

# 膝痹宁Ⅱ方经JAK2/STAT3通路缓解KOA大鼠滑膜炎症及纤维化的机制研究<sup>Δ</sup>

宋佳宸\*, 吴 鹏, 张 立, 刘德仁, 施 蕾, 刘江宇, 史尧天, 茆 军<sup>△</sup>[南京中医药大学附属医院(江苏省中医院)骨伤科, 南京 210029]

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)14-1838-07  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.14.07



**摘 要** **目的** 基于Janus激酶2(JAK2)/信号转导及转录激活因子3(STAT3)通路,探讨膝痹宁Ⅱ方缓解膝关节炎(KOA)大鼠滑膜炎症及纤维化的作用机制。**方法** 将75只雄性SD大鼠随机分为假手术组(Sham组)、KOA组、膝痹宁Ⅱ低剂量组(XBNⅡ-L组,4 g/kg)、高剂量组(XBNⅡ-H组,8 g/kg)、膝痹宁Ⅱ高剂量联合STAT3激活剂Colivelin三氟乙酸盐(C-TFA)组[C-TFA组,8 g/kg膝痹宁Ⅱ+1.0 mg/(kg·d) C-TFA],每组15只。除Sham组外,其余各组采用前交叉韧带离断法建立KOA模型。造模成功后,各药物组分别给予相应药物灌胃和(或)腹腔注射,每日1次,持续28 d。末次给药后,评估各组大鼠膝关节滑膜组织病理改变并进行指标计算;检测血清炎症因子水平,检测膝关节滑膜组织中磷酸化JAK2(p-JAK2)、磷酸化STAT3(p-STAT3)蛋白阳性表达,滑膜组织JAK2/STAT3通路相关蛋白及mRNA表达。**结果** 与Sham组相比,KOA组大鼠滑膜衬里细胞显著增生且排列紊乱,Krenn评分,纤维化占比,p-JAK2、p-STAT3阳性面积百分比,p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3和Ⅰ型胶原蛋白、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白的表达水平,JAK2、STAT3、Ⅰ型胶原蛋白、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白mRNA的表达水平,以及血清白细胞介素1 $\beta$ 、白细胞介素18水平均显著升高( $P<0.05$ )。与KOA组相比,XBNⅡ-L组、XBNⅡ-H组大鼠上述病理改变明显改善,各指标均显著下降( $P<0.05$ ),且XBNⅡ-H组的改善效果显著优于XBNⅡ-L组( $P<0.05$ )。与XBNⅡ-H组相比,C-TFA组上述病理损伤加重,各指标均显著恶化( $P<0.05$ )。**结论** 膝痹宁Ⅱ方可减轻KOA大鼠滑膜炎症与纤维化,其机制可能与抑制JAK2/STAT3通路激活有关。**关键词** 膝痹宁Ⅱ方;膝骨关节炎;滑膜纤维化;滑膜炎症;JAK2/STAT3通路

## Mechanism study of Xibining Ⅱ formula in alleviating synovial inflammation and fibrosis in KOA rats via JAK2/STAT3 pathway

SONG Jiachen, WU Peng, ZHANG Li, LIU Deren, SHI Lei, LIU Jiangyu, SHI Yaotian, MAO Jun [Dept. of Orthopedics and Traumatology, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine (Jiangsu Provincial Hospital of Chinese Medicine), Nanjing 210029, China]

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To investigate the mechanism of Xibining Ⅱ formula in alleviating synovial inflammation and fibrosis in knee osteoarthritis (KOA) rats based on Janus kinase 2 (JAK2)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway. **METHODS** Seventy-five male SD rats were randomly divided into sham operation group (Sham group), KOA group, Xibining Ⅱ low-dose group (XBN Ⅱ-L group, 4 g/kg), Xibining Ⅱ high-dose group (XBN Ⅱ-H group, 8 g/kg), and Xibining Ⅱ high-dose combined with STAT3 activator Colivelin trifluoroacetate (C-TFA) group [C-TFA group, 8 g/kg Xibining Ⅱ + 1.0 mg/(kg·d) C-TFA], with 15 rats in each group. Except for the Sham group, the KOA model was established by anterior cruciate ligament transection in the other groups. After successful modeling, each group was given corresponding drugs by intragastric administration and (or) intraperitoneal injection once daily for 28 consecutive days. After the last medication, the pathological changes of synovial tissue of knee joint in each group were evaluated and the indicators were calculated. The levels of serum inflammatory factors were detected. The positive expressions of phosphorylated JAK2 (p-JAK2) and phosphorylated STAT3

<sup>Δ</sup> **基金项目** 国家自然科学基金面上项目(No.82575102);江苏省中医药科技发展计划项目(No.MS2024018);江苏省中医药和中西医结合科研项目(No.CYTF2026011);江苏省中医院高峰学术人才培养项目(No.k2026yrc26, No.k2026yrc51)

\* **第一作者** 硕士研究生。研究方向:膝骨关节炎发病机制及中药干预机制。E-mail:2091009510@qq.com

# **通信作者** 主任中医师,教授,博士生导师,博士。研究方向:中医骨伤科学的临床与基础。E-mail:fsyy00606@njucm.edu.cn

(p-STAT3) in synovial tissue of the knee joint were detected. The expressions of JAK2/STAT3 pathway-related proteins and mRNAs in synovial tissue were detected. **RESULTS** Compared with the Sham group, the synovial lining cells in the KOA group showed significant proliferation and disordered arrangement; the Krenn score, fibrosis ratio, positive area percentage of p-JAK2 and p-STAT3, p-JAK2/JAK2 and p-STAT3/STAT3, protein expression of Collagen-Ⅰ and  $\alpha$ -smooth

muscle actin, the mRNA expression of JAK2, STAT3, Collagen- I and  $\alpha$ -smooth muscle actin, as well as serum levels of interleukin-1 $\beta$  and interleukin-18 were significantly increased ( $P<0.05$ ). Compared with the KOA group, the above pathological changes were significantly improved in each dose group of Xibining II formula, and all indicators were significantly decreased ( $P<0.05$ ), with the XBN II -H group showing better effects than the XBN II -L group ( $P<0.05$ ). Compared with the XBN II -H group, the above pathological damages were aggravated in the C-TFA group, and all indicators were significantly worsened ( $P<0.05$ ). **CONCLUSIONS** Xibining II formula can alleviate synovial inflammation and fibrosis in KOA rats, and its mechanism may be related to inhibiting the activation of JAK2/STAT3 pathway.

**KEYWORDS** Xibining II formula; knee osteoarthritis; synovial fibrosis; synovial inflammation; JAK2/STAT3 pathway

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种常见的退行性关节病变。据统计,全球约5.59亿骨关节炎患者中,KOA患者占40%~50%<sup>[1]</sup>。随着我国人口老龄化加剧,国内KOA患病率已达6.65%,且呈逐年上升趋势<sup>[2]</sup>。KOA的典型临床表现为膝关节疼痛、僵硬、肿胀及活动受限,疾病进展至终末期可出现关节畸形,严重影响患者生活质量<sup>[3]</sup>。膝关节滑膜炎是KOA中炎症与退变恶性循环的核心驱动环节<sup>[4]</sup>。滑膜纤维化作为滑膜炎的重要结局,是引发关节疼痛、痛觉敏化和僵硬等核心症状的关键因素<sup>[5]</sup>。现代医学认为,慢性炎症的持续刺激会导致滑膜细胞异常增殖,进而引发滑膜组织增厚、病理性增生,最终进展为纤维化,这一过程也使得滑膜纤维化成为慢性滑膜炎难以逆转的终末病理转归<sup>[6]</sup>。中医学根据其临床特征将KOA归为“积聚”范畴,核心病机概括为“本虚标实,瘀痰毒结,久病入络成癥”。由于KOA发病机制尚未完全明确,目前临床干预多局限于对症处理,仍缺乏可精准作用于滑膜炎症、软骨降解等核心病理环节的特异性疗法,因此探寻新的治疗靶点具有重要的临床价值。

膝痹宁II方是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,确立“温经活血、补益肝肾”治疗原则、提出“以痛为枢”诊疗思路后创立的经验方。本课题组前期研究已证实,该方可缓解KOA滑膜纤维化<sup>[7]</sup>。近年来有研究表明,Janus激酶2(Janus kinase 2, JAK2)/信号转导及转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)通路是调控纤维化进程的关键机制,干预该通路可有效缓解组织纤维化,故其在KOA滑膜纤维化中的作用也日益受到学者关注<sup>[8]</sup>。基于此,本研究采用前交叉韧带离断法构建大鼠KOA模型,探讨膝痹宁II方通过JAK2/STAT3通路缓解KOA滑膜炎症及纤维化的机制,以期为该病的临床治疗提供新策略。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

75只SPF级8周龄雄性SD大鼠(体重200~220 g)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,动物使用许可证号为SYXK(苏)2023-0077。饲养条件为:温度( $25\pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度( $60\pm 5$ )%、12 h明暗交替,大鼠自由进食、饮水。本研究动物实验经南京中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理批号202409A050)。

### 1.2 主要药品与试剂

膝痹宁II方组方药材(淡附片、制狗脊、山萸肉、桂枝、巴戟天、生薏苡仁、独一味、炒白芍、川牛膝、生甘草)均购自江苏省中医院,经江苏省海滨康复医院束雅春主任药师鉴定均为真品。

苏木精-伊红(HE)染色试剂盒、Masson染色试剂盒(货号分别为G1120、G1340)均购自北京索莱宝科技有限公司;戊巴比妥钠(货号F20020915)购自中国医药集团上海化学试剂公司;4%多聚甲醛(货号BL-G002)购自南京森贝伽生物科技有限公司;Colivelin三氟乙酸盐(Colivelin trifluoroacetate, C-TFA)(货号C287769)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;兔抗磷酸化JAK2(phosphorylated JAK2, p-JAK2)、JAK2、磷酸化STAT3(phosphorylated STAT3, p-STAT3)、STAT3一抗(货号分别为ab32101、ab108596、ab267373、ab68153)均购自英国Abcam公司;兔抗I型胶原蛋白(Collagen- I)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)一抗(货号分别为AF7001、AF1032)均购自江苏亲科生物研究中心有限公司;兔抗 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)一抗(货号20536-1-AP)购自武汉三鹰生物技术有限公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗、RIPA裂解液(货号分别为K1223、K1020)均购自美国APEX BIO公司;蛋白上样缓冲液(货号P0015)购自上海碧云天生物技术有限公司;无蛋白快速封闭液、RNA快速提取试剂盒(货号分别为G2052、G3607)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;大鼠白细胞介素1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、IL-18酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(货号分别为SYP-R0009、SYP-R0151)均购自杭州臻优品生物科技有限公司;PrimeScript<sup>TM</sup> RT试剂盒购自日本Takara公司;逆转录试剂盒、聚合酶链式反应(PCR)试剂盒(货号分别为R222-01、Q331-02)均购自南京诺唯赞生物科技有限公司;PCR引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

### 1.3 主要仪器

Mini Trans-Blot® Cell型蛋白电泳及转膜系统、LAS 4000型凝胶成像系统均购自美国Bio-Rad公司;JJ-12J型组织脱水机、JB-P5型石蜡包埋机均购自武汉俊杰电子有限公司;ECLIPSE Ti-SR型倒置荧光显微镜购自日本Nikon公司;QuantStudio 5型实时荧光定量PCR(qPCR)仪、Forma 900 Series型超低温冰箱、Multiskan SkyHigh全波长酶标仪均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;80-2型医用低速离心机购自常州峥嵘仪器有限公司;R-1005型旋转蒸发仪购自京华仪器有限责任公司。

## 2 方法

### 2.1 药液制备

取膝痹宁Ⅱ方组方药材(淡附片10 g、制狗脊10 g、山萸肉10 g、桂枝10 g、巴戟天10 g、生薏苡仁15 g、独一味10 g、炒白芍10 g、川牛膝10 g、生甘草5 g),加入600 mL水浸泡40 min后煎沸20 min,纱布过滤并二次煎煮10 min后合并煎煮液,用旋蒸仪浓缩成含生药0.684 g/mL的药液,于4℃环境下保存,备用<sup>[9]</sup>。

### 2.2 分组、建模与给药

将75只大鼠适应性饲养14 d后,随机分为假手术组(Sham组)、KOA组、膝痹宁Ⅱ低剂量组(XBNⅡ-L组)、膝痹宁Ⅱ高剂量组(XBNⅡ-H组)、膝痹宁Ⅱ高剂量联合STAT3激活剂C-TFA组(C-TFA组),每组15只。除Sham组外,其余4组大鼠均采用前交叉韧带离断法构建KOA模型:以腹腔注射3%戊巴比妥钠溶液(2 mL/kg)麻醉后,常规对膝关节区域备皮消毒;于膝关节内侧切开皮肤及皮下组织,暴露关节腔,以眼科镊辅助定位,并用手术刀片切断前交叉韧带;随后通过前抽屉试验阳性确认韧带完全离断,即造模成功<sup>[10]</sup>,再逐层缝合切口。Sham组大鼠仅进行备皮及关节囊切开暴露处理,不损伤韧带。

造模14 d后,依据文献[7, 11],XBNⅡ-L组大鼠每日灌胃4 g/kg膝痹宁Ⅱ方药液,并腹腔注射等体积生理盐水;XBNⅡ-H组与C-TFA组大鼠每日灌胃8 g/kg膝痹宁Ⅱ方药液,XBNⅡ-H组同时腹腔注射等体积生理盐水,C-TFA组同时腹腔注射C-TFA 1.0 mg/(kg·d);Sham组和KOA组大鼠每日灌胃并同时腹腔注射等体积生理盐水。各组大鼠均每日干预1次,持续28 d。

### 2.3 样本提取与保存

本次干预结束后,所有大鼠禁食12 h,经腹主动脉采血。血液样本于4℃、3 000 r/min离心15 min,分离血清并置于-80℃保存,备用。采血后,腹腔注射3%戊巴比妥钠(150 mg/kg)处死大鼠,沿髌韧带两侧切开膝关节,于髌骨上缘横向切断股四头肌远端,将髌骨及其周围组织翻向远端,充分暴露滑膜组织;使用手术刀片小心切

取滑膜组织适量,置于4%多聚甲醛中固定,以制备病理切片;其余大鼠滑膜组织装入冻存管,置于-80℃保存,用于后续实验。

### 2.4 大鼠膝关节滑膜组织病理学变化观察与指标计算

采用HE染色、Masson染色观察。取“2.3”项下经4%多聚甲醛固定的每组3只大鼠的膝关节滑膜组织,经梯度脱水后行石蜡包埋、切片。按照相应试剂盒说明书进行HE染色与Masson染色,以中性树胶封片后于显微镜下观察。HE染色后,根据Krenn滑膜炎评分标准计算Krenn评分<sup>[12]</sup>;Masson染色后,选取面积为100 μm<sup>2</sup>的总视野,测定大鼠滑膜组织中胶原纤维(呈蓝色)面积占总视野面积的比例,即为滑膜组织纤维化占比。

### 2.5 大鼠血清中IL-1β、IL-18水平检测

采用ELISA法检测。取“2.3”项下于-80℃保存的每组3只大鼠的血清样品,按照ELISA试剂盒说明书进行操作,检测各组大鼠血清中促炎因子(IL-1β和IL-18)的水平。

### 2.6 大鼠膝关节滑膜组织中p-JAK2、p-STAT3蛋白阳性表达检测

采用免疫组化法检测。取“2.3”项下经4%多聚甲醛固定的每组3只大鼠的膝关节滑膜组织,以石蜡包埋后制成5 μm厚的切片。切片依次经脱蜡、水化及抗原修复处理,以3%过氧化氢灭活内源性过氧化物酶,以磷酸盐缓冲液漂洗3次(每次15 min),再用10%牛血清白蛋白于室温封闭30 min;弃去封闭液后,分别滴加p-JAK2、p-STAT3一抗(稀释比例均为1:1 000),4℃孵育过夜;经磷酸盐缓冲液漂洗3次(每次15 min),加入相应二抗(稀释比例为1:5 000),室温孵育1 h;再次用磷酸盐缓冲液漂洗后,进行3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色和苏木精复染,经梯度脱水、透明处理后封片,于显微镜下观察,并使用Image J软件对p-JAK2、p-STAT3的蛋白表达水平进行半定量分析,即在每张切片中测定阳性染色区域(呈棕褐色)面积,以阳性面积百分比(阳性染色区域面积占整个组织切片视野面积的百分比)量化蛋白的阳性表达水平。

### 2.7 大鼠膝关节滑膜组织中JAK2/STAT3通路相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取“2.3”项下于-80℃保存的每组3只大鼠的膝关节滑膜组织,加入RIPA裂解液提取总蛋白,采用BCA法测定蛋白浓度。每孔上样30 μg已变性总蛋白,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,转至聚偏二氟乙烯膜;用无蛋白快速封闭液封闭1 h,随后于4℃孵育一抗(JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、Collagen-I、α-SMA的稀释比例均为1:1 000;β-actin的稀释比例为1:5 000)过夜;经TBST洗涤3次(每次10 min),再加入相应二抗(稀释比例为1:5 000)于室温孵育1 h。采用Image J软件分析,以

Collagen- I、 $\alpha$ -SMA 与内参蛋白( $\beta$ -actin)的条带灰度值比值表示目标蛋白的表达水平,并计算 p-JAK2 与 JAK2、p-STAT3 与 STAT3 的条带灰度值比值(p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3)。

2.8 大鼠膝关节滑膜组织中 JAK2/STAT3 通路相关因子 mRNA 表达检测

采用 qPCR 法检测。取“2.3”项下 -80℃ 保存的每组 3 只大鼠的膝关节滑膜组织,称取 20 mg 进行总 RNA 提取。提取完成后,通过分光光度法测定 RNA 的纯度与浓度,取 1  $\mu$ g 总 RNA,使用 PrimeScript™ RT 试剂盒合成 cDNA;取 1  $\mu$ L 反转录产物作为 qPCR 模板,进行后续检测。qPCR 反应体系总体积为 20  $\mu$ L,包括正、反向引物各 0.4  $\mu$ L, cDNA 模板 2  $\mu$ L, 2 $\times$ SYBR qPCR Master Mix 10  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 7.2  $\mu$ L。反应程序如下:预变性 95℃、30 s;循环反应 95℃、10 s, 60℃、30 s,共 40 个循环;熔解曲线设为 95℃、15 s, 60℃、60 s, 95℃、15 s。以  $\beta$ -actin 为内参,采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>法计算目的基因的表达水平,结果以 Sham 组为参照进行归一化处理。qPCR 引物序列及产物长度见表 1。

表 1 qPCR 引物序列及产物长度

| 基因             | 序列(5'→3')               | 产物长度/bp |
|----------------|-------------------------|---------|
| JAK2           | 正向:ACTGTCACGGCCCAATTCA  | 128     |
|                | 反向:AACGGCAAAGTCAAGGAAGT |         |
| STAT3          | 正向:AACCTCAGACCCGCCAACAA | 149     |
|                | 反向:CACCACGAAGGCACTCTTCA |         |
| Collagen-I     | 正向:GAGACAGGCGAACAAGGTGA | 185     |
|                | 反向:GGGAGACCGTTGAGTCCATC |         |
| $\alpha$ -SMA  | 正向:GGATCAGCGCCTTCAGTTCT | 107     |
|                | 反向:AGGGCTAGAAGGGTAGCACA |         |
| $\beta$ -actin | 正向:CGCGAGTACAACCTTCTTGC | 211     |
|                | 反向:CCTTCTGACCCATACCCACC |         |

2.9 统计学分析

使用 GraphPad Prism 9 软件进行数据分析。计量资料满足正态分布以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 膝痹宁 II 方对大鼠膝关节滑膜组织病理学变化的影响

HE 染色结果显示,Sham 组大鼠膝关节滑膜组织衬里层细胞排列规则,未见明显滑膜细胞增生及炎症细胞浸润;与 Sham 组比较,KOA 组大鼠膝关节滑膜组织出现缺损,衬里层细胞排列紊乱,炎症细胞浸润明显;与 KOA 组比较,XBN II-L 组、XBN II-H 组大鼠膝关节滑膜组织衬里层细胞排列趋于规则,炎症细胞浸润明显减轻,其中 XBN II-H 组的改善更明显;与 XBN II-H 组比较,C-TFA 组大鼠膝关节滑膜组织炎症细胞浸润程度加重。Masson 染色结果显示,Sham 组大鼠膝关节滑膜组织纤维化程度较低;与 Sham 组比较,KOA 组大鼠膝关节滑膜组织纤维化程度明显加重,可见大量胶原纤维沉积;与 KOA 组比较,XBN II-L 组、XBN II-H 组大鼠膝关节滑膜组织胶原纤维沉积及纤维化程度均得到不同程度缓解,其中 XBN II-H 组的改善更明显;与 XBN II-H 组比较,C-TFA 组大鼠膝关节滑膜组织的胶原纤维沉积和纤维化程度加重。HE 和 Masson 染色结果见图 1。

与 Sham 组比较,KOA 组大鼠膝关节滑膜组织 HE 染色 Krenn 评分、Masson 染色纤维化占比均显著升高 ( $P<0.05$ );与 KOA 组比较,XBN II-L 组、XBN II-H 组大鼠膝关节滑膜组织上述指标均显著降低 ( $P<0.05$ ),且 XBN II-H 组大鼠膝关节滑膜组织上述指标均显著低于 XBN II-L 组 ( $P<0.05$ );与 XBN II-H 组比较,C-TFA 组大鼠膝关节滑膜组织上述指标均显著升高 ( $P<0.05$ )。结果见表 2。

3.2 膝痹宁 II 方对大鼠血清 IL-18、IL-1 $\beta$  水平的影响

与 Sham 组比较,KOA 组大鼠血清促炎因子 IL-18、IL-1 $\beta$  水平均显著升高 ( $P<0.05$ );与 KOA 组比较,XBN II-L 组、XBN II-H 组大鼠血清上述指标水平均显著降低 ( $P<0.05$ ),且 XBN II-H 组大鼠血清上述指标水平均显著低于 XBN II-L 组 ( $P<0.05$ );与 XBN II-H 组比

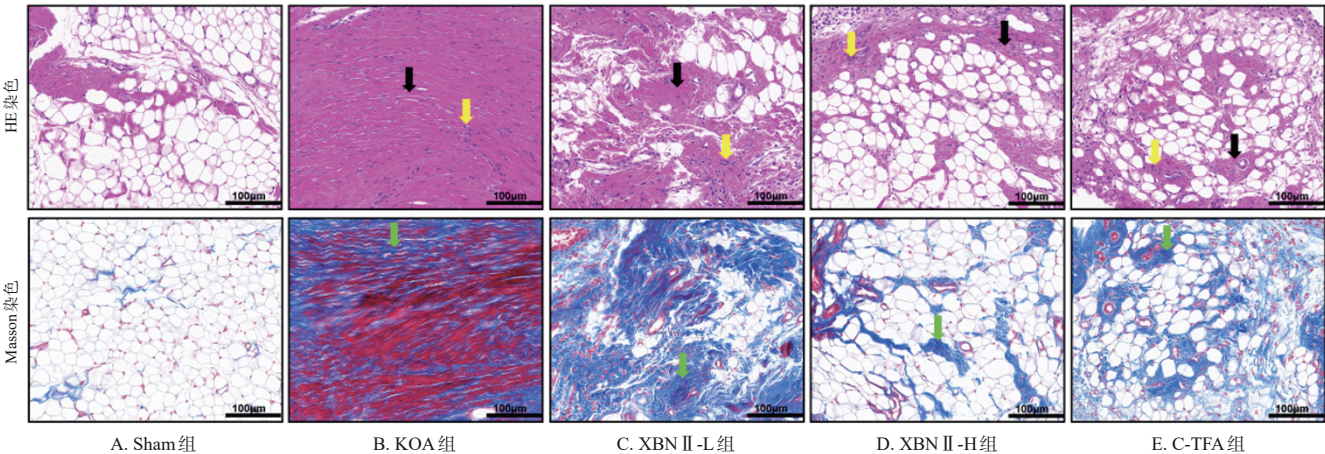


图 1 各组大鼠膝关节滑膜组织病理学观察的显微镜

较,C-TFA组大鼠血清上述指标水平均显著升高( $P<0.05$ )。结果见表2。

表2 各组大鼠膝关节滑膜组织 Krenn 评分、纤维化占比以及血清 IL-18、IL-1 $\beta$  水平比较( $\bar{x}\pm s,n=3$ )

| 组别        | Krenn评分/分                     | 纤维化占比/%                        | IL-1 $\beta$ /(pg/mL)          | IL-18/(pg/mL)                  |
|-----------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Sham组     | 0.57 $\pm$ 0.31               | 16.43 $\pm$ 1.18               | 23.36 $\pm$ 2.30               | 54.32 $\pm$ 2.05               |
| KOA组      | 5.71 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>  | 56.39 $\pm$ 1.95 <sup>a</sup>  | 55.96 $\pm$ 1.90 <sup>a</sup>  | 132.10 $\pm$ 7.29 <sup>a</sup> |
| XBN II-L组 | 4.17 $\pm$ 0.51 <sup>b</sup>  | 51.03 $\pm$ 2.67 <sup>b</sup>  | 47.58 $\pm$ 0.70 <sup>b</sup>  | 98.37 $\pm$ 3.07 <sup>b</sup>  |
| XBN II-H组 | 2.63 $\pm$ 0.47 <sup>bc</sup> | 30.61 $\pm$ 2.14 <sup>bc</sup> | 33.41 $\pm$ 0.95 <sup>bc</sup> | 64.48 $\pm$ 2.60 <sup>bc</sup> |
| C-TFA组    | 3.53 $\pm$ 0.44 <sup>d</sup>  | 35.18 $\pm$ 1.75 <sup>d</sup>  | 42.25 $\pm$ 2.60 <sup>d</sup>  | 113.27 $\pm$ 4.40 <sup>d</sup> |

a: 与 Sham 组比较,  $P<0.05$ ; b: 与 KOA 组比较,  $P<0.05$ ; c: 与 XBN II-L 组比较,  $P<0.05$ ; d: 与 XBN II-H 组比较,  $P<0.05$ 。

3.3 膝痹宁 II 方对大鼠膝关节滑膜组织中 p-JAK2、p-STAT3 阳性表达的影响

与 Sham 组比较, KOA 组大鼠膝关节滑膜组织中 p-JAK2、p-STAT3 阳性面积百分比均显著升高( $P<0.05$ ); 与 KOA 组比较, XBN II-L 组、XBN II-H 组大鼠膝关节滑膜组织中上述指标均显著降低( $P<0.05$ ), 且 XBN II-H 组大鼠滑膜组织中上述指标均显著低于 XBN II-L 组( $P<0.05$ ); 与 XBN II-H 组比较, C-TFA 组大鼠膝关节滑膜组织中上述指标均显著升高( $P<0.05$ )。结果见表 3、图 2。

表3 各组大鼠膝关节滑膜组织中 p-JAK2、p-STAT3 阳性面积百分比比较( $\bar{x}\pm s,n=3$ )

| 组别        | p-JAK2 阳性面积百分比/%               | p-STAT3 阳性面积百分比/%              |
|-----------|--------------------------------|--------------------------------|
| Sham组     | 12.29 $\pm$ 1.23               | 13.92 $\pm$ 1.23               |
| KOA组      | 59.57 $\pm$ 2.98 <sup>a</sup>  | 60.23 $\pm$ 1.94 <sup>a</sup>  |
| XBN II-L组 | 48.35 $\pm$ 3.06 <sup>b</sup>  | 46.99 $\pm$ 3.06 <sup>b</sup>  |
| XBN II-H组 | 29.22 $\pm$ 1.87 <sup>bc</sup> | 30.99 $\pm$ 1.50 <sup>bc</sup> |
| C-TFA组    | 39.24 $\pm$ 2.21 <sup>d</sup>  | 40.86 $\pm$ 1.45 <sup>d</sup>  |

a: 与 Sham 组比较,  $P<0.05$ ; b: 与 KOA 组比较,  $P<0.05$ ; c: 与 XBN II-L 组比较,  $P<0.05$ ; d: 与 XBN II-H 组比较,  $P<0.05$ 。

3.4 膝痹宁 II 方对大鼠膝关节滑膜组织 JAK2/STAT3 通路相关蛋白表达的影响

与 Sham 组比较, KOA 组大鼠 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 和 Collagen-I、 $\alpha$ -SMA 蛋白的表达水平均显著升高( $P<0.05$ ); 与 KOA 组比较, XBN II-L 组、

XBN II-H 组大鼠膝关节滑膜组织中上述指标水平均显著降低( $P<0.05$ ), 且 XBN II-H 组大鼠膝关节滑膜组织中上述指标水平均显著低于 XBN II-L 组( $P<0.05$ ); 与 XBN II-H 组比较, C-TFA 组大鼠膝关节滑膜组织中上述指标水平均显著升高( $P<0.05$ )。结果见图 3、表 4。

3.5 膝痹宁 II 方对大鼠膝关节滑膜组织 JAK2/STAT3 通路相关因子 mRNA 表达的影响

与 Sham 组比较, KOA 组大鼠膝关节滑膜组织中 JAK2、STAT3、Collagen-I、 $\alpha$ -SMA mRNA 的表达水平均显著升高( $P<0.05$ ); 与 KOA 组比较, XBN II-L 组、XBN II-H 组大鼠膝关节滑膜组织中上述 mRNA 的表达水平均显著降低( $P<0.05$ ), 且 XBN II-H 组大鼠膝关节滑膜组织中上述 mRNA 的表达水平均显著低于 XBN II-L 组( $P<0.05$ ); 与 XBN II-H 组比较, C-TFA 组大鼠膝关节滑膜组织中上述 mRNA 的表达水平均显著升高( $P<0.05$ )。结果见表 5。

4 讨论

KOA 病变不仅累及骨骼与软骨, 滑膜炎症也全程参与其进展过程<sup>[13]</sup>。目前临床常用的非甾体抗炎药虽可缓解疼痛, 但存在肝肾损伤、胃肠道反应等不良反应<sup>[14]</sup>。因此, 研发能够有效控制 KOA 疼痛、炎症及纤维化, 且安全性更高的替代疗法具有重要临床意义。中药复方膝痹宁 II 方在缓解疼痛、控制炎症方面具有独特优势, 且副作用较少。前期临床研究证实, 该方联合西药治疗寒湿痹阻型 KOA 的疗效优于单用西药<sup>[15]</sup>。基础实验也表明, 膝痹宁 II 方可通过抑制转化生长因子  $\beta$ /Smad 同源物 3 介导的巨噬细胞-肌成纤维细胞转化, 改善 KOA 滑膜纤维化<sup>[5]</sup>。

滑膜慢性炎症是 KOA 进展的关键驱动因素, 其持续释放的 IL-1 $\beta$  等炎症介质可激活成纤维样滑膜细胞, 导致细胞外基质过度沉积与滑膜纤维化, 进而加速关节结构破坏与功能恶化<sup>[16]</sup>。炎症因子与蛋白可通过 JAK2/STAT3 通路调控 KOA 病程中的炎症、血管生成、细胞外

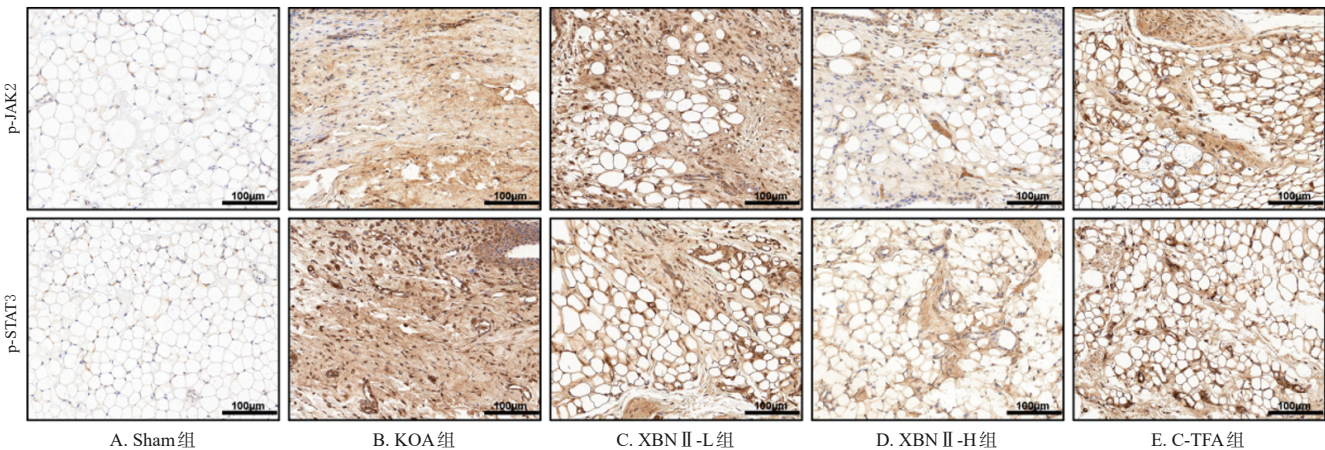
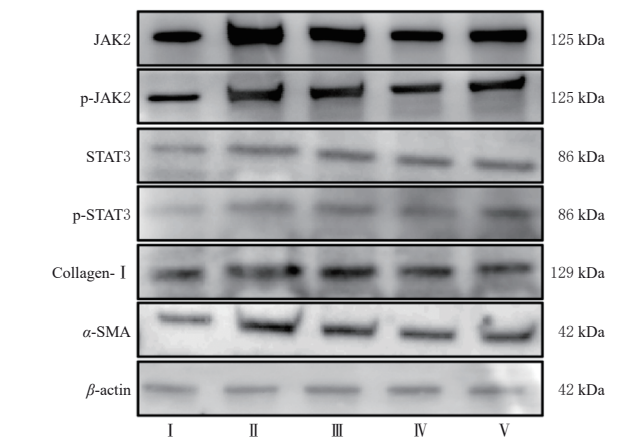


图2 各组大鼠膝关节滑膜组织中 p-JAK2、p-STAT3 阳性表达的免疫组化图



I : Sham组; II : KOA组; III : XBN II -L组; IV : XBN II -H组; V : C-TFA组。

图3 各组大鼠膝关节滑膜组织中JAK2/STAT3通路相关蛋白表达的电泳图

表4 各组大鼠膝关节滑膜组织中JAK2/STAT3通路相关蛋白表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别         | p-JAK2/JAK2                   | p-STAT3/STAT3                 | Collagen- I / $\beta$ -actin  | $\alpha$ -SMA/ $\beta$ -actin |
|------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Sham组      | 0.50 $\pm$ 0.02               | 0.41 $\pm$ 0.05               | 0.32 $\pm$ 0.03               | 0.21 $\pm$ 0.02               |
| KOA组       | 0.85 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>  | 0.90 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>  | 0.95 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>  | 0.85 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>  |
| XBN II -L组 | 0.76 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>  | 0.79 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>  | 0.53 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>  | 0.47 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>  |
| XBN II -H组 | 0.64 $\pm$ 0.04 <sup>bc</sup> | 0.63 $\pm$ 0.02 <sup>bc</sup> | 0.40 $\pm$ 0.01 <sup>bc</sup> | 0.28 $\pm$ 0.02 <sup>bc</sup> |
| C-TFA组     | 0.74 $\pm$ 0.04 <sup>d</sup>  | 0.81 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>  | 0.52 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>  | 0.41 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>  |

a: 与Sham组比较,  $P<0.05$ ; b: 与KOA组比较,  $P<0.05$ ; c: 与XBN II -L组比较,  $P<0.05$ ; d: 与XBN II -H组比较,  $P<0.05$ 。

表5 各组大鼠膝关节滑膜组织中JAK2/STAT3通路相关因子mRNA表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别         | JAK2 mRNA                     | STAT3 mRNA                    | Collagen- I mRNA              | $\alpha$ -SMA mRNA            |
|------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Sham组      | 1.00 $\pm$ 0.02               | 1.00 $\pm$ 0.04               | 1.00 $\pm$ 0.06               | 1.00 $\pm$ 0.03               |
| KOA组       | 3.27 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>  | 2.83 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>  | 3.42 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>  | 3.31 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>  |
| XBN II -L组 | 2.27 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>  | 2.03 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>  | 2.25 $\pm$ 0.36 <sup>b</sup>  | 1.81 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>  |
| XBN II -H组 | 1.49 $\pm$ 0.29 <sup>bc</sup> | 1.45 $\pm$ 0.11 <sup>bc</sup> | 1.50 $\pm$ 0.23 <sup>bc</sup> | 1.22 $\pm$ 0.19 <sup>bc</sup> |
| C-TFA组     | 2.20 $\pm$ 0.32 <sup>d</sup>  | 1.92 $\pm$ 0.04 <sup>d</sup>  | 1.72 $\pm$ 0.22 <sup>d</sup>  | 1.55 $\pm$ 0.24 <sup>d</sup>  |

a: 与Sham组比较,  $P<0.05$ ; b: 与KOA组比较,  $P<0.05$ ; c: 与XBN II -L组比较,  $P<0.05$ ; d: 与XBN II -H组比较,  $P<0.05$ 。

基质降解及软骨细胞凋亡等病理过程<sup>[17-18]</sup>。已有研究表明,独活寄生汤可通过靶向调控JAK2/STAT3通路及软骨细胞凋亡延缓KOA进展,证实KOA中存在炎症相关的JAK2/STAT3通路活化,抑制该通路可缓解关节退变<sup>[19]</sup>。为进一步明确膝痹宁II方对KOA大鼠体内炎症的影响,本研究通过血清ELISA检测发现,与Sham组比较,KOA组大鼠血清促炎因子IL-18、IL-1 $\beta$ 水平均显著升高;与KOA组比较,经膝痹宁II方干预后,上述指标水平呈剂量依赖性下降趋势,C-TFA联合处理可逆转XBN II -H对上述指标的改善作用。由此可见,膝痹宁II方干预可抑制KOA大鼠体内炎症因子释放,进而发挥缓解滑膜炎症的作用。

JAK2/STAT3通路是介导KOA滑膜炎症及纤维化的关键靶点,IL-1 $\beta$ 、IL-6可通过激活该通路来促进炎症释放与细胞外基质异常沉积,加速KOA进展;抑制

JAK2/STAT3通路可减轻滑膜炎症及纤维化、延缓病情进展<sup>[20-21]</sup>。已有研究证实,抑制花生四烯酸-5-脂氧酶可通过JAK2/STAT3通路缓解KOA进展<sup>[22]</sup>。在JAK2/STAT3通路中,JAK2通过磷酸化激活关键下游转录因子STAT3,是启动下游基因调控和生物学效应的核心步骤<sup>[23]</sup>。既往研究已证实,C-TFA能够激活STAT3<sup>[24-25]</sup>,使用C-TFA可直接激活该通路的核心转录因子,有效模拟JAK2活化后的下游关键信号传递,从而明确验证实验体系中STAT3依赖性通路的激活状态及相关表型。尽管JAK激动剂是激活上游通路的常用选择,但STAT3作为JAK通路最关键的效应分子之一,直接激活STAT3即可高效诱导经典的下游信号事件,是验证通路功能的有效策略<sup>[26]</sup>。据此,本研究设计了膝痹宁II高剂量联合C-TFA的干预方案,通过组织病理学、Western blot、qPCR及滑膜组织免疫组化实验验证其效果。组织病理学结果显示,KOA模型组大鼠滑膜组织存在明显细胞损伤及炎症细胞浸润;经不同剂量膝痹宁II方干预后,上述病理改变均得到不同程度改善,其中XBN II -H组的缓解效果优于XBN II -L组;而经C-TFA腹腔注射激活STAT3后,膝痹宁II方对滑膜的保护作用被逆转,滑膜组织损伤与炎症细胞浸润均较XBN II -H组更严重。Western blot和qPCR检测结果显示,与Sham组比较,KOA组滑膜组织中p-JAK2、p-STAT3及纤维化标志物Collagen-I、 $\alpha$ -SMA的表达水平,以及JAK2、STAT3、Collagen-I、 $\alpha$ -SMA mRNA的表达水平均显著升高;经膝痹宁II方干预后,上述指标的表达呈剂量依赖性下降趋势;而C-TFA联合处理可逆转XBN II -H对上述指标的改善作用。滑膜组织免疫组化检测结果的变化趋势与上述发现一致。由此可见,膝痹宁II方通过抑制JAK2/STAT3通路缓解膝骨关节炎滑膜炎症与纤维化,而激活该通路可逆转该方的保护作用。

本研究存在一定局限性:未设置阳性对照药物,因此难以客观评估膝痹宁II方相较于现有临床常规药物的治疗优势与效应差异;C-TFA的给药剂量主要参考其在阿尔茨海默病模型中的文献报道,目前尚无该剂量在KOA模型中直接激活STAT3的文献依据。

综上,膝痹宁II方可减轻KOA大鼠滑膜炎症与纤维化,其机制可能与抑制JAK2/STAT3通路激活有关。

## 参考文献

- [1] GBD 2021 Rheumatoid Arthritis Collaborators. Global, regional, and national burden of rheumatoid arthritis, 1990-2020, and projections to 2050: a systematic analysis of the global burden of disease study 2021[J]. Lancet Rheumatol, 2023, 5(10): e594-e610.
- [2] 冯晓晴,蔡道章,余星磊,等. 基于GBD大数据中国膝骨关节炎疾病负担现状与趋势分析[J]. 现代预防医学,

2022,49(10):1753-1760.

- [3] 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.
- [4] Sellam J, Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2010, 6(11):625-635.
- [5] Zhang L, Xing R L, Huang Z Q, et al. Synovial fibrosis involvement in osteoarthritis[J]. Front Med, 2021, 8: 684389.
- [6] Zhang L, Li M C, Li X C, 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.
- [7] 施蕾, 刘德仁, 刘江宇, 等. 膝痹宁Ⅱ方抑制 TGF- $\beta$ /Smad3 介导巨噬细胞-肌成纤维细胞的转化改善 KOA 滑膜纤维化[J]. 南京中医药大学学报, 2026, 42(3): 388-397.
- [8] 吴孝政, 黄高, 王力子, 等. 玉屏风散对博来霉素诱导的肺纤维化大鼠中 JAK2/STAT3 信号通路的干预机制研究[J]. 时珍国医国药, 2025, 36(15):2861-2870.
- [9] 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.
- [10] 胡恩睿, 魏义保, 刘德仁, 等. 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[J]. 中国药房, 2026, 37(3):324-330.
- [11] Chiba T, Yamada M, Hashimoto Y, et al. Development of a femtomolar-acting humanin derivative named Colivelin by attaching activity-dependent neurotrophic factor to its N terminus; characterization of Colivelin-mediated neuroprotection against Alzheimer's disease-relevant insults *in vitro* and *in vivo*[J]. J Neurosci, 2005, 25(44):10252-10261.
- [12] 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.
- [13] Ivanovska A, Mancuso P, Burke A, et al. Identification of disease-stage therapeutic responses of mesenchymal stromal cells retrieved from murine osteoarthritic joints[J]. Front Cell Dev Biol, 2025, 13:1521437.
- [14] Zhang L, Xing R L, Huang Z Q, et al. Inhibition of synovial macrophage pyroptosis alleviates synovitis and fibrosis in knee osteoarthritis[J]. Mediators Inflamm, 2019, 2019:2165918.
- [15] 曹子丰, 梅伟, 张立, 等. 膝痹宁Ⅱ方内服治疗寒湿痹阻型膝骨关节炎临床疗效的回顾性队列研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(14):122-129.
- [16] 魏义保, 马振源, 廖太阳, 等. “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[J]. 中国药房, 2024, 35(4):407-412.
- [17] 刘建华, 赵海勇, 温芳, 等. 炎性细胞因子在膝骨关节炎中的表达及与高敏 C 反应蛋白和红细胞沉降率的相关性[J]. 天津医药, 2020, 48(1):55-58.
- [18] 朱宇喆, 王其澜, 梁琦兴, 等. 基于 JAK2/STAT3 通路探讨独活寄生汤治疗膝骨关节炎的作用机制[J]. 浙江中医杂志, 2025, 60(12):1112-1116.
- [19] 李宏军, 钱亮, 邓新超, 等. 舒筋活血胶囊通过 JAK2/STAT3 通路缓解大鼠膝骨关节炎的机制研究[J]. 天津医药, 2023, 51(9):961-967.
- [20] 向文远, 邓迎杰, 热米拉·艾买提, 等. 基于 JAK2/STAT3 信号通路探讨补肾痹通方抑制 ECM 降解及炎症反应对骨关节炎大鼠软骨保护的作用[J]. 新疆医科大学学报, 2026, 49(2):145-152.
- [21] Cota P, Helmi S A, Hsu C, et al. Cytokine directed chondroblast trans-differentiation: JAK inhibition facilitates direct reprogramming of fibroblasts to chondroblasts[J]. Cells, 2020, 9(1):191.
- [22] Zou F Z, Zhang K M, Sun X D, et al. Inhibiting arachidonate-5-lipoxygenase expression ameliorates osteoarthritis progression by suppressing ferroptosis via the JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. Free Radic Biol Med, 2026, 246:334-349.
- [23] O'Shea J J, Schwartz D M, Villarino A V, et al. The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention[J]. Annu Rev Med, 2015, 66:311-328.
- [24] 姜敬敏. 桑根皮活性成分桑辛素通过下调 STAT3 表达减轻力竭运动诱导的肾损伤[J]. 分子植物育种, 2025, 23(21):7278-7285.
- [25] 杨丽娜, 孔慧, 贾平. 藏红花酸通过下调 STAT3 活性抑制糖尿病视网膜病变[J]. 眼科新进展, 2025, 45(7): 526-532.
- [26] Johnson D E, O'Keefe R A, Grandis J R. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15(4):234-248.

(收稿日期:2026-04-23 修回日期:2026-06-11)

(本文责编:舒安琴)