

推拿对膝骨性关节炎大鼠滑膜 TRAF6、 NF- κ Bp65 mRNA 及蛋白的影响^{*}

曲崇正¹, 刘 姣², 陶 静¹, 江钢辉¹

(1. 广州中医药大学第三附属医院, 广东 广州 510360; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 对建立的大鼠膝骨性关节炎模型行推拿治疗, 观察其滑膜 TRAF6、NF- κ Bp65 mRNA 及蛋白表达, 探讨推拿治疗膝骨性关节炎的效果及其机制。 **方法** 采用随机化的原则, 抽取 10 只大鼠为空白组, 余下 40 只大鼠采用木瓜蛋白酶关节注射建立大鼠膝骨性关节炎模型, 待造模成功后, 再将造模大鼠随机分为模型组、推拿组、灌胃组、推拿加灌胃组, 每组 10 只。空白组常规饲养, 推拿组一指禅手法治疗, 灌胃组塞来昔布灌胃, 推拿加灌胃组以上两种治疗。治疗 4 周后取材, 对膝关节滑膜行荧光定量 PCR、Western blot 检测 TRAF6、NF- κ Bp65 mRNA 和蛋白表达水平。 **结果** ①荧光定量 PCR 结果显示, 与空白组相比, 模型组、推拿组、灌胃组的 TRAF6、NF- κ Bp65 mRNA 表达均上调, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 推拿加灌胃组与空白组相比 TRAF6、NF- κ Bp65 mRNA 表达几乎无差异, 稍上调 ($P > 0.05$); 与模型组相比, 各治疗组 TRAF6、NF- κ Bp65 mRNA 表达下调, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 且各治疗组 TRAF6、NF- κ Bp65 mRNA 表达量: 推拿加灌胃组 $<$ 推拿组 $<$ 灌胃组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。②Western blot 结果显示, 与空白组相比, 其余各组 TRAF6、NF- κ Bp65 蛋白的表达上调, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 其余各组 TRAF6、NF- κ Bp65 蛋白的表达下调, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 且各治疗组 TRAF6、NF- κ Bp65 蛋白表达量: 推拿加灌胃组 $<$ 推拿组 $<$ 灌胃组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。 **结论** 推拿通过下调膝骨性关节炎大鼠滑膜组织 TRAF6、NF- κ Bp65 mRNA 和蛋白的表达, 减轻滑膜炎反应, 从而起到消炎止痛的作用, 最终达到防治膝骨性关节炎的目的。

关键词: 膝骨性关节炎; 推拿; TRAF6; NF- κ Bp65; 大鼠

中图分类号: R244.1 文献标志码: A 文章编号: 1000-2723(2019)01-0024-06

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2019.01.005

Effects of Massage on the Expression of TRAF6 and NF- κ Bp65 mRNA and Protein in Synovium of Rats with Knee Osteoarthritis

QU Chongzheng¹, LIU Jiao², TAO Jing¹, JIANG Ganghui¹

(1. The Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510360, China;

2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

ABSTRACT: **Objective** To observe the expression of TRAF6, NF- κ Bp65 mRNA and protein in synovium of knee osteoarthritis rat model by massage, and to explore the effect and mechanism of massage on knee osteoarthritis. **Methods** Ten rats were randomized into blank group and the remaining 40 rats were injected with papain to establish knee osteoarthritis model. After the model was successfully established, the rats were randomly divided into model group, massage group, gastric lavage group and massage plus gastric lavage group, with 10 rats in each group. The blank group was fed routinely, the massage group was treated with one finger Zen manipulation, the gastric lavage group was treated with celecoxib, and the massage plus gastric lavage group was treated with the above two methods. After 4 weeks of treatment, the synovium of knee joint was detected by fluorescence quantitative PCR and Western blot for TRAF6, NF- κ Bp65 mRNA and protein

收稿日期: 2019-02-05

^{*} 基金项目: 高水平大学建设(A1-AF01816Z0207)

第一作者简介: 曲崇正(1974-), 男, 博士, 副主任中医师, 研究方向: 中医筋伤学疾病、骨关节病、骨质疏松症临床防治研究。E-mail: 873397214@qq.com

expression. **Results** ① The results of fluorescence quantitative PCR showed that compared with the blank group, the expression of TRAF6 and NF-p65 mRNA in model group, massage group and gastric lavage group were up-regulated, with significant difference ($P<0.05$). Compared with the blank group, the expression of TRAF6 and NF-p65 mRNA in massage plus gastric lavage group was almost no difference, but slightly up-regulated ($P>0.05$). Compared with the model group, the expression of TRAF6 and NF-p65 mRNA in each treatment group was up-regulated. The difference was statistically significant ($P<0.05$), and the expression of TRAF6 and NF-p65 mRNA in each treatment group was significantly different ($P<0.05$). ② Western blot results showed that the expression of TRAF6 and NF-p65 protein was up-regulated in other groups compared with the blank group ($P<0.05$). Compared with the model group, the expression of TRAF6 and NF-p65 protein was down-regulated in the other groups ($P<0.05$). The expression of TRAF6 and NF-p65 protein in each treatment group was significantly different ($P<0.05$). The expression of TRAF6 and NF-p65 protein in massage plus gastric lavage group was lower than that in massage. The difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** It is suggested that massage can decrease the expression of TRAF6, NF-p65 mRNA and protein in synovial tissue of rats with knee osteoarthritis and alleviate the inflammatory reaction of synovium, thus playing an anti-inflammatory and analgesic role, and ultimately achieving the goal of preventing and treating knee osteoarthritis.

KEY WORDS: knee osteoarthritis; massage; TRAF6; NF- κ Bp65; rats

膝关节骨性关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是一种常见的慢性退行性疾病, 主要病变特征为关节软骨损坏、关节囊退变及滑膜炎反应, 早期主要表现为关节肿痛, 发展至中晚期可出现关节畸形、活动障碍等^[1-5]。目前的临床研究证明, 推拿可以有效防治膝骨性关节炎^[6-7], 但其机制不够明确。近来研究发现, 膝骨性关节炎的病变除了与软骨的退变相关外, 滑膜也占据主导地位^[8-9]。TLR4/NF- κ Bp65 信号转导通路是近年来膝骨性关节炎方面研究较多的炎症通路, 而 NF- κ Bp65、TRAF6 是这条通路中的 2 个关键致炎因子^[10]。本实验通过观察膝骨性关节炎大鼠滑膜 TRAF6、NF- κ Bp65 mRNA 及蛋白的表达, 探讨推拿治疗膝骨性关节炎的机制。

1 材料和方法

1.1 设计 随机对照动物体内实验

1.2 时间及地点 实验于 2018 年 3 月 22 日至 2018 年 5 月 19 日在广州中医药大学动物实验中心完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 3 月龄健康 SPF 级 SD 雌性大鼠 50 只, 体质量 180~220 g, 由山东省实验动物中心提供, 动物生产许可证号 SCXK(鲁)20140007。所有实验大鼠均在 SPF 级实验室中饲养, 不限饮食, 自由进食饲料和水。

1.3.2 实验用主要试剂 荧光定量 PCR 检测试剂盒 (AOPR-1200, Genecopies); TRIzol Reagent (DP424, 天根); 逆转录试剂盒 (DBI-2220, DBI); DEPC (V900882, Vetec); 木瓜蛋白酶 (上海源叶生物科技有限公司 S10011, CAS:9001-73-4); 塞来昔布 (辉瑞

制药有限公司, 国药准字 J20140072); Anti-NF- κ B p65 antibody (Abcam, 8242T); RP-Goat Anti-Mouse IgG (Jackson, 115-035-003)。

1.3.3 实验设备 荧光定量 PCR 仪 (7500, ABI); 基因扩增仪 (9600, 珠海黑马); 多功能酶标仪 (上海现科仪器有限公司); 扫描仪 (Canon); 暗匣 (广东粤华医疗器械厂有限公司); 感光胶片 (kodak); 电泳仪 (北京六一仪器厂); 台式高速离心机 (D3204R, SCIllogex); 微量核酸定量仪 (SMA4000, Merinton); 灰度分析软件 (Image J)。

1.3.4 溶液配制 磷酸化蛋白酶抑制剂: 每 1 mL RIPA 试剂配制 100 mM PMSF 10 μ L, 加蛋白酶抑制剂 5 μ L, 加磷酸化蛋白酶抑制剂 5 μ L, 混匀; 30% 丙烯酰胺 (1 L): BIS 10 g 配丙烯酰胺 290 g, 加入去离子水直至 1 000 mL; TBS 缓冲液 (1 L): 10 mL Na-Cl 8.8 g 配 1 M Tris-HCl (pH=7.5), 加入去离子水直到 1 000 mL; 转移缓冲液 (2L): 甲醇 400 mL 配甘氨酸 28.8 g 配 Tris 4.84 g 加入去离子水直到 2 000 mL; 非磷酸化蛋白酶抑制剂: 每 1 mL RIPA 试剂配制 100 mM PMSF 10 μ L、蛋白酶抑制剂 5 μ L, 混匀; 电泳缓冲液 (2L): 2 g SDS 配 37.54 g 甘氨酸配 6.06 g Tris 加入去离子水直到 2 000 mL。

1.4 方法

1.4.1 分组与造模 采用随机化的原则, 抽取 10 只大鼠为空白组, 余下 40 只大鼠采用木瓜蛋白酶法^[11-12]制作大鼠膝骨性关节炎模型, 待造模成功后, 再将造模大鼠随机分为模型组、推拿组、灌胃组、推拿加灌胃组, 每组 10 只。

造模方法:使用 10%水合氯醛生理盐水溶液腹腔麻醉大鼠后,将大鼠双膝关节绒毛剃净,消毒皮肤表面,屈曲大鼠膝关节以便于触到外膝眼所在,确定进针点后,沿髌间窝方向进针,针头刺入皮肤表面后会有落空感,然后将木瓜蛋白酶推入,双侧膝关节腔分别注射 4%木瓜蛋白酶 0.2 mL。出针后按压针口约 1 分钟,用酒精擦净血迹,最后将大鼠放回笼内常规饲养。于实验开始的第 1、4、7 天重复操作。关节注射 3 次后,使用动物实验跑台驱赶大鼠跑步 1 周,每天 20 min。

1.4.2 干预方法 造模完成后的第 1 天,进行推拿、灌胃给药治疗。推拿组将大鼠固定于大鼠固定器上,遵循《实验针灸学》^[13]的取穴原则确定穴位所在,待大鼠平静后,于大鼠膝关节的内膝眼、外膝眼、血海、梁丘等穴行一指禅推法,以拇指前端精准接触穴位,频率控制约 120 次/min,每穴推约 2 min,最后屈伸膝关节 10 次,结束治疗,每次总治疗时间约 10 min,每天 1 次。参照《药理实验方法学》^[14]种属间等效剂量折算表,灌胃组予以塞来昔布 24 mg/kg·d 灌胃,药物剂量:每天塞来昔布 24 mg/kg 溶于生理盐水中配制成混悬液,定时给药,每天 1 次。推拿加灌胃组予以上 2 种干预方式,每天 1 次。

4 周推拿、灌胃给药治疗结束后处死所有大鼠,取出膝关节滑膜用于荧光定量 PCR、Western blot 检测。

1.4.3 荧光定量 PCR 检测 TRAF6、NF- κ Bp65 mRNA 表达 运用 Trizol 法对大鼠膝关节滑膜进行总 RNA 提取,然后进行逆转录操作,严格按照试剂盒说明书进行,荧光定量 PCR 检测 TRAF6、NF- κ Bp65 mRNA 表达水平。本实验采用 GAPDH 作为内参,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')	扩增长度 (bp)
GAPDH (内参)	Forward: AGTTCAACGGCACAGTCAAG	118
	Reverse: TACTCAGCACCAGCATCACC	
r-NF- κ Bp65	Forward: AAAGGAAGAGCCCAAGGAAG	97
	Reverse: CTGGATGATTCCCACCAACA	
r-TRAF6	Forward: GCGCTGTGCAAACTACATTT	103
	Reverse: AAGGATCGTGAGGCGTATTG	

1.4.4 Western blot 检测 TRAF6、NF- κ Bp65 蛋白表达 将冻存与 -80℃冰箱的滑膜组织取出备用,使用 RI-

PA 裂解液将细胞裂解,按说明书步骤配制总蛋白溶液,再将滑膜组织匀浆。BCA 法测定蛋白质浓度。测完蛋白含量后,按照 5:1 的比例加入蛋白上样缓冲液,滚水煮约 5 min。将样本配制于分离胶及浓缩胶中进行电泳,然后转移至 PVDF 膜,室温下将膜脱色后,使用 5%的脱脂牛奶封闭一小时,加入配制的稀释一抗(TBST 溶解的 5%脱脂牛奶,磷酸化蛋白使用 TBST 溶解的 5%BSA),4℃过夜。洗膜后,再次加入稀释一抗室温下孵育 30 min 后洗膜。用化学发光剂显影,获取图像,Image J 软件处理系统分析 TRAF6、NF- κ Bp65 蛋白表达水平。以 GAPDH 作内参对照,每个蛋白重复检测 3 次。

1.5 主要观察指标 实时荧光定量 PCR 检测各组大鼠滑膜 TRAF6、NF- κ Bp65 mRNA 表达水平;Western blot 检测 TRAF6、NF- κ Bp65 蛋白表达水平。

1.6 统计学分析 采用 SPSS19.0 软件,均以($\bar{x} \pm s$)表示计量数据资料,采用单因素方差分析(One-WayANOVA)比较多组间的均数,两两比较组间均数,若方差齐,选择 LSD 法;方差不齐,选择 Dunnett's T3 法。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 实验过程中无大鼠死亡,除为验证造模是否成功每组处死 1 只大鼠外,余下大鼠每组 9 只均完成所有干预治疗,进入结果分析。

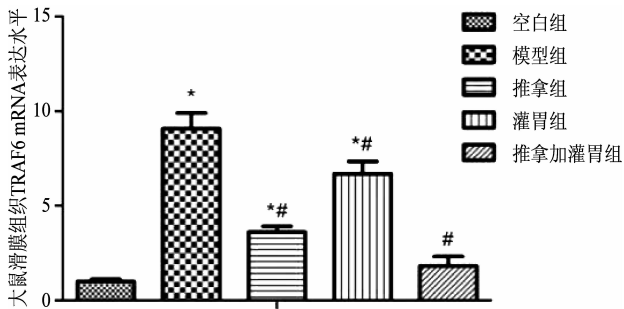
2.2 滑膜形态观察 经肉眼观察,空白组大鼠滑膜平滑光亮,呈粉红色,薄而柔润。模型组大鼠滑膜颜色较深,组织水肿、变厚。推拿组、推拿加灌胃组大鼠滑膜组织颜色较正常稍变深,灌胃大鼠滑膜颜色呈红色。

2.3 各组滑膜 TRAF6、NF- κ Bp65 mRNA 的表达水平

2.3.1 TRAF6 mRNA 表达水平 与空白组相比,模型组、推拿组、灌胃组的 TRAF6 mRNA 表达均上调,差异具有统计学意义($P < 0.05$),推拿加灌胃组与空白组相比 TRAF6 mRNA 表达几乎无差异,稍上调($P > 0.05$);与模型组相比,各治疗组 TRAF6 mRNA 表达下调,差异具有统计学意义($P < 0.05$),且各治疗组 TRAF6 mRNA 表达量:推拿加灌胃组<推拿组<灌胃组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2、图 1。

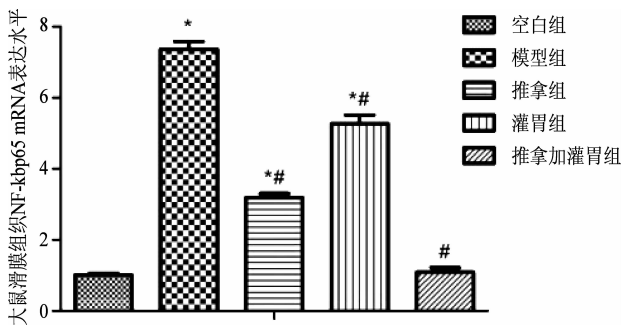
2.3.2 NF- κ Bp65 mRNA 表达水平 与空白组相比,模型组、推拿组、灌胃组的 NF- κ Bp65 mRNA 表达均

上调,差异具有统计学意义($P<0.05$),推拿加灌胃组与空白组相比 NF-κBp65 mRNA 表达几乎无差异,稍上调,差异无统计学意义($P>0.05$);与模型组相比,各治疗组 NF-κBp65 mRNA 表达下调,差异具有统计学意义($P<0.05$),各治疗组 NF-κBp65 mRNA 表达量:推拿加灌胃组<推拿组<灌胃组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表2、图2。



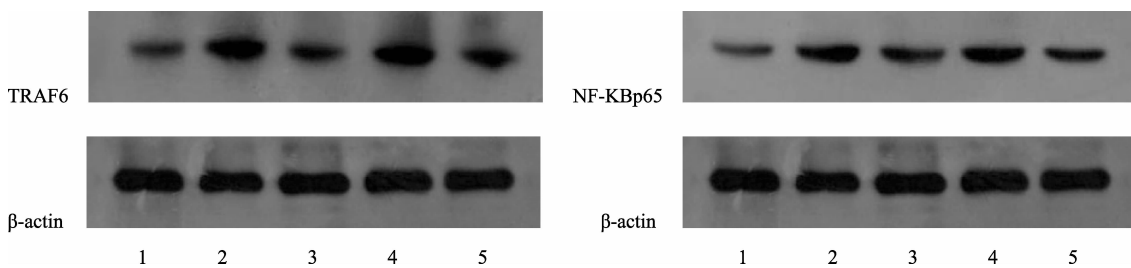
注:与空白组比,* $P<0.05$;与模型组比,# $P<0.05$

图1 各组大鼠滑膜组织 TRAF6 mRNA 表达水平



注:与空白组比,* $P<0.05$;与模型组比,# $P<0.05$

图2 各组大鼠滑膜组织 NF-κBp65 mRNA 表达水平



注:1 空白组;2 模型组;3 推拿组;4 灌胃组;5 推拿加灌胃组

图3 各组大鼠滑膜组织 TRAF6、NF-κBp65 蛋白的表达水平(Western blotting)

3 讨论

随着对 TLR4 研究的广泛深入,OA 患者组织中的 TLR4 受到的关注逐渐增多。TLR4 是 TLRs 家族中的一员,作为一类 I 型跨膜蛋白受体^[15],它的激活可诱导很强的免疫反应,在天然免疫和炎症反应中发挥主要作用^[16-17]。当 TLR4 被激活后,TLR4 可以通过其

表2 各组大鼠滑膜组织 TRAF6、NF-κBp65 mRNA 的表达水平($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	TRAF6	NF-κBp65
空白组	1.01±0.11	1.01±0.08
模型组	9.08±0.82*	7.37±0.37*
推拿组	3.61±0.31**	3.19±0.2**
灌胃组	6.7±0.64**	5.27±0.41**
推拿加灌胃组	1.83±0.49#	1.09±0.22#

注:与空白组比,* $P<0.05$;与模型组比,# $P<0.05$

2.4 各组滑膜 TRAF6、NF-κBp65 蛋白的表达水平与空白组相比,其余各组 TRAF6、NF-κBp65 蛋白的表达上调,差异具有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,其余各组 TRAF6、NF-κBp65 蛋白的表达下调,差异具有统计学意义($P<0.05$),各治疗组 TRAF6、NF-κBp65 蛋白表达:推拿加灌胃组<推拿组<灌胃组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表3、图3。

表3 各组大鼠滑膜组织 TRAF6、NF-κBp65 蛋白的表达水平($\bar{x} \pm s, n=9, \mu\text{mol/L}$)

组别	NF-κBp65	TRAF6
空白组	0.41±0.02	0.53±0.04
模型组	1.75±0.03*	1.67±0.11*
推拿组	0.8±0.03**	0.94±0.05**
灌胃组	1.07±0.03**	1.5±0.1**
推拿加灌胃组	0.63±0.02**	0.74±0.05**

注:与空白组比,* $P<0.05$;与模型组比,# $P<0.05$

下游的 MyD88 依赖性信号转导通路来激活各种炎症因子。MyD88 是 TLR4 信号通路中的关键接头分子之一,主要作用是传递上游信息,在疾病的发生发展中产生重要作用^[18]。当激活 TLR4-MD2-CD14 复合体之后,TLR4 与 MyD88 Toll 结构相结合,接着产生一连串级联反应,再通过结合 TRAF6 来激活 IκB 激酶

(IKK)复合体^[19-20]。谈冰^[10]等研究发现新风胶囊通过下调 NF- κ Bp65、TRAF6 的表达水平,降低异常的炎症免疫反应,进而减轻膝骨性关节炎患者关节疼痛及僵硬症状。

肿瘤坏死因子受体相关因子 6(TNF receptor associated factor 6, TRAF6)属于 TRAFs 家族,相对分子量为 60 kD,由 530 个氨基酸组成^[21]。TRAF6 直接或间接参与许多条滑膜组织炎症信号通路的活化过程,调控炎症因子的产生和释放,与破骨细胞的分化、存活及骨的重吸收等密切相关^[22-23]。在炎症反应、骨代谢、细胞凋亡及应激反应等方面具有重要意义^[24-25]。由表 2 和表 3 的可以看出:与空白组相比,其余各组 TRAF6 mRNA 和蛋白表达均上调,说明和正常大鼠对比,膝骨性关节炎大鼠滑膜中的 TRAF6 mRNA 和蛋白含量均是高表达的,该因子与膝骨性关节炎的发生相关;与模型组相比,其余各组 TRAF6 mRNA 和蛋白表达均下调,说明各治疗组都能有效抑制了大鼠滑膜组织的 TRAF6 表达,从而减轻炎症反应。从图 1 和图 3 可以看出:各治疗组在与模型组相比 TRAF6 mRNA 和蛋白表达均下调的同时,组间比较二者的表达也存在差异,且表达量都表现为:推拿加灌胃组<推拿组<灌胃组。这说明各治疗组在有效抑制了大鼠滑膜组织的 TRAF6 mRNA 和蛋白表达方面,推拿组优于灌胃组,但推拿加灌胃组的效果更好。

NF- κ B 家族归属于 Rel 蛋白家族,该家族共有 5 个成员,NF- κ B1,NF- κ B2,Rel A (p65)、Rel B 和 c-Rel^[26],NF- κ Bp65 在炎症反应、免疫调节、细胞凋亡及肿瘤发生中起到重要的作用^[27-29]。由表 2 和表 3 可以看出:与空白组相比,其余各组 NF- κ Bp65 mRNA 和蛋白表达上调,说明较正常大鼠来说,膝骨性关节炎大鼠滑膜中的 NF- κ Bp65 mRNA 和蛋白含量均升高,该因子与膝骨性关节炎的发生相关;与模型组相比,其余各组 NF- κ Bp65 mRNA 和蛋白表达均下调,说明各治疗组都能有效抑制了大鼠滑膜组织的 NF- κ Bp65 表达,从而减轻炎症反应。从图 2 和图 3 可以看出:各治疗组在与模型组相比 NF- κ Bp65 mRNA 和蛋白表达均下降的同时,组间比较二者的表达也存在差异,且表达量都表现为:推拿加灌胃组<推拿组<灌胃组,从而说明各治疗组在有效抑制了大鼠滑膜组织的 NF- κ Bp65 mRNA 和蛋白表达方面,推拿组优于灌

胃组,但推拿加灌胃组效果更好。

推拿疗法是医者运用特定的手法作用于患者体表;可以通过刺激穴位或痛点,达到活血止痛、疏经通络的作用^[30]。一指禅推法为一指禅流派的经典治疗手法,具有操作简单,着力面积小,力量集中的特点,被广泛用于科研及临床^[31]。胡炳麟^[32]等研究发现一指禅推法能有效减轻膝关节骨性关节炎患者膝关节疼痛。本次实验使用一指禅推法作用于大鼠血海、梁丘、内膝眼、外膝眼 4 穴,再配合膝关节屈伸法,以达到舒筋骨、利关节的目的。

综上所述,推拿通过下调膝骨性关节炎大鼠滑膜组织 TRAF-6、NF- κ Bp65 mRNA 和蛋白的表达,减轻滑膜炎反应,从而起到消炎止痛的作用,最终达到防治膝骨性关节炎的目的,这为推拿防治膝骨性关节炎的作用机制的临床研究提供一定的实验基础。

参考文献:

- [1] CHEN B, DENG Y, TAN Y, et al. Association between severity of knee osteoarthritis and serum and synovial fluid interleukin 17 concentrations [J]. J Int Med Res, 2014, 42(1):138-144.
- [2] HALL M, DOHERTY S, COURTNEY P, et al. Ultrasound detected synovial change and pain response following intra-articular injection of corticosteroid and a placebo in symptomatic osteoarthritic knees: a pilot study[J]. Ann Rheum Dis, 2014, 73(8):1590-1591.
- [3] PEREIRA D, PELETEIRO B, ARAUJO J, et al. The effect of osteoarthritis definition on prevalence and incidence estimates: a systematic review[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2011, 19(11):1270-1285.
- [4] 程少丹,徐菁,王慧芳,等. 膝骨性关节炎针灸治疗研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2013, 21(1):72-74.
- [5] 霍红军,王维山,董金波,等. 骨性关节炎患者不同病变程度滑膜中基质金属蛋白酶-3 的表达及意义[J]. 实用医学杂志, 2014, 30(6):895-897.
- [6] 马碧涛,金立伦,陈丽丽,等. 手法对膝骨性关节炎患者血清 IGF-1、IL-1、TNF- α 含量的影响 [J]. 安徽中医药大学学报, 2017, 36(4):12-15.
- [7] 曲崇正,范志勇,彭旭明,等. 弹拨拔伸法对膝骨性关节炎临床疗效观察 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(1):117-118.
- [8] 汤继文,刘新宇. 骨关节病的诊治[J]. 山东医药, 2000, 40(15):43-44.

- [9] 宋朋飞, 阚卫兵, 赵婧, 等. 补肾活血方对人滑膜细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路的调控作用 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(9): 2806–2809.
- [10] 谈冰, 刘健, 章平衡. 新风胶囊通过抑制 NF- κ B 信号通路改善膝骨性关节炎患者高凝状态 [J]. 免疫学杂志, 2016, 32(9): 781–789.
- [11] 陈达, 彭力平, 廖州伟, 等. 木瓜蛋白酶与石膏制动建立兔膝骨性关节炎模型的比较 [J]. 广东医学, 2017, 38(14): 2114–2118.
- [12] 王文胜, 陈伟, 沈堡垒, 等. 上、下坡跑台训练膝骨性关节炎模型大鼠关节软骨及炎症因子的变化[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(2): 197–201.
- [13] 沈梅红, 李忠仁, 沈洁. 《实验针灸学》实验教学之浅见 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2009, 7(2): 130–131.
- [14] 黄琼, 严尚学, 张玲玲, 等. 在药理实验方法学教学中培养研究生创新思维与能力的思考和探索[J]. 中国医药指南, 2012, 10(17): 668–669.
- [15] 朱雪坤, 杨日芳, 孟艳秋. Toll 样受体 4 配体的研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016, 30(4): 389–396.
- [16] TEMPERLEY N D, BERLIN S, PATON I R, et al. Evolution of the chicken Toll-like receptor gene family: a story of gene gain and gene loss [J]. BMC Genomics, 2008, 9(1): 62.
- [17] ANWAR M A, BASITH S, CHOI S. Negative regulatory approaches to the attenuation of Toll-like receptor signaling[J]. Exp Mol Med, 2013, 45(2): e11.
- [18] HUA F, HA T, MA J, et al. Blocking the MyD88-dependent pathway protects the myocardium from ischemia/reperfusion injury in rat hearts[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 338(2): 1118–1125.
- [19] SPEHLMANN M E, ECKMANN L. Nuclear factor- κ B in intestinal protection and destruction [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2009, 25(2): 92–99.
- [20] LIM B J, LEE D, HONG S W, et al. Toll-like receptor 4 signaling is involved in IgA-stimulated mesangial cell activation[J]. Yonsei Med J, 2011, 52(4): 610–615.
- [21] 李妙, 周立军. TRAF6 与肿瘤关系的研究进展[J]. 生物技术通报, 2017, 33(6): 24–31.
- [22] ZHANG H, MA X, WU H, et al. Effect of moxibustion on tumor necrosis factor- α and nuclear transcription factor kappa B in ankle joints of rats with rheumatoid arthritis [J]. Journal of Acupuncture and Tuina Science, 2017, 15(3): 171–176.
- [23] CHEN H, SHAO X, LI L, et al. Electroacupuncture serum inhibits TNF α mediated chondrocyte inflammation via the Ras Raf MEK1/2 ERK1/2 signaling pathway [J]. Mol Med Rep, 2017, 16(5): 5807–5814.
- [24] YE H, ARRON J R, LAMOTHE B, et al. Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling[J]. Nature, 2002, 418(6896): 443–447.
- [25] WALSH M C, LEE J, CHOI Y. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) regulation of development, function, and homeostasis of the immune system[J]. Immunol Rev, 2015, 266(1): 72–92.
- [26] BROWN K D, CLAUDIO E, SIEBENLIST U. The roles of the classical and alternative nuclear factor- κ B pathways: potential implications for autoimmunity and rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10(4): 212.
- [27] 孟得世, 李沛, 胡盼盼, 等. 近 5 年针灸治疗膝骨性关节炎研究进展[J]. 中医研究, 2018, 31(12): 74–77.
- [28] 陈良恩. NF- κ B 信号传导通路 [J]. 解放军预防医学杂志, 2002, 20(2): 154–156.
- [29] 方针, 何帮剑. 一指禅推法合股四头肌肌力锻炼治疗膝关节骨性关节炎 45 例[J]. 浙江中医杂志, 2011, 46(10): 738–739.
- [30] ERIKSSON C M, LACOURPAILLE L, HEALES L J, et al. Massage induces an immediate, albeit short-term, reduction in muscle stiffness[J]. Scand J Med Sci Sports, 2015, 25(5): e490–e496.
- [31] 严晓慧, 严隽陶, 龚利. 一指禅推法的源流与现代研究进展[J]. 河南中医, 2009, 29(5): 515–518.
- [32] 胡炳麟, 龚利, 李建华, 等. 一指禅推法治疗膝关节骨性关节炎的临床研究[J]. 中医药导报, 2017, 23(2): 72–75.