

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.09.013

温经通络汤对膝骨关节炎模型小鼠膝关节软骨组织 HMGB1/NF- κ B 信号通路的影响

钱佳佳¹, 许奇², 许炜民¹, 黄桂成^{1✉}

1. 南京中医药大学, 江苏省南京市栖霞区仙林大道 138 号, 210023; 2. 安徽中医药大学第一附属医院

[摘要] **目的** 探讨温经通络汤治疗膝骨关节炎的可能作用机制。**方法** 将 32 只小鼠随机分为假手术组, 模型组及温经通络汤低剂量组、高剂量组, 每组 8 只。除假手术组外, 其余各组采用前交叉韧带横断术 (ACLT) 法建立膝骨关节炎模型。术后 4 周, 温经通络汤低剂量、高剂量组分别以温经通络汤 20、80 g/(kg·d) 灌胃, 假手术组及模型组给予 0.2 ml/10 g 生理盐水灌胃, 均每天 1 次, 持续 4 周。采用 HE 染色及番红 O-固绿 (S-O) 染色法观察各组小鼠软骨组织病理形态, 并根据改良 Mankin's 评分标准对病理变化进行评分; Western blot 法检测各组小鼠关节软骨组织中基质金属蛋白酶 13 (MMP13)、II 型胶原 (COL II) 及高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1)、核因子 κ B (NF- κ B) 通路的蛋白表达情况; qPCR 法检测 COL II、MMP13 及 NF- κ B mRNA 表达; 免疫组化法观察软骨中诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 表达; ELISA 法检测血清炎症因子前列腺素 E2 (PGE2)、白细胞介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 表达。**结果** 与假手术组比较, 模型组关节软骨表面破坏明显, 软骨层有明显缺损, 改良 Mankin's 评分提高, 软骨组织中 p-I κ B α /I κ B α 值、p-p65/p65 值、MMP13 及 HMGB1 蛋白表达, MMP13、NF- κ B1 及 NF- κ B2 mRNA 表达均显著提高, iNOS 阳性细胞表达增加, 血清炎症因子 IL-6、PGE2 和 TNF- α 表达明显升高, 且 COL II 蛋白及 mRNA 表达明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 温经通络汤高、低剂量组软骨组织病理形态均改善, 关节软骨表面破损减少, 改良 Mankin's 评分降低, 软骨组织中 p-I κ B α /I κ B α 值、p-p65/p65 值、MMP13 及 HMGB1 蛋白表达, MMP13、NF- κ B1 mRNA 表达, 血清炎症因子 IL-6、PGE2 和 TNF- α 表达水平均明显降低, iNOS 阳性细胞表达减少, COL II 蛋白表达升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与温经通络汤低剂量组比较, 温经通络汤高剂量组改良 Mankin's 评分, p-I κ B α /I κ B α 值和 MMP13 蛋白表达, MMP13、NF- κ B1、NF- κ B2 mRNA, 血清炎症因子 IL-6、PGE2 和 TNF- α 表达降低, p-p65/p65 值升高 ($P < 0.01$)。**结论** 温经通络汤可显著改善膝骨关节炎模型小鼠软骨组织病理形态, 延缓疾病进程, 其作用机制可能与抑制 HMGB1/NF- κ B 信号通路, 减轻炎症反应有关。

[关键词] 膝骨关节炎; 软骨退变; 温经通络汤; HMGB1/NF- κ B 信号通路; 炎症因子

骨关节炎是一种以关节疼痛、肿胀、活动障碍为主要表现, 关节软骨退变和周围骨质增生为主要病理特征的慢性进行性骨关节病, 膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是常见的骨关节炎类型之一^[1-2]。据报道, 中国 KOA 新发病例数及患病例数逐年增加, 且发病率随年龄的增加而逐步增加^[3]。KOA 发病机制虽尚未明确, 但多项研究已证实炎症和分解代谢异常与 KOA 的发生发展密切

相关^[4-5]。高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 是一种普遍存在于真核细胞中的非组蛋白染色质相关蛋白, HMGB1 可通过激活核因子 κ B (NF- κ B) 信号传导途径, 引起关节软骨破坏、炎症反应等病理进程^[6]。

KOA 可归属中医学“痹证”范畴。《素问·痹论篇》云:“风寒湿三气杂至, 合而为痹也”, 指出痹证成因在于风、寒、湿邪。温经通络汤以散寒除湿、补益肝肾、通经活络为治疗原则, 已有临床研究证实其在临床应用中可显著减轻 KOA 患者疼痛、改善关节功能^[7]。课题组前期研究已证实其治疗 KOA 疗效显著, 可抑制血管内皮细胞生长因子

基金项目:国家自然科学基金(81774341); 江苏高校品牌专业建设工程二期项目

✉ 通讯作者: hgc@njucm.edu.cn

(VEGF)、基质金属蛋白酶 13 (MMP13) 等表达, 延缓软骨退变^[8-9]。本研究拟从 HMGB1/NF- κ B 通路角度探讨温经通络汤延缓 KOA 疾病进程的可能作用机制, 以期为其临床治疗 KOA 提供实验依据。本研究方案经南京中医药大学动物伦理委员会批准 (批准号: 201904A009)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠 32 只, 雌雄各半, 3 月龄, 体重 (20 $\pm$ 3)g, 购于山东斯科贝斯生物科技股份有限公司, 实验动物许可证号: SCXK(鲁)2016-0001, 于南京中医药大学动物实验中心常规饲养, 动物房干燥、通风, 环境温度控制在 27 $^{\circ}$ C, 湿度 50%, 自由饮水和饮食, 12 h/12 h 明暗交替。

1.2 药物

温经通络汤组成: 桂枝 8 g, 泽泻 10 g, 延胡索 15 g, 陈皮 10 g, 蜈蚣 2 g, 全蝎 3 g, 黑顺片 10 g、怀牛膝 10 g, 熟地黄 25 g, 胆南星 6 g, 甘草 10 g, 土茯苓 25 g, 药物均购于江苏省中医院。将黑顺片浸泡 30 min 后, 先煎 30 min, 同时将其余各药材混合加药物总量的 8 倍蒸馏水浸泡 30 min 后加入, 沸腾后转微沸煎煮 45 min 后过滤煎液, 再加药物总量的 8 倍蒸馏水煎煮同前, 滤出煎液。合并两次煎煮液, 将其分别浓缩至含生药 4 g/ml (高剂量)、1 g/ml (低剂量) 浓度药液, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3 主要仪器及试剂

1% 戊巴比妥钠 (中国医药集团上海化学试剂公司, 批号: F20020915); HE 染液、PBS 溶液、BCA 蛋白含量检测试剂盒、H₂O₂-甲醇溶液 (江苏凯基生物技术有限公司, 批号: KGA224、KGB5001、KGA902、20210118); 软骨染色液 (S-O 法, 北京索莱宝科技有限公司, 批号: G2540); DAB 试剂盒 (福州迈新生物技术有限公司, 批号: DAB-1031); PAGE 电泳液 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号: P0014F); 磷酸化核因子 κ B 抑制蛋白 α (p-IKB α) 抗体 (美国 Cell Signaling 公司, 批号: 2859); 核因子 κ B 抑制蛋白 α (IKB α)、磷酸化 p65 蛋白 (p-p65)、p65 蛋白 (p65) 抗体 (英国 Abcam 公司, 批号: Ab32518、Ab194726、Ab16502); II 型胶原 (COL II) 抗体、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 抗体、前列腺素 E2 (PGE2) 抗体 (美国 Affinity 公司, 批号: AF0135、AF0199、DF7107); MMP13 抗体 (北京博奥森生物技术有限公司, 批号: bs-

10589R); GAPDH、HMGB1 抗体、二抗羊抗兔、二抗羊抗小鼠 (美国 Proteintech 公司, 批号: 60004-1-Ig、66525-1-Ig、SA00001-2、SA00001-1); MaxVision 试剂盒 (兔, 二抗, 中国福州迈新生物技术有限公司, 批号: KIT-5005); ECL 工作液 (美国 ThermoFisher Scientific 公司, 批号: 34577); 总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、qPCR 试剂盒 (南京诺唯赞生物技术有限公司, 批号: RC101-01、R323-01、Q711-02); 小鼠白细胞介素 6 (IL-6)、PGE2、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) Elisa 试剂盒 (南京翼飞雪生物技术有限公司, 批号: YFXEM00045、YFXEM00048、YFXEM00031)。

台式冷冻离心机 (美国 Thermo 公司, 型号: MultifugeX1R); 生物显微镜 (德国 Leica 公司, 型号: DM1000); 生物荧光显微镜 (日本 Olympus 公司, 型号: BX43); 电转印槽系列 (美国 Bio-Rad 公司, 型号: mini Trans-blot cell); 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司, 型号: QuantStudio3); 全自动化学发光图像分析系统 (中国 Tanon 公司, 型号: 5200 CE); PCR 仪 (德国 Tppendorf 公司, 型号: Mastercycler nexus); 恒温培养振荡器 (上海智城分析仪器制造有限公司, 型号: CE IS09001); 微量分光光度计 (山东莱索科技公司, 型号: Nano-300)。

1.4 造模、分组及干预方法

小鼠适应性饲养 1 周后采用随机数字表法分为假手术组, 模型组及温经通络汤低剂量组、高剂量组, 每组 8 只。假手术组仅切开发节囊, 暴露关节腔不离断前交叉韧带。模型组及温经通络汤低剂量组、高剂量组采用前交叉韧带横断术 (ACLT) 建立膝关节关节炎模型^[10]; 以 1% 戊巴比妥钠溶液 70 mg/kg 腹腔注射进行麻醉, 以髌骨为中心剔除周围毛发, 碘伏消毒后于膝关节内侧面作 1 cm 左右纵向切口, 逐层剥离皮下组织, 剥离髌骨用显微剪离断前交叉韧带, 前抽屉试验阳性, 说明前交叉韧带已被剪断。课题组前期研究已证实该手术可成功构建 KOA 模型, 且其病理变化符合 KOA 病理进程特征^[11]。

术后 4 周温经通络汤低剂量组、高剂量组分别给予温经通络汤 20、80 g/(kg $\cdot$ d) 灌胃, 灌胃量为 0.2 ml/10 g; 假手术组及模型组给予 0.2 ml/10 g 生理盐水灌胃。各组均每天 1 次, 持续 4 周。参照《中药药理研究方法学》^[12], 按照人与小鼠体表面积换算法确定小鼠给药剂量, 以人用剂量等效换算

为小鼠给药低剂量，并将该剂量的 4 倍设置为高剂量。

1.5 观察指标及方法

实验结束后 24 h，各组小鼠摘眼球采血后脱颈处死，摘取双侧完整膝关节（保留部分股骨及胫骨平台），左侧膝关节固定于组织固定液中，右侧膝关节用小剪刀将股骨与胫腓骨分离，暴露关节表面，手术刀片刮取股骨头及胫骨平台表面的软骨组织，-80℃冻存备用。

1.5.1 化学染色法观察各组小鼠软骨病理形态变化 取各组小鼠完整的膝关节于多聚甲醛中固定 24 h，脱钙液脱钙 12 周，常规梯度乙醇脱水，二甲苯透明，石蜡包埋后 4 μm 厚切片进行 HE 染色和 S-O 染色，以观察软骨组织病理改变。每个切片随机取 3 到 5 个视野，在 400 倍光镜下观察膝关节软骨退变程度，并根据改良 Mankin's 评分标准^[13]对病理变化进行评分。

1.5.2 免疫组化法测定软骨组织中 iNOS 表达 取各组小鼠完整的膝关节进行石蜡切片，二甲苯、梯度水化后浸入抗原修复缓冲液中微波加热 10 min，自然冷却后滴加 3% H₂O₂-甲醇溶液，室温封闭 10 min，漂洗后滴加 1% BSA 室温孵育 20 min，漂洗后滴加 iNOS 一抗，稀释比例为 1：100，4℃孵育过夜，漂洗后滴加二抗（即用型）室温孵育 2 h，滴加 DAB 显色，苏木素复染 10 min，依次脱水、透明、封片，荧光显微镜下观察组织细胞中蛋白的表达情况，取 3~5 个高表达区域拍照保存（×200）。被染成棕褐或棕黄色为阳性细胞，蓝色为阴性细胞。

1.5.3 Western blot 法测定软骨组织中 MMP13、COL II、p65、p-p65、IκBα、p-IκBα 及 HMGB1 蛋白表达 称取各组小鼠膝关节软骨组织 100 mg，提取总蛋白，离心取上清后 BCA 试剂盒检测蛋白浓度，向各组上清中加入 5 倍上样缓冲液，混匀后 100℃加热 10 min。随后取蛋白样本进行电泳、转膜、封闭，TBST 洗膜后分别按照说明书要求稀释比例加入各指标抗体，MMP13、COL II、p65、p-p65、IκBα、p-IκBα，稀释比例均为 1：500，HMGB1 稀释比例 1：3000，GAPDH 稀释比例 1：200 000，4℃孵育过夜，洗膜后加入二抗（1：500），室温孵育 2 h，清洗后滴加 ECL 工作液后上机显影，使用 Image JV1.8.0 对结果进行灰度值分析。

1.5.4 RT-PCR 法检测软骨组织中 NF-κB1、NF-κB2、COL II、MMP13 mRNA 表达 称取各组小鼠膝关

节软骨组织 100 mg，提取总 RNA，采用分光光度计检测 RNA 浓度和纯度，按照逆转录试剂盒说明书将 mRNA 逆转录成 cDNA。应用荧光定量 PCR 循环仪进行 RT-PCR 反应。以 GAPDH 为内参校正，采用 2^{-ΔΔCt} 法求得目的基因的相对表达水平，引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成，引物序列见表 1。

表 1 大鼠软骨组织中 NF-κB1、NF-κB2、COL II、MMP13mRNA 引物序列
Table 1 Primer sequences of NF-κB1, NF-κB2, COL II, and MMP13 mRNA in mice cartilage tissue

基因	引物序列	碱基数	扩增长度/bp
NF-κB1	正向 ATGGCAGACGATGATCCCTAC	21	111
	反向 TGTGACAGTGGTATTCTGCTG	23	
NF-κB2	正向 GGCCGGAAGACCTATCCTACT	21	157
	反向 CTACAGACACAGCGCACACT	20	
COL II	正向 GGGAATGTCCTCTGCGATGAC	21	66
	反向 GAAGGGGATCTCGGGGTTG	19	
MMP13	正向 CTTCTTCTTGTGAGCTGGACTC	23	173
	反向 CTGTGGAGGTCAGTGTAGACT	21	
GAPDH	正向 AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	21	123
	反向 TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	23	

注：NF-κB1，核因子 κB1；NF-κB2，核因子 κB2；COL II，Ⅱ型胶原；MMP13，基质金属蛋白酶 13。

1.5.5 ELISA 法检测小鼠血清中炎症因子 IL-6、PGE2、TNF-α 表达 实验结束后 24 h，采用摘眼球采血法将各组小鼠血液尽可能多地收集至 1.5 ml Ep 管内，4℃静置 2 h，血清和血浆分离后，4℃、3500 r/min（半径为 5.427 cm）离心 15 min，收集分离后的上层血清。根据 IL-6、PGE2、TNF-α ELISA 试剂盒说明书进行检测。

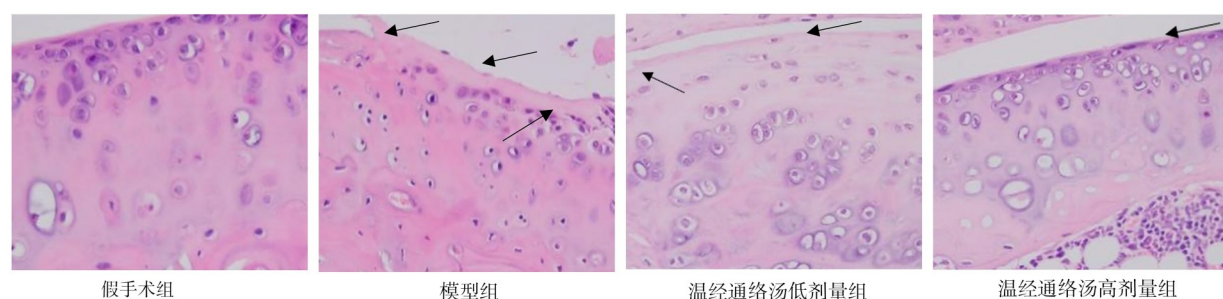
1.6 统计学方法

采用 SPSS 19.0 对数据进行统计分析，Graphpad Prism 8 进行数据作图。数据均符合正态分布及方差齐性，用均数±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 SNK 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠膝关节软骨组织病理形态学变化及改良 Mankin's 评分比较

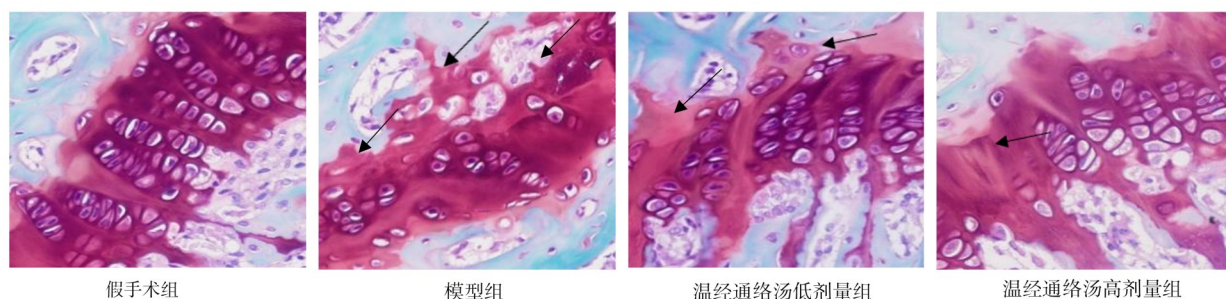
图 1、图 2 示，HE 染色及 S-O 染色结果显示，假手术组软骨边缘光滑，表层完整，软骨细胞排列规则，潮线完整，结构清晰，染色正常；而模型组



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 (×400)

Figure 1 HE staining of articular cartilage of mice in each group (×400)



注：黑色箭头所指为破坏的软骨表面。

图2 各组小鼠关节软骨组织S-O染色病理图 (×400)

Figure 2 S-O staining of articular cartilage of mice in each group (×400)

关节软骨表面破坏明显，软骨层有明显缺损，切片着色不匀，软骨细胞聚集；温经通络汤低、高剂量组关节软骨表面破损减少，其中温经通络汤高剂量组小鼠膝关节软骨面光滑完整，软骨细胞排列较为规则，温经通络汤低剂量组小鼠软骨表面较为连续，软骨细胞相对增多且簇集细胞团减少。

表2示，与假手术组比较，模型组及温经通络汤高、低剂量组改良Mankin's评分提高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与模型组比较，温经通络汤高、低剂量组改良Mankin's评分均降低，且温经通络汤高剂量组改良Mankin's评分低于温经通络汤低剂量组 ($P<0.01$)。

表2 各组小鼠膝关节改良Mankin评分比较

Table 2 Comparison of modified Mankin score of knee joint of mice in each group (分, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Mankin's 评分
假手术组	8	2.40±0.55
模型组	8	10.80±1.30 ^{a)}
温经通络汤低剂量组	8	7.40±0.55 ^{a) c)}
温经通络汤高剂量组	8	4.40±0.89 ^{b) c) d)}

注：a) 与假手术组比较， $P<0.01$ ；b) 与假手术组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与温经通络汤低剂量组比较， $P<0.01$ 。

2.2 各组小鼠膝关节软骨组织中COL II、MMP13、p-IκBα/IκBα、p-p65/p65及HMGB1蛋白表达比较

表3示，与假手术组比较，模型组p-IκBα/IκBα值、p-p65/p65值、MMP13及HMGB1蛋白表达均升高，而COL II蛋白表达降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，温经通络汤低剂量组、高剂量组MMP13、p-IκBα/IκBα值、p-p65/p65值、HMGB1蛋白表达均降低，COL II蛋白表达升高 ($P<0.01$)，其中温经通络汤高剂量组p-IκBα/IκBα值和MMP13蛋白表达低于温经通络汤低剂量组，而p-p65/p65值高于温经通络汤低剂量组 ($P<0.01$)。蛋白电泳图见图3、图4、图5。

2.3 各组小鼠膝关节软骨组织中COL II、MMP13、NF-κB1及NF-κB2 mRNA表达比较

表4示，与假手术组比较，模型组MMP13、NF-κB1及NF-κB2 mRNA表达上升，COL II mRNA表达下降 ($P<0.01$)；与模型组比较，温经通络汤高、低剂量组MMP13、NF-κB1 mRNA表达下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，温经通络汤高剂量组NF-κB2 mRNA表达亦下降，COL II mRNA表达上升 ($P<0.05$)；与温经通络汤低剂量组相比，温经通络汤高剂量组MMP13、NF-κB1、NF-κB2 mRNA表达下

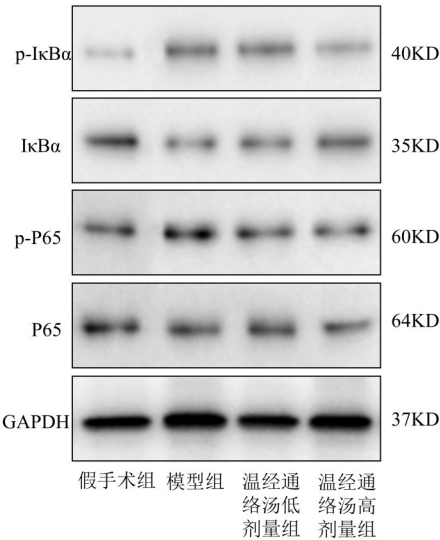
表 3 各组小鼠膝关节软骨组织内 COL II、MMP13、p-IκBα/IκBα、p-p65/p65 及 HMGB1 的蛋白表达比较

Table 3 Comparison of protein expression of COL II、MMP13、p-IκBα/IκBα、p-p65/p65 and HMGB1 in knee cartilage of mice in each group						
组别	鼠数	COL II /GAPDH	MMP13/GAPDH	p-IκBα/IκBα	p-p65/p65	HMGB1/GAPDH
假手术组	8	1.58±0.05	1.33±0.04	0.25±0.03	0.81±0.02	0.19±0.01
模型组	8	0.95±0.04 ^{a)}	2.66±0.06 ^{a)}	1.95±0.08 ^{a)}	1.66±0.06 ^{a)}	1.09±0.05 ^{a)}
温经通络汤低剂量组	8	1.15±0.03 ^{b)}	2.48±0.19 ^{b)}	1.24±0.06 ^{b)}	1.24±0.03 ^{b)}	0.45±0.01 ^{b)}
温经通络汤高剂量组	8	1.32±0.10 ^{b)}	1.35±0.12 ^{b) c)}	0.64±0.04 ^{b) c)}	1.54±0.05 ^{b) c)}	0.61±0.01 ^{b)}

注：COL II，Ⅱ型胶原；p-IκBα/IκBα，磷酸化核因子κB抑制蛋白α/核因子κB抑制蛋白α；p-p65/p65，磷酸化p65蛋白/p65蛋白；MMP13，基质金属蛋白酶13；HMGB1，高迁移率族蛋白B1。

a) 与假手术组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与温经通络汤低剂量组比较， $P<0.01$ 。

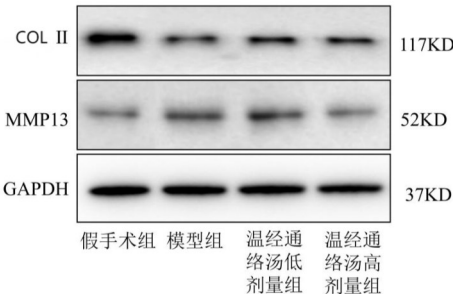
降 ($P<0.01$)。



注：p-IκBα，磷酸化核因子κB抑制蛋白α；IκBα，核因子κB抑制蛋白α；p-p65，磷酸化p65蛋白；p65，p65蛋白。

图 3 各组小鼠膝关节软骨组织中 p-IκBα、IκBα、p-p65、p65 蛋白电泳图

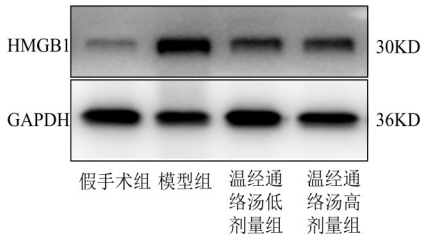
Figure 3 Protein electrophoretogram of p-IκBα, IκBα, p-p65 and p65 in knee cartilage of mice in each group



注：COL II，Ⅱ型胶原；MMP13，基质金属蛋白酶13。

图 4 各组小鼠膝关节软骨组织中 COL II、MMP1 蛋白电泳图

Figure 4 Protein electrophoretogram of COL II and MMP13 in knee cartilage of mice in each group



注：HMGB1，高迁移率族蛋白B1。

图 5 各组小鼠膝关节软骨组织 HMGB1 蛋白电泳图
Figure 5 Protein electrophoretogram of HMGB1 in knee cartilage of mice in each group

2.4 各组小鼠血清中炎症因子水平比较

表 5 示，与假手术组比较，模型组血清中炎症因子 IL-6、PGE2 和 TNF-α 表达显著上调 ($P<0.01$)；与模型组比较，温经通络汤高、低剂量组血清炎症因子 IL-6、PGE2 和 TNF-α 表达水平显著降低 ($P<0.01$)；与温经通络汤低剂量组比较，温经通络汤高剂量组血清炎症因子 IL-6、PGE2 和 TNF-α 表达水平显著降低 ($P<0.01$)。

2.5 各组小鼠膝关节软骨组织中 iNOS 表达比较

图 6 示，假手术组软骨结构完整，可见少量棕褐色 iNOS 阳性细胞；与假手术组比较，模型组小鼠软骨破坏明显，iNOS 阳性细胞增加；与模型组比较，温经通络汤低剂量组小鼠软骨中 iNOS 阳性细胞表达减少，软骨破坏减少，温经通络汤高剂量组 iNOS 阳性细胞表达减少，较温经通络汤低剂量组软骨结构改善更明显。

3 讨论

《素问·痹论篇》云：“风寒湿三气杂至，合而为痹也”，即风、寒、湿外邪侵入人体，停留于关节内，气血不畅，致筋脉拘急，肢体疼痛，屈伸不利等，是 KOA 重要外因。中年以后肝、脾、肾三脏亏虚，正气化生不足，气血不荣，筋不能维持骨节之张弛，关节失滑利，肾虚而髓减，致使筋骨均

表 4 各组小鼠膝关节软骨组织内 COL II、MMP13、NF-κB1 和 NF-κB2 mRNA 表达比较

Table 4 Comparison of mRNA expression of COL II, MMP13, NF-κB1 and NF-κB2 in knee cartilage of mice in each group (/GAPDH, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	COL II	MMP13	NF-κB1	NF-κB2
假手术组	8	1.26±0.10	1.03±0.06	0.86±0.02	0.72±0.11
模型组	8	0.99±0.02 ^{a)}	2.75±0.28 ^{a)}	1.44±0.05 ^{a)}	1.03±0.11 ^{a)}
温经通络汤低剂量组	8	1.05±0.03	2.05±0.18 ^{b)}	1.26±0.10 ^{c)}	0.97±0.06
温经通络汤高剂量组	8	1.11±0.01 ^{c)}	1.51±0.07 ^{b) d)}	1.08±0.04 ^{b) d)}	0.81±0.03 ^{c) d)}

注: a) 与假手术组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.01$; c) 与模型组比较, $P < 0.05$; d) 与温经通络汤低剂量组比较, $P < 0.01$ 。

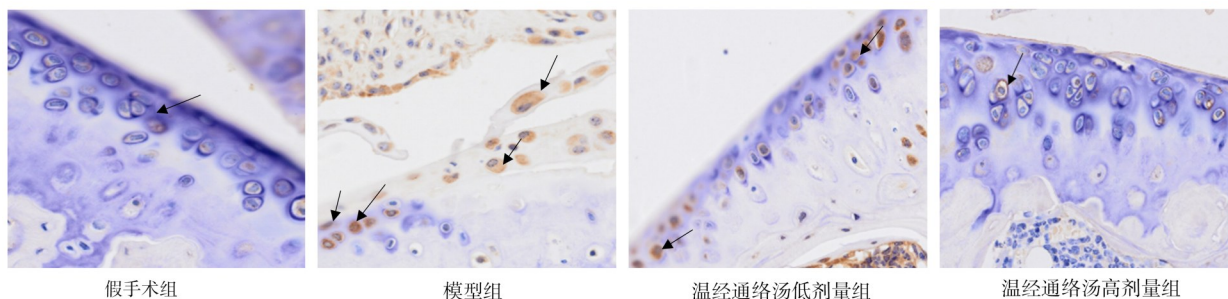
表 5 各组小鼠血清 IL-6、PGE2 和 TNF-α 表达水平比较

Table 5 Comparison of expression of serum IL-6, PGE2 and TNF-α of mice in each group (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IL-6	PGE2	TNF-α
假手术组	8	23.33±2.31	25.40±5.76	344.97±24.22
模型组	8	49.16±3.81 ^{a)}	80.60±18.95 ^{a)}	557.40±22.64 ^{a)}
温经通络汤低剂量组	8	37.13±3.53 ^{b)}	54.23±3.98 ^{b)}	455.54±25.09 ^{b)}
温经通络汤高剂量组	8	28.93±1.89 ^{b) c)}	40.34±6.04 ^{b) c)}	406.75±37.48 ^{b) c)}

注: IL-6, 白细胞介素 6; PGE2, 前列腺素 E2; 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) 与温经通络汤低剂量组比较, $P < 0.01$ 。



注: 黑色箭头所指处为阳性表达细胞; iNOS, 诱导型一氧化氮合酶。

图 6 各组小鼠膝关节软骨组织中 iNOS 免疫组化染色结果 (×200)

Figure 6 Immunohistochemical staining results of iNOS in knee cartilage of mice in each group (×200)

失所养, 此为 KOA 发病内因。KOA 病机可概括为“络虚失养、络脉不通”, 提出当以“扶其正, 须通络”为主要治则^[14]。温经通络汤中附子、桂枝温经散寒除湿、通络蠲痹止痛, 共为君药; 胆南星能除经络中风湿顽痰而具通络之功, 泽泻、土茯苓祛湿消肿、通利关节, 陈皮、延胡索行气止痛, 化经络中瘀血, 共为臣药; 熟地黄、怀牛膝补肝肾、强筋骨、散瘀血, 且熟地黄滋阴养血可解附子、桂枝燥热之性, 使阴阳互根, 水火相济, 蜈蚣、全蝎性善走窜, 搜风剔邪, 通经活络, 四者共为佐药; 甘草调和诸药。全方配伍共奏散寒除湿、补益肝肾、通经活络之功, 正切合 KOA 病机。

ACLT 小鼠模型是一种常见的应力诱导模型, 具有可重复性强及与人类创伤后骨关节炎相关性高的优势^[15]。课题组前期研究发现该模型软骨退变的严重程度呈时间依赖性^[11], 术后 4 周开始出现软

骨层明显缺损, 表现出典型的 KOA 病理特征。本研究以 ACLT 模型小鼠作为研究对象于术后 4 周进行温经通络汤灌胃治疗, 探讨其延缓 KOA 病理进程的作用机制。

COL II 是软骨细胞外基质 (ECM) 的主要组成部分, 其降解是导致关节内软骨损伤的主要原因^[16]。MMP13 属于基质金属蛋白酶 (MMPs) 家族, 可引起软骨中 COL II 和蛋白聚糖的降解, 其表达水平与骨关节炎损伤程度密切相关^[17], 而炎症反应被认为是造成骨关节炎软骨 ECM 降解的始动环节。本研究结果表明, 温经通络汤低剂量及高剂量均可下调模型小鼠软骨组织中 MMP13 蛋白及 mRNA 表达, 提高细胞外基质主要成分 COL II 蛋白表达, 且高剂量温经通络汤效果更佳, 高剂量温经通络汤还可促进 COL II mRNA 表达回升, 进而降低了软骨 ECM 降解水平。病理组织及改良 Mankin's 评分结果提

示,温经通络汤低剂量及高剂量均可显著改善小鼠膝关节软骨组织病理形态,其中温经通络汤高剂量组效果更佳。同时,温经通络汤低剂量及高剂量干预能抑制模型小鼠软骨中 iNOS 阳性表达量,并降低血清中炎症因子 IL-6、PGE2 和 TNF- α 的水平,其中高剂量组效果更为显著,证实该方可缓解 KOA 小鼠炎症反应,进而延缓 KOA 的发展。

骨关节炎相关炎症反应与多种因素相关,其中, NF- κ B 是重要的调控因子,可以调节大量基因参与骨关节炎的发生发展^[18-20]。在抑制性 κ B 蛋白(I κ B)的作用下, NF- κ B 以非活性形式存在于哺乳动物的细胞质中^[21]。当机体受到刺激后, I κ B 蛋白被降解,使游离的 NF- κ B 复合物移位到细胞核,激活数以百计的免疫调节蛋白、促炎细胞因子、趋化因子和生长因子等表达,由此产生的 PGE2、iNOS、TNF- α 、IL-6 和 MMP13 等因子加速骨关节炎的发展^[22-23]。前期研究已初步证实 NF- κ B 信号通路参与 KOA 模型小鼠病理进程^[24]。研究表明, HMGB1 可作为促炎细胞因子,激活 NF- κ B 信号传导途径,促进软骨细胞中炎症反应^[8,25],抑制 HMGB1 介导的 NF- κ B 通路可减轻炎症反应^[26-28],本研究拟通过实验进一步验证该通路在中药调控小鼠 KOA 中的作用。结果显示,温经通络汤低剂量及高剂量均可以抑制 p-I κ B α /I κ B α 、p-p65/p65 值及 HMGB1 蛋白的表达,其中温经通络汤高剂量组在下调 p-I κ B α /I κ B α 值方面的作用优于温经通络汤低剂量组,而温经通络汤低剂量组下调 p-p65/p65 值的作用更显著;温经通络汤低剂量及高剂量组均可降低 NF- κ B1 mRNA 表达,且温经通络汤高剂量组效果更显著,同时,温经通络汤高剂量组还可下调 NF- κ B2mRNA 表达,从而削弱了 NF- κ B 信号通路的活化水平。基于此,我们推测温经通络汤可能通过抑制 HMGB1/NF- κ B 信号通路,减少炎症因子的浸润,从而发挥改善膝骨关节炎病理进程的作用,且高剂量温经通络汤效果更佳。

综上所述,温经通络汤能够有效抑制炎症反应从而改善 KOA 软骨退变,起到保护软骨内稳态和干预骨关节炎进程的作用,其作用机制可能与抑制 HMGB1/NF- κ B 信号通路相关。然而本研究仅设置了温经通络汤高、低剂量,缺少更为细致的浓度分析,难以全面观察不同浓度温经通络汤对 KOA 的影响;另外,本实验尚未对 HMGB1/NF- κ B 信号通路上游信号进行研究,在后续实验中拟采用基因探针、生物信息学等方法对上游信号通路进行进一步

预测及验证。

参考文献

- [1]中华医学会骨科学分会关节外科学组,中国医师协会骨科医师分会骨关节炎学组,国家老年疾病临床医学研究中心(湘雅医院),等. 中国骨关节炎诊疗指南(2021 年版)[J]. 中华骨科杂志,2021,41(18):1291-1314.
- [2]王和鸣,黄桂成. 中医骨伤科学[M]. 北京:中国中医药出版社,2016:372-373.
- [3]冯晓晴,蔡道章,余星磊,等. 基于 GBD 大数据中国膝骨关节炎疾病负担现状与趋势分析[J]. 现代预防医学,2022,45(10):1753-1760.
- [4]GLYN-JONES S, PALMERAJ, AGRICOLA R, et al. Osteoarthritis[J]. Lancet, 2015, 386(9991):376-387.
- [5]HYOCHOL A, JUN-HO L, JIN MC, et al. The relationship between beta-endorphin and experimental pain sensitivity in older adults with knee osteoarthritis[J]. Biol Res Nurs, 2019, 21(4):400-406.
- [6]WU X, MI Y, YANG H, et al. The activation of HMGB1 as a progression factor on inflammation response in normal human bronchial epithelial cells through RAGE/JNK/NF-kappaB pathway [J]. Mol Cell Biochem, 2013, 380 (1/2): 249-257.
- [7]陈晨. 温经通络汤治疗膝骨关节炎(寒湿痹阻证)的临床观察[D]. 南京:南京中医药大学, 2020.
- [8]许炜民,钱佳佳,韩龙,等. 温经通络汤对小鼠膝骨关节炎软骨形态改变和 VEGF、MMP-13、HIF-1 α 表达情况的影响[J]. 中医药信息, 2020, 37(6):6-12.
- [9]许奇,钱佳佳,许炜民,等. 温经通络汤对膝骨关节炎模型小鼠 VEGF/VEGFR2/ERK1/2 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(13):28-34.
- [10]KAMEKURA S, HOSHI K, SHIMOAKA T, et al. Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2005, 13(7):632-641.
- [11]QIAN JJ, XU Q, XU WM, et al. Expression of VEGF-A signaling pathway in cartilage of ACLT-induced osteoarthritis mouse model [J]. Orthop Surg Res, 2021, 16 (1):379.
- [12]陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1996:1103.
- [13]PATEL DV, SAWANT MG, KAUR G. Evaluation of anti-osteoarthritic activity of Vigna mungo in papain induced osteoarthritis model [J]. Indian J Pharmacol, 2015, 47 (1): 59-64.
- [14]闵文,周龙云,黄桂成,等. 黄桂成教授运用络病理论治疗骨关节炎学术思想探讨[J]. 四川中医, 2018, 36 (8): 8-10.

- [15] LUO Y, ZHANG Y, HUANG Y. Icaritin reduces cartilage degeneration in a mouse model of osteoarthritis and is associated with the changes in expression of indian hedgehog and parathyroid hormone-related protein [J]. Med Sci Monitor, 2018, 24: 6695-6706. doi: 10.12659/MSM.910983.
- [16] 郑力铭, 马佳凯, 王威, 等. 关节软骨退变相关生物学标志物研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2022, 30(3): 78-84.
- [17] YAO X, SUN K, YU S, et al. Chondrocyte ferroptosis contribute to the progression of osteoarthritis [J]. J Orthop Translat, 2021, 27: 33-43. doi: 10.1016/j.jot.2020.09.006.
- [18] CHENG T, BAI J, CHUNG CS, et al. Enhanced innate inflammation induced by anti-BTLA antibody in dual insult model of hemorrhagic shock/sepsis [J]. Shock, 2016, 45(1): 40-49.
- [19] 闫文, 顾玉彪, 谢兴文, 等. microRNA-223 调控 NF- κ B 信号通路干预骨关节炎的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2022, 28(11): 1706-1710.
- [20] TANG Z H, PENG J, REN Z, et al. New role of PCSK9 in atherosclerotic inflammation promotion involving the TLR4/NF- κ B pathway [J]. Atherosclerosis, 2017, 262: 113-122. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.04.023.
- [21] JIA Y, PANG C, ZHAO K, et al. Garcinol suppresses IL-1 β -induced chondrocyte inflammation and osteoarthritis via inhibition of the NF- κ B signaling pathway [J]. Inflammation, 2019, 42(5): 1754-1766.
- [22] LI D, LUO F, GUO T, et al. Targeting NF- κ B pathway by dietary lignans in inflammation: expanding roles of gut microbiota and metabolites [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2022; 1-17. doi: 10.1080/10408398.2022.2026871.
- [23] DURAND JK, BALDWIN AS. Targeting IKK and NF- κ B for therapy [J]. Adv Protein Chem Struct Biol, 2017 (107): 77-115. doi: 10.1016/bs.apcsb.2016.11.006.
- [24] 蔡任, 钱佳佳, 许奇, 等. 游泳运动对膝骨关节炎小鼠软骨退变和 NF- κ B 激活的影响[J]. 山东体育学院学报, 2021, 37(6): 25-33.
- [25] KANG R, CHEN R, ZHANG Q, et al. HMGB1 in health and disease [J]. Mol Aspects Med, 2014, 40: 1-116. doi: 10.1016/j.mam.2014.05.001.
- [26] CIPRANDI G, BELLUSSI LM, PASSALI GC, et al. HMGB1 in nasal inflammatory diseases: a reappraisal 30 years after its discovery [J]. Expert Rev Clin Immunol, 2020, 16(5): 457-463.
- [27] YANG Y, YANG L, JIANG S, et al. HMGB1 mediates lipopolysaccharide-induced inflammation via interacting with GPX4 in colon cancer cells [J]. Cancer Cell Int, 2020, 20: 205. doi: 10.1186/s12935-020-01289-6.
- [28] 张春玲, 梁超, 王宝爱, 等. 大黄素通过调控 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路对老年脑出血模型大鼠炎症因子的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(24): 2992-2996.

Effect of *Wenjing Tongluo Decoction* (温经通络汤) on HMGB1/NF- κ B Signaling Pathway in Knee Articular Cartilage Tissue of Knee Osteoarthritis Model Mice

QIAN Jiajia¹, XU Qi², XU Weimin¹, HUANG Guicheng¹

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023; 2. The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Wenjing Tongluo Decoction* (温经通络汤, WTD) in the treatment of knee osteoarthritis (KOA). **Methods** Thirty-two mice were randomly divided into sham operation group, model group, WTD low-dose group (Group WTD-L) and high-dose group (Group WTD-H), with eight mice in each group. Except for the Group S, the KOA model was established with anterior cruciate ligament transection (ACLT) method. Four weeks after operation, Group WTD-L and Group WTD-H were given 20 and 80 g/(kg·d) of WTD by gavage, respectively, while Group S and Group M were given 0.2 ml/10 g of normal saline by gavage, once a day for 4 weeks. The pathological morphology of the cartilage tissue of mice were evaluated through HE staining and safranin O-fast green (S-O) staining, and the pathological changes were scored according to the modified Mankin system. Protein expression of matrix metalloproteinase 13 (MMP13), collagen (COL II), high mobility group box B1 (HMGB1), and nuclear factor κ B (NF- κ B) pathway in articular cartilage of mice were detected by Western blot. The mRNA expression of COL II, MMP13 and NF- κ B were detected by qPCR method. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cartilage was observed by immunohistochemistry, and serum inflammatory factors prostaglandin E2 (PGE2), interleukin 6 (IL-6), and tumor necrosis factor α (TNF- α) were detected by ELISA. **Results** Compared to those in the sham operation group, the articular cartilage surface in the model group was damaged significantly with obvious defects of cartilage layer, and the modified Mankin score significantly increased; the protein expression of p-I κ B α /I κ B α , p-p65/p65, MMP13 and HMGB1 in the cartilage tissue, the mRNA expression of MMP13, NF- κ B1 and

NF- κ B2, positive expression of iNOS cells, expression of serum inflammatory factors IL-6, PGE2 and TNF- α increased, while the protein and mRNA expression of COL II significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to those in the model group, the pathological morphology of cartilage tissues in Group WTD-L and Group WTD-H were improved, and the damage of articular cartilage surface was reduced; the modified Mankin score decreased, as well as the p-I κ B α /I κ B α , p-p65/p65, MMP13 and HMGB1 protein expression, MMP13 and NF- κ B1 mRNA expression, serum inflammatory factors IL-6, PGE2 and TNF- α expression levels in cartilage tissue, and positive expression of iNOS cells, while the expression of COL II protein increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to those in the Group WTD-L, the modified Mankin score, p-I κ B α /I κ B α and MMP13 protein expression, MMP13, mRNA expression of NF- κ B1 and NF- κ B2, serum inflammatory factors IL-6, PGE2 and TNF- α expression in the Group WTD-H significantly decreased, while p-p65/p65 value increased ($P < 0.01$). **Conclusion** WTD can significantly improve the pathological morphology of cartilage tissue in KOA mice and delay the progression of disease. Its mechanism may be related to the inhibition of HMGB1/NF- κ B signaling pathway and the reduction of inflammatory responses.

Keywords knee osteoarthritis; cartilage degeneration; *Wenjing Tongluo Decoction* (温经通络汤); HMGB1/NF- κ B signaling pathway; inflammatory factors

(收稿日期: 2022-08-23; 修回日期: 2023-02-12)

[编辑: 王利芬]

· 信息窗 ·

八部门联合印发中医药文化弘扬工程实施方案 为中医药振兴发展厚植文化土壤

日前,国家中医药管理局、中央宣传部、教育部、商务部、文化和旅游部、国家卫生健康委、国家广电总局、国家文物局联合印发《“十四五”中医药文化弘扬工程实施方案》,推动部署“十四五”期间中医药文化建设工作。

《方案》指出,要以习近平新时代中国特色社会主义思想为指导,认真贯彻党的二十大精神,围绕举旗帜、聚民心、育新人、兴文化、展形象的使命任务,深入挖掘中医药文化的精神内涵和时代价值,充分发挥其作为中华文明宝库“钥匙”的独特作用,加大中医药文化保护传承和传播推广力度,推动中医药文化贯穿国民教育,融入群众生产生活,为中医药振兴发展厚植文化土壤,为健康中国建设注入源源不断的文化动力,为铸就社会主义文化新辉煌贡献力量。

《方案》提出到2025年,中医药文化产品和服务供给更为优质丰富,中医药博物馆事业加快发展,中医药文化传播体系趋于健全,公民中医药健康文化素养水平提升至25%左右,中医药“走出去”步伐更加坚实。

《方案》明确了12项重点任务,包括挖掘整理中医药蕴含的中华文化内涵元素,加强研究并凝练中医药文化精神标识;鼓励引导对中医药文化内涵理念进行时代化、大众化、创新性的阐释,推出一批面向不同受众的精品图书和数字读物;充分发挥中医药典籍的文化载体作用,系统保护、研究和利用中医药古籍;推动中医药博物馆事业发展,加强中医药博物馆和文化场馆建设;打造中医药文化传播平台,遴选建设中医药文化宣传教育基地和中医药文化体验场馆,加大对传统医药类非物质文化遗产代表性项目保护传承力度;加大中医药文化活动和产品供给,每年度打造一组中医药文化传播专题活动,支持中医药动漫精品创新,引导中医药题材文艺作品创作;丰富中小学中医药文化教育校园活动,引导学生了解有关中医药文化的常识;广泛开展中医药科普工作,方便群众便捷获取正确、规范的中医药养生保健知识;实施中医药健康文化素养调查制度,为中医药健康文化的传播推广提供数据支撑;推动中医药医教研产彰显文化特色,加强对中医药从业人员文化熏陶,将中医药文化融入现代生产生活;培养建立中医药文化传播队伍,构建能力突出、结构合理、梯次分明的人才体系;促进中医药文化海外交流,提增中医药在海外认可度和接受度。

《方案》指出,开展中医药文化弘扬工程是贯彻落实《中共中央 国务院关于促进中医药传承创新发展的意见》《中共中央办公厅 国务院办公厅关于实施中华优秀传统文化传承发展工程的意见》的重要举措,要求加强统筹协调、加大投入力度、做好评估考核,保障各项重点任务落地落实。

(转自中国中医药报)