

黄芪桂枝五物汤对骨关节炎大鼠血管新生的作用

赵乐^{1,2}, 李艳彦^{2*}, 王永辉², 董小君³, 周然², 张若楠², 孙力威²

(1. 成都中医药大学, 成都 611137; 2. 山西中医药大学, 太原 030024;
3. 遵义医药高等专科学校, 贵州 遵义 563006)

[摘要] **目的:**研究黄芪桂枝五物汤对阳虚寒凝骨关节炎(osteoarthritis, OA)模型大鼠血管内皮生长因子(VEGF)及相关因子的影响。**方法:**60只SPF级SD大鼠随机分为正常组,模型组,塞来昔布组(20.82 mg·kg⁻¹),黄芪桂枝五物汤低、中、高剂量组(3.24, 6.48, 12.96 g·kg⁻¹)。除正常组外,其余各组通过冷固法复合寒冷环境刺激42 d,复制OA模型。造模后,给药组分别灌胃相应药物,正常组和模型组给同等剂量蒸馏水,每天1次,连续28 d。末次给药24 h后,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血清中VEGF,前列腺素E₂(PGE₂),转化生长因子β₁(TGF-β₁)水平;免疫组化染色检测左膝关节滑膜和软骨内VEGF表达;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测右膝关节滑膜白细胞介素-17(IL-17)和VEGF mRNA表达。**结果:**与正常组比较,模型组血清、软骨和滑膜组织中VEGF表达均显著性升高(P<0.01),同时,血清中PGE₂和TGF-β₁,滑膜组织IL-17水平均显著升高(P<0.01);与模型组比较,各用药组血清、软骨和滑膜组织中VEGF表达均显著性降低(P<0.05),同时,血清中PGE₂和TGF-β₁水平,滑膜组织中IL-17水平亦显著降低(P<0.05);各用药组间比较,黄芪桂枝五物汤高剂量组膝关节滑膜组织IL-17较塞来昔布组升高(P<0.05),黄芪桂枝五物汤中、高剂量组VEGF较塞来昔布组显著升高(P<0.01),其余各组间比较均无显著性差异。**结论:**黄芪桂枝五物汤可能通过减轻骨关节炎大鼠血管新生相关细胞因子PGE₂和TGF-β₁等的表达而作用于VEGF,从而抑制膝关节处血管新生,减轻软骨损伤。

[关键词] 黄芪桂枝五物汤; 骨关节炎; 血管内皮生长因子(VEGF); 血管新生

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)03-0087-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20190338

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181115.0949.019.html>

[网络出版时间] 2018-11-16 15:24

Effect of Huangqi Guizhi Wuwu Tang on Angiogenesis in Osteoarthritis

ZHAO Le^{1,2}, LI Yan-yan^{2*}, WANG Yong-hui², DONG Xiao-jun³, ZHOU Ran²,
ZHANG Ruo-nan², SUN Li-wei²

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;
2. Shanxi University of Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China;
3. Zunyi Medical and Pharmaceutical College, Zunyi 563006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Huangqi Guizhi Wuwu Tang on angiogenesis of osteoarthritis with Yang deficiency and cold coagulation. **Method:** Totally 60 female SD rats were randomly divided into control group, model group, celecoxib group (20.82 mg·kg⁻¹) and low, medium, high-dose Huangqi Guizhi Wuwu Tang groups (3.24, 6.48, 12.96 g·kg⁻¹). All groups, except for control group, were involved in duplicating the osteoarthritis (OA) model through frozen and knee fixation, as well as 42-day cold environmental stimulation. After modeling, all drug-group rats were respectively administrated with corresponding drugs for 28 days, once a day. Meanwhile, control group and model group were given equivalent distilled water by gavage. 24 hours after the

[收稿日期] 20180712(012)

[基金项目] 山西省卫生厅项目(201601110);山西省科技厅项目(2014011047-1);山西中医药大学博士科研启动项目

[第一作者] 赵乐,在读博士,从事方剂相关配伍理论的研究,E-mail:Zleva2012@126.com

[通信作者] *李艳彦,博士,教授,从事方证相关物质基础的研究,Tel:0351-8618180,E-mail:liyiyi002@163.com

last gavage, vascular endothelial growth factor (VEGF), prostaglandin E₂ (PGE₂) and transforming growth factor-β₁ (TGF-β₁) in serum were detected with enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) method, VEGF expressions in cartilage and synovial with immunohistochemical method, and interleukin-17 (IL-17) and VEGF levels in synovial with Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** Compared with normal group, the expression of VEGF in serum, cartilage and synovial were significantly increased ($P < 0.01$), and PGE₂ and TGF-β₁ expressions, IL-17 level were increased significantly ($P < 0.01$) as well. Compared with model group, VEGF in serum, cartilage and synovial were significantly decreased in the 4 drug groups. Meanwhile, PGE₂, TGF-β₁ and IL-17 level were decreased significantly ($P < 0.05$). Among drug groups, IL-17 of high-dose group in synovial was higher than that of celecoxib group ($P < 0.05$), and VEGF of medium and high-dose Huangqi Guizhi Wuwu Tang groups in synovial was higher than that of celecoxib group ($P < 0.05$). There was no significant difference among other drug groups. **Conclusion:** Huangqi Guizhi Wuwu Tang has an effect in suppressing angiogenesis of knee and alleviate cartilage lesion by regulating VEGF and its upstream cytokines PGE₂ and TGF-β₁.

[**Key words**] Huangqi Guizhi Wuwu Tang; osteoarthritis; vascular endothelial growth factor (VEGF); angiogenesis

骨关节炎(OA)是一种由劳损、创伤、肥胖、遗传等多种复杂因素导致关节软骨退化损伤、关节边缘和软骨下骨增生形成骨赘的退行性关节炎疾病^[1]。目前对OA发病机制认识不清,近期研究认为OA发病过程中常伴有滑膜炎,其通过炎症反应,促进局部血管新生、滑膜组织增生,继而造成软骨破坏、骨赘形成^[2],因此,滑膜炎是OA研究新的切入口。在滑膜炎发生、加重OA病理进程中,以血管内皮生长因子(VEGF)为代表诱导的局部血管新生在OA的发生中起着重要的作用。VEGF作为内皮细胞有丝分裂原,不仅可促进内皮细胞分裂、增殖、迁移,增加血管通透性^[3],诱导新血管形成^[4],且对关节及机体炎性细胞的趋化性产生调节,使炎性物质通过新生血管加剧在关节处的释放,为进一步破坏关节结构提供便利^[5],并已发现其与疾病严重程度呈正相关性^[6]。

经方黄芪桂枝五物汤出自《金匮要略》,经过历代医家不断运用、总结,在多种疾病中均有广泛应用。临床发现,黄芪桂枝五物汤加减,通过益气温阳,散寒通络,对治疗骨性关节炎具有确切疗效^[7-8],但其作用途径尚不明确。本实验在黄芪桂枝五物汤对阳虚寒凝型OA具有确切疗效的基础上,给予OA模型黄芪桂枝五物汤干预,研究OA大鼠体内VEGF及相关因子前列腺素E₂(PGE₂),转化生长因子-β₁(TGF-β₁),白细胞介素-17(IL-17)的表达,旨在对黄芪桂枝五物汤干预OA途径,与血管新生的关系有进一步的认识。

1 材料

1.1 动物 健康SD大鼠,SPF级,雌性,60只,体重(200±10)g,北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号SCXK(京)2016-0006,适应性喂养1周后开始实验。实验室温度(20±2)℃,湿度(40±10)%。本实验获得山西中医药大学实验动物伦理委员会批准(2017-009)。

1.2 药物与试剂 黄芪、桂枝、白芍购自太原同仁堂(黄芪产地内蒙古,批号2017071461,桂枝产地广西,批号150801,白芍产地安徽,批号201507042);大枣为河南新郑枣;生姜采自当地市场。药材全部由山西中医药大学实验中心王永辉教授鉴定,符合2015年版《中国药典》要求。以上药材分别按《金匱要略》中1:1:1:2:1的比例配伍,实际用量用人体与大鼠体表面积折算后,分2次煎煮:分别加10倍和8倍量水,首次浸泡30min,武火煎煮沸腾后,改文火煎煮25min和15min,纱布过滤,合并滤液浓缩至分别含生药量为3.24,6.48,12.96g·kg⁻¹。塞来昔布胶囊(辉瑞制药有限公司,批号R77188S15589)药粉温水溶解至为20.82mg·kg⁻¹。各药液配制后冰箱保存,每周煎药1次,每次煎1周药量。PGE₂酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海西唐生物科技有限公司,批号1712251),VEGF和TGF-β₁ELISA试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为25413441111,228131241228);trizol(美国Ambion公司,批号79325405);SYBR Green PCR试剂盒(美国Kapa Biosystems公司,批号005196-19-1);逆转录试剂盒(日本Takara公司,批

号 AK2201)。

1.3 仪器 EL204 型万分之一电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];ZX-S26 型恒温水浴锅(上海知信实验仪器技术有限公司);Centrifuge 5424 R 型离心机(德国 Eppendorf 公司);MK3 型酶标仪(美国 Thermo 公司);DHG-9023A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);SW-CJ-2D 型超净工作台(苏州净化设备有限公司);G80F20CN1L-DG(W0)型微波炉(广东格兰仕微波生活电器制造有限公司);T100 型 Thermal Cycler PCR 仪,Real-time System 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 分组与造模 60 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后,按随机数字表法分为 2 组,正常组(10 只)和造模组(50 只)。采用冷固法复合外界环境刺激^[9]复制阳虚寒凝型骨关节炎模型,除正常组外,造模组 50 只大鼠俱采用相同造模方法造模,直至造模结束,每日将大鼠双后肢膝关节伸直位石膏绷带固定,及自然站立于(6±2)℃冰水中,各 6 h,持续 6 周。造模期间,每晚于人工气候箱寒冷刺激 10 h,温度(10±2)℃。造模结束后,按随机数字表法将 50 只造模大鼠随机分为模型组、黄芪桂枝五物汤低、中、高剂量组和塞来昔布组。

2.2 给药 自造模结束次日起,各组分别按 5 mL·kg⁻¹灌胃,黄芪桂枝五物汤低、中、高剂量组灌胃剂量依次为 3.24,6.48,12.96 g·kg⁻¹,塞来昔布组 20.82 mg·kg⁻¹,正常组与模型组给予等剂量蒸馏水,每日 1 次,持续 4 周。

2.3 指标检测

2.3.1 大鼠一般情况观察 给药结束后,观察大鼠的精神状态、毛色、大便、活动度、及体质量。

2.3.2 ELISA 检测血清 VEGF, PGE₂, TGF-β₁ 含量 末次给药结束后 12 h 取材,前一晚禁食不禁水。大鼠予 10% 水合氯醛溶液腹腔注射麻醉后,腹主动脉取血,3 000 r·min⁻¹离心 15 min,分离血清。按照 ELISA 试剂盒说明书步骤分别检测血清中 VEGF, PGE₂, TGF-β₁ 吸光度 A,并换算为实际加样浓度。

2.3.3 膝关节软骨及滑膜组织 VEGF 检测 分离大鼠双侧膝关节,左侧于 4% 多聚甲醛溶液及 10% EDTA 溶液循环浸泡组织 4 周,至大头针可穿透,制作石蜡组织块,免疫组化 SABC 法检测大鼠膝关节软骨及滑膜 VEGF 表达(VEGF 一抗浓度 1:200,抗原修复用 0.01 mol·L⁻¹柠檬酸钠缓冲液高压修复

15 min),余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,Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件统计分析积分吸光度 IA。

2.3.4 Real-time PCR 检测膝关节滑膜组织 IL-17 和 VEGF mRNA 表达 滑膜组织依次进行总 RNA 提取, DNA 反转录及扩增,检测 IL-17 和 VEGF mRNA 表达, IL-17 上游引物 5'-CCGTTCCACTT CACCCT-3',下游引物 5'-TCCAACCTCC CTCAGC-3'(117 bp), VEGF 上游引物 5'-GCACCCACG ACAGAAGG-3',下游引物 5'-ATTAGGGGCA CACAGGA-3'(161 bp),β-肌动蛋白(β-actin)上游引物 5'-CGTTGACATCCGTAAAGAC-3',下游引物 5'-TAGGAGCCAGGGCAGTA-3'(110 bp)。引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。DNA 扩增条件为 95℃ 3 min,95℃ 5 s,56℃ 10 s,72℃ 25 s;39 个循环。结果以 2^{-ΔΔC_t} 计算,以 C_t 值对 IL-17 和 VEGF mRNA 的相对表达量进行分析。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用 LSD-*t* 方差分析,正态不齐时进行正态性校正,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般情况 与正常组比较,模型组精神状态明显萎靡低下,其毛色枯槁无光泽且散乱,大便质软,部分可见粪质稀溏,活动度明显减少,极喜扎堆且寒颤明显,体质量下降明显,体型差距显而易见。各给药组大鼠状态较模型组有明显恢复:黄芪桂枝五物汤各组大鼠精神状态较好,毛发稍有不整但有光泽,未见毛色枯槁或散乱竖毛,大部分大便湿润,偶有粪质变软,但尚成形,活动较模型组增多,寒颤减少,进食量较模型组增加,体质量恢复但较正常组轻。

3.2 对阳虚寒凝型 OA 大鼠血清 VEGF, PGE₂ 和 TGF-β₁ 的影响 与正常组比较,模型组血清中 VEGF, PGE₂ 和 TGF-β₁ 水平显著升高(*P* < 0.01);与模型组比较,用药各组 VEGF, PGE₂ 和 TGF-β₁ 水平明显降低(*P* < 0.05, *P* < 0.01);各用药组间比较,黄芪桂枝五物汤中剂量及塞来昔布组较黄芪桂枝五物汤中、高剂量组差别明显,但无统计学意义。见表 1。

3.3 对阳虚寒凝型 OA 大鼠膝关节软骨及滑膜组织 VEGF 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组软骨和滑膜内 VEGF 阳性表达显著升高(*P* < 0.01);与模型组比较,塞来昔布和黄芪桂枝五物汤中、高剂量组软骨和滑膜内 VEGF 水平显著降低(*P* < 0.01),黄芪桂枝五物汤低剂量组软骨、滑膜

表 1 黄芪桂枝五物汤对阳虚寒凝型 OA 大鼠血清 VEGF, PGE₂ 和 TGF-β₁ 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Effect of Huangqi Guizhi Wuwu Tang on VEGF, PGE₂ and TGF-β₁ in serum of OA rats with Yang deficiency and cold coagulation ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	VEGF	PGE ₂	TGF-β ₁ (×10 ⁻²)
正常	-	39.11 ± 9.78	182.90 ± 35.24	20.39 ± 3.37
模型	-	85.79 ± 8.49 ²⁾	416.22 ± 99.53 ²⁾	53.90 ± 3.75 ²⁾
塞来昔布	20.82 × 10 ⁻³	44.81 ± 9.14 ⁴⁾	264.57 ± 69.01 ⁴⁾	24.74 ± 4.74 ⁴⁾
黄芪桂枝五物汤	3.24	55.19 ± 12.76 ⁴⁾	309.69 ± 43.43 ⁴⁾	34.43 ± 10.47 ⁴⁾
	6.48	49.54 ± 7.27 ⁴⁾	293.20 ± 64.69 ⁴⁾	31.46 ± 11.45 ⁴⁾
	12.96	56.05 ± 12.21 ⁴⁾	323.25 ± 97.72 ³⁾	33.01 ± 9.05 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01;与模型组比较³⁾P < 0.05, ⁴⁾P < 0.01(表 2 同)。

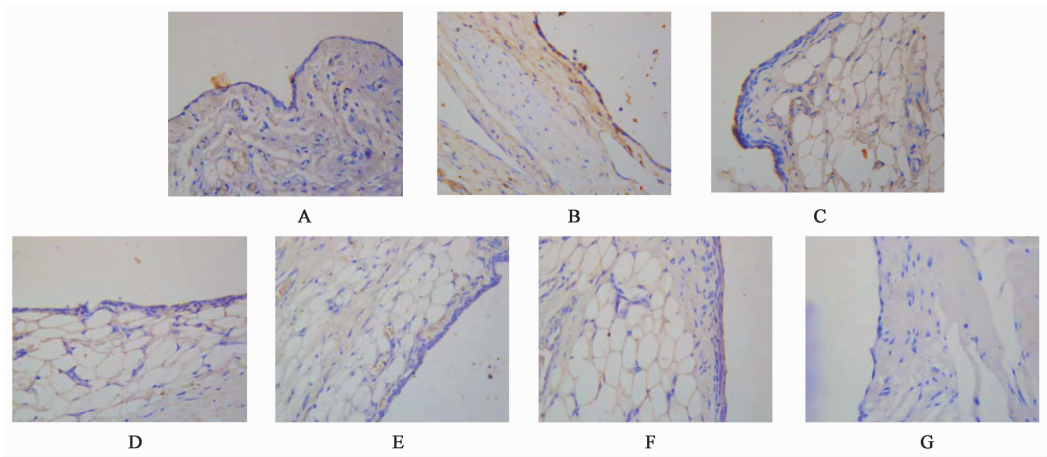
内 VEGF 降低 ($P < 0.05, P < 0.01$); 各用药组间比较, 差异无统计学意义。见表 2。由免疫组化染色结果可知, VEGF 阳性表达为棕黄色, 软骨和滑膜层均可见, 滑膜表层较深层表达呈强阳性。表达主要位于细胞浆近胞膜处及小血管周围, 正常组呈阴性或弱阳性表达, 模型组呈阳性或强阳性表达, 余各组呈阳性或弱阳性, 见图 1, 2。

3.4 对阳虚寒凝型 OA 大鼠膝关节滑膜组织 IL-17 和 VEGF mRNA 的影响 与正常组比较, 模型组 IL-17 和 VEGF mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各用药组 IL-17 和 VEGF mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$); 与塞来昔布组比较, IL-17 在

表 2 黄芪桂枝五物汤对阳虚寒凝型 OA 大鼠膝关节 VEGF IA 值的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Effect of Huangqi Guizhi Wuwu Tang on VEGF in knee of OA rats with Yang deficiency and cold coagulation ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	软骨 (×10 ⁻²)	滑膜 (×10 ⁻³)
正常	-	6.87 ± 1.55	15.16 ± 2.90
模型	-	24.06 ± 2.30 ²⁾	44.25 ± 4.52 ²⁾
塞来昔布	20.82 × 10 ⁻³	10.12 ± 1.81 ⁴⁾	24.84 ± 7.83 ⁴⁾
黄芪桂枝五物汤	3.24	11.50 ± 2.27 ⁴⁾	31.37 ± 1.21 ³⁾
	6.48	10.35 ± 1.87 ⁴⁾	24.92 ± 3.55 ⁴⁾
	12.96	11.08 ± 1.58 ⁴⁾	26.65 ± 4.14 ⁴⁾



A. 正常组; B. 模型组; C. 塞来昔布组; D. 黄芪桂枝五物汤 3.24 g·kg⁻¹ 组; E. 黄芪桂枝五物汤 6.48 g·kg⁻¹ 组; F. 黄芪桂枝五物汤 12.96 g·kg⁻¹ 组; G. 阴性组(图 2 同)

图 1 黄芪桂枝五物汤对阳虚寒凝型 OA 大鼠膝关节滑膜 VEGF 蛋白表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig. 1 Effect of Huangqi Guizhi Wuwu Tang on VEGF in synovial of OA rats with Yang deficiency and cold coagulation (IHC, 200)

黄芪桂枝五物汤高剂量组, 及 VEGF 在黄芪桂枝五物汤中、高剂量组均升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。其余各用药组间比较, 无显著性差别。见表 3。

4 讨论

OA 是中老年人常见疾病之一, 其在 65 岁以上人群均有高患病率、高致残率的特点, 随着我国居民健康保健意识的提高及社会老龄化时代的到来,

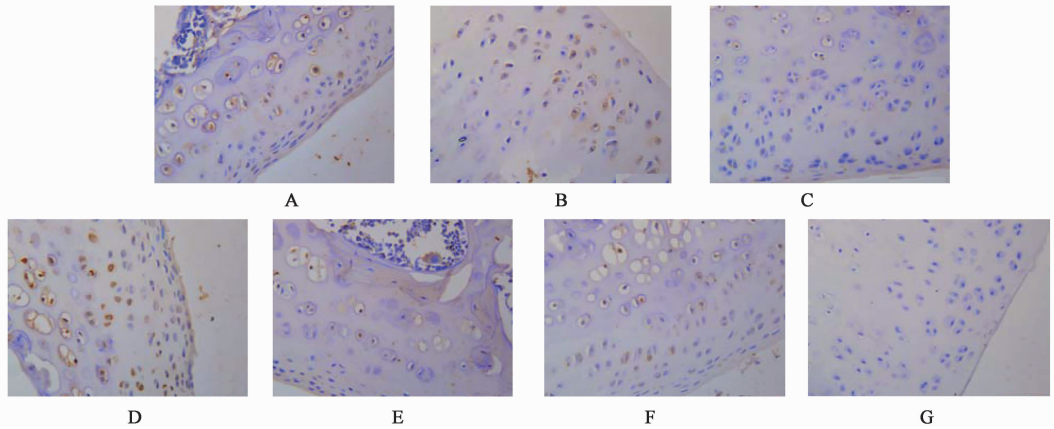


图 2 黄芪桂枝五物汤对阳虚寒凝型 OA 大鼠膝关节软骨 VEGF 蛋白表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig. 2 Effect of Huangqi Guizhi Wuwu Tang on VEGF in cartilage of OA rats with Yang deficiency and cold coagulation (IHC, ×200)

表 3 黄芪桂枝五物汤对阳虚寒凝型 OA 大鼠膝关节滑膜组织 IL-17 和 VEGF mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of Huangqi Guizhi Wuwu Tang on IL-17 and VEGF mRNA expression in synovial of OA rats' knee with Yang deficiency and cold coagulation ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	IL-17	VEGF
正常	-	1.14 ± 0.27	2.01 ± 1.01
模型	-	16.54 ± 2.06 ²⁾	22.97 ± 1.01 ²⁾
塞来昔布	20.82 × 10 ⁻³	3.14 ± 0.74 ³⁾	5.66 ± 1.53 ³⁾
黄芪桂枝五物汤	3.24	4.81 ± 1.34 ³⁾	8.01 ± 2.65 ³⁾
	6.48	4.27 ± 0.60 ³⁾	14.04 ± 1.08 ^{3,5)}
	12.96	6.23 ± 1.66 ^{3,4)}	10.33 ± 1.08 ^{3,5)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.01$;与塞来昔布组比较⁴⁾ $P < 0.05$, ⁵⁾ $P < 0.01$ 。

老年性疾病的防治不仅是老年人关心的头等大事,更是医务工作者面临的重要课题之一。但 OA 的临床治疗,目前以非甾体等抗炎,缓解患者疼痛为主,不能阻止疾病进展,常需在疾病后期行关节置换,近年来研究热点“间充质干细胞移植技术”通过干细胞直接促进软骨再生,促进膝关节功能恢复,可能成为 OA 治疗的新途径^[10],但应用人群还较局限,且长效作用效果还有待时间检验。

比较西医目前对 OA 治疗方面的不足,中医学在 OA 的治疗方面发挥着独特的优势。骨关节炎,古称“鹤膝风”“痹症”,常由虚实之邪夹杂而致,而正气亏损是 OA 发生的重要内因,《黄帝内经·灵枢·五变篇》曰:“粗理而肉不坚者,善病痹”。老年人常伴有阳气不足,并逐渐发展为肝脾肾亏损,《黄帝内经·素问·上古天真论》提到:“六八,阳气衰竭于上,面焦,发鬓颁白;七八肝气衰,筋不能动。”因此,OA

治疗早期,通过补益阳气,不仅对老年人生理性衰老有较好的作用,还可有效阻止其进程。相反,如防护不当,病情迁延,则可见阳虚寒凝证。其作为 OA 常见证型之一,即是以阳气不足,致寒邪内侵为病因,并常会伴随膝骨关节疼痛。《黄帝内经·素问·痹论》对其阐述:“痹或痛,痛者,寒气多也,有寒故痛也……其寒者,阳气少,阴气多,与病相益,故寒也。”因此,通过补气升阳,散寒通络治疗 OA,是临床行之有效的办法,黄芪桂枝五物汤加减在 OA 治疗中作用显著。

本实验在前期石膏关节制动^[11]改良后冷固法基础上进行模型复制,造模后大鼠膝骨关节滑膜处胶原纤维增多、增粗,且软骨细胞结构破坏,排列不规则,关节间隙疑似缩小或缩小现象,同时伴有 II 型胶原表达减少等表现,证明模型复制有效^[12-13]。且通过前期研究及临床经验总结,OA 与 T 细胞介导的免疫功能低下及血脉瘀滞关系密切^[13-14],通过升阳散寒、活血通络治疗 OA 过程中,对机体免疫功能改善和局部血运有较好调节疏导效果^[15]。局部血瘀状态,在关节性疾病中,被称为异常血管的“类肿瘤样”生长,是关节处滑膜、软骨功能过度活跃,最终造成滑膜、软骨细胞损伤、凋亡的重要因素,血管异常新生在关节炎发病过程中出现较早,消退较晚,并与炎症因子互相作用导致关节滑膜炎,OA 病情加重^[16],同时血管不断增生导致关节处血管翳形成,滑膜增生,其对关节软骨及软骨下骨巨大的破坏最终诱导关节损伤、功能丧失^[17],是 OA 患者疾病晚期面临的最大困扰。

VEGF 作为调节血管新生的重要细胞因子,与 VEGF 受体 2 (VEGFR2) 结合,可调节 PGI₂ 及内皮型一氧化氮合酶 (eNOS),半光氨酸天冬氨酸蛋白

水解酶-9 (Caspase-9) 的表达,并促进细胞凋亡^[18],加之感觉神经伴行于新生血管处,穿透非钙化关节软骨,引起关节疼痛^[5]。在 OA 进程中,炎症反应和免疫功能的异常一直受到学界的广泛关注,PGE₂ 既与 IL-1 β 等炎性因子协同,促进血管内皮细胞分裂、增殖,并移行、聚集至关节处,形成小血管,又可提高血管通透性,促进缓激肽、组胺等物质表达,引起关节局部水肿及炎症反应,同时参与滑膜炎的加剧和血管翳的形成^[19-20],其与 VEGF 促血管生成具有协同效应。此外,根据前期研究,课题组发现免疫细胞在 OA 免疫功能调解中有重要作用,其中 Th17 细胞可能与 OA 血管生成密切相关,Th17 细胞由 IL-6 和 TGF- β_1 诱导分化,成熟的 Th17 细胞可分泌 IL-17, IL-6, TNF- α 等多种炎症因子,其中 IL-17 可单独或协同 TNF- α 等使滑膜细胞分泌 VEGF,从而参与关节炎疾病的发展^[21],且有研究证明,OA 患者存在 IL-17 的高水平表达^[22],体内高凝状态的改善与抑制 IL-17 等表达有关^[23]。本次实验结果表明,OA 模型组大鼠 VEGF 及上述细胞因子均较正常组显著升高,提示 VEGF 可能是促使机体关节处血管新生,导致关节损伤的重要因素,且其可能受到 IL-17, PGE₂ 和 TGF- β_1 等因子调节。

课题组对模型大鼠予《金匱要略》经方黄芪桂枝五物汤干预,基于临床实践中阳虚寒凝证型为常见且极易发生虚实夹杂证型,患者多因年老体弱,调摄失当,阳气亏虚为先,继而致卫弱营强之营卫不和,腠理疏松,寒邪内侵,内外邪气困扰而发于本病。用黄芪桂枝五物汤干预,以补气升阳,散寒通络,且本方具有益卫和营之功,从而达到治病求本,祛邪外出,缓解及阻止 OA 进程的目的。具体分析方中各药,黄芪甘、温,有益气升阳之效;桂枝辛、温,辛可温经散寒通络,并解肌发汗,给寒邪以出路,与黄芪同用,益气固表,兼具调和营卫之功;配伍等量白芍,酸苦敛阴柔肝,缓急止痛,伍以黄芪,一以养阴血,一以补阳气,而无耗散气血之弊;生姜与大枣相伍,补脾益胃,则气血生化有源,且生姜加量,既可散寒于外,又以其归太阴脾土,温热之生姜有如太阳温煦大地,使湿不内聚,寒不内侵。诸药相合,通过补气升阳,散寒通脉之法,使气血充足,营卫调和,寒邪外散,诸证自除,免疫功能增强,经络通达,亦符合中医各家治疗阳虚寒凝型骨关节炎风寒湿痹、气滞血瘀等实证及肝脾肾亏虚所导致之虚证的治则。

实验结果表明,模型组大鼠在黄芪桂枝五物汤干预后,精神状态较模型组明显好转,活动度增加,

且血清、软骨、滑膜处 VEGF 表达均有下降,与之相关炎症因子 PGE₂ 和 TGF- β_1 ,以及免疫细胞因子 IL-17 亦降低,说明免疫细胞 Th17 及 PGE₂ 与血管新生细胞因子 VEGF 之间存在着同向作用关系,与文献报道基本符合,但其具体作用关系,及中间作用通路,及重要节点处细胞因子的筛查还有待进一步探讨。

综上所述,黄芪桂枝五物汤可能通过调节机体 Th17 免疫细胞上下游因子 IL-17 和 TGF- β_1 ,及炎症因子 PGE₂ 等,参与机体免疫调节及炎症反应过程,并对机体 VEGF 等产生影响,抑制关节处血管过度增生现象,减轻关节局部滑膜炎以及血管、滑膜增生对软骨的损伤,从而有效减轻骨关节炎的病理进程。

[参考文献]

- [1] Daniel P A, Judge A, Javaid M K, et al. Incidence and risk factors for clinically diagnosed knee, hip and hand osteoarthritis: influences of age, gender and osteoarthritis affecting other joints[J]. Ann Rheum Dis, 2014, 73 (9): 1659-1664.
- [2] 黄志,郭卫兵,王小虎,等.早期骨关节炎慢性滑膜炎的发病机制研究进展[J].实用骨科杂志,2016, 22 (5): 428-431.
- [3] Landry J P, FEI Y Y, ZHU X D, et al. Discovering small molecule ligands of vascular endothelial growth factor that block VEGF-KDR binding using label-free microarray-based assays[J]. Assay Drug Dev Technol, 2013, 11 (5): 326-332.
- [4] 刘秀丽,滕蔚然,金立伦.血管内皮生长因子在骨关节炎中的研究进展[J].医学综述,2014, 20 (17): 3092-3094.
- [5] 郑洁,王瑞辉,寇久社.血管生成及神经生长在骨关节炎中的作用[J].中国老年学杂志, 2015, 35 (18): 5339-5342.
- [6] 徐慧,陆进明. VEGF 在骨关节炎发病机制中的研究进展[J].安徽医学,2016, 37 (7): 923-925.
- [7] 李冀,孙新雨,毕珺辉.黄芪桂枝五物汤的临床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.
- [10] Trounson A, Mc Donald C. Stem cell therapies in clinical trials: progress and challenges[J]. Cell Stem

- Cell, 2015, 17(1):11-22.
- [11] 陈世杰, 劳文艳, 周艳丽, 等. 骨关节炎动物模型建立在功能食品研究中的研究[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(28):4536-4542.
- [12] 李艳彦, 赵乐, 王永辉, 等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(23):149-154.
- [13] 赵乐, 李艳彦, 王永辉, 等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(7):160-166.
- [14] 袁芳, 何晓瑾, 石俊, 等. 骨痹方治疗膝骨关节炎肾虚络痹证临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(7):207-211.
- [15] 彭全利. 加味黄芪桂枝五物汤治疗膝骨性关节炎 80 例临床观察[J]. 临床医学研究与实践, 2017, 2(23):116-117.
- [16] 蔡辉, 常文静, 商玮. 血管新生在类风湿关节炎中的作用[J]. 安徽医药, 2015, 19(3):417-421.
- [17] 郑双融. 痹祺胶囊对 CIA 大鼠滑膜炎症及血管新生相关因子的影响[D]. 天津:天津医科大学, 2016.
- [18] 周建林, 方洪松, 彭昊, 等. 血管内皮生长因子和缺氧诱导因子对软骨细胞凋亡的作用[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(29):4705-4709.
- [19] Meini S, Cucchi P, Tinti L, et al. Fasitibant prevents the bradykinin and interleukin 1β synergism on prostaglandin E_2 release and cyclooxygenase 2 expression in human fibroblast-like synoviocytes [J]. Springer, 2012, 358(8):777-786.
- [20] 梁江, 马武开, 刘正奇, 等. 黑骨藤乙醇提取物影响人类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖及 COX-2、PGE₂ 表达的研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(1):24-27.
- [21] 郭亚春, 高亚贤, 宋鸿儒, 等. 薯蓣皂苷元体外对大鼠滑膜 RSC-364 细胞株 STAT3 及 VEGF 影响的研究[J]. 现代预防医学, 2016, 43(1):128-131.
- [22] 陆斌, 李建武, 杨艳, 等. 膝骨关节炎患者血浆中 IL-17、IL-22 的表达水平及其临床意义[J]. 山西医科大学学报, 2014, 45(3):183-185.
- [23] 谈冰, 刘健, 章平衡. 新风胶囊通过抑制 NF- κ B 信号通路改善膝骨关节炎患者高凝状态[J]. 免疫学杂志, 2016, 32(9):781-789.

[责任编辑 周冰冰]