

# 补肾壮筋汤对肾虚血瘀型膝骨性关节炎大鼠软骨损伤的保护作用与分子机制探讨

李新<sup>1,2</sup>, 史鹏博<sup>1</sup>

1. 河南中医药大学第一附属医院, 河南 郑州 450099; 2. 河南中医药大学, 河南 郑州 450046

**摘要** 目的: 观察补肾壮筋汤对肾虚血瘀型膝骨性关节炎(KOA)大鼠软骨损伤的保护作用, 并探讨其分子机制。方法: 70 只雌性 SD 大鼠采用随机数字表法分为正常组, 模型组, 阳性药组, 补肾壮筋汤低、中、高剂量组, SB203580 组, 每组 10 只。除正常组外, 其余均建立肾虚血瘀型 KOA 模型。模型组与正常组中随机抽取 1 只处死验证模型, 剩余大鼠中阳性药组予以依托考昔 5.4 mg/kg 灌胃, 补肾壮筋汤低、中、高剂量组分别予以补肾壮筋汤 2.1、4.2、8.4 g/kg 灌胃, SB203580 组灌胃 SB203580 3.0 mg/kg, 模型组予以 1 mL/100 g 生理盐水灌胃。正常组 10 只灌胃等体积生理盐水。干预 30 d, 酶联免疫法检测各组关节液肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、白介素-6 (IL-6) 水平; 苏木素-伊红 (HE) 染色观察各组软骨组织病理改变, 比较 Mankin 评分; 实时-逆转录聚合酶链反应 (RT-qPCR) 检测软骨组织 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38MAPK)、核转录因子- $\kappa$ B p65 (NF- $\kappa$ B p65)、核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3 (NLRP3)、天冬氨酸蛋白水解酶 3 (Caspase3) 基因表达水平; 免疫印迹法 (WB) 检测软骨组织 p38MAPK、NF- $\kappa$ B p65、NLRP3、Caspase3 蛋白表达及 p-p38MAPK 水平。结果: 模型组大鼠关节液 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平, Mankin 评分, 膝关节软骨组织 p38MAPK 基因、NF- $\kappa$ B p65、NLRP3 和 Caspase3 基因和蛋白表达水平以及 p-p38MAPK 均高于正常组 ( $P < 0.01$ ), 各治疗组均低于模型组 ( $P < 0.01$ ), 除 Caspase3 表达外补肾壮筋汤高剂量组均低于 SB203580 组 ( $P < 0.01$ ), 且补肾壮筋汤的作用呈剂量依赖性; 模型组大鼠软骨组织呈严重病理改变, 各治疗组均减轻, 补肾壮筋汤低剂量组与阳性药组、补肾壮筋汤中剂量组及 SB203580 组的作用均基本相当。结论: 补肾壮筋汤可减轻肾虚血瘀型 KOA 大鼠软骨组织炎症反应, 推测可通过抑制 p38MAPK/NF- $\kappa$ B 通路实现此作用。

**关键词** 补肾壮筋汤; 膝骨性关节炎; 肾虚血瘀; 软骨损伤

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-2392(2026)04-0016-08

DOI: 10.19664/j.cnki.1002-2392.260070

膝骨性关节炎 (Knee osteoarthritis, KOA) 是常见的慢性膝关节病, 以膝关节软骨退变和继发骨质增生为主要疾病特征, 此类疾病可随时间进展导致软骨组织损伤、影响关节功能。调查<sup>[1]</sup>指出, 在中国有症状的 KOA 患病率已达 8.1%, 随着年龄增长而增加, 75 岁以上人群中超过 80% 患 KOA。依托考昔是 KOA 的常用药, 可抗炎、镇痛, 减轻骨关节炎症状, 但其疗效有待提升<sup>[2]</sup>。KOA 属于中医“膝痹”“骨痹”范畴, 多为年老体虚、肝肾亏损、气血虚亏, 邪实趁虚而入, 引起血瘀气滞、气机不畅, 使筋骨失养、经脉不通, 故此类病患应

以补肾养血、行气化瘀、濡养经筋为治则<sup>[3]</sup>。补肾壮筋汤源自《伤科补要》, 主治肾精虚损, 可补肾填精、舒经活络, 使筋脉得以濡养、骨骼得以健壮。有临床研究<sup>[4]</sup>证实, 补肾壮筋汤对肾虚血瘀型 KOA 患者有效, 不仅可减轻关节液炎性因子和关节疼痛程度, 还可提升骨密度与日常生活能力。也有报道<sup>[5]</sup>指出, 补肾壮筋汤可抑制软骨细胞凋亡、促进膝软骨细胞增殖, 推测其对肾虚血瘀型 KOA 的软骨组织也有保护作用, 但该作用仍需进一步研究验证, 且可能的作用机制也需深入探讨。基于此, 本研究取 SD 雌性大鼠建立肾虚血瘀型 KOA 动物模型进行实验, 旨在探讨上述问题, 为补肾壮筋汤在临床中的推广使用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

清洁级 SD 大鼠 70 只, 雌性, 7~9 周龄, 体质量

收稿日期: 2025-03-06 修回日期: 2025-12-11

基金项目: 2023 年度河南省中医药科学研究专项课题 (2023ZY2010)

作者简介: 李新 (1983-), 女, 副主任医师, 研究方向: 腰椎管狭窄症的中医保守治疗。

180 ~ 270 g, 购自河南省实验动物中心, 许可证号: SCXK(豫)2022-0001。饲养条件: 温度 20 ~ 25℃, 湿度 50% ~ 60%, 标准饲料、无菌蒸馏水, 12 h 光照与 12 h 黑暗交替。经河南中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号 DWLL2022060005)。

### 1.2 药品与试剂

熟地黄、山茱萸、续断、当归、茯苓、杜仲、五加皮、白芍、牛膝、青皮(安徽雷允上国药有限公司), 且符合《中华人民共和国药典》<sup>[6]</sup>要求; 氢化可的松(上海源叶生物科技有限公司, 货号: B21001-20 mg); 肾上腺素(上海丰寿实业有限公司, 货号: BP-1113)。

番红 O/固绿染色试剂盒(上海多沃生物科技有限公司, 货号: DW2068-A); 依托考昔(Frosst Iberica SA, 规格: 120 mg); SB203580[p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)抑制剂]购自爱必信(上海)生物科技有限公司, 货号: ABS810002; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白介素-6(IL-6)酶联免疫法检测试剂盒(上海科艾博生物科技有限公司, 批号: 2107013、2109026、2110134); 苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(上海沪震生物科技有限公司, 货号: HZ0105); 一步法 PrimeScript 信使核糖核酸(mRNA)互补的脱氧(cDNA)合成试剂盒(上海联迈生物工程有限公司, 货号: LM-63826); p38MAPK、核转录因子- $\kappa$ B p65(NF- $\kappa$ B p65)、核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3(NLRP3)、天冬氨酸蛋白水解酶 3(Caspase3)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)引物序列(参照 Primer5.0 设计, 委托广州艾基生物技术有限公司合成); 二喹啉甲酸(BCA)试剂盒(美国 Gibco 公司, 货号: 16000044); 兔抗鼠 p38MAPK、p-p38MAPK、NF- $\kappa$ B p65、NLRP3、Caspase3、 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)、H3 单克隆抗体, 驴抗兔 p38MAPK、p-p38MAPK、NF- $\kappa$ B p65、NLRP3、Caspase3、 $\beta$ -actin、H3 单克隆抗体(Abcam 中国公司, 批号: 210806、210813、210912、211017、210715、210923、211025、211015、210921、211014、211104、210920、211013、211124); 电化学发光液(北京百奥莱博生物科技有限公司, 货号: ZN1944)。

### 1.3 主要仪器

PL620 型电子天平(上海精密仪器仪表有限公司); HF5000 型全自动血流变仪[东方化玻(北京)科技有限公司]; OLS5000 型光学显微镜(日本 Olympus 公司); Sorvall ST40 型离心机(美国 Thermo Fisher 公司); HBS-1011 型酶标仪(上海精若科学仪器有限公司); 7500 型聚合酶链反应仪(PCR, 美国 ABI 公司);

SN-388 型凝胶成像分析仪(深圳市三莉科技有限公司)。

### 1.4 分组与造模方法

70 只雌性 SD 大鼠采用随机数字表法分为正常组、模型组、阳性药组、补肾壮筋汤低、中、高剂量组和 SB203580 组, 每组 10 只。除正常组外, 其余均建立肾虚血瘀型 KOA 模型, 方法<sup>[7]</sup>如下, 先建立肾虚模型, 即: 氯胺酮 80 mg/kg 腹腔注射麻醉, 经大鼠腰背侧正中入路分开腰部筋膜, 分离暴露卵巢, 将输卵管与周围血管结扎后切除双侧卵巢。8 周后同时建立血瘀和 KOA 模型, 即氢化可的松 10 mg/kg 肌肉注射, 每天 1 次, 13 d 后肾上腺素 0.36 mg/kg 皮下注射 1 次; 同法麻醉, 双侧膝关节内侧各取 2 cm 的纵切口, 显露膝关节后将前后交叉韧带与内侧副韧带、内侧半月板完整切除, 术后自由活动。术后 7 d 驱赶动物被动活动, 每次 30 min, 每天 2 次, 持续 4 周。正常组大鼠麻醉、入路、做膝关节内侧切口、被动活动等均操作均同上, 但不切除双侧卵巢, 肌肉和皮下注射药物均无无菌生理盐水, 且不切除前后交叉韧带与内侧副韧带、内侧半月板。观察造模和非造模大鼠状态, 电子天平检测体质量, 取尾静脉血全自动血流变仪检测血流变学指标。模型组与正常组中随机抽取 1 只处死, 番红 O/固绿染色观察膝关节病理改变, 即取膝关节软骨组织多聚甲醛固定、乙二胺四乙酸脱钙、梯度浓度酒精溶液脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、连续切片, 并参照说明书染色。光学显微镜观察膝关节病理学改变。

### 1.5 补肾壮筋汤制备

熟地黄、山茱萸、续断、当归、茯苓各 12 g, 杜仲、五加皮、白芍、牛膝各 10 g, 青皮 5 g, 取上述中药材粉碎, 加入 4 倍蒸馏水浸泡 24 h, 70℃ 水浴加热回流提取药液, 每次 2 h, 共 4 次。将提取液过滤, 药渣中加入 20 倍蒸馏水, 70℃ 水浴 2 h 回流提取, 共 4 次。将提取液合并浓缩, 每 1 mL 浓缩液相当于 1 g 生药。

### 1.6 干预方法

建模 12 周后开始, 阳性药组予以依托考昔 5.4 mg/kg 灌胃, 补肾壮筋汤低、中、高剂量组予以补肾壮筋汤 2.1、4.2、8.4 g/kg 灌胃(1 L 补肾壮筋汤原液含 50 g 生药, 临床剂量为每天 400 mL, 即 20 g 生药, 按 60 kg 体质量计算, 大鼠等效剂量为 20 g/60 kg  $\times$  6.3, 即 2.1 g/kg, 中剂量为临床等效剂量  $\times$  2、高剂量为临床等效剂量  $\times$  4), SB203580 组灌胃 SB203580 3.0 mg/kg, 模型组和正常组予以 1 mL/100 g 生理盐水灌胃。每只灌胃 1 mL/100 g 生理盐水。各组灌胃均每天 1 次, 持续 30 d。

1.7 检测指标及方法

1.7.1 关节液 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平检测

各组干预 30 d 结束后次日处死大鼠,注射器收集双侧关节液后混合。3 500 r/min 离心 15 min(离心半径 8.5 cm)。取上清液根据试剂盒说明步骤、借助酶标仪检测 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平。

1.7.2 软骨组织病理改变观察

各组干预 30 d 结束后次日处死大鼠,取双侧膝关节软骨组织,左侧用以 HE 染色、右侧用以基因与蛋白表达检测。软骨组织浸泡于多聚甲醛中固定、脱钙、包埋、切片。烤片后自然冷却,二甲苯透明处理,梯度浓度酒精脱蜡和脱水。苏木素染色 5 min、自来水冲洗 30 s,盐酸分色 3 s、自来水冲洗 30 s,伊红染色 1 s,自来水冲洗 30 s。光学显微镜下观察,若染色太深自来水浸泡 10 s,若染色太淡苏木素或伊红染色 1 s。吹干

载玻片水分后封片,光镜下观察软骨组织病理改变。Mankin 评分<sup>[8]</sup>:软骨结构共 6 分、细胞排列共 3 分、基质染色共 4 分、潮线完整性共 1 分,理论最高分 14,评分越高认为软骨组织损伤越重。

1.7.3 软骨组织 p38MAPK、NF-κB p65、NLRP3、Caspase3 基因表达检测

各组干预 30 d 结束后次日处死大鼠,取软骨组织以 Trizol Reagent 法提取总 RNA,用一步法 PrimeScript mRNA cDNA 合成试剂盒对其进行逆转录。引物信息见表 1,配置反应体系,正向与反向引物各 10 μL, RNA 模板 0.6 μL,超级酶混合物 0.2 μL、缓冲液 5 μL、去 RNA 水 3.4 μL。内参为 GAPDH。PCR 循环程序为 95 ℃ 10 min,40 个循环;75 ℃ 45 s、54 ℃ 15 s,最后 60 ℃ 15 s。绘制 DNA 溶解曲线,计算  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

表 1 基因引物信息

| 基因        | 引物序列                                    | 产物长度/bp |
|-----------|-----------------------------------------|---------|
| p38MAPK   | 正向引物:5' - TCCAACGACTTACACTTTCTC - 3'    | 223     |
|           | 反向引物:5' - CTCGCATTTACGTCGCACAG - 3'     |         |
| NF-κB p65 | 正向引物:5' - GCGGACTGAAATGGTCTTGC - 3'     | 746     |
|           | 反向引物:5' - GAGGAAAGTGTAACTCGTTGGA - 3'   |         |
| NLRP3     | 正向引物:5' - TCAATCCAACGACTTACACTTTCC - 3' | 363     |
|           | 反向引物:5' - GTGTGTGGGACGTGAGAACT - 3'     |         |
| Caspase3  | 正向引物:5' - CAATCCAACGACTTACACTTTCTC - 3' | 251     |
|           | 反向引物:5' - CACACCTACTTACTCGCGCT - 3'     |         |
| GAPDH     | 正向引物:5' - AATCCAACGACTTACACTTTCTC - 3'  | 477     |
|           | 反向引物:5' - TAGAAACTCCGACTGCGAGC - 3'     |         |

1.7.4 软骨组织 p38MAPK、NF-κB p65、NLRP3、Caspase3 蛋白及 p-p38MAPK 水平检测

各组干预 30 d 结束后次日处死大鼠,取软骨组织捣碎,添加裂解液。12 000 r/min 离心 5 min(离心半径 8.5 cm)。取上清液 BCA 试剂盒对蛋白定量,添加电泳缓冲液,50 μg/孔上样,凝胶电泳后转膜。5% 脱脂奶粉封闭 1 h,洗膜 3 次。添加一抗,4 ℃ 过夜,洗膜 3 次;添加二抗,室温 2 h,洗膜 3 次。加入电化学发光液显影。凝胶成像分析蛋白相对表达量,其中为观察 NF-κB p65 核移位情况内参选择 H3,其余蛋白内参均为 β-actin。

1.8 统计学方法

采用 SPSS21.0 软件统计数据。计量资料经 K-S

法验证服从正态分布,描述方式为“ $\bar{x} \pm s$ ”,多样本检验采用单因素方差分析和 SNK-q 检验,两样本检验采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般状态与膝关节软骨形态改变

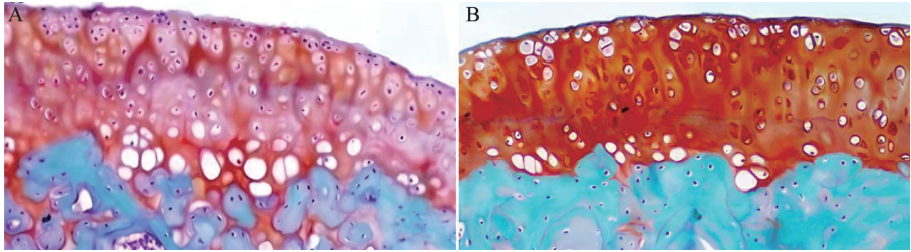
正常组大鼠饮食正常、体质量无明显改变、动作灵活、皮毛有光泽、二便正常、活泼好动;其余各组大鼠少动、精神萎靡、体质量有所增长、皮毛蓬乱无光泽,舌下有瘀斑、脉络增粗变长,尾巴瘀青。造模后大鼠体质量、聚集指数、低切还原黏度均高于正常大鼠( $P < 0.01$ ),红细胞压积高于正常大鼠( $P < 0.05$ ),变形指数低于正常大鼠( $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 造模与非造模大鼠体质量、血流变学比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | n  | 体质量/g          | 红细胞压积/%      | 聚集指数        | 变形指数        | 低切还原黏度/(mPa·s) |
|-----|----|----------------|--------------|-------------|-------------|----------------|
| 造模组 | 60 | 306.32 ± 22.64 | 46.25 ± 3.33 | 3.48 ± 0.36 | 0.37 ± 0.05 | 28.37 ± 4.69   |
| 正常组 | 10 | 255.15 ± 12.75 | 42.30 ± 2.17 | 1.39 ± 0.21 | 0.48 ± 0.09 | 22.74 ± 4.23   |
| t 值 |    | 6.938          | 3.613        | 17.791      | 5.657       | 3.559          |
| P 值 |    | <0.01          | 0.01         | <0.01       | <0.01       | <0.01          |

形态学观察显示,正常组大鼠软骨表层光滑且平整,软骨细胞丰富、分布均匀、排列整齐、层次清晰、潮

线完整(图 1A);模型组大鼠软骨层变薄、细胞数量减少、结构严重受损、潮线不完整、有明显细胞簇集(图 1B)。



注:A. 正常组;B. 模型组。

图 1 各组大鼠膝关节软骨形态改变(番红 O/固绿染色, ×100)

2.2 各组大鼠关节液 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平

模型组大鼠关节液 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平均高于正常组( $P < 0.01$ ),阳性药组、SB203580 组和补肾壮筋汤低、中、高剂量组均低于模型组( $P < 0.01$ ),SB203580 组和补肾壮筋汤中、高剂量组均低于

阳性药组和补肾壮筋汤低剂量组( $P < 0.01$ ),SB203580 组和补肾壮筋汤高剂量组均低于补肾壮筋汤中剂量组( $P < 0.01$ ),补肾壮筋汤高剂量组均低于 SB203580 组( $P < 0.01$ )。见表 3。

表 3 各组大鼠关节液 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平比较( $\bar{x} \pm s$ , ng/L)

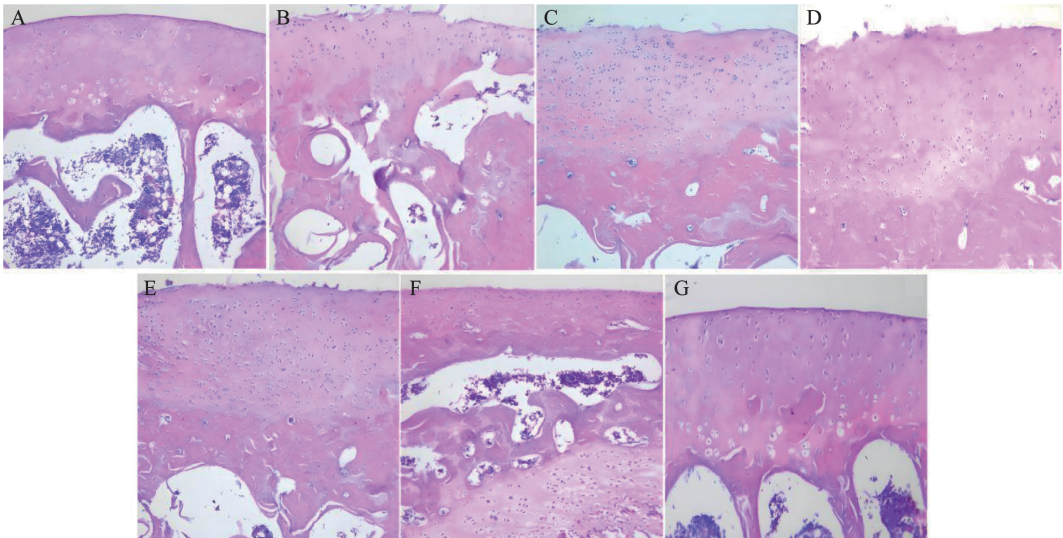
| 组别         | n  | TNF-α              | IL-1β             | IL-6                |
|------------|----|--------------------|-------------------|---------------------|
| 正常组        | 9  | 16.52 ± 3.04       | 0.39 ± 0.04       | 21.43 ± 4.11        |
| 模型组        | 9  | 79.69 ± 10.23 *    | 1.98 ± 0.27 *     | 132.69 ± 20.58 *    |
| 阳性药组       | 10 | 66.24 ± 7.91 #     | 1.65 ± 0.20 #     | 97.79 ± 15.83 #     |
| SB203580 组 | 10 | 37.75 ± 6.11 #&    | 1.18 ± 0.19 #&    | 68.69 ± 11.20 #&    |
| 补肾壮筋汤低剂量组  | 10 | 66.35 ± 7.96 #△    | 1.67 ± 0.22 #△    | 98.72 ± 16.74 #△    |
| 补肾壮筋汤中剂量组  | 10 | 53.27 ± 6.78 #&△○  | 1.30 ± 0.21 #&△○  | 79.35 ± 14.29 #&△○  |
| 补肾壮筋汤高剂量组  | 10 | 30.02 ± 5.07 #&△○● | 0.97 ± 0.16 #&△○● | 60.17 ± 10.06 #&△○● |

注:与正常组比较, \*  $P < 0.01$ ;与模型组比较, #  $P < 0.01$ ;与阳性药组比较, &  $P < 0.01$ ;与 SB203580 组比较, △  $P < 0.01$ ;与补肾壮筋汤低剂量组比较, ○  $P < 0.01$ ;与补肾壮筋汤中剂量组比较, ●  $P < 0.01$ 。

2.3 各组大鼠软骨组织病理改变与 Mankin 评分

正常组大鼠膝关节软骨组织结构完整、表面光滑连续、细胞排列整齐、潮线完整、无炎症细胞浸润;模型组膝关节软骨严重增厚、细胞严重疏松紊乱,皱缩明显,潮线严重破坏、有大量炎症细胞浸润,且可见大量软骨成纤维细胞增生;阳性药组和补肾壮筋汤低剂量组膝关节软骨明显增厚、细胞明显疏松紊乱,有皱缩,潮线明显破坏,有部分炎症细胞浸润,且可见部分软骨成纤维

细胞增生;补肾壮筋汤中剂量组膝关节软骨有增厚、细胞疏松紊乱,部分细胞皱缩,潮线有破坏,有炎症细胞浸润,且可见软骨成纤维细胞增生;SB203580 组膝关节软骨轻微增厚、少部分细胞疏松,潮线基本完整,有少量炎症细胞浸润和软骨成纤维细胞增生;补肾壮筋汤高剂量组膝关节软骨结构完整,细胞基本排列整齐、层次清晰,极少细胞疏松,潮线完整,极少炎症细胞浸润和软骨成纤维细胞增生。见图 2。



注:A. 正常组;B. 模型组;C. 阳性药组;D. SB203580 组;E. 补肾壮筋汤低剂量组;F. 补肾壮筋汤中剂量组;G. 补肾壮筋汤高剂量组。

图 2 各组大鼠软骨组织病理改变(HE 染色, ×100)

模型组大鼠膝关节软骨组织 Mankin 评分高于正常组 ( $P < 0.01$ ), 阳性药组、SB203580 组和补肾壮筋汤低、中、高剂量组均低于模型组 ( $P < 0.01$ ), SB203580 组和补肾壮筋汤中、高剂量组均低于阳性药组和补肾壮筋汤低剂量组 ( $P < 0.01$ ), SB203580 组和补肾壮筋汤高剂量组均低于补肾壮筋汤中剂量组 ( $P < 0.01$ ), 补肾壮筋汤高剂量组低于 SB203580 组 ( $P < 0.01$ )。见表 4。

2.4 各组大鼠软骨组织 p38MAPK、NF-κB p65、NLRP3 和 Caspase3 基因表达水平

模型组大鼠膝关节软骨组织 p38MAPK、NF-κB p65、NLRP3 和 Caspase3 基因表达均高于正常组 ( $P < 0.01$ ), 阳性药组、SB203580 组和补肾壮筋汤低、中、高剂量组均低于模型组 ( $P < 0.01$ ), SB203580 组和补肾壮筋汤中、高剂量组均低于阳性药组和补肾壮筋汤低剂量组 ( $P < 0.01$ ), SB203580 组和补肾壮筋汤高剂量组

均低于补肾壮筋汤中剂量组 ( $P < 0.01$ ), 补肾壮筋汤高剂量组与 SB203580 组 p38MAPK、NF-κB p65、NLRP3 表达差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 但补肾壮筋汤高剂量组 Caspase3 基因表达高于 SB203580 组 ( $P < 0.01$ )。见表 5。

表 4 各组大鼠膝关节软骨组织 Mankin 评分比较( $\bar{x} \pm s$ , 分)

| 组别         | <i>n</i> | Mankin 评分         |
|------------|----------|-------------------|
| 正常组        | 9        | 0                 |
| 模型组        | 9        | 11.67 ± 0.50 *    |
| 阳性药组       | 10       | 8.30 ± 0.48 #     |
| SB203580 组 | 10       | 3.40 ± 0.52 #&    |
| 补肾壮筋汤低剂量组  | 10       | 8.40 ± 0.52 #△    |
| 补肾壮筋汤中剂量组  | 10       | 5.40 ± 0.52 #&△○  |
| 补肾壮筋汤高剂量组  | 10       | 2.40 ± 0.52 #&△○● |

注:与正常组比较,\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,# $P < 0.01$ ;与阳性药组比较,& $P < 0.01$ ;与 SB203580 组比较,△ $P < 0.01$ ;与补肾壮筋汤低剂量组比较,○ $P < 0.01$ ;与补肾壮筋汤中剂量组比较,● $P < 0.01$ 。

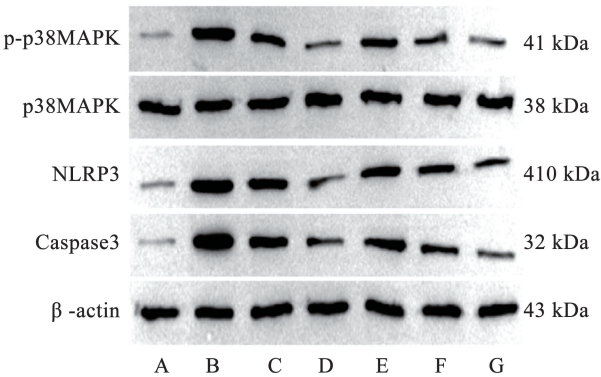
表 5 各组大鼠软骨组织 p38MAPK、NF-κB p65、NLRP3 和 Caspase3 基因表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别         | <i>n</i> | p38MAPK           | NF-κB p65         | NLRP3             | Caspase3          |
|------------|----------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 正常组        | 9        | 0.43 ± 0.05       | 0.52 ± 0.08       | 0.58 ± 0.07       | 0.26 ± 0.04       |
| 模型组        | 9        | 1.89 ± 0.32 *     | 2.02 ± 0.40 *     | 1.96 ± 0.39 *     | 1.73 ± 0.32 *     |
| 阳性药组       | 10       | 1.48 ± 0.28 #     | 1.61 ± 0.30 #     | 1.46 ± 0.26 #     | 1.42 ± 0.25 #     |
| SB203580 组 | 10       | 1.02 ± 0.21 #&    | 1.14 ± 0.24 #&    | 0.93 ± 0.19 #&    | 0.95 ± 0.17 #&    |
| 补肾壮筋汤低剂量组  | 10       | 1.50 ± 0.30 #△    | 1.63 ± 0.32 #△    | 1.44 ± 0.28 #△    | 1.44 ± 0.27 #△    |
| 补肾壮筋汤中剂量组  | 10       | 1.21 ± 0.23 #&△○  | 1.40 ± 0.27 #&△○  | 1.10 ± 0.21 #&△○  | 1.08 ± 0.22 #&△○  |
| 补肾壮筋汤高剂量组  | 10       | 1.03 ± 0.22 #&△○● | 1.12 ± 0.25 #&△○● | 0.95 ± 0.18 #&△○● | 0.60 ± 0.12 #&△○● |

注:与正常组比较,\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,# $P < 0.01$ ;与阳性药组比较,& $P < 0.01$ ;与 SB203580 组比较,△ $P < 0.01$ ;与补肾壮筋汤低剂量组比较,○ $P < 0.01$ ;与补肾壮筋汤中剂量组比较,● $P < 0.01$ 。

2.5 各组大鼠软骨组织 p38MAPK、NF-κB p65、NLRP3 和 Caspase3 蛋白表达水平

各组 p38MAPK 蛋白表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ );模型组大鼠膝关节软骨组织 p-p38MAPK、NF-κB p65、NLRP3 和 Caspase3 蛋白表达均高于正常组 ( $P < 0.01$ ), 阳性药组、SB203580 组和补肾壮筋汤低、中、高剂量组均低于模型组 ( $P < 0.01$ ), SB203580 组和补肾壮筋汤中、高剂量组均低于阳性药组和补肾壮筋汤低剂量组 ( $P < 0.01$ ), SB203580 组和补肾壮筋汤高剂量组均低于补肾壮筋汤中剂量组 ( $P < 0.01$ ), 补肾壮筋汤高剂量组与 SB203580 组 p-p38MAPK、NF-κB p65、NLRP3 表达差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 但补肾壮筋汤高剂量组 Caspase3 基因表达高于 SB203580 组 ( $P < 0.01$ )。见图 3、4 和表 6。



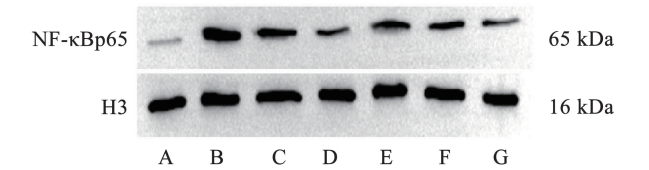
注:A. 正常组;B. 模型组;C. 阳性药组;D. SB203580 组;E. 补肾壮筋汤低剂量组;F. 补肾壮筋汤中剂量组;G. 补肾壮筋汤高剂量组。

图 3 各组大鼠软骨组织 p38MAPK、p-p38MAPK、NLRP3 和 Caspase3 蛋白表达印迹图

表 6 各组大鼠软骨组织 p38MAPK、NF-κB p65、NLRP3 和 Caspase3 蛋白表达和 p-p38MAPK 比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别         | n  | p-p38MAPK        | p38MAPK     | NF-κB p65        | NLRP3            | Caspase3          |
|------------|----|------------------|-------------|------------------|------------------|-------------------|
| 正常组        | 9  | 0.22 ± 0.04      | 1.62 ± 0.31 | 0.33 ± 0.05      | 0.49 ± 0.07      | 0.34 ± 0.05       |
| 模型组        | 9  | 1.45 ± 0.31 *    | 1.60 ± 0.32 | 1.95 ± 0.37 *    | 1.86 ± 0.34 *    | 2.11 ± 0.40 *     |
| 阳性药组       | 10 | 1.10 ± 0.21 #    | 1.61 ± 0.33 | 1.62 ± 0.31 #    | 1.38 ± 0.24 #    | 1.65 ± 0.24 #     |
| SB203580 组 | 10 | 0.62 ± 0.07 #&   | 1.63 ± 0.32 | 1.01 ± 0.21 #&   | 0.93 ± 0.18 #&   | 1.04 ± 0.19 #&    |
| 补肾壮筋汤低剂量组  | 10 | 1.12 ± 0.22 #△   | 1.62 ± 0.30 | 1.60 ± 0.30 #△   | 1.40 ± 0.25 #△   | 1.67 ± 0.25 #△    |
| 补肾壮筋汤中剂量组  | 10 | 0.89 ± 0.17 #&△○ | 1.60 ± 0.31 | 1.33 ± 0.26 #&△○ | 1.12 ± 0.20 #&△○ | 1.28 ± 0.24 #&△○  |
| 补肾壮筋汤高剂量组  | 10 | 0.60 ± 0.06 #&○● | 1.59 ± 0.32 | 1.03 ± 0.22 #&○● | 0.91 ± 0.17 #&○● | 0.89 ± 0.13 #&△○● |

注:与正常组比较,\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,# $P < 0.01$ ;与阳性药组比较,& $P < 0.01$ ;与 SB203580 组比较,△ $P < 0.01$ ;与补肾壮筋汤低剂量组比较,○ $P < 0.01$ ;与补肾壮筋汤中剂量组比较,● $P < 0.01$ 。



注:A. 正常组;B. 模型组;C. 阳性药组;D. SB203580 组;E. 补肾壮筋汤低剂量组;F. 补肾壮筋汤中剂量组;G. 补肾壮筋汤高剂量组。

图 4 各组大鼠软骨组织 NF-κB p65 蛋白表达印迹图

3 讨论

KOA 与年龄增长、关节力学改变、软骨合成细胞与基质合成代谢失衡等有关,中西医结合已成为该病的主流治疗方案。中医学认为,肾虚络阻是 KOA 的根本病因<sup>[9]</sup>。《景岳全书》记载:“盖痹者闭也……不得通行而病也”,说明筋脉痹阻、血不得行是其重要病因。《灵枢》曰:“经脉者,所以行血气而营阴阳”,提示气血畅通则阴阳平衡、筋骨得以濡养。中医学家<sup>[10-11]</sup>指出,年龄渐增,身弱体虚,肝肾亏损,加之长久操劳,日积月累,可致气滞血瘀、痰凝痹阻之症;复感风寒湿邪,气血瘀阻筋脉,筋骨失去濡养,关节屈伸不利。“肾主骨生髓”,肾精亏虚则骨髓生化无源,骨质疏松,卫外不固,风寒湿邪客于筋脉,发为痹症。因此 KOA 患者常见肾虚血瘀证。

本研究造模大鼠符合肾虚血瘀型 KOA 特征。KOA 患者常见老年女性,此类人群卵巢功能低下、雌激素水平降低,而该症状是肾虚的主要特征,因此去卵巢法可构建肾虚模型<sup>[12]</sup>。肾上腺皮质激素与肾上腺素法可导致微循环障碍,符合“血瘀证”表现,加之造模大鼠舌下有瘀斑、脉络增粗变长,尾巴瘀青,均可证实血瘀证大鼠模型建立成功。同时采用经典的 Hulth 法建立 KOA 模型,可导致关节软骨、软骨外基质的分解与合成代谢失衡,引起膝关节软骨损伤。

本研究还显示,补肾壮筋汤不同剂量组、阳性药组

和 SB203580 组关节液 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平均低于模型组,关节软骨病理改变均减轻,Mankin 评分也均下降,且补肾壮筋汤的作用呈剂量依赖性,补肾壮筋汤低剂量组与阳性药组、补肾壮筋汤高剂量组与 SB203580 组的效果均基本相当,证实补肾壮筋汤在肾虚血瘀型 KOA 治疗中有良好效果。依托考昔是 KOA 患者的常用药,且对关节软骨有保护作用,这也是本研究将其作为阳性对照药物的主要原因。SB203580 属于 p38MAPK 抑制剂<sup>[13]</sup>,为了进一步探讨分子机制,本研究设置了 SB20350 组。补肾壮筋汤以熟地黄、山茱萸共为君药,熟地黄补肾填精、滋阴清热,山茱萸益气养血、益肾固精,二者阴阳并重、气血同补、化瘀通脉;以续断、杜仲、五加皮为臣药,续断补肝益肾、强筋健骨,杜仲补肝益肾、强壮筋骨,五加皮补益肝肾、强筋壮骨,三者配伍,可助君药补益肾精、濡养筋骨;以白芍、青皮、茯苓、当归共为佐药,白芍敛阴和营,青皮行气化瘀,茯苓健脾除湿,当归补血活血,可助君药活血化瘀、行气止痛;牛膝引血下行,直达病所,为使药,并作补肾益肾、强筋壮骨、活血通经之用。全方正合肾虚血瘀型 KOA 的治则。现代药理研究<sup>[14-15]</sup>表明,熟地黄共有 14 种活性成分,均对骨关节炎有治疗作用,且涉及抑制破骨细胞的骨吸收、抗炎等多种机制;山茱萸中含有丰富的山茱萸新苷 I,治疗 KOA 是可促进成骨细胞增殖、抑制软骨细胞增殖,并可通过抑制炎症反应减轻软骨损伤。

本研究还发现,补肾壮筋汤不同剂量组、阳性药组和 SB203580 组软骨组织 p38MAPK 基因、NF-κB p65、NLRP3 和 Caspase3 基因和蛋白表达水平,p-p38MAPK 均低于模型组,提示补肾壮筋汤、依托考昔和 SB203580 均可抑制肾虚血瘀型 KOA 软骨组织 p38MAPK/NF-κB 通路,不仅证实了 SB203580 属于 p38MAPK 抑制剂,也提示了补肾壮筋汤减轻软骨损伤

的可能机制。p38MAPK/NF- $\kappa$ B 属于经典的炎症反应通路,在病理因素刺激下该通路被激活,p38MAPK 和 NF- $\kappa$ B p65 表达增加、p-p38MAPK 水平升高,NF- $\kappa$ B p65 核移位增多,触发更多炎症反应信号,导致 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 等促炎因子水平升高,可参与组织炎症损伤;而 Caspase3 位于 NLRP3 的下游,当该通路被激活,Caspase3 表达也升高,细胞凋亡增加<sup>[16-18]</sup>。有研究<sup>[19-20]</sup>指出,p38MAPK/NF- $\kappa$ B、NLRP3/Caspase3 通路激活均可参与 KOA 所致的软骨组织损伤,且抑制上述信号通路可减轻软骨组织炎症反应和病理损伤。既往也有报道<sup>[21-22]</sup>证实,地黄可抑制 p38MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路、山茱萸的活性成分马钱子苷可抑制 NLRP3 表达发挥抗炎效用;武艳芝等<sup>[23]</sup>研究发现当归中的主要活性成分当归多糖能抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路减轻脂多糖诱导的 SD 大鼠骨性关节炎,且观察到 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平也显著下降。然而本研究中补肾壮筋汤高剂量组软骨组织 Caspase3 表达均高于 SB203580 组,这可能是因为高剂量的补肾壮筋汤还可通过其它分子途径抑制 Caspase3 表达、减轻软骨组织损伤。

综上,补肾壮筋汤可减轻肾虚血瘀型 KOA 关节软骨炎症反应与病理损伤,且其作用呈剂量依赖性,推测与抑制 p38MAPK/NF- $\kappa$ B 通路,减少 p-p38MAPK 水平和 NF- $\kappa$ B p65 核移位,进而降低 NLRP3、Caspase3 表达有关。本研究提示补肾壮筋汤对肾虚血瘀型 KOA 患者有确切效果,临床应用的可行性较高,后续应开展临床试验验证该汤剂的价值;另外补肾壮筋汤治疗该病也可能有其它分子途径抑制 Caspase3 表达,后续仍需进一步探讨。

## 参考文献:

- [1] SUN X S,ZHEN X M,HU X Q,et al. Osteoarthritis in the middle-aged and elderly in China;prevalence and influencing factors[J]. Int J Environ Res Public Health,2019,16(23):4701.
- [2] SUN X S,ZHEN X M,GU S Y,et al. Cost-utility analysis of duloxetine in osteoarthritis:from Chinese healthcare perspective[J]. Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res,2025,25(2):245-256.
- [3] 梁健忠,黄韵,李廉行. 补肾活血汤治疗肾虚血瘀型膝骨性关节炎的疗效及对血清炎症因子的影响[J]. 四川中医,2023,41(4):140-144.
- [4] 吴晓文. 补肾壮筋汤配合依托考昔片对肾虚血瘀型膝骨性关节炎患者骨密度及关节液炎症因子水平的影响[J]. 湖北中医杂志,2023,45(10):17-19.
- [5] 李宇,王伟,邱裕佳. 补肾壮筋汤联合盐酸氨基葡萄糖对大鼠膝软骨细胞增殖及凋亡影响的研究[J]. 中国骨质疏松杂志,2020,26(1):25-30,63.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国

- 医药科技出版社,2020:102-104.
- [7] 刘振峰,方锐,艾力江·阿斯拉,等. 肾虚血瘀型膝骨性关节炎大鼠模型的建立[J]. 中国组织工程研究,2013,17(2):270-274.
- [8] 谈倩,李佳,李柏村,等. 温针灸减轻膝骨性关节炎大鼠软骨组织的氧化损伤和炎症反应[J]. 针刺研究,2022,47(4):321-328.
- [9] 石佳,刘爱峰,靳博,等. 基于网络药理学探究补肾活血汤治疗肾虚血瘀型膝骨性关节炎的作用机制[J]. 天津中医药,2022,39(7):924-933.
- [10] 木定海,杜祖耀,林祥宋,等. 补肾活血汤联合中药蜡疗治疗绝经后肾虚血瘀型膝骨性关节炎[J]. 中国中医骨伤科杂志,2022,30(1):35-38,44.
- [11] 苑成发,韩科,俞鹏飞,等. 加味补肾活血汤治疗肾虚血瘀型膝骨性关节炎临床疗效观察[J]. 中国中医骨伤科杂志,2022,30(9):36-42.
- [12] 王君,吴滨滨,王晓东,等. 补肾益气化痰冲剂对去卵巢骨质疏松模型大鼠血管形成的影响及机制研究[J]. 中国比较医学杂志,2022,32(3):54-61.
- [13] PEREA-GIL I,SEEGER T,BRUYNEEL A A N,et al. Serine biosynthesis as a novel therapeutic target for dilated cardiomyopathy[J]. Eur Heart J,2022,43(36):3477-3489.
- [14] 凤雯晴,刘凯洋,张嘉宁,等. 基于网络药理学和分子对接的熟地黄治疗骨关节炎的作用机制研究[J]. 中国中药杂志,2022,47(19):5336-5343.
- [15] 李虎业,窦增花,孔德元,等. 山茱萸新苷 I 干预膝骨关节炎模型大鼠抑制白细胞介素 6 介导的炎症反应[J]. 中国组织工程研究,2021,25(2):211-215.
- [16] LUO M X,WANG Q Z,BAO J G. Investigate the therapeutic effect of ibandronate sodium on knee osteoarthritis based on TLRs/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway in vitro and in vivo[J]. Discov Med,2024,36(180):100-112.
- [17] CIOROIANU G O,FLORESCU A,SIMIONESCU C E,et al. The therapeutic benefits of NSAIDs and physical therapy in knee osteoarthritis[J]. Rom J Morphol Embryol,2024,65(2):217-224.
- [18] YANG F,XIONG W Q,LI C Z,et al. Extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells mediate extracellular matrix remodeling in osteoarthritis through the transport of microRNA-29a[J]. World J Stem Cells,2024,16(2):191-206.
- [19] ZHAO C W,SONG W X,LIU B,et al. Resistin induces chemokine and matrix metalloproteinase production via CAPI receptor and activation of p38-MAPK and NF- $\kappa$ B signalling pathways in human chondrocytes[J]. Clin Exp Rheumatol,2022,40(3):501-513.
- [20] SUN W,YUE M X,XI G M,et al. Knockdown of NEK7 alleviates anterior cruciate ligament transection osteoarthritis ( ACLT )-induced knee osteoarthritis in mice via inhibiting NLRP3 activation[J]. Autoimmunity,2022,55(6):398-407.
- [21] 朴钟源,魏亚芬,宋琳,等. 地黄饮子对 A $\beta$  诱导的 SH-SY5Y 细胞 RAGE/p38MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路的影响[J]. 中华神经医学杂志,2017,16(10):1022-1027.
- [22] 傅超. 山茱萸活性成分马钱子苷对超负荷运动大鼠心肌细胞焦亡的保护作用[J]. 分子植物育种,2023,21(20):6894-6900.
- [23] 武艳芝,姚远,杨五小,等. 基于 NF- $\kappa$ B 信号通路探讨当归多糖对 LPS 介导的 SD 大鼠骨性关节炎作用研究[J]. 中华中医药学刊,2024,42(11):136-140,后插 26-后插 30.

# Exploration of the Protective Effect and Molecular Mechanism of Bushen Zhuangjin Decoction on Cartilage Injury in Rats with Knee Osteoarthritis of Kidney Deficiency and Blood Stasis Type

LI Xin<sup>1,2</sup>, SHI Pengbo<sup>1</sup>

1. *First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450099, China;*

2. *Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China*

**Abstract** Objective: To observe the protective effect of Bushen Zhuangjin Decoction on cartilage damage in knee osteoarthritis (KOA) rats with kidney deficiency and blood stasis type, and to explore its molecular mechanism. Methods: Seventy female SD rats were divided into 7 groups by a random digital table, with 10 in each. Except the normal group, the others were established kidney deficiency and blood stasis type KOA models. Each 1 rat was selected from the model group and the normal group, which were euthanized to verify successful modeling. Among the others, the positive drug group was given a dose of 5.4 mg/kg of etoposide by gavage. The low, medium, and high dose groups of Bushen Zhuangjin Decoction were given Bushen Zhuangjin Decoction 2.1, 4.2, and 8.4 g/kg by gavage respectively. SB203580 group was orally administered with SB203580 3.0 mg/kg. The model group was given 1 mL/100 g of physiological saline by gavage. The other 10 female SD rats were given an equal volume of physiological saline by gavage (normal group). All lasted for 30 days. Enzyme linked immunosorbent assay was used for detecting tumor necrosis factor -  $\alpha$  (TNF) -  $\alpha$ , interleukin -  $1\beta$  (IL -  $1\beta$ ) and interleukin - 6 (IL - 6) levels in joint fluid. Hematoxylin eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of cartilage tissues, and the Mankin scores were compared. Real time reverse transcription polymerase chain reaction (RT - qPCR) was used to detect p38 mitogen activated protein kinase (p38MAPK) and nuclear transcription factors in various groups of cartilage tissues -  $\kappa$ B p65 (NF -  $\kappa$ B p65), nucleotide binding oligomerization domain like receptor 3 (NLRP3), and aspartate proteolytic enzyme 3 (Caspase3) gene expressions. Western blotting (WB) was used for detecting p38MAPK and NF -  $\kappa$ B p65, NLRP3, Caspase3 protein expressions and p - p38MAPK levels in cartilage tissues. Results: KOA models of kidney deficiency and blood stasis type were successfully established. The TNF -  $\alpha$ , IL -  $1\beta$ , IL - 6 levels of joint fluid, Mankin score, p38MAPK gene, NF -  $\kappa$ B p65, NLRP3, Caspase3 expressions and p - p38MAPK in knee cartilage tissues in the model group were all higher than those in the normal group ( $P < 0.01$ ), of which the treatment groups were all lower than the model group ( $P < 0.01$ ), and except for Caspase3 expressions the indexes in the high - dose group of Bushen Zhuangjin Decoction were lower than the SB203580 group ( $P < 0.01$ ), and the effect of Bushen Zhuangjin Decoction was dose - dependent. The cartilage tissue of the model group rats showed severe pathological changes, and the treatment groups all showed relief, and the effects of the low - dose and positive drug groups of Bushen Zhuangjin Decoction, the medium dose group of Bushen Zhuangjin Decoction and SB203580 group were basically equivalent. Conclusion: Bushen Zhuangjin Decoction can alleviate the inflammatory response of cartilage tissue in KOA rats with kidney deficiency and blood stasis type, and it is speculated to inhibit p38MAPK/NF -  $\kappa$ B pathway achieves this effect.

**Key words** Bushen Zhuangjin Decoction; Knee osteoarthritis; Kidney deficiency and blood stasis; Cartilage injury