

加味当归四逆汤对膝骨关节炎大鼠软骨退变的影响及作用机制研究

王永涛¹ 谢一舟¹ 樊效鸿¹ 余洋^{1△}

[摘要] **目的:**探讨加味当归四逆汤通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路对膝骨关节炎(KOA)模型大鼠关节软骨退变及细胞自噬相关因子表达的影响。**方法:**将 96 只 SD 大鼠饲养 2 周后,随机分为正常对照组、模型空白组、硫酸氨基葡萄糖组、加味当归四逆汤高、中和低剂量组,每组 16 只,采用改良的 Hulth 法造模。造模成功后 24 h~4 周各组分批次分别给予生理盐水、硫酸氨基葡萄糖、加味当归四逆汤高、中、低剂量灌服。各批次大鼠均在灌胃 4 周后观察软骨组织形态学变化和 Mankin 病理评分;实时 PCR 检测 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-3、MMP-13、COL2A1 表达;Western Blot 法检测 PI3K、p-Akt、p-mTOR 和 Beclin-1、LC3- I / II 表达。**结果:**模型空白组关节软骨严重退变,软骨细胞分布紊乱,出现了严重萎缩、变性的情况;加味当归四逆汤低、中、高剂量各组,药物剂量越低,关节软骨细胞退变、萎缩程度越接近模型空白组,药物剂量越高,关节软骨细胞退变、萎缩程度越接近正常对照组;与模型空白组相比,硫酸氨基葡萄糖组、加味当归四逆汤高、中、低三种剂量组大鼠膝关节病理 Mankin 评分显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$),硫酸氨基葡萄糖组、加味当归四逆汤高、中剂量组大鼠膝关节 IL-1 β 、MMP-3、MMP-13、PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$),COL2A1、Aggrecan、Beclin-1、LC3- I / II 蛋白表达明显上升,差异有统计学意义($P<0.05$),且加味当归四逆汤高剂量组与硫酸氨基葡萄糖组各蛋白表达结果间差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论:**加味当归四逆汤能通过下调 PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达,抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路,诱导自噬基因 Beclin1、LC3 表达,提升膝骨关节炎软骨细胞自噬水平,以缓解膝骨关节炎关节软骨退变。

[关键词] 膝骨关节炎;当归四逆汤;软骨细胞;自噬

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]**1005-0205(2022)11-0007-06

Efficacy and Mechanism of Modified Danggui Sini Decoction on the Treatment Cartilage Degeneration in Knee Osteoarthritis Rats

WANG Yongtao¹ XIE Yizhou¹ FAN Xiaohong¹ YU Yang^{1△}

¹ Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China.

Abstract Objective: To investigate the efficacy of modified Danggui Sini decoction on articular degeneration and the expression of autophagy related factors in knee osteoarthritis (KOA) rats through PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.

Methods: 96 SD rats were randomly divided into normal control group, blank model group, glucosamine sulfate group, modified Danggui Sini decoction high-dose group, middle-dose group and low-dose group with 16 rats in each group after feeding for 2 weeks. The modified Hulth method was used to build the model. Each group was administered in batches of physiological saline, glucosamine sulfate, and high, middle and low doses of modified Danggui Sini decoction 24 h to 4 weeks after the successful model building. The morphological changes of cartilage tissue were observed in each batch of rats after intragastric administration for 4 weeks; the expression of IL-1 β , TNF- α , MMP-3, MMP-13, and COL2A1 were detected by RT-PCR; the expression of PI3K, p-Akt, p-mTOR, Beclin-1 and LC3- I / II were detected by Western Blot.

Results: There were severe degeneration of articular cartilage, disorder of chondrocyte distribution, severe atrophy and

degeneration in blank group. In the low-dose, middle-dose and high-dose groups of modified Danggui Sini decoction, with the increasing of drug dosage, the degree of degeneration and atrophy of articular chondrocytes was closer to that

基金项目:四川省中医药管理局课题(CKY2021127)

¹ 成都中医药大学附属医院骨科(成都,610072)

[△]通信作者 E-mail:270539179@qq.com

of the normal control group. Compared with model blank group, the pathological Mankin score of knee joint of rats in glucosamine sulfate group, modified Danggui Sini decoction high-dose, medium-dose and low-dose groups was significantly decreased ($P < 0.05$). The protein expressions of IL-1 β , MMP-3, MMP-13, PI3K, p-Akt and p-mTOR in knee joint of rats in glucosamine sulfate group and high-dose and medium-dose modified Danggui Sini decoction groups were significantly decreased ($P < 0.05$). The protein expressions of COL2A1, Aggrecan, Beclin-1 and LC3- I / II were significantly increased ($P < 0.05$), and there was no statistical significance between the high-dose modified Danggui Sini decoction group and glucosamine sulfate group ($P > 0.05$). **Conclusion:** Modified Danggui Sini decoction can reduce the expression of PI3K, p-Akt, p-mTOR protein, inhibit the PI3K/Akt/mTOR pathway, induce the expression of autophagy genes Beclin-1 and LC3, and increase the autophagy level of KOA chondrocytes to alleviate the degeneration of KOA articular cartilage.

Keywords: knee osteoarthritis; Danggui Sini decoction; chondrocyte; autophagy

膝骨关节炎(Kneeosteo Oarthritis, KOA)是引起中老年人疼痛、活动受限甚至残疾的主要原因^[1-4]。膝骨关节炎在中医属于“痹症”范畴,本病病机以肝肾亏虚为本,邪实为标^[5]。当归四逆汤出自《伤寒论》厥阴篇,本课题前期研究结果证明,加味当归四逆汤单用或者联合其他内外疗法均可有效改善膝骨关节炎患者的症状和功能,且无明显不良反应^[6-8],但加味当归四逆汤治疗膝骨关节炎的具体作用机制仍不明确。膝骨关节炎的发生发展是由于机体 PI3K/Akt/mTOR 信号通路激活的结果^[9-11],且该通路蛋白参与软骨细胞自噬以调节细胞代谢^[12-15]。加味当归四逆汤治疗膝骨关节炎的作用机制亦可能是通过调控软骨细胞自噬实现的。本研究通过探究加味当归四逆汤是否通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路影响细胞自噬及其机制,以期对膝骨关节炎的临床治疗提供新的方法和确切靶点。

1 材料和方法

1.1 实验动物

4个月龄成熟大鼠100只,体重约为200g,由成都中医药大学动物实验中心提供(许可证号为川实动管第99011号)。在室温为22~25℃,湿度为55%~65%,昼夜明暗交替时间为12h/12h的环境中分笼适应性喂养。

1.2 实验药物

加味当归四逆汤(当归20g、桂枝15g、芍药15g、怀牛膝15g、川木瓜20g、补骨脂10g、骨碎补10g、红花10g、细辛3g、通草5g、大枣3枚(约12g)、炙甘草5g)药液样品制备所需的中药材饮片均符合2015年版《中国药典》的质量标准,生药由成都中医药大学附属医院制药车间煎制,密封于无菌瓶中分装冻存,4℃储存备用。硫酸氨基葡萄糖片,生产厂家为新兴同仁药业有限公司,国药准字H20041317,生产批号为160302。

1.3 主要仪器与试剂

QPJ-1C生物病理切片机(济南千司生物技术有限公司)、荧光显微镜(Nikon, ECLIPSE600)、高速冷冻离心机(Heraeus)、EPS-200型电泳仪(北京中西华大科技

有限公司)、冷冻干燥机(HETO, FDI. 0-110)、OHSP-350L灰度扫描仪(杭州虹谱光色科技有限公司)等。Trizol试剂(厂家为ZCIBIO,批号为ZC-0021A)、Super-criptRT反转录试剂盒(厂家为赛默飞,批号为18064022)、山羊抗兔IgG二抗(Amyjet Scientific 6927-100)、ECL试剂(厂家为邦景,批号为BJ-S964209)等。

1.4 分组与给药

1.4.1 动物造模 采用经典的Hulth造模法^[16],即用10%水合氯醛腹腔麻醉成功后,从关节内侧切口,剥离肌肉与黏附的韧带,充分暴露关节腔,切断实验大鼠的右侧膝关节内侧副韧带和前后交叉韧带,并整体切除内侧半月板,逐层缝合切口建立大鼠膝骨关节炎模型,术后每只大鼠连续3d肌内注射青霉素(40万U/d),继续放入笼中饲养,任其自由活动。为保证造模的成功,在正式实验前进行造模预实验,并于造模后2、4周后将大鼠麻醉后用断颈法处死,分别观察膝关节有无关节积液和滑膜肿胀等滑膜炎表现,再于解剖显微镜下观察股骨内髁关节面的病理改变,以确定造模成功的最佳时间点。

1.4.2 动物分组 将96只造模成功的SD大鼠按随机数字表法随机分为正常对照组、模型空白组、硫酸氨基葡萄糖组、加味当归四逆汤高剂量组、中剂量组和低剂量组,每组16只。

1.4.3 给药方法 在造模24h后,每组16只中首先随机抽取4只进行第一轮灌喂相应药物。造模后1、2、3周,每组剩余的大鼠中随机再抽取4只进行相应药物的灌喂。各组大鼠对应药物剂量均为人体对应剂量^[17],空白组与模型空白组每日3mL/100g蒸馏水;硫酸氨基葡萄糖组每日2mL/100g硫酸氨基葡萄糖(浓度5mg/mL)溶液;加味当归四逆汤高剂量组每日4.7mL/100g、中剂量组每日2.35mL/100g、低剂量组每日1.175mL/100g煎制浓度为0.94g/mL的药液。各组每日药量均分早中晚3次灌胃。每只大鼠药物灌喂4周后,股动脉采血处死各只动物,取双侧膝关节软骨,左侧膝关节软骨固定于4%多聚甲醛中,用于

各项指标的检测,右侧膝关节软骨放置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存备用。

1.5 检测指标

1.5.1 关节软骨形态观察 将固定于4%多聚甲醛的左侧膝关节进行脱钙处理后,采用石蜡包埋法制作蜡块,并用切片机切片,苏木精-伊红(HE)染色,光学显微镜下观察形态学变化并进行 Mankin 评分^[16]。

1.5.2 实时 PCR 检测 将大鼠软骨组织放入预冷的研钵中加入液氮进行快速研磨后装管,用 Trizol 试剂提取软骨组织总 RNA;通过琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 纯度及完整性;提取的 RNA 用温水解融,利用 SuperscriptRT 反转录试剂盒对其进行反转录成 cDNA,以 cDNA 为模板进行扩增;反转录完成后,用去离子水将所得 cDNA 50 倍稀释,而后用于 IL-1 β 、MMP-3、COL2A1、Aggrecan、MMP-13 的检测。

1.5.3 Western Blot 法检测 将浸泡于液氮中的大鼠关节软骨于研钵中加入液氮后迅速研磨成细小粉末,将粉末按 1 g/4 mL 加入蛋白裂解液 4 $^{\circ}\text{C}$ 进行裂解。用 BCA 法测定蛋白质含量,并调整点样的蛋白质浓度为 40 $\mu\text{g}/10\text{ }\mu\text{L}$,每孔 10 μL ,行 SDS-PAGE、转

膜、TBST 封闭、滴加相应一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 浸泡过夜。以 TBS 洗膜后滴加山羊抗兔 IgG 二抗孵育,洗膜。采用 ECL 试剂作用 5 min,暗室压片,显影,定影。

1.6 统计学方法

使用 SPSS 25.0 软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 形式表示,组间差异比较采用方差分析,差异有统计学意义时,进一步用 LSD 法做两两比较, $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 关节病理改变

软骨细胞的凋零是膝关节炎重要发病病理机制之一。经过 4 周干预后,正常对照组大鼠的关节软骨无退变,软骨细胞分布均匀,未出现萎缩、变性的情况。模型空白组关节软骨严重退变,软骨细胞分布紊乱,出现了严重萎缩、变性的情况。硫酸氨基葡萄糖组关节软骨出现中等程度的退变,软骨细胞分布呈中等程度的紊乱,出现了中等程度萎缩、变性的情况。加味当归四逆汤低、中、高剂量各组,药物剂量越低,关节软骨细胞退变、萎缩程度越接近模型空白组;药物剂量越高,关节软骨细胞退变、萎缩程度越接近正常对照组,见图 1。

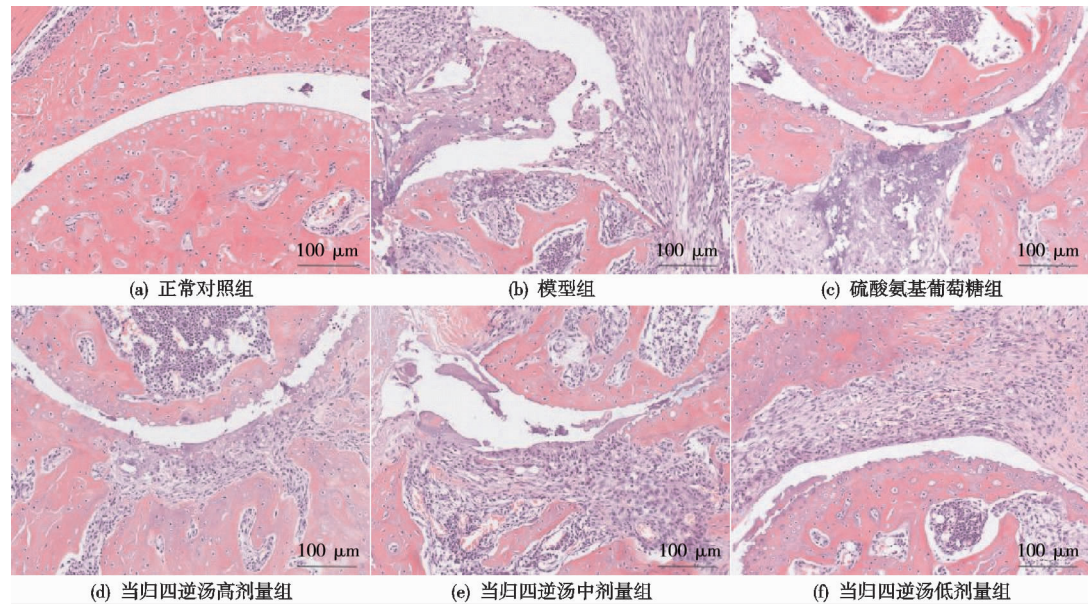


图 1 各组织关节软骨病理改变(HE, $\times 200$)

2.2 各组大鼠膝关节病理 Mankin 评分

各组 Mankin 评分结果显示,相较于正常对照组,模型空白组大鼠膝关节病理 Mankin 评分显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);相较于模型空白组,硫酸氨基葡萄糖组、加味当归四逆汤高、中、低三种剂量组大鼠膝关节病理 Mankin 评分显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

2.3 各组大鼠膝关节软骨组织 IL-1 β 、MMP-3、

COL2A1、Aggrecan、MMP-13 蛋白表达比较 各组蛋白表达结果显示,相较于正常对照组,模型

空白组大鼠膝关节软骨组织 IL-1 β 、MMP-3、MMP-13 蛋白表达明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$), COL2A1、Aggrecan 蛋白表达明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);相较于模型空白组,硫酸氨基葡萄糖组、加味当归四逆汤中、高剂量组大鼠膝关节软骨组织 IL-1 β 、MMP-3、MMP-13 蛋白表达明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),COL2A1、Aggrecan 蛋白表达明显上升,差异有统计学意义($P<0.05$);加味当归四逆汤高剂量组与正常对照组间各蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$);加味当归四逆汤低剂量组与模

型空白组间各蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$),见表2及图2。

表1 六组 Mankin 评分差异比较

组别	鼠数/只	Mankin 评分/分($\bar{x}\pm s$)	<i>F</i>	<i>P</i>
正常对照组	16	0.88±0.81	479.685	<0.001
空白模型组	16	12.94±0.93 ¹⁾		
硫酸氨基葡萄糖组	16	2.44±0.51 ¹⁾²⁾		
中药高剂量组	16	2.44±0.51 ¹⁾²⁾		
中药中剂量组	16	5.31±1.20 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾		
中药低剂量组	16	9.81±1.05 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾		

注:1)与正常对照组比较, $P<0.05$;2)与空白模型组比较, $P<0.05$;3)与硫酸氨基葡萄糖组比较, $P<0.05$;4)与中药高剂量组比较, $P<0.05$;5)与中药中剂量组比较, $P<0.05$ 。

表2 六组不同基因相对表达量差异比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数/只	IL-1 β	MMP-3	COL2A1	Aggrecan	MMP-13
正常对照组	16	1.03±0.32	1.02±0.15	1.01±0.14	1.00±0.09	1.00±0.25
模型空白组	16	3.51±0.48 ¹⁾	3.51±0.56 ¹⁾	0.32±0.11 ¹⁾	0.20±0.05 ¹⁾	3.93±0.48 ¹⁾
硫酸氨基葡萄糖组	16	1.24±0.34 ²⁾	1.24±0.27 ²⁾	0.93±0.15 ²⁾	0.78±0.11 ¹⁾²⁾	1.18±0.36 ²⁾
中药高剂量组	16	1.25±0.22 ²⁾	1.38±0.15 ²⁾	0.80±0.10 ²⁾	0.80±0.21 ²⁾	1.28±0.15 ²⁾
中药中剂量组	16	2.49±0.44 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	2.36±0.29 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	0.62±0.16 ¹⁾²⁾³⁾	0.71±0.13 ¹⁾²⁾	2.63±0.32 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾
中药低剂量组	16	3.45±0.76 ¹⁾³⁾⁴⁾⁵⁾	3.32±0.68 ¹⁾³⁾⁴⁾⁵⁾	0.34±0.09 ¹⁾³⁾⁴⁾⁵⁾	0.21±0.05 ¹⁾³⁾⁴⁾⁵⁾	3.46±0.37 ¹⁾³⁾⁴⁾⁵⁾
<i>F</i>		18.690	22.038	15.555	23.216	42.453
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:1)与正常对照组比较, $P<0.05$;2)与空白模型组比较, $P<0.05$;3)与硫酸氨基葡萄糖组比较, $P<0.05$;4)与中药高剂量组比较, $P<0.05$;5)与中药中剂量组比较, $P<0.05$ 。

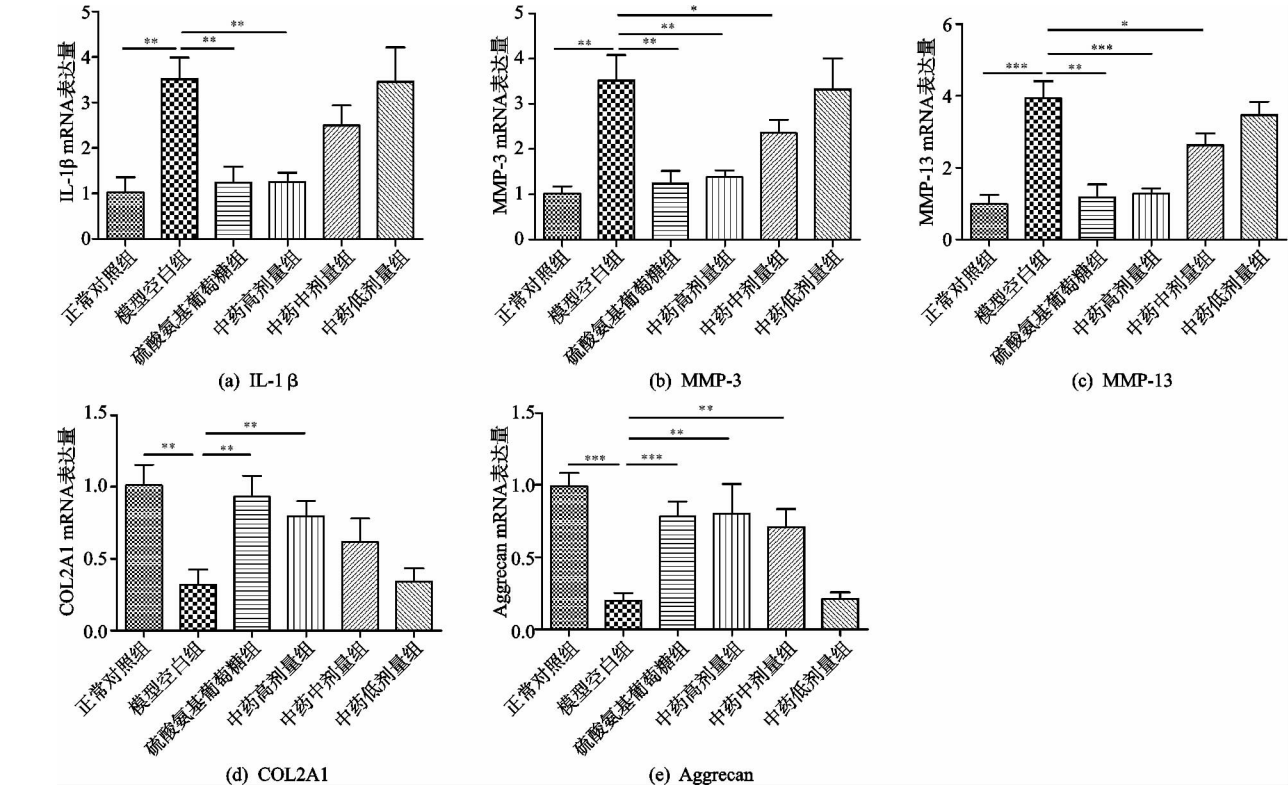


图2 各组大鼠膝关节软骨组织 IL-1 β 、MMP-3、MMP-13、COL2A1、Aggrecan mRNA 蛋白表达实时 PCR 检测结果

2.4 各组大鼠膝关节软骨组织 PI3K、p-Akt、p-mTOR 和 Beclin-1、LC3- I / II mRNA 蛋白表达比较

各组蛋白表达结果显示,相较于正常对照组,模型空白组大鼠膝关节软骨组织 PI3K、p-Akt、p-mTOR

蛋白表达明显上升,Beclin-1、LC3- I / II 蛋白表达降低,差异有统计学意义($P<0.05$);相较于模型空白组,硫酸氨基葡萄糖组、加味当归四逆汤高、中剂量组大鼠膝关节软骨组织 PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达明显降低,Beclin-1、LC3- I / II 蛋白表达上升,差异

有统计学意义($P<0.05$);加味当归四逆汤高剂量组相较于正常组大鼠膝关节软骨组织各蛋白表达差异均无统计学意义($P>0.05$);加味当归四逆汤低剂量组相较于模型组大鼠膝关节软骨组织各蛋白表达差异均无统计学意义($P>0.05$),见图 3。

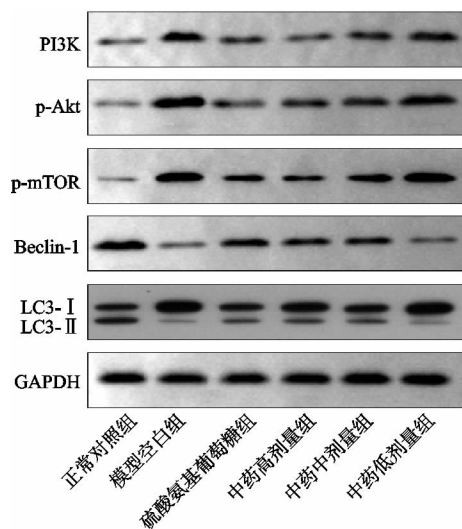


图 3 各组大鼠膝关节软骨组织 PI3K、p-Akt、p-mTOR 和 Beclin-1、LC3-I/II mRNA 蛋白表达 Western Blot 法检测结果

3 讨论

膝骨关节炎的主要诱因是源自膝关节软骨的损伤、退变,软骨的退变包括大量软骨细胞凋亡及细胞外基质过度降解^[18]。本研究膝关节病理切片及 Mankin 评分均表明,加味当归四逆汤高、中、低剂量均能明显改善膝骨关节炎大鼠关节软骨退变情况,减少软骨细胞凋零,且加味当归四逆汤高剂量组与硫酸氨基葡萄糖组治疗效果相当。

当软骨细胞新陈代谢异常或软骨细胞的细胞器损伤时,软骨细胞为了抑制自身的凋亡,会提升细胞自噬水平,以清除和降解该已经损伤的细胞器^[19]。在健康的关节软骨中,软骨细胞依靠自噬维持着关节软骨的稳定形态;在膝骨关节炎发生的早期,机体软骨细胞自噬水平会增强,以保护软骨细胞免受炎症刺激、氧化应激或代谢异常等因素的损害;随着人体衰老或膝骨关节炎的进一步发展,软骨细胞中受损的程度逐渐加重,软骨细胞的自噬水平和抗氧化能力下降,致使关节软骨组织的修复能力进一步降低^[20]。因此,软骨细胞自噬能力的激活对关节软骨组织的自我修复具有重要意义。PI3K 作为重要的自噬调节因子之一,主要负责传递细胞内的信号和调控膜的运动^[21]。Akt 在多种细胞生长过程(如葡萄糖代谢、细胞增殖、凋亡、转录和迁移)中均可发挥关键的作用^[22]。mTOR 属于抑制细胞自噬的一个重要蛋白,不单可以调节细胞的生长,而且也能改善细胞的营养代谢及周期^[23]。Zhang 等^[24]发现,mTOR 激活后能够抑制相应细胞的自噬水平。

PI3K/Akt/mTOR 通路激活后,PI3K 活化,活化的 PI3K 通过磷酸化 Akt,使信号通过 Akt 传递到下游不同的靶点,激活 mTOR,从而进一步调控下游蛋白(如自噬基因 Beclin1、Atg、LC3 等),此时细胞自噬水平受到抑制,对细胞生长、增殖、凋亡及细胞周期等多种生理功能产生影响^[25]。抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路可延缓膝骨关节炎软骨退变和炎症反应,Takayama 等^[26-27]发现,在关节内注射雷帕霉素可特异性抑制 mTOR 的表达,有助于增强细胞自噬水平,从而抑制软骨细胞凋亡及细胞外基质的降解,达到延缓内侧半月板-胫骨韧带切断术诱导的实验性膝骨关节炎小鼠关节软骨变性的效果。Shi 等^[28]发现通过影响 PI3K 表达阻断自噬,会增多巨噬细胞中炎症小体的数量而加重炎症反应,表明通过调控 PI3K/Akt/mTOR 通路中的因子干预自噬,能影响骨关节炎进展。本次研究结果表明:加味当归四逆汤高剂量组与硫酸氨基葡萄糖组均能抑制 PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达,上调自噬基因 Beclin-1、LC3 表达,降低大鼠膝关节软骨组织 IL-1 β 、MMP-3、MMP-13 蛋白表达,提升 COL2A1、Aggrecan 蛋白表达,表明加味当归四逆汤能通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路,增强软骨细胞的自噬水平,减轻关节软骨细胞炎症破坏,达到延缓关节软骨细胞退变的效果。

加味当归四逆汤能缓解膝骨关节炎关节软骨退变,其机制是通过下调 PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达,抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路,诱导自噬基因 Beclin-1、LC3 表达,提升膝骨关节炎软骨细胞自噬水平,以延缓关节软骨的退变。

参考文献

- [1] GLYN-JONES S, PALMER A J, AGRICOLA R, et al. Osteoarthritis[J]. Lancet, 2015, 386 (9991): 376-387.
- [2] 中华医学会骨科学分会关节外科组. 骨关节炎诊治指南(2018 年版)[J]. 中华骨科杂志, 2018, 38(12): 705-715.
- [3] 敖秀兰, 张婷, 程维, 等. 老年膝关节炎患者生活质量及影响因素[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(6): 1522-1524.
- [4] 膝骨关节炎运动治疗临床实践指南编写组. 膝骨关节炎运动治疗临床实践指南[J]. 中华医学杂志, 2020, 100(15): 1123-1129.
- [5] 范海霞, 刘健, 黄传兵, 等. 消瘀接骨散外敷联合中药内服对膝骨关节炎患者临床疗效的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40(9): 1042-1046.
- [6] 樊效鸿, 余洋, 黄勇, 等. 加味当归四逆汤治疗膝骨性关节炎 76 例[J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(11): 2184-2186.
- [7] 余洋, 周群, 樊效鸿, 等. 加味当归四逆汤配合温针灸治疗膝骨性关节炎的随机对照研究[J]. 山西中医, 2014, 30(6): 16-19.
- [8] 余洋, 周群, 樊效鸿, 等. 加味当归四逆汤配合中药熨烫治

- 疗膝骨性关节炎疗效观察[J]. 山西中医, 2017, 33(7): 11-12.
- [9] 缪成贵,熊友谊,秦梅颂,等. 芍药苷抑制佐剂性关节炎大鼠 mTOR 信号通路的实验研究[J]. 四川大学学报(医学版), 2018, 49(4): 535-539.
- [10] HARIKRISHNAN H, HJANTAN I, HAQUE M A, et al. Anti-inflammatory effects of hypophyllanthin and niranthin through downregulation of NF- κ B/MAPKs/PI3K-Akt signaling pathways[J]. *Inflammation*, 2018, 41(3): 984-995.
- [11] ZHANG S, YE J, ZHANG Y, et al. P2Y₁₂ protects platelets from apoptosis via PI3K-dependent Bak/Bax inactivation[J]. *J Thromb Haemost*, 2013, 11(1): 149-160.
- [12] MAEJIMA Y, ISOBE M, SADOSHIMA J, et al. Regulation of autophagy by Beclin-1 in the heart[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 95: 19-25.
- [13] 邵然然,周慧,吴也可,等. 中医药通过 mTOR 途径调节细胞凋亡与自噬的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(3): 1-7.
- [14] 黄艳辉,冯丹,丑丹,等. 当归四逆汤加减调节 Akt/mTOR 信号诱导自噬治疗子宫内异症的研究[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(12): 166-170.
- [15] 张虎林,喻琳,王亮,等. 膝骨性关节炎关键信号通路的研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2021, 29(10): 84-88.
- [16] 李文雄,孙赫,沈玮,等. SD 大鼠骨关节炎造模方法的筛选及优化探究[J]. 畜牧与兽医, 2014, 46(10): 70-73.
- [17] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2011: 1261-1264.
- [18] LOESER R F, COLLINS J A, DIEKMAN B O. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2016, 12(7): 412-420.
- [19] JEON H, IM G I. Autophagy in osteoarthritis[J]. *Connect Tissue Res*, 2017, 58(6): 497-508.
- [20] HUI W, YOUNG D A, ROWAN A D, et al. Oxidative changes and signaling pathways are pivotal in initiating age-related changes in articular cartilage[J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 75(2): 449-458.
- [21] SARRIS E G, SAIF M W, SYRIGOS K N. The biological role of PI3K pathway in lung cancer[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2012, 5(11): 1235-1264.
- [22] ZHONG J T, YU J, WANG H J, et al. Effects of endoplasmic reticulum stress on the autophagy, apoptosis, and chemotherapy resistance of human breast cancer cells by regulating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Tumor Biol*, 2017, 39(5): 1010428317697562.
- [23] ZHANG Y, VASHEGHANI F, LI Y H, et al. Cartilage-specific deletion of mTOR upregulates autophagy and protects mice from osteoarthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(7): 1432-1440.
- [24] ZHANG H Y, WANG Z G, WU F Z, et al. Regulation of autophagy and ubiquitinated protein accumulation by bFGF promotes functional recovery and neural protection in a rat model of spinal cord injury[J]. *Mol Neurobiol*, 2013, 48(3): 452-464.
- [25] 尹承龙,劳学军. PI3K/Akt/mTOR 信号通路的研究进展[J]. 中国医学创新, 2016, 13(1): 145-148.
- [26] TAKAYAMA K, KAWAKAMAI Y, KOOBAYASHI M, et al. Local intra-articular injection of rapamycin delays articular cartilage degeneration in a murine model of osteoarthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2014, 6(6): 482.
- [27] XUE J F, SHI Z M, ZOU J, et al. Inhibition of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway promotes autophagy of articular chondrocytes and attenuates inflammatory response in rats with osteoarthritis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89: 1252-1261.
- [28] SHI C S, SHENDEROV K, HUANG N N, et al. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction[J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(3): 256-263.

(收稿日期: 2022-05-05)