

☆ XXXX ☆

针刀通过 Sirt1/Nrf2/NQO1 信号通路调控家兔膝关节骨关节炎软骨氧化应激损伤的机制研究

王 敏^{1,2}, 张照庆^{1,2}, 曹雨微², 李 凯¹, 张 哲³, 安 康⁴, 骆小娟¹⁽¹⁾武汉市第三医院疼痛康复科, 武汉 430060; ⁽²⁾湖北中医药大学针灸骨伤学院, 武汉 430000;⁽³⁾蚌埠市第三人民医院, 安徽蚌埠 233000; ⁽⁴⁾松原市中西医结合医院骨伤科, 吉林松原 138000)

【摘要】 目的:观察针刀对膝骨关节炎(KOA)家兔软骨氧化应激沉默信息调节因子1(Sirt1)/核转录因子E2相关因子2(Nrf2)/NADPH 醌氧化还原酶-1(NQO1)信号通路的影响,探讨其改善软骨损伤的作用机制。**方法:**24只雄性新西兰家兔随机分为正常组、模型组、针刀组与针刀+抑制剂组,每组6只。除正常组外,均采用改良Videman法建立KOA模型。针刀组选取左下肢内侧副韧带、外侧副韧带、髌内侧支持带、髌外侧支持带、髌韧带及条索结节点进行针刀松解,每周1次,共4周;针刀+抑制剂组于每次针刀干预前30 min腹腔注射 Sirt1 抑制剂 EX-527,每周1次,共4周。分别于干预前及末次干预结束后1周,行 Lequesne MG 评分和被动关节活动度(PROM)评分测定;末次干预后1周,取软骨组织,行 HE 及番红固绿染色观察病理形态;ELISA 法检测关节液白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量;比色法检测软骨组织中超氧化物歧化酶(SOD)活力,酶促反应结合二硫代硝基苯甲酸显色法检测谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力,总抗氧化能力检测试剂盒检测总抗氧化能力(T-AOC),硫代巴比妥酸法检测丙二醛(MDA)含量;免疫荧光法检测软骨组织中活性氧(ROS)水平;Western blot 法检测 Sirt1、Nrf2、NQO1、含血小板反应蛋白基序的去整合素金属蛋白酶5(ADAMTS-5)和基质金属蛋白酶3(MMP-3)的蛋白表达;实时荧光定量PCR法检测软骨 Sirt1、Nrf2、NQO1 mRNA 表达。**结果:**与正常组比较,模型组家兔左膝关节 Lequesne MG 评分,关节液 IL-1 β 、TNF- α 含量及软骨组织 MDA 含量、ROS 表达水平,以及 ADAMTS-5、MMP-3 蛋白表达水平升高($P < 0.01$),Nrf2 蛋白及 mRNA 表达水平升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);PROM 评分,软骨组织 SOD、GSH-Px 和 T-AOC 活力,软骨组织 Sirt1 蛋白及 mRNA 表达水平均降低($P < 0.01$)。与模型组比较,针刀组 Lequesne MG 评分,关节液 IL-1 β 和 TNF- α 含量,软骨组织 MDA 含量、ROS 表达水平,ADAMTS-5、MMP-3 蛋白表达水平降低($P < 0.01$),PROM 评分,软骨组织 SOD、GSH-Px 和 T-AOC 活力, Sirt1、Nrf2、NQO1 蛋白及 mRNA 表达水平均升高($P < 0.01$);针刀+抑制剂组 Lequesne MG 评分,关节液 TNF- α 含量及软骨组织 MDA 含量、ROS 表达水平降低($P < 0.01$, $P < 0.05$),PROM 评分, Sirt1、Nrf2 及 NQO1 mRNA 表达水平升高($P < 0.01$)。与针刀+抑制剂组比较,针刀组的 Lequesne MG 评分,关节液 IL-1 β 和 TNF- α ,软骨组织 MDA 含量、ROS 表达水平降低($P < 0.01$),MMP-3、ADAMTS-5 蛋白表达水平降低($P < 0.01$, $P < 0.05$),PROM 评分,软骨组织 SOD、GSH-Px、T-AOC 活力, Sirt1、Nrf2、NQO1 蛋白及 mRNA 表达水平升高($P < 0.01$, $P < 0.05$)。HE 染色结果显示,模型组膝关节软骨表面变薄,软骨细胞数量减少,排列紊乱,蛋白多糖丢失;针刀组较模型组软骨细胞数量增多、排列规则,蛋白多糖增多;针刀+抑制剂组较针刀组软骨组织表面受损现象加重。**结论:**针刀能够改善 KOA 家兔关节功能及软骨病理损伤,可能与其通过激活 Sirt1/Nrf2/NQO1 信号通路减轻氧化应激和炎症反应的作用有关。

【关键词】 针刀;膝关节骨关节炎;膝关节功能;Sirt1/Nrf2/NQO1 信号通路;氧化应激;软骨损伤;EX-527

【DOI】 10.13702/j.1000-0607.20251280

引用格式:王敏,张照庆,曹雨微,等.针刀通过 Sirt1/Nrf2/NQO1 信号通路调控家兔膝关节骨关节炎软骨氧化应激损伤的机制研究[J]. 针刺研究,XXXX,XX(X):1-11.

项目来源:武汉市中医药科研重点项目(No.WZ24M02)

通信作者:张照庆, E-mail: 2568584089@qq.com

Study on the mechanism of acupotomy in regulating oxidative stress injury of cartilage in rabbits with knee osteoarthritis via the Sirt1/Nrf2/NQO1 signaling pathway

Wang Min^{1,2}, Zhang Zhaoqing^{1,2}, Cao Yuwei², Li Kai¹, Zhang Zhe³, An Kang⁴, Luo Xiaojuan¹ (¹Department of Pain and Rehabilitation, Wuhan Third Hospital, Wuhan 430060, China; ²School of Acupuncture-Moxibustion & Orthopedics, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430000; ³Bengbu Third People's Hospital, Bengbu 233000, Anhui Province; ⁴Department of Orthopedics, Songyuan Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Songyuan 138000, Jilin Province)

【ABSTRACT】 Objective To observe the effect of acupotomy on the sirtuin 1 (Sirt1)/ nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/ NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) signaling pathway of oxidative stress in the cartilage tissue of rabbits with knee osteoarthritis (KOA), so as to explore its underlying mechanism in ameliorating cartilage injury. **Methods** Twenty-four male New Zealand rabbits were randomly divided into normal control, model, acupotomy, and acupotomy+inhibitor (EX527, an inhibitor of Sirt1) groups, with 6 rabbits in each group. The KOA model was established by using the modified Videman method. After successful modeling, the acupotomy group received acupotomy releasing at the medial collateral ligament, lateral collateral ligament, medial patellar retinaculum, lateral patellar retinaculum, patellar ligament, and cord-like nodular points of the left lower limb, once weekly for 4 weeks. The acupotomy + inhibitor group received intraperitoneal injection of the Sirt1 inhibitor EX-527 30 min before every session of acupotomy intervention, once weekly for 4 weeks. Before intervention and one week after the final intervention, the Lequesne disability index score (Lequesne score) assessment and passive range of motion (PROM) measurement were performed. The cartilage tissue was collected for observing histopathological changes after H.E. and Safranin O-Fast Green staining, detecting the level of reactive oxygen species (ROS) with immunofluorescence stain, detecting the activity of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) with colorimetric assay and enzymatic reaction combined with DTNB colorimetric method respectively, and for measuring the contents of total antioxidant capacity (T-AOC) with ABTS method, and MDA with TBA method. The contents of IL-1 β and TNF- α in the synovial fluid were measured using ELISA. The expression levels of Sirt1, Nrf2, NQO1, recombinant A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin 5 (ADAMTS5) and matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) proteins, and Sirt1, Nrf2 and NQO1 mRNAs in the cartilage tissue were detected using western blot and real-time fluorescence quantitative PCR, separately. **Results** Compared with the normal control group, the model group showed a significant increase in the Lequesne score, contents of IL-1 β , TNF- α and MDA, immunofluorescence intensity of ROS, and expression levels of Nrf2, MMP3 and ADAMTS5 proteins, and Nrf2mRNA ($P<0.01$, $P<0.05$), and a significant decrease in the PROM score, contents of SOD, GSH-Px and T-AOC, and expression levels of Sirt1 protein and mRNA ($P<0.01$). In contrast to those of the model group, both the increase and decrease of the indexes mentioned above in the acupotomy group were all reversed ($P<0.01$). Compared with the model group, the Lequesne score, contents of TNF- α , MDA, and immunofluorescence intensity of ROS were obviously decreased ($P<0.01$, $P<0.05$), while the PROM score, expression levels of Nrf2, Sirt1 and NQO1 mRNA strikingly increased in the acupotomy+inhibitor group ($P<0.01$). The effects of acupotomy were significantly superior to those of acupotomy+inhibitor in lowering the Lequesne score, contents of TNF- α , IL-1 β , MDA, ROS immunofluorescence intensity, expression levels of MMP3 and ADAMTS5 proteins ($P<0.01$, $P<0.05$), and in increasing the PROM score, contents of SOD, GSH-Px and T-AOC, expression of Sirt1, Nrf2 and NQO1 proteins and mRNAs ($P<0.01$, $P<0.05$), suggesting a strikingly weakened efficacy of acupotomy after administration of inhibitor EX-527 and an involvement of Sirt1 in acupotomy effect. Morphological observation revealed that in the model group, the cartilage surface of the knee joint became thinner, and the number of chondrocytes was decreased, with disordered arrangement, and Safranin and Fast Green staining showed that the protein polysaccharides were lost. Compared with the model group, the number of chondrocytes was increased, with regular arrangement, clear nuclear and cytoplasmic structures, and the protein polysaccharides was increased in the acupotomy group; but in the acupotomy+inhibitor group, the damage of the cartilage surface was more severe compared to the acupotomy group. **Conclusion** Acupotomy therapy can ameliorate joint function and cartilage pathological damage in KOA rabbits, which may be related to its functions in mitigating oxidative stress and inflammatory responses by activating the Sirt1/Nrf2/NQO1 signaling pathway.

【KEYWORDS】 Acupotomy; Knee osteoarthritis; Knee joint function; Sirt1/Nrf2/NQO1 signaling; Oxidative stress;

Cartilage injury; EX527

膝关节炎(KOA)是由关节软骨退变、软骨下骨重塑及滑膜炎性反应共同导致的慢性退行性疾病^[1],全球患病人数约3亿^[2],60岁与75岁以上人口的患病率分别高达约50%与80%^[3],患者致残率高达53%^[4],疾病负担沉重。肥胖、机械创伤及衰老等多因素交互作用,可诱导关节局部活性氧(ROS)爆发性升高,进而触发氧化应激与炎症级联反应,加速软骨基质降解^[5-6]。软骨细胞是关节软骨的主要细胞成分,其抗氧化防御功能下降被认为是KOA病程进展的关键环节^[7]。沉默信息调节因子1(Sirt1)/核转录因子E2相关因子2(Nrf2)信号轴是维持细胞氧化还原稳态的核心调控通路^[8]。Sirt1通过去乙酰化激活Nrf2,促进其核转位并上调下游NADPH醌氧化还原酶-1(NQO1)等Ⅱ相解毒酶,从而清除过量ROS,抑制软骨细胞凋亡及基质金属蛋白酶(MMPs)的异常表达^[9-11]。当前,KOA的治疗虽涵盖药物、理疗及手术等多种方式,但仍有局限^[12]。近年来,以针刀为代表的中医微创疗法,在改善KOA症状及延缓软骨退变方面显示出独特优势^[13],研究表明,针刀松解在改善患者关节疼痛、僵硬和活动功能障碍等方面近远期疗效均显著^[14]。动物实验亦表明,针刀可减轻KOA兔软骨氧化应激损伤,抑制脂质过氧化并调节抗氧化酶活性^[15],但其调控氧化应激的具体信号转导通路及关键分子靶点仍待阐明。本文采用改良的Videman法构建KOA家兔模型,观察针刀对软骨Sirt1/Nrf2/NQO1信号通路的调控作用,旨在从抗氧化应激角度揭示针刀改善软骨损伤的分子机制,为临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物

6月龄新西兰雄性家兔24只,体质量2~3 kg,健康清洁级,购自湖北逸挚诚生物科技有限公司,实验动物生产许可证号为SCXK(鄂)2021-0020。动物饲养于武汉市第三医院实验动物中心,饲养环境:12/12 h光照/黑暗,单笼饲养,自由摄食饮水,定期通风,室温18~22℃,相对湿度40%~60%。本研究经武汉市第三医院实验动物伦理委员会批准(伦理编号:SY2024-001)。

1.2 主要试剂及仪器

Sirt1抗体(美国Sigma),Nrf2抗体、NQO1抗体、基质金属蛋白酶3(MMP-3)抗体(武汉三鹰),含

血小板反应蛋白基序的去整合素金属蛋白酶5(ADAMTS-5)抗体(上海晖科),肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素1 β (IL-1 β)ELISA定量检测试剂盒(南京睿信),超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、总抗氧化能力(T-AOC)、丙二醛(MDA)检测试剂盒(南京建成),Sirt1抑制剂EX527(美国AbMole),苏木精、伊红染色液、RIPA裂解液、抗体洗脱液、EDTA脱钙液、PAG凝胶配制试剂盒、荧光定量PCR试剂盒、反转录试剂盒、RNA提取试剂盒、异丙醇、ECL超敏发光试剂盒、 β -actin抗体(武汉赛维尔)。

针刀(0.4 mm $\times$ 40 mm,江苏华友),RM2016切片机、UC-7超薄切片机(德国徕卡),YB-7LF生物组织包埋机(湖北亚光),漩涡混匀仪、移液器(武汉赛维尔),干式恒温仪、掌心离心机(海门其林贝尔),台式高速离心机(上海卢湘仪),蛋白显影仪(上海嘉鹏),电子天平(上海梅特勒-托利多),RT6000酶标仪(南京贝登),Tanon-5200型化学发光图像分析系统、EPS300型电泳仪、VE-180型电泳槽、VE-186型转膜仪(上海天能),光学显微镜(日本奥林巴斯),PikoReal96型荧光定量PCR仪(美国赛默飞),BA410E型荧光显微镜(美国Motic),基因扩增仪(上海伯乐),超净工作台(苏净安泰)。

1.3 造模方法及分组

适应性饲养7 d后,采用随机数字表法将动物分为正常组、模型组、针刀+抑制剂组和针刀组,每组6只。除正常组外,各组用改良的Videman法^[16]造模:在家兔清醒状态下,将其左后肢固定并伸展。左后肢腹股沟至踝关节区域备皮准备,将树脂绷带浸泡在65℃以上的热水中软化,用以固定腹股沟到脚踝。保证兔膝关节伸直180°,踝关节跖屈60°,最后用医用胶带固定树脂绷带,以防止家兔抓伤绷带,同时,留出足趾部分以便观察家兔的血液循环状况。每日检查固定情况,及时处理脱落及肿胀等问题。参考奎森功能障碍指数(Lequesne MG)评分标准进行造模评估,评分 $\geq$ 6分即为造模成功。

1.4 干预方法

正常组、模型组:于造模结束后,每周腹腔注射1次与针刀+抑制剂组等体积的含0.2%二甲基亚砷的0.9%氯化钠溶液(即不含EX527的溶剂),连续4周。期间仅进行常规饲养,给予与其他组同样的抓取。

针刀组:选择左下肢内外侧副韧带、髌内外侧支持带、髌韧带及条索结节点作为治疗点。备皮后,持针刀使刀口线与肌腱纤维平行,针体垂直于皮肤刺入,直至感到阻力。随后在肌腱与骨附着点进行2~3次纵向疏通与横向剥离松解,待手下感觉阻力减小、局部松动后出针,以无菌干棉球按压止血。每周干预1次,连续4周。

针刀+抑制剂组:在进行上述针刀干预前30 min,腹腔注射 Sirt1 抑制剂 EX527(以含 0.2% 二甲基亚

砷的 0.9% 氯化钠溶液配制,浓度为 5 mg/mL),给药剂量为 5 mg/kg(给药体积为 1 mL/kg)^[17]。每周干预1次,连续4周。

1.5 观察指标及检测方法

Lequesne MG 评分评估关节损伤和步态情况:干预前后评估兔患侧膝关节的疼痛、肿胀、关节活动度及步态情况。最终评分为4个方面的评分相加,分值越高则严重程度越高。评分标准见表1。

表1 Lequesne MG 评分标准
Table 1 Lequesne MG scoring criteria

评分内容	0分	1分	2分	3分
膝关节局部按压疼痛表现	无反应	患肢收缩	轻度全身反应	挣扎抽搐
关节肿胀程度	无	轻度	明显	
关节活动度	>90°	45°(含45°)~90°	15°~45°	<15°(含15°)
步态变化	正常行走	轻度跛行可奔跑	可行走伴跛行明显	不参与行走

注:Lequesne MG 为奎森功能障碍指数。

后肢周径测量:使用软尺分别测量健侧与患侧后肢的周长,并计算两者之间的差值,以此评估膝关节肿胀程度。

关节被动活动度(PROM)测量:将家兔呈侧卧位固定,一名实验人员用双臂量角器进行测量,轴心对准膝关节,固定臂与股骨中线对齐,活动臂与胫骨中线对齐;另一实验人员被动地将兔的膝关节先完全伸直,记录最大伸展角度;再完全弯曲,记录最大屈曲角度。重复测量3次,取最大伸展角度与最大屈曲角度差值的绝对值,作为关节活动范围。

取材:各组在治疗结束1周后,以3%戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉家兔,使家兔左膝关节屈曲45°,进针点在髌韧带中部和股骨下缘,刺入关节腔时有落空感。将1 mL 0.9%氯化钠溶液注入膝关节腔内。在膝关节充分屈曲和伸展后,将关节液收集到冻干管中,并将样品在4℃、12 000 r/min(离心半径9.5 cm)条件下离心15 min,去除细胞和关节碎片,取上清液于-80℃下储存。后采用空气栓塞法处死家兔,用手术刀在家兔的关节处做切口,分离其与皮下组织,暴露髌韧带,刮取软骨组织,然后将组织固定在4%多聚甲醛中,并将冻干管分别储存在-80℃下。

HE染色法观察软骨病理形态:4%多聚甲醛溶液固定采集的软骨组织样本(4 mm×3 mm×3 mm),经过梯度乙醇脱水、二甲苯透明化处理,石蜡包埋

并切成5 μm厚切片。切片在二甲苯中脱蜡两次,每次5 min,接着用乙醇水化以促进染色剂渗透。依次进行苏木精染色和伊红染色,最后用中性树胶封片,光学显微镜下观察软骨病理形态。

番红-固绿染色观察软骨形态:切片制备同HE染色。切片经 Weigert 染液染色 5 min,酸性分化液分化,固绿染色液染色 8 min,用弱酸溶液洗涤去除多余固绿染色,最后用番红 O 染色。随后样本经脱水、二甲苯透明化 5 min,中性树胶封片,镜下观察。按(OARSI)评分^[18]标准评估软骨丢失、糜烂、钙化软骨层病变及蛋白多糖成分丢失等指标。

ELISA 法检测关节液炎症因子 IL-1β、TNF-α 含量:取关节液样本经离心后取上清,按试剂盒说明操作:于预包被板中分别加入校准品及关节液各 50 μL,除空白孔外,再加入辣根过氧化物酶标记的检测抗体 100 μL,37℃恒温箱孵育 60 min;手工洗涤液洗涤 5 次后,加底物 A、B 的 1:1 混合液 37℃避光反应 15 min,各孔加入终止液 50 μL,终止反应后于 450 nm 波长测定吸光度值。依据校准品浓度绘制标准曲线并计算样本浓度。

软骨组织 SOD、GSH-Px、T-AOC 活力及 MDA 含量检测:按照生化试剂盒操作说明书检测。取冻存软骨组织样本 50 mg,按照质量体积比 1:9 加入 0.9% 氯化钠溶液,冰浴条件下机械匀浆,4℃、4 000 r/min(离心半径 15.8 cm)条件下离心 10 min,

取上清液即为10%匀浆上清液待测样本,测定其蛋白浓度。采用硫代巴比妥酸法检测MDA含量,样本经沸水浴反应后于532 nm检测吸光度值;比色法检测SOD活力,取稀释后样本于550 nm处检测吸光度,按抑制率计算酶活力单位;GSH-Px活性通过酶促反应结合DTNB显色法,于412 nm检测吸光度值,依据GSH消耗量计算酶活力单位;采用总抗氧化能力检测试剂盒评估T-AOC活力,于405 nm检测吸光度值,使用Trolox标准曲线计算总抗氧化能力。各指标均严格按试剂盒步骤操作,并设置标准管、空白管及对照管进行校准。

荧光探针检测软骨组织中的ROS水平:取每组3只家兔新鲜兔软骨组织(5 mm×5 mm×3 mm),制作冰冻切片(厚度约5 μm)。PBS洗涤后,加入终浓度为10 μmol/L的二氢乙啶(DHE)探针工作液,37℃避光孵育30 min,PBS洗涤3次,以4%多聚甲醛溶液室温固定15 min。固定完成后再次用PBS洗涤,DAPI复染细胞核,含抗荧光淬灭封片剂封片。荧光显微镜下统一参数采集图像。使用Image J软件定量分析。计算公式为:平均荧光强度=积分吸光度值/阳性区域面积。

Western blot法检测软骨Sirt1、Nrf2、NQO1、ADAMTS-5、MMP-3蛋白表达水平:取每组3只家兔冻存软骨约100 mg,提总蛋白进行SDS-PAGE,结束后转移至PVDF膜上,使用5%脱脂奶粉封闭1.5 h,分别加入相应一抗:Sirt1(1:500)、Nrf2(1:3000)、NQO1(1:3000)、MMP-3(1:3000)、ADAMTS-5(1:1000),以及内参β-actin抗体(1:3000),4℃孵育过夜。次日TBST洗涤3次,以HRP标记二抗(1:2000),室温孵育45 min,TBST清洗4次,ECL发光液1:1混合,滴加于膜上,化学发光成像系统显影。Image J软件进行灰度值分析,以目的蛋白和内参β-actin灰度值之比为目的蛋白相对表达量。

实时荧光定量PCR法检测家兔软骨组织Sirt1、Nrf2、NQO1 mRNA表达水平:取每组3只家兔约100 mg软骨组织,加入1 mL RNA提取液及氧化锆研磨珠,匀浆后于4℃、12 000×g离心10 min。上清经氯仿替代物抽提、异丙醇沉淀及75%乙醇洗涤后,用15 μL无RNase水溶解RNA。检测RNA浓度与纯度,合格样品稀释至200 ng/μL。取1 μg总RNA,使用试剂盒进行反转录(20 μL体系:25℃5 min,42℃30 min,85℃5 s)。PCR采用15 μL反应体系,包含2×Universal Blue SYBR Green qPCR

Master Mix 7.5 μL、2.5 μmol/L引物混合液1.5 μL、cDNA模板2 μL。PCR扩增条件:95℃30 s预变性;40个循环(95℃15 s,60℃30 s);最后进行熔解曲线分析(65℃至95℃)。以β-actin为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量。引物由武汉赛维尔生物科技有限公司合成。引物序列见表2。

表2 引物序列
Table 2 Primer sequences

基因	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
Sirt1	上游 AAGGTCCGAGATGTAGGATGTG	285
	下游 GCTTGGTACTCTGATACATTCCTCT	
Nrf2	上游 AAAGTCCCATCAACTGCCCTCTA	174
	下游 CCAGCTCATACTCCTTCTGTGCGC	
NQO1	上游 CAGGAAGGACATCACAGGCAA	151
	下游 CTTCTGAAATATCACCAGGTCTGC	
β-actin	上游 CGCAGAAACGAGACGAGATTG	146
	下游 GATGCTCGCTCCAACGACTG	

注:Sirt1为沉默信息调节因子1,Nrf2为核转录因子E2相关因子2,NQO1为NADPH醌氧化还原酶-1。

1.6 统计学处理

所有实验数据采用GraphPad Prism8.0和SPSS26.0软件进行分析。计量资料经检验符合正态分布且方差齐,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较用单因素方差分析,进一步两两比较用LSD检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 各组家兔Lequesne MG、PROM评分比较

造模后,与正常组比较,其余3组Lequesne MG评分升高($P < 0.01$),且评分均大于6;PROM评分降低($P < 0.01$)。干预后,与正常组比较,模型组Lequesne MG评分升高($P < 0.01$),PROM评分降低($P < 0.01$)。与模型组比较,针刀组和针刀+抑制剂组Lequesne MG评分降低($P < 0.01$),PROM评分升高($P < 0.01$)。与针刀+抑制剂组比较,针刀组Lequesne MG评分降低($P < 0.01$),PROM评分升高($P < 0.01$)。见图1。

2.2 各组家兔软骨组织的病理形态比较

HE染色结果显示,正常组家兔软骨组织表面光滑,软骨细胞数量丰富,排列规则,结构清晰,软骨细胞的细胞核、细胞质均清晰可见。模型组可见较大范围血管翳(黄色箭头),软骨细胞的数量减

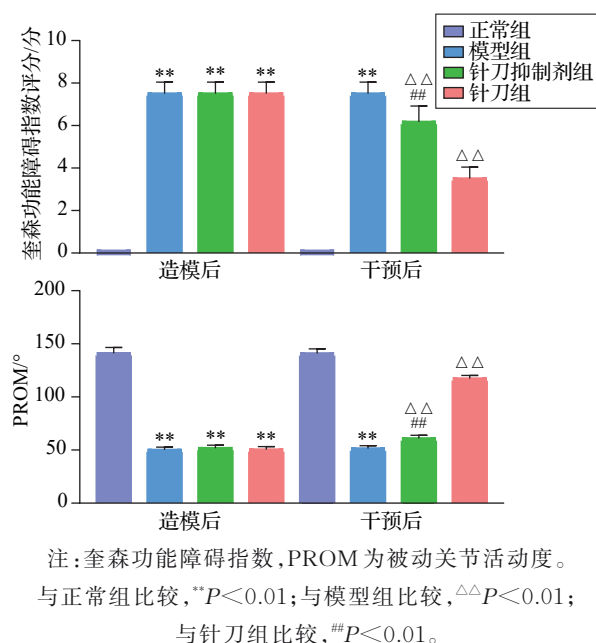


图1 各组家兔 Lequesne MG 评分及 PROM 评分的比较
($\bar{x}\pm s$, 6只兔/组)

Fig. 1 Comparison of Lequesne MG and passive range of motion scores of the knee joint in rabbits of the 4 groups
($\bar{x}\pm s$, 6 rabbits/group)

少,排列紊乱、伴少量软骨细胞体积增大(棕色箭头),软骨表层可见游离组织碎片脱落(黑色箭头)。与模型组相比,针刀组明显改善,软骨细胞数量增多,软骨细胞核、细胞质结构清晰,仅局部可见少量形状不规则的裂隙(绿色箭头)。与针刀组比较,针刀+抑制剂组受损现象加重。见图2。

番红固绿染色下,软骨呈红色,成骨呈绿色,与正常组相比,模型组软骨细胞数量减少,出现小灶性骨组织结构破坏(黑色箭头),蛋白多糖丢失;针刀组局灶性软骨组织表面破坏无明显缺损,蛋白多糖增多,骨组织呈正常海绵状结构,未见其他明显病理改变。与针刀组比较,针刀+抑制剂组上述

受损现象加重。见图2。

2.3 各组家兔关节液炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 含量比较

与正常组比较,模型组家兔关节液炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 含量升高($P<0.01$)。与模型组比较,针刀组关节液 IL-1 β 、TNF- α 含量降低($P<0.01$),针刀+抑制剂组 TNF- α 含量降低($P<0.05$),IL-1 β 含量虽有所降低但差异无统计学意义。与针刀+抑制剂组比较,针刀组关节液 IL-1 β 、TNF- α 含量降低($P<0.01$)。见图3。

2.4 各组家兔软骨组织 SOD、GSH-Px、T-AOC 活力及 MDA 含量比较

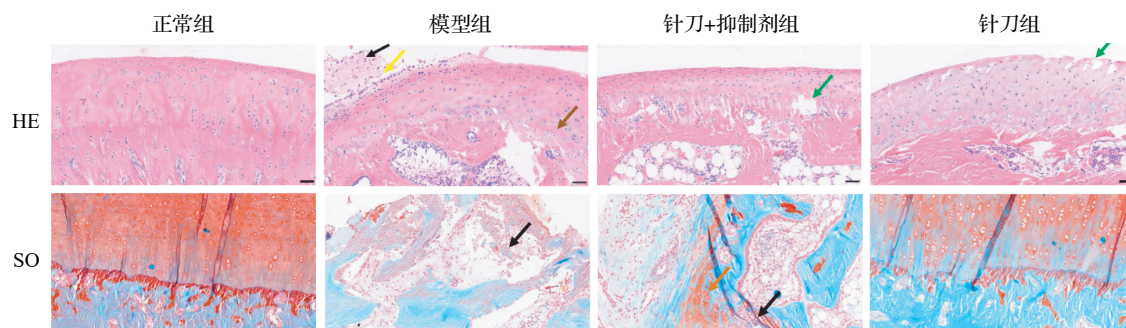
与正常组比较,模型组家兔软骨中 SOD、GSH-Px 和 T-AOC 活力降低($P<0.01$),而 MDA 含量升高($P<0.01$)。与模型组比较,针刀组 SOD、T-AOC 和 GSH-Px 活力升高($P<0.01$),MDA 含量降低($P<0.01$),针刀+抑制剂组 MDA 含量降低($P<0.01$),其余差异无统计学意义。但与针刀组比较,针刀+抑制剂组 SOD、GSH-Px、T-AOC 活力降低($P<0.01$),MDA 含量升高($P<0.01$)。见图4。

2.5 各组家兔软骨组织 ROS 表达水平比较

与正常组比较,模型组家兔软骨组织中 ROS 表达水平升高($P<0.01$);与模型组比较,针刀组 ROS 水平降低($P<0.01$);针刀+抑制剂组中 ROS 水平低于模型组($P<0.05$),但高于针刀组($P<0.01$)。见图5。

2.6 各组家兔软骨组织中 Sirt1、Nrf2、NQO1、MMP-3、ADAMTS-5 蛋白表达水平比较

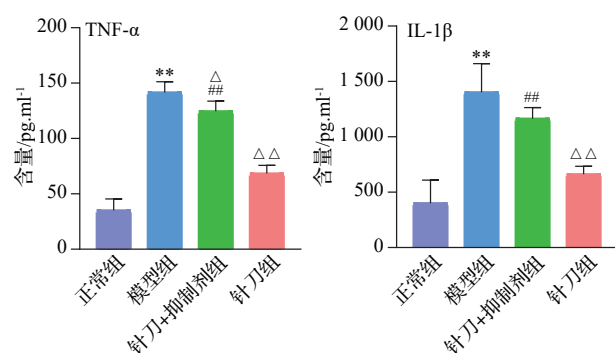
与正常组比较,模型组家兔软骨组织 Sirt1 蛋白表达水平降低($P<0.01$),Nrf2、MMP-3、ADAMTS-5 蛋白表达水平升高($P<0.05$, $P<0.01$),NQO1 蛋白表达水平有所升高,但差异无统计学意义。与模型组比较,针刀组 Sirt1、Nrf2、



注: HE 为苏木精-伊红染色, 标尺=50 μm ; SO 为番红-固绿染色, 标尺=50 μm 。

图2 各组家兔软骨组织的病理形态比较

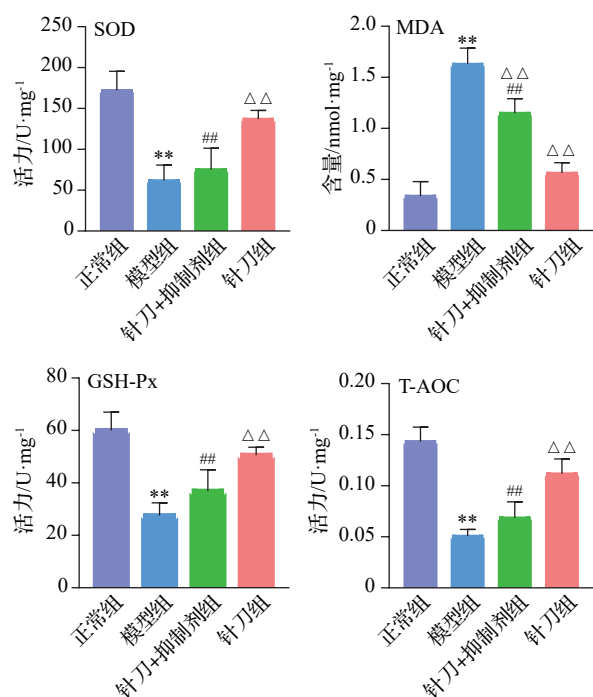
Fig. 2 Comparison of pathological morphology of cartilage tissue of rabbits in the 4 groups



注:TNF- α 为肿瘤坏死因子- α ,IL-1 β 为白细胞介素-1 β 。与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;与针刀组比较,## $P<0.01$ 。

图3 各组家兔关节液炎症因子TNF- α 、IL-1 β 含量比较 ($\bar{x}\pm s$,6只兔/组)

Fig. 3 Comparison of TNF- α and IL-1 β levels in synovial fluid of rabbits in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 rabbits/group)

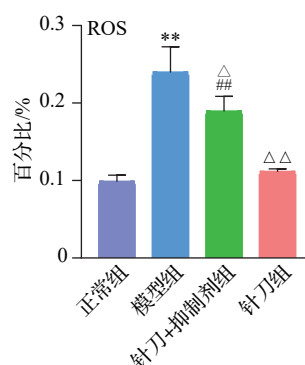
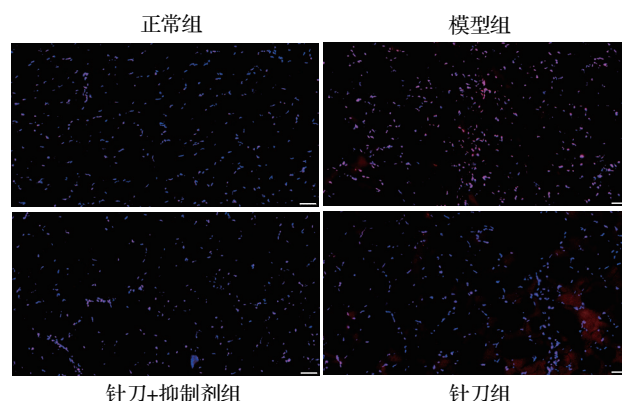


注:SOD为超氧化物歧化酶,MDA为丙二醛,GSH-Px为谷胱甘肽过氧化物酶,T-AOC为总抗氧化能力。与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,△△ $P<0.01$;与针刀组比较,## $P<0.01$ 。

图4 各组家兔软骨SOD、GSH-Px、T-AOC活力及MDA含量比较 ($\bar{x}\pm s$,6只兔/组)

Fig. 4 Comparison of SOD, GSH-Px, T-AOC activity and MDA contents in the cartilage tissue of rabbits in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 rabbits/group)

NQO1蛋白表达水平升高($P<0.01$),MMP-3、ADAMTS-5表达水平降低($P<0.01$),而针刀+抑制剂组差异无统计学意义。与针刀+抑制剂组比较,针刀组Sirt1、Nrf2、NQO1蛋白表达水平升高



注:ROS为活性氧。标尺=50 μm 。与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;与针刀组比较,## $P<0.01$ 。

图5 各组家兔软骨组织ROS表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$,3只兔/组)

Fig. 5 Comparison of ROS expression levels in the cartilage tissue of rabbits in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 3 rabbits/group)

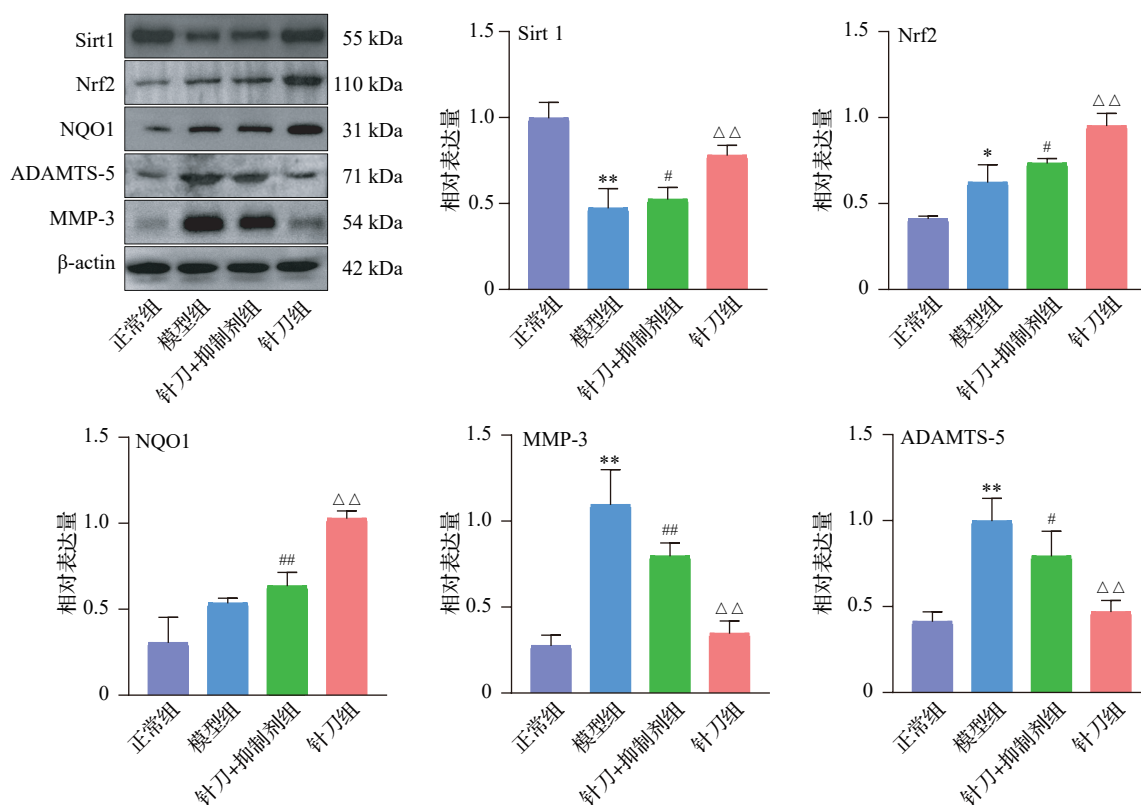
($P<0.05$, $P<0.01$),ADAMTS-5、MMP-3蛋白表达水平降低($P<0.01$, $P<0.05$)。见图6。

2.7 各组家兔软骨组织中Sirt1、Nrf2、NQO1 mRNA表达水平比较

与正常组比较,模型组家兔软骨组织中Sirt1 mRNA表达水平降低($P<0.01$),Nrf2 mRNA升高($P<0.01$),NQO1 mRNA表达水平有所升高,但差异无统计学意义。与模型组比较,针刀组和针刀+抑制剂组Sirt1、Nrf2、NQO1 mRNA表达水平升高($P<0.01$)。与针刀+抑制剂组比较,针刀组Sirt1、Nrf2、NQO1 mRNA表达水平升高($P<0.01$)。见图7。

3 讨论

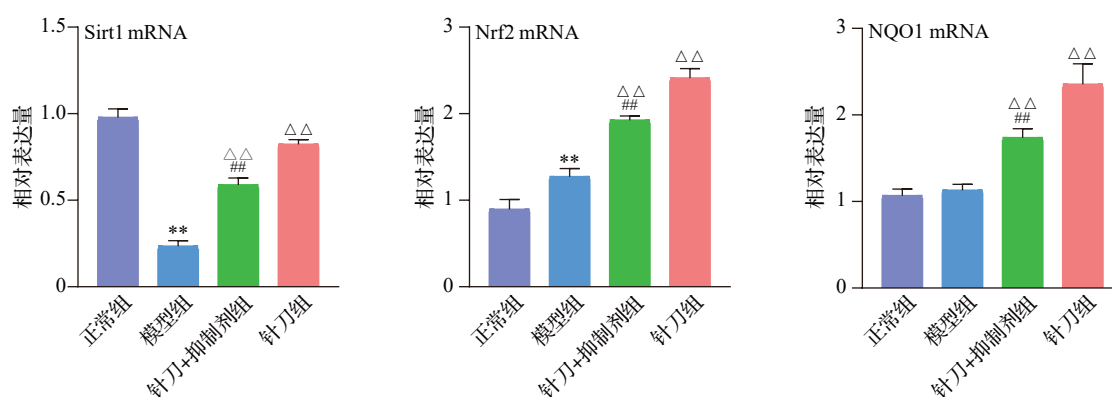
KOA作为一种软骨退行性病变,其发生发展与生物力学失衡密切相关。中医学将其归为“骨痹”“筋痹”范畴,其病机本质为“筋先病,骨后损”的筋系疾病。《类经·卷十七》言:“筋急则拘挛,筋缓则弛纵”,阐明筋病所致关节活动异常的核心病机。清·



注: Sirt1为沉默信息调节因子1, Nrf2为核转录因子E2相关因子2, NQO1为NADPH醌氧化还原酶-1, MMP-3为基质金属蛋白酶3, ADAMTS-5为含血小板反应蛋白基序的去整合素金属蛋白酶5。与正常组比较, $P < 0.05$, $**P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与针刀组比较, $P < 0.05$, $^{\#}P < 0.01$ 。

图6 各组家兔软骨组织中Sirt1、Nrf2、NQO1、MMP-3、ADAMTS-5蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$, 3只兔/组)

Fig.6 Comparison of protein expression levels of Sirt1, Nrf2, NQO1, MMP-3, and ADAMTS-5 in the cartilage tissue of rabbits in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 3 rabbits/group)



注: 与正常组比较, $**P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与针刀组比较, $^{\#}P < 0.01$ 。

图7 各组家兔软骨组织中Sirt1、Nrf2、NQO1 mRNA相对表达量比较($\bar{x} \pm s$, 3只兔/组)

Fig.7 Comparison of the relative mRNA expression of Sirt1, Nrf2, and NQO1 in the cartilage tissue of rabbits in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 3 rabbits/group)

沈金鳌《杂病源流犀烛》进一步指出“筋之屈伸,全赖气血滋养,气血亏则筋失所养而病……筋病则骨亦随病”,明确揭示了“筋病传骨”的先后传变关系。

经筋结于膝,形态或功能改变可破坏力线传导,引发筋痹^[19]。长期机械劳损可导致软组织出现

结节、粘连或条索状物等“筋结”^[20],与现代医学“肌筋膜激痛点”在病理上高度吻合^[21],均表现为局部应力集中、气血不通或能量缺氧状态。针刀以“松筋解结、通络调衡”为核心^[22],从生物力学角度看,膝关节退变常伴下肢力线内移,导致内侧副韧带张力增

高,而外侧副韧带稳定性降低;与此同时,髌内外侧支持带、髌韧带等维持髌骨稳定的软组织,也会因关节间隙狭窄及力线异常而形成应力集中点,出现条索、结节等经筋结聚表现。针对上述筋结点进行针刀松解,可有效释放局部应力,改善组织缺氧,恢复力学平衡,实现“松筋解结、筋骨平衡”之效,且已被临床证实可快速缓解膝痛并改善功能^[23]。

余文英等^[24]系统梳理了针刀治疗KOA的机制研究,发现针刀可通过调控软骨稳态、恢复骨骼肌功能、减缓滑膜炎性反应、重塑软骨下骨及神经调控等多途径协同干预KOA病理进程。但该研究同时指出,现有研究主要局限于单一组织表型观察,缺乏多组织协同作用及分子上下游机制的深入探讨,尤其缺乏从氧化应激调控角度阐释针刀软骨保护作用的系统研究。本研究正是基于此,从Sirt1/Nrf2/NQO1信号轴角度探讨针刀防治KOA的分子机制。本研究采用改良Videman伸直位固定法建立家兔KOA模型,造模后家兔Lequesne MG指数升高、PROM降低,提示关节退变与功能障碍并存。病理结果显示软骨结构破坏,软骨细胞减少、软骨面粗糙及蛋白多糖大量丢失等病理学损伤,表明KOA家兔软骨损伤;针刀干预4周后,Lequesne MG评分显著降低、PROM评分显著升高,软骨病理损伤明显改善,表明针刀可有效延缓KOA进展,改善关节功能。

关节软骨是关节负重与运动的核心结构,主要由软骨细胞与细胞外基质(ECM)构成。其损伤始于氧化应激失衡^[25],当ROS产量超过SOD、GSH-Px等内源性抗氧化系统的清除能力时,过量ROS一方面直接升高脂质过氧化终产物MDA含量,另一方面下调SOD、GSH-Px、T-AOC活力,并激活基质金属蛋白酶MMP-3、ADAMTS-5高表达加速ECM降解,同时释放IL-1 β 、TNF- α 加剧炎症反应,从而形成氧化-炎症反应-降解的恶性循环^[26-28]。KOA患者内侧软骨ROS活性显著增高^[29],而软骨因缺乏血管分布,修复能力有限,对氧化应激尤为敏感^[30]。SOD将O₂歧化为H₂O₂与O₂,GSH-Px进一步把H₂O₂还原为H₂O,从而有效减轻氧化应激损伤^[31]。总抗氧化能力T-AOC作为机体抗氧化储备的综合指标,其降低预示机体遭受氧化损伤的风险增加,当抗氧化防御系统减弱时,氧化应激反应增强^[32]。ROS攻击细胞膜多不饱和脂肪酸,触发链式脂质过氧化反应,MDA作为此过程的关键终产物,其水平升高可定量反映氧化应激强度并与软骨退

变程度呈正相关^[33]。本研究结果显示,针刀可显著上调SOD、GSH-Px及T-AOC的活力,降低MDA、炎症因子IL-1 β 、TNF- α 含量与ROS水平,其效应与张茜、齐昕等^[15,34]报道的针刀可通过抑制氧化应激治疗KOA结果一致,但本研究进一步揭示该效应源的上下游信号机制,而非单纯清除自由基或抑制脂质过氧化。

Sirt1作为NAD⁺依赖的去乙酰化酶,广泛分布于人和兔等膝关节软骨细胞的胞核与胞质,其去乙酰化活性可调控下游靶点并参与氧化应激稳态^[35-36]。Nrf2是细胞应对氧化还原失衡的关键介质,调控多种抗氧化和解毒酶的表达。生理状态下,Sirt1通过去乙酰化激活Nrf2的K588位点促进其核转位,启动抗氧化酶和解毒酶的NQO1、HO-1及SOD的转录,以清除ROS,维持细胞氧化还原平衡^[37]。已有研究证实,激活Sirt1可增强Nrf2核积累,从而协同抵抗氧化和炎症损伤^[38]。近年来,Sirt1通路在抗氧化中的作用备受关注,如热补针法^[39]能够通过调控Sirt1/FoxO1通路,减轻风湿炎性氧化应激损伤。然而,关于针刀能否靶向Sirt1/Nrf2尚无证据。本研究中,正常组中,Sirt1的蛋白及mRNA表达水平较高,Nrf2、NQO1较低,而KOA家兔模型组Sirt1蛋白及mRNA表达水平下调,Nrf2、NQO1的表达高于正常组。考虑正常状态时,Nrf2与抑制蛋白Keap1结合于胞质中,处于非活性状态。氧化应激导致Sirt1显著下调,通过氧化Keap1诱导Nrf2解离入核,启动NQO1转录,故Nrf2、NQO1高于正常组。Nrf2缺乏去乙酰化修饰,其转录活性处于低效状态,仅驱动NQO1呈轻度升高趋势。而针刀干预后,Sirt1、Nrf2、NQO1均显著上调,考虑可能为针刀改善微环境,上调Sirt1,升高的Sirt1通过去乙酰化Nrf2从Keap1上解离。解离后的Nrf2稳定性增加,转位进入细胞核,与ARE序列结合,启动下游的NQO1实现上调。以上提示针刀治疗可通过激活Sirt1增强Nrf2转录活性,使得下游的抗氧化酶NQO1被激活,增强了细胞的抗氧化能力。

为明确Sirt1/Nrf2/NQO1通路在针刀效应中的必要性,本研究进一步采用EX-527特异性抑制Sirt1活性。结果显示,针刀介导的抗氧化、抗炎及软骨保护效应均被部分逆转,具体表现为MDA含量与ROS水平回升,SOD、T-AOC和GSH-Px活力降低,同时IL-1 β 、TNF- α 含量,MMP-3、ADAMTS-5蛋白表达再度升高。这一结果与李巧等^[40]在慢性

心力衰竭研究中观察到的 Sirt1 抑制效应一致。表明 Sirt1 是针刀发挥多效性保护作用的关键节点之一,但需指出 EX-527 同时抑制 Sirt1 对其他底物的调控,因此,针刀是否通过多靶点网络协同起效,尚需 Sirt1 软骨特异性敲除模型进一步验证。

综上所述,针刀可通过松解肌腱-筋膜高应力点,改善关节应力分布,同时激活 Sirt1/Nrf2/NQO1 信号轴,提升软骨内源性抗氧化能力,减轻炎症反应、抑制 ECM 降解,进而缓解软骨氧化应激损伤,延缓 KOA 进展。然而,本研究仍存在一些局限,首先,NQO1 催化 NADH 氧化生成 NAD⁺^[41],可能通过补充 Sirt1 辅酶形成正反馈放大效应,本研究未深入探讨;其次,EX-527 为全身性 Sirt1 抑制剂,未能完全排除外周组织 Sirt1 抑制对关节局部的间接影响。未来拟采用 Sirt1 软骨特异性敲除动物模型,结合单细胞测序技术解析针刀对软骨不同亚群细胞的差异化调控机制,为针刀个体化治疗提供精准依据。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] Zhu S Y, Qu W C, He C Q. Evaluation and management of knee osteoarthritis[J]. J Evidence Based Medicine, 2024, 17(3): 675-687.
- [2] Prieto-Alhambra D, Judge A, Javaid M K, et al. Incidence and risk factors for clinically diagnosed knee, hip and hand osteoarthritis: influences of age, gender and osteoarthritis affecting other joints[J]. Ann Rheumatic Dis, 2014, 73(9): 1659-1664.
- [3] Giorgino R, Albano D, Fusco S, et al. Knee osteoarthritis: epidemiology, pathogenesis, and mesenchymal stem cells: what else is new? an update[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(7): 6405.
- [4] Cross M, Smith E, Hoy D, et al. The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the Global Burden of Disease 2010 study[J]. Ann Rheumatic Dis, 2014, 73(7): 1323-1330.
- [5] Tao Y L, Fan J B. Oxidative stress and chondrocytes in osteoarthritis: advances in mechanisms of action and therapeutic strategies[J]. China Journal of Orthopaedics and Traumatology, 2025, 38(4): 434-440.
- [6] Lepetos P, Papavassiliou A G. ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1862(4): 576-591.
- [7] Liu L, Luo P, Yang M, et al. The role of oxidative stress in the development of knee osteoarthritis: a comprehensive research review[J]. Front Mol Biosci, 2022, 9: 1001212.
- [8] Zhang Y, Kong F, Li N, et al. Potential role of SIRT1 in cell ferroptosis[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2025, 13(13): 1525294.
- [9] Khan N M, Ahmad I, Haqqi M T, et al. Nrf2/ARE pathway attenuates oxidative and apoptotic response in human osteoarthritis chondrocytes by activating ERK1/2/ELK1-P70S6K-P90RSK signaling axis[J]. Free Radic Biol Med, 2018, 116: 159-171.
- [10] Gureev A P, Krutskikh E P. Regulation of the NRF2 transcription factor activity by SIRT1-induced deacetylation: a possible SIRT1 - NRF2 feedback loop[J]. Russ J Genet, 2025, 61(2): 133-139.
- [11] Riegger J, Schoppa A, Ruths L, et al. Oxidative stress as a key modulator of cell fate decision in osteoarthritis and osteoporosis: a narrative review[J]. Cell Mol Biol Lett, 2023, 28(1): 76.
- [12] Jang S, Lee K, Ju J H. Recent updates of diagnosis, pathophysiology, and treatment on osteoarthritis of the knee[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(5): 2619.
- [13] 刘晶, 曾维铨, 林巧璇, 等. 基于自噬及凋亡调控探讨针刀对膝关节骨关节炎软骨的保护作用[J]. 针刺研究, 2022, 47(12): 1080-1087.
- [14] Liu J, Zeng W Q, Lin Q X, et al. Acupotomy relieves pain and improves motor function by regulating autophagy and apoptosis of cartilage in rabbits with knee osteoarthritis apoptosis (in Chinese)[J]. Acupuncture Research, 2022, 47(12): 1080-1087.
- [15] 唐占英, 肖静, 李唯薇, 等. 针刀松解联合 Mulligan 手法治疗中期膝关节骨关节炎临床观察[J]. 世界中医药, 2024, 19(1): 47-51.
- [16] Tang Z Y, Xiao J, Li W W, et al. Clinical observation of the treatment of intermediate stage knee osteoarthritis with acupotomy combined with mulligan manipulation (in Chinese)[J]. World Chinese Medicine, 2024, 19(1): 47-51.
- [17] 齐昕, 陈幼楠, 马芸瑄, 等. 针刀对膝关节骨关节炎软骨细胞脂质过氧化的影响[J]. 针刺研究, 2025, 50(4): 402-410.
- [18] Qi X, Chen Y N, Ma Y X, et al. Effect of acupotomy on lipid peroxidation of chondrocytes in rabbits with knee osteoarthritis (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2025, 50(4): 402-410.
- [19] 刘晶, 林巧璇, 卢莉铭, 等. 改良 Videman 法复制兔膝关节骨关节炎的实验研究[J]. 康复学报, 2020, 30(3): 212-219.
- [20] 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.
- [21] 胡馨月, 罗亚, 祖芳, 等. 电针“丰隆”“足三里”对非酒精性脂肪肝大鼠 SIRT1/FOXO1 信号通路的影响[J]. 针刺研究, 2025, 50(2): 150-158.
- [22] Hu X Y, Luo Y, Zu F, et al. Effects of electroacupuncture at “Fenglong” (ST40) and “Zusanli” (ST36) on the SIRT1/FOXO1 signaling pathway in rats with non-alcoholic fatty liver disease [J]. Acupuncture Research, 2025, 50(2): 150-158.
- [23] 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]. Osteoarthritis Cartil, 2010, 18: S17-S23.
- [24] 刘晶. 基于经筋理论膝骨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.
- [25] Liu J. 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.
- [26] 许云腾. 基于经筋与筋膜理论探讨膝骨关节炎的辨治策略

- [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(7): : 3293-3296..
- Xu Y T. Discussion on differentiation and treatment of knee osteoarthritis based on meridian tendon and myofascial theory (in Chinese) [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2020, 35(7): : 3293-3296..
- [21] 谢妮娜, 罗书跃. 小针刀合关节腔注射治疗早中期膝骨关节炎40例临床观察[J]. 湖南中医杂志, 2021, 37(1): 73-75.
- Xie N N, Luo S Y. Clinical observation on the treatment of 40 cases of knee osteoarthritis in early and middle stage with small needle knife and joint cavity injection (in Chinese) [J]. Hunan Journal of Traditional Chinese Medicine, 2021, 37(1): 73-75.
- [22] 孟德鸿, 卢曼, 尚祥, 等. 基于经筋理论下的解筋正骨法针刀对膝骨关节炎患者膝关节功能的影响[J]. 中华中医药杂志, 2024, 39(11): 6275-6280.
- Meng D H, Lu M, Shang X, et al. Effects of acupotomy for relieving tendon and setting bone based on meridian tendon theory on knee joint function in patients with knee osteoarthritis (in Chinese) [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2024, 39(11): 6275-6280.
- [23] 陈平, 陈磊, 王海东, 等. 针刀疏筋解结术对Ca²⁺/NFATc1信号通路骨代谢影响[J]. 中国矫形外科杂志, 2025, 33(11): 997-1002, 1008.
- Chen P, Chen L, Wang H D, et al. Research progress of the effect of acupotomy on bone metabolisms based on Ca²⁺/NFATc1 signaling pathway in osteoarthritis (in Chinese) [J]. Orthopedic Journal of China, 2025, 33(11): 997-1002, 1008.
- [24] 余文英, 刘晶, 刘洪, 等. 针刀干预膝关节骨关节炎的效应机制研究进展[J]. 中国针灸, 2025, 45(6): 867-874.
- Yu W Y, Liu J, Liu H, et al. Research progress of effect mechanism of acupotomy for knee osteoarthritis (in Chinese) [J]. Chinese Acupuncture & Moxibustion, 2025, 45(6): 867-874.
- [25] 柯桂芝, 黄煜, 富丽萍, 等. 基质-软骨细胞的相互作用关系在骨关节炎中的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2025, 41(10): 1590-1596.
- Ke G Z, Huang Y, Fu L P, et al. Research progress on matrix-chondrocyte interactions in osteoarthritis (in Chinese) [J]. The Journal of Practical Medicine, 2025, 41(10): 1590-1596.
- [26] Averill-Bates D. Reactive oxygen species and cell signaling. Review [J]. Biochim Biophys Acta BBA Mol Cell Res, 2024, 1871(2): 119573.
- [27] Zhou Q, Wang W, Wu J, et al. Ubiquitin-specific protease 3 attenuates interleukin-1 β -mediated chondrocyte senescence by deacetylating forkhead box O-3 via sirtuin-3 [J]. Bioengineered, 2022, 13(2): 2017-2027.
- [28] Ostalowska A, Birkner E, Wiecha M, et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in synovial fluid of patients with primary and secondary osteoarthritis of the knee joint [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2006, 14(2): 139-145.
- [29] Bouviere J, Fortunato R S, Dupuy C, et al. Exercise-stimulated ROS sensitive signaling pathways in skeletal muscle [J]. Antioxidants (Basel), 2021, 10(4): 537.
- [30] Drevet S, Gavazzi G, Grange L, et al. Reactive oxygen species and NADPH oxidase 4 involvement in osteoarthritis [J]. Exp Gerontol, 2018, 111: 107-117.
- [31] Jomova K, Alomar S Y, Alwasel S H, et al. Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants [J]. Arch Toxicol, 2024, 98(5): 1323-1367.
- [32] 龙云霞. 血清中8-OHdG、MDA、SOD和T-AOC对脑卒中患者的诊断价值[J]. 中华卫生应急电子杂志, 2020, 6(4): 233-238.
- Long Y X. Diagnostic value of serum 8-OHdG, MDA, SOD and T-AOC in patients with stroke (in Chinese) [J]. Chinese Journal Hygiene Rescue, 2020, 6(4): 233-238.
- [33] Cordiano R, Di Gioacchino M, Mangifesta R, et al. Malondialdehyde as a potential oxidative stress marker for allergy-oriented diseases: an update [J]. Molecules, 2023, 28(16): 5979.
- [34] 张茜, 张典, 许悦, 等. 针刀对膝骨关节炎兔软骨细胞氧化应激的影响[J]. 中国中医急症, 2022, 31(10): 1708-1712.
- Zhang Q, Zhang D, Xu Y, et al. Effect of acupotomy on oxidative stress of chondrocytes in KOA rabbit (in Chinese) [J]. Journal of Emergency in Traditional Chinese Medicine, 2022, 31(10): 1708-1712.
- [35] Yang Y S, Liu Y, Wang Y W, et al. Regulation of SIRT1 and its roles in inflammation [J]. Front Immunol, 2022, 13: 831168.
- [36] Singh V, Ubaid S. Role of silent information regulator 1 (SIRT1) in regulating oxidative stress and inflammation [J]. Inflammation, 2020, 43(5): 1589-1598.
- [37] Zhao M C, Qiu D, Miao X, et al. Melatonin delays arthritis inflammation and reduces cartilage matrix degradation through the SIRT1-mediated NF- κ B/Nrf2/TGF- β /BMPs pathway [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(11): 6202.
- [38] Liu Y, Wang Y, Cheng S, et al. Pantothenic acid alleviates osteoarthritis progression by inhibiting inflammatory response and ferroptosis through the SIRT1/Nrf2 signaling pathway [J]. Chem Biol Interact, 2025, 391: 111494.
- [39] 吴永吉, 张宏涛, 张星华, 等. 热补针法调控Sirt1/FoxO1通路对类风湿性关节炎寒证大鼠氧化应激损伤的影响[J]. 针刺研究, 2025, 50(7): 808-814.
- Wu Y J, Zhang H T, Zhang X H, et al. Heat-reinforcing needling inhibits oxidative stress injury via modulating the Sirt1/FoxO1 pathway in rheumatoid arthritis rats with cold syndrome (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2025, 50(7): 808-814.
- [40] 李巧, 褚庆民, 叶桃春, 等. 心阴片激活SIRT1抑制内皮间质转化改善慢性心力衰竭大鼠心肌纤维化的作用及机制[J]. 中药新药与临床药理, 2026, 37(2): 199-207.
- Li Q, Chu Q M, Ye T C, et al. Effect and mechanism of Xinyin Tablets in ameliorating myocardial fibrosis in rats with chronic heart failure by activating SIRT1 to inhibit endothelial-mesenchymal transition (in Chinese) [J]. Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology, 2026, 37(2): 199-207.
- [41] Tsvetkov P, Adler J, Strobel R, et al. NQO1 binds and supports SIRT1 function [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 671929.

收稿日期:2025-11-25 修回日期:2026-03-14