

DOI: 10.13210/j.cnki.jhmu.20250701.001

网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/46.1049.r.20250701.1534.002>

苗医弩药针对膝骨性关节炎大鼠背根神经节 Nav1.7/Nav1.8 通路的影响

杨心彧¹, 王 欣¹, 李虹莹¹, 卢春霞^{1,2}, 崔 瑾²✉

(1. 贵州中医药大学针灸推拿学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州中医药大学第一附属医院, 贵州 贵阳 550002)

[摘要] **目的:** 观察苗医弩药针对膝骨性关节炎(knee osteoarthritis, KOA)大鼠背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)电压门控钠通道 1.7(Nav1.7)/1.8(Nav1.8)蛋白的影响, 探讨弩药针治疗 KOA 的潜在机制。**方法:** 将 36 只雄性 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、弩药针组、皮肤针组。除正常组大鼠($n=9$)外, 其余采用右膝关节注射碘乙酸建立 KOA 模型。造模结束后, 每组随机抽取 1 只进行模型评估, 模型组、弩药针组、皮肤针组每组各 8 只接受造模处理和干预。弩药针组按照苗医弩药针的操作步骤于大鼠右膝关节面进行干预治疗, 皮肤针组采用皮肤针于右膝关节进行局部滚刺。隔日 1 次, 每周 3 次, 连续干预 4 周。于实验第 1、14、21、28、35、42 天检测大鼠机械性刺激缩足(von Frey)阈值。干预结束后, 通过 H&E 染色观察大鼠右膝关节软骨组织形态变化; ELISA 检测大鼠血清中降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)、P 物质(substance P, SP)和前列素 E2(prostaglandin E2, PGE2)含量; Western blot 和实时荧光定量 PCR 检测大鼠 DRG 组织中 Nav1.7、Nav1.8 蛋白和 mRNA 相对表达量。**结果:** 与正常组比, 模型组大鼠实验第 42 天 von Frey 阈值明显降低($P<0.05$); 右膝关节软骨表面糜烂缺损, 结构层次紊乱, 软骨细胞明显减少; 血清中 CGRP、SP、PGE2 含量明显升高($P<0.05$); DRG 组织中 Nav1.7、Nav1.8 蛋白和 mRNA 相对表达量明显升高($P<0.05$)。与模型组比较, 弩药针组、皮肤针组大鼠实验第 42 天 von Frey 阈值明显升高($P<0.05$); 右膝关节软骨形态较完整, 结构层次较清晰, 新生软骨细胞较多; 血清中 CGRP、SP、PGE2 含量明显降低($P<0.05$); DRG 组织中 Nav1.7、Nav1.8 蛋白和 mRNA 相对表达量明显降低($P<0.05$)。与皮肤针组比较, 弩药针组大鼠实验第 42 天 von Frey 阈值明显升高($P<0.05$); 右膝关节软骨表面光滑, 结构层次清晰; 血清中 CGRP、SP、PGE2 含量明显降低($P<0.05$); DRG 组织中 Nav1.7、Nav1.8 蛋白和 mRNA 相对表达量明显降低($P<0.05$)。**结论:** 苗医弩药针可能通过抑制炎症因子 CGRP、SP、PGE2 的表达和下调 DRG 中钠通道 Nav1.7、Nav1.8 蛋白的表达, 发挥治疗 KOA 作用。

[关键词] 膝骨性关节炎; 苗医弩药针; 慢性疼痛; 电压门控钠通道; Nav1.7; Nav1.8

[中图分类号] R29 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-5953(2026)17-1306-09

Effects of Miao medicinal crossbow acupuncture on Nav1.7/Nav1.8 pathway in dorsal root ganglion of rats with knee osteoarthritis

YANG Xinyu¹, WANG Xin¹, Li Hongying¹, Lu Chunxia^{1,2}, CUI Jin²✉

(1. College of Acupuncture-Moxibustion and Tuina, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China;
2. The First Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Foundation Project]: This study was supported by the Guizhou Provincial Science and Technology Program [Qiankehe Support (2023) General 240]

[Author]: YANG Xinyu, E-mail: 3436620834@qq.com.

[Correspondence to]: CUI Jin, Professor, Doctoral Supervisor, E-mail: 516260179@qq.com.

Received: 2025-02-21

Revised: 2025-05-29

JHMu, 2026;32(17):1306-1314

[基金项目] 贵州省科技计划项目 [黔科合支撑(2023)一般 240]

[作者简介] 杨心彧, E-mail: 3436620834@qq.com。

[通讯作者] 崔瑾, 教授, 博士生导师, E-mail: 516260179@qq.com。

[收稿日期] 2025-02-21

[修回日期] 2025-05-29

网络出版时间: 2025-07-02 10:02:40

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] Objective: To observe the effects of Miao medicinal crossbow acupuncture on voltage-gated sodium channel 1.7 (Nav1.7)/voltage-gated sodium channel 1.8 (Nav1.8) proteins in the dorsal root ganglion (DRG) of rats with knee osteoarthritis (KOA), and to explore the potential mechanism of the crossbow acupuncture treating KOA. **Methods:** A total of 36 rats were randomly divided into the normal group, the model group, the Miao medicinal crossbow acupuncture group, and the dermal needle group. Except for the normal group ($n=9$), the rest of the rats were injected with sodium iodoacetate into the right knee joint to establish KOA models. One rat was randomly selected from each group for model evaluation after modeling, and there were 8 rats in each group of the model group, the Miao medicinal crossbow acupuncture group, and the dermal needle group that received modeling procedure and intervention. The rats in the Miao medicinal crossbow acupuncture group were treated with Miao medicinal crossbow acupuncture following the operation procedures, and the rats in the dermal needle group were treated with rolling a skin needle on the right knee joint surface. The intervention was given once every other day, 3 times a week for 4 weeks. On day 1, 14, 21, 28, 35 and 42 of the experiment, paw withdrawal (von Frey) threshold was measured. After the intervention, H&E staining was used to observe the morphological changes of cartilage tissue in the right knee joint of rats. The contents of calcitonin gene-related peptide (CGRP), substance P (SP), and prostaglandin E2 (PGE2) in serum of rats were detected by ELISA. The relative expressions of Nav1.7 and Nav1.8 proteins and mRNA in DRG tissues of rats were detected by Western blot and real-time fluorescence quantitative PCR. **Results:** Compared to the normal group, von Frey threshold was significantly decreased in the model group on day 42 ($P<0.05$). The cartilage surface of the right knee joint was eroded and defective, with structural disorders and a significant reduction in chondrocytes. The levels of CGRP, SP, and PGE2 in serum were significantly increased ($P<0.05$). The relative expressions of Nav1.7 and Nav1.8 proteins and mRNA in DRG tissue were significantly increased ($P<0.05$). Compared to the model group, von Frey threshold was significantly increased on the day 42 of experiment in the Miao medicinal crossbow acupuncture group and the dermal needle group ($P<0.05$). The cartilage of the right knee joint was more complete in morphology, with clearer structural layers and more neoplastic chondrocytes. The levels of CGRP, SP, and PGE2 in serum were significantly decreased ($P<0.05$). The relative expressions of Nav1.7 and Nav1.8 proteins and mRNA in DRG tissue were significantly decreased ($P<0.05$). Compared to the dermal needle group, von Frey threshold was significantly increased on the day 42 of experiment in the Miao medicinal crossbow acupuncture group ($P<0.05$). The cartilage surface of the right knee joint was smooth and the structural layers were clear. The levels of CGRP, SP, and PGE2 in serum were significantly decreased ($P<0.05$). The relative expressions of Nav1.7 and Nav1.8 proteins and mRNA in DRG tissue were significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** Miao medicinal crossbow acupuncture may exert its therapeutic effects on KOA by inhibiting the expression of inflammatory factors such as CGRP, SP, and PGE2, as well as downregulating the expression of sodium channels Nav1.7 and Nav1.8 proteins in the DRG.

[Key words] Knee osteoarthritis; Miao medicinal crossbow acupuncture; Chronic pain; Voltage-gated sodium channel; Nav1.7; Nav1.8

膝骨性关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种慢性退行性骨关节疾病,其临床特征以进行性关节软骨损伤、滑膜炎和软骨下骨硬化为主,多发于中老年人群^[1]。在KOA病程进展中,反复持续的慢性疼痛是最常见、最困扰患者的症状,也是患者寻求医疗帮助的主要原因。已有研究表明,KOA慢性疼痛与神经递质、外周感受器敏化密切相关^[2]。膝关节局部组织病变所产生的炎症介质可激活外周伤害性感受器,使其维持高阈值状态而发生持续性的外周敏化,导致膝关节局部慢性疼痛的发生^[3]。背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)作为外周感觉神经元,是疼痛信号传导过程的“中转站”^[4]。近年研究显示,KOA慢性疼痛外周痛敏的机制与DRG上电压门控钠通道息息相关,其中与疼痛机制密切相关的主要是Nav1.7和Nav1.8钠离子通道^[5]。

弩药针作为苗医特色外治法的代表,具有抗炎

镇痛的功效,课题组前期临床研究^[6,7]与动物实验^[8]显示弩药针对KOA具有良好的治疗作用,但其具体机制仍需进一步明确。因此,在课题组前期研究的基础上,为多方面揭示弩药针疗法的部分作用机理,本研究以外周痛觉敏化为切入点,进一步探讨弩药针对KOA大鼠DRG组织中Nav1.7、Nav1.8通道蛋白的影响,以期阐明弩药针治疗KOA慢性炎性疼痛的作用机制,为推广民族医药的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取SPF级雄性SD大鼠36只,鼠龄8周,体重180~220 g,购于长沙天勤实验动物中心[许可证号:SCXK(湘)2019-0014],饲养于贵州中医药大学东垣楼动物实验室,饲养环境温度20~25℃,予以基础饲料喂养,自由饮用纯净水。本实验经贵州中

医药大学动物实验伦理委员会批准(伦理审查批号:20210079),符合实验动物福利伦理审查要求。

1.2 主要试剂与仪器

苗医弩药液处方:大血藤 50 g、透骨香 50 g、黑骨藤 30 g、生草乌 20 g、白龙须 15 g,将上述5味药材放置于玻璃容器中,加入 50 度白酒密封浸泡 2 周后即可使用^[8]。苗医弩药液处方及药材来源于贵州中医药大学民族医药研究所。

碘乙酸钠(S30680,上海源叶);牛血清白蛋白(A8020,北京索莱宝);4%多聚甲醛(69061800,北京 biosharp);氨基甲酸乙酯(30191228,上海国药试剂);Trizon Reagent(CW0580S)、超纯 RNA 提取试剂盒(CW0581M)购于北京康为;RIPA 裂解液(C1053,北京普利莱);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(P0010)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 5×(P0015L)、APS(ST005)、TEMED(ST728)购于上海碧云天;羊多抗 TRPV1 (92KD) (NB100-98890,美国 Novus);兔多抗 TRPV4 (91KD) (ab94868,英国 Abcam);Goat Anti-rabbit IgG/HRP (AH1127-9138,北京 Bioss);Trizol(15596-026,美国 Ambion)。

皮肤滚针(0.5 mm,成都奥鑫);显微镜(DP73+STANDARD1.6,日本 Olympus);台式高速冷冻离心机(1580R,丹麦 labogene);高通量组织研磨器(SCIENTZ-48,宁波新芝);实时荧光定量 PCR 仪(CFX96™,美国 BIO-RAD)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组与模型建立 将大鼠喂养 1 周,待其适应环境后再开始实验。按照随机数字法原则将 36 只大鼠随机分为正常组、模型组、弩药针组、皮肤针组,每组 9 只。除正常组外,采用关节腔注射碘乙酸钠法构建 KOA 模型^[9]。具体操作如下:大鼠称重后用 20% 氨基甲酸乙酯(0.6 mL/100 g)腹腔注射麻醉,仰卧位固定,右膝关节常规备皮、消毒。90 mg 碘乙酸钠溶解于 1.5 mL 无菌 0.9% 氯化钠溶液中,按照 3 mg/50 μ L 比例的剂量,采用 1 mL 注射器经大鼠右膝关节髌韧带外侧凹陷注入关节腔,仅注射 1 次,注射后手动伸展和弯曲膝关节 30 s,使溶液分散到整个关节腔内。造模周期为 14 d,在此期间,所有大鼠予以基础喂食及自由饮水。造模结束后,每组随机抽取 1 只进行模型评估。与正常组大鼠相比,模型组大鼠膝关节局部肿胀、跛行、饮食量明显减少,精神状态较蜷缩,软骨表面凹凸不平,结构层次紊乱,软骨细胞排列紊乱且数量减少,局部出现糜

烂灶,有炎性物质渗出,表明 KOA 大鼠模型构建成功^[10,11]。

1.3.2 干预方法

1.3.2.1 弩药针组 造模成功后,大鼠仰卧位固定,右膝关节周围常规备皮消毒,先用灭菌注射器抽取 5 mL 弩药液^[12],棉签蘸取弩药液后涂抹于右膝关节,再用皮肤滚针在大鼠右膝关节面(以“血海”、“梁丘”、“阳陵泉”、“阴陵泉”4个穴位为定点,相连而成的长方形干预面)上按照“米”字笔画顺序进行滚刺,滚刺的次数为 20 次。穴位定位参考^[13-15]:“梁丘”:大鼠髌骨外上缘 3 mm;“血海”:髌骨内上缘 3 mm;“阳陵泉”:小腿的外侧,腓骨头前下方的凹陷处;“阴陵泉”:大鼠后肢内侧,约胫骨内侧髁后下方凹陷处,见图 1。干预隔日 1 次,每周 3 次,连续干预 4 周。

1.3.2.2 皮肤针组 造模成功后,大鼠固定、消毒方法同弩药针组,用皮肤针进行右膝关节局部滚刺,滚刺次数为 20 次。干预周期同弩药针组。

正常组与模型组大鼠采取同样方法抓取固定,不予其他干预。

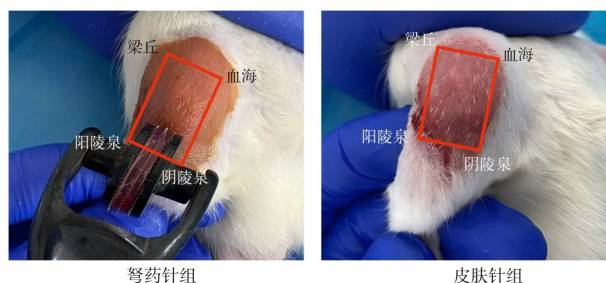


图 1 干预操作示意图

Fig 1 Schematic diagram of intervention operation

1.3.3 标本采集 干预完成并大鼠称重后,使用 20% 氨基甲酸乙酯(0.6 mL/100 g)进行腹腔注射麻醉,腹主动脉采血约 3.5 mL,静置 2 h 后,3 000 r/min 离心 20 min,取上层血清,−80 °C 冰箱保存,用于 ELISA 检测。随后用眼科剪解剖大鼠右膝关节,剥离表面肌肉组织,在上下 3 cm 处将其截断,放置于装有 4% 多聚甲醛的 EP 管中保存 48 h,用于 H&E 染色。完成上述步骤后,使用眼科剪剥离背部皮肤,剪开右后肢大腿肌肉,沿着坐骨神经方向剪至脊柱位置,轻扯出背根神经,沿着神经节上下 1 cm 处剪断,将其一分为二,分别放置于无酶的冻存管中,−80 °C 冰箱储存,用于 Western blot 及实时荧光定量 PCR 法检测。

1.3.4 观察指标与检测方法

1.3.4.1 机械性刺激缩足(von Frey)阈值检测 分

别于实验第1、14、21、28、35、42天采用 von Frey 阈值痛阈测量仪对大鼠进行行为学检测,共测量6次。操作方法:将大鼠放置于475 mm×350 mm×210 mm 的鼠笼内(换底漏网笼),待其适应15 min,在大鼠安静状态下进行测量。采用 von Frey 阈值痛阈测量仪的刺激针头对大鼠右后足底中部进行刺激,缓慢增加刺激强度,测量过程中密切观察仪器数值变化。直至大鼠出现缩足反应则记录相对应的计数即为痛阈值,最大60 g。待其安静后再次测量,测量3次,计算平均值。

1.3.4.2 H&E染色 软骨组织经4%多聚甲醛固定48 h后取出,经常规冲洗、脱水、透明、浸蜡、包埋等步骤,制备厚为4~5 μm的组织切片,经38℃恒温箱烘干后,二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,苏木素染色,分化,伊红染色,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。光学显微镜观察软骨组织形态并采集图像。

1.3.4.3 ELISA检测 将血清从-80℃冰箱取出,静置到室温,按照ELISA试剂盒说明书进行操作,采用酶标仪(波长为450 nm)读取吸光度(OD)值,绘制标准曲线,计算降钙素基因相关肽(calcitonin

gene-related peptide, CGRP)、P物质(substance P, SP)和前列素E2(prostaglandin E2, PGE2)含量。

1.3.4.4 Western blot检测 取20 mg DRG组织,研磨后裂解,匀浆,取上清,用BCA法测定蛋白浓度,电泳、转膜,室温封闭2 h。按照抗体说明书稀释一抗和二抗,一抗4℃孵育过夜, TBST清洗后,滴加二抗,室温孵育2 h, TBST清洗,滴加显影液曝光,使用ImageJ软件对蛋白条带进行分析,相对表达量为目的蛋白(Nav1.7、Nav1.8)与内参比值。

1.3.4.5 实时荧光定量PCR检测 取20 mg DRG组织,使用Trizol试剂提取总RNA,经反转录制得cDNA,进行PCR扩增。反应条件:50℃预变性2 min, 95℃变性10 min, 95℃退火30 s, 60℃延伸30 s, 循环次数40次。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 进行统计学分析,以 β -actin为内参计算Nav1.7、Nav1.8 mRNA相对表达量,引物序列见表1。

1.4 统计学处理

使用SPSS 25.0软件进行统计学分析,所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,分组资料采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD法。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

表1 引物序列
Tab 1 Primer sequences

基因名称	引物序列	扩增长度 (bp)
β -actin	5'-TGGCTCTAACAGTCCGCTAG-3'	295
	5'-AGTGCGACGTGGACATCCG-3'	
Nav1.7	5'-GGTCGTCCGATAGCTCCTAC-3'	206
	5'-GATCTTGTTGACCGTCTCGC-3'	
Nav1.8	5'-ACTCCTGTGGGACAAGTGGC-3'	144
	5'-GTGGTGCGGTAAGGGTATGG-3'	

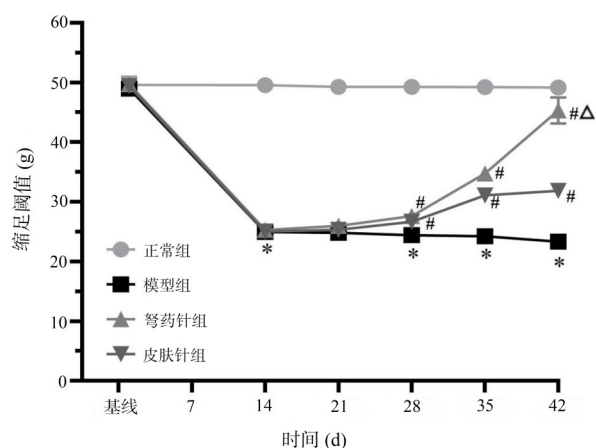
2 结果

2.1 各组大鼠 von Frey 阈值的比较

与正常组比较,模型组大鼠的机械性 von Frey 阈值低于正常组($P<0.05$)。实验第21天,即干预1周后,与模型组比较,弩药针组和皮肤针组大鼠的机械性 von Frey 阈值差异无统计学意义($P>0.05$);实验第28、35、42天,与模型组相比,弩药针组、皮肤针组大鼠的机械性 von Frey 阈值明显升高($P<0.05$),但仍低于正常组大鼠的机械性 von Frey 阈值;与皮肤针组比较,弩药针组大鼠机械性 von Frey 阈值明显升高($P<0.05$),见图2。

2.2 各组大鼠右膝关节软骨组织形态的比较

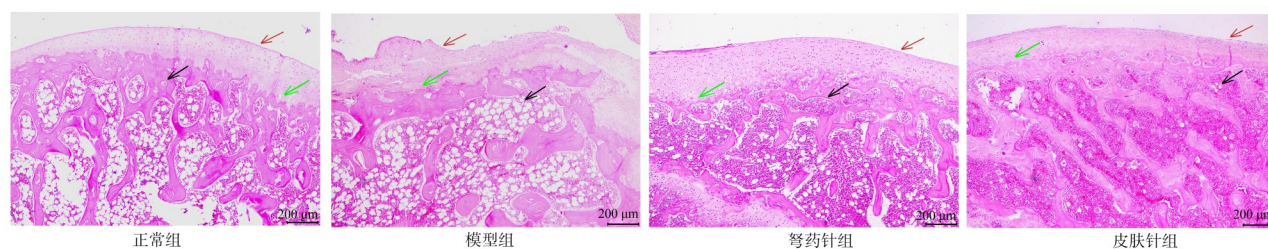
正常组大鼠关节软骨表面光滑,结构清晰,软骨细胞排列规则且数量正常,潮线清晰完整;模型组大鼠关节软骨表面凹凸不平,关节软骨表面糜烂和缺损,软骨层变薄被纤维组织填充,软骨结构层次紊乱,软骨细胞明显减少,周围软骨见簇状增生明显,局部可见骨赘,潮线消失或模糊不清,出现基质染色不均;弩药针组大鼠关节软骨组织与皮肤针组相比有明显的改善,软骨结构较皮肤针组清晰,软骨表面也较皮肤针组光滑,未见明显的纤维层,可见软骨细胞团,新生软骨细胞较多,见图3。



与正常组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, # $P<0.05$;与皮肤针组比较, $\Delta P<0.05$

图2 各组大鼠机械性刺激缩足阈值的比较

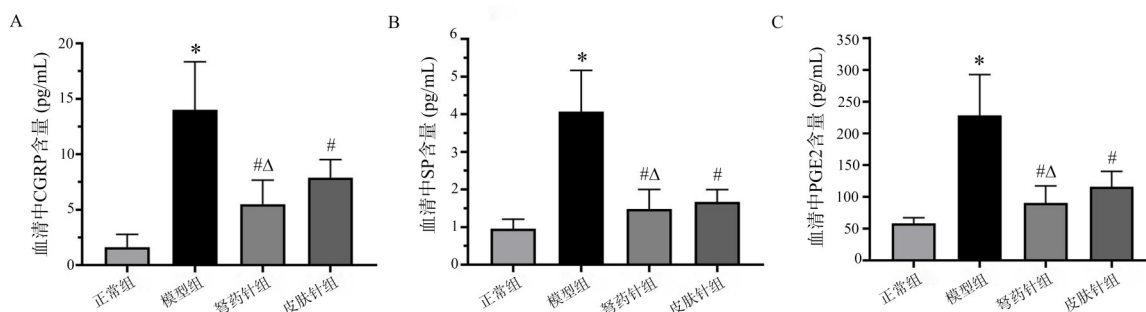
Fig 2 Comparison of mechanical paw withdrawal threshold of rats in each group



绿色箭头指示关节软骨, 黑色箭头指示软骨细胞, 红色箭头指示表面, 标尺=200 μm

图3 各组大鼠膝关节软骨组织病理学显微图(H&E染色, $\times 100$)

Fig 3 Histopathological micrograph of articular cartilage of rats in each group (H&E staining, $\times 100$)



CGRP:降钙素基因相关肽;SP:P物质;PGE2:前列腺素E2;与正常组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, # $P<0.05$;与皮肤针组比较, $\Delta P<0.05$

图4 各组大鼠血清降钙素基因相关肽、P物质、前列腺素E2表达水平的比较

Fig 4 Comparison of serum calcitonin gene-related peptide, substance P, and prostaglandin E2 expression levels of rats in each group

2.5 各组大鼠DRG组织中Nav1.7、Nav1.8 mRNA相对表达量的比较

与正常组比较, 模型组大鼠DRG组织中Nav1.7、Nav1.8 mRNA相对表达量明显升高($P<0.05$);与模型组比较, 针灸组和皮肤针组大鼠

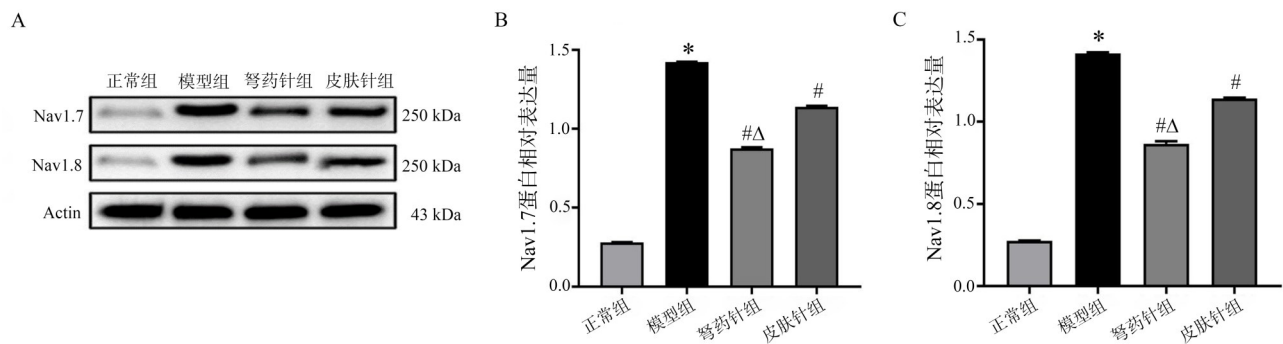
2.3 各组大鼠血清中CGRP、SP、PGE2含量的比较

与正常组比较, 模型组大鼠血清CGRP、SP、PGE2含量明显升高($P<0.05$);与模型组比较, 针灸组、皮肤针组血清中CGRP、SP、PGE2含量明显降低($P<0.05$);与皮肤针组比较, 针灸组大鼠血清中CGRP、SP、PGE2含量明显降低($P<0.05$), 见图4A~C。

2.4 各组大鼠DRG组织中Nav1.7、Nav1.8蛋白相对表达量的比较

与正常组比较, 模型组大鼠DRG中Nav1.7、Nav1.8蛋白相对表达量明显升高($P<0.05$);与模型组比较, 针灸组和皮肤针组大鼠DRG组织中Nav1.7、Nav1.8蛋白相对表达量明显降低($P<0.05$);与皮肤针组比较, 针灸组大鼠DRG组织中Nav1.7、Nav1.8蛋白相对表达量明显降低($P<0.05$), 见图5A~C。

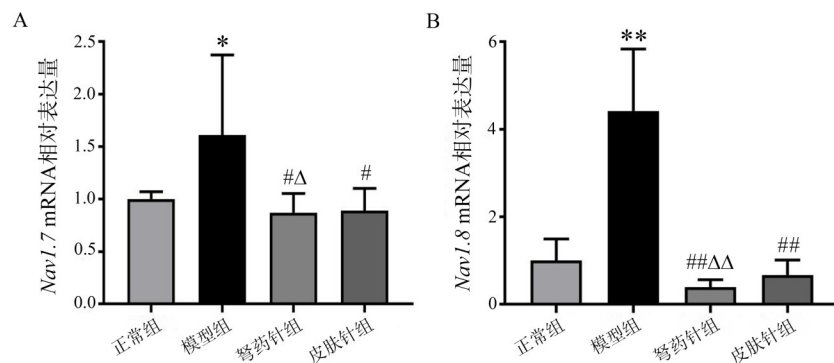
DRG组织中Nav1.7、Nav1.8 mRNA相对表达量明显降低($P<0.05$);与皮肤针组比较, 针灸组大鼠DRG组织中Nav1.7、Nav1.8 mRNA相对表达量明显降低($P<0.05$), 见图6A、B。



与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$; 与皮肤针组比较, Δ $P < 0.05$

图5 各组大鼠背根神经节中 Nav1.7、Nav1.8 蛋白相对表达量的比较

Fig 5 Comparison of the relative expressions of Nav1.7 and Nav1.8 proteins in the dorsal root ganglia of rats in each group



与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与皮肤针组比较, Δ $P < 0.05$, ΔΔ $P < 0.01$

图6 各组大鼠背根神经节组织中 Nav1.7、Nav1.8 mRNA 相对表达量的比较

Fig 6 Comparison of Nav1.7 and Nav1.8 mRNA relative expression in dorsal root ganglion tissue of rats in each group

3 讨论

KOA 是一种影响膝关节及其周围组织发生病变且不可逆的慢性退行性疾病,是骨科常见病之一,多发于中老年人群^[16]。反复、持续的疼痛是 KOA 患者寻求医疗帮助的主要原因,也是临床亟待解决的难题。近年来研究表明,炎症是引发 KOA 疼痛的主要病理机制,通过软骨基质中分解代谢和合成代谢分子的失衡以及炎症介质如 IL-1 β 、PGE2 的过度释放,导致“炎症-疼痛-软骨退化”恶性循环的形成^[17]。炎性介质激活外周伤害感受器时,疼痛信号产生并由脊髓背角传导至中枢神经系统,形成痛觉^[18]。在疼痛信号传导过程中,电压门控钠通道上 Nav1.7、Nav1.8 两个亚型则是介导 DRG 神经元兴奋的关键开关。因此,本研究在课题组前期研究的基础上^[8],以“外周痛觉敏化”为切入点,从炎性因子 CGRP、SP、PGE2 及 DRG 上钠通道 Nav1.7、Nav1.8 角度探讨弩药针治疗 KOA 慢性炎性疼痛的作用机制。

DRG 作为躯干和四肢疼痛的初级传入神经元,能将外周疼痛信号传递至脊髓,是疼痛信号传导过程中的重要通路,其神经元的兴奋性升高是痛觉敏化的关键^[19]。已有研究表明,DRG 上电压门控钠通道是介导其神经元兴奋性的关键通道,其中 Nav1.7 和 Nav1.8 是电压门控钠通道高度表达在感知疼痛的初级神经元中的两个亚型,在外周痛觉敏化中发挥着重要作用,其敏感性增加直接导致痛觉过敏^[20,21]。Rahman 等^[22]研究发现,在关节炎病理条件下,位于外周和中枢伤害性通路中的 Nav1.7、Nav1.8 敏感性增加,通过注射 Nav1.7、Nav1.8 阻滞剂可有效缓解关节炎疼痛,明显抑制神经元活性,减弱异常的疼痛病理生理传递。通过敲除编码 Nav1.7 的基因 *Scn9a*,或条件性敲除表达 Nav1.7、Nav1.8 神经元可有效缓解炎症性疼痛^[23]。Miller 等^[24]通过化学遗传抑制 Nav1.8 表达神经元,可有效阻断早期实验性 KOA 的膝关节痛觉过敏和机械性痛觉过敏。近期研究发现^[25],通过调控 Nav1.7 可减

轻KOA软骨细胞外基质代谢紊乱,从而延缓软骨细胞退变。本研究结果显示,KOA大鼠DRG中Nav1.7和Nav1.8的表达明显上调。由此可见,抑制DRG上Nav1.7、Nav1.8的表达是有效缓解KOA疼痛的关键之一。

CGRP、SP与PGE2是引起KOA慢性疼痛的重要炎症因子。研究表明,CGRP通过介导神经源性血管舒张和炎症发展从而引发关节疼痛^[26]。在创伤诱导的骨关节炎小鼠模型中,CGRP受体拮抗剂可减轻软骨下骨硬化和滑膜炎以缓解疼痛^[27]。另有研究发现,通过抑制KOA大鼠DRG中CGRP和TRPV1的表达,可有效缓解炎症性疼痛^[28]。SP与神经激肽受体I(NK1)结合,在动物模型和人类骨关节炎研究中,SP和NK1受体与关节疼痛、炎症和损伤相关^[29]。PGE2通过局部调节机制直接参与异常的软骨下骨重塑、软骨变性和滑膜炎,参与骨关节炎病程进展^[30],通过特异性敲除骨关节炎小鼠成骨细胞中PGE2产生酶或外周感觉神经中PGE2受体,可降低Nav1.8的表达以缓解疼痛^[31]。本研究结果表明,KOA大鼠DRG中Nav1.7、Nav1.8的表达上调,也伴随着炎症因子CGRP、SP、PGE2水平升高。

苗医将KOA归为“猫头风”“冷骨风”等风类疾病范畴。弩药针作为苗医特色疗法的代表,是以弩针和弩药液相结合的复合治疗,其中弩针的作用原理与针刺中的“皮肤针”原理一致。前期药理实验表明,弩药液处方中黑骨藤、大血藤、白龙须、生草乌均含有黄酮、皂苷等化学成分,具有镇痛、抗炎等作用^[32]。体内和体外透皮实验表明,皮肤滚针可在皮肤角质层上形成数十甚至数百个亲水通道,同时破坏角质层原有致密有序的结构,促进弩药液中有效成分的透皮吸收率和皮肤保留率^[33]。两者结合对缓解KOA疼痛具有积极作用。熊芳丽等^[6]研究发现,弩药针能有效增加KOA患者膝关节液中透明质酸的含量,降低一氧化氮的含量,从而明显缓解关节疼痛、僵硬等症状。付静等^[7]研究显示,弩药针可降低KOA患者血清中炎症因子IL-1 β 、TNF- α 含量,缓解关节炎引起的病理性疼痛,改善关节功能。前期动物实验也表明^[8],弩药针能有效降低家兔关节液中炎症因子IL-1 β 、TNF- α 的含量,从而下调TRPV蛋白通道中TRPV1及TRPV4蛋白表达,发挥其治疗KOA的作用。

本研究选取单纯的皮肤针疗法作为对照组,以对比探究针药协同是否对缓解KOA慢性炎症性疼痛

疗效更佳。研究结果显示,与模型组相比,皮肤针组大鼠von Frey阈值明显提高,膝关节软骨形态明显改善,血清中炎症因子CGRP、SP、PGE2的表达降低,以及Nav1.7和Nav1.8蛋白及mRNA表达水平下调,说明皮肤针对KOA慢性炎症性疼痛也有治疗作用。研究表明,当皮肤针作用于皮肤表面时,可促进局部血液循环,减轻局部炎症反应,进而减轻疼痛、改善膝关节功能^[34]。而与单纯使用皮肤针相比,针药协同的弩药针更能有效提升大鼠的von Frey阈值,改善大鼠软骨组织形态,更能明显降低大鼠血清中炎症因子CGRP、SP、PGE2的释放以及抑制大鼠DRG中Nav1.7、Nav1.8蛋白及mRNA的表达。同时反向说明在KOA慢性炎症性疼痛中,DRG上电压门控钠通道Nav1.7、Nav1.8蛋白表达与CGRP、SP、PGE2的活性有关,且下调炎症因子的释放就能有效降低Nav1.7、Nav1.8蛋白表达,进而缓解疼痛。

综上所述,弩药针可通过抑制炎症因子CGRP、SP、PGE2的活性,下调DRG上电压门控钠通道Nav1.7、Nav1.8蛋白表达,从而缓解KOA疼痛,其疗效优势源于针药协同作用,为推广民族医药的临床应用提供了实验依据。但本研究仅从外周角度对弩药针缓解KOA慢性疼痛进行初步探究,未来还需从中枢敏化角度进行更深入地机制论证。

作者贡献度说明:

杨心彧:实验操作、查阅文献、论文撰写;王欣:参与实验、数据分析;李虹莹:参与实验、试剂和相关耗材购买;卢春霞:课题设计、成文审核;崔瑾:课题设计、论文写作指导、经费支持。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

- 1 Zhang J, Xiang X, Yu X, et al. Mechanisms and applications of the regenerative capacity of platelets-based therapy in knee osteoarthritis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 178: 117226.
 - 2 Yu H, Huang T, Lu WW, et al. Osteoarthritis pain[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(9): 4642.
 - 3 谭春霞,屠建峰,马欣,等. 针刺缓解膝骨关节炎疼痛机制的研究进展[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2024, 30(3): 215-219.
- Tan CX, Tu JJ, Ma X, et al. Research progress on the mechanism of acupuncture relieving knee osteoarthritis associated pain [J]. *Chin J Pain Med*, 2024, 30 (3) : 215-219.

- 4 廖太阳, 张力, 丁亮, 等. 膝痹宁通过CPT1调节大鼠滑膜氧化还原稳态缓解膝骨关节炎疼痛的效应机制[J]. 解放军医学杂志, 2023, 48(1): 49-57.
Liao TY, Zhang L, Ding L, et al. Mitigation mechanism of Xibining decoction on pain of knee osteoarthritis by regulating redox homeostasis of synoviocytes through CPT1 enzyme[J]. Med J Chin PLA, 2023, 48(1): 49-57.
- 5 刘靖芷. 背根神经节参与疼痛机制研究进展[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2018, 18(10): 705-708.
Liu JZ. Progress of dorsal root ganglia in mechanism of pain[J]. Chin J Contemp Neurol Neurosurg, 2018, 18(10): 705-708.
- 6 熊芳丽, 冯斌, 武红艳, 等. 苗医弩药针疗法对膝骨性关节炎的临床研究及滑液含量的影响[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(1): 306-308.
Xiong FL, Feng B, Wu HY, et al. Clinical research of Miao medical crossbow medicine needle therapy for knee osteoarthritis and the influence on the synovial fluid content[J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2014, 29(1): 306-308.
- 7 付静, 刘娇莹, 崔瑾. 苗医弩药针疗法治疗膝骨关节炎50例[J]. 中国针灸, 2019, 39(10): 1087-1088.
Fu J, Liu JY, Cui J. Crossbow needle therapy of the Miao ethnic minority for 50 cases of knee osteoarthritis[J]. Chin Acupunct Moxibust, 2019, 39(10): 1087-1088.
- 8 陈平男, 张宁, 崔瑾. 基于TRPV离子通道探讨苗医弩药针疗法治疗膝骨性关节炎的作用机制[J]. 中国针灸, 2020, 40(12): 1328-1334.
Chen PN, Zhang N, Cui J. Exploration on effect mechanism of Miao medicinal acupuncture therapy in treatment of knee osteoarthritis based on TRPV ion channel[J]. Chin Acupunct Moxibust, 2020, 40(12): 1328-1334.
- 9 Philpott HT, O'brien M, Mcdougall JJ. Attenuation of early phase inflammation by cannabidiol prevents pain and nerve damage in rat osteoarthritis[J]. Pain, 2017, 158(12): 2442-2451.
- 10 周凯, 罗雪梅, 朱明双. 鼠类膝骨关节炎模型评价方法现状分析[J]. 风湿病与关节炎, 2015, 4(7): 66-69.
Zhou K, Luo XM, Zhu MS. Analysis of the current status of evaluation methods for murine knee osteoarthritis models[J]. Rheumat Arthrit, 2015, 4(7): 66-69.
- 11 张荣凯, 杨禄坤, 叶志强, 等. 以关节不稳建立的大鼠骨关节炎模型[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(37): 6628-6635.
Zhang RK, Yang LK, Ye ZQ, et al. Establishing a rat osteoarthritis model based on knee joint instability[J]. Chin J Tissue Engineer Res, 2013, 17(37): 6628-6635.
- 12 陈平男. 基于TRPV通道蛋白探讨苗医弩药针治疗膝骨性关节炎家兔的机制[D]. 贵阳: 贵州中医药大学, 2020.
Chen PN. Exploring the mechanism of Miao medicinal acupuncture in treating rabbits with osteoarthritis of the knee based on TRPV channel protein[D]. Guiyang: Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, 2020.
- 13 谭同才, 余艳梅, 程瑞动. 鹿瓜多肽穴位注射结合运动疗法对膝骨关节炎模型大鼠膝关节软骨Ⅱ型胶原、血清MMP-3水平的影响[J]. 浙江中西医结合杂志, 2020, 30(1): 10-13.
Tan TC, Yu YM, Cheng RD. Effect of acupoint injection of cervus and cucumis polypeptide combined with exercise therapy on the levels of serum type II collagen and MMP-3 in knee joint cartilage of knee osteoarthritis rats[J]. Zhejiang J Integr Chin West Med, 2020, 30(1): 10-13.
- 14 赵庚洋. 艾灸刺激不同穴组对高脂血症大鼠血脂水平及纤维蛋白原的影响[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2014.
Zhao GY. Effects of moxibustion stimulation of different acupoint groups on blood lipid levels and fibrinogen in hyperlipidaemic rats[D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2014.
- 15 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位第2部分: 大鼠[J]. 针刺研究, 2021, 46(4): 351-352.
China Association of Acupuncture and Moxibustion. Names and localisation of commonly used acupoints in experimental animals Part 2: The rat[J]. Acupunct Res, 2021, 46(4): 351-352.
- 16 Molnar V, Matisić V, Kodvanj I, et al. Cytokines and chemokines involved in osteoarthritis pathogenesis[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(17): 9208.
- 17 Riewruja K, Phakham S, Sompolpong P, et al. Cytokine profiling and intra-articular injection of autologous platelet-rich plasma in knee osteoarthritis[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(2): 890.
- 18 时方圆, 李亚男, 贾若, 等. 基于外周神经-免疫交互探讨针刺对抗炎性疼痛的作用[J]. 针灸临床杂志, 2023, 39(12): 95-101.
Shi FY, Li YN, Jia R, et al. Role of neuroimmune crosstalk mediating acupuncture to alleviate inflammatory pain[J]. J Clin Acupunct Moxibust, 2023, 39(12): 95-101.

- 19 李丽梅, 郑宝森, 张志利, 等. 背根神经节解剖及其参与神经病理性疼痛机制的研究进展[J]. 中国疼痛医学杂志, 2022, 28(7): 531-540.
Li LM, Zheng BS, Zhang ZL, et al. Anatomy of the dorsal root ganglion and its involvement in the mechanism of neuropathic pain [J]. Chin J Pain Med, 2022, 28(7): 531-540.
- 20 张玮丽, 唐倩, 邓镇, 等. 葛根素通过抑制背根神经节 Nav1.7 上调治疗神经根性疼痛[J]. 中国疼痛医学杂志, 2023, 29(5): 332-339.
Zhang WL, Tang Q, Deng Z, et al. Puerarin alleviates radicular pain by inhibiting Nav1.7 upregulation in the dorsal root ganglia [J]. Chin J Pain Med, 2023, 29(5): 332-339.
- 21 Kushnarev M, Pirvulescu IP, Candido KD, et al. Neuropathic pain: Preclinical and early clinical progress with voltage-gated sodium channel blockers [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2020, 29(3): 259-271.
- 22 Rahman W, Dickenson AH. Osteoarthritis-dependent changes in antinociceptive action of Nav1.7 and Nav1.8 sodium channel blockers: An *in vivo* electrophysiological study in the rat [J]. Neuroscience, 2015, 295: 103-116.
- 23 Atmaramani RR, Black BJ, De la peña JB, et al. Conserved expression of Nav1.7 and Nav1.8 contribute to the spontaneous and thermally evoked excitability in IL-6 and NGF-sensitized adult dorsal root ganglion neurons *in vitro* [J]. Bioengineering (Basel), 2020, 7(2): 44.
- 24 Miller RE, Ishihara S, Bhattacharyya B, et al. Chemo-genetic inhibition of pain neurons in a mouse model of osteoarthritis [J]. Arthritis Rheumatol, 2017, 69(7): 1429-1439.
- 25 付长龙, 林艳铭, 兰书洁, 等. 透骨消痛胶囊调控 Nav1.7 减轻膝骨关节炎小鼠软骨细胞退变 [J]. 南方医科大学学报, 2024, 44(11): 2074-2081.
Fu CL, Lin YM, Lan SJ, et al. Tougu Xiaotong Capsule alleviates cartilage degeneration in mice with knee osteoarthritis by modulating Nav1.7 [J]. J Southern Med Univ, 2024, 44(11): 2074-2081.
- 26 Hildebrandt A, Dietrich T, Weber J, et al. The dual pro-inflammatory and bone-protective role of calcitonin gene-related peptide alpha in age-related osteoarthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2023, 25(1): 244.
- 27 Nekomoto A, Nakasa T, Ikuta Y, et al. Feasibility of administration of calcitonin gene-related peptide receptor antagonist on attenuation of pain and progression in osteoarthritis [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 15354.
- 28 Jiang X, Guo Y, Fang M, et al. Suppression of CGRP and TRPV1 expression in dorsal root ganglia of knee osteoarthritis rats by Huojing Decoction *via* TrkA/MKK3/6/p38 pathway [J]. J Inflamm Res, 2024, 17: 5311-5326.
- 29 Warner SC, Walsh DA, Laslett LL, et al. Pain in knee osteoarthritis is associated with variation in the neurokinin 1/substance P receptor (TACR1) gene [J]. Eur J Pain, 2017, 21(7): 1277-1284.
- 30 Yang D, Xu K, Xu X, et al. Revisiting prostaglandin E2: A promising therapeutic target for osteoarthritis [J]. Clin Immunol, 2024, 260: 109904.
- 31 Zhu J, Zhen G, An S, et al. Aberrant subchondral osteoblastic metabolism modifies Na1.8 for osteoarthritis [J]. Elife, 2020, 9: e57656.
- 32 咎芳芳, 崔瑾. HPLC 法测定弩药液中 5 个成分的含量 [J]. 中国医药导报, 2021, 18(17): 142-145.
Zan FF, Cui J. Determination of the content of five components in crossbow liquid by HPLC [J]. Chin Med Herald, 2021, 18(17): 142-145.
- 33 Luo H, Zan F, Cui J. Effect of microneedle roller on promoting transdermal absorption of crossbow-medicine liquid *via* transdermal administration of traditional Chinese medicine and the safety of crossbow-medicine needle therapy: An experimental study [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 317: 116751.
- 34 龚婷婷, 王超. 浅刺疗法作用机制及现代临床应用研究概况 [J]. 中医药临床杂志, 2023, 35(1): 184-188.
Gong TT, Wang C. A review of mechanism and modern clinical application of shallow acupuncture therapy [J]. Clin J Tradit Chin Med, 2023, 35(1): 184-188.

[本文编辑] 陈思润