【基础研究】

基于 TLR4/NF-κB 信号通路探讨绿原酸对膝骨关节炎大鼠软骨损伤的改善作用

郑雨玲[1]，梁 艳[1]，徐 丽[1]，张 上[2]，肖盈沅[3]，张国斌[3]*
（1. 中国人民解放军总医院医疗保障中心药剂科，北京 100141；2. 武警河南省总队医院外一骨科，河南郑州 450000；
3. 河南中医药大学药学院，河南郑州 450046）

摘要：目的 探讨绿原酸对膝骨关节炎（knee osteoarthritis，KOA）大鼠的软骨保护及其作用机制。**方法** 建立 KOA 大鼠模型，随机分为空白组、模型组、绿原酸高剂量组（20 mg/kg）及低剂量组（10 mg/kg）、阳性组（双醋瑞因 50 mg/kg）。比较各组膝关节功能及软骨病变程度，血清肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）-α、白介素（interleukin，IL）-1β 浓度，滑膜液基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinase，MMP）-13、解整合素金属肽酶（a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs，ADAMTS）-5 水平、软骨 Toll 样受体（toll-like receptor，TLR）4/ 核因子（nuclear factor，NF）-κB 信号通路相关因子的基因及蛋白表达。**结果** 与模型组比较，绿原酸膝关节 Lequesne MG 评分显著降低（$P < 0.05$），关节软骨病变 Mankin's 评分显著降低（$P < 0.01$），血清 TNF-α、IL-1β 浓度及滑膜液 MMP-13、ADAMTS-5 水平显著降低（$P < 0.01$），膝关节软骨 TLR4、MyD88、NF-κB p65 基因表达及 TLR4/β-actin、MyD88/β-actin、p-NF-κB p65/NF-κB p65 蛋白相对表达显著下调（$P < 0.01$）。绿原酸高剂量组整体改善幅度优于低剂量组，存在一定剂量相关趋势。**结论** 绿原酸可有效改善 KOA 大鼠的膝关节功能、保护关节软骨，可能与其抑制 TLR4/NF-κB 信号通路进而下调炎性因子及基质降解酶表达等环节有关。

关键词： 绿原酸；膝骨关节炎；软骨保护；Toll 样受体 4/ 核因子 -κB 信号通路
中图分类号： R-33 **文献标志码：** A **文章编号：** 1672-9188(2026)07-0718-008
引用： 郑雨玲, 梁艳, 徐丽, 等. 基于TLR4/NF-κB信号通路探讨绿原酸对膝骨关节炎大鼠软骨损伤的改善作用[J]. 世界临床药物, 2026, 47(7): 718-725. DOI：10.13683/j.wph.2026.07.003

Exploring the ameliorative effects of chlorogenic acid on cartilage damage in knee osteoarthritis rats based on the TLR4/NF-κB signaling pathway

ZHENG Yuling[1], LIANG Yan[1], XU Li[1], ZHANG Shang[2], XIAO Yingyuan[3], ZHANG Guobin[3]*
(*1. Department of Pharmacy, Medical Security Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100141;*
2. Department of Orthopedics, Arned Police Forces Hospital of Henan, Zhengzhou 450000, Henan Province, China;
3. College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan Province, China)

Abstract: ***Objective*** To explore the chondroprotective effect of chlorogenic acid on rats with knee osteoarthritis (KOA) and its underlying mechanism. ***Methods*** A KOA rat model was established and randomly divided into the blank group, the model group, the high-dose chlorogenic acid group (20 mg/kg), the low-dose chlorogenic acid group (10 mg/kg), and the positive control group (dipivefrin 50 mg/kg). The knee joint functions and the severity of cartilage lesions among different groups, the levels of serum tumor necrosis factor (TNF)-α, interleukin (IL)-1β, the

收稿日期：2026-01-13
作者简介：郑雨玲，药师，研究方向：医院药学。
通信作者：张国斌，副教授，研究方向：中药抗炎与免疫调节。
基金项目：河南省高校科技创新人才支持计划(15HASTIT041)

levels of matrix metalloproteinase（MMP）-13 in synovial fluid, disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs（ADAMTS）-5 in synovial fluid, and the gene and protein expressions of factors related to the cartilage Toll-like receptor（TLR）4/nuclear factor（NF）-κB signaling pathway were compared. ***Results*** Compared with the model group, the chlorogenic acid group showed a significantly reduced Lequesne MG score for knee joint function（$P<0.05$）, significantly lower Mankin's score for joint cartilage lesions（$P<0.01$）, significantly decreased serum TNF-α and IL-1β and the levels of MMP-13 and ADAMTS-5 in synovial fluid（$P<0.01$）, and significantly downregulated the gene expressions of TLR4, MyD88, and NF-κB p65 in knee joint cartilage and the relative expressions of TLR4/β-actin, MyD88/β-actin, and p-NF-κB p65/NF-κB p65 proteins（$P<0.01$）. The improvement in the high-dose chlorogenic acid group was better than that in the low-dose chlorogenic acid group, and there was a dose-dependent trend. ***Conclusion*** Chlorogenic acid can effectively improve the knee joint function and protect the articular cartilage of KOA rats, which may be related to its inhibition of the TLR4/NF-κB signaling pathway and thereby downregulating the expression of inflammatory factors and matrix-degrading enzymes.

Key words: chlorogenic acid; knee osteoarthritis; cartilage protection; Toll-like receptor 4/nuclear factor-κB signaling pathway

膝骨关节炎（knee osteoarthritis，KOA）是一种以软骨退化、骨质增生、滑膜炎症和正常关节功能丧失等为特征的退行性疾病[1]，现有治疗药物主要侧重缓解疼痛和炎性症状，同时存在长期使用会导致不良反应加重、经济成本较高以及患者难以耐受等问题；发掘安全有效且能延缓软骨退化及病程进展的新药依然是研究人员的重要课题[2]。绿原酸是金银花、杜仲、马齿苋、毛竹等药用植物的主要有效成分之一，抗炎作用强大，适于缓解慢性炎性疼痛[3]，可改善多种炎症性疾病包括关节炎的症状[4-5]。研究[6]发现，绿原酸用于 KOA 大鼠，可减轻膝关节症状、炎症反应及软骨细胞凋亡。在此基础上，本研究进一步观察绿原酸的软骨保护效果以及对 KOA 病程中 Toll 样受体（toll-like receptor，TLR）4/核因子（nuclear factor，NF）-κB 信号通路的调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料

50 只 SD 雄性大鼠，体质量 170 ～ 190 g，由赛业（固安）生物科技有限公司提供，生产许可证号：SCXK（冀）2021-003，使用许可证号：SYXK（豫）2024-0001。置于 12 h 明暗周期，22 ℃恒温的动物饲养室，食物和水供应充足，

绿原酸（纯度≥ 95%，C3878）、木瓜蛋白酶（P4762）、L- 半胱氨酸（cysteine，Cys，C5360），均购自美国默克公司产品。双醋瑞因胶囊（26023，50 mg/ 粒）购自阿根廷 TRB 药厂产品。甲醛固定液（DW2001）、乙二胺四乙酸脱钙液（DW2010）、苏木素 - 伊红（hematoxylin-eosin，HE）染色试剂盒（DW2148）均购自上海多沃生物科技有限公司产品。大鼠肿瘤坏死因子 α（tumor necrosis factor-α，TNF-α，ER1393）、白介素 1β（interleukin-1β，IL-1β，ER0124）、基质金属蛋白酶 13（matrix metalloproteinase 13，MMP-13，ER0303）、血小板反应蛋白解整合素金属肽酶（a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs，ADAMTS）-5 酶联免疫吸附法试剂盒（ER2158）均为武汉菲恩生物科技有限公司产品。Trizol 裂解液（T9108）、cDNA 逆转录试剂盒（RR047A）、荧光定量 PCR 试剂盒（RR036A），均为日本宝生物技术公司产品。TLR4、髓样分化因子（myeloid differentiation factor，MyD）88、NF-κB 亚单位 p65 及三磷酸甘油醛脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）引物由上海生工生物工程股份公司提供。蛋白浓度测定试剂盒（abs9232）、

放射免疫沉淀法裂解液（abs9229）、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗（abs20040），均为上海爱必信生物科技有限公司产品。TLR4（PA5-23124）、MyD88（PA5-19919）、NF-κB p65（PA5-35232）及磷酸化 NF-κB p65（p-NF-κB p65，PA5-37718）等一抗及内参 β-actin 免疫印迹法试剂盒（MA5-16410）均为美国赛默飞世尔科技公司产品。

G-26C 型高速冷冻离心机，德国赛多利斯公司产品。DM3000 型光学显微镜、EG1150 型石蜡包埋机、RM2125 RTS 型切片机，德国徕卡生物系统公司产品。SPECTROstar Nano 型酶联免疫检测仪，德国 BMG Labtech 公司产品。Scope-T10 型显微图像分析系统，杭州泽析生物科技有限公司产品。ABI QuantStudio 3 型实时荧光定量 PCR 仪、iBind Flex 型全自动蛋白质印迹仪均为美国赛默飞世尔科技公司产品。

1.2 KOA 模型的构建

先随机取 10 只 SD 大鼠作为空白组，其余 40 只采用木瓜蛋白酶关节腔内注射诱导 KOA 模型[7]。取 SD 大鼠，自造模第 1 周起，每隔 3 d 在其双侧膝关节腔内各注射 4% 木瓜蛋白酶与 0.03 mol/L L-Cys 等比例混合液 100 μL，持续 4 周。空白组大鼠关节腔内注射生理盐水。造模后，大鼠膝关节改良奎森功能障碍指数（Lequesne MG 评分）[8] ≥ 6 分，则视为模型构建成功。

1.3 分组和治疗

采用随机数字表法由第三方统计人员完成分组，过程盲法隐藏，避免选择偏倚。将成模大鼠分为模型组、绿原酸高剂量组（20 mg/kg）、绿原酸低剂量组（10 mg/kg）[6]、阳性组（双醋瑞因 50 mg/kg）[8]，每组各 10 只。各组按 10 mL/kg 灌胃给药，模型组和空白组给予等体积 0.5% 羧甲基纤维素钠，一日 1 次，持续 6 周。

1.4 观察指标

1.4.1 膝关节症状及功能评估

于给药前及给药 2、4、6 周，采用改良 Lequesne MG 评分法评估各组大鼠膝关节功能[9]，内容包括局部疼痛程度、膝关节肿胀度、关节受限及步态异常、主动活动频率和幅度等 4 项，每项按“无、轻度、中度、重度”分别计为“0、1、2、3”分，总分 12 分，评分越高，症状越重。

1.4.2 血清炎性因子及滑膜液基质降解酶水平

末次改良 Lequesne MG 评分完成后，将大鼠麻醉，左膝关节区域消毒，剪开皮肤、韧带，暴露膝关节腔，用生理盐水反复灌洗关节腔 2 ～ 3 次，收集滑膜液。随后打开腹腔，由腹主动脉采血，室温下静置 1 h，4 ℃下，离心 10 min，收集血清样本。行酶联免疫吸附试验，操作流程遵循试剂盒说明书，酶联免疫检测仪测定 450 nm 光密度值，根据标准曲线方程计算血清中 TNF-α、IL-1β 及滑膜液中 MMP-13、ADAMTS-5 浓度。

1.4.3 膝关节组织病理学

采集滑膜液与血清后将大鼠处死，取左膝关节软骨组织，经甲醛液固定，随后置于脱钙液中直至骨骼软化，行石蜡包埋，关节矢状面连续 5 μm 切片，HE 染色，中性树胶封片。光学显微镜下观察，选取包含“软骨 - 潮线 - 软骨下骨”连续结构、染色质量合格的代表性视野进行改良 Mankin's 评分[10]，由 2 名独立观察者盲法评估。

1.4.4 膝关节软骨 TLR4/NF-κB 通路相关基因表达

取各组大鼠右膝关节软骨组织，液氮速冻后，Trizol 法提取总 RNA，按试剂盒反应体系逆转录为 cDNA，−20 ℃保存。行实时荧光定量 PCR 扩增反应，分析获得目的基因 C_t 值，以 GAPDH 为内参基因进行表达校正，应用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算膝关节软骨组织中 TLR4 mRNA、MyD88 mRNA 及 NF-κB p65 mRNA 的相对表达水平。引物信息见表 1。

1.4.5 膝关节软骨 TLR4/NF-κB 通路相关蛋白表达

取液氮速冻的右膝关节软骨组织，经裂解液匀浆后收集上清液，定量总蛋白浓度。取蛋白样品，行凝胶电泳分离，转印至聚偏二氟乙烯膜，封闭孵育，加入 TLR4、MyD88、NF-κB p65 及 p-NF-

表 1 PCR 引物信息

Table 1 PCR primer information

基因名称	引物序列	产物长度/bp
TLR4	正向：5'-GAGCTCTTCCACCTGTCTGG-3'	122
	反向：5'-AAGGTGGTCCAGGAACTGTG-3'	
MyD88	正向：5'-AGGAAGGCAGAGGAAGGAAG-3'	187
	反向：5'-AAAGCCATGGAAAACACAGG-3'	
NF-κB p65	正向：5'-GGAAGAGAGCTGGGAGGAGT-3'	174
	反向：5'-CGGCTGCTAGCTTTGGTATC-3'	
GAPDH	正向：5'-GGTGTGAGAGGAGCAGGAAG-3'	201
	反向：5'-TAGCCCAGTCTCTGCCATCT-3'	

κB p65 等一抗稀释液（1 ∶ 1 000），4 ℃过夜后，加入二抗稀释液（1 ∶ 5 000）孵育，通过增强化学发光试剂对蛋白条带进行显影。以 β-actin 为内参，Image J 软件分析灰度值并计算蛋白表达水平。

1.5 统计学方法

数据导入 SPSS22.0 软件处理，计量资料均符合正态分布，以（$\bar{x}\pm s$）表示，炎性因子及基质降解酶水平、关节软骨蛋白及基因表达等多组比较采用单因素方差分析，膝关节 Lequesne MG 评分等多个时间点比较采用重复测量方差分析，两两比较行 Bonferroni 检验。多组间两两比较时，调整检验水准，以 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Lequesne MG 评分

造模第 2 周，大鼠开始出现膝关节压痛、红肿，主动活动频率和幅度减少，并有跛行等步态异常；模型组 Lequesne MG 评分随时间下降较为平缓，各给药组 Lequesne MG 评分则随时间下降较为明显。经 Mauchly 球形性检验（$\chi^2 = 9.474$，$P = 0.092$），满足球形性假设；经整体分析存在时间效应（$F = 35.000$，$P < 0.001$）、组间效应（$F = 585.400$，$P < 0.001$）及交互效应（$F = 4.408$，$P < 0.001$）；经两两比较，绿原酸高剂量组 Lequesne MG 评分在给药 2、4、6 周时均显著低于模型组（$P < 0.05$），低剂量组在给药 4、6 周时均显著低于模型组（$P < 0.05$）；给药 6 周时，绿原酸高剂量组评分显著低于低剂量组（$P < 0.05$）。见表 2。

2.2 各组膝关节组织病理学的影响

HE 染色结果显示，模型组膝关节可见软骨表层不平整、软骨细胞排列紊乱、滑膜下巨噬细胞空泡样改变等病理现象；绿原酸高、低剂量组可在不同程度上减轻关节软骨上述病变，Mankin's 评分较模型组均显著降低（$P < 0.01$）；绿原酸高剂量组 Mankin's 评分显著低于低剂量组（$P < 0.01$）。见图 1、表 3。

2.3 各组炎性因子水平的影响

与空白组比较，模型组血清 TNF-α、IL-1β 水平均明显增高（$P < 0.01$）。绿原酸高、低剂量组血清 TNF-α、IL-1β 水平较模型组均有显著降低（$P < 0.01$）。见表 4。

表 2 各组膝关节 Lequesne MG 评分比较（$\bar{x}\pm s$，单位：分）

Table 2 Comparison of Lequesne MG scores for knee joints in each group ($\bar{x}\pm s$, unit: point)

组别	Lequesne MG评分			
	给药前	给药2周	给药4周	给药6周
空白组（n=10）	0±0	0±0	0±0	0±0
模型组（n=10）	10.20±1.32**	10.00±1.15**	9.60±1.43**	9.20±1.03**
绿原酸高剂量组（n=10）	10.40±0.84	8.90±1.10$^{\#}$	7.40±1.43$^{\#\#}$	6.50±1.08$^{\#\#\triangle}$
绿原酸低剂量组（n=10）	9.80±1.75	9.10±1.20	8.30±1.06$^{\#}$	7.60±0.97$^{\#\#}$
阳性组（n=10）	10.00±1.33	9.30±1.49	7.70±1.25$^{\#\#}$	6.40±0.97$^{\#\#\triangle}$

注：与空白组比较，**P<0.01；与模型组比较，$^{\#}P$<0.05，$^{\#\#}P$<0.01；与绿原酸低剂量组比较，$^{\triangle}P$<0.05。

Note: vs. blank group, **P<0.01; vs. model group, $^{\#}P$<0.05, $^{\#\#}P$<0.01; vs. low-dose chlorogenic acid group, $^{\triangle}P$<0.05.

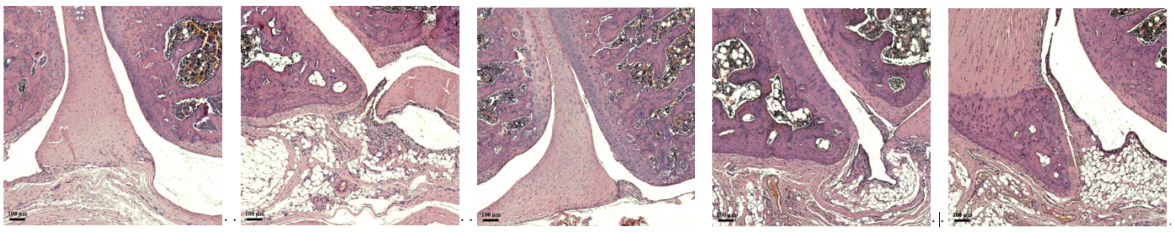


图 1 各组膝关节 HE 染色图

Figure 1 HE staining images of knee joints in each group

表 3 各组膝关节 Mankin's 评分比较（$\bar{x}\pm s$，单位：分）

Table 3 Comparison of Mankin's scores for knee joints in each group ($\bar{x}\pm s$, unit: point)

组别	Mankin's评分
空白组（n=10）	0±0
模型组（n=10）	11.85±1.27**
绿原酸高剂量组（n=10）	$7.95\pm0.96^{\#\#\Delta\Delta}$
绿原酸低剂量组（n=10）	$9.60\pm1.10^{\#\#}$
阳性组（n=10）	$8.25\pm1.46^{\#\#\Delta}$

注：与空白组比较，**P<0.01；与模型组比较，$^{\#}P$<0.05，$^{\#\#}P$<0.01；与绿原酸低剂量组比较，$^{\Delta}P$<0.05。

Note: vs. blank group, **P<0.01; vs. model group, $^{\#}P$<0.05, $^{\#\#}P$<0.01; vs. low-dose chlorogenic acid group, $^{\Delta}P$<0.05.

表 4 各组血清炎性因子水平比较（$\bar{x}\pm s$，单位：pg/mL）

Table 4 Comparison of serum inflammatory factor levels in each group ($\bar{x}\pm s$, unit: pg/mL)

组别	TNF-α	IL-1β
空白组（n=10）	48.43±7.56	17.87±4.04
模型组（n=10）	161.20±16.99**	82.59±11.10**
绿原酸高剂量组（n=10）	$103.81\pm11.87^{\#\#\Delta\Delta}$	$58.51\pm8.38^{\#\#\Delta}$
绿原酸低剂量组（n=10）	$127.97\pm15.14^{\#\#}$	$67.62\pm10.30^{\#\#}$
阳性组（n=10）	$110.76\pm14.30^{\#\#\Delta}$	$51.12\pm8.98^{\#\#\Delta\Delta}$

注：与空白组比较，**P<0.01；与模型组比较，$^{\#}P$<0.05，$^{\#\#}P$<0.01；与绿原酸低剂量组比较，$^{\Delta}P$<0.05。

Note: vs. blank group, **P<0.01; vs. model group, $^{\#}P$<0.05, $^{\#\#}P$<0.01; vs. low-dose chlorogenic acid group, $^{\Delta}P$<0.05.

2.4 各组滑膜液基质降解酶水平的影响

与空白组比较，模型组 KOA 大鼠滑膜液 MMP-13、ADAMTS-5 水平均明显增高（P < 0.01）。绿原酸高、低剂量组滑膜液 MMP-13、ADAMTS-5 水平较模型组均显著降低（P < 0.01）；高剂量组 MMP-13 水平显著低于低剂量组（P < 0.05）。见表 5。

表 5 各组滑膜液基质降解酶水平比较（$\bar{x}\pm s$，单位：pg/mL）

Table 5 Comparison of the levels of synovial fluid matrix degrading enzymes in each group ($\bar{x}\pm s$, unit: pg/mL)

组别	MMP-13	ADAMTS-5
空白组（n=10）	95.47±10.25	30.28±5.20
模型组（n=10）	201.42±29.37**	89.87±10.97**
绿原酸高剂量组（n=10）	$149.19\pm14.25^{\#\#}$	$65.30\pm10.85^{\#\#}$
绿原酸低剂量组（n=10）	$168.63\pm21.03^{\#\#\Delta}$	$73.10\pm12.25^{\#\#}$
阳性组（n=10）	$167.32\pm22.02^{\#\#\Delta}$	$74.25\pm10.60^{\#\#}$

注：与空白组比较，**P<0.01；与模型组比较，$^{\#\#}P$<0.01；与绿原酸高剂量组比较，$^{\Delta}P$<0.05。

Note: vs. blank group, **P<0.01; vs. model group, $^{\#\#}P$<0.01; vs. high-dose chlorogenic acid group, $^{\Delta}P$<0.05.

2.5 各组 TLR4/NF-κB 通路相关基因表达的影响

与空白组比较，模型组 TLR4、MyD88 及 NF-κB mRNA 表达均明显上调（P < 0.01）。绿原酸高、低剂量组较模型组均显著下调（P < 0.01）。见表 6。

2.6 各组 TLR4/NF-κB 通路相关蛋白表达的影响

与空白组比较，模型组 TLR4/β-actin、MyD88/β-actin、p-NF-κB p65/NF-κB p65 蛋白相对表达量均显著上调（P < 0.01）。绿原酸高、低剂量组 TLR4/β-actin、MyD88/β-actin、p-NF-κB p65/NF-κB p65 表达较模型组均显著下调（P < 0.01）。见图 2、表 7。

表 6 各组 TLR4/NF-κB 通路相关基因表达比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Table 6 Comparison of gene expressions related to the TLR4/NF-κB pathway in each group（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	TLR4 mRNA	MyD88 mRNA	NF-κB p65 mRNA
空白组	1.00±0.03	0.99±0.05	1.00±0.05
模型组	3.92±0.39**	3.45±0.44**	2.80±0.32**
绿原酸高剂量组	2.90±0.21$^{\#\#\Delta}$	2.54±0.22$^{\#\#\Delta\&}$	2.15±0.16$^{\#\#\Delta}$
绿原酸低剂量组	3.11±0.25$^{\#\#}$	2.83±0.30$^{\#\#}$	2.36±0.23$^{\#\#}$
阳性组	3.14±0.32$^{\#\#}$	2.82±0.34$^{\#\#}$	2.07±0.34$^{\#\#\Delta}$

注：与空白组比较，**$P<0.01$；与模型组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；与绿原酸低剂量组比较，$^{\Delta}P<0.05$；与阳性组比较，$^{\&}P<0.05$。

Note: vs. blank group, **$P<0.01$; vs. model group, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$; vs. low-dose chlorogenic acid group, $^{\Delta}P<0.05$, vs. positive group, $^{\&}P<0.05$.

3 讨论

研究发现，KOA 病变过程与免疫炎症级联反应、软骨基质合成 / 代谢失衡等多种因素相关[11]。木瓜蛋白酶属于水解酶类，通过特异性降解关节软骨基质成分，触发滑膜组织的炎症反应，能较好的模拟 KOA 发生发展中的炎症、疼痛、软骨退变及关节损伤等病理状态[12]。本研究采用连续 4 周膝关节腔内注射 4% 木瓜蛋白酶的方式构建 KOA 模型，结果显示造模大鼠在注射第 2 周开始出现膝关节压痛、红肿，主动活动频率和幅度减少，并有跛行等步态异常，模型组 Lequesne MG 评分在试验期间保持较

表 7 各组 TLR4/NF-κB 通路蛋白表达比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Table 7 Comparison of TLR4/NF-κB pathway protein expressions in each group（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	TLR4/β-actin	MyD88/β-actin	p-NF-κB p65/NF-κB p65
空白组	0.28±0.03	0.19±0.02	0.17±0.03
模型组	1.24±0.13**	1.39±0.18**	0.94±0.10**
绿原酸高剂量组	0.54±0.09$^{\#\#\Delta\Delta\&}$	0.82±0.09$^{\#\#\Delta}$	0.61±0.07$^{\#\#\Delta}$
绿原酸低剂量组	0.69±0.11$^{\#\#}$	0.94±0.14$^{\#\#}$	0.70±0.09$^{\#\#}$
阳性组	0.72±0.15$^{\#\#}$	0.91±0.13$^{\#\#}$	0.59±0.08$^{\#\#\Delta}$

注：与空白组比较，**$P<0.01$；与模型组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；与绿原酸低剂量组比较，$^{\Delta}P<0.05$；与阳性组比较，$^{\&}P<0.05$。

Note: vs. blank group, **$P<0.01$; vs. model group, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$; vs. low-dose chlorogenic acid group, $^{\Delta}P<0.05$, vs. positive group, $^{\&}P<0.05$.

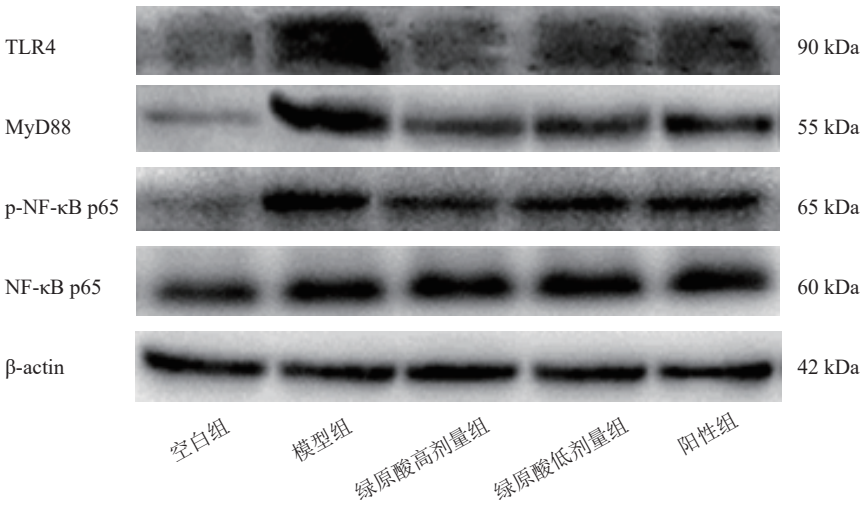


图 2 各组 TLR4、MyD88、p-NF-κB p65 以及 NF-κB p65 蛋白表达比较

Figure 2 Comparison of protein expressions of TLR4, MyD88, p-NF-κB p65 and NF-κB p65 in each group

高水平，结合病理组织学及 Mankin's 评分，说明该造模方式与人类 KOA 疾病特征较为契合。

持续性慢性炎症及软骨代谢失衡是 KOA 的主要病理学特征。炎性因子 TNF-α、IL-1β 等在 KOA 中扮演的角色已广受认可，这些因子的高表达不仅可促进炎性细胞在关节软骨组织的浸润、参与炎症级联反应，还可驱动软骨细胞释放包括 MMP-13、ADAMTS-5 在内的基质降解酶 [13-14]。MMP-13 与 ADAMTS-5 主要降解软骨细胞外基质中的 II 型胶原、聚蛋白聚糖等成分，二者的过表达是造成基质合成 / 代谢失衡、软骨结构进行性破坏的重要原因；临床研究 [15-16] 表明，KOA 患者体内 MMP-13、ADAMTS-5 表达较健康人群显著上调，且与病情严重程度呈正相关。当前针对性拮抗 TNF-α、IL-1β、MMP-13 或 ADAMTS-5 等作用靶点的 KOA 治疗药物或处于研发阶段、或已应用于临床 [17-18]，但在兼顾安全性、保护膝关节功能、延缓软骨损伤等方面仍不够理想。本研究结果显示，KOA 大鼠血清 TNF-α、IL-1β 及滑膜液 MMP-13、ADAMTS-5 水平均明显增高，提示这些炎性因子及基质降解酶相互促进、共同参与 KOA 病理进程；绿原酸可明显改善关节软骨组织学病变、Mankin's 评分、膝关节症状及 Lequesne MG 评分，显著降低 KOA 大鼠血清 TNF-α、IL-1β 及滑膜液 MMP-13、ADAMTS-5 表达，提示多靶点、多环节的作用可能是绿原酸抑制 KOA 发生与进展的重要策略。

介导免疫炎症反应的经典 TLR4/NF-κB 信号通路在 KOA 病变进程中亦发挥关键作用。TLR4 是一种天然免疫受体，与相应配体结合、活化后可通过 MyD88 依赖性途径，引起下游 NF-κB 信号的级联激活，促使 NF-κB 磷酸化并移位至细胞核，进而上调炎性因子及基质降解酶等多种基因的转录 [19-20]。临床研究 [21-22] 证实，抑制 TLR4/NF-κB 信号通路的治疗可有效缓解 KOA 患者的炎症和胀痛症状，改善预后。本研究中，模型组大鼠膝关节软骨 TLR4、MyD88 及 NF-κB 基因表达及 TLR4/β-actin、MyD88/β-actin、p-NF-κB p65/NF-κB p65 蛋白相对表达量均明显上调，说明 TLR4/NF-κB 信号通路处于活化状态，参与 KOA 疾病进程；绿原酸可显著下调膝关节软骨 TLR4、MyD88 及 NF-κB 相关基因及蛋白表达，提示绿原酸可能通过抑制 TLR4/NF-κB 信号通路的活化，一方面下调炎性因子表达和缓解膝关节炎症反应，另一方面下调基质降解酶表达、纠正软骨基质合成 / 降解的失衡现象，实现保护软骨的目的。既往研究 [23-25] 亦表明，绿原酸抗炎镇痛效果突出，可改善多种炎症性疾病的症状，与其抑制 TLR4/NF-κB 信号通路相关。

4 结论

总之，绿原酸用于试验性 KOA 模型，可改善大鼠膝关节功能、减轻炎症反应、保护关节软骨，可能与其抑制 TLR4/NF-κB 信号通路进而下调炎性因子及基质降解酶等表达相关。

参考文献：

[1] Jansen M P, Turmezei T D, Dattani K, *et al*. Cartilage thickness distribution and its dependence on demographic, radiographic, and MRI structural pathology in knee osteoarthritis-data from the IMI-APPROACH cohort[J]. Skeletal Radiol, 2025, 54(10): 2025-2034.

[2] Zhang Y, Ji Q. Current advances of photobiomodulation therapy in treating knee osteoarthritis[J]. Front Cell Dev Biol, 2023, 11: 1286025.

[3] 李银霞, 高敏, 白雪, 等. 绿原酸通过抑制AMPA受体的突触表达缓解慢性炎性疼痛[J]. 中国药理学通报, 2021, 37(9): 1251-1256.

[4] 凌鑫萍, 晏伟, 杨芬, 等. 绿原酸改善炎症性疾病的研究进展[J]. 中南大学学报(医学版), 2023, 48(10): 1611-1620.

[5] 刘杨, 段学清, 严福林, 等. 异绿原酸A抑制NLRP3炎性复合体/NF-κB活化减轻胶原诱导型关节炎大鼠炎症反应[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(10): 1415-1419.

[6] 杜星男, 田宝忠. 绿原酸对膝骨关节炎大鼠软骨细胞炎性凋亡及免疫反应的影响[J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(11): 2785-2789.

[7] 王明建, 巨少华, 刘攀旺, 等. 木瓜蛋白酶、碘乙酸钠和Ⅱ型胶原蛋白酶致膝骨关节炎大鼠模型的对比研究[J]. 四川医学, 2020, 41(2): 126-131.

[8] 徐懿, 冼乐瑶, 林煜翔, 等. 调和阴阳针刀对膝骨关节炎大鼠关节功能及下肢力学的改善作用[J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(7): 1010-1020.

[9] Abdel-Aziz M A, Ahmed H M S, El-Nekeety A A, *et al*. Biosynthesis of gold nanoparticles for the treatment of osteoarthritis alone or in combination with Diacerein in a rat model[J]. Inflammopharmacology, 2021, 29(3): 705-719.

[10] Asjid R, Faisal T, Qamar K, *et al*. Effect of platelet-rich plasma on Mankin scoring in chemically-induced animal model of osteoarthritis[J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2019, 29(11): 1067-1071.

[11] 李会东, 杨学钰, 郭文帆, 等. 汉黄芩素调节炎症通路对膝骨关节炎大鼠炎性损伤的影响[J]. 世界临床药物, 2023, 44(6): 552-560.

[12] Molinet M, Alves N, Vasconcelos A, *et al*. Comparative study of osteoarthritis induced by monoiodoacetate and papain in rabbit temporomandibular joints: macroscopic and microscopic analysis[J]. Folia Morphol(Warsz), 2020, 79(3): 516-527.

[13] He Z, Nie P, Lu J, *et al*. Less mechanical loading attenuates osteoarthritis by reducing cartilage degeneration, subchondral bone remodelling, secondary inflammation, and activation of NLRP3 inflammasome[J]. Bone Joint Res, 2020, 9(10): 731-741.

[14] 汪敏杰, 王晓赟, 熊梦婷, 等. 通络祛痛膏治疗膝骨关节炎效果研究[J]. 世界临床药物, 2024, 45(11): 1149-1154.

[15] Milaras C, Lepetsos P, Pampanos A, *et al*. The association of *MMP-2*, *MMP-9*, and *MMP-13* gene polymorphisms with knee osteoarthritis in the Greek population[J]. Cureus, 2024, 16(7): e65379.

[16] Gao S, Jia M, Wang J, *et al*. Association of *ADAMTS-5* gene polymorphisms with the susceptibility to knee osteoarthritis in a Chinese Han population[J]. J Orthop Surg Res, 2024, 19(1): 513.

[17] Bendele A M, Neelagiri M, Neelagiri V, *et al*. Development of a selective matrix metalloproteinase 13(MMP-13) inhibitor for the treatment of Osteoarthritis[J]. Eur J Med Chem, 2021, 224: 113666.

[18] Schnitzer T, Pueyo M, Deckx H, *et al*. Evaluation of S201086/GLPG1972, an ADAMTS-5 inhibitor, for the treatment of knee osteoarthritis in ROCCELLA: a phase 2 randomized clinical trial[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2023, 31(7): 985-994.

[19] 张栋, 王庆甫, 张晓哲, 等. β-catenin与NF-κB信号通路在膝骨关节炎滑膜炎症中的表达特点及意义[J]. 中国骨伤, 2019, 32(8): 721-726.

[20] 王学宗, 丁道芳, 薛艳, 等. TLR4/NF-κB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.

[21] 陆海红, 孟庆芳, 冷珊珊, 等. 电针联合康复运动训练对膝骨关节炎患者血液流变学和TLR4/MyD88/NF-κB信号通路的影响[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2023, 15(11): 1855-1858.

[22] 薛英, 田永祥, 刘峰瑞, 等. 独活寄生汤对老年膝骨关节炎血清TLR4/NF-κB信号通路的影响[J]. 中华中医药学刊, 2025, 43(4): 201-205.

[23] 王柏森. 绿原酸通过抑制TLR4/MAPK/NF-κB通路激活自噬抑制炎症和氧化应激[D]. 长春: 吉林大学学位论文, 2021.

[24] 张文静, 徐新禹. 基于TLR4/NF-κB信号通路探讨绿原酸对糖尿病肾病大鼠肾组织炎症和凋亡的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2022, 31(19): 2629-2635.

[25] 王金鑫, 饶春晖, 代波, 等. 绿原酸通过TLR4/NF-κB信号通路调控脓毒症大鼠肠上皮细胞屏障功能的研究[J]. 中华全科医学, 2023, 21(3): 405-408.

(编辑：沈佳婕)