

本文引用: 卢一帆, 卢承印, 段俊杰, 熊 辉, 陆小龙, 李 前, 齐新宇, 伍搏宇, 吴成亮, 苏文杰, 杨 卓, 段建辉. 基于网络药理学和代谢组学探讨独活寄生汤治疗膝骨关节炎的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(10): 1839–1951.

基于网络药理学和代谢组学探讨独活寄生汤治疗 膝骨关节炎的作用机制

卢一帆^{1,2}, 卢承印³, 段俊杰¹, 熊 辉⁴, 陆小龙⁴, 李 前¹, 齐新宇², 伍搏宇⁵, 吴成亮²,
苏文杰², 杨 卓^{1*}, 段建辉^{1*}

1.湖南中医药大学附属常德医院,湖南 常德 415000;2.湖南中医药大学,湖南 长沙 410208;
3.河南省洛阳正骨医院/河南省骨科医院,河南 郑州 450000;4.湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙 410007;
5.广州中医药大学附属东莞医院,广东 东莞 523000

[摘要] **目的** 通过网络药理学和代谢组学探讨独活寄生汤(DHJSD)在治疗膝骨关节炎(KOA)中的作用机制。**方法** 共纳入 40 只 SD 大鼠,随机分空白组、模型组、DHJSD 组和盐酸氨基葡萄糖(GH)组,每组 10 只。除空白组外,其余各组均建立 KOA 模型,造模方法为关节腔内注射 40 mg/mL 的碘乙酸单钠 50 μ L。DHJSD 组予以灌胃 DHJSD(9.56 g/kg),GH 组予以 GH 溶液(1 g/kg),模型组和空白组予以等体积生理盐水,连续灌胃 7 d。采用液相色谱-串联质谱技术检测 DHJSD 在大鼠血清中的成分,利用网络药理学分析挖掘 DHJSD 治疗 KOA 的潜在关键靶点。在建立 KOA 大鼠模型后,通过 HE 染色、RT-qPCR 及 Western blot 技术验证 DHJSD 对 KOA 中的核因子- κ B(NF- κ B)、磷脂酰肌醇 3 激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3K/mTOR)信号通路的调控作用,并利用代谢组学方法筛选差异代谢物。**结果** 共鉴定出 49 种成分,主要包括黄酮类、萜类、苯丙素类和生物碱类成分。网络药理学和代谢组学分析显示,Toll 样受体信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、白细胞介素 17 和鞘脂代谢信号通路可能是 DHJSD 治疗 KOA 的重要作用靶点。动物实验结果表明,DHJSD 可显著改善 KOA 模型大鼠的软骨结构,减少纤维化,缓解炎症反应,下调 NF- κ B p65 和 p-PI3K 的蛋白表达($P<0.05$)。**结论** DHJSD 在 KOA 中的作用可能与 NF- κ B、PI3K/mTOR 及鞘脂代谢等信号通路和代谢途径的调节相关,从而实现代谢稳态改善与炎症反应缓解,并促进关节修复。

[关键词] 膝骨关节炎;独活寄生汤;网络药理学;代谢组学;鞘脂代谢

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.10.006

Mechanism of action of Duhuo Jisheng Decoction in treating knee osteoarthritis based on network pharmacology and metabolomics

LU Yifan^{1,2}, LU Chengyin³, DUAN Junjie¹, XIONG Hui⁴, LU Xiaolong⁴, LI Qian¹, QI Xinyu², WU Boyu⁵,
WU Chengliang², SU Wenjie², YANG Zhuo^{1*}, DUAN Jianhui^{1*}

1. Changde Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changde, Hunan 415000, China; 2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Luoyang Orthopedic-Traumatological Hospital of Henan Province/Henan Provincial

[收稿日期]2025-08-07

[基金项目]湖南省自然科学基金项目(2022JJ30087,2024JJ5002);常德市科技研发与科技创新指导性项目(CDKJJ20220357);湖南省自然科学基金地区联合基金项目(2025JJ70653);湖南中医药大学本科生科研创新基金项目(2023BKS023);湖南中医药大学校级科研项目(2022XYLH045,2022XYLH051)。

[通信作者]*段建辉,男,硕士,主任医师,硕士生导师,E-mail:djh191025@163.com;杨 卓,男,硕士,医师,E-mail:yz780199@163.com。

Orthopedic Hospital, Zhengzhou, Henan 450000, China; 4. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 5. Dongguan Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Dongguan, Guangdong 523000, China

[Abstract] **Objective** To explore the mechanism of action of Duhuo Jisheng Decoction (DHJSD) in the treatment of knee osteoarthritis (KOA) through network pharmacology and metabolomics. **Methods** A total of 40 SD rats were randomly divided into a blank group, a model group, a DHJSD group, and a glucosamine hydrochloride (GH) group, with 10 rats in each group. Except the blank group, KOA models were established in all the other groups by intra-articular injection of 50 μ L of sodium iodoacetate (40 mg/mL). The DHJSD group was administered DHJSD (9.56 g/kg) via gavage, the GH group was given glucosamine hydrochloride (1 g/kg), while the model and blank groups received an equal volume of normal saline. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was used to check the serum components of DHJSD, and network pharmacology analysis to identify potential key targets of DHJSD in the treatment of KOA. After establishing the KOA rat model, HE staining, RT-qPCR, and Western blot were performed to verify the regulatory effects of DHJSD on the nuclear factor kappa-B (NF- κ B) and phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin (PI3K/mTOR) signaling pathways in KOA. Additionally, metabolomics was employed to screen differential metabolites. **Results** A total of 49 components were identified, primarily including flavonoids, terpenoids, phenylpropanoids, and alkaloids. Network pharmacology and metabolomics analyses revealed that the signaling pathways of Toll-like receptor, tumor necrosis factor (TNF), interleukin-17 (IL-17), and sphingolipid metabolism may represent key therapeutic targets of DHJSD in the treatment of KOA. Animal experiments demonstrated that DHJSD significantly improved the cartilage structure in KOA model rats, reduced fibrosis, alleviated inflammatory responses, and downregulated the protein expression of NF- κ B p65 and p-PI3K ($P < 0.05$). **Conclusion** The therapeutic effects of DHJSD in KOA treatment may be related to the regulation of signaling pathways and metabolic pathways such as NF- κ B, PI3K/mTOR, and sphingolipid metabolism, thereby achieving the improvement of metabolic homeostasis, the alleviation of inflammatory responses, and the promotion of joint repair.

[Keywords] knee osteoarthritis; Duhuo Jisheng Decoction; network pharmacology; metabolomics; sphingolipid metabolism

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种常见的退行性关节疾病,其主要特征包括关节软骨的逐渐磨损、骨赘形成及关节功能退化,进而导致疼痛、僵硬及活动受限^[1-2]。KOA的发病机制主要涉及软骨退变、炎症反应、骨结构改变及力学负荷等多个方面,其中软骨退行性变和磨损是其核心病理改变^[3]。软骨细胞凋亡及细胞外基质降解是导致软骨损伤的主要原因。随着全球人口老龄化加剧及肥胖率上升,KOA的发病率呈逐年增长趋势^[4]。目前,KOA的常规治疗方法主要包括抗炎镇痛治疗及手术干预^[5],但疗效有限,且部分治疗手段存在较高的不良反应风险。传统中医学以整体调节、辨证论治为核心,注重标本兼治,在改善 KOA 症状、提升生活质量方面展现出独特优势。

独活寄生汤(Duhuo Jisheng Decoction, DHJSD)是治疗 KOA 的经典中药复方,临床疗效显著^[6]。现

代研究表明,DHJSD 的治疗作用来源于多成分、多靶点的协同调控,其主要药理效应包括抗炎、镇痛、免疫调节、抗氧化、活血通络及神经调节等^[7-8]。过往研究已揭示其部分潜在机制,如调控细胞外基质代谢、抑制白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等关键炎症因子的表达、抑制基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)过度表达,并通过作用于 IL-6 等信号通路显著缓解炎症反应,减轻软骨损伤^[9-10]。此外,随机对照试验表明,DHJSD 联合体外冲击波疗法可有效缓解 KOA 患者的疼痛与僵硬,提升生活质量,且安全性良好^[11]。系统评价和荟萃分析亦证实,DHJSD 在联合透明质酸注射或其他药物治疗中,可显著改善 WOMAC 评分及疼痛程度,显示出联合治疗的优势^[12]。针对寒湿痹阻型 KOA 患者,DHJSD 在降低 IL-6、TNF- α 等炎症因子方面疗效显著,联

合葡萄糖胺或温针灸疗法可进一步增强其治疗效果^[13]。这些研究结果为 DHJSD 在个体化中医治疗和联合干预中的广泛应用提供了有力证据。然而,其具体机制如关键通路和代谢环节的研究较少,尤其是 DHJSD 在鞘脂代谢和丁酸代谢方面的作用尚未见报道。

本研究首次运用血清药物化学技术分析 DHJSD 的成分,并结合网络药理学方法预测其治疗 KOA 中的潜在靶点与作用通路,从而挖掘其协同效应与关键机制^[14]。此外,通过建立 KOA 大鼠模型,采用 HE 染色观察软骨组织结构变化,RT-qPCR、Western blot 检测相关基因与蛋白表达水平,进一步阐明 DHJSD 改善软骨损伤及调控炎症性通路的分子机制。最后,运用血清代谢组学技术分析 KOA 治疗过程中内源性物质的变化,揭示 DHJSD 可能的代谢调控机制。综上所述,本研究假设 DHJSD 通过调控 NF- κ B/PI3K-mTOR 信号通路及鞘脂代谢发挥治疗 KOA 的作用。

1 材料与方法

1.1 DHJSD 及其血清的制备

本研究所用 DHJSD 由以下 15 味中药组成:独活 9 g(批号:92240205),桑寄生 6 g(批号:92230921),白芍 6 g(批号:92240156),党参 6 g(批号:92240836),川芎 6 g(批号:92240528),当归 6 g(批号:92240802),怀牛膝 6 g(批号:92240407),防风 6 g(批号:92240945),甘草 6 g(批号:92231239),购自湖南春光九汇公司;杜仲 6 g(批号:AB442472),秦艽 6 g(批号:AB450782),肉桂 6 g(批号:A2041902),购自广东一方制药公司;细辛 6 g(批号:C240397),茯苓 6 g(批号:C240636),生地黄 6 g(批号:C240336),购自湖南天地恒一公司。上述药材均购自湖南中医药大学第一附属医院药房。将药材混合后加水煎煮两次,第一次加水量为药材总重的 10 倍,第二次为 8 倍,每次煎煮 1 h。煎煮所得药液经纱布过滤后合并,50℃减压浓缩至相当于生药 1 g/mL 的浓度,分装于无菌管中,置于 4℃保存备用。

选取 8 只 SD 大鼠随机分为空白血清组和 DHJSD 含药血清组,每组各 4 只。所有大鼠在实验前适应性饲养 1 周。参照人与动物剂量换算公式:大鼠剂量(g/kg)=6.17×人体剂量(g)/60 kg 成人^[15],

计算所得大鼠剂量为 9.56 g/(kg·d)。试验组大鼠每日灌胃给予 DHJSD 药液,对照组给予等体积生理盐水,连续给药 7 d,每天给药 1 次。第 7 天当天给予两次灌胃,间隔 1 h。末次给药后 1 h 内采集大鼠腹主动脉血,4℃下以 4 000 r/min 离心 20 min,分离血清,上清液用于后续的分析。

1.2 试剂及仪器

盐酸氨基葡萄糖(国药准字 H20060802)购自四川绿叶制药股份有限公司;HE 染色液、分化液、复蓝液(货号:G1005、G1005-3、G1005-4)购自武汉赛维尔生物科技有限公司。RNA isolater 总 RNA 提取试剂(R401-01)、HiScript II Q RT SuperMix for qPCR(含 gDNA 消除剂,R223-01)、HiScript II Q Select RT SuperMix for qPCR(含 gDNA 消除剂,R233-01)、DL2000 Plus DNA Marker(MD101-02)、Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix(Q712-02)均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。核酸染料 GelRed(10 000×水溶液,货号:41003)购自宝天生物科技有限公司。

1.3 血清药物化学分析

采用液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)技术对实验组大鼠的血清样本进行化学成分分析,识别 DHJSD 经口服吸收后进入血液的关键活性成分。综合评分,取值范围 0~1,本研究以综合评分 ≥ 0.6 作为成分鉴定的置信度阈值。

1.4 网络药理学分析

本研究通过整合 DHJSD 经血吸收的成分与相关疾病靶点,构建中药-成分-靶点的理论作用网络。首先,利用 ChEMBL(<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>)、TTD(<http://db.idrblab.net/ttd/>)、DisGeNET(<http://www.disgenet.org>)、Ya TCM(<http://cadd.pharmacy.nankai.edu.cn/yatcm/home>)、TCMIO(<http://http://tcmio.xielab.net>)数据库预测并验证血中成分的潜在治疗靶点。根据吸收率和类药性对化合物进行筛选,选取口服生物利用度大于等于 30%,药物相似性大于等于 0.18 的活性成分,进一步预测其在 KOA 中的潜在治疗作用。随后,对核心靶基因进行 GO 功能富集分析(<http://www.geneontology.org/>)及 KEGG 通路富集分析(www.kegg.jp/kegg/pathway.html),明确 DHJSD 治疗 KOA 涉及的生物过程和信号通路。最终,借助 STRING(v11, stringdb.org)数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用(pro-

tein-protein interaction, PPI)网络,并使用 Cytoscape 3.10.3 软件进行可视化,识别关键调控靶点。

1.5 动物、造模与组织采集

共选用 40 只健康、2 月龄、SPF 级雄性 SD 大鼠(体质量 200~220 g),购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[许可证号:SYXK(湘)2019-0009],饲养于湖南中医药大学 SPF 级实验动物中心。环境条件控制为:温度(21±3)℃、湿度 50%±10%、12 h 昼夜交替,可自由摄食饮水。本实验已通过湖南中医药大学医学实验动物伦理委员会审批(伦理批号:LLBH-202207190001)。

所有大鼠随机分为空白组、模型组、DHJSD 组和盐酸氨基葡萄糖(glucosamine hydrochloride, GH)组,每组 10 只。空白组给予生理盐水灌胃,其余 3 组采用碘乙酸单钠(sodium iodoacetate, MIA)关节腔注射法建立 KOA 模型^[6]。造模后第 1 天大鼠右侧膝关节肿胀,滑膜充血水肿,右侧患肢承重下降,提示造模成功^[7]。空白组与模型组则灌胃等体积生理盐水。建模 2 周后开始干预,连续灌胃 4 周。干预结束后,所有大鼠麻醉并处死。常规消毒取部分软骨组织用于 HE 染色,剩余软骨迅速冻存于-80℃冰箱中,备用。

1.6 动物实验验证

1.6.1 软骨组织病理学观察 采集大鼠右后膝关节,PBS 冲洗后剥除软组织,将关节置于 4%多聚甲醛固定 24 h,随后于 10%EDTA 溶液中脱钙 3 周。经常规脱水、透明和石蜡包埋后,切片进行 HE 染色,染后脱水、透明并封片,在显微镜下观察膝关节

的病理变化。

1.6.2 RT-qPCR 及 Wester blot 检测 采用Trizol 法提取滑膜组织总 RNA,测定 OD 值后进行反转录和扩增反应体系配置,在 PCR 仪上进行扩增。以内参基因为基础,采用 2^{-ΔΔCT}法计算自噬相关蛋白 Beclin-1、微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3, LC3)、隔离小体蛋白 1(sequestosome 1, p62/SQSTM1)和大鼠微小 RNA-140-5p(rattus norvegicus microRNA-140-5p, rno-miR-140-5p)的相对表达水平。引物序列详见表 1。

称取提取的软骨组织重量,按说明书要求加入相应比例的 RIPA 裂解液,液氮条件下研磨后匀浆,按 BCA 蛋白测定试剂盒说明书操作确定蛋白样品浓度,配平后煮沸蛋白。上样电泳后,运用湿转法转膜至 PVDF 膜,封闭、洗膜,分别加入一抗 LC3(1:2 000)、NF-κB-p65(1:1 000)、p-mTOR(1:1 000)、mTOR(1:5 000)、PI3K(1:1 000)、p-PI3K(1:1 000)4℃过夜,洗膜并孵育对应二抗后显影曝光。

1.7 代谢组学分析

取 50 μL 血清样本,加入 200 μL 甲醇(体积比 1:1,含内标)进行代谢物提取,涡旋混匀 30 s,超声处理 10 min,室温静置 1 h 后,4℃下以 12 000 r/min 离心 15 min,收集上清液用于分析。质控样本(由各组上清液等量混合而成。代谢组学分析采用 Vanquish UHPLC 系统联合 Orbitrap Exploris 120 高分辨质谱仪进行。原始数据通过 ProteoWizard 软件转换后,采用 XCMS 软件进行数据预处理与峰提取。代谢物注释则依托 BiotreeDB MS2 数据库进行。为

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因名称	引物序列(5'-3')	产物长度/bp
GAPDH	正向 ACAGCAACAGGGTGGTGGAC	253
	反向 TTTGAGGGTGCAGCGAACTT	
Beclin-1	正向 GAGGTACCGACTTGTTCCT	225
	反向 CCTTTCTCCACGTCCATCCT	
LC3	正向 AAAATGGGGCACGGATGAAG	155
	反向 GCAGGTCTTCAAAATGCCCA	
P62	正向 TACCTTTGCCTCCAACACCT	152
	反向 TTGAAGCTCCCCATGTCCAT	
rno-mir-140-5p	正向 TGCGCAGTGGTTTACCCTA	
	环引物 GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAG GTATTCGCACTGGATACGACCTACCA	

识别不同组之间的代谢谱差异,采用正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA),筛选变量投影重要性(variable important projection, VIP)值>1 且 $P<0.05$ 的差异代谢物。通路富集分析基于 KEGG 数据库及 MetaboAnalyst 平台完成。

1.8 统计学分析

所有数据采用 GraphPad Prism 9.0 统计软件进行分析。符合正态分布的数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多组间比较采用单因素方差分析。若满足方差齐性,进一步采用 *LSD* 法进行事后多重比较。若不满足方差齐性,则采用 *Dunnnett T3* 法。组间比较采用 *Kruskal-Wallis* 秩和检验。以 $P<0.05$ 表示结果具有统计学意义。

2 结果

2.1 血清中 DHJSD 成分的鉴定

基于 LC-MS/MS 系统组合型四极杆 Orbitrap 质谱仪对 DHJSD 药物组、空白血清组及 DHJSD 含药

血清组分别进行正负离子模式扫描,分析条件一致,获得总离子流图。详见图 1。本研究对空白血清组、DHJSD 药物组(1 g/mL 浓缩液)以及 DHJSD 含药血清组的化合物组成进行分析。结果显示,空白血清组检测到 411 种化合物,DHJSD 药物组检测到 492 种,DHJSD 含药血清组检测到 450 种。通过韦恩图分析三组间的重叠及特异性化合物,发现共有 49 种化合物在 DHJSD 药物组与 DHJSD 含药血清组中存在,而在空白血清组中未检测到,这些成分被认为是 DHJSD 口服吸收入血后的特异性成分,详见图 2。进一步分类分析显示,这 49 种特异性成分包括:萜类化合物 9 种、苯丙素类 8 种、黄酮类 24 种、生物碱 2 种,以及 6 种尚未归类的成分。详见表 2。

2.2 网络药理学分析预测 DHJSD 的作用靶点及其治疗 KOA 的机制

2.2.1 GO 功能富集分析 血液中检出的 DHJSD 活性成分主要参与以下生物过程(biological process, BP):结缔组织发育、骨化过程、炎症反应调控、细胞

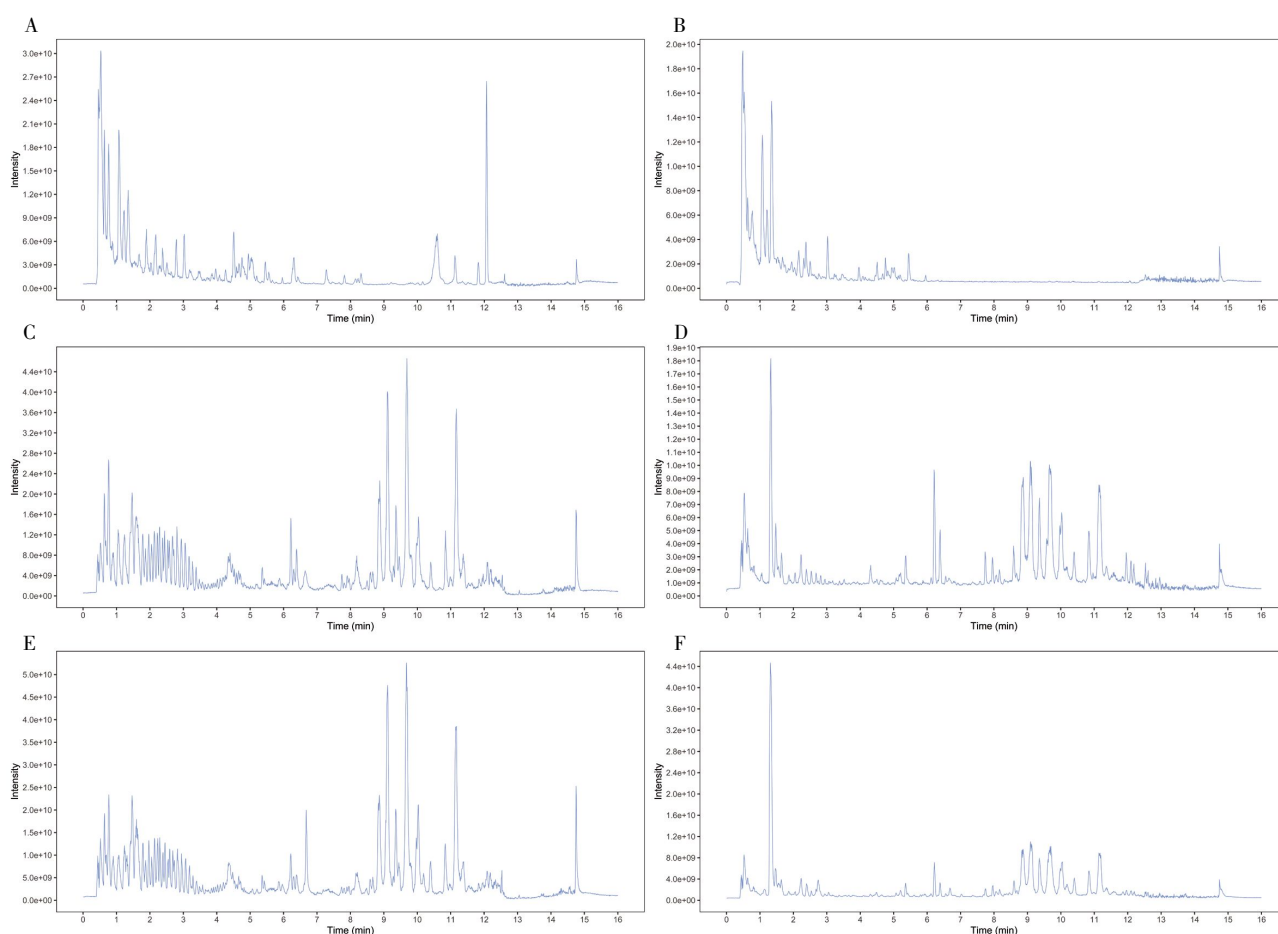


图 1 正负离子模式下的总离子流图

Fig.1 Total ion current chromatogram in positive and negative ion modes

注:A 和 B 为正负离子模式下的 DHJSD 药物组;C 和 D 为正负离子模式下的空白血清组;E 和 F 为正负离子模式下的 DHJSD 含药血清组。

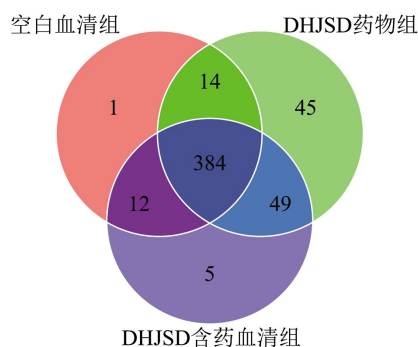


图 2 入血成分韦恩图

Fig.2 Venn diagram of blood-entering components

因子产生的正调控以及应对多种微生物刺激的反应等。在细胞组分 (cellular component, CC) 方面, 富集分析显示这些成分主要集中于细胞外基质及其相关结构, 如胶原纤维基质和囊泡腔等部位。在分子功能 (molecular function, MF) 方面, DHJSD 活性成分显著富集于受体调控、配体结合及转录调控等相关功能, 涉及细胞因子、激素及生长因子等多种信号分子调控机制。详见图 3A。

2.2.2 KEGG 通路富集分析 KEGG 通路分析结果显示, DHJSD 的作用主要集中在 Toll 样受体信号通路以及细胞因子-受体相互作用通路上。将潜在靶蛋白映射至 KEGG 信号通路图中, 发现 PI3K、NF- κ B 等蛋白可能是 DHJSD 的重要作用靶点。详见图 3B、C。

2.2.3 DHJSD 靶蛋白的 PPI 网络分析 PPI 网络有助于识别靶点蛋白中的关键节点。本研究利用 STRING 数据库中人类蛋白互作数据构建靶点 PPI 网络。详见图 4。在度值大于 25 的 211 个靶点中, 关键节点包括: 白蛋白 (albumin, ALB)、TNF、IL-6、血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、IL-1B、NF- κ B、PI3K 和 MMP-9。

2.3 动物实验验证

2.3.1 组织病理学分析 各组大鼠软骨组织在形态学上存在显著差异。空白组软骨结构基本正常, 软骨层厚度均匀, 表面光滑, 四层结构清晰可辨, 软骨细胞无坏死或变性表现。骨小梁呈网状连接, 骨髓腔狭小, 骨髓细胞丰富, 仅可见少量骨小梁轻度断裂。模型组软骨组织发生严重病理性改变, 软骨结构紊乱, 软骨细胞明显增生, 形成细胞簇团, 部分细胞出现肥大, 胞质呈嗜酸性。骨组织内存在明显纤维

化, 大量成纤维细胞及部分异型细胞可见, 提示 KOA 模型构建成功。GH 组软骨结构异常程度较轻, 软骨层厚度基本均匀, 表面光滑, 四层结构清晰, 仅在局灶区域可见纤维化, 成纤维细胞略有增多, 未见明显异型细胞。软骨细胞无坏死或变性, 软骨表面可见少量炎症细胞浸润。与模型组相比, DHJSD 组软骨组织结构显著改善。软骨层厚度恢复正常, 表面平整, 四层结构清晰, 无明显软骨细胞坏死或变性。骨小梁呈网状连接, 骨髓腔小且充盈, 骨髓细胞丰富。组织纤维化程度减轻, 异型细胞数量减少。详见图 5。

2.3.2 DHJSD 对 KOA 大鼠软骨组织 Beclin-1、LC3、p62 及 rno-miR-140-5p 表达的影响 与空白组相比, 模型组 Beclin-1 表达显著下降、p62 表达水平则显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比, DHJSD 组 Beclin-1 表达显著升高 ($P < 0.01$)、p62 表达下降 ($P < 0.05$)。GH 组的 Beclin-1 的表达低于 DHJSD 组和空白组, LC3 表达高于空白组, p62 表达低于模型组但高于空白组, rno-miR-140-5p 的表达水平则高于其余三组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。详见表 3。

2.3.3 软骨组织蛋白水平的表达 模型组的 LC3-II、NF- κ B-p65 和 p-PI3K 蛋白表达显著高于空白组 ($P < 0.01$), 而 mTOR 蛋白显著降低 ($P < 0.01$)。相比模型组, DHJSD 组 NF- κ B-p65 和 p-PI3K 表达下降 ($P < 0.05$), GH 组同样低于模型组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。详见图 6。

2.4 血清代谢组学结果

2.4.1 LC-MS/MS 代谢物谱分析 在正负离子模式下, 两组样本均表现出明显的代谢轮廓分离, 详见图 7A、B。所有样本均分布在 95% 置信区间以内, 说明数据具有良好的稳定性和可重复性, 详见图 7C、D。在正离子模式下, 共检测出 885 种差异代谢物。在负离子模式下, 检测到 1 639 种差异代谢物, 见图 8A、B。进一步采用欧几里得距离矩阵对差异代谢物进行聚类分析, 并绘制热图, 直观展示了两组之间的主要代谢差异, 见图 8C、D。

2.4.2 代谢通路富集分析 差异丰度评分分析显示, 包括癌症中的胆碱代谢、花生四烯酸代谢在内的 5 条通路呈上调趋势, 其余通路则表现为下调。将差异代谢物映射至 KEGG 和 MetaboAnalyst 数据库后

表 2 DHJSD 的血中原型成分
Table 2 Prototype components of DHJSD in blood

编号	名称	综合评分	分子式	质荷比	保留时间/min	分类
1	Kaempferol	0.999	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.043	205.448	黄酮类
2	Bergapten/Heracltin	0.998	C ₁₂ H ₈ O ₄	217.049	272.570	苯丙素类
3	Licoricesaponin G2	0.988	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	837.389	214.705	萜类
4	Quercetin-3-O-galactoside	0.987	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.088	90.689	黄酮类
5	Ginsenoside Ro	0.984	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉	955.491	383.385	萜类
6	Isobergapten	0.969	C ₁₂ H ₈ O ₄	217.049	238.959	苯丙素类
7	Ginsenoside Rc	0.969	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1 077.584	296.692	萜类
8	Quercetin-3-O-glucuronide	0.958	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	477.067	89.758	黄酮类
9	Naringenin	0.944	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271.061	219.826	黄酮类
10	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-6-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]chromen-4-one	0.923	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	433.112	168.725	黄酮类
11	Rutin	0.921	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	611.159	84.985	黄酮类
12	Flavonol base + 3O, O-Hex	0.921	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.093	94.491	黄酮类
13	Licofuranocoumarin	0.920	C ₂₁ H ₂₀ O ₇	385.127	119.725	苯丙素类
14	Kaempferol-3-O-glucuronoside	0.919	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	461.072	92.996	黄酮类
15	Withanolide A	0.913	C ₂₈ H ₃₈ O ₆	471.275	740.129	萜类
16	(2E,4E)-N-(2-methylpropyl)deca-2,4-dienamide	0.890	C ₁₄ H ₂₅ NO	224.200	494.559	未分类
17	Pectolarigenin	0.888	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	313.071	344.616	黄酮类
18	6-[3-[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]-4-methoxy-2-(methoxymethyl)butyl]-4-methoxy-1,3-benzodioxole	0.875	C ₂₄ H ₃₂ O ₇	415.211	484.780	苯丙素类
19	Corylin	0.858	C ₂₀ H ₁₆ O ₄	321.112	249.560	黄酮类
20	Biochanin-7-O-glucoside	0.856	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	491.118	225.755	黄酮类
21	Daidzein-8-C-glucoside	0.828	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	415.103	129.982	黄酮类
22	Launobine	0.827	C ₁₈ H ₁₇ NO ₄	312.123	72.224	生物碱
23	(R)-Heraclenol	0.826	C ₁₆ H ₁₆ O ₆	305.101	129.455	未分类
24	8-(2-hydroxy-3-methylbut-3-enyl)-7-methoxychromen-2-one	0.820	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	243.101	167.395	苯丙素类
25	Ugaxanthone	0.801	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	329.102	298.093	未分类
26	Kaempferol-7-O-neohesperidoside	0.789	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.126	182.910	黄酮类
27	Fisetin	0.753	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287.055	265.573	黄酮类
28	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]-6-(3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl)chromen-4-one	0.743	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	563.140	64.878	黄酮类
29	1,5-Dihydroxy-3-methoxy-2-prenylxanthone	0.729	C ₁₉ H ₁₈ O ₅	327.122	196.376	未分类
30	2''-O-beta-L-galactopyranosylorientin	0.722	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.145	56.181	黄酮类
31	Swertiamarin	0.721	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	419.119	52.665	萜类
32	Coumarin+10+1MeO,O-Hex-Hex 7-[4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-3-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyoxan-2-yl]oxy-6-methoxychromen-2-one	0.719	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₄	515.139	40.081	苯丙素类
33	Oxoglucine	0.718	C ₂₀ H ₁₇ NO ₅	352.118	356.896	生物碱
34	Quillaic acid 3-[galactosyl-(1->2)-glucuronide]	0.717	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₆	825.426	302.556	萜类
35	Lysionotin	0.682	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	345.109	373.629	黄酮类
36	Isobiflorin	0.677	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	355.102	47.792	未分类
37	Isoglycycoumarin	0.671	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	369.133	360.643	苯丙素类
38	7,4'-Dimethoxyflavone	0.666	C ₁₇ H ₁₄ O ₄	283.096	235.207	黄酮类
39	Tangeritin	0.646	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	373.128	126.021	黄酮类
40	4-prenylcoumestrol	0.645	C ₂₀ H ₁₆ O ₅	337.107	220.177	苯丙素类
41	Semilicoisoflavone B	0.643	C ₂₀ H ₁₆ O ₆	353.101	353.068	黄酮类
42	Methyl tanshinonate	0.641	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	339.122	258.389	未分类
43	Flavone base+3O, 2MeO, O-Hex 6-[2-[3,5-dimethoxy-4-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]-5-hydroxy-4-oxochromen-7-yl]oxy-3,4,5-trihydroxyoxane-2-carboxylic acid	0.640	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	491.119	120.950	黄酮类
44	Ginsenoside Rb3	0.626	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1 123.592	309.082	萜类
45	5'-(furan-3-yl)-4a-hydroxy-4,7-dimethylspiro [5,6,7,8a-tetrahydro-1H-naphthalene-8,3'-oxolane]-2,2'-dione	0.617	C ₁₉ H ₂₂ O ₅	331.154	102.507	萜类
46	Herbacetin	0.617	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.038	114.953	黄酮类
47	Formononetin	0.611	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	267.066	283.633	黄酮类
48	Citrusinol	0.611	C ₂₀ H ₁₆ O ₆	353.101	297.923	黄酮类
49	Betulin	0.609	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	425.377	311.919	萜类

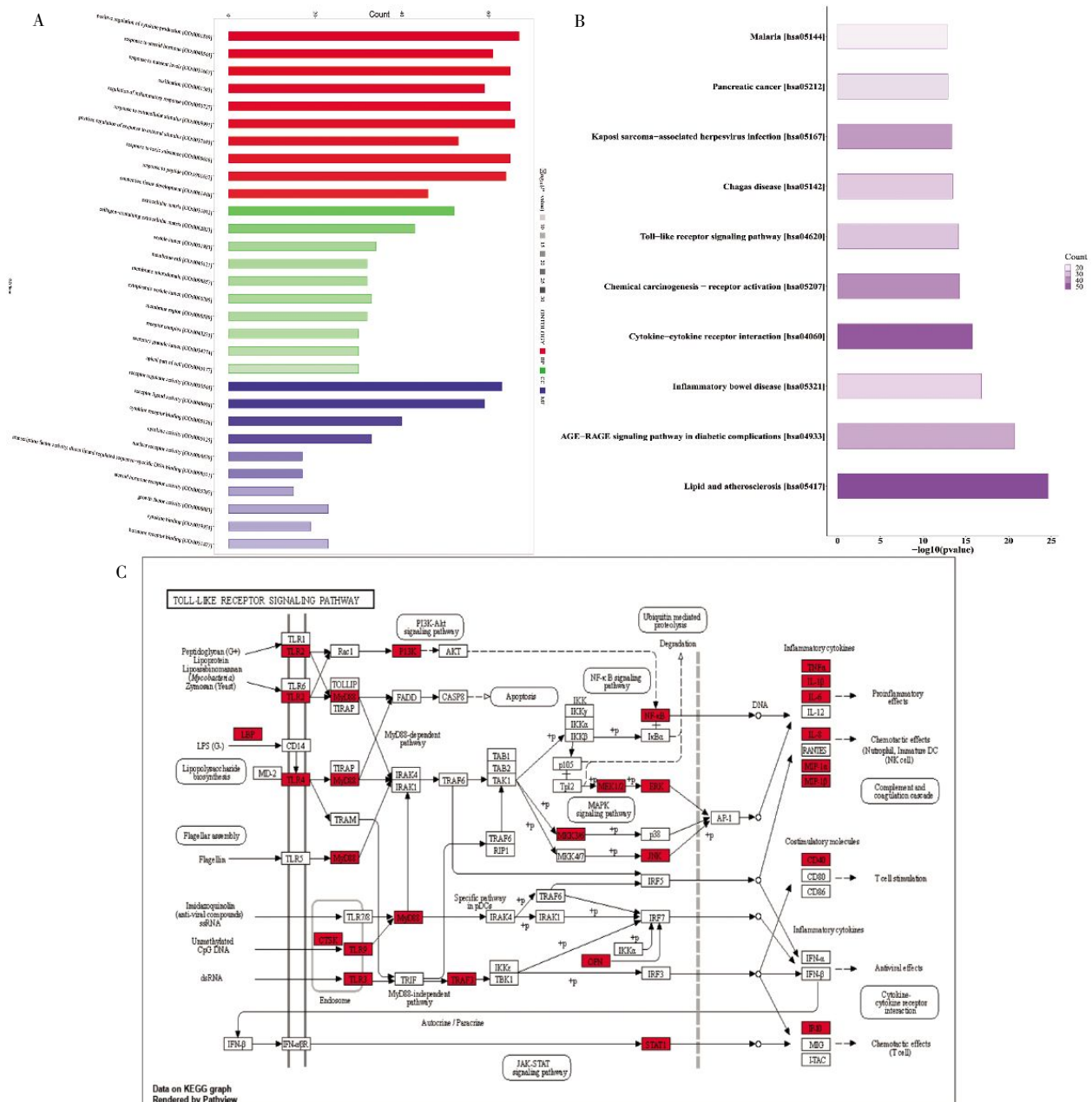


图3 DHJSD 抗 KOA 潜在靶点的 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析

Fig.3 GO functional annotation and KEGG pathway enrichment analysis of the potential targets of DHJSD against KOA
注:A. GO 分析中 BP/CC 和 MF 类别中富集程度最高的前 10 个条目;B. KEGG 分析中富集程度最高的前 10 条通路;C. Toll 样受体信号通路示意图。

发现,正离子模式下丁酸代谢和鞘脂代谢是受影响最显著的通路。而在负离子模式下,乙醛酸与二羧酸代谢通路表现最为显著,详见图 9。

3 讨论

KOA 是骨关节炎最常见的亚型之一,其发病过程具有慢性、进行性及多因素交互作用等特点^[18]。鉴于其病因复杂,目前临床治疗策略主要强调综合管理。DHJSD 作为经典中医方剂,具有补肝肾、强筋骨、祛风除湿的功效,广泛应用于 KOA 的治疗中^[19-22]。

已有研究表明,DHJSD 可通过增强自噬而改善软骨退变,并可调节细胞内锌稳态^[23]。

本研究首次整合血清化学、网络药理学、代谢组学和实验验证探讨 DHJSD 治疗 KOA 的作用机制。首先,通过血清药物化学分析,共鉴定出 49 种进入血液的成分,主要包括类黄酮、萜类及苯丙素类化合物,提示这些成分可能为 DHJSD 发挥治疗作用的主要活性物质。其次,基于上述成分开展网络药理学研究,预测 DHJSD 可能通过多条信号通路发挥治疗作用,包括 Toll 样受体通路、脂质代谢/动脉粥样硬化

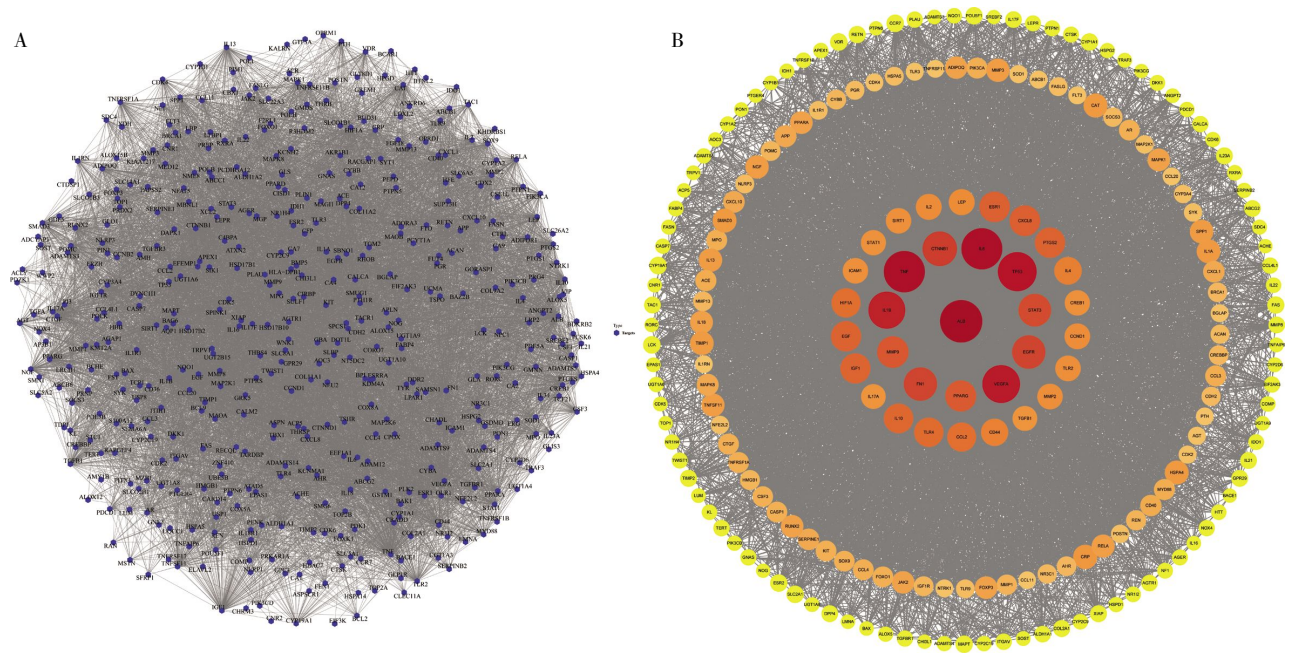


图 4 DHJSD 抗 KOA 潜在靶点 PPI 网络

Fig.4 PPI network of the potential targets of DHJSD against KOA

注:A. 靶点蛋白互作网络图;B. PPI 核心靶点图。

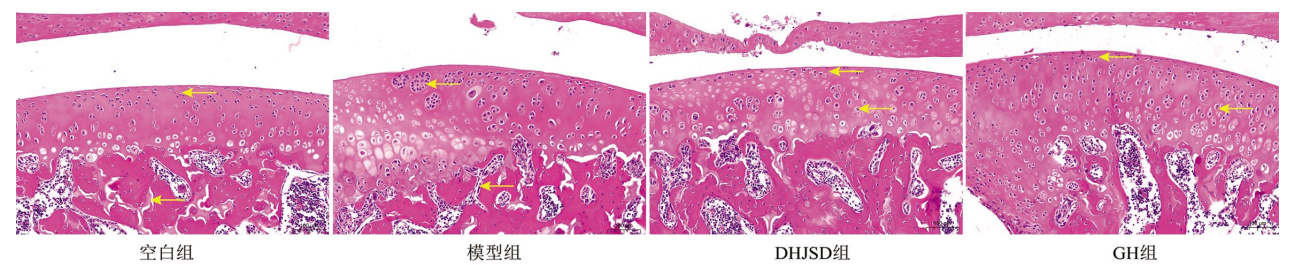


图 5 各组大鼠膝关节软骨的病理变化(HE 染色,×200,比例尺=100 μm)

Fig.5 Pathological changes in knee joint cartilage in different groups of rats (HE staining, ×200, scale bar=100 μm)

注:黄色箭头所指为病变部位。

表 3 不同处理条件下大鼠软骨中 Beclin-1、LC3、p62 及 rno-miR-140-5p 的表达情况

Table 3 Expression of Beclin-1, LC3, p62, and rno-miR-140-5p in rat cartilage under different treatment conditions

组别	Beclin-1	LC3	p62	rno-mir-140-5p
空白组	1.141±0.127	1.188±0.170	1.230±0.199	1.037±0.033
模型组	0.631±0.019 ^{###}	2.741±0.600	4.650±0.168 ^{###}	2.286±0.286
DHJSD 组	1.749±0.190 ^{###**}	2.079±0.071	1.837±0.063 ^{**}	3.605±0.545 ^{###}
GH 组	0.843±0.011 ^{#△△}	7.304±5.927 [#]	2.134±0.412 ^{###**}	5.153±1.370 ^{###**△}

注:与空白组比较,* $P<0.05$,^{###} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$;与 DHJSD 组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$ 。

通路等。通过动物实验验证发现,DHJSD 可明显改善 KOA 模型大鼠的软骨结构,减少纤维化,缓解炎症反应,提示其具有明确的组织修复和抗炎效果。此外,非靶向代谢组学分析进一步揭示,DHJSD 干预可显著影响鞘脂代谢,提示该通路可能在 DHJSD 治疗 KOA 中发挥关键作用。同时,RT-qPCR 和

Western blot 结果显示 DHJSD 上调 Beclin-1,降低了 p62、NFKB-p65 和 p-PI3K 在 KOA 模型大鼠软骨中的表达,支持了上述信号通路的预测。

网络药理学预测结果显示,脂质代谢/动脉粥样硬化通路为潜在信号通路之一。而在动脉粥样硬化中,脂质代谢紊乱导致脂质蓄积,激活巨噬细胞并诱

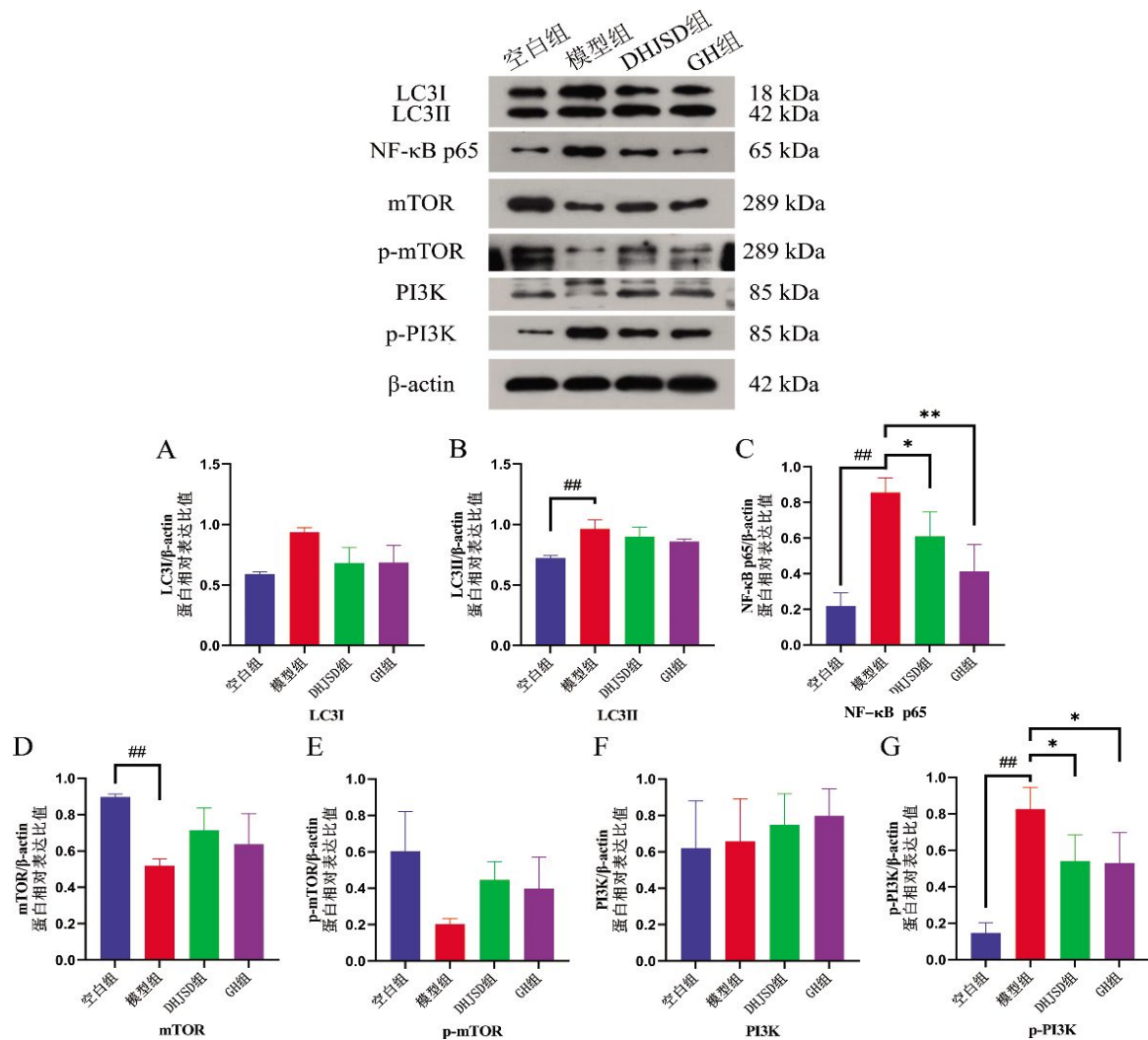


图6 DHJSD对KOA模型大鼠软骨相关蛋白表达的影响

Fig.6 Effects of DHJSD on the expression of cartilage-related proteins in KOA model rats

注: A. LC3-I; B. LC3-II; C. NF- κ B p65; D. mTOR; E. p-mTOR; F. PI3K; G. p-PI3K。与空白组比较, # $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

导炎症因子释放,从而加重血管和组织损伤。类似机制亦可能参与 KOA 的发病过程。研究显示,脂筏等脂质微结构是炎症信号转导的重要平台,能放大免疫细胞中的促炎信号,进而加剧关节局部炎症反应^[24]。KANG 等^[25]发现,圣草酚可通过抑制脂筏形成,抑制人软骨细胞中 IL-1 β 诱导的炎症反应,进而下调 PI3K/NF- κ B 信号通路。此外,利用 Caspase-1 抑制剂(如 Ac-YVAD-CMK)抑制滑膜巨噬细胞焦亡,可显著降低滑膜炎与纤维化。在 KOA 模型中,焦亡抑制不仅降低了促炎因子表达,也显著抑制了转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、I 型胶原 α 1 链(collagen type I α 1 chain, COL1A1)等纤维化标志物的表达,从而缓解滑膜组织损伤^[26]。这表明脂质代谢紊乱可能通过影响脂筏结构和促进

炎症小体激活,从而间接增强巨噬细胞焦亡加剧炎症反应。

而在鞘脂代谢过程中,过往研究发现鞘氨醇激酶(sphingosine kinase, SphK)1/2 可催化神经鞘氨醇转化为鞘氨醇-1-磷酸(sphingosine-1-phosphate, S1P),从而调节三者之间的动态平衡。该平衡被称为“鞘脂流变仪”,其被认为在很大程度上影响细胞的存活或凋亡状态,并主要受 SphKs 调控^[27]。此外,选择性 SphK2 抑制剂 ABC294640 被证实能够减少软骨细胞凋亡、保护软骨基质,从而显著减轻 MIA 诱导大鼠的关节损伤与疼痛,提示靶向鞘脂代谢在 KOA 治疗中具有潜在前景^[28]。相对地,神经酰胺作为该通路的重要代谢物,则可通过上调 MMP 表达诱导软骨细胞凋亡并促进基质降解,从而加速 OA

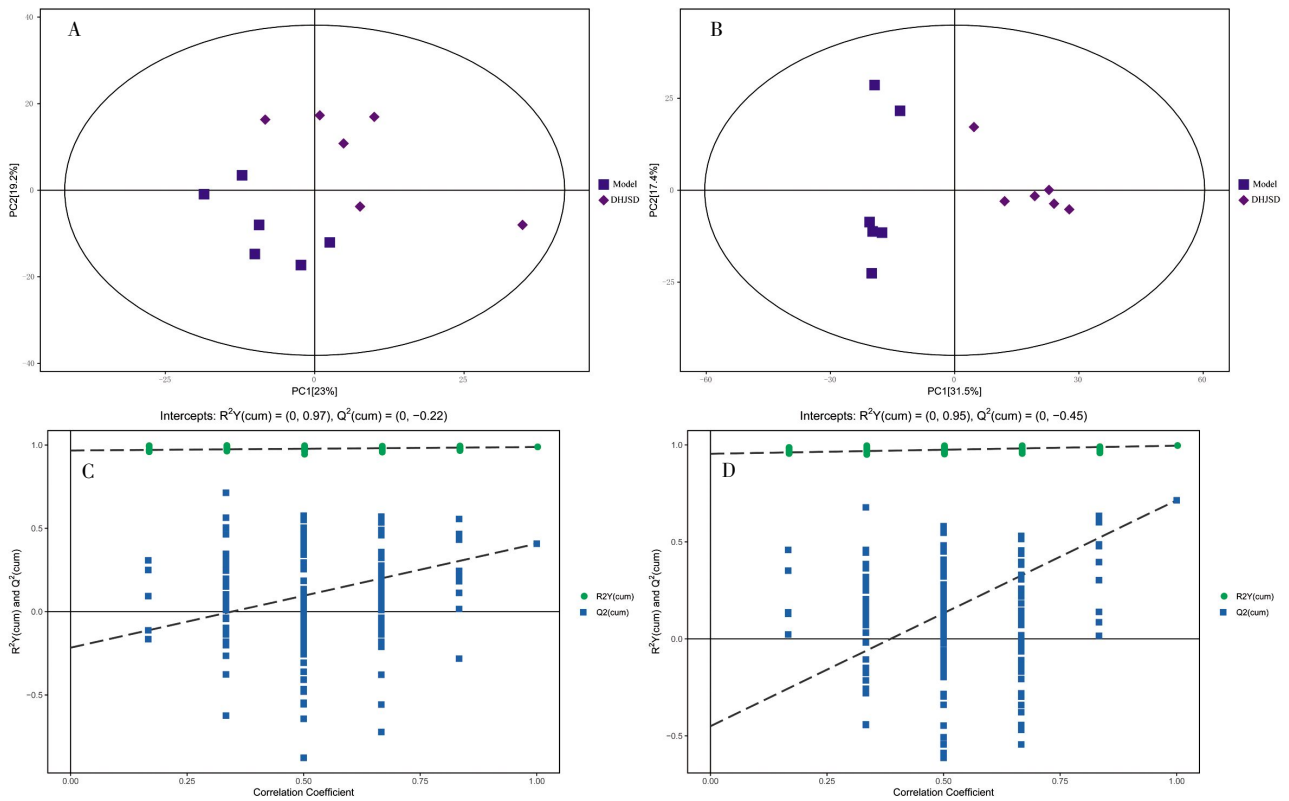


图 7 DHJSD 组与模型组的 PCA 得分图与 OPLS-DA 置换验证

Fig.7 PCA score plot and OPLS-DA permutation test between the DHJSD group and the model group

注:A.正离子模式下的 PCA 得分图;B.负离子模式下的 PCA 得分图;C.正离子模式下 OPLS-DA 模型的 200 次置换检验,显示模型未过拟合;D.负离子模式下的 OPLS-DA 模型未过拟合。

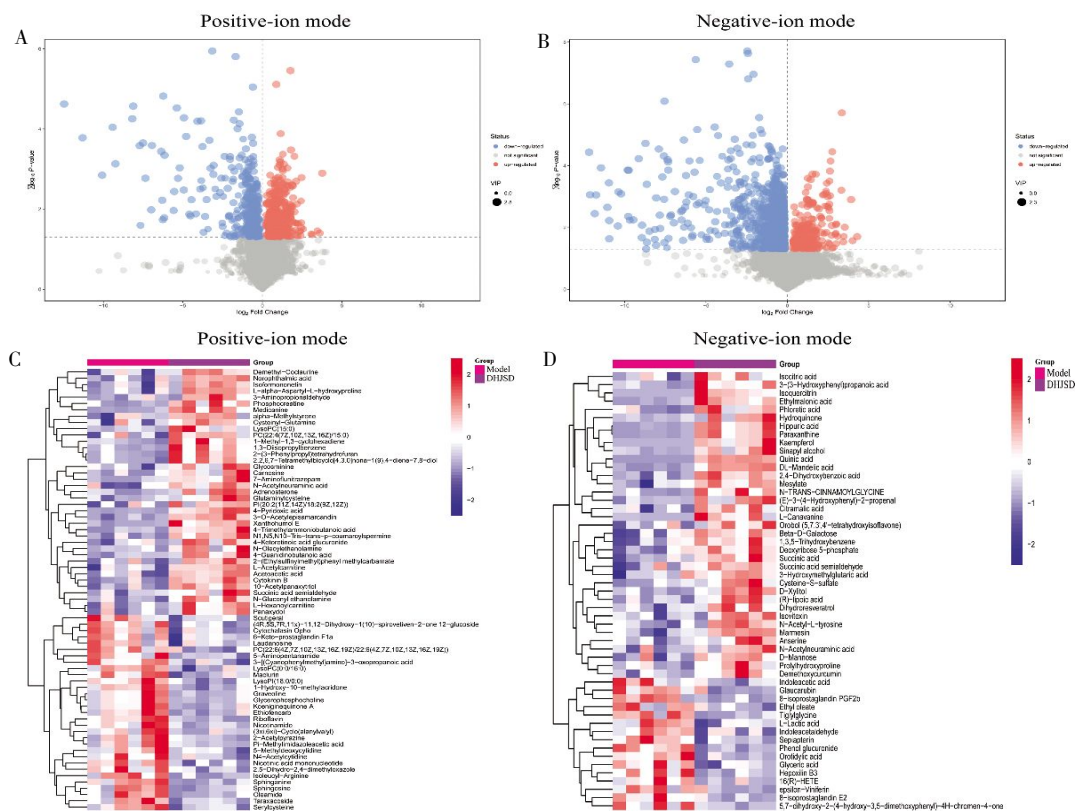


图 8 DHJSD 组与模型组间的差异代谢物

Fig.8 Differential metabolites between the DHJSD group and the model group

注:A.正离子模式下 $VIP>1$ 且 $P<0.05$ 的差异代谢物火山图;B.负离子模式下 $VIP>1$ 且 $P<0.05$ 的差异代谢物火山图;C.正离子模式下差异代谢物的层级聚类热图;D.负离子模式下差异代谢物的层级聚类热图。

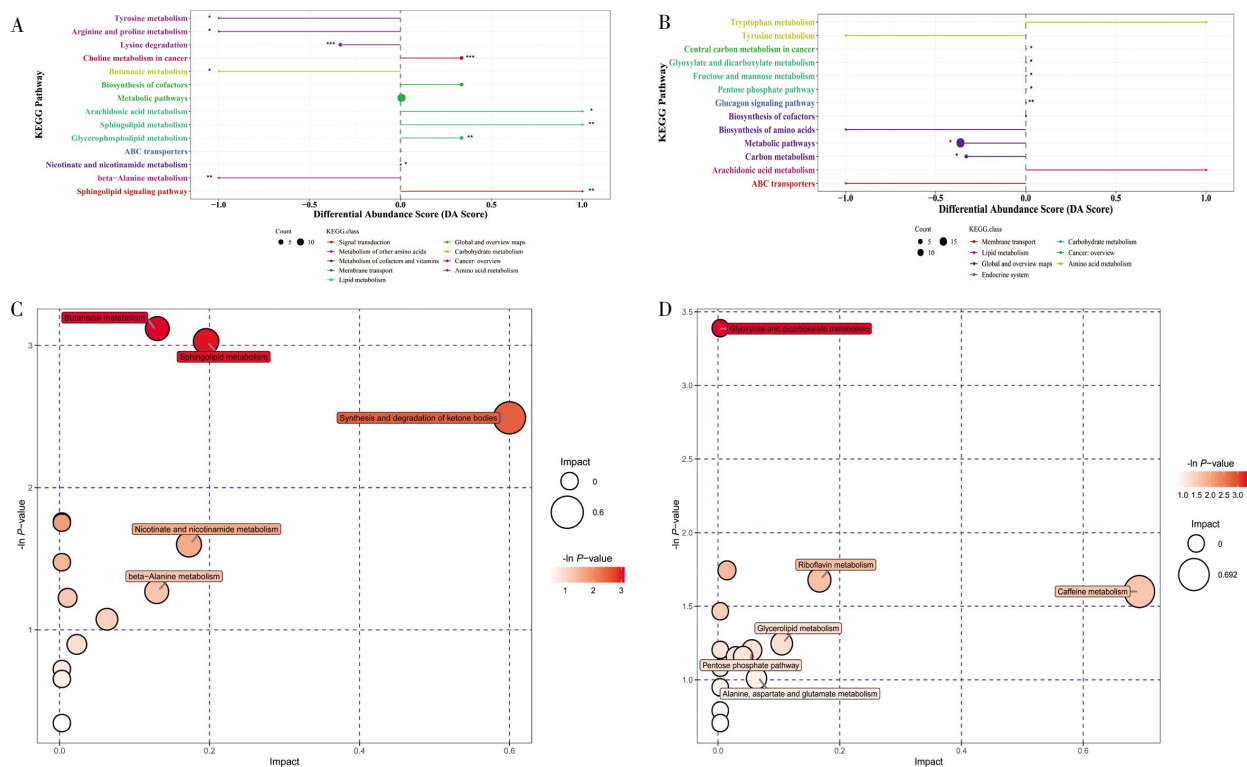


图9 DHJSD组与模型组差异代谢物的KEGG通路富集分析

Fig.9 KEGG pathway enrichment analysis of differential metabolites between the DHJSD group and the model group

注:A.正离子模式差异通路的丰度分析;B.负离子模式差异通路的丰度分析;C.正离子模式通路的气泡图分析;D.负离子模式通路的气泡图分析。每个气泡代表一个代谢通路,气泡的水平位置与大小表示影响因子,越大表示影响越大;垂直位置与颜色代表富集分析的 P 值[以 $-\ln(p)$ 表示],颜色越深表示 P 值越小,富集越显著。

的病理进展^[29]。

本研究主要聚焦于鞘脂代谢通路在 KOA 发展中的作用,而未对 IL-17、TNF 等其他已知参与 KOA 病理过程的重要炎症信号通路进行验证,因此尚不能完全排除这些通路在本研究观察到的效应中可能发挥作用。未来研究可进一步探讨。与此同时,本研究也探讨了 DHJSD 对 KOA 中关键信号分子及代谢通路的影响。需要指出的是,NF- κ B、PI3K/mTOR 与鞘脂代谢在炎症调控和代谢稳态维持中均具有重要作用,但它们之间的相互作用和协同机制尚未深入阐明。未来研究可进一步结合细胞与动物模型,通过特异性抑制剂或基因干预手段验证这些通路之间的交叉调控,并整合多组学数据构建更系统的信号网络模型,从而更加全面地揭示 KOA 的分子机制及 DHJSD 的作用靶点。

综上所述,DHJSD 可能通过调控鞘脂代谢和相关信号通路,在整体上实现对 KOA 炎症环境及组织稳态的调节,这与中医“整体观”“异病同治”的治疗理念高度契合。未来应结合靶向代谢组学及体内外

实验证实其作用机制,为临床推广提供理论与数据支持。

参考文献

- [1] HUNTER D J, BIERMA-ZEINSTRAS S. Osteoarthritis[J]. Lancet, 2019, 393(10182): 1745-1759.
- [2] SHI X, YU W, WANG T, et al. Electroacupuncture alleviates cartilage degradation: Improvement in cartilage biomechanics via pain relief and potentiation of muscle function in a rabbit model of knee osteoarthritis[J]. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie, 2020, 123: 109724.
- [3] ZHENG W, LI X, LIU D, et al. Mechanical loading mitigates osteoarthritis symptoms by regulating endoplasmic reticulum stress and autophagy[J]. FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2019, 33(3): 4077-4088.
- [4] 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.
- [5] SIDDIQ M, CLEGG D, JANSEN T L, et al. Emerging and new treatment options for knee osteoarthritis[J]. Current rheumatology reviews, 2022, 18(1): 20-32.

- [6] CAO J H, FENG D G, WANG Y Z, et al. Chinese herbal medicine Du-Huo-Ji-Sheng-decoction for knee osteoarthritis: A protocol for systematic review and meta-analysis[J]. *Medicine*, 2021, 100(3): e24413.
- [7] 卢一帆, 徐无忌, 熊 辉, 等. 基于 16S rDNA 测序分析独活寄生汤对膝关节炎大鼠肠道菌群的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2024, 44(12): 2277-2285.
- [8] CHEN C W, SUN J, LI Y M, et al. Action mechanisms of du-huo-ji-sheng-tang on cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis[J]. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 2011, 2011: 571479.
- [9] CUI Z, ZHANG W, LE X, et al. Analyzing network pharmacology and molecular docking to clarify Duhuo Jisheng decoction potential mechanism of osteoarthritis mitigation[J]. *Medicine*, 2022, 101(50): e32132.
- [10] ZHENG S, ZHOU B, YANG L, et al. System pharmacology analysis to decipher the effect and mechanism of active ingredients combination from Duhuo Jisheng decoction on osteoarthritis in rats[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2023, 315: 116679.
- [11] 许天亮, 张 磊, 孙 彤, 等. 独活寄生汤联合体外冲击波疗法对膝关节炎患者的临床疗效及生活质量评价[J]. *河北中医药学报*, 2024, 39(5): 14-19.
- [12] ZHANG W, WANG S, ZHANG R, et al. Evidence of Chinese herbal medicine Duhuo Jisheng decoction for knee osteoarthritis: a systematic review of randomised clinical trials[J]. *BMJ open*, 2016, 6(1): e008973.
- [13] ZHAO J, LIANG G, PAN J, et al. Efficacy of Duhuo Jisheng Decoction for treating cold-dampness obstruction syndrome-type knee osteoarthritis: A pooled analysis[J]. *BioMed Research International*, 2022, 2022: 2350404.
- [14] ZHANG Z, YI P, YANG J, et al. Integrated network pharmacology analysis and serum metabolomics to reveal the cognitive improvement effect of Bushen Tiansui formula on Alzheimer's disease[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, 249: 112371.
- [15] REAGAN-SHAW S, NIHAL M, AHMAD N. Dose translation from animal to human studies revisited[J]. *FASEB Journal*, 2008, 22(3): 659-661.
- [16] BOVE S E, CALCATERRA S L, BROOKER R M, et al. Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2003, 11(11): 821-830.
- [17] 陈 蔚, 李恒聪, 万红叶, 等. 电针对膝关节骨关节炎大鼠滑膜炎性反应期自发痛及后期触诱发痛的影响[J]. *中国针灸*, 2022, 42(12): 1385-1393.
- [18] LV Z, YANG Y X, LI J, et al. Molecular Classification of Knee Osteoarthritis[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 725568.
- [19] 罗红梅, 莫丽莎, 余学龙, 等. 热敏灸、热敏穴位贴敷联合独活寄生汤三联方案治疗膝骨性关节炎(肝肾亏虚证)的临床研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2023, 43(12): 2278-2283.
- [20] 黄玉丰. 独活寄生汤联合超微肿痛贴治疗膝关节骨性关节炎疗效观察[J]. *实用中医药杂志*, 2021, 37(11): 1818-1819.
- [21] 王君清, 贾超轶, 刘文琼. 龙砂开阖六气针法联合独活寄生汤治疗肝肾亏虚型膝关节炎临床观察[J]. *山东中医杂志*, 2025, 44(5): 550-554.
- [22] 张茜玥, 彭 鹏. 独活寄生汤治疗肝肾亏虚型膝关节骨性关节炎疗效研究[J]. *陕西中医*, 2025, 46(3): 354-358, 363.
- [23] WANG Y H, ZHOU Y, GAO X, et al. Duhuo Jisheng Decoction regulates intracellular zinc homeostasis by enhancing autophagy via PTEN/Akt/mTOR pathway to improve knee cartilage degeneration[J]. *PLoS one*, 2024, 19(1): e0290925.
- [24] LEMAIRE-EWING S, LAGROST L, NèEL D. Lipid rafts: a signalling platform linking lipoprotein metabolism to atherogenesis[J]. *Atherosclerosis*, 2012, 221(2): 303-310.
- [25] KANG W, XU Q, DONG H, et al. Eriodictyol attenuates osteoarthritis progression through inhibiting inflammation via the PI3K/AKT/NF- κ B signaling pathway[J]. *Scientific Reports*, 2024, 14(1): 18853.
- [26] ZHANG L, XING R, HUANG Z, et al. Inhibition of synovial macrophage pyroptosis alleviates synovitis and fibrosis in knee osteoarthritis[J]. *Mediators of Inflammation*, 2019, 2019: 2165918.
- [27] EL JAMAL A, BOUGAULT C, MEBAREK S, et al. The role of sphingosine 1-phosphate metabolism in bone and joint pathologies and ectopic calcification[J]. *Bone*, 2020, 130: 115087.
- [28] FITZPATRICK L R, GREEN C, MAINES L W, et al. Experimental osteoarthritis in rats is attenuated by ABC294640, a selective inhibitor of sphingosine kinase-2[J]. *Pharmacology*, 2011, 87(3/4): 135-143.
- [29] SABATINI M, ROLLAND G, LÉONCE S, et al. Effects of ceramide on apoptosis, proteoglycan degradation, and matrix metalloproteinase expression in rabbit articular cartilage[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 267(1): 438-444.

(本文编辑 苏 维)