

• 针灸研究 •

刺山柑结合艾灸对佐剂型关节炎大鼠 Treg 和 Th17 相关细胞因子的影响*

霍新慧, 毛丽旦·阿扎提, 李 盼, 马 超, 曹 月

(新疆医科大学中医学院, 新疆 乌鲁木齐 830054)

摘要: **目的** 观察刺山柑、艾灸和二者联合治疗对佐剂型关节炎大鼠血清 IL-17、IL-6、TGF- β 、IL-10 和 IL-23 含量的影响, 探讨其调节 Th17 和 Treg 相关细胞因子的作用机制。 **方法** 60 只大鼠随机分为正常组、模型组、阳性药组、刺山柑组、艾灸组和综合组, 于大鼠足跖皮下注射 0.1 mL 弗氏完全佐剂建立 AA 模型。造模成功后, 阳性药组以甲氨蝶呤灌胃, 刺山柑组以刺山柑外敷, 艾灸组进行艾条温和灸肾俞、足三里, 综合组进行联合治疗, 各组均治疗 3 疗程(21 d)。分别在每 1 个疗程结束后观察大鼠 AI 指数评分和足爪容积, 并用 ELISA 检测大鼠血清 IL-17、IL-6、TGF- β 、IL-10 和 IL-23 含量。 **结果** 造模后, 大鼠关节肿胀明显, Th17/Treg 失衡。经治疗后, 各组大鼠足跖炎症情况均有明显改善, 尤其是综合组 7 d 显著疗效。各组干预治疗均能逆转 IL-17、IL-6 和 IL-10 水平 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$), 仅有刺山柑组和综合组能显著降低 IL-23 水平 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$), 各组 TGF- β 水平无显著改变。 **结论** 刺山柑组和综合组消炎作用迅速, 刺山柑、艾灸和综合治疗的方法均能使免疫细胞 Th17/Treg 达到动态平衡, 其中刺山柑和综合治疗更具优势。

关键词: 刺山柑; 艾灸; 佐剂型关节炎; Th17/Treg

中图分类号: R245.81; R29 文献标志码: A 文章编号: 1000-2723(2018)06-0058-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2018.06.012

Effects of Capparis Spinosa L Combined with Moxibustion on Treg and Th17-related Cytokines in Rats with Adjuvant Arthritis

HUO Xinhui, MAURIDAN Azati, LI Pan, MA Chao, CAO Yue

(College of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

ABSTRACT: **Objective** To observe the effects of Capparis Spinosa L, moxibustion and their combination on serum levels of IL-17, IL-6, TGF- β , IL-10 and IL-23 in AA rats, and to explore the mechanism of their regulation of Th17 and Treg-related cytokines. **Methods** Sixty rats were randomly divided into normal group, model group, positive drug group, Capparis Spinosa L group, moxibustion group and comprehensive group. AA model was established by subcutaneous injection of 0.1 mL Freund's complete adjuvant into rat plantar. After the successful establishment of the model, the positive drug group was given methotrexate by gastric lavage, the prickly citrus group was given prickly citrus external application, the moxibustion group was given moxibustion with moxibustion sticks for mild moxibustion of Shenshu and Zusanli, and the comprehensive group was given combined treatment. Each group was treated for 3 courses (21 days). AI index score and foot volume were observed at the end of each course. Serum levels of IL-17, IL-6, TGF- β , IL-10 and IL-23 were measured by ELISA. **Results** After the establishment of the model, the joint swelling was obvious and Th17/Treg was imbalance. After treatment, the inflammation of rat's plantar paw in each group was significantly improved, especially in comprehensive group on 7 days. Intervention treatment could reverse the levels of IL-17, IL-6 and IL-10 in all groups ($P<0.01$ or $P<0.05$). Only Capparis Spinosa L group and comprehensive group could significantly reduce the levels of IL-23 ($P<0.01$ or $P<0.05$).

收稿日期: 2018-12-08

* 基金项目: 国家自然科学基金地区项目(81860890);新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目(2017D01C210);新疆维吾尔自治区高校科研基金(XJEDU2017M018)

第一作者简介: 霍新慧(1981-),女,博士,副教授,研究方向:灸法治疗免疫系统疾病的临床与机制研、民族药的应用研究。E-mail:xjhuoxinhui@126.com

There was no significant change in the levels of TGF- β in all groups. **Conclusion** The anti-inflammatory effect of Capparis Spinosa L group and comprehensive group is rapid. Th17/Treg of immune cells can be dynamically balanced by the methods of Capparis Spinosa L, moxibustion and comprehensive treatment, among which Capparis Spinosa L and comprehensive treatment are more advantageous.

KEY WORDS: Capparis Spinosa L; moxibustion; adjuvant arthritis; Th17/Treg

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的病理特征主要是对称性和侵蚀性的滑膜炎,主要的临床表现为关节的肿胀和疼痛,并可导致关节畸形和功能下降而致残^[1]。由于 RA 的发病机制较为复杂,病情反复且缠绵不愈,所以尽管目前西医、中医有多种治疗手段,均有一定疗效,但并不够理想^[2],多种方法的综合治疗常常取得更佳的疗效。

刺山柑(Capparis Spinosa L)在新疆地区民间应用具有悠久的历史^[3],在 RA 的治疗方面,采用外敷的方法疗效显著^[4]。灸法具有温通经络、扶正祛邪、活血通痹的作用对 RA 疗效显著^[5]。

本研究从现代医学的角度,探讨民族医学多途径的综合治疗方案,对 RA 免疫平衡相关细胞因子的影响及其可能的机制,为刺山柑和灸法治疗 RA 提供新的思路和实验数据。

1 材料与方法

1.1 动物 SPF 级 Wistar 大鼠 60 只,体质量(180±20)g,雌雄各半,购于新疆医科大学动物中心,动物合格证号:SYXK(新)2016-0002,动物标准住宿条件为温度(22±2)℃,湿度 55%~60%,明暗交替各 12 h,自由饮食、摄水,屏障环境质量合格证:65000700000749。

1.2 试剂 完全弗氏佐剂(购自 Sigma 公司),甲氨蝶呤片(规格 2.5 mg/片,购自上海医药有限公司信谊制药厂),刺山柑(新疆新特药有限公司,新疆医科大学中医学院中药系药物资源教研室鉴定)。IL-17、IL-6、TGF- β 、IL-10、和 IL-23 ELISA 检测试剂盒均购于美国 Bim 公司。

1.3 分组、造模和干预 60 只大鼠适应性喂养后采用随机数字表法选取 10 只为正常组,其余大鼠进行建立佐剂型关节炎大鼠(adjuvant arthritis, AA)模型:左后足跖底部皮肤常规消毒后皮内注射完全弗氏佐剂(0.1 mL/只),造模 3 d 后采用关节炎指数(arthritis

index, AI)评分进行造模成功评定。模型成功判定标准:无关节红肿计 0 分;足小趾关节红肿计 1 分;趾关节和足趾肿胀计 2 分;踝关节以下均红肿计 3 分;包括踝关节在内的全部足爪的肿胀计 4 分。AI 值即每只大鼠四肢评分分数之和。评分达到 6 分以上即为造模成功。将造模成功的大鼠再随机分为模型组、阳性药组、刺山柑组、艾灸组和综合组,每组 10 只。

正常组和模型组每日予以自制鼠架固定 20 min;阳性药组按照 0.1 mg/100 g 的剂量进行甲氨蝶呤灌胃,1 次/3 d(每周 2 次);刺山柑组将刺山柑果实打粉的粗提取物,与 45°白酒和蛋清(1:2)混合均匀,适量外敷于大鼠左后足踝,纱布包裹并固定,敷药 1 h/d;艾灸组选取肾俞、足三里(具体定位参照《实验针灸学》^[6]),用自制鼠架固定大鼠后,选用温灸纯艾条(规格 4 mm×120 mm)做艾条温和悬灸治疗:用悬灸支架固定艾条(2 个腧穴同时施灸),每穴 20 min,左右侧腧穴交替进行;综合组进行艾灸治疗后,再予以刺山柑外敷治疗。

各组干预均是 6 d 为 1 疗程,共治疗 18 d,疗程间休 1 d。

1.4 观察指标

1.4.1 AI 指数 造模后 3 d,及每个疗程治疗结束后进行关节炎症 AI 评分,具体评分方法同前。

1.4.2 足爪容积 造模和每个疗程治疗结束后采用排水法测量足爪容积:在大鼠踝关节上方约 1 cm 处画圈做为标记,将水注满 10 mL 玻璃刻度管,保持大鼠足部垂直插入水中至标记处后取出,动作尽量保持轻柔,再用装满水的 5 mL 注射器加水至原有水面高度,记录注射器中剩余水量,其差值即为足爪所排出的水量,每次由专人进行测量,每只足爪测量 2 次取平均值以尽量减小误差。

1.4.3 ELISA 法检测血清细胞因子含量 末次给药、治疗和行为学测定后禁食禁水 12 h,腹腔注射 1%戊

巴比妥钠(50 mg/kg)进行麻醉,腹主动脉采血,真空管收集全血标本,室温放置 1 h 后离心 15 min(3 000 r/min),取上清液-20 ℃保存。严格按试剂盒说明操作采用 ELISA 法检测大鼠血清 IL-17、IL-6、TGF- β 、IL-10、和 IL-23 的含量水平。

1.5 统计学方法 数据以均值士标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS17.0 软件进行数据的统计分析,各组间均数的比较采用单因素方差分析,方差齐时两两比较采用 LSD 法,若不齐时采用 Dunnett T3 法进行比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对大鼠一般情况的影响 AA 大鼠造模后表现为精神倦怠,不喜活动,进食较少,体重增长缓慢,被毛无光泽、暗淡,下肢足跖局部肿胀明显。各组经干预治疗后的大鼠饮食正常,体重增加明显,精神和活动度较模型组均有不同程度的改善。

2.2 对大鼠 AI 指数和足爪容积的影响 造模致炎

后,大鼠注射侧下肢可见严重红肿,足跖增厚,并继发可见四肢关节部位出现红肿,干预后各组的 AI 指数评分均明显下降,并随着治疗周期有继续下降的趋势,结果见表 1。

表 1 各组大鼠不同时间点 AI 指数评分比较($\bar{x} \pm s$, 分)

组别	n	造模后	7 d	14 d	21 d
模型组	10	7.40 $\pm$ 0.52	6.80 $\pm$ 0.42	5.20 $\pm$ 0.79	5.00 $\pm$ 1.15
阳性药组	10	7.40 $\pm$ 0.52	3.20 $\pm$ 0.42*	2.60 $\pm$ 1.20*	2.40 $\pm$ 1.25*
刺山柑组	10	7.50 $\pm$ 0.53	3.00 $\pm$ 0.48*	2.30 $\pm$ 0.82*	2.10 $\pm$ 1.10*
艾灸组	10	7.40 $\pm$ 0.52	2.60 $\pm$ 0.52*	2.60 $\pm$ 2.06*	2.40 $\pm$ 1.97*
综合组	10	7.60 $\pm$ 0.70	2.70 $\pm$ 0.74*	2.20 $\pm$ 0.52*	2.10 $\pm$ 0.92*

注:与模型组比较,* $P < 0.01$

从足爪容积分析,与模型组比较,第 7 天:综合组与模型组相比显著降低($P < 0.05$),起效迅速,优势明显;第 14 天:阳性药组也显著降低($P < 0.05$);第 21 天:各治疗组均比模型组显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),结果见表 2。

表 2 各组大鼠不同时间点足爪容积比较($\bar{x} \pm s$, mL)

组别	n	造模后	7 d	14 d	21 d
正常组	10	2.80 $\pm$ 0.46	2.55 $\pm$ 0.74	2.67 $\pm$ 0.63	3.37 $\pm$ 0.39
模型组	10	3.46 $\pm$ 0.71**	3.38 $\pm$ 0.69**	3.50 $\pm$ 0.71**	4.04 $\pm$ 1.11**
阳性药组	10	3.32 $\pm$ 0.50**	3.09 $\pm$ 0.36*	2.89 $\pm$ 0.50 $\blacktriangle$	3.42 $\pm$ 0.56 $\blacktriangle$
刺山柑组	10	3.47 $\pm$ 0.38**	2.80 $\pm$ 0.52 $\blacktriangle$	2.92 $\pm$ 0.59 $\blacktriangle$	3.32 $\pm$ 0.55 $\blacktriangle\blacktriangle$
艾灸组	10	3.37 $\pm$ 0.13**	3.12 $\pm$ 0.60*	3.00 $\pm$ 0.89	3.49 $\pm$ 0.44 $\blacktriangle\blacktriangle$
综合组	10	3.48 $\pm$ 0.40**	2.69 $\pm$ 0.37 $\blacktriangle$	2.70 $\pm$ 0.59 $\blacktriangle\blacktriangle$	3.31 $\pm$ 0.41 $\blacktriangle\blacktriangle$

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$

2.3 对大鼠血清 IL-17、IL-6、TGF- β 、IL-10、和 IL-23 水平的影响 模型组大鼠血清 IL-17、IL-6、IL-23 显著升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),TGF- β 、IL-10 显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

阳性药组、刺山柑组、艾灸组和综合组都能显著

降低 IL-17 和 IL-6 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),升高 IL-10 水平($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);仅有刺山柑组和综合组能显著降低 IL-23 水平($P < 0.05$);各组的 TGF- β 水平与模型组相比无显著性差异,均低于正常组($P < 0.05$)。结果见表 3。

表 3 各组血清 IL-17、IL-6、TGF- β 、IL-10、和 IL-23 的比较($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	IL-17	IL-6	TGF- β	IL-10	IL-23
正常组	43.11 $\pm$ 4.50	121.80 $\pm$ 10.44	118.05 $\pm$ 10.46	199.21 $\pm$ 10.37	11.85 $\pm$ 2.64
模型组	69.52 $\pm$ 8.60**	187.59 $\pm$ 15.31**	92.83 $\pm$ 12.86*	124.55 $\pm$ 19.22**	15.25 $\pm$ 4.13*
阳性药组	48.52 $\pm$ 7.95 $\blacktriangle\blacktriangle$	159.06 $\pm$ 15.64 $\blacktriangle$	102.82 $\pm$ 10.73*	177.03 $\pm$ 11.75 $\blacktriangle\blacktriangle$	13.72 $\pm$ 6.24
刺山柑组	47.79 $\pm$ 7.04 $\blacktriangle\blacktriangle$	139.81 $\pm$ 14.27 $\blacktriangle\blacktriangle$	100.48 $\pm$ 17.38*	176.80 $\pm$ 17.37 $\blacktriangle\blacktriangle$	12.13 $\pm$ 4.26 $\blacktriangle$
艾灸组	50.65 $\pm$ 9.52 $\blacktriangle$	147.40 $\pm$ 18.67 $\blacktriangle\blacktriangle$	91.73 $\pm$ 10.18*	167.81 $\pm$ 19.31 $\blacktriangle\blacktriangle$	13.95 $\pm$ 3.58
综合组	48.63 $\pm$ 5.83 $\blacktriangle\blacktriangle$	140.93 $\pm$ 12.95 $\blacktriangle\blacktriangle$	97.28 $\pm$ 16.54*	186.62 $\pm$ 9.91 $\blacktriangle\blacktriangle$	12.25 $\pm$ 4.13 $\blacktriangle$

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$

3 讨论

由于新疆地区气候寒冷、干燥、昼夜温差大,因此新疆地区 RA 患者众多,尤其是中医寒湿痹阻证居多^[7]。正是由于这样的发病特点,新疆地区在治疗 RA 方面历史悠久,药材和方法独具特色,刺山柑作为新疆地区治疗 RA 的常用传统药物之一^[8],近年来越来越受到国内外研究者的关注^[9]。

刺山柑是一种食药两用草本中草药,属白菜花科山柑属植物,又名槌果藤、野西瓜、老鼠瓜等,我国主要分布于新疆、甘肃和西藏等地区,尤其是在沙漠分布较多的新疆地区资源丰富。刺山柑有较广泛的药学用途,如抗菌、消炎、抗氧化、抗过敏等^[10]。刺山柑果性温,有消肿、止痛、祛风、散寒的作用^[11-12],其可能的作用机制是免疫抑制^[13]、镇痛、抗炎和抑制软骨和骨破坏等作用等^[14]。

中医认为 RA 属“痹证”“顽痹”“历节风”“鹤膝风”等范畴,该病的发病是“正虚外感”,即正气不足和外感六淫互相作用的结果。艾灸通过对腧穴的温热作用,以起到激发经气、调节阴阳、温通经脉、祛风散寒的功效,在 RA 的治疗中疗效确切,独具优势^[15]。

本研究采用最常用于 RA 研究的动物模型之一——佐剂性大鼠关节炎模型^[16],研究已证实其临床表现、病理特征和免疫学改变与 RA 极为相似,病变稳定,造模重复性好,模型成功率高^[17]。

在 RA 的发病机制和病理变化中,免疫稳态的失衡,尤其是 CD4⁺ T 细胞亚群中辅助性 T 细胞(helper T cells, Th17)和调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)的失衡具有重要意义^[18]。RA 患者外周血中 Th17/Treg 比值明显升高,并且与疾病活动度相关^[19]。Th17 是促进自身免疫性疾病发生并介导促炎反应^[18],主要分泌炎症介质 IL-17。Th17 细胞的分化和存活过程大致分为诱导分化、扩增和存活三个阶段 JZ1,转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)和白介素-6(interleukin-6, IL-6)^[20]共同诱导启动诱导分化阶段,IL-23 主要是介导存活阶段,在 Th17 细胞分化功能维持阶段起主要作用。Treg 细胞在维持机体免疫内环境平衡中具有重要意义,所以被比喻为“免疫系统终极维和部队”^[21]。IL-10 是由 Treg 释放

的,具有发挥其抑制 T 细胞及抗原呈递细胞的功能。Th17 细胞与 Treg 细胞的分化呈互相抑制关系,二者共用了 TGF- β 这个细胞因子,TGF- β 既可影响 Th17 细胞分化,又参与调节 Treg 功能^[22]。

本实验中 AA 大鼠在干预治疗后病变情况均有改善,AI 指数评分均明显下降。足跖炎症情况在治疗 21 d 后均有明显改善,其中刺山柑组和综合组起效迅速,治疗 7 d 就明显消炎消肿,艾灸组次之,在 14 d 显效。

细胞因子的测定结果表明,模型组大鼠血清促炎因子 IL-17、致炎因子 IL-6,和主要对 Th17 细胞分化功能维持作用的 IL-23 显著升高,抑炎因子 IL-10 和 TGF- β 显著降低,Th17/Treg 失衡。各组干预治疗均能逆转 IL-17、IL-6 和 IL-10 水平。刺山柑组和综合组能显著降低 IL-23 水平,而阳性药组、艾灸组未能有显著改善。各治疗组均不能改变 TGF- β 水平,可能是由于 TGF- β 同时参与了 Th17 细胞与 Treg 细胞的分化,有待进一步深入研究。

综上,刺山柑、艾灸和综合治疗的方法均能降低 AA 大鼠促炎细胞因子水平,增加抗炎因子的分泌,使免疫细胞 Th17/Treg 达到动态平衡,其中刺山柑和综合治疗的方法在重建 Th17/Treg 平衡方面更具优势。

参考文献:

- [1] 黄耀连,罗桂青,李磊. 针灸治疗类风湿性关节炎的临床研究进展[J]. 环球中医药,2017,10(7):793-798.
- [2] 郭亚春,梁秀军,高亚贤,等. 中药薯蓣皂苷元对 CIA 大鼠滑膜组织 VEGF 及 AP-I 表达的影响 [J]. 世界科学技术-中医药现代化,2015(9):1801-1805.
- [3] 周海凤,乐心逸,王嫻嫻,等. 刺山柑果实精制提取物抗类风湿性关节炎的实验研究 [J]. 实验动物与比较医学,2018,38(3):227-230.
- [4] 周文涛,顾仁艳,王家平,等. 维药野西瓜对佐剂性关节炎小鼠治疗效果及机制研究[J]. 现代中西医结合杂志,2015(7):691-693.
- [5] 殷媛,陈天帷,张瑞,等. 艾灸对胶原诱导性关节炎大鼠血清白介素-17 和肿瘤坏死因子 α 含量的影响 [J]. 针刺研究,2017,42(2):149-152.
- [6] 郭义. 实验针灸学 [M]. 北京: 中国中医药出版社,2008: 415.

- [7] 陈慕芝,孙学斌,巴哈尔古丽·力提甫,等. 新疆地区维吾尔、哈萨克、汉族类风湿关节炎患者相关指标分析[J]. 新疆医科大学学报,2016,39(1):64-67.
- [8] 秦秀军,刘冲,岳娟,等. 维吾尔药刺山柑果风湿止痛贴的遗传毒性研究[J]. 毒理学杂志,2017(4):317-320.
- [9] 康小龙,何承辉,卢军,等. 刺山柑总生物碱对系统性硬皮病小鼠皮肤纤维化相关指标的影响 [J]. 重庆医学,2018,47(23):3032-3034.
- [10] 董壮,李冀. 尖叶假龙胆与秦艽配伍对类风湿性关节炎模型大鼠相关炎性因子的影响[J]. 中医药信息,2016,33(3):75-78.
- [11] 蒋思思,马文娜,路文杰,等. 维吾尔族药刺山柑果实抗炎活性部分的初步筛选 [J]. 中国实验方剂学杂志,2015(2):144-148.
- [12] 徐琦,吴晔华,王晓梅,等. 维药刺山柑抑制金黄色葡萄球菌生物膜的研究[J]. 中国医药导报,2015(2):20-23.
- [13] 应旭旻,周夏娟. 褪黑素提取物对 CIA 小鼠模型 Treg 和 Th17 细胞及相关细胞因子的影响[J]. 浙江中西医结合杂志,2017,27(3):193-198.
- [14] 何承辉,康小龙,刘晶,等. 刺山柑总生物碱对系统性硬皮病小鼠血清白细胞介素-4、白细胞介素-13 和干扰素- γ 的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2016,23(8):77-79.
- [15] 陈开慧,杨吉恒. 艾灸治疗类风湿关节炎研究进展[J]. 世界临床医学,2017,11(13):116-117.
- [16] 邓龙飞,汪永忠,韩燕全,等. 威灵仙总皂苷抑制佐剂性关节炎大鼠 JAK2 /STAT3 信号通路[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2015,31(2):153-158.
- [17] 陈莹,杨路,洗培凤,等. 不同蜂针剂量治疗类风湿性关节炎大鼠的疗效研究[J]. 辽宁中医杂志,2017(2):392-397.
- [18] NOACK M, MIOSSEC P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases [J]. Autoimmun Rev,2014,13(6):668-677.
- [19] GIZINSKI A M, FOX D A. T cell subsets and their role in the pathogenesis of rheumatic diseases [J]. Curr Opin Rheumatol,2014,26(2):204-210.
- [20] BENEDETTI G, MIOSSEC P. Interleukin 17 contributes to the chronicity of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis[J]. EuroPeian Journal of Immunology,2014,44(2):339-347.
- [21] CHINEN T, KANNAN A K, LEVINE A G, et al. An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function [J]. Nature Immunology,2016,17(11):1322-1333.
- [22] 梁永妍. 补肾通督胶囊对类风湿性关节炎患者骨代谢及炎性细胞因子的影响[J]. 西部中医药,2017,30(11):4-7.

欢迎订阅, 欢迎投稿