

电针对膝骨性关节炎模型大鼠脊髓 P2X4 的影响^{*}

王占魁¹ 袁明权² 康武林¹ 朱峰峰¹ 董博¹ 袁普卫¹ 余红超^{1**}

(1. 陕西中医药大学附属医院, 陕西 咸阳 712046; 2. 开封市第二中医院, 河南 开封 475000)

摘要:目的 通过电针针刺膝骨性关节炎模型 SD 大鼠“内膝眼、外犊鼻”穴, 研究电针调控脊髓 P2X4 受体减轻膝骨性关节炎疼痛大鼠的可能机制, 以及对膝骨性关节炎模型大鼠相关基因蛋白表达的影响。方法 将 60 只清洁级 SD 大鼠随机分为空白组、模型组及电针组, 每组各 20 只。除空白组外, 其他两组均使用右膝关节腔内注射碘乙酸钠进行造模。治疗组在造模结束后 1 d 后给予“内膝眼、外犊鼻”穴电针干预, 1 次/日, 30 min/次, 治疗周期为 4 w。干预前后对大鼠机械痛阈进行分析。取大鼠脊髓 L4-L6 腰膨大处, 用 Western Blot 检测脊髓组织中 P2X4 蛋白表达情况; 免疫荧光双标方法检测大鼠脊髓背角 Iba-1 和 P2X4 受体表达; Elisa 测定各组脊髓组织匀浆中 IL-1 β 水平。结果 与空白组相比, 模型组机械痛阈明显降低 ($P < 0.01$), P2X4 受体表达明显升高 ($P < 0.01$), IL-1 β 水平明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 电针组机械痛阈上升 ($P < 0.01$), P2X4 受体表达下降 ($P < 0.01$), IL-1 β 水平降低 ($P < 0.01$)。结论 电针可抑制膝骨性关节炎模型大鼠脊髓 P2X4 受体表达及小胶质细胞的活化以及下游炎症因子 IL-1 β 过度表达, 从而减轻膝骨性关节炎引起的疼痛。

关键词: 电针; P2X4 受体; 膝骨性关节炎; 镇痛

中图分类号: R245.9⁺⁷

文献标识码: A

文章编号: 2096-1340(2023)03-0076-05

DOI: 10.13424/j.cnki.jsctcm.2023.03.015

膝骨性关节炎(knee osteoarthritis, KOA), 是老年常见的关节软骨退行性疾病。主要表现为软骨的退变、破坏, 软骨下骨增生, 进而引发关节功能障碍等一系列病理改变^[1-2]。其中疼痛是 KOA 患者最严重的致残症状, 也是驱使患者就医的主要因素^[3]。大量临床试验表明电针是一种有效缓解膝骨性关节炎疼痛的治疗手段, 然而其镇痛机制不明。既往研究表明 P2X4 受体与疼痛密切相关, 任春光等^[4]研究表明, 大鼠脊髓 P2X4 受体表达上调参与了骨癌痛的产生; 黄华等^[5]研究表明, 电针夹脊穴可降低 P2X4 的表达从而减缓坐骨神经慢性损伤大鼠的疼痛。P2X4 受体可以通过介导脊髓小胶质细胞活化, 促进炎症因子表达, 从而导致疼痛。然而电针治疗膝骨性关节炎性疼痛是否也与 P2X4 受体有关, 目前相关研究尚不清楚。因

此, 我们构建膝骨性关节炎模型大鼠, 探讨电针是否通过调控 P2X4 受体表达进而减轻膝骨性关节炎性疼痛。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 选取 60 只清洁级 3 月龄 SD 大鼠, 雄性, 体重 200 ~ 230 g, 人工喂养。动物购由恩斯维尔实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(湘)(2019-0004)。陕西中医药大学药理学研究室动物房适应性喂养, 温度保持在 25 ~ 28 $^{\circ}\text{C}$, 湿度维持在 40% ~ 60%, 室内光照周期采用 12 h/12 h 昼夜循环。实验大鼠的使用与处理等均遵照美国国立卫生署颁布的《实验动物关爱和使用指南》进行。人工适应性喂养 1 w, 采用随机数字表法将大鼠随机分为 3 组, 其中电针组 20 只, 模型组 20 只, 空白组 20 只。

^{*} **基金项目:** 长安医学关中李氏骨伤学术流派传承工作室建设项目(陕中医药发[2018]40号); 陕西省骨退行性疾病中西医结合防治重点实验室建设项目(陕中医药发[2018]32号); 陕西省科技厅重点研发计划重点项目(2018ZDXM-SF-009); 陕西中医药大学学科创新团队(2019-YL02); 陕西省教育厅 2021 年度一般专项科研计划项目(21JK0603); 陕西中医药大学附属医院院内课题(2020QN003); 陕西省教育厅“骨退行性疾病中西医结合防治转化医学陕西省高校工程研究中心”(陕教技办[2021]10号); 陕西省中医药管理局“骨退行性疾病中西医结合防治“双链融合”中青年科研创新团队”(2022-SLRH-LJ-001)

^{**} **通讯作者:** 余红超, 副主任医师。E-mail: yuhongchao1980@163.com

1.2 主要试剂与仪器 试剂: Anti-IL-1 β (美国 abcam 公司, ab283818)、Anti-Iba1 单克隆抗体 (美国 abcam 公司, ab178846)、Anti-P2X4 多克隆抗体 (美国 abcam 公司, ab134559)、小鼠 IL-1 β ELISA 检测试剂盒 (上海纪宁公司)、抗小鼠 FITC、Alexa fluor 555 标记驴抗兔、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠二抗、Western-Blot 相关试剂、RIPA 裂解液 (强)、蛋白酶抑制剂、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、PVDF 印迹膜 (碧云天生物技术有限公司)、PBS 缓冲液 (福州科诺生物技术技术有限公司)。

仪器: SDZ-II 型电子针疗仪 (苏州信诺达医疗科技有限公司)、华佗牌一次性不锈钢针灸针 (0.25 mm \times 13 mm)、包埋机 (武汉俊杰电子有限公司, JB-P5)、切片机 (上海莱卡仪器公司, RM2016)、荧光显微镜 (德国 Lecia, MZ10F)、F50 酶标仪 (瑞士 Sunrise 公司)、电泳仪、转膜仪 (美国 Bio-Rad)。

1.3 KOA 模型建立 采用碘乙酸钠 (Sodium iodoacetate) 关节腔内注射制备雄性大鼠 KOA 模型, 造模周期为 1 w。理论依据: 碘乙酸钠通过抑制糖醇解和蛋白多糖的合成, 可干扰软骨细胞的正常代谢, 造成软骨细胞显著的破坏^[6]。其方法为: 电针及模型组 40 只 SD 大鼠, 向右膝关节腔内注射碘乙酸钠 0.4 ps/0.1 mL, 即造模完成。于术后 4 w 处死造模组大鼠 3 只, 取出膝关节, 通过番红-固绿染色进行病理组织学检测, 若出现软骨结构破坏, 关节面粗糙不整等则造模成功。

1.4 机械痛阈记录 在造模前 (第 0 d)、造模后第 7、14、21、28 d 时测定机械痛阈值。采用 Von Frey 纤维丝测痛仪 (美国 Stoelting 公司)。将标记好的各组实验大鼠置于专用透明小格箱中, 底部放置金属网架, 约 10 min 大鼠对陌生环境安静后用不同大小的 Von Frey 丝 (规格: 1, 1.4, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 26 g) 垂直刺激其后爪足心, 力度以 Von Frey 丝轻微弯曲, 呈“S”型, 出现明显缩足或舔足而非跳跃性反应, 则记为阳性。作用时间 6 ~ 8 s, 相邻刺激间隔至少 7 s。同一纤维丝刺激 5 次后出现 3 次阳性时记录为最小刺激强度。

1.5 电针干预方法 使用 ABM 动物麻醉机对大鼠进行吸入麻醉, 参照《实验针灸学》^[7] 取穴内膝

眼、外犊鼻 (在髌韧带内缘凹陷中、髌韧带外缘凹陷中) 两穴, 采用 0.25 mm \times 13 mm 毫针垂直刺入 5 mm, 1 次/日, 设定脉冲频率 1 ~ 3 Hz, 强度 1 ~ 3 mA, 设置为疏密波, 以局部肌肉轻抽搐为度, 连续干预 4 w。

1.6 组织取材 干预 30d 后处死各组大鼠, 取材前 15 h 禁饮食。10% 水合氯醛腹腔注射麻醉后, 在泡沫纸板上仰卧固定大鼠。迅速沿剑突下缘剪开胸腔并暴露心脏, 在心间处插入灌注针到主动脉根部, 快速灌注 150 mL 37 $^{\circ}$ C 生理盐水溶液, 待从右心耳流出澄清液体, 肝脏和无血心脏颜色相近时, 使用 4 $^{\circ}$ C 4% 多聚甲醛灌注, 取出脊髓 L4 ~ L6 腰膨大部位。

1.7 观察指标及检测方法

1.7.1 免疫组织化学荧光双标法 将备用的脊髓组织脱水, 切片, 载玻片贴片, 丙酮固定, 将载玻片拿出复温后, 放置在 PBS 缓冲液中进行漂洗, 在羊血清工作液、室温条件下封闭, 一抗孵育: 滴加一抗混合液 (Iba-1 抗 1:200、P2X4 抗 1:50), 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜; 二抗孵育: 避光滴加荧光二抗混合液 (抗小鼠 FITC 1:250; Alexa fluor 555 标记驴抗兔 1:500), 避光滴加 DAPI 溶液, 使用抗荧光淬灭剂封片, 保存于暗盒中, 并使用激光共聚焦显微镜拍照观察。

1.7.2 Western blot 检测脊髓组织 P2X4 受体表达

取脊髓组织剪碎, 加入适量裂解液。充分裂解后, 4 $^{\circ}$ C 下 12000 rpm 离心 30 min, 迅速取上清液用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。制作 8% 分离胶及 5% 浓缩胶, 按照每孔 20 μ g 定量加入蛋白样品后进行电泳分离, 后转入 PVDF 膜。旋转封闭, 加入 5 mL 稀释后的一抗 (稀释度 1:1000 的 Rabbit anti-P2X4 receptor antibody), 过夜。回收孵育过夜一抗, 加入 5 mL 5% 脱脂牛奶稀释的二抗 (稀释度 1:8000 的 HRP-conjugated secondary antibody)。弃去二抗, 用 5 mL 1x TBST, 旋转洗脱 15 min/次, 洗脱 3 次, 每次洗脱完毕弃去 TBST。将膜置于凝胶成像仪中, 在膜上均匀滴加适量 ECL 发光液, 按程序进行曝光。

1.7.3 Elisa 检测大鼠脊髓组织匀浆 IL-1 β 浓度

将脊髓组织放入 EP 管中, 加入适量裂解液, 充分裂解后在 4 $^{\circ}$ C 下, 1200 rpm 离心 30 min, 取上清液。第一排设为标准孔, 从低到高加入标准品 50 μ L, 余

为样本孔。各样本孔加入10 μL 样本及样本稀释液 40 μL 。各孔加入辣根过氧化物酶 100 μL ，封口，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。孵育结束，没空加入 350 μL 洗涤剂 1 min，弃去洗涤剂，吸水纸拍干，重复 5 次。每孔加入底物 A、B 各 50 μL ，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 25 min。每孔加入 50 μL 终止液，使用酶标仪在 450 nm 波长测定吸光度，并通过标准曲线测定各组样品中 IL-1 β 浓度。

1.8 统计学方法 采用 SPSS 23.0 进行数据处理。服从正态分布、方差齐性的多组均数之间的比较，采用方差分析，方差不齐采用秩和检验，在总体差异有显著性的基础上进行均数间的两两比较。以 $\alpha = 0.05$ 为显著性检验水准， $P < 0.05$ 则有统计学意义。并使用 Prism 8.3 制图。

2 结果

2.1 番红固绿染色结果 空白组：空白组大鼠关节间隙正常，软骨结构清晰，排列整齐，软骨表层光滑无破损，细胞排列有序，中间细胞层呈梭形聚集，松质骨骨小梁密度适中。

模型组：模型组大鼠关节间隙较空白组变窄，关节软骨结构破坏较空白组明显，表层变薄变粗

糙，表层不完整，可见部分区域软骨表面破坏，局部软骨增厚，软骨纤维化明显，中间细胞层梭形结构消失，软骨下骨出现增生，软骨层变薄。

电针组：电针组大鼠关节间隙较空白组变窄，软骨表层裂缝较少，组织损伤程度轻于模型组，整体上细胞排列较整齐，部分区域排列较乱，但优于模型组，软骨深层结构清晰，各层细胞结构较正常（见图 1）。

2.2 机械痛检测结果 3 组大鼠在造模前机械痛阈没有显著差异。在碘乙酸钠注射建立 KOA 模型后模型组大鼠及电针组大鼠机械痛阈在第 1 个周期显著下降，在之后的 4 个周期内保持平稳，无明显变化。从图中可看出经电针治疗的电针组较模型组痛阈明显提高（见图 1）。

结果表明，电针内膝眼、外髌鼻穴治疗可提高 KOA 模型大鼠的机械痛阈。

2.3 免疫荧光结果 通过免疫荧光双标的方法检测 P2X4 在大鼠脊髓背角的表达部位。结果提示：P2X4 受体与 Iba-1 表达部位一致，主要表达于小胶质细胞。而电针可抑制 P2X4 受体减少 Iba-1 的表达，从而抑制小胶质细胞的活化（见图 2）。

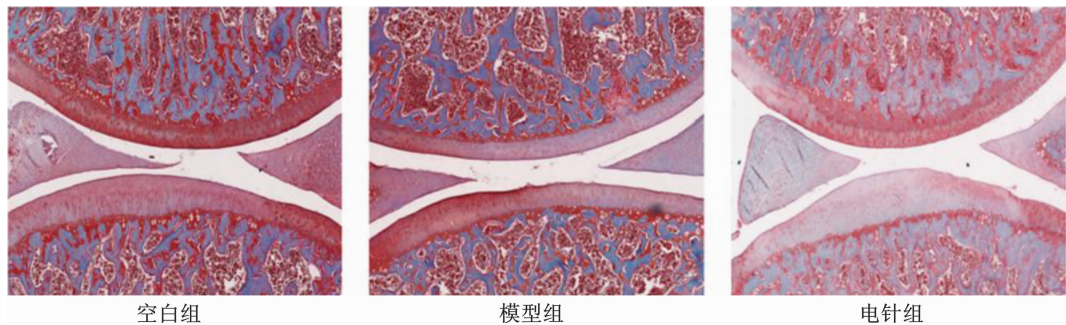
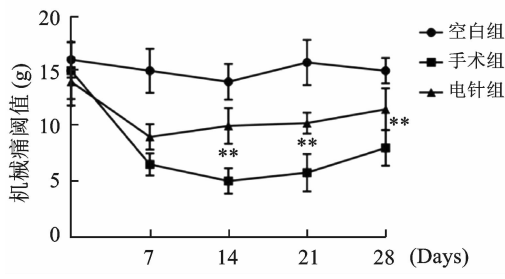


图 1 各组番红固绿染色结果



注：与 KOA 模型大鼠相比，电针组的机械痛阈值显著提高，** $P < 0.01$

图 2 机械痛阈值趋势

2.4 Western-Blot 检测结果 Western-Blot 结果显示：与空白组相比，模型组脊髓组织的 P2X4 受体蛋白表达高于空白组（ $P < 0.01$ ）。与模型组相比，

电针组脊髓组织的 P2X4 受体蛋白表达水平明显低于模型组（ $P < 0.01$ ）（见图 3）。

结果提示，KOA 模型组大鼠脊髓背角 P2X4 受体的蛋白表达水平较空白组大鼠显著提高。而模型组与电针组相比较，电针组脊髓背角 P2X4 受体蛋白表达水平显著降低。提示电针可以抑制 KOA 模型脊髓增高的 P2X4 受体蛋白水平（见图 4）。

2.5 Elisa 检测结果 Elisa 结果显示：模型组 IL-1 β 水平明显高于空白组（ $P < 0.01$ ），差异具有统计学意义；电针组与模型组比较，IL-1 β 水平均明显降低（ $P < 0.01$ ），差异有统计学意义（见图 5）。

结果表明：电针可以减少炎症因子 IL-1 β 的释放。

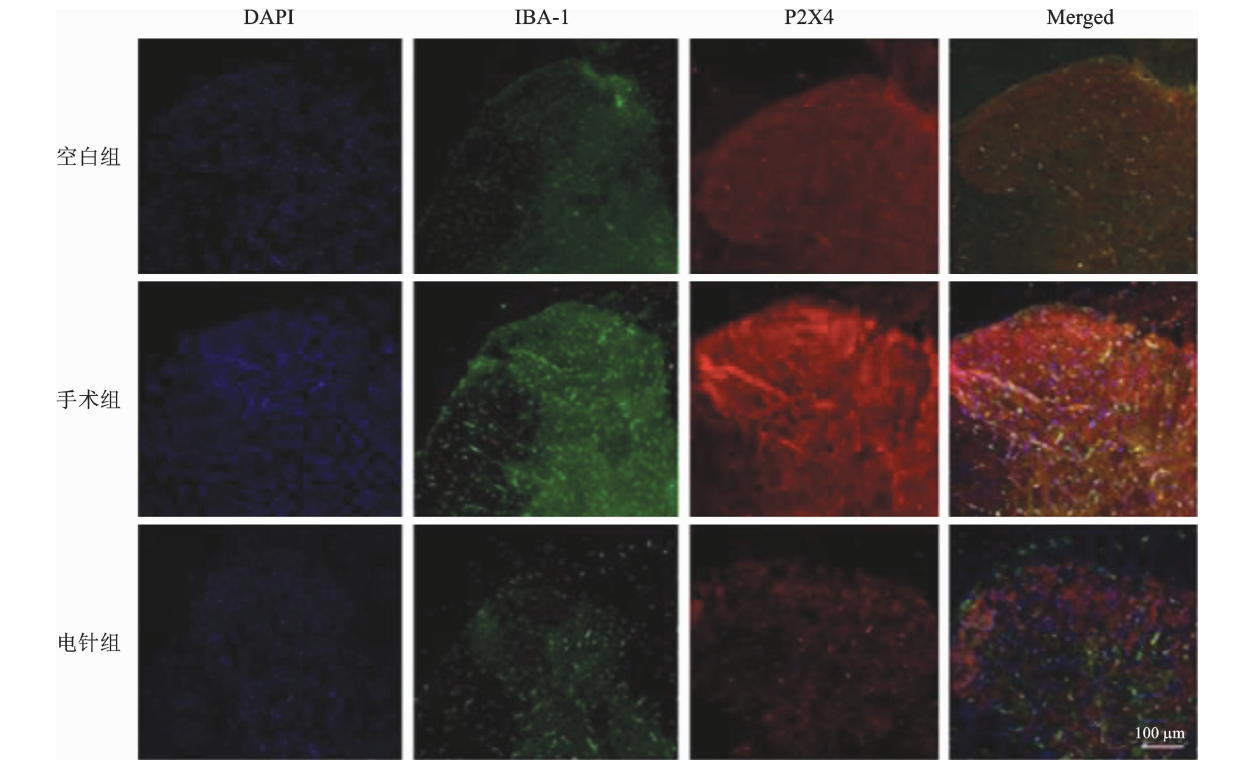
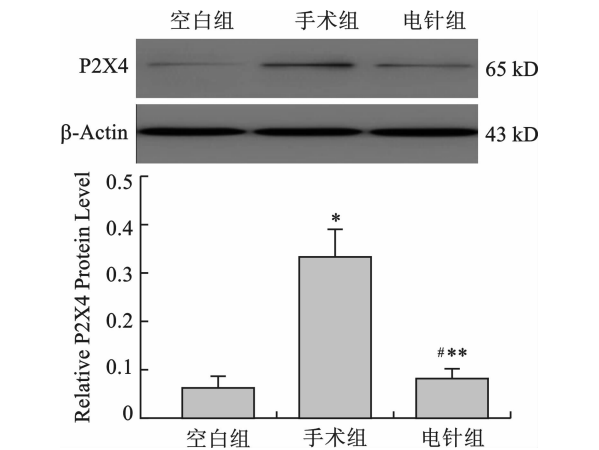
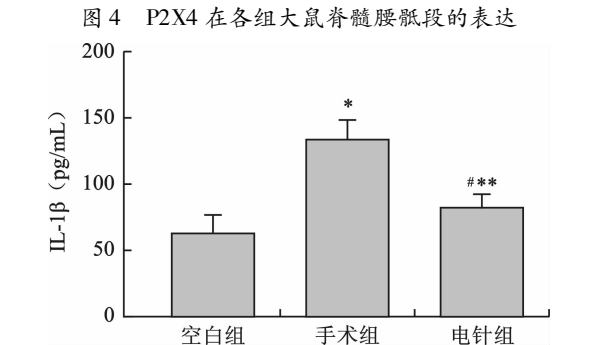


图3 P2X4和Iba-1在大鼠脊髓背角免疫荧光双标



注:与空白组相比较: * $P < 0.01$; # $P > 0.05$ 与模型组相比较: ** $P < 0.01$



注:与空白组相比较: * $P < 0.01$; # $P < 0.05$ 与模型组相比较: ** $P < 0.01$

图5 Elisa检测各组组织匀浆IL-1β浓度结果

3 讨论

膝骨性关节炎主要是以关节软骨退变为主,软骨原有形态结构遭受破坏并伴随滑膜增生,使软骨周围骨质增生以及关节炎性反应发生^[8-11]。膝骨关节炎导致的疼痛,机制复杂,临床治疗棘手。相关研究发现,电针能减轻KOA疼痛。Lin等^[12]的一项初步研究表明,电针对于缓解KOA疼痛有一定效果,而每周3次较每周1次效果更优;Liang等^[13]的研究表明,电针与软组织松解针刺法两组均可降低KOA的VAS评分;Lv等^[14]的研究表明,电针可减缓疼痛,降低VAS评分;Tu等^[15]的多中心研究发现,电针可减轻KOA的疼痛,且效果持续较久。而电针镇痛机制仍需进一步阐明。

内膝眼及犊鼻穴是临床治疗膝骨关节炎最常见取穴部位。《针灸甲乙经》记载:“犊鼻肿,可刺其上。”《玉龙歌》云:“膝头红肿不能行,必针膝眼、膝关穴。”近年来,有学者通过文献定量分析发现犊鼻穴在膝骨关节炎的治疗穴位占比中达79.2%,占据首位^[16]。本次研究也采用电针犊鼻穴及内膝眼,同样发现在改善骨关节炎退变方面有着较好作用。同时有研究发现疏密波电针可改善局部血液循环,促进膝关节积液吸收及关节软骨修复^[17],故在本研究中我们采用疏密波电针治疗,取得了较好效果。

KOA的疼痛机制较为复杂,除了外周疼痛的产生外,疼痛敏化作用的神经性疼痛机制或中枢疼痛机制也参与KOA之中^[3,18-19]。既往研究表明脊髓背角小胶质细胞参与神经病理痛的发生、发展及调控^[20-21]。作为P2X受体的一种亚型,P2X4受体主要分布在小胶质细胞中,其对于小胶质细胞的激活具有重要的调控作用^[22-24]。研究证明P2X4受体激活后,小胶质细胞表面的Iba-1大量表达,而活化的小胶质细胞可释放炎症细胞因子白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β),进而导致神经系统炎症,降低疼痛阈值^[25]。结合我们研究结果提示P2X4参与了KOA患者的慢性疼痛的发生、发展。

综上所述,本实验研究发现电针内膝眼、犊鼻穴可抑制膝骨性关节炎模型大鼠脊髓P2X4受体表达及小胶质细胞的活化以及下游炎症因子IL-1 β 过度表达,从而减轻膝骨性关节炎引起的疼痛。

参考文献

- [1] 马永圆,郭海云,白福海,等.电针治疗膝骨关节炎的基础研究进展[J].上海针灸杂志,2018,37(7):833-840.
- [2] 邓凯峰,颜家兴,高倩倩,等.电针治疗膝骨性关节炎的临床研究进展[J].山东中医杂志,2020,39(10):1135-1139.
- [3] Hunter David J, Bierma-Zeinstra Sita. Osteoarthritis[J]. Lancet,2019,393(10182):1745-1759.
- [4] 任春光,杨建平,王丽娜,等. P2X4受体在大鼠胫骨痛中的变化及可能机制[J].中国疼痛医学杂志,2011,17(1):41-45.
- [5] 黄华,陈慧娥,余文英,等.电针“夹脊”穴对坐骨神经慢性损伤大鼠镇痛后效应的影响[J].针刺研究,2020,45(1):40-45.
- [6] 霍康富,李楠,王和鸣.膝骨关节炎动物模型的研究进展[J].中国中医骨伤科杂志,2014,22(11):68-71.
- [7] 张露芬.实验针灸学[M].北京:化学工业出版社,2010:221.
- [8] 张媛媛,李西海,吴明霞.电针调节Wnt/ β -catenin信号通路抑制大鼠膝骨关节炎软骨退变的研究[J].中国针灸,2019,39(10):1081-1086.
- [9] 江攀,李大鹏,毛良浩,等.滑膜在骨关节炎发病机制及治疗中的作用[J].中国矫形外科杂志,2020,28(5):430-434.
- [10] 谈倩,李柏村,李静,等.针刺结合艾灸调节骨关节炎模型大鼠滑膜昼夜节律蛋白的表达[J].中国组织工程研究,2022,26(11):1714-1719.
- [11] 胡芯源,曹珊,陈文明,等.连翘苷元通过抑制TLR4介导的NF- κ B信号通路减轻大鼠骨关节炎软组织损伤

和基质降解[J].免疫学杂志,2021,37(2):115-121.

- [12] Lin LL, Tu JF, Shao JK, et al. Acupuncture of different treatment frequency in knee osteoarthritis: a protocol for a pilot randomized clinical trial[J]. Trials, 2019, 20:423.
- [13] Liang YF, Li WX, Ma Y, et al. Comparison of therapeutic effect of soft-tissue relaxing needling and electroacupuncture for knee osteoarthritis[J]. Acupuncture research, 2019, 44(6):439-442.
- [14] Lv ZT, Shen LL, Zhu B, et al. Effects of intensity of electroacupuncture on chronic pain in patients with knee osteoarthritis: a randomized controlled trial[J]. Arthritis Res Ther, 2019, 21(1):120.
- [15] Tu JF, Yang JW, Shi GX, et al. Efficacy of Intensive Acupuncture Versus Sham Acupuncture in Knee Osteoarthritis: A Randomized Controlled Trial[J]. Arthritis Rheumatol, 2021, 73:448-458.
- [16] 李丽, 李宁, 吴滨. 针灸治疗膝关节骨性关节炎的文献计量学分析[J]. 中国针灸, 2007(11):862-864.
- [17] 孙奎. 魏福良学术思想与临床经验总结及魏氏针灸治疗膝骨关节炎临床研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2015.
- [18] Villafañe Jorge Hugo, Valdes Kristin, Pedersini Paolo, et al. Osteoarthritis: a call for research on central pain mechanism and personalized prevention strategies[J]. Clinical rheumatology, 2018, 38(2):583-584.
- [19] Haywood Adrian R, Hathway Gareth J, Chapman Victoria. Differential contributions of peripheral and central mechanisms to pain in a rodent model of osteoarthritis[J]. Scientific reports, 2018, 8(1).
- [20] 许今. 脊髓P2X受体阳性小胶质细胞在电针治疗神经病理痛中的作用研究[D]. 上海:上海交通大学, 2016.
- [21] Ji RR, Suter MR. p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain[J]. Mol Pain 2007, 3:33.
- [22] 李洁, 刘晓宇, 毛培军, 等. 大鼠脊髓小胶质细胞P2X4的表达和糖尿病病理性神经痛大鼠炎症反应和疼痛阈值的关系[J]. 现代生物医学进展, 2022, 22(12):2232-2236.
- [23] 陈文佳, 孙灿林, 姜琳. 右美托咪定对慢性压迫性神经痛大鼠脊髓P2X4/NLRP3通路的影响[J]. 江苏医药, 2020, 46(3):224-228.
- [24] Kohno Keita, Tsuda Makoto. Role of microglia and P2X4 receptors in chronic pain[J]. PAIN Reports, 2021, 6(1):e864.
- [25] Gosselin RD, Suter MR, Ji RR, et al. Glial cells and chronic pain[J]. Neuroscientist, 2010, 6(16):519-531.

(修回日期:2022-11-30 编辑:蒲瑞生)