

DOI: 10.13210/j.cnki.jhmu.20241106.004

网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20241106.1656.008>

消瘀散精简方新组方凝胶贴透皮成分的探究及其对骨关节炎大鼠软骨损伤和滑膜炎的治疗作用

张 玉¹, 杨 然¹, 刘 芳², 娄祺祺¹, 金立伦¹, 滕蔚然¹✉

(1. 上海交通大学医学院附属新华医院中医科, 上海 200092; 2. 上海交通大学医学院附属新华医院老年科, 上海 200092)

[摘要] **目的:** 研究消瘀散精简方新组方凝胶贴对骨关节炎(osteoarthritis, OA)大鼠的透皮吸收成分以及治疗作用和生物安全性。**方法:** 通过Franz扩散池法模拟皮肤透皮吸收过程, 采用超高效液相色谱-高分辨质谱联用方法(UPLC-Q-TOF/MS)对消瘀散精简方新组方凝胶贴透皮接受液进行成分分析; 将24只大鼠分为假手术组、OA模型组、阳性对照组(氟比洛芬凝胶贴)、实验组(消瘀散精简方新组方凝胶贴)4组, 每组6只, 除假手术组外其余组通过前交叉韧带横断术(anterior cruciate ligament transection, ACLT)建立OA大鼠模型, 造模后1周将消瘀散精简方新组方凝胶贴作为实验药物外敷于大鼠膝关节, 连续用药21 d后收集眼眶血及膝关节标本, 利用苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, H&E)染色法和番红-固绿(safranin O-fast green, Safranin O)染色法分析各组大鼠膝关节软骨损伤严重程度; 利用H&E染色法评估大鼠膝关节滑膜炎严重程度; 采用免疫组化法检测各组软骨中Ⅱ型胶原(collagen type Ⅱ alpha 1, Col2a1)、基质金属蛋白酶13(matrix metalloproteinase 13, MMP13)与半胱氨酸蛋白酶3(Caspase 3)的表达及各组滑膜中诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、肿瘤坏死因子- α (tumour necrosis factor alpha, TNF- α)的表达; 利用酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)分析各组大鼠血清炎症因子TNF- α 、白介素-17(interleukin 17, IL-17)水平, 利用H&E染色分析各组大鼠组织器官结构评估生物安全性。**结果:** (1) 消瘀散精简方新组方凝胶贴透皮成分含有28种原型成分, 包含君药大黄中的6-甲基-大黄酸、大黄酸。(2) 经过21 d外敷治疗后消瘀散精简方新组方凝胶贴与氟比洛芬凝胶贴可治疗OA大鼠关节软骨损伤和滑膜炎, 并且消瘀散精简方新组方凝胶贴的治疗效果更优。消瘀散精简方新组方凝胶贴组大鼠膝关节软骨Col2a1的表达明显上调, MMP13与Caspase 3的表达被明显抑制($P < 0.05$)。(3) 应用氟比洛芬凝胶贴膏与消瘀散精简方新组方凝胶贴治疗后能缓解大鼠滑膜炎, 免疫组化染色进一步表明消瘀散精简方新组方凝胶贴组大鼠滑膜TNF- α 和iNOS的表达明显下调($P < 0.05$)。(4) ELISA结果表明OA发生、发展过程及消瘀散精简方新组方凝胶贴治疗过程中不会引起全身性的炎症因子TNF- α 、IL-17上调, 同时消瘀散精简方新组方凝胶贴外敷治疗后各组大鼠组织器官的微观结构正常且无明显炎症浸润。**结论:** 消瘀散精简方新组方凝胶贴透皮成分包含君药大黄中的6-甲基-大黄酸、大黄酸等, 消瘀散精简方新组方凝胶贴通过促进关节软骨基质合成, 抑制软骨细胞凋亡和滑膜炎因子表达治疗OA, 同时还具有良好生物安全性。有望进一步通过安全性和有效性评估以推进临床转化。

[关键词] 骨关节炎; 软骨损伤; 滑膜炎; 透皮消瘀散精简方新组方凝胶贴

[中图分类号] R285.5; R283.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-5953(2026)01-0010-10

Study on the transdermal components of the new formula gel patch compound of the Xiaoyusan and its therapeutic effect on cartilage injury and synovitis in rats with osteoarthritis

ZHANG Yu¹, YANG Ran¹, LIU Fang², LOU Qiqi¹, JIN Lilun¹, TENG Weiran¹✉

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, Xinhua Hospital Affiliated Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China; 2. Department of Geriatrics, Xinhua Hospital Affiliated Shanghai Jiao Tong University School of Medicine,

[基金项目] 上海市科委项目(20S21900200); 上海市卫健委项目[ZY(2021-2023)-03-02-25, 2024002]

[作者简介] 张玉, E-mail: zhangyu02022@163.com。

[通讯作者] 滕蔚然, 博士, 副主任医师, E-mail: tengweiran2024@163.com。

[收稿日期] 2024-08-26 **[修回日期]** 2024-10-15 **网络出版时间:** 2024-11-07 11:04:14

Shanghai 200092, China)

[Foundation Project]: This study was supported by the Shanghai Science and Technology Commission Project (20S21900200); Shanghai Municipal Health Commission Project [ZY (2021-2023) -03-02-25, 2024002]

[Author]: ZHANG Yu, E-mail: zhangyu02022@163.com.

[Correspondence to]: TENG Weiran, Ph.D., Associate Chief Physician, E-mail: tengweiran2024@163.com.

Received: 2024-08-26

Revised: 2024-10-15

JHMu, 2026;32(1):10-19

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objective:** To study the transdermal absorption of ingredients, therapeutic effect and biosafety of the new formula gel patch compound of the Xiaoyusan in osteoarthritis (OA) rats. **Methods:** The skin transdermal absorption process was simulated by Franz diffusion cell method, and the new formula gel patch compound of the Xiaoyusan receiving solution was analyzed by UPLC-Q-TOF/MS. 24 rats were divided into sham operation group, OA model group, positive control group (Flurbiprofen Cataplasms) and experimental group (the new formula gel patch compound of the Xiaoyusan) with 6 rats in each group. All rats underwent anterior cruciate ligament transection (ACLT) except the sham operation group. The OA rat model was established by ACLT. One week after the model was made, the new formula gel patch compound of the Xiaoyusan was applied to the knee joint of the rat as an experimental drug. Orbital blood and knee joint specimens were collected after continuous treatment for 21 days, and hematoxylin-eosin (H&E) staining and safranin O-fast green (Safranin O) staining were used to analyze the severity of knee cartilage injury in each group. H&E staining was used to evaluate the severity of knee synovitis. The expression of collagen type II alpha 1 (Col2a1), matrix metalloproteinase 13 (MMP13), and caspase 3 in cartilage, as well as the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and tumour necrosis factor alpha (TNF- α) in synovium, was detected using immunohistochemistry in each group; enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to analyze the levels of serum inflammatory cytokines TNF- α and interleukin 17 (IL-17) in each group. The tissue and organ structure of each group was analyzed by H&E staining to evaluate the biosafety. **Results:** (1) The new formula gel patch compound of the Xiaoyusan contain 28 prototype ingredients, including 6-methyl-rhein and rhein in imperial medicine Rhubarb. (2) After 21 days of external application treatment, both the new formula gel patch compound of the Xiaoyusan and Flurbiprofen Cataplasms can save articular cartilage injury and synovial inflammation in OA rats, and the therapeutic effect of the new formula gel patch compound of the Xiaoyusan is better. The expression of Col2a1 was significantly up-regulated, and the expressions of MMP13 and Caspase 3 were significantly inhibited ($P<0.05$). (3) The treatment of flurbiprofen gel paste and the new formula gel patch compound of the Xiaoyusan can alleviate synovial inflammation in rats. Immunohistochemical staining further indicated that the expression of TNF- α and iNOS in synovial membrane of rats in the new formula gel patch compound of the Xiaoyusan group was significantly down-regulated ($P<0.05$). (4) ELISA results showed that the occurrence and development of OA and the treatment of the new formula gel patch compound of the Xiaoyusan did not cause the up-regulation of systemic inflammatory factors TNF- α and IL-17. Meanwhile, after external treatment of the new formula gel patch compound of the Xiaoyusan, the microstructure of tissues and organs of rats in each group were normal and there was no obvious inflammatory infiltration. **Conclusion:** The new formula gel patch compound of the Xiaoyusan contains 6-methyl-rhein and rhein, which are found in rhubarb. The new formula gel patch compound of the Xiaoyusan can promote the synthesis of cartilage matrix, inhibit the apoptosis of chondrocytes and the expression of synovial inflammatory factors in the treatment of OA, and has good biosafety. It is expected to further promote clinical conversion through safety and efficacy evaluation.

[Key words] Osteoarthritis(OA); Cartilage injury; Synovitis; Transdermal the new formula gel patch compound of the Xiaoyusan

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种以关节软骨损伤、滑膜炎症、骨赘形成和软骨下骨硬化为主要特征的退行性关节疾病^[1],其中膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)占OA患者的70%~80%^[2,3]。随着老龄化趋势的加剧,KOA的发病率明显上升,给家庭和社会带来沉重负担,因此研发安全有效的KOA治疗药物成为亟待解决的重大课题^[4],国际骨关节炎研究学会(Osteoarthritis Research Society International, OARSI)建议的非手术疗法主要是口服非甾体抗炎药,尽管这些药物能缓解部分症状,但长期应用可能会引起诸多不良反应^[5,6]。与现代医学主要以抗炎止痛等对症治疗不同的是,中医药在

治疗OA方面具有独特的优势^[7-9],不仅可以缓解患者疼痛,也可以有效延缓甚至逆转关节软骨损伤^[10]。《膝骨关节炎中医诊疗指南2020版》建议KOA患者全程选择中成药贴膏治疗。

消瘀散方是上海著名流派魏氏伤科的经验方,魏氏伤科疗法被列入第五批国家级非物质文化遗产代表性项目名录。消瘀散原方为十六味药,成分复杂,容易造成过敏现象,本研究在前期临床基础和动物实验中,选取了其中发挥主要作用的8味药(大黄、紫荆皮、蒲公英、乳香、当归、没药、丹参和泽兰),组成消瘀散精简方新组方,具有清热除湿,活血化瘀,通络止痛的功效,将其制备成消瘀散精简

方新组方凝胶贴膏,简称消瘀散精简方凝胶贴,不仅解决黑布膏使用不便的情况,还避免原方组成成分过多而造成的过敏现象。本课题组前期研究表明:消瘀散在临床上对踝关节软组织损伤和KOA方面治疗效果明显,且副作用低^[11,12];消瘀散新组方对KOA兔关节软骨的损伤具有修复作用,降低了软骨组织中基质金属蛋白酶13(MMP13)的表达水平^[11,12]。

消瘀散精简方新组方凝胶贴膏通过膝关节局部用药直达病灶,具有发挥药效快,全身副作用小等优势,但其透过皮肤到达体内的成分尚不明确,因此本研究采用体外透皮扩散实验来模拟外用制剂的体内透皮吸收过程,利用超高效液相色谱-高分辨质谱联用方法(UPLC-Q-TOF/MS)对消瘀散精简方新组方凝胶贴透皮接受液所含成分进行分析,探究君臣佐药透过皮肤吸收入体内的成分,透皮成分的确定为进一步阐明消瘀散精简方新组方凝胶贴的药理活性及质量标准的提升提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要设备 SQP型分析天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;MK-GBI型搅拌机,厦门建松电器有限公司;TB-0612B型涂布机,上海铠凯科技贸易有限公司;Waters H-Class超高效液相色谱仪,沃特世科技有限公司;TK-12D Franz扩散池,上海铠凯科技贸易有限公司;KQ-300 BD型超声清洗仪,昆山市超声仪器有限公司;AB Sciex Triple TOF® 4600 高分辨质谱,SCIEX公司。

1.1.2 试剂和药物 甘油:国药集团化学试剂有限公司,批号:190525;甘羟铝:上海冠英生物科技有限公司,批号:SG-0494;聚丙烯酸钠(Viscomate NP700):日本昭和电工株式会社,批号:190721;酒石酸:成都华邑药用辅料有限公司,批号:190625;高岭土:上海麦克林,批号:K812209;卡波姆981:上海泛科史康医药科技有限公司,批号:20210701;乙腈、甲醇(批号分别为:I1232729230、I1243235239)购自Merck公司;甲酸:上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:B2307771;氟比洛芬(批号:211091.01)兔源iNOS单克隆抗体(货号:A0277);TNF- α 抗体(批号:A3774)购自爱博泰克武汉生物科技有限公司;兔源Collagen Type II多克隆抗体、兔源MMP13多克隆抗体、兔源Caspase3多克隆抗体(批号分别为:28459-1-AP、18165-1-AP、19677-1-AP)购于武汉三鹰生物技术有限公司;免疫组化二抗山羊抗兔免疫球蛋白G(Ig G)、免疫组

化二抗山羊抗鼠免疫球蛋白G(Ig G)二抗(批号:GB23303、GB23301)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;

1.1.3 动物 SD大鼠,雄性,SPF级,体重200~220 g,6~8周24只和2周6只,购自上海必凯科翼生物科技有限公司,实验动物的生产许可证号:SCXK(沪)2023-0009;动物实验方案经上海交通大学医学院附属新华医院伦理委员会审核批准,批准号:XHEC-F-2024-077。

1.2 消瘀散精简方新组方凝胶贴的制备

消瘀散精简方新组方凝胶贴由本课题组自制,制备工艺如下:将处方中8味药材熬煎成原液,加热70℃时,将药液减压浓缩至350 mL的稠膏状。称取处方量的甘羟铝、NP700和高岭土,将其分散到甘油中,均匀搅拌,得到A相;将处方量的卡波姆981加入适量的水使其充分溶胀后,加入酒石酸,得到B相。将浓缩稠膏溶解于适量水中,搅拌均匀得C相,将C相与B相搅拌均匀后加入到A相中,继续搅拌均匀至可涂布状态,于涂布机上涂布展开,切片,即得。

1.3 基于UPLC-Q-TOF-MS的消瘀散精简方凝胶贴的透皮成分分析

1.3.1 Franz扩散池体外透皮实验 用脱毛膏将6只2周大鼠腹部脱毛,剪下腹部皮肤后剔除皮下组织、筋膜和脂肪,用生理盐水漂洗后即取即用。透皮扩散装置采用垂直式Franz扩散池,以生理盐水作为接收液。将离体鼠皮真皮层朝向接受室置于扩散池上,用固定夹固定,接受液紧贴皮肤,排空气泡,将消瘀散精简方凝胶贴剪取0.1 g贴于离体鼠皮,设置循环水浴温度为(32±0.5)℃,转速为300 r/min,于设定的时间24 h时用弯头取样针取样,取出全部接受液。

1.3.2 供试品溶液制备 取消瘀散凝胶贴透皮实验接收液样品冷冻浓缩干燥。取冻干样品0.1 g,精密称定,加20%甲醇1 mL使溶解,混匀,12 000 r/min离心5 min,取上清液,即得。

1.3.3 色谱条件 Waters ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱(2.1 mm×150 mm, 1.8 μ m),柱温30℃,流速0.3 mL/min,进样量4 μ L,检测波长190~400 nm;流动相比例:A相乙腈,B相0.1%甲酸水溶液,梯度洗脱(0~3 min,3%A;3~8 min,3%→8%A;8~25 min,8%→20%A,25~35 min,20%→30%A;35~40 min,30%→60%A;40~45 min,60%→95%A;45~48 min,95%A;48~48.1 min,95%→3%A;48.1~51 min,3%A)。

1.3.4 质谱条件 质谱检测的设置包含ESI负离子/正离子模式, TOF mass range质量范围为50~1 700; 去簇电压为100 V; 碰撞电压为 ± 40 eV; 离子化电压为-4 500/5 000 V; 离子释放延迟为30 ms。

1.3.5 透皮成分分析数据处理 对于透皮成分数据的分析, 是通过Analyst TF 1.7.1软件进行采集, 利用Peakview 1.2软件进行处理。在鉴定过程中, 将质谱数据与Natural Products HR-MS/MS Spectral Library 1.0进行比对, 依据色谱峰的得分对化合物进行初步筛选。然后结合各色谱峰的一级和二级质谱信息对化合物进行确认。对于库中未包含的化合物, 则依据查阅相关文献以及质谱裂解特征等方法进行鉴定。

1.4 消瘀散精简方凝胶贴对骨关节炎大鼠软骨损伤和滑膜炎的治疗作用

1.4.1 造模、分组及给药 根据随机数字表法将24只8周龄的雄性SD大鼠随机分为假手术组、OA模型组、氟比洛芬凝胶贴组、消瘀散精简方凝胶贴组, 每组6只。除空白组, 其余3组大鼠在适应性喂养1周后在水合氯醛麻醉下, 四肢固定于超净台中, 膝关节部位内侧切口暴露膝关节, 使用ACLT建立膝关节炎大鼠模型。待创面愈合, 氟比洛芬凝胶贴和消瘀散精简方凝胶贴于术后1周贴于膝关节部位, 每天换药1次, 连续用药21 d。

1.4.2 关节软骨组织、滑膜组织形态观察 将大鼠安乐死后取下膝关节, 用4%的多聚甲醛固定后常规脱钙脱水包埋, 矢状面连续切片, 脱蜡、水化后进行H&E和Safranin O染色, 通过光学显微镜观察软骨组织、滑膜组织, 骨关节炎的组织病理学分级与评分分值密切相关, 分值提升意味着软骨退变加剧。0分对应正常软骨状态, 最高14分则标志着软骨病变达到了最为严重的程度^[14]。采用滑膜炎评分对各组大鼠膝关节滑膜进行评估^[13-15]。

1.4.3 免疫组化染色 石蜡切片脱蜡至水后抗原修复, 阻断内源性过氧化物酶, 将3%的BSA于组织表面均匀涂布, 并在室温下封闭30 min。轻轻去除封闭液, 并按照说明书指示, 使用一抗稀释液将抗体按比例稀释后施加于切片上。将切片水平放置于湿盒内, 于4℃条件下孵育过夜。次日, 将玻片浸入PBS(pH7.4)中, 在脱色摇床上轻轻摇动洗涤, 稍微甩干后在切片所在区域内滴加与一抗相应种属的二抗, 确保完全覆盖切片, 并在室温下孵

育50 min。进行DAB显色、复染细胞核后脱水封片, 置于光学显微镜下观察。通过计算阳性染色的软骨细胞或滑膜细胞数量来估计软骨中抗原的存在。使用Image Pro Plus 5.1版软件计算关节软骨或滑膜3个中心区域的总软骨细胞数或总滑膜细胞和阳性染色细胞数, 测定各组抗原染色阳性细胞百分率^[16]。

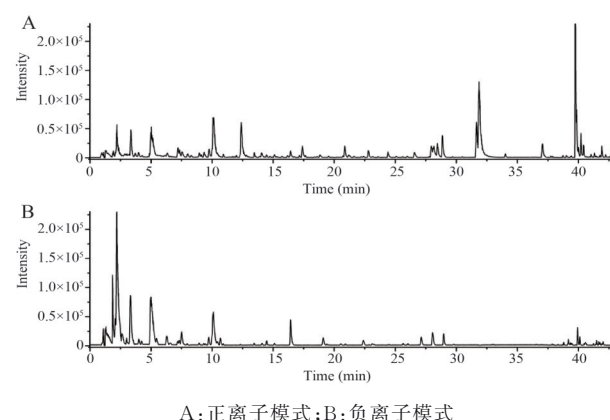
1.5 统计学处理

各组数据通过Graphpad Prime 8和SPSS22.0软件进行处理, 多组间比较采用单因素方差分析。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 消瘀散精简方凝胶贴透皮成分分析

对透皮接受液样品进行正、负离子模式全扫描分析, 得总离子流图, 见图1A、B。在前期消瘀散凝胶贴体外成分分析谱的基础上, 依据各色谱峰的得分信息初步筛选化合物, 利用各色谱峰的一级和二级等详细信息, 对初步筛选出的化合物进行进一步确认。在透皮接受液中共指认出28种成分(表1), 包括核苷类、酚酸苷类、酚酸类、倍半萜苷类、生物碱类、香豆素类、单萜苷类、木脂素类、有机酸类、苯酚类、环肽类、脂肪酸类、蒽醌类。其中14种成分来自蒲公英, 7种成分来自当归, 3种成分来自没药, 2种成分来自西泽兰, 2种成分来自乳香, 2种成分来自紫荆皮, 2种成分来自大黄, 1种成分来自丹参。



A: 正离子模式; B: 负离子模式
图1 消瘀散精简方新组方凝胶贴透皮实验接收液样品
UPLC-HRMS基峰离子流图(BPC)-正、负离子模式
Fig 1 UPLC-HRMSs-based peak chromatogram (BPC) in positive and negative ion modes of transdermal test received samples of the new formula gel patch compound of the Xiaoyusan

表1 UPLC-Q-TOF/MS 鉴定消瘀散精简方新组方凝胶贴透皮成分									
Tab 1 UPLC-Q-TOF/MS to identify the transdermal ingredients of the new formula gel patch compound of the Xiaoyusan									
序号	t_R (min)	实测分子 量(m/z)	质量误差 (ppm)	分子式	电离模式	化合物	MS/MS数据	归属	CAS号
1	5.07	166.086 2	−0.6	C ₉ H ₁₁ NO ₂	[M+H] ⁺	Phenylalanine	120.080 9;103.054 0;77.038 2	All	63-91-2
2	7.49	315.073 6	4.4	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	[M-H] [−]	Protocatechuic acid-3-O-glucoside	/	蒲公英	20300-54-3
3	8.39	153.020 3	6.5	C ₇ H ₆ O ₄	[M-H] [−]	Protocatechuic acid	153.022 5;139.029 1	蒲公英	99-50-3
4	8.56	329.087 8	0.0	C ₁₄ H ₁₈ O ₉	[M-H] [−]	Vanillic acid 4-O-β-D-glucopyranoside	/	蒲公英	32142-31-7
5	10.47	311.041 8	2.9	C ₁₃ H ₁₂ O ₉	[M-H] [−]	Caftaric acid	/	蒲公英	67879-58-7
6	12.02	137.024 7	2.2	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] [−]	Protocatechuic aldehyde	93.033 7	丹参/西泽兰	139-85-5
7	12.69	443.192 7	0.9	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₀	[M-H] [−]	Dihydrophaseic acid 4'-O-β-D-glucopyranoside	/	/	78914-56-4
8	12.94	337.095 6	8.0	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	[M-H] [−]	3-p-coumaroylquinic acid	/	当归/蒲公英	42438-90-4
9	13.34	215.082 4	−0.9	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₂	[M-H] [−]	Lycoperodine-1	171.089 6;125.874 8	蒲公英	6052-68-2
10	13.89	353.088 5	2.0	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M-H] [−]	Neochlorogenic acid	353.089 0;191.057 4;173.046 7	当归/蒲公英	906-33-2
11	14.69	177.019 5	1.1	C ₉ H ₆ O ₄	[M-H] [−]	Esculetin	177.023 2;141.869 3;133.026 7;105.033 2;89.039 6	蒲公英	305-01-1
12	14.80	353.090 2	6.8	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M-H] [−]	Chlorogenic acid	/	当归/蒲公英	327-97-9
13	15.19	179.035 6	3.4	C ₉ H ₈ O ₄	[M-H] [−]	Caffeic acid	/	西泽兰	331-39-5
14	15.84	431.191 1	−2.8	C ₁₉ H ₃₀ O ₈	[M+FA-H] [−]	Icariside B2	/	蒲公英	108906-51-0
15	16.70	431.191 3	−2.3	C ₁₉ H ₃₀ O ₈	[M+FA-H] [−]	Corchoionoside C	431.193 3;385.183 2;153.093 8	蒲公英	185414-25-9
16	17.69	337.093 9	3.0	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	[M-H] [−]	5-p-coumaroylquinic acid	191.058 0;173.046 9;163.041 3;137.024 2	当归/蒲公英	185502-68-5
17	21.89	193.049 3	−6.7	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-H] [−]	Ferulic acid	178.026 0;134.037 1	当归/蒲公英/紫荆皮	1135-24-6
18	22.52	473.070 1	−5.1	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₂	[M-H] [−]	Chicoric acid	311.039 3;293.033 7;179.034 5;149.012 1;135.048 8	蒲公英	70831-56-0
19	23.41	567.209 8	2.6	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₁	[M+FA-H] [−]	Lariciresinol 4-O-glucoside	521.2 077;359.137 4;329.1 374	紫荆皮	143663-00-7
20	27.14	187.097 3	−1.6	C ₉ H ₁₆ O ₄	[M-H] [−]	Azelaic acid	187.097 1;125.097 8;123.082 0	没药	123-99-9
21	28.04	207.100 7	−6.8	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	[M-H ₂ O+H] ⁺	Senkyunolide I	/	当归	94596-28-8

续表									
序号	t_R (min)	实测分子 量(m/z)	质量误差 (ppm)	分子式	电离模式	化合物	MS/MS 数据	归属	CAS 号
22	28.96	723.503 6	1.4	$C_{36}H_{66}N_6O_6$	$[M+FA-H]^-$	Cyclic hexaleucine	723.508 6;677.495 9;451.325 2	/	83793-12-8
23	29.65	207.100 5	-7.7	$C_{12}H_{16}O_4$	$[M-H_2O+H]^+$	Senkyunolide H	/	当归	94596-27-7
24	36.29	261.112 7	-1.9	$C_{15}H_{18}O_4$	$[M-H]^-$	Myrrhanolide C	217.125 5;201.102 5;189.091 1;175.112 7	乳香/没药	1147340-35-9
25	38.34	293.137 6	-6.1	$C_{16}H_{22}O_5$	$[M-H]^-$	1 β ,8 β -Epoxy-2 α -methoxy-6-oxogermacra-9(10),7(11)-dien 8,12-olide	293.137 1;249.149 3;217.121 9;199.111 8;149.097 3	乳香/没药	1361531-66-9
26	39.19	329.232 3	-3.0	$C_{18}H_{34}O_5$	$[M-H]^-$	9,10,13-Trihydroxyoctadec-11-enoic acid	329.233 0;229.144 6;211.135 3;171.103 3	All	29907-57-1
27	39.92	297.038 9	-5.4	$C_{16}H_{10}O_6$	$[M-H]^-$	6-Methyl-rhein	/	大黄	401621-27-0
28	40.97	283.023 8	-3.5	$C_{15}H_8O_6$	$[M-H]^-$	Rhein	239.032 9;211.039 8;183.043 6	大黄	478-43-3

2.2 消瘀散精简方新组方凝胶贴对骨关节炎大鼠软骨损伤的治疗作用

利用 ACLT 建立骨关节炎大鼠模型,与假手术

组相比,OA 模型组大鼠膝关节关节面欠平整,软骨细胞排列紊乱、潮线消失,番红着色变浅表明软骨基质丧失,Mankin 评分明显增加,见图 2、3。应用氟

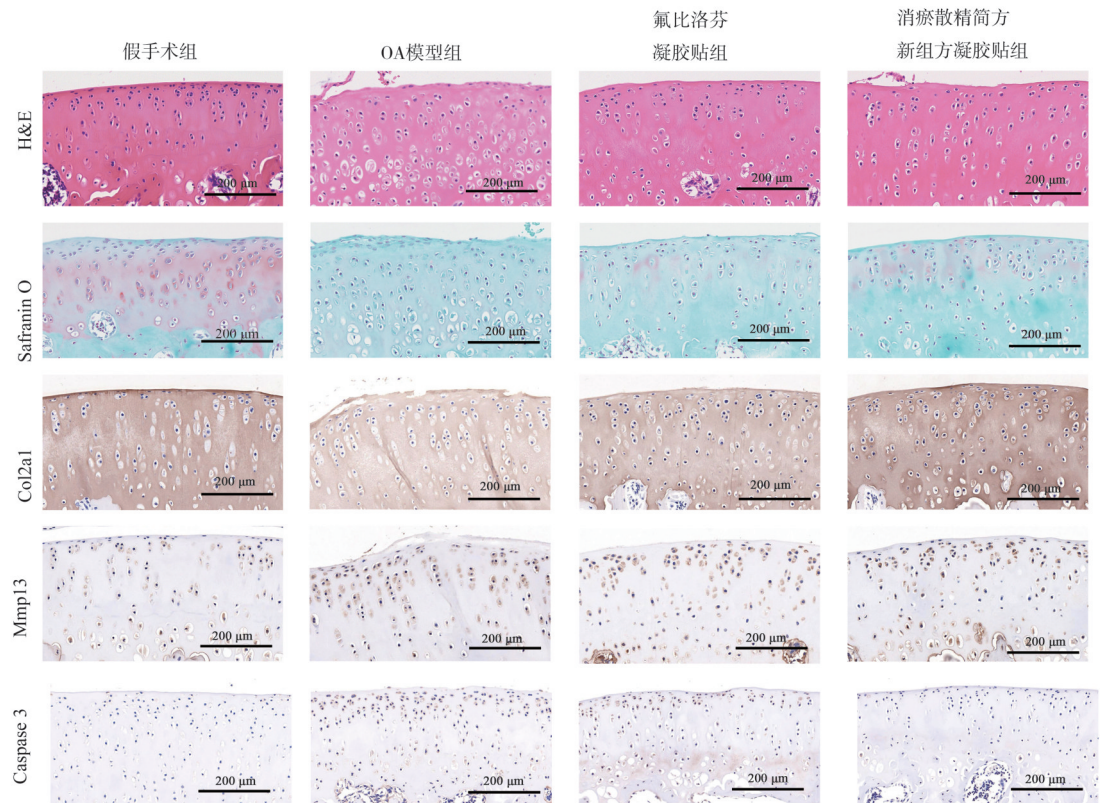
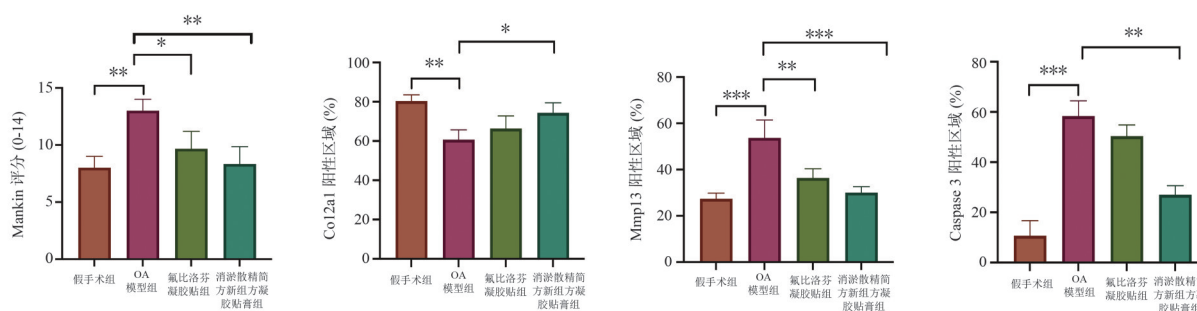


图2 各组大鼠关节软骨组织学染色分析:苏木精-伊红、番红-固绿染色,Col2a1、Mmp13和Caspase 3免疫组化染色

Fig 2 Histological staining analysis of articular cartilage in each group: H&E and Safranin O-fast green staining, IHC staining of Col2a1, Mmp13 and Caspase 3

比洛芬凝胶贴膏与消瘀散精简方新组方凝胶贴治疗后软骨损伤程度得到一定缓解。与OA模型组相比,消瘀散精简方新组方凝胶贴组的大鼠膝关节软骨结构部分恢复,Mankin评分更低($P=0.0057$),Col2a1的表达明显上调($P=0.0273$),Mmp13($P=$

0.0008)与Caspase 3($P=0.002$)则被明显抑制,见图2、3。以上结果表明,消瘀散精简方新组方凝胶贴挽救了骨关节炎大鼠的软骨损伤,具有较好的治疗作用。



Mankin评分、Col2a1、Mmp13和Caspase 3阳性区域比例,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$, $n=6$

图3 各组大鼠关节软骨组织学定量统计结果

Fig 3 Quantitative statistical of articular cartilage histology in each group

2.3 消瘀散凝胶贴对骨关节炎大鼠滑膜炎的治疗作用

进一步观察各组大鼠膝关节滑膜见图4,H&E染色结果表明OA模型组大鼠膝关节滑膜出现大量炎症细胞浸润,滑膜炎评分明显升高($P<0.0001$),免疫组化结果表明滑膜TNF- α ($P=0.0107$)和iNOS($P=0.0003$)的表达明显上调,见图5。应用氟比洛芬凝胶贴膏与消瘀散精简方新组方凝胶贴治

疗后能缓解大鼠滑膜炎。与OA模型组相比,消瘀散精简方新组方凝胶贴组的大鼠滑膜炎细胞浸润减少,滑膜炎评分下降($P=0.047$)。免疫组化染色进一步表明该组大鼠滑膜TNF- α ($P=0.0278$)和iNOS($P=0.0002$)的表达明显下调,见图5。以上结果说明消瘀散精简方新组方凝胶贴不仅能够挽救骨关节炎大鼠软骨损伤,还明显抑制了骨关节炎大鼠的滑膜炎。

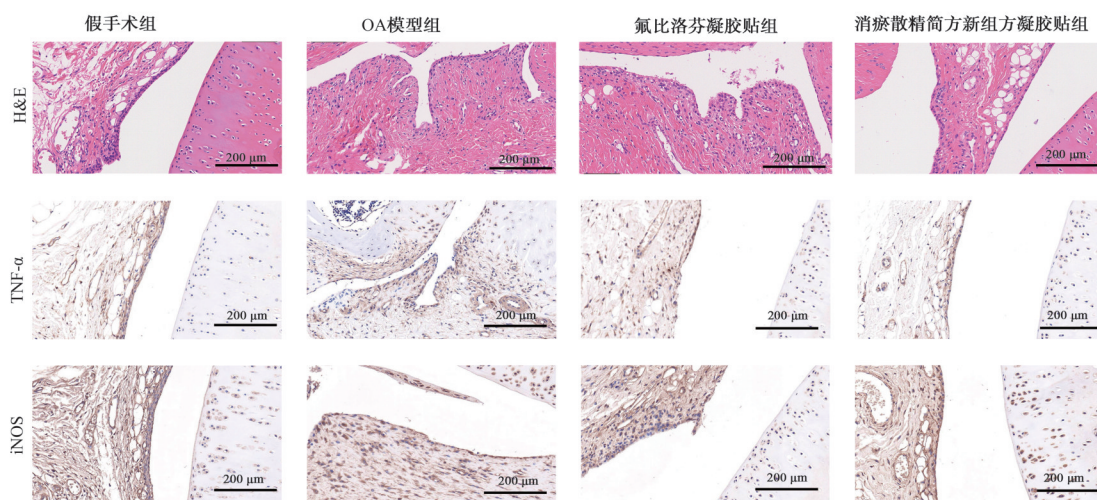


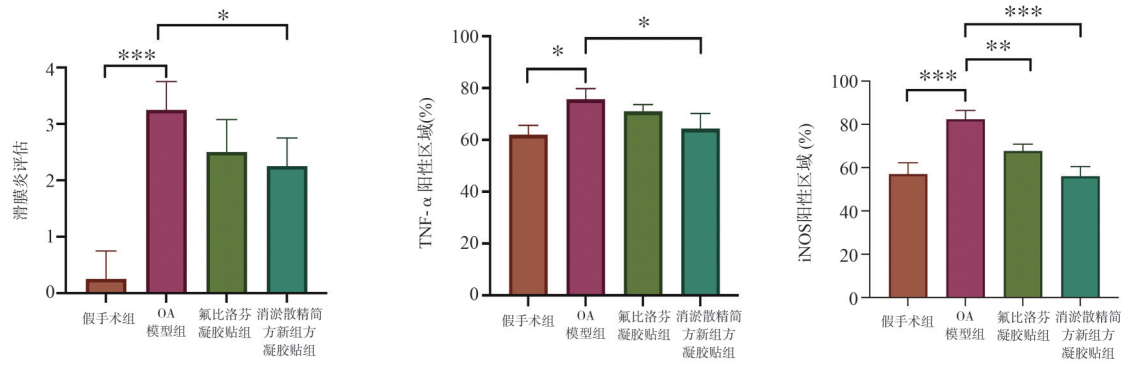
图4 各组大鼠膝关节滑膜组织学染色分析:苏木精-伊红染色,TNF- α 和iNOS免疫组化染色

Fig 4 Histological staining analysis of synovium of knee joint in each group: H&E staining, IHC staining of TNF- α and iNOS

2.4 消瘀散凝胶贴的生物安全性评价

在分析局部应用消瘀散凝胶贴有效性后,继续评估消瘀散凝胶贴的生物安全性。采用ELISA分

析各组大鼠血清炎症因子,结果表明骨关节炎OA模型组大鼠和应用氟比洛芬凝胶贴膏与消瘀散精简方新组方凝胶贴治疗后的大鼠,以TNF- α 与



滑膜炎评分、TNF-α 和 iNOS 阳性区域比例, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n = 6$

图5 各组大鼠膝关节滑膜组织学定量统计结果

Fig 5 Quantitative statistical of synovium of knee joint in each group

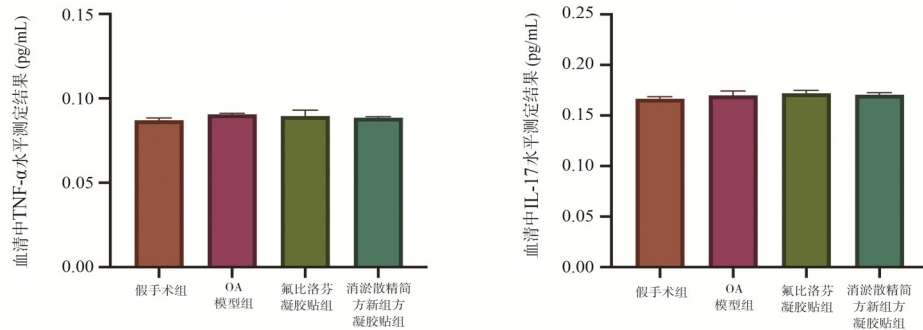


图6 各组大鼠血清炎症因子测定结果

Fig 6 Serum inflammatory factors in each group

IL-17 为代表的炎症因子无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 6, 说明骨关节炎与外用贴膏不引起全身炎症。

对各组大鼠组织器官微观结构进行观察, 结果表明各组大鼠组织器官结构正常, 无炎症细胞浸润, 见图 7。以上结果说明在局部应用

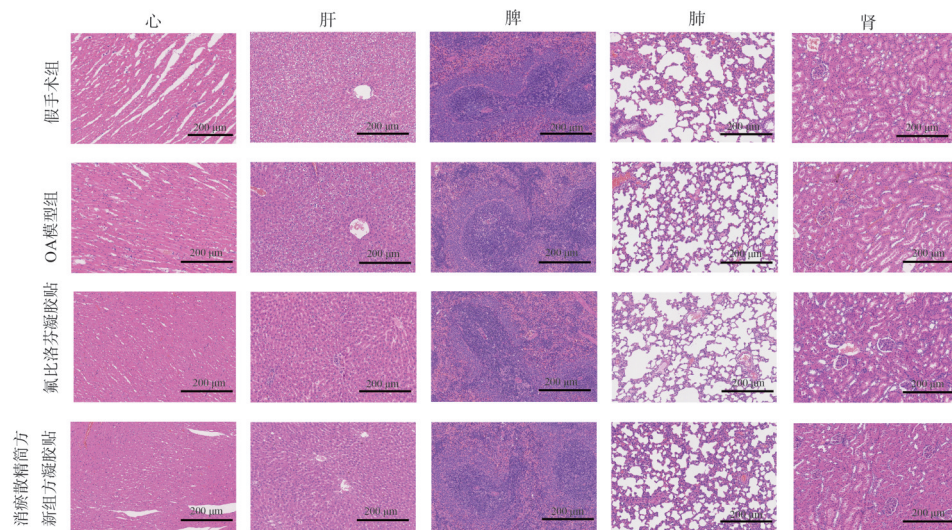


图7 各组大鼠组织器官毒性评价

Fig 7 Tissue and organ toxicity evaluation of rats in each group

消瘀散精简方新组方凝胶贴治疗骨关节炎有效的基础上,并不会引起全身炎症和组织毒性。

3 讨论

本研究通过动物实验研究消瘀散精简方新组方凝胶贴对于OA大鼠软骨损伤和滑膜炎症的治疗作用。经过21 d外敷治疗后,消瘀散精简方新组方凝胶贴与氟比洛芬凝胶贴可挽救OA大鼠关节软骨损伤和滑膜炎症,并且消瘀散精简方新组方凝胶贴的治疗效果更优。具体而言,通过组织病理学观察到消瘀散精简方新组方凝胶贴治疗后OA大鼠关节软骨基质合成增加、软骨细胞凋亡减少,同时滑膜炎症细胞浸润与炎症因子表达明显减少。在此基础上进一步评估消瘀散精简方新组方凝胶贴对于OA大鼠全身炎症水平和组织器官的影响,血清学分析结果表明一方面OA发生、发展过程中不会引起全身性的炎症水平上调,消瘀散精简方新组方凝胶贴未对OA大鼠全身炎症因子表达造成明显影响。组织病理学结果表明消瘀散精简方新组方凝胶贴应用后各组织器官的微观结构正常且无明显的炎症细胞浸润。

目前广泛认可的OA发病机制假说是慢性炎症、异常应力或代谢改变等因素导致关节软骨损伤,伴随滑膜炎症介质释放从而激活炎症通路^[4]。滑膜炎是KOA发生、发展过程中的常见病理表现,全球范围内有近90%会并发膝关节滑膜炎^[17]。研究表明滑膜炎症与OA的严重程度呈正相关,且滑膜炎的出现早于关节软骨的退变^[18],提示针对滑膜炎症的治疗在OA的疾病进展中意义重大^[19,20]。研究表明,在关节软骨退化程度尚未触及软骨下骨的阶段,持续的滑膜炎症对于膝关节持续疼痛的产生扮演着关键的角色^[21],多种基质降解酶的水平有明显提升,同时炎症因子的过量分泌导致了剧烈的疼痛和关节功能的受损,还加速了软骨的退化。滑膜炎在组织学上展现出滑膜衬里的增生、巨噬细胞和淋巴细胞的浸润,以及新血管的形成等特征^[22],滑膜中的巨噬细胞活化与疼痛和疾病活动度和严重程度相关^[23,24],当滑膜出现炎症时,其中的巨噬细胞会释放炎症因子及疼痛相关的神经递质,这些物质触发氧化应激反应,进而促使OA的发展进程加速^[25]。与此同时,巨噬细胞与软骨细胞间的相互作用,通过旁分泌机制,对OA的起始阶段及进展过程产生影响。活化的滑膜巨噬细胞能够释放大量的TNF- α 等炎性介质,导致软骨基质成分如Col2a1和聚合糖等降解,从而促进软骨细胞肥大化或凋亡^[26]。

OA在中医领域被归类为痹症,《类证治裁·痹症》中提到痹症起因于诸痹“良由营卫先虚,腠理不密,风湿寒乘虚内袭。正气为邪所阻,不能宣行,因而留滞,气血凝涩,久而成痹”。现代中医同样认为,痹症的内在发病基础是体质虚弱、正气亏虚,而外界邪气侵袭则是发病的外部条件^[10]。OA被视为一种本虚标实的病症,病因主要是肝肾不足、气滞血瘀、风寒湿热邪气外侵。基于以上病机认识,临床上针对骨关节炎的治疗当以滋养肝肾,活血化瘀,祛邪通络为治则。若风湿热邪趁虚侵袭人体,热邪为甚,或病人素体阳盛,邪气闭阻经脉日久而化热,邪热煎灼阴液,致关节焮红肿胀、触之灼热而发为热痹,如《素问·痹论》云“其热者,阳气多,阴气少,病气胜,阳遭阴,故为痹热。”临床上OA急性发作期患者多表现为热痹,因此急性期应以治疗湿热痹阻的“标实”之证,治疗要以清热利湿,祛风止痛,化瘀通络为主。改良后的消瘀散新组方中,以大黄为君药,主行清热祛湿,祛瘀止痛之功,大黄为苦寒之药,以苦燥湿,以寒清热,且能逐瘀通经,荡涤湿热瘀结之毒;乳香、没药有行气活血,化瘀通络之功,为常用药对,《医学衷中参西录》云“虽为开通之品,不至耗伤气血,当归性温、味甘,擅补血调血,荣筋骨血脉,使血有所生,筋有所养,寓意“治风先治血,血行风自灭,丹参活血祛瘀、凉血消痈,“破宿血,补新血。”四者共为臣药,助君药清热祛瘀,通利关节;蒲公英、泽兰清热解毒、祛瘀散结,紫荆皮可活血通络,消肿定痛,三者共为佐药,清热通络止痛。诸药合用,共奏清热利湿、化瘀止痛、祛风通络之功,为目前上海交通大学医学院附属新华医院中医骨伤科临床上常用方。本研究利用Franz扩散池模拟外用药物在生理条件下的透皮过程,以反映外用制剂的质量。结合消瘀散精简方凝胶贴的用法用量:每日1次,作用24 h,设定24 h这一时间点取透皮接受液,利用超高效液相色谱串联四极杆飞行时间高分辨率质谱技术(UPLC-Q-TOF/MS)对消瘀散精简方凝胶贴透皮成分进行分析,结合课题组前期对消瘀散凝胶贴体外成分分析谱的基础上,发现接受液中28种原型成分,包含君药大黄中的6-甲基-大黄酸、大黄酸等;臣药当归中的洋川芎内酯、新绿原酸等;佐药蒲公英中的阿魏酸、菊苣酸等;佐药西泽兰中的咖啡酸等。不仅说明君臣佐药成分均可通过皮肤进入体内,还为进一步阐明消瘀散精简方新组方凝胶贴的药理活性及质量标准的提升提供理论依据。

综上,消瘀散贴通过促进关节软骨基质合成,

抑制软骨细胞凋亡和滑膜炎因子表达治疗 OA, 同时还具有良好生物安全性。有望进一步通过临床试验进行安全性和有效性评估以进行临床转化。

作者贡献度说明:

张玉:设计和完成实验;杨然、娄祺祺和刘芳:数据分析与整理;张玉:初稿编撰;杨然和娄祺祺:初稿修改;金立伦和滕蔚然:实验监督和指导。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

- 1 Yao Q, Wu X, Tao C, et al. Osteoarthritis: Pathogenic signaling pathways and therapeutic targets [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1):56.
- 2 Sharma L. Osteoarthritis of the knee[J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(1):51-59.
- 3 阚天佑,侯伶俐,李汉骏,等.膝骨关节炎软骨基质刚度对线粒体形态异质性的影响[J].*医用生物力学*,2023, 38(3):521-527.
- 4 Sanchez-Lopez E, Coras R, Torres A, et al. Synovial inflammation in osteoarthritis progression [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2022, 18(5):258-275.
- 5 Bannuru R, Osani M, Vaysbrot E, et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2019, 27(11):1578-1589.
- 6 Han Y, Huang H, Pan J, et al. Meta-analysis comparing platelet-rich plasma vs hyaluronic acid injection in patients with knee osteoarthritis[J]. *Pain Med*, 2019, 20(7):1418-1429.
- 7 林承宇,陈海鹏,陈凯.膝骨关节炎非手术治疗进展[J].*风湿病与关节炎*,2018,7(6):71-75.
- 8 高欢欢,薛志鹏,李泰贤,等.治疗膝骨关节炎的中成药的组方规律分析[J].*中国药房*,2019,30(15):2096-2100.
- 9 Chen B, Zhan H, Marszalek J, et al. Traditional Chinese medications for knee osteoarthritis pain: A meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Am J Chin Med*, 2016, 44(4):677-703.
- 10 郑斌,梅伟,魏建成.中医治疗膝骨关节炎研究进展[J].*湖北中医药大学学报*,2016,18(2):114-117.
- 11 金立伦,滕蔚然,罗健兴,等.消瘀散精简方贴膏治疗急性软组织损伤的临床随机对照研究[J].*上海中医药杂志*,2013,47(4):51-54.
- 12 叶劲松,梁子聪.3种不同膝骨关节炎造模方法比较[J].*中国老年学杂志*,2023,43(16):3948-3954.
- 13 Scudamore. A practical guide to the histology of the mouse[M].New Jersey:Wiley-Blackwell,2014.
- 14 李宪堂,KN Khan,John EB.实验动物功能性组织学图谱[M].北京:科学出版社,2019.
- 15 Piper MT, Suzanne MD, Kathleen SM. Comparative anatomy and histology: A mouse, rat, and human atlas [M].Academic Press,2017.
- 16 何璐,李彦林,蒙旭晗,等.C-X-C趋化因子受体4拮抗剂延缓豚鼠关节软骨的退变[J].*中国组织工程研究*,2022,26(14):2150-2154.
- 17 Perry T, Gait A, O'Neill T, et al. Measurement of synovial tissue volume in knee osteoarthritis using a semi-automated MRI-based quantitative approach [J]. *Magn Reson Med*, 2019, 81(5):3056-3064.
- 18 Li C, Ouyang Z, Huang Y, et al. NOD2 attenuates osteoarthritis *via* reprogramming the activation of synovial macrophages[J]. *Arthritis Res Ther*, 2024, 26(1):22.
- 19 Davis J, Ward R, MacKay J, et al. Effusion-synovitis and infrapatellar fat pad signal intensity alteration differentiate accelerated knee osteoarthritis[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2019, 58(3):418-426.
- 20 Gómez-Aristizábal A, Gandhi R, Mahomed N, et al. Synovial fluid monocyte/macrophage subsets and their correlation to patient-reported outcomes in osteoarthritic patients: A cohort study [J]. *Arthritis Res Ther*, 2019, 21(1):26.
- 21 Hoshino T, Tsuji K, Onuma H, et al. Persistent synovial inflammation plays important roles in persistent pain development in the rat knee before cartilage degradation reaches the subchondral bone [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2018, 19(1):291.
- 22 Scanzello C, Goldring S. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis[J]. *Bone*, 2012, 51(2):249-257.
- 23 Henrotin Y, Lambert C, Richette P. Importance of synovitis in osteoarthritis: Evidence for the use of glycosaminoglycans against synovial inflammation [J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2014, 43(5):579-587.
- 24 Zhang H, Cai D, Bai X. Macrophages regulate the progression of osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2020, 28(5):555-561.
- 25 Ansari M, Ahmad N, Haqqi T. Oxidative stress and inflammation in osteoarthritis pathogenesis: Role of polyphenols[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129:110452.
- 26 Wang B, Sun Y, Liu N, et al. LncRNA HOTAIR modulates chondrocyte apoptosis and inflammation in osteoarthritis *via* regulating miR-1277-5p/SGTB axis [J]. *Wound Repair Regen*, 2021, 29(3):495-504.

[本文编辑] 朱 昊