

基于网络药理学探讨金藤清痹颗粒对大鼠膝骨关节炎的影响及与促进线粒体自噬改善铁死亡的相关性

王丽娟, 孟美辰, 王志远, 杨寒冰, 史佳玮, 魏彪, 周延萌*, 于海洋*

山东第一医科大学(山东省医学科学院), 药学院(药物研究所), 山东 济南 250117

摘要: **目的** 基于网络药理学探讨金藤清痹颗粒对大鼠膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)的影响及与促进线粒体自噬改善铁死亡的相关性。**方法** 通过中药系统药理学数据库和分析平台(traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP)数据库搜集金藤清痹颗粒的活性成分及靶点, 利用人类基因数据库(Gene Cards)、在线人类孟德尔遗传数据库(online Mendelian inheritance in Man, OMIM)等数据库搜集 KOA 及金藤清痹颗粒药物作用靶点, 构建蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络和“中药-活性成分-靶点”网络。应用 Autodock 软件对筛选出的有效成分和关键靶点进行分子对接。将大鼠随机分为对照组、假手术组、模型组、双氯芬酸钠(5 mg/kg)组和金藤清痹颗粒高、中、低(5.4、2.7、1.4 g/kg)剂量组, 各组 ig 相应药物, 1 次/d, 给药 4 周后取材。ELISA 检测白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的含量; 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色评估软骨病理变化; 蛋白免疫印迹(Western blotting, WB)法检测半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(cysteine-aspartate protease-1, Caspase-1)、核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)、磷酸酶及张力蛋白同源物诱导的蛋白激酶 1(PTEN-induced putative kinase 1, Pink1)、帕金抗体(Parkinson disease, Parkin)、泛素结合蛋白(sequestosome 1, SQSTM1/p62)、膜铁转运蛋白 1(ferroportin 1, FPN1)、谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)、酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4(acyl-CoA synthetase long chain family member 4, ACSL4)、铁蛋白(ferritin)、转铁蛋白受体蛋白 1(transferrin receptor protein 1, TFR1)、过氧化氢酶 3 重组蛋白(recombinant peroxiredoxin 3, PRDX3)的表达。**结果** 数据库共检索到金藤清痹颗粒 116 种活性成分、268 个作用靶点, 共有靶点 107 个, 关键靶点涉及 NF- κ B 信号通路、线粒体自噬信号通路等; 分子对接结果提示靶蛋白与小分子之间存在结合位点且结合能较低, 提示有较强的结合活性。动物实验结果表明, 与对照组比较, 模型组大鼠 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著升高($P < 0.01$ 、 0.001); 膝关节软骨病理组织增生明显; Pro-Caspase-1、p-NF- κ B、NF- κ B、p62、ASL4、TFR1、PRDX3 表达量显著上升($P < 0.05$); Pink1、Parkin、FPN1、GPX4、ferritin 表达量显著下降($P < 0.05$), 自噬蛋白 Beclin、LC3BII/I 的值显著下降($P < 0.05$); 与模型组比较, 金藤清痹颗粒各组病理形态损伤减轻; IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、Pro-Caspase-1、p-NF- κ B、NF- κ B、p62、ASL4、TFR1、PRDX3、NCOA4 显著降低($P < 0.05$); Pink1、Parkin、FPN1、GPX4、ferritin 及自噬蛋白表达量 Beclin、LC3BII/I 显著升高($P < 0.05$)。**结论** 金藤清痹颗粒可能与增强线粒体自噬, 改善铁死亡, 抑制 NF- κ B 炎症信号等实现对膝骨关节炎的治疗。

关键词: 金藤清痹颗粒; 网络药理学; 膝骨关节炎; 炎症因子; 软骨损伤

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)04-1244-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.04.013

Exploring effects of Jinteng Qingbi Granules on knee osteoarthritis in rats and its correlation with promoting mitophagy to improve ferroptosis based on network pharmacology

WANG Lijuan, MENG Meichen, WANG Zhiyuan, YANG Hanbing, SHI Jiawei, WEI Biao, ZHOU Yanmeng, YU Haiyang

Shandong First Medical University (Shandong Academy of Medical Sciences), School of Pharmacy (Institute of Pharmaceutical Research), Jinan 250117, China

收稿日期: 2024-08-12

基金项目: 山东省自然科学基金项目(ZR2020MH127); 山东省自然科学基金项目(ZR2020MH412)

作者简介: 王丽娟, 硕士研究生, 研究方向为药理学。E-mail: 1668530017@qq.com

*通信作者: 周延萌, 教授, 硕士研究生导师, 从事药理学研究。E-mail: ymzhou790412@163.com

于海洋, 副教授, 硕士研究生导师, 从事药理学研究。E-mail: hyyu@sdfmu.edu.cn

Abstract: Objective To explore the effect of Jinteng Qingbi Granules on knee osteoarthritis (KOA) in rats based on network pharmacology and its correlation with promoting mitophagy to improve ferroptosis. **Methods** The active components and targets of Jinteng Qingbi Granules were collected through the traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform (TCMSP) database. The targets of KOA and Jinteng Qingbi Granules were collected using databases such as the GeneCards and the online Mendelian inheritance in Man (OMIM). Protein-protein interaction (PPI) network and “traditional Chinese medicine-active component-target” networks were constructed. The Autodock software was used for molecular docking of the screened effective components and key targets. Rats were randomly divided into control group, sham group, model group, diclofenac sodium (5 mg/kg) group and high-, medium- and low-dose (5.4, 2.7, 1.4 g/kg) Jinteng Qingbi Granule groups. Each group was administered the corresponding drug by intragastric administration once a day. After four weeks of administration, samples were collected. The contents of interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected by ELISA. The pathological changes of cartilage were evaluated by hematoxylin-eosin (HE) staining. The expressions of cystein-aspartate protease-1 (Caspase-1), nuclear factor- κ B (NF- κ B), PTEN-induced putative kinase 1 (Pink1), Parkinson disease (Parkin), sequestosome 1 (SQSTM1/p62), ferroportin 1 (FPN1), glutathione peroxidase 4 (GPX4), acyl-CoA synthetase long chain family member 4 (ACSL4), ferritin, transferrin receptor protein 1 (TFR1), and recombinant peroxiredoxin 3 (PRDX3) were detected by Western blotting (WB). **Results** A total of 116 active components and 268 action targets of Jinteng Qingbi Granules were retrieved from the database, with 107 common targets. The key targets were involved in the NF- κ B signaling pathway, mitophagy signaling pathway, etc. Molecular docking results suggested that binding sites existed between the target proteins and small molecules, with low binding energy, indicating strong binding activity. The results of animal experiments showed that compared with the control group, the levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in the model group were significantly increased ($P < 0.01$, 0.001), the pathological tissue hyperplasia of knee joint cartilage was obvious, the expression levels of Pro-Caspase-1, p-NF- κ B, NF- κ B, p62, ASL4, TFR1 and PRDX3 were significantly increased ($P < 0.05$), the expression levels of Pink1, Parkin, FPN1, GPX4, and ferritin were significantly decreased ($P < 0.05$), and the values of autophagy proteins Beclin and LC3BII/I were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the pathological morphological damage in each group of Jinteng Qingbi Granules was alleviated, the levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , Pro-Caspase-1, p-NF- κ B, NF- κ B, p62, ASL4, TFR1, PRDX3 and NCOA4 were significantly decreased ($P < 0.05$), and the expression levels of Pink1, Parkin, FPN1, GPX4, ferritin, and autophagy proteins Beclin and LC3BII/I were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Jinteng Qingbi Granules may treat knee osteoarthritis by enhancing mitophagy, improving ferroptosis, and inhibiting NF- κ B inflammatory signaling pathway.

Keywords: Jinteng Qingbi Granules; network pharmacology; knee osteoarthritis; inflammatory factors; cartilage damage

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是一种普遍的关节疾病, 主要表现为膝关节疼痛、肿胀、功能受限和形态异常, 限制患者的日常活动, 降低其生活质量^[1]。与骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 不同, KOA 的特点是关节软骨的逐渐磨损、关节边缘骨刺形成以及关节腔内炎症水平升高。目前临床上常用的治疗药物包括非甾体抗炎药、止痛药以及糖皮质激素等^[2]。然而, 这些药物在缓解症状和改善关节功能的同时, 带来了一系列的不良反应, 如消化系统损害、肾脏毒性及长期使用激素的潜在风险^[3]。因此, 有必要寻找新的 KOA 治疗药物, 为广大患者提供安全有效的治疗方法。

线粒体自噬作为一种重要的细胞保护机制, 可以通过清除受损线粒体来维持线粒体正常功能, 为软骨细胞提供能量, 维持软骨细胞稳态, 磷酸酶及张力蛋白同源物诱导的蛋白激酶 1 (PTEN induced putative kinase 1, PINK1)-帕金森蛋白 (Parkinson

disease, Parkin) 途径是一条经典的线粒体自噬通路, 在 KOA 中, 当 Pink1-Parkin 通路受损时, 线粒体碎片无法被及时清除, 导致活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 过量产生, 进而引起过氧化物的蓄积、抗氧化物如谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 的过度消耗^[4], 诱发脂质过氧化和铁死亡的发生加剧关节软骨细胞的损伤。线粒体自噬通过清除受损线粒体减少 ROS 的产生, 调节铁代谢和抗氧化系统的功能等来影响铁死亡进程。在病理条件下, 促进线粒体自噬可能成为一种策略来对抗铁死亡相关疾病^[5]。有研究表明 Pink1-Parkin 途径依赖的线粒体自噬, 可通过减少细胞内 ROS 的产生来抑制软骨细胞的铁死亡, 从而维持软骨的正常结构和功能^[6]。

近年来, 中药在治疗膝骨关节炎中的作用受到越来越多的关注, 并取得了显著的成果^[7]。中医辨证治疗不仅可以减轻患者痛苦、延缓病情, 而且具

有不良反应少的特点。金藤清痹颗粒是我国风湿类疾病专家房定亚教授的临床经验方，在临床上主要用于类风湿性关节炎的治疗^[8]，该方剂由金银花、青风藤、鹿衔草、山慈姑、蜈蚣、当归、白芍、甘草、熟地黄、白花蛇舌草、玄参 11 种中药配伍而成，具备清热解毒、活血消肿以及通痹止痛的功效，临床主要用于骨关节炎的治疗^[9]。金藤清痹颗粒在治疗类风湿性关节炎、减轻炎症反应、缓解疼痛以及改善关节功能方面展现出积极的治疗效果，但对于 KOA 的药效及其作用机制尚不清楚。据此，本研究将网络药理学^[10-11]与动物实验相结合，评价金藤清痹颗粒治疗 KOA 的药效，并探索相关作用机制，以期为临床治疗 KOA 提供理论依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 70 只，8 周龄，体质量 (200±10) g，购自济南朋悦实验动物有限公司，许可证号 SCXK (京) 2019-0010。实验动物饲养于山东第一医科大学药理学研究所的 SPF 级动物饲养室，光照与黑暗周期各为 12 h，确保所有大鼠获得充足的饮食和水源，温度维持在 (22±1) °C，湿度 45%~60%，适应性饲养 7 d 后，进行相关实验。本研究动物实验经山东第一医科大学动物保护与使用协会批准 (批准号 W202406060526)。

1.2 药品与试剂

金藤清痹颗粒 (批号 28180061，国药准字 Z20080675)、双氯芬酸钠肠溶片 (批号 H51020298，国药准字 H51020298) 由鲁南制药集团股份有限公司提供；白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒 (批号分别为 ml002859、ml037361、ml102828) 购自上海酶联生物科技有限公司；木瓜蛋白酶 (批号 G8432) 购自北京索莱宝有限公司；苏木素染液 (批号 BA4041)、伊红染液 (批号 BA4024) 购自珠海贝索生物技术有限公司；RIPA 强效裂解液 (批号 AR0105-30)、肌动蛋白抗体 (beta-actin, β -actin, 批号 TA-09) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司；核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 抗体 (批号 8242S) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cystein-aspartate protease-1, Caspase-1) 抗体 (批号 ab179515) 购自上海碧云天生物技术有限公司；Parkin 抗体 (批号 ab77924)、泛素结合蛋白抗体

(sequestosome 1, SQSTM1/p62) 抗体 (批号 ab109012)、微管相关蛋白 1A/1B 轻链 3B (microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B, LC3B) 抗体 (批号 ab192890)、 κ 氯素 1 (Beclin1, 批号 ab62557) 购自美国 Abcam 公司；Pink1 (批号 AF7755) 购自美国 Beyotime 公司；核受体共激活因子 4 (nuclear receptor coactivator 4, NCOA4) 抗体 (批号 abs155118) 购自北京爱必信公司；谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 抗体 (批号 67763-1-Ig)、转铁蛋白受体 (Transferrin receptor protein 1, TFR1) 抗体 (批号 66180-1-Ig)、铁蛋白 (ferritin) 抗体 (批号 68060-1-Ig)、膜铁转运蛋白 1 (ferroportin 1, FPN1) 抗体 (批号 26601-1-AP)、酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (acyl-CoA synthetase long chain family member 4, ACSL4) 抗体 (批号 22401-1-AP) 均购自武汉 Proteintech 公司；HRP 标记的山羊抗兔二抗 (批号 ZB2303)、HRP 标记的山羊抗鼠二抗 (批号 ZB2307) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 仪器

HERCUES CA 型电泳仪、电转仪 (美国 Bio-Rad)；Tecan Infinite 型酶标仪 (瑞士 TECAN)；DW-86L63 型 -80 °C 超低温冷冻冰箱 (青岛海尔公司)；CJJ72-6 型电磁搅拌机 (甄城现代实验仪器有限公司)；5048R 型台式低温离心机、移液器 (德国 Eppendorf 股份公司)；超净工作台 (上海海新医疗器械制造公司)；Amersham Imager 60 型自动化学发光凝胶成像分析 (美国通用电气公司)；FA3204B 型电子天平 (赛多利斯科学仪器)；IMS-130 型制冰机 (上海安亭科学仪器厂)；SH15097397 型水平摇床 (北京市六一仪器厂)；JJ-12J 型脱水机 (武汉俊杰电子有限公司)；JB-P5 型包埋机 (武汉俊杰电子有限公司)；RM2016 型病理切片机 (上海徕卡仪器有限公司)；JB-L5 型冻台 (武汉俊杰电子有限公司)；KD-P 型组织摊片机 (浙江省金华市科技有限公司)；GFL-230 型烤箱 (天津市莱玻瑞仪器有限公司)；10127105P-G 型载玻片及盖玻片 (江苏世泰实验器材有限公司)；Nikon Evlipse E100 型正置光学显微镜 (日本尼康公司)。

1.4 数据库

中药系统药理数据库和分析平台 (traditional Chinese medicine systems pharmacology database and

analysis platform, TCMSP, <http://tcmsp.com/>); 蛋白质数据库 (universal protein, UniProt, <https://www.uniprot.org/>); 人类基因 (Gene Cards) 数据库 (<http://www.genecards.org/>); 在线人类孟德尔遗传 (online mendelian inheritance in man, OMIM) 数据库 (<https://omim.org/>); 交互基因/蛋白质检索工具 (search tool for the retrieval of interacting genes/proteins, String) 数据库 (<https://string-db.org/>); 注释、可视化和综合发现 (database for annotation, visualization and integrated discovery, DAVID) 数据库 (<https://davidbioinformatics.nih.gov/>); 微生物平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>); 蛋白质数据库 (protein data bank, PDB, <https://www.rcsb.org/>)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 金藤清痹颗粒活性成分及靶点筛选 分别以金藤清痹颗粒中“金银花”“青风藤”“鹿衔草”“山慈菇”“蜈蚣”“白花蛇舌草”“白芍”“当归”“甘草”“生地黄”“玄参”为关键词,在 TCMSP 数据库中以口服生物利用度 $\geq 30\%$ 且类药性 ≥ 0.18 为条件检索、筛选活性成分及其靶点,并用 Uniprot 数据库对靶点名称进行校正。

2.1.2 KOA 靶点采集、筛选 以“knee osteoarthritis”为关键词,在 Gene Cards、Drug bank 和 OMIM 数据库中搜索疾病靶点。

2.1.3 共有靶点的筛选及网络构建 筛选金藤清痹颗粒与 KOA 的共有靶点,上传至 String 数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络图,利用 DAVID 数据库基因本体 (gene ontology, GO) 分析及京都基因和基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路分析,结果提交至微生物可视化。

2.1.4 分子对接 通过 PDB 数据库获得关键靶点的蛋白结构,通过 PubChem 数据库得到化合物的结构信息。利用 Autodock Tools 1.5.6 软件对靶蛋白和小分子进行相关处理后,利用 Autodock Vina 对二者进行对接,并将对接结果良好的靶蛋白与小分子通过 PyMOL 软件进行可视化展示。

2.2 动物实验

2.2.1 动物分组、造模及给药 大鼠随机分为对照组、假手术组、模型组、双氯芬酸钠组 (2.0 mg/kg) 和金藤清痹颗粒高、中、低 (5.4、2.7、1.4 g/kg) 剂量组,每组 10 只。模型组、双氯芬酸钠组和各给药

组在第 1、3、7 天大鼠右膝 iv 0.2 mL 4%木瓜蛋白酶诱导 KOA 模型。经病理检验造模成功后,各给药组 ig 相应药物,1 次/d,连续 30 d。末次给药后,用 0.2 mL 生理盐水从大鼠关节腔内抽取关节液,离心后取上清。采用腹主动脉取血法采血,3 000 r/min 离心 10 min,取上清。每组取 3 个胫骨软骨样本放入 4%多聚甲醛溶液中固定,剩余样本迅速转移至液氮中保存。

2.2.2 膝关节肿胀度测量 造模后用游标卡尺测量大鼠右膝关节同一部位关节直径,得出膝关节肿胀度。

2.2.3 血清及关节液炎症因子检测 按照 ELISA 试剂盒说明书检测各组大鼠血清及关节液中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平。

2.2.4 HE 染色 大鼠关节软骨在 4%多聚甲醛中固定 48 h 后,经脱钙、梯度乙醇脱水后,石蜡包埋切片,常规脱蜡复水,苏木素 10 min、分化液 2 s、伊红 1 min 进行染色,脱水封片后在光学显微镜下观察切片并采集图像进行分析。

2.2.5 Western blotting 检测膝关节 Caspase-1、p-NF- κ B、NF- κ B、Pink1、Parkin、p62、FPN1、GPX4、ferritin、TFR1、Beclin、LC3BII/I 蛋白表达 取大鼠膝关节软骨组织,加入 RIPA 强效裂解液,研磨 3 min,转至冰上裂解 30 min。4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 20 min 后,取上清,加入上样缓冲液混匀,100 $^{\circ}$ C 金属浴使蛋白变性。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,5%脱脂牛奶封闭 1 h,加入一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,加入二抗室温孵育 1 h 后显影曝光,采用 Image-J 软件分析条带灰度,检测上述蛋白的表达情况。

2.2.6 免疫组化 大鼠关节软骨在 4%多聚甲醛中固定 48 h 后,经脱钙、梯度乙醇脱水后,石蜡包埋切片,常规脱蜡复水,EDTA 抗原修复,染一抗、二抗后苏木素复染 5 min,中性树胶封片。

2.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8 软件进行数据分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据符合正态分布,采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 方法进行统计处理多组间的比较。

3 结果

3.1 网络药理学分析金藤清痹颗粒治疗 KOA 的活性成分及相关靶点

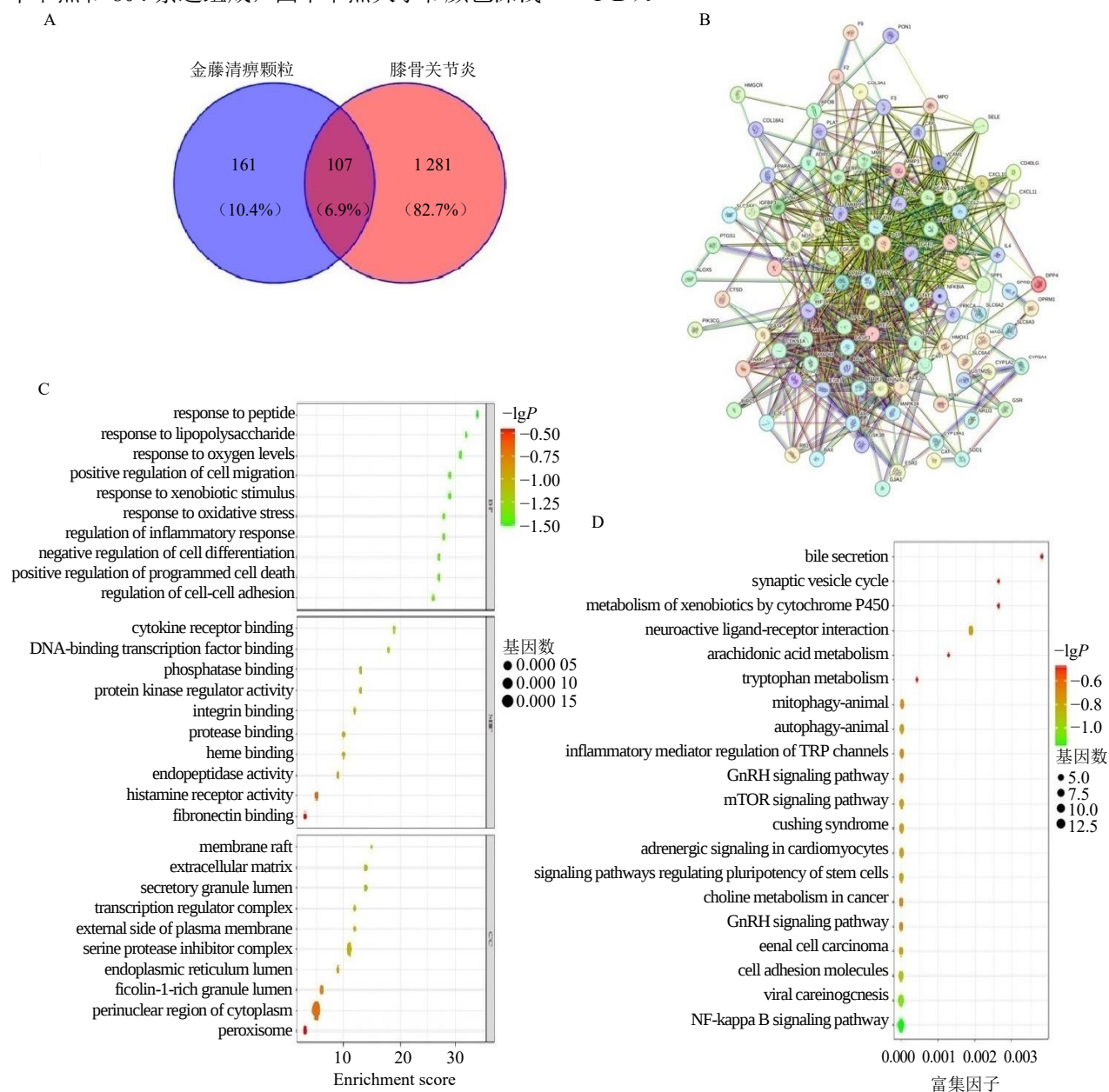
3.1.1 金藤清痹颗粒治疗 KOA 的活性成分及相关靶点 收集并删除重复项,得到金藤清痹颗粒 116

个活性成分, 并筛选得到 268 个靶点; 通过检索、合并和去重, 共得到 KOA 疾病相关靶点共 1 388 个。利用 Venny 2.1.0 平台, 将膝骨关节炎靶点与金藤清痹颗粒的预测靶点取交集, 得到金藤清痹颗粒治疗膝骨关节炎的潜在靶点共 107 个 (图 1-A)。

3.1.2 PPI 相互作用结果 利用 STRING 平台对金藤清痹颗粒治疗膝骨关节炎的潜在靶点进行 PPI 分析, 绘制其相互作用网络 (图 1-B)。该网络图由 106 个节点和 804 条边组成, 图中节点大小和颜色深浅

与 Degree 值呈正比, 其中关键节点包括 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6。

3.1.3 GO、KEGG 富集分析结果 GO 分析显示, 金藤清痹颗粒可能干预的生物过程涉及炎症反应、细胞死亡等, 相对应的分子功能有氧化还原酶、细胞因子等 (图 1-C)。KEGG 富集分析显示, 前 20 个关键信号通路涉及代谢、死亡、炎症等相关信号通路, 包括 NF- κ B 通路和线粒体自噬通路等 (图 1-D)。



A-药物-疾病靶点交集图; B-共有靶点 PPI 网络; C-GO 功能富集分析; D-KEGG 通路富集分析。

A-drug disease target intersection map; B-consensus target PPI network; C-GO function enrichment analysis; D-KEGG pathway enrichment analysis.

图 1 网络药理学结果

Fig. 1 Results of network pharmacology

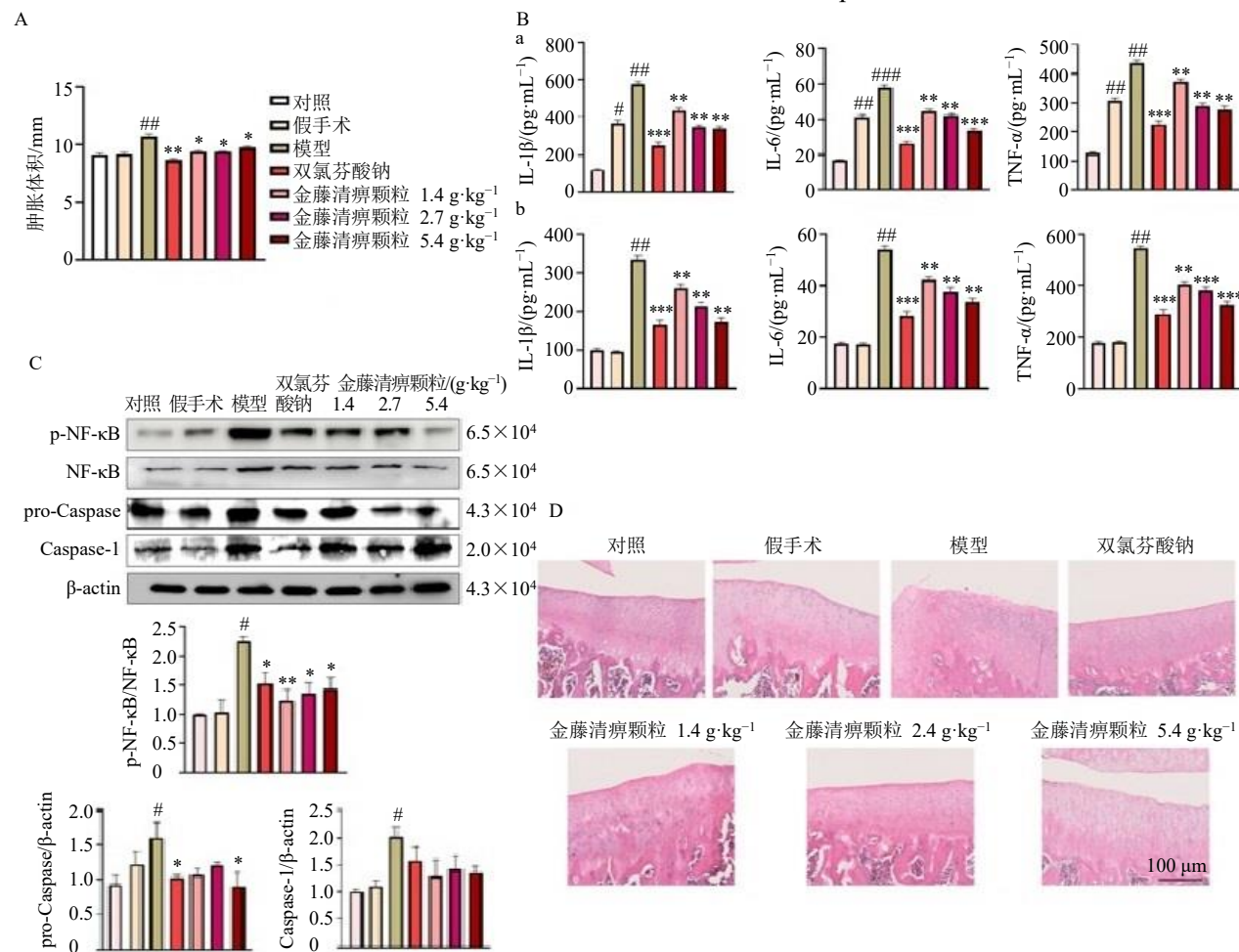
3.1.4 分子对接结果 如表 1 所示, 各成分与 NF- κ B 之间结合能均小于 -8 kcal/mol (1 kcal/mol= 4.182 kJ/mol), 提示有较强的结合活性。

3.2 对 KOA 大鼠膝关节炎的改善作用及机制

3.2.1 对 KOA 大鼠膝关节炎的改善作用 如图

表 1 分子对接结果

序号	化合物名称	对接蛋白	结合能/(kcal·mol ⁻¹)
1	槲皮素	NF- κ B	-9.01
2	山柰酚	NF- κ B	-8.21
3	β -谷甾醇	NF- κ B	-8.48
4	豆甾醇	NF- κ B	-9.32
5	芒柄花黄素	NF- κ B	-8.79



A-金藤清痹颗粒对 KOA 大鼠膝关节肿胀的影响; B-金藤清痹颗粒对 KOA 大鼠血清 (a) 及关节液 (b) 中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的影响; C-金藤清痹颗粒对 KOA 大鼠膝关节软骨组织 Caspase-1、p-NF- κ B、NF- κ B 蛋白表达的影响; D-金藤清痹颗粒对 KOA 大鼠膝关节软骨病理变化的影响; 与对照组比较: # $P<0.05$ ### $P<0.01$ ### $P<0.001$; 与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$; 下图同。

A-effect of Jinteng Qingbi granules on knee joint swelling in KOA rats; B-effects of Jinteng Qingbi Granule on IL-1 β , IL-6 and TNF- α in serum (a) and joint fluid (b) of KOA rats; C-effect of Jinteng Qingbi granules on expression of Caspase-1, p-NF- κ B and NF- κ B proteins in knee cartilage of KOA rats; D-effect of Jinteng Qingbi Granules on pathological changes of knee cartilage in KOA rats; # $P<0.05$ # $P<0.01$ # $P<0.001$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs model group; same as below figures.

图 2 金藤清痹颗粒对大鼠膝关节炎的治疗作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Therapeutic effect of Jinteng Qingbi Granules on knee osteoarthritis in rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

0.05); 与模型组比较, 双氯芬酸钠组及金藤清痹颗粒各治疗组 p-NF- κ B/NF- κ B 的值及金藤清痹颗粒高剂量组 pro-Caspase-1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。如图 2-D 所示, 对照组大鼠膝关节组织结构清晰, 软骨细胞排列正常, 无细胞增生、无炎性细胞浸润; 与对照组比较, 模型组软骨组织增生明显、结构紊乱, 大量炎性细胞浸润; 与模型组比较, 双氯芬酸钠组软骨增生及炎症浸润程度明显降低; 金藤清痹颗粒各剂量组可显著降低 KOA 大鼠关节软骨增生及炎症浸润程度。

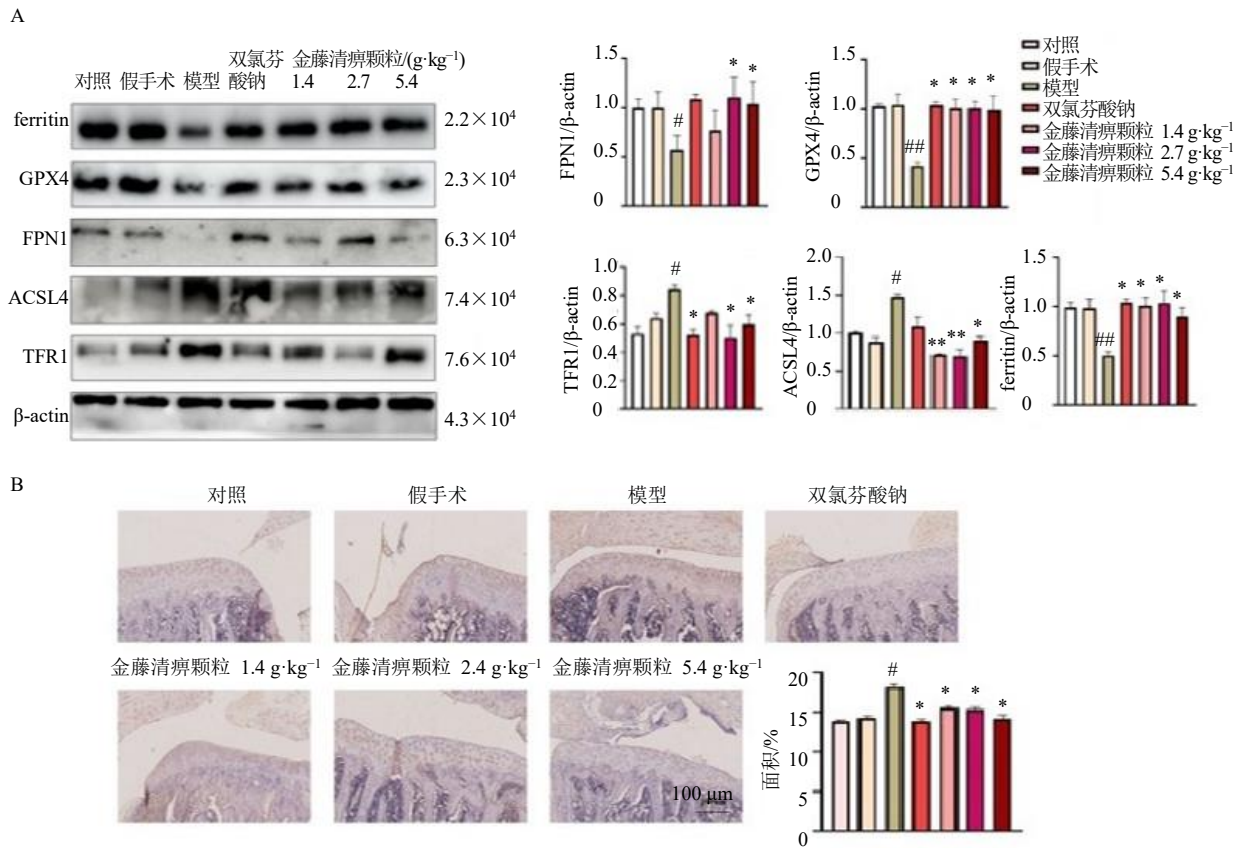
3.2.2 金藤清痹颗粒对 KOA 大鼠膝关节软骨组织铁死亡的影响 如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠软骨组织中, ASL4、TFR1、PRDX3 蛋白表达水平均显著上升, FPN1、GPX4、ferritin 蛋白表达水平显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组比较,

双氯芬酸钠组及金藤清痹颗粒各治疗组 ASL4、TFR1、PRDX3 蛋白表达量均显著降低, FPN1、GPX4、ferritin 表达量显著上升 ($P < 0.05$)。

3.2.3 金藤清痹颗粒对 KOA 大鼠膝关节软骨组织自噬蛋白的影响 如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠软骨组织中 NCOA4 蛋白表达水平均显著上升 ($P < 0.05$), p62 蛋白表达水平呈上升趋势, Pink1、Parkin 及自噬蛋白 Beclin、LC3BII/I 表达量显著下降 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 双氯芬酸钠组及金藤清痹颗粒各治疗组 p62 蛋白表达量呈降低趋势, 金藤清痹颗粒高剂量组 NCOA4 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 金藤清痹颗粒中剂量组 Pink1、Parkin 蛋白表达水平显著上升 ($P < 0.05$)。

4 讨论

骨关节炎是一种最常见的与衰老相关的关节

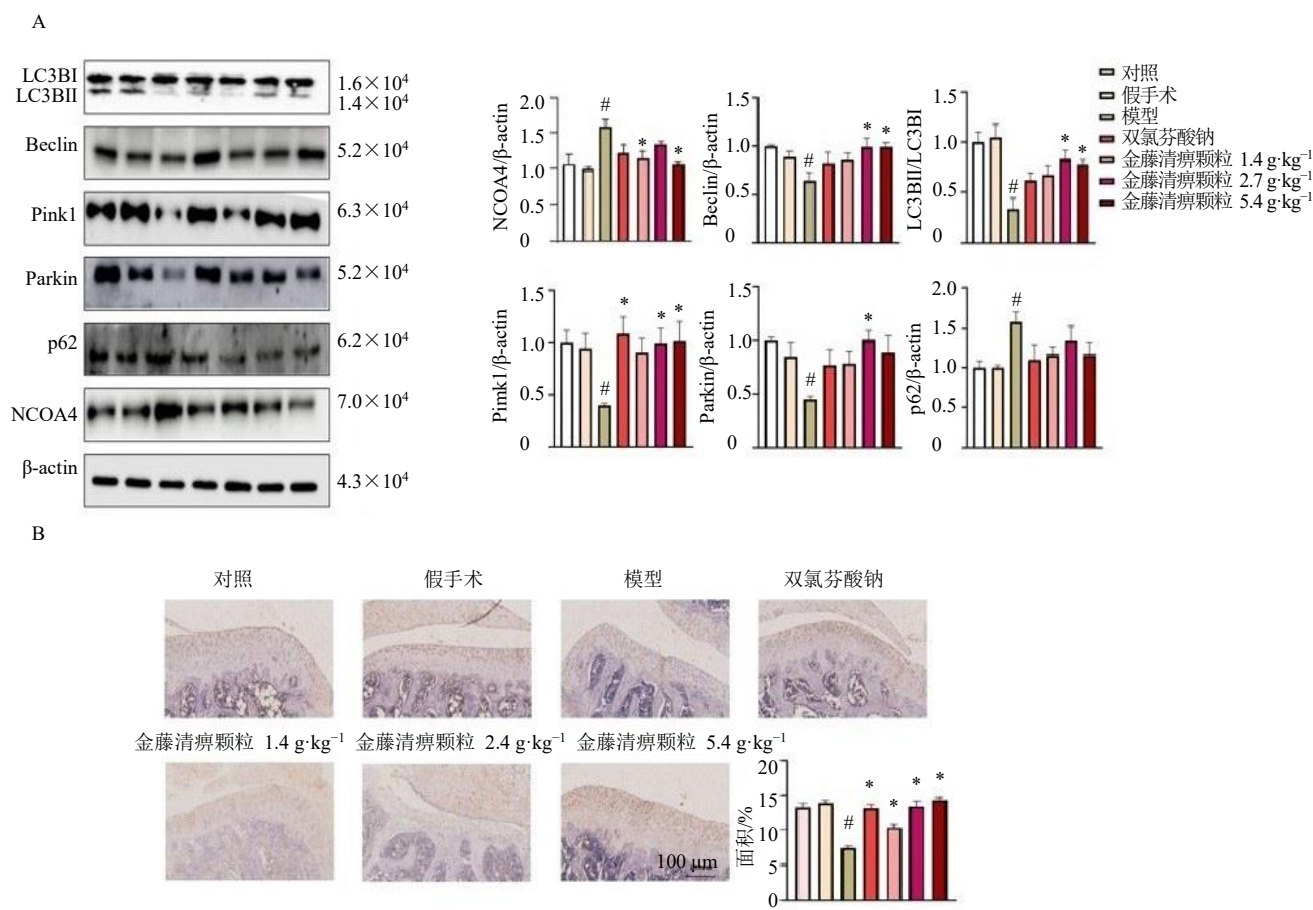


A-金藤清痹颗粒对 KOA 大鼠膝关节软骨组织 FPN1、GPX4、ferritin、ACSL4、TFR1 蛋白表达的影响; B-金藤清痹颗粒对 KOA 大鼠膝关节软骨组织 PRDX3 蛋白表达的影响。

A-effects of Jinteng Qingbi Granules on expression of FPN1, GPX4, ferritin, ACSL4 and TFR1 proteins in knee cartilage of KOA rats; B-effect of Jinteng Qingbi Granules on PRDX3 protein expression in knee cartilage of KOA rats.

图 3 金藤清痹颗粒对 KOA 大鼠膝关节软骨组织 FPN1、GPX4、ferritin、ACSL4、TFR1、PRDX3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of Jinteng Qingbi Granules on expression of FPN1, GPX4, ferritin, ACSL4, TFR1, PRDX3 proteins in knee joint cartilage tissue of KOA rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-金藤清痹颗粒对 KOA 大鼠膝关节软骨组织 Pink1、Parkin、p62、NCOA4、Beclin、LC3BII/I 蛋白表达的影响；B-金藤清痹颗粒对 KOA 大鼠膝关节软骨组织 LC3I 蛋白表达的影响。

A-effects of Jintengqingbi Granules on the expression of Pink1, Parkin, p62, NCOA4, Beclin, LC3BII/I proteins in knee cartilage of KOA rats; B-effect of Jinteng Qingbi Granules on LC3I protein expression in knee cartilage of KOA rats.

图 4 金藤清痹颗粒对 KOA 大鼠膝关节软骨组织 Pink1、Parkin、p62、NCOA4、Beclin、LC3BII/I 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of Jinteng Qingbi Granules on expression of Pink1, Parkin, p62, NCOA4, Beclin, LC3BII/I proteins in knee joint cartilage tissue of KOA rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

退行性疾病，且在老年人群中非常常见。膝关节骨性关节炎是最常见的骨关节炎类型^[11]，主要表现为膝关节肿痛、活动受限，其主要病理改变以关节发炎、关节周围继发骨质增生和关节软骨退变为主^[12]。目前临床上常用的治疗药物主要有非甾体抗炎药、止痛药以及糖皮质激素等，但这些药物在缓解症状和改善关节功能的同时，会给患者带来消化系统损害、肾损伤等不良反应。因此，对 KOA 治疗药物的安全性、有效性提出了更高的要求。本研究通过 TCMSIP 平台和文献检索得到金藤清痹颗粒中的相关活性成分，并预测其可能作用靶点；利用数据库搜集 KOA 相关靶点，构建了 PPI 网络并进行了 GO 分析和 KEGG 通路富集分析并采用分子对接计算验证了该复方中的主要小分子活性成分与 NF- κ B

有较高的结合能，表明其治疗 KOA 的潜在作用，通过网络药理学筛选得到其作用机制可能与调节线粒体自噬信号，改善铁死亡相关。随后，在动物实验上证明金藤清痹颗粒能够改善木瓜蛋白酶诱导的 KOA 模型大鼠关节损伤，其作用机制与激活 Pink1-Parkin 促进线粒体自噬改善铁死亡，抑制炎症反应相关。中医视 KOA 为“骨痹”或“痛痹”等痹证范畴^[13]，其历史可追溯至《内经》，古时常以“痹病”称之。中医理论认为，KOA 的发病主要由“体虚受邪”所致，随着年龄增长，人体肝肾精气逐渐损耗，肝肾亏虚导致筋骨失养。同时，外界风、寒、湿邪的侵袭使局部气血流通不畅，经络受阻，从而引发膝部疼痛和活动受限。网络药理学的结果表明，筛选得到的靶点与中医药能够降低 KOA

金属蛋白酶、改善关节病理组织增生相吻合。金藤清痹颗粒中的金银花具有解热、抗炎、调节机体的免疫功能等作用；青风藤具有抗炎镇痛、抗风湿及免疫抑制等作用；白花蛇舌草有增强肾上腺皮质功能，抑制炎症反应的作用；玄参有解热、抗炎、抗氧化的作用；鹿衔草有调节免疫的功能，用于治疗多种风湿病；白芍对软骨成纤维细胞生长具有调节能力；蜈蚣能改善微循环；甘草具有抗氧化、抗菌、抗炎等多种作用；当归可减轻软骨炎症水平，起到保护软骨细胞的作用；熟地黄可促进骨关节炎软骨细胞的增殖，抑制凋亡。诸药配伍使中药有效成分能够多途径、多环节、多靶点参与 KOA 的治疗，共同发挥抑制炎症因子和细胞凋亡、促进软骨细胞增殖和抑制软骨基质降解，降低关节软骨的损伤作用。

炎症反应在 KOA 的发展中起着重要作用，能够导致膝关节疼痛、肿胀和功能不全^[14]，IL-1 β 和 TNF- α 等炎症因子可以促进金属蛋白酶的生成从而破坏软骨的细胞外基质，加重关节病变^[15]。针灸及传统中草药可以通过降低关节内的炎症因子，来减轻软骨细胞炎症，治疗 KOA^[16]。已有的研究证实，抑制 NF- κ B 的激活可延缓关节内炎症的发展^[17]。研究发现加服唐代医家孙思邈的独活寄生汤组治疗 KOA 较单独口服塞来昔布组总有效率高；清代《伤科大成》中的补肾活血汤对软骨修复手术的 KOA 患者，较塞来昔布胶囊总有效率更高^[18]。本研究同样证实金藤清痹颗粒可以减少关节内炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的水平，抑制 NF- κ B 信号通路，对膝骨关节炎起到治疗作用。

线粒体自噬失调已成为 KOA 炎症反应和软骨损伤的重要因素之一^[19-24]，自噬关键调节因子的丧失，会导致 KOA 软骨细胞死亡加重^[25-26]。Pink1-Parkin 通路是调节线粒体自噬最重要的信号通路之一^[27]。在病理条件下，Parkin 与 Pink1 功能降低会导致损伤线粒体含量增加，氧化应激的发生和过氧化产物的蓄积及抗氧化物质的过度消耗，破坏软骨细胞的正常结构和功能^[28-30]，进而导致铁代谢异常及铁死亡的发生^[31]。有研究表明软骨细胞中的铁死亡能够通过消耗软骨细胞中的 GPX4，激活细胞内的 NF- κ B 信号通路，诱导和加重 KOA^[32]。研究表明，改善线粒体自噬，抑制铁死亡和炎症反应，能减轻软骨损伤。姜黄素通过促进 Pink1-Parkin 介导的线粒体自噬，发挥软骨保护作用，减轻骨关节炎^[33]。

鹰嘴豆牙素能够有效调节 GPX4 轴，减轻铁超载，从而减轻软骨损伤^[34]。本研究证实金藤清痹颗粒通过改善 Pink1-Parkin 通路增强线粒体自噬，改善 FPN1、GPX4、ferritin 来抑制铁死亡，从而控制 KOA 的发生发展。

综上，本研究采用网络药理学结合动物实验的方法，研究金藤清痹颗粒对大鼠 KOA 的保护作用及机制。结果表明，金藤清痹颗粒能够降低 Pro-Caspase-1、TFR1 的表达及 p-NF- κ B/NF- κ B 的值，增加自噬蛋白 LC3B、Beclin 的表达，有效缓解膝关节肿胀，其机制可能与抑制 NF- κ B 受体信号通路改善线粒体自噬，抑制铁死亡，降低炎症因子水平，改善膝关节软骨增生有关。本研究为临床应用金藤清痹颗粒治疗 KOA 提供了理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 蒋舒芳, 万桃红, 黎雯. 中药熏洗结合舒筋活血合剂治疗膝骨关节炎 40 例 [J]. 药品评价, 2022, 19(9): 548-550.
- [2] 马洁, 褚晓彦, 刘伙生, 等. 刃针结合电针治疗对膝关节骨关节炎患者膝关节功能的影响 [J]. 针刺研究, 2024, 49(4): 398-402.
- [3] Black R, Grodzinsky A J. Dexamethasone: Chondroprotective corticosteroid or catabolic killer? [J]. *Eur Cell Mater*, 2019, 38: 246-263.
- [4] Li C, Zhang Y, Liu J, *et al*. Mitochondrial DNA stress triggers autophagy-dependent ferroptotic death [J]. *Autophagy*, 2021, 17(4): 948-960.
- [5] Yao X D, Sun K, Yu S N, *et al*. Chondrocyte ferroptosis contribute to the progression of osteoarthritis [J]. *J Orthop Translat*, 2020, 27: 33-43.
- [6] Li J, Jia Y C, Ding Y X, *et al*. The crosstalk between ferroptosis and mitochondrial dynamic regulatory networks [J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(9): 2756-2771.
- [7] 沈锦涛, 华茂奇, 张北, 等. 由 IL-10/JAK2/STAT3 通路探讨养血柔筋方对兔膝骨关节炎软骨损伤的研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2023, 29(6): 796-801.
- [8] 杨家熙, 苗宇, 万盈盈, 等. 金藤清痹颗粒对胶原诱导性类风湿关节炎大鼠滑膜血管新生的影响 [J]. 世界中医药, 2023, 18(22): 3194-3201.
- [9] Tang J Y, Wang Z L, Zhou C Y, *et al*. Mechanism of Jinteng Qingbi granules in the treatment of rheumatoid arthritis using metabolomics analysis [J]. *Biomed Chromatogr*, 2024, 38(7): e5886.
- [10] 王秀文, 张丛慧, 韦方娇, 等. 基于网络药理学和代谢组学探究荆防颗粒对类风湿关节炎的保护作用及机制

- [J]. 中草药, 2024, 55 (23): 8067-8078.
- [11] Giorgino R, Albano D, Fusco S, *et al.* Knee osteoarthritis: Epidemiology, pathogenesis, and mesenchymal stem cells: What else is new? an update [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(7): 6405.
- [12] Michael J W, Schlüter-Brust K U, Eysel P. The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee [J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2010, 107(9): 152-162.
- [13] Wang X, Wang Z Y, Zheng J H, *et al.* TCM network pharmacology: A new trend towards combining computational, experimental and clinical approaches [J]. *Chin J Nat Med*, 2021, 19(1): 1-11.
- [14] 沈景寿, 张晶, 胡毓诗, 等. 膝关节骨关节炎诱导性动物模型研究进展 [J]. 中国运动医学杂志, 2019, 38(8): 726-730.
- [15] Tang K H, Sun L, Chen L, *et al.* Bioinformatics analysis and experimental validation of mitochondrial autophagy genes in knee osteoarthritis [J]. *Int J Gen Med*, 2024, 17: 639-650.
- [16] Katz J N, Arant K R, Loeser R F. Diagnosis and treatment of hip and knee osteoarthritis: A review [J]. *JAMA*, 2021, 325(6): 568-578.
- [17] Wang M N, Liu L, Zhang C S, *et al.* Mechanism of traditional Chinese medicine in treating knee osteoarthritis [J]. *J Pain Res*, 2020, 13: 1421-1429.
- [18] 李云龙, 冯文杰. 中药汤剂治疗膝骨关节炎的研究进展 [J]. 风湿病与关节炎, 2024, 13(9): 72-76.
- [19] Xu K, He Y Z, 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.
- [20] Duan R, Xie H, Liu Z Z. The role of autophagy in osteoarthritis [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 608388.
- [21] Chang J, Wang W, Zhang H, *et al.* The dual role of autophagy in chondrocyte responses in the pathogenesis of articular cartilage degeneration in osteoarthritis [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 32(6): 1311-1318.
- [22] Cheng N T, Meng H, Ma L F, *et al.* Role of autophagy in the progression of osteoarthritis: The autophagy inhibitor, 3-methyladenine, aggravates the severity of experimental osteoarthritis [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39(5): 1224-1232.
- [23] Lotz M K, Caramés B. Autophagy and cartilage homeostasis mechanisms in joint health, aging and OA [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2011, 7(10): 579-587.
- [24] López de Figueroa P, Lotz M K, Blanco F J, *et al.* Autophagy activation and protection from mitochondrial dysfunction in human chondrocytes [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2015, 67(4): 966-976.
- [25] Ashrafi G, Schwarz T L. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria [J]. *Cell Death Differ*, 2013, 20(1): 31-42.
- [26] Wang S, Deng Z T, Ma Y C, *et al.* The role of autophagy and mitophagy in bone metabolic disorders [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(14): 2675-2691.
- [27] Pickles S, Vigie P, Youle R J. Mitophagy and quality control mechanisms in mitochondrial maintenance [J]. *Curr Biol*, 2018, 28(4): R170-R185.
- [28] Li J, Yang D M, Li Z P, *et al.* PINK1/Parkin-mediated mitophagy in neurodegenerative diseases [J]. *Ageing Res Rev*, 2023, 84: 101817.
- [29] Sekine S, Youle R J. PINK1 import regulation; a fine system to convey mitochondrial stress to the cytosol [J]. *BMC Biol*, 2018, 16(1): 2.
- [30] Aguirre J D, Dunkerley K M, Mercier P, *et al.* Structure of phosphorylated UBL domain and insights into PINK1-orchestrated parkin activation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(2): 298-303.
- [31] Chang J, Debreli Coskun M, Kim J. Inflammation alters iron distribution in bone and spleen in mice [J]. *Metallomics*, 2023, 15(10): mfa055.
- [32] Xu C, Ni S, Xu N W, *et al.* Theaflavin-3, 3'-digallate inhibits erastin-induced chondrocytes ferroptosis via the Nrf2/GPX4 signaling pathway in osteoarthritis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 3531995.
- [33] Jin Z Z, Chang B H, Wei Y L, *et al.* Curcumin exerts chondroprotective effects against osteoarthritis by promoting AMPK/PINK1/Parkin-mediated mitophagy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 151: 113092.
- [34] He Q, Yang J Z, Pan Z F, *et al.* Biochanin A protects against iron overload associated knee osteoarthritis via regulating iron levels and NRF2/System xc- / GPX4 axis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 157: 113915.

[责任编辑 罗 曦]