

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.24.012

温肾通络止痛方对骨质疏松症合并骨关节炎模型大鼠
膝关节骨-软骨代谢及 HIFs/OPG/RANKL 通路的影响傅璟玥^{1,2}, 马勇^{1,2}, 周勤峰¹, 孙杰¹, 潘娅岚¹, 王礼宁^{1,3}, 李沐哲¹, 黄项阳¹, 郭杨¹✉

1. 南京中医药大学骨伤修复与重建新技术实验室, 江苏省南京市栖霞区仙林大道 138 号, 210023; 2. 南京中医药大学附属盐城中医院; 3. 南京中医药大学中西医结合学院

[摘要] **目的** 从骨-软骨代谢及低氧诱导因子(HIFs)/骨保护素(OPG)/核因子 κ B受体激活因子配体(RANKL)通路探讨温肾通络止痛方治疗骨质疏松症和骨关节炎共病的可能作用机制。**方法** 35只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、阿仑膦酸钠组、温肾通络止痛方低剂量组及高剂量组,每组7只。除假手术组外,其余各组大鼠采用双侧卵巢去势+改良式Hulth术构建骨质疏松症和骨关节炎共病大鼠模型。于造模结束后2周开始干预,温肾通络止痛方低剂量组、高剂量组分别给予温肾通络止痛方14.76、29.52 g/(kg·d)灌胃,每日1次;阿仑膦酸钠组给予6.3 mg/kg灌胃,每周1次;假手术组与模型组均以10 ml/(kg·d)生理盐水灌胃,每日1次。干预10周后,观察大鼠膝关节大体形态并进行Collins评分;采用Micro-CT检测股骨远端骨密度和胫骨平台软骨下骨骨微结构[包括骨体积分数(BV/TV)、骨小梁分离度(Tb.Sp)];HE染色和番红固绿染色观察膝关节病理变化,并进行Mankin评分;采用ELISA法测定血清炎症因子水平[包括肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素1 β (IL-1 β)]和HIFs/OPG/RANKL信号通路相关因子[包括缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α)、缺氧诱导因子2 α (HIF-2 α)、OPG、RANKL]水平,并计算OPG/RANKL比值;免疫荧光检测膝关节HIF-1 α 、HIF-2 α 蛋白表达;Western Blot法测定膝关节骨-软骨代谢[包括Ⅱ型胶原 α 1链(COL2A1)、Ⅰ型胶原 α 2链(COL1A2)、基质金属蛋白酶13(MMP13)、基质金属蛋白酶9(MMP9)、Runt相关转录因子(RUNX2)]和HIFs/OPG/RANKL蛋白[包括OPG、RANKL、HIF-1 α 、HIF-2 α 、Egl九同源蛋白(EGLN)]水平。**结果** 与假手术组比较,模型组大鼠膝关节Collins评分、Mankin评分显著升高;骨密度、BV/TV显著下降,Tb.Sp显著上升;血清TNF- α 、IL-1 β 、RANKL、HIF-1 α 、HIF-2 α 水平升高,OPG/RANKL水平降低;HIF-1 α 蛋白平均免疫荧光强度降低,HIF-2 α 蛋白平均免疫荧光强度升高;膝关节COL2A1、COL1A2、HIF-1 α 、OPG/RANKL水平降低,MMP9、MMP13、RUNX2、RANKL、HIF-2 α 、EGLN蛋白水平升高($P<0.05$)。与模型组比较,温肾通络止痛方高剂量组和阿仑膦酸钠组上述各指标均改善($P<0.05$)。温肾通络止痛方高剂量组在改善血清HIF-1 α 、HIF-2 α 、OPG水平,HIF-2 α 蛋白平均免疫荧光强度,COL2A1、MMP9、RUNX2、COL1A2、OPG、OPG/RANKL、EGLN水平方面优于温肾通络止痛方低剂量组($P<0.05$);阿仑膦酸钠组在降低血清TNF- α 、IL-1 β 、HIF-1 α 、HIF-2 α 水平和膝关节HIF-1 α 、HIF-2 α 蛋白平均荧光强度方面优于温肾通络止痛方低剂量组($P<0.05$)。**结论** 温肾通络止痛方可能通过调控膝关节HIFs/OPG/RANKL通路,平衡骨代谢和改善软骨退变,进而缓解骨质疏松和骨关节炎共病发展进程。

[关键词] 骨质疏松症;骨关节炎;低氧诱导因子;骨保护素;核因子 κ B受体激活因子配体;骨代谢;温肾通络止痛方

基金项目:国家自然科学基金(82174411);江苏省自然科学基金(BK20221351);国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目(国中医药人教函[2023]85号);盐城市基础 Research 计划(YCBK2024087);江苏省研究生科研创新计划(KYCX24_2190)

✉ 通讯作者: dguoyang@njucm.edu.cn

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 和骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是两种常见的骨骼疾病, 均为老年人常见病、高发病, 同时也被认定为全球主要的公共卫生问题^[1]。一项大型调查^[2]显示, 约 95% 的 OP 患者至少存在一种共病, 且全球超过 50% 的绝经女性同时患有 OP 和 OA。然而现代医疗缺乏对老年共病医疗管理的研究与实践, 使共病人群存在多重用药等问题。OP 和 OA 均可归属于中医学“骨痹”“骨痿”范畴, 以肝肾亏虚为本, 气滞血瘀为标, 脾胃气血亏虚贯穿其中是两种疾病共同的病机特点^[3], 针对共同病机可依据中医异病同治原则进行辨治。本团队经验方温肾通络止痛方治疗 OP 临床疗效确切, 能有效减轻腰背冷痛、骨痛、步履艰难等临床症状, 且可提高骨密度^[4]; 基础研究进一步发现该方可抑制破骨细胞功能, 促进成骨细胞分化, 增强骨形成^[5-6]。

低氧诱导因子 (HIFs) 是一类氧依赖的转录激活因子, 主导细胞对低氧环境的耐受, 在调节血管生成、能量代谢和细胞周期中起着至关重要的作用^[7]。HIFs 是由缺氧诱导因子 α (HIF- α) 和缺氧诱导因子 β (HIF- β) 亚基组成的异二聚体蛋白, HIF- α 的不同亚型具有不同的功能和各自的转录活性, 缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)、缺氧诱导因子 2 α (HIF-2 α) 直接诱导调控不同的靶基因转录, 且对急、慢性缺氧环境的反应存在差异^[7]。有研究证实, OP 和 OA 共病状态下的缺氧微环境中, HIF-1 α 、HIF-2 α 信号通过介导不同基因的转录, 从正负两方面调控了骨-软骨代谢过程, 且骨-软骨交界面骨保护素 (OPG)、核因子 κ B 受体激活因子配体 (RANKL) 的分泌水平可受到 HIFs 影响^[8]。因此, 本研究观察温肾通络止痛方对 OP 和 OA 共病模型大鼠的干预效果, 拟从骨-软骨代谢及 HIFs/OPG/RANKL 信号通路角度探讨其可能作用机制。本研究通过南京中医药大学实验动物伦理委员会审批 (批件号: 202304A073)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雌性 SD 大鼠 35 只, 体质量 (180 $\pm$ 20) g, 7~8 周龄, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物合格证号: SCXK (京) 2021-0011。饲养于南京中医药大学实验动物中心, 环境温度 24~26 $^{\circ}$ C, 相对湿度 50% 左右, 明暗交替各 12 h。动物分笼饲养, 每笼 4~5 只, 自由摄食饮水, 经适

应性饲养 1 周后开始实验。

1.2 药物

温肾通络止痛方组成: 黄芪 15 g, 炮附片 8 g, 蛇床子 6 g, 淫羊藿 10 g, 独活 10 g, 羌活 10 g, 白芍 15 g, 山萸肉 10 g, 骨碎补 30 g, 狗脊 10 g, 薏苡仁 15 g, 白术 10 g, 细辛 3 g, 天麻 6 g, 炙甘草 6 g。药物购自江苏省中医院紫东院区, 加入 10 倍水重复煎煮 2 次, 药液过滤后浓缩至生药浓度为 2.95 g/ml。

阿仑膦酸钠片 (杭州默沙东制药有限公司, 70 mg/片), 药片碾碎后加入蒸馏水溶解为 0.63 mg/ml。

1.3 主要试剂与仪器

红霉素软膏 (福元药业有限公司, 批号 H34020379); 4% 多聚甲醛 (批号 G1101)、HE 染色液 (批号 G1103)、番红固绿染液 (批号 G1053), Servicebio 公司; 肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、HIF-1 α 、HIF-2 α 、OPG、RANKL ELISA 试剂盒 (南京金益柏生物科技有限公司, 批号分别为 LA166601H、LA167616H、LA166672H、LA166101H、LA166688H、LA166689H); Runt 相关转录因子 (RUNX2) 抗体、I 型胶原 α 2 链 (COL1A2) 抗体、II 型胶原 α 1 链 (COL2A1)、基质金属蛋白酶 13 (MMP13) 抗体、核因子 κ B 受体活化因子 (RANKL) 抗体 (Proteintech 公司, 批号分别为 20700-1-AP、14695-1-AP、28459-1-AP、18165-1-AP、23408-1-AP); 基质金属蛋白酶 9 (MMP9) 抗体 (Abways 公司, 批号 CY5205); OPG 抗体 (华安生物科技有限公司, 批号 R1608-4); HIF-1 α 抗体 (Immunoway 公司, 批号 YT2133); HIF-2 α 抗体、Egl 九同源蛋白 (EGLN) 抗体 (SAB 公司, 批号分别为 49814、27397-1); ECL 显影液 (Biosharp 公司, 批号 BL520A); 羊抗鼠二抗 (批号 A0216)、羊抗兔二抗 (批号 A0208), 碧云天生物技术有限公司。

小动物活体 Micro CT (Skyscan-1276 型), 德国 Bruker 公司; 蛋白电泳仪 (221BR 型)、ChemiDoc 化学发光凝胶成像系统 (12003153 型), 美国 Bio-Rad 公司; 正置荧光显微镜 (CX33 型), 日本 OLYMPUS 公司。

1.4 动物分组、造模及给药

按照随机数字表将 35 只大鼠分为假手术组、模型组、阿仑膦酸钠组、温肾通络止痛方低剂量组及高剂量组, 每组 7 只。除假手术组外, 其余各组大鼠参考既往研究结果^[9-10]制备 OP 和 OA 共病模

型：术前一晚禁食禁水，进行双侧卵巢去势法（用丝线将卵巢根部下输卵管结扎后摘除卵巢）建立 OP 模型，术后 4 周对大鼠双侧膝关节采用改良式 Hulth 法（离断膝关节内侧副韧带，打开关节腔，横断前交叉韧带，摘除内侧半月板）建立 OA 模型，术中避免损伤关节面。术后于伤口处涂抹红霉素软膏每日 1 次，连续 6 天，不固定患肢让大鼠自由活动。假手术组不切除卵巢仅切除部分脂肪组织，膝关节部位仅打开暴露关节腔而不做任何其他创伤性手术处理。

温肾通络止痛方低、高剂量组给药剂量按照成人临床剂量与大鼠和成人之间体表面积折算系数^[11]计算，分别给予温肾通络止痛方 14.76、29.52 g/(kg·d) 灌胃，每日 1 次，其中低剂量为临床等效剂量。阿仑膦酸钠组大鼠给予临床等效剂量 6.3 mg/kg 灌胃，每周 1 次。假手术组与模型组均以 10 ml/(kg·d) 生理盐水灌胃，每日 1 次。各组均于模型制备结束后 2 周开始干预，持续干预 10 周，于末次给药 2 h 后处死大鼠并收集血液及膝关节组织保存备用。

1.5 观察指标与方法

1.5.1 大鼠膝关节大体情况 解剖大鼠，打开大鼠膝关节，用高清相机拍摄记录大鼠股骨髁表面及胫骨平台，并对单侧大鼠膝关节大体情况按照关节软骨宏观评分 Collins 评分^[12]系统评分。0 分：关节面完整，颜色正常；1 分：关节面明显粗糙；2 分：关节面破坏，存在细小裂隙；3 分：关节面破坏，软骨损伤深达软骨表中层；4 分：关节面破坏，软骨损伤深达软骨下骨，软骨下骨暴露。

1.5.2 Micro-CT 检测膝关节骨密度及骨微结构

采用随机数字表法每组选取 5 只大鼠将左侧完整膝关节放入 4% 多聚甲醛中固定 72 h 后，进行 Micro-CT 扫描，分辨率 9 μm，扫描图像导入 CTVOX 3.0 软件进行二维和三维重建。选取股骨远端生长板融合点下 1000~4500 μm 区域、以胫骨平台外表面为上限和胫骨近端生长板为下限的软骨下骨区域为两个感兴趣区域，检测股骨下端骨密度和胫骨平台软骨下骨骨体积分数 (BV/TV)、骨小梁分离度 (Tb.Sp)。

1.5.3 HE 染色和番红固绿染色检测膝关节软骨和软骨下骨病理形态 取上述 Micro-CT 扫描后的膝关节移入 EDTA 脱钙液中脱钙 30 天后，用注射器针头检验脱钙效率，脱水浸蜡，包埋，切片。切片分别入苏木素伊红染液和固绿番红染液染色，后无水乙

醇脱水，二甲苯透明后，中性树胶封片，进行显微镜镜检，图像采集分析。每张切片选择 3 个不同视野，依据 Mankin 关节软骨病理评分标准^[13]进行 Mankin 评分。

1.5.4 ELISA 法测定血清炎症因子及 HIFs/OPG/RANKL 信号通路相关因子水平 大鼠腹主动脉采血提取血清，-80℃ 保存备用，依照 ELISA 试剂盒具体操作步骤检测血清炎症因子 (TNF-α、IL-1β) 及 HIF-1α、HIF-2α、OPG、RANKL 水平。使用酶标仪测定 450 nm 处最大吸收波长值，并计算 OPG/RANKL 比值评估骨吸收净效应。

1.5.5 免疫荧光法检测膝关节软骨及软骨下骨中 HIF-1α、HIF-2α 表达水平 采用随机数字表法每组选取 5 只大鼠左侧膝关节放入 4% 多聚甲醛中固定 72 h 后，移入 EDTA 脱钙液中脱钙 30 天，用注射器针头检验脱钙效率，脱水浸蜡，包埋，切片。采用免疫荧光法依次对 HIF-1α、HIF-2α 蛋白进行孵育，显微镜下观察组织阳性情况，使用 Image J 1.54 系统分析各组相对荧光强度。

1.5.6 Western Blot 法检测膝关节骨-软骨代谢和 HIFs/OPG/RANKL 蛋白表达 采用随机数字表法各组选取 3 只大鼠，提取大鼠胫骨平台软骨组织及胫骨近端生长板以上软骨下骨部分样本，通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质，PVDF 膜转膜，脱脂奶粉封闭，加入按照说明书比例稀释的骨形成相关分子 RUNX2、COL1A2（稀释比例分别为 1:1000，1:2000），软骨基质合成与降解相关分子 COL2A1、MMP13（稀释比例分别为 1:2000，1:1000），骨吸收相关分子 MMP9（稀释比例为 1:1000），HIFs 通路相关分子 HIF-1α、HIF-2α、OPG、RANKL、EGLN-1 抗体（稀释比例分别为 1:1000、1:1000、1:1000、1:500、1:1000），4℃ 孵育过夜，加入相应种属二抗室温（稀释比例 1:1000）室温孵育，配置 ECL 显影液，凝胶成像系统显影，使用 Image J 1.54 系统分析各条带灰度值。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析，计量资料均符合正态分布，用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，方差齐时组间比较采用单因素方差分析和 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠膝关节 Collins 评分比较

假手术组大鼠膝关节表面光滑完整，有光泽；

模型组大鼠膝关节表面破坏，失去光泽弹性，股骨髁表面及胫骨平台内侧软骨面有缺损，有骨赘生成，软骨下骨暴露；相较模型组，温肾通络止痛方低剂量组关节表面有缺损，温肾通络止痛方高剂量组关节软骨表面颜色透亮，有细小裂痕，无骨赘糜烂现象，与阿仑膦酸钠组修复程度相似。表 1 示，与假手术组比较，模型组大鼠膝关节 Collins 评分升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，各给药组大鼠膝关节 Collins 评分均降低 ($P<0.05$)，但各给药组之间 Collins 评分差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 1 各组大鼠膝关节 Collins 评分比较

Table 1 Comparison of knee joint Collins scores among rats in each group (分, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Collins 评分
假手术组	7	0.29±0.49
模型组	7	3.43±0.53 ^{a)}
温肾通络止痛方低剂量组	7	2.43±0.53 ^{b)}
温肾通络止痛方高剂量组	7	2.00±0.58 ^{b)}
阿仑膦酸钠组	7	1.86±0.69 ^{b)}

注：a) 与假手术组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

2.2 各组大鼠股骨远端骨密度及胫骨平台软骨下骨骨微结构比较

表 2 示，与假手术组比较，模型组大鼠骨密度、BV/TV 显著下降，Tb. Sp 显著上升 ($P<0.05$)；与模型组比较，温肾通络止痛方低剂量组骨密度差异无统计学意义 ($P>0.05$)，BV/TV 显著上升，Tb. Sp 显著下降 ($P<0.05$)；温肾通络止痛方高剂量组、阿仑膦酸钠组骨密度、BV/TV 显著上升，Tb. Sp 显著下降 ($P<0.05$)。各给药组组间比较，骨密度、BV/TV、Tb. Sp 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

图 1 示，假手术组大鼠膝关节解剖结构清晰可见，软骨下骨板较厚，软骨下骨骨小梁排列紧密且厚度均匀，未见骨赘与骨刺，关节表面光滑；模型组大鼠相较假手术组，软骨下骨板厚度不均，骨小梁结构破坏、排列稀疏、间隙变大，有明骨赘生成，关节表面损坏严重；相较模型组，温肾通络止痛方低剂量组骨小梁增多加厚，连续性增强，未见骨赘骨刺，关节表面变平整，但仍有局部缺损；温肾通络止痛方高剂量组骨小梁结构更完整，无骨赘

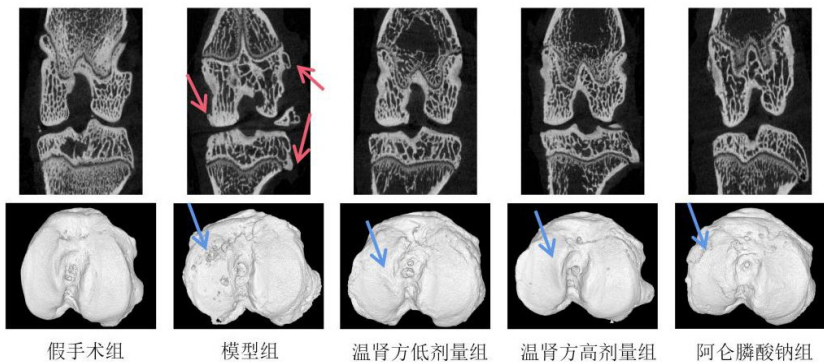
表 2 各组大鼠股骨远端骨密度及胫骨平台软骨下骨骨微结构比较

Table 2 Comparison of bone mineral density at the distal femur and subchondral bone microstructure of the tibial plateau among rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	骨密度/ $\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$	骨微结构	
			BV/TV/%	Tb. Sp/ μm
假手术组	5	0.53±0.05	66.63±1.10	222.80±10.42
模型组	5	0.30±0.02 ^{a)}	61.86±1.86 ^{a)}	279.00±2.26 ^{a)}
温肾通络止痛方低剂量组	5	0.35±0.01	70.91±3.12 ^{b)}	243.70±5.52 ^{b)}
温肾通络止痛方高剂量组	5	0.39±0.01 ^{b)}	68.60±1.90 ^{b)}	229.20±1.23 ^{b)}
阿仑膦酸钠组	5	0.38±0.02 ^{b)}	67.03±2.51 ^{b)}	266.90±4.91 ^{b)}

注：BV/TV，骨体积分数；Tb. Sp，骨小梁分离度。

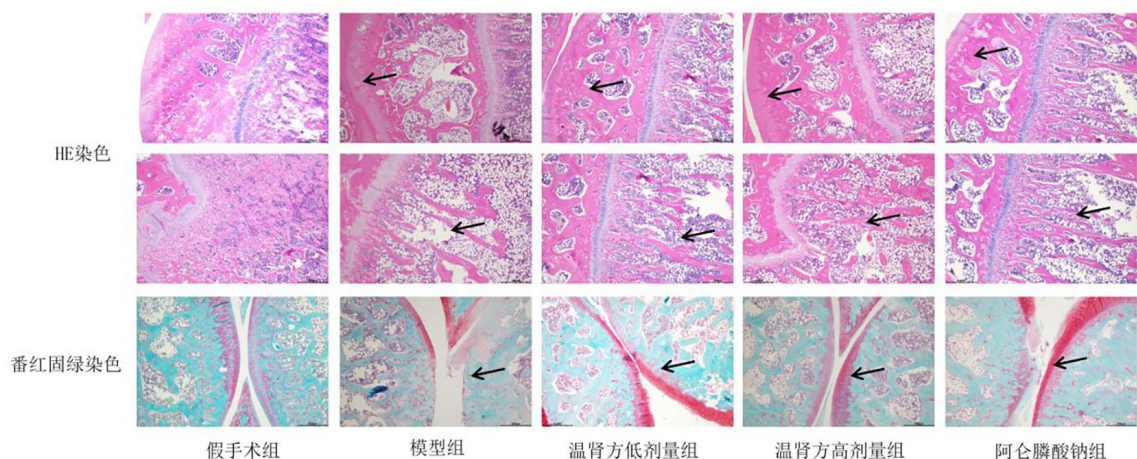
a) 与假手术组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ 。



注：红色箭头指示为骨赘，蓝色箭头指示为关节表面缺损处。

图 1 各组大鼠 Micro-CT 膝关节冠状面图像及 3D 重建图

Figure 1 Coronal plane images and 3D reconstructions of rat knee joints detected by Micro-CT in each group



注：HE 染色图第一行为骨表面，第二行为骨表面下骨小梁，黑色箭头指示关节表面结构破坏处与骨小梁结构破坏处；番红固绿染色黑色箭头指示关节表面缺损处。

图2 各组大鼠膝关节 HE 染色和番红固绿染色病理图 (×40)

Figure 2 Pathological images of rat knee joints with HE and Safranin O-Fast Green Stainings in each group (×40)

骨刺，关节表面修复度高；阿仑膦酸钠组软骨下骨骨微结构与软骨表面总体修复程度与温肾通络止痛方低剂量组相似。

2.3 各组大鼠膝关节病理学结构改变比较

图2示，HE 染色结果发现，假手术组软骨层四层结构排列紧密、有序，软骨细胞排列整齐，潮线完整连续，软骨下骨骨小梁数量多且厚度适中、排列有序，骨小梁之间的连接紧密；模型组软骨表面不平整有裂隙，四层结构破坏，软骨层明显变薄，潮线中断，软骨下骨骨小梁数目显著减少、厚度变薄且出现断裂，骨髓腔变大充斥脂肪空泡；相较模型组，温肾通络止痛方低、高剂量组软骨层均有修复，骨小梁数量增加、厚度增厚、连接增多，温肾通络止痛方低剂量组软骨表面仍有局部缺损，温肾通络止痛方高剂量组软骨表面趋于完整；阿仑膦酸钠组软骨表面有所修复但有部分缺损，层状结构有所恢复，骨小梁数量增多、连续性增强。

番红固绿染色结果显示，假手术组大鼠膝关节软骨表面平整，软骨细胞分布均匀，红染均匀，潮线清晰；模型组大鼠软骨表面不平整，软骨细胞分布紊乱，红染信号减弱甚至完全褪色；相较模型组，温肾通络止痛方低、高剂量组软骨表面较完整，潮线结构恢复，红染增强；阿仑膦酸钠组软骨表面破损区域减少，细胞排列紊乱程度减轻。

表3示，与假手术组比较，模型组大鼠膝关节 Mankin 评分显著升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，各给药组大鼠膝关节 Mankin 评分均显著下降 ($P<0.05$)，各给药组间膝关节 Mankin 评分差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表3 各组大鼠膝关节 Mankin 评分比较

Table 3 Comparison of knee joint Mankin scores among rats in each group (分, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Mankin 评分
假手术组	5	1.67±0.58
模型组	5	12.00±1.00 ^{a)}
温肾通络止痛方低剂量组	5	7.67±0.58 ^{b)}
温肾通络止痛方高剂量组	5	5.33±1.00 ^{b)}
阿仑膦酸钠组	5	6.00±0.58 ^{b)}

注：a) 与假手术组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

2.4 各组大鼠血清炎症因子和 HIFs/OPG/RANKL 信号通路相关因子水平比较

表4示，与假手术组比较，模型组时大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、RANKL、HIF-1 α 、HIF-2 α 水平显著升高，OPG、OPG/RANKL 水平降低 ($P<0.05$)。与模型组比较，除温肾通络止痛方低剂量组 OPG 外，各给药组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、RANKL、HIF-1 α 、HIF-2 α 水平显著降低，OPG、OPG/RANKL 水平升高 ($P<0.05$)。与温肾通络止痛方低剂量比较，温肾通络止痛方高剂量大鼠血清 HIF-1 α 、HIF-2 α 水平降低，OPG 水平升高 ($P<0.05$)，阿仑膦酸钠组 TNF- α 、IL-1 β 、HIF-1 α 、HIF-2 α 水平降低，OPG 水平上升 ($P<0.05$)。

2.5 各组大鼠膝关节 HIF-1 α 、HIF-2 α 蛋白免疫荧光检测结果比较

各组大鼠膝关节 HIF-1 α 、HIF-2 α 免疫荧光染色图见图3。表5示，与假手术组比较，模型组大鼠膝关节 HIF-1 α 蛋白平均免疫荧光强度降低，HIF-2 α 蛋白平均免疫荧光强度升高 ($P<0.05$)。

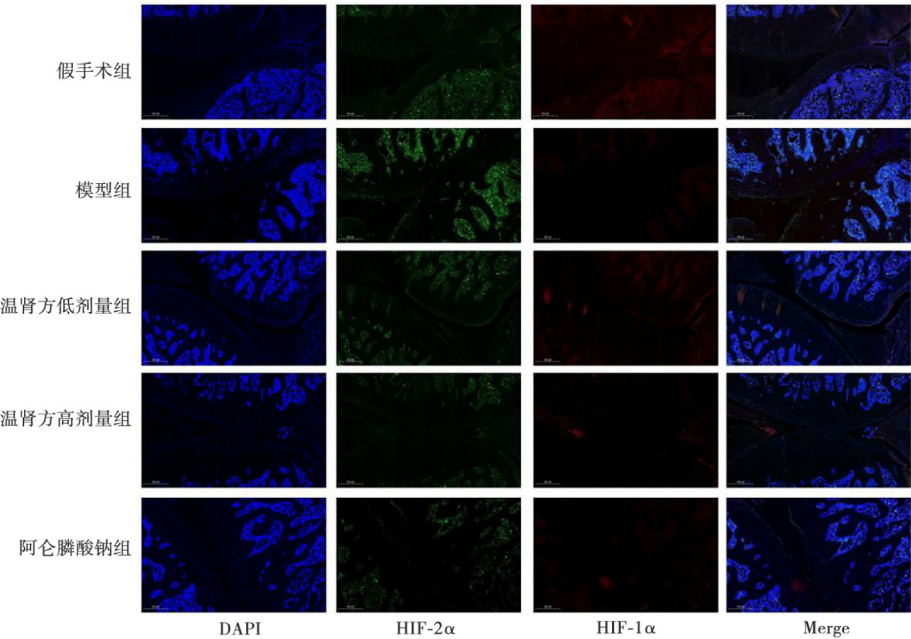
表 4 各组大鼠血清中炎症因子和 HIFs/OPG/RANKL 信号通路相关因子水平比较

Table 4 Comparison of serum levels of inflammatory factors and factors related to the HIFs/OPG/RANKL signaling pathway among rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	TNF- α /pg·ml ⁻¹	IL-1 β /pg·ml ⁻¹	OPG/pg·ml ⁻¹	RANKL/pg·ml ⁻¹	OPG/RANKL	HIF-1 α /ng·ml ⁻¹	HIF-2 α /pg·ml ⁻¹
假手术组	7	45.72 $\pm$ 17.93	74.03 $\pm$ 8.68	232.00 $\pm$ 51.22	96.85 $\pm$ 6.93	2.43 $\pm$ 0.69	0.21 $\pm$ 0.04	51.69 $\pm$ 9.43
模型组	7	169.80 $\pm$ 28.09 ^{a)}	317.00 $\pm$ 29.37 ^{a)}	60.90 $\pm$ 21.34 ^{a)}	316.00 $\pm$ 83.79 ^{a)}	0.21 $\pm$ 0.11 ^{a)}	1.06 $\pm$ 0.11 ^{a)}	161.20 $\pm$ 11.75 ^{a)}
温肾通络止痛方低剂量组	7	97.48 $\pm$ 11.96 ^{b)}	145.20 $\pm$ 35.05 ^{b)}	94.30 $\pm$ 13.55	100.70 $\pm$ 16.68 ^{b)}	0.97 $\pm$ 0.25 ^{b)}	0.87 $\pm$ 0.03 ^{b)}	136.30 $\pm$ 8.78 ^{b)}
温肾通络止痛方高剂量组	7	100.80 $\pm$ 2.86 ^{b)}	103.70 $\pm$ 11.01 ^{b)}	161.80 $\pm$ 10.08 ^{b)c)}	156.40 $\pm$ 9.48 ^{b)}	1.04 $\pm$ 0.13 ^{b)}	0.53 $\pm$ 0.07 ^{b)c)}	104.40 $\pm$ 7.05 ^{b)c)}
阿仑膦酸钠组	7	57.88 $\pm$ 15.65 ^{b)c)}	78.00 $\pm$ 10.94 ^{b)c)}	138.60 $\pm$ 9.46 ^{b)c)}	121.60 $\pm$ 36.43 ^{b)}	1.24 $\pm$ 0.41 ^{b)}	0.35 $\pm$ 0.06 ^{b)c)}	79.93 $\pm$ 8.75 ^{b)c)}

注：TNF- α ，肿瘤坏死因子 α ；IL-1 β ，白细胞介素1 β ；OPG，骨保护素；RANKL，核因子 κ B受体活化因子；HIF-1 α ，缺氧诱导因子1 α ；HIF-2 α ，缺氧诱导因子2 α 。

a) 与假手术比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与温肾通络止痛方低剂量比较， $P<0.05$ 。



注：HIF-1 α ，缺氧诱导因子1 α ；HIF-2 α ，缺氧诱导因子2 α ；蓝色为DAPI，绿色为HIF-2 α 表达，红色为HIF-1 α 表达。

图3 各组大鼠膝关节HIF-1 α 、HIF-2 α 免疫荧光染色图(×5)

Figure 3 Immunofluorescence staining images of HIF-1 α and HIF-2 α in rat knee joints of each group (×5)

与模型组比较，各给药组大鼠膝关节HIF-1 α 蛋白平均免疫荧光强度升高，HIF-2 α 蛋白平均免疫荧光强度降低($P<0.05$)。与温肾通络止痛方低剂量组比较，温肾通络止痛方高剂量组HIF-2 α 蛋白平均免疫荧光强度降低，阿仑膦酸钠组HIF-1 α 蛋白、HIF-2 α 蛋白平均免疫荧光强度降低($P<0.05$)。

2.6 各组大鼠膝关节骨-软骨代谢相关蛋白水平比较

表6示，与假手术比较，模型组大鼠膝关节COL2A1、COL1A2蛋白水平降低，MMP9、MMP13、RUNX2蛋白水平升高($P<0.05$)。与模型组比较，各药物干预组COL2A1、COL1A2蛋白水平上升，

MMP13、MMP9、RUNX2蛋白水平下降($P<0.05$)。与温肾通络止痛方低剂量比较，温肾通络止痛方高剂量组COL2A1、MMP9蛋白水平下降，COL1A2、RUNX2蛋白表达显著上升($P<0.05$)，阿仑膦酸钠组COL1A2蛋白水平下降、RUNX2蛋白水平上升($P<0.05$)。各组大鼠膝关节骨-软骨代谢相关蛋白电泳图见图4。

2.7 各组大鼠膝关节HIFs/OPG/RANKL通路蛋白水平比较

表7示，与假手术组比较，模型组大鼠膝关节中RANKL、HIF-2 α 、EGLN蛋白水平上升，HIF-1 α 、

表5 各组大鼠膝关节中 HIF-1α、HIF-2α 蛋白
平均荧光强度比较

Table 5 Comparison of average fluorescence intensities of
HIF-1α and HIF-2α proteins in the knee joint among rats
in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	HIF-1α	HIF-2α
假手术组	5	24.35±0.56	25.55±0.49
模型组	5	12.87±0.53 ^{a)}	45.43±0.53 ^{a)}
温肾通络止痛方低剂量组	5	20.45±0.44 ^{b)}	36.43±0.63 ^{b)}
温肾通络止痛方高剂量组	5	21.88±0.58 ^{b)}	24.80±0.58 ^{b) c)}
阿仑膦酸钠组	5	16.86±0.69 ^{b) c)}	27.45±0.69 ^{b) c)}

注：HIF-1α，缺氧诱导因子 1α；HIF-2α，缺氧诱导因子 2α。

a) 与假手术比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；

c) 与温肾通络止痛方低剂量比较， $P<0.05$ 。

OPG/RANKL 水平下降 ($P<0.05$)。与模型组比较，温肾通络止痛方低剂量组 HIF-1α、OPG/RANKL 蛋白水平上升，OPG、RANKL、HIF-2α、EGLN 蛋白水平下降；温肾通络止痛方高剂量组 OPG/RANKL、HIF-1α 水平上升，RANKL、HIF-2α、EGLN 蛋白水平下降；阿仑膦酸钠组 OPG/RANKL 水平上升，RANKL、HIF-1α、EGLN 蛋白水平下降 ($P<0.05$)。与温肾通络止痛方低剂量组比较，温肾通络止痛方高剂量组 OPG、OPG/RANKL、EGLN 水平升高，阿仑膦酸钠组 OPG、OPG/RANKL、HIF-2α、EGLN 水

表6 各组大鼠膝关节中 COL2A1、COL1A2、MMP13、MMP-9、RUNX2 蛋白水平比较

Table 6 Comparison of protein levels of COL2A1, COL1A2, MMP13, MMP-9, and RUNX2 in the knee joint among rats in each group
(/GAPDH, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	COL2A1	COL1A2	MMP13	MMP-9	RUNX2
假手术组	3	0.63±0.05	1.15±0.01	0.62±0.03	0.52±0.01	0.22±0.01
模型组	3	0.31±0.04 ^{a)}	0.43±0.01 ^{a)}	1.07±0.03 ^{a)}	1.00±0.06 ^{a)}	0.91±0.01 ^{a)}
温肾通络止痛方低剂量组	3	1.07±0.10 ^{b)}	0.67±0.01 ^{b)}	0.69±0.01 ^{b)}	0.79±0.01 ^{b)}	0.25±0.01 ^{b)}
温肾通络止痛方高剂量组	3	0.85±0.05 ^{b) c)}	0.90±0.03 ^{b) c)}	0.96±0.04 ^{b)}	0.54±0.01 ^{b) c)}	0.49±0.02 ^{b) c)}
阿仑膦酸钠组	3	0.72±0.20 ^{b)}	0.51±0.06 ^{b) c)}	0.74±0.02 ^{b)}	0.57±0.01 ^{b)}	0.52±0.03 ^{b) c)}

注：COL2A1，Ⅱ型胶原α1链；COL1A2，Ⅰ型胶原α2链；MMP13，基质金属蛋白酶13；MMP9，基质金属蛋白酶9；RUNX2，Runt相关转录因子。

a) 与假手术比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与温肾通络止痛方低剂量比较， $P<0.05$ 。

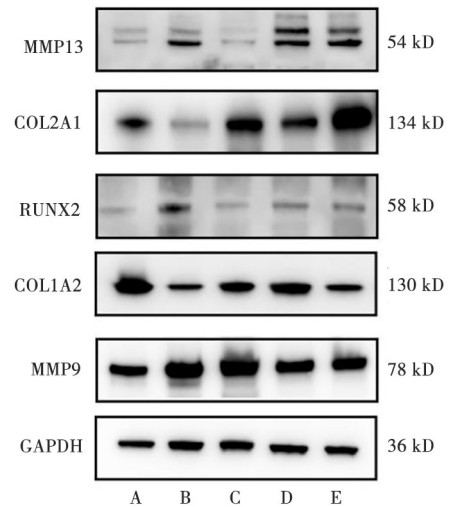
表7 各组大鼠膝关节 OPG、RANKL、HIF-1α、HIF-2α、EGLN 蛋白水平比较

Table 7 Comparison of protein levels of OPG, RANKL, HIF-1α, HIF-2α, and EGLN in the knee joint among rats in each group
(/Actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	OPG	RANKL	OPG/RANKL	HIF-1α	HIF-2α	EGLN
假手术组	3	0.65±0.04	0.37±0.02	1.77±0.18	1.11±0.05	0.64±0.01	0.91±0.01
模型组	3	0.85±0.16	0.95±0.07 ^{a)}	0.91±0.21 ^{a)}	1.03±0.12 ^{a)}	0.94±0.02 ^{a)}	1.24±0.01 ^{a)}
温肾通络止痛方低剂量组	3	0.60±0.04 ^{b)}	0.55±0.07 ^{b)}	1.11±0.20 ^{b)}	1.37±0.07 ^{b)}	0.63±0.05 ^{b)}	0.66±0.01 ^{b)}
温肾通络止痛方高剂量组	3	0.97±0.09 ^{c)}	0.56±0.02 ^{b)}	1.71±0.14 ^{b) c)}	1.20±0.08 ^{b)}	0.66±0.05 ^{b)}	0.75±0.01 ^{b) c)}
阿仑膦酸钠组	3	0.94±0.06 ^{c)}	0.42±0.04 ^{b) c)}	2.22±0.23 ^{b) c)}	0.67±0.19 ^{b) c)}	1.00±0.21 ^{c)}	0.99±0.01 ^{b) c)}

注：OPG，骨保护素；RANKL，核因子κB受体活化因子；HIF-1α，缺氧诱导因子1α；HIF-2α，缺氧诱导因子2α；EGLN，Egl 九同源蛋白。

a) 与假手术组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与温肾通络止痛方低剂量比较， $P<0.05$ 。



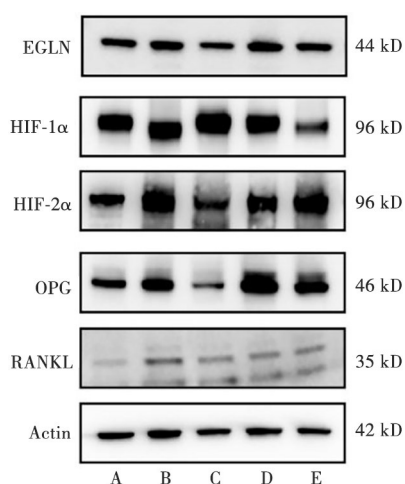
注：MMP13，基质金属蛋白酶13；COL2A1，Ⅱ型胶原α1链；RUNX2，Runt相关转录因子；COL1A2，Ⅰ型胶原α2链；MMP9，基质金属蛋白酶9；GAPDH，甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

A，假手术组；B，模型组；C，温肾通络止痛方低剂量组；D，温肾通络止痛方高剂量组；E，阿仑膦酸钠组。

图4 各组大鼠膝关节骨-软骨代谢相关蛋白电泳图

Figure 4 Electrophoresis images of osteo-cartilage metabolism-related proteins in rat knee joints of each group

平上升，RANKL、HIF-1α 水平下降 ($P<0.05$)。各组大鼠膝关节 HIFs/OPG/RANKL 通路相关蛋白电泳图见图5。



注: EGLN, Egl 九同源蛋白; HIF-1 α , 缺氧诱导因子 1 α ; HIF-2 α , 缺氧诱导因子 2 α ; OPG, 骨保护素; RANKL, 核因子 κ B 受体活化因子; Actin, 肌动蛋白。

A, 假手术组; B, 模型组; C, 温肾通络止痛方低剂量组; D, 温肾通络止痛方高剂量组; E, 阿仑膦酸钠组。

图5 各组大鼠膝关节 HIFs/OPG/RANKL 通路蛋白电泳图

Figure 5 Electrophoresis images of proteins in the HIFs/OPG/RANKL pathway in rat knee joints of each group

3 讨论

当前, OP 和 OA 作为高发的老年性骨骼类疾病, 其共病研究日益受到关注。OP 和 OA 共病治疗需兼顾改善骨密度和延缓软骨退变两个要点, 临床除生活方式干预和物理康复治疗外, 在药物选择上需避免单一疾病治疗对另一疾病的潜在负面影响。中医学强调整体观念和辨证论治, 认为 OP、OA 病机均为本虚标实, 肝肾不足为本, 瘀血阻滞、气滞血瘀, 不通而痛为标^[14-15]。本课题组基于 OP 和 OA 病机特点设立温肾通络止痛方, 方中黄芪、附子健脾益气, 鼓舞肾阳; 骨碎补、蛇床子、狗脊、淫羊藿、山萸肉温补肾阳, 充养骨髓, 狗脊、淫羊藿兼可祛风除湿; 薏苡仁、白术、白芍益气健脾疏肝; 羌活、细辛、独活、天麻散寒通络止痛; 炙甘草调和诸药。全方共奏补益脾肾、疏肝通络、强筋健骨之效。既往研究显示, 阿仑膦酸钠可改善 OA 关节软骨代谢微环境, 抑制软骨下骨重塑, 对关节软骨具有潜在的保护作用^[16]; 同时阿仑膦酸钠对软骨退行性病变有部分软骨保护作用^[17], 减少软骨组织退变和基质蛋白损失的作用^[18], 故选取阿仑膦酸钠作为本研究阳性药物。

本研究采用双侧卵巢去势法+改良式 Hulth 法建立 OP 和 OA 共病大鼠模型, 依据前期实验证实该模型可稳定构建共病表型, 动物重复性高, 并可模拟出关节炎慢性变化^[10]。本研究结果发现, 相

较模型组, 温肾通络止痛方低、高剂量组在干预 10 周后股骨远端骨密度显著上调, 软骨下骨骨微结构有所修复, 关节软骨宏观评分 Collins 评分、膝关节病理结构 Mankin 评分均显著下调, 炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 表达显著下降, 成软骨代谢相关指标 COL2A1 显著上升, 成软骨代谢 MMP13 和骨吸收相关分子 MMP9 显著下降, 且以温肾通络止痛方高剂量组治疗效果更佳, 在骨重建上效果与阿仑膦酸钠组无明显差异, 在软骨修复上效果优于阿仑膦酸钠组, 表明温肾通络止痛方可有效修复骨和软骨损伤, 促进骨软骨重建。

既往研究表明, OP 与 OA 在病因病理上存在共通点, 代谢失常引起的骨-软骨交界面破坏是共病的基本特征^[19]。骨关节组织本身处于相对低氧的微环境, HIFs 在骨组织中不仅参与维持稳态, 还在骨关节疾病的发病机制中扮演重要角色^[7]。HIF- α 的不同亚型具有不同的功能, HIF-1 α 、HIF-2 α 直接诱导调控不同的靶基因转录, 且对急、慢性缺氧环境的反应存在差异, 发挥相反的作用效应^[20]。其中 HIF-1 α 亚基的稳定性受 EGLN 蛋白 (PHD 蛋白) 介导的脯氨酰羟基化修饰直接控制, 缺氧条件下, EGLN 活性受到抑制从而维持 HIF-1 α 稳定^[21]。另外, OPG/RANKL/RANK 信号通路在调节骨吸收-骨形成的有序耦联中发挥关键作用, OPG 与 RANKL 之间的平衡决定体内骨重建过程^[22]。有研究证实, 缺氧微环境下骨-软骨交界面 OPG/RANKL 的分泌水平可受到 HIFs 影响。针对成骨细胞、骨细胞的研究^[23]发现, 促进 HIF-1 α 的表达会上调 OPG 或 RANKL 水平, 从而抑制骨吸收; 特异性阻断 HIF-2 α 通路可以直接抑制 RANKL 介导的破骨形成, 是维护骨骼内稳态的关键^[8]。

本研究结果发现, 与模型组大鼠相比, 假手术组骨-软骨面 HIF-1 α 蛋白和 OPG/RANKL 比值显著下降, RANKL、HIF-2 α 、EGLN 表达显著升高。药物干预 10 周后, 相较模型组, 温肾通络止痛方低、高剂量组大鼠 HIF-1 α 蛋白表达及 OPG/RANKL 比值显著升高, RANKL、HIF-2 α 、EGLN 蛋白表达显著下降, 以高剂量效果更佳; 阿仑膦酸钠组 RANKL、HIF-1 α 、EGLN 蛋白表达显著下降, OPG/RANKL 比值显著升高。与温肾通络止痛方低剂量组比较, 阿仑膦酸钠组 OPG、OPG/RANKL 比值、HIF-2 α 、EGLN 显著升高, RANKL、HIF-1 α 蛋白显著降低。血清 ELISA 检测中, 模型组大鼠 HIF-1 α 和 HIF-2 α 较假手术组均显著上升, 药物干预后, 3 组大鼠血清中 HIF-1 α 、

HIF-2 α 均显著下降。以上结果显示, HIF-1 α 在软骨及软骨下骨和血清中的变化趋势不同, 可能与全身性的系统应激和局部组织系统细胞功能耗尽相关。

综上所述, 温肾通络止痛方可提高膝关节骨密度, 减轻炎症反应, 其可能与调控 HIFs/OPG/RANKL 通路、改善骨-软骨代谢有关。本研究未采用基因或病毒敲除动物模型, 无法排除所用药物的脱靶效应, 后续将利用敲基因鼠进行深入研究。

参考文献

- [1] 章轶立, 黄馨懿, 齐保玉, 等. 老年人共病研究的现实意义、内容方法与前景展望[J]. 中国循证医学杂志, 2023, 23(7): 862-868.
- [2] SALIVE ME. Multimorbidity in older adults[J]. Epidemiol Rev, 2013, 35: 75-83. doi: 10.1093/epirev/mxs009.
- [3] 颜炎, 梁志, 陈卫衡. 基于现代文献分析慢性骨病的核心病机[J]. 中医正骨, 2024, 36(2): 39-48, 54.
- [4] 郑苏阳, 马勇, 郭杨, 等. “温肾通络止痛方”治疗原发性骨质疏松症的疗效观察及处方优化[J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(10): 2098-2100.
- [5] MA Y, WANG L, ZHENG S, et al. Osthole inhibits osteoclasts formation and bone resorption by regulating NF- κ B signaling and NFATc1 activations stimulated by RANKL [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(9): 16052-16061.
- [6] WANG L, ZHENG S, HUANG G, et al. Osthole-loaded N-octyl-O-sulfonyl chitosan micelles (NSC-OST) inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis and prevents ovariectomy-induced bone loss in rats[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(7): 4105-4117.
- [7] TAN JK, MOHAMAD HAZIR NS, ALIAS E. Impacts of hypoxia on osteoclast formation and activity: systematic review[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(18): 10146.
- [8] KNOWLES HJ. Distinct roles for the hypoxia-inducible transcription factors HIF-1 α and HIF-2 α in human osteoclast formation and function[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 21072.
- [9] BEI MJ, TIAN FM, XIAO YP, et al. Raloxifene retards cartilage degradation and improves subchondral bone micro-architecture in ovariectomized rats with patella baja-induced patellofemoral joint osteoarthritis [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2020, 28(3): 344-355.
- [10] 傅璟玥, 周勤峰, 李沐哲, 等. 骨质疏松症与骨关节炎共病模型大鼠的制备与评价[J/OL]. 中国组织工程研究. (2025-07-24)[2025-09-12]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1581.R.20250724.1334.008>.
- [11] 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.
- [12] LI J, ZHANG B, LIU WX, et al. Metformin limits osteoarthritis development and progression through activation of AMPK Signalling[J]. Ann Rheum Dis, 2020, 79(5): 635-645.
- [13] 方锐, 艾力江·阿斯拉, 卢勇, 等. 兔骨性关节炎模型构建及早中晚期的特点[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(7): 1218-1222.
- [14] 葛继荣, 王和鸣, 郑洪新, 等. 中医药防治原发性骨质疏松症专家共识(2020)[J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(12): 1717-1725.
- [15] 中国中医药研究促进会骨伤科分会. 膝骨关节炎中医诊疗指南(2020年版)[J]. 中医正骨, 2020, 32(10): 1-14.
- [16] 何丁文, 殷明, 罗元一, 等. 阿仑膦酸钠对骨关节炎关节软骨保护作用的研究进展[J]. 中国修复重建外科杂志, 2012, 26(10): 1187-1190.
- [17] NISHII T, TAMURA S, SHIOMI T, et al. Alendronate treatment for hip osteoarthritis: prospective randomized 2-year trial[J]. Clin Rheum, 2013, 32(12): 1759-1766.
- [18] ACIBADEM E, KESKINRUZGAR A, BOZDAG Z, et al. Therapeutic effect of alendronate in an experimental temporomandibular joint osteoarthritis [J]. J Oral Rehabil, 2023, 50(2): 113-121.
- [19] GEUSENS PP, VAN DEN BERGH JP. Osteoporosis and osteoarthritis: shared mechanisms and epidemiology[J]. Curr Opin Rheumatol, 2016, 28(2): 97-103.
- [20] CHEN BY, PATHAK JL, LIN HY, et al. Inflammation triggers chondrocyte ferroptosis in TMJOA via HIF-1 α /TFRC[J]. J Dent Res, 2024, 103(7): 712-722.
- [21] KAELIN WG. Von Hippel-lindau disease: insights into oxygen sensing, protein degradation, and cancer [J]. J Clin Invest, 2022, 132(18): e162480.
- [22] KOVÁCS B, VAJDA E, NAGY EE. Regulatory effects and interactions of the Wnt and OPG-RANKL-RANK signaling at the bone-cartilage interface in osteoarthritis[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(18): 4653.
- [23] STEGEN S, LAPERRÉ K, EELÉN G, et al. HIF-1 α metabolically controls collagen synthesis and modification in chondrocytes [J]. Nature, 2019, 565(7740): 511-515.

The Effect of the *Wenshen Tongluo Zhitong Formula* (温肾通络止痛方) on Knee Joint Osteo-Cartilage Metabolism and HIFs/OPG/RANKL Pathway in a Rat Model of Osteoporosis Complicated with Osteoarthritis

FU Jingyue^{1,2}, MA Yong^{1,2}, ZHOU Qinfeng¹, SUN Jie¹, PAN Yalan¹, WANG Lining^{1,3}, LI Muzhe¹, HUANG Xiangyang¹, GUO Yang¹

1. New Technology Laboratory of Bone Injury Repair and Reconstruction, Nanjing University of Chinese Medicine, 210023; 2. Yancheng Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine; 3. School of Integrated Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the potential mechanism of *Wenshen Tongluo Zhitong Formula* (温肾通络止痛方, WTZF) in treating comorbidity of osteoporosis (OP) and osteoarthritis (OA) from the perspectives of osteo-cartilage metabolism and the hypoxia-inducible factors (HIFs)/osteoprotegerin (OPG)/receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) pathway. **Methods** Thirty-five Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into 5 groups, sham operation group, model group, alendronate sodium group, low- and high-dose WTZF group, 7 rats in each group. Except for the sham operation group, rats were subjected to bilateral ovariectomy combined with modified Hulth surgery to establish a rat model of comorbidity of OP and OA. Interventions were initiated 2 weeks after model establishment. The low- and high-dose WTZF groups were given WTZF by gavage at doses of 14.76 g/(kg·d) and 29.52 g/(kg·d), respectively, once a day; the alendronate sodium group was given alendronate sodium by gavage at 6.3 mg/kg once a week; the sham operation group and the model group were given normal saline by gavage at 10 ml/(kg·d) once a day. After 10 weeks of intervention, the gross morphology of the rat knee joint was observed and scored using the Collins scoring system; micro-computed tomography (Micro-CT) was used to detect the bone mineral density of the distal femur and the subchondral bone microstructure of the tibial plateau including bone volume fraction (BV/TV) and trabecular separation (Tb. Sp); HE staining and safranin O-fast green staining were performed to observe the pathological changes of the knee joint, and the Mankin scoring system was used for evaluation; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the serum levels of inflammatory factors such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), and factors related to the HIFs/OPG/RANKL signaling pathway including hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), hypoxia-inducible factor-2 α (HIF-2 α), OPG, and RANKL, and the OPG/RANKL ratio was calculated. Immunofluorescence was used to detect the protein expression of HIF-1 α and HIF-2 α in the knee joint; Western Blotting was used to determine the levels of proteins related to knee joint osteo-cartilage metabolism, including collagen type II α 1 chain (COL2A1), collagen type I α 2 chain (COL1A2), matrix metalloproteinase 13 (MMP13), matrix metalloproteinase 9 (MMP9), and Runt-related transcription factor 2 (RUNX2), and also the HIFs/OPG/RANKL pathway including OPG, RANKL, HIF-1 α , HIF-2 α , Egl nine homolog (EGLN) was determined. **Results** Compared with the sham operation group, the model group showed significantly increased Collins score and Mankin score of the knee joint, significantly decreased BMD and BV/TV, significantly increased Tb. Sp, increased serum levels of TNF- α , IL-1 β , RANKL, HIF-1 α , and HIF-2 α , decreased serum OPG/RANKL ratio, average immunofluorescence intensity of HIF-1 α protein, increased average immunofluorescence intensity of HIF-2 α protein, decreased levels of COL2A1, COL1A2, HIF-1 α , and OPG/RANKL in the knee joint, and increased protein levels of MMP9, MMP13, RUNX2, RANKL, HIF-2 α , and EGLN (all $P < 0.05$). Compared with the model group, the high-dose WTZF group and the alendronate sodium group showed improvements in all the above indicators (all $P < 0.05$). The high-dose WTZF group was superior to the low-dose WTZF group in improving serum levels of HIF-1 α , HIF-2 α , and OPG, the average immunofluorescence intensity of HIF-2 α protein, and the levels of COL2A1, MMP9, RUNX2, COL1A2, OPG, OPG/RANKL, and EGLN (all $P < 0.05$); the alendronate sodium group was superior to the low-dose WTZF group in reducing serum levels of TNF- α , IL-1 β , HIF-1 α , and HIF-2 α , and the average immunofluorescence intensity of HIF-1 α and HIF-2 α proteins in the knee joint (all $P < 0.05$). **Conclusion** The *Wenshen Tongluo Zhitong Formula* may regulate the HIFs/OPG/RANKL pathway in the knee joint, balance bone metabolism, and improve cartilage degeneration, thereby alleviating the progression of comorbid osteoporosis and osteoarthritis.

Keywords osteoporosis; osteoarthritis; hypoxia-inducible factors; osteoprotegerin; receptor activator of nuclear factor- κ B ligand; bone metabolism; *Wenshen Tongluo Zhitong Formula* (温肾通络止痛方)

(收稿日期: 2025-06-14; 修回日期: 2025-10-09)

[编辑: 邓媛]