

基于 TGF-β1/Smad3、Keap1/Nrf2 信号通路探究三强方对膝骨关节炎大鼠的影响

王静雅^{1,2}, 申明宇^{1,3}, 闫康⁴, 赵英捷¹, 王 翀¹, 韩茹杰¹, 田朝阳¹, 李嘉钰¹, 李继安^{1,5*}

(1. 华北理工大学中医学院, 河北 唐山 063210; 2. 广安门医院保定医院, 河北 保定 071000; 3. 石家庄医学高等专科学校, 河北 石家庄 050200; 4. 河北大学中医学院, 河北 保定 071000; 5. 河北省国际联合研究中心, 河北 唐山 063210)

摘要: **目的** 探讨三强方对膝骨关节炎 (KOA) 大鼠的保护作用。**方法** 48 只大鼠随机分为假手术组、模型组、塞来昔布组 (18 mg/kg) 及三强方低、中、高剂量组 (3.8、7.6、15.2 g/kg), 每组 8 只, 假手术组只切开关节皮肤, 其余各组均采用右后膝关节前交叉韧带横断 (ACLT) 造模, 各组大鼠灌胃相应药物或生理盐水, 每天 1 次, 连续 8 周。给药结束后, 各组进行行为学检测, HE 染色、番红固绿染色、甲苯胺蓝染色观察膝关节软骨损伤情况, Micro-CT 检测软骨下骨微结构, ELISA 法检测血清 IL-1、IL-1β、IL-6、IL-17、TNF-α、NO、MDA 水平和 GSH-Px、SOD 活性, Western blot 法检测软骨组织 TGF-β1、Smad3、p-Smad3、Col II、Col X、MMP13、Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1 蛋白表达, RT-qPCR 法检测软骨组织 *Col II*、*Col X*、*MMP13*、*Nrf2*、*Keap1*、*HO-1*、*NQO1* mRNA 表达。**结果** 与模型组比较, 塞来昔布组及三强方高剂量组大鼠斜坡实验角度和热痛阈值升高 ($P<0.01$); 膝关节软骨表面较为平整, 软骨层较厚, 细胞数量增多, 形态较完整, 关节软骨番红失染现象改善; BMD、BV/TV、Tb. Th 升高 ($P<0.01$), SMI 降低 ($P<0.05$); 血清 IL-1、IL-1β、IL-6、IL-17、TNF-α、MDA、NO 水平降低 ($P<0.01$), SOD、GSH-Px 活性升高 ($P<0.01$); 软骨组织 Nrf2、HO-1、NQO1、TGF-β1、p-Smad3/Smad3、Col II 蛋白表达升高 ($P<0.01$), Keap1、Col X、MMP13 蛋白表达降低 ($P<0.01$); 软骨组织 *Nrf2*、*HO-1*、*NQO1*、*Col II* mRNA 表达升高 ($P<0.01$), *Keap1*、*Col X*、*MMP13* mRNA 表达降低 ($P<0.01$)。**结论** 三强方对 KOA 大鼠膝骨关节软骨及软骨下骨具有保护作用, 可能与调控 TGF-β1/Smad3、Keap1/Nrf2 信号通路, 抑制炎症反应和氧化应激有关。

关键词: 三强方; 膝骨关节炎; TGF-β1/Smad3 信号通路; Keap1/Nrf2 信号通路; 氧化应激; 炎症反应

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2026)09-2926-10

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2026.09.011

Effects of Sanqiang Formula on knee osteoarthritis in rats based on TGF-β1/Smad3 and Keap1/Nrf2 signaling pathways

WANG Jing-ya^{1,2}, SHEN Ming-yu^{1,3}, YAN Kang⁴, ZHAO Ying-jie¹, WANG Chong¹, HAN Ru-jie¹, TIAN Chao-yang¹, LI Jia-yu¹, LI Ji-an^{1,5*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China; 2. Baoding Hospital, Guang'anmen Hospital, Baoding 071000, China; 3. Shijiazhuang Medical College, Shijiazhuang 050200, China; 4. School of Traditional Chinese Medicine, Hebei University, Baoding 071000, China; 5. Hebei International Joint Research Center, Tangshan 063210, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the protective effect of Sanqiang Formula (SQF) on knee osteoarthritis (KOA) in rats. **METHODS** A total of 48 rats were randomly divided into a sham group, a model group, a celecoxib group (18 mg/kg), and SQF low-, medium-, and high-dose groups (3.8, 7.6, and 15.2 g/kg), with 8 rats in each group. The sham group underwent only skin incision of the joint, while the other groups underwent

收稿日期: 2025-09-24

基金项目: 河北省国际科技合作基地建设专项 (19392507D); 河北省自然科学基金基础研究重大项目 (H2023209084)

作者简介: 王静雅 (1992—), 女, 硕士, 主治医师, 从事中医药防治膝骨关节炎临床研究。E-mail: 1399426535@qq.com

* 通信作者: 李继安 (1962—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中医药防治膝骨关节炎研究。E-mail: lnyy@sina.com

anterior cruciate ligament transection (ACLT) of the right hind knee to establish the KOA model. The rats in each group were administered the corresponding drugs or normal saline by gavage once daily for 8 consecutive weeks. After the treatment, behavioral tests were conducted. Hematoxylin-eosin (HE) staining, safranin O-fast green staining, and toluidine blue staining were used to observe the damage of knee articular cartilage. Micro-CT was used to detect the microstructure of subchondral bone. ELISA was used to detect the levels of serum IL-1, IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α , NO, and MDA, as well as the activities of GSH-Px and SOD. Western blot was used to detect the protein expressions of TGF- β 1, Smad3, p-Smad3, Col II, Col X, MMP13, Nrf2, Keap1, HO-1, and NQO1 in cartilage tissues. RT-qPCR was used to detect the mRNA expressions of *Col II*, *Col X*, *MMP13*, *Nrf2*, *Keap1*, *HO-1*, and *NQO1* in cartilage tissues. **RESULTS** Compared with the model group, the ramp test angle and thermal pain threshold were increased in the celecoxib group and the SQF high-dose group ($P < 0.01$). The articular cartilage surface was relatively smooth, the cartilage layer was thicker, the number of cells increased, the morphology was relatively intact, and the safranin O staining loss was improved. The BMD, BV/TV, and Tb. Th were increased ($P < 0.01$), while the SMI was decreased ($P < 0.05$). The levels of serum IL-1, IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α , MDA, and NO were decreased ($P < 0.01$), while the activities of SOD and GSH-Px were increased ($P < 0.01$). The protein expressions of Nrf2, HO-1, NQO1, TGF- β 1, p-Smad3/Smad3, and Col II in cartilage tissues were increased ($P < 0.01$), while the protein expressions of Keap1, Col X, and MMP13 were decreased ($P < 0.01$). The mRNA expressions of *Nrf2*, *HO-1*, *NQO1*, and *Col II* in cartilage tissues were increased ($P < 0.01$), while the mRNA expressions of *Keap1*, *Col X*, and *MMP13* were decreased ($P < 0.01$). **CONCLUSION** SQF has a protective effect on the knee articular cartilage and subchondral bone in KOA rats, which may be related to the regulation of TGF- β 1/Smad3 and Keap1/Nrf2 signaling pathways, and the inhibition of inflammatory response and oxidative stress.

KEY WORDS: Sanqiang Formula; knee osteoarthritis; TGF- β 1/Smad3 signaling pathway; Keap1/Nrf2 signaling pathway; oxidative stress; inflammatory responses

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是以膝关节疼痛、肿胀、畸形和功能残疾为特征的退行性病变^[1], 严重影响患者生活质量^[2]。目前西医治疗本病以镇痛药物、非甾体抗炎药物及物理治疗为主^[3], 但长期用药易引起胃肠道等诸多不良反应^[4], 大大限制了其临床应用, 因此, 研发药食同源制剂是当今研究热点。KOA 一般归因于遗传、运动损伤、肥胖、性别等因素, 其发生机制与软骨、软骨下骨的结构病变密切相关, IL-1、IL-1 β 、IL-6、IL-17、TNF- α 等炎症因子与氧化应激因子不仅能加速软骨胶原蛋白溶解, 还可导致软骨下骨微结构变化。同时, TGF- β 1/Smad3、Keap1/Nrf2 信号通路参与了软骨细胞的生长发育过程^[5], 在维持软骨细胞的稳态中发挥重要作用。

中医认为, KOA 为筋肌骨同病, 以中老年患者居多, 病机以肾虚骨枯、脾虚肌弱、肝虚筋损为本, 瘀血阻络为标, 病位在骨, 与肾、肝、脾三脏关系密切, 尤以肾虚为关键。课题组前期根据临床经验拟定了以补肝肾健脾、强筋骨、活血通络为主要功效的三强方, 方中杜仲叶、黄芪、山萸肉补肝

肾健脾、强筋骨, 为君药; 葛根升阳解肌、木瓜舒筋活络、石斛滋肾阴, 共为臣药; 薏苡仁健脾、舒筋缓急, 天麻祛风通络、止痹痛, 姜黄行气活血、通经止痛, 桃仁活血祛瘀, 葡萄糖酸钙壮骨补钙, 共为佐使药, 全方共奏益肾、健脾、柔肝、活血通络之功, 临床治疗 KOA 时具有较好的疗效, 并且不良反应小, 但其机制未明。因此, 本研究拟探讨三强方对 KOA 大鼠关节软骨炎症、氧化应激、软骨微结构的作用机制。

1 材料

1.1 动物 48 只 SPF 级雄性 SD 大鼠, 6 周龄, 体质量 (180 $\pm$ 20) g, 购于北京斯贝福生物技术有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2019-0010], 饲养于华北理工大学动物实验中心洁净实验室 [实验动物使用许可证号 SYXK (冀) 2020-007], 恒温 25 $^{\circ}$ C, 自由饮水、摄食。动物实验经华北理工大学实验动物伦理委员会审查批准 (伦理编号 2023-SY-211)。

1.2 药物 三强方由杜仲叶 12 g、黄芪 12 g、山萸肉 10 g、木瓜 9 g、天麻 5 g、石斛 5 g、姜黄 5 g、

桃仁 5 g、葛根 5 g、薏苡仁 5 g、葡萄糖酸钙 1.2 g 组成，其中药材均购于北京同仁堂药店唐山分公司，经华北理工大学李继安教授鉴定为正品，而葡萄糖酸钙（批号 GB15571-2010）购自浙江一诺生物科技有限公司。塞来昔布（国药准字 J20140072）购自晖致制药（大连）有限公司。

1.3 试剂 大鼠白细胞介素（interleukin, IL）-1、IL-1 β 、IL-6、IL-17、肿瘤坏死因子- α （tumor necrosis factor- α , TNF- α ）ELISA 试剂盒（货号 ED-30193、ED-30206、ED-30219、ED-0201、ED-31063）均购自厦门仑昌硕生物科技有限公司；Mayer 苏木素染液、伊红染液、番红固绿染色试剂盒、甲苯胺蓝染色试剂盒（货号 BT-P107、BT-P109、BT-P102、BT-P103）均购自旗赛生物科技（武汉）有限公司；转化生长因子 β 1（TGF- β 1）、细胞信号转导分子 3（Smad3）、II 型胶原蛋白（Col II）、基质金属蛋白酶 13（MMP13）抗体（货号 Ba0290、Bm3919、Ba0533、Ma00420）均购自武汉博士德生物工程有限公司；p-Smad3、X 型胶原蛋白（Col X）抗体（货号 Bs5616r、Bs0554r）均购自北京博奥森生物技术有限公司； β 肌动蛋白（ β -actin）抗体（货号 Af3416）购自江苏亲科生物研究中心有限公司；HRP 标记的羊抗兔二抗（货号 A0208）购自上海碧云天生物技术股份有限公司；HRP 标记的羊抗鼠二抗（货号 SA00001-1）购自武汉三鹰生物技术有限公司；Trizol（货号 15596-026）购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司；HiScript[®] II Q Select RT SuperMix for qPCR（货号 R233）购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.4 仪器 DB026 型智能热板仪（北京智鼠多宝生物科技有限责任公司）；SpectraMaxM3 型多功能微孔板读板机（美国 Molecular Devices 公司）；JT-12J 型组织脱水机、JB-L6 型组织包埋机（武汉俊杰电子有限公司）；RM 2016 型生物组织石蜡切片机、FLEXACAM C1 型显微镜（德国 Leica 公司）；ViiA-7 型实时荧光定量 PCR 仪（美国 ABI 公司）；DYCZ-24DN 型垂直电泳槽（北京六一生物科技股份有限公司）；FW606 型半干转印仪（南京艾思易生物科技有限公司）；DS-H200 型水平摇床（武汉赛维尔生物科技有限公司）；Tissuelyser-24L 型自动研磨仪（上海净信实业发展有限公司）；VNC-102 型 VENUS Micro CT[平生医疗科技（昆山）有限公司]。

2 方法

2.1 药物制备 杜仲叶、黄芪、山萸肉、天麻、

木瓜、葛根、薏苡仁浸泡于 70% 乙醇中，采用超声波辅助提取后过滤浓缩，滤液减压浓缩回收溶剂至无醇味，得醇提浸膏；姜黄、桃仁采用水蒸气蒸馏法提取挥发油，采用 β -环糊精包合，得包合物；将醇提后的药渣与石斛合并，加水煎煮提取，过滤，滤液浓缩，得水提浸膏。将醇提浸膏、包合物与水提浸膏合并，加入葡萄糖酸钙混匀，进行冷冻干燥，得到冻干粉末，即得。为了检测潜在溶剂残留，对冻干粉进行 GC 分析，结果显示残留乙醇含量低于 0.01%，低于药理活性阈值。

2.2 造模、分组及给药 将大鼠右后膝关节前交叉韧带横断，“抽屉试验”阳性并维持关节失稳 6 周，制备膝关节关节炎模型^[6]，造模成功后按随机数字表法分为模型组、塞来昔布组及三强方低、中、高剂量组，每组 8 只，另取 8 只作为假手术组，只划开皮肤，不剪断前交叉韧带。三强方低、中、高剂量组分别灌胃给予 3.8、7.6、15.2 g/kg（生药量）混悬液，塞来昔布组灌胃给予 18 mg/kg 药液，假手术组和模型组灌胃给予等体积生理盐水，每天 1 次，连续 8 周。灌胃前称取适量冻干粉，加入预热蒸馏水中，涡旋振荡初步分散，立即超声水浴以形成均匀的混悬液。为了确保给药过程中药液均一，给药期间将盛有混悬液的容器置于磁力搅拌器上持续低速搅拌，以期避免固体颗粒沉降。

2.3 大鼠行为学检测 给药 8 周后，将大鼠放入智能热板仪中，设定温度为 52.5 $^{\circ}\text{C}$ ，当其开始舔足后迅速取出，记录热痛阈时间。再将大鼠逐个放置在坡度 25 $^{\circ}$ ~45 $^{\circ}$ 的光滑板斜坡上，连续 3 次于同一坡度停留 10 s 以上，每次升高 5 $^{\circ}$ ，当其不能停留 10 s 时前一个坡度即为稳定坡度。

2.4 取材 给药结束后，大鼠腹腔注射戊巴比妥钠麻醉，腹主动脉取血，3 000 r/min 离心取上清，-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存，一部分剥离右后膝关节周围肌肉组织，得到完整的该部位，置于多聚甲醛中固定；另一部分取该部位软骨组织，放入冻存管中，-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.5 Micro-CT 检测软骨下骨微结构 将大鼠膝关节垂直置于样品套筒中并固定，采用 Micro-CT 进行扫描，测定骨密度（BMD）、骨体积分数（BV/TV）、骨小梁数量（Tb. N）、骨小梁厚度（Tb. Th）、骨小梁间距（Tb. Sp）、骨小梁结构模型参数（SMI）。

2.6 血清生化指标检测 根据试剂盒说明书，检测大鼠血清 IL-1、IL-1 β 、IL-6、IL-17、TNF- α 、

NO、MDA 水平和 GSH-Px、SOD 活性。

2.7 组织学分析 将大鼠膝关节在 4% 多聚甲醛中固定 24 h，放入 10% EDTA 溶液中进行脱钙，依次经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋、切片后分别进行 HE 染色、番红固绿染色、甲苯胺蓝染色，在显微镜下分别采用 100、200 倍视野观察膝关节软骨形态。

2.8 Western blot 法检测软骨组织 TGF-β1、Smad3、p-Smad3、Col II、Col X、MMP13、Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1 蛋白表达 将大鼠软骨组织与相应比例的组织裂解液、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂混匀，研磨后提取蛋白，BCA 法测定浓度，将其与相应比例的上样缓冲液、双蒸水混匀，进行金属浴加热变性和电泳，半干转法转膜，快速封闭液封闭后滴加一抗 TGF-β1(1：1 000)、Smad3(1：1 000)、p-Smad3 (1：1 000)、Col II (1：1 000)、Col X (1：1 000)、MMP13 (1：1 000)、β-actin (1：20 000)、Nrf2 (1：3 000)、Keap1 (1：2 000)、HO-1 (1：1 000)、NQO1 (1：5 000)，4 ℃ 孵育过夜，TBST 洗膜 3 次，加入羊抗兔二抗 (1：10 000) 或羊抗鼠二抗 (1：10 000)，室温孵育 2 h，TBST 洗膜 3 次，ECL 发光液显色，采用 Image Lab 软件扫描存档，ImageJ 软件分析目标条带灰度值。

2.9 RT-qPCR 法检测软骨组织 Col II、Col X、MMP13、Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1 mRNA 表达 取大鼠新鲜软骨组织 100 mg，加入 1 mL Trizol 试剂后匀浆，再加入氯仿混匀，高速离心后吸出上层无色液体，与异丙醇混合后离心取沉淀，与 75% 乙醇混匀，离心后弃上清，加入 DEPC 溶解，冷冻保存。采用 HiScript® II Q Select RT SuperMix for qPCR 试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA，加样后进行定量 PCR 反应。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

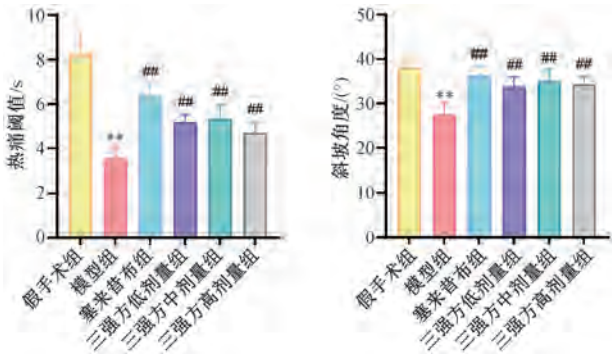
基因	正向(5'→3')	反向(5'→3')
β-actin	CACGATGGAGGGCCGCACTCATCTAAAGACCTCTATGCCAACACAGT	
Col II	TGACTTTCCTCCGTCTACTGTC	AGGTCTTCTGTGATCGGTACTC
Col X	TCTGCTGCTAATGTTCTTGA	GAATGCCTTGTTCTCCTCTT
MMP13	CCCGAGACCTCATGTTTCATCT	CTTCTTCTATGAGCGGGGAT
Nrf2	CCCATTGAGGGCTGTGAT	TTGGCTGTGCTTTAGGTC
Keap1	AGCGTGGAGAGATATGAGCC	ATCATCCGCCACTCATTCCT
NQO1	ACCTTGCTTTCCATCACCAC	GAGTGGTGACTCCTCCCAGA
HO-1	GCATGTCCAGGATTGTCC	GTTCTGCTTGTTCGCTCT

2.10 统计学分析 通过 SPSS 23.0 软件进行处理，符合正态分布的计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多

组间比较采用单因素方差分析，若方差齐，2 组间比较采用 LSD 检验；若方差不齐，2 组间比较采用 Tamhane's 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 三强方对 KOA 大鼠行为学的影响 与假手术组比较，模型组大鼠热痛阈值、斜坡实验角度降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，各给药组大鼠热痛阈值、斜坡实验角度升高 ($P < 0.01$)，见图 1。



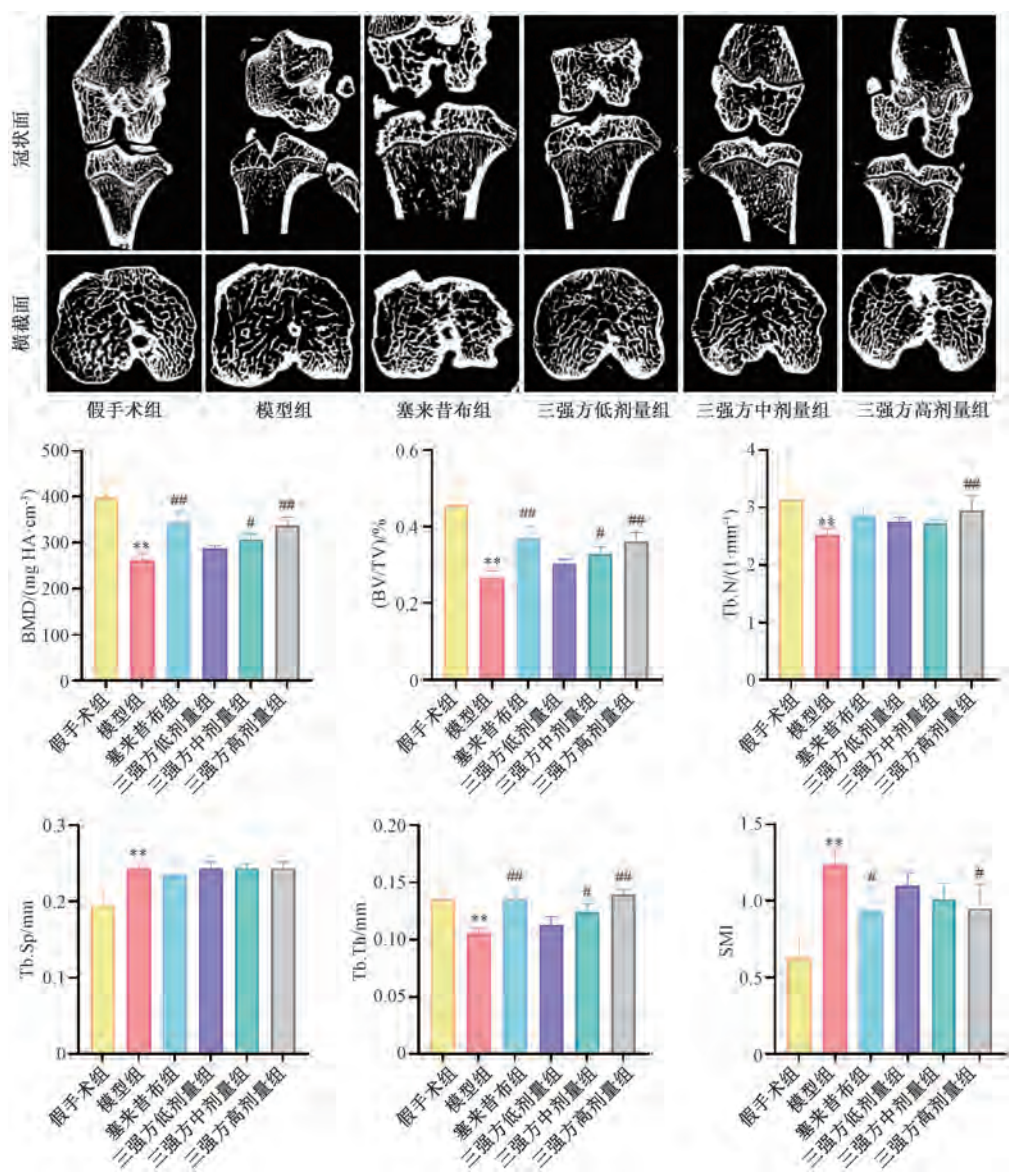
注：与假手术组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，### $P < 0.01$ 。

图 1 各组大鼠热痛阈值、斜坡角度比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig. 1 Comparison of thermal pain threshold and ramp test angle in rats from each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

3.2 三强方对 KOA 大鼠软骨下骨微结构的影响 如图 2 所示，模型组大鼠骨小梁数量较假手术组大鼠减少且分布紊乱；各给药组大鼠骨小梁数量较模型组大鼠增加，排列紧密，软骨下骨微结构改善；与假手术组比较，模型组大鼠 BMD、BV/TV、Tb. N、Tb. Th 值降低 ($P < 0.01$)，Tb. Sp、SMI 值升高 ($P < 0.01$)，而与模型组比较，三强方中剂量组 BMD、BV/TV、Tb. Th 值升高 ($P < 0.05$)；三强方高剂量组 BMD、BV/TV、Tb. N、Tb. Th 值升高 ($P < 0.01$)，SMI 值降低 ($P < 0.05$)；塞来昔布组 BMD、BV/TV、Tb. Th 值升高 ($P < 0.01$)，SMI 值降低 ($P < 0.05$)。

3.3 三强方对 KOA 大鼠软骨组织形态的影响 HE 染色、甲苯胺蓝染色显示，假手术组大鼠关节软骨表面完整平滑，全层软骨染色均匀，骨小梁排列有序，各层软骨细胞呈圆形或椭圆形且分布均匀，胞核居中，胞质饱满，未见纤维化或细胞固缩现象；模型组大鼠呈现软骨表层缺损变薄、细胞数量减少伴空泡形成、细胞排列紊乱且簇集分布等病理特征；三强方各剂量组大鼠均表现出修复趋势，其中低、中剂量组软骨结构有所改善，而高剂量组效果更好，膝关节软骨表面平整度恢复，软骨层增厚，



注：与假手术组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

图 2 各组大鼠膝关节软骨下骨微结构比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig. 2 Comparison of subchondral bone microstructure in knee joint of rats from each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

细胞形态趋于完整。番红固绿染色显示，假手术组大鼠软骨层番红染色均匀；模型组大鼠关节软骨浅表层番红，出现失染现象，提示蛋白聚糖丢失严重，软骨表面有毛刺样改变；三强方各剂量组和塞来昔布组大鼠关节软骨番红失染现象改善。见图 3。

3.4 三强方对 KOA 大鼠血清炎症因子水平的影响 与假手术组比较，模型组大鼠血清 IL-1、IL-1 β 、IL-6、IL-17、TNF- α 水平升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，各给药组大鼠血清 IL-1、IL-6、IL-17、TNF- α 水平降低 ($P<0.01$)，塞来昔布组和三强方高剂量组大鼠血清 IL-1 β 水平降低 ($P<0.01$)，

见图 4。

3.5 三强方对 KOA 大鼠氧化应激的影响

3.5.1 血清氧化应激因子水平 与假手术组比较，模型组大鼠血清 SOD、GSH-Px 活性降低 ($P<0.01$)，MDA、NO 水平升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，塞来昔布组和三强方高剂量组大鼠血清 SOD、GSH-Px 活性升高 ($P<0.01$)，MDA、NO 水平降低 ($P<0.01$)，三强方中剂量组大鼠血清 GSH-Px 活性升高 ($P<0.05$)，MDA 水平降低 ($P<0.05$)，见图 4。

3.5.2 软骨组织 Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1 蛋白表达 与假手术组比较，模型组大鼠软骨组织 Nrf2、

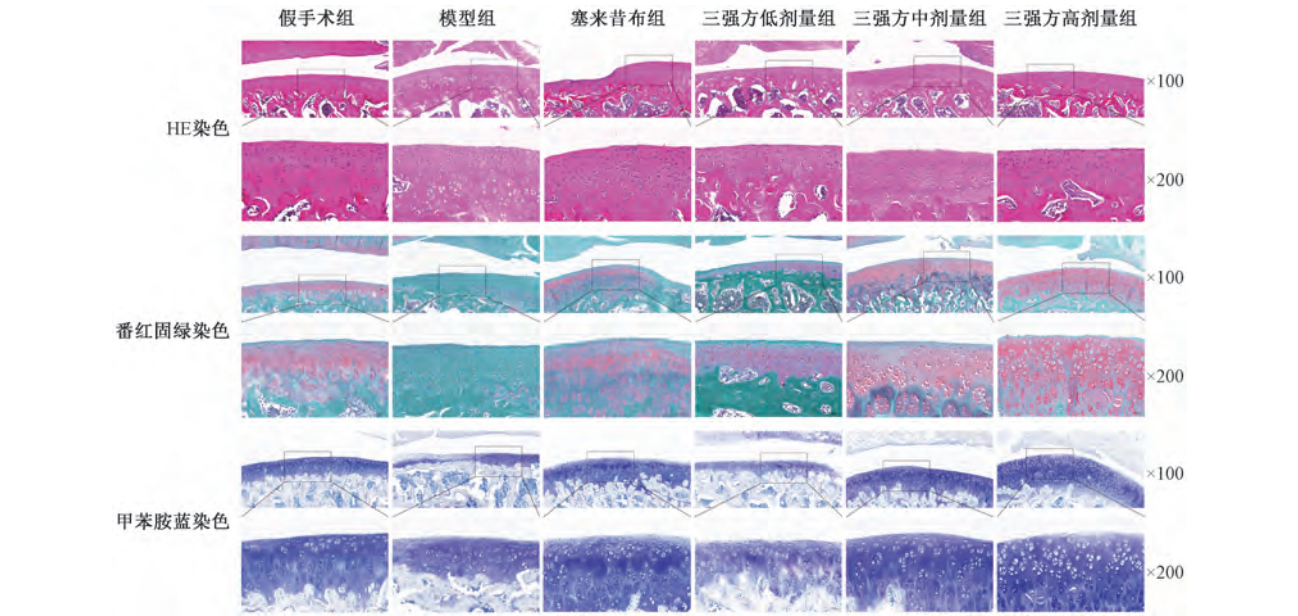
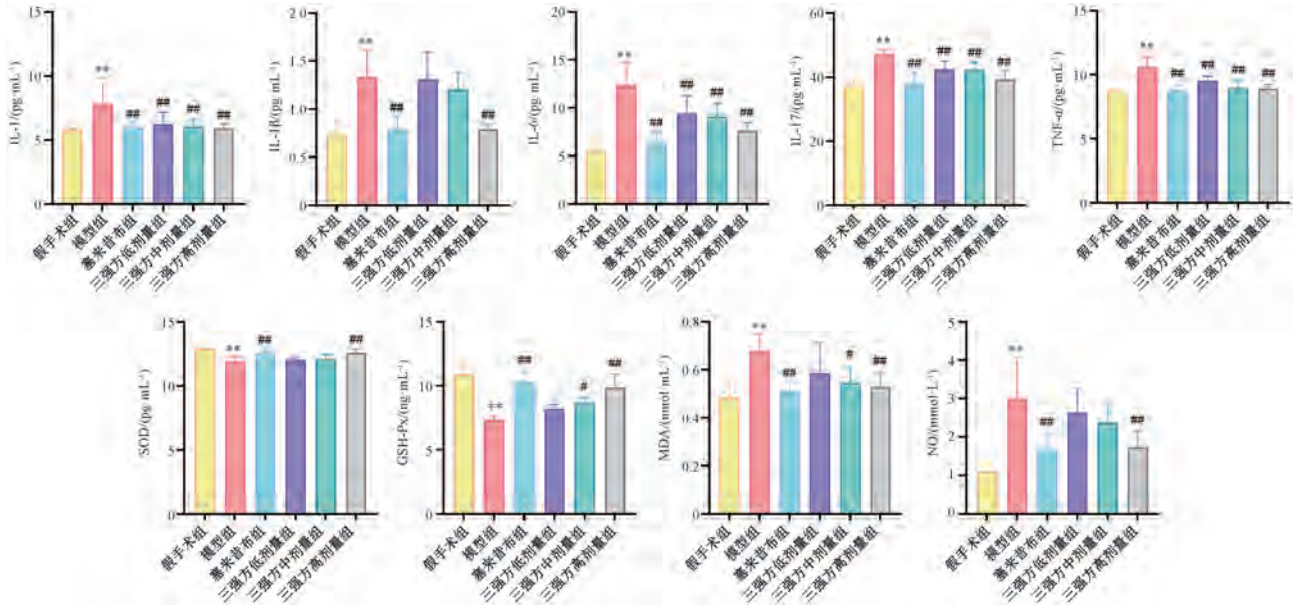


图 3 各组大鼠膝关节软骨组织形态
Fig. 3 Histological observation of knee articular cartilage in rats from each group



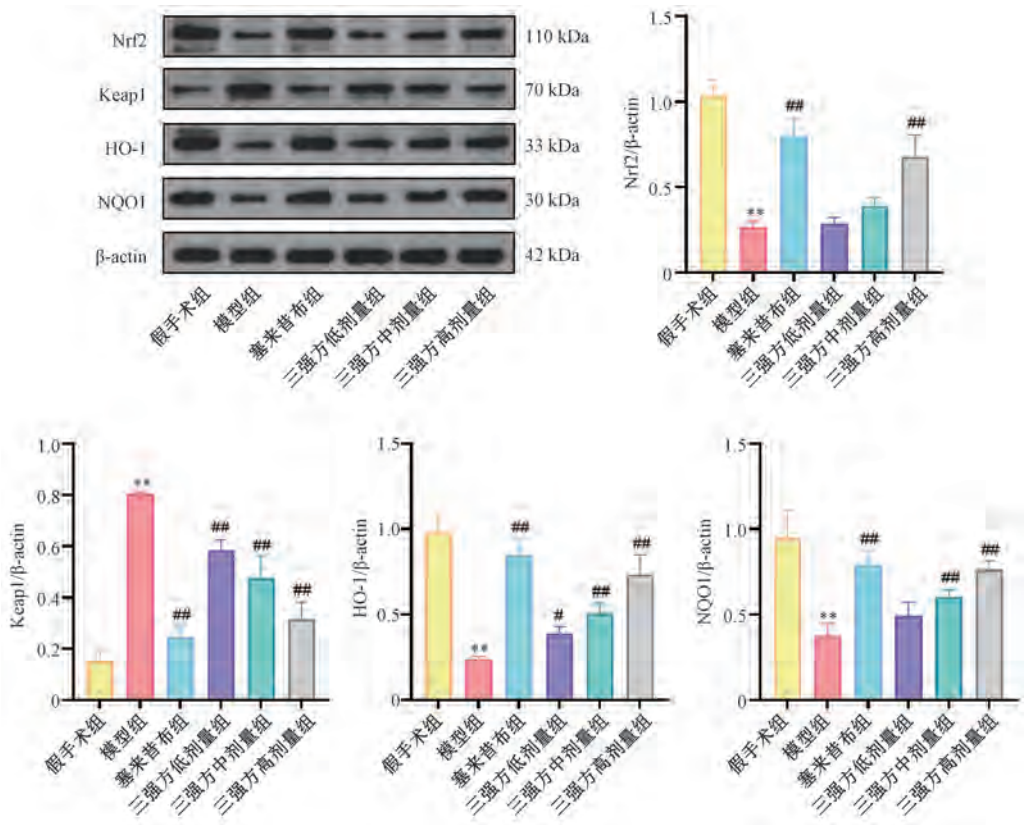
注：与假手术组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

图 4 各组大鼠血清炎症因子、氧化应激因子水平比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Fig. 4 Comparison of serum levels of inflammatory factors and oxidative stress factors in rats from each group ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

HO-1、NQO1 蛋白表达降低 ($P<0.01$)，Keap1 蛋白表达升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，三强方各剂量组和塞来昔布组大鼠软骨组织 HO-1 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，Keap1 蛋白表达降低 ($P<0.01$)，三强方高剂量组和塞来昔布组 Nrf2、NQO1 蛋白表达升高 ($P<0.01$)，三强方中剂量组 NQO1 蛋白表达升高 ($P<0.01$)，见图 5。

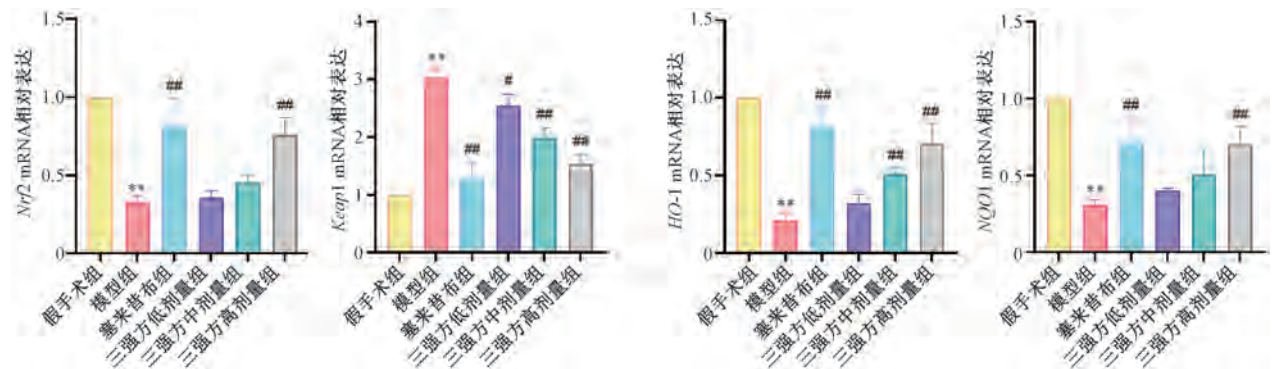
3.5.3 软骨组织 *Nrf2*、*Keap1*、*HO-1*、*NQO1* mRNA 表达 如图 6 所示，与假手术组比较，模型组大鼠软骨组织 *Nrf2*、*HO-1*、*NQO1* mRNA 表达降低 ($P<0.01$)，*Keap1* mRNA 表达升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，塞来昔布组和三强方高剂量组大鼠软骨组织 *Nrf2*、*HO-1*、*NQO1* mRNA 表达升高 ($P<0.01$)，*Keap1* mRNA 表达降低 ($P<0.01$)，三强



注：与假手术组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

图 5 各组大鼠软骨组织 Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Comparison of Nrf2, Keap1, HO-1 and NQO1 protein expressions in rat cartilage tissues from each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



注：与假手术组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

图 6 各组大鼠软骨组织 Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1 mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig. 6 Comparison of Nrf2, Keap1, HO-1 and NQO1 mRNA expressions in rat cartilage tissues from each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

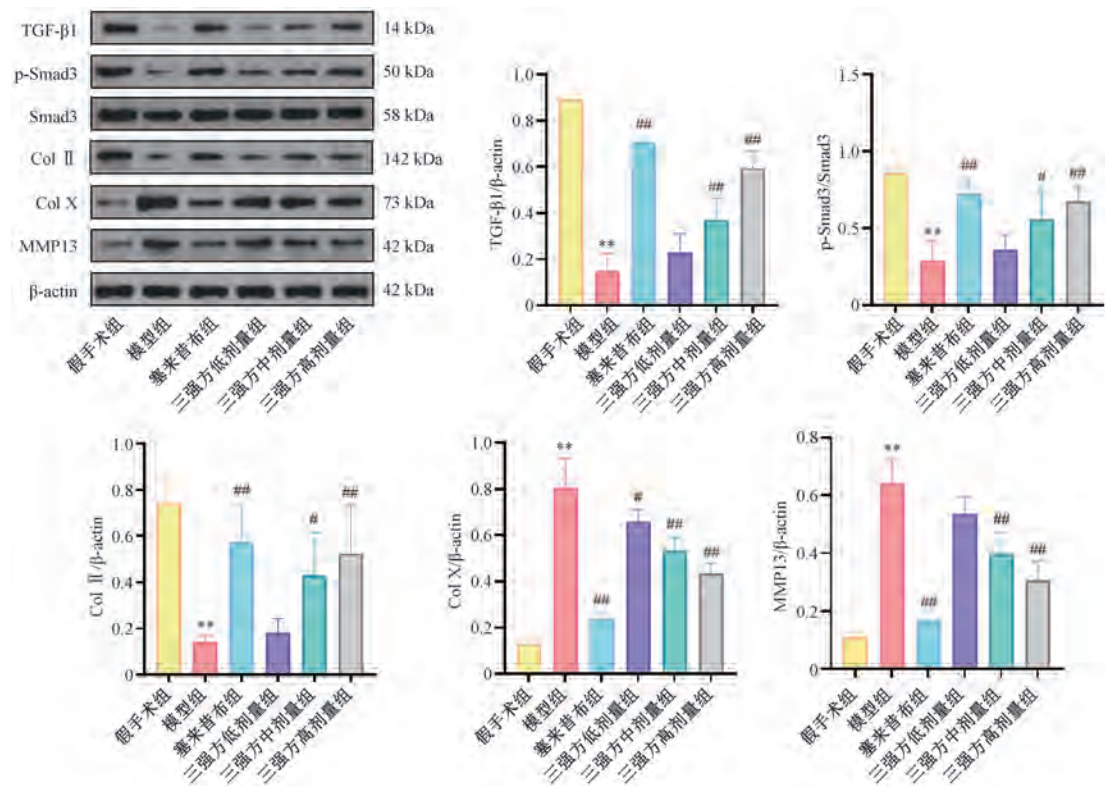
方低剂量组 Keap1 mRNA 表达降低 ($P<0.05$)，三强方中剂量组 HO-1 mRNA 表达升高 ($P<0.01$)，Keap1 mRNA 表达降低 ($P<0.01$)。

3.6 三强方对 KOA 大鼠软骨细胞稳态的影响

3.6.1 软骨组织 TGF-β1、Smad3、p-Smad3、Col II、Col X、MMP13 蛋白表达 与假手术组比较，模型

组大鼠软骨组织 TGF-β1、p-Smad3/Smad3、Col II 蛋白表达降低 ($P<0.01$)，Col X、MMP13 蛋白表达升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，塞来昔布组和三强方中、高剂量组大鼠软骨组织 TGF-β1、p-Smad3/Smad3、Col II 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，Col X、MMP13 蛋白表达降低 ($P<0.01$)，

三强方低剂量组 Col X 蛋白表达降低 ($P<0.05$), 见图 7。

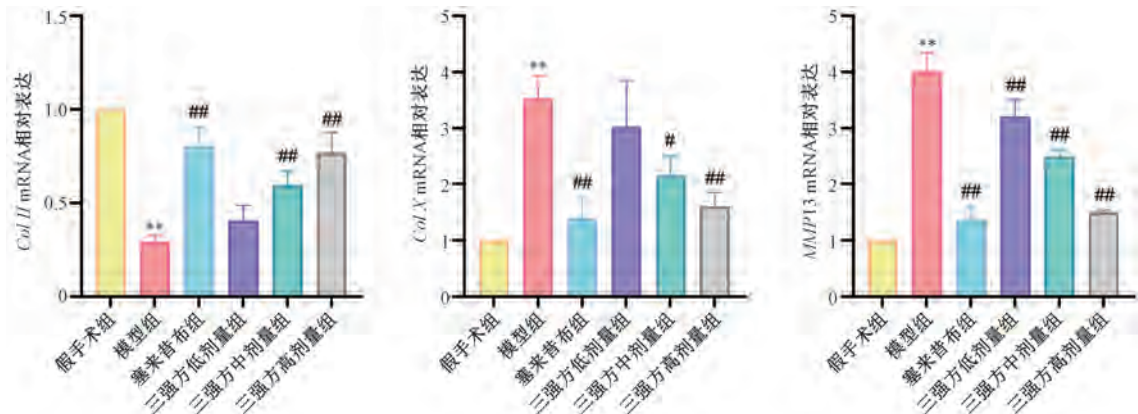


注：与假手术组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

图 7 各组大鼠软骨组织 TGF-β1、Smad3、p-Smad3、Col II、Col X、MMP13 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Fig. 7 Comparison of TGF-β1, Smad3, p-Smad3, Col II, Col X and MMP13 protein expressions in rat cartilage tissues from each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.6.2 软骨组织 Col II、Col X、MMP13 mRNA 表达 与假手术组比较，模型组大鼠软骨组织 Col II mRNA 表达降低 ($P<0.01$), Col X、MMP13 mRNA 表达升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，塞来昔布组

和三强方中、高剂量组大鼠软骨组织 Col II mRNA 表达升高 ($P<0.01$), Col X、MMP13 mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 三强方低剂量组 MMP13 mRNA 表达降低 ($P<0.01$), 见图 8。



注：与假手术组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

图 8 各组大鼠软骨组织 Col II、Col X、MMP13 mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Fig. 8 Comparison of Col II, Col X and MMP13 mRNA expressions in rat cartilage tissues from each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

4 讨论

膝关节前交叉韧带功能衰退或损伤是 KOA 常见的病因，表现为胫骨前移和胫股关节旋转失稳，产生的机械性、生物化学性刺激导致膝关节软骨和软骨下骨不同程度损伤，从而发生软骨细胞肥大、凋亡、衰老^[7]，导致细胞外基质中Ⅱ型胶原、蛋白多糖丢失，对软骨细胞的保护和支撑减弱；MMP13、X 型胶原表达活跃^[8]，加速软骨、细胞外基质降解与损伤。研究表明，采用离断前交叉韧带法建立大鼠或兔模型时，在术后 4~6 周与人类 KOA 的病理形态非常相似^[9-10]。关于 KOA 病理机制很多，其中炎性因子^[11-13]、氧化应激^[14-20]是骨关节炎发生发展的关键。

研究表明，三强方具有多靶向治疗作用。在抑制炎症方面，杜仲叶中的绿原酸可降低 NO、IL-6、TNF-α 等促炎细胞因子的释放，从而改善 KOA 炎症水平^[21]；黄芪中的黄芪甲苷可提高软骨细胞内 TGF-β1 及软骨细胞外基质Ⅱ型胶原、蛋白多糖表达，降低 IL-1 表达^[22-23]；山萸肉中的莫诺苷可通过降低关节软骨中炎症介质表达来减轻软骨破坏^[24]；木瓜中的木瓜苷可调节促炎、抗炎因子平衡状态，降低 IL-6、TNF-α 表达，升高 IL-4、IL-10 表达，改善机体内细胞因子的紊乱状态，抑制 RANKL/RANK/OPG 信号通路活化，减轻大鼠关节肿胀、关节炎程度^[25]；霍山石斛多糖能抑制小鼠足肿胀度，降低炎症因子 IL-1β、TNF-α、PGE2 水平，抑制环氧化酶-2 活性，具有较好的抗急性炎症作用^[26]。在抑制氧化应激方面，绿原酸等酚酸类成分、葛根素等是其发挥抗氧化作用的物质基础^[27-28]，可减少氧化损伤^[29]；黄芪甲苷可提高抗氧化酶 GSH-Px、SOD 活性，降低细胞中 ROS、MDA 水平，抑制软骨降解^[23]；天麻可减少活性氧自由基损伤^[30]，促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化，抑制其向脂肪细胞分化，降低血清骨吸收标志物水平，保护骨小梁微观结构，提高骨密度，增强骨生物力学性能^[31]。在软骨、软骨下骨保护方面，绿原酸可抑制 MMP13 表达，减少软骨下骨骨质流失^[32-33]；莫诺苷可通过提高增殖细胞核抗原、Ⅱ型胶原、聚集素表达，促进软骨细胞存活和基质合成，从而增加关节软骨厚度^[34]；石斛可通过促进细胞增殖及抑制细胞凋亡，减轻 IL-1β 诱导软骨细胞损伤，从而保护软骨下骨^[35]。

本实验结果显示，三强方可提高 KOA 大鼠斜坡实验坡度和热痛阈指标，修复软骨下骨结构异常，

降低炎症因子 IL-1、IL-1β、IL-6、IL-17、TNF-α 水平，激活 TGF-β1/Smad3 通路，促进Ⅱ型胶原生成，下调 X 型胶原、MMP13 表达；还可提升 SOD 活性，降低 MDA、NO 水平，上调 Nr2、HO-1、NQO1 mRNA、蛋白表达，下调 Keap1 mRNA、蛋白表达，表明该方能激活 Keap1/Nrf2 通路，提高 HO-1、NQO1 表达，恢复机体对氧化应激的调节作用及抗氧化能力。

综上所述，三强方可有效抑制 KOA 的炎症和氧化应激反应，并对软骨及软骨下骨发挥保护作用，维护软骨细胞稳态，其机制与激活 TGF-β1/Smad3、Keap1/Nrf2 信号通路有关，为其他药食同源中药多靶向治疗本病提供了实验依据。

参考文献：

[1] 陈军涛, 许 辉, 周运峰, 等. 基于“筋骨失衡”理论探讨膝骨关节炎发病机制及推拿治疗研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2024, 39(11): 6026-6031.

[2] Nagai T, Uei H, Nakanishi K. Changes in health-related quality of life by patient education and rehabilitation based on a behavior change program in knee osteoarthritis[J]. *Ann Rehabil Med*, 2024, 48(3): 211-219.

[3] Wang Y, Li D, Lv Z, *et al.* Efficacy and safety of Gutong Patch compared with NSAIDs for knee osteoarthritis: A real-world multicenter, prospective cohort study in China[J]. *Pharmacol Res*, 2023, 197: 106954.

[4] Naumov A V, Tkacheva O N. Use of a glycosamine sulfate for patients with osteoarthritis and a comorbidity with high risk of the side effects from NSAIDS[J]. *Ter Arkh*, 2018, 90(5): 81-87.

[5] 廖太阳, 马振源, 邢润麟, 等. 膝痹宁Ⅱ方对膝骨关节炎软骨细胞铁死亡及 Nr2/GPX4 信号通路的影响[J]. 中华中医药杂志, 2024, 39(10): 5182-5188.

[6] Oka Y, Murata K, Kano T, *et al.* Impact of controlling abnormal joint movement on the effectiveness of subsequent exercise intervention in mouse models of early knee osteoarthritis[J]. *Cartilage*, 2021, 13(2_suppl): 1334S-1344S.

[7] Ungsudechachai T, Jittikoon J, Honsawek S, *et al.* Protective effect of clusterin against interleukin-1β-induced apoptosis and inflammation in human knee osteoarthritis chondrocytes[J]. *Clin Transl Sci*, 2024, 17(7): e13881.

[8] He Y, Manon-Jensen T, Arendt-Nielsen L, *et al.* Potential diagnostic value of a type X collagen neo-epitope biomarker for knee osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2019, 27(4): 611-620.

[9] Xu Y, Wang J Y, Zou Y, *et al.* Role of IL-1 family cytokines IL-36, IL-37, IL-38 in osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a comprehensive review[J]. *J Inflamm Res*, 2024, 17: 4001-4016.

[10] 李顺利, 赵永红, 王新军, 等. 单纯前交叉韧带离断法建立兔膝骨关节炎模型[J]. 中国骨伤, 2024, 37(10): 1003-1009.

[11] Wang M, Gao Z, Zhang Y, *et al.* Syringic acid promotes cartilage extracellular matrix generation and attenuates osteoarthritic cartilage degradation by activating TGF- β /Smad and inhibiting NF- κ B signaling pathway[J]. *Phytother Res*, 2024, 38(2): 1000-1012.

[12] Pitou M, Papachristou E, Bratsios D, *et al.* *In vitro* chondrogenesis induction by short peptides of the carboxy-terminal domain of transforming growth factor β 1[J]. *Biomedicines*, 2023, 11(12): 3182.

[13] Yan Y, He Y, Jiang R, *et al.* Flavonoid-rich *Scabiosa comosa* inflorescence extract attenuates CCl₄-induced hepatic fibrosis by modulating TGF- β -induced Smad3 phosphorylation[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 426-433.

[14] Gundogdu G, Kilic-Erkek O, Gundogdu K. The impact of sericin on inflammation, oxidative stress, and lipid metabolism in female rats with experimental knee osteoarthritis[J]. *Clin Rheumatol*, 2024, 43(7): 2307-2316.

[15] Liu C, Wang F, Li Q, *et al.* Effect of NO₂ exposure on airway inflammation and oxidative stress in asthmatic mice[J]. *J Hazard Mater*, 2023, 457: 131787.

[16] He Q, Feng W, Chen X, *et al.* H₂O₂-induced oxidative stress responses in *Eriocheir sinensis*: antioxidant defense and immune gene expression dynamics[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2024, 13(5): 524.

[17] Long X, Hu X, Pan C, *et al.* Antioxidant activity of *Gracilaria lemaneiformis* polysaccharide degradation based on Nrf-2/Keap-1 signaling pathway in HepG2 cells with oxidative stress induced by H₂O₂[J]. *Mar Drugs*, 2022, 20(9): 545.

[18] Chen S, Yin Q, Hu H, *et al.* AOPPs induce HTR-8/SVneo cell apoptosis by downregulating the Nrf-2/ARE/HO-1 anti-oxidative pathway: Potential implications for preeclampsia[J]. *Placenta*, 2021, 112: 1-8.

[19] Chen Y, Liu C, Tong J, *et al.* Inhibition of cullin3 neddylation alleviates diabetic retinopathy by activating Nrf2 signaling to combat ROS-induced oxidative stress and inflammation[J]. *Inflammation*, 2025, 48(5): 3194-3205.

[20] Guevara C, Vicencio S C, Pizarro I S, *et al.* Evidence for TGF- β 1/Nrf2 signaling crosstalk in a cuprizone model of multiple sclerosis[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2024, 13(8): 914.

[21] 杜星男, 田宝忠. 绿原酸对膝关节炎大鼠软骨细胞炎性凋亡及免疫反应的影响[J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(11): 2785-2789.

[22] Li L, Zou J, Zhou M, *et al.* Phenylsulfate-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in podocytes are ameliorated by astragaloside IV activation of the SIRT1/PGC1 α /Nrf1 signaling pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 177: 117008.

[23] Xu H, Wang J B, Chen Y P, *et al.* Astragaloside IV protects against IL-1 β -induced chondrocyte damage *via* activating autophagy[J]. *Curr Mol Med*, 24(11): 1382-1389.

[24] Park E, Lee C G, Han S J, *et al.* Antiosteoarthritic effect of morroniside in chondrocyte inflammation and destabilization of medial meniscus-induced mouse model[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(6): 2987.

[25] 周炜津, 杨提昆, 王亿童, 等. 木瓜苷对 AA 大鼠抗炎干预及细胞因子表达影响[J]. 中国医学创新, 2022, 19(16): 34-39.

[26] 谷仿丽, 黄仁术, 何晓梅, 等. 霍山石斛抗急性炎症有效部位筛选研究[J]. 宜春学院学报, 2022, 44(3): 1-5.

[27] Cao S, Li X, Yin H, *et al.* Dietary puerarin supplementation improves immune response and antioxidant capacity of sows[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2024, 13(3): 290.

[28] Tang Y, Fang C, Shi J, *et al.* Antioxidant potential of chlorogenic acid in age-related eye diseases[J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2024, 12(1): e1162.

[29] Liu H, Chen P, Lv X, *et al.* Effects of chlorogenic acid on performance, anticoccidial indicators, immunity, antioxidant status, and intestinal barrier function in coccidia-infected broilers[J]. *Animals (Basel)*, 2022, 12(8): 963.

[30] 张宇标, 蔡伟松, 韩广弢, 等. 天麻素预防 TNF- α 诱导的骨关节炎滑膜细胞衰老和线粒体膜破坏[J]. 武汉大学学报 (医学版), 2019, 40(5): 708-712.

[31] Huang Q, Shi J, Gao B, *et al.* Gastrodin: an ancient Chinese herbal medicine as a source for anti-osteoporosis agents *via* reducing reactive oxygen species[J]. *Bone*, 2015, 73: 132-144.

[32] Zhang J, Huang S, Tong X, *et al.* Chlorogenic acid alleviates thiram-induced tibial dyschondroplasia by modulating Caspases, BECN1 expression and ECM degradation[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(13): 3160.

[33] Liu C C, Zhang Y, Dai B L, *et al.* Chlorogenic acid prevents inflammatory responses in IL-1 β -stimulated human SW-1353 chondrocytes, a model for osteoarthritis[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(2): 1369-1375.

[34] Cheng L, Zeng G, Liu Z, *et al.* Protein kinase B and extracellular signal-regulated kinase contribute to the chondroprotective effect of morroniside on osteoarthritis chondrocytes[J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(8): 1877-1886.

[35] 杨 翀, 张 奕, 陈超斌, 等. 石斛碱对 IL-1 β 诱导的软骨细胞增殖和凋亡的影响及其机制研究[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(6): 1338-1340.