

基于Piezo1/GPX4/ACSL4信号轴探讨针刀抑制软骨细胞铁死亡的作用机制

张良志^{1,2}, 刘洪^{1,2}, 黄旺祥³, 刘文辉^{1,2}, 余文英^{1,2}, 谢丽梅^{1,2}, 郑宇逵⁴, 曾伟毅³, 修忠标^{1,2}

(¹福建中医药大学附属人民医院, 福州 350004; ²福建省中西医结合慢性筋骨病医学临床研究中心, 福州 350004; ³泉州市正骨医院, 福建泉州 362000; ⁴福建中医药大学, 福州 350122)

【摘要】目的:观察针刀对膝关节骨关节炎(KOA)兔膝关节软骨细胞压电型机械门控离子通道组件1(Piezo1)/谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)/长链酰基辅酶A合成酶4(ACSL4)信号轴的影响,探讨针刀治疗KOA的作用机制。**方法:**将雄性新西兰兔随机分为空白组、模型组和针刀组,每组8只。采用改良Videman法左侧后肢伸直位固定6周建立KOA兔模型。针刀组选取左膝经筋病灶点“鹤顶次”“髌外上”“髌内上”“成腓间”“委阳次”“阴陵次”行针刀治疗,每周1次,连续4周。干预前后对兔左膝关节进行奎森功能障碍指数(Lequesne MG)评分;HE染色法观察兔左膝关节软骨细胞病理学变化;透射电镜观察兔左膝关节软骨细胞线粒体超微结构;实时荧光定量PCR法检测兔左膝关节软骨组织Piezo1、GPX4、ACSL4 mRNA表达水平;Western blot法检测兔左膝关节软骨组织Piezo1、GPX4、ACSL4蛋白表达。**结果:**与空白组比较,模型组兔左膝关节Lequesne MG评分升高($P<0.01$),Piezo1、ACSL4 mRNA及蛋白表达水平上升($P<0.01$),GPX4 mRNA及蛋白表达水平下降($P<0.01, P<0.05$)。与模型组比较,针刀组左膝关节Lequesne MG评分降低($P<0.05$),Piezo1、ACSL4 mRNA及蛋白表达水平下降($P<0.01, P<0.05$),GPX4 mRNA及蛋白表达水平上升($P<0.01, P<0.05$)。HE染色结果显示,模型组兔膝关节软骨表面粗糙,细胞核皱缩、破裂或消失,且数量稀少、排列分散、层次不齐;针刀组兔膝关节软骨表面较为平整,细胞核较清晰,且数量增多、排列较有序、层次变齐。透射电镜结果显示,模型组软骨细胞皱缩、形态不规则,胞膜破裂,胞质多处溶解、形成空泡,线粒体呈圆形或椭圆形,且数量减少,基质大面积溶解,嵴变短,甚至断裂、消失;针刀组软骨细胞形状较为规则,胞膜较完整,胞质较均匀,线粒体呈圆形或椭圆形,且数量较多,基质较为均匀,有较多的嵴。**结论:**基于经筋理论针刀松解膝周经筋病灶点可能通过调控Piezo1/GPX4/ACSL4信号轴,抑制软骨细胞铁死亡,改善KOA兔软骨损伤。

【关键词】 膝关节骨关节炎;针刀;铁死亡;Piezo1/GPX4/ACSL4信号轴

Effects of acupotomy therapy on chondrocyte ferroptosis based on the Piezo1/GPX4/ACSL4 signaling axis

ZHANG Liang-zhi^{1,2}, LIU Hong^{1,2}, HUANG Wang-xiang³, LIU Wen-hui^{1,2}, YU Wen-ying^{1,2}, XIE Li-mei^{1,2}, ZHENG Yu-kui⁴, ZENG Wei-yi³, XIU Zhong-biao^{1,2} (¹Affiliated People's Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350004, China; ²Fujian Provincial Clinical Research Center of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Chronic Osteoporosis, Fuzhou 350004; ³Quanzhou Orthopaedics & Traumatology Hospital, Quanzhou 362000, Fujian Province; ⁴Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122)

【ABSTRACT】 Objective To observe the effect of acupotomy on the piezoelectric mechanical gating ion channel component 1 (Piezo1)/glutathione peroxidase 4 (GPX4)/long-chain acyl coenzyme A synthetase 4 (ACSL4) signaling axis of knee chondrocytes in knee osteoarthritis (KOA) rabbits, so as to explore its mechanisms underlying improvement of

[DOI] 10.13702/j.1000-0607.20251053

引用格式:张良志,刘洪,黄旺祥,等.基于Piezo1/GPX4/ACSL4信号轴探讨针刀抑制软骨细胞铁死亡的作用机制[J].针刺研究,2026,51(6):731-739.

项目来源:国家自然科学基金项目(No.82474531);国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目(中医骨伤科, No.zyyzdxk-2023106);福建省科技创新联合基金项目(No.2024Y9494);福建中医药大学中医骨伤科学学科开放课题项目(No.XGS2023010)

通信作者:修忠标, E-mail: xzbdoctor@sina.com

KOA. Methods Twenty-four male New Zealand rabbits were randomly divided into blank control, KOA model and acupotomy groups, with 8 rabbits in each group. The KOA model was established by immobilizing the left hind limb (with a plaster cast) in an extended position for 6 weeks according to the modified Videman method. For rabbits of the acupotomy group, the needle-knife release technique was applied to the musculotendon lesion points (“Hedingci” “Binwaishang” “Binneishang” “Chengfeijian” “Weiyangci” and “Yinlingci”) of the left knee, once a week for 4 weeks. The degree of the left knee joint dysfunction was assessed by referring to Lequesne MG’s functional disability scale (pain reaction [0—3 points], gait [0—3 points], joint motion [0—3 points] and swelling [0—2 points]) before and after the intervention. Histopathological changes of the left knee joint cartilage tissue (chondrocytes) were observed after H.E. staining. The mitochondrial structure of the cartilage chondrocytes was observed using transmission electron microscopy (TEM). The mRNA expression levels of Piezo1, GPX4 and ACSL4 in the cartilage tissue were detected by using real-time qPCR. The protein expression levels of Piezo1, GPX4 and ACSL4 in the cartilage tissue were detected by using Western blot. **Results** Compared with the blank control group, the model group showed a significant increase in the Lequesne MG score ($P<0.01$), expression levels of Piezo1 and ACSL4 mRNAs and proteins ($P<0.01$), and a notable decrease in the expression levels of GPX4 mRNA and protein ($P<0.01$, $P<0.05$). Compared with the model group, the acupotomy group had an evident decrease in the Lequesne MG score ($P<0.05$), expression levels of Piezo1 and ACSL4 mRNAs and proteins ($P<0.01$, $P<0.05$), and an evident increase in the expression levels of GPX4 mRNA and protein ($P<0.01$, $P<0.05$). The results of H.E. staining showed a rough surface of the cartilage of the left knee joint, wrinkled and broken nucleus, being sparse in number, scattered arrangement and with uneven level in the model group. Whereas in the acupotomy group, the cartilage surface of the knee joint was relatively flat, the nucleus was clear and increased in the number and the arrangement was in order, and the level was relatively distinct. The results of TEM showed shrunk and irregular chondrocytes, ruptured cell membrane, multiple dissolved cytoplasm, formation of some vacuoles, round or oval mitochondria with reduction in the number, shortening in the ridge, even disappearance, and dissolved matrix in a large area in the model group. In the acupotomy group, the chondrocytes were relatively regular in shape, with complete membrane and uniform cytoplasm, and the mitochondria were more in the number, with more uniform matrix and more ridges. **Conclusion** Acupotomy can improve the motor function in KOA rabbits, which may be associated with its functions in inhibiting chondrocyte ferroptosis by regulating Piezo1/GPX4/ACSL4 signaling axis, and relieving cartilage injury.

【KEYWORDS】 Knee osteoarthritis; Acupotomy; Ferroptosis; Piezo1/GPX4/ACSL4 signaling axis

膝关节骨关节炎(KOA)是以软骨退行性变为主要特征的关节疾患,全球患病率为4.9%^[1-2],呈现“高患病率、高致残率、高手术率、高复发率和低控制率”的特征,其引起的关节疼痛和下肢功能障碍是临床亟须解决的问题^[3]。中医针刀疗法发挥“针刺”和“刀割”的双重功效,调节力学平衡^[4],治疗KOA疗效确切,已被多个KOA诊疗指南所推荐应用^[5-7],然而其具体的作用机制尚未完全明确。细胞死亡在KOA软骨病理改变过程中发挥重要作用,铁死亡作为一种新型非凋亡形式的细胞死亡方式,近年来逐渐成为国内外研究的热点^[8]。压电型机械门控离子通道组件1(Piezo1)^[9]是一种主要分布于软骨细胞表面的机械敏感离子通道蛋白,可介导细胞外的机械信号转变成细胞内的化学信号,进而调控软骨细胞的生物学效应。谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)和长链酰基辅酶A合成酶4(ACSL4)是调控铁死亡的两个核心蛋白^[10-11]。研究^[12]表明,Piezo1是过度机械应力诱导软骨细胞铁死亡的关键通道

蛋白。因此本研究从铁死亡的角度入手,基于Piezo1/GPX4/ACSL4信号轴探讨针刀治疗KOA可能的作用机制,以期为其临床应用提供有力的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

6月龄普通级雄性新西兰兔24只,体质量(2.0 ± 0.5) kg,订购于上海松联实验动物有限责任公司,并将其饲养在福建中医药大学实验动物中心。实验兔采取单笼喂养,自由摄食、饮水。饲养房自然光照,温度严格控制在20~25℃,湿度30%~60%。适应性喂养1周后,采用随机数字表法将新西兰兔随机分成空白组、模型组、针刀组,每组8只。本研究经福建中医药大学动物伦理委员会批准(伦理批件号:FJTCM PRE IACUC 2024407),严格遵照相关实验动物福利伦理审查清单的规定实施^[13]。

1.2 主要试剂与仪器

HE染色试剂盒、Trizol试剂盒、二乙胺四乙酸脱钙液(北京索莱宝),蛋白上样缓冲液、BCA蛋白定量试剂盒、ECL Plus超敏化学发光液、HRP标记的二抗(中国Abiowell),mRNA反转录试剂盒、实时荧光定量PCR试剂盒(北京康为世纪),核酸染料(北京普利莱),Piezo1、GPX4、ACSL4抗体(美国Proteintech),高分子石膏(陕西安信)。

一次性使用无菌小针刀(0.4 mm×40 mm,江西老宗医),数字X线摄影系统(日本岛津),组织包埋机(常州中威),电泳仪、电泳槽、转膜仪(北京六一),台式冷冻离心机(湖南湘仪),化学发光成像系统(上海勤翔),光学显微镜(德国Leica),透射电镜(日本Olympus)。

1.3 造模与干预方法

参照团队前期研究的改良Videman法^[14]将模型组、针刀组实验兔左后肢伸直位石膏固定制动6周以建立KOA兔模型。造模结束后采用奎森功能障碍指数(Lequesne MG)评分评估兔的左膝关节功能障碍程度,并进行X线检查观察左膝关节间隙,以Lequesne MG评分≥6分且X线显示关节间隙变窄视为造模成功。

造模成功后1周借助固定器对针刀组实验兔在清醒状态下进行固定,参照《中国经筋学》^[15]中关于膝周经筋病灶点的命名及定位,依据兔的骨度分寸标准,选取“鹤顶次”(股四头肌肌腱髌骨正上缘附着处)、“髌内上”(股内侧肌肌腱髌骨内上缘附着处)、“髌外上”(股外侧肌肌腱髌骨外上缘附着处)、“成腓间”(外侧关节间隙中膝外侧副韧带移行处)、“委阳次”(腓横纹外侧端,股二头肌内侧缘处)、“阴陵次”(鹅足腱胫骨内侧止点处)为治疗点^[16-17]。采用一次性使用无菌小针刀,严格遵守无菌要求,刀口线垂直皮肤刺入,抵达病变处行提插刀法快速切割2~3刀,松解范围不超过0.5 cm,术毕用无菌干棉球按压术区1 min,每周干预1次,共干预4周。空白组、模型组模拟同样的抓取和固定,而不行针刀干预。

1.4 观察指标与检测方法

取材:干预结束后1周开始组织取材。所有的实验兔禁食水12 h,在称重之后按0.1 mg/kg行阿托品皮下注射以抑制腺体分泌,再以总剂量0.1 mL/kg为标准,用舒泰50和速眠新Ⅱ注射液以5:5的体积比配制复合麻醉剂行全身麻醉^[18]。麻醉达效后迅速取出每组8只实验兔的左膝关节软骨组

织,一部分以4%多聚甲醛固定后用于HE染色,一部分以2.5%戊二醛固定后用于透射电镜观察,每组随机取3只兔的剩余膝关节软骨组织用液氮速冻后再转移至-80℃冰箱进行保存,用于实时荧光定量PCR、Western blot检测。

X线检查:造模结束后,按上述方法麻醉达效后对每组8只实验兔进行左膝关节正侧位X线检查。参数设置:照射电压为50 kV,照射电流为250 mA,照射量为32 mAs,照射时间为128 ms。仰卧位时保持髌骨位于正前方,屈髋30°、伸膝0°、髌外展15°拍正位片;左侧卧位时,左后肢肢体伸直,右后肢屈髋70°、屈膝45°拍侧位片。放射球管离膝关节的距离均为110 mm。

行为学检测:造模后、干预后对每组8只实验兔进行Lequesne MG评分,从疼痛刺激反应(0~3分)、步态改变(0~3分)、关节活动(0~3分)、肿胀(0~2分)4个维度进行标准化评定,总分11分。总分越高说明膝关节功能障碍越严重。

HE染色法观察兔软骨组织病理改变:取每组8只实验兔的左膝关节软骨组织,经4%多聚甲醛固定24 h,脱钙、脱水、石蜡包埋、切片(厚度5 μm)后进行HE染色,再以中性胶密封,于光学显微镜下观察各组兔左膝关节软骨组织病理形态。

透射电镜观察兔软骨细胞及线粒体结构形态:取每组8只实验兔的左膝关节软骨组织,按常规透射电镜样本制备流程进行固定、漂洗、再固定、脱水、渗透、包埋、聚合、切片(厚度60 nm),柠檬酸铅、醋酸铀双重染色,清洗干燥后于透射电子显微镜下观察实验兔软骨细胞及线粒体结构形态。

实时荧光定量PCR法检测兔左膝关节软骨组织Piezo1、GPX4、ACSL4 mRNA表达水平:每组随机取3只实验兔的左膝关节软骨组织20 mg,经液氮研磨成粉后,用Trizol法提取总RNA,分光光度计测算RNA浓度、纯度,按照反转录试剂盒相应操作步骤将mRNA反转录为cDNA。根据实时荧光定量PCR反应体系配制相应试剂后进行PCR检测。反应条件:95℃ 10 min预变性;95℃ 15 s变性、60℃ 30 s退火,40个循环。最后采用2^{-ΔΔCt}相对定量法分析mRNA相对表达量。各基因引物序列见表1。

Western blot法检测兔左膝关节软骨组织Piezo1、GPX4、ACSL4蛋白表达水平:每组随机取3只实验兔的左膝关节软骨组织100 mg进行蛋白提取,BCA法测定蛋白的浓度、上样量。每次按测得

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	序列(5'→3')	产物长度/ bp
Piezo1	上游 AAGAGCATCCACTTCCACCG	172
	下游 GGATGACTGTGGCGTGGTC	
GPX4	上游 CTGTCCCACACTCTGTGCC	194
	下游 GCAGGTCCTTCTCGATCACC	
ACSL4	上游 CTGGCTGTTAAGACGCGGTG	162
	下游 GCCGACAATAAAGTACACTTACAGA	
GAPDH	上游 AGAGCACCAGAGGAGGACG	104
	下游 TGGGATGGAACTGTGAAGAG	

注:Piezo1为压电型机械门控离子通道组件1,GPX4为谷胱甘肽过氧化物酶4,ACSL4为长链酰基辅酶A合成酶4。

的上样量取蛋白样本进行电泳、转膜。室温封闭90 min后进行一抗(Piezo1稀释比例为1:500,GPX4、ACSL4为1:1 000,GAPDH为1:5 000)4℃孵育过夜,TBST漂洗后加入相应二抗(1:5 000)室温孵育2 h。ECL显色曝光,凝胶成像系统成像。

用Image J软件分析各目标蛋白灰度值,目标蛋白的相对表达量为目标蛋白条带和内参GAPDH条带灰度值的比值。

1.5 统计学方法

采用SPSS25.0软件进行统计学处理分析。服从正态分布的计量资料数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验;不全服从正态分布的计量资料数据以中位数(上下四分位数) $[M(P_{25}, P_{75})]$ 表示,组间比较采用Kruskal-Wallis检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 各组兔左膝关节X线、Lequesne MG评分比较

干预前空白组左膝关节X线显示关节间隙正常,无明显变窄、骨赘;与空白组比较,模型组、针刀组兔左膝关节间隙变窄,周围有骨赘形成,左膝关节Lequesne MG评分均升高($P < 0.01$),说明KOA兔模型造模成功。干预后,与空白组比较,模型组兔左膝关节Lequesne MG评分升高($P < 0.01$);与模型组比较,针刀组左膝关节Lequesne MG评分降低($P < 0.05$)。见图1、图2。

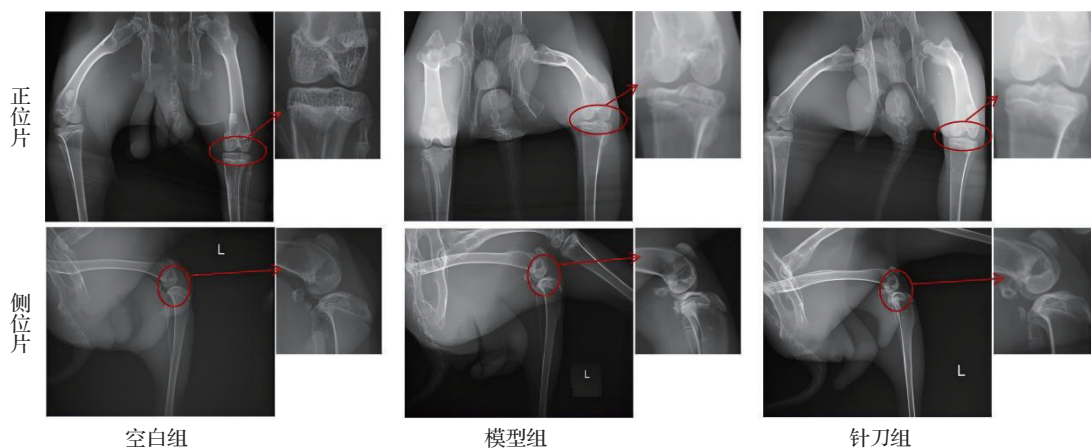


图1 各组兔左膝关节X线片比较

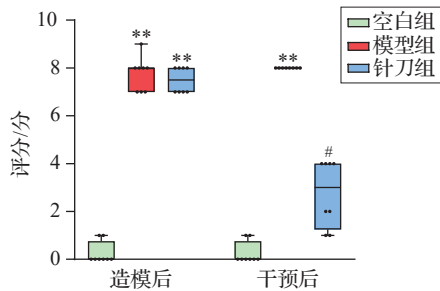
Fig. 1 Comparison of X-ray examination results of left knee joint of rabbits in the three groups

2.2 各组兔左膝关节软骨组织HE染色比较

空白组兔膝关节软骨表面平整光滑,细胞核清晰可见,数量多,排列密集且整齐;与空白组比较,模型组兔膝关节软骨表面粗糙,细胞核皱缩、破裂或消失,数量稀少,排列分散,层次不齐;与模型组比较,针刀组兔膝关节软骨表面较为平整,细胞核较清晰,数量增多,排列较有序,层次变齐。见图3。

2.3 各组兔软骨细胞、线粒体超微结构形态比较

空白组兔软骨细胞近似椭圆形,胞膜完整,胞质分布均匀,线粒体呈长条或圆形,数量多,基质均匀,嵴排布密集;与空白组比较,模型组软骨细胞皱缩,形态不规则,胞膜破裂,胞质多处溶解,形成空泡,线粒体呈圆形或椭圆形,数量减少,基质大面积溶解,嵴变短,甚至断裂、消失;与模型组比较,针刀组软骨细胞形状较为规则,胞膜较完整,胞质较均



注: Lequesne MG 为奎森功能障碍指数。与空白组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, # $P<0.05$ 。

图2 各组兔左膝关节 Lequesne MG 评分比较

[$M(P_{25}, P_{75})$, 8只兔/组]

Fig. 2 Comparison of Lequesne MG score of left knee joint of rabbits in the three groups [$M(P_{25}, P_{75})$, 8 rabbits / group]

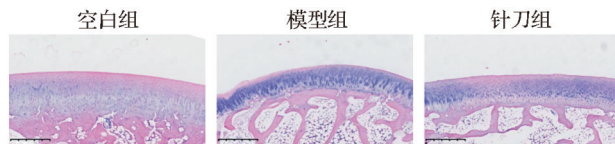


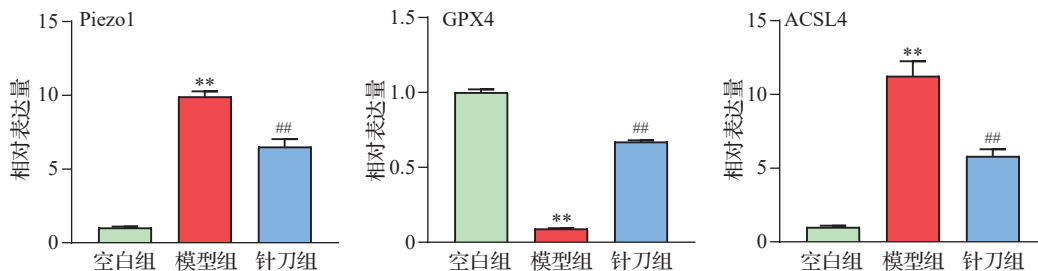
图3 各组兔左膝关节软骨组织形态学比较 (HE 染色, 标尺=125 μ m)

Fig. 3 Comparison of histomorphology of cartilage in left knee joint of rabbits in the three groups (HE staining, scale bar=125 μ m)

匀, 线粒体呈圆形或椭圆形, 数量较多, 基质较为均匀, 有较多的嵴。见图4。

2.4 各组兔左膝关节软骨组织 Piezo1、GPX4、ACSL4 mRNA 表达水平比较

与空白组比较, 模型组兔软骨组织 Piezo1、ACSL4 mRNA 表达水平上升($P<0.01$), GPX4 表达水平下降($P<0.01$); 与模型组比较, 针刀组兔软骨组织 Piezo1、ACSL4 mRNA 表达水平下降($P<0.01$), GPX4 mRNA 表达水平上升($P<0.01$)。



注: Piezo1 为压电型机械门控离子通道组件1, GPX4 为谷胱甘肽过氧化物酶4, ACSL4 为长链酰基辅酶A合成酶4。与空白组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, ## $P<0.01$ 。

图5 各组兔左膝关节软骨组织 Piezo1、GPX4、ACSL4 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$, 3只兔/组)

Fig. 5 Comparison of mRNA expression levels of Piezo1, GPX4 and ACSL4 in cartilage tissue of left knee joint of rabbits in the three groups ($\bar{x}\pm s$, 3 rabbits/group)

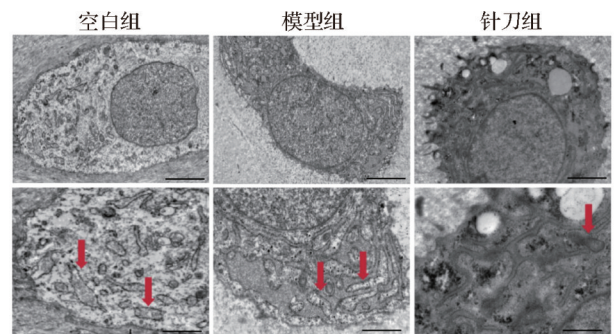
见图5。

2.5 各组兔左膝关节软骨组织 Piezo1、GPX4、ACSL4 蛋白表达水平比较

与空白组比较, 模型组兔软骨组织 Piezo1、ACSL4 蛋白表达水平上升($P<0.01$), GPX4 蛋白表达水平下降($P<0.05$); 与模型组比较, 针刀组兔软骨组织 Piezo1、ACSL4 蛋白表达水平下降($P<0.05$, $P<0.01$), GPX4 蛋白表达水平上升($P<0.05$)。见图6。

3 讨论

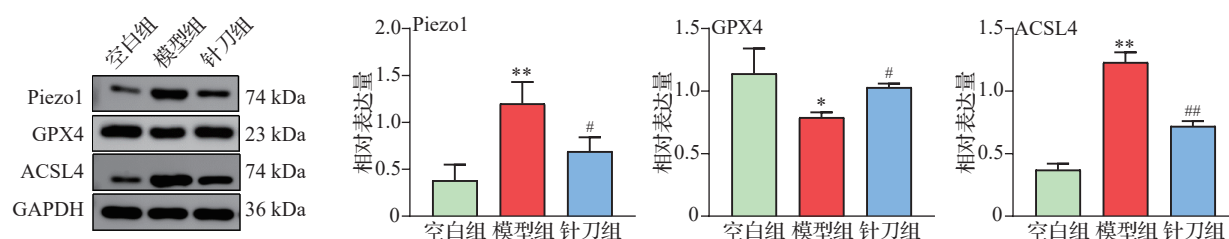
KOA 属中医学“膝痹”范畴, 足三阳和足三阴经筋结聚于膝关节, 发挥“主束骨、利关节”的作用。团队前期梳理、总结出膝部经筋“横络痹阻、气血失和、筋骨失衡”是 KOA 的核心病机^[19]。当外邪客居于膝关节, 膝周就会出现病理性产物“横络”, 阻碍气血运行, 致使局部血流不畅, 筋骨失养, 筋骨平衡



注: 红色箭头示线粒体。上排图标尺=3 μ m, 下排图标尺=1 μ m。

图4 各组兔软骨细胞、线粒体超微结构形态比较 (透射电镜)

Fig. 4 Comparison of ultrastructure morphology of chondrocytes and mitochondria of rabbits in the three groups (transmission electron microscope)



注: Piezo1 为压电型机械门控离子通道组件 1, GPX4 为谷胱甘肽过氧化物酶 4, ACSL4 为长链酰基辅酶 A 合成酶 4。

与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 6 各组兔左膝关节软骨组织 Piezo1、GPX4、ACSL4 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$, 3 只兔/组)

Fig. 6 Comparison of Piezo1, GPX4 and ACSL4 protein expression levels in cartilage tissue of left knee joint of rabbits in the three groups ($\bar{x} \pm s$, 3 rabbits/group)

失调。“横络”好发于出现异常应力的肌肉、韧带起止点处,即“鹤顶次”“髌内上”“髌外上”“成腓间”“委阳次”“阴陵次”^[20-21]。基于经筋理论,针刀松解膝周经筋病灶点能优化“针”畅达经筋气血、“刀”调节经筋平衡的双重功效,恢复气血和畅、筋骨平衡的生理状态,从而有效地治疗 KOA^[22-23]。

KOA 是以膝关节软骨退化、关节炎症反应、软骨下骨硬化、骨赘形成和关节功能丧失等为主要特征的一种最常见的骨关节炎(OA)类型^[24]。软骨细胞是软骨组织中唯一的细胞成分,维持正常软骨结构和代谢平衡^[25]。在 KOA 的病理进程中,细胞死亡占据至关重要的地位,包括细胞凋亡、坏死、自噬、焦亡及铁死亡等形式。针刀疗法治疗 KOA 疗效确切,但具体作用机制尚不明确,可能与抑制膝关节软骨细胞铁死亡有关^[26]。铁死亡^[27-28]是一种细胞死亡形式,其主要特征是铁超载和脂质过氧化积累,铁超载会促使软骨细胞产生过量的活性氧(ROS)和脂质过氧化物,破坏细胞的结构和功能,最终导致细胞死亡。线粒体膜密度增高,外膜破裂,以及嵴退化、断裂,甚至消失等改变是铁死亡独特的形态学特征^[29-30]。本研究通过观察膝关节软骨细胞和线粒体超微结构的变化,证实了 KOA 病理发展和铁死亡的发生有关。结果显示, KOA 兔膝关节出现疼痛和功能障碍,线粒体损伤加重,启动相关的生物学效应,诱导软骨细胞铁死亡;针刀干预能发挥抑制软骨细胞铁死亡,改善软骨损伤,缓解膝关节疼痛,改善功能障碍的作用。

Piezo1 是发现于哺乳动物体内的首个机械门控阳离子通道,能感受来自外部、内部的机械应力,并通过以 Ca^{2+} 为首的多种阳离子将其转导为生物电信号,调节蛋白质的合成和各种炎症因子的分泌,进而调控软骨细胞的生物学功能^[31-32]。越来越多的研究^[33-36]表明, Piezo1、铁死亡和软骨损伤存在着密

切的关系。吴斌等^[12]通过体外细胞实验明确了 Piezo1 在细胞发生铁死亡中的作用,结果显示过表达 Piezo1 将进一步降低细胞的增殖活力,促使线粒体发生损伤,介导铁死亡的发生。在 OA 经历机械应激诱导软骨细胞铁死亡中,GPX4 是 Piezo1 蛋白的关键下游靶标^[37]。Wang 等^[38]的研究也验证了通过抑制 Piezo1 的表达可以降低 OA 小鼠的 Ca^{2+} 水平,促进 GPX4 的表达,从而治疗 OA。GPX4 是还原过氧化物的关键酶,是铁死亡的重要抑制因子,能将多不饱和脂肪酸与 ROS 反应生成的毒性脂质过氧化物转化为无毒醇类,减少 ROS 及过氧化脂质的积累,抑制脂质过氧化反应的继续发展,进而有效减轻铁死亡的发生^[8,39]。另一方面,ACSL4 作为调节脂质组成的关键酶,是铁死亡的促进因子,可促进花生四烯酸酯化向磷脂酰乙醇胺转化,通过催化多不饱和脂肪酸与辅酶 A 结合,影响其跨膜特性,使细胞更易感于铁死亡,从而传递铁死亡信号^[40]。本研究显示,模型组兔膝关节软骨组织 Piezo1、ACSL4 表达水平上升,GPX4 表达水平下降,经针刀干预后,兔膝关节软骨组织 Piezo1、ACSL4 表达水平下降,GPX4 表达水平上升,且 HE 染色、透射电子显微镜观察显示兔膝关节软骨细胞铁死亡病理化发展进程减缓,软骨损伤得到改善,这提示针刀干预可能通过调控 Piezo1/GPX4/ACSL4 信号轴抑制软骨细胞铁死亡,发挥保护软骨的作用。改良 Videman 法造模后膝关节承受机械负荷,能理想地模拟 KOA 的发展过程。这可能是因为软骨细胞受到机械应力使得软骨细胞内的张力和结构改变,直接上调 Piezo1 的活性和表达^[41],促使大量 Ca^{2+} 内流,谷胱甘肽耗竭,直接导致 GPX4 活性降低,引起铁依赖性脂质过氧化物积累,致使细胞抗氧化能力下降^[42],ACSL4 活性增强,增加了细胞膜上脂质过氧化的靶点^[11],脂质 ROS 上升,最终

引起铁死亡。有研究^[43]表明,关闭Piezo1通道蛋白能发挥保护软骨细胞的作用。本研究结果显示,针刀可下调Piezo1表达水平,从而抑制软骨细胞内Ca²⁺超载,增加细胞机械负载的抵抗阈值,增强细胞活性,促进GPX4的表达,减少了软骨损伤后的脂质过氧化物积累,下调ACSL4的表达,减少细胞膜上脂质过氧化的靶点,阻碍铁死亡信号的传递,从而有效抑制了铁死亡的发生,减轻软骨损伤,最终改善KOA。

综上所述,基于经筋理论的针刀松解膝周经筋病灶点可以改善KOA兔的关节疼痛和功能障碍,延缓疾病进程,其机制可能与调控Piezo1/GPX4/ACSL4信号轴,抑制软骨细胞铁死亡,改善软骨损伤有关。本研究从铁死亡的角度入手,虽能揭示了针刀抑制软骨细胞铁死亡的部分调控机制,但并未探讨信号通路之间的相互作用关系,难以阐明复杂的整体调控,今后有待进一步开展更多的相关机制研究,阐明针刀治疗KOA的作用机制。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] LI E L, TAN J S, XU K, et al. Global burden and socioeconomic impact of knee osteoarthritis: a comprehensive analysis[J]. *Front Med*, 2024, 11: 1323091.
- [2] KANG Y K, LIU C L, JI Y C, et al. The burden of knee osteoarthritis worldwide, regionally, and nationally from 1990 to 2019, along with an analysis of cross-national inequalities [J]. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2024, 144(6): 2731-2743.
- [3] ATHWAL K K, MILNER P E, BELLIER G, et al. Posterior capsular release is a biomechanically safe procedure to perform in total knee arthroplasty [J]. *Knee Surg Phys Traumatol Arthrosc*, 2019, 27(5): 1587-1594.
- [4] 张雨晴, 侯逸敏, 夏敏, 等. 针刀松解合阳内调控膝周肌力改善KOA患者膝关节功能的研究[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2024, 26(12): 3180-3186.
ZHANG Y Q, HOU Y M, XIA M, et al. Study on the improvement of knee joint function in KOA patients by the regulation of periknee muscle strength by acupotomy loosening heyangnei (in Chinese) [J]. *World Science and Technology-Modernization of Traditional Chinese Medicine*, 2024, 26(12): 3180-3186.
- [5] 中华中医药学会骨伤科分会膝痹病(膝骨关节炎)临床诊疗指南制定工作组. 中医骨伤科临床诊疗指南·膝痹病(膝骨关节炎)[J]. *康复学报*, 2019, 29(3): 1-7.
Working Group for Formulating Clinical Diagnosis and Treatment Guidelines for Knee Arthritis (Knee Osteoarthritis) of Orthopedics Branch, China Association of Traditional Chinese Medicine. Clinical guidelines for diagnosis and treatment of knee osteoarthritis (xibibing) in orthopedics and traumatology of traditional Chinese medicine (in Chinese) [J]. *Journal of Fujian University of Traditional Chinese Medicine*, 2019, 29(3): 1-7.
- [6] 中国中医药研究促进会骨伤科分会. 膝骨关节炎中医诊疗指南(2020年版)[J]. *中医正骨*, 2020, 32(10): 1-14.
Traumatology and Orthopedics Branch of Chinese Association for Research and Advancement of Traditional Chinese Medicine. Guidelines for traditional Chinese medicine diagnosis and treatment of knee osteoarthritis (2020 edition) (in Chinese) [J]. *The Journal of Traditional Chinese Orthopedics and Traumatology*, 2020, 32(10): 1-14.
- [7] 修忠标, 陈长贤, 张建新, 等. 膝骨关节炎针刀临床诊疗指南[J]. *康复学报*, 2023, 33(3): 193-201.
XIU Z B, CHEN C X, ZHANG J X, et al. Clinical guidelines for acupotomy treatment of knee osteoarthritis (in Chinese) [J]. *Rehabilitation Medicine*, 2023, 33(3): 193-201.
- [8] LIANG D G, MINIKES A M, JIANG X J. Ferroptosis at the intersection of lipid metabolism and cellular signaling [J]. *Mol Cell*, 2022, 82(12): 2215-2227.
- [9] LAI A, COX C D, CHANDRA SEKAR N, et al. Mechanosensing by Piezo1 and its implications for physiology and various pathologies [J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2022, 97(2): 604-614.
- [10] LIU Y, WAN Y C, JIANG Y, et al. GPX4: the hub of lipid oxidation, ferroptosis, disease and treatment [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2023, 1878(3): 188890.
- [11] DING K Y, LIU C B, LI L, et al. Acyl-CoA synthase ACSL4: an essential target in ferroptosis and fatty acid metabolism [J]. *Chin Med J*, 2023, 136(21): 2521-2537.
- [12] 吴斌, 刘兆祥, 张月红, 等. 过度机械应力调控Piezo1介导成软骨细胞铁死亡的机制探讨[J]. *天津医药*, 2025, 53(1): 14-18.
WU B, LIU Z X, ZHANG Y H, et al. The mechanism of excessive mechanical stress modulates Piezo1-mediated ferroptosis in chondrocytes (in Chinese) [J]. *Tianjin Medical Journal*, 2025, 53(1): 14-18.
- [13] 《针刺研究》编辑部. 《针刺研究》实验动物福利伦理审查清单 [J]. *针刺研究*, 2024, 49(2): 220.
Editorial Department of Acupuncture Research. Checklist of welfare ethics of experimental animals in *Acupuncture Research* (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2024, 49(2): 220.
- [14] 刘晶, 林巧璇, 卢莉铭, 等. 改良Videman法复制兔膝骨关节炎的实验研究[J]. *康复学报*, 2020, 30(3): 212-219.
LIU J, LIN Q X, LU L M, et al. Experimental study of modified videman method to replicate knee osteoarthritis in rabbits (in Chinese) [J]. *Rehabilitation Medicine*, 2020, 30

- (3): 212-219.
- [15] 薛立功. 中国经筋学[M]. 北京: 中医古籍出版社, 2009: 681-728.
- XUE L G. Chinese sinewology (in Chinese) [M]. Beijing: Traditional Chinese Medicine Ancient Books Publishing House, 2009: 681-728.
- [16] 刘晶, 林巧璇, 卢莉铭, 等. 基于 Wnt3a/ β -catenin 信号通路探讨针刀对膝关节炎兔股直肌纤维化的影响[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(1): 136-140.
- LIU J, LIN Q X, LU L M, et al. Effects of acupotomy therapy on the fibroification of femoral rectus in rabbits with knee osteoarthritis based on Wnt3a/ β -catenin signaling pathway (in Chinese) [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2022, 37(1): 136-140.
- [17] 余文英, 修忠标, 林泽豪, 等. 基于 Notch1/Jagged1/Hes1 信号通路探讨针刀调控巨噬细胞极化抑制兔膝关节滑膜炎性反应的作用机制[J]. 针刺研究, 2025, 50(6): 649-657.
- YU W Y, XIU Z B, LIN Z H, et al. Effects of acupotomy therapy on macrophage polarization and inhibition of synovial inflammation in rabbits with knee osteoarthritis based on the Notch1/Jagged1/Hes1 signaling pathway (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2025, 50(6): 649-657.
- [18] 郭晨晨, 李欢欢, 任雪华, 等. 速眠新 II 与舒泰 50 混合麻醉最佳配比及用量的探索[J]. 黑龙江畜牧兽医(下半月), 2019(9): 127-130.
- GUO C C, LI H H, REN X H, et al. Exploration of the optimal ratio and dosage of mixed anesthesia of Sumianxin II and Zoletil 50 (in Chinese) [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2019(9): 127-130.
- [19] 刘晶, 修忠标, 林巧璇, 等. 基于经筋理论膝关节炎常见经筋病灶点的超声解剖学及针刀入路研究[J]. 中国针灸, 2021, 41(8): 892-896.
- LIU J, XIU Z B, LIN Q X, et al. Ultrasound anatomy and needle-knife insertion approach of common tendon lesions in knee osteoarthritis based on meridian sinew theory (in Chinese) [J]. Chinese Acupuncture & Moxibustion, 2021, 41(8): 892-896.
- [20] 刘晶, 林巧璇, 宫玉榕, 等. 超声多模态联合技术评估膝骨性关节炎兔股直肌病变的应用探析[J]. 中国医药导报, 2020, 17(7): 147-151.
- LIU J, LIN Q X, GONG Y R, et al. Discussion on application of ultrasonic multimodal combined technique in the evaluation of femoral rectus in rabbits with knee osteoarthritis (in Chinese) [J]. China Medical Herald, 2020, 17(7): 147-151.
- [21] 刘晶, 赵红佳, 林巧璇, 等. 超声可视化经筋弓弦针刀松解术治疗膝关节炎的效果[J]. 中国医药导报, 2022, 19(9): 153-156, 172.
- LIU J, ZHAO H J, LIN Q X, et al. Effect of ultrasonic visualization of jingjin bowstring acupotomy dissolution technique in treatment of knee osteoarthritis (in Chinese) [J]. China Medical Herald, 2022, 19(9): 153-156, 172.
- [22] 刘晶, 林巧璇, 卢莉铭, 等. 针刀“解结法”对膝关节炎兔软骨形态学及影像学的影响[J]. 针刺研究, 2021, 46(2): 129-135.
- LIU J, LIN Q X, LU L M, et al. Effects of “knot-loosing” of acupotomy on motor function and morphological changes of knee joint in knee osteoarthritis rabbits (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2021, 46(2): 129-135.
- [23] 刘晶, 林巧璇, 卢莉铭, 等. 从“气血和畅、筋骨平衡”探析慢性筋骨病的诊治思路[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(12): 7193-7195.
- LIU J, LIN Q X, LU L M, et al. Discussion on the diagnosis and treatment of chronic muscle and bone disease from the perspective of “the harmony of qi and blood, the balance of tendon and bone” (in Chinese) [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2021, 36(12): 7193-7195.
- [24] KATZ J N, ARANT K R, LOESER R F. Diagnosis and treatment of hip and knee osteoarthritis: a review[J]. JAMA, 2021, 325(6): 568-578.
- [25] 牛鲁豫, 张涛, 李嘉萌, 等. 软骨稳态与骨关节炎关系的研究进展[J]. 中华骨与关节外科杂志, 2024, 17(4): 377-384.
- NIU L Y, ZHANG T, LI J M, et al. Research progress on the relationship between cartilage homeostasis destruction and osteoarthritis (in Chinese) [J]. Chinese Journal Bone and Joint Surgery, 2024, 17(4): 377-384.
- [26] 马芸瑄, 郭长青, 齐昕, 等. 针刀干预对膝关节炎模型兔软骨细胞铁死亡相关蛋白表达的影响[J]. 世界中医药, 2025, 20(5): 746-751.
- MA Y X, GUO C Q, QI X, et al. Effect of acupotomy intervention on the expression of ferroptosis-related proteins in chondrocytes of rabbit model of knee osteoarthritis (in Chinese) [J]. World Chinese Medicine, 2025, 20(5): 746-751.
- [27] JIANG X J, STOCKWELL B R, CONRAD M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22(4): 266-282.
- [28] 许丽梅, 徐芳媛, 夏婧, 等. 铁死亡的基本途径及其与骨关节炎可能调控机制的研究进展[J]. 中国医药导报, 2023, 20(9): 50-53.
- XU L M, XU F Y, XIA J, et al. Research progress on the basic pathway of ferroptosis and the possible regulatory mechanism of ferroptosis and osteoarthritis (in Chinese) [J]. China Medical Herald, 2023, 20(9): 50-53.
- [29] ZHANG S Y, XU J W, SI H B, et al. The role played by ferroptosis in osteoarthritis: evidence based on iron

- dyshomeostasis and lipid peroxidation [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(9): 1668.
- [30] 耿慧君, 张佩, 王国艳, 等. 铁死亡及其研究进展[J]. *生命的化学*, 2021, 41(11): 2376-2382.
- GENG H J, ZHANG P, WANG G Y, et al. Research progress of ferroptosis (in Chinese) [J]. *Chemistry of Life*, 2021, 41(11): 2376-2382.
- [31] ZONG B Y, YU F Z, ZHANG X Y, et al. Mechanosensitive Piezo1 channel in physiology and pathophysiology of the central nervous system [J]. *Ageing Res Rev*, 2023, 90: 102026.
- [32] QIN L, HE T L, CHEN S, et al. Roles of mechanosensitive channel Piezo1/2 proteins in skeleton and other tissues [J]. *Bone Res*, 2021, 9(1): 44.
- [33] 何崱琥, 李杜晨晖, 何流, 等. Piezo1在骨关节炎发病机制中的研究进展[J]. *中国医药导报*, 2024, 21(36): 75-78, 84.
- HE X H, LI D C H, HE L, et al. Research progress on Piezo1 in the pathogenesis of osteoarthritis (in Chinese) [J]. *China Medical Herald*, 2024, 21(36): 75-78, 84.
- [34] DIENES B, BAZSÓ T, SZABÓ L, et al. The role of the Piezo1 mechanosensitive channel in the musculoskeletal system[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(7): 6513.
- [35] LEE W, NIMS R J, SAVADIPOUR A, et al. Inflammatory signaling sensitizes Piezo1 mechanotransduction in articular chondrocytes as a pathogenic feed-forward mechanism in osteoarthritis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(13): e2001611118.
- [36] GAO W, HASAN H, ANDERSON D E, et al. The role of mechanically-activated ion channels Piezo1, Piezo2, and TRPV4 in chondrocyte mechanotransduction and mechanotherapeutics for osteoarthritis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 885224.
- [37] DU J T, SUN X, AO L, et al. Impact of abnormal mechanical stress on chondrocyte death in osteoarthritis [J]. *Med Sci Monit*, 2025, 31: e948290.
- [38] WANG S Y, LI W W, ZHANG P F, et al. Mechanical overloading induces GPX4-regulated chondrocyte ferroptosis in osteoarthritis via Piezo1 channel facilitated calcium influx [J]. *J Adv Res*, 2022, 41: 63-75.
- [39] BARUAH P, MOORTHY H, RAMESH M, et al. A natural polyphenol activates and enhances GPX4 to mitigate amyloid- β induced ferroptosis in Alzheimer's disease [J]. *Chem Sci*, 2023, 14(35): 9427-9438.
- [40] BOUCHAOUI H, MAHONEY-SANCHEZ L, GARÇON G, et al. ACSL4 and the lipoxygenases 15/15B are pivotal for ferroptosis induced by iron and PUFA dyshomeostasis in dopaminergic neurons [J]. *Free Radic Biol Med*, 2023, 195: 145-157.
- [41] SAVADIPOUR A, NIMS R J, RASHIDI N, et al. Membrane stretch as the mechanism of activation of PIEZO1 ion channels in chondrocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, 120(30): e2221958120.
- [42] TSURUTA K, MATSUOKA M, HARADA S, et al. Slowly progressive cell death induced by GPx4-deficiency occurs via MEK1/ERK2 activation as a downstream signal after iron-independent lipid peroxidation [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2024, 74(2): 97-107.
- [43] SUN Y, LENG P, GUO P C, et al. G protein coupled estrogen receptor attenuates mechanical stress-mediated apoptosis of chondrocyte in osteoarthritis via suppression of Piezo1 [J]. *Mol Med*, 2021, 27(1): 96.

收稿日期:2025-09-26 修回日期:2025-11-01
网络首发:2025-12-25 编辑:李天娇