

膝痹宁Ⅱ方调控 SETDB2/H3K9me3 信号轴缓解寒湿痹阻型 KOA 大鼠冷刺激疼痛敏感性的机制^Δ

胡思睿^{1*}, 魏义保¹, 刘德仁¹, 奥布力艾散·麦麦提吐逊¹, 王培民¹, 廖太阳^{2#}(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. 南京中医药大学第二附属医院骨伤科, 南京 210017)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)03-0324-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.03.09



摘要 目的 基于 SET 域分叉组蛋白赖氨酸甲基转移酶 2 (SETDB2)/组蛋白 H3 第 9 位赖氨酸三甲基化修饰 (H3K9me3) 信号轴研究膝痹宁Ⅱ方缓解寒湿痹阻型膝骨关节炎 (KOA) 大鼠冷刺激疼痛敏感性的作用机制。方法 将 50 只大鼠随机分为对照组 (灌胃并髓鞘内注射等体积生理盐水), 模型组 (灌胃并髓鞘内注射等体积生理盐水), 膝痹宁Ⅱ方低、高剂量组 (4、8 g/kg 膝痹宁Ⅱ方药液, 灌胃) 和膝痹宁Ⅱ方高剂量+小干扰 RNA (siRNA) 组 (灌胃 8 g/kg 膝痹宁Ⅱ方药液+髓鞘内注射 SETDB2 的 siRNA, 0.2 mmol/L, 20 μL/只), 每组 10 只。除对照组外, 其余各组大鼠均构建寒湿痹阻型 KOA 模型; 造模 14 d 后开始给药, 持续 28 d。末次给药后, 检测大鼠冷刺激疼痛敏感性行为学变化, 观察膝关节软骨组织病理形态学变化, 检测血清中炎症因子 [肿瘤坏死因子 α (TNF-α)、白细胞介素 1β (IL-1β)]、疼痛介质 [降钙素基因相关肽 (CGRP)、神经生长因子 (NGF)] 含量以及背根神经节 (DRG) 组织中 SETDB2/H3K9me3 信号轴和炎症因子、疼痛介质相关蛋白及 mRNA 的表达。结果 给药 28 d 后, 与模型组比较, 膝痹宁Ⅱ方低、高剂量组大鼠的冷刺激缩足潜伏期均显著延长 ($P < 0.05$), 丙酮低温实验阳性次数均显著减少 ($P < 0.05$), 膝关节组织的 Mankin 评分、国际骨关节炎研究学会评分以及血清中炎症因子、疼痛介质含量和 DRG 组织中炎症因子、疼痛介质的表达均显著降低 ($P < 0.05$), DRG 组织中 SETDB2、H3K9me3 蛋白表达均显著上调 ($P < 0.05$); 髓鞘内注射 SETDB2 的 siRNA 后, 高剂量膝痹宁Ⅱ方的上述作用均被显著逆转 ($P < 0.05$)。结论 膝痹宁Ⅱ方可能通过激活 SETDB2/H3K9me3 信号轴减轻炎症与疼痛反应, 进而改善寒湿痹阻型 KOA 大鼠的冷刺激疼痛敏感性。

关键词 膝痹宁Ⅱ方; 膝骨关节炎; 寒湿痹阻型; 疼痛敏感性; SETDB2/H3K9me3 信号轴

Mechanism of Xibining II in alleviating cold stimulus pain sensitivity in rats with cold-damp obstruction-type KOA by regulating SETDB2/H3K9me3 signaling axis

HU Enrui¹, WEI Yibao¹, LIU Deren¹, Aobuliansan·Maimaitixun¹, WANG Peimin¹, LIAO Taiyang² (1. Dept. of Orthopedics, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine/Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 2. Dept. of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210017, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To investigate the mechanism by which the traditional Chinese medicine formula Xibining II modulates cold-stimulus pain sensitivity in rats with cold-damp obstruction-type knee osteoarthritis (KOA) based on the SET domain bifurcated histone lysine methyltransferase 2 (SETDB2)/histone H3 lysine 9 trimethylation (H3K9me3) signaling axis.

METHODS Fifty SD rats were randomly divided into control group (intra-gastric administration and intrathecal injection of equal volumes of normal saline), model group (intra-gastric administration and intrathecal injection of equal volumes of normal saline), Xibining II low- and high-dose groups (4, 8 g/kg Xibining II, intra-gastric administration), and high-dose of Xibining II + small interfering RNA (siRNA) group (8 g/kg of Xibining II via intra-gastric administration and intrathecal injection of SETDB2 siRNA at 0.2 mmol/L, 20 μL per rat), with 10 rats in each group. Except for the control group, cold-damp obstruction-type KOA model was induced in other groups. Drug administration commenced 14 days post-modeling and continued for 28 days. Following the final administration, the following were assessed: behavioral changes in cold-stimulation pain sensitivity, histopathological changes in the articular cartilage of the knee joint, the contents of inflammatory factors [tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β)] and pain mediators [calcitonin gene-related peptide (CGRP), nerve growth factor (NGF)], as well as the expressions of SETDB2/H3K9me3 signaling axis, inflammatory factors and pain mediators related proteins and

^Δ 基金项目 国家自然科学基金项目 (No.82274545); 2026 年度江苏省中医药和中西医结合科研项目 (No.CYTF2026031); 江苏省中医院临床医学创新中心发展项目 (No.Y2023zx05); 江苏省第二中医院 2025 年度院级科研立项项目 (No.SEZDF202501)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向: 膝骨关节炎的基础与临床研究。E-mail: 202410083@njucm.edu.cn

通信作者 住院医师, 博士。研究方向: 膝骨关节炎的基础与临床研究。E-mail: drtaiyang@126.com

as well as the expressions of SETDB2/H3K9me3 signaling axis, inflammatory factors and pain mediators related proteins and

mRNAs in dorsal root ganglion (DRG) tissue. **RESULTS** After 28 days of drug administration, compared with the model group, Xibining II low- and high-dose groups exhibited significantly prolonged cold-stimulus paw withdrawal latency ($P<0.05$); the number of positive responses in the acetone low-temperature test was significantly reduced ($P<0.05$); Mankin score and the Osteoarthritis Research Society International score for knee joint tissue, as well as the levels of inflammatory factors and pain mediators in the serum and their expression in DRG tissue were all significantly decreased ($P<0.05$); the protein expressions of SETDB2 and H3K9me3 in DRG tissue were significantly increased ($P<0.05$). Intrathecal injection of SETDB2 siRNA reversed the above effects of high-dose of Xibining II ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Xibining II may alleviate inflammatory and pain responses by activating the SETDB2/H3K9me3 signaling axis, ultimately improving cold-stimulus pain sensitivity in rats with cold-damp obstruction-type KOA.

KEYWORDS Xibining II; knee osteoarthritis; cold-damp obstruction-type; pain sensitivity; SETDB2/H3K9me3 signaling axis

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种常见的慢性退行性关节疾病,以关节炎症和软骨退化为主要病理特征,常在疾病进展至终末期时导致膝关节结构破坏与功能障碍^[1]。其中,反复发作的慢性疼痛是KOA最常见的临床症状,也是导致患者就医的主要原因之一,其不仅给患者带来身体上的痛苦,也给社会造成了沉重的经济负担^[2]。目前,以塞来昔布为代表的非甾体抗炎药是临床缓解KOA慢性疼痛的常用药物,但长期使用易发生胃肠道、心血管及肾脏等相关不良反应^[3]。相较于化学药,中药复方以整体观和辨证论治为指导,具有多成分、多靶点的作用特点,在缓解关节疼痛、改善关节功能方面具有潜在优势。

中医学将KOA归属于“痹证”范畴,并将其分为寒湿痹阻型、痰瘀痹阻型及肝肾亏虚型等证型。其中,寒湿痹阻型KOA最常见,其核心病理表现为“遇寒加重,得热则缓”,因此降低冷刺激疼痛敏感性是此类KOA治疗的关键,也是当前临床亟待攻克的难题^[4]。膝痹宁II方是江苏省名中医王培民教授基于KOA“本虚标实”的病因病机,并结合其多年治疗寒湿痹阻型KOA的临床经验所创立的中药复方,以温经活血类药物为核心组成,在改善KOA患者膝关节功能、缓解关节冷刺激疼痛等方面疗效显著^[5],但该方缓解寒湿痹阻型KOA冷刺激疼痛敏感性的具体作用机制尚不明确。

SET域分叉组蛋白赖氨酸甲基转移酶2(SET domain bifurcated histone lysine methyltransferase 2, SETDB2)主要通过催化组蛋白H3第9位赖氨酸三甲基化修饰(histone H3 lysine 9 trimethylation, H3K9me3)发挥重要的细胞调节功能^[6]。近期研究发现,H3K9me3缺失可激活内源性逆转录病毒,与骨关节炎(osteoarthritis, OA)的发生发展相关;而增强H3K9me3表达能够缓解OA相关炎症^[7]。另有研究表明,SETDB2/H3K9me3信号轴与代谢紊乱相关的无菌性炎症及组织修复过程密切相关^[8-9]。在KOA中,膝关节内的无菌性炎症是导致疼痛和软骨损伤的核心环节^[10]。因此,本研究基于SETDB2/H3K9me3信号轴探讨膝痹宁II方改善寒湿痹阻型KOA冷刺激疼痛敏感性的作用机制,旨在为膝痹

宁II方治疗寒湿痹阻型KOA的临床应用提供更充分的实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器包括:BME404型行为学检测有机玻璃室(中国医学科学院生物医学工程研究所)、35150-001型大小鼠冷热盘痛觉测试仪(意大利Ugo Basile公司)、LAS 4000型凝胶成像发光系统(美国GE公司)、ABI 7500型实时荧光定量-聚合酶链式反应(RT-PCR)仪(美国ABI公司)、170-3930型凝胶电泳及转膜仪(美国Bio-Rad公司)、ELX 800型酶标仪(美国Bio-Tek公司)等。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用的主要药品与试剂有:苏木精-伊红(HE)染色试剂盒、番红-固绿染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为G1120-100、G1371),兔源肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、 β -肌动蛋白(β -actin)一抗(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为29652-1-AP、26048-1-AP、20536-1-AP),SETDB2、H3K9me3、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)一抗(武汉爱博泰克生物科技有限公司,批号分别为A7391、A22295、A14216、A5542),辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(美国APEX BIO公司,批号K1223),大鼠IL-1 β 、TNF- α 、NGF、CGRP酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒和BCA蛋白测定试剂盒(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号分别为BMS630TEN、KRC3011、ERNGF、EEL226、A55864),RNA快速提取试剂盒、无蛋白快速封闭液(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为G3607-50T、G2052),PCR试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,批号R222-01)。

SETDB2的小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)(上游引物序列为5'-GGAUCGAGACCUUAG-UGUUTT-3',下游引物序列为5'-AACACUAAGGU-CUCGAUCCTT-3')及其等量的对照siRNA(上游引物

序列为5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3',下游引物序列为5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3')均由复百澳(苏州)生物科技有限公司协助合成。

膝痹宁Ⅱ方的组方药材淡附片、桂枝、制狗脊、山萸肉、巴戟天、生薏苡仁、炒白芍、川牛膝、独一味、生甘草均购自江苏省中医院中药房,经该院药学部张倩副主任中药师鉴定均为真品。

1.3 实验动物

本研究所用动物为SPF级8周龄雄性SD大鼠,共62只,体重300~350 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。购入后,大鼠均饲养于南京中医药大学实验动物中心[动物使用许可证号:SYXK(苏)2023-0077],动物房维持饲养温度为(25±2)℃、相对湿度为(60±5)%、12 h明/12 h暗交替,饲养期间大鼠自由进食和饮水。本研究动物实验获得南京中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理批号:202409A047)。

2 方法

2.1 药液制备

取膝痹宁Ⅱ方的组方药材(生薏苡仁15 g,淡附片、桂枝、制狗脊、山萸肉、巴戟天各15 g,炒白芍、川牛膝、独一味各10 g,生甘草5 g),加入600 mL水浸泡40 min,武火煮沸后转文火煎煮20 min,立即用纱布过滤并收集滤液。将药渣重新置于容器中,再次加入600 mL水进行二次煎煮(10 min),然后用纱布过滤并收集滤液。将2次滤液合并,用旋蒸仪浓缩成含生药量为0.684 g/mL的药液,于4℃环境下保存备用^[1]。

2.2 分组与造模

将50只大鼠适应性饲养14 d后随机分为对照组、模型组、膝痹宁Ⅱ方低剂量组、膝痹宁Ⅱ方高剂量组和膝痹宁Ⅱ方高剂量+siRNA组,每组10只。除对照组外,其余各组大鼠均采取前交叉韧带横断术联合人工气候箱构建寒湿痹阻型KOA模型:以2 mL/kg的剂量腹腔注射戊巴比妥钠溶液(30 g/L)将大鼠麻醉,于膝关节处常规备皮消毒,用手术刀片切开皮肤和皮下组织并切断前交叉韧带,通过前抽屉试验判断大鼠KOA模型构建成功后^[2],将皮肤逐层缝合。对照组大鼠仅备皮后切开膝关节处皮肤及皮下组织,暴露关节腔后缝合。术后每只大鼠每天肌内注射青霉素钠溶液1次,连续3 d,预防感染。3 d后,将大鼠置于相对湿度为60%、温度为4℃、风速为6 m/s的人工气候箱中持续干预14 d,每日1次,每次持续2 h,以构建大鼠寒湿痹阻型KOA模型。大鼠寒湿痹阻型KOA造模成功的标准如下:(1)造模后大鼠的步态较对照组大鼠发生改变;(2)造模后大鼠膝关节直径较对照组大鼠增加;(3)造模后大鼠出现寒湿痹阻证的临床表现,包括活动减少、关节屈伸不利等^[2]。本研究中实施寒湿痹阻型KOA造模的40只大鼠均造模成功,且后续实验过程中无动物脱落和死亡。

2.3 给药

造模14 d后,膝痹宁Ⅱ方低、高剂量组大鼠每日分别灌胃4、8 g/kg膝痹宁Ⅱ方药液,持续28 d^[3]。膝痹宁Ⅱ方高剂量+siRNA组大鼠每日灌胃8 g/kg膝痹宁Ⅱ方药液,并在第1次灌胃前,对大鼠髓鞘内注射SETDB2的siRNA(0.2 mmol/L,20 μL/只),之后每3 d注射1次,持续28 d^[4]。对照组和模型组大鼠灌胃并髓鞘内注射等体积无菌生理盐水。在开展髓鞘内注射前,本课题组通过髓鞘内注射实验验证了SETDB2 siRNA的转染效率:将12只大鼠分为对照siRNA组和SETDB2 siRNA组,每组6只,采用Western blot法检测发现,SETDB2 siRNA能有效降低大鼠L3~L5背根神经节(dorsal root ganglia, DRG)组织中SETDB2蛋白的表达水平。

2.4 大鼠冷刺激疼痛敏感性行为学检测

在造模的前1 d(记为实验第0天)和实验第14、28和42天,分别采用温度调节冷板测痛法和丙酮低温法对大鼠进行冷刺激疼痛敏感性行为学测试。(1)温度调节冷板测痛法:将冷板温度保持在(4.0±0.5)℃,将大鼠放置于冷板中央的透明观察罩内后,立即启动计时器并持续观察,记录大鼠出现缩足或舔爪等痛觉反应的时间,即冷刺激缩足潜伏期。(2)丙酮低温法:将大鼠置于金属网上,将1 mL丙酮快速喷洒在大鼠足跖面,观察并记录其30 s内出现缩足或舔爪等阳性反应的次数,即丙酮低温实验阳性次数。每组大鼠的上述指标均重复测量3次,每次间隔15 min。

2.5 样本取材与处理

行为学检测结束后,全部大鼠禁食、禁水12 h,随后经腹主动脉收集大鼠外周血液。将血液在4℃下以3 000 r/min离心15 min,分离血清并将其置于-80℃环境中保存备用。取血后处死大鼠,提取每只大鼠双侧膝关节软骨组织,置于4%多聚甲醛中固定,备用。此外,提取大鼠L3~L5 DRG组织,将每组5只大鼠的DRG组织置于4%多聚甲醛中固定,将每组其余5只大鼠的DRG组织置于-80℃环境中保存备用。

2.6 大鼠膝关节软骨组织病理形态学观察

采用HE染色法和番红-固绿染色法观察。取经4%多聚甲醛固定的大鼠膝关节软骨组织,常规制备石蜡切片(厚3 μm)。按照试剂盒使用说明书操作,对切片进行HE染色和番红-固绿染色,使用中性树胶封片后置于显微镜下观察,分别根据Mankin评分^[5]和国际骨关节炎研究学会(Osteoarthritis Research Society International, OARSI)评分^[6],评估大鼠OA的病变程度。

2.7 大鼠血清中炎症因子和疼痛介质含量检测

采用ELISA法检测。取“2.5”项下冻存的大鼠血清,按照ELISA试剂盒说明书操作,采用酶标仪于450 nm波长下测定各孔的光密度值,并计算各组大鼠血清中炎症因子(TNF-α、IL-1β)与疼痛介质(NGF、CGRP)含量。

2.8 大鼠 DRG 组织中 SETDB2、H3K9me3、NGF、CGRP 表达检测

采用免疫荧光法检测。取“2.5”项下经 4% 多聚甲醛固定的大鼠 DRG 组织,经 0.1% Triton X-100 透化 10 min,然后用 5% 牛血清白蛋白封闭 30 min,之后分别滴加 SETDB2、H3K9me3、NGF、CGRP 一抗(稀释比例均为 1:100),于 4 °C 下孵育过夜,再在室温下孵育二抗(稀释比例为 1:2 000)。使用 DAPI 复染细胞核,封片,于显微镜下观察(染色后细胞核呈蓝色,SETDB2、NGF 阳性染色细胞呈绿色,H3K9me3、CGRP 阳性染色细胞呈红色),并利用 Image J 软件对细胞荧光强度进行定量分析。

2.9 大鼠 DRG 组织中炎症因子和疼痛介质的 mRNA 表达检测

采用 RT-PCR 法检测。取“2.5”项下冻存的大鼠 DRG 组织,采用 TRIzol 法提取组织中的总 RNA,检测其浓度和纯度后,将 RNA 逆转录为 cDNA,并以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应体系(总体积为 20 μ L)包含:上、下游引物各 0.4 μ L,cDNA 模板 2 μ L,2 \times SYBR qPCR Master Mix 10 μ L,ddH₂O 7.2 μ L。反应程序包括:预变性阶段(95 °C、30 s)、循环反应阶段(95 °C、10 s,60 °C、30 s,共 40 个循环)和熔解曲线阶段(95 °C、15 s,60 °C、60 s,95 °C、15 s)。以 β -actin 为内参,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算各目的基因 mRNA 的表达水平。各基因的特异性引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成,引物序列及扩增产物长度见表 1。

表 1 引物序列及扩增产物长度

基因名称	引物序列(5'→3')	扩增产物长度/bp
TNF- α	上游引物:GGAGGGAGAACGCAACTCC	93
	下游引物:GCCAGTGTATGAGAGGGACG	
IL-1 β	上游引物:CCTATGCTTGCCCGTGGAG	118
	下游引物:CACACACTAGCAGGTCGTCA	
NGF	上游引物:CAGCGTTTTGATCGGCCGTA	158
	下游引物:ACGGCAGCATATGGTTTCAG	
CGRP	上游引物:TCTCCCTTCTCTGGTTGTC	132
	下游引物:CCAGTAGCGAGCTTCTTCTT	
β -actin	上游引物:CGCGAGTACAACCTTCTTGC	211
	下游引物:CCTTCTGACCCATACCCACC	

2.10 大鼠 DRG 组织中 SETDB2/H3K9me3 信号轴及炎症因子和疼痛介质相关蛋白表达检测

采用 Western blot 法检测。取“2.5”项下冻存的大鼠 DRG 组织,使用 RIPA 裂解液提取组织中的总蛋白,使用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度后,于 100 °C 下煮沸变性。取等量蛋白上样进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离(电压 160 V,电泳时间 40 min),然后电转(电压 25 V,转膜时间 30 min)至聚偏二氟乙烯膜,用无蛋白快速封闭液封闭 1 h;于 4 °C 下将膜与 SETDB2、H3K9me3、TNF- α 、IL-1 β 、NGF、CGRP(稀释比例均为 1:1 000)及 β -actin(稀释比例为 1:10 000)一抗孵育过夜;

TBST 缓冲液洗膜 3 次(每次 10 min)后,于室温下用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗(稀释比例为 1:5 000)孵育 1 h。在凝胶成像发光系统中曝光经 ECL 发光液孵育后的蛋白条带并拍照。采用 Image J 软件分析条带灰度值,以目的蛋白与内参(β -actin)蛋白条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达水平。

2.11 统计学方法

使用 GraphPad Prism 9 软件进行统计分析与绘图。计量资料符合正态分布的以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Tukey 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 大鼠冷刺激疼痛敏感性行为学检测结果

实验第 0 天,各组大鼠的冷刺激缩足潜伏期与丙酮低温实验阳性次数差异均无统计学意义($P>0.05$)。与对照组比较,模型组大鼠从实验第 14 天起冷刺激缩足潜伏期显著缩短($P<0.05$),丙酮低温实验阳性次数显著增加($P<0.05$);与模型组比较,膝痹宁 II 方低、高剂量组大鼠从实验第 28 天起冷刺激缩足潜伏期均显著延长($P<0.05$),丙酮低温实验阳性次数均显著减少($P<0.05$),且膝痹宁 II 方高剂量组大鼠的上述指标变化较膝痹宁 II 方低剂量组显著($P<0.05$);与膝痹宁 II 方高剂量组比较,膝痹宁 II 方高剂量+siRNA 组大鼠从实验第 28 天起冷刺激缩足潜伏期显著缩短($P<0.05$),丙酮低温实验阳性次数显著增加($P<0.05$)。结果见表 2、表 3。

表 2 各组大鼠冷刺激缩足潜伏期比较($\bar{x} \pm s, n=10, s$)

组别	第 0 天	第 14 天	第 28 天	第 42 天
对照组	124.61 \pm 5.70	121.71 \pm 5.01	122.27 \pm 6.95	122.51 \pm 6.39
模型组	122.99 \pm 6.29	24.93 \pm 3.58 ^a	25.16 \pm 5.20 ^a	26.72 \pm 4.98 ^a
膝痹宁 II 方低剂量组	121.18 \pm 6.65	28.75 \pm 5.00	57.40 \pm 5.49 ^b	71.03 \pm 5.01 ^b
膝痹宁 II 方高剂量组	121.36 \pm 4.66	28.43 \pm 4.70	66.97 \pm 6.75 ^{bc}	91.92 \pm 5.83 ^{bc}
膝痹宁 II 方高剂量+siRNA 组	123.75 \pm 4.55	28.16 \pm 5.26	57.44 \pm 5.37 ^d	73.55 \pm 5.61 ^d

a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与模型组比较, $P<0.05$; c: 与膝痹宁 II 方低剂量组比较, $P<0.05$; d: 与膝痹宁 II 方高剂量组比较, $P<0.05$ 。

表 3 各组大鼠丙酮低温实验阳性次数比较($\bar{x} \pm s, n=10, 次$)

组别	第 0 天	第 14 天	第 28 天	第 42 天
对照组	1.70 \pm 0.82	1.70 \pm 0.67	1.60 \pm 0.70	1.90 \pm 0.32
模型组	1.90 \pm 0.57	7.10 \pm 0.88 ^a	6.80 \pm 1.03 ^a	7.10 \pm 1.10 ^a
膝痹宁 II 方低剂量组	1.70 \pm 0.67	7.00 \pm 0.94	5.10 \pm 0.99 ^b	3.60 \pm 0.84 ^b
膝痹宁 II 方高剂量组	1.80 \pm 0.42	7.10 \pm 0.88	3.90 \pm 1.10 ^{bc}	1.90 \pm 0.74 ^{bc}
膝痹宁 II 方高剂量+siRNA 组	1.70 \pm 0.48	7.20 \pm 0.92	5.70 \pm 0.82 ^d	4.50 \pm 1.08 ^d

a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与模型组比较, $P<0.05$; c: 与膝痹宁 II 方低剂量组比较, $P<0.05$; d: 与膝痹宁 II 方高剂量组比较, $P<0.05$ 。

3.2 大鼠膝关节软组织病理形态学观察结果

3.2.1 HE 染色结果

对照组大鼠软骨表面光滑平整、结构清晰,软骨细胞形态正常、分布均匀且排列有序,无血管侵蚀、软骨裂隙或炎症细胞浸润现象;与对照组比较,模型组大鼠软骨表面出现磨损、裂纹以及结构层次紊乱等变化,

Mankin评分显著升高($P<0.05$);与模型组比较,膝痹宁Ⅱ方低、高剂量组大鼠软骨组织的病理形态均得到明显改善,Mankin评分均显著降低($P<0.05$),且其中以膝痹宁Ⅱ方高剂量组大鼠的病理改善更明显,Mankin评分也更低($P<0.05$);与膝痹宁Ⅱ方高剂量组比较,膝痹宁Ⅱ方高剂量+siRNA组大鼠软骨损伤与炎症细胞浸润明显加重,Mankin评分显著升高($P<0.05$)。结果见表4、图1。

表4 各组大鼠膝关节软骨组织的Mankin、OARSI评分比较($\bar{x} \pm s, n=10$,分)

组别	Mankin评分	OARSI评分
对照组	0.75±0.50	0.63±0.25
模型组	10.75±1.26 ^a	5.75±0.50 ^a
膝痹宁Ⅱ方低剂量组	7.25±0.96 ^b	3.25±0.50 ^b
膝痹宁Ⅱ方高剂量组	3.75±0.50 ^{b,c}	1.50±0.58 ^{b,c}
膝痹宁Ⅱ方高剂量+siRNA组	6.75±0.96 ^d	2.75±0.50 ^d

a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$;c:与膝痹宁Ⅱ方低剂量组比较, $P<0.05$;d:与膝痹宁Ⅱ方高剂量组比较, $P<0.05$ 。

3.2.2 番红-固绿染色结果

对照组大鼠软骨表面平整,结构完整,染色均匀;与对照组比较,模型组大鼠软骨出现明显裂纹,着色减弱,软骨基质严重退化,OARSI评分显著升高($P<0.05$);与模型组比较,膝痹宁Ⅱ方低、高剂量组大鼠软骨着色减弱、裂纹减少,软骨基质退化等情况明显改善,OARSI评分均显著降低($P<0.05$),且膝痹宁Ⅱ方高剂量组大鼠的OARSI评分显著低于膝痹宁Ⅱ方低剂量组($P<0.05$);与膝痹宁Ⅱ方高剂量组比较,膝痹宁Ⅱ方高剂量+siRNA组大鼠软骨磨损程度、组织破坏程度等均明显加重,OARSI评分显著升高($P<0.05$)。结果见表4、图1。

3.3 大鼠血清中炎症因子和疼痛介质含量检测结果

与对照组比较,模型组大鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 、NGF、CGRP含量均显著升高($P<0.05$);与模型组比较,膝痹宁Ⅱ方低、高剂量组大鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 、NGF、CGRP含量均显著降低($P<0.05$),且膝痹宁Ⅱ方

高剂量组大鼠血清中上述指标含量显著低于膝痹宁Ⅱ方低剂量组($P<0.05$);与膝痹宁Ⅱ方高剂量组比较,膝痹宁Ⅱ方高剂量+siRNA组大鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 、NGF、CGRP含量均显著升高($P<0.05$)。结果见表5。

表5 各组大鼠血清中炎症因子、疼痛介质含量比较($\bar{x} \pm s, n=10, \text{pg/mL}$)

组别	TNF- α	IL-1 β	NGF	CGRP
对照组	13.99±1.94	37.38±2.80	112.17±5.52	35.85±3.63
模型组	42.69±2.32 ^a	91.61±2.93 ^a	303.21±4.27 ^a	115.03±8.86 ^a
膝痹宁Ⅱ方低剂量组	27.20±3.30 ^b	49.31±3.24 ^b	237.49±3.27 ^b	76.23±3.04 ^b
膝痹宁Ⅱ方高剂量组	20.27±3.59 ^{b,c}	43.10±3.20 ^{b,c}	197.41±2.89 ^{b,c}	59.57±4.21 ^{b,c}
膝痹宁Ⅱ方高剂量+siRNA组	28.11±2.34 ^d	55.38±2.87 ^d	233.79±3.04 ^d	78.05±3.14 ^d

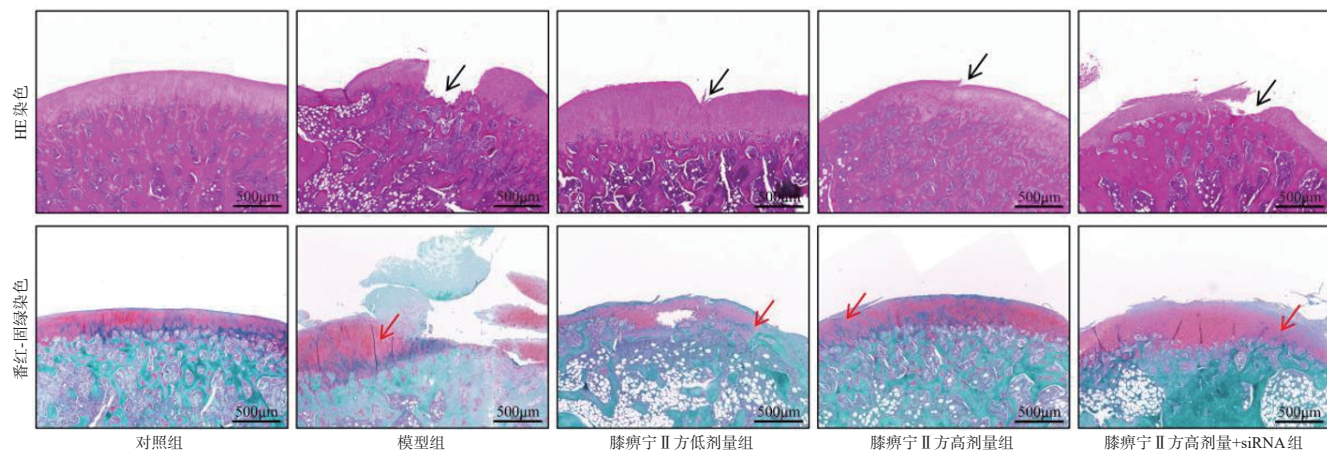
a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$;c:与膝痹宁Ⅱ方低剂量组比较, $P<0.05$;d:与膝痹宁Ⅱ方高剂量组比较, $P<0.05$ 。

3.4 大鼠DRG组织中SETDB2、H3K9me3、NGF、CGRP表达检测结果

与对照组比较,模型组大鼠DRG组织中SETDB2、H3K9me3的荧光强度均显著减弱($P<0.05$),NGF、CGRP的荧光强度均显著增强($P<0.05$);与模型组比较,膝痹宁Ⅱ方低、高剂量组大鼠DRG组织中SETDB2、H3K9me3的荧光强度均显著增强($P<0.05$),NGF、CGRP的荧光强度均显著减弱($P<0.05$),且膝痹宁Ⅱ方高剂量组大鼠DRG组织中上述指标的变化较膝痹宁Ⅱ方低剂量组更显著($P<0.05$);与膝痹宁Ⅱ方高剂量组比较,膝痹宁Ⅱ方高剂量+siRNA组大鼠DRG组织中SETDB2、H3K9me3的荧光强度均显著减弱($P<0.05$),NGF、CGRP的荧光强度均显著增强($P<0.05$)。结果见表6(免疫荧光染色图请扫描本文首页二维码进入“增强出版”板块查看附图1)。

3.5 大鼠DRG组织中炎症因子和疼痛介质的mRNA表达检测结果

与对照组比较,模型组大鼠DRG组织中TNF- α 、IL-1 β 、NGF、CGRP mRNA的表达水平均显著升高($P<0.05$);与模型组比较,膝痹宁Ⅱ方低、高剂量组大鼠DRG组织中上述mRNA的表达水平均显著降低($P<$



注:黑色箭头所指为软骨损伤;红色箭头所指为软骨基质退化。

图1 各组大鼠膝关节软骨组织病理形态学观察显微图

表6 各组大鼠 DRG 组织中 SETDB2、H3K9me3、NGF、CGRP 的荧光强度比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	SETDB2	H3K9me3	NGF	CGRP
对照组	7.86 ± 0.55	6.07 ± 0.30	0.97 ± 0.10	0.38 ± 0.12
模型组	1.08 ± 0.18 ^a	0.85 ± 0.13 ^a	7.78 ± 0.21 ^a	6.94 ± 0.32 ^a
膝痹宁 II 方低剂量组	3.95 ± 0.18 ^b	3.24 ± 0.31 ^b	5.16 ± 0.21 ^b	3.34 ± 0.39 ^b
膝痹宁 II 方高剂量组	6.03 ± 0.23 ^{bc}	4.95 ± 0.27 ^{bc}	2.12 ± 0.19 ^{bc}	1.45 ± 0.17 ^{bc}
膝痹宁 II 方高剂量+siRNA 组	3.16 ± 0.20 ^d	2.16 ± 0.19 ^d	5.07 ± 0.22 ^d	4.45 ± 0.44 ^d

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与膝痹宁 II 方低剂量组比较, $P < 0.05$; d: 与膝痹宁 II 方高剂量组比较, $P < 0.05$ 。0.05), 且膝痹宁 II 方高剂量组大鼠 DRG 组织中上述 mRNA 的表达水平均显著低于膝痹宁 II 方低剂量组 ($P < 0.05$); 与膝痹宁 II 方高剂量组比较, 膝痹宁 II 方高剂量+siRNA 组大鼠 DRG 组织中上述 mRNA 的表达水平均显著升高 ($P < 0.05$)。结果见表 7。

表7 各组大鼠 DRG 组织中炎症因子和疼痛介质的 mRNA 表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	TNF- α mRNA	IL-1 β mRNA	NGF mRNA	CGRP mRNA
对照组	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.08
模型组	2.97 ± 0.20 ^a	2.30 ± 0.08 ^a	2.74 ± 0.28 ^a	2.30 ± 0.14 ^a
膝痹宁 II 方低剂量组	1.97 ± 0.09 ^b	1.61 ± 0.11 ^b	1.84 ± 0.05 ^b	1.76 ± 0.17 ^b
膝痹宁 II 方高剂量组	1.37 ± 0.08 ^{bc}	1.27 ± 0.03 ^{bc}	1.27 ± 0.12 ^{bc}	1.26 ± 0.05 ^{bc}
膝痹宁 II 方高剂量+siRNA 组	1.74 ± 0.14 ^d	1.57 ± 0.11 ^d	1.71 ± 0.07 ^d	1.55 ± 0.10 ^d

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与膝痹宁 II 方低剂量组比较, $P < 0.05$; d: 与膝痹宁 II 方高剂量组比较, $P < 0.05$ 。

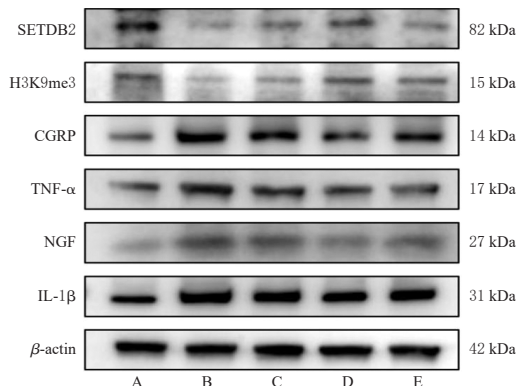
3.6 大鼠 DRG 组织中 SETDB2/H3K9me3 信号轴及炎症因子和疼痛介质相关蛋白表达检测结果

与对照组比较, 模型组大鼠 DRG 组织中 SETDB2、H3K9me3 蛋白表达均显著下调 ($P < 0.05$), TNF- α 、IL-1 β 、NGF、CGRP 蛋白表达均显著上调 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 膝痹宁 II 方低、高剂量组大鼠 DRG 组织中 SETDB2、H3K9me3 蛋白表达均显著上调 ($P < 0.05$), TNF- α 、IL-1 β 、NGF、CGRP 蛋白表达均显著下调 ($P < 0.05$), 且膝痹宁 II 方高剂量组大鼠 DRG 组织中上述指标的变化较膝痹宁 II 方低剂量组更显著 ($P < 0.05$); 与膝痹宁 II 方高剂量组比较, 膝痹宁 II 方高剂量+siRNA 组大鼠 DRG 组织中 SETDB2、H3K9me3 蛋白表达均显著下调 ($P < 0.05$), TNF- α 、IL-1 β 、NGF、CGRP 蛋白表达均显著上调 ($P < 0.05$)。结果见图 2、表 8。

4 讨论

KOA 是临床常见的慢性退行性疾病。寒湿痹阻作为 KOA 的常见证型之一, 其“遇寒加重”的临床表现提示局部炎症反应与疼痛敏化在病情发展中发挥关键作用。因此, 探索契合寒湿痹阻证特点, 既能缓解冷刺激疼痛敏感性又具有良好安全性的治疗策略, 对 KOA 的临床治疗具有重要意义。

江苏省名中医王培民教授针对寒湿痹阻型 KOA 的病因病机与临床表现, 以“温经活血、补益肝肾”为治疗大法, 创立了“以痛为枢”的诊疗思路, 并据此创制了膝痹宁 II 方。该方由淡附片、山萸肉、桂枝、川牛膝等 10 味



A: 对照组; B: 模型组; C: 膝痹宁 II 方低剂量组; D: 膝痹宁 II 方高剂量组; E: 膝痹宁 II 方高剂量+siRNA 组。

图2 各组大鼠 DRG 组织中 SETDB2/H3K9me3 信号轴及炎症因子和疼痛介质相关蛋白表达的电泳图

表8 各组大鼠 DRG 组织中 SETDB2/H3K9me3 信号轴及炎症因子和疼痛介质相关蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	SETDB2/ β -actin	H3K9me3/ β -actin	TNF- α / β -actin	IL-1 β / β -actin	NGF/ β -actin	CGRP/ β -actin
对照组	1.01 ± 0.06	0.85 ± 0.06	0.40 ± 0.05	0.37 ± 0.06	0.29 ± 0.06	0.37 ± 0.04
模型组	0.29 ± 0.01 ^a	0.22 ± 0.02 ^a	1.06 ± 0.13 ^a	1.07 ± 0.07 ^a	0.91 ± 0.03 ^a	0.96 ± 0.03 ^a
膝痹宁 II 方低剂量组	0.56 ± 0.03 ^b	0.44 ± 0.05 ^b	0.78 ± 0.06 ^b	0.82 ± 0.04 ^b	0.68 ± 0.03 ^b	0.68 ± 0.02 ^b
膝痹宁 II 方高剂量组	0.83 ± 0.03 ^{bc}	0.66 ± 0.03 ^{bc}	0.54 ± 0.03 ^{bc}	0.61 ± 0.06 ^{bc}	0.46 ± 0.03 ^{bc}	0.44 ± 0.03 ^{bc}
膝痹宁 II 方高剂量+siRNA 组	0.43 ± 0.01 ^d	0.45 ± 0.08 ^d	0.74 ± 0.01 ^d	0.81 ± 0.05 ^d	0.59 ± 0.01 ^d	0.61 ± 0.08 ^d

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 膝痹宁 II 方低剂量组比较, $P < 0.05$; d: 与膝痹宁 II 方高剂量组比较, $P < 0.05$ 。

中药组成, 具有外祛寒湿、内温肝肾之效。方中淡附片、桂枝为君药, 温阳散寒、宣通痹阻; 山萸肉、巴戟天、制狗脊及独一味为臣药, 滋补肝肾、填精生髓; 佐以炒白芍、生薏苡仁与川牛膝, 活血消肿、缓急止痛, 既补益肝肾, 又引药下行; 生甘草调和诸药、缓急止痛。诸药合用, 共奏温经通络、益肾养肝、活血止痛之效。

本研究冷刺激疼痛敏感性行为学检测结果显示, 膝痹宁 II 方可有效延长模型大鼠冷刺激缩足潜伏期, 并减少丙酮低温实验阳性次数。此外, HE 染色与番红-固绿染色结果显示, 膝痹宁 II 方能够有效缓解寒湿痹阻型 KOA 所致的软骨损伤与软骨基质退化。已有研究表明, KOA 疼痛敏感性升高与关节组织持续性低度炎症密切相关——TNF- α 、IL-1 β 等促炎细胞因子可直接激活 DRG 组织中的感觉神经元, 并上调 NGF、CGRP 等疼痛介质表达, 共同介导外周及中枢敏化, 进而导致疼痛敏感性阈值降低^[17]。本研究 ELISA 检测结果显示, 膝痹宁 II 方可显著降低模型大鼠血清中炎症因子 (TNF- α 、IL-1 β) 与疼痛介质 (NGF、CGRP) 含量。进一步的免疫荧光染色及 Western blot、RT-PCR 检测结果证实, 膝痹宁 II 方干预后, 大鼠 DRG 组织中上述指标表达同步降低。这提示膝痹宁 II 方可能是通过降低大鼠 DRG 组织中炎症因子与疼痛介质含量, 进而降低寒湿痹阻型 KOA 大鼠的冷刺激疼痛敏感性。

SETDB2是赖氨酸甲基转移酶SUV39家族的关键成员,通过催化H3K9me3抑制细胞衰老与炎症相关基因的转录^[7,18]。研究表明,SETDB2的表达变化与炎症调控密切相关:在冠状病毒感染中,SETDB2表达下调会导致炎症基因*NF-κB*启动子区H3K9me3水平降低,进而加剧炎症反应^[8];造血干细胞中SETDB2缺失会促进血管炎症发生与动脉粥样硬化进展^[19]。此外,最新研究表明,H3K9me3的缺失会介导内源性逆转录病毒激活,最终引发OA患者及OA小鼠膝关节组织的炎症反应,并推动OA病程持续进展^[7]。本研究中,免疫荧光染色与Western blot实验结果均显示,膝痹宁Ⅱ方可显著上调模型大鼠DRG组织中SETDB2、H3K9me3的表达。这提示膝痹宁Ⅱ方可能通过激活SETDB2/H3K9me3信号轴,抑制炎症因子与疼痛介质的表达,从而降低寒湿痹阻型KOA大鼠的冷刺激疼痛敏感性。为验证上述机制,本课题组通过髓鞘内注射SETDB2的siRNA,敲低大鼠DRG组织中SETDB2表达后再次进行上述检测。结果显示,在髓鞘内注射SETDB2的siRNA后,显著逆转了高剂量膝痹宁Ⅱ对上述指标的改善作用。

综上所述,膝痹宁Ⅱ方具有缓解寒湿痹阻型KOA大鼠冷刺激疼痛敏感性的功效,其作用机制可能与激活SETDB2/H3K9me3信号轴有关。但本研究未设置阳性对照药物,难以准确评估该复方相较于现有药物的治疗效果;此外,KOA证型具有异质性,本研究结论是否适用于肝肾亏虚、痰瘀痹阻等其他证型仍需进一步验证。

参考文献

[1] 魏义保,张力,廖太阳,等. 基于HMGB1/CXCL12/CXCR4信号轴探讨伤科冷痛贴缓解KOA小鼠冷痛敏的机制研究[J]. 南京中医药大学学报, 2025, 41(2): 195-202.

[2] KATZ J N, ARANT K R, LOESER R F. Diagnosis and treatment of hip and knee osteoarthritis: a review[J]. JAMA, 2021, 325(6): 568-578.

[3] CHENG L, LI G Z, SHEN X, et al. Effects of celecoxib combined with glucosamine hydrochloride in the management of knee osteoarthritis[J]. Am J Transl Res, 2025, 17(8): 6359-6369.

[4] 卓涛,王国威,吴思贤,等. 基于网络药理学、分子对接和动物实验探讨海马治疗膝骨关节炎的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2025, 50(14): 4026-4036.

[5] 康俊峰,揭立士,廖太阳,等. 膝痹宁Ⅱ治疗寒湿痹阻型膝骨关节炎的随机对照研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2025, 33(1): 27-32.

[6] YUAN G D, HU B W, MA J, et al. Histone lysine methyltransferase SETDB2 suppresses NRF2 to restrict tumor progression and modulates chemotherapy sensitivity in lung adenocarcinoma[J]. Cancer Med, 2023, 12(6): 7258-7272.

[7] LIU Y, MOLCHANOV V, ZHAO Y G, et al. H3K9me3 loss and ERVs activation as hallmarks for osteoarthritis

progression and knee joint aging[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2025, 33(1): 128-133.

[8] MELVIN W J, AUDU C O, DAVIS F M, et al. Coronavirus induces diabetic macrophage-mediated inflammation via SETDB2[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2021, 118(38): e2101071118.

[9] KIMBALL A S, DAVIS F M, DENDEKKER A, et al. The histone methyltransferase SETDB2 modulates macrophage phenotype and uric acid production in diabetic wound repair[J]. Immunity, 2019, 51(2): 258-271.e5.

[10] IADAROLA M J, SAPIO M R, NAHAMA A, et al. Intraarticular resiniferatoxin, a potent TRPV1 agonist, for treatment of osteoarthritic pain[J]. Pain Manag, 2025, 15(10): 659-670.

[11] 康俊峰,揭立士,伏厚宇,等. 膝痹宁Ⅱ联合脂肪干细胞外泌体调控线粒体自噬改善膝骨关节炎的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(11): 111-119.

[12] MA Z Y, WEI Y B, LIAO T Y, et al. Activation of vascular endothelial cells by synovial fibrosis promotes Netrin-1-induced sensory nerve sprouting and exacerbates pain sensitivity[J]. J Cell Mol Med, 2023, 27(23): 3773-3785.

[13] 魏义保,马振源,刘德仁,等. 膝痹宁Ⅱ通过AMPK/PGC1α信号通路调控糖酵解而减轻膝骨关节炎大鼠软骨损伤[J]. 中国病理生理杂志, 2025, 41(8): 1569-1577.

[14] LU W, YANG X, ZHONG W, et al. METTL14-mediated m6A epitranscriptomic modification contributes to chemotherapy-induced neuropathic pain by stabilizing GluN2A expression via IGF2BP2 [J]. J Clin Invest, 2024, 134(6).

[15] TANG Z F, CHENG L L, LI M, et al. Astragaloside IV alleviates osteoarthritis by inhibiting chondrocyte ferroptosis via the p53/SLC7A11/GPX4 axis[J]. J Inflamm Res, 2025, 18: 16169-16186.

[16] THOMAS M, FRONK Z, GROSS A, et al. Losartan attenuates progression of osteoarthritis in the synovial temporomandibular and knee joints of a chondrodysplasia mouse model through inhibition of TGF-β₁ signaling pathway[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2019, 27(4): 676-686.

[17] 胡恩睿,魏义保,刘德仁,等. 背根神经节巨噬细胞介导膝骨关节炎疼痛敏化的研究进展[J]. 中国疼痛医学杂志, 2025, 31(11): 855-862.

[18] SHI X Z, AN Z K, CHENG S Q, et al. SETDB2 participates in iron metabolism in esophageal squamous cell carcinoma via H3K9me3-mediated TFRC silencing[J]. Biochem Pharmacol, 2025, 241: 117135.

[19] ZHANG X B, SUN J, CANFRÁN-DUQUE A, et al. Deficiency of histone lysine methyltransferase SETDB2 in hematopoietic cells promotes vascular inflammation and accelerates atherosclerosis[J]. JCI Insight, 2021, 6(12): e147984.

(收稿日期:2025-09-26 修回日期:2026-01-06)

(编辑:林 静)