

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.12.011

实验研究

膝痹宁对膝骨关节炎模型小鼠膝关节软骨组织损伤及cGAS-STING信号通路的影响

伏厚宇^{1,2}, 李晓辰^{1,2}, 龚子健^{1,2}, 揭立士^{1,2}, 刘江宇^{1,2}, 陈颖琦^{1,2}, 王培民^{1,2}✉

1. 南京中医药大学附属医院/江苏省中医院, 江苏省南京市汉中路155号, 210029; 2. 南京中医药大学第一临床医学院

[摘要] **目的** 从环鸟苷酸-腺苷酸合成酶(cGAS)-干扰素基因刺激蛋白(STING)信号通路探讨膝痹宁治疗膝骨关节炎软骨损伤的可能作用机制。**方法** 将50只C57BL/6J小鼠随机分为假手术组、模型组、膝痹宁低剂量组、膝痹宁高剂量组、膝痹宁高剂量+激动剂组, 每组10只。除假手术组外, 其余各组小鼠采用半月板失稳术构建膝骨关节炎小鼠模型。术后2周, 膝痹宁低、高剂量组分别给予3.58、14.32 g/(kg·d)膝痹宁汤剂灌胃给药, 膝痹宁高剂量+激动剂组使用14.32 g/(kg·d)膝痹宁汤剂灌胃后, 按25 mg/kg腹腔注射2,5-己酮可可碱, 假手术组与模型组给予5 ml/(kg·d)生理盐水灌胃, 每日1次, 各组均连续干预4周。采用ELISA法检测各组小鼠血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素1 β (IL-1 β)、白细胞介素6(IL-6)表达水平; 苏木素-伊红、番红O-固绿染色观察软骨组织病理变化, 并根据Mankin评分标准对病理变化进行评分; Western Blot法和qPCR法分别检测软骨组织基质调控相关指标[基质金属蛋白酶3(MMP3)、基质金属蛋白酶13(MMP13)、含血小板反应蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶5(ADAMTS5)、II型胶原(COL II)、聚集蛋白聚糖(Aggregan)]水平及cGAS-STING通路相关指标(cGAS、STING)蛋白水平及mRNA表达。**结果** 与假手术组比较, 模型组小鼠软骨边缘破坏严重, Mankin评分升高, COL II、Aggregan蛋白及mRNA表达水平降低, cGAS、STING、MMP3、MMP13、ADAMTS5蛋白及mRNA表达水平升高($P<0.01$); 与模型组比较, 各干预组小鼠血清IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平均降低($P<0.01$); 与膝痹宁高剂量组比较, 膝痹宁低剂量组及膝痹宁高剂量+激动剂组IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平均升高($P<0.01$)。与模型组比较, 膝痹宁低、高剂量组和膝痹宁高剂量+激动剂组小鼠软骨病理改变减轻, Mankin评分降低, COL II、Aggregan蛋白及mRNA表达水平升高, cGAS、STING、MMP3、MMP13、ADAMTS5蛋白及mRNA表达水平降低($P<0.01$); 与膝痹宁高剂量组比较, 膝痹宁高剂量+激动剂组小鼠软骨边缘破坏, Mankin评分升高, COL II、Aggregan蛋白及mRNA表达水平降低, cGAS、STING、MMP3、MMP13、ADAMTS5蛋白及mRNA表达水平升高($P<0.01$)。**结论** 膝痹宁可能通过抑制cGAS-STING通路, 降低基质降解相关蛋白, 升高基质组成相关蛋白, 从而改善膝骨关节炎软骨损伤。

[关键词] 膝骨关节炎; 软骨损伤; 膝痹宁; 环鸟苷酸-腺苷酸合成酶; 干扰素基因刺激蛋白; 基质金属蛋白酶

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种常见的关节退行性疾病, 关节软骨损伤、软骨下骨重塑及滑膜病变是其主要的临床表现^[1]。随着人

口老龄化进程的加快及生活方式的改变, KOA患病率正逐年升高, 中国KOA的发病率约6.65%^[2]。环鸟苷酸-腺苷酸合成酶(cGAS)-干扰素基因刺激蛋白(STING)通路是细胞内重要的免疫信号传导通路, 与炎症反应密切相关^[3]。研究表明, cGAS-STING通路与骨关节炎、骨溶解等骨科疾病发展密切相关^[4-5]。

目前, 中医药在KOA临床治疗中应用广泛,

基金项目:国家自然科学基金(82305276); 江苏省中医药科技发展项目(QN202105); 江苏省中医院膝关节骨关节炎临床医学创新中心(Y2023zx05); 江苏省医学重点学科(实验室)培育单位(JSDW202252); 江苏省高等学校大学生创新创业训练计划(202410315091Y)

✉ 通讯作者: drwpm@163.com

可缓解其疼痛症状,减轻炎症、保护软骨并恢复膝关节功能^[6]。膝痹宁是江苏省中医院研发的中药复方,临床上广泛应用于膝关节疼痛和软骨退化等的治疗^[7]。本课题组前期研究证实,膝痹宁具有改善 KOA 炎症,延缓软骨退化的作用^[8],但其具体作用机制尚未明确。故本研究拟从 cGAS-STING 通路角度探讨膝痹宁改善 KOA 小鼠软骨损伤的可能作用机制,以期为临床治疗 KOA、延缓 KOA 软骨病变提供有效的研究依据。本试验经南京中医药大学动物伦理委员会审核批准(批件号:202409A051)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 50 只,8 周龄,体重(20±2) g。小鼠饲养环境:12 h 光照,室温(25±2)℃,相对湿度 40%~70%,自由摄食饮水。

1.2 药物

膝痹宁方组成:淡附片 10 g,烫狗脊 10 g,紫河车 10 g,巴戟天 10 g,桂枝 10 g,薏苡仁 15 g,制何首乌 15 g,川牛膝 10 g,山萸肉 10 g,甘草 10 g。药物来自南京中医药大学附属医院制剂部,加水 400 ml 煎煮浓缩至浓度为含生药 1.1 g/ml 的药液。

1.3 主要试剂与仪器

2,5-己酮可可碱(DMXAA,批号:HY-10964),美国 MCE 公司;肿瘤坏死因子 α (TNF- α ,批号:JL10484)、白细胞介素 1 β (IL-1 β ,批号:JL18442)、白细胞介素 6 (IL-6,批号:JL20268) ELISA 试剂盒,江莱生物科技有限公司;戊巴比妥钠(批号:F20020915),中国医药集团上海化学试剂公司;4%多聚甲醛(批号:BL-G002),南京森贝伽生物科技有限公司;cGAS 一抗(批号:26416-1-AP)、STING 一抗(批号:19851-1-AP),美国 Proteintech 公司;II 型胶原(COL II)一抗(批号:AF0135)、聚集蛋白聚糖(Aggregan)一抗(批号:DF7561)、基质金属蛋白酶 3(MMP3)一抗(批号:AF0217)、基质金属蛋白酶 13(MMP13)一抗(批号:DF6494)、含血小板反应蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶 5 (ADAMTS5)一抗(批号:DF13268)、GAPDH 一抗(批号:AF7021),美国 Affinity 公司;抗兔二抗(货号 7074),美国 CST 公司;ECL 试剂盒(批号:180-5001),上海天能科技有限公司;异丙醇(批号:R018247),上海易恩化学技术有限公司;氯仿替代物(批号:TW0911),南京翼飞雪生物科技有限公司;无水乙醇(批号:32061),无锡亚盛化工有

限公司;苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(批号:C0105S)、RIPA 裂解液(批号:P0013)、BCA 试剂盒(批号:P0012)、ddH₂O(批号:R0021),碧云天生物技术有限公司;番红 O-固绿染色试剂盒(批号:S191031),皮诺飞生物科技有限公司;Trizol、逆转录试剂盒、qPCR 试剂盒(批号:R401-01、R323-01、Q711-02),南京诺唯赞生物科技有限公司;青霉素钠(批号:F0112104),华北制药股份有限公司。

台式高速离心机(Heraeus Fresco17 型)、核酸蛋白分析仪(AZY1707914 型),Thermo Fisher Scientific 公司;蛋白电泳仪及转膜仪系统(mini Trans-blot cell 型)、蛋白表达成像系统(LAS 4000 型),美国 Bio-Rad 公司;ELx800 光吸收酶标仪(Tanon 5200 型),上海天能科技有限公司;显微镜(DM10000),德国 Leica 公司;荧光定量 PCR 仪(Quant Studio3),美国 ABI 公司。

1.4 模型建立及分组

小鼠适应性饲养 1 周后,采用随机数字表法分为假手术组、模型组、膝痹宁低剂量组、膝痹宁高剂量组、膝痹宁高剂量+激动剂组,每组 10 只。各组均予 0.3% 戊巴比妥钠 2 ml/kg 剂量腹腔注射麻醉。使用碘伏对各组小鼠膝关节处进行消毒,假手术组仅切开皮肤后缝合;其余各组小鼠采用半月板失稳术构建 KOA 小鼠模型^[9]:剪开膝关节内侧皮肤和关节囊,钝性剥离髌下脂肪垫,剪断内侧副韧带和内侧半月板,缝合关节囊和皮肤后碘伏消毒,术后连续 3 天肌肉注射 20 万 U 青霉素钠以预防感染。造模完成后第 14 天,造模小鼠膝关节肿胀、步态异常,X 线显示关节间隙变窄,软骨在 HE 染色下出现结构破损,细胞排列紊乱,说明构建 KOA 模型成功^[10]。

1.5 干预方法

造模成功后,根据人与动物体表面积折算的等效剂量^[11]换算,膝痹宁 7.16 g/(kg·d)为临床等效剂量,膝痹宁低、高剂量分别取等效剂量的 1/2、2 倍,分别给予 3.58、14.32 g/(kg·d)的膝痹宁汤剂灌胃给药;膝痹宁高剂量+激动剂组灌胃 14.32 g/(kg·d)的膝痹宁汤剂后,按 25 mg/kg 腹腔注射激动剂 DMXAA^[12];假手术组和模型组小鼠给予 5 ml/(kg·d)的生理盐水灌胃。各组均每日 1 次,连续干预 4 周。

1.6 观察指标及方法

最后一次灌胃结束 24 h 后,采用眼球取血法收

集小鼠血液，静置离心后吸取上层血清，于-80℃保存。脱颈处死，膝关节处备皮，剪开皮肤，打开关节囊，剪取软骨组织，每组采用随机数字表法选择5只小鼠软骨，置于4%多聚甲醛中固定，备病理切片；每组剩余5只小鼠软骨置于-80℃保存，用于检测蛋白水平和mRNA表达。

1.6.1 ELISA 法检测小鼠血清 IL-6、IL-1β、TNF-α 炎症因子水平 使用ELISA试剂盒检测各炎症因子含量，步骤按照说明书进行，以空白孔为参考调零，使用酶标仪在450 nm波长下读取各孔的OD值。

1.6.2 HE 染色、番红 O-固绿染色观察软骨组织变化及病理学评分 取出于4%多聚甲醛中固定的小鼠软骨组织，梯度脱水后用石蜡包埋、切片，根据试剂盒说明书分别进行HE、番红 O-固绿染色，使用中性树胶封片，置于显微镜下观察。采用Mankin 评分^[13]评估关节软骨病理变化。1) 软骨结构：结构正常，表面光滑计0分，表面出现裂隙计1分，裂隙达肌层计2分，裂隙达放射层计3分，裂隙达钙化层计4分，软骨层脱落计5分；2) 软骨细胞：细胞分布正常计0分，细胞数量弥散性增多计1分，细胞簇集明显计2分，细胞数量显著减少计3分，细胞几乎完全消失计4分；3) 基质染色：基质染色均匀正常计0分，染色轻微减退计1分，染色中度减退计2分，染色重度减退计3分，染色完全减退计4分；4) 潮线完整性：潮线完整计0分，潮线被破坏、轻微不规则记1分，潮线有血管侵入计2分。各项评分相加为总评分，评分越高，表示病理损伤越严重。

1.6.3 Western Blot 法检测软骨组织内基质调控及 cGAS-STING 通路相关蛋白水平 使用RIPA裂解液提取软骨组织总蛋白，BCA检测试剂盒检测蛋白浓度并定量，SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白，将其转移至PVDF膜上，5%脱脂奶粉封闭1 h，TBST清洗膜30 min，将膜放入cGAS、STING、COL II、Aggrecan、MMP3、MMP13、ADAMTS5、GAPDH一抗（稀释比例均为1：1000）中4℃过夜孵育。次日使用TBST清洗膜30 min，将膜与一抗相对应种属的二抗（稀释比例为1:5000）孵育1 h，TBST清洗30 min，使用ECL试剂盒以及凝胶成像系统检测蛋白表达，以GAPDH为内参，计算各组蛋白相对含量。

1.6.4 RT-PCR 法检测软骨组织内基质调控及 cGAS-STING 通路相关指标 mRNA 表达 将各组小鼠软骨组织充分研磨后加入1 ml Trizol，通过离心获取上清（4℃，12 000 r/min，15 min，离心半径

为10 cm），加入0.2 ml 氯仿替代物，离心获取上层水相（4℃，12 000 r/min，15 min，离心半径为10 cm），加入异丙醇离心后去除上清获得沉淀（4℃，12 000 r/min，10 min，离心半径为10 cm），加入乙醇洗涤沉淀后4℃、8000 r/min 离心（离心半径为10 cm）3 min，加入ddH₂O溶解获得总RNA，使用核酸蛋白分析仪检测其含量，经逆转录试剂盒说明步骤将RNA转录为cDNA，再进行Real-time PCR反应，最后以GAPDH为内参以2^{-ΔΔCT}计算目的基因相对表达量。PCR引物序列见表1。

表1 小鼠软骨组织中 cGAS、STING、MMP3、MMP13、ADAMTS5、Aggrecan、COL II 及 GAPDH 基因引物序列
Table 1 Primer sequences of cGAS, STING, COL II, Aggrecan, MMP3, MMP13, ADAMTS5 and GAPDH genes in cartilage tissue of mice

基因	序列 (5'-3')	产物长度 /bp
cGAS	上游: CAGGAAGGAACCGGACAAGC	134
	下游: CCGACTCCCGTTTCTGCATT	
STING	上游: TCTTCTGCCGGACACTTGAG	178
	下游: GAGGTCATGGGGGCATTCAT	
MMP3	上游: GTTCTGGGCTATACGAGGGC	84
	下游: TTCTTCACGGTTGCAGGGAG	
MMP13	上游: ACCCAGCCCTATCCCTTGAT	180
	下游: GGTACACGGATGGATGTTCA	
ADAMTS5	上游: CCAAGGCCAAATGGGTGTGTC	114
	下游: CAATGGCGGTAGGCAAACTG	
Aggrecan	上游: CCCAGGATAAAACCAGGCAG	105
	下游: CGGCCAAGGGTTGTAATGG	
COL II	上游: GGGAATGTCTCTGCGATGAC	72
	下游: GAAGGGGATCTCGGGGTTG	
GAPDH	上游: AACTTTGGCATTGTGGAAGGG	123
	下游: GACACATTGGGGGTAGGAACA	

注：cGAS，环磷酸鸟苷-腺苷合成酶；STING，干扰素基因刺激蛋白；MMP3，基质金属蛋白酶3；MMP13，基质金属蛋白酶13；ADAMTS5，含血小板反应蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶5；Aggrecan，聚集蛋白聚糖；COL II，II型胶原。

1.7 统计学方法

采用GraphPad Prism 8软件进行数据分析。计量资料符合正态分布采用均值±标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，多组比较采用单因素方差分析，两两比较采用LSD法。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血清 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 水平比较 表2示，与假手术组比较，模型组小鼠血清

IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平均升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，各干预组小鼠血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平均降低 ($P<0.01$)；与膝痹宁高剂量组比较，膝痹宁低剂量组及膝痹宁高剂量+激动剂组 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平均升高 ($P<0.01$)。

2.2 各组小鼠软骨损伤及 Mankin 评分比较

HE 染色 (图 1) 显示：假手术组小鼠软骨层结构完整，表面光滑，细胞排列整齐，无炎性浸润；模型组小鼠软骨表面粗糙，边缘磨损严重，细胞排列紊乱，炎性浸润明显；膝痹宁低剂量组及膝痹宁高剂量组+激动剂组小鼠软骨表面较模型组有所改善，软骨结构较完整，但仍存在局部缺损；膝痹宁高剂量组软骨结构趋于正常，软骨表面光滑，细胞排列较为整齐，炎性浸润明显减少。

番红 O-固绿染色 (图 2) 显示：假手术组小鼠软骨关节面清晰，软骨潮线完整，细胞排列整齐，形态正常；模型组小鼠软骨关节表面破损严重，潮线破坏，细胞排列紊乱；膝痹宁低剂量组及膝痹宁高剂量+激动剂组小鼠软骨表面较完整，破损区域

减少，细胞排列紊乱程度较模型组减轻；膝痹宁高剂量组小鼠软骨表面较清晰，细胞排列较整齐，潮线结构恢复。

表 3 示，与假手术组比较，模型组小鼠膝关节软骨组织 Mankin 评分升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，各干预组 Mankin 评分均降低 ($P<0.01$)；与膝痹宁高剂量组比较，膝痹宁低剂量组及膝痹宁高剂量+激动剂组 Mankin 评分升高 ($P<0.01$)。

表 3 各组小鼠膝关节软骨组织 Mankin 评分比较

Table 3 Comparison of Mankin scores of cartilage tissues in the knee joints of mice in each group (分, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Mankin 评分
假手术组	10	0.70 $\pm$ 0.48
模型组	10	9.30 $\pm$ 1.06 ^{a)}
膝痹宁低剂量组	10	6.70 $\pm$ 1.16 ^{b) c)}
膝痹宁高剂量组	10	4.40 $\pm$ 0.52 ^{b)}
膝痹宁高剂量+激动剂组	10	6.90 $\pm$ 0.74 ^{b) c)}

注：a) 与假手术组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与膝痹宁高剂量组比较， $P<0.01$ 。

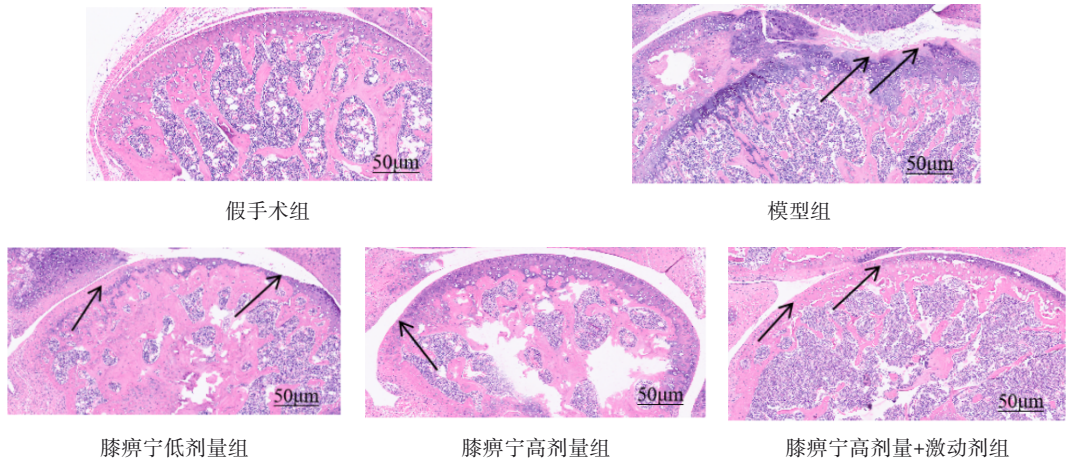
表 2 各组小鼠血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平比较

Table 2 Comparison of serum IL-1 β , IL-6 and TNF- α levels of mice in each group (pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	IL-6	IL-1 β	TNF- α
假手术组	10	66.07 $\pm$ 4.85	40.51 $\pm$ 2.76	125.37 $\pm$ 10.25
模型组	10	130.54 $\pm$ 5.94 ^{a)}	105.56 $\pm$ 6.59 ^{a)}	252.68 $\pm$ 19.84 ^{a)}
膝痹宁低剂量组	10	101.01 $\pm$ 5.09 ^{b) c)}	79.96 $\pm$ 5.09 ^{b) c)}	204.54 $\pm$ 13.03 ^{b) c)}
膝痹宁高剂量组	10	74.73 $\pm$ 7.18 ^{b)}	58.21 $\pm$ 3.03 ^{b)}	171.18 $\pm$ 12.08 ^{b)}
膝痹宁高剂量+激动剂组	10	96.59 $\pm$ 9.66 ^{b) c)}	79.93 $\pm$ 5.19 ^{b) c)}	207.21 $\pm$ 9.01 ^{b) c)}

注：IL-6，白细胞介素 6；IL-1 β ，白细胞介素 1 β ；TNF- α ，肿瘤坏死因子 α 。

a) 与假手术组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与膝痹宁高剂量组比较， $P<0.01$ 。



注：黑色箭头所指为破坏的软骨表面。

图 1 各组小鼠关节软骨组织 HE 染色病理图 ($\times 400$)

Figure 1 Pathological picture of articular cartilage tissues of mice in each group by hematoxylin-eosin (HE) staining ($\times 400$)

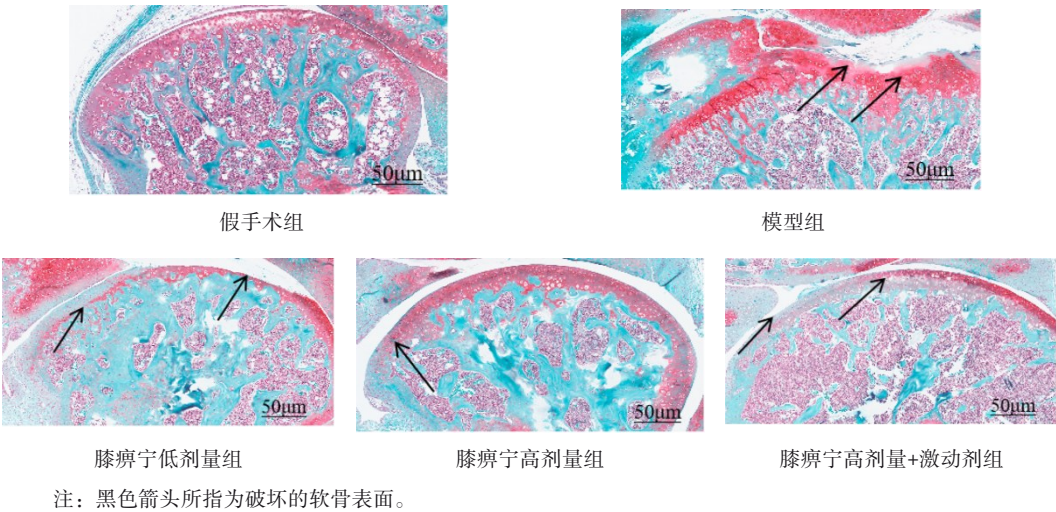


图2 各组小鼠关节软骨组织番红 O-固绿染色病理图 (×400)
Figure2 Pathological picture of articular cartilage tissues of mice in each group by Safranin O-Fast Green staining (×400)

表4 各组小鼠软骨组织内基质调控及 cGAS-STING 通路相关蛋白水平比较

Table 4 Comparison of the levels of matrix-regulated and cGAS-STING pathway-related proteins in cartilage tissues of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)								
组别	鼠数	COL II	Aggrecan	ADAMTS5	MMP3	MMP13	cGAS	STING
假手术组	5	1.01±0.05	1.18±0.08	0.38±0.02	0.44±0.04	0.48±0.06	0.43±0.03	0.47±0.06
模型组	5	0.31±0.02 ^{a)}	0.44±0.06 ^{a)}	1.07±0.07 ^{a)}	1.41±0.07 ^{a)}	1.24±0.10 ^{a)}	1.02±0.02 ^{a)}	1.09±0.07 ^{a)}
膝痹宁低剂量组	5	0.59±0.02 ^{b) c)}	0.70±0.02 ^{b) c)}	0.84±0.04 ^{b) c)}	0.95±0.06 ^{b) c)}	0.92±0.06 ^{b) d)}	0.86±0.06 ^{b) c)}	0.81±0.04 ^{b) d)}
膝痹宁高剂量组	5	0.87±0.03 ^{b)}	0.90±0.05 ^{b)}	0.61±0.02 ^{b)}	0.69±0.03 ^{b)}	0.71±0.04 ^{b)}	0.59±0.02 ^{b)}	0.62±0.03 ^{b)}
膝痹宁高剂量+激动剂组	5	0.62±0.06 ^{b) c)}	0.72±0.03 ^{b) d)}	0.78±0.05 ^{b) c)}	0.85±0.03 ^{b) d)}	0.91±0.06 ^{b) d)}	0.84±0.04 ^{b) c)}	0.83±0.06 ^{b) c)}

注：COL II，Ⅱ型胶原；Aggrecan，聚集蛋白聚糖；ADAMTS5，含血小板反应蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶5；MMP3，基质金属蛋白酶3；MMP13，基质金属蛋白酶13；cGAS，环磷酸鸟苷-腺苷合成酶；STING，干扰素基因刺激蛋白。

a) 与假手术组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与膝痹宁高剂量组比较， $P<0.01$ ；d) 与膝痹宁高剂量+激动剂组比较， $P<0.05$ 。

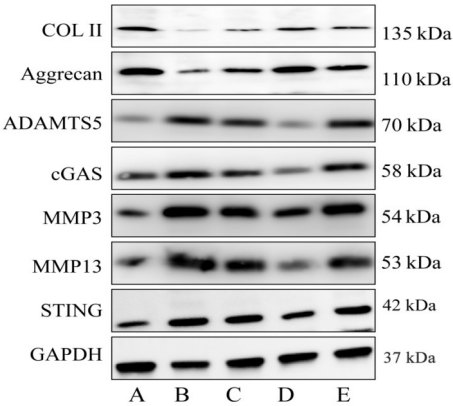
2.3 各组小鼠软骨组织内基质调控及 cGAS-STING 通路相关蛋白水平比较

表4示，与假手术组比较，模型组软骨组织内COL II、Aggrecan蛋白水平降低，cGAS、STING、MMP3、MMP13、ADAMTS5蛋白水平升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，各干预组软骨组织COL II、Aggrecan蛋白水平升高，cGAS、STING、MMP3、MMP13、ADAMTS5蛋白水平降低 ($P<0.01$)；与膝痹宁高剂量组比较，膝痹宁低剂量组及膝痹宁高剂量+激动剂组COL II、Aggrecan蛋白水平降低，cGAS、STING、MMP3、MMP13、ADAMTS5蛋白水平升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

各组小鼠软骨组织内cGAS、STING、Aggrecan、MMP3、MMP13、ADAMTS5蛋白电泳图见图3。

2.4 各组小鼠软骨组织内基质调控及 cGAS-STING 通路相关指标 mRNA 表达比较

表5示，与假手术组比较，模型组软骨组织内COL II、Aggrecan mRNA表达降低，cGAS、STING、



注：COL II，Ⅱ型胶原；Aggrecan，聚集蛋白聚糖；ADAMTS5，含血小板反应蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶5；cGAS，环磷酸鸟苷-腺苷合成酶；MMP3，基质金属蛋白酶3；MMP13，基质金属蛋白酶13；STING，干扰素基因刺激蛋白；GAPDH，甘油醛-3-磷酸脱氢酶。A，假手术组；B，模型组；C，膝痹宁低剂量组；D，膝痹宁高剂量组；E，膝痹宁高剂量+激动剂组。

图3 各组小鼠软骨组织基质调控及 cGAS-STING 通路相关蛋白电泳图

Figure 3 Electrophoresis of proteins related to matrix regulation and cGAS-STING pathway in cartilage tissues of mice in all groups

表 5 各组小鼠软骨组织内基质调控及 cGAS-STING 通路相关指标 mRNA 表达比较
Table 5 Comparison of mRNA expression of matrix-regulated and cGAS-STING pathway-related indicators

in cartilage tissues of mice in each group								
组别	鼠数	cGAS	STING	COL II	Aggrecan	MMP3	MMP13	ADAMTS5
假手术组	5	1.00±0.03	1.00±0.02	1.00±0.10	1.00±0.06	1.01±0.14	1.00±0.09	1.00±0.07
模型组	5	4.71±0.25 ^{a)}	3.99±0.20 ^{a)}	0.32±0.04 ^{a)}	0.30±0.05 ^{a)}	3.57±0.63 ^{a)}	2.86±0.18 ^{a)}	4.02±0.25 ^{a)}
膝痹宁低剂量组	5	2.99±0.35 ^{b) c)}	2.71±0.53 ^{b) c)}	0.45±0.03 ^{b) c)}	0.49±0.07 ^{b) c)}	2.25±0.21 ^{b) c)}	1.91±0.11 ^{b) c)}	2.51±0.13 ^{b) c)}
膝痹宁高剂量组	5	1.77±0.21 ^{b)}	1.80±0.17 ^{b)}	0.76±0.06 ^{b)}	0.75±0.03 ^{b)}	1.57±0.20 ^{b)}	1.38±0.10 ^{b)}	1.61±0.09 ^{b)}
膝痹宁高剂量+ 激动剂组	5	2.88±0.38 ^{b) c)}	2.78±0.62 ^{b) c)}	0.49±0.04 ^{b) c)}	0.49±0.08 ^{b) c)}	2.17±0.23 ^{b) c)}	1.88±0.11 ^{b) c)}	2.36±0.23 ^{b) c)}

注：cGAS，环磷酸鸟苷-腺苷合成酶；STING，干扰素基因刺激蛋白；COL II，Ⅱ型胶原；Aggrecan，聚集蛋白聚糖；MMP3，基质金属蛋白酶3；MMP13，基质金属蛋白酶13；ADAMTS5，含血小板反应蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶5。

a) 与假手术组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与膝痹宁高剂量组比较， $P<0.01$ 。

MMP3、MMP13、ADAMTS5 mRNA 表达升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，各干预组软骨组织 COL II、Aggrecan mRNA 表达升高，cGAS、STING、MMP3、MMP13、ADAMTS5 mRNA 表达降低 ($P<0.01$)；与膝痹宁高剂量组比较，膝痹宁低剂量组及膝痹宁高剂量+激动剂组软骨组织内 COL II、Aggrecan mRNA 表达降低，cGAS、STING、MMP3、MMP13、ADAMTS5 mRNA 表达升高 ($P<0.01$)。

3 讨论

KOA 作为一种临床上常见的、严重影响患者生活质量的关节退行性疾病，给个人健康和社会经济带来较大负担^[14]。在中医理论中，根据 KOA 症状及体征，将其归属为“痹证”范畴。随着年龄增长，肾气渐消，不能主骨生髓，腰膝失于濡养，导致“不荣则痛”，又因风、寒、湿等外邪凝滞血脉，脉络不通，致“不通则痛”。正如《张氏医通》所云：“膝为筋之府，膝痛无有不因肝肾虚者……”，因此，对于膝痹的治疗，临床常以温经通络立法，再配伍补益肝肾中药^[15]。膝痹宁是本团队基于 KOA 虚、寒、瘀的病机特点，以通经络、除寒凝、补肝肾立法所研发的中药复方。方中淡附片、桂枝温肾助阳、温经通络、宣痹散寒，为君药；紫河车、烫狗脊、巴戟天、山萸肉、制何首乌补益肝肾，祛风胜湿；薏苡仁健脾益气、祛湿通络；牛膝通经活血引血下行，共为臣药；甘草缓急止痛、调和诸药，为佐使药。诸药合用，共奏益气血、补肝肾、祛寒凝、通经络之效。

本研究中膝关节软骨病理组织及 Mankin 评分提示，成功构建的 KOA 小鼠模型软骨表面粗糙，边缘磨损严重，Mankin 评分较假手术组升高，予不同剂量的膝痹宁治疗后，软骨表面光滑，破损结

构减少，Mankin 评分较模型组下降，且以高剂量治疗效果最为显著，表明膝痹宁可以有效改善 KOA 软骨损伤。软骨损伤是 KOA 一个重要的病理特征，且在 KOA 中发挥重要作用。软骨损伤不仅可以加速 KOA 病程，还可以加重关节疼痛和活动障碍^[16-17]。COL II 和 Aggrecan 作为细胞外基质的核心成分，对维持软骨结构和功能至关重要^[18]。然而，在 KOA 中，炎症因子能够调控基质金属蛋白酶 (MMPs) 及含血小板反应蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶 (ADAMTS) 家族降解细胞外基质，导致软骨功能丧失^[19-20]。本研究采用半月板不稳术构建 KOA 模型小鼠，模型组小鼠软骨细胞排列不规则，炎性浸润严重，结构破坏明显，提示出现 KOA 典型病理改变。经不同剂量膝痹宁治疗后，膝关节软骨组织中基质降解相关蛋白 (MMP3、MMP13 及 ADAMTS5) 水平降低，基质组成相关蛋白 (COL II、Aggrecan) 水平升高，与膝痹宁高剂量组比较，膝痹宁低剂量组 MMPs 及 ADAMTS5 蛋白水平较高，COL II 及 Aggrecan 蛋白水平较低，各指标的 mRNA 表达结果亦表明膝痹宁能够有效缓解细胞外基质降解，改善小鼠软骨组织病理损伤，且高剂量效果更好。

cGAS-STING 通路是机体内一种重要的免疫信号通路，广泛参与抗病毒免疫、细胞损伤反应及炎症调节^[21]。研究发现，cGAS-STING 通路在 KOA 中发挥了重要作用^[22]。cGAS 是细胞质中 DNA 感知受体，当细胞受损时，cGAS 可以识别细胞内的双链 DNA。cGAS 与 DNA 结合后会催化合成环状 cGAMP，cGAMP 随后通过结合 STING 蛋白，激活 STING 通路，进一步引发下游的免疫反应^[23]。当 cGAS-STING 通路被激活后，巨噬细胞通过 STING 通路产生大量的促炎因子，如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等^[24]。

此外, cGAS-STING 信号通路还能够调节巨噬细胞的极化状态, 减少 M2 型巨噬细胞, 加剧局部的炎症反应^[25]。本研究结果表明, 不同剂量的膝痹宁均可有效降低膝关节软骨组织中 cGAS、STING 蛋白及其 mRNA 表达, 与膝痹宁高剂量组比较, 膝痹宁低剂量组 cGAS、STING 表达较高, 提示膝痹宁可能是通过调控 cGAS-STING 信号通路发挥治疗 KOA 的作用, 且高剂量效果更好。血清 ELISA 结果显示, 不同剂量的膝痹宁治疗后, 能有效降低 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 炎症因子水平, 且以高剂量治疗效果最显著。以上结果表明, 膝痹宁能够有效缓解 KOA 小鼠软骨损伤且随着剂量的升高, 治疗效果逐步提升, 呈现明显的正相关量效关系。故本研究采用膝痹宁高剂量加入 cGAS-STING 激动剂, 与膝痹宁高剂量组比较, 膝痹宁高剂量+激动剂组软骨细胞外基质破坏严重, Mankin 评分升高; 血清炎症因子含量升高; COL II、Aggrecan 蛋白及其 mRNA 表达降低, MMP3、MMP13、ADAMTS5、cGAS、STING 蛋白及其 mRNA 表达升高, 表明 cGAS-STING 信号通路被 DMXAA 激活后, 膝痹宁改善软骨损伤的作用则被减弱和消除。因此我们认为, 膝痹宁缓解软骨损伤的机制与抑制 cGAS-STING 信号通路相关。

综上所述, 膝痹宁能够有效抑制 cGAS-STING 信号通路, 缓解 KOA 软骨损伤。然而, 本研究复方药物成分较为复杂, 其具体作用机制仍需进一步研究与验证。

参考文献

- [1] KAN HS, CHAN PK, CHIU KY, et al. Non-surgical treatment of knee osteoarthritis [J]. Hong Kong Med J, 2019, 25(2):127-133.
- [2] 冯晓晴, 蔡道章, 余星磊, 等. 基于 GBD 大数据中国膝关节关节炎疾病负担现状与趋势分析 [J]. 现代预防医学, 2022, 49(10):1753-1760.
- [3] HOPFNER KP, HORNUNG V. Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS-STING signalling [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(9):501-521.
- [4] YU ZC, FU R, LI Y, et al. The STING inhibitor C-176 attenuates osteoclast-related osteolytic diseases by inhibiting osteoclast differentiation [J]. Faseb J, 2023, 37(4):e22867.
- [5] NI L, LIN Z, HU S, et al. Itaconate attenuates osteoarthritis by inhibiting STING/NF- κ B axis in chondrocytes and promoting M2 polarization in macrophages [J]. Biochem Pharmacol, 2022, 198:114935. doi: 10.1016/j.bcp.2022.114935.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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, 2022, 35:141-151. doi: 10.1016/j.jare.2021.06.007.
- [10] SONG X, LIU Y, CHEN S, et al. Knee osteoarthritis: a review of animal models and intervention of traditional Chinese medicine [J]. Animal Model Exp Med, 2024, 7(2):114-126.
- [11] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010:69-72.
- [12] VINCENT J, ADURA C, GAO P, et al. Small molecule inhibition of cGAS reduces interferon expression in primary macrophages from autoimmune mice [J]. Nat Commun, 2017, 8(1):750.
- [13] MURAT N, KARADAM B, OZKAL S, et al. Quantification of papain-induced rat osteoarthritis in relation to time with the Mankin score [J]. Acta Orthop Traumatol Turc, 2007, 41(3):233-237.
- [14] HALL M, VAN DER ESCH M, HINMAN RS, et al. How does hip osteoarthritis differ from knee osteoarthritis? [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2022, 30(1):32-41.
- [15] 邢润麟, 廖太阳, 王培民. 衰老视角阐释膝关节炎虚实夹杂病机的科学内涵 [J]. 世界中医药, 2023, 18(23):3382-3385.
- [16] SZWEDOWSKI D, SZCZEPANEK J, PACZESNY Ł, et al. The effect of platelet-rich plasma on the intra-articular microenvironment in knee osteoarthritis [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(11):5492.
- [17] NEDUNCHEZHIAN U, VARUGHESE I, SUN AR, et al. Obesity, inflammation, and immune system in osteoarthritis [J]. Front Immunol, 2022, 13:907750. doi: 10.3389/fimmu.2022.907750.
- [18] MARTEL-PELLETIER J, BARR AJ, CICUTTINI FM, et al. Osteoarthritis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2016, 2:16072. doi: 10.1038/nrdp.2016.72.
- [19] TROEBERG L, NAGASE H. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1824(1):133-145.
- [20] LI T, PENG J, LI Q, et al. The mechanism and role of

- ADAMTS protein family in osteoarthritis[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(7):959.
- [21] DECOUT A, KATZ JD, VENKATRAMAN S, et al. The cGAS-STING pathway as a therapeutic target in inflammatory diseases[J]. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21(9): 548–569.
- [22] SUN K, ZHANG X, HOU L, et al. TRPM2-mediated feed-forward loop promotes chondrocyte damage in osteoarthritis via calcium-cGAS-STING-NF- κ B pathway[J]. *J Adv Res*, 2024, 5:S2090–1232(24)00499-5. doi: 10.1016/j.jare.2024.11.007.
- [23] SAMSON N, ABLASSER A. The cGAS-STING pathway and cancer[J]. *Nat Cancer*, 2022, 3(12):1452–1463.
- [24] CHEN C, XU P. Cellular functions of cGAS-STING signaling[J]. *Trends Cell Biol*, 2023, 33(8):630–648.
- [25] LIU Z, WANG M, WANG X, et al. XBP1 deficiency promotes hepatocyte pyroptosis by impairing mitophagy to activate mtDNA-cGAS-STING signaling in macrophages during acute liver injury [J]. *Redox Biol*, 2022, 52: 102305. doi: 10.1016/j.redox.2022.102305.

Effect of *Xibining Formula* (膝痹宁) on Knee Cartilage Tissue Damage and the cGAS-STING Signaling Pathway in Knee Osteoarthritis Model Mice

FU Houyu^{1,2}, LI Xiaochen^{1,2}, GONG Zijian^{1,2}, JIE Lishi^{1,2}, LIU Jiangyu^{1,2}, CHEN Yingqi^{1,2}, WANG Peimin^{1,2}

1. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine / Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Nanjing, 210029;
2. The First Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To investigate the possible mechanism of action of *Xibining Formula* (膝痹宁) for cartilage damage in knee osteoarthritis (KOA) through the cyclic guanosine-adenosine monophosphate synthase (cGAS)-stimulator of interferon genes (STING) signaling pathway. **Methods** Fifty C57BL/6J mice were randomly divided into five groups (10 per group), sham operation group, KOA model group, low-dose *Xibining Formula* group, high-dose *Xibining Formula* group, and high-dose *Xibining Formula* + agonist group. The KOA models were constructed using the destabilization of the medial meniscus (DMM) method in all groups but the sham surgery group. Two weeks after surgery, the low- and high-dose *Xibining Formula* groups were administered *Xibining Formula* at doses of 3.58 g/(kg·d) and 14.32 g/(kg·d) respectively via gavage. The high-dose *Xibining Formula* + agonist group received 14.32 g/(kg·d) of *Xibining Formula* via gavage followed by an intraperitoneal injection of Vadimezan (DMXAA) at 25 mg/kg. The sham surgery group and the KOA model group mice were given an equivalent volume of normal saline at 5 ml/(kg·d) via gavage, once daily for four consecutive weeks. Serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), and interleukin-6 (IL-6) were measured by ELISA; pathological changes in cartilage tissue were observed using hematoxylin-eosin (HE) staining and Safranin O-Fast Green staining. Pathological changes were scored according to the Mankin scoring system; the levels of cartilage tissue matrix regulation-related indicators such as matrix metalloproteinase 3 (MMP3), matrix metalloproteinase 13 (MMP13), a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5 (ADAMTS), type-II collagen (C II) and aggregated proteoglycan (Aggrecan), and also cGAS-STING pathway-related protein and mRNA expression levels were detected by Western blot and qPCR methods. **Results** Compared with the sham surgery group, the KOA model group showed severe cartilage edge destruction, significantly increased Mankin scores, significantly decreased protein and mRNA expression levels of COL II and Aggrecan, and significantly increased protein and mRNA expression levels of cGAS, STING, MMP3, MMP13, and ADAMTS5 ($P < 0.01$). Compared with the control group, serum level of IL-6, IL-1 β , TNF- α in all the intervened groups decreased ($P < 0.01$), while compared with high-dose *Xibining Formula* group, level of IL-6, IL-1 β , and TNF- α in low-dose *Xibining Formula* group and high-dose *Xibining Formula* + agonist group increased ($P < 0.01$). Compared with the KOA model group, all the intervention groups exhibited alleviated cartilage pathological changes, significantly reduced Mankin scores, significantly increased protein and mRNA expression levels of COL II and Aggrecan, and significantly decreased protein and mRNA expression levels of cGAS, STING, MMP3, MMP13, and ADAMTS5 ($P < 0.01$). Compared with high-dose *Xibining Formula* group, high-dose *Xibining Formula* + agonist group showed cartilage edge destruction, significantly increased Mankin scores, significantly decreased protein and mRNA expression levels of COL II and Aggrecan, and increased protein and mRNA expression levels of cGAS, STING, MMP3, MMP13, and ADAMTS5 ($P < 0.01$). **Conclusion** *Xibining Formula* may improve KOA cartilage damage by inhibiting the cGAS-STING signaling pathway, decreasing matrix degradation-related proteins, and elevating matrix composition-related proteins.

Keywords knee osteoarthritis; cartilage damage; *Xibining Formula* (膝痹宁); cyclic guanosine-adenosine monophosphate synthase; stimulator of interferon genes; matrix metalloproteinases

(收稿日期: 2025-02-27; 修回日期: 2025-03-25)

[编辑: 邓媛]