

# 刮痧对膝关节骨关节炎大鼠软骨细胞凋亡及自噬的影响

颜雪华<sup>1</sup>, 朱浩<sup>1</sup>, 陈帅<sup>1</sup>, 张改月<sup>1</sup>, 张豪斌<sup>2</sup>, 杨金生<sup>3</sup>, 王莹莹<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>陕西中医药大学针灸推拿学院, 陕西咸阳 712046; <sup>2</sup>陕西中医药大学第二附属医院, 陕西咸阳 712000; <sup>3</sup>中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700; <sup>4</sup>中国中医科学院针灸研究所, 北京 100700)

**【摘要】** 目的:观察刮痧对膝关节骨关节炎(KOA)大鼠膝关节软骨组织炎症因子、细胞凋亡及自噬的影响,探讨刮痧治疗KOA的作用机制。方法:SD大鼠随机分为空白组、模型组和刮痧组,每组17只。采用右膝关节腔内注射谷氨酸钠碘乙酸复制KOA大鼠模型。刮痧组选择右侧“阳陵泉”“血海”进行刮痧治疗,频率为1次/s,按压力度在0.3~0.5 kgf,隔日干预1次,连续干预7次。记录各组大鼠右膝关节周径变化;HE染色法观察大鼠右膝关节软骨病理形态变化;ELISA法检测大鼠右膝关节软骨组织中白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 及肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 含量;荧光定量PCR法和Western blot法分别检测大鼠膝关节软骨组织中自噬性关键小分子酵母Atg6的同素系物(Beclin-1)、微管相关结合蛋白1轻链蛋白酶复合物3 II/I型(LC3 II/LC3 I)、泛素相关结合蛋白62(P62)、半胱天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)mRNA和蛋白的表达水平;TUNEL染色观察大鼠膝关节软骨细胞的凋亡情况;免疫荧光法检测大鼠右膝关节软骨中LC3的表达水平。结果:造模后,与空白组比较,模型组右侧膝关节周径明显增大( $P<0.01$ );软骨层有明显的紊乱和缺损,软骨细胞大量坏死,有纤维增生及大量骨小梁破坏;软骨组织细胞凋亡率、IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 含量及Caspase-3、P62 mRNA和蛋白表达水平均升高( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ),Beclin-1、LC3 mRNA和蛋白表达水平和LC3平均荧光强度降低( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ )。治疗后,与模型组比较,刮痧组右侧膝关节周径缩小( $P<0.05$ );软骨层排列趋于正常,炎症细胞浸润程度较低;软骨组织细胞凋亡率、IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 含量降低( $P<0.05$ ),Caspase-3、P62 mRNA和蛋白表达水平降低( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ),Beclin-1、LC3 mRNA和蛋白表达水平及LC3平均荧光强度升高( $P<0.05$ )。结论:刮痧能够改善KOA大鼠关节软骨损伤,抑制炎症因子过量释放,减少软骨细胞凋亡率。这可能与上调Beclin-1、LC3的表达,降低P62、Caspase-3的表达,促进KOA大鼠软骨细胞自噬有关。**【关键词】** 刮痧;膝关节骨关节炎;自噬;细胞凋亡

## Guasha improves knee osteoarthritis by inhibiting chondrocyte apoptosis and regulating expression of autophagy-related genes and proteins in rats

YAN Xue-hua<sup>1</sup>, ZHU Hao<sup>1</sup>, CHEN Shuai<sup>1</sup>, ZHANG Gai-yue<sup>1</sup>, ZHANG Hao-bin<sup>2</sup>, YANG Jin-sheng<sup>3</sup>, WANG Ying-ying<sup>4</sup>  
(<sup>1</sup>School of Acupuncture-moxibustion and Tuina, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, Shaanxi Province, China; <sup>2</sup>The Second Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, Shaanxi Province; <sup>3</sup>Institute of Basic Theory for Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700; <sup>4</sup>Institute of Acupuncture and Moxibustion, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700)

**【ABSTRACT】 Objective** To observe the effect of Guasha on inflammation factors, apoptosis and autophagy in the cartilage tissue of knee joint in rats with knee osteoarthritis (KOA), so as to explore its mechanisms underlying improvement of KOA. **Methods** A total of 51 male SD rats were randomized into three groups: blank control, KOA model and Guasha ( $n=17$  in each group). The rats in the blank control group received intra-articular injection of 0.9%

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20230493

引用格式:颜雪华,朱浩,陈帅,等.刮痧对膝关节骨关节炎大鼠软骨细胞凋亡及自噬的影响[J].针刺研究,2024,49(3):247-255.

项目来源:国家自然科学基金项目(No.82074563);2022年国家中医药管理局青年岐黄学者培养项目

共同通信作者:王莹莹,E-mail:yyw261206@126.com

杨金生,E-mail:zml@ibucm.com

NaCl solution in the right knee joint. The KOA model was established by intraarticular injection of glutamate sodium iodo-acetic acid in the right knee joint. For rats of the Guasha group, Guasha (at a frequency of 1 time/s, and an applied pressure of 0.3—0.5 kgf) was applied to “Yanglingquan” (GB34) and “Xuehai” (SP10) areas of the right leg, once every other day, for 7 consecutive sessions. The circumference of the right knee was measured, The histopathological changes of right knee cartilage were observed after H.E. staining. The contents of inflammatory factors interleukin (IL)-1 $\beta$  and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in the right knee articular cartilage tissue were assayed using ELISA. The expression levels of autophagy-related key molecule Beclin-1 (homologous series of yeast Atg6), light chain protease complication 3 type II/I (LC3II/LC3 I), ubiquitin binding factor 62 (P62) and cysteine aspartate protease-3 (Caspase-3) mRNAs and proteins of the right knee articular cartilage tissue were measured using real-time fluorescent quantitative PCR and Western blot, separately. The apoptosis of chondrocytes was assayed using TUNEL staining, and the immunoreactivity of LC3 determined using immunofluorescence staining. **Results** After modeling, the right knee circumference of the model and Guasha groups was significantly increased compared with the blank control group ( $P<0.01$ ), and after the intervention, the knee circumference of the Guasha group was markedly decreased in comparison with that of the model group ( $P<0.05$ ). Results of H.E. staining showed obvious degeneration and defects in the cartilage tissue, necrosis of a large number of chondrocytes, fibrous hyperplasia, accompanied by inflammatory cell infiltration, osteoclast increase, fibroplasia and bone trabecular destruction in the model group, which was relatively milder in the Guasha group. Compared with the blank control group, the expression of Beclin-1 and LC3 mRNAs and proteins, and LC immunofluorescence intensity in the right knee articular cartilage tissue were significantly down-regulated ( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ), whereas the expression of P62 and Caspase-3 mRNAs and proteins, the apoptosis rate, contents of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in the right knee articular cartilage tissue considerably increased ( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ) in the model group. In contrast to the model group, the Guasha group had an apparent increase in the expression levels of Beclin-1 and LC3 mRNAs and proteins and LC immunofluorescence intensity in the right knee articular cartilage tissue ( $P<0.05$ ), and a pronounced decrease in the expression of P62 and Caspase-3 mRNAs and proteins, the apoptosis rate, and contents of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in the right knee articular cartilage tissue ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion** Guasha stimulation of GB34 and SP10 can improve joint cartilage damage in KOA rats, which may be associated with its functions in inhibiting the excessive release of inflammatory factors and apoptosis, possibly by down-regulating the expression of P62 and Caspase-3 mRNAs and proteins and up-regulating the expression of Beclin-1 and LC3 mRNAs and proteins, and by promoting autophagy of chondrocytes.

**【KEYWORDS】** Guasha; Knee osteoarthritis; Autophagy; Apoptosis

膝关节骨关节炎(KOA)是关节软骨组织发生退行性病变的慢性疾病,关节软骨细胞变性和凋亡是发病的主要原因<sup>[1]</sup>。其发病率和年龄增长呈正相关<sup>[2]</sup>,同时由于解剖结构及生物机制复杂,药效难至病所使得治愈率极低<sup>[3-4]</sup>。针灸治疗KOA已被证明在临床应用中具有确切的疗效,并在基础实验中得到了验证<sup>[5-6]</sup>。课题组前期研究证实刮痧能减少KOA炎性因子,缓解氧化应激,延缓细胞衰老,抑制软骨细胞坏死<sup>[7-8]</sup>。自噬在软骨细胞维持自身稳态中发挥了重要作用<sup>[9]</sup>,自噬的细胞保护功能之一是缓解细胞内的氧化应激,清除受损线粒体<sup>[10]</sup>,从而降低炎性因子的过量产生与释放及减少细胞凋亡<sup>[11]</sup>,因此推测刮痧的作用机制与自噬有关。基于此,本实验通过建立KOA大鼠模型,从分子生物学角度,就刮痧是否能激活软骨细胞自噬的机制进行初步探索,通过观察刮痧对KOA大鼠软骨组织中炎性因子含量及细胞凋亡率,以及自噬相关基因醇

母Atg6的同素系物(Beclin-1)、微管相关结合蛋白1轻链蛋白酶复合物3 II / I型(LC3 II / LC3 I)、泛素相关结合蛋白62(P62)、凋亡蛋白半胱天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)表达的影响,观察刮痧是否能通过激活自噬,下调炎性指数,抑制软骨细胞凋亡,改善软骨形态结构。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

健康雄性SD大鼠51只,体质量(180 $\pm$ 20)g,6周龄,由陕西中医药大学实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(陕)2021-001。实验室温度为(22 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C,湿度为(54 $\pm$ 10)% ,12 h明暗交替环境,自由进食和饮水。适应性喂养1周后,首先按照体质量分层,然后按照随机数字表法将大鼠分为空白组、模型组和刮痧组,每组17只。整个实验过程严格遵守《关于善待实验动物的指导性意见》中的

相关规定。

## 1.2 主要试剂和仪器

谷氨酸钠碘乙酸(MIA, 美国Sigma), 乌拉坦(上海国药), 苏木精染液(武汉塞维尔), 伊红染液(合肥博美), 白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$  ELISA试剂盒(上海茁彩), 反转录试剂盒、SYBR qPCR试剂盒(日本Takara), SQSTM1/P62、Beclin-1、LC3抗体(美国CST), Caspase-3(美国AntiProtech), GAPDH鼠单克隆抗体(西安壮志), TUNEL染色试剂盒、山羊抗兔IgG H&L、山羊抗鼠IgG H&L(美国Abcam)等。

小动物麻醉机(深圳瑞沃德), 酶标仪(美国BioTek), 电热恒温培养箱(上海博迅), 电泳仪、转膜仪、化学发光成像系统、普通反转录PCR仪(美国Bio-Rad), 实时定量PCR仪器(美国Life Technologies), 切片仪、正置成像显微镜系统(德国Leica)。

## 1.3 造模方法

本研究采取课题组前期造模方法<sup>[12]</sup>, 用2%异氟烷通过小动物麻醉机将大鼠俯卧位麻醉, 右膝关节处脱毛剔除, 清洁皮肤, 碘附消毒, 微量注射器针头直接通过右侧内/外“膝眼”插入, 针尖向下坠并出现明显地落空感, 回抽时亦无任何新鲜血迹流出, 说明针尖已经插入关节腔。将50  $\mu$ L浓度为80  $\mu$ g/ $\mu$ L MIA溶液注射入模型组及刮痧组大鼠的右膝关节腔内; 空白组注射等量0.9%氯化钠溶液。注射完毕后立即活动膝关节, 以确保药物能均匀分布于关节腔内, 注射1次即可完成造模, 以HE染色显示膝关节出现关节病理性改变为模型复制成功<sup>[12]</sup>, 造模结束后, 每组取3只大鼠进行验证。

## 1.4 各组干预方法

刮痧组大鼠参考文献<sup>[13]</sup>进行穴位定位, 药物注射后第15天, 将大鼠固定, 暴露右侧后肢, 脱毛揣穴后对右侧“阳陵泉”“血海”穴区进行刮痧治疗。“阳陵泉”位于膝部, 当腓骨头前下方凹陷处; “血海”位于后肢股内侧中间, 髌底内侧端与耻骨连线下1/9处。使用特制的刮痧力度测量仪用平补平泻法在穴位上进行治疗, 移动频率1次/s, 按压力度0.3~0.5 kgf, 刮痧面积1 cm $\times$ 1.2 cm, 刮至大鼠皮肤出现皮下血点、潮红等颜色变化视为出痧, 隔日干预1次, 连续干预7次, 整个操作过程由1人完成。空白组、模型组固定方式和固定时间同刮痧组一致, 不进行其他干预。

## 1.5 观察指标及检测方法

大鼠右膝关节周径测量: 在造模前、造模成功

后、干预结束后对大鼠右膝关节周径进行测量。用尼龙线分别固定在大鼠股骨内侧髁和外侧髁连线处环绕一圈并用红笔标记好其重合线位置, 最后将标记好的线段在卡尺板上测量, 得出大鼠膝关节的周径。

HE染色法观察大鼠右膝关节软骨组织病理形态: 在最后1次膝关节周径测量完成后, 每组随机选取4只大鼠, 取右膝关节软骨组织, 多聚甲醛固定, 脱钙、洗净、脱水、包埋、切片(厚度为4  $\mu$ m), 脱蜡, 苏木精染色、冲洗、盐酸乙醇分化、返蓝、冲洗, 伊红染色, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 封片, 光学显微镜下观察膝关节软骨组织病理形态。

ELISA法检测大鼠右膝关节软骨组织IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 含量: 每组采集4只大鼠右膝关节软骨组织, 根据操作说明书的要求, 设置标准品、样本孔及副孔, 依次向样本孔中加入辣根过氧化物酶抑制剂, 封板, 随即置于37  $^{\circ}$ C烘箱孵育。洗板处理, 每孔加入洗涤液, 加底物, 烘箱下孵育15 min, 加入终止液, 酶标仪于450 nm波长处测定各孔的吸光度值。用标准曲线中的标准样品浓度值与标准样品吸光度值计算得出线性回归方程, 代入样品孔吸光度值, 计算出样本的相应浓度。

实时荧光定量PCR法检测大鼠右膝关节软骨组织内的Beclin-1、LC3、P62、Caspase-3 mRNA表达水平: 每组取6只大鼠新鲜右膝软骨组织约100 mg, 研钵中加入液氮进行充分研磨并干燥处理后, 用RNA定量提取试剂提取总RNA, 紫外分光光度计测算出总RNA中的分离物浓度, 反转录成cDNA, 反应的起始条件为37  $^{\circ}$ C 15 min、85  $^{\circ}$ C 5 s。引物序列见表1, 引物合成由广州市锐博生物科技有限公司提供。反应体系为20  $\mu$ L, 其中cDNA模板2  $\mu$ L、2 $\times$ TB Green Premix Ex Taq 10  $\mu$ L、上下游引物各0.8  $\mu$ L、ROX 0.4  $\mu$ L、实验用无酶灭菌水6  $\mu$ L; 95  $^{\circ}$ C 15 s、60  $^{\circ}$ C 30 s, 共40个循环, 随后进行qPCR反应。以GAPDH作为内参, 采用2 $^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对目标基因的相对表达量进行分析。

Western blot法检测大鼠右膝关节软骨组织Beclin-1、LC3、P62、Caspase-3蛋白表达水平: 取上述每组6只大鼠剩余软骨组织样品约100 mg, 研钵研磨, 收集样本后加入RIPA裂解液和蛋白酶裂解抑制剂, 4  $^{\circ}$ C高速离心, 取上清, BCA蛋白定量后开始制样, 进入电泳, 80 V电压电泳20 min, 随后转至120 V电泳40 min, 220 mA转膜55 min, TBST配置好的5%脱脂奶粉液封闭, 摇床封闭2 h, 加入

表1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

基因	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
Beclin-1	上游 GAATGAGGGCGACAGTGAAC	152
	下游 CCTGGACCTTCTCCAGGTTT	
LC3	上游 GTGTCCACACCCATCTCTGA	103
	下游 AGTCTTACACAGCCAGTGCT	
P62	上游 CGACTGGACGCATTTGTCTT	138
	下游 GTCTAGAGAGCTTGGCCCTT	
Caspase-3	上游 ACTCGTGTTAACCGGAAGGT	112
	下游 CCCACTCCCAGTCATTCCTT	
GAPDH	上游 AAGATGGTGAAGGTCGGTGT	139
	下游 GCTTCCCATTCTCAGCCTTG	

Beclin-1、LC3、P62(均 1:1 000)、Caspase-3(1:800)一抗,4℃过夜,洗膜,孵育二抗(1:10 000)2 h,洗膜,在凝胶成像器中进行曝光显影成像,用 Image J 软件分析蛋白条带,以 GAPDH 为内参,以目的蛋白与内参蛋白条带灰度值的比值为目的蛋白的相对表达量,对数据做归一化处理,同时计算 LC3 II/LC3 I 的比值。

TUNEL 染色法检测大鼠右膝关节软骨组织细胞凋亡情况:每组取 4 只大鼠右膝关节软骨组织制成石蜡切片(厚度 4 μm),TUNEL 染色,待切片干燥后加 DAPI 染核 15 min,PBS 冲洗,甘油明胶封片,-20℃保存。在荧光显微镜下观察膝骨关节软骨切片上细胞凋亡情况,选择分布均匀的视野计数,TUNEL 阳性表达呈绿色荧光,软骨细胞呈蓝色荧光,蓝、绿荧光重合的为凋亡细胞。软骨细胞凋亡率(%)=凋亡软骨细胞数/总软骨细胞数×100%。

免疫荧光染色法观察大鼠右膝关节软骨组织中 LC3 阳性表达情况:取每组 4 只大鼠石蜡切片脱蜡至水,洗净,山羊血清封闭,加入一抗 LC3 抗体(1:200)4℃过夜,PBS 洗片,晾干,加入荧光二抗(1:100)室温孵育 2 h,洗净玻片,加 DAPI 染色,甘油封片。荧光显微镜下观察切片,每张切片选取 3 个视野,绿色为 LC3 的阳性表达,用 Image J 软件分析阳性表达的平均荧光强度。

### 1.6 统计学分析

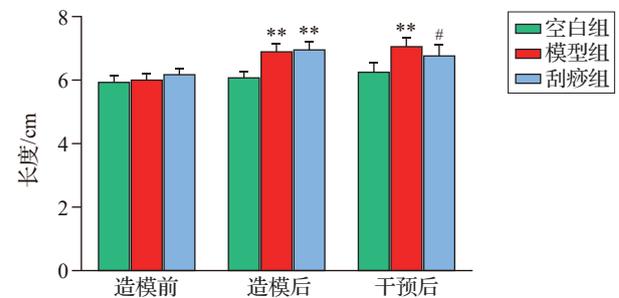
使用 SPSS26.0 软件对数据进行分析,本实验所有计量数据均呈正态分布,以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。采用单因素方差分析比较多组间差异,若方差齐,用 LSD 检验进行两两比较,方差不齐采用

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 各组大鼠右侧膝关节周径比较

造模前,各组大鼠右侧膝关节周径比较差异无统计学意义。造模后,造模大鼠右侧膝关节出现明显肿胀,活动范围明显减少,出现拖步等异常行为;模型组和刮痧组大鼠右侧膝关节周径明显高于空白组( $P<0.01$ )。干预后,与空白组比较,模型组大鼠右侧膝关节周径大于空白组( $P<0.01$ );刮痧组大鼠右侧膝关节周径小于模型组( $P<0.05$ )。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,# $P<0.05$ 。

图1 各组大鼠造模前后及干预后右侧膝关节周径比较( $\bar{x}\pm s$ ,14 鼠/组)

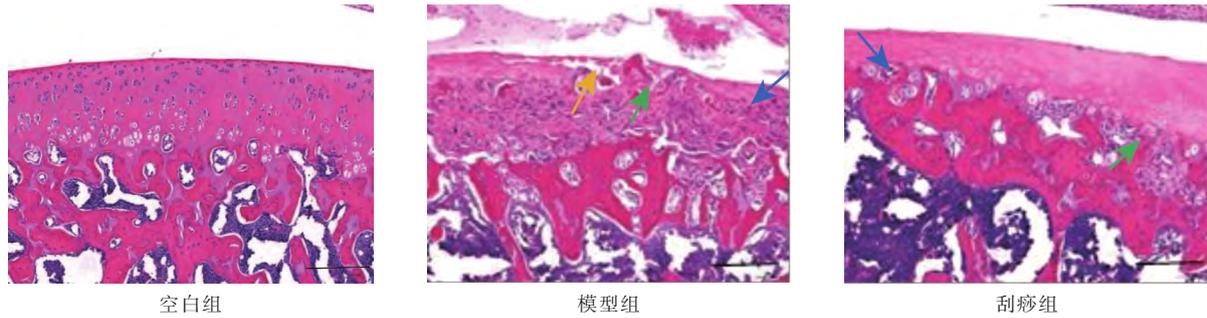
Fig. 1 Comparison of right knee circumference before and after modeling and after intervention of rats in the 3 groups( $\bar{x}\pm s$ ,14 rats/group)

### 2.2 各组大鼠右膝关节软骨组织病理形态比较

HE 染色结果显示,空白组大鼠右膝关节软骨细胞结构完整,层次清晰,细胞分布规律,未见明显软骨面结构破坏。模型组软骨层面有明显退行性病变及缺损,大量的软骨细胞坏死,层次紊乱有缺损,伴有大量炎性细胞侵蚀,破骨细胞增多,有纤维增生及骨小梁破坏。刮痧组软骨层变薄,层次大致完整,少量软骨细胞坏死,少量毛细血管增加,可见少量的骨小梁坏死。见图 2。

### 2.3 各组大鼠右膝关节软骨组织中 IL-1β、TNF-α 含量比较

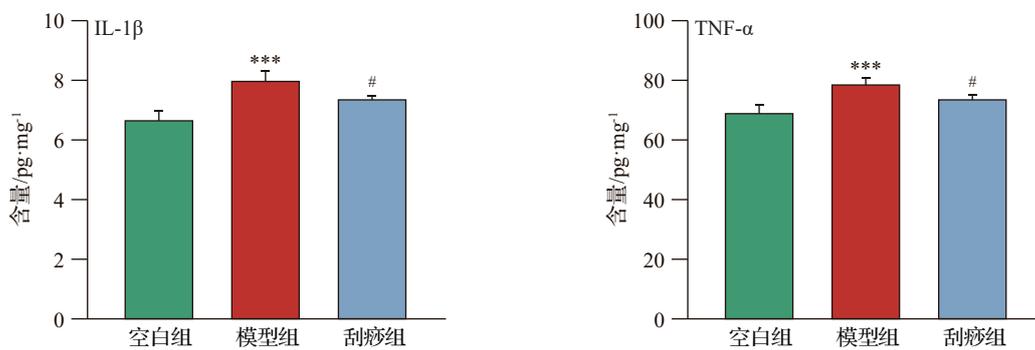
与空白组比较,模型组大鼠膝关节软骨组织中的 IL-1β、TNF-α 含量升高( $P<0.001$ );与模型组比较,刮痧组大鼠右膝关节软骨组织中 IL-1β、TNF-α 含量降低( $P<0.05$ )。见图 3。



注:标尺=50 μm。绿色箭头示骨小梁破坏,黄色箭头示关节软骨表面缺损,蓝色箭头示巨噬细胞。

图2 各组大鼠右膝关节软骨组织病理形态比较(HE染色)

Fig. 2 Comparison of pathological morphology of the right knee cartilage of rats in the 3 groups(HE staining)



注:与空白组比较,\*\*\* $P < 0.001$ ;与模型组比较,# $P < 0.05$ 。

图3 各组大鼠右膝关节软骨组织IL-1β、TNF-α含量比较( $\bar{x} \pm s$ , 4只鼠/组)

Fig. 3 Comparison of IL-1β and TNF-α contents in right knee cartilage tissue of rats in the 3 groups( $\bar{x} \pm s$ , 4 rats/group)

2.4 各组大鼠右膝关节软骨组织中 Beclin-1、LC3、P62 和 Caspase-3 mRNA 表达比较

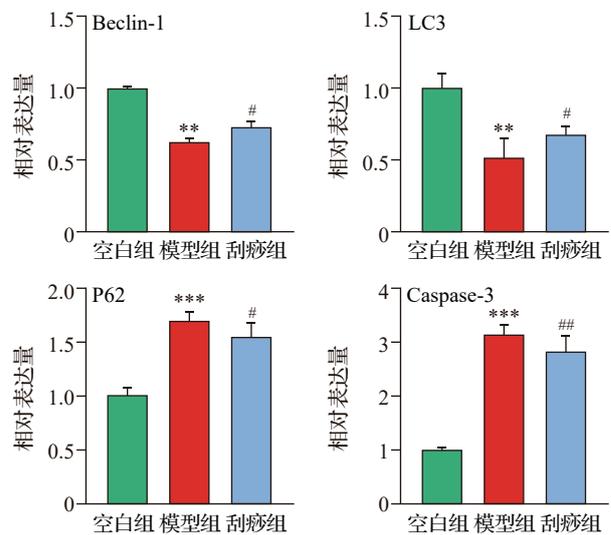
与空白组比较,模型组大鼠右膝关节软骨组织 Beclin-1、LC3 mRNA 表达降低( $P < 0.01$ ), P62、Caspase-3 mRNA 表达升高( $P < 0.001$ );与模型组比较,刮痧组 Beclin-1、LC3 mRNA 表达升高( $P < 0.05$ ), P62、Caspase-3 mRNA 表达降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见图4。

2.5 各组大鼠右膝关节软骨组织 Beclin-1、LC3 II / I、P62、Caspase-3 蛋白表达水平比较

与空白组比较,模型组大鼠右膝关节软骨组织 Beclin-1 蛋白表达水平、LC3 II / I 比值降低( $P < 0.001$ ), P62、Caspase-3 蛋白表达水平升高( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ );与模型组比较,刮痧组大鼠右膝关节软骨组织 Beclin-1 蛋白表达水平、LC3 II / I 比值升高( $P < 0.05$ ), P62、Caspase-3 蛋白表达水平下降( $P < 0.05$ )。见图5。

2.6 各组大鼠右膝关节软骨细胞凋亡率比较

空白组大鼠右膝关节软骨组织中可见少量散在凋亡细胞;模型组大鼠软骨可见大量集中分布的



注:与空白组比较,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ;与模型组比较,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ 。

图4 各组大鼠右膝关节软骨组织 Beclin-1、LC3、P62、Caspase-3 mRNA 表达比较( $\bar{x} \pm s$ , 6只鼠/组)

Fig. 4 Comparison of the expressions of Beclin-1, LC3, P62 and Caspase-3 mRNAs in the right knee cartilage of rats in the 3 groups ( $\bar{x} \pm s$ , 6 rats/group)

凋亡细胞;刮痧组可见分布不均少量片状的软骨凋亡细胞。与空白组比较,模型组软骨细胞凋亡率升高( $P<0.01$ );与模型组比较,刮痧组软骨细胞凋亡率降低( $P<0.05$ )。见图6。

### 2.7 各组大鼠右膝关节软骨组织LC3表达比较

与空白组比较,模型组大鼠右膝关节软骨组织中LC3平均荧光强度降低( $P<0.01$ );与模型组比较,刮痧组右膝关节软骨中的LC3平均荧光强度升高( $P<0.05$ )。见图7。

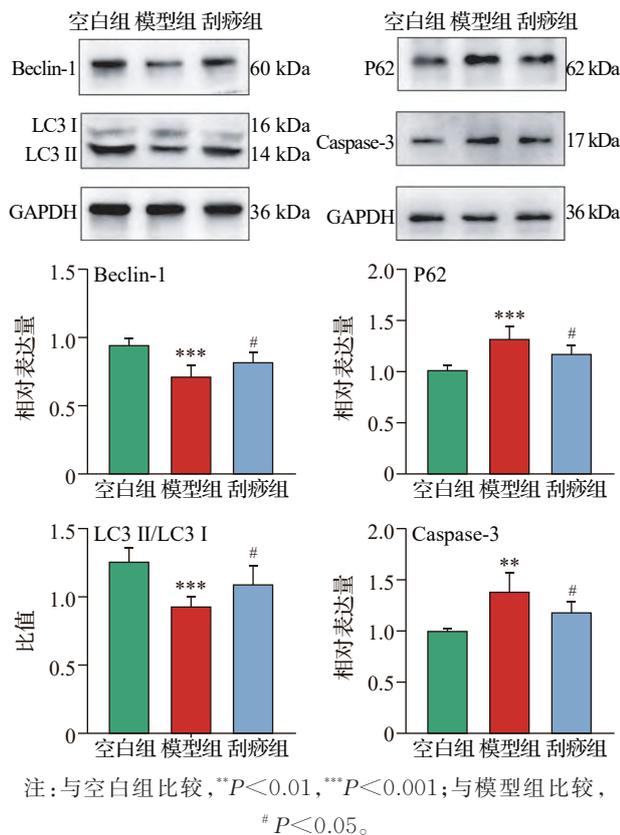


图5 各组大鼠右膝关节软骨组织 Beclin-1、LC3II/I、P62、Caspase-3 蛋白表达比较( $\bar{x}\pm s$ , 6 只鼠/组)

Fig. 5 Comparison of Beclin-1, LC3II/I, P62 and Caspase-3 protein expressions in the right knee cartilage of rats in the 3 groups ( $\bar{x}\pm s$ , 6 rats/group)

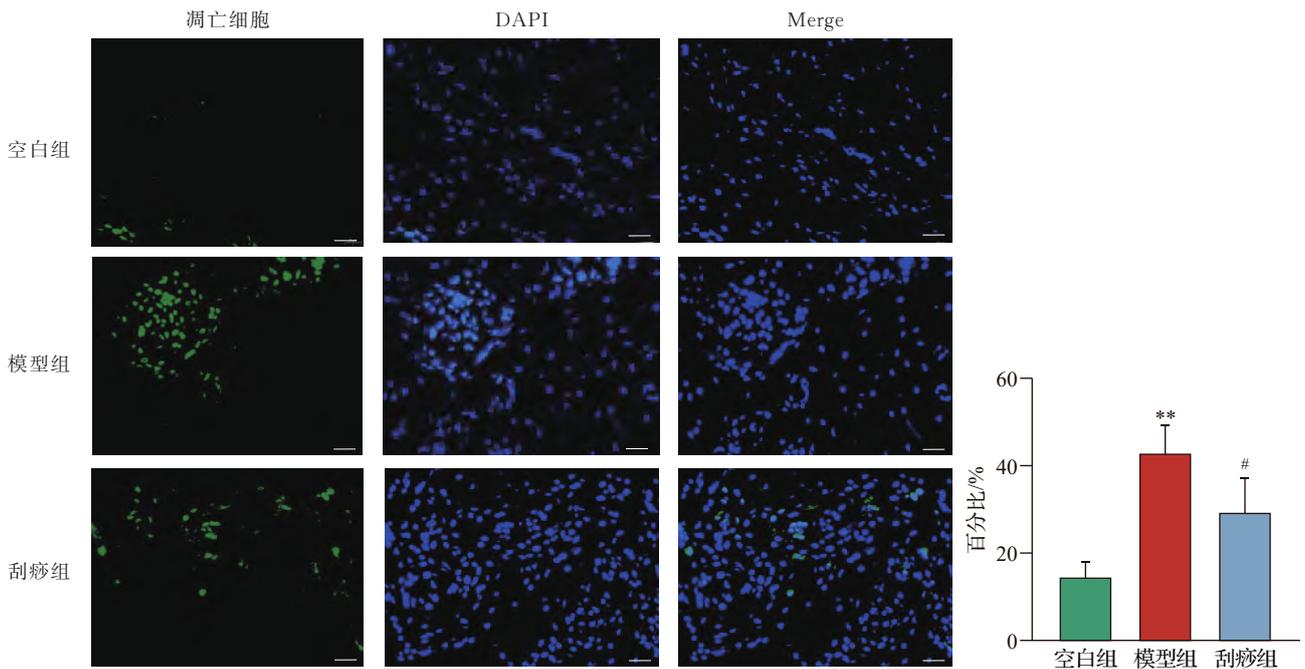
### 3 讨论

KOA 属于中医学“痹病”范畴,多因风、寒、湿、痰、瘀等聚积膝骨,气滞血瘀、久瘀致实、痰瘀互结所致。刮痧具有行气活血、蠲痹通络的作用,配合取穴阳陵泉、血海,可以发挥较好的治疗作用。现代医学认为刮痧通过刮擦体表,促进局部血液循环和提高代谢,可有效缓解氧化应激,使机体内环境达到新的平衡状态,延缓细胞的衰老,增强全身免疫功能<sup>[8]</sup>。研究显示自噬可以及时“回收”细胞内发

生错误折叠的蛋白质和受损的细胞器等有害物质,可以消化这类物质并转化成细胞内的能量供应<sup>[14]</sup>,以提高细胞内代谢,从而改善机体对外免疫应答能力,减轻炎症反应<sup>[15]</sup>。刮痧通过体表刺激使皮下发生充血或出血性改变进而发挥治疗作用,是否与自噬具有异曲同工之妙?由此推测刮痧或许间接影响自噬的激活。本实验采取的是目前国际上广泛采用的KOA造模方法,结果显示造模后的大鼠右膝关节软骨大量炎症细胞侵蚀,软骨组织分层不清晰,膝关节周径增加,提示造模成功。模型组的炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 明显增高;刮痧组与模型组相比,炎症指标及膝关节周径降低,提示刮痧可有效缓解KOA软骨组织破坏,降低炎症因子表达。在此基础上,本研究继续探讨刮痧改善KOA软骨退变是否和激活自噬有关。

KOA发病机制比较复杂,但是软骨破坏是发病过程中最突出的病理变化,在软骨组织发育中,软骨细胞高度分化完成后再生速率非常低。由于软骨组织中几乎没有血管,同时被自己分泌细胞外基质紧密包裹,始终处于一个缺乏能量和氧气的环境中<sup>[9,16]</sup>,于是软骨细胞自噬被激活,以响应各种应激条件,提高细胞对环境改变的耐受能力<sup>[17-18]</sup>,从而抑制软骨细胞过早凋亡,提高细胞存活率<sup>[19-20]</sup>。因此激活细胞自噬可能是维持KOA稳态的潜在治疗方法<sup>[21-22]</sup>。有研究显示KOA患者软骨中的自噬相关基因表达水平较低,证实了软骨中的自噬活性会随着病情进展降低<sup>[23]</sup>。自噬活性降低导致胞内受损的细胞器和大分子物质异常积累,使得机体清除炎症介质和细胞死亡产物能力随之下降,细胞凋亡率上升,局部组织损伤和疼痛加剧,成为KOA潜在发病机制<sup>[24]</sup>。

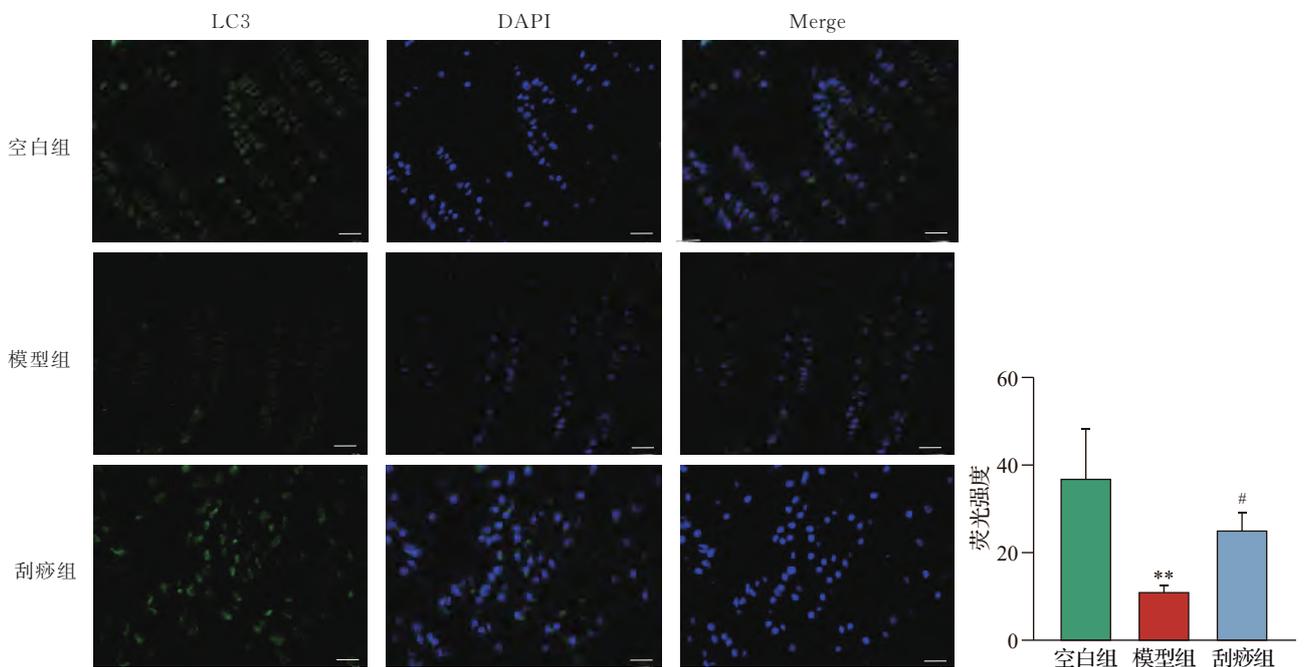
Beclin-1蛋白在自噬形成的起始阶段起核心作用,可以促进自噬体的形成,诱导活性吞噬细胞质内容物的产生,调节其他自噬基因并决定自噬程度的高低<sup>[25]</sup>。Beclin-1与各种辅助因子相互作用触发自噬蛋白级联反应,通过Beclin-1结合LC3,其与吞噬细胞质内容物进行后续降解的自噬体膜有关<sup>[26]</sup>。在此过程中自噬被激活,胞质中的LC3 I转化为与膜结合的LC3 II形式,这个过程LC3 II的表达情况可以作为监测自噬活性的一个重要指标。自噬将细胞质成分送至溶酶体降解,自噬的诱导依赖炎症体和炎症体传感器存在,炎症体是由感染或应激激活的分子平台。阻断自噬会增强炎症体的活性,组装的炎症体进行泛素化,泛素化的炎症体募集P62,自噬流的不畅会增加P62,促进溶酶体中泛素化蛋



注:左图为各组大鼠右膝关节软骨组织凋亡细胞表达的免疫荧光图,标尺=20 μm;右图为各组大鼠右侧膝关节软骨细胞凋亡率直方图( $\bar{x}\pm s$ ,4只鼠/组)。与空白组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,# $P<0.05$ 。

图6 各组大鼠右膝关节软骨细胞凋亡率比较(TUNEL染色)

Fig. 6 Comparison of TUNEL staining and chondrocytes apoptosis rate of the right knee cartilage of rats in the 3 groups (TUNEL staining)



注:标尺=20 μm。与空白组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,# $P<0.05$ 。

图7 各组大鼠右膝关节软骨组织LC3平均荧光强度比较(免疫荧光染色, $\bar{x}\pm s$ ,4只鼠/组)

Fig. 7 Comparison of the average immunofluorescence intensity of LC3 in the right knee cartilage of rats in the 3 groups (immunofluorescence staining,  $\bar{x}\pm s$ , 4 rats/group)

白质聚集体的形成,其凭借LC3结合结构可以将炎性体递送至自噬体中降解,缓和炎症反应<sup>[27]</sup>,从而限制IL-1 $\beta$ 的产生<sup>[28]</sup>。P62的表达水平与IL-1 $\beta$ 和

TNF- $\alpha$ 等炎症因子的表达水平息息相关。TNF- $\alpha$ 是KOA病情进展中的关键炎症介质,也是导致基质合成和分解失衡的主要细胞因子之一<sup>[29]</sup>,TNF- $\alpha$

可降低 LC3 II 的表达,同时促进 P62 的表达,并抑制其与 LC3 II 的结合,从而抑制细胞自噬<sup>[30-31]</sup>。TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  在促进软骨吸收和破坏膝骨关节软骨方面具有协同作用, TNF- $\alpha$  诱导 IL-1 $\beta$  产生,而 IL-1 $\beta$  又能增加 TNF- $\alpha$  的活性,这种相互作用进一步加剧了软骨细胞凋亡程度<sup>[32]</sup>。软骨细胞凋亡可被多种的凋亡信号激活,但是最终都是以同样的凋亡执行信号通路 Caspase-3 来完成凋亡<sup>[33]</sup>。Caspase-3 在活化后可以切割 Beclin-1,从而破坏其促自噬活性,裂解后的 Beclin 易位到线粒体后释放细胞色素 C 并增强细胞凋亡<sup>[34]</sup>。细胞凋亡的特异性检验就是 TUNEL 阳性染色<sup>[35]</sup>。本实验研究结果显示,模型组 Beclin-1 和 LC3 mRNA 和蛋白及 LC3 荧光强度表达较空白组明显降低, P62 及 Caspase-3 mRNA 及蛋白表达较空白组明显增高,细胞凋亡率显著增高。刮痧组与模型组比较,软骨中 Beclin-1 和 LC3 蛋白和基因及 LC3 荧光强度表达增加, P62、Caspase-3 mRNA 及蛋白表达水平下降,软骨细胞凋亡率降低。上述自噬相关指标在软骨细胞中的表达与既往研究一致<sup>[36]</sup>。表明刮痧可以提高软骨细胞自噬水平,抑制炎症反应,从而降低细胞凋亡,改善膝关节软骨损伤。

综上,本研究结果表明,刮痧对大鼠软骨细胞的自噬功能有促进作用,表现为上调自噬关键蛋白 LC3 和 Beclin-1 的表达,下调 P62、凋亡蛋白 Caspase-3 的表达。说明刮痧可以通过促进自噬来改善 KOA 模型大鼠症状,降低炎症反应,减少细胞凋亡,缓解软骨功能退化。刮痧作为一种有效的治疗 KOA 的方法,其作用机制可能与调控自噬有关。

## 参考文献

- [1] LUO P, GAO F Q, NIU D S, et al. The role of autophagy in chondrocyte metabolism and osteoarthritis: a comprehensive research review[J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 5171602.
- [2] BIJLSMA J W J, BERENBAUM F, LAFEBER F P J G. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice [J]. Lancet, 2011, 377(9783): 2115-2126.
- [3] BENNELL K L, HUNTER D J, HINMAN R S. Management of osteoarthritis of the knee[J]. BMJ, 2012:345.
- [4] 逯子衡, 林晓云, 张勇龙, 等. 电针治疗膝骨关节炎作用机制研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(3): 97-101.  
LU Z H, LIN X Y, ZHANG Y L, et al. Research progress on the mechanism of electroacupuncture in the treatment of knee osteoarthritis (in Chinese)[J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2023, 25(3): 97-101.
- [5] 张改月, 王莹莹, 陈帅, 等. 针灸疗法治疗膝骨关节炎的临床研究现状[J]. 河北中医, 2022, 44(11): 1916-1920.  
ZHANG G Y, WANG Y Y, CHEN S, et al. Clinical research status of acupuncture therapy for knee osteoarthritis (in Chinese)[J]. Hebei Journal of Traditional Chinese Medicine, 2022, 44(11): 1916-1920.
- [6] 杨昆吾, 袁普卫, 董博, 等. 电针对膝骨性关节炎大鼠痛行为及脊髓背角和背根神经节中疼痛相关因子含量的影响[J]. 针刺研究, 2020, 45(10): 818-822.  
YANG K W, YUAN P W, DONG B, et al. Effects of electroacupuncture on pain behavior and pain-related factors in spinal cord dorsal horn and dorsal root Ganglia of rats with knee osteoarthritis (in Chinese)[J]. Acupuncture Research, 2020, 45(10): 818-822.
- [7] 张改月, 陈帅, 颜雪华, 等. 电针联合刮痧对膝骨性关节炎大鼠疼痛及炎症因子表达的影响[J]. 针灸临床杂志, 2023, 39(3): 67-72.  
ZHANG G Y, CHEN S, YAN X H, et al. Effect of electroacupuncture combined with scrapping therapy on pain and expression of inflammatory factors in rats with knee osteoarthritis (in Chinese)[J]. Journal of Clinical Acupuncture and Moxibustion, 2023, 39(3): 67-72.
- [8] 王莹莹, 陈虹, 张豪斌, 等. 刮痧对皮肤组织形态和 GCS、SP、SOD 表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(7): 3204-3208.  
WANG Y Y, CHEN H, ZHANG H B, et al. Effects of Gua-sha therapy on skin tissue morphology and the expression of GCS, SP and SOD of the human body (in Chinese) [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2019, 34(7): 3204-3208.
- [9] KAO W C, CHEN J C, LIU P C, et al. The role of autophagy in osteoarthritic cartilage[J]. Biomolecules, 2022, 12(10): 1357.
- [10] ARRA M, ABU-AMER Y. Cross-talk of inflammation and chondrocyte intracellular metabolism in osteoarthritis [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2023, 31(8): 1012-1021.
- [11] HUI W, YOUNG D A, ROWAN A D, et al. Oxidative changes and signalling pathways are pivotal in initiating age-related changes in articular cartilage [J]. Ann Rheum Dis, 2016, 75(2): 449-458.
- [12] 陈帅, 张改月, 王莹莹, 等. 艾灸与刮痧治疗膝关节骨关节炎的穴区效应研究[J]. 针刺研究, 2023, 48(4): 359-365.  
CHEN S, ZHANG G Y, WANG Y Y, et al. Effect of moxibustion and scraping on bioactive substances changes of acupoints in knee osteoarthritis rats (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2023, 48(4): 359-365.
- [13] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 2版. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 255-257.  
LI Z R. Experimental acupuncture (in Chinese) [M]. 2<sup>nd</sup> edition. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2007: 255-257.
- [14] 智猛, 那俊夫, 曹奇, 等. 基于中医气血理论探究 AMPK/mTOR 信号通路与自噬的关系[J]. 中华中医药学刊, 2023,

- 42(3): 80-84.
- ZHI M, NA J F, CAO Q, et al. Research on relationship between AMPK/MTOR signal pathway and autophagy based on theory of qi and blood in traditional Chinese medicine (in Chinese)[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2023, 42(3): 80-84.
- [15] LÓPEZ DE FIGUEROA P, LOTZ M K, BLANCO F J, et al. Autophagy activation and protection from mitochondrial dysfunction in human chondrocytes[J]. Arthritis Rheumatol, 2015, 67(4): 966-976.
- [16] HOSSEINZADEH A, KAMRAVA S K, JOGHATAEI M T, et al. Apoptosis signaling pathways in osteoarthritis and possible protective role of melatonin[J]. J Pineal Res, 2016, 61(4): 411-425.
- [17] PEI D D, SUN J L, ZHU C H, et al. Contribution of mitophagy to cell-mediated mineralization: revisiting a 50-year-old conundrum[J]. Adv Sci, 2018, 5(10): 1800873.
- [18] 蒋全睿, 吴琼, 朱晓晴, 等. 按压对慢性激痛点模型大鼠线粒体自噬水平及PINK1/Parkin通路的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2022, 37(12): 1593-1598.
- JIANG Q R, WU Q, ZHU X Q, et al. Effects of pressing on mitochondrial autophagy and PINK1/Parkin pathway of chronic myofascial trigger point in rats (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2022, 37(12): 1593-1598.
- [19] 卢曼, 黄小双, 孟德鸿, 等. 针刀对膝关节骨关节炎大鼠mTOR/Atg/ULK1/Beclin-1轴及软骨细胞自噬的影响[J]. 中国针灸, 2022, 42(1): 59-65.
- LU M, HUANG X S, MENG D H, et al. Effect of needle knife on mTOR/Atg/ULK1/Beclin-1 axis and chondrocyte autophagy in rats with knee osteoarthritis (in Chinese) [J]. Chinese Acupuncture & Moxibustion, 2022, 42(1): 59-65.
- [20] ZHU C, SHEN S, ZHANG S, et al. Autophagy in bone remodeling: a regulator of oxidative stress[J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 898634.
- [21] BOUDERLIQUE T, VUPPALAPATI K K, NEWTON P T, et al. Targeted deletion of Atg5 in chondrocytes promotes age-related osteoarthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2016, 75(3): 627-631.
- [22] LI J, JIANG M Q, YU Z T, et al. Artemisinin relieves osteoarthritis by activating mitochondrial autophagy through reducing TNFSF11 expression and inhibiting PI3K/AKT/mTOR signaling in cartilage[J]. Cell Mol Biol Lett, 2022, 27(1): 62.
- [23] RAHMATI M, NALESSO G, MOBASHERI A, et al. Aging and osteoarthritis: central role of the extracellular matrix [J]. Ageing Res Rev, 2017, 40: 20-30.
- [24] VALENTI M T, DALLE CARBONARE L, ZIPETO D, et al. Control of the autophagy pathway in osteoarthritis: key regulators, therapeutic targets and therapeutic strategies [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(5): 2700.
- [25] SONG B, SONG H, WANG W G, et al. Beclin 1 overexpression inhibits chondrocyte apoptosis and downregulates extracellular matrix metabolism in osteoarthritis [J]. Mol Med Rep, 2017, 16(4): 3958-3964.
- [26] WARGASETIA T L, SHAHIB N, MARTAADISO EBRATA D, et al. Characterization of apoptosis and autophagy through Bcl-2 and Beclin-1 immunexpression in gestational trophoblastic disease[J]. Iran J Reprod Med, 2015, 13(7): 413-420.
- [27] MYUNG PARK J, HUANG S B, WU T T, et al. Prognostic impact of Beclin 1, p62/sequestosome 1 and LC3 protein expression in colon carcinomas from patients receiving 5-fluorouracil as adjuvant chemotherapy [J]. Cancer Biol Ther, 2013, 14(2): 100-107.
- [28] SHI C S, SHENDEROV K, HUANG N N, et al. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 $\beta$  production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction [J]. Nat Immunol, 2012, 13(3): 255-263.
- [29] MA C H, WU C H, JOU I M, et al. PKR activation causes inflammation and MMP-13 secretion in human degenerated articular chondrocytes[J]. Redox Biol, 2018, 14: 72-81.
- [30] SUN K, GUO Z, ZHANG J M, et al. Inhibition of TRADD ameliorates chondrocyte necroptosis and osteoarthritis by blocking RIPK1-TAK1 pathway and restoring autophagy [J]. Cell Death Discov, 2023, 9(1): 109.
- [31] DENG D N, LUO K M, LIU H M, et al. p62 acts as an oncogene and is targeted by miR-124-3p in glioma [J]. Cancer Cell Int, 2019, 19: 280.
- [32] KAPOOR M, MARTEL-PELLETIER J, LAJEUNESSE D, et al. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2011, 7(1): 33-42.
- [33] QIAN Z G, RU X L, LIU C, et al. Fraxin prevents knee osteoarthritis through inhibiting chondrocyte apoptosis in an experimental rat osteoarthritis model [J]. Protein Pept Lett, 2021, 28(11): 1298-1302.
- [34] SIDDIQUI M A, MUKHERJEE S, MANIVANNAN P, et al. RNase L cleavage products promote switch from autophagy to apoptosis by caspase-mediated cleavage of beclin-1[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(8): 17611-17636.
- [35] LIU Y, SHOJI-KAWATA S, SUMPTER R M Jr, et al. Autosis is a Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase-regulated form of cell death triggered by autophagy-inducing peptides, starvation, and hypoxia-ischemia [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(51): 20364-20371.
- [36] 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兔软骨的保护作用[J]. 针刺研究, 2022, 47(12): 1080-1087.
- 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.

收稿日期:2023-06-11 修回日期:2023-10-11  
网络首发:2024-01-22 编辑:刘婉宁