

☆ XXXX ☆

基于Piezo1/MEK5/ERK5机械敏感通路探讨电针干预膝关节骨关节炎兔软骨退化的机制

邵欣欣, 潘丽婕, 李鑫茹, 林谦信, 田珂铭, 王 瑞, 孙丽丽, 高海南, 谭紫丽, 朱翔宇
(北京中医药大学针灸推拿学院, 北京 100029)

【摘要】 目的:探究电针对膝关节骨关节炎(KOA)兔压电式机械敏感离子通道组件1(Piezo1)/丝裂原活化蛋白激酶激酶5(MEK5)/细胞外信号调节激酶5(ERK5)机械敏感通路的调节作用,探究其缓解KOA软骨退行性改变的潜在机制。方法:将24只新西兰雄兔随机分为空白组、模型组、电针组、电针+Yoda1组,每组6只。除模型组外,其余3组采用改良Videman固定法建立KOA模型。电针组选取“外膝眼”“内膝眼”“足三里”“阳陵泉”进行电针干预,20 min/次;电针+Yoda1组电针干预前2 h关节腔注射Piezo1特异性激动剂Yoda1溶液(浓度为0.355 mg/mL,每次注射0.5 mL),其余操作同电针组。均隔天治疗1次,连续治疗3周。干预前后,采用奎森功能障碍指数(Lequesne MG)评分检测膝关节的局部症状和功能。干预后,采用番红O-固绿染色观察兔膝关节软骨组织形态;免疫荧光染色法检测兔膝关节软骨Ⅱ型胶原蛋白(Col-Ⅱ)的荧光表达强度;ELISA法测定关节液中软骨降解产物软骨寡聚基质蛋白(COMP)和Ⅱ型胶原羧基端肽(CTX-Ⅱ)含量;Western blot法检测兔膝关节软骨中Col-Ⅱ、聚集蛋白聚糖(Aggregan)、Piezo1、MEK5、ERK5的蛋白表达水平。结果:模型组和电针+Yoda1组兔膝关节软骨基质番红着色明显减退,软骨细胞分布不均,成簇分布,软骨结构层次不清,潮线紊乱、模糊不清;与模型组和电针+Yoda1组比较,电针组兔膝关节软骨基质番红染色较均匀,呈红色,软骨细胞分布较均匀,排列整齐,软骨结构层次较清楚,潮线恢复。干预后,与空白组比较,模型组兔Lequesne MG评分升高($P<0.01$),膝关节液COMP、CTX-Ⅱ含量升高($P<0.01$),膝关节软骨Col-Ⅱ荧光强度显著降低($P<0.01$),Col-Ⅱ、Aggregan蛋白表达降低($P<0.01$),Piezo1、MEK5、ERK5蛋白表达升高($P<0.01$)。与模型组和电针+Yoda1组相比,电针组兔Lequesne MG评分降低($P<0.01$, $P<0.05$),膝关节液COMP、CTX-Ⅱ含量下降($P<0.01$),膝关节软骨Col-Ⅱ荧光强度显著升高($P<0.01$),Col-Ⅱ、Aggregan蛋白表达升高($P<0.01$),Piezo1、MEK5、ERK5蛋白表达下降($P<0.01$, $P<0.05$)。结论:电针干预可能是通过下调Piezo1/MEK5/ERK5机械敏感通路,抑制软骨细胞外基质降解,促进其合成,从而延缓KOA兔的软骨退化。

【关键词】 电针;Piezo1;软骨退化;膝关节骨关节炎

Mechanism of electroacupuncture intervention on cartilage degradation in rabbits with knee osteoarthritis based on Piezo1/MEK5/ERK5 mechanosensitive pathway

Shao Xinxin, Pan Lijie, Li Xinru, Lin Qianxin, Tian Keming, Wang Rui, Sun Lili, Gao Hainan, Tan Zili, Zhu Xiangyu
(School of Acupuncture-moxibustion and Tuina, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the regulatory effect of electroacupuncture (EA) on the Piezo1/mitogen-activated protein kinase kinase 5 (MEK5)/extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) mechanosensitive pathway in rabbits with knee osteoarthritis (KOA), so as to explore its potential mechanism in alleviating KOA cartilage degeneration. **Methods** Twenty-four male New Zealand rabbits were randomly divided into a blank group, a model group, an EA group, and an EA + Yoda1 group, with 6 rabbits in each group. Except for the blank group, the KOA model was established in the other three groups using the modified Videman fixation method. Rabbits in the EA group

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20251427

引用格式:邵欣欣,潘丽婕,李鑫茹,等.基于Piezo1/MEK5/ERK5机械敏感通路探讨电针干预膝关节骨关节炎兔软骨退化的机制[J].针刺研究,XXXX,XX(X):1-9.

项目来源:国家中医药管理局高水平针灸学重点学科(No.zyyzdxk-2023254);国家自然科学基金资助项目(No.82105034)

通信作者:朱翔宇,E-mail:116491992@qq.com

received EA at “Waixiyan” (ST35), “Neixiyan” (EX-LE4), “Zusanli” (ST36) and “Yanglingquan” (GB34), 20 min per session. In the EA + Yoda1 group, the Piezo1-specific agonist Yoda1 solution (0.355 mg/mL, 0.5 mL per injection) was injected into the articular cavity 2 h before EA intervention, and the other procedures were the same as those in the EA group. All treatments were performed once every other day for 3 consecutive weeks. Before and after intervention, the Lequesne MG index was used to evaluate local symptoms and function of the knee joint. After intervention, safranin O-fast green staining was used to observe the morphological structure of rabbit knee articular cartilage; immunofluorescence staining was used to detect the fluorescence intensity of type II collagen (Col- II) in cartilage; ELISA was used to determine the contents of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and C-telopeptide of type II collagen (CTX- II) in synovial fluid; Western blot was used to detect the protein expression levels of Col- II, Aggrecan, Piezo1, MEK5 and ERK5 in knee articular cartilage. **Results** Safranin O staining of knee articular cartilage matrix was significantly reduced, chondrocytes were unevenly distributed in clusters, the cartilage structure was unclear, and the tidal line was disordered and blurred in the model group and the EA + Yoda1 group. Compared with the model group and the EA + Yoda1 group, the EA group showed more uniform safranin O staining (red staining), more evenly and neatly arranged chondrocytes, clearer hierarchical structure of cartilage, and restored tidal line. After intervention, compared with the blank group, the model group showed increased Lequesne MG score ($P<0.01$), elevated contents of COMP and CTX- II in synovial fluid ($P<0.01$), significantly decreased fluorescence intensity of Col- II in cartilage ($P<0.01$), down-regulated protein expressions of Col- II and Aggrecan ($P<0.01$), and up-regulated protein expressions of Piezo1, MEK5 and ERK5 ($P<0.01$). Compared with the model group and the EA + Yoda1 group, the EA group exhibited decreased Lequesne MG score ($P<0.01$, $P<0.05$), reduced contents of COMP and CTX- II in synovial fluid ($P<0.01$), significantly increased fluorescence intensity of Col- II in knee cartilage ($P<0.01$), up-regulated protein expressions of Col- II and Aggrecan ($P<0.01$), and down-regulated protein expressions of Piezo1, MEK5 and ERK5 ($P<0.01$, $P<0.05$). **Conclusion** EA intervention may delay cartilage degradation in KOA rabbits by down-regulating the Piezo1/MEK5/ERK5 mechanosensitive pathway, inhibiting the degradation and promoting the synthesis of chondrocyte extracellular matrix.

【KEYWORDS】 Electroacupuncture; Piezo1; Cartilage degradation; Knee osteoarthritis

膝关节骨关节炎(KOA)是一种慢性退行性关节疾病,表现为关节软骨退化、软骨下骨硬化及滑膜增生。其中,关节软骨的进行性退化是KOA发病机制中最具特征性的病理学表现^[1]。该疾病在老年人群中高度流行,是全球范围内疼痛与功能障碍的主要病因之一^[2]。现有研究表明,过度的机械应力是骨关节炎发病机制中的关键因素^[3]。机械敏感离子通道Piezo1在软骨中的机械转导中扮演关键角色^[4-5],机械应力介导的Piezo1激活参与软骨细胞外基质(ECM)的分解代谢,最终导致关节软骨退变^[6-7]。细胞外信号调节激酶5(ERK5)是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族新发现的成员。激活后,ERK5将外部机械负荷转化为细胞生物学效应,包括增殖、分化和凋亡^[8]。作为ERK5的唯一上游激酶,丝裂原活化蛋白激酶激酶5(MEK5)特异性激活ERK5,且与其他MAPK家族成员发生交叉反应,该激酶选择性调控ERK5的表达,调节增殖和分化等细胞过程^[9]。MEK5/ERK5信号级联作为Piezo1机械敏感性离子通道的下游通路,调控软骨生长、组织修复及再生过程^[10-11]。针刺作为一种中医的非

药物治疗方式,在KOA的治疗中展现出治疗与预防双重功效^[12]。早在2019年,骨关节炎研究学会与美国风湿病学会/关节炎基金会联合发布的《骨关节炎非手术治疗国际指南》中就已推荐采用针灸治疗KOA^[13]。研究显示,电针通过促进II型胶原蛋白(Col-II)和聚集蛋白聚糖(Aggrecan)的合成,同时抑制软骨寡聚基质蛋白(COMP)和II型胶原羧基端肽(CTX-II)的降解,显著延缓软骨退变,改善软骨ECM代谢^[14],并且能显著提升骨关节炎患者的生活质量^[15]。但电针是否能通过Piezo1/MEK5/ERK5机械敏感通路改善KOA的软骨退化尚不清楚。本研究基于Piezo1/MEK5/ERK5机械敏感通路探讨电针对KOA兔软骨损伤的影响及其作用机制,以期电针干预KOA提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

3月龄清洁级健康雄性新西兰兔24只,体质量(2.2±0.2)kg,购自北京富龙腾飞实验动物研究院有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2023-0011。于北京中医药大学动物实验中心饲养,自然光线照

射,温度 20~22 ℃,相对湿度 40%~60%,单笼饲养,自由摄食饮水。实验动物适应性饲养一周后,采用随机数字表法将新西兰雄兔随机分为空白组、模型组、电针组和电针+Yoda1组,每组 6 只。本实验通过北京中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理批准号:BUCM-2023092602-3172),严格遵守中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》相关规定。

1.2 主要仪器与试剂

高分子树脂绷带(泰州医疗科技有限公司,15 cm×180 cm),一次性针灸针(北京中研太和,0.2 mm×13 mm),LH202H 型韩氏穴位神经刺激仪(北京华为产业开发),JB-P5 型包埋机(武汉俊杰),RM2016 型病理切片机(上海徠卡仪器),NIKON ECLIPSE E100 型光学显微镜、NIKON ECLIPSE C1 型正置荧光显微镜(日本尼康),Epoch 型酶标仪(美国 Bio Tek),D3024R 型台式高速冷冻离心机(北京大龙兴创),MV-100 型涡旋混合器(武汉赛维尔),电泳仪(Mini Trans-Blot@ Cell)、电转仪(Mini PROTEAN@ Tetra Cell)、GelDoc XR+ 化学发光成像系统(美国 BIO-RAD)。

戊巴比妥钠(P1110,德国 Sigma),CTX- II ELISA 试剂盒(CEA686Rb,武汉云克隆),COMP ELISA 试剂盒(m1031041,上海酶联),乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙液(G110)、柠檬酸抗原修复液(pH6.0,G1202)、牛血清白蛋白(GC305010)、DAPI 染色试剂(G1012)、组织自发荧光淬灭剂(G1401)、Col- II 一抗(GB11021)、Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG 二抗(GB25303)、抗荧光淬灭封片剂(G1401)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(GB23303)、 β -actin 抗体(GB15003)、MEK5 抗体(GB154685)、番红 O-固绿(骨组织)染液套装(G1053)均购自武汉 Servicebio,Aggrecan 抗体(ab313636)、ERK5 抗体(ab40809)均购自美国 Abcam, Piezo1 抗体(15939-1-AP,武汉三鹰),ECL Plus 超敏发光液(PE0010,北京索莱宝),Piezo1 特异性激动剂 Yoda1(T7506,美国 Targetmol),RIPA 裂解液(R1091,北京兰博利德)。

1.3 造模方法

除空白组外,模型组、电针组和电针+Yoda1 组兔均采用改良 Videman 法^[16]将兔左后膝伸直位固定制动建立 KOA 模型。用 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)经耳缘静脉注射将兔麻醉后,仰卧固定于兔台上,牵拉左后肢使膝关节伸直 180°,踝关节背屈 60°。用

双面泡沫胶包绕膝关节,左后肢剩余部分用弹性绷带缠绕,再用经热水浸泡软化的高分子树脂绷带从腹股沟包绕到趾头固定动物左后肢,留出兔足趾部分以便观察其末梢血液循环情况。再用医用纱布将树脂绷带固定,外缠 2 层弹性绷带,并外套丝袜防动物撕咬。每隔 1 d 观察损坏、松动情况及兔左下肢供血情况,连续有效制动 6 周。造模后,采用奎森功能障碍指数(Lequesne MG 评分)^[17]对兔膝关节疼痛、肿胀、关节活动度及步态进行评价,以 Lequesne MG 评分 ≥ 6 分为造模成功标准。

1.4 干预方法

电针组造模成功 1 周后,将实验兔清醒时固定于兔盒中,参照《实验针灸学》^[18]兔常用针灸穴位定位标准选取左侧“外膝眼”(为与“内膝眼”对应,本文“犊鼻”均写为“外膝眼”)“内膝眼”“足三里”“阳陵泉”进行针刺。毫针(一次性无菌针灸针,规格 0.2 mm×13 mm),刺入腧穴深度约为 5 mm,应用穴位神经刺激仪进行电刺激治疗,正负极分别连接“外膝眼”“内膝眼”,“足三里”“阳陵泉”,疏密波,频率 2 Hz/100 Hz,强度 3 mA,每次 20 min,隔天治疗 1 次,治疗 3 周。电针+Yoda1 组的电针干预方法同电针组,在每次干预前 2 h 给予关节腔注射 0.5 mL Piezo1 特异性激动剂 Yoda1 溶液(0.355 mg/mL)^[19]。空白组和模型组常规饲养,正常抓取,不予任何干预。

1.5 观察指标与检测方法

行为学检测:分别于干预前后采用 Lequesne MG 评分评估兔左后肢膝关节局部症状、体征及功能,包括膝关节局部疼痛刺激反应(0~3 分)、关节肿胀程度(0~2 分)、关节活动范围(0~3 分)及步态变化(0~3 分)4 个部分。总分 0~11 分,评分越高提示膝关节功能障碍越严重^[17]。

取材:经耳缘静脉注射过量(≥ 100 mg/kg)3% 戊巴比妥钠将兔麻醉致死,左后肢去皮,用含有 1 mL 0.9% 氯化钠溶液的注射器反复冲洗膝关节腔获得关节液,立即浸没于液氮中,再移至-80 ℃冰箱冻存,用于 ELISA 检测。迅速打开左后肢膝关节腔,并去除膝周韧带、滑膜、半月板等组织,使用咬骨钳快速取下在患肢胫骨平台内、外侧中央负重区的软骨组织块,以 0.9% 氯化钠溶液冲洗黏附的血液、组织液、污物后,一部分置于 4% 多聚甲醛中固定,用于病理学检查;一部分浸没于液氮中,后移至-80 ℃冰箱冻存,用于 Western blot 检测。

采用番红 O-固绿染色法观察兔膝关节软骨组

织病理变化:软骨组织块置于4%多聚甲醛中充分固定后,室温内用EDTA脱钙液脱钙3周,然后脱水,透明,浸蜡,石蜡包埋,切片(厚度约4 μm)。烤制石蜡切片后,分别放入二甲苯中充分脱蜡。将切片依次放入微波修复盒中的番红染液、固绿染液染色,脱水,透明,中性树胶封片,于光学显微镜下观察各组兔膝关节软骨组织形态。

ELISA法检测兔膝关节液中COMP、CTX-II含量:取出冷冻关节液,在样本孔中加入稀释后的50 μL待测样本,在标准品孔中加入等量的标准品。随后,将100 μL待检测的酶标记抗体加入各孔中。封板后,37℃恒温温育1h。然后洗板,拍干,加显色剂,37℃遮光孵育15min。每孔加入终止液50 μL。用酶标仪在450nm处测量吸光度值,绘制标准曲线,计算COMP、CTX-II含量。

免疫荧光染色法检测兔膝关节软骨组织Col-II表达:将固定的软骨组织用石蜡包埋,切片厚约5 μm,在60℃下烤片60min,常规脱蜡水化后,在37℃下进行30min抗原修复。用组织自身荧光淬灭剂处理30min,用3%牛血清蛋白封闭,阻断30min后,4℃下加入Col-II(1:300)一抗孵育过夜,洗涤后加入Alexa Fluor 488标记的CY3标记山羊抗兔IgG二抗(1:400)在37℃下孵育1h。将DAPI染液滴加在组织上,避光室温孵育10min,洗涤,甩干。在组织上滴加抗荧光淬灭封片剂封片,用正置荧光显微镜观察,并用Image J进行分析。

Western blot法检测兔膝关节软骨组织Col-II、Aggrecan、Piezo1、MEK5、ERK5蛋白表达水平:取冻存的兔左后肢软骨组织100mg,液氮研磨后,用1mL RIPA裂解液于冰上裂解,离心后取上清液,采用BCA法测定蛋白浓度,后加入5×蛋白上样缓冲液。制胶,上样,电泳,转膜,加入5%脱脂奶粉封闭2h,1×TBST洗涤3次,加入Col-II、Aggrecan、Piezo1、MEK5、ERK5一抗(稀释比例均为1:1000)于4℃冰箱孵育过夜,1×TBST洗涤3次,加入二抗(稀释比例均为1:5000)室温孵育90min,1×TBST洗涤3次,显影液A液和B液按照1:1比例配制,滴加适量显影液于PVDF膜上,显影。以β-actin为内参蛋白进行校准,运用Image J软件进行胶片条带的灰度值分析,以目的蛋白和内参蛋白灰度值比值作为目的蛋白相对表达量。

1.6 统计学方法

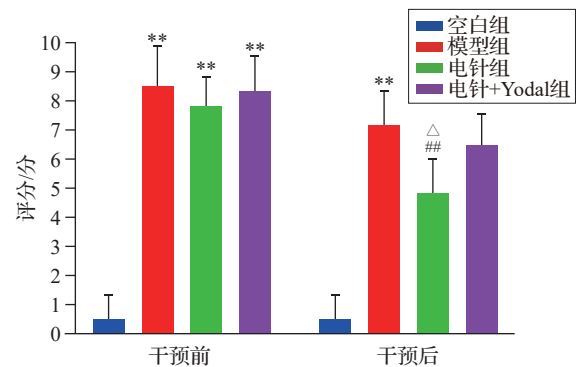
数据采用SPSS27.0软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,

方差齐者,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD检验;方差不齐者,组间比较采用Kruskal-Wallis H秩和检验。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Lequesne MG评分比较

采用改良的Videman法固定左后肢6周后,造模兔患肢活动能力受损,肌腱附着处可触到纤维索结构。造模后干预前,与空白组相比,模型组、电针组、电针+Yodal组的Lequesne MG评分显著升高($P < 0.05$),且 ≥ 6 分;而模型组、电针组、电针+Yodal组之间的差异无统计学意义,提示KOA兔模型成功,且模型组、电针组、电针+Yodal组之间的基线值一致,具有可比性。干预后,与空白组相比,模型组的Lequesne MG评分显著升高($P < 0.01$);与模型组和电针+Yodal组相比,电针组的Lequesne MG评分降低($P < 0.01, P < 0.05$)。见图1。



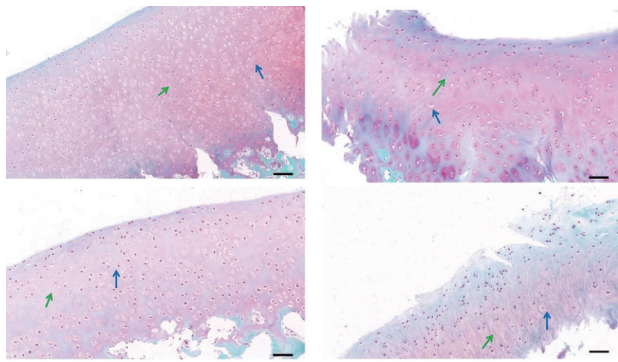
注:与同时点空白组比较,** $P < 0.01$;与同时点模型组比较,## $P < 0.01$;与同时点电针+Yodal组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图1 各组兔患侧膝关节干预前后Lequesne MG评分比较 ($\bar{x} \pm s, 6$ 只兔/组)

Fig. 1 Comparison of Lequesne MG score for the affected knee joints before and after intervention of rabbits in the 4 groups ($\bar{x} \pm s, 6$ rabbits/group)

2.2 各组兔膝关节软骨组织番红O-固绿染色比较

与空白组比较,模型组和电针+Yodal组兔膝关节软骨基质番红着色明显减退,软骨细胞分布不均,成簇分布,软骨结构层次不清,潮线紊乱、模糊不清;与模型组和电针+Yodal组比较,电针组兔膝关节软骨基质番红染色较均匀,呈红色,软骨细胞分布较均匀,排列整齐,软骨结构层次较清楚,潮线恢复。见图2。



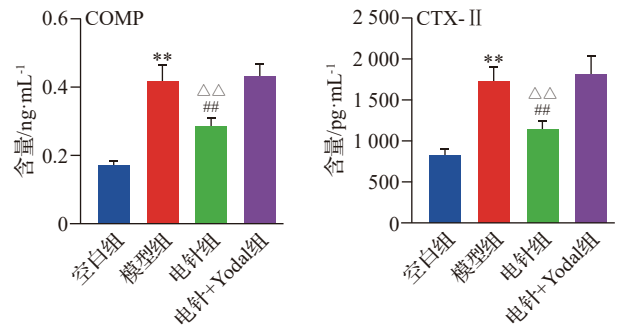
注:绿色箭头代表软骨基质,蓝色箭头代表软骨细胞。
标尺=50 μm。

图2 各组兔膝关节软骨组织形态比较(番红O-固绿染色)
Fig. 2 Comparison of chondrocyte tissue morphology of knee joints of rabbits in the 4 groups (safranin O-fast green staining)

2.3 各组兔膝关节液中COMP、CTX-II含量比较
与空白组比较,模型组兔膝关节液中COMP、CTX-II含量升高($P < 0.01$);与模型组和电针+Yodal组比较,电针组兔膝关节液中COMP、CTX-II含量下降($P < 0.01$)。见图3。

2.4 各组兔膝关节软骨Col-II的荧光表达强度比较

与空白组比较,模型组兔膝关节软骨组织中Col-II荧光强度显著降低($P < 0.01$);与模型组和电针+Yodal组比较,电针组兔膝关节软骨组织中Col-II荧光强度显著升高($P < 0.01$)。见图4。



注:COMP为软骨寡聚基质蛋白,CTX-II为II型胶原羧基端肽。与空白组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$;与电针+Yodal组比较,△△ $P < 0.01$ 。

图3 各组兔膝关节液COMP、CTX-II含量比较
($\bar{x} \pm s$, 6只兔/组)

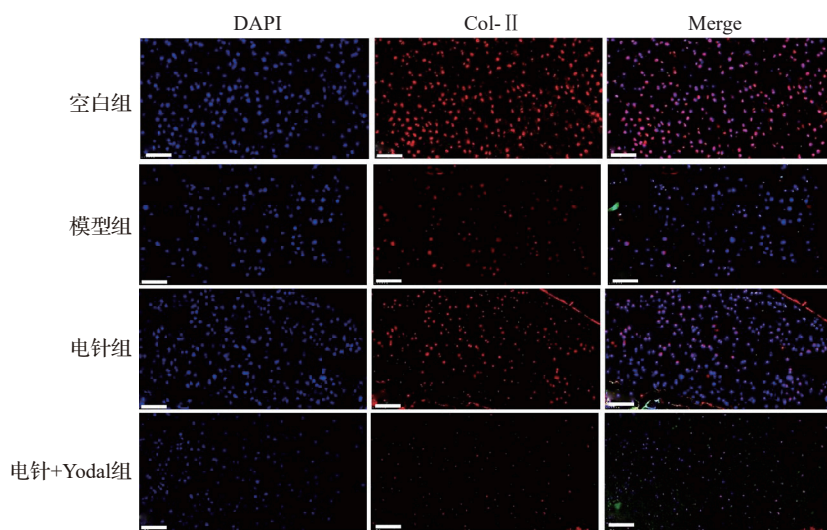
Fig. 3 Comparison of COMP、CTX-II contents in synovial fluid of rabbits in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 6 rabbits/group)

2.5 各组兔膝关节软骨Col-II、Aggrecan蛋白表达比较

与空白组比较,模型组兔膝关节软骨Col-II、Aggrecan蛋白表达显著下降($P < 0.01$);与模型组和电针+Yodal组比较,电针组Col-II、Aggrecan蛋白表达显著升高($P < 0.01$)。见图5。

2.6 各组兔膝关节软骨Piezo1、MEK5、ERK5蛋白表达比较

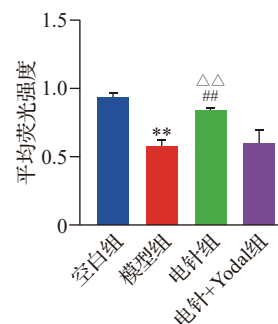
与空白组比较,模型组兔膝关节软骨Piezo1、MEK5、ERK5蛋白表达显著升高($P < 0.01$);与模型组和电针+Yodal组比较,电针组Piezo1、

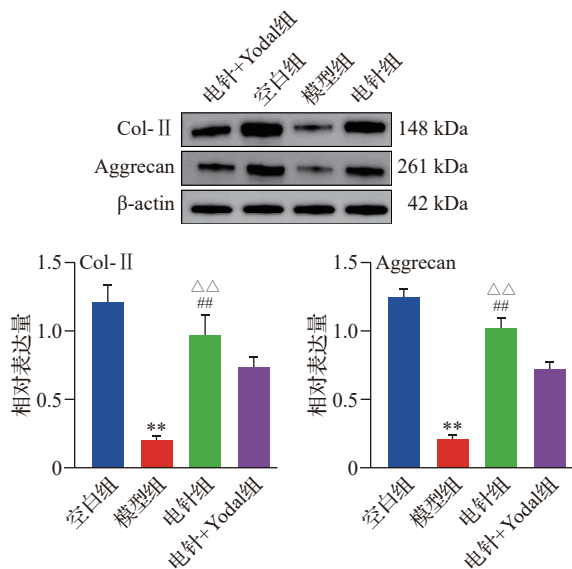


注:Col-II为II型胶原蛋白。标尺=50 μm。与空白组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$;与电针+Yodal组比较,△△ $P < 0.01$ 。

图4 各组兔膝关节软骨Col-II荧光强度比较(免疫荧光染色, $\bar{x} \pm s$, 6只兔/组)

Fig. 4 Comparison of fluorescence intensity of Col-II in knee cartilage of rabbits in the 4 groups (immunofluorescence staining, $\bar{x} \pm s$, 6 rabbits/group)





注: Col-II 为 II 型胶原蛋白, Aggrecan 为聚集蛋白聚糖。
与空白组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{##} $P < 0.01$;
与电针 + Yodal 组比较, ^{△△} $P < 0.01$ 。

图 5 各组兔膝关节软骨 Col-II、Aggrecan 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, 6 只兔/组)

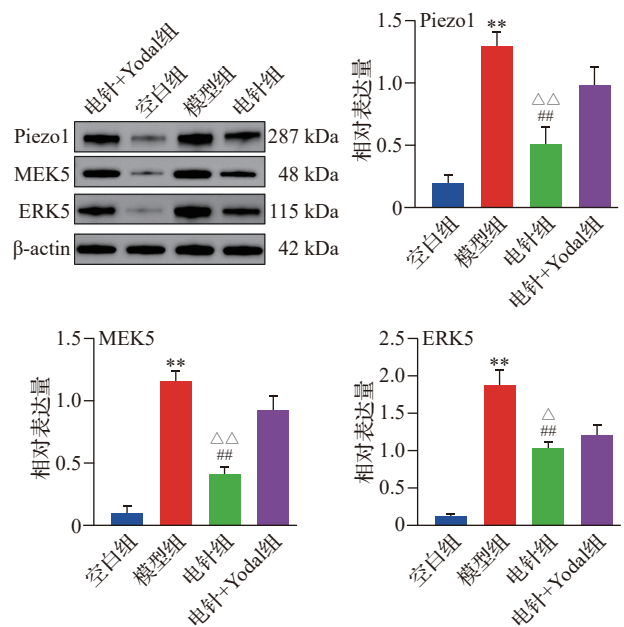
Fig. 5 Comparison of Col-II and Aggrecan protein expressions in knee joints cartilage of rabbits in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 6 rabbits/group)

MEK5、ERK5 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。见图 6。

3 讨论

KOA 好发于中老年群体, 主要表现为膝关节软骨退行性病变, 疼痛僵硬, 关节屈伸不利, 严重者可出现关节畸形, 甚至致残^[20]。从中医学角度 KOA 属于“痹症”中的“骨痹”“筋痹”。《灵枢·经筋》载: “经筋之病, 寒则反折筋急, 热则筋弛纵不收, 阴痿不用。阳急则反折, 阴急则俯不伸”。KOA 患者常因长期慢性劳损、外伤等因素导致膝关节周围经筋受损, 加之风寒湿邪侵入, 形成“筋结”“条索”等病理产物, 阻碍气血运行, 致使局部血流不畅, 筋骨失养, 最终筋骨平衡失调, 加速软骨退化, 形成恶性循环。

电针疗法是将针刺和现代电刺激技术相结合的一种治疗手段, 除了具备传统针刺的疏通经络、行气活血、利节止痛的作用之外, 还能调节人体的生物电活动, 促进机体自我修复, 是国际临床实践指南提出作为治疗 KOA 非药物干预的重要手段之一^[13]。文献研究显示, 临床上治疗 KOA 的高频穴位有外膝眼、内膝眼、阳陵泉、足三里、血海、梁丘、阴陵泉、鹤顶、阿是穴^[21-22]。本研究所选外膝眼、内膝



注: Piezo1 为压电式机械敏感离子通道组件 1, MEK5 为丝裂原活化蛋白激酶 5, ERK5 为细胞外信号调节激酶 5。
与空白组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{##} $P < 0.01$;
与电针 + Yodal 组比较, ^{△△} $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ 。

图 6 各组兔膝关节软骨 Piezo1、MEK5、ERK5 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, 6 只兔/组)

Fig. 6 Comparison of Piezo1, MEK5 and ERK5 protein expressions in knee joints cartilage of rabbits in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 6 rabbits/group)

眼属经外奇穴, 分别位于髌韧带的外侧, 内侧凹陷中。《针灸大成》指出“膝眼主膝肿痛”, 明确了其活血消肿、舒筋通络的作用。足三里为胃腑之下合穴, 是人体的强壮要穴, 能大补脾胃、生化气血, 从根源上濡养筋骨。《针灸甲乙经》记载: “膝疼痛, 三里主之。”阳陵泉为足少阳经合穴、八会穴之筋会, 能从整体上调节全身“筋”的功能状态, 达到舒筋解痉、松解筋膜链的效果。四穴相近, 可直接作用于膝关节, 在穴下周围深层组织形成回路, 增强膝周肌肉力量, 濡养筋脉, 稳定关节、延缓膝关节退变。研究显示疏密波治疗 KOA 能提高关节液中转化生长因子 $\beta 1$ 的含量, 促进软骨细胞增殖分化^[23], 保护关节软骨基质, 有助于其修复; 强电针组 ($> 2 \text{ mA}$) 在减轻疼痛强度和抑制慢性疼痛方面优于弱电针组 ($< 0.5 \text{ mA}$)^[24]。因此, 本研究选择 2 Hz/100 Hz 的疏密波、强度 3 mA 的治疗参数。

本研究采用的改良 Videman 方法是目前最常用的 KOA 造模方法, 可在软骨区产生局部高机械应力, 从而诱导生物力学驱动的软骨退化, 该 KOA 模型可模拟人类 KOA 的自然进展过程^[25-26]。

Lequesne MG 评分是国际常用的评估 KOA 行为学的指标,能反映膝关节功能情况^[17]。本研究中模型组、电针组、电针+Yodal 组兔造模后 Lequesne MG 评分均高于空白组,表明造模后 3 组兔膝关节功能障碍明显,达到 KOA 成模标准。干预结束后,电针组的 Lequesne MG 评分均明显低于模型组,且番红 O-固绿染色显示电针组的膝关节软骨基质番红染色较均匀,软骨细胞分布较均匀,排列较整齐,潮线恢复;而模型组膝关节软骨基质番红着色明显减退,软骨细胞分布不均,成簇分布,潮线紊乱、模糊不清,说明电针对 KOA 模型兔膝关节功能及软组织损伤有改善作用,与胡哲等^[27]的研究结果一致。

软骨退变的病理本质在于其 ECM 合成与分解代谢之间的失衡。软骨 ECM 是由蛋白多糖、胶原、水、矿物质和纤维蛋白组成的复杂网络,赋予关节软骨生物力学特性,参与维持正常软骨的结构和功能^[28]。证据表明,异常机械负荷会破坏软骨 ECM 代谢的稳态平衡,以 Col-II 和 Aggrecan 的分解代谢为主,产生 CTX-II 和 COMP 等裂解产物,从而破坏软骨基质的稳态^[29]。Shi 等^[30]观察到 COMP 在 KOA 患者血清中显著升高,而电针可降低其血清 COMP 水平,这些结果与本研究类似。本研究结果显示,模型组兔膝关节液中 COMP 和 CTX-II 含量显著升高,而膝关节软骨中 Col-II 荧光强度降低。电针干预后 COMP 和 CTX-II 含量显著下降,而 Col-II 荧光强度升高,这表明电针能促进软骨 ECM 合成,抑制 COMP、CTX-II 释放,最终延缓软骨退变。

Piezo1 是一种机械敏感的离子通道,广泛表达于软骨细胞、骨细胞及间充质干细胞中,参与机械信号的转导,在软骨退变、细胞凋亡、炎症反应及骨代谢紊乱中发挥着重要的调控作用^[31-32]。在骨关节炎中,软骨细胞作为软骨中的唯一细胞,可通过 Piezo1 离子通道感应来自外部和内部的机械力,介导钙离子进入细胞内,激活下游的信号通路或者引发一系列细胞内信号级联反应^[33]。Piezo1 可以触发多条下游分子通路,如 MAPK 家族信号通路、氧化应激、铁死亡、IL-1 β 和 NF- κ B 通路等,这些通路还会导致软骨细胞凋亡和 ECM 分解^[32,34-35]。而特异性敲除 Piezo1 基因可保护软骨细胞免于凋亡,维持软骨 ECM 分解与合成过程之间的稳态^[36]。ERK5 可被其唯一上游激酶 MEK5 高度特异性激活,参与细胞活动^[37]。MEK5/ERK5 已被证实是 Piezo1 的关键下游信号通路^[38]。近年来,大量研究表明骨关节炎中 MEK5/ERK5 信号通路的活性增强可抑制软骨

Col-II 和 Aggrecan 基因的转录活性^[39-40],引起软骨退化。最新研究证实,Piezo1 通道活性升高会诱导 Ca²⁺ 内流,促进 Ca²⁺/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (CaMKII) 磷酸化,MEK5/ERK5 发生级联反应,加速了 ECM 的降解^[41]。本研究显示,模型组兔膝关节软骨中 Piezo1、MEK5 和 ERK5 的蛋白表达升高,Col-II、Aggrecan 蛋白表达降低。经电针干预后,兔膝关节软骨中 Piezo1、MEK5 和 ERK5 的蛋白表达下降,Col-II、Aggrecan 蛋白表达升高。这提示电针干预可能通过调控 Piezo1/MEK5/ERK5 信号通路抑制软骨 ECM 分解,促进其合成,而发挥保护软骨的作用。

为进一步验证我们的研究结果,我们通过关节腔注射给药方式在 KOA 兔中注射 Piezo1 激动剂 Yodal,随后进行电针干预。最终结果显示,电针+Yodal 组的 Lequesne MG 评分高于电针组,软骨基质番红着色明显减退,软骨细胞分布不均,潮线模糊;膝关节液中 COMP 和 CTX-II 含量,及膝关节软骨 Piezo1、MEK5 和 ERK5 蛋白表达水平高于电针组,而 Col-II 和 Aggrecan 蛋白表达水平低于电针组。这表明,当 Piezo1/MEK5/ERK5 机械敏感通路被激活后,电针干预的效果会受到抑制,致使软骨 ECM 的降解无法得到有效缓解。因此我们可以推断电针可能通过下调 Piezo1/MEK5/ERK5 机械敏感通路,抑制软骨 ECM 的分解代谢,促进软骨基质合成,最终延缓 KOA 的软骨退化进程。

Piezo 是一种机械敏感性离子通道蛋白,可以特异性调节机械力,主要分为 Piezo1 和 Piezo2 两个亚家族。作为 Piezo1 的同源蛋白,Piezo2 目前被认为与机械性疼痛的发生相关^[42-43],后续可进一步探究电针减轻 KOA 患者的膝周疼痛是否与 Piezo2 有关。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] Master H, Thoma L, Truong L. Infographic on OA as a serious disease [R/OL]. New Jersey: Osteoarthritis Research Society International (OARSI), 2020. <https://oarsi.org/research/oarsi-infographics>.
- [2] Vitaloni M, Botto-van Bemden A, Sciortino Contreras R M, et al. Global management of patients with knee osteoarthritis begins with quality of life assessment: a systematic review [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2019, 20(1): 493.
- [3] 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.

- [4] 许博洋, 樊逸菲, 杜雨青, 等. 人源软骨细胞PIEZO2过表达细胞株模拟骨关节炎表型[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2025, 41(6): 871-878.
Xu B Y, Fan Y F, Du Y Q, et al. Construction of human-derived chondrocyte PIEZO2 overexpressing cell line and identification of osteoarthritis phenotype (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2025, 41(6): 871-878.
- [5] Chen F, Chen S Q, Peng F S, et al. PIEZO1-primary cilia axis mediates compressive stress-induced growth plate degeneration and ossification in adolescent idiopathic scoliosis [J]. JOR SPINE, 2025, 8(4): e70133.
- [6] 王振. Piezo1蛋白通过NF- κ B信号通路介导软骨细胞凋亡的机制研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2021.
Wang Z. The study of the mechanism of the Piezo1 protein-induced apoptosis of the osteoarthritis chondrocytes through the NF- κ B signal pathway (in Chinese) [D]. Qingdao: Qingdao University, 2021.
- [7] Hasegawa K, Fujii S, Matsumoto S, et al. YAP signaling induces PIEZO1 to promote oral squamous cell carcinoma cell proliferation[J]. J Pathol, 2021, 253(1): 80-93.
- [8] Clark P R, Jensen T J, Kluger M S, et al. MEK5 is activated by shear stress, activates ERK5 and induces KLF4 to modulate TNF responses in human dermal microvascular endothelial cells[J]. Microcirculation, 2011, 18(2): 102-117.
- [9] Kaneshiro S, Otsuki D, Yoshida K, et al. MEK5 suppresses osteoblastic differentiation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 463(3): 241-247.
- [10] Wang Y F, Chi S P, Guo H F, et al. A lever-like transduction pathway for long-distance chemical- and mechanogating of the mechanosensitive Piezo1 channel [J]. Nat Commun, 2018, 9: 1300.
- [11] Bobick B E, Matsche A I, Chen F H, et al. The ERK5 and ERK1/2 signaling pathways play opposing regulatory roles during chondrogenesis of adult human bone marrow-derived multipotent progenitor cells [J]. J Cell Physiol, 2010, 224(1): 178-186.
- [12] 毛晓宇, 王德强, 彭馨慧, 等. 针灸治疗膝骨关节炎的研究进展[J]. 实用中医内科杂志, 2025, 39(11): 75-78.
Mao X Y, Wang D Q, Peng X H, et al. Research progress of acupuncture in the treatment of knee osteoarthritis (in Chinese) [J]. Journal of Practical Traditional Chinese Internal Medicine, 2025, 39(11): 75-78.
- [13] Kolasinski S L, Neogi T, Hochberg M C, et al. 2019 American college of rheumatology/arthritis foundation guideline for the management of osteoarthritis of the hand, hip, and knee[J]. Arthritis Care Res, 2020, 72(2): 149-162.
- [14] 尹锦楠. 原络配穴针刺治疗早期膝骨关节炎的疗效观察及对关节滑液中炎症因子水平的影响[J]. 上海针灸杂志, 2024, 43(12): 1353-1357.
Yin J N. Observation on the efficacy of acupuncture with Yuan and Luo point combination in the treatment of early knee osteoarthritis and its effect on the level of inflammatory factors in the synovial fluid of the joints (in Chinese) [J]. Shanghai Journal of Acupuncture and Moxibustion, 2024, 43(12): 1353-1357.
- [15] Zhao Z Y, Bi B J, Cheng G, et al. Melatonin ameliorates osteoarthritis rat cartilage injury by inhibiting matrix metalloproteinases and JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. Inflammopharmacology, 2023, 31(1): 359-368.
- [16] Videman T. Experimental osteoarthritis in the rabbit: comparison of different periods of repeated immobilization [J]. Acta Orthop Scand, 1982, 53(3): 339-347.
- [17] Lequesne M G, Samson M. Indices of severity in osteoarthritis for weight bearing joints [J]. J Rheumatol Suppl, 1991, 27: 16-18.
- [18] 郭义, 方剑乔. 实验针灸学[M]. 3版. 北京: 中国中医药出版社, 2012.
Guo Y, Fang J Q. Experimental acupuncture (in Chinese) [M]. 3rd edition. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2012.
- [19] Xu Y F, Zhu X Y, Li X R, et al. Tuina Intervention in sodium monoiodoacetate injection-induced rat model of knee osteoarthritis [J]. J Vis Exp, 2024(203): e65770.
- [20] 中华中医药学会. 膝骨关节炎中西医结合诊疗指南(2023年版) [J]. 中医正骨, 2023, 35(6): 1-10.
China Association of Chinese Medicine. Guidelines for INTEGRATED TCM WM diagnosis and treatment of knee osteoarthritis (2023 edition) (in Chinese) [J]. The Journal of Traditional Chinese Orthopedics and Traumatology, 2023, 35(6): 1-10.
- [21] 王瑞涵, 薛平聚, 邢海娇, 等. 针灸治疗膝骨性关节炎腧穴配伍规律的复杂网络分析 [J]. 针刺研究, 2022, 47(1): 65-70, 87.
Wang R H, Xue P J, Xing H J, et al. Complex network analysis on regularities of acupoint combinations and application characteristics of acupuncture and moxibustion in the treatment of knee osteoarthritis (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2022, 47(1): 65-70, 87.
- [22] 曹姚佳妮, 黄琴峰, 杨光, 等. 基于随机对照试验的针灸治疗膝骨关节炎临床规律分析 [J]. 上海针灸杂志, 2022, 41(10): 1032-1038.
Cao Y J N, Huang Q F, Yang G, et al. Clinical analysis of acupuncture treatment of knee osteoarthritis based on randomized controlled trial (in Chinese) [J]. Shanghai Journal of Acupuncture and Moxibustion, 2022, 41(10): 1032-1038.
- [23] 黄冬娥, 秦茵, 林木南, 等. 不同波型电针治疗膝骨关节炎及对关节液转化生长因子- β 1的影响 [J]. 中国针灸, 2020, 40(4): 370-374.
Huang D E, Qin Y, Lin M N, et al. Clinical efficacy of different waves of electroacupuncture on knee osteoarthritis and its effect on TGF- β 1 in joint fluid (in Chinese) [J]. Chinese Acupuncture & Moxibustion, 2020, 40(4): 370-374.
- [24] Lv Z T, Shen L L, 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.
- [25] 高海南, 张梦怡, 刘茜, 等. 针刀对膝关节炎兔屈伸肌群生物力学特征及软骨退化的影响[J]. 康复学报, 2025, 35(4): 409-417.
- Gao H N, Zhang M Y, Liu X, et al. Effects of acupotomy on biomechanical characteristics of flexor and extensor muscle groups and cartilage degeneration in rabbits with knee osteoarthritis (in Chinese) [J]. Rehabilitation Medicine, 2025, 35(4): 409-417.
- [26] 郭长青, 张丽萍. 针刀干预对膝关节炎兔髌韧带拉伸、蠕变及应力松弛等生物力学特性的影响[J]. 中国科学(生命科学), 2016, 46(8): 976-982.
- Guo C Q, Zhang L P. Influences of acupotomy intervention on biomechanical characteristics of tension, creep and stress relaxation of patellar ligament in rabbits with knee osteoarthritis (in Chinese) [J]. Science in China (Series C), 2016, 46(8): 976-982.
- [27] 胡哲, 马俊杰, 马铁明, 等. 电针对膝关节骨关节炎肠道菌群及关节软骨TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路的影响[J]. 针刺研究, 2025, 50(10): 1114-1123.
- Hu Z, Ma J J, Ma T M, et al. Effects of electroacupuncture on intestinal flora and TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway of articular cartilage in rabbits with knee osteoarthritis (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2025, 50(10): 1114-1123.
- [28] 李媛, 徐媛, 陈波, 等. 针灸对骨关节炎软骨损伤的作用及机制研究进展[J]. 针刺研究, 2022, 47(9): 837-842.
- Li Y, Xu Y, Chen B, et al. Progress of researches on acupuncture-moxibustion treatment of cartilage damage of osteoarthritis (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2022, 47(9): 837-842.
- [29] Chen C H, Kuo C Y, Chen J P. Effect of cyclic dynamic compressive loading on chondrocytes and adipose-derived stem cells co-cultured in highly elastic cryogel scaffolds [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(2): 370.
- [30] Shi G X, Tu J F, Wang T Q, et al. Effect of electroacupuncture (EA) and manual acupuncture (MA) on markers of inflammation in knee osteoarthritis [J]. J Pain Res, 2020, 13: 2171-2179.
- [31] Wang X H, Tao J L, Zhou J P, et al. Excessive load promotes temporomandibular joint chondrocyte apoptosis *via* Piezo1/endoplasmic reticulum stress pathway [J]. J Cellular Molecular Med, 2024, 28(11): e18472.
- [32] 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.
- [33] Brylka L J, Alimy A R, Tschaffon-Müller M E A, et al. Piezo1 expression in chondrocytes controls endochondral ossification and osteoarthritis development [J]. Bone Res, 2024, 12: 12.
- [34] 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/OL]. 针刺研究, 2026-04-23. <https://doi.org/10.13702/j.1000-0607.20251053>.
- Zhang L Z, Liu H, Huang W X, et al. Mechanism of acupotomy in inhibiting chondrocyte ferroptosis based on the Piezo1/GPX4/ACSL4 signaling axis (in Chinese) [J/OL]. Acupuncture Research, 2026-04-23. <https://doi.org/10.13702/j.1000-0607.20251053>.
- [35] 周子齐, 杨永菊, 马贤德, 等. 电针透刺法通过TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路改善膝关节骨关节炎滑膜炎性反应的机制研究[J]. 针刺研究, 2023, 48(4): 353-358, 365.
- Zhou Z Q, Yang Y J, Ma X D, et al. Mechanism of electroacupuncture penetration needling for relieving synovial inflammation of knee osteoarthritis through TLR4/MyD88/NF- κ B signal pathway (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2023, 48(4): 353-358, 365.
- [36] Ren X S, Zhuang H M, Li B, et al. Gsmx4 alleviated osteoarthritis through Piezo1/calcineurin/NFAT1 signaling axis under excessive mechanical strain [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(4): 4022.
- [37] Paudel R, Fusi L, Schmidt M. The MEK5/ERK5 pathway in health and disease [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(14): 7594.
- [38] Zheng Q, Zou Y G, Teng P, et al. Mechanosensitive channel PIEZO1 senses shear force to induce KLF2/4 expression via CaMKII/MEKK3/ERK5 axis in endothelial cells [J]. Cells, 2022, 11(14): 2191.
- [39] 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 U S A, 2021, 118(13): e2001611118.
- [40] Prasadam I, Mao X Z, Shi W, et al. Combination of MEK-ERK inhibitor and hyaluronic acid has a synergistic effect on anti-hypertrophic and pro-chondrogenic activities in osteoarthritis treatment [J]. J Mol Med, 2013, 91(3): 369-380.
- [41] Ahalya S, Karthika C L, Sreelakshmi B J, et al. Altered venous flow drives endothelial to mesenchymal transition in varicose veins by suppressing PIEZO1-KLF2 signaling [J]. Cell Mol Life Sci, 2025, 82(1): 345.
- [42] Obeidat A M, Wood M J, Adamczyk N S, et al. Piezo2 expressing nociceptors mediate mechanical sensitization in experimental osteoarthritis [J]. Nat Commun, 2023, 14: 2479.
- [43] 吕萍. 机械敏感性通道蛋白Piezo2在皮肤感觉中的作用研究进展[J]. 中国疼痛医学杂志, 2023, 29(7): 535-538.
- Lü P. Research progress on the role of mechanosensitive channel protein Piezo2 in skin sensation (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Pain Medicine, 2023, 29(7): 535-538.

收稿日期: 2025-12-28 修回日期: 2026-02-15