

淫羊藿苷改善肾虚血瘀型膝骨关节炎大鼠关节炎症的机制研究

许祎萱^{1,2}, 李远栋^{1,2*}, 刘 畅^{1,2}, 马常荣^{1,2}, 张君涛^{1,2}, 刘爱峰^{1,2}

1. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300381

2. 中医国家临床医学研究中心, 天津 300381

摘要: 目的 基于 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)/核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路探讨淫羊藿苷改善肾虚血瘀型膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 大鼠关节炎症的作用及机制。方法 将 60 只雌性 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、阳性对照 (仙灵骨葆胶囊 270 mg/kg) 组和淫羊藿苷低、中、高剂量 (40、100、200 mg/kg) 组, 每组 10 只。除对照组外, 其余各组采用“去卵巢法+氢化可的松联合肾上腺素法+改良 Hulth 法”复合制备肾虚血瘀型 KOA 大鼠模型。造模成功后, 各组连续 ig 给药 4 周。分别于给药 0、1、2、3、4 周检测大鼠关节炎症评分及关节肿胀度; 给药结束后, ELISA 法检测血清中白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和 IL-10 水平, 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察膝关节软骨病理变化, Western blotting 检测软骨组织 TLR4、髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88)、NF- κ B 抑制蛋白 (inhibitor of NF- κ B, I κ B)、p-I κ B、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 蛋白表达。结果 与对照组比较, 模型组大鼠关节炎症评分和关节肿胀度显著升高 ($P < 0.001$), 血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.001$), IL-10 水平显著降低 ($P < 0.001$), 软骨组织病理损伤明显, 软骨组织 TLR4、MyD88、p-I κ B、p-NF- κ B p65 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。与模型组比较, 阳性对照组及淫羊藿苷中、高剂量组上述指标均有不同程度的改善, 淫羊藿苷低剂量组部分指标呈改善趋势。结论 淫羊藿苷可改善肾虚血瘀型 KOA 大鼠关节炎症及软骨损伤, 其机制可能与抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路活化、调控炎症因子网络平衡有关。

关键词: 膝骨关节炎; 淫羊藿苷; 肾虚血瘀; 炎症反应; TLR4/NF- κ B 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2026)17-6859-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.17.017

Mechanism of icariin in ameliorating joint inflammation in rats with kidney deficiency and blood stasis type knee osteoarthritis

XU Yixuan^{1,2}, LI Yuandong^{1,2}, LIU Chang^{1,2}, MA Changrong^{1,2}, ZHANG Juntao^{1,2}, LIU Aifeng^{1,2}

1. First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300381, China

2. National Clinical Research Center for Chinese Medicine, Tianjin 300381, China

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of icariin in improving knee osteoarthritis (KOA) in rats with kidney deficiency and blood stasis based on Toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway. **Methods** A total of 60 female SD rats were randomly divided into control group, model group, positive control [Xianling Gubao Capsules (仙灵骨葆胶囊, 270 mg/kg)] group and icariin low-, medium-, high-dose (40, 100, 200 mg/kg) groups, with 10 rats in each group. Except for the control group, the other groups were prepared with a combination of “ovariectomy method + hydrocortisone combined with adrenaline method + modified Hulth method” to establish a kidney deficiency and blood stasis KOA rat model. After successful modeling, each group was administered ig continuously for four weeks. The joint inflammation score and joint swelling degree of rats were measured at 0, 1, 2, 3, and 4 weeks after administration. After administration, the levels of interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and IL-10 in serum were detected by ELISA. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe pathological changes in

收稿日期: 2026-03-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82575103); 国家自然科学基金资助项目 (82474538); 国家自然科学基金资助项目 (82074470); 天津市卫生健康委员会天津市中医药重点领域科研项目 (2026005); 河北省中医药管理局科研计划项目 (T2025087); 天津中医药大学教师队伍建设研究项目 (Y-202608); 天津中医药大学教师教学发展研究项目 (A26JF12); 天津市高等学校研究生教育改革研究计划项目 (TJYG25101)

作者简介: 许祎萱 (2002—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中医药防治脊柱关节疾病的基础与临床。E-mail: 13321289827@163.com

***通信作者:** 李远栋 (1980—), 男, 副主任医师, 硕士生导师, 研究方向为中医药防治脊柱关节疾病的基础与临床。E-mail: 33724755@qq.com

knee cartilage. Western blotting was used to detect the expressions of TLR4, myeloid differentiation factor 88 (MyD88), inhibitor of NF- κ B (I κ B), p-I κ B, NF- κ B p65 and p-NF- κ B p65 proteins in cartilage tissue. **Results** Compared with control group, the joint inflammation score and joint swelling degree of rats in model group were significantly increased ($P < 0.001$), the levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α in serum were significantly increased ($P < 0.001$), and the level of IL-10 was significantly decreased ($P < 0.001$). The pathological damage of cartilage tissue was obvious, and the protein expression levels of TLR4, MyD88, p-I κ B, p-NF- κ B p65 in cartilage tissue were significantly increased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). Compared with model group, the positive control group and icariin medium-, high-dose groups showed varying degrees of improvement in the above indicators, while some indicators in icariin low-dose group showed an improvement trend. **Conclusion** Icariin could improve joint inflammation and cartilage damage in KOA rats with kidney deficiency and blood stasis, and its mechanism may be related to inhibiting the activation of TLR4/NF- κ B signaling pathway and regulating the balance of inflammatory cytokine network.

Key words: knee osteoarthritis; icariin; kidney deficiency and blood stasis; inflammatory response; TLR4/NF- κ B signaling pathway

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是一种全球高发的慢性退行性关节疾病, 其核心病理特征为关节软骨的进行性退变与丢失, 伴随滑膜炎症、软骨下骨重塑及骨赘形成^[1-2]。临床上主要表现为膝关节疼痛、僵硬、肿胀、活动受限乃至畸形, 严重影响患者生活质量^[3-4]。随着人口老龄化加剧, KOA 的发病率逐年上升, 寻找安全有效的治疗方法已成为医学研究热点^[5]。目前, 现代医学对 KOA 的治疗以缓解疼痛、改善功能为主, 常用药物包括非甾体抗炎药、软骨保护剂等, 但长期使用存在消化道、心血管等系统的不良反应, 且难以逆转软骨损伤^[6]。

中医理论认为, KOA 属于“骨痹”范畴, 其发病与“肾虚”和“血瘀”密切相关。“肾主骨生髓”, 肾虚则筋骨失养, 软骨易发生退变; “不通则痛”, 血瘀则经络阻滞, 气血运行不畅, 加重关节肿痛和炎症反应^[7]。因此, “补肾活血”是中医治疗 KOA 的核心法则^[8]。淫羊藿为小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim. 的干燥叶, 具有补肾壮阳、强筋健骨之功效, 《本草纲目》载其“益精气、坚筋骨、补腰膝”^[9], 临床广泛用于治疗骨关节疾病^[10]。淫羊藿苷是淫羊藿的主要活性成分之一, 属于黄酮醇苷类化合物, 具有抗炎、抗氧化、促进软骨修复、抑制破骨细胞活性等多种药理作用^[11-13]。课题组前期研究表明, 淫羊藿苷对 KOA 具有一定的治疗作用^[14], 但其作用机制尚不完全明确, 尤其是针对“肾虚血瘀”这一核心病机的调控机制研究尚少。

“肾虚血瘀”病机可能通过调控炎症相关信号通路参与 KOA 发病, 已有研究提示, 肾虚可导致机体免疫功能紊乱、炎症因子失衡, 而血瘀则进一步加剧局部炎症微环境异常。Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)/核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路作为炎症调控的核心通路,

可能是肾虚血瘀型 KOA 的关键分子靶点之一^[15]。该通路在 KOA 的病理过程中扮演重要角色^[16]。TLR4 作为模式识别受体, 可识别损伤相关分子模式 (damage-associated molecular patterns, DAMPs), 激活后通过髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 依赖途径, 促使 NF- κ B 抑制蛋白 (inhibitor of NF- κ B, I κ B) 磷酸化并降解, 从而释放 NF- κ B p65 进入细胞核, 启动下游促炎因子如白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等的转录与表达, 加重关节炎症和软骨损伤^[17]。本研究基于中医“肾虚血瘀”理论, 构建更贴近临床实际的 KOA 复合动物模型, 系统评价淫羊藿苷对 KOA 关节炎症的改善作用, 并深入探讨其是否通过调控 TLR4/NF- κ B 信号通路发挥作用, 以期淫羊藿苷的临床应用提供更科学的实验依据, 也为中医“补肾活血”法治疗 KOA 的现代生物学机制提供新的思路。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雌性 SD 大鼠 60 只, 6~8 周龄, 体质量 (200 $\pm$ 20) g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 生产许可证号 SCXK (京) 2019-0008, 动物质量合格证号 No.110322231103397048。动物饲养于易生源基因科技 (天津) 有限公司实验动物中心, 温度 (23 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C, 相对湿度 (50 $\pm$ 15) %, 12 h 明暗交替, 自由摄食饮水, 适应性喂养 1 周后开始实验。动物实验经易生源基因科技 (天津) 有限公司实验动物伦理委员会批准 (批准号 YSY-DWLL-2024318)。

1.2 药品与试剂

淫羊藿苷 (批号 ZL090912, 质量分数 $\geq$ 98%) 购自南京泽朗生物有限责任公司; 仙灵骨葆胶囊

(批号 1603023, 国药准字 Z20025337) 购自贵州同济堂制药有限公司; 氢化可的松注射液 (国药准字 H20023069) 购自国药集团容生制药有限公司; 盐酸肾上腺素注射液 (国药准字 H42021700) 购自远大医药 (中国) 有限公司; 大鼠 IL-6 ELISA 试剂盒 (批号 ml102828)、大鼠 IL-1 β ELISA 试剂盒 (批号 ml028514)、大鼠 TNF- α ELISA 试剂盒 (批号 ml002859)、大鼠 IL-10 ELISA 试剂盒 (批号 ml002813) 购自上海酶联生物科技有限公司; TLR4 抗体 (批号 19811-1-AP)、MyD88 抗体 (批号 67969-1-Ig)、 β -actin 抗体 (批号 20536-1-AP) 购自美国 Proteintech 公司; I κ B 抗体 (批号 ab32518)、p-I κ B 抗体 (批号 ab133462) 购自英国 Abcam 公司; NF- κ B p65 抗体 (批号 8242)、p-NF- κ B p65 抗体 (批号 3033) 购自美国 CST 公司。

1.3 仪器

CANSH 型纯水仪 (宁波丹斯博顿环保科技有限公司); DHP9121B 型恒温箱 (上海一恒科学仪器有限公司); DNM-9602 型酶标检测仪 (北京普朗科技有限公司); D8PCS 型紫外分光光度计 [让奇 (上海) 仪器科技有限公司]; KZ-III-F 高速低温组织研磨仪 (武汉塞维尔生物科技有限公司); DYY-6C 型电泳仪、DYCZ-40D 型电泳槽、DYCZ-40G 型转膜槽 (北京六一生物科技有限公司); PR SERIES 型万分位天平 (美国 OHAUS 公司); Champchemi 610 plus 型全自动化学/荧光/凝胶成像分析系统 (北京赛智创业科技有限公司); IMS-50 型制冰机 (常熟市雪科电器有限公司); DT5-3 型医用离心机、GTR16-2 型低温高速离心机 (北京北利时代医疗科技有限公司); NMYA-60 型摇床 (泰州诺米医疗科技有限公司); DW-86L338J 型 -80 $^{\circ}$ C 医用冰箱 (海尔集团)。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药

2.1.1 分组与造模 大鼠适应性饲养后, 按随机数字表法分为对照组、模型组、阳性对照组及淫羊藿苷低、中、高剂量组, 每组 10 只。

(1) “肾虚”模型制备 (去卵巢法): 除对照组外, 其余大鼠 ip 氯胺酮 (100 mg/kg) 麻醉, 背部备皮消毒, 于腰背侧正中切口进入腹腔, 分离双侧卵巢, 结扎输卵管及周围血管后摘除卵巢, 逐层缝合。术后 im 青霉素 (4×10^4 U/只), 连续注射 3 d 预防感染。对照组大鼠仅开腹不切除卵巢。

(2) “血瘀”模型制备 (氢化可的松联合肾上腺素法): 去卵巢术后 8 周, 大鼠 im 氢化可的松 (10 mg/kg), 1 次/d, 连续注射 13 d; 第 14 天, 大鼠 sc 肾上腺素 (0.36 mg/kg)。

(3) KOA 模型制备 (改良 Hulth 法): 在进行血瘀造模的同时 (即去卵巢术后 8 周), 大鼠 ip 氯胺酮 (100 mg/kg) 麻醉, 右后肢膝关节备皮消毒, 行髌旁内侧切口进入关节腔, 切断前后交叉韧带及内侧副韧带, 切除内侧半月板的 2/3, 保留关节软骨面, 生理盐水冲洗后逐层缝合。术后 im 青霉素 (4×10^4 U/只), 连续注射 3 d。术后不固定患肢, 每日强迫活动 1 h, 连续 4 周, 以加速关节软骨退变。对照组仅切开关节囊后缝合, 不进行韧带切断及半月板切除。

为确保各组基线水平一致, 所有造模大鼠均在相同日龄开始去卵巢手术, 于去卵巢术后 8 周同期进行 KOA 手术, 对照组大鼠亦饲养至相同日龄。给药前各组大鼠关节炎症评分及关节肿胀度无显著差异, 证实基线可比。

2.1.2 给药 造模成功后 (即去卵巢术后 12 周, KOA 造模术后 4 周) 开始药物干预。阳性对照组 ig 仙灵骨葆胶囊混悬液 (270 mg/kg), 淫羊藿苷低、中、高剂量组分别 ig 淫羊藿苷混悬液 (40、100、200 mg/kg), 对照组和模型组 ig 等体积的生理盐水 (3 mL/kg), 1 次/d, 连续给药 4 周。淫羊藿苷剂量选择参考本课题组前期研究及文献报道^[14,18], 仙灵骨葆胶囊剂量参照临床等效剂量换算^[19]。此外, 仙灵骨葆胶囊作为复方制剂, 其药效是多种成分协同作用的结果, 所含淫羊藿苷的实际剂量远低于淫羊藿苷高剂量组。本研究以仙灵骨葆胶囊作为阳性对照, 旨在验证模型的有效性和实验系统的可靠性, 而非直接比较两者药效强弱。

2.2 关节炎症评分测定

分别于造模后 0 (给药前)、1、2、3、4 周 (给药结束), 参考文献方法^[20]并进行改良, 对大鼠膝关节炎症程度进行评分。评分标准: 0 分, 关节正常, 无红肿; 1 分, 轻度红肿, 局限于膝关节; 2 分, 中度红肿, 累及踝关节; 3 分, 重度红肿, 累及整个后爪; 4 分, 严重红肿, 累及整个后肢, 伴活动受限。由 2 名实验人员双盲观察并记录每只大鼠右后肢评分, 取平均值。

2.3 关节肿胀度测量

分别于造模后 0 (给药前)、1、2、3、4 周 (给

药结束), 采用排水法测量大鼠右后肢膝关节体积。将大鼠右后肢膝关节以下浸入盛有生理盐水的量筒中, 记录浸入前后体积变化, 计算关节肿胀度。测量时统一将右后肢膝关节以下浸入量筒至髌骨下缘同一标记刻度, 以尽量控制浸入深度, 减少踝关节肿胀的干扰, 可反映关节总体积的相对变化趋势。

关节肿胀度=(造模后关节体积-造模前关节体积)/造模前关节体积

2.4 血清炎症因子水平的检测

给药结束后, 大鼠禁食不禁水 12 h, 眼眶静脉丛采血, 4 ℃、3 000 r/min 离心 15 min, 分离血清, -80 ℃保存备用。按照 ELISA 试剂盒说明书操作, 检测血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 IL-10 的水平。

2.5 膝关节软骨组织病理学观察

采血后, 颈椎脱臼处死大鼠, 迅速分离右后肢膝关节, 剔除周围软组织, 置于 4%多聚甲醛溶液中固定 24 h。常规脱钙、脱水、石蜡包埋、切片(厚度 5 μ m), 进行苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色, 于光学显微镜下观察软骨组织病理形态学变化。

2.6 Western blotting 检测软骨组织 TLR4/NF- κ B 通路相关蛋白表达

处死大鼠后, 于冰上迅速分离右后肢膝关节软骨组织, 液氮速冻后-80 ℃保存备用。每组随机选取 3 份软骨组织样本, 加入裂解液提取软骨组织总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳分离后, 湿转至 PVDF 膜, 用 5%脱脂牛奶室温封闭 2 h。分别加入 TLR4(1:1 000)、MyD88(1:2 000)、I κ B(1:1 000)、p-I κ B(1:800)、NF- κ B p65(1:1 000)、p-NF- κ B p65(1:1 000)、 β -actin(1:5 000)一抗, 4 ℃孵育过夜。TBST 洗涤

后, 加入二抗(1:5 000), 室温孵育 2 h。TBST 洗涤后, ECL 化学发光法显影, 采用凝胶成像系统曝光并采集图像, 以 β -actin 为内参, 分析目标蛋白相对表达量。

2.7 统计学分析

采用 SPSS 27.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。若数据符合正态分布且方差齐, 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 进一步两两比较采用 LSD 法; 若符合正态分布但方差不齐, 采用单因素方差分析后, 两两比较采用 Dunnett's T_3 法分析; 若数据不符合正态分布, 采用 Kruskal-Wallis H 检验分析。

3 结果

3.1 淫羊藿苷对肾虚血瘀型 KOA 大鼠关节炎症评分的影响

如表 1 所示, 对照组大鼠关节炎症评分在整个观察周期内略有波动, 可能与日常活动所致的轻微生理性反应或测量误差有关。与对照组比较, 模型组大鼠关节炎症评分显著升高($P<0.001$), 表明肾虚血瘀型 KOA 模型构建成功。与模型组比较, 阳性对照组及淫羊藿苷高剂量组自给药 2 周起大鼠关节炎症评分显著降低($P<0.05$ 、 0.001), 淫羊藿苷低、中剂量组自给药 3 周起大鼠关节炎症评分显著降低($P<0.05$)。

3.2 淫羊藿苷对肾虚血瘀型 KOA 大鼠关节肿胀度的影响

如表 2 所示, 对照组大鼠关节肿胀度在整个观察周期内始终维持在 5.5%~6.0%的基线水平, 无明显炎症反应。与对照组比较, 模型组大鼠关节肿胀度显著升高($P<0.001$), 表明肾虚血瘀型 KOA 模型构建成功。与模型组比较, 给药 1 周淫羊藿苷中、高剂量组关节肿胀度显著降低($P<0.05$), 给药 2

表 1 各组大鼠关节炎症评分比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Comparison of joint inflammation score of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	关节炎症评分				
		给药前	给药1周	给药2周	给药3周	给药4周
对照	—	1.55 $\pm$ 0.14	1.66 $\pm$ 0.12	1.75 $\pm$ 0.08	1.78 $\pm$ 0.14	1.91 $\pm$ 0.15
模型	—	2.86 $\pm$ 0.36***	3.14 $\pm$ 0.39***	3.25 $\pm$ 0.41***	3.40 $\pm$ 0.47***	3.36 $\pm$ 0.48***
阳性对照	270	2.76 $\pm$ 0.17	2.83 $\pm$ 0.17	2.61 $\pm$ 0.21 [#]	2.52 $\pm$ 0.20 [#]	2.31 $\pm$ 0.23###
淫羊藿苷	40	2.70 $\pm$ 0.20	2.73 $\pm$ 0.21	2.75 $\pm$ 0.28	2.62 $\pm$ 0.21 [#]	2.57 $\pm$ 0.19 [#]
	100	2.77 $\pm$ 0.11	2.87 $\pm$ 0.13	2.80 $\pm$ 0.13	2.63 $\pm$ 0.16 [#]	2.46 $\pm$ 0.20 [#]
	200	2.84 $\pm$ 0.25	2.77 $\pm$ 0.24	2.69 $\pm$ 0.23 [#]	2.58 $\pm$ 0.23 [#]	2.35 $\pm$ 0.18 [#]

与对照组比较: *** $P<0.001$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ### $P<0.001$, 表 2 同。

*** $P<0.001$ vs control group; [#] $P<0.05$ ### $P<0.001$ vs model group, same as table 2.

表 2 各组大鼠关节肿胀度比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Comparison of joint swelling degree of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	关节肿胀度/%				
		给药前	给药1周	给药2周	给药3周	给药4周
对照	—	5.50±0.30	5.50±0.25	5.50±0.35	5.50±0.30	5.50±0.40
模型	—	36.80±3.25***	40.35±3.68***	48.55±4.12***	53.30±4.57***	55.20±4.81***
阳性对照	270	34.55±3.02	32.05±2.87	24.25±2.31###	24.10±2.26#	25.95±2.40#
淫羊藿苷	40	38.85±3.41	42.20±3.79	40.45±3.52#	39.00±3.38#	38.90±3.26#
	100	34.55±2.98	37.30±3.21#	37.75±3.30	33.80±2.95#	33.10±2.87#
	200	32.75±2.86	25.60±2.24#	26.50±2.37###	27.30±2.41#	23.85±2.19###

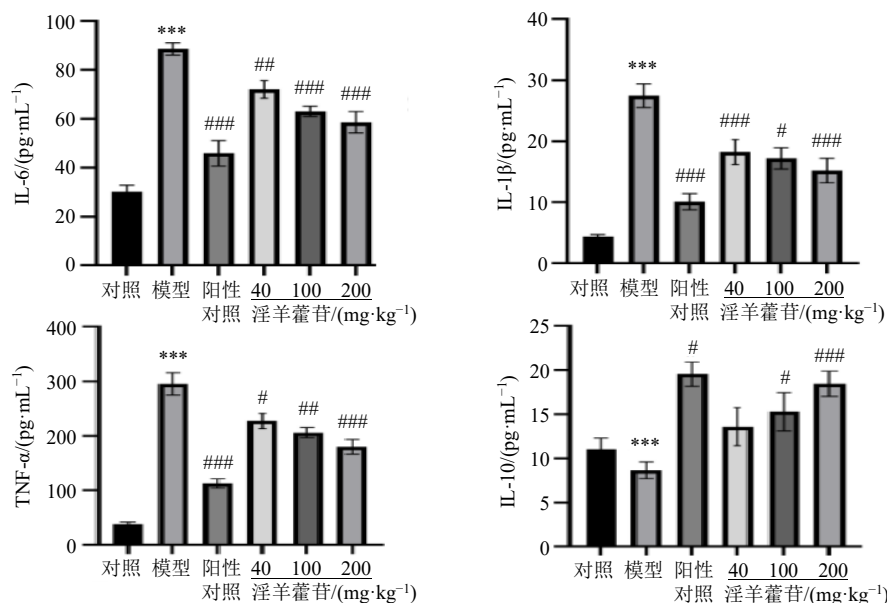
周阳性对照组和淫羊藿苷低、高剂量组关节肿胀度显著降低 ($P < 0.05, 0.001$), 自给药 3 周起各给药组关节肿胀度均显著降低 ($P < 0.05, 0.001$), 表明淫羊藿苷可有效抑制关节炎症进展。

3.3 淫羊藿苷对肾虚血瘀型 KOA 大鼠血清炎症因子水平的影响

如图 1 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清中促炎因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的水平显著升高 ($P < 0.001$), 而抗炎因子 IL-10 水平显著降低 ($P < 0.001$), 提示肾虚血瘀型 KOA 模型大鼠存在明显的促炎/抗炎失衡, 抗炎功能受损。与模型组比较, 各给药组大鼠血清中促炎因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平均显著降低 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 阳性对照组和淫羊藿苷中、高剂量组抗炎因子 IL-10 水平显著升高 ($P < 0.05, 0.001$)。

3.4 淫羊藿苷对肾虚血瘀型 KOA 大鼠膝关节软骨组织病理学的影响

如图 2 所示, 对照组大鼠软骨组织结构完整, 细胞排列有序, 软骨基质染色均匀, 未见明显的病理改变。模型组软骨组织出现明显病理改变, 如软骨细胞数量减少、排列紊乱, 软骨基质染色不均, 可能存在软骨基质降解、缺损等情况, 反映了造模成功导致膝关节软骨出现损伤。与模型组相比, 阳性对照组软骨组织的病理改变有所减轻, 软骨细胞形态相对改善, 软骨基质的完整性有所恢复, 表明仙灵骨葆胶囊对造模导致的软骨损伤有一定的治疗作用。淫羊藿苷低剂量组软骨形态略有改善, 中、高剂量组软骨细胞排列和基质染色进一步改善, 其中高剂量组软骨形态改善最为明显, 提示淫羊藿苷可能对膝关节软骨损伤具有保护作用。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$, 图 3 同。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group, same as fig. 3.

图 1 各组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 IL-10 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Comparison of levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α and IL-10 in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

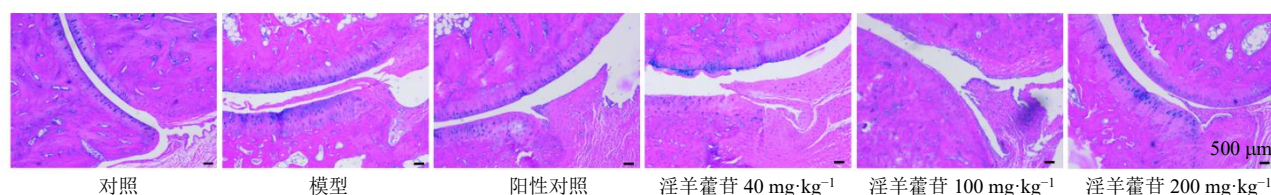


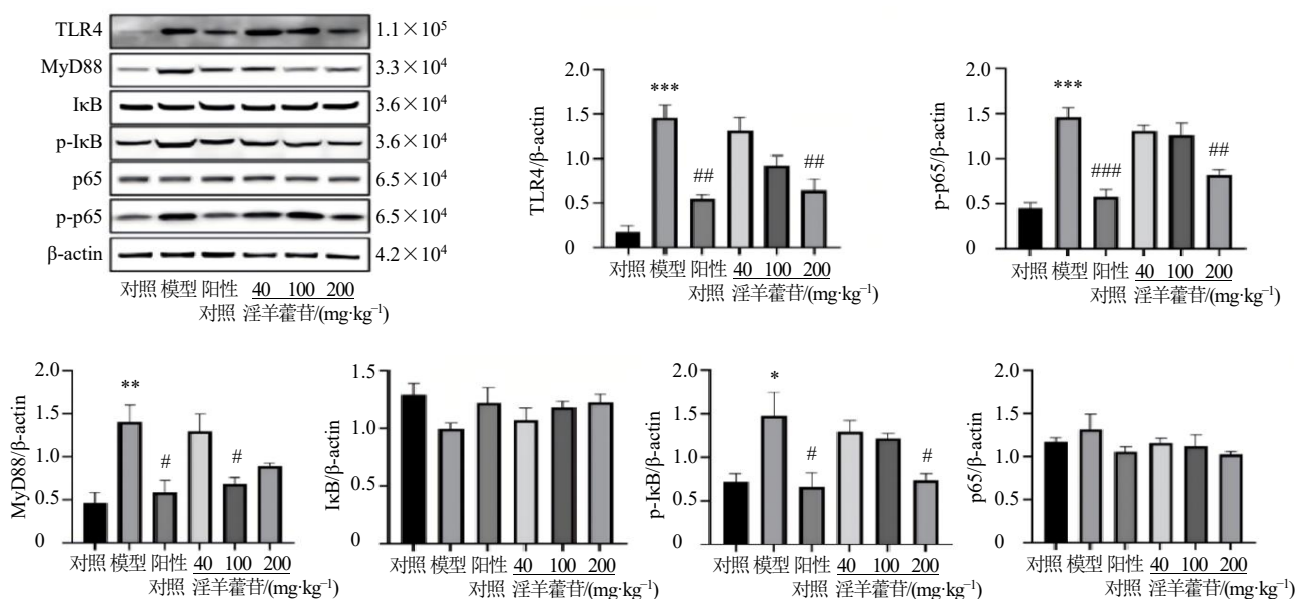
图 2 各组大鼠膝关节软骨组织病理形态 (HE, ×40)

Fig. 2 Pathological morphology of knee joint cartilage tissue of rats in each group (HE, ×40)

3.5 淫羊藿苷对肾虚血瘀型 KOA 大鼠膝关节软骨组织 TLR4/NF-κB 信号通路相关蛋白表达的影响

如图 3 所示,与对照组比较,模型组大鼠软骨组织 TLR4、MyD88、p-NF-κB p65、p-IκB 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), IκB 和 NF-κB p65 蛋白表达无统计学差异,提示肾虚血瘀型 KOA 大鼠软骨中 TLR4/NF-κB 信号通路呈过度

激活状态,且通路活化以磷酸化蛋白上调为主,总蛋白水平未发生明显改变。与模型组比较,阳性对照组及淫羊藿苷高剂量组 TLR4、p-NF-κB p65、p-IκB 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),阳性对照组及淫羊藿苷中剂量组 MyD88 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$),提示淫羊藿苷主要通过调控通路蛋白磷酸化活化过程发挥抗炎作用。

图 3 各组大鼠膝关节软骨组织 TLR4/NF-κB 通路相关蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Fig. 3 Comparison of TLR4/NF-κB pathway-related protein expressions in knee joint cartilage tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

4 讨论

KOA 是一种多因素导致的复杂性疾病,炎症反应在其发生发展中起关键作用^[21]。关节内活化的滑膜细胞、巨噬细胞等释放大量促炎因子(如 IL-1β、IL-6、TNF-α),这些因子既可诱导软骨细胞凋亡、抑制软骨基质合成,又能促进基质金属蛋白酶的表达,从而加速软骨退变与损伤^[22]。同时,促炎因子还可刺激滑膜增生,加重关节肿胀和疼痛。因此,抑制关节炎症反应、调控炎症因子网络平衡,是治疗 KOA 的重要策略。中医认为, KOA 以“肾虚血瘀”为核心病机^[23]。《中藏经》云:“骨痹者,

乃嗜欲不节,伤于肾也。”肾藏精,主骨生髓,肾精亏虚则骨髓化生无源,骨骼失养,致关节软骨退变、骨质疏松,发为 KOA。而“血瘀”既是病理产物,亦是致病因素。外伤、劳损等致气血运行不畅,瘀血阻滞关节经络,不通则痛;瘀久化热,可进一步加重关节炎症。故“补肾活血”乃中医治疗 KOA 之根本大法,补肾以强筋骨,活血以通经络,标本兼治^[24]。

淫羊藿苷作为淫羊藿的主要活性成分,现代药理研究证实其具有抗炎、抗氧化、抗凋亡、促进软骨修复、调节免疫等多重生物活性。研究表明,淫

羊藿苷可诱导破骨细胞凋亡、抑制骨吸收^[25-26], 亦能通过调控 Wnt/ β -catenin 和骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) /Smad 信号通路促进成骨分化及细胞外基质合成, 并下调 TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子表达^[27]。此外, 淫羊藿苷还可通过抑制磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) /哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) /unc-51 样自噬激活激酶 1 (unc-51 like autophagy activating kinase 1, ULK1) 信号通路激活软骨细胞自噬, 延缓 OA 进展^[28]。TLR4/NF- κ B 是调控机体炎症反应的核心通路之一^[29-30]。在 KOA 病理状态下, 软骨降解产物、炎症因子等作为内源性 DAMPs, 可被 TLR4 识别并激活, 通过 MyD88 依赖途径启动下游级联反应, 导致 I κ B 磷酸化降解, 释放 NF- κ B p65 进入核内, 启动 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等促炎因子基因转录, 加剧炎症与软骨损伤^[31]。值得注意的是, 淫羊藿苷对 TLR4/NF- κ B 通路相关蛋白的抑制作用呈剂量相关性趋势: 高剂量组在多数指标上效果与阳性对照组相当, 而低剂量组仅部分指标改善。这与既往文献报道的淫羊藿苷在骨关节炎模型中呈剂量相关性发挥保护作用的结果一致, 进一步支持了淫羊藿苷的药理活性与给药剂量密切相关。本研究还观察到, 与对照组比较, 模型组总 NF- κ B p65 蛋白表达呈升高趋势, 但差异无统计学意义; 与模型组比较, 各给药组差异亦无统计学意义。这一结果提示, 淫羊藿苷对 NF- κ B 通路的调控可能主要作用于 p65 的磷酸化激活环节, 而非抑制 p65 总蛋白的表达。该现象与文献报道的某些 NF- κ B 抑制剂的作用模式相似, 即通过抑制 I κ B 磷酸化降解、减少 p65 核转位来阻断炎症信号传导。此外, 淫羊藿苷在抑制促炎因子释放的同时, 显著上调了抗炎因子 IL-10 的水平。这种双向调节作用对于恢复关节局部免疫微环境的稳态具有重要意义, 也符合中医“补肾活血”法“扶正祛邪”的治疗理念。从中医理论角度阐释, 淫羊藿苷的“补肾”功效可能通过抑制 TLR4/NF- κ B 通路的过度激活, 改善肾虚所致的免疫炎症紊乱; 其“活血”作用则可能通过下调促炎因子、上调抗炎因子, 改善血瘀所致的局部炎症微环境, 这为“补肾活血”法治疗 KOA 提供了现代分子生物学层面的解释。但上述推测仍需通过通路抑制剂或基因敲除等实验进一步验证。

综上, 本研究采用复合造模法构建的肾虚血瘀型 KOA 大鼠模型, 较好地模拟了中医核心病机与 KOA 病理特征, 具有较高的临床相关性。结果表明, 淫羊藿苷能剂量相关性地改善模型大鼠的关节炎评分、肿胀度、血清炎症因子水平及软骨病理损伤, 其作用机制与抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路活化、调控炎症因子网络平衡密切相关。本研究为淫羊藿苷治疗 KOA 的临床应用提供了实验依据, 也为中医“补肾活血”法的现代生物学机制研究提供了新思路。然而, 本研究尚存在一定局限性。首先, 复合模型虽能模拟“肾虚血瘀”病机, 但与临床 KOA 患者漫长而复杂的病程仍存在差距, 其临床转化价值有待进一步验证。其次, 在模型检测方面, 本研究依据文献报道的经典方法制备“血瘀”模型, 未直接检测血液流变学指标; 采用排水法测量关节肿胀度, 可能受踝关节及个体差异影响; 且仅以 HE 染色观察软骨病理, 未进行番红 O-固绿等特殊染色, 对软骨基质的评估不够全面。上述方法学不足在一定程度上限制了证据的完整性。再者, 在机制验证方面, 研究仅通过 Western blotting 检测 TLR4/NF- κ B 通路关键蛋白的表达变化, 关于淫羊藿苷通过该通路发挥抗炎作用的结论仍属于相关性提示。此外, 淫羊藿苷作为多靶点天然产物, 可能同时调控 Wnt/ β -catenin、PI3K/Akt 等多条通路, 各通路间的交互机制尚不明确; 且研究中仅检测血清炎症因子, 关节局部微环境的炎症状态有待深入探究。未来研究应完善模型评价体系, 结合多种染色方法、局部因子检测及功能验证实验, 进一步阐明淫羊藿苷的多靶点作用机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Bliddal H. Definition, pathology and pathogenesis of osteoarthritis [J]. *Ugeskr Laeger*, 2020, 182(42): V06200477.
- [2] 姜泉, 罗成贵, 巩勋, 等. 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.
- [3] 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.
- [4] Hunter D J, Schofield D, Callander E. The individual and socioeconomic impact of osteoarthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2014, 10(7): 437-441.
- [5] GBD 2021 Osteoarthritis Collaborators. Global, regional, and national burden of osteoarthritis, 1990—2020 and

- projections to 2050: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021 [J]. *Lancet Rheumatol*, 2023, 5(9): 508-522.
- [6] Bannuru R R, Osani M C, Vaysbrot E E, *et al.* OARSI guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2019, 27(11): 1578-1589.
- [7] 彭文忠, 刘渝松, 张文斌. 中西医治疗膝关节骨性关节炎研究进展 [J]. *中国药业*, 2022, 31(19): 124-127.
- [8] 尹润宇, 杨东元, 王世坤, 等. 补肾活血类中成药治疗膝骨性关节炎的有效性和安全性网状 Meta 分析 [J]. *中草药*, 2023, 54(13): 4266-4277.
- [9] 赵国平. *中药大辞典* [M]. 第2版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 3152.
- [10] 廖建青, 吕静, 赖福崇, 等. 中药内服治疗膝骨性关节炎的用药规律分析 [J]. *云南中医学院学报*, 2020, 43(1): 83-88.
- [11] 白家奇, 张宇, 郑曲, 等. 淫羊藿及其有效成分治疗膝骨关节炎的研究进展 [J]. *实用中医内科杂志*, 2026, 40(2): 115-119.
- [12] 路宇仁, 陈映冰, 崔元璐, 等. 淫羊藿苷药理作用研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(17): 209-220.
- [13] 蒋俊, 崔莉, 孙娥, 等. 基于淫羊藿黄酮类化合物的体内代谢阐述其抗骨质疏松药效物质基础 [J]. *中草药*, 2014, 45(5): 721-729.
- [14] 李远栋, 王世坤, 杨东元, 等. 淫羊藿苷防治膝骨性关节炎作用机制的研究进展 [J]. *中草药*, 2023, 54(8): 2652-2658.
- [15] 张师尧, 杨永菊, 闵冬雨, 等. 基于肾虚血瘀病机探析膝痛康复治疗膝骨关节炎机理 [J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(3): 741-743.
- [16] Horváth E, Sólyom Á, Székely J, *et al.* Inflammatory and metabolic signaling interfaces of the hypertrophic and senescent chondrocyte phenotypes associated with osteoarthritis [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(22): 16468.
- [17] Bobacz K, Sunk I G, Hofstaetter J G, *et al.* Toll-like receptors and chondrocytes: The lipopolysaccharide-induced decrease in cartilage matrix synthesis is dependent on the presence of Toll-like receptor 4 and antagonized by bone morphogenetic protein 7 [J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(6): 1880-1893.
- [18] 丰瑞兵, 黄勇, 胡昊, 等. 淫羊藿苷对膝创伤性关节炎模型大鼠的镇痛效果及机制 [J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(32): 5108-5113.
- [19] Wu H, Zhong Q, Wang J, *et al.* Beneficial effects and toxicity studies of Xian-Ling-Gu-Bao on bone metabolism in ovariectomized rats [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 273.
- [20] Gou K J, Zeng R, Ren X D, *et al.* Anti-rheumatoid arthritis effects in adjuvant-induced arthritis in rats and molecular docking studies of *Polygonum orientale* L. extracts [J]. *Immunol Lett*, 2018, 201: 59-69.
- [21] 张荣, 张向东, 赵明宇. 膝骨关节炎发病机制及治疗进展 [J]. *风湿病与关节炎*, 2019, 8(5): 68-72.
- [22] 魏宁, 郑占乐. 膝关节骨关节炎疼痛原因研究进展 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2026, 40(2): 315-320.
- [23] 徐传毅, 樊粤光, 宁显明. 肾虚血瘀与膝骨性关节炎关系初探 [J]. *新中医*, 2002, 34(3): 7-9.
- [24] 郭恩平, 王丹, 叶晓昂, 等. 基于“虚瘀并重, 筋骨兼治”原则治疗膝骨关节炎 [J]. *浙江中医杂志*, 2025, 60(4): 356-357.
- [25] 何丽君, 江金井, 陈豪, 等. 淫羊藿药理作用和临床应用的研究进展 [J]. *中医临床研究*, 2020, 12(2): 17-20.
- [26] 刘琪, 李林臻, 张君涛. 淫羊藿苷促进关节软骨损伤修复作用机制研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2024, 47(6): 1393-1399.
- [27] 胡伟健, 于子豪, 谢鑫. 淫羊藿苷促进骨损伤修复的研究进展 [J/OL]. *中医学报*, (2025-05-26) [2026-08-03]. <https://link.cnki.net/urlid/41.1411.R.20250526.1107.002>.
- [28] Chen Y, Pan X L, Zhao J, *et al.* Icaritin alleviates osteoarthritis through PI3K/Akt/mTOR/ULK1 signaling pathway [J]. *Eur J Med Res*, 2022, 27(1): 204.
- [29] Zhang Y, Zeng Y. Curcumin reduces inflammation in knee osteoarthritis rats through blocking TLR4/MyD88/NF- κ B signal pathway [J]. *Drug Dev Res*, 2019, 80(3): 353-359.
- [30] Bartels Y L, van Lent P L E M, van der Kraan P M, *et al.* Inhibition of TLR4 signalling to dampen joint inflammation in osteoarthritis [J]. *Rheumatology*, 2024, 63(3): 608-618.
- [31] Duan T H, Du Y, Xing C S, *et al.* Toll-like receptor signaling and its role in cell-mediated immunity [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 812774.

[责任编辑 李亚楠]