

· 基础研究 ·

针刺治疗鼠胶原性关节炎的免疫学研究及其与 Cx43 基因的关系

颜灿群 占克斌 黄光英 王伟

【摘要】目的 探讨针刺治疗 Cx43 基因敲除鼠胶原性关节炎(CIA)的疗效及免疫学机制。**方法** 以 Cx43 基因敲除小鼠杂合型和野生型为研究对象,用牛 II 型胶原诱导 CIA 模型。在初次免疫后第 4 周开始针刺治疗,连续 3 周。观察关节炎分数,流式细胞术检测脾淋巴细胞中 Th 细胞亚群含量。**结果** Cx43 基因敲除杂合型小鼠 CIA 发病率及关节炎分数明显低于野生型小鼠;针刺抑制野生型 CIA 小鼠 Th1 细胞分泌,降低 Th1/Th2 比值,对 Th2 细胞的分泌无明显影响;而针刺对 Cx43 基因敲除杂合型 CIA 鼠无明显影响。**结论** 针刺治疗野生型 CIA 小鼠疗效明显优于 Cx43 基因敲除杂合型 CIA 小鼠,提示针刺疗效与 Cx43 基因密切相关,其疗效可能是通过调节 Th1/Th2 平衡起作用的。

【关键词】 Cx43; 针刺; 胶原性关节炎; 流式细胞术; Th 细胞亚群

Immunological effects of acupuncture on mice with collagen-induced arthritis in Cx43 knockout mice YAN Can-qun*, ZHAN Ke-bin, HUANG Guang-ying, WANG Wei. * Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: HUANG Guang-ying, Email: Gyhuang@tjh.tjmu.edu.cn

【Abstract】Objective To explore the effects of acupuncture on Cx43 knockout mice with collagen-induced arthritis (CIA) and its immunological mechanism. **Methods** Heterozygotes (Cx43 +/-) and wild-types (Cx43 +/+) mice were used to establish the CIA mice model. Acupuncture were carried out at 3 weeks after initial immunization once a day for 3 weeks. Arthritis score and day of onset of arthritis were recorded. The intracellular cytokine was detected with flow cytometry to quantitate the splenic Th1/Th2 cell subsets in mice with CIA. **Results** The incidence and arthritis score in Cx43 +/- mice were much lower than in Cx43 +/+ mice. Acupuncture can decrease the number of Th1 and Th1/Th2 in Cx43 +/+ mice but had no effect on Cx43 +/- mice. **Conclusion** The effect of acupuncture on Cx43 +/+ mice was significantly better than on Cx43 +/- mice. It was shown that the effect was related to Cx43 gene, which might regulated the proportion of Th1/Th2.

【Key words】 Cx43; Acupuncture; Collagen induced arthritis; Flow cytometry; Th cell subsets

经络学说是中医学理论体系的重要组成部分,半个多世纪以来,我国在经络实质的研究方面做了大量工作,取得了一系列重要进展,其中孙兆贵^[1]提出的细胞通讯经络实质假说从细胞通讯角度进行了新尝试。这一假说给经络实质的研究提供了一个崭新的视角。以往的研究表明,在穴位处的表皮中发现缝隙连接数量明显多于对照皮肤^[2],Cx43 可能是大鼠上皮细胞和成纤维细胞中维持细胞缝隙连接通讯功能和神经循经感传特异表达的连接蛋白^[3]。缝隙连接蛋白 Cx43 广泛表达于表皮上皮细胞、真皮成纤维细胞、皮

下筋膜的肥大细胞以及肌肉肌膜细胞的胞浆和胞膜中^[4]。缝隙连接蛋白及缝隙连接可能是穴位的主要组成成分,针刺能明显增加缝隙连接蛋白在穴位处的表达^[5]。本研究设想针刺可能是通过 Cx43 产生疗效,故采用 Cx43 基因敲除小鼠来进行研究,旨在探讨 Cx43 与针刺疗效的相关性及其机制。

材料与方法

一、实验动物及其基因型的鉴定

Cx43 基因敲除小鼠:自美国 Jackson 实验室购得 Cx43 基因敲除小鼠杂合子 2 对,在我院 SPF 级动物房饲养并繁殖成功。在其子鼠出生后第 21 天参照 Jackson 实验室关于缝隙连接蛋白 Cx43 基因敲除鼠的说明,依据聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 进行基因型鉴定。将产生的 Cx43 基因敲除杂合型小鼠 (Cx43 +/-) 和野生型小鼠 (Cx43 +/+) 作为

基金项目:国家自然科学基金重大研究计划资助项目(90209009)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合研究所(颜灿群、黄光英),神经内科(王伟);深圳市第五人民医院急诊科(颜灿群),神经内科(占克斌)

通讯作者:黄光英,Email:Gyhuang@tjh.tjmu.edu.cn

研究对象,选择 7~11 周龄的雄性小鼠。

二、试剂和仪器

1. 试剂:牛 II 型胶原蛋白(Collagen II, C II)、弗氏完全佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)购自美国 Chondrex 公司;Brefeldin A,异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的抗小鼠 CD3(145-2C11 克隆)单抗(CD3-FITC),藻红蛋白(phycoerythrin, PE)标记的抗小鼠 CD8(53-6.7 克隆)单抗(CD8-PE),藻红蛋白-花青苷 5(Phycoerythrin-Cy5, PE-CY5)标记的抗小鼠白细胞介素 4(interleukin-4, IL-4)(11B11 克隆)单抗(IL-4-PE/CY5),抗小鼠 γ 干扰素(Interferon- γ , IFN- γ)(XMG-1.2 克隆)单抗(IFN- γ -PE/CY5),及相对应的同型对照抗体均购自美国 eBioscience 公司;佛波醇乙酯(phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA)购自德国 Merck 公司;离子霉素(ionomycin)购自 Alexis 公司;破膜固定剂(试剂 A、B)购自 Caltag 公司。

2. 仪器:PCR 仪(德国 eppendorf),流式细胞仪器(FACSalibur,美国 Becton Dickinson 公司),CO₂ 培养箱(Forma Scientific 公司)。

三、胶原性关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)模型的建立及关节炎评分

液态的 C II 与 CFA 等体积混合并充分乳化,在小鼠尾部(距尾基部 2~3 cm 处)皮内注射 0.1 ml(含 0.1 mg C II 和 0.25 mg 结核分枝杆菌),首次免疫后第 21 天在小鼠尾基部按上述方法加强免疫。对照组用 CFA 与冰醋酸等体积混合,充分乳化后进行免疫(剂量、方法同实验组)。加强免疫后每隔 1 d 观察小鼠成模情况,并根据肉眼所见的关节炎严重程度进行临床评分。各关节病变程度按 4 分评分法^[6]:0 分为关节正常;1 分为轻度关节肿胀或不伴红斑,无关节变形;2 分为明显关节肿胀,但无关节变形;3 分为关节强直或变形。四肢合计最高评分为 12 分。

四、分组及治疗

未造模的 Cx43 +/+ 和 Cx43 +/- 小鼠分别设为 A、B 组,将造模成功的 Cx43 +/+ 小鼠按随机分配的原则分为 C、E 组,将造模成功的 Cx43 +/- 小鼠按随机原则分为 D、F 组。具体分组情况如下:A 组——Cx43 +/+ 小鼠对照组;B 组——Cx43 +/- 对照组;C 组——Cx43 +/+ 小鼠成模组;D 组——Cx43 +/- 小鼠成模组;E 组——Cx43 +/+ 小鼠成模针刺组;F 组——Cx43 +/- 小鼠成模针刺组。每组 4 只小鼠。

针刺组小鼠以自制布袋固定,选取双侧足三里(后三里)穴(膝关节下外侧,腓骨小头下 3.5 mm

处),直刺 3 mm,每 5 min 捻转 1 次,留针时间共 30 min。E、F 组治疗从首次免疫后第 4 周开始,每天 1 次,连续 3 周,共 21 次。

五、流式细胞仪检测淋巴细胞 Th 亚群

根据检测有特征性的细胞内细胞因子 IFN- γ 和 IL-4 来区分淋巴细胞 Th1 与 Th2 亚群^[7]。断颈处死小鼠,取新鲜的脾组织,分离、洗涤并悬于 1640 培养液中,计数,调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml;将细胞悬液移入 24 孔培养板中,分别加入刺激剂 PMA(20 ng/ml)、Ionomycin(1 μ g/ml)和蛋白质转运抑制剂 brefeldin A(10 μ g/ml),37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 环境下 CO₂ 培养箱内培养 4 h;收集细胞,离心后加入 CD3-FITC 和 CD8-PE 单抗及二者对应的同型对照抗体,避光孵育 15 min;加入 100 μ l 固定剂(试剂 A)室温孵育 15 min;染色缓冲液洗涤、离心后,加入 100 μ l 破膜剂(试剂 B),并分别加入 IL-4-PE/CY5、IFN- γ -PE/CY5 及二者对应的同型对照抗体,避光孵育 20 min;洗涤后,将细胞悬于 400 μ l 染色缓冲液中,上流式细胞仪检测,以 CD3⁺CD8⁻设门,用 Cell Quest 软件分别检测胞内细胞因子 IL-4 和 IFN- γ 的含量。

六、统计学分析

发病率的比较采用卡方检验,其它所有数据均采用方差分析。

结 果

一、C II 免疫 Cx43 +/+ 和 Cx43 +/- 小鼠 CIA 成模率的比较

Cx43 +/+ 小鼠的成模率明显高于 Cx43 +/- 小鼠的成模率,差异有统计学意义($P < 0.05$)。由于免疫造模成本高,Cx43 +/+ 小鼠成模率高,免疫 46 只后未再免疫,选择先成模的 8 只进入实验。实验过程中动物无死亡。见表 1。

表 1 Cx43 +/+、Cx43 +/- 小鼠 CIA 成模率的比较

基因型	成模动物数(只)	未成模动物数(只)	合计动物数(只)	成模率(%)
Cx43 +/+	15	31	46	32.6 ^a
Cx43 +/-	8	58	64	12.5

注:与 Cx43 +/- 比较,^a $P < 0.05$

二、针刺治疗对 C II 免疫的 CIA 小鼠关节炎指数的影响

C II 免疫的小鼠,初次免疫后 3 周左右开始出现关节炎症状,即鼠爪明显红、肿。Cx43 +/+ 小鼠成模组经针刺治疗 3 周,与 Cx43 +/+ 小鼠成模未治疗组相比,关节炎症状计分明显降低($P < 0.01$);而 Cx43 +/- 小鼠成模后经针刺治疗组与未治疗组相比,关节炎症状计分无明显降低($P > 0.01$)。见表 2。

表 2 各组小鼠不同时期关节炎指数(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	18 d	25 d	32 d	39 d	46 d	53 d	56 d
C 组	4	1.60 ± 0.55	5.60 ± 1.34	7.00 ± 1.87	7.00 ± 1.58	7.60 ± 1.52	8.40 ± 1.67	7.60 ± 0.89
D 组	4	1.50 ± 0.58	4.50 ± 1.29	6.75 ± 0.96	6.00 ± 2.16	5.00 ± 0.82 ^a	3.25 ± 0.50 ^a	2.50 ± 0.58 ^a
E 组	4	1.50 ± 0.58	2.50 ± 0.58	2.50 ± 0.58	2.00 ± 1.15	1.50 ± 0.58	1.50 ± 0.58	1.50 ± 0.58
F 组	4	1.25 ± 0.50	2.25 ± 0.50	2.25 ± 0.50	1.75 ± 0.96	1.25 ± 0.50	1.25 ± 0.50	1.25 ± 0.50

注:与 C 组同时期比较,^a $P < 0.01$

三、针刺对 CIA 小鼠 Th1 和 Th2 细胞百分数及 Th1/Th2 比值的影响

免疫后 6 周,与 A 组相比,C 组 CIA 小鼠脾细胞中 Th1 和 Th2 细胞百分率均升高,且以 Th1 细胞更为明显;针刺结束后,与 C 组相比,E 组小鼠脾细胞中 Th1 明显降低($P < 0.01$),而 Th2 细胞无明显变化;F 组与 D 组相比小鼠脾细胞中 Th1 与 Th2 细胞无明显变化($P > 0.01$)。见表 3。

表 3 各组小鼠 Th1 和 Th2 细胞百分数及 Th1/Th2 比值($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Th1	Th2	Th1/Th2
		CD3 + CD8 - IFN- γ +	CD3 + CD8 - IL-4 +	
A 组	4	2.67 ± 0.46	0.47 ± 0.06	5.72 ± 0.85
C 组	4	5.47 ± 0.40 ^a	0.74 ± 0.32 ^a	8.22 ± 2.67 ^a
E 组	4	2.91 ± 0.16 ^b	0.51 ± 0.04 ^b	5.74 ± 0.53 ^b
B 组	4	0.49 ± 0.01	0.50 ± 0.03	0.98 ± 0.04
D 组	4	3.75 ± 0.13 ^c	0.70 ± 0.05	5.40 ± 0.20 ^c
F 组	4	3.50 ± 0.46 ^c	0.70 ± 0.06	4.96 ± 0.85 ^c

注:与 A 组比较,^a $P < 0.05$;与 C 组比较,^b $P < 0.05$;与 B 组比较,^c $P < 0.05$

讨 论

祖国医学认为,“刺之要,气至而有效”,指出“气至病所”能收到较好的临床疗效。大量的临床观察资料证明,循经感传越显著,疗效越好。因而对经络实质的研究长期以来成为经络研究的热点。对经络实质的研究主要有神经体液经络相关假说、“经络-大脑皮质-内脏相关”假说、“经络蛋白耦联带”假说等。根据对现有资料的分析以及我们的前期研究工作,我们推测经络的主要组成部分是具有低电阻特性的皮肤、皮下组织细胞间缝隙连接(gap junctional, GJ),并且有离体实验^[3]和在体实验^[5]研究表明 Cx43 是离体大鼠上皮细胞和成纤维细胞缝隙连接通道的主要成分,穴位针刺后 Cx43 表达显著增加。为了进一步证实 GJ 与经络是否存在因果关系,本研究引进了 Cx43 基因敲除的小鼠。但纯合子 Cx43 -/- 的小鼠多在出生后 24 h 之内死于右室流出道梗阻,所以本研究选用 Cx43 +/- 和 Cx43 +/+ 小鼠来研究。

本实验对 Cx43 +/- 和 Cx43 +/+ 小鼠进行胶原免疫造模,Cx43 +/- 小鼠成模率明显低于 Cx43 +/+

小鼠,且远远低于文献报道的 H-2^r 和 H-2^d 背景来源的 DBA/1 小鼠^[8]和 H-2^b 单倍型小鼠系(如 C57BL/6 鼠)的发病率^[9]。为什么 Cx43 基因敲除鼠发病率会如此低呢?对此本研究对 Cx43 +/- 和 Cx43 +/+ CIA 小鼠进行了免疫学机制的初步探讨。类风湿关节炎是一种典型的多因素诱发的自身免疫反应性疾病,活化的 T 淋巴细胞在发病中起重要作用^[10]。根据分泌细胞因子模式的不同,激活的 CD4⁺ Th 细胞可分化为 Th1 和 Th2 细胞亚群,其中 Th1 主要分泌 IFN- γ 、IL-2、IL-12、TNF- α ,以 IFN- γ 为代表;Th2 主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10,以 IL-4 为代表。近年研究提示,CIA 和类风湿性关节炎都是 Th1 细胞介导的自身免疫应答疾病。Kanik 等^[11]观察到,同慢性患者相比,早期类风湿性关节炎的外周血中,IL-2 和 IFN- γ 明显增多,随着关节炎的发展,Th1 细胞逐渐减少,Th2 细胞占优势,这可能与 Th1 细胞选择性地聚集到关节炎部位有关,因此,类风湿性关节炎患者关节滑膜、滑膜液和外周血中存在 Th1/Th2 亚群失衡。本实验运用流式细胞术检测 Cx43 基因敲除小鼠脾淋巴细胞 Th 细胞亚群的变化,结果发现 Cx43 +/- 和 Cx43 +/+ 小鼠发病后脾细胞中均以 Th1 细胞为主导,表明 CX43 基因敲除鼠诱导的 CIA 模型仍然是 Th1 为主的细胞免疫反应;同时结果发现 Cx43 +/- 小鼠较 Cx43 +/+ 小鼠 Th2 水平极低,虽然在成模小鼠中经 PMA 刺激后分泌水平有较大幅度的升高,由此我们推测,杂合型小鼠成模率如此之低是由于 Th2 基础值太低,淋巴细胞不易活化或者活化不够。

目前抗风湿药或因疗效不十分满意,或因毒副作用太大,难以推广或长期使用。实验研究显示,针灸能调节 RA 患者和模型动物的免疫和内分泌功能、改善血液循环等^[12]。针灸疗法已逐渐被用来治疗本病。在本实验中对已经成模的小鼠采用了关节炎指数来评估疗效。野生型小鼠模型较对照组的关节炎指数增加明显,针刺治疗组的关节炎指数虽也随之增加,但始终低于模型对照组。而在杂合型小鼠中不论对照组还是治疗组关节炎指数都是逐渐增加,治疗组略低于对照组,但两组间差异无统计学意义。这表明,针刺治疗杂合型小鼠的疗效明显比野生型小鼠差,同时也表明 Cx43 与针刺疗效存在一定的因果关系。对于各组小鼠的

Th 细胞亚群的检测结果显示,针刺抑制了野生型小鼠脾细胞中 Th1 水平,而对 Th2 水平无明显影响,下调 Th1/Th2 比值至接近正常水平,对 T 细胞亚群显示了良好的选择性抑制作用。而在杂合型小鼠中针刺对 Th1 和 Th2 均无明显影响。这可能是针刺治疗 Cx43 基因敲除鼠疗效差的免疫学机制。

综上所述,针刺治疗 Cx43 基因敲除 CIA 鼠时,野生型疗效明显优于杂合型小鼠,这种疗效的差异可能是通过恢复体内 Th1/Th2 的平衡有关。由于实验小鼠数量有限,检测的时间点有限,是否在更晚期也能得出同样的结论有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] 孙兆贵. 细胞通讯和经络实质假说解剖学. 针灸临床杂志, 1994, 5: 10.

[2] 席时元, 樊景禹. 狗肢体穴位皮肤结构的定量形态学研究. 解剖学, 1993, 24: 329.

[3] 黄晓桃, 黄光英, 张明敏. 缝隙连接蛋白 43 在经穴上皮细胞和成纤维细胞中表达的实验研究. 湖南中医学院学报, 2005, 25: 43-45.

[4] 郑翠红, 黄光英, 张明敏. 缝隙连接蛋白 Cx43 在大鼠经脉线上

表达的实验研究. 中国针灸, 2005, 25: 629-632.

[5] 黄光英, 郑翠红, 张明敏. 针刺对大鼠“足三里”穴缝隙连接蛋白 Cx43 表达的影响. 中国针灸, 2005, 25: 565-568.

[6] Juarranz Y, Abad C, Martinez C, et al. Protective effect of vasoactive intestinal peptide on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther, 2005, 7: 1034-1045.

[7] Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. Immunol Today, 1997, 18: 263-266.

[8] Campbell IK, Hamilton JA, Wicks IP. Collagen-induced arthritis in C57BL/6(H-2b) mice; new insights into an important disease model of rheumatoid arthritis. Eur J Immunol, 2000, 30:1568-1575.

[9] 李晓燕, 朱平, 樊春梅. C57BL/6 小鼠胶原诱导关节炎的特异性细胞及体液免疫反应. 中华风湿病学杂志, 2005, 4: 215-218.

[10] Yocum DE. T cells: pathogenic cells and therapeutic targets in rheumatoid arthritis. Sem Arthritis Rheum, 1999, 29: 27-35.

[11] Kanik KS, Hagiwara E, Yarboro CH, et al. Distinct patterns of cytokine secretion characterize new synovitis versus chronic rheumatoid arthritis. J Rheumatol, 1998, 25: 16-22.

[12] 方剑乔. 类风湿关节炎的中医针灸治疗. 杭州: 浙江科学技术出版社, 2000:93-98.

(修回日期:2007-08-13)
(本 文 编 辑 : 松 明)

· 短篇论著 ·

早期康复治疗对急性面神经炎患者面肌功能恢复的影响

张焱

面神经炎又称贝尔麻痹(Bell palsy),是由于茎乳孔内的面神经急性非化脓性炎症所致的周围性面神经麻痹。我们对 55 例急性面神经炎患者给予早期康复治疗,显著提高了治愈率,现报道如下。

一、资料与方法

1. 临床资料:选择 2003 年 1 月至 2006 年 1 月在我院门诊就诊的单侧急性面神经炎患者 110 例。入选标准:(1)临床表现为一侧面部表情肌完全瘫痪;(2)排除 Guillain-Barre 综合征、中耳炎、迷路炎和乳突炎等引起的耳源性面神经麻痹;(3)经头部 MRI 检查排除脑干梗死和肿瘤所致的面神经麻痹。将 110 例患者随机分为治疗组和对照组,每组 55 例,2 组患者性别、年龄、病程、病变部位比较,差异无统计学意义(P>0.05),具有可比性,见表 1。

表 1 2 组患者一般资料比较

组别	例数	性别(男/女,例)	年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	病程(d, $\bar{x} \pm s$)	病变部位(左侧/右侧,例)
治疗组	55	29/26	50.8 ± 11.6	3.5 ± 1.0	30/25
对照组	55	31/24	51.6 ± 10.6	3.4 ± 1.0	26/29

2. 治疗方法:2 组患者均在病后 1 ~ 2 周内应用地塞米松

静脉点滴,每日 1 次,每次 10 mg,连用 7 d。对伴有带状疱疹的面神经麻痹综合征者,应用无环鸟苷静脉点滴,每日 1 次,剂量为 15 ~ 30 mg/kg 体重,连用 10 d。2 组患者均给予维生素 B₁ 肌肉注射,每次 100 mg,每日 1 次,维生素 B₁₂ 肌肉注射,每次 500 mg,每日 1 次。急性期过后给予电刺治疗,取太阳、下关、颊车穴。

治疗组急性期同时给予超短波和红外线治疗。超短波治疗应用北京产 TMH-A 型超短波电疗仪,波长 7.3 m,患者取坐位,用 2 个直径为 7.5 cm 的圆形电极置于患侧乳突和耳前,电流强度为 50 mA,选择微热量,每日 1 次,每次 12 ~ 15 min,10 d 为 1 个疗程。红外线治疗应用福州产 YAD 型红外线治疗仪,功率为 600 W,波长为 800 nm,照射患侧面颊部,照射时配戴防护镜,照射距离为 20 cm,每日 1 次,每次 20 min,10 d 为 1 个疗程。并于耳后茎乳孔周围局部热敷。治疗组患者患侧面肌能活动后即开始自我功能康复训练,包括对着镜子做皱眉、举额、用力闭眼、露齿、噘嘴、吹口哨、鼓腮等动作,每日数次,每次数分钟,并辅以面部肌肉按摩等。恢复期在自我功能康复训练的同时行碘离子透入治疗,应用广东产 DL-Z 型直流感应电疗机,60 cm² 的半面具电极盖内放置用 10% 碘化钾浸透的纱布衬垫,置于患侧面部,阴极导入,阳极置于颈椎区,电流强度为 6 mA,每日治疗 1 次,每次 15 min,10 d 为 1 个疗程。

作者单位:041000 临汾,山西临汾市人民医院