

电针法对兔膝关节炎模型治疗效果及机制研究

郑一鸣¹ 李伦兰² 陈和木¹

摘要 目的 观察电针法对兔膝关节炎(KOA)模型治疗效果,探讨电针法治疗兔KOA的机制。方法 将18只健康新西兰兔随机分为空白对照组、模型对照组、电针法组,每组6只。空白对照组正常饲养,模型对照组、电针法组采用改良韦德曼左后肢伸直位固定制动法固定6周制作KOA模型,造模完成1周后给予电针法组电针治疗4周,每周5次,每次20 min。用奎森(Lequesne)功能指数评价兔左膝关节功能评分;酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测血清及关节液白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6水平;亚硝酸盐比色(Griess)法检测血清及关节液一氧化氮(NO)水平;苏木精-伊红(HE)染色法观察膝关节软骨组织形态学改变,曼金(Mankin)评分法评价软骨退变程度;免疫荧光技术观察膝关节软骨组织p-P38MAPK阳性细胞表达。结果 与空白对照组比较,模型对照组Lequesne评分增高($P < 0.05$);血清及关节液中IL-1 β 、IL-6、NO水平升高($P < 0.05$);软骨面欠光滑,Mankin评分升高($P < 0.05$);免疫荧光染色阳性细胞增多($P < 0.05$)。与模型对照组比较,电针法组Lequesne评分降低($P < 0.05$);血清及关节液中IL-1 β 、IL-6、NO水平降低($P < 0.05$);软骨面光滑,Mankin评分降低($P < 0.05$);免疫荧光染色阳性细胞减少($P < 0.05$)。结论 电针法能有效提高兔KOA模型膝关节行为能力,其机制可能是通过降低炎症因子表达水平,影响MAPK信号通路的表达,延缓KOA发病进程。

关键词 膝关节炎;电针;关节软骨

中图分类号 R 684.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)06-0914-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.06.006

膝关节骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种慢性劳损导致的关节退行性疾病,累及软骨、软骨下骨等结构^[1],超过35%的中老年人受其影响^[2]。由于软骨无神经与血管组织,被破坏结构和受损的关节软骨修复缓慢。KOA常采用药物和手术治

疗^[3]。目前,非类固醇抗炎药是治疗KOA的常用药物,但长期用药会产生严重副作用^[4]。因此,对于病情较轻或存在手术禁忌证的患者,确定有效安全的干预措施非常重要。电针是一种基于针灸的中西医结合治疗方法,其原理是通过针灸和电的双重刺激来达到治疗疾病的目的^[5]。虽然电针已被广泛应用于治疗KOA,但作用机制尚未明确。

该实验研究电针法对兔KOA模型血清、关节液中炎症因子的影响和关节软骨组织形态学改变,观察电针法治疗KOA效果及其作用机制,评价电针法在治疗KOA过程中的应用价值,拓展中医在防治KOA中的积极意义,为KOA的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 18只骨骼完整、6月龄成年雄性新西兰兔(2.25~2.75 kg),由安徽医科大学实验动物中心提供并进行饲养[许可证号:SYXK(皖)2017-006]。动物实验方案经安徽医科大学动物伦理委员会批准(伦理编号:LLSC20221122)。经过1周适应性饲养后,18只新西兰兔运用随机数字表法被分配到空白对照组(A组)、模型对照组(B组)和电针法组(C组),每组各6只。

1.2 主要材料 电子针灸治疗仪(型号:CMNS6-I型)购自苏州佳健器械总厂;全波长酶标仪购自无锡华卫德朗公司;高速组织研磨仪购自武汉赛维尔公司;生物组织自动包埋机、石蜡包埋机(冷台)购自湖北贝诺医疗科技有限公司;显微镜购自日本NIKON公司;苏木精-伊红(HE)染色试剂盒购自美国Solarbio公司;兔白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6、ELISA试剂盒购自武汉科鹿生物公司,批号:ELK1228、ELK2419;NO试剂盒购自上海碧云天生物公司;一抗:p-P38购自美国Cell Signaling Technology公司,货号4511T;二抗:超敏兔鼠通用二抗购自北京ZSGB-BIO公司,货号:PV-9000。

1.3 方法

1.3.1 造模及干预措施 A组未经处理,正常饲养;B组和C组采用改良韦德曼左后肢伸直位固定制动法^[6]制备模型。助手控制兔使其呈仰卧位,操

2023-03-01 接收

基金项目:安徽省高校科学研究项目(编号:KJ2020ZD18)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院¹ 康复医学科、² 护理部,合肥 230022

作者简介:郑一鸣,女,硕士研究生;

陈和木,男,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: chenhemu123@126.com

作者把兔左后肢拉至充分伸展(膝关节伸展 180°, 踝关节 60°背屈)。从腹股沟到跖趾关节内层缠绕绵纸,外层用树脂绷带包裹 1 周以巩固固定,待树脂绷带变硬后,最外层以胶带包裹防止兔啃咬。每天早晚巡视,若兔出现足趾充血、肿胀,应立即去除绷带,待肿胀消退后重新造模。若出现树脂绷带滑脱,应立即修复。6 周后拆除外部石膏固定装置,驱使兔行走奔跑。B、C 组兔膝关节红肿,步态呈跛行、拖行状,膝关节活动范围受限,表明造模成功。所有兔正常饲养 1 周后继续实验, A、B 组自由活动、常规饲养,每周与 C 组同一时间抓取 5 次,不做干预,连续 4 周; C 组参照《实验针灸学》^[7] 叙述,选择内外膝眼、梁丘穴、血海穴,以 0.3 mm × 25.0 mm 毫针进行针刺,直刺或斜刺均可。刺入深度约 5 mm,将针与电针治疗仪进行连接,强度以局部皮肤肌肉的轻微震颤为度,频率为 2、100 Hz 疏密交替,电流强度 1~2 mA,治疗每次 20 min,每周治疗 5 d,休息 2 d,连续 4 周。

1.3.2 行为学观察 干预完成后,采用改良 Lequesne MG 膝关节级别评估量表作为评分标准,观察各组兔的疼痛、步态、关节活动和肿胀程度。选取 2 位对该实验分组不知情的实验助理担任评分员,在同一时间对同一只兔进行评分,结果取均值。

1.3.3 标本采集 取材方法如下:耳缘静脉取血 3~5 ml,静置 2 h 后取上清液,以 3 000 r/min 快速离心 10 min, -80 °C 贮存待测血清中炎症因子表达水平。空气栓塞法处死兔,暴露左膝浅层滑囊,在髌上囊开口,注射器抽取 1 ml 无菌盐水灌注于髌上囊中,操作人员充分活动其膝关节,重复回抽直到收集 3 ml 关节液,快速离心取上清液,置于 -80 °C 液氮中。切开关节囊,使膝关节腔充分暴露,切开十字韧带,清除半月板,分离关节。使用咬骨钳取左侧股骨内侧髁,冲洗后固定于 4% 多聚甲醛中 48 h,经修剪、乙醇梯度脱水、常规石蜡包埋、切片后进行 HE 染色,镜下观察拍照记录。根据 Mankin 分级标准对软骨退化程度进行分级。

1.3.4 ELISA 法检测血清、关节液中 IL-6、IL-1 β 含量 按照试剂说明书进行操作,将试样置于酶标板孔的底端,轻轻摇晃搅拌均匀,将盖板或薄膜覆于酶标板上方,37 °C 下孵育 80 min 后清洗。添加 TMB 显色剂溶液,37 °C 下避光培养 20 min。最后加入终止液进行检测。

1.3.5 Griess 法检测血清及关节液 NO 水平 按照试剂说明书操作,取出 Griess reagent I 和 II,静置恢

复室温。用待测样品所用溶液稀释标准品,按 50 μ l/孔,96 孔板中加入标准品及样品。按 50 μ l/孔,各孔中加入室温 Griess reagent I,按 50 μ l/孔,在各孔中加入室温 Griess reagent II,540 nm 测定吸光度值。

1.3.6 HE 染色观察膝关节软骨组织病理形态 切片后行 HE 染色,将染色后切片放置于镜下放大 100 倍观察。使用 Mankin 评分法对膝关节软骨退化程度进行评分,得分越高,说明软骨退化程度越明显。

1.3.7 免疫荧光染色法观察兔膝关节软骨组织 p-P38 MAPK 表达 取制备的石蜡切片经脱蜡、孵育、水洗、浸泡,抗原修复后孵 p-P38 一抗过夜,孵二抗 50 min,复染细胞核后甘油明胶封片,显微镜镜检。每组切片随机选取 3 个 100 倍视野拍照,使用 Image J 软件进行图像采集分析。蓝色荧光为 DAPI 表达,红色荧光为 p-P38 阳性表达, Merge 为双重荧光染色。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析,测量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布且方差齐采用单因素方差分析;不符合正态分布的数据则采用非参数秩和检验比较组间差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学观察 与空白对照组比较,模型对照组兔 Lequesne 评分升高 ($P < 0.05$);与模型对照组比较,电针法组兔 Lequesne 评分降低 ($P < 0.05$)。见图 1。

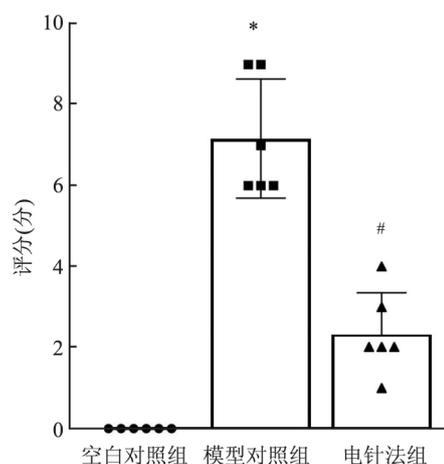


图 1 兔 KOA 模型行为学观察

与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型对照组比较: # $P < 0.05$

2.2 各组兔血清、膝关节液中 IL-1 β 、IL-6、NO 表达水平 与空白对照组比较,模型对照组兔血清、膝关节液中 IL-1 β 、IL-6、NO 水平升高 ($P < 0.05$);与模型对照组比较,电针法组兔血清、膝关节液中 IL-1 β 、IL-6、NO 水平降低 ($P < 0.05$)。见图 2、3。

2.3 各组兔膝关节软骨组织镜下病理形态观察 HE 染色结果显示,空白对照组软骨细胞核完好,呈梭状有序排列,可见清晰潮线;模型对照组切面损伤较大,细胞簇状无序排列,潮线不清;电针法组软骨细胞外形基本正常,胞核和胞膜完好,可辨潮线。见图 4。

2.4 软骨组织 Mankin 评分 与空白对照组比较,模型对照组 Mankin 评分升高 ($P < 0.05$);与模型对照组相比,电针法组 Mankin 评分降低 ($P < 0.05$)。见图 5。

2.5 各组兔膝关节软骨组织免疫荧光 p-P38 表达 与空白对照组比较,模型组膝关节软骨组织 p-P38 免疫荧光染色阳性细胞数量增加 ($P < 0.05$);与模型对照组相比,电针法组膝关节软骨组织 p-P38 免疫荧光染色阳性细胞数量减少 ($P < 0.05$)。见图 6、7。

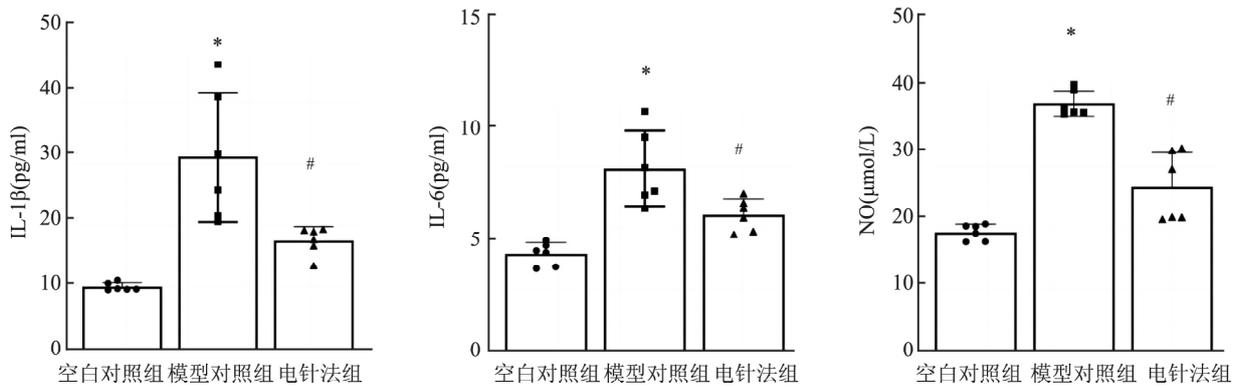


图 2 各组兔血清中 IL-1 β 、IL-6、NO 表达水平
与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型对照组比较: # $P < 0.05$

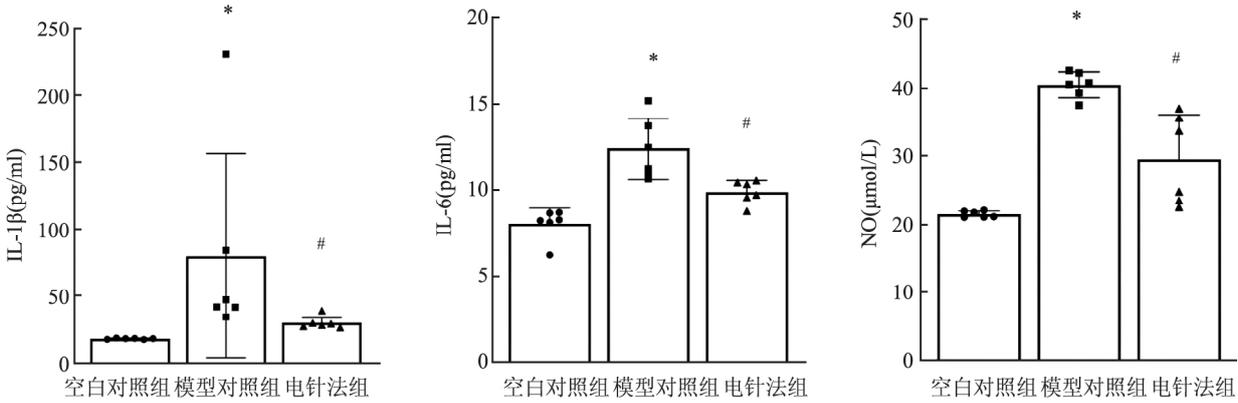


图 3 各组兔关节液中 IL-1 β 、IL-6、NO 表达水平
与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型对照组比较: # $P < 0.05$

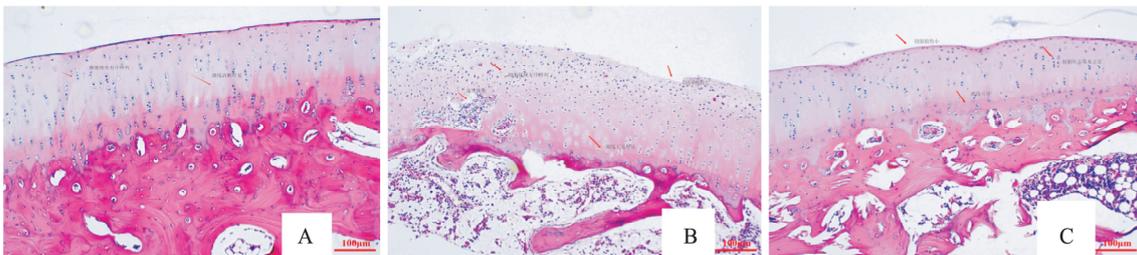


图 4 各组兔膝关节软骨组织镜下病理形态 HE $\times 100$
A: 空白对照组; B: 模型对照组; C: 电针法组

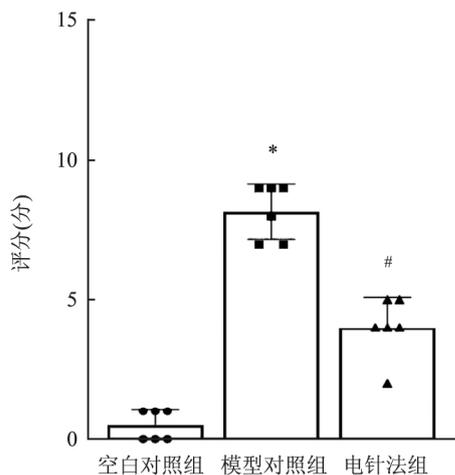


图5 各组兔膝关节软骨组织 Mankin 评分比较
与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型对照组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

KOA 是影响人类健康的常见关节疾病之一,通常认为是生物学和机械损伤共同作用下,软骨细胞、软骨外基质等合成降解失衡产生的结果。研究^[8]表明,炎性因子及软骨代谢相关细胞因子是导致 KOA 发病的重要因素。

针灸疗法,包括手针、电针等,被认为是预防和延缓 KOA 进展的有效干预措施。研究^[9]表明,手针对于 KOA 患者具有一定治疗效果。电针在手针的基础上,将针灸与电脉冲相结合,其机制可能是内分泌系统释放激素,自主神经系统释放神经递质,调节细胞因子分泌和机体免疫反应,缓解患者的临床症

状。研究^[10]表明,电针法对 KOA 有良性作用,但具体机制尚不明确。

该研究采用 Lequesne 评分评价电针法干预治疗后的各组兔膝关节功能。评分结果显示,与模型对照组相比,电针法组兔 Lequesne 评分显著降低 ($P < 0.05$),表明电针法能改善 KOA 膝关节功能,对 KOA 有一定治疗作用。

细胞因子由多种细胞分泌、调控、介导免疫及炎症反应。研究^[11]表明,IL-1 β 、IL-6、NO 在 KOA 患者滑液中表达增加。IL-1 β 可促进金属蛋白酶 MMP 家族和 II 类胶原蛋白合成,诱导性 NO 合成酶激活,产生大量下游产物^[12],强烈刺激 iNOS mRNA 转录,合成大量 NO^[13]。高浓度 NO 一方面抑制软骨细胞,降低其再生能力;另一方面增强血管通透性,导致关节液渗出。IL-6 只在 KOA 患者滑膜中可被检出,加剧关节炎症反应^[14],调节 MMPs,促进破骨细胞激活,加速基质和成纤维细胞的降解,进一步损害膝关节软骨。MAPK 信号转导通路是由多种细胞因子活化的丝氨酸-苏氨酸激酶,受 IL-1 β 等炎性因子刺激时,MAPK 通路以逐步磷酸化的方式被激活,加快诱导关节软骨细胞外基质的降解,诱发 KOA。研究^[15]表明,MAPK 信号转导通路是 KOA 重要信号转导通路,参与软骨细胞增殖、凋亡和炎症反应等多种生理过程。该研究通过动物实验显示,KOA 兔经过 4 周电针法治疗后,血清、关节液中 IL-1 β 、IL-6、NO 表达水平较模型对照组降低 ($P < 0.05$),膝关节软骨组织中 p-P38 表达较模型对照组下降 ($P <$

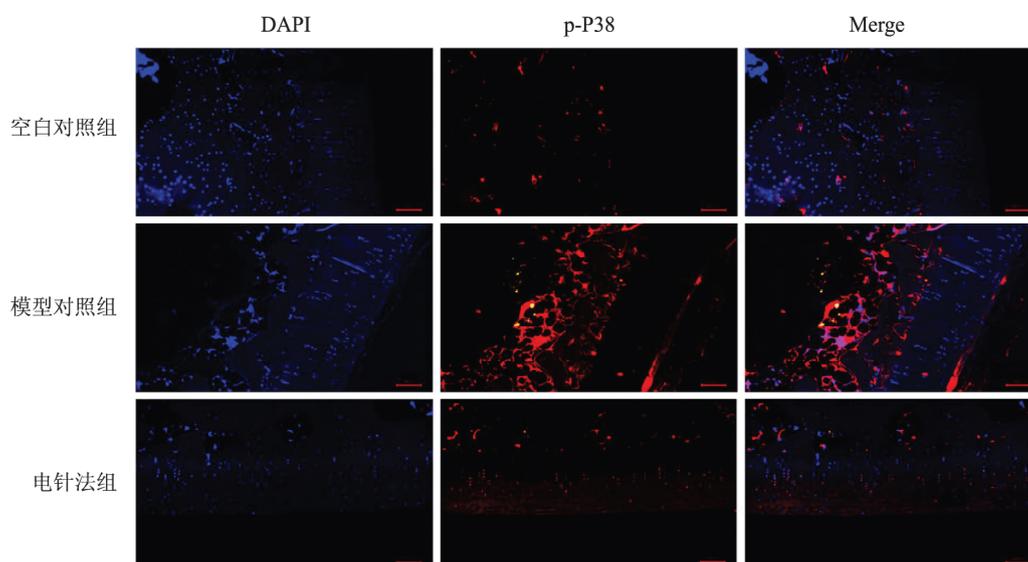


图6 各组兔膝关节软骨组织免疫荧光染色 $\times 100$

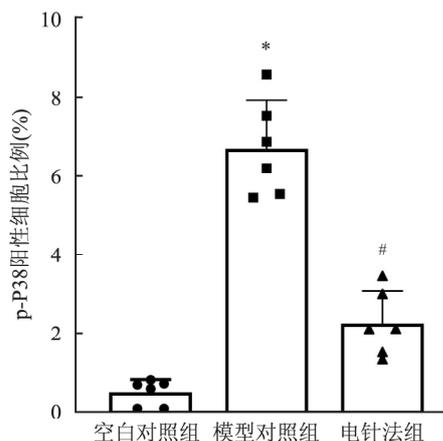


图7 各组免疫荧光染色 p-P38 阳性细胞比例比较
与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型对照组比较: # $P < 0.05$

0.05)。镜下病理形态观察电针法组呈大致正常状态,与 Mankin 评分结果一致,表明电针法治疗 KOA 机制是一种多靶点、多机制的综合调控系统:软骨表面损伤导致血管裂纹增多,同时,炎症因子刺激软骨,引起软骨钙化。干扰软骨和软骨之间相互作用,形成 KOA 的“恶性循环”。电针法通过下调血清和关节液中炎症因子表达水平,阻遏细胞内炎性物质释放,阻止了“恶性循环”的发生。

参考文献

[1] 中华医学会骨科学分会关节外科学组,中国医师协会骨科医师分会骨关节炎学组,国家老年疾病临床医学研究中心(湘雅医院)等.中国骨关节炎诊疗指南(2021年版)[J].中华骨科杂志 2021 41(18):1291-314.

[2] Alam J, Jantan I, Bukhari S N A. Rheumatoid arthritis: recent advances on its etiology, role of cytokines and pharmacotherapy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017 92: 615-33.

[3] Aweid O, Haider Z, Saed A, et al. Treatment modalities for hip and knee osteoarthritis: a systematic review of safety [J]. *J Orthop*

Surg (Hong Kong) 2018 26(3):2309499018808669.

[4] 李夏楠,田少奇,王远贺,等.硫化氢可对膝关节炎模型兔关节软骨发挥保护效应[J].中国组织工程研究 2019 23(31):4992-7.

[5] 叶涛,朱路文,阮野,等.针康法对脑缺血大鼠神经功能及缺血半暗区皮层细胞凋亡相关蛋白表达的影响[J].中国康复理论与实践 2018 24(5):502-8.

[6] Videman T. Experimental osteoarthritis in the rabbit: comparison of different periods of repeated immobilization [J]. *Acta Orthop Scand*, 1982, 53(3):339-47.

[7] 李忠仁.实验针灸学[M].北京:中国中医药出版社,2003:314-9.

[8] Zheng W, Feng Z, You S, et al. Fisetin inhibits IL-1 beta-induced inflammatory response in human osteoarthritis chondrocytes through activating SIRT1 and attenuates the progression of osteoarthritis in mice [J]. *Int Immunopharmacol* 2017 45:135-47.

[9] Lin L L, Li Y T, Tu J F, et al. Effectiveness and feasibility of acupuncture for knee osteoarthritis: a pilot randomized controlled trial [J]. *Clin Rehabil*, 2018, 32(12):1666-75.

[10] Wu G W, Chen J, Huang Y M, et al. Electroacupuncture delays cartilage degeneration by modulating nuclear factor- κ B signaling pathway [J]. *Chin J Integr Med*, 2019, 25(9):677-83.

[11] 朱瑜琪,王智耀,张帅,等.细胞因子与膝关节炎关节软骨损伤的修复[J].中国组织工程研究 2017 21(36):5873-8.

[12] Kardos D, Marschall B, Simon M, et al. Investigation of cytokine changes in osteoarthritic knee joint tissues in response to hyperacute serum treatment [J]. *Cells*, 2019, 8(8):824.

[13] Wang D, Wang Z, Li M, et al. The underlying mechanism of partial anterior cruciate ligament injuries to the meniscus degeneration of knee joint in rabbit models. [J]. *J Orthop Surg Res* 2020, 15(1):428.

[14] Qin L, Li X, Wang J, et al. Improved diagnosis of chronic hip and knee prosthetic joint infection using combined serum and synovial IL-6 tests. [J]. *Bone Joint Res* 2020 9(9):587-92.

[15] 付长龙,林洁,赵忠胜,等.电针抑制 Ras/Raf/MEK1/2/ERK1/2 信号通路介导骨关节炎软骨超微结构退变[J].中国组织工程研究 2017 21(32):5134-9.

Therapeutic effect and mechanism of electroacupuncture on rabbit model of knee arthritis

Zheng Yiming¹, Li Lunlan², Chen Hemu¹

(¹Dept of Rehabilitation Medicine, ²Dept of Nursing, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To observe the therapeutic effect of electroacupuncture on rabbit knee osteoarthritis (KOA) model and to explore the mechanism of electroacupuncture in the treatment of KOA in rabbits. **Methods** Eighteen healthy New Zealand rabbits were randomly divided into a blank control group, a model control group and an electroacupuncture group, with 6 rabbits in each group. The rabbits were kept normally in the blank control group, while the model control and electroacupuncture groups were fixed in a modified Videman left hind limb extension

网络出版时间: 2023-05-30 17:22:18 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/34.1065.R.20230529.1632.006.html>

AMD3100 下调 CA9 与 CXCR4 表达逆转索拉菲尼耐药

秦骥伟, 郑浩, 徐治军, 栗雪峰, 孙成

摘要 目的 研究 AMD3100 通过调控碳酸酐酶 IX (CA9) 和趋化因子受体 4 (CXCR4) 逆转人肝癌细胞对索拉菲尼的耐药性机制。方法 以人肝癌细胞 Huh7 和 HepG2 为研究对象, 建立索拉菲尼耐药株 Huh7/Sor 和 HepG2/Sor; 检测索拉菲尼单独或联合使用 AMD3100 对 Huh7、HepG2、Huh7/Sor、HepG2/Sor 细胞增殖的影响; 观察索拉菲尼耐药细胞与非耐药细胞侵袭能力的区别, AMD3100 对肝癌细胞侵袭能力的影响; 索拉菲尼单独或联合使用 AMD3100 对 Huh7、HepG2、Huh7/Sor 和 HepG2/Sor 细胞的 CA9 和 CXCR4 蛋白表达的调控作用。结果 与对照组比较, AMD3100 (50 $\mu\text{mol/L}$) 可提高索拉菲尼对 Huh7/Sor 和 HepG2/Sor 细胞的增殖抑制作用 ($P < 0.05$); 与 Huh7 细胞比较, 索拉菲尼耐药株 Huh7/Sor 细胞的侵袭能力增强 ($P < 0.05$), AMD3100 (50 $\mu\text{mol/L}$) 可降低 Huh7 和 Huh7/Sor 细胞的侵袭能力 ($P < 0.05$); 与 Huh7 和 HepG2 细胞比较, Huh7/Sor 和 HepG2/Sor 细胞的 CA9 和 CXCR4 蛋白表达增加 ($P < 0.05$), AMD3100

(50 $\mu\text{mol/L}$) 可下调 Huh7、HepG2、Huh7/Sor 和 HepG2/Sor 细胞的 CA9 和 CXCR4 蛋白表达 ($P < 0.05$)。结论 AMD3100 可能通过下调 CA9、CXCR4 表达降低人肝癌细胞对索拉菲尼耐药性, 增强索拉菲尼对人肝癌细胞的增殖和侵袭抑制。

关键词 肝细胞癌; AMD3100; 碳酸酐酶 IX; 趋化因子受体 4; 索拉菲尼; 耐药

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)06-0919-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.06.007

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是全球致死率第 4 的恶性肿瘤, 也是全球第 6 大常见癌症^[1]。手术切除是早期 HCC 的标准治疗方法, 但超过 80% 的 HCC 患者被诊断时已无法进行根治性手术。索拉菲尼作为晚期 HCC 的一线药物作用于多个靶点, 可显著延长晚期 HCC 患者的生存时间^[2-3]。然而, 索拉菲尼的获得性耐药限制了其临床疗效。

碳酸酐酶 IX (carbonic anhydrase IX, CA9) 是一种膜相关锌金属酶, 可使肿瘤细胞在低氧酸性微环

2023-03-21 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 2008085J35)

作者单位: 中国科学技术大学附属第一医院器官移植中心, 合肥 230001

作者简介: 秦骥伟, 男, 医师, 责任作者, E-mail: jiweiqin1120@hotmail.com

and braking position for 6 weeks to create a KOA model, and electroacupuncture was given to the electroacupuncture group 1 week after completion of the modeling for 4 weeks, five times a week for 20 min each time. The functional score of the left knee joint of rabbits was evaluated by Lequesne's functional algorithm index; serum and joint fluid interleukin (IL)-1 β and IL-6 levels were measured by enzyme-linked immunosorbent (ELISA) assay; serum and joint fluid nitric oxide (NO) levels were measured by Griess; morphological changes in knee cartilage were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, and the degree of cartilage degeneration was evaluated by Mankin's scale; p-P38MAPK positive cell expression in knee cartilage was observed by immunofluorescence technique. **Results** Compared with the blank control group, the Lequesne score increased in the model control group ($P < 0.05$); the levels of IL-1 β , IL-6, and NO in serum and joint fluid increased ($P < 0.05$); the cartilage surface was less smooth and the Mankin score increased ($P < 0.05$); and the immunofluorescence staining positive cells increased ($P < 0.05$). Compared with the model control group, the Lequesne score was reduced in the electroacupuncture group ($P < 0.05$); the levels of IL-1 β , IL-6, and NO in serum and joint fluid were reduced ($P < 0.05$); the cartilage surface was smoother, and the Mankin score was reduced ($P < 0.05$); and the immunofluorescence staining positive cells were reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** Electroacupuncture can effectively improve knee joint behavior in rabbit KOA model, and the mechanism may be to delay the onset of KOA by decreasing the expression level of inflammatory factors and affecting the expression of MAPK signaling pathway.

Key words osteoarthritis of the knee; electroacupuncture; articular cartilage