“易层”贴敷对膝骨关节炎大鼠滑膜纤维化的改善作用及机制Δ

魏义保[1*]，马振源[1]，廖太阳[1]，杨　楠[1]，吴　鹏[1]，王培民[1,2]，黄正泉[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.江苏省中医外用药开发与应用工程研究中心，南京　210023）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）04-0407-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.04.05

摘　要　目的　探究“易层”贴敷对膝骨关节炎（KOA）大鼠滑膜纤维化（SF）的改善作用及潜在机制。**方法**　将雄性SD大鼠随机分为假手术组、KOA组和易层组，每组8只。KOA和易层组大鼠以前交叉韧带离断法复制KOA模型。造模14 d后，易层组大鼠于膝关节均匀涂抹“易层”贴敷[三色散（每100 cm²涂抹8 g）和复方三黄油膏（每100 cm²涂抹5 g）]，每天贴敷8 h，连续28 d。末次给药后，观察各组大鼠的滑膜炎症程度及纤维化程度并进行Krenn评分，检测其滑膜组织中Ⅰ型胶原蛋白（collagenⅠ）、高迁移率族蛋白B1（HMGB1）、磷酸化核因子κB p65（p-NF-κB p65）蛋白的表达，血清中白细胞介素1β（IL-1β）、IL-6、肿瘤坏死因子α（TNF-α）的含量，以及滑膜组织中纤维化及HMGB1/Toll样受体4（TLR4）/NF-κB通路相关蛋白及mRNA的表达。**结果**　与假手术组比较，KOA组大鼠滑膜衬里细胞大量增生且排列紊乱，炎症细胞浸润和胶原纤维沉积明显；collagenⅠ、HMGB1、p-NF-κB p65阳性表达细胞均明显增加，血清中IL-1β、IL-6、TNF-α含量，滑膜组织中纤维化相关蛋白（转化生长因子β、collagenⅠ、金属蛋白酶组织抑制物1、α-平滑肌肌动蛋白）及mRNA的表达，以及HMGB1、TLR4蛋白及mRNA，p-NF-κB p65蛋白及NF-κB p65 mRNA的表达均显著升高（$P<0.01$）。与KOA组比较，易层组大鼠滑膜组织的病理改变明显改善，上述定量指标均显著逆转（$P<0.05$或$P<0.01$）。**结论**　“易层”贴敷可显著改善KOA大鼠的SF，其作用可能与抑制HMGB1/TLR4/NF-κB信号通路激活有关。

关键词　膝骨关节炎；滑膜炎症；滑膜纤维化；高迁移率族蛋白B1/Toll样受体4/核因子κB信号通路

Improvement effect and mechanism of “Layers adjusting external application” paste on synovial fibrosis in rats with knee osteoarthritis

WEI Yibao[1], MA Zhenyuan[1], LIAO Taiyang[1], YANG Nan[1], WU Peng[1], WANG Peimin[1,2], HUANG Zhengquan[1]（1. Dept. of Orthopedics and Traumatology, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine/Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 2. Jiangsu Provincial Engineering Research Center of TCM External Medication Development and Application, Nanjing 210023, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the improvement effect and potential mechanism of “Layers adjusting external application” paste on synovial fibrosis (SF) in rats with knee osteoarthritis (KOA). **METHODS** Male SD rats were randomly divided into sham operation group, KOA group and Layers adjusting external application group, with 8 rats in each group. KOA model was induced by the anterior cruciate ligament disruption method in KOA group and Layers adjusting external application group. Fourteen days after modeling, the Layers adjusting external application group was given “Layers adjusting external application” paste [Sanse powder (8 g for every 100 cm²), Compound sanhuang ointment (5 g for every 100 cm²)] on the knee joint, 8 h every day, for 28 d in total. After the last administration, the degree of synovitis and fibrosis in rats was observed, and Krenn scoring was performed in each group. The expressions of collagen Ⅰ, high mobility group protein B1 (HMGB1) and phosphorylated nuclear factor-κB p65 (p-NF-κB p65) were detected in the synovial membrane; the contents of interleukin-1β (IL-1β), IL-6 and tumor necrosis factor-α (TNF-α) in serum as well as the expressions of fibrosis-related and HMGB1/Toll-like receptor 4 (TLR4)/NF-κB signaling pathway-related proteins and mRNA were detected in synovial tissue. **RESULTS** Compared with the sham operation group, the synovial lining cells in the KOA group showed significant proliferation and disordered arrangement, the inflammatory cell infiltration and collagen fiber deposition were obvious; the positive expressing cells of collagen Ⅰ, HMGB1 and p-NF-κB p65 were increased significantly; the contents of IL-1β, IL-6 and TNF-α in serum, the expressions of fibrosis-related protein (transforming growth factor-β, collagen Ⅰ, tissue inhibitor of metalloproteinase 1, α-smooth muscle actin) and their mRNA as well as the expressions of HMGB1, TLR4 protein and their mRNA, the expressions of p-NF-κB p65 protein and NF-κB p65 mRNA

Δ **基金项目**　国家自然科学基金青年项目（No.82004391，No.82205143）；江苏省研究生科研创新计划（No.KYCX23_2125）；江苏省医学重点学科/实验室建设项目（No.JSDW202252）；江苏省中医院优秀青年博士培养计划（No.2023QB0122）；江苏省中医院中医膝骨关节炎临床医学创新中心项目（No.Y2023zx05）

＊**第一作者**　硕士研究生。研究方向：膝骨关节炎的基础与临床。E-mail：a398645461@163.com

＃**通信作者**　副主任中医师，硕士。研究方向：膝骨关节炎的基础与临床。E-mail：5964990@qq.com

were all increased significantly in synovial tissues of rats ($P<0.01$). Compared with the KOA group, the pathological changes in the synovial tissue of rats in Layers adjusting external application group were significantly improved, and the above quantitative indicators were significantly reversed ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS** "Layers adjusting external application" paste could significantly improve SF in KOA rats, the mechanism of which may be associated with the inhibition of the activation of HMGB1/TLR4/NF-κB signaling pathway.

KEYWORDS knee osteoarthritis; synovial inflammation; synovial fibrosis; high mobility group protein B1/Toll-like receptor 4/nuclear factor-κB signaling pathway

膝骨关节炎（knee osteoarthritis，KOA）是常见的慢性退行性疾病，好发于中老年人群，且致残率较高。随着人口老龄化的加剧，全球症状性KOA的患病率已达3.8%，成为亟待解决的公共卫生问题之一[1]。KOA是一种全关节疾病，其发病与关节软骨及软骨周围组织的病理变化（如关节软骨破坏、软骨下骨改变和骨赘形成等）有关[2]。研究表明，滑膜病变在KOA的发病过程中具有重要作用。滑膜炎症可能是KOA的始动环节，在滑膜炎症的晚期通常伴随着滑膜纤维化（synovial fibrosis，SF）的发生，后者以胶原异常重塑、纤维结缔组织聚集和细胞外基质（extracellular matrix，ECM）沉积为主要表现，被认为是患者膝关节僵硬、功能障碍的重要原因[3]。

"易层"贴敷是由全国名老中医诸方受教授在传统中医贴敷疗法的基础上，结合多年临床经验研制出的新型中医外治方法。该贴敷共有两层，第1层复方三黄油膏含黄柏、黄芩、大黄3味凉性中药，可直接敷于患者皮肤；第2层三色散则由当归、川牛膝等温经活血类中药组成，性温燥，具有活血、通络、止痛之功；两层中药相辅相成，且可根据患者寒热证型灵活调整用量，改善KOA患者的膝关节疼痛和活动受限等症状的疗效较好[4-5]。本课题组前期研究发现，"易层"贴敷不仅能够缓解KOA模型大鼠的滑膜炎症和关节疼痛，还具有抑制SF的作用，上述作用可能与该贴敷能够抑制高迁移率族蛋白B1（high mobility group protein B1，HMGB1）表达、维持促炎-抑炎因子动态平衡有关[6]。HMGB1是一种参与炎症反应的多功能蛋白，HMGB1/Toll样受体4（Toll-like receptor 4，TLR4）/核因子κB（nuclear factor-κB，NF-κB）信号通路与炎症及纤维化的发生密切相关[7]，故本课题组推测"易层"贴敷抑制KOA患者SF的作用可能与该通路有关。基于此，本研究拟基于HMGB1/TLR4/NF-κB信号通路探讨"易层"贴敷对KOA模型动物SF的干预机制，旨在为"易层"贴敷的临床应用提供依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括ABI 7500型实时荧光定量聚合酶链式反应（PCR）仪（美国ABI公司）、170-3930型凝胶电泳及转膜仪（美国Bio-Rad公司）、LAS 4000型凝胶成像发光系统（美国GE公司）、ELX 800型酶标仪（美国BioTek公司）等。

1.2 主要药品与试剂

"易层"贴敷由三色散（由当归、独活、川芎、秦艽、紫荆皮、马钱子、丹参、赤芍、天花粉、防风、连翘、片姜黄、羌活、蔓荆子、白芷、木瓜、川牛膝、威灵仙、防己、甘草等组方而成，苏药制字Z04000566，每贴20 g，相当于生药总量16 g）和复方三黄油膏（由黄芩、黄柏、大黄、东丹、滑石粉等组方而成，苏药制字Z04000388，每贴10 g，相当于生药总量8 g）组成，两者均由南京中医药大学附属医院/江苏省中医院提供。

兔源转化生长因子β（transforming growth factor-β，TGF-β）、α-平滑肌肌动蛋白（α-smooth muscle actin，α-SMA）抗体（货号分别为3711S、19245S）均购自美国CST公司；兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）、HMGB1、TLR4、NF-κB p65、磷酸化NF-κB p65（phosphorylated NF-κB p65，p-NF-κB p65）、金属蛋白酶组织抑制物1（tissue inhibitor of metalloproteinase 1，TIMP1）、Ⅰ型胶原蛋白（collagen Ⅰ）抗体（货号分别为AF7021、AF7020、AF7017、AF5006、AF2006、AF7007、AF7001）均购自美国Affinity公司；辣根过氧化物酶标记的亲和纯化山羊抗兔IgG（H+L）二抗（货号K1223）购自美国APExBIO公司；5×蛋白上样缓冲液（货号P0015L）购自上海碧云天生物技术有限公司；RNA快速提取试剂盒（货号AG21024）购自湖南艾科瑞生物工程有限公司；逆转录及PCR试剂盒（货号分别为R223-01、Q331-02）均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；无蛋白快速封闭液（货号PS108P）购自上海雅酶生物医药科技有限公司；白细胞介素6（interleukin-6，IL-6）、IL-1β、肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒（货号分别为YJ102828、F15810、YJ002859）均购自上海源桔生物科技中心。

1.3 实验动物

本实验选用2月龄SPF级雄性SD大鼠24只，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，动物生产许可证号为SCXK（京）2021-0011。所有动物均饲养于室温（25±2）℃、相对湿度（60±5）%、每12 h昼夜交替的动物房内，自由摄食、饮水，适应性喂养1周后开始实验。本动物实验方案由南京中医药大学实验动物伦理委员会审核批准，申请号为202205A046。

2 方法

2.1 KOA模型制备与分组、给药

将24只雄性SD大鼠随机分为假手术组、KOA组、易层组，每组8只。KOA组和易层组大鼠采取前交叉韧带离断法复制KOA模型：大鼠经腹腔注射30 g/L戊巴比妥钠（2 mL/kg）麻醉，于膝关节处常规备皮消毒，打开膝关节腔并切断前交叉韧带（通过前抽屉实验判断模型是否复制成功）后，逐层缝合。假手术组大鼠仅切开膝关节处皮肤后缝合。术后，每只大鼠每天肌内注射青霉素钠1次，连续3 d，以预防感染。

造模14 d后，易层组大鼠于膝关节处备皮，皮肤表面先后均匀涂抹糊状的三色散（每100 cm^2涂抹8 g，按成品质量计）和复方三黄油膏（每100 cm^2涂抹5 g，按成品质量计），随后用纱布包裹并用胶带固定，每天贴敷8 h，连续28 d[6]；假手术组和KOA组大鼠仅于膝关节备皮处用纱布包裹。

2.2 组织样本的提取和保存

末次给药后，所有大鼠于麻醉状态下采集腹主动脉血，血样静置1.5 h后，于4 ℃下以3 000 r/min离心15 min，取上层血清于－80 ℃下冻存，备用。于膝关节处备皮，自髌骨上缘打开关节腔，用眼科镊牵起髌骨及其周围组织并翻开，暴露髌下脂肪垫及附着在上面的滑膜，小心切取滑膜组织。随机选取每组3只大鼠的滑膜组织放入4%多聚甲醛中保存，其余5只大鼠的滑膜组织放入冻存管中于－80 ℃下保存，备用。

2.3 大鼠滑膜组织病理形态学观察

取“2.2”项下固定于4%多聚甲醛中的各组大鼠滑膜组织，行常规石蜡包埋、切片，分别用苏木精-伊红（HE）、Masson试剂染色后，使用显微镜观察各组大鼠的滑膜炎症程度及纤维化程度。采用Krenn评分评价滑膜炎症程度，评分标准为：无炎症，记0～1分；有轻度炎症，记2～4分；有重度炎症，记5～9分[8]。

2.4 大鼠滑膜组织中collagen Ⅰ、HMGB1、p-NF-κB p65蛋白阳性表达检测

采用免疫组化法检测。取“2.3”项下各组大鼠滑膜组织的石蜡切片，脱蜡至水，并进行抗原修复；以磷酸盐缓冲液（PBS）清洗5 min×3次，加入30 g/L的过氧化氢溶液适量，于室温下孵育20 min；以PBS清洗5 min×3次，以封闭液于室温下封闭30 min；弃去封闭液，滴加collagen Ⅰ、HMGB1、p-NF-κB p65一抗（稀释比例均为1∶100），于4 ℃下孵育过夜；以PBS清洗5 min×3次，滴加相应二抗（稀释比例1∶500），于室温下孵育60 min；以PBS清洗5 min×3次，以DAB复染细胞核，再经脱水后封片，使用Image J软件分析阳性表达细胞（呈棕色）的平均光密度值，并计算阳性表达细胞面积占比以表示上述蛋白的相对表达量。

2.5 大鼠血清中炎症因子含量检测

取“2.2”项下各组大鼠的血清样品，严格参照相应试剂盒说明书操作，采用ELISA法以酶标仪于450 nm波长处检测其IL-1β、IL-6、TNF-α的含量。

2.6 大鼠滑膜组织中纤维化及HMGB1/TLR4/NF-κB信号通路相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取“2.2”项下冻存的各组大鼠滑膜组织适量，研磨、裂解，以12 000 r/min离心15 min，取上清液。经BCA法测定浓度后，加入5×蛋白上样缓冲液适量，煮沸变性。取变性蛋白适量，经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转移至聚偏二氟乙烯膜上，于室温下封闭20 min；加入内参（GAPDH）、纤维化相关蛋白（TGF-β、collagen Ⅰ、TIMP1、α-SMA）和HMGB1/TLR4/NF-κB信号通路相关蛋白（HMGB1、TLR4、NF-κB p65、p-NF-κB p65）一抗（稀释比例均为1∶1 000），于4 ℃下孵育过夜；以TBST洗膜10 min×3次，加入相应二抗（稀释比例为1∶5 000），于室温下孵育60 min；以TBST洗膜10 min×3次，用ECL显色曝光并置于凝胶成像发光系统下成像。以GAPDH为内参，分析并计算各目的蛋白的灰度值比值，用以表示各目的蛋白的相对表达量。

2.7 大鼠滑膜组织中纤维化及HMGB1/TLR4/NF-κB信号通路相关蛋白mRNA表达检测

采用实时聚合酶链式反应（real-time PCR）法检测。取“2.2”项下冻存的各组大鼠滑膜组织适量，按照Trizol法常规提取其总RNA，逆转录后严格按照试剂盒说明书操作，进行PCR扩增。反应体系包括：上、下游引物各0.4 μL，cDNA 2 μL，2×SYBR qPCR Master Mix 10 μL，ddH_2O 7.2 μL。反应包括预变性阶段（95 ℃，30 s）、循环反应阶段（95 ℃，10 s；60 ℃，30 s；共40个循环）和熔解曲线阶段（95 ℃，15 s；60 ℃，60 s；95 ℃，15 s）。以GAPDH为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各目的基因mRNA的相对表达量（结果以假手术组为参照进行归一化处理）。各目的基因的引物序列及产物大小见表1。

表1 各目的基因的引物序列及产物大小

目的基因	序列（5′→3′）	产物大小/bp
GAPDH	上游：GCCTTCCGTGTTCCTACC	100
	下游：CCTGCTTCACCACCTTCTT	
TGF-β	上游：GCAACAATTCCTGGCGTTA	117
	下游：TTCCGTCTCCTTGGTTCAG	
collagen I	上游：CGGCTCCTGCTCCTCTT	117
	下游：AGGTTTCCACGTCTCACCA	
TIMP1	上游：CAACCCACCCACAGACA	143
	下游：CACAGCGTCGAATCCTTT	
α-SMA	上游：GCGTGGCTATTCCTTCGTGACTAC	150
	下游：CCATCAGGCAGTTCGTAGCTCTTC	
HMGB1	上游：GAGAAGCTGGCTGTAATGC	155
	下游：GGGACAAACCACAATATAGGA	
TLR4	上游：GCCACCATTTACAGTTCGT	125
	下游：GTCTCAGGCAGGAAAGGA	
NF-κB p65	上游：TTCCTGGGGAGAGAAGCA	114
	下游：GGTGAGGTGGGTCTTTGG	

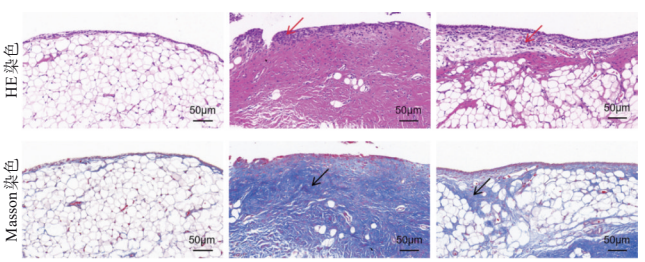
2.8 统计学方法

采用SPSS 25.0软件对数据进行统计分析，使用GraphPad Prism 8.0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 “易层”贴敷对大鼠滑膜组织病理形态的影响

HE染色结果显示，KOA组大鼠滑膜衬里细胞（以成纤维样滑膜细胞为主）大量增生且排列不规则，炎症细胞浸润明显增加；经“易层”贴敷干预后，模型大鼠的滑膜表面相对光滑，滑膜衬里细胞排列有序，炎症细胞浸润较少。Masson染色结果显示，KOA组大鼠可见大量胶原纤维沉积，提示SF发生；经“易层”贴敷干预后，易层组大鼠SF程度明显减轻。结果见图1。此外，与假手术组[(0.33±0.52)分]比较，KOA组大鼠的Krenn评分[(5.83±0.75)分]显著升高（$P<0.01$）；与KOA组大鼠比较，易层组大鼠的Krenn评分[(2.50±0.84)分]显著降低（$P<0.01$）。



A. 假手术组　B. KOA组　C. 易层组

红色箭头：炎症细胞浸润；黑色箭头：胶原纤维沉积。

图1 各组大鼠滑膜组织病理形态学观察的显微图（HE和Masson染色法）

3.2 “易层”贴敷对大鼠滑膜组织中collagen Ⅰ、HMGB1、p-NF-κB p65阳性表达的影响

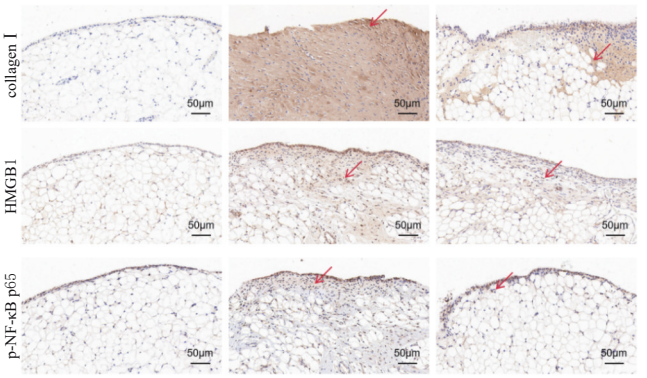
与假手术组比较，KOA组大鼠滑膜组织中collagen Ⅰ、HMGB1、p-NF-κB p65阳性表达细胞明显增多，其表达均显著上调（$P<0.01$）；与KOA组比较，易层组大鼠滑膜组织中上述蛋白的阳性表达细胞均有所减少，其表达均显著下调（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见图2、表2。

3.3 “易层”贴敷对大鼠血清炎症因子含量的影响

与假手术组比较，KOA组大鼠血清中促炎因子IL-1β、IL-6、TNF-α含量均显著升高（$P<0.01$）；与KOA组比较，易层组大鼠血清中上述指标含量均显著降低（$P<0.01$）。结果见表3。

3.4 “易层”贴敷对大鼠滑膜组织中纤维化相关蛋白及mRNA表达的影响

与假手术组比较，KOA组大鼠滑膜组织中TGF-β、collagen Ⅰ、TIMP1、α-SMA蛋白及mRNA的表达均显著上调（$P<0.01$）；与KOA组比较，易层组大鼠滑膜组织中上述指标的表达均显著下调（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见图3、表4。



A. 假手术组　B. KOA组　C. 易层组

红色箭头：目的蛋白阳性表达细胞。

图2 各组大鼠滑膜组织中collagen Ⅰ、HMGB1、p-NF-κB p65蛋白阳性表达的显微图（免疫组化法）

表2 各组大鼠滑膜组织中collagen Ⅰ、HMGB1、p-NF-κB p65蛋白的相对表达量比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	collagen Ⅰ/%	HMGB1/%	p-NF-κB p65/%
假手术组	4.89±0.83	4.15±0.36	10.37±1.40
KOA组	18.52±0.97[a]	12.76±0.65[a]	16.32±0.39[a]
易层组	10.31±0.66[b]	10.17±1.32[c]	12.90±1.10[c]

a：与假手术组比较，$P<0.01$；b：与KOA组比较，$P<0.01$；c：与KOA组比较，$P<0.05$。

表3 各组大鼠血清中IL-1β、IL-6、TNF-α含量比较（$\bar{x}\pm s$，$n=8$，pg/mL）

组别	IL-1β	IL-6	TNF-α
假手术组	5.33±0.11	23.90±1.19	36.21±0.89
KOA组	12.89±0.09[a]	41.04±0.63[a]	87.47±0.89[a]
易层组	6.56±0.15[b]	30.41±0.84[b]	56.86±1.09[b]

a：与假手术组比较，$P<0.01$；b：与KOA组比较，$P<0.01$。

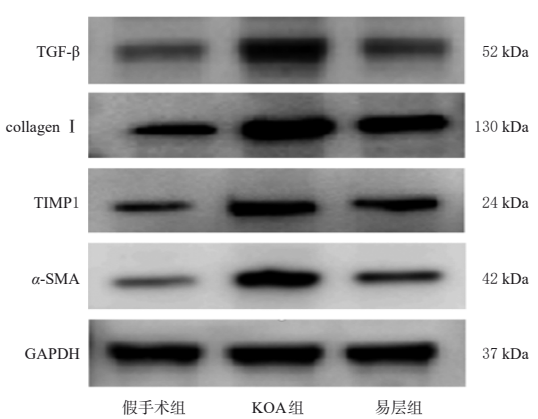


图3 各组大鼠滑膜组织中纤维化相关蛋白表达的电泳图

表4 各组大鼠滑膜组织中纤维化相关蛋白及mRNA表达比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	蛋白				mRNA			
	TGF-β	collagen Ⅰ	TIMP1	α-SMA	TGF-β	collagen Ⅰ	TIMP1	α-SMA
假手术组	0.21±0.04	0.15±0.01	0.40±0.01	0.33±0.06	1	1	1	1
KOA组	0.52±0.12[a]	0.61±0.05[a]	0.83±0.05[a]	1.19±0.10[a]	5.33±0.37[a]	4.10±0.41[a]	5.12±0.07[a]	2.19±0.26[a]
易层组	0.35±0.08[b]	0.38±0.02[c]	0.56±0.01[c]	0.55±0.08[c]	1.15±0.08[c]	1.12±0.17[c]	1.17±0.01[c]	1.48±0.35[b]

a：与假手术组比较，$P<0.01$；b：与KOA组比较，$P<0.05$；c：与KOA组比较，$P<0.01$。

3.5 “易层”贴敷对大鼠滑膜组织中HMGB1/TLR4/NF-κB信号通路相关蛋白及mRNA表达的影响

与假手术组比较，KOA组大鼠滑膜组织中HMGB1、TLR4蛋白及mRNA，p-NF-κB p65蛋白及NF-κB p65 mRNA的表达均显著上调（$P<0.01$）；与KOA组比较，易层组大鼠滑膜组织中上述指标的表达均显著下调（$P<0.05$或$P<0.01$）。而各组大鼠滑膜组织中NF-κB p65蛋白的表达比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。结果见图4、表5。

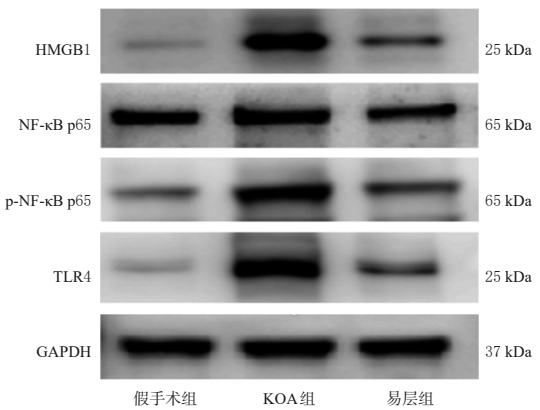


图4 各组大鼠滑膜组织中HMGB1/TLR4/NF-κB信号通路相关蛋白表达的电泳图

表5 各组大鼠滑膜组织中HMGB1/TLR4/NF-κB信号通路相关蛋白及mRNA表达比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	蛋白				mRNA		
	HMGB1	TLR4	NF-κB p65	p-NF-κB p65	HMGB1	TLR4	NF-κB p65
假手术组	0.11±0.01	0.40±0.03	0.39±0.02	0.55±0.07	1	1	1
KOA组	0.68±0.11[a]	1.42±0.24[a]	0.38±0.19	1.56±0.05[a]	2.20±0.37[a]	4.81±0.97[a]	3.06±0.20[a]
易层组	0.21±0.04[b]	0.68±0.10[b]	0.37±0.03	0.75±0.10[b]	1.56±0.33[c]	1.70±0.31[b]	1.86±0.95[b]

a：与假手术组比较，$P<0.01$；b：与KOA组比较，$P<0.01$；c：与KOA组比较，$P<0.05$。

4 讨论

KOA晚期患者膝关节滑膜通常会发生以ECM沉积、纤维结缔组织聚集等为主要特征的纤维化病变，从而引发炎症和组织损伤[9]，这也是导致患者膝关节疼痛、僵硬和功能障碍的首要原因。中医把纤维化病机归为风、寒、湿、邪侵袭所导致的经脉瘀阻、筋骨屈伸不利[10]。现代中医理论认为，温经活血类中药可针对其虚、寒、瘀的病机特点，经多靶点、多途径发挥对纤维化病变的干预作用，在各种纤维化疾病的治疗领域中表现出一定的优势[11]。“易层”贴敷作为一种新型的中医外治疗法，其方中含有当归、丹参、川牛膝等温经活血类中药，同时具有安全性高、副作用少等优点，在KOA的临床治疗方面取得了良好的效果[4,12]。

研究指出，SF的发生与滑膜炎症密切相关，KOA患者大多伴有滑膜炎症，膝关节内的炎症环境较为复杂，且长期的慢性炎症可能会导致上皮间充质转化的发生，这种转化也是各种纤维化疾病的常见诱因之一[13]；此外，纤维化是机体内一种过度的修复反应，炎症环境是诱发纤维化的潜在因素之一[14]。可见，滑膜炎症的严重程度可反映SF的进展情况。本研究通过ELISA法检测了大鼠血清中促炎因子IL-1β、IL-6、TNF-α的含量，结果显示，KOA大鼠血清中上述炎症因子的含量均较假手术组大幅增加，而易层组大鼠的上述指标含量则显著降低。HE染色结果显示，相较于假手术组，KOA组大鼠滑膜衬里细胞（以成纤维样滑膜细胞为主）增生明显且排列紊乱，炎症细胞浸润增加，Krenn评分显著升高；而易层组大鼠滑膜病变明显改善，且Krenn评分显著降低，表明“易层”贴敷可显著改善KOA大鼠的滑膜炎症。

纤维化的形成与胶原蛋白表型的转换密切相关，纤维状胶原蛋白collagen Ⅰ的表达与纤维化的严重程度呈正相关，是经典的纤维化标志物[15]。TGF-β、TIMP1、α-SMA均为纤维化相关因子，参与调节ECM的组成和介导多种纤维化的发生[16]。本研究检测了各组大鼠滑膜组织中纤维化相关蛋白及mRNA的表达情况，结果显示，KOA组大鼠滑膜组织中纤维化相关指标TGF-β、collagen Ⅰ、TIMP1、α-SMA蛋白及mRNA的表达均显著上调，而易层组大鼠上述蛋白及mRNA的表达均显著下调。Masson染色结果显示，相较于假手术组，KOA组大鼠的滑膜组织存在大量的胶原纤维增生；而经“易层”贴敷干预后，大鼠的SF程度明显减轻。免疫组化结果显示，KOA组大鼠滑膜组织中collagen Ⅰ沉积较假手术组显著增多，而易层组大鼠上述指标得以逆转。这提示，“易层”贴敷很可能通过抑制各种炎症因子的表达而抑制纤维化的发生，从而改善KOA。

HMGB1是一种参与炎症反应的多功能蛋白，在组织修复和纤维化中具有关键作用，可参与各种器官纤维化疾病的发生[17]。通常情况下，HMGB1存在于细胞核中；在感染或损伤期间，HMGB1会发生迁移，逐渐从细胞核转移至细胞质，再移动到细胞外[18]。HMGB1/TLR4/NF-κB信号转导与炎症的发生及ECM的合成密切相关：释放到细胞膜外的HMGB1与靶细胞的TLR4结合后，可激活下游NF-κB信号通路，进而诱发炎症级联反应并诱发纤维化，因此抑制HMGB1可显著减少组织炎症反应并改善纤维化[19]。本研究免疫组化结果显示，经“易层”贴敷干预后，大鼠滑膜组织中HMGB1/TLR4/NF-κB信号通路相关蛋白（HMGB1、p-NF-κB p65）的表达均较KOA组显著下调；此外，Western blot、real-time PCR实验结果也显示，易层组大鼠滑膜组织中HMGB1、TLR4蛋白及mRNA，p-NF-κB p65蛋白及NF-κB p65 mRNA的表达均较KOA组显著下调，提示“易层”贴敷改善KOA大鼠SF的作用可能与其抑制HMGB1/TLR4/NF-κB信号通路的激活有关。

综上所述，“易层”贴敷可改善KOA模型大鼠的SF，降低炎症及纤维化相关指标的含量/表达，抑制HMGB1/TLR4/NF-κB信号通路可能与这一作用的发挥有关。然

而，本研究仅设置了“易层”贴敷单一剂量组，后续本课题组将进一步考察不同剂量的干预效果，并进一步明确“易层”贴敷对KOA SF的改善作用及机制。

参考文献

[1] BROPHY R H, FILLINGHAM Y A. AAOS clinical practice guideline summary: management of osteoarthritis of the knee(nonarthroplasty), third edition[J]. J Am Acad Orthop Surg, 2022, 30(9): e721-e729.

[2] MA Z Y, WEI Y B, ZHANG L, et al. GCTOF-MS combined LC-QTRAP-MS/MS reveals metabolic difference between osteoarthritis and osteoporotic osteoarthritis and the intervention effect of Erxian decoction[J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 905507.

[3] SRIWATANANUKULKIT O, DESCLAUX S, TAWONSAWATRUK T, et al. Effectiveness of losartan on infrapatellar fat pad/synovial fibrosis and pain behavior in the monoiodoacetate-induced rat model of osteoarthritis pain[J]. Biomedecine Pharmacother, 2023, 158: 114121.

[4] 时孝晴. “易层”贴敷治疗膝骨关节炎的疗效评价及中药外用贴剂治疗膝骨关节炎的Meta分析[D]. 南京：南京中医药大学，2020.
SHI X Q. Evaluation on the efficacy of yiceng patch in the treatment of knee osteoarthritis and a meta-analysis on the treatment of knee osteoarthritis with Chinese medicine external patch[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2020.

[5] 王培民，黄国淳，丁亮，等. “易层”贴敷疗法治疗膝骨性关节炎的临床疗效观察[J]. 世界科学技术-中医药现代化，2014，16(10)：2097-2101.
WANG P M, HUANG G C, DING L, et al. Clinic effect of layers adjusting external application therapy on knee osteoarthritis[J]. World Sci Technol-Mod Tradit Chin Med Mater Med, 2014, 16(10): 2097-2101.

[6] 吴鹏，黄正泉，邢润麟，等. 基于HMGB1探讨“易层”贴敷对KOA大鼠滑膜纤维化的影响[J]. 南京中医药大学学报，2019，35(5)：547-551.
WU P, HUANG Z Q, XING R L, et al. Effect of Yiceng on the synovial fibrosis in KOA rats based on HMGB1[J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2019, 35(5): 547-551.

[7] ELKHOELY A, ESTFANOUS R S, ALROBAIAN M, et al. Repositioning itraconazole for amelioration of bleomycin-induced pulmonary fibrosis: targeting HMGB1/TLR4 axis, NLRP3 inflammasome/NF-κB signaling, and autophagy[J]. Life Sci, 2023, 313: 121288.

[8] KRENN V, MORAWIETZ L, BURMESTER G R, et al. Synovitis score: discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis[J]. Histopathology, 2006, 49(4): 358-364.

[9] CHAN D D, LI J, LUO W, et al. Pirfenidone reduces subchondral bone loss and fibrosis after murine knee cartilage injury[J]. J Orthop Res, 2018, 36(1): 365-376.

[10] 马振源，魏义保，吴鹏，等. 基于TGF-β_1/SMAD3信号通路探讨“易层”贴敷对膝骨关节炎模型大鼠滑膜纤维化的干预机制[J]. 江苏中医药，2023，55(8)：70-74.
MA Z Y, WEI Y B, WU P, et al. Study of “Yi ceng” application treating synovial fibrosis of knee osteoarthritis model rats based on TGF-β_1/SMAD3 signal pathway[J]. Jiangsu J Tradit Chin Med, 2023, 55(8): 70-74.

[11] 刘必旺，赵换. 补阳还五汤对特发性肺纤维化模型大鼠的改善作用机制[J]. 中国药房，2023，34(14)：1671-1675.
LIU B W, ZHAO H. Improving mechanism of Buyang huanwu decoction on idiopathic pulmonary fibrosis model rats[J]. China Pharm, 2023, 34(14): 1671-1675.

[12] 范东华，茆军，梅伟，等. 腰膝协同中医外治技术治疗膝骨关节炎的临床疗效[J]. 实用老年医学，2021，35(4)：393-397.
FAN D H, MAO J, MEI W, et al. Clinical effect of traditional Chinese medicine external application technology of waist and knee in treating knee osteoarthritis[J]. Pract Geriatr, 2021, 35(4): 393-397.

[13] WANG Y W, CHEN Y H, LIANG J, et al. METTL3-mediated m6A modification of HMGA2 mRNA promotes subretinal fibrosis and epithelial-mesenchymal transition [J]. J Mol Cell Biol, 2023, 15(3): mjad005.

[14] URTASUN R, LOPATEGI A, GEORGE J, et al. Osteopontin, an oxidant stress sensitive cytokine, up-regulates collagen-Ⅰ via integrin $\alpha_v\beta_3$ engagement and PI3K/pAkt/NFκB signaling[J]. Hepatology, 2012, 55(2): 594-608.

[15] ZHANG L, XING R L, HUANG Z Q, et al. Synovial fibrosis involvement in osteoarthritis[J]. Front Med, 2021, 8: 684389.

[16] ABDELHADY R, CAVALU S, SABER S, et al. Mirtazapine, an atypical antidepressant, mitigates lung fibrosis by suppressing NLPR3 inflammasome and fibrosis-related mediators in endotracheal bleomycin rat model[J]. Biomedecine Pharmacother, 2023, 161: 114553.

[17] MAO Y, PATIAL S, SAINI Y. Airway epithelial cell-specific deletion of HMGB1 exaggerates inflammatory responses in mice with muco-obstructive airway disease[J]. Front Immunol, 2022, 13: 944772.

[18] TAO Z P, HELMS M N, LEACH B C B, et al. Molecular insights into the multifaceted functions and therapeutic targeting of high mobility group box 1 in metabolic diseases [J]. J Cell Mol Med, 2022, 26(14): 3809-3815.

[19] KIM H Y, HONG M H, YOON J J, et al. Protective effect of *Vitis labrusca* leaves extract on cardiovascular dysfunction through HMGB1-TLR4-NFκB signaling in spontaneously hypertensive rats[J]. Nutrients, 2020, 12(10): 3096.

（收稿日期：2023-08-14　修回日期：2023-12-16）
（编辑：张元媛）