

基于 TGF- β /Smad 信号通路研究独活寄生汤在大鼠膝骨关节炎软骨修复的作用机制

肖潇

常德市第一中医医院门诊部中医正骨室, 湖南 常德 415000

DOI:10.61369/MRP.2025100015

摘要 : 目的: 探究基于 TGF- β /Smad 信号通路研究独活寄生汤在大鼠膝骨关节炎软骨修复的作用机制。方法: 将40只 SPF 级 SD 大鼠按随机数字表分为四组: 正常组、骨折模型组、药物组、西药对照组, 每组 10 只。对比各组大鼠临床症状、关节软骨的组织形态学变化、采用 Western Blot 和 RT-PCR 技术对软骨组织中通路相关蛋白 TGB- β 、SMD2、SMAD4 蛋白表达。结果: 与模型组相比, 药物组和西药组对照组的 Lequesne MG 评分和 Mankin 评分均显著降低 ($P < 0.05$) ; Western Blot 和 RT-PCR 结果显示, 经药物干预后, 药物组和西药组对照组上述指标均显著上调 ($P < 0.05$) 。结论: 独活寄生汤能有效缓解 KOA 大鼠的临床症状。

关键词 : 独活寄生汤; 膝骨关节炎; TGF- β /Smad 信号通路; 软骨修复; 大鼠

Research on the Mechanism of Action of Duhuo Jisheng Decoction in Cartilage Repair of Rat Knee Osteoarthritis Based on the TGF- β /Smad Signaling Pathway

Xiao Xiao

Traditional Chinese Medicine Bone-Setting Room, Outpatient Department, First Traditional Chinese Medicine Hospital of Changde City, Changde, Hunan 415000

Abstract : Objective: To explore the mechanism of action of Duhuo Jisheng Decoction in cartilage repair of rat knee osteoarthritis (KOA) based on the TGF- β /Smad signaling pathway. Methods: Forty SPF-grade SD rats were randomly divided into four groups using a random number table: normal group, fracture model group, medication group, and western medicine control group, with 10 rats in each group. Clinical symptoms, histomorphological changes in articular cartilage, and the expression of pathway-related proteins TGB- β , SMD2, and SMAD4 in cartilage tissue were compared among the groups using Western Blot and RT-PCR techniques. Results: Compared with the model group, the Lequesne MG scores and Mankin scores in the medication group and the western medicine control group were significantly reduced ($P < 0.05$). Western Blot and RT-PCR results showed that after drug intervention, the aforementioned indicators in the medication group and the western medicine control group were significantly upregulated ($P < 0.05$). Conclusion: Duhuo Jisheng Decoction can effectively alleviate the clinical symptoms of KOA in rats.

Keywords : Duhuo Jisheng Decoction; knee osteoarthritis; TGF- β /Smad signaling pathway; cartilage repair; rats

引言

膝骨关节炎 (KOA) 是一种慢性退行性关节疾病, 特征是关节软骨退变、软骨下骨硬化和骨赘形成, 症状包括关节疼痛、僵硬、肿胀和功能障碍, 影响生活质量, 随着人口老龄化, KOA 发病率上升, 成为公共卫生问题^[1]。目前治疗包括非甾体抗炎药、糖皮质激素和玻璃酸钠注射, 以及手术治疗, 但无法逆转软骨退变且长期使用有副作用。中医药如独活寄生汤, 通过祛风湿、止痹痛、益肝肾、补气血来治疗 KOA, 具有疗效, TGF- β 信号通路, 尤其是 TGF- β /Smad 通路, 在维持关节软骨稳态中关键, 它能刺激软骨细胞合成 ECM 成分, 促进软骨形成和修复, 此通路受损会导致 KOA 软骨退变, 激活该通路是治疗 KOA 的策略之一^[2]。基于此, 本研究对 TGF- β /Smad 信号通路研究独活寄生汤在大鼠膝骨关节炎软骨修复的作用机制分析。

项目基金: 2024 院校联合基金项目

项目名称: 基于 TGF- β /Smad 信号通路研究独活寄生汤在大鼠膝骨关节炎软骨修复的作用机制。项目编号: 2024XYLH104。

一、对象与方法

(一) 对象

健康成年 SD 雄性大鼠 40 只 (100 ± 20 g, SPF 级; 湖南中医药大学动物实验中心提供)。

实验药物

独活寄生汤制备: 独活、桑寄生、防风、秦艽、肉桂、细辛、熟地黄、白芍、当归、川芎、杜仲、川牛膝、人参、茯苓、甘草各 6g。依据临床处方指定的剂量, 将药材先以冷水浸泡 20 分钟, 随后进行煮沸并持续煎煮 30 分钟。通过双层纱布对煎煮后的液体进行过滤, 并将残留的药渣重新煮沸 20 分钟。最终, 将两次过滤所得的滤液进行合并处理。浓缩至 1.0g/ml 生药浓度, 由常德市第一中医医院药剂科制备备用。

(二) 方法

动物模型的建立

根据改良 Hulth 法造模, 大鼠术前 12 小时禁食, 4 小时禁水, 麻醉后切开右侧膝关节内侧缘, 切断前交叉韧带, 切除内侧半月板, 保留关节软骨面, 冲洗伤口并缝合。术后连续 3 天注射青霉素预防感染, 伤口愈合后每天强迫活动 0.5 小时, 持续一周。

分组设计:

1. 将 SPF 级 SD 大鼠 (220 ± 10 g) 40 只按随机数字表分为四组: 正常组、骨折模型组、药物组、西药对照组, 每组 10 只。

2. 药物干预: 除正常组外, 其他均采用 Hulth 法造模模型后各组通过灌胃方式给药, 正常组、骨折模型组每日以生理盐水灌胃, 西药对照治疗组每日以硫酸氨基葡萄糖液灌胃, 药物治疗组每日以独活寄生汤灌胃。

(三) 指标检测

1. 临床症状分析: Lequesne MG 评分^[3] 观察其膝关节肿胀情况, 局部按压疼痛反应、步态、关节可自由活动的角度等方面由同一观察者进行操作评分。

2. 膝关节软骨退变的组织病理学评价: 将膝关节软骨置入 10% 甲醛中, 用 10% EDTA 脱钙, 流水冲洗后石蜡包埋, 切片 HE 染色, 观察软骨组织形态学变化并进行 Mankin 关节软骨病理评分^[4]。

3. 通路蛋白的检测: 采用 Western Blot 检测软骨组织中通路相关蛋白 TGB-β、SMD2、SMAD4 蛋白表达

4. 通路蛋白的检测: 采用 RT-PCR 技术检测软骨组织中通路相关基因 TGB-β、SMD2、SMAD4 mRNA 的表达水平。

(四) 统计学处理

采用 SPSS 24.0 软件进行处理。各检测指标统计数据均以均数和标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间两两比较若方差齐时选择 LSD 法, 方差不齐时选择 Tamhane 法进行方差分析, 不满足正态性及方差齐性时采用秩和检验。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

二、结果

(一) 各组膝关节肿胀情况、关节软骨的组织形态学变化比较

如表 1 所示, 与正常组分相比, 模型组 Lequesne MG 评分、Mankin 评分显著升高 ($P < 0.05$); 与骨折模型组相比, 西药对照组和药物组的 Lequesne MG 评分、Mankin 评分均显著降低 ($P < 0.05$)。且药物组的 Lequesne MG 评分、Mankin 评分显著低于西药对照组 ($P < 0.05$)。

表 1 各组膝关节肿胀情况、关节软骨的组织形态学变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数 (n)	Lequesne MG 评分	Mankin 评分
正常组	10	1.25 ± 0.42	0.95 ± 0.52
骨折模型组	10	9.85 ± 1.06	10.74 ± 1.14
西药对照组	10	6.12 ± 0.96	6.68 ± 0.96
药物组	10	4.32 ± 0.82	4.10 ± 0.85
F 值		1.232	1.365
P 值		0.002	0.001

(二) 各组大鼠软骨组织中通路相关蛋白 TGB-β、SMD2、SMAD4 蛋白表达比较

如表 2 所示, Western Blot 检测结果显示, 与正常组相比, 骨折模型组软骨组织中 TGF-β、p-Smad2、Smad4 的蛋白表达水平均显著下调 ($P < 0.05$, 与骨折模型组比较, 西药对照组和药物组的 TGF-β、p-Smad2、Smad4 蛋白表达均显著升高 ($P < 0.05$)。药物组各蛋白的表达水平均显著高于西药对照组 ($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠软骨组织中通路相关蛋白 TGB-β、SMD2、

SMAD4 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数 (n)	TGB-β	SMD2	SMAD4
正常组	10	0.98 ± 0.05	0.95 ± 0.06	1.02 ± 0.04
骨折模型组	10	0.32 ± 0.04	0.28 ± 0.05	0.41 ± 0.06
西药对照组	10	0.59 ± 0.06	0.52 ± 0.07	0.67 ± 0.05
药物组	10	0.82 ± 0.07	0.79 ± 0.06	0.88 ± 0.07
F 值		1.085	1.282	1.068
P 值		0.005	0.004	0.001

(三) 各组大鼠软骨组织中通路相关基因 TGB-β、SMD2、SMAD4 mRNA 的表达水平比较

如表 3 所示, RT-PCR 结果与蛋白水平的变化趋势基本一致。骨折模型组 TGF-β、Smad2、Smad4 的 mRNA 表达水平较正常组显著降低 ($P < 0.05$)。药物治疗后, 西药对照组和药物组这三个基因的 mRNA 表达均得到显著上调 ($P < 0.05$)。药物组各基因的 mRNA 表达水平上调幅度显著大于西药对照组, 有统计学差异 ($P < 0.05$)。

表 3 各组大鼠软骨组织中通路相关基因 TGB-β、SMD2、

SMAD4 的表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数 (n)	TGB-β	SMD2	SMAD4
正常组	10	1.02 ± 0.08	1.00 ± 0.07	0.99 ± 0.06
骨折模型组	10	0.35 ± 0.06	0.30 ± 0.05	0.38 ± 0.07
西药对照组	10	0.65 ± 0.07	0.58 ± 0.06	0.64 ± 0.05
药物组	10	0.92 ± 0.09	0.87 ± 0.08	0.90 ± 0.07
F 值		2.541	1.635	1.254
P 值		0.002	0.001	0.001

三、讨论

膝骨关节炎 (KOA) 是中老年常见的慢性病, 表现为膝关节软骨退变和炎症, 发病率上升, KOA 导致疼痛和活动受限, 影响生活质量, 发病因素多样, 现代医学和中医理论各有解释, 随着老龄化, 治疗需求增加, 但治疗面临挑战^[3]。

本研究结果显示: 与模型组相比, 药物组和西药组对照组的Lequesne MG 评分和Mankin 评分都有明显下降, 且药物组效果优于西药组对照组。Western Blot 和 RT-PCR 结果显示, 经药物干预后, 药物组和西药组对照组上述指标均显著上调, 且药物

组的上调作用更为显著, 行其原因分析可知, 独活寄生汤是中医方剂, 用于治疗膝关节骨性关节炎。它能祛风散寒、除湿止痛, 补肝肾、养血, 缓解疼痛和肿胀, 改善关节功能。研究显示, 该方剂中的成分如杜仲、牛膝等, 能促进软骨修复、抗炎, 并激活TGF- β 通路, 实现软骨修复与重建, 温和全面恢复机体平衡。

综上所述, 独活寄生汤能显著改善 KOA 大鼠的关节功能, 缓解临床症状。能有效减轻关节软骨的病理损伤, 促进软骨修复。独活寄生汤的作用机制可能与上调软骨组织中 TGF- β 、Smad2、Smad4 的基因和蛋白表达, 激活被抑制的 TGF- β / Smad 信号通路有关。

参考文献

- [1] 陈俊, 郑若曦, 叶锦霞, 等. 独活寄生汤治疗大鼠膝骨关节炎的作用机制研究 [J]. 中医正骨, 2021, 33(11):6-12.
- [2] 张续, 郑洁, 赵莉平, 等. 独活寄生汤对膝骨关节炎大鼠 IL-17/NF- κ B 通路的影响 [J]. 陕西中医, 2022, 43(6):691-695.
- [3] 刘杨, 薛小娜, 吕亚楠, 等. 电针联合推拿对骨关节炎大鼠模型的保护软骨损伤并减轻膝骨关节炎疼痛作用研究 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2025, 27(1):292-300.
- [4] 高志旭, 王玉满, 郭建恩, 等. 温针灸对膝骨关节炎大鼠跨膜受体蛋白1和自噬相关基因3的影响 [J]. 世界中医药, 2025, 20(10):1749-1754.
- [5] 王强, 谭章勇, 诸葛恒艳, 等. 基于 TLR-4/NF- κ B P65 信号通路研究独活寄生汤对膝骨关节炎的治疗作用及机制 [J]. 中药材, 2024, 47(6):1524-1530.