

• 实验研究 •

温针灸内、外膝眼穴对膝骨性关节炎兔软骨组织 Caspase-3、Caspase-9 mRNA 表达的影响*

王 舰^{1,2}, 王巧灵^{1,2}, 林淑芳^{1,2}

(1. 福建中医药大学附属康复医院, 福建 福州 350003; 2. 福建省康复产业研究院, 福建 福州 350003)

摘要: **目的** 观察温针灸内、外膝眼穴对膝骨性关节炎兔软骨组织细胞凋亡调控蛋白 Caspase-3、Caspase-9 表达的调节作用。**方法** 将 18 只新西兰兔随机分为正常对照组(正常组)、膝骨性关节炎组(模型组)和温针灸内、外膝眼穴组(温针组)。采用关节腔注射木瓜蛋白酶法制作膝骨性关节炎模型。造模后温针组于内外膝眼穴处行温针灸 20min, 隔天 1 次, 每 2 周为 1 个疗程, 中间休息 2d, 共治疗 4 个疗程。模型组和正常组不给予任何治疗。RT-qPCR 法检测软骨组织 Caspase-3、Caspase-9 mRNA 表达。**结果** (1)温针灸干预后, 新西兰兔的精神、食欲、膝关节活动能力等均明显改善。(2)模型组与正常组比较, 膝关节软骨组织 Caspase-3、Caspase-9 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.001$), 温针组与模型组比较, 膝关节软骨组织 Caspase-3、Caspase-9 mRNA 表达显著下调 ($P < 0.05$)。**结论** 温针灸内、外膝眼穴能下调膝关节软骨组织中细胞凋亡调控蛋白 Caspase-3、Caspase-9 mRNA 的表达, 抑制软骨细胞凋亡通路的信号转导。

关键词: 膝骨性关节炎; 温针灸; Caspase-3; Caspase-9

中图分类号: R245

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2017)04-0001-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.04.001

膝骨性关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种以关节软骨退变为特征的慢性、进展性疾病, 主要表现为关节肿胀、僵硬、疼痛^[1-2]。国内外研究表明, 其发病率与年龄呈正相关^[3-5]。在我国其患病率为 40 岁以上人群为 10%~17%, 60 岁以上为 50%, 75 岁以上则达 80%, 而该病最终致残率为 53%, 被称为人类“下半生疾病”^[6]。KOA 的发病机制目前仍未完全明确, 但是较多研究表明软骨细胞凋亡是其重要的病理机制^[7]。目前研究发现^[8], 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(Caspase)家族是软骨细胞凋亡调控的中心执行者。细胞凋亡活化复合体激活 Caspase-9 及下游的 Caspase-3, 最终导致细胞凋亡。因此, 治疗的重点在于通过调控软骨细胞凋亡, 缓解疼痛、延缓疾病的发生发展, 保护关节软骨功能。

本研究拟从分子生物学层面探讨温针灸内、外膝眼穴调控软骨细胞凋亡的可能作用靶点, 旨在为防

治膝骨性关节炎的研究提供思路。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

健康雄性新西兰兔 18 只, 普通级, 体质量 2.5~3.0kg, 由上海松江区松联实验动物场提供, 许可证号: SCXK(沪)2012-0011。购入后所有动物均分笼单独饲养于福建省中医药研究院实验动物中心。按随机数字表法随机将动物分为正常对照组(正常组)、膝骨性关节炎组(模型组)和温针灸内、外膝眼穴组(温针组)。实验动物条件符合国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》要求。实验过程中对动物的处置符合 2006 年科技部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》要求。

1.2 仪器和试剂

C1000 型 PCR 仪(美国 Bio-rad 公司); 7900 型荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司);

* 基金项目: 福建省自然科学基金项目(2016J01379); 福建省科技厅科技平台建设项目(2015Y2001)

收稿日期: 2017-08-08

作者简介: 王舰(1971-), 男, 福建福州人, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 神经及骨科康复。

E-mail: 13705059855@139.com

ND2000C 型超微量分光光度计 (美国 Thermo Scientific 公司);Primo R 型台式冷冻离心机 (美国 Thermo Fisher 公司)。0.25mm×25mm 一次性无菌针灸针 (苏州医疗用品厂有限公司);5mm 清艾条 (珠海宜灸科技有限公司)。总 RNA 提取试剂盒 (德国 Qiagen 公司);反转录试剂盒 (美国 Thermo Scientific 公司);聚合酶链反应 (PCR)试剂盒 (美国 Applied Biosystems 公司);Caspase-3、Caspase-9 及 GAPDH 引物 (德国 Qiagen 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 膝骨性关节炎模型的制作

适应性喂养 7d 后,按照日本头康彦等^[9]的兔膝关节腔内注射木瓜蛋白酶的方法对模型组和温针组动物造模。将新西兰兔左侧膝关节周围剃毛,然后用 75% 的乙醇消毒局部皮肤,将膝关节弯曲,分别于实验第 1、4、7 天将 4% 木瓜蛋白酶生理盐水溶液 0.1mL 注入兔膝关节腔中。术中注意尽量不刺激关节软骨及滑膜。术后兔子自由饮水、摄食、活动。

1.3.2 干预方法

参考《实验针灸学》和《实用动物针灸手册》进行取穴^[10-11],内膝眼 (EX-LE4):屈膝,在膝部,髌韧带内侧凹陷处。外膝眼 (EX-LE5):屈膝,在膝部,髌骨与髌韧带外侧凹陷中。于最后 1 次造模 1 周后开始温针灸治疗。温针灸操作参考 2009 年由中国国家标准化管理委员会主编中国标准出版社出版的《针灸技术操作规范第 1 和 20 部分:毫针基本刺法 (GB/T 21709.20-2009)、温针灸操作法 (GB/T 21709.1-2008)》^[12]。具体操作:将兔子固定于兔台,剃除左侧上述穴位处兔毛,常规消毒,用 0.25mm×25mm 规格的毫针由外膝眼进针,透过皮肤后调整针刺方向,向内膝眼方向进行透刺,当针尖抵达内膝眼皮下时停止进针,施以捻转补泻手法得气 (平补平泻,以手下有沉紧感为度),然后针尾插上艾条,点燃艾条行温针灸,留针 20min,隔天 1 次,每 2 周为 1 个疗程,中间休息 2d,共治疗 4 个疗程。模型组和正常组不给予任何治疗。

1.3.3 Caspase-3、Caspase-9 mRNA 检测

治疗周期结束后,经耳缘静脉空气栓塞处死动物,立即切开左侧膝关节腔,用锐利刀片在冰上切取膝关节软骨,液氮速冻后保存于-80℃冰箱。将软骨组织于液氮中研磨后按 QIAGEN 公司 RNeasy®

Mini Kit 试剂盒提取总 RNA;于紫外分光光度计测量 RNA 样品的浓度和纯度;使用 Thermo 公司 Revertaid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒进行逆转录反应;取逆转录产物分别进行 Caspase-3、Caspase-9 mRNA 的 Real Time PCR 反应,以 GAPDH 作为内参照。新西兰兔 Caspase-3 上游引物为 5'GC-GACTCAGTCTTGAGGTGTC3',下游引物为 5'TAT-GACAGGGCGCCTAAGAG3';caspase-9 上游引物为 5'GGCTGTATATCTGCTCTATATGC3'下游引物为 5'CCGTTGGTCCTTTGTCCATCAG3';GAPDH 上游引物为 5'CAACGGGAAACCCATCACCA3',下游引物为 5'ACGCCAGTAGACTCCACGACAT3'。荧光定量 PCR 反应体系:SYBR® Universal PCR Master Mix 10μL,Primer 1μL,cDNA 2μL,ddH₂O 7μL,总体积 20μL。反应条件:①50℃预变性 2min;②95℃变性 10min;③55℃退火 15s,60℃延伸 30s,循环 40 次。采用 ABI 7900 Real time PCR 仪检测各样本中 mRNA 的表达情况。实验采用 $\Delta\Delta C_t$ 法:每个标本重复 3 次, C_t 值取平均值;以 GAPDH 为内参,校正每个样品的 C_t 值,得 ΔC_t 值。以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各样品的 Caspase-3、Caspase-9 mRNA 表达量。

1.3.4 统计学分析

数据以均值±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,采用 SPSS17.0 软件进行单因素方差分析。当方差齐时,使用 LSD 检验,当方差不齐时,使用 Games-Howell 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

造模及干预过程中,无动物死亡。正常组新西兰兔在实验期间精神、食欲、活动、步态等均正常;模型组和温针组新西兰兔造模后精神、食欲较差,左侧膝关节活动僵硬跛行,活动频次减少;温针组干预疗程结束后,新西兰兔的精神、食欲、膝关节活动能力等较模型组改善明显。对各组新西兰兔的精神、食欲、膝关节活动能力从低到高分 I-III 3 级。详见表 1。

表 1 各组新西兰兔一般情况

组别	例数	死亡数	精神食欲状态			膝关节活动能力		
			I	II	III	I	II	III
正常组	6	0	0	0	6	0	0	6
模型组	6	0	6	0	0	6	0	0
温针组	6	0	0	6	0	0	6	0

2.2 各组新西兰兔膝关节软骨组织 Caspase-3、Caspase-9 mRNA 表达水平比较

正常组、模型组和温针组新西兰兔膝关节软骨组织均表达 Caspase-3、Caspase-9 mRNA, 模型组新西兰兔膝关节软骨组织 Caspase-3、Caspase-9 mRNA 的表达均较正常组明显升高 ($P<0.001$); 温针组新西兰兔膝关节软骨组织 Caspase-3、Caspase-9mRNA 表达均显著低于模型组 ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组新西兰兔膝关节软骨组织 Caspase-3、Caspase-9 mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Caspase-3	Caspase-9
正常组	6	1.0041 $\pm$ 0.0781	1.0464 $\pm$ 0.0543
模型组	6	1.8150 $\pm$ 0.1118*	1.8668 $\pm$ 0.0801*
温针组	6	1.5308 $\pm$ 0.0585 Δ	1.5998 $\pm$ 0.0891 Δ

注:与正常组比较,* $P<0.001$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$

3 讨论

膝骨性关节炎(KOA)属于中医“痹症”范畴。《素问·痹论》认为:“风寒湿三气杂至合而为痹也”,其病机系肢体经络为风寒湿邪所闭塞,导致气血不通,经络痹阻,引起关节、筋骨等疼痛、酸楚、重着、屈伸不利,甚至关节肿大变形。《张氏医通》亦云:“膝为筋之府,膝痛无有不因肾虚者,虚则风寒湿气袭之。”古人认为肾虚是膝骨性关节炎的病变根本, 风寒湿邪是致痹外因,瘀血是病变过程中的病理产物。因此本病治疗的重点在于祛风散寒、活血通络、补肾固本。《千金方》记载:膝眼“在膝头骨下,两旁陷者宛宛中”,指有内外两穴是膝眼穴。《外台秘要》称“膝目”,《胜玉歌》:“两膝无端肿如斗,膝眼、三里艾当施”。《玉龙歌》:“髌骨能医两腿疼,膝头红肿不能行,必针膝眼、膝关穴,功效须臾病不生”。故笔者采用温针灸治疗此病,亦以活血通络、祛风散寒、除湿为原则,选用内、外膝眼穴,加用艾条温针灸,取得了较好的效果,值得推广应用。

近年来研究者在膝骨关节炎与软骨细胞凋亡之间的关系方面作了大量的研究,较多研究表明软骨细胞凋亡是其重要的病理机制。细胞凋亡(Apoptosis)又称细胞程序性死亡(programmed cell death,PCD),是生物体内的细胞受基因调控出现的死亡现象。KOA的发病是由于软骨细胞的凋亡超出一定的范围,导致软骨细胞的数量减少,进而引起维持软骨基

质合成与降解酶系统平衡的紊乱,最终引起软骨基质的质与量发生变化,软骨基质的这种变化又会促进软骨细胞的凋亡,如此形成恶性循环,从而导致关节软骨退变的发生^[13-14]。

目前研究发现,Caspase 家族是软骨细胞凋亡调控的中心执行者。软骨细胞凋亡机制主要有外源性和内源性途径两种,外源性途径先形成凋亡诱导信号复合体(DISC)激活 Caspase-3,引起细胞凋亡;内源性途径也需要先形成凋亡活化复合体,然后激活 Caspase-9 及下游的 Caspase-3,最终导致细胞凋亡^[15]。本研究通过实验发现,模型组新西兰兔膝关节软骨组织 Caspase-3、Caspase-9 mRNA 的表达较正常组显著升高 ($P<0.001$),提示 Caspase-3、Caspase-9 在膝骨性关节炎的发生发展中发挥重要作用,这与前期研究一致^[16-17]。与模型组比较,温针组新西兰兔的精神、食欲、膝关节活动能力等均明显改善,并且膝关节软骨组织 Caspase-3、Caspase-9 mRNA 的表达显著下降 ($P<0.05$),温针灸内外膝眼穴可能是通过调控软骨组织中细胞凋亡调控蛋白 Caspase-3、Caspase-9 mRNA 表达的途径来抑制软骨细胞凋亡,从而促进关节软骨修复。

参考文献:

- [1] Takács-Buia L, Iordachel C, Efimov N, et al. Pathogenesis of osteoarthritis: chondrocyte replicative senescence or apoptosis[J]. Cytometry B Clin Cytom, 2008, 74(6): 356-362.
- [2] Ea HK, Monceau V, Camors E, et al. Annexin 5 overexpression increased articular chondrocyte apoptosis induced by basic calcium phosphate crystals [J]. Ann Rheum Dis, 2008, 67(11): 1617-1625.
- [3] Okazaki R, Sakai A, Ootsuyama A, et al. Apoptosis and p53 expression in chondrocytes relate to degeneration in articular cartilage of immobilized knee joints [J]. J Rheumatol, 2003, 30(3): 559-566.
- [4] Englund M, Turkiewicz A. Osteoarthritis increasingly common public disease [J]. Lakartidningen, 2014, 111(21): 930-931.
- [5] 姚兴璋, 李兴勇. 从流行病学浅析膝关节骨性关节炎的危险因素[J]. 西部中医药, 2012, 25(9): 132-135.
- [6] 中华医学会风湿病学分会. 骨关节炎诊治指南(草案) [J]. 中华风湿病学杂志, 2003, 7(11): 702-704.
- [7] Lin HD, He CQ, Luo QL, et al. The effect of low-level-

- el laser to apoptosis of chondrocyte and caspases expression, including caspase-8 and caspase-3 in rabbit surgery-induced model of knee osteoarthritis [J]. *Rheumatol Int*, 2012, 30(3): 759-766.
- [8] 袁长青, 丁振华. Caspase 的活化及其在细胞凋亡中的作用[J]. *生理科学进展*, 2002, 33(3): 220-224.
- [9] Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry[J]. *Circ Res*, 2003, 92(8): 827-839.
- [10] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 314.
- [11] 胡元亮. 实用动物针灸手册[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 288.
- [12] 中国国家标准化管理委员会. 针灸技术操作规范第 20 部分: 毫针基本刺法[M]. 北京: 中国标准出版社, 2009: 20-23.
- [13] Legendre F, Heuze A, Boukerrouche K, et al. Rhein, the metabolite of diacerhein, reduces the proliferation of osteoarthritic chondrocytes and synoviocytes without inducing apoptosis[J]. *Scand J Rheumatol*, 2009, 38(2): 104-111.
- [14] Pischon N, Rohner E, Hocke A, et al. Effects of Porphyromonas gingivalis on cell cycle progression and apoptosis of primary human chondrocytes [J]. *Ann Rheum Dis*, 2009, 68(12): 1902-1907.
- [15] 梁英杰, 周德鹏, 曹东华, 等. Wortmannin 对糖尿病大鼠肺组织 Caspase-3 与 Caspase-9 表达的影响 [J]. *中国实验诊断学*, 2016, 20(9): 1428-1431.
- [16] 张振雨, 叶伟, 黄东生, 等. 兔软骨终板细胞凋亡与 Caspase-3 和 Fas 表达的实验研究 [J]. *中国临床解剖学杂志*, 2006, 24(5): 553-556.
- [17] 谢薇, 周君, 罗庆禄, 等. 脉冲电磁场对兔膝关节炎软骨细胞凋亡及凋亡调控蛋白的影响 [J]. *四川大学学报(医学版)*, 2014, 45(1): 107-110.
- (编辑: 徐建平)

Effects of Warm-needle-moxibustion at Neixiyan(EX-LE4) and Waixiyan(EX-LE5) on the Expression of Caspase-3 and Caspase-9 mRNA in Knee Cartilage of Rabbits with Knee Osteoarthritis

WANG Jian^{1,2}, WANG Qiaoling^{1,2}, LIN Shufang^{1,2}

(1. Rehabilitation Hospital Affiliated To Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, 350003, China;

2. Fujian Provincial Rehabilitation Industrial Institution, Fuzhou, 350003, China)

ABSTRACT: **Objective** To observe the regulatory effects of Warm-needle-moxibustion at neixiyan(EX-LE4) and waixiyan(EX-LE5) on the expressions of Caspase-3 and Caspase-9 mRNA in Knee Cartilage of Rabbits with Knee Osteoarthritis. **Methods** 18 New Zealand rabbits were randomly divided into normal control group(normal group), Knee Osteoarthritis group(model group) and Warm-needle-moxibustion at neixiyan(EX-LE4) and waixiyan(EX-LE5) group(WNM group). The Knee Osteoarthritis model was made by injecting the papain into the joint cavity. After modeling, the WNM group were received Warm-needle-moxibustion at neixiyan (EX-LE4) and waixiyan (EX-LE5) for 20 min, 1 time every other day, every 2 weeks for 1 course rest for 2 days, a total of 4 courses of treatment. The model group and the normal group were not given any treatment. The expression of Caspase-3 and Caspase-9 mRNA in knee cartilage tissue was detected by RT-qPCR. **Results** (1) Compared with the model group, the spirit, appetite and knee joint activities of the rabbits in the WNM group were obviously improved. (2) The expression of Caspase-3 and Caspase-9 mRNA in the model group was both higher than those in normal group($P<0.001$). Compared with the model group, the expressions of Caspase-3 and Caspase-9 mRNA in the WNB group was significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion** Warm-needle-moxibustion at neixiyan (EX-LE4) and waixiyan (EX-LE5) can down-regulate the expression of Caspase-3 and Caspase-9 mRNA in knee cartilage of rabbits with Knee Osteoarthritis, and inhibit the signal transduction of chondrocyte apoptosis pathway.

KEY WORDS: knee osteoarthritis; warm-needle-moxibustion; Caspase-3; Caspase-9