

本文引用: 祁芳, 李艳玲, 艾坤, 蔡雄, 李鑫, 刘梨, 杨茜芸. 电针对佐剂性关节炎大鼠踝关节滑膜细胞胞浆内 I κ B 磷酸化的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(12): 1494-1498.

电针对佐剂性关节炎大鼠踝关节滑膜细胞胞浆内 I κ B 磷酸化的影响

祁芳¹, 李艳玲¹, 艾坤^{1*}, 蔡雄¹, 李鑫¹, 刘梨², 杨茜芸¹

(1. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208, 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007)

〔摘要〕 **目的** 探讨电针足三里、关元穴对佐剂性关节炎(adjuvant arthritis, AA)大鼠踝关节滑膜细胞胞浆内核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)的抑制蛋白 I κ B 磷酸化的影响。**方法** 将 60 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、甲氨蝶呤组(MTX 组)、电针组, 每组 15 只。模型组、MTX 组和电针组大鼠均于尾根部皮下注入完全弗氏佐剂复制 AA 模型。自造模后第 1 天开始, MTX 组大鼠予以 0.35 mg/kg 剂量的 MTX 灌胃治疗, 电针组大鼠每日予以电针关元、双侧足三里、阿是穴, 共治疗 3 周, 正常组和模型组正常饲养不作干预。治疗过程中每 3 天行 1 次体质量、足爪容积、关节炎指数测评; 实验结束后对各组大鼠踝关节行 HE 染色切片, 并运用 Western blot 法分别检测大鼠踝关节滑膜细胞胞浆内 I κ B 磷酸化水平及其重要相关蛋白 NF- κ B 的含量。**结果** 与正常组比较, 模型组大鼠踝关节滑膜细胞胞浆内 I κ B 磷酸化水平显著升高($P<0.01$), 细胞核内 NF- κ B 的含量显著升高($P<0.01$); 与模型组比较, 电针组踝关节滑膜细胞胞浆内 I κ B 磷酸化水平低于模型组($P<0.05$), 细胞核内 NF- κ B 的含量显著降低($P<0.01$)。**结论** 电针 AA 大鼠能够有效抗炎, 其抗炎机制可能与抑制关节滑膜细胞胞浆内 I κ B 磷酸化, 从而良性调控 NF- κ B 炎症信号通路有关。

〔关键词〕 佐剂性关节炎; 电针; I κ B 磷酸化; 关元; 足三里; 阿是穴

〔中图分类号〕R245 **〔文献标志码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.12.011

Effects of Electroacupuncture on I κ B Phosphorylation in Synovial Cell Cytoplasm of Adjuvant Arthritis Rats' Ankles

QI Fang¹, LI Yanling¹, AI Kun^{1*}, CAI Xiong¹, LI Xin¹, LIU Li², YANG Qianyun¹

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

〔Abstract〕 Objective To explore effects of electroacupuncture at Zusanli (ST36) and Guanyuan (RN4) on phosphorylation of I κ B, which is an inhibitor of nuclear factor-Kappa B (NF- κ B) in synovial cell cytoplasm of adjuvant arthritis (AA) rats' ankles. **Methods** A total of 60 SD rats were randomly assigned into a normal group, a model group, a methotrexate (MTX) group and an electroacupuncture group, with 15 rats in each group. Rats in the model group, the MTX group and the electroacupuncture group were injected with complete Freund's adjuvant subcutaneously into roots of tails to replicate AA models. From the first day after the modeling, rats in the MTX group were treated with 0.35 mg/kg MTX by gavage, and rats in the electroacupuncture group were given electroacupuncture at Guanyuan (RN4), bilateral Zusanli (ST36) and Ashi points for 3 weeks. The normal group and the model group were fed normally without intervention. Body mass, paw volume and arthritis indexes were evaluated every 3 days during the treatment. After the experiment, HE staining sections were performed on the rats' ankles in each group,

〔收稿日期〕2020-08-15

〔基金项目〕 国家自然科学基金青年基金项目 (81303048); 国家自然科学基金面上项目 (82074565); 湖南省科技厅科技计划一般项目 (2014SK3046); 湖南省教育厅科学研究优秀青年项目 (15B176); 湖南省教育厅科学研究项目 (14C0854)。

〔作者简介〕 祁芳, 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 常见疾病的针灸康复机理。

〔通讯作者〕 * 艾坤, 男, 硕士, 副教授, 硕士研究生导师; E-mail: aikun650@qq.com。

and levels of I κ B phosphorylation in the synovial cell cytoplasm of the rats' ankles and contents of the important relevant protein NF- κ B in the 4 groups were detected by the Western blot (WB) method. **Results** Compared with the normal group, the level of I κ B phosphorylation in the synovial cell cytoplasm of the rats' ankles in the model group was significantly increased ($P < 0.01$), and the content of NF- κ B in the cell nucleus was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the level of I κ B phosphorylation in the synovial cell cytoplasm of the rats' ankles in the electroacupuncture group was lower than that in the model group ($P < 0.05$), and the content of NF- κ B in the cell nucleus was significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** Electroacupuncture in AA rats is effectively anti-inflammatory, and its anti-inflammatory mechanism may be related to inhibiting the phosphorylation of I κ B in the cytoplasm of joint synovial cells, thereby performing benign regulation on the NF- κ B inflammatory signaling pathway.

[**Keywords**] adjuvant arthritis; electroacupuncture; I κ B phosphorylation; Guanyuan (RN4); Zusanli (ST36); Ashi point

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种病因不明、发病率高、致残率高的慢性自身免疫性疾病^[1],治疗棘手。中医针灸治疗 RA 历史悠久、疗效甚佳,因此,RA 的疾病发展机制以及针灸治疗 RA 的干预机制持续成为了医学界的研究热点。现有的研究证实,人体内核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 炎性通路的激活在 RA 的发生发展中有着至关重要的作用^[2]。本实验以 NF- κ B 信号通路为切入点,通过电针佐剂性关节炎(adjuvant arthritis, AA)大鼠模型,在证实电针抗炎作用的基础上,通过检测大鼠踝关节滑膜细胞胞浆内 NF- κ B 信号通路上游的前信号因子 I κ B 的磷酸化水平,进一步揭示电针可能的抗炎机制。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

由湖南中医药大学实验中心提供的 SPF 级雄性 SD 大鼠 70 只,体质量(100 ± 15) g,动物许可证号:SYXK(湘)2013-0005,在条件适宜的 SPF 级实验室喂养 1 周后,用电子秤测量每只大鼠体质量,根据测量结果进行体质量的分层(10 g 一分层),挑选体质量为(130 ± 15) g 的大鼠纳入实验,体质量偏轻或偏重者剔除,最终保留 60 只体质量均匀的大鼠,然后将不同体质量层次的大鼠随机分至正常组、模型组、甲氨蝶呤组(MTX 组)和电针组,每组 15 只。

1.2 主要试剂与仪器

矿物油(湖南惟世尔科技有限公司);灭活结核杆菌(美国 Difco 实验室);异氟烷(上海佳行股份有限公司);AIMS 型动物纹身仪(深圳 Reward 公司);RWD510 型小动物呼吸麻醉机(山东格莱特股份有限公司);移液枪(杭州雷琪实验器材有限公司);Hamilton 250 μ L 型微量注射器(北京 Bloning 有限公司);足肿测量仪(MGO37140 UGO Basile);bt701-1b 型电针治疗仪(苏州医疗用品厂制造)。

1.3 佐剂制备^[2]

高温灭菌后的干燥研钵置于精密天平上准确称取结核杆菌 15 mg;用移液枪精密吸取矿物油 12 mL 加入研钵中充分研磨,直至矿物油清亮无明显悬浮杂质;将研磨好的 MT 悬浮液移入 EP 管中,经震荡仪混合均匀后,稀释、分装,配备成浓度为 1.25 mg/mL 的 MT 悬浮液(以上操作均在通风橱中进行)。

1.4 AA 大鼠模型制备^[2]

用小动物呼吸麻醉机将大鼠浅麻醉完毕后,将大鼠取出并固定,以酒精棉擦拭大鼠尾根部,并在尾根部皮下注射 0.1 mL 佐剂,出针、按压片刻,造模完成。

1.5 模型制备成功的标志^[3]

正式实验开始前进行预备实验,相较于正常组大鼠而言,致炎大鼠从第 3 天开始逐步出现炎症相关的症状,例如皮温升高、尾部破溃等;随着时间的推延,症状持续加重,第 9~12 天,造模后的大鼠(模型组为甚)出现明显致炎症状:皮毛散乱、皮温升高、体质量减轻且尾部多处溃烂,足爪各关节有不同程度的肿胀,以上现象提示造模成功。

1.6 取穴与治疗方法

取穴定位方法:参照“十三五”国家规划统编教材《实验针灸学》大鼠标准穴位图谱定位及拟人对照法定位^[4]。足三里:位于小腿外侧,膝关节后外侧,腓骨小头下约 5 mm;关元:从胸剑联合至耻骨联合上缘以松紧带平均分为 13 等份(每一等分模拟大鼠同身寸一寸),关元为耻骨联合上缘 3 寸;阿是穴:取关节周围肿胀严重部位。(1)电针组^[5]:用剃毛器将电针组每只大鼠的关元、两侧足三里及其附近的毛发清理,从造模后的第 1 天起在每日的上午 9~11 点进行治疗。将大鼠固定后,以半寸毫针刺于两侧足三里、关元穴以及 1 个阿是穴,深度 3 mm 左右。每只大鼠接两组电针:“足三里(左)+关元穴”“足三里(右)+阿是穴”为一组,设置疏密波,频率为 20/50 Hz,缓

慢调节电流,以针身轻颤为宜,每次治疗时间持续20 min,7次/疗程,共治疗3个疗程21 d;(2)MTX组:MTX灌胃治疗,剂量为0.35 mg/kg,2次/周,共给药3周;(3)正常组与模型组不作干预。

1.7 观测指标及检测方法

1.7.1 体质量 大鼠分组后立即对所有大鼠进行编号,随后用电子称测量并记录每只大鼠的体质量作为基础数据,在造模后的第12、15、18、21天的同一时间点以同样的方式对大鼠进行体质量检测 and 记录,整个实验过程中共记录5次体质量的检测。

1.7.2 足爪容积的测量 大鼠分组后在其踝关节外侧进行纹身标记(该标记持续存在,无需重复打点),随后检测初始的足爪容积,在此基础上,实验期间大鼠足爪容积的检测时间与体质量的测量时间一致,共记录5次足爪容积的测量。

1.7.3 关节炎评分^[6] 该项指标的评价依赖对大鼠的耳部、尾部以及四肢各大、小关节进行仔细观察,本研究中大鼠从造模的第12天起,出现肉眼可观察到的致炎反应,因此,评分操作亦自第12天开始,并依次在造模后第15、18、21天,对大鼠进行关节炎指数评分。具体评分细则为:0分,无关节红肿;1分,小趾关节的红肿;2分,足趾关节与小趾关节均有肿胀;3分,踝关节以下的足趾关节及小趾关节肿胀;4分,包括踝关节在内的全部足爪的肿胀。每只大鼠四肢均进行评分,将四肢分数累积,累积分数越高则提示炎症越严重。最高分累计为16分。

1.7.4 踝关节 HE 染色及 Western-Blot 检测 造模后第22天结束实验并取材,将大鼠用10%的水合氯醛麻醉后沿膝关节处离断后爪,全部大鼠左侧踝关节用于 HE 染色,右侧踝关节用于检测踝关节滑膜细胞胞浆中 I κ B 磷酸化水平及其重要相关蛋白 NF- κ B 的含量。(1)踝关节 HE 染色检测:大鼠后爪浸泡、固定、脱钙、冲洗、脱水、透明、浸蜡、包埋、冷却,再固定、切片、展片、捞片、烤片、染色、脱水、透明、封片观察。(2)小动物手术器械完整剥离关节滑膜组织行 Western-blot 检测:第一步,进行蛋白提取;第二步,进行蛋白含量测定;第三步,进行 Western-blot 操作,包括电泳、转膜、经孵育/曝光和图片分析。

1.8 统计学分析

实验完成后所得数据均由 SPSS 19.0 进行分析,计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,并进行正态性与方差齐

性分析,对非正态分布的数据以秩和检验分析,正态分布且方差齐性者用 LSD 方法,正态分布但方差不齐者用多元方差分析方法。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

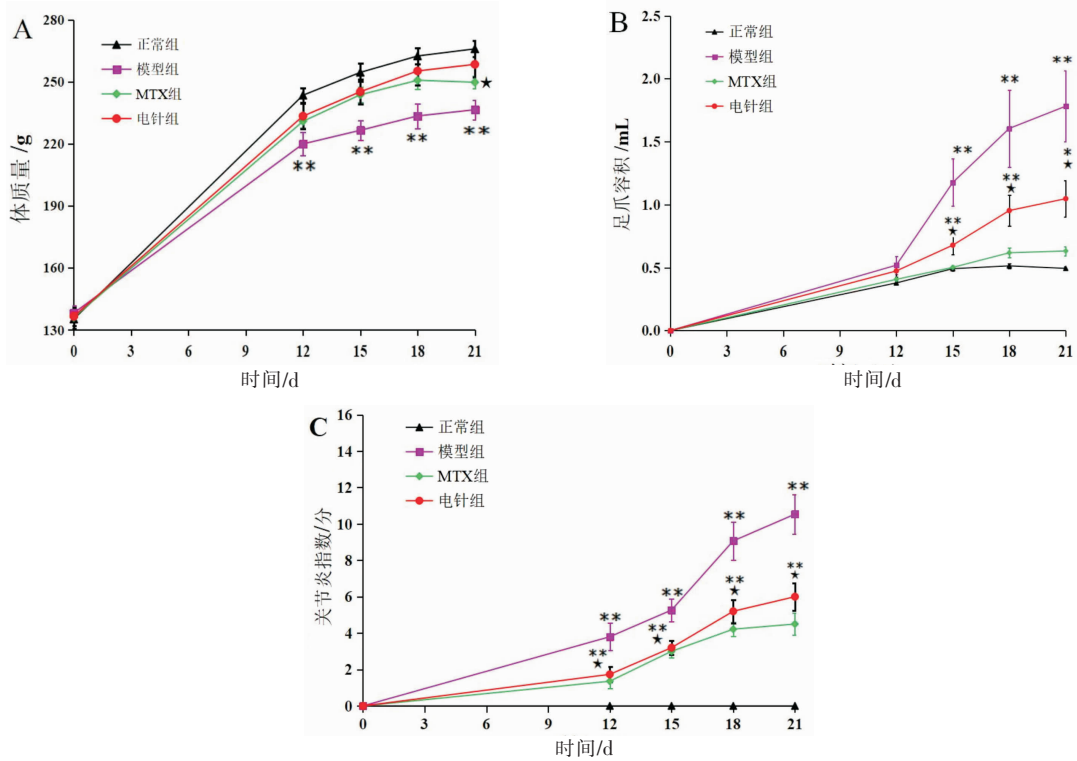
致炎的大鼠先后出现纳差、少动、情绪激惹、皮毛松散等现象,以模型组最明显。数据统计分析结果:(1)体质量:造模后的第12、15、18、21天分别对大鼠进行体质量的测量,与正常组比较,模型组体质量显著减轻($P<0.01$),电针组、MTX 组差异无统计学意义($P>0.05$);与模型组比较,电针组、MTX 组大鼠的体质量在以上时段的测量中均显著高于模型组($P<0.05$)。(2)足爪容积:对各组大鼠第12、15、18、21天足爪容积测量数据的统计分析:与正常组比较,模型组存在明显肿胀($P<0.01$),电针组亦存在肿胀($P<0.05$);与模型组比较,MTX 组大鼠足趾关节的肿胀显著减轻($P<0.01$),电针组肿胀程度亦有减轻($P<0.05$)。(3)关节炎指数评分:自造模后的第12、15、18、21天分别进行关节炎指数评分。数据分析显示:与正常组比较,模型组、电针组的关节炎评分均存在显著性差异($P<0.01$);与模型组比较,电针组关节炎指数则明显低于模型组($P<0.05$)。见图1。

2.2 各组大鼠关节病理检查结果

HE 染色结果显示,正常组大鼠踝关节结构完好,骨骼线清晰,关节间隙适中,滑膜生长正常;模型组大鼠踝关节结构有明显的改变,关节间隙明显狭窄,关节滑膜增生和骨质破坏严重;另一方面,与模型组比较,MTX 组与电针组大鼠的踝关节结构保留较为完整,受破坏程度较轻,而 MTX 组的大鼠踝关节破坏情况较电针组轻。见图2。

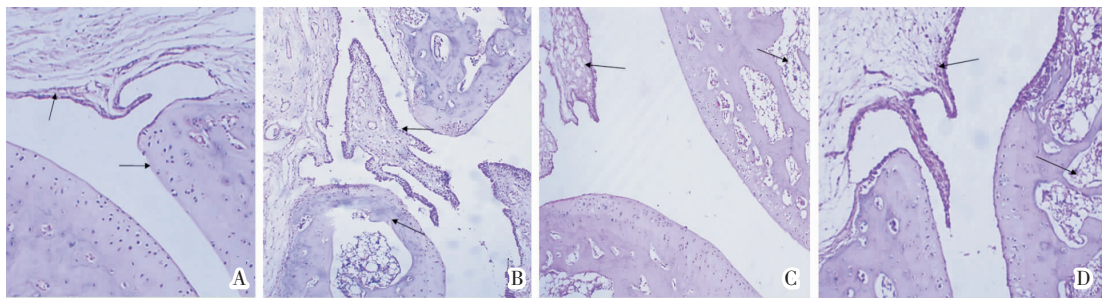
2.3 滑膜细胞胞浆内 I κ B、P-I κ B 及胞核内 NF- κ B 含量比较

与正常组比较,模型组大鼠细胞胞浆内的 I κ B 显著低于正常组($P<0.01$),磷酸化的 I κ B(P-I κ B)以及胞核内 NF- κ B 则显著高于正常组($P<0.01$);与模型组比较,电针组大鼠细胞胞浆内 I κ B 含量与模型组差异无统计学意义($P>0.05$),P-I κ B 含量则低于模型组($P<0.05$),而胞核内 NF- κ B 亦低于模型组($P<0.01$)。见图3-4。



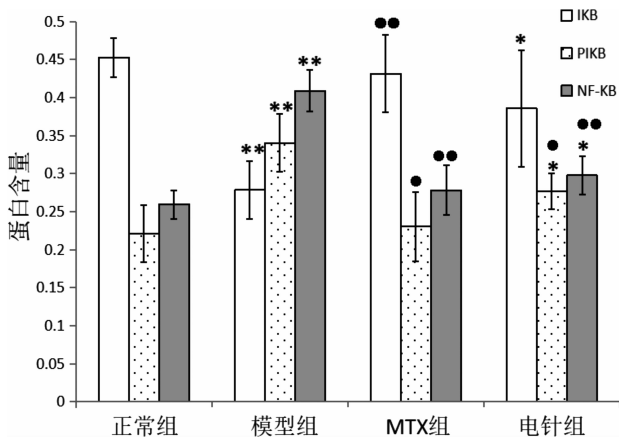
注:与正常组比较,★P<0.05;与模型组比较,*P<0.05,**P<0.01;A.体质量;B.足爪容积;C.关节炎指数评分

图 1 各组大鼠一般情况比较



注:A.正常组;B.模型组;C.MTX组;D.电针组

图 2 各组大鼠踝关节 HE 染色病理切片结果比较(HE,×40)



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

图 3 各组大鼠关节滑膜细胞胞浆内 IκB、PIκB,胞核内 NF-κB 比较

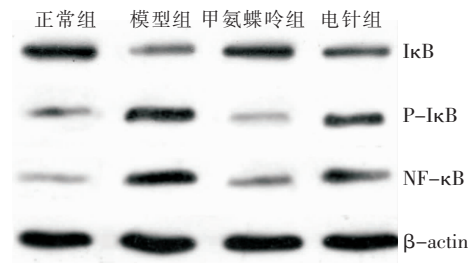


图 4 各组 IκB、PIκB、胞核内 NF-κB、β-actin 电泳图

3 讨论

已有研究证实^[7-8],NF-κB 对 RA 的发生和发展主要体现在:一方面某些炎症因子例如 TNF-α 的存在,会刺激和启动 NF-κB 进行强烈的炎性反应,促成多种细胞因子、趋化因子、黏附分子的过度表达,使炎症反应迅猛而广泛,关节滑膜细胞增生过度;且

过度增生的滑膜组织亦将分泌多种炎性介质,反作用于NF- κ B,使炎症反应更为强烈而形成正向循环,推动炎症的恶化发展,使滑膜增生进一步加重;另一方面是活化的NF- κ B通路对滑膜细胞的凋亡起重要的抑制作用。对滑膜细胞凋亡起抑制作用的凋亡抑制蛋白c-IAP1和c-IAP2在NF- κ B被激活后,也会相应升高表达水平,阻止滑膜细胞进行正常的凋亡程序,导致滑膜细胞拥有肿瘤细胞的繁殖特性。在过度增生和凋亡抑制的双重作用下,滑膜组织最终入侵关节和骨组织,导致疼痛、关节变形、丧失劳动能力。

本实验研究选择电针大鼠足三里、关元和阿是穴,主要基于中医学对RA的认识和研究^[9],中医学认为RA属“痹症”,其病因包括“外因”和“内因”两个部分,“外因”指“湿邪、风寒、居住不良、劳役过度、起居不节等”,而“内因”分为“先天禀赋不足”和“后天之气不足”两方面,历代医家对RA的治疗均遵循了“扶正祛邪”的基本原则。足三里为足阳明之脉的合土穴,可调理脾胃、补益气血生化之源、固护后天之本。关元穴为任脉与足三阴经交会穴,有培肾固本、补益精血、调理冲任、固护先天之本的功效;另外,通过刺激阿是穴可以疏通经络,刺激气血运行,充分发挥经络的治疗作用,达到缓解疼痛、改善症状的目的。另外,从分子生物学角度也证实^[10-11]:电针能够确切改善RA病情的确和干预NF- κ B通路有关系,然而具体的干预环节的研究仍不够深入和具体,其作用机制仍需进一步研究和探讨。

相关文献资料表明^[12]:细胞胞浆内的I κ B主要作用是抑制NF- κ B信号通路的激活,在正常情况下I κ B通常和NF- κ B蛋白结合成无活性的复合物,防止NF- κ B蛋白进入胞核内进行复制后激活该炎症通路。另外,即便有部分NF- κ B蛋白进入胞核内,I κ B在一定程度上亦能对该蛋白的活动起到抑制作用^[13]。因此,一旦机体由于某种原因导致I κ B磷酸化,I κ B蛋白将迅速被水解,从NF- κ B与I κ B复合体上脱落,解除了抑制的NF- κ B则迅速进入细胞核内,与相应的 κ B位点结合,实现对相关基因的表达调控,从而启动一系列炎症相关反应。由此可见,NF- κ B信号通路能够被激活,与I κ B的磷酸化有着密切联系:P-I κ B在细胞胞浆内表达低者,胞核内NF- κ B表达量也低;而P-I κ B表达越高者,则胞核内NF- κ B的表达也相应高。本实验研究结果亦证实了该理论。

本研究的结果表明,NF- κ B信号通路在模型组大鼠关节滑膜细胞内得到高度激活,而电针组以及MTX组中大鼠踝关节滑膜细胞内该信号通路得到良性的调控,因其胞浆内的I κ B磷酸化水平均较模型组低,表明电针治疗对抑制I κ B的磷酸化有较为明显的作用,从一定程度上抑制了NF- κ B信号通路的活化,从而抑制关节滑膜的增生增殖,减轻炎症反应,遏制类RA的发生发展。综上,降低滑膜细胞胞浆内I κ B磷酸化水平,良性调控机体内NF- κ B这一炎症信号通路,是电针有效对抗炎症、治疗RA疾病的机制之一。

参考文献

- [1] STOFFER M A, SCHOELS M M, SMOLEN J S, et al. Evidence for treating rheumatoid arthritis to target: Results of a systematic literature search update[J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2016, 75(1): 16-22.
- [2] 王晶,袁玉华.类风湿关节炎中NF- κ B信号通路相关微小RNA的研究进展[J]. *天津医药*, 2019, 47(3): 333-336.
- [3] 祁芳,李艳玲,艾坤,等. SD大鼠佐剂性关节炎模型的建立与评估[J]. *湖南中医药大学学报*, 2016, 36(1): 23-26.
- [4] 郭义. *实验针灸学*[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 90-95.
- [5] 刘梨,祁芳,李艳玲,等. 电针对佐剂性关节炎大鼠关节滑膜细胞内TAK1表达的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2017, 37(1): 65-69.
- [6] 李培培,解国雄,宋珊珊,等. 大鼠佐剂性关节炎模型表现特征及评价指标[J]. *中国免疫学杂志*, 2012, 28(5): 453-457.
- [7] MIRAGHAZADEH B, COOK M C. Nuclear factor- κ B in autoimmunity: Man and mouse[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 613.
- [8] 王晨,程艳杰. NF- κ B在类风湿性关节炎中的作用及调控机制[J]. *国际检验医学杂志*, 2016, 37(18): 2600-2603.
- [9] 姚晓玲,宁乔怡,王秋葵,等. 类风湿性关节炎中医药因病机研究进展[J]. *风湿病与关节炎*, 2018, 7(5): 68-72.
- [10] 明荷,谢寒,何可,等. 电针对类风湿性关节炎的疗效及对血清炎症因子的影响[J]. *中国康复理论与实践*, 2015, 31(3): 344-347.
- [11] 李佳,李静,唐宏图,等. 电针对类风湿性关节炎大鼠膝关节滑膜组织肿瘤坏死因子- α 转换酶/核转录因子- κ B信号通路的影响[J]. *针刺研究*, 2016, 41(3): 215-219, 246.
- [12] 黄文林,朱孝峰. *信号传导与疾病*[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 48-453.
- [13] SHEN J, CHENG J Z, ZHU S G, et al. Regulating effect of baicalin on IKK/I κ B/NF- κ B signaling pathway and apoptosis-related proteins in rats with ulcerative colitis[J]. *International Immunopharmacology*, 2019, 73: 193-200.