

基于 Ihh-Gli 信号通路探究乌头汤治疗膝骨关节炎的作用机制

虞跃跃^{1,2}, 成杭洁², 孟梓涵², 张 旭², 赵合立², 张文静³, 李继安^{2,4*}, 张一昕^{1*}

1. 河北中医药大学, 河北 石家庄 050200

2. 华北理工大学, 河北 唐山 063210

3. 北京卫戍区海淀第五退休干部休养所, 北京 100089

4. 河北省中西医结合防治糖尿病及其并发症重点实验室, 河北 唐山 063210

摘要: 目的 探讨乌头汤通过调控印度刺猬因子 (Indian hedgehog, Ihh) -胶质瘤相关癌基因同源物 (glioma-associated oncogene homolog, Gli) 信号通路治疗膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 的作用机制。方法 SD 雄性大鼠随机分为假手术组、模型组、塞来昔布 (24 mg/kg) 组和乌头汤低、中、高剂量 (1.05, 2.10, 4.20 g/kg) 组, 每组 10 只。采用改良前交叉韧带切除技术建立 KOA 模型, 给予药物干预 8 周后, 测定机械痛阈值、热痛阈值及爬坡能力; ELISA 检测血清中基质金属蛋白酶-3 (matrix metalloproteinase-3, MMP-3)、MMP-13 和 II 型胶原蛋白 (type II collagen, Col II) 水平; 采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察膝关节的形态学变化; 采用显微计算机断层扫描技术 (micro-computed tomography, Micro-CT) 分析膝关节的骨微结构变化; 采用 Western blotting 检测膝关节 Ihh、斑驳蛋白 1 (patched 1, Ptch1)、Gli 和 MMP-13 蛋白表达。结果 与假手术组比较, 模型组大鼠软骨表层缺损、变薄, 细胞减少且排列紊乱, 膝关节横截面和冠状面骨小梁减小, 分布稀疏, 骨密度降低, 热痛阈值和机械痛阈值显著降低 ($P < 0.001$), 斜坡角度变小 ($P < 0.001$), 血清中 MMP-3、MMP-13 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), Col II 水平显著降低 ($P < 0.05$), 膝关节 Ihh-Gli 信号通路相关蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$)。与模型组比较, 乌头汤组大鼠软骨表面平整, 细胞数量增多且形态完整, 膝关节横截面和冠状面骨小梁增多, 分布密集, 热痛阈值和机械痛阈值显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.001), 斜坡角度变大 ($P < 0.01$ 、 0.001), 血清中 MMP-3、MMP-13 水平显著降低 ($P < 0.05$), Col II 水平显著升高 ($P < 0.05$), 膝关节 Ihh-Gli 信号通路相关蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.001)。结论 乌头汤通过抑制 Ihh-Gli 信号通路过度激活, 减少软骨细胞异常增殖与分化, 从而保护关节软骨。

关键词: 膝骨关节炎; 乌头汤; Ihh-Gli 信号通路; 关节软骨; 乌头碱; 次乌头碱; 新乌头碱; 苓药昔; 甘草昔; 黄芪甲苷

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2026)03-0990-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.03.017

Mechanism of Wutou Decoction in treatment of knee osteoarthritis based on Ihh-Gli signaling pathway

YU Yueyue^{1,2}, CHENG Hangjie², MENG Zihan², ZHANG Xu², ZHAO Heli², ZHANG Wenjing³, LI Ji'an^{2,4}, ZHANG Yixin¹

1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China

2. North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China

3. No. 5 Retired Cadres Recuperation Center of Beijing, Garrison District, Beijing 100089, China

4. Hebei Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Diabetes and Its Complications, Tangshan 063210, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of Wutou Decoction (乌头汤) in treating knee osteoarthritis (KOA) by regulating Indian hedgehog factor (Ihh)-glioma associated oncogene homolog (Gli) signaling pathway. **Methods** Male SD rats were randomly divided into sham group, model group, celecoxib (24 mg/kg) group, Wutou Decoction low-, medium-, and high-dose (1.05, 2.10, 4.20

收稿日期: 2025-11-07

基金项目: 河北省国际合作专项 (19392507D); 国家科技部对发展中国家科技援助项目 (KY201904005)

作者简介: 虞跃跃, 博士研究生, 研究方向为中医药临床应用及其机制研究。E-mail: tcmuyueyue@ncst.edu.cn

*通信作者: 张一昕, 教授, 博士生导师, 从事临床中药药理研究。E-mail: hbzyx123@163.com

李继安, 教授, 博士生导师, 从事中西医防治骨性关节炎的机制研究。E-mail: JianLi@ncst.edu.cn

g/kg) groups, with 10 rats in each group. The improved anterior cruciate ligament resection technique was used to establish a KOA model, after eight weeks of drug intervention, mechanical pain threshold, thermal pain threshold and climbing ability were measured. ELISA was used to detect the levels of matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), MMP-13 and type II collagen (Col II) in serum. The morphological changes of knee joint were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Micro computed tomography (Micro-CT) technology was used to analyze the changes in bone microstructure of knee joint. Western blotting was used to detect the expressions of Ihh, patched 1 (Ptch1), Gli and MMP-13 proteins in knee joint. **Results** Compared with sham group, rats in model group showed defects and thinning of cartilage surface layer, decreased and disordered cell arrangement, decreased cross-sectional and coronal bone trabeculae, sparse distribution, decreased bone density, thermal pain threshold and mechanical pain threshold were significantly reduced ($P < 0.001$), slope angle was decreased ($P < 0.001$), levels of MMP-3 and MMP-13 in serum were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), Col II level was significantly decreased ($P < 0.05$), and expression levels of Ihh-Gli signaling pathway related proteins in knee joint were significantly increased ($P < 0.001$). Compared with model group, the cartilage surface of rats in Wutou Decoction group was smooth, the number of cells was increased, and the morphology was intact. The knee joint cross-section and coronal bone trabeculae were increased, and the distribution was dense. The thermal pain threshold and mechanical pain threshold were significantly increased ($P < 0.05, 0.001$), slope angle was increased ($P < 0.01, 0.001$), levels of MMP-3 and MMP-13 in serum were significantly reduced ($P < 0.05$), level of Col II was significantly increased ($P < 0.05$), and expression levels of Ihh-Gli signaling pathway related proteins in knee joint were significantly reduced ($P < 0.05, 0.001$). **Conclusion** Wutou Decoction protects articular cartilage by inhibiting excessive activation of Ihh-Gli signaling pathway, reducing abnormal proliferation and differentiation of chondrocytes.

Key words: knee osteoarthritis; Wutou Decoction; Ihh-Gli signaling pathway; joint cartilage; aconitine; hypaconitine; mesaconitine; paeoniflorin; glycyrrhizin; astragaloside IV

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是一种以膝关节软骨退变、滑膜炎症以及骨质增生为主要特征的关节退行性疾病^[1]。临床以膝关节的肿胀、疼痛、活动受限为主要表现^[2]，疾病进展至后期，患者出现严重的关节内翻、外翻或屈曲挛缩等，最终导致关节畸形，严重者完全无法行走，对患者的生活质量产生较大的影响。目前有研究表明我国是全球 KOA 患病人数最多的国家，症状性 KOA 的患病率高达 8.1%^[3]。其发病机制较为复杂，受高龄、肥胖、代谢紊乱和应力损伤等多种因素的影响^[4]。乌头汤为东汉张仲景《金匮要略》中的经典方剂，由制川乌、麻黄、黄芪、白芍和炙甘草 5 味药组成，因其具有扶正祛邪、祛寒除湿、通利关节的功效，在临幊上被广泛用于治疗膝骨痹。乌头汤还被中华中医药学会风湿病分会发布的《骨关节炎病证结合诊疗指南》强烈推荐，具有延缓膝骨关节退变、减轻膝关节功能障碍的作用^[5-6]。

印度刺猬因子 (Indian hedgehog, Ihh) 是 Hedgehog 蛋白家族的成员之一。Ihh 主要由肥大前软骨细胞合成并释放，在骨骼发育中发挥关键作用，它由软骨细胞分泌，并调节软骨细胞的增殖、分化和骨骼的生长板中的骨化过程。研究表明，Ihh 对软骨和骨骼发育的影响主要通过胶质瘤相关癌基因同源物 (glioma-associated oncogene homolog, Gli) 通路和甲状腺激素相关蛋白 (parathyroid

hormone-related protein, PTHrP) 负反馈机制发生^[7]。在炎症环境中，Ihh 通过调控 Gli-1 通路抑制低氧诱导因子-2α (hypoxia-inducible factor-2α, HIF-2α) 降解，从而促进 HIF-2α 及其下游因子的表达。HIF-2α 水平升高可进一步促进细胞内 Ihh-Gli-1 蛋白表达。在生理缺氧条件下，软骨细胞中的 Ihh-Gli-1-HIF-2α 轴抑制软骨细胞增殖^[8]。在 KOA 中，Ihh 通路被异常激活，活化的 Gli1 进入细胞核启动下游因子的转录，促进 Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, Runx2) 的表达。而 Runx2 诱导的基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 高表达是导致软骨基质降解的关键^[9]。尽管该通路在软骨代谢中的作用机制尚未完全揭示，但其核心地位已获得广泛认同^[10-11]。

西医对 KOA 发病机制的认识具有一定的局限性，在治疗上一般以抗炎、消肿、止痛为主，如关节腔内注射玻璃酸钠、口服非甾体类药物及手术治疗，虽然能够暂时缓解症状，但非甾体抗炎药、糖皮质激素等药物对胃肠道具有一定程度的不良影响^[12]。临床研究及实践证实，中医药在治疗关节炎方面有着独特的优势，不仅能缓解患者疼痛，还能减轻西医治疗的不良反应。研究表明，乌头汤通过调节炎性介质释放、降低一氧化氮 (nitric oxide, NO) 水平等方式，发挥镇痛及延缓关节软骨退变的作用，同时通过改善微循环障碍延缓关节软骨损伤

来治疗 KOA。为了科学验证乌头汤的实际疗效, 本研究开展动物实验, 旨在深入探究其治疗 KOA 的具体机制, 并为临床应用提供坚实的数据支撑。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只, 8 周龄, 体质量 180~200 g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK(京)2020-0004。动物饲养于华北理工大学动物实验中心洁净实验室, 实验动物使用许可证号 SYXK(冀)2020-007, 恒温 25 °C, 自由进食饮水。动物实验通过华北理工大学实验动物伦理委员会审查(伦理批准号 LX201851)。

1.2 药材

制川乌(批号 20230123)、麻黄(批号 20230320)、黄芪(批号 20230130)、白芍(批号 20231101)、炙甘草(批号 20230321)饮片购自河北明珠药业有限公司, 经华北理工大学中医院李继安教授分别鉴定为毛茛科乌头属植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的干燥母根经炮制加工品、麻黄科麻黄属植物木贼麻黄 *Ephedra equisetina* Bge. 的干燥草质茎、豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根经加工品、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎经蜜炙加工品, 均符合《中国药典》2025 年版规定。

1.3 药品与试剂

塞来昔布(批号 20240130)购自美国辉瑞公司; 戊巴比妥钠(批号 20230919)购自美国 Sigma-Aldrich 公司; EDTA 脱钙液[批号 CE32(42325)]购自北京索莱宝科技有限公司; 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染液(批号 C220604)购自珠海贝索生物技术有限公司; MMP-13 ELISA 试剂盒(批号 20231101)、MMP-3 ELISA 试剂盒(批号 20230919)、II 型胶原蛋白(type II collagen, Col II) ELISA 试剂盒(批号 20231001)购自南京建成生物工程研究所; β-actin 抗体(批号 20231212)、斑驳蛋白 1(patched 1, Ptch1)抗体(批号 20231218)购自美国 Affinity 公司; Gli 抗体(批号 20240211)、MMP-13 抗体(批号 20240118)购自武汉博士德生物工程有限公司; Ihh 抗体(批号 20231212)、HRP 标记的羊抗小鼠二抗(批号

20231203)购自武汉三鹰生物技术有限公司; HRP 标记的羊抗兔二抗(批号 20231223)购自碧云天生物技术有限公司。

1.4 仪器

JK-TBP-3A 型生物组织摊片机(上海精学科学仪器有限公司); DB-B2 型烤片机(常州国华电器有限公司); G-9070MBE 型电热鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司); RM2245 型转轮切片机、TP1020 型细胞组织处理化验仪器(德国 Leica 公司); AE2000 型倒置生物显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司); M200PRO 型酶标仪(瑞士 Tecan 公司); DB026 型智能热板仪(北京智鼠多宝生物科技有限责任公司); YLS-13A 型大小鼠抓力测定仪(济南益延科技发展有限公司); NC12775-99 型纤维丝(美国 North Coast 公司); R2M8 型机械痛阈测试平台(上海玉研科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 乌头汤的制备

乌头汤由制川乌 6 g、麻黄 9 g、黄芪 9 g、白芍 9 g、炙甘草 9 g 组成。取制川乌 6 g, 加入 420 mL 纯净水, 加热至沸腾后开始计时, 煮沸 1.5 h, 加入余下 4 味中药材, 继续煎煮 1.5 h, 滤过。滤渣加入 336 mL 纯净水, 再次煎煮 1.5 h, 滤过, 合并 2 次滤液, 再次用 8 层纱布对药液进行滤过。冷却后, 滤液置于烧杯中, 振荡使其充分混合均匀, 转移至旋转蒸发仪进行浓缩^[13]。乌头汤中含有 29 种化学成分, 其中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、芍药苷、甘草苷、黄芪甲苷的质量分数分别为 (0.006 0±0.001 2)、(0.011 4±0.002 0)、(0.020 4±0.002 1)、(0.067 6±0.000 8)、(0.020 0±0.003 8)、(0.000 6±0.000 3) %。双酯型生物碱[以乌头碱、次乌头碱及新乌头碱的总量计]质量分数为 (0.037 8±0.002 3) %, 符合《中国药典》2025 年版规定。

2.2 动物造模、分组与给药

随机取 10 只大鼠作为假手术组, 其余 50 只大鼠采用改良前交叉韧带切除技术(anterior cruciate ligament transection, ACLT)构建 KOA 模型^[14-15]。大鼠麻醉后, 剃毛消毒右膝关节, 切开膝内侧皮, 打开关节腔, 剪断前交叉韧带, 通过“抽屉试验”阳性并维持关节失稳 6 周确认 KOA 模型建立成功。KOA 大鼠采用随机数字表法分为模型组、塞来昔布(24 mg/kg)组和乌头汤低、中、高剂量(1.05、2.10、4.20 g/kg, 分别相当于临床剂量的 0.5、1、2 倍)

组, 每组 10 只。乌头汤组 ig 不同质量浓度 (0.105、0.210、0.420 g/mL) 的乌头汤 (10 mL/kg), 塞来昔布组 ig 以纯净水配制的塞来昔布溶液, 对照组和模型组 ig 等体积的生理盐水, 1 次/d, 每周给药 6 d, 连续给药 8 周。给药期间, 观察并记录各组大鼠的精神状态、自发活动、毛发、呼吸、饮食、饮水、粪便及死亡情况。

2.3 行为学检测

分别在给药前、后 1 d 的固定时间进行行为学实验, 实验前将大鼠置于透明箱内适应 15 min, 待大鼠安静, 分别进行机械痛阈值、热痛阈值测定及斜坡实验。

2.3.1 机械痛阈值测定 采用 Von Frey 测试平台测定各组大鼠机械痛阈值, 将待测大鼠依次置于可容纳 4 只大鼠的 Von Frey 测试平台内, 遵循从小到大的原则, 从 2 g 测试笔开始, 对大鼠的机械痛阈值进行测量。

2.3.2 热痛阈值测定 采用 YLS-6B 型智能热板仪测定各组大鼠热痛阈值, 提前打开智能热板仪开关预热, 温度设置为 49.6 °C。将大鼠置于智能热板仪中, 一手盖上盖子, 防止大鼠跳出, 一手食指始终放于 T 按键上, 当大鼠前后爪子同时着地, 按 T 键计时, 密切观察其舔足行为的起始时间, 并迅速将大鼠取出, 准确记录其热痛阈时间。

2.3.3 斜坡实验 进行正式斜板实验前, 将大鼠置于 40° 的斜面上, 使其适应 1 min, 之后以 5° 为单位逐渐增加斜板的角度。当大鼠可在一定角度的斜板上坚持 5 s 且不滑落则继续增加斜板角度, 直至大鼠无法在该斜板上坚持 5 s, 无法坚持 5 s 的标准为 5 次实验中能坚持 5 s 的次数少于 3 次。最终记录大鼠所能坚持的最大角度。

2.4 取材

给药结束后, 大鼠 ip 戊巴比妥钠麻醉, 通过腹主动脉采集血液样本, 3 000 r/min 离心后取上清液, 保存于 -80 °C。采血后, 剥离大鼠右后膝关节周围的肌肉组织, 以获取完整的右膝关节, 将关节置于多聚甲醛溶液中固定 24 h, 用于后续实验。

2.5 ELISA 检测大鼠血清中 MMP-3、MMP-13 和 Col II 水平

取各组大鼠血清, 按照 ELISA 试剂盒说明书测定 MMP-13、MMP-3、Col II 水平。

2.6 HE 染色观察膝关节的形态学变化

将大鼠膝关节放入 EDTA 脱钙液的 EP 管中,

去除骨组织中的钙质, 采用梯度乙醇法脱水, 石蜡包埋后切成薄片, 进行常规的 HE 染色, 于显微镜下观察并拍照。

2.7 微计算机断层扫描 (microcomputed tomography, Micro-CT) 分析膝关节的骨微结构变化

将大鼠右侧下肢完全分离, 去除软组织, 保留完整膝关节及后爪, 送至华北理工大学进行 Micro-CT, 采用 Micro-CT 软件分析骨密度 (bone mineral density, BMD)、骨体积分数 (bone volume/tissue volume, BV/TV)、骨小梁数目 (trabecular number, Tb.N)、骨小梁厚度 (trabecular thickness, Tb.Th)、骨小梁间距 (trabecular separation, Tb.Sp) 和骨小梁结构模式参数 (structure model index, SMI)。

2.8 Western blotting 检测膝关节 Ihh-Gli 信号通路相关蛋白表达

取大鼠膝关节软骨组织 100 mg, 加入裂解液提取总蛋白, 采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。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, 封闭后分别加入一抗, 4 °C 孵育过夜; 加入二抗, 室温孵育 2 h 后, 加入 ECL 化学发光试剂, 于显影仪中曝光、显影, 采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

2.9 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析。对于计量资料, 多组数据比较采用方差分析。首先检验方差齐性, 满足时采用最小显著差异法 (LSD), 不满足时用 Dunnett T3。对于计数资料, 因不满足正态分布和方差齐性, 采用非参数检验。

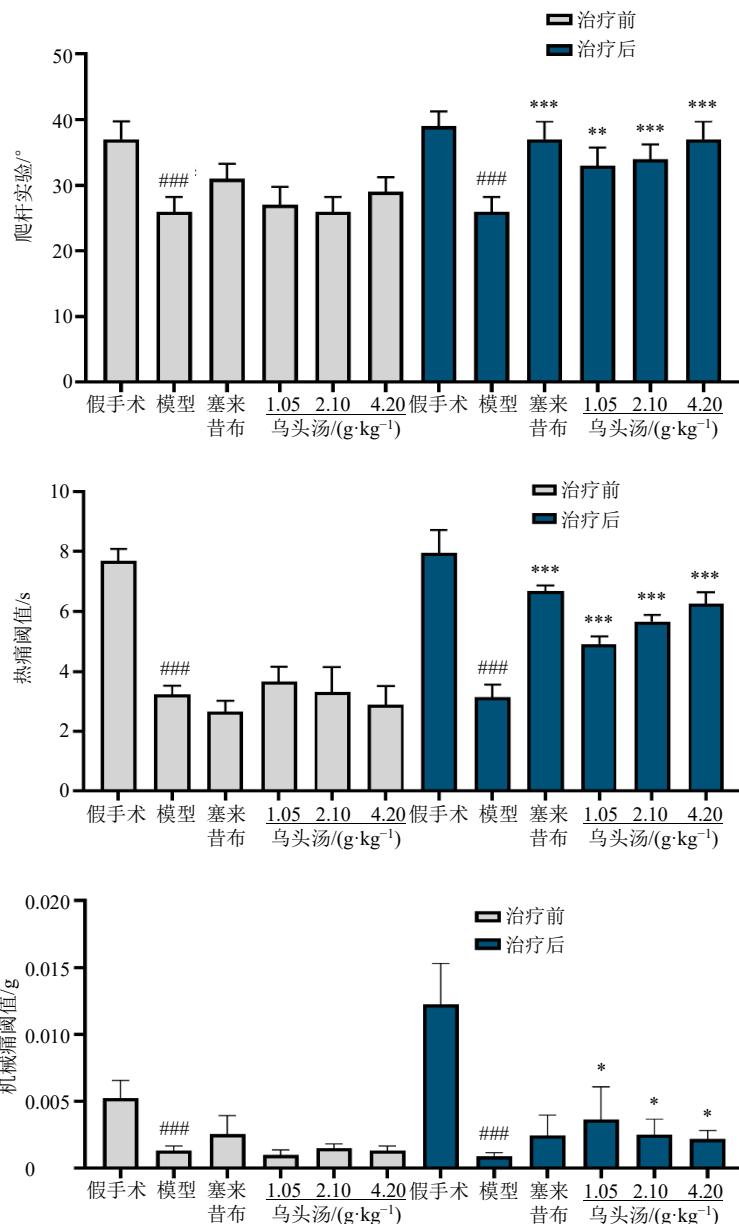
3 结果

3.1 乌头汤对 KOA 大鼠一般情况的影响

实验期间, 各组大鼠未发生死亡, 无流涎、抽搐、震颤、呼吸困难或腹泻的明显中毒症状, 饮食和饮水消耗量均保持稳定。表明在本实验所采用的剂量和给药周期下, 乌头汤未引起大鼠明显的全身性毒性反应。

3.2 乌头汤对 KOA 大鼠行为学的影响

如图 1 所示, 治疗前, 与假手术组比较, 模型组大鼠热痛阈值和机械痛阈值显著降低 ($P < 0.001$), 斜坡角度变小 ($P < 0.001$)。给药治疗 8 周后, 与模型组比较, 乌头汤各剂量组大鼠热痛阈值和机械痛阈值均显著升高 ($P < 0.05, 0.001$), 斜坡角度变大 ($P < 0.01, 0.001$); 塞来昔布组大鼠热痛阈值显著升高 ($P < 0.001$), 斜坡角度变大 ($P < 0.001$)。



与假手术组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下图同。

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs sham group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图 1 乌头汤对 KOA 大鼠行为学的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 1 Effect of Wutou Decoction on behavior of KOA rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

3.3 乌头汤对 KOA 大鼠血清中 MMP-3、MMP-13 和 Col II 水平的影响

如图 2 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠血清中 MMP-3、MMP-13 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), Col II 水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 乌头汤高剂量组大鼠血清中 MMP-3、MMP-13 水平显著降低 ($P < 0.05$), Col II 水平显著升高 ($P < 0.05$), 提示乌头汤可能通过抑制 MMP 活性减少软骨基质破坏。

3.4 乌头汤对 KOA 大鼠膝关节病理变化的影响

如图 3 所示, 假手术组大鼠膝关节软骨表层完整、平滑, 全层软骨基质染色均匀, 无纤维化, 骨小梁排序规则, 各层细胞排列整齐、分布均匀, 无局部软骨细胞丢失或固缩现象; 模型组膝关节软骨表层缺损、变薄, 细胞减少, 且有空泡, 整体各层细胞排列紊乱, 簇集分布, 有裂隙直入深层; 乌头汤低、中剂量组较模型组有所改善, 高剂量组膝关节软骨表面较为平整, 软骨层较厚, 细胞数量增多, 形态较完整。

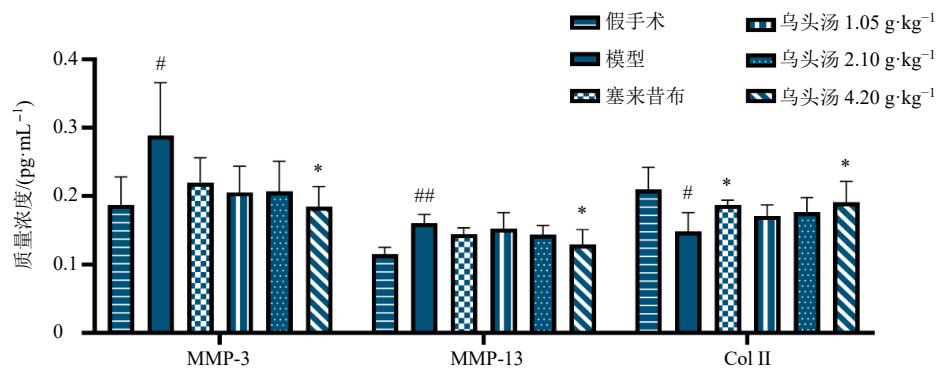
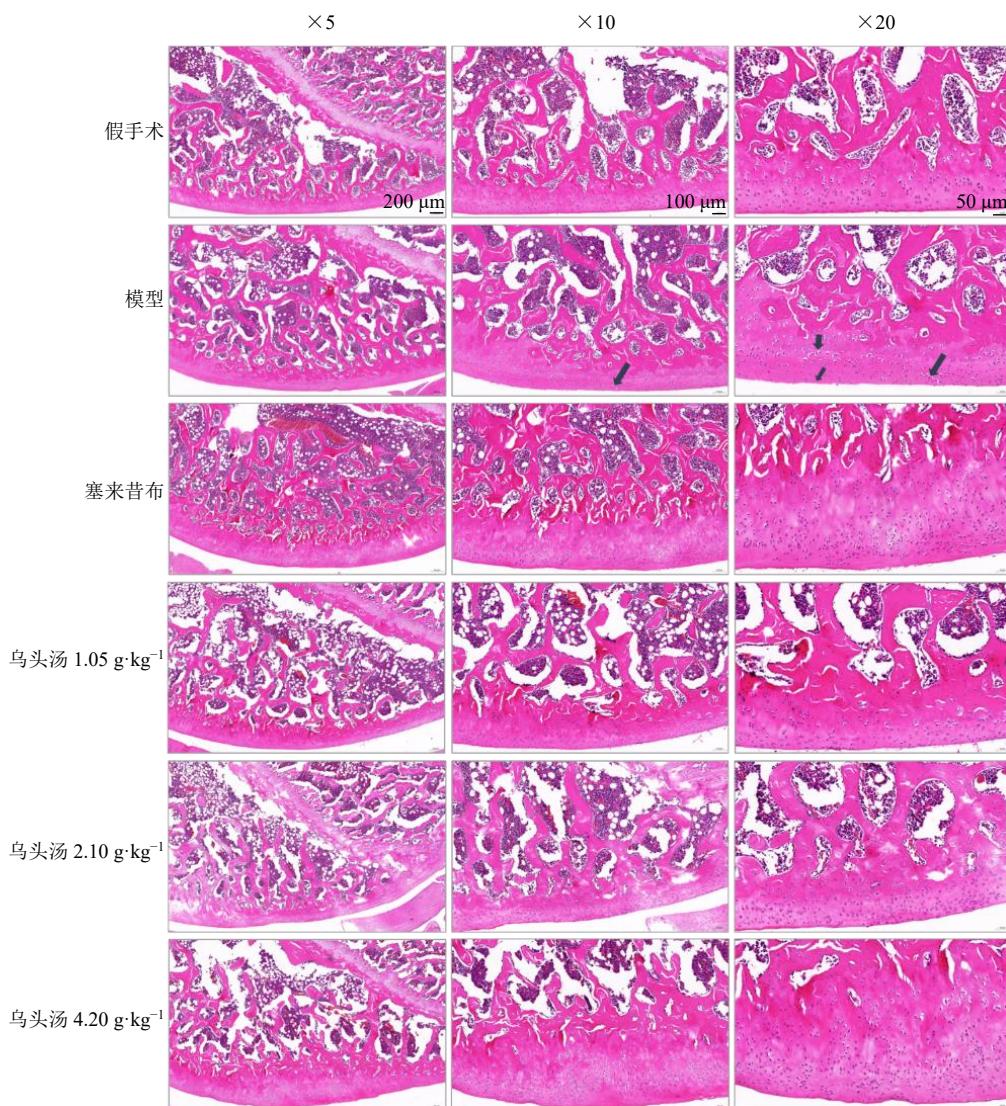


图2 乌头汤对 KOA 大鼠血清中 MMP-3、MMP-13 和 Col II 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 2 Effect of Wutou Decoction on levels of MMP-3, MMP-13 and Col II in serum of KOA rats ($\bar{x} \pm s, n=5$)



箭头表示软骨表层缺损、变薄，细胞减少，且有空泡，整体各层细胞排列紊乱，簇集分布，有裂隙直入深层。

Arrow indicates defects, thinning and reduced cellularity in cartilage surface layer, along with vacuoles. The overall arrangement of cells across all layers is disorganized, with clustered distribution and fissures extending into the deeper layers.

图3 乌头汤对 KOA 大鼠膝关节病理变化的影响 (HE)

Fig. 3 Effect of Wutou Decoction on pathological changes of knee joints in KOA rats (HE)

3.5 乌头汤对 KOA 大鼠膝关节骨微结构变化的影响

如图 4 所示,与假手术组比较,模型组大鼠膝关节横截面和冠状面骨小梁减小,分布稀疏;与模型组比较,各给药组大鼠膝关节横截面和冠状面骨小梁增多,分布密集。如图 5 所示,与假手术组比较,模型组大鼠膝关节 BMD、Tb.N、Tb.Th、BV/TV 显著降低 ($P<0.001$), Tb.Sp 和 SMI 显著升高 ($P<0.001$);与模型组比较,各给药组大鼠膝关节 BMD、Tb.N、Tb.Th、BV/TV 均显著升高

($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), SMI 和 Tb.Sp 显著降低 ($P<0.01$)。

3.6 乌头汤对 KOA 大鼠膝关节 Ihh-Gli 信号通路相关蛋白表达的影响

如图 6 所示,与假手术组比较,模型组大鼠膝关节 Ihh、Gli、Ptch1、MMP-13 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.001$);与模型组比较,塞来昔布组和乌头汤中、高剂量组大鼠膝关节 Ihh、Gli、MMP-13 蛋白表达水平均显著降低 ($P<0.001$),各给药组 Ptch1 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.001)。

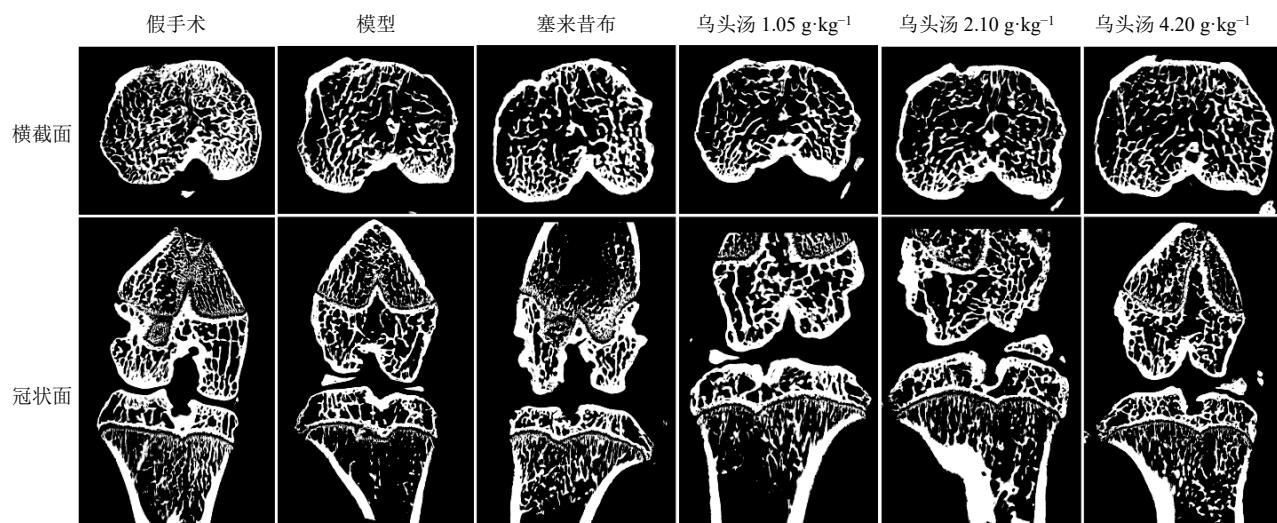


图 4 乌头汤对 KOA 大鼠膝关节骨微结构变化的影响

Fig. 4 Effect of Wutou Decoction on changes in bone microstructure of knee joint in KOA rats

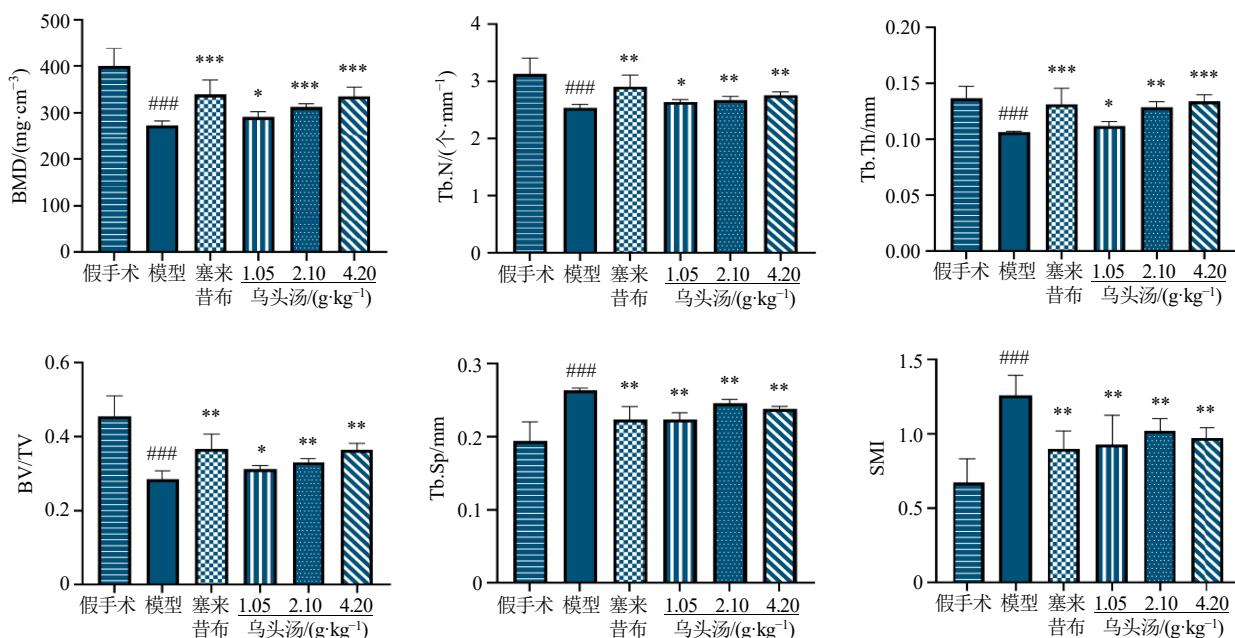


图 5 乌头汤对 KOA 大鼠膝关节骨微结构参数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 5 Effect of Wutou Decoction on bone microstructural parameters of knee joints in KOA rats ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

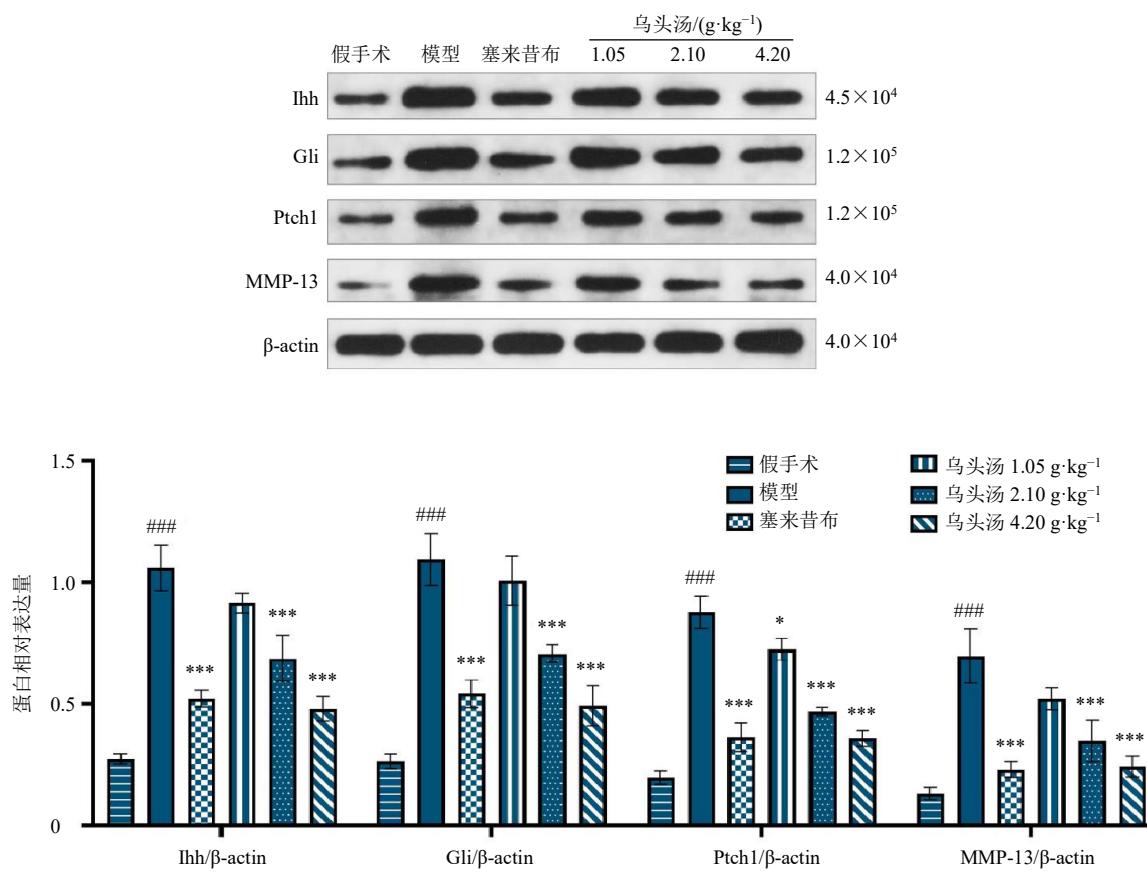


图 6 乌头汤对 KOA 大鼠膝关节 Ihh-Gli 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 6 Effect of Wutou Decoction on expressions of Ihh-Gli signaling pathway related proteins in knee joints of KOA rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

4 讨论

KOA 是一种关节退行性疾病, 以膝关节疼痛、关节畸形、活动受限等为主要临床表现, 初期膝关节轻微疼痛; 中期疼痛呈持续性进展, 累及周围组织, 筋病及骨, 以筋病为主; 后期软骨磨损, 骨质增生, 以骨病为主, 累及筋, 随着病情的加重, 会并发骨质增生、滑膜炎、软骨撕脱等, 导致膝关节疼痛、畸形, 严重影响患者的膝关节运动功能。其存在不仅严重影响患者生活质量, 还对医疗健康系统产生了深远影响^[16-20]。KOA 属于中医中“骨痹”“筋痹”的范畴。《内经》云:“风寒湿三气杂至, 合而为痹也。”指出风、寒、湿 3 种外邪共同侵袭人体, 导致气血运行不畅、经络阻塞, 从而引发肢体关节疼痛、麻木、肿胀等症状。乌头汤作为传统中药方剂, 在《金匱要略·中风历节病脉证并治第五》中有详细记载:“病历节, 不可屈伸, 疼痛, 乌头汤主之”。其主要功效集中在温经散寒、祛湿止痛等方面^[21-22], 由川乌、白芍、黄芪、甘草以及麻黄配伍

而成, 这些药味相互作用, 使得乌头汤在治疗风湿性关节炎、肩关节周围炎等由寒湿痹阻所致的关节病症上, 展现出了显著疗效。

研究表明, 乌头汤具有提高动物痛阈值的能力, 并能减少与胶质细胞活化相关的炎症因子表达。针对 KOA 大鼠的研究揭示, 乌头汤能够通过调控 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) / 核因子-κB (nuclear factor-κB, NF-κB) 信号通路, 调节如诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS)、肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis-α, TNF-α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 等炎症相关因子的表达, 有效抑制滑膜炎症, 从而治疗 KOA^[23]。其镇痛机制涉及多个方面: ①通过调控胶质细胞活化和神经炎症, 调节脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) / 酪氨酸激酶受体 B (tyrosine kinase receptor B, TrkB) 通路以保护神经元, 进而改善疼痛与抑郁症状^[24]; ②抑制脑源性神经营养因子和 5-羟色胺 (5-

hydroxytryptamine, 5-HT) 的表达以缓解疼痛; ③通过调节蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) -丝裂原活化蛋白激酶激酶 4 (mitogen activated protein kinase kinase 4, MKK4) -Janus 激酶 (Janus kinase, JNK) -JUN 信号轴, 提升神经营养因子基因表达, 同时抑制神经炎症, 以此发挥镇痛作用^[25]。乌头汤已被证实具有抗炎镇痛、治疗骨关节炎的效果, 但其关键药效物质及分子机制仍有待深入探究。

Ihh-Gli 信号通路在软骨的发育和维持过程中发挥着至关重要的作用^[24]。在 KOA 的发生和发展过程中, Ihh-Gli 信号通路的异常表达可能会导致软骨细胞的增殖和分化失衡, 进而加剧关节软骨的损伤和退变^[26-28]。因此, 调节 Ihh-Gli 信号通路的活性成为了治疗 KOA 的一种潜在策略。Ihh-Gli 信号通路是一个复杂的调控网络, 包括 Ihh、Ptch、膜受体蛋白 Smo、Gli 及其他下游靶基因^[29-30]。在该通路中, Ihh 配体与 Ptch1 受体的结合能够解除对 Smo 的抑制^[31-32], 进而激活 Gli 家族成员, 上调下游靶基因和 Hedgehog 相互作用蛋白 (Hedgehog-interacting protein, HHIP) 的表达^[33], 最终促进 Runx2 的生成, 介导聚蛋白多糖酶 5、MMP-13 等的表达, 导致软骨细胞肥大^[34]。

本研究结果进一步证实, 乌头汤能够显著提高大鼠的爬坡能力、热痛阈值以及机械痛阈值。血清中 MMP-13、MMP-3 的水平与 KOA 的严重程度呈正相关^[35-36], 而增加 Col II 的表达则有助于延缓 KOA 的进展^[37]。本研究发现, 给予乌头汤治疗后, MMP-13 和 MMP-3 水平显著降低, 同时 Col II 的表达增加, 表明乌头汤能有效缓解 KOA 症状。此外, Micro-CT 结果显示, 乌头汤能够提高 BMD、Tb.N、Tb.Th、Tb.BV/TV 的水平, 同时降低 Tb.Sp 和 SMI, 乌头汤对软骨下骨结构异常变化具有修复作用, 有效改善了大鼠的关节炎症。乌头汤治疗后, 膝关节 Ihh、Gli、Ptch1 及 MMP-13 的蛋白表达水平显著降低, 表明乌头汤通过抑制 Ihh-Gli 信号通路, 发挥其治疗 KOA 的作用。

基于上述结果与分析可知, 乌头汤作为一种传统中药方剂, 在治疗 KOA 方面展现出了显著的疗效。首先, 通过提升大鼠的痛阈值, 乌头汤有效缓解了关节炎引起的疼痛, 改善了动物的行为表现, 如爬坡能力的增强。其次, 乌头汤通过调节一系列与炎症和软骨退化相关的分子机制, 如抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路和减少炎症因子的表达, 显著减轻

了滑膜炎症和软骨损伤。这些作用不仅体现在血清中炎症因子水平的下降, 还反映在软骨下骨结构的改善上, 如骨密度的增加、骨小梁数量和厚度的提升, 以及骨小梁间距和结构模型指数的降低, 共同促进了软骨下骨结构的修复和关节功能的恢复。本研究还发现乌头汤能够抑制 Ihh-Gli 信号通路的异常激活。这一信号通路在软骨发育和维持中扮演着关键角色, 其异常表达与 KOA 的发生和发展密切相关。乌头汤通过降低 Ihh、Gli、Ptch1 及 MMP-13 等关键蛋白的表达量, 有效抑制了软骨细胞的异常增殖和分化, 减缓了关节软骨的损伤和退变进程。同时, 它还能促进 Ihh-Gli 信号通路的正常表达, 提高软骨细胞的再生能力, 有助于关节软骨的修复和重建。这一发现不仅揭示了乌头汤治疗 KOA 的新机制, 也为开发针对 Ihh-Gli 信号通路的新型 KOA 治疗药物提供了潜在的靶点和研究思路。

综上, 乌头汤在 KOA 治疗中展现出多靶点、多途径的协同调节优势, 疗效确切且作用机制复杂。本研究初步证实, 乌头汤可能通过调控 Ihh-Gli 信号通路及其他相关通路发挥治疗效应, 为 KOA 的临床治疗提供了新的研究思路与理论支撑。然而, 本研究仍存在若干局限性: 在动物模型层面, 尽管大鼠模型可在一定程度上模拟人类 KOA 的病理特征, 但难以完全复现其复杂的发病机制、病程进展及个体差异等临床实际情况, 可能导致研究结果向临床转化时存在潜在偏差; 在样本量方面, 本研究纳入的大鼠数量有限, 可能影响结果的稳定性与可靠性, 较小的样本量难以充分反映乌头汤在更广泛群体中的疗效及安全性; 在实验设计上, 本研究主要聚焦于乌头汤对特定信号通路的调控作用, 对于其他潜在作用机制尚未开展深入探究, 实验的研究深度与覆盖广度仍有待进一步拓展。基于上述局限性, 未来研究可从以下方向逐步推进: ①开展细胞实验, 进一步明确乌头汤中具体活性成分对软骨细胞、滑膜细胞等关节相关细胞的作用机制, 从细胞层面深入阐释其治疗 KOA 的分子生物学基础; ②加强核心成分筛选与优化, 运用现代分离纯化及分析技术, 从乌头汤中筛选出具有明确治疗活性的核心成分, 并通过结构修饰等手段提升其疗效、降低毒性风险; ③积极推进临床转化研究, 在前期动物实验的基础上, 设计严谨规范的临床试验, 系统评估乌头汤在 KOA 患者中的临床疗效与安全性, 探索其最佳用药剂量、疗程及配伍方案, 为 KOA 的

精准治疗与个体化治疗提供更充分的科学依据和实践指导, 最终为改善 KOA 患者的生活质量、促进关节健康提供有力支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 陈天勤, 王树东, 胡哲, 等. 基于肥胖和经筋理论探讨五禽戏对膝骨性关节炎的作用机制 [J/OL]. 辽宁中医药大学学报, (2025-09-08) [2025-09-09]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1543.r.20250905.1656.002.2>.
- [2] 李永琦, 唐友斌. 浅析《针灸逢源》针灸治疗膝骨关节炎的腧穴应用规律与思路 [J]. 中国中医药科技, 2025, 32(5): 939-942.
- [3] 卢志程. 温阳舒筋方对膝骨性关节炎患者股四头肌弥漫性成像影响的临床研究 [D]. 南宁: 广西中医药大学, 2025.
- [4] 魏义保, 马振源, 刘德仁, 等. 膝痹宁II通过 AMPK/PGC1 α 信号通路调控糖酵解而减轻膝骨关节炎大鼠软骨损伤 [J]. 中国病理生理杂志, 2025, 41(8): 1569-1577.
- [5] 陈长兴, 仲卫红, 金灵璐, 等. 乌头汤抑制膝骨关节炎软骨细胞氧化应激反应的作用研究 [J]. 风湿病与关节炎, 2022, 11(11): 1-4.
- [6] 林琴, 姚禹娴, 詹成明, 等. 乌头汤调控 P38 MAPK 信号通路延缓膝骨关节炎软骨退变的机制研究 [J]. 福建中医药, 2025, 56(3): 10-14.
- [7] Alman B A. The role of hedgehog signalling in skeletal health and disease [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2015, 11(9): 552-560.
- [8] Zhang C M, Zhao R P, Dong Z Q, et al. IHH-GLI-1-HIF-2 α signalling influences hypertrophic chondrocytes to exacerbate osteoarthritis progression [J]. *J Orthop Translat*, 2024, 49: 207-217.
- [9] 董政权. Ihh 通过调控软骨细胞的肥大化及次级骨化中心的形成影响四肢生长板的发育 [D]. 太原: 山西医科大学, 2023.
- [10] Thompson C L, Patel R, Kelly T N, et al. Hedgehog signalling does not stimulate cartilage catabolism and is inhibited by Interleukin-1 β [J]. *Arthritis Res Ther*, 2015, 17: 373.
- [11] Zhang R K, Fang H, Chen Y X, et al. Gene expression analyses of subchondral bone in early experimental osteoarthritis by microarray [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e32356.
- [12] 孙强, 桑晓文, 张志方. 经方治疗膝骨关节炎的临床应用进展 [J]. 河北中医, 2025, 47(6): 1041-1045.
- [13] 毛霞. 乌头汤缓解类风湿关节炎寒证的关键药效物质基础及其作用机制研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2020.
- [14] Tawonsawatruk T, Sriwatananukulkit O, Himakhun W, et al. Comparison of pain behaviour and osteoarthritis progression between anterior cruciate ligament transection and osteochondral injury in rat models [J]. *Bone Joint Res*, 2018, 7(3): 244-251.
- [15] 杨清林, 杨雨旸, 王萌, 等. 益肾活络逐痛汤对膝骨关节炎大鼠软骨损伤及骨微结构的影响 [J]. 中成药, 2023, 45(7): 2158-2166.
- [16] 孙烨凯, 金红婷, 何帮剑, 等. 肾髓同治方治疗膝骨关节炎肝肾亏虚证的临床研究 [J]. 中医正骨, 2025, 37(9): 36-39.
- [17] 黄杰, 曾浩, 章震浩, 等. 体质量指数与膝骨关节炎: Web of Science 核心合集数据库来源文献计量学分析 [J/OL]. 中国组织工程研究, (2025-09-19) [2025-09-19]. https://link_cnkis.net.share.sclib.cn/urlid/21.1581.R.20250918.1516.014.
- [18] 覃建东, 王明杰, 任世定, 等. 基于筋骨和合理论推拿治疗膝骨性关节炎研究进展 [J]. 国医论坛, 2025, 40(5): 74-78.
- [19] 于利凯, 苏子珊, 刘尚齐, 等. 基于机械应力介导的 PINK1/Parkin 途径探讨汉黄芩素改善膝骨关节炎软骨损伤的作用机制 [J]. 中草药, 2025, 56(22): 8188-8200.
- [20] 范琳, 惠备战, 张议蕲, 等. 骨痛灵酊联合富血小板血浆注射治疗膝骨关节炎的临床观察 [J]. 中国民间疗法, 2025, 33(17): 63-66.
- [21] 刘旖哲, 陶楚君, 马哈, 等. 基于 UHPLC-ESI-MS/MS 多组分定量的乌头汤制备工艺量值传递规律研究 [J]. 中草药, 2025, 56(14): 4991-5005.
- [22] 中华中医药学会风湿病分会. 骨关节炎病证结合诊疗指南 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(2): 929-933.
- [23] 师钰琪, 吴红艳, 朱春燕, 等. 从 BDNF/TrkB 信号通路探讨乌头汤对神经病理性疼痛模型小鼠脑神经元的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(7): 23-30.
- [24] 陈俊, 林洁, 赵忠胜, 等. 乌头汤对膝骨关节炎模型大鼠滑膜组织 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(27): 4381-4386.
- [25] 毛志云, 许琼虹, 朱春燕, 等. 乌头汤改善下行抑制系统损伤以缓解神经病理性疼痛的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(5): 82-87.
- [26] 李晔, 耿秋东, 郑珍萍, 等. 基于 IHH-Gli 信号通路探讨龟鹿二仙胶含药血清调控大鼠膝关节软骨细胞肥大分化作用机制 [J]. 福建中医药, 2023, 54(2): 26-30.
- [27] Englund M, Haugen I K, Guermazi A, et al. Evidence that meniscus damage may be a component of osteoarthritis: The Framingham study [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, 24(2): 270-273.

- [28] 虞跃跃, 崔建美, 王萌, 等. 乌头配伍芍药干预骨性关节炎的机制研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(1): 58-62.
- [29] 郑珍萍, 吴伟欣, 李晔, 等. 龟鹿二仙胶对膝骨关节炎大鼠软骨细胞 IHH-GLI 信号通路的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2024, 39(4): 1747-1752.
- [30] Huang L, Jin M, Gu R Y, et al. miR-199a-5p reduces chondrocyte hypertrophy and attenuates osteoarthritis progression via the Indian hedgehog signal pathway [J]. *J Clin Med*, 2023, 12(4): 1313.
- [31] Ballester A, Guijarro A, Bravo B, et al. Hedgehog signalling modulates immune response and protects against experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(6): 3171.
- [32] Doheny D, Manore S G, Wong G L, et al. Hedgehog signaling and truncated GLI1 in cancer [J]. *Cells*, 2020, 9(9): 2114.
- [33] Huang J, Zhao L, Chen D. Growth factor signalling in osteoarthritis [J]. *Growth Factors*, 2018, 36(5/6): 187-195.
- [34] Kim E J, Cho S W, Shin J O, et al. Ihh and Runx2/Runx3 signaling interact to coordinate early chondrogenesis: A mouse model [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e55296.
- [35] 陈志伟, 申建军, 王泽鑫, 等. 陇中骨刺膏对膝关节骨性关节炎患者血清 COMP、MMP-13 水平的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(1): 592-595.
- [36] 陈志伟, 石关桐, 胡红艳, 等. 血清 COMP 和 MMP-13 在膝骨关节炎早期诊断中的应用研究 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2016, 24(7): 23-25.
- [37] 李建, 李大鹏, 赵国阳. 骨关节炎患者关节软骨中胶原蛋白表达变化的研究进展 [J]. 中国骨与关节杂志, 2020, 9(2): 148-152.

[责任编辑 李亚楠]