



中国组织工程研究

Chinese Journal of Tissue Engineering Research

ISSN 2095-4344, CN 21-1581/R

《中国组织工程研究》网络首发论文

题目：骨痹散干预膝骨关节炎兔软骨组织相关信号通路的变化
作者：李东东, 陈光友, 李晓明, 吴雪莲, 朱凯, 雷杨, 易露
收稿日期：2022-08-16
网络首发日期：2023-01-31
引用格式：李东东, 陈光友, 李晓明, 吴雪莲, 朱凯, 雷杨, 易露. 骨痹散干预膝骨关节炎兔软骨组织相关信号通路的变化[J/OL]. 中国组织工程研究.
<https://kns.cnki.net/kcms/detail//21.1581.R.20230130.1132.028.html>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

骨痹散干预膝骨关节炎兔软骨组织相关信号通路的变化

李东东¹, 陈光友¹, 李晓明², 吴雪莲², 朱凯¹, 雷杨¹, 易露¹<https://doi.org/10.12307/2023.812>

投稿日期: 2022-08-16

采用日期: 2022-10-27

修回日期: 2022-12-25

网络首发时间: 2023-01-31 11:15:42

中图分类号:

R459.9; R318; R648.3

文章编号:

2095-4344(2023)00-00000-06

文献标识码: A

文章快速阅读: 骨痹散治疗兔膝骨关节炎的作用机制

40只新西兰大白兔随机分为4组

(1) 假手术组只进行关节探查而不切除半月板与韧带;
(2) 其余3组采用改良Hulth法构建膝骨关节炎动物模型

假手术组与模型组膝关节处涂抹生理盐水, 阳性组涂抹双氯芬酸钾凝胶, 骨痹散组涂抹骨痹散

活动评分

膝关节软骨组织病理形态

血清中炎症因子水平

膝软骨组织中基质金属蛋白酶1, 2, 3, 13的表达

膝软骨组织中Wnt5a、 β -catenin、Bax、Caspase-3、 β -actin、Notch3、Hes1的表达

文题释义:

膝骨关节炎: 主要因素有软骨基质合成和分解代谢失调、软骨下骨板损害使软骨失去缓冲作用、关节内局限性炎症等, 导致膝关节出现疼痛、活动障碍、晨僵等一系列症状和体征。

Wnt/ β -catenin信号通路: 是调节骨关节炎的重要通路之一。Wnt/ β -catenin信号通路的激活会影响软骨细胞的正常增殖、分化和凋亡, 软骨基质降解, 导致骨关节炎的发生。

摘要

背景: Wnt信号转导的活化与膝骨关节炎的发病机制密切相关, 当前对Wnt信号通路的研究侧重于Wnt/ β -catenin信号通路及其激活或抑制蛋白的表达。目的: 观察院内协定处方骨痹散对膝骨关节炎模型兔体内炎症因子与Notch3/Hes1及Wnt/ β -catenin信号通路的影响, 为临床治疗提供新的用药思路。方法: 将40只新西兰大白兔随机分为假手术组、模型组、阳性组与骨痹散组, 每组10只, 使用改良Hulth法构建兔膝骨关节炎模型, 持续造模8周, 模型构建完后假手术组、模型组膝关节处涂抹生理盐水, 阳性组涂抹双氯芬酸钾凝胶, 骨痹散组涂抹骨痹散, 每天敷8 h, 连续1周。给药完毕后观察动物活动情况并进行行为学评分, ELISA法检测血清中前列腺素E2、环氧合酶2、白细胞介素1 β 与肿瘤坏死因子 α 水平, 苏木精-伊红染色与番红O染色观察软骨组织病变情况, 免疫组织化学法检测膝关节软骨组织中基质金属蛋白酶1, 2, 3, 13蛋白的表达水平, Western blot法检测膝关节软骨组织中Notch3、Hes1、Wnt5a、 β -catenin、Bcl-2、Bax、Caspase-3的蛋白表达水平。结果与结论: ①与假手术组相比, 模型组动物行走困难, 膝关节软骨组织损伤严重, 血清中前列腺素E2、环氧合酶2、白细胞介素1 β 与肿瘤坏死因子 α 水平升高($P < 0.05$), 软骨组织中基质金属蛋白酶1, 2, 3, 13和Bax、Caspase-3、Wnt5a、 β -catenin蛋白表达升高($P < 0.05$), Notch3、Hes1、Bcl-2蛋白表达降低($P < 0.05$)。②与模型组相比, 骨痹散组动物行走情况良好, 血清中前列腺素E2、环氧合酶2、白细胞介素1 β 与肿瘤坏死因子 α 水平降低($P < 0.05$), 膝关节软骨组织损伤减轻, 软骨组织中基质金属蛋白酶1, 2, 3, 13和Bax、Caspase-3、Wnt5a、 β -catenin蛋白表达降低($P < 0.05$), Notch3、Hes1、Bcl-2蛋白表达升高($P < 0.05$)。③结果表明, 院内协定处方骨痹散能减轻兔膝骨关节炎的症状, 改善软骨组织病变, 减少血清中炎症因子水平, 作用机制可能与调控Notch3/Hes1、Wnt/ β -catenin信号通路有关。关键词: 膝骨关节炎; 骨痹散; 软骨组织; 兔; 中药复方; Wnt; β -catenin; Notch3; Hes1Effects of *Gubi* Powder on cartilage tissue-related signaling pathways in rabbits with knee osteoarthritisLi Dongdong¹, Chen Guangyou¹, Li Xiaoming², Wu Xuelian², Zhu Kai¹, Lei Yang¹, Yi Lu¹¹Department of Orthopedics and Traumatology, Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China; ²Department of Rehabilitation Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Li Dongdong, Master, Attending physician, Department of Orthopedics and Traumatology, Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Corresponding author: Chen Guangyou, MD, Associate professor, Associate chief physician, Department of Orthopedics and Traumatology, Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Abstract

BACKGROUND: Activation of Wnt signaling is closely related to the pathogenesis of knee osteoarthritis. Current research on the Wnt signaling pathway has focused on the Wnt/ β -catenin signaling pathway and the expression of its activation or inhibition proteins.¹西南医科大学附属中医医院骨伤科, 四川省泸州市 646000; ²西南医科大学康复医学系, 四川省泸州市 646000

第一作者: 李东东, 男, 1983年生, 2011年成都中医药大学毕业, 硕士, 主治中医师, 主要从事脊柱与骨关节疾病方面的研究。

通讯作者: 陈光友, 博士, 副教授, 副主任中医师, 西南医科大学附属中医医院骨伤科, 四川省泸州市 646000

<https://orcid.org/0000-0003-2652-1528> (李东东)

基金资助: 西南医科大学附属中医医院课题(2018XYLH-019), 项目负责人: 陈光友

引用本文: 李东东, 陈光友, 李晓明, 吴雪莲, 朱凯, 雷杨, 易露. 骨痹散干预膝骨关节炎兔软骨组织相关信号通路的变化[J].

中国组织工程研究, 2023, 27(00):000-000.



OBJECTIVE: To observe the effect of *Gubi* Powder, an in-hospital prescription, on inflammatory factors and Notch3/Hes1 and Wnt/ β -catenin signaling pathways in rabbits with knee osteoarthritis model, providing new drug ideas for clinical treatment.

METHODS: Forty New Zealand rabbits were divided into sham operation group, model group, positive group (diclofenac potassium gel) and *Gubi* Powder group, with 10 rabbits in each group. The modified Hulth method was used to construct the rabbit knee osteoarthritis model, which lasted for 8 weeks. After modeling, normal saline was applied to the knee joints of the sham operation group and model group, diclofenac potassium gel was applied to the positive group, and *Gubi* Powder was applied to the *Gubi* Powder group, 8 hours a day, for 1 week. After administration, animal activity and behaviors were evaluated and scored; serum levels of prostaglandin E2, cyclooxygenase-2, interleukin 1 β and tumor necrosis factor α were determined by ELISA; pathological changes of cartilage tissue were observed by hematoxylin-eosin staining and Safranin-O staining; protein levels of matrix metalloproteinases 1, 2, 3, and 13 in cartilage tissue of the knee joint were determined by immunohistochemistry; and protein levels of Notch3, Hes1, Wnt5a, β -catenin, Bcl-2, Bax, and Caspase-3 in cartilage tissue of the knee joint were determined by western blot assay.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the sham operation group, animals in the model group had difficulties in walking, serious cartilage injury in the knee joint, significantly elevated levels of serum prostaglandin E2, cyclooxygenase 2, interleukin 1 β and tumor necrosis factor α ($P < 0.05$), significantly increased protein expression levels of matrix metalloproteinases 1, 2, 3, and 13, Bax, Caspase-3, Wnt5a and β -catenin in cartilage tissue ($P < 0.05$), and decreased protein expression levels of Notch3, Hes1, and Bcl-2 ($P < 0.05$). Compared with the model group, the walking condition of animals in the positive group and *Gubi* Powder group was improved, the serum levels of prostaglandin E2, cyclooxygenase-2, interleukin 1 β and tumor necrosis factor α were decreased, cartilage damage of the knee was alleviated, the protein expression levels of matrix metalloproteinases 1, 2, 3, and 13, Bax, Caspase-3, Wnt5a and β -catenin in cartilage tissue were reduced ($P < 0.05$), and the protein expression levels of Notch3, Hes1, and Bcl-2 were increased ($P < 0.05$). To conclude, *Gubi* Powder can alleviate the symptoms of knee osteoarthritis in rabbits, improve the pathological changes of the cartilage, and reduce inflammatory factor levels in serum. The mechanism of action may be related to the inhibition of Notch3/Hes1 and Wnt/ β -catenin signaling pathways.

Key words: knee osteoarthritis; *Gubi* Powder; cartilage tissue; rabbit; Chinese herbal compound; Wnt; β -catenin; Notch3; Hes1

Funding: Project of the Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Southwest Medical University, No. 2018XYLH-019 (to CGY)

How to cite this article: LI DD, CHEN GY, LI XM, WU XL, ZHU K, LEI Y, YI L. Effects of *Gubi* Powder on cartilage tissue-related signaling pathways in rabbits with knee osteoarthritis. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2023;27(00):0000-0000.

0 引言 Introduction

膝骨关节炎发病因素多且复杂, 常见于致残性关节疾病, 主要症状为关节疼痛、僵硬和肿胀, 占骨关节炎总负担的 80% 以上^[1]。由于其复杂的病因学, 发病机制目前尚不完全清楚, 导致治疗手段的开发陷入瓶颈。典型的治疗手段包括使用止痛剂、非类固醇抗炎药、关节内皮质类固醇注射和关节置换手术。虽然膝关节置换术已被证明是有效的治疗手段, 但这种手术并不适用于所有患者, 一般在疾病晚期或药物治疗无效后进行, 而且高达 20% 的患者报告手术预后效果差^[2]。

经过多年的发展, 中医药治疗膝骨关节炎已经颇有成效, 有多项研究发现, 中药及其复方能改善局部微循环, 加速代谢炎性物质, 也可减少膝关节组织中的炎症因子, 防止软骨细胞凋亡^[3-4]。最近研究发现在膝骨关节炎的发病过程中 Notch3/Hes1 信号通路受到抑制, 而 Wnt/ β -catenin 信号通路异常激活, β -catenin 表达增加。中药可以影响 Notch3/Hes1 与 Wnt/ β -catenin 信号通路蛋白的表达^[5-8], 促进局部微血管扩张, 减少炎症因子产生及抑制软骨细胞外基质降解, 从而缓解症状。骨痹散为院内协定处方, 以制川乌、制草乌、秦艽、威灵仙、桑枝, 川芎、乳香、没药、酒军、海桐皮、透骨草、白鲜皮、禹白附、王不留行、莱菔子、甘草 16 味中药组成, 经蜂蜜调制后外用, 该研究探讨骨痹散对膝骨关节炎模型兔体内炎症因子与 Notch3/Hes1 及 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响, 为临床治疗膝骨关节炎的用药提供新的思路。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。两组比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA)。

1.2 时间及地点 实验于 2019 年 2-6 月在西南医科大学动物实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 雄性新西兰大白兔 44 只, 清洁级, 体质量 3.0-4.0 kg, 购自成都达硕实验动物有限公司, 生产许可证号:

SCXK(川)2020-030, 使用许可证号: SYXK(川)2019-189。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

1.3.2 药品与试剂 骨痹散由西南医科大学附属中医医院药剂科制备 (制川乌 18 g、制草乌 18 g、川芎 12 g、乳香 12 g、没药 12 g、海桐皮 24 g、透骨草 24 g、白鲜皮 18 g、酒军 18 g、秦艽 18 g、威灵仙 18 g、桑枝 18 g、甘草 12 g、禹白附 18 g、王不留行 24 g、莱菔子 24 g, 研成粉末, 蜂蜜调配成膏状); 双氯芬酸钾凝胶, 国药准字 H20020385, 购自太极集团·四川天诚制药有限公司; 环氧合酶 2(SEKRT-0218) 购自北京索莱宝科技有限公司; 前列腺素 E2(ZC-52609)、白细胞介素 1 β (ZC-52385)、肿瘤坏死因子 α (ZC-52984) ELISA 试剂盒均购自上海茁彩生物科技有限公司; 基质金属蛋白酶 1 (10371-2-AP)、基质金属蛋白酶 13(18165-1-AP) 抗体均购自武汉三鹰生物技术有限公司; Bax(K009716P)、Bcl-2 (K009640P)、基质金属蛋白酶 2(K009709P) 抗体购自北京索莱宝科技有限公司; Notch3(ab23426)、Hes1(ab71559) 购自 Cell Signaling Technology 公司; Caspase-3(ab184787)、基质金属蛋白酶 3(ab52915)、Wnt5a(ab229200)、 β -catenin(ab32572) 和 β -actin(ab8227) 均购自艾博抗 (上海) 贸易有限公司。

1.3.3 主要仪器 Multiskan™ FC 酶标仪 [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司]; CX23 显微镜 (日本 Olympus 公司); ChemiDoc MP 多功能凝胶成像仪、Mini-PROTEAN® Tetra 电泳系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 膝骨关节炎动物模型的构建^[9] 取 44 只健康新西兰大白兔, 其中 40 只分为 4 组, 每组 10 只, 除假手术组外, 模型组、阳性组与骨痹散组均采用改良 Hulth 法构建膝骨关节炎动物模型, 另外 4 只造模后, 以大体解剖见软骨面部分区域明显变薄, 粗糙无光泽, 作为造模成功的标准, 验证模型是否成功。首先戊巴比妥钠耳缘静脉注射麻醉大白兔, 注射剂量

30 mg/kg, 然后于右后膝关节外侧纵向逐层切开, 切口长度 5 cm, 分离关节并完整切除内侧半月板、前交叉韧带和内侧副韧带。为了防治切口感染术后肌注青霉素 160 万 U/(kg·d), 连续 8 d。术后第 4 天即强迫兔奔跑 (0.5 h/d), 持续 8 周。假手术组只进行关节探查而不切除半月板与韧带。

组织工程实验动物造模过程中的相关问题

造模目的	探讨骨痹散对膝关节炎症模型的作用及机制
选择动物的	新西兰大白兔, 清洁级, 雄性, 体质量 3.0-4.0 kg
基本资料	
模型与所研究	利用骨痹散对构建的膝关节炎症模型进行治疗, 探讨骨痹散对
疾病的关系	炎症及相关通路的影响
造模技术描述	戊巴比妥钠耳缘静脉注射麻醉大白兔后, 于右后膝关节外侧纵向逐层切开, 切口长度 5 cm, 分离关节并完整切除内侧半月板、前交叉韧带、内侧副韧带
动物数量及	40 只健康新西兰大白兔分为假手术组、模型组、阳性组与骨痹散组,
分组方法	每组 10 只
造模成功	大体观察解剖见软骨面部分区域明显变薄, 粗糙无光泽, 提示造
评价指标	模成功
造模后取材	活动评分; 血清中炎症因子水平; 膝关节组织中基质金属蛋白酶 1,
及观察指标	2, 3, 13 的表 达; Wnt5a、 β -catenin、Bax、Caspase-3、Bcl-2、Notch3、Hes1 的表 达

1.4.2 给药 模型构建 8 周后各组开始给药, 假手术组与模型组膝关节处涂抹生理盐水, 阳性组涂抹双氯芬酸钾凝胶 (2 g), 骨痹散组涂抹骨痹散 (8 g), 用纱布进行包扎, 每天敷 8 h, 连续 1 周。

1.4.3 一般性体征观察 各组动物手术与给药后进行观察, 观察指标为奔跑与活动情况, 后肢活动情况, 并对步行情况进行分级评分: 0 分为正常步态; 1 分为轻度跛行; 2 分为中度跛行。

1.4.4 膝关节组织病理学观察 最后一次给药 12 h 麻醉后处死大白兔, 收集膝关节软骨组织制作石蜡切片, 经苏木精-伊红染色与番红 O 染色后观察软骨组织病理学变化, 并进行 Mankin 评分, 4 项指标合计为最终得分, 评分标准见表 1。

表 1 | 骨关节炎病理学评分表

Table 1 | Pathological scoring of knee osteoarthritis

得分	骨组织描述	得分	软骨细胞描述
0	正常组织	0	正常软骨细胞
1	组织表面不规则	1	弥散性细胞数量增多
2	组织表面出现血管翳	2	增生性细胞簇显现
3	软骨移行层出现组织裂隙	3	正常软骨细胞数量明显减少
4	软骨辐射层出现组织裂隙		
5	软骨钙化层出现组织裂隙		
6	组织结构完全破坏		
得分	基质染色情况描述	得分	潮线完整性描述
0	正常染色	0	完整
1	染色轻度减弱	1	出现血管穿越
2	染色中度减弱		
3	染色重度减弱		
4	未染色		

1.4.5 血清中炎症因子水平检测 各组动物处死前进行心脏采血, 分离血清, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测环氧合酶 2、前列腺素 E₂、白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 水平。

1.4.6 免疫组织化学染色 收集各组动物的膝关节软骨组织, 常规固定, 经包埋、切片后, 按免疫组化试剂盒要求进行实验操作, 加入基质金属蛋白酶 1, 2, 3, 13 一抗 (1 : 1 500), 4 °C 过夜孵育, 再加入二抗 (1 : 1 500) 常温下孵育 30 min, DAB 显色, 常规脱水, 透明, 中性树脂封固, 每张组织切片在 100 倍放大倍数下采集 3 个视野, Image J 图像处理软件统计测量平均吸光度值。

1.4.7 蛋白质免疫印迹分析 收集各组动物膝关节软骨组织, 冰上进行蛋白质提取与定量, 然后按照 Western blot 法进行凝胶电泳, 一抗为 Wnt5a(1 : 800)、 β -catenin(1 : 800)、Bax(1 : 800)、Bcl-2(1 : 800)、Caspase-3(1 : 800)、 β -actin (1 : 1 500)、Notch3(1 : 2 000)、Hes1(1 : 2 000), 最后使用 ECL 试剂盒进行蛋白条带显影后在凝胶成像系统中进行曝光拍照, 以 β -actin 作为内参计算各蛋白表达水平。

1.5 主要观察指标 ①各组兔活动评分; ②各组兔膝关节软骨组织病理形态; ③各组兔血清中炎症因子水平; ④各组兔膝关节组织中基质金属蛋白酶 1, 2, 3, 13 的表达; ⑤各组兔膝关节组织中 Wnt5a、 β -catenin、Bax、Caspase-3、Bcl-2、Notch3、Hes1 的表达。

1.6 统计学分析 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 SPSS 25.0 进行数据分析, 统计方法为单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-t 检验。P < 0.05 为差异有显著性意义。文章统计学方法经过西南医科大学附属中医医院统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 共 44 只新西兰大白兔参加实验, 其中 4 只用于验证模型是否成功, 另外 40 只兔均进入结果分析, 中途无脱落。

2.2 各组兔的一般行为 给药结束后, 假手术组动物饮食正常, 奔跑与活动未出现障碍; 模型组动物出现食欲不振、活动减少、行走不便、奔跑困难等情况; 与模型组相比, 阳性组与骨痹散组动物食欲与精神状态有所好转, 活动范围与幅度增加。具体评分结果见表 2。

表 2 | 各组兔给药结束后活动评分表

($\bar{x} \pm s, n=10$)

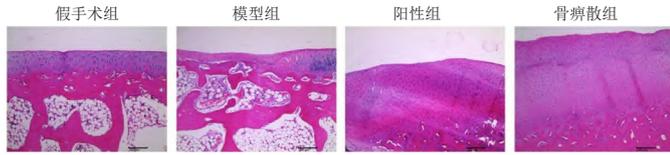
Table 2 | Activity score of rabbits in each group after drug administration

组别	活动评分
假手术组	0.0 \pm 0.0
模型组	1.8 \pm 0.4 ^a
阳性组	0.8 \pm 0.4 ^c
骨痹散组	1.3 \pm 0.5 ^b
F 值	37.211
P 值	0.000

表注: 与假手术组相比, ^aP < 0.01; 与模型组相比, ^bP < 0.05, ^cP < 0.01

2.3 各组兔膝关节软骨组织病理形态 假手术组关节软骨结构完整, 关节软骨结构分层清晰, 未见明显潮线, 软骨细胞分布均匀, 软骨内无血管和神经, 未见明显软骨缺损、软骨细胞坏死及纤维增生等病理改变; 模型组可见局部软骨面缺损, 缺损区域软骨细胞显著减少, 大量软骨细胞坏死, 软骨层明显变薄甚至丢失, 缺失区域大量纤维组织增生, 可见较

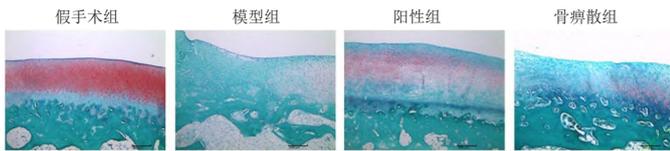
多胶原纤维以及核呈长梭形的纤维细胞；阳性组可见局部软骨面缺损，软骨细胞排列紊乱，软骨细胞数量减少，软骨细胞坏死，部分软骨层丢失，缺失区域存在纤维组织增生情况，可见较多胶原纤维和纤维细胞，未见明显炎性细胞浸润；骨痹散组可见局部软骨面不同程度缺损，软骨细胞数量减少，部分软骨层丢失，多量纤维组织增生，可见较多胶原纤维和纤维细胞，未见明显炎性细胞浸润，见图 1、2 和表 3。



图注：除假手术组外软骨组织均可见不同程度软骨损伤，模型组可见软骨出现分层及大量软骨细胞坏死，阳性组与骨痹散组软骨损伤均有减轻，仍可见部分软骨细胞簇集

图 1 | 治疗后各组兔软骨组织苏木精-伊红染色 (×100)

Figure 1 | Hematoxylin-eosin staining of rabbit cartilage tissue after treatment (×100)



图注：假手术组滑膜有 1-3 层细胞；模型组滑膜层增厚，局部炎性浸润明显；阳性组与骨痹散组滑膜厚度降低，炎性浸润减轻

图 2 | 治疗后各组兔软骨组织番红 O 染色 (×100)

Figure 2 | Saffron O staining of cartilage tissue of rabbits after treatment (×100)

表 3 | 治疗后各组兔软骨组织病理学评分 (x̄±s, n=10)

Table 3 | Cartilage histopathological scores of rabbits after treatment

组别	Mankin 评分
假手术组	0.0±0.0
模型组	11.7±0.5 ^a
阳性组	3.7±1.4 ^b
骨痹散组	6.7±0.5 ^c
F 值	357.890
P 值	0.000

表注：与假手术组相比，^aP < 0.01；与模型组相比，^bP < 0.05，^cP < 0.01

2.4 各组兔血清中炎症因子水平 与假手术组相比，模型组动物血清中环氧化酶 2、前列腺素 E2、白细胞介素 1β、肿瘤坏死因子 α 水平均显著性升高 (P < 0.01)，与模型组相比，阳性组与骨痹散组动物血清中环氧化酶 2、前列腺素 E2、白细胞介素 1β、肿瘤坏死因子 α 水平均显著性降低 (P < 0.05)，见表 4。

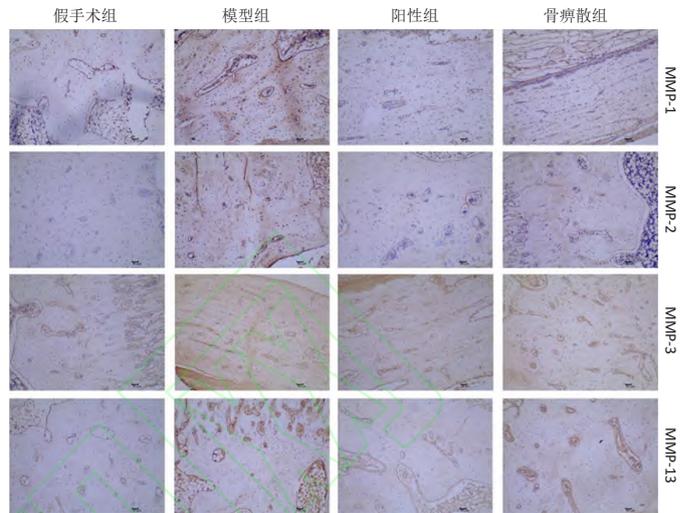
表 4 | 治疗后各组兔血清中炎症因子水平 (x̄±s, n=10)

Table 4 | The levels of inflammatory factors in serum of rabbits after treatment

组别	前列腺素 E2 (pg/mL)	环氧化酶 2 (U/L)	白细胞介素 1β (pg/mL)	肿瘤坏死因子 α (pg/mL)
假手术组	438.659±14.382	50.863±0.964	18.264±1.894	99.444±1.707
模型组	533.696±24.356 ^a	59.543±2.456 ^a	25.909±1.203 ^a	116.475±3.394 ^a
阳性组	477.974±16.536 ^b	54.341±2.279 ^b	22.588±1.766 ^b	110.831±3.946 ^b
骨痹散组	469.453±22.882 ^b	53.659±2.294 ^c	22.851±1.227 ^b	105.228±2.405 ^c
F 值	35.372	27.111	36.847	53.894
P 值	0.002	0.006	0.000	0.000

表注：与假手术组相比，^aP < 0.01；与模型组相比，^bP < 0.05，^cP < 0.01

2.5 各组兔膝关节组织中基质金属蛋白酶 1, 2, 3, 13 的表达 与假手术组相比，模型组动物膝关节软骨组织中基质金属蛋白酶 1, 2, 3, 13 蛋白表达水平显著性升高 (P < 0.05)；与模型组相比，阳性组与骨痹散组基质金属蛋白酶 1, 2, 3, 13 蛋白表达水平显著性降低 (P < 0.05)，见图 3 和表 5。



图注：各 MMP 蛋白主要表达于软骨细胞胞浆和侵蚀软骨的血管周围

图 3 | 各组兔膝关节软骨组织中基质金属蛋白酶 (MMP) 蛋白表达 (免疫组织化学染色, ×100)

Figure 3 | Expression of matrix metalloproteinases 1, 2, 3, and 13 in cartilage tissue of the rabbit knee joint after treatment (immunohistochemical staining, ×100)

表 5 | 治疗后各组兔膝关节软骨组织中基质金属蛋白酶 1, 2, 3, 13 的表达 (x̄±s, n=10, 平均吸光度值)

Table 5 | Expression of matrix metalloproteinases 1, 2, 3, and 13 in cartilage tissue of the rabbit knee joint after treatment

组别	基质金属蛋白酶 1	基质金属蛋白酶 2	基质金属蛋白酶 3	基质金属蛋白酶 13
假手术组	0.188±0.003	0.181±0.009	0.171±0.001	0.172±0.005
模型组	0.227±0.009 ^a	0.209±0.005 ^a	0.185±0.004 ^a	0.200±0.008 ^a
阳性组	0.191±0.001 ^b	0.185±0.004 ^b	0.176±0.002 ^b	0.179±0.001 ^b
骨痹散组	0.201±0.001 ^c	0.193±0.002 ^c	0.176±0.005 ^b	0.190±0.002 ^b
F 值	122.967	43.810	26.609	58.053
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

表注：与假手术组相比，^aP < 0.01；与模型组相比，^bP < 0.05，^cP < 0.01

2.6 各组兔膝关节组织中基质蛋白、凋亡蛋白与 Wnt/β-catenin 信号通路蛋白的表达 与假手术组相比，模型组动物膝关节软骨组织中 Bax、Caspase-3、Wnt5a、β-catenin 蛋白表达水平显著升高 (P < 0.05)，Bcl-2、Notch3、Hes1 蛋白表达降低 (P < 0.05)；与模型组相比，阳性组与骨痹散组 Bax、Caspase-3、Wnt5a、β-catenin 蛋白表达水平显著降低 (P < 0.05)，Bcl-2、Notch3、Hes1 蛋白表达升高 (P < 0.05)，见图 4 和表 6。

3 讨论 Discussion

骨性关节炎是关节炎最常见的形式，随着社会的老龄化和肥胖的流行，骨性关节炎的发病率预计将在未来 20 年内继续增加^[10]。骨性关节炎的特征是软骨降解和软骨下骨改变。骨赘形成，并伴有滑膜局部炎症，在膝关节也存在半月板退变和挤压的情况发生。膝关节关节炎的药物治多以对症抗炎

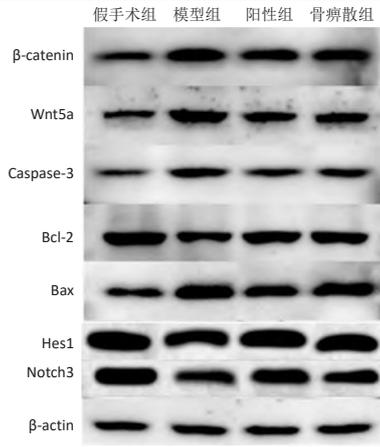


图4 | 各组兔膝关节软骨组织中 Bax、Bcl-2、Caspase-3、Wnt5a、β-catenin、Notch3、Hes1 蛋白表达
Figure 4 | Protein expression levels of Bax, Bcl-2, Caspase-3, Wnt5a, β-catenin, Notch3 and Hes1 in the knee cartilage of rabbits in each group

表6 | 各组兔膝关节软骨组织中 Notch3、Hes1、Bax、Bcl-2、Caspase-3、Wnt5a、β-catenin 的表达 (x̄±s, n=10)

Table 6 | Expression of Notch3, Hes1, Bax, Bcl-2, Caspase-3, Wnt5a, and β-catenin in the knee cartilage of rabbits in each group

组别	Bax	Notch3	Bcl-2	Hes1
假手术组	1.003±0.073	1.006±0.068	1.005±0.098	1.008±0.073
模型组	1.885±0.039 ^a	0.723±0.033 ^a	0.611±0.028 ^a	0.702±0.031 ^a
阳性组	1.379±0.185 ^c	0.935±0.037 ^c	0.854±0.046 ^c	0.923±0.038 ^c
骨痹散组	1.618±0.115 ^b	0.918±0.039 ^c	0.827±0.025 ^c	0.912±0.036 ^c
F 值	92.927	61.420	72.242	67.488
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

组别	Caspase-3	Wnt5a	β-catenin
假手术组	1.004±0.087	1.001±0.029	1.005±0.108
模型组	2.399±0.050 ^a	1.940±0.100 ^a	1.977±0.125 ^a
阳性组	1.703±0.029 ^c	1.578±0.166 ^c	1.628±0.172 ^c
骨痹散组	1.785±0.016 ^c	1.590±0.132 ^c	1.678±0.066 ^b
F 值	1 051.242	97.558	97.970
P 值	0.000	0.000	0.000

表注：与假手术组相比，^aP < 0.01；与模型组相比，^bP < 0.05，^cP < 0.01

治疗为主，另外中药可以促进局部微循环扩张，加快炎症产物代谢，以控制疼痛、改善自我报告的身体功能和生活质量为目的^[11-12]。但口服非类固醇抗炎药只能间歇性地使用最短时间和尽可能低的剂量来控制疼痛，并且会对心血管、肝脏、肾脏等器官造成不良影响^[13]。以往的研究表明，白细胞介素 1β 在骨性关节炎的发生发展中起核心作用。白细胞介素 1β 可刺激基质金属蛋白酶的产生，在骨性关节炎发病机制中可降解细胞外基质成分，如 II 型胶原和蛋白多糖等。此外，据报道，Wnt/β-catenin 和丝裂原活化蛋白激酶信号通路激活都参与了骨性关节炎的发生发展。靶向抑制白细胞介素 1β 诱导的基质金属蛋白酶过度表达可能是治疗骨性关节炎的一种潜在方法。该实验使用院内协定处方骨痹散，其中制川乌、制草乌、秦艽、威灵仙都是治疗关节炎的常用中药，具有抗炎止痛及扩张局部组织血管的功效，毒副作用小。实验结果发现，骨痹散在治疗膝骨关节炎中发挥与非类固醇抗炎药基本一致的效果，鉴于中药复方具有不良反应发生率低的优点，这对膝骨关节炎治疗药物的选择有一定的指导作用。

膝骨关节炎是以软骨组织退化、降解为主要病理特征。软骨细胞存在于软骨组织中，调节细胞外基质的分泌。细胞外基质组成和关节软骨稳态与软骨的生物力学功能密切相

关。软骨细胞依赖软骨组织稳态来维持细胞存活和正常的生物合成功能^[14]。当出现膝骨关节炎时，细胞外基质稳态被打乱，细胞外基质的合成减少，导致软骨中分解代谢酶活性增强，最终造成细胞外基质降解^[15]。Notch 信号是通过细胞表面配体和受体的相互作用激活的，这依赖于细胞与细胞之间的接触。局部微血管的生成有利炎症产物的代谢，减轻炎症症状。研究表明，Notch 受体是形成功能血管的前提，是不可或缺的要害，Notch3 受体缺少会造成血管功能障碍，影响扩张^[16-18]。Notch3 受体在动脉血管生长中具有重要地位，它参与血管平滑肌细胞的增殖、分化、成熟、凋亡等全过程。Notch3 信号途径在血管形成中的作用已经通过大量实验得到证明^[19-20]。

该研究通过对比模型组与骨痹散组动物体征与膝关节炎病理学后发现，骨痹散组兔后肢活动幅度增大，活动范围变广，食欲增加，膝关节中的软骨组织退化情况减弱，软骨结构分层逐渐清晰，缺损区域得到修复，局部微血管扩张，炎症细胞的聚集与浸润减少，说明骨痹散能从症状上缓解膝骨关节炎的进程。

膝骨关节炎发病的确切机制尚不清楚，但主要因素被认为是促炎细胞因子触发的慢性炎症，研究明白细胞介素 1β 等炎性物质是这种炎症反应的主要决定因素^[21]。白细胞介素 1β 极大地影响软骨细胞中细胞外基质的成分，干扰关键性结构蛋白的合成，同时影响软骨细胞中基质金属蛋白酶 13 等基质金属蛋白酶的合成，对软骨成分具有破坏作用^[22]。白细胞介素 1β 和肿瘤坏死因子 α 增加后，刺激软骨降解酶的生成，进一步损伤关节软骨^[23]。前列腺素是存在于滑膜液中的一类重要信号分子，而环氧合酶 2 被认为是炎症亚型因子^[24]。非类固醇抗炎药主要抑制体内环氧合酶 2，发挥抗炎与缓解疼痛效果，从而延缓膝骨关节炎发展。因此炎症细胞因子被认为是治疗膝骨关节炎的关键，而中药因为其多靶点的药理特性，在抗炎上具有巨大优势。该研究发现骨痹散能有效减少兔血清中环氧合酶 2、前列腺素 E2、白细胞介素 1β、肿瘤坏死因子 α 水平，与双氯芬酸钾凝胶的抗炎效果基本一致，说明骨痹散在膝骨关节炎的抗炎效果上与非类固醇抗炎药拥有相同的效果。

作为调控软骨关节炎的重要通路之一，Wnt/β-catenin 通路在物种间高度保守，在器官生成、细胞分化和组织重塑中发挥着核心作用，影响着软骨细胞合成与分解代谢。研究发现，软骨细胞质中的 Wnt 转运到细胞核并与 T 细胞因子 / 淋巴样增强因子转录因子相互作用以激活 β-catenin 下游靶基因表达^[25]。在膝骨关节炎中，Wnt 通路被激活，β-catenin 分泌增加，导致基质降解及功能减退，并促进骨分化、软骨降解、软骨细胞肥大和炎症反应^[26]。研究表明，在退行性软骨细胞中，β-catenin 表达水平上调，导致软骨丢失^[27]。此外，β-catenin 活化导致成年小鼠软骨细胞异常分化^[28]。基质金属蛋白酶蛋白是 Wnt/β-catenin 通路下游重要调控因子，基质金属蛋白酶蛋白表达增多会造成关节软骨的破坏，诱发膝骨关节炎^[29]。该研究发现，骨痹散组兔关节软骨组织中 Wnt/β-catenin 信号通路被抑制，Wnt5a 与 β-catenin 蛋白的表达

水平减少,同时发现凋亡蛋白 Bax 与 Caspase-3 的表达水平减少, Bcl-2 的表达水平升高,导致组织中基质金属蛋白酶 1, 2, 3, 13 分布减少,由此说明膝关节软骨细胞的降解与凋亡得到抑制,疾病进程得到延缓。

Notch3 信号通路可调控局部微血管循环,且在软骨细胞纤维化中发挥重要的调节作用,影响软骨细胞的正常增殖、分化和凋亡。研究发现,Notch3 通路有 2 个下游靶基因 Hes1 和 Hey1, Notch3 通过促进 Hes1 的表达导致软骨细胞凋亡,从而加重软骨损害程度^[30]。研究表明,抑制 Notch 通路活化,可抑制 Notch3 表达,降低 Hes1 蛋白表达,减轻膝骨关节炎炎症水平^[31-32]。该研究结果表明骨痹散能促进软骨组织 Notch3、Hes1 蛋白表达,促进内皮细胞生长,改善局部血管微循环。

综上所述,院内协定处方骨痹散具有抗炎、扩张微循环的作用,治疗膝骨关节炎的效果与非类固醇抗炎药相当,具体机制可能为通过调控 Notch3/Hes1、Wnt/ β -catenin 信号通路,促进局部微循环血管扩张,减少血清中环氧化酶 2、前列腺素 E2、白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 炎症因子的产生与组织中基质金属蛋白酶 1, 2, 3, 13 蛋白的分布。但由于膝骨关节炎的发病机制复杂,当前实验只能证明院内协定处方骨痹散在 Notch3 /Hes1、Wnt/ β -catenin 信号通路上有治疗膝骨关节炎的潜力,具有一定的局限性,今后将设计更多实验完善院内协定处方骨痹散抗膝骨关节炎的研究。

致谢:感谢万洪江等同学。

作者贡献:李东东负责实验实施、论文撰写,李晓明、吴雪莲负责实验数据分析处理,李晓明、朱凯负责指标检测,雷杨、吴雪莲、易露负责数据和文章的校对,陈光友负责实验设计。

利益冲突:文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明:这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让:文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范:该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

4 参考文献 References

[1] BEARD DJ, DAVIES LJ, COOK JA, et al. The clinical and cost-effectiveness of total versus partial knee replacement in patients with medial compartment osteoarthritis (TOPKAT): 5-year outcomes of a randomised controlled trial. *Lancet*. 2019;394(10200):746-756.

[2] YIN Z, QIAN P, WU X, et al. Unicompartmental knee arthroplasty versus total knee arthroplasty in adults with isolated medial osteoarthritis: A matched study protocol. *Medicine (Baltimore)*. 2020;99(35):e21868.

[3] 霍少川,王海彬,唐宏宇,等.补肾健脾活血中药干预膝骨关节炎模型大鼠软骨细胞 IL-1 β /ERR α /SOX9/Col2 α 1 信号通路的变化 [J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(35):5577-5581.

[4] 夏璇,王焕锐,吕媛,等.痹祺胶囊治疗膝骨关节炎的临床疗效及影像学评价 [J]. *中草药*, 2020, 51(13):3518-3522.

[5] JUNG JH, IKEDA G, TADA Y, et al. miR-106a-363 cluster in extracellular vesicles promotes endogenous myocardial repair via Notch3 pathway in ischemic heart injury. *Basic Res Cardiol*. 2021;116(1):19.

[6] LUO X, ZHANG L, HAN GD, et al. MDM2 inhibition improves cisplatin-induced renal injury in mice via inactivation of Notch/hes1 signaling pathway. *Hum Exp Toxicol*. 2021;40(2):369-379.

[7] 朱星昊,陈亚楠,魏丹丹,等.七味红花殊胜丸对肝纤维化小鼠 Notch/Hes1 信号通路的影响 [J]. *中国医院药学杂志*, 2021, 41(1):8-12.

[8] 岳宗进,刘汝银,于露,等.牛膝多糖通过 Notch1 通路影响骨髓间充质干细胞向髓核样细胞分化的机制 [J]. *西安交通大学学报 (医学版)*, 2022, 43(4):600-606.

[9] 曾凡,陈柏屹,王康,等.加味独活寄生合剂对膝骨关节炎模型兔膝关节软骨组织细胞自噬及凋亡相关蛋白的影响 [J]. *中医杂志*, 2022, 63(8):773-780.

[10] GUERMAZI A, NEOGI T, KATZ JN, et al. Intra-articular Corticosteroid Injections for the Treatment of Hip and Knee Osteoarthritis-related Pain: Considerations and Controversies with a Focus on Imaging-Radiology Scientific Expert Panel. *Radiology*. 2020;297(3):503-512.

[11] 冀海军,张永红.阳和汤含药血清对膝骨性关节炎兔膝软骨 MMP-1, MMP-3 和 TIMP-1 表达的影响 [J]. *四川中医*, 2020, 38(3):72-76.

[12] 陶金刚,黄媛媛.右归丸联合美洛昔康治疗膝骨性关节炎的临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2020, 35(10):2057-2062.

[13] ARDEN NK, PERRY TA, BANNURU RR, et al. Non-surgical management of knee osteoarthritis: comparison of ESCO and OARSI 2019 guidelines. *Nat Rev Rheumatol*. 2021;17(1):59-66.

[14] CHEN Y, WU YY, SI HB, et al. Mechanistic insights into AMPK-SIRT3 positive feedback loop-mediated chondrocyte mitochondrial quality control in osteoarthritis pathogenesis. *Pharmacol Res*. 2021;166:105497.

[15] WU X, CAI Y, LU S, et al. Intra-articular Injection of Chloramphenicol Reduces Articular Cartilage Degeneration in a Rabbit Model of Osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res*. 2019;477(12):2785-2797.

[16] 孙立平,周霞,刘炬,等.从调控血管内皮生长因子及其受体激活 Notch 信号通路角度探讨生地醇促血管新生及神经功能重塑作用 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2021, 29(11):63-68.

[17] 韩莎莎,张贺鹏,李跃峰.玻璃体腔注射 TA 对光化学诱导大鼠 BRVO 模型血管生成及 Notch 通路的影响 [J]. *国际眼科杂志*, 2020, 20(6):951-955.

[18] TURHAN Y, ARICAN M, KARADUMAN ZO, et al. Chondroprotective effect of Nigella sativa oil in the early stages of osteoarthritis: an experimental study in rabbits. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2019;19(3):362-369.

[19] ZIPPORAH E B, PATRA B, GOVARTHANAN K, et al. Defective cell proliferation is an attribute of overexpressed Notch1 receptor and impaired autophagy in Fanconi Anemia. *Genomics*. 2020;112(6):4628-4639.

[20] LEE YC, CHUNG CP, CHANG MH, et al. NOTCH3 cysteine-altering variant is an important risk factor for stroke in the Taiwanese population. *Neurology*. 2020;94(1):e87-e96.

[21] 陈谱,阮安民,周俊,等.通路止痛凝胶对不同程度膝骨性关节炎炎性免疫膜炎性程度的影响 [J]. *北京中医药大学学报*, 2020, 43(12):1011-1017.

[22] 杨少辉,许红霞,孙卫强,等.杯苋茵圃通过上调 miR-204 表达抑制 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡的实验研究 [J]. *河北医学*, 2021, 27(3):368-374.

[23] AN Y, WAN G, TAO J, et al. Down-regulation of microRNA-203a suppresses IL-1 β -induced inflammation and cartilage degradation in human chondrocytes through Smad3 signaling. *Biosci Rep*. 2020;40(3):BSR20192723.

[24] TIMUR UT, CARON MMJ, JEUKEN RM, et al. Chondroprotective Actions of Selective COX-2 Inhibitors In Vivo: A Systematic Review. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(18):6962.

[25] KAJINO-SAKAMOTO R, FUJISHITA T, TAKETO MM, et al. Synthetic lethality between MyD88 loss and mutations in Wnt/ β -catenin pathway in intestinal tumor epithelial cells. *Oncogene*. 2021;40(2):408-420.

[26] BARTOLETTI G, DONG C, UMAR M, et al. Pdgfra regulates multipotent cell differentiation towards chondrocytes via inhibiting Wnt9a/ β -catenin pathway during chondrocranial cartilage development. *Dev Biol*. 2020; 466(1-2):36-46.

[27] 李慧,马玉环,许丽梅,等.独活寄生汤拆方通过 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制软骨细胞炎症反应 [J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(35):5589-5594.

[28] XIA C, WANG P, FANG L, et al. Activation of β -catenin in Col2-expressing chondrocytes leads to osteoarthritis-like defects in hip joint. *J Cell Physiol*. 2019;234(10):18535-18543.

[29] MA L, LIU Y, ZHAO X, et al. Rapamycin attenuates articular cartilage degeneration by inhibiting β -catenin in a murine model of osteoarthritis. *Connect Tissue Res*. 2019;60(5):452-462.

[30] 冯玮,谢正松,罗岑,等.过表达 Notch 配体 Delta-like 基因的 MLO-Y4 骨细胞株的建立及其对骨髓基质细胞成骨分化的作用 [J]. *第三军医大学学报*, 2020, 42(9):899-907.

[31] SZEMES M, MELEGH Z, BELLAMY J, et al. A Wnt-BMP4 Signaling Axis Induces MSX and NOTCH Proteins and Promotes Growth Suppression and Differentiation in Neuroblastoma. *Cells*. 2020;9(3):783.

[32] ESMAIL MM, SAEED NM, MICHEL HE, et al. The ameliorative effect of niclosamide on bile duct ligation induced liver fibrosis via suppression of NOTCH and Wnt pathways. *Toxicol Lett*. 2021;347:23-35.