

本文引用: 邱礼国, 许晓彤, 叶子丰, 邝高艳, 李纳平, 文志, 刘鑫, 卢敏. 基于滑膜细胞焦亡探讨加味独活寄生合剂治疗膝骨关节炎的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2026, 46(2): 268-276.

基于滑膜细胞焦亡探讨加味独活寄生合剂 治疗膝骨关节炎的作用机制

邱礼国^{1,2}, 许晓彤¹, 叶子丰^{1,2}, 邝高艳¹, 李纳平¹, 文志³, 刘鑫^{1*}, 卢敏^{1*}

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007; 2. 湖南中医药大学研究生院, 湖南长沙 410208;

3. 湖南医药学院总院, 湖南怀化 418099

【摘要】目的 基于核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(NLRP3)/胱天蛋白酶-1(Caspase-1)/消皮素D(GSDMD)信号通路探讨加味独活寄生合剂干预膝骨关节炎(KOA)的作用机制。**方法** 将50只雄性SPF级小鼠适应性喂养后, 随机分为空白组(10只)、造模组(40只), 造模组小鼠采用半月板失稳术建立KOA模型。将造模组小鼠随机分为模型组(等体积0.9%氯化钠注射液)、阳性药物组[美洛昔康片混悬液0.975 mg/(kg·d)]、加味独活寄生合剂中剂量组(JDJM-M组, 16.25 mL/kg)和加味独活寄生合剂高剂量组(JDJM-H组, 32.50 mL/kg), 于术后一周灌胃给药, 连续干预8周。观察各组小鼠一般情况; 观察小鼠对冷刺激的耐受性; 免疫组化检测滑膜组织中白细胞介素(IL)-6、IL-18的表达水平; HE染色观察滑膜形态结构并进行滑膜炎评分; ELISA检测血清IL-6、IL-18含量; RT-PCR检测滑膜组织中Caspase-1、NLRP3、GSDMD mRNA表达水平; Western blot检测滑膜组织中Caspase-1、NLRP3、GSDMD蛋白表达水平。**结果** 与空白组相比, 模型组小鼠对外界刺激反应相对迟缓, 膝关节滑膜出现增生肥厚, 结构破坏, 可见炎症细胞广泛浸润; 术后第7天, 对冷刺激的耐受性降低($P<0.05$)。与模型组相比, 阳性药物组、JDJM-H组小鼠滑膜组织内衬层细胞层数减少, 细胞排列较为规整, 可见部分血管生成; 术后第56天对冷刺激的耐受性升高($P<0.05$), 滑膜炎评分及IL-6、IL-18含量均降低($P<0.05$), Caspase-1、NLRP3、GSDMD蛋白及mRNA表达水平均降低($P<0.05$)。与阳性药物组相比, JDJM-M组小鼠术后第56天对冷刺激的耐受性降低($P<0.05$), 滑膜炎评分及IL-6、IL-18含量均升高($P<0.05$), Caspase-1、GSDMD蛋白及mRNA表达水平均升高($P<0.05$), NLRP3 mRNA表达水平升高($P<0.05$); JDJM-H组Caspase-1、NLRP3蛋白表达水平均降低($P<0.05$)。与JDJM-M组相比, JDJM-H组小鼠术后第56天对冷刺激的耐受性升高($P<0.05$), 滑膜炎评分及IL-18含量降低($P<0.05$), GSDMD、Caspase-1、NLRP3蛋白及mRNA表达水平均降低($P<0.05$)。**结论** 加味独活寄生合剂可能通过NLRP3/Caspase-1/GSDMD信号通路调控滑膜细胞焦亡, 抑制滑膜炎, 从而起到缓解KOA症状的作用。

【关键词】 膝骨关节炎; 加味独活寄生合剂; 细胞焦亡; 滑膜炎; 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3; 胱天蛋白酶-1; 消皮素D

〔中图分类号〕R274

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2026.02.007

Mechanism of action of Jiawei Duhuo Jisheng Mixture in treating knee osteoarthritis based on synovial cell pyroptosis

QIU Ligu^{1,2}, XU Xiaotong¹, YE Zifeng^{1,2}, KUANG Gaoyan¹, LI Naping¹, WEN Zhi³,
LIU Xin^{1*}, LU Min^{1*}

〔收稿日期〕2025-11-05

〔基金项目〕国家自然科学基金项目(82405445, 82274543); 湖南省教育厅课题(23C0154); 湖南省自然科学基金项目(2024JJ6353, 2024JJ6360); 长沙市自然科学基金项目(kq2403099); 湖南省中医药管理局中医药类科研基金项目(B2024062, B2024250); 湖南省卫生健康科研课题重点课题(20257930); 湖南中医药大学校院联合项目(2023XYLH009, 2023XYLH001, CX2024074, 2022XYLH006); 湖南省卫生健康委员会科研项目(D202319019171)。

〔通信作者〕* 卢敏, 男, 硕士, 教授, 博士研究生导师, E-mail: lumin6563@163.com; 刘鑫, 男, 硕士, 副主任医师, 硕士研究生导师, E-mail: 477279453@qq.com。

1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 2. Graduate School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Hunan University of Medicine General Hospital, Huaihua, Hunan 418099, China.

[Abstract] Objective To investigate the mechanism of action of Jiawei Duhuo Jisheng Mixture (JWDHJSM) in intervening in knee osteoarthritis (KOA) based on the NOD-like receptor family pyrin domain containing protein 3 (NLRP3) /cysteine-dependent aspartate-specific protease-1 (Caspase-1) /gasdermin D (GSDMD) signaling pathway. **Methods** After adaptive feeding, 50 male SPF-grade mice were randomly divided into a blank group ($n=10$) and a modeling group ($n=40$). KOA models were established in mice in the modeling group using meniscal destabilization surgery. The modeling group was then randomized into a model group (equal volume of normal saline), a positive drug group [meloxicam tablet suspension 0.975 mg/(kg·d)], a medium-dose JWDHJSM group (JDJM-M group, 16.25 mL/kg), and a high-dose JWDHJSM group (JDJM-H group, 32.50 mL/kg). Intra-gastric administration was initiated one week after surgery, with continuous intervention for 8 weeks. The general conditions of mice in each group were observed; their tolerance to cold stimulation was assessed; expression levels of interleukin (IL)-6 and IL-18 in synovial tissues were measured by immunohistochemistry; synovial morphology was observed by HE staining and synovitis scores were assigned; serum IL-6 and IL-18 levels were measured by ELISA; mRNA expression levels of Caspase-1, NLRP3, and GSDMD in synovial tissues were determined by RT-PCR; and protein expression levels of Caspase-1, NLRP3, and GSDMD were determined by Western blot. **Results** Compared with the blank group, mice in the model group exhibited relatively sluggish responses to external stimuli, with synovial hyperplasia and thickening in the knee joint, structural damage, and widespread infiltration of inflammatory cells; their tolerance to cold stimulation decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, the positive drug group and the JDJM-H group exhibited reduced layers of synovial lining cells, more regular cell arrangement, and partial vascular generation; increased tolerance to cold stimulation on day 56 ($P<0.05$), lower synovitis scores and reduced levels of IL-6 and IL-18 ($P<0.05$), and decreased protein and mRNA expression levels of Caspase-1, NLRP3, and GSDMD ($P<0.05$). Compared with the positive drug group, the JDJM-M group showed decreased tolerance to cold stimulation on day 56 ($P<0.05$), increased synovitis scores and elevated levels of IL-6 and IL-18 ($P<0.05$), increased protein and mRNA expression of Caspase-1 and GSDMD ($P<0.05$), and increased NLRP3 mRNA level ($P<0.05$). The JDJM-H group showed lower protein levels of Caspase-1 and NLRP3 ($P<0.05$). Compared with the JDJM-M group, the JDJM-H group displayed increased tolerance to cold stimulation on day 56 ($P<0.05$), decreased synovitis score and IL-18 level ($P<0.05$), and reduced protein and mRNA levels of GSDMD, Caspase-1, and NLRP3 ($P<0.05$). **Conclusion** JWDHJSM may alleviate KOA symptoms by regulating synovial cell pyroptosis through the NLRP3/Caspase-1/GSDMD signaling pathway, thereby inhibiting synovial inflammation.

[Keywords] knee osteoarthritis; Jiawei Duhuo Jisheng Mixture; pyroptosis; synovitis; NOD-like receptor family pyrin domain containing protein 3; cysteine-dependent aspartate-specific protease1; gasdermin D

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种常见的慢性筋骨疾病。该疾病严重影响患者的生活,并带来严重的社会负担^[1]。研究表明,骨关节炎是临床上致残率最高的疾病^[2]。在临床上,西医治疗多以降低炎症反应、缓解疼痛为主,包括口服非甾体抗炎药(如美洛昔康、艾瑞昔布等)、关节营养药或人工膝关节置换术、膝关节注射药物等^[3]。西医治疗具有长期治疗效果欠佳、经济负担较高、不良反应较多等缺点^[4]。因此,治疗与预防 KOA 成为重大的公共卫生学问题。中药复方对于 KOA 等慢性筋骨疾病的预防与治疗具有优势,中医药对于慢性筋骨疾病的治

疗效果在临床上受到广泛认可^[5-6]。多数研究验证了中医药在治疗及预防 KOA 中的确切疗效^[7-8]。

KOA 曾被视为单纯的关节软骨“磨损”性疾病^[9],但随着对 KOA 疾病认识的加深,现代医学认为它是一种涉及整个关节结构的低度炎症性疾病^[10]。其中,滑膜炎是驱动 KOA 疼痛和疾病进展的关键环节,近年来,核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3)/胱天蛋白酶-1 (cysteine-dependent aspartate-specific protease1, Caspase-1)/消皮素 D (gasdermin D, GSDMD) 信号通路被证实是连接关节内

危险信号与滑膜炎症的核心分子桥梁^[11]。在 KOA 滑膜组织中,NLRP3 炎症小体及其下游效应分子显著上调。活化的 Caspase-1 通过产生白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 和 IL-18,直接作用于滑膜细胞自身及其周围的免疫细胞,促进肿瘤坏死因子- α 、IL-6、前列腺素 E2 等更多炎症介质的分泌,形成一个自我放大的炎症级联网络^[12]。这直接导致了滑膜组织的血管增生、免疫细胞浸润及滑膜肥厚,即临床所见的滑膜炎。

中医学将 KOA 归属于“膝痹”“骨痹”范畴,卢敏教授结合多年临床经验提出,虚、瘀、毒是膝痹的重要病机之一。该病病机由内外多种病因共同作用所致,内因为气血不充、肝肾亏虚,外因为风、寒、湿、热等邪毒侵袭^[13]。瘀血的形成原因复杂多样,既可因正气不足而推动无力,也可因外邪阻滞经络所致,最终导致瘀阻^[14]。本病以肝肾不足为根本,痰湿和瘀血阻滞为症状,虚、瘀、毒三者相互交织,共同影响 KOA 的发生和发展^[15]。加味独活寄生合剂是在中药名方独活寄生汤的基础上,结合湖南地区特殊致病因素,加入黄芩、木瓜、威灵仙、制天南星等药物配伍而成^[16]。此制剂具有补益肝肾、祛风除痹的功效,在治疗 KOA 方面取得了良好的临床效果^[17]。因此,本研究拟探究加味独活寄生合剂通过调控滑膜细胞焦亡干预 KOA 的作用机制,为中医药干预 KOA 提供一定的理论依据。

1 资料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 50 只,10 周龄,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司。分笼饲养于湖南中医药大学第一附属医院动物中心实验室,饲养温度 20~25 $^{\circ}\text{C}$,湿度 50%~70%,明暗光照 12 h/12 h,每日喂饲料和水两次。动物合格证号:SCXK (湘)2022-0003,实验经湖南中医药大学第一附属医院动物实验伦理委员会批准,实验伦理编号:伦审科第(202403097)号。

1.2 实验药物

加味独活寄生合剂(湖南中医药大学第一附属医院制剂中心,湘药制备字 Z20210394000,批号:20240328,规格:250 mL/瓶);美洛昔康片(上海勃林格殷格翰有限公司,国药准字 H20020217,批号:C78434,规格:7.5 mg/片)。

1.3 主要试剂

HE 染色试剂盒、细胞裂解液、蛋白 Marker、快速转模液、PVDF 膜、蛋白上样缓冲液、Caspase-1 抗体、NLRP3 抗体、GSDMD 抗体试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为:G1004、G2004、G2083、G2002、WGPVDF45、G2006、GB113091、GB113091、GB115276);4%多聚甲醛、无水乙醇(北京兰杰柯科技有限公司,批号:24005654、BL539A);IL-6、IL-18 ELISA 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号:ML801rb、ML094963);IL-6、IL-18 抗体、牛血清白蛋白(BSA)、Western blot 通用性抗体稀释液(武汉博士德生物工程有限公司,批号:BA0131、RP1016、gb11247、AR0146);0.9%氯化钠注射液(湖南科伦制药有限公司,批号:H0109);BCA 蛋白定量试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号:P1110)。

1.4 主要试验仪器

酶标仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司,型号:RT-6100);低温研磨仪、涡旋混匀仪、磁力搅拌器、垂直电泳仪(武汉赛维尔生物科技有限公司,型号:KZ-III-FP、SMV-4500B、MS-150、SVE-2);台式高速冷冻离心机(大龙兴创实验仪器有限公司,型号:D3024R);电子精密天平(上海恒平科学仪器有限公司,型号:JA41002);电热恒温培养箱(天津泰斯特仪器有限公司,型号:DH36001B);石蜡切片机(德国徕卡公司,型号:RM2235);荧光定量 PCR 仪(韩国 Bioneer 公司,型号:Exicycler 96)。

1.5 KOA 模型建立

参照半月板失稳(destabilization of the medial meniscus, DMM)术建立小鼠 KOA 模型^[18]。采用呼吸麻醉法,2%异氟烷麻醉小鼠,聚维酮碘消毒小鼠手术部位。使用无菌刀片,取右膝关节内侧髌韧带与内侧副韧带中间开 1 cm 切口,显微镜下运用镊子牵开皮肤及脂肪组织,暴露膝关节内部,用显微手术剪贴着胫骨切断内侧半月板胫骨韧带(完成此步骤即视为造模成功^[18]),全层缝合小鼠手术切口。造模后,予聚维酮碘消毒并包扎伤口以预防感染,术后连续 3 d 肌内注射青霉素,每次 40 000 U。每日强迫小鼠活动 30 min,其余时间令其自由活动。

1.6 实验分组及给药

将 50 只小鼠按随机数字表法分为空白组(10 只)和造模组(40 只)。造模组小鼠行 DMM 术后按随机数字表法分为 4 组:模型组、阳性药物组、加味独

活寄生合剂中剂量组(JDJM-M组)、加味独活寄生合剂高剂量组(JDJM-H组),每组10只。按照成人与动物之间的药物换算公式计算^[19],加味独活寄生合剂参考人体剂量(125 mL/d),并按人(70 kg)和小鼠(20 g)体表面积折算等效剂量,小鼠灌胃给药量=成人临床给药剂量(g/kg)×12,换算得出小鼠剂量为16.25 mL/kg,于术后一周灌胃给药,连续干预8周。

空白组和模型组给予等体积0.9%氯化钠注射液;阳性药物组予以等体积美洛昔康片混悬液0.975 mg/(kg·d)灌胃;JDJM-M组予以加味独活寄生合剂16.25 mL/kg灌胃;JDJM-H组予以加味独活寄生合剂32.50 mL/kg灌胃。

1.7 实验取材

于术后8周眼球取血后脱颈处死,每组取3只小鼠的完整膝关节,剩余小鼠取滑膜组织。小鼠膝关节样本用10%多聚甲醛固定24 h后,20%EDTA脱钙1个月,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,矢状位切成4.0 μm切片备用。将滑膜组织置于5 mL离心管中并迅速置入液氮罐中,再转移至-80℃冰箱储存备用,用于后续实验检测。

1.8 指标观察

1.8.1 观察小鼠一般情况 观察各组小鼠毛发、饮食、精神状态、行走步态等情况。

1.8.2 观察小鼠对冷刺激的耐受性 确保测试环境无干扰噪声和震动,测试房间保持安静,光线柔和一致。室温维持在(22±2)℃,湿度50%~60%。实验固定在每日上午(9:00~12:00)进行,以减少昼夜节律影响。实验前3~7 d,每日将小鼠移至测试房间,让其适应环境至少1 h。测试前1 d,将小鼠单独放入清洁后的观察箱(室温)中适应5~10 min,以减少新奇环境带来的应激反应。严格遵循60 s截断时间,防止小鼠冻伤或产生严重应激反应。冷板痛觉测试仪的温度设定为(0±3)℃,小鼠被放置在安静环境下的玻璃围栏内,从接触冷板到小鼠首次出现如快速足部收缩、舔足或跳跃等阳性反应的时间被记录为冷刺激潜伏期。每隔10 min测量一次,共3次,取平均值,反应时间越长代表对冷刺激耐受性越强^[20]。

1.8.3 免疫组化检测滑膜组织IL-6、IL-18的表达

滑膜石蜡切片经二甲苯脱蜡,梯度乙醇复水后,用3% H₂O₂孵育15 min灭活组织内源性过氧化物酶。用蛋白酶K消化10 min进行抗原修复,再用5% BSA对非特异性位点进行封闭。一抗(均为1:100)4℃

孵育过夜后,再用二抗(1:1 000)37℃孵育30 min, PBS洗涤后DAB显色,切片经苏木素复染。常规脱水,透明,中性树胶封片。采用Image-Pro Plus 6.0软件分析计算IL-6、IL-18表达水平。

1.8.4 HE染色观察滑膜形态结构 标本用苏木精染色40 min,伊红染色40 s,封片后显微镜下观察滑膜组织细胞形态,并进行滑膜炎症评分。具体评分准则为^[21]:(1)无明显滑膜细胞增生为0分;单层少量增生、细胞肿胀为1分;2层以上密集肿胀增生为2分;3层以上密集肿胀增生为3分;(2)无明显炎症细胞浸润为0分;有20个以下炎症细胞浸润为1分;20~50个炎症细胞浸润为2分;50个以上炎症细胞浸润为3分;(3)无显著纤维组织增生为0分;仅有少量稀疏增生为1分;呈中度密集增生状态为2分;若为大量增生则评3分。总分9分,分值越高提示滑膜炎症反应越明显。

1.8.5 ELISA检测血清IL-6、IL-18含量 将血液标本离心后,取上清液备用。按1:24的比例将浓缩洗涤液与双蒸水混合,配制成稀释洗涤液。在酶标板上分别设置标准品孔、待测样品孔和空白孔,每孔中加入100 μL标准品或血清样品。盖上封板膜,于37℃孵育60 min。孵育结束后甩去孔内液体,在吸水纸上拍干。每孔加入350 μL洗涤液,静置1 min后弃去,重复洗板3次。完成后,每孔加入100 μL酶结合物工作液,覆膜后于室温孵育30 min。随后在避光条件下向每孔中加入90 μL显色液,覆膜避光孵育15 min。最后每孔加入50 μL终止液终止反应,立即用酶标仪在450 nm波长下测定各孔的吸光度值。

1.8.6 RT-PCR检测滑膜组织中Caspase-1、NLRP3、GSDMD mRNA表达水平 用Trizol试剂盒从细胞中提取总RNA,并使用试剂盒逆转录成cDNA。使用CFX96 Touch实时PCR系统进行PCR扩增。引物序列详见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer Sequences

引物	引物序列(5'-3')	长度/bp
Caspase-1	正向:CCGCGTTGAATCCTTTTCA	99
	反向:AACCACAATTGCTGTGTGCC	
NLRP3	正向:CTGAAGCATCTGCTCTGCAACC	110
	反向:AACCAATGCGAGATCCTGACAA	
GSDMD	正向:ATGGCATGGCTTACACCACC	138
	反向:GAGCCAATTTTGTCTCCAC	
β-actin	正向:GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTAGC	127
	反向:GGCCGGACTCATCGTACTCTCTGCTT	

1.8.7 Western blot 检测滑膜组织中 Caspase-1、NLRP3、GSDMD 蛋白表达水平 应用组织裂解法提取膝关节滑膜组织蛋白后,将组织放于离心机上离心,取上清液置入新的离心管。BCA 蛋白分析试剂盒测定蛋白质浓度,应用裂解缓冲液配平。将组织样本放入电泳槽中,先以浓缩胶电泳 30 min,再将电压升至 190 V 继续电泳 90 min,随后进行转膜。将转膜后的条带按照目的分子量裁剪后加入 TBST 配制的 5%脱脂奶粉,室温下摇床封闭 2 h。参照说明书将 Caspase-1(1:1 000)、NLRP3(1:1 000)、GSDMD(1:1 000)、actin(1:5 000)加入封闭盒中孵育过夜, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。加入二抗(1:5 000)孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。用超灵敏多色荧光成像分析系统对蛋白质条带进行分析。以 actin 为内参,计算蛋白的相对表达量。

1.9 统计学分析

数据分析采用 SPSS 22.0 软件,计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。若数据符合正态分布且方差齐,采用单因素方差分析(One-way ANOVA),进一步组间两两比较使用 Tukey HSD 检验;若数据不符合正态分布,采用非参数检验(Kruskal-Wallis 检验),组间比较使用 Dunn's 检验,并进行 Bonferroni 校正。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 观察造模后小鼠的一般情况

空白组小鼠毛发色泽光亮,对外界刺激敏感,体质量增加,饮食、排便正常,膝关节皮肤色泽正常,整体呈现出活泼的特性。模型组小鼠普遍呈现精神萎靡的特征,蜷缩于角落且易嗜睡,对外界刺激反应相

对迟缓,食欲减弱,小鼠体质量较轻,易软便,行走跛行等表现。与模型组相比,阳性药物组、JDJM-M 组及 JDJM-H 组小鼠对外界刺激敏感,日常活动量大,毛发光泽、食量适当。

2.2 观察小鼠对冷刺激的耐受性

在 DMM 术前,各组小鼠对冷刺激的耐受性比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。术后第 7 天,与空白组相比,模型组小鼠对冷刺激的耐受性降低($P < 0.05$)。术后第 56 天,与模型组相比,阳性药物组、JDJM-M 组和 JDJM-H 组小鼠对冷刺激的耐受性升高($P < 0.05$);与阳性药物组相比,JDJM-M 组对冷刺激的耐受性降低($P < 0.05$)。与 JDJM-M 组相比,JDJM-H 组对冷刺激的耐受性升高($P < 0.05$)。详见图 1。

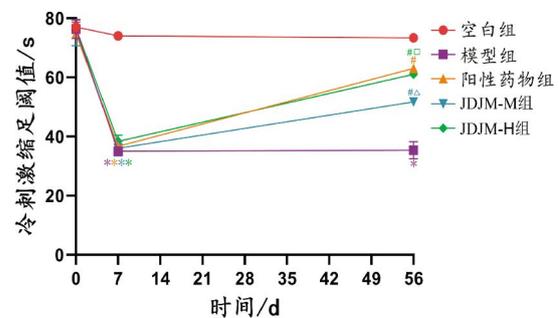


图 1 各组小鼠冷刺激缩足阈值比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig.1 Comparison of cold-stimulation paw withdrawal thresholds among different groups of mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$;与阳性药物组比较,^ $P < 0.05$;与 JDJM-M 组比较,□ $P < 0.05$ 。

2.3 免疫组化检测小鼠膝关节滑膜组织中 IL-6、IL-18 的表达水平

与空白组比较,模型组 IL-6、IL-18 阳性细胞着色率均升高($P < 0.05$);与模型组比较,阳性药物组、JDJM-M 组和 JDJM-H 组 IL-6、IL-18 阳性细胞着色

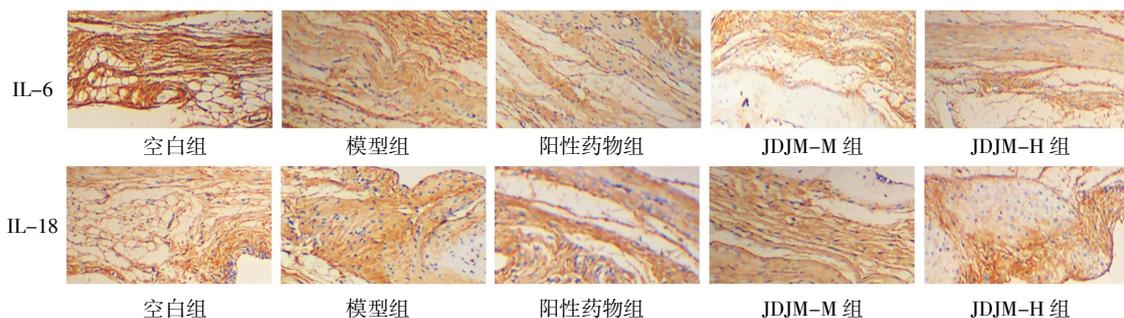


图 2 各组小鼠滑膜组织 IL-6、IL-18 免疫组化图($\times 400$,标尺:100 μm)

Fig.2 Immunohistochemical images of IL-6 and IL-18 in synovial tissues of mice from different groups ($\times 400$,scale:100 μm)

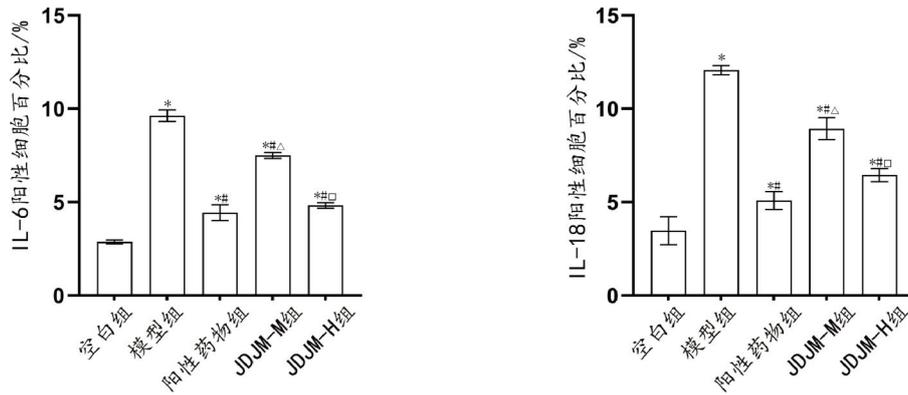


图3 各组小鼠滑膜组织 IL-6、IL-18 阳性细胞着色率比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

Fig.3 Comparison of the staining rates of IL-6 and IL-18 positive cells in synovial tissues among different groups of mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,## $P<0.05$;与阳性药物组比较,△ $P<0.05$;与 JDJM-M 组比较,□ $P<0.05$ 。

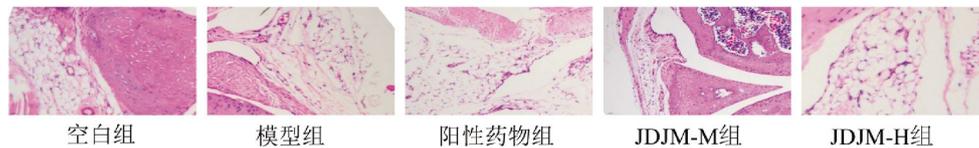


图4 各组小鼠膝关节滑膜组织 HE 染色结果($\times 200$, 标尺:100 μm)

Fig.4 HE staining results of knee joint synovial tissues in each group of mice ($\times 200$, scale bar: 100 μm)

率均降低($P<0.05$);与阳性药物组相比,JDJM-M 组 IL-6、IL-18 阳性细胞着色率均升高($P<0.05$)。与 JDJM-M 组相比,JDJM-H 组 IL-6、IL-18 阳性细胞着色率均降低($P<0.05$)。详见图 2、图 3。

2.4 HE 染色观察小鼠膝关节滑膜形态结构变化

空白组滑膜组织的结构和细胞排列有序,细胞层未见明显增生,细胞形态大小无异常,未见炎症细胞浸润。模型组滑膜组织出现大量炎症细胞浸润,组织结构出现紊乱,内衬层出现细胞排列紊乱。JDJM-M 组滑膜组织炎症细胞浸润较模型组减少,但仍可见内衬层细胞层数增厚,滑膜细胞排列不规则以及部分炎症浸润;JDJM-H 组以及阳性药物组滑膜组织炎症细胞浸润减少,滑膜组织内衬层细胞层数减少,细胞排列较为规整,可见部分血管生成。详见图 4。

与空白组相比,模型组滑膜炎评分升高($P<0.05$);与模型组相比,阳性药物组、JDJM-M 组和 JDJM-H 组炎症评分均降低($P<0.05$);与阳性药物组相比,JDJM-M 组炎症评分升高($P<0.05$);与 JDJM-M 组相比,JDJM-H 组炎症评分降低($P<0.05$)。详见图 5。

2.5 ELISA 检测小鼠血清 IL-6、IL-18 含量变化

与空白组相比,模型组 IL-6、IL-18 含量均升

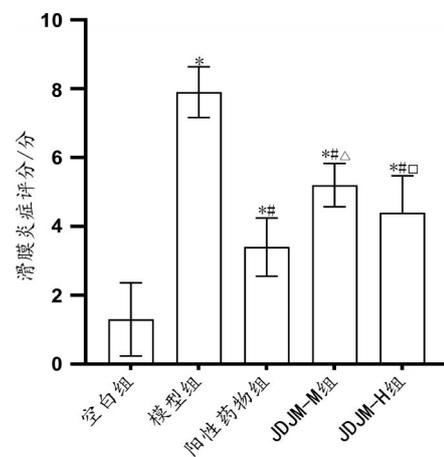


图5 各组小鼠膝关节滑膜炎评分比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

Fig.5 Comparison of knee joint synovial scores among different groups of mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,## $P<0.05$;与阳性药物组比较,△ $P<0.05$;与 JDJM-M 组比较,□ $P<0.05$ 。

高($P<0.05$);与模型组相比,阳性药物组、JDJM-M 组和 JDJM-H 组 IL-6、IL-18 含量均降低($P<0.05$);与阳性药物组相比,JDJM-M 组 IL-6、IL-18 含量均升高($P<0.05$);与 JDJM-M 组相比,JDJM-H 组 IL-18 含量降低($P<0.05$)。详见图 6。

2.6 Western blot 检测滑膜组织 Caspase-1、NLRP3、GSDMD 蛋白表达水平

与空白组相比,模型组 Caspase-1、NLRP3、GSD-

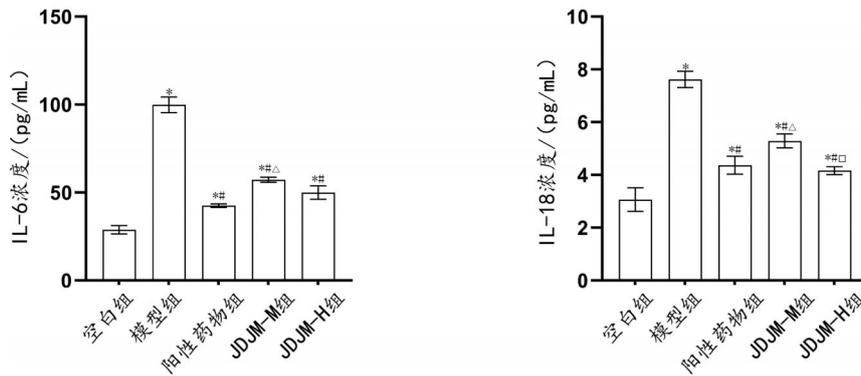


图 6 各组小鼠血清 IL-6、IL-18 含量比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Fig.6 Comparison of serum IL-6 and IL-18 levels among different groups of mice ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,** $P<0.05$;与阳性药物组比较,[△] $P<0.05$;与 JDJM-M 组比较,[□] $P<0.05$ 。

MD 蛋白表达水平均升高($P<0.05$);与模型组相比,阳性药物组、JDJM-M 组和 JDJM-H 组 Caspase-1、NLRP3、GSDMD 蛋白表达水平均降低($P<0.05$);与阳性药物组相比,JDJM-M 组 Caspase-1、GSDMD 蛋白表达水平均升高($P<0.05$),JDJM-H 组 Caspase-1、NLRP3 蛋白表达水平均降低($P<0.05$);与 JDJM-M 组相比,JDJM-H 组 GSDMD、Caspase-1、NLRP3 蛋白表达水平均降低($P<0.05$)。详见图 7、图 8。

2.7 RT-PCR 检测滑膜组织 Caspase-1、NLRP3、GSDMD mRNA 表达水平

与空白组相比,模型组 Caspase-1、NLRP3、GSDMD mRNA 表达水平均升高($P<0.05$);与模型组相比,阳性药物组、JDJM-M 组和 JDJM-H 组 Caspase-1、NLRP3、GSDMD mRNA 表达水平均降低($P<0.05$);与阳性药物组相比,JDJM-M 组 Caspase-1、NLRP3、GSDMD mRNA 表达水平均升高($P<0.05$);与 JDJM-M 组相比,JDJM-H 组 Caspase-1、GSDMD、NLRP3 mRNA 表达水平均降低($P<0.05$)。详见图 9。

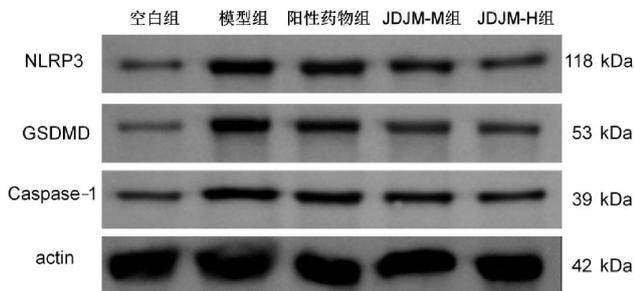


图 7 各组小鼠 Caspase-1、NLRP3、GSDMD 蛋白电泳图

Fig.7 Protein electrophoresis images of Caspase-1, NLRP3, and GSDMD in mice from different groups

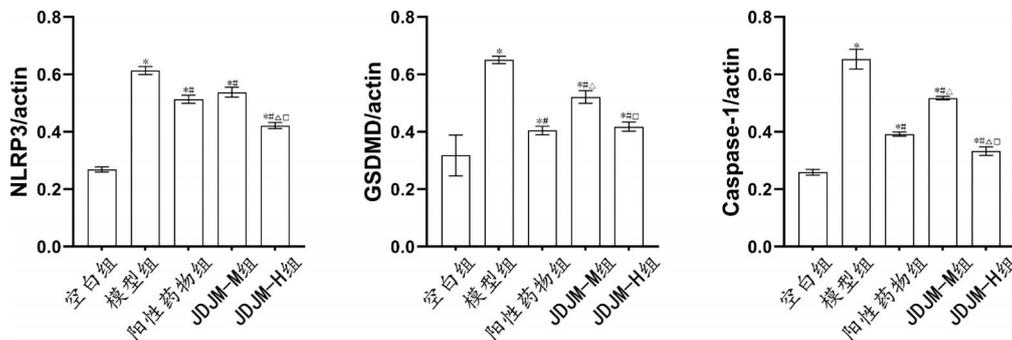


图 8 各组小鼠 Caspase-1、NLRP3、GSDMD 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig.8 Comparison of protein expression levels of Caspase-1, NLRP3, and GSDMD among different groups of mice ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,** $P<0.05$;与阳性药物组比较,[△] $P<0.05$;与 JDJM-M 组比较,[□] $P<0.05$ 。

3 讨论

近年来的多项研究指出,大部分 KOA 患者在疾病的早期和晚期均观察到低级别的滑膜炎[22-23]。滑膜细胞主要包括巨噬样滑膜细胞和成纤维样滑膜细胞。这些细胞能够分泌滑液和透明质酸等物质,起到润滑关节的作用,同时还为软骨细胞提供所需的营养[24]。

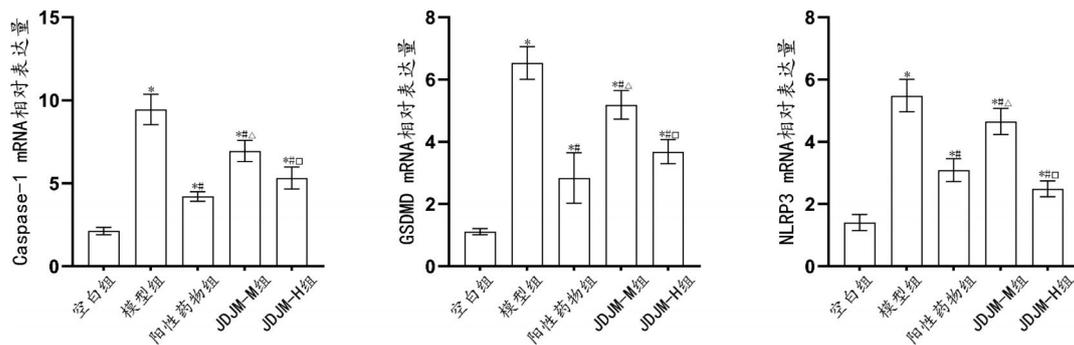


图9 加味独活寄生合剂对各组小鼠 Caspase-1、NLRP3、GSDMD mRNA 表达水平的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig.9 Effects of JWDHJSM on the mRNA expression levels of Caspase-1, NLRP3, and GSDMD in mice from different groups ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与阳性药物组比较,△ $P<0.05$;与 JDJM-M 组比较,□ $P<0.05$ 。

本研究通过观察发现,模型组小鼠符合 KOA 的症状表现。冷刺激潜伏期提示,经过 DMM 术后,小鼠对于冷刺激的耐受性明显降低,表明手术造模成功。加味独活寄生合剂干预后,小鼠对于冷刺激的耐受性有所改善,说明加味独活寄生合剂可以改善 KOA 症状。实验小鼠的 HE 染色及滑膜炎评分结果表明,加味独活寄生合剂可以降低膝关节滑膜炎反应,改善 KOA 模型小鼠膝关节滑膜病理变化。

在参与 KOA 炎症微环境的形成中,促炎性细胞因子 IL-18 与 IL-6 对于 KOA 的发生发展有着核心调控作用^[25]。ELISA 检测结果显示,与空白组比较,模型组小鼠血清中的 IL-18 和 IL-6 含量升高,说明这两种细胞因子可能促进了炎症反应。免疫组化结果显示,造模后小鼠滑膜组织炎症细胞因子 IL-6 和 IL-18 的表达增加,加味独活寄生合剂干预后,IL-6、IL-18 下降,提示加味独活寄生合剂可以下调两种炎症因子的表达,这可能是其发挥治疗作用的机制之一。

细胞焦亡是一种依赖于炎性体的程序性细胞死亡过程。该过程伴随着炎症因子的产生和释放。细胞焦亡主要通过炎症小体激活 Caspase-1,导致 GSDMD 被切割并发生多聚化,最终引起细胞死亡^[26]。依赖于 Caspase-1 的细胞焦亡属于经典途径。这一通路通常由外源性危险信号刺激引发,表现为炎症小体的应答反应^[27]。炎症小体 NLRP3 的激活是发生细胞焦亡的关键环节^[27]。本研究检测了焦亡通路关键分子 Caspase-1、NLRP3 和 GSDMD 的表达,结果表明,模型组中这些分子的 mRNA 和蛋白表达水平均升高,而加味独活寄生合剂干预后这些分子的 mRNA 和蛋白表达水平均下调,提示加味独活寄生合剂

可能通过调控该通路影响滑膜细胞的炎症与焦亡过程。此外,疼痛行为的改善与焦亡通路下调在本研究中同时出现,提示二者之间可能存在相关性,但本次实验结果尚不足以明确其因果关系。

本次研究发现,部分指标中 JDJM-M 组的效果与阳性药或 JDJM-H 组不一致,例如在某些分子表达上 JDJM-M 组并未表现出优于或等于 JDJM-H 组的效应。这可能反映了中药复方多成分、多靶点的作用特点,其剂量-效应关系并非简单线性。不同剂量可能通过调控不同信号节点或细胞群,产生复杂的生物学响应^[28]。本课题组提出以下假设以供后续验证:中药复方常具有双向调节作用。某一通路被抑制后,可能触发代偿性或负反馈性机制。中剂量干预可能处于“临界点”,未能完全抑制主要炎症通路,反而可能轻微激活了其他替代通路或反馈环,导致部分指标出现“波动”。高剂量则可能全面覆盖多个靶点从而抑制整个炎症网络。

综上所述,加味独活寄生合剂可能通过 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路调控滑膜细胞焦亡,降低 IL-6、IL-18 的表达,从而抑制滑膜炎,改善关节疼痛及活动功能症状,起到缓解 KOA 的作用。本研究通过 DMM 术建立 KOA 小鼠模型,研究加味独活寄生合剂干预 KOA 的作用机制,进一步阐明了加味独活寄生合剂治疗 KOA 的潜力,为后续开展深入的因果机制研究提供了明确的方向与实验依据。但仍存在一定的局限性,如本研究检测的 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 表达变化是焦亡过程的上游事件与相关标志物,而非焦亡发生的直接证据,缺乏直接的焦亡证据和因果验证;中、高剂量效应机制也有待进一步阐明。后续研究将结合体外细胞模型、通

路特异性调控工具等,深入揭示其作用细节与转化潜力。

参考文献

- [1] 中华中医药学会. 膝关节炎中西医结合诊疗指南(2023年版)[J]. 中医正骨, 2023, 35(6): 1-10.
- [2] CAO X F, ZHU R X, LIU D, et al. Epidemiological trends in burden of osteoarthritis in China: An analysis from 1990 to 2021 with forecasts for 2022-2050[J]. *Frontiers in Public Health*, 2025, 13: 1612596.
- [3] 林青, 李小云, 黄峙, 等. 膝关节炎“未病”至“已病”的生物学基础研究进展与研究策略[J]. 中华中医药杂志, 2025, 40(3): 1283-1288.
- [4] LU J Y, WEN T S, HUANG H Y, et al. Intraarticular injection of the stromal vascular fraction for the treatment of knee osteoarthritis a prospective randomized controlled clinical trial[J]. *Scientific Reports*, 2025, 15: 28109.
- [5] WANG K, WU Z Y, SHEN X N, et al. Clinical efficacy of traditional Chinese medicine compound on patients with knee osteoarthritis and its impact on inflammatory cytokine levels[J]. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 2025, 41(7): 2036-2040.
- [6] 张茜玥, 李昀姝, 赵杰瑞, 等. 中医药联合富血小板血浆治疗膝骨关节炎进展[J]. 中药材, 2024, 47(1): 261-267.
- [7] 叶子丰, 戎宽, 匡建军, 等. 补肝健膝方对膝骨关节炎模型兔COMP、CTX-II及炎性指标的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(12): 2157-2162.
- [8] ZHENG Z L, WANG X H, MI B H, et al. Tenghuang Jiangu tablet in knee osteoarthritis therapy: A prospective multicenter registry study in China[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2025, 345: 119525.
- [9] FELSON D T, LAWRENCE R C, DIEPPE P A, et al. Osteoarthritis: New insights. part I: The disease and its risk factors[J]. *Annals of Internal Medicine*, 2000, 133(8): 635-646.
- [10] TANG S A, ZHANG C Q, OO W M, et al. Osteoarthritis[J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2025, 11: 10.
- [11] WANG Y J, CHEN Y, YANG Y, et al. Effect of acupotomy modulation of NLRP3/caspase-1/GSDMD pathway on chondrocyte pyroptosis in knee osteoarthritis[J]. *Journal of Pain Research*, 2025, 18: 4935-4945.
- [12] LIU J, HUANG X R, ZHOU J, et al. Pulsed electromagnetic field alleviates synovitis and inhibits the NLRP3/Caspase-1/GSDMD signaling pathway in osteoarthritis rats[J]. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 2022, 41(1): 101-107.
- [13] 谭旭仪, 邝高艳, 卢敏. 膝骨关节炎的“虚、瘀、毒”病机特点探析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(24): 201-206.
- [14] 邝高艳, 谭旭仪, 卢敏, 等. 基于虚、瘀、毒理论构建慢性筋骨疾病防治体系[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(2): 196-199.
- [15] 欧梁, 卢敏, 张永辉, 等. 基于“虚、瘀、毒”病机理论的膝痹病证结合模型的建立及评价[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 590-597.
- [16] 邝高艳, 严可, 卢敏, 等. 加味独活寄生合剂及含药血清主要成分超高效液相色谱-四级杆-时间飞行质谱仪分析[J]. 中医药导报, 2020, 26(15): 70-74.
- [17] 邝高艳, 严可, 柴爽, 等. 加味独活寄生合剂治疗膝骨关节炎临床疗效及对关节液中IL-1, IL-6, TNF- α 及NO的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(1): 174-178.
- [18] GLASSON S S, BLANCHET T J, MORRIS E A. The surgical destabilization of the medial Meniscus (DMM) model of osteoarthritis in the 129/SvEv mouse[J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2007, 15(9): 1061-1069.
- [19] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [20] PREECE S J, BROOKES N, WILLIAMS A E, et al. A new integrated behavioural intervention for knee osteoarthritis: Development and pilot study[J]. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 2021, 22(1): 526.
- [21] JIE L S, ZHANG L, FU H Y, et al. Xibining inhibition of the PI3K-AKT pathway reduces M1 macrophage polarization to ameliorate KOA synovial inflammation and nociceptive sensitization[J]. *Phytomedicine*, 2025, 136: 156281.
- [22] 韩明睿, 刘倩倩, 孙洋. 骨关节炎发病机制及药物调控新进展[J]. 中国药理学通报, 2022, 38(6): 807-812.
- [23] 杨永菊, 张师饶, 张江, 等. 基于滑膜巨噬细胞焦亡探讨针刺治疗膝骨关节炎“筋骨并重”的科学内涵[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(3): 209-211.
- [24] HUANG H R, ZHENG S M, WU J N, et al. Opsonization in vivo of macrophages engulfing carrier-free bilirubin/JPH203 nanoparticles to suppress inflammation for osteoarthritis therapy[J]. *Advanced Science*, 2024, 11(22): 2400713.
- [25] LIU Y H, HAO R H, LV J, et al. Targeted knockdown of PGAM5 in synovial macrophages efficiently alleviates osteoarthritis[J]. *Bone Research*, 2024, 12: 15.
- [26] LIU W X, LIU A Q, LI X J, et al. Dual-engineered cartilage-targeting extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells enhance osteoarthritis treatment via miR-223/NLRP3/pyroptosis axis: Toward a precision therapy[J]. *Bioactive Materials*, 2023, 30: 169-183.
- [27] XUE Y M, LI F C, LI R, et al. Chlorogenic acid alleviates IPEC-J2 pyroptosis induced by deoxynivalenol by inhibiting activation of the NF- κ B/NLRP3/caspase-1 pathway[J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2024, 15(1): 159.
- [28] WANG D, CALABRESE E J, LIAN B, et al. Hormesis as a mechanistic approach to understanding herbal treatments in traditional Chinese medicine[J]. *Pharmacol Ther*. 2018, 184: 42-50.