

· 针灸推拿 ·

本文引用: 孙晓莹, 龙轶映, 赵凌云, 吴庆泽, 瞿启睿, 祁芳, 刘梨, 艾坤, 张亮. 电针对佐剂性关节炎大鼠膝关节滑膜 VEGF/Vav2/Rac1 信号通路的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(10): 1830-1837.

电针对佐剂性关节炎大鼠膝关节滑膜 VEGF/Vav2/Rac1 信号通路的影响

孙晓莹¹, 龙轶映¹, 赵凌云¹, 吴庆泽¹, 瞿启睿¹, 祁芳¹, 刘梨², 艾坤^{1*}, 张亮^{3*}

1 湖南中医药大学针灸推拿与康复学院, 湖南长沙 410208; 2 湖南中医药大学附属第一医院, 湖南长沙 410007;

3 湖南中医药大学继续教育学院, 湖南长沙 410208

〔摘要〕目的 观察电针对佐剂性关节炎(adjuvant arthritis, AA)大鼠膝关节滑膜组织内血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、鸟嘌呤核苷酸交换因子2(vav guanine nucleotide exchange factor 2, Vav2)和 Ras 相关 C3 肉毒素底物1(Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, Rac1)表达的影响,探究电针干预类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)血管新生的可能机制。方法 将40只 SPF 级 SD 雄性大鼠随机分成4组(空白组、模型组、西药组和电针组),每组10只。除空白组,其他3组采用尾根部皮下注射完全弗氏佐剂制成 AA 大鼠模型。造模后第2天开始干预,电针组进行电针干预,以左侧足三里与关元穴配穴,右侧足三里与同侧阿是穴配穴,每次20 min,每天干预1次,共干预21次;西药组给予甲氨蝶呤灌胃给药,每周1次,共干预3次。观察各组体质量、关节红肿等一般情况,每3天测量1次大鼠后双侧足跖容积。干预结束后,通过大鼠一般情况、体质量、足跖容积分析各组大鼠足跖肿胀程度,HE 染色观察 AA 大鼠膝关节滑膜组织的病理形态学,免疫组织化学法检测膝关节滑膜组织内 CD31 表达变化,Western blot 法检测大鼠膝关节滑膜组织 VEGF、Vav2 和 Rac1 蛋白表达量。结果 与空白组相比,模型组大鼠第21天足跖容积均明显增大($P<0.01$),膝关节滑膜组织出现显著性病理改变,CD31 表达量明显升高($P<0.05$),VEGF、Vav2、Rac1 蛋白表达量显著升高($P<0.01$)。与模型组相比,西药组足跖容积在第21天显著减小($P<0.01$),膝关节滑膜组织病理改变明显改善,VEGF、Vav2 表达量明显下降($P<0.05$),Rac1 蛋白表达量显著下降($P<0.01$);电针组足跖容积在第21天显著减小($P<0.01$),膝关节滑膜组织病理改变明显改善,VEGF、Rac1 表达量明显下降($P<0.05$),Vav2 蛋白表达量显著下降($P<0.01$)。结论 电针改善 RA 的作用机制可能与抑制 VEGF/Vav2/Rac1 信号通路,进而抑制血管新生有关。

〔关键词〕 佐剂性关节炎;电针;血管内皮生长因子;鸟嘌呤核苷酸交换因子2;Ras 相关 C3 肉毒素底物1;血管新生

〔中图分类号〕 R245.9

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.10.012

Effects of electroacupuncture on VEGF/Vav2/Rac1 signaling pathway in knee joint synovium of adjuvant arthritis rats

SUN Xiaoying¹, LONG Yiyi¹, ZHAO Lingyun¹, WU Qingze¹, QU Qirui¹, QI Fang¹, LIU Li²,
AI Kun^{1*}, ZHANG Liang^{3*}

1. School of Acupuncture-moxibustion, Tuina and Rehabilitation, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 3. School of Continuing Education, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

〔Abstract〕 Objective To observe the effects of electroacupuncture on the expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF), Vav guanine nucleotide exchange factor 2 (Vav2), and Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) in knee

〔收稿日期〕 2023-04-29

〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(82074565, 82274627); 湖南省自然科学基金项目(S2023JJMSXM2790); 湖南省教育厅科学研究一般项目(21C0254); 湖南省研究生科研创新项目(CX20220798)。

〔第一作者〕 孙晓莹, 女, 硕士研究生, 研究方向: 神经系统疾病的中西医结合康复的临床与机制研究。

〔通信作者〕 * 张亮, 男, 讲师, E-mail: 4966153@qq.com; 艾坤, 男, 教授, 硕士研究生导师, E-mail: aikun650@qq.com。

joint synovial tissue of adjuvant arthritis (AA) rats, so as to investigate the possible mechanism of electroacupuncture intervention on angiogenesis in rheumatoid arthritis (RA). **Methods** A total of 40 SPF SD male rats were randomly divided into blank group, model group, western medicine group, and electroacupuncture group, with 10 rats in each group. Except for the blank group, the other three groups were treated with subcutaneous injection of complete Freund's adjuvant at the base of the tail to establish AA rats model. Two days after model establishment, the electroacupuncture group were given electroacupuncture at left "Zusanli" (ST36) with "Guanyuan" (BL26), right "Zusanli" (ST36) with ipsilateral "Ashi" (experience acupoint) for 20 min each time, once a day for 21 consecutive days. The rats in western medicine group were given methotrexate by gavage once a week, for a total of 3 times. The body weight, redness and swelling of joints, and other general conditions in each group were observed and the plantar volume was measured every 3 days. After the intervention, the degree of plantar swelling in each group was analyzed by the general conditions, body weight, redness and swelling of joints, and plantar volume of rats. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the pathological morphology of knee joint synovial tissue of AA rats, Immunohistochemistry was used to measure the expression change of CD31 in knee joint synovial tissue, and the protein expression levels of VEGF, Vav2, and Rac1 were determined by Western blot. **Results** Compared with the blank group, the rats' plantar volume in the model group significantly increased on the 21st day ($P<0.01$), the knee joint synovial tissue showed significant pathological changes, the expression level of CD31 was significantly higher ($P<0.05$), and the protein expression levels of VEGF, Vav2, and Rac1 were significantly higher ($P<0.01$). Compared with the model group, the rats' plantar volume in the western medicine group significantly decreased on the 21st day ($P<0.01$), the pathological changes of knee joint synovial tissue were significantly improved, the expression levels of VEGF and Vav2 were significantly lower ($P<0.05$), and the protein expression level of Rac1 was significantly lower ($P<0.01$); the rats' plantar volume in electroacupuncture group significantly decreased on the 21st day ($P<0.01$), the pathological changes of knee joint synovial tissue were significantly improved, the expression levels of VEGF and Rac1 were significantly lower ($P<0.05$), and the protein expression level of Vav 2 was significantly lower ($P<0.01$). **Conclusion** The mechanism of electroacupuncture in improving RA may be related to the inhibition of VEGF/Vav2/Rac1 signaling pathway, thereby inhibiting angiogenesis.

[Keywords] adjuvant arthritis; electroacupuncture; vascular endothelial growth factor; Vav guanine nucleotide exchange factor 2; Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1; angiogenesis

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以侵蚀性关节滑膜炎为主要特征的自身免疫性疾病,血管新生是滑膜组织病变的重要病理基础,在RA滑膜血管翳的形成与发展中有着关键作用。最新研究表明,抑制血管新生可作为治疗RA的重要靶点^[1]。在血管新生过程中,内皮细胞迁移是其重要环节,而伪足生成在细胞迁移中起关键作用^[2-4]。有研究表明,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)可通过激活Ras相关C3肉毒素底物1(Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, Rac1)诱导细胞前端片状伪足形成来刺激内皮细胞迁移^[5],这一激活过程与鸟嘌呤核苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange factors, GEFs)密切相关。与二磷酸鸟苷(guanosine diphosphate, GDP)结合的非活性状态的Rac1-GDP可被GEFs激活转换为与三磷酸鸟苷(guanosine triphosphate, GTP)结合的活性状态的Rac1-GTP^[6-7]。鸟嘌呤核苷酸交换因子2(vav guanine nucleotide exchange factor 2, Vav2)是一种常见的GEFs,VEGF可调控Vav2促进Rac1-GDP转化为Rac1-GTP,使Rac1活化,促进伪足形成,从

而刺激内皮细胞迁移^[8-10]。因此,通过调控VEGF/Vav2/Rac1信号通路,抑制滑膜内皮细胞伪足生成,是抑制RA血管新生的重要途径之一。

本课题组前期研究表明,电针“关元”“足三里”“阿是穴”能明显减轻佐剂性关节炎(adjuvant arthritis, AA)模型大鼠足跖关节肿胀程度,降低相关细胞因子含量,从而减轻炎症反应^[11-12]。另有研究证实,电针可以有效抑制滑膜内血管生成,减轻RA滑膜炎症,且与VEGF相关^[13-14]。为了探索电针抑制RA滑膜血管新生的内在机制,本研究拟以AA大鼠模型为观察对象,采用电针干预,从调节VEGF/Vav2/Rac1信号通路、抑制内皮细胞伪足生成、抑制血管新生的角度,探讨电针在RA治疗中对血管新生的作用机制,为电针治疗RA的临床应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

40只SPF级SD雄性大鼠均由湖南斯莱克景达实验动物公司提供,体质量(100±10)g,动物合格证号:430727211101621817,实验动物生产许可证号:

SCXK(湘)2019-0009。40 只大鼠以 3 只一笼饲养在湖南中医药大学动物实验中心,饲养室温度(23±3)℃,相对湿度 60%±10%。适应性饲养 7 d 后开始实验,按随机数字表法将其分成空白组、模型组、西药组、电针组,每组 10 只。实验全程遵从《关于善待实验动物的指导性意见》(2006 年版)中动物伦理学有关条规,本实验伦理编号:LLBH-202203140004。

1.2 主要试剂与仪器

灭活结核分枝杆菌(美国 BD 公司,批号:231141);矿物油(美国 Sigma Aldrich 公司,批号:M8410);甲氨蝶呤(美国 AbMole Bioscience 公司,批号:M2228);二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒(美国 Thermo Scientific 公司,批号:QB214754);VEGF 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号:65373);Vav2 抗体、Rac1 抗体、 β -actin 抗体、Rabbit 二抗(美国 Proteintech Group 公司,批号:21924、24072、20536、SA00001-2);显影液(苏州科达科技股份有限公司,批号:6610190);ECL 发光液(美国 Advansta 公司,批号:K-12045-D50);4%多聚甲醛(广州硕谱生物科技有限公司,批号:BL539A);DAB 显色液(北京索莱宝科技有限公司,批号:SW1020)。

电针治疗仪(苏州医疗用品有限公司,型号:SDZ-II);超净工作台(苏州净化设备厂,型号:SW-CJ-1FD);高速低温离心机(美国 SCIOGBX 公司,型号:D3024R);电泳仪(美国 BIO-RAD 公司,型号:041BR126545);GloMax 酶标仪(美国 Promega 公司,型号:GM3030);磁力恒温搅拌器(金坛市城西峰峰实验仪器厂,型号:HJ-4A);足跖容积测量仪(济南益延科技发展有限公司,型号:YLS-7C)。

1.3 模型制备

本实验采用完全弗氏佐剂注射尾根部皮下组织制作 AA 大鼠模型^[15-16]。将定量的灭活结核分枝杆菌与矿物油在通风柜中混合研磨至溶液清透无杂质,制成 2.5 mg/mL 的完全弗氏佐剂;然后依次将模型组、西药组、电针组大鼠用异氟烷呼吸麻醉,用 0.1 mL 的微量注射器于尾根部皮下缓慢注射佐剂(0.1 mL/只)。观察大鼠关节外表现,进行模型评价,造模后第 3 天出现尾根部红肿,全身性关节继发病状出现,造模后第 9~12 天关节红肿明显加剧,其余关节也出现症状,大鼠食欲减退、体质量减轻和皮温变高,则判定为模型制备成功^[15-17]。

1.4 干预方法

于造模第 2 天开始干预,空白组、模型组大鼠以仰卧位固定于自制鼠板上 20 min,不做其他处理。电针组大鼠仰卧位固定于鼠板上,75%乙醇消毒穴位局部皮肤,使用华佗牌针灸针(0.25 mm×25 mm)直刺“足三里”“关元”“阿是穴”,穴位参照“十三五”国家规划统编教材《实验针灸学》中的大鼠标准穴位图谱进行定位^[18],针刺深度为 3~4 mm,然后接电针(左侧足三里与关元配穴,右侧足三里与同侧阿是穴配穴),选择疏密波(20/50 Hz),电流强度通过观察针柄处抖动情况来判读,轻微抖动即可,留针 20 min。均每天 1 次,7 次为 1 个疗程,共干预 3 个疗程。西药组使用阳性对照药物甲氨蝶呤,按每只 0.35 mg/kg 灌胃给药^[19],每周 1 次,共干预 3 次。

1.5 取材

于干预后禁食 24 h,隔天在无菌操作台上用刀片拨开大鼠膝关节囊,取出清透淡黄色的滑膜组织,放入做好标记的冻存管中,分别于液氮中或装有 4%多聚甲醛的试剂管中保存。

1.6 指标检测

1.6.1 一般情况观察 于实验过程中,观察造模后第 1、9、12、15、18、21 天大鼠的饮食、毛发、体质量、关节肿胀等一般情况的变化。

1.6.2 足跖容积测量 测量前,用防水不掉色黑色记号笔在大鼠后足踝关节处标好测量标线,为减少人为误差,每次测量标线以及测足肿均由专人完成,并且每次标线的位置不宜有较大偏差,应在第 1 次测量时使用墨水针头纹好一点作为标线固点。将足跖测量仪放置水平固定的台面上进行校零,量杯中装适量蒸馏水,测量时测量者先将大鼠一侧后足伸直,放进装有适量蒸馏水的量杯中,直到后足的标线与量杯中的液面平行,重复 3 次,再换下一侧后足,记录读数,后取其平均值进行数据统计。在造模后第 1、9、12、15、18、21 天进行足跖容积的测量。

1.6.3 HE 染色 备取使用 4%多聚甲醛固定好的膝关节滑膜组织,标定组号,流水清洗 2 h,然后取出滑膜组织进行脱水,于 56℃的石蜡浸泡进行包埋,包埋成块后,把石蜡置于切片机中,切分成 5 μ m 的石蜡片,石蜡片放入水浴锅后展开贴在载玻片上,60℃烘箱烘干 2 h。脱蜡后放入苏木素溶液中染色 5 min,接着使用蒸馏水冲洗,浸透于 1%氨水中返蓝,清水

冲洗 30~60 s 后,于显微镜下观察细胞核的分色程度,之后置于 1%伊红中染色,蒸馏水冲洗后脱水,最后每个组织滴加一滴中性树胶,盖上盖玻片。每个片子分别拍 100×视野。

1.6.4 免疫组织化学检测 备取用 4%多聚甲醛固定好的膝关节滑膜组织,每组抽取 5 只大鼠并标定组号,流水清洗 2 h,然后取出滑膜组织,依次浸透于不同浓度的乙醇、二甲苯中进行脱水,然后于 56 ℃的石蜡浸泡进行包埋,包埋成块后,把石蜡置于切片机中,切分成 5 μm 的石蜡片,石蜡片放入水浴锅中展开贴在载玻片上,60 ℃烘箱烘干于 2 h。脱蜡后放置高压喷气中抗原修复,喷水致冷后将石蜡片放入 10%羊血清中,室温封闭 1 h,去除封闭液后,滴加抗体,37 ℃孵育 1 h 后,PBS 清洗 4 次,每次 5 min。接着加相对应的二抗孵育,孵育后 PBS 摇洗 5 min,10 次。之后配备 DAB 显色液,即配即用,显微镜观察显色,然后复染、脱水。每个切片上滴注些许中性树胶后盖上盖玻片。每个片子分别拍 400×视野;采用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量平均光密度值,为便于计算,将空白组平均数赋值为 1,进行数据归一化处理,最终采用 SPSS 26.0 分析结果。

1.6.5 Western blot 检测 每组另 5 只大鼠各取 100 mg 膝关节滑膜组织样本,随后加定量混有蛋白酶、磷酸酶抑制剂的蛋白裂解液,搅匀混合溶液,使用匀浆机匀浆 4 min,再将得到的样品裂解 30 min,裂解全程均在冰上操作,裂解完全后以 4 ℃、半径 8 cm、12 000 r/min 离心 20 min,利用 BCA 蛋白质定量法测定离心得到的上清液蛋白浓度,得到蛋白质样品液。取蛋白质样品液 30 μg,加上一定蛋白上样缓冲液,放入恒温槽中沸水浴 10 min,再以半径 8 cm、10 000 r/min 离心 10 min;随之计算蛋白分子量,选择制备 10%或 12%的分离胶、浓缩胶,将之电泳,接着进行电转,将胶上的蛋白转移至 PVDF 蛋白印迹膜;下一步进行封闭,将 PVDF 膜全部浸泡于封闭液中,室温 25 ℃孵育 1 h,然后摇洗 3 次,每次 10 min;而后分别加入一抗(VEGF 稀释度 1:1 000;Vav2 稀释度 1:500;Rac1 稀释度 1:800),放入 4 ℃冰箱过夜,隔天用 PBST 洗膜,每次 20 min,摇洗 3 次后,使用移液枪吹打入相对应的二抗溶液(稀释度 1:1 000),室温 25 ℃孵育 1 h;再用 PBST 摇洗 3 次,每次 10 min,

滴加显影液,反应 2 min 后进行曝光显影,得到条带采用 Image J 软件行灰度分析,数据根据相对应的内参对比,为便于计算与直观,将空白组平均数赋值为 1,进行数据归一化处理,最终采用 SPSS 26.0 分析结果。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 26.0 分析数据,GraphPad Prism 8.0.2 软件制作图表。全部数据用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,符合正态分布和方差齐性,使用单因素方差分析法,进一步两两比较用 LSD 检验;方差不齐则采用 Tamhane's T2 多重检验。不满足正态性则采用非参数检验。均以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况

模型组大鼠活动及饮食减少,于造模后第 3~5 天尾根部出现脱皮、红肿,甚至出现溃烂,第 9~12 天后足、关节、耳朵、眼角陆续出现肉眼可见的红肿,第 15~18 天症状达到高峰期。各组大鼠第 1 天体质量比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。相较于空白组,模型组大鼠于造模后第 9、12、15、18、21 天体质量降低($P<0.05$, $P<0.01$);西药组体质量于造模后第 9、12、15 天差异均无统计学意义($P>0.05$),于第 18、21 天降低($P<0.01$);电针组体质量于造模后第 9、15 天差异均无统计学意义($P>0.05$),第 12、18、21 日均降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组相比,西药组体质量在造模后第 9、21 天差异均无统计学意义($P>0.05$),在第 12、15、18 日均升高($P<0.01$);电针组体质量在造模后第 1、9 天差异均无统计学意义($P>0.05$),在第 12、15、18、21 日均升高($P<0.01$, $P<0.05$)。与西药组相比,电针组体质量差异均无统计学意义($P>0.05$)。详见图 1。

2.2 各组大鼠足跖容积比较

各组大鼠在造模后第 1、9 天足跖容积比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。相较于空白组,模型组大鼠于造模后第 12、15、18、21 天足跖容积增大($P<0.05$, $P<0.01$),结合一般情况,提示模型制备成功;西药组足跖容积于造模后第 12、15、18 天差异均无统计学意义($P>0.05$),于第 21 天增大($P<0.05$);电针组足跖容积于造模后第 12、18 天差异均无统计学意义($P>0.05$),第 15、21 日均增大($P<0.05$)。与模

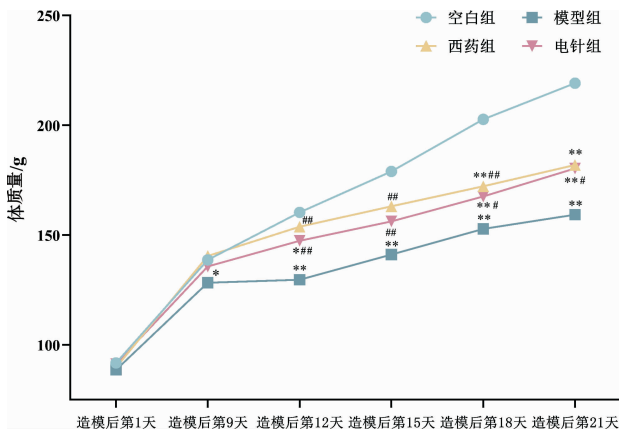


图 1 各组大鼠造模前后各时点体重比较($\bar{x}\pm s, n=10$)
注:与空白组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组相比,# $P<0.05$,### $P<0.01$ 。

型组相比,其余 3 组足跖容积于造模后第 12 天差异均无统计学意义($P>0.05$),西药组足跖容积在造模后第 15、18、21 天均减小($P<0.05, P<0.01$),电针组在第 21 天明显减小($P<0.01$)。与西药组相比,电针组足跖容积差异均无统计学意义($P>0.05$)。详见图 2。

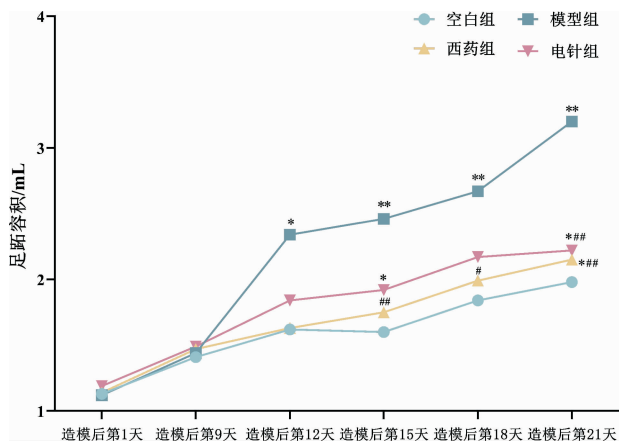


图 2 各组大鼠造模前后各时点足跖容积比较($\bar{x}\pm s, n=10$)
注:与空白组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组相比,# $P<0.05$,### $P<0.01$ 。

2.3 各组大鼠组织形态学结果比较

空白组大鼠膝关节滑膜组织内衬层细胞排列规则(图 3 箭头①),未见炎细胞浸润;与空白组相比,模型组大鼠滑膜组织结构呈现异常,滑膜组织出现一定增生,可见大面积胶原纤维组织增生(图 3 箭头②),诸多炎细胞浸润(图 3 箭头③),大量血管增生(图 3 箭头④);与模型组相比,电针组和西药组滑膜结构较好,细胞密度明显降低,滑膜组织增生一定程度缓解,出现较小面积的胶原纤维组织增生,炎细胞浸润较模型组大鼠少,偶见血管生成。

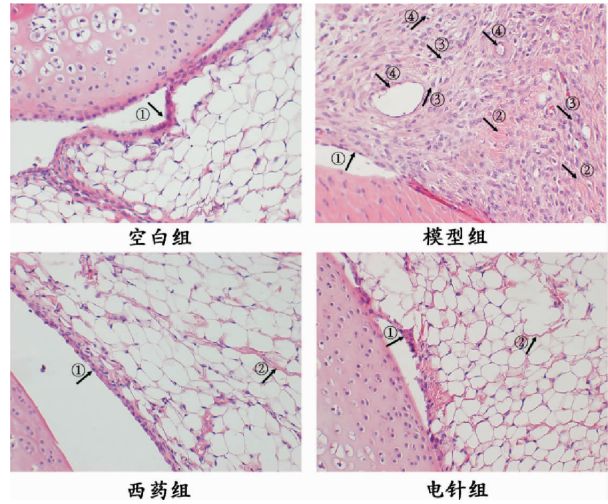


图 3 各组大鼠膝关节滑膜组织病理形态学结果(HE, $\times 100$)
注:箭头①标记的是滑膜内衬层,箭头②标记的是增生的纤维组织,箭头③标记的是炎细胞,箭头④标记的是血管。

2.4 各组大鼠滑膜组织中 CD31 蛋白表达的比较

空白组大鼠滑膜组织见少量 CD31 蛋白表达。与空白组相比,模型组 CD31 表达明显增加($P<0.05$),表明血管生成增加;与模型组相比,西药组和电针组 CD31 表达有一定减少,但差异无统计学意义($P>0.05$)。详见图 4—5。

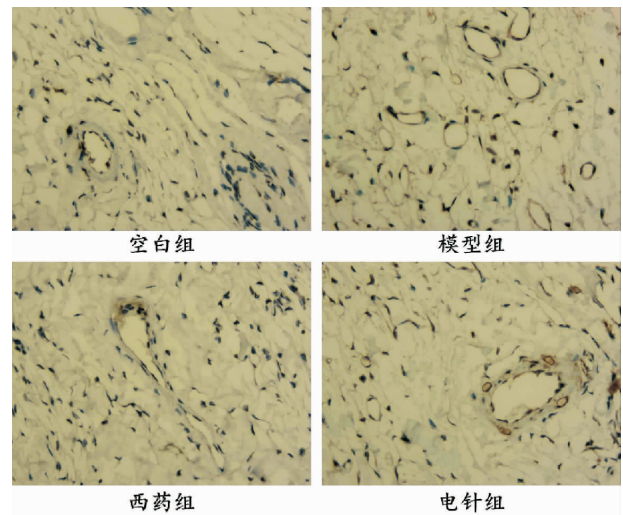


图 4 各组大鼠滑膜组织 CD31 表达水平(免疫组织化学, $\times 400$)

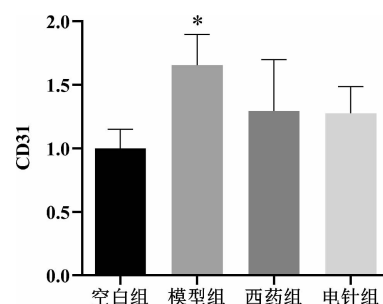


图 5 各组大鼠滑膜组织 CD31 表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=5$)
注:与空白组相比,* $P<0.05$ 。

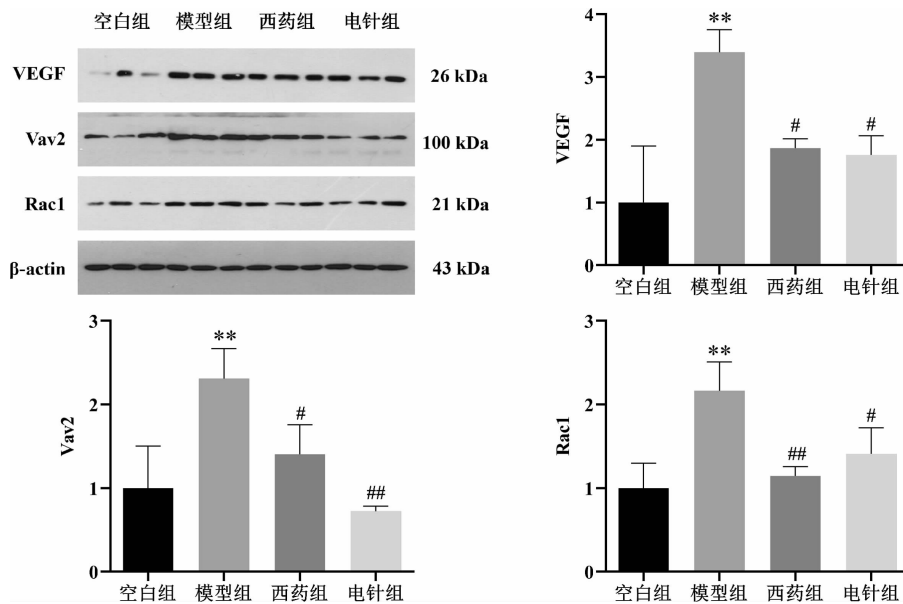


图6 各组大鼠滑膜组织 VEGF、Vav2、Rac1 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

注:与空白组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

2.5 各组大鼠滑膜组织中 VEGF、Rac1、Vav2 的蛋白表达比较

与空白组相比,模型组大鼠滑膜组织中 VEGF、Rac1、Vav2 蛋白表达量显著升高($P<0.01$);与模型组相比,西药组、电针组中 VEGF、Vav2、Rac1 蛋白表达量下降($P<0.05, P<0.01$)。详见图 6。

3 讨论

RA 是最常见的自身免疫性关节炎疾病,其临床最大危害在于关节软骨与骨的破坏,影响正常关节活动,导致活动受限。RA 基本病理是关节内的滑膜炎及血管翳形成^[20-21]。血管翳主要由滑膜炎、滑膜增生以及血管新生等共同构成。血管新生是 RA 早期促进滑膜增生和炎症发展的核心病理特征,是 RA 关节侵蚀破坏最主要的原因^[1,22]。因此,血管新生在 RA 的发病机制中发挥了重要作用,已成为当前 RA 研究的热点和治疗靶点之一^[3,23]。RA 在中医学中属于“痹病”范畴。《素问·痹论》曰“风寒湿三气杂至,合而为痹”,指出感受外邪是痹病发病的外因;《金匱要略·中风历节病脉证并治第五》曰“寸口脉沉弱……故曰历节”,指出正气虚弱是痹病发病的内因^[24]。“正气不足,复感外邪”,内外相合发病,虚实夹杂、本虚标实为其病机特点^[25-26]。临床上,多遵循扶正祛邪、活血化瘀的治疗原则^[27-28]。针刺是治疗 RA 常用的中医技法之一,有扶正祛邪、通脉止痛的作用^[29]。根据 RA 的治疗原则,本实验选取足三里、关

元和阿是穴,足三里为胃经之合穴,关元为先天之气海,两者均有补益气血、扶正培元的功效,阿是穴具有活血化瘀、通络止痛的功效。

与空白组比较,本实验 AA 模型大鼠足跖关节肿胀明显,足跖容积明显增大($P<0.01$),电针干预后足跖容积减少($P<0.01$),与既往研究结果一致^[7-8]。组织形态学显示,模型组大鼠滑膜组织结构排列异常,大量炎细胞浸润,血管生成增多,电针干预后滑膜组织结构较好,炎细胞浸润、血管生成明显减少。CD31 是公认的血管特异性标志物^[30],免疫组织化学结果显示,与空白组比较,模型组关节滑膜组织中 CD31 表达明显增加($P<0.05$),电针干预后 CD31 表达差异虽无统计学意义($P>0.05$),但有明显下降趋势,提示电针干预后 RA 滑膜血管数量减少。因此,初步证实电针治疗 RA 可能与抑制滑膜血管新生有关。另外,Western blot 结果显示,与空白组比较,模型组大鼠关节滑膜组织中 VEGF、Vav2 和 Rac1 表达均明显增多($P<0.01$),电针干预后 VEGF、Rac1、Vav2 蛋白表达量均下降($P<0.05, P<0.01$),这提示 VEGF/Vav2/Rac1 信号通路可能在这一过程中发挥了重要作用。

RA 血管新生是一项极为复杂的过程,内皮细胞迁移是其中的重要环节之一,而伪足生成在细胞迁移中占据了重要位置^[31-32]。VEGF 及其信号通路参与血管新生全部过程,有着无可替代的作用^[33]。研究表明,电针调节血管新生可能与调控 VEGF 表达有关^[34-35]。已有研究证实,VEGF 通过诱导其下游 Vav2 激

活 Rac1 引起内皮细胞迁移^[6]。Rac1 作为小蛋白酶家族的一员,在细胞迁移过程中发挥了重要作用,参与细胞前端片状伪足的形成并向前伸出^[36]。Rac1 作为分子开关被 Vav2 激活,从不活跃的 GDP 结合态循环到活跃的 GTP 结合态,活性状态下的 Rac1 通过信号通路作用于肌动蛋白结合蛋白,使得肌动蛋白细胞骨架发生聚合的重构变化,最终使得细胞前端片状伪足生成,诱导内皮细胞发生迁移^[37-40]。

本实验以 VEGF 及其下游 Vav2/Rac1 信号通路为切入点展开研究,结合组织形态学结果及血管内皮细胞标记物 CD31 结果,模型组大鼠滑膜组织中 CD31 较空白组表达升高 ($P<0.05$),VEGF 含量明显升高 ($P<0.01$),说明模型大鼠血管新生增多,且与 VEGF 表达增多密切相关。电针干预后 CD31 表达差异虽无统计学意义 ($P>0.05$),但有明显降低趋势,提示血管新生较少,同时 VEGF 表达明显降低,这表明 VEGF 可能是电针发挥抑制血管新生的关键信号途径。同时,本研究结果显示,模型组大鼠滑膜组织中 Vav2、Rac1 蛋白表达量较空白组大鼠均明显增多 ($P<0.01$),电针干预后 Vav2、Rac1 蛋白表达量明显下降 ($P<0.01, P<0.05$),提示电针可能通过抑制 VEGF 的表达,从而抑制 Vav2、Rac1 活性和血管新生,减少血管翳浸润,减轻关节肿胀。因此,VEGF/Vav2/Rac1 信号通路可能介导了电针抑制 AA 模型大鼠滑膜血管新生这一作用。

综上所述,电针治疗 RA 的效应机制可能是通过抑制 VEGF/Vav2/Rac1 信号通路,抑制内皮细胞伪足生成及其迁移,从而抑制 RA 血管新生,改善关节症状,为电针抑制 RA 血管新生提供了一定证据支持。为了进一步确定 VEGF/Vav2/Rac1 信号通路在电针抑制 RA 血管新生中的作用机制,后续将通过设置其信号通路关键蛋白的阻断剂或激动剂展开研究,同时补充内皮细胞伪足生成直接证据的检测。

参考文献

- [1] WANG Y, WU H, DENG R. Angiogenesis as a potential treatment strategy for rheumatoid arthritis[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2021, 910: 174500.
- [2] 安南, 陈子琦, 黄敏. 血管内皮细胞代谢与肿瘤血管新生研究进展[J]. *药学报*, 2020, 55(7): 1373-1381.
- [3] QIAN K, ZHENG X X, WANG C, et al. β -sitosterol inhibits rheumatoid synovial angiogenesis through suppressing VEGF signaling pathway[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 816477.
- [4] CHEN Y X, DANG J L, LIN X R, et al. RA fibroblast-like synoviocytes derived extracellular vesicles promote angiogenesis by miRNA-1972 targeting p53/mTOR signaling in vascular endothelial cell[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 793855.
- [5] GARRETT T A, VAN BUUL J D, BURRIDGE K. VEGF-induced Rac1 activation in endothelial cells is regulated by the guanine nucleotide exchange factor Vav2[J]. *Experimental Cell Research*, 2007, 313(15): 3285-3297.
- [6] HU J G, MENG Y, ZENG J H, et al. Ubiquitin E3 Ligase MARCH7 promotes proliferation and invasion of cervical cancer cells through VAV2-RAC1-CDC42 pathway[J]. *Oncology Letters*, 2018, 16(2): 2312-2318.
- [7] LI Z L, YANG A J, YIN X L, et al. Mesenchymal stem cells promote endothelial progenitor cell migration, vascularization, and bone repair in tissue-engineered constructs via activating CXCR2-Src-PKL/Vav2-Rac1[J]. *FASEB Journal*, 2018, 32(4): 2197-2211.
- [8] BARBERA S, RAUCCI L, LUGANO R, et al. CD93 signaling via rho proteins drives cytoskeletal remodeling in spreading endothelial cells[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(22): 12417.
- [9] COLÓN-BOLEA P, GARCÍA-GÓMEZ R, CASAR B. RAC1 activation as a potential therapeutic option in metastatic cutaneous melanoma[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(11): 1554.
- [10] WANG P, LIU G Z, WANG J F, et al. SNHG3 silencing suppresses the malignant development of triple-negative breast cancer cells by regulating miRNA-326/integrin $\alpha 5$ axis and inactivating Vav2/Rac1 signaling pathway[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2020, 24(10): 5481-5492.
- [11] 龙轶映, 张亮, 祁芳, 等. 电针对佐剂性关节炎大鼠滑膜组织中 mTOR 磷酸化水平的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2021, 41(12): 1881-1885.
- [12] 艾坤, 李艳玲, 祁芳, 等. 电针对佐剂性关节炎大鼠滑膜组织 c-IAP1mRNA 和 c-IAP2mRNA 的影响[J]. *针灸推拿医学(英文版)*, 2019, 17(1): 16-23.
- [13] ZHU J, SU C G, CHEN Y Z, et al. Electroacupuncture on ST36 and GB39 acupoints inhibits synovial angiogenesis via downregulating HIF-1 α /VEGF expression in a rat model of adjuvant arthritis[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019, 2019: 5741931.
- [14] OUYANG B S, GAO J, CHE J L, et al. Effect of electroacupuncture on tumor necrosis factor- α and vascular endothelial growth factor in peripheral blood and joint synovia of patients with rheumatoid arthritis[J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2011, 17(7): 505-509.
- [15] 叶冠成, 陈光耀, 江雯欣, 等. 类风湿关节炎动物模型研究进展[J]. *安徽中医药大学学报*, 2019, 38(5): 88-92.

- [16] 祁芳, 李艳玲, 艾坤, 等. SD大鼠佐剂性关节炎模型的建立与评估[J]. 湖南中医药大学学报, 2016, 36(1): 23-26.
- [17] 黄淑敏, 钟森杰, 廖晓倩, 等. 基于中西医临床病症特点的类风湿性关节炎动物模型分析[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(19): 5152-5158.
- [18] 余曙光, 徐斌. 实验针灸学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2016: 287-290.
- [19] 张梦颖, 姚瑶, 葛卫红. 甲氨蝶呤治疗类风湿性关节炎骨破坏的研究进展[J]. 中国药房, 2012, 23(41): 3926-3928.
- [20] TUCKERMANN J, ADAMS R H. The endothelium-bone axis in development, homeostasis and bone and joint disease[J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2021, 17(10): 608-620.
- [21] 马天越, 方宜梅, 郭甘霖, 等. 二四汤对牛Ⅱ型胶原诱导大鼠类风湿关节炎的干预机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(5): 38-45.
- [22] JIANG H L, XU F, ZENG L, et al. Saponins from *Nigella glandulifera* seeds attenuate collagen-induced rheumatoid arthritis in rats via the OPG/RANKL/NF- κ B and Ang/Tie-2 pathways[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2022, 283: 114714.
- [23] MICHALLEK F, ULAS S T, PODDUBNY D, et al. Fractal analysis of perfusion imaging in synovitis: A novel imaging biomarker for grading inflammatory activity based on assessing angiogenesis[J]. *RMD Open*, 2022, 8(1): e002078.
- [24] 谢继光. 《内经》针灸治疗痹症的论述[J]. 上海针灸杂志, 1990, 9(1): 35-37.
- [25] 舒遵华, 丁庆刚, 孙牧, 等. 痹症的中医诊断规范[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(72): 233-234.
- [26] 甘振宝, 唐宏亮, 庞军, 等. 中医外治法干预痹症的研究概况[J]. 按摩与康复医学, 2020, 11(1): 4-6.
- [27] 代雪双, 王鹏飞, 卜凡优, 等. 基于医案数据探讨明清医家及张鸣鹤辨治类风湿关节炎规律[J]. 山东中医杂志, 2021, 40(1): 32-36, 70.
- [28] 李梢. 王永炎院士从“络”辨治痹病学术思想举隅[J]. 北京中医药大学学报, 2002, 25(1): 43-45.
- [29] 吴中朝. 痹症: 针灸疗法的优势病种[J]. 中国针灸, 2018, 38(12): 1340.
- [30] LIU L, SHI G P. CD31: Beyond a marker for endothelial cells[J]. *Cardiovascular Research*, 2012, 94(1): 3-5.
- [31] CÁRDENAS-LEÓN C G, KLAAS M, MÄEMETS-ALLAS K, et al. Olfactomedin 4 regulates migration and proliferation of immortalized non-transformed keratinocytes through modulation of the cell cycle machinery and actin cytoskeleton remodelling[J]. *Experimental Cell Research*, 2022, 415(1): 113111.
- [32] WU D J, LIU L Y, FU S L, et al. Osteostatin improves the Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and enhances angiogenesis through HIF-1 α under hypoxia conditions invitro[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2022, 606: 100-107.
- [33] ZHANG J, MA Y Y, ZHANG Y, et al. Angiogenesis is inhibited by arsenic trioxide through downregulation of the CircHIPK3/miR-149-5p/FOXO1/VEGF functional module in rheumatoid arthritis[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 751667.
- [34] YAMAGUCHI K, SUDO H, IMAI K. Vascular endothelial growth factor signaling in VE-cadherin expression and tube-like formation by rheumatoid arthritic synovial fibroblast-like cells[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 508(2): 405-409.
- [35] 甘珮荣, 刘超, 吴虹, 等. HIF-VEGF-Ang-2信号转导介导的滑膜血管新生在类风湿关节炎中的作用[J]. 药理学报, 2021, 56(5): 1246-1252.
- [36] LOPEZ-GUERRERO A M, ESPINOSA-BERMEJO N, SANCHEZ-LOPEZ I, et al. RAC1-Dependent ORAI1 translocation to the leading edge supports lamellipodia formation and directional persistence[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 6580.
- [37] AHMAT AMIN M K B, SHIMIZU A, ZANKOV D P, et al. Epithelial membrane protein 1 promotes tumor metastasis by enhancing cell migration via copine-III and Rac1[J]. *Oncogene*, 2018, 37(40): 5416-5434.
- [38] GAVARD J, GUTKIND J S. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin[J]. *Nature Cell Biology*, 2006, 8(11): 1223-1234.
- [39] JU L, ZHOU Z W, JIANG B, et al. Autocrine VEGF and IL-8 promote migration via src/Vav2/Rac1/PAK1 signaling in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2017, 41(4): 1346-1359.
- [40] DEL VALLE-PÉREZ B, MARTÍNEZ V G, LACASA-SALAVERT C, et al. Filamin B plays a key role in vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility through its interaction with Rac-1 and Vav-2[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(14): 10748-10760.

(本文编辑 匡静之)