

• 基础研究 •

电针对实验性膝骨关节炎大鼠软骨转化生长因子 $\beta 1$ 表达的影响包飞^{1a},王道海^{1a},王凤琴^{1a},孙华^{1a},李兵^{1b},张云祥^{1a},吴志宏^{1b}

[摘要] 目的 探讨电针对膝骨关节炎(OA)软骨修复的影响。方法 40只SD雌性大鼠随机分为正常组、模型组、治疗组、对照组各10只。造模手术4周后分别对治疗组左膝和对照组右膝采用电针治疗2周。实验第7周收集每只动物左侧膝关节股骨端软骨,进行组织病理切片和HE染色及免疫组化染色,观察转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)在软骨组织表达的特点。结果 治疗组软骨TGF- $\beta 1$ 的表达明显增强,与其他各组的差异有非常显著性意义($P < 0.01$)。结论 电针治疗可明显上调实验性OA大鼠膝关节软骨TGF- $\beta 1$ 的表达,促进软骨修复。

[关键词] 电针;骨关节炎;转化生长因子 $\beta 1$

Effect of Electroacupuncture on Expression of Transforming Growth Factor $\beta 1$ in the Cartilage of Experimental Rats with Knee Osteoarthritis BAO Fei, WANG Dao-hai, WANG Feng-qin, et al. The Department of Traditional Chinese Medicine, Peking Union Medical College Hospital, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of electroacupuncture on cartilage renovation of knee osteoarthritis. **Methods** 40 female SD rats were randomly divided into the normal group, model group, electroacupuncture treatment group and control group. The left knees of the treatment group and right ones of the control group were treated by electroacupuncture for two weeks from the fifth week since operation. Collected left knees cartilage of all rats at the seventh week since the beginning of experiment. HE and immunohistochemical staining were used to observe the expression characteristic of transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) in cartilage. **Results** The expression of TGF- $\beta 1$ in the treatment group was very significantly stronger than all other groups ($P < 0.01$). **Conclusion** Electroacupuncture can obviously up-regulate the level of TGF- $\beta 1$ in cartilage of experimental rats with knee osteoarthritis, and promote the repair of cartilage.

Key words: electroacupuncture; osteoarthritis; transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)

[中图分类号] R684.3 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2008)04-0345-02

[本文著录格式] 包飞,王道海,王凤琴,等. 电针对实验性膝骨关节炎大鼠软骨转化生长因子 $\beta 1$ 表达的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2008, 14(4): 345-346.

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是以关节软骨降解为特征的退行性关节疾病,也是最常见的老年病之一,临床以膝骨关节炎最为常见,严重者可以致残。本病早、中期宜非手术治疗,晚期宜手术治疗。在非手术治疗阶段若能有效促进软骨修复,则可防止和延迟病变向晚期发展,但目前尚无理想的非手术疗法可供临床选择。

针灸具有疏通经络、调和阴阳的作用,能促使失衡的机体状态向平衡态方向调节。对于皮肤、肌肉、肌腱、韧带、神经以及骨组织的损伤、断裂,针灸都具有促进损伤组织修复、再生的作用,但是否对软骨亦有促进修复作用,迄今尚未见相关报道。转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)可影响软骨细胞的发育、增殖分化,在软骨的修复重建、细胞外基质的形成过程中发挥重要作用。为探讨电针对OA软骨修复的影响,我们采用单侧跟腱切除法^[1]制备大鼠膝OA模型,进行电针干预后,采用免疫组化染色观察TGF- $\beta 1$ 在负重关节面软骨组织表达的特点。

1 材料与方法

1.1 材料 健康雌性SD大鼠40只,SPF级,体重(190±10)g,由维通利华实验动物有限公司提供。主要试剂和仪器:抗鼠TGF- $\beta 1$ 单克隆抗体(美国Santa公司产品);汉医牌 $\varnothing 0.20 \times 13$ mm无菌针灸针(北京汉医医疗器械中心生产);电针仪:长城牌KWD-808 II全能脉冲电疗仪;生物组织自动脱水机、石蜡包埋机、切片机、展片机、烤片机均为德国LEICA公司产品;光学显

微镜为日本Nikon eclipse 80i,连接Nikon CCD DS-SMC照相机。

1.2 实验分组 随机取10只大鼠作为正常增龄组(正常组),其余造模后随机分为骨关节炎模型对照组(模型组)、电针治疗组(治疗组)和电针对照组(对照组),每组10只。

病理模型制备:采用单侧跟腱切除法,切除动物右侧后肢跟腱,术后自由活动、进食、饮水,4周后造模成功^[1]。

1.3 干预方法: ①正常组:无处理;②模型组:造模术后不予治疗;③治疗组:于造模术后第5周开始治疗。取穴:左侧膝前、后三里^[2],穴位常规消毒,针刺后行平补平泻手法,得气后接电针仪,采用连续波刺激20 min,频率2 Hz,强度以局部肌肉出现收缩为度,每日治疗1次,5次为1个疗程,疗程间休息2 d,治疗2个疗程;④对照组:取右侧膝前、后三里穴进行电针治疗,方法同治疗组。

1.4 标本处理 实验第7周采用断髓法处死动物,收集每只动物左侧膝关节股骨端软骨,用4%多聚甲醛固定,梯度乙醇逐级脱水,透明,石蜡包埋,切片,厚5 μ m,采用HE染色和TGF- $\beta 1$ 免疫组化染色,进行组织学和免疫组织化学检测。

1.5 TGF- $\beta 1$ 免疫组织化学染色 石蜡切片脱蜡,水洗;3%过氧化氢室温孵育10 min;滴加1抗,室温孵育60 min;滴加2抗,室温孵育10 min;滴加DAB溶液,镜检;苏木素复染;梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。

1.6 图像分析: ①图像选取位置的确定及图像采集:先在10倍物镜下确定股骨软骨面内、外侧髁顶点,换20倍物镜,在内、外侧髁顶点及附近区域各取2个视野,共4个视野,显微镜物镜固定为20倍,应用彩色图像采集软件NIS-Elements F摄取图像;②图像分析:采用Image-Pro Plus 5.0专业图像分析软件进行图像分析,测定TGF- $\beta 1$ 表达阳性细胞的光密度值(indicator

作者单位:1. 中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院 a. 中医科; b. 骨科,北京市100730。作者简介:包飞(1968-),女,北京市人,副主任医师,主要从事针灸治疗骨关节炎的临床和实验研究。通讯作者:吴志宏。

optic density, IOD), 阳性细胞的确定条件: a. 染色呈棕黄色; b. 细胞核比较清晰; c. 形状比较规则; d. 轮廓比较清楚, 完全具备上述条件方确定为阳性表达细胞。

1.7 统计学处理 TGF- β 1 表达阳性细胞 IOD 值以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计分析采用 SPSS 11.0 统计软件, 组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 q 检验。

2 结果

2.1 HE 染色 正常组软骨表面光滑, 表层细胞呈梭形, 近似水平排列, 中间层细胞圆形, 散在分布, 柱状层细胞排列呈柱状, 软骨细胞簇少量。模型组关节软骨变薄, 软骨细胞数目明显减少, 细胞排列紊乱, 有较多软骨细胞簇出现。治疗组软骨细胞增生明显, 大量软骨细胞成簇出现。对照组可见较多软骨细胞簇。

2.2 免疫组织化学染色 正常组软骨细胞偶见浅棕色 TGF- β 1 弱阳性染色; 模型组有少量棕色 TGF- β 1 阳性染色颗粒; 治疗组可见大量深棕色 TGF- β 1 强阳性染色颗粒; 对照组有部分棕色 TGF- β 1 阳性染色颗粒。四组动物的软骨组织 TGF- β 1 免疫组织化学染色 (200 \times) 见插图 1 图 5.1 ~ 图 5.4。

2.3 图像分析 四组动物的组间差异有非常显著性意义 ($P < 0.01$)。正常组 TGF- β 1 的表达较其他三组有显著性或非常显著性意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 治疗组的表达较模型组、对照组明显增强 ($P < 0.01$), 而模型组与对照组间的差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 四组大鼠软骨细胞 TGF- β 1 阳性表达的 IOD 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IOD 值
正常组	10	1596.09 \pm 563.10
模型组	10	4020.86 \pm 906.26 ^a
治疗组	10	19120.10 \pm 7648.92 ^{b,c,d}
对照组	10	5365.14 \pm 1480.07 ^b

注: a. 与正常组比较, $P < 0.05$; b. 与正常组比较, $P < 0.01$; c. 与模型组比较, $P < 0.01$; d. 与对照组比较, $P < 0.01$ 。

3 讨论

3.1 OA 动物模型的制备 OA 多累及负重关节和手部小关节, 临床以膝关节炎最为常见, 女性多于男性。一般认为, 本病的发病与增龄、外伤、体力劳动、运动和过度使用、肥胖、免疫及遗传有关。研究证实, 软骨表面损害多集中于负重区, 异常高应力是导致关节软骨退变的重要因素之一^[3,4]。在形态学方面, 鼠软骨细胞凋亡方式与人类软骨细胞凋亡相似, 不同于其他细胞的典型凋亡方式^[5]。故本研究选用雌性大鼠单侧跟腱切除法制备膝 OA 动物模型。一侧后肢跟腱切除后, 对侧后肢负重代偿性增加, 膝关节应力异常增高。造模术后 1 周软骨表面光整, 无凹陷无裂隙。术后 2 周软骨表面出现凹陷和小裂隙, 胶原纤维裸露。术后 1 个月, 软骨表面的许多部位出现裂隙, 部分裂隙较宽大, 纵横交错^[1], 属 OA 中期病理改变。跟腱切除法属 OA 的关节外诱发模型, 采用关节外手术途径, 膝关节的结构和稳定性未遭破坏, 无创伤性滑膜炎干扰, 较切断膝关节交叉韧带、半月板、关节内注射药物等关节内干预法更接近人类 OA 的形成过程, 且方法简单、创伤小、成功率高^[6]。该法只改变后肢的负重, 不影响肢体活动, 将负重和活动两因素分开, 有助于着重研究负重增加对关节软骨的影响^[1]。

3.2 OA 软骨 TGF- β 1 表达的意义 近期的研究显示, 多种细胞因子、蛋白酶在 OA 的软骨退变降解和修复过程中起着重要

作用, 其中 TGF- β 是参与软骨保护的重要因子。

TGF- β 是一组对细胞的生长、分化、免疫和凋亡都有重要调节作用的蛋白多肽, 在哺乳动物体内至少已发现 4 个亚型, 目前研究得最多的是 TGF- β 1, 因其与组织修复密切相关^[7,8]。软骨退变的主要表现是胶原网架破坏和蛋白多糖降解。正常软骨中软骨细胞维持正常的新陈代谢, 仅有极少量 TGF- β 1 的表达; 当软骨发生退变降解时, 刺激 TGF- β 1 的合成与分泌, 使其在软骨中广泛表达, 能增加胶原和蛋白多糖的合成^[9], 在 OA 软骨修复中起重要作用。因此, 软骨组织中 TGF- β 1 的表达可间接反映软骨的修复情况。

3.3 电针对 OA 软骨 TGF- β 1 表达的影响 OA 属中医“痹症”范畴, 针灸治疗痹症历史悠久, 具有安全、无毒副作用、经济等优势, 在缓解临床症状方面效果明显。本实验针灸处方选用膝前、后三里穴, 并加以电刺激。膝前在人体相当于犊鼻穴, 是根据近部取穴原则选取, 可使针体直接刺入关节腔, 作用于软骨表面; 后三里相当于人体足三里穴, 旨在激发阳明经的调节作用, 补益气血; 将微量电流通过针体导入关节腔, 可加强针感, 消炎止痛。

本实验中正常组软骨 TGF- β 1 偶见弱阳性表达, 模型组有少量棕色阳性染色颗粒, 表明受损的关节软骨具有一定的修复能力, 能代偿性合成和分泌 TGF- β 1, 但数量较少, 提示其自然修复能力有限; 而治疗组则有大量深棕色强阳性染色颗粒, 表明电针刺激可促使 TGF- β 1 大量合成和分泌, 进而促进软骨修复的进程。为明确电针促进 OA 软骨修复是通过局部抑或全身作用实现, 本实验特设电针对照组, 取手术侧与治疗组同名的穴位, 结果对照组 TGF- β 1 的表达与模型组无差异, 而治疗组则较两者均明显增强, 表明电针促进 OA 软骨修复主要是通过局部作用实现, 提示促进 OA 软骨修复的针灸处方应以遵循近部取穴原则为主。本实验在造模后第 5 周开始电针干预, 是对 OA 中期病变治疗效果的初步机理探讨。本研究结果显示, 局部电针刺激对受损关节软骨的修复具有一定的促进作用, 可能是治疗 OA 的有效方法, 更多的作用机理以及对晚期病变的影响有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 顾延, 戴冠戎, 裴世静, 等. 异常高应力导致关节软骨退变机理的形态学研究[J]. 中华外科杂志, 1995, 33(10): 597—560.
- [2] 林文注. 实验针灸学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1994.
- [3] Marks R. Obesity profiles with knee osteoarthritis: correlation with pain, disability, disease progression[J]. Obesity, 2007, 15(7): 1867—1874.
- [4] Bierma-Zeinstra SM, Koes BW. Risk factors and prognostic factors of hip and knee osteoarthritis[J]. Nature Clin Practice Rheumatol, 2007, 3(2): 78—85.
- [5] Kouri JB, Aguilera J, Reyes J, et al. Apoptotic chondrocytes from osteoarthritis human articular cartilage and the abnormal calcification of the subchondral bone[J]. Rheumatol, 2000, 27: 1005—1019.
- [6] 欧云生, 安洪. 鼠骨关节炎动物模型建立的现状[J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(1): 41—44.
- [7] 杨梅, 胡治平. TGF- β 1、Caspase-3 与脑损伤缺血再灌注的相互关系[J]. 医学临床研究, 2006, 23(2): 270—273.
- [8] 宋雅芳, 洪嘉禾, 徐列明. 中药对 TGF- β 1 调控作用的研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2004, 38(1): 61—64.
- [9] 黄涛, 吕刚. 转化生长因子 β 与关节软骨损伤的组织工程化修复[J]. 中国临床康复, 2005, 9(30): 219—221.

(收稿日期: 2007-08-23 修回日期: 2007-12-19)



图5.1 正常组软骨细胞偶见浅棕色弱阳性染色



图5.2 模型组软骨细胞有少量棕色阳性染色颗粒

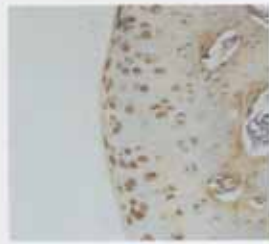


图5.3 治疗组软骨细胞有大量深棕色强阳性染色颗粒

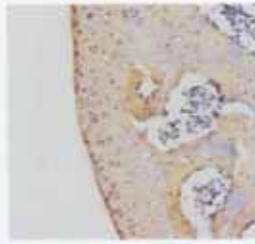


图5.4 对照组软骨细胞有部分棕色阳性染色颗粒

图1.1—1.2 正文见P321—322

图4.1—4.2 正文见P341—342

图2.1—2.4 正文见P326—328

图5.1—5.4 正文见P345—346

图3.1—3.6 正文见P338—340