基于转录组学探讨针刀干预对膝骨关节炎兔关节软骨的作用机制*

史晓伟，于文静，王东峰，徐萌，刘大鹏，闫泽明，张治多，胡胜华，史术峰

北京中医药大学第三附属医院，北京 100029

摘要：目的：基于转录组学测序技术探讨针刀干预膝骨关节炎（knee osteoarthritis，KOA）的分子机制。方法：9 只新西兰兔随机分为空白组（3 只）及 KOA 造模组（6 只），造模组采用改良 Videman 法固定 6 周以建立 KOA 模型，拆除固定装置后根据 Lequesne 评分再随机分为模型组和针刀组（每组 3 只），干预 4 周。干预结束后进行行为学评价，并对兔膝关节软骨进行转录组学测序、基因本体论（Gene Ontology，GO）和京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）分析。结果：（1）干预后，与模型组相比，针刀组 Lequesne 评分显著降低（$P<0.01$）；（2）与空白组相比，模型组共筛选出 1 055 条差异表达基因（differentially expressed genes，DEGs），GO 分析生物过程主要涉及“炎症反应”“免疫反应”和“细胞外基质组织”等功能，KEGG Level2 分析显示模型组 DEGs 主要参与“感染性疾病”“信号转导”“免疫系统”等通路；模型组表达上调的 DEGs 主要参与“细胞因子相互作用”“吞噬体”等通路，而表达下调的 DEGs 主要参与“癌症通路”“轴突导向”等通路。与模型组相比，针刀组共筛选出 312 条 DEGs，GO 分析结果显示，这些基因主要涉及“炎症反应”“肿瘤坏死因子反应”“semaphorin－plexin 信号通路”等功能，KEGG Level2 分析显示其主要参与“信号转导”“感染性疾病”及“免疫系统”等通路；针刀组表达下调的 DEGs 参与“细胞因子相互作用”“吞噬体”“破骨细胞分化”等通路，表达上调的 DEGs 参与“轴突导向”“蛋白质消化和吸收”等通路。（3）进行 qRT－PCR 验证，结果显示：针刀干预显著降低 *CCL2*、*CCL7*、*IL34* mRNA 表达。结论：针刀干预 KOA 的分子机制主要涉及关节软骨“信号转导”“免疫－炎症”等功能以及“细胞因子受体相互作用”“吞噬体”“轴突引导”等通路。

关键词：膝骨关节炎；针刀；转录组学；信号转导；免疫炎症；关节软骨

DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2025.12.413

中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999(2025)12－2650－11

Action Mechanism of Acupotomy Intervention in Rabbit Knee Osteoarthritis Cartilage Based on Transcriptomics

SHI Xiaowei，YU Wenjing，WANG Dongfeng，XU Meng，LIU Dapeng，YAN Zeming，ZHANG Zhiduo，HU Shenghua，SHI Shufeng

The Third Affiliated Hospital to Beijing University of Chinese Medicine，Beijing China 100029

Abstract：Objective：To explore the molecular mechanism of acupotomy intervention in knee osteoarthritis（KOA）based on transcriptome sequencing technology. Methods：Nine New Zealand rabbits were randomly divided into a blank group（3 rabbits）and a KOA modeling group（6 rabbits）. The modeling group was subjected to a modified Videman method fixation for 6 weeks to establish the KOA model. After removing the fixation device，the rabbits were further randomly divided into a model group and an acupotomy group（3 rabbits each）according to Lequesne scores and intervened for 4 weeks. After the intervention，behavioral assessments were conducted，and transcriptome sequencing，Gene Ontology（GO），and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes（KEGG）analyses were performed on the rabbit knee cartilage. Results：（1）After the intervention，compared with the model group，the Lequesne scores in the acupotomy group were significantly reduced（$P<0.01$）；（2）Compared with the blank group，a total of 1 055 differentially expressed genes

* **基金项目**：国家自然科学基金项目（81804184）；中国博士后科学基金一等资助项目（2018M640098）；北京中医药大学新教师启动基金项目（2021－JYB－XJSJJ－091）

(DEGs) were identified in the model group. GO biological process analysis mainly involved functions such as "inflammatory response","immune response",and "extracellular matrix organization". KEGG Level 2 analysis showed that the model group was mainly enriched in pathways related to "infectious diseases","signal transduction",and "immune system". In addition,the upregulated DEGs in the model group were enriched in pathways such as "cytokine – cytokine receptor interaction" and "phagosome",while the downregulated DEGs were enriched in "cancer pathways" and "axon guidance". Compared with the model group,312 differentially expressed genes were identified in the acupotomy group. GO analysis indicated that these genes primarily involved functions such as "inflammatory response","tumor necrosis factor response",and "semaphorin – plexin signaling pathway". KEGG Level 2 analysis showed enrichment mainly in pathways related to "signal transduction","infectious diseases",and "immune system". Moreover,downregulated DEGs in the acupotomy group were enriched in "cytokine – cytokine receptor interaction","phagosome",and "osteoclast differentiation",while upregulated DEGs were enriched in "axon guidance" and "protein digestion and absorption". (3) qRT – PCR validation showed that acupotomy intervention significantly reduced the mRNA expression of *CCL2*,*CCL7*,and *IL34*. Conclusion:The molecular mechanism of acupotomy intervention in KOA mainly involves functions related to joint cartilage "signal transduction","immune – inflammatory response",and pathways such as "cytokine – cytokine receptor interaction","phagosome",and "axon guidance".

Key words:knee osteoarthritis;acupotomy;transcriptomics;signal transduction;immune – inflammatory response;joint cartilage

膝骨关节炎(knee osteoarthritis,KOA)是临床常见的一种慢性骨关节退行性疾病,其典型病理表现为关节软骨退变,临床表现以膝关节疼痛和关节活动受限为主[1]。KOA 患病率较高,2018 年的《骨关节炎诊疗指南》显示,我国 KOA 的发病率约 8.1%[2],同时 KOA 多发于中老年人,严重影响中老年人生活质量。2023 年《膝骨关节炎中西医结合诊疗指南》中建议:中医综合治疗疗效确切,可贯穿全程[3]。2015 年《膝骨关节炎中医诊疗专家共识》和 2023 年《膝骨关节炎中西医结合诊疗指南》均推荐了针刀疗法[3-4]。针刀治疗作为一种中医疗法,在 KOA 的临床治疗中被广泛应用。团队前期研究证实,针刀治疗可调节 KOA 兔膝周肌肉的生物力学,并改善关节软骨的退变[5-6],然而,针刀对 KOA 兔关节软骨在全基因组水平上的调控作用尚不明确。因此,本项目拟利用转录组学测序与生物信息学分析,探索针刀对 KOA 兔关节软骨基因转录谱的影响,以进一步阐明其治疗 KOA 的分子机制。

1　材料

1.1　实验动物　9 只 6 月龄的健康清洁级新西兰雄兔,体质量(2.75 ± 0.25) kg,购买并饲养于北京金牧阳实验动物有限公司(动物生产许可证号:SCXK 2015 – 0005;动物使用许可证号:SYXK 2015 – 0008),所有实验动物均单笼饲养,自由获取食物和纯净水[温度(22 ± 2) ℃,相对湿度(45 ± 5)%]。本实验研究获得北京中医药大学动物伦理委员会批准(动物伦理号:BUCM – 4 – 2022010101 – 1097),实验过程严格按照实验动物管理规定进行。

1.2　材料与试剂　树脂绷带(揭西县泰洲医疗有限公司,泰洲);高分子固定绷带(苏州可耐特医疗科技有限公司,KCP04);mirVana™ miRNA ISOlation Kit(美国 Ambion,1561);TruSeq Stranded mRNA LT-Sample Prep Kit(美国 Illumina,RS – 122 – 2101);Agencourt AMPure XP(美国 Beckman Coulter,A63881);Qubit RNA Assay Kit(美国 Life Technologies,Q32852);Bioanalyzer 2100 RNA – 6000 Nano Kit(美国 Aglient,5067 – 1511);SuperScript II Reverse Transcriptase(美国 Invitrogen,18064014)。

1.3　仪器　AceQ ® qPCR SYBR ® Green Master Mix (Without ROX)(南京 Vazyme,Q321);GoScript™逆转录酶(美国 Promega,A5001);8 Strip Real – time PCR Tubes And Caps(上海生工,F603001);超纯水仪(美国 Millipore,Qso);冷冻离心机(美国 Thermo,ST16R);凝胶成像系统(天能公司,Tanon 2500);紫外分光光度计(美国 Thermo,NanoDrop 2000);PCR 仪(美国 Bio – rad,MyCycler);磁力架(美国 Invitrogen,Magnetic stand – 96);测序仪(Illumina 公司,HiSeqTM 2500)。

2　方法

2.1　KOA 模型制备　应用改良的 Videman 法(下肢过伸位固定制动)制备兔 KOA 模型,详细造模方法参照团队前期研究[5-7],简要步骤如下:(1)用医用胶带缠绕左后肢;(2)以 0.5 cm 厚泡沫双面胶再次缠绕;(3)使树脂绷带与双面胶紧密贴合;(4)最后用高分子固定绷带缠绕树脂绷带 1 圈,并以弹性胶带固定。连续制动 6 周。

KOA 兔造模成功的判断标准是关节软骨出现损伤降解,团队前期研究已证实,制动 6 周后的 KOA 兔关节软骨即出现典型 OA 表现[5,7]:软骨番红 O/固绿染色可见软骨层着色浅淡不均、潮线消

失、组织厚度明显变薄等；Mankin 病理评分达到中等损伤程度；此外，反映软骨降解的分子指标 COMP 与 CTX－Ⅱ也显著升高。

2.2　分组及干预　将 9 只新西兰兔按体质量随机分为两组：空白组（3 只）与造模组（6 只），造模组进行 KOA 制备（方法同前）；造模组经 6 周制动成功建立 KOA 模型后，再随机分为模型组（3 只）与针刀组（3 只）。在实验期间每日给予空白组与模型组相同的抓取，但不进行针刀治疗；针刀组干预与前期研究参数一致[5－6,8]，具体如下：股内侧肌、股外侧肌腱止点，股直肌肌腱止点，股二头肌肌腱止点，鹅足腱囊以及局部压痛点、结节（压痛点确定方法：根据兔子对疼痛的躲避反应来确定，当兔子出现抖动或下肢收缩等躲避反射，则该按压点即为压痛点）进行针刀松解，刀体与皮肤切面垂直刺入，每次 1～2 刀，出刀并加压止血；每周 2 次，干预 4 周。

2.3　行为学评价　行为学评价根据改良的 Lequesne MG 评分标准[7,9]进行，包括：关节疼痛（0～3 分），关节活动度（0～3 分），关节肿胀程度（0～2 分）和步态改变（0～3 分）。于干预开始前及干预结束后，对新西兰兔进行行为学评价，由两名评价人进行单独评价，取平均值进行统计分析。

2.4　转录组学测序及生物信息学分析　干预结束后，采用空气栓塞法将实验兔处死。暴露膝关节腔，快速钳取兔股骨内侧髁软骨，液氮保存备用；每组取 3 只进行转录组学测序及后续生物信息学分析。

建库测序主要流程：（1）提取样品总 RNA 并使用 DNase 消化 DNA 后，用带有 Oligo（dT）的磁珠富集真核生物 mRNA；（2）加入打断试剂将 mRNA 打断成短片段，以打断后的 mRNA 为模板，用六碱基随机引物合成一链 cDNA，然后配制二链式反应体系合成二链 cDNA，并使用试剂盒纯化双链 cDNA；（3）纯化的双链 cDNA 再进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头，进行片段大小选择，最后进行 PCR 扩增；（4）构建好的文库用 Agilent 2100 Bioanalyzer 质检合格后，使用 Illumina HiSeqTM 2500 测序仪进行测序，产生 125 bp 或 150 bp 的双端数据。质检合格后，使用 Illumina 测序仪进行测序（该实验过程由上海欧易生物医学科技有限公司全程负责完成）。

生物信息学分析流程：（1）数据预处理和质量控制：高通量测序产生的原始数据（raw reads）首先使用 Trimmomatic 软件[10]进行质控并去除接头（过滤掉低质量碱基以及 N 碱基），最终得到高质量的 clean reads；将 clean reads 使用 hisat2[11]比对到物种的参考基因组，通过基因组比对率来评估样本的情况。（2）转录本水平定量、差异表达基因（differentially expressed genes，DEGs）筛选和功能富集及聚类分析：clean reads 与参考基因组比对的结果，以二进制 binary 文件进行储存；FPKM[12]和 count 使用 bowtie2 和 eXpress 软件[13]分析得到。通过 eXpress 软件获取样本中转录本（protein_coding）的 reads 数目，使用 DESeq R package 的 estimateSizeFactors 函数[14]对数据进行标准化，并使用 nbinomTest 函数计算差异比较的 pvalue 和 foldchange 值。挑选出 pvalue 小于 0.05，且差异倍数大于 2 的差异转录本，进行 GO 和 KEGG 富集分析，以判定差异转录本主要影响的生物学功能或者通路（该分析过程由上海欧易生物科技有限公司负责完成）。

2.5　qRT－PCR 结果验证　根据测序结果，选择显著差异表达的候选基因进行 qRT－PCR 验证。主要实验步骤如下：软骨组织使用液氮进行低温研碎，应用 TRIzol 法进行总 RNA 抽提，并进行 RNA 沉淀、洗涤、再悬浮等标准操作；应用 NanoDrop 进行总 RNA 浓度测定；随后应用逆转录酶试剂盒进行 cDNA 合成（25 ℃ 5 min，42 ℃ 60 min，70 ℃ 15 min）；应用 AceQ® qPCR SYBR® Green Master Mix 试剂盒进行 qPCR 反应，总体系 14 μL（qPCR SYBR® Green Master Mix 7 μL，cDNA 模板 3 μL，上游和下游 PCR 引物各 0.5 μL，超纯水 3 μL），以 GAPDH 基因为内参，反应程序（第一步 95 ℃ 5 min；第二步 95 ℃ 5 s，60 ℃ 20 s，72 ℃ 30 s，循环 40 次；第三步 65 ℃ 5 s，95 ℃ 5 s）；表 1 为所有引物序列（上海生工提供）。mRNA 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Cq}$ 法计算。

表 1　引物信息

基因	前向引物（5′－3′）	反向引物（5′－3′）
CCL2	AGCCAACTCTCACTGAAGCC	AACTGTGAACAACAGGCCCA
CCL7	AAGCCCTGAAGACAGATGCC	CCCCTTAGGACCGTAGTCCA
IL34	TGAGCTGCTGTAGCTTGCAT	CTCTTGGAATCTGGGGCTGG
GADPH	GGCATCCTGGGCTACACTGA	GGAGTGGGTGTCGCTGTTG

2.6　统计学分析　采用 SPSS 20.0 软件（美国 IBM 公司）进行统计学分析，计量资料采用均值 ± 标准差表示（$\bar{x} \pm s$）。数据先进行 *Kolmogorov－Smirnov* 正态性检验及 *Levene's test* 方差齐整性检验，符合正

态分布及方差齐的数据资料，两组间比较采用独立样本 t 检验；多组间比较采用单因素方差分析（*one way ANOVA*），各组间分析采用 *LSD* 中 *Dunnett's post hoc* 检验。不符合正态检验或方差不齐的数据，采用非参数检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3　结果

3.1　行为学评价　干预治疗前，模型组与针刀组 Lequesne MG 评分相比无统计学差异（$P=0.374$）；干预 4 周后，与模型组相比，针刀组 Lequesne MG 评分显著降低（$P=0.008$，$P<0.01$），见表 2。

表 2　各组干预前后 Lequesne 评分比较　（$\bar{x}\pm s$，分）

时间	n	模型组	针刀组	t 值	P 值
干预前	3	6.33±0.57	6.00±0.00	1.00	0.374
干预后	3	5.67±0.57	3.33±0.57*	4.95	0.008

注：与模型组相比，*$P<0.01$。

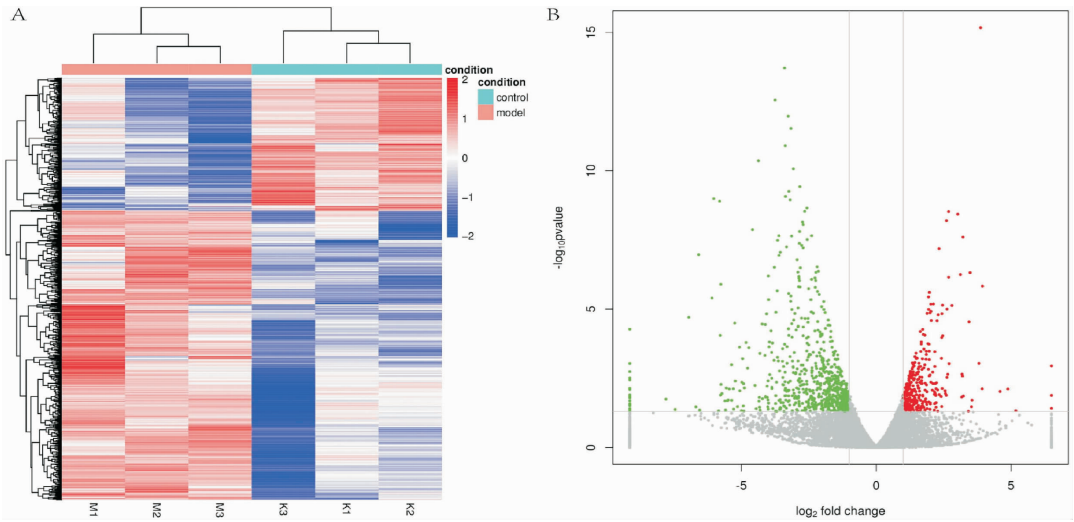
3.2　转录组测序数据质量控制结果　9 个新西兰兔股骨内侧髁软骨组织共获得 431.67M clean reads，其中 Q30 值均在 90% 以上，clean reads 比对新西兰兔参考基因组的比例均高于 91.18%；说明测序数据质量控制良好，可满足后续生信分析要求，见表 3。

表 3　测序数据质量控制结果

样品	Raw reads/Mb	Raw bases/Gb	Clean reads/Mb	Clean bases/Gb	Q30/%	GC/%	Total reads	Total mapped reads(%)
空白 1	50.36	7.55	45.69	6.52	90.70	54.76	45 688 232	41 659 835(91.18)
空白 2	55.44	8.32	52.40	7.56	93.41	54.10	52 404 236	48 549 636(92.64)
空白 3	52.05	7.81	47.81	6.83	91.66	52.82	47 810 884	43 834 282(91.68)
模型 1	52.04	7.81	48.70	7.01	92.87	52.59	48 697 944	44 530 255(91.44)
模型 2	53.61	8.04	49.51	7.08	92.23	53.76	49 514 234	45 501 233(91.89)
模型 3	50.96	7.64	45.74	6.54	90.51	54.55	45 739 054	42 532 703(92.98)
针刀 1	55.70	8.36	51.16	7.38	92.52	53.10	51 164 144	47 037 311(91.93)
针刀 2	52.23	7.83	47.52	6.87	91.93	52.27	47 521 040	43 964 990(92.52)
针刀 3	53.11	7.97	43.14	6.23	91.68	54.40	43 141 256	39 578 087(91.74)

注：Sample：样品；Raw reads：原始 reads 数目；Raw bases：原始测序量；Clean reads：过滤后的 reads 数目；Clean bases：过滤后的测序量；Q30：Raw bases 中 Qphred 数值大于 30 的碱基占总体碱基的百分比；GC：clean bases 中 G 和 C 的数量总和占总碱基数量的百分比；Total reads：测序序列经过滤后的 clean reads 数量统计；Total mapped reads：能定位到基因组上的测序序列的 clean reads 数量统计。

3.3　转录组学 DEGs 筛选　与空白组相比，模型组共筛选出 DEGs 1 055 个，其中 723 个上调，332 个下调（图 1）。与模型组相比，针刀组共筛选出 DEGs 312 个，其中 97 个上调，215 个下调（图 2）。

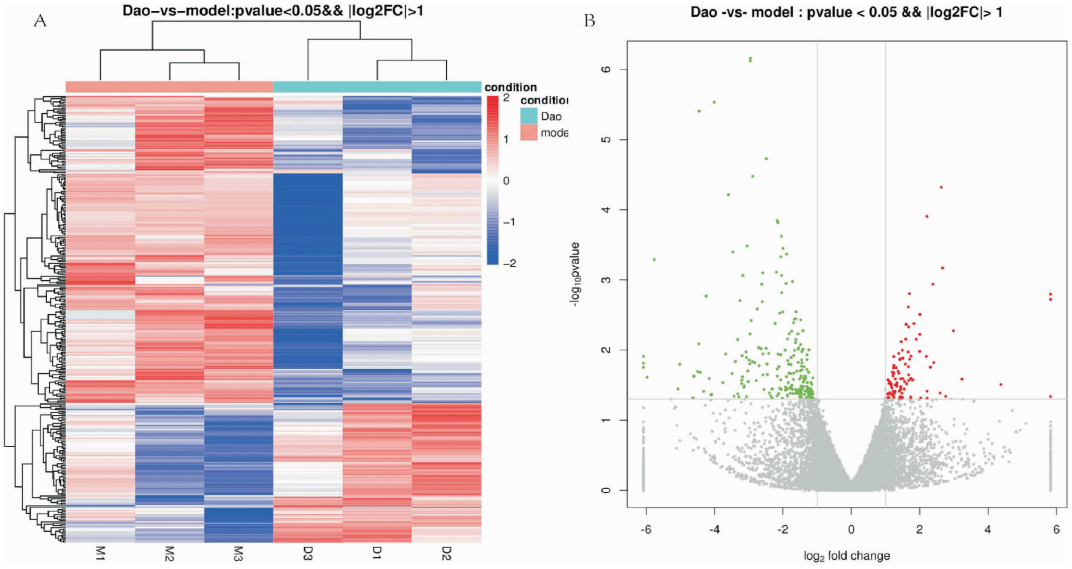


注：A：模型组与空白组 DEGs 聚类分析热图；control 代表空白组，model 代表模型组；红色代表高表达，蓝色代表低表达。B：模型组与空白组 DEGs 火山图；绿色代表高表达，红色代表低表达，灰色代表无差异。

图 1　与空白组相比模型组 DEGs 图

3.4　DEGs GO 功能富集分析　与空白组相比，对模型组的 DEGs 进行 GO 富集分析，结果显示：（1）在生物过程中，富集最显著的三个条目分别是：44 个基因参与的“炎症反应”（inflammatory response，

GO:0006954)、41 个基因参与的“先天免疫反应”(innate immune response,GO:0045087)、35 个基因参与的“免疫反应”(immune response,GO:0006955);(2)在细胞组成中,富集最显著的 3 个条目分别是:111 个基因参与的“细胞外区域”(extracellular region,GO:0005576)、106 个基因参与的“细胞外空间”(extracellular space,GO:0005615)、85 个基因参与的“质膜的组成部分”(integral component of plasma membrane,GO:0005887);(3)在分子功能中,富集最显著的三个条目分别是:24 个基因参与的“细胞外基质结构成分”(extracellular matrix structural constituent,GO:0005201)、20 个基因参与的“信号受体激活”(signaling receptor activity,GO:0038023)、12 个基因参与的“胶原结合域”(collagen binding,GO:0005518),见图 3。



注:A:针刀组与模型组 DEGs 聚类分析热图;Dao 代表针刀组,model 代表模型组;红色代表高表达,蓝色代表低表达。B:针刀组与模型组 DEGs 火山图;绿色代表低表达,红色代表高表达,灰色代表无差异。

图 2　与模型组相比针刀组 DEGs 图

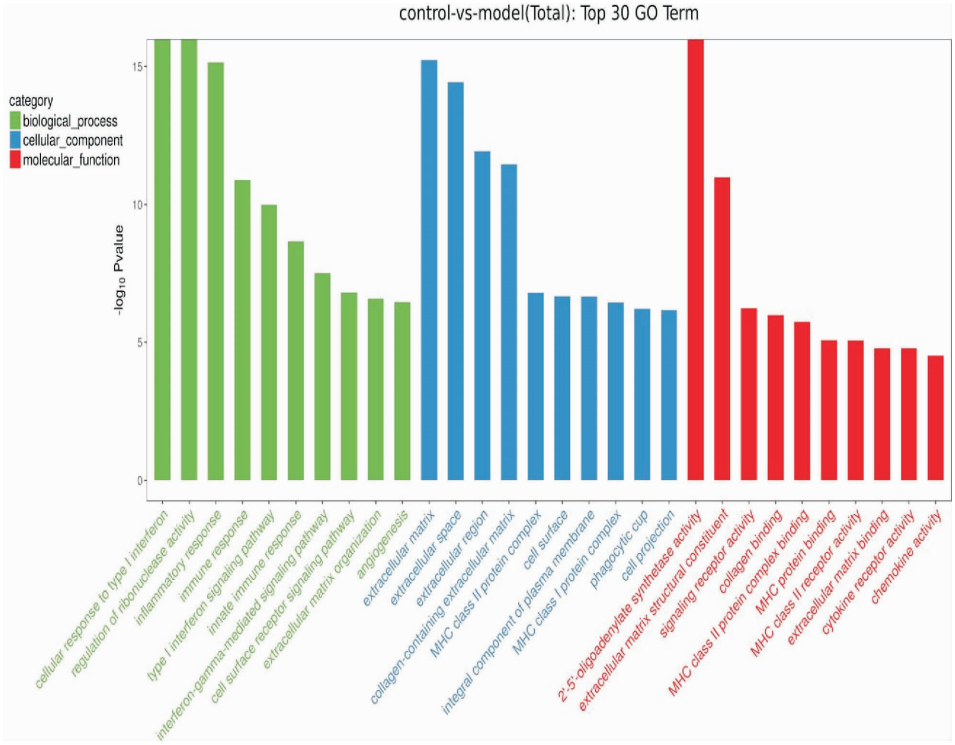


图 3　模型组 *vs* 空白组 DEGs GO 富集分析(TOP 30 GO Term)

与模型组相比，对针刀组的 DEGs 进行 GO 富集分析，结果显示：(1)在生物过程中，富集最显著的三个条目分别是：17 个基因参与的“炎症反应”(inflammatory response，GO：0006954)、6 个基因参与的“细胞对肿瘤坏死因子反应”(cellular response to tumor necrosis factor，GO：0071356)、5 个基因参与的“semaphorin－plexin 信号通路”(semaphorin－plexin signaling pathway，GO：0071526)；(2)在细胞组成中，富集最显著的三个条目分别是：47 个基因参与的“细胞外区域”(extracellular region，GO：0005576)、41 个基因参与的“细胞外空间”(extracellular space，GO：0005615)、19 个基因参与的“细胞表面”(cell surface，GO：0009986)；(3)在分子功能中，富集最显著的 3 个条目分别是：10 个基因参与的“细胞外基质结构成分”(extracellular matrix structural constituent，GO：0005201)、“丝氨酸型内肽酶活性”(serine－type endopeptidase activity，GO：0004252)、“钙调素结合”(calmodulin binding，GO：0005516)，见图 4。

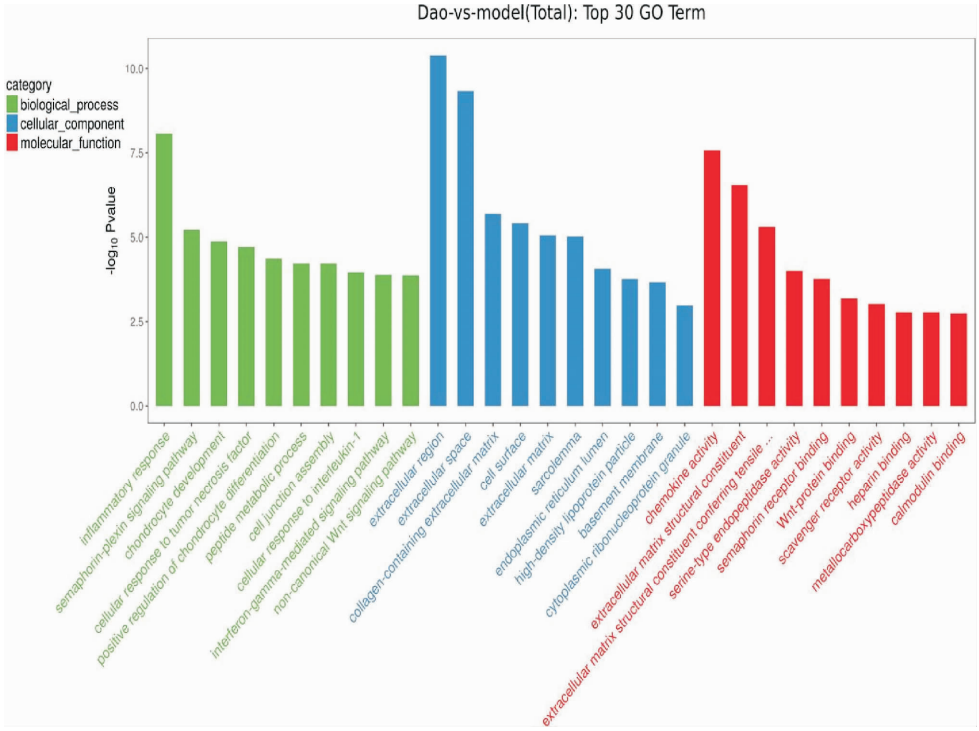


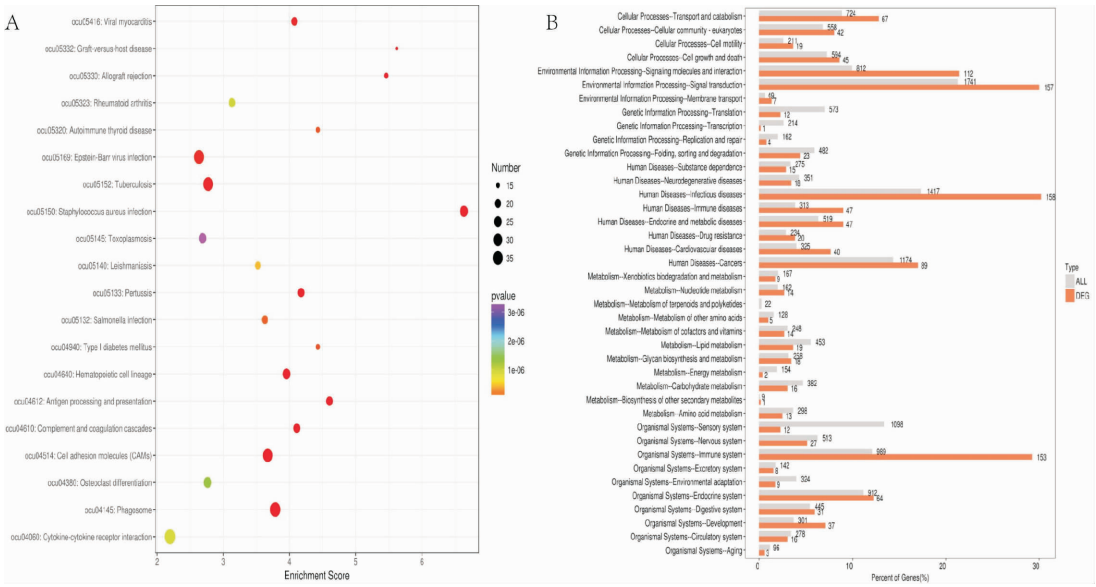
图 4　针刀组 *vs* 模型组 DEGs GO 富集分析(TOP 30 GO Term)

3.5　DEGs KEGG 通路富集分析

3.5.1　模型组 *vs* 空白组 DEGs KEGG 富集分析

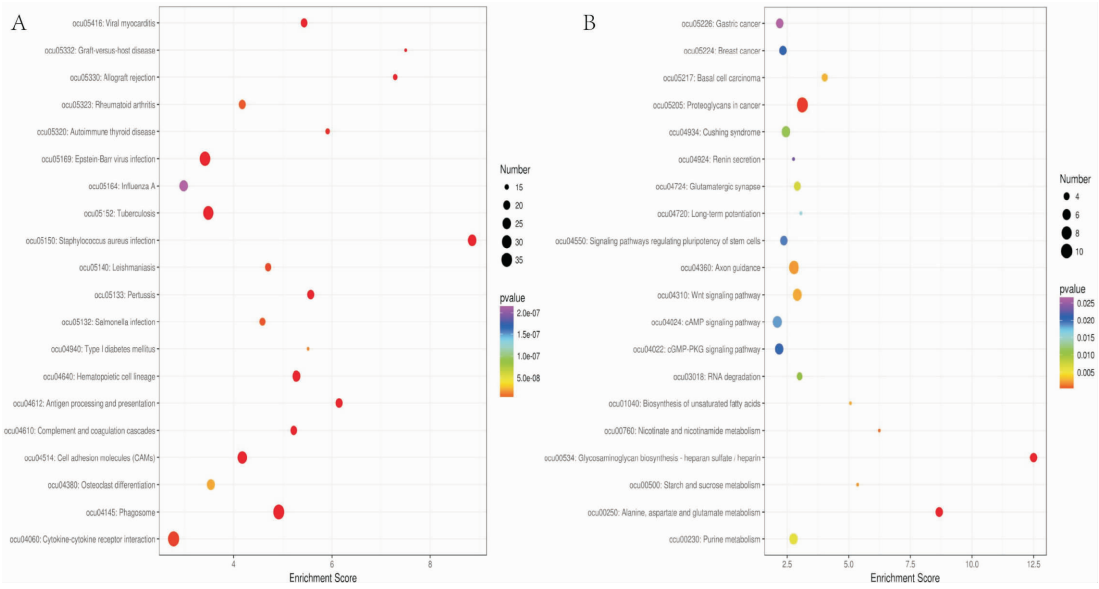
与空白组相比，对模型组的 DEGs 进行 KEGG 通路富集分析，结果显示：39 个基因参与“细胞因子受体相互作用”(cytokine－cytokine receptor interaction，path：ocu04060)、37 个基因参与“吞噬体”(phagosome，path：ocu04145)、35 个基因参与“EB 病毒感染”(epstein－barr virus infection，path：ocu05169)。此外，KEGG Level2 水平分析，模型组 DEGs 参与的通路主要包括：158 个基因参与“infectious diseases”、157 个基因参与“signal transduction”、153 个基因参与“immune system”，见图 5。

进一步对模型组上调和下调的 DEGs 分别进行 KEGG 富集分析，结果发现模型组 DEGs 表达上调的基因主要参与以下通路：37 个基因参与“cytokine－cytokine receptor interaction”、36 个基因参与“phagosome”、34 个基因参与“epstein－barr virus infection”；富集指数(enrichment score)排名前 3 的分别为：“staphylococcus aureus infection”(8.849 6)、“graft－versus－host disease”(7.497 3)、“allograft rejection”(7.285 5)；模型组 DEGs 表达下调的基因主要参与以下通路：10 个基因参与“pathways in cancer”、8 个基因参与“axon guidance”、7 个基因参与“wnt signaling pathway”、7 个基因参与“MAPK signaling pathway”；富集指数(enrichment score)排名前 3 的分别为：“glycosaminoglycan biosynthesis－heparan sulfate/heparin”(12.499 2)、“alanine，aspartate and glutamate metabolism”(8.680 0)、“nicotinate and nicotinamide metabolism”(6.249 6)，见图 6。



注：A：模型组与空白组 DEGs KEGG 通路富集分析前 20 分布图（Enrichment top 20）；B：模型组与空白组 DEGs 与所有基因在 KEGG Level2 水平分布比较图（KEGG Pathway Classification）。

图 5　模型组 *vs* 空白组 DEGs KEGG 通路富集分析



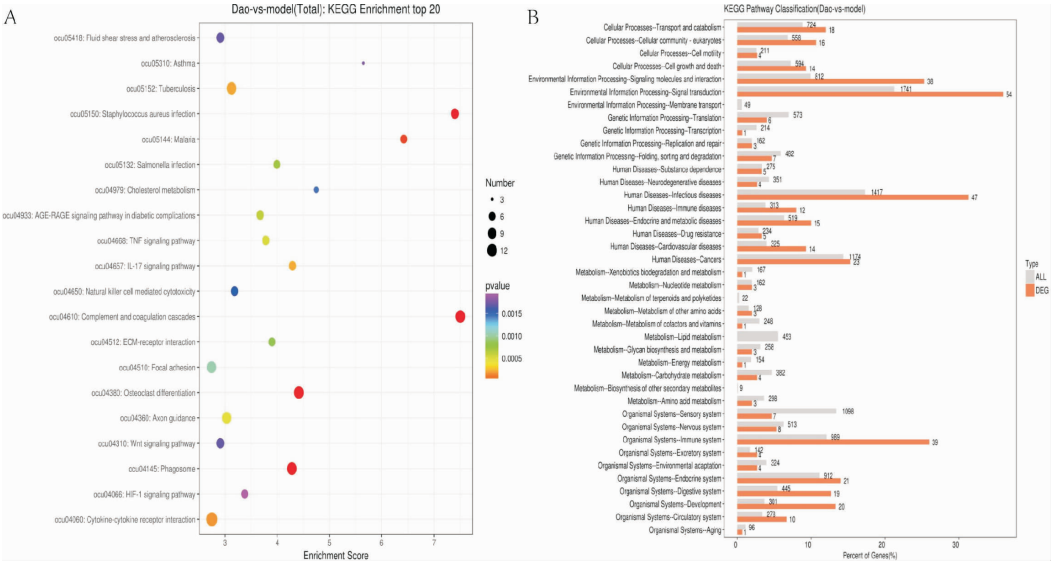
注：A：模型组 *vs* 空白组 DEGs 表达升高 KEGG 通路富集分析前 20 分布图；B：模型组 *vs* 空白组 DEGs 表达降低 KEGG 通路富集分析前 20 分布图。

图 6　模型组 *vs* 空白组 DEGs 表达升高/降低 KEGG 富集分析图（Enrichment top 20）

3.5.2　针刀组 *vs* 模型组 DEGs KEGG 富集分析

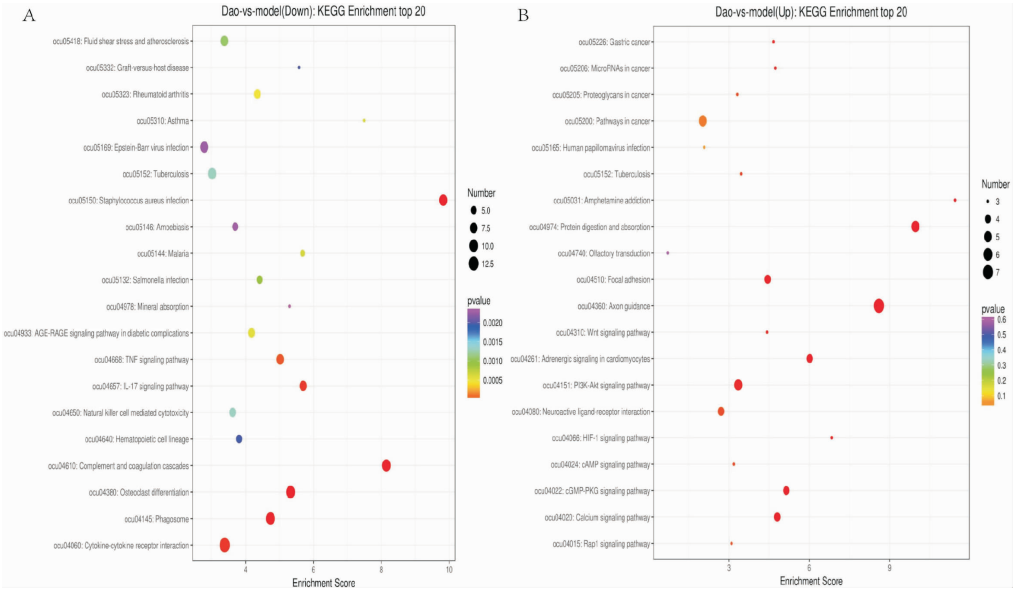
与模型组相比，对针刀组的 DEGs 进行 KEGG 通路富集分析，结果显示：14 个基因参与“细胞因子受体相互作用”（cytokine - cytokine receptor interaction，path：ocu04060）、12 个基因参与“吞噬体”（phagosome，path：ocu04145），另外，11 个基因分别参与“补体和凝血级联反应”（complement and coagulation cascades，path：ocu04610）、“破骨细胞分化”（osteoclast differentiation，path：ocu04380）、“结核病”（tuberculosis，path：ocu05152）、“神经活性配体 - 受体作用”（neuroactive ligand - receptor interaction，path：ocu04080）、“PI3K - Akt 信号通路”（PI3K - Akt signaling pathway，path：ocu04151）。此外，进行 KEGG Level2 水平分析，针刀组的 DEGs 富集的通路主要包括：54 个基因参与“信号转导”（signal transduction）、47 个基因参与“感染性疾病”（infectious diseases）、39 个基因参与“免疫系统”（immune system）。见图 7。

进一步对针刀组上调和下调的 DEGs（与模型组相比）分别进行 KEGG 富集分析，结果发现针刀组 DEGs 表达下调的基因主要涉及以下通路：13 个基因参与的“cytokine – cytokine receptor interaction”、10 个基因参与的“phagosome”和“osteoclast differentiation”、9 个基因参与的“complement and coagulation cascades”；富集指数（enrichment score）排名前 3 的分别为：“staphylococcus aureus infection”（9.823 9）、“complement and coagulation cascades”（8.150 7）、“IL – 17 signaling pathway”（5.698 4）。针刀组 DEGs 表达上调的基因主要涉及以下通路：7 个基因参与的“axon guidance”、5 个基因参与的“protein digestion and absorption”、4 个基因参与的“adrenergic signaling in cardiomyocytes”“cGMP – PKG signaling pathway”“calcium signaling pathway”“Focal adhesion”；富集指数（enrichment score）排名前 3 的分别为：“amphetamine addiction”（11.445 0）、“protein digestion and absorption”（9.967 1）、“axon guidance”（8.604 9），见图 8。



注：A：针刀组与模型组 DEGs KEGG 通路富集分析前 20 分布图（enrichment top 20）；B：针刀组与模型组 DEGs 与所有基因在 KEGG Level2 水平分布比较图（KEGG Pathway Classification）。

图 7　针刀组 *vs* 模型组 DEGs KEGG 通路富集分析



注：A：针刀组 *vs* 模型组 DEGs 表达降低 KEGG 通路富集分析前 20 分布图；B：针刀组 *vs* 模型组 DEGs 表达升高 KEGG 通路富集分析前 20 分布图。

图 8　针刀组 *vs* 模型组 DEGs 表达降低/升高 KEGG 富集分析图（enrichment top 20）

3.6　候选 DEGs qRT－PCR 验证结果　根据测序结果，针刀干预后主要富集的通路是“cytokine－cytokine receptor interaction”和“phagosome”，因此选取差异表达显著的基因进行 qRT－PCR 验证，选取 CCL2、CCL7 和 IL34 共 3 个基因。结果显示，针刀干预后，KOA 软骨 CCL2（$P<0.01$）CCL7（$P<0.05$）和 IL34（$P<0.01$）mRNA 相对表达量均显著降低。见表 4。

表 4　DEGs 相对表达量比较　（$\bar{x}\pm s$）

基因	n	空白组	模型组	针刀组	F 值	P 值
CCL2	3	0.089 ±0.004	0.479 ±0.176	0.101 ±0.017	14.180	0.004
CCL7	3	0.053 ±0.006	0.110 ±0.015	0.075 ±0.012	18.432	0.010
IL34	3	0.112 ±0.013	0.375 ±0.034	0.226 ±0.019	91.323	0.000

注：P 值为模型组 *vs* 针刀组之间比较。

4　讨论

西医学认为 KOA 是一种慢性退行性关节疾病，典型病理变化是关节软骨破坏缺失[1]，同时还存在软骨损伤之外的其他病理变化，比如滑膜炎[15]、膝周肌肉萎缩[16]等，目前认为其是一种全关节疾病（whole－organ disease）。有学者认为 KOA 是一种生物力学和炎症共同作用的疾病[17]，突出强调了生物力学因素和炎症因素在 KOA 致病过程中的关键作用。

KOA 在中医学总体属于“膝痹”范畴，杨威等[18]根据 KOA 不同分期的表现提出 KOA 早、中期“筋痹”尤为重要，而中、晚期属于“膝痹”“骨痹”共存，然而我们认为“筋痹”在 KOA 的病理过程中贯穿始终，中、晚期“筋痹”“膝痹”“骨痹”共存。这一理念即强调了“筋”的作用，“膝者，筋之府”，筋的生理功能正常与否在 KOA 过程中发挥重要作用。KOA 广泛存在的肌肉筋膜等病变，均属于广义“筋”的范畴。“筋”是经筋理论的继承与发展，包括现代解剖学的肌肉、韧带、筋膜、关节囊等软组织。“从筋论治”“筋骨同调”治疗 KOA 也被众多学者所认可[18－20]。

针刀疗法已被纳入 KOA 治疗指南。针刀融合了西医手术刀与中医针灸针的技术特点，治疗时发挥针刺效应和手术刀切割剥离的双重作用[21]。针刀治疗 KOA 的作用点在“筋”，通过“调筋”而“疏利关节”，恢复膝关节内外平衡，从而发挥“治骨”作用，即“调筋治骨”。团队前期研究证实了针刀可改善 KOA 兔膝周肌肉生物力学、减轻肌肉萎缩程度[6]，同时对 KOA 兔关节软骨具有一定保护作用（病理学变化以及软骨 ECM 降解减少）[5]。为了探讨针刀对 KOA 兔软骨的保护作用具体通过哪些功能或通路来实现，本项目进行了转录组学测序和生物信息学分析，以进一步探究针刀干预 KOA 软骨组织的分子机制。

本项目共筛选出 1 055 条模型组 *vs* 空白组 DEGs，GO 功能富集分析其中的细胞组分显示主要富集的是细胞外区域（extracellular region）、含胶原蛋白的细胞外基质（collagen－containing extracellular matrix）等，提示 KOA 兔关节软骨细胞外基质发生病变，这一结果与 KOA 基本病理变化相一致，Chang 等[22]汇总 GEO 数据显示模型组富集程度最高的细胞组成部分是细胞外基质（extracellular matrix）等，与本研究结果基本一致。进一步分析 KOA 兔 GO 功能富集生物过程，发现主要涉及炎症反应（inflammatory response）、先天免疫反应（innate immune response）、免疫反应（immune response）等功能；KEGG 通路分析（Level2 水平）发现富集通路主要是感染性疾病（infectious diseases）、免疫系统（immune system）等。这说明在 KOA 软骨破坏过程中炎症反应、免疫因素等发挥重要作用。对本研究模型组高表达 DEGs 进行 KEGG 分析，发现主要富集“细胞因子受体相互作用”“吞噬体”等，该结果与其他研究基本一致。Li 等[23]对 KOA 关节液测序后进行 KEGG 分析，显示高表达 DEGs 富集通路有“细胞因子受体相互作用”“趋化因子受体通路”等。Han 等[24]进行 KEGG 分析发现“吞噬体”“蛋白质消化”等与 OA 密切相关。此外，本研究模型组低表达 DEGs KEGG 分析主要富集“轴突引导”“Wnt 信号通路”“cAMP 通路”等。Chang 等[22]汇集多个 GEO 数据，结果显示 KOA KEGG 富集通路有“Wnt 信号通路”“轴突引导”“HIF－1 信号通路”等，与本研究基本一致。以上结果说明应用 Videman 法成功建立 KOA 兔模型，众多通路参与了 KOA 致病过程。

本项目首次对针刀干预 KOA 兔软骨进行转录组学测序，结果发现针刀组 vs 模型组共筛选出 312 条 DEGs，GO 分析细胞成分主要富集细胞外区域（extracellular region）、细胞外空间（extracellular

space)等,提示针刀干预 KOA 对软骨 ECM 发挥作用。进一步 GO 分析生物过程显示,主要富集炎症反应(inflammatory response)、细胞对 TNF 反应(cellular response to tumor necrosis factor)等,而 KEGG Level2 分析发现针刀 DEGs 富集通路包括信号转导(signal transduction)、感染性疾病(infectious diseases)和免疫系统(immune system)。上述结果表明针刀干预 KOA 兔主要通过信号转导、调节免疫 - 炎症过程而发挥软骨保护作用。此外,针刀组表达下调 DEGs KEGG 分析显示,富集通路主要是"cytokine - cytokine receptor interaction""phagosome""osteoclast differentiation"等;而针刀组表达上调 DEGs KEGG 分析显示,富集通路主要是"axon guidance""protein digestion and absorption""focal adhesion"等。针刀干预后调控的 KEGG 富集通路也是上文 KOA 模型组富集的关键通路,说明针刀干预 KOA 发挥软骨保护作用主要通过逆转 KOA 致病关键功能(比如信号转导、免疫 - 炎症反应)或通路(比如细胞因子受体相互作用、吞噬体和轴突引导等)而发挥作用。

针刀在临床广泛应用于治疗 KOA,研究者们对针刀干预 KOA 的机制进行了探索,发现相关机制主要集中于炎症、自噬等领域[25-29]。卢曼[25]证实针刀通过 AMPK - mTOR - ULK1 信号通路调控软骨细胞自噬。佘泽宇等[26]应用蛋白质组学发现自噬相关蛋白表达变化(APOE 等)。伍闲等[28]发现针刀调控 lncRNA/miRNA/NF - κB 通路的抗炎机制。张良志等[29]证实针刀通过 NLRP3/Caspase - 1 通路降低关节内炎症介质发挥治疗作用。本研究富集分析发现,针刀治疗 KOA 涉及的功能为信号转导、免疫 - 炎症反应等。此外,本研究新发现针刀富集的主要通路包括"吞噬体"(phagosome)、"破骨细胞分化"(osteoclast differentiation)、"轴突引导"(axon guidance)、"黏着斑"(focal adhesion)等,最新研究发现"phagosome""focal adhesion"通路在 KOA 中高富集[24],研究者汇集多个 GEO 数据发现"axon guidance"是关键通路[22,30],而"osteoclast differentiation"可由 NF - κB、MAPK 等炎症通路激活[31]。因此,这些新发现的通路可能是未来探索针刀治疗 KOA 机制的新方向。

总之,本研究通过转录组学测序发现:针刀干预 KOA 的分子机制主要涉及关节软骨"信号转导""免疫 - 炎症反应"等功能以及"细胞因子受体相互作用""吞噬体"等通路。然而针刀对 KOA 软骨以上功能或通路的影响需要进一步深入研究和验证。

参考文献:

[1]SHARMA L. Osteoarthritis of the knee[J]. N Engl J Med, 2021,384(1):51 - 59.

[2]中华医学会骨科学分会关节外科学组. 骨关节炎诊疗指南(2018 年版)[J]. 中华骨科杂志,2018,38(12):705 - 715.

[3]中华中医药学会. 膝骨关节炎中西医结合诊疗指南(2023 年版)[J]. 中医正骨,2023,35(6):1 - 10.

[4]陈卫衡,刘献祥,童培建,等. 膝骨关节炎中医诊疗专家共识(2015 年版)[J]. 中医正骨,2015,27(7):4 - 5.

[5]乌云额尔敦,郭长青,王彤,等. 针刀干预对 KOA 兔关节软骨细胞功能及细胞外基质代谢的影响[J]. 中医学报,2020,35(12):2612 - 2618.

[6]乌云额尔敦,郭长青,王彤,等. 针刀干预对中期膝骨关节炎兔模型伸肌 - 屈肌萎缩状态及肌肉拉伸弹性模量的影响[J]. 湖南中医药大学学报,2019,39(10):1248 - 1253.

[7]SHI X W,YU W J,WANG T,et al. Electroacupuncture alleviates cartilage degradation:Improvement in cartilage biomechanics via pain relief and potentiation of muscle function in a rabbit model of knee osteoarthritis[J]. Biomed Pharmacother,2020,123:109724.

[8]史晓伟,乌云额尔顿,王东峰,等. 针刀、电针对制动 4 周 KOA 兔模型股直肌 - 股二头肌肌肉状态及拉伸生物力学的影响[J]. 针灸临床杂志,2021,37(11):69 - 74.

[9]LEQUESNE M G,SAMSON M. Indices of severity in osteoarthritis for weight bearing joints[J]. J Rheumatol Suppl, 1991,27:16 - 18.

[10]BOLGER A M,LOHSE M,USADEL B. Trimmomatic:a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. Bioinformatics,2014,30(15):2114 - 2120.

[11]KIM D,LANGMEAD B,SALZBERG S L. HISAT:a fast spliced aligner with low memory requirements[J]. Nat Methods,2015,12(4):357 - 360.

[12]ROBERTS A,TRAPNELL C,DONAGHEY J,et al. Improving RNA - Seq expression estimates by correcting for fragment bias[J]. Genome Biol,2011,12(3):R22.

[13]ROBERTS A,PACHTER L. Streaming fragment assignment for real - time analysis of sequencing experiments[J]. Nat Methods,2013,10(1):71 - 73.

[14]LI D M,ZAND M S,DYE T D,et al. An evaluation of RNA - seq differential analysis methods[J]. PLoS One,2022,17(9):e0264246.

[15]MATHIESSEN A,CONAGHAN P G. Synovitis in osteoarthritis:current understanding with therapeutic implications[J]. Arthritis Res Ther,2017,19(1):18.

[16]CULVENOR A G,RUHDORFER A,JUHL C,et al. Knee

extensor strength and risk of structural, symptomatic, and functional decline in knee osteoarthritis: a systematic review and meta – analysis[J]. Arthritis Care Res, 2017, 69(5): 649 – 658.

[17] BERENBAUM F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!) [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2013, 21(1): 16 – 21.

[18] 杨威, 郭斯印, 易志勇, 等. 由筋痹论膝骨关节炎病机[J]. 风湿病与关节炎, 2021, 10(6): 53 – 56.

[19] 李西海. 基于中和思想初探慢性筋骨病的防治新策略[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(4): 1651 – 1653.

[20] 张健, 章新玲, 江旭, 等. 基于“筋骨并重”理论刃针结合手法治疗膝骨性关节炎临床研究[J]. 针灸临床杂志, 2023, 39(7): 19 – 24.

[21] 李晓乐, 李无阴, 曹向阳, 等. 针刀疗法治疗膝骨关节炎临床疗效的 Meta 分析[J]. 中医学报, 2022, 37(11): 2478 – 2486.

[22] CHANG L, YAO H, YAO Z, et al. Comprehensive analysis of key genes, signaling pathways and miRNAs in human knee osteoarthritis: based on bioinformatics [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 730587.

[23] LI Z Y, ZHONG L, DU Z W, et al. Network analyses of differentially expressed genes in osteoarthritis to identify hub genes[J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 8340573.

[24] HAN J, DENG H, LYU Y Z, et al. Identification of N – glycoproteins of knee cartilage from adult osteoarthritis and kashin – beck disease based on quantitative glycoproteomics, compared with normal control cartilage[J]. Cells, 2022, 11(16): 2513.

[25] 卢曼. 基于 AMPK – mTOR – ULK1 信号通路探讨针刀干预膝关节骨关节炎兔软骨细胞自噬的作用机制[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2023.

[26] 佘泽宇, 伍闲, 夏帅, 等. 基于蛋白质组学探讨针刀对膝骨关节炎兔软骨细胞自噬的影响[J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(1): 352 – 356.

[27] 宋寒冰, 刘家兴, 刘宏鹏, 等. 基于 wnt/β – catenin 信号通路针刀疗法对膝骨性关节炎的分子作用机制[J]. 针灸临床杂志, 2022, 38(10): 35 – 40.

[28] 伍闲, 宋小鸽, 卢曼, 等. 基于 lncRNA/miRNA/NF – κB 通路探讨针刀对膝骨关节炎兔的软骨保护作用机制[J]. 北京中医药大学学报, 2022, 45(6): 603 – 611.

[29] 张良志, 刘洪, 谢梓毅, 等. 基于 NLRP3/Caspase – 1 通路探讨针刀对兔膝骨关节炎软骨细胞的影响[J]. 福建医药杂志, 2023, 45(5): 87 – 90, 181.

[30] GU H Y, YANG M, GUO J, et al. Identification of the biomarkers and pathological process of osteoarthritis: weighted gene co – expression network analysis[J]. Front Physiol, 2019, 10: 275.

[31] WANG L, SU W, ZHENG X H, et al. BML – 111 inhibits osteoclast differentiation by suppressing the MAPK and NF – κB pathways, alleviating deterioration of the knee joints in a CIA rat model[J]. Cell Biol Int, 2023, 47(5): 954 – 968.

收稿日期: 2025 – 06 – 14

作者简介: 史晓伟(1986 –), 男, 河南济源人, 医学博士, 副研究员, 研究方向: 针灸推拿防治肌肉骨骼系统疾病研究。
通信作者: 史术峰, 男, 黑龙江孙吴人, 医学博士, 主任医师, 研究方向: 针灸推拿防治肌肉骨骼系统疾病研究。E – mail: drshishufeng88@ sina. com

编辑: 李潇