

骨碎补总黄酮对膝骨关节炎模型兔HIF-1 α 和VEGF表达的影响^Δ

李明*, 李君, 付昆[#](海南医学院第一附属医院关节创伤外科, 海口 570102)

中图分类号 R684.3;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)18-2484-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.18.09

摘要 目的:研究骨碎补总黄酮对膝骨关节炎(KOA)模型兔滑膜组织及软骨组织/细胞中低氧诱导因子1 α (HIF-1 α)、血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响。方法:将30只家兔随机分为正常组、模型组和骨碎补总黄酮低、中、高剂量组(30、60、100 mg/kg),每组6只。除正常组外,其余各组家兔均切开左膝关节,剪断内侧副韧带和前后交叉韧带,完整切除内侧半月板,复制KOA模型。术后5周,各给药组家兔灌胃相应剂量的骨碎补总黄酮,正常组和模型组家兔灌胃等容生理盐水,每天3次,连续14 d。末次给药后,采用酶联免疫吸附测定法检测家兔滑膜组织中HIF-1 α 和VEGF的含量,并考察两者的相关性;以苏木精-伊红染色观察家兔滑膜组织的形态学变化;采用免疫组化法检测家兔软骨组织中HIF-1 α 和VEGF阳性表达的情况;采用蛋白质印迹法检测家兔软骨细胞中HIF-1 α 和VEGF蛋白表达的情况。结果:与正常组比较,模型组家兔滑膜组织中HIF-1 α 和VEGF的含量均显著升高,差异均有统计学意义($P<0.01$);滑膜表层出现裂隙,细胞层次不清晰且排列无序;软骨组织中HIF-1 α 和VEGF阳性细胞数增加,软骨细胞中HIF-1 α 和VEGF蛋白的相对表达量均显著升高,差异均有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,骨碎补总黄酮各剂量组家兔滑膜组织中HIF-1 α 和VEGF的含量均显著下降,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且两者呈正相关($r=0.923, P<0.01$);滑膜表面裂隙减少,细胞排列较为均匀,损伤程度减轻;软骨组织中HIF-1 α 和VEGF阳性细胞数减少,软骨细胞中HIF-1 α 和VEGF蛋白的相对表达量均显著下降,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:骨碎补总黄酮可减轻KOA模型兔滑膜及软骨的损伤程度,这种作用可能与下调滑膜组织及软骨组织/细胞中HIF-1 α 和VEGF的表达有关。

关键词 骨碎补总黄酮;膝骨关节炎;低氧诱导因子1 α ;血管内皮生长因子;兔;滑膜;软骨

Effects of Total Flavonoids of *Drynariae rhizoma* on the Expression of HIF-1 α and VEGF in Knee Osteoarthritis Model Rabbits

LI Ming, LI Jun, FU Kun (Dept. of Joint Trauma, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570102, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the effects of total flavonoids of *Drynariae rhizoma* on the expression of HIF-1 α and VEGF in synovial tissues and cartilage tissues/cells of knee osteoarthritis (KOA) model rabbits. **METHODS:** Totally 30 rabbits were randomly divided into normal group, model group and total flavonoids of *D. rhizoma* low-dose, medium-dose and high-dose groups (30, 60, 100 mg/kg), with 6 rabbits in each group. Except for normal group, KOA model of rabbits was induced in other groups by cutting the left knee joint, shearing off the medial collateral ligament, anterior and posterior cruciate ligaments, and completely removing the medial meniscus. Five weeks after surgery, administration groups were given relevant dose of total flavonoids of *D. rhizoma* intragastrically; normal group and model group were given constant volume of normal saline intragastrically, 3 times a day, for consecutive 14 d. After last medication, the contents of HIF-1 α and VEGF in synovial tissues of rabbits were detected by ELISA, and the relationship of them was investigated. HE staining was used to observe the morphology of the synovial tissues; immunohistochemical staining was used to detect the positive expression of HIF-1 α and VEGF in cartilage tissues; protein expression of HIF-1 α and VEGF in cartilage cells was detected by Western blot method. **RESULTS:** Compared with normal group, the contents of HIF-1 α and VEGF in synovial tissues of rabbits in model group were increased significantly, with statistical significance ($P<0.01$); synovial tissues surface appeared fissures, and the cell layers were not clear and arranged in disorder; the number of positive cells of HIF-1 α and VEGF in cartilage tissues was increased, and the relative expression of HIF-1 α and VEGF in cartilage cells was increased significantly, with statistical significance ($P<0.01$). Compared with model group, the contents of HIF-1 α and VEGF in synovial tissues of rabbits were decreased significantly in total flavonoids of *D. rhizoma* groups, with statistical significance ($P<0.05$ or $P<0.01$), showing positive relationship ($r=0.923, P<0.01$); the fissures were reduced, and the cell arrangement was more uniform, the degree of synovium injury was reduced; the number of positive cells of HIF-1 α and VEGF in cartilage tissues was decreased, and the relative expression of HIF-1 α and VEGF in cartilage cells was decreased significantly, with statistical significance ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS:** Total flavonoids of *D. rhizoma* can relieve synovium and cartilage injury in KOA model rabbits,

the effect of which may be associated with regulating the expression of HIF-1 α and VEGF in synovial tissues and cartilage tissues/cells.

KEYWORDS Total flavonoids of *Drynariae rhizoma*; Knee osteoarthritis; HIF-1 α ; VEGF; Rabbit; Synovium; Cartilage

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81260271)

* 主治医师。研究方向:关节创伤外科。电话:0898-66775290。

E-mail:154267423@qq.com

[#] 通信作者:主任医师,博士。研究方向:关节创伤外科。电话:

0898-66775290。E-mail:18702374435@163.com

膝关节炎(KOA)是一种在全世界范围内较为普遍的且以膝关节软骨退变性疾病和在膝关节周围形成骨质增生为主要特征的疾病。目前研究发现,KOA的核心为膝关节软骨退行性病变,并伴有多种组织如骨质、关节、滑膜等结构的慢性炎症^[1]。有研究表明,不同组合的生长因子会以协同或拮抗的方式影响软骨细胞的增殖,在防治关节软骨病变上可能具有重要的意义^[2]。缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α)是调控机体无氧代谢的重要因子,其对关节软骨细胞的增殖、凋亡以及维持正常关节软骨细胞代谢等均有重要作用^[3]。血管内皮生长因子(VEGF)是调控血管生成的重要因子之一,是HIF-1 α 的重要靶点,对新生血管的快速形成、软骨细胞的存活、骨转换速率等均具有调控作用^[4]。

在众多KOA治疗方法中,中药治疗是疗效较为突出的方法之一。相关研究显示,骨碎补总黄酮(为强骨胶囊主成分)在防治骨质疏松症、骨量减少中具有重要作用^[5],且用以治疗KOA效果明显^[6]。有研究者发现,微骨折技术联合骨碎补总黄酮对实验性兔膝关节损伤具有一定的修复作用,但具体机制尚未阐明^[7]。本课题组在前期研究中发现,骨碎补总黄酮可有效减轻KOA模型兔的滑膜损伤程度。在此基础上,本研究以KOA模型兔为对象,进一步检测了给予骨碎补总黄酮后家兔滑膜组织及软骨组织/细胞中HIF-1 α 和VEGF的表达水平,初步探讨了骨碎补总黄酮治疗KOA的可能机制,以期为其临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

FLUOstar Omega型全自动多功能酶标仪(德国BMG Labtech公司);E-Gel Imager凝胶成像分析系统(美国Thermo Fisher Scientific公司);BX-50型显微镜(日本Olympus公司);Z446K型通用冷冻离心机(德国Hermle公司);MTC型冷冻切片机(德国SLEE公司);ATK-7型生物组织摊烤片机(湖北安立信医疗实业有限公司);DHG-9245A型医用烤箱(佛山市迅优电子有限公司);BWY型标准恒温摇床、HWS型恒温恒湿培养箱(上海丙林电子科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

骨碎补总黄酮[强骨胶囊,北京岐黄医药股份有限公司,批准文号:国药准字Z20030007,批号:080102020,规格:每粒装0.25g(以芦丁作标准,每粒约含总黄酮8.75mg)];硫酸庆大霉素片[福安药业集团烟台只楚药业有限公司,批准文号:国药准字H37020905,批号:P20091030269919,规格:40mg(4万单位)];戊巴比妥钠(国药集团上海化学试剂有限公司,批号:T20060816),上述药物使用前均用生理盐水溶解。II型胶原酶(上海翊圣生物科技有限公司,批号:40508ES60);二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:W026);VEGF试剂盒(批号:HB-65A044)、HIF-1 α 试剂

盒[批号:JK-(a)-E00921]均购自上海晶抗生物工程有限公司;十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)上样缓冲液(上海康朗生物科技有限公司,批号:KL-F112);聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(苏州瑞诺德生物科技有限公司,批号:25800035);鼠抗兔单克隆HIF-1 α 抗体(批号:F675432J)及二抗(批号:F768643)、鼠抗兔单克隆VEGF抗体(批号:B567432P)及二抗(批号:B59874R)、鼠抗兔单克隆甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(批号:GY76532R)、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(TBST)溶液(批号:F54763)、免疫印迹化学发光(ECL)试剂(批号:ECL76843)均购自美国Thermo Fisher Scientific公司。其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

1.3 动物

新西兰家兔30只,雌性,6月龄,体质量(2.41 \pm 0.32)kg,由上海中医药大学提供[动物生产许可证号:SCXK(沪)2004-0004]。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

30只家兔适应性喂养1周后,将其随机分为正常组、模型组和骨碎补总黄酮低、中、高剂量组(30、60、100mg/kg,参照本课题组前期实验根据兔体表面积按成人剂量的3/50、3/25、1/5换算而得),每组6只。除正常组外,其余各组家兔均参照文献[8]方法复制KOA模型:于耳缘静脉注射3%戊巴比妥钠(剂量为35~40mg/kg)进行麻醉后,剃除其膝关节周围的毛发,随后予碘伏消毒,将左膝关节切开,剪断内侧副韧带和前后交叉韧带,完整切除内侧半月板。术中不作固定,并注意对关节软骨面进行保护使其不受损伤;术后亦不作固定,分笼饲养,并肌肉注射庆大霉素(剂量为4万单位/d),连续3d。术后5周(家兔KOA模型复制成功),各给药组家兔灌胃相应剂量的骨碎补总黄酮,正常组和模型组灌胃等容生理盐水,每天3次,连续14d。

2.2 滑膜组织中HIF-1 α 和VEGF含量的检测

末次给药后,腹腔注射3%戊巴比妥钠(剂量为35~40mg/kg)进行麻醉并处死各组家兔,取出其膝关节滑膜,迅速投入4 $^{\circ}$ C、10%中性多聚甲醛中,取样过程不超过8min。称取上述滑膜组织100mg,破碎,匀浆,以转速5000r/min离心5min,取上清液,采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)以全自动多功能酶标仪检测滑膜组织中HIF-1 α 和VEGF的含量,并考察两者的相关性。检测波长为405nm,严格按照试剂盒说明书操作。

2.3 滑膜组织形态学观察

取上述经固定的各组家兔滑膜组织适量,用乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙、乙醇脱水、石蜡包埋后,切片(厚度约4~5 μ m)。切片在42 $^{\circ}$ C水中展开,以载玻片捞片,置62 $^{\circ}$ C摊烤片机中烘片1h,随后置72 $^{\circ}$ C医用烤箱中烤片2h,行苏木精-伊红(HE)染色,经75%、85%、90%、95%、100%乙醇逐级脱水各2min,以二甲苯透明、中性

树胶封片后,置显微镜下观察滑膜组织形态学变化。

2.4 软骨组织中HIF-1 α 和VEGF阳性表达的检测

采用免疫组化法(SP)检测各组家兔软骨组织中HIF-1 α 和VEGF阳性表达的情况。取各组家兔软骨组织适量,于4℃、10%中性多聚甲醛中固定,经EDTA脱钙、乙醇脱水、石蜡包埋后,切片(厚度约4~5 μ m)。采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶法对上述切片进行处理,并依次经二甲苯脱蜡、乙醇脱水后,滴加双氧水进行抗原修复,依次加入HIF-1 α 和VEGF一抗、二抗(加入量分别为1:500、1:1000)进行孵育,经DAB显色后,再用苏木精复染,经常规脱水、透明封片后,置于显微镜下观察、读取阳性细胞数。每组随机选取5个视野,重复6次,取平均值。用磷酸盐缓冲液(PBS, pH=7.0)代替一抗作阴性对照。其中,VEGF定位于细胞浆或细胞核,HIF-1 α 定位于细胞浆及细胞核中,在无背景着色的情况下,以细胞内出现棕黄色颗粒者为阳性。

2.5 软骨细胞中HIF-1 α 和VEGF蛋白表达的检测

采用蛋白质印迹法(Western blot)检测各组家兔软骨细胞中HIF-1 α 和VEGF蛋白表达的情况。离断各组家兔关节及其周围肌肉组织,剔除软组织,用尖刀片削取透明软骨,以PBS 2 mL清洗3次后,加入2% II型胶原酶4 mL,置37℃恒温摇床中振荡消化,直至组织变为絮状细胞混悬液。将上述混悬液经滤网滤过后,收集软骨细胞分别按2000个/孔、5000个/cm²接种于96孔板及培养瓶中,于37℃、5%CO₂培养箱中培养,每天用显微镜观察细胞生长情况。取上述对数生长期家兔软骨细胞适量,通过Bradford法调整蛋白浓度后,采用SDS-PAGE分离,将分离后的蛋白转移至PVDF膜上,经丽春红S染色后,按目标条带剪膜,用含5%脱脂奶粉的TBST溶液于室温下封闭2 h,分别加入相应一抗[HIF-1 α (1:2000)、VEGF(1:5000)、GAPDH(1:2000)],于4℃下孵育过夜后,于室温下以TBST溶液洗膜,加入相应二抗(1:1000),孵育2 h后,用TBST溶液洗膜,以ECL显色,37℃普通胶片曝光,使用凝胶成像分析系统进行扫描,采用Image J 7.0软件计算条带的光密度值,以相应蛋白与内参(GAPDH)的光密度比值作为该蛋白的相对表达量。

2.6 统计学方法

采用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA);HIF-1 α 和VEGF含量的相关性评价采用Pearson相关性分析法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 骨碎补总黄酮对家兔滑膜组织中HIF-1 α 和VEGF含量的影响

与正常组比较,模型组家兔滑膜组织中HIF-1 α 和VEGF的含量均显著升高,差异均有统计学意义($P <$

0.01);与模型组比较,骨碎补总黄酮各剂量组家兔滑膜组织中HIF-1 α 和VEGF的含量均显著下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见表1。

表1 各组家兔滑膜组织中HIF-1 α 和VEGF的含量比较($\bar{x} \pm s, n=6, \text{ng/mL}$)

Tab 1 Comparison of the contents of HIF-1 α and VEGF in synovial tissues of rabbits in each group ($\bar{x} \pm s, n=6, \text{ng/mL}$)

组别	HIF-1 α	VEGF
正常组	18.56 \pm 2.13	145.32 \pm 9.54
模型组	42.56 \pm 3.65*	213.87 \pm 12.43*
骨碎补总黄酮低剂量组	35.76 \pm 4.21#	187.87 \pm 11.54#
骨碎补总黄酮中剂量组	29.65 \pm 3.11##	163.23 \pm 9.66##
骨碎补总黄酮高剂量组	23.87 \pm 2.98##	153.98 \pm 8.56##

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

Note: vs. normal group, * $P < 0.01$; vs. model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3.2 家兔滑膜组织中HIF-1 α 和VEGF含量的相关性

通过对KOA模型兔滑膜组织中HIF-1 α 和VEGF含量的相关性进行分析发现,两者呈正相关($r=0.923, P < 0.001$)。

3.3 骨碎补总黄酮对家兔滑膜组织形态学的影响

正常组家兔的滑膜表面较为光滑,细胞分布较为均匀且排列较为整齐。模型组家兔的滑膜表层有裂隙出现,细胞层次不清晰且排列无序,出现了成簇细胞。与模型组比较,骨碎补总黄酮各剂量组家兔的滑膜表面裂隙明显减少,细胞分布更为均匀,损伤程度明显减轻;骨碎补总黄酮各剂量组中,高剂量组家兔滑膜组织中细胞的分布更为均匀,细胞排列更为整齐,层次更清晰,详见图1。

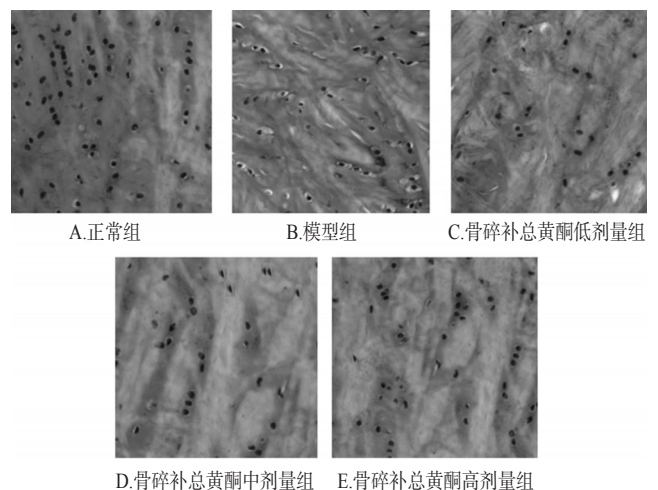


图1 各组家兔滑膜组织的形态学观察结果(HE, $\times 200$)
Fig 1 Morphological observation results of synovial tissues of rabbits in each group (HE, $\times 200$)

3.4 骨碎补总黄酮对家兔软骨组织中HIF-1 α 和VEGF阳性表达的影响

正常组家兔的软骨组织中可见HIF-1 α 和VEGF的表达,即少量均匀分布的棕黄色阳性细胞(图中色深者,

下同);与正常组比较,模型组家兔的软骨组织中有较多而密集的棕黄色阳性细胞,提示HIF-1 α 和VEGF的表达明显增加;与模型组比较,骨碎补总黄酮各剂量组家兔的软骨组织中阳性细胞数明显减少,提示HIF-1 α 和VEGF的表达明显减少,详见图2。

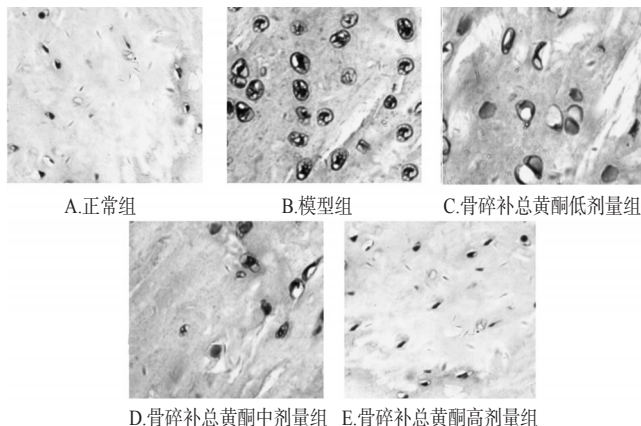


图2 各组家兔软骨组织中HIF-1 α 和VEGF阳性表达的显微图(SP, $\times 200$)

Fig 2 Micrographes of positive expression of HIF-1 α and VEGF in cartilage tissues of rabbits in each group (SP, $\times 200$)

3.5 骨碎补总黄酮对家兔软骨细胞中HIF-1 α 和VEGF蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组家兔软骨细胞中HIF-1 α 和VEGF蛋白的相对表达量均显著增加,差异均有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,骨碎补总黄酮各剂量组家兔软骨细胞中HIF-1 α 和VEGF蛋白的相对表达量均显著下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见图3、表2。

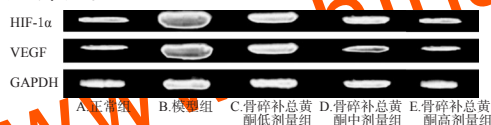


图3 各组家兔软骨细胞中HIF-1 α 和VEGF蛋白表达的电泳图

Fig 3 Electrophorograms of protein expression of HIF-1 α and VEGF in cartilage cells of rabbits in each group

表2 各组家兔软骨细胞中HIF-1 α 和VEGF蛋白的相对表达量比较($\bar{x} \pm s, n=6, \%$)

Tab 2 Comparison of relative expression of HIF-1 α and VEGF in cartilage cells of rabbits in each group ($\bar{x} \pm s, n=6, \%$)

组别	HIF-1 α	VEGF
正常组	79.56 \pm 8.43	45.11 \pm 3.66
模型组	234.56 \pm 15.54*	215.11 \pm 22.67*
骨碎补总黄酮低剂量组	125.13 \pm 6.43*	117.45 \pm 11.78**
骨碎补总黄酮中剂量组	89.11 \pm 7.56**	73.73 \pm 9.66**
骨碎补总黄酮高剂量组	83.87 \pm 7.58**	53.12 \pm 5.11**

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

Note: vs. normal group, * $P < 0.01$; vs. model group, ** $P < 0.05$, *** $P <$

0.01

4 讨论

KOA是一种慢性进行性退行性疾病,在病理情况下,骨/软骨接合处以及滑膜中的血管分布明显增加。在此过程中,VEGF能特异性地结合血管内皮细胞,促进内皮细胞生长,增加血管通透性,从而对血管新生具有重要的促进作用^[9]。VEGF作为最重要的促血管生成因子,积极参与了KOA的病理过程^[9-10]。Pfander D等^[11]的研究也表明,与健康受试者比较,KOA患者关节软骨中VEGF阳性细胞数显著增加($P < 0.05$)。此外有研究指出,氧浓度较低会加剧KOA的病情进展,这是由于在KOA发病过程中,机体中的细胞和组织会产生一系列的适应性缺氧反应(如促使细胞内能量代谢途径逐渐转变为无氧酵解途径、新生血管形成及全身红细胞合成增加等)^[12];在这种低氧情况下,HIF-1 α 可对其他生长因子的表达进行重点调控,广泛参与血管生长和发展的整个过程,并进一步影响软骨细胞的代谢^[9]。VEGF是HIF-1 α 的作用靶点之一,HIF-1 α 上调VEGF表达促血管新生的机制可能为:在其他辅助激活因子作用下,HIF-1 α 启动VEGF转录,并增强缺氧时VEGF mRNA的稳定性,最后对VEGF RNA转录进行上调,以加强其生物学效应^[4,9]。有研究指出,在敲除HIF-1 α 编码基因后,关节炎模型动物的滑膜细胞增殖和血管翳形成均有所减少,其关节软骨被破坏及肿胀程度得以缓解^[13-14]。

本研究在前期研究的基础上,探讨了骨碎补总黄酮对KOA模型兔滑膜组织及软骨组织/细胞中HIF-1 α 和VEGF表达水平的影响。结果显示,KOA模型兔给予不同剂量的骨碎补总黄酮后,其滑膜表面裂隙较模型组明显减少,损伤程度明显减轻,细胞分布更为均匀,且骨碎补总黄酮各剂量组中高剂量组家兔滑膜组织中的细胞分布更为均匀,排列更为整齐,层次更清晰。同时,骨碎补总黄酮各剂量组家兔的软骨组织中HIF-1 α 和VEGF阳性细胞数明显减少,滑膜组织中HIF-1 α 和VEGF的含量均显著下降,软骨组织/细胞中HIF-1 α 和VEGF的表达均显著降低,差异均有统计学意义,提示骨碎补总黄酮可显著抑制滑膜及软骨组织/细胞中HIF-1 α 和VEGF的表达。此外,本研究还发现在家兔滑膜组织中HIF-1 α 和VEGF的含量呈正相关,进一步证实了VEGF是HIF-1 α 的作用靶点之一,HIF-1 α 能上调VEGF的表达,VEGF也可逆反馈HIF-1 α 的表达。

综上所述,骨碎补总黄酮可减轻KOA模型兔滑膜及软骨的损伤程度,这种改善作用可能与下调滑膜及软骨组织/细胞中HIF-1 α 和VEGF的表达有关。但本研究仅以HIF-1 α 和VEGF为考察指标,而其余多种生长因子间的协同作用及其机制仍有待后续深入研究。

参考文献

[1] 袁普卫,杨威,康武林,等.骨性关节炎发病机制研究进

莪红片对急性血瘀证模型大鼠血液流变学及血栓形成相关指标的影响^Δ

郝少君^{1*}, 谢国旗², 李重先³, 李 军¹, 刘晓斌^{4#}, 李文俊¹, 张正臣¹ (1.解放军第371医院药械科, 河南新乡 453000; 2.解放军第371医院神经内科, 河南新乡 453000; 3.解放军第371医院护理部, 河南新乡 453000; 4.解放军第371医院医务处, 河南新乡 453000)

中图分类号 R364.1⁺5;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)18-2488-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.18.10

摘要 目的:观察莪红片对急性血瘀证模型大鼠血液流变学及血栓形成相关指标的影响。方法:将72只雄性SD大鼠随机分为空白组、模型组、脑心通胶囊组(0.8 g/kg)和莪红片低、中、高剂量组(0.375、0.75、1.5 g/kg),每组12只。各给药组大鼠均灌胃相应药物,空白组和模型组大鼠灌胃等容生理盐水,每天1次,连续7 d。除空白组外,其余各组大鼠均于末次给药1 h后皮下注射盐酸肾上腺素(0.06 mg/kg),2 h后用冷水刺激3 min,并于2 h后再次皮下注射同等剂量的盐酸肾上腺素以复制急性血瘀证模型。禁食、不禁水20 h后,观察各组大鼠行为,并检测其全血黏度(高、中、低切)和血清血栓素B₂(TXB₂)、6-酮-前列腺素F_{1a}(6-k-PGF_{1a})含量。结果:空白组大鼠饮食正常,精神和活动状态良好;模型组大鼠出现食欲不振、精神萎靡、活动减少等症状,其全血黏度(高、中、低切)和血清TXB₂含量均较空白组显著升高,6-k-PGF_{1a}含量较空白组显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$);各给药组大鼠上述症状均有不同程度改善,且脑心通胶囊组和莪红片中、高剂量组大鼠全血黏度(高、中、低切)和血清TXB₂含量均较模型组显著降低,6-k-PGF_{1a}含量均较模型组显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:莪红片可一定程度地降低全血黏度、改善血瘀症状,这种作用可能与其下调血清TXB₂、上调6-k-PGF_{1a}含量有关。

关键词 莪红片;大鼠;急性血瘀证模型;全血黏度;血栓素B₂;6-酮-前列腺素F_{1a}

- 展[J]. 中国骨质疏松杂志,2016,22(7):902-906.
- [2] 许建中,解志杰,杨物鹏,等. 生长因子(IGF-I、TGF- β 1和BMP-2)对兔关节软骨细胞体外增殖的作用[J]. 第三军医大学学报,2002,24(5):540-543.
- [3] LAFONT JE, TALMA S, HOPFGARTEN C, et al. Hypoxia promotes the differentiated human articular chondrocyte phenotype through SOX9-dependent and -independent pathways[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(8):4778-4786.
- [4] AMARILIO R, VUKOV SV, SHARIR A, et al. HIF1- α regulation of SOX9 is necessary to maintain differentiation of hypoxic prechondrogenic cells during early skeletogenesis[J]. *Development*, 2007, 134(21):3917-3923.
- [5] 刘剑刚,谢雁鸣,邓文龙. 骨碎补总黄酮抗炎作用的实验研究[J]. 中国天然药物,2004,2(4):232-234.
- [6] 周荣魁,陈昌红,李贺,等. 口服骨碎补总黄酮治疗膝关节炎患者的临床观察[J]. 中国医药导报,2011,8(2):77-78.
- [7] 韦积华,罗群强,陈载霞,等. 微骨折技术联合骨碎补总黄酮对实验性兔膝关节软骨损伤的修复作用[J]. 中国地
- 方病防治杂志,2017,12(10):67-69.
- [8] 方斌,刘文刚,赵自明,等. 参麦注射液关节内注射治疗家兔膝关节炎的实验研究[J]. 风湿病与关节炎,2013,2(8):27-30.
- [9] PALEOLOG EM. The vasculature in rheumatoid arthritis: cause or consequence?[J]. *Int J Exp Pathol*, 2009, 90(3):249-261.
- [10] MAPP PI, AVERY PS, MCWILLIAMS DF, et al. Angiogenesis in two animal models of osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, 16(1):61-69.
- [11] PFANDER D, KÖRTJE D, ZIMMERMANN R, et al. Vascular endothelial growth factor in articular cartilage of healthy and osteoarthritic human knee joints[J]. *Ann Rheum Dis*, 2001, 60(11):1070-1073.
- [12] 宋亚琼,周播江. 低氧诱导因子-1在调控骨骼肌缺氧时能量代谢发生适应性变化的机制研究进展[J]. 解剖学报,2017,48(2):236-240.
- [13] CRAMER T, YAMANISHI, Y, CLAUSEN BE, et al. HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation[J]. *Cell*, 2003, 112(5):645-657.
- [14] 蔡佳宇,常文静,商玮,等. 姜黄素对佐剂性关节炎模型大鼠HIF-1 α 、VEGF及VEGFR表达的影响[J]. 山东中医药大学学报,2015,39(3):285-287.

^Δ 基金项目:河南省科技发展计划项目(No.豫科计[2013]25号-132102310408);新乡市科技攻关计划项目(No.新科计[2017]22号-CXGG17025)

* 主任药师。研究方向:中药制剂、药理学。电话:0373-3541018。E-mail:haosj371@sohu.com

通信作者:主任医师,硕士。研究方向:心脑血管疾病防治及基础。电话:0373-5081371-549506。E-mail:xwqh@163.com

(收稿日期:2018-03-08 修回日期:2018-07-11)

(编辑:张元媛)