

[药 理]

## 蠲痹胶囊醇提工艺对大鼠骨性关节炎模型的影响

刘继平<sup>1</sup>, 程 玥<sup>1</sup>, 周园里<sup>1</sup>, 史亚军<sup>1</sup>, 邓 翀<sup>1</sup>, 袁普卫<sup>2\*</sup>

(1. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西中医药大学第一临床医学院, 陕西 咸阳 712046)

**摘要:** **目的** 比较醇提工艺和水煎工艺生产的蠲痹胶囊(熟地黄、肉苁蓉、骨碎补等)防治大鼠膝骨性关节炎的差异。**方法** 90只SD大鼠,除空白组10只外,其余采用4%木瓜蛋白酶制备膝骨性关节炎模型,随机分为模型组,壮骨关节丸组,水煎工艺和醇提工艺蠲痹胶囊的低、中、高剂量组。给药30d后,各组大鼠称重,检测血清及关节腔液中环氧合酶-2(COX-2)、一氧化氮(NO)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)水平;病理学检查取各组胫骨平台关节软骨,分别进行HE、AB-PAS染色及肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )免疫组化染色,观察各组关节软骨形态及炎性因子表达。**结果** 醇提工艺蠲痹胶囊比水煎工艺更能显著降低膝骨性关节炎和大鼠血清及关节液中COX-2、NO、iNOS及TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 含量,延缓软骨降解。**结论** 蠲痹胶囊醇提工艺取代水煎工艺是合理的。

**关键词:** 蠲痹胶囊;醇提工艺;水煎工艺;骨性关节炎;TNF- $\alpha$ ;IL-1 $\beta$

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)08-1661-08

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.08.001

## Influence of alcohol extraction of Juanbi Capsules on rats with osteoarthritis

LIU Ji-ping<sup>1</sup>, CHENG Yue<sup>1</sup>, ZHOU Yuan-li<sup>1</sup>, SHI Ya-jun<sup>1</sup>, DENG Chong<sup>1</sup>, YUAN Pu-wei<sup>2\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China; 2. Clinical Medical College, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China)

**ABSTRACT: AIM** To compare the effects between the water and the alcohol extraction of Juanbi Capsules (*Rehmanniae Radix Praeparata*, *Cistanches Herba*, *Drynariae Rhizoma*, etc.) in treating rats with knee osteoarthritis.

**METHODS** Eighty rat modelled for knee osteoarthritis was induced by 4% papain and then were randomly divided into model group, Zhuanggu Guanjie Pills group, water-extraction Juanbi Capsules low, medium and high dose groups, alcohol-extraction Juanbi Capsules low, medium and high dose groups. Another ten rats served as the blank group. After consecutive intragastric administration for thirty days, rats were weighed. The levels of COX-2, NO and iNOS in serum and knee joint cavity fluid were detected. Tibial articular cartilage was taken for pathological examination. HE, AB-PAS staining and TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  immunohistochemical staining were performed to observe the histomorphology of articular cartilage and expressions of inflammatory factor. **RESULTS** Alcohol-extraction Juanbi Capsules were superb to the water-extraction Juanbi Capsules in reducing knee osteoarthritis and levels of COX-2, NO and iNOS in serum and joint fluid, and slowing down cartilage degradation. **CONCLUSION**

Alcohol extraction is more suitable to Juanbi Capsules than water-extraction.

**KEY WORDS:** Juanbi Capsules; alcohol extraction; water extraction; osteoarthritis; TNF- $\alpha$ ; IL-1 $\beta$

骨关节炎(OA)是一种渐进性关节退行病变,而其中又以膝骨性关节炎(KOA)发病率最

高,其特征表现为软骨基质崩解、减少、骨赘形成、滑膜无菌性炎症,病变涉及关节软骨、滑膜

收稿日期: 2015-12-02

基金项目: 陕西中医学院中西医结合防治骨退行性疾病研究创新团队(2013KCT-26)

作者简介: 刘继平(1978—),男,副教授,从事中药及复方药理作用研究。Tel: (029) 8185177, E-mail: liwenjie780711@163.com

\*通信作者: 袁普卫(1979—),男,教授,从事骨退行性疾病研究。Tel: (029) 33320873, E-mail: 348380910@qq.com

和软骨下骨,是致病因素多样但生物学、形态学和临床表现相似的中老年最常见关节病,而随着老龄化加重,其发病率逐渐升高<sup>[1]</sup>。虽然目前在临床上治疗方法众多,但在其防治方面尚缺乏针对性的特效药物及方法<sup>[2-3]</sup>。蠲痹胶囊是根据陕西中医药大学骨科经验方制备而成的院内制剂,临床使用多年,效果良好。本研究采用大鼠膝骨性关节炎模型,观察蠲痹胶囊醇提工艺对大鼠早期骨性关节炎治疗前后血清及关节液中炎症指标及关节软骨组织形态学及Mankin评分的改变情况,探讨其防治OA的作用及其机理,为进一步开发该药作为OA早期干预的中药新制剂提供科学依据。

## 1 材料与仪器

1.1 实验动物 SD大鼠,清洁级,雌雄各半,体质量(200±20)g,由第四军医大学实验动物中心提供,合格证号SCXK(军)2012-006;饲养环境:陕西中医药大学中药药理实验室,动物分笼饲养,保持12h昼夜节律,室温(22±1)℃,自由饮水摄食。

1.2 药物与试剂 蠲痹胶囊受试药:熟地黄:肉苁蓉:骨碎补:淫羊藿:黄芪:当归:白芍:牛膝:甘草(10:8:10:10:10:8:12:10:6),药材均购自咸阳天天乐医药超市,由陕西中医药大学中药化学实验室按照以下方法分别制备。传统工艺(水煎):除肉苁蓉打细粉外其余药材分别用10倍量和8倍量水煎煮2h,合并药液,浓缩干燥(出膏率29.4%)。改进工艺(醇提):肉苁蓉、骨碎补、当归、白芍、淫羊藿醇提(70%乙醇),其余水提醇沉(60%乙醇)合并药液,浓缩干燥(出膏率13.8%)。壮骨关节丸(批号1402014S,华润三九医药股份有限公司);木瓜蛋白酶(郑州永华化工有限公司);COX-2(批号201411)、iNOS(批号201412)、NO(批号201411)ELISA试剂盒,均购于艾莱萨生物科技(上海)有限公司;IL-1β(批号BA2782)、TNF-α(批号BA0131)抗体,购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 仪器 Eon全波长酶标仪(美国BioTek公司);TB-718生物组织包埋机(湖北泰维科技实业有限公司);BI-2000医学图像分析系统(成都泰盟软件有限公司);切片机(无锡双盛石化装备有限公司)。

## 2 方法

2.1 动物分组、模型制作及给药 SD大鼠90只,

按性别体质量随机分9组,每组10只,除空白组外,其余动物均制备大鼠膝骨性关节炎模型,具体方法如下:第1天,无菌条件下,腹腔注射戊巴比妥钠(1mL/kg)麻醉,用剃毛器去掉大鼠后足关节处毛,双侧膝关节腔内注射4%的木瓜蛋白酶溶液各0.2mL,分别于第4、7天按照上述方法操作,共3次<sup>[4]</sup>。大鼠喂养2周后,将造模大鼠随机分为模型组,蠲痹水煎低、中、高剂量组(1.036、5.18、10.36g/kg),蠲痹醇提低、中、高剂量组(1.036、5.18、10.36g/kg)和壮骨关节丸组(1.029g/kg),分组后第2天开始灌胃给药,空白组和模型组均灌胃等容量生理盐水,蠲痹水煎、醇提给药量均按照临床人用生药量折算成大鼠给药量,1次/d,给药30d,给药期间动物自由进食进水。

2.2 取材与标本 处理给药30d后,各组大鼠称重,禁食不禁水12h,用3%戊巴比妥钠1mL/kg麻醉,腹主动脉取血,离心取血清,-80℃冻存备用;膝关节髌韧带的外侧,常规备皮消毒,以1mL医用无菌注射器行膝关节腔穿刺术,先注入0.9%生理盐水1mL后,反活动膝关节10次,缓慢抽取关节液,并放入1.5mLEP管中,3000r/min离心30min,取上清液-80℃保存备用,严格按照试剂盒说明测定血清和关节腔液中COX-2、iNOS和NO各项指标。取各组胫骨平台关节软骨,修成约0.5cm×0.5cm×0.5cm,4%多聚甲醛固定,常规系列脱水、脱钙,石蜡包埋切片,脱蜡入水,PBS冲洗,行HE、AB-PAS、免疫组化染色,光学显微镜下观察各组关节软骨形态结构及IL-1β、TNF-α表达。

2.3 统计学处理 所有实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较正态分布均匀和方差齐时采用单因素方差分析,正态分布不均匀或方差不齐时用非参数检验,用SPSS 13.0软件统计。

## 3 结果

3.1 对血清及关节液中COX-2、NO、iNOS的影响 与空白组比较,模型组血清、关节液中COX-2、NO、iNOS水平均显著性升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与模型组比较,壮骨关节丸组血清COX-2、NO水平降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),关节液中NO、iNOS水平降低( $P < 0.05$ );蠲痹水煎各剂量组血清中COX-2水平降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),高剂量组血清中NO水平降低( $P < 0.05$ ),低剂量组血清中iNOS水平降低( $P < 0.05$ ),高剂量组

关节液中 NO、iNOS 水平显著性降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 薏苡醇提各剂量组血清中 COX-2、iNOS 水平降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 中剂量组关节液 COX-2 水平降低 ( $P < 0.05$ ), 各剂量组关节液中 NO 水平均降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。薏苡醇提低、中、高剂量组与水煎相对应剂量组比较, 血清中 COX-2、NO、iNOS 水平均无显著性差异

( $P > 0.05$ ); 薏苡醇提中剂量组与水煎中剂量组比较, 关节液中 COX-2 水平降低, 有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); 薏苡醇提低剂量组与水煎低剂量组比较, 关节液中 NO 水平降低, 有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); 薏苡醇提高剂量组与水煎高剂量组比较, 关节液中 iNOS 水平升高, 有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。结果见表 1~2。

表 1 薏苡胶囊对血清中 COX-2、NO、iNOS 的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Effects of Juanbi Capsules on the COX-2, NO, iNOS in serum in OA rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数/只	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	COX-2/(U·L <sup>-1</sup> )	NO/(μmol·L <sup>-1</sup> )	iNOS/(U·mL <sup>-1</sup> )
空白组	10	—	8.94 ± 4.88	27.17 ± 8.51	1.00 ± 0.53
模型组	10	—	20.13 ± 12.69*	60.83 ± 22.72**	2.51 ± 1.25**
壮骨关节丸组	10	1.029	10.38 ± 5.74 <sup>▲</sup>	29.08 ± 17.91 <sup>▲▲</sup>	1.69 ± 1.40
薏苡水煎低剂量组	10	1.036	10.30 ± 6.30 <sup>▲</sup>	43.27 ± 38.07	1.51 ± 1.24 <sup>▲</sup>
薏苡水煎中剂量组	10	5.18	7.29 ± 3.06 <sup>▲▲</sup>	42.48 ± 25.44	1.58 ± 0.78
薏苡水煎高剂量组	10	10.36	9.31 ± 2.12 <sup>▲▲</sup>	37.60 ± 23.47 <sup>▲</sup>	1.88 ± 1.13
薏苡醇提低剂量组	10	1.036	5.29 ± 2.88 <sup>▲▲</sup>	58.87 ± 32.43	1.18 ± 0.70 <sup>▲</sup>
薏苡醇提中剂量组	10	5.18	4.07 ± 3.23 <sup>▲▲</sup>	55.33 ± 26.58	1.28 ± 0.69 <sup>▲</sup>
薏苡醇提高剂量组	10	10.36	8.81 ± 5.08 <sup>▲</sup>	40.21 ± 2.78	1.48 ± 1.55 <sup>▲</sup>

注: 与空白组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>▲</sup> $P < 0.05$ , <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$

表 2 薏苡胶囊对关节液中 COX-2、NO、iNOS 的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 Effects of Juanbi Capsules on the COX-2, NO, iNOS in knee joint cavity fluid in OA rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数/只	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	COX-2/(U·L <sup>-1</sup> )	NO/(μmol·L <sup>-1</sup> )	iNOS/(U·mL <sup>-1</sup> )
空白组	10	—	19.69 ± 9.68	49.76 ± 26.52	3.15 ± 0.63
模型组	10	—	37.83 ± 9.23**	85.86 ± 24.44**	6.42 ± 1.31**
壮骨关节丸组	10	1.029	28.01 ± 9.57	64.48 ± 24.68 <sup>▲</sup>	4.49 ± 1.96 <sup>▲</sup>
薏苡水煎低剂量组	10	1.036	30.88 ± 6.14	82.23 ± 23.98	6.85 ± 1.33
薏苡水煎中剂量组	10	5.18	38.70 ± 11.95	67.23 ± 24.45	5.65 ± 1.98
薏苡水煎高剂量组	10	10.36	29.61 ± 7.53	51.92 ± 24.02 <sup>▲</sup>	3.47 ± 1.44 <sup>▲▲</sup>
薏苡醇提低剂量组	10	1.036	26.59 ± 9.71	58.19 ± 17.14 <sup>◆</sup>	6.95 ± 1.39
薏苡醇提中剂量组	10	5.18	24.02 ± 9.64 <sup>◆</sup>	50.34 ± 17.30 <sup>▲▲</sup>	6.95 ± 2.04
薏苡醇提高剂量组	10	10.36	29.96 ± 10.46	56.81 ± 20.80 <sup>▲</sup>	5.37 ± 0.78 <sup>◆◆</sup>

注: 与空白组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>▲</sup> $P < 0.05$ , <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$ ; 与薏苡水煎相对应剂量组比较, <sup>◆</sup> $P < 0.05$ , <sup>◆◆</sup> $P < 0.01$

### 3.2 关节软骨组织形态学观察及 Mankin 评分<sup>[5]</sup>

空白组 HE 染色大鼠软骨关节表层光滑、平整, 软骨细胞分布均匀, 序列整齐, 层次清楚, 无簇集软骨细胞, 潮线完整, AB-PAS 染色均匀, 失染少; 模型组 HE 染色软骨表层出现较大缺损区, 细胞排列紊乱, 软骨细胞层次不清, 细胞散在增生和巢状增生, 部分细胞坏死, 簇聚细胞出现频率增加潮线消失, AB-PAS 染色大部分层次失染, 伴软骨下骨硬化; 壮骨关节丸组与薏苡水煎、醇提高剂量组 HE 染色关节软骨表面较光滑, 软骨细胞排列轻度

紊乱, 有部分簇集软骨细胞, 接近于空白组, AB-PAS 染色与模型组比较失染减少, 软骨下骨硬化减弱, 见图 1~2。

同时, 按 Mankin 评分标准评分 (评分标准见表 3) 并进行统计。结果显示, 与模型组比较, 壮骨关节丸组与薏苡水煎、醇提高剂量组能降低 Mankin 评分, 且有显著性差异 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 薏苡醇提低、中、高剂量组与水煎相对应剂量组比较, Mankin 评分均无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。见表 4。

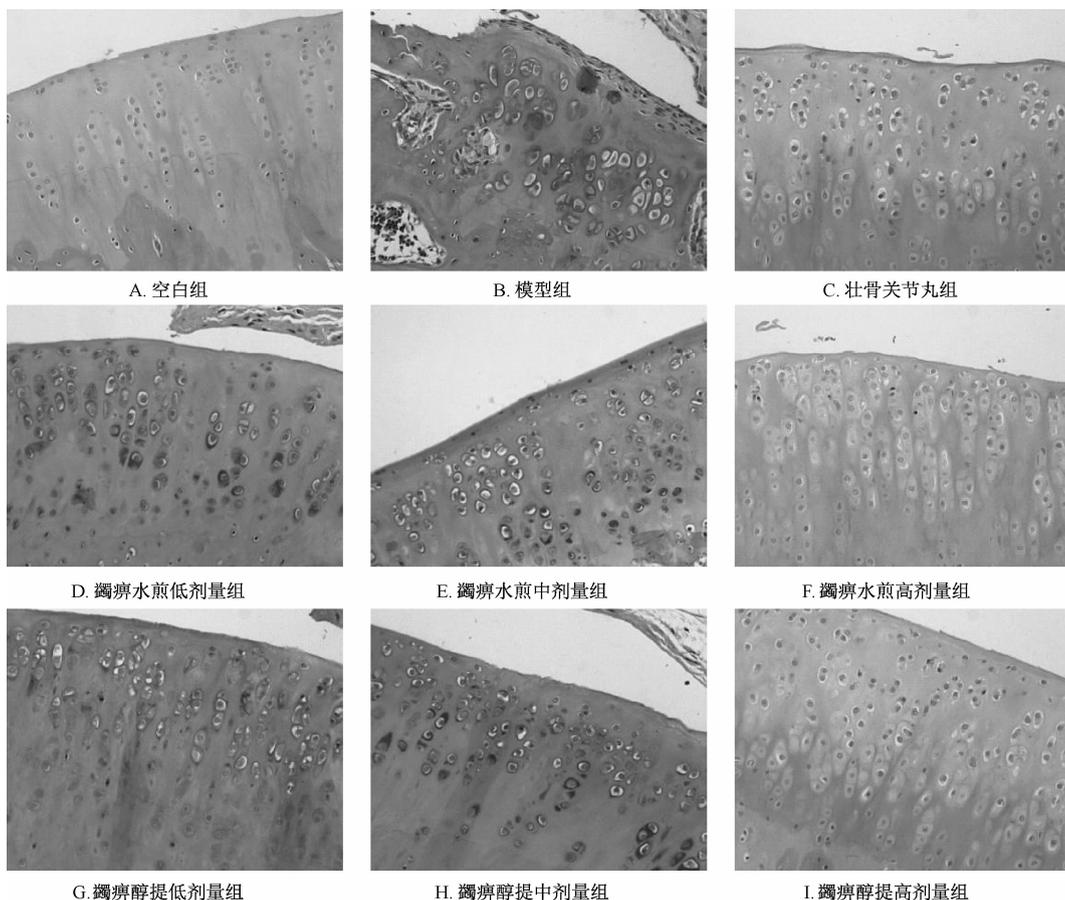


图1 罍痹胶囊软骨关节 HE 染色 (100 ×)

Fig. 1 Effects of Juanbi Capsules on the articular cartilage in OA rats (HE, 100 ×)

表3 Mankin 软骨组织学评分标准

Tab. 3 Mankin cartilage histological grading standards

观察项目	计分/分	观察项目	计分/分	观察项目	计分/分
I 表层关节软骨细胞分裂增生		II 软骨细胞排列		III AB-PAS 染色	
正常	0	正常	0	正常	0
轻度增生	1	排列稍乱,但层次可分	1	轻度降低	1
中度增生	2	排列明显不规则,层次紊乱	2	中度降低	2
明显增生	3	严重紊乱	3	严重降低	3
IV 潮线		V 血管翳样物生成		不着色	4
完整	0	无	0		
多层次	1	轻度	1		
模糊	2	中度	2		
有血管穿过	3	重度	3		

3.3 对免疫组化 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  表达的影响 免疫组化染色显示,与空白组比较,模型组大鼠软骨细胞 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  免疫阳性细胞数明显增多,着色明显加深,平均光密度值明显升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,壮骨关节丸组,罍痹水煎、醇提高剂量组大鼠软骨细胞 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  免疫阳性细胞数明显降低,

罍痹水煎、醇提中剂量组 IL-1 $\beta$  明显降低,着色较浅,平均光密度值显著性降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );罍痹醇提低、中、高剂量组与水煎相对应剂量组比较, TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  平均光密度值均无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。见图 3~4,表 5。

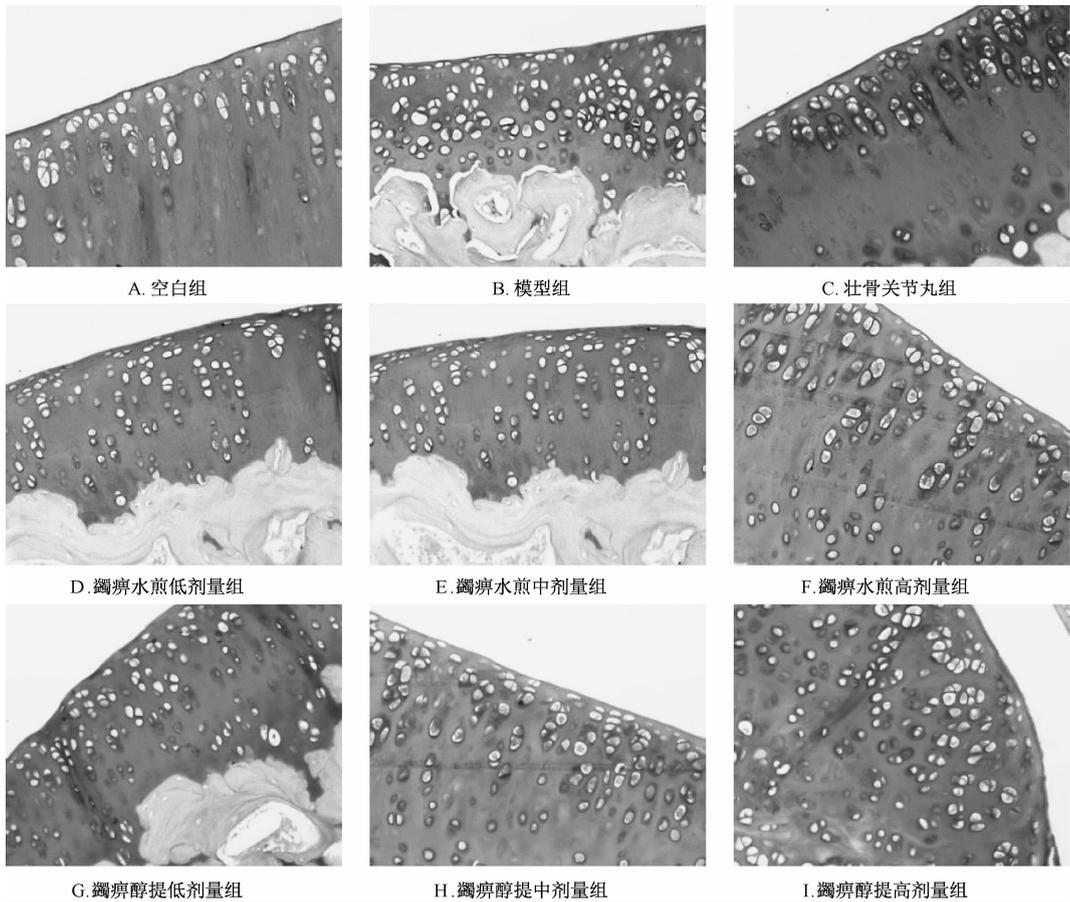


图2 蠲痹胶囊软骨关节 AB-PAS 染色 (100 ×)

Fig. 2 Effects of Juanbi Capsules on the articular cartilage in OA rats (AB-PAS, 100 ×)

表4 蠲痹胶囊 Mankin 软骨组织学评分 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 4 Effects of Juanbi Capsules on the Mankin cartilage histological grading in OA rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数/只	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	Mankin 评分/分
空白组	10	—	0.00 ± 0.00
模型组	10	—	6.60 ± 1.14 **
壮骨关节丸组	10	1.029	3.50 ± 1.29 ▲▲
蠲痹水煎低剂量组	10	1.036	5.50 ± 1.29
蠲痹水煎中剂量组	10	5.18	5.75 ± 1.71
蠲痹水煎高剂量组	10	10.36	3.75 ± 1.71 ▲
蠲痹醇提低剂量组	10	1.036	5.67 ± 1.53
蠲痹醇提中剂量组	10	5.18	4.75 ± 4.50
蠲痹醇提高剂量组	10	10.36	3.80 ± 1.92 ▲

注:与空白组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,▲ $P < 0.05$ ,  
▲▲ $P < 0.01$

#### 4 讨论

OA 属中医“骨痹”、“痹症”范畴,该病最早载于《内经》。中医认为“本虚标实”是其基本病机,正虚是本病发生的内在因素,治疗上主要遵从中医“肾主骨”的思想,采用滋养肝肾,补益气血的治法。近年来临床报道六味地黄汤、补肾壮筋

汤、健膝壮骨方等能延缓 OA 的进程,抑制 OA 软骨细胞凋亡<sup>[6-8]</sup>。蠲痹胶囊是根据陕西中医药大学骨科经验方制备而成,由熟地黄、肉苁蓉、骨碎补、淫羊藿、黄芪、当归、白芍、牛膝、甘草 9 味传统补益类中药加工而成,已在临床使用多年,患者反映效果良好,为了推广其临床使用,对其进行工艺改造并进行药效评价。目前 OA 实验动物模型制作常用方法有药物和机械方法两种,其中药物方法主要以关节腔内注射木瓜蛋白酶(papain)为主,此 OA 模型接近于临床骨关节炎,还可避免机械方法引起手术并发症的影响以及术后关节腔内药物注射时发生渗漏<sup>[9-10]</sup>。本次研究使用木瓜蛋白酶诱导大鼠膝关节骨性关节炎的造模方法,木瓜蛋白酶可以分解关节软骨基质中的蛋白多糖,加速蛋白多糖从关节软骨中丢失,改变关节软骨的生物学特性,促进关节软骨退变的进程,能成功复制 SD 大鼠膝关节骨性关节炎模型,本实验模型大鼠关节软骨石蜡切片 HE 染色和 AB-PAS 染色光镜下观察可见典型的骨关节炎病变,提示造模成功。

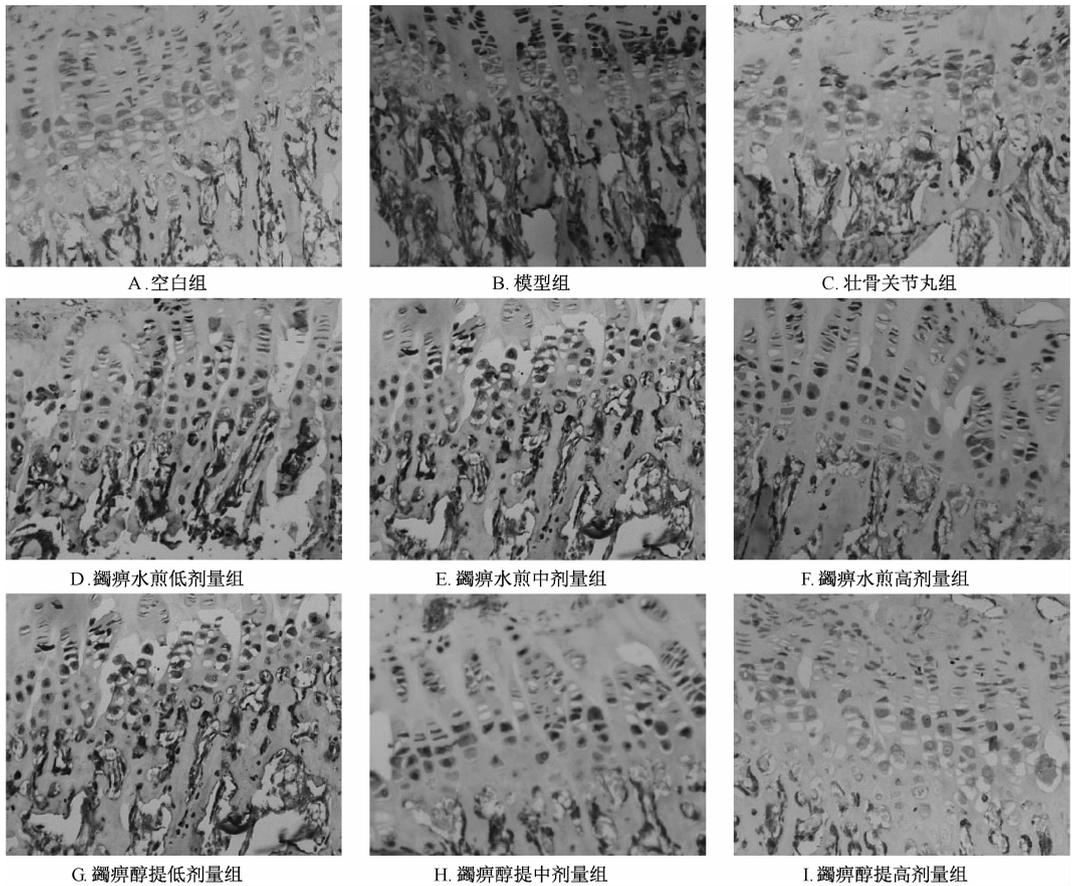


图3 蠲痹胶囊对免疫组化 TNF- $\alpha$  表达的影响 (100 $\times$ )

Fig. 3 Effects of Juanbi Capsules on the TNF- $\alpha$  expressions in articular cartilage in OA rats (100 $\times$ )

表5 蠲痹胶囊对大鼠软骨细胞免疫组化 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  表达平均光密度值的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 5 Effects of Juanbi Capsules on TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  average gray levels in the articular cartilage in OA rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数/只	剂量/(g $\cdot$ kg $^{-1}$ )	TNF- $\alpha$ 平均光密度值	IL-1 $\beta$ 平均光密度值
空白组	10	—	0.37 $\pm$ 0.04	0.32 $\pm$ 0.03
模型组	10	—	0.67 $\pm$ 0.13 **	0.74 $\pm$ 0.15 **
壮骨关节丸组	10	1.029	0.49 $\pm$ 0.62 $\blacktriangle$	0.46 $\pm$ 0.06 $\blacktriangle$
蠲痹水煎低剂量组	10	1.036	0.52 $\pm$ 0.13	0.57 $\pm$ 0.16
蠲痹水煎中剂量组	10	5.18	0.54 $\pm$ 0.07	0.49 $\pm$ 0.09 $\blacktriangle$
蠲痹水煎高剂量组	10	10.36	0.44 $\pm$ 0.09 $\blacktriangle$	0.36 $\pm$ 0.11 $\blacktriangle\blacktriangle$
蠲痹醇提低剂量组	10	1.036	0.61 $\pm$ 0.05	0.56 $\pm$ 0.14
蠲痹醇提中剂量组	10	5.18	0.50 $\pm$ 0.12	0.45 $\pm$ 0.07 $\blacktriangle$
蠲痹醇提高剂量组	10	10.36	0.47 $\pm$ 0.08 $\blacktriangle$	0.40 $\pm$ 0.11 $\blacktriangle$

注:与空白组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较, $\blacktriangle P < 0.05$ , $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$

环氧合酶 (COX) 又称前列腺素内过氧化合成酶,是一种诱导酶,当受到细胞内外各种因素刺激时,其合成与表达增强,与炎症性疾病的关系非常密切,各种炎症的炎性渗出液中均发现 COX-2 mRNA 和蛋白表达的增强<sup>[11]</sup>。iNOS 在关节软骨中起重要的调节作用。NO 可进一步促进前炎症细胞因子 COX-2 释放,抑制软骨细胞分泌细胞外基质和合成 II 型胶原,影响软骨的营养交换,从而抑制

软骨细胞增殖,促进软骨细胞凋亡,加速软骨基质的破坏,最终导致关节软骨的退变<sup>[12]</sup>。本研究结果显示:血液及关节液中 iNOS、COX-2、NO 含有量,模型组均呈高表达,各给药组均低于模型组,服用蠲痹胶囊(醇提工艺)后能更有效降低 SD 大鼠骨性关节炎模型血液及关节液中 COX-2、NO、iNOS 含有量,减轻炎症反应,缓解关节软骨的退变。

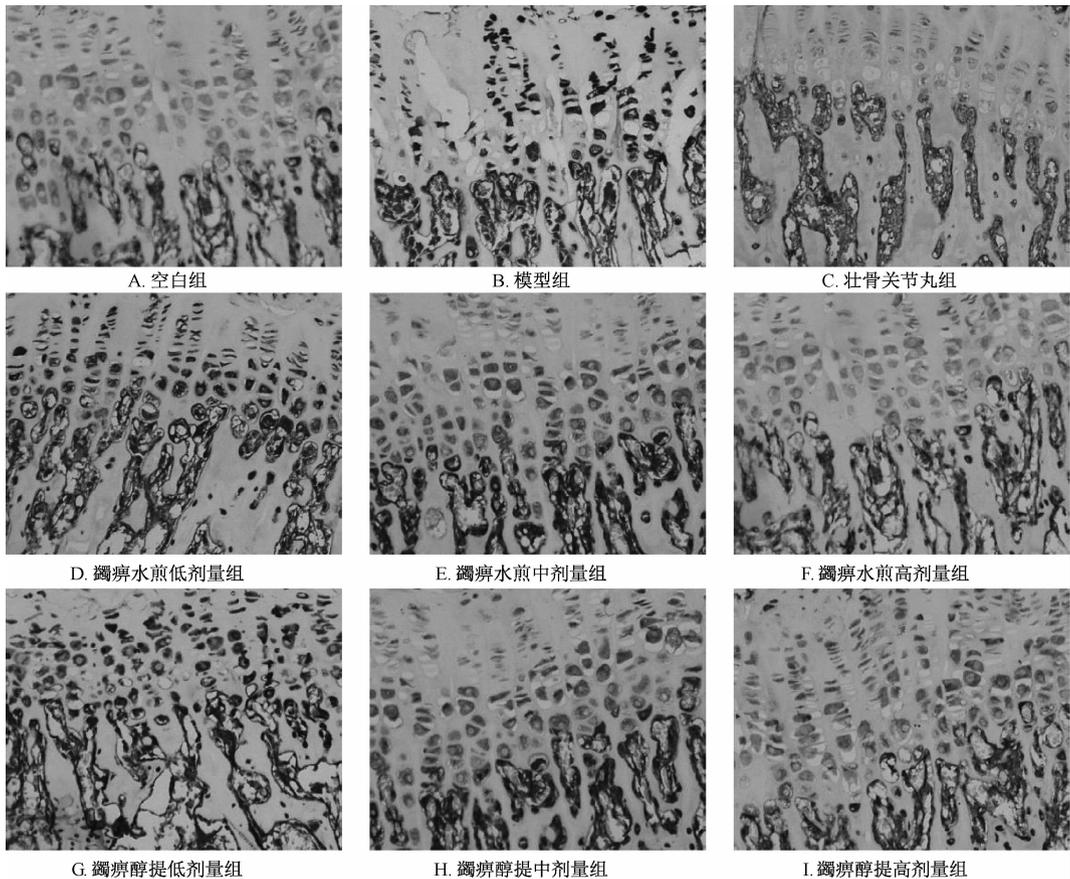


图4 蠲痹胶囊对免疫组化 IL-1 $\beta$  表达的影响 (100 $\times$ )

Fig. 4 Effects of Juanbi Capsules on the IL-1 $\beta$  expressions in the articular cartilage in OA rats (100 $\times$ )

OA 最主要的病理变化为受累关节软组织的进行性破坏, 关节软骨基质的分解与合成代谢的失衡。各种细胞因子的失调所致的合成和分解效应在软骨退变中起重要作用, IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  通过刺激软骨细胞退变, 刺激软骨细胞和滑膜细胞产生前列腺素 E<sub>2</sub> 和胶原酶, 引起基质降解酶尤其是基质金属蛋白酶 (matrix metal proteinase, MMPs) 的产生, 抑制 II 型胶原的合成, 在骨性关节炎的发病和进展中起着重要作用<sup>[13-14]</sup>。本研究结果显示: 给药组大鼠软骨细胞 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  免疫阳性细胞数明显降低, 着色较浅, 平均光密度值显著性降低。服用蠲痹胶囊 (醇提工艺) 后能有效降低大鼠软骨细胞 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  含量, 从而抑制 OA 中胞浆素的 MMPs 激活, 减缓对软骨机制的破坏, 延缓关节软组织的退变。蠲痹胶囊原工艺为水煎工艺, 改为醇提工艺, 出膏量大为减小 (由 29.4% 降为 13.8%), 研究结果显示改进工艺与原工艺药效相当。表明改进工艺后在保证药效的前提下, 大大缩减了给药量, 提高了成药性, 便于进一

步开发推广使用。

参考文献:

- [1] 刘淑芬, 李莹辉, 徐团才. 骨性关节炎的生化及病理变化 [J]. 中国临床康复, 2004, 8(5): 938-939.
- [2] 杨镇源, 余红超, 尹相锋, 等. 中医药预防早期骨性关节炎现状 [J]. 现代中医药, 2010, 30(1): 64-65.
- [3] 张立强, 杨米雄. 骨性关节炎疾病改善药物的研究进展 [J]. 医学综述, 2008, 14(18): 2814-2816.
- [4] Lin Y S, Huang M H, Chai C Y. Effects of helium-neon laser on the mucopolysaccharide induction in experimental osteoarthritic cartilage [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006, 14(4): 377-383.
- [5] Mankin H, Doffman H, Lippiello L, et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips [J]. *J Bone Joint Surg (Am)*, 1971, 53(3): 523-537.
- [6] 舒 谦, 卿茂盛, 曹亚飞, 等. 六味地黄汤含药血清对软骨细胞增殖、凋亡影响的体外实验研究 [J]. 中国中医药科技, 2006, 13(4): 217-219.
- [7] 潘 浩, 胡庆丰, 李雄峰, 等. 补肾壮筋汤对兔早期实验性骨关节炎软骨细胞凋亡及 PCNA 表达的影响 [J]. 中国

- 中医骨伤科杂志, 2004, 12(4): 16-20.
- [8] 章建华, 章 权, 朱 希, 等. 健膝壮骨方对大鼠骨性关节炎软骨细胞凋亡及其调控基因 P53、Bcl-2 表达作用的影响[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(11): 2437-2439.
- [9] 邹 季. 骨折愈合实验研究中动物模型选择的有关问题[J]. 湖北中医学院学报, 2002, 4(2): 25-27.
- [10] 聂 林. 骨关节炎的动物模型[J]. 中华实验外科杂志, 1990, 7(2): 96-97.
- [11] 方 忠, 李 锋, 杨 琴, 等. 特异性 COX-2 抑制剂对骨性关节炎的软骨保护作用的临床对照研究[J]. 实用医学进修杂志, 2005, 33(4): 222-227.
- [12] 段 戡, 袁长深, 姚弘毅, 等. 化淤祛湿法对膝关节炎早期诱导型一氧化氮合酶炎症途径影响的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(6): 3-4.
- [13] 张铁锋, 李景峰. 细胞因子 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  在骨关节炎软骨中 mRNA 表达的变化及意义[J]. 中国现代医生, 2008, 46(15): 116-117.
- [14] 季卫锋, 施伟峰, 陈 林, 等. 补肾活血法防治大鼠膝骨性关节炎的实验研究[J]. 中国骨伤, 2012, 25(3): 246-250.

## 12 $\beta$ -羟基藜芦酰棋盘花胺对小鼠小脑和大脑皮层组织 DNA 损伤的影响

郭敬功<sup>1</sup>, 李 林<sup>2</sup>, 刘迎滑<sup>3</sup>, 王江英<sup>2</sup>, 李沙沙<sup>2</sup>, 沈 姗<sup>2</sup>, 魏晓利<sup>3</sup>, 丛 悦<sup>2\*</sup>, 王天晓<sup>3\*\*</sup>

(1. 河南大学生命科学学院, 河南 开封 475004; 2. 河南大学药学院药物研究所, 河南 开封 475004; 3. 河南大学药学院中药研究所, 河南 开封 475004)

**摘要:** 目的 探讨 12 $\beta$ -羟基藜芦酰棋盘花胺 (12 $\beta$ -hydroxylveratroylzygadenine, Vog) 引起小鼠小脑和大脑皮层组织 DNA 损伤的影响。方法 取 132 只雄性昆明种小鼠, 随机分为空白组, Vog 高 (2.50  $\mu$ mol/kg)、低剂量组 (0.25  $\mu$ mol/kg), 给药 7 d。采用彗星实验检测小脑和大脑皮层 DNA 损伤及修复情况; 酶联免疫法检测 8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG)、醌氧化还原酶 (NQO1) 含有量; 比色法测定小脑和大脑皮层活性氧自由基 (ROS)、丙二醛 (MDA)、一氧化氮 (NO) 含有量和总超氧化物歧化酶 (T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活力; RT-PCR 检测小脑和大脑皮层 8-羟基鸟嘌呤 DNA 糖苷酶 (*Ogg1*) 和血红素加氧酶-1 (*Ho-1*) mRNA 表达。结果 Vog 明显提高小鼠小脑和大脑皮层 MDA、ROS、NO 以及尿液中 8-OHdG 含有量, 降低 GSH-Px 和 T-SOD 活力, 以及 NQO1 含有量, 上调 *Ogg1* 表达。停药后第 3 天 DNA 修复接近正常水平, 8-OHdG 含有量接近正常水平。结论 Vog 可能引起氧化应激, 导致 DNA 损伤。Vog 同时上调 *Ogg1* 表达, 为抗氧化防御状态和 DNA 修复系统的代偿性调节。

**关键词:** 12 $\beta$ -羟基藜芦酰棋盘花胺; DNA 损伤; 氧化应激; DNA 修复

中图分类号: R966

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)08-1668-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.08.002

## DNA damage of 12 $\beta$ -hydroxylveratroylzygadenine to cerebellum and cerebral cortex of mice

GUO Jing-gong<sup>1</sup>, LI Lin<sup>2</sup>, LIU Ying-hua<sup>3</sup>, WANG Jiang-ying<sup>2</sup>, LI Sha-sha<sup>2</sup>, SHEN Shan<sup>2</sup>, WEI Xiao-li<sup>3</sup>, CONG Yue<sup>2\*</sup>, WANG Tian-xiao<sup>3\*\*</sup>

(1. School of Life Science, Henan University, Kaifeng 475004, China; 2. Institute of Pharmacy, Pharmaceutical College, Henan University, Kaifeng 475004, China; 3. Institute of Chinese Materia Medica, Pharmaceutical College, Henan University, Kaifeng 475004, China)

**ABSTRACT:** AIM To investigate DNA damage of 12 $\beta$ -hydroxylveratroylzygadenine (Vog) to mouse cerebellum

收稿日期: 2016-01-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21102035); 河南省科技厅基础研究项目 (142300410128); 河南省教育厅自然科学基金项目 (14A180030)

作者简介: 郭敬功 (1982—), 男, 博士生, 从事生物学研究。Tel: (0371) 22857224, E-mail: jgguo@henu.edu.cn

\* 通信作者: 丛 悦 (1978—), 女, 副教授, 从事中药药效物质基础研究。Tel: (0371) 23880680, E-mail: congyue1027@163.com

王天晓 (1975—), 女, 教授, 从事中药药理研究。Tel: (0371) 23880680, E-mail: wtx1975@126.com