

◆实验研究◆

基于铁死亡理论应用针刺治疗SD大鼠膝骨关节炎机制研究

韩笑¹, 詹嘉欣¹, 余洁¹, 燕军²

1. 广州中医药大学深圳中西医结合临床医学院, 广东 深圳 518104

2. 深圳市中西医结合医院康复医学科, 广东 深圳 518104

[摘要] 目的: 探讨针刺是否通过抑制铁死亡进程治疗膝骨关节炎(KOA)。方法: 选取SPF级别雄性SD大鼠18只, 按随机数字表法分为假手术组、模型组、实验组, 每组6只。假手术组关节腔内注射等量的0.9%氯化钠溶液; 模型组采用碘乙酸钠法构建KOA模型; 实验组在造模后的第2天开始针刺, 取足三里、内膝眼和鹤顶穴, 每周5天, 每次30 min, 持续干预3周。实验期间, 每周采用von Frey丝法检测大鼠疼痛反应, 天平测量体质量, 游标卡尺测量膝关节宽度。实验结束后, 取膝关节组织, 进行苏木素伊红染色、番红固绿染色、Tunel凋亡检测与免疫双荧光双染, 观察溶质载体家族7成员11(SLC7A11)、谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)与软骨细胞标志物SOX9的共表达定位情况; 取血液与滑膜液, 采用酶联免疫法检测炎症因子白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)的表达水平。取软骨组织检测谷胱甘肽(GSH)与铁(Fe^{2+})的含量。结果: 与假手术组比较, 模型组大鼠的疼痛反应显著减弱, 体质量逐渐减轻, 膝关节宽度增加; 模型组大鼠膝关节软骨细胞排列紊乱、簇集现象明显, 可见部分软骨细胞缺失、基质染色不均、软骨结构破坏、表面凹凸不平、软骨层次模糊等病理改变, 软骨侵蚀明显。与模型组比较, 实验组大鼠机械缩爪阈值升高(痛敏降低)及体质量明显增加, 膝关节宽度减少; 实验组大鼠膝关节软骨的上述病理损害及软骨侵蚀现象较模型组明显减轻。与假手术组比较, 模型组大鼠血清和滑膜液中炎症细胞因子IL-6、IL-1 β 和TNF- α 表达及大鼠膝关节软骨细胞凋亡数量明显增加; 模型组大鼠膝关节软骨组织中, 与SOX9共定位的SLC7A11、GPX4表达水平减少, GSH含量增加, Fe^{2+} 含量降低, 上述各项差异均存在统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较, 血液与滑膜液中炎症因子IL-6、TNF- α 、IL-1 β 的表达及大鼠膝关节软骨细胞凋亡数量明显减少; 大鼠膝关节软骨组织中, 与SOX9共定位的GPX4、SLC7A11表达增加, GSH含量增加, Fe^{2+} 含量降低, 差异均存在统计学意义($P<0.05$)。结论: 针刺可以通过调控炎症因子表达、促进SLC7A11、GPX4与软骨细胞标志基因SOX9共定位及调节软骨组织GSH与 Fe^{2+} 含量, 抑制铁死亡, 进而改善KOA大鼠的疼痛症状、体质量、膝关节宽度及软骨组织损伤。

[关键词] 膝骨关节炎; 针刺; 铁死亡; 溶质载体家族7成员11; 谷胱甘肽过氧化物酶4; 软骨细胞标志物; SD大鼠

[中图分类号] R274.9; R684.3

[文献标志码] A

[文章编号] 0256-7415 (2026) 12-0183-10

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2026.12.031

[收稿日期] 2025-11-26

[修回日期] 2026-03-19

[基金项目] 广东省中医药局资助项目(20231282); 广东省深圳市宝安区科创局资助项目(2024JD324)

[作者简介] 韩笑(1999-), 女, 硕士研究生。

[通信作者] 燕军(1974-), 男, 主任中医师, 硕士研究生导师。

Study on Mechanism of Acupuncture in Treating Knee Osteoarthritis in SD Rats Based on Ferroptosis Theory

HAN Xiao¹, ZHAN Jiaxin¹, YU Jie¹, YAN Jun²

1. Shenzhen Clinical Medical College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen Guangdong 518104, China; 2. Department of Rehabilitation Medicine, Shenzhen Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shenzhen Guangdong 518104, China

Abstract: **Objective:** To investigate whether acupuncture treats knee osteoarthritis (KOA) by inhibiting the ferroptosis process. **Methods:** Eighteen SPF-grade male SD rats were selected and randomly divided into the sham-operation group, the model group, and the experiment group, with six rats in each group. The sham-operation group received an intra-articular injection of an equal volume of 0.9% sodium chloride solution; the model group was subjected to the sodium iodoacetate method to establish the KOA model; the experiment group received acupuncture starting from the second day after modeling, with *Zusanli* (ST36), *Neixiyan* (EX-LE4), and *Heding* (EX-LE2) points selected. Acupuncture was administered five days per week, 30 min per session, for three consecutive weeks. During the experiment, the von Frey filament test was used weekly to assess pain response, body weight was measured with a balance, and knee joint width was measured with a vernier caliper. After the experiment, knee joint tissues were collected for hematoxylin-eosin staining, safranin O-fast green staining, TUNEL apoptosis detection, and immunofluorescence double staining to observe the co-localization of solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11), glutathione peroxidase 4 (GPX4), and chondrocyte marker SOX9. Blood and synovial fluid were collected to measure the expression levels of inflammatory factors interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interleukin-1 β (IL-1 β) by enzyme-linked immunosorbent assay. Cartilage tissues were collected to determine the contents of glutathione (GSH) and ferrous ion (Fe²⁺). **Results:** Compared with the sham-operation group, the model group showed a significant decrease in pain response, a gradual reduction in body weight, and an increase in knee joint width. In the model group, articular cartilage cells were disorganized and clustered, with partial chondrocyte loss, uneven matrix staining, destruction of cartilage structure, irregular surface, and blurred cartilage layers; cartilage erosion was evident. Compared with the model group, the experiment group showed an increased mechanical paw withdrawal threshold (reduced hyperalgesia), a significant increase in body weight, and a decrease in knee joint width. The pathological damage and cartilage erosion in the knee joint cartilage of the experiment group were significantly alleviated compared with those in the model group. Compared with the sham-operation group, the expression of inflammatory factors IL-6, IL-1 β , and TNF- α in serum and synovial fluid, as well as the count of apoptotic chondrocytes in the knee joint, were significantly increased in the model group. In the knee joint cartilage of the model group, the expression levels of SLC7A11 and GPX4 co-localized with SOX9 were reduced, GSH content was increased, and Fe²⁺ content was decreased, with all differences being statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the model group, the expression of inflammatory factors IL-6, TNF- α , and IL-1 β in blood and synovial fluid, as well as the count of apoptotic chondrocytes in the knee joint, were significantly reduced in the experiment group. In the knee joint cartilage of the experiment group, the expression of GPX4 and SLC7A11 co-localized with SOX9 was increased, GSH content was increased, and Fe²⁺ content was decreased, with all differences being statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Acupuncture can alleviate pain, improve body weight and knee joint width, and reduce cartilage tissue damage in KOA rats by regulating the expression of inflammatory factors, promoting the co-localization of SLC7A11 and GPX4 with chondrocyte marker SOX9, and modulating the contents of GSH and Fe²⁺ in cartilage tissue, thereby inhibiting ferroptosis.

Keywords: Knee osteoarthritis; Acupuncture; Ferroptosis; Solute carrier family 7 member 11; Glutathione peroxidase 4; Chondrocyte marker; SD rats

膝关节炎(KOA)是老年人群常见的骨科疾病,主要症状为关节疼痛、僵硬以及身体机能受限,其病理特征主要表现为膝关节软骨损伤进行性退变、滑膜炎症、关节囊肥大^[1-2]。此外,已有研究证实,针刺对KOA有明显的治疗效果,并且医疗成本相对较低^[3]。铁死亡是一种新型调节方式,其是以脂质过氧化为特征的铁依赖性的程序性死亡^[4]。研究表明,针刺可以干预脑出血引起的神经细胞铁死亡,降低细胞对铁死亡的敏感性,也可对脊髓损伤进行修复,还能在佐剂性关节炎中抑制P53的表达,降低活性氧(ROS)的产生,并促进溶质载体家族7成员11(SLC7A11)、谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)的生成^[5]。因此,利用针刺治疗靶向铁死亡,可能为治疗KOA开辟新的道路^[6]。本研究旨在探讨针刺是否通过抑制铁死亡进程治疗KOA,结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF级别雄性SD大鼠18只,体质量200~250 g(中位数220 g),广州锐格生物科技有限公司提供,实验动物许可证号SCXK(粤)2021-0059。此次动物实验获得广州永诺生物动物实验中心伦理委员会批准(伦理号IACUC-AEWC-F2211036)。

1.2 实验用具及试剂 华佗牌0.25 mm×13 mm针灸针(苏州医疗用品有限公司),无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司,货号100092683),二甲苯(国药集团化学试剂有限公司,货号10023418),中性树胶(国药集团化学试剂有限公司,货号10004160),环保型脱蜡液(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号G1128),通用型组织固定液(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号G1101),苏木素伊红(HE)染液套装(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号G1076),番红固绿染色液(武汉赛维

尔生物科技有限公司,货号G1053),破膜液(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号G1204),蛋白酶K(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号G1205),4,6-二氨基-2-苯基吲哚(4,6-diamino-2-phenyl indole, DAPI)染色液(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号G1012),抗荧光淬灭封片剂(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号G1401),脱氧核苷酸末端转移酶介导的dUTP生物素缺口末端标记法(Tunel)试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号G1502),牛血清白蛋白(BSA,白鲨生物,货号BS114-100g),三色多重免疫荧光试剂盒(上海茹创生物科技有限公司,货号RC0086-23),GPX4抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号67763-1-Ig),SLC7A11抗体(爱博泰克生物,货号A13685),SRY盒转录因子9(SOX9)抗体(Cell Signaling Technology,货号82630T),白细胞介素-6(IL-6)酶联免疫试剂盒(广州市睿信生物科技有限公司,货号RX302856R)白细胞介素-1 β (IL-1 β)酶联免疫试剂盒(广州市睿信生物科技有限公司,货号RX302869R),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫试剂盒(广州市睿信生物科技有限公司,货号RX302058R),谷胱甘肽(GSH)检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号BC1175),铁(Fe²⁺)检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号BC5415)。碘乙酸钠(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,货号S104897),异氟烷(上海陶术生物科技有限公司,货号T19651),0.9%氯化钠溶液(上海麦克林生化科技股份有限公司,货号S790534),磷酸盐缓冲盐溶液(PBS,上海阿拉丁生化科技股份有限公司,货号P397924),DAPI(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,货号D609734),过氧化氢溶液(上海阿拉丁生化科技股份有限公

司, 货号H112515)。

1.3 实验仪器 脱水机(益迪, 型号 YD-14P1.8), 包埋机冷台(益迪, 型号 YD-6L), 手动切片机(德国徕卡, 型号 HistoCore BIOCUT), 显微镜(明美, 型号 ML31), 全波长扫描式多功能读数仪(赛默飞, Varioskan Flash)。

1.4 方法

1.4.1 膝关节炎造模方法 采用碘乙酸钠法构建 KOA 模型^[7]。采用 2%~4% 异氟烷对 SD 大鼠进行深度麻醉。剃光大鼠右膝关节上的被毛, 并用 100% 乙醇擦拭局部皮肤消毒。将用 1 mL 0.9% 氯化钠溶液配制的含有 60 mg 的碘乙酸钠溶液, 再次吸打混匀后, 用注射器吸取 50 μ L, 注射到大鼠右膝关节间隙, 然后对其进行手动伸展和弯曲膝盖 30 s, 将溶液分散到整个关节缝中。

1.4.2 动物实验分组、干预及取材 所有 SD 大鼠适应性饲养 1 周后, 由不参与后续实验的人员随机分为假手术组、模型组、实验组 3 组, 每组 6 只。分组及干预方案如下: 假手术组: 造模时在关节腔内注射 50 μ L 0.9% 氯化钠溶液, 不进行其他干预。模型组: 采用碘乙酸钠法构建 KOA 模型, 不给予针刺治疗。实验组: KOA 造模后第 2 天进行针刺治疗, 每周治疗 5 天, 每次 30 min, 连续干预 3 周。针刺具体操作: 足三里穴向膝关节方向斜刺 10 mm、内膝眼穴直刺 5 mm、鹤顶穴直刺 2 mm。

实验结束后, 收集所有 SD 大鼠的血液与滑膜液, 用于检测炎性因子 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 的表达水平; 取每组 3 只大鼠的膝关节组织, 用于后续检测。血液采集采用心脏穿刺法: 大鼠麻醉后于胸腔左侧用无菌注射器穿刺点刺入心脏, 缓慢抽取血液, 注入无菌离心管, 室温静置 30~60 min, 待血液凝固后, 随后于 4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min 条件下离心 15 min, 吸

取上层淡黄色液体(即为血清), 转移至新管保存备用。滑膜液采集采用膝关节穿刺法: 选用无菌微量注射器, 将针头尖端磨钝, 从膝关节穿刺点垂直刺入关节腔, 缓慢抽吸滑膜液备用。

膝关节组织处理: 将取出的膝关节固定、脱钙、切片后, 分别进行番红固绿染色、HE 染色、Tunel 染色与免疫荧光染色, 检测膝关节组织中 SLC7A11、GPX4 与 SOX9 共定位表达; 同时取膝关节上软骨组织, 检测 GSH、Fe²⁺ 含量。

1.4.3 相关指标检测 实验期间, 每周观察 1 次 SD 大鼠的疼痛反应, 并测量体质量及膝关节宽度。疼痛行为(机械缩爪阈值)采用 von Frey 丝法进行评估^[8]。将大鼠放置在一个模块鼠笼里, 底部为金属网地板, 待其适应环境至探索行为停止(约 10 min)后, 使用 von Frey 丝垂直刺激同侧后爪足底(避免脚垫), 直到 von Frey 丝弯曲, 固定在原地 3 s。如果有积极的反应(即退缩、摇晃或舔后爪), 则更换较低强度的 von Frey 丝; 如果没有反应, 则更换更高强度的 von Frey 丝, 直到 25 g 时终止评估。

体质量及膝关节宽度测量方法: 将大鼠麻醉后, 置于天平上称量体质量; 随后将大鼠仰卧于手术垫巾上, 露出膝关节部位, 使用游标卡尺测量股骨内髁与外髁之间的横向距离(即膝关节冠状面的最宽处)。每个膝关节重复测量 3 次, 取平均值作为该次测量的最终结果。

采用酶联免疫法检测血液与滑膜液中 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 的表达水平, 采用对应试剂盒检测软骨组织中 GSH、Fe²⁺ 含量, 所有操作均严格按照试剂盒说明书进行操作, 并计算样本中相应指标的值。

1.4.4 膝关节番红固绿染色 膝关节石蜡切片先进行脱蜡至水, 具体操作如下: 将切片放

入二甲苯中 10 min, 更换新鲜二甲苯再浸泡 10 min; 随后依次放入无水乙醇中浸泡 5 min, 梯度无水乙醇(100%, 95%, 75%)中各浸泡 5 min, 最后用自来水流水冲洗干净。脱蜡至水后进行固绿染色, 具体操作如下。①固绿染色: 将切片放入骨组织固绿染液染色 3 min, 自来水流水冲洗至软骨呈无色, 经 1% 盐酸酒精快速处理 10 s, 自来水稍洗; ②红染色: 将切片放入骨组织番红染液染色 5 s, 然后放入无水乙醇中快速脱水, 总共 4 缸, 每缸 5 s, 镜检确认软骨组织着红色、背景无色; ③透明与封片: 将切片分别放入两缸二甲苯, 每缸浸泡 5 min 进行透明处理, 中性树胶封片后在显微镜下观察拍照记录。

1.4.5 膝关节 HE 染色 膝关节石蜡切片脱蜡至水步骤同番红固绿染色。脱蜡完成后进行染色操作: 将切片放入高清恒染预处理液处理 1 min, 苏木素染液染色 3 min, 自来水冲洗 1 min; 用恒染分化液分化 5 s, 自来水冲洗 20 s; 恒染返蓝液处理 1 min, 自来水冲洗 20 s; 95% 乙醇处理 60 s, 伊红 Y 染液染色 20 s。染色完成后进行脱水透明: 将切片放入 3 缸无水乙醇中, 每缸浸泡 2 min, 再放入正丁醇中浸泡 2 min, 二甲苯中浸泡 2 min; 中性树胶封片后显微镜下观察拍照记录。

1.4.6 膝关节 Tunel 检测 膝关节石蜡切片首先进行脱蜡至水处理, 具体步骤如下: 环保型脱蜡透明液处理 10 min, 重复 3 次; 无水乙醇处理 5 min, 重复 2 次; 梯度乙醇(85%、75%)与双蒸水各处理 1 次, 每次 5 min。脱蜡至水后进行后续操作: 用 PBS 轻轻润洗切片 3 次; 滴加蛋白酶 K(PBS 配制, 终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 于切片上至完全覆盖组织, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min。PBS 润洗切片 3 次, 每次 5 min; 滴加破膜液于切片上, 室温处理 20 min 后, 再用 PBS 润洗

3 次, 每次 5 min; 将试剂盒中的 Equilibration Buffer 滴于切片上, 室温孵育 10 min; 弃去 Equilibration Buffer, 再滴加配制好的 TdT 孵育缓冲液(Recombinant TdT enzyme : TMR-5-dUTP Labeling Mix : Equilibration Buffer=1:5:50), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; 然后于 PBS 润洗 4 次, 每次 5 min; 再将切片放入 DAPI 染液中室温处理 8 min; 于 PBS 中洗涤 3 次, 每次 5 min; 滴加抗荧光淬灭封片剂封片, 在荧光显微镜下观察拍照记录。

1.4.7 免疫荧光双染检测 GPX4、SLC7A11 与 SOX9 共定位 膝关节石蜡切片脱蜡至水步骤同 Tunel 检测。脱蜡完成后进行抗原修复: 将切片放入 0.01 mol/L 枸橼酸钠缓冲溶液(pH 6.0)中, 高压锅中将枸橼酸钠缓冲溶液煮沸, 盖上盖子, 在阀门喷气的时候开始计时 3 min, 停止加热, 室温降温 30 min; 蒸馏水洗 4 次, 每次 2 min。后续操作如下: 用 3% 双氧水于室温处理 10 min, PBS 洗 3 次, 每次 2 min; 滴加 5% 牛血清白蛋白于切片上, 室温处理 15 min, 弃去封闭液; 滴加稀释的 SOX9 一抗体于切片上, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育; 第 2 天 PBS 洗涤切片 3 次, 每次 2 min, 滴加对应的 HRP 二抗, 室温孵育 50 min; PBS 洗涤 3 次, 每次 2 min, 滴加对应 TSA 工作液, 避光室温孵育 10 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 2 min; 滴加 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热至完全溶解的 mIHC 专用抗体洗脱液, 覆盖组织样本 20 min 进行抗体洗脱; 弃洗脱液, PBS 洗涤 3 次, 每次 2 min; 用 3% 双氧水于室温处理 10 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 2 min; 滴加 5% 牛血清白蛋白于切片上, 室温处理 15 min, 弃去封闭液; 滴加稀释的 GPX4(或 SLC7A1)一抗于切片上, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育, PBS 洗涤 3 次, 每次 2 min, 滴加对应的 HRP 二抗, 室温孵育 50 min, 入 PBS 洗涤 3 次, 每次 2 min, 滴加对应 TSA 试

剂,避光室温孵育10 min;PBS洗涤3次,每次2 min;滴加DAPI染色液于切片上,染色10 min;PBS洗涤3次,每次2 min;滴加抗荧光淬灭封片剂封片,在荧光显微镜下观察拍照记录。

1.5 统计学方法 采用SPSS21.0统计学软件对所得数据进行统计处理。所有的数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组之间比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 认为组间差异有统计学意义。用Graphpad prism 7.0绘图。

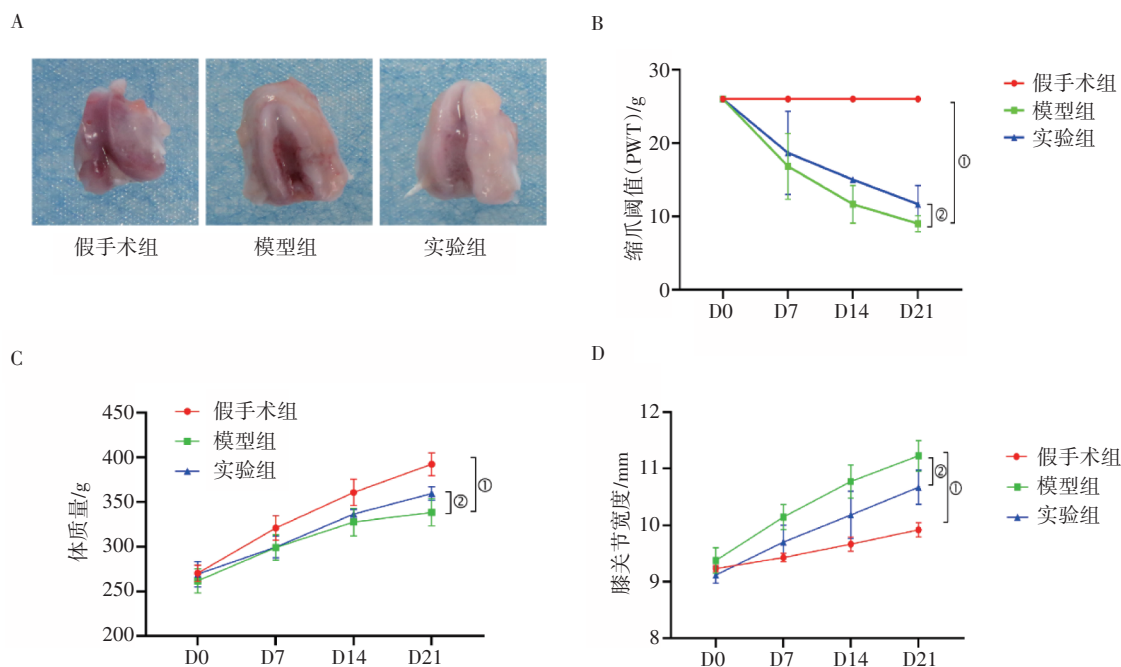
2 结果

2.1 大鼠的行为检测与表征 与假手术组比较,模型组大鼠的膝关节软骨出现了软骨损伤、表面不光滑($P<0.05$);而实验组的膝关节软骨损伤明显减轻($P<0.05$),具体表现见图1A。实验周期内(第7天至第21天),模型组大鼠的疼痛反应较假手术组显著减弱,体质

量逐渐减轻,膝关节宽度逐渐增加($P<0.05$);经针刺干预后,实验组大鼠体质量较模型组增加,膝关节宽度减少,机械缩爪阈值升高,可见其痛敏程度降低($P<0.05$),相关检测结果见图1B~D。

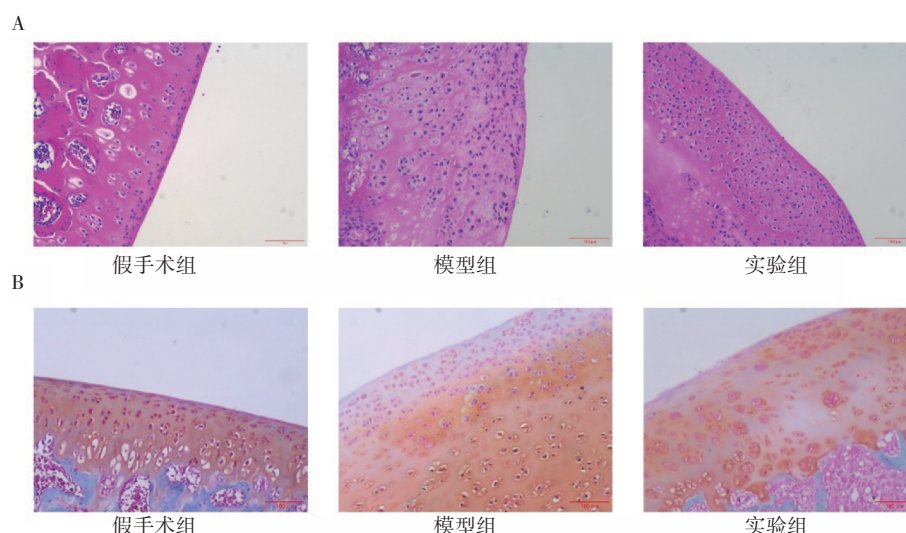
2.2 大鼠膝关节软骨组织病理学分析 HE染色结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠膝关节软骨细胞排列紊乱、簇集现象明显,可见部分软骨细胞缺失、基质染色不均、软骨结构破坏、表面凹凸不平、软骨层次模糊等病理改变,软骨侵蚀明显;而实验组大鼠膝关节软骨的上述病理损坏及软骨侵蚀现象较模型组明显减轻(图2A)。番红固绿染色结果进一步佐证了这一结论,实验组软骨病理损伤改善效果显著(图2B)。

2.3 血清和滑膜液中炎症细胞因子IL-6、TNF- α 和IL-1 β 的水平与膝关节软骨细胞凋亡检测 检测结果显示,模型组大鼠血清和滑膜



注: A为各组大鼠膝关节软骨表面形态; B为各组大鼠的疼痛变化趋势; C为各组大鼠的体质量变化趋势; D为各组大鼠膝关节宽度趋势。①模型组与假手术组比较, $P<0.05$; ②实验组与模型组比较, $P<0.05$ 。

图1 大鼠的行为检测与表征



注：A为各组大鼠膝关节软骨组织的HE染色结果；B为各组大鼠膝关节软骨组织的番红固绿染色结果。

图2 大鼠膝关节软骨组织病理学分析

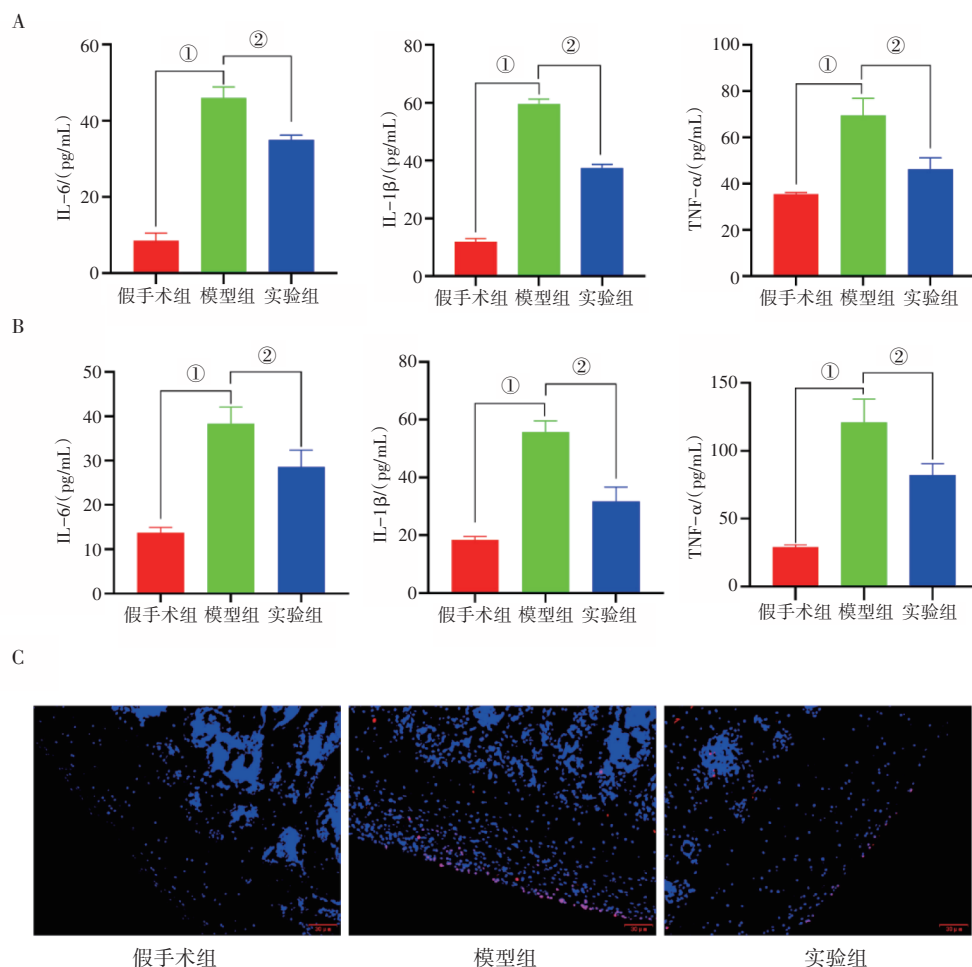
液中炎性细胞因子IL-6、IL-1 β 和TNF- α 水平显著高于假手术组($P < 0.05$)；经针刺干预后，实验组上述炎性细胞因子水平较模型组显著降低($P < 0.05$)，但仍高于假手术组，具体见图3A、图3B。此外，Tunel染色结果显示，与假手术组比较，模型组大鼠膝关节软骨细胞凋亡数量明显增加；而实验组膝关节软骨细胞凋亡数量存在明显减少，差异有统计学意义($P < 0.05$)，见图3C。

2.4 SLC7A11、GPX4与软骨细胞标志基因SOX9共定位及软骨GSH与Fe²⁺含量检测 免疫荧光双染结果显示，与假手术组比较，模型组大鼠膝关节软骨组织中SLC7A11、GPX4与软骨细胞标志基因SOX9的共定位表达水平显著减少；经针刺干预后，实验组中SLC7A11、GPX4与软骨细胞标志基因SOX9的共定位表达较模型组有所回升，见图4A与图4B。此外，软骨组织相关指标检测显示，模型组软骨组织中GSH的含量较假手术组显著降低($P < 0.05$)，实验组软骨组织中GSH的含量较模型组增加($P < 0.05$)，见图4C；同时，模型组软骨组织中的Fe²⁺含量较假手术组显著增加($P <$

0.05)，实验组软骨组织中Fe²⁺含量较模型组显著降低($P < 0.05$)，见图4D。

3 讨论

大量研究发现，KOA的主要发病机制特征为关节微环境失衡导致的过度炎症反应和软骨细胞死亡^[9]。KOA涉及复杂的病理生理学机制，机械负荷过重、炎症介质增加、代谢改变、细胞衰老等，这些因素共同导致滑膜关节退行性变和功能障碍^[10]。而KOA患者关节软骨的表观遗传学特征(DNA甲基化)与健康人的关节软骨存在显著差异，且这些改变发生时间早于其他组织，提示软骨细胞衰老为KOA进展的关键特征之一^[11]。现行KOA指南推荐的常规治疗方案，主要包括运动康复、口服镇痛药、关节腔内注射及手术治疗，而疾病处于终末期的患者可考虑进行关节置换术^[12]。然而，镇痛药存在多种副作用且不可长期使用，而关节腔内注射疗效短暂，常需频繁给药。关节镜手术及关节置换术存在手术创伤大、术后恢复期长及费用高昂等局限性。因此，仍需探索治疗KOA的临床方案，以期实现更持久的疗效、更少的副作用、更低的成本以及更高的实施便



注：A为各组大鼠血液中IL-6、TNF-α和IL-1β的表达水平；B为各组大鼠滑膜液中IL-6、TNF-α和IL-1β的表达水平；C为各组大鼠膝关节软骨中细胞凋亡情况。①模型组与假手术组比较， $P < 0.05$ ；②实验组与模型组比较， $P < 0.05$ 。

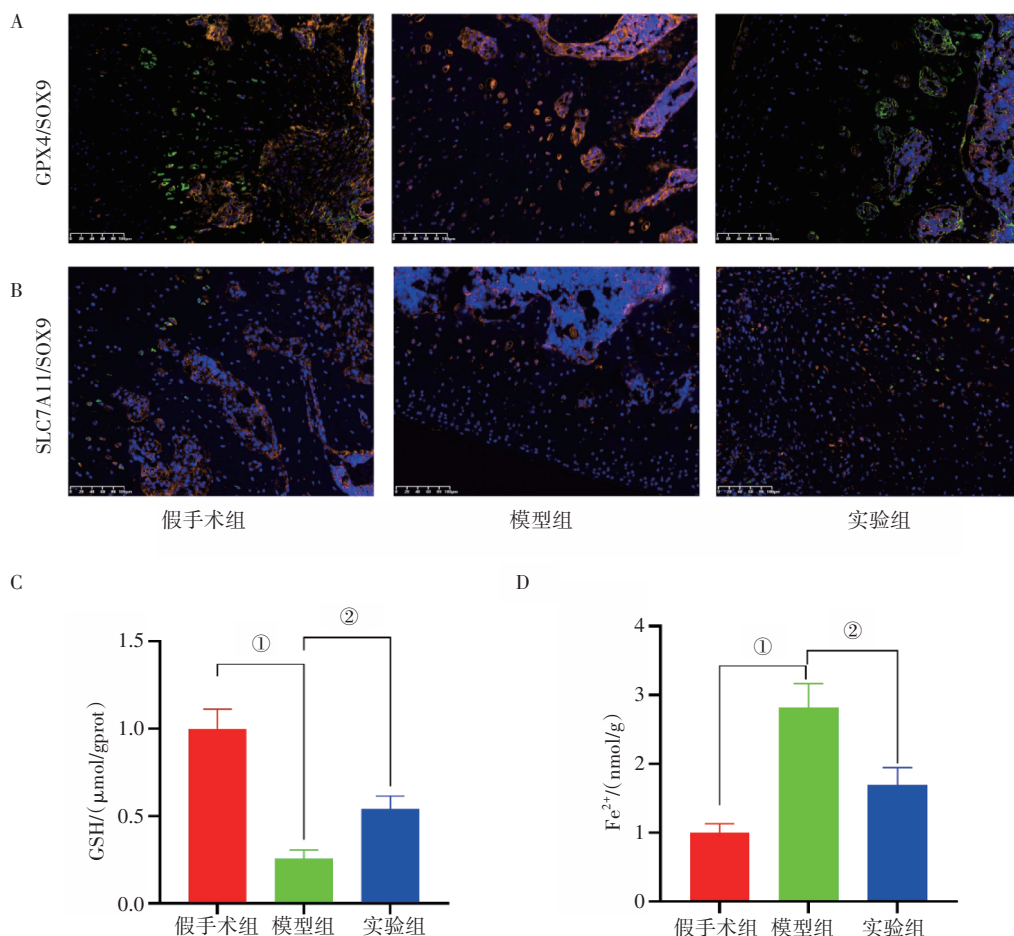
图3 血清和滑膜液中炎症细胞因子IL-6、TNF-α和IL-1β的水平与膝关节软骨凋亡检测

捷性。

KOA 归属于中医学痹证范畴，其治疗重点在于活血化瘀、通络止痛。《中国骨关节炎诊疗指南(2021年版)》^[12]明确指出，针灸可有效改善骨关节炎患者的关节疼痛和关节功能，且安全性较高。目前，各文献中针刺治疗KOA的取穴方案各有不同^[13]。林映欣^[14]研究表明，尺泽穴针刺配合膝关节功能训练可有效减轻KOA患者的疼痛。李丹慧^[15]应用“补肾荣骨针法”组穴(肝俞、肾俞、梁丘、血海、压痛点)，另加膝五针(鹤顶、内外膝眼、阴陵泉、阳陵泉)配合肌力训练，治疗KOA效果显著。

足三里、内膝眼和鹤顶穴都是治疗KOA的高频用穴^[16]，本研究选取此3个穴进行进行针刺干预，有效地减少了软骨的磨损，增加了大鼠的疼痛反应，并减少了血液与滑膜液中的炎症因子，说明针刺可以通过抑制铁死亡改善KOA的症状。

铁死亡是一种由铁依赖性脂质过氧化驱动的程序性细胞死亡形式。这一概念源于对小分子化合物erastin可诱导一种独特细胞死亡形式的发现。2012年，Dixon S J等^[17]正式将这一独特的细胞死亡通路命名为“铁死亡”。铁死亡依赖于细胞内的铁元素，而非其他金属，且在



注：A为各组GPX4与软骨细胞标志基因SOX9共定位情况；B为各组SLC7A11与软骨细胞标志基因SOX9共定位情况；C为各组软骨组织中GSH含量；D为各组软骨组织中Fe²⁺含量。①模型组与假手术组比较， $P < 0.05$ ；②实验组与模型组比较， $P < 0.05$ 。

图4 SLC7A11、GPX4与软骨细胞标志基因SOX9共定位及软骨GSH与Fe²⁺含量

形态学、生物化学和遗传学方面均与凋亡、坏死、自噬不同。在铁死亡过程中，Fe²⁺水平增加，促进机体内的M1型巨噬细胞极化，释放IL-6、TNF- α 和IL-1 β ，降低GSH含量及GPX4、SLC7A11的表达^[18]。李全等^[19]认为夹脊电针刺通过Nrf2/ARE通路增加GSH含量进而激活GPX4的活性，同时上调Beclin的途径促进SLC7A11的表达，降低过氧化反应，最终促进脊髓损伤修复。在本研究中，同样发现针刺能够减少血液与滑膜液中炎症因子的表达，同时降低了软骨中Fe²⁺的含量，但是增加了软骨中GSH含量及GPX4、SLC7A11的表达。换句话说，针刺能够通过减少铁死亡改善KOA。

这也是首次用实验证明，通过靶向铁死亡的治疗可以缓解KOA病情进展，为KOA的治疗提供了新的策略。

本研究发现，针刺可以通过抑制软骨细胞的铁死亡改善KOA症状：与模型组比较，实验组大鼠膝关节软骨损伤显著减轻、机械撤回阈值升高(痛敏降低)、体质量增加且膝关节宽度缩小，软骨细胞凋亡减少、病理损伤明显改善，血清及滑膜液中炎症因子水平显著降低，同时软骨组织Fe²⁺含量降低、GSH含量升高，SLC7A11、GPX4与SOX9共定位表达回升。该结果首次在KOA模型中验证了针刺-铁死亡通路的关联，为KOA的治疗提供了新的策略。

本实验结果能够表明针刺可使炎症因子下降、铁死亡指标改变,改善KOA症状。但也存在不足之处,其结果尚不足以证明“针刺→抑制铁死亡→改善KOA”的机制链条,缺少阻断实验(如铁死亡激动剂、抑制剂)以支持其中的因果关系。

[参考文献]

- [1] 李旭,肖峰. 基于影像特征的膝关节炎进展预测建模及列线图设计[J]. 湖北大学学报(自然科学版), 2022, 44(5): 609-615.
- [2] 张雨,魏志昊,颜冰. 铁死亡在骨关节炎发生机制和治疗中的研究进展[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2023, 29(3): 397-402.
- [3] 吴频霞. 电针刺配合针刺减肥治疗对退行性膝关节炎复发率的影响[J]. 中医药导报, 2011, 17(10): 64.
- [4] 林鹏展,田菲,张林,等. 中医药干预铁死亡机制的研究进展[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(2): 318-322.
- [5] 褚红,肖燕. 针刺干预铁死亡机制研究进展[J]. 中文科技期刊数据库(全文版)医药卫生, 2022(10): 162-164.
- [6] 许丽梅,徐芳媛,夏婧,等. 铁死亡的基本途径及其与骨关节炎可能调控机制的研究进展[J]. 中国医药导报, 2023, 20(9): 50-53.
- [7] PHILPOTT H T, MCDUGALL J J. Combatting joint pain and inflammation by dual inhibition of monoacylglycerol lipase and cyclooxygenase-2 in a rat model of osteoarthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2020, 22(1): 9-17.
- [8] LI B, JING L, JIA L, et al. Acupuncture reduces pain in rats with osteoarthritis by inhibiting MCP2/CCR2 signaling pathway[J]. Exp Biol Med(Maywood), 2020, 245(18): 1722-1731.
- [9] JIANG W, CHEN H, LIN Y, et al. Mechanical stress abnormalities promote chondrocyte senescence-The pathogenesis of knee osteoarthritis[J]. Biomed Pharmacother, 2023, 167: 115552.
- [10] XIA B, DI C, ZHANG J, et al. Tong Osteoarthritis pathogenesis: a review of molecular mechanisms Calcif[J]. Tissue Int, 2014, 95(6): 495-505.
- [11] LIU Y, DA W, XU M J, et al. Single-cell transcriptomics reveals novel chondrocyte and osteoblast subtypes and their role in knee osteoarthritis pathogenesis[J]. Signal Transduct Target Ther, 2025, 10(1): 40.
- [12] 中华医学会骨科学分会关节外科学组,中国医师协会骨科医师分会骨关节炎学组,国家老年疾病临床医学研究中心(湘雅医院),等. 中国骨关节炎诊疗指南(2021年版)[J]. 中华骨科杂志, 2021, 41(18): 1291-1304.
- [13] 梁延昌. 浮针联合运动功能训练治疗膝关节炎骨性关节炎的疗效观察[D]. 广州:广州中医药大学, 2021.
- [14] 林映欣. 针刺尺泽穴配合膝关节功能训练治疗膝骨性关节炎的疗效观察[D]. 福州:福建中医药大学, 2017.
- [15] 李丹慧. 肌力训练结合针刺治疗膝关节炎骨性关节炎的临床疗效观察[D]. 南京:南京中医药大学, 2018.
- [16] 傅健强. 膝关节炎骨性关节炎针刺取穴规律初探[D]. 北京:北京中医药大学, 2012.
- [17] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. Cell, 2012, 149(5): 1060-1072.
- [18] 方晓蓉,石建华,王金海,等. 铁死亡与炎症的关系[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2023, 32(2): 196-201.
- [19] 李全,栾逸先,朱荟一,等. 基于铁死亡Xc⁻/GPX4通路探究夹脊电针促进脊髓损伤修复机制[J]. 针刺临床杂志, 2020, 36(6): 6-10.

[责任编辑:冯天保,蒋维超(英文)]