

· 基础研究 ·

针刺对膝骨关节炎大鼠软骨白细胞介素-1 β 及肿瘤坏死因子- α 表达的影响

王道海, 包飞, 吴志宏, 孙华, 张云祥

(中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院, 北京 100730)

【摘要】目的:探讨针刺对骨关节炎(OA)软骨中炎性细胞因子的影响作用。**方法:**选用 SD 雌性大鼠 40 只, 采用随机数字表, 随机分为正常组、模型组、针刺组和对照组, 各 10 只。采用单侧后肢跟腱切除法建立 OA 动物模型, 切除左后肢跟腱, 分别采用电针和扶他林乳剂对针刺组和对照组非手术侧(右后肢)进行治疗。采用免疫组化技术, 观察各组关节软骨中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达的特点, 并比较各组间的差异。**结果:**模型组 IL-1 β 和 TNF- α 的表达都较正常组上调($P < 0.01$); 模型组、针刺组和对照组 3 组比较, IL-1 β 和 TNF- α 的表达差异有统计学意义, 针刺组和对照组的表达均较模型组下调($P < 0.01$), 两者在针刺组与对照组的表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论:**针刺能下调 OA 软骨细胞 IL-1 β 、TNF- α 的表达, 与扶他林乳剂作用相当, 说明针刺对 OA 软骨具有一定的保护作用。

【关键词】 骨关节炎; 针刺; 白细胞介素 1 β ; 肿瘤坏死因子 α

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2011.09.019

Influence of acupuncture on IL-1 β and TNF- α expression in the cartilage of rats with knee osteoarthritis WANG Dao-hai, BAO Fei, WU Zhi-hong, SUN Hua, ZHANG Yun-xiang. Peking Union Medical College Hospital, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

ABSTRACT Objective: To explore the influence of acupuncture treatment on proinflammatory cytokines of osteoarthritic (OA) cartilage. **Methods:** Forty female SD rats were randomly and averagely divided into four groups: the normal, model, acupuncture and control group. The method of heel tendon resection for unilateral hind limb was used to establish OA animal models—that was to cut off the rat's heel tendon of left hind limb. The acupuncture group and control group were respectively treated by electro-acupuncture and Diclofenac on right hind limb of each animal for 2 weeks. Immunohistochemical staining was used to observe the expression characteristic of IL-1 β and TNF- α in cartilage of each group, and the differences were compared among the groups. **Results:** Both IL-1 β and TNF- α expression in model group were significantly up-regulated than those in the normal group ($P < 0.01$). Their expression in model, acupuncture and control group were significantly different ($P < 0.01$). IL-1 β and TNF- α expression were significantly down-regulated in acupuncture and control group than that in model group ($P < 0.01$), while the difference between the two former groups was not significant ($P > 0.05$). **Conclusion:** Acupuncture can down-regulate the expression of IL-1 β and TNF- α in osteoarthritic chondrocytes, and the regulating effect is the same as Diclofenac. This shows that acupuncture has a certain protective effect on osteoarthritic cartilage.

KEYWORDS Osteoarthritis; Acupuncture; Interleukin-1 beta; Tumor necrosis factor-alpha

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2011, 24(9): 775-778 www.zggszz.com

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是最常见的老年病之一, 常导致关节疼痛甚至功能丧失。OA 按病理特征分早、中、晚 3 期^[1], 目前尚无特效疗法, 治疗目标主要是止痛和改善关节功能。对于早中期患者以保守治疗为主, 包括非甾体类抗炎镇痛药、关节腔内注

射激素或透明质酸钠、物理疗法、运动疗法, 以及中药内服外敷、针灸、推拿等^[2], 晚期患者则适宜手术治疗。OA 属中医“痹症”范畴, 针灸治疗痹症历史悠久, 具有镇痛、消肿、改善关节活动功能的作用^[3]。

为揭示针灸治疗 OA 的部分作用机制, 本研究采用免疫组化技术, 探讨针刺对 OA 软骨中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 由北京大学医学部实验动物科学部提供的清洁级雌性 SD 大鼠 40 只, 6~7 周龄, 体质

基金项目: 国家中医药管理局中医药科学技术研究专项课题(编号: 06-07LP01)

Fund programs: Provided by Science and Technological Study on Traditional Chinese Medicine of State Administration of Traditional Chinese Medicine

通讯作者: 包飞 E-mail: zengfei68@tom.com

量(190±10) g。实验动物质量合格证号:SCXK(京)2006-0008。动物实验室:北京协和医院动物实验室。

1.2 主要药物、试剂和仪器 扶他林乳剂(双氯芬酸二乙胺乳胶剂,北京诺华制药有限公司,批准文号:国药准字 H20020176)。汉医牌 Φ0.20 mm×13 mm 无菌针灸针(天津华鸿医材有限公司),长城牌 KWD-808 II 全能脉冲电疗仪(常州市武进长城医疗器械有限公司),RM2235 型石蜡切片机(德国 Leica 公司),ZPJ-1A 型展片机(天津天利航空机电有限公司),烤片机(北京百姓佳公司)。兔抗 IL-1β(产品编号:bs-0812R),TNF-α(产品编号:bs-2081R),多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司提供)。NovoLink™ 聚合物检测系统(珠海泉晖企业有限公司提供,产品编号:RE-7290),光学显微镜(Nikon PHASE CONTRAST 0.90 DRY),照相机(Nikon Eclipse 80i)。

1.3 模型建立与分组方法 采用染色法对所有实验大鼠进行编号,按随机数字表随机分配到正常组、模型组、针刺组、对照组,各 10 只。模型组、针刺组、对照组用单侧后肢跟腱切除法建立 OA 动物模型:切除左后肢跟腱,术后自由活动、进食、摄水,4 周后造模成功^[4]。

1.4 干预方法

1.4.1 正常组 无特殊处理。

1.4.2 模型组 造模术后不予治疗。

1.4.3 针刺组 于造模术后第 5 周开始治疗。取穴:非手术侧(右后肢)膝前(定位:后肢膝盖前方),后三里(定位:膝关节后外侧,在腓骨小头下约 5 mm 处)^[5]。穴位常规消毒,选用 Φ0.20 mm×13 mm 无菌针灸针,得气后接电疗仪,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 1 次,5 次为 1 个疗程,疗程间休息 2 d,治疗 2 个疗程。

1.4.4 对照组 与针刺组同时开始治疗。采用扶他林乳剂(双氯芬酸二乙胺乳胶剂)治疗,剂量为 0.2 g·kg⁻¹·d⁻¹,涂擦于每只大鼠非手术侧(右后肢)膝关节处(采用剃毛法去除关节局部体毛),每日 1 次,5 次为 1 个疗程,疗程间休息 2 d,治疗 2 个疗程。

1.5 观测指标与方法

1.5.1 标本处理 于实验第 7 周采用断髓法处死全部大鼠,收集每只大鼠右后肢膝关节股骨端软骨,用 4%多聚甲醛固定,10%甲醛浸泡,15%乙二胺四乙酸浸泡,石蜡包埋。

1.5.2 免疫组织化学染色 切片厚度 4~5 μm,暴露抗原,二甲苯脱蜡,梯度乙醇组织切片水化,抗原修复,过氧化物酶阻断剂抑制内源性过氧化物酶。蛋白阻断剂孵育,一抗孵育,一抗后封闭剂孵育,NovoLink™ 聚合物(二抗)孵育,DAB 工作液显色,苏木素复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封片。

1.5.3 图像分析及观测指标 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 个清晰视野,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 2.3 摄取图像。采用 Image-Pro Plus 5.0 专业图像分析软件进行图像分析,测定 IL-1β、TNF-α 表达阳性细胞的积分光密度值(integrated optical density, IOD)。阳性细胞的确定条件:①胞浆染色成棕黄色;②细胞核比较清晰;③形状比较规则;④轮廓比较清楚。完全具备上述条件方确定为阳性表达细胞。

1.6 统计处理方法 IL-1β、TNF-α 表达阳性细胞 IOD 值以 $\bar{x} \pm s$ 表示。统计学分析采用 SPSS 11.0 统计软件,正常组与模型组比较采用成组设计定量资料 *t* 检验;模型组、针刺组和对照组 3 组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 染色结果 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。模型组关节软骨变薄,软骨细胞数目减少,细胞排列紊乱。针刺组软骨层变薄,细胞排列紊乱。对照组软骨变薄,软骨细胞数目减少,细胞排列紊乱。

2.2 免疫组织化学染色结果 正常组软骨细胞胞浆中偶见浅棕黄色 IL-1β、TNF-α 弱阳性染色。模型组见大量软骨细胞呈深棕色 IL-1β、TNF-α 强阳性染色颗粒。针刺组和对照组软骨细胞胞浆呈浅棕黄色 IL-1β、TNF-α 阳性染色。4 组软骨细胞免疫组化染色结果(×200)见图 1-8。

2.3 图像分析结果 4 组软骨细胞 IL-1β、TNF-α 阳性表达的 IOD 值比较见表 1。由表 1 可见,模型组 IL-1β 和 TNF-α 的表达都较正常组上调。模型组、针刺组和对照组比较,IL-1β 和 TNF-α 的表达差异均有统计学意义,针刺组和对照组的表达均较模型组下调,两者在针刺组与对照组的表达差异无统计学意义。

3 讨论

3.1 OA 动物模型的制备 临床以膝关节炎最为常见,女性多于男性,并且鼠软骨细胞凋亡方式与人类软骨细胞凋亡相似^[6],因此本研究选用雌性大鼠作为实验动物。

研究显示,异常高应力是导致关节软骨退变的重要因素^[7]。本实验采用单侧后肢跟腱切除法^[8]建立 OA 动物模型。该法属 OA 的关节外诱发模型,只

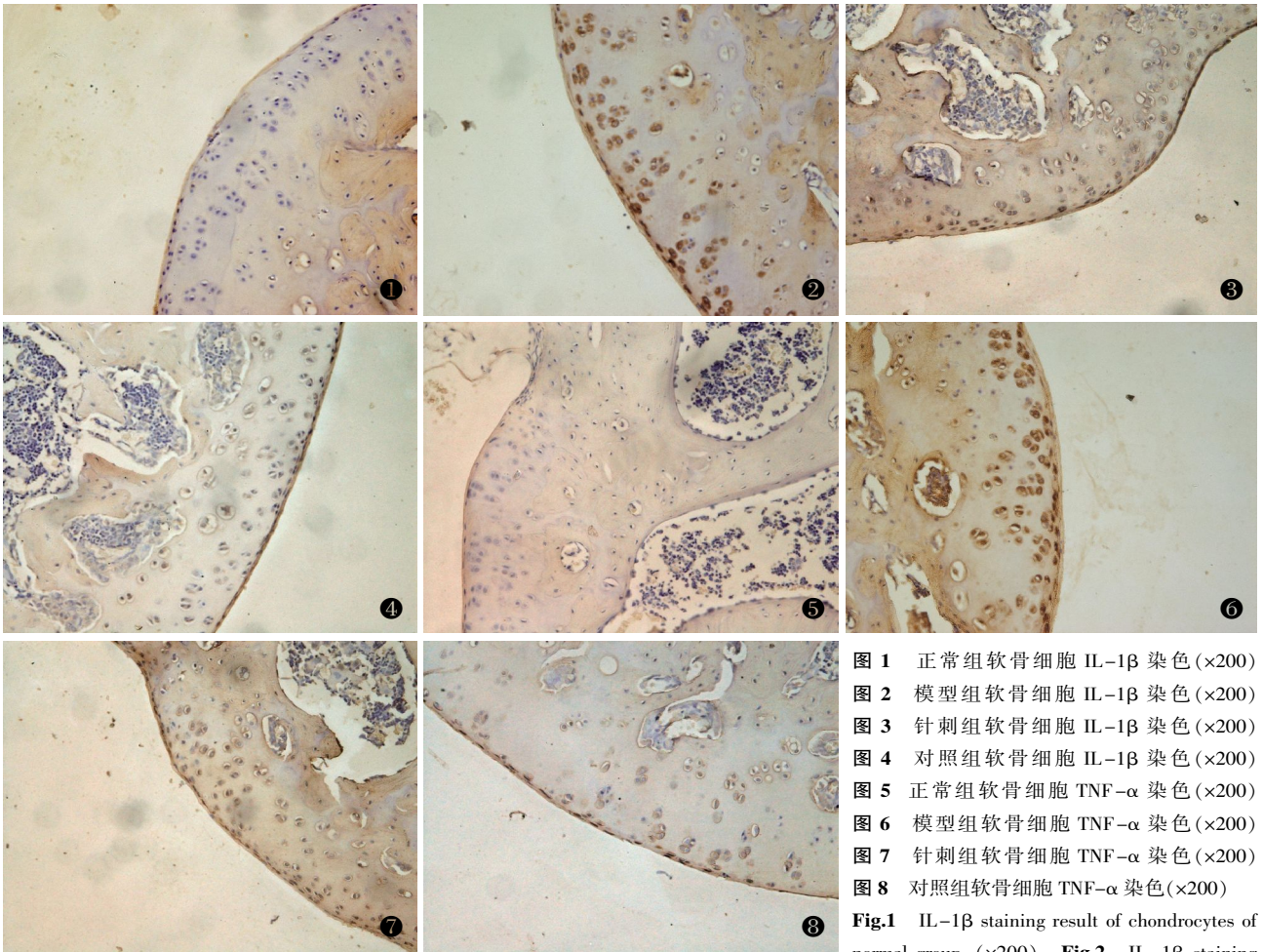


图 1 正常组软骨细胞 IL-1β 染色(×200) 图 2 模型组软骨细胞 IL-1β 染色(×200) 图 3 针刺组软骨细胞 IL-1β 染色(×200) 图 4 对照组软骨细胞 IL-1β 染色(×200) 图 5 正常组软骨细胞 TNF-α 染色(×200) 图 6 模型组软骨细胞 TNF-α 染色(×200) 图 7 针刺组软骨细胞 TNF-α 染色(×200) 图 8 对照组软骨细胞 TNF-α 染色(×200)

Fig.1 IL-1β staining result of chondrocytes of normal group (×200) Fig.2 IL-1β staining

result of chondrocytes of model group(×200) Fig.3 IL-1β staining result of chondrocytes of acupuncture group(×200) Fig.4 IL-1β staining result of chondrocytes of control group(×200) Fig.5 TNF-α staining result of chondrocytes of normal group(×200) Fig.6 TNF-α staining result of chondrocytes of model group(×200) Fig.7 TNF-α staining result of chondrocytes of acupuncture group(×200) Fig.8 TNF-α staining result of chondrocytes of control group(×200)

表 1 4 组软骨细胞 IL-1β、TNF-α 阳性表达的 IOD 值比较 (x̄±s)

Tab.1 Comparison of IL-1β and TNF-α expression in chondrocytes among four groups(x̄±s)

组别	鼠数(只)	IL-1β	TNF-α
正常组	10	301.713±101.777	239.547±110.706
模型组	10	6636.332±1405.870*	6261.825±1379.968*
针刺组	10	2209.376±556.288 [△]	2422.057±564.426 [△]
对照组	10	1973.478±524.131 [△]	2201.971±567.425 [△]

注:正常组与模型组比较, $t_{IL-1\beta}=27.961, t_{TNF-\alpha}=26.098, *P<0.01$ 。模型组、治疗组和对照组比较, $F_{IL-1\beta}=289.731, F_{TNF-\alpha}=222.643, P<0.01$ 。组间两两比较, [△]与模型组比较, $P<0.01$; 针刺组与对照组比较, $P>0.05$

Note: Independent samples t -test was used to compare the differences of IL-1β and TNF-α between model and normal group, $t_{IL-1\beta}=27.961, t_{TNF-\alpha}=26.098, *P<0.01$. One-Way ANOVA was used to compare the differences of IL-1β and TNF-α in model, acupuncture and control groups, $F_{IL-1\beta}=289.731, P<0.01, F_{TNF-\alpha}=222.643, P<0.01$; compared between two groups, compared to model group, [△] $P<0.01$, compared between acupuncture and control group, $P>0.05$

改变后肢负重而不影响肢体的活动, 较切断膝关节交叉韧带、半月板、关节内注射药物等关节内诱发模型更接近人类 OA 的形成过程, 且方法简单、创伤小、成功率高。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。电镜观察^[4]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 4 周, 软骨表面的许多部位出现裂隙, 部分裂隙较宽大, 纵横交错, 属 OA 中期病理改变。本研究中针刺组和对照组即是从造模 4 周后开始干预治疗, 组织学染色结果显示造模大鼠膝关节软骨明显变薄, 软骨细胞数目明显减少, 细胞排列紊乱, 符合 OA 中期病理改变。本实验中无动物死亡发生。

3.2 OA 软骨中 IL-1β、TNF-α 表达的意义 目前发现与 OA 有关的细胞因子近 10 种, 其中 IL-1、TNF-α 就是参与关节软骨破坏的重要因子。

IL-1 分为 IL-1α 和 IL-1β 2 种, 生物活性相似, 表现为刺激软骨细胞和滑膜产生金属蛋白酶等蛋白

酶,促进软骨基质的降解;刺激软骨细胞和滑膜产生一氧化氮(NO),诱导关节软骨细胞的凋亡;促进软骨细胞和滑膜细胞产生前列腺素 E2(PGE2)参与炎症反应;促进成骨细胞样细胞的增殖和骨吸收,参与骨质增生和软骨下骨囊性变的形成;介导软骨细胞分化,调节软骨细胞表型变成成纤维细胞表型;抑制蛋白多糖的合成;抑制软骨细胞的增殖^[9]。体外培养来源于 OA 的软骨细胞能自发产生 IL-1 β ^[10]。

TNF 分为 TNF- α 和 TNF- β 2 种,两者生物活性几乎相同,具有强烈的破骨吸收活性。TNF- α 与 IL-1 只有 3% 的同源性,生物活性比 IL-1 低 100 倍,两者作用于不同的受体,但表现出许多相似的生物学特性^[11]。TNF- α 可促进 PGE 的产生,而且可诱导软骨细胞产生过氧化反应,与 IL-1 共同促进软骨的吸收,从而介导骨性关节炎的软骨破坏^[12]。

本研究检测到 OA 模型组中 IL-1、TNF- α 水平较正常组显著升高,说明 IL-1 β 和 TNF- α 随着 OA 的发生而大量产生,引发一系列破坏性反应,进而促进软骨的退变。

3.3 针刺对 OA 软骨 IL-1 β 、TNF- α 表达的影响
本实验观察到针刺组中软骨细胞 IL-1 β 、TNF- α 的表达较 OA 模型组显著下调,说明针刺对 IL-1 β 、TNF- α 的分泌具有明显抑制作用。扶他林(双氯芬酸钠)是骨关节炎治疗中经典的非甾体类抗炎镇痛药,有口服和外用 2 种给药途径。针刺属于中医外治法,故本实验选用扶他林乳剂关节局部涂擦作为对照组。本研究结果显示针刺组 IL-1 β 、TNF- α 表达的下调与扶他林对照组无显著差异,说明针刺对 OA 软骨 IL-1 β 、TNF- α 的调节作用与扶他林乳剂相当。

本实验在造模 4 周后开始针刺治疗,是通过在体动物实验对 OA 中期病变治疗部分机制探讨。本研究结果说明针刺具有抗炎作用,对受损关节软骨具有一定的保护作用,其更多的作用机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 刘子君. 骨与关节病理学[M]. 北京:人民卫生出版社,1992:359.
Liu ZJ. Bone and joint pathology[M]. Beijing:People's Medical Publishing House, 1992:359. Chinese.
- [2] 王亦聰. 膝关节外科的基础和临床[M]. 北京:人民卫生出版

社,1999:269.

Wang YC. Knee-joint surgical base and clinic[M]. Beijing:People's Medical Publishing House, 1999:269. Chinese.

- [3] 吴志宏,包飞. 电针治疗膝骨关节炎临床对照试验[J]. 中国骨伤,2008,21(3):170-172.
Wu ZH, Bao F. Controlled clinical trial of knee osteoarthritis treated by electroacupuncture[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2008, 21(3):170-172. Chinese with abstract in English.
- [4] 顾延,戴尅戎,袁世静,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.
Gu Y, Dai KR, Qiu SJ, et al. A morphological study of degenerative mechanism of articular cartilage by abnormal high stress[J]. Zhonghua Wai Ke Za Zhi, 1995, 33(10):597-560. Chinese.
- [5] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京:中国中医药出版社,2008:255-256.
Li ZR. Experimental acupuncture science[M]. Beijing:China Press of Traditional Chinese Medicine, 2008:255-256. Chinese.
- [6] Kourí JB, Aguilera JM, Reyes J, et al. Apoptotic chondrocytes from osteoarthrotic human articular cartilage and abnormal calcification of subchondral bone[J]. J Rheumatol, 2000, 27:1005-1019.
- [7] Bierma-Zeinstra SM, Koes BW. Risk factors and prognostic factors of hip and knee osteoarthritis[J]. Nat Clin Pract Rheumatol, 2007, 3(2):78-85.
- [8] 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,2004,4(1):41-44.
Ou YS, An H. Experimental study of animal model with osteoarthritis in rats[J]. Zhongguo Bi Jiao Yi Xue Za Zhi, 2004, 4(1):41-44. Chinese.
- [9] Largo R, Alvarez-Soria MA, Díez-Ortego I, et al. Glucosamine inhibits IL-1 β -induced Nf κ B activation in human osteoarthrotic chondrocytes[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2003, 11(4):290-298.
- [10] 林木南,刘献祥. 骨性关节炎中细胞因子的协同效应[J]. 福建中医学院学报,2006,16(2):69-70.
Lin MN, Liu XX. Synergy of cytokines in osteoarthritis[J]. Fu Jian Zhong Yi Xue Yuan Xue Bao, 2006, 16(2):69-70. Chinese.
- [11] 田华,娄思权,党耕町,等. 肿瘤坏死因子 TNF- α 导致软骨损伤的机制探讨[J]. 中华外科杂志,2000,38(1):76.
Tian H, Lou SQ, Dang GD, et al. Mechanism research of TNF- α leading to cartilage injure[J]. Zhonghua Wai Ke Za Zhi, 2000, 38(1):76. Chinese.
- [12] Homandberg GA, Ummadi V, Kang H. High molecular weight hyaluronan promotes of IL-1 β -damaged cartilage explants from both young and old bovines[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2003, 11(3):177-186.

(收稿日期:2011-05-08 本文编辑:连智华)