

针刀治疗胶原诱导性关节炎大鼠滑膜组织 Bcl-2/Bax 的表达

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3007>

刘青, 万碧江

2095-4344.3007

投稿日期: 2020-02-10

送审日期: 2020-02-19

采用日期: 2020-03-18

在线日期: 2020-08-25

中图分类号:

R446; R496; R318

文章编号:

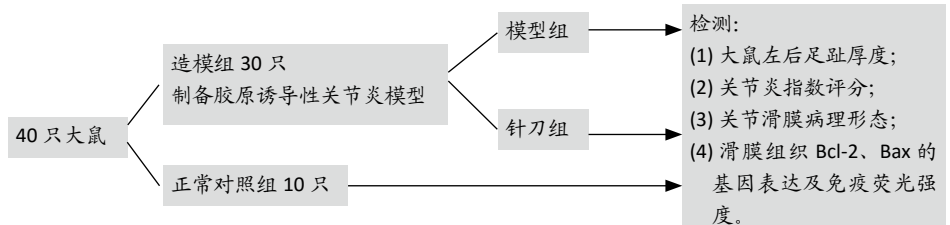
2095-4344(2021)05-00729-06

文献标识码: B

文章快速阅读:

文章特点一

△结果表明, 针刀治疗类风湿性关节炎的机制可能与下调滑膜组织中 Bcl-2 表达、降低 Bcl-2/Bax 比值有关。



文题释义:

胶原诱导性关节炎: 用牛Ⅱ型胶原蛋白和弗氏不完全佐剂制成的Ⅱ型乳剂进行二次免疫, 诱导大鼠产生关节炎。由于其免疫炎症反应、病理变化和疾病表现与人类的类风湿性关节炎具有高度相似性, 是研究类风湿性关节炎较理想的动物模型。

滑膜组织Bcl-2/Bax表达: Bcl-2蛋白家族是参与细胞凋亡的关键调节因子, 在Bcl-2蛋白家族中Bcl-2是起主要作用的抗凋亡蛋白, Bax是重要的促凋亡蛋白, Bcl-2/Bax是启动细胞凋亡的“分子开关”, 滑膜组织中Bcl-2/Bax比值的增高促进了类风湿性关节炎的发生发展。

摘要

背景: 临床研究表明, 针刀治疗能够改善类风湿性关节炎患者的症状, 减轻关节肿胀, 改善受损关节的活动功能, 但尚无其具体作用机制的实验研究报道。

目的: 观察针刀治疗对胶原诱导性关节炎大鼠滑膜组织Bcl-2、Bax表达的影响。

方法: 将40只大鼠随机分为正常对照组10只, 造模组30只。造模组大鼠采用二次免疫法制备胶原诱导性关节炎模型, 随机选取20只造模成功大鼠随机分为模型组和针刀组。正常组和模型组不予处理; 针刀组大鼠于左膝关节周围触及髌内外支持带、膝内外侧副韧带、髌底上缘中点及髌韧带中点, 每次选取上述2点予以针刀治疗, 1次/周, 共治疗3次。实验过程中监测大鼠一般情况, 测量大鼠左后足趾厚度, 进行关节炎指数评分; 苏木精-伊红染色法观察关节滑膜病理形态; 应用实时定量PCR法、免疫荧光技术分别检测滑膜组织Bcl-2、Bax的基因表达水平及免疫荧光强度。实验方案经湖北中医药大学动物实验伦理委员会批准(批准号为00127518)。

结果与结论: ①与正常组相比, 模型组左后足趾厚度及关节炎指数评分明显增加($P < 0.01$, $P < 0.01$); 与模型组相比, 针刀组左后足趾厚度及关节炎指数评分减小($P < 0.05$, $P < 0.05$); ②病理形态上, 模型组较正常组滑膜层数增厚, 大量炎症细胞浸润, 针刀组较模型组滑膜层数减少, 炎症细胞浸润减轻; ③各组间滑膜组织Bax mRNA表达水平比较, 差异无显著性意义($P > 0.05$); 针刀组Bcl-2 mRNA、Bcl-2/Bax mRNA表达较模型组明显降低($P < 0.01$, $P < 0.01$); ④与模型组比较, 针刀组Bcl-2/Bax荧光强度明显降低($P < 0.01$); ⑤结果表明, 针刀治疗类风湿性关节炎的机制可能与下调滑膜组织中Bcl-2表达, 降低Bcl-2/Bax比值有关。

关键词: 针刀; 关节炎; 类风湿性关节炎; 滑膜; 细胞凋亡; 动物; 鼠

Effect of acupotomy therapy on the expression of Bcl-2/Bax in synovial tissue of collagen-induced arthritis rats

Liu Qing, Wan Bijiang

College of Acupuncture and Moxibustion and Orthopedics, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei Province, China

Liu Qing, Master candidate, College of Acupuncture and Moxibustion and Orthopedics, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei Province, China

Corresponding author: Wan Bijiang, Associate professor, Associate chief physician, Master's supervisor, College of Acupuncture and Moxibustion and Orthopedics, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei Province, China

湖北中医药大学针灸骨伤学院, 湖北省武汉市 430061

第一作者: 刘青, 女, 1996年生, 湖北省汉川市人, 汉族, 湖北中医药大学在读硕士, 主要从事针灸、针刀治疗疼痛的临床相关研究。**通讯作者:** 万碧江, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 湖北中医药大学针灸骨伤学院, 湖北省武汉市 430061<https://orcid.org/0000-0001-6777-8616> (刘青)**基金资助:** 湖北中医药大学研究生创新能力提升项目(1010040103)**引用本文:** 刘青, 万碧江. 针刀治疗胶原诱导性关节炎大鼠滑膜组织 Bcl-2/Bax 的表达 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(5): 729-734.

Abstract

BACKGROUND: It has been shown that acupotomy therapy can improve the symptoms of rheumatoid arthritis, reduce the swelling of the joints, and improve the function of the damaged joints in clinical practice. However, the specific mechanism has not been reported in animal experiments.

OBJECTIVE: To observe the effect of acupotomy therapy on the expression of Bcl-2 and Bax in synovial tissue of collagen-induced arthritis rats.

METHODS: Forty rats were prepared for the experiment. Ten of them were randomly selected as normal controls, and the other 30 rats were used to manufacture collagen-induced arthritis models via secondary immunization. After the modeling, 20 successful models were randomly selected for subsequent experiments and randomly divided into a model group and an acupotomy group, with 10 in each group. Normal group and model group remain untreated. The medial and lateral patellofemoral ligament, the tibial and fibular collateral ligament, the midpoint of the upper margin of the patella and the midpoint of the patellar ligament around the left knee joint were selected as points of acupotomy treatment, two of which were selected for each acupotomy session. Rats in the acupotomy group were treated once a week for 3 continuous weeks. The general condition of experimental rats was monitored daily, thickness of the left posterior toe was measured and arthritis index was evaluated. Hematoxylin-eosin staining was executed to observe the pathological morphology of the synovial tissue. Real-time quantitative PCR and immunofluorescence staining were implemented to measure gene expression and immunofluorescence intensity of Bcl-2 and Bax in synovial tissue, respectively. The study protocol was approved by the Animal Ethic Committee of Hubei University of Traditional Chinese Medicine with an approval No. 00127518.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the normal group, the thickness of the left posterior toe and arthritis index score of the model group were significantly increased ($P < 0.01$, $P < 0.01$). Compared with the model group, the left hind toe thickness and arthritis index score of the acupotomy group were decreased ($P < 0.05$, $P < 0.05$). Hematoxylin-eosin staining showed that: pathologically, the synovial layers of the model group were thicker, with infiltration of a large number of inflammatory cells. However, the synovial layers of the acupotomy group were fewer with less infiltration of inflammatory cells. RT-PCR showed that there was no significant difference in the expression of Bax mRNA in the synovial tissue between all the groups ($P > 0.05$). The expressions of Bcl-2 mRNA and Bcl-2/Bax mRNA were significantly reduced in the acupotomy group compared with the model group ($P < 0.01$, $P < 0.01$). Immunofluorescence detection indicated that the fluorescence intensity of Bcl-2/Bax in the acupotomy group was significantly reduced compared with the model group ($P < 0.01$). To conclude, the down-regulation of Bcl-2 expression and Bcl-2/Bax ratio in the synovial tissue may be one of its mechanisms for improving rheumatoid arthritis.

Key words: acupotomy; arthritis; rheumatoid arthritis; synovium; apoptosis; animal; rat

Funding: Postgraduate Innovation Ability Improvement Project of Hubei University of Traditional Chinese Medicine, No. 1010040103

How to cite this article: LIU Q, WAN BJ. Effect of acupotomy therapy on the expression of Bcl-2/Bax in synovial tissue of collagen-induced arthritis rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(5):729-734.

0 引言 Introduction

类风湿关节炎是一种以关节滑膜增生、慢性炎症为最主要病理表现的自身免疫性疾病^[1]，目前在国内外仍属难治之症。近年来，作者导师运用针刀治疗类风湿关节炎取得了较好的临床疗效，且在研究中发现，针刀治疗通过调节类风湿关节炎患者关节滑液中肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素6和白细胞介素10炎症细胞因子的水平，减轻了关节炎反应；通过调节与类风湿关节炎发病密切相关的关节滑液基质金属蛋白酶的表达，有效调控了关节软骨细胞外基质的降解；且针刀治疗后类风湿关节炎患者血清中类风湿因子、C-反应蛋白、血沉含量降低，针刀治疗通过活化血清中自由基清除剂超氧化物歧化酶，有效清除多余自由基，从而在一定程度上保护受损的滑膜及骨组织^[2-3]。随着针刀治疗类风湿关节炎的临床观察日益增多^[4-5]，其疗效也逐渐受到认可，但其具体作用机制却未见实验研究报道。

有研究表明，类风湿关节炎的关节病理表现与滑膜成纤维细胞的凋亡密切相关^[6]。由于滑膜组织中凋亡调节因子Bax、Bcl-2表达水平的变化对类风湿关节炎的发生发展具有重要意义^[7]，实验通过观察针刀治疗对胶原诱导性关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)大鼠滑膜组织中Bax、Bcl-2表达的影响，探究针刀治疗类风湿关节炎的作用机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验，盲法评估。

1.2 时间及地点 实验于2018年8月至2019年5月在湖北中医药大学针灸研究所实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 SPF级SD大鼠40只，雌性，体质量180-200g，动物合格证号SCXK(鄂)2017-0012，由湖北省实验动物中心

提供。饲养条件：温度20-25℃，湿度45%-55%，自由取食和饮水。实验过程中对大鼠的处置符合中华人民共和国科技部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

1.3.2 针刀和试剂 一次性汉章系列无菌针刀(0.4 mm×30 mm)由北京健力园医疗器械有限公司生产，牛II型胶原蛋白粉末(CII, 批号：C8000)、弗氏不完全佐剂(IFA, 批号：F5506)购自Sigma公司，磷酸盐缓冲液(PBS, 批号：PN0001)由武汉市皮诺飞生物科技有限公司生产，TRIzol Reagent(Ambion15596-026)、cDNA合成试剂盒、PowerUp™ SYBR® Green Master Mix(批号：00684043)由美国Thermo Scientific公司生产。Bcl-2一抗(批号：Ab32503)、Bax一抗(批号：ab32503)购自Abcam公司；488标记HRP山羊抗兔(批号：074-1506)购自KPL公司，CY3山羊抗兔(批号：111-165-003)购自Jackson公司，DAPI(批号：C0060)、抗荧光淬灭封片剂(批号：S2100)购自Solarbio公司。

1.3.3 主要仪器 TGL-10B系列台式离心机(上海安亭科学仪器厂)，石蜡切片机(型号RM2245, 德国莱卡公司)，包埋机(型号KD-BM, 浙江金华科迪有限公司)，成像系统(型号Nikon DS-U3, 日本尼康公司)，Aquaplust2系列艾科浦超纯水制成机(美国艾科浦国际有限公司)，C16000型全自动生化仪(美国雅培公司)，Bio-Rad CFX96型荧光定量PCR仪(美国伯乐公司)，倒置显微镜(日本Olympus公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 分组及处理 适应性饲养1周后将大鼠编号，随机抽出10只作为正常对照组，对其余30只大鼠建立胶原诱导性关节炎模型。初次免疫后第14天评估造模效果，在造模成功的大鼠中随机选取20只，并随机分为模型对照组和针刀治疗组各10只。正常组和模型组大鼠正常饲养，不予任何处理；对针刀组大鼠进行针刀松解，操作步骤如下：使用自

制鼠衣将大鼠固定在治疗台上,在大鼠左侧患膝进行触诊,触及膝关节周围相应软组织:第1次治疗选取髌内、外支持带,第2次治疗选取膝内、外侧副韧带,第3次治疗选取髌底上缘中点和髌韧带的中点作为进针刀部位,用龙胆紫标记,常规备皮、消毒后,按4步进针规程刺入针刀,于深度约0.2 cm处行纵向疏通法,再辅以横行剥离手法操作3刀,随即出针,用无菌干棉球按压3 min止血。每7 d治疗1次,共治疗3次。

1.4.2 模型制备与评价 参照GU等^[8]的方法制备胶原诱导性关节炎模型:将冻干的牛II型胶原蛋白溶解于0.1 mol/L乙酸溶液中,质量浓度为400 mg/L,置于4℃冰箱过夜,再将等体积的牛II型胶原蛋白溶液和弗氏不完全佐剂混合并充分乳化,制成II型乳剂(每100 μL含20 μg II型胶原蛋白),置于4℃冰箱保存备用。在尾根部皮内注射100 μL II型乳剂免疫大鼠;在第7天给予20 μg II型乳剂加强注射。正常对照组用生理盐水同法注射。观察大鼠的一般情况,于初次免疫前(第0天)及初次免疫后第7, 14, 21, 28, 35天分别测量各组大鼠体质量、左后足趾厚度,并记录大鼠关节炎指数(arthritis index, AI)评分,具体评分标准如下:无关节红肿记0分,趾关节红肿记1分,趾关节和足趾肿胀记2分,踝关节以下的足爪肿胀记3分,踝关节在内的全部足爪肿胀记4分。每个关节最高分为4分,4个关节累计积分即为每只大鼠的关节炎指数评分,关节炎指数评分≥4表示造模成功。

实验动物造模过程的相关问题

造模目的:	观察针刀治疗对胶原诱导性关节炎大鼠滑膜组织 Bcl-2、Bax 表达的影响
借鉴已有标准实施动物造模:	参照 GU 等 ^[8] 的方法制备胶原诱导性关节炎模型
动物来源及品系:	SPF 级 SD 大鼠由湖北省实验动物中心提供
模型与所研究疾病的关系:	胶原诱导性关节炎模型是研究类风湿性关节炎最理想的动物模型
造模技术描述:	在尾根部皮内注射 100 μL II 型乳剂免疫大鼠;在第 7 天给予 20 μg II 型乳剂加强注射
造模主要诱导用药:	II 型乳剂(牛 II 型胶原蛋白溶液和弗氏不完全佐剂混合,每 100 μL 含 20 μg II 型胶原蛋白)
动物数量及分组方法:	SD 大鼠随机分为正常对照组 n=10; 模型对照组 n=10; 针刀治疗组 n=10
造模成功评价指标:	关节炎指数评分 ≥ 4 表示造模成功
造模后实验观察指标:	①大鼠一般情况及体质量; ②大鼠左后足趾厚度及关节炎指数评分; ③大鼠关节滑膜病理形态学观察; ④ PCR 检测结果; ⑤免疫荧光检测结果
如何补充造模过程中缺失的动物:	9 只造模不成功,已经剔除
造模后动物处理:	初次免疫后 35 d,在戊巴比妥钠麻醉大鼠,取致炎侧(左足)膝关节滑膜组织,待检测
伦理委员会批准:	实验方案经湖北中医药大学动物实验伦理委员会批准(批准号为 00127518)

1.4.3 苏木精-伊红染色观察关节滑膜的形态学变化 初次免疫后 35 d, 各组随机选取 5 只大鼠, 在戊巴比妥钠麻醉

下纵行切开大鼠致炎侧(左足)膝部皮肤, 隔离中央肌肉, 暴露膝关节, 剥离支持组织。用 PBS 洗去血迹和残渣, 在 40 g/L 多聚甲醛中固定 1 周后将组织转移至 20-30 倍体积的 EDTA 脱钙液中 6-8 周, 用大头针探刺关节脱钙满意后, 置于常规梯度乙醇中脱水, 二甲苯透明后进行石蜡包埋, 5 μm 厚连续切片。用苏木精和伊红染色后在 400 倍光镜下观察关节滑膜病理形态。

1.4.4 实时定量 PCR 法检测滑膜组织 Bcl-2、Bax mRNA 表达 各组所剩另 5 只大鼠在戊巴比妥钠麻醉下用手术刀轻轻刮取左膝关节滑膜组织用于 PCR 指标检测。切取冰冻滑膜组织 50-100 mg, 在研钵中加液氮充分研磨, 用 Trizol 法提取滑膜组织总 RNA, 按 cDNA 合成试剂盒说明书操作, 将 RNA 反转录为 cDNA, 运用 SYBR Green I 染料法, 在 Bio-Rad CFX96 型荧光定量 PCR 仪上, 进行各目的基因的定量检测。PCR 引物序列(见表 1) 由昆泰锐(武汉公司)合成, 以 β-actin 作为内参对照, 反应总体积为 20 μL, 反应扩增条件: 50℃ 2 min, 95℃ 2 min, 95℃ 15 s、60℃ 15 s、72℃ 1 min, 共 40 个循环。反应结束获得 Bax、Bcl-2 的循环阈值(cycle threshold, Ct), 根据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算目的基因的相对表达量。

表 1 | RT-PCR 引物序列

Table 1 | Primers used for RT-PCR

基因	引物序列(5' to 3')	产物长度(bp)
Bax	上游引物 CAC AAC TCA GCG CAA ACA TT	519
	下游引物 ACA GCC ATC TCT CTC CAT GC	
Bcl-2	上游引物 GAA GCA CAG ATG GTT GAT GG	496
	下游引物 CAG CCT CAC AAG GTT CCA AT	
β-actin	上游引物 CGC CAC CAG TTC GCC AT	120
	下游引物 CAC GAT GGA GGG GAA GAC G	

1.4.5 免疫荧光技术检测滑膜组织 Bcl-2/Bax 表达 依次将切片放入二甲苯 I 15 min-二甲苯 II 15 min-无水乙醇 I 5 min-无水乙醇 II 5 min-体积分数 85% 乙醇 5 min-75% 乙醇 5 min-蒸馏水洗。然后组织切片置于盛满 EDTA 抗原修复缓冲液(pH 8.0)的修复盒中于微波炉内进行抗原修复。用组化笔在组织周围画圈, 在圈内滴加 BSA 孵育 30 min, 在切片上滴加 PBS 按一定比例配好的 Bcl-2 一抗(1 : 150), 4℃ 孵育过夜; 玻片置于 PBS(pH 7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。切片稍甩干后在圈内滴加与一抗相应种属的 HRP 标记的二抗(1 : 500)覆盖组织, 室温孵育 50 min。PBS 漂洗 5 min×3 次加 Bax 一抗(1 : 250), 加二抗 CY3 山羊抗兔(1 : 300); PBS 漂洗 5 min×3 次后滴加 CY3 山羊抗兔, 避光室温孵育 50 min。DAPI 复染细胞核避光室温孵育 10 min。PBS 洗 3 次, 滴加抗荧光淬灭封片剂封固。切片于荧光显微镜下观察并采集图像。

1.5 主要观察指标 ①大鼠一般情况及体质量; ②大鼠左后足趾厚度及关节炎指数评分; ③大鼠关节滑膜病理形态学观察; ④ PCR 检测结果; ⑤免疫荧光检测结果。

1.6 统计学分析 使用 SPSS 25.0 进行统计分析, 计量资料若呈非正态分布、方差不齐者采用两样本非参数的秩和检验;

符合正态分布和方差齐性, 用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析方法、 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义, $P < 0.01$ 为差异有非常显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 40 只大鼠中正常对照组 10 只, 剩余 30 只进行了胶原诱导性关节炎造模, 其中 21 只关节炎指数评分 ≥ 4 , 提示造模成功, 成模率为 70%, 与王琦^[9] 的研究相符。造模成功的 21 只大鼠中随机选取 20 只进行后续实验。纳入实验的 30 只大鼠实验过程中无感染或死亡, 均进入结果分析。大鼠造模分组流程见图 1。

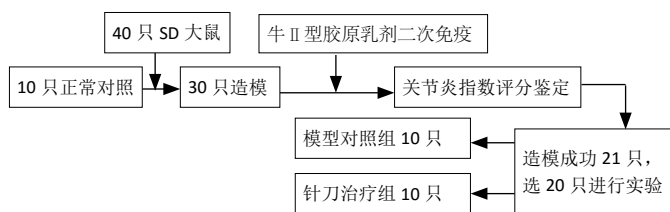


图 1 | 大鼠造模分组流程图

Figure 1 | Flow chart of modeling and grouping

2.2 大鼠一般情况及体质量 造模大鼠在试验期间精神逐渐处于激惹状态, 摄食及活动减少, 体质量增长缓慢, 行动不灵活甚至跛行, 毛发变得黯淡枯燥, 足趾渐渐红肿, 发病部位主要分布在后足, 前爪受累仅在实验后期发生。与正常对照组相比, 模型对照组体质量明显减轻 ($P < 0.01$); 与模型对照组相比, 针刀治疗组体质量有所增加, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。针刀治疗后胶原诱导性关节炎大鼠反应更灵敏, 活动更灵活, 足趾肿胀程度逐渐减轻。见图 2, 3。

2.3 大鼠左后足趾厚度及关节炎指数评分 正常对照组关节无一发病。造模成功后, 与正常对照组比较, 模型对照组左后足趾厚度及关节炎指数评分增加明显 ($P < 0.01$, $P < 0.01$); 与模型对照组比较, 针刀治疗组左后足趾厚度及关节炎指数评分减小 ($P < 0.05$, $P < 0.05$)。见图 4, 5。

2.4 大鼠关节滑膜病理形态学观察 正常对照组滑膜细胞一两层, 滑膜内层细胞未见炎细胞浸润, 滑膜下层未见颗粒细胞增生、血管化及炎细胞浸润; 模型对照组滑膜细胞层数明显增厚, 排列紊乱, 滑膜可见大量炎性细胞浸润; 针刀治疗组滑膜细胞层数增加, 但炎症细胞浸润较少, 见图 6。这表明针刀治疗减轻了胶原诱导性关节炎关节滑膜炎反应。

2.5 PCR 检测结果 造模后及针刀治疗后, 滑膜组织 Bax mRNA 表达未见明显变化, 各组间比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。与正常对照组比较, 模型对照组大鼠滑膜组织 Bcl-2 mRNA 表达显著上调 ($P < 0.01$); 与模型对照组比较, 针刀治疗组大鼠滑膜组织 Bcl-2 mRNA 表达显著下调 ($P < 0.01$)。与正常对照组比较, 模型对照组大鼠滑膜组织 Bcl-2/Bax mRNA 表达显著上调 ($P < 0.01$); 与模型对照组比较, 针刀治疗组大鼠滑膜组织 Bcl-2/Bax mRNA 表达显著下调 ($P < 0.01$)。见图 7。

2.6 免疫荧光检测结果 与正常对照组比较, 模型对照组大

鼠滑膜组织 Bcl-2/Bax 荧光强度显著增加 ($P < 0.01$)。与模型对照组比较, 针刀治疗组大鼠滑膜组织 Bcl-2/Bax 荧光强度显著降低 ($P < 0.01$)。见图 8。

3 讨论 Discussion

类风湿关节炎是临床常见的慢性自身免疫性疾病, 主要侵犯关节滑膜, 以滑膜的慢性增生性炎症、血管翳形成、关节软骨及骨损害为主要病理过程, 早期即出现滑膜炎^[10-11]。滑膜组织在炎症因子的刺激下会导致滑膜细胞凋亡抑制、增生异常, 而异常增生的滑膜又不断破坏软骨等组织导致关节炎加重, 形成恶性循环。因此, 抑制滑膜组织的异常增生对缓解关节炎具有重要意义, 成为了治疗类风湿关节炎的重要目标^[12-14]。存在于滑膜衬里层的滑膜成纤维细胞是滑膜组织的主要组成部分。滑膜成纤维细胞的大量增生在类风湿关节炎的病理机制中起着关键作用^[15], 其过度增殖由凋亡相对不足所导致^[16], 因而, 诱导滑膜成纤维细胞的凋亡是抑制滑膜增生的重要途径^[17]。研究表明, Bcl-2 家族对线粒体膜通透性的调节、NF-KappaB 信号通路的激活、p53 突变等多种途径皆与类风湿关节炎滑膜成纤维细胞的凋亡有关^[18-19], 其中与线粒体反应相关的研究广泛。在线粒体途径上 Bcl-2 蛋白家族作为参与细胞凋亡的核心家族, 对凋亡的调控意义尤为突出^[20-22]。在 Bcl-2 蛋白家族中 Bcl-2 是起主要作用的抗凋亡蛋白, Bax 是重要的促凋亡蛋白, 二者动态变化可引起线粒体膜通透性改变, 从而激活线粒体凋亡通路^[23-24]。Bcl-2 过多将阻止其与 Bax 之间形成同源二聚体, 而 Bax 同源二聚体的相对减少, 使细胞免受凋亡^[25]。在类风湿关节炎的发病过程中, Bcl-2 呈明显高表达状态, 而 Bax 表达水平升高的幅度远远低于 Bcl-2 升高的水平, 使 Bcl-2/Bax 比值升高, 从而造成滑膜细胞增殖/凋亡失衡, 促进了类风湿关节炎的发生发展^[7, 26]。通过调节 Bcl-2/Bax 比值来发挥对滑膜成纤维细胞的促凋亡作用, 从而抑制滑膜细胞增殖, 可有效治疗类风湿关节炎^[27]。

针刀疗法是一种融合了中医针刺疗法和西医手术疗法之优点的新疗法^[28]。临床研究证实, 针刀治疗类风湿关节炎疗效突出, 具有抗炎镇痛作用, 能有效改善类风湿关节炎患者的疼痛、肿胀和功能障碍^[29]。在类风湿关节炎发病过程中, 关节内炎症反应不断加重, 渗出液不断增加, 致使关节内承受了巨大的张力, 进而导致关节变形甚至功能丧失; 针刀治疗可以通过“针”的刺激和“刀”的切割, 缓解关节周围软组织痉挛, 松解软组织的粘连瘢痕, 从而恢复关节局部力学的动态平衡, 达到改善类风湿关节炎关节功能活动的目的^[30]。有研究证实, 针刀治疗可以减轻滑膜囊压力, 促进滑囊血液循环, 改善滑膜的通透性, 以修复损伤的滑膜^[31]。然而其修复类风湿关节炎滑膜损伤的分子生物学机制尚未见报道。胶原诱导性关节炎模型是研究类风湿关节炎最理想的动物模型^[32], 此次实验旨在从针刀治疗对胶原诱导性关节炎大鼠滑膜组织凋亡因子影响的角度来探究其作用机制。

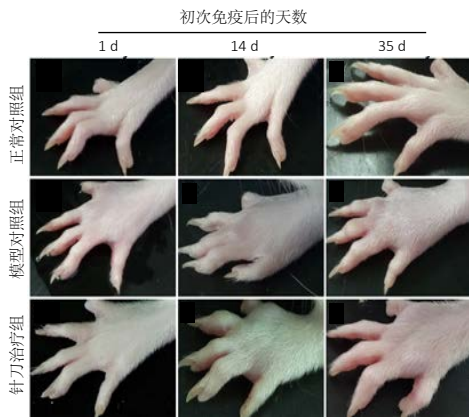
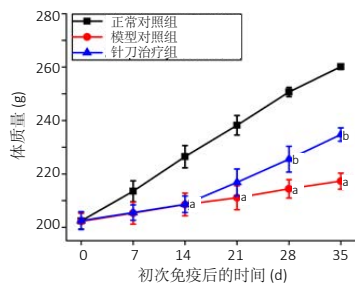
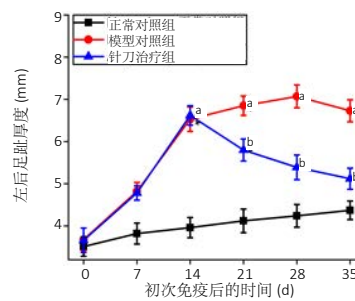


图2 | 各组大鼠左后足趾肿胀情况大体照片
Figure 2 | Swelling of the left hind toe of rats



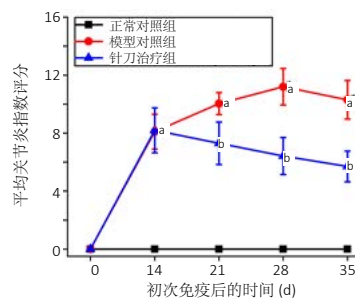
图注: 与正常对照组比较, $^aP < 0.01$; 与模型对照组比较, $^bP < 0.05$

图3 | 各组大鼠体重变化测量图 ($\bar{x} \pm s, n=10$)
Figure 3 | Changes in rat body mass ($\bar{x} \pm s, n=10$)



图注: 与正常对照组比较, $^aP < 0.01$; 与模型对照组比较, $^bP < 0.05$

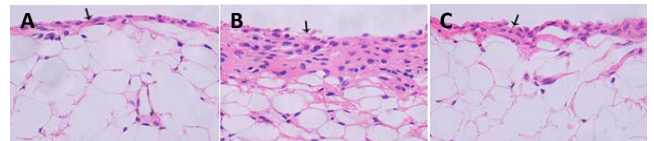
图4 | 各组大鼠左后足趾厚度变化测量图 ($\bar{x} \pm s, n=10$)
Figure 4 | Changes in the thickness of the rat's left posterior toe ($\bar{x} \pm s, n=10$)



图注: 与正常对照组比较, $^aP < 0.01$; 与模型对照组比较, $^bP < 0.05$

图5 | 各组大鼠平均关节炎指数评分 ($\bar{x} \pm s, n=10$)
Figure 5 | Changes in mean arthritis index of rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

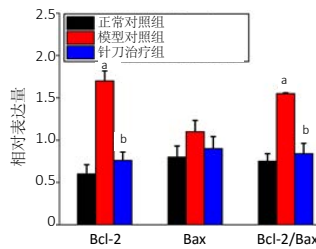
此次研究观察到, 在胶原诱导性关节炎大鼠模型中, 初次免疫后 14 d, 各组大鼠足趾明显红肿, 并出现功能障碍。针刀治疗前, 胶原诱导性关节炎大鼠体质量显著降低, 足趾肿胀明显; 针刀治疗后, 胶原诱导性关节炎大鼠体质量有所增加, 足趾肿胀程度减轻, 关节炎指数评分下降, 提示针刀治疗在一定程度上改善了大鼠的健康状况, 并发挥了减轻足趾肿胀、减轻局部组织炎症反应的作用。苏木精-伊红染色病理观察显示, 针刀治疗组较模型组滑膜层数减少, 炎症细胞数量减少, 进一步说明针刀治疗可以减轻胶原诱导性关节炎大鼠的滑膜增生程度及关节炎症状, 从而对胶原诱导性



图注: 图A为正常对照组; B为模型对照组; C为针刀治疗组。针刀治疗组滑膜细胞层数增加, 但炎症细胞浸润较少

图6 | 各组大鼠关节滑膜病理形态学观察 (箭头所指处为滑膜层边缘, 苏木精-伊红染色, $\times 400$)

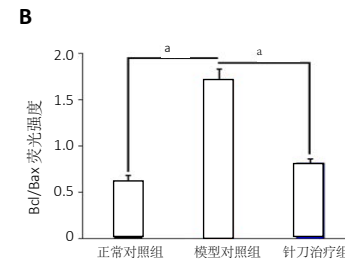
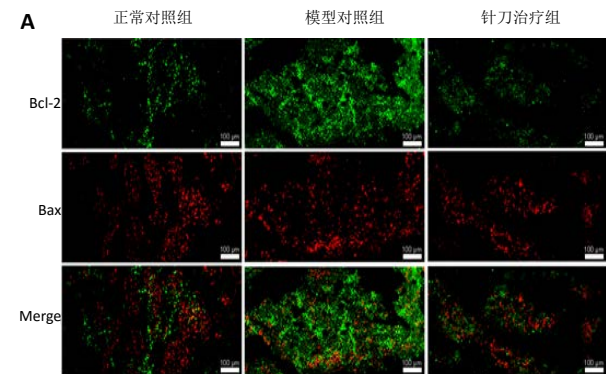
Figure 6 | Pathological observation of the rat's joint synovium (arrows indicate the edge of the synovium; hematoxylin-eosin staining, $\times 400$)



图注: 与正常对照组比较, $^aP < 0.01$; 与模型对照组比较, $^bP < 0.05$

图7 | 各组大鼠滑膜组织 Bcl-2、Bax、Bcl-2/Bax mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Figure 7 | Expression of Bcl-2, Bax, and Bcl-2/Bax mRNAs in the rat synovium ($\bar{x} \pm s, n=10$)



图注: 图A为免疫荧光染色观察 (标尺=100 μm); B为荧光强度比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$), $^aP < 0.01$

图8 | 各组大鼠滑膜组织 Bcl-2/Bax 表达的比较

Figure 8 | Comparison of Bcl-2/Bax expression in the rat synovium among groups

关节炎大鼠具有较好的治疗作用。RT-PCR 检测结果表明, 针刀治疗降低了滑膜组织 Bcl-2 mRNA 的表达, 下调了 Bcl-2/Bax mRNA 比值; 免疫荧光染色检测结果也一致性地反映了针刀治疗下调了滑膜组织 Bcl-2/Bax 的比值。但由于实验尚未检测滑膜细胞凋亡情况, 故其是否通过 Bcl-2/Bax 途径调节了类风湿关节炎滑膜细胞的凋亡有待于进一步细胞实验验证; 其调节胶原诱导性关节炎大鼠滑膜组织 Bcl-2/Bax 表达的具体途径, 也有待深入研究。

综上所述, 实验通过大体水平和基因、蛋白表达水平检测滑膜组织中较为典型的凋亡因子, 初步探究了针刀治疗类

风湿关节炎的作用机制：针刀治疗能有效降低胶原诱导性关节炎大鼠滑膜组织 Bcl-2 表达，下调 Bcl-2/Bax 的比值，这可能是其减轻类风湿关节炎滑膜炎反应和滑膜增生的作用机制之一。

作者贡献：刘青（第一作者）进行实验实施、文献资料收集、成文，万碧江（通讯作者）负责实验设计、实验评估、审核，盲法评估。

经费支持：该文章接受了“湖北中医药大学研究生创新能力提升项目(1010040103)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题：实验方案经湖北中医药大学动物实验伦理委员会批准（批准号为 00127518）。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术，并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重：文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审：文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

文章版权：文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] 茹晋丽, 李小峰, 胡学芳, 等. 血管内皮生长因子在类风湿关节炎的表达 [J]. 中华风湿病学杂志, 2003,7(11):699-701.
- [2] 姜功道, 万碧江, 黄伟, 等. 针刀松解术对类风湿关节炎肘关节僵硬患者关节液 IL-6、IL-10、TNF- α 的影响 [J]. 世界针灸杂志 (英文版), 2018,28(2):21-26.
- [3] 万碧江, 黄伟, 任婕, 等. 针刀松解术对类风湿关节炎肘关节僵硬患者血清氧自由基代谢水平的影响 [J]. 针灸临床杂志, 2018,34(1):47-50.
- [4] 万碧江, 黄伟, 张荒生, 等. 针刀整体松解术配合微波治疗类风湿湿肘关节僵硬的临床观察 [J]. 中国康复医学杂志, 2018,33(12):1429-1433.
- [5] 方勇. 针刀方案结合中药内服外敷法治疗类风湿关节炎顽固性肿痛的临床研究 [J]. 中华中医药学刊, 2016,34(3):724-727.
- [6] 王凤杰, 樊莎莎, 陈显兵, 等. Lunasin 对实验性类风湿关节炎大鼠滑膜成纤维细胞增殖与凋亡的影响 [J]. 免疫学杂志, 2016,32(2):114-118.
- [7] 高薇, 冯欣, 任立冰, 等. 类风湿关节炎大鼠滑膜组织中凋亡因子 Bcl-xl 和 Bcl-2 及 Bax 的表达及意义 [J]. 中国全科医学, 2012,15(24):2776-2779.
- [8] GU WZ, BRANDWEIN SR. Inhibition of type II collagen-induced arthritis in rats by triptolide. *Int J Immunopharmacol.* 1998;20(8):389-400.
- [9] 王琦. Dkk1 在 CIA 大鼠骨质侵蚀中的作用及药物干预影响 [D]. 南京: 东南大学, 2012.
- [10] 黄英, 陈哲, 王玉, 等. 中药对类风湿关节炎成纤维滑膜细胞的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2017,35(8):2095-2097.
- [11] 宋小莉, 苏娟, 刘重阳, 等. 类风湿关节炎滑膜组织中脯氨酸羟化酶及希佩尔林道肿瘤抑制蛋白的表达及意义 [J]. 中国组织工程研究, 2019,23(23):3623-3629.

- [12] 肖长虹, 顾为望, 张嘉宁, 等. 南蛇藤醇提取物对类风湿关节炎滑膜增生和软骨侵蚀及降解的抑制作用 [J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(7):945-950.
- [13] 朱艳媚, 祁岗, 杨春燕, 等. 藏药十八味党参丸抑制 CIA 大鼠滑膜组织炎症因子表达和细胞凋亡诱导 [J]. 中国高原医学与生物学杂志, 2017,38(4):273-279.
- [14] 党鹏, 田杰祥, 王钢, 等. 中医药对类风湿关节炎滑膜炎的作用机制 [J]. 中国老年学杂志, 2019,39(14):3590-3593.
- [15] HA YJ, CHOI YS, HAN DW, et al. PIM-1 kinase is a novel regulator of proinflammatory cytokine-mediated responses in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology (Oxford, Engl.)*. 2018;58(1):154-164.
- [16] 贾晓益, 魏伟, 郑咏秋, 等. 白芍总苷对胶原性关节炎滑膜组织中 Bcl-2、Bax 表达的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2006,41(2):143-146.
- [17] 赵欣欣, 赵丽娟, 肖卫国, 等. C-myc 反义寡脱氧核苷酸抑制类风湿滑膜细胞增殖诱导滑膜细胞凋亡 [J]. 中华风湿病学杂志, 2004,8(2):67-72+129.
- [18] GUO F, YANG F, ZHU YH. Scutellariaein from *Scutellaria barbata* induces apoptosis of human colon cancer HCT116 cells through the ROS-mediated mitochondria-dependent pathway. *Nat Prod Res.* 2018,19:1-4.
- [19] MALEMUD CJ. The role of the JAK/STAT signal pathway in rheumatoid arthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2018;10(5/6):117-127.
- [20] MAHONEY JA, ROSEN A. Apoptosis and autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 2005;17(6):583-588.
- [21] 任玉伟, 宿华威. Bcl-2 基因家族研究进展 [J]. 大连医科大学学报, 2015, 37 (2) :202.
- [22] AQUACHERIA A, BAGHDIGUIAN S, LAMB HM, et al. Connecting mitochondrial dynamics and life-or-death events via Bcl-2 family proteins. *Neurochem Int.* 2017;109:141-161.
- [23] LEE SY, KWOK SK, SON HJ, et al. IL-17-mediated Bcl-2 expression regulates survival of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis through STAT3 activation. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(1):R31.
- [24] DAHMARDEH N, SHABANI M, BASIRI M, et al. Functional antagonism of sphingosine-1-phosphate receptor 1 prevents harmaline-induced ultrastructural alterations and Caspase-3 mediated apoptosis. *Malays J Med Sci.* 2019;26(4):28-38.
- [25] 江爱娟, 王浩, 李道卫, 等. 益气活血通络方对糖尿病大鼠坐骨神经细胞凋亡及相关蛋白表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2016,31(8):3009-3012.
- [26] 王妮妮, 赵鹏飞, 谈文峰, 等. 沉默脂联素受体 1 对脂多糖诱导的类风湿关节炎滑膜成纤维细胞 MH7A 增殖凋亡的影响 [J]. 南京医科大学学报 (自然科学版), 2017,37(9):1109-1113+1153.
- [27] 林昌松, 陈秀敏, 刘清平, 等. 昆母汤对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞 bax、bcl-2 的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2014,25(6):656-659.
- [28] 张义, 郭长青. 浅析针刀疗法与中医学的关系 [J]. 江苏中医药, 2010, 42(5):3-5.
- [29] 胡佳伟, 刘维, 张博. 针刀治疗类风湿关节炎临床研究进展 [J]. 天津中医药, 2019,36(6):617-621.
- [30] 吴绪平. 针刀医学 [M]. 北京: 中国医药科技出版社. 2016.
- [31] 王立新, 代修勇, 郭力军, 等. 针刀中药康复综合治疗膝关节外伤性滑膜炎疗效观察 [J]. 针灸临床杂志, 2010,26(10):16.
- [32] 方剑乔, 马桂芝, 梁宜. 电针足三里、三阴交穴治疗大鼠胶原性关节炎及其部分血液流变学机制 [J]. 浙江中医药大学学报, 2008, 32(5):652-655.