

基于 Wnt/Ca²⁺ 信号通路探究盘龙七片干预大鼠实验性膝骨关节炎疼痛的作用机制

王 璐, 徐 颖*, 徐盼瑜, 杨一博, 邹 钊, 杜寒倩, 李佳珊, 林 娜*

中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

摘 要: **目的** 基于网络药理学整合体内验证方法探索盘龙七片对膝骨关节炎疼痛大鼠的干预作用及相关机制。**方法** 从疾病及药物相关数据库筛选盘龙七片药物作用靶点及膝骨关节炎疼痛相关靶点, 根据拓扑特征值筛选关键靶标后, 进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。采用改良 Hulth 法建立大鼠膝骨关节炎疼痛模型, 设置假手术组、模型组、美洛昔康 (1.5 g/kg) 组和盘龙七片低、中、高剂量 (0.15、0.30、0.60 g/kg) 组, 给予药物干预 42 d, 测量给药后大鼠机械痛阈值、冷痛觉超敏反应评分及双后肢负重差, 并对网络药理学预测结果进行体内实验验证。**结果** 共筛选出 175 个盘龙七片治疗膝骨关节炎疼痛的潜在核心靶点, 生物学功能富集在调节神经细胞对各种刺激反应、炎症反应、细胞内信号传导及代谢反应 4 个过表达模块, 其中 Wnt/Ca²⁺ 途径核心靶标富集较为显著, 也是在调节神经细胞对各种刺激反应生物学过程富集程度最高的通路。体内实验结果显示, 盘龙七片可明显升高给药 3~12 d 及 24~30 d 膝骨关节炎大鼠机械痛阈值 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 显著降低给药 3~42 d 时膝骨关节炎大鼠冷痛觉超敏反应评分与双后肢负重差 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 抑制膝骨关节炎疼痛大鼠脊髓中无翅型 MMTV 整合位点家族成员 5A (wingless type MMTV integration site family member 5A, WNT5A)、重组磷脂酶 C (phospholipase C, PLC)、蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 蛋白表达及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂) 水平 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。**结论** 盘龙七片对大鼠实验性膝骨关节炎急性发作期和慢性持续性的疼痛均有缓解作用, 其机制可能与调节 Wnt/Ca²⁺ 信号通路有关。

关键词: 盘龙七片; 膝骨关节炎; 大鼠; 疼痛; 中枢敏化; 网络药理学; Wnt/Ca²⁺ 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)07-2044-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.07.013

Mechanism of Panlongqi Tablet in intervention of experimental knee osteoarthritis pain in rats based on Wnt/Ca²⁺ signaling pathway

WANG Lu, XU Ying, XU Pan-yu, YANG Yi-bo, ZOU Zhao, DU Han-qian, LI Jia-shan, LIN Na

Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: **Objective** To explore the interventional effect and related mechanism of Panlongqi Tablet (盘龙七片) on rats with knee osteoarthritis pain through network pharmacology analysis and *in vivo* validation method. **Methods** Drug targets of Panlongqi Tablet and targets related to knee osteoarthritis pain were screened from disease and drug related database, and key targets were screened according to topological eigenvalues. After that, modular enrichment analysis of function and pathway was conducted based on gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG). Rats with knee osteoarthritis pain model established by modified Hulth method were divided into sham group, model group, meloxicam (1.5 g/kg) group and Panlongqi Tablet low-, medium-, high-dose (0.15, 0.30, 0.60 g/kg) group, drug intervention was given for 42 d. Mechanical pain threshold, cold pain hypersensitivity score and weight bearing difference of both hind limbs were measured after treatment, and network pharmacological prediction results were verified *in vivo*. **Results** A total of 175 potential core targets of Panlongqi Tablet for treatment of knee osteoarthritis pain were

收稿日期: 2021-12-20

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 (20191306)

作者简介: 王 璐 (1995—), 男, 硕士, 研究方向为中医药防治骨关节相关疾病。Tel: 18809589112 E-mail: Doctorwl26@163.com

***通信作者:** 徐 颖, 硕士生导师, 研究员, 从事中药药理及中药药性研究工作。E-mail: yxu@icmm.ac.cn

林 娜, 博士生导师, 研究员, 从事中药药理及中药药性研究工作。E-mail: nlin@icmm.ac.cn

selected based on topological screening parameters. Their biological functions focus on four overexpression modules including regulating nerve cell responses to various stimuli, regulating inflammatory response process, regulating intracellular signal transduction and metabolic response. Wnt/Ca²⁺ pathway was a significant pathway for core target enrichment, and also a pathway with the highest enrichment degree in the biological process of regulating nerve cell responses to endogenous, hormonal, exogenous and other stimuli. *In vivo* experiment results showed that Panlongqi Tablet significantly increased the mechanical pain threshold of rats with knee osteoarthritis pain from 3—12 d and 24—30 d after treatment, and decreased the cold pain hypersensitivity score and weight bearing difference on both hind limbs of rats from 3—42 d after treatment ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and inhibited wingless type MMTV integration site family member 5A (WNT5A), phospholipase C (PLC) and protein kinase C (PKC) protein expressions as well as levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and prostaglandin E₂ (PGE₂) in spinal cord of rats with knee osteoarthritis pain ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** Panlongqi Tablet can alleviate both acute onset and chronic persistent pain of experimental knee osteoarthritis in rats, and its mechanism may be related to the regulation of Wnt/Ca²⁺ signaling pathway.

Key words: Panlongqi Tablet; knee osteoarthritis; rats; pain; central sensitization; network pharmacology; Wnt/Ca²⁺ signaling pathway

膝骨关节炎是一种因关节过度劳损、肥胖、机械创伤等多种因素引起的膝关节慢性退行性病变疾病^[1]。其中膝关节疼痛作为最早出现和最常见临床症状,因其反复发作、迁延难愈的发病特点,给患者身体和精神带来巨大负担,也是膝骨关节炎患者关节功能障碍渐进性发展和最终致残的重要因素,所以如何缓解或者根治疼痛是该病在临床治疗中亟需解决的难题^[2]。目前膝骨关节炎的化学药治疗仍以非甾体抗炎药为主,以改善症状,缓解疼痛为目的,但因其长期使用会增加胃肠道出血、穿孔、心血管疾病的发病风险,从而限制了其临床应用范围^[3-4]。基于中医理论指导下的多种药物组方配伍,具有增效减毒的药效特点,在缓解膝骨关节炎疼痛方面疗效显著。盘龙七片是以中医骨伤专家王家成先生所献祖传秘方为基础方配伍而成的新方,由盘龙七、支柱蓼、铁棒锤、八里麻、当归、丹参、重楼、红花、乳香、没药、老鼠七、白毛七、祖师麻、珠子参、木香、伸筋草、竹根七、羊角七、过山龙、秦艽、络石藤、缬草、青蛙七、川乌、草乌、五加皮、牛膝、杜仲、壮筋丹组成,具有活血化瘀、祛风除湿、消肿止痛的功效。临床实践也证明^[5-7],盘龙七片在缓解关节肿痛、改善关节功能及其他伴随症状方面具有一定作用,2018 年被中国中西医结合学会骨伤科专业委员会发布的《膝骨关节炎中西医结合诊疗指南》推荐为活血镇痛类代表性中成药用于治疗气滞血瘀型膝骨关节炎^[8]。随着盘龙七片在膝骨关节炎临床应用的推广,其临床研究从单一的疗效观察逐渐拓展到针对具体证型、联合用药、配合针灸等其他疗法的多维度研究^[9-10]。然而,作为一种活血化瘀、消肿止痛的中成药,盘龙七片对膝骨关节炎疼痛的作用机制及特点至今尚未被较全面揭

示。本课题组前期通过采用完全弗氏佐剂诱导的慢性炎性疼痛模型证明了盘龙七片对慢性炎性疼痛大鼠具有良好的镇痛作用^[11],为了进一步揭示其镇痛作用特点和相关机制,拟通过网络药理学整合实验验证的研究策略,借助改良 Hult 方法诱导的大鼠膝骨关节炎疼痛模型开展研究,以期为盘龙七片缓解膝骨关节炎疼痛的基础实验研究提供新的研究思路,并指导临床合理用药。

1 材料

1.1 药物及疾病数据库

中医药百科全书数据库(ETCM)、中医药整合药理学研究平台(TCMIP)、人类本体表型库(HPO)、疾病相关的基因与突变位点数据库(DisGenNet)、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)、疗效药靶数据库(TTD)、人类基因突变数据库(GeneCards)。

1.2 动物

48 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,6 周龄,体质量为(200±20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号 SCXK(京)2019-0003。动物饲养于中国中医科学院中药研究所实验动物中心,温度(24±1)℃,湿度(50±10)%,自由活动、进食、饮水,适应性饲养 4 d 后开始实验。动物实验通过中国中医科学院中药研究所实验动物福利伦理审查(伦理批准号 2019-0053)。

1.3 药品与试剂

盘龙七片(批号 20190801, 0.3 g/片)购自陕西盘龙药业集团股份有限公司;美洛昔康(批号 20190713, 7.5 mg/片)购自齐鲁制药有限公司;大鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒(批号 EELR2856c)、前列腺素 E₂

(prostaglandin E₂, PGE₂) ELISA 试剂盒 (批号 EELR0034c)、大鼠白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) ELISA 试剂盒 (批号 EELR0012c) 购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; 兔无翅型 MMTV 整合位点家族成员 5A (wingless type MMTV integration site family member 5A, WNT5A) 多克隆抗体 (批号 NBP2-24752) 购自美国 Novus 公司; 重组磷脂酶 C (phospholipase C, PLC) 单克隆抗体 (批号 ab182359)、HRP 标记的山羊抗兔二抗 (批号 ab6721) 购自英国 Abcam 公司; 兔蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 多克隆抗体 (批号 59090S) 购自美国 CST 公司; 兔 β -actin 抗体 (批号 bs0061R) 购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.4 仪器

纤维丝针刺触觉测量套件 (美国 Stoeltingco 公司); 双足平衡测试仪 (意大利 Ugo Basile 公司); 电子天平 (德国 Sartorius 公司); MK3 型酶免疫分析仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 水浴锅 (北京中兴伟业仪器有限公司); Power PacBasic 型电泳仪和转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司); TS-1 型水平摇床 (江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司); 涡旋混合器 (北京金北德工贸有限公司); Fusion FX5 型凝胶成像仪 (法国 Vilber 公司)。

2 方法

2.1 盘龙七片治疗膝骨关节炎疼痛的潜在靶点的收集与筛选

从 ETCM 数据库 (<http://www.tcmip.cn>)、TCMIP 研究平台 (<http://www.tcmip.cn>) 及相关文献数据库检索并收集盘龙七片中所有中药的潜在作用靶点; 从 HPO 数据库 (<https://hpo.jax.org/app/>)、DisGenNet 数据库 (<https://www.disgenet.org/search>)、OMIM 数据库 (<https://omim.org/>)、TTD 数据库 (<http://db.Idrblab.net/ttd/>)、GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 及文献数据库筛选膝骨关节炎疼痛相关靶点信息。整合上述数据库来源和文献来源中盘龙七片与膝骨关节炎相关的靶标, 除冗余后得到盘龙七片治疗膝骨关节炎疼痛的靶基因^[12-14]。

2.2 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建与分析

整合上述靶点去除冗余后导入 String 数据库, 构建 PPI 网络并计算分析其拓扑属性值如节点连接度、节点紧密度、节点介度。选取上述拓扑特征值均超过中位值的靶点, 作为后续分析盘龙七片缓解

膝骨关节炎疼痛作用机制的关键靶点。

2.3 基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析与网络的构建

将候选靶点导入 Cytoscape 软件中, 利用其生物网络基因本体论 (genetic ontology of biological network, BiNGO) 插件进行 GO 功能富集分析; 将候选靶点分别输入 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>), 进行通路富集分析。整合关键靶标功能富集分析及通路富集分析结果 ($P \leq 0.05$)。结合膝骨关节炎疼痛发病的基本病理过程剔除广泛通路进行模块化分析, 并绘制相应的网络分析图。

2.4 动物分组和给药

SD 大鼠按照随机数字表法分为假手术组、模型组、美洛昔康 (1.5 g/kg, 相当于临床等效剂量) 组及盘龙七片低、中、高剂量 (0.15、0.30、0.60 g/kg, 分别相当于 0.5、1、2 倍临床等效剂量) 组。盘龙七片充分研磨, 精密称取研细后的粉末适量, 加入蒸馏水, 分别配制成 0.025、0.050、0.100 g/mL 的混悬液; 美洛昔康充分研磨, 精密称取研细后的粉末适量, 加入蒸馏水, 配制成 0.25 g/mL 的混悬液。造模 1 周后, 各给药组 ig 相应药物 (6 mL/kg), 假手术组、模型组 ig 等体积蒸馏水, 1 次/d, 连续 42 d。

2.5 改良 Hulth 法建立膝骨关节炎疼痛动物模型

大鼠吸入 2% 异氟烷麻醉后剔除右侧后肢膝关节内侧半月板, 并切断前交叉韧带, 最后抽屉实验确定前交叉韧带分离, 缝合手术切口后擦净皮肤表面血迹。模型组及各给药组均采用改良 Hulth 法建立膝骨关节炎疼痛模型, 假手术组在右膝关节相同部位皮肤处切开相同大小的切口后缝合。

2.6 机械痛阈值、冷疼阈值、双后肢负重差检测

给药前和给药第 3、6、9、12、15、18、21、24、27、30、33、36、39、42 天, 利用冯弗雷纤维丝按照 “Up-Down” 法进行机械痛敏的检测^[15]。用注射器滴 0.1 mL 冷丙酮到大鼠右后肢的足底, 通过计数一定时间内的抖或舔后爪的次数或收回爪子的次数来测量冷痛阈值: 无反应记 0 分; 退缩, 躲避记 1 分; 多次退缩躲避记 2 分; 多次舔舐爪子记 3 分。用大鼠双足平衡测量仪测量大鼠双后肢负重差^[16]。

2.7 ELISA 法检测大鼠脊髓背角组织 PGE₂、TNF- α 和 IL-1 β 的含量

大鼠麻醉后取 L3~L5 脊髓背角组织, 提取蛋白并定量, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测大鼠 L3~

L5 脊髓背角中 TNF- α 、IL-1 β 和 PGE₂ 的含量。

2.8 Western blotting 法检测大鼠脊髓背角组织 WNT5A、PLC 和 PKC 的蛋白表达

取大鼠 L3~L5 脊髓液氮中研磨,冰上裂解后采用 Bradford 法测定蛋白浓度,加入 5×蛋白上样缓冲液,100 °C 水浴 5 min 使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,封闭后分别加入 WNT5A 抗体(1:1000)、PLC 抗体(1:1000)、PKC 抗体(1:1500)和 β -actin 抗体(1:1000),4 °C 孵育过夜;TBST 洗膜后,加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗(1:10 000),室温孵育 2 h, TBST 洗膜后,采用凝胶成像仪成像,Image J 软件分析条带灰度值。

2.9 数据处理与分析

实验数据使用 SPSS 23.0 软件进行分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 描述,各组间用单因素方差分析进行比较。

3 结果

3.1 盘龙七片成分作用靶点及膝骨关节炎相关靶点收集

从 ETCM 数据库中直接收集盘龙七片所含的络石藤、壮筋丹、五加皮、川乌、生草乌、当归、杜仲、红花、牛膝、丹参、乳香、没药、木香、珠子参、秦艽、竹根七共 16 味中药靶点及成分信息,剩余八里麻、白毛七、过山龙等 13 味药物利用 TCMIP、TCMSP 数据库及文献数据库中收集药物的靶点。整合上述结果,去冗余共计 823 个靶点。从 HPO、DisGenNet、OMIM、TTD、GeneCards 等数据库中收集 984 个膝骨关节炎疼痛相关靶点,整合药物与疾病靶点共 1159 个盘龙七片治疗膝骨关节炎疼痛的候选靶点。

3.2 候选靶点 PPI 网络构建与拓扑属性分析

整合上述预测得到的盘龙七片治疗膝骨关节炎疼痛候选靶点,导入 String 数据库进行 PPI 分析,初始网络包含 1159 个节点和 14 686 对相互作用,通过拓扑属性分析节点连接度、介数中心性、接近中心性进一步筛选网络中的关键基因共计 175 个。

3.3 GO 功能和 KEGG 通路富集分析及网络构建

GO 功能富集分析结果显示,盘龙七片治疗膝骨关节炎疼痛候选关键靶点功能富集与膝骨关节炎疼痛相关生物过程中, P 值排名前 30 的生物过程主要涉及以下 4 个功能模块:①调节神经细胞对内源性、激素、外源性等各种刺激的反应,如对化学刺激的反应、内源刺激的反应、有机反应、激素刺激

反应、外部刺激反应、细胞对化学刺激的反应、对无机物质的反应等;②调控炎症介质合成及释放等相关的炎症反应过程,如正调控氮化合物代谢过程、调节前列腺素的合成过程、调控 TNF 合成过程、IL-6 的细胞反应、对炎症反应的正调节等;③调控神经细胞内信号传导相关生物学过程,如细胞通讯调节、信号处理、信号传输等;④调节代谢相关生物学过程,如正调节代谢过程、细胞代谢过程的负调节、细胞代谢过程的正调节、大分子代谢过程的正调控等。其中与神经细胞各种刺激的反应相关靶点 57 个、与炎症反应相关靶点 31 个、与神经细胞内信号传导相关靶点 41 个、与代谢反应相关靶点 48 个。

关键靶基因通路富集分析,排除广泛通路筛选后共得 25 条与膝骨关节炎疼痛相关通路。KEGG 通路富集分析结果显示,关键靶点富集程度较高的通路中参与调节神经细胞各种刺激反应相关信号通路有 8 个,参与调节炎症反应相关信号通路 6 个,参与调节神经细胞内信号传导相关信号通路 6 个,参与调节代谢反应信号通路 5 个。在核心靶标所参与的通路中,Wnt 信号通路是核心靶标富集显著性较高的通路,该通路涉及的关键靶点在调节神经细胞对内源、激素、外源性等各种刺激的反应生物学过程富集程度最高。通过分析关键靶点在该通路中的富集情况,结合文献验证发现,盘龙七片可能是通过调控 Wnt 非典型通路 Wnt/Ca²⁺ 途径干预膝骨关节炎引起的疼痛。整合盘龙七片药物、作用靶点、功能富集及通路富集模块化分析结果,构建盘龙七片治疗膝骨关节炎疼痛“中药-靶点-通路”网络分析图(图 1)。

3.4 盘龙七片对膝骨关节炎大鼠机械痛阈的影响

如表 1 所示,给药前各组大鼠机械痛阈无统计学差异。与假手术组相比,模型组大鼠在给药第 3~42 天机械痛阈明显降低($P<0.001$),提示大鼠出现机械刺激痛敏反应,表明膝骨关节炎疼痛模型造模成功;与模型组相比,美洛昔康组大鼠在给药第 6~12 天机械痛阈明显升高($P<0.05$ 、0.001),但之后到实验结束期间大鼠机械痛阈无明显改善;盘龙七片中剂量组大鼠在给药第 3~12 天及第 24~30 天机械痛阈明显升高($P<0.05$ 、0.01、0.001),盘龙七片高剂量组大鼠在给药第 3~15 天及第 24~30 天机械痛阈明显升高($P<0.05$ 、0.01、0.001)。

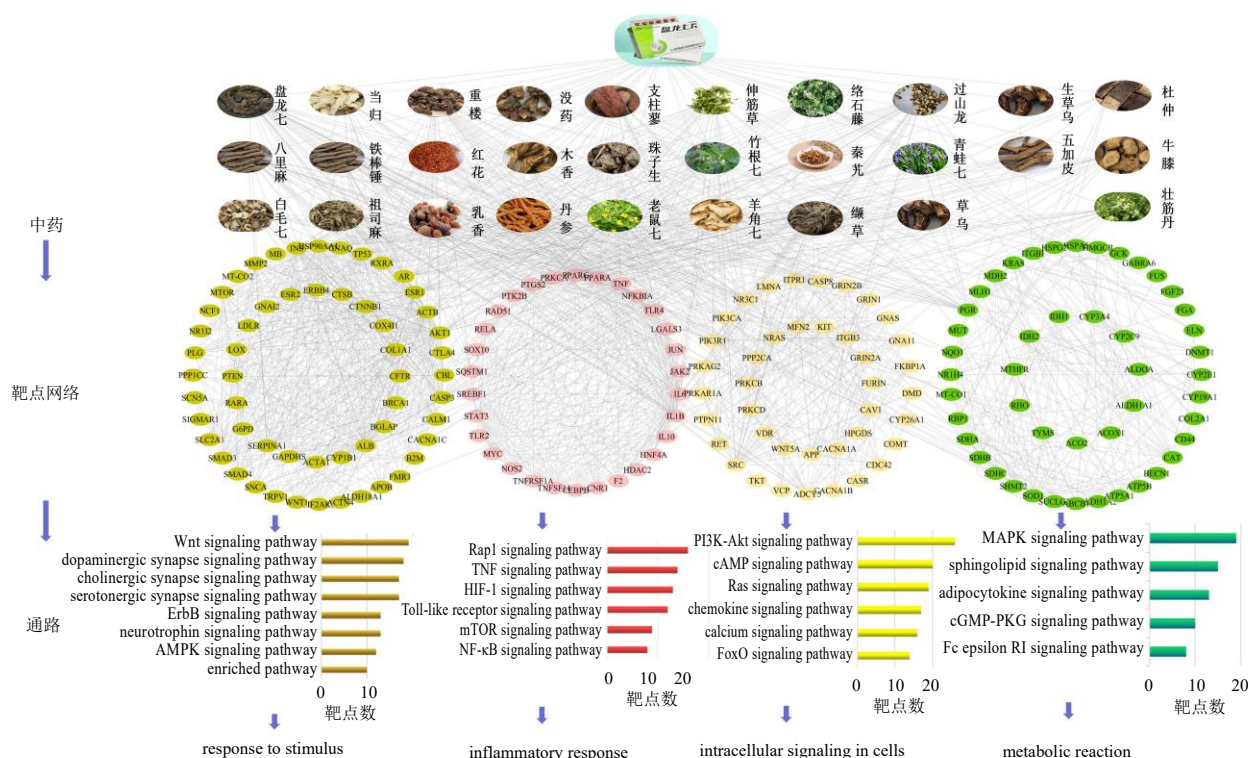


图 1 盘龙七片治疗膝骨关节炎疼痛“中药-靶点-通路”网络分析图

Fig. 1 Network analysis of “traditional Chinese medicine-target-pathway” of Panlongqi Tablet in treatment of knee osteoarthritis pain

表 1 盘龙七片对膝骨关节炎大鼠机械痛阈的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Table 1 Effect of Panlongqi Tablet on paw withdrawal mechanical threshold in rats with knee osteoarthritis ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	机械痛阈/g							
		给药前	给药第 3 天	给药第 6 天	给药第 9 天	给药第 12 天	给药第 15 天	给药第 18 天	给药第 21 天
假手术	—	6.94±0.60	7.25±0.46	7.12±0.70	6.98±0.52	7.07±0.30	7.03±0.30	7.34±0.40	7.20±0.41
模型	—	1.17±0.11	0.90±0.14 ^{###}	0.99±0.13 ^{###}	0.85±0.14 ^{###}	0.35±0.03 ^{###}	0.38±0.03 ^{###}	0.49±0.02 ^{###}	0.41±0.04 ^{###}
美洛昔康	1.50	1.40±0.08	1.22±0.12	1.98±0.18*	2.34±0.35***	1.24±0.09*	1.35±0.09	1.14±0.06	1.01±0.05
盘龙七片	0.15	1.20±0.13	1.11±0.09	1.19±0.07	1.33±0.10	0.60±0.04	0.65±0.04	0.81±0.11	0.59±0.04
	0.30	1.24±0.09	2.09±0.11**	2.41±0.26**	2.36±0.09***	1.25±0.11*	1.36±0.14	1.22±0.10	1.06±0.10
	0.60	1.35±0.10	2.76±0.11***	2.83±0.18***	2.89±0.19***	1.76±0.22***	1.48±0.09*	1.22±0.11	1.29±0.05
组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	机械痛阈/g							
		给药第 24 天	给药第 27 天	给药第 30 天	给药第 33 天	给药第 36 天	给药第 39 天	给药第 42 天	
假手术	—	7.11±0.31	7.32±0.41	7.10±0.29	7.13±0.56	7.30±0.58	7.41±0.48	7.13±0.56	
模型	—	0.35±0.03 ^{###}	0.29±0.05 ^{###}	0.33±0.10 ^{###}	0.39±0.01 ^{###}	0.46±0.04 ^{###}	0.40±0.14 ^{###}	0.36±0.05 ^{###}	
美洛昔康	1.50	1.07±0.24	1.20±0.27	1.13±0.20	0.89±0.13	0.94±0.07	0.98±0.05	0.95±0.04	
盘龙七片	0.15	0.76±0.23	0.95±0.20	0.65±0.09	0.58±0.15	0.70±0.10	0.84±0.13	0.68±0.15	
	0.30	1.49±0.11*	1.56±0.08*	1.09±0.14*	1.16±0.15	1.11±0.02	0.98±0.03	0.99±0.04	
	0.60	1.90±0.18*	1.90±0.17**	1.64±0.14*	1.51±0.04	1.45±0.12	1.53±0.09	1.31±0.17	

与假手术组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 表 2、3 同^{###} $P < 0.001$ vs sham group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as tables 2, 3

3.5 盘龙七片对膝骨关节炎大鼠冷痛觉超敏反应评分的影响

如表 2 所示, 给药前各组大鼠冷痛觉超敏反应评分无统计学差异。与假手术组相比, 模型组大鼠在给药第 3~42 天大鼠冷痛觉超敏反应评分明显升

高 ($P < 0.001$)。与模型组相比, 美洛昔康组大鼠在给药 12~18 d 及 30~42 d 冷痛觉超敏反应评分降低 ($P < 0.05$ 、0.01); 盘龙七片中、高剂量组大鼠在给药 3~42 d 冷痛觉超敏反应评分显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。

3.6 盘龙七片对膝骨关节炎大鼠双后肢负重差的影响

如表 3 所示,与假手术组相比,模型组大鼠在给药第 3~42 天双后肢负重差明显升高 ($P <$

0.001)。与模型组相比,美洛昔康组大鼠在给药第 6~27 天双后肢负重差明显降低 ($P < 0.05$ 、0.001),盘龙七片中、高剂量组大鼠在给药第 3~42 天双后肢负重差明显降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。

表 2 盘龙七片对膝骨关节炎大鼠冷痛觉超敏反应评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

		Table 2 Effect of Panlongqi Tablet on cold pain threshold in rats with knee osteoarthritis ($\bar{x} \pm s, n = 8$)							
组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	冷痛觉超敏反应评分/分							
		给药前	给药第 3 天	给药第 6 天	给药第 9 天	给药第 12 天	给药第 15 天	给药第 18 天	给药第 21 天
假手术	—	0.40±0.10	0.22±0.06	0.40±0.11	0.42±0.11	0.40±0.05	0.48±0.19	0.48±0.10	0.38±0.10
模型	—	1.78±0.16	1.64±0.11 ^{###}	1.68±0.14 ^{###}	1.74±0.21 ^{###}	1.84±0.11 ^{###}	1.56±0.11 ^{###}	1.60±0.17 ^{###}	1.46±0.10 ^{###}
美洛昔康	1.50	1.52±0.10	1.12±0.15	1.12±0.12	1.32±0.23	1.34±0.11*	1.00±0.23*	1.06±0.10*	1.10±0.21
盘龙七片	0.15	1.48±0.20	1.24±0.18	1.22±0.22	1.56±0.20	1.42±0.11	1.34±0.10	1.34±0.20	1.26±0.17
	0.30	1.68±0.13	0.52±0.11 ^{***}	0.86±0.08 ^{***}	1.16±0.16*	1.08±0.12**	0.92±0.16**	0.90±0.18**	0.84±0.19**
	0.60	1.54±0.10	0.40±0.08 ^{***}	0.58±0.06 ^{***}	0.78±0.07 ^{***}	0.64±0.13 ^{***}	0.74±0.13 ^{***}	0.78±0.13 ^{***}	0.56±0.10 ^{***}
组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	冷痛觉超敏反应评分/分							
		给药第 24 天	给药第 27 天	给药第 30 天	给药第 33 天	给药第 36 天	给药第 39 天	给药第 42 天	
假手术	—	0.32±0.14	0.60±0.09	0.56±0.17	0.56±0.07	0.44±0.16	0.48±0.16	0.52±0.14	
模型	—	1.68±0.24 ^{###}	1.92±0.10 ^{###}	1.88±0.08 ^{###}	2.00±0.09 ^{###}	1.80±0.19 ^{###}	1.68±0.17 ^{###}	1.80±0.19 ^{###}	
美洛昔康	1.50	0.92±0.16	1.08±0.25	0.92±0.34*	1.08±0.25**	0.84±0.10*	0.96±0.17*	0.85±0.10*	
盘龙七片	0.15	1.60±0.06	1.60±0.14	1.80±0.21	1.60±0.14	1.52±0.21	1.56±0.15	1.44±0.10	
	0.30	0.92±0.25*	0.84±0.17 ^{***}	0.92±0.19**	0.84±0.17 ^{***}	0.76±0.29**	0.84±0.17*	0.80±0.18**	
	0.60	0.76±0.20 ^{***}	0.56±0.12 ^{***}	0.76±0.28 ^{***}	0.56±0.12 ^{***}	0.64±0.32 ^{***}	0.50±0.17 ^{***}	0.55±0.22 ^{***}	

表 3 盘龙七片对膝骨关节炎大鼠双后肢负重差的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of Panlongqi Tablet on weight bearing difference of both hind limbs in rats with knee osteoarthritis ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

		Table 3 Effect of Panlongqi Tablet on weight bearing difference of both hind limbs in rats with knee osteoarthritis ($\bar{x} \pm s, n = 8$)							
组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	双后肢负重差/g							
		给药前	给药第 3 天	给药第 6 天	给药第 9 天	给药第 12 天	给药第 15 天	给药第 18 天	给药第 21 天
假手术	—	0.09±0.05	0.21±0.06	0.02±0.03	0.02±0.03	0.07±0.05	0.13±0.05	0.12±0.07	0.22±0.08
模型	—	0.87±0.30	1.49±0.13 ^{###}	2.48±0.47 ^{###}	2.92±0.32 ^{###}	2.97±0.27 ^{###}	3.03±0.34 ^{###}	2.54±0.29 ^{###}	2.04±0.15 ^{###}
美洛昔康	1.50	0.87±0.11	0.94±0.06	1.06±0.17 ^{***}	1.26±0.16 ^{***}	1.62±0.31 ^{***}	1.76±0.17 ^{***}	0.79±0.10 ^{***}	0.85±0.14 ^{***}
盘龙七片	0.15	0.83±0.13	1.01±0.07	1.23±0.14	1.70±0.29	1.49±0.17	1.35±0.21	0.92±0.15	0.95±0.15
	0.30	0.85±0.17	0.49±0.06**	0.35±0.12 ^{***}	0.41±0.09 ^{***}	0.81±0.16 ^{***}	0.86±0.16 ^{***}	0.79±0.11 ^{***}	0.42±0.14 ^{***}
	0.60	0.86±0.09	0.36±0.08 ^{***}	0.05±0.06 ^{***}	0.22±0.07 ^{***}	0.32±0.09 ^{***}	0.58±0.15 ^{***}	0.44±0.10 ^{***}	0.29±0.11 ^{***}
组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	双后肢负重差/g							
		给药第 24 天	给药第 27 天	给药第 30 天	给药第 33 天	给药第 36 天	给药第 39 天	给药第 42 天	
假手术	—	0.15±0.06	0.29±0.20	0.26±0.18	0.13±0.08	0.20±0.08	0.12±0.05	0.17±0.05	
模型	—	2.21±0.45 ^{###}	2.58±0.24 ^{###}	2.44±0.13 ^{###}	2.52±0.24 ^{###}	2.30±0.18 ^{###}	1.91±0.18 ^{###}	1.71±0.29 ^{###}	
美洛昔康	1.50	1.16±0.11*	0.85±0.11 ^{***}	1.52±0.16	1.27±0.22	1.36±0.22	1.32±0.05	1.29±0.22	
盘龙七片	0.15	1.65±0.10	1.29±0.23	2.02±0.29	1.49±0.25	2.21±0.37	1.87±0.07	1.47±0.23	
	0.30	0.90±0.14**	0.74±0.20 ^{***}	0.86±0.07 ^{***}	0.94±0.13 ^{***}	1.12±0.24**	0.95±0.21*	0.71±0.08*	
	0.60	0.39±0.14 ^{***}	0.60±0.12 ^{***}	0.45±0.14 ^{***}	0.56±0.21 ^{***}	0.44±0.15 ^{***}	0.34±0.13 ^{***}	0.50±0.20 ^{***}	

3.7 盘龙七片对膝骨关节炎疼痛大鼠脊髓背角中 Wnt5A、PLC 和 PKC 蛋白表达的影响

如图 2 所示,与假手术组比较,模型组大鼠脊髓 Wnt5A、PLC 和 PKC 蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.001$);与模型组比较,盘龙七片中、高剂量组大鼠脊髓 Wnt5A、PLC 和 PKC 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。

3.8 盘龙七片对膝骨关节炎大鼠脊髓背角中 TNF- α 、IL-1 β 和 PGE₂ 水平的影响

如图 3 所示,与假手术组比较,模型组大鼠脊髓 TNF- α 、IL-1 β 和 PGE₂ 水平均明显升高 ($P < 0.001$);与模型组比较,美洛昔康及盘龙七片中、高剂量组大鼠脊髓 TNF- α 、IL-1 β 和 PGE₂ 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。

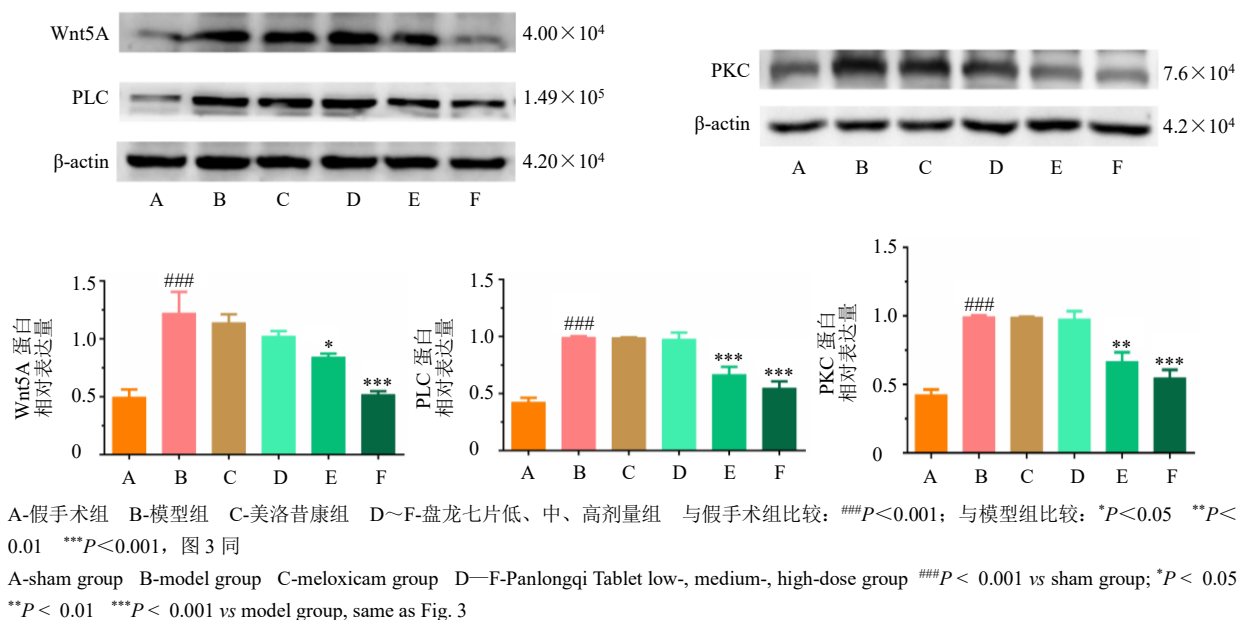


图 2 盘龙七片对膝骨关节炎疼痛大鼠脊髓背角中 Wnt5A、PLC 和 PKC 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of Panlongqi Tablet on Wnt5A, PLC and PKC protein expressions in spinal dorsal horn of rats with knee osteoarthritis pain

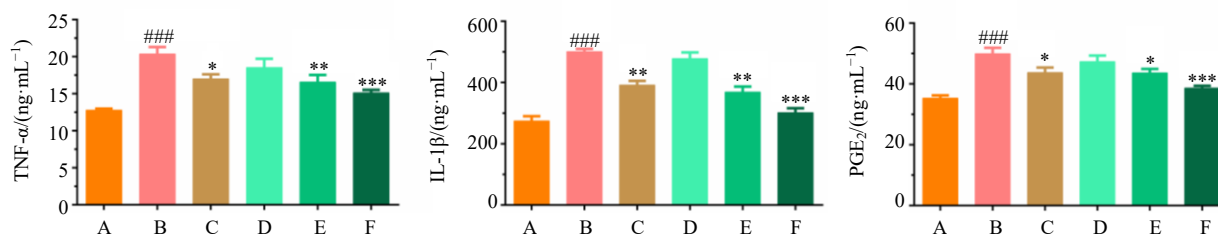


图 3 盘龙七片对膝骨关节炎疼痛大鼠脊髓背角中 TNF-α、IL-1β 和 PGE₂ 水平的影响

Fig. 3 Effect of Panlongqi Tablet on TNF-α, IL-1β and PGE₂ levels in spinal dorsal horn of rats with knee osteoarthritis pain

4 讨论

膝骨关节炎属于中医学“痹症”范畴,《素问·痹论》指出:“风、寒、湿三气杂至,合而为痹”。虽然后世医家在此基础对膝骨关节炎疼痛的病因病机的认识多有发展,但究其根源,仍为机体正气不足,复感风、寒、湿等外邪侵入,从而闭塞经脉,致气血不通,不通而痛;或外邪流注筋骨,致筋束骨无力,关节屈伸不利,久而发为痹痛。本课题组前期针对盘龙七片配伍规律的研究结果表明,盘龙七片以盘龙七、支柱蓼、铁棒锤、八里麻、当归、丹参、重楼、红花、乳香、没药、老鼠七、白毛七、祖师麻、珠子参、木香行气活血化瘀;以伸筋草、竹根七、羊角七、过山龙、秦艽、络石藤、缬草、青蛙七、川乌、草乌、五加皮祛风通络,佐以牛膝、杜仲、壮筋丹以补益肝肾^[17]。就组方配伍而言,盘龙七片具有良好的活血、通络、止痛的药效基础。

膝骨关节炎的疼痛机制比较复杂,在疾病发展的不同时期其机制也不尽相同。有学者认为,膝骨关节炎最早和最主要的病理变化是关节软骨的破坏^[18]。但软骨内并无神经分布,所以膝骨关节炎早期的疼痛机制可能与软骨细胞及滑膜细胞释放的炎性介质直接作用于疼痛神经元有关^[19]。随着膝骨关节炎病程发展,伤害性突触信息的传递对脊髓背角感觉形成过程进行活性依赖的功能性调节,导致疼痛的长时间持续增强,甚至在外周的伤害性刺激已经不存在的情况下,脊髓中枢仍然对来自外周刺激产生过度反应,从而诱发中枢敏化^[20]。在膝骨关节炎后期,慢性持续性疼痛的发病与慢性炎症、神经病理性疼痛参与等密切相关,其主要病理基础是中枢敏化引起的痛觉过敏。网络药理学预测结果表明盘龙七片可通过调控神经细胞对各种刺激的反应、炎症反应、神经细胞内信号传导及代谢相关生

物学过程改善膝骨关节炎疼痛。通过盘龙七片与传统用于膝骨关节炎治疗的非甾体抗炎药美洛昔康的对照研究,结果表明盘龙七片与美洛昔康对膝骨关节炎疼痛都有一定作用,但与模型组比较,美洛昔康只能提高膝骨关节炎大鼠早期 6~12 d 的机械痛阈值,随着模型组机械痛阈值的降低,美洛昔康的镇痛效果也逐渐减弱消失,而盘龙七片镇痛作用在给药第 3 天就可明显提高膝骨关节炎大鼠的机械痛阈值,并且在膝骨关节炎后期 24~30 d,仍然明显提高大鼠的机械痛阈值。同样,与模型组相比,盘龙七片干预可降低膝骨关节炎大鼠给药 3~42 d 冷痛觉超敏反应评分,而美洛昔康在给药 21~27 d 时对膝骨关节炎大鼠冷痛觉超敏反应评分影响并不显著。双后肢负重差能够反映大鼠双后肢的功能与关节疼痛程度,与模型组相比,美洛昔康组大鼠双后肢负重差在膝骨关节炎前期 6~27 d 明显降低,而盘龙七片干预组大鼠双后肢负重差在给药 3~42 d 明显降低。总的来说,在膝骨关节炎早期盘龙七片与美洛昔康都具有显著的镇痛作用,但美洛昔康对膝骨关节炎大鼠后期机械痛阈、冷痛觉超敏反应评分及双后肢负重差改善并不显著,而盘龙七片在膝骨关节炎后期仍然具有相对稳定的镇痛作用。究其原因可能是在膝骨关节炎早期以急性炎症性疼痛为主,所以非甾体抗炎药和盘龙七片都有较好的抗炎镇痛作用,但在后期因中枢敏化引起的慢性炎症性疼痛及神经病理性疼痛等慢性持续性疼痛的参与,此时非甾体抗炎药的镇痛效果降低,提示盘龙七片不仅可以用于缓解膝骨关节炎急性发作期间疼痛,而且对疾病后期慢性持续性疼痛仍然具有一定药效作用。

网络药理学预测通路富集分析结果中,富集程度较高的 Wnt 信号通路的非典型途径 Wnt/Ca²⁺信号通路与中枢敏化引起的慢性炎症性疼痛和神经病理性疼痛等参与的慢性持续性疼痛的形成密切相关^[21-22]。Wnt/Ca²⁺信号通路的激活,通过提高 PLC 浓度增加胞内 Ca²⁺浓度,进一步激活胞内钙依赖性效应分子 PKC,而 PKC 作为胞内的第二信使,在伤害性刺激的传导中发挥重要作用,可将外周损伤产生的伤害性刺激信号传入到脊髓背角,调节疼痛^[23]。同时 PKC 可以将许多受体通路整合成最终效应器增加兴奋性信号,减少抑制性信号,导致外周敏化和中枢敏化,引起慢性持续性疼痛^[24]。并且其致中枢及外周神经敏化,参与慢性持续性疼痛的发生发

展的机制还可能与炎症因子、离子通道、氨基酸受体的表达或激活有关。研究表明,神经元与胶质细胞间的相互作用是维持持续性疼痛的重要原因,胶质细胞活化后释放的炎症因子可以激活 PKC,活化后的 PKC 进一步促进疼痛的发生与发展^[25-26]。而痛觉过敏的广泛分布表明持续性疼痛可能是由中枢疼痛调节机制引起的,而不只是由痛觉感受器的外周刺激引起的^[27],因此在本研究中,在网络药理学预测基础上,通过对膝骨关节炎大鼠脊髓中 Wnt5A、PLC 和 PKC 蛋白及炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 PGE₂ 水平的检测发现,模型组大鼠脊髓 Wnt5A、PLC 和 PKC 蛋白表达水平明显较假手术组高,提示模型组大鼠脊髓中 Wnt/Ca²⁺信号通路被激活,而盘龙七片可明显抑制该通路 Wnt5A、PLC 和 PKC 蛋白表达及 TNF- α 、IL-1 β 和 PGE₂ 水平,从而缓解膝骨关节炎引起的疼痛。

综上,本研究通过网络药理学方法揭示盘龙七片治疗膝骨关节炎疼痛的作用与其参与调节神经细胞对各种刺激反应、炎症反应、神经细胞内信号传导及代谢反应相关,借助改良 Hultth 法诱导的大鼠膝骨关节炎疼痛模型观察盘龙七片对膝骨关节炎疼痛的作用特点,发现盘龙七片不仅可以用于缓解膝骨关节炎急性发作期疼痛,而且对疾病后期慢性持续性疼痛仍然具有良好的镇痛作用,对关键靶点富集程度较高的 Wnt/Ca²⁺信号通路初步验证发现盘龙七片可能通过抑制 Wnt/Ca²⁺信号通路从而调控膝骨关节炎疼痛。本研究为盘龙七片缓解膝骨关节炎疼痛的临床合理用药提供指导,同时为其基础研究提供新的思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Chen L, Yao F, Wang T, *et al.* Horizontal fissuring at the osteochondral interface: A novel and unique pathological feature in patients with obesity-related osteoarthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2020, 79(6): 811-818.
- [2] 李建华, 龚利, 房敏. 膝骨性关节炎疼痛机制及推拿治疗研究进展 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2010, 18(3): 68-69.
- [3] Cooper C, Chapurlat R, Al-Daghri N, *et al.* Safety of oral non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs in osteoarthritis: What does the literature say? [J]. *Drugs Aging*, 2019, 36(Suppl 1): 15-24.
- [4] 袁本红. 非甾体抗炎药不良反应发生的表现及预防措施 [J]. 中国现代药物应用, 2017, 11(23): 195-196.

- [5] 李军锋, 王晓峰, 卫志刚. 盘龙七片治疗膝骨关节炎的临床观察 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2015, 23(8): 65-67.
- [6] 周晓莉, 乔平平. 盘龙七片治疗寒湿痹阻型膝骨关节炎 32 例 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2018, 26(12): 68-69.
- [7] 李勃, 陈莉, 赵欣. 盘龙七片联合依托考昔治疗膝骨关节炎的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2022, 37(1): 156-160.
- [8] 童培建. 膝骨关节炎中西医结合诊疗指南 [J]. 中华医学杂志, 2018, 98(45): 3653-3658.
- [9] 马瑞, 王伟, 王坤正. 盘龙七片联合塞来昔布胶囊治疗早期膝骨关节炎的有效性安全性 [J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(16): 1781-1785.
- [10] 邢政. 温针灸联合盘龙七片促进膝骨性关节炎患者康复的效果 [J]. 现代诊断与治疗, 2021, 32(19): 3042-3044.
- [11] 贾可欣, 刘春芳, 王金霞, 等. 盘龙七片对慢性炎性疼痛大鼠的镇痛作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(15): 61-68.
- [12] Han J, Wang X, Hou J, *et al.* Using network pharmacology to explore the mechanism of peach kernel-safflower in the treatment of diabetic nephropathy [J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 6642584.
- [13] Lv X, Xu Z, Xu G, *et al.* Investigation of the active components and mechanisms of *Schisandra chinensis* in the treatment of asthma based on a network pharmacology approach and experimental validation [J]. *Food Funct*, 2020, 11(4): 3032-3042.
- [14] Zhang W D, Chen Y, Jiang H H, *et al.* Integrated strategy for accurately screening biomarkers based on metabolomics coupled with network pharmacology [J]. *Talanta*, 2020, 211: 120710.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 王璐, 徐颖, 刘春芳, 等. 基于网络药理学探讨盘龙七片治疗骨性关节炎配伍的合理性 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(18): 166-174.
- [18] 彭昊, 张雷, 廉凯, 等. 膝骨性关节炎慢性疼痛的机制及其综合治疗进展 [J]. 临床外科杂志, 2016, 24(6): 476-478.
- [19] Rahmati M, Mobasheri A, Mozafari M. Inflammatory mediators in osteoarthritis: A critical review of the state-of-the-art, current prospects, and future challenges [J]. *Bone*, 2016, 85: 81-90.
- [20] 张希, 刘萍. 骨性关节炎所致慢性持续性疼痛的发病机制 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(2): 248-255.
- [21] 朱阿芳. Wnt5a 参与开胸术后慢性疼痛形成机制的研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2018.
- [22] Aley K O, Messing R O, Mochly-Rosen D, *et al.* Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the epsilon isozyme of protein kinase C [J]. *J Neurosci*, 2000, 20(12): 4680-4685.
- [23] 李雪, 袁杰, 秦榜勇. PKC 在神经病理性疼痛机制中的研究进展 [J]. 医学综述, 2020, 26(10): 1924-1929.
- [24] Velázquez K T, Mohammad H, Sweitzer S M. Protein kinase C in pain: Involvement of multiple isoforms [J]. *Pharmacol Res*, 2007, 55(6): 578-589.
- [25] 张文华, 江剑平. 白介素-1 β 在炎性痛中的作用及其机制 [J]. 生命科学, 2010, 22(3): 291-295.
- [26] Thakur K K, Saini J, Mahajan K, *et al.* Therapeutic implications of toll-like receptors in peripheral neuropathic pain [J]. *Pharmacol Res*, 2017, 115: 224-232.
- [27] Ten Klooster P M, de Graaf N, Vonkeman H E. Association between pain phenotype and disease activity in rheumatoid arthritis patients: A non-interventional, longitudinal cohort study [J]. *Arthritis Res Ther*, 2019, 21(1): 257.

[责任编辑 李亚楠]