

# 膝痹宁Ⅱ干预小鼠膝骨关节炎寒湿痹阻证的效果及作用机制研究

伏厚宇, 揭立士, 茆军, 张农山, 黄正泉, 丁亮, 邢润麟, 梅伟, 殷松江,  
吴鹏, 李晓辰, 马振源, 王培民, 张立

(南京中医药大学附属医院, 江苏 南京 210029)

**摘要 目的:**探讨膝痹宁Ⅱ干预小鼠膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)寒湿痹阻证的效果及作用机制。**方法:**将 40 只 C57BL/6J 小鼠随机分为假手术组、模型组、膝痹宁Ⅱ组、蠲痹汤组, 每组 10 只。模型组、膝痹宁Ⅱ组、蠲痹汤组小鼠均行半月板失稳术, 并在术后将小鼠置于人工气候箱(湿度 60 %、温度 4 ℃、风速 6 m·s<sup>-1</sup>)中构建 KOA 寒湿痹阻证模型; 假手术组仅切开膝关节处皮肤。造模成功后, 膝痹宁Ⅱ组和蠲痹汤组小鼠分别用 0.26 mL 的膝痹宁Ⅱ药液(生药浓度 1.0 g·mL<sup>-1</sup>)和 0.26 mL 的蠲痹汤药液(生药浓度 1.9 g·mL<sup>-1</sup>)灌胃, 假手术组和模型组小鼠均给予等量蒸馏水灌胃。每日给药 1 次, 连续给药 28 d。分别于造模开始前、造模结束后第 7 天及药物干预 7 d、14 d、21 d、28 d, 测定各组小鼠冷刺激缩足阈值和机械刺激缩足阈值。药物干预 28 d 后, 采用 ELISA 法检测小鼠血清中肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$ 、白细胞介素(interleukin, IL)-1 $\beta$  和 IL-6 的含量, 分别采用 HE 染色、Masson 染色、天狼星红染色观察小鼠膝关节滑膜组织病理变化, 采用免疫荧光法检测小鼠 L<sub>3</sub>~L<sub>5</sub> 背根神经节(dorsal root ganglia, DRG)组织中瞬时受体电位锚蛋白 1(transient receptor potential ankyrin 1, TRPA1)、瞬时受体电位香草酸 1(transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1)、瞬时受体电位褪黑素 8(transient receptor potential melastatin 8, TRPM8)通道, 采用 Western Bolt 法检测 L<sub>3</sub>~L<sub>5</sub> DRG 组织中 TRPA1、TRPV1、TRPM8、降钙素基因相关肽(calcitonin gene related peptide, CGRP)、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)的蛋白表达水平。**结果:**①小鼠冷刺激缩足阈值和机械刺激缩足阈值测定结果。造模结束后第 7 天, 模型组、膝痹宁Ⅱ组、蠲痹汤组小鼠冷刺激缩足阈值、机械刺激缩足阈值均低于假手术组( $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ;  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ), 膝痹宁Ⅱ组、蠲痹汤组小鼠冷刺激缩足阈值、机械刺激缩足阈值与模型组的差异均无统计学意义( $P=0.782$ ,  $P=0.957$ ;  $P=0.988$ ,  $P=0.986$ ), 膝痹宁Ⅱ组小鼠冷刺激缩足阈值、机械刺激缩足阈值与蠲痹汤组的差异均无统计学意义( $P=0.990$ ,  $P=0.915$ ); 药物干预 7 d、14 d、21 d、28 d, 模型组小鼠冷刺激缩足阈值、机械刺激缩足阈值均低于假手术组、膝痹宁Ⅱ组、蠲痹汤组(干预 7 d:  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ;  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ 。干预 14 d:  $P=0.000$ ,  $P=0.005$ ,  $P=0.000$ ;  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ 。干预 21 d:  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ;  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ 。干预 28 d:  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ;  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ), 膝痹宁Ⅱ组小鼠冷刺激缩足阈值、机械刺激缩足阈值与蠲痹汤组的差异均无统计学意义(干预 7 d:  $P=0.714$ ,  $P=0.767$ ; 干预 14 d:  $P=0.781$ ,  $P=0.997$ ; 干预 21 d:  $P=0.994$ ,  $P=0.762$ ; 干预 28 d:  $P=0.892$ ,  $P=0.961$ )。②小鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  含量测定结果。模型组小鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  含量均高于假手术组、膝痹宁Ⅱ组、蠲痹汤组(TNF- $\alpha$ :  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ; IL-6:  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ; IL-1 $\beta$ :  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ), 膝痹宁Ⅱ组小鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  含量与蠲痹汤组的差异均无统计学意义( $P=0.996$ ,  $P=0.950$ ,  $P=0.799$ )。③小鼠膝关节滑膜组织病理学观察结果。HE 染色显示, 模型组滑膜细胞排列紊乱, 炎性浸润明显; 膝痹宁Ⅱ组、蠲痹汤组滑膜细胞排列较整齐, 滑膜结构趋于正常, 炎性浸润明显减少。Masson 染色显示, 模型组滑膜胶原纤维排列紊乱, 胶原纤维沉积增多; 膝痹宁Ⅱ组、蠲痹汤组滑膜胶原纤维排列整齐, 滑膜结构趋于正常, 胶原纤维沉积明显减少。天狼星红染色显示, 模型组Ⅱ型胶原减少, 胶原纤维排列紊乱; 膝痹宁Ⅱ组、蠲痹汤组Ⅱ型胶原增多, 胶原纤维排列较整齐。④小鼠 L<sub>3</sub>~L<sub>5</sub> DRG 组织中 TRPA1、TRPV1、TRPM8 通道检测结果。免疫荧光染色显示, 假手术组 TRPA1、TRPV1、TRPM8 荧光强度最弱, 模型组荧光强度最强, 膝痹宁Ⅱ和蠲痹汤组荧光强度较模型组减弱。⑤小鼠 L<sub>3</sub>~L<sub>5</sub> DRG 组织中 TRPA1、TRPM8、TRPV1、NGF、CGRP 的蛋白表达水平检测结果。模型组小鼠 L<sub>3</sub>~L<sub>5</sub> DRG 组织中 TRPA1、TRPM8、TRPV1、NGF、CGRP 的蛋白相对表达量均高于假手术组、膝痹宁Ⅱ组、蠲痹汤组(TRPA1:  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ; TRPM8:  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ; TRPV1:  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ; NGF:  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ; CGRP:  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ), 膝痹宁Ⅱ组 TRPA1、TRPM8、TRPV1、

基金项目: 国家自然科学基金项目(82305276); 江苏省医学重点学科和医学重点实验室项目(JSDW202252); 江苏省中医院临床医学创新中心发展规划项目(Y2023zx05)

通讯作者: 张立 E-mail: zhang4462053@126.com

NGF、CGRP 的蛋白相对表达量与蠲痹汤组的差异均无统计学意义 ( $P=0.939, P=0.998, P=0.981, P=0.961, P=0.794$ )。结论: 膝痹宁 II 能够减轻 KOA 寒湿痹阻证模型小鼠痛觉敏化和滑膜炎症, 疗效与蠲痹汤相当, 其作用机制可能与其能抑制 DRG 组织中 TRP 通道激活有关。

**关键词** 骨关节炎; 膝; 寒湿; 痹证; 膝痹宁 II; 疼痛; 敏化; 神经节; 脊; 滑膜; 肿瘤坏死因子; 白细胞介素类; 瞬时受体电位通道; 降钙素基因相关肽; 神经生长因子; 小鼠

## Efficacy and mechanism of Xibi Ning II (膝痹宁 II) against knee osteoarthritis with cold-dampness stagnation syndrome in mice: an experimental study

FU Houyu, JIE Lishi, MAO Jun, ZHANG Nongshan, HUANG Zhengquan, DING Liang, XING Runlin, MEI Wei, YIN Songjiang, WU Peng, LI Xiaochen, MA Zhenyuan, WANG Peimin, ZHANG Li

Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu, China

**ABSTRACT** **Objective:** To observe the outcomes of Xibi Ning II (膝痹宁 II, XBN II) against knee osteoarthritis (KOA) with the syndrome of cold-dampness stagnation in mice, and to explore its underlying mechanism. **Methods:** Forty C57BL/6J mice were selected and randomized into sham-operated group, model group, XBN II group and Juanbi Tang (蠲痹汤, JBT) group, with 10 ones in each group. All mice but the ones in sham-operated group were subjected to destabilization of the medial meniscus (DMM) surgery for inducing KOA, and then housed in an artificial climate chamber (humidity: 60%, temperature: 4 °C, wind speed: 6 m/s) for further inducing the syndrome of cold-dampness stagnation, while the ones in sham-operated group were merely incised the skin at the corresponding site. After successful modeling, the mice in XBN II group and JBT group were intervened by intragastric administration with 0.26 mL XBN II solution (the crude drug concentration was 1.0 g/mL) and 0.26 mL JBT solution (the crude drug concentration was 1.9 g/mL), respectively, while the ones in the sham-operated group and model group with the same dose of distilled water, once a day for consecutive 28 days. The cold and mechanical stimulation paw withdrawal thresholds (PWTs) were measured before the modeling, on day 7 after the end of the modeling and after 7-, 14-, 21- and 28-day drug intervention, respectively. After 28-day drug intervention, the serum levels of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$ , and IL-6 were detected by ELISA. After that, the mice knee synovial tissues were harvested and stained with HE staining, Masson staining, and Sirius red staining, respectively, to observe the pathological changes. Furthermore, the channels of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1), transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1), and transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) in the L<sub>3</sub>-L<sub>5</sub> dorsal root ganglia (DRG) tissues was detected using immunofluorescence, and the protein expression levels of TRPA1, TRPV1, TRPM8, calcitonin gene related peptide (CGRP) and nerve growth factor (NGF) in the L<sub>3</sub>-L<sub>5</sub> DRG tissues were detected using Western Blot. **Results:** ①The cold and mechanical stimulation PWTs. On day 7 after the end of the modeling, the cold and mechanical stimulation PWTs were lower in model group, XBN II group and JBT group compared to sham-operated group ( $P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ), with no significant differences between XBN II group and model group, between JBT group and model group, between XBN II group and JBT group ( $P=0.782, P=0.957; P=0.988, P=0.986; P=0.990, P=0.915$ ). After 7-, 14-, 21- and 28-day drug intervention, the cold and mechanical stimulation PWTs were lower in model group compared to sham-operated group, XBN II group and JBT group (7-day intervention:  $P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000$ . 14-day intervention:  $P=0.000, P=0.005, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000$ . 21-day intervention:  $P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000$ . 28-day intervention:  $P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ), with no significant differences between XBN II group and JBT group (7-day intervention:  $P=0.714, P=0.767$ ; 14-day intervention:  $P=0.781, P=0.997$ ; 21-day intervention:  $P=0.994, P=0.762$ ; 28-day intervention:  $P=0.892, P=0.961$ ). ②The serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$ . The serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$  were higher in model group compared to sham-operated group, XBN II group and JBT group (TNF- $\alpha$ :  $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ; IL-6:  $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ; IL-1 $\beta$ :  $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ), with no significant differences between XBN II group and JBT group ( $P=0.996, P=0.950, P=0.799$ ). ③The pathological changes in the knee synovial tissues. HE staining showed that, the changes, manifesting as disorderedly arranged synovial cells with obviously inflammatory infiltration, were observed in the knee synovial tissues of mice in model group; while, compared with that of model group, the knee synovial tissues in mice of XBN II group and JBT group was significantly improved, manifesting as neatly arranged synovial cells, with basically normalized synovial tissue architecture, and markedly reduced inflammatory infiltration. Masson staining revealed that, in model group, the synovial collagen fibers were

disorderedly arranged with increased collagen fiber deposition; while, which was improved in XBN II group and JBT group, manifesting as aligned synovial collagen fibers with basically normalized synovial tissue architecture and significantly decreased collagen fiber deposition. Sirius red staining showed that, reduced type II collagen and disorganized collagen fiber arrangement were observed in the knee synovial tissues of mice in model group, while, compared with that of model group, the knee synovial tissues in mice of XBN II group and JBT group exhibited increased type II collagen with more improved arrangement in collagen fiber organization. ④The channels of TRPA1, TRPV1 and TRPM8 in the L<sub>3</sub> - L<sub>5</sub> DRG tissues. The immunofluorescence staining showed that the weakest fluorescence intensity of TRPA1, TRPV1 and TRPM8 was observed in sham-operated group, the strongest in model group, and attenuated in XBN II group and JBT group compared to model group. ⑤The protein expression levels of TRPA1, TRPM8, TRPV1, NGF, and CGRP in the L<sub>3</sub> - L<sub>5</sub> DRG tissues. The relative protein expression levels of TRPA1, TRPM8, TRPV1, NGF, and CGRP in the L<sub>3</sub> - L<sub>5</sub> DRG tissues were higher in model group compared to sham-operated group, XBN II group and JBT group (TRPA1:  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ; TRPM8:  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ; TRPV1:  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ; NGF:  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ; CGRP:  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ), with no significant differences between XBN II group and JBT group ( $P = 0.939$ ,  $P = 0.998$ ,  $P = 0.981$ ,  $P = 0.961$ ,  $P = 0.794$ ). **Conclusion:** XBN II can alleviate pain hypersensitivity and synovial inflammation in KOA model mice with the syndrome of cold-dampness stagnation, and it is similar to JBT in clinical efficacy. It may work by inhibiting the activation of TRP channels in DRG tissues.

**Keywords** osteoarthritis; knee; cold dampness; arthromyodynia; Xibi Ning II; pain; sensitization; ganglia, spinal; synovial membrane; tumor necrosis factors; interleukins; transient receptor potential channels; calcitonin gene-related peptide; nerve growth factor; mice

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是一种临床上常见的慢性关节疾病, 多发于中老年人<sup>[1-2]</sup>。该病的主要临床表现之一是膝关节疼痛, 而痛觉敏化是导致慢性疼痛的重要机制之一。背根神经节 (dorsal root ganglia, DRG) 是传导疼痛信号的初级神经元, 在 KOA 痛觉传导中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。瞬时受体电位 (transient receptor potentials, TRP) 通道是一类位于细胞膜上的离子通道蛋白家族, 广泛存在于感觉神经元中, 参与疼痛信号的传导。炎症介质如肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$ 、白细胞介素 (interleukin, IL)-1 $\beta$  等会激活 TRP 通道, 从而导致痛觉敏化<sup>[4]</sup>。因此, 探索一种能够同步调控 KOA 炎症反应和痛觉敏化的治疗策略, 对改善临床预后具有重要的意义。

膝痹宁是由江苏省名中医王培民教授基于 KOA 本虚标实的病机特点研制的中药复方, 用于治疗 KOA 寒湿痹阻证, 临床疗效显著。然而, 原方中紫河车价格昂贵且资源稀缺<sup>[5]</sup>, 何首乌长期服用存在肝肾损伤的潜在风险<sup>[6]</sup>, 限制了其临床应用。为提高疗效并降低用药风险, 王培民教授对膝痹宁进行了优化, 去除紫河车和何首乌, 增加具有养骨补髓、止血止痛功效的独一味<sup>[7]</sup>及具有缓急止痛、柔肝养阴功效的炒白芍<sup>[8]</sup>, 最终创制了膝痹宁 II。该方能够有效缓解膝关节疼痛、僵硬及活动受限等症状<sup>[9]</sup>, 同时规避了原方的安全隐患。课题组前期研究表明, 膝痹宁能够通过磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B 信号通路减轻滑膜炎

症及痛觉敏化<sup>[10]</sup>, 而膝痹宁 II 则能够通过调节线粒体自噬抑制软骨细胞凋亡<sup>[11]</sup>。为了深入探讨膝痹宁 II 干预 KOA 的效果及作用机制, 我们开展了此项研究, 现报告如下。

## 1 材料与仪器

### 1.1 实验动物

8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 40 只, 体质量 18 ~ 20 g。购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物生产许可证号: SCXK (京) 2021-0011。小鼠均于南京中医药大学实验动物中心饲养 [动物使用许可证号: SYXK (苏) 2023-0076], 饲养温度 (25 ± 2) °C, 相对湿度 40% ~ 70%, 12 h 明暗交替, 自由摄食饮水。动物实验方案由南京中医药大学实验动物伦理委员会审查通过, 伦理批件号: 202409A051。

### 1.2 实验主要试剂

TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒 (货号: JL10484, 北京江莱生物科技有限公司), IL-1 $\beta$  ELISA 试剂盒 (货号: JL18442, 北京江莱生物科技有限公司), IL-6 ELISA 试剂盒 (货号: JL20268, 北京江莱生物科技有限公司), 4% 多聚甲醛 (货号: BL-G002, 南京森贝伽生物科技有限公司), 神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 一抗 (货号: DF7522, 美国 Affinity 公司), 瞬时受体电位锚蛋白 1 (transient receptor potential ankyrin 1, TRPA1) 一抗 (货号: DF13269, 美国 Affinity 公司), 瞬时受体电位香草酸 1 (transient receptor potential va-

nilloid 1, TRPV1) 一抗(货号:DF10320, 美国 Affinity 公司), 瞬时受体电位褪黑素 8 (transient receptor potential melastatin 8, TRPM8) 一抗(货号:DF7966, 美国 Affinity 公司), 降钙素基因相关肽(calcitonin gene related peptide, CGRP) 一抗(货号:27257-1-AP, 美国 Proteintech 公司), 抗兔二抗(货号:7074, 美国 CST 公司), 放射性免疫沉淀分析裂解缓冲液(货号:P0013, 碧云天生物技术有限公司)、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量检测试剂盒(货号:P0012, 碧云天生物技术有限公司)、5 × 蛋白上样缓冲液(货号:P0015L, 碧云天生物技术有限公司)。

### 1.3 实验主要仪器

5702 型台式高速离心机(德国 Eppendorf 公司), FR900 型超低温冰箱(美国 Thermo 公司), 70-3930 型蛋白电泳仪及转膜仪系统(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方 法

### 2.1 中药药液制备

**2.1.1 膝痹宁 II 药液制备** 膝痹宁 II 组成: 淡附片 10 g, 桂枝 10 g, 烫狗脊 10 g, 山萸肉 10 g, 巴戟天 10 g, 薏苡仁 15 g, 炒白芍 10 g, 川牛膝 10 g, 独一味 10 g, 甘草片 5 g。上述药物均由南京中医药大学附属医院制剂部提供。将上述药物放入 400 mL 水中煎煮, 煮沸后用文火继续浓缩药液至 100 mL, 制成每毫升含 1.0 g 生药的药液。

**2.1.2 蠲痹汤药液制备** 蠲痹汤组成: 羌活 15 g, 独活 15 g, 秦艽 15 g, 当归 40 g, 桑枝 40 g, 川芎 9 g, 肉桂 6 g, 海风藤 20 g, 醋乳香 12 g, 木香 12 g, 炙甘草 6 g<sup>[12]</sup>。上述药物均由南京中医药大学附属医院制剂部提供。将上述药物放入 400 mL 水中煎煮, 煮沸后用文火继续浓缩药液至 100 mL, 制成每毫升含 1.9 g 生药的药液。

### 2.2 动物分组与造模

**2.2.1 分组方法** 将 40 只小鼠按体质量由大到小排序后编号, 采用 SPSS25.0 软件生成 40 个连续随机数字, 记录在小鼠编号下方, 再将 40 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 对应的小鼠纳入膝痹宁 II 组、31~40 对应的小鼠纳入蠲痹汤组。

**2.2.2 KOA 寒湿痹阻证模型建造** 各组小鼠均采用腹腔注射 0.3% 戊巴比妥钠溶液麻醉, 剂量为

0.2 mL · g<sup>-1</sup>。待麻醉成功后, 模型组、膝痹宁 II 组和蠲痹汤组小鼠行半月板失稳术, 并在术后将小鼠置于人工气候箱(设置湿度 60%、温度 4 ℃、风速 6 m · s<sup>-1</sup>) 中持续干预 15 d, 每日 1 次, 每次持续 2 h, 构建 KOA 寒湿痹阻证模型<sup>[13]</sup>; 假手术组仅切开膝关节处皮肤。

### 2.3 模型鉴定

造模结束后第 7 天, 观察各组小鼠膝关节肿胀、僵硬及局部皮温变化等情况; 分别从各组随机选取 3 只小鼠, 剪取小鼠膝关节软骨组织, 将其置于 4% 多聚甲醛中固定, 梯度脱水后石蜡包埋、切片, 进行 HE 及番红 O-固绿染色, 乙醇脱水, 二甲苯透明, 并用中性树脂封片, 置于显微镜下观察小鼠膝关节软骨组织病理学改变, 鉴定造模是否成功。

### 2.4 药物干预

造模成功后, 根据人与动物药物剂量换算标准(体表面积)<sup>[14]</sup> 计算小鼠用药剂量, 膝痹宁 II 组和蠲痹汤组小鼠分别用 0.26 mL 的膝痹宁 II 药液和 0.26 mL 蠲痹汤药液灌胃, 假手术组和模型组小鼠均给予等量蒸馏水灌胃。每日给药 1 次, 连续给药 28 d。

### 2.5 小鼠冷刺激缩足阈值和机械刺激缩足阈值测定

分别于造模开始前、造模结束后第 7 天及药物干预 7 d、14 d、21 d、28 d, 从各组抽取 6 只小鼠, 测定冷刺激缩足阈值和机械刺激缩足阈值。冷刺激缩足阈值测定方法: 在室温安静环境中将小鼠放入冷板痛觉测试仪中, 温度设定为 (0 ± 3) ℃, 记录小鼠从接触冷板到首次出现如快速缩足、舔足、跳跃等阳性反应的时间。每只测量 3 次, 每次间隔 10~15 min, 取平均值。机械刺激缩足阈值测定方法: 在室温环境中, 将小鼠置于由 1 cm × 1 cm 小格组成的金属网(金属网的四周被罩上透明塑料板)上, 待其探索行为消失后, 使用不同重量的 Von-Frey 纤维丝垂直压于后足底表面 4~5 s, 观察是否缩足并记录缩足反应的重量。每只测量 3 次, 每次间隔约 5 min, 取平均值。

### 2.6 小鼠血清中 TNF-α、IL-6、IL-1β 含量测定

干预 28 d 后, 于各组随机抽取 6 只小鼠, 采用眼球取血法收集各组小鼠血液, 室温静置 30 min, 以 1000 r · min<sup>-1</sup> 离心 30 s (离心半径为 10 cm) 后取上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书步骤检测血清 TNF-α、IL-6、IL-1β 的含量。

### 2.7 小鼠膝关节滑膜组织病理学观察

干预 28 d 后, 于各组随机抽取 3 只小鼠脱颈处

死,暴露膝关节,剪取膝关节滑膜组织,用 4% 多聚甲醛固定滑膜组织后,进行梯度脱水、包埋、切片、脱蜡后分别按照 HE 染色、Masson 染色、天狼星红染色试剂盒说明书步骤进行操作,通过显微镜进行观察小鼠膝关节滑膜组织病理变化。

## 2.8 小鼠 $L_3 \sim L_5$ DRG 组织中 TRPA1、TRPV1、TRPM8 通道检测

取膝关节滑膜组织后,剪取各组小鼠脊柱,暴露椎间孔,使用显微镊迅速取出  $L_3 \sim L_5$  相应节段的 DRG,用 4% 多聚甲醛固定 DRG 组织后,进行梯度乙醇脱水、石蜡包埋、制备切片,置于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱保存备用。取部分切片进行抗原修复、内源酶阻断和封闭处理,随后分别使用一抗、二抗进行孵育。最终 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚复染细胞核,于荧光显微镜下观察拍照。

## 2.9 小鼠 $L_3 \sim L_5$ DRG 组织中 TRPA1、TRPM8、TRPV1、NGF、CGRP 的蛋白表达水平检测

采用 Western Blot 法检测 TRPA1、TRPM8、TRPV1、NGF、CGRP 的蛋白表达水平。取保存于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱的 DRG 组织,加入组织裂解液与蛋白酶和磷酸酶抑制剂,匀浆后用 BCA 试剂盒测蛋白浓度并配平。将组织蛋白进行加样、电泳、转膜、封闭。Tris 缓冲盐溶液-吐温 20 (tris-buffered saline with tween 20, TBST) 清洗后加入 TRPA1、TRPM8、TRPV1、NGF、CGRP 一抗孵育过夜。次日,使用 TBST 清洗膜 30 min,二抗孵育 1 h, TBST 清洗膜 30 min,通过增强型化学发光液使蛋白显色曝光,采用 ImageJ 软件分析蛋白灰度值,以  $\beta$ -肌动蛋白为内参,计算 TRPA1、TRPM8、TRPV1、NGF、CGRP 的蛋白相对表达量。

## 2.10 数据统计

采用 SPSS25.0 软件进行数据统计分析。4 组小鼠冷刺激缩足阈值、机械刺激缩足阈值,血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  含量, DRG 组织中 TRPA1、TRPV1、TRPM8、NGF、CGRP 的蛋白表达水平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 模型鉴定结果

造模结束后第 7 天,与假手术组比较,造模的 3 组小鼠膝关节出现明显肿胀、僵硬,局部皮温降低,且低温刺激下疼痛反应显著加剧。HE 染色和番红 O-固绿染色显示:假手术组小鼠软骨关节面光滑平整,结构完整,细胞排列整齐,无炎性浸润;造模的 3 组小鼠软骨关节面磨损严重,结果不完整,细胞排列紊乱,大量炎性浸润(图 1、图 2)。

### 3.2 小鼠冷刺激缩足阈值和机械刺激缩足阈值测定结果

造模前,各组小鼠冷刺激缩足阈值、机械刺激缩足阈值比较,组间差异均无统计学意义。造模结束后第 7 天,模型组、膝痹宁 II 组、蠲痹汤组小鼠冷刺激缩足阈值、机械刺激缩足阈值均低于假手术组 ( $P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ),膝痹宁 II 组、蠲痹汤组小鼠冷刺激缩足阈值、机械刺激缩足阈值与模型组的差异均无统计学意义 ( $P=0.782, P=0.957; P=0.988, P=0.986$ ),膝痹宁 II 组小鼠冷刺激缩足阈值、机械刺激缩足阈值与蠲痹汤组的差异均无统计学意义 ( $P=0.990, P=0.915$ );药物干预 7 d、14 d、21 d、28 d,模型组小鼠冷

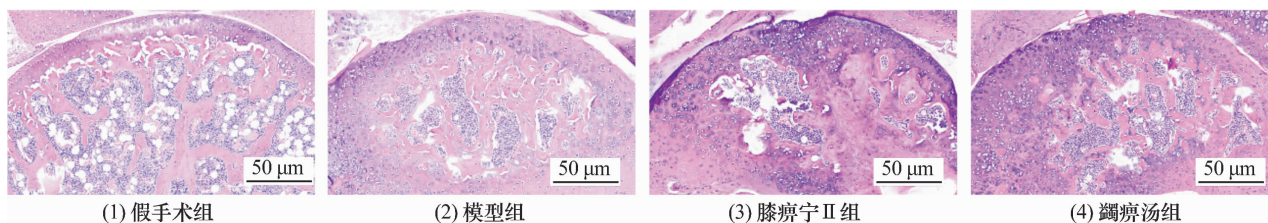


图 1 小鼠膝关节软骨组织 HE 染色结果

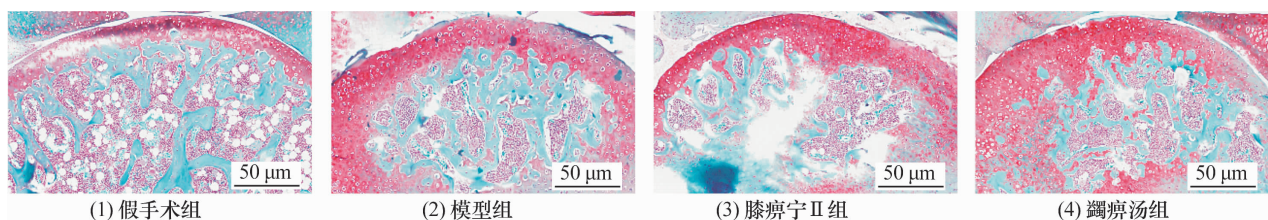


图 2 小鼠膝关节软骨组织番红 O-固绿染色结果

刺激缩足阈值、机械刺激缩足阈值均低于假手术组、膝痹宁Ⅱ组、蠲痹汤组(药物干预 7 d: $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ;  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ 。药物干预 14 d: $P=0.000$ ,  $P=0.005$ ,  $P=0.000$ ;  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ 。药物干预 21 d: $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ;  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ 。药物干预 28 d: $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ;  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ), 膝痹宁Ⅱ组小鼠冷刺激缩足阈值、机械刺激缩足阈值与蠲痹汤组的差异均无统计学意义(药物干预 7 d: $P=0.714$ ,  $P=0.767$ ; 药物干预 14 d: $P=0.781$ ,  $P=0.997$ ; 药物干预 21 d: $P=0.994$ ,  $P=0.762$ ; 药物干预 28 d: $P=0.892$ ,  $P=0.961$ )。见表 1、表 2。

3.3 小鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  含量测定结果

药物干预 28 d 后, 小鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  含量比较, 组间差异均有统计学意义。模型组小鼠血

清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  含量均高于假手术组、膝痹宁Ⅱ组、蠲痹汤组(TNF- $\alpha$ : $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ; IL-6: $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ; IL-1 $\beta$ : $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ); 膝痹宁Ⅱ组血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  含量与蠲痹汤组的差异均无统计学意义( $P=0.996$ ,  $P=0.950$ ,  $P=0.799$ )。见表 3。

3.4 小鼠膝关节滑膜组织病理学观察结果

HE 染色显示: 模型组滑膜细胞排列紊乱, 炎性浸润明显; 膝痹宁Ⅱ组、蠲痹汤组滑膜细胞排列较整齐, 滑膜结构趋于正常, 炎性浸润明显减少(图 3)。Masson 染色显示: 模型组滑膜胶原纤维排列紊乱, 胶原纤维沉积增多; 膝痹宁Ⅱ组、蠲痹汤组滑膜胶原纤维排列整齐, 滑膜结构趋于正常, 胶原纤维沉积明显减少(图 4)。天狼星红染色显示: 模型组Ⅱ型胶原减少, 胶原纤维排列紊乱; 膝痹宁Ⅱ组、蠲痹汤组Ⅱ型胶原增多, 胶原纤维排列较整齐(图 5)。

表 1 各组小鼠冷刺激缩足阈值

组别	样本量/ 只	冷刺激缩足阈值/ $(\bar{x} \pm s, s)$					
		造模前	造模结束后 第 7 天	药物干预 7 d	药物干预 14 d	药物干预 21 d	药物干预 28 d
假手术组	6	72.90 $\pm$ 4.40	73.25 $\pm$ 4.88	75.23 $\pm$ 4.37	73.05 $\pm$ 1.09	75.62 $\pm$ 3.24	72.98 $\pm$ 2.91
模型组	6	73.29 $\pm$ 3.16	40.24 $\pm$ 1.64	43.46 $\pm$ 4.26	47.29 $\pm$ 1.68	46.16 $\pm$ 2.63	47.53 $\pm$ 2.64
膝痹宁Ⅱ组	6	71.24 $\pm$ 6.08	41.98 $\pm$ 1.14	48.72 $\pm$ 1.01	56.33 $\pm$ 1.36	61.30 $\pm$ 2.98	62.81 $\pm$ 1.28
蠲痹汤组	6	73.65 $\pm$ 4.14	41.17 $\pm$ 2.98	50.63 $\pm$ 2.27	58.59 $\pm$ 3.28	61.45 $\pm$ 1.87	63.04 $\pm$ 2.75
F 值		0.270	130.469	53.537	35.644	34.592	48.545
P 值		0.895	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

表 2 各组小鼠机械刺激缩足阈值

组别	样本量/ 只	机械刺激缩足阈值/ $(\bar{x} \pm s, g)$					
		造模前	造模结束后 第 7 天	药物干预 7 d	药物干预 14 d	药物干预 21 d	药物干预 28 d
假手术组	6	22.41 $\pm$ 0.86	23.06 $\pm$ 0.81	22.59 $\pm$ 1.29	22.31 $\pm$ 0.35	22.51 $\pm$ 0.81	22.73 $\pm$ 0.97
模型组	6	22.30 $\pm$ 1.15	6.56 $\pm$ 0.91	6.63 $\pm$ 0.63	7.18 $\pm$ 0.64	7.17 $\pm$ 0.71	7.52 $\pm$ 0.28
膝痹宁Ⅱ组	6	22.61 $\pm$ 0.88	6.56 $\pm$ 0.75	10.88 $\pm$ 1.24	13.92 $\pm$ 1.06	14.96 $\pm$ 0.39	18.89 $\pm$ 1.14
蠲痹汤组	6	22.35 $\pm$ 0.83	6.71 $\pm$ 0.82	11.29 $\pm$ 1.17	13.81 $\pm$ 0.25	15.54 $\pm$ 1.09	19.15 $\pm$ 1.12
F 值		0.099	527.058	218.968	157.631	161.760	226.795
P 值		0.982	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

表 3 各组小鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  含量

组别	样本量/ 只	TNF <sup>1)</sup> - $\alpha$ 含量/ $(\bar{x} \pm s, \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1})$	IL <sup>2)</sup> -6 含量/ $(\bar{x} \pm s, \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1})$	IL <sup>2)</sup> -1 $\beta$ 含量/ $(\bar{x} \pm s, \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1})$
假手术组	6	124.00 $\pm$ 10.69	61.19 $\pm$ 8.68	44.90 $\pm$ 8.07
模型组	6	261.35 $\pm$ 27.14	126.85 $\pm$ 11.40	65.11 $\pm$ 8.64
膝痹宁Ⅱ组	6	144.09 $\pm$ 18.84	74.87 $\pm$ 9.12	54.51 $\pm$ 7.10
蠲痹汤组	6	140.47 $\pm$ 12.30	70.96 $\pm$ 5.20	53.62 $\pm$ 8.01
F 值		59.300	44.403	5.890
P 值		0.000	0.000	0.000

注: 1) 肿瘤坏死因子, 2) 白细胞介素。



### 3.5 小鼠 $L_3 \sim L_5$ DRG 组织中 TRPA1、TRPV1、TRPM8 通道检测结果

免疫荧光染色显示:假手术组 TRPA1、TRPV1、

TRPM8 荧光强度最弱,模型组荧光强度最强,膝痹宁 II 和 蠲痹汤组荧光强度较模型组减弱(图 6)。

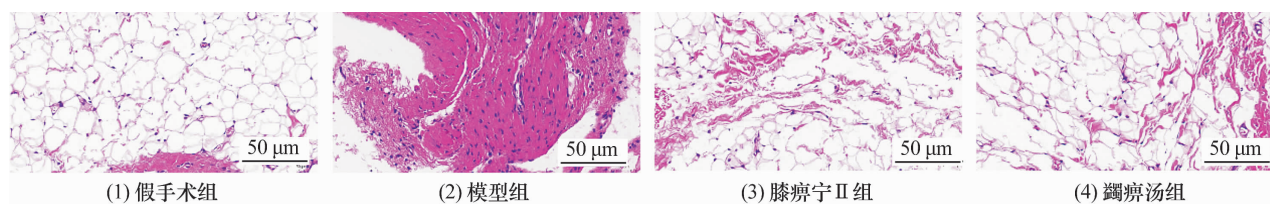


图 3 各组小鼠膝关节滑膜组织 HE 染色结果

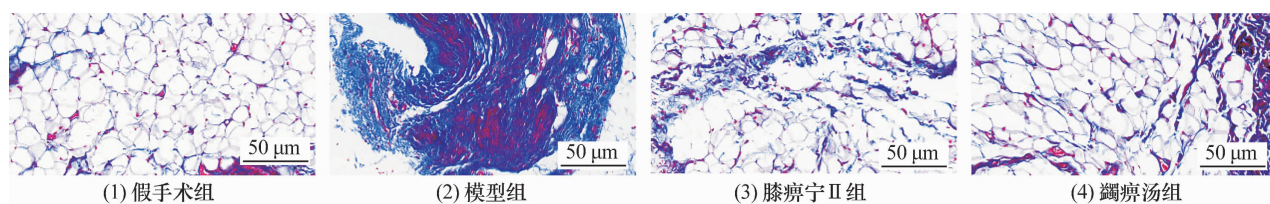


图 4 各组小鼠膝关节滑膜组织 Masson 染色结果

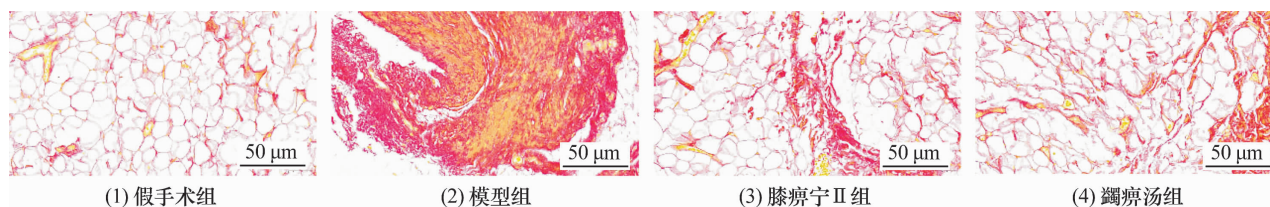
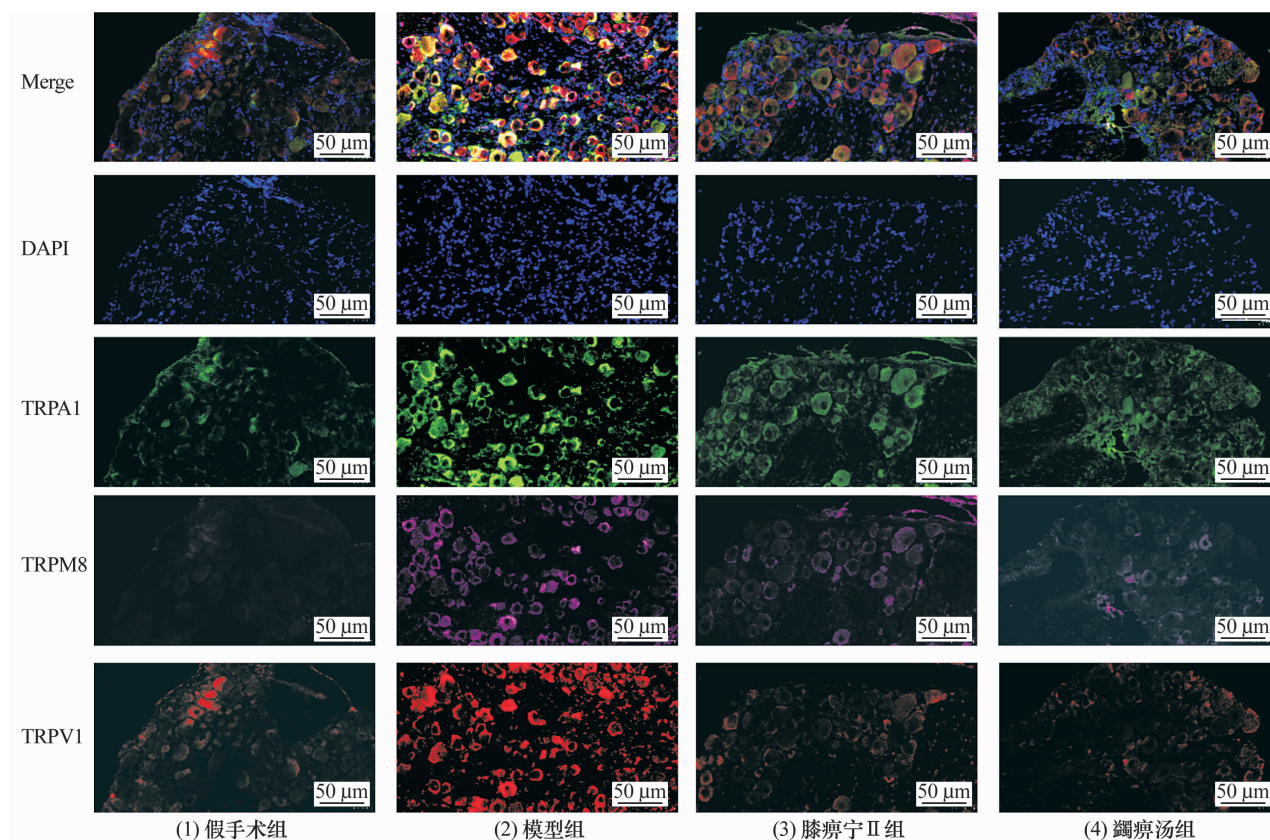


图 5 各组小鼠膝关节滑膜组织天狼星红染色结果

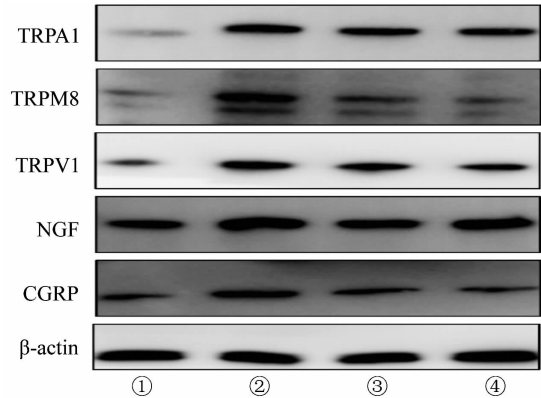


Merge 为组合图片,DAPI 为 4',6-二脒基-2-苯基吡啶,TRPA1 为瞬时受体电位锚蛋白 1,TRPM8 为瞬时受体电位褪黑素 8,TRPV1 为瞬时受体电位香草酸 1。

图 6 各组小鼠  $L_3 \sim L_5$  背根神经节组织中 TRPA1、TRPV1、TRPM8 通道免疫荧光染色结果

### 3.6 小鼠 $L_3 \sim L_5$ DRG 组织中 TRPA1、TRPM8、TRPV1、NGF、CGRP 的蛋白表达水平检测结果

各组小鼠  $L_3 \sim L_5$  DRG 组织中 TRPA1、TRPM8、TRPV1、NGF、CGRP 的蛋白相对表达量比较,组间差异均有统计学意义。模型组小鼠  $L_3 \sim L_5$  DRG 组织中 TRPA1、TRPM8、TRPV1、NGF、CGRP 的蛋白相对表达量均高于假手术组、膝痹宁 II 组、蠲痹汤组 (TRPA1:  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ; TRPM8:  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ; TRPV1:  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ; NGF:  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ; CGRP:  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ); 膝痹宁 II 组 TRPA1、TRPM8、TRPV1、NGF、CGRP 的蛋白相对表达量与蠲痹汤组的差异均无统计学意义 ( $P=0.939$ ,  $P=0.998$ ,  $P=0.981$ ,  $P=0.961$ ,  $P=0.794$ )。见图 7、表 4。



TRPA1 为瞬时受体电位锚蛋白 1, TRPM8 为瞬时受体电位褪黑素 8, TRPV1 为瞬时受体电位香草酸 1, NGF 为神经生长因子, CGRP 为降钙素基因相关肽,  $\beta$ -actin 为  $\beta$ -肌动蛋白, ①为假手术组, ②为模型组, ③为膝痹宁 II 组, ④为蠲痹汤组。

图 7 各组小鼠  $L_3 \sim L_5$  背根神经节组织中 TRPA1、TRPM8、TRPV1、NGF、CGRP 的蛋白表达 Western Blot 法检测图片

表 4 各组小鼠  $L_3 \sim L_5$  背根神经节组织中 TRPA1、TRPM8、TRPV1、NGF、CGRP 的蛋白相对表达量

分组	样本量/只	TRPA1 <sup>1)</sup> 蛋白相对表达量 ( $\bar{x} \pm s$ )	TRPM8 <sup>2)</sup> 蛋白相对表达量 ( $\bar{x} \pm s$ )	TRPV1 <sup>3)</sup> 蛋白相对表达量 ( $\bar{x} \pm s$ )	NGF <sup>4)</sup> 蛋白相对表达量 ( $\bar{x} \pm s$ )	CGRP <sup>5)</sup> 蛋白相对表达量 ( $\bar{x} \pm s$ )
假手术组	3	0.35 $\pm$ 0.01	0.40 $\pm$ 0.06	0.29 $\pm$ 0.07	0.31 $\pm$ 0.08	0.39 $\pm$ 0.06
模型组	3	1.31 $\pm$ 0.10	1.10 $\pm$ 0.08	1.61 $\pm$ 0.05	1.29 $\pm$ 0.04	1.28 $\pm$ 0.09
膝痹宁 II 组	3	0.57 $\pm$ 0.04	0.54 $\pm$ 0.02	0.54 $\pm$ 0.01	0.65 $\pm$ 0.03	0.53 $\pm$ 0.06
蠲痹汤组	3	0.55 $\pm$ 0.06	0.56 $\pm$ 0.01	0.52 $\pm$ 0.08	0.63 $\pm$ 0.05	0.51 $\pm$ 0.03
F 值		131.520	69.801	42.703	11.001	65.764
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 1) 瞬时受体电位锚蛋白 1, 2) 瞬时受体电位褪黑素 8, 3) 瞬时受体电位香草酸 1, 4) 神经生长因子, 5) 降钙素基因相关肽。

## 4 讨论

KOA 属中医学“痹证”“骨痹”“鹤膝风”等范畴。《素问·痹论》曰:“风寒湿三气杂至, 合而为痹也。”KOA 多因风寒湿三邪侵袭人体, 痹阻经络, 筋脉失养, 致“不通则痛”<sup>[15]</sup>。寒湿痹阻证在 KOA 中较为常见, 其典型症状为膝关节疼痛 (遇冷加剧、得温痛减、昼轻夜重), 部分患者还伴有膝关节肿胀<sup>[16]</sup>。目前, 临床上治疗 KOA 的目标以缓解临床症状为主, 同时尽可能延缓疾病进程。近年来, 中医药在 KOA 临床治疗中的应用日益广泛, 一些基础研究<sup>[17-19]</sup> 也为其治疗 KOA 提供了依据。

王培民教授针对痹证的病因及临床特点, 以“除寒凝, 通经络, 补肝肾, 强筋骨”为治法, 创立了膝痹宁方<sup>[20]</sup>, 专用于治疗 KOA 寒湿痹阻证。因原方中紫河车、何首乌的应用限制, 进一步优化创制了膝痹宁 II<sup>[21]</sup>。该方以淡附片、桂枝为君药, 温阳益肾、宣痹通络; 臣以山萸肉、巴戟天、烫狗脊, 补肝肾、除风湿、

强筋骨; 佐以独一味活血消肿止痛, 炒白芍和薏苡仁健脾利湿; 甘草为使药, 缓急止痛、调和诸药。全方共奏温经散寒、活血通络、补益肝肾之效。

蠲痹汤源自于《医学心悟》, 是中医治疗寒湿痹阻证的经典方剂。其组方原则与膝痹宁 II 相似, 皆以温经散寒、活血通络为核心治法。该方由羌活、独活、桑枝等药物组成, 具有祛风除湿、温经止痛的功效, 在 KOA 寒湿痹阻证的临床治疗中备受推崇。选用蠲痹汤作为对照方剂, 主要基于以下原因: 其一, 该方与膝痹宁 II 在治法上具有可比性; 其二, 该方作为经典名方, 其疗效已得到长期临床实践验证, 具有明确的参照价值和临床意义。

TRP 通道具有感知并响应局部微环境变化的生物学特性。研究<sup>[22]</sup> 表明, 炎症介质可激活 TRP 通道, 其通道开放后会放大所受到刺激的信号。持续的伤害性刺激使神经元敏感化增强, 表现为阈值下降、反应时程缩短和强度增强, 即痛觉敏化的产生<sup>[23]</sup>。TRP



通道在 KOA 模型动物的 DRG 组织中呈现高表达与活化状态;TRPM8、TRPA1、TRPV1 离子通道的激活与 KOA 疼痛的发生密切相关,是调控疼痛信号传导的关键靶点<sup>[24]</sup>。因此,特异性阻断这些离子通道可有效抑制疼痛信号的传导,从而提高疼痛阈值。在膝痹宁 II 的有效成分中,来源于独一味的木犀草素能够通过抑制小鼠脊髓背角中 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 炎症小体和神经胶质细胞的激活,发挥镇痛作用<sup>[25]</sup>;来源于山萸肉的没食子酸能够通过调控大鼠脊髓中 P2X7 受体,减轻慢性疼痛<sup>[26]</sup>;来源于川牛膝的阿魏酸能够通过 Toll 样受体 4/核因子  $\kappa$ B 通路,抑制神经炎症,缓解疼痛<sup>[27]</sup>。基于上述多靶点协同作用机制,我们推测膝痹宁 II 可通过调节 TRP 通道活性及其下游炎症信号,有效改善 KOA 模型动物的痛觉敏化状态,从而缓解疼痛症状。

课题组前期临床研究显示,膝痹宁 II 能够显著缓解 KOA 患者疼痛症状、改善膝关节功能<sup>[28]</sup>;同时基础研究也证实,该方在减轻滑膜炎、缓解滑膜纤维化和保护关节软骨方面具有显著作用<sup>[29-31]</sup>。基于此,本研究聚焦于疼痛敏感核心靶点 TRP 通道蛋白,深入探究膝痹宁 II 减轻 KOA 痛觉敏化的作用机制。研究表明<sup>[32]</sup>,TRPM8、TRPV1 和 TRPA1 通道分别作为冷觉、机械压力和热觉的感受器发挥作用。本研究结果显示,与假手术组相比,模型组小鼠对伤害性刺激的耐受阈值显著下降,小鼠  $L_3 \sim L_5$  DRG 组织中 TRPM8、TRPV1 和 TRPA1 的表达明显上调;经药物干预后,膝痹宁 II 组及蠲痹汤组小鼠对伤害性刺激的耐受阈值较模型组明显提高,TRP 通道活化程度显著降低。通过 Western Blot 法检测疼痛相关介质 NGF、CGRP 的表达,结果显示:模型组小鼠 DRG 组织中 NGF、CGRP 的蛋白相对表达量较假手术组显著升高;经药物干预后,膝痹宁 II 组及蠲痹汤组小鼠 DRG 组织中 NGF、CGRP 的蛋白相对表达量均明显降低,且两组比较无明显差异。小鼠血清 ELISA 检测及膝关节滑膜组织病理学检测显示,膝痹宁 II 能显著降低 KOA 小鼠血清中 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等炎症因子水平,改善滑膜炎。

本研究结果显示,膝痹宁 II 能够减轻 KOA 寒湿痹阻证模型小鼠痛觉敏化和滑膜炎,疗效与蠲痹汤相当,其作用机制可能与其能抑制 DRG 组织中 TRP 通道激活有关。然而,本研究为动物实验,且该复方

药物成分复杂,具体机制仍需进一步研究与验证,为其临床应用提供更丰富的理论支持。

## 参考文献

- [1] MICHAEL J W, SCHLÜTER-BRUST K U, EYSEL P. The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee [J]. Dtsch Arztebl Int, 2010, 107 (9): 152 - 162.
- [2] 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.
- [3] MONTAGUE-CARDOSO K, MALCANGIO M. The role of microRNAs in neurons and neuroimmune communication in the dorsal root ganglia in chronic pain [J]. Neurosci Lett, 2020, 735: 135230.
- [4] XU S, WANG Y. Transient receptor potential channels: multiple modulators of peripheral neuropathic pain in several rodent models [J]. Neurochem Res, 2024, 49 (4): 872 - 886.
- [5] 徐承平. 紫河车价格狂涨 [J]. 中药材, 1995 (5): 273.
- [6] 宋海波, 沈传勇. 中药安全用药与风险防控的探索及实践——以何首乌为例的安全风险管理 [J]. 中国食品药品监管, 2020 (12): 12 - 18.
- [7] 葛珈铭, 索南昂旦, 康生福, 等. 藏族药独一味本草考证 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29 (14): 164 - 172.
- [8] 刘春华, 樊碧发, 张媛婧, 等. 基于网络药理学及分子对接探讨枳实-白芍药对镇痛的作用机制 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2024, 30 (7): 501 - 508.
- [9] 张力, 刘子修, 廖太阳, 等. 基于 UPLC-Q-Orbitrap MS/MS 技术研究膝痹宁对 KOA 模型大鼠的软骨保护效应 [J]. 南京中医药大学学报, 2023, 39 (1): 32 - 41.
- [10] JIE L, ZHANG L, FU H, et al. Xibining inhibition of the PI3K-AKT pathway reduces M1 macrophage polarization to ameliorate KOA synovial inflammation and nociceptive sensitization [J]. Phytomedicine, 2024, 136: 156281.
- [11] 康俊峰, 揭立士, 伏厚宇, 等. 膝痹宁 II 联合脂肪干细胞外泌体调控线粒体自噬改善膝骨关节炎的机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30 (11): 111 - 119.
- [12] 梁绿圆, 张进彦, 曹佳蕾, 等. 经典名方蠲痹汤的古代文献分析与考证 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30 (24): 190 - 197.
- [13] MAO X, LI W, CHEN W, et al. Exploring and characterizing a novel combination of paeoniflorin and talatizidine for the treatment of rheumatoid arthritis [J]. Pharmacol Res, 2020, 153: 104658.

- [14] 赵伟,孙国志. 不同种实验动物间用量换算[J]. 畜牧兽医科技信息, 2010(5):52-53.
- [15] 梅伟,谷远洋,曹子丰,等. 周福胎教授治疗痛风性关节炎临床经验[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2024, 32(7): 85-87.
- [16] 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.
- [17] MARIANO A, DI SOTTO A, LEOPIZZI M, et al. Antiarthritic effects of a root extract from harpagophytum procumbens DC: novel insights into the molecular mechanisms and possible bioactive phytochemicals[J]. Nutrients, 2020, 12(9): 2545.
- [18] WU K C, WENG H K, HSU Y S, et al. Aqueous extract of arctium lappa L. root (burdock) enhances chondrogenesis in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. BMC Complement Med Ther, 2020, 20(1):364.
- [19] 吴鹏,单进军,黄正泉,等. 丁公藤对大鼠膝关节炎滑膜炎及痛阈的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(6):837-841.
- [20] 王培民. 王培民效方治验——膝痹宁方[J]. 江苏中医药, 2021, 53(2):5-6.
- [21] 康俊峰,茆军,揭立士,等. 王培民教授从寒湿致病探讨膝关节炎病机及辨治经验[J]. 现代中医药, 2025, 45(2):72-76.
- [22] KOIVISTO A P, BELVISI M G, GAUDET R, et al. Advances in TRP channel drug discovery: from target validation to clinical studies[J]. Nat Rev Drug Discov, 2022, 21(1): 41-59.
- [23] DAHMANI D, TAIK F Z, BERRICHI I, et al. Impact of central sensitization on pain, disability and psychological distress in patients with knee osteoarthritis and chronic low back pain[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2023, 24(1): 877.
- [24] LIANG H Y, YIN H X, LI S F, et al. Calcium-permeable channels cooperation for rheumatoid arthritis: therapeutic opportunities[J]. Biomolecules, 2022, 12(10):1383.
- [25] ZHOU Y S, CUI Y, ZHENG J X, et al. Luteolin relieves lung cancer-induced bone pain by inhibiting NLRP3 inflammasomes and glial activation in the spinal dorsal horn in mice[J]. Phytomedicine, 2022, 96:153910.
- [26] WEN L, TANG L, ZHANG M, et al. Gallic acid alleviates visceral pain and depression via inhibition of P2X7 Receptor[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(11):6159.
- [27] ZHANG D, JING B, CHEN Z N, et al. Ferulic acid alleviates sciatica by inhibiting neuroinflammation and promoting nerve repair via the TLR4/NF- $\kappa$ B pathway[J]. CNS Neurosci Ther, 2023, 29(4):1000-1011.
- [28] 曹子丰,梅伟,张立,等. 膝痹宁 II 方内服治疗寒湿痹阻型膝关节炎临床疗效的回顾性队列研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(14):122-129.
- [29] 廖太阳,马振源,邢润麟,等. 膝痹宁 II 方对膝关节炎软骨细胞铁死亡及 Nr2/GPX4 信号通路的影响[J]. 中华中医药杂志, 2024, 39(10):5182-5188.
- [30] 张力,黄正泉,李晓辰,等. 膝痹宁对膝关节炎模型大鼠滑膜纤维化的影响[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(1): 29-32.
- [31] 张力,张立,邢润麟,等. 基于缺氧组织中 NLRP3 炎症小体的活化研究膝痹宁减轻 KOA 滑膜炎的效应机制[J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(1):68-72.
- [32] MATTA C, TAKÁCS R, DUCZA L, et al. Ion channels involved in inflammation and pain in osteoarthritis and related musculoskeletal disorders[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2023, 325(1):C257-C271.

(收稿日期:2024-12-30 本文编辑:时红磊)

(上接第 19 页)

- [31] MIRZA A Z, ALTHAGAFI I I, SHAMSHAD H. Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: physiological importance and clinical implications[J]. Eur J Med Chem, 2019, 166:502-513.
- [32] WANG J, GUO L, SHEN D, et al. The role of c-SKI in regulation of TGF $\beta$ -induced human cardiac fibroblast proliferation and ECM protein expression[J]. J Cell Biochem, 2017, 118(7):1911-1920.
- [33] 李工博,李军,曾益军,等. PPAR $\gamma$  对 TGF $\beta$ /smad 信号通路阻遏子 c-Ski 的上调作用[J]. 生理学报, 2011, 63(1):62-68.
- [34] 康毅,罗伟生,黄红,等. 荔枝核总黄酮对肝纤维化大鼠模型 PPAR $\gamma$ /c-Ski 表达的影响[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2016, 18(1):106-111.
- [35] WANG F, FAN K, ZHAO Y, et al. Apigenin attenuates TGF- $\beta$ 1-stimulated cardiac fibroblast differentiation and extracellular matrix production by targeting miR-155-5p/c-Ski/Smad pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 265: 113195.
- [36] BAUMANN A, BURGER K, BRANDT A, et al. GW9662, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma antagonist, attenuates the development of non-alcoholic fatty liver disease[J]. Metabolism, 2022, 133:155233.

(收稿日期:2025-01-17 本文编辑:吕宁)