基于AMPK/mTOR信号通路研究膝痹宁方对膝骨关节炎模型大鼠的改善作用机制Δ

廖太阳[1*]，张　力[1]，杨　楠[1]，魏义保[1]，吕璟先[1]，徐　波[2]，丁　亮[1]，王培民[1]，张　立[1#]（1.南京中医药大学附属医院/江苏省中医院骨伤科，南京　210029；2.南京中医药大学附属苏州市中医医院骨伤科，江苏 苏州　215007）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）01-0023-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.01.05

摘　要　目的　基于腺苷酸活化蛋白激酶（AMPK）/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mTOR）信号通路探究膝痹宁方（XBN）对膝骨关节炎（KOA）模型大鼠的改善作用机制。**方法**　将36只大鼠随机分为空白组、模型组、XBN组（12.56 g/kg）、XBN+二甲双胍（AMPK激动剂）组[12.56 g/kg XBN+100 mg/kg二甲双胍]，每组9只。除空白组外，其余各组大鼠均通过离断前交叉韧带的方法复制KOA模型。造模成功后，各组大鼠给予相应药物/生理盐水，XBN和生理盐水每天灌胃1次，二甲双胍隔天腹腔注射1次，连续4周。观察大鼠软骨组织病理形态学变化并进行Mankin评分，检测大鼠软骨组织中聚集蛋白聚糖（Aggrecan）的表达水平，血小板反应蛋白解整合素金属肽酶4（ADAMTS-4）、ADAMTS-5、基质金属蛋白酶3（MMP-3）、MMP-13的mRNA和蛋白表达水平，及AMPK、mTOR蛋白的磷酸化水平。**结果**　与空白组比较，模型组大鼠软骨组织结构分层紊乱，软骨层基质淡染，潮线出现扭曲或中断，Mankin评分显著升高（$P<0.05$）；软骨组织中Aggrecan蛋白表达水平和AMPK蛋白的磷酸化水平均显著降低（$P<0.05$），ADAMTS-4、ADAMTS-5、MMP-3、MMP-13 mRNA和蛋白的表达水平以及mTOR蛋白的磷酸化水平均显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，各给药组大鼠软骨病理形态学变化明显改善，上述评分或指标水平均显著逆转（$P<0.05$）。与XBN组比较，XBN+二甲双胍组大鼠软骨病变程度进一步减轻，上述评分或指标水平进一步改善（$P<0.05$）。**结论**　XBN可改善KOA模型大鼠的软骨损伤，促进软骨合成，减少软骨降解，其作用机制可能与激活AMPK/mTOR信号通路有关。

关键词　膝痹宁方；膝骨关节炎；腺苷酸活化蛋白激酶；哺乳动物雷帕霉素靶蛋白；软骨

Study on improvement effect mechanism of Xibining prescription on knee osteoarthritis model rats based on AMPK/mTOR signaling pathway

LIAO Taiyang[1], ZHANG Li[1], YANG Nan[1], WEI Yibao[1], LYU Jingxian[1], XU Bo[2], DING Liang[1], WANG Peimin[1], ZHANG Li[1]（1. Dept. of Orthopaedics, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine/Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 2. Dept. of Orthopaedics, the Affiliated Suzhou Traditional Chinese Medicine Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Suzhou 215007, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the improvement effect mechanism of Xibining prescription (XBN) on knee osteoarthritis (KOA) model rats based on AMP-activated protein kinase (AMPK)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway. **METHODS** Totally 36 rats were randomly divided into blank group, model group, XBN group (12.56 g/kg), XBN+metformin (AMPK agonist) group (12.56 g/kg XBN+100 mg/kg metformin), with 9 rats in each group. Except for blank group, KOA model was induced by anterior cruciate ligament transection in other groups. After modeling, each group was given relevant medicine/normal saline, XBN and normal saline intragastrically, once a day, and metformin intraperitoneally, every other day, for 4 consecutive weeks. The pathomorphological changes of cartilage tissue in rats were observed and Mankin scoring was conducted. The expression level of Aggrecan in rat cartilage, mRNA and protein expressions of platelet reactive protein disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4 (ADAMTS-4), ADAMTS-5, matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) and MMP-13, and the phosphorylation level of AMPK and mTOR proteins were detected. **RESULTS** Compared with blank group, the structure of cartilage tissue in the model group was disordered, the matrix of cartilage layer was lightly stained, the tide line was distorted or interrupted, and Mankin score was significantly increased ($P<0.05$). The protein expression of Aggrecan in cartilage tissue and the phosphorylation level of

Δ**基金项目**　国家自然科学基金资助项目（No.81904224）；江苏省中医院高峰学术人才项目（No.y2021rc02）；苏州市“科教兴卫”青年科技项目（No.KJXW2020045）

＊**第一作者**　博士研究生。研究方向：膝骨关节炎的基础与临床。E-mail：drtaiyang@126.com

\# **通信作者**　主治中医师，博士。研究方向：膝骨关节炎的基础与临床。E-mail：zhang4462053@126.com

AMPK protein were all decreased significantly ($P<0.05$); mRNA and protein expressions of ADAMTS-4, ADAMTS-5, MMP-3 and MMP-13 and the phosphorylation levels of mTOR protein were significantly increased in cartilage tissues ($P<0.05$). Compared with model group, the pathological morphology of cartilage was improved significantly in each administration group, and above score or indexes were reversed significantly ($P<0.05$). Compared with XBN group, the degree of cartilage lesions in rats was further alleviated in XBN+ metformin group, and the levels of above score or indicators were further improved ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** XBN can ameliorate cartilage injury in KOA model rats, promote cartilage synthesis and reduce cartilage degradation, the mechanism of which may be associated with activating AMPK/mTOR signaling pathway.

KEYWORDS Xibining prescription; knee osteoarthritis; AMP-activated protein kinase; mammalian target of rapamycin; cartilage

膝骨关节炎（knee osteoarthritis，KOA）是一种全关节疾病，该病病因复杂，软骨退变是其核心病理环节[1]。软骨退变主要是由于软骨细胞合成代谢及细胞外基质（extracellular matrix，ECM）分解代谢平衡失调所致，因此，维持软骨组织自身的代谢平衡在KOA的治疗中具有十分关键的作用，对于延缓KOA发展进程至关重要[2]。研究显示，以血小板反应蛋白解整合素金属肽酶4（disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4，ADAMTS-4）、ADAMTS-5、基质金属蛋白酶3（matrix metalloproteinase3，MMP-3）、MMP-13为代表的胶原水解酶，对关节软骨具有破坏作用[3-4]；而聚集蛋白聚糖（Aggrecan）对关节软骨具有保护作用[5-6]。另外，越来越多的研究表明，调控腺苷酸活化蛋白激酶（AMP-activated protein kinase，AMPK）/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR）信号通路对软骨具有保护效应[7-9]。

基于KOA中医学“寒、瘀、虚”的病机特点，南京中医药大学附属医院骨伤科王培民教授研制了中药复方——膝痹宁方（XBN），该方由制狗脊、山萸肉、生薏苡仁、川牛膝、制何首乌、生甘草等11味中药组成，且已获国家专利（专利号为CN201010514325），在临床上主要用于治疗骨关节退行性疾病导致的慢性疼痛，疗效显著[10-11]。本课题组前期研究也发现，XBN可改善KOA模型大鼠的滑膜炎症和疼痛[12]，但具体作用机制尚不明确。基于此，笔者拟基于AMPK/mTOR信号通路探讨XBN改善KOA的作用机制，以期为XBN的临床应用提供实验基础。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括AB7500型荧光定量聚合酶链式反应（qPCR）系统（美国ABI公司），HistoCore型组织切片机、TP1020型组织脱水机、KD-BMⅢ型组织包埋机、MI-3000B型倒置显微镜（德国Leica公司），BioPhotometer-Plus型多功能核酸蛋白检测系统（德国Eppendorf公司），170-3930型垂直凝胶电泳及转膜系统（美国Bio-Rad公司），LAS4000型凝胶成像发光系统（美国GE公司）等。

1.2 主要药品与试剂

制狗脊、山萸肉、生薏苡仁、川牛膝、制何首乌、生甘草药材均购自康美药业股份有限公司（批号分别为211201171、220101031、220202271、220200041、211003211、211200251），巴戟天、炒白芍（批号分别为220100129、220400529）购自康美（亳州）世纪国药有限公司，淡附片（批号22030206）购自康美膝王阁（四川）制药有限公司，桂枝（批号220101）购自普宁市泽群中药饮片有限公司，紫河车（批号211001）购自安徽道源堂中药饮片有限公司。上述药材经南京中医药大学附属医院骨伤科王培民教授鉴定为真品。二甲双胍（AMPK激动剂，批号R000310）购自上海易恩化学技术有限公司；番红O-固绿染色试剂盒（批号YM1011）购自南京伊尔美生物科技有限公司；兔源ADAMTS-4多克隆抗体、兔源ADAMTS-5多克隆抗体（批号分别为A02899、A02802-1）均购自美国Boster公司；兔源Aggrecan多克隆抗体、兔源MMP-3多克隆抗体、兔源MMP-13多克隆抗体、小鼠源GAPDH单克隆抗体（批号分别为13880-1-AP、17873-1-AP、18165-1-AP、60004-1-Ig）均购自美国Proteintech公司；兔源AMPK单克隆抗体、兔源磷酸化AMPK（p-AMPK）单克隆抗体、mTOR单克隆抗体、兔源磷酸化mTOR（p-mTOR）单克隆抗体（批号分别为2532S、50081S、2983S、5536S）均购自美国CST公司；辣根酶素标记的山羊抗兔免疫球蛋白G（IgG）二抗（批号K1223）均购自美国APExBIO公司；BCA试剂盒（批号P0012）购自上海Beyotime公司；青霉素钠（批号F0112104）购自华北制药股份有限公司。

1.3 实验动物

本研究所用实验动物为SPF级SD雄性大鼠，共36只，体质量190～200 g，2月龄，由浙江省医学科学院提供，动物生产许可证号为SCXK（浙）2019-0002。所有大鼠均分笼饲养于光/暗各12 h、室温（25±2）℃、相对湿度（60±5）%的动物房内，自由摄食、饮水。动物实验方案经南京中医药大学动物伦理委员会审核批准，批准号为ACU210101。

2 方法

2.1 药物制备

按照文献[10]方法将XBN的11味中药按处方比例称取适量，将除淡附片、紫河车的其余9味中药加8倍量（g/mL，下同）水浸泡30 min。用武火将淡附片煎至沸腾，再以文火煎30 min，加入上述浸泡后的中药，煎至沸腾后继续煎煮30 min，滤过；再加6倍量水，煎至沸腾后再煎30 min，滤过；合并2次滤液，最后加入研磨成粉的紫河车，浓缩成质量浓度为1.2 g/mL（以生药量计）的XBN溶液。

2.2 动物分组、给药与造模

将大鼠随机分为空白组、模型组、XBN组（12.56 g/kg，剂量为临床等效剂量）和XBN+二甲双胍组（12.56 g/kg XBN+100 mg/kg二甲双胍，二甲双胍剂量参考文献[13]设置），每组9只。空白组大鼠仅切开皮肤而不开放膝关节腔，其余各组大鼠采用离断前交叉韧带的方法建立KOA模型[14]，具体方法如下：用2%戊巴比妥钠（50 mg/kg）腹腔注射麻醉大鼠后，备皮、消毒，纵向切口打开膝关节腔，髌骨脱位后用手术刀离断前交叉韧带，然后逐层缝合；术后连续肌内注射青霉素钠3 d以预防感染。造模14 d后，大鼠前抽屉试验阳性，表明造模成功。空白组与模型组大鼠灌胃等体积生理盐水，各给药组大鼠给予相应药物，XBN和生理盐水每天灌胃1次，二甲双胍隔天腹腔注射1次，连续4周。

2.3 大鼠软骨组织病理形态学观察

采用番红O-固绿染色法进行检测。末次给药24 h后，将各组大鼠处死，剖取软骨组织。取3只大鼠的软骨组织（其余大鼠软骨组织于－80 ℃下保存备用）清理干净后流水冲洗，置于4%多聚甲醛中固定3～5 d，再以10% EDTA溶液脱钙4周；经梯度浓度的乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡包埋后，切片（厚度为5 μm）；将切片脱蜡至水后，进行番红O-固绿染色，以自来水冲洗后，用1%冰醋酸分色3 s，经无水乙醇脱水、二甲苯透明及中性树胶封片后，观察各组大鼠软骨组织的病理学形态并拍照，参照Mankin评分标准评估大鼠软骨组织的病理形态学变化[15]。

2.4 大鼠软骨组织中Aggrecan蛋白表达水平的检测

采用免疫荧光染色法进行测定。每组随机取3只大鼠冻存的软骨组织，按“2.3”项下方法制备石蜡切片，使用二甲苯和梯度浓度的乙醇分别进行脱蜡和水合后，滴加适量的EDTA完成抗原修复，滴加3%BSA溶液封闭30 min；加入Aggrecan一抗（稀释度为1∶500），于4 ℃孵育过夜；滴加二抗，于室温孵育1 h；滴加DAPI染色液，于室温下静置15 min；用水冲洗后，滴加适量抗荧光淬灭剂，转移组织切片于显微镜下进行观察（Aggrecan蛋白的阳性表达呈红色荧光），使用Image J v1.53f软件分析各组蛋白的荧光强度（荧光强度越大，表示蛋白表达水平越高）。

2.5 大鼠软骨组织中分解代谢相关基因mRNA表达水平的检测

采用qPCR方法进行检测。每组随机取3只大鼠冻存的软骨组织，经液氮研磨裂解后，常规提取软骨组织总RNA，再逆转录为cDNA。以cDNA为模板，进行PCR（PCR引物序列和产物长度见表1）。PCR反应体系为上、下游引物各0.4 μL，cDNA 1 μL，2×SYBR qPCR Master Mix 10 μL，ddH_2O 8.2 μL。PCR反应条件为95 ℃预变性5 min；95 ℃变性10 s，60 ℃退火20 s，72 ℃延伸20 s，共40个循环。以GAPDH为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各目的基因mRNA的表达水平。

表1 PCR引物序列和产物长度

基因	引物序列（5′→3′）	扩增产物长度/bp
ADAMTS-4	上游：AACTCACCTGCCAGGCCC	186
	下游：CATTCCCACCGCACACCA	
ADAMTS-5	上游：AGCCCTAAAGAAGAAAAC	138
	下游：ATCCCATGTAAAAAATCA	
MMP-3	上游：CCTGATGTCCTCGTGGTA	156
	下游：GGTCCTGAGAGATTTTCG	
MMP-13	上游：CCCTAAGCACCCCAAAAC	114
	下游：TGCAGACGCCAGAAGAAT	
GAPDH	上游：GGCTCTCTGCTCCTCCCTGT	95
	下游：CGTTCACACCGACCTTCACC	

2.6 大鼠软骨组织中分解代谢和AMPK/mTOR信号通路相关蛋白表达水平的检测

采用Western blot法进行测定。每组随机取3只大鼠冻存的软骨组织，经液氮研磨裂解后，离心，取上清液15 μL测定蛋白含量，其余上清液煮沸变性，然后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转膜，以5%脱脂奶粉封闭1 h；加入GAPDH、ADAMTS-4、ADAMTS-5、MMP-3、MMP-13、AMPK、p-AMPK、mTOR、p-mTOR一抗（稀释度分别为1∶50 000、1∶1 000、1∶1 000、1∶1 000、1∶2 000、1∶1 000、1∶1 000、1∶1 000、1∶1 000），4 ℃孵育过夜；以TBST洗膜10 min×3次，加入二抗（稀释度为1∶5 000），室温孵育1 h；以TBST溶液洗膜10 min×3次，加入ECL显色，采用凝胶成像发光系统显影曝光。采用Image J v1.53f软件对各组蛋白条带进行分析，以ADAMTS-4、ADAMTS-5、MMP-3、MMP-13与内参GAPDH灰度值的比值表示其表达水平；以p-AMPK与AMPK、p-mTOR与mTOR的灰度值比值表示AMPK、mTOR的磷酸化水平。

2.7 统计学方法

采用SPSS 20.0软件对数据进行统计分析，使用GraphPad 7.04软件绘图。数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

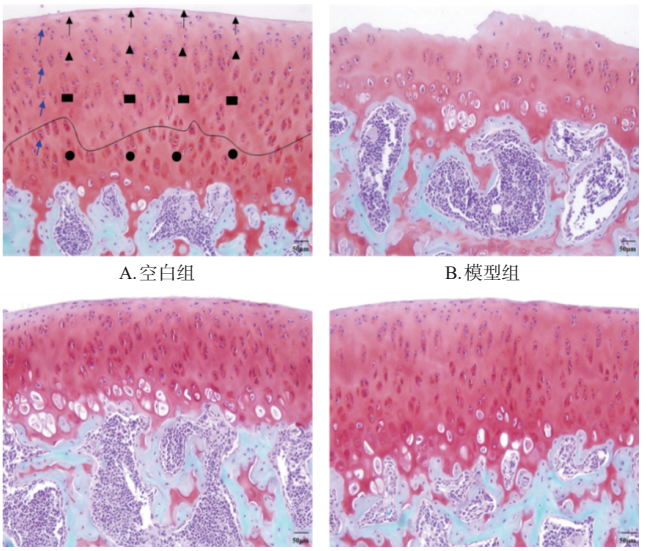
3.1 XBN对模型大鼠软骨组织病理学形态的影响

空白组大鼠软骨结构完整，层次分明，呈现均匀红色，软骨浅表层光滑完整，软骨细胞规律排列，潮线清晰可见，软骨下骨呈现蓝色，软骨下骨板厚度正常。模型组大鼠软骨组织结构分层紊乱，软骨损伤至辐射层，软骨层明显变薄且软骨浅表层不平滑，软骨层基质淡染，软骨细胞排列紊乱，潮线出现扭曲或中断，软骨下骨与软骨层难以区分。XBN组大鼠软骨退变程度位于空白组与模型组之间，软骨浅表层较为光滑、缺损减少，软骨结构分层较为清晰，基质染色相对均匀，软骨细胞排列较为规则，潮线尚完整。XBN+二甲双胍组大鼠软骨病变程度较XBN组进一步减轻。结果见图1。

Mankin评分结果显示，与空白组比较，模型组大鼠Mankin评分显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，各给药组大鼠Mankin评分均显著降低（$P<0.05$）；与XBN组比较，XBN+二甲双胍组大鼠Mankin评分显著降低（$P<0.05$）。结果见表2。

3.2 XBN对模型大鼠软骨组织中Aggrecan蛋白表达的影响

与空白组比较，模型组大鼠软骨组织中Aggrecan蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，各给药组大鼠软骨组织中Aggrecan蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）。与XBN组比较，XBN+二甲双胍组大鼠软骨组织中Aggrecan蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）。结果见图2、表2。



A.空白组　B.模型组　C. XBN组　D. XBN+二甲双胍组

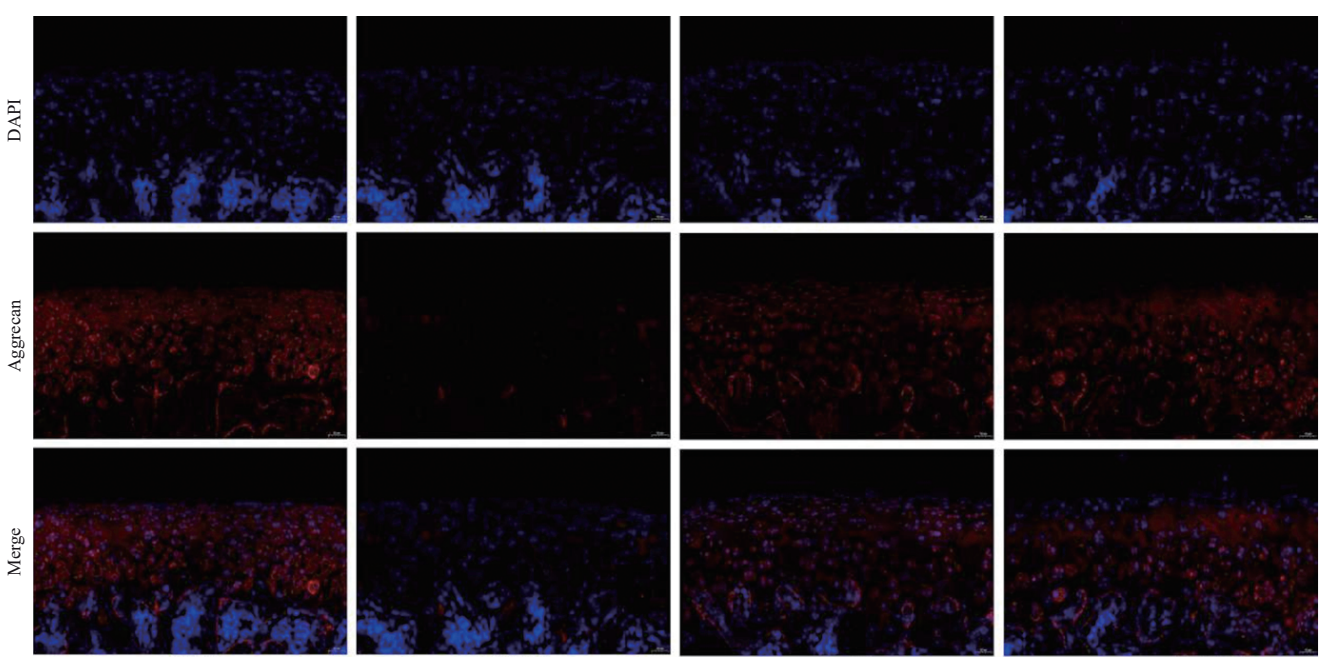
↑：浅表层；▲：中间层；■：辐射层；●：钙化软骨层；～：潮线；↑：软骨细胞

图1　各组大鼠软骨组织病理形态学显微图（番红O-固绿染色，×200）

表2　各组大鼠Mankin评分和软骨组织中Aggrecan蛋白表达水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	Mankin评分	Aggrecan蛋白表达水平
空白组	1.16±0.55	44.75±0.96
模型组	8.33±0.82[a]	3.80±0.89[a]
XBN组	3.25±0.61[b]	24.19±0.92[b]
XBN+二甲双胍组	2.08±0.66[c]	29.92±0.42[c]

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与XBN组比较，$P<0.05$



A.空白组　B.模型组　C. XBN组　D. XBN+二甲双胍组

图2　各组大鼠软骨组织中Aggrecan蛋白表达的免疫荧光图（×200）

3.3 XBN对模型大鼠软骨组织中分解代谢相关基因mRNA表达的影响

与空白组比较，模型组大鼠软骨组织中ADAMTS-4、ADAMTS-5、MMP-3、MMP-13 mRNA的表达水平均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，各给药组大鼠软骨组织中上述指标水平均显著降低（$P<0.05$）；与XBN组比较，XBN+二甲双胍组大鼠软骨组织中上述指标水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见表3。

表3 各组大鼠软骨组织中分解代谢相关基因mRNA的表达水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	ADAMTS-4 mRNA	ADAMTS-5 mRNA	MMP-3 mRNA	MMP-13 mRNA
空白组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	1.91±0.08[a]	1.61±0.08[a]	2.57±0.06[a]	2.23±0.07[a]
XBN组	1.48±0.07[b]	1.37±0.06[b]	1.91±0.04[b]	1.62±0.07[b]
XBN+二甲双胍组	1.23±0.04[c]	1.19±0.08[c]	1.66±0.11[c]	1.38±0.05[c]

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与XBN组比较，$P<0.05$

3.4 XBN对模型大鼠软骨组织中分解代谢相关蛋白表达的影响

与空白组比较，模型组大鼠软骨组织中ADAMTS-4、ADAMTS-5、MMP-3、MMP-13蛋白的表达水平均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，各给药组大鼠软骨组织中上述指标水平均显著降低（$P<0.05$）；与XBN组比较，XBN+二甲双胍组上述指标水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见图3、表4。

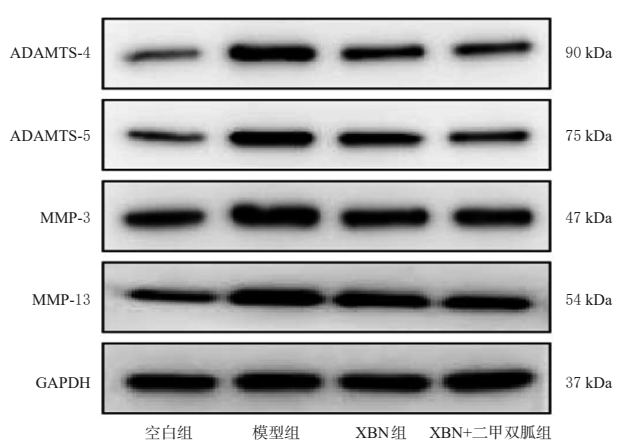


图3 各组大鼠软骨组织中分解代谢相关蛋白表达的电泳图

表4 各组大鼠软骨组织中分解代谢相关蛋白的表达水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	ADAMTS-4/GAPDH	ADAMTS-5/GAPDH	MMP-3/GAPDH	MMP-13/GAPDH
空白组	0.21±0.09	0.28±0.06	0.53±0.12	0.43±0.07
模型组	1.33±0.07[a]	1.21±0.16[a]	1.83±0.11[a]	1.66±0.07[a]
XBN组	0.48±0.03[b]	0.65±0.07[b]	1.25±0.09[b]	1.37±0.06[b]
XBN+二甲双胍组	0.33±0.04[c]	0.36±0.06[c]	0.81±0.08[c]	0.89±0.13[c]

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与XBN组比较，$P<0.05$

3.5 XBN对模型大鼠软骨组织中AMPK/mTOR信号通路相关蛋白表达的影响

与空白组比较，模型组大鼠软骨组织中AMPK蛋白的磷酸化水平显著降低（$P<0.05$），mTOR蛋白的磷酸化水平显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，各给药组大鼠软骨组织上述指标水平均显著逆转（$P<0.05$）；与XBN组比较，XBN+二甲双胍组大鼠软骨组织中AMPK蛋白的磷酸化水平显著升高（$P<0.05$），mTOR蛋白的磷酸化水平显著降低（$P<0.05$）。结果见图4、表5。

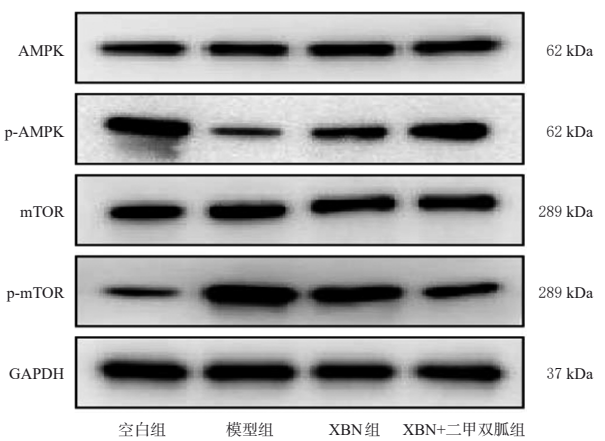


图4 各组大鼠软骨组织中AMPK/mTOR信号通路相关蛋白表达的电泳图

表5 各组大鼠软骨组织中AMPK/mTOR信号通路相关蛋白的磷酸化水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	p-AMPK/AMPK	p-mTOR/mTOR
空白组	1.98±0.13	0.21±0.03
模型组	0.32±0.05[a]	2.56±0.09[a]
XBN组	0.71±0.07[b]	1.62±0.09[b]
XBN+二甲双胍组	1.19±0.06[c]	0.88±0.11[c]

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与XBN组比较，$P<0.05$

4 讨论

KOA归属于中医“痹证”“痿证”“骨痹”“筋痹”等范畴，病机多为本虚标实，肝肾不足为本，风寒湿邪气外侵为标[1]。XBN具有补益肝肾、温经散寒、柔肝养血的功效[10]。本课题组前期研究显示，XBN对KOA具有较好的治疗作用[10-12]，但具体作用机制至今尚未完全阐明。本研究通过对KOA模型大鼠的软骨组织进行番红O-固绿染色发现，与空白组相比，模型组大鼠软骨组织结构分层紊乱，表面不平整，软骨细胞分布不均匀，软骨层基质淡染，潮线出现中断，且Mankin评分显著升高；经过XBN或XBN+二甲双胍干预后，大鼠软骨上述病理改变均明显减轻，且Mankin评分明显降低。这表明XBN能明显改善大鼠软骨组织的病理损伤。

KOA最显著的病理变化是关节软骨渐进式的降解、退变和破坏，表现为软骨蛋白合成酶减少而分解酶大量释放，从而导致软骨胶原亚型发生改变，软骨厚度变薄、

破损，进而失去正常的生物学功能[3—6]。本研究通过检测各组大鼠软骨合成和分解代谢指标发现，模型组大鼠软骨组织中合成代谢指标Aggrecan蛋白表达水平显著降低，分解代谢指标ADAMTS-4、ADAMTS-5、MMP-3、MMP-13蛋白和mRNA的表达水平均显著升高。经过XBN或XBN+二甲双胍干预后，大鼠软骨组织中上述指标水平均显著逆转。这说明XBN可促进软骨合成Aggrecan，减少软骨降解，从而发挥改善KOA的作用。

AMPK是一种保守的异质三聚体蛋白激酶，能通过影响细胞物质代谢的多个环节维持细胞能量供求平衡，被称为人体代谢的“总开关”和“能量感受器”[16]。相关研究显示，在小鼠骨关节炎软骨和衰老的软骨细胞中均观察到AMPK活性的降低[8]。在异常应力、氧化应激等因素的作用下，软骨细胞可激活AMPK，阻断mTOR的磷酸化，并通过调节核转录因子κB/沉默信息调节因子1等信号通路，降低白细胞介素6、肿瘤坏死因子α等炎症因子表达，保护软骨细胞并抑制炎症[9]。二甲双胍是一种AMPK激动剂，被证明可通过调控AMPK/mTOR信号通路，减轻小鼠内侧半月板失稳术后的关节软骨破坏[7]。本研究结果显示，经XBN或XBN+二甲双胍干预后，大鼠软骨组织中AMPK蛋白的磷酸化水平显著升高，mTOR蛋白的磷酸化水平显著降低。这表明，XBN可通过激活AMPK/mTOR信号通路改善KOA。

综上所述，XBN可改善KOA模型大鼠的软骨损伤，促进软骨合成，减少软骨降解，其作用机制可能与激活AMPK/mTOR信号通路有关。

参考文献

[1] 中华中医药学会风湿病分会.骨关节炎病证结合诊疗指南[J].中华中医药杂志，2021，36(2)：929-933.

[2] 廖太阳，李晓辰，张力，等.基于柔肝养筋理论研究肝外泌体减少膝骨关节炎软骨凋亡及木瓜的疗效机制[J].中华中医药杂志，2022，37(10)：6031-6036.

[3] SHARMA L. Osteoarthritis of the knee[J]. N Engl J Med，2021，384(1)：51-59.

[4] 张力，李晓辰，廖太阳，等.衰老表型肝细胞外泌体对脂多糖致炎软骨细胞的影响及白芍的干预效应[J].南京中医药大学学报，2021，37(5)：702-708.

[5] GU J，LIN H，ZHANG Y，et al. Activation of GPR40 suppresses AGE-induced reduction of type Ⅱ collagen and aggrecan in human SW1353 chondrocytes[J]. Drug Des Devel Ther，2020，14：2371-2379.

[6] LU J，ZHANG H，PAN J，et al. Fargesin ameliorates osteoarthritis via macrophage reprogramming by downregulating MAPK and NF-κB pathways[J]. Arthritis Res Ther，2021，23(1)：142.

[7] FENG X，PAN J，LI J，et al. Metformin attenuates cartilage degeneration in an experimental osteoarthritis model by regulating AMPK/mTOR[J]. Aging（Albany NY），2020，12(2)：1087-1103.

[8] ZHOU S，LU W，CHEN L，et al. AMPK deficiency in chondrocytes accelerated the progression of instability-induced and ageing-associated osteoarthritis in adult mice [J]. Sci Rep，2017，7：43245.

[9] WANG C，GAO Y，ZHANG Z，et al. Safflower yellow alleviates osteoarthritis and prevents inflammation by inhibiting PGE2 release and regulating NF-κB/SIRT1/AMPK signaling pathways[J]. Phytomedicine，2020，78：153305.

[10] 王培民.王培民效方治验：膝痹宁方[J].江苏中医药，2021，53(2)：5-6.

[11] 王宽.膝痹宁治疗寒湿痹阻型膝骨关节炎的临床疗效观察[D].南京：南京中医药大学，2021.

[12] 张力，张立，邢润麟，等.基于缺氧组织中NLRP3炎症小体的活化研究膝痹宁减轻KOA滑膜炎症的效应机制[J].南京中医药大学学报，2020，36(1)：68-72.

[13] FAN K J，WU J，WANG Q S，et al. Metformin inhibits inflammation and bone destruction in collagen-induced arthritis in rats[J]. Ann Transl Med，2020，8(23)：1565.

[14] ZHANG L，LI M，LI X，et al. Characteristics of sensory innervation in synovium of rats within different knee osteoarthritis models and the correlation between synovial fibrosis and hyperalgesia[J]. J Adv Res，2022，35：141-151.

[15] MANKIN H J，JOHNSON M E，LIPPIELLO L. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. Ⅲ. Distribution and metabolism of amino sugar-containing macromolecules[J]. J Bone Joint Surg Am，1981，63(1)：131-139.

[16] GONZALEZ A，HALL M N，LIN S C，et al. AMPK and TOR：the yin and yang of cellular nutrient sensing and growth control[J]. Cell Metab，2020，31(3)：472-492.

（收稿日期：2022-07-08　修回日期：2022-11-19）

（编辑：唐晓莲）