

电针足三里、关元对佐剂性关节炎大鼠 IL-1, IL-2, IL-10, TNF α 的影响

常小荣 刘梨 艾坤 刘美荣

中图分类号: R242 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)02-0107-04

摘要:目的 探讨足三里、关元对佐剂性关节炎大鼠白细胞介素(IL-1、IL-2、IL-10) 肿瘤坏死因子(TNF α)的影响。方法 将 60 只健康 SD 大鼠(雄性 4 月龄)完全随机分为 5 组:空白组、模型组、足三里组、关元组、委中组,每组 12 只。除空白组和模型组外,其他各组分别电针刺激,隔天 1 次,32 天后取大鼠血清,采用放射免疫法检测 IL-1、IL-2、IL-10、TNF α 值。结果 ①与模型组比较,足三里组、关元组、委中组 IL-1、IL-2、TNF α 降低,IL-10 升高,并有显著性差异($P < 0.01$ 或 0.05)。②与委中组比较,足三里组、关元组的各项指标均有显著性差异($P < 0.05$)。结论 电针足三里、关元能调节佐剂性关节炎大鼠的 IL-1、IL-2、IL-10、TNF α 值,其疗效强于委中。

关键词: 足三里; 关元; 佐剂性关节炎大鼠; 白细胞介素; 肿瘤坏死因子

The impact of electroacupuncture on point Zusanli, Guanyuan to IL-1, IL-2, IL-10, TNF α of adjuvant-induced arthritis rats CHANG Xiaorong, LI Li, AI Kun, et al. Section of Acupuncture and Massage, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China

Abstract: **Objective** To observe the impact of the point Zusanli, Guanyuan to IL-1, IL-2, IL-10, TNF α of adjuvant-induced arthritis rats. **Method** To divided 60 healthy Sprague-Dawley (SD) rats (four-month-old male) into 5 groups randomly: blank group, model group, Zusanli group, Guanyuan group, Weizhong group, each with 12 rats. Stimulated each group by electroacupuncture except the blank group and the model group, once per 2 days, 32 days later, took the blood serum of the rats and used radioimmunoassay and malondialdehyde (MDA) technique to test contents of IL-1, IL-2, IL-10, TNF α of each group. **Result** (1) Compared with the model group, the contents of rats' IL-1, IL-2 and TNF α of the Zusanli group, Guanyuan group, Weizhong group decreased, IL-10 increased, with significant difference ($P < 0.01$ or 0.05). (2) compared with the Weizhong group, detecting items of Zusanli- Guanyuan group all had significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion** Electroacupuncture on Zusanli, Guanyuan can regulate IL-1, IL-2, IL-10, TNF α content of adjuvant arthritis rats. The curative effects are stronger than Weizhong.

Key words: Zusanli; Guanyuan; Adjuvant arthritis rats; IL-1; IL-2; IL-10; TNF α

本研究以电针足三里、关元穴为实验组和委中对照穴为被试因素,佐剂性关节炎大鼠为受试对象,从分子生物学角度探讨不同穴位的免疫调整作用是否有差异。通过弗式完全佐剂法制作类风湿性关节炎动物模型,观察相同的电针刺激分别作用于足三

里、关元、委中单个腧穴,所引起的以 IL-2 为代表的细胞因子在机体不同部位的含量变化规律,进而把这些变化看作是针灸效应在机体内重要的信息传递机制,深入研究其动态作用轨迹和信号传导过程,从而科学阐明实验穴位的免疫调整作用的相对特异性规律。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康 SD 大鼠(雄性 4 月龄)大鼠 60 只, 雄性, 体重 180 ~ 200 g, 由湖南中医药大学实验动物中心提

基金项目: 湖南省自然科学基金课题资助(07JJ6050)

作者单位: 410007 长沙, 湖南中医药大学针灸推拿学重点学科, 国家中医药管理局重点研究室(常小荣, 艾坤), 湖南中医药大学第一附属医院(刘梨, 刘美荣)

通讯作者: 常小荣, Email: xrchang1956@163.com

供(批号 SYXK(湘)2003-0001,清洁级)。

1.2 实验分组

将 60 只大鼠随机分为 5 组:空白组、模型组、电针足三里组、电针关元组、电针委中组,每组 12 只(实验过程中有 3 只大鼠死亡,电针足三里组、电针关元组、空白对照组各 1 只)。空白组和模型组每天捆绑不扎针。

1.3 造模方法

佐剂性关节炎模型(AA)选用 Freund 氏完全佐剂(FCA)造模法^[1]。FCA 制备方法:取液体卡介苗 2 支(160 mg),80℃ 灭活 1 h,均匀混入高压灭菌(121℃、1.1 kg/cm、30 min)的液体石蜡、羊毛脂(2:1)16 mL,使混合液的含菌浓度达到 10 mg/mL,超声波细胞粉碎仪乳化 20 min。大鼠右足垫皮内注射(0.1 mL/只)致敏大鼠。

1.4 穴位定位与针刺方法

1.4.1 选穴及定位:选穴:足三里、关元、委中(注:足三里、关元为实验组,委中为对照组)。取穴定位:参照“十一五”国家规划统编教材《实验针灸学》和《腧穴学》大鼠标准穴位图谱定位及拟人对照法定位。

1.4.2 针刺方法:大鼠清醒固定,各穴均用 30 号 1 寸进针后,接华佗电针仪,疏密波,频率 2 Hz,强度以针柄轻微抖动而大鼠能够忍耐为宜,每次留针 20 min,于造模第 3 d 开始针刺,每日 1 次,8 次为 1 个疗程,共 2 个疗程(16 次)^[7]。

1.5 主要试剂

①液体石蜡、羊毛脂、卡介苗冻干粉(50 mg/支,北京生物制品研究所生产,批号:200406028);②20% 乌拉坦(上海化学试剂厂产品,批号 030412),乙酸乙酯,1 mmol/L 盐酸均为色谱纯,重蒸馏水(本院制剂室生产)。③10% EDTA-Na₂,抑肽酶(珠海丽珠集团丽宝生物化学制药有限公司生产,批号为 040501)。④β-内啡肽放免试剂盒(950224),ACTH 放免试剂盒(HY-050)由北京华英生物技术研究所提供。

1.6 标本采集

①按 4 mL/kg 体重剂量自大鼠腹腔注射 20% 乌拉坦,麻醉后断头采血,2 mL 注入含 10% EDTA-Na₂ 30 μL 和 4 万 U/mL 抑肽酶 40 μL 试管中,上下缓慢颠倒 3 次混匀,其余 3~4 mL 注入干燥试管;②4℃,3000 r/min,离心 10 min;③取尽量多每管中的上清液,放入小试管中,-20℃ 冰冻保存。

1.7 指标检测及方法

IL-1、IL-2、IL-10、TNFα 均采用放射免疫法测定(检测单位:湖南中医药大学核医学科)。

1.8 统计学处理

所有数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS13.0 软件,不同组间比较采用单因素方差分析(One-WayANOVA),方差齐时选择 LSD 法,方差不齐时选择 DunnettT3 法;组内两两比较采用配对 t 检验,相关性采用直线相关分析。

2 结果

2.1 电针不同穴组对佐剂性关节炎大鼠白细胞介素含量的影响(表 1)

表 1 各组大鼠血清白细胞介素含量的比较($\bar{x} \pm s$, ng/L)

组别	例数	IL-1	IL-2	IL-10
空白组	11	0.1190±0.0318	2.0650±0.1631	6.4450±0.4726
模型组	12	0.5400±0.0551▲	6.4440±0.6261▲	4.7045±0.9455▲
足三里组	11	0.2600±0.0639●●★	2.7600±0.2886●●★	12.309±1.6716●●★
关元组	11	0.2655±0.0630●●★	2.7860±0.2207●●★	11.9055±1.2806●●★
委中组	12	0.3827±0.0190●	4.2636±0.6493●	8.7827±0.9462●

注:与空白组比较,▲ $P < 0.01$;与模型组比较,●● $P < 0.01$;与模型组比较,● $P < 0.05$;与委中组比较,★ $P < 0.01$ 。

表 1 结果提示:各组 AA 大鼠血清 IL-1、IL-2、IL-10 含量的变化,模型组与空白组比较有非常显著性差异($P < 0.01$);足三里、关元穴组与模型组比较有非常显著性差异($P < 0.01$);委中组与模型组比较有显著性差异($P < 0.05$);足三里、关元穴组与委中组比较有非常显著性差异($P < 0.01$)。

2.2 电针不同穴组对佐剂性关节炎大鼠 TNFα 含量的影响(表 2)

表 2 各组大鼠血清 TNFα 含量的比较($\bar{x} \pm s$, μg/L)

组别	例数	TNFα
空白组	11	0.8520±0.1163
模型组	12	2.2064±0.1440▲
足三里组	11	1.3700±0.2445●●★
关元组	11	1.3818±0.1918●●★
委中组	12	1.8536±0.0427●

注:与空白组比较,▲ $P < 0.01$;与模型组比较,●● $P < 0.01$;与模型组比较,● $P < 0.05$;与委中组比较,★ $P < 0.01$ 。

表 2 结果提示:各组 AA 大鼠血清 TNFα 含量的变化,模型组与空白组比较有非常显著性差异($P < 0.01$);足三里、关元穴组与模型组比较有非常显著性差异($P < 0.01$);委中组与模型组比较有显著性差异($P < 0.05$);足三里、关元穴组与委中组比较有非常显著性差异($P < 0.01$)。

3 讨论

佐剂性关节炎(Adjuvant Arthritis, AA)大鼠是研

研究 RA 及评价防治 RA 药物的常用动物模型之一。现代医学认为,大鼠佐剂性关节炎是一种迟发型超敏反应,亦可能属于自身免疫性疾病。其组织病理学改变和其发病机制与人的 RA 很相似,并且弗式完全佐剂制备比较容易,所以是一种被广泛运用研究 RA 的动物模型。

3.1 细胞因子与佐剂性关节炎的关系

细胞因子 IL-1, IL-2, TNF 既是炎症因子,又参与机体的免疫反应,IL-2 和 TNF 是免疫促进因子,能促进机体的免疫反应。RA 及 AA 大鼠外周单核细胞和滑膜的巨噬细胞分泌 IL-1, IL-2, TNF 使外周血和关节滑膜液 IL-1, IL-2, TNF 明显升高。IL-10 是重要的抗炎介质,它能明显抑制单核-吞噬细胞的致炎作用。

本实验中,AA 大鼠的血清 IL-1, IL-2, TNF α 明显高于正常组,具有显著性差异;IL-10 在炎症早期升高,中晚期明显低于正常组,进一步证明,IL-1, IL-2, IL-10, TNF α 含量在 AA 发病过程中具有重要作用。

3.2 针灸对 IL-1, IL-2, TNF α 的调节作用

IL-1, IL-2, TNF α 是重要的致炎因子和炎症促进因子,针灸治疗 AA 大鼠,主要是降低血清中 IL-1, IL-2, TNF α 的含量。赵仓焕等^[1]已经证明电针对 AA 大鼠镇痛的同时,能够提高细胞因子 IL-1 和 IL-2 的活性。李熯等^[2]电针 AA 大鼠,发现能抑制皮肤组织 IL-1 α mRNA 的表达。唐照亮等^[3]观察艾灸 AA 大鼠,能减少血清中 IL-1 的含量,与模型组有显著差异($P < 0.05$)。

3.3 针灸对 IL-10 的调节作用

IL-10 为分泌性蛋白,它不仅是诱导外周耐受的一种细胞因子,而且还是一个具有重要免疫调节功能的细胞因子,可抑制中性粒细胞和嗜酸性粒细胞产生促炎症因子和趋化因子。本实验发现在 AA 早期,血清中 IL-10 水平有所升高,但至中后期则低于正常大鼠($P < 0.01$),通过电针足三里、关元后,IL-10 水平显著升高($P < 0.01$),同时可见 AA 大鼠足趾肿胀减轻,高水平的 IL-10 可能是针灸发挥免疫抑制作用的重要因素。

3.4 足三里、关元调节 AA 大鼠 IL-1、IL-2、IL-10、TNF α 的机制探讨

本实验从细胞因子的角度对足三里、关元、委中调节 AA 大鼠免疫功能的情况进行了对比,发现足三里、关元、委中均能降低 AA 大鼠 IL-1, IL-2, TNF α 含量,升高 IL-10 含量,且足三里、关元的疗效明显高于委中,说明足三里、关元在调节机体免疫功能方

面存在着腧穴特异性。

AA 为免疫功能紊乱的免疫性疾病模型,病位在骨、关节、筋脉、肌肉。病机为本虚标实,肝脾肾亏虚为本,湿滞瘀阻为标。病因主要是气血亏虚,正气不足,风寒湿热之邪乘虚侵入痹阻于筋脉关节,以致气血运行不畅,瘀阻经脉。内因是基础,素体虚弱,正气不足,腠理不密,卫外不固,是引起痹证的内在因素,因而益气养血、活血祛风除湿为主要治疗原则。

足三里,又名下陵,出《灵枢·本输》篇,为足阳明胃经合穴,是全身性强壮要穴,有人称其为“长寿穴”,它具有调理脾胃、培土化元、补中益气、通经活络、疏风化湿、扶正祛邪、固肾益精、益气养血、预防早衰之功效。从脏腑经络生理而言,胃乃后天之本、气血生化之源,足三里穴,五行属土,故为土中土穴,所谓土生万物,而胃与脾相表里,故统治一切脾胃之疾,祖国医学认为“脾胃为后天之本”,所以调补足三里,实即培补后天。后天充足,则体健少病。因而针灸治疗疾病的同时,加针足三里,可提高疗效,虚则用补,实则用泻,随证治之。我国古代医家孙思邈、葛洪多以此穴益寿延年,其功可见一斑。以针调三里,为老少咸宜之法。因此,我们说“针必三里”。大量的研究证实,针灸足三里穴具有良好的免疫调节作用,且这种作用具有整体性和双向性。因此,足三里穴在临床上可治疗免疫低下或免疫缺陷疾病,又可治疗免疫亢进疾病,而体现了针灸所特有的双向良性调整作用。有研究表明艾灸足三里可在一定程度上改善衰老机体的免疫衰退或紊乱情况,增强免疫器官功能,从多个途径增强或改善机体免疫功能^[4,5]。电针大鼠足三里穴能明显提高 T 细胞免疫功能^[6]。温针足三里能调节受治者外周血 IL-2、NO 含量趋向上调,提示针灸能增强调节免疫功能,且发现温针对病理状态的调节更显著^[7]。另外针刺足三里穴能提高单核巨噬系统的吞噬功能,达到增强免疫功能的效果^[8],对红细胞免疫黏附功能也有增强作用^[9]。

关元穴,内应胞宫精室,为元阴元阳之气闭藏之处,《医经精义》指出其为“元阴元阳交关之所”,故名关元,出自《素问·气穴论》,为“生气之源”。其主治功能可概括为培肾固本,补肾益精,调气回阳,健脾补虚,养肝疏泄,具有益气和调气的双重功能,在恢复脏腑气血功能方面作用显著。艾灸关元穴可补摄下焦元气,扶助机体元阴元阳,延年益寿。

现代研究表明:针刺关元穴能提高单核巨噬系统的吞噬功能,达到增强免疫功能的效果^[8]。针

刺^[10]足三里、关元穴区能增强老年大鼠肝脏内巨噬细胞的功能,提高老年大鼠单核巨噬系统的吞噬功能,起到增强免疫功能的效果。陈永等发现针灸强壮要穴(足三里、关元)可以显著提高机体的免疫功能。

对于针灸疗法的免疫调控机制,越来越多的理论与实验证明“免疫-神经-内分泌网络”系统是一个最具启发意义的认识模式,它从微观分子水平上整合了最重要的三大功能系统的相互作用关系^[11,12]。我们已经知道,辅助性T细胞Th₁和Th₂、Th和Ts之间的平衡紊乱是大鼠免疫功能异常的重要病理生理学基础之一,IL-1、TNF α 是关节炎发病的重要炎症介质,IL-1、IL-2、TNF α 是加强细胞炎症反应的免疫促进因子,IL-10是细胞炎症反应的免疫抗炎因子。本实验中,AA大鼠的血清IL-1、IL-2、TNF α 明显高于正常组,IL-10在炎症早期升高,中晚期明显低于正常组,进一步证明,IL-1、IL-2、IL-10、TNF α 含量变化在AA发病过程中具有重要作用。本实验在此基础上,研究足三里、关元穴对IL-1、IL-2、IL-10、TNF α 的影响,并进一步比较其差异,将有助于科学阐释针灸效应的免疫调控机制和科学解释腧穴主治特异性产生的内在机制。

【参 考 文 献】

[1] 赵仓焕.不同间隔时间电针对佐剂性关节炎大鼠炎症局部前

阿黑皮素和前脑啡肽原 mRNA 表达的影响.暨南大学学报, 2006, 20(6):43-45.

- [2] 李燧,王丽娜,易春霞,等.电针对佐剂性关节炎大鼠病灶局部皮肤组织 IL-1 β 、IL-1ra mRNA 表达的影响.针刺研究, 2004, 29(3):187.
- [3] 唐照亮,宋小鸽,陈全珠,等.艾灸抗炎免疫作用机制的实验研究.安徽中医学院学报, 2003, 22(10):35-37.
- [4] 谢李丽红.艾灸关元、足三里对衰老小鼠免疫功能影响的实验研究.贵阳中医学院学报, 2003, 25(2):44-46.
- [5] 高希言,王燕.艾灸强壮要穴对衰老小鼠免疫功能的影响.河南中医, 2005, 25(11):24-26.
- [6] 赵宁侠,高巍.电针“足三里”穴对免疫抑制大鼠细胞免疫的影响.针刺研究, 2005, 27(1):56.
- [7] 李苏,王晓铃.针灸足三里对中老年人免疫功能影响的观察.针灸临床杂志, 2006, 18(1):19-20.
- [8] 高洪泉,朱梅.针刺老年大鼠“足三里”、“关元”穴对免疫影响的实验研究.针灸临床杂志, 2004, 18(5):53-54.
- [9] 詹曦菁,华晓宁.针刺足三里穴对鼠红细胞免疫功能影响的实验研究.武警医学, 2003, 14(5):267-268.
- [10] 朱梅,高洪泉.针刺“足三里”、“关元”穴区对老年大鼠肝脏内巨噬细胞功能影响的实验研究.针灸临床杂志, 2003, 19(1):52-53.
- [11] 李娜,李为民,陈颖波,等.电针对完全弗氏佐剂性小鼠外周慢性炎症痛的缓解作用.中国针灸杂志, 2006, 14(2):136-138.
- [12] 司勇锋,王培中,焦伟,等.白细胞介素2对鼻咽癌放、化疗患者机体免疫功能影响的研究.临床耳鼻咽喉科杂志, 2002, 15(2):59-61.

(收稿日期:2008-11-18)