

甘草附子汤调控PI3K/Akt/mTOR信号通路促进自噬改善 大鼠膝骨关节炎的机制

王小超¹, 刘满格², 肖嘉聪², 李泽晖¹, 郭达¹, 蔡育霖², 字淳坚², 曹学伟^{1*}

(1. 广东省中医院, 广州 510120; 2. 广州中医药大学, 广州 510405)

[摘要] 目的:探讨甘草附子汤对膝骨关节炎(KOA)的干预作用及其分子机制。方法:采用网络药理学预测甘草附子汤作用的关键靶点与信号通路。将50只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、甘草附子汤低剂量组(2.8 g·kg⁻¹)、甘草附子汤高剂量组(5.6 g·kg⁻¹)及阳性药物塞来昔布组(20 mg·kg⁻¹),每组10只。假手术组及模型组给予等体积蒸馏水。除假手术组外,其余4组均采用前交叉韧带切断法建立KOA大鼠模型。造模成功后,各组每日灌胃1次,连续给药8周。利用微计算机断层扫描(Micro-CT)仪及组织学染色评估软骨与软骨下骨的结构改变;酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒检测血清炎症因子白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 水平;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)、蛋白免疫印迹法(Western blot)及免疫组化检测关节软骨中微管相关蛋白1轻链3B(LC3B)、选择性自噬接头蛋白62(p62)、自噬关键分子酵母Atg6同系物(Beclin-1)等自噬相关蛋白及磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路关键分子的表达变化。结果:网络药理学结果提示,甘草附子汤可能通过调控PI3K/Akt/mTOR通路发挥抗骨关节炎的作用。体内实验表明,甘草附子汤可显著改善KOA大鼠软骨退变,减轻软骨下骨破坏。血清炎症因子检测结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠血清IL-6、IL-1 β 及TNF- α 水平均明显升高($P<0.05$);与模型组比较,甘草附子汤低、高剂量组及塞来昔布组上述3项炎症因子水平均明显降低($P<0.05$),但甘草附子汤高剂量组与塞来昔布组上述3项水平差异无统计学意义,提示甘草附子汤可有效抑制KOA大鼠的全身炎症反应。机制研究显示,甘草附子汤抑制PI3K/Akt/mTOR通路活化,从而促进自噬活性,改善软骨细胞功能与基质降解。结论:甘草附子汤通过抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路、促进自噬,改善KOA大鼠软骨与软骨下骨损伤,为其在骨关节炎防治中的应用提供了理论依据。

[关键词] 甘草附子汤; 膝骨关节炎; 磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR); 自噬; 炎症

[中图分类号] R684.3;R285;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)17-0046-13

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20260718

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.r.20260618.1632.002>

[网络出版日期] 2026-06-22 10:34:10 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Mechanism of Gancao Fuzitang Improving Knee Osteoarthritis in Rats via Regulating PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway and Promoting Autophagy

WANG Xiaochao¹, LIU Mange², XIAO Jiacong², LI Zehui¹, GUO Da¹,

CAI Yulin², ZI Chunjian², CAO Xuewei^{1*}

(1. Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China;

2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** This paper aims to investigate the intervention effect and molecular mechanism of Gancao Fuzitang (GCFZT) in knee osteoarthritis (KOA). **Methods:** Network pharmacology was employed to predict the key targets and signaling pathways of GCFZT. Fifty SD rats were randomly divided into a sham group, a model group (KOA), a low-dose GCFZT group

[收稿日期] 2026-03-18

[基金项目] 黄宪章广东省名中医传承工作室项目(粤中医办函[2020]1号);广东省基础与应用基础研究基金企业联合基金项目(2022B1515230008);广州市科技计划项目(2024A03J0118)

[第一作者] 王小超,博士,住院医师,从事中医药防治骨关节疾病的临床与基础研究,E-mail:635836379@qq.com

[通信作者] *曹学伟,博士,主任中医师,博士生导师,从事中医药治疗骨关节疾病研究,E-mail:caoxuewei@126.com

(GCFZT-L, $2.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), a high-dose GCFZT group (GCFZT-H, $5.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and a positive drug celecoxib group (Celecoxib, $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), with 10 rats in each group. The rats in the sham group and the model group were given an equal volume of distilled water. Except for the sham group, the other four groups underwent anterior cruciate ligament transection to establish the KOA rat model. After successful modeling, the rats in each group received intragastric administration once a day for eight consecutive weeks. The structural changes of cartilage and subchondral bone were assessed via micro-computed tomography (micro-CT) and histological staining. The levels of inflammatory factors in the serum, such as interleukin- 1β (IL- 1β), IL-6, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were measured using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit. Real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), Western blot, and immunohistochemistry were used to detect changes in the expression of autophagy-related proteins such as microtubule-associated protein 1 light chain 3B (LC3B), selective autophagy junction protein 62 (p62), and autophagy key molecule yeast Atg6 homolog (Beclin-1) in articular cartilage, as well as key molecules of the phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway. **Results:** Network pharmacology analysis suggests that GCFZT may exert anti-osteoarthritic effects through regulating the PI3K/Akt/mTOR pathway. *In vivo* experiment shows that GCFZT can significantly improve cartilage degeneration and attenuate subchondral bone destruction in KOA rats. Detection results of inflammatory factors in the serum reveal that, compared with those in the sham group, the levels of IL-6, IL- 1β , and TNF- α in the serum of rats in the KOA group are significantly increased ($P < 0.05$). Compared with those in the KOA group, the levels of these three inflammatory factors in the GCFZT-L, GCFZT-H, and Celecoxib groups were significantly decreased ($P < 0.05$). However, there was no statistically significant difference in these three inflammatory factor levels between the GCFZT-H group and the celecoxib group. These findings suggest that GCFZT can effectively inhibit the systemic inflammatory response in KOA rats. Mechanism research indicates that GCFZT inhibits activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway, thereby enhancing autophagic activity and improving chondrocyte function and matrix degeneration. **Conclusion:** GCFZT improves cartilage and subchondral bone damage in KOA rats by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and promoting autophagy. These findings provide theoretical evidence for the application of GCFZT in the prevention and treatment of osteoarthritis.

[Keywords] Gancao Fuzitang; knee osteoarthritis; phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR); autophagy; inflammation

膝关节炎(KOA)是全球最常见的退行性骨关节疾病之一,影响超过2.5亿人群,是导致老年人疼痛和致残的主要原因^[1-2],也给医疗体系和患者家庭带来了沉重的负担。其病理特征包括关节软骨退变、软骨下骨硬化及滑膜炎症反应,严重影响患者生活质量^[3-5]。尽管药物与手术治疗在缓解症状方面取得一定进展,但目前临床用药主要针对疼痛与炎症控制,难以有效延缓软骨退变^[6-7]。长期使用非甾体抗炎药(NSAIDs)或糖皮质激素还可能引发胃肠、肝肾等不良反应,因此亟需探索新的安全有效干预策略延缓KOA的进展^[8-9],为KOA患者提供一种新的治疗选择。

KOA的发生发展涉及机械负荷、炎症反应与细胞代谢异常的多因素交互作用^[10-11]。近年来研究表明,自噬功能障碍在KOA进展中起关键作用^[12-13]。自噬是一种进化上保守的细胞内降解过程,负责清除受损细胞器与异常蛋白,以维持细胞稳态及能量代谢^[14]。自噬活性下降可导致软骨细胞凋亡增加、细胞外基质(ECM)降解与炎症因子过度释放,从而加速软骨退变^[15]。在多条调控通路中,磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3K/Akt/mTOR)信号通路被认为是自噬调节的关键节点,其过度激活可抑制自噬通量并促进代谢紊乱,导致关节

结构破坏^[16-18]。因此,靶向PI3K/Akt/mTOR信号通路以恢复自噬稳态,可能是干预KOA的重要策略。

中医学认为,KOA属“痹证”范畴,其病机多与风寒湿邪侵袭、肝肾亏虚及气血失调有关^[19-20]。传统中医药以“多成分、多靶点、网络调控”的整体干预优势,为退行性疾病的治疗提供了新思路。甘草附子汤出自《金匮要略·痹病篇》,由甘草、附子、白术与桂枝组成,历来用于治疗寒湿痹痛及关节冷痛。现代药理研究表明,甘草附子汤具有抗炎、抗氧化和免疫调节等多重生物学效应,对关节炎症及组织损伤具有潜在的保护作用^[21-22]。ZHAO等^[21]研究表明,甘草附子汤对胶原诱导性关节炎模型小鼠具有治疗作用。此外,ZHAO等^[23]研究指出,甘草附子汤对寒湿痹阻型KOA具有潜在治疗作用,其机制可能与炎症相关信号通路的调控密切相关。然而,目前关于甘草附子汤治疗KOA的分子机制研究仍较有限,尤其缺乏针对其是否通过PI3K/Akt/mTOR信号通路调控自噬改善软骨退变的系统研究,其现代生物学机制仍有待进一步阐明。

基于上述背景,本研究结合网络药理学与动物实验,初步探讨甘草附子汤通过调控PI3K/Akt/mTOR信号通路、恢复自噬水平,进而改善软骨细胞功能与基质代谢失衡、延缓KOA病理进程的潜在机制,以期

为中药复方干预退行性骨关节疾病提供一定的实验依据与参考。与现有研究比较,本研究的创新之处在于,既往针对甘草附子汤治疗KOA的研究多集中于炎症相关通路的宏观描述,尚缺乏从自噬调控角度的机制探讨;本研究将PI3K/Akt/mTOR通路介导的自噬调控作为核心切入点,结合网络药理学筛选与动物实验验证,对甘草附子汤干预KOA的分子机制进行初步阐释,是对现有研究的有益补充。

1 材料

1.1 动物 选用8周龄、体质量180~200 g的雄性SD大鼠,由广州锐格生物科技有限公司提供,合格证号SCXK(粤)2023-0059。所有动物饲养于广州中医药大学第一附属医院实验动物中心SPF级动物房,饲养与实验操作均遵循国家及实验动物管理规范要求。饲养环境恒温恒湿,温度保持在(22±2)℃,相对湿度为50%~60%,并采用12 h光/暗交替。大鼠可自由摄取饲料和饮用水。

1.2 伦理 本实验方案经广州中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会审查批准(批准号GZTCMF1-20250066)。

1.3 试剂和仪器 大鼠血清炎症因子白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测试剂盒(武汉亚科因生物技术有限公司,货号分别为KTE9001、KTE9004、KTE9007);RNA提取试剂盒、反转录试剂盒、SYBR Green Pro Taq HS预混型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(湖南艾科瑞生物技术有限公司,货号分别为AG21017、AG11705、AG11701);放射免疫沉淀法(RIPA)裂解液及蛋白酶/磷酸酶抑制剂混合物(碧云天生物技术有限公司,货号分别为P0013B、P1045);TRIzol裂解液(美国Invitrogen公司,货号15596026);

二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒、极超敏增强化学发光法(ECL)化学发光底物(白鲨生物科技有限公司,货号分别为BL1054A、BL5965B);一抗聚集蛋白聚糖(ACAN)、胶原蛋白II型(Col II)、基质金属蛋白酶(MMP)3、MMP13、选择性自噬接头蛋白62(p62)、自噬关键分子酵母Atg6同系物-1(Beclin-1)、PI3K、磷酸化(p)-PI3K、Akt、p-Akt、 β -肌动蛋白(β -actin)一抗及相应二抗(江苏亲科生物科技有限公司,货号分别为DF7561、AF5456、AF0217、DF6494、AF5384、AF5128、AF6241、AF3242、AF0836、AF0016、AF7018、S0001);一抗微管相关蛋白1轻链3B(LC3B)、

mTOR、p-mTOR(美国Cell Signaling Technology公司,货号分别为2775、2972、2971);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒、番红O-固绿(SF)软骨染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为G1120、G1371)。

SkyScan1276型Micro-CT扫描系统(比利时Bruker公司);Microplate Absorbance Reader型酶标仪、ChemiDoc Imaging System型凝胶/化学发光成像系统、PCR仪(美国Bio-Rad公司);BX53型正置显微镜(日本Olympus公司);切片机、ST16R型离心机(美国Thermo Scientific公司)。

1.4 药物 甘草附子汤由甘草(6 g)、附子(6 g)、白术(9 g)及桂枝(6 g)组成。本研究所用甘草附子汤由广州中医药大学第二附属医院药剂科按照2020年版《中华人民共和国药典》标准配制,所有药材均经邓广海副主任中药师鉴定合格后使用。

2 方法

2.1 甘草附子汤药物制备 各药材按比例称取后加入10倍体积纯化水浸泡30 min,先以武火煎沸,再以文火煎煮30 min,滤取第1次煎液;再加入8倍体积纯化水煎煮20 min,合并2次煎液,经100 μ m滤布过滤后,于减压条件下浓缩至相当于原药材1 g·mL⁻¹的质量浓度。所得药液分装、灭菌后,置4℃保存备用。

2.2 网络药理学分析

2.2.1 筛选药物的活性化学成分 利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)数据库(<https://tcmsp-e.com/>)检索甘草附子汤中各药材(甘草、附子、白术、桂枝)的化学成分。为确保候选成分具备良好的药代动力学特性与潜在活性,依据文献[24]标准设定筛选条件为口服生物利用度(OB)≥30%、类药性(DL)≥0.18。筛选得到的活性成分及其潜在靶点经通用蛋白质数据库(UniProt, <https://www.uniprot.org/>)标准化处理,统一转化为基因官方符号(Gene Name),并将物种限定为“Homo sapiens”,以确保靶点信息的准确性与可比性。

2.2.2 获取KOA疾病靶基因 利用在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <https://www.omim.org/>)和基因名片数据库(GeneCards, <https://www.genecards.org/>)数据库,以关键词“Knee Osteoarthritis”为检索词,获取与膝骨关节炎相关的疾病靶基因信息。分别从两数据库中下载所得结果后,使用Excel软件对数据进行整合与去重处理(依据相同Entry ID去除重复项),最终获得与膝骨关节炎相关的非冗余

靶基因集。

2.2.3 甘草附子汤治疗 KOA 的交集靶点 利用 E Venn 在线作图工具绘制药物与疾病靶点的交集图。将甘草附子汤活性成分对应的靶基因导入 List1, 将 KOA 相关靶基因导入 List2, 生成二者的 Venn 图, 并提取其交集靶点。所得交集基因即为甘草附子汤治疗膝骨关节炎的潜在作用靶点, 整合交集靶点, 作为甘草附子汤治疗 KOA 的潜在靶点。

2.2.4 构建药物-成分-靶点网络 在 Cytoscape 3.9.1 软件中分别导入甘草附子汤、其活性成分及治疗 KOA 的潜在靶点(即交集靶点)数据, 构建“药物-成分-靶点”网络。网络节点(node)代表中药、活性成分及靶基因, 边(edge)表示他们的相互作用关系。通过计算各节点的度值(Degree), 评估其在网络中的重要性; 其中度值较高的化合物被视为甘草附子汤中发挥抗膝骨关节炎作用的关键活性成分, 反映其与潜在靶点之间的高度相关性。

2.2.5 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络图构建与核心靶点筛选 运用蛋白互作网络分析数据库 (STRING) 对甘草附子汤治疗 KOA 的关键靶点进行 PPI 分析。将药物与疾病的交集靶点导入 STRING, 物种设定为“Homo sapiens”, 筛选条件设为最高置信度(confidence degree) > 0.9, 并勾选“hide disconnected nodes in the network”(隐藏未连接节点), 以获得高可信度的 PPI 网络结果。随后, 将导出的 PPI 网络数据导入 Cytoscape 3.9.1 软件, 通过 Network Analyzer 模块计算各节点的 Degree、介数中心性(Betweenness Centrality)和紧密度(Closeness Centrality)等拓扑特征参数。根据这些指标, 筛选出在网络中具有显著连接性与中心性的节点作为核心靶点, 以揭示甘草附子汤治疗 KOA 的关键作用蛋白。

2.2.6 基因本体(GO)与京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析 利用 DAVID 数据库, 对甘草附子汤治疗 KOA 的潜在靶点进行 GO 功能注释与 KEGG 通路富集分析。

2.3 动物实验

2.3.1 动物造模及分组给药 采用前交叉韧带切断术建立大鼠 KOA 模型^[25]。具体操作如下, 在戊巴比妥钠腹腔注射麻醉下, 于大鼠膝关节正中作切口, 显露关节腔后切断前交叉韧带, 并部分切除内侧半月板以造成关节不稳; 假手术组仅行关节切开而不切断韧带。术后予以常规消毒, 并肌内注射青霉素 G 钠 80 000 U·kg⁻¹, 每日 1 次, 连续 3 d 以预防

感染。造模后根据大鼠患侧膝关节肿胀、活动受限、负重减少、步态异常及前抽屉试验阳性等表现判断模型是否成功; 实验终点通过 HE、SF 染色及国际骨关节炎研究协会(OARSI)评分进一步确认 KOA 模型建立情况。造模成功后, 将大鼠随机分为假手术组, 模型组, 甘草附子汤低、高剂量组, 阳性药物塞来昔布组 5 组(每组 $n=10$)。甘草附子汤以灌胃方式给药, 低剂量组按 2.8 g·kg⁻¹, 高剂量组按 5.6 g·kg⁻¹ 给药。剂量依据临床成人常用量(27 g·d⁻¹, 以 60 kg 体质量计约 0.75 g·kg⁻¹)按体表面积换算法(人-大鼠换算系数 6.2)折算得出, 大鼠等效剂量为约 2.8 g·kg⁻¹。为考察剂量依赖性及安全范围, 设低剂量组为临床等效剂量(2.8 g·kg⁻¹), 高剂量组为其 2 倍(5.6 g·kg⁻¹)。塞来昔布组剂量为 20 mg·kg⁻¹。假手术组及模型组给予等体积蒸馏水。各组每日灌胃 1 次, 连续 8 周。

2.3.2 动物取材 干预期结束后, 在过量戊巴比妥钠(150 mg·kg⁻¹, 腹腔注射)麻醉下处死大鼠, 以确保实验符合人道处置原则。随后, 经腹主动脉采集全血, 室温静置凝固后以 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 离心半径 12.5 cm, 分离血清并置于 -80 °C 冻存备用。同时, 分离双侧膝关节并去除周围软组织。一部分关节标本固定于 4% 多聚甲醛溶液中, 用于组织学及免疫组织化学分析; 另一部分迅速置于 -80 °C 保存, 以供后续分子生物学检测使用。

2.3.3 血清 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 含量检测 采用试剂盒测定大鼠血清中 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 的水平。检测过程严格按照厂家提供的操作说明进行。使用酶标仪读取吸光度 A , 并根据标准曲线计算各指标的实际浓度。

2.3.4 Micro-CT 扫描大鼠膝关节影像 采用高分辨率 Micro-CT 扫描系统(Bruker SkyScan 1276)对大鼠膝关节进行影像学分析。样本经 4% 多聚甲醛固定后置于样品架中, 扫描参数设定为电压 55 kV, 电流 200 μ A, 分辨率 12 μ m, 步进角 0.4°。扫描完成后, 利用 Bruker 配套软件 NRecon、DataViewer 和 CTAn 进行图像重建与定量分析。选择膝关节内侧软骨下骨作为感兴趣区域, 分析软骨下骨骨体积分数(BV/TV)、结构模型指数(SMI)、小梁数(Tb.N)、骨密度及小梁分离度(Tb.Sp)。

2.3.5 大鼠膝关节组织组织学染色 取大鼠膝关节组织于 4% 多聚甲醛溶液中固定 48 h, 随后置于 10% 乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙液中脱钙 3 周, 每 5 d 更换 1 次脱钙液以确保充分脱钙。脱钙完成后,

标本经梯度乙醇脱水、二甲苯透明后进行石蜡包埋,并切取厚度为5 μm的连续切片。切片经脱蜡脱水后,分别采用HE和SF染色。染色结束后,经中性树胶封片,在光学显微镜下观察和拍摄组织形态。

2.3.6 Real-time PCR测定大鼠膝关节组织目标基因 取大鼠膝关节软骨组织,于液氮中速冻后研磨成细粉,加入预冷的TRIzol裂解液充分匀浆以提取总RNA。经三氯甲烷分层、异丙醇沉淀及75%乙醇洗涤后,将RNA溶解于无RNA酶水(RNase-free water)中,测定其纯度与浓度。随后,按照试剂盒说明书操作,将RNA反转录为cDNA,并于-20℃条件下保存备用。Real-time PCR采用SYBR Green法进行,扩增反应条件为:95℃预变性30 s,随后40个循环(95℃5~10 s,60℃30 s)。检测的目标基因包括ACAN、Col II a1、MMP3、MMP13、ATG5、LC3B、Beclin-1和p62,内参基因为18S。引物由擎科生物科技有限公司合成,引物序列见表1。结果采用2^{-ΔΔC_t}法计算相对表达量。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
18S	上游 TGCGGAAGGATCATTAACGGA	300
	下游 AGTAGGAGAGGAGCGAGCGACC	
ACAN	上游 TCCACATCAGAAGAGCCATAC	196
	下游 AGTCAAGGTCGCCAGAGG	
Col II a1	上游 GCTGTGGAAGTGGATGAAGA	174
	下游 TGAGGAACTGTGGAGAGACG	
MMP3	上游 CTGGGCTATCCGAGGTCATG	77
	下游 TCCGCTGAAGAAGTAAAGAAACC	
MMP13	上游 CAAGCAGCTCCAAAGGCTAC	130
	下游 TGGATGTGACCGTTTTTCGGT	
ATG5	上游 GTGTGAAGGAAGCTGACGCT	197
	下游 CCATGAGTTTCCGGTTGATGGT	
LC3B	上游 CGCTTGCAGCTCAATGCTAAC	93
	下游 CTCGTACACTTCGGAGATGGG	
p62	上游 GGAAGTATGGAGTCGGATAAC	80
	下游 GTGGATGGGTCCACTTCTTT	
Beclin-1	上游 ATGGAGGGGTCTAAGGCGTC	149
	下游 TGGGCTGTGTAAGTAATGGA	

2.3.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠膝关节软骨组织蛋白 取大鼠膝关节软骨组织,于液氮中迅速冷冻后置于预冷研钵中,在持续液氮冷却条件下充分研磨成细粉。立即加入预冷的RIPA裂

解液(含1×蛋白酶抑制剂与1×磷酸酶抑制剂),充分吹打匀浆并于冰浴条件下裂解30 min。以12 000×g,4℃离心15 min,离心半径10 cm,取上清液作为总蛋白。蛋白浓度采用BCA法测定。按体积比例加入4×上样缓冲液,于95℃加热5 min进行变性处理。每孔上样蛋白30 μg,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。以5%脱脂奶粉在室温封闭1 h,随后于4℃条件下孵育一抗过夜。所用一抗包括MMP3、MMP13、Col II、ACAN、LC3B、p62、Beclin-1、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、β-actin(稀释比均为1:1 000)。次日用TBST洗膜3次,随后加入辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗(1:5 000)室温孵育1 h。TBST洗膜3次后,采用ECL化学发光法显色成像。条带灰度值使用Image J软件进行分析统计。

2.3.8 免疫组织化学 大鼠膝关节石蜡切片经二甲苯脱蜡及梯度乙醇复水后,使用3%过氧化氢室温孵育10 min以阻断内源性过氧化物酶活性。随后采用柠檬酸钠缓冲液进行微波热修复15 min,自然冷却至室温。以5%牛血清白蛋白封闭30 min后,加入一抗LC3B、p62、p-mTOR(1:200),于4℃湿盒中孵育过夜。次日,切片经磷酸盐缓冲液(PBS)清洗3次,加入HRP标记二抗(1:200),室温孵育60 min。再次PBS清洗后,采用二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒显色,在显微镜下实时监控反应时间以防过染。经苏木素复染细胞核,再依次进行梯度乙醇脱水、二甲苯透明,并以中性树胶封片。染色完成后,在光学显微镜下观察并拍摄图像。图像分析使用Image J软件进行:通过Color Deconvolution模块分离DAB信号,设定统一阈值后测定阳性细胞数与总细胞数,阳性细胞率=阳性细胞数/总细胞数×100%。

2.3.9 统计学分析 所有数据均使用SPSS 25.0进行统计分析,并使用GraphPad Prism 9.0软件进行绘图。首先对各组数据进行正态性检验,若数据符合正态分布,则以 $\bar{x} \pm s$ 表示;对满足方差齐性的数据,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行多组间比较;若差异具有统计学意义,进一步进行Tukey's事后检验(Tukey's post hoc test)以比较组间差异;对不满足方差齐性的数据,采用Dunnett's T3检验进行两两比较。若数据不符合正态分布,则以中位数(M)±四分位距(IQR)表示,并采用非参数检验(Kruskal-Wallis检验)进行多组比较,必要时进行

Dunn's 多重比较校正。所有实验均至少独立重复3次,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 网络药理学

3.1.1 甘草附子汤潜在活性成分与作用靶点的鉴定 通过TCMSP数据库对甘草附子汤的化学成分进行系统筛选,并结合ADME参数进行活性化合物筛选。结果显示,甘草获得活性成分92个,附子21个,白术7个,桂枝7个。经合并去除重复后,共得到124个潜在活性成分。随后,收集并整合这些成分对应的作用靶点信息,最终共获得827个潜在靶点基因。

3.1.2 疾病相关靶点与“疾病-药物”重叠靶点的获取 通过GeneCards数据库检索与KOA相关的疾病靶点,共获得3 367个候选基因。根据相关性评分(Relevance Score)筛选标准,去除评分 <2.9 的基因后,最终保留1 025个高相关靶点。同时,从OMIM数据库检索获得42个KOA相关靶点。将两数据库所得结果进行合并与去重处理后,最终获得1 061个与膝骨关节炎相关的非冗余靶点。利用Venny平台进行交集分析,共鉴定出甘草附子汤药物靶点与KOA疾病靶点的145个重叠基因,其中包括磷酸肌醇3-激酶调节亚基1(PIK3R1)、Akt1、前列腺素内过氧化物合酶2(PTGS2)、MMP1、MMP3、MMP8、MMP9、mTOR、瞬时受体电位香草酸亚型1(TRPV1)及缺氧诱导因子(HIF)1A等代表性靶点,结果见增强出版附加材料。

3.1.3 甘草附子汤“药物-成分-靶点”网络的构建

将甘草附子汤的药物、活性成分及其治疗KOA的潜在靶点导入Cytoscape 3.9.01软件,构建“药物-成分-靶点”相互作用网络。结果显示,该网络共包含274个节点和2 741条边,充分揭示了甘草附子汤多成分、多靶点的作用特征。见增强出版附加材料。

3.1.4 PPI网络构建 将145个潜在靶点导入

STRING平台,设定最小交互评分阈值为0.4,隐藏游离节点。在Cytoscape 3.9.1中可视化的结果包含137个节点和768条边,节点的大小和颜色深浅反映其在网络中的重要性。综合评价结果,筛选出Akt1、IL-6、STAT3、TNF、Bcl-2、ESR1、MMP9、HIF1A、PIK3CA和MTOR等核心基因。见增强出版附加材料。

3.1.5 GO功能与KEGG通路富集分析 将145个重叠靶点导入DAVID数据库进行GO富集分析,涵盖生物学过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF)3个层面。结果共富集4 277个BP条目、302个CC条目和532个MF条目。根据校正后的 P 值(adjusted P -value)筛选出各类别中显著性最高的前10项,并绘制可视化图表。富集结果显示,BP主要涉及激酶活性的正向调控和对氧水平的响应;MF主要与内肽酶活性和丝氨酸型内肽酶活性相关;CC主要集中于含胶原的细胞外基质和细胞-基质连接。进一步的KEGG通路富集分析共识别出261条信号通路,其中与KOA发病机制密切相关的前10条包括PI3K/Akt、Autophagy-animal、mTOR、IL-17等信号通路。见增强出版附加材料。

3.2 动物实验结果

3.2.1 甘草附子汤减轻KOA大鼠的血清炎症反应

ELISA试剂盒检测结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠血清中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平明显升高($P<0.05$),提示KOA伴随明显的系统性炎症反应。与模型组比较,甘草附子汤低、高剂量组和塞来昔布组大鼠血清中上述炎症因子水平明显下降($P<0.05$),其中高剂量组改善效果更为显著。见表2。以上结果表明,甘草附子汤能够有效抑制KOA大鼠的系统性炎症反应,其作用效果与塞来昔布相当,可能通过下调IL-1 β 、IL-6和TNF- α 等炎症介质的释放,减轻免疫与代谢相关信号通路的过度激活,从而发挥抗炎和软骨保护作用。

表2 甘草附子汤对KOA大鼠血清炎症因子水平的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

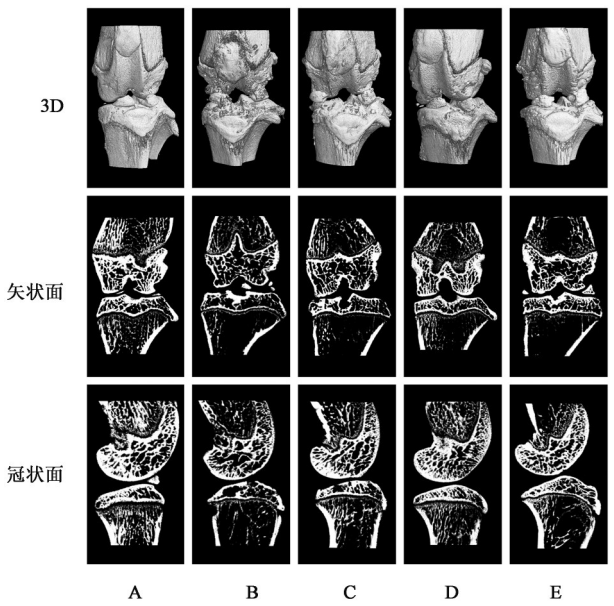
Table 2 Effect of Gancao Fuzitang on levels of inflammatory factors in serum of KOA rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)					ng·L ⁻¹
组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-1 β	IL-6	TNF- α	
假手术组		40.77 $\pm$ 4.53	27.63 $\pm$ 1.08	73.27 $\pm$ 5.23	
模型组		98.07 $\pm$ 4.57 ¹⁾	81.21 $\pm$ 4.54 ¹⁾	276.24 $\pm$ 5.94 ¹⁾	
甘草附子汤低剂量组	2.8	73.61 $\pm$ 5.74 ^{1,2)}	57.13 $\pm$ 2.79 ^{1,2)}	155.80 $\pm$ 8.25 ^{1,2)}	
甘草附子汤高剂量组	5.6	66.66 $\pm$ 3.66 ^{1,2)}	42.39 $\pm$ 4.06 ^{1,2)}	103.44 $\pm$ 8.07 ^{1,2)}	
塞来昔布组	0.02	61.83 $\pm$ 4.44 ^{1,2)}	38.78 $\pm$ 3.53 ^{1,2)}	93.41 $\pm$ 4.34 ^{1,2)}	

注:与假手术组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$ (表8和表9同)

3.2.2 甘草附子汤减轻 KOA 大鼠软骨下骨破坏

Micro-CT 三维重建图像显示,假手术组大鼠软骨下骨结构完整,小梁致密且连续,关节面平整,骨小梁间隙均匀,呈网状支撑结构。模型组软骨下骨明显破坏,小梁稀疏、断裂,关节面塌陷不平,软骨下骨骨密度明显降低,显示显著的骨小梁丢失与重塑紊乱。经甘草附子汤低剂量组干预后,软骨下骨的整体形态较模型组有所恢复,小梁结构较为连续,但仍可见部分间隙扩大。高剂量组的重建图像显示软骨下骨结构明显改善,小梁数量增多、排列规则、骨小梁连接性增强,整体结构更接近正常状态。塞来昔布组亦表现出相似的保护作用,小梁断裂减少、结构相对致密,提示其对软骨下骨破坏亦具有一定改善作用,见图1。

进一步对膝关节软骨下骨区域进行定量分析发现,假手术组大鼠软骨下骨骨体积分数(BV/TV)、骨密度(BMD)及小梁数(Tb.N)较高,结构模型指数(SMI)与小梁分离度(Tb.Sp)处于正常范围。模型组大鼠软骨下骨结构严重破坏,小梁稀疏、断裂、排列紊乱,表现为与假手术组比较,BV/TV、BMD和Tb.N显著降低($P<0.01$),而SMI与Tb.Sp显著升高($P<0.01$),提示软骨下骨重塑失衡与微结构退变。经甘草附子汤低剂量组与高剂量组干预后,软骨下骨结构显著改善,小梁数量与连续性恢复,排列趋于规则;定量分析显示与模型组比较,BV/TV、BMD与Tb.N显著升高($P<0.01$),SMI与Tb.Sp显著



注:A.假手术组;B.模型组;C.甘草附子汤低剂量组;D.甘草附子汤高剂量组;E.塞来昔布组(图2-图6同)

图1 甘草附子汤对KOA大鼠膝关节周围骨微结构的影响
Fig. 1 Effect of Gancao Fuzitang on bone microstructure around knee joint of KOA rats

下降,差异有统计学意义($P<0.01$),其中高剂量组改善作用最为显著;塞来昔布组与甘草附子汤高剂量对比差异无统计学意义,见表3。综上,甘草附子汤能够有效减轻KOA大鼠软骨下骨破坏,通过提高骨体积分数与骨密度、降低结构模型指数和小梁分离度,从而改善小梁骨微结构,增强软骨下骨的力学支撑功能,维持关节软骨-骨界面的结构稳定性。

表3 甘草附子汤对KOA大鼠Micro CT定量分析结果的影响($\bar{x}\pm s, n=4$)

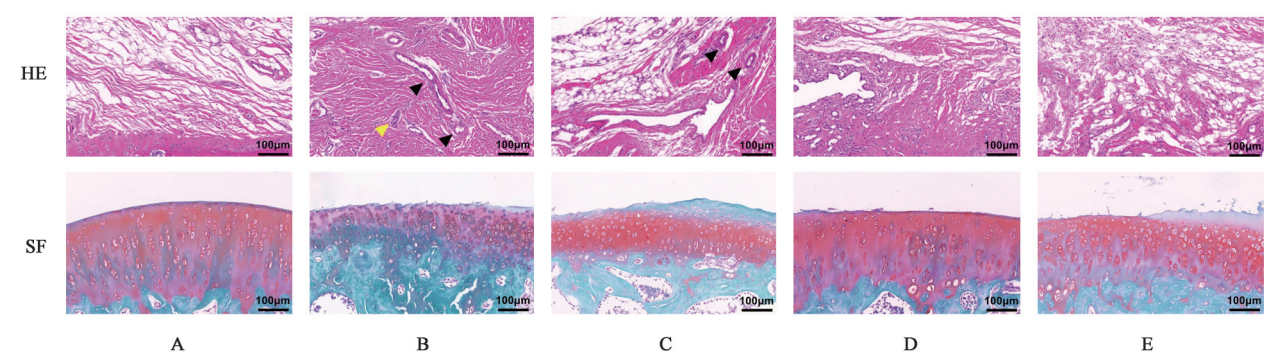
Table 3 Effect of Gancao Fuzitang on Micro-CT quantitative analysis results of KOA rats ($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	BMD/g·cm ⁻³	BV/TV/%	SMI	Tb.N/mm ⁻¹	Tb.Sp/μm
假手术组		0.97±0.02 ¹⁾	30.28±1.85 ¹⁾	1.29±0.06 ¹⁾	0.040±0.003 ¹⁾	14.30±1.53 ¹⁾
模型组		0.55±0.03	18.03±1.58	2.25±0.22	0.020±0.001	22.37±2.35
甘草附子汤低剂量组	2.8	0.69±0.06 ¹⁾	22.43±1.08 ¹⁾	1.64±0.09 ¹⁾	0.030±0.002 ¹⁾	18.82±0.57 ¹⁾
甘草附子汤高剂量组	5.6	0.82±0.03 ¹⁾	27.37±1.49 ¹⁾	1.85±0.12 ¹⁾	0.040±0.002 ¹⁾	16.69±0.62 ¹⁾
塞来昔布组	0.02	0.84±0.02 ¹⁾	26.78±0.66 ¹⁾	1.83±0.08 ¹⁾	0.040±0.001 ¹⁾	16.38±0.53 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P<0.01$

3.2.3 甘草附子汤减轻 KOA 大鼠滑膜炎症与软骨退变 HE 染色主要用于观察滑膜组织形态。结果显示,假手术组大鼠滑膜结构完整,细胞排列整齐,血管形态正常,未见明显炎症细胞浸润;模型组滑膜显著增厚,血管扩张充血,并伴大量炎症细胞浸润及纤维化样改变,提示KOA伴随显著滑膜炎症反应。经甘草附子汤干预后,滑膜组织结构明显改善,炎症细胞数量显著减少,血管扩张程度减轻;高

剂量组改善效果最为显著。塞来昔布组亦表现出相似的抗炎作用,滑膜炎症反应明显减轻。滑膜炎症评分结果显示,与假手术组比较,模型组评分明显升高($P<0.05$);与模型组比较,甘草附子汤低、高剂量组及塞来昔布组评分均明显降低($P<0.05, P<0.01$),其中高剂量组与塞来昔布组降幅最为显著。提示甘草附子汤可有效抑制KOA滑膜炎症反应。见图2、表4。



注:HE染色结果黑色箭头代表增生血管,黄色箭头指示炎性细胞浸润;SF染色结果红色为软骨层,绿色为骨组织

图2 甘草附子汤对KOA大鼠膝关节组织病理改变的影响

Fig. 2 Effect of Gancao Fuzitang on histopathological changes of knee joint tissues in KOA rats

表4 甘草附子汤对KOA大鼠的滑膜炎评分和OARSI评分的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 4 Effect of Gancao Fuzitang on synovitis score and OARSI scores for each group of rats ($\bar{x}\pm s, n=5$) 分

组别	剂量/g·kg ⁻¹	滑膜炎评分	OARSI评分
假手术组		0.80±0.84 ¹⁾	1.00±0.71 ¹⁾
模型组		7.80±0.84	12.40±1.14
甘草附子汤低剂量组	2.8	4.20±0.84 ¹⁾	6.20±0.84 ¹⁾
甘草附子汤高剂量组	5.6	3.00±0.71 ²⁾	3.80±0.84 ²⁾
塞来昔布组	0.02	3.00±0.71 ²⁾	4.00±0.71 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$

SF染色结果显示,假手术组软骨表面光滑、结构完整,番红O染色蛋白多糖呈均匀红色,固绿层与软骨下骨形成清晰分界;模型组软骨表面粗糙并出现裂隙,番红O染色明显变浅、呈斑片状减弱,局部出现近阴性区,固绿与番红O界限模糊,提示软骨基质成分丢失与结构破坏。经甘草附子汤干预后,软骨结构明显改善,裂隙范围与深度减小,番红O染色强度与连续性恢复,蛋白多糖含量增加;高剂

量组改善效果优于低剂量组;塞来昔布组亦表现出较显著的软骨保护作用。OARSI评分结果显示,与假手术组比较,模型组评分显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各治疗组评分明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),其中高剂量组与塞来昔布组改善最为显著。见图2、表4。

在分子机制层面,Real-time PCR结果显示,模型组软骨中基质合成相关基因ACAN与ColⅡa1表达显著下调($P<0.01$),基质降解相关基因MMP3与MMP13显著上调($P<0.01$)。经甘草附子汤干预后,ACAN与ColⅡa1表达升高,MMP3与MMP13表达下降,呈剂量依赖性改善趋势,见表5。Western blot结果与Real-time PCR一致,模型组ACAN、ColⅡ蛋白水平显著下降,差异有统计学意义($P<0.01$),而MMP3、MMP13显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$),见表6和图3;甘草附子汤显著逆转上述变化,促进基质合成、抑制基质降解。综上,甘草附子汤可有效减轻KOA大鼠的滑膜炎症与软骨退变,其作用效果与塞来昔布相当,机制可能与改善滑膜炎症微环境、促进软骨基质合成及抑制基质降解密切相关。

表5 甘草附子汤对大鼠软骨细胞外基质相关基因表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Gancao Fuzitang on expression of extracellular matrix-related genes in rat chondrocytes ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ACAN	ColⅡa1	MMP3	MMP13
假手术组		1.00±0.08 ¹⁾	1.00±0.09 ¹⁾	1.00±0.09 ¹⁾	1.00±0.10 ¹⁾
模型组		0.31±0.05	0.47±0.02	9.79±0.55	5.19±0.43
甘草附子汤低剂量组	2.8	0.74±0.08 ¹⁾	1.16±0.07 ¹⁾	3.80±0.20 ¹⁾	3.05±0.26 ¹⁾
甘草附子汤高剂量组	5.6	0.86±0.09 ¹⁾	1.69±0.02 ¹⁾	2.19±0.11 ¹⁾	1.68±0.10 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P<0.05$

3.2.4 甘草附子汤促进KOA大鼠软骨细胞自噬活性 为探讨甘草附子汤对KOA大鼠软骨细胞自噬水平的调控作用,笔者对大鼠软骨组织中关键自噬相关基因及蛋白的表达进行了检测。Real-time

PCR结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠软骨组织中ATG5、Beclin-1和LC3B基因表达明显下调($P<0.05$),而自噬底物蛋白p62表达明显上调($P<0.05$),提示KOA软骨细胞自噬功能受到抑制。与

表 6 甘草附子汤对大鼠软骨细胞外基质相关蛋白的分子表达量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ACAN/ β -actin	Col II/ β -actin	MMP3/ β -actin	MMP13/ β -actin
假手术组		1.00±0.03 ¹⁾	1.00±0.05 ¹⁾	1.00±0.04 ¹⁾	1.00±0.09 ¹⁾
模型组		0.40±0.03	0.31±0.05	1.89±0.08	1.85±0.07
甘草附子汤低剂量组	2.8	0.58±0.05 ¹⁾	0.59±0.04 ¹⁾	1.45±0.07 ¹⁾	1.45±0.05 ¹⁾
甘草附子汤高剂量组	5.6	0.75±0.05 ¹⁾	1.00±0.08 ¹⁾	1.26±0.05 ¹⁾	1.22±0.04 ¹⁾

注：与模型组比较¹⁾ $P<0.01$

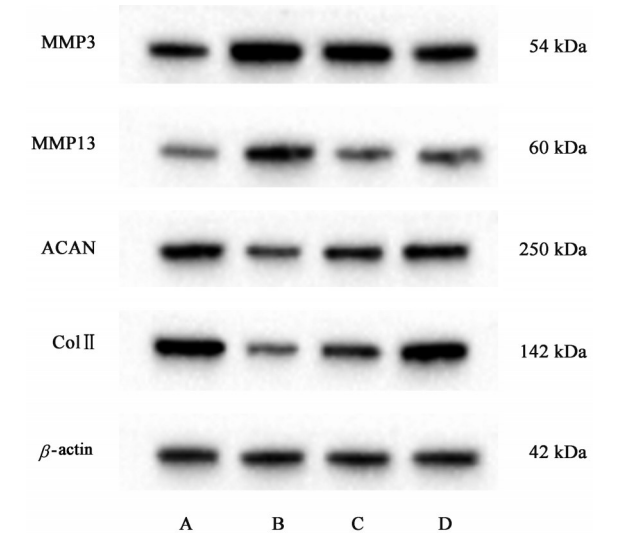


图 3 大鼠软骨细胞中 MMP3、MMP13、ACAN、Col II 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of MMP3, MMP13, ACAN and Col II protein expressions in rat chondrocytes

模型组比较，甘草附子汤低、高剂量组 ATG5、

Beclin-1 与 LC3B mRNA 表达水平均明显升高 ($P<0.05$)，p62 表达明显下降 ($P<0.05$)，其中高剂量组改善作用最为显著。见表 7。

Western blot 结果进一步验证了上述基因水平变化。与假手术组比较，模型组软骨中 LC3 II/I 值及 Beclin-1 蛋白水平均明显降低 ($P<0.05$)，而 p62 蛋白水平明显升高 ($P<0.05$)，表明 KOA 软骨细胞自噬流动性下降。经甘草附子汤干预后，LC3 II/I 与 Beclin-1 蛋白水平均明显升高 ($P<0.05$)，而 p62 水平明显下降 ($P<0.05$)，提示自噬通路重新被激活，其中高剂量组作用最为显著，见表 8 及图 4。综上所述，甘草附子汤能够显著增强 KOA 大鼠软骨细胞自噬活性，其作用机制可能与上调 ATG5、Beclin-1 及 LC3B 表达、降低 p62 水平，从而恢复自噬流动性与细胞清除功能密切相关。以上结果表明，甘草附子汤通过促进软骨细胞自噬、维持能量与基质代谢稳态，从而发挥保护软骨结构与延缓 KOA 进展的作用。

表 7 甘草附子汤对 KOA 大鼠软骨自噬相关基因表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ATG5	LC3B	Beclin-1	p62
假手术组		1.00±0.05 ¹⁾	1.00±0.10 ¹⁾	1.00±0.07 ¹⁾	1.00±0.07 ¹⁾
模型组		0.31±0.01	0.23±0.01	0.32±0.05	2.64±0.20
甘草附子汤低剂量组	2.8	1.09±0.14 ¹⁾	0.57±0.03 ¹⁾	0.59±0.05 ¹⁾	1.63±0.05 ¹⁾
甘草附子汤高剂量组	5.6	1.62±0.12 ^{1,2)}	0.88±0.04 ^{1,2)}	0.81±0.03 ^{1,2)}	1.22±0.05 ^{1,2)}

注：与模型组比较¹⁾ $P<0.05$ ；与甘草附子汤低剂量组比较²⁾ $P<0.05$

表 8 甘草附子汤对 KOA 大鼠软骨自噬相关蛋白表达量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 8 Effect of Gancao Fuzitang on expression levels of chondrocyte autophagy-related proteins in KOA rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	LC3 II/I	Beclin-1/ β -actin	p62/ β -actin
假手术组		1.00±0.10	1.00±0.04	1.00±0.08
模型组		0.15±0.01 ¹⁾	0.31±0.02 ¹⁾	2.07±0.17 ¹⁾
甘草附子汤低剂量组	2.8	0.82±0.06 ²⁾	0.58±0.04 ²⁾	1.47±0.06 ²⁾
甘草附子汤高剂量组	5.6	0.88±0.04 ²⁾	0.77±0.06 ²⁾	1.29±0.10 ²⁾

3.2.5 甘草附子汤通过调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路促进 KOA 大鼠软骨细胞自噬 结合之前网络药理学分析结果，推测 PI3K/Akt/mTOR 信号通路可能是甘草附子汤治疗大鼠 KOA 的潜在分子机制，为进一步验证甘草附子汤促进软骨细胞自噬的分子机制，对 KOA 大鼠软骨组织中 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白的表达进行了检测。Western blot 结果显示，与假手术组比较，模型组大鼠软骨组织中 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 及 p-mTOR/mTOR 值明

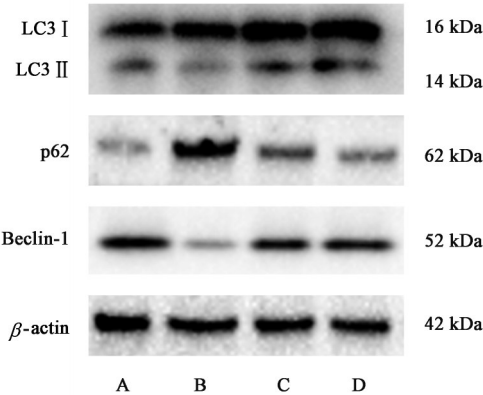


图 4 大鼠软骨细胞中 LC3 II / I 、p62、Beclin-1 蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of LC3 II / I , p62, and Beclin-1 protein expressions in rat chondrocytes

显升高 ($P<0.05$),提示 PI3K/Akt/mTOR 信号通路异常激活,自噬功能受抑。与模型组比较,甘草附子汤低、高剂量组上述磷酸化蛋白比值均明显下降 ($P<0.05$),其中高剂量组改善最为明显。见表 9 和图 5。

表 9 甘草附子汤对 KOA 大鼠 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 9 Effect of Gancao Fuzitang on expression of proteins related to PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in KOA rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	p-PI3K /PI3K	p-Akt /Akt	p-mTOR /mTOR
假手术组		1.00±0.04	1.00±0.04	1.00±0.03
模型组		1.97±0.12 ¹⁾	2.42±0.18 ¹⁾	1.94±0.09 ¹⁾
甘草附子汤低剂量组	2.8	1.44±0.05 ²⁾	1.64±0.08 ²⁾	1.50±0.03 ²⁾
甘草附子汤高剂量组	5.6	1.10±0.05 ²⁾	1.36±0.07 ²⁾	1.25±0.05 ²⁾

免疫组化结果进一步验证了这一变化,与假手术组比较,模型组大鼠软骨组织中 p-mTOR 表达明

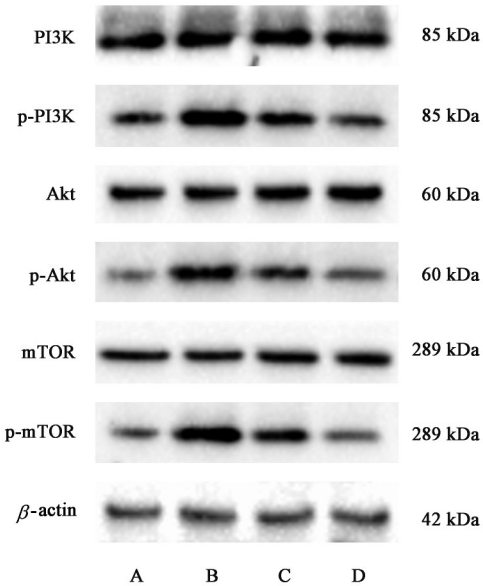


图 5 大鼠软骨细胞中 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of protein expressions of p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, and p-mTOR/mTOR in rat chondrocytes

显增强 ($P<0.05$),而自噬标志物 LC3B 阳性信号明显减少 ($P<0.05$),p62 阳性表达明显增强 ($P<0.05$),表明自噬活性下降。经甘草附子汤干预后, p-mTOR 染色强度明显减弱 ($P<0.05, P<0.01$), LC3B 阳性细胞数明显增加 ($P<0.05, P<0.01$), p62 表达明显下降 ($P<0.05, P<0.01$),提示自噬通路被重新激活,其中高剂量组作用最为显著。见图 6 和表 10。以上结果表明,甘草附子汤可通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的过度激活,解除其对自噬的负向调控,从而增强软骨细胞自噬活性。该机制可能是甘草附子汤延缓 KOA 软骨退变、维持软骨细胞稳态的重要分子基础。

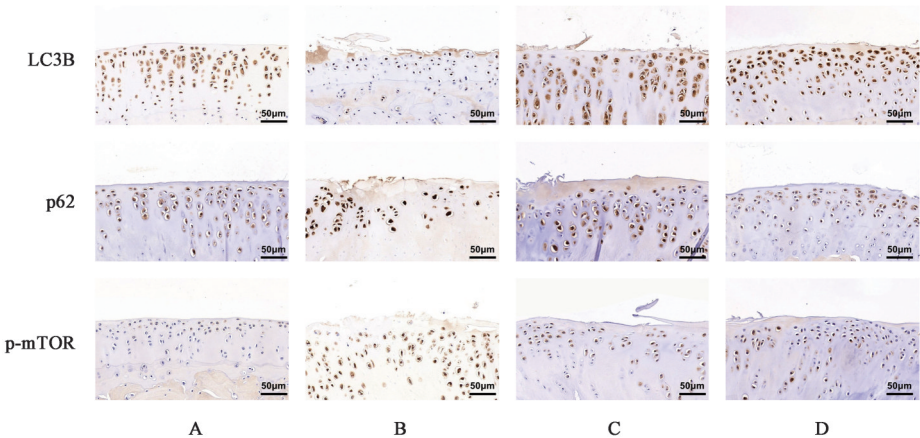


图 6 甘草附子汤对 KOA 大鼠关节软骨中 LC3B、p62 及 p-mTOR 表达的影响 (IHC, ×40)
Fig. 6 Effect of Gancao Fuzitang on expressions of LC3B, p62 and p-mTOR in articular cartilage of KOA rats (IHC, ×40)

表10 甘草附子汤对KOA大鼠关节软骨中LC3B、p62及p-mTOR蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 10 Effect of Gancao Fuzitang on expression of LC3B, p62 and p-mTOR proteins in articular cartilage of KOA rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	LC3B	p62	p-mTOR
假手术组		51.00±3.80	18.97±2.58	10.58±2.51
模型组		12.94±2.04 ¹⁾	53.28±2.98 ¹⁾	55.59±4.13 ¹⁾
甘草附子汤低剂量组	2.8	33.38±3.20 ²⁾	36.41±1.93 ²⁾	30.98±2.26 ²⁾
甘草附子汤高剂量组	5.6	43.23±3.01 ³⁾	30.00±2.94 ³⁾	21.14±2.68 ³⁾

注:与假手术组比较¹⁾P<0.05;与模型组比较²⁾P<0.05,³⁾P<0.01

4 讨论

本研究旨在系统阐明甘草附子汤对KOA的治疗作用及其潜在分子机制。通过动物模型、组织学观察、影像学定量分析及分子生物学检测,本研究发现甘草附子汤能显著降低KOA大鼠的炎症水平,改善软骨与软骨下骨结构破坏,并通过抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路活化而增强软骨细胞自噬能力,从而延缓软骨退变进程。该研究揭示了传统复方中药在维持关节代谢稳态与结构完整性方面的重要分子基础,为KOA的干预提供了新的思路。

炎症反应与ECM降解是推动KOA进展的核心环节之一^[26-27]。慢性炎症刺激下,滑膜细胞和软骨细胞分泌的炎症因子(如TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)可通过激活PI3K/Akt、核转录因子- κ B(NF- κ B)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)等信号通路^[28-30],诱导软骨细胞获得分解表型,从而上调基质金属蛋白酶(MMP3、MMP13)及组织蛋白酶表达,同时抑制性别决定区Y框蛋白9(SOX9)、Col II a1、ACAN等基质合成相关基因的转录,导致II型胶原和蛋白多糖持续丢失。此外,炎症反应与机械负荷异常相互作用,可形成“炎症-降解”正反馈环,进一步放大基质破坏。其中,MMP13对Col II的裂解作用已被证实是ECM降解的关键驱动因子,其持续高表达与软骨结构破坏密切相关^[31]。与上述研究一致,本研究中模型组大鼠血清中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 显著升高,伴随ACAN、Col II表达下调及MMP3、MMP13表达上升,提示炎症信号激活导致ECM合成与降解失衡。然而,甘草附子汤干预后,上述指标显著逆转,炎症因子水平下降,合成基因恢复,降解酶表达减弱,表明该方可通过抑制炎症驱动的分解通路并恢复ECM稳态发挥软骨保护作用。

近年来,大量研究表明,软骨细胞自噬功能障碍是KOA发生与进展的重要分子基础^[31]。自噬作

为维持细胞稳态与能量平衡的关键机制,能够清除受损细胞器与异常蛋白,从而防止细胞凋亡与代谢紊乱^[32]。在正常关节中,自噬持续处于低水平激活状态,以维持软骨细胞的生理稳态^[33];而在KOA中,自噬相关基因(如Beclin-1、ATG5、LC3B)表达显著下降,伴随自噬体形成减少与p62积聚,提示自噬活性受抑^[12,15,34]。部分天然活性物质可通过上调自噬改善软骨基质损伤^[35-36]。自噬的缺失会导致线粒体功能障碍、活性氧积累及能量代谢紊乱,从而触发软骨细胞凋亡与基质降解^[17,37]。自噬功能的调控受到多种信号通路的精细控制,其中PI3K/Akt/mTOR信号通路被认为是最核心的负调控轴。mTOR作为营养和能量状态的感受器,可在氧化应激和炎症刺激下被异常激活,抑制自噬体的形成与融合,从而阻断自噬流。既往研究发现,KOA患者软骨组织中p-Akt和p-mTOR表达上升,而自噬标志物LC3 II/I下降,提示该通路的过度激活与自噬功能障碍密切相关^[38]。LU等^[18]的研究发现,抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路,增强软骨细胞自噬能够延缓KOA进展。本研究结果与上述报道高度一致。本团队观察到KOA模型大鼠软骨组织中ATG5、Beclin-1、LC3B表达显著下调,而p62水平升高;同时PI3K、Akt和mTOR磷酸化水平上升,提示该信号通路异常活化并抑制自噬。甘草附子汤干预后,上述分子指标均显著逆转,自噬相关基因与蛋白表达恢复,LC3 II/I升高,p62明显减少。这表明甘草附子汤能够通过抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路过度激活、恢复自噬流动性,从而促进受损细胞器清除与代谢重塑,减轻软骨细胞退行性改变。结合前期网络药理学预测结果,本研究从实验层面验证了自噬调控是甘草附子汤发挥保护作用的关键环节。由此推测,甘草附子汤可能通过多成分协同作用,重塑软骨细胞自噬-代谢互作网络,延缓KOA进展。

综上所述,本研究表明甘草附子汤可改善膝骨关节炎大鼠的炎症反应及软骨和骨结构损伤,其作用机制可能是通过调控PI3K/Akt/mTOR信号通路恢复软骨细胞自噬水平有关。上述结果从网络药理学预测和动物实验2个层面为甘草附子汤干预膝骨关节炎提供了实验依据,也为进一步阐明其中的物质基础及分子机制提供了研究思路。未来仍需结合体外细胞实验、关键活性成分筛选及临床研究,对其作用机制和应用价值进行进一步验证。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] GBD 2021 Osteoarthritis Collaborators. Global, regional, and national burden of osteoarthritis, 1990—2020 and projections to 2050: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021[J]. *Lancet Rheumatol*, 2023, 5(9): e508-e522.
- [2] LANGWORTHY M, DASA V, SPITZER A I. Knee osteoarthritis: Disease burden, available treatments, and emerging options[J]. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 2024, 16: 1759720X241273009.
- [3] COURTIES A, KOUKI I, SOLIMAN N, et al. Osteoarthritis year in review 2024: Epidemiology and therapy [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2024, 32(11): 1397-1404.
- [4] JIANG P, HU K, JIN L, et al. A brief review of current treatment options for osteoarthritis including disease-modifying osteoarthritis drugs (DMOADs) and novel therapeutics[J]. *Ann Med Surg (Lond)*, 2024, 86(7): 4042-4048.
- [5] 杨泓毅, 林龙飞, 刘宇灵, 等. 黄酮类化合物抗骨关节炎机制研究进展[J]. *中草药*, 2023, 54(24): 8290-8300.
- YANG H Y, LIN L F, LIU Y L, et al. Research progress on mechanism of flavonoids against osteoarthritis [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(24): 8290-8300.
- [6] KLOPPENBURG M, NAMANE M, CICUTTINI F. Osteoarthritis[J]. *Lancet*, 2025, 405(10472): 71-85.
- [7] LIU W, GUO N Y, WANG J Q, et al. Osteoarthritis: Mechanisms and therapeutic advances [J]. *MedComm* (2020), 2025, 6(8): e70290.
- [8] CHO Y, JEONG S, KIM H, et al. Disease-modifying therapeutic strategies in osteoarthritis: Current status and future directions[J]. *Exp Mol Med*, 2021, 53(11): 1689-1696.
- [9] RICHARD M J, DRIBAN J B, MCALINDON T E. Pharmaceutical treatment of osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2023, 31(4): 458-466.
- [10] MOLNAR V, MATISIC V, KODVANJ I, et al. Cytokines and chemokines involved in osteoarthritis pathogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(17): 9208.
- [11] KNIGHTS A J, REDDING S J, MAERZ T. Inflammation in osteoarthritis: The latest progress and ongoing challenges[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2023, 35(2): 128-134.
- [12] CHEN X, GONG W, SHAO X, et al. METTL3-mediated m(6) A modification of ATG7 regulates autophagy-GATA4 axis to promote cellular senescence and osteoarthritis progression[J]. *Ann Rheum Dis*, 2022, 81(1): 87-99.
- [13] LI L, LI J, LI J J, et al. Chondrocyte autophagy mechanism and therapeutic prospects in osteoarthritis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2024, 12: 1472613.
- [14] KAO W C, CHEN J C, LIU P C, et al. The role of autophagy in osteoarthritic cartilage [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(10): 1357.
- [15] ANDREI C, MIHAI D P, NITULESCU G M, et al. Modulating autophagy in osteoarthritis: Exploring emerging therapeutic drug targets [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(24): 13695.
- [16] XU K, HE Y, MOQBEL S A A, et al. SIRT3 ameliorates osteoarthritis via regulating chondrocyte autophagy and apoptosis through the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 175: 351-360.
- [17] LI J, JIANG M, YU Z, et al. Artemisinin relieves osteoarthritis by activating mitochondrial autophagy through reducing TNFSF11 expression and inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling in cartilage [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2022, 27(1): 62.
- [18] LU R, HE Z, ZHANG W, et al. Oroxin B alleviates osteoarthritis through anti-inflammation and inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and enhancement of autophagy [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 1060721.
- [19] 商岚清, 程鑫雨, 单鸿哲, 等. 地黄及其有效成分干预膝关节关节炎的作用机制研究进展[J]. *中草药*, 2025, 56(1): 349-359.
- SHANG L Q, CHENG X Y, SHAN H Z, et al. Research progress on mechanism of *Rehmannia glutinosa* and its active components in intervention of knee osteoarthritis [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2025, 56(1): 349-359.
- [20] 张鑫, 汪伟. 中西医结合治疗退行性膝关节炎研究进展[J]. *光明中医*, 2025, 40(5): 1010-1013.
- ZHANG X, WANG W. Research progress on the treatment of degenerative knee arthritis with traditional Chinese and western medicine [J]. *Guangming J Chin Med*, 2025, 40(5): 1010-1013.
- [21] ZHAO X, YI Y, JIANG C, et al. Gancao Fuzi decoction regulates the Th17/Treg cell imbalance in rheumatoid arthritis by targeting FoxP3 via miR-34a [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 301: 115837.
- [22] FU W, SHENTU C, CHEN D, et al. Network pharmacology combined with affinity ultrafiltration to elucidate the potential compounds of Shaoyao Gancao Fuzi decoction for the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 330: 118268.
- [23] ZHAO J, LIANG G, HUANG H, et al. Potential mechanisms underlying the therapeutic roles of Gancao Fuzi decoction in cold-dampness obstruction syndrome-type knee osteoarthritis [J]. *Curr Comput-Aided Drug Des*, 2024, 20(4): 384-395.
- [24] 李源, 杜寒倩, 李佳珊, 等. 基于均匀设计法优化菟丝子方对卵巢储备功能影响的组方配比及机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(7): 53-62.
- LI Y, DU H Q, LI J S, et al. Optimization and mechanism exploration of Tusizi prescription for ovarian reserve function based on uniform design method [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2025, 31(7): 53-62.
- [25] LIU L, ZHANG W, LIU T, et al. The physiological metabolite alpha-ketoglutarate ameliorates osteoarthritis by regulating mitophagy and oxidative stress [J]. *Redox Biol*,

- 2023,62:102663.
- [26] LI B, GUAN G, MEI L, et al. Pathological mechanism of chondrocytes and the surrounding environment during osteoarthritis of temporomandibular joint[J]. J Cell Mol Med, 2021,25(11):4902-4911.
- [27] NEDUNCHEZHIAN U, VARUGHESE I, SUN A R, et al. Obesity, inflammation, and immune system in osteoarthritis [J]. Front Immunol, 2022, 13:907750.
- [28] LIU J, JIA S, YANG Y, et al. Exercise induced meteorin-like protects chondrocytes against inflammation and pyroptosis in osteoarthritis by inhibiting PI3K/Akt/NF-kappaB and NLRP3/Caspase-1/GSDMD signaling [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 158: 114118.
- [29] ZHUANG H, REN X, JIANG F, et al. Indole-3-propionic acid alleviates chondrocytes inflammation and osteoarthritis via the AhR/NF-kappaB axis[J]. Mol Med, 2023, 29(1):17.
- [30] ZHAO C, SUN G, LI Y, et al. Forkhead box O3 attenuates osteoarthritis by suppressing ferroptosis through inactivation of NF-kappaB/MAPK signaling[J]. J Orthop Translat, 2023, 39:147-162.
- [31] FU B, SHEN J, ZOU X, et al. Matrix stiffening promotes chondrocyte senescence and the osteoarthritis development through downregulating HDAC3 [J]. Bone Res, 2024, 12(1):32.
- [32] LIAO J, YU X, CHEN J, et al. Knowledge mapping of autophagy in osteoarthritis from 2004 to 2022: A bibliometric analysis[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1063018.
- [33] LEE D Y, BAHAR M E, KIM C W, et al. Autophagy in osteoarthritis: A double-edged sword in cartilage aging and mechanical stress response: A systematic review [J]. J Clin Med, 2024, 13(10):3005.
- [34] LV X, ZHAO T, DAI Y, et al. New insights into the interplay between autophagy and cartilage degeneration in osteoarthritis [J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 1089668.
- [35] LI Y, SHEN B, LV C, et al. Methyl gallate prevents oxidative stress induced apoptosis and ECM degradation in chondrocytes via restoring Sirt3 mediated autophagy and ameliorates osteoarthritis progression [J]. Int Immunopharmacol, 2023, 114: 109489.
- [36] HAN H, CHEN M, LI Z, et al. Corosolic acid protects rat chondrocytes against IL-1beta-induced ECM degradation by activating autophagy via PI3K/Akt/mTOR pathway and ameliorates rat osteoarthritis[J]. Drug Des Devel Ther, 2022, 16:2627-2637.
- [37] PAN X, SHAN H, BAI J, et al. Four-octyl itaconate improves osteoarthritis by enhancing autophagy in chondrocytes via PI3K/Akt/mTOR signalling pathway inhibition[J]. Commun Biol, 2022, 5(1):641.
- [38] WANG J, ZHANG Y, CAO J, et al. The role of autophagy in bone metabolism and clinical significance [J]. Autophagy, 2023, 19(9):2409-2427.

[责任编辑 顾雪竹]