

· 基础研究 ·

温针灸对膝骨关节炎大鼠软骨细胞凋亡及 miR-27a 介导的 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响

吴福春¹ 陈晓婷² 余德标¹ 陈捷¹ 金星¹¹福建医科大学省立临床医学院,福建省立医院,福州 350001; ²福建中医药大学康复医学院,福州 350122

通信作者:陈捷,Email:bigcowabc@sina.com

【摘要】 目的 观察温针灸对早期膝骨关节炎(KOA)模型大鼠软骨细胞凋亡及 miR-27a 介导的 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响。**方法** 采用随机数字表法将 50 只 SD 大鼠分为对照组、模型组、温针灸组、抑制剂组及抑制剂+温针灸组(简称联合组),每组 10 只大鼠。于造模前 3 d 对抑制剂组及联合组大鼠给予局部 miR-27a 抑制剂药物干预;除对照组以外,其余各组大鼠均通过局部注射木瓜蛋白酶方法制成早期 KOA 大鼠模型。待造模完成后,联合组及温针灸组大鼠均给予内、外侧膝眼穴温针灸治疗,每次治疗 30 min,共治疗 14 d。模型组及抑制剂组大鼠则同期在固定器上制动 30 min。于干预 2 周后采用苏木精-伊红(HE)染色观察各组大鼠软骨组织病理学改变,采用 TUNEL 法检测软骨细胞凋亡情况,采用 ELISA 法检测软骨组织白介素(IL)-1 β 和 IL-6 水平;采用 WB 技术检测软骨组织 p-PI3K、p-AKT、p-mTOR、PI3K、AKT、mTOR、LC3-II 及 Beclin1 蛋白表达,采用 qRT-PCR 技术检测软骨组织中 miR-27a 含量。**结果** 干预结束后发现温针灸组软骨细胞形态较模型组明显改善,抑制剂组及联合组软骨细胞形态较温针灸组进一步改善;温针灸组软骨细胞凋亡率明显低于模型组($P<0.05$);与温针灸组比较,抑制剂组及联合组软骨细胞凋亡率均显著降低($P<0.05$),抑制剂组与联合组软骨细胞凋亡率组间差异无统计学意义($P>0.05$);温针灸组、抑制剂组和联合组 IL-1 β 、IL-6、LC3-II、Beclin1、miR-27a 蛋白表达及 mRNA 水平均较模型组明显降低($P<0.05$),抑制剂组及联合组上述指标均较温针灸组显著降低($P<0.05$);温针灸组、抑制剂组和联合组 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 及 p-mTOR/mTOR 水平均较模型组明显升高($P<0.05$),抑制剂组及联合组上述指标水平亦显著高于温针灸组($P<0.05$),抑制剂组及联合组上述蛋白表达及 mRNA 水平组间差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 温针灸可能通过下调 miR-27a 表达,促进 PI3K/AKT/mTOR 信号通路激活,能抑制早期 KOA 模型大鼠软骨细胞过度自噬及凋亡,有助于减轻关节炎症反应及损伤,延缓关节退变进程。

【关键词】 膝骨关节炎; 温针灸; 自噬; miR-27a; PI3K/AKT/mTOR 信号通路**基金项目:**福建省自然科学基金(2021J01391);福建省卫生健康中青年骨干人才培养项目(2020GGA001)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2024.02.002

Effects of warm acupuncture on apoptosis of chondrocytes and MiR-27a-mediated PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in a rat model of knee osteoarthritis

Wu Fuchun¹, Chen Xiaoting², Yu Debiao¹, Chen Jie¹, Jin Xing¹¹Fujian Provincial Clinical Medical College of Fujian Medical University, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, China; ²College of Rehabilitation Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

Corresponding author: Chen Jie, Email: hopesflying@hotmail.com

【Abstract】 Objective To observe any effect of warm acupuncture on chondrocyte apoptosis and the miR-27a-mediated PI3K/AKT/mTOR signaling pathway using a rat model of early knee osteoarthritis (KOA). **Methods** Fifty Sprague-Dawley rats were randomly divided into a control group, a model group, a warm acupuncture group, an inhibitor group, and an inhibitor + warm acupuncture group (the combined group), each of 10. Three days before the modeling, both the inhibitor and combined groups were injected with miR-27a inhibitor. Pain was then injected in all groups except the control group to establish the early KOA model. After successful modeling, the combined and warm acupuncture groups were given 30 minutes of warm acupuncture at the medial and lateral Xiyan points daily for 14 days. The model and inhibitor groups were fixed for 30 minutes during those sessions. After the 2 weeks, hematoxylin-eosin staining was used to observe any pathological changes in the cartilage tissue. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling was used to detect chondrocyte apop-

tosis, and enzyme-linked immunosorbent assays were employed to observe the levels of interleukin 1β (IL- 1β) and IL-6. Western blotting was used to evaluate the expression of p-PI3K, p-AKT, p-mTOR, PI3K, AKT, mTOR, LC3-II, and Beclin1 proteins in the cartilage tissue, while quantitative real-time polymerase chain reactions detected the content of miR-27a. **Results** After the intervention, the morphology of the chondrocytes in the warm acupuncture group had improved significantly compared to the model group, while that of the inhibitor and combined groups was better than among the warm acupuncture group. The rate of chondrocyte apoptosis in the warm acupuncture group was significantly lower than in the model group, while the rates of the inhibitor and combined groups were lower still. There was no significant difference between the inhibitor and the combination group on average. The average expression of IL-6, IL- 1β , LC3-II and Beclin1 protein and of miR-27a were significantly lower in the warm acupuncture, inhibitor and combined groups than among the model group, with those of the inhibitor and combined groups significantly lower than among the warm acupuncture group, on average. The average p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT and p-mTOR/mTOR levels of the warm acupuncture, inhibitor and combined groups were significantly higher than those of the model group, with those of the inhibitor and combined groups significantly higher, on average, than among the warm acupuncture group. However, there was no significant difference between the inhibitor group and the combined group in their protein expression and mRNA levels. **Conclusions** Warm acupuncture may down-regulate the expression of miR-27a to promote the activation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, inhibiting excessive autophagy and apoptosis. That would relieve inflammation and damage, and delay degeneration in early KOA, at least in rats.

【Key words】 Osteoarthritis of the knee; Warm acupuncture; Autophagy; Micro RNA-27a; PI3K/AKT/mTOR signaling pathway

Funding: The Natural Science Foundation of Fujian Province (2021J01391); the Fujian Training of Young and Middle-aged Backbone Talents program (2020GGA001)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2024.02.002

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种常见的关节退行性疾病,主要导致膝关节疼痛及功能障碍,严重影响患者的生活质量。临床针对 KOA 患者多给予保守治疗,如病情持续恶化则需考虑关节置换术等侵入性治疗,故早期干预并抑制 KOA 病情进展具有重要的临床意义^[1]。

自噬是细胞的一种调节性反应,软骨组织的自噬会随 KOA 不同阶段而相应变化,在 KOA 早期阶段软骨浅表区表现为明显自噬和大量细胞凋亡,从而加重软骨组织损伤^[2-3],故抑制早期 KOA 软骨过度自噬对延缓 KOA 病情进展极其重要。相关研究表明软骨细胞自噬水平受 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的调控,激活该信号通路可抑制细胞自噬反应,延缓 KOA 关节软骨退化^[4]。近年来有学者发现 PI3K/AKT/mTOR 信号通路受部分短链非编码 RNA 的调控,如 miR-27a 可抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路激活^[5]。温针灸作为一种中医治疗手段,具有温经通脉、行气活血等功效;相关动物实验证实温针灸对 KOA 模型兔关节软骨 PI3K/AKT/mTOR 信号通路具有调控作用,能抑制 KOA 病情进展^[6],但具体作用机制尚未明确。基于此,本研究通过制作早期 KOA 大鼠模型并给予内、外侧膝眼穴温针灸治疗,同时观察对 miR-27a 表达及其介导的软骨细胞自噬信号通路的影响,以初步探讨温针灸治疗早期 KOA 的相关

机制。

材料与方法

一、实验动物及主要试剂

选取 50 只 10 周龄、体重 300~350 g 无特定病原体(specific pathogen-free, SPF)级健康 Sprague-Dawley (SD)大鼠,由福建省立医院实验动物中心提供[动物合格证号 SCXK(京)2019-0008]。本研究主要试剂包括苏木素染液(北京中衫金桥有限公司, ZLI-9610)、伊红染液(北京 Solarbio 有限公司, G1100)、TUNEL 检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司, C1090)、Trizon Reagent(北京康为世纪生物科技有限公司, CW0580S)、白细胞介素(interleukin, IL)- 1β 、IL-6 ELISA 检测试剂盒(武汉基因美生科技有限公司, HM10206、HN10001)、miR-27a 抑制剂(锐博生物, NO2151A)、鼠抗 β -actin(北京 TransGen Biotech 有限公司, HC201)、抗兔 LC3(江苏亲科生物研究中心有限公司, AF5402)、抗鼠 Beclin1(美国 Proteintech 公司, 66665-1-Ig)、抗兔 p-mTOR(美国 Proteintech 公司, 67778-1-Ig)、抗兔 p-PI3K(江苏亲科生物研究中心有限公司, AF3241)、抗鼠 p-AKT(英国 Abcam 公司, ab38449)、抗兔 PI3K(北京博奥森生物技术有限公司, BS-0128R)、抗鼠 AKT(美国 Proteintech 公司, 60203-2-Ig)、抗兔 mTOR(英国 Abcam 公司,

ab32028)及辣根过氧化物酶标记二抗(北京中杉金桥有限公司,ZB-2301)等。

二、动物分组及 KOA 模型制作

入选 SD 大鼠经适应性喂养 1 周后按体重编号,采用随机数字表法将其分为 5 组,分别是对照组、模型组、温针灸组、抑制剂组及抑制剂+温针灸组(简称联合组),每组 10 只大鼠。

在制模前 3 天时向抑制剂组、联合组大鼠右后肢膝关节腔内注射 miR-27a 抑制剂,该注射液采用 5 nmol miR-27a 抑制剂溶于 0.2 ml 生理盐水的方案进行配制。同期模型组、温针灸组大鼠右后肢膝关节腔内分别注射 0.2 ml 生理盐水,各组大鼠注射操作均只进行 1 次。

随后将模型组、温针灸组、抑制剂组及联合组大鼠制成 KOA 大鼠模型,主要制模步骤如下:提前配制戊巴比妥钠溶液(浓度 3%)及木瓜蛋白酶混合液(成分包括 4%木瓜蛋白酶溶液+0.03 mol/L 半胱氨酸+生理盐水),采用戊巴比妥钠溶液按 30 mg/kg 体重标准对大鼠进行腹腔注射麻醉,待麻醉剂生效后将大鼠仰卧束缚于桌面上,右侧膝关节备皮,并将膝关节屈曲至 45°,然后由髌骨下缘前方内侧向髌间窝方向进针,向膝关节腔内注入约 0.2 ml 木瓜蛋白酶混合液以诱导 KOA 形成,于制模当天及第 4 天、第 7 天时各注射 1 次^[7]。对照组大鼠在整个研究期间均不给予任何特殊处理。

三、干预方法

温针灸组及联合组大鼠于制模后第 8 天时对其内、外侧“膝眼”穴进行温针灸干预,大鼠右后肢膝关节常规消毒后,选用一次性“佳健”牌无菌针灸针(苏州医疗用品有限公司出品,规格为 0.25 mm×25 mm)分别直刺内、外侧“膝眼”穴 5 mm^[8],在针柄处放置一根直径 0.5 cm 的艾条(无锡市药条厂出品,规格为 18 mm×200 mm)并点燃,当艾条燃烧至剩余 0.5 cm 时迅速更换。每只大鼠温针灸持续时间约 30 min,每天治疗 1 次,治疗 7 d 为 1 个疗程,共治疗 2 个疗程。模型组及抑制剂组大鼠在制模后均不给予特殊干预,仅每天在固定器上制动 30 min,连续干预 2 周。

四、软骨组织病理学观察

各组大鼠经 2 周干预后采用戊巴比妥钠溶液过量麻醉处死,取右侧膝关节软骨组织,经脱钙、脱水、石蜡包埋等处理后行连续切片(片厚 5 μm)。各组大鼠软骨切片经苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色后,置于光学显微镜下观察软骨形态结构变化。采用 Mankin 评分系统对软骨病变程度进行评分,分值范围 0~14 分,其中 0~1 分表示软骨形态结构正常;2~6 分

表示早期 OA;7~10 分表示中期 OA;11~14 分表示晚期 OA^[9]。

五、软骨细胞凋亡检测

各组大鼠软骨切片经常规脱蜡、脱水后,采用脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL)检测软骨细胞凋亡情况,具体检测步骤严格参照 TUNEL 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司, C1090)说明书。通过显微镜观察各组大鼠软骨细胞凋亡情况, TUNEL 染色阳性的凋亡细胞在显微镜下呈棕黄色。凋亡率(%)=(TUNEL 染色阳性细胞数/总细胞数)×100%。

六、软骨组织 IL-1β、IL-6 含量检测

将各组大鼠软骨组织裂解后取上清液,参照酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒说明书进行操作,将上清液添加到酶标板中,经孵育、抗体标记、亲和素标记、洗板等处理后,采用酶标仪检测样品在 450 nm 处的吸光度值,以标准品吸光度值为基准绘制标准曲线,并计算各组大鼠样品浓度。

七、细胞自噬因子及相关信号通路蛋白检测

采用 Western blot 法检测各组大鼠软骨组织自噬因子 LC3-II、Beclin1 及相关信号通路蛋白 PI3K、AKT、mTOR、p-PI3K、p-AKT、p-mTOR 蛋白含量。取各组大鼠右后肢膝关节内侧的胫骨平台软骨组织并制成切片,分别置入 EP 试管中并加入裂解液,离心后取上清液,采用 BCA(bicinchoninic acid, BCA)法测定蛋白质含量并对其进行调平。通过电泳、转印、封闭、孵育、染色、凝胶系统拍照成像等一系列操作后,采用 ImageJ 软件分析对比各目标蛋白灰度值与内参 β-actin 的比值。

八、miR-27a mRNA 表达水平检测

将各组大鼠软骨组织充分研磨后提取总 RNA,并测量其浓度及纯度,采用 cDNA Kit 试剂盒进行逆转录反应并获得相应的 cDNA,采用 RT-PCR 技术对 RNA 进行扩增分析,以 β-actin 作为内参基因,参照荧光定量试剂盒说明书要求检测各目标基因的表达水平,采用 2^{-ΔΔCt}法计算目标基因 mRNA 相对表达量。具体引物序列情况见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')
β-actin	上游 TGTCACCAACTGGGACGATA
	下游 GGGGTGTTGAAGGCTCAAA
miR-27a	上游 GCGCGTTCACAGTGGCTAAG
	下游 AGTGCAGGGTCCGAGGTATT

九、统计学方法

采用 SPSS 19.0 版统计学软件包进行数据分析, 所得计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA), 两组间比较采用最小显著差异法 (least-significant difference, LSD), $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、温针灸对早期 KOA 大鼠软骨组织病理学改变的影响

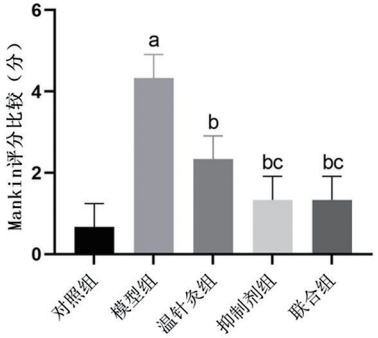
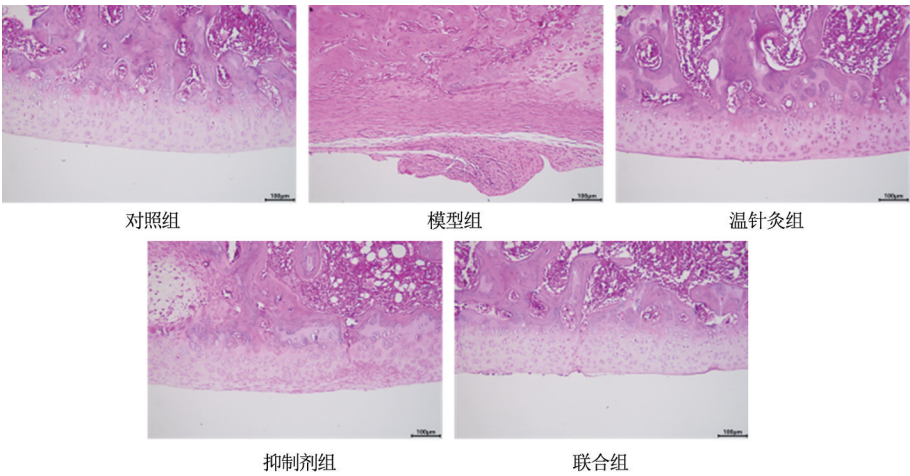
通过 HE 染色发现, 对照组大鼠软骨组织着色均匀, 基质丰富, 潮线完整; 模型组软骨细胞数量明显减少, 且出现细胞核皱缩现象, 基质染色较浅。与模型组比较, 温针灸组软骨形态显著改善; 抑制剂组及联合组软骨形态较温针灸组有进一步改善。与对照组比较, 模型组软骨细胞 Mankin 评分显著升高 ($P < 0.05$), 提示早期 KOA 模型造模成功。经 2 周干预后, 与模型组

比较, 温针灸组、抑制剂组及联合组软骨细胞 Mankin 评分均显著降低 ($P < 0.05$); 而抑制剂组及联合组较温针灸组软骨细胞 Mankin 评分亦显著降低 ($P < 0.05$); 但抑制剂组与联合组 Mankin 评分组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。具体情况详见图 1。

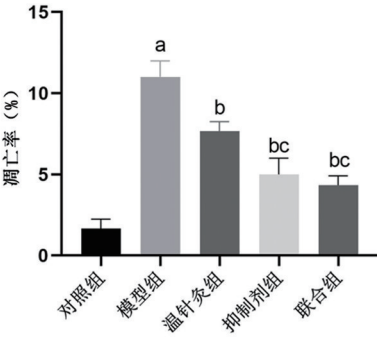
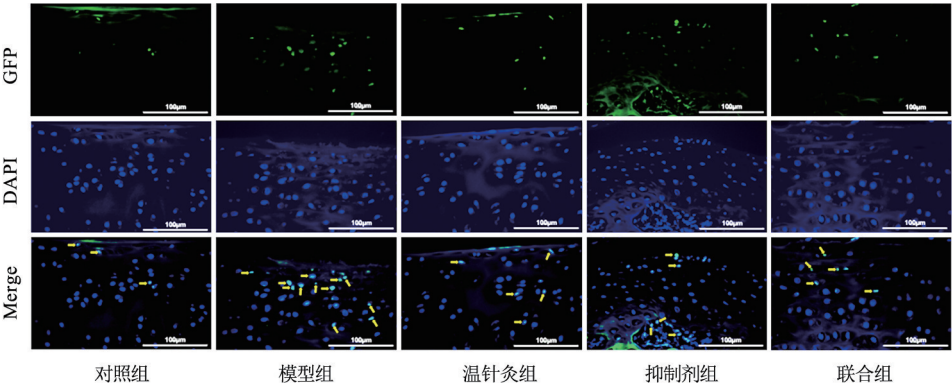
二、温针灸对早期 KOA 大鼠软骨细胞凋亡的影响
通过 TUNEL 染色发现, 模型组大鼠膝关节软骨 TUNEL 阳性细胞率较对照组显著增高 ($P < 0.05$)。经 2 周干预后, 温针灸组、抑制剂组及联合组膝关节软骨 TUNEL 阳性细胞率较模型组显著降低 ($P < 0.05$); 抑制剂组及联合组软骨细胞凋亡率亦显著低于温针灸组 ($P < 0.05$); 抑制剂组与联合组软骨细胞凋亡率组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。具体情况见图 2。

三、温针灸对早期 KOA 大鼠软骨细胞炎症因子的影响

通过 ELISA 法检测发现, 模型组软骨细胞 IL-1 β 、IL-6 蛋白含量均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 温针灸组、抑制剂组及联合组软骨细胞 IL-1 β 、IL-6 蛋白含量



注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与温针灸组比较, ^c $P < 0.05$
图 1 温针灸对早期 KOA 模型大鼠软骨细胞形态学的影响 (HE 染色, $\times 200$)



注: 图中箭头示 TUNEL 染色阳性细胞 (呈棕黄色); 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与温针灸组比较, ^c $P < 0.05$
图 2 温针灸对早期 KOA 模型大鼠软骨细胞凋亡的影响 (TUNEL 染色, $\times 200$)

均较模型组显著降低($P<0.05$)。经 2 周干预后,与温针灸组比较,抑制剂组及联合组 IL-1 β 、IL-6 蛋白含量均显著降低($P<0.05$);抑制剂组及联合组 IL-1 β 、IL-6 蛋白含量组间差异无统计学意义($P>0.05$)。具体情况见图 3。

四、温针灸对早期 KOA 大鼠软骨细胞自噬的影响
通过 Western blot 检测发现,模型组软骨细胞 LC3-II、Beclin1 蛋白表达均显著高于对照组($P<0.05$)。经 2 周干预后,温针灸组、抑制剂组及联合组上述蛋白表达均显著低于模型组($P<0.05$);与温针灸组比较,抑制剂组和联合组 LC3-II、Beclin1 蛋白含量均显著降低($P<0.05$);抑制剂组和联合组上述蛋白含量组间差异均无统计学意义($P>0.05$)。具体情况见图 4。

五、温针灸对早期 KOA 模型大鼠软骨细胞 PI3K/AKT/mTOR 自噬信号通路的影响

通过 Western blot 检测发现,模型组 PI3K、AKT 及 mTOR 磷酸化水平均较对照组明显降低($P<0.05$)。经 2 周干预后,温针灸组、抑制剂组及联合组上述蛋白磷酸化水平均显著高于模型组($P<0.05$);与温针灸组比较,抑制剂组和联合组上述蛋白磷酸化水平均显著

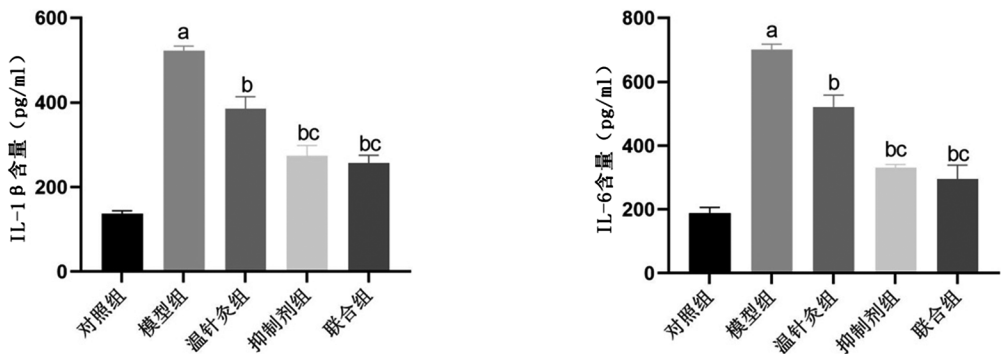
升高($P<0.05$);抑制剂组和联合组上述蛋白磷酸化水平组间差异无统计学意义($P>0.05$)。具体情况见图 5。

六、温针灸对早期 KOA 模型大鼠软骨细胞 miR-27a 的影响

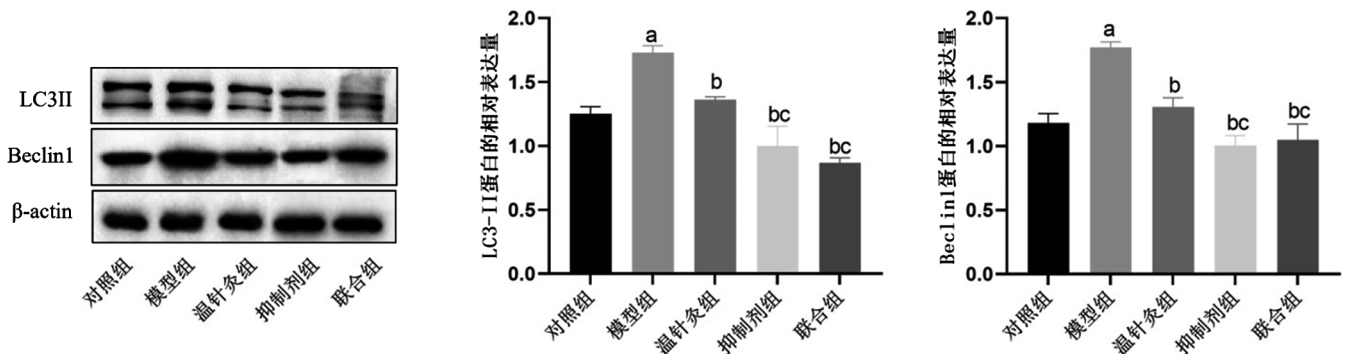
通过 qRT-PCR 检查发现,模型组大鼠膝关节软骨细胞 miR-27a 水平较对照组显著升高($P<0.05$)。经 2 周干预后,与模型组比较,温针灸组、抑制剂组及联合组大鼠软骨细胞 miR-27a 表达水平均显著降低($P<0.05$);与温针灸组比较,抑制剂组、联合组软骨细胞 miR-27a 表达水平均显著降低($P<0.05$),抑制剂组与联合组 miR-27a 表达水平组间差异无统计学意义($P>0.05$)。具体情况见图 6。

讨 论

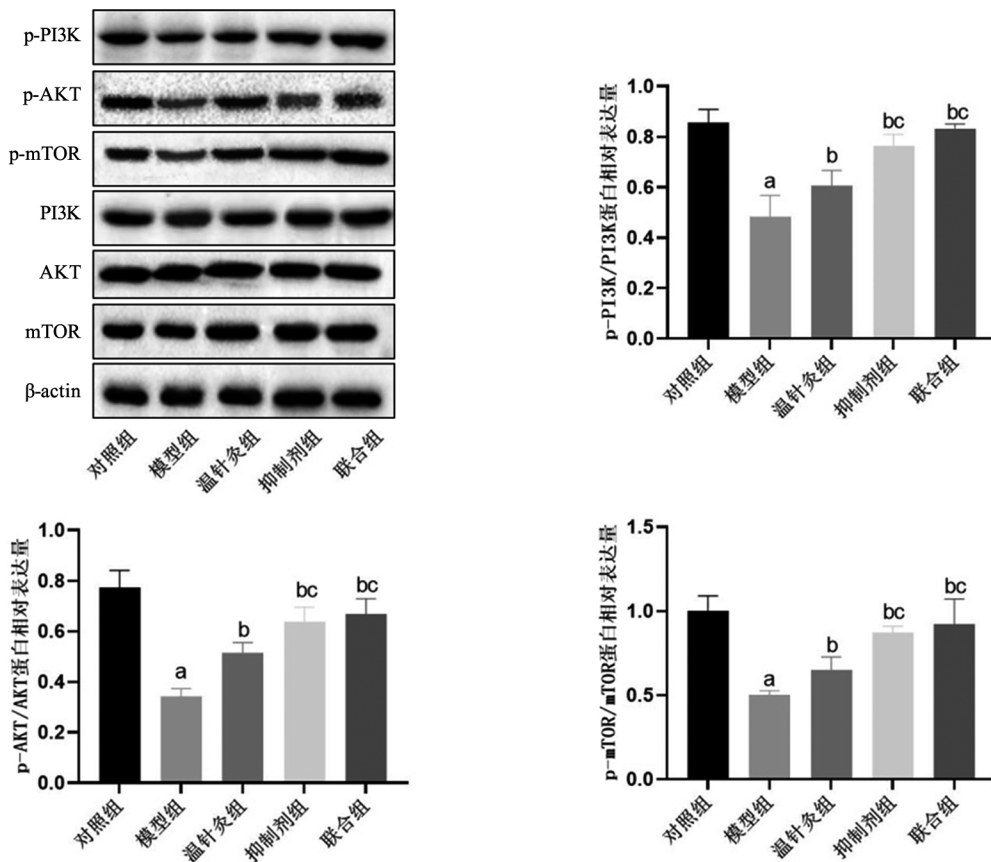
相关研究报道,在 KOA 早期阶段软骨组织可能出现自噬过度激活的现象,从而导致细胞功能紊乱和程序性死亡^[10]。温针灸疗法具有行气活血、温经通脉、化瘀止痛等作用,刺激内、外侧“膝眼”穴能发挥祛风湿、散风寒、利关节、通经络、止痹痛之功效^[11]。本研究对早期 KOA 模型大鼠施以内、外侧膝眼穴温针灸



注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与温针灸组比较,^c $P<0.05$
图 3 温针灸对早期 KOA 模型大鼠软骨细胞 IL-1 β 、IL-6 炎症因子的影响

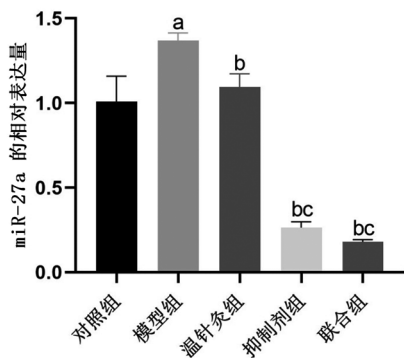


注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与温针灸组比较,^c $P<0.05$
图 4 温针灸对早期 KOA 模型大鼠软骨细胞 LC3-II、Beclin1 自噬因子的影响



注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与温针灸组比较,^c $P<0.05$

图5 温针灸对早期 KOA 模型大鼠软骨细胞 PI3K/AKT/mTOR 自噬信号通路的影响



注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与温针灸组比较,^c $P<0.05$

图6 温针灸对早期 KOA 模型大鼠软骨细胞 miR-27a 表达的影响

治疗,发现温针灸组大鼠软骨细胞形态良好,miR-27a 及自噬因子 Beclin1、LC3-II 蛋白水平均较模型组明显降低,p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 及 p-mTOR/mTOR 水平均较模型组显著升高,表明温针灸可能通过下调 miR-27a 含量,靶向调控 PI3K/AKT/mTOR 信号通路,抑制早期 KOA 异常自噬,减少软骨细胞凋亡,从而缓解软骨损伤。

自噬是机体的一种免疫保护机制,也与软骨退化

密切相关。Beclin1 在自噬的启动阶段具有关键作用,而 LC3-II 则参与自噬溶酶体膜的延伸过程,直至自噬溶酶体形成,故 Beclin1 及 LC3-II 表达水平被认为可用于监测自噬的发生及程度^[12]。既往动物实验观察到 OA 软骨组织中 PI3K/AKT/mTOR 信号通路被激活时会抑制软骨细胞自噬,表明软骨细胞自噬过程受 PI3K/AKT/mTOR 信号通路调控^[13-14]。其作用机制可能是 PI3K 诱导 PIP3 产生并激活磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1, PDK1),通过进一步诱导 AKT 磷酸化,可抑制吞噬细胞膜形成并降低细胞自噬能力,故激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路有助于抑制 OA 软骨细胞自噬^[15]。本研究结果显示,早期 KOA 模型组大鼠 Beclin1、LC3-II 蛋白水平均显著高于对照组,表明早期 KOA 模型大鼠自噬反应被激活,与 Zhang 等^[2]报道结果基本一致;同时模型组软骨细胞破坏严重,炎症因子 IL-1 β 、IL-6 水平升高,TUNEL 阳性细胞率显著上升,与机体正常适应性反应的自噬结果不一致,也进一步证实了 KOA 早期大鼠模型制作成功。而模型组 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 及 p-mTOR/mTOR 水平均显著低于对照组,提示其 PI3K/AKT/mTOR 信号通路被抑制,从而导致

自噬反应过度激活。温针灸组软骨组织病理改变较模型组明显减轻,炎症因子水平降低,同时 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 及 p-mTOR/mTOR 水平升高,自噬相关蛋白含量降低,表明温针灸可能通过激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路,抑制软骨细胞的过度自噬,减少软骨细胞凋亡,进而缓解软骨炎性病变。

近年来研究发现,KOA 软骨中的 miR-27a 表达异常,且 KOA 疾病严重程度与 miR-27a 含量具有显著相关性^[5]。已有学者证实 miR-27a 可靶向控制 PI3K 基因的 3'-UTR 使其沉默,进而抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路功能^[16]。本研究结果显示,模型组 miR-27a 含量显著高于对照组,提示早期 KOA 大鼠 PI3K/AKT/mTOR 信号通路被抑制。与模型组比较,温针灸组 miR-27a 含量明显降低,表明温针灸可通过抑制 miR-27a 表达,促进 PI3K/AKT/mTOR 信号通路激活,进而减轻早期 KOA 软骨细胞的过度自噬。为反向验证 miR-27a 在软骨细胞自噬中的作用,本研究通过向关节腔内注射 miR-27a 抑制剂以阻断 miR-27a 的激活效应,发现抑制剂组、联合组 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 及 p-mTOR/mTOR 水平均较模型组明显升高,Beclin1、LC3-II 蛋白含量均较模型组显著降低,而抑制剂组与联合组上述指标组间差异均无统计学意义($P>0.05$)。由此推测 miR-27a 作为 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的上游启动因子,对软骨细胞自噬具有明确调控作用,同时也进一步证实了温针灸能通过抑制 miR-27a 表达,促进下游 PI3K/AKT/mTOR 信号通路激活,进而发挥软骨保护作用。

综上所述,本研究提示温针灸可能通过抑制早期 KOA 模型大鼠 miR-27a 表达,促进 PI3K/AKT/mTOR 信号通路激活,能抑制软骨细胞过度自噬,减少软骨细胞凋亡,改善局部炎症反应,进而缓解 KOA 局部症状,为临床采用温针灸治疗 KOA 患者提供了理论基础。但温针灸调控 KOA 软骨细胞凋亡的确切机制仍需进一步探讨,未来研究方向包括探究其他 miRNAs 及潜在调控因子在温针灸治疗不同病程 KOA 中的作用,以进一步明确 PI3K/AKT/mTOR 信号通路在软骨细胞自噬及凋亡中的调控机制。

参 考 文 献

- [1] 叶海霞,谭波涛,贾功伟,等.膝关节骨性关节炎的物理治疗进展[J].中华物理医学与康复杂志,2020,42(9):853-857. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2020.09.021.
- [2] Zhang SL, Zhang KS, Wang JF, et al. Corresponding changes of autophagy-related genes and proteins in different stages of knee osteoarthritis: an animal model study[J]. Orthop Surg, 2022, 14(3):595-604.

DOI:10.1111/os.13057.

- [3] Almonte-Becerril M, Navarro-Garcia F, Gonzalez-Robles A, et al. Cell death of chondrocytes is a combination between apoptosis and autophagy during the pathogenesis of Osteoarthritis within an experimental model[J]. Apoptosis, 2010, 15(5):631-638. DOI: 10.1007/s10495-010-0458-z.
- [4] Xue JF, Shi ZM, Zou J, et al. Inhibition of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway promotes autophagy of articular chondrocytes and attenuates inflammatory response in rats with osteoarthritis[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 89:1252-1261. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.01.130.
- [5] Cai C, Min S, Yan B, et al. MiR-27a promotes the autophagy and apoptosis of IL-1 β treated-articular chondrocytes in osteoarthritis through PI3K/AKT/mTOR signaling[J]. Aging, 2019, 11(16):6371-6384. DOI: 10.18632/aging.102194.
- [6] 武永利,刘娣,王铎,等.温针灸调控膝关节炎模型兔关节软骨中 PI3K/Akt 信号通路的变化[J].中国组织工程研究,2022,26(35):5596-5601. DOI: org/10.12307/2022.911.
- [7] Tan C, Zhang J, Chen W, et al. Inflammatory cytokines via up-regulation of aquaporins deteriorated the pathogenesis of early osteoarthritis[J]. PLoS One, 2019, 14(8):e0220846. DOI: 10.1371/journal.pone.0220846.
- [8] 喻溢楠,唐成林,郭啸,等.电针对膝关节炎大鼠膝关节滑膜组织细胞焦亡的影响[J].针刺研究,2022,47(6):471-478. DOI: 10.13702/j.1000-0607.20211269.
- [9] 虞记华,艾海波,彭娟,等.电针刺激对膝关节炎软骨细胞 SIRT1 及 p53 表达的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2020,42(2):120-121. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2020.02.006.
- [10] Duan R, Xie H, Liu ZZ. The role of autophagy in osteoarthritis[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 608388. DOI: 10.3389/fcell.2020.608388.
- [11] 吴福春,陈捷,余德标,等.温针灸对兔膝关节炎软骨细胞及 Lubricin 的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2019,41(8):565-569. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2019.08.002.
- [12] Fernandez AF, Sebt S, Wei Y, et al. Disruption of the beclin 1-BCL2 autophagy regulatory complex promotes longevity in mice[J]. Nature, 2018, 558(7708):136-140. DOI: 10.1038/s41586-018-0162-7.
- [13] Xu K, He Y, SAA Moqbel, et al. SIRT3 ameliorates osteoarthritis via regulating chondrocyte autophagy and apoptosis through the PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. Int J Biol Macromol, 2021, 175:351-360. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.029.
- [14] Shi X, Han L, Sun T, et al. Silencing UHRF1 enhances cell autophagy to prevent articular chondrocytes from apoptosis in osteoarthritis through PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 529(4):1018-1024. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.06.032.
- [15] 阮丽萍.骨关节炎大鼠软骨 PI3K/Akt-mTOR 及 Beclin-1 自噬通路的表达及相关性分析[J].华中科技大学学报:医学版,2015,44(4):433. DOI: 10.3870/j.issn.1672-0741.2015.04.012.
- [16] Liu G, Cao P, Chen H, et al. MiR-27a regulates apoptosis in nucleus pulposus cells by targeting PI3K[J]. PLoS One, 2013, 8(9):e75251. DOI: 10.1371/journal.pone.0075251.

(修回日期:2023-11-27)

(本文编辑:易 浩)