

·实验研究·

本文引用: 吴昊, 龚志贤, 卢敏, 邝高艳, 许晓彤, 唐志明. 黄栀理伤贴膏对兔膝关节炎滑膜组织 TLR4/MyD88 信号通路的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(7): 1195-1202.

黄栀理伤贴膏对兔膝关节炎滑膜组织 TLR4/MyD88 信号通路的影响

吴昊¹, 龚志贤^{2*}, 卢敏², 邝高艳², 许晓彤², 唐志明¹

1. 湖南中医药大学第一中医临床学院, 湖南长沙 410007; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007

[摘要] **目的** 探讨黄栀理伤贴膏对兔膝关节炎(KOA)、滑膜组织 Toll 样受体 4(TLR4)/髓细胞分化初级反应蛋白 88(MyD88) 信号通路的影响。**方法** 将新西兰兔随机分为空白组(6只)、KOA 造模组(18只)。采用膝关节腔注射木瓜蛋白酶与 L-半胱氨酸混合液对 KOA 造模组进行造模, 将 KOA 造模组中 15 只造模成功的新西兰兔分为模型组、骨通贴膏组、黄栀理伤贴膏组, 每组 5 只。模型组予胶布贴敷, 骨通贴膏组予骨通贴膏贴敷, 黄栀理伤贴膏组予黄栀理伤贴膏贴敷, 干预每次 8 h, 1 次/d, 连续 4 周。空白组不予处理。观察各组新西兰兔一般情况、X 线摄像、关节软骨大体观; 采用 Pelletier 评分评估软骨损伤情况; ELISA 检测血清、滑膜组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量; Western blot 和 RT-qPCR 检测滑膜组织 TLR4、MyD88 蛋白及 mRNA 表达水平。**结果** X 线摄像显示膝关节不同程度退行性改变, 模型组、骨通贴膏组、黄栀理伤贴膏组退行性改变较空白组显著, 但骨通贴膏组、黄栀理伤贴膏组较模型组轻。软骨大体观显示模型组右后膝关节退变与软骨损伤较空白组明显, 骨通贴膏组、黄栀理伤贴膏组关节退变及软骨损伤较模型组改善。与空白组比较, 模型组 Pelletier 评分、血清和滑膜组织 TNF- α 含量、滑膜组织中 TLR4 和 MyD88 的蛋白及 mRNA 表达水平均升高($P<0.001$); 与模型组比较, 骨通贴膏组及黄栀理伤贴膏组 Pelletier 评分、血清和滑膜组织 TNF- α 含量、滑膜组织中 TLR4 和 MyD88 的蛋白及 mRNA 表达水平降低($P<0.05, P<0.001$)。与骨通贴膏组比较, 黄栀理伤贴膏组血清和滑膜组织 TNF- α 表达水平、滑膜组织中 TLR4 和 MyD88 的蛋白及 mRNA 表达水平降低($P<0.05, P<0.01, P<0.001$)。**结论** 黄栀理伤贴膏能有效延缓兔 KOA 疾病进展, 其作用机制可能与抑制滑膜组织 TLR4/MyD88 信号通路的活化, 从而减轻炎症反应相关。

[关键词] 黄栀理伤贴膏; 膝关节炎; 滑膜组织; Toll 样受体 4; 髓细胞分化初级反应蛋白 88; 炎症指标

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.07.001

Effects of Huangzhi Lishang Plaster on the TLR4/MyD88 signaling pathway in synovial tissue of rabbits with knee osteoarthritis

WU Hao¹, GONG Zhixian^{2*}, LU Min², KUANG Gaoyan², XU Xiaotong², TANG Zhiming¹

1. The First Clinical School of Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;

2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of Huangzhi Lishang Plaster (HZLSP) on the Toll-like receptor 4 (TLR4)/myeloid differentiation primary response protein 88 (MyD88) signaling pathway in the synovial tissue of rabbits with knee osteoarthritis (KOA). **Methods** New Zealand rabbits were randomly divided into a blank group ($n=6$) and a KOA model group ($n=18$). KOA in the

[收稿日期] 2025-03-17

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82274543); 湖南省中医药管理局项目(C2023014); 长沙市自然科学基金项目(kq2208209)。

[通信作者] * 龚志贤, 男, 博士研究生, 副主任医师, E-mail: 33123893@qq.com。

model group was induced via intra-articular injection of a mixed solution of papain and L-cysteine into the knee joint. Fifteen successfully modeled rabbits from the KOA model group were further divided into a model group, a Gutong Plaster (GTP) group, and a HZLSP group, with 5 rabbits in each group. The model, GTP, and HZLSP groups received adhesive tape, GTP, and HZLSP applications respectively. The intervention was administered once daily for 8 hours per session, for 4 consecutive weeks. The blank group received no treatment. General conditions, X-ray imaging, and gross morphology of articular cartilage were observed in each group. Cartilage damage was evaluated using the Pelletier scoring system. ELISA was used to measure the expression levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum and synovial tissue. Western blot and RT-qPCR were used to check the protein and mRNA expression levels of TLR4 and MyD88 in synovial tissue. **Results** X-ray imaging showed varying degrees of degenerative changes in the knee joints. Animals in the model group, GTP group, and HZLSP group exhibited more pronounced degenerative changes compared to the blank group; however, the degenerative changes in animals of the GTP and HZLSP groups were less severe than those in the model group. Gross morphology of cartilage showed that the model group had more apparent degeneration and cartilage damage in the right posterior knee joint compared to the blank group, while joint degeneration and cartilage damage were ameliorated in the GTP and HZLSP groups relative to the model group. Compared with the blank group, the model group had significantly increased Pelletier scores, TNF- α expression levels in serum and synovial tissue, and protein and mRNA expression levels of TLR4 and MyD88 in synovial tissue ($P < 0.001$). Compared with the model group, animals in the GTP and HZLSP groups had reduced Pelletier scores, TNF- α expression levels in serum and synovial tissue, and protein and mRNA expression levels of TLR4 and MyD88 in synovial tissue ($P < 0.05$, $P < 0.001$). Compared with the GTP group, the HZLSP group showed further reductions in TNF- α expression levels in serum and synovial tissue, and in protein and mRNA expression levels of TLR4 and MyD88 in synovial tissue ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). **Conclusion** HZLSP can effectively delay the progression of KOA in rabbits, and its mechanism of action may be related to the inhibition of TLR4/MyD88 signaling pathway activation in synovial tissue, thereby alleviating inflammation.

[**Keywords**] Huangzhi Lishang Plaster; knee osteoarthritis; synovial tissue; Toll-like receptor 4; myeloid differentiation primary response protein 88; inflammatory marker

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种以关节软骨破坏、骨赘形成、软骨下骨硬化、滑膜炎症为主要病理特征的骨关节疾病^[1],主要临床表现为膝关节疼痛、肿胀、活动受限、畸形。KOA 是骨科最常见的中老年慢性疾病,国内患病率约 18%,且女性患者多于男性^[2],其临床及影像学诊断方式已趋于标准化^[3]。其中,滑膜组织炎症是 KOA 中的关键病理环节,非感染性炎症与滑膜增生贯穿全程^[4]。近年研究证实,KOA 滑膜炎症与 Toll 样受体 4(Toll like receptor 4, TLR4)/髓样分化因子(myeloid differentiation primary response protein 88, MyD88)信号通路的持续活化状态相关^[5-6]。KOA 属于中医学“膝痹”范畴,病因为风寒湿热之邪侵袭、劳逸不当、体质亏虚等,病机以经络闭阻、气血运行失畅为本,病理产物瘀热贯穿疾病始终。黄栀理伤贴膏(原名伤速康贴膏、伤速康巴布膏、跌打通痹膏)是由经典名方“消炎散”加减化裁而来,具有活血祛瘀、行气止痛、通经活络、清热消肿之效,治疗 KOA 有明显的疗

效^[7]。前期实验证实,其能降低 KOA 兔关节液中白细胞介素(interleukin, IL)-1、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumour necrosis factor- α , TNF- α)含量,能显著降低 KOA 兔关节液中一氧化氮含量以及基质金属蛋白酶类(matrix metalloproteinase, MMP)如MMP-1、MMP-3、MMP-13 mRNA 表达;能升高 KOA 兔关节液中超氧化物歧化酶含量,增加 II 型胶原 mRNA 的表达,对 KOA 关节软骨退变有保护和延缓作用^[8-12]。在此基础上,本研究拟进一步探究黄栀理伤贴膏对 KOA 滑膜组织 TLR4/MyD88 信号通路的影响及其对滑膜组织的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

成年普通级新西兰雄兔 24 只,体质量 1.8~2.5 kg,购自湖南太平生物科技有限公司,动物生产许可证号:SCXK(湘)2023-0011,动物合格证号 SYXK(湘)2022-0003。单笼饲养于湖南中医药大学普通级动

物房,环境温度(25±1)℃,相对湿度50%±5%,自由饮食,保证笼舍清洁,适应性饲养7 d。本研究经过湖南中医药大学伦理委员会审批(ZYFY20221017-04)。

1.2 主要药物与试剂

黄栀理伤贴膏由湖南中医药大学第一附属医院药剂科提供,批号:2024062503;骨通贴膏由桂林天和药业股份有限公司生产,国药准字:Z10980134,批号:20240401。

木瓜蛋白酶、L-半胱氨酸(北京索莱宝公司,批号:G8430-25g、C0012-25g);BCA蛋白定量试剂、RIPA裂解液、蛋白上样缓冲液、PBST、Western转膜缓冲液、MyD88一抗、HRP-山羊抗兔IgG(H+L)(长沙艾碧维生物科技有限公司,批号:AWB0104c、AWB0136、AWB0055、AWI0130、AWB0211、AWA54415、AWS0002);TLR4一抗、GAPDH一抗(美国proteintech公司,批号:19811-1-AP、10494-1-AP);DM2000 Plus DNA标记、mRNA逆转录试剂盒、miRNA逆转录试剂盒(中国北京康为世纪生物科技有限公司,批号: CW0632、CW2569、CW2141);TNF- α (武汉华美生物工程公司,批号:CSB-E06998Rb)。

1.3 主要仪器

台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,型号:H1650R);全自动酶标洗板机、多功能酶标分析仪(深圳市汇松科技发展有限公司,型号:PW-812、MB-530);电热恒温培养箱(北京市永光明医疗仪器有限公司,型号:DHP-500);摇床、漩涡混合器(中国江苏其林贝尔公司,型号:TS-1、GL-88B);电泳仪、水平琼脂糖电泳槽(北京六一生物科技有限公司,型号:DYY-6C、DYCP-31DN);荧光定量PCR仪、荧光PCR板(上海赛默飞世尔管理有限公司,型号:PIKOREAL96、SPL0960)。

2 方法

2.1 分组与造模

随机将24只新西兰兔参照随机数字表法分为空白组(6只)、KOA造模组(18只)。对KOA造模组18只新西兰兔采用木瓜蛋白酶与L-半胱氨酸溶液干预进行造模^[13],于实验开始第1、4、7天,将KOA造模组新西兰兔右后膝关节备皮、体积分数75%乙醇消毒,0.2%戊巴比妥钠以30 mg/kg耳缘静脉

麻醉后,屈曲45°以髌骨下极髌腱外缘为进针点,向髌间窝方向进针,抵达股骨髁后回撤2 mm,注入0.2 mL 4%木瓜蛋白酶与0.03 mol/L L-半胱氨酸混合溶液。空白组右后膝关节注射等量0.9%氯化钠溶液。注射结束后用棉球按压出血点,并屈伸活动右后膝关节将药液充分吸收浸润整个关节腔,每天驱赶模型兔运动30 min,其余时间在笼内自由活动。造模4周后,从空白组、KOA造模采用随机数字表法分别挑选1只、3只进行验证模型。将造模侧膝关节与健侧膝关节对照观察,造模侧出现肿胀、屈伸功能障碍,结合X线摄像见兔膝关节骨质增生,骨赘形成,关节面粗糙、狭窄;关节软骨大体观察见兔膝关节面明显变薄,粗糙无光泽,甚则形成溃疡、缺损,判断为造模成功^[14]。KOA模型建立成功后,参照随机数字表法将KOA造模组剩余15只分为模型组、骨通贴膏组、黄栀理伤贴膏组,每组5只。

2.2 药物干预

于验证模型后第1天开始,贴敷膏药前,对每组兔右后膝关节直径3 cm范围进行备皮。空白组不予干预处理,常规饲养;模型组予外用贴敷胶布贴于右后膝;骨通贴膏组予外用骨通贴膏贴于右后膝;黄栀理伤贴膏组予外用黄栀理伤贴膏贴于右后膝。按照成人每次贴敷膏药需求量,采用Meeh-Rubner公式^[15]计算实验兔每次使用膏药面积为2 cm×4 cm。将膏药固定于右后膝关节后再以胶布覆盖膏药、佩戴伊丽莎白圈预防实验兔撕咬膏药。膏药贴敷每次8 h,每天1次,共敷贴4周。敷贴期间注意检查膏药是否固定,若出现右后膝关节局部皮疹则视为药物过敏,则停药并剔除标本。

2.3 取材方法

取材前,腹部脱毛后聚维酮碘消毒,乙醇脱碘,用0.2%戊巴比妥钠以30 mg/kg腹腔注射麻醉。麻醉成功后,取仰卧位,逐层打开腹腔,使用镊子游离腹腔脏器,暴露腹主动脉,采血针斜面朝下斜刺于腹主动脉远心端,见回血后,连接普通血清管,每只采血量为5~10 mL。将血清标本在室温下静置1 h后放入低温高速离心机中配平,调整参数为4℃、3 000 r/min离心10 min(离心半径8 cm)得到血清样本,置于-80℃冰箱保存备用。过量采血法处死兔后,立即消毒,在无菌工作台下取兔右后膝关节髌上囊滑膜组织,

PBS 缓冲液冲洗后,置于冻存管中-80 ℃冻存。

2.4 观察指标及方法

2.4.1 一般情况 观察兔的精神状态、毛色、饮食、步态及膝关节皮色、皮温、肿胀、活动度等情况。注意观察注射部位是否有肿胀、感染等情况。

2.4.2 影像学检查 给药 4 周后,每组各取 2 只兔拍摄右后膝关节正侧位 DR 片,观察膝关节 X 线表现。

2.4.3 膝关节软骨大体观察及 Pelletier 评分 对膝关节软骨进行大体观察。采用 Pelletier 评分^[6]评估软骨损伤情况。0 分:关节面光整,色泽如常;1 分:关节面粗糙,有小的裂隙且色泽灰暗;2 分:关节面糜烂,软骨缺损深达软骨表中层;3 分:关节面溃疡形成,缺损深达软骨深层;4 分:软骨剥脱,软骨下骨暴露。软骨损伤程度与分数呈正相关。

2.4.4 ELISA 检测血清、滑膜组织 TNF- α 水平 将血清、滑膜标本在室温解冻后再次离心,按 ELISA 试剂盒说明书添加试剂,调整全自动生化分析仪参数,将标本放入标本槽,通过 BCA 定量等操作,测定血清、滑膜组织中 TNF- α 含量。

2.4.5 Western blot 检测滑膜组织 TLR4、MyD88 蛋白表达 使用 300 μ L RIPA 裂解液加入膝关节滑膜组织,冰上裂解 10 min,4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min(离心半径 8 cm),提取总蛋白。BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质浓度,沸水煮 5 min 使蛋白变性。放入电泳槽,75 V 电泳 130 min 后进行转膜。转膜完成后浸入 5%脱脂奶粉,室温放置 90 min,再加入一抗 TLR4(1:2 000)、MyD88(1:1 500)、GAPDH(1:5 000)于 4 ℃冰箱孵育过夜。加入 HRP 标记的二抗(1:5 000),在室温下孵育 90 min 后。使用 ECL 化学发光液与 PVDF 膜孵育 1 min,凝胶成像系统成像。使用 ImageJ 分析条带灰度值,目标蛋白及内参 GAPDH 灰度比值反映相对表达量。

2.4.6 RT-qPCR 检测滑膜组织 TLR4、MyD88 的 mRNA 含量 剪取适量滑膜组织,取 1 mL Trizol 试剂进行裂解,提取出总 RNA,逆转录为 cDNA,进行 PCR 反应。反应条件为:95 ℃预变性 10 min,95 ℃变性 15 s,60 ℃退火 30 s,循环 40 次。反应结束后使用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算各样品相对于对照组样品目的基因表达水平的比值。相关引物序列信息,详见表 1。

2.5 统计学分析

实验数据采用 SPSS 26.0 统计学软件进行分析,计量数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。满足正态分布和方差齐

表 1 各基因引物序列

Table 1 Gene primer sequences

基因	引物	长度/bp
TLR4	正向:AGAAATCTGGGAGCCCTGTG	151
	反向:GCTATGGCTGCCTAAATGCTC	
MyD88	正向:CCCTTTGTCTCTCGACTCTTGG	185
	反向:TACGAGAACAGCCACTGCC	
GAPDH	正向:TGGAATCCACTGGCGTCTTCAC	168
	反向:AGGATGCCTTGCTGACAATCTTGA	

性检验,用单因素方差分析(ANOVA)进行多组比较;不满足正态分布和方差齐性检验,采用 Kruskal-Wallis 法比较。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。使用 Graphpad Prism 10.5 软件进行图形绘制。

3 结果

3.1 各组兔一般情况观察

各组兔无异常皮疹及死亡。空白组精神状态良好,毛色润泽,自发活动正常,双膝关节无明显肿胀、活动受限。模型组毛色枯槁,自发活动明显减少,右后膝关节肿胀、活动受限,对外界刺激不敏感。骨通贴膏组和黄栀理伤贴膏组精神状态较模型组好,毛色较模型组润泽,右后膝关节活动较模型组改善,对外界刺激比较敏感。

3.2 各组兔膝关节正侧位 X 线摄像

空白组右后膝关节无明显骨赘形成,关节间隙良好,关节面平整。模型组、骨通贴膏组、黄栀理伤贴膏组退变较空白组显著,但骨通贴膏组、黄栀理伤贴膏组较模型组轻。模型组右膝关节胫骨平台明显骨质增生,骨赘形成,关节间隙狭窄,关节囊肿胀;骨通贴膏组和黄栀理伤贴膏组右膝关节胫骨平台少量骨质增生,关节间隙稍变窄,关节囊未见明显肿胀。详见图 1。

3.3 各组兔膝关节软骨大体观察及 Pelletier 评分结果

空白组关节面光整,色泽如常,软骨颜色正常,完整无损伤;模型组关节软骨颜色灰白无光泽,关节面糜烂,甚至缺损深达软骨深层,骨赘形成;骨通贴膏组关节面软骨呈淡白色,光泽稍差,关节软骨面部分区域表层软骨见少许破坏;黄栀理伤贴膏组关节面软骨呈淡白色,光泽稍差,关节软骨面部分区域粗糙。详见图 2。

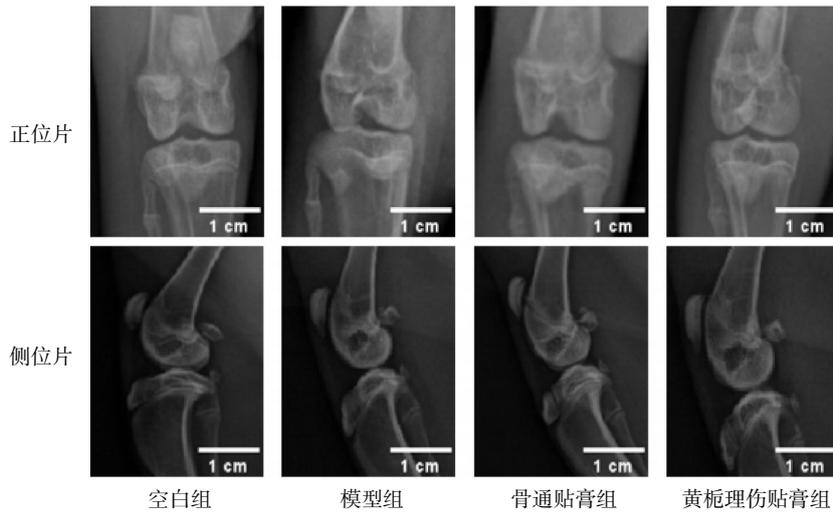


图 1 各组兔右后膝 X 线摄像

Fig.1 X-ray images of the right posterior knees in each group of rabbits

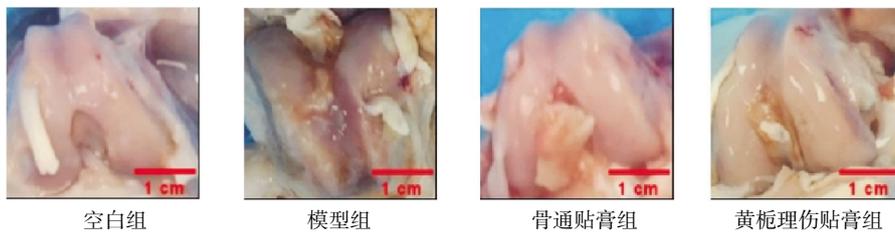


图 2 各组兔造模侧膝关节软骨大体观察结果

Fig.2 Gross morphological observation results of articular cartilage of the knee joint on the modeling side in each group of rabbits

与空白组比较,模型组、骨通贴膏组、黄梳理伤贴膏组 Pelletier 评分均升高($P<0.01, P<0.001$);与模型组比较,骨通贴膏组、黄梳理伤贴膏组 Pelletier 评分均降低($P<0.001$)。详见图 3。

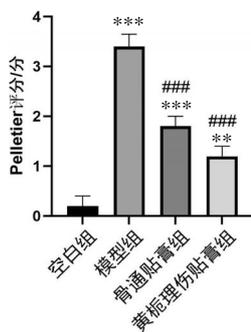


图 3 各组兔造模侧膝关节软骨 Pelletier 评分比较 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Fig.3 Comparison of Pelletier scores of the knee cartilage on the modeling side among different groups of rabbits ($\bar{x}\pm s, n=5$)

注:与空白组比较, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;与模型组比较, ### $P<0.001$ 。

3.4 各组兔血清、滑膜组织 TNF- α 含量

与空白组比较,模型组、骨通贴膏组、黄梳理伤贴膏组血清、滑膜组织中 TNF- α 含量均升高($P<0.05, P<0.01, P<0.001$);与模型组比较,骨通贴膏组及黄梳理伤贴膏组血清、滑膜组织中 TNF- α 含量均降低($P<0.001$);与骨通贴膏组比较,黄梳理伤贴膏组血清、滑膜组织中 TNF- α 含量均降低($P<0.01, P<0.001$)。详见图 4。

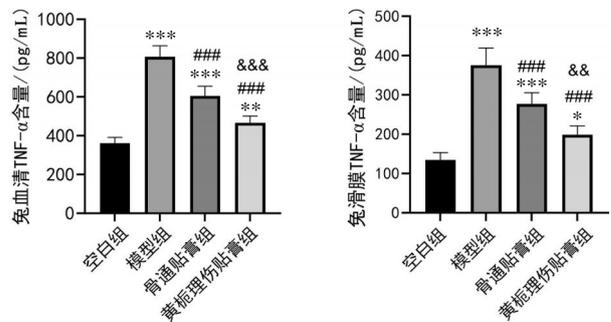


图 4 各组兔血清、滑膜组织 TNF- α 含量比较 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Fig.4 Comparison of TNF- α content in serum and synovial tissue among different groups of rabbits ($\bar{x}\pm s, n=5$)

注:与空白组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;与模型组比较, ### $P<0.001$;与骨通贴膏组比较, &&& $P<0.01$, &&&&&& $P<0.001$ 。

3.5 各组兔膝关节滑膜组织中 TLR4、MyD88 蛋白表达水平

与空白组比较,模型组、骨通贴膏组、黄梳理伤贴膏组滑膜 TLR4、MyD88 蛋白表达水平均升高($P<0.05, P<0.001$);与模型组比较,骨通贴膏组、黄梳理伤贴膏组滑膜 TLR4、MyD88 蛋白表达水平均降低($P<0.05, P<0.001$);与骨通贴膏组比较,黄梳理伤贴膏组滑膜 TLR4、MyD88 蛋白表达水平均降低($P<0.001$)。详见图 5—6。

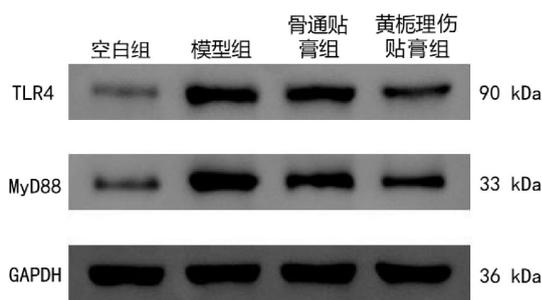


图 5 各组兔滑膜组织 TLR4、MyD88 蛋白条带图
($\bar{x}\pm s, n=5$)

Fig.5 Western blot bands of TLR4 and MyD88 proteins in synovial tissue in each group of rabbits
($\bar{x}\pm s, n=5$)

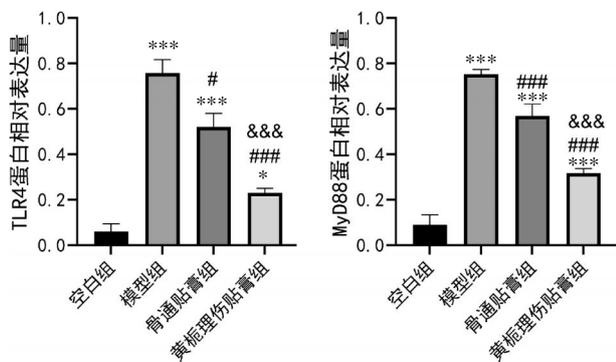


图 6 各组兔滑膜组织 TLR4、MyD88 蛋白表达水平比较
($\bar{x}\pm s, n=5$)

Fig.6 Comparison of TLR4 and MyD88 protein expression levels in synovial tissues among different groups of rabbits
($\bar{x}\pm s, n=5$)

注:与空白组比较, * $P<0.05$, *** $P<0.001$;与模型组比较, # $P<0.05$, ### $P<0.001$;与骨通贴膏组比较, &&& $P<0.001$ 。

3.6 各组兔膝关节滑膜组织中 TLR4、MyD88 mRNA 表达水平

与空白组比较,模型组、骨通贴膏组、黄梳理伤贴膏组滑膜 TLR4、MyD88 的 mRNA 表达水平均升高($P<0.05, P<0.001$);与模型组比较,骨通贴膏组、黄梳理伤贴膏组滑膜 TLR4、MyD88 的 mRNA 表达

水平均降低($P<0.001$);与骨通贴膏组比较,黄梳理伤贴膏组滑膜 TLR4、MyD88 的 mRNA 水平均降低($P<0.05, P<0.001$)。详见图 7。

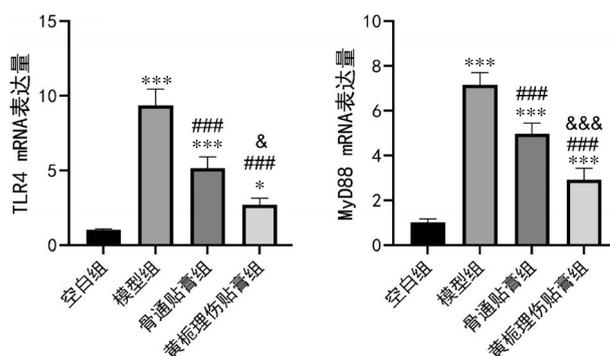


图 7 各组兔滑膜组织 TLR4、MyD88 mRNA 表达水平比较
($\bar{x}\pm s, n=5$)

Fig.7 Comparison of TLR4 and MyD88 mRNA expression levels in synovial tissues among different groups of rabbits
($\bar{x}\pm s, n=5$)

注:与空白组比较, * $P<0.05$, *** $P<0.001$;与模型组比较, ### $P<0.001$;与骨通贴膏组比较, & $P<0.05$, &&& $P<0.001$ 。

4 讨论

KOA 的致病因素众多,目前研究多集中于炎症通路的激活^[17]。近年研究证明,核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路的异常激活通过促炎细胞因子过量分泌,在膝关节稳态失衡中起关键作用^[18-19]。其中 TLR4 作为重要的跨膜免疫受体,能识别多种病原体相关分子模式,激活下游的 MyD88 依赖性信号通路,最终引发 NF- κ B 的活化^[20]。TLR4/MyD88 信号通路能激活存在于动物细胞质中的二聚体蛋白 NF- κ B^[21]。该蛋白在滑膜炎部位被高度激活,进一步促进滑膜炎生成^[22]。抑制 NF- κ B 信号通路不仅可以降低与炎症刺激因子、生长因子、黏附分子和趋化因子的基因转录,减少滑膜组织相关炎症介质的分泌,从而有效缓解局部炎症;还可以降低多种细胞凋亡抑制蛋白(cellular inhibitor of apoptosis protein, c-IAP)如 c-IAP1、c-IAP2 等的诱导表达,消除细胞对 TNF- α 诱导凋亡的保护作用,进而诱导滑膜细胞凋亡,抑制其过度增生,缓解局部炎症^[23-24]。

滑膜病变是 KOA 发展过程中的重要环节^[25],以滑膜炎、滑膜血管新生和滑膜纤维化为主要特征^[26]。其中,以 IL-1 β 、TNF- α 为主的各种炎症因子促进其发生发展^[27]。研究表明,机械应力与炎症小体在体内外双重激活作用下,可增加 NF- κ B 表达,从而增加

炎症因子释放,形成正反馈循环,导致膝关节滑膜炎的形成^[27]。研究发现,药物干预抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路,可改善滑膜病理形态,减轻 KOA 疼痛症状^[28]。实验研究证实,TLR4/NF- κ B 通路可通过早期激活免疫因素进而触发滑膜分泌炎症因子并诱导滑膜增生,最终介导 KOA 病理进展^[29]。这些发现为靶向滑膜病变的 KOA 治疗策略提供了重要理论依据。本研究采用木瓜蛋白酶诱导的 KOA 动物模型虽能模拟人类疾病的滑膜炎与软骨退变特征,但仍存在种属差异。动物模型通过化学诱导快速引发炎症反应,而人类 KOA 是年龄、力学负荷、代谢紊乱等多因素长期作用的结果^[30]。且造模药物浓度较低、时间较短,故模型兔膝关节肿胀、灼热、疼痛症状属于急性 KOA 滑膜炎,与长期、慢性 KOA 有一定差异。

根据 KOA 的临床症状,可归属于中医学“膝痹”“骨痹”“膝肿痛”范畴。中医学认为,本病多因年老体衰、肝肾渐亏所致,肝血不足则筋失濡养,肾精亏虚则骨髓不充,筋骨失于温煦濡润;或因劳逸失度,久坐久立、过度负重致气血耗伤,经络受阻;或因起居不慎,风寒湿邪乘虚而入,留滞关节,寒性收引,湿性黏滞,阻遏气机,导致脏腑功能失调,津液疏泄异常,水湿停聚为痰,气血不畅则血行瘀滞,终致痰湿内聚、气血凝塞;或因痰致瘀,痰瘀互结,郁而化热,痹阻膝关节局部经络,发为膝痹。其核心病机为湿热瘀阻,治疗原则以活血化瘀、清热利湿为主。《膝骨关节炎中西医结合诊疗指南(2023版)》^[31]将骨通贴膏作为治疗早中期各类骨关节炎疼痛的中药外用贴膏,故将其作为阳性药物对照研究。多项研究证明,骨通贴膏对 KOA 有抗炎、镇痛等治疗作用^[32-34]。黄栀理伤贴膏为湖南中医药大学第一附属医院针对性治疗骨关节炎的外用膏药,以“消炎散”加减化裁而来,由大黄、栀子、金银花、蒲公英等中药配伍而成,具有清热祛瘀、行气止痛、通经活络、清热消肿之效。现代药理研究表明:大黄素可阻断 TLR4 二聚化及内吞过程,抑制 MyD88 衔接蛋白募集,从而阻遏 NF- κ B 核转位;栀子苷可通过降低氧化应激,维持 KOA 大鼠软骨基质稳态;蒲公英皂苷可抑制 NF- κ B α 磷酸化而阻断 NF- κ B 通路从而发挥抗炎作用^[35-37]。现代药理学研究表明,活血化瘀药物能改善血流动力学状态,改善血流变及微循环,同时还具

镇痛、镇静作用^[38]。

本实验结果显示:骨通贴膏组、黄栀理伤贴膏组均能有效降低 KOA 兔血清、滑膜组织中的炎症指标。与骨通贴膏组相比,黄栀理伤贴膏组 Pelletier 评分,血清、滑膜组织中 TNF- α ,滑膜组织中 TLR4、MyD88 蛋白及 mRNA 表达水平降低,说明黄栀理伤贴膏对 KOA 兔产生作用的机制可能是通过抑制血清、滑膜组织中 TNF- α ,滑膜组织中 TLR4、MyD88 蛋白及 mRNA 水平实现的。

综上所述,通过本研究验证黄栀理伤贴膏可降低兔 KOA 血清、滑膜组织中 TNF- α 含量及滑膜组织中 TLR4、MyD88 蛋白与 mRNA 表达水平。推测其可能通过下调促炎症因子 TNF- α 水平,抑制 TLR4/MyD88 信号通路活化,从而延缓 KOA 疾病的进展。

参考文献

- [1] 刘朝晖,马剑雄,张顺,等. 膝骨关节炎的现状与治疗方法的研究进展[J]. 中华骨与关节外科杂志, 2020, 13(8): 688-693.
- [2] 王斌,邢丹,董圣杰,等. 中国膝骨关节炎流行病学和疾病负担的系统评价[J]. 中国循证医学杂志, 2018, 18(2): 134-142.
- [3] 陈庆奇,龚敬乐. 基于国内外指南的适用于我国全科医疗的膝骨关节炎诊疗流程[J]. 中国全科医学, 2016, 19(2): 125-129.
- [4] ATUKORALA I, KWONG C K, GUERMAZI A, et al. Synovitis in knee osteoarthritis: A precursor of disease?[J]. Annals of the Rheumatic Diseases, 2016, 75(2): 390-395.
- [5] 周子齐,杨永菊,马贤德,等. 电针透刺法通过 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路改善膝骨关节炎滑膜炎性反应的机制研究[J]. 针刺研究, 2023, 48(4): 353-358, 365.
- [6] 曹寅生,易强,邝高艳,等. 基于 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路探讨追风透骨胶囊减缓兔膝骨关节炎模型软骨退变的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(2): 240-248.
- [7] 许晓彤,谢心军,张雄,等. 桃红四物液联合伤速康治疗急性膝关节扭伤临床观察[J]. 广西中医药, 2020, 43(3): 29-31.
- [8] 龚志贤,卢敏,罗凌威,等. 跌打通痹膏对兔膝关节软骨细胞 MMP-1, MMP-3, MMP-13 及 COL- II 的 mRNA 表达的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2016, 24(9): 1-4, 10.
- [9] 龚志贤,罗凌威,卢敏,等. 跌打通痹膏对兔膝关节软骨 MMP-13、II 型胶原 mRNA 表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2016, 36(11): 18-21.
- [10] 龚志贤,范杰,卢敏,等. 跌打通痹膏对兔膝关节软骨退变关节软骨细胞 MMP-1、MMP-3 表达的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2016, 11(9): 1233-1237.
- [11] 卢敏,谢心军,严可,等. 伤速康巴布膏对兔膝骨性关节炎模型关节液中 SOD、NO 水平变化影响的实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2011, 19(10): 1-3, 6.

- [12] 卢敏, 谭旭仪, 谢心军, 等. 伤速康贴膏对兔膝骨性关节炎模型关节液中 IL-1、IL-6 及 TNF- α 水平的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2011, 31(7): 18-21.
- [13] 耿秋东, 张应生, 卢文亚, 等. 化湿定痛汤对木瓜蛋白酶诱导的膝骨关节炎大鼠血清 IL-1、IL-6、IL-10 的影响[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(9): 4654-4657.
- [14] LIU J W, WU Y L, WEI W, et al. Effect of warm acupuncture combined with bone marrow mesenchymal stem cells transplantation on cartilage tissue in rabbit knee osteoarthritis[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2021, 2021(1): 5523726.
- [15] 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.
- [16] 曾凡, 陈柏屹, 王康, 等. 加味独活寄生合剂对膝骨关节炎模型兔膝关节软骨组织细胞自噬及凋亡相关蛋白的影响[J]. 中医杂志, 2022, 63(8): 773-780.
- [17] ROMANINI E, DECAROLIS F, LUZI I, et al. Total knee arthroplasty in Italy: Reflections from the last fifteen years and projections for the next thirty[J]. International Orthopaedics, 2019, 43(1): 133-138.
- [18] SUN S C. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation[J]. Nature Reviews Immunology, 2017, 17(9): 545-558.
- [19] SCANZELLO C R, GOLDRING S R. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis[J]. Bone, 2012, 51(2): 249-257.
- [20] TASNEEM S, LIU B, LI B, et al. Molecular pharmacology of inflammation: Medicinal plants as anti-inflammatory agents[J]. Pharmacological Research, 2019, 139: 126-140.
- [21] SEUMEN C H T, GRIMM T M, HAUCK C R. Protein phosphatases in TLR signaling[J]. Cell Communication and Signaling, 2021, 19(1): 45.
- [22] 韩宪富, 李宁, 谢兴文, 等. TLR4/MyD88 信号通路在膝骨关节炎滑膜炎中的作用[J]. 中国骨质疏松杂志, 2022, 28(11): 1690-1694.
- [23] 陈景涛, 陈有, 李玉静, 等. 黄芪多糖抑制 Toll 样受体 4/核因子 κ B p65 通路治疗大鼠膝骨关节炎[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(31): 5002-5008.
- [24] 王永福, 林剑, 詹宏刚. CD14/TLR-4-NF- κ B 信号通路参与骨关节炎发病机制的研究[J]. 实用骨科杂志, 2013, 19(6): 528-530.
- [25] ZHANG L, XING R L, HUANG Z Q, et al. Synovial fibrosis involvement in osteoarthritis[J]. Frontiers in Medicine, 2021, 8: 684389.
- [26] REMST D F G, BLANEY DAVIDSON E N, VAN DER KRAAN P M. Unravelling osteoarthritis-related synovial fibrosis: A step closer to solving joint stiffness[J]. Rheumatology (Oxford, England), 2015, 54(11): 1954-1963.
- [27] 王景红, 夏坤, 张志千, 等. 骨关节炎相关细胞因子及生物标志物的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(10): 225-230.
- [28] 李志文. 探究右归丸加味对 KOA 模型大鼠 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路的滑膜炎的作用机制[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2024.
- [29] 王学宗, 丁道芳, 薛艳, 等. TLR4/NF- κ B 通路参与大鼠膝骨关节炎滑膜早期病变的研究[J]. 中国骨伤, 2019, 32(1): 68-71.
- [30] 吴强, 郑倩华, 蒋一璐, 等. 膝骨性关节炎动物模型选择与制备的比较[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(5): 125-130.
- [31] 中华中医药学会. 膝骨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.
- [32] 经天宇, 刘朝一, 刘海娇, 等. 聚异丁烯型骨通贴膏用于中国成人骨关节炎的有效性、安全性和经济性[J]. 中国药房, 2023, 34(12): 1478-1482.
- [33] 赵桂琴. 骨通贴膏联合塞来昔布胶囊治疗膝骨关节炎发作期临床研究[J]. 新中医, 2020, 52(20): 84-87.
- [34] 赵光辉, 杜婕莹, 袁捷, 等. 骨通贴膏对大鼠急性炎症的抗炎作用研究[J]. 中国药师, 2018, 21(3): 393-397.
- [35] 权伍荣, 夏炎, 管晓辉, 等. 蒲公英皂苷体外抗炎作用及对 NF- κ B 信号通路的调控[J]. 延边大学农学学报, 2019, 41(2): 41-48.
- [36] 胡溪, 冯立, 高智, 等. 大黄素调节 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路对慢性肾功能衰竭大鼠肠道菌群结构的影响[J/OL]. 中国医院药学杂志, 2024: 1-9[2024-12-02]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/42.1204.R.20241129.1751.006.html>.
- [37] 张健, 颜运涛, 王响, 等. 栀子苷调节 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路缓解膝骨关节炎大鼠的炎症反应[J]. 中药药理与临床, 2025, 41(5): 22-27.
- [38] 高樱, 杨龙飞, 翟阳, 等. 具有活血化瘀功效的中药药理作用及机制研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(11): 5053-5056.

(本文编辑 田梦妍)