

基于PI3K/Akt信号通路探讨祛风骨痛巴布膏对寒湿痹阻型骨关节炎模型大鼠的干预作用

陶雪莹^{1,2}, 王超², 黄凤玉², 张昕卓², 刘春芳², 苏晓慧^{2*}, 林娜^{2*}

(1. 贵州中医药大学, 贵阳 550025;

2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:探讨祛风骨痛巴布膏对寒湿痹阻型骨关节炎(OA)大鼠的干预作用,并初步阐明其作用机制。方法:将SD雄性大鼠分成6组,为正常组、模型组、活血止痛膏组(1.26 cm²·d⁻¹)、祛风骨痛巴布膏低、中、高剂量组(75、150、300 mg·d⁻¹)。通过关节腔注射木瓜蛋白酶联合L-半胱氨酸制备OA模型,造模第2天开始施加气候因素,建立寒湿痹阻型OA大鼠病证结合动物模型。标准 VonFrey 纤维评价机械痛阈值;双后肢负重差评分及关节功能评分;苏木素-伊红(HE)染色和番红固绿染色观察大鼠膝关节组织病理变化和软骨退变;免疫组化法(IHC)检测白细胞介素(IL)-1 β 、白细胞介素(IL)-8、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)和组织蛋白酶K(CTSK)的表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)、蛋白激酶B(Akt)、磷酸化蛋白激酶B(p-Akt)、T细胞的核因子1(NFATc1)、MMP-9和CTSK的蛋白表达水平。结果:与正常组比较,模型组在造模后出现了显著的机械痛敏反应($P<0.01$),双后肢负重差和关节功能评分明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较,祛风骨痛巴布膏高剂量组和活血止痛膏组均可明显降低大鼠机械痛敏反应、负重差和关节功能评分($P<0.05$, $P<0.01$),且祛风骨痛巴布膏中剂量也可一定程度改善关节功能,大鼠膝关节软骨退变明显减轻($P<0.05$, $P<0.01$);祛风骨痛巴布膏、活血止痛膏均在一定程度上抑制OA大鼠关节软骨中IL-1 β 、IL-8、TNF- α 、MMP-9、CTAK、PI3K、p-Akt、Akt等相关蛋白表达($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:祛风骨痛巴布膏通过抑制寒湿痹阻型OA模型大鼠关节软骨中PI3K/Akt信号通路进而抑制炎症因子和基质金属蛋白酶的释放,最终减弱局部软骨退变,改善关节功能。

[关键词] 祛风骨痛巴布膏; 骨关节炎(OA); 磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路; 炎症因子; 寒湿痹阻

[中图分类号] R2-0;R22;R33;R289;R684.3 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2023)09-0156-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230344

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20230307.1107.001.html>

[网络出版日期] 2023-03-08 08:46:48

Intervention Effect of Qufeng Gutong Babu Ointment on Rat Model of Osteoarthritis with Cold-dampness Obstruction Based on PI3K/Akt Signal Pathway

TAO Xueying^{1,2}, WANG Chao², HUANG Fengyu², ZHANG Xinzhuo², LIU Chunfang²,
SU Xiaohui^{2*}, LIN Na^{2*}

(1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the intervention effect of Qufeng Gutong Babu ointment (QFGT) on rats with osteoarthritis (OA) with cold-dampness obstruction, and preliminarily clarify its mechanism.

[收稿日期] 2023-02-10

[基金项目] 中国中医科学院科技创新工程项目(C12021A03808);国家“重大新药创制”科技重大专项(2019ZX09731-002);中国中医科学院中药研究所技术研发项目(20211024)

[第一作者] 陶雪莹,在读硕士,从事中药药理学研究,E-mail:taozideyouxiang121@163.com

[通信作者] * 苏晓慧,博士,助理研究员,从事抗炎中药药理研究,E-mail:sxh66159@163.com;

* 林娜,博士,研究员,从事抗炎中药药理研究,E-mail:linna888@163.com

Method: SD male rats were divided into 6 groups, namely, the blank group, model group, positive control drug Huoxue Zhitong ointment (HXZTG) group ($1.26 \text{ cm}^2 \cdot \text{d}^{-1}$), and low, medium, and high-dose QFGT group (75, 150, 300 $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$). OA model was prepared by joint cavity injection of papain and L-cysteine. On the second day of modeling, climate factors were applied to establish an animal model of combination of disease and syndrome of OA rats with cold-dampness obstruction. Standard VonFrey fiber was used to evaluate the threshold of mechanical pain. Weight bearing difference score and joint function score of both hind limbs were recorded. Hematoxylin-eosin (HE) staining and safranin fixation green staining were used to observe the pathological changes and cartilage degeneration of rat knee joint. Immunohistochemistry (IHC) was used to detect the expression of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-8 (IL-8), tumor necrosis factor- α (TNF- α), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), and cathepsin K (CTSK). Western blot was used to detect the protein expression of kinase B (Akt), phosphorylated protein kinase B (p-Akt), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), nuclear factor 1 (NFATc1), MMP-9, and CTSK in T cells. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed significant mechanical pain sensitivity reaction after modeling ($P < 0.01$), and the weight bearing difference of both hind limbs and joint function score were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, both the high-dose QFGT group and the HXZTG group significantly reduced the mechanical pain sensitivity, weight difference, and joint function score of rats ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the medium-dose QFGT group also improved the joint function to a certain extent, and the degeneration of the knee joint cartilage of rats was significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$). QFGT and HXZTG both inhibited the protein expression of IL-1 β , IL-8, TNF- α , MMP-9, CTAK, PI3K, p-Akt, Akt, and other related proteins in articular cartilage of rats with OA to a certain extent ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** QFGT can inhibit the release of inflammatory factors and matrix metalloproteinases by inhibiting the PI3K/Akt signal pathway in articular cartilage of rats with OA with cold-dampness obstruction, thus ultimately weakening local cartilage degeneration and improving joint function.

[Keywords] Qufeng Gutong Babu ointment; osteoarthritis (OA); phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/kinase B (Akt) signaling pathway; inflammatory factors; cold-dampness obstruction

骨关节炎(OA)是一种病变累及关节软骨、软骨下骨、滑膜和关节周围肌肉的退行性疾病,并以疼痛、骨摩擦、关节肿胀和运动障碍等为主要临床表现^[1-2]。现代医学的非甾体类抗炎药、理疗等保守干预方式因不良反应等因素效果有限,晚期的手术等干预方式对患者的伤害性较大。对广大保守干预的患者而言,中医药优势独特,尤其是外治法,因简便、疗效确切、安全而广泛应用于临床。

中医认为OA属“痹症”范畴,《黄帝内经》中提出关于痹症的病因病机,“风寒湿三气杂至,合而为痹也。其风气胜者为行痹,寒气胜者为痛痹,湿气胜者为著痹也”^[3]。叶天士除沿袭既往的中医理论,认为痹症主要由于风、寒、湿、热等外邪侵袭机体,导致经络和气血津液运行受阻,从而引起关节肿胀疼痛、四肢屈伸不利等症,又提出了“内风致痹论”“久病入络论”“通补奇经论”,拓宽了此后的痹症治疗思想^[4]。

祛风骨痛巴布膏是由川芎、红花、白芷、乳香、

天南星、泽兰、没药、细辛、三棱、石菖蒲、皮子药、冰片、桃仁、川乌、当归、草乌、独活、黄柏、羌活、冬青油、干姜、莪术、薄荷脑,23味药材加工成的外用膏剂,具有祛风散寒、舒筋活血、消肿止痛等功效,其有效成分可透皮吸收,直接作用于关节及周围组织,发挥局部抗炎、镇痛、改善微循环等作用,有利于消除肿胀并止痛、缓解肌肉疼痛、促进康复。临床上主要用于风湿寒痹引起的疼痛,适用于骨关节痛、颈椎痛、肩周炎、腰腿疼痛等,疗效确切。已被纳入2021年第6期中华疼痛学杂志《慢性腰背疼痛康复中国疼痛科专家共识》中作为外用敷贴治疗“1A,强推荐”药品,目前已有将该药用于治疗OA的案例,表明该药对患者疼痛症状、提高关节活动度、改善关节功能有较好的作用^[5],但其作用机制尚不明确。为了进一步了解其作用机制,本研究拟采用通过风、寒、湿之邪侵袭大鼠关节,从而建立寒湿痹阻型OA(寒痹OA)大鼠模型,观察祛风骨痛巴布膏对寒痹OA的影响,为临床的合理应用提供实验参考。

1 材料

1.1 动物 50只SPF级SD雄性大鼠,体质量(200±20)g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,动物合格证号SCXK(京)2019-0008,实验单位使用许可证号SYXK(京)2021-0017,饲养在中国中医科学院中医基础理论研究所动物实验中心,实验所需的光照和温度、相对湿度都适宜,实验操作符合中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物福利伦理审查委员会标准2018-066,动物福利伦理编号IBTCMCACMSZ1-2109-06。

1.2 药物及试剂 祛风骨痛巴布膏(哈药集团世一堂制药厂,国药准字Z20025852);活血止痛膏(安徽安科余良卿药业有限公司,国药准字Z34020905);木瓜蛋白酶、L-半胱氨酸、苏木素-伊红(HE)染色液、番红固绿染色液(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为P8150、C0012、G1120、G1371);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、组织蛋白酶K(CTSK)抗体(美国Santa Cruz公司,批号分别为sc52746、sc48353);白细胞介素-1 β (IL-1 β)抗体(美国Novus公司,批号NB600-633);白细胞介素-8(IL-8)抗体(美国SAB公司,货号38419);基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、T细胞的核因子1(NFATc1)抗体、磷脂酰肌醇3-激酶(GAPDH)抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab76003、ab25916、ab181602);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(PI3K)、蛋白激酶B(Akt)、磷酸化(p)-Akt抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为CST4249S、CST4691S、CST4060S);兔、鼠二抗(美国Earth Ox公司,批号分别为E030120、E030110)。

1.3 仪器 VonFrey针刺触觉测量套件(美国Danmic Aesthesio公司);BS224S型电子天平(德国Sartorius公司);KPJ-1A型烤片机(天津天利航空机电有限公司);RM2255型切片机(德国徕卡公司);ECLIPSETs2型倒置光学显微镜(日本Nikon公司);MK3型全自动酶标仪(Thermo公司);5415R型低温高速离心机(德国Eppendorf公司);LX-100型手掌型离心机(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司);Mini-PROTEAN Tetra型电泳槽、Trans-Blot型转膜仪(美国Bio-Rad公司);FusionFX5Spectra型凝胶成像仪(法国Vilber公司);TS-1型水平摇床(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

2 方法

2.1 病因病证结合动物模型的制备 精确称取木瓜蛋白酶0.4 g、L-半胱氨酸36 mg,共同置于离心管

中,加入生理盐水10 mL,摇匀,0.22 μ m滤膜过滤,4 $^{\circ}$ C低温冷藏保存。以大鼠右膝建立模型:剪去右腿鼠毛,使用络合碘消毒,右膝关节呈45 $^{\circ}$ 方向弯曲,以1 mL注射器外缘的膝眼为进针点,将针插入髌间窝,抵达股骨髁后往外拔出2 mm,注入木瓜蛋白酶混合物(质量浓度0.04 g \cdot mL $^{-1}$)0.1 mL,第1、4、7天重复注射^[6]。从造模第2天开始施加气候因素,将模型大鼠每天放入恒温人工气候箱2~4 h,寒痹OA模型组的环境条件为温度6 $^{\circ}$ C,湿度60%,风速6 m \cdot s $^{-1}$,连续28 d^[7],期间可见木瓜蛋白酶注射后会出现较为严重急性炎症反应,关节肿大、相对压痛阈值降低,而后膝关节软骨出现明显炎性细胞浸润和组织破坏情况^[8]。

2.2 分组及给药 取SD雄性大鼠50只,按体质量随机分为正常组、模型组、祛风骨痛巴布膏低、中、高剂量组(75、150、300 g \cdot kg $^{-1}$,分别相当于临床等效剂量的0.5、1、2倍)和活血止痛膏临床1倍剂量组。于造模成功后的第2天开始给药,连续给药28 d。

2.3 大鼠一般情况观察 每天进行各组大鼠的毛发毛色、精神及活跃度状态观察,大便是否稀溏,抓取有无抵抗,以及大鼠的畏寒情况观察,并做好相应记录。

2.4 机械痛阈值、双后肢负重差检测及膝关节Lequesne MG评分 造模前测量基础痛阈值,造模后第7、11、15、19、23、27、31天,利用标准VonFrey纤维丝按照“Up-Down”法进行机械痛敏的检测^[9]。用大鼠双足平衡测量仪测量大鼠双后肢负重差^[10]。使用Lequesne MG的膝关节级别评估方法评估各组大鼠右膝关节局部反应、步态改变、关节活动范围及肿胀程度等情况^[11]。

2.5 HE染色观察膝关节骨形态学变化 膝关节组织石蜡包埋、切片,二甲苯中脱蜡、梯度乙醇复水,苏木素复染,盐酸乙醇分化完全后返蓝,伊红染色梯度乙醇脱水、二甲苯透明,中性树脂封片,于光镜下观察OA大鼠关节病理变化并进行Mankin评分,具体评分标准参考文献[12]进行。正常,0分;表层破坏,1分;血管翳及表层破坏,2分;浅层裂隙形成达移行层,3分;局限性深达骨质辐射层裂隙,4分;深达骨质钙化层软骨缺损负重区,5分。

2.6 番红固绿染色观察软骨破坏 组织切片后进行脱蜡复水,滴加苯胺番红染液浸染3 min,后蒸馏水涮洗,随后滴加苯胺固绿染液浸染2 min,滴加1%盐酸乙醇进行分化,再进行脱水和透明,封片后于光镜下观察OA大鼠关节病理变化并进行Mankin

评分,具体评分标准参考文献[12]进行,具体同上。

2.7 免疫组化法观察软骨组织中蛋白表达 将OA大鼠膝关节石蜡切片脱蜡复水,3% H₂O₂抑制内源性过氧化氢酶活性,依次加入抗原修复液、5% BSA于37℃封闭2h,分别加入一抗IL-1β(1:200)、IL-8(1:100)、TNF-α(1:1000)、MMP-9(1:500)、CTSK(1:200)置于4℃冰箱过夜,滴加二抗,37℃孵育30min,DBA显色,苏木素染核,脱水封片,于显微镜下观察IL-1β及TNF-α等蛋白在OA大鼠关节组织中的表达,软骨基质表面或中间层的软骨细胞内可见棕黄色颗粒阳性表达。

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠关节组织中蛋白表达 将大鼠膝关节用液氮研磨至粉末状,按照100:1的比例加入RIPA裂解液和磷酸酶抑制剂,匀浆后冰上裂解1h,4℃、12000 r·min⁻¹离心15min,将上清吸出进行蛋白定量。进行电泳和转膜,于5% BSA中室温封闭2h,分别加入一抗PI3K、p-Akt、Akt、IL-1β、TNF-α(1:1000)、NFATc1(1:800)、MMP-9、CTSK、GAPDH(1:5000),在4℃

冰箱过夜,TBST洗后加入二抗兔/鼠(1:5000)室温孵育2h,将条带放于ECL化学发光剂中20s,使用凝胶成像仪观察蛋白表达,Image J软件进行条带灰度值的统计分析。

2.9 统计学分析 采用Graph Pad Prism 8.0.1软件进行统计分析,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行组间差异分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对寒痹OA大鼠机械痛阈值的影响 造模后第11天起,模型组较正常组机械痛阈值显著降低($P < 0.01$),此后一直维持较低水平,说明OA模型建立后,大鼠呈现出明显的机械痛敏反应状态;与模型组比较,造模第7~15天祛风骨痛巴布膏中、高剂量组机械痛敏阈值升高,第31天时活血止痛膏组、祛风骨痛巴布膏高剂量组与模型组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$),表明祛风骨痛巴布膏和活血止痛膏均具有改善寒痹OA大鼠机械痛阈值的作用。见表1。

表1 祛风骨痛巴布膏对寒痹OA大鼠机械痛敏阈值的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of Qufeng Gutong Babu ointment (QFGT) on mechanical pain threshold in cold arthralgia OA rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量	n	机械痛敏阈值/g			
			0 d	7 d	11 d	15 d
正常组		8	12.30±6.52	18.68±14.84	21.17±6.58	19.88±5.66
模型组		9	14.40±12.95	8.21±6.61	9.14±3.74 ²⁾	10.57±5.98 ¹⁾
活血止痛膏组	1.26 cm ² ·d ⁻¹	9	14.42±5.15	8.84±5.91	11.93±6.70	11.11±2.39
祛风骨痛巴布膏低剂量组	75 mg·d ⁻¹	8	10.14±5.16	4.38±2.20	9.19±6.71	10.98±2.36
祛风骨痛巴布膏中剂量组	150 mg·d ⁻¹	8	13.39±9.42	6.43±6.47	9.16±6.22	14.27±6.20
祛风骨痛巴布膏高剂量组	300 mg·d ⁻¹	8	12.45±4.18	5.08±2.48	15.07±6.39	16.99±6.95

组别	剂量	n	机械痛敏阈值/g			
			19 d	23 d	27 d	31 d
正常组		8	21.22±4.48	22.34±4.23	22.61±6.63	22.79±6.10
模型组		9	7.90±3.60 ¹⁾	10.23±4.12 ²⁾	10.52±5.17 ²⁾	7.69±2.96 ²⁾
活血止痛膏组	1.26 cm ² ·d ⁻¹	9	9.82±4.98	9.34±1.88	12.43±6.54	14.28±4.50 ³⁾
祛风骨痛巴布膏低剂量组	75 mg·d ⁻¹	8	11.82±8.44	17.01±7.75	12.62±2.36	11.84±6.79
祛风骨痛巴布膏中剂量组	150 mg·d ⁻¹	8	12.01±3.59	10.46±1.82	14.97±9.87	14.76±7.38
祛风骨痛巴布膏高剂量组	300 mg·d ⁻¹	8	14.66±7.24	13.02±3.31	13.49±6.91	15.07±4.49 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表2-表9同)

3.2 对寒痹OA大鼠双后肢负重差的影响 与正常组比较,模型组负重差反应评分在造模成功后第3天明显升高($P < 0.05$),第11天后显著升高($P < 0.01$),且在实验期间始终保持在较高水平,表明寒痹OA模型建立后大鼠呈现明显的负重反应;与模

型组比较,给药第19天后,祛风骨痛巴布膏中、高剂量组和活血止痛膏组双后肢负重差明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),表明祛风骨痛巴布膏和活血止痛膏均改善寒痹OA大鼠负重功能。见表2。

表2 祛风骨痛巴布膏对寒痹OA大鼠双后肢负重差的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Effect of QFGT on weight bearing difference of both hind limbs in cold arthralgia OA rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量	n	双后肢负重差/g					
			3 d	7 d	11 d	15 d	19 d	23 d
正常组		8	0.29±0.24	1.78±1.18	1.15±1.21	0.11±0.28	0.04±0.10	0.05±0.11
模型组		9	2.84±2.40 ¹⁾	3.42±0.89	5.72±2.00 ²⁾	4.15±2.33 ²⁾	4.19±1.70 ²⁾	3.93±1.29 ²⁾
活血止痛膏组	1.26 cm ² ·d ⁻¹	9	1.79±1.99	3.72±1.00	3.17±2.16	1.76±0.99	1.61±0.73 ³⁾	1.93±0.94 ³⁾
祛风骨痛巴布膏低剂量组	75 mg·d ⁻¹	8	0.89±2.78	2.60±1.81	3.82±2.93	3.37±1.59	2.07±0.93 ³⁾	3.37±1.11
祛风骨痛巴布膏中剂量组	150 mg·d ⁻¹	8	2.84±1.33	3.27±0.63	4.34±2.85	3.61±2.55	1.82±1.28 ³⁾	1.76±0.32 ³⁾
祛风骨痛巴布膏高剂量组	300 mg·d ⁻¹	8	2.73±1.58	2.70±1.50	4.02±2.38	3.19±0.84	1.28±0.97 ⁴⁾	1.27±0.84 ⁴⁾

3.3 对寒痹OA大鼠膝关节Lequesne MG评分的影响 与正常组比较,模型组大鼠膝关节Lequesne MG评分从给药第3天后开始显著升高,之后维持较高水平($P<0.01$),且大鼠局部疼痛度、步态、关节肿胀程度及关节活动范围都呈现出较高评分;与模

型组比较,从给药第12天开始,祛风骨痛巴布膏高剂量组明显降低膝关节Lequesne MG评分($P<0.05$, $P<0.01$);给药第21天直至给药结束,祛风骨痛巴布膏中、高剂量组和活血止痛膏组对膝关节Lequesne MG评分均有明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。见表3。

表3 祛风骨痛巴布膏对寒痹OA大鼠膝关节Lequesne MG评分的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Effect of QFGT on Lequesne MG score of knee joint in cold arthralgia OA rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量	n	Lequesne MG评分/分							
			3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	18 d	21 d	24 d
正常组		8	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组		9	10.11±1.90 ²⁾	10.11±1.90 ²⁾	8.44±1.81 ²⁾	8.22±1.72 ²⁾	7.22±1.48 ²⁾	7.11±1.62 ²⁾	7.11±1.76 ²⁾	6.00±1.66 ²⁾
活血止痛膏组	1.26 cm ² ·d ⁻¹	9	8.78±2.54	8.78±2.54	8.33±1.87	7.56±1.42	6.50±0.53	5.17±1.17 ³⁾	4.80±1.10 ³⁾	4.00±1.00 ³⁾
祛风骨痛巴布膏低剂量组	75 mg·d ⁻¹	8	10.63±1.30	10.63±1.30	8.38±1.69	7.50±1.69	7.00±0.93	6.29±1.38	5.86±1.57	5.63±1.51
祛风骨痛巴布膏中剂量组	150 mg·d ⁻¹	8	10.88±1.36	10.88±1.36	8.25±1.04	7.63±1.06	7.00±1.07	5.40±1.14	5.17±0.75 ³⁾	4.00±1.15 ³⁾
祛风骨痛巴布膏高剂量组	300 mg·d ⁻¹	8	10.63±1.06	10.63±1.06	7.63±1.30	6.38±1.6 ³⁾	6.00±1.69	4.63±1.06 ³⁾	4.50±0.76 ⁴⁾	3.25±0.89 ⁴⁾

3.4 对寒痹OA大鼠炎症关节组织病理学的影响 正常组大鼠膝关节结构正常,关节间隙清晰明显,未见炎性细胞浸润、滑膜增生,关节软骨表面光滑完整;与正常组比较,模型组大鼠膝关节组织可见滑膜异常增生,并伴有大量炎性细胞浸润及血管翳形成,软骨表层结构被侵蚀破坏,关节腔内可见大量剥脱组织,组织病理学评分显著升高($P<0.01$);与模型组比较,祛风骨痛巴布膏各剂量组能改善大鼠膝关节组织中滑膜增生、炎性细胞浸润、血管翳生成、软骨破坏情况。Mankin评分结果显示,与模型组比较,祛风骨痛巴布膏中、高剂量组及活血止痛膏组效果明显($P<0.05$, $P<0.01$)。见表4、图1。

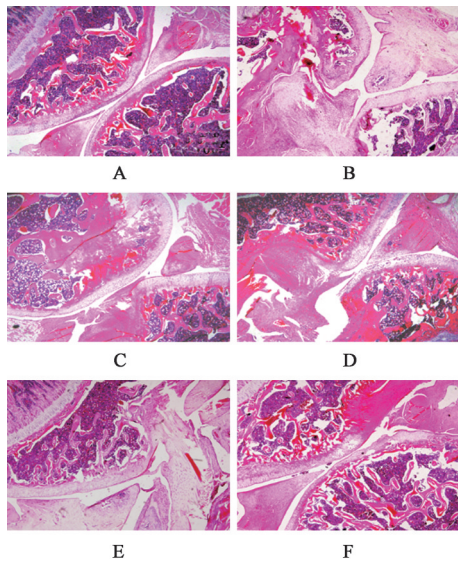
表4 祛风骨痛巴布膏对寒痹OA大鼠膝关节组织病理学的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 4 Effect of QFGT on histopathology of knee joint in cold arthralgia OA rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量	Mankin评分/分
正常组		0.00±0.00
模型组		4.75±0.50 ²⁾
活血止痛膏组	1.26 cm ² ·d ⁻¹	3.25±0.96 ³⁾
祛风骨痛巴布膏低剂量组	75 mg·d ⁻¹	3.50±0.58
祛风骨痛巴布膏中剂量组	150 mg·d ⁻¹	3.25±0.50 ³⁾
祛风骨痛巴布膏高剂量组	300 mg·d ⁻¹	1.50±1.00 ⁴⁾

3.5 对寒痹OA大鼠关节软骨基质成分的影响 正常组染色均匀,软骨组织均匀且全层番红O红染明显,潮线完整;与正常组比较,模型组软骨组织全层番红O红染明显减少,潮线模糊,提示软骨层中红染的蛋白多糖成分大量丢失($P<0.01$);与模型组比较,祛风骨痛巴布膏组给药后,软骨番红O着色增

加,祛风骨痛巴布膏中、高剂量组较模型组软骨基质中番红O着色明显增加,提示软骨层中红染的蛋白多糖成分丢失明显减少,通过Mankin评分也进一步说明祛风骨痛巴布膏对寒痹OA大鼠蛋白多糖的丢失有改善作用,以中、高剂量作用最为显著($P<0.01$);与模型组比较,活血止痛膏组软骨红染增加, Mankin评分显著降低($P<0.01$)。见图2、表5。



注:A.正常组;B.模型组;C.活血止痛膏组;D~F.祛风骨痛巴布膏低、中、高剂量组(图2-图9同)

图1 祛风骨痛巴布膏对寒痹OA大鼠膝关节组织病理学的影响(HE, ×40)

Fig. 1 Effect of QFGT on histopathology of knee joint in cold arthralgia OA rats (HE, ×40)

3.6 对寒痹OA大鼠关节软骨中IL-1 β 、IL-8和TNF- α 蛋白表达的影响 正常组软骨组织细胞中棕褐色颗粒较少或基本无表达;与正常组比较,模型组软骨组织细胞中棕褐色颗粒明显增多,且IL-1 β 、IL-8和TNF- α 表达均显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,祛风骨痛巴布膏中、高剂量组的软骨组织细胞中棕褐色颗粒明显减少,大鼠膝关节软骨组织细胞中IL-1 β 、IL-8和TNF- α 的表达明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),活血止痛膏组大鼠关节软骨中IL-8和TNF- α 的表达明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表6、

表6 祛风骨痛巴布膏对寒痹OA大鼠关节组织中IL-1 β 、IL-8和TNF- α 表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 6 Effect of QFGT on expression of IL-1 β , IL-8 and TNF- α in cold arthralgia OA rats ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量	IL-1 β	IL-8	TNF- α
正常组		3.99 \pm 0.83	3.54 \pm 0.98	3.98 \pm 0.43
模型组		14.76 \pm 4.45 ²⁾	14.33 \pm 2.52 ²⁾	14.65 \pm 3.63 ²⁾
活血止痛膏组	1.26 cm ² ·d ⁻¹	9.56 \pm 2.49	7.56 \pm 0.55 ⁴⁾	8.91 \pm 1.72 ³⁾
祛风骨痛巴布膏低剂量组	75 mg·d ⁻¹	11.87 \pm 1.68	11.33 \pm 2.22	12.58 \pm 3.42
祛风骨痛巴布膏中剂量组	150 mg·d ⁻¹	10.45 \pm 1.60	8.09 \pm 1.05 ⁴⁾	8.74 \pm 1.03 ³⁾
祛风骨痛巴布膏高剂量组	300 mg·d ⁻¹	5.61 \pm 1.21 ⁴⁾	5.94 \pm 1.00 ⁴⁾	7.00 \pm 2.00 ⁴⁾

3.7 对寒痹OA大鼠关节软骨中NFATc1、MMP-9及CTSK蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组MMP-9和CTSK的表达显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,祛风骨痛巴布膏高剂量组和活血止痛膏组可明显降低关节组织中MMP-9和CTSK的表达($P <$

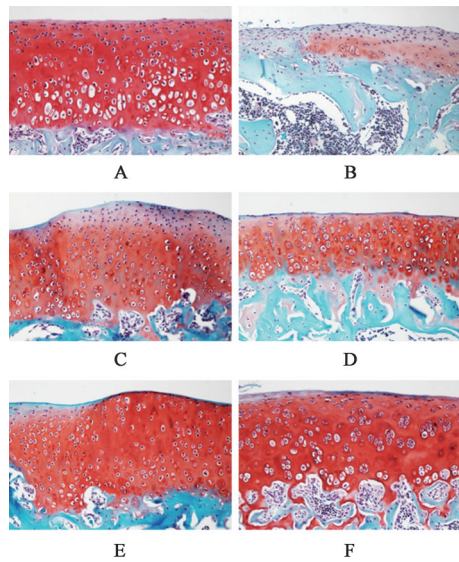


图2 祛风骨痛巴布膏对寒痹OA大鼠关节软骨基质成分的影响(番红固绿, ×100)

Fig. 2 Effect of QFGT on matrix components of articular cartilage in cold arthralgia OA rats (Safranin O-Fast Green, ×100)

表5 祛风骨痛巴布膏对寒痹OA大鼠关节软骨基质成分的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 5 Effect of QFGT on matrix components of articular cartilage in cold arthralgia OA rats ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量	Mankin评分/分
正常组		0.00 \pm 0.00
模型组		4.50 \pm 0.58 ²⁾
活血止痛膏组	1.26 cm ² ·d ⁻¹	2.00 \pm 0.82 ⁴⁾
祛风骨痛巴布膏低剂量组	75 mg·d ⁻¹	3.50 \pm 0.58 ³⁾
祛风骨痛巴布膏中剂量组	150 mg·d ⁻¹	1.75 \pm 0.50 ⁴⁾
祛风骨痛巴布膏高剂量组	300 mg·d ⁻¹	1.50 \pm 1.00 ⁴⁾

图3-图5。

0.05, $P < 0.01$)。Western blot结果显示,与正常组比较,模型组NFATc1、MMP-9及CTSK的蛋白表达显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,活血止痛膏组和祛风骨痛巴布膏高剂量组NFATc1、MMP-9蛋白表达降低($P < 0.01$),祛风骨痛巴布膏高剂量组CTSK蛋

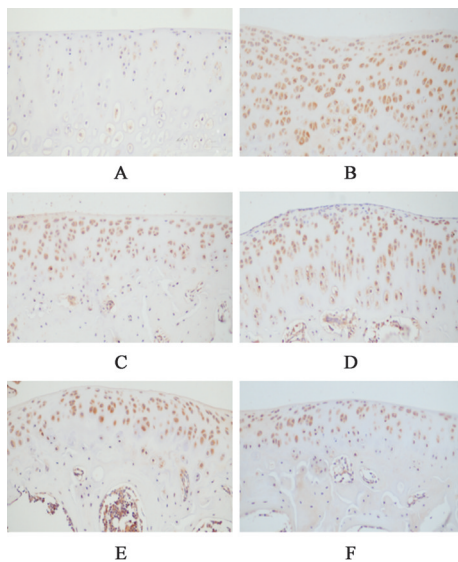


图3 祛风骨痛巴布膏对寒痹OA大鼠关节组织IL-1 β 表达的影响(IHC, $\times 200$)

Fig. 3 Effect of QFGT on expression of IL-1 β in cold arthralgia OA rats (IHC, $\times 200$)

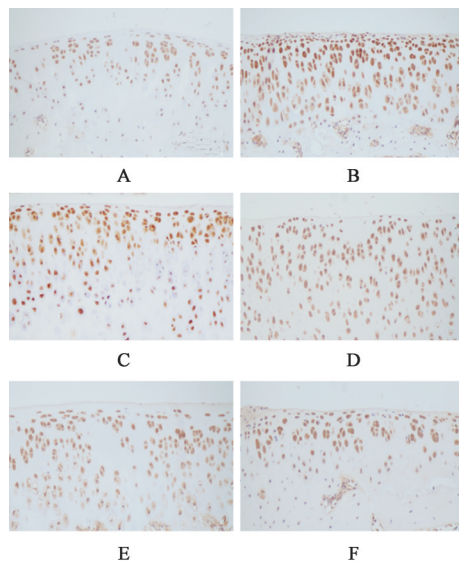


图5 祛风骨痛巴布膏对寒痹OA大鼠关节组织TNF- α 表达的影响(IHC, $\times 200$)

Fig. 5 Effect of QFGT on expression of TNF- α in cold arthralgia OA rats (IHC, $\times 200$)

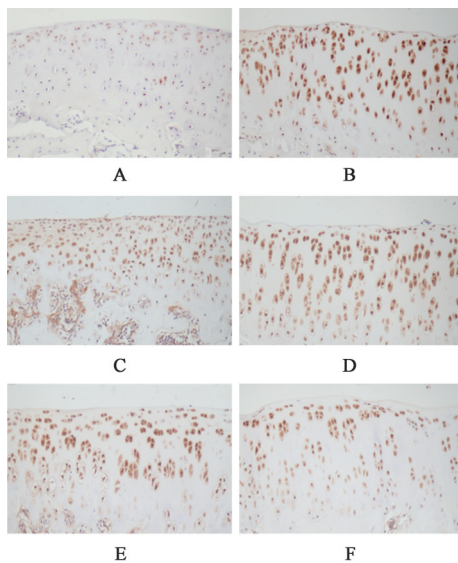


图4 祛风骨痛巴布膏对寒痹OA大鼠关节组织IL-8表达的影响(IHC, $\times 200$)

Fig. 4 Effect of QFGT on expression of IL-8 in cold arthralgia OA rats (IHC, $\times 200$)

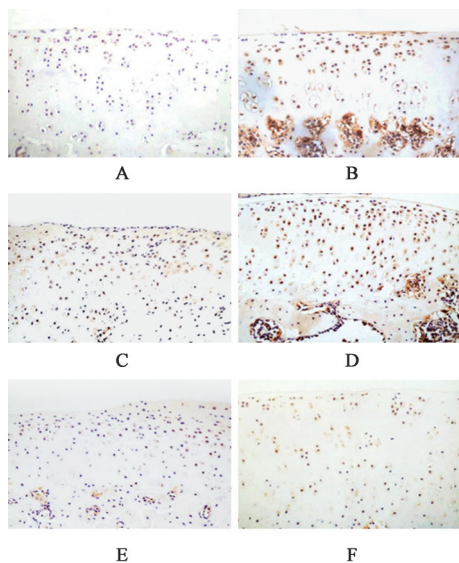


图6 祛风骨痛巴布膏对寒痹OA大鼠关节组织MMP-9表达的影响(IHC, $\times 200$)

Fig. 6 Effect of QFGT on expression of MMP-9 in cold arthralgia OA rats (IHC, $\times 200$)

白表达降低($P < 0.01$)。见图6-图8、表7和表8。

3.8 对寒痹OA大鼠关节软骨中PI3K/Akt信号通路的影响 与正常组比较,模型组大鼠关节软骨中PI3K、p-Akt蛋白表达明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),提示寒痹OA大鼠关节软骨中PI3K/Akt信号通路被激活;与模型组比较,祛风骨痛巴布膏高剂量组和活血止痛膏组能明显降低PI3K和p-Akt的蛋白表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图9、表9。

4 讨论

OA骨关节炎是一种慢性、进展性软骨病变及软骨下骨重塑为特点的退行性关节病^[13],临床表现复杂多变,最终会发生关节疼痛、肿胀、运动障碍甚至畸形^[14]。《膝骨关节炎中医诊疗指南(2020年版)》将OA证型分为气滞血瘀证、寒湿痹阻证、风湿热痹证、肝肾亏虚证及气血虚弱证5个基本证型^[15],寒湿痹阻型OA患者以老年人居多^[13],此类患者因机体内正气不足、卫外不固、筋脉失养,风寒湿邪侵袭导

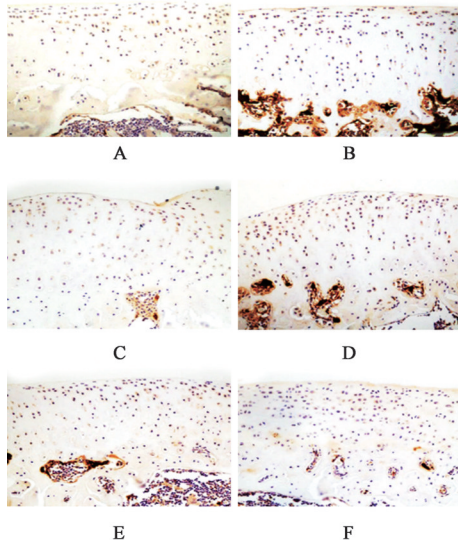


图7 祛风骨痛巴布膏对寒痹OA大鼠关节组织CTSK表达的影响(IHC, ×200)

Fig. 7 Effect of QFGT on expression of CT SK in cold arthralgia OA rats (IHC, ×200)

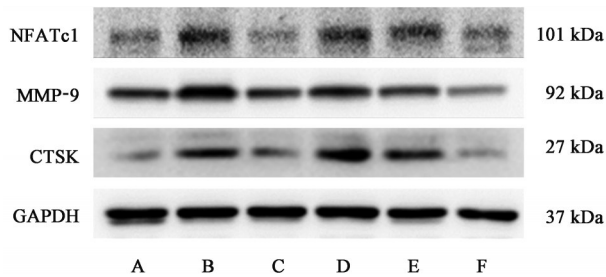


图8 大鼠关节组织中NFATc1、MMP-9和CT SK蛋白表达电泳

Fig. 8 Electrophoresis of NFATc1, MMP-9 and CT SK expression in rats

致筋脉气血阻滞,关节缺乏气血滋养而红肿形变、筋骨麻木,进而生骨痹。本方药兼具祛风除湿、活络舒筋、止痛活血功效,以川乌、草乌为君药,取其

表7 祛风骨痛巴布膏对寒痹OA大鼠关节组织中MMP-9和CT SK表达的影响(, n=8)

Table 7 Effect of QFGT on expression of MMP-9 and CT SK in cold arthralgia OA rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量	MMP-9	CT SK
正常组		2.53±1.54	4.53±1.54
模型组		12.02±3.35 ²⁾	14.71±2.10 ²⁾
活血止痛膏组	1.26 cm ² ·d ⁻¹	7.14±1.27 ³⁾	7.07±2.44 ⁴⁾
祛风骨痛巴布膏低剂量组	75 mg·d ⁻¹	10.92±1.61	11.62±1.26
祛风骨痛巴布膏中剂量组	150 mg·d ⁻¹	8.42±1.92	8.38±2.50 ³⁾
祛风骨痛巴布膏高剂量组	300 mg·d ⁻¹	6.45±1.72 ³⁾	6.45±1.73 ⁴⁾

祛风除湿、温经止痛之效。皮子药、干姜、细辛散寒止痛;羌活、独活、白芷祛风散寒,除湿止痛,共为臣药。乳香、没药行气止痛,当归、川芎行气活血、养血柔筋,红花、桃仁、泽兰活血化瘀,三棱、莪术破血行气,气血并治;加入天南星、石菖蒲、黄柏除湿消肿,共为佐药。方中冰片、薄荷脑、冬青油芳香走窜为使药^[16]。本研究选择由风寒湿所导致的寒湿痹阻OA模型^[17],采用木瓜蛋白酶混合L-半胱氨酸注入大鼠关节腔,外加人工气候箱模拟风、寒、湿3种气候条件来复制寒痹OA大鼠模型。建模后大鼠体现为关节疼痛、肿胀、运动障碍甚至畸形,符合临床OA病理生理学特点。针对以上临床特点,本实验采用VonFrey纤维丝机械刺激、双后肢负重差检测及膝关节Lequesne MG评分对寒痹OA大鼠后肢不同时间点机械痛阈值和负重差进行检测,同时进行Lequesne MG评分^[18],发现祛风骨痛巴布膏不仅能够缓解由炎性刺激所引发的疼痛,还可以改善寒痹OA大鼠关节肿胀状态、关节活动范围和受重强度。

表8 祛风骨痛巴布膏对寒痹OA大鼠关节组织中NFATc1、MMP-9和CT SK表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 8 Effect of QFGT on expression of NFATc1, MMP-9 and CT SK in cold arthralgia OA rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量	NFATc1/GAPDH	MMP-9/GAPDH	CT SK/GAPDH
正常组		1.00±0.16	1.00±0.10	1.00±0.32
模型组		2.14±0.13 ²⁾	1.74±0.18 ²⁾	3.73±0.88 ²⁾
活血止痛膏组	1.26 cm ² ·d ⁻¹	1.03±0.13 ⁴⁾	0.95±0.50 ⁴⁾	1.87±0.57
祛风骨痛巴布膏低剂量组	75 mg·d ⁻¹	2.10±0.43	1.72±0.13	3.69±1.11
祛风骨痛巴布膏中剂量组	150 mg·d ⁻¹	2.12±0.77	1.35±0.17	3.00±1.16
祛风骨痛巴布膏高剂量组	300 mg·d ⁻¹	1.06±0.29 ⁴⁾	0.58±0.24 ⁴⁾	0.60±0.13 ⁴⁾

研究发现IL-1 β 、IL-8、TNF- α 等炎性因子能够参与OA软骨降解,IL-1 β 和TNF- α 可通过协同作用促进破骨细胞分化因子(RANKL)在骨髓成骨基质细胞的表达,间接诱导破骨细胞生成^[19]。OA的炎

性反应会促进滑膜中IL-1 β 、IL-8和TNF- α 等促炎因子的过度表达,诱导血管新生^[20]。在软骨细胞中IL-1 β 和IL-8可以介导MMP-1、MMP-3和MMP-9产生,进而促进II型胶原降解,最终破坏软骨和骨^[21]。

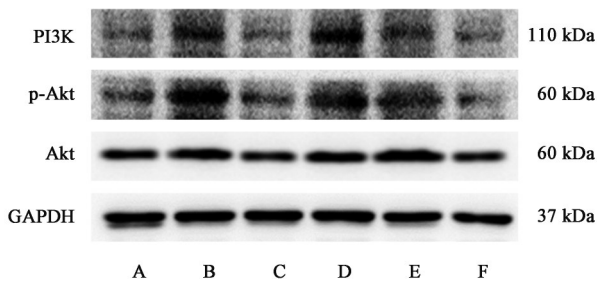


图9 各组大鼠关节组织中PI3K/Akt蛋白表达电泳

Fig. 9 Electrophoresis of PI3K/Akt expression in each group rats

表9 祛风骨痛巴布膏对寒痹OA大鼠关节组织中PI3K/Akt表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 9 Effect of QFGT on expression of PI3K/Akt in cold arthralgia OA rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量	PI3K /GAPDH	p-Akt /Akt
正常组		1.00±0.23	1.00±0.14
模型组		2.11±0.34 ¹⁾	1.79±0.12 ²⁾
活血止痛膏组	1.26 cm ² ·d ⁻¹	0.92±0.27 ³⁾	1.29±0.12 ⁴⁾
祛风骨痛巴布膏低剂量组	75 mg·d ⁻¹	1.75±0.46	1.71±0.22
祛风骨痛巴布膏中剂量组	150 mg·d ⁻¹	1.34±0.86	1.48±0.15
祛风骨痛巴布膏高剂量组	300 mg·d ⁻¹	1.04±0.13 ³⁾	1.08±0.02 ⁴⁾

而NFATc1是破骨细胞发生的主要转录调节因子, NFATc1能够直接或间接调节破骨细胞下游基因表达,包括CTSK和MMP-9等骨吸收相关基因,参与破骨细胞形成及其骨吸收功能^[22]。MMP-9属基质金属蛋白酶(MMP)家族中的一员, MMP与金属蛋白酶组织抑制因子(TIMP)相互作用共同维持关节腔内平衡,当MMP含量升高, TIMP含量降低时,这种平衡关系被打破,关节细胞外基质被大量溶解,软骨结构被破坏,加剧胶原变性,关节炎症也随之产生^[23]。而研究也显示,祛风骨痛巴布膏不仅可以显著降低炎症因子IL-1 β 、IL-8、TNF- α 表达,而且还能降低NFATc1调控的骨破坏因子MMP-9和CTSK的表达,说明祛风骨痛巴布膏可以通过改善局部炎症从而延缓OA软骨破坏进程。

破骨细胞是体内唯一具有骨吸收功能的细胞,并降解矿化骨基质。破骨细胞形成于单核细胞前体,由两种关键细胞因子RANKL和巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)控制作用,其中RANKL与受体RANK的结合启动一系列下游信号反应,导致单核细胞分化和融合,以及随后的成熟破骨细胞骨吸收和PI3K/Akt信号级联反应。而NFATc1被认为是RANKL下游最远端的重要转录因子,参与破骨细胞分化和骨吸收,而其上游的PI3K/Akt通路会对

NFATc1形成信号传导,调节NFATc1对破骨细胞分化的响应程度。而反过来, NFATc1的损失和PI3K/Akt信号级联同样会抑制RANKL介导的破骨细胞生成。PI3K/Akt信号通路是PI3K作为信号分子的中间产物,能够被多种细胞因子受体激活,且广泛存在于各种细胞的胞质中^[24]。PI3K/Akt信号通路不但作用了滑膜细胞异常增生、破骨细胞形成和血管新生,还介导OA关节组织中炎症因子释放最终促进关节软骨细胞凋亡,是增强OA大鼠炎症反应的关键信号通路^[25-27]。而PI3K/Akt信号通路在引起炎症反应分泌大量IL-1 β 的同时,产生的IL-1 β 又会反过来刺激PI3K和Akt迅速磷酸化^[28-32],如此以往加速OA炎症反应及软骨破坏。因此,本研究选择PI3K/Akt信号通路进一步验证祛风骨痛巴布膏相关机制,结果显示祛风骨痛巴布膏有效的抑制炎症因子缓解骨破坏的同时,还可以抑制PI3K/Akt通路中关键蛋白PI3K和p-Akt的激活。

本研究结果显示,祛风骨痛巴布膏不仅显著降低寒痹OA大鼠机械痛敏反应,缓解OA的临床症状,改善软骨损伤和关节组织的病理改变程度。而且明显抑制炎症反应以及IL-1 β 、IL-8、TNF- α 等炎症因子的高表达,阻止骨破坏进程中NFATc1骨破坏相关信号通路的激活,最终延缓骨破坏进程。进一步的机制探索发现,祛风骨痛巴布膏对PI3K/Akt信号通路发挥了重要作用,通过抑制PI3K/Akt信号通路过度激活进而抑制炎症因子及骨破坏。相关研究结果有利于解析祛风骨痛巴布膏祛风除湿、活络舒筋、止痛活血的科学内涵,并指导临床合理用药。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 韩明睿,刘倩倩,孙洋. 骨关节炎发病机制及药物调控新进展[J]. 中国药理学通报, 2022, 38(6): 807-812.

[2] 孙建辉,霍海如,李小芹,等. 不同产地、不同储存期灸材对膝关节关节炎的药效比较[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(17):4065-4070.

[3] 朱文,汪悦. 《临证指南医案》痹症诊疗特色分析[J]. 中国中医基础医学杂志, 2019, 25(10): 1358-1359, 1480.

[4] 舒遵华,丁庆刚,孙牧,等. 痹症的中医治疗规范[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(77): 183-184.

[5] 张跃. 祛风骨痛巴布膏对围绝经期女性膝关节骨关节炎患者的临床疗效分析[J]. 实用妇科内分泌电子杂志, 2020, 7(3): 189.

- [6] 何强,尹宏,代凤雷,等.地黄梓醇对木瓜蛋白酶诱导的大鼠膝骨关节炎模型滑膜组织中S100A12、IL-1 β 、Galectin-3表达的影响[J].中国免疫学杂志,2020,36(21):2597-2602.
- [7] 宋敬怡,张硕峰,马丹,等.乌头对痛觉过敏大鼠脊髓背角相关受体表达的影响[J].重庆医学,2020,49(6):872-878.
- [8] 唐和斌,李婷婷,杨燕京,等.木瓜蛋白酶诱导骨关节炎模型中病理指标的动态变化[J].中南民族大学学报:自然科学版,2013,32(4):41-45.
- [9] PIEL M J, KROIN J S, IM H J. Assessment of knee joint pain in experimental rodent models of osteoarthritis [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1226: 175-181.
- [10] NWOSU L N, MAPP P I, CHAPMAN V, et al. Blocking the tropomyosin receptor kinase A (TrkA) receptor inhibits pain behaviour in two rat models of osteoarthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2016, 75(6): 1246-1254.
- [11] 黄滢,何智军,庄礼兴.不同针灸方法对膝骨关节炎大鼠骨桥蛋白、基质金属蛋白酶-3和转化生长因子- β_1 表达的影响[J].世界中西医结合杂志,2021,16(10):1820-1825.
- [12] 陈俊,吴广文,黄云梅,等.独活寄生汤对膝骨关节炎大鼠软骨形态的影响[J].风湿病与关节炎,2018,7(10):5-9,30.
- [13] 《中成药治疗优势病种临床应用指南》标准化项目组.中成药治疗膝骨关节炎临床应用指南(2020年)[J].中国中西医结合杂志,2021,41(5):522-533.
- [14] 邱贵兴,王桂生.骨关节炎的病因探讨(文献综述)[J].国外医学.外科学分册,1983,6:355.
- [15] 陈卫衡.膝骨关节炎中医诊疗指南(2020年版)[J].中医正骨,2020,32(10):1.
- [16] 刘毓东,毛霞,张苏雅,等.基于生物信息学分析整合组方规律发掘白脉软膏治疗白脉病的作用机制及其功效组配伍特点[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(24):186-195.
- [17] 刘鑫,谭旭仪,邝高艳,等.膝骨关节炎中医证型、K-L分级与IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、VAS评分的相关性[J].中医学报,2022,37(12):2681-2687.
- [18] 袁蓓,苏晓慧,郭婉怡,等.瘀血痹片对大鼠胶原诱导性关节炎的干预作用及抗炎机制[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(11):52-62.
- [19] YAO Z, GETTING S J, LOCKE I C. Regulation of TNF-induced osteoclast differentiation [J]. *Cells*, 2021, doi:10.3390/cells11010132.
- [20] 乔磊,邸振宇,乔曼,等.紫丁香苷对前交叉韧带横断诱导的大鼠骨关节炎的影响[J].局解手术学杂志,2022,31(1):10-15.
- [21] CAI C, MIN S, YAN B, et al. MiR-27a promotes the autophagy and apoptosis of IL-1 β treated-articular chondrocytes in osteoarthritis through PI3K/Akt/mTOR signaling [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(16):6371-6384.
- [22] CHEN K, QIU P, YUAN Y, et al. Pseurotin A inhibits osteoclastogenesis and prevents ovariectomized-induced bone loss by suppressing reactive oxygen species [J]. *Theranostics*, 2019, 9(6):1634-1650.
- [23] 黄思敏,吴雨蒙,张丽,等.甘草附子汤对大鼠骨关节炎及关节软骨蛋白质组学的影响[J].中国中药杂志,2021,46(3):661-669.
- [24] JOSEPHS D H, SARKER D. Pharmacodynamic biomarker development for PI3K pathway therapeutics [J]. *Transl Oncogenomics*, 2015, 7(Suppl 1): 33-49.
- [25] MALEMUD C J. The PI3K/Akt/PTEN/mTOR pathway: A fruitful target for inducing cell death in rheumatoid arthritis? [J]. *Future Med Chem*, 2015, 7(9):1137-1147.
- [26] KOROTKYI O, HUET A, DVORSHCHENKO K, et al. Probiotic composition and chondroitin sulfate regulate TLR-2/4-mediated NF- κ B inflammatory pathway and cartilage metabolism in experimental osteoarthritis [J]. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2021, 13(4):1018-1032.
- [27] SOKI F N, YOSHIDA R, PAGLIA D N, et al. Articular cartilage protection in Ctsk^{-/-} mice is associated with cellular and molecular changes in subchondral bone and cartilage matrix [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(11): 8666-8676.
- [28] SUN K, LUO J, GUO J, et al. The PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in osteoarthritis: A narrative review [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2020, 28(4):400-409.
- [29] HOSSAIN M A, ADITHAN A, ALAM M J, et al. IGF-1 facilitates cartilage reconstruction by regulating PI3K/Akt, MAPK, and NF- κ B signaling in rabbit osteoarthritis [J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14: 3555-3568.
- [30] WEN X, LI H, SUN H, et al. MiR-455-3p reduces apoptosis and alleviates degeneration of chondrocyte through regulating PI3K/Akt pathway [J]. *Life Sci*, 2020, 253:117718.
- [31] BOLLMANN M, PINNO K, EHNOLD L I, et al. MMP-9 mediated Syndecan-4 shedding correlates with osteoarthritis severity [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2021, 29(2):280-289.
- [32] LÓPEZ-ARMADA M J, CARAMÉS B, LIREs-DEÁN M, et al. Cytokines, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta, differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006, 14(7):660-669.

[责任编辑 孙丛丛]