

·基础研究·

电针对佐剂性关节炎大鼠足跖肿胀度和炎性细胞因子的影响

艾坤¹, 武丹², 常小荣¹, 刘密¹, 刘梨³, 刘美荣³

[摘要] 目的 探讨电针对佐剂性关节炎大鼠血浆内炎症相关细胞因子的作用及其与足跖肿胀度的相关性。方法 60 只大鼠随机分为 5 组, 每组 12 只。空白组、模型组做捆绑处理, 足三里组、关元组、委中组分别于捆绑后电针单穴, 隔天 1 次。32 d 后断头取血, 测量各组足跖肿胀度及血浆内白细胞介素(IL)-1、IL-2、IL-10、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平。结果 造模后, 模型组大鼠足跖肿胀($P<0.05$), 足三里组、关元组、委中组大鼠足跖关节肿胀度较电针治疗前改善($P<0.05$); 模型组血浆 IL-1、IL-2、TNF- α 含量明显高于空白组($P<0.01$); 足三里组、关元组、委中组血浆 IL-1、IL-2、TNF- α 含量低于模型组($P<0.05$); 委中组与足三里组、关元组有非常显著性差异($P<0.01$); 模型组血浆 IL-10 含量低于空白组($P<0.05$); 足三里组、关元组、委中组血浆 IL-10 含量高于模型组($P<0.05$); 委中组与足三里组、关元组之间有非常显著性差异($P<0.01$); 大鼠足跖肿胀度与 IL-1、IL-2、TNF- α 呈正相关($r=0.881\sim0.912$, $P<0.01$); IL-1、IL-2、TNF- α 之间呈正相关($P<0.01$); IL-10 与跖围、IL-1、IL-2、TNF- α 呈负相关($r=-0.519\sim-0.293$, $P<0.05$)。结论 电针能够改善佐剂性关节炎大鼠足跖肿胀度, 可能是通过增加血浆 IL-10 含量, 降低 IL-1、IL-2、TNF- α 含量, 达到改善免疫功能的作用。

[关键词] 佐剂性关节炎; 电针; 足跖肿胀度; 细胞因子; 大鼠

Effects of Electrical Acupuncture on Swelling of Voix Pedis and Proinflammatory Cytokines in Adjuvant Arthritis Rats AI Kun, WU Dan, CHANG Xiao-rong, et al. Key Subject of Acupuncture and Massage, Hunan University of TCM; Key Research Department of State Administration of TCM, Changsha 410007, Hunan, China

Abstract: **Objective** To explore the effect of electrical acupuncture on the cytokines in adjuvant arthritis rats. **Methods** 60 rats were divided into 5 groups randomly, each with 12 rats. The blank control group and the model group were only bundled; while the Zusanli group, the Guanyuan group, and the Weizhong group were electroacupunctured each single point after bundled, once per 2 d. 32 d later, the swelling of voix pedis was measured and the level of interleukin (IL)-1, IL-2, IL-10, tumor necrosis factor (TNF)- α in plasma was determined in each group. **Results** After being modeled, the voix pedis of rats were swelling ($P<0.05$), while the swelling of voix pedis in the Zusanli, Guanyuan and Weizhong groups significantly reduced ($P<0.05$). The plasma IL-1, IL-2 and TNF- α was significantly higher in the model group than in the blank group ($P<0.01$), and reduced in Zusanli, Guanyuan and Weizhong groups ($P<0.05$). Compared with Zusanli and Guanyuan groups, there was a significant difference in the Weizhong group ($P<0.01$). The plasma IL-10 was significantly lower in the model group than in the blank control group ($P<0.05$), and increased in the Zusanli, Guanyuan and Weizhong groups ($P<0.05$). Compared with Zusanli and Guanyuan groups, there was a significant difference in the Weizhong group ($P<0.01$). The swelling of voix pedis was positively correlated with the level of IL-1, IL-2, and TNF- α ($r=0.881\sim0.912$, $P<0.01$). There was positive correlation among the IL-1, IL-2, and TNF- α ($P<0.01$). IL-10 was negatively correlated with the swelling, IL-1, IL-2, and TNF- α ($r=-0.293\sim-0.519$, $P<0.05$). **Conclusion** Electroacupuncture can significantly reduce the swelling of voix pedis in adjuvant arthritis rats, and it may be related with improving immune function by increasing the level of IL-10 and decreasing the level of IL-1, IL-2 and TNF- α in plasma.

Key words: adjuvant arthritis; electrical acupuncture; swelling of voix pedis; cytokine; rats

[中图分类号] R684.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1006-9771(2011)07-0622-03

[本文著录格式] 艾坤, 武丹, 常小荣, 等. 电针对佐剂性关节炎大鼠足跖肿胀度和炎性细胞因子的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2011, 17(7): 622—624.

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种免疫介导的慢性、炎症性和破坏性疾病, 是一类严重危害人类身体健康的常见自身免疫性疾病。针刺疗法已被确认对类风湿性关节炎具有较好的疗效。本研究通过类风湿性关节炎动物模型(佐剂性关节炎大鼠)观察相同的电针刺激分别作用于足三里、关元、委中单

个腧穴所引起的治疗前后大鼠足跖关节肿胀度的变化, 以白细胞介素(IL)-1、IL-2、IL-10、肿瘤坏死因子(TNF)- α 为代表的炎症相关细胞因子在血浆中含量变化, 探讨针刺实验穴位的免疫调整作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 健康成年 Wistar 大鼠 60 只, 雄

基金项目: 1.湖南省教育厅重点课题资助(08A048); 2.长沙市科技计划产学研合作资金专项重点项目(k1005020-31)。

作者单位: 1.湖南中医药大学针灸推拿学省级重点学科, 国家中医药管理局重点研究室, 湖南长沙市 410007; 2.广东省中医院, 广东广州市 510000; 3.湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙市 410007。作者简介: 艾坤(1983-), 男, 湖南岳阳市人, 硕士, 讲师, 主要研究方向: 针灸治病机理的研究。通讯作者: 常小荣。

性, 体重 180~200 g, 清洁级, 湖南中医药大学动物中心, 实验动物证号 SYXKC(湘)2003-0001。随机分为 5 组: 空白组、模型组、足三里组、关元组、委中组, 每组 12 只。实验过程中有 3 只大鼠死亡, 其中足三里组 1 只, 关元组 1 只, 空白组 1 只。

1.2 实验试剂 液体石蜡、羊毛脂、卡介苗冻干粉(50 mg/支): 北京生物制品研究所; IL-1、IL-2、IL-10、TNF- α 放免试剂盒: 北京华英生物技术研究所。

1.3 方法

1.3.1 造模 选用 Freund 氏完全佐剂(FCA)造模法^[1]。FCA 制备方法: 取液体卡介苗 2 支(160 mg), 80℃ 灭活 1 h, 均匀混入高压灭菌(121℃、1.1 kg/cm²、30 min)的液体石蜡、羊毛脂(2:1)16 ml, 使混合液的含菌浓度达到 10 mg/ml。超声波细胞粉碎仪乳化 20 min。除空白组以外, 每只大鼠右足垫皮内注射 0.1 ml 致敏大鼠。

1.3.2 穴位定位与针刺方法 实验组分别选择足三里、关元, 针刺对照组选择委中。取穴定位参照“十五”国家规划统编教材《实验针灸学》大鼠标准穴位图谱定位及拟人对照法定位。所有穴位均用直刺。大鼠清醒固定, 各穴均用 30 号 1 寸针进针后, 接华佗电针仪, 疏密波, 疏波频率 20 Hz, 密波频率 100 Hz, 强度以针柄轻微抖动为度。每次留针 20 min。于造模后第 3 天开始针刺, 隔日 1 次, 共 16 次。

1.3.3 标本采集 大鼠腹腔注射 20% 乌拉坦 1 ml/100 g, 麻醉后断头采血, 2 ml 注入含 10% EDTA-Na₂ 30 μ l 和 40000 U/ml 抑肽酶 40 μ l 的 5 ml 试管中, 上下缓慢颠倒 3 次混匀, 其余 3~4 ml 注入干燥试管; 4℃, 3000 r/min 离心 10 min; 取上清液放入小试管中, -20℃ 冰冻保存。

1.3.4 指标检测 大鼠足跖关节肿胀度采用测量大鼠非致炎跖围的方法; IL-1、IL-2、IL-10、TNF- α 均采用放射免疫法测定, 由北京华英生物技术研究所测定。

1.4 统计学方法 所有数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 13.0 软件, 组间比较采用单因素方差分析

(One-Way ANOVA), 方差齐时选择 LSD 法, 方差不齐时选择 Dunnett T3 法; 组内比较采用配对 *t* 检验。显著性水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 大鼠足跖关节肿胀度 造模后, 大鼠足跖关节明显肿胀, 模型组与空白组比较具有显著性差异($P<0.05$)。足三里组、关元组、委中组治疗前后大鼠跖围比较均具有显著性差异($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠跖围变化(cm)

组别	n	治疗前	治疗后
空白组	11	2.291 \pm 0.152	2.285 \pm 0.160
模型组	12	3.511 \pm 0.140 ^a	3.503 \pm 0.132
足三里组	11	3.513 \pm 0.180 ^a	3.215 \pm 0.213 ^b
关元组	11	3.501 \pm 0.130 ^a	3.163 \pm 0.205 ^b
委中组	12	3.462 \pm 0.142 ^a	3.369 \pm 0.156 ^b

注: a: 与空白组比较, $P<0.05$; b: 与治疗前比较, $P<0.05$ 。

2.2 血浆 IL-1、IL-2、IL-10、TNF- α 含量 模型组血浆 IL-1、IL-2、TNF- α 含量较空白组明显升高($P<0.01$), 血浆 IL-10 含量较空白组明显降低($P<0.01$)。足三里组、关元组血浆 IL-1、IL-2、TNF- α 含量较模型组明显降低($P<0.01$), 血浆 IL-10 含量较模型组明显升高($P<0.01$); 足三里和关元两组间 IL-1、IL-2、TNF- α 、IL-10 含量无显著性差异(均 $P>0.05$)。委中组血浆 IL-1、IL-2、TNF- α 含量较模型组有降低($P<0.05$), 血浆 IL-10 含量较模型组升高($P<0.05$); 委中组血浆 IL-1、IL-2、TNF- α 、IL-10 含量与足三里组、关元组比较均有非常显著性差异($P<0.01$)。见表 2。

2.3 相关性分析 大鼠足跖肿胀度与 IL-1、IL-2、TNF- α 呈正相关($r=0.881$, $r=0.912$, $r=0.907$, $P<0.01$); IL-1、IL-2、TNF- α 之间呈正相关($P<0.01$); IL-10 与大鼠足跖肿胀度、IL-1、IL-2、TNF- α 呈负相关($r=-0.436$, $P<0.01$; $r=-0.365$, $P<0.01$; $r=-0.519$, $P<0.01$; $r=-0.293$, $P<0.05$)。

表 2 各组大鼠血浆中 IL-1、IL-2、IL-10、TNF- α 含量(ng/L)

组别	n	IL-1	IL-2	IL-10	TNF- α (μ g/L)
空白组	11	0.1190 \pm 0.0318	2.0650 \pm 0.1631	6.4450 \pm 0.4726	0.8520 \pm 0.1163
模型组	12	0.5400 \pm 0.0551 ^a	6.4440 \pm 0.6261 ^a	4.7045 \pm 0.9455 ^a	2.2064 \pm 0.1440 ^a
足三里组	11	0.2600 \pm 0.0639 ^{b,d}	2.7600 \pm 0.2886 ^{b,d}	12.3209 \pm 1.6716 ^{b,d}	1.3700 \pm 0.2445 ^{b,d}
关元组	11	0.2655 \pm 0.0630 ^{b,d}	2.7860 \pm 0.2207 ^{b,d}	11.9055 \pm 1.2806 ^{b,d}	1.3818 \pm 0.1918 ^{b,d}
委中组	12	0.3827 \pm 0.0190 ^c	4.2636 \pm 0.6493 ^c	8.7827 \pm 0.9462 ^c	1.8536 \pm 0.0427 ^c

注: a: 与空白组比较, $P<0.01$; 与模型组比较, b: $P<0.01$; c: $P<0.05$; d: 与委中组比较, $P<0.01$ 。

3 讨论

佐剂性关节炎(adjuvant arthritis, AA)是以关节滑膜慢性炎症为主要表现,主要侵犯关节及其周围组织的自身免疫性疾病,是目前研究针灸免疫调节机制较为理想的动物模型。其原发病变主要表现为致炎局部的炎症反应,续发病变表现为非致炎足爪肿胀^[2-3]。

IL-1 具有广泛的免疫调节作用,并有致热和介导炎症的作用。IL-2 是一种免疫增强剂,主要由 T 细胞产生。TNF- α 是重要的致炎因子和免疫调节因子。IL-1、IL-2、TNF- α 既是炎症因子,又参与机体的免疫反应。IL-2 和 TNF- α 是免疫促进因子,能促进机体的免疫反应。AA 大鼠外周单核细胞和滑膜的巨噬细胞分泌 IL-1、IL-2、TNF- α , 使外周血和关节滑膜液中 IL-1、IL-2、TNF- α 明显升高。因此,本实验中,AA 大鼠血清 IL-1、IL-2、TNF- α 明显高于空白组; IL-1、IL-2、TNF- α 之间呈正相关,且与大鼠关节肿胀度(跖围)呈正相关,说明在 AA 发病中, IL-1、IL-2、TNF- α 起着同样的作用,都是炎症因子。

针灸治疗 AA 大鼠,主要是降低血清中 IL-1、IL-2、TNF- α 的含量,从而发挥其免疫调节作用。李煜电针 AA 大鼠,发现能抑制皮肤组织 IL-1Ra mRNA 的表达^[4]。唐照亮观察艾灸 AA 大鼠,能减少血清中 IL-1 的含量^[5]。李世光等研究针灸对 RA 的免疫调节作用,发现通过 IL-2 受体百分率下降, IL-2、TNF- α 的含量明显改变,使患者的免疫功能得以改善^[6]。唐照亮等观察 AA 大鼠失去肾上腺和海马交感神经的支配, IL-6、IL-2 含量上升,艾灸能减轻 AA 大鼠炎症肿胀,恢复和促进大鼠松果腺褪黑素(MT)的分泌,使 IL-6、IL-2 降低^[7]。唐照亮等进一步观察到,艾灸能恢复和促进刀豆素 A (ConA)诱导的脾淋巴细胞增殖反应,降低 IL-1 的含量^[8]。本实验显示,针灸足三里穴、关元穴后能有效降低 AA 大鼠血浆 IL-1、IL-2、TNF- α 水平,且大鼠足跖关节肿胀度(趾围)明显降低,相互之间呈正相关。

IL-10 有很强的抗炎作用,能明显抑制单核-吞噬细胞的致炎作用,可能是一种有效的抗炎物质^[9-10]。IL-10 不仅是诱导外周耐受的一种细胞因子,而且还是一个具有重要免疫调节功能的细胞因子,可抑制中性粒细胞和嗜酸性粒细胞产生促炎症因子和趋化因子,并通过抑制单核细胞 MHC-II 类分子和共刺激分子的表达,抑制其抗原递呈作用。张红星等发现,头针可在一定范围内增强 IL-10 表达,从而减轻炎症反

应,减轻脑缺血再灌注损伤^[11]。研究还发现,针刺能提高正常大鼠 IL-10/IL-6 比值,升高创伤痛应激所致的免疫抑制患者 IL-10/IL-6 比值^[12]。

有报道急性期 RA 患者血清中 IL-10 水平显著升高,由滑膜液中的单个核细胞自发分泌 IL-10。本实验也发现在 AA 造模后,血清中 IL-10 水平有所升高,但至中后期则低于正常大鼠。通过电针足三里、关元后, IL-10 水平显著升高,同时可见 AA 大鼠足跖肿胀减轻。高水平的 IL-10 可能是针灸发挥免疫抑制作用的重要因素。

实验中还发现血浆炎症因子含量以针刺足三里和关元作用最强,说明电针调节免疫具有腧穴特异性。

[参考文献]

- [1]冯芳,丁志建,刘俊.佐剂性关节炎大鼠模型的实验研究[J].天津药学,2004,16(2):1-2.
- [2]李辉,李晓泓,张露芬,等.电针对佐剂性关节炎大鼠下丘脑 CRH、IL-2、 β -EP 含量的影响[J].中国针灸,2005,25(11):793-796.
- [3]马东来,李俊,陈敏珠.卡芬尼对大鼠佐剂性关节炎治疗作用的免疫机制[J].中国免疫学杂志,1992,8(2):114-119.
- [4]李煜,王丽娜,易春霞,等.电针对佐剂性关节炎大鼠病灶局部皮肤组织 IL-1 β 、IL-1Ra mRNA 表达的影响[J].针刺研究,2004,29(3):187-191.
- [5]唐照亮,宋小鸽,陈全珠,等.艾灸抗炎免疫作用及对神经递质影响的实验研究[J].中国中医基础医学杂志,2000,6(9):53.
- [6]李世光,赵俊萍,岳月娥,等.温针疗法对类风湿性关节炎患者免疫调节的影响[J].中国康复医学杂志,1994,9(5):212-214.
- [7]唐照亮,宋小鸽,李俊,等.艾灸抗炎免疫作用的实验观察与分析[J].针刺研究,1996,21(2):67-70.
- [8]唐照亮,宋小鸽,侯振明,等.艾灸疗抗炎免疫作用的实验研究[J].中国针灸,1997,17(4):233-235.
- [9]Puliti M,von Hunolstein C,Verwaerde C,et al. Regulatory role of interleukin-10 in experimental group B streptococcal arthritis[J]. Infect Immun,2002,70(6):2862-2868.
- [10]Asadullah K,Eskdale J,Wiese A,et al. Interleukin-10 promoter polymorphism in psoriasis[J]. J Invest Dermatol,2001,116(6):975-978.
- [11]张红星,刘灵光,周利,等.头针对急性脑缺血再灌注大鼠炎症反应的影响[J].中西医结合学报,2007,5(6):686-691.
- [12]薛红,徐蕾,余曙光,等.电针对大鼠创伤痛术后抗炎/促炎细胞因子比值影响的昼夜节律研究[J].成都中医药大学学报,2007,30(4):245-247.

(收稿日期:2011-04-14)