

王静雅, 闫康, 李继安, 等. 益肾逐瘀通络汤对膝骨关节炎大鼠软骨细胞焦亡和铁死亡的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(1): 49-58.

Wang JY, Yan K, Li JA, et al. Effect of Yishen Zhuyu Tongluo Decoction on chondrocyte pyroptosis and ferroptosis in rats with knee osteoarthritis [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(1): 49-58.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.01.005

益肾逐瘀通络汤对膝骨关节炎大鼠软骨细胞焦亡和铁死亡的影响

王静雅^{1,2}, 闫康³, 李继安^{1,2}, 王萌^{1,2*}, 杨雨暘^{1,2}, 虞跃跃^{1,2}

(1.华北理工大学中医学院,河北唐山 063210;2.河北省中西医结合重点实验室,河北唐山 063210;
3.河北大学中医学院,河北保定 071000)

【摘要】 **目的** 探究益肾逐瘀通络汤对膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)大鼠软骨细胞焦亡和铁死亡的影响。**方法** 40只SD大鼠随机分为假手术组(10只)和造模组(30只);造模组大鼠右后肢膝关节均采用前交叉韧带离断术(anterior cruciate ligament-transection, ACLT)制作KOA模型,抽屉试验检测是否到位,造模操作后,驱赶大鼠每天强制活动30 min以诱导KOA模型,造模4周后大鼠出现跛行、跳跃动作,且苏木素-伊红(HE)染色出现软骨表层缺损变形和炎细胞浸润确认造模成功,造模成功后,大鼠随机分为模型组($n=8$)、塞来昔布组($n=8$)和益肾逐瘀通络汤组($n=8$)。各组大鼠给予生理盐水或药物灌胃干预,其中,假手术组和模型组大鼠灌胃10 mL/kg的生理盐水,塞来昔布组大鼠灌胃12 mg/kg的塞来昔布水溶液,益肾逐瘀通络汤组大鼠灌胃5.4 g/kg的中药水煎液,每天1次,连续8周。干预完成后,麻醉大鼠,腹主动脉采血分离血清,分离膝关节,每组取3份膝关节固定于多聚甲醛,其他分离关节软骨组织备用。使用HE、番红固绿染色观察大鼠关节面软骨病理改变;micro-CT分析骨微结构;ELISA检测血清白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-18的蛋白表达量;逆转录定量PCR(reverse transcription quantitative real-time PCR, RT-qPCR)检测细胞焦亡和铁死亡相关基因NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 、IL-18、ACSL-4、FTH-1、GPX-4和COX-2的mRNA相对表达水平。免疫组化检测NLRP3、Caspase-1、COX-2蛋白表达情况。**结果** 与假手术组比较,模型组大鼠软骨组织表层缺损变形,整体各层细胞排列紊乱,番红固绿染色丢失较多,骨小梁稀疏、分布紊乱;血清炎症因子IL-1 β 和IL-18升高($P<0.01$);软骨组织NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 、IL-18、ACSL-4和COX-2 mRNA表达量均升高(均 $P<0.01$),FTH-1和GPX-4 mRNA表达量均下降($P<0.01$)。与模型组比较,塞来昔布和益肾逐瘀通络汤组大鼠软骨表面较完整且平滑,细胞数量显著增多,番红固绿染色丢失较少,骨小梁致密、骨皮质丰厚,骨微结构均改善;血清炎症因子IL-1 β 和IL-18表达量下降($P<0.01$);软骨组织NLRP3($P<0.01$, $P<0.05$)、ASC、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 和IL-18、ACSL-4和COX-2 mRNA(均 $P<0.01$)mRNA表达量下降;FTH-1和GPX-4 mRNA相对表达量显著升高($P<0.01$)。**结论** 益肾逐瘀通络汤可通过抑制KOA大鼠软骨细胞焦亡和铁死亡,降低血清IL-1 β 、IL-18的水平,改善骨微结构,治疗KOA。

【关键词】 逐瘀通络汤;骨关节炎;细胞焦亡;铁死亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 01-0049-10

【基金项目】 河北省国际科技合作基地建设专项(19392507D);国家科技部对发展中国家科技援助项目(KY201904005)。

【作者简介】 王静雅(1992—),女,在读硕士研究生,研究方向:骨关节疾病发生机制与防治。E-mail:1399426535@qq.com

【通信作者】 王萌(1989—),女,博士,副教授,研究方向:骨关节疾病发生机制与防治。E-mail:wmedtcm@163.com

Effect of Yishen Zhuyu Tongluo Decoction on chondrocyte pyroptosis and ferroptosis in rats with knee osteoarthritis

WANG Jingya^{1,2}, YAN Kang³, LI Jian^{1,2}, WANG Meng^{1,2*}, YANG Yuyang^{1,2}, YU Yueyue^{1,2}

(1. College of Traditional Chinese Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China. 2. Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hebei Province, Tangshan 063210. 3. College of Traditional Chinese Medicine, Hebei University, Baoding 071000)

【 Abstract 】 Objective To investigate the effects of Yishen Zhuyu Tongluo Decoction on chondrocyte pyroptosis and ferroptosis in rats with knee osteoarthritis (KOA). **Methods** Forty SD were divided randomly into a sham operation group ($n=10$) and a modeling group ($n=30$). A KOA model was established in the modeling group by anterior cruciate ligament transection of the right hind limb knee joint. The drawer test was used to confirm the successful establishment of the model. Post-surgery, the rats were subjected to 30 min of forced activity daily to induce KOA. Lameness and hopping movements were observed after 4 weeks, and hematoxylin and eosin staining confirmed cartilage surface damage, deformation, and inflammatory cell infiltration, indicating successful modeling. The model rats were then assigned randomly to a model group ($n=8$), celecoxib group ($n=8$), and Yishen Zhuyu Tongluo Decoction group ($n=8$). The sham operation and model groups received 10 mL/kg of saline by gavage, the celecoxib group received 12 mg/kg of celecoxib solution, and the Yishen Zhuyu Tongluo Decoction group received 5.4 g/kg of the herbal decoction, once daily for 8 weeks. After the interventions, the rats were anesthetized, blood was collected from the abdominal aorta and serum was separated, and the knee joints were isolated. Three samples were fixed in paraformaldehyde, while the remaining cartilage tissue was reserved. Pathological changes in joint cartilage were observed by hematoxylin and eosin and Safranin O-Fast Green staining. Bone microstructure was analyzed using micro-computed tomography. Serum interleukin (IL)-1 β and IL-18 protein levels were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Relative mRNA expression levels of *NLRP3*, *ASC*, *Caspase-1*, *GSDMD*, *IL-1 β* , *IL-18*, *ACSL-4*, *FTH-1*, *GPX-4*, and cyclooxygenase (COX)-2 were detected by reverse transcription quantitative real-time PCR, and protein expression of *NLRP3*, *Caspase-1*, and *COX-2* were detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with the sham operation group, model rats showed surface damage and deformation of cartilage tissue, disordered cell arrangement in all layers, significant loss of Safranin O-Fast Green staining, and sparse and irregular trabecular bone distribution. Serum levels of the inflammatory factors IL-1 β and IL-18 were elevated ($P<0.01$). mRNA expression levels of *NLRP3*, *ASC*, *Caspase-1*, *GSDMD*, *IL-1 β* , *IL-18*, *ACSL-4*, and *COX-2* were also significantly increased (all $P<0.01$), while *FTH-1* and *GPX-4* mRNA expression levels were decreased ($P<0.01$). Compared with the model group, rats in the celecoxib and Yishen Zhuyu Tongluo Decoction groups showed smoother and more intact cartilage surfaces, significantly increased cell counts, less loss of Safranin O-Fast Green staining, denser trabecular bone, and thicker cortical bone, with improved bone microstructure. Serum IL-1 β and IL-18 levels were reduced ($P<0.01$), *NLRP3* ($P<0.01$, $P<0.05$), *ASC*, *Capase-1*, *GSDMD*, *IL-1 β* , *IL-18*, *ACSL-4*, and *COX-2* mRNA levels were decreased (all $P<0.01$), and relative expression levels of *FTH-1* and *GPX-4* mRNA were significantly increased ($P<0.01$). **Conclusions** Yishen Zhuyu Tongluo Decoction can treat KOA by inhibiting chondroptosis and ferroptosis in chondrocytes, reducing serum IL-1 β and IL-18 levels, and improving bone microstructure.

【 Keywords 】 Zhuyu Tongluo Decoction; osteoarthritis; cell pyroptosis; ferroptosis

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

膝关节骨性关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种以关节软骨破坏、软骨下骨硬化等为主要病理表现的一种关节软骨退行性病变^[1]。KOA 总体发病率较高,数据调查显示,我国 8.1% 的人群患有 KOA 症状^[2]。KOA 临床常见膝关节疼痛以及活动受限,严重影响患者的健康水平及生活质量。传统中医理论并未有“膝骨关节炎”的病名,根据其患处在膝关节且以疼痛为主诉的特征,将之归于“骨痹”“膝痹”的范畴^[3]。中医理论认为,该病与肾精亏虚、元气不足、久病入络、瘀血阻滞密切相关,因此用药多选滋补肝肾、活血化瘀之品。益肾逐瘀通络汤由身痛逐瘀汤加味益气强肾、活血化瘀之品而来,常用于治疗颈椎病、肩周炎、肘关节炎、腰椎病、膝关节炎等疾病,临床效果显著。

细胞焦亡是一种细胞的裂解性死亡方式,表现为细胞胀大至细胞膜破裂,使细胞内炎性物质等细胞内容物释放至胞外,导致一系列炎症反应^[4]。铁死亡是新发现的一种新型程序性细胞死亡方式,与铁超载、氨基酸代谢异常、脂质过氧化等密切相关^[5]。现代研究发现,KOA 发病进程中存在滑膜巨噬细胞焦亡^[6]和铁死亡的现象^[7],益肾逐瘀通络汤在实际临床应用与前期动物实验当中有缓解 KOA 的作用^[8],但其起效机制尚未知。因此,本研究旨在通过动物实验观察益肾逐瘀通络汤对 KOA 大鼠关节软骨细胞焦亡和铁死亡的影响,进一步探讨其治疗 KOA 的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

40 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,6 周龄,体重 200 ~ 230 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2020-0004]。大鼠在华北理工大学动物实验中心进行 7 d 适应性饲养[SYXK(冀)2020-0007],饲养环境符合国家标准(GB 14925-2023)。动物实验方案由华北理工大学动物伦理委员会审批通过(2021-SY-0070)。实验动物饲养和实验过程中遵循减少(reduction)、替代(replacement)和优化(refinement)的 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

益肾逐瘀通络汤全方共 17 味中药,其中包含黄芪 30 g、牛膝 12 g、杜仲 6 g、秦艽 3 g、当归 9 g、

桃仁 9 g、红花 9 g、川芎 6 g、制没药 6 g、香附 5 g、羌活 3 g、地龙 6 g、生甘草 6 g、片姜黄 6 g、全蝎 1 g、蜈蚣 1 g、鹿茸 1 g。中药饮片购于河北明珠药业有限公司,药物水煎后浓缩药液至 0.6 g/mL,4 ℃ 保存备用。白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β) ELISA 检测试剂盒购自南京建成生物工程有限公司,货号:A0172;白细胞介素-18(Interleukin-18, IL-18)检测试剂盒购自南京博研生物科技有限公司,货号:BY-ER330204;核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 基因(NOD-like receptor family pyrin domain containing 3, *NLRP3*)、凋亡相关颗粒样蛋白基因(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, *ASC*)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶基因(cysteiny l aspartate specific proteinase, *Caspase-1*)、Gasdermin-D(*GSDMD*)、*IL-1 β* 、*IL-18*、长链酰基辅酶 A 合成酶 4 基因(long-chain acyl-coenzyme A synthase 4, *ACSL-4*)、重铁蛋白基因(ferritin heavy chain 1, *FTH-1*)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, *GPX4*) 和环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, *COX-2*) 的引物序列(见表 1)

表 1 引物序列

Table 1 Primer Sequence

名称 Name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')
<i>GAPDH</i>	F: ACAGCAACAGGTTGCTGGAC R: TTTGAGGGTGCACGCAACTT
<i>NLRP3</i>	F: CTGCTGAAGTGGATCGAAGTG R: TGCAAAAGGAAGAAACACGCT
<i>ASC</i>	F: TCATTGCCAGGCTCACAAAAG R: CAAGTTCTTGAGGTCAGGTT
<i>Caspase-1</i>	F: AACTGAACAAAAGAAGGTGGCG R: GCAGATAATGAGGGCAAGACC F: CCTGTGTGATGAAAGACGGC R: TATGTCCCGACCATTGCTGT
<i>IL-1β</i>	F: GGAATCAGACCACTTTGGCAGA R: CACAGATAGGCTCACAGCCAGT
<i>IL-18</i>	F: ACCAGAACCGGAGTGTITTTG R: TGACTCACACGCAGCATACA
<i>GSDMD</i>	F: AAATGCAGCCAAATGGAAG R: CACAGAAAATGCCAATGGTG
<i>ACSL4</i>	F: ATGATGTGGCCCTGAAGAAC R: GCACACTCCATTGCATTGAG
<i>FTH1</i>	F: CCGGCTACAATGTCAGGTTT R: ACCGACGGCTTCTTATCAAT
<i>GPX4</i>	F: ACTACGCCTGAGTTTCTGACA R: GGTGGGCTGTCAATCAAATGT
<i>COX-2</i>	

由大连宝生物有限公司合成。EDTA 购自北京酷来博科技有限公司,货号:CE4971;NLRP3 一抗购自华安生物,货号:ET1610-93;Caspase-1 一抗购自 Proteintech 公司,货号:22915-1-AP;COX-2 一抗购自 Proteintech 公司,货号:66351-1-Ig。

生物组织摊片机购自上海精学科学仪器有限公司,型号:JK-TBP-3A;切片机购自德国 Leica 公司,型号:TP1020;倒置生物显微镜购自麦克奥迪实业集团有限公司,型号:AE2000;FlexStation 3 多功能酶标仪购自 Molecular Devices,型号:Flexstation 3;组织脱水机、包埋机、摊烤片机均购自武汉俊杰电子有限公司,型号:JT-12J、JB-L6、JK-6。

1.3 实验方法

1.3.1 分组、造模和给药

应用随机数字表法将大鼠随机分为假手术组($n=10$)和造模组($n=30$),除假手术组,其他大鼠右侧后肢接受前交叉韧带离断术(anterior cruciate ligament-transection, ACLT),造模 KOA 模型。麻醉后将大鼠仰卧位固定于操作台,沿髌骨内缘行纵向切口打开关节腔,屈曲大鼠膝关节,侧推髌骨,暴露前交叉韧带,离断韧带后使髌骨复位,逐层缝合。抽屈试验检验造模操作是否到位。予青霉素 3 d,待伤口痊愈后,驱赶大鼠强制活动,令其每天活动不少于 30 min,持续 3 周,以诱导 KOA 模型。如大鼠出现跛行、跳跃动作,苏木素-伊红(HE)染色出现软骨表层缺损变形和炎细胞浸润则表明造模成功^[9-12]。假手术组大鼠仅剪开局部皮肤后即缝合,每日活动方式、活动时长与其他组相同。造模 4 周后,造模成功的大鼠随机分为模型组($n=8$)、塞来昔布组($n=8$)和益肾逐瘀通络汤组($n=8$)。大鼠接受药物干预,假手术组和模型组大鼠灌胃 10 mL/(kg·d)的生理盐水;各给药组大鼠按人体剂量的 3.15 倍(低剂量)给药,塞来昔布组大鼠按照 12 mg/(kg·d)灌胃的塞来昔布水溶液;益肾逐瘀通络汤组大鼠灌胃 5.4 g/(kg·d)中药水煎液,各干预 8 周。

1.3.2 HE 染色、番红固绿染色

大鼠膝关节脱钙、脱水浸蜡、包埋、切片。HE 染色:石蜡切片脱蜡至水后分别进行苏木素染色和伊红染色,脱水封片后镜下观察膝关节软骨细胞形态。番红固绿染色:石蜡切片脱蜡至水后分

别进行固绿染色和番红染色,二甲苯透明,封片后镜下观察软骨组织形态。

1.3.3 ELISA 检测血清 IL-1 β 、IL-18 的表达

应用 ELISA 试剂盒检测血清 IL-1 β 、IL-18 的水平。实验操作方法按试剂盒说明书执行。

1.3.4 micro-CT 分析

应用 4%多聚甲醛将大鼠右膝关节固定后送至上海市第六人民医院进行 micro-CT 扫描,观察大鼠膝关节骨微结构。

1.3.5 逆转录定量 PCR (reverse transcription quantitative real-time PCR, RT-qPCR) 检测 mRNA 的表达

用 TRIzol 试剂从右膝关节软骨中提取总 RNA,逆转录成 cDNA,使用实时定量 PCR 检测基因 *NLRP3*、*ASC*、*Caspase-1*、*GSDMD*、*IL-1 β* 、*IL-18*、*ACSL-4*、*FTH-1*、*GPX-4* 和 *COX-2* 的表达水平。

1.3.6 免疫组化检测蛋白的表达

按照免疫组化试剂盒说明书进行操作。石蜡切片脱蜡水化后进行抗原修复,加入内源性过氧化物酶抑制剂,一抗 4℃过夜,加入二抗,37℃孵育,DAB 显色。观察关节软骨中 *NLRP3*、*ASC*、*Caspase-1* 和 *COX-2* 的表达。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 22.0 软件对数据进行处理,检测结果用平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较应用 One-Way ANOVA。事后比较方差齐时用 Bonferroni 检验,方差不齐用 Tamhane *T2* 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 益肾逐瘀通络汤对软骨组织形态学的影响

HE 染色主要用于观察软骨细胞形态学的情况,其中细胞核呈蓝色,细胞质呈红色。如图 1 所示,假手术组关节软骨表面光滑且完整,各层细胞排列整齐;而模型组关节软骨表层缺损变形,整体各层细胞排列紊乱;塞来昔布组和益肾逐瘀通络汤组软骨表面较完整且平滑,细胞数量显著增多。

番红固绿染色主要用于观察关节软骨、软骨下的骨组织结构,其中关节软骨呈红色或橙红色,成骨呈绿色。如图 2 所示,假手术组软骨表面光滑,结构正常,关节面整齐,无番红固绿丢失;

模型组软骨组织关节面结构破坏,表面粗糙,番红固绿染色丢失;塞来昔布组和益肾逐瘀通络汤组大鼠骨组织关节面结构明显改善,表面略微粗糙番红固绿染色丢失较少。

2.2 益肾逐瘀通络汤对骨微结构的影响

micro-CT 检测结果见图 3。软骨下骨二维成像所示,与假手术组比较,模型组骨小梁变得稀疏、分布紊乱,骨皮质变薄;与模型组比较,塞来昔布组与益肾逐瘀通络汤组骨小梁致密、骨皮质丰厚,骨微结构均改善。

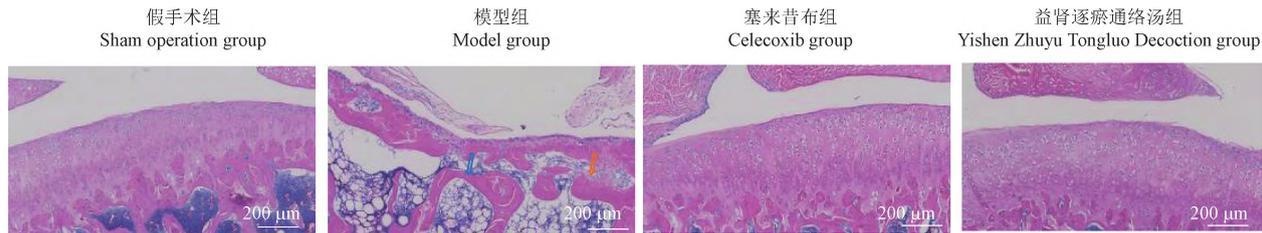
2.3 益肾逐瘀通络汤对血清炎症因子的影响

与假手术组比较,模型组大鼠血清细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 显著升高 ($P < 0.01$),存在明显的炎症反应;与模型组比较,塞来昔布组和益肾逐

瘀通络汤组均显著下调了大鼠的血清炎症因子表达 ($P < 0.01$),提示二者均具有抗炎作用。见表 2。

2.4 益肾逐瘀通络汤对软骨细胞焦亡的影响

与假手术组比较,模型组大鼠软骨组织 *NLRP3*、*ASC*、*Caspase-1*、*GSDMD*、*IL-1 β* 和 *IL-18* mRNA 相对表达量均显著升高 ($P < 0.01$),KOA 模型大鼠软骨组织中存在炎症和细胞焦亡相关基因表达上调;与模型组比较,塞来昔布组和益肾逐瘀通络汤组大鼠软骨组织 *NLRP3* ($P < 0.01$, $P < 0.05$)、*ASC*、*Caspase-1*、*GSDMD*、*IL-1 β* 和 *IL-18* (均 $P < 0.01$) mRNA 表达量下降,益肾逐瘀通络汤能够显著降低炎性与细胞焦亡基因表达。见表 3,图 4。

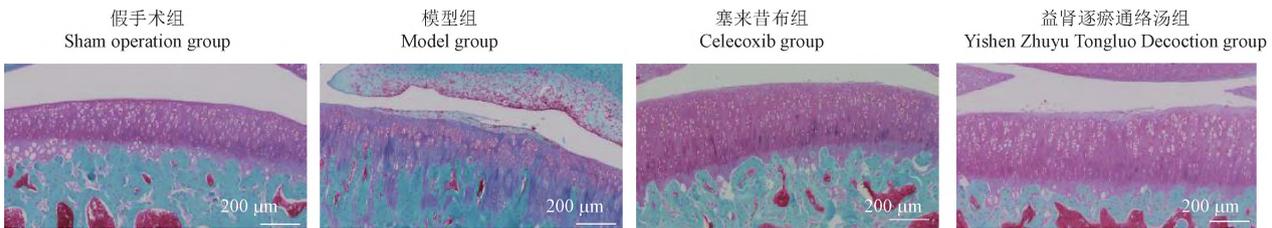


注:蓝色箭头:软骨表层缺损变形;黄色箭头:软骨细胞增生。

图 1 软骨 HE 染色

Note. Blue arrow, Surface layer of cartilage was defective and deformed. Yellow arrow, Chondrocyte proliferation.

Figure 1 HE staining of cartilage



注:蓝色箭头:软骨表层缺损变形,黄色箭头:染色缺失。

图 2 软骨番红固绿染色

Note. Blue arrow, Surface layer of cartilage was defective and deformed. Yellow arrow, Staining deficiency.

Figure 2 cartilage safranin and solid green staining

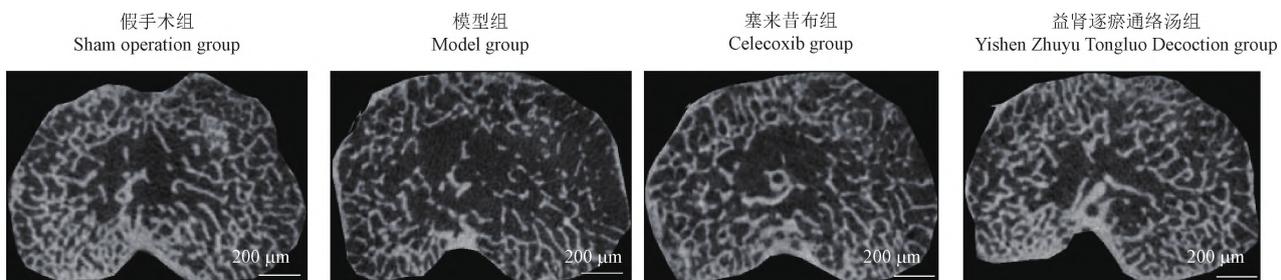


图 3 软骨下骨 2D 成像图像

Figure 3 2D imaging image of subchondral bone

2.5 益肾逐瘀通络汤对软骨细胞铁死亡的影响

与假手术组比较,模型组大鼠软骨组织 *ACSL-4* 和 *COX-2* mRNA 表达量显著升高 ($P < 0.01$), *FTH-1* 和 *GPX-4* mRNA 表达量显著下降 ($P < 0.01$), *KOA* 模型大鼠的软骨组织中存在铁死亡相关基因表达的显著变化,这可能与软骨细

胞的损伤和 *KOA* 的进展有关;与模型组比较,塞来昔布组和益肾逐瘀通络汤组大鼠软骨组织 *ACSL-4* 和 *COX-2* mRNA 表达量显著下降 ($P < 0.01$), *FTH-1* 和 *GPX-4* mRNA 表达量显著升高 ($P < 0.01$),益肾逐瘀通络汤能够显著降低铁死亡相关基因的表达,提高铁稳态和抗氧化相关基因的表达。见表 4,图 5。

表 2 益肾逐瘀通络汤对血清炎症因子的影响 ($n=6$)

Table 2 Effect of Yishen Zhuyu Tongluo Decoction on serum inflammatory factors ($n=6$)

组别 Group	白介素-1 β /(pg/mL) IL-1 β	白介素-18/(ng/L) IL-18
假手术组 Sham operation group	56.21 \pm 3.00	9.11 \pm 1.49
模型组 Model group	106.43 \pm 3.99**	32.76 \pm 0.99**
塞来昔布组 Celecoxib group	66.73 \pm 4.90 $\Delta\Delta$	18.51 \pm 1.63 $\Delta\Delta$
益肾逐瘀通络汤组 Yishen Zhuyu Tongluo Decoction group	59.50 \pm 3.73 $\Delta\Delta$	27.30 \pm 1.04 $\Delta\Delta$

注:与假手术组相比, ** $P < 0.01$;与模型组相比, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

Note. Compared with sham operation group, ** $P < 0.01$. Compared with model group, $\Delta\Delta P < 0.01$.

表 3 益肾逐瘀通络汤对软骨细胞 *NLRP3*、*ASC*、*Caspase-1*、*GSDMD*、*IL-1 β* 和 *IL-18* mRNA 的影响 ($n=3$)

Table 3 Effects of Yishen Zhuyu Tongluo Decoction on *NLRP3*、*ASC*、*Caspase-1*、*GSDMD*、*IL-1 β* and *IL-18* mRNA in chondrocytes ($n=3$)

组别 Groups	<i>NLRP3</i>	<i>ASC</i>	<i>Caspase-1</i>	<i>GSDMD</i>	<i>IL-1β</i>	<i>IL-18</i>
假手术组 Sham operation group	1	1	1	1	1	1
模型组 Model group	4.16 \pm 0.08**	3.53 \pm 0.20**	4.59 \pm 0.17**	3.95 \pm 0.05**	3.47 \pm 0.20**	3.19 \pm 0.43**
塞来昔布组 Celecoxib group	1.10 \pm 0.01 $\Delta\Delta$	1.04 \pm 0.02 $\Delta\Delta$	1.30 \pm 0.08 $\Delta\Delta$	1.25 \pm 0.07 $\Delta\Delta$	1.22 \pm 0.19 $\Delta\Delta$	1.32 \pm 0.21 $\Delta\Delta$
益肾逐瘀通络汤组 Yishen Zhuyu Tongluo Decoction group	2.51 \pm 0.25 Δ	2.66 \pm 0.22 $\Delta\Delta$	2.01 \pm 0.18 $\Delta\Delta$	2.43 \pm 0.17 $\Delta\Delta$	2.23 \pm 0.24 $\Delta\Delta$	1.91 \pm 0.27 $\Delta\Delta$

注:与假手术组相比, ** $P < 0.01$;与模型组相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

Note. Compared with sham operation group, ** $P < 0.01$. Compared with model group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$.

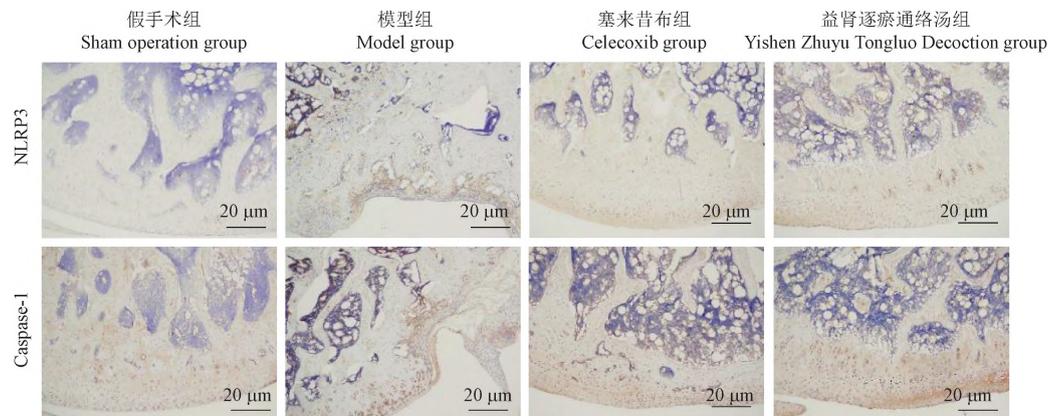


图 4 各组大鼠膝关节软骨组织中 *NLRP3*、*Caspase-1* 蛋白表达

Figure 4 Expression of *NLRP3* and *Caspase-1* proteins in knee joint cartilage tissue of rats in each group

表 4 益肾逐瘀通络汤对软骨细胞 *ACSL-4*、*COX-2*、*FTH-1*、*GPX-4* mRNA 的影响 ($n=3$)

Table 4 Effects of Yishen Zhuyu Tongluo Decoction on *ACSL-4*, *COX-2*, *FTH-1*, and *GPX-4* mRNA in chondrocytes ($n=3$)

组别 Groups	<i>ACSL-4</i>	<i>COX-2</i>	<i>FTH-1</i>	<i>GPX-4</i>
假手术组 Sham operation group	1	1	1	1
模型组 Model group	3.77±0.48**	2.53±0.07**	0.26±0.03**	0.20±0.03**
塞来昔布组 Celecoxib group	1.02±0.08 ^{△△}	1.31±0.13 ^{△△}	0.89±0.08 ^{△△}	0.88±0.06 ^{△△}
益肾逐瘀通络汤组 Yishen Zhuyu Tongluo Decoction group	1.96±0.10 ^{△△}	1.41±0.13 ^{△△}	0.67±0.03 ^{△△}	0.60±0.07 ^{△△}

注:与假手术组相比, ** $P<0.01$;与模型组相比, ^{△△} $P<0.01$ 。

Note. Compared with sham operation group, ** $P<0.01$. Compared with model group, ^{△△} $P<0.01$.

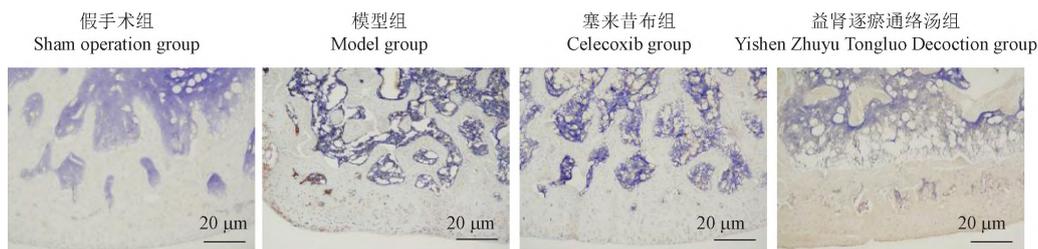


图 5 大鼠膝关节软骨组织 COX-2 表达

Figure 5 COX-2 expression in rat knee joint cartilage tissue

3 讨论

内经指出“年四十,而阴气自半,起居衰矣”,强调了肾精不足是机体衰老的主导因素^[10-12],而 KOA 的主要发病机制在于软骨发生退行性变化,软骨成分发生改变,最终导致关节疼痛和功能丧失,与肾虚精亏所致经脉痹阻密切相关。益肾逐瘀通络汤由身痛逐瘀汤去掉五灵脂加黄芪、鹿茸、杜仲、全蝎、蜈蚣、片姜黄化裁而来,在原方活血通络的基础上,加黄芪补气以活血,杜仲、鹿茸补肝肾、壮筋骨;全蝎、蜈蚣、片姜黄通络化瘀,使全方具有益气强肾、活血祛瘀、通痹止痛之功,符合中老年人 KOA 肾精亏虚、络脉不畅的基本病机。本方临床常用于治疗瘀血痹阻、肾精不充、筋骨失荣导致的各种退行性关节病经久不愈者。

细胞焦亡、铁死亡是区别于传统细胞凋亡、坏死和自噬的两种新型细胞程序性死亡,具有不同的生物学特征,对 KOA 软骨基质稳态具有调控作用,是引起软骨成分改变的重要因素,这同时也是 KOA 瘀血痹阻、肾精不充、筋骨失荣的具体体现。塞来昔布是非甾体类抗炎药,是临床治疗 KOA 的常规药物,本品通过抑制环氧化酶-2

(COX-2)来抑制前列腺素生成,可以减少局部组织的水肿和疼痛。因此,本实验以塞来昔布为阳性对照药。

近年来,部分研究证明细胞焦亡可能与 KOA 的软骨破坏有关^[13-14]。具体来说,NLRP3 (NOD 样受体蛋白 3) 炎症小体的激活可以介导 Caspase-1,促使 IL-1 β 和 IL-18 的前体加工裂解,促进细胞焦亡,破坏膝关节软骨^[15]。研究表明,IL-1 β 在 KOA 的发病过程中起重要作用,包括加速关节软骨破坏,促进软骨纤维化等^[16-17]。IL-18 可刺激 TNF- α 和 IL-1 β 的释放,进而协调促进基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)生成,并加速降解 II 型胶原和蛋白聚糖,破坏软骨细胞基质稳态^[18]。因此,调控 NLRP3 炎症小体介导依赖 Caspase-1 的细胞焦亡是抑制 KOA 的炎症损伤的重要方法。本实验结果表明与假手术组比较,模型组大鼠软骨组织 *NLRP3*、*ASC*、*Caspase-1*、*GSDMD*、*IL-1 β* 和 *IL-18* 表达量均显著升高,与模型组比较,益肾逐瘀通络汤组大鼠软骨组织 *NLRP3*、*ASC*、*Caspase-1*、*GSDMD*、*IL-1 β* 和 *IL-18* 表达量下降。说明 KOA 大鼠软骨细胞出现 NLRP3 炎症小体活化和细胞焦亡,而益肾逐瘀通络汤可

以抑制软骨细胞焦亡,治疗 KOA。

铁死亡被发现与 KOA 的发生发展有着密切的联系^[19]。铁死亡与传统的细胞死亡方式不同,其主要是由于铁含量的增高引起细胞内脂质活性氧生成与降解的平衡失调而引起的细胞死亡^[20]。铁死亡具有典型的生物化学特征,如谷胱甘肽耗竭以及 GPX4 被抑制,使得细胞内活性氧浓度上升、细胞内 Fe²⁺ 水平升高,同时还会出现线粒体膜电位的下降、发生炎症反应等现象,进而促进骨关节炎的发生^[21]。骨关节炎患者滑液中铁的浓度明显高于健康人,此外,关节损伤程度与血清铁蛋白升高呈正相关。ACSL4 是多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFAs)代谢的重要同工酶,决定细胞铁死亡的敏感性^[22]。COX-2 是催化体内 AA 合成前列腺素(PG)步骤中的限速酶,是脂质过氧化和铁死亡的标志物^[23],GPX4 蛋白是人体内一类能够将脂质过氧化物还原为醇类的酶,可以减少细胞中的脂质过氧化物的积累并且帮助细胞存活,GPX4 蛋白丧失活性可以促进铁死亡的发生^[24]。铁蛋白(ferritin)由重链(ferritin heavy chain, FTH)和轻链(ferritin light chain, FTL)两种亚基构成球壳空腔结构,是细胞内最主要的储铁蛋白,维持细胞内铁稳态,减少 Fenton 反应导致的氧化应激,达到保护细胞的目的,铁输入和 ferritin 降解等过程都促进铁死亡^[25]。本研究发现与假手术组比较,模型组大鼠软骨组织 ACSL-4 和 COX-2 表达量均显著升高,FTH-1 和 GPX-4 表达量均显著下降;与模型组比较,益肾逐瘀通络汤组大鼠软骨组织 ACSL-4 和 COX-2 表达量下降,FTH-1 和 GPX-4 表达量升高。说明除细胞焦亡外,KOA 大鼠软骨细胞出现铁死亡现象,而益肾逐瘀通络汤可以抑制软骨铁死亡。

KOA 是一种退行性疾病,这与老年人年老体衰,肾精亏虚,筋骨失荣;久病入络,瘀血阻滞,经脉痹阻密切相关。肾精亏虚,筋骨失荣则关节软骨组织不能得到精血荣养,细胞出现各种异常死亡,如细胞焦亡、铁死亡等。瘀血阻滞,经脉痹阻,使得关节软骨组织出现炎症反应。本研究表明益肾逐瘀通络汤既可益气强肾又可活血祛瘀、通痹止痛,是治疗 KOA 的有效方剂,其作用机制可能与抑制 KOA 大鼠软骨细胞焦亡和铁死亡,降低

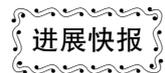
血清 IL-1 β 、IL-18 的水平,改善骨微结构有关。

参考文献:

- [1] 廖太阳,王培民,张农山,等. NLRP3 炎症小体在 KOA 发病机制中的作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(12): 91-96.
LIAO T Y, WANG P M, ZHANG N S, et al. Role of the NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of knee osteoarthritis [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(12): 91-96.
- [2] 王斌,邢丹,董圣杰,等. 中国膝关节炎流行病学和疾病负担的系统评价 [J]. 中国循证医学杂志, 2018, 18(2): 134-142.
WANG B, XING D, DONG S J, et al. Prevalence and disease burden of knee osteoarthritis in China: a systematic review [J]. Chin J Evid Based Med, 2018, 18(2): 134-142.
- [3] 余皓,张洙,李雪萍,等. 独活寄生汤对膝关节骨性关节炎患者膝关节功能、疼痛及血清炎症因子的影响 [EB/OL]. [2024-08-29]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.r.20240828.1623.019.html>.
YU H, ZHANG X, LI X P, et al. Effect of Duhuo Jisheng decoction on knee joint function, pain and serum inflammatory factors in patients with knee osteoarthritis [EB/OL]. [2024-08-29]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.r.20240828.1623.019.html>.
- [4] 王秋苑,刘又文,岳辰,等. 细胞焦亡相关因子在类风湿关节炎患者中的表达及意义 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(32): 5209-5213.
WANG Q Y, LIU Y W, YUE C, et al. Expression and significance of pyroptosis-related factors in patients with rheumatoid arthritis [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2023, 27(32): 5209-5213.
- [5] YAO X, SUN K, YU S, et al. Chondrocyte ferroptosis contribute to the progression of osteoarthritis [J]. J Orthop Translat, 2021, 27: 33-43.
- [6] 譙童茜,唐成林,邱丽,等. 基于 NLRP3 炎症小体通路探讨电针对急性痛性关节炎大鼠组织蛋白酶 B 的影响 [J]. 针刺研究, 2021, 46(4): 295-300.
QIAO T X, TANG C L, QIU L, et al. Cathepsin-B involved in effect of electroacupuncture by inhibiting the activation of NLRP3 inflammasome in rats with acute gouty arthritis [J]. Acupunct Res, 2021, 46(4): 295-300.
- [7] WANG Z, EFFERTH T, HUA X, et al. Medicinal plants and their secondary metabolites in alleviating knee osteoarthritis: a systematic review [J]. Phytomedicine, 2022, 105: 154347.
- [8] 杨清林,杨雨暘,王萌,等. 益肾活络逐痛汤对膝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.
- YANG Q L, YANG Y Y, WANG M, et al. Effects of Yishen Huoluo Zhutong Decoction on cartilage injury and bone microstructure in rats with knee osteoarthritis [J]. Chin Tradit Pat Med, 2023, 45(7): 2158-2166.
- [9] 吴强, 郑倩华, 蒋一璐, 等. 膝骨性关节炎动物模型选择与制备的比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(5): 125-130.
- WU Q, ZHENG Q H, JIANG Y L, et al. A comparative study of animal model selection and preparation for knee osteoarthritis [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(5): 125-130.
- [10] 金晓飞, 杨郁鹏, 赵季宇, 等. 运用制动法建兔 KOA 分期模型的合理性分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(5): 78-82.
- JIN X F, YANG Y P, ZHAO J Y, et al. Analysis of the rabbit knee osteoarthritis staging model using the braking method [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(5): 78-82.
- [11] 黄俊杰, 陈民利, 朱科燕, 等. WHBE 兔膝关节炎模型的建立与 PRFr 的干预研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(5): 65-73.
- HUANG J J, CHEN M L, ZHU K Y, et al. Establishment of a WHBE rabbit knee osteoarthritis model and therapeutic effect of platelet-rich fibrin releasates [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(5): 65-73.
- [12] 欧宝芳, 别亚男, 陈千晴, 等. 改良后 Hulth 法和 II 型胶原酶注射法建立兔膝关节炎模型的比较研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 29-37.
- OU B F, BIE Y N, CHEN Q Q, et al. Comparison of the modified Hulth model and intra-articular type II collagenase injection as established rabbit models of knee osteoarthritis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(2): 29-37.
- [13] XIAO Y, DING L, YIN S, et al. Relationship between the pyroptosis of fibroblast-like synoviocytes and HMGB1 secretion in knee osteoarthritis [J]. Mol Med Rep, 2021, 23(2): 97.
- [14] AN F, SUN B, LIU Y, et al. Advances in understanding effects of miRNAs on apoptosis, autophagy, and pyroptosis in knee osteoarthritis [J]. Mol Genet Genomics, 2023, 298(6): 1261-1278.
- [15] 高飞, 于博睿, 谢惠迪, 等. 芪地糖肾方对糖尿病肾病足细胞焦亡及 MAPK14/RELA/Caspase-8 信号通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(13): 67-75.
- GAO F, YU B R, XIE H D, et al. Implication of qidi Tangshen prescription (QDTS) on podocyte pyroptosis in diabetes nephropathy by regulating MAPK14/RELA/Caspase-8 signaling pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2024, 30(13): 67-75.
- [16] 付长龙, 叶锦霞, 林洁, 等. 新型程序性细胞死亡对骨关节炎软骨基质稳态影响之初探 [J]. 风湿病与关节炎, 2020, 9(5): 55-57, 80.
- FU C L, YE J X, LIN J, et al. On the effect of new programmed cell death on cartilage matrix homeostasis in osteoarthritis [J]. Rheum Arthritis, 2020, 9(5): 55-57, 80.
- [17] ZHAO L R, XING R L, WANG P M, et al. NLRP1 and NLRP3 inflammasomes mediate LPS/ATP-induced pyroptosis in knee osteoarthritis [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(4): 5463-5469.
- [18] 柴居堂, 宁红霞, 李永章, 等. 中药干预细胞焦亡防治骨关节相关疾病机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(6): 289-298.
- CHAI J T, NING H X, LI Y Z, et al. Mechanism of traditional Chinese medicine intervening in pyroptosis to prevent and treat bone and joint related diseases: a review [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2024, 30(6): 289-298.
- [19] BAO T, LIAO T, CAI X, et al. METTL3 mediated ferroptosis in chondrocytes and promoted pain in KOA via HMGB1 m6A modification [J]. Cell Biol Int, 2024, 48(11): 1755-1765.
- [20] 刘祥辉, 彭国璇, 彭洪成, 等. 成骨分化中的铁死亡在骨质疏松发病机制中的研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2024, 30(2): 305-312.
- LIU X H, PENG G X, PENG H C, et al. Research in ferroptosis in osteogenic differentiation and its role in the pathogenesis of osteoporosis [J]. Chin J Osteoporos, 2024, 30(2): 305-312.
- [21] 高振罡, 章晓云, 蒋文. 铁死亡在骨关节炎中的作用机制及其中医药干预研究进展 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(14): 2242-2247.
- GAO Z G, ZHANG X Y, JIANG W. Mechanism of ferroptosis in osteoarthritis and its traditional Chinese medicine interventions [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2024, 28(14): 2242-2247.
- [22] 邓怡然, 马丽芳, 王佳谊. 铁死亡在肿瘤诊断和治疗中的研究进展 [J]. 中国细胞生物学学报, 2023, 45(12): 1920-1930.
- DENG Y R, MA L F, WANG J Y. Research progress on ferroptosis in tumor diagnosis and treatment [J]. Chin J Cell Biol, 2023, 45(12): 1920-1930.
- [23] 牛媛媛, 樊泽坤, 汪龙德, 等. 诱导肝星状细胞铁死亡在肝纤维化防治中的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2024, 49(9): 2281-2289.
- NIU Y Y, FAN Z K, WANG L D, et al. Research progress on induced hepatic stellate cell ferroptosis in prevention and treatment of liver fibrosis [J]. China J Chin Mater Med, 2024, 49(9): 2281-2289.

- [24] 王芹, 何梦婕, 龙方懿. 铁死亡相关的环状 RNA 在疾病中的作用及机制 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2024, 40(3): 295-311.
WANG Q, HE M J, LONG F Y. Role and mechanism of iron death-related circular RNA in diseases [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2024, 40(3): 295-311.
- [25] 方学贤, 蔡昭贤, 王浩, 等. 铁过载及铁死亡在心脏疾病中的研究进展 [J]. 科学通报, 2019, 64(S2): 2974-2987.
FANG X X, CAI Z X, WANG H, et al. Research progress of iron overload and iron death in heart diseases [J]. Chin Sci Bull, 2019, 64(S2): 2974-2987.
- [收稿日期]2024-07-07



创伤后脑损伤修复中的神经营养素和神经干细胞

创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 是导致残疾、精神障碍甚至死亡的主要原因, 其发病率和社会成本不断上升。尽管人们已经开发并测试了不同的治疗策略来缓解神经功能衰退, 但仍无法彻底治愈这些疾病。研究发现, 以脑源性神经营养因子为代表的各种神经营养素是神经炎症、细胞凋亡、血脑屏障通透性、神经元再生和记忆功能的关键调节因子。这些因子在缓解神经炎症和促进神经再生方面发挥着重要作用。此外, 神经干细胞 (neural stem cell, NSCs) 通过其固有的神经保护和免疫调节特性、神经营养素的释放、内源性 NSCs 的激活以及细胞间信号传导, 促进神经修复。值得注意的是, 创新性的研究建议正在出现, 即结合脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 和 NSCs, 使它们在促进损伤修复和改善创伤后神经元分化方面协同互补、相互促进。在这篇综述中, 我们总结了神经营养素在创伤性脑损伤后促进神经发生和恢复神经功能的机制, 全面探讨了各种神经营养素在创伤性脑损伤基础研究中的潜在治疗作用, 并研究了它们与 NSCs 的相互作用。这项工作旨在为神经营养素在创伤性脑损伤中的临床治疗和转化提供有价值的见解, 从而促进创伤性脑损伤治疗学的进步。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学 (英文)》期刊 (*Animal Models and Experimental Medicine*, 2024, 7(1): 12-23. doi: 10.1002/ame2.12363)。