

艾灸对类风湿关节炎模型大鼠滑膜细胞凋亡的影响^{*}

彭传玉, 胡 玲[△], 吴子建, 蔡荣林, 何 璐

(安徽中医学院, 安徽合肥 230038)

摘要: 目的 观察艾灸对类风湿关节炎模型大鼠关节肿胀度和滑膜细胞凋亡的影响。方法 将 80 只雄性 Wistar 大鼠随机分为正常组、模型组、艾灸组、艾油组, 每组 20 只。除正常组外, 其余 3 组大鼠建立类风湿关节炎模型。造模成功后, 正常组和模型组不予治疗; 艾灸组予艾条悬灸; 艾油组予艾叶精油涂抹。采用 TUNEL 法观察艾灸对类风湿关节炎模型大鼠滑膜细胞凋亡的影响以及大鼠关节肿胀度的变化。结果 模型组大鼠关节肿胀度及滑膜细胞凋亡与正常组大鼠比较有统计学意义($P < 0.01$)。经治疗后, 艾灸组、艾油组大鼠关节肿胀度和滑膜细胞凋亡指数较模型组大鼠均有所改善, 其中, 艾灸组大鼠与模型组大鼠比较关节肿胀度和滑膜细胞凋亡指数改善明显($P < 0.01$), 同时艾灸组也优于艾油组。结论 这些结果表明, 艾灸疗法能够减轻大鼠关节肿胀度, 并诱导滑膜细胞凋亡, 对类风湿关节炎有很好的治疗作用。

关键词: 类风湿关节炎; 艾灸; 细胞凋亡; 艾油

中图分类号: R245.81 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2013)06-0052-04

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是以慢性、对称性、多滑膜关节炎病变为主要临床表现的自身免疫性疾病。临床上运用灸法治疗类风湿性关节炎报道较多, 而且疗效显著^[1]。应用艾灸疗法治疗类风湿性关节炎能够改善症状, 控制病情, 减轻痛苦, 恢复关节功能, 有很好的前景^[2-4]。类风湿性关节炎的关节软骨和骨组织损害与滑膜细胞的过度增生活化和凋亡不足密切相关^[5]。近年来越来越多的研究表明细胞凋亡在自身免疫病的发病机制中起着重要作用^[6]。

本文通过建立大鼠类风湿关节炎模型, 观察艾灸对类风湿关节炎模型大鼠关节肿胀度及滑膜细胞凋亡的影响, 并为艾灸治疗 RA 发挥温通效应的作用机制提供可靠的理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

清洁级雄性大鼠, 体质量 180~200g, 月龄 3~4 月, 80 只, 由南京医科大学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(苏)2010-0004。

实验前将大鼠常规适应性喂养 1 周, 按照《卫生统计学》^[7]中的随机数字表随机抽取 20 只为正常组, 其余大鼠进行模型复制。造模成功的 60 只大鼠中按随机数字表随机分为 3 组, 即模型组、艾灸组和艾油组。

正常组和模型组大鼠不予任何治疗处理。其余 2 组大鼠, 均参考《实验针灸学》^[8]“大鼠穴位图谱”选取双侧“足三里”和“肾俞”。剪去穴区被毛, 标记颜色。造模成功后连续治疗 15d, 每日治疗 1 次, “足三里”和“肾俞”交替使用。艾灸组大鼠予直径 5mm 的香烟型艾条悬灸(距穴区 2cm), 每穴 20min; 艾油组大鼠予艾叶精油穴位涂抹。整个实验过程均按照实验动物伦理学的规定进行。

1.2 材料与仪器

弗氏完全佐剂(美国 SIGMA 公司, 068K8761); 香烟型纯艾条(南阳市卧龙汉医艾绒厂, 061205); 艾叶精油(南阳市卧龙汉医艾绒厂, 专利号: 200830080127.4); 细胞凋亡试剂盒(In Situ Death Detection Kit, POD 货号: 11684817910)

^{*} 基金项目: 安徽省中医药大学青年科学研究基金(NO:2013qn015); 国家 973 计划(NO:2009CB522905); 国家中医药管理局重点学科——针灸学科开放基金项目(NO:2011zjxk012)

收稿日期: 2013-10-23 修回日期: 2013-11-25

作者简介: 彭传玉(1984~), 女, 安徽阜阳人, 助教, 研究方向: 腧穴作用与艾灸。

[△]通信作者: 胡玲, E-mail: hulingtem@126.com

自制铝合金-玻璃造模箱:1.2m×1.0m×0.8m;手掌型离心机 LX-100 (海门市麒麟医用仪器厂);漩涡混合器 QT-1 (上海琪特分析仪器有限公司);荧光显微镜-Nikon80(新飞达光学仪器公司);YLS-7C 足趾容积测量仪(山东省医学科学院设备站)

1.3 模型复制方法

本实验采用“病证结合”的造模方法,即用风、寒、湿环境+生物因子复合造模方法^[9]。将大鼠放置在自制铝合金-玻璃造模箱内,超声雾化器控制箱内湿度,加大量冰块,使箱内环境温度控制在 $6\pm 2^{\circ}\text{C}$,湿度 80%~90%,电风扇风力定于高档,时间连续 12h。所有需要造模的大鼠均放入上述风、寒、湿环境中 20d(12h/d)(20:00~8:00)。第 21 天用 75% 酒精消毒大鼠左后足跖部,然后注射弗氏完全佐剂 0.15mL/只。观察 3d,以 24h 出现足踝部急性炎症肿胀,48h 后前肢或对侧肢体甚至耳、尾部红肿或出现炎性结节为造模成功。

1.4 取材方法

实验第 39d,断头处死各组大鼠。仰位固定,沿后肢膝关节正中纵行切外皮肤直至暴露以膝关节为中心约 3cm×3cm 的区域,以眼科镊提起髌骨。沿髌骨上沿约 0.3cm~0.4cm 处向下切割直至股骨,再分别沿髌骨两侧向下分离至胫骨,即打开了膝关节腔,可见由髌骨向下延续有一层平滑光亮呈浅淡黄色的滑膜组织。用眼科直镊钝性分离关节囊的滑膜层和纤维层,完整剥离滑膜组织,最后以眼科镊轻轻夹住其中央,完整剪下滑膜组织。

1.5 观察和检测指标

分别在模型复制前(实验前)、注射弗氏完全佐剂后 3d(实验第 23 天)、治疗 15d(实验第 38 天),使用 YLS-7C 足趾容积测量仪测定每组大鼠的左足趾容积,测 3 次取其平均值。

采用 TUNEL 法,即末端脱氧核苷酸转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase,TdT)介导的生物素 dUTP 缺口末端标记法,检测滑膜细胞凋亡。主要步骤详见参考文献^[10]。样片封固后,显微镜下观察、拍照并计数凋亡细胞数目,计算凋亡指数:即在 400 倍光镜下,每张切片计数 10 个视野,每个视野计数 50 个细胞,凋亡指数=凋亡阳性细胞数/总计数的细胞数×100%。

2 统计学处理

统计结果均用($\bar{x}\pm s$)表示,用 SPSS13.0 统计软

件进行数据分析。各组间均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间均数的两两比较采用最小显著法(LSD)法。其中, $P<0.05$ 为组间有显著性差异, $P<0.01$ 为组间有非常显著性差异。

3 结果

3.1 不同疗法对类风湿关节炎模型大鼠关节肿胀度的影响

在模型复制前,各组大鼠左后肢足趾容积基本一致,各组之间无明显差异($P>0.05$)。注射完全弗氏完全佐剂 3d 后,各组造模大鼠足跖与踝部出现明显的急性炎症红肿,足跖容积较正常组大鼠明显增加($P<0.01$),表明造模成功。经过 15d 治疗后,与模型组大鼠相比,艾灸组大鼠肿胀度有所改善($P<0.01$),艾油组大鼠与模型组大鼠相比关节肿胀度无明显变化($P>0.05$);艾灸组大鼠的关节肿胀度要明显优于艾油组($P<0.01$)。提示:艾灸能改善 RA 大鼠的局部肿胀,使足跖容积值减小,并且艾灸消肿的效果则远远优于单纯艾油涂抹的治疗效果。见表 1。

表 1 各组大鼠足趾容积的比较($\bar{x}\pm s$, mL)

组别	例数	足趾容积/mL		
		实验前	注射后 3d	治疗 15d
正常组	15	1.08±0.53	1.21±0.67 ^{△△}	1.22±0.48 ^{△△▲}
模型组	15	1.06±0.66	3.64±0.52	3.62±0.73
艾灸组	15	1.05±0.56	3.60±0.43	2.35±0.49 [△]
艾油组	15	1.06±0.61	3.63±0.47	3.51±0.48 [▲]

注:与模型组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$;与艾灸组比较,[▲] $P<0.05$,^{▲▲} $P<0.01$

3.2 不同疗法对类风湿关节炎模型大鼠滑膜细胞凋亡的影响

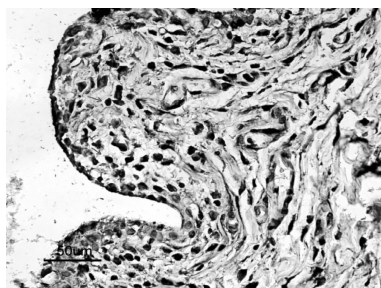
TUNEL 染色法可以准确定位凋亡的细胞,凋亡细胞被特异性染成棕黄色或棕褐色,细胞核中出现棕黄色或棕褐色颗粒者为阳性细胞,即凋亡细胞。计数结果显示,模型组大鼠滑膜细胞凋亡指数与正常组比较有统计学意义($P<0.01$)。经 15d 治疗后,艾灸组、艾油组大鼠滑膜细胞凋亡指数较模型组均有所提高,其中,艾灸组大鼠滑膜细胞凋亡指数也高于艾油组($P<0.05$)。提示艾灸能够改善类风湿关节炎模型大鼠滑膜细胞凋亡指数,艾灸组的治疗效果优于艾油组,进一步提示艾灸中的热刺激可能是其产生疗效的主要原因(见表 2,图 1)。

表 2 各组大鼠膝关节滑膜细胞凋亡率比较($\bar{x} \pm s$)

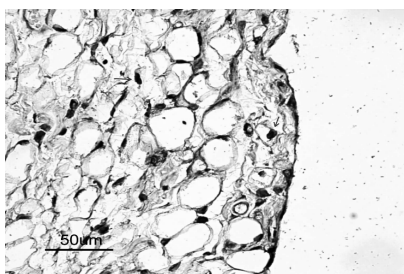
组别	例数	阳性细胞率
正常组	20	0.551±0.042 ^{△△}
模型组	20	0.278±0.054
艾灸组	20	0.498±0.035 ^{△△}
艾油组	20	0.374±0.028 ^{△△}

注:与模型组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$;与艾灸组比较,[▲] $P<0.05$,^{▲▲} $P<0.01$

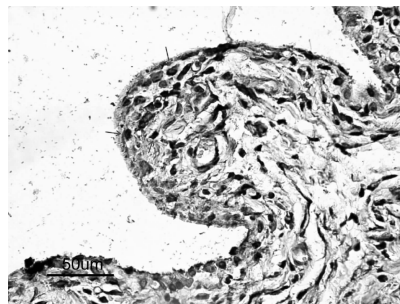
正常组大鼠滑膜细胞凋亡($n=20$)细胞核出现棕黄色或棕褐色,滑膜细胞凋亡指数高于其它治疗组



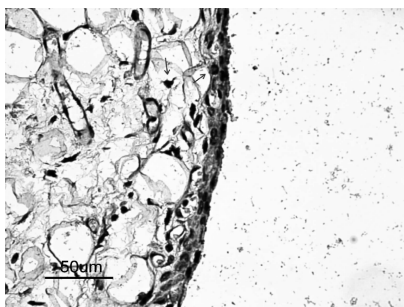
模型组大鼠滑膜细胞凋亡($n=20$)细胞核呈棕黄色,滑膜细胞凋亡数量最少



艾灸组大鼠滑膜细胞凋亡($n=20$)细胞核呈棕黄色或棕褐色,细胞凋亡数量高于艾油组



艾油组大鼠滑膜细胞凋亡($n=20$)细胞核呈棕黄色,滑膜细胞凋亡数量低于艾灸组



(TUNEL 法, $\times 400$)

图 1 各组类风湿关节炎大鼠滑膜细胞凋亡

4 讨论

类风湿关节炎属于中医“痹症”的范畴,该病好发于手、腕、足等小关节,反复发作,致残率高,给患者造成长期的折磨和巨大的痛苦。RA 的病理特征主要表现为滑膜细胞的增殖与炎性细胞的浸润,导致滑膜增厚、骨与软骨组织的受损,最后导致关节的破坏。

目前对滑膜增生的确切原因还不清楚,但这些细胞的积累肯定部分与细胞凋亡抵抗或缺陷有关^[11]。细胞凋亡是机体主动清除多余细胞的正常生理现象,滑膜细胞的异常增生及细胞凋亡的减少与 RA 密切相关。正常情况下,细胞增殖与凋亡之间保持一种动态平衡,而炎症反应可能引起细胞凋亡动力学的改变。类风湿关节炎滑膜细胞凋亡机制障碍,导致滑膜组织增殖,是类风湿关节炎的重要病理改变,特别是对 RA 持续进展性破坏过程中的自身免疫反应起着促进作用。

艾灸治疗类风湿关节炎具有良好的疗效,艾灸可以调整脏腑机能,促进新陈代谢,增强免疫功能,尤其在治疗慢性病、疑难病及预防保健方面具有显著优势^[12]。前期研究已证实,艾灸足三里、肾俞能抗炎消肿止痛,减轻关节的肿胀,减少血清中肿瘤坏死因子,纠正机体免疫紊乱,调整自由基代谢失衡,改善局部滑膜细胞超微结构,减轻炎症反应^[13-17]。现代研究发现,灸疗的作用是温热作用、药物作用与腧穴的特殊作用相结合而产生的一种综合效应^[18-19]。

在本实验中选用艾灸“肾俞”、“足三里”穴位,二穴相配,以后天补先天,先天生后天,相互滋生,从而达到驱邪扶正之功,借其传导艾灸的温经通络效应,使体内的阳气从内而生,达到行气活血,散寒除湿的功效。艾灸的温热刺激,直接或间接的作用于人体体表的特定部位,并通过经络等作用,调整脏腑功能,达到预防和治疗疾病的目的。

本实验结果发现,模型组大鼠关节肿胀明显以及滑膜细胞凋亡明显减少,与正常组比较有显著性差异,说明其符合类风湿关节炎病理特点,提示滑膜细胞的凋亡障碍可能是导致滑膜增厚的原因之一,经 15d 治疗后,艾灸组、艾油组大鼠关节肿胀和滑膜细胞凋亡指数较模型组大鼠均有所改善,其中,艾灸组大鼠关节肿胀程度和滑膜细胞凋亡指数明显优于艾油组。结果表明艾灸不仅能够改善类风湿关节炎模型大鼠的症状,而且促进滑膜细胞的调

亡。本实验研究表明艾灸治疗类风湿关节炎具有良好的疗效,艾灸能够减轻关节肿胀度,促进滑膜细胞的凋亡,对 RA 滑膜细胞功能具有良性调节作用,从而提示艾灸对类风湿关节炎大鼠有明显是改善作用。同时艾灸治疗类风湿关节炎发挥疗效的作用机制还需进一步探讨,艾灸的温热刺激是否是其产生疗效的主要原因仍需进一步证实。

参考文献

- [1] 蔡荣林,胡玲,宋小鸽,等. 艾灸治疗关节炎的临床与实验研究概况[J]. 中医药临床杂志,2008,20(4):427-429.
- [2] 何悦硕,梁维超,傅春文. 麦粒灸治疗类风湿性关节炎 40 例[J]. 中国针灸,2008,28(4):243.
- [3] 龚福英. 隔药饼灸治疗类风湿性关节炎 33 例 [J]. 针灸临床杂志,2007,23(5):42.
- [4] 丁放. 单纯灸法治疗类风湿关节炎 [J]. 针灸临床杂志,2007,23(10):40-41.
- [5] 施桂英,栗占国,袁国华. 关节炎概要[M]. 北京:中国医药科技出版社,2005:300-332.
- [6] 张学军,郭礼和. 细胞凋亡失调与疾病关系的研究[J]. 中华医学杂志,1998,78(8):565-567.
- [7] 倪宗瓚. 卫生统计学 [M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2002:267.
- [8] 林文注,王佩. 实验针灸学[M]. 上海:上海科技出版社,1999:277-282.
- [9] 胡玲,Dirckinck-Holmfeld Lars,宋小鸽,等. Effect of Moxibustion on IL-1 β and IL-2 in rat Models of Rheumatoid Arthritis [J]. Journal of Acupuncture and Tuina Science, 2010,8(3):149-153.
- [10] 姜泊,谭晓华,许岸高,等. 细胞凋亡基础与临床[M]. 北京:人民军医出版社,1999,255-275.
- [11] 刘莉莉. 类风湿关节炎细胞凋亡分子的研究进展 [J]. 上海免疫学杂志,2003:142-144.
- [12] Nakazawa M, Nakajima T, Nishioka K. Possible pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. Nippon Rinsho, 2001,59(1):147-151.
- [13] 唐照亮,宋小鸽,章复清,等. 艾灸治疗类风湿性关节炎抗炎免疫作用机理的研究 [J]. 针刺研究,2003,28(4):292-298.
- [14] 唐照亮,宋小鸽,章复清,等. 艾灸对关节炎大鼠抗炎消肿作用及细胞因子、自由基影响[J]. 安徽中医学院学报,2001,20(5):34-36.
- [15] 宋小鸽,唐照亮,侯正明,等. 艾灸对实验炎症大鼠抗炎作用和红细胞免疫功能的影响 [J]. 中国中医药信息杂志,1999,6(12):31.
- [16] 罗磊,胡玲,宋小鸽,等. 艾灸对类风湿关节炎滑膜细胞超微结构的影响[J]. 针刺研究,2011,4(2):105-109.
- [17] 罗磊,胡玲,宋小鸽,等. 艾灸对类风湿关节炎模型大鼠趾关节中细胞因子的影响[J]. 环球中医药,2011,11(4):416-419.
- [18] 吴焕淦,刘立公,陈跃来,等. 灸法的继承与创新[J]. 上海针灸杂志,2007,26(12):40-41.
- [19] 马本绪. 艾灸对机体免疫调节作用概述[J]. 江苏中医药,2008,40(1):86-87.

(编辑:迟越)

Effects of the Moxibustion on Apoptosis of Rat Synovial Cells of Rheumatoid Arthritis

PENG Chuan-yu, HU Ling, WU Zi-jian, CAI Rong-lin

(Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei Anhui 230038, China)

ABSTRACT: **Objective** Observation on moxibustion on apoptosis of rat synovial cells of rheumatoid arthritis effects, and moxibustion heat stimulating effect on their efficacy. **Methods** 80 male Wistar rats were randomly assigned to groups, model groups, and moxibustion set correctly, HIV-oil groups, each group of 20. Apart from the normal group, and the remaining 3 Group established rheumatoid arthritis rats model. Modeled after the success of group and model groups are not treated properly. Moxa moxibustion group suspended moxibustion; oil group to Folium artemisiae argyi essential oil from Artemisia argyi with smudge. Using TUNEL method moxibustion on apoptosis of rat synovial cells of rheumatoid arthritis effects. **Results** Synovial apoptosis in model groups compared statistically with the normal group ($P < 0.01$). After treatment, moxibustion group, art-oil group synovial apoptosis index of model groups is increased, where the moxibustion group compared with the model groups synovial apoptosis index increased significantly ($P < 0.01$), while oil group than HIV. HIV-oil group compared with the model group there are also significant differences ($P < 0.05$). **Conclusion** Moxibustion therapy can induce apoptosis of synovial cells, has a good therapeutic effect on rheumatoid arthritis, while prompting moxibustion heat stimuli might be the main reason for the effect.

KEY WORDS: rheumatoid arthritis; moxibustion; cell apoptosis; AI oil