

维吾尔医沙疗对兔膝关节炎细胞因子的影响

卫荣 迪丽娜·马合木提 卡哈尔·库尔班 亚力孔·卡地尔

[摘要] 目的 探讨维吾尔医沙疗对骨关节炎模型动物关节液、血液中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、一氧化氮(NO)的影响。方法 新西兰兔右膝关节腔内注射木瓜蛋白酶,再随机分成3组。从造模第15天开始,I组予埋沙治疗,II组予芬必得灌胃,III组不作任何处理。第30天留取血清及关节液标本检测IL-1 β 、TNF- α 、NO水平。并取滑膜及软骨组织作组织病理学观察。结果 I组的软骨及滑膜病变程度较II、III组减轻;I、II组关节液中的IL-1 β 、TNF- α 的水平及血清中NO水平较III组明显降低。结论 维吾尔医沙疗通过抑制关节液中细胞因子升高而发挥其对骨关节炎的防治作用。

[关键词] 维吾尔医学;沙疗;骨关节炎;细胞因子;兔

Effects of the sand therapy of Uyghur Traditional Medicine on cytokines of the experimental knee osteoarthritis in rabbit WEI Rong, Dilina Mahe muti, Kahaer Kuerban, et al. First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumuqi 830054, Xinjiang, China

[Abstract] **Objective** To study the effects of the sand therapy of Uyghur Traditional Medicine on cytokines, such as interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), nitric oxide(NO) of the rabbit experimental knee osteoarthritis. **Methods** 27 rabbits were injected papain into the joint space of right knee, and divided randomly into three groups. 15 d after the articular injection, the rabbits of group I were treated with the sand therapy, the rabbits of group II were treated with fenbid, and III group accepted no treatment for the blank control. 15 d after treatment, the serum and the douche fluid of the diseased joints were obtained to measure the level of IL-1 β , TNF- α and NO. The synovium and the cartilage was observed histopathologically. **Results** Compare with group II and III, the pathological changes of cartilage and synovitis in group I lighten significantly. Compare with group III, the level of IL-1 β , TNF- α in articular douche fluid and NO in serum of group I and II decreased significantly. **Conclusion** The sand therapy can decrease the level of cytokines in the focus joints, which may play a role of treatment in osteoarthritis.

[Key words] Uyghur Traditional Medicine; sand therapy; osteoarthritis; cytokines

中图分类号:R684.3 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2005)05-0340-03

[本文著录格式] 卫荣,迪丽娜·马合木提,卡哈尔·库尔班,等.维吾尔医沙疗对兔膝关节炎细胞因子的影响[J].中国康复理论与实践,2005,11(5):340—342.

基金项目:国家中医药管理局科研项目(2000-01 L M06)。

作者单位:1.830054 新疆乌鲁木齐市,新疆医科大学第一附属医院(卫荣);2.830008 新疆乌鲁木齐市,新疆大学(迪丽娜·马合木提);3.838000 新疆吐鲁番市,新疆吐鲁番地区维吾尔医院(卡哈尔·库尔班、亚力孔·卡地尔)。作者简介:卫荣(1968-),女,汉族,陕西韩城市人,硕士研究生,副主任医师,主要研究方向:骨性关节炎。

骨关节炎(osteoarthritis, OA)被认为是一种老年性风湿性疾病(rheumatologic disease),在最常见的三大老年病中,OA的患病率和患病人数在世界范围内居首位^[1]。据统计,美国在关节炎治疗的花费中,绝大多数是应用在关节置换上^[2]。沙疗,即埋沙疗法,是维吾尔医学在独特气候和地理条件下创造出来的一种治

疗疾病的方法,它的有效性已经被大量的临床实践所证实^[3],对风湿病的康复效果尤其受到重视。本文通过建立 OA 动物模型及对细胞因子水平的检测,探讨维医沙疗治疗骨关节炎的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 选用 8~14 个月龄,体重 2.0~2.5 kg 成年新西兰兔 27 只,雄性,由新疆医科大学实验动物中心提供。兔右膝关节范围去毛,第 1、4、7 天,右膝关节局部常规消毒后,分别于右膝关节腔内注射 4%木瓜蛋白酶(EMK,美国 Sigma 公司)0.3 ml,建立骨关节炎模型。兔随机分为 3 组,每组 9 只,分笼饲养。从第 15 天开始,Ⅰ组每天沙疗 1 次,Ⅱ组予芬必得灌胃,Ⅲ组不予任何处理。

1.2 治疗方法

1.2.1 沙疗 首先建立维医沙疗生物传热实验平台,使其沙子的表面温度达 86℃,5 cm 深处达 56℃,10 cm 达 45℃,15 cm 达 42℃,20 cm 达 39.6℃,与吐鲁番沙场温度基本符合。将兔置于固定装置中,其右后肢与沙子表面接触并埋于热沙中,深达 20 cm;固定其颈部,使兔的头部处于上抬位,将兔的口鼻与沙隔离。每天 1 次,持续 15 d。

1.2.2 芬必得 予芬必得 28.44 mg/kg 灌胃,每天 1 次,持续 15 d。

1.3 标本取材 于实验第 31 天,各兔 2.5%硫喷妥钠腹腔注射麻醉,耳缘静脉取血,分离血清,-20℃保存备检。切开并分离兔的右后肢膝关节处皮肤,充分暴露膝关节,注入 0.9%氯化钠注射液 1 ml,充分活动膝关节使氯化钠液与关节滑液充分混合,再抽取关节腔洗液,-20℃保存备检。切断髌骨下缘的髌韧带,打开膝关节,肉眼观察并记录膝关节面软骨情况,切除胫骨干和内侧股骨髁表面的软骨,10%甲醛固定,50%EDTA 液(pH=7)脱钙 2 周,4 d 换液 1 次;常规脱水,浸蜡包埋,5 μm 切片,HE 染色,观察软骨形态学变化。

1.4 细胞因子检测 白介素-1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子(TNF-α)试剂盒由解放军总医院放免研究所提供,采用放射免疫分析法(RIA),按试剂说明书进行。一氧化氮(NO)试验盒由南京生物建成公司生产,以亚硝酸盐还原酶法测定标本液中的亚硝酸盐的浓度。

1.5 其他仪器设备 SZ2PC 分光光度计:上海棱光仪器厂;SK-1 型快速混匀仪:江苏金坛医疗仪器厂;J180-2B 型离心机:上海安亭仪器厂。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 11.5 统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 血清检测 TNF-α(F=1.503)、IL-1β(F=

1.955)组间无显著性差异(P>0.05)。NO 在 3 组间有非常显著性差异(F=8.999,P<0.01);两组间比较,Ⅰ、Ⅱ组间(F=1.5)和Ⅱ、Ⅲ组间(F=2.69)无显著性差异(P>0.05),Ⅰ、Ⅲ组间有显著性差异(F=4.19,P<0.05)。见表 1。

表 1 各组血清中各细胞因子的浓度

组别	IL-1β(Pg/ml)	TNF-α(Pg/ml)	NO(μmol/ml)
Ⅰ组	0.308±0.103	4.06±1.736	42.81±11.083 ^a
Ⅱ组	0.260±0.053	4.93±1.174	58.63±21.66
Ⅲ组	0.375±0.167	4.27±1.375	87.06±27.37

注:a:与Ⅲ组比较,P<0.05。

2.2 关节液检测 TNF-α(F=29.186)、IL-1β(F=15.97)3 组间有非常显著性差异(P<0.01)。两两比较,Ⅰ、Ⅱ组间均无显著性差异,Ⅰ、Ⅲ组间和Ⅱ、Ⅲ组间均有显著性差异(P<0.05)。NO 在 3 组间无显著性差异(F=0.119,P>0.05)。见表 2。

表 2 各组关节液中各细胞因子的浓度

组别	IL-1β(Pg/ml)	TNF-α(Pg/ml)	NO(μmol/ml)
Ⅰ组	2.46±1.19 ^a	7.88±7.58 ^b	36.73±28.70
Ⅱ组	2.30±1.10 ^b	15.09±13.57 ^b	37.17±28.49
Ⅲ组	4.99±0.88	54.91±16.91	42.73±24.91

注:与Ⅲ组比较,a:P<0.05;b:P<0.01。

2.3 病理观察 打开关节腔后,Ⅰ组右膝关节软骨表面为蓝白色,Ⅱ组及Ⅲ组软骨表面失去光泽,略呈淡黄色,且右膝胫骨平台内侧的关节软骨较为粗糙。镜下观察,Ⅱ、Ⅲ组均有明显的软骨纤维变性、坏死,血窦丰富,滑膜有血管增生,淋巴细胞及单核细胞浸润。(见中插图 5.1~5.4)

3 讨论

OA 以局灶性炎性病变为主^[4],故血清中 IL-1β、TNF-α 的含量变化不大;而临床资料表明,OA 患者血清及滑膜液中 NO 含量增高^[5]。我们的研究表明,沙疗能降低血清中 NO,关节液中 IL-1β、TNF-α 的水平,减少炎症反应,与疗效与芬必得相似。我们所测关节液中 NO 的浓度 3 组间变化不大,与大量的临床及实验报道不同,这是否由于 NO 的半衰期短,或者由于其在体内扮演着生理和病理的双重角色有关。有待今后的进一步研究。

NO 为一种自由基气体,是一种生理和病理生理介质^[6-7]。Grrabowski 认为,在关节内炎性介质(如 IL-1β)诱导下,软骨母细胞中的诱导型 NO 合成酶(iNOS)被激活,产生大量的 NO^[8]。Lotz 等认为,NO 及其产物的水平同软骨细胞的凋亡数目,OA 的严重程度呈正相关^[9-10]。Hashimoto 等发现,至少有两种相互独立的途径参与了 OA 软骨细胞的凋亡,一种是同滑膜炎无关的途径,由 NO 介导;另一种是同滑膜炎炎症相关的途径,由 Fas 介导;他们认为,典型的 OA 不存在明显的炎症反应,此时软骨细胞凋亡以 NO 途

径为主^[11]。

IL-1 和 TNF 是关节炎病理过程中促进软骨基质降解和关节软骨破坏的两种最重要的细胞因子^[12-14]。IL-1 在关节软骨的代谢中有多方面的作用,它一方面促进透明软骨型胶原的降解,一方面促进纤维软骨型胶原的增生,同时还抑制蛋白聚糖的合成,促进其分解,是直接介导软骨破坏的细胞因子^[15]。体外培养的正常软骨细胞可产生少量的 IL-1 β ;在骨关节炎软骨组织中,上层细胞及基质皆呈 IL-1 β 强阳性反应,说明骨关节炎时可能存在某些因素刺激并加速了 IL-1 β 的转录后过程。在 Moos 等证实,编码 IL-1 β 的基因改变与 OA 的关系密切^[16]。

TNF 是动物实验性骨关节炎中最早出现的细胞因子,其作用与 IL-1 类似。在软骨细胞中,TNF- α 选择性抑制软骨胶原的产生,抑制蛋白聚糖的合成,同时促进其降解,与 OA 软骨破坏及滑膜炎有一定的关系。体外研究证实,TNF- α 能够诱导滑膜细胞、软骨细胞分泌 IL-1 β ,两者相互协同,共同加强对关节软骨的破坏作用。此外,TNF- α 还可激活多型核细胞,刺激滑膜细胞,产生前列腺素 E₂ (PGE₂),参与炎症反应。可见,对抗 IL-1 和 TNF 对 OA 的防治十分重要^[17]。

沙疗流行于吐鲁番地区,它是利用吐鲁番地区独特的气候、地理条件治疗疾病的一种方法。据气象资料,每年 6 月初至 8 月底,吐鲁番地区高温、干热,白天气温高达 38℃~42℃,表面沙温高达 75℃~82℃,北京时间 5PM 后,沙堆 10 cm 深处沙温仍在 60℃~80℃之间。研究证实^[18],吐鲁番沙比其他地区沙磁矿含量高 9 倍,经磁场作用后,神经系统可释放出内啡肽^[19],从而起镇痛作用。所以,沙疗是一种集热疗、磁疗、按摩于一体的综合物理疗法。

我们的实验研究表明,沙疗能显著抑制兔 OA 模型的软骨损伤,降低关节液中的 IL-1 β 、TNF- α 水平及血清中的 NO 水平,推测沙疗可能通过这一途径发挥其对 OA 的预防和治疗作用。其疗效与非甾体类抗炎药物相近,但比非甾体类抗炎药物毒副作用小。

由于沙疗应用于 OA 的防治的研究刚刚起步,沙疗降低 IL-1 β 、TNF- α 、NO 水平的机制尚不十分清楚,是否还有其他因素参与作用也不清楚。此外,维医沙疗受地域及季节、气候自然条件的限制,推广使用也受到一定限制。这些都有待进一步研究、开发。

[参考文献]

- [1] Dieppe P. Osteoarthritis: The scale and scope of the clinical problem [A]. In: Rnsell, Dieppe P. Osteoarthritis: Current Research and

Prospects for Pharmacological Intervension[C]. London: Mosthy, 1991.

- [2] 王慧敏.骨关节炎研究新进展[J].江西中医学院学报,1999,11(1): 46-48.
- [3] 卡哈尔·库尔班.风湿病的维吾尔医沙疗疗效观察[A].国际维吾尔医药学术会议论文集[C].乌鲁木齐:新疆人民卫生科技出版社, 2003.25-26.
- [4] 闵伟琪,施桂英.骨关节炎患者血清和滑液可溶性肿瘤坏死因子受体的检测[J].中华风湿病学杂志,1998,2(2):198-120.
- [5] 冯剑颖.骨关节病时关节软骨细胞凋亡的研究进展[J].现代口腔医学杂志,2003,17(2):167-169.
- [6] Relic E, Bentrises Aij M, Ribbens C, et al. TNF- α protects human primary articular chondrocytes from Nitric Oxide-induced apoptosis via nuclear factor- κ B[J]. Lab Invest Dec,2002,82(12):1661-1672.
- [7] Vuolteenaho K, Moilanen T, Al-Saffar N, et al. Regulation of the nitric oxide production resulting from the glucocorticoid-insensitive expression of iNOS in human osteoarthritic cartilage[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2001, 9(7): 597-605.
- [8] Grabowski PS, Uacpherson H, Ralston SH. Nitric Oxide production in cells derived from the human joint[J]. Br J Rheumatol, 1996, 35(3): 207-212.
- [9] Lotz M, Hashimoto S, Kuhn K. Mechanisms of chondrocyte apoptosis[J]. Osteo Cart, 1999, 7(4): 389-391.
- [10] Lotz M, Hashimoto S, Kuhn K, et al. Mechanism of chondrocyte apoptosis[J]. Osteoarthritis, 1997, 7:389-391.
- [11] Hashimoto S, Takahashi K, Oshs RL, et al. Nitric Oxide production and apoptosis in cells of the meniscus during experimental osteoarthritis[J]. Arthritis Rheum, 1999, 42(10): 2123-2131.
- [12] Westacotl CL, Shanf M. Cytokines in osteoarthritis: Meditors or markers of joint destmetion[J]? Sonin Arthri Rheum 1996, 25:254.
- [13] Pelletier JP, Faner MP, DiBattista JA, et al. Coonlinat synthesis of stromelysin interlenkin-1, and on cogene protein in experimental osteoarthritis[J]. Am J Patho, 1993, 142:95.
- [14] Kammermann JR, Kincaid SA, Rnmph PF, et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in canine osteoarthritis: Immunolocalization of TNF-alpha, stromelysin and TNF receptors in canine osteoarthritic cartilage[J]. Osteoarthritis cartilage, 1996, 4:23-28.
- [15] Pelletier JP, DiBattista JA, Routhfey P, et al. Cytokines and inflammation in cartilage degradation[J]. Rheum Dis Din North Am, 1993, 19:545-568.
- [16] Moos V, Rndwaleit M, Herzog V, et al. Association of genotyoes affecting the expression of interleukin-1 or inerlerlin-1 receptor antagonist with osteoarthritis[J]. Arthritis and Rheum, 2000, 43: 2417-2422.
- [17] 余家阔,于长隆,曲锦域.骨关节的基因治疗现状和应用前景[J].中国运动医学杂志,1998,17(4):344-348.
- [18] 迪丽娜·马合木提,哈木拉提·吾甫尔,富荣昌.生物力学与维吾尔医沙疗[J].中国民族医药杂志,2000,7:24-25.
- [19] 郭明霞,王荻,张弛.磁场在医学中的作用及机理[J].中国疗养医学,1999,8(1):13-16.

(收稿日期:2005-03-29)

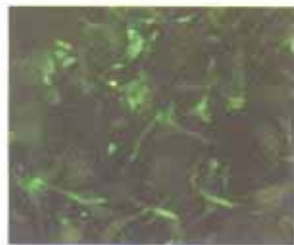


图 4.4 诱导分化后第 10 天 GFAP 表达
(FITC, 200 ×)



图 5.1 正常组 (100 ×)



图 5.2 I 组 (100 ×)



图 5.3 II 组 (100 ×)



图 5.4 III 组 (100 ×)



图 6.1 正常视网膜、脉络膜
(HE, 400 ×)



图 6.2 负压吸引 45 s 后即制
(HE, 400 ×)



图 6.3 负压吸引 3 min 后即制
(HE, 400 ×)