

· 基础研究 ·

电针治疗对膝骨关节炎兔膝关节软骨细胞凋亡的影响

汤剑斌¹, 圣小平², 樊天佑²

(1. 上海市浦东新区光明中医医院, 上海 201399; 2. 上海市中医医院, 上海 200071)

摘要 目的:观察电针治疗对膝骨关节炎兔膝关节软骨细胞凋亡的影响,探讨电针治疗膝骨关节炎的作用机制。**方法:**将 30 只健康新西兰大白兔随机分为正常对照组、模型对照组和电针治疗组,每组 10 只。采用 Hulth 法对模型对照组及电针治疗组实验兔左膝关节进行造模,造模后第 5 周开始对电针治疗组实验兔进行电针治疗,正常对照组、模型对照组同期正常饲养,不作任何治疗。治疗 4 周后同时处死 3 组实验兔,取左膝关节股骨端制成切片,观察各组实验兔软骨组织形态及软骨细胞凋亡情况。**结果:**①软骨组织形态。正常对照组软骨表层光滑、平整,4 层结构清晰,软骨细胞分布均匀、无簇聚,潮线完整;模型对照组关节软骨厚度减小,表面毛糙,可见明显纤维化、裂隙、软骨细胞簇聚,潮线断裂;电针治疗组关节软骨厚度减小,表面不光滑,少见纤维化、裂隙、软骨细胞簇聚,潮线断裂。②软骨细胞凋亡情况。3 组实验兔软骨细胞凋亡率比较,差异有统计学意义($F = 126.753, P = 0.000$);进一步两两比较,模型对照组软骨细胞凋亡率大于正常对照组和电针治疗组($LSD - t = 3.769, P = 0.000; LSD - t = 7.000, P = 0.000$),电针治疗组软骨细胞凋亡率大于正常对照组($LSD - t = 10.769, P = 0.000$)。**结论:**电针治疗可以通过抑制软骨细胞凋亡,减轻膝骨关节炎软骨的损伤,这可能是电针治疗膝骨关节炎的机制之一。

关键词 骨关节炎; 膝 电针 软骨细胞 细胞凋亡

Study on the effect of electroacupuncture on knee joint chondrocyte apoptosis in rabbits with knee osteoarthritis

TANG Jian-bin*, SHENG Xiao-ping, FAN Tian-you. *Guangming Hospital of Traditional Chinese Medicine of Pudong New Area in Shanghai City, Shanghai 201399, China

ABSTRACT Objective: To observe the effect of electroacupuncture on knee joint chondrocyte apoptosis in rabbits with knee osteoarthritis (KOA), and to explore the mechanisms of electroacupuncture on KOA. **Methods:** Thirty healthy New Zealand white rabbits were randomly divided into 3 groups as normal control group, model control group and electroacupuncture group, 10 cases in each group. Left knee joints of experimental rabbits in model control group and electroacupuncture group were all built models through Hulth method. At the 5th week after modeling, cases in electroacupuncture group were administrated with electroacupuncture, while the others in the normal control group and model control group were administrated with normal feeding without treatment. After 4 weeks of treatment, all of the experimental rabbits were executed for making slices of left femoral condyle which were observed on the morphous of cartilaginous tissue and chondrocyte apoptosis situation. **Results:** ①The morphous of cartilaginous tissue: the situations as smooth cartilage surface, clearness in four-layer structure, evenly distribution of chondrocytes without clustering and complete tidemark were found in normal control group; the situations as decrease in articular cartilage thickness, rough surface, significant fibrosis and fissures, clustered chondrocytes and fractured tidemark were found in model control group; and the situations as decrease in articular cartilage thickness, unsmooth surface, rare fibrosis and fissures, clustered chondrocytes and fractured tidemark were found in electroacupuncture group. ②Chondrocyte apoptosis situation: there were statistical difference in chondrocyte apoptosis rate of experimental rabbits among the 3 groups ($F = 126.753, P = 0.000$). Chondrocyte apoptosis rate of model control group was higher than that of normal control group and electroacupuncture group respectively ($LSD - t = 3.769, P = 0.000; LSD - t = 7.000, P = 0.000$), and the chondrocyte apoptosis rate of electroacupuncture group was higher than that of normal control group ($LSD - t = 10.769, P = 0.000$). **Conclusion:** Electroacupuncture can relieve articular cartilage injuries of KOA through inhibiting chondrocyte apoptosis, which may be one of the mechanisms of electroacupuncture on KOA.

Key words Osteoarthritis; knee; Electroacupuncture; Chondrocytes; Apoptosis

电针是中医疗法中一种重要的治疗手段,目前已广泛用于治疗膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA),且取得了良好的疗效^[1-5]。但目前关于电针对 OA

患者软骨细胞影响的研究尚不多见,难以全面阐述电针治疗 OA 的作用机理。为此,笔者针对电针治疗对 KOA 兔膝关节软骨细胞凋亡的影响进行了研究,现

总结报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 健康成年雄性新西兰大白兔 30 只, 平均体质量 2.5 kg, 购自上海市松江车墩实验动物良种场, 实验动物合格证号: SCXK 沪 2007-0008。

1.2 实验器材 瑞琪尔 N3015 无菌针灸针, 批号: 3-30705-3; BT701-1B 电针仪, 上海华谊医用仪器有限公司制造; Chemicon S7101 软骨细胞凋亡检测试剂盒; 奥林巴斯 BX50 光学显微镜。

2 方法

2.1 分组方法 将 30 只大白兔随机分为正常对照组、模型对照组和电针治疗组, 每组 10 只。全部动物由上海市中医医院中心实验室喂养, 适应性喂养 1 周, 无异常后开始造模。

2.2 造模方法 采用 Hulth 法^[6]对模型对照组及电针治疗组实验兔进行造模。以 3% 戊巴比妥钠将动物麻醉后, 仰卧固定于手术台上。采用左膝关节内侧纵形切口, 长约 3 cm, 探查关节腔内无原发病变后, 一次切断内侧副韧带和前后交叉韧带, 完整切除内侧半月板, 冲洗切口, 逐层缝合。术后至处死前伤肢不固定, 分笼饲养, 饲养房湿度 60% ~ 80%, 温度 24 ~ 28 ℃, 自由活动、取食、饮水。

2.3 干预方法 造模后第 5 周开始对电针治疗组实验兔进行电针治疗, 正常对照组和模型对照组同期正常饲养, 不作任何治疗。电针治疗时先将实验兔固定于兔架上, 暴露下肢, 不作麻醉。参照《实验针灸学》《中国兽医针灸学》和《兔的解剖》, 根据比较解剖取穴法结合模拟骨度取穴法选取兔左膝关节犊鼻、内膝眼、阳陵泉、足三里 4 个穴位。常规消毒后, 选用 0.3 mm × 60 mm 毫针, 刺入 0.5 ~ 1 寸。采用 2/100 Hz 等幅疏密波, 强度 1 ~ 3 mA, 以局部肌肉开始抽搐

为度。每次 45 min, 每周 2 次, 共治疗 4 周。

2.4 效应指标观察 治疗 4 周后同时处死 3 组实验兔, 取左膝关节股骨端置于 10% 中性福尔马林溶液中, 经固定、脱钙、石蜡包埋后切片备用。

2.4.1 软骨组织形态 从各组分别取 10 张切片进行 HE 染色 (每只实验兔 1 张切片), 然后在光镜下观察软骨表面光滑度、厚度、缺损情况、结构层次、软骨细胞分布及潮线等。

2.4.2 软骨细胞凋亡情况 从各组分别取 10 张切片用原位末端脱氧核苷转移酶标记法 (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling, TUNNEL) 测定软骨细胞凋亡率 (每只实验兔 1 张切片), 具体操作按照试剂盒标准步骤进行。光镜下细胞核有明显棕黄色为阳性细胞, 每张切片随机观察 10 个视野, 凋亡率 = 10 个视野阳性软骨细胞总数 / 10 个视野内软骨细胞总数 × 100%。

2.5 统计学方法 采用 SPSS17.0 统计软件对所得数据进行统计分析, 3 组实验兔软骨细胞凋亡率的比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 软骨组织形态 正常对照组软骨表层光滑、平整, 4 层结构清晰, 软骨细胞分布均匀、无簇聚, 潮线完整 [图 1(1)]; 模型对照组关节软骨厚度减小, 表面毛糙, 可见明显纤维化、裂隙、软骨细胞簇聚, 潮线断裂 [图 1(2)]; 电针治疗组关节软骨厚度减小, 表面不光滑, 少见纤维化、裂隙、软骨细胞簇聚, 潮线断裂 [图 1(3)]。

3.2 软骨细胞凋亡情况 凋亡的软骨细胞主要位于软骨表层和中层 (图 2)。3 组软骨细胞凋亡率比较, 差异有统计学意义 ($F = 126.753, P = 0.000$); 进一步

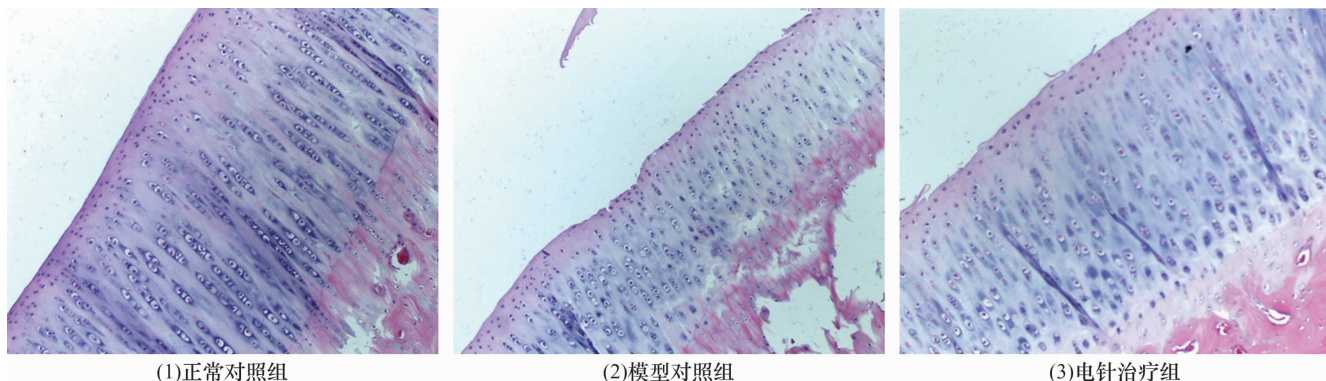


图 1 各组实验兔膝关节软骨组织形态观察 (HE 染色 ×100)

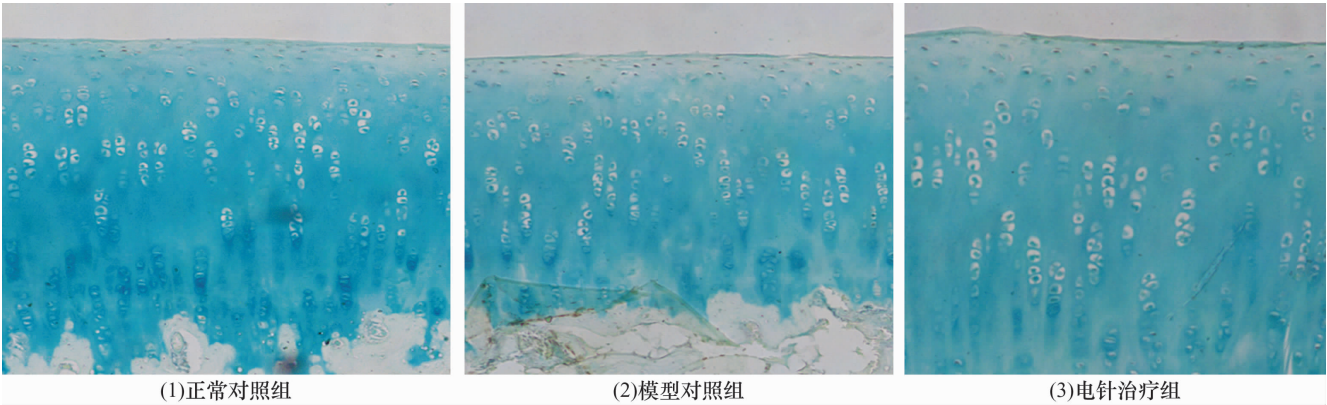


图2 各组实验兔膝关节软骨细胞凋亡情况观察(TUNNEL 染色 ×100)

两两比较,模型对照组软骨细胞凋亡率大于正常对照组和电针治疗组($LSD - t = 3.769, P = 0.000; LSD - t = 7.000, P = 0.000$),电针治疗组软骨细胞凋亡率大于正常对照组($LSD - t = 10.769, P = 0.000$)。(表1)

表1 3组实验兔软骨细胞凋亡率 %

组 别	软骨细胞凋亡率
正常对照组	8.58 ± 1.56
模型对照组	19.35 ± 1.81
电针治疗组	12.35 ± 1.17

4 讨 论

现代医学认为 OA 是在机械性和生物性因素相互作用下,关节软骨细胞、细胞外基质和软骨下骨合成与降解失去平衡的结果,最终导致关节软骨软化、纤维化、溃疡、减少,软骨下骨硬化、象牙化,骨赘形成及软骨下骨囊肿^[7]。目前对于 OA 的发病机理还不清楚,多认为与年龄、体重、创伤、遗传、发育等有关。OA 属中医学“痹证”“骨痹”范畴,病机为经络气血痹阻,治疗以补益肝肾、祛风散寒、活血化瘀、温经通络为法。

电针是中医疗法中一种重要的治疗手段,具有疏通经络、扶正祛邪、调和阴阳的作用。通过电针治疗可以减少 OA 患者软骨中 IL-1、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、MMP-1 及 MMP-3 的表达,降低 MMP-1/TIMP-1 的比值,减少 OA 患者软骨的病理性损伤^[8-11]。

关节软骨的退行性改变和破坏是 OA 的主要病理特征。OA 早期,患者软骨中的胶原纤维退化,表面粗糙,继而出现软骨龟裂、溃疡、缺损,软骨下骨暴露,关节软骨周围可形成骨赘。组织学观察可见局部软骨变薄,细胞数量减少、成簇、排列紊乱,潮线不规则或消失。本研究中,正常对照组软骨表层光滑、厚度均一,4 层结构清晰,软骨细胞分布均匀、无簇聚,潮线完整;模型对照组关节软骨表面粗糙、局部变薄、缺

损、结构紊乱,软骨细胞簇聚,潮线断裂,符合 OA 软骨表现,表明动物模型建立成功;电针治疗组关节软骨可见毛玻璃样改变,色泽稍暗,局部变薄,结构尚清晰,局部软骨细胞减少、簇聚,少见潮线断裂,相对于模型对照组软骨的病理损伤明显减轻,说明电针治疗能够减轻 OA 患者软骨病理损伤,这与其他学者的研究结果相符^[9,11]。

近年来有研究表明软骨细胞凋亡异常在 OA 的发病过程中起着重要作用^[12],软骨细胞是成熟关节软骨中唯一的一种细胞,其作用主要是维持软骨的正常代谢和修复损伤的组织。在 OA 患者和动物模型的软骨中,软骨细胞凋亡率要明显高于正常软骨,且凋亡的软骨细胞主要位于关节软骨的表层和中层^[12-17]。在本研究中,模型对照组软骨细胞凋亡率大于正常对照组和电针治疗组,电针治疗组软骨细胞凋亡率大于正常对照组。这表明模型兔膝关节存在软骨细胞过度凋亡的现象,而电针治疗能降低软骨细胞凋亡率。

从本研究可以看出,电针治疗可以通过抑制软骨细胞凋亡,减轻 KOA 软骨的损伤,这可能是电针治疗 KOA 的机制之一,但电针抑制软骨细胞凋亡的途径还不明确,尚需进一步研究。

5 参考文献

[1] Jubb RW, Tukmachi ES, Jones PW, et al. A blinded randomised trial of acupuncture (manual and electroacupuncture) compared with a non-penetrating sham for the symptoms of osteoarthritis of the knee[J]. Acupunct Med, 2008, 26(2): 69-78.

[2] Itoh K, Hirota S, Katsumi Y, et al. A pilot study on using acupuncture and transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) to treat knee osteoarthritis (OA) [J]. Chin Med, 2008, 3: 2.

[3] Witt CM, Jena S, Brinkhaus B, et al. Acupuncture in patients with osteoarthritis of the knee or hip: a randomized, controlled trial with an additional nonrandomized arm[J]. Arthritis Rheum, 2006, 54(11): 3485-3493.

[4] Vas J, Méndez C, Perea - Milla E, et al. Acupuncture as a complementary therapy to the pharmacological treatment of osteoarthritis of the knee: randomised controlled trial[J]. BMJ, 2004, 329(7476): 1216.

[5] Berman BM, Lao L, Langenberg P, et al. Effectiveness of acupuncture as adjunctive therapy in osteoarthritis of the knee: a randomized, controlled trial[J]. Ann Intern Med, 2004, 141(12): 901-910.

[6] Hulth A, Lindberg L, Telhag H. Experimental osteoarthritis in rabbits. Preliminary report[J]. Acta Orthop Scand, 1970, 41(5): 522-530.

[7] Moskowitz RW, Altman RD, Buckwalter JA, et al. Osteoarthritis: diagnosis and medical/surgical management[M]. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2001: 1.

[8] 王瑞辉, 杨介宾. 电针对佐剂性关节炎大鼠 IL-1 和 IL-6 活性的影响[J]. 陕西中医学院学报, 2001, 24(4): 43-45.

[9] 丘德兴. 不同针灸法对膝骨性关节炎疗效对比的实验与临床研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2004.

[10] 郑秀存. 针刺、电针和温针治疗对硒鼓性关节炎(KOA)软骨基质代谢调节作用的实验研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2005.

[11] 翁文水. 针灸治疗家兔膝关节骨性关节炎的实验研究[D]. 福州: 福建中医学院, 2004.

[12] Blanco FJ, Guitian R, Vázquez - Martul E, et al. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology[J]. Arthritis Rheum, 1998, 41(2): 284-289.

[13] Aigner T, Hemmel M, Neureiter D, et al. Apoptotic cell death is not a widespread phenomenon in normal aging and osteoarthritis human articular knee cartilage: a study of proliferation, programmed cell death (apoptosis), and viability of chondrocytes in normal and osteoarthritic human knee cartilage[J]. Arthritis Rheum, 2001, 44(6): 1304-1312.

[14] Watrin - Pinzano A, Etienne S, Grossin L, et al. Increased apoptosis in rat osteoarthritic cartilage corresponds to degenerative chondral lesions and concomitant expression of caspase-3[J]. Biorheology, 2006, 43(3-4): 403-412.

[15] Kim HA, Lee YJ, Seong SC, et al. Apoptotic chondrocyte death in human osteoarthritis[J]. J Rheumatol, 2000, 27(2): 455-462.

[16] Hashimoto S, Takahashi K, Amiel D, et al. Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis[J]. Arthritis Rheum, 1998, 41(7): 1266-1274.

[17] 吴明霞, 李西海, 吴广文, 等. 电针后血清对肿瘤坏死因子 α 诱导软骨细胞凋亡的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(46): 8551-8555.

(2011-08-17 收稿 2012-02-14 修回)

· 简 讯 ·

《中医正骨》广告业务范围

- 医疗、科研、教学单位及药械生产营销企业介绍

■ 用于骨伤科医疗、科研、教学的器械设备介绍

■ 用于骨伤科医疗、科研、教学的中西药物及中间体介绍

■ 各种形式的骨伤科讯息, 如书刊征订、招生启事、会议通知等

《中医正骨》2012—2013 年度广告收费标准

刊登位置	印刷规格	版面	每期收费标准(元)	半年收费标准(元)	全年收费标准(元)
封二	大 16 开彩色铜版纸印刷	全版	9 000	54 000	75 600
封三	大 16 开彩色铜版纸印刷	全版	8 000	48 000	67 200
封底	大 16 开彩色铜版纸印刷	全版	10 000	60 000	84 000
前插页	大 16 开彩色铜版纸印刷	全版	7 000	42 000	58 800
后插页	大 16 开彩色铜版纸印刷	全版	6 000	36 000	50 400
内文图文	大 16 开黑白铜版纸印刷	全版	3 000	18 000	25 200
	大 16 开黑白铜版纸印刷	1/2 版	1 800	10 800	15 120
内文文字	大 16 开黑白铜版纸印刷	全版	3 000	18 000	25 200
	大 16 开黑白铜版纸印刷	1/2 版	1 800	10 800	15 120