

电针对膝骨关节炎模型兔滑膜组织信号通路的影响机制研究

殷岳杉¹ 阮安民² 刘梦玉¹ 马佳音¹ 白鹏^{1△}

[摘要] 目的:探讨电针对不同造模时间下膝骨关节炎(KOA)模型兔滑膜组织中 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响。方法:采用改良 Hulth 法建立兔 KOA 模型,将 44 只家兔随机分为 6 组,其中空白组 4 只,假手术组、模型 1 组、模型 2 组、电针 1 组、电针 2 组各 8 只。空白组、假手术组、模型 1 组和模型 2 组不予治疗,电针 1 组及电针 2 组分别在造模后 2 周及 4 周给予电针治疗,每周治疗 3 次,共治疗 4 周。处死家兔后,取模型膝周滑膜组织,并应用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)及 Western Blot 法检测滑膜组织中 TLR4、NF- κ B、MyD88 的 mRNA 及蛋白的表达。结果:PCR 结果显示模型 2 组中 TLR4、NF- κ B 及 MyD88 的 mRNA 表达量显著高于模型 1 组,电针治疗能够明显抑制 TLR4、NF- κ B 及 MyD88 的 mRNA 表达,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Western Blot 结果显示模型 2 组中 TLR4、NF- κ B 及 MyD88 的蛋白表达量显著高于模型 1 组,电针治疗能够明显抑制 TLR4、NF- κ B 及 MyD88 蛋白的表达,差异有统计学意义($P < 0.05$)。随着造模时间的延长,TLR4、NF- κ B 及 MyD88 的 mRNA 及蛋白表达水平呈上调的趋势。结论:电针治疗可以调控 TLR4/NF- κ B 信号通路,抑制滑膜炎反应,从而对膝骨关节炎起到治疗作用。

[关键词] 膝骨关节炎;滑膜炎;信号通路;电针;机理研究

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2021)06-0001-04

Mechanism Study of Efficacy of Electroacupuncture on Signaling Pathway in Synovial Tissue of Rabbits with Knee Osteoarthritis

YIN Yueshan¹ RUAN Anmin² LIU Mengyu¹ MA Jiayin¹ BAI Peng^{1△}

¹ Department of Acupuncture and Moxibustion, Third Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

² Beijing University of Chinese Medicine Graduate School, Beijing 100029, China.

Abstract Objective: To investigate the efficacy of electroacupuncture on TLR4/NF- κ B signaling pathway in synovial tissue of rabbits with knee osteoarthritis at different modeling time. **Methods:** 44 rabbits were randomly divided into 6 groups: blank group, sham operation group, model 1 group, model 2 group, electroacupuncture group 1, electroacupuncture group 2, and 8 rabbits in each group. The blank group, the sham operation group, the model 1 group and the model 2 group were not treated. The electroacupuncture group 1 and the electroacupuncture 2 groups were given electroacupuncture treatment 2 weeks and 4 weeks after modeling. 3 times a week for 4 weeks. The expression of mRNA and protein of TLR4, NF- κ B and MyD88 were detected by real-time PCR and Western Blot. **Results:** PCR results showed that mRNA expression levels of TLR4, NF- κ B and MyD88 in model group 2 were significantly higher than that in model group 1. Electroacupuncture treatment significantly inhibited mRNA expression levels of TLR4, NF- κ B and MyD88 ($P < 0.05$). Western Blot results showed that the protein expression levels of TLR4, NF- κ B and MyD88 in model group 2 were significantly higher than that in model group 1. Electroacupuncture significantly inhibited the protein expression levels of TLR4, NF- κ B and MyD88 ($P < 0.05$).

The mRNA and protein levels of TLR4, NF- κ B and MyD88 were up-regulated with the extension of modeling time.

Conclusion: Electroacupuncture can regulate TLR4/NF- κ B signaling pathway and inhibit synovial inflammatory reaction, thus playing a therapeutic role in knee osteoarthritis.

Keywords: knee osteoarthritis, synovitis; signaling pathway; electroacupuncture; mechanism study

基金项目:2018 年北京中医药大学校级课题青年教师项目
(2018-JYBZZ-JS199)

¹ 北京中医药大学第三附属医院针灸科(北京,100029)

² 北京中医药大学研究生院

[△]通信作者 E-mail:baipeng1978@163.com

膝关节炎(Knee Osteoarthritis, KOA)是临床常见的以膝关节软骨破坏为主要特性的退行性骨关节疾病。其病变过程累积整个膝关节,包括软骨、软骨下骨、滑膜及周围韧带等软组织结构,表现为全方位、多层次、不同程度的慢性炎症^[1]。然而目前其病因病机并不清楚,之前研究认为软骨损伤是 KOA 的病因也是导致 KOA 的病理结果,近些年来随着研究的不断深入,滑膜炎症在 KOA 病变过程中的作用逐渐被认识,而且滑膜炎症可能作为 KOA 病变的使动因素^[2]。我们知道关节滑液主要由滑膜组织分泌,当滑膜发生炎症病变时关节滑液中透明质酸(HA)和润滑素等成分都会降低,这些改变会对软骨产生不利影响^[3]。而在 KOA 进展过程中,滑膜炎症也会导致大量炎症因子及金属蛋白酶等分解酶的产生,进一步促进软骨基质的降解^[4]。在疾病发展过程中许多 OA 患者关节滑膜表现出非感染性慢性炎症的特征,但目前关于 OA 滑膜炎的原因仍存在争议^[5]。前期临床研究结果表明电针疗法对于 KOA 效果显著^[6],然而其具体的作用机理有待于进一步探讨。因此本研究采用电针疗法对模型兔进行干预,并采用 RT-PCR 法及 Western Blot 法对兔滑膜样本中 TLR4/NF- κ B 信号通路的主要成分进行检测,旨在从分子生物学层面探求电针治疗膝关节骨性关节炎的作用机制,明确电针治疗 KOA 的特异性作用靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康 6 个月龄新西兰大白兔 44 只,雌雄各半,体重 2.0~2.5 kg,由北京金牧阳实验动物养殖有限公司提供(许可证号为 SCXK(京)2015-0005),饲养于中日友好医院临床医学研究所动物试验中心。所有家兔适应性喂养 1 周后随机分成 6 组,其中空白组 4 只,假手术组、模型 1 组、模型 2 组、电针 1 组、电针 2 组每组 8 只。其中空白组双膝取材,其余各组左侧膝关节取材。在实验过程中,对动物的处置经过北京中医药大学动物护理和使用委员会批准,并严格按照《实验动物护理和使用指南》福利伦理执行。

1.2 主要试剂及仪器

TRNzol 总 RNA 提取试剂盒,天根生化科技有限公司提供;PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser, SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus), ROX plus, DL2000 DNA Marker, 由 TaKaRa 公司提供;TLR4、NF- κ B 及 MyD88,美国 Abcam 公司提供;二抗及 NC 膜(0.45 μ m),由美国 Millipore 公司提供。离心机,德国 Eppendorf 公司;分光光度计,美国 Thermo scientific 公司;荧光定量 PCR 仪,美国 Applied Biosystems 公司;Fresco 低温冷冻离心机,美

国 Thermo 公司;湿转电泳槽,Cavoy 公司;电泳仪,美国 Bio-Rad 公司。

1.3 模型制备

造模组:模型 1 组、模型 2 组、电针 1 组、电针 2 组采用改良 Hulth 法制备动物左膝 KOA 模型^[7],术后不固定患肢,驱赶动物缩短造模时间。其中模型 1 组与电针 1 组造模时间为 2 周,模型 2 组与电针 2 组造模时间为 4 周。术后肌注庆大霉素注射液 3 d (0.125 mL/kg),1 次/d 抗感染。假手术组:与造模组相同方法入路切开皮肤及关节囊进入关节腔,生理盐水冲洗后逐层缝合关节囊及皮肤,以排除手术因素的干扰。空白组:正常饲养,不作任何处理。

1.4 术后干预

1.4.1 取穴 选取 KOA 兔膝关节周围穴位:阳陵泉、阴陵泉、内膝眼、犊鼻、梁丘、血海等穴参照《实验针灸学》^[8]与《动物针灸学》^[9],并结合动物比较学方法,根据比较解剖取穴法并结合模拟骨度分寸取穴法,选取兔膝关节周围上述腧穴进行治疗。

1.4.2 治疗 电针组:选取“内膝眼”“犊鼻穴”“阴陵泉”“阳陵泉”“血海”及“梁丘”穴,用毫针进行针刺,直刺约 5 mm。采用英迪脉冲针灸治疗仪进行电针治疗,选取两组电针,一组“正极:梁丘,负极:血海”、另一组“正极:犊鼻穴,负极:内膝眼”。疏密波,强度 1~2 mA,以免下肢微微抖动为度,每次 20 min。电针 1 组造模 2 周后给予电针干预,电针 2 组造模 4 周后给予电针干预,隔日治疗 1 次,每周治疗 3 次,共治疗 4 周。

1.5 取材处理

各组在造模结束或治疗结束后分批取材,3%戊巴比妥钠水溶液麻醉后,局部常规消毒,以造模时原切口路入。切开皮肤、皮下组织,打开关节腔,分离剔取滑膜,迅速装入相应分组标记的 EP 管内,及时投入液氮冷冻,后保存于一 80 ℃冰箱冻存待检,用于实时 PCR 和 Western Blot 检测。

1.6 检测方法及指标

1.6.1 实时 PCR 检测 各组滑膜中 TLR4、NF- κ B、MyD88 的 mRNA 表达水平 将滑膜组织匀浆后,采用 Trizol 总 RNA 提取试剂进行样本 RNA 提取,采用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 进行 cDNA 反转录,2 μ L cDNA 为模板扩增 TLR4、NF- κ B、MyD88 及 ACTIN,具体步骤按照说明书进行。所用引物序列见表 1。

1.6.2 Western Blot 测定 滑膜中 TLR4、NF- κ B、MyD88 的蛋白表达 BCA 蛋白定量后,每孔上样 30 μ g,SDS-PAGE 胶电泳分离蛋白,采用湿转法转膜,5%的脱脂奶室温下封闭 2 h,然后分别加入一抗

在 4℃ 过夜孵育, TBST 洗涤 5 min×4 次, 加入相应的二抗室温孵育 1 h, 再用 TBST 洗涤 5 min×4 次, ECL 发光试剂盒显影, Bio-Rad 荧光扫描仪扫描显像。

表 1 TLR4、NF-κB 及 MyD88 引物序列设计		
引物名称	引物序列(5' to 3')	产物长度 /bp
TLR4 上游引物	GAAAGTATGGTAGGGG TGAAAGCG	161
TLR4 下游引物	GTGAAGGCAGAGCCGAA AGG	
NF-κB 下游引物	GAAGGACAAGACCAAAT TCTCAGT	121
NF-κB 下游引物	GCAGGCTATTGCTCAAC ACG	
MyD88 上游引物	CTACTGCCCCAGCGACAT	175
MyD88 下游引物	CGAGACGACCACCACC AT	
ACTIN 上游引物	AAGTGCACGTGGACA TCCG	109
ACTIN 下游引物	GGGCGGTGATCTCCTT CTGC	

表 2 各组兔关节滑膜中 TLR4、NF-κB、MyD88 的 mRNA 表达水平(̄x±s)			
组别	TLR4	NF-κB	MyD88
空白组	1	1	1
假手术组	1.37±0.14▲	1.02±0.42▲	1.65±0.28▲
模型 1 组	7.87±2.20*	12.09±2.03*	8.77±2.58*
模型 2 组	10.50±3.32*◆	15.84±3.97*◆	11.22±3.89*◆
电针 1 组	3.54±1.21*#	1.32±0.57#	3.68±2.64*#
电针 2 组	3.14±1.35*#	1.49±0.97#	4.78±3.94*#★

注:▲与空白组比较, P>0.05; * 与假手术组比较, P<0.05; # 与相应电针组比较, P<0.05; ★电针 1 组与电针 2 组比较, P<0.05; ◆模型 1 组与模型 2 组比较, P<0.05。

表 3。模型组 1、2 中 TLR4、NF-κB 及 MyD88 的蛋白表达水平显著高于假手术组, 差异有统计学意义(P<0.05); 电针 1 组及电针 2 组中 TLR4、NF-κB 及 MyD88 的蛋白表达水平显著低于与其对应的模型 1

1.7 统计学方法

采用 SPSS22.0 软件进行统计学分析, 定量资料以 ̄x±s 表示。对实验数据做正态分布检验和齐性检验, 若两项符合各组组间差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 继以 LSD 检验; 若有一项不符合, 则采用非参数检验, P<0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实时 PCR 检测

各组 TLR4、NF-κB、MyD88 的 mRNA 表达结果见表 2。模型组 1、2 中 TLR4、NF-κB 及 MyD88 的 mRNA 表达水平显著高于假手术组, 差异有统计学意义(P<0.05); 电针 1 组及电针 2 组中 TLR4、NF-κB 及 MyD88 的 mRNA 表达水平显著低于与其对应的模型 1 组和模型 2 组, 差异有统计学意义(P<0.05); 模型 2 组与模型 1 组比较 TLR4、NF-κB 及 MyD88 的 mRNA 表达水平均升高, 差异有统计学意义(P<0.05)。

2.2 Western Blot 检测

各组滑膜中 TLR4、NF-κB、MyD88 蛋白表达见

表 3 各组兔关节滑膜中 TLR4、NF-κB、MyD88 的蛋白表达水平(̄x±s)			
组别	TLR4	NF-κB	MyD88
空白组	0.32±0.02	0.27±0.02	0.29±0.01
假手术组	0.29±0.01▲	0.25±0.03▲	0.26±0.02▲
模型 1 组	0.49±0.06*	0.61±0.12*	0.75±0.24*
模型 2 组	0.57±0.09*◆	0.70±0.09*◆	0.82±0.20*◆
电针 1 组	0.35±0.22#	0.30±0.01#	0.60±0.74*#
电针 2 组	0.30±0.02#	0.28±0.02#	0.45±0.11*#★

注:▲与空白组比较, P>0.05; * 与假手术组比较, P<0.05; # 与相应电针组比较, P<0.05; ★电针 1 组与电针 2 组比较, P<0.05; ◆模型 1 组与模型 2 组比较, P<0.05。

3.1 滑膜炎症在 KOA 病变过程中的重要作用

KOA 是临床中常见的肌肉骨骼疾病, 临床发病率较高, 35% 以上中年人受到其困扰, 严重影响人们的生活质量^[10]。本病的发病机制目前尚不清楚, 因此还没有一种方法能够从根本上逆转 KOA 的病理进程, 当

组和模型 2 组, 差异有统计学意义(P<0.05); 模型 2 组与模型 1 组比较, TLR4、NF-κB 及 MyD88 的蛋白表达水平均升高, 差异有统计学意义(P<0.05)。

3 讨论

前的治疗方式主要为对症治疗, 并且存在一定的副作用。以往的研究结果认为软骨损伤是 KOA 发病的主要病理机制, 随着研究的逐渐深入滑膜炎症在 KOA 病理和临床中扮演的角色逐渐被认识, 现在已经知道在许多 KOA 患者的疾病发展过程中关节滑膜表现出

非感染性慢性炎症的特征^[11]。滑膜炎症与疼痛和关节功能障碍程度密切相关,炎症状态下滑膜分泌的关节液含有大量的细胞因子和趋化因子,加速软骨细胞损伤及细胞外基质的分解,从而导致关节退变发生^[12]。被破坏的细胞外基质及脱落的碎片进入关节腔,刺激滑膜导致炎症进一步扩大化,促进炎性介质释放进入滑液,这些介质亦可诱发滑膜血管生成、激活细胞因子和关节软骨表面的 MMPs,加重软骨的退变,进一步破坏关节内环境,从而形成恶性循环^[13]。

大量研究表明无论是在 OA 疾病的早期或末期都伴有滑膜炎症的存在,并且通过关节镜、MRI 和超声检测到的滑膜炎进展程度可以作为评价 OA 病变严重程度的指标^[14]。这与中医的筋骨理论相一致,滑膜属于软组织,属于中医经筋的范畴。当肌肉过度收缩的时候,产生的应力沿经筋进行传导,引起膝周的软组织损伤,即“筋伤”。膝周软组织损伤导致力学失衡,进而诱发滑膜炎症。滑膜炎症与软骨损伤之间形成恶性循环,这是一个由筋及骨的传变过程,筋伤而骨损,骨损进一步加重筋伤。因此在临床治疗上抑制滑膜炎症反应对于治疗 KOA 具有重要意义。

3.2 TLRs/NF- κ B 信号通路介导的滑膜炎症反应是促进 KOA 滑膜炎的关键环节

TLRs 是固有免疫系统中一类重要的模式识别受体(PRRs),广泛参与病原相关分子模式(PAMPs)或内源性危险信号相关分子模式(DAMPs)的感知,诱导多种促炎性因子合成和释放,引发或加重炎症^[15]。DAMPs 包括分布于 KOA 滑液中的小分子量透明质酸、纤维连接蛋白、细胞粘素 C、高迁移率族蛋白 B1(S100 proteins, HMGB-1)等内源性物质,这些内源性物质来源于无菌性组织损伤或细胞应激导致降解的细胞外基质^[16-18]。激活的 TLRs/NF- κ B 信号通路最终通过活化转录因子 AP-1,进而启动 IL-1 β 等一系列促炎性因子基因转录和表达^[19]。释放至胞外的 IL-1 β 通过与 IL-1 受体结合激活 IL-1 信号通路和 TLRs/NF- κ B 信号通路,募集炎性细胞、刺激滑膜细胞增殖、促进滑膜血管生成,释放更多的炎性因子及蛋白酶进入关节,发生炎症级联放大效应^[20],使 KOA 炎症反应持续,进一步加重 KOA 病变进程。因此, KOA 滑膜固有免疫应答通过 DAMPs/TLRs/NF- κ B 信号通路激活 KOA 滑膜炎症反应,是 KOA 可能的发病机制。

3.3 电针治疗 KOA 的作用机制

临床研究证实电针能够通过缓解疼痛、改善关节功能、增强肌力从而达到治疗 KOA 的目的^[6]。然而电针治疗 KOA 的具体作用机制有待研究,刘苗苗等^[21]发现电针能够通过降低 KOA 大鼠滑膜组织中基质金属蛋白酶-3(MMP-3)和基质金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1)的高表达,达到缓解疼痛、消肿的目的。王

道海等^[22]发现电针能够通过上调碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的表达促使 KOA 大鼠关节损伤软骨的修复。本研究从滑膜炎症角度出发,探讨电针对于 TLRs/NF- κ B 信号通路介导的滑膜炎症的干预作用。研究结果发现,TLR4、NF- κ B 及 MyD88 三种指标在实验过程中变化趋势基本一致,在两模型组中 mRNA 及蛋白表达水平显著高于假手术组,说明 TLR4、NF- κ B 及 MyD88 的 mRNA 及蛋白的表达在滑膜炎症中呈现特异性增加的趋势;在电针 1 组与电针 2 组中 mRNA 及蛋白表达水平显著高于模型 1 组和模型 2 组,说明电针治疗可以抑制 TLR4、NF- κ B 及 MyD88 的 mRNA 及蛋白的表达;模型 2 组与模型 1 组比较 TLR4、NF- κ B 及 MyD88 的 mRNA 及蛋白表达水平升高,说明随着造模时间的延长,TLR4、NF- κ B 及 MyD88 的 mRNA 及蛋白表达水平呈上调的趋势;而电针 1 组与电针 2 组的表达趋势未出现明显差异,说明电针对 KOA 不同时期模型的 TLR4、NF- κ B 及 MyD88 的 mRNA 及蛋白表达均具有调控作用。

综上所述,电针可以通过调控 TLRs/NF- κ B 信号通路介导的滑膜炎症反应达到治疗 KOA 的目的。

参考文献

- [1] ROSSANA D,ROSSELLA Z,FEDERICA C,et al. Characterization of the proinflammatory profile of synovial fluid-derived exosomes of patients with osteoarthritis[J]. *Mediators of Inflammation*,2017(1):4814987.
- [2] WANG H,WNAG Q,YANG M,et al. Histomorphology and innate immunity during the progression of osteoarthritis:Does synovitis affect cartilage degradation? [J]. *Journal of Cellular Physiology*,2018,233(2):1342-1358.
- [3] RHEE D K,MARCELINO J,BAKER M,et al. The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth[J]. *J Clin Invest*,2005,115(3):622-631.
- [4] BONDESON J,BLOM A B,WAINWRIGHT S,et al. The role of synovial macrophages and macrophage-produced mediators in driving inflammatory and destructive responses in osteoarthritis[J]. *Arthritis Rheum*,2010,62(3):647-657.
- [5] SELAM J,BERENBAUM F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis[J]. *Nat Rev Rheumatol*,2010,6(11):625-635.
- [6] 殷岳杉,阮安民,赵万明,等. 电针治疗膝骨关节炎的临床疗效观察[J]. *中国中医骨伤科杂志*,2019,27(12):48-51.
- [7] 刘献祥,李西海,周江涛. 改良 Hult 造模法复制膝骨关节炎的实验研究[J]. *中国中西医结合杂志*,2005,25(12):1104-1108.
- [8] 张露芬. 实验针灸学[M]. 北京:化学工业出版社,2004:792.