

☆ 综 述 ☆

温针灸调控膝关节软骨细胞衰老干预
大鼠膝关节骨关节炎的研究冯天时^{1,2}, 李俊蕾^{1,2}, 贾叶娟^{1,2}, 陶 园^{1,2}, 徐 晶^{1,2}

(1河北中医药大学针灸推拿学院, 石家庄050200; 2河北省中医针灸优势病症国际联合研究中心, 石家庄050091)

【摘 要】 目的:探讨温针灸对膝关节骨关节炎(KOA)大鼠膝关节软骨细胞衰老的影响,并比较温针灸与温和灸的效应差异。**方法:**Wistar大鼠随机分为正常组、模型组、温和灸组和温针灸组,每组12只。采用碘乙酸钠注射法复制KOA模型。温和灸组和温针灸组大鼠于“伏兔”“足三里”分别施以温和灸和温针灸,30 min/次,隔日1次,干预4周。Lequesne MG行为学评分评估大鼠膝关节功能,并测量各组大鼠右侧膝关节横向直径及右侧足底痛阈值;HE及番红O固绿染色法观察大鼠膝关节的病理形态变化,并进行Mankin's、OARSI评分;ELISA法检测血清白细胞介素(IL)-6、IL-18、基质金属蛋白酶(MMP)-13含量;免疫组织化学法检测膝关节软骨组织中细胞周期蛋白依赖性激酶4抑制剂A(P16^{INK4A})、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A(P21^{Waf1/Cip1})、IL-6、MMP-13、Ⅱ型胶原蛋白(Collagen-Ⅱ)的阳性表达;Western blot法检测软骨组织中P16^{INK4A}、P21^{Waf1/Cip1}、Collagen-Ⅱ、IL-6、MMP-13蛋白相对表达水平。**结果:**与正常组相比,模型组Lequesne MG评分升高($P<0.01$),右侧膝关节横向直径增大($P<0.01$),痛阈值降低($P<0.01$);与模型组相比,温和灸组和温针灸组Lequesne MG评分降低($P<0.01$),右侧膝关节横向直径减小($P<0.01$),痛阈值升高($P<0.01$);与温和灸组相比,温针灸组Lequesne MG评分降低($P<0.01$),痛阈值升高($P<0.01$)。模型组出现膝关节软骨退变特征,表层软骨破损、潮线消失,温和灸组和温针灸组退变程度减轻,温针灸组改善更明显。与正常组相比,模型组Mankin's、OARSI评分均升高($P<0.01$);与模型组相比,温和灸组和温针灸组Mankin's、OARSI评分均降低($P<0.01$),且温针灸组低于温和灸组($P<0.05$)。与正常组相比,模型组血清中IL-6、IL-18、MMP-13含量均升高($P<0.01$),膝关节软骨组织中P16^{INK4A}、P21^{Waf1/Cip1}、IL-6、MMP-13阳性表达和蛋白表达均升高($P<0.01$),Collagen-Ⅱ阳性表达和蛋白表达降低($P<0.01$);与模型组相比,温和灸组和温针灸组血清IL-6、IL-18、MMP-13含量均降低($P<0.01$),膝关节软骨组织中P16^{INK4A}、P21^{Waf1/Cip1}、IL-6、MMP-13阳性表达和蛋白表达均降低($P<0.01$, $P<0.05$),Collagen-Ⅱ阳性表达和蛋白表达升高($P<0.01$);与温和灸组相比,温针灸组以上指标(除膝关节横外直径外)变化更加明显($P<0.01$, $P<0.05$)。**结论:**温针灸能有效改善大鼠KOA,且作用优于温和灸,其效应机制可能与抑制软骨细胞衰老有关。

【关键词】 膝关节骨关节炎;关节软骨;细胞衰老;温针灸;温和灸

Study on regulatory effects of warm needling moxibustion on chondrocyte senescence in rats with knee osteoarthritis

Feng Tianshi^{1,2}, Li Junlei^{1,2}, Jia Yejuan^{1,2}, Tao Yuan^{1,2}, Xu Jing^{1,2} (¹College of Acupuncture-moxibustion and Tuina, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China; ²Hebei International Joint Research Center for Advantageous Diseases of Traditional Chinese Medicine Acupuncture, Shijiazhuang 050091)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the effect of warm needling moxibustion on chondrocyte senescence in rats with knee osteoarthritis (KOA), and to compare its efficacy with that of mild moxibustion. **Methods** Forty-eight Wistar rats were randomly assigned to 4 groups ($n=12$): normal, model, mild moxibustion, and warm needling. KOA

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20251035

引用格式:冯天时,李俊蕾,贾叶娟,等.温针灸调控膝关节软骨细胞衰老干预大鼠膝关节骨关节炎的研究[J].针刺研究,2026,51(10): 1-9.

项目来源:河北省自然科学基金项目(No.H2024423012);国家自然科学基金项目(No.82004449)

通信作者:徐晶, E-mail: xujing@hebcm.edu.cn

was induced by intra-articular injection of monosodium iodoacetate (MIA) into the right knee. Rats in the mild moxibustion and warm needling moxibustion groups received interventions at the acupoints “Futu” (ST32) and “Zusanli” (ST36), 30 min per session, once every other day for 4 weeks. After intervention, Lequesne MG scores, the right knee joint horizontal diameter, and right hind paw pain threshold were assessed. Histopathological changes in the rat knee joints were observed by hematoxylin-eosin (HE) and safranin O staining, and were scored using the Mankin’s and OARSI systems. Serum contents of interleukin-6 (IL-6), interleukin-18 (IL-18), and matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) were measured by ELISA. Immunohistochemistry was performed to detect the expressions of P16^{INK4A}, P21^{Waf1/Cip1}, IL-6, MMP-13, and type II collagen (Collagen- II) in knee cartilage. Western blot was performed to detect the relative protein expression levels of P16^{INK4A}, P21^{Waf1/Cip1}, Collagen- II, IL-6, and MMP-13 in cartilage tissue.

Results Compared with the normal group, the model group showed a significantly higher Lequesne MG score ($P<0.01$), an increased horizontal diameter of the right knee joint ($P<0.01$), and a decreased pain threshold ($P<0.01$). Compared with the model group, both treatment groups exhibited significantly lower Lequesne MG scores ($P<0.01$), reduced joint horizontal diameters ($P<0.01$), and increased pain thresholds ($P<0.01$). Compared with the mild moxibustion group, the warm needling group showed a lower Lequesne MG score ($P<0.01$) and a higher pain threshold ($P<0.01$). Histopathological staining revealed degenerative features in the model group, including damage to the superficial cartilage layer and disappearance of the tidemark, while both treatment groups exhibited milder degeneration. Compared with the normal group, both the Mankin’s and OARSI scores were significantly increased in the model group ($P<0.01$). Compared with the model group, both scores were decreased in the mild moxibustion and warm needling groups ($P<0.01$), and the scores in the warm needling group were significantly lower than those in the mild moxibustion group ($P<0.05$). Compared with the normal group, the serum contents of IL-6, IL-18, and MMP-13 were significantly elevated in the model group ($P<0.01$); in cartilage tissue, the expressions of P16^{INK4A}, P21^{Waf1/Cip1}, IL-6, and MMP-13 proteins were increased ($P<0.01$), while Collagen- II expression was reduced ($P<0.01$). Compared with the model group, both treatment groups showed decreased serum IL-6, IL-18, and MMP-13 contents, and reduced expression of P16^{INK4A}, P21^{Waf1/Cip1}, IL-6, and MMP-13 proteins in cartilage tissue ($P<0.01$, $P<0.05$), along with increased Collagen- II expression ($P<0.01$). Furthermore, compared with the mild moxibustion group, the warm needling group exhibited more significant changes in the above indicators except joint horizontal diameter ($P<0.01$, $P<0.05$).

Conclusion Warm needling moxibustion effectively improves knee osteoarthritis in rats and shows superior efficacy compared with mild moxibustion. Its therapeutic mechanism may be associated with the inhibition of chondrocyte senescence.

[KEYWORDS] Knee osteoarthritis; Articular cartilage; Cell senescence; Warm needling moxibustion; Mild moxibustion

膝关节骨关节炎(KOA)是一种以关节软骨退变和骨质增生为主要特征的慢性退行性疾病,多发于中老年人群,由年龄、肥胖、炎性反应、创伤及遗传等多种因素共同引起。患者常表现为膝关节疼痛、僵硬、肿胀及活动受限,严重者可致关节畸形甚至残疾^[1]。目前临床治疗以非甾体抗炎药(NSAIDs)及关节腔注射等保守手段为主,但长期应用易引发胃肠道、心血管等不良反应^[2]。因此,现代医学针对该病的药物治疗方案仍在探索中。KOA的病理本质在于关节软骨进行性退变,近年来研究^[3-4]显示,软骨细胞衰老是推动KOA进展的重要环节。衰老软骨细胞可分泌白细胞介素(IL)-6、IL-18、基质金属蛋白酶13(MMP-13)等衰老相关分泌表型因子(SASP),诱导炎性反应及基质降解,形成“炎性反应-退变”恶性循环^[5-6]。因此,从细胞衰老

角度探讨KOA的干预机制,可能有助于加深对KOA关节退变生物学机制的认识,从而探索针对KOA的最佳干预方法。

临床研究表明,针灸对KOA具有确切疗效^[7]。课题组前期研究^[8-9]比较了手针、电针、艾灸等疗法对KOA的治疗效果,其中温和灸效果最好。温和灸以温热刺激为主,可温经散寒、改善局部血液循环。相比之下,温针灸在艾火温热刺激的同时,兼具针刺的经络传导效应,推测其临床效应可能优于单纯灸法。研究^[10-11]已证实其在减轻疼痛、改善关节功能方面疗效确切。基于此,本研究以温和灸为对照,探讨温针灸对KOA的治疗作用及其对膝关节软骨细胞衰老的影响,为温针灸治疗KOA提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

选用健康雄性 Wistar 大鼠 48 只,鼠龄 10~12 周,体质量 260~300 g,购自北京维通利华公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2021-0006。所有动物于河北中医药大学科学实验中心清洁级动物房饲养,环境条件严格控制在室温(22 ± 3)℃、相对湿度(60 ± 10)%,自然光照,动物自由摄食饮水。适应性喂养 1 周后,采用 SPSS27.0 软件生成随机数字进行分组,其中 12 只作为正常组,剩余 36 只用于模型制备。4 周后,通过 Lequesne MG 行为学评分(≥ 6 分)确认造模成功,最终将造模成功的 36 只大鼠分为模型组、温和灸组和温针灸组,每组 12 只。实验全程遵循河北中医药大学实验动物伦理委员会审批要求(伦理号:DWLL202403005)。

1.2 主要试剂与仪器

碘乙酸钠(MIA,德国 Sigma),异氟烷(深圳瑞沃德),HE 染色试剂盒、番红 O 固绿染色试剂盒、HRP 标记的二抗、BCA 蛋白定量试剂盒(武汉赛维尔),大鼠 IL-6、IL-18、MMP-13 ELISA 试剂盒(上海科艾博),免疫组织化学试剂盒(北京中山金桥),P16^{INK4A}、P21^{Waf1/Cip1} 抗体(美国 Santa),IL-6、II 型胶原蛋白(Collagen-II)抗体(苏州康何欣),MMP-13 抗体(南京巴傲得),艾条(12 mm×115 mm,南阳灸龙)。

一次性无菌针灸针(0.25 mm×40 mm,北京中研太和),小动物吸入式气体麻醉机(深圳瑞沃德),生物组织包埋机、病理切片机(德国 Leica),光学显微镜(日本尼康),垂直电泳仪及转膜系统(美国 Bio-Rad),酶标检测仪(美国 BioTek),高速冷冻离心机(北京大龙兴创),肢体压力测痛仪(法国 Bioseb),数显测厚规(深圳源恒通),玻片扫描仪(山东志盈医学)。

1.3 模型制备

KOA 模型采用 MIA 关节腔注射法^[12]建立。右侧膝关节备皮消毒后,屈曲 45°,于髌韧带下极外侧进针,针尖进入关节腔(落空感),缓慢注入 50 μ L MIA 溶液(1 mg/mL)。注射后按压针孔 30 s,被动屈伸膝关节 5 次促进药液扩散。正常组同法注射等量 0.9% 氯化钠溶液。MIA 注射后 4 周末,进行 Lequesne MG 行为学评分,总分 ≥ 6 分且关节肿胀、步态异常,提示造模成功。

1.4 干预方法

造模成功后 1 d 开始干预,各组大鼠均进行固

定操作。温和灸组与温针灸组均取大鼠右侧“伏兔”(髌前上棘与髌底外侧端的连线上,髌骨外上缘上 15 mm)及“足三里”(膝关节后外侧,在腓骨小头下约 3 mm 处),穴位定位参照文献[13]。温和灸组艾条距皮肤表面 2 cm 固定施灸,以局部皮肤微红、大鼠无挣扎为度。温针灸组先直刺进针 3~5 mm,然后针柄置 1 cm 长艾段并点燃艾段。两组干预时间均为 30 min/次,隔日治疗 1 次,共 14 次。

1.5 观察指标及检测方法

行为学评估:采用改良的 Lequesne MG 行为学量表于造模成功后及治疗结束后对每组 12 只大鼠进行评分。评估内容包括:①关节肿胀程度(0 分:无肿胀;1 分:轻度肿胀;2 分:中度肿胀;3 分:重度肿胀);②步态改变(0 分:正常跑动;1 分:轻度跛行;2 分:明显跛行;3 分:无法行走);③关节自主屈曲角度(0 分: $>90^\circ$;1 分: $>45^\circ$ 且 $\leq 90^\circ$;2 分: $>15^\circ$ 且 $\leq 45^\circ$;3 分: $\leq 15^\circ$)。总分越高表明关节功能障碍越严重。

右侧膝关节横向直径测量:治疗结束后,使用数显测厚规测量每组 12 只大鼠右侧膝关节的横向直径,评估大鼠膝关节肿胀程度。

痛阈值检测:治疗结束后采用肢体压力测痛仪对每组 12 只大鼠右侧足底中心区域施加压力刺激,当大鼠因感受到疼痛而产生缩足抬腿反应时,记录此时的压力值,该数值定义为痛阈值。为保证数据的可靠性,每只大鼠均进行 3 次重复测量,相邻两次测量间隔 30 min,最终以 3 次测量结果的算术平均值作为该大鼠的痛阈值。

取材方法:在行为学评估、膝关节直径、痛阈值测量结束后进行取材。每组 12 只大鼠采用异氟烷吸入法进行气体麻醉,经腹主动脉取血约 4 mL 于静脉采血管中,室温下静置 1 h。将样品放入离心机中 4℃离心 15 min。取上清液,置于-20℃冰箱中,用于 ELISA 检测。取血后,将大鼠腹部及右侧膝关节周围剃毛,于股骨髁上 1.5 cm 处截取股骨,于胫骨平台下 1 cm 截取胫骨,取下膝关节,去除周围附着的组织,用刀片剥离软骨组织。每组取 6 只大鼠的膝关节软骨组织置于 4% 多聚甲醛中固定,待行组织病理观察及免疫组织化学检测。其余 6 只大鼠的软骨组织放入冻存管后投入液氮中,后转移到-80℃冰箱,待用于 Western blot 检测。

HE 染色观察右侧膝关节软骨组织病理变化:将固定的右侧膝关节软骨组织进行脱钙处理和石蜡包埋,制作 4 μ m 厚度的石蜡切片。烤片 30 min,

二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水,依次进行苏木精、伊红染色,滴加透明树胶于组织上,盖玻片封片,显微镜下观察,并根据 Mankin's 评分标准^[14]对染色结果进行评分。①软骨结构:正常,0分;软骨表面不平整,1分;血管翳形成并伴表面不平,2分;裂隙达到过渡层,3分;裂隙深入辐射层,4分;裂隙进入钙化层,5分;结构完全破坏,6分。②软骨细胞:正常,0分;弥漫性细胞增多,1分;局部细胞增多,2分;细胞数量明显减少,3分。③软骨基质染色:正常,0分;轻度减少,1分;中度减少,2分;重度减少,3分;未着色,4分。④潮线完整性:完整,0分;不完整,1分。得分越高表示软骨退变越严重。

番红 O 固绿染色观察软骨组织病理变化:将石蜡切片进行蒸馏水清洗,番红 O 固绿染液(A/B液等量混)核染 5 min,流水冲洗;酸性分化液处理,蒸馏水蓝化;番红 O 浸染,水洗后梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,镜检成像,根据 OARSI 评分标准^[15]对染色结果进行评分。OARSI 评分标准:正常软骨,0分;染色丢失但无结构改变,0.5分;出现轻度纤维化但无软骨丢失,1分;浅表层下方可见垂直裂隙并伴部分表面缺损,2分;垂直裂隙延伸至钙化层并累及小于 25% 的关节面,3分;裂隙累及 25%~50% 的关节面,4分;裂隙累及 50%~75% 的关节面,5分;裂隙延伸至钙化层并累及超过 75% 的关节面,6分。评分越高,代表软骨退变程度越重。

ELISA 法检测血清 IL-6、IL-18、MMP-13 含量:将标准品及待测血清样品各 100 μ L 加入酶标板孔中,于 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min 后洗板 5 次;每孔加入酶标二抗 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,再洗板 5 次;加入显色底物溶液 100 μ L,避光反应 15 min 后加终止液 50 μ L 终止反应。于酶标仪 450 nm 波长下测定各孔吸光度值,并根据标准曲线计算 IL-6、IL-18 及 MMP-13 的含量。

免疫组织化学法检测软骨组织 IL-6、MMP-13 及 Collagen- II 阳性表达:将石蜡切片脱蜡至水,PBS 清洗 3 次,每次 5 min。3% 过氧化氢溶液处理 25 min 以灭活内源性过氧化物酶。分别以 1:200 稀释 IL-6、MMP-13 及 Collagen- II 一抗,以 1:50 稀释 P16^{INK4A} 和 P21^{Waf1/Cip1} 一抗,滴加后于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日滴加 1:200 稀释的二抗,置 37 $^{\circ}$ C 烘箱内反应 30 min。DAB 显色液显色,并在显微镜下实时监控显色程度,纯水冲洗终止反应。苏木精复染细胞核,经分化、水洗及返蓝处理后,将切片脱水透明,

最后封片,于光学显微镜下观察蛋白的阳性表达情况,计算阳性表达面积百分比。阳性表达面积百分比(%)=(阳性表达面积 $\div$ 总面积) $\times$ 100%。

Western blot 法检测软骨组织 IL-6、MMP-13、Collagen- II、P16^{INK4A}、P21^{Waf1/Cip1} 蛋白表达:取每组 6 只大鼠 100 mg 软骨组织加入 RIPA 裂解液(含蛋白酶抑制剂)匀浆,BCA 法测定蛋白浓度。取 40 μ g 蛋白上样,SDS-PAGE 电泳分离,转移到 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶封闭 1 h,加入一抗孵育(P16^{INK4A}、P21^{Waf1/Cip1} 稀释比例均为 1:100,IL-6、MMP-13、Collagen- II 稀释比例分别为 1:1 000、1:1 500、1:3 000),4 $^{\circ}$ C 过夜,TBST 洗膜后加入 HRP 标记二抗孵育 2 h。ECL 化学发光显影,Image J 分析条带灰度值,以 β -actin 为内参,以目的蛋白与内参蛋白条带灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

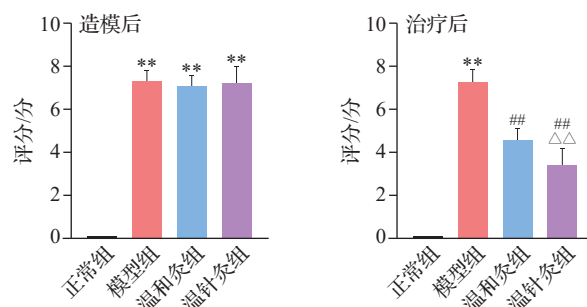
1.6 统计学处理

使用 SPSS27.0 统计软件进行统计学分析,Graphpad Prism 10.0 软件绘制图表。计量资料均符合正态分布,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。组间比较用单因素方差分析,进一步两两比较,方差齐用 LSD 检验,方差不齐用 Tamhane's t_2 检验。以 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 各组大鼠膝关节 Lequesne MG 行为学评分比较

造模后,与正常组相比,其余 3 组行为学评分升高($P<0.01$)。治疗后,与正常组相比,模型组评分升高($P<0.01$);与模型组相比,温和灸组、温针灸组行为学评分降低($P<0.01$);与温和灸组相比,温针灸组治疗后行为学评分降低($P<0.01$)。见图 1。



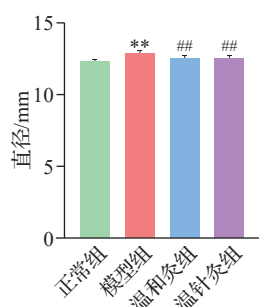
注:与正常组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,## $P<0.01$;与温和灸组相比,△△ $P<0.01$ 。

图 1 各组大鼠造模后及治疗后 Lequesne MG 评分比较 ($\bar{x}\pm s$, 12 只鼠/组)

Fig. 1 Comparison of Lequesne MG scores after modeling and intervention of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 12 rats/group)

2.2 各组大鼠膝关节横向直径比较

与正常组相比,模型组膝关节横向直径增加($P<0.01$);与模型组相比,温和灸组、温针灸组膝关节横向直径减小($P<0.01$);温和灸组与温针灸组差异无统计学意义。见图2。



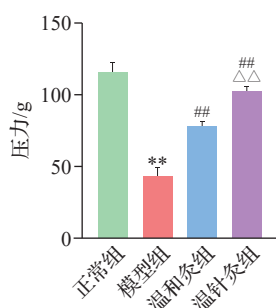
注:与正常组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,## $P<0.01$ 。

图2 各组大鼠右侧膝关节横向直径比较($\bar{x}\pm s$,12只鼠/组)

Fig. 2 Comparison of right knee joint diameters of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$,12 rats/group)

2.3 各组大鼠痛阈值比较

与正常组相比,模型组痛阈值降低($P<0.01$);与模型组相比,温和灸组、温针灸组痛阈值升高($P<0.01$);与温和灸组相比,温针灸组痛阈值升高($P<0.01$)。见图3。



注:与正常组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,## $P<0.01$;

与温和灸组相比,ΔΔ $P<0.01$ 。

图3 各组大鼠痛阈值比较($\bar{x}\pm s$,12只鼠/组)

Fig. 3 Comparison of pain thresholds of rats in 4 groups ($\bar{x}\pm s$,12 rats/group)

2.4 各组大鼠膝关节软骨组织病理学变化及评分比较

HE染色结果显示,正常组软骨形态完整,表面光滑,软骨细胞排列有序,潮线连续无缺失。模型组出现典型退变特征,表层软骨破损,软骨厚度减少,纤维化,细胞排列紊乱,潮线断裂。干预后,温针灸组结构仅局部表层轻度破损,细胞排列较规整,潮线基本连续;温和灸组出现细胞核固缩,软骨

细胞数量减少。Mankin's评分结果显示,模型组较正常组升高($P<0.01$);与模型组相比,温和灸组、温针灸组均降低($P<0.01$);与温和灸相比,温针灸组降低($P<0.05$)。见图4。

番红O固绿染色显示,正常组软骨基质染色均匀,潮线完整,无纤维化。模型组软骨出现严重退变,表面侵蚀性缺损,基质大面积丢失,广泛纤维化,潮线消失。温针灸组干预后,基质着色较均匀,纤维化显著减轻,潮线基本完整;温和灸组仍存在局部纤维化和着色不均。OARSI评分结果显示,模型组较正常组升高($P<0.01$);与模型组相比,温和灸组、温针灸组降低($P<0.01$);与温和灸相比,温针灸组降低($P<0.05$)。见图4。

2.5 各组大鼠血清IL-6、IL-18、MMP-13含量比较

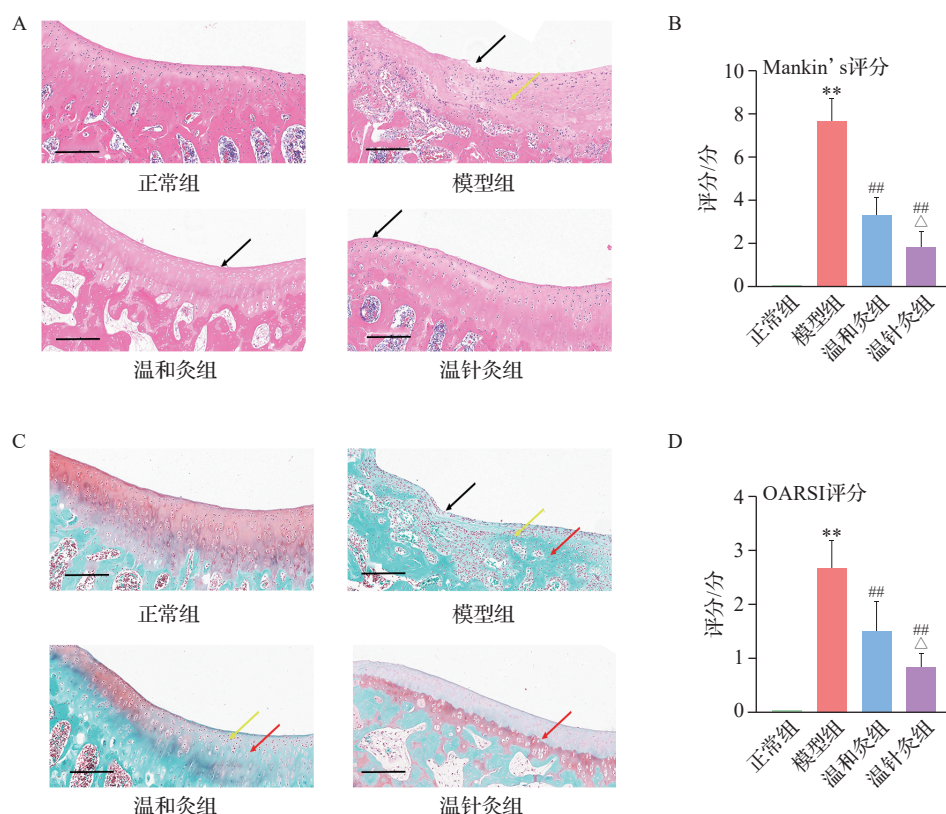
与正常组相比,模型组血清IL-6、IL-18、MMP-13含量升高($P<0.01$)。与模型组相比,温和灸组、温针灸组IL-6、IL-18、MMP-13含量降低($P<0.01$)。与温和灸组相比,温针灸组IL-6、IL-18、MMP-13含量降低($P<0.01$)。见图5。

2.6 各组大鼠膝关节软骨P16^{INK4A}、P21^{Waf1/Cip1}、Collagen-Ⅱ、IL-6、MMP-13阳性表达比较

各组大鼠膝关节软骨组织均呈现出不同程度的P16^{INK4A}、P21^{Waf1/Cip1}、Collagen-Ⅱ、IL-6、MMP-13阳性表达,棕黄色颗粒主要分布于细胞质中。与正常组相比,模型组P16^{INK4A}、P21^{Waf1/Cip1}、IL-6、MMP-13阳性表达面积百分比升高($P<0.01$),Collagen-Ⅱ阳性表达面积百分比降低($P<0.01$);与模型组相比,温和灸组和温针灸组P16^{INK4A}、P21^{Waf1/Cip1}、IL-6、MMP-13阳性表达面积百分比降低($P<0.01$),Collagen-Ⅱ阳性表达面积百分比升高($P<0.01$);与温和灸组相比,温针灸组P16^{INK4A}、P21^{Waf1/Cip1}、IL-6、MMP-13阳性表达面积百分比降低($P<0.01$),Collagen-Ⅱ阳性表达面积百分比升高($P<0.01$)。见图6。

2.7 各组大鼠膝关节软骨组织P16^{INK4A}、P21^{Waf1/Cip1}、Collagen-Ⅱ、IL-6、MMP-13蛋白相对表达量比较

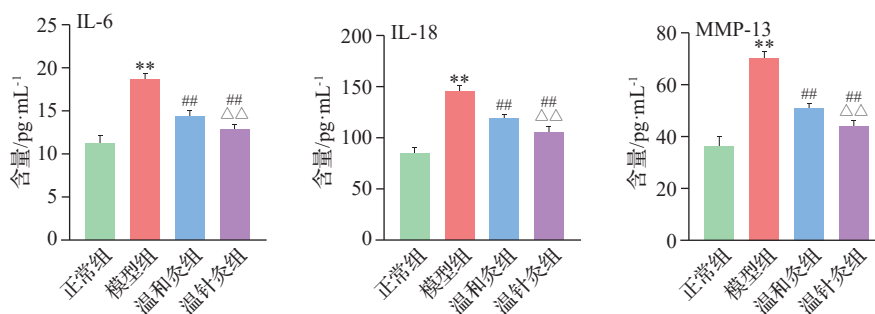
与正常组相比,模型组P16^{INK4A}、P21^{Waf1/Cip1}、IL-6、MMP-13蛋白表达升高($P<0.01$),Collagen-Ⅱ表达降低($P<0.01$);与模型组相比,温和灸组、温针灸组P16^{INK4A}、P21^{Waf1/Cip1}、IL-6、MMP-13蛋白表达降低($P<0.05$, $P<0.01$),Collagen-Ⅱ表达升高($P<0.01$);与温和灸组相比,温针灸组P16^{INK4A}、P21^{Waf1/Cip1}、IL-6、MMP-13蛋白表达均降低($P<0.05$),Collagen-Ⅱ表达升高($P<0.01$)。见图7。



注:黑色箭头示表面软骨破损,黄色箭头示纤维化,红色箭头示染色丢失。A为各组大鼠膝关节软骨组织HE染色,标尺=100 μm;B为各组大鼠Mankin's评分比较($\bar{x} \pm s$, 6只鼠/组);C为各组大鼠膝关节软骨组织番红O固绿染色,标尺=100 μm;D为各组大鼠OARSI评分比较($\bar{x} \pm s$, 6只鼠/组)。与正常组相比,** $P < 0.01$;与模型组相比,## $P < 0.01$;与温和灸组相比,△ $P < 0.05$ 。

图4 各组大鼠膝关节软骨组织病理形态学比较

Fig. 4 Comparison of histopathological morphology of knee cartilage tissues of rats in the 4 groups



注:IL为白细胞介素,MMP-13为基质金属蛋白酶13。与正常组相比,** $P < 0.01$;与模型组相比,## $P < 0.01$;与温和灸组相比,△△ $P < 0.01$ 。

图5 各组大鼠血清IL-6、IL-18、MMP-13含量比较($\bar{x} \pm s$, 12只鼠/组)

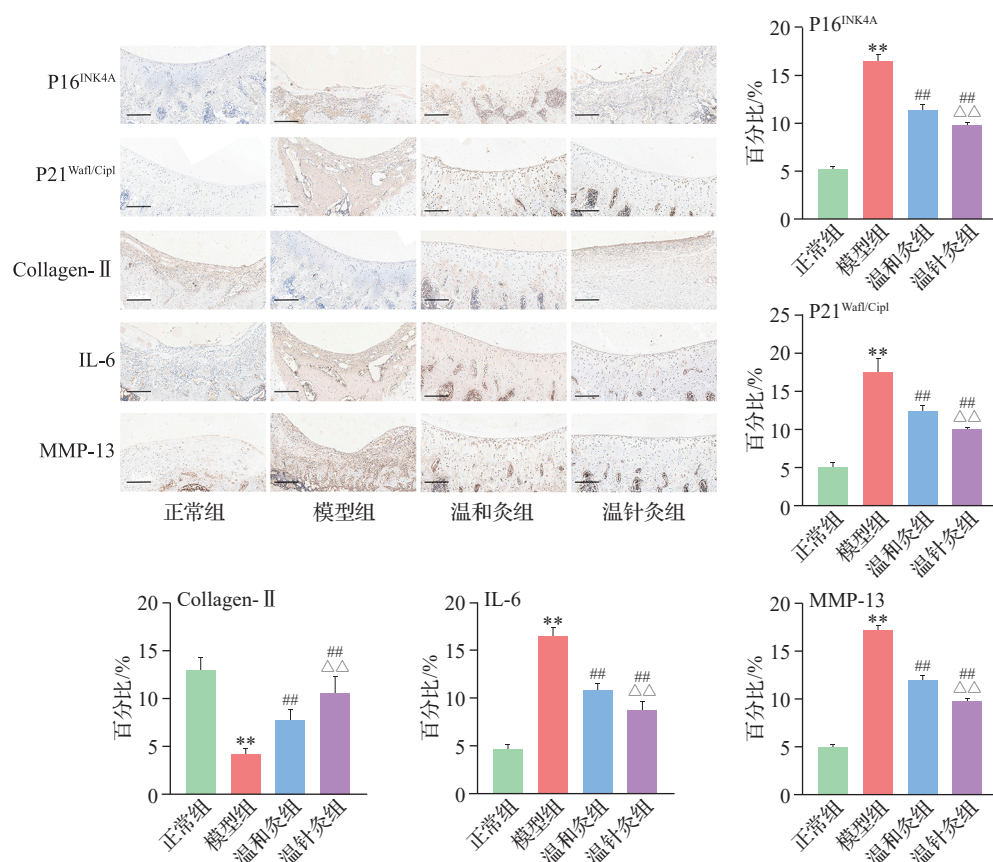
Fig. 5 Comparison of serum levels of IL-6, IL-18, and MMP-13 of rats in the 4 groups($\bar{x} \pm s$, 12 rats/group)

3 讨论

KOA属中医学“膝痹”范畴,与气血运行不畅、经络瘀阻密切相关^[16-17]。《针灸甲乙经》有“针所不及,灸之所宜”之论,《备急千金要方》载“针可行气,灸能补虚”,提示温针灸兼具针刺行气与艾灸温阳之功,可温经通络、助阳化瘀、濡养筋骨。本研究选取足阳明胃经“伏兔”“足三里”二穴,阳明主肌肉,可使气血充沛,针灸此经有助于畅达气血、濡养筋

骨,从而改善关节僵痛与运动受限。

近年来多项研究表明,针灸干预能通过改善局部循环、调控炎症因子与氧化应激水平,促进软骨修复与功能恢复^[18-19]。本研究结果亦表明,温针灸可显著改善KOA大鼠的软骨结构破坏与纤维化,温针灸大鼠潮线连续性明显优于温和灸组,同时痛阈升高、膝关节肿胀减轻。形态学与行为学结果均提示温针灸能在结构与功能两个层面协同促进软



注: P16^{INK4A}为细胞周期蛋白依赖性激酶4抑制剂A, P21^{Waf1/Cip1}为细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A, Collagen-Ⅱ为Ⅱ型胶原蛋白, IL-6为白细胞介素6, MMP-13为基质金属蛋白酶13。标尺=100 μm。与正常组相比, ** $P < 0.01$; 与模型组相比, ## $P < 0.01$; 与温和灸组相比, △△ $P < 0.01$ 。

图6 各组大鼠膝关节软骨组织P16^{INK4A}、P21^{Waf1/Cip1}、Collagen-Ⅱ、IL-6、MMP-13阳性表达比较 (免疫组织化学染色, $\bar{x} \pm s$, 6只鼠/组)

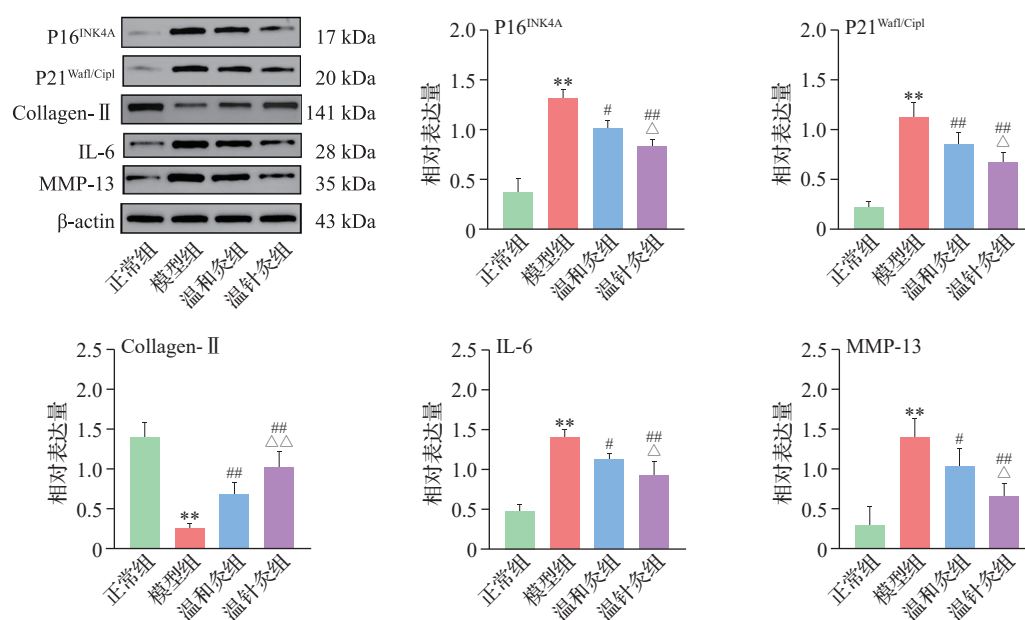
Fig. 6 Comparison of the positive expressions for P16^{INK4A}, P21^{Waf1/Cip1}, Collagen-Ⅱ, IL-6, and MMP-13 in the Rnee cartilage tissues of rats in the 4 groups (immunohistochemistry stainig, $\bar{x} \pm s$, 6 rats/group)

骨修复,这与Ye的研究结果“针灸可通过改善关节微环境、促进代谢平衡而延缓退变”相符^[20]。这些结果从实验层面证实了温针灸改善KOA关节功能的综合效应。

细胞衰老在KOA的进展中起关键作用。软骨细胞受机械应力、氧化应激和炎性因子刺激后, DNA损伤反应被激活,经P53/P21和P16/pRb通路介导细胞周期停滞,诱发衰老表型^[21-24]。其中, P21^{Waf1/Cip1}与P16^{INK4A}均为经典的细胞周期抑制因子,是衰老信号通路的关键执行分子。P21^{Waf1/Cip1}主要受P53调控,通过抑制细胞周期蛋白(Cyclin) E/细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)2复合物,使细胞阻滞于G1期形成应激性衰老;P16^{INK4A}通过抑制Cyclin D/CDK4/6活性,阻断Rb蛋白磷酸化,维持程序性衰老状态^[25-26]。二者的持续高表达不仅反映软骨细胞衰老积聚,还可诱导IL-6、IL-18、MMP-13等SASP因子分泌,加重基质降解^[27-29]。因此,本研

究检测P16^{INK4A}与P21^{Waf1/Cip1}的意义在于揭示软骨细胞进入衰老状态的早期分子变化,它们的升高可被视为KOA退变的“分子开关”。本研究结果显示,模型组大鼠软骨组织中P16^{INK4A}、P21^{Waf1/Cip1}表达显著升高,说明KOA状态下软骨细胞出现显著衰老积累;温针灸及温和灸干预后,二者表达均显著下调,提示温针灸可有效抑制细胞衰老信号激活,延缓软骨退变进程。其可能机制在于温针灸改善关节局部微循环与氧化还原状态,降低活性氧生成,从而减轻DNA损伤应答,抑制P53及其下游效应因子的过度激活。说明温针灸不仅能改善组织形态,还能从分子层面调控细胞衰老过程。

除细胞衰老信号外,本研究还检测了典型的SASP因子IL-6、IL-18、MMP-13、Collagen-Ⅱ。IL-6和IL-18是SASP核心炎性介质,前者通过JAK/STAT3通路促进MMP-13表达,导致基质降解;后者增强炎性细胞浸润并放大局部免疫反应^[30-31]。



注:P16^{INK4A}为细胞周期蛋白依赖性激酶4抑制剂A,P21^{Waf1/Cip1}为细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A, Collagen-Ⅱ为Ⅱ型胶原蛋白,IL-6为白细胞介素,MMP-13为基质金属蛋白酶13。与正常组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与温针灸组相比, $\triangle P<0.05$, $\triangle\triangle P<0.01$ 。

图7 各组大鼠膝关节软骨组织P16^{INK4A}、P21^{Waf1/Cip1}、Collagen-Ⅱ、IL-6、MMP-13蛋白相对表达量比较($\bar{x}\pm s$,6只鼠/组)

Fig. 7 Comparison of relative protein expression levels of P16^{INK4A}, P21^{Waf1/Cip1}, Collagen-Ⅱ, IL-6, and MMP-13 in knee cartilage tissues of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 rats/group)

MMP-13是降解Collagen-Ⅱ的关键酶,其过度表达直接导致软骨基质塌陷与潮线破坏,Collagen-Ⅱ是软骨细胞合成的主要结构蛋白,其水平下降标志着软骨退变与功能丧失^[32]。在本研究中,模型组IL-6、IL-18、MMP-13显著升高而Collagen-Ⅱ下降,表明KOA模型中存在明显的炎性与降解失衡。温针灸干预后,上述炎性与降解因子显著下调,Collagen-Ⅱ显著上调。说明温针灸的效应不仅是抗炎或抗衰老的单一作用,而是同时调节衰老及炎性反应,从而达到治疗目的,且温针灸作用优于温针灸。

本研究初步揭示了温针灸延缓KOA进展的抗细胞衰老机制。考虑到磷脂酰肌酶3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)、沉默信息调节因子1(SIRT1)/p53等信号通路在调控细胞衰老与氧化应激中的关键作用,后续研究将进一步探讨温针灸通过这些信号轴调节线粒体功能、自噬及抗氧化防御的具体机制,从而继续深化对温针灸延缓软骨退变分子基础的认识^[33]。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] Ren J L, Yang J N, Hu W. The global burden of osteoarthritis knee: a secondary data analysis of a population-based study[J]. Clin Rheumatol, 2025, 44(4): 1769-1810.
- [2] 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 Rheumatol, 2020, 72 (2): 220-233.
- [3] Yagi M, Endo K, Komori K, et al. Comparison of the effects of oxidative and inflammatory stresses on rat chondrocyte senescence[J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 7697.
- [4] Ji M L, Jiang H, Li Z, et al. Sirt6 attenuates chondrocyte senescence and osteoarthritis progression [J]. Nat Commun, 2022, 13: 7658.
- [5] Liu Y K, Zhang Z A, Li T, et al. Senescence in osteoarthritis: from mechanism to potential treatment [J]. Arthritis Res Ther, 2022, 24(1): 174.
- [6] Jiang W, Chen H X, Lin Y, et al. Mechanical stress abnormalities promote chondrocyte senescence - the pathogenesis of knee osteoarthritis[J]. Biomed Pharmacother, 2023, 167: 115552.
- [7] Tu J F, Yang J W, Shi G X, et al. Efficacy of intensive acupuncture versus sham acupuncture in knee osteoarthritis: a randomized controlled trial[J]. Arthritis Rheumatol, 2021, 73 (3): 448-458.
- [8] 陈瑜, 贾叶娟, 吕九亨, 等. 不同刺灸法治疗膝骨关节炎的临床疗效观察[J]. 针刺研究, 2020, 45(7): 569-573.
- [9] 张小琴, 李倩, 薛平聚, 等. 不同刺灸法对膝关节骨关节炎大鼠关节软骨形态结构及NF-κB p65/NLRP3通路的影响[J]. 针刺研究, 2023, 48(2): 185-191.
- Zhang X Q, Li Q, Xue P J, et al. Effects of different

- acupuncture and moxibustion methods on articular cartilage morphology and NF- κ B p65/NLRP3 pathway in rats with knee osteoarthritis (in Chinese)[J]. *Acupuncture Research*, 2023, 48(2): 185-191.
- [10] Wei Y, Yuan N R, Ding J R, et al. Efficacy and safety of warm needle acupuncture in knee osteoarthritis: a protocol for systematic review and meta-analysis[J]. *Medicine*, 2020, 99(50): e23596.
- [11] Jun J H, Choi T Y, Robinson N, et al. Warm needle acupuncture for osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis[J]. *Phytomedicine*, 2022, 106: 154388.
- [12] 鲍哲明, 单青, 李晨, 等. 碘乙酸钠大鼠骨关节炎模型骨微结构研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2022, 28(2): 210-214.
Bao Z M, Shan Q, Li C, et al. Research on subchondral bone in an animal model of osteoarthritis induced by monosodium iodoacetate (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2022, 28(2): 210-214.
- [13] 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位 第2部分: 大鼠[J]. *针刺研究*, 2021, 46(4): 351-352.
China Association of Acupuncture-Moxibustion. Nomenclature and location of acupoints commonly used in laboratory animals. Part 2: rats (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2021, 46(4): 351-352.
- [14] Mankin H J, Johnson M E, Lippiello L. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. III. Distribution and metabolism of amino sugar-containing macromolecules[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 1981, 63(1): 131-139.
- [15] Glasson S S, Chambers M G, Van Den Berg W B, et al. The OARSI histopathology initiative-recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse [J]. *Osteoarthr Cartil*, 2010, 18: S17-S23.
- [16] 殷磊, 褚立希, 朱鸿飞, 等. 石氏伤科辨治膝骨关节炎临床经验撷菁[J]. *上海中医药杂志*, 2016, 50(5): 1-3.
Yin L, Chu L X, Zhu H F, et al. Experience with differentiation and treatment of knee osteoarthritis in Shi's traumatology (in Chinese) [J]. *Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2016, 50(5): 1-3.
- [17] 管玉洁, 何晓瑾, 周学平, 等. 国医大师周仲瑛从络病论治骨关节炎经验[J]. *南京中医药大学学报*, 2021, 37(2): 287-289.
Guan Y J, He X J, Zhou X P, et al. TCM master Zhou Zhongying's experience on treating osteoarthritis from the theory of collateral disease (in Chinese) [J]. *Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine*, 2021, 37(2): 287-289.
- [18] 董逸波, 唐锐, 杨涵翔, 等. 针灸抑制铁死亡治疗膝骨关节炎研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2025, 27(2): 79-83.
Dong Y B, Tang R, Yang H X, et al. Research progress on the inhibition of ferroptosis by acupuncture and moxibustion in the treatment of knee osteoarthritis (in Chinese) [J]. *Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, 2025, 27(2): 79-83.
- [19] Huang Y J, Huang H, Chen Q Q, et al. Efficacy and immune-inflammatory mechanism of acupuncture-related therapy in animal models of knee osteoarthritis: a preclinical systematic review and network meta-analysis [J]. *J Orthop Surg Res*, 2024, 19(1): 177.
- [20] Ye J N, Su C G, Jiang Y Q, et al. Effects of acupuncture on cartilage p38MAPK and mitochondrial pathways in animal model of knee osteoarthritis: a systematic evaluation and meta-analysis [J]. *Front Neurosci*, 2022, 16: 1098311.
- [21] Georget M, Defois A, Guiho R, et al. Development of a DNA damage-induced senescence model in osteoarthritic chondrocytes [J]. *Aging*, 2023, 15(17): 8576-8593.
- [22] Iijima H, Gilmer G, Wang K, et al. Age-related matrix stiffening epigenetically regulates α -Klotho expression and compromises chondrocyte integrity [J]. *Nat Commun*, 2023, 14: 18.
- [23] Reyes N S, Krasilnikov M, Allen N C, et al. Sentinel p16^{INK4a+} cells in the basement membrane form a reparative niche in the lung [J]. *Science*, 2022, 378(6616): 192-201.
- [24] Li Z, Zhang W T, Wei X Y, et al. TRIM15 drives chondrocyte senescence and osteoarthritis progression [J]. *Sci Transl Med*, 2025, 17(791): eadq1735.
- [25] Han Z Y, Wang K T, Ding S L, et al. Cross-talk of inflammation and cellular senescence: a new insight into the occurrence and progression of osteoarthritis [J]. *Bone Res*, 2024, 12: 69.
- [26] Yan J Y, Chen S Y, Yi Z M, et al. The role of p21 in cellular senescence and aging-related diseases [J]. *Mol Cells*, 2024, 47(11): 100113.
- [27] Diekmann B O, Sessions G A, Collins J A, et al. Expression of p16^{INK4a} is a biomarker of chondrocyte aging but does not cause osteoarthritis [J]. *Aging Cell*, 2018, 17(4): e12771.
- [28] Ma Y X, Hu T Y, Liu N G, et al. Acupotomy ameliorates KOA related chondrocyte premature senescence through YAP/FOXD1 pathway [J]. *J Pain Res*, 2025, 18: 2011-2023.
- [29] Horváth E, Sólyom Á, Székely J, et al. Inflammatory and metabolic signaling interfaces of the hypertrophic and senescent chondrocyte phenotypes associated with osteoarthritis [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(22): 16468.
- [30] Liao Y H, Ren Y S, Luo X, et al. Interleukin-6 signaling mediates cartilage degradation and pain in posttraumatic osteoarthritis in a sex-specific manner [J]. *Sci Signal*, 2022, 15(744): eabn7082.
- [31] Takahashi A, de Andrés M C, Hashimoto K, et al. Epigenetic regulation of interleukin-8, an inflammatory chemokine, in osteoarthritis [J]. *Osteoarthr Cartil*, 2015, 23(11): 1946-1954.
- [32] Hu Q C, Ecker M. Overview of MMP-13 as a promising target for the treatment of osteoarthritis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4): 1742.
- [33] 针灸科学联盟. 针灸科学研究行动计划 [J]. *针刺研究*, 2025, 50(1): 1-2.
Acupuncture Scientific Research Alliance. A plan for acupuncture-moxibustion scientific research (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2025, 50(1): 1-2.

收稿日期: 2025-09-23 修回日期: 2026-01-06