

外膝眼透刺内膝眼温针灸对膝骨性关节炎兔软骨组织 Bax、Bcl-2 表达的影响 *

王 舰^{1,2}, 王巧灵³, 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;
3. 福建医科大学附属泉州第一医院, 福建 泉州 362000)

摘要: **目的** 观察外膝眼透刺内膝眼温针灸对膝骨性关节炎兔软骨组织 Bax mRNA、Bcl-2 mRNA 及 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响。**方法** 按随机数字表法将 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)和温针内、外膝眼穴组(温针组)。4%木瓜蛋白酶关节腔注射法制作膝骨性关节炎模型。温针组在造模后行内外膝眼穴温针灸治疗 20 min,隔天 1 次,每 2 周为 1 个疗程,中间休息 2 d,共治疗 4 个疗程。模型组和正常组不予任何治疗。RT-qPCR 法和 Western Blotting 法检测软骨组织 Bax mRNA、Bcl-2 mRNA 和 Bax、Bcl-2 蛋白表达。**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 Bax mRNA 和蛋白表达均显著升高 ($P<0.001$, $P<0.01$), Bcl-2 mRNA 和蛋白表达均明显降低 ($P<0.001$, $P<0.001$);温针组与模型组比较,温针组 Bax mRNA 表达显著降低 ($P<0.05$), Bcl-2 mRNA 和蛋白表达均明显升高 ($P<0.05$, $P<0.05$)。**结论** 温针内、外膝眼穴能下调软骨细胞促凋亡基因 Bax、上调抗凋亡基因 Bcl-2 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; Bax; Bcl-2

中图分类号: R245

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2018)01-0029-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2018.01.007

Effects of Bax and Bcl-2 in Knee Cartilage of Knee Osteoarthritis of Rabbits by Warm-Needle-Moxibustion at Neixiyan(EX-LE4) and Waixiyan(EX-LE5)

WANG Jian^{1,2}, WANG Qiaoling³, 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
3. Quanzhou First Hospital Of Affiliated to Fujian Medical University, Quanzhou 362000, China)

ABSTRACT: Objective To observe the regulatory effects Bax, Bcl-2 mRNA and protein in knee cartilage of rabbits by knee osteoarthritis of warm-needle-moxibustion at neixiyan (EX-LE4) and waixiyan (EX-LE5). **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) using the randomized controlled Methods. The knee osteoarthritis model was made by injecting four percent of papain into the joint cavity. The WNM group were received warm-needle-moxibustion at neixiyan (EX-LE4) and waixiyan (EX-LE5) for 20 min, one treatment for two days, every 2 weeks is a course of treatment, there are rest 2 days between 2 course, after 4 courses of treatment. The model group and the normal group were not given any treatment. The expressions of Bax mRNA、Bcl-2 mRNA and protein in knee cartilage tissue was detected by RT-qPCR and Western-Blotting. **Results** ① Compared with the model group, the spirit, appetite and knee joint activities of rabbits in the WNM Group were obviously improved. ② The expressions of Bax mRNA and protein in the model group were both higher than those in normal group ($P<0.001$, $P<0.01$), and the expressions

* 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: 2017-12-28

作者简介: 王舰(1971-),男,副主任医师,研究方向:神经及骨科康复。

of Bcl-2 mRNA and protein in the model group were both lower than those in normal group ($P<0.001$, $P<0.001$). Compared with the model group, the expressions of Bax mRNA in the WNB group were significantly decreased ($P<0.05$), and the expressions of Bcl-2 mRNA and protein in the model group were both obviously improved ($P<0.05$, $P<0.05$). **Conclusion** Warm-needle-moxibustion at neixiyan (EX-LE4) and waixiyan (EX-LE5) can down-regulate the expression of Bax mRNA in knee cartilage of rabbits with knee osteoarthritis, and can up-regulate the expression of Bcl-2 mRNA and protein to inhibit the signal transduction of chondrocyte apoptosis pathway.

KEY WORDS: knee osteoarthritis; warm-needle-moxibustion; Bax; Bcl-2

膝骨性关节炎(KOA)是一种由多因素引发的以关节软骨降解为基本特点的慢性、进展性、退行性改变的关节疾病,主要表现为关节疼痛、肿胀^[1-2]。目前研究表明,尚无逆转或中止 KOA 的药物,治疗的目的在于缓解疼痛、延缓疾病的发展,保护关节软骨功能。软骨细胞是关节软骨中唯一的细胞成分,其有维持、重建、塑形、更新的作用。因此,软骨细胞的老化、凋亡导致 KOA 的重要机制^[3]。研究发现,软骨细胞中的 Bax 基因是人体最主要的细胞凋亡促进基因,属于 Bcl-2 基因家族,对 Bcl-2 产生阻抑作用。Bax/Bcl-2 两蛋白之间的比例关系是决定对细胞凋亡(Apoptosis)抑制作用强弱的关键因素^[4]。

本实验采用关节腔注射木瓜蛋白酶法建立新西兰兔膝骨性关节炎模型,外膝眼透刺内膝眼温针灸,探讨温针灸对膝骨性关节炎兔软骨细胞 Bax、Bcl-2 的影响,旨在从分子生物学水平探讨外膝眼透刺内膝眼温针灸调控软骨细胞凋亡的可能作用靶点。

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 2.5~3.0 kg,购自上海松江区松联实验动物场,许可证号:SCXK(沪)2012-0011。所有动物购入后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)和温针内、外膝眼穴组(温针组)。本实验过程中的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,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 试剂及仪器 PCR 仪(C1000 型,美国 Bio-rad 公司);荧光定量 PCR 仪(7900 型,美国 Applied Biosystems 公司);超微量分光光度计(ND2000C 型,美国 Thermo Scientific 公司);凝胶成像系统(Dolphin-Chemi 型,美国 WEALTEC 公司);台式冷冻离心机(Primo R 型,美国 Thermo Fisher 公司)。一次性

无菌针灸针(0.25 mm×25 mm,苏州医疗用品厂有限公司);清艾条(直径 5 mm,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);Bax、Bcl-2 及 GAPDH 引物(德国 Qiagen 公司)。总蛋白提取试剂(杭州碧云天生物公司);Bax、Bcl-2 抗体(美国 CST 公司); β -Actin 抗体(英国 abcam 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 膝骨性关节炎模型的制作 将新西兰兔适应性喂养 7 d 后,按照关节腔内注射木瓜蛋白酶的方法^[5]对模型组和温针组新西兰兔制作膝骨性关节炎模型。用宠物剃毛器剃去新西兰兔左侧膝关节周围毛发,75%乙醇消毒膝关节局部皮肤,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 0.1 mL 注入兔膝关节腔中。术后兔子自由饮水、摄食、活动。

1.3.2 干预方法 穴位定位参考《实验针灸学》和《实用动物针灸手册》^[6-7],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)》^[8]。温针组治疗具体操作:将兔子固定于兔台,剃除左侧上述穴位处兔毛,常规消毒,用 0.25 mm×25 mm 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(进针深度为 0.8~1.2 寸)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 20 min,隔天 1 次,每 2 周为 1 个疗程,中间休息 2 d,共治疗 4 个疗程。模型组和正常组不给予任何治疗。

1.3.3 RT-qPCR 法检测 Bax、Bcl-2 mRNA 表达 将软骨组织置于液氮中研磨后按 RNeasy® Mini Kit 试剂盒提取总 RNA;于超微量分光光度计测量 RNA 样品的浓度和纯度;使用 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 Bax、Bcl-2 mRNA 的 Real Time PCR 反应,以 GAPDH 作为内参照。新西兰兔 Bax 上游引物为 5'GCCTCGCCAGAAATACATACGC 3',下游引物为 5'CTTCAAGTGTGGGACACTGCTC 3';Bcl-2 上游引物为 5'ACCGTTTGCATGCCATGTTCT 3'下游引物为 5'5'TCACGGTGCAGGTGCTACAA 3';GAPDH 上游引物为 5'CAACGGGAAACCCATCACCA 3',下游引物为 5'ACGCCAGTAGACTCCACGACAT 3'。荧光定量 PCR 反应体系组成:SYBR® Universal PCR Master Mix 10 μ L,上下游引物各 0.5 μ L,cDNA 2 μ L,ddH₂O 7 μ L。反应条件:① 50 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;② 95 $^{\circ}$ C 变性 10 min;③ 55 $^{\circ}$ C 退火 15 s,60 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,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 Bax、Bcl-2 mRNA 表达量。

1.3.4 Western Blot 法检测 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达 将软骨组织置于液氮中研磨后进行总蛋白提取,BCA 法进行蛋白定量。聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白质,按常规方法电转移至 PVDF 膜,封闭液封闭 2 h 后加一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,加二抗室温孵育 2 h,每个反应后均用 TBS 洗涤 3 次,每次 10 min。将 PVDF 膜蛋白面朝上置于凝胶成像系统密封暗箱内采用化学发光法显影,用凝胶图像处理系统分析目标条带的灰度值,分别以 Bax、Bcl-2 与 β -actin 的光密度比值代表 Bax、Bcl-2 蛋白的相对表达量。

1.3.5 统计学处理 数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,应用 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,无动物死亡脱落。正常组新西兰兔在实验期间精神、食欲状态正常,

活动自如;模型组和温针组新西兰兔造模后精神、食欲较差,左后肢力量减低,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。

2.2 各组新西兰兔膝关节软骨组织 Bax mRNA、Bcl-2 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 Bax mRNA、Bcl-2 mRNA 表达水平与正常组比较,模型组新西兰兔膝关节软骨组织 Bax mRNA 表达明显升高($P<0.001$),Bcl-2 mRNA 表达明显减低,差异具有统计学意义($P<0.001$);温针组新西兰兔膝关节软骨组织 Bax mRNA 表达较模型组明显减低,差异具有统计学意义($P<0.05$),而 Bcl-2 mRNA 表达较模型组明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组新西兰兔膝关节软骨组织 Bax mRNA、Bcl-2 mRNA 表达的比较($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	Bax mRNA	Bcl-2 mRNA
正常组	1.0222 $\pm$ 0.0189	0.9921 $\pm$ 0.0344
模型组	1.7388 $\pm$ 0.0461*	0.6019 $\pm$ 0.0246*
温针组	1.4878 $\pm$ 0.0565 Δ	0.7260 $\pm$ 0.0344 Δ

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

2.3 各组新西兰兔膝关节软骨组织 Bax、Bcl-2 蛋白表达水平比较 正常组、模型组和温针组新西兰兔膝关节软骨组织均有 Bax、Bcl-2 蛋白表达;与正常组比较,模型组新西兰兔膝关节软骨组织 Bax 蛋白表达明显升高,差异具有统计学意义($P<0.01$),Bcl-2 蛋白表达明显减低,差异具有统计学意义($P<0.001$);与模型组比较,温针组新西兰兔膝关节软骨组织 Bcl-2 蛋白表达明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$),Bax 蛋白表达降低,但未达到统计学差异($P>0.05$)。见表 2、图 1。

表 2 各组新西兰兔膝关节软骨组织 Bax、Bcl-2 蛋白表达的比较($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	Bax	Bcl-2
正常组	0.2867 $\pm$ 0.0049	0.5860 $\pm$ 0.0363
模型组	0.4802 $\pm$ 0.0345*	0.3250 $\pm$ 0.0206**
温针组	0.3787 $\pm$ 0.0341	0.4261 $\pm$ 0.0328 Δ

注:与正常组比较,* $P<0.01$,** $P<0.001$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$

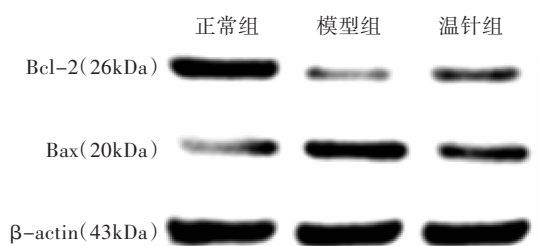


图 1 各组新西兰兔膝关节软骨组织 Bax、Bcl-2 蛋白的表达 (Western Blotting)

3 讨论

膝骨性关节炎(KOA)属祖国医学“骨痹”的范畴,《素问·长刺节论》云:“病在骨,骨重不可举,骨髓酸痛,寒气至,名曰‘骨痹’^[9]。其病机为风寒湿邪痹阻经络,局部气血瘀滞,筋骨失去濡养,故表现为患膝疼痛,酸软乏力,屈伸不利,甚至关节肿大变形。治宜祛风散寒、活血化瘀、温经通络。

针灸治疗 KOA 具有独特的优势,临床疗效肯定,能有效延缓疾病的进展^[10-12]。本研究采用温针灸疗法,结合了针刺与灸法的双重作用,具有温肾阳、祛风散寒、活血化瘀之功效。在选穴上,主要根据治疗痹症的取穴原则,选择内外膝眼为局部取穴,外膝眼又为胃经穴位,经脉所过,主治所及,二穴可扶正祛邪、通经活络、行气活血、散寒除湿,使膝关节局部痹阻的情况改善,从而使气血调畅,筋骨得以濡养。在针刺方法上运用透刺法,其具有一针多穴,操作简便,针感较强,疗效显著的优点^[13]。

有研究认为,膝骨性关节炎的发病机制中软骨细胞的凋亡起到了关键作用^[14-15]。而膝关节软骨细胞的凋亡和 Bcl-2、Bax 蛋白的表达密切相关^[16-17]。Bax 是 Bcl-2 同源相关蛋白,是 Bcl-2 基因家族中细胞凋亡促进基因,Bax 的过度表达可拮抗 Bcl-2 的保护效应而使细胞趋于死亡^[18-19]。Bcl-2 与 Bax 作用相反,能够抑制凋亡,Bcl-2 表达水平较高时,形成 Bcl-2/Bcl-2 同源二聚体,抑制细胞凋亡;Bax 表达水平较高时,形成 Bax/Bax 同源二聚体,加速细胞凋亡。Bcl-2 和 Bax 相互作用,启动软骨细胞内的凋亡信号转导,引起线粒体膜通透性改变、跨膜电位丢失,导致线粒体内、外膜间的促凋亡因子释放至胞浆中,引起软骨细胞的凋亡^[20]。本实验通过软骨细胞凋亡相关蛋白的检测发现,模型组新西兰兔膝关节软骨组织 Bax mRNA 和蛋白的表达较正常组显著升高,Bcl-2 mRNA 和蛋白

的表达较正常组显著降低,通过温针内外膝眼穴可以改善新西兰兔的膝关节活动能力,并使膝关节软骨组织 Bax mRNA 表达显著降低,Bcl-2 mRNA 和蛋白表达明显升高。虽然 Bax 蛋白的降低尚未达到统计学差异,但其趋势与 Bax mRNA 的降低是一致的,这有待于今后进一步研究观察。以上实验结果可初步说明 Bax 和 Bcl-2 在膝骨性关节炎的发生发展中具有重要作用,同时也提示温针灸可以抑制软骨细胞的凋亡,具有良好的关节软骨修复功能。

温针灸是在传统的针灸疗法的基础上发展起来的针刺方法。其结合了针刺与灸法的双重作用,具有温通经脉、祛风散寒、活血化瘀之功效。本研究选用的内膝眼、外膝眼穴位于膝部,温针灸此穴可透筋达骨,有祛风散寒、温阳化湿、通络止痛的作用。前期实验研究表明^[21-22],温针灸治疗 KOA 的有效机制归纳为以下两点:①通过抑制中枢神经递质的活动和促使外周炎症物质吸收来止痛;②通过活血化瘀,改善血液高粘度状态,抑制血小板聚集功能,使血流速度加快,从而调控关节周围的血流和微循环,达到改善关节内微环境。本研究的结果发现,外膝眼透刺内膝眼温针灸通过下调 Bax 基因表达,同时上调 Bcl-2 基因表达来抑制软骨细胞凋亡,从而改善兔膝骨性关节炎。

总之,本研究从细胞凋亡信号通路角度探讨了温针灸内、外膝眼穴治疗 KOA 的部分作用机制。实验结果初步说明,外膝眼透刺内膝眼温针灸治疗 KOA 的作用机制之一可能在于促进 Bcl-2 基因表达的同时抑制 Bax 基因表达,从而抑制软骨细胞凋亡,延缓兔膝关节炎模型的关节软骨退变和破坏。

参考文献:

- [1] TAKACS -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 H K,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] BRAMONO D S,RICHMOND J C,WEITZEI P P,et al. Matrix metalloproteinases and their clinical applications in orthopaedics [J]. Clin Orthop Relat Res,2004,428(428):272-285.

- [4] LARSEN C J. The BCL2 gene, prototype of a gene family that controls programmed cell death (apoptosis)[J]. *Ann Genet*, 1994, 37(3): 121-134.
- [5] VISSE R, NAGASE H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases structure, function, and biochemistry[J]. *Circ Res*, 2003, 92(8): 827-839.
- [6] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 314.
- [7] 胡元亮. 实用动物针灸手册[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 288.
- [8] 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.
- [9] 田代华整理. 黄帝内经素问[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 104.
- [10] 岳萍, 高亮, 陈默, 等. 温针灸对膝骨性关节炎兔行为学及关节软骨肿瘤坏死因子- α 、基质金属蛋白酶-3 含量的影响[J]. *针刺研究*, 2016, 41(3): 235-239.
- [11] 曹锐, 杨红玲, 何润东. 针刺治疗膝骨性关节炎 45 例临床观察[J]. *中医杂志*, 2016, 57(13): 1133-1136.
- [12] 叶国平, 朱定钰, 李俐, 等. 不同深度温针灸治疗膝骨性关节炎随机对照研究[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(8): 2886-2889.
- [13] 孟立强, 王卫强, 程艳婷. 透刺法理论探析[J]. *江苏中医药*, 2013, 45(1): 56-58.
- [14] 熊勇, 彭锐, 王华. “双固一通”温针灸实验性膝骨性关节炎模型兔 Bcl-2 及 Bax 蛋白的表达[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(2): 261-264.
- [15] 刘娣. 温针灸对兔膝骨性关节炎软骨细胞 JNK 信号通路及 MMP-1、13 表达的影响[D]. 宁夏: 宁夏医科大学, 2015.
- [16] 张翼, 吴广文. 中医药防治骨性关节炎分子生物学研究进展[J]. *福建中医药大学学报*, 2012, 22(4): 66-69.
- [17] 林瑞珠, 孙改玲, 朱宁, 等. 回医烙灸对兔膝骨关节炎软骨细胞 Bcl-2 和 Bax 表达的影响[J]. *长春中医药大学学报*, 2017, 33(1): 34-36.
- [18] 贾炜. Bcl-2 家族研究进展 [J]. *当代医学*, 2012, 18(3): 26-28.
- [19] 朱秀敏. 细胞凋亡的形态特征与分子机制研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31(13): 2595-2597.
- [20] OSHIMA Y, AKIYAMA T, HIKITA A, et al. Pivotal role of Bcl-2 family Proteins in the regulation of Chondrocyte apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(39): 26499-26508.
- [21] WU M X, LI X H, LIN M N, et al. Clinical study on the treatment of knee osteoarthritis of shen-sui insufficiency syndrome type by electroacupuncture [J]. *Chin J Integr Med*, 2010, 16(4): 291-297.
- [22] 洪昆达, 李俐, 李西海, 等. 温针治疗中医不同证型膝骨性关节炎的临床研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2012, 32(11): 1466-1469.