亡的作用;同时其通过降低MMP-3基因的表达、增加TIMP-1基因的表达而下调MMP-3/TIMP-1,进而保护软骨细胞外基质;所以GLG通过抑制软骨细胞的异常凋亡和阻止细胞外基质异常降解而阻止OA关节软骨退行性变,保护了关节软骨,其作用明显优于其拆方制剂GUG, LG。

[参考文献]

[1] Roybal C N, Marmorstein L Y, VanderJagt D L, et al. Aberrant accumulation of fibulin-3 in the endoplasmic

reticulum Leads to activation of the unfolded protein response and VEGF expression [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46 (11): 3973.

[2] Paschen W, Gissel C, Linden T, et al. Activation of gadd153 expression through transient cerebral ischemia: evidence that ischemia causes endoplasmic reticulum dysfunction [J]. Brain Res Mol Brain Res, 1998, 60(1): 115.

[3] 刘杰, 王晓黎, 郭俊生. 冷应激引发小鼠骨关节炎模型的建立 [J]. 环境与职业医学, 2011, 28(5): 289.

[4] 张洪, 江捍平, 王大平. 关节制动制作骨性关节炎动物模型的探讨 [J]. 中国现代医学杂志, 2006, 16(12): 1843.

[5] 高改霞, 卫小春, 李凯, 等. 大鼠膝关节软骨不同染色方法的差异 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(24): 4385.

[6] Pahl H L. Signal transduction from the endoplasmic reticulum to the cell nucleus [J]. Physiol Rev, 1999, 79(3): 683.

[7] Yokouchi M, Hiramatsu N, Hayakawa K, et al. Atypical bidirectional regulation of cadmium induced apoptosis via distinct signaling of unfolded protein response [J]. Cell Death Differ, 2007, 14(8): 1467.

[8] Oda T, Kosuge Y, Arakawa M, et al. Distinct mechanism of cell death is responsible for tunicamycin-induced ER stress in SK-N-SH and SH-SY5Y cells [J]. Neurosci Res J T, 2008, 60(1): 29.

[9] Wang S J, Guo X, Zuo H, et al. C hondrocyte apoptosis and expression of Bcl-2, Bax, Fas, and iNOS in articular cartilage in patients with Kash in Beck disease [J]. J Rheumatol, 2006, 33(3): 615.

[10] 吴剑, 鲍同柱, 周纳新, 等. 栀子对兔膝关节炎软骨组织中Bcl-2/Bax表达的影响 [J]. 四川中医, 2009, 27(5): 13.

[11] Jain A, Nanchahal J, Troeberg L, et al. Production of cytokines, vascular Endothelial growth factors, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitors of

- metalloproteinases-1 by tenosynovium demonstrates its potential for tendon destruction in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2001, 44:1754.
- [12] Mc Carthy K, Maguire T, McGreal G, et al. High levels of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 predict poor outcome in patients with breast cancer[J]. *Int J Cancer*, 1999, 84:44.
- [13] 赵东杰, 王峻, 何炳荣. 银杏叶提取物对白细胞介素-1 β 损伤关节软骨细胞 MMP-3 和 TIMP-1 的影响[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2011, 17(1):72.
- [14] 师咏梅, 许放, 柳占彪. 痹胶囊对实验性骨关节炎大鼠 MMP-3 和 TIMP-1 的影响[J]. *天津中医药*, 2011, 28(1):64.
- [15] 陈文超, 周然, 王永辉, 等. 骨灵膏及拆方制剂治疗骨性关节炎[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(1):311.
- [16] Tang J R, Nakamura M, Okura T, et al. Mechanism of oxidative stress-induced GADD153 gene expression in vascular smooth muscle cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 290(4):1255.
- [17] Ubeda M, Habener J F. CHOP gene expression in response to endoplasmic-reticular stress requires NFY in interaction with different domains of a conserved DNA-binding element [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(24):4987.
- [18] Corazzari M, Lovat P E, Oliverio S, et al. Fenretinide: a p53-independent way to kill cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 331(3):810.
- [责任编辑 聂淑琴]

《中国医药导报》杂志 欢迎订阅 欢迎投稿

《中国医药导报》杂志是国家卫生和计划生育委员会主管、中国医学科学院主办的国家级医药卫生类科技核心期刊, 现为旬刊, 国内统一刊号: CN11-5539/R, 国际标准刊号 ISSN1673-7210, 邮发代号: 80-372, 本刊系中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊, 并被万方数据、中国知网、中国学术期刊网络出版总库、中国期刊全文数据库、解放军医学图书馆中文生物医学期刊文献数据库、中文科技期刊数据库收录。每期定价 20 元, 全年 36 期优惠价 540 元。

本刊设有专家论坛、研究进展、论著、临床研究、药理与毒理、中医中药、生物医药、病理分析、药品鉴定、制剂与技术、药物与临床、麻醉与镇痛、医学检验、影像与介入、护理研究、教学研究、药物经济学、科研管理、政策研究、医药监管等栏目, 是广大医药科研、教育、临床等人员开阔视野、交流经验、增进学术交流的贴身参谋和得力助手, 也是发表学术论文的园地。在本刊发表的论文可获得继续教育学分。本刊订户凭订阅单复印件投稿优先发表, 来稿注明单位名称、地址、电话、联系人姓名。

社址: 北京市朝阳区通惠家园惠润园(壹线国际)5-3-601 邮编: 100025

投稿热线: 010-59679061 59679063 发行热线: 010-59679533

传真: 010-59679056 投稿邮箱: yyzx68@vip.163.com

网址: www.yiyaodaobao.com.cn