

· 基础研究 ·

肾髓安康饮干预小鼠膝关节炎的效果和安全性
及作用机制研究李雪枫¹, 王玉杭¹, 邹凯奥¹, 温经渊¹, 陈文哲¹, 袁文华², 肖鲁伟², 金红婷²

(1. 浙江中医药大学第一临床医学院, 浙江 杭州 310053;

2. 浙江省中医院, 浙江 杭州 310006)

摘要 目的: 探讨肾髓安康饮干预小鼠膝关节炎(knee osteoarthritis, KOA)的效果、安全性及作用机制。方法: 将 30 只 C57BL/6J 小鼠随机分为假手术组、模型组和肾髓安康饮组。模型组和肾髓安康饮组小鼠采用内侧半月板失稳术在右后肢构建 KOA 模型, 假手术组小鼠切开右后肢皮肤、暴露膝关节后缝合。自造模手术后第 2 天起, 肾髓安康饮组小鼠以肾髓安康饮浓缩液(生药浓度 $1.6 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)灌胃, 每次 0.5 mL, 每天 1 次, 连续灌胃 8 周; 模型组和假手术组小鼠以等量生理盐水灌胃。干预 8 周后, 分别采用 Up-down 法和热板实验测定小鼠机械痛阈值和热痛阈值, 采用 DigiGait 步态分析系统分析小鼠步态; 采用 Micro-CT 扫描仪扫描小鼠右膝关节, 测定胫骨平台软骨下骨的骨体积分数; 制备小鼠膝关节软骨组织切片, 采用阿尔辛蓝-苏木素/橙黄 G 染色观察膝关节软骨退变情况, 采用国际骨关节炎研究学会(Osteoarthritis Research Society International, OARSI)评分标准评价膝关节软骨退变情况, 采用免疫组织化学染色法检测膝关节软骨中 II 型胶原、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-13 的表达情况; 制备小鼠膝关节软骨下骨和 L₄ 右侧背根神经节组织切片, 采用免疫荧光染色法检测小鼠膝关节软骨下骨和 L₄ 右侧背根神经节内神经生长因子(nerve growth factor, NGF)的表达情况; 取小鼠心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏, 制备组织切片, 采用 HE 染色法观察小鼠内脏组织病变情况。**结果:** ①疼痛阈值测定结果。模型组小鼠 50% 缩足阈值低于假手术组($P=0.000$), 右后足反应时间短于假手术组($P=0.000$); 肾髓安康饮组小鼠 50% 缩足阈值高于模型组($P=0.000$), 右后足反应时间长于模型组($P=0.000$)。②步态分析结果。模型组小鼠右后肢的摆动相时间长于假手术组($P=0.001$), 支撑相时间短于假手术组($P=0.000$), 步幅和足底接触面积均小于假手术组($P=0.000, P=0.000$); 肾髓安康饮组小鼠右后肢的摆动相时间短于模型组($P=0.001$), 支撑相时间长于模型组($P=0.000$), 步幅和足底接触面积均大于模型组($P=0.000, P=0.000$)。③膝关节 Micro-CT 分析结果。模型组小鼠胫骨平台软骨下骨异常骨重塑明显, 肾髓安康饮组小鼠胫骨平台软骨下骨异常骨重塑较模型组明显减少。模型组小鼠胫骨平台软骨下骨骨体积分数大于假手术组($P=0.000$), 肾髓安康饮组小鼠胫骨平台软骨下骨骨体积分数小于模型组($P=0.000$)。④膝关节软骨组织病理学观察结果。模型组小鼠膝关节软骨磨损严重, 软骨层变薄、缺失, 裂隙深达软骨下骨; 肾髓安康饮组小鼠膝关节软骨损伤较模型组有明显好转, 软骨表面部分损伤、基质结构较完整。模型组小鼠 OARSI 评分高于假手术组($P=0.000$), 肾髓安康饮组小鼠 OARSI 评分低于模型组($P=0.000$)。⑤膝关节软骨 II 型胶原和 MMP-13 表达的检测结果。模型组小鼠膝关节软骨 II 型胶原阳性表达面积比小于假手术组($P=0.000$), MMP-13 阳性表达面积比大于假手术组($P=0.000$); 肾髓安康饮组小鼠膝关节软骨 II 型胶原阳性表达面积比大于模型组($P=0.000$), MMP-13 阳性表达面积比小于模型组($P=0.000$)。⑥膝关节软骨下骨和 L₄ 右侧背根神经节内 NGF 表达的检测结果。模型组小鼠膝关节软骨下骨和 L₄ 右侧背根神经节内 NGF 阳性表达面积比均大于假手术组($P=0.000, P=0.000$), 肾髓安康饮组小鼠膝关节软骨下骨和 L₄ 右侧背根神经节内 NGF 阳性表达面积比均小于模型组($P=0.000, P=0.000$)。⑦小鼠内脏组织病理学观察结果。3 组小鼠心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏均未见病理性改变。**结论:** 肾髓安康饮能够有效减轻 KOA 小鼠疼痛敏化和软骨退化, 且安全性高, 其作用机制可能与其能够抑制 NGF 表达、调节软骨细胞外基质代谢有关。

关键词 骨关节炎; 膝; 肾髓安康饮; 疼痛; 敏化; 软骨细胞; 神经生长因子; 小鼠**Efficacy, safety, and mechanism of Shensui Ankang Yin (肾髓安康饮) against knee osteoarthritis in mice: an experimental study**LI Xuefeng¹, WANG Yuhang¹, ZOU Kaiao¹, WEN Jingyuan¹, CHEN Wenzhe¹, YUAN Wenhua², XIAO Luwei², JIN Hongting²

基金项目: 国家自然科学基金项目(82274280); 浙江省基础公益研究计划项目(LR23H270001)

通讯作者: 金红婷 E-mail: hongtingjin@163.com

1. The First Clinical Medical College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China
2. Zhejiang Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310006, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To observe the outcomes and safety of Shensui Ankang Yin (肾髓安康饮, SSAKY) against knee osteoarthritis (KOA) in mice, and to explore its mechanism. **Methods:** Thirty C57BL/6J mice were selected and randomized into sham-operated group, model group, and SSAKY group. The mice in model group and SSAKY group were subjected to destabilization of the medial meniscus (DMM) on the right hind limbs to build KOA models, while the ones in sham-operated group were merely incised the skin at the corresponding site and then sutured after exposing the knee joints. From day 2 after the modeling surgery, the mice in SSAKY group were intervened by intragastric administration with SSAKY concentrate (the crude drug concentration was 1.6 g/mL), once a day, 0.5 mL at a time for consecutive 8 weeks; while the ones in model group and sham-operated group with the same dosage of normal saline. After 8-week intervention, the mechanical and thermal pain thresholds of the mice were measured by Up-down method and hot plate test, respectively, and the gait of the mice was analyzed using the DigiGait gait analysis system. After that, the mice were executed, and the knee joints were harvested from their right hind limbs, and scanned by Micro-CT scanner to measure the bone volume fraction (BVF) of the subchondral bone in tibial plateau. Furthermore, the knee joint cartilage tissue sections were prepared and stained with alcian blue-hematoxylin/orange G (ABH/OG) to observe the degeneration of knee joint cartilage, and then evaluate by using Osteoarthritis Research Society International (OARSI) scoring criteria, apart from that, the expression of type II collagen and matrix metalloproteinase (MMP)-13 in the knee joint cartilages was detected by employing immunohistochemical staining. In addition, the tissue sections of the subchondral bone of mice knee joints and the right dorsal root ganglion (DRG) of L₄ were prepared for detecting the expression of nerve growth factor (NGF) by immunofluorescence staining; besides, the heart, liver, spleen, lung and kidney of mice were harvested to make tissue sections for observing the histopathological changes via HE staining. **Results:** ①The pain threshold. The 50% paw withdrawal threshold (PWT) was lower, and the reaction time of the right hind paw was shorter in model group compared to sham-operated group ($P=0.000, P=0.000$); while, the 50% PWT was higher, and the reaction time of the right hind paw was longer in SSAKY group compared to model group ($P=0.000, P=0.000$). ②The gait. The model group exhibited longer swing phase duration, shorter stance phase duration, smaller stride length and paw contact area in the right hind limbs compared to the sham-operated group ($P=0.001, P=0.000, P=0.000, P=0.000$); while, the SSAKY group showed shorter swing phase duration, longer stance phase duration, greater stride length and paw contact area compared to the model group ($P=0.001, P=0.000, P=0.000, P=0.000$). ③Micro-CT analysis on the knee joints. The obviously abnormal subchondral bone remodeling was observed in the tibial plateau in mice of model group, while that was significantly improved in SSAKY group compared to model group. The BVF of subchondral bone in tibial plateau was greater in model group compared to sham-operated group, while it was smaller in SSAKY group compared to model group ($P=0.000, P=0.000$). ④The pathological observation of knee joint cartilage tissues. The changes, manifesting as severely worn cartilage with thinned and lost cartilage layer and fissures extending deep into the subchondral bone, were observed in the knee joints of mice in model group; while, compared with that of model group, the knee joint cartilage injury in mice of SSAKY group was significantly improved, only presented as partially damaged cartilage surface and a relatively intact matrix structure. The OARSI score was higher in model group compared to sham-operated group, while it was lower in SSAKY group compared to model group ($P=0.000, P=0.000$). ⑤The expression of type II collagen and MMP-13 in the knee joint cartilage. The positive expression area ratio of type II collagen in knee joint cartilage was smaller, while that of MMP-13 was greater in model group compared to sham-operated group ($P=0.000, P=0.000$); The positive expression area ratio of type II collagen in knee joint cartilage increased, while that of MMP-13 decreased in SSAKY group compared to model group ($P=0.000, P=0.000$). ⑥The expression of NGF in the subchondral bone of knee joint and the right DRG of L₄. The positive expression area ratio of NGF in the subchondral bone of knee joint and the right DRG of L₄ was greater in model group compared to sham-operated group ($P=0.000, P=0.000$), while it was smaller in SSAKY group compared to model group ($P=0.000, P=0.000$). ⑦The pathological observation of visceral tissues in mice. The pathological changes failed to be observed in the heart, liver, spleen, lung, or kidney in the mice of the 3 groups. **Conclusion:** SSAKY can effectively alleviate the pain sensitization and cartilage degeneration in KOA mice with high safety. It may work by inhibiting the expression of NGF and regulating the cartilage extracellular matrix metabolism.

Keywords osteoarthritis, knee; Shensui Ankang Yin; pain; sensitization; chondrocytes; nerve growth factor; mice

骨关节炎属于增龄性退行性疾病, 关节疼痛是其
主要临床症状, 软骨退变、软骨下骨异常骨重塑以及
关节边缘骨赘形成等是其
主要病理特征^[1-3]。骨
关节炎多累及人体承重关节, 膝骨关节炎 (knee osteoar-

thritis, KOA)是最常见的骨关节炎类型之一^[4]。随着全球人口老龄化程度的不断加剧,骨关节炎发病率呈逐年上升之势;截至 2019 年,全球范围内约有 2.5 亿人患骨关节炎,中国 KOA 患者人数超过 1.2 亿^[5]。目前,临床治疗 KOA 多以镇痛抗炎药物对症治疗,而长期服用此类药物会导致多种不良反应^[6]。中医药治疗 KOA 疗效确切,安全性高,具有独特优势^[7]。肾髓安康饮是以“浙派中医”骨伤科中的“髓系骨病”理论为指导,在右归饮的基础上根据临床经验化裁而成的针对 KOA 的中药方剂^[8]。该方以补肾强骨、益髓安痛为治法,在临床上治疗 KOA 疗效显著^[9]。为了深入探讨肾髓安康饮治疗 KOA 的疗效和安全性及其作用机制,我们进行了相关动物实验,现总结报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

10 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 30 只,体重(26 ± 2)g,购自上海必凯科翼生物科技有限公司[动物生产许可证号:SCXK(沪)2018-0006]。小鼠均于浙江中医药大学动物实验研究中心[动物使用许可证号:SYXK(浙)2021-0012]饲养,饲养温度(24 ± 2)℃,相对湿度(50 ± 10)%,12 h 明暗交替,小鼠自由饮食、饮水。实验方案经浙江中医药大学实验动物伦理委员会审查通过,伦理批件号:IACUC-202305-18。

1.2 实验药物

肾髓安康饮,药物组成包括盐杜仲 10 g、生地黄 15 g、黄芪 20 g、当归 12 g、牛膝 12 g、川芎 9 g、山萸肉 12 g、麸炒枳壳 10 g、炒白芍 15 g、炙甘草 5 g。中药饮片均购自浙江中医药大学中药饮片有限公司。采用回流法制备中药药液,将药液过滤蒸发,制备中药浓缩液(生药浓度为 1.6 g · mL⁻¹),储存备用。

1.3 实验主要试剂

阿尔辛蓝-苏木素/橙黄 G 染色液(货号: SML1466,美国 Sigma 公司),Ⅱ型胶原一抗(货号: ab34712,英国 Abcam 公司),神经生长因子(nerve growth factor,NGF)一抗(货号: ab52918,英国 Abcam 公司),基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-13 一抗(货号: A11148,爱博泰克生物科技有限公司),山羊抗小鼠荧光二抗(货号: ab150117,英国 Abcam 公司),4',6-二脒基-2-苯基吲哚染色液(货号: ab104139,英国 Abcam 公司),免疫组织化学染色试

剂盒(货号: PV-6000,北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.4 实验主要仪器和软件

North Coast Vonfrey 纤维丝测痛仪(美国 Stoelting 公司),YLS-6B 智能热板仪(美国 Mouse Specifics 公司),DigiGait 步态分析系统(美国 Mouse Specifics 公司),S-1170Micro-CT 扫描仪(比利时 Bruker 公司),VIP 5jr 组织自动脱水机(日本 Sakura 公司),Pan-noramic MIDI 数字病理切片扫描系统(匈牙利 3DHIESTECH 公司),SZX 12 体视显微镜(日本 Olympus 公司),Axio Zoom.V16 荧光正置显微镜(德国 Zeiss 公司),EC-350 石蜡包埋机(德国美康公司),CryoStar NX50 冰冻切片机(美国 Biolog 公司),RM2135 石蜡切片机(德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 动物分组与造模

将 30 只小鼠按体重排序编号,从随机数字表中选取 30 个连续随机数字记录在小鼠编号下方,再将 30 个随机数字从小到大排序,将随机数字排序 1 ~ 10 对应的小鼠纳入假手术组、11 ~ 20 对应的小鼠纳入模型组、21 ~ 30 对应的小鼠纳入肾髓安康饮组。模型组和肾髓安康饮组小鼠采用内侧半月板失稳术^[10]在右后肢构建 KOA 模型,假手术组小鼠切开右后肢皮肤、暴露膝关节后缝合。

2.2 药物干预

自造模手术后第 2 天起,肾髓安康饮组小鼠以肾髓安康饮浓缩液灌胃,每次 0.5 mL,每天 1 次,连续灌胃 8 周;模型组和假手术组小鼠以等量生理盐水灌胃。

2.3 疼痛阈值测定

2.3.1 机械痛阈值测定 干预 8 周后,采用纤维丝测痛仪,依据 Up-down 法^[11]测定小鼠的 50% 缩足阈值。

2.3.2 热痛阈值测定 干预 8 周后,采用热板实验评估小鼠热痛阈值。将小鼠置于温度为 50 ℃ 的热板上,记录小鼠上热板至舔右后足或跳跃的时间。每只小鼠测试 5 次,2 次测试间隔 5 min,取 5 次测量的平均值。右后足反应时间越短,表示小鼠热痛越敏感,即热痛阈值越低。

2.4 步态分析

干预 8 周后,将小鼠放置在以 18 cm · s⁻¹ 的速度

移动的跑道上,用相机记录小鼠在 6~10 s 内的运动状态。采用 DigiGait 步态分析系统分析小鼠步态^[12],记录小鼠右后肢摆动相时间、支撑相时间、步幅、足底接触面积。

2.5 样品收集与处理

步态分析后,采用颈椎脱位法处死小鼠。获得小鼠右后肢膝关节,置于 4% 多聚甲醛中,于 4 ℃ 固定 48 h 后转移至 75% 乙醇中,保存备用。在体视显微镜下小心剥离 L₄ 右侧背根神经节,置于 4% 多聚甲醛中,固定 1 h 后转移至 30% 蔗糖溶液中,保存备用。取各组小鼠心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏,置于 4% 多聚甲醛中,于 4 ℃ 固定 6~8 h 后转移至 75% 乙醇中,保存备用。

2.6 膝关节 Micro-CT 分析

取小鼠右后肢膝关节,采用 Micro-CT 扫描仪扫描,扫描参数为电压 75 kV、电流 200 μA、分辨率 18 μm;采用显微断层成像系统进行三维重建,提取胫骨平台软骨下骨三维重建模型,计算胫骨平台软骨下骨的骨体积分数。

2.7 膝关节软骨组织病理学观察

小鼠右后肢膝关节扫描后,依次进行脱钙、脱水、石蜡包埋等处理。切片后选取内侧膝关节软骨组织切片,采用阿尔辛蓝-苏木素/橙黄 G 染色,观察膝关节软骨退变情况,并采用国际骨关节炎研究学会(Osteoarthritis Research Society International, OARSI)评分标准^[13]评价膝关节软骨退变情况。

2.8 膝关节软骨 II 型胶原和 MMP-13 表达检测

取小鼠膝关节软骨组织切片,采用免疫组织化学染色法检测软骨中 II 型胶原、MMP-13 的表达情况。

2.9 膝关节软骨下骨和 L₄ 右侧背根神经节内 NGF 表达检测

制备小鼠膝关节软骨下骨和 L₄ 右侧背根神经节组织切片,采用免疫荧光染色法检测小鼠膝关节软骨下骨和 L₄ 右侧背根神经节内 NGF 的表达。

2.10 内脏组织病理学观察

取各组小鼠心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏,制备组织切片,采用 HE 染色法观察小鼠内脏组织病变情况。

2.11 数据统计

采用 SPSS26.0 统计软件对所得数据进行统计学分析。3 组小鼠 50% 缩足阈值、右后足反应时间、右后肢摆动相时间、右后肢支撑相时间、右后肢步幅、右

后肢足底接触面积、胫骨平台软骨下骨骨体积分数、OARSI 评分、膝关节软骨 II 型胶原阳性表达面积比、膝关节软骨 MMP-13 阳性表达面积比、膝关节软骨下骨 NGF 阳性表达面积比、L₄ 右侧背根神经节 NGF 阳性表达面积比的组间比较均采用单因素方差分析,组间两两比较均采用 LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 疼痛阈值测定结果

3 组小鼠 50% 缩足阈值、右后足反应时间比较,组间差异均有统计学意义。模型组小鼠 50% 缩足阈值低于假手术组 ($P = 0.000$),右后足反应时间短于假手术组 ($P = 0.000$);肾髓安康饮组小鼠 50% 缩足阈值高于模型组 ($P = 0.000$),右后足反应时间长于模型组 ($P = 0.000$)。见表 1。

3.2 步态分析结果

3 组小鼠右后肢摆动相时间、支撑相时间、步幅、足底接触面积比较,组间差异均有统计学意义。模型组小鼠右后肢的摆动相时间长于假手术组 ($P = 0.001$),支撑相时间短于假手术组 ($P = 0.000$),步幅和足底接触面积小于假手术组 ($P = 0.000, P = 0.000$);肾髓安康饮组小鼠右后肢的摆动相时间短于模型组 ($P = 0.001$),支撑相时间长于模型组 ($P = 0.000$),步幅和足底接触面积大于模型组 ($P = 0.000, P = 0.000$)。见表 2。

3.3 膝关节 Micro-CT 分析结果

胫骨平台软骨下骨三维重建模型显示,模型组小鼠胫骨平台软骨下骨异常骨重塑明显,肾髓安康饮组小鼠胫骨平台软骨下骨异常骨重塑较模型组明显减少(图 1)。3 组小鼠胫骨平台软骨下骨骨体积分数比较,差异有统计学意义 [$(53.811 \pm 1.488)\%$, $(88.553 \pm 2.944)\%$, $(79.061 \pm 4.569)\%$, $F = 159.414, P = 0.000$]。模型组小鼠胫骨平台软骨下骨骨体积分数大于假手术组 ($P = 0.000$),肾髓安康饮组小鼠胫骨平台软骨下骨骨体积分数小于模型组 ($P = 0.000$)。

3.4 膝关节软骨组织病理学观察结果

阿尔辛蓝-苏木素/橙黄 G 染色结果显示,假手术组小鼠膝关节软骨正常,软骨基质形态正常;模型组小鼠膝关节软骨磨损严重,软骨层变薄、缺失,裂隙深达软骨下骨;肾髓安康饮组小鼠膝关节软骨损伤较模型组有明显好转,软骨表面部分损伤、基质结构较

完整(图 2)。3 组小鼠 OARSI 评分比较,差异有统计学意义[(0.600 ± 0.418)分,(4.700 ± 0.447)分,(2.400 ± 0.418)分, $F = 115.180, P = 0.000$]。模型组小鼠 OARSI 评分高于假手术组($P = 0.000$),肾髓安康饮组 OARSI 评分低于模型组($P = 0.000$)。

3.5 膝关节软骨 II 型胶原和 MMP-13 表达的检测结果

3 组小鼠膝关节软骨 II 型胶原和 MMP-13 阳性表

达面积比组间比较,差异均有统计学意义。模型组小鼠膝关节软骨 II 型胶原阳性表达面积比小于假手术组($P = 0.000$),MMP-13 阳性表达面积比大于假手术组($P = 0.000$);肾髓安康饮组小鼠膝关节软骨 II 型胶原阳性表达面积比大于模型组($P = 0.000$),MMP-13 阳性表达面积比小于模型组($P = 0.000$)。见表 3。小鼠膝关节软骨 II 型胶原和 MMP-13 的免疫组织化学染色图分别见图 3、图 4。

表 1 3 组小鼠 50% 缩足阈值和右后足反应时间

组别	样本量/只	50% 缩足阈值/ $(\bar{x} \pm s, g)$	右后足反应时间/ $(\bar{x} \pm s, s)$
假手术组	10	0.961 ± 0.100	6.150 ± 0.601
模型组	10	0.027 ± 0.014	2.413 ± 0.226
肾髓安康饮组	10	0.702 ± 0.096	5.441 ± 0.157
<i>F</i> 值		107.495	135.221
<i>P</i> 值		0.000	0.000

表 2 3 组小鼠右后肢步态参数

组别	样本量/只	摆动相时间/ $(\bar{x} \pm s, s)$	支撑相时间/ $(\bar{x} \pm s, s)$	步幅/ $(\bar{x} \pm s, cm)$	足底接触面积/ $(\bar{x} \pm s, cm^2)$
假手术组	5	0.092 ± 0.006	0.200 ± 0.122	5.440 ± 0.894	0.784 ± 0.023
模型组	5	0.115 ± 0.037	0.100 ± 0.019	3.360 ± 0.230	0.420 ± 0.041
肾髓安康饮组	5	0.097 ± 0.040	0.154 ± 0.086	4.560 ± 0.182	0.552 ± 0.182
<i>F</i> 值		35.166	64.344	173.957	199.749
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000

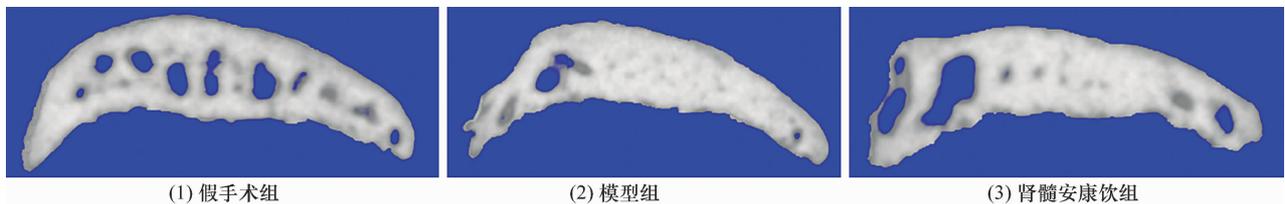


图 1 3 组小鼠胫骨平台软骨下骨三维重建模型

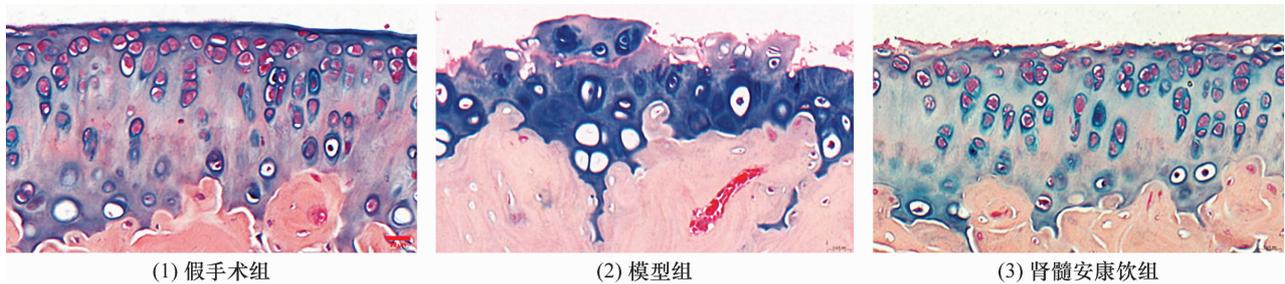


图 2 3 组小鼠膝关节软骨阿尔辛蓝-苏木素/橙黄 G 染色图($\times 500$)

表 3 3 组小鼠膝关节软骨 II 型胶原和基质金属蛋白酶-13 阳性表达面积比

组别	样本量/只	阳性表达面积比/ $(\bar{x} \pm s, \%)$	
		II 型胶原	基质金属蛋白酶-13
假手术组	5	40.223 ± 3.680	34.346 ± 4.031
模型组	5	19.498 ± 2.368	83.019 ± 0.200
肾髓安康饮组	5	54.032 ± 1.612	54.032 ± 4.591
<i>F</i> 值		60.660	209.443
<i>P</i> 值		0.000	0.000

3.6 膝关节软骨下骨和 L₄ 右侧背根神经节内 NGF 表达的检测结果

3 组小鼠膝关节软骨下骨和 L₄ 右侧背根神经节内 NGF 阳性表达面积比组间比较, 差异均有统计学意义。模型组小鼠膝关节软骨下骨和 L₄ 右侧背根神经节内 NGF 阳性表达面积比均大于假手术组 ($P = 0.000, P = 0.000$), 肾髓安康饮组小鼠膝关节软骨下骨和 L₄ 右侧背根神经节内 NGF 阳性表达面积比均小于模型组 ($P = 0.000, P = 0.000$)。见表 4。小鼠膝关节软骨下骨和 L₄ 右侧背根神经节 NGF 免疫荧光染色图分别见图 5、图 6。

3.7 小鼠内脏组织病理学观察结果

HE 染色结果显示, 3 组小鼠心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏均未见病理性改变(图 7 至图 11)。

4 讨论

KOA 是常见的一种退行性肌肉骨骼疾病, 会导致膝关节畸形和功能障碍。目前, KOA 的临床治疗尚缺乏能同时缓解疼痛和延缓疾病进展的有效手段。因此, 探寻一种安全、有效的 KOA 治疗方法具有重要的临床意义。

KOA 属中医学“骨痹”“痹证”范畴。“肾主骨生髓”是中医经典理论。中医学认为, “髓”有促精、生

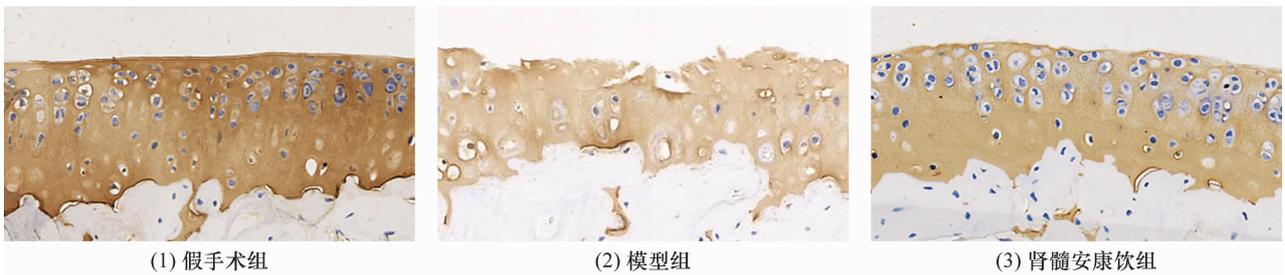


图 3 3 组小鼠膝关节软骨 II 型胶原免疫组织化学染色图 (×500)

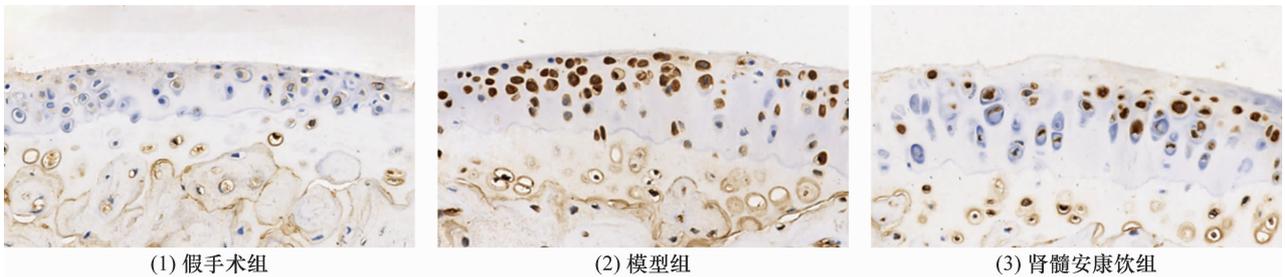
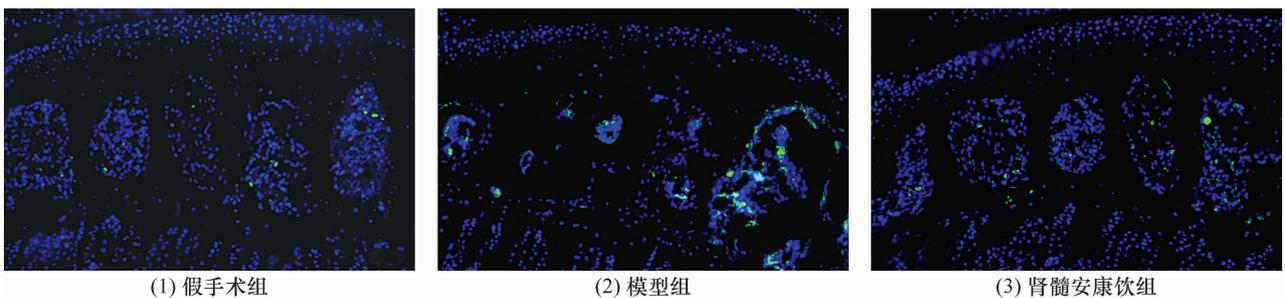


图 4 3 组小鼠膝关节软骨基质金属蛋白酶-13 免疫组织化学染色图 (×500)

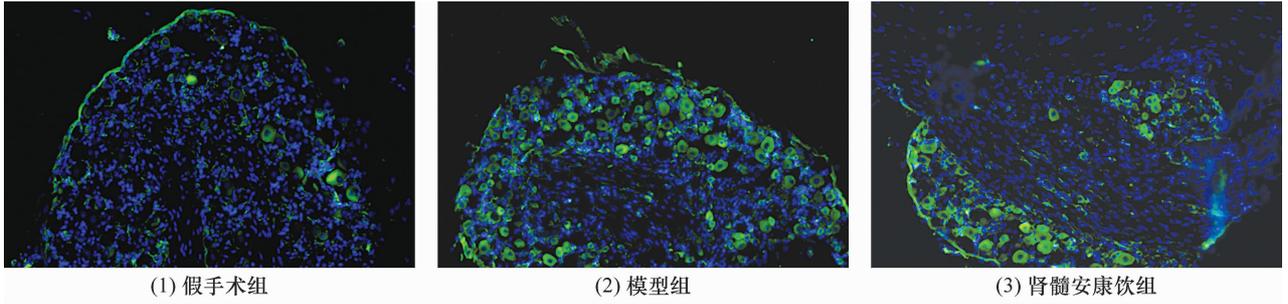
表 4 3 组小鼠膝关节软骨下骨和 L₄ 右侧背根神经节内神经生长因子阳性表达面积比

组别	样本量/只	神经生长因子阳性表达面积比/(\bar{x} ± s, %)	
		膝关节软骨下骨	L ₄ 右侧背根神经节
假手术组	5	0.886 ± 0.105	8.075 ± 0.265
模型组	5	3.641 ± 0.820	16.991 ± 1.944
肾髓安康饮组	5	2.034 ± 0.634	11.695 ± 1.657
F 值		26.481	45.746
P 值		0.000	0.000



绿色为神经生长因子, 蓝色为 4',6-二脒基-2-苯基吲哚。

图 5 3 组小鼠软骨下骨神经生长因子免疫荧光染色图 (×100)



绿色为神经生长因子,蓝色为4',6-二脒基-2-苯基吲哚。

图 6 3 组小鼠 L₄ 右侧背根神经节神经生长因子免疫荧光染色图 (×200)

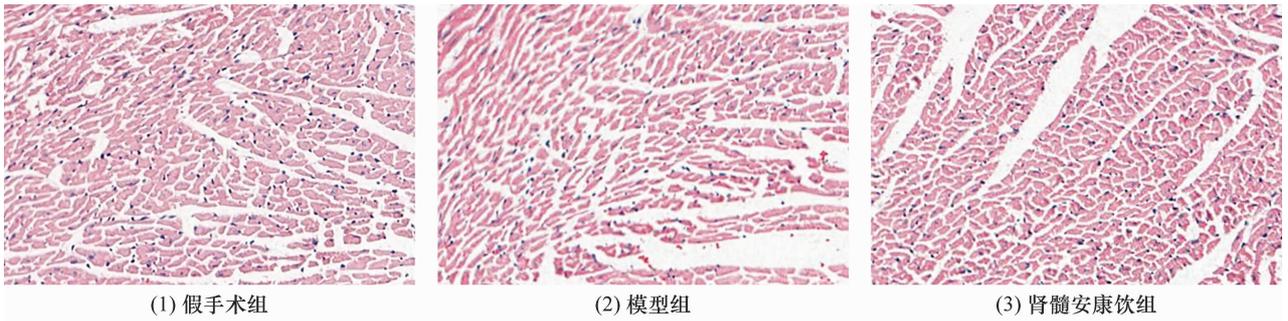


图 7 3 组小鼠心脏组织 HE 染色图 (×400)

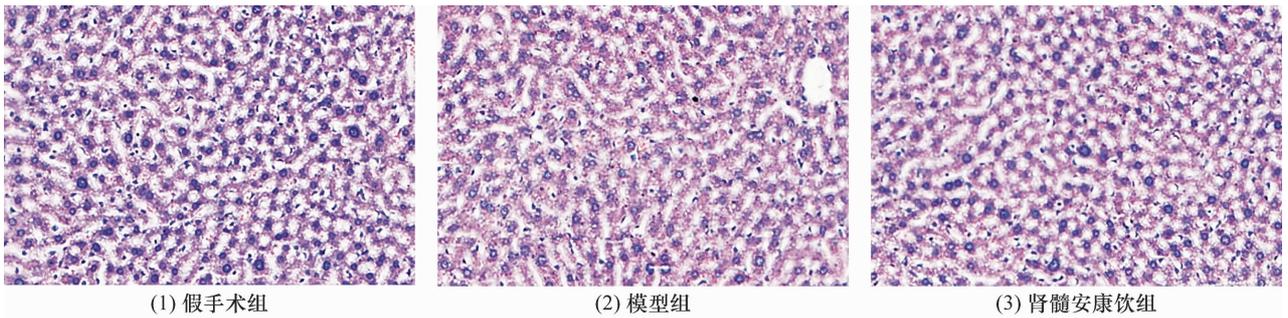


图 8 3 组小鼠肝脏组织 HE 染色图 (×400)

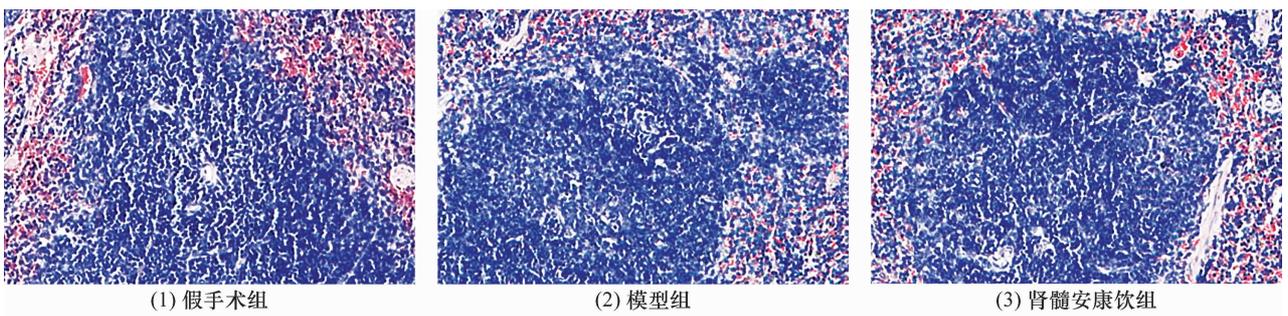


图 9 3 组小鼠脾脏组织 HE 染色图 (×400)

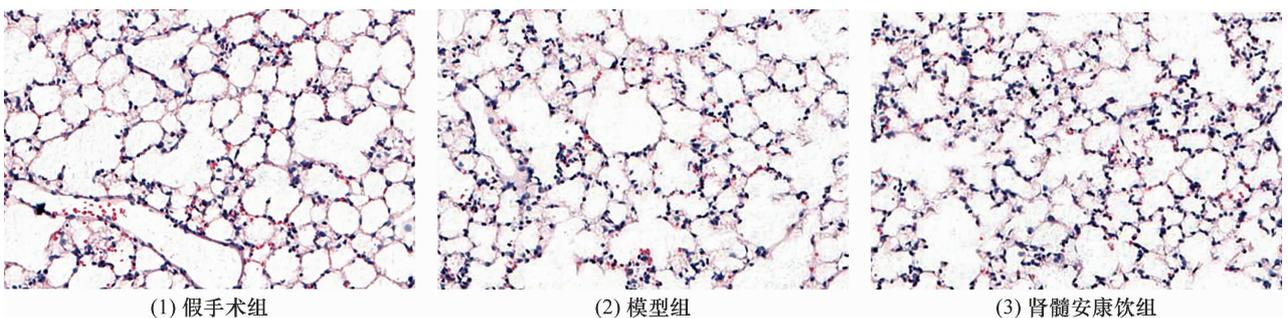


图 10 3 组小鼠肺脏组织 HE 染色图 (×400)

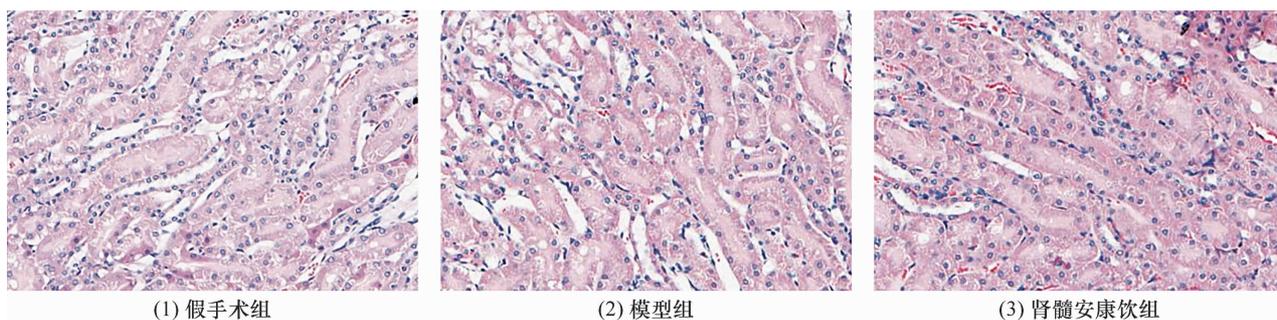


图 11 3 组小鼠肾脏组织 HE 染色图(×400)

血、养骨之效。现代研究发现,骨髓间充质干细胞与中医“髓”在功能上高度相似,其能够分化为软骨细胞、成骨细胞,促进骨修复^[14]。“浙派中医”骨伤科创立了“髓系骨病”理论,指出 KOA 的病机是“肾虚髓萎、骨枯痹痛”,并提出“补肾强骨,益髓安痛”的治法^[15]。肾髓安康饮以盐杜仲、生地黄为君药,盐杜仲补肾填髓、强筋壮骨,生地黄滋阴补血、逐痹填髓,二药合用,滋阴助阳、益肾填髓;黄芪、当归、牛膝为臣药,黄芪、当归补气生血,牛膝补肾逐瘀通经,三者合用,祛邪扶正、通经除痹;川芎为血中气药,行气破瘀、散寒柔筋,山萸肉入厥阴,补肝肾、通风痹,麸炒枳壳理气宽中,以固后天之本;炒白芍、炙甘草酸甘化阴,柔筋止痛。诸药合用,既有补肝肾、益精髓之功,又行通经止痛、行气活血之效。此外,现代药理学研究结果表明,地黄、黄芪、当归、白芍具有促进免疫调节、抑制炎症反应及缓解疼痛的作用^[16-17]。

疼痛是 KOA 的重要临床表现,也是患者就诊的首要原因。我们通过对 KOA 小鼠进行机械痛阈值、热痛阈值测定及步态分析发现,肾髓安康饮缓解了 KOA 小鼠疼痛敏化、改善了 KOA 小鼠步态。为了进一步探究肾髓安康饮缓解疼痛敏化的作用机制,我们分离了膝关节软骨下骨和 L₄ 右侧背根神经节,检测 3 组小鼠膝关节软骨下骨和 L₄ 右侧背根神经节中 NGF 的表达。软骨无血管、神经分布,而软骨下骨内密布着大量血管、神经,是 KOA 疼痛的关键触发点之一^[18]。背根神经节是由脊神经后根初级感觉神经元的胞体组成,主要的功能是传输和调节机体感觉;疼痛刺激会导致其兴奋性的增加,从而诱发外周神经疼痛敏化^[19]。NGF 是介导外周疼痛敏化的重要因子,其过量表达可导致背根神经节神经元兴奋性增加,诱发疼痛感觉^[20-21]。Zhu 等^[22]研究发现,KOA 造模可诱导小鼠膝关节软骨下骨与背根神经节中 NGF 的过量表达,促进外周疼痛敏化。本研究发现,肾髓安康

饮能够显著降低 KOA 小鼠软骨下骨和背根神经节中 NGF 的表达,进而阻断疼痛信号的传导,缓解 KOA 小鼠的外周疼痛敏化。这可能是肾髓安康饮缓解 KOA 小鼠疼痛敏化的作用机制。

软骨破坏是 KOA 进展的核心病理特征。细胞外基质对于维持关节软骨的正常生理结构和生物功能至关重要^[23]。KOA 会导致软骨中细胞外基质降解增加。Ⅱ型胶原是关节软骨和透明软骨的重要组成部分,也是软骨细胞外基质代谢的标志物。MMP-13 是 MMP 家族成员,可以降解Ⅱ型胶原,在正常组织中表达水平较低^[24]。本研究结果显示,肾髓安康饮能够通过抑制 MMP-13 的表达抑制 KOA 小鼠软骨组织中Ⅱ型胶原的降解,提示肾髓安康饮能够有效维持软骨细胞外基质的稳态,进而延缓 KOA 进展。此外,软骨下骨异常骨重塑也是 KOA 的重要病理特征之一,与软骨退化密切相关^[25]。我们采用 Micro-CT 扫描小鼠右后肢膝关节,结果显示肾髓安康饮可改善 KOA 小鼠软骨下骨异常骨重塑,认为肾髓安康饮通过改善软骨下骨微结构,间接促进软骨的修复与保护。这为“补肾强骨,益髓安痛”的中医治法提供了现代科学依据。

本研究结果表明,肾髓安康饮能够有效减轻 KOA 小鼠疼痛敏化和软骨退化,且安全性高,其作用机制可能与其能够抑制 NGF 表达、调节软骨细胞外基质代谢有关。本研究为肾髓安康饮作为临床 KOA 治疗药物提供了证据,也为中医药治疗 KOA 的有效性和安全性评价提供了重要的研究资料。但肾髓安康饮的具体作用靶点和分子机制仍需进一步探索,未来可结合转录组学、代谢组学及网络药理学等进一步深入探究。

参考文献

[1] KOLASINSKI S L, NEOGI T, HOCHBERG M C, et al. 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the management of osteoarthritis of the hand,

- hip, and knee [J]. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2020, 72(2):149-162.
- [2] HUNTER D J, BIERMA-ZEINSTRA S. Osteoarthritis [J]. *Lancet*, 2019, 393(10182):1745-1759.
- [3] 中华中医药学会. 膝关节炎中西医结合诊疗指南 (2023 年版) [J]. *中医正骨*, 2023, 35(6):1-10.
- [4] GIORGINO R, ALBANO D, FUSCO S, et al. Knee osteoarthritis: epidemiology, pathogenesis, and mesenchymal stem cells: what else is new? An update [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(7):6405.
- [5] PERRUCCIO A V, YOUNG J J, WILFONG J M, et al. Osteoarthritis year in review 2023: Epidemiology & therapy [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2024, 32(2):159-165.
- [6] 李雪枫, 袁普卫, 康武林, 等. 中成药治疗膝关节炎的研究进展 [J]. *中医正骨*, 2022, 34(5):43-48.
- [7] 中国中医药研究促进会骨科专业委员会, 中国中西医结合学会骨伤科专业委员会关节工作委员会. 膝关节炎中医诊疗专家共识 (2015 年版) [J]. *中医正骨*, 2015, 27(7):4-5.
- [8] 吴丛姿, 金红婷, 童培建. 从髓论治膝关节炎 [J]. *中医正骨*, 2021, 33(1):52-55.
- [9] 范梦强, 吕帅洁, 金红婷, 等. 调髓补中法辅助治疗膝关节炎的临床观察 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2021, 41(7):784-789.
- [10] ZHANG L, LI M, LI X, et al. Characteristics of sensory innervation in synovium of rats within different knee osteoarthritis models and the correlation between synovial fibrosis and hyperalgesia [J]. *J Adv Res*, 2021, 35:141-151.
- [11] 樊静杰, 袁普卫, 郑洁, 等. 基于脊髓大麻素受体 CB2 介导的 MAPK 信号通路探讨电针治疗膝骨性关节炎慢性痛的机制研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(13):1582-1586.
- [12] QIU M, CHENG L, XU J, et al. Liquiritin reduces chondrocyte apoptosis through P53/PUMA signaling pathway to alleviate osteoarthritis [J]. *Life Sci*, 2024, 343:122536.
- [13] CHEN Y, HU Y, YU Y E, et al. Subchondral trabecular rod loss and plate thickening in the development of osteoarthritis [J]. *J Bone Miner Res*, 2018, 33(2):316-327.
- [14] XIA C, ZOU Z, FANG L, et al. Bushenhuoxue formula promotes osteogenic differentiation of growth plate chondrocytes through β -catenin-dependent manner during osteoporosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 127:110170.
- [15] YUE W, SUN N, ZHANG J, et al. Alleviated diabetic osteoporosis and peripheral neuropathic pain by *Rehmannia glutinosa* Libosch polysaccharide via increasing regulatory T cells [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 277(Pt 4):134241.
- [16] CHEK K, YU Y, WANG Y, et al. Systematic pharmacology and experimental validation to reveal the alleviation of astragalus membranaceus regulating ferroptosis in osteoarthritis [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2024, 18:259-275.
- [17] LIU L, ZHANG B, ZHOU Z, et al. Integrated network pharmacology and experimental validation approach to investigate the mechanisms of *Radix Rehmanniae Praeparata-Angelica Sinensis-Radix Achyranthis Bidentatae* in treating knee osteoarthritis [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2024, 18:1583-1602.
- [18] GULATI M, DURSUN E, VINCENT K, et al. The influence of sex hormones on musculoskeletal pain and osteoarthritis [J]. *Lancet Rheumatol*, 2023, 5(4):e225-e238.
- [19] RAOOF R, MARTIN G C, LAFEFER F, et al. Dorsal root ganglia macrophages maintain osteoarthritis pain [J]. *J Neurosci*, 2021, 41(39):8249-8261.
- [20] OO W M, HUNTER D J. Nerve growth factor (NGF) inhibitors and related agents for chronic musculoskeletal pain: a comprehensive review [J]. *BioDrugs*, 2021, 35(6):611-641.
- [21] YU H, HUANG T, LU W W, et al. Osteoarthritis Pain [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(9):4642.
- [22] ZHU S, ZHU J, ZHEN G, et al. Subchondral bone osteoclasts induce sensory innervation and osteoarthritis pain [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(3):1076-1093.
- [23] MUSUMECI G, CASTROGIOVANGNI P, TROVATO F M, et al. Biomarkers of chondrocyte apoptosis and autophagy in osteoarthritis [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(9):20560-20575.
- [24] WERNER N C, STOKER A M, BOZYNSKI C C, et al. Characterizing correlations among disease severity measures in osteochondral tissues from osteoarthritic knees [J]. *J Orthop Res*, 2021, 39(5):1103-1112.
- [25] LI J W, WANG R L, XU J, et al. Methylene blue prevents osteoarthritis progression and relieves pain in rats via upregulation of Nrf2/PRDX1 [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(2):417-428.

(收稿日期:2025-01-17 本文编辑:吕宁)