

·基础研究·

基于 Piezo1/ROS/SERCA1a 信号轴探讨针刺抑制膝骨关节炎模型大鼠股四头肌肌细胞凋亡的机制研究

郑 曲^{1,2,3}, 董宝强^{1,3}, 林星星^{1,3}, 张 宇¹, 关雪峰⁴, 韩易言^{1,3*}

1 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110847;

2 辽宁省教育厅针灸生物学重点实验室, 辽宁 沈阳 110847;

3 辽宁省针灸养生康复重点实验室, 辽宁 沈阳 110847;

4 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016

* 通信作者: 韩易言, E-mail: hyy-zjtn@lnutem.edu.cn

收稿日期: 2024-07-01; 接受日期: 2024-11-19

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFC1712800); 辽宁省科技计划联合计划(自然科学基金-面上项目)(2025-MSLH-482); 辽宁中医药大学重大重点科研项目团队培育项目(2024-JYTCCB-053)

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2026.01008

摘要 **目的** 基于 Piezo1/ROS/SERCA1a 信号轴探讨针刺抑制膝骨关节炎(KOA)模型大鼠股四头肌肌细胞凋亡的机制。**方法** 选择 SPF 级 Wistar 大鼠 36 只, 采用随机数字表法分为假手术组、模型组、塞来昔布组与针刺组, 每组 9 只。模型组、塞来昔布组与针刺组采用改良 Hulth 法造模, 假手术组仅切开关节腔后缝合。造模后假手术组、模型组给予 5 mL 生理盐水灌胃, 塞来昔布组给予 5 mL 浓度为 1.8 mg/100 g 的塞来昔布溶液灌胃, 针刺组给予针刺髌下、鹤顶次、血海次。每日干预 1 次, 连续干预 14 d。测量各组大腿围度、股四头肌湿重并计算湿重维持率及湿重体质量比值; 采用 HE 染色法观察各组股四头肌形态; 采用 TUNEL 法检测各组股四头肌肌细胞凋亡率; 采用免疫荧光染色法检测股四头肌肌细胞内活性氧(ROS)表达水平以及 Piezo1 与 SERCA1a 共表达情况; 采用 Western blot 法检测各组 Piezo1、SERCA1a 及凋亡相关蛋白 Bcl-2、BCL-XL、Bax、Cyt C、Caspase-3 蛋白相对表达量。**结果** 与假手术组比较, 模型组大腿围度较小($P < 0.05$), 股四头肌湿重较轻($P < 0.05$), 湿重维持率及湿重体质量比值均较低($P < 0.05$); 与模型组比较, 塞来昔布组和针刺组大腿围度均较大($P < 0.05$), 股四头肌湿重均较重($P < 0.05$), 湿重维持率及湿重体质量比值均较高($P < 0.05$); 与塞来昔布组比较, 针刺组大腿围度较大($P < 0.05$), 股四头肌湿重较重($P < 0.05$), 湿重维持率及湿重体质量比值均较高($P < 0.05$)。与假手术组比较, 模型组股四头肌肌细胞凋亡率较高($P < 0.05$); 与模型组比较, 塞来昔布组和针刺组股四头肌肌细胞凋亡率均较低($P < 0.05$); 与塞来昔布组比较, 针刺组股四头肌肌细胞凋亡率较低($P < 0.05$)。与假手术组比较, 模型组股四头肌肌细胞内 ROS 表达水平较高($P < 0.05$); 与模型组比较, 塞来昔布组和针刺组股四头肌肌细胞内 ROS 表达水平均较低($P < 0.05$); 与塞来昔布组比较, 针刺组股四头肌肌细胞内 ROS 表达水平较低($P < 0.05$)。与假手术组比较, 模型组 Piezo1、SERCA1a 蛋白表达水平较低($P < 0.05$); 与模型组比较, 塞来昔布组和针刺组 Piezo1、SERCA1a 蛋白表达水平均较高($P < 0.05$); 与塞来昔布组比较, 针刺组 Piezo1、SERCA1a 蛋白表达水平均较高($P < 0.05$)。与假手术组比较, 模型组 Piezo1、SERCA1a 蛋白相对表达量较低($P < 0.05$); 与模型组比较, 塞来昔布组和针刺组

引用格式: 郑曲, 董宝强, 林星星, 等. 基于 Piezo1/ROS/SERCA1a 信号轴探讨针刺抑制膝骨关节炎模型大鼠股四头肌肌细胞凋亡的机制研究[J]. 康复学报, 2026, 36(1): 56-65.

ZHENG Q, DONG B Q, LIN X X, et al. Mechanism of acupuncture inhibiting apoptosis of quadriceps femoris muscle cells in a rat model of knee osteoarthritis based on the Piezo1/ROS/SERCA1a signaling axis [J]. Rehabil Med, 2026, 36(1): 56-65.

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2026.01008

©《康复学报》编辑部, 开放获取 CC BY-NC-ND 4.0 协议

© Rehabilitation Medicine, OA under the CC BY-NC-ND 4.0

Piezo1、SERCA1a蛋白相对表达量均较高($P<0.05$);与塞来昔布组比较,针刺组Piezo1、SERCA1a蛋白相对表达量较高($P<0.05$)。与假手术组比较,模型组BCL-XL蛋白相对表达量较低($P<0.05$),Cyt C、Caspase-3蛋白相对表达量较高($P<0.05$),Bax/Bcl-2比值较高($P<0.05$);与模型组比较,塞来昔布组和针刺组BCL-XL蛋白相对表达量均较高($P<0.05$),Cyt C、Caspase-3蛋白相对表达量均较低($P<0.05$),Bax/Bcl-2比值均较低($P<0.05$);与塞来昔布组比较,针刺组BCL-XL蛋白相对表达量较高($P<0.05$),Cyt C、Caspase-3蛋白相对表达量较低($P<0.05$),Bax/Bcl-2比值较低($P<0.05$)。**结论** 针刺可抑制KOA模型大鼠股四头肌细胞凋亡,其机制可能与调节Piezo1/ROS/SERCA1a信号轴有关。

关键词 膝关节炎;股四头肌;Piezo1/ROS/SERCA1a信号轴;线粒体凋亡;活性氧;针刺

膝关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种老年退行性疾病,它不仅影响关节软骨,还涉及软骨下骨、滑膜以及周围肌肉^[1-2]。随着全球人口老龄化的加剧,KOA的发病率和致残率也在上升^[3]。患者主要面临疼痛、肿胀和关节功能受限等问题,这使得KOA成为了当前和未来需要优先解决的慢性疾病之一。《中国膝关节炎康复治疗指南(2023版)》^[4]中明确指出,KOA与关节周围肌力下降高度相关,且以伸肌肌力下降为主,即股四头肌。从康复医学角度看,膝关节周围肌肉的力量、张力及协调性是维持关节力学平衡与功能的关键。因此,股四头肌的肌力下降可能是KOA发病的重要原因之一,也是加重骨关节炎的重要原因之一。当股四头肌等肌群出现张力异常、力量减弱或协调障碍时,影响下肢力线,运动过程中加速关节磨损,促进炎症反应,从而加重KOA的病理进程。多种康复治疗方法中,针刺治疗在缓解KOA疼痛、改善关节功能方面具有一定优势。研究表明,针刺可通过调节局部血液循环、缓解肌肉紧张、抑制炎症反应等途径,减轻膝关节疼痛并增强股四头肌等肌群的功能状态,从而为KOA的康复管理提供一种可行的辅助手段,但具体分子机制尚待深入阐明^[5]。

机械敏感性离子通道蛋白Piezo1(Piezo type mechanosensitive ion channel component 1, Piezo1)是一种特殊的机械门控阳离子通道,可将机械刺激转化为电化学信号,在调节机械力介导的细胞生物学行为方面发挥着重要作用,其表达下降与肌肉功能障碍密切相关^[6]。Piezo1可能通过影响细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平及肌浆网/内质网钙离子ATP酶1a(Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 1a, SERCA1a)的活性,进而扰动线粒体依赖性凋亡通路,影响B细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)家族蛋白,调节促凋亡蛋白Bcl-2

相关X蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)与抗凋亡蛋白Bcl-2、B细胞淋巴瘤-特大号(B-cell lymphoma-extra large, BCL-XL)的平衡,并最终调控下游凋亡执行蛋白含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(cysteiny aspartate specific proteinase-3, Caspase-3)活化,进而抑制凋亡发生。基于本研究提出如下假设:针刺可能通过调控Piezo1/ROS/SERCA1a信号轴,影响下游Bcl-2、Bax、细胞色素C(cytochrome C, Cyt C)、Caspase-3等凋亡相关蛋白的表达,抑制KOA模型大鼠股四头肌细胞的异常凋亡。为验证该假设,本研究以KOA模型大鼠为对象,以针刺为干预手段,旨在从Piezo1/ROS/SERCA1a信号轴的角度,探讨针刺保护股四头肌细胞、改善肌肉功能的可能机制,以期针刺在KOA康复治疗中的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选择无特定病原体(SPF)级别Wistar大鼠36只,雌雄各半,购自辽宁长生生物技术股份有限公司[实验动物生产许可证号:SCXK(辽)2019-0001]。饲养于辽宁中医药大学动物实验中心[实验动物使用许可证号:SYXK(辽)2023-0001]。光照时间:6:00-18:00,相对湿度40%~70%,温度26℃,给予常规饲料与双重蒸馏水,每日更换垫料并消毒,垫料由沈阳茂华生物科技有限公司提供。本研究经辽宁中医药大学动物实验伦理委员会批准(审批号:21000042023118)。

1.2 主要实验仪器

荧光显微镜(型号:BX53)购自日本OLYMPUS公司;多功能酶标分析仪(型号:MB-530)购自深圳市汇松科技发展有限公司;光学显微镜(型号:DM500)购自德国Leica公司;电泳仪(型号:EPS-600)、电泳槽(型号:VE-180)、转膜仪(型号:VE-

186)均购自上海天能生命科学有限公司;离心机(型号:SL02)购自湖南湘仪实验室仪器开发有限公司。

1.3 主要实验试剂

TUNEL试剂盒(货号:C1056)购自上海碧云天生物技术有限公司;Piezo1抗体(货号:ab259949)、SERCA1a抗体(货号:ab120276)均购自英国Abcam公司;Bel-2抗体(货号:26593-1-AP)、BCL-XL抗体(货号:26967-1-AP)、Bax抗体(货号:50599-2-Ig)、Cyt C抗体(货号:12245-1-AP)、Caspase-3抗体(货号:v68773-1-Ig)均购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.4 实验分组与干预方法

1.4.1 实验动物分组及预适应方案 全部实验动物适应性饲养7 d后,采用随机数字表法分为假手术组、模型组、塞来昔布组与针刺组,每组9只。

1.4.2 KOA造模方法 模型组、塞来昔布组与针刺组采用改良Hulth法制造KOA模型^[7]。用3%戊巴比妥钠腹腔注射对大鼠进行麻醉,麻醉后切断大鼠右侧后肢内侧副韧带,切开关节腔,剪断前后交叉韧带,摘除内侧半月板,然后进行抽屉试验,大鼠患侧呈抽屉试验(+)后缝合。假手术组仅切开关节腔,随即便进行缝合。术后第1~3天,4组每日给予大鼠青霉20万U溶于0.9%生理盐水中腹腔注射。第4天开始,4组每日于小动物跑步机上进行后肢被动运动,模拟因力线偏移、骨关节磨损导致KOA的发生机制。跑台参数:离心半径20 cm,转速:6 r/min,每次30 min,连续训练6周。6周后,各组开始干预并进行后续实验。

1.4.3 干预方案

1.4.3.1 假手术组与模型组 均给予5 mL生理盐水灌胃,每日1次,持续干预14 d。

1.4.3.2 塞来昔布组 根据体表面积折算,给予5 mL浓度为1.8 mg/100 g的塞来昔布溶液灌胃,每日1次,持续干预14 d。

1.4.3.3 针刺组 给予针刺治疗,参考《中国经筋学》^[8],选取髌下、鹤顶次、血海次进行针刺。参考《实验针灸学》^[9]中大鼠解剖学骨性标志进行定位,髌下(大鼠膝部,髌韧带下缘)、鹤顶次(大鼠膝部,髌骨上缘)、血海次(大鼠股内侧部,大鼠膝内缘直上与缝匠肌交界处,即缝匠肌与股四头肌交汇处)。髌下、鹤顶次与血海次均直刺到骨面,反复提插剥离粘连,留针20 min,每日1次,持续干预14 d。

1.4.4 动物处置、取样 末次干预后,4组禁食水12 h,3%的戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,麻醉后固定于实验台,取大鼠患侧整个股四头肌,一半置于多聚甲醛中固定,剩余部分置于50 mL EP管中,-80 °C冰箱冷藏备用。

1.5 观察指标

1.5.1 测量大腿围度、股四头肌湿重并计算湿重维持率及湿重体质量比值 实验前称量每只大鼠体质量,用于计算湿重体质量比值。将大鼠麻醉后,取仰卧位固定于实验台,测量患肢大腿围度。随后充分暴露双侧后肢,完整剥离并取出双侧股四头肌,分别称取湿重。再根据测量结果计算湿重维持率和湿重体质量比值。

湿重维持体质量比值=患侧股四头肌湿重/健侧股四头肌湿重×100%

湿重比=患侧股四头肌湿重/体质量×100%

1.5.2 HE染色观察股四头肌形态 取各组右侧股四头肌,固定后石蜡包埋并切片。切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇复水后,进行HE染色。苏木精染液染色5 min,流水冲洗,1%盐酸乙醇分化10 s,流水冲洗,1%氨水返蓝30 s,流水冲洗,伊红染液染色3 min。染色后流水冲洗60 s,依次经梯度乙醇脱水、二甲苯透明,中性树胶封固。最后采用DM500光学显微镜观察并拍照。

1.5.3 股四头肌肌细胞凋亡率检测 采用原位末端转移酶标记实验(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)检测各组股四头肌肌细胞凋亡情况。将股四头肌石蜡切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇复水后,使用蛋白酶K(20 μg/mL)或0.1% Triton X-100进行通透处理(室温,20 min)。PBS冲洗后,滴加不含酶的标记反应缓冲液室温平衡10 min。其后进行封闭处理,再滴加50 μL TUNEL反应混合液[含末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)酶与荧光素标记脱氧尿苷三磷酸(dUTP)],于37 °C避光孵育60 min。后续滴加稀释后的一抗,4 °C孵育过夜,次日滴加荧光二抗,室温避光孵育90 min。最后使用DAPI染细胞核,甘油封片,于荧光显微镜下观察并随机选取3个视野拍照,计算细胞凋亡率。

1.5.4 股四头肌肌细胞内ROS表达水平以及Piezo1与SERCA1a共表达检测 采用免疫荧光染色法检测各组ROS表达水平以及Piezo1与SERCA1a共表达情况。

1.5.4.1 ROS表达水平检测 石蜡切片经柠檬酸盐

缓冲液(pH 6.0)进行微波热修复(中高火,8 min×2次)并冷却后,于避光条件下滴加1:100稀释的ROS抗体,4℃孵育过夜。次日用PBS清洗,然后在避光条件下滴加荧光二抗和细胞核染料DAPI,避光孵育1 h后,加入抗荧光淬灭剂,最后封片。

1.5.4.2 Piezo1与SERCA1a共表达检测 Piezo1抗体染色方法同ROS表达检测,染色完成后,将切片置于修复盒中进行抗原修复,用微波炉加热30 min,然后孵育SERCA1a抗体,过夜。荧光显微镜下观察并拍摄,每张切片选取3个视野,使用ImageJ软件对荧光量进行分析。

1.5.5 Piezo1、SERCA1a及凋亡相关蛋白相对表达量检测 采用Western blot检测各组Piezo1、SERCA1a、Bcl-2、BCL-XL、Bax、Cyt C、Caspase-3蛋白相对表达量。将4组股四头肌组织剪碎后,加入蛋白裂解液,进行研磨并在冰上裂解、离心,吸取上清,在沸水煮10 min,冷却备用。取各组30 μg蛋白样本,使用含有SDS-PAGE凝胶的电泳系统进行电泳,分离目标蛋白,转移至PVDF膜上。使用5%脱脂奶粉溶液封闭PVDF膜2 h,随后用TBST洗涤,将PVDF膜置于1:2 000稀释的一抗和1:3 000稀释的β-actin一抗中,在4℃下孵育12 h。TBST洗涤PVDF膜后,将其

置于1:2 000稀释的二抗中,在4℃下孵育2 h,使用化学发光成像系统进行曝光并采集图像,采用ImageJ软件分析各蛋白条带的灰度值。

1.6 统计学方法

采用SPSS 25.0统计软件进行数据分析。计量资料服从正态分布数据以($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,若方差齐两两比较采用LSD-*t*检验,若方差不齐采用Games-Howell法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4组大腿围度、股四头肌湿重、湿重维持率及湿重体质量比值比较

与假手术组比较,模型组大腿围度较小($P<0.05$),股四头肌湿重较轻($P<0.05$),湿重维持率及湿重体质量比值均较低($P<0.05$);与模型组比较,塞来昔布组和针刺组大腿围度均较大($P<0.05$),股四头肌湿重均较重($P<0.05$),湿重维持率及湿重体质量比值均较高($P<0.05$);与塞来昔布组比较,针刺组大腿围度较大($P<0.05$),股四头肌湿重较重($P<0.05$),湿重维持率及湿重体质量比值均较高($P<0.05$)。见表1。

表1 4组大腿围度、股四头肌湿重、湿重维持率及湿重体质量比值比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of thigh circumference, quadriceps wet weight, wet weight maintenance rate, and wet weight to body weight ratio in four groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	大腿围度/mm	股四头肌湿重/g	湿重维持率/%	湿重体质量比值/%
假手术组	9	161.41±2.63	4.84±0.70	96.16±1.61	4.83±0.59
模型组	9	100.89±5.10 ¹⁾	2.67±0.61 ¹⁾	79.99±1.00 ¹⁾	2.03±0.22 ¹⁾
塞来昔布组	9	112.19±9.10 ²⁾	3.29±0.36 ²⁾	83.99±3.37 ²⁾	2.93±0.42 ²⁾
针刺组	9	121.57±4.55 ²⁾³⁾	3.91±0.59 ²⁾³⁾	89.96±2.29 ²⁾³⁾	4.13±0.58 ²⁾³⁾

注:与假手术组比较,1) $P<0.05$;与模型组比较,2) $P<0.05$;与塞来昔布组比较,3) $P<0.05$ 。

Note: compared with the sham-operated group, 1) $P<0.05$; compared with the model group, 2) $P<0.05$; compared with the celecoxib group, 3) $P<0.05$.

2.2 4组股四头肌形态比较

假手术组股四头肌肌细胞呈长圆柱形,排列整齐,形态完整。表面可见蓝染的细胞核结构,细胞核完整呈椭圆形,肌细胞表面还可见垂直于长轴的周期性明暗交替的横纹。

模型组股四头肌肌细胞排列紊乱,部分肌细胞出现溶解和坏死,肌膜受损,表面不光滑且呈曲折状。肌细胞松散,肌细胞之间存在明显间隙,并伴有部分肌细胞碎片和大量炎性渗出,淋巴细胞增多。

塞来昔布组股四头肌肌细胞大部分保持了完整的长圆柱形,肌膜的完整性相对较好,可见新生

肌细胞,但仍存在部分肌细胞边缘不清晰的现象,少量细胞碎片以及炎性浸润。

针刺组股四头肌肌细胞形态呈现长圆柱形,肌膜的完整性较好,可见新生肌细胞,未见肌细胞边缘不清晰,未见细胞碎片以及炎性浸润。见图1。

2.3 4组股四头肌肌细胞凋亡率比较

与假手术组比较,模型组股四头肌肌细胞凋亡率较高($P<0.05$);与模型组比较,塞来昔布组和针刺组股四头肌肌细胞凋亡率均较低($P<0.05$);与塞来昔布组比较,针刺组股四头肌肌细胞凋亡率较低($P<0.05$)。见表2、图2。

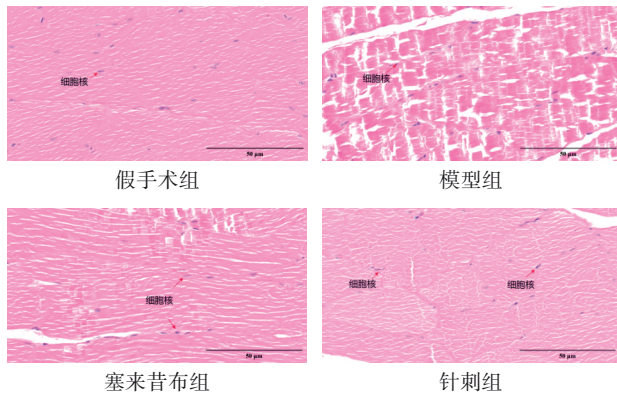


图1 4组股四头肌 HE 染色图比较 (×400)

Figure 1 Comparison of HE staining images of quadriceps femoris in four groups (×400)

表2 4组股四头肌肌细胞凋亡率比较 ($\bar{x}\pm s$) %

Table 2 Comparison of apoptosis index of quadriceps muscle in four groups ($\bar{x}\pm s$) %

组别	n	凋亡率
假手术组	9	0.94±0.03
模型组	9	1.84±0.62 ¹⁾
塞来昔布组	9	1.34±0.30 ²⁾
针刺组	9	1.12±0.16 ²⁾³⁾

注:与假手术组比较,1) $P<0.05$;与模型组比较,2) $P<0.05$;与塞来昔布组比较,3) $P<0.05$ 。

Note: compared with the sham-operated group, 1) $P<0.05$; compared with the model group, 2) $P<0.05$; compared with the celecoxib group, 3) $P<0.05$.

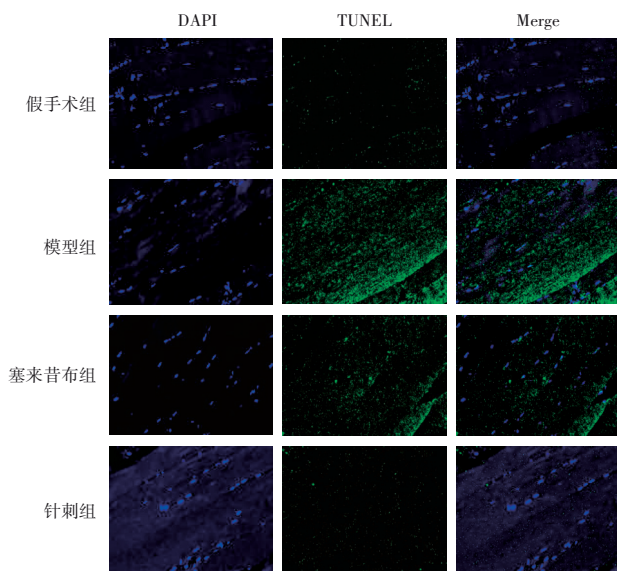


图2 4组 TUNEL 染色图 (×400)

Figure 2 TUNEL staining images in four groups (×400)

2.4 4组股四头肌肌细胞内 ROS 表达水平比较

与假手术组比较,模型组股四头肌肌细胞内 ROS 表达水平较高 ($P<0.05$);与模型组比较,塞来昔布组和针刺组股四头肌肌细胞内 ROS 表达水平均较低 ($P<0.05$);与塞来昔布组比较,针刺组股四头肌肌细胞内 ROS 表达水平较低 ($P<0.05$)。见表3、图3。

表3 4组股四头肌肌细胞内 ROS 表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of intracellular ROS levels in quadriceps myocytes in four groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	ROS
假手术组	9	2.03±0.34
模型组	9	13.77±3.75 ¹⁾
塞来昔布组	9	11.07±3.20 ²⁾
针刺组	9	6.17±1.43 ²⁾³⁾

注:与假手术组比较,1) $P<0.05$;与模型组比较,2) $P<0.05$;与塞来昔布组比较,3) $P<0.05$ 。

Note: compared with the sham-operated group, 1) $P<0.05$; compared with the model group, 2) $P<0.05$; compared with the Celecoxib group, 3) $P<0.05$.

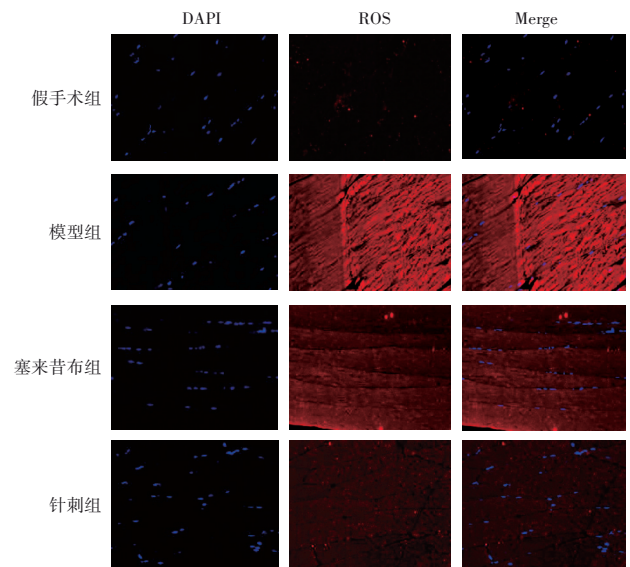


图3 4组股四头肌肌细胞内 ROS 表达图 (×400)

Figure 3 ROS fluorescence images of quadriceps myocytes in four groups (×400)

2.5 4组 Piezo1 与 SERCA1a 蛋白表达水平比较

与假手术组比较,模型组 Piezo1、SERCA1a 蛋白表达水平较低 ($P<0.05$);与模型组比较,塞来昔布组和针刺组 Piezo1、SERCA1a 蛋白表达水平均较高 ($P<0.05$);与塞来昔布组比较,针刺组 Piezo1、SERCA1a 蛋白表达水平较高 ($P<0.05$)。见表4、图4。

表4 4组股四头肌组织Piezo1与SERCA1a蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$)
Table 4 Comparison of relative expression levels of Piezo1 and SERCA1a proteins in quadriceps femoris tissue among the four groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Piezo1	SERCA1a
假手术组	9	9.66±1.61	10.37±2.34
模型组	9	1.04±0.23 ¹⁾	4.34±0.78 ¹⁾
塞来昔布组	9	4.16±1.02 ²⁾	6.78±1.34 ²⁾
针刺组	9	8.20±1.47 ²⁾³⁾	9.12±1.34 ²⁾³⁾

注:与假手术组比较,1) $P<0.05$;与模型组比较,2) $P<0.05$;与塞来昔布组比较,3) $P<0.05$ 。

Note: compared with the sham-operated group, 1) $P<0.05$; compared with the model group, 2) $P<0.05$; compared with the celecoxib group, 3) $P<0.05$.

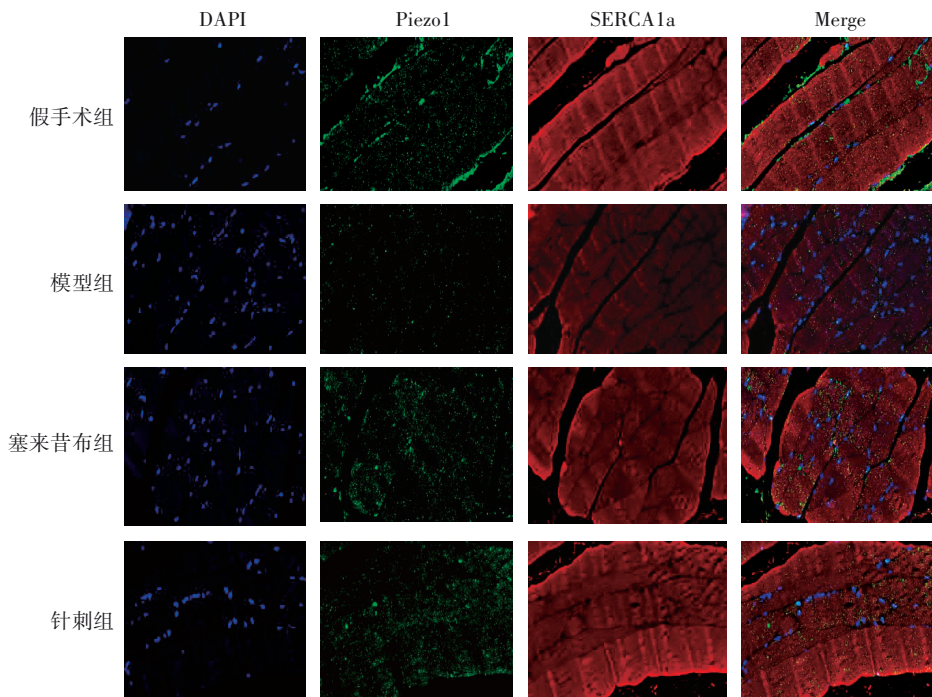


图4 4组Piezo1与SERCA1a蛋白共表达图($\times 400$)

Figure 4 Expression images of Piezo1 and SERCA1a proteins in four groups ($\times 400$)

2.6 4组Piezo1、SERCA1a蛋白相对表达量比较

与假手术组比较,模型组Piezo1、SERCA1a蛋白相对表达量均较低($P<0.05$);与模型组比较,塞来昔布组和针刺组Piezo1、SERCA1a蛋白相对表达

量均较高($P<0.05$);与塞来昔布组比较,针刺组Piezo1、SERCA1a蛋白相对表达量均较高($P<0.05$)。见表5、图5。

表5 4组股四头肌组织Piezo1、SERCA1a蛋白相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)

Table 5 Comparison of Piezo1 and SERCA1a protein expression in quadriceps femoris tissue in four groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Piezo1	SERCA1a
假手术组	9	0.93±0.04	0.88±0.11
模型组	9	0.30±0.06 ¹⁾	0.26±0.07 ¹⁾
塞来昔布组	9	0.52±0.10 ²⁾	0.60±0.18 ²⁾
针刺组	9	0.81±0.17 ²⁾³⁾	0.83±0.14 ²⁾³⁾

注:与假手术组比较,1) $P<0.05$;与模型组比较,2) $P<0.05$;与塞来昔布组比较,3) $P<0.05$ 。

Note: compared with the sham-operated group, 1) $P<0.05$; compared with the model group, 2) $P<0.05$; compared with the celecoxib group, 3) $P<0.05$.

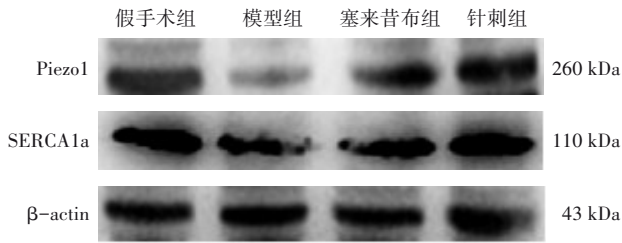


图5 4组股四头肌组织SERCA1a及PLB蛋白表达电泳图
Figure 5 Electrophoretogram of SERCA1a and PLB protein expression in quadriceps femoris tissue in four groups

表6 4组BCL-XL、Cyt C、Caspase-3蛋白相对表达量和Bax/Bcl-2比值比较($\bar{x}\pm s$)
Table 6 Comparison of relative expression levels of BCL-XL, Cyt C, and Caspase-3 proteins and the Bax/Bcl-2 ratio in four groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	BCL-XL	Cyt C	Caspase-3	Bax/Bcl-2 比值
假手术组	9	0.90±0.10	0.12±0.02	0.31±0.12	0.40±0.18
模型组	9	0.12±0.03 ¹⁾	0.94±0.13 ¹⁾	0.90±0.10 ¹⁾	4.35±0.82 ¹⁾
塞来昔布组	9	0.64±0.17 ²⁾	0.78±0.16 ²⁾	0.72±0.22 ²⁾	1.32±0.28 ²⁾
针刺组	9	0.89±0.11 ²⁾³⁾	0.52±0.20 ²⁾³⁾	0.27±0.09 ²⁾³⁾	0.33±0.20 ²⁾³⁾

注:与假手术组比较,1) $P<0.05$;与模型组比较,2) $P<0.05$;与塞来昔布组比较,3) $P<0.05$ 。

Note: compared with the sham-operated group, 1) $P<0.05$; compared with the model group, 2) $P<0.05$; compared with the celecoxib group, 3) $P<0.05$.

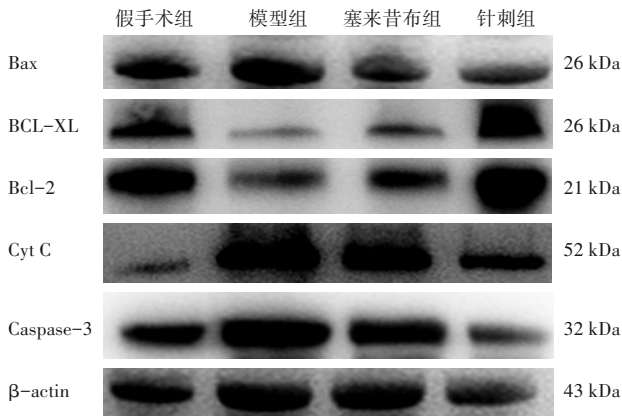


图6 4组股四头肌组织Bax、BCL-XL、Bcl-2、Cyt C、Caspase-3蛋白条带图

Figure 6 Western blot bands of Bax, BCL-XL, Bcl-2, Cyt C, Caspase-3 proteins in quadriceps femoris tissue among the four groups

3 讨论

3.1 股四头肌功能障碍与KOA康复的关系

KOA是一种高致残性的退行性疾病,其导致的健康生命年损失位列全球前列,给社会带来沉重负担^[10-12]。康复医学日益认识到,膝关节周围肌肉,尤其是作为主要伸膝肌群的股四头肌,其功能状态是

2.7 4组凋亡相关蛋白相对表达量比较

与假手术组比较,模型组BCL-XL蛋白相对表达量较低($P<0.05$),Cyt C、Caspase-3蛋白相对表达量均较高($P<0.05$),Bax/Bcl-2比值较高($P<0.05$);与模型组比较,塞来昔布组和针刺组BCL-XL蛋白相对表达量均较高($P<0.05$),Cyt C、Caspase-3蛋白相对表达量均较低($P<0.05$),Bax/Bcl-2比值均较低($P<0.05$);与塞来昔布组比较,针刺组BCL-XL蛋白相对表达量均较高($P<0.05$),Cyt C、Caspase-3蛋白相对表达量均较低($P<0.05$),Bax/Bcl-2比值较低($P<0.05$)。见表6、图6。

影响KOA进程与康复结局的核心环节^[13]。股四头肌不仅是产生伸膝力量的动力源,更是维持膝关节动态稳定的关键“动力稳定器”。股四头肌肌力下降、萎缩及激活延迟会直接导致膝关节稳定性降低、关节负荷分布异常,从而加剧软骨磨损、疼痛和功能障碍,形成“肌肉萎缩-关节失稳-退变加重”的恶性循环,严重阻碍康复^[14]。为探究这一机制并评估效果,本研究采用改良Hulth法构建大鼠KOA模型。该方法通过手术制造膝关节结构性不稳,并结合术后规律驱赶运动,成功模拟了临床因力学失衡导致的渐进性关节退变及继发性肌肉改变^[15]。本研究采用HE染色法观察股四头肌组织形态,镜下观察到模型组大鼠股四头肌出现了典型的病理形态学改变,为KOA继发的伸肌群萎缩提供了直接的形态学证据。治疗后,针刺组肌纤维排列趋于整齐,萎缩迹象减轻。本研究表明针刺能直接靶向受损的伸肌群,促进其形态恢复。从康复角度看,股四头肌功能的恢复是打破上述恶性循环、重建膝关节稳定性、实现功能康复的基石。因此,针刺对股四头肌形态的改善,为其能够缓解疼痛、增强关节稳定性并促进整体功能康复,提供了结构层面的机

制解释,深化了“筋骨并重,以筋为先”治疗理念在康复实践中的科学内涵,即通过优先改善“筋”的功能与状态,来为“骨”的康复创造有利的力学环境^[16-17]。

3.2 Piezo1与SERCA1a的共表达关系及功能联动

本研究聚焦于机械敏感离子通道Piezo1与肌浆网钙泵SERCA1a在KOA股四头肌中的共表达与功能关系。免疫荧光染色法双标结果显示,在正常肌肉中,Piezo1与SERCA1a存在显著的共定位,提示两者在功能上可能形成一个密切协同的单元,共同调控肌细胞的钙信号与收缩活动。Piezo1作为机械门控钙通道,负责感知力学刺激并介导初始、快速的钙内流,是连接外部机械环境与细胞内生化信号的关键分子^[18-19]。SERCA1a则是维持钙稳态的核心蛋白,通过消耗ATP将胞质内的钙离子主动泵回肌浆网,这一过程不仅终止了收缩信号,也为下一次收缩储备了钙离子,是决定肌肉舒张速率和疲劳恢复能力的关键因素^[20-21]。二者平衡是维持骨骼肌正常兴奋-收缩耦联与钙稳态的基础。一个高效的功能联动可能表现为Piezo1介导的钙内流作为触发或调节信号,在生理范围内“告知”细胞当前的力学状态,而SERCA1a则确保信号结束后胞质钙离子能被迅速清除,维持钙瞬变的精确性与可重复性。这种“感知与清除”的快速循环,是肌肉适应动态负荷、实现精确收缩与快速放松的分子基础。本研究观察到模型组、塞来昔布组、针刺组Piezo1与SERCA1a相对表达水平较假手术组低,提示KOA病理状态抑制了Piezo1与SERCA1a蛋白表达,导致机械信号转导效率降低以及钙回收能力受损,这种表达的下调,从分子层面解释了KOA股四头肌为何同时出现对力学刺激应答异常和舒张功能障碍,为针刺通过同时上调Piezo1与SERCA1a表达以恢复钙信号完整性提供了关键的机制依据。

3.3 针刺通过调控Piezo1/ROS/SERCA1a信号轴抑制股四头肌细胞凋亡

在KOA股四头肌萎缩的病理进程中,钙稳态失衡与氧化应激是诱发肌细胞凋亡的关键环节^[22]。本研究证实了一条由Piezo1介导的核心机制信号轴,生理状态下,Piezo1通道负责感知机械刺激并介导低ROS生成的钙内流,与负责钙回收的SERCA1a协同维持钙平衡^[23-24]。研究发现,造模后的大鼠股四头肌肌细胞Piezo1表达下调,迫使钙离子更多通过耗能的电压依赖性钙通道内流,此过程伴随大量

ROS生成。过量ROS不仅直接损伤细胞,更会抑制SERCA1a的活性与表达,导致其钙回收功能衰竭。持续的胞内钙超载与氧化应激共同激活了线粒体依赖性凋亡通路。本研究数据一致地显示,模型组股四头肌同时存在ROS表达水平升高、SERCA1a蛋白相对表达量下降、凋亡率增加以及凋亡蛋白Bax/Bcl-2比率升高和Caspase-3的活化。针刺干预逆转了这一恶性循环,显著上调了股四头肌中Piezo1与SERCA1a的表达。Piezo1的上调恢复了对生理性机械转导的依赖,从源头减少了ROS的异常生成。与此同时,SERCA1a功能的恢复增强了肌浆网钙回收的能力,有效解除了钙超载。最终,ROS表达水平随之降低,线粒体凋亡通路被抑制,肌细胞得以存活。对“Piezo1/ROS/SERCA1a”信号轴的调控,阐明了针刺通过改善钙稳态与氧化应激,从而抑制细胞凋亡、对抗KOA相关肌萎缩的整合生物学机制。

4 小 结

经筋理论指导下针刺膝下、鹤顶次、血海次可有效改善KOA模型大鼠的股四头肌功能障碍。其作用可能与上调Piezo1与SERCA1a蛋白表达量,降低ROS表达水平,抑制股四头肌肌细胞凋亡有关。然而,本研究尚未深入阐明针刺调控Piezo1/ROS/SERCA1a信号轴的具体分子机制及关键靶点,未来研究需借助基因干预、钙信号实时监测等技术,进一步揭示针刺恢复肌肉“筋骨平衡”的内在机制,为临床优化针刺治疗方案提供实验依据。

参考文献

- [1] TANG S-A, ZHANG C Q, OO W M, et al. Osteoarthritis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2025, 11: 10.
- [2] TANG Y L, WANG Z Y, CAO J, et al. Bone-brain crosstalk in osteoarthritis: pathophysiology and interventions [J]. Trends Mol Med, 2025, 31(3): 281-295.
- [3] HAYASHI D, ROEMER F W, GUERMAZI A. Osteoarthritis year in review 2024: imaging [J]. Osteoarthr Cartil, 2025, 33(1): 88-93.
- [4] 中华医学会物理医学与康复学分会, 四川大学华西医院. 中国膝关节炎康复治疗指南(2023版)[J]. 中国循证医学杂志, 2024, 24(1): 1-14. Chinese Society of Physical Medicine and Rehabilitation, West China Hospital of Sichuan University. Chinese guideline for the rehabilitation treatment of knee osteoarthritis (2023 edition) [J]. Chin J Evid Based Med, 2024, 24(1): 1-14.
- [5] 夏心瑛, 龚利, 孟凡超, 等. 基于经筋与同气相求理论探讨手法

- 联合针刺治疗膝关节关节炎的方案[J]. 中医正骨, 2025, 37(10): 38-40, 45.
- XIA X Y, GONG L, MENG F C, et al. Exploring a protocol of manipulation therapy combined with acupuncture therapy for treatment of knee osteoarthritis based on meridian-sinew and sensation-response theories [J]. *J Tradit Chin Orthop Traumatol*, 2025, 37(10): 38-40, 45.
- [6] XU X, LIU S Y, LIU H, et al. Piezo channels: awesome mechanosensitive structures in cellular mechanotransduction and their role in bone [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(12): 6429.
- [7] FANG X Z, ZHOU T, XU J Q, et al. Structure, kinetic properties and biological function of mechanosensitive Piezo channels [J]. *Cell Biosci*, 2021, 11(1): 13.
- [8] 薛立功. 中国经筋学[M]. 北京: 中医古籍出版社, 2009: 181-183.
- XUE L G. Chinese Meridian and Tendon Studies [M]. Beijing: Traditional Chinese Medicine Classics Press, 2009: 181-183.
- [9] 郭义. 实验针灸学[M]. 5版. 北京: 中国中医药出版社, 2021: 38-43.
- GUO Y. Experimental acupuncturology [M]. 5th ed. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2021: 38-43.
- [10] MEI Z X, YILAMU K, NI W Y, et al. Chondrocyte fatty acid oxidation drives osteoarthritis *via* SOX9 degradation and epigenetic regulation [J]. *Nat Commun*, 2025, 16: 4892.
- [11] GBD 2021 Osteoarthritis Collaborators. Global, regional, and national burden of osteoarthritis, 1990-2020 and projections to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021 [J]. *Lancet Rheumatol*, 2023, 5(9): e508-e522.
- [12] HAWKER G A, KING L K. The burden of osteoarthritis in older adults [J]. *Clin Geriatr Med*, 2022, 38(2): 181-192.
- [13] 余伟杰, 刘爱峰, 陈继鑫, 等. 基于“骨正筋柔”理论探讨保膝截骨治疗膝关节关节炎的生物力学内涵[J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(11): 5255-5259.
- YU W J, LIU A F, CHEN J X, et al. Discussion on the biomechanical connotation of knee-preserving osteotomy in the treatment of knee osteoarthritis based on the theory of "bone strengthening and tendon softening" [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2023, 38(11): 5255-5259.
- [14] JHANGIANI P, JAIN S, NEHA K, et al. Osteoarthritis: an update on diagnosis & management [J]. *Curr Rheumatol Rev*, 2025, 21(4): 367-385.
- [15] BOER C G. Osteoarthritis year in review 2024: Genetics, genomics, and epigenetics [J]. *Osteoarthr Cartil*, 2025, 33(1): 50-57.
- [16] 林星星, 董宝强, 王树东, 等. 基于筋膜的经筋基础研究: 述评与展望[J]. 中国针灸, 2023, 43(11): 1338-1342.
- LIN X X, DONG B Q, WANG S D, et al. Basic research of meridian-tendon based on Fascia: review and prospects [J]. *Chin Acupunct Moxibustion*, 2023, 43(11): 1338-1342.
- [17] 魏子程, 吴江栋, 王亦仓, 等. 膝关节周围截骨的生物力学机制与临床研究进展[J]. 医用生物力学, 2025, 40(5): 1092-1100.
- WEI Z C, WU J D, WANG Y C, et al. Biomechanical mechanism and clinical research progress of knee osteotomy [J]. *J Med Biomech*, 2025, 40(5): 1092-1100.
- [18] SMITH K A, CHUNTHARPURSAT-BON E, POVSTYAN O V, et al. Regulation of Piezo1 channel force sensitivity by interblade handshaking [J]. *Sci Adv*, 2025, 11(24): ead7046.
- [19] GARCIA JM, RIESTER R, GAMINO M, et al. Piezo1-mediated calcium influx transiently alters nuclear mechanical properties via actin remodeling in chondrocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2025, 742: 151135.
- [20] CHEN J, SITSEL A, BENOY V, et al. Primary active Ca²⁺ transport systems in health and disease [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2020, 12(2): a035113.
- [21] 郑曲, 董宝强, 林星星, 等. 基于线粒体凋亡途径探究经筋刺法对膝关节炎模型大鼠股四头肌保护作用机制[J]. 中国中医药信息杂志, 2025, 32(4): 92-99.
- ZHENG Q, DONG B Q, LIN X X, et al. Study on the protective mechanism of meridian and tendon acupuncture on the quadriceps femoris cells in rat model of knee osteoarthritis based on mitochondrial apoptosis pathway [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2025, 32(4): 92-99.
- [22] XIA Y, LI B, ZHANG F, et al. Hydroxyapatite nanoparticles promote mitochondrial-based pyroptosis via activating calcium homeostasis and redox imbalance in vascular smooth muscle cells [J]. *Nanotechnology*, 2022, 33(27): 10.
- [23] YANG R S, OU S J, ZENG W, et al. Piezo1 promotes M1 macrophage polarization and impairs osteogenic differentiation in bone infection [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2026, 1872(1): 168042.
- [24] CHEN J, WU D, HUANG C, et al. Piezo1-driven mechanotransduction regulates mitochondrial biogenesis by AMPK/SIRT1-mediated PGC-1 α deacetylation to ameliorate bone loss in disuse osteoporosis [J]. *Int J Biol Sci*, 2026, 22(1): 308-326.

Mechanism of Acupuncture Inhibiting Apoptosis of Quadriceps Femoris Muscle Cells in a Rat Model of Knee Osteoarthritis Based on the Piezo1/ROS/SERCA1a Signaling Axis

ZHENG Qu^{1,2,3}, DONG Baoqiang^{1,3}, LIN Xingxing^{1,3}, ZHANG Yu¹, GUAN Xuefeng⁴, HAN Yiyan^{1,3*}

¹ Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning 110847, China;

² Liaoning Provincial Key Laboratory of Acupuncture Biology, Shenyang, Liaoning 110847, China;

³ Liaoning Provincial Key Laboratory of Acupuncture and Moxibustion Health and Rehabilitation, Shenyang, Liaoning 110847, China;

⁴ Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang, Liaoning 110016, China

*Correspondence: HAN Yiyan, E-mail: hyy-zjtn@lnutcm.edu.cn

ABSTRACT Objective To explore the mechanism by which acupuncture inhibits quadriceps femoris myocyte apoptosis in a rat model of knee osteoarthritis (KOA) based on the Piezo1/ROS/SERCA1a signaling axis. **Methods** A total of thirty-six SPF-grade Wistar rats were randomly divided into sham-operated group, model group, celecoxib group, and acupuncture group, with nine rats in each group. The KOA model was established in the model, celecoxib, and acupuncture groups using the modified Hulth method, while the sham-operated group only underwent arthrotomy followed by suture. After modeling, the sham-operated and model groups received 5 mL of normal saline by gavage, the celecoxib group received 1.8 mg/mL celecoxib solution 5 mL by gavage, and the acupuncture group received acupuncture at the infra-patellar, Hedingci, and Xuehaici acupoints. Interventions were performed once daily for 14 consecutive days. Thigh circumference and quadriceps wet weight were measured, and the wet weight maintenance rate and wet weight to body weight ratio were calculated. HE staining was used to observe quadriceps morphology; TUNEL assay was applied to detect quadriceps myocyte apoptosis rate; immunofluorescence staining was employed to assess intracellular ROS expression and co-expression of Piezo1 and SERCA1a in quadriceps myocytes; and Western blot was performed to measure the relative expression levels of Piezo1, SERCA1a, and apoptosis-related proteins (Bcl-2, BCL-XL, Bax, Cyt C, Caspase-3). **Results** Compared with the sham-operated group, the model group showed a smaller thigh circumference ($P<0.05$), lighter wet weight of the quadriceps femoris ($P<0.05$), and lower wet weight maintenance rate and wet weight to body weight ratio ($P<0.05$). Compared with the model group, the thigh circumference was greater ($P<0.05$), quadriceps wet weight was heavier ($P<0.05$); and both the wet weight maintenance rate and the wet weight to body weight ratio were higher in the celecoxib and acupuncture groups ($P<0.05$). Compared with the celecoxib group, the thigh circumference was larger ($P<0.05$), quadriceps wet weight was heavier ($P<0.05$), and both the wet weight maintenance rate and the wet weight to body weight ratio were higher in the acupuncture group ($P<0.05$). Compared with the sham-operated group, the apoptosis rate of quadriceps myocytes was higher in the model group ($P<0.05$); compared with the model group, the apoptosis rate of quadriceps myocytes was lower in both the celecoxib group and the acupuncture group ($P<0.05$); and compared with the celecoxib group, the apoptosis rate of quadriceps myocytes was lower in acupuncture group ($P<0.05$). Compared with the sham-operated group, intracellular ROS expression level in quadriceps myocytes was higher in the model group ($P<0.05$); compared with the model group, intracellular ROS expression levels in quadriceps myocytes were lower in the celecoxib group and the acupuncture group ($P<0.05$); and compared with the celecoxib group, intracellular ROS expression level in quadriceps myocytes was lower in the acupuncture group ($P<0.05$). Compared with the sham-operated group, the protein expression levels of Piezo1 and SERCA1a were lower in the model group ($P<0.05$); compared with the model group, the protein expression levels of Piezo1 and SERCA1a were higher in the celecoxib group and the acupuncture group ($P<0.05$); and compared with the celecoxib group, the protein expression levels of Piezo1 and SERCA1a were higher in the acupuncture group ($P<0.05$). Compared with the sham-operated group, the relative expression levels of Piezo1 and SERCA1a proteins in the model group were lower ($P<0.05$); compared with the model group, the relative expression levels of Piezo1 and SERCA1a proteins were higher in the celecoxib group and the acupuncture group ($P<0.05$); compared with the celecoxib group, the relative expression levels of Piezo1 and SERCA1a proteins were higher in the acupuncture group ($P<0.05$). Compared with the sham-operated group, the relative expression level of BCL-XL protein in the model group was lower ($P<0.05$), the relative expression levels of Cyt C and Caspase-3 proteins were higher ($P<0.05$), and the Bax/Bcl-2 ratio was higher ($P<0.05$). Compared with the model group, the relative expression of BCL-XL protein was higher, the relative expression of Cyt C and Caspase3 proteins were lower, and the Bax/Bcl-2 ratio was lower in the celecoxib group and acupuncture group ($P<0.05$). Compared with the celecoxib group, the relative expression of BCL-XL protein was higher, Cyt C and Caspase-3 proteins were lower, and the Bax/Bcl-2 ratio was lower in the acupuncture group ($P<0.05$). **Conclusion** Acupuncture can inhibit quadriceps myocyte apoptosis in KOA model rats, and its mechanism may be related to the regulation of the Piezo1/ROS/SERCA1a signaling axis.

KEY WORDS knee osteoarthritis; quadriceps femoris; Piezo1/ROS/SERCA1a signaling axis; mitochondrial apoptosis; reactive oxygen species; acupuncture

DOI:10.3724/SP.J.1329.2026.01008