

独活寄生汤对膝骨关节炎模型大鼠 PERK/Bip 信号通路的影响

赵林灿¹, 李薇薇², 吴毅明², 段卫峰^{3*}
(1. 郑州澍青医学高等专科学校, 郑州 450000; 2. 河南中医药大学 第三附属医院, 郑州 450004; 3. 河南省洛阳正骨医院, 河南 洛阳 471000)

[摘要] **目的:** 基于蛋白激酶 R 样内质网激酶 (PERK)/免疫球蛋白结合蛋白 (Bip) 信号通路探讨独活寄生汤缓解膝骨关节炎的可能机制。**方法:** 采用寒冷刺激法建立膝骨性关节炎模型, 将大鼠随机分为空白组, 模型组, 塞来昔布组 (0.021 g·kg⁻¹) 和独活寄生汤低、中、高剂量组 (8.37, 16.72, 33.48 g·kg⁻¹), 空白组和模型组给予等体积的生理盐水, 记录各组大鼠膝关节直径变化。采用苏木素-伊红 (HE) 染色观察大鼠膝关节软骨病理形态变化; 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测血清中肿瘤坏死因子-α (TNF-α), 白细胞介素-1β (IL-1β), 透明质酸 (HA) 的表达; 采用实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 和蛋白免疫印迹法 (Western bolt) 检测软骨中 PERK, Bip, 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9 (Caspase-9) mRNA 和蛋白的表达。**结果:** 与模型组比较, 塞来昔布组和独活寄生汤高剂量组大鼠膝关节红肿明显改善, 且关节直径均显著的减小 ($P < 0.01$), 塞来昔布组和独活寄生汤高剂量组大鼠膝关节软骨局部裂隙缺损有明显好转。与空白组比较, 模型组大鼠 TNF-α, IL-1β 和 HA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$), 大鼠软骨中 PERK, Bip, Caspase-9 的 mRNA 和蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型组比较, 塞来昔布组和独活寄生汤高剂量组大鼠血清中 TNF-α, IL-1β 和 HA 表达明显下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 塞来昔布组和独活寄生汤高剂量组大鼠软骨中 PERK, Bip, Caspase-9 的 mRNA 和蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:** 独活寄生汤能缓解膝骨关节炎模型大鼠的症状, 其机制可能与调节大鼠软骨中 PERK/Bip 信号通路有关。

[关键词] 独活寄生汤; 骨性关节炎; 蛋白激酶 R 样内质网激酶 (PERK); 免疫球蛋白结合蛋白 (Bip); 信号通路
[中图分类号] R289; R684.3; R274; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2019) 09-0018-07
[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20190937
[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190118.1617.006.html>
[网络出版时间] 2019-01-22 8:43

Effect of Duhuo Jisheng Tang on PERK/Bip Signaling Pathway in Knee Osteoarthritis Model Rats

ZHAO Lin-can¹, LI Wei-wei², WU Yi-ming², DUAN Wei-feng^{3*}
(1. Zhengzhou Shuqing Medical College, Zhengzhou 450000;
2. The Third Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450004, China;
3. Luoyang Orthopedic-traumatological Hospital of Henan Province, Luoyang 471000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the possible mechanism of Duhuo Jisheng Tang in relieving knee osteoarthritis based on protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) /immunoglobulin-binding protein (Bip) signaling pathway. **Method:** A model of knee osteoarthritis was established by cold stimulation. Rats were randomly divided into blank group, model group, celecoxib group (0.021 g·kg⁻¹), low, medium and high-dose Duhuo Jisheng Tang groups (8.37, 16.72, 33.48 g·kg⁻¹). Blank group and model group were given equal volume of physiological saline. The changes of knee joint diameter were recorded. The pathological changes of rat articular cartilage were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The expressions of tumor necrosis

[收稿日期] 20181102(014)
[基金项目] 河南省中医药科学研究专项 (2018ZY2018)
[第一作者] 赵林灿, 硕士, 讲师, 主治医师, 从事关节炎疾病研究, E-mail: yzrx_888@126.com
[通信作者] * 段卫峰, 硕士, 副主任医师, 从事中医骨科研究, E-mail: dweifeng666@163.com

factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and hyaluronic acid (HA) in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA and protein expression levels of PERK, Bip and cysteinyl asparates pecific protein-9 (Caspase-9) in cartilage were detected by Real-time PCR and Western blot. **Result:** The knee joint redn ess and the joint diameter of celecoxib group and high-dose Duhuo Jisheng Tang group were improved, and the joint diameter was reduced significantly ($P < 0.01$). The local fractures of knee joint cartilage in the celecoxib group and the high-dose Duhuo Jisheng Tang group were significantly improved. Compared with blank group, the expression levels of TNF- α , IL-1 β and HA were increased in model group ($P < 0.01$). The gene and protein expression levels of PERK, Bip and Caspase-9 in cartilage of the model group were increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with model group, the expressions of TNF- α , IL-1 β and HA in serum of celecoxib group and high-dose Duhuo Jisheng Tang group were decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The mRNA and protein expression levels of PERK, Bip and Caspase-9 in cartilage of celecoxib group and high-dose Duhuo Jisheng Tang group were decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Duhuo Jisheng Tang can alleviate the symptoms of knee osteoarthritis model rats, and its mechanism may be related to the regulation of PERK/Bip signaling pathway in rat cartilage.

[**Key words**] Duhuo Jisheng Tang; osteoarthritis; protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK); immunoglobulin-binding protein (Bip); signaling pathway

骨性关节炎(OA)是一种好发于中老年女性的慢性进行性骨关节病,主要以关节软骨退行性病变和关节周围骨质增生为病理特征,临床以关节疼痛、肿胀、僵硬为主要症状^[1-2]。据统计我国有多达1亿以上的骨关节炎患者^[3],已超过人口总数的10%,随着我国人口老龄化的发展,其患病率和发病率还会进一步增加。OA可发生于全身各个关节,其中膝关节OA(KOA)发生率尤高^[4]。目前OA的西医治疗主要有保守治疗和手术治疗,其中保守治疗又可分为口服药物治疗和关节腔药物注射,西药和手术治疗虽能改善患者的症状,但其不良反应也不容忽视,因此亟需寻找新的解决思路^[5]。近年来随着中医药介入OA的治疗,OA临床疗效得以显著提高^[3]。临床实践证明中医药防治OA优势明显、疗效确切、安全可靠^[6]。因此中医药对于OA的防治具有广阔的前景。

KOA主要以关节软骨退行性改变为病理特征,细胞凋亡是软骨退行性改变的中心性特征^[7]。研究证实蛋白激酶R样内质网激酶(PERK)/免疫球蛋白结合蛋白(Bip)信号通路在骨关节炎内质网应激反应引起软骨细胞凋亡过程中起重要的调控作用^[9]。KOA属于中医中的“历节病”“痹证”“骨痹”“骨赘”“骨疣”范畴^[3,7]。独活寄生汤出自《备急千金要方》,具有祛风湿,止痹痛,补肝肾,益气血的功效^[8]。可有效缓解风寒湿邪外侵引起的腰膝冷痛,关节屈伸不利等症状。近年来,大量的临床报道和实验研究均显示独活寄生汤对于OA有一定

疗效^[9-12],但其是否可以调节PERK/Bip信号通路,尚不明确。因此,本研究以KOA大鼠模型为研究对象,通过观察独活寄生汤对KOA大鼠PERK/Bip信号通路中关键调控因子PERK,Bip,半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9(Caspase-9)的mRNA和蛋白的表达,探讨独活寄生汤抑制骨关节炎的作用机制,以期独活寄生汤改善KOA提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 成年健康SPF级雄性SD大鼠85只,体质量200~220g,由湖北省实验动物研究中心提供,合格证号SCXK(鄂)2015-0018。大鼠均饲养于郑州澍青医学高等专科学校动物实验中心的SPF级动物房,室温控制在20~25℃,湿度控制在50%~65%,将动物房设置为12h光暗循环。本实验经郑州澍青医学高等专科学校动物伦理委员会批准,编号HN-DWLL-2015-021。

1.2 材料 独活寄生汤由独活9g,桑寄生、杜仲、牛膝、细辛、秦艽、茯苓、肉桂、防风、川芎、人参片、当归、白芍、熟地黄、甘草片各6g组成,饮片均购自同仁堂,由同仁堂药业有限公司中药鉴定师卢广荣教授鉴定为正品。塞来昔布胶囊(辉瑞制药有限公司,批号C14201006862);肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-1 β (IL-1 β),透明质酸(HA)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(深圳欣博盛生物科技有限公司,批号分别为20170825,20171102,20171025);trizol(美国Thermo Scientific公司,批号172534);Takara逆转录试剂盒,宝生物染料法荧光

定量试剂盒 SYBR Premix Ex *Taq*^[TM] (大连 Takara 公司, 批号分别为 AK2834, AS4421); PERK, Bip, Caspase-9 兔多克隆抗体 (英国 Abcam 公司, 批号分别为 ST233561, UA112054, SC201457); β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (武汉 ABclonal 公司, 批号 AC037); 辣根过氧化物酶标记羊抗兔免疫球蛋白 (Ig) G 抗体 (武汉科瑞生物技术有限公司, 批号 20171245); 苏木素-伊红 (HE) 染色液 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 G1120-10); PCR 引物均由武汉谷歌生物技术有限公司设计合成, 并做引物验证, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

引物	序列	长度/bp
PERK	上游 5'-AACCTGCTGCTCAACACCACCT-3'	501
	下游 5'-ACTCGGGTCGTAA TACTGCTCC-3'	
Bip	上游 5'-GTTCTGCTTGATGTGTGTCC-3'	358
	下游 5'-TTTGTCATTGGTGATGGTG-3'	
Caspase-9	上游 5'-CCCGTGAAGCAAGGATTTC-3'	447
	下游 5'-ACTGTGGGTCTG GGAAGC-3'	
β -actin	上游 5'-CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC-3'	171
	下游 5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3'	

1.3 仪器 AL204 型电子天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 公司]; KD-2950 型低温恒冷切片机 (上海光学仪器厂); KD-H 型烘片机 (北京鑫淼腾达仪器设备有限公司); DU730 型核酸蛋白分析仪 (美国 Beckman Coulter 公司); CFX96 型实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 扩增仪, Universal Hood III 型凝胶图像成像分析系统 (美国 Bio-Rad 公司); SpectraMax iD5 型多功能酶标仪 [美谷分子仪器 (上海) 有限公司]; DYCZ-25D 型电泳仪, DYCZ-40G 型转膜仪 (北京六一仪器厂); FV1200 型激光共聚焦显微镜 (日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 药物制备 制作独活寄生汤水煎液: 先用药材总量的 8 倍水浸泡 30 min, 武火煮开后再用文火煎煮 40 min, 过滤药液, 再加 6 倍量水煎煮 30 min, 过滤药液, 混匀 2 次药液。按照上述煎煮方法, 将独活寄生汤低、中、高剂量浓缩为含生药 1, 2, 4 kg·L⁻¹^[13]。

2.2 分组和造模 适应性饲养 1 周后将大鼠随机分为空白组和造模组, 其中空白组 10 只, 造模组 75 只, 应用寒冷刺激法建立骨性关节炎模型^[8]:

自制塑料圆形筒状大鼠固定器, 将大鼠固定在圆筒后将其双脚放入冷水 (6 ~ 8 ℃) 槽中进行冷刺激, 1.5 h·d⁻¹, 持续造模 30 d。采用平均关节炎指数 (MAI) 的方法进行模型判定, 大鼠膝关节红肿, 证明造模成功^[14]。造模后选取造模成功的大鼠进行第 2 次分组, 即分为模型组, 塞来昔布组和独活寄生汤低、中、高剂量组, 其中模型组, 塞来昔布组和独活寄生汤低、中剂量组各 10 只, 独活寄生汤高剂量组 12 只。

2.3 给药 根据参考文献 [15] 确定塞来昔布的给药剂量, 同时根据“人和动物体表面积折算的等效剂量比率表”换算得到独活寄生汤中剂量组的给药剂量, 即塞来昔布组按 0.021 g·kg⁻¹ 剂量灌胃, 独活寄生汤低、中、高剂量组分别按 8.37, 16.72, 33.48 g·kg⁻¹ 的剂量灌胃, 模型组和空白组按等体积的生理盐水灌胃, 1 次/d, 持续给药 30 d。

2.4 大鼠膝关节肿胀度测量 分别于实验前和实验后 (选取关节红肿的大鼠) 用游标卡尺测量各组大鼠双侧膝关节肿胀程度。

2.5 HE 染色观察大鼠膝关节软骨病变情况 6% 水合氯醛经腹腔注射麻醉 (6 mL·kg⁻¹), 经腹主动脉取血, 取血后, 取出左侧膝关节软骨, 生理盐水冲洗血水, 置 4% 多聚甲醛固定 24 h, HE 染色观察各组大鼠关节软骨病理形态变化。

2.6 ELISA 检测血清学指标 取血后, 以 3 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 取上清, 用 ELISA 检测各组大鼠血清中 TNF- α , IL-1 β 和 HA 的表达水平, TNF- α , IL-1 β 分别上样 50 μ L, HA 上样 100 μ L, 使用酶标仪进行单波长检测, 检测波长分别为 450, 570, 630 nm, 其他实验步骤严格按照试剂盒说明书进行。

2.7 Real-time PCR 检测软骨细胞 PERK, Bip, Caspase-9 mRNA 的表达 经腹主动脉取血后, 取右侧膝关节, 分离肌肉、韧带等, 取出软骨。用 trizol 法提取软骨总 mRNA, 提取方法参照 trizol 说明书; 总 mRNA 提取后用核酸蛋白仪检测纯度, 检测纯度为 1.8 ~ 2.0 即为合格; 按照 Takara 逆转录试剂盒说明书逆转录合成 cDNA; 按照宝生物染料法荧光定量 SYBR Premix Ex *Taq*^[TM] 试剂盒说明书添加各种试剂, 置于 PCR 仪进行 mRNA 扩增。反应条件: 95 ℃ 10 min, 95 ℃ 10 s; 60 ℃ 30 s, 40 个循环; 95 ℃ 15 s, 75 ℃ 15 s, 75 ℃ 30 s。用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 表示 mRNA 相对表达水平。

2.8 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测软骨细胞 PERK, Bip 和 Caspase-9 的表达 取软骨组织 50 mg, 加蛋白裂解液, 冰上研磨, 以 4 ℃

12 000 r·min⁻¹离心 30 min,取上清,用 BCA 蛋白试剂盒分别测定各组蛋白量;依次加样、电泳、转膜和室温封闭;按抗体说明书加入 PERK 一抗(1:3 000),Bip 一抗(1:2 000),Caspase-9 一抗(1:2 000)和 β -actin 一抗(1:5 000),置 4 ℃冰箱过夜,洗膜,再加入二抗(1:2 000),ECL 显色;置于凝胶图像成像分析系统,曝光各组蛋白条带,采用 Image Lab 软件进行结果分析。

2.9 统计学方法 实验数据采用 SPSS 19.0 统计软件处理,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差齐性时,组间比较采用单因素方差分析,多组间比较采用 LSD 法,

$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠膝关节直径的影响 造模及给药期间,空白组大鼠左右膝关节无明显改变,造模组大鼠左右膝关节均出现不同程度的红肿,但无紫红色斑和结节等变化。与模型组比较,塞来昔布组和独活寄生汤高剂量组大鼠双侧膝关节红肿均有不同程度改善。造模后,与正常组比较,各造模组大鼠膝关节直径显著增加($P < 0.01$)。给药后,与模型组比较,塞来昔布组和独活寄生汤高剂量组大鼠膝关节直径均显著减小($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 独活寄生汤对大鼠膝关节直径的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Duhuo Jisheng Tang on knee joint diameter in rats($\bar{x} \pm s$)

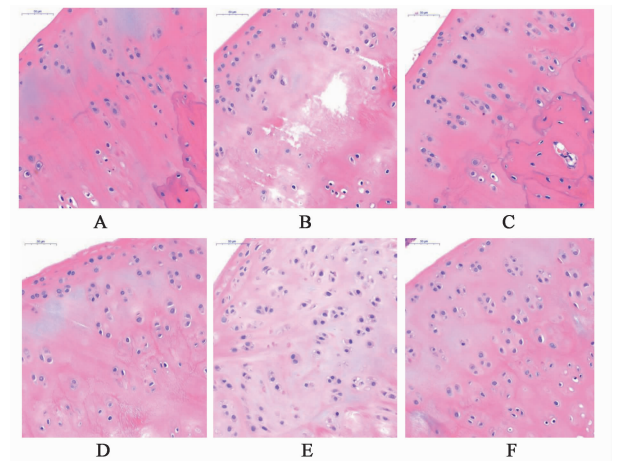
组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	给药前	给药后	变化量
空白	—	10	11.243 ± 0.080	11.243 ± 0.080	0
模型	—	10	11.531 ± 0.175 ¹⁾	11.593 ± 2.240	0.283 ± 0.070 ¹⁾
塞来昔布	0.021	10	11.373 ± 0.146 ²⁾	11.422 ± 0.158	0.089 ± 0.037 ²⁾
独活寄生汤	8.37	10	11.341 ± 0.182 ²⁾	11.381 ± 0.196	0.252 ± 0.029
	16.72	10	11.338 ± 0.174 ²⁾	11.374 ± 0.146	0.236 ± 0.049
	33.48	12	11.361 ± 0.164 ²⁾	11.426 ± 0.194	0.185 ± 0.068 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对大鼠膝关节软骨病理形态的影响 空白组大鼠关节软骨表面光滑、平整,软骨结构完整,软骨细胞排列均匀。模型组大鼠关节软骨表面粗糙、不平整,软骨表层变薄,局部裂隙缺损,软骨细胞排列紊乱。塞来昔布组和独活寄生汤组高剂量组大鼠膝关节软骨局部裂隙缺损有明显好转。独活寄生汤低、中剂量组对大鼠膝关节软骨病理形态改善不如高剂量组明显。见图 1。

3.3 对大鼠血清中 TNF- α , IL-1 β , HA 表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠血清 TNF- α , IL-1 β 和 HA 含量显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,塞来昔布组和独活寄生汤高剂量组大鼠血清中 TNF- α , IL-1 β 和 HA 含量明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 3。

3.4 对大鼠软骨中 PERK, Bip, Caspase-9 mRNA 表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠软骨中 PERK, Bip, Caspase-9 mRNA 表达水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,塞来昔布组和独活寄生汤高剂量组大鼠软骨中 PERK, Bip, Caspase-9 mRNA 表达水平明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 4。



A. 模型组;B. 空白组;C. 塞来昔布组;D. 独活寄生汤组低剂量组;E. 独活寄生汤组中剂量组;F. 独活寄生汤组高剂量组(图 2 同)

图 1 独活寄生汤对大鼠膝关节软骨组织病理学的影响(HE, ×400)
Fig.1 Effect of Duhuo Jisheng Tang on pathological changes of knee joint of rats (HE, ×400)

3.5 对大鼠软骨中 PERK, Bip, Caspase-9 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠软骨中 PERK, Bip, Caspase-9 蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,塞来昔布组和独活寄生汤高剂量组

表 3 独活寄生汤对大鼠血清中 TNF-α,IL-1β,HA 水平表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Duhuo Jisheng Tang on expressions of TNF-α, IL-1β and HA in serum of rats($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	TNF-α/ng·L ⁻¹	IL-1β/ng·L ⁻¹	HA/μg·L ⁻¹
空白	—	10	88.40 ± 4.47	43.99 ± 15.37	117.39 ± 22.84
模型	—	10	152.09 ± 27.33 ¹⁾	91.76 ± 13.49 ¹⁾	227.51 ± 27.17 ¹⁾
塞来昔布	0.021	10	107.44 ± 22.74 ³⁾	73.56 ± 16.16 ²⁾	178.15 ± 23.26 ³⁾
独活寄生汤	8.37	10	132.41 ± 19.56	82.12 ± 14.52	198.24 ± 19.21
	16.72	10	146.18 ± 12.58	83.14 ± 18.65	204.28 ± 18.47
	33.48	12	114.43 ± 24.19 ³⁾	71.98 ± 16.76 ³⁾	191.55 ± 16.96 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 4,5 同)。

表 4 独活寄生汤对大鼠软骨中 PERK,Bip,Caspase-9 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of Duhuo Jisheng Tang on PERK,Bip, Caspase-9 mRNA expressions in cartilage of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	PERK	Bip	Caspase-9
空白	—	10	0.99 ± 0.21	0.66 ± 0.25	0.75 ± 0.17
模型	—	10	1.73 ± 0.23 ¹⁾	1.29 ± 0.16 ¹⁾	1.18 ± 0.26 ¹⁾
塞来昔布	0.021	10	1.33 ± 0.36 ³⁾	0.88 ± 0.15 ³⁾	0.81 ± 0.21 ³⁾
独活寄生汤	8.37	10	1.60 ± 0.21	1.05 ± 0.21	1.08 ± 0.26
	16.72	10	1.64 ± 0.29	1.12 ± 0.15	1.14 ± 0.18
	33.48	12	1.40 ± 0.27 ²⁾	0.93 ± 0.19 ³⁾	0.88 ± 0.21 ³⁾

大鼠软骨中 PERK,Bip,Caspase-9 蛋白表达水平明显降低($P < 0.01$, $P < 0.05$)。见图 2,表 5。

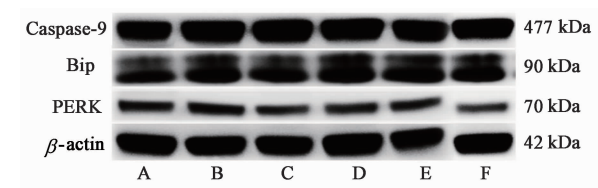


图 2 大鼠软骨中 Caspase-9,Bip 和 PERK 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of Caspase-9, Bip and PERK in cartilage of rats

4 讨论

OA 属于中医中的“痹证”“骨痹”“历节病”等范畴^[6],本病以肝肾亏损为本,风、寒、湿、毒痹阻关节为标^[16]。肝肾亏虚,正气不能抗御风、寒、湿、毒等邪气,则发痹症;同时,风、寒、湿等邪气反复侵袭机体又会损伤正气致肝肾亏损,痹症则经久不愈。因此该病应以补肝肾、益气血为主,辅以祛风湿、止痹痛^[17]。独活寄生汤出自《备急千金要方》,具有补肝肾、益气血、祛风湿、止痹痛的功效。该方中桑寄生、杜仲、牛膝补益肝肾而强壮筋骨,当归、川芎、

表 5 独活寄生汤对大鼠软骨中 PERK,Bip,Caspase-9 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effect of Duhuo Jisheng Tang on protein expressions of PERK, Bip and Caspase-9 proteins in cartilage of rats($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	PERK/ β-actin	Bip/ β-actin	Caspase-9/ β-actin
空白	—	10	0.57 ± 0.19	0.86 ± 0.16	0.47 ± 0.21
模型	—	10	1.25 ± 0.16 ¹⁾	1.47 ± 0.21 ¹⁾	0.90 ± 0.16 ¹⁾
塞来昔布	0.021	10	0.89 ± 0.18 ³⁾	1.12 ± 0.22 ³⁾	0.64 ± 0.24 ³⁾
独活寄生汤	8.37	10	1.12 ± 0.21	1.33 ± 0.19	0.75 ± 0.21
	16.72	10	1.08 ± 0.18	1.29 ± 0.26	0.81 ± 0.15
	33.48	12	0.79 ± 0.22 ²⁾	1.24 ± 0.15 ²⁾	0.66 ± 0.17 ²⁾

熟地黄、白芍益气养血,独活、细辛、防风、秦艽、桂枝、细辛、防风、秦艽祛风湿止痹痛,组方原则与 OA 的中医病机相契合^[18]。同时,有学者对治疗 OA 的文献进行分析和总结,发现治疗骨性关节炎最常用的 10 味药中有 6 味药与独活寄生汤中药物一致,分别为熟地黄、当归、白芍、杜仲、牛膝、甘草片,这说明独活寄生汤对 OA 患者具有较好的临床疗效^[9,19]。

OA 患者主要表现为关节肿胀、疼痛、关节活动不灵活、僵硬等,本实验发现,通过冷刺激法刺激大鼠膝关节,大鼠膝关节有明显的肿胀和活动受限,说明寒冷刺激法可以用作构建 OA 模型。给予模型大鼠高剂量的独活寄生汤之后,大鼠膝关节肿胀程度明显减轻,这表明独活寄生汤确实能改善 KOA 的症状,这一结果也再次印证了临床实践结果。冷刺激法是建立骨性关节炎的经典模型,该刺激法有造模简单、易于操作、价格低廉等优势,但也存在许多弊端,如寒冷刺激时间短可能造成模型不成功,而采用长时间寒冷刺激也会存在耗时、耗力等弊端^[20-21]。因此是否采用该种模型,还需要综合考虑人力和材料等多种因素。

OA 是以关节软骨退行性病变为主要病理

特征^[22]。研究发现软骨细胞过度凋亡是软骨退变的关键因素之一^[23]。在正常情况下,软骨细胞存有凋亡的现象,应激状态下软骨细胞的过度凋亡会导致软骨基质的变化,从而导致软骨退变。近年来,研究发现内质网应激性凋亡在 OA 的发病过程中发挥重要的调控作用^[24-26]。冷刺激、机械损伤等应激刺激会导致炎症因子过度分泌,炎症因子浸润在软骨细胞周围会触发内质网应激性凋亡,导致关节软骨退变,最终形成骨性关节炎^[27-28]。PEAK/Bip 是内质网应激感受蛋白,也是启动内质网应激性凋亡的重要信号通路^[29]。TNF- α , IL-1 β 等炎症因子的异常升高会活化 PEAK, PEAK 活化后会促使 Bip 的激活,从而导致 PEAK/Bip 信号通路的激活, PEAK/Bip 的激活会引起 Caspase-9 激活,活化的 Caspase-9 启动细胞凋亡程序^[30]。实验发现,冷刺激后模型组大鼠血清中 TNF- α , IL-1 β , HA 等炎症因子表达升高,模型组中 PEAK, Bip, Caspase-9 的 mRNA 和蛋白表达也升高,这说明冷刺激可诱使膝关节的炎症反应,从而激活 PEAK/Bip 信号通路,进而导致关节软骨退变,最终形成骨性关节炎。给予模型大鼠高剂量的独活寄生汤后,大鼠血清中 TNF- α , IL-1 β , HA 等炎症因子表达下降,软骨中 PEAK, Bip, Caspase-9 的 mRNA 和蛋白表达也相应下降,这说明独活寄生汤可通过抑制关节炎症反应,进而下调 PEAK/Bip 信号通路,减少软骨细胞凋亡,最终达到治疗 OA 的效果。综合分析,独活寄生汤能缓解 KOA 模型大鼠的症状,其机制可能与其抑制关节炎症反应和调节大鼠软骨中 PERK 和 Bip 的表达有关。

中医药对一些疑难杂症确有疗效,但许多方药还缺乏现代科学支撑,本实验的开展也为中医经典方药的开发和应用提供了一定的借鉴意义。

[参考文献]

[1] 王文燕,庞金辉,石继祥,等. 骨关节炎炎症的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘 2018,18(15):34-35.

[2] 薛浩,刘岩,冉博,等. 膝关节骨性关节炎治疗现状[J]. 医学综述,2018,24(2):321-325,330.

[3] 钟清源,赵炳瑞,王清玉. 膝关节炎中医药治疗现状[J]. 云南中医中药杂志,2018,39(4):85-87.

[3] 俞颖豪,赵继军,艾山尔吐,等. 阿合奇县柯尔克孜族膝关节骨性关节炎流行病学调查[J]. 实用骨科杂志,2018,24(3):226-229.

[4] 陈峰,石晓兵. 膝骨性关节炎临床分期的现状和研究进展[J]. 广西医科大学学报,2018,35(3):412-415.

[5] 陈加荣,李凭跃. 膝关节骨性关节炎的阶梯治疗原则

[J]. 中国骨科临床与基础研究杂志,2018,10(1):53-57.

[6] 田惠萍,刘莹,王海洋,等. 膝关节炎的中医药治疗临床研究进展[J]. 风湿病与关节炎,2018,7(1):67-71.

[7] WANG F M, Galson D L, Roodman G D, et al. Resveratrol triggers the pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress response and represses pro-survival XBP1 signaling in human multiple myeloma cells[J]. Exp Hematol,2011,39(10):999-1006.

[8] 陈俊,吴广文,许惠凤,等. 独活寄生汤干预膝骨关节炎模型大鼠软骨 PERK/Bip 信号通路的表达[J]. 中国组织工程研究,2018,22(28):4493-4500.

[9] 郑自然,唐仕欢. 骨质疏松症与骨性关节炎中医治疗方剂用药规律比较分析[J]. 中国中药杂志,2014,39(16):3172-3175.

[10] 马拥军. 独活寄生汤治疗膝关节骨性关节炎 32 例临床观察[J]. 中医学报,2018,33(1):153-157.

[11] 傅品来,丘青中,李剑. 独活寄生汤联合塞来昔布胶囊防治早期膝骨性关节炎临床研究[J]. 世界中西医结合杂志,2018,13(1):66-69.

[12] 夏璇,黄清春,何羿婷. 独活寄生汤治疗膝骨关节炎临床疗效 Meta 分析[J]. 新中医,2018,50(5):208-211.

[13] 谢鸣. 方剂学[M]. 北京:人民卫生出版社,2010:271.

[14] 李翠葳. 从 Wnt/ β -catenin 通路探讨益气养血方干预膝骨关节炎大鼠软骨退变的机制研究[D]. 昆明:云南中医学院,2017.

[15] 叶大林,谢平金,魏合伟,等. 补肾活血方调控膝骨性关节炎大鼠软骨下骨的作用机制研究[J]. 中国骨质疏松杂志,2018,24(12):1606-1611.

[16] 冯小波,朱思刚. 独活寄生汤对髌骨软化症髌骨软骨及膝关节液中 IL-1, MMP-1, GAG 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(17):156-160.

[17] 程志安,胡广兵,刘幸明,等. 独活寄生汤治疗老年性腰膝疼痛临证体悟[J]. 新中医,2018,50(2):175-177.

[18] 高尚轸,张小宁. 独活寄生汤组方治疗慢性腰痛思路探析[J]. 亚太传统医药,2014,10(12):53-54.

[19] 麦海燕,黄小舟,徐能. 独活寄生汤缓解膝关节骨性关节炎疼痛的疗效分析[J]. 中国当代医药,2013,20(19):97-98.

[20] 张君涛,吴超超,张栋林,等. 膝关节骨性关节炎动物模型研究进展[J]. 重庆医学,2018,47(15):2061-2063,2067.

[21] 宋寒冰,赵峰,葛圆圆,等. 膝关节骨性关节炎动物模型建立的研究现状[J]. 中国医药导报,2017,14(30):46-49.

[22] 张冰,王洋,王建民. 膝关节骨性关节炎的诊断与治疗进展[J]. 甘肃医药,2018,37(3):204-208.

[23] WANG H J,YING A O,CHEN L X,et al. Second-look arthroscopic evaluation of the articular cartilage after primary single-bundle and double-bundle anterior cruciate ligament reconstructions [J]. Chinese Med J-Peking,2011,124(21):3551.

[24] 贾峻,荣兵,李建,等. 独活寄生汤含药血清对膝骨性关节炎大鼠软骨细胞代谢,BMP-7 及 SIRT1 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23 (17):159-165.

[25] Herrman M,Anders S,Straub R H,et al. TNF inhibits catecholamine production from induced sympathetic neuron-like cells in rheumatoid arthritis and osteoarthritis *in vitro* [J]. Sci Rep, 2018, 8 (1):9645-9657.

[26] Vinatier C,Domínguez E,Guicheux J,et al. Role of the inflammation-autophagy-senescence integrative network in osteoarthritis [J]. Front Physiol, 2018, 9 (41):706-721.

[27] Bokhari R A, Naca T, Lau S F, et al. Java tea (orthosiphon stamineus) protected against osteoarthritis by mitigating inflammation and cartilage degradation: a preclinical study [J]. Inflammopharmacology, 2018, 26 (2):1-11.

[28] WEI Y, JIA J, JIN X, et al. Resveratrol ameliorates inflammatory damage and protects against osteoarthritis in a rat model of osteoarthritis[J]. Mol Med Rep,2018,17(1):1493-1498.

[29] Recnik G,Kralj-Igli ċ V, Igli ċ A, et al. Higher peak contact hip stress predetermines the side of hip involved in idiopathic osteoarthritis [J]. Clin Biomech,2007,22(10):1119-1124.

[30] 叶锦霞,吴广文,赖舜森,等. 透骨消痛胶囊对膝骨关节炎大鼠内质网应激影响的研究[J]. 风湿病与关节炎,2015,4(11):5-11.

[责任编辑 孙丛丛]