

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.03.017

实验研究

骨灵膏及其拆方对骨关节炎模型大鼠炎性细胞因子与聚蛋白多糖酶的影响

陈文超, 周然*, 王永辉, 李艳彦, 柴智, 高丽

(山西中医学院, 山西省太原市晋祠路一段 89 号, 030024)

摘要 目的 探讨骨灵膏及其拆方制剂抗骨关节炎软骨损伤的可能作用机制。方法 60 只 SD 大鼠随机分为骨灵膏组、骨膏组、灵膏组、塞来昔布组、模型组及正常组, 每组 10 只。除正常组外其余各组采用寒冷刺激结合石膏固定的方法建立骨关节炎模型, 造模成功后骨灵膏组、骨膏组及灵膏组分别给予骨灵膏、骨膏及灵膏生药量 33.31 g/(kg·d) 灌胃给药, 塞来昔布组给予塞来昔布 20.83 mg/(kg·d) 灌胃, 模型组和正常组给予等量生理盐水灌胃, 8 周后检测膝关节软骨组织聚蛋白多糖酶 4 (ADAMTs-4)、聚蛋白多糖酶 5 (ADAMTs-5) 蛋白表达, 检测膝关节滑膜和血清白细胞介素 1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、前列腺素 E₂ (PGE₂)、环氧合酶 2 (COX-2)、 γ 干扰素 (IFN- γ) 的含量。结果 与正常组比较, 模型组大鼠血清与滑膜 IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂、COX-2、IFN- γ 的含量均显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 骨灵膏组血清与滑膜 IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂、COX-2、IFN- γ 含量明显降低 ($P < 0.01$)。与骨灵膏组比较, 骨膏组血清 IL-1 β 、TNF- α 、COX-2、IFN- γ 含量和滑膜 IL-1 β 、COX-2、PGE₂、TNF- α 、IFN- γ 含量升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 灵膏组血清和滑膜 IL-1 β 、TNF- α 、COX-2、PGE₂、IFN- γ 含量升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 塞来昔布组血清 IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂、IFN- γ 含量和滑膜 IL-1 β 、PGE₂ 含量亦升高 ($P < 0.01$)。各组大鼠膝关节软骨组织 ADAMTs-4、ADAMTs-5 均有表达, 其中模型组表达最显著, 骨灵膏组 ADAMTs-4、ADAMTs-5 蛋白表达最低。结论 骨灵膏可能通过降低血清及滑膜中炎性细胞因子, 进而阻止局部关节软骨聚蛋白多糖酶合成, 从而减轻了骨关节炎软骨损伤, 并且作用明显优于其拆方制剂及塞来昔布。

关键词 骨关节炎; 骨灵膏; 炎性细胞因子; 聚蛋白多糖酶

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是由炎性损伤、生物力学改变等导致的一组关节软骨进行性退变的慢性关节病。研究表明, 白细胞介素 1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、前列腺素 E₂ (PGE₂)、环氧合酶 2 (COX-2)、 γ 干扰素 (IFN- γ) 等炎性细胞因子在 OA 的发病中起着重要作用, 而炎症损伤最终导致关节软骨细胞外基质降解, 主要以聚蛋白多糖代谢降解为主, 而聚蛋白多糖酶 (ADAMTs) 为代谢标志物^[1]。关节组织结构的损伤往往伴随着功能下降, 故而疗程较长、病情易反复。中药膏剂型适合长期治疗, 且具有副作用小等特点。前期研究表明, 骨灵膏能显著降低患者膝关节疼痛评分、减轻关节肿胀指数、改善病变关节活

动度, 是治疗 OA 的一种疗效理想的制剂^[2]。为了进一步探讨骨灵膏对 OA 的可能作用机制, 我们将其拆方成具有单独补益脏腑的“骨膏”和单独活血化瘀的“灵膏”, 并从炎症细胞因子和 ADAMTs 方面着手探讨其可能分子生物学机理, 现报告如下。

1 材料

1.1 动物

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

1.2 药物

骨灵膏组成: 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

* 通讯作者: zhour58@sohu.com, 13903413552

30 g, 巴戟天 15 g, 黄芪 15 g, 党参 10 g 等。骨膏组成: 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 等。灵膏组成: 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 等。中药饮片由北京同仁堂提供。骨灵膏、骨膏及灵膏均采用中药膏滋制作方法制备, 由山西中医学院附属医院药剂室提供。塞来昔布 (Pfizer Pharmaceuticals LLC, 批号: BK11CCEE171)。

1.3 主要试剂及仪器

水合氯醛 (青岛宇龙海藻有限公司, 国药准字 H37022673), IL-1 β (批号: C507369)、TNF- α (批号: D221347)、IFN- γ (批号: C600061)、PGE₂ (批号: E90538Ge)、COX-2 (批号: BAO738) 细胞因子 ELISA 免疫试剂盒 (上海生工生物工程技术有限公司), 兔抗鼠 ADAMTs-4、ADAMTs-5 (批号: NB110-82383、NB110-82386) 多克隆抗体 (美国 SantaCruz 公司), β -Actin (批号: BA2305)、SDs-PAGE 凝胶配置试剂盒 (批号: WB007)、DAB 显色试剂盒 (批号: AR1021) 均购自武汉博士德生物工程有限公司。匀浆仪 (温州维科生物实验设备有限公司, 型号: ZW-800D-C), 恒温水浴锅 (上海后前电子科技有限公司, 型号: HH-2), Western blotting 垂直电泳槽 (美国 Labnet 公司, 型号: Enduro™), 电转仪 (广州华粤行仪器有限公司, 型号: NEPA-21), 多功能生化酶标仪 (美国 Thermo 公司, 型号: MK-3), 低温离心机 (湖南凯达科学仪器有限公司, 型号: GL21M), 恒温孵育箱 (上海五相仪器仪表有限公司, 型号: WF-45)。

1.4 动物分组及模型建立

将 60 只 SD 大鼠按体重大小编号, 从随机数字表中的任一行任一列开始抄取 60 个随机数字, 对随机数字由小到大排序, 从排序后的数字中规定前 10 个为第一组, 由此类推, 分成骨灵膏组、骨膏组、灵膏组、塞来昔布组、模型组、正常组, 每组 10 只。除正常组外, 其余各组采用寒冷刺激^[8]结合石膏固定^[9]的方法制作骨关节炎大鼠模型。将大鼠置于水温为 (6 $\pm$ 0.5) $^{\circ}$ C 左右的水中, 因大鼠具有恐水反应故其将处于上下肢直立状态, 每天保持大鼠在水中固定位置双下肢直立 4 h (膝关节曲度 $\geq 75^{\circ}$), 然后给予石膏膝至下踝关节部位全固定制动 4 h, 如此重复 6 周。

1.5 给药方法

骨灵膏组、骨膏组及灵膏组分别给予骨灵膏、

骨膏及灵膏生药量 33.31 g/(kg $\cdot$ d) 灌胃给药, 塞来昔布组给予塞来昔布 20.83 mg/(kg $\cdot$ d) 灌胃, 模型组和正常组给予等量生理盐水灌胃。各组每天灌胃 1 次, 共 8 周。

1.6 观察指标及方法

大鼠最后一次给药 4 h 后用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠, 通过腹主动脉采血方式收集血液, 离心, 取血清低温保存备用; 接着取膝关节, 分离肌肉、韧带及骨关节周围组织, 取出软骨及滑膜, 用 PBS 清洗软骨表面组织及血迹, 将软骨及滑膜迅速置于液氮中冷储备用。

1.6.1 ELISA 法检测血清、滑膜炎性细胞因子水平 将收集的血清再次适度离心分类, 再将滑膜加入一定量的 PBS (pH7.4), 用匀浆器将标本匀浆充分, 离心 20 min 左右 (2000~3000 r/min), 收集上清, 分装冷冻备用。严格按照说明书方法检测血清和滑膜中 IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 、PGE₂、COX-2 水平。

1.6.2 Western Blotting 检测关节软骨 ADAMTs-4、ADAMTs-5 蛋白表达 取低温备用的软骨, 称重后与蛋白酶抑制剂混合物Ⅲ及哺乳动物组织蛋白抽提试剂按一定比例混合后剪碎, 随后进行匀浆及离心, 取离心后上清 300 μ l 加入等量的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDs-PAGE) 蛋白上样缓冲液加热变性处理, 行 SDs-PAGE 电泳分离, 分离后将蛋白样本行干法电转移至硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上, 用封闭蛋白干粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h, 加入鼠抗 ADAMTs-4 或 ADAMTs-5 一抗、鼠抗 β -Actin (用抗体稀释液 1:1000 稀释) 于封闭后的 NC 膜上, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 缓冲液洗涤 4 次 $\times$ 5 min, 加入经聚合过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 内参抗体 (用抗体稀释液 1:1000 稀释), 37 $^{\circ}$ C 孵育 90 min, 洗涤缓冲液洗涤 4 次 $\times$ 5 min, 加入 DAB 显色剂进行显色, 观察摄像。

1.7 统计学方法

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

2 结果

2.1 各组大鼠血清及滑膜 IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂、COX-2、IFN- γ 含量比较

表1、表2示, 与正常组比较, 模型组大鼠血

表 1 各组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂、COX-2、IFN- γ 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IL-1 β (ng/L)	TNF- α (ng/L)	PGE ₂ (ng/L)	COX-2 (U/L)	IFN- γ (ng/L)
正常组	10	5.90 $\pm$ 2.23	5.20 $\pm$ 2.45	30.47 $\pm$ 5.19	11.36 $\pm$ 3.90	110.97 $\pm$ 16.77
模型组	10	19.70 $\pm$ 3.09*	72.60 $\pm$ 7.65*	99.43 $\pm$ 11.06*	110.19 $\pm$ 14.34*	343.65 $\pm$ 26.12*
骨灵膏组	10	4.50 $\pm$ 2.42 Δ	21.80 $\pm$ 5.98 Δ	35.72 $\pm$ 7.07 Δ	24.45 $\pm$ 5.39 Δ	110.96 $\pm$ 19.12 Δ
骨膏组	10	20.90 $\pm$ 2.69 $\Delta\Delta$	79.08 $\pm$ 11.40 $\Delta\Delta$	31.70 $\pm$ 7.38 Δ	64.27 $\pm$ 8.73 $\Delta\Delta\Delta$	209.64 $\pm$ 15.11 $\Delta\Delta\Delta$
灵膏组	10	8.40 $\pm$ 2.55 $\Delta\Delta$	43.84 $\pm$ 2.23 $\Delta\Delta\Delta$	70.22 $\pm$ 8.05 $\Delta\Delta\Delta$	63.53 $\pm$ 8.88 $\Delta\Delta\Delta$	215.18 $\pm$ 8.28 $\Delta\Delta\Delta$
塞来昔布组	10	14.30 $\pm$ 4.52 $\Delta\Delta\Delta$	32.93 $\pm$ 6.68 $\Delta\Delta\Delta$	55.37 $\pm$ 8.43 $\Delta\Delta\Delta$	24.93 $\pm$ 6.74 Δ	344.45 $\pm$ 24.74 $\Delta\Delta$

注: IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; PGE₂, 前列腺素 E₂; COX-2, 环氧合酶 2; IFN- γ , γ 干扰素; 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$; 与骨灵膏组比较, $\Delta\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$

表 2 各组大鼠滑膜 IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂、COX-2、IFN- γ 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IL-1 β (ng/L)	TNF- α (ng/L)	PGE ₂ (ng/L)	COX-2 (U/L)	IFN- γ (ng/L)
正常组	10	3.20 $\pm$ 1.51	17.66 $\pm$ 4.37	49.26 $\pm$ 12.56	10.65 $\pm$ 3.66	144.92 $\pm$ 49.55
模型组	10	16.70 $\pm$ 4.57*	139.68 $\pm$ 22.12*	212.49 $\pm$ 25.26*	72.61 $\pm$ 14.60*	425.81 $\pm$ 69.19*
骨灵膏组	10	4.60 $\pm$ 2.50 $\Delta\Delta$	33.45 $\pm$ 11.08 $\Delta\Delta$	59.23 $\pm$ 12.17 $\Delta\Delta$	26.61 $\pm$ 11.36 $\Delta\Delta$	163.81 $\pm$ 49.72 $\Delta\Delta$
骨膏组	10	9.20 $\pm$ 3.01 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	52.89 $\pm$ 12.29 $\Delta\Delta\Delta$	111.69 $\pm$ 18.58 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	52.77 $\pm$ 16.18 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	225.68 $\pm$ 45.55 Δ
灵膏组	10	17.20 $\pm$ 4.73 $\Delta\Delta$	129.00 $\pm$ 28.02 $\Delta\Delta$	209.67 $\pm$ 27.48 $\Delta\Delta$	85.82 $\pm$ 22.38 $\Delta\Delta$	344.07 $\pm$ 74.29 $\Delta\Delta\Delta$
塞来昔布组	10	9.70 $\pm$ 3.68 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	41.59 $\pm$ 19.17 $\Delta\Delta$	170.33 $\pm$ 26.47 $\Delta\Delta$	13.88 $\pm$ 5.67 $\Delta\Delta$	137.69 $\pm$ 44.44 $\Delta\Delta$

注: IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; PGE₂, 前列腺素 E₂; COX-2, 环氧合酶 2; IFN- γ , γ 干扰素; 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与骨灵膏组比较, $\Delta\Delta\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta\Delta\Delta P < 0.01$

清与滑膜 IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂、COX-2、IFN- γ 的含量均显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 骨灵膏组血清与滑膜 IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂、COX-2、IFN- γ 含量均显著降低 ($P < 0.01$); 骨膏组能降低血清 PGE₂、COX-2、IFN- γ 的含量和滑膜 IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂、COX-2 的含量 ($P < 0.01$); 灵膏组能降低血清 IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂、COX-2、IFN- γ 的含量和滑膜 IFN- γ 的含量 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 塞来昔布组能减低血清 IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂、COX-2 的含量和滑膜 IL-1 β 、TNF- α 、COX-2、IFN- γ 的含量 ($P < 0.01$)。与骨灵膏组比较, 骨膏组血清 IL-1 β 、TNF- α 、COX-2、IFN- γ 含量和滑膜 IL-1 β 、COX-2、PGE₂、TNF- α 、IFN- γ 含量升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 灵膏组血清和滑膜 IL-1 β 、TNF- α 、COX-2、PGE₂、IFN- γ 含量升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 塞来昔布组血清 IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂、IFN- γ 含量和滑膜 IL-1 β 、PGE₂ 含量亦升高 ($P < 0.01$)。

2.2 各组大鼠关节软骨 ADAMTs-4、ADAMTs-5 蛋白表达比较

图 1 示, 各组大鼠关节软骨 ADAMTs-4、ADAMTs-5 蛋白均有表达, 其中模型组表达最显著; 骨灵膏组 ADAMTs-4、ADAMTs-5 蛋白表达最低, 骨灵膏组 ADAMTs-4、ADAMTs-5 蛋白表达较骨膏组、灵膏组及塞来昔布组显著降低。

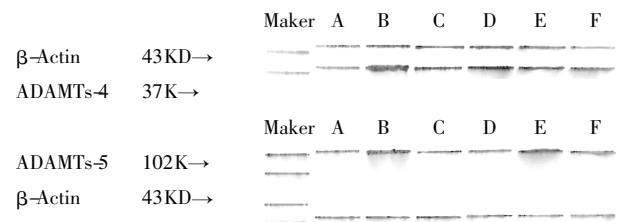


图 1 各组大鼠 ADAMTs-4、ADAMTs-5 蛋白表达电泳图
注: ADAMTs-4, 聚蛋白多糖酶 4; ADAMTs-5, 聚蛋白多糖酶 5; β -Actin, 内参抗体; Maker, 蛋白质分子量标准; A, 正常组; B, 模型组; C, 骨灵膏组; D, 骨膏组; E, 灵膏组; F, 塞来昔布组

3 结果

OA 是一种常见的慢性关节病, 软骨细胞外基质的降解是软骨损伤的主要因素之一, 细胞外基质由蛋白聚糖形式存在的蛋白多糖和 II 型胶原组成, 蛋白聚糖酶的活性增高是导致蛋白多糖酶解和软骨退变的主要诱因, 主要有 ADAMTs-4、ADAMTs-5 两种^[9]。ADAMTs-4 在膝骨关节炎早期和中晚期关节液中均有高表达, 检测关节液中 ADAMTs-4 的表达有助于病情早期诊断^[9]。

OA 并非典型的关节炎症性疾病, 但炎症反应却贯穿于骨关节炎的病程中, 相关炎性细胞因子的异常生成已经成为骨关节炎炎症反应的主要诱因, 其中 IL-1 β 是典型的致炎细胞因子, 关节腔内注射 IL-1 β 可导致蛋白多糖的降解和软骨细胞的破坏,

可抑制软骨细胞合成具有透明软骨特性的蛋白聚糖和 II 型胶原,引起软骨损伤和生物力学改变^[9]。和 IL-1 β 一样 TNF- α 被认为是在关节炎发病机制中起关键作用的促炎症性细胞因子。黄金刚等^[8]通过 IL-1 β 和 TNF- α 对软骨细胞基质降解的影响及相关机制研究表明, IL-1 β 诱导软骨细胞产生大量的 MMP-13、ADAMTs-4 和 ADAMTs-5 而直接降解软骨细胞外基质, TNF- α 可能不直接引起软骨细胞外基质的降解。在骨关节炎病理进程中 PGE₂ 是最重要的分解代谢因子之一^[10], 除参与炎症反应, PGE₂ 通过刺激基质金属蛋白酶的生成诱导软骨细胞凋亡, 抑制蛋白聚糖聚合物的生化合成和促进血管形成等加速软骨的破坏^[10-11]。金荣忠等^[12]研究表明, COX-2 基因及其表达蛋白在膝关节骨性关节炎软骨组织损害过程中起到重要作用。IFN- γ 由活化的 T 细胞和 NK 细胞产生, 具有抗病毒复制, 抑制肿瘤细胞增殖等作用, 也是巨噬细胞活化因子, 可以促进巨噬细胞吞噬功能和炎症反应, 在 OA 的发病机制中起着重要作用^[13]。

OA 属中医学“骨痹”范畴。骨灵膏是按照益气温阳、补血滋阴、活血化瘀、祛风湿的中医理论配伍组方而成, 骨膏和灵膏分别为骨灵膏的拆方制剂, 骨膏以益气温阳、补血滋阴为主。灵膏以活血化瘀、祛风湿为主, 通过骨灵膏及其拆方制剂的临床研究表明, 骨灵膏与其拆方配伍制剂骨膏、灵膏比较, 在治疗骨关节炎方面疗效显著, 提示联合组方配伍优于拆方^[9]。本实验结果显示, 骨灵膏组与模型组比较明显降低血清与滑膜 IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂、COX-2、IFN- γ 的含量, 表明骨灵膏有对抗机体整体血液系统炎症和局部滑膜部位炎症的双重作用。骨膏、灵膏和塞来昔布在降低血清和滑膜 IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂、COX-2、IFN- γ 含量方面也显示出一定疗效, 但在部分细胞因子方面疗效不如骨灵膏, 说明骨灵膏及其拆方制剂均有调节血清和滑膜中 IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂、COX-2、IFN- γ 的作用, 但骨灵膏从整体和局部对炎症细胞因子的作用优于其拆方制剂及塞来昔布。Western Blotting 结果显示, 各组 ADAMTs-4、ADAMTs-5 均有表达, 其中模型组表达最显著, 骨灵膏组 ADAMTs-4、ADAMTs-5 蛋白表达最低, 骨灵膏组 ADAMTs-4、ADAMTs-5 蛋白表达较骨膏组、灵膏组及塞来昔布组显著降低。因此, 骨灵膏可能通过整体调节免疫细胞因子 IFN- γ 而降低骨关节炎不同部位 IL-1 β 、

TNF- α 相关炎症细胞因子的含量, 进而阻止炎症介质 PGE₂、COX-2 对局部关节软骨 ADAMTs-4、ADAMTs-5 蛋白合成代谢的影响, 减轻了骨关节炎软骨损伤, 其作用明显优于其拆方制剂及塞来昔布。

参考文献

- [1] HARDINGHAM T. Extracellular matrix and pathogenic mechanisms in osteoarthritis [J]. Curr Rheumatol Rep, 2008, 10(1): 30-36.
- [2] 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): 311-314.
- [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): 289-292.
- [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): 1843-1848.
- [5] GENDRON C, KASHIWAGI M, LIM NH, et al. Proteolytic activities of human ADAMTs-5: comparative studies with ADAMTs-4 [J]. J Biol Chem, 2007, 282(25): 18294-18306.
- [6] 邓紫玉, 孙鹭, 林俊, 等. ADAMTs-4 在膝骨关节炎关节液中的表达和意义 [J]. 昆明医学院学报, 2011, 32(6): 59-61.
- [7] 顾翔, 杜宁. 细胞因子在骨关节炎软骨退变中的作用 [J]. 中国骨伤, 2007, 20(11): 792-795.
- [8] 黄金刚, 童海骏, 刘宏强, 等. IL-1 β 和 TNF- α 对软骨细胞基质降解的影响及相关机制研究 [J]. 上海交通大学学报, 2010, 30(9): 1084-1089.
- [9] LI X, ELLMAN M, MUDDASANI P, et al. Prostaglandin E₂ and its cognate EP receptors control human adult articular cartilage homeostasis and are linked to the pathophysiology of osteoarthritis [J]. Arthritis Rheum, 2009, 60(2): 513-523.
- [10] MYERS LK, KANG AH, POSTLETHWAITE AE, et al. The genetic ablation of cyclooxygenase 2 prevents the development of autoimmune arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2000, 43(12): 2687-2693.
- [11] MCCOY JM, WICKS JR, AUDOLY LP. The role of prostaglandin E₂ receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. J Clin Invest, 2002, 110(5): 651-658.
- [12] 金荣忠, 谈国明, 胡辉东. COX-2 在膝关节骨性关节炎软骨中表达及临床意义 [J]. 生物骨科材料与临床研究, 2010, 7(6): 18-20.
- [13] 刘爱华, 陈颖娟, 王钱, 等. 骨关节炎中软骨细胞的 CD80/CD86 的表达及白细胞介素 18 对其影响 [J]. 中国临床保健杂志, 2006, 9(2): 103-105.

Effect of *Gulinggao* (骨灵膏) and Its Disassembled Prescriptions on Inflammatory Cytokines and Aggrecanase of Osteoarthritis Model Rats

CHEN Wenchao, ZHOU Ran, WANG Yonghui, LI Yanyan, CHAI Zhi, GAO Li

(Shanxi College of Chinese Medicine, Shanxi 030024)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Gulinggao* (骨灵膏) and its disassembled prescriptions in resisting cartilage injury in osteoarthritis. **Methods** Randomly divided 60 SD rats into the *Gulinggao* group, the *Gugao* (骨膏) group, the *Linggao* (灵膏) group, the Celecoxib group, the model group and the normal group, with 10 each. All groups except the normal group adopted cold stimulating with plaster fixation method to establish osteoarthritis model. After modeling successfully, the *Gulinggao* group, the *Gugao* group and the *Linggao* group were respectively given *Gulinggao*, *Gugao* and *Linggao* of crude herb 33.31 g/ (kg · d) for gavage. The Celecoxib group was given celecoxib 20.83 mg/ (kg · d) for gavage. The model group and the normal group was given the same volume normal saline for gavage. Examined the protein expression of aggrecanase4 (ADAMTs-4) and aggrecanase5 (ADAMTs-5) in cartilage tissue of knee. Examined the levels of interleukin 1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor α (TNF- α), prostaglandin E₂ (PGE₂), cyclooxygenase2 (COX-2), interferon γ (IFN- γ) in synovial membrane and serum. **Results** Compared with the normal group, the levels of IL-1 β , TNF- α , PGE₂, COX-2, IFN- γ in serum and synovial membrane of rats in the model group remarkably increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the levels of IL-1 β , TNF- α , PGE₂, COX-2, IFN- γ in serum and synovial membrane of rats in the *Gulinggao* group remarkably decreased ($P < 0.01$). Compared with the *Gulinggao* group, the levels of IL-1 β , TNF- α , COX-2, IFN- γ in serum and the levels of IL-1 β , COX-2, PGE₂, TNF- α , IFN- γ in synovial membrane of the *Gugao* group increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the levels of IL-1 β , TNF- α , COX-2, PGE₂, IFN- γ in serum and synovial membrane of the *Linggao* group increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Also, the levels of IL-1 β , TNF- α , PGE₂, IFN- γ in serum and IL-1 β , PGE₂ in synovial membrane of the Celecoxib group increased ($P < 0.01$). ADAMTs-4、ADAMTs-5 protein in knee cartilage tissue of rats in each group all expressed, of which the model group expressed the mostly remarkably. The *Gulinggao* group expressed the least. **Conclusion** *Gulinggao* may reduce osteoarthritis cartilage injury by the following mechanism: decreasing inflammatory cytokines in serum and synovial membrane, and then preventing the synthesis of aggrecanase in local joint cartilage. And the effect was remarkably superior to its disassembled prescriptions and celecoxib.

Keywords osteoarthritis; *Gulinggao*; inflammatory cytokines; aggrecanase

(收稿日期: 2015-03-27; 修回日期: 2015-08-09)

编辑: 邓 媛

欢迎邮购 《中医杂志》 光盘合订本

1951-1986 年 (4 张光盘) 480 元; 1987-1994 年 (1 张光盘) 260 元; 1995-2004 年 (1 张光盘) 280 元; 2005-2013 年 (1 张光盘) 300 元。

光盘合订本为计算机用数据光盘, 收入了同期出版的全部《中医杂志》的内容, 可对所有文章进行任意字检索, 方便实用。

汇款地址: 北京东直门内南小街 16 号中医杂志社北京医海林音像书店, 邮政编码: 100700

电话: (010) 64035632; 网址: <http://www.jtcm.net.cn>