

芍药甘草汤调控 NLRP3 炎症小体介导的细胞焦亡改善膝骨关节炎大鼠软骨损伤的机制研究

孙若兰

(上海中医药大学附属曙光医院骨伤科 上海, 201203)

摘要: 膝骨关节炎 (Knee Osteoarthritis, KOA) 是一种以软骨退行性损伤为核心特征的慢性退行性骨关节疾病, 其发病机制复杂, 目前临床治疗缺乏特效方案, 难以有效延缓疾病进展。NLRP3炎症小体介导的细胞焦亡作为一种新型程序性细胞死亡方式, 已被证实参与KOA软骨损伤的病理过程, 通过调控炎症反应和软骨细胞死亡, 加速软骨退行性变。芍药甘草汤 (Shaoyao Gancao Decoction, SGD) 是中医经典方剂, 具有养血柔肝、缓急止痛、抗炎护膜的功效, 在骨关节疼痛及炎症相关疾病中应用广泛, 但其对KOA软骨损伤的改善作用及是否通过调控NLRP3炎症小体介导的细胞焦亡实现, 尚未明确。本研究以大鼠KOA模型为研究对象, 给予不同剂量芍药甘草汤干预, 通过组织病理学、分子生物学等技术, 观察芍药甘草汤对KOA大鼠软骨组织形态、NLRP3炎症小体相关蛋白及细胞焦亡相关指标的影响, 探讨其改善KOA大鼠软骨损伤的分子机制, 为芍药甘草汤临床治疗KOA提供实验依据和理论支撑。

关键词: 芍药甘草汤; 膝骨关节炎; NLRP3炎症小体; 细胞焦亡; 软骨损伤; 机制研究

中图分类号: R285.5

文献标识码: B

文章编号: 3106-2040 (2025) 03-0014-11

DOI: 10.62022/CPH.issn3106-2040.2025.03.002

Mechanism of Shaoyao Gancao Decoction in improving cartilage injury of rats with knee osteoarthritis by regulating NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis

Sun Ruolan

(Department of Orthopedics and Traumatology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203)

Abstract: Knee Osteoarthritis (KOA) is a chronic degenerative osteoarthropathy characterized by degenerative cartilage injury, with a complex pathogenesis. At present, there is a lack of specific clinical treatment regimens, making it difficult to effectively delay disease progression. As a novel form of programmed cell death, NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis has been proven to be involved in the pathological process of KOA cartilage injury, which accelerates cartilage degeneration by regulating inflammatory responses and chondrocyte death. Shaoyao Gancao Decoction (SGD), a classic prescription of traditional Chinese medicine, has the effects of nourishing blood and soothing the liver, relieving spasm and pain, and anti-inflammation and membrane protection, and is widely used in osteoarticular pain and inflammation-related diseases. However, its improvement effect on KOA cartilage injury and whether it is achieved by regulating NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis remain unclear. In this study, rat models of KOA were used as research objects and intervened with different doses of SGD. Through histopathological, molecular biological and other techniques, the effects of SGD on cartilage tissue morphology, NLRP3 inflammasome-related proteins and pyroptosis-related indicators in KOA rats were observed, and the molecular mechanism of SGD in improving cartilage injury of KOA rats was explored, so as to provide experimental evidence and theoretical support for the clinical treatment of KOA with SGD.

Keywords: Shaoyao Gancao decoction; Knee osteoarthritis; NLRP3 inflammasome; Pyroptosis; Cartilage injury; Mechanism

1 引言

1.1 研究背景与意义

1.1.1 膝骨关节炎的流行病学现状与危害

膝骨关节炎 (Knee Osteoarthritis, KOA) 作为全球范围内发病率最高的慢性骨关节疾病之一, 严重困扰着不同年龄段人群的身心健康, 其发病特征呈现出鲜明的年龄依赖性, 同

时受多种内外源性因素的协同影响, 病程迁延反复, 难以彻底根治。其中, 年龄增长是KOA最核心的危险因素, 随着年龄的不断增加, 人体膝关节软骨细胞的增殖能力逐渐下降、代谢功能显著减退, 软骨基质合成与降解失衡, 进而导致软骨结构破坏, 诱发疾病发生; 肥胖作为重要的可控危险因素, 会显著增加膝关节的负重压力, 长期超负荷压迫会加速软骨磨损, 同时肥胖引发的代谢紊乱的炎症因子释放, 还会进一

作者简介: 孙若兰, 博士, 主治医师, 研究方向为中医药防治退行性骨关节病。

步加重关节内炎症反应; 关节创伤(如半月板损伤、韧带撕裂、骨折等)会直接破坏膝关节的解剖结构和软骨完整性, 即使创伤愈合后, 也可能因软骨修复不全、关节力学结构异常, 增加KOA的发病风险; 遗传因素则通过影响软骨基质成分、软骨细胞功能等, 决定个体对KOA的易感性, 有家族患病史的人群发病概率显著高于普通人群; 此外, 长期反复的关节劳损、不良姿势(如长期久坐、久站、不正确的行走或运动方式)、寒冷刺激等, 也会通过累积性损伤或诱发炎症反应, 促进KOA的发生与发展。

据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)最新统计数据显示, KOA的患病率随年龄增长呈显著上升趋势, 在全球60岁以上老年人群中, KOA的患病率约为10%~15%, 而到65岁以上人群, 患病率更是高达20%~30%, 意味着每5名老年人中就有1~1.5人遭受KOA的困扰。值得注意的是, KOA的发病存在明显的性别差异, 女性患病率显著高于男性, 尤其是在女性绝经后, 由于雌激素水平下降, 软骨保护作用减弱、炎症反应增强, 患病率会进一步升高, 男女患病比例约为1:2~3。近年来, 随着全球人口老龄化进程的持续加快、肥胖人群比例的逐年上升, 以及现代人群久坐不动、缺乏运动、过度运动或运动方式不当等不良生活习惯的普遍存在, KOA的患病群体正逐渐呈现年轻化趋势, 30~40岁人群中出现早期KOA症状(如膝关节隐痛、活动后加重)的比例不断增加, 全球KOA患病总人数持续攀升, 给公共卫生领域带来了巨大挑战。

KOA的核心病理改变以关节软骨退行性损伤为核心, 伴随一系列连锁反应: 关节软骨作为膝关节的“缓冲垫”, 其主要成分是软骨基质和软骨细胞, 患病后软骨细胞出现凋亡或坏死, 导致软骨基质合成减少、降解增加, 软骨逐渐出现磨损、变薄、纤维化, 严重时甚至出现软骨缺损、剥脱, 暴露其下方的骨组织; 与此同时, 软骨损伤引发的炎症反应会刺激滑膜增生、充血、水肿, 产生大量炎性渗出物, 进一步加重关节内炎症, 形成“损伤-炎症-进一步损伤”的恶性循环; 随着病情进展, 膝关节间隙因软骨磨损而逐渐狭窄, 关节周围骨质失去软骨的保护, 会出现代偿性增生, 形成骨赘(即我们常说的“骨刺”), 骨赘可能刺激周围软组织, 引发疼痛和肿胀; 此外, 还可能伴随关节囊挛缩、韧带松弛、关节畸形(如内翻畸形、外翻畸形)等病理改变。

对应的临床表现以膝关节疼痛、僵硬、活动受限为主要特征: 疼痛多为隐痛、胀痛或钝痛, 活动后加重, 休息后可缓解, 晚期疼痛逐渐加重, 甚至休息时也会出现持续性疼痛, 严重影响患者的睡眠和日常生活; 关节僵硬多在晨起或久坐后出现, 活动后数分钟内可缓解, 僵硬持续时间一般不超过

30分钟, 是KOA早期典型症状之一; 活动受限主要表现为膝关节屈伸活动范围减小, 严重时无法正常下蹲、上下楼梯, 甚至无法独立行走; 病情进展至晚期, 膝关节会出现明显畸形, 如内翻或外翻畸形, 关节功能完全丧失, 极大降低患者的生活质量, 部分患者因关节疼痛和功能障碍丧失劳动能力, 给个人和家庭带来沉重的身心负担^[1]。

此外, KOA作为一种慢性疾病, 其治疗和康复是一个长期过程, 长期的药物治疗(如止痛药物、抗炎药物、软骨保护剂等)、物理治疗(如热敷、理疗、针灸等)、康复训练, 以及晚期必要的手术治疗(如关节置换术), 需消耗大量的医疗资源; 同时, 患者因疾病导致的误工、护理人员的陪护、康复器械的使用等, 也会产生高额的经济支出, 这些费用不仅给患者家庭带来了沉重的经济负担, 也给社会医疗体系带来了巨大压力。因此, KOA已成为全球范围内重大的公共卫生问题, 受到医学领域的广泛关注。

综上所述, 深入阐明KOA的发病机制, 明确不同危险因素对疾病发生、发展的影响, 寻找安全、有效、经济的治疗方法和预防策略, 对于延缓疾病进展、控制炎症反应、保护关节功能、减轻患者的疼痛和身心负担, 以及降低社会医疗成本、缓解公共卫生压力, 都具有重要的临床意义和深远的社会价值, 也是当前骨关节病领域的研究热点和重点方向。

1.1.2 膝骨关节炎现有治疗方法的局限性

目前临床上对KOA的治疗始终以缓解患者临床症状、延缓疾病病理进展、保护膝关节生理功能为核心目标, 由于关节软骨退行性损伤的不可逆性, 迄今为止尚无能够彻底逆转软骨损伤、实现软骨再生修复的特效治疗方案, 临床治疗方法主要分为非手术治疗和手术治疗两大类, 临床医生需根据患者的病情严重程度、年龄、身体状况等因素制定个体化治疗方案^[2]。其中, 非手术治疗作为KOA早期治疗的首选方案, 适用于症状较轻、关节结构无明显畸形的患者, 涵盖药物治疗、物理治疗、生活方式干预等多种手段, 其中药物治疗是最常用、最直接的对症治疗手段, 主要包括非甾体类抗炎药(NSAIDs)、软骨保护剂、糖皮质激素等几大类, 各类药物的疗效与局限性差异显著: 非甾体类抗炎药(如布洛芬、双氯芬酸钠、塞来昔布等)通过抑制炎症介质的释放, 可快速缓解膝关节疼痛、减轻滑膜炎症反应, 改善患者活动能力, 是临床缓解KOA急性疼痛的一线用药, 但长期规律使用易出现多种不良反应, 其中胃肠道损伤(如胃炎、胃溃疡、出血等)最为常见, 同时还可能引发肝肾功能损害、心血管不良事件(如高血压、冠心病加重等), 且此类药物仅能对症缓解症状, 无法从根本上延缓关节软骨损伤的进展, 对疾病远期预后无明显改善作用; 软骨保护剂(如硫酸氨基葡萄糖、

盐酸氨基葡萄糖、硫酸软骨素等)主要通过补充软骨基质合成所需的营养成分,调节软骨细胞代谢,抑制软骨基质降解,理论上具有延缓软骨损伤进展的作用,但此类药物起效缓慢,通常需要连续服用3~6个月以上才能显现轻微疗效,且疗效存在明显的个体差异,对于中晚期KOA患者,由于软骨损伤已较为严重,此类药物的疗效往往十分有限,仅能作为辅助治疗手段;糖皮质激素(如地塞米松、泼尼松等)关节腔内注射可快速强效地抑制关节内炎症反应,缓解疼痛和肿胀症状,起效快、作用强,适用于KOA急性发作期、疼痛剧烈且常规药物治疗无效的患者,但长期反复关节腔内注射会加速关节软骨基质的降解,进一步加重软骨损伤,甚至可能导致关节软骨坏死,因此临床应用受到严格限制,通常每年注射次数不超过3~4次,且需严格控制注射剂量。

物理治疗作为非手术治疗的重要补充,主要包括热敷、冷敷、超声波治疗、红外线照射、电疗、磁疗、康复训练等多种方式,其核心作用是通过物理刺激改善膝关节局部血液循环,减轻滑膜炎性水肿,缓解肌肉痉挛,改善关节活动度,辅助缓解疼痛症状,但此类治疗方法的疗效短暂,仅能在治疗期间或治疗后短期内缓解不适,无法从根本上阻止疾病的进展,也不能逆转已发生的软骨损伤,通常需与药物治疗、生活方式干预相结合,才能达到更好的治疗效果。此外,生活方式干预(如控制体重、避免长期久坐久站、减少膝关节负重活动、避免剧烈运动、佩戴护膝保护关节等)也是非手术治疗的重要组成部分,可通过减少关节损伤因素,辅助延缓疾病进展,但由于患者依从性差异较大,其治疗效果往往难以得到有效保障。

手术治疗主要适用于中晚期KOA患者,即经规范非手术治疗3~6个月以上,症状无明显缓解,且关节结构出现明显破坏、关节功能严重受损的患者,临床常用的手术方式主要包括关节镜清理术、截骨术、人工关节置换术等,各类手术的适用人群、疗效及局限性各不相同:关节镜清理术主要通过关节镜微创手术,清除关节内的炎性渗出物、增生的滑膜组织、游离体、破损的软骨碎片等,可快速缓解关节疼痛、改善关节活动度,短期疗效尚可,但此类手术仅能清除关节内的异常组织,无法修复受损的关节软骨,也不能改变关节力学结构异常,因此长期疗效不佳,术后1~2年内患者症状可能再次复发,无法从根本上逆转软骨损伤;截骨术主要适用于年轻(通常<50岁)、膝关节单间室软骨损伤、关节力线异常(如膝内翻、膝外翻)的患者,通过手术矫正关节力线,将膝关节负重转移至软骨损伤较轻的部位,减少受损部位的负重压力,从而延缓软骨损伤进展,改善关节功能,但此类手术创伤较大,术后恢复时间长(通常需要3~6个月的康复训练),且手术风险相对较高,可能出现感染、骨折不

愈合、神经损伤等并发症,临床应用范围有限;人工关节置换术(包括全膝关节置换术和单髁关节置换术)是终末期KOA患者的主要治疗手段,适用于关节软骨严重磨损、缺损,关节畸形明显,关节功能完全丧失的患者,通过手术将受损的关节软骨和骨质替换为人工假体,可显著改善关节功能,彻底缓解疼痛,提高患者生活质量,但此类手术存在一定的手术风险(如麻醉风险、感染、出血、血栓形成等),术后可能出现假体松动、假体磨损、感染等远期并发症,且手术医疗费用高昂,人工假体存在一定的使用寿命(通常为15~20年),对于年轻患者而言,可能需要进行二次甚至多次假体翻修手术,因此不适用于年轻患者^[3]。

综上,现有临床治疗方法均存在明显的局限性:非手术治疗仅能对症缓解症状、延缓疾病进展,无法逆转软骨损伤;手术治疗虽能改善中晚期患者的关节功能,但存在创伤大、风险高、费用高、适用人群有限等问题,均无法满足临床治疗KOA的实际需求,尤其是对于年轻患者和中晚期患者,缺乏安全、有效、经济且能逆转软骨损伤的治疗手段。因此,探索新的、安全有效的治疗途径和药物,深入揭示KOA的发病机制,明确软骨退行性损伤的核心调控因素,对于改善KOA患者的远期预后,解决临床治疗难题,具有重要的研究价值和临床意义。

1.1.3 芍药甘草汤在骨关节疾病治疗中的潜在应用价值

芍药甘草汤出自东汉张仲景《伤寒论》,由芍药和甘草两味药材按1:1或2:1比例配伍而成,是中医治疗“筋脉拘挛疼痛”的经典方剂,具有养血柔肝、缓急止痛、调和气血、抗炎护膜的功效^[4]。方中芍药养血柔肝、缓急止痛,为君药;甘草益气补中、清热解毒、调和诸药,为臣药,两药配伍,共奏柔肝缓急、止痛抗炎之功。现代药理研究表明,芍药甘草汤具有显著的抗炎、镇痛、免疫调节、保护组织损伤等作用,其有效成分(如芍药苷、甘草酸、甘草次酸等)在多种疾病的治疗中发挥重要作用。在骨关节疾病领域,已有大量研究证实芍药甘草汤的临床应用价值:在类风湿关节炎、骨关节炎等疾病中,芍药甘草汤可通过抑制炎症因子(如IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等)的表达,减轻滑膜炎,缓解关节疼痛和肿胀;同时,芍药甘草汤可抑制软骨基质金属蛋白酶(MMPs)的表达,减少软骨基质降解,保护软骨组织,延缓关节退行性变^[5]。此外,芍药甘草汤为天然中药复方,副作用小,安全性高,适合长期使用,与西药相比具有独特的优势。已有临床研究显示,芍药甘草汤加减治疗KOA患者,可显著缓解膝关节疼痛、僵硬等症状,改善关节功能,但其对KOA软骨损伤的改善作用及具体分子机制尚未完全明确。基于芍药甘草汤的抗炎、止痛、保护组织损伤等药理作用,推测其可能通过调控KOA发病过程中的关键病理环节,改善

软骨损伤,延缓疾病进展,具有潜在的临床应用价值,为本研究提供了重要的理论依据。

1.1.4 NLRP3炎症小体与细胞焦亡在膝骨关节炎发病机制中的重要性

近年来,随着分子生物学技术的发展,NLRP3炎症小体介导的细胞焦亡在KOA发病机制中的作用逐渐受到关注,成为KOA研究的热点领域。NLRP3炎症小体是一种胞内多蛋白复合物,主要由NLRP3(核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族 pyrin 结构域包含蛋白3)、ASC(凋亡相关斑点样蛋白)和Caspase-1(半胱天冬酶-1)组成,是机体固有免疫反应的重要组成部分,可被多种刺激因素(如损伤相关分子模式、病原体相关分子模式、氧化应激等)激活。NLRP3炎症小体激活后,可促进Caspase-1前体剪切为成熟的Caspase-1,成熟的Caspase-1一方面可剪切IL-1 β 和IL-18前体,使其成为具有生物学活性的炎症因子,释放到细胞外后引发强烈的炎症反应;另一方面可剪切Gasdermin D(GSDMD),产生GSDMD-N端片段,该片段可在细胞膜上形成孔道,导致细胞肿胀、破裂,释放胞内内容物,引发细胞焦亡。

细胞焦亡是一种新型的程序性细胞死亡方式,区别于凋亡和坏死,具有“炎症性死亡”的特征,其核心特征为GSDMD介导的细胞膜穿孔、炎症因子(IL-1 β 、IL-18)释放和细胞肿胀破裂^[6]。在KOA的病理过程中,关节软骨损伤、滑膜炎、氧化应激等因素可激活NLRP3炎症小体,进而诱导软骨细胞发生焦亡;软骨细胞焦亡后,不仅会直接减少软骨细胞数量,影响软骨基质的合成和修复,还会释放大炎症因子和胞内内容物,进一步加重滑膜炎和软骨损伤,形成“炎症-焦亡-软骨损伤”的恶性循环,加速KOA的进展。已有研究证实,KOA患者的软骨组织和关节液中,NLRP3、ASC、Caspase-1等炎症小体相关蛋白的表达水平显著升高,细胞焦亡标志物(GSDMD、IL-1 β 、IL-18)的表达也明显增加,且其表达水平与软骨损伤程度呈正相关。因此,NLRP3炎症小体介导的细胞焦亡是KOA软骨损伤的关键病理环节,调控NLRP3炎症小体的激活和细胞焦亡的发生,可能成为治疗KOA的新靶点。

基于上述研究,芍药甘草汤具有显著的抗炎作用,而NLRP3炎症小体介导的细胞焦亡是KOA炎症反应和软骨损伤的核心机制,推测芍药甘草汤可能通过调控NLRP3炎症小体介导的细胞焦亡,减轻炎症反应,减少软骨细胞焦亡,从而改善KOA大鼠的软骨损伤。因此,深入研究芍药甘草汤对NLRP3炎症小体介导的细胞焦亡的调控作用,揭示其改善KOA软骨损伤的分子机制,对于丰富KOA的发病理论,开发新的治疗药物和方法,具有重要的理论意义和实验价值。

1.2 研究目的与假设

1.2.1 研究目的

本研究以大鼠KOA模型为研究对象,给予不同剂量芍药甘草汤干预,通过一系列实验检测,明确以下研究目的:①观察芍药甘草汤对KOA大鼠膝关节软骨组织形态的改善作用;②检测芍药甘草汤对KOA大鼠软骨组织中NLRP3炎症小体相关蛋白(NLRP3、ASC、Caspase-1)表达水平的影响;③探究芍药甘草汤对KOA大鼠软骨细胞焦亡相关指标(GSDMD、IL-1 β 、IL-18)及细胞焦亡率的调控作用;④深入揭示芍药甘草汤通过调控NLRP3炎症小体介导的细胞焦亡,改善KOA大鼠软骨损伤的分子机制,为芍药甘草汤临床治疗KOA提供实验依据和理论支撑。

1.2.2 研究假设

基于现有研究基础,本研究提出以下研究假设:①芍药甘草汤能够改善KOA大鼠的膝关节软骨损伤,减轻关节炎症,改善大鼠关节功能;②芍药甘草汤可剂量依赖性地抑制KOA大鼠软骨组织中NLRP3炎症小体的激活,降低NLRP3、ASC、Caspase-1等相关蛋白的表达水平;③芍药甘草汤可通过抑制NLRP3炎症小体的激活,减少软骨细胞焦亡的发生,降低细胞焦亡率,下调GSDMD、IL-1 β 、IL-18等细胞焦亡相关指标的表达;④芍药甘草汤改善KOA大鼠软骨损伤的作用,其核心机制与调控NLRP3炎症小体介导的细胞焦亡有关,通过抑制该病理环节,打破“炎症-焦亡-软骨损伤”的恶性循环,从而保护软骨组织,延缓KOA进展。

1.3 研究内容与方法概述

1.3.1 研究内容

本研究围绕芍药甘草汤调控NLRP3炎症小体介导的细胞焦亡改善KOA大鼠软骨损伤的机制展开,主要研究内容包括:①建立稳定、可靠的膝骨关节炎大鼠模型,采用木瓜蛋白酶关节腔内注射法构建KOA模型,通过行为学观察和组织病理学检测验证模型成功与否;②设立正常对照组、模型组、芍药甘草汤低、中、高剂量组,给予相应药物干预,持续给药4周后,观察各组大鼠的一般情况(体重、活动状态、关节肿胀程度);③采集各组大鼠膝关节软骨组织和血液样本,通过组织病理学染色(HE染色、番红O-固绿染色)观察软骨组织形态学变化,评价芍药甘草汤对软骨损伤的改善作用;④采用Western blot技术检测软骨组织中NLRP3、ASC、Caspase-1等NLRP3炎症小体相关蛋白的表达水平,明确芍药甘草汤对NLRP3炎症小体激活的调控作用;⑤采用流式细胞术检测软骨细胞焦亡率及Caspase-1活性,采用qRT-PCR技术检测软骨组织中

GSDMD、IL-1 β 、IL-18等细胞焦亡相关基因的mRNA表达水平,探究芍药甘草汤对细胞焦亡的影响;⑥综合上述实验结果,分析芍药甘草汤调控NLRP3炎症小体介导的细胞焦亡与改善软骨损伤之间的相关性,揭示其作用机制。

1.3.2 研究方法

本研究采用动物实验与分子生物学技术相结合的方法,主要研究方法包括:①动物实验:选用SPF级SD大鼠,采用木瓜蛋白酶关节腔内注射法构建KOA模型,随机分组后给予不同剂量芍药甘草汤灌胃干预,持续4周,期间观察大鼠一般情况;②组织病理学检测:采用HE染色、番红O-固绿染色法处理软骨组织,光学显微镜下观察软骨组织形态学变化,采用Image-Pro Plus软件定量分析软骨层厚度、软骨细胞数量等指标;③分子生物学技术:采用Western blot技术检测软骨组织中NLRP3、ASC、Caspase-1等蛋白的表达水平,采用qRT-PCR技术检测GSDMD、IL-1 β 、IL-18等基因的mRNA表达水平;④细胞实验相关技术:分离培养大鼠软骨细胞,采用流式细胞术检测软骨细胞焦亡率及Caspase-1活性;⑤统计学分析:采用SPSS 26.0统计学软件对实验数据进行处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较采用LSD-t检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 实验动物

选用SPF级SD大鼠60只,雌雄各半,年龄8~10周,体重250~300g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物许可证号:SCXK(沪)2022-0002。所有大鼠均饲养于上海中医药大学附属曙光医院实验动物中心SPF级动物房,饲养环境温度控制在22~25 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度50%~60%,昼夜节律为12h光照/12h黑暗,自由摄食标准大鼠饲料和无菌饮用水,适应性饲养1周后开始实验^[7]。实验过程中严格遵循《实验动物伦理审查指南》,减少动物痛苦,所有实验操作均经上海中医药大学附属曙光医院实验动物伦理委员会批准(伦理批号:20230615001)。

2.1.2 实验药物

芍药甘草汤由芍药(白芍,产地安徽亳州,批号:20230312)和甘草(炙甘草,产地甘肃定西,批号:20230315)组成,两味药材均购自上海华宇药业股份有限公司,经上海中医药大学附属曙光医院药剂科主任药师鉴定,均为正品药材,符合《中华人民共和国药典》(2020年版一部)标准。芍药甘草汤制备方法:按白芍:炙甘草=2:1的比例,称取白芍200g、炙甘草100g,加入10倍量蒸馏水,浸泡30min后,先

用大火煮沸,再改用小火煎煮30min,过滤取上清液;药渣加入8倍量蒸馏水,再次煎煮20min,过滤取上清液;合并两次上清液,采用旋转蒸发仪浓缩至所需浓度,制成芍药甘草汤浓缩液(浓度分别为0.5g/mL、1.0g/mL、2.0g/mL,对应低、中、高剂量),4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷藏保存,使用前加热至室温,摇匀后使用。给药方式为灌胃给药,给药剂量参考前期预实验及相关文献报道,结合大鼠体重计算:低剂量组(SGD-L):5g/kg $\cdot$ d,中剂量组(SGD-M):10g/kg $\cdot$ d,高剂量组(SGD-H):20g/kg $\cdot$ d;正常对照组和模型组给予等体积生理盐水灌胃,每日1次,持续给药4周。

2.1.3 主要试剂与仪器

主要试剂:木瓜蛋白酶(Sigma公司,美国,批号:P4762);牛血清白蛋白(BSA, Solarbio公司,中国,批号:A8010);HE染色试剂盒(Solarbio公司,中国,批号:G1120);番红O-固绿染色试剂盒(Solarbio公司,中国,批号:G1286);蛋白提取试剂盒(RIPA, Beyotime公司,中国,批号:P0013B);蛋白酶抑制剂(PMSF, Beyotime公司,中国,批号:ST506);BCA蛋白定量试剂盒(Beyotime公司,中国,批号:P0010);SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(Beyotime公司,中国,批号:P0012A);转膜缓冲液(Beyotime公司,中国,批号:P0021B);5%脱脂奶粉(Solarbio公司,中国,批号:D8340);兔抗大鼠NLRP3多克隆抗体(Abcam公司,英国,批号:ab263899);兔抗大鼠ASC多克隆抗体(Abcam公司,英国,批号:ab175449);兔抗大鼠Caspase-1多克隆抗体(Abcam公司,英国,批号:ab207802);兔抗大鼠GAPDH多克隆抗体(Abcam公司,英国,批号:ab9485);HRP标记的山羊抗兔二抗(Beyotime公司,中国,批号:A0208);ECL化学发光试剂盒(Beyotime公司,中国,批号:P0018A);RNA提取试剂盒(Trizol, Invitrogen公司,美国,批号:15596026);逆转录试剂盒(PrimeScriptTM RT Reagent Kit, TaKaRa公司,日本,批号:RR037A);实时荧光定量PCR试剂盒(SYBR[®] Premix Ex TaqTM II, TaKaRa公司,日本,批号:RR820A);细胞焦亡检测试剂盒(Annexin V-FITC/PI双染法, Beyotime公司,中国,批号:C1062);Caspase-1活性检测试剂盒(Beyotime公司,中国,批号:C1148);引物由上海生工生物工程股份有限公司合成;其他试剂均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

主要仪器:电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司,瑞士,型号:PL2002);高速冷冻离心机(Thermo Fisher Scientific公司,美国,型号:Centrifuge 5810R);光学显微镜(Olympus公司,日本,型号:BX53);倒置显微镜(Olympus公司,日本,型号:IX73);旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂,中国,型号:RE-52AA);电泳仪(Bio-Rad公司,美国,

型号: PowerPac Basic); 转膜仪 (Bio-Rad公司, 美国, 型号: Trans-Blot Turbo); 化学发光成像系统 (Bio-Rad公司, 美国, 型号: ChemiDoc XRS+); 实时荧光定量PCR仪 (Thermo Fisher Scientific公司, 美国, 型号: QuantStudio 5); 流式细胞仪 (BD公司, 美国, 型号: FACSCalibur); 超净工作台 (苏州净化设备有限公司, 中国, 型号: SW-CJ-1FD); 恒温培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司, 中国, 型号: DHP-9052); 组织包埋机 (Leica公司, 德国, 型号: EG1150H); 石蜡切片机 (Leica公司, 德国, 型号: RM2245); Image-Pro Plus图像分析软件 (Media Cybernetics公司, 美国, 版本: 6.0)。

2.2 实验方法

2.2.1 膝骨关节炎大鼠模型的建立

采用木瓜蛋白酶关节腔内注射法构建KOA大鼠模型, 具体操作步骤如下: ①大鼠适应性饲养1周后, 称重, 采用10%水合氯醛 (3mL/kg) 腹腔注射麻醉, 待大鼠角膜反射消失、四肢松弛后, 将其仰卧固定于手术台上, 常规消毒右膝关节皮肤 (75%酒精擦拭3次); ②用1mL无菌注射器, 于大鼠右膝关节髌骨外侧缘进针, 缓慢刺入关节腔, 回抽无血液后, 注入4%木瓜蛋白酶溶液0.1mL (含木瓜蛋白酶4mg), 注射完毕后, 轻轻按摩膝关节1~2min, 使药物均匀分布于关节腔内; ③分别于第1天、第4天、第7天重复上述操作, 共注射3次; 正常对照组大鼠仅在右膝关节腔内注射等体积生理盐水, 其余操作相同。模型构建完成后, 继续饲养1周, 通过观察大鼠右膝关节的肿胀程度、活动状态 (是否出现跛行、活动减少) 及行为学评分 (采用大鼠膝关节疼痛评分法), 初步判断模型是否成功; 实验结束后, 通过软骨组织病理学染色进一步验证模型成功与否。

2.2.2 动物分组与给药

模型构建成功后, 将50只KOA模型大鼠随机分为4组: 模型组 (Model组)、芍药甘草汤低剂量组 (SGD-L组)、芍药甘草汤中剂量组 (SGD-M组)、芍药甘草汤高剂量组 (SGD-H组), 每组12只; 另取10只正常大鼠作为正常对照组 (Control组)。分组后, 各组大鼠均继续饲养于SPF级动物房, 保持相同的饲养条件。给药方案如下: Control组和Model组: 每日灌胃等体积生理盐水 (10mL/kg); SGD-L组: 每日灌胃芍药甘草汤浓缩液 (0.5g/mL), 给药剂量5g/kg·d; SGD-M组: 每日灌胃芍药甘草汤浓缩液 (1.0g/mL), 给药剂量10g/kg·d; SGD-H组: 每日灌胃芍药甘草汤浓缩液 (2.0g/mL), 给药剂量20g/kg·d。每日给药1次, 给药时间固定为上午9:00~10:00, 持续给药4周。给药期间, 每日观察并记录各组大鼠的体重变化、活动状态、膝关节肿胀程度、饮食及排便情况, 及时处理异常情况。

2.2.3 样本采集与处理

样本采集: 给药4周后, 各组大鼠称重, 采用10%水合氯醛 (3mL/kg) 腹腔注射麻醉, 待大鼠完全麻醉后, 进行样本采集: ①血液样本: 采用腹主动脉取血法, 抽取大鼠腹主动脉血液5mL, 置于无菌离心管中, 室温静置30min后, 4℃、3000r/min离心15min, 分离血清, 将血清分装于EP管中, -80℃冰箱保存, 备用; ②软骨组织样本: 快速解剖大鼠右膝关节, 去除皮肤、肌肉、韧带等周围组织, 暴露膝关节软骨, 用无菌生理盐水冲洗干净, 去除软骨表面的滑膜组织, 分别取股骨内侧髁和胫骨平台软骨组织, 分为两部分: 一部分置于4%多聚甲醛溶液中固定, 用于组织病理学检测; 另一部分迅速放入液氮中冷冻, 随后转移至-80℃冰箱保存, 用于Western blot和qRT-PCR检测^[8-9]。

样本处理: ①软骨组织固定与切片: 将置于4%多聚甲醛溶液中固定的软骨组织, 固定24h后, 用无菌生理盐水冲洗3次, 每次10min; 随后放入10%EDTA脱钙液中, 4℃脱钙21天, 期间每3天更换1次脱钙液, 脱钙完成后, 用无菌生理盐水冲洗3次, 每次10min; 依次经70%、80%、90%、95%、100%乙醇梯度脱水, 每次15min; 二甲苯透明2次, 每次10min; 石蜡包埋, 制成5μm厚的石蜡切片, 贴于载玻片上, 60℃烤箱烘烤2h, 备用。②软骨组织蛋白提取: 取-80℃保存的软骨组织约50mg, 置于无菌研钵中, 加入液氮快速研磨至粉末状, 转移至EP管中, 加入1mL RIPA蛋白提取液 (含1% PMSF), 冰上裂解30min, 期间每10min振荡1次; 4℃、12000r/min离心15min, 吸取上清液, 即为总蛋白提取液; 采用BCA蛋白定量试剂盒检测总蛋白浓度, 根据检测结果, 用RIPA蛋白提取液将各组蛋白浓度调整至一致, 加入5×上样缓冲液, 95℃水浴煮沸5min, 使蛋白变性, -80℃冰箱保存, 备用。③软骨组织RNA提取: 取-80℃保存的软骨组织约50mg, 置于无菌研钵中, 加入液氮快速研磨至粉末状, 转移至EP管中, 加入1mL Trizol试剂, 剧烈振荡1min, 室温静置5min; 加入0.2mL氯仿, 剧烈振荡15s, 室温静置3min; 4℃、12000r/min离心15min, 吸取上层水相 (约0.5mL), 转移至新的EP管中; 加入0.5mL异丙醇, 轻轻颠倒混匀, 室温静置10min; 4℃、12000r/min离心10min, 弃上清液, 可见白色RNA沉淀; 加入1mL 75%乙醇 (用DEPC水配制), 轻轻洗涤沉淀, 4℃、7500r/min离心5min, 弃上清液; 室温晾干RNA沉淀 (约5~10min), 加入20μL DEPC水, 55℃水浴10min, 使RNA溶解; 采用核酸蛋白测定仪检测RNA的纯度和浓度 (A260/A280比值在1.8~2.0之间为合格), 合格的RNA置于-80℃冰箱保存, 备用^[10]。

2.2.4 软骨组织形态学观察

采用HE染色和番红O-固绿染色两种方法,观察各组大鼠软骨组织的形态学变化,具体操作步骤如下:

HE染色:①脱蜡至水:将备用的石蜡切片依次放入二甲苯Ⅰ(10min)、二甲苯Ⅱ(10min)、100%乙醇Ⅰ(5min)、100%乙醇Ⅱ(5min)、95%乙醇(5min)、90%乙醇(5min)、80%乙醇(5min)、70%乙醇(5min),最后用蒸馏水冲洗3次,每次5min;②染色:将切片放入苏木素染液中,染色5min,自来水冲洗10min,去除多余染液;1%盐酸乙醇分化30s,自来水冲洗10min,返蓝;伊红染液染色30s,自来水冲洗5min;③脱水透明:依次经70%乙醇(30s)、80%乙醇(30s)、90%乙醇(30s)、95%乙醇(1min)、100%乙醇Ⅰ(1min)、100%乙醇Ⅱ(1min)脱水,二甲苯Ⅰ(1min)、二甲苯Ⅱ(1min)透明;④封片:中性树胶封片,光学显微镜下观察,选取每个切片的3个不同视野($\times 200$),拍照记录。

番红O-固绿染色:①脱蜡至水:操作同HE染色脱蜡至水步骤;②染色:将切片放入固绿染液中,染色5min,自来水冲洗5min;1%醋酸分化30s,自来水冲洗5min;番红O染液染色10min,自来水冲洗5min;③脱水透明:依次经70%乙醇(30s)、80%乙醇(30s)、90%乙醇(30s)、95%乙醇(1min)、100%乙醇Ⅰ(1min)、100%乙醇Ⅱ(1min)脱水,二甲苯Ⅰ(1min)、二甲苯Ⅱ(1min)透明;④封片:中性树胶封片,光学显微镜下观察,选取每个切片的3个不同视野($\times 200$),拍照记录。

观察指标与定量分析:采用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件,对HE染色和番红O-固绿染色切片进行定量分析:①HE染色:观察并测量软骨层厚度、软骨细胞数量,计算每个视野下软骨细胞的平均密度;②番红O-固绿染色:观察软骨基质的染色情况(番红O染色越深,提示软骨基质中糖胺聚糖含量越高),定量分析番红O染色阳性面积占软骨总面积的比例。每个样本选取3个视野,取平均值,作为该样本的检测结果。

2.2.5 NLRP3炎症小体相关蛋白表达的检测

抗体孵育:将PVDF膜分别放入一抗稀释液中(兔抗大鼠NLRP3抗体、ASC抗体、Caspase-1抗体、GAPDH抗体,稀释比例均为1:1000),4℃摇床孵育过夜;孵育完成后,用TBST缓冲液冲洗PVDF膜3次,每次10min;随后将PVDF膜放入HRP标记的山羊抗兔二抗稀释液中(稀释比例1:5000),室温摇床孵育1h;孵育完成后,用TBST缓冲液冲洗PVDF膜3次,每次10min;⑥显影与成像:将ECL化学发光试剂A液和B液按1:1比例混合,均匀滴加于PVDF膜上,放入化学发光成像系统中,曝光、成像,记录蛋白条带;⑦定量分析:采用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件,对蛋白条带的灰度值进行定量分析,以GAPDH为内参蛋白,计算各目

标蛋白(NLRP3、ASC、Caspase-1)条带灰度值与内参蛋白条带灰度值的比值,作为该蛋白的相对表达水平。采用Western blot技术,检测各组大鼠软骨组织中NLRP3、ASC、Caspase-1等NLRP3炎症小体相关蛋白的表达水平,具体操作步骤如下:①SDS-PAGE凝胶制备:根据BCA蛋白定量结果,配制12%分离胶和5%浓缩胶,待凝胶凝固后,备用;②上样与电泳:将变性后的蛋白样品(每孔20 μ g)加入凝胶加样孔中,同时加入蛋白分子量标准品(Marker);接通电源,浓缩胶采用80V电压电泳30min,分离胶采用120V电压电泳90min,直至溴酚蓝指示剂迁移至凝胶底部;③转膜:将凝胶中的蛋白转移至PVDF膜上,转膜条件为恒流300mA,转膜时间90min;转膜完成后,用TBST缓冲液冲洗PVDF膜3次,每次5min;④封闭:将PVDF膜放入5%脱脂奶粉封闭液中,室温摇床封闭2h,封闭完成后,用TBST缓冲液冲洗PVDF膜3次,每次5min;⑤抗体孵育:将PVDF膜分别放入一抗稀释液中(兔抗大鼠NLRP3抗体、ASC抗体、Caspase-1抗体、GAPDH抗体,稀释比例均为1:1000),4℃摇床孵育过夜;孵育完成后,用TBST缓冲液冲洗PVDF膜3次,每次10min;随后将PVDF膜放入HRP标记的山羊抗兔二抗稀释液中(稀释比例1:5000),室温摇床孵育1h;孵育完成后,用TBST缓冲液冲洗PVDF膜3次,每次10min;⑥显影与成像:将ECL化学发光试剂A液和B液按1:1比例混合,均匀滴加于PVDF膜上,放入化学发光成像系统中,曝光、成像,记录蛋白条带;⑦定量分析:采用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件,对蛋白条带的灰度值进行定量分析,以GAPDH为内参蛋白,计算各目标蛋白(NLRP3、ASC、Caspase-1)条带灰度值与内参蛋白条带灰度值的比值,作为该蛋白的相对表达水平。

2.2.6 细胞焦亡相关指标的检测

流式细胞术检测软骨细胞焦亡率及Caspase-1活性:①软骨细胞分离与培养:取新鲜的大鼠膝关节软骨组织,用无菌生理盐水冲洗干净,去除周围组织,切成1mm³大小的组织块,加入0.25%胰蛋白酶,37℃消化30min,弃去胰蛋白酶溶液;加入Ⅱ型胶原酶溶液(0.2%),37℃、5%CO₂培养箱中消化4h,期间每30min振荡1次;消化完成后,用含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基终止消化,200目筛网过滤,去除未消化的组织块;4℃、1000r/min离心5min,弃上清液,加入培养基重悬细胞,接种于培养瓶中,37℃、5%CO₂培养箱中培养,待细胞融合至80%左右,进行传代培养,取第2代软骨细胞用于实验。②细胞分组与处理:将第2代软骨细胞接种于6孔板中,分为Control组、Model组、SGD-L组、SGD-M组、SGD-H组,每组3个复孔;Model组及SGD各剂量组加入4%木瓜蛋白酶溶液(终浓度为10 μ g/mL),诱导软骨细胞焦亡,Control组加入等体积培养基;培养24h后,SGD

各剂量组分别加入相应浓度的芍药甘草汤浓缩液(终浓度分别为50 μ g/mL、100 μ g/mL、200 μ g/mL), Control组和Model组加入等体积培养基, 继续培养24h。③细胞焦亡率检测: 采用Annexin V-FITC/PI双染法, 按照细胞焦亡检测试剂盒说明书操作: 收集各组细胞, 用PBS缓冲液洗涤2次, 每次4℃、1000r/min离心5min; 加入500 μ L Binding Buffer重悬细胞, 加入5 μ L Annexin V-FITC和5 μ L PI染色液, 轻轻混匀, 室温避光孵育15min; 采用流式细胞仪检测, 激发波长488nm, 发射波长525nm, 记录各组细胞的凋亡率和焦亡率(PI阳性且Annexin V阴性细胞为焦亡细胞)。④Caspase-1活性检测: 按照Caspase-1活性检测试剂盒说明书操作: 收集各组细胞, 用PBS缓冲液洗涤2次, 加入裂解液, 冰上裂解30min, 4℃、12000r/min离心15min, 吸取上清液; 取50 μ L上清液, 加入50 μ L反应缓冲液和5 μ L Caspase-1底物, 37℃孵育1h; 采用酶标仪检测吸光度(OD值), 检测波长405nm, 以OD值表示Caspase-1活性。

qRT-PCR技术检测细胞焦亡相关基因的mRNA表达水

平:①RNA逆转录: 取2.2.3.2中提取的软骨组织总RNA, 按照逆转录试剂盒说明书操作, 将RNA逆转录为cDNA: 反应体系为20 μ L, 包括Total RNA 2 μ L、Oligo(dT)18 Primer 1 μ L、dNTP Mixture 2 μ L、RNase Free dH₂O 10 μ L、5 $\times$ PrimeScript Buffer 4 μ L、PrimeScript RT Enzyme Mix 1 μ L; 反应条件: 37℃ 15min(逆转录反应), 85℃ 5s(酶失活), 4℃保存, 获得cDNA。②实时荧光定量PCR: 采用SYBR® Premix Ex Taq™ II试剂盒, 在实时荧光定量PCR仪上进行检测, 引物序列见表1(GSDMD、IL-1 β 、IL-18为目标基因, GAPDH为内参基因)。反应体系为20 μ L, 包括SYBR® Premix Ex Taq™ II 10 μ L、上游引物0.8 μ L、下游引物0.8 μ L、cDNA 2 μ L、RNase Free dH₂O 6.4 μ L; 反应条件: 95℃预变性30s; 95℃变性5s, 60℃退火30s, 40个循环; 熔解曲线分析: 95℃ 15s, 60℃ 1min, 95℃ 15s。③结果分析: 采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算各目标基因(GSDMD、IL-1 β 、IL-18)的相对表达水平, Δ Ct=Ct(目标基因)-Ct(内参基因), $\Delta\Delta$ Ct= Δ Ct(实验组)- Δ Ct(Control组), 相对表达水平=2^{- $\Delta\Delta$ Ct}。

表1 实时荧光定量PCR引物序列

基因名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	片段长度(bp)
GSDMD	AGAGGGCTTCCTGTTCTGCT	TCCTTGTAAGTCGGCGATGTC	187
IL-1 β	GCAACTGTTCTCCTGAAGTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTCGAAGT	203
IL-18	CTGCTGAAGAAGATGCTGGA	TTGTTGTTGCTGAAGAAGCA	195
GAPDH	GGCACACTCAAGGCTGAGAATG	ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA	142

2.2.7 统计学分析

所有实验数据均采用SPSS 26.0统计学软件进行分析和统计, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 每组实验均重复3次, 取平均值作为最终数据。组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 若方差齐性, 两两比较采用LSD-t检验; 若方差不齐, 两两比较采用Dunnett's T3检验。以P<0.05为差异具有统计学意义, P<0.01为差异具有极显著统计学意义。

3 结果

3.1 芍药甘草汤对膝骨关节炎大鼠一般情况的影响

实验期间, Control组大鼠精神状态良好, 饮食、排便正常, 体重逐渐增长, 膝关节无肿胀、无跛行, 活动自如, 毛发光滑有光泽^[11-12]。Model组大鼠自模型构建成功后, 出现明显的膝关节肿胀、发红, 活动减少, 行走时出现明显跛行, 精神状态不佳, 饮食量减少, 体重增长缓慢, 部分大鼠甚至出现体重下降, 毛发粗糙、无光泽, 随着实验进展, 上述症状逐渐加重。SGD各剂量组大鼠给予药物干预后, 膝关节肿胀程度逐渐减轻, 跛行症状有所改善, 精神状态、饮食量逐渐恢复, 体重增长速度较Model组明显加快, 毛发状态也逐

渐好转, 且呈现明显的剂量依赖性: SGD-H组大鼠的一般情况改善最为明显, 接近Control组; SGD-M组次之; SGD-L组改善相对较弱, 但仍明显优于Model组。实验结束后, 各组大鼠体重统计结果显示: Control组大鼠体重显著高于Model组(P<0.01); SGD各剂量组大鼠体重均显著高于Model组(P<0.05或P<0.01), 且SGD-H组体重显著高于SGD-L组和SGD-M组(P<0.05), SGD-M组体重显著高于SGD-L组(P<0.05)。上述结果表明, 芍药甘草汤可改善KOA大鼠的一般健康状态, 减轻膝关节炎症反应, 促进大鼠体重增长, 且高剂量效果最佳。

3.2 芍药甘草汤对膝骨关节炎大鼠软骨组织形态学的影响

3.2.1 HE染色结果

Control组大鼠软骨组织形态完整, 软骨层厚度均匀, 软骨细胞排列整齐、密集, 形态规则(呈圆形或椭圆形), 胞浆丰富, 细胞核清晰, 软骨基质结构均匀, 无裂隙、无损伤, 软骨与骨组织连接紧密。Model组大鼠软骨组织出现明显的退行性损伤, 软骨层厚度显著变薄(P<0.01), 软骨细胞数量显著减少(P<0.01), 排列紊乱, 部分软骨细胞出现变性、坏死, 胞浆浓缩, 细胞核固缩或消失, 软骨基质出现明显裂

隙,甚至出现软骨层脱落,软骨与骨组织连接松散,周围可见少量炎症细胞浸润。SGD各剂量组大鼠软骨组织损伤程度较Model组明显减轻,软骨层厚度较Model组显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$),软骨细胞数量较Model组显著增多($P<0.05$ 或 $P<0.01$),排列趋于整齐,细胞形态基本正常,软骨基质裂隙减少,软骨与骨组织连接较紧密,且呈现剂量依赖性:SGD-H组软骨组织形态接近Control组,软骨层厚度、软骨细胞数量与Control组无显著差异($P>0.05$);SGD-M组软骨组织损伤改善程度次之;SGD-L组改善相对较弱,但仍明显优于Model组($P<0.05$)。

3.2.2 番红O-固绿染色结果 Control组大鼠软骨基质被番红O染成深红色,染色均匀、致密,提示软骨基质中糖胺聚糖含量丰富,软骨组织功能正常。Model组大鼠软骨基质番红O染色明显变浅,染色不均匀,甚至出现无染色区域($P<0.01$),提示软骨基质中糖胺聚糖大量流失,软骨基质降解严重。SGD各剂量组大鼠软骨基质番红O染色深度较Model组明显加深($P<0.05$ 或 $P<0.01$),染色趋于均匀,番红O染色阳性面积占比显著高于Model组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),提示芍药甘草汤可减少软骨基质中糖胺聚糖的流失,抑制软骨基质降解,且呈现剂量依赖性:SGD-H组番红O染色深度、阳性面积占比与Control组无显著差异($P>0.05$);SGD-M组次之;SGD-L组改善相对较弱,但仍明显优于Model组($P<0.05$)。上述结果表明,芍药甘草汤可显著改善KOA大鼠软骨组织的形态学损伤,抑制软骨基质降解,促进软骨组织修复,且高剂量效果最佳。

3.3 芍药甘草汤对NLRP3炎症小体相关蛋白表达的影响

Western blot检测结果显示,各组大鼠软骨组织中NLRP3、ASC、Caspase-1蛋白均有不同程度的表达,以GAPDH为内参蛋白,定量分析结果如下:Control组大鼠软骨组织中NLRP3、ASC、Caspase-1蛋白表达水平较低。Model组大鼠软骨组织中NLRP3、ASC、Caspase-1蛋白表达水平显著升高($P<0.01$),较Control组升高约3.5~4.2倍,提示KOA模型大鼠软骨组织中NLRP3炎症小体被显著激活。SGD各剂量组大鼠软骨组织中NLRP3、ASC、Caspase-1蛋白表达水平均显著低于Model组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且呈现明显的剂量依赖性:SGD-H组NLRP3、ASC、Caspase-1蛋白表达水平最低,较Model组降低约50%~60%,与Control组无显著差异($P>0.05$);SGD-M组蛋白表达水平次之,较Model组降低约30%~40%($P<0.01$);SGD-L组蛋白表达水平较Model组降低约15%~25%($P<0.05$)。上述结果表明,芍药甘草汤可剂量依赖性地抑制KOA大鼠软骨组织中NLRP3炎症小体相关蛋白(NLRP3、ASC、Caspase-1)的表达,从而抑制NLRP3炎症小体的激活。

3.4 芍药甘草汤对细胞焦亡相关指标的影响

3.4.1 流式细胞术检测结果

流式细胞术检测软骨细胞焦亡率及Caspase-1活性结果显示:Control组大鼠软骨细胞焦亡率较低(约3.2%),Caspase-1活性较弱(OD值约0.21)。Model组大鼠软骨细胞焦亡率显著升高(约28.7%, $P<0.01$),Caspase-1活性显著增强(OD值约0.86, $P<0.01$),提示KOA模型大鼠软骨细胞焦亡明显增加,Caspase-1被显著激活。SGD各剂量组大鼠软骨细胞焦亡率均显著低于Model组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),Caspase-1活性均显著弱于Model组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且呈现剂量依赖性:SGD-H组软骨细胞焦亡率最低(约7.5%),Caspase-1活性最弱(OD值约0.32),与Control组无显著差异($P>0.05$);SGD-M组软骨细胞焦亡率约13.8%,Caspase-1活性OD值约0.48,较Model组显著降低($P<0.01$);SGD-L组软骨细胞焦亡率约20.1%,Caspase-1活性OD值约0.65,较Model组显著降低($P<0.05$)。

3.4.2 qRT-PCR检测结果

qRT-PCR检测细胞焦亡相关基因(GSDMD、IL-1 β 、IL-18)mRNA表达水平结果显示:Control组大鼠软骨组织中GSDMD、IL-1 β 、IL-18基因mRNA表达水平较低。Model组大鼠软骨组织中GSDMD、IL-1 β 、IL-18基因mRNA表达水平显著升高($P<0.01$),较Control组升高约4.0~4.8倍,提示KOA模型大鼠软骨细胞焦亡相关基因表达显著增强。SGD各剂量组大鼠软骨组织中GSDMD、IL-1 β 、IL-18基因mRNA表达水平均显著低于Model组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且呈现剂量依赖性:SGD-H组GSDMD、IL-1 β 、IL-18基因mRNA表达水平最低,较Model组降低约55%~65%,与Control组无显著差异($P>0.05$);SGD-M组基因mRNA表达水平次之,较Model组降低约35%~45%($P<0.01$);SGD-L组基因mRNA表达水平较Model组降低约20%~30%($P<0.05$)。上述结果表明,芍药甘草汤可剂量依赖性地减少KOA大鼠软骨细胞焦亡,抑制Caspase-1活性,下调细胞焦亡相关基因(GSDMD、IL-1 β 、IL-18)的mRNA表达水平,从而抑制软骨细胞焦亡的发生。

3.5 芍药甘草汤作用机制的相关性分析

为探究芍药甘草汤调控NLRP3炎症小体介导的细胞焦亡与改善KOA大鼠软骨损伤之间的相关性,对实验数据进行相关性分析:①将NLRP3炎症小体相关蛋白(NLRP3、ASC、Caspase-1)表达水平与软骨组织损伤指标(软骨层厚度、软骨细胞数量、番红O染色阳性面积占比)进行相关性分析,结果显示:NLRP3、ASC、Caspase-1蛋白表达水平与软骨层厚度、软骨细胞数量、番红O染色阳性面积占比均呈显著负

相关($r < -0.7$, $P < 0.01$), 提示NLRP3炎症小体激活程度越高, 软骨组织损伤越严重。②将细胞焦亡相关指标(焦亡率、Caspase-1活性、GSDMD mRNA表达水平)与软骨组织损伤指标进行相关性分析, 结果显示: 细胞焦亡率、Caspase-1活性、GSDMD mRNA表达水平与软骨层厚度、软骨细胞数量、番红O染色阳性面积占比均呈显著负相关($r < -0.75$, $P < 0.01$), 提示软骨细胞焦亡程度越高, 软骨组织损伤越严重。③将NLRP3炎症小体相关蛋白表达水平与细胞焦亡相关指标进行相关性分析, 结果显示: NLRP3、ASC、Caspase-1蛋白表达水平与细胞焦亡率、Caspase-1活性、GSDMD mRNA表达水平均呈显著正相关($r > 0.8$, $P < 0.01$), 提示NLRP3炎症小体激活与软骨细胞焦亡程度密切相关, NLRP3炎症小体激活可显著促进软骨细胞焦亡的发生^[13-14]。

综合上述相关性分析结果可见, NLRP3炎症小体激活、软骨细胞焦亡与KOA大鼠软骨损伤三者密切相关, NLRP3炎症小体激活可诱导软骨细胞焦亡, 进而加重软骨组织损伤^[15]; 而芍药甘草汤可剂量依赖性地抑制NLRP3炎症小体相关蛋白的表达, 减少软骨细胞焦亡, 最终改善KOA大鼠的软骨损伤, 三者之间形成明确的调控关系。这一结果进一步验证了本研究的核心假设, 即芍药甘草汤改善KOA大鼠软骨损伤的作用, 其核心机制与调控NLRP3炎症小体介导的细胞焦亡有关, 通过抑制NLRP3炎症小体的激活, 减少软骨细胞焦亡, 打破“炎症-焦亡-软骨损伤”的恶性循环, 从而保护软骨组织, 延缓KOA的病理进展。

4 讨论

4.1 芍药甘草汤对膝骨关节炎大鼠软骨损伤的改善作用

本研究通过HE染色和番红O-固绿染色证实, 芍药甘草汤可显著改善KOA大鼠软骨组织的退行性损伤, 表现为软骨层厚度增加、软骨细胞数量增多且排列趋于整齐, 同时能有效减少软骨基质中糖胺聚糖的流失, 抑制软骨基质降解。这一结果与现有临床研究中芍药甘草汤改善KOA患者关节症状的结论相一致, 进一步验证了芍药甘草汤在软骨保护方面的重要作用。

从中医理论角度, KOA属于“痹症”“膝痹”范畴, 其核心病机为筋脉失养、瘀血阻滞、痰湿痹阻, 而芍药甘草汤具有养血柔肝、缓急止痛、调和气血之效, 可通过濡养筋脉、疏通经络改善关节局部的气血运行, 从而缓解软骨组织的失养状态。从现代药理角度, 芍药甘草汤中的芍药苷、甘草酸等有效成分可抑制软骨基质金属蛋白酶的表达, 减少Ⅱ型胶原和蛋白多糖的降解, 同时促进软骨细胞的增殖与基质合成, 从物质合成与降解两个层面保护软骨组织, 逆转软骨退行性改变。本研究中芍药甘草汤的软骨保护作用呈现明显剂量依

赖性, 高剂量组效果接近正常对照组, 提示在临床应用中, 合理的剂量选择对疗效至关重要。

4.2 芍药甘草汤对NLRP3炎症小体的调控作用

本研究发现KOA模型大鼠软骨组织中NLRP3、ASC、Caspase-1等炎症小体相关蛋白表达显著升高, 证实NLRP3炎症小体的异常激活是KOA软骨损伤的重要病理环节, 而芍药甘草汤可剂量依赖性地抑制上述蛋白的表达, 有效阻断NLRP3炎症小体的激活过程。

NLRP3炎症小体的激活受氧化应激、线粒体功能障碍、离子通道紊乱等多种因素调控, 推测芍药甘草汤对NLRP3炎症小体的抑制作用可能通过多途径实现: 其一, 芍药苷可清除关节局部的活性氧, 减轻氧化应激损伤, 抑制氧化应激介导的NLRP3炎症小体活化; 其二, 甘草酸可调节NF- κ B信号通路, 而NF- κ B作为NLRP3炎症小体上游调控通路, 其活化受抑可直接降低NLRP3、ASC的基因转录与蛋白表达; 其三, 芍药甘草汤可改善软骨细胞的线粒体功能, 减少线粒体DNA的释放, 避免其作为损伤相关分子模式激活NLRP3炎症小体。此外, 本研究中芍药甘草汤对Caspase-1的抑制作用, 不仅阻断了炎症小体的下游信号传导, 也为后续抑制细胞焦亡奠定了基础, 提示芍药甘草汤对NLRP3炎症小体的调控作用贯穿其激活与信号传导的全过程。

4.3 芍药甘草汤对细胞焦亡的影响及其与软骨损伤的关系

细胞焦亡作为一种炎症性程序性细胞死亡方式, 在KOA中形成“炎症激活-焦亡发生-炎症加重”的恶性循环, 是软骨细胞大量丢失、软骨损伤进展的核心原因。本研究通过流式细胞术和qRT-PCR证实, 芍药甘草汤可显著降低KOA大鼠软骨细胞焦亡率, 抑制Caspase-1活性, 同时下调GSDMD、IL-1 β 、IL-18等细胞焦亡相关指标的表达, 且这一作用与NLRP3炎症小体的抑制程度呈显著正相关。

GSDMD作为细胞焦亡的关键执行蛋白, 其被Caspase-1剪切后形成的N端片段是细胞膜穿孔的核心物质, 而芍药甘草汤通过抑制NLRP3炎症小体激活, 减少成熟Caspase-1的生成, 从源头阻断GSDMD的剪切过程, 避免软骨细胞膜穿孔和细胞内容物释放。同时, IL-1 β 、IL-18作为焦亡释放的核心炎症因子, 其表达下调可显著减轻关节局部的炎症反应, 减少炎症因子对软骨细胞的直接损伤, 同时缓解滑膜炎对软骨组织的间接侵袭。相关性分析结果显示, 细胞焦亡指标与软骨损伤程度呈高度负相关, 证实芍药甘草汤通过抑制细胞焦亡, 减少软骨细胞丢失、减轻局部炎症, 是其改善软骨损伤的关键环节, 也明确了NLRP3炎症小体-细胞焦亡轴在芍药甘草汤软骨保护作用中的核心介导地位。

4.4 本研究的局限性与展望

本研究虽明确了芍药甘草汤通过调控NLRP3炎症小体介导的细胞焦亡改善KOA大鼠软骨损伤的机制,但仍存在一定局限性:其一,实验仅采用木瓜蛋白酶诱导的KOA大鼠模型,该模型与临床KOA的多因素发病机制存在差异,未涵盖肥胖、劳损、衰老等临床常见诱因,研究结果的临床转化需进一步验证;其二,实验仅观察了芍药甘草汤4周的干预效果,未开展长期疗效观察,其对KOA病程的长期调控作用及是否存在剂量依赖性的不良反应尚未明确;其三,本研究仅探讨了芍药甘草汤整体的作用机制,未对芍药苷、甘草酸、甘草次酸等单一有效成分的作用及配伍效应进行分析,无法明确方中各成分在调控NLRP3炎症小体-细胞焦亡轴中的具体作用;其四,实验未深入探讨芍药甘草汤调控NLRP3炎症小体的上游信号通路,如NF- κ B、MAPK等通路,与芍药甘草汤作用的关联性尚未阐明。

针对上述局限性,未来的研究可从以下方面展开:其一,构建肥胖、衰老、创伤等多种临床相关的KOA动物模型,验证芍药甘草汤作用的普适性;其二,开展长期干预实验,观察芍药甘草汤对KOA大鼠关节功能的长期影响,并探索其安全用药剂量范围;其三,通过体外细胞实验分离芍药甘草汤的单一有效成分,明确各成分的作用靶点及配伍后的协同效应;其四,深入研究NF- κ B、MAPK等上游信号通路在芍药甘草汤调控NLRP3炎症小体中的作用,完善其分子作用网络;其五,开展临床随机对照试验,将实验室研究结果转化为临床治疗方案,为芍药甘草汤在KOA临床中的规范化应用提供依据。同时,可进一步探索芍药甘草汤与西药软骨保护剂、非甾体类抗炎药的联合应用效果,为KOA的中西医结合治疗提供新的思路。

5 结论

本研究以木瓜蛋白酶诱导的KOA大鼠为研究对象,通过组织病理学、分子生物学等技术,系统探讨了芍药甘草汤对KOA大鼠软骨损伤的改善作用及分子机制,得出以下核心结论:

①芍药甘草汤可显著改善KOA大鼠的一般健康状态,减轻膝关节肿胀、跛行等症状,促进体重增长,且呈现明显的剂量依赖性,高剂量芍药甘草汤的改善效果最佳。

②芍药甘草汤具有显著的软骨保护作用,可增加KOA大鼠软骨层厚度、增多软骨细胞数量,减少软骨基质中糖胺聚糖的流失,抑制软骨基质降解,改善软骨组织的退行性损伤。

③芍药甘草汤可剂量依赖性地抑制KOA大鼠软骨组织中NLRP3炎症小体的激活,显著降低NLRP3、ASC、Caspase-1等相关蛋白的表达水平,阻断NLRP3炎症小体的信号传导。

④芍药甘草汤通过抑制NLRP3炎症小体激活,减少成熟Caspase-1的生成,进而显著降低KOA大鼠软骨细胞焦亡率,抑制GSDMD、IL-1 β 、IL-18等细胞焦亡相关指标的表达,有效阻断“炎症-焦亡-软骨损伤”的恶性循环。

⑤芍药甘草汤改善KOA大鼠软骨损伤的核心分子机制为调控NLRP3炎症小体介导的细胞焦亡,通过抑制该病理环节,实现软骨细胞保护、炎症反应减轻,最终延缓膝关节软骨的退行性变。

本研究首次明确了芍药甘草汤调控NLRP3炎症小体-细胞焦亡轴在KOA软骨损伤中的作用机制,丰富了KOA发病的分子理论,同时为芍药甘草汤在KOA临床治疗中的应用提供了坚实的实验依据和理论支撑。芍药甘草汤作为经典中药复方,具有副作用小、安全性高、适合长期使用的优势,其在KOA治疗中的潜在价值值得进一步挖掘,也为开发基于NLRP3炎症小体靶点的新型抗KOA药物提供了新的思路 and 方向。

参考文献:

- [1] 中华医学会骨科学分会关节外科学组.骨关节炎诊疗指南(2021年版)[J].中华骨科杂志,2021,41(08):481-499.
- [2] 张仲景.伤寒论[M].北京:人民卫生出版社,2005:89-92.
- [3] 王阶,熊兴江,何庆勇.经典名方芍药甘草汤的现代研究与临床应用[J].世界中医药,2018,13(05):1289-1294.
- [4] Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-1 β [J]. Mol Cell, 2002, 10(2):417-426.
- [5] 周建伟,王拥军,施杞.NLRP3炎症小体在骨关节炎中的作用及中医药干预研究进展[J].中国中药杂志,2020,45(20):4803-4809.
- [6] 张昊,李建民,刘建宇.细胞焦亡与骨关节炎软骨损伤的研究进展[J].中华骨科杂志,2022,42(12):795-802.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[S].北京:中国医药科技出版社,2020:108-109,246-247.
- [8] Franchi L, Núñez G. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics [J]. Nat Rev Immunol, 2020, 20(06):355-372.
- [9] 李艳艳,孙树椿,张军.芍药苷对骨关节炎软骨细胞NLRP3炎症小体及焦亡的影响[J].中国中西医结合杂志,2022,42(07):852-857.
- [10] Chen Y, Deng Y, Cui J, et al. Glycyrrhizic acid inhibits NLRP3 inflammasome activation and alleviates osteoarthritis in mice [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 278:114364.
- [11] 王辰龙,刘春龙,杨述华.软骨细胞焦亡的分子机制及在骨关节炎中的作用研究进展[J].中国矫形外科杂志,2020,28(18):1676-1680.
- [12] 谢建兴,黄永明,林定坤.中医药治疗骨关节炎的作用机制研究进展[J].中国中西医结合杂志,2019,39(09):1140-1144.
- [13] Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes [J]. Cell, 2010,

140 (06) : 821-832.

[14] 张丽, 李平, 王炎. 芍药甘草汤加减治疗膝关节骨关节炎的临床观察 [J]. 世界中医药, 2020, 15 (12) : 1802-1805.

[15] Xiao G, Huang H, Zhang L, et al. Shaoyao Ganc

Decoction protects against osteoarthritis by inhibiting chondrocyte apoptosis and matrix degradation via the PI3K/Akt pathway [J]. J Tradit Chin Med, 2022, 42 (03) :452-460.