

基于 Ihh-Gli 信号通路研究乌头碱配伍芍药苷抗膝骨关节炎的作用机制

虞跃跃^{1,2}, 赵合立², 王艺然², 成杭洁², 孟梓涵², 张旭², 李继安^{2,3*}, 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. 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 基于印度刺猬因子 (Indian hedgehog, Ihh)-胶质瘤相关癌基因同源物 (glioma-associated oncogene homolog, Gli) 信号通路探讨乌头碱配伍芍药苷对膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 的干预作用及分子机制, 并评价其给药安全性。方法 采用前交叉韧带横断手术构建大鼠 KOA 模型, 设置假手术组、模型组、塞来昔布 (24 mg/kg) 组和乌头碱-芍药苷低 (5+50 μ g/kg)、中 (10+100 μ g/kg)、高 (20+200 μ g/kg) 剂量组, 每组 10 只。通过行为学测试评价镇痛效果, 采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色与显微计算机断层扫描技术 (micro-computed tomography, Micro-CT) 观察关节软骨形态及骨微结构变化; ELISA 检测血清中基质金属蛋白酶 13 (matrix metalloproteinase 13, MMP13) 和 II 型胶原蛋白 (type II collagen, Col II) 水平; 免疫荧光染色和 qRT-PCR 检测膝关节组织中 Ihh、Gli、斑疹蛋白 1 (patched 1, Ptch1)、MMP13 的蛋白和基因表达; 采用分子对接验证乌头碱、芍药苷与 Ihh-Gli 信号通路关键靶点的结合能力。通过检测血清天冬氨酸氨基转移酶活性及肌酐、血尿素氮、尿蛋白水平, 并采用 HE 染色法对各组大鼠心脏、肝脏及肾脏组织进行形态学分析, 以评价乌头碱配伍芍药苷的安全性。结果 给药期间各组大鼠未见死亡及中毒症状, 血清肝、肾功能指标及心、肝、肾组织形态学均无显著异常, 表明乌头碱配伍芍药苷具有较好的安全性。与假手术组比较, 模型组大鼠机械痛阈值和热痛阈值显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001), 关节软骨表面破坏、潮线不完整, 软骨下骨丢失且骨小梁分布紊乱; 血清中 MMP13 水平显著升高 ($P<0.001$), Col II 水平显著降低 ($P<0.001$); 膝关节组织中 Ihh、Gli、Ptch1、MMP13 的蛋白和基因表达均显著上调 ($P<0.001$), 提示 Ihh-Gli 通路在 KOA 状态下异常激活。与模型组比较, 乌头碱配伍芍药苷能提高大鼠机械痛阈值和热痛阈值 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 修复软骨基质, 改善骨微结构, 血清中 MMP13 升高、Col II 水平降低 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 膝关节组织中 Ihh、Gli、Ptch1、MMP13 的蛋白和基因表达均显著下调 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。分子对接结果显示, 乌头碱、芍药苷与 Ihh、Gli、含凝血酶敏感蛋白基序的整合素金属蛋白酶 5 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5, ADAMTS5)、MMP13 的结合能均 ≤ -5 kcal/mol, 表明乌头碱、芍药苷与 Ihh-Gli 通路关键靶点具有较强的结合能力。结论 乌头碱配伍芍药苷可通过抑制 Ihh-Gli 信号通路异常激活, 下调 MMP13 表达并上调 Col II 表达, 抑制软骨基质降解, 改善 KOA 大鼠关节功能与软骨病理损伤, 且具有良好的安全性, 为乌头汤核心药对治疗寒湿痹阻型 KOA 提供了实验依据。

关键词: 膝骨关节炎; 乌头碱; 芍药苷; 乌头汤; Ihh-Gli 信号通路; 软骨基质降解

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)16-6411-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.16.016

Mechanism of aconitine combined with paeoniflorin against knee osteoarthritis based on Ihh-Gli signaling pathway

YU Yueyue^{1,2}, ZHAO Heli², WANG Yiran², CHENG Hangjie², MENG Zihan², ZHANG Xu², LI Ji'an^{2,3}, ZHANG Yixin¹

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

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

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

收稿日期: 2026-06-15

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。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, 从事中西医结合防治骨性关节炎的机制研究。E-mail: JianLi@ncst.edu.cn

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effect and molecular mechanism of aconitine combined with paeoniflorin on knee osteoarthritis (KOA) based on Indian hedgehog (Ihh)-glioma-associated oncogene homolog (Gli) signaling pathway, as well as to evaluate the safety of this combined administration. **Methods** Anterior cruciate ligament transection was performed to establish a rat KOA model. Sham group, model group, celecoxib (24 mg/kg) group, and aconitine-paeoniflorin low- (5 + 50 μ g/kg), medium- (10 + 100 μ g/kg), and high- (20 + 200 μ g/kg) dose groups were set up, with 10 rats in each group. Behavioral tests were conducted to assess analgesic efficacy. Hematoxylin-eosin (HE) staining and micro-computed tomography (Micro-CT) were used to observe morphological changes of articular cartilage and bone microarchitecture. ELISA was used to detect levels of matrix metalloproteinase 13 (MMP13) and type II collagen (Col II) in serum. Immunofluorescence staining and qRT-PCR were applied to determine the protein and gene expressions of Ihh, Gli, patched 1 (Ptch1) and MMP13 in knee joint tissues. Molecular docking was performed to verify the binding affinity between aconitine, paeoniflorin and core targets of Ihh-Gli signaling pathway. Activity of aspartate aminotransferase and levels creatinine, blood urea nitrogen, urinary protein in serum were detected, and morphological analysis on heart, liver and kidney tissues of rats in each group were observed by HE staining to evaluate the safety of aconitine combined with paeoniflorin. **Results** During the administration period, no death or toxic symptoms were observed of rats in each group. There were no significant abnormalities in serum liver and kidney function indicators, as well as in the morphology of heart, liver and kidney tissues, indicating that the combination of aconitine and paeoniflorin had good safety. Compared with sham group, the mechanical pain threshold and thermal pain threshold of rats in model group were significantly reduced ($P < 0.01$, 0.001), the articular cartilage surface was damaged, the tidemark was incomplete, the subchondral bone was lost, and the distribution of bone trabeculae was disordered. The level of MMP13 in serum was significantly increased ($P < 0.001$), while the level of Col II was significantly decreased ($P < 0.001$). The protein and gene expressions of Ihh, Gli, Ptch1 and MMP13 in knee joint tissue were significantly upregulated ($P < 0.001$), indicating abnormal activation of Ihh-Gli pathway in KOA state. Compared with model group, the combination of aconitine and paeoniflorin could increase the mechanical pain threshold and thermal pain threshold of rats ($P < 0.05$, 0.01, 0.001), repair cartilage matrix, improve bone microstructure, increase MMP13 level and decrease Col II level in serum ($P < 0.05$, 0.01, 0.001), and significantly downregulate the protein and gene expressions of Ihh, Gli, Ptch1 and MMP13 in knee joint tissue ($P < 0.05$, 0.01, 0.001). The molecular docking results showed that the binding energies of aconitine and paeoniflorin to Ihh, Gli, a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs 5 (ADAMTS5) and MMP13 were all ≤ -5 kcal/mol, indicating that aconitine and paeoniflorin have strong binding abilities to key targets of Ihh-Gli pathway. **Conclusion** The combination of aconitine and paeoniflorin can inhibit abnormal activation of Ihh-Gli signaling pathway, downregulate MMP13 expression and upregulate Col II expression, inhibit cartilage matrix degradation, improve joint function and cartilage pathological damage in KOA rats, and has a good safety, providing experimental evidence for the treatment of cold dampness obstruction type KOA with the herb pair of Wutou Decoction.

Key words: knee osteoarthritis; aconitine; paeoniflorin; Wutou Decoction; Ihh-Gli signaling pathway; degradation of cartilage matrix

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是一种临床常见的慢性退行性骨关节疾病, 以关节软骨退变、骨质增生以及慢性炎症为主要病理特征^[1]。研究显示, 2013—2023 年我国 KOA 的总体患病率为 28.0%, 女性患病率高于男性^[2]。全球疾病负担数据表明, KOA 的患病率、发病率及伤残调整寿命年在中国及全球均呈上升趋势^[3]。西医临床治疗多采用非甾体抗炎药治疗 KOA, 塞来昔布作为选择性环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 抑制剂, 可快速缓解炎症与疼痛症状, 但无法调控软骨基质代谢, 不具备修复受损关节软骨的作用, 且长期服用存在心血管、胃肠道等不良反应, 难以延缓 KOA 软骨损伤, 存在明显治疗局限^[4]。在中医理论体系中, KOA 的发病机制主要归结为风寒湿邪痹阻经络, 气血阻滞不通、筋骨失于濡养, 日久痰瘀互结、虚实

夹杂而发骨痹^[5]。

张仲景在《金匱要略》中记载的乌头汤以川乌、白芍配伍, 秉持“温阳散寒、养血柔肝”的组方原则, 历经千年临床实践的检验, 已成为治疗寒湿痹阻型 KOA 的经典方剂。课题组前期研究证实乌头汤可抑制印度刺猬因子 (Indian hedgehog, Ihh)-胶质瘤相关癌基因同源物 (glioma-associated oncogene homolog, Gli) 信号通路活化从而减轻大鼠 KOA 软骨损伤, 但全方成分复杂, 无法明确川乌-白芍核心药对是全方起效的关键物质基础, 亦未区分乌头碱、芍药苷单体各自及配伍协同效应, 无法阐释“川乌配白芍”相须、相制配伍的科学机制^[6]。目前, 针对单味药的研究已有一定成果。对于川乌, 已有研究聚焦于其活性成分乌头碱的药理作用, 发现乌头碱在抗炎、镇痛等方面具有一定活性, 但单独使用

可能存在毒性等问题^[7]。对于白芍，其标志性成分芍药苷也被广泛研究，其具有抗炎、免疫调节等多种生物活性^[8]。现代药理学研究进一步证实，川乌主要活性成分乌头碱与白芍标志性成分芍药苷配伍，可通过多靶点协同作用发挥抗炎镇痛效应^[9]，为从物质基础层面研究 KOA 治疗提供了新的视角。

作为 Hedgehog 蛋白家族成员，Ihh 由肥大前软骨细胞、成骨细胞分泌，能够调控软骨增殖、分化、成骨与破骨平衡，其生物学效应主要通过 Gli 通路并与甲状旁腺激素相关蛋白（parathyroid hormone-related protein, PTHrP）形成负反馈环路共同实现^[10]。Ihh 通路和低氧诱导因子-2 α （hypoxia-inducible factor-2 α , HIF-2 α ）存在交互作用并参与软骨退变。炎症状态下，Ihh 可通过激活 Gli 通路，阻碍 HIF-2 α 降解，进而上调 HIF-2 α 及其下游靶分子的表达，HIF-2 α 的累积又会进一步促进 Ihh-Gli 信号上调，形成相互调控的环路^[11]。KOA 发病过程中，Ihh 通路异常激活，Gli 入核促进 Runt 相关转录因子 2（Runt-related transcription factor 2, Runx2）表达。Runx2 作为关键转录因子，能够诱导基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinases, MMPs）大量合成，进而降解软骨细胞外基质，破坏软骨正常结构^[12-14]。目前，该通路在软骨代谢中的完整作用机制仍有待深入探索，但其在关节病变中的核心作用已得到学界普遍认可。本研究聚焦乌头汤核心活性单体乌头碱、芍药苷，单独探究二者配伍的协同药效、减毒机制及靶向 Ihh-Gli 通路的分子靶点，进一步完善乌头汤治疗寒湿痹阻型 KOA 的物质基础与分子机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只，8 周龄，体质量（200 $\pm$ 10）g，购自斯贝福（北京）生物技术有限公司，生产许可证号 SCXK（京）2024-0001，动物使用许可证号 SYXK（冀）2023-018。动物饲养于华北理工大学动物实验中心洁净实验室，饲养环境恒温 25℃，相对湿度（50 $\pm$ 10）%，室内换气次数不低于 15 次/h，采用 12 h 光照、12 h 黑暗的昼夜节律，自由摄食与饮水。动物实验经华北理工大学动物伦理委员会批准（批准号 2023-SY-207）。

1.2 药品与试剂

乌头碱（质量分数 $\geq$ 98%，批号 20240122）、芍药苷（质量分数 $\geq$ 98%，批号 20240318）购自宝药

市辰光生物科技有限公司；塞来昔布（批号 20240512）购自美国辉瑞公司；戊巴比妥钠（批号 20231228）购自美国 Sigma-Aldrich 公司；EDTA 脱钙液（批号 20230518）购自北京索莱宝科技有限公司；苏木素-伊红（hematoxylin-eosin, HE）染液（批号 C220604）购自珠海贝索生物技术有限公司；TRIzol 试剂（批号 20240311）购自美国 Invitrogen 生命技术公司；cDNA 合成试剂盒（批号 20240423）购自美国 Invitrogen 生命技术公司；qRT-PCR 主混合物（批号 20240123）购自德国 Qiagen 公司；天冬氨酸氨基转移酶（aspartate aminotransferase, AST）试剂盒（批号 20230803）、肌酐（creatinine, Cr）试剂盒（批号 20230813）、血尿素氮（blood urea nitrogen, BUN）试剂盒（批号 20230815）、尿蛋白试剂盒（批号 20230819）、MMP13 ELISA 试剂盒（批号 20231101）、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；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）、MMP13 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）购自武汉三鹰生物技术有限公司；荧光二抗（批号 20221202）购自英国 Abcam 公司。

1.3 仪器

R2M8 型机械痛阈测试平台（上海玉研科学仪器有限公司）；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）；Skyscan-1176 型动物活体成像（德国布鲁克公司）；SkyScan-1.6 型 NRecon 重建软件（德国布鲁克公司）；PANalytica 型 X 射线管（英国马尔文帕纳科有限公司）；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）；Roche480II 型实时 PCR 系统（瑞士罗氏公司）

2 方法

2.1 乌头碱-芍药苷溶液的配制

2.1.1 乌头碱原液配制 称取乌头碱 24 mg 溶于 6 mL 二甲亚砜中，制成质量浓度为 4 mg/mL 的乌头碱原液，分装保存备用。

2.1.2 乌头碱-芍药苷低剂量组给药溶液的配制 取 0.025 mL 乌头碱原液，加 1 mg 芍药苷，溶于 20

mL 纯净水中, 即得。

2.1.3 乌头碱-芍药苷中剂量组给药溶液的配制 取 0.050 mL 乌头碱原液, 加 2 mg 芍药苷, 溶于 20 mL 纯净水中, 即得。

2.1.4 乌头碱-芍药苷高剂量组给药溶液的配制 取 0.100 mL 乌头碱原液, 加 4 mg 芍药苷, 溶于 20 mL 纯净水中, 即得。

2.2 动物分组、造模与给药

将 60 只大鼠随机分为假手术组、模型组、塞来昔布 (24 mg/kg) 组和乌头碱-芍药苷低、中、高剂量组, 每组 10 只。乌头碱半数致死量 (median lethal dose, LD₅₀) 为 3.17 mg/kg, 根据药效学实验的剂量 ≤ 毒理学实验剂量, 本研究用乌头碱的给药剂量为 5、10、20 μg/kg, 分别取自 1/10、1/20、1/30 倍的 LD₅₀ 作为药效学实验的高、中、低剂量组^[15], 按照川乌与白芍在乌头汤中的原药比例折算, 乌头碱与芍药苷的用药比例在大鼠体内为 1:10^[16], 因此芍药苷的给药剂量为 50、100、200 μg/kg。

大鼠适应性饲养 1 周后, 除假手术组外, 其余大鼠进行前交叉韧带横断手术。大鼠 ip 戊巴比妥钠溶液 (30 mg/kg) 麻醉, 用电动剃须刀去除膝盖区域的毛发, 并用聚维酮碘溶液和 75%乙醇对手术部位进行消毒。在膝关节内侧开 1 个 3 cm 的纵向切口, 沿髌韧带开 1 个小孔, 在膝盖弯曲的状态下切断前交叉韧带, 使用可吸收缝线分 2 层缝合手术切口。假手术组仅进行模拟手术, 不切断前交叉韧带。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。造模成功后, 各给药组 ig 相应药物, 假手术组和模型组 ig 等体积的生理盐水, 1 次/d, 连续给药 8 周。

2.3 安全性评价

给药结束后, 麻醉大鼠, 通过腹主动脉采血, 离心分离血清, 按照试剂盒说明书检测血清中 AST 活性及 Cr、BUN、尿蛋白水平。各组随机取 3 只大鼠的心、肝、肾, 置于多聚甲醛溶液中固定 48 h, 采用 HE 染色法对各组大鼠心脏、肝脏及肾脏组织进行形态学分析, 以评价乌头碱配伍芍药苷的药物安全性。

2.4 机械和热痛觉过敏的镇痛作用评价

2.4.1 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 2 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。

2.4.2 热痛阈值测定 采用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。

2.5 HE 染色观察膝关节的形态学变化

取各组大鼠膝关节, 用 4%多聚甲醛固定 48 h, 并用 EDTA 脱钙液脱钙 1 个月。经脱水、石蜡包埋后切成厚度为 4 μm 的薄片, 进行常规 HE 染色, 于显微镜下观察并拍照。

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

取各组大鼠完整的右膝关节, 送至上海市第六人民医院进行 Micro-CT 检查。取分离后的大鼠胫骨标本, 采用 Skyscan 1176 型显微 CT 开展扫描成像, 设备搭载 PANalytical 微焦点 X 射线管, 扫描参数设置: 体素尺寸 17.93 μm、电压 90 kV、电流 278 μA、旋转步长 0.5°、总扫描角度 180°。扫描原始数据采用 SkyScan NRecon 重建软件 (1.6 版) 完成三维图像重建; 重建完成后借助 Dataview 软件划定感兴趣区域, 选取胫骨远端 1~4 mm、生长板包绕的全部松质骨 (软骨下骨区域) 用于后续骨微结构分析。通过 CTan 软件在感兴趣区域内测量骨密度, 并进行统计学分析。

2.7 分子对接验证乌头碱配伍芍药苷与 Ihh-Gli 信号通路相互作用的机制

利用分子对接技术预测乌头碱配伍芍药苷与 Ihh-Gli 信号通路 [关键靶点为 Ihh、Gli、含凝血酶敏感蛋白基序的解整合素金属蛋白酶 5 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5, ADAMTS5)、MMP13] 之间的结合活性。从 TCMSP 数据库 (<https://old.tcm-sp-e.com/tcm-sp.php>) 中检索成分的结构式, 保存为 Mol 2 文件。从蛋白质数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 中收集中心靶标构象, 筛选条件: (1) 用 X 射线晶体衍射法测定蛋白质结构; (2) 蛋白质晶体分辨率 > 3; (3) 优先选择具有独特配体的蛋白质结构; (4) 作为生物体的智人。收集蛋白质受体和配体的结构, 使用 AutoDockTools 1.5.6 软件进行分子对接, 使用 PyMol 2.3.2 软件可视化对接结果 (<https://pymol.org/2/>)。

2.8 ELISA 检测血清中 MMP13 和 Col II 水平

取各组大鼠血清,按照试剂盒说明书检测血清中 MMP13 和 Col II 水平。

2.9 免疫荧光法检测膝关节 Ihh-Gli 信号通路相关蛋白的表达

取固定且脱钙后的膝关节组织切片, PBS 洗涤 3 次后,以 0.3% Triton X-100 室温通透 15 min, PBS 洗涤 3 次。随后以 5% 牛血清白蛋白于室温封闭 1 h, 弃去封闭液, 加入一抗, 4 °C 孵育过夜。PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 加入荧光二抗, 室温避光孵育 1 h。PBS 洗涤 3 次, 滴加 DAPI 染核 5 min, PBS 洗涤后, 滴加抗荧光淬灭封片剂, 盖片后于激光共聚焦显微镜下采集图像, 利用 Image J 软件对荧光强度进行半定量分析。

2.10 qRT-PCR 检测膝关节 Ihh-Gli 信号通路相关基因的表达

取各组大鼠膝关节,按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1, 将 β -actin 作为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。

2.11 统计学分析

采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对于计量资料, 多组数据比较采用方差

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

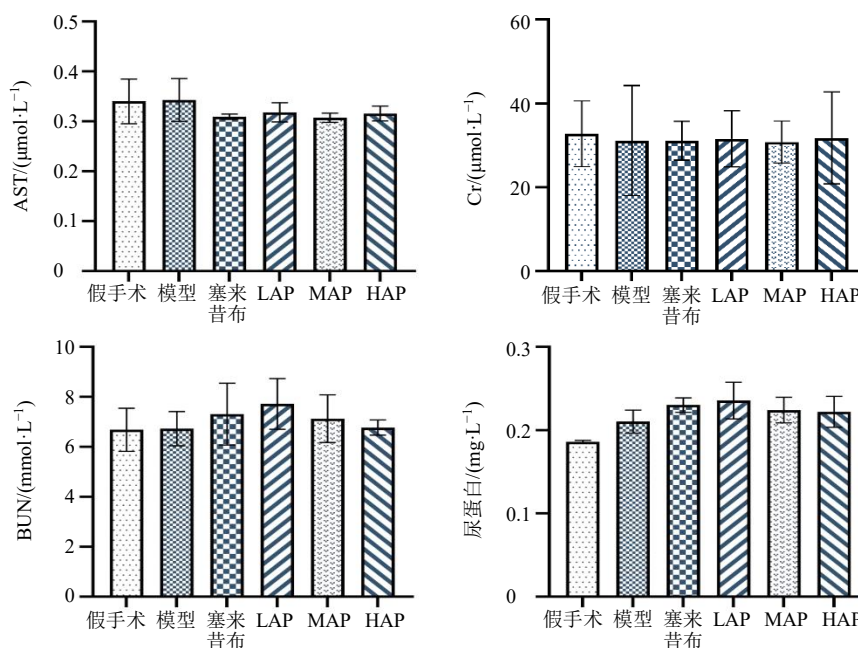
基因	引物序列 (5'-3')
β -actin	F: CTAAGGCCAACCGTGAAAAG R: TACATGGCTGGGGTGTGTA
Ihh	F: AGGACCGTCTGAACTCACTG R: CTTATTTTCGGTCGCGGTCTG
Ptch1	F: CCAGCTACTGCCAGCCTATC R: AACACCCCGTGATCAGTCTC
Gli	F: CAGCTCAAAGCTCAGCTCCT R: CTTGGGGCTCTGATATGGAA
MMP13	F: GAGGTGAAAAGGCTCAGTGC R: ATGAGGCGGGGATAGTCTTT

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 检验。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 乌头碱配伍芍药苷的安全性评价

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。结果显示, 各组大鼠在实验期间未发生死亡, 且未观察到任何明显中毒症状, 饮食和饮水消耗量亦保持稳定。如图 1 所示, 各组大鼠血清中 AST 活性及 Cr、BUN、尿蛋白水平无统计学差异, 表明乌



LAP-乌头碱-芍药苷低剂量组, MAP-乌头碱-芍药苷中剂量组, HAP-乌头碱-芍药苷高剂量组, 下图同。

LAP-aconitine-paeoniflorin low-dose group, MAP-aconitine-paeoniflorin medium-dose group, HAP-aconitine-paeoniflorin high-dose group, same as below figures.

图 1 各组大鼠血清中 AST 活性及 Cr、BUN、尿蛋白水平 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 AST activity and levels of Cr, BUN and urinary protein in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

头碱配伍芍药苷未对大鼠肝、肾功能产生影响。各组大鼠心脏、肝脏及肾脏组织的 HE 染色结果 (图 2) 显示, 各组大鼠心肌纤维排列整齐, 横纹清晰可见, 细胞核呈椭圆形且位于细胞中央; 肝小叶结构完整, 肝细胞索排列规则; 肾小球结构清晰, 毛细血管袢开放良好, 肾小管上皮细胞排列紧密, 管腔规整。各组大鼠心、肝、肾组织形态学特征无显著差异, 均未出现中毒性病理改变。以上结果表明, 在本研究采用的剂量和给药周期下, 乌头碱配伍芍药苷具有较好的安全性。

3.2 乌头碱配伍芍药苷对 KOA 大鼠行为学的影响

如图 3 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠机械痛阈值和热痛阈值均明显降低 ($P < 0.01$ 、 0.001), 表明 KOA 模型成功建立; 与模型组比较, 各给药组大鼠机械痛阈值和热痛阈值均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 表明乌头碱配伍芍药苷能提高 KOA 大鼠的镇痛能力。

3.3 乌头碱配伍芍药苷对 KOA 大鼠膝关节形态的影响

如图 4 所示, 假手术组大鼠膝关节表面光滑, 结构清晰, 可见滑动层、过渡层、辐射层和钙化层的边界, 潮线完整。模型组大鼠关节软骨膜浅层破坏, 有缺损和裂纹, 关节各结构层边界不清晰, 部分区域潮线空洞、不完整。与模型组比较, 各给药

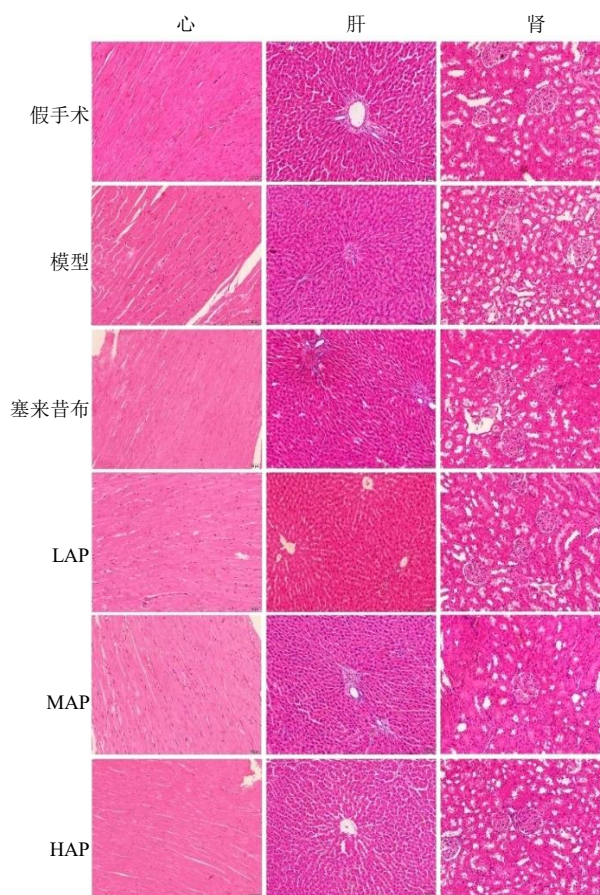
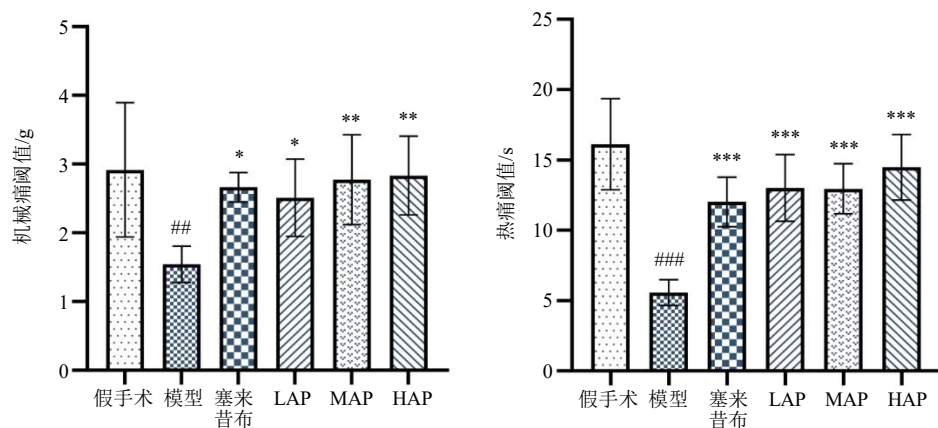


图 2 各组大鼠心、肝、肾组织形态学观察 (HE, $\times 20$)

Fig. 2 Morphological observation of heart, liver and kidney tissues of rats in each group (HE, $\times 20$)



与假手术组比较: $##P < 0.01$ $###P < 0.001$ 。与模型组比较: $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ $***P < 0.001$, 下图同。
 $##P < 0.01$ $###P < 0.001$ vs sham group; $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ $***P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

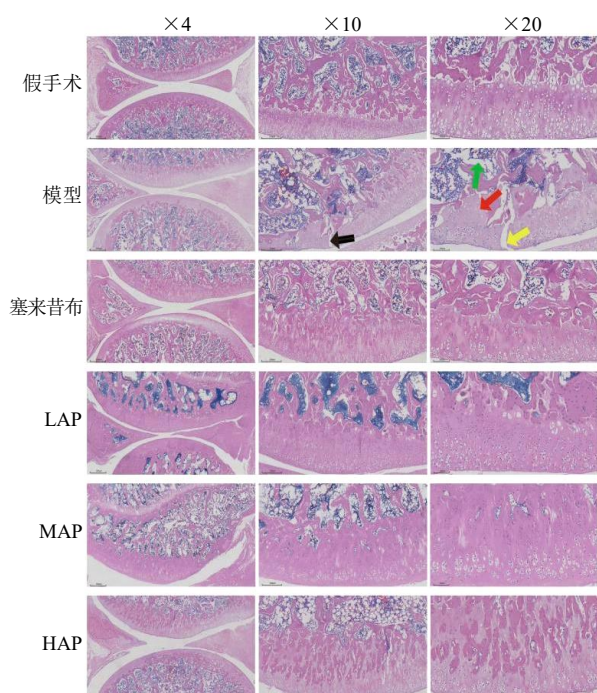
图 3 各组大鼠机械痛阈值和热痛阈值比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

Fig. 3 Comparison of mechanical pain threshold and thermal pain threshold of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

组大鼠软骨关节表面的磨损明显减少, 软骨表面以下的扁平细胞增加, 软骨基质部分修复, 潮线完整。表明乌头碱配伍芍药苷可修复 KOA 大鼠关节软骨基质, 改善关节软骨表面。

3.4 乌头碱配伍芍药苷对 KOA 大鼠骨微结构的影响

Micro-CT 结果如图 5 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠软骨下可见大量骨丢失和分布不均的



黑色箭头表示关节软骨表层糜烂缺损, 绿色箭头表示软骨纵深撕裂裂隙, 红色箭头表示软骨细胞大量丢失、基质纤维化变薄, 黄色箭头表示潮线扭曲断裂、钙化软骨侵蚀伴软骨下骨裸露。

Black arrow indicates erosion and defects in superficial layer of articular cartilage, green arrow shows deep cartilage tears, red arrow indicates significant loss of chondrocytes and fibrosis-thinning of matrix, and yellow arrows indicate distortion and disruption of tidemark, erosion of calcified cartilage, and exposure of subchondral bone.

图 4 各组大鼠膝关节软骨 HE 染色

Fig. 4 HE staining of knee articular cartilage in rats of each group

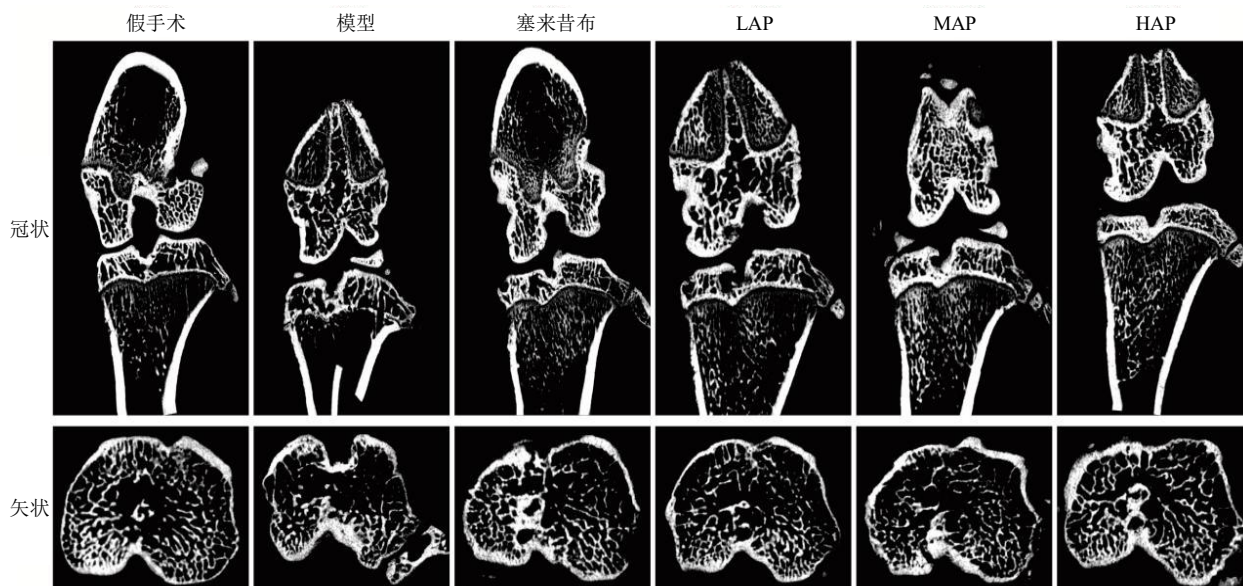


图 5 各组大鼠膝关节骨微结构变化

Fig. 5 Changes in bone microstructure of knee joints of rats in each group

骨增生, 失去了正常的骨结构。与模型组比较, 给予药物干预后, 骨小梁分布均匀, 紧密相连, 软骨下骨增生得到改善。如图 6 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠骨密度显著降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠骨密度显著升高 ($P<0.001$)。

3.5 分子对接结果

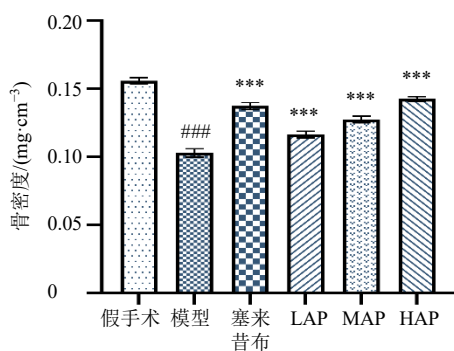
通过分子对接实验预测乌头碱、芍药苷与 Ihh-Gli 信号通路相关蛋白 (Ihh、Gli、ADAMTS5、MMP13) 的结合亲和力。对接示意图见图 7, 对接结合能见表 2, 结果显示, 乌头碱、芍药苷与 Ihh-Gli 信号通路相关蛋白的结合能均 ≤ -5 kcal/mol (1 kcal/mol = 4.182 kJ/mol), 表明乌头碱、芍药苷与 Ihh-Gli 信号通路靶点蛋白具有良好的结合能力, 乌头碱配伍芍药苷可能通过 Ihh-Gli 信号通路发挥对 KOA 的治疗作用。

3.6 乌头碱配伍芍药苷对 KOA 大鼠血清中 MMP13 和 Col II 水平的影响

如图 8 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠血清中 MMP13 水平明显升高 ($P<0.001$), Col II 水平显著降低 ($P<0.001$); 与模型组比较, 各给药组大鼠血清中 MMP13 水平显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001), 血清中 Col II 水平显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。

3.7 乌头碱配伍芍药苷对 KOA 大鼠膝关节 Ihh-Gli 信号通路相关蛋白表达的影响

如图 9 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠膝

图6 各组大鼠膝关节骨密度比较 ($\bar{x} \pm s, n=5$)Fig. 6 Comparison of bone mineral density of knee joint in rats of each group ($\bar{x} \pm s, n=5$)

关节组织中 Ihh、Gli、Ptch1 和 MMP13 的荧光表达均显著升高 ($P<0.001$), 提示 Ihh-Gli 信号通路在 KOA 状态下处于异常激活状态, 且下游效应分子 MMP13 的表达与 Ihh-Gli 信号通路的激活呈一致性改变。与模型组比较, 各给药组大鼠膝关节组织中 Gli、Ptch1 和 MMP13 的荧光表达均显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 塞来昔布组和乌头碱-芍药苷低、高剂量组大鼠膝关节组织中 Ihh 的荧光表达显著降低 ($P<0.001$), 表明乌头碱配伍芍药苷可通过抑制 Ihh-Gli 信号通路的异常激活, 减少 MMP13 的表达, 从而减轻软骨基质降解, 发挥对 KOA 的保护作用。

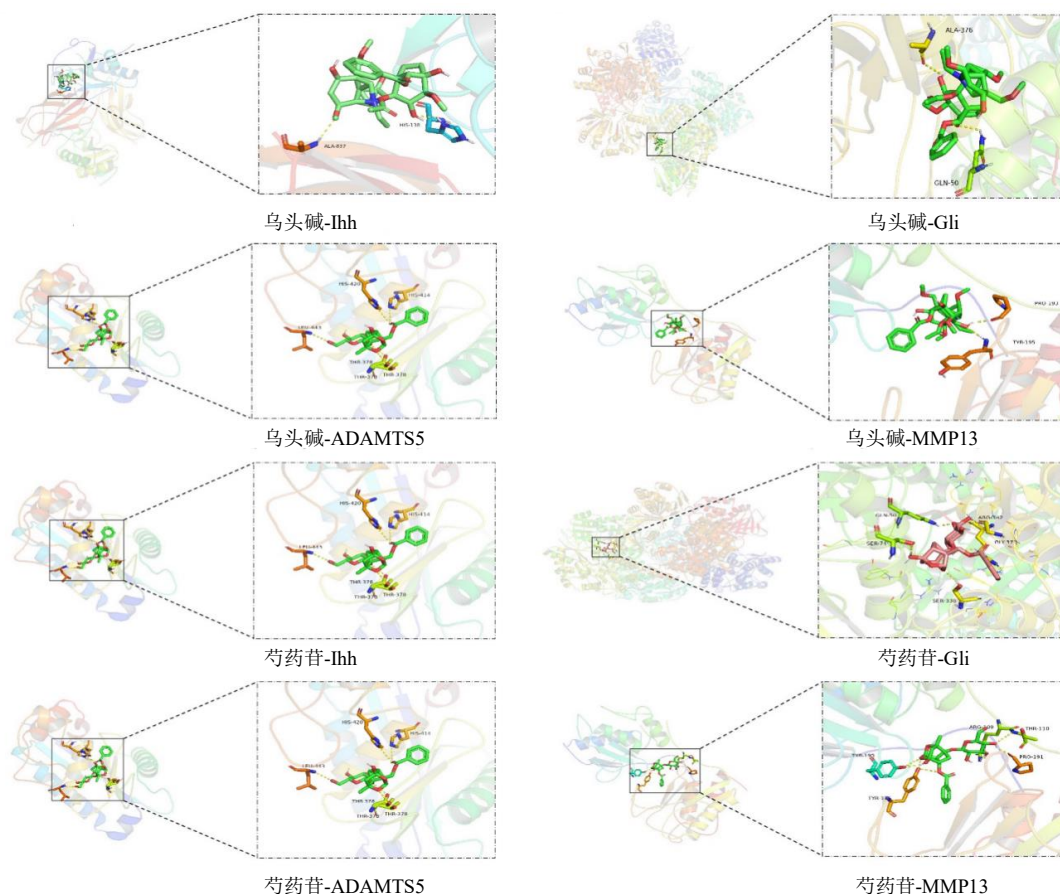


图7 乌头碱、芍药苷与 Ihh-Gli 信号通路相关蛋白的分子对接示意图

Fig. 7 Molecular docking schematic diagram of aconitine and paeoniflorin with Ihh-Gli signaling pathway related proteins

表2 乌头碱、芍药苷与 Ihh-Gli 信号通路相关蛋白的分子对接结果

Table 2 Molecular docking results of aconitine and paeoniflorin with Ihh-Gli signaling pathway related proteins

蛋白	PDB ID	化合物	结合能/(kcal·mol ⁻¹)	蛋白	PDB ID	化合物	结合能/(kcal·mol ⁻¹)
Ihh	3N1F	乌头碱	-6.6	ADAMTS5	3LJT	乌头碱	-7.3
		芍药苷	-8.0			芍药苷	-9.1
Gli	4BLB	乌头碱	-8.2	MMP13	7JU8	乌头碱	-7.7
		芍药苷	-9.0			芍药苷	-9.1

1 kcal·mol⁻¹ = 4.182 kJ·mol⁻¹.

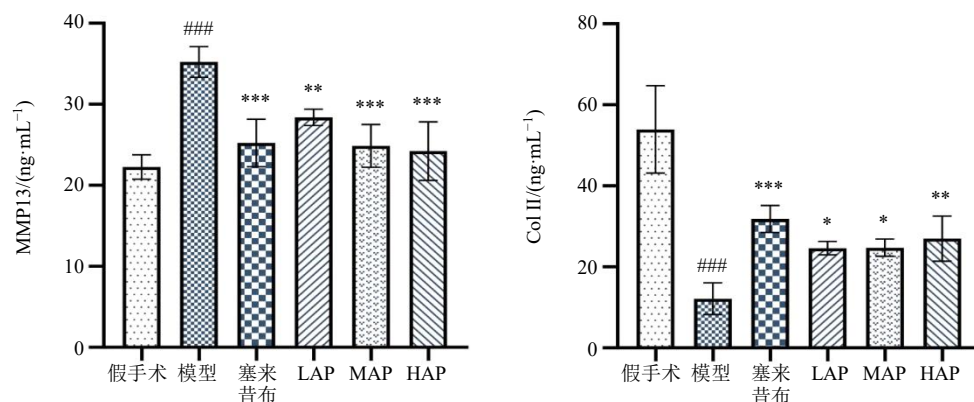


图 8 各组大鼠血清中 MMP13 和 Col II 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 8 Levels of MMP13 and Col II in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

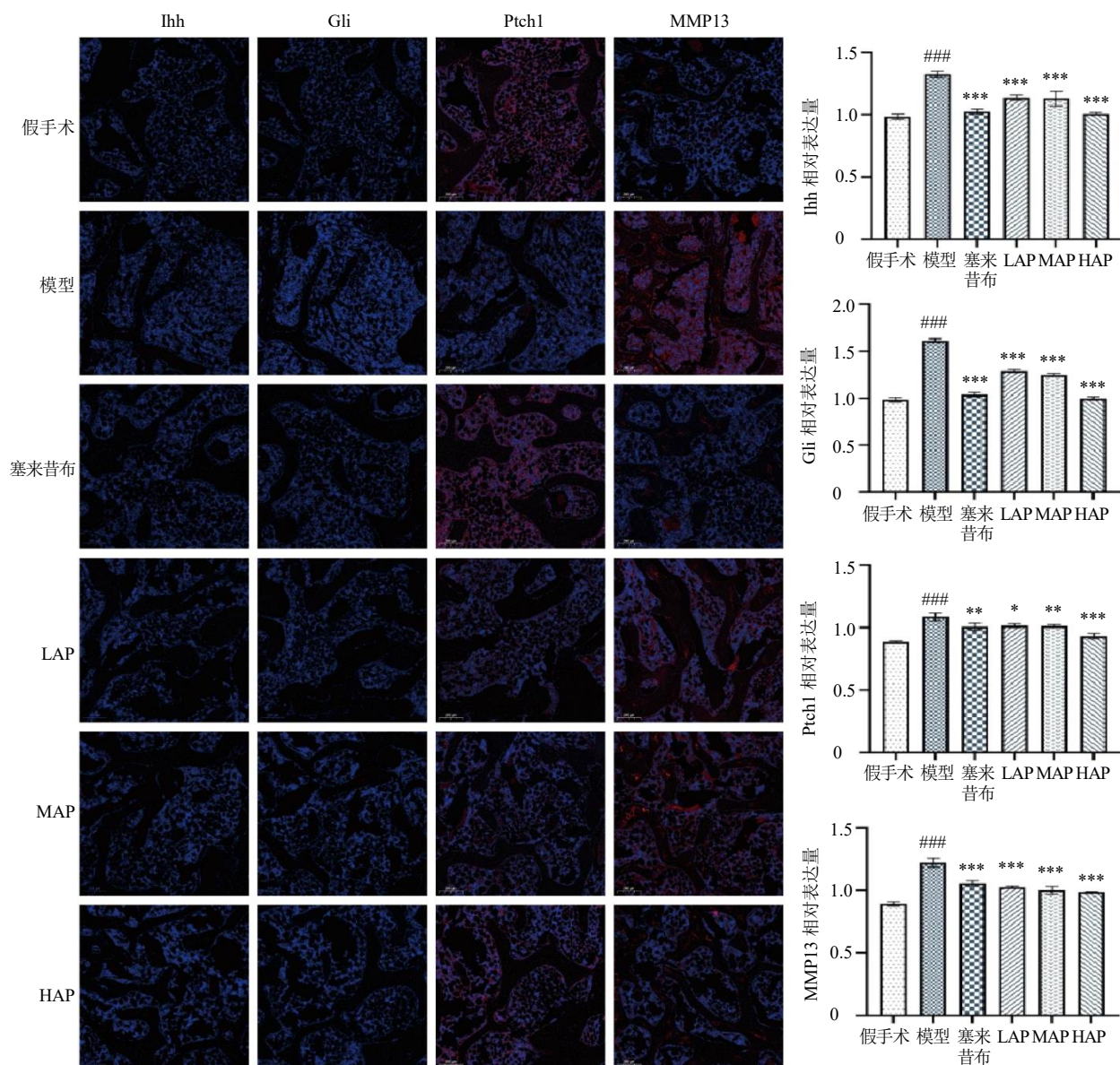


图 9 各组大鼠膝关节 Ihh-Gli 信号通路相关蛋白表达 ($\times 200; \bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Expressions of Ihh-Gli signaling pathway related proteins in knee joints of rats in each group ($\times 200; \bar{x} \pm s, n = 3$)

3.8 乌头碱配伍芍药苷对 KOA 大鼠膝关节 Ihh-Gli 信号通路相关基因表达的影响

qRT-PCR 结果 (图 10) 与免疫荧光结果一致, 与假手术组比较, 模型组大鼠膝关节组织中 *Ihh*、

Gli、*Ptch1* 和 *MMP13* 的 mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.001$); 与模型组比较, 各给药组大鼠膝关节组织中 *Ihh*、*Gli*、*Ptch1* 和 *MMP13* 的 mRNA 表达水平均显著降低 ($P<0.001$)。

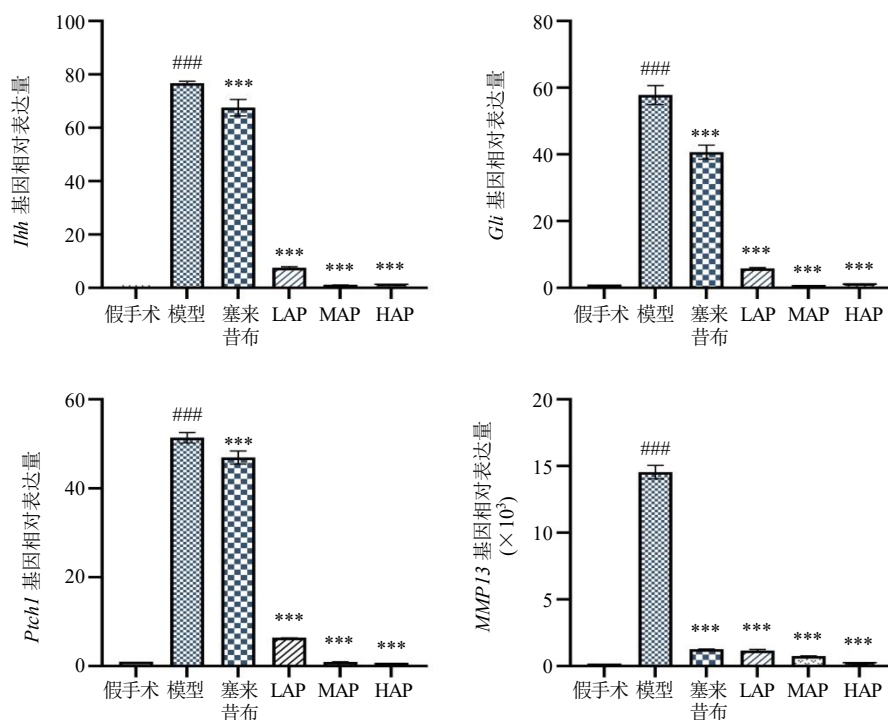


图 10 各组大鼠膝关节 Ihh-Gli 信号通路相关基因表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 10 Expressions of Ihh-Gli signaling pathway related genes in knee joints of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

KOA 是中老年高发的慢性退行性骨关节病, 具有病程长、致残率高的特点, 严重影响患者生活质量。现代医学以对症抗炎、止痛治疗为主, 仅能缓解临床症状, 无法阻断软骨退行性病变, 长期用药存在不良反应, 临床应用存在明显局限。中医药治疗 KOA 秉持整体辨证理念, 具备多靶点、低不良反应、长效干预优势。乌头汤出自《金匮要略》, 是治疗寒湿痹阻型 KOA 的经典方剂, 川乌-白芍为其核心药对, 但二者活性成分协同治疗 KOA 的物质基础与分子机制尚未明确, 制约了方剂的现代化临床转化。基于此, 本研究以乌头汤核心活性单体乌头碱、芍药苷为研究对象, 构建大鼠 KOA 模型, 从行为学、骨微结构、组织病理及分子层面系统验证二者配伍的干预效应, 聚焦 Ihh-Gli 信号通路阐释其软骨保护机制, 为中药药对减毒增效理论及 KOA 靶向治疗提供实验支撑。

关节软骨基质代谢失衡是 KOA 发病的核心病理机制。在外伤、炎症、衰老等诱因作用下, 机体

大量释放白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等促炎因子, 促进一氧化氮异常分泌, 诱发软骨细胞损伤、凋亡, 导致软骨基质降解加剧, 最终出现软骨磨损、纤维化及软骨下骨异常重塑, 推动 KOA 持续进展^[17]。Col II 是维持软骨结构完整与弹性的核心基质蛋白, 其表达降低是软骨退变的标志性特征; MMP13 可特异性降解 Col II, 是介导软骨基质流失、加重关节退变的关键效应酶。本研究结果表明, 乌头碱-芍药苷配伍可显著降低 KOA 大鼠血清 MMP13 水平, 升高 Col II 水平, 有效纠正软骨基质分解与合成失衡, 发挥显著的软骨保护作用。

Ihh-Gli 信号通路是调控软骨细胞肥大分化、基质代谢的关键通路, 其异常过度活化是 KOA 进展的重要分子机制^[18-20]。Ihh 结合细胞膜受体 Ptch1 后, 可解除其对下游平滑蛋白 (smoothened, SMO) 的抑制作用, 激活 Gli 家族转录因子, 上调 RUNX-2、ADAMTS5、MMP13 等靶基因表达, 介导软骨细胞异常肥大与基质降解^[21-22]。本课题组前期已证实

乌头汤可抑制 Ihh-Gli 通路过度激活、减轻软骨损伤,但复方成分复杂,无法明确核心起效物质。本研究通过单体配伍干预验证,乌头碱联合芍药苷可显著抑制 KOA 大鼠关节组织 Ihh、Ptch1、Gli1 及 MMP13 的基因与蛋白异常表达,有效阻断通路介导的软骨退变级联反应。分子对接结果进一步证实,乌头碱、芍药苷可与通路关键蛋白稳定结合,明确了该药对靶向调控 Ihh-Gli 通路、延缓 KOA 软骨退变的核心作用机制。

乌头碱-芍药苷配伍充分体现中医“温阳散寒、养血柔筋、相制为用”的组方特色。乌头碱抗炎镇痛活性显著,可靶向改善寒湿痹阻型 KOA 关节冷痛、僵硬症状,但药性燥烈、安全窗口狭窄,高剂量应用存在神经、心脏毒性风险^[23-24]。芍药苷具有抗炎、抗氧化、稳定细胞稳态的作用,既可养血柔筋、辅助增效,又可拮抗乌头碱毒性,实现典型的减毒增效配伍效应^[25-27]。本研究安全性评价结果证实,配伍用药对大鼠心、肝、肾功能无明显损伤,用药安全性显著优于乌头碱单药。相较于塞来昔布仅靶向 COX-2、单纯抗炎止痛、无法修复软骨且长期用药存在心血管风险的局限性,乌头碱-芍药苷配伍可多靶点调控软骨代谢,兼具镇痛抗炎、改善骨微结构、抑制基质退变的多重功效,可从源头延缓 KOA 进展,更适用于寒湿痹阻型 KOA 的长期干预。本研究多维度药效学结果证实了乌头碱-芍药苷配伍的抗 KOA 疗效。行为学结果显示,该配伍可显著提升 KOA 大鼠机械痛与热痛阈值,改善痛觉过敏状态,镇痛效果优于阳性对照药。Micro-CT 及 HE 染色结果表明,乌头碱-芍药苷配伍可有效修复软骨磨损与纤维化损伤,恢复软骨潮线完整性,改善软骨下骨骨小梁稀疏、紊乱、增生等病理改变,优化骨微结构、提升骨密度,其中高剂量配伍的软骨修复效果最为显著,明确了该药对改善 KOA 关节病理损伤、保护骨关节结构的显著药效。

本研究虽阐明了乌头碱-芍药苷配伍治疗 KOA 的核心药效与机制,但仍存在一定局限性。本研究仅通过体内动物实验开展验证,未结合体外软骨细胞实验进行靶向机制佐证,无法区分药物直接保护效应与体内微环境间接调控作用,通路靶向特异性仍需进一步验证。研究仅聚焦 Ihh-Gli 单一通路,未探究该药对与 HIF-2 α 、核因子- κ B、p38 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)等通路的交叉调控机制,多靶点协同作用网络尚未

完全阐明。同时,本研究缺乏药动学数据,无法明确活性成分体内吸收、分布、代谢特征,最优配伍剂量的临床适用性有待验证。此外,本研究采用手术创伤造模,与临床衰老、劳损所致慢性 KOA 病理特征存在差异,且仅选用雄性大鼠,未探讨性别及雌激素对软骨代谢与通路活性的影响。针对上述不足,后续将进一步完善实验体系、深化机制研究。通过构建体外软骨细胞退变模型,结合通路激动剂与抑制剂干预,反向验证药对对 Ihh-Gli 通路的靶向调控作用;同步检测多条通路关键指标,系统解析其多靶点调控网络。开展药动学实验,明确活性成分体内代谢规律,完善量效关系研究。同时增设雌性大鼠组别,分析性别差异对药效及通路表达的影响;结合临床 KOA 患者样本验证通路表达特征,对比乌头汤全方与单体配伍的药效差异,进一步阐释复方增效减毒的科学内涵,为临床精准用药提供依据。

综上,本研究证实乌头碱-芍药苷配伍可通过抑制 Ihh-Gli 信号通路异常活化,下调 MMP13、上调 Col II 表达,纠正软骨基质代谢紊乱,有效改善 KOA 大鼠关节疼痛与骨软骨病理损伤,且二者配伍具备显著的减毒增效优势。本研究明确了乌头汤核心药对治疗寒湿痹阻型 KOA 的物质基础与分子机制,弥补了单一单体研究的不足,为经典中药方剂现代化传承及 KOA 靶向治疗提供了可靠的实验依据与理论参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Li P, Kang Z J, Ma R Q, *et al.* A prospective study on the regulation of osteoarthritis risk through inflammatory pathways in clonal hematopoiesis [J]. *Gero Sci*, 2026, 48(2): 2969-2985.
- [2] Chen X, Shao C L, Li L, *et al.* Prevalence of knee osteoarthritis in the Chinese population, 2013—2023: A systematic review and Meta-analysis [J]. *J Orthop Surg Res*, 2025, 20(1): 916.
- [3] Li M Y, Xia Q L, Nie Q L, *et al.* Burden of knee osteoarthritis in China and globally: 1990—2045 [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2025, 26(1): 582.
- [4] 梅博. 附桂骨痛胶囊联合塞来昔布对老年膝骨关节炎患者膝关节功能及疼痛的影响 [J]. *山西医药杂志*, 2020, 49(3): 269-271.
- [5] 吕世伟, 关雪峰, 杨永菊, 等. 膝骨关节炎之中医病因病机概述 [J]. *中华中医药学刊*, 2024, 42(11): 85-88.
- [6] 虞跃跃, 成杭洁, 孟梓涵, 等. 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 [J]. *中草药*,

- 2026, 57(3): 990-1000.
- [7] Li L Y, Zhang L M, Liao T T, *et al.* Advances on pharmacology and toxicology of aconitine [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2022, 36(4): 601-611.
- [8] Wu Z G, Zhu Y, Yuan R, *et al.* Paeoniflorin modulates DL-glyceraldehyde metabolism to promote mitochondrial dynamics homeostasis and ameliorate knee osteoarthritis cartilage degeneration [J]. *Phytomedicine*, 2026, 156: 158211.
- [9] 段金威, 范欣生, 宿树兰. 方剂类方现代研究 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2021: 1003.
- [10] Alman B A. The role of hedgehog signalling in skeletal health and disease [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2015, 11(9): 552-560.
- [11] 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 Transl*, 2024, 49: 207-217.
- [12] 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.
- [13] 王高峰, 姜成丽, 赵福香. 药理学 [M]. 南京: 东南大学出版社, 2022: 357.
- [14] 张舒涵. 芍药苷减轻乌头碱心脏毒性的机制研究 [D]. 成都: 电子科技大学, 2018.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] Martínez-Moreno D, Jiménez G, Gálvez-Martín P, *et al.* Cartilage biomechanics: A key factor for osteoarthritis regenerative medicine [J]. *Biochim Biophys Acta BBA Mol Basis Dis*, 2019, 1865(6): 1067-1075.
- [18] Woods S, Barter M J, Elliott H R, *et al.* miR-324-5p is up regulated in end-stage osteoarthritis and regulates Indian hedgehog signalling by differing mechanisms in human and mouse [J]. *Matrix Biol*, 2019, 77: 87-100.
- [19] Xiao W F, Li Y S, Deng A, *et al.* Functional role of hedgehog pathway in osteoarthritis [J]. *Cell Biochem Funct*, 2020, 38(2): 122-129.
- [20] Worthley D L, Churchill M, Compton J T, *et al.* Gremlin 1 identifies a skeletal stem cell with bone, cartilage, and reticular stromal potential [J]. *Cell*, 2015, 160(1/2): 269-284.
- [21] Huang J, Zhao L, Chen D. Growth factor signalling in osteoarthritis [J]. *Growth Factors*, 2018, 36(5/6): 187-195.
- [22] Zhao T, Wang X C, Li Z F, *et al.* Yiqi Yangxue Formula inhibits cartilage degeneration in knee osteoarthritis by regulating LncRNA-UFC1/miR-34a/MMP-13 axis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 337: 118930.
- [23] Jiang C, Shen J, Wang C, *et al.* Mechanism of aconitine mediated neuronal apoptosis induced by mitochondrial calcium overload caused by MCU [J]. *Toxicol Lett*, 2023, 384: 86-95.
- [24] Zhang S, Chen S Q, Zhu F Z, *et al.* Rapid determination of five common toxic alkaloids in blood by UPLC-MRM-IDA-EPI: Application to poisoning case [J]. *Leg Med*, 2023, 63: 102267.
- [25] Li H, Jiao Y B, Xie M J. Paeoniflorin ameliorates atherosclerosis by suppressing TLR4-mediated NF- κ B activation [J]. *Inflammation*, 2017, 40(6): 2042-2051.
- [26] Ren S, Wang Y G, Zhang Y Y, *et al.* Paeoniflorin alleviates AngII-induced cardiac hypertrophy in H9c2 cells by regulating oxidative stress and Nrf2 signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 165: 115253.
- [27] Yu X, Chai J H, Kong X W, *et al.* Insight of “Yin-Jing” medical property of *Ligusticum chuanxiong* Hort. via pharmacokinetics and tissue distributions by ultra-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 314: 116569.

[责任编辑 李亚楠]