

针灸对骨髓源性破骨细胞形成数和 IL-6 mRNA 表达的影响

刘献祥¹ 沈霖² 吴明霞³ 吴炳煌¹ 高兰² 胡文胜² 张安桢¹

摘要 目的:探讨针灸对骨髓源性破骨细胞形成数和白细胞介素 6 信使 RNA(IL-6 mRNA)表达的影响。方法:进行骨髓源性破骨细胞培养、鉴定及 IL-6 mRNA 基因表达水平的检测。结果:模型组破骨细胞形成数明显多于假手术组($P<0.01$),针刺后破骨细胞形成数显著低于模型组($P<0.01$);模型组与假手术组比较,骨髓细胞 IL-6 mRNA 表达呈有意义增高($P<0.01$),而针刺后其升高的水平明显低于模型组($P<0.01$)。结论:(1)针刺有效调节白细胞介素 6(IL-6)的分泌,使 IL-6 mRNA 表达下降;(2)针刺使破骨细胞形成数减少。

主题词 骨髓/针灸效应 破骨细胞/针灸效应 mRNA/针灸效应

我们在前期的研究中已证实,针灸某些穴位能调整骨质疏松症患者机体内雌激素水平及垂体、肾上腺的功能,调节骨代谢,增加骨密度,达到补肾壮骨之目的^[1~3]。为了阐明针灸的作用机制,本课题进行了针灸对破骨细胞形成数和白细胞介素 6 信使 RNA(IL-6 mRNA)表达水平影响的研究。

1 材料与方法

1.1 动物模型的复制:12 月龄雌性 SD 大鼠 76 只(上海西普尔一必凯实验动物有限公司提供),体重 310 ± 12 g,随机分为两组。造模组 64 只,完整摘除双侧卵巢;假手术组 12 只,切除一部分小肠系膜,未切除卵巢。

1.2 针灸治疗实验:将造模 3 个月的造模组大鼠 64 只随机分为 4 组,包括假手术组 12 只,共 5 组。模型组 16 只,不给任何药物。雌二醇组 16 只,以苯甲酸雌二醇后肢肌肉注射,按人鼠剂量换算,每只鼠每次肌肉注射 0.1mg/kg 体重,每周 1 次,连续 90 天。针刺组 16 只。主穴:大杼、命门;配穴:悬钟、足三里。穴位局部常规消毒,以毫针进行针刺,行提插捻转平补平泻手法,留针 30min,每隔 10min 捻针 1 次,每日 1 次,10 次为 1 个疗程,疗程间休息 5 天,再行下一个疗程,共针刺 6 个疗程,持续 90 天。艾灸组 16 只,穴位同针刺组。以 0.75cm $\times$ 30cm 补肾药条(组成:艾绒、淫羊藿、补骨脂、刺五加、黄芪、当归、杜仲、桂枝、牛膝;福建长乐针

灸用品厂出品)距穴位皮肤 1cm 处行温和灸,每次灸 15min,每日 1 次,10 次为 1 个疗程,疗程间休息 5 天,再行下一个疗程,共艾灸 6 个疗程,持续 90 天。假手术组 12 只,不给任何药物。

1.3 观察指标

1.3.1 主要仪器:台式高速离心机(上海医用分析仪器厂,TGL-16G),低温超速离心机(L8-70M 美国),电热恒温水浴箱(上海医疗器械厂),DNA 扩增仪(PE480,美国 PE 公司),稳压稳流电泳仪(DYY III 型北京六一仪器厂),752 可见紫外检测仪(上海顾村电光仪器厂),恒温摇床(HQ45,中国科学院武汉科学仪器厂),二氧化碳培养箱(SHELL-LAB-2300 美国),超净工作台(YJ1450 苏州)。

1.3.2 实验试剂和材料:(1)细胞培养材料:DMEM(Gibco 公司);胎牛血清(FCS,Gibco 公司);地塞米松(Dexamethasone,Sigma 公司);1,25(OH)₂D₃(Sigma 公司);粒单核细胞集落刺激因子(GM-CSF,Sigma 公司)。(2)分子生物学材料:TRIZOI(美国 Gibco 公司);RNA 逆转录酶-MTLV、TaqDNA 酶(德国宝灵曼公司);dNTPs(上海 Sangon);按文献设计 IL-6、LP-19 的 PCR 引物序列,由大连 Takara 生物技术公司合成。引物序列如下:

大鼠 IL-6 引物:

5'-GACTGATGTTGTTGACAGCCACTGC-3'

5'-TAGCCACTCCTTCTGTGACTCTAACT-3'

大鼠 LP-19 引物:

5'-CTGAAGGTCAAAGGGAATGTG-G 3'

5'-CTCTAGTAGTTCTAGGACAGG-3'

1.3.3 实验动物取材:将各组处死大鼠右侧股骨放入装有无菌生理盐水的烧杯中,转入超净台。剔净骨周围软组织,用纱布擦净股骨,浸入装有生理盐水的烧杯中,用生理盐水清洗 3 次待用。每组中一半动物的股骨用于骨髓源性破骨细胞培养,余下股骨待下一步取骨髓细胞分离提取 RNA。

1.3.4 骨髓源性破骨细胞培养:(1)用骨剪剪断股骨两端骨髓。用 7 号针头注射器抽取含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养液 2ml 冲洗骨髓,重复 3 次,将含骨髓的冲洗液收集在培养皿中,用吸管轻柔吹打培养液数次,

基金项目:福建省自然科学基金资助课题(C0110019)

1 福建中医学院,福州市五四路 282 号(350003)

2 华中科技大学同济医学院

3 福建省第二人民医院

收稿日期:2002-06-26;修回日期:2002-08-16

以吹散组织团块。用吸管轻柔吹打细胞悬液使之均匀,取少许细胞计数,调整细胞数至 $2 \times 10^7/\text{ml}$ 。(2)在细胞悬液中分别加入 GM-CSF(终浓度为 $1.25\text{ng}/\text{ml}$); $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (终浓度 10^{-8}M);地塞米松(终浓度 10^{-7}M);FCS 终浓度 20%,DMEM 补足体积。用吸管轻柔吹打至混合均匀。(3)将上述混合物分别种入到 6 孔培养板中,每孔 1.3ml(6 孔板每孔中预置有玻片 1 张)。培养板放入 CO_2 培养箱 37°C 、5% CO_2 、100%湿度培养 7 天,每 3 天换液 1 次,每次换液一半。每日在倒置相差显微镜下观察细胞生长情况。第 7 天取出玻片进行染色。

1.3.5 破骨细胞鉴定:(1)抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色:染色药盒购自中国医科院血液病研究所。按说明书操作。1)作用液配制:①5 号液配制:称 5 号粉剂 10mg 溶于 0.25ml 蒸馏水中。②六偶氮品红配制:取 4 号液 0.17ml,5 号液 0.17ml 混匀,混合液体成草黄色,约 1min 后使用。③取 2 号储备液 A 1ml,3 号液 0.2ml,加 2 号储备液 B 2.8ml,再加六偶氮品红 0.3ml,混匀、立即过滤到涂片上。2)操作步骤:①盖玻片上滴加 1 号固定液数滴固定 1min,流水冲洗 2min,晾干。②盖玻片上滴加作用液数滴,于 37°C 湿盒内孵育 60min,取出后流水冲洗 2min。③盖玻片用 1% 酸酒精(70%酒精 99ml 加浓盐酸 1ml,混匀)浸泡 1~5s,自来水冲洗 2min。滴加 6 号液数滴,复染 10min。④盖玻片用 0.5% 氨水浸泡 3 秒,自来水冲洗 5~10min,晾干。(2)破骨细胞计数:200 倍光镜下观察,每张培养板 3 张玻片计数。以 TRAP 阳性多核细胞(3 个或 3 个以上核)为骨髓源性破骨细胞,计数每个玻片上 10 个随机视野($\times 200$)中的骨髓源性破骨细胞数,其平均值为每张玻片上多核细胞数,每组所有玻片平均值为各组多核细胞数。

1.3.6 IL-6 mRNA 基因表达水平的检测:(1)骨髓细胞获得:将余下股骨用骨剪剪断两端骨髓。用 PBS(pH7.45)冲洗骨髓,重复 3 次,将含骨髓的冲洗液收集在培养皿中、用吸管轻柔吹打培养液数次,以吹散组织团块。(2)RNA 提取:采用 Trizol 法。主要过程如下:①以上细胞悬液移入 EP 管,2 000r/min 离心 3min,去上清。②上述 EP 管中加 1.0ml TRIZOL,混匀,再加入氯仿 200 μl 后混匀,室温静置 5min,然后 12 000r/min,4 $^\circ\text{C}$ 离心 10min。③取上清约 300 μl ,加入无水乙醇沉淀。弃上清后加入 75% 冰乙醇清洗 1 次。④以 30 μl 消毒后经 DEPC 处理双蒸水溶解沉淀,储存于 70°C 待用。(3)逆转录 PCR:①cDNA 合成:用 oligo(dT)完成反转录,反应体系总体积为 20 μl ,其中二硫苏糖醇

(DTT)2 μl (1mM),dNTP2 μl (10mM),RNA 酶抑制物 0.5 μl (40U/ μl),逆转录酶 0.5 μl (50/ μl)(德国 B. M ExpandTM Rev. Transcr),总 RNA1 μl ,oligo(dT)1 μl (20pmol/L)。反应条件:首先 42°C 50min,然后 95°C 5min。②PCR 反应:反应体系总体积为 20 μl ,其中 cDNA 50ng, Mg^{2+} 2.5mmol/L, dNTP1 μl (10mM),引物各 20pmol, Taq 酶(1.5U/管)。按下列条件进行扩增循环:首先 95°C 预变性 4min;然后 94°C 变性 30s,之后各引物 62°C 45s, 71°C 延伸 45s,共 24 次循环。反应产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳检验分析。(4)PCR 产物半定量:扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后拍照,然后进行光密度扫描,并以 LP-19 为内参照校正作相对量分析,以 LP-19 光密度扫描数值为 100%,以两者之积分吸光度比值百分数表示(IMAGE1 图像分析系统,同济医科大学千屏医学影像公司)。

2 结果

2.1 各组骨髓源性破骨细胞形成数比较:附表表示,模型组破骨细胞形成数明显多于假手术组($P < 0.01$),而针刺后破骨细胞形成数显著低于模型组($P < 0.01$),与雌激素组相比差异无显著性($P > 0.05$);艾灸组虽稍低于模型组,但差异无统计学意义。

2.2 各组骨髓细胞 IL-6 mRNA 的表达:附表表示,模型组与假手术组比较,骨髓细胞 IL-6 mRNA 表达呈有意义增高($P < 0.01$),而针刺组升高的水平明显低于模型组($P < 0.01$),与雌二醇组相比有显著性差异;艾灸组虽稍低于模型组,但差异无统计学意义。

附表 各组破骨细胞形成数及 IL-6mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	标本数	破骨细胞数(个/玻片)	IL-6(%)
假手术组	5	12.12 $\pm$ 3.32	31.21 $\pm$ 2.31
模型组	5	23.54 $\pm$ 2.78 ^{##}	74.03 $\pm$ 8.14 ^{##}
雌二醇组	4	13.13 $\pm$ 3.21 [△]	47.21 $\pm$ 8.11 ^{△##}
针刺组	5	16.51 $\pm$ 5.27 ^{△#}	56.28 $\pm$ 7.51 ^{△##*}
艾灸组	5	22.17 $\pm$ 6.18 ^{##*}	68.31 $\pm$ 10.43 ^{##*}

与模型组比较, $\Delta P < 0.01$;与假手术组比较, $\# P < 0.05$, $\#\# P < 0.01$;与雌二醇组比较, $* P < 0.01$

3 讨论

随着妇女绝经后雌激素水平降低,导致一系列细胞因子如白细胞介素 1(IL-1)、白细胞介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF)等在体内分泌增多,研究表明,雌激素减少后出现的骨吸收增强最先是由 IL-6 启动的^[4]。由 IL-6 诱导的破骨活性增强,溶骨所释放的产物激活巨噬细胞产生更多的细胞因子,包括 TNF,后者反过来增加和扩大溶骨的应答,因此 IL-6 被认为是病理条件下调节骨吸收的重要因子。

IL-6 促进人和小鼠破骨细胞的早期形成,IL-6 在富含前破骨细胞的胎鼠的掌骨培养中促进骨吸收^[5]。国内外大量实验证实,IL-6 增加破骨细胞形成,刺激骨吸收。早在 1990 年,Noriyoshi^[6]研究发现,IL-6 可刺激长时间人骨髓培养中的破骨细胞多样核细胞形成。Roodman 也证实了这一点,并报道加入 IL-6 抗体可抑制破骨细胞形成吸收陷窝。用 IL-6 基因缺失的小鼠进行实验,切除这些小鼠卵巢后未出现骨量丢失,而正常小鼠去势后很快出现骨量下降^[7]。这是因为正常小鼠去势后雌激素下降,使 IL-6 的表达增加,增强骨质吸收。破骨细胞起源于骨髓造血干细胞,具体地说,起源于粒细胞/巨噬细胞克隆形成单位(CFU-GM),其形成包括由 CFU-GM 经过增殖形成单核破骨细胞前体,后者融合形成多核巨细胞,再经过活化后形成成熟的破骨细胞。IL-6 主要作用于破骨细胞形成的早期阶段,通过增加 CFU-GM 形成、增加破骨细胞早期前体的分裂,加强破骨细胞骨吸收而在骨质吸收中发挥重要作用。

本实验表明,模型组破骨细胞形成数、IL-6 mRNA 表达率较正常组高($P<0.01$),表明去卵巢大鼠由于雌激素水平下降,导致 IL-6 骨吸收细胞因子产生过量,作用于破骨细胞形成的早期阶段,增加破骨细胞早期前体的分裂,促进了破骨细胞骨吸收,从而导致

骨质疏松。而去卵巢大鼠经雌激素、针刺及艾灸治疗后,IL-6 mRNA 表达率、破骨细胞形成数较模型组有不同程度的下降,而用针刺及雌二醇治疗后破骨细胞数明显减少,与模型组比较差异显著($P<0.01$),说明针刺及雌激素治疗可有效调节 IL-6 的分泌,使 IL-6 表达下降;针刺使破骨细胞形成数减少,由此有效地抑制了骨吸收。

参考文献

- 1 刘献祥,吴明霞,吴炳煌,等. 针刺对原发性骨质疏松症影响的实验和临床研究. 中国骨伤,2000,13(9):519-521.
- 2 吴明霞,吴炳煌,刘献祥,等. 艾灸对绝经后骨质疏松症影响的实验的临床研究. 中国针灸,2002,22(5):334.
- 3 吴明霞,吴炳煌,钱松涛,等. 针刺对骨质疏松患者骨密度作用的临床研究. 福建中医学院学报,2000,10(4):33-34.
- 4 周丕琪,沈霖,杜靖远,等. 绝经后骨质疏松症与血清 IL-6, TNF- α 浓度关系的临床研究. 中国骨质疏松杂志,2001,7(1):1-3.
- 5 Lowik CW, van der Pluijm G, Bloys H, et al. Parathyroid hormone (PTH) and PTH-like protein (PLP) stimulate IL-6 production in osteogenic cells; a possible role of IL-6 in osteoclastogenesis. Biochem Biophys Res Commun,1989,162(3):1546-1552.
- 6 Kurihara N, Bertolini D, Suda T, et al. IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in longterm human marrow cultures by inducing IL-1 release. J Immunol, 1990,144(11):4226-4230.
- 7 Suda T, Udagawa N, Nakamura I, et al. Modulation of osteoclast differentiation by local factors. Bone, 1995,17(2Suppl):87s-91s.

北京市东方中医药培训中心

2003 年全国名老中医治疗疑难病经验高级专修班招生通知

1. 注重信誉:北京市东方中医药培训中心由中华中医药学会继续教育部主管,中国中医研究院、中医杂志社主办,专门举办国家级继续教育学习班和专病研讨班,其中 2002 年系列高级专修班深得各地学员好评。

2. 雄厚师资:依托中华中医药学会、中国中医研究院和中医杂志社在科研、临床、教学和学术方面的独有优势,集各种著名权威、专家、博导,面对面传授,浓缩理论与实践精华,突出实用与提高。学会一招,办一专科,兴一医院,造福一方。

3. 中西结合 专题突出:

(1) 2003 年 4 月 24 日~29 日在北京举办“全国心血管病、脑病高级专修班”,由谢海州、周玉萍等教授主讲。

(2) 2003 年 5 月 8 日~13 日在北京举办“全国中西医结合治疗肝病肿瘤高级专修班”,由钱英、陈立华等教授主讲。

(3) 2003 年 5 月 22 日~27 日在北京举办“全国不育不孕症高级专修班”,由王瑞、李日庆、蔡连香等教授主讲。

(4) 2003 年 6 月 19 日~24 日在北京举办“全国痹证高级专修班”,由路志正、房定亚等教授主讲。

(5) 2003 年 9 月 25 日~30 日在北京举办“全国中医临床专病专治高级专修班”,由李俊龙、杜怀棠等教授主讲。

(6) 2003 年 10 月 16 日~21 日在北京举办“全国针药并用专病专治高级专修班”,由李传杰、魏明丰等教授主讲。

(7) 2003 年 11 月 6 日~11 日在北京举办“全国中西医结合治疗皮肤病、性病高级专修班”,由庄国康、许统等教授主讲。

4. 收费合理 准时开班:以上各班每期学费 680 元,第 1 天均为报到日,学习期间酌情安排临床见习。学习结业后颁发中英文对照结业证书(盖钢印)和国家继续教育学分证书,升职晋级,全国通用。凡参加专修班学员的优秀论文将优先于《中医杂志》每年正式出版的增刊中发表。欲学习者请先交报名费 10 元(注明班别),附个人简历(注明学历、职称、电话等)。我中心收到报名函后即做排名和安排,经审查合格,即发入学通知。

广告批准号:京教社广字(东城)2002156 号

中医杂志社与北京东方中医药培训中心举办 手穴诊疗培训班

为发掘民族瑰宝、弘扬中医精粹,满足广大学员开展特色诊疗的需求,中医杂志社与北京东方中医药培训中心将于 2003 年 6 月 6 日至 10 日(5 日报到)在北京联合举办“手穴诊疗培训班”。由中国老教授协会医学专业委员会手诊分会副会长、江苏省常州市手穴诊疗研究所所长刘浩兴主讲,传授“望诊、触诊、压诊”的手穴诊疗方法。该法以中医动态整体观念为基础,交融西医静态组织解剖论,率先运用阴阳理论,将现代基因观点应用于手诊,数分钟即可概知家族遗传性疾病及自身健康状况、鉴别诊断及诸多疑难病症的诊治观点,并能根据掌、指的各种特征预示部分隐患。该手诊法中西医结合,直观明了,易学易用。为广大学务工作者诊断寻根、治病求本,不治已病治未病提供了一条新思路、新方法。

学费 680 元,学期 5 天,结业后颁发中英文对照(盖钢印)的结业证书和继续教育学分证书。欲学习者请先交报名费 10 元(信封上请注明“手穴班”字样),附个人简历(注明学历、职称、电话等)。我中心收到报名函后,经审查合格,即发入学通知。

以上培训班报名联系地址:北京东城区北新仓 18 号中医杂志社北京东方中医药培训中心,邮政编码:100700。

电话:(010)64013009,传真:(010)86472013。联系人:梅丽。

京教社广字(东城)2003012 号 (广告编号:20030214)