

针灸推拿

逆灸对佐剂性关节炎大鼠保护效应的抗氧化机制研究

李晓泓¹ 张露芬¹ 郭顺根² 解桔萍¹ 李学武¹
翟景慧¹ 李 辉³ 朱文莲¹ 周登方¹ 张 慧¹

摘要 目的:探讨逆灸对完全弗氏佐剂关节炎(AA)大鼠的保护作用及抗氧化机制。方法:大鼠大椎穴逆灸(预先艾灸)。用AA大鼠模型,观察逆灸对AA大鼠早期和继发期原发关节组织病理学及下丘脑、血浆中超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)含量的影响。结果:与正常组比较,AA各组大鼠原发足踝关节滑膜炎表现更为明显,早期重于继发期,继发期关节软骨呈现部分损坏。同时,AA各组大鼠血浆和下丘脑SOD活性下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$);MDA含量增加($P<0.01$)。与同期AA各组比较,逆灸可使原发足踝关节的组织病理学得到明显的改善,并使血浆、下丘脑SOD活性明显回升($P<0.05$ 或 $P<0.01$),血浆MDA明显下降($P<0.05$),但仅使继发期AA大鼠下丘脑MDA有所下降($P<0.01$),对早期下丘脑MDA影响不大($P>0.05$)。逆灸还可使正常大鼠血浆SOD活性显著提高($P<0.05$)。结论:逆灸对AA大鼠早期和继发期原发关节炎具有阻抑减轻的保护作用,这可能与逆灸调整早期及继发期血液及下丘脑自由基代谢失衡有关。

主题词 关节炎/针灸疗法 @ 逆灸

Study on Antioxidative Mechanism of Preventive Moxibustion in Rats with Adjuvant Arthritis

Li Xiaohong¹, Zhang Lufen¹, Guo Shungen², et al.

(¹. College of Acupuncture and Moxibustion, Beijing University of TCM, Beijing 100029; ². College of Preclinical Medicine, Beijing University of TCM)

Objective: To study on protective effect and antioxidative mechanism of preventive moxibustion in rats with adjuvant arthritis (AA). **Methods:** Preventive moxibustion was applied at Dazhui (GV 14) in AA rats, and the histopathological changes of the joints, the activity of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) content in hypothalamus and plasma were investigated in the rats at the early and secondary stages. **Results:** As compared with the normal group, primary synovitis of the ankle joint was more obvious in the various AA groups, and at the secondary stage, the articular cartilage showed a part of injury. SOD activities decreased and MDA content increased in plasma and hypothalamus of the various AA groups ($P<0.05$ or $P<0.01$). The preventive moxibustion could improve significantly histopathological changes of the primary ankle joints, increase the activities of SOD in plasma and hypothalamus ($P<0.05$ or $P<0.01$) and decrease MDA level in plasma ($P<0.05$) and the hypothalamus ($P<0.01$) of AA rats at the secondary stage ($P<0.01$), but did not significantly change MDA level in the hypothalamus ($P>0.05$) at the early stage, as compared with the various AA groups at the same stage. The preventive moxibustion could significantly increase plasma SOD activity in the normal rat ($P<0.05$). **Conclusion:** Preventive moxibustion has protective action of inhibiting and relieving primary arthritis at the early and secondary stages in AA rats, and this action is possibly related with preventive moxibustion regulating metabolism of free radicals in blood and the hypothalamus at the early and secondary stages.

Key Words Arthritis/acupuncture & moxibustion therapy; @ Preventive Moxibustion

逆灸是针灸“治未病”的方法之一,是指在机体未病之时应用艾灸刺激一定的腧穴,通过激发自身潜能,以提高机体耐受与应变能力的传统方法。佐剂性关节

炎(AA)是传统经典的免疫性炎症动物模型^[1]。我们以往实验研究已经证实,逆灸对AA早期和继发期免疫性炎症具有一定的阻抑减轻作用^[2]。为进一步探讨逆灸保护作用的机制,本实验观察预先艾灸对正常及AA大鼠下丘脑和血浆中超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)含量的影响,并初步探讨逆灸对AA产生延迟保护效应的抗氧化机制。

1 材料

1.1 实验动物:健康成年Wistar大鼠48只,雌性,体

基金项目:国家自然科学基金课题(90209026);教育部优秀青年骨干教师资助课题

1 北京中医药大学针灸学院,北京市北三环东路11号(100029)

2 北京中医药大学基础医学院

3 中日友好医院针灸科

收稿日期:2005-01-12;修回日期:2005-04-11

Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

重 180~220g, 清洁级, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 主要实验仪器及设备: 724 型微机可见光分光光度计(上海光学仪器厂); ZK 380 型低温离心机(德国); ER-182A 型电子天平(日本); Leitz 1410 型石蜡切片机(德国); 恒温水浴箱(北京光学仪器厂); 漩涡混匀器(苏州科学仪器厂)。

1.3 主要试剂: 液体卡介苗(北京天坛生物制品股份有限公司, 4℃保存); 苏木素精(美国 Sigma 公司); 伊红(美国 Sigma 公司); SOD、MDA 试剂药盒由南京建成生物工程研究所提供(批号 20030624)。

2 方法

2.1 动物分组: 动物常规饲养 1 周后, 随机分为 6 组, 每组 8 只。正常组不造模, 不预灸。AA 早期组参阅文献[1]方法造模, 造模第 3 天取材。逆灸早期组于造模前进行艾灸, 并于灸结束后应用前法造模, 造模第 3 天取材。AA 继发期组应用前法造模, 造模第 16 天取材。逆灸继发期组于造模前进行艾灸, 并于灸结束后应用前法造模, 造模第 16 天取材。逆灸正常组于造模前进行艾灸, 灸结束后取材。

2.2 模型制备: (1) 弗氏完全佐剂(FCA)的制备: 液体卡介苗 160mg, 80℃, 1 小时灭活, 均匀加入经过高压灭菌的液体石蜡油和羊毛脂混合液 16ml 中(按 2:1 重量比), 使浓度为 10mg/ml, 调匀即成 FCA, 置 4℃冰箱保存备用。(2) AA 模型制备: 于严格无菌条件下, 在每只大鼠右后足掌皮下注射 FCA 0.1ml, 随后每天观察关节局部肿胀情况。

2.3 取穴及逆灸方法: 参照全国统编教材《腧穴学》和协编教材《实验针灸学》大鼠标准穴位图谱定位取大椎穴, 将穴区直径 1.5~2cm 的鼠毛剪干净, 暴露穴区皮肤。让大鼠处于自然状态下, 将小号艾炷点燃后直接放置在已经剪毛的大椎穴处施灸, 每次 1 壮。灸后大椎穴局部略红, 无发泡烫伤。隔日灸 1 次, 共灸 8 次, 持续 16 天。

2.4 取材与样品基础处理: 各组大鼠快速断头取血, 注入已加抗凝剂的试管若干时间后, 4000 转/分钟低温离心 15 分钟, 分离上清, -20℃保存。冰上迅速取下丘脑, 在生理盐水中煮沸 5 分钟称重, 置于玻璃匀浆管内, 加入 1N HCl 1ml, 充分匀浆后室温放置 100 分钟, 加入 1N NaOH 0.8~1ml 中和至一定的 pH 值; 3500 转/分钟离心 10 分钟, 取上清, -20℃保存。取各组大鼠右后踝关节, 常规甲醛固定, 流水冲洗过夜, 5.6% EDTA-2Na 脱钙 4 周后, 流水冲洗过夜, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 组织切片 7 μm。

2.5 检测指标及方法: (1) 关节组织病理学切片观察: 常规脱蜡, HE 染色, 脱水, 封片, 光镜下观察。血浆 SOD 活性 = (对照管吸光度 - 测定管吸光度) / 对照管吸光度 / 50% × 反应体系的稀释倍数; MDA 含量 = (测定 OD 值 - 测定空白 OD 值) / (标准 OD 值 - 标准空白 OD 值) × 标准品的浓度 (10nmol/ml) × 样本测试稀释倍数。下丘脑组织匀浆中 SOD 活性 = (对照管吸光度 - 测定管吸光度) / 对照管吸光度 / 50% × 反应液总体积 / 取样量 (ml) / 组织中蛋白含量 (mg prot/ml); MDA 含量 (nmol/mg prot) = (测定 OD 值 - 测定空白 OD 值) / (标准 OD 值 - 标准空白 OD 值) × 标准品浓度 (10nmol/ml) / 蛋白含量 (mg prot/ml)。

2.6 统计学方法: 所有数据以平均值 ± 标准差表示。用 SPSS 10.0 软件进行分析, 各组间差异采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 逆灸对 AA 大鼠原发右足关节病理组织学变化的影响: 光镜下观察关节 HE 染色的切片, 正常组大鼠关节结构正常。AA 各组大鼠关节滑膜间皮下组织内, 有大量炎性细胞浸润, 滑膜血管增多, 滑膜水肿。上述情况 AA 早期比继发期更明显, 但早期未见明显的软骨破坏, 继发期关节软骨表面呈现粗糙、剥失、缺损, 有的出现纤维结缔组织增生, 软骨基质和下骨的小梁骨损坏。逆灸各组大鼠滑膜间皮细胞增生程度和炎性细胞浸润及纤维结缔组织增生较同期 AA 组有所减轻, 关节软骨面较完整。

3.2 逆灸对血浆、下丘脑 SOD 活性的影响: 表 1 示, 与正常组比较, AA 各组大鼠血浆 SOD 活性明显降低, 早期比继发期更明显, 但随疾病进程呈现自发缓升的趋势。AA 大鼠下丘脑 SOD 活性明显降低, 早期同继发期相似 ($P < 0.01$)。与同期 AA 组比较, 逆灸可使 AA 大鼠血浆 SOD 活性明显回升, 无论早期还是继发期均非常明显 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 几乎接近正常组。逆灸可使 AA 大鼠早期和继发期下丘脑受抑的 SOD 活性明显回升 ($P < 0.01$)。逆灸亦可使正常大鼠的血浆 SOD 活性显著提高 ($P < 0.05$), 但对下丘脑 SOD 活性影响不大。

3.3 逆灸对血浆、下丘脑 MDA 的影响: 表 2 示, 与正常组比较, AA 各组大鼠血浆 MDA 早期和继发期持续升高 ($P < 0.01$)。但下丘脑 MDA 早期变化不明显, 继发期开始明显上升 ($P < 0.01$)。与同期 AA 组比较, 逆灸各组可使 AA 大鼠血浆 MDA 明显下降, 无论早期还是继发期均较明显 ($P < 0.05$)。但仅使继发期 AA 大鼠下丘脑升高的 MDA 有所下降 ($P < 0.01$)。逆灸对

正常大鼠血浆、下丘脑 MDA 影响不大。

表 1 逆灸对血浆、下丘脑 SOD 活性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	血浆 SOD(U/ml)	下丘脑 SOD(U/mg prot)
正常组	8	95.143 $\pm$ 8.10	85.29 $\pm$ 4.44
AA 早期组	8	65.571 $\pm$ 8.54**	59.29 $\pm$ 7.19**
逆灸早期组	8	90.375 $\pm$ 2.14 $\Delta\Delta$	97.14 $\pm$ 6.90 $\Delta\Delta$
AA 继发期组	8	81.377 $\pm$ 5.18* Δ	58.71 $\pm$ 7.98**
逆灸继发期组	8	91.571 $\pm$ 10.08 $\Delta\Delta\blacktriangle$	86.14 $\pm$ 3.81 $\blacktriangle\blacktriangle$
逆灸正常组	8	107.111 $\pm$ 3.31*	82.88 $\pm$ 5.17

与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 AA 早期组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 AA 继发期组比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ 。下表同

表 2 逆灸对血浆、下丘脑 MDA 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	血浆 MDA(U/ml)	下丘脑 MDA(nmol/ml)
正常组	8	9.3886 $\pm$ 0.6236	1.3229 $\pm$ 0.1595
AA 早期组	8	11.7214 $\pm$ 0.6973**	1.8486 $\pm$ 0.2233
逆灸早期组	8	9.1425 $\pm$ 0.4316 Δ	1.6886 $\pm$ 0.1531
AA 继发期组	8	12.5400 $\pm$ 0.6689**	2.6343 $\pm$ 0.3306** Δ
逆灸继发期组	8	10.5271 $\pm$ 0.5795 $\blacktriangle$	1.4957 $\pm$ 0.2456 $\blacktriangle\blacktriangle$
逆灸正常组	8	10.3844 $\pm$ 0.4320	1.2450 $\pm$ 0.1856

4 讨论

本实验选用 FCA 制备的 AA 模型,可较好地反映免疫失调与炎症^[3]。实验观察到,应用 FCA 造成 AA 后,大鼠关节出现较严重的病理征象,同时 AA 大鼠下丘脑与血浆的 SOD 活性明显降低,早期比继发期更突出。提示 AA 可使机体清除自由基抗氧化损伤的能力下降。但反映机体受自由基攻击程度的毒性物质 MDA,在 AA 大鼠早期变化并不明显,继发期开始明显上升,说明 MDA 在体内的堆积需要一定的时间。近年的研究发现,SOD 可抑制自由基所致的炎症过程,具有抗炎作用。模拟 SOD 可以对活性氧相关疾病产生预防及治疗作用^[4]。进一步的研究证明^[1],SOD 对 AA 大鼠的关节局部、全身病变的影响非常明显,特别是可明显减轻继发期的全身病变情况。

现代应激理论认为,适度的应激可启动机体内源性保护机制,使机体提高耐受与抵抗力。研究也证明,多种预处理方法可使机体对随后损伤性刺激产生耐受,这种耐受与机体抗氧化能力的提高有关^[5~8],并与减少组织中的 MDA、同时提高 SOD 活性有关。近年来针灸预处理对疾病抵御与保护的研究也发现,针刺的延迟保护作用与 SOD、MDA 等物质关系密切,SOD、MDA 可能是机体对随后疾病产生耐受的物质基础之一^[9]。已有研究证明,接受适应动物脑匀浆液和生理盐水者长

1.8 和 2.0 倍。研究发现,针刺预处理脑组织提取液可提高机体的缺氧耐受能力,具有抗缺氧损伤作用。本实验采用传统的逆灸方法,与针灸预处理方法有相似之处,在造模前预先对机体的大椎穴施灸,持续一段时间后,造成 AA 模型,观察逆灸对 AA 的影响。结果显示,逆灸各组可使 AA 大鼠的 HE 病理情况得到明显改善,尤其是继发期更为明显。逆灸可使 AA 大鼠早期和继发期下丘脑、血浆受抑 SOD 活性明显回升,甚至使血浆 SOD 活性接近正常。也可使 AA 大鼠早期和继发期血浆 MDA 下降,尤其在继发期下降更明显。本实验中逆灸减轻 AA 造成的免疫性炎症,改善 AA 大鼠早期和继发期关节组织病理状况,可能是因为逆灸充当了使机体产生适度应激的有效手段,启动了机体内源性抗氧化保护机制,激发了机体内在抗氧化潜力,一定程度上改善了 AA 早期及继发期自由基代谢失衡的状态,进而提高了机体对损伤性刺激产生耐受与保护的能力。

值得注意的是,逆灸还可适度提高正常大鼠血浆 SOD 活性,这可能是逆灸使机体产生适应,并减轻 AA 大鼠炎症级联反应的重要物质基础。逆灸作为一种穴位局部的药热刺激,是否也可引起机体产生适量的热休克蛋白,热休克蛋白是否与保护组织抗氧化酶活性的作用相关,均有待进一步的研究证实。

参考文献

- 1 朱永进,俞光第,印其章.奥克丁(SOD)对佐剂关节炎大鼠的影响.苏州医学院学报,2001,21(4):410~412.
- 2 李晓泓,张露芬,郭顺根,等."逆灸"对佐剂性关节炎大鼠早期及继发期炎症细胞因子和局部足肿胀率的影响.中国临床康复,2005,15(9):123~125.
- 3 徐叔云,卡如谦,陈修.药理实验方法学.第2版.北京:人民卫生出版社,1992:933~949.
- 4 王智,李培凡,刘斌.SOD 模拟酶及其生物效果研究进展.继续医学教育,2003,17(3):36~37.
- 5 李洪波,陈润芬,王长谦,等.间歇性低氧预处理对缺血心肌的促血管生成作用的实验研究.中国病理生理杂志,2004,20(1):103~108.
- 6 赵红岗,李文斌,刘惠卿,等.肢体缺血预处理减轻大鼠海马缺血/再灌注损伤.中国应用生理学杂志,2004,20(1):50~53.
- 7 曾常春,唐勇.低强度激光的生物学效应及抗自由基损伤的作用.中国激光医学杂志,2004,13(1):48~50.
- 8 Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, et al. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. Circulation, 2002, 106(23):2881~2883.
- 9 柏志全,蒋建伟,周丽丽,等.电针穴位对脑缺血一再灌注大鼠海马内MDA含量及SOD、GSH-PX活性的影响.暨南大学学报(医学版),2005,24(2):39~41.