

# 施氏滋肾通痹汤调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路 治疗膝骨关节炎的作用机制

吴刚<sup>1,2</sup> 付富瑞<sup>3,4</sup> 狄嘉杰<sup>1,2</sup> 李振宇<sup>5</sup> 湛玥燚<sup>1,2</sup> 徐文<sup>1,2</sup>  
周于程<sup>1,2</sup> 唐德志<sup>3,4</sup> 徐创龙<sup>1,6,7 $\Delta$</sup>

**[摘要]** 目的:研究施氏滋肾通痹汤通过调控  $\beta$ -catenin 信号通路治疗膝骨关节炎的作用机制。方法:选取 30 只 SD 大鼠,随机分为假手术组、模型组和施氏滋肾通痹汤组,每组各 10 只。采用改良 Hulth 法建立膝骨关节炎大鼠模型,造模 2 个月后给予施氏滋肾通痹汤灌胃,于治疗 2 个月后处死大鼠,取膝关节组织进行指标检测。通过 X 线与 Micro-CT 检测评估膝关节骨结构变化;阿利新蓝-苏木精/橙黄 G 染色 (ABH/OG) 及番红 O 固绿染色观察软骨组织形态;免疫组化检测  $\beta$ -catenin、Col X、MMP-13、Col II 等蛋白表达;采用 RT-PCR 与 Western Blot 检测 Wnt3a、MMP9、MMP13、Col X、ALP、OC、Axin2 等基因及其对应蛋白的表达水平。结果:X 线及 Micro-CT 检测发现,模型组膝关节周围骨赘形成较假手术组明显增多,而施氏滋肾通痹汤组骨赘形成较模型组减少。ABH/OG 及番红 O 固绿染色结果显示,假手术组关节软骨表面光滑,四层结构(表浅层、移行层、放射层及钙化层)清晰,软骨细胞呈柱状排列,无巢聚现象;模型组表浅层细胞数减少,移行层和放射层可见大量细胞巢聚,潮线前移,出现双潮线;施氏滋肾通痹汤组软骨组织形态较模型组明显改善。免疫组化结果显示,模型组软骨组织中  $\beta$ -catenin、Col X 及 MMP-13 蛋白表达水平显著高于假手术组 ( $P < 0.05$ ),施氏滋肾通痹汤组关节软骨细胞  $\beta$ -catenin、Col X 和 MMP-13 蛋白表达较模型组显著减少 ( $P < 0.05$ )。RT-PCR 结果显示,模型组软骨组织中 Wnt3a、MMP9、MMP13、Col X、ALP、OC 及 Axin2 等基因表达水平显著高于假手术组 ( $P < 0.05$ ),施氏滋肾通痹汤组关节软骨细胞 Wnt3a、MMP9、MMP13、Col X、ALP、OC 和 Axin2 基因表达较模型组显著降低 ( $P < 0.05$ )。结论:施氏滋肾通痹汤对膝骨关节炎具有治疗作用,其机制可能与下调  $\beta$ -catenin 信号通路相关蛋白及基因表达,从而抑制该通路的异常激活有关。

**[关键词]** 施氏滋肾通痹汤;  $\beta$ -catenin 信号通路; 骨关节炎; 分子机制

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2026)03-0023-07

**DOI:** 10.20085/j.cnki.issn1005-0205.260304

## Mechanism of Shishi Zishen Tongbi Decoction in the Treatment of Knee Osteoarthritis through the Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway

WU Gang<sup>1,2</sup> FU Furui<sup>3,4</sup> DI Jiajie<sup>1,2</sup> LI Zhenyu<sup>5</sup> CHEN Yueyi<sup>1,2</sup>  
XU Wen<sup>1,2</sup> ZHOU Yucheng<sup>1,2</sup> TANG Dezhi<sup>3,4</sup> XU Chuanglong<sup>1,6,7 $\Delta$</sup>

基金项目:宁夏回族自治区自然科学基金项目(2022AAC02070)

<sup>1</sup> 宁夏回族自治区中医医院(宁夏回族自治区中医研究院)

(银川,750021)

<sup>2</sup> 宁夏医科大学

<sup>3</sup> 上海中医药大学附属龙华医院

<sup>4</sup> 上海中医药大学脊柱病研究所

<sup>5</sup> 陕西中医药大学

<sup>6</sup> 宁夏医科大学附属自治区中医医院

<sup>7</sup> 宁夏中西医康复临床医学研究中心

$\Delta$ 通信作者 E-mail:mqxcl@163.com

<sup>1</sup> Ningxia Hui Autonomous Region Hospital of Traditional Chinese Medicine & TCM Research Institute, Yinchuan 750021, China;

<sup>2</sup> Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China;

<sup>3</sup> Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China;

<sup>4</sup> Institute of Spinal Diseases, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China;

<sup>5</sup> Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, Shaanxi China;

<sup>6</sup> Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750021, China;

<sup>7</sup> Ningxia Clinical Medical Research Center for Rehabilitation of Integrative Medicine, Yinchuan 750021, China.

**Abstract Objective:** To investigate the therapeutic mechanism of Shishi Zishen Tongbi decoction in treating knee osteoarthritis (KOA) through the  $\beta$ -catenin signaling pathway. **Methods:** Thirty male SPF-grade Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups: the sham-operated group, the model group, and the Shishi Zishen Tongbi decoction group ( $n=10$  each). A modified Hulth method was used to establish KOA models. After two months of modeling, the Shishi Zishen Tongbi decoction group received intragastric administration of the decoction for an additional two months. Upon completion, knee joints were collected for evaluation. X-ray and Micro-CT were used to assess structural changes in subchondral bone. Cartilage morphology was observed using ABH/OG and Safranin O/Fast Green staining. Immunohistochemistry was performed to detect the expression of  $\beta$ -catenin, Col X, MMP-13, and Col II. RT-PCR and Western Blot were used to measure the mRNA and protein levels of Wnt3a, MMP-9, MMP-13, Col X, alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OC) and Axin2. **Results:** X-ray and Micro-CT analyses demonstrated a significant increase in osteophyte formation around the knee joint in the model group compared with the sham-operated group. However, osteophyte formation was markedly reduced in the Shishi Zishen Tongbi decoction group compared to the model group. Histological evaluations using ABH/OG and Safranin O/Fast Green staining showed a smooth articular cartilage surface and clearly defined four-layer structures (superficial, transitional, radial, and calcified zones) in the sham-operated group, with chondrocytes arranged in regular columnar patterns and no evidence of chondrocyte clustering. In contrast, the model group exhibited reduced cell numbers in the superficial zone, prominent chondrocyte clustering in the transitional and radial zones, forward displacement of the tidemark, and double tidemark formation. The cartilage morphology in the Shishi Zishen Tongbi decoction group was significantly improved relative to that in the model group. Immunohistochemical analysis revealed significantly elevated expression levels of  $\beta$ -catenin, Col X, and MMP-13 in the cartilage tissue of the model group compared to the sham-operated group ( $P<0.05$ ), while these protein levels were significantly reduced in the Shishi Zishen Tongbi decoction group compared to the model group ( $P<0.05$ ). Real-time PCR results further confirmed that the expression levels of Wnt3a, MMP9, MMP13, Col X, ALP, OC and Axin2 genes were significantly higher in the model group than in the sham-operated group ( $P<0.05$ ), whereas these gene expression levels were significantly downregulated in the Shishi Zishen Tongbi decoction group compared to the model group ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Shishi Zishen Tongbi decoction exerts therapeutic effects on KOA by modulating the  $\beta$ -catenin signaling pathway, likely through downregulation of key genes and proteins involved in its activation, thus slowing disease progression.

**Keywords:** Shishi Zishen Tongbi decoction;  $\beta$ -catenin signaling pathway; osteoarthritis; molecular mechanism

膝骨关节炎(KOA)是一种以关节软骨退行性变、软骨下骨硬化、滑膜炎及骨赘形成为主要特征的慢性退行性疾病,其主要病理过程包括细胞外基质(ECM)代谢紊乱、软骨细胞凋亡、炎症因子释放及骨性重塑等<sup>[1-2]</sup>。研究显示 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在软骨代谢和炎症调控中发挥关键作用,其异常激活与疾病进展密切相关<sup>[3-5]</sup>。施杞国医大师自拟滋肾通痹汤用于治疗膝骨关节炎,临床疗效确切,但其作用机制尚不明确。本研究拟通过膝骨关节炎大鼠模型,从组织学及分子水平探讨滋肾通痹汤对  $\beta$ -catenin 信号通路的影响及其治疗膝骨关节炎的作用机制,现报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和分组

无特定病原体(SPF)级 8 周龄 SD 雄性大鼠 30 只,体重为(200±20)g,由上海中医药大学动物中心提供,动物合格证号为 SCXK(沪)2003-0003。按体重随机分为模型组、假手术组和施氏滋肾通痹汤组,各 10 只。

### 1.2 实验试剂

注射用青霉素钠(华北制药集团北元有限公司,国

药准字 H1302 0428,规格为 0.48 g,80 万单位),氯胺酮(西安力邦制药有限公司,国药准字 H20054749), $H_2O_2$ (中衫金桥),0.1%胰蛋白酶(碧云天),免疫组化试剂盒(武汉博士德),DAB 显色试剂盒(中衫金桥),苏木精(南京建成),抗体稀释液(中衫金桥),兔多克隆 Anti- $\beta$ -catenin、Anti-Col X、Anti-MMP-13、Anti-MMP-1、Anti-TIMP-1(Abcam 公司);高纯度 RNA 离心柱提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司),RNAiso Plus、Prime Script<sup>TM</sup> reverse transcription reagent Kit、SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II、PCR 引物(TaKaRa Biotechnology(大连)公司)。

### 1.3 实验仪器

UV-5500PC 紫外分光光度计,RT-6100 酶标分析仪,qTOWER 实时荧光定量 PCR 仪,Olympus 光学显微镜,5427R 高速冷冻离心机,MDF-U53V 低温冰箱。

### 1.4 模型的建立

大鼠经氯胺酮腹腔注射麻醉后,于右膝内侧皮肤作纵行切口,逐层分离组织,切断内侧副韧带,暴露关

节腔后切除内侧半月板并剪断前交叉韧带,操作过程中尽量避免对关节软骨造成人为损伤。术后连续 3 d 肌注青霉素以防感染,自术后第 4 天起,每天驱赶大鼠运动 30 min 以模拟关节活动。假手术组仅在麻醉状态下切开右膝内侧皮肤后直接缝合,不损伤关节<sup>[6]</sup>。

### 1.5 给药方法

于造模 2 个月后,分别给予施氏滋肾通痹汤(黄芪 15 g、党参 12 g、川芎 12 g、丹参 9 g)和生理盐水灌胃治疗,均每周给药 5 次,连续灌胃 2 个月。大鼠用药剂量参照人用等效剂量,按体表面积换算。干预 2 个月后处死大鼠,取膝关节组织,检测相关指标,以评估关节软骨的形态结构与功能变化<sup>[7]</sup>。

### 1.6 指标采集

**1.6.1 X 线扫描分析** 取大鼠膝关节标本,去除膝关节周围多余软组织,对膝关节进行 X 线扫描。

**1.6.2 Micro-CT 扫描分析** 采用  $\mu$ CT80 型 Micro-CT 对大鼠膝关节进行高分辨率扫描,层厚为 18  $\mu$ m,获取断层图像并进行三维结构重建,以分析骨结构变化。

**1.6.3 组织病理学和形态计量学分析** 取出膝关节标本,清除多余软组织后,置于 10% 福尔马林溶液中固定,随后进行脱钙处理及石蜡包埋。采用连续矢状位切片(厚度为 10  $\mu$ m),经阿利新蓝-苏木精/橙黄 G 染色(ABH/OG)及番红 O 固绿染色处理后,在 Olympus VS120-SL 显微镜下(20 倍物镜)观察软骨组织的组织结构及染色特征。

**1.6.4 免疫组化染色** 石蜡切片于 60  $^{\circ}$ C 下烘烤 5 min 后依次脱蜡至水,蒸馏水冲洗 1 min,甲醇与 3%  $H_2O_2$  (1:9) 封闭内源性过氧化酶 15 min,经蒸馏水冲洗后,置于稀释比为 1:50 的抗原修复液中,于高压灭菌锅中加热(105  $^{\circ}$ C, 0.025 kPa),进行抗原修复,自然冷却至室温。随后用 PBS 冲洗 3 次(每次 2 min),滴加 5% BSA 封闭 20 min(37  $^{\circ}$ C 下)。无需洗片,滴加一抗( $\beta$ -catenin、Col II、MMP-13、Col X 和 OC),4  $^{\circ}$ C 下孵育过夜。PBS 洗片后,加入相应的二抗,37  $^{\circ}$ C 下孵育 15 min,PBS 冲洗后滴加 SABC 复合物,室温反应 15 min,再经 PBS 清洗。用 DAB 显色液(蒸馏水 1 mL+D1 50  $\mu$ L+D2 100  $\mu$ L+D3 50  $\mu$ L)于室温下显色 3~10 min,随后进行梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片,并在 Olympus VS120-SL 显微镜下(20 倍物镜)观察。

**1.6.5 RT-PCR 检测** 逆转录(RT)反应体系中包括 1 mmol/L DTT、M-MLV 逆转录酶(200 IU/ $\mu$ L)、10 mmol/L dNTP 混合液、随机引物及 5 $\times$  逆转录缓冲液(250 mmol/L Tris-HCl(pH8.3),375 mmol/L KCl,15 mmol/L  $MgCl_2$ )。

聚合酶链式反应(PCR)体系中包括 50 mmol/L

$MgCl_2$ 、10 mmol/L dNTP 混合液、Taq DNA 聚合酶(5 IU/ $\mu$ L)、10 $\times$  PCR 反应缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl(pH8.5),500 mmol/L KCl,0.1% 明胶)以及 50 $\times$  TAE 缓冲液(由 242 g Tris,57.1 mL 冰乙酸及 100 mL 0.5 mol/L EDTA 溶液(pH8.0)配制)。RT-PCR 检测的基因及内参  $\beta$ -Actin 引物序列<sup>[8]</sup>见表 1。

表 1 大鼠 RT-PCR 引物序列

| 名称             | 分类   | 引物序列                           |
|----------------|------|--------------------------------|
| Wnt3a          | 正向引物 | 5' TCTGTGTGCGCCTGAGTGG 3'      |
|                | 反向引物 | 5' GAATGGCGAGCAACAATTCA 3'     |
| MMP9           | 正向引物 | 5' GTTCCTTGGGCTGAAGATGA 3'     |
|                | 反向引物 | 5' ATGAGCCAAGACCATTCCAG 3'     |
| MMP13          | 正向引物 | 5' GATGTGAGTGCCTGATGTG 3'      |
|                | 反向引物 | 5' TCATGGGCAGCAACAATAAA 3'     |
| ALP            | 正向引物 | 5' TCCTAAGGGTGCCAATGGTGA 3'    |
|                | 反向引物 | 5' AGGACCAACTTTGCCTTGAGGAC 3'  |
| OC             | 正向引物 | 5' AGGTCGTCATCATCCCACGAG 3'    |
|                | 反向引物 | 5' GCTGTGGCAGCTACCTATGTCTTG 3' |
| Axin2          | 正向引物 | 5' GGAGCATCCTGAGTGGGATGA 3'    |
|                | 反向引物 | 5' AAGCAGGTCTGGGTGCGAAGTGA 3'  |
| $\beta$ -Actin | 正向引物 | 5' GGCATCCTGACCCTGAAGTA 3'     |
|                | 反向引物 | 5' AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG 3'     |

主要仪器:PTC200 扩增仪(Bio-Rad 公司),高速低温离心机(Herus 公司),-80  $^{\circ}$ C 冰箱(Heraeus 公司),高速组织捣碎器 DIA900(Heidolph 公司),烤箱、电泳仪(上海天能科技公司),紫外分光光度计 UV1240(日本岛津公司),凝胶成像系统(上海天能科技公司)。

在解剖显微镜下采集各组大鼠膝关节软骨组织,使用匀浆器充分研磨,加入 1 mL TRIzol 试剂混匀后加入 0.2 mL 氯仿剧烈震荡,静置于 15~30  $^{\circ}$ C 环境中 2~3 min,随后在 2~8  $^{\circ}$ C 下 12 000g 离心 15 min。取上清液 0.6 mL,加入 0.5 mL 异丙醇于室温下反应 10 min,再次 12 000g 离心 10 min,弃去上清。将所得 RNA 沉淀加入 1 mL 由 DEPC 水配制的 75% 乙醇溶液中充分混匀清洗,离心去除杂质后自然干燥,并用 30  $\mu$ L DEPC 水溶解。取 1  $\mu$ L RNA 样品,加入 100  $\mu$ L DEPC 水稀释,采用紫外分光光度计测定其 A260/A280 比值约为 2.0,表明 RNA 纯度较高。按照试剂盒说明书配制反转录体系,进行逆转录反应以合成 cDNA。随后以 cDNA 为模板,按规定顺序配置 PCR 反应体系并进行扩增实验。94  $^{\circ}$ C 下变性 40 s,56  $^{\circ}$ C 下退火 40 s,72  $^{\circ}$ C 下延伸 1 min,30 次循环。

**1.6.6 Western Blot 法检测** 切取膝关节软骨组织,研磨组织样本,用蛋白裂解液于冰上静置 30 min,使其充分裂解,于 4  $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 15 min,取上清后采用 BCA 法测定总蛋白浓度。各组取等量蛋

白(50  $\mu\text{g}$ )经 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min 后进行 15% SDS-PAGE 电泳分离,转移至 PVDF 膜上。室温下以 2% 脱脂奶粉封闭 2 h,加入稀释比例 1:1 000 的一抗( $\beta$ -Actin 等)4  $^{\circ}\text{C}$  下孵育过夜,次日加入 HRP 标记二抗(1:3 000)于 37  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 2 h。各步骤间均用 PBST 缓冲液清洗 3 次,每次 10 min。用 ECL 化学发光法显色,图像通过 X 线片曝光并利用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析,计算蛋白条带灰度值与 GAPDH 比值,表示其表达水平。实验重复 3 次以确保数据可靠性。

### 1.7 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件对实验数据进行统计处理。

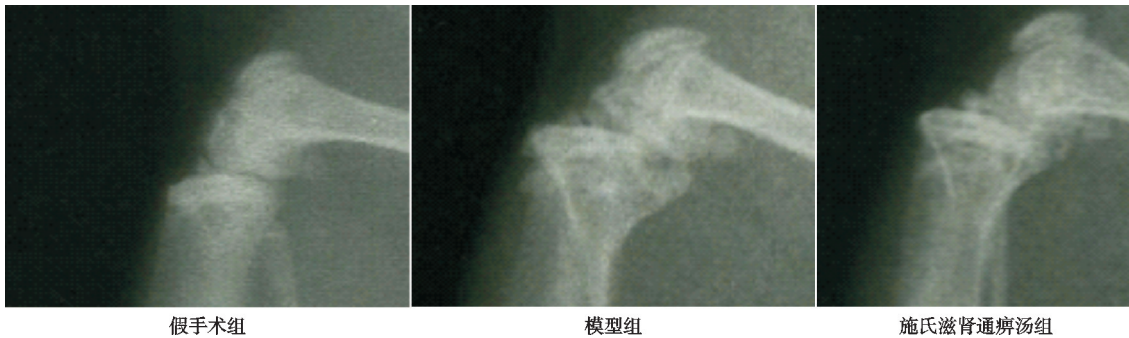


图 1 各组大鼠 X 线检测结果

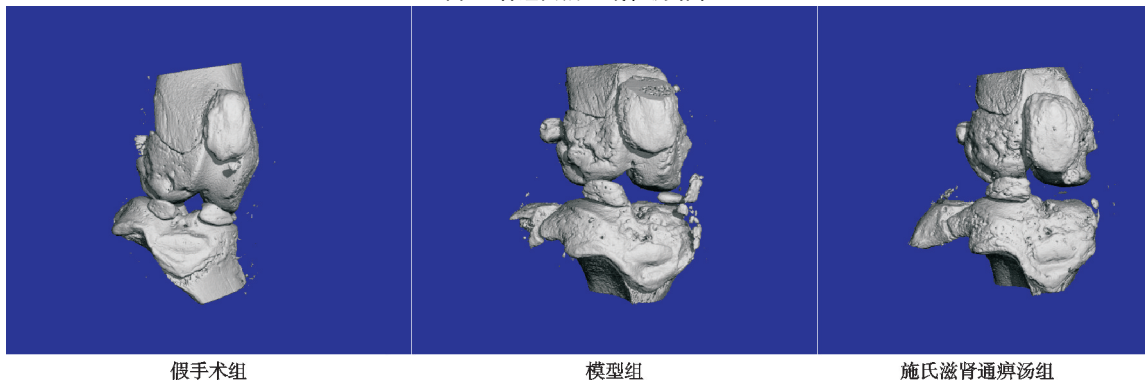


图 2 各组大鼠 Micro-CT 检测结果

### 2.2 ABH/OG 染色和 SO/Fast Green 染色

ABH/OG 染色和 SO/Fast Green 染色发现,假手术组大鼠关节软骨表面平整,组织结构完整,表浅层、移行层、放射层及钙化层分层清晰,软骨细胞呈柱状规则排列,未见细胞巢聚;模型组软骨表面结构破坏明

显,表浅层细胞显著减少,移行层和放射层出现大量细胞巢状聚集,潮线前移,局部可见双潮线改变;施氏滋肾通痹汤干预后,软骨组织结构较模型组明显改善,层次分布相对清楚,细胞排列较为整齐,组织损伤程度明显减轻,见图 3。

## 2 结果

### 2.1 X 线和 Micro-CT 检测

X 线和 Micro-CT 检测发现,与假手术组相比,模型组大鼠膝关节周边可见骨赘形成显著增多。施氏滋肾通痹汤干预后,其骨赘生成明显减少,关节结构破坏相对减轻,见图 1 和图 2。

显,表浅层细胞显著减少,移行层和放射层出现大量细胞巢状聚集,潮线前移,局部可见双潮线改变;施氏滋肾通痹汤干预后,软骨组织结构较模型组明显改善,层次分布相对清楚,细胞排列较为整齐,组织损伤程度明显减轻,见图 3。

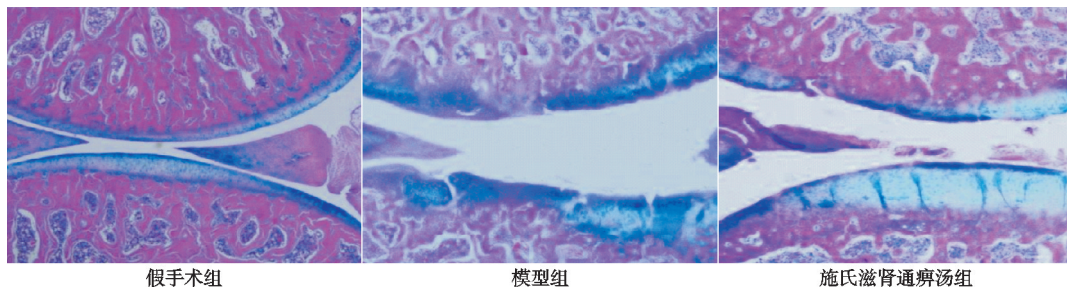


图 3 各组大鼠膝关节软骨组织形态(病理组织学染色,20 $\times$ )

### 2.3 免疫组化染色

免疫组化染色结果显示,与假手术组比较,模型组关节软骨组织 Col II 蛋白表达显著下降, $\beta$ -catenin、

Col X、MMP-13、ADAMTS-5、VEGF 和 TGF- $\beta$  蛋白表达显著增加;与模型组比较,施氏滋肾通痹汤干预后,Col II 蛋白表达水平明显回升,而  $\beta$ -catenin、Col

X、MMP-13、ADAMTS-5、VEGF 和 TGF-β 表达水平均呈现不同程度下降,见图 4。

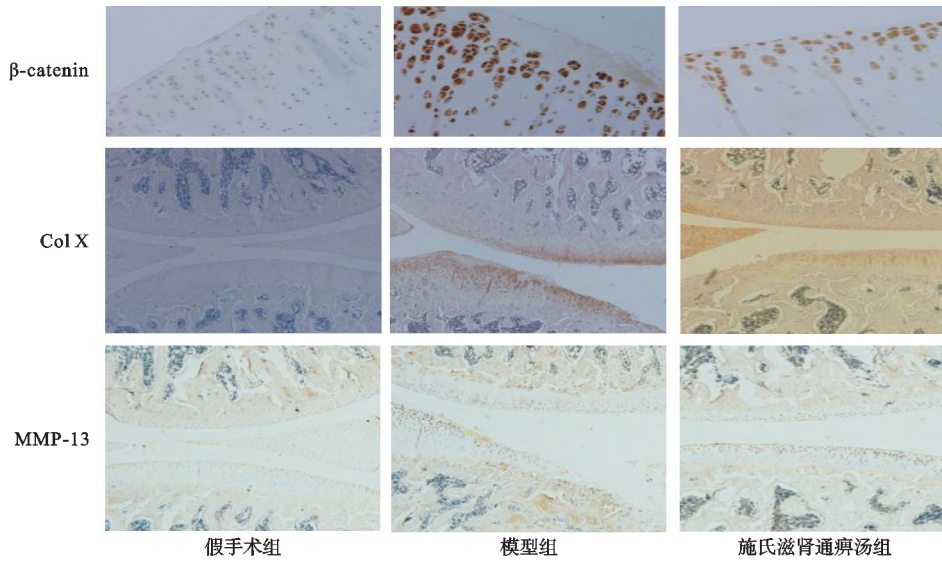


图 4 各组大鼠 β-catenin、Col X、MMP-13 蛋白表达(免疫组化染色,20×)

### 2.4 RT-PCR 反应检测

RT-PCR 反应检测结果表明,与假手术组相比,模型组关节软骨组织中 Wnt3a、MMP9、MMP13、Col X、ALP、OC 及 Axin2 等基因表达水平均显著升高,差异

有统计学意义( $P < 0.05$ );施氏滋肾通痹汤组上述基因表达较模型组显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2。

### 2.5 Western Blot 法检测

表 2 RT-PCR 反应检测各组大鼠 Wnt3a、MMP9、MMP13、Col X、ALP、OC 和 Axin2 基因表达比较( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

| 组别       | Wnt3a                   | MMP9                    | MMP13                   | Col X                   | ALP                     | OC                      | Axin2                   |
|----------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 假手术组     | 1.00±0.02 <sup>1)</sup> | 1.00±0.02 <sup>1)</sup> | 1.01±0.04 <sup>1)</sup> | 1.00±0.05 <sup>1)</sup> | 0.99±0.07 <sup>1)</sup> | 1.01±0.06 <sup>1)</sup> | 1.01±0.05 <sup>1)</sup> |
| 模型组      | 2.02±0.15               | 1.87±0.03               | 2.92±0.21               | 1.72±0.03               | 1.91±0.14               | 2.08±0.16               | 1.69±0.07               |
| 施氏滋肾通痹汤组 | 1.57±0.11 <sup>1)</sup> | 1.22±0.04 <sup>1)</sup> | 1.61±0.10 <sup>1)</sup> | 1.19±0.02 <sup>1)</sup> | 1.33±0.05 <sup>1)</sup> | 1.46±0.08 <sup>1)</sup> | 1.25±0.03 <sup>1)</sup> |

注:1)与模型组相比, $P < 0.05$ 。

Western Blot 法检测结果显示,模型组关节软骨组织中 MMP-1 蛋白表达水平较假手术组显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),TIMP-1 蛋白表达水平显著下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组相比,施氏滋肾通痹汤组 MMP-1 蛋白表达水平明显低于模型组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),TIMP-1 蛋白表达水平显著上调,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 3。

表 3 各组大鼠膝关节软骨中 MMP-1、TIMP-1 蛋白表达比较( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

| 组别       | MMP-1                   | TIMP-1                  |
|----------|-------------------------|-------------------------|
| 假手术组     | 0.75±0.04 <sup>1)</sup> | 1.46±0.06 <sup>1)</sup> |
| 模型组      | 1.38±0.06               | 1.24±0.10               |
| 施氏滋肾通痹汤组 | 1.10±0.06 <sup>1)</sup> | 1.40±0.08 <sup>1)</sup> |

注:1)与模型组相比, $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

膝骨关节炎是临床常见的慢性退行性疾病,是老年人致残的重要原因之一,全球患者超 3 亿人,我国患病率约为 14.6%,并随人口老龄化持续上升<sup>[9]</sup>。其临床表现以关节疼痛、僵硬和活动受限为主,严重影响患者生存质量。现有治疗方法包括非甾体抗炎药、软骨

保护剂及关节置换,受副作用和适应证限制,疗效不佳<sup>[7]</sup>。中医学在膝骨关节炎治疗中显现出独特优势,具有较好疗效与较高安全性,既能用于急性发作期的症状缓解,又适合慢性进展期的防治<sup>[10-12]</sup>。

从中医角度看,膝骨关节炎属于“痹证”范畴,多因年老、肝肾亏虚、气血不足,复感风寒湿邪之邪,闭阻经络,导致气血运行不畅、筋骨失养而发病<sup>[13]</sup>。《素问·痹论》云:“风寒湿三气杂至,合而为痹。”其中,肝主筋,肾主骨,肝肾亏虚为其发病之本,风寒湿邪为其发病之标。国医大师施杞在长期临床实践中,提出膝骨关节炎的病机以“本虚标实”为核心,强调肝肾不足是发病根源,痰瘀互结、风寒湿邪为外在诱因,形成虚实夹杂的病理特点。其学术思想主张“以补益肝肾为本,兼顾祛痰化瘀”,以调和通痹十三方防治慢性筋骨病<sup>[14-15]</sup>,并在此基础上自拟滋肾通痹汤用于治疗膝骨关节炎。滋肾通痹汤由黄芪、熟地黄、当归、川芎等中药组成。黄芪为“补药之长”,其有效成分黄芪多糖、黄芪甲苷等具有抗炎、调节免疫等作用<sup>[16-17]</sup>。熟地黄具有滋阴补血、益精填髓之效,含有梓醇、红景天苷、毛蕊花糖苷等多种成分,可抑制炎症因子分泌、减缓软骨基质降解、促进细胞增殖并调控自噬<sup>[18]</sup>。当归中的阿魏酸、当归

多糖、藁本内酯等能抑制炎症反应、减少软骨破坏、延缓凋亡<sup>[19-20]</sup>。川芎富含多种抗炎活性成分,通过影响多个通路的信号传递发挥抗炎作用<sup>[21]</sup>。可见施氏滋肾通痹汤治疗膝骨关节炎是多靶点、多途径、多维度的。

$\beta$ -catenin 信号通路在膝骨关节炎的防治过程中起着重要作用。现代研究发现经典的 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在维持关节软骨稳态、调控软骨细胞增殖分化及骨重建过程中发挥着重要作用<sup>[22-23]</sup>,其通过调控细胞的增殖、分化、衰老与凋亡等途径参与膝骨关节炎的发生发展<sup>[24-25]</sup>。该通路激活时,Wnt 配体与 Frizzled 受体及 LRP5/6 辅助受体结合,抑制 GSK-3 $\beta$  对  $\beta$ -catenin 的磷酸化,使其在胞质中积聚并转位入核,进而诱导下游靶基因(如 MMP13、Col X、ALP 等)表达上调,促进软骨降解与病理性骨化<sup>[26-27]</sup>。在膝骨关节炎进程中,Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路常处于持续激活状态,成为推动软骨退变与骨性改变的重要病理基础。关节软骨的退行性改变是膝骨关节炎最典型的病理特征,而软骨细胞外基质(ECM)合成与降解失衡则是其发生发展的关键环节<sup>[28]</sup>。II 型胶原(Col II)和蛋白多糖是软骨细胞外基质的主要结构成分,在维持软骨组织的弹性与功能中发挥核心作用,研究表明<sup>[29]</sup>其持续流失是导致软骨结构破坏与功能丧失的直接原因。在细胞外基质的降解过程中,基质金属蛋白酶(MMPs)尤其是 MMP-13 和 MMP-9,发挥着重要的酶促水解作用,被视为软骨退变的关键介导因子。大量研究证实<sup>[30-31]</sup>,Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路不仅调控软骨细胞、成骨细胞和滑膜细胞的代谢行为,还参与骨重建及骨赘形成等病理过程。因此,Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路不仅是膝骨关节炎关键发病机制之一,还为其临床干预提供了潜在的靶点。

本研究选择在造模 2 个月后开始干预<sup>[32]</sup>,因为膝骨关节炎并非急性损伤所致,而是长期累积作用下形成的慢性退行性疾病,若在造模后立即给药,可能掩盖疾病的自然演变过程,难以反映人类膝骨关节炎的慢性进展规律。2 个月时大鼠关节软骨退变与骨赘形成已相对稳定确立,但尚未进入不可逆阶段,在此时点进行干预更能体现药物的“治疗”作用。实验采用雄性大鼠<sup>[33-34]</sup>,主要考虑雌性动物受雌激素水平波动影响较大,其骨代谢及炎症反应存在显著差异,影响结果的稳定性与可重复性。相比之下,雄性动物的病程进展一致性更佳,更适合膝骨关节炎的实验研究。结果显示施氏滋肾通痹汤干预后,大鼠膝关节 X 线和 Micro-CT 检测提示骨赘形成减少,软骨表面结构改善,潮线位置恢复,组织学表现与免疫组化染色亦证实其具有一定的软骨保护作用。分子机制方面,施氏滋肾通痹

汤可显著抑制膝骨关节炎模型大鼠 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关关键蛋白及靶基因的表达,包括 Wnt3a、 $\beta$ -catenin、MMP13、Col X、ALP、OC 及 Axin2。Axin2 作为 Wnt 通路的负反馈调节因子,在膝骨关节炎模型中反而表达升高,可能代表一种代偿性反馈机制。施氏滋肾通痹汤对 Axin2 表达的下调,提示其可能通过早期抑制 Wnt 通路激活,避免通路过度依赖负反馈调节。此外,该方剂还能降低 MMP-1 蛋白表达、上调 TIMP-1 蛋白水平,维持基质降解与抑制机制之间的动态平衡。VEGF 和 TGF- $\beta$  等因子的下调亦反映其对滑膜血管生成及局部炎症微环境的改善作用。综上所述,施氏滋肾通痹汤对膝骨关节炎具有治疗作用,其机制可能与下调  $\beta$ -catenin 信号通路相关蛋白及基因表达,从而抑制该通路的异常激活有关。

### 参考文献

- [1] YAO Q, WU X H, TAO C, et al. Osteoarthritis: pathogenic signaling pathways and therapeutic targets[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2023, 8: 56.
- [2] TRACHANA V, MOURMOURA E, PAPATHANASSIOU I, et al. Understanding the role of chondrocytes in osteoarthritis: utilizing proteomics[J]. Expert Review of Proteomics, 2019, 16(3): 201-213.
- [3] CHENG J C, LI M, BAI R J. The Wnt signaling cascade in the pathogenesis of osteoarthritis and related promising treatment strategies [J]. Frontiers in Physiology, 2022, 13: 954454.
- [4] HAYAT R, MANZOOR M, HUSSAIN A. Wnt signaling pathway: a comprehensive review[J]. Cell Biology International, 2022, 46(6): 863-877.
- [5] 王鑫睿, 徐无忌, 张慧, 等. 基于 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路探讨六味地黄丸对软骨终板退变大鼠的作用机制[J]. 河北中医, 2025, 47(5): 784-789.
- [6] 熊振飞, 汤样华, 王乾, 等. 自拟益气化痰补肾方对膝骨关节炎小鼠  $\beta$ -catenin 信号通路的影响[J]. 上海中医药杂志, 2021, 55(9): 86-90.
- [7] 颜雯婷, 杨倩倩, 任凤, 等. 双侧膝骨关节炎患者足底压力分布及平衡特征研究[J]. 中国康复医学杂志, 2023, 38(5): 696-699.
- [8] 汤样华, 徐灿达, 岳振双, 等.  $\beta$ -蜕皮甾酮抑制 IL-1 $\beta$  诱导的关节软骨细胞退变的实验研究[J]. 中国中医药科技, 2020, 27(3): 366-369.
- [9] PRIMORAC D, MOLNAR V, ROD E, et al. Knee osteoarthritis: a review of pathogenesis and state-of-the-art non-operative therapeutic considerations[J]. Genes, 2020, 11(8): 854.
- [10] 张茜玥, 李昀姝, 赵杰瑞, 等. 中医药联合富血小板血浆治疗膝骨关节炎进展[J]. 中药材, 2024, 47(1): 261-267.
- [11] 刘利涛, 朱华亮, 周宗波, 等. 宣痹汤加减对风湿热痹型膝骨性关节炎发作期急性炎症的影响[J]. 中国实验方剂学

- 杂志,2020,26(18):105-110.
- [12] 于长禾,周彦吉,安易,等.基于多阶段优化策略构建中医治疗膝骨关节炎的综合方案[J].中华中医药杂志,2023,38(7):3383-3387.
- [13] 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.
- [14] 冉磊,韩海慧,辛鹏飞,等.施杞教授防治慢性筋骨病学术思想及临证经验[J].时珍国医国药,2023,34(9):2249-2251.
- [15] 王拥军,吴骏.石氏伤科施杞临证经验集萃[M].北京:科学出版社,2016.
- [16] 范元赫,杨永菊,张宇,等.黄芪及其活性成分治疗骨关节炎的研究现状[J].中华中医药学刊,2025,43(2):168-172.
- [17] 许航,孟林.黄芪活性成分调控相关信号通路治疗骨关节炎的机制[J].现代中西医结合杂志,2023,32(10):1443-1450.
- [18] 商岚清,程鑫雨,单鸿哲,等.地黄及其有效成分干预膝骨关节炎的作用机制研究进展[J].中草药,2025,56(1):349-359.
- [19] 齐伟,刘建军,王凯,等.当归活性成分治疗骨关节炎的药理学机制研究进展[J].中国医院药学杂志,2024,44(14):1708-1714.
- [20] 齐伟,安文博,陈欣,等.基于网络药理学及实验验证探讨当归治疗膝骨关节炎的作用机制[J/OL].天然产物研究与开发,1-25[2025-09-04].<https://link.cnki.net/urlid/51.1335.Q.20250725.1058.004>.
- [21] 马宁宁,范姗姗,李欣,等.川芎的抗炎物质筛选及其作用机制分析[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(18):140-146.
- [22] 李晓峰,那俊夫,关雪峰,等.基于 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路治疗膝骨关节炎中西医研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2024,26(9):150-156.
- [23] 方园,章海凤,喻文,等.由 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路探讨艾灸干预膝骨性关节炎的作用机制[J].中国骨质疏松杂志,2025,31(4):495-500.
- [24] SHANG X B, BÖKER K O, TAHERI S, et al. The interaction between microRNAs and the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in osteoarthritis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(18):9887.
- [25] ZHOU Y, ZHAO Y J, WU Y J, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate rat knee osteoarthritis via activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. Current Stem Cell Research & Therapy, 2024, 19(2):234-244.
- [26] YAO N, CHEN G C, LU Y Y, et al. Bushen Qiangjin capsule (补肾强筋胶囊) inhibits the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway to ameliorate papain-induced knee osteoarthritis in rats[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2021, 41(6):935-942.
- [27] 唐芳,马武开,周静,等.温经通络方对兔膝骨关节软骨细胞中  $\beta$ -catenin、Axin 及 GSK-3 $\beta$  蛋白表达水平的影响[J].中华中医药杂志,2020,35(4):1747-1750.
- [28] 杨星,周明旺,王晓萍,等.干细胞修复软骨损伤治疗膝骨关节炎的机制与临床研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2024,30(10):1466-1471.
- [29] 李辉,李宁,谢兴文,等.中医药干预基质金属蛋白酶表达治疗膝骨性关节炎研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2022,28(1):120-123.
- [30] 汪国翔,章晓云.骨关节炎病变过程中炎症细胞因子及相关信号通路的作用机制[J].中国组织工程研究,2021,25(14):2266-2273.
- [31] 刘洪波,靖春颖,黎正卿,等.基于 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的健骨伸筋汤对膝骨关节炎患者的干预作用研究[J].世界中医药,2024,19(9):1252-1257.
- [32] LOESER R F, OLEX A L, MCNULTY M A, et al. Disease progression and phasic changes in gene expression in a mouse model of osteoarthritis[J]. PLoS One, 2013, 8(1):e54633.
- [33] ROMAN-BLAS J A, CASTAÑEDA S, LARGO R, et al. Osteoarthritis associated with estrogen deficiency[J]. Arthritis Research & Therapy, 2009, 11(5):241.
- [34] RO J Y, ZHANG Y P, TRICOU C, et al. Age and sex differences in acute and osteoarthritis-like pain responses in rats[J]. The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences, 2020, 75(8):1465-1472.

(收稿日期:2025-07-02)