DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.03.019

基于 Wnt/β-catenin 通路探究补肾壮骨方含药血清对 IL-1β 诱导软骨细胞退变的保护作用

张辽,傅科上,史燕红,金甬,吴权
(浙江中医药大学附属宁波市中医院,浙江 宁波 315000)

摘要:目的 探究补肾壮骨方对大鼠软骨细胞退变的保护作用及其作用机制。方法 分离大鼠原代软骨细胞并给予不同浓度白细胞介素-1β(IL-1β)刺激,探索 IL-1β 诱导骨关节炎(OA)细胞模型的最佳浓度,同时制备高中低浓度梯度的补肾壮骨方含药血清或盐酸氨基葡萄糖胶囊血清,作为细胞干预手段。检测软骨退化相关蛋白以及 Wnt/β-catenin 信号通路相关蛋白的 mRNA 及蛋白质表达,并使用透射电镜评价细胞超微结构变化。结果 经过 IL-1β 刺激后,软骨细胞的软骨退化相关蛋白以及 Wnt/β-catenin 通路相关蛋白表达明显异常,超微结构也可观察到细胞严重损伤。而补肾壮骨方通过抑制 Wnt/β-catenin 信号通路的激活,改善降低 IL-1β 诱导的炎症因子和基质金属蛋白酶(MMP)的表达,并促进了 Collagen Ⅱ和 Aggrecan 的表达,从而保护软骨细胞。结论 补肾壮骨方含药血清能够通过抑制 Wnt/β-catenin 通路减少退变相关蛋白的异常表达,从而发挥保护作用。

关键词:补肾壮骨方;Wnt/β-catenin 信号通路;骨关节炎;软骨细胞
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2026)03-0099-08

Investigating Protective Effect of Serum Containing Bushen Zhuanggu Prescription(补肾壮骨方) on IL-1β-Induced Chondrocyte Degeneration via Wnt/β-catenin Pathway

ZHANG Liao, FU Keshang, SHI Yanhong, JIN Yong, WU Quan
(Ningbo Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine,
Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Ningbo 315000, Zhejiang, China)

Abstract: *Objective* To explore the protective effect of Bushen Zhuanggu Prescription(补肾壮骨方) on chondrocyte degeneration in rats and its mechanism of action. *Methods* Primary chondrocytes from rats were isolated and stimulated with various concentrations of interleukin-1β(IL-1β) to identify the optimal concentration for inducing an osteoarthritis(OA) cell model. Concurrently, the serum containing Bushen Zhuanggu Formula at high, medium and low concentration gradients, or serum containing hydrochloric aminoglucose capsules, was prepared as a cellular intervention. The expressions of mRNA and proteins related to cartilage degeneration and the Wnt/β-catenin signaling pathway were measured, and the transmission electron microscopy was used to evaluate the changes in cellular ultrastructure. *Results* After stimulation with IL-1β, the expressions of proteins related to cartilage degeneration and the Wnt/β-catenin pathway in chondrocytes was significantly abnormal, and the severe cellular damage was observed under ultrastructural examination. However, Bushen Zhuanggu Formula, by inhibiting the activation of the Wnt/β-catenin signaling pathway, reduced the expressions of inflammatory factors and MMPs induced by IL-1β and promoted the expressions of Collagen Ⅱ and Aggrecan, thereby protecting the chondrocytes. *Conclusion* Serum containing Bushen Zhuanggu Formula can reduce the abnormal expression of degeneration-related proteins by inhibiting the Wnt/β-catenin pathway, thus exerting a protective effect.

Keywords: Bushen Zhuanggu Formula(补肾壮骨方); Wnt/β-catenin signaling pathway; osteoarthritis; chondrocytes

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种以关节软骨退行性变和继发骨质增生为特征的慢性退行性和致残性疾病[1]。软骨细胞是关节软骨当中唯一的细胞类型[2],对于 OA 的发生发展至关重要。因此,探索延缓关节软骨细胞退变的有效策略是预防或治疗 OA 的关键所在[3]。目前研究发现,Wnt/β-catenin 信号通路异常激活导致软骨细胞凋亡[4-5],并通过加速软骨细胞外基质(extracellular matrix, ECM)降解导致软骨细胞退化[6],从而导致 OA 进程加速。中医在治疗 OA 中具有独特的优势,采用"补益肝肾"法理论治疗往往能取得良好的效果。本课题组在前期针对专家叶海主任中医师的补肾壮骨方进行一系列研究[7],补肾壮骨汤能有效改善膝骨关节炎患者的各类临床症状以及骨生物学指标[8],在动物研究中也发现该方

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(82104885);国家中医药管理局全国名老中医药专家传承工作室建设项目(国中医药人教发〔2016〕42号);国家中医药管理局科技司-浙江省中医药管理局共建科技计划项目(重大项目)(GZY-ZJ-KJ-23037);浙江省中医药科技计划项目(2024ZL144, 2018ZB119);宁波市医学重点学科建设计划项目(2022-Z09);宁波市卫生健康青年技术骨干人才培养专项(甬卫发〔2020〕95号);宁波市名中医药专家学术经验继承项目(甬卫办中医〔2020〕150号);宁波市自然科学基金项目(2021J300)
作者简介:张辽(1985-),男,浙江宁波人,副主任中医师,硕士,研究方向:骨与关节疾病的基础与临床。

能够有效维持实验OA模型大鼠软骨稳态。但是目前尚不清楚补肾壮骨汤具体作用的细胞类型以及其作用机制。故本研究拟探讨补肾壮骨方含药血清通过Wnt/β-catenin通路对软骨细胞的调控保护作用,进一步阐明补肾壮骨方治疗OA的作用机制,为中医药治疗OA提供实验依据。

1 实验材料

1.1 实验药品

补肾壮骨方药物组成:熟地黄20 g,山药15 g,茯苓15 g,牛膝15 g,桑寄生15 g,仙茅15 g,山茱萸10 g,延胡索10 g,制川乌(先煎)6 g,炒甘草5 g。中药材均购自本单位中药房,中药液的制备由本单位制剂室协助进行。具体做法:生药先在砂锅中加入适量水浸泡30 min,武火煎煮至沸腾,文火浓缩。参照《人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值表》,按照质量比例,低剂量将水煎液浓缩成每毫升含生药0.661 5 g的浓缩液,中剂量将水煎液浓缩成每毫升含生药1.323 g的浓缩液,高剂量将水煎液浓缩成每毫升含生药2.646 g的浓缩液,置于冰箱保存,用时取定量浓缩液。

盐酸氨基葡萄糖溶液(0.24 g/粒)。生产厂家:北京康必得药业有限公司,批号H20070173。

1.2 实验试剂及仪器

Wnt5a、β-catenin、MMP-13抗体、β-actin抗体、蛋白聚糖酶-5(A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs, ADAMTS-5)、Ⅱ型胶原(Collagen Ⅱ)、聚集蛋白聚糖(Aggrecan)、轴蛋白(Axin)、糖原合酶激酶3β(GSK-3β)、白细胞介素1β(IL-1β)购自美国CST公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自美国ThermoFisher公司;多功能酶标仪(型号BioTek-26262059,美国BioTek伯腾有限公司);荧光倒置显微镜(型号IX70,日本太阳交易株式会社);化学发光系统(型号ChemiDocXRS,美国Bio-Rad公司)。引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。具体序列见表1。

表1 引物序列

基因	引物序列
Wnt5a	F:5′-AGCTACCCGATCTGGTGGTC-3′
	R:5′-CAAACTCGATGTCCTCGCTAC-3′
β-catenin	F:5′-CTTCCAGACACGCCATCATG-3′
	R:5′-CACACAGAGTACTTGCGCTC-3′
MMP-13	F:5′-CATGAGCTTGGCCACTCCCT-3′
	R:5′-TGAACGTCATCATCTGGGAGCA-3′
ADAMTS-5	F:5′-AGGGCACTGGCTATTACG-3′
	R:5′-GTTCTCACGCACCTTCCT-3′
Collagen Ⅱ	F:5′-GGCTTCCAAGTGCCAGTAGG-3′
	R:5′-TGGAGAGGAGAGTGCAGTCA-3′
Aggrecan	F:5′-AGGTGTCGCTCCCCAACTAT-3′
	R:5′-CTTCACAGCGGTAGATCCCAG-3′
Axin	F:5′-GTAGACGGTACAACGAAGGCA-3′
	R:5′-AGCCAGAGTTGACGTAGTAGG-3′
GSK-3β	F:5′-GTCCGACTGCGGTATTTCTTC-3′
	R:5′-CTCGATGGCAGATTCCAAAGG-3′
IL-1β	F:5′-TTCAGGCAGGCAGTATCACTC-3′
	R:5′-GAAGGTCCACGGGAAAGACAC-3′
β-actin	F:5′-TCTTCCAGCCTTCCTTCCTG-3′
	R:5′-CACACGAGTACTTGCGCTC-3′

2 实验方法

2.1 大鼠原代软骨细胞分离培养

使用8只2月龄雄性SD大鼠用于分离获取大鼠原代软骨细胞。动物饲养于南京中医药大学SPF级动物房,(20±2)℃,相对湿度60%~80%,明暗各12 h。动物伦理号:202204A008,动物生产许可证号:SCXK(苏)(沪)2022-0005。取材前使用2%异氟烷腹腔麻醉,在无菌条件下分离出双膝关节的软骨,分离时尽量保证关节囊完整。于超净台内使用PBS冲洗后将软骨组织剪成大小1 mm^3左右,置于15 mL离心管中使用2.0 mg/mL Ⅱ型胶原酶37 ℃消化3~4 h,每隔30 min颠倒混匀一次。消化结束后用200目细胞筛过滤上清,随后离心弃上清收集细胞。10% FBS DMEM培养液(含维生素C 50 mg/L,链霉素100 μg/mL和青霉素100 U/mL)重悬细胞沉淀,调整细胞悬液浓度为3×10^5/mL,于37 ℃,5% CO_2的细胞孵箱中培养。每2~3 d换液细胞长至80%后使用0.25%胰酶消化传代一次后可用于实验。

2.2 含药血清制备

36只雄性SD大鼠均购自邳州市东方养殖有限公司,动物许可证号:SCXK(苏)2022-0005,质量检测单位:苏州西山生物技术有限公司,大鼠均为SPF级,体质量180~220 g,统一饲养于南京中医药大学动物房内,温度20~24 ℃、相对湿度60%~80%,光照12 h/12 h循环交替,自由饮水,固定饮食,让大鼠适应性饲养7 d。本实验经南京中医药大学实验动物伦理委员会批准通过,伦理批号202204A008。36只大鼠随机分为6个组:阳性药物对照组用盐酸氨基葡萄糖溶液(0.24 g/粒)配成浓度为7.56 mg/mL。空白组灌服相应体积的0.9%氯化钠溶液。每日根据补骨壮骨方低剂量组(0.661 5 g/mL)、补骨壮骨方中剂量组(1.323 g/mL)、补骨壮骨方高剂量组(2.646 g/mL)、阳性对照组(7.56 mg/mL),根据实际体质量折算灌胃量。给药时间为8周。在末次灌胃1 h后,以2%异氟烷麻醉腹腔麻醉,腹主动脉采血,37 ℃水浴30 min,3000 r/min离心15 min,取上清,灭活56 ℃水浴30 min,0.22 μm滤膜抽滤除菌,制备含药血清,-80 ℃保存。

2.3 IL-1β诱导建立OA细胞模型

将软骨细胞以2.0×10^4个/孔的密度接种于96孔板中,待细胞贴壁后,分别加入不同浓度的IL-1β(0、1、5、10、20 μg/mL),每孔的终体积为100 μL,每个浓度均设6个复孔,进行24 h的处理。处理结束后,在每孔中加入10 μL的CCK-8试剂,然后在CO_2培养箱中避光孵育2 h。之后取出96孔板,使用酶标仪在450 nm波长处测定每孔的吸光度(A)。根据所测得的吸光度A值,计算软骨细胞存活率,取半数致死量的质量浓度为IL-1β的最佳刺激浓度。

2.4 补肾壮骨方含药血清干预OA细胞实验分组

最佳浓度IL-1β诱导建立OA细胞模型,将各组含药血清加入软骨细胞培养液中,分为空白组(0.9%氯化钠溶液血清)、模型组(IL-1β+0.9%氯化钠溶液血清)、阳性药物对照组(IL-1β+盐酸氨基葡萄糖胶囊血清)、补肾壮骨方高浓度组(IL-1β+补肾壮骨方高剂量血清)、补肾壮骨方中浓度组(IL-1β+补肾壮骨方中剂量血清)、补肾壮骨方低浓度组(IL-1β+补肾壮骨方低剂量血清),干预24 h。

2.5 指标检测

2.5.1 透射电镜观察 离心收集细胞(半颗绿豆大小),2.5%戊二醛固定6 h后,依次使用乙醇、丙酮、树脂脱水置换固化制块后,超薄切片机切片70 nm,并使用3%醋酸铀-枸橼酸铅双染色,随后于电镜下观察。

2.5.2 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测 加入Trizol试剂裂解,加入200 μL氯仿混匀,静置5 min后,4 ℃、12 000 r/min,离心15 min;收集上清,加入400 μL异丙酚混匀,静置10

min 再次离心,用分光光度计测定 RNA 浓度。根据逆转录试剂盒说明书将总 RNA 反转录为 cDNA。引物序列见表 2,将各引物瞬时离心,加入去离子水制成 100 μmol/L 的贮存液,后稀释溶液终浓度为 20 μmol/L。PCR 反应条件:95 ℃预变性 2 min;95 ℃1 5 s,60 ℃ 30 s,40 次循环。采用 $2-^{\triangle\triangle Ct}$ 法分析相关表达量。

2.5.3 蛋白质印迹(Westernblot)分析 采用 Western blot 检测软骨细胞 IL-1β、Wnt5α、β-catenin、GSK-3β、Axin、MMP13、ADAMTS5、Collagen Ⅱ、Aggrecan mRNA 与蛋白表达的变化。采用 BCA 法测定总蛋白浓度。取 50 μg 蛋白样品于沸水中,煮沸变性后用 SDS-PAGE 胶分离,转移分离后的蛋白于 PVDF 膜上。加入 5% 脱脂牛奶封闭 1 h;TBST 溶液清洗后,按照 1∶500 比例一抗,并在 4 ℃环境中过夜孵育;随后,按照 1∶1000 比例加入 HRP 标记的二抗抗体,并进行常规的 2 h 孵育。样本中滴加 ECL 发光液,并进行显影。最后,使用相机拍摄图像,并利用 Image Lab 软件分析蛋白条带的灰度。

2.6 统计学方法

实验数据采用 Graphpad priam 8.0 软件进行统计学分析。计量资料均用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。符合正态分布的数据采用单因素方差分析,组间两两比较使用 LSD-t 检验;不符合正态分布的计量资料用 Kruskal Wallis 秩和检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 软骨细胞形态学观察

经分离培养后,倒置相差显微镜下观察原代软骨细胞多为轮廓清晰的椭圆形,细胞融合为单层,相互紧密连接,呈"铺路石"状。随着细胞的多次传代,软骨细胞大小较原代有所增加,且伴有伪足的形成,细胞形态多呈扁平状不规则多边形、梭形或长梭形。见插页ⅩⅩⅦ图 1。

3.2 CCK8 法筛选最佳 IL-1β 诱导浓度

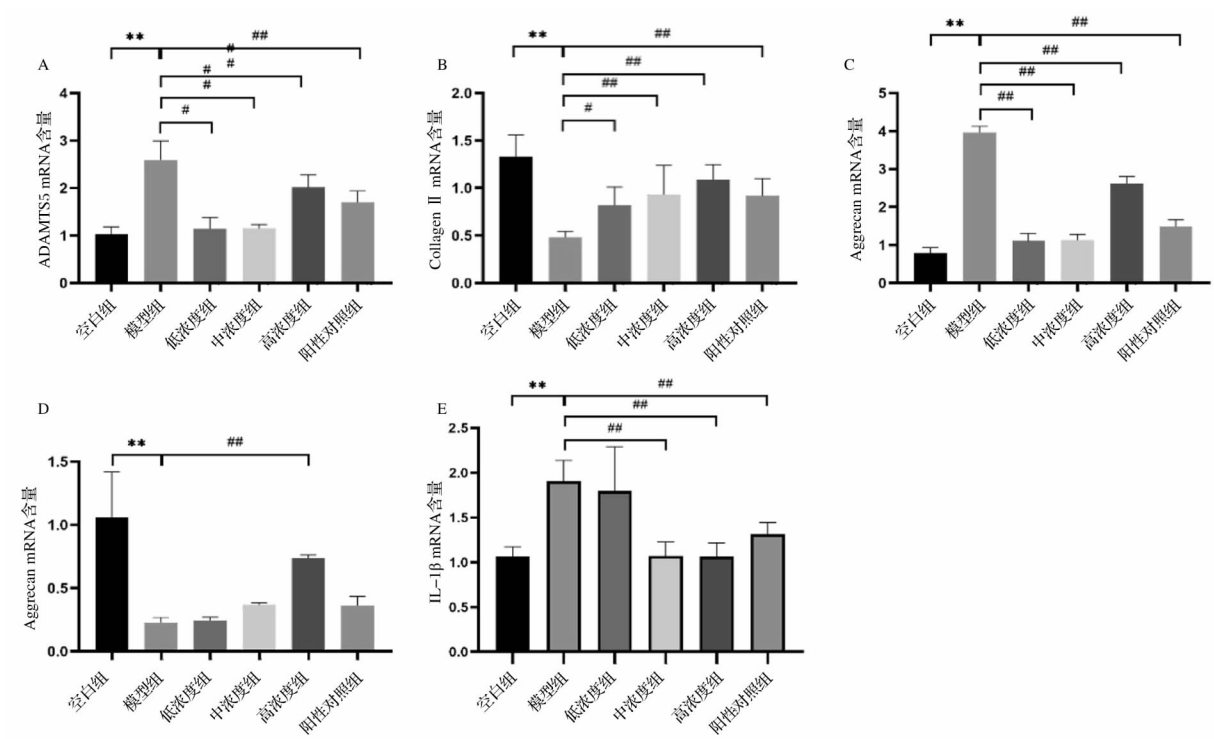
由 CCK8 实验结果可见,IL-1β 刺激软骨细胞的 IC50 浓度为 12.75 ng/mL,所以本实验中选择该浓度作为 IL-1β 诱导软骨细胞建立 OA 细胞模型的处理浓度。见插页ⅩⅩⅦ图 2。

3.3 补肾壮骨方含药血清对软骨细胞退变相关基因的影响

通过对不同组细胞中 IL-1β、MMP13、ADAMTS5、Collagen Ⅱ、Aggrecan mRNA 含量检测可知,经过造模后软骨细胞中的 ADAMTS5、MMP13、IL-1β mRNA 含量显著升高($P<0.01$),而 Collagen Ⅱ及 Aggrecan mRNA 含量显著降低($P<0.01$)。而在给予不同浓度的补肾壮骨方含药血清或盐酸氨基葡萄糖胶囊血清后,ADAMTS5、MMP13、IL-1β mRNA 含量较模型组有所下降,其中中浓度组与高浓度组的 ADAMTS5、MMP13、IL-1β mRNA 含量较模型组显著下降,差异具有统计学意义($P<0.01$),而在低浓度组中,仅有 ADAMTS5、MMP13 的 mRNA 含量较模型组显著下降($P<0.01$),IL-1β mRNA 含量与模型组相比差异无明显统计学意义。各给药组与模型组相比,Collagen Ⅱ及 Aggrecan mRNA 含量显著回升。其中低中高浓度的补肾壮骨方含药血清均能够显著提升细胞中的 Collagen Ⅱ mRNA 含量($P<0.01$),而只有高浓度的补肾壮骨方含药血清能够提升细胞中 Aggrecan mRNA 含量($P<0.01$)。见图 3。

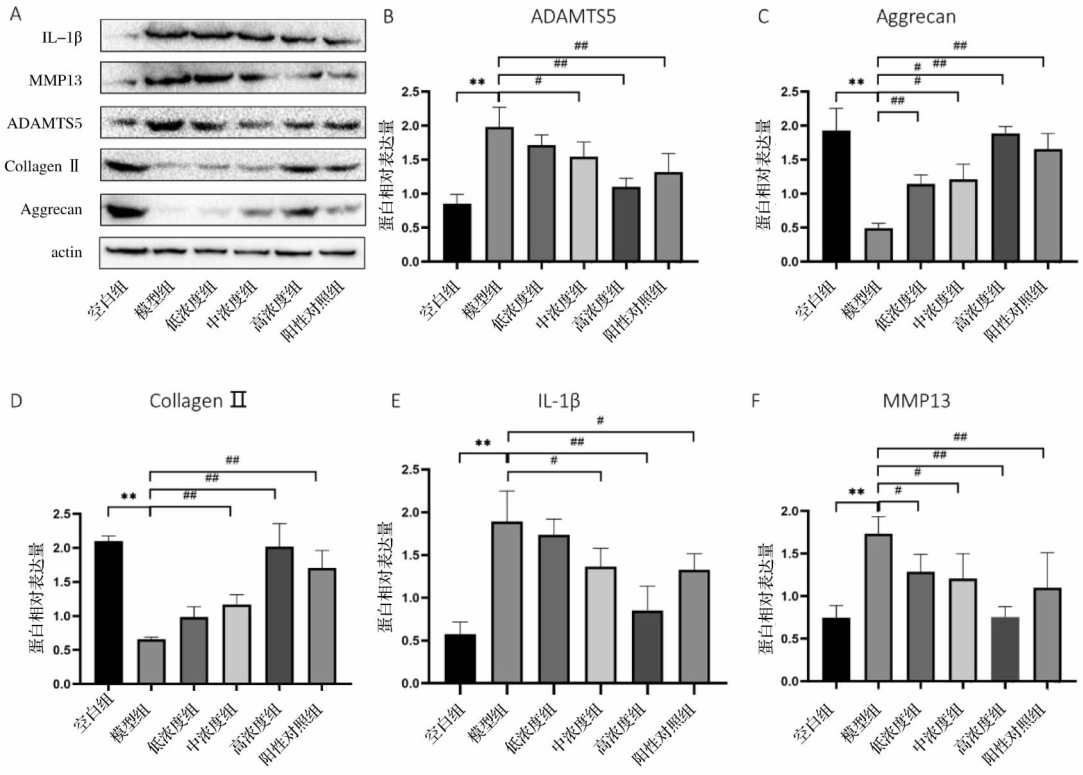
3.4 补肾壮骨方含药血清对软骨细胞退变相关蛋白的影响

通过对不同组细胞中 IL-1β、MMP13、ADAMTS5、Collagen Ⅱ、Aggrecan 蛋白含量检测可知,经过造模后软骨细胞中的 ADAMTS5、MMP13、IL-1β 蛋白含量显著升高($P<0.01$),而 Collagen Ⅱ及 Aggrecan 蛋白含量显著降低($P<0.01$)。而在给予中、高浓度的补肾壮骨方含药血清或盐酸氨基葡萄糖胶囊血清后,ADAMTS5、MMP13、IL-1β 蛋白含量较模型组明显下降,差异具有统计学意义($P<0.01$),而在低浓度组中,仅有 MMP13 的蛋白含量较模型组显著降低($P<0.01$),ADAMTS5、



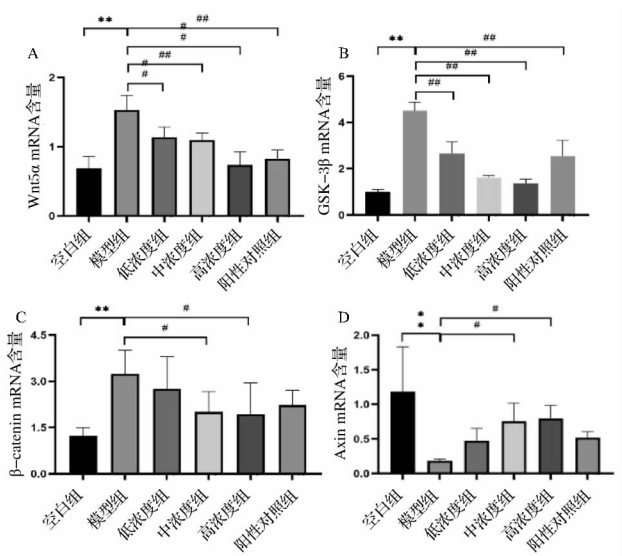
注:A. ADAMTS5 mRNA 含量;B. Collagen Ⅱ mRNA 含量;C. MMP13 mRNA 含量;D. Aggrecan mRNA 含量;E. IL-1β mRNA 含量。**与空白组比较,$P<0.01$;#与模型组比较,$P<0.05$;##与模型组比较,$P<0.01$。

图 3 补肾壮骨方含药血清对软骨细胞退变相关基因的影响



注：A. 各蛋白典型条带图；B. ADAMTS5 蛋白相对表达量结果；C. Aggrecan 蛋白相对表达量结果；D. Collagen Ⅱ 蛋白相对表达量结果；E. IL－1β 蛋白相对表达量结果；F. MMP13 蛋白相对表达量结果。＊＊与空白组比较，$P<0.01$；#与模型组比较，$P<0.05$；##与模型组比较，$P<0.01$。

图4 补肾壮骨方含药血清对软骨细胞退变相关蛋白的影响



注：A. Wnt5α mRNA 含量；B. GSK－3β mRNA 含量；C. β－catenin mRNA 含量；D. Axin mRNA 含量。＊＊与空白组比较，$P<0.01$；#与模型组比较，$P<0.05$；##与模型组比较，$P<0.01$；＊＊与空白组比较，$P<0.01$；#与模型组比较，$P<0.05$；##与模型组比较，$P<0.01$。

图5 补肾壮骨方含药血清对 Wnt/β－catenin 信号通路相关基因的影响

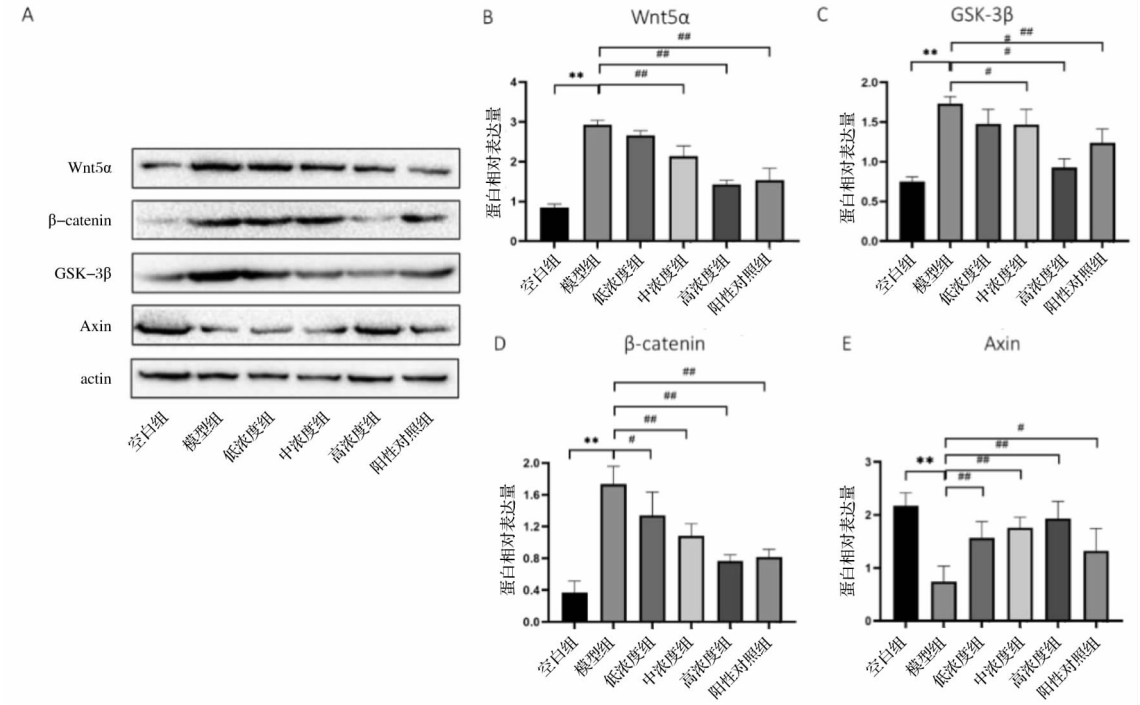
IL－1β 蛋白含量与模型组相比差异无明显统计学意义。各给药组与模型组相比，经过不同药物干预后细胞中 Collagen Ⅱ及 Aggrecan 蛋白含量显著回升。其中低中高浓度的补肾壮骨方含药血清均能够显著提升细胞中的 Aggrecan 蛋白含量（$P<0.01$），而只有中浓度及高浓度的补肾壮骨方含药血清能够提升细胞中 Collagen Ⅱ 蛋白含量（$P<0.01$）。见图4。

3.5 补肾壮骨方含药血清对 Wnt/β－catenin 信号通路相关基因的影响

通过对不同组细胞中 Wnt5α、β－catenin、GSK－3β、Axin mRNA 含量检测可知，经过造模后软骨细胞中的 Wnt5α、β－catenin、GSK－3β mRNA 含量显著升高（$P<0.01$），而 Axin mRNA 含量显著降低（$P<0.01$）。在给予中、高浓度的补肾壮骨方含药血清或盐酸氨基葡萄糖胶囊血清后，Wnt5α、β－catenin、GSK－3β mRNA 含量较模型组明显下降，差异具有统计学意义（$P<0.01$），而在低浓度组中，仅有 Wnt5α、GSK－3β mRNA 含量较模型组显著降低（$P<0.01$），β－catenin mRNA 含量与模型组相比差异无明显统计学意义。而各给药组与模型组相比，经过中高浓度的补肾壮骨方含药血清干预后细胞中 Axin mRNA 含量显著回升（$P<0.01$）。见图5。

3.6 补肾壮骨方含药血清对 Wnt/β－catenin 信号通路相关蛋白的影响

通过对不同组细胞中 Wnt5α、β－catenin、GSK－3β、Axin 蛋白含量检测可知，经过造模后软骨细胞中的 Wnt5α、β－catenin、GSK－3β 蛋白含量显著升高（$P<0.01$），而 Axin 蛋白含量显著降低（$P<0.01$）。在给予中、高浓度的补肾壮骨方含药血清或盐酸氨基葡萄糖胶囊血清后，Wnt5α、β－catenin、GSK－3β 蛋白含量较模型组明显下降，差异具有统计学意义（$P<0.01$），而在低浓度组中，仅有 β－catenin 蛋白含量较模型组显著降低（$P<0.01$），Wnt5α、GSK－3β 蛋白含量与模型组相比差异无明显统计学意义。而与模型组相比，在给予低、中、高浓



注：A. Wnt5α mRNA 含量；B. GSK－3β mRNA 含量；C. β－catenin mRNA 含量；D. Axin mRNA 含量。＊＊与空白组相比，$P<0.01$；#与模型组相比，$P<0.05$；##与模型组相比，$P<0.01$。

图6 补肾壮骨方含药血清对 Wnt/β－catenin 信号通路相关蛋白的影响

度的补肾壮骨方含药血清或盐酸氨基葡萄糖胶囊血清的细胞中，Axin 蛋白含量均能够显著回升（$P<0.01$）。见图6。

3.7 补肾壮骨方含药血清对软骨细胞超微结构的影响

透射电镜用于观察炎症相关焦亡。TEM 结果显示，空白组软骨细胞的细胞形态良好，细胞膜完整，伪足丰富，细胞核状态正常；在细胞质中可见丰富的内质网和高尔基体，线粒体形状规则。使用 IL－1β 刺激后，软骨细胞出现细胞膜肿胀，细胞核形态异常，出现严重空化，染色质破坏明显。细胞质水肿、细胞基质总电子密度降低、线粒体、内质网和高尔基体的数量减少，线粒体形态明显异常，出现空洞及棘断裂。在给予不同浓度的补肾壮骨方含药血清或盐酸氨基葡萄糖胶囊血清后，细胞的上述损伤现象明显减轻，细胞形态恢复，细胞膜结构及伪足均有明显恢复。细胞核空化、染色质破坏减轻，细胞质中线粒体、内质网结构损伤明显好转。见插页XXX图7。

4 讨论

OA 是一种影响老年人群的退行性关节疾病[9]，其特征是关节软骨的退化、软骨下骨的异常重塑，以及骨赘的形成[10－11]。OA 的病理过程涉及多种细胞因子和酶的相互作用，导致软骨基质的降解和炎症反应的加剧[12]。软骨细胞在维持关节软骨的完整性和功能中起着关键作用。它们通过合成和分泌 ECM 成分，如 Collagen Ⅱ和 Aggrecan，来维持软骨的结构和功能[13－14]。然而，在 OA 中，软骨细胞的功能障碍，特别是其代谢活性的下降和细胞死亡，是 OA 病理变化的核心[15]。这些细胞的变化不仅导致软骨基质的合成减少[16]，还促进了蛋白水解酶，如 MMPs 和 ADAMTS 的释放，加速了软骨细胞组织的破坏[17]。

Wnt/β－catenin 信号通路是细胞内一个关键的调控途径，涉及细胞增殖、分化和组织再生[18－19]。在 OA 的背景下，Wnt/β－catenin 信号通路的异常激活与软骨细胞的分解代谢增强有关[20－21]。Wnt 配体与受体结合后，导致 β－catenin 在细胞内的积累，进而激活下游基因的表达，如 MMP13，这些基因的表达增加导致软骨基质的降解[22－23]。此外，Wnt/β－catenin 信号通路还与炎症反应的调节有关，其激活可以增强 IL－1β 等炎症因子的作用，进一步促进 OA 的进展。

研究表明，炎症因子（如促炎细胞因子）是参与 OA 的关节组织代谢紊乱和分解代谢增强的关键介质[24]。在关节中 IL－1β 由单核细胞、成骨细胞和滑膜组织等多种细胞产生，可诱导许多炎症和分解代谢因子的产生[25]。在 OA 患者中，滑液、滑膜、软骨下骨和软骨中的 IL－1β 水平明显升高[26]。所以本研究采用 IL－1β 刺激大鼠原代软骨细胞构建细胞 OA 模型。实验结果表明，经过 IL－1β 刺激后，软骨细胞的 ADAMTS5、MMP13、IL－1β 显著升高，而 Collagen Ⅱ及 Aggrecan 含量显著降低，超微结构也可观察到细胞形态、细胞核以及线粒体等重要细胞器的严重损伤，整体呈现出结构与功能的明显异常。IL－1β 刺激后的软骨细胞也表现出 Wnt/β－catenin 信号通路的异常激活，Wnt5α、β－catenin、GSK－3β 含量显著升高，而 Axin 蛋白含量显著降低。

补肾壮骨方是由全国老中医药专家学术经验继承工作指导老师叶海医师提出的治疗 OA 的经验方[27]。该方基于中医“肾主骨生髓”的理论，采用标本兼治的方法，通过补肾益精、续筋强骨、调和阴阳，辅以理气活血、祛风除湿来治疗 OA[28]。由熟地黄、山药、茯苓、牛膝、桑寄生、仙茅、山茱萸、延胡索、制川乌和炒甘草等药材组成。方中以熟地黄为君药，补血滋阴，填精益髓，大补肾中元气；山茱萸敛精补血，强腰壮骨，与熟地黄相辅相成，一补一敛，强阴益精；桑寄生、仙茅为臣药，补益肝肾、强壮筋骨，祛风湿、壮腰膝；山药补脾养胃，补肾涩精，茯苓渗湿健脾，助山药健运，以后天滋养先天；牛膝、延胡索、川乌行气活血、祛风散寒，疏其血气，同时延胡索与甘草又能够减轻患者疼痛。使全方攻补兼施，动静相宜。现代药理学研究也表明，牛膝[29]、桑寄生[30]、仙茅[31]、川乌[32]等药物均能够从调节

关节微环境稳态、干预 NF－κB 信号通路、减轻炎症等多种途径发挥治疗作用。本研究中，补肾壮骨方含药血清显示出对 Wnt/β－catenin 信号通路的调控作用。补肾壮骨方通过抑制 Wnt/β－catenin 信号通路的激活，降低了 IL－1β 诱导的炎症因子和 MMP 的表达，并促进了 Collagen Ⅱ和 Aggrecan 的表达，从而抑制了软骨基质的降解。

然而，本研究还未涉及补肾壮骨方中活性成分的鉴定和纯化，以分析筛选出补肾壮骨方的具体成分。以具体何种成分对 Wnt/β－catenin 信号通路具有调控作用，也还值得进一步探索，以完善。综上所述，补肾壮骨方含药血清通过调节 Wnt/β－catenin 信号通路，对软骨细胞具有保护作用，为 OA 的治疗提供了一种新的策略，并为补肾壮骨方治疗 OA 提供实验依据。

参考文献

[1] WAN Y, SHEN K, YU H, et al. Baicalein limits osteoarthritis development by inhibiting chondrocyte ferroptosis [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2023, 196: 108－120.
[2] STAMPOULTZIS T, GUO Y, NASROLLAHZADEH N, et al. Mimicking loading－induced cartilage self－heating in vitro promotes matrix formation in chondrocyte－laden constructs with different mechanical properties [J]. ACS Biomater Sci Eng, 2023, 9(2): 651－661.
[3] ZHAO Z, LI Y, WANG M, et al. Mechanotransduction pathways in the regulation of cartilage chondrocyte homoeostasis [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(10): 5408－5419.
[4] VASILIADIS E S, EVANGELOPOULOS D S, KASPIRIS A, et al. The role of sclerostin in bone diseases [J]. Journal of Clinical Medicine, 2022, 11(3): 806.
[5] HORVÁTH E, SÓLYOM Á, SZÉKELY J, et al. Inflammatory and metabolic signaling interfaces of the hypertrophic and senescent chondrocyte phenotypes associated with osteoarthritis [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(22): 2210.
[6] LV R, DU L, BAI L. RNF125, transcriptionally regulated by NFATC2, alleviates osteoarthritis via inhibiting the Wnt/β－catenin signaling pathway through degrading TRIM14 [J]. Int Immunopharmacol, 2023, 125(Pt B): 111191.
[7] 韩晶晶，许旻鸣. 医海缀叶：全国名老中医叶海学术思想与临证精华 [M]. 北京：中国中医药出版社，2021.
[8] 张辽，傅科上，胡俊翔，等. 针刀联合补肾壮骨方治疗骨质疏松性椎体压缩骨折 PKP 术后腰部残余痛临床观察 [J]. 中国现代医生，2024，62(9)：22－25.
[9] PIRES T, OLIVEIRA A S, MARQUES A C, et al. Effects of non－conventional sterilisation methods on PBO－reinforced PVA hydrogels for cartilage replacement [J]. Gels, 2022, 8(10): 640.
[10] WU X, YIN S, YAN L, et al. lncRNA DLEU1 Modulates proliferation, inflammation, and extracellular matrix degradation of chondrocytes through regulating miR－671－5p [J]. J Immunol Res, 2022, 2022: 1816217.
[11] SÁNCHEZ－DÍAZ L, ESPINOSA－SÁNCHEZ A, BLANCO J R, et al. Senotherapeutics in cancer and HIV [J]. Cells, 2022, 11(7): 122.
[12] XIE W, QI S, DOU L, et al. Achyranthoside D attenuates chondrocyte loss and inflammation in osteoarthritis via targeted regulation of Wnt3a [J]. Phytomedicine, 2023, 111: 154663.
[13] SHEN G, ZHANG W, TU Q, et al. Bergamottin (Ber) ameliorates the progression of osteoarthritis via the Sirt1/NF－κB pathway [J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1389786.
[14] LI Y, LI H, WANG L, et al. The p65－LOC727924－miR－26a/KPNA3－p65 regulatory loop mediates vasoactive intestinal peptide effects on osteoarthritis chondrocytes [J]. Int Immunopharmacol, 2023, 122: 110518.
[15] PETRIGNA L, ROGGIO F, TROVATO B, et al. How physical activity affects knee cartilage and a standard intervention procedure for an exercise program: a systematic review [J]. Healthcare (Basel), 2022, 10(10): 1121.
[16] GUILAK F, NIMS R J, DICKS A, et al. Osteoarthritis as a disease of the cartilage pericellular matrix [J]. Matrix Biol, 2018, 71－72: 40－50.
[17] ZENG Z, LI H, LUO C, et al. Pelargonidin ameliorates inflammatory response and cartilage degeneration in osteoarthritis via suppressing the NF－κB pathway [J]. Arch Biochem Biophys, 2023, 743: 109668.
[18] CHEN J, LIU J, CHEN S, et al. Salinomycin alleviates osteoarthritis progression via inhibiting Wnt/β－catenin signaling [J]. Int Immunopharmacol, 2022, 112: 109225.
[19] 李浩博. 软骨细胞外泌体介导软骨下骨祖细胞 Wnt/β－catenin 信号通路在骨关节炎中的作用机制[D]. 上海：中国人民解放军海军军医大学，2022.
[20] 项攀，车艳军，罗宗平. 压应力激活 SOST/Wnt/β－catenin 通路诱导软骨终板细胞退变[J]. 中国组织工程研究，2025，29(5)：951－957.
[21] HAO X, WU X. SP1－mediated ADAMTS5 transcription promotes IL－1β induced chondrocyte injury via Wnt/β catenin pathway in osteoarthritis[J]. Mol Med Rep, 2024, 30(2): 149.
[22] MA T, RUAN H, LV L, et al. Oleanolic acid, a small－molecule natural product, inhibits ECM degeneration in osteoarthritis by regulating the Hippo/YAP and Wnt/β－catenin pathways [J]. Food Funct, 2023, 14(22): 9999－10013.
[23] DANALACHE M, UMRATH F, RIESTER R, et al. Proteolysis of the pericellular matrix: Pinpointing the role and involvement of matrix metalloproteinases in early osteoarthritic remodeling [J]. Acta Biomater, 2024, 181: 297－307.
[24] JACKSON M T, MORADI B, SMITH M M, et al. Activation of matrix metalloproteinases 2, 9, and 13 by activated protein C in human osteoarthritic cartilage chondrocytes [J]. Arthritis Rheumatol, 2014, 66(6): 1525－1536.
[25] KAPOOR M, MARTEL－PELLETIER J, LAJEUNESSE D, et al. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis [J]. Nature Reviews Rheumatology, 2011, 7(1): 33－42.
[26] COLOMBINI A, RAGNI E, MORTATI L, et al. Adipose－derived mesenchymal stromal cells treated with interleukin 1 beta produced chondro－protective vesicles able to fast penetrate in cartilage [J]. Cells, 2021, 10(5): 1180.
[27] 韩晶晶. 叶海“经纬辨证”法简介 [J]. 浙江中医杂志，2018，53(5)：322.
[28] SUMSUZZMAN D M, KHAN Z A, CHOI J, et al. Assessment of functional roles and therapeutic potential of integrin receptors in osteoarthritis: A systematic review and meta－analysis of preclinical studies [J]. Ageing Res Rev, 2022, 81: 101729.
[29] 马笃军，彭力平，蒋顺琬，等. 牛膝醇提物干预 BMSC－Exos 对 OA 模型兔局部骨组织超微结构及炎症小体的影响 [J]. 中医药导报，2022，28(1)：12－18.
[30] 李波，涂元宝，金秀娟，等. 针刺联合桑寄生汤治疗类风湿关节炎的疗效观察及对促炎细胞因子水平的影响 [J]. 上海针灸杂志，2024，43(4)：422－427.
[31] 刘霞，张小琼，郭小红，等. 基于转录组学探讨仙茅酚苷类提取物对胶原诱导性关节炎大鼠的作用及机制 [J]. 中药药理与临床，2022，38(2)：84－90.
[32] 虞跃跃，崔建美，王萌，等. 乌头配伍芍药干预骨性关节炎的机制研究进展 [J]. 中华中医药学刊，2023，41(1)：58－62.