

- Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus *Neurospora crassa* [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2011, 83(1): 42-48.
- [10] 曲明星, 姚 薇, 高增贵, 等. 木霉菌辅助合成纳米银对甜瓜的防病促生作用研究[J]. *生态环境学报*, 2020, 29(1): 149-155.
- [11] 毛 迪, 杜 宇, 赵婷婷, 等. 黄芪制备纳米银材料的抑菌性能研究[J]. *潍坊医学院学报*, 2019, 41(4): 247-250.
- [12] 周 凤, 张弘弛, 刘 瑞, 等. 恒山黄芪内生真菌分离鉴定及抗菌活性的研究[J]. *食品科技*, 2012, 37(1): 22-25; 28.
- [13] 孔 悦, 王腾龙, 王新源, 等. 利用二级模型筛选源自恒山黄芪的活性内生真菌[J]. *陕西农业科学*, 2016, 62(3): 44-46.
- [14] Ahila N K, Ramkumar V S, Prakash S, et al. Synthesis of stable nanosilver particles (AgNPs) by the proteins of seagrass *Syringodium isoetifolium* and its biomedical properties[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 60-70.
- [15] 刘 瑞, 张弘弛, 安志鹏, 等. 一株黄芪内生真菌甾醇类代谢产物的分离和鉴定[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(8): 120-124; 130.
- [16] Bassole I H N, Ouattara A S, Nebie R, et al. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso[J]. *Phytochemistry*, 2003, 62: 209-212.
- [17] Mohan S, Oluwafemi O S, George S C, et al. Completely green synthesis of dextrose reduced silver nanoparticles, its antimicrobial and sensing properties[J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 106: 469-474.
- [18] Morones J R, Elechiguerra J L, Camacho A, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles[J]. *Nanotechnology*, 2005, 16(10): 2346.
- [19] 张 映. 钩状木霉生物还原制备纳米银的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2015.

淫羊藿-川芎药对 HPLC 指纹图谱建立与骨关节炎的谱效关系研究

陈文钧¹, 骆 媛¹, 章建华^{2*}, 尹 华^{1*}

(1. 浙江中医药大学药学院中药标准化研究实验室, 浙江 杭州 311402; 2. 浙江中医药大学附属第一医院, 浙江 杭州 310006)

摘要: 目的 建立淫羊藿-川芎药对 HPLC 指纹图谱, 并分析它与骨关节炎的谱效关系。方法 HPLC 法建立 22 批药对的指纹图谱, HPLC 法建立大鼠骨关节炎模型, 酶免法检测大鼠血浆中 MMP-13、MMP-3、IL-1 β 、NO、PGE₂ 水平, 双变量相关分析、灰色关联度分析、遗传神经网络研究其谱效关系。结果 指纹图谱中共确定 20 个共有峰, 通过对照品比对指出 10 个。给予淫羊藿-川芎药对后, 大鼠血浆中 MMP-13、MMP-3、IL-1 β 、NO、PGE₂ 水平降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。药对中抑制 MMPs 表达贡献较大的有 9 个峰, 为淫羊藿成分; 抑制炎症因子贡献较大的有 7 个峰, 为淫羊藿-川芎药对成分。结论 淫羊藿既可调控 MMPs 表达, 又具有抗炎作用, 而川芎主要发挥抗炎作用。

关键词: 淫羊藿-川芎药对; HPLC 指纹图谱; 骨关节炎; 谱效关系; 双变量相关分析; 灰色关联度分析; 遗传神经网络

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)05-1670-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.05.056

骨关节炎是一种以关节软骨退行性病变为核心, 累及骨质并包括滑膜、关节囊及关节其他结构的慢性炎症^[1-2]。骨关节炎属中医“骨痹”范畴, 临床多采用补肾活血方药治疗。淫羊藿-川芎药对取自《太平圣惠方》中的仙灵脾散, 由淫羊藿、川芎、威灵仙、肉桂、苍耳子组成, 取淫

羊藿补肾阳、强筋骨之功, 川芎活血行气、祛风止痛之效, 两药合用可标本兼治。中医骨伤科临床诊治骨关节炎时, 常以淫羊藿、川芎配伍使用, 再随证加减其他药味, 疗效显著。研究表明, 淫羊藿苷可调控软骨细胞代谢, 促进滑膜细胞增殖, 抑制 MMP-13、MMP-3、IL-1 β 、PGE₂ 表达,

收稿日期: 2020-10-14

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81874340)

作者简介: 陈文钧 (1995—), 女, 硕士生, 研究方向为中药分析及新药开发。Tel: 13588162411, E-mail: 13588162411@163.com

* 通信作者: 章建华 (1962—), 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向为骨关节病的基础研究、临床诊治及骨伤中药新药开发。Tel: 13588193391, E-mail: zhangjh311@163.com

尹 华 (1965—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药分析及质量评价、药效物质基础及中药新药开发。Tel: (0571) 61768172, E-mail: maryinhua@163.com

从而延缓骨关节炎的发展^[3-5];川芎可改善外周血管循环,抑制血小板聚集,改善炎症^[6-7]。

本研究采用 HPLC 法建立 22 批淫羊藿-川芎药对指纹图谱,酶联免疫法检测 MMP-13、MMP-3、IL-1 β 、NO、PGE₂ 水平,应用双变量相关分析、灰色关联度分析和遗传神经网络研究其谱-效关系,初步阐明该药对治疗骨关节炎的物质基础。

1 材料

1.1 仪器 Waters alliancee 2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司,配置 e2695 分离模块、柱温箱、2998PDA 检测器、Empower 色谱工作站);MettlerXS105 电子天平(十万分之一,瑞士 Mettler-Toledo 公司);BP211D 电子分析天平(德国赛多利斯公司);Centrifuge 5804R 高速冷冻离心机、手动移液器(德国 Eppendorf 公司);KQ5200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);Biorad 680 全自动酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);Ti-S 正置显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.2 试剂与药物 淫羊藿、川芎饮片共 22 批,具体信息见表 1~2,经浙江中医药大学药学院中药鉴定教研室鉴定为正品,编号 S1~S22。硫酸氨基葡萄糖胶囊购自永信药品工业(昆山)股份有限公司,批号 GSCyK004;塞来昔布胶囊购自美国 Pfizer 公司,批号 W64712。绿原酸购自中国食品药品检定研究院,纯度均>98%,批号 0753-200111;阿魏酸、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I、藁本内酯对照品购自上海源叶生物科技有限公司,纯度均>98%,批号 B20007、B20170、B20172、B20173、B21576、B20075、B20492;洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A 购自成都克洛玛生物科技有限公司,纯度均>98%,批号 CHB180617、CHB180615。MMP-13、MMP-3、IL-1 β 、NO、PGE₂ 试剂盒均购自江苏酶免实业有限公司,批号 MM-O110R1、MM-O112R1、MM-0047R1、MM-20607R1、MM-0068R1。乙腈、甲醇为色谱纯;其他试剂均为分析纯;水为娃哈哈纯净水。

表 1 淫羊藿饮片信息

序号	批号	生产厂家	产地	序号	批号	生产厂家	产地
1	171218	义乌市三溪堂国药馆	陕西	12	180401	杭州市富阳区第一人民医院	甘肃
2	160830	义乌市普泽大药房	甘肃	13	181207	杭州市富阳中医骨伤医院	陕西
3	180101	浙江天道医药有限公司	甘肃	14	180427	浙江省中医院	陕西
4	170501	浙江天道医药有限公司	甘肃	15	180501	义乌市中医医院	甘肃
5	171218	浙江中医药大学名中医馆	陕西	16	20161203	义乌市中心医院	甘肃
6	180409	宁波鄞州区白鹤街道社区卫生服务中心	福建	17	180304	浙江医院灵隐院区	陕西
7	180304	义乌市稠州医院	陕西	18	180604	杭州市第一人民医院	陕西
8	180110	安徽省芜湖市南陵同仁大药房	陕西	19	1711011	胡庆余堂	四川
9	180100751	康美药业股份有限公司	甘肃	20	180908	浙江大学医学院附属第二医院	陕西
10	180304	温州市泰顺人民医院	陕西	21	171017	方回春堂	甘肃
11	180612	文择轩中药材批发有限公司	陕西	22	180906	浙江医院三墩院区	陕西

表 2 川芎饮片信息

序号	批号	公司	产地	序号	批号	公司	产地
1	1708013	浙江省义乌市三溪堂国药馆	四川	12	180301	杭州市富阳区第一人民医院	四川
2	180101	温州市泰顺中医院	四川	13	180206003	杭州市富阳中医骨伤医院	四川
3	171201	浙江天道医药有限公司	四川	14	180310	浙江省中医院	四川
4	1804065	温州市泰顺中医院	四川	15	180501	义乌市中医医院	四川
5	170601	浙江中医药大学名中医馆	四川	16	20170538	义乌市中心医院	四川
6	180228	宁波鄞州区白鹤街道社区卫生服务中心	四川	17	180619	浙江医院灵隐院区	四川
7	1802005	义乌市稠州医院	四川	18	1804033	杭州市第一人民医院	四川
8	180506	芜湖市南陵同仁大药房	四川	19	171218	胡庆余堂	四川
9	180100591	康美药业股份有限公司	四川	20	180403	浙江大学医学院附属第二医院	四川
10	1803014	温州市泰顺人民医院	四川	21	180523	方回春堂	四川
11	180612	文择轩中药材批发有限公司	四川	22	180105	浙江医院三墩院区	四川

1.3 动物 清洁级 SD 大鼠,雌雄各半,体质量 180~220 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,实验动物生产许可号 SCXK(沪)2017-0005,饲养于浙江中医药大学动物实验中心屏障系统内。

2 方法与结果

2.1 HPLC 指纹图谱建立

2.1.1 色谱条件 按照文献[8-9]报道,Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μ m);流动相乙腈(A)-0.1%磷酸(B),梯度洗脱,程序见表 3;体积流量 1 mL/min;柱温 30 $^{\circ}$ C;检测波长 275 nm;进样量 10 μ L。

表3 梯度洗脱程序

时间/min	A 乙腈/%	B 0.1% 磷酸/%
0	9	91
13	12	88
15	18	82
21	18	82
22	21	79
29	21	79
30	25	75
48	25	75
49	32	68
67	32	68
68	44	56
77	44	56
78	56	44
87	56	44
88	100	0
95	100	0

2.1.2 溶液制备

2.1.2.1 供试品溶液 精密称取淫羊藿（批号 180101）、川芎（批号 171201）饮片粉末各 0.2 g（过 40 目筛），置于 50 mL 具塞锥形瓶中，加入 80 倍量 50% 乙醇，称定质量，在 40℃ 下超声处理 30 min，冷却至室温，50% 乙醇补足减失的质量，滤过，取续滤液，12 000 r/min 离心 15 min，取上清液，即得。

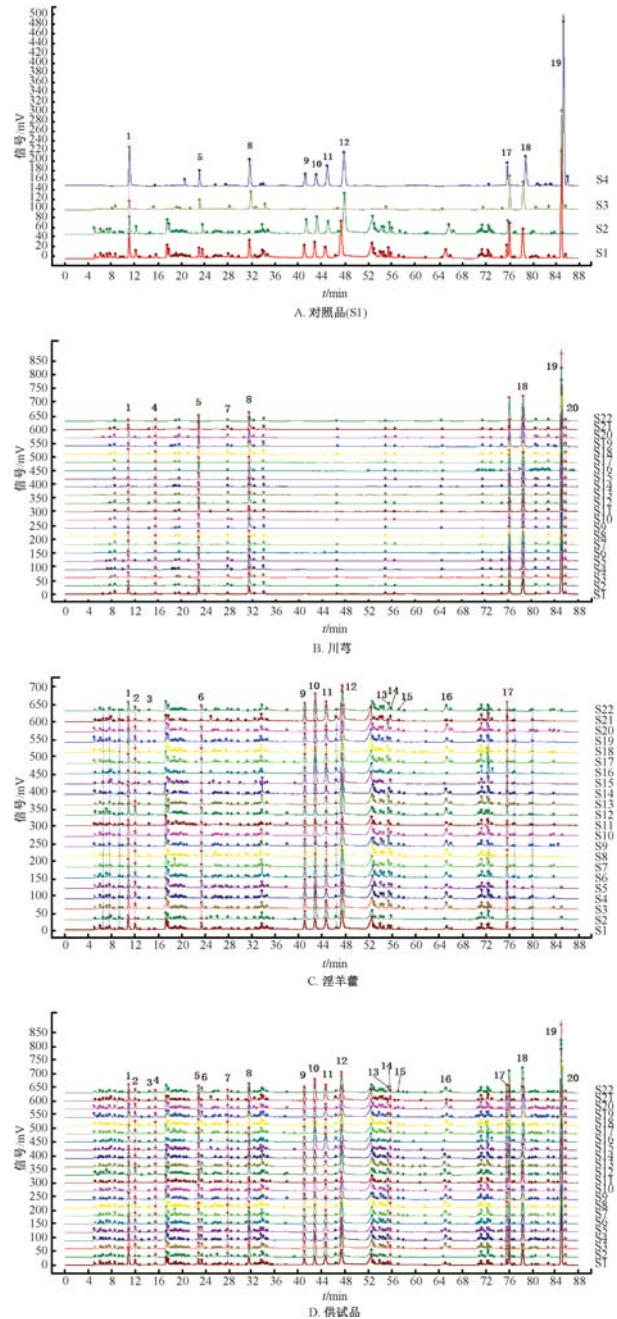
2.1.2.2 对照品溶液 精密称取绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I、洋川芎内酯 A、藁本内酯适量，置于 10 mL 量瓶中，甲醇制成质量浓度为 2.255、2.330、2.167、2.041、2.042、2.327、2.173、2.112、2.261、2.049 mg/mL 的溶液，即得。

2.1.3 方法学考察 以朝藿定 C（11 号峰）为参照峰，取同一供试品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得各成分色谱峰相对保留时间 RSD 均<1.7%，相对峰面积均 RSD<2.8%，表明仪器精密度良好。按“2.1.2.1”项下方法制备供试品溶液 6 份，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，测得各成分色谱峰相对保留时间 RSD 均<0.1%，相对峰面积 RSD 均<2.9%，表明该方法重复性良好。取同一供试品溶液，于 0、2、4、8、12 h 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，测得各成分色谱峰相对保留时间 RSD 均<1.2%，相对峰面积 RSD 均<2.9%，表明溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.1.4 图谱生成 按“2.1.2.1”项下方法制备 22 批药对的供试品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统建立指纹图谱，共确定 20 个共有峰，见图 1，再采用 SPSS 17.0 软件，以共有峰峰面积为变量，将 22 批次饮片分为 7 类，见图 2。最终，选取 S3、S19、S12、S21 进行后续药效学研究。

2.2 药效学研究

2.2.1 造模与给药 56 只大鼠适应性饲养 1 周后，分为正



注：S2 为淫羊藿对照图谱，S3 为川芎对照图谱，S4 为对照品溶液。

1. 绿原酸 5. 阿魏酸 8. 洋川芎内酯 I 9. 朝藿定 A 10. 朝藿定 B 11. 朝藿定 C 12. 淫羊藿苷 17. 宝藿苷 I 18. 洋川芎内酯 A 19. 藁本内酯

图1 22批药对HPLC指纹图谱

常组（8只）和造模组（48只），造模组大鼠采用切断前交叉韧带并损伤半月板法建立骨关节炎模型，术后每天腹腔注射青霉素 40 000 U/只，连续 3 d，以预防感染。

图 2 显示，22 批药对分为 7 类，其中 S16、S11、S20 这 3 批饮片单独成类，样本量较少，无可比性，故选取其他 4 类中的各 1 批。将造模组大鼠随机分为模型组，淫羊藿-川芎药对 I、II、III、IV 组，阳性药组，每组 8 只，雌雄分笼饲养，正常饮水摄食。

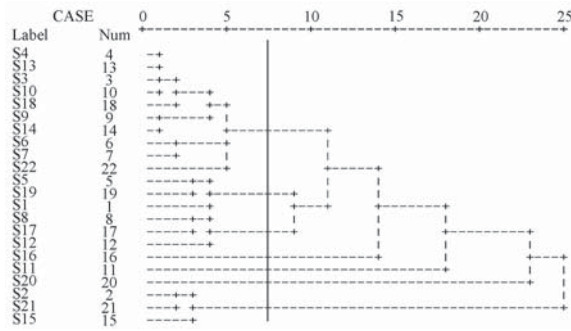


图2 22批药对聚类分析图

造模3 d后,淫羊藿-川芎药对I、II、III、IV组大鼠分别灌胃给予2 g/mL药液,阳性药物组大鼠灌胃给予

表4 淫羊藿-川芎药对对大鼠血浆中MMP-13、MMP-3、IL-1 β 、NO、PGE₂水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	MMP-13/(ng·mL ⁻¹)	MMP-3/(ng·mL ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	NO/(μ mol·L ⁻¹)	PGE ₂ /(pg·mL ⁻¹)
正常组	282.6 $\pm$ 17.92	20.80 $\pm$ 1.309	31.48 $\pm$ 1.534	27.58 $\pm$ 1.775	368.8 $\pm$ 17.47
模型组	330.5 $\pm$ 22.60**	23.90 $\pm$ 2.192**	36.81 $\pm$ 1.667**	34.44 $\pm$ 2.155**	436.5 $\pm$ 29.60**
淫羊藿-川芎药对I组	307.7 $\pm$ 14.21* Δ	21.86 $\pm$ 0.9913 Δ	33.00 $\pm$ 2.107 $\Delta\Delta$	28.79 $\pm$ 2.460 $\Delta\Delta$	378.3 $\pm$ 14.32 $\Delta\Delta$
淫羊藿-川芎药对II组	305.1 $\pm$ 20.08* Δ	21.01 $\pm$ 2.248 Δ	31.65 $\pm$ 1.294 $\Delta\Delta$	28.04 $\pm$ 1.943 $\Delta\Delta$	373.5 $\pm$ 37.83 $\Delta\Delta$
淫羊藿-川芎药对III组	302.2 $\pm$ 25.42 Δ	20.84 $\pm$ 0.9785 $\Delta\Delta$	33.04 $\pm$ 2.487 $\Delta\Delta$	32.91 $\pm$ 2.403**	378.2 $\pm$ 14.42 $\Delta\Delta$
淫羊藿-川芎药对IV组	289.0 $\pm$ 33.53 Δ	21.79 $\pm$ 1.224 Δ	33.90 $\pm$ 1.947* $\Delta\Delta$	31.80 $\pm$ 2.364** Δ	380.3 $\pm$ 27.20 $\Delta\Delta$
阳性药组	309.4 $\pm$ 13.43** Δ	20.90 $\pm$ 2.051 Δ	31.81 $\pm$ 1.697 $\Delta\Delta$	30.76 $\pm$ 3.983 Δ	374.8 $\pm$ 40.36 $\Delta\Delta$

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

2.3 谱效关系研究 以20个共有峰峰面积为 X ,MMP-13、MMP-3、IL-1 β 、NO、PGE₂水平分别为 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_4 、 Y_5 ,将数据进行归一化处理后,采用双变量相关分析、灰色关联度分析、遗传神经网络^[10-13]进行分析,结果见表5。双变量相关分析得出,1(绿原酸)、9(朝藿定A)、10(朝藿定B)、17(宝藿苷I)号峰对抑制MMPs(MMP-13、MMP-3)水平的贡献较大,5(阿魏酸)、10(朝藿定B)、18(洋川芎内酯A)号峰对抑制炎症因子(IL-1 β 、NO、PGE₂)水平的贡献较大;灰色关联度

2 mg/mL塞来昔布、12.5 mg/mL硫酸氨基葡萄糖溶液,剂量均为1 mL/100 g;正常组、模型组大鼠灌胃给予等体积蒸馏水。

2.2.2 淫羊藿-川芎药对对骨关节炎大鼠血浆中MMP-13、MMP-3、IL-1 β 、NO、PGE₂水平的影响 给药8周后,大鼠禁食12 h,腹腔注射3%戊巴比妥(0.15 mL/100 g)麻醉,心脏取血,4℃、3 000 r/min离心20 min,分离血浆,按酶联免疫检测试剂盒说明书操作,检测血浆中MMP-13、MMP-3、IL-1 β 、NO、PGE₂水平,结果见表4。由此可知,与正常组比较,模型组大鼠血浆中MMP-13、MMP-3、IL-1 β 、NO、PGE₂水平升高($P<0.01$);与模型组比较,各淫羊藿-川芎药对组和阳性药组大鼠血浆中MMP-13、MMP-3、IL-1 β 、NO、PGE₂水平降低($P<0.05$, $P<0.01$)。

分析得出,2、11(朝藿定C)、12(淫羊藿苷)号峰与MMPs关联度大于0.7,说明这3种成分对抑制MMPs表达的贡献较大,而其他共有峰均在0.6~0.7之间;遗传神经网络分析得出,9(朝藿定A)、16、12(淫羊藿苷)、13号峰对抑制MMPs表达贡献较大,3、6、10(朝藿定B)、15、2号峰对抑制炎症因子的表达贡献较大。3种分析方法表明,抑制MMPs表达贡献较大的为1(绿原酸)、2、9(朝藿定A)、10(朝藿定B)、11(朝藿定C)、12(淫羊藿苷)、13、16、17(宝藿苷I)号峰,均为

表5 相关系数测定结果

相关系数	Y ₁ MMP-13			Y ₂ MMP-3			Y ₃ IL-1 β			Y ₄ NO			Y ₅ PGE ₂		
	灰色关联			灰色关联			灰色关联			灰色关联			灰色关联		
	度分析	双变量相	遗传神	度分析	双变量相	遗传神	度分析	双变量相	遗传神	度分析	双变量相	遗传神	度分析	双变量相	遗传神
X_1	0.561	-0.373	0.478	0.691	0.210	-5.668	0.639	0.324	-1.284	0.629	0.094	2.717	0.627	-0.141	0.824
X_2	0.733	-0.134	-5.299	0.472	0.296	-1.119	0.477	0.347	0.085	0.547	0.265	-6.298	0.516	-0.055	0.929
X_3	0.619	-0.128	4.122	0.575	-0.248	1.467	0.652	-0.054	0.199	0.632	-0.055	-38.880	0.635	0.104	0.216
X_4	0.655	0.341	6.257	0.590	0.218	-3.234	0.638	0.390	1.756	0.666	0.398	0.569	0.655	0.222	0.120
X_5	0.591	0.065	-2.436	0.651	0.148	2.513	0.630	-0.141	-0.283	0.582	-0.540	-1.494	0.589	-0.086	1.993
X_6	0.680	-0.081	2.051	0.487	0.232	-2.099	0.507	0.395	0.921	0.553	0.480	-23.300	0.532	0.053	1.425
X_7	0.514	-0.127	6.333	0.588	-0.059	2.054	0.440	-0.123	0.020	0.449	-0.075	-4.996	0.440	0.153	2.533
X_8	0.556	0.081	6.668	0.605	0.250	1.728	0.551	0.373	0.761	0.560	0.519	-1.598	0.549	0.144	0.138
X_9	0.676	-0.369	-26.870	0.564	-0.130	-1.502	0.581	-0.061	-0.042	0.621	0.025	0.731	0.604	0.062	-2.566
X_{10}	0.389	-0.018	4.156	0.564	-0.319	-5.649	0.376	-0.418	-1.521	0.366	-0.354	-7.080	0.364	-0.006	-0.237
X_{11}	0.715	0.021	3.289	0.504	-0.057	-2.085	0.583	0.067	3.945	0.665	0.410	-0.943	0.636	0.234	0.426
X_{12}	0.521	-0.094	-11.430	0.707	-0.195	-2.015	0.593	-0.194	3.727	0.553	-0.227	-0.254	0.560	-0.008	1.195
X_{13}	0.519	-0.157	-10.870	0.655	0.273	-4.701	0.508	0.294	0.408	0.516	-0.196	36.120	0.506	-0.228	-0.091
X_{14}	0.533	0.160	1.871	0.513	0.278	7.193	0.473	0.542	-0.653	0.477	0.516	1.697	0.473	0.156	1.819
X_{15}	0.414	-0.183	-2.317	0.651	0.008	-0.923	0.443	0.192	0.966	0.414	-0.014	-6.494	0.417	0.067	-0.133
X_{16}	0.534	-0.117	-15.930	0.631	0.338	0.694	0.536	0.443	0.550	0.520	0.038	-1.474	0.518	-0.130	-0.965
X_{17}	0.622	-0.340	-1.530	0.663	-0.148	1.563	0.540	0.060	0.556	0.553	-0.171	0.987	0.543	-0.167	-0.563
X_{18}	0.583	0.109	11.390	0.567	0.365	1.411	0.618	0.052	-1.466	0.593	-0.491	0.637	0.600	-0.069	-0.456
X_{19}	0.462	0.057	8.039	0.577	0.304	2.952	0.429	0.348	3.785	0.434	-0.096	0.525	0.426	-0.100	0.113
X_{20}	0.594	0.221	-7.220	0.538	0.266	-3.370	0.485	0.550	-2.262	0.505	0.582	-0.348	0.491	0.160	1.022

淫羊藿成分;抑制炎症因子贡献较大的为 2、3、5(阿魏酸)、6、10(朝藿定 B)、15、18(洋川芎内酯 A)号峰,均为淫羊藿-川芎药对成分。

3 讨论

本研究考察提取方式(超声、回流)、提取时间(15、30、45、60 min)、溶剂倍数(40、80、100、120、150、200 倍)、浸泡时间(0、0.5、1、2 h)等,以绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I、洋川芎内酯 A、藁本内酯 10 个成分的提取率、色谱峰响应及分离情况为评价指标,确定供试品溶液的制备方法。

骨关节炎的发病机制有基质金属蛋白酶、炎症因子和一氧化氮学说等。基质金属蛋白酶过表达会导致软骨退化,MMP-13 是作用于软骨降解的主要酶^[14-15];IL-1 β 是促使软骨代谢平衡转向分解和退化的细胞因子之一,诱导滑膜和软骨产生 MMPs 等蛋白水解酶造成软骨基质的降解破坏;PGE₂参与全身的炎症反应,导致软骨下骨的吸收,影响骨与软骨合成代谢,并通过细胞间 cAMP 的积累诱导软骨细胞凋亡^[16-17];炎症介质导致 NO 合成增多,导致滑膜、软骨的氧化损伤。选择 MMP-13、MMP-3、IL-1 β 、NO、PGE₂进行药效评价,可客观准确地评价淫羊藿-川芎药对对骨关节炎的治疗作用。4 批淫羊藿-川芎药对、阳性药给药后,骨关节炎大鼠血浆中各指标含量均下降,说明淫羊藿-川芎药对对骨关节炎确切有效。

采用 3 种统计方法联用并进行交叉验证,结果更准确。结果显示,淫羊藿中 1(绿原酸)、2、9(朝藿定 A)、10(朝藿定 B)、11(朝藿定 C)、12(淫羊藿苷)、13、16、17(宝藿苷 I)号峰对抑制 MMPs 表达贡献较大,淫羊藿-川芎药对中 2、3、5(阿魏酸)、6、10(朝藿定 B)、15、18(洋川芎内酯 A)号峰抑制炎症因子贡献较大。综上所述,淫羊藿对抑制 MMPs 表达贡献较大,而抑制炎症因子的表达是淫羊藿-川芎药对协同作用的结果,初步阐明了淫羊藿-川芎药对治疗骨关节炎的物质基础。

参考文献:

[1] 陈孝平,汪建国.外科学[M].北京:人民卫生出版社,2013.

[2] Angele P, Madry H, Kon E. Early OA: point of no return or a chance for regenerative approaches[J]. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2016, 24(6): 1741-1742.

[3] 金剑飞,何维英,周钰龙.淫羊藿总黄酮对膝关节骨性关节炎大鼠核因子- κ B 通路的影响[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2020, 28(3): 5-9; 14.

[4] Pan L H, Zhang Y H, Chen N, et al. Icariin regulates cellular functions and gene expression of osteoarthritis patient-derived human fibroblast-like synoviocytes[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(12): 2656.

[5] Zeng L, Rong X F, Li R H, et al. Icariin inhibits MMP-1, MMP-3 and MMP-13 expression through MAPK pathways in IL-1 β -stimulated SW1353 chondrosarcoma cells[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(5): 2853-2858.

[6] 陈 岩,王拥军,徐 浩,等.川芎嗪对白介素-1 β 诱导退变的椎间盘终板软骨细胞的保护作用[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(5): 1437-1442.

[7] 张丽娟,刘继勇,姚 翀,等.洋川芎内酯类化合物药理作用研究进展[J]. *中国药理学杂志*, 2015, 50(13): 1081-1084.

[8] 刘 娟,冯 芮,蒲忠慧,等.指纹图谱结合 HPLC 定量分析在中药川芎质量评价中的应用研究[J]. *中药材*, 2019, 42(2): 353-357.

[9] 马 越,李德坤,叶正良,等.基于一测多评法测定淫羊藿中 6 种黄酮类化合物的含量[J]. *中药材*, 2019, 42(5): 1071-1076.

[10] 商利娜,王亚静,赵 鑫,等.基于谱-效关系探究黄芩抑制白色念珠菌的质量标志物[J]. *中成药*, 2020, 42(5): 1357-1361.

[11] 李 进.基于改进遗传神经网络的软件可靠性模型研究[D].成都:电子科技大学,2014.

[12] 薛 翔.人工智能在糖尿病诊断中的应用研究[D].兰州:兰州理工大学,2018.

[13] Liu C C, Zhang Y, Dai B L, et al. Chlorogenic acid prevents inflammatory responses in IL-1 β stimulated human SW-1353 chondrocytes, a model for osteoarthritis[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(2): 1369-1375.

[14] Li H, Wang D, Yuan Y J, et al. New insights on the MMP-13 regulatory network in the pathogenesis of early osteoarthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2017, 19(1): 248-259.

[15] Kunisch E, Kinne R W, Alsalameh R J, et al. Pro-inflammatory IL-1 β and/or TNF- α up-regulate matrix metalloproteinases-1 and -3 mRNA in chondrocyte subpopulations potentially pathogenic in osteoarthritis; *in situ* hybridization studies on a single cell level[J]. *Int J Rheum Dis*, 2016, 19(6): 557-566.

[16] 窦鹏程.四种药物对骨关节炎滑膜成纤维细胞分泌 IL-1 β 、MMP-13、PGE₂的影响[D].长沙:中南大学,2012.

[17] 王凤龙.OA 滑膜细胞中 IL-18 及 PGE₂ 含量测定及意义[D].广州:南方医科大学,2010.