

# 毛冬青汤干预大鼠膝关节炎的疗效及作用机制研究

何宇, 贾琼, 罗虎, 赵俊淞, 罗凌威, 曹雨林, 张作夫

(湖南中医药大学附属省直中医医院, 湖南 株洲 412000)

**摘要 目的:**探讨毛冬青汤干预大鼠膝关节炎(knee osteoarthritis, KOA)的疗效及作用机制。**方法:**将 45 只雄性 SD 大鼠随机分为空白对照组、假手术组、模型组、毛冬青汤组和塞来昔布组, 每组 9 只。模型组、毛冬青汤组和塞来昔布组大鼠采用 Hulth 法建立右侧 KOA 模型; 假手术组大鼠仅切开右侧膝关节内侧皮肤及皮下组织, 暴露关节腔后缝合; 空白对照组大鼠不进行任何处理。造模后 4 周, 毛冬青汤组大鼠按照生药量  $5.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  以毛冬青汤药液灌胃, 塞来昔布组大鼠按照  $12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  以塞来昔布溶液灌胃, 空白对照组、假手术组和模型组按照  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  以生理盐水灌胃。连续干预 8 周后, 采用 ELISA 试剂盒检测血清白细胞介素(interleukin, IL)-1 $\beta$ 、IL-6、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )含量, 采用 Micro-CT 分析胫骨平台软骨下骨的骨体积分数、骨矿物质含量、骨小梁数量, 采用番红 O-固绿染色观察膝关节软骨组织病理改变, 采用实时定量 PCR 检测膝关节软骨组织中 Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)4、髓系分化初级反应蛋白 88(myeloid differentiation primary response protein 88, MyD88)、核因子  $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)的 mRNA 表达水平, 采用 Western Blot 法检测膝关节滑膜组织中 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 的蛋白表达水平。**结果:**①血清促炎性细胞因子含量检测结果。假手术组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  含量均高于空白对照组( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ); 模型组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  含量均高于假手术组( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ); 毛冬青汤组、塞来昔布组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  含量均低于模型组( $P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ); 毛冬青汤组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6 与塞来昔布组的差异均无统计学意义( $P=1.000, P=0.397$ ), TNF- $\alpha$  含量高于塞来昔布组( $P=0.001$ )。②胫骨平台软骨下骨微结构检测结果。5 组大鼠胫骨平台软骨下骨骨体积分数比较, 组间差异无统计学意义( $F=2.642, P=0.097$ )。模型组大鼠胫骨平台软骨下骨骨矿物质含量低于假手术组( $P=0.030$ ), 骨小梁数量与假手术组的差异无统计学意义( $P=0.592$ ); 毛冬青汤组和塞来昔布组大鼠胫骨平台软骨下骨骨矿物质含量均高于模型组( $P=0.008, P=0.007$ ), 骨小梁数量均多于模型组( $P=0.001, P=0.001$ ); 毛冬青汤组大鼠胫骨平台软骨下骨骨矿物质含量、骨小梁数量与塞来昔布组的差异均无统计学意义( $P=1.000, P=1.000$ )。③膝关节软骨组织病理学观察结果。模型组大鼠表层软骨大面积剥脱, 软骨细胞簇集, 软骨基质染色较浅; 毛冬青汤组和塞来昔布组大鼠表层软骨缺损较模型组减轻, 软骨细胞排列较规律, 软骨基质染色较深, 其中毛冬青汤组大鼠软骨基质染色深于塞来昔布组。④膝关节软骨组织中 TLR4-MyD88-NF- $\kappa$ B 信号通路相关基因的 mRNA 表达水平检测结果。模型组大鼠膝关节软骨组织中 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 的 mRNA 相对表达量均高于假手术组( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ); 塞来昔布组和毛冬青汤组大鼠膝关节软骨组织中 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 的 mRNA 相对表达量均低于模型组( $P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000$ ); 毛冬青汤组大鼠膝关节软骨组织中 TLR4 的 mRNA 相对表达量高于塞来昔布组( $P=0.011$ ), MyD88、NF- $\kappa$ B 的 mRNA 相对表达量与塞来昔布组的差异均无统计学意义( $P=0.975, P=0.264$ )。⑤膝关节滑膜组织中 TLR4-MyD88-NF- $\kappa$ B 信号通路相关基因的蛋白表达水平检测结果。模型组大鼠滑膜组织中 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 的蛋白相对表达量均高于假手术组( $P=0.000, P=0.000, P=0.017$ ); 毛冬青汤组和塞来昔布组大鼠滑膜组织中 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 的蛋白相对表达量均低于模型组( $P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.003; P=0.006, P=0.000$ ); 毛冬青汤组大鼠膝关节软骨组织中 MyD88 的蛋白相对表达量低于塞来昔布组( $P=0.006$ ), TLR4、NF- $\kappa$ B 的蛋白相对表达量与塞来昔布组的差异均无统计学意义( $P=0.366, P=1.000$ )。**结论:**毛冬青汤干预大鼠 KOA, 能够抑制炎症反应、修复软骨和软骨下骨, 其作用机制与抑制滑膜和软骨细胞中 TLR4-MyD88-NF- $\kappa$ B 信号通路相关基因的表达有关。

**关键词** 骨关节炎, 膝; 毛冬青; 类 Toll 受体 4; 髓系分化因子 88; NF- $\kappa$ B; 大鼠; 动物实验

## Efficacy and mechanism of Maodongqing Tang(毛冬青汤) against knee osteoarthritis in rats: an experimental study

HE Yu, JIA Qiong, LUO Hu, ZHAO Junsong, LUO Lingwei, CAO Yulin, ZHANG Zuofu

基金项目:湖南省中医药科研课题(A2024043);湖南省“十四五”第二批中医药领军人才、科学带人和骨干人才培养项目(湘中医药[2024]3号)

通讯作者:贾琼 E-mail:04170731@163.com

Hunan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Hunan University of Chinese Medicine, Zhuzhou 412000, Hunan, China

**ABSTRACT Objective:** To investigate the therapeutic efficacy of Maodongqing Tang (毛冬青汤, MDQT) against knee osteoarthritis (KOA) in rats, and to explore its underlying mechanism. **Methods:** Forty-five male SD rats were selected and randomized into blank control group, sham-operated group, model group, MDQT group, and celecoxib group, with 9 cases in each group. The rats in model group, MDQT group, and celecoxib group were subjected to surgeries on the right knee joints by using Hulth method to build KOA models, while the ones in sham-operated group were merely incised the medial skin and subcutaneous tissues to expose the knee joint cavity at the corresponding sites and then sutured, the ones in blank control group were not given any intervention. Four weeks after successful modeling, the rats in MDQT group were intervened by intragastric administration with MDQT solution at a crude dose of 5.4 g/kg/day, the ones in celecoxib group with celecoxib solution at a dose of 12 mg/kg/day, and the ones in the remaining groups with sterile saline at a dose of 10 mg/kg/day for consecutive 8 weeks. Following the end of intervention, the blood was drawn and the right knee joints were harvested for the following analyses: the serum levels of interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in the serum samples were measured by ELISA, the knee joint specimens were scanned by Micro-CT for examining the subchondral bone microarchitecture and analyzing the parameters such as bone volume/tissue volume (BV/TV), bone mineral content (BMC), and trabecular number (Tb. N), and the histopathological changes of knee articular cartilage tissues were observed by safranin O-fast green (SO-FG) staining. Furthermore, the mRNA expression levels of Toll-like receptor (TLR)4, myeloid differentiation primary response protein 88 (MyD88), and nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) in the knee articular cartilage tissues were determined by real-time quantitative PCR (RT-qPCR), and the protein expression levels of TLR4, MyD88, and NF- $\kappa$ B in knee articular synovial tissues were detected by Western Blot. **Results:** ① Serum pro-inflammatory cytokine levels. The serum levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  were higher in sham-operated group compared to blank control group ( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ), and these markers were also higher in model group compared to sham-operated group ( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ); conversely, these markers reduced in both MDQT group and celecoxib group compared to model group ( $P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ), with MDQT group showing comparable serum levels of IL-1 $\beta$  and IL-6 to celecoxib group, but higher serum level of TNF- $\alpha$  ( $P=1.000, P=0.397, P=0.001$ ). ② Subchondral bone microstructure of the tibial plateau. The BV/TV showed no significant difference among the 5 groups ( $F=2.642, P=0.097$ ). The BMC in subchondral bone of tibial plateau reduced in model group compared to the sham-operated group, but Tb. N showed no significant difference between the 2 groups ( $P=0.030, P=0.592$ ). Conversely, the BMC and Tb. N were elevated in both MDQT group and celecoxib group compared to model group ( $P=0.008, P=0.007; P=0.001, P=0.001$ ), with MDQT group showing comparable therapeutic effect to celecoxib group in improving BMC and Tb. N ( $P=1.000, P=1.000$ ). ③ Histopathological findings in rat knee articular cartilage. The marked changes, manifesting as large-scale superficial cartilage exfoliation, clustered chondrocytes and lighter stained cartilage matrix, were observed in the knee articular cartilage of rats in model group, whereas, the aforementioned changes were ameliorated, manifesting as reduced superficial cartilage defects, more organized chondrocyte arrangement and deeper stained cartilage matrix, in MDQT group and celecoxib group compared to model group, with the MDQT group showing the deeper stained cartilage matrix compared to the celecoxib group. ④ The mRNA expression levels of TLR4-MyD88-NF- $\kappa$ B signaling pathway-related genes in knee articular cartilage tissues. The relative mRNA expression levels of TLR4, MyD88, and NF- $\kappa$ B in the knee articular cartilage tissues were all higher in model group compared to sham-operated group ( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ), while these markers were all downregulated in celecoxib group and MDQT group compared to model group ( $P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000$ ); furthermore, the relative mRNA expression level of TLR4 was higher in MDQT group compared to celecoxib group ( $P=0.011$ ), but those of MyD88 and NF- $\kappa$ B showed no significant difference between the 2 groups ( $P=0.975, P=0.264$ ). ⑤ The protein expression levels of TLR4-MyD88-NF- $\kappa$ B signaling pathway-related genes in knee articular synovial tissues. The relative protein expression levels of TLR4, MyD88, and NF- $\kappa$ B in rat knee articular synovial tissues were all higher in model group compared to sham-operated group ( $P=0.000, P=0.000, P=0.017$ ), while these markers were all downregulated in MDQT group and celecoxib group compared to model group ( $P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.003; P=0.006, P=0.000$ ); furthermore, the relative protein expression level of MyD88 was lower in MDQT group compared to celecoxib group ( $P=0.006$ ), but those of TLR4 and NF- $\kappa$ B showed no significant difference between the 2 groups ( $P=0.366, P=1.000$ ). **Conclusion:** MDQT can inhibit inflammatory response and repair cartilage and subchondral bone in intervention of KOA in rats. It may exert the effects by inhibiting the expression of TLR4-MyD88-NF- $\kappa$ B signaling pathway-related genes in synoviocytes and chondrocytes.

**Keywords** osteoarthritis, knee; radix ilicis pubescentis; Toll-like receptor 4; myeloid differentiation factor 88; NF-kappa B; rats; animal experimentation

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是临床常见退行性关节疾病, 主要临床表现为关节疼痛、僵硬和活动功能障碍, 具有一定的致残率<sup>[1]</sup>。由于人口老龄化加剧、肥胖人群增多, KOA 的发病率呈逐年上升趋势<sup>[2]</sup>。《中国骨关节炎诊疗指南(2021 年版)》强调 OA 治疗的个性化和阶梯化<sup>[3]</sup>, 而中药治疗在这方面具有独特的优势。毛冬青汤是湖南中医药大学附属省直中医医院肖学峰教授基于活血利水之法提出的经验方。前期临床研究结果表明, 在膝关节镜术后应用毛冬青汤能够显著缓解患者疼痛、抑制炎症反应、改善膝关节功能<sup>[4-5]</sup>。为了探讨毛冬青汤干预大鼠 KOA 的疗效及作用机制, 我们开展了此项研究, 现总结报告如下。

## 1 材料与仪器

### 1.1 实验动物

8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 45 只, 体质量 (215 ± 20) g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司 [实验动物生产许可证: SCXK(湘)2024-0009]。大鼠均于湖南中医药大学实验动物中心 [实验动物使用许可证号: SYXK(湘)2024-0014] 饲养, 饲养温度 (25 ± 2) °C、相对湿度 (60 ± 5)%, 明暗交替 (12 h/12 h), 自由进食饮水。动物实验方案经湖南中医药大学实验动物伦理委员会审查通过, 伦理批件号: HNUCM21-2410-21。

### 1.2 实验药物

毛冬青汤, 药物组成包括毛冬青 30 g、三七粉 5 g、丹参 15 g、红花 10 g、当归 15 g、茯苓 10 g、泽泻 10 g、薏苡仁 10 g、白芍 10 g、川牛膝 10 g、桑寄生 10 g、狗脊 10 g、甘草片 6 g。将上述中药饮片水煎, 并浓缩至生药浓度 0.6 g · mL<sup>-1</sup>, 于 4 °C 保存备用。塞来昔布胶囊 (批准文号: 国药准字 H20193414, 江苏正大清江制药有限公司)。

### 1.3 实验主要试剂

白细胞介素 (interleukin, IL)-1β ELISA 检测试剂盒 (货号: ZC-36391)、IL-6 ELISA 检测试剂盒 (货号: ZC-37624)、肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α) ELISA 检测试剂盒 (货号: ZC-36404) 均购自上海茁彩生物科技有限公司, TRIPure 试剂 (货号: G3013)、逆转录试剂盒 (货号: G3337)、2 × Universal

Blue SYBR Green qPCR Master Mix (货号: G3326)、通用型组织固定液 (货号: G1101)、番红 O-固绿染色试剂盒 (货号: G1371)、放射免疫沉淀法 (radioimmuno-precipitation assay, RIPA) 裂解液 (货号: G2002-100ML)、Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 4 抗体 (货号: A5258) 均购自武汉赛维尔生物科技有限公司, 髓系分化初级反应蛋白质 88 (myeloid differentiation primary response protein 88, MyD88) 抗体 (货号: YT2928)、核因子 κB (nuclear factor-κB, NF-κB) 抗体 (货号: YT3108) 均购自 Immuno Way 公司。

### 1.4 实验主要仪器

D3024R 型台式高速冷冻型微量离心机 (大龙兴创实验仪器有限公司), Rayto RT-6100 酶标仪 (深圳雷杜生命科学股份有限公司), CFX Connect 型荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad 公司), ETC811 型 PCR 仪 (北京东胜创新生物科技有限公司), NMC-200 型小动物 Micro-CT (平生医疗科技公司)。

## 2 方法

### 2.1 分组方法

将 45 只大鼠按体质量排序编号, 从随机数字表中抄录 45 个连续随机数字记录在小鼠编号下方, 再将 45 个随机数字从小到大排序, 将随机数字排序 1 ~ 9 对应的大鼠纳入空白对照组、10 ~ 18 对应的大鼠纳入假手术组、19 ~ 27 对应的大鼠纳入模型组、28 ~ 36 对应的大鼠纳入毛冬青汤组、37 ~ 45 对应的大鼠纳入塞来昔布组。

### 2.2 造模方法

在适应性饲养 1 周后, 对模型组、毛冬青汤组和塞来昔布组大鼠采用 Hulth 法<sup>[6]</sup> 建立右侧 KOA 模型。假手术组大鼠仅切开右侧膝关节内侧皮肤及皮下组织, 暴露关节腔后缝合。空白对照组大鼠不进行任何处理。

### 2.3 干预方法

参照人与动物体表面积等效剂量比值表<sup>[7]</sup>, 并通过安全性预实验确定大鼠给药剂量为人的 3.15 倍。造模后 4 周, 毛冬青汤组大鼠按照生药量 5.4 g · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> 以毛冬青汤药液灌胃, 塞来昔布组大鼠按照 12 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> 以塞来昔布溶液灌胃, 空

白对照组、假手术组和模型组按照  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  以生理盐水灌胃。连续干预 8 周。

#### 2.4 组织样本获取与保存方法

干预 8 周后,禁食 12 h,按照  $3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  的剂量腹腔注射 10% 水合氯醛;大鼠麻醉后,采集腹主动脉血,静置 1.5 h,于  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  以  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min (离心半径 10 cm),取上清液,于  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。采血后处死大鼠,分离右侧膝关节,采用 Micro-CT 扫描。扫描后,将膝关节从内侧切开,暴露关节腔,切取部分软骨和滑膜组织,液氮快速冷冻后,于  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用;将剩余的膝关节组织于通用型组织固定液中固定备用。

#### 2.5 血清促炎性细胞因子含量检测方法

取各组大鼠血清样本,分别采用 IL-1 $\beta$  ELISA 试剂盒、IL-6 ELISA 试剂盒、TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒检测血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  含量。

#### 2.6 胫骨平台软骨下骨微结构检测方法

取大鼠右侧膝关节,采用 Micro-CT 扫描。扫描参数为:电压 80 kV,电流 0.06 mA,横向视野范围 50 mm,轴向视野范围 16 mm。采用 Recon 软件对原始数据进行三维重建。采用数据分析软件 Avatar 对胫骨平台软骨下骨微结构进行分析,获取胫骨平台软骨下骨的骨体积分数、骨矿物质含量、骨小梁数量。

#### 2.7 膝关节软骨组织病理学观察方法

取于通用型组织固定液中固定的膝关节组织,依次进行脱钙、脱水、石蜡包埋后,切成厚度  $5 \mu\text{m}$  的切片;梯度乙醇脱水和再水合后,进行番红 O-固绿染色,于显微镜下观察软骨组织病理改变。

#### 2.8 膝关节软骨组织中 TLR4-MyD88-NF- $\kappa$ B 信号通路相关基因的 mRNA 表达水平检测方法

取各组大鼠膝关节软骨组织,加入液氮,研磨后采用 TRIpure 试剂提取 RNA,采用逆转录试剂盒将

RNA 逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模版,采用  $2 \times$  Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix 进行实时定量 PCR,检测大鼠膝关节软骨组织中 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 的 mRNA 表达水平。以  $\beta$  肌动蛋白为内参,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算各基因的 mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

#### 2.9 膝关节滑膜组织中 TLR4-MyD88-NF- $\kappa$ B 信号通路相关基因的蛋白表达水平检测方法

取各组大鼠膝关节滑膜组织,加入液氮,研磨后加入 RIPA 裂解液进行裂解,以  $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min (离心半径 8 cm),取上清液。采用 Western Blot 法检测大鼠膝关节滑膜组织中 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 的蛋白表达水平。采用 ImageJ 软件分析条带灰度值,以  $\beta$  肌动蛋白为内参,计算各基因的蛋白相对表达量。

#### 2.10 数据统计方法

采用 SPSS26.0 软件进行数据统计分析。5 组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  含量,胫骨平台软骨下骨骨体积分数、骨矿物质含量、骨小梁数量,膝关节软骨组织中 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 的 mRNA 相对表达量及膝关节滑膜组织中 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 的蛋白相对表达量的组间总体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 血清促炎性细胞因子含量检测结果

5 组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  含量比较,组间差异均有统计学意义。假手术组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  含量均高于空白对照组 ( $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ );模型组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  含量均高于假手术组 ( $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ );毛冬青汤组和塞来昔布组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  含量均低于模型组 ( $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ,

表 1 实时定量 PCR 引物信息

基因名称	引物序列(5'—3')	扩增片段长度/bp
Toll 样受体 4	上游引物 CCAGGTGTGAAATGAGACAATTG	191
	下游引物 AAGCTGTCCAATATGGAAACCC	
髓系分化初级反应蛋白质 88	上游引物 TCGACGCCTTCATCTGCTAC	177
	下游引物 CCATGCGACGACACCTTTTC	
核因子 $\kappa$ B	上游引物 CAGATACCTAAGACGCACCC	227
	下游引物 CTCCAGGTCTCGCTTCTTCACA	
$\beta$ 肌动蛋白	上游引物 CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	下游引物 GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT	

$P=0.000$ ;  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ); 毛冬青汤组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6 与塞来昔布组的差异均无统计学意义 ( $P=1.000$ ,  $P=0.397$ ), TNF- $\alpha$  含量高于塞来昔布组 ( $P=0.001$ )。见表 2。

### 3.2 胫骨平台软骨下骨微结构检测结果

5 组大鼠胫骨平台软骨下骨骨体积分数比较, 组间差异无统计学意义。5 组大鼠胫骨平台软骨下骨骨矿物质含量、骨小梁数量比较, 组间差异均有统计学意义。假手术组大鼠胫骨平台软骨下骨骨矿物质含量、骨小梁数量与空白对照组的差异均无统计学意义 ( $P=0.264$ ,  $P=0.514$ ); 模型组大鼠胫骨平台软骨下骨骨矿物质含量低于假手术组 ( $P=0.030$ ), 骨小梁数量与假手术组的差异无统计学意义 ( $P=0.592$ ); 毛冬青汤组和塞来昔布组大鼠胫骨平台软骨

下骨骨矿物质含量均高于模型组 ( $P=0.008$ ,  $P=0.007$ ), 骨小梁数量均多于模型组 ( $P=0.001$ ,  $P=0.001$ ); 毛冬青汤组大鼠胫骨平台软骨下骨骨矿物质含量、骨小梁数量与塞来昔布组的差异均无统计学意义 ( $P=1.000$ ,  $P=1.000$ )。见表 3、图 1。

### 3.3 膝关节软骨组织病理学观察结果

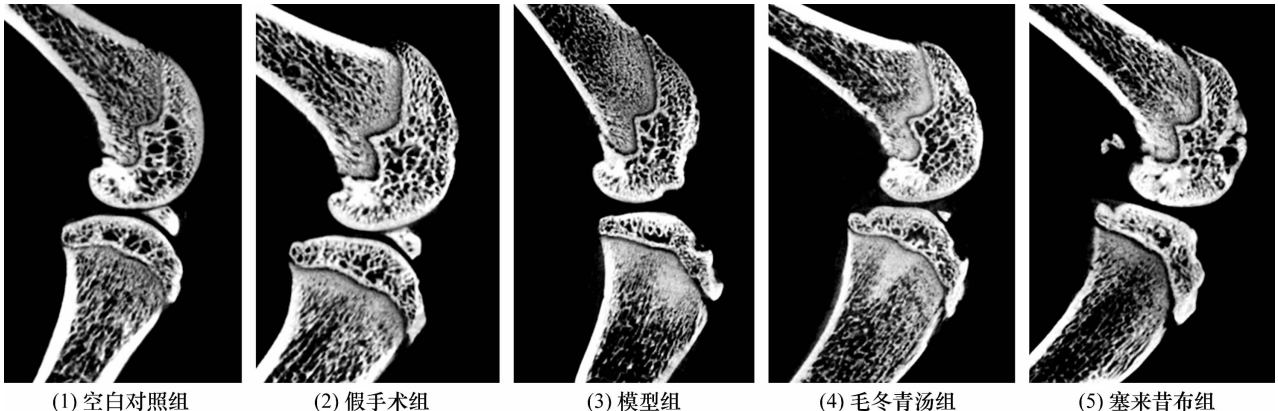
空白对照组及假手术组大鼠软骨表面光滑, 潮线完整, 软骨细胞排列规律, 软骨基质染色均匀; 模型组大鼠表层软骨大面积剥脱, 软骨细胞簇集, 软骨基质染色较浅; 毛冬青汤组和塞来昔布组大鼠表层软骨缺损较模型组减轻, 软骨细胞排列较规律, 软骨基质染色较深, 其中毛冬青汤组大鼠软骨基质染色深于塞来昔布组 (图 2)。

表 2 5 组大鼠血清促炎性细胞因子含量检测结果

组别	样本量/ 只	白细胞介素-1 $\beta$ / ( $\bar{x} \pm s$ , pg · mL <sup>-1</sup> )	白细胞介素-6/ ( $\bar{x} \pm s$ , pg · mL <sup>-1</sup> )	肿瘤坏死因子- $\alpha$ / ( $\bar{x} \pm s$ , pg · mL <sup>-1</sup> )
空白对照组	9	7.254 ± 2.014	45.381 ± 7.600	53.223 ± 7.232
假手术组	9	13.953 ± 4.264	82.980 ± 12.094	151.106 ± 16.730
模型组	9	31.030 ± 3.312	140.674 ± 11.729	299.981 ± 15.681
毛冬青汤组	9	21.583 ± 2.126	116.577 ± 4.635	252.714 ± 15.596
塞来昔布组	9	21.820 ± 3.667	106.491 ± 11.969	212.492 ± 32.413
<i>F</i> 值		70.915	116.234	220.432
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

表 3 5 组大鼠胫骨平台软骨下骨微结构检测结果

组别	样本量/ 只	骨体积分数/ ( $\bar{x} \pm s$ , %)	骨矿物质含量/ ( $\bar{x} \pm s$ , g · cm <sup>-3</sup> )	骨小梁数量/ ( $\bar{x} \pm s$ , 个 · mm <sup>-1</sup> )
空白对照组	9	65.3 ± 2.5	120.536 ± 8.829	1.073 ± 0.025
假手术组	9	66.3 ± 5.0	104.003 ± 8.470	0.963 ± 0.070
模型组	9	57.3 ± 1.1	79.323 ± 8.480	0.863 ± 0.058
毛冬青汤组	9	63.3 ± 4.1	109.603 ± 4.770	1.173 ± 0.015
塞来昔布组	9	61.3 ± 4.7	102.433 ± 7.633	1.173 ± 0.085
<i>F</i> 值		2.642	11.311	16.597
<i>P</i> 值		0.097	0.001	0.000



(1) 空白对照组 (2) 假手术组 (3) 模型组 (4) 毛冬青汤组 (5) 塞来昔布组

图 1 5 组大鼠膝关节矢状面 CT 片

### 3.4 膝关节软骨组织中 TLR4-MyD88-NF-κB 信号通路相关基因的 mRNA 表达水平检测结果

5 组大鼠膝关节软骨组织中 TLR4、MyD88、NF-κB 的 mRNA 相对表达量比较,组间差异均有统计学意义。假手术组大鼠膝关节软骨组织中 TLR4、MyD88 的 mRNA 相对表达量与空白对照组的差异均无统计学意义( $P=0.843, P=0.718$ ),NF-κB 的 mRNA 相对表达量低于空白对照组( $P=0.030$ );模型组大鼠膝关节软骨组织中 TLR4、MyD88、NF-κB 的 mRNA 相对表达量均高于假手术组( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ );塞来昔布组和毛冬青汤组大鼠膝关节软骨组织中 TLR4、MyD88、NF-κB 的 mRNA 相对表达量均低于模型组( $P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000$ );毛冬青汤组大鼠膝关节软骨组织中 TLR4 的 mRNA 相对表达量高于塞来昔布组( $P=0.011$ ),MyD88、NF-κB 的 mRNA 相对表达量与塞来昔布组的差异均无统计学意义( $P=0.975, P=0.264$ )。见表 4。

### 3.5 膝关节滑膜组织中 TLR4-MyD88-NF-κB 信号通路相关基因的蛋白表达水平检测结果

5 组大鼠膝关节滑膜组织中 TLR4、MyD88、NF-κB 的蛋白相对表达量比较,组间差异均有统计学意义。假手术组大鼠膝关节滑膜组织中 TLR4 的蛋白相对表达量高于空白对照组( $P=0.046$ ),MyD88、NF-κB

的蛋白相对表达量与空白对照组的差异均无统计学意义( $P=0.051, P=0.315$ );模型组大鼠膝关节滑膜组织中 TLR4、MyD88、NF-κB 的蛋白相对表达量均高于假手术组( $P=0.000, P=0.000, P=0.017$ );毛冬青汤组和塞来昔布组大鼠膝关节滑膜组织中 TLR4、MyD88、NF-κB 的蛋白相对表达量均低于模型组( $P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.003; P=0.006, P=0.000$ );毛冬青汤组大鼠膝关节滑膜组织中 MyD88 的蛋白相对表达量低于塞来昔布组( $P=0.006$ ),TLR4、NF-κB 的蛋白相对表达量与塞来昔布组的差异均无统计学意义( $P=0.366, P=1.000$ )。见表 5、图 3。

## 4 讨论

KOA 属中医“骨痹”“痹证”范畴,其核心病机为本虚标实。针对这一关键病机,肖学峰教授以“活血利水”作为基本治法,提出了毛冬青汤。该方以毛冬青、三七粉为君药,毛冬青活血通络、利水消肿,三七粉活血止痛、化瘀止血;丹参、红花、当归为臣药,有增强活血化痰、通络止痛之功;茯苓、泽泻、薏苡仁健脾渗湿、利水消肿,白芍养血柔肝、缓急止痛,川牛膝、桑寄生、狗脊补肝肾、强筋骨、祛风湿,为佐药;甘草调和诸药,为使药。本方的精妙之处在于,将活血化瘀药和利水渗湿药有机配伍,同时佐以补肝肾、强筋骨之品,共奏去菀陈莖、扶正固本之效。现代药理学研究

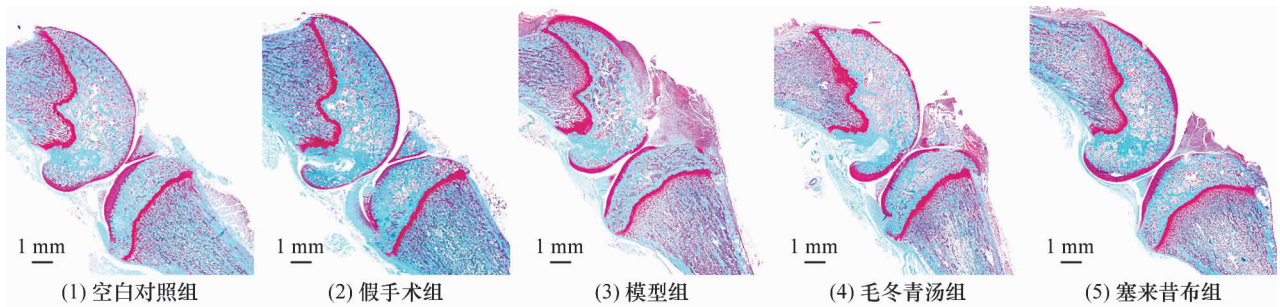


图 2 3 组大鼠膝关节软骨组织番红 O-固绿染色图片

表 4 5 组大鼠膝关节软骨组织中 TLR4-MyD88-NF-κB 信号通路相关基因的 mRNA 表达水平

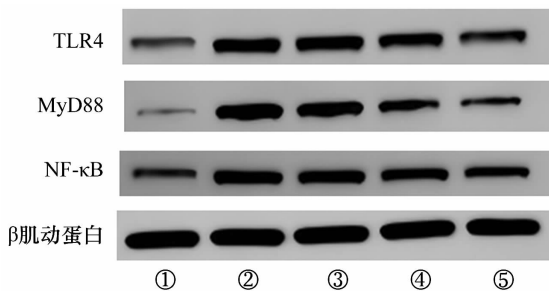
组别	样本量/只	TLR4 <sup>1)</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )	MyD88 <sup>2)</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )	NF-κB <sup>3)</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )
空白对照组	9	1.017 ± 0.197	1.087 ± 0.419	1.092 ± 0.460
假手术组	9	1.067 ± 0.418	1.653 ± 0.731	0.676 ± 0.271
模型组	9	2.631 ± 1.010	8.122 ± 7.317	1.566 ± 0.406
毛冬青汤组	9	0.711 ± 0.408	0.343 ± 0.296	0.719 ± 0.485
塞来昔布组	9	0.047 ± 0.010	0.293 ± 0.368	0.508 ± 0.283
F 值		28.992	28.475	10.394
P 值		0.000	0.000	0.000

注:1) Toll 样受体 4;2) 髓系分化初级反应蛋白质 88;3) 核因子 κB。

表 5 5 组大鼠膝关节滑膜组织中 TLR4-MyD88-NF-κB 信号通路相关基因的蛋白表达水平

组别	样本量/只	TLR4 <sup>1)</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )	MyD88 <sup>2)</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )	NF-κB <sup>3)</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )
空白对照组	9	0.176 ± 0.015	0.143 ± 0.450	0.150 ± 0.020
假手术组	9	0.343 ± 0.037	0.356 ± 0.015	0.276 ± 0.070
模型组	9	0.843 ± 0.144	1.380 ± 0.200	0.620 ± 0.199
毛冬青汤组	9	0.540 ± 0.095	0.590 ± 0.080	0.393 ± 0.146
塞来昔布组	9	0.716 ± 0.092	1.060 ± 0.144	0.513 ± 0.202
F 值		27.275	55.453	4.825
P 值		0.000	0.000	0.020

注:1) Toll 样受体 4; 2) 髓系分化初级反应蛋白质 88; 3) 核因子 κB。



TLR4 为 Toll 样受体 4, MyD88 为髓系分化初级反应蛋白质 88, NF-κB 为核因子 κB; ①为空白对照组, ②为模型组, ③为塞来昔布组, ④为毛冬青汤组, ⑤为假手术组。

图 3 5 组大鼠滑膜组织中 TLR4-MyD88-NF-κB 信号通路相关基因的蛋白表达水平 Western Blot 法检测结果

证实, 这些药物的活性成分能够通过多靶点、多途径发挥协同治疗 KOA 的作用。毛冬青的主要活性成分齐墩果酸能够特异性结合 TLR4 胞外域, 阻断其识别病原或损伤相关模式分子, 进而抑制炎症反应的级联放大<sup>[8]</sup>。三七总皂苷能够通过降低活性氧水平抑制 TLR4-MyD88-NF-κB 信号通路的激活, 进而缓解 KOA 症状<sup>[9]</sup>。丹参酮 II A 能够通过抑制 TLR4-MyD88-NF-κB 信号通路减少促炎性细胞因子的释放, 进而减轻膝关节软骨退变、改善膝关节功能<sup>[10]</sup>。丹参酮能够促进软骨细胞的增值, 增加胶原和蛋白多糖的合成, 促进软骨基质的修复和再生<sup>[11]</sup>。红花的主要活性成分羟基红花黄色素 A<sup>[12]</sup> 及当归的主要活性成分当归多糖<sup>[13]</sup> 均具有抗炎、抗氧化、免疫调节等作用。泽泻中的萜类化合物能够抑制促炎性细胞因子的表达<sup>[14]</sup>。芍药苷具有抗炎、镇痛、免疫调节及解除平滑肌痉挛等作用<sup>[15]</sup>。本研究结果显示, 毛冬青汤具有显著的抗炎作用, 且其作用效果与塞来昔布相当。除了抗炎作用外, 毛冬青汤还具有保护软骨及软骨下骨的作用。膝关节软骨组织番红 O-固绿染色结果显示, 模型组大鼠表层软骨大面积剥脱, 软骨细胞簇集,

而毛冬青汤组大鼠的表层软骨缺损较轻, 且软骨细胞排列较规律; 胫骨平台软骨下骨微结构检测结果显示, 毛冬青汤组大鼠胫骨平台软骨下骨骨矿物质含量高于模型组, 骨小梁数量多于模型组。

TLR4-MyD88-NF-κB 信号通路是调控促炎性细胞因子表达和释放的关键通路, 直接参与 KOA 发生发展过程中的软骨破坏和骨代谢异常<sup>[16]</sup>。TLR4 是先天免疫的关键受体, 在识别损伤或病原相关模式分子后被激活, 进而招募 MyD88 接头蛋白, 激活下游的 NF-κB<sup>[17]</sup>。NF-κB 被激活后会进入细胞核, 调控多种促炎性细胞因子的表达, 进而加剧炎症反应和软骨破坏<sup>[18]</sup>。滑膜组织是关节腔内促炎性细胞因子的重要来源, 这些促炎性细胞因子释放到关节腔中, 通过与软骨细胞表面的受体结合, 激活软骨细胞内多条与炎症反应相关的信号通路, 进而上调软骨细胞自身促炎性细胞因子和趋化因子的表达, 形成局部炎症反应级联放大环路<sup>[19]</sup>。本研究发现, 模型组大鼠软骨细胞 TLR4、MyD88、NF-κB 的 mRNA 表达水平和滑膜组织中 TLR4、MyD88、NF-κB 的蛋白表达水平均显著上调, 而毛冬青汤能够显著抑制软骨和滑膜组织中上述基因的表达。这提示, 毛冬青汤能有效阻断滑膜源性炎症信号的传导, 抑制促炎性细胞因子的表达和释放。我们认为, 毛冬青汤可能通过靶向抑制滑膜炎症反应, 进而减轻促炎性细胞因子对软骨细胞的影响, 实现保护软骨细胞的作用, 而其作用机制与调控 TLR4-MyD88-NF-κB 信号通路的关键基因的表达关系密切。

本研究结果表明, 毛冬青汤干预大鼠 KOA, 能够抑制炎症反应、修复软骨和软骨下骨, 其作用机制与抑制滑膜和软骨细胞中 TLR4-MyD88-NF-κB 信号通路相关基因的表达有关。但本研究未能够对 TLR4-MyD88-NF-κB 信号通路下游效应分子进行深入分析, 且未能对毛冬青汤的长期疗效进行评估。因此, 未来

可进一步优化实验设计以开展更加深入的研究。

### 参考文献

- [1] LIEW J W, KING L K, MAHMOUDIAN A, et al. A scoping review of how early-stage knee osteoarthritis has been defined[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2023, 31(9): 1234 - 1241.
- [2] CUI A, LI H, WANG D, et al. Global, regional prevalence, incidence and risk factors of knee osteoarthritis in population-based studies[J]. *EclinicalMedicine*, 2020, 29 - 30: 100587.
- [3] 樊子娟, 王桂杉, 李川, 等. 《中国骨关节炎诊疗指南(2021年版)》解读和评价[J]. *中国循证医学杂志*, 2022, 22(6): 621 - 627.
- [4] 江斌, 杨承伟, 何华锋. 毛冬青汤对膝关节镜术后患者血清 ESR、CRP 水平的影响[J]. *内蒙古中医药*, 2021, 40(1): 14 - 15.
- [5] 潘乐, 张意侗, 张霞, 等. 毛冬青汤对膝关节镜术后早期关节肿痛及炎症因子的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2019, 26(4): 38 - 41.
- [6] 叶劲松, 梁子聪. 3 种不同膝骨关节炎造模方法比较[J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(16): 3948 - 3954.
- [7] 魏伟, 吴希美, 李元健. *药理实验方法学*[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 71 - 72.
- [8] 王诗婷, 孔伟华, 温乐乐, 等. 中药三萜类成分防治膝骨关节炎作用机制研究进展[J]. *中草药*, 2023, 54(18): 6128 - 6138.
- [9] 吴金仓, 张宵元, 叶阳, 等. 丹参-三七治疗膝骨关节炎的网络药理学机制研究[J]. *特产研究*, 2024, 46(3): 72 - 79.
- [10] 张金锋, 徐志龙, 吴梦, 等. 丹参酮 II A 通过抑制信号通路延缓膝骨关节炎大鼠软骨退变及抑制局部炎症的研究[J]. *中国药理学杂志*, 2021, 56(23): 1918 - 1926.
- [11] 傅永升, 王卫国, 张城铭, 等. 丹参活性成分抗膝骨关节炎的药理研究进展[J]. *中药新药与临床药理*, 2024, 35(2): 299 - 306.
- [12] 李清瀚, 王大麟, 王海涛, 等. 羟基红花黄色素 A 对老龄大鼠膝关节骨性关节炎的干预效果及作用机制[J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42(24): 6060 - 6064.
- [13] 王庆彦, 毕映燕, 徐生杰, 等. 当归中活性成分提取方法及药理作用的研究进展[J]. *化学试剂*, 2025, 47(4): 43 - 51.
- [14] 张力文, 阮云乐, 王加朋, 等. 泽泻的化学成分和药理作用研究进展[J]. *中医药大学学报*, 2025, 39(1): 99 - 104.
- [15] 陈谱, 阮安民, 周俊, 等. 基于 NF- $\kappa$ B 信号通路探讨芍药苷对 LPS 诱导的人软骨细胞炎症及退变的作用机制[J]. *北京中医药大学学报*, 2020, 43(11): 903 - 909.
- [16] 张健, 颜运涛, 王响, 等. 梔子苷调节 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号通路缓解膝骨关节炎大鼠的炎症反应[J]. *中药药理与临床*, 2025, 41(5): 22 - 27.
- [17] 李志文. 探究右归丸加味对 KOA 模型大鼠 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号通路的滑膜炎的作用机制[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2024.
- [18] ZHAO Y, LI Y, QU R, et al. Cortistatin binds to TNF- $\alpha$  receptors and protects against osteoarthritis[J]. *EBioMedicine*, 2019, 41: 556 - 570.
- [19] 曹寅生, 易强, 邝高艳, 等. 基于 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号通路探讨追风透骨胶囊减缓兔膝骨关节炎模型软骨退变的作用机制[J]. *湖南中医药大学学报*, 2023, 43(2): 240 - 248.

(收稿日期: 2025-06-07 本文编辑: 吕宁)