

· 基础研究 ·

艾灸血清对体外 RA 滑膜成纤维细胞增殖的影响

戴历群, 王 蕾*

(四川大学华西基础医学与法医学院, 四川 成都 610041)

摘要:目的 探究艾灸血清对类风湿性关节炎(RA)大鼠滑膜成纤维细胞体外增殖的影响,观察艾灸对实验性RA大鼠的治疗效果。**方法** 将30只SD大鼠随机分为3组,即模型组、直接灸组、隔姜灸组,每组10只,将每组大鼠造RA模型。造模成功后,模型组不予以任何治疗,直接灸组、隔姜灸法分别给予直接灸法、隔姜灸法刺激RA模型大鼠的“肾俞”、“足三里”。疗程结束后,取腹主动脉血并离心取血清,用含有各组血清培养基培养RA模型滑膜成纤维细胞24 h、36 h、48 h,用CCK8试剂盒检测各组血清培养的滑膜成纤维细胞增殖情况。**结果** 艾灸血清培养的滑膜成纤维细胞的增殖较模型组血清培养的滑膜成纤维细胞受到抑制,其中36 h隔姜灸组抑制程度最显著。**结论** 艾灸治疗能显著改善大鼠RA症状,抑制RA滑膜成纤维细胞的增殖,这可能是艾灸发挥抗炎作用的有效机制之一。

关键词: 类风湿性关节炎; 艾灸; 滑膜成纤维细胞; 细胞增殖

中图分类号: R245.81 文献标识码: A 文章编号: 1672-2639(2018)01-0014-04

Effect of moxibustion serum on the proliferation of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts *in vitro*

DAI Li-qun, WANG Lei*

(Department of Histology, Embryology and Neurobiology, West China School of Basic and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu, China, 610041)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of moxibustion serum on the proliferation of synovial fibroblasts *in vitro* and to observe the therapeutic effect of moxibustion on experimental RA rats. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into three groups: model group, direct moxibustion group and Ginger moxibustion group, with 10 rats in each group. RA rats were made in each group. The rats in the model group were not given any treatment after the model established successfully. The direct moxibustion group and the ginger-free moxibustion group were given direct moxibustion and ginger-free moxibustion to stimulate “Shensu” and “Zusanli” of RA rats. After the treatment, took the abdominal aorta blood and centrifuged to take the serum, culture medium containing with each group of serum to culture RA synovial fibroblasts for 24 h, 36 h, 48 h, using CCK8 kit to detect of the synovial fibroblasts proliferation. **Results** The proliferation of synovial fibroblasts cultured in moxibustion serum was inhibited compared with that in the model group, and the inhibition of ginger moxibustion group was the most significant in the 36-hour. **Conclusion** Moxibustion treatment can significantly ameliorate the symptoms of RA and inhibit the proliferation of RA synovial fibroblasts, which may be one of the effective mechanisms of moxibustion to achieve anti-inflammatory effects.

Key words: Rheumatoid arthritis; Moxibustion; Synovial fibroblasts; Cell proliferation

作者简介: 戴历群(1990—), 女, 四川渠县人, 硕士研究生。研究方向: 神经免疫调节。

* 通讯作者: 王 蕾(1963—), 女, 北京人, 教授, 硕士生导师。研究方向: 神经免疫调节。E-mail: wanglei_scu@scu.edu.cn

类风湿性关节炎(RA)是全球性健康问题,无论在发达国家还是发展中国家,影响全球约1%的人口,且女性患病几率是男性的两倍^[1]。RA是一种复杂的慢性炎性疾病,像其他关节炎一样,RA最初的特征是滑膜炎反应与异常增殖,包括血管分布和通透性增加。虽然RA的确切原因仍然是未知的,但是过去几十年的大量研究提供了支持RA是抗原驱动的自身免疫性疾病的数据。这种疼痛和失能疾病表现为慢性全身性炎症,给病人造成生理上的折磨的同时,还带来了沉重的经济负担^[2]。艾灸作为传统中医的一个重要组成部分,虽然西方国家对此知之甚少,但从穴位刺激角度出发,艾灸与针灸类似^[3,4]。以往已有大量在体实验研究艾灸从调节免疫系统和抑制炎症因子分泌的角度出发,对艾灸治疗RA的作用机理进行了阐述,但是艾灸对RA滑膜成纤维细胞体外增殖作用的影响却鲜有报道。在此实验中,我们通过建立大鼠RA模型,体外培养RA滑膜成纤维细胞,探索艾灸血清对异常增殖的RA滑膜成纤维细胞的影响,直接从滑膜成纤维细胞增殖的角度进一步探讨了艾灸在治疗RA的作用机制^[5]。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

将SPF级体重225~230gSD大鼠30只,雌雄各半,适应性喂养一周后,将老鼠随机分为模型组、直接灸组、隔姜灸组三组,每组10只。由四川大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂

弗式完全佐剂(Sigma,美国),二甲基亚砷(Sigma,美国),高糖DMEM培养基(Hyclone,美国),0.25%胰蛋白酶(Hyclone,美国),胎牛血清(Gibco,美国),CCK-8(CellCountingKit-8)试剂盒(日本同仁化学)。

1.3 实验方法

1.3.1 RA模型建立 成年SD大鼠(雄性,十周龄,雌性,十一周龄),研究开始时体重为225~230g,获自四川大学实验动物中心,用于本研究。在 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 的环境温度和12:12小时的光照/黑暗循环的房内,将动物自由食入标准食物和水。所有的动物实验操作均经过四川大学动物护理与道德操守委员会的批准,并严格按照国家卫生研究院实验动物护理和使用指南(1985年修订的第85~23号出版

物)进行。SD大鼠适应性喂养一周后,随机分为以下实验组:模型组,直接灸组和隔姜灸组,每组10只老鼠。分组完成第一天,将每组动物的左后足足底用75%医用酒精消毒后注射FCA,按老鼠体重 $0.1\text{ mL}/100\text{ g}$ 注射^[6]。

1.3.2 艾灸治疗 弗式完全佐剂造模后的第八天开始艾灸治疗。艾灸治疗共三个疗程,每个疗程六天,每两个疗程之间间隔一天。艾灸治疗时,将大鼠固定于操作台上,将大鼠肾俞穴和足三里穴位处的毛发剃除。将艾绒制成 $5\text{ mg}/\text{壮}$ 的艾粒。直接灸组老鼠在“肾俞穴”和“足三里穴”涂抹少量白凡士林后,点燃艾粒,用艾粒未点燃一头置于大鼠穴位处,燃尽后换新的艾粒,每个穴位各五壮。隔姜灸组老鼠在穴位处放置隔离材料姜片(姜片面积为 $2.5 \times 2.5\text{ cm}$,厚度 0.1 cm),艾粒点燃后,将点燃一头置于姜片中央进行艾灸治疗^[7-9]。模型组老鼠同法固定但不给予治疗。且艾灸组艾灸治疗双侧交替进行。

1.3.3 RA滑膜成纤维细胞培养 在艾灸治疗三个疗程结束后的第一天,将模型组老鼠按 $0.5\text{ mL}/100\text{ g}$ 腹腔注射3.6%的水合氯醛,处死模型组老鼠,在无菌操作台中打开大鼠双侧后肢膝关节,用手术钳取出膝关节腔内的滑膜组织,然后将其置于装有适量含有1%双抗(青霉素和链霉素各 10 万 u/L)的PBS培养皿中。取材完成后移至超净工作台,再用PBS洗三次后,将组织块剪碎后均匀植入盛有 2 mL 完全培养基(含10%胎牛血清的高糖DMEM培养基)6cm培养皿中,使培养基刚好润湿覆盖滑膜组织碎片,然后将培养皿放置于 37°C 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养,培养24h后补加 3 mL 完全培养基。当原代滑膜成纤维细胞长至覆盖培养皿80%面积时,用0.25%胰蛋白酶消化后传代,当滑膜成纤维细胞传至3~4代时,用含10%二甲基亚砷的高糖DMEM培养基冻存于液氮中备用。取5~7代滑膜成纤维细胞用于此研究。

1.3.4 艾灸血清的提取 艾灸治疗结束后,各组老鼠按体重 $0.1\text{ mL}/100\text{ g}$ 注射3.6%的水合氯醛,待老鼠麻醉后,对模型组、直接灸组和隔姜灸组进行腹主动脉无菌取血。将血液放置 4°C 冰箱静置1h后,离心机于转速 3000 r/min 离心 5 min 后,然后在超净台中取上清液,同组血清混合、分装后冻存于 -80°C 冰箱备用。

1.3.5 滑膜成纤维细胞增殖检测 通过CCK8试剂盒测定评估来自RA大鼠的原代培养的滑膜成纤

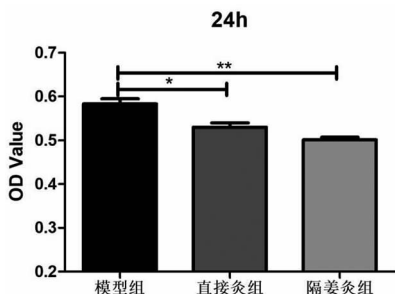
维细胞的增殖活力。取对数生长期的 RA 滑膜细胞,胰蛋白酶消化重悬后细胞计数,调整细胞浓度,按每孔 200 μL 细胞数量为 8000 个的浓度接种于 96 孔板中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24h 后弃培养液,并分为模型组、直接灸组、隔姜灸组,每组设 5 个复孔。各组对应分别加入 200 μL 模型组(含 10% 模型组大鼠血清的高糖 DMEM 培养基)、直接灸组(含 10% 直接灸血清的高糖 DMEM 培养基)和隔姜灸组(含 10% 隔姜灸血清的高糖 DMEM 培养基)培养基。加入以上各组不同血清的培养液继续培养 24 h、36 h 与 48 h。在指定的时间血清处理后,接着弃培养液,换成常规高糖 DMEM 培养基后,每孔加入 20 μL CCK8 检测试剂,继续培养 1h 后终止培养。再于摇床上振荡 10 min 使结晶完全溶解,用酶联免疫检测仪上测定 450 nm 波长的光密度值(OD Value)。然后作图分析,包括来自一只动物的 RA 滑膜成纤维细胞的五份重复,并且用来自三只实验动物的 RA 滑膜成纤维细胞独立地重复三次。

2 结果

体外培养的 RA 滑膜成纤维细胞,换为各组实验组血清。在用直接灸和隔姜灸治疗后的 RA 大鼠的血清刺激后,来自 RA 大鼠的滑膜成纤维细胞的增殖活力显著降低,表现为与细胞数相对应的 CCK8 检测中的光密度值较模型组血清刺激后低^[9-11]。

2.1 各实验组血清刺激 RA 滑膜成纤维细胞 24 h 结果

CCK8 检测结果显示,用不同实验组血清培养 RA 滑膜成纤维细胞 24 h 后,与模型组比较,两个艾灸组细胞增殖减慢(见图 1)。



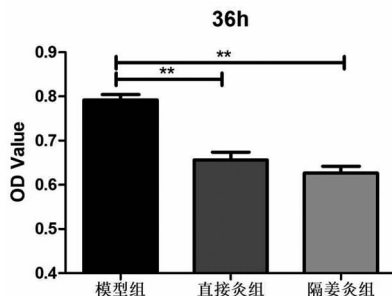
注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与 RA 模型组老鼠血清刺激 RA 滑膜成纤维细胞增殖 OD 值比较

图 1 RA 滑膜成纤维细胞不同实验组血清刺激 24 h 后 OD 值

2.2 各实验组血清刺激 RA 滑膜成纤维细胞 36 h 结果

CCK8 检测结果显示,用不同实验组血清培养

RA 滑膜成纤维细胞 36 h 后,与模型组比较,两个艾灸组细胞增殖减慢(见图 2)。

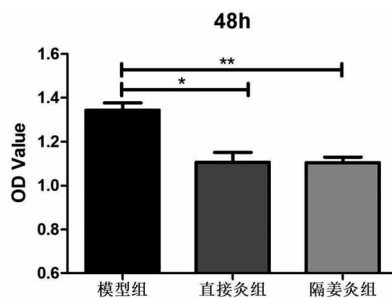


注: ** $P < 0.01$, 与 RA 模型组老鼠血清刺激 RA 滑膜成纤维细胞增殖 OD 值比较

图 2 RA 滑膜成纤维细胞不同实验组血清刺激 36 h 后 OD 值

2.3 各实验组血清刺激 RA 滑膜成纤维细胞 48 h 结果

CCK8 检测结果显示,用不同实验组血清培养 RA 滑膜成纤维细胞 48 h 后,与模型组比较,两个艾灸组细胞增殖减慢(见图 3)。



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与 RA 模型组老鼠血清刺激 RA 滑膜成纤维细胞增殖 OD 值比较

图 3 RA 滑膜成纤维细胞不同实验组血清刺激 48 h 后 OD 值

3 讨论

滑膜成纤维细胞是 RA 中关节损伤和 IL-1、IL-17、TNF- α 等多种炎症因子的直接作用细胞,在 RA 发病机制中起着及其重要的作用^[12-14]。滑膜成纤维细胞通过分泌各种蛋白酶类、花生四烯酸代谢产物及细胞因子等诱导滑膜炎症,同时滑膜成纤维细胞自身分泌的高水平促炎细胞因子和化学趋化因子又反过来持续刺激滑膜成纤维细胞信号转导途径的不同部位,引起细胞内蛋白激酶的持续激活,导致滑膜成纤维细胞信号转导异常及滑膜细胞异常增殖,进一步加重炎症过程,致使病情难以控制^[9,11,15]。本实验中可能是艾灸治疗后引起血清中某些活性物质含量有意义的改变,致使艾灸血清最

终能够抑制 RA 滑膜成纤维细胞体外增殖^[9,11,16]。实验结果显示两种艾灸对 RA 滑膜成纤维细胞的异常增殖均有抑制作用,在血清刺激 36 h 时细胞抑制程度最为显著,且不同血清刺激时间段里,隔姜灸组血清效果更明显。

4 结论

本研究中用两种艾灸方法即直接灸法与隔姜灸法治疗实验性 RA 大鼠“肾俞”、“足三里”两穴,通过体外培养 RA 滑膜成纤维细胞,用各实验组血清刺激 RA 滑膜成纤维细胞,并检测不同时间段滑膜成纤维细胞的增殖。结果显示,血清刺激 36h 时两组艾灸血清抑制细胞增殖最明显,且隔姜灸组血清效果最为显著。病理学证实,RA 关节滑膜的主要异常表现为滑膜组织充血,滑膜衬里层滑膜成纤维细胞增生,因此抑制滑膜成纤维细胞的活化与增殖对控制 RA 的发病具有重要意义。艾灸血清对 RA 滑膜成纤维细胞异常增殖的抑制,可能是艾灸产生抗炎效应,治疗 RA 的作用机制之一。本研究结果显示艾灸治疗 RA 的最佳时间段。但艾灸的具体作用机制还有待进一步探究。

参考文献:

[1] Alam J, Jantan I, Bukhari SNA. Rheumatoid arthritis: Recent advances on its etiology, role of cytokines and pharmacotherapy[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, (92): 615 - 633.

[2] García - Vicua R, Martín - Martínez MA, Gonzalez - Crespo MR, et al. Recommendations by the Spanish Society of Rheumatology for the management of patients diagnosed with rheumatoid arthritis who cannot be treated with methotrexate [J]. *Reumatología clínica (English Edition)*, 2017, 13(3): 127 - 138.

[3] Chen H, Shao X, Li L, et al. Electroacupuncture serum inhibits TNF α mediated chondrocyte inflammation via the Ras Raf MEK1/2 ERK1/2 signaling pathway [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2017, 16(5): 5807.

[4] Guo YM. Treatment of Rheumatoid Arthritis Mainly by Acupuncture [J]. *Journal of Acupuncture & Tuina Science*, 2005, 3(6): 35 - 36.

[5] Yang ZB, Yan J, Zou XP, et al. Enhanced expression of epi-

dermal growth factor receptor gene in gastric mucosal cells by the serum derived from rats treated with electroacupuncture at stomach meridian acupoints [J]. *World journal of gastroenterology*, 2006, 12(34): 5557.

[6] Connor SC, Gray RA, Hodson MP, et al. An NMR - based metabolic profiling study of inflammatory pain using the rat FCA model [J]. *Metabolomics*, 2007, 3(1): 29 - 39.

[7] Fang RY, Shao XM. Effects of moxibustion on the paw swelling and pain threshold in rats with experimental arthritis [J]. *Journal of Acupuncture and Tuina Science*. 2012, 10(4): 199 - 203.

[8] 高骏, 刘旭光, 黄迪君, 等. 艾灸对实验性 RA 大鼠类风湿性关节炎作用机制的研究 [J]. *中国针灸*, 2008, (s1): 66 - 68.

[9] 罗磊, 胡玲, 何璐, 等. Dirckinck - Holmfeld Lars, 等. 艾灸对类风湿性关节炎大鼠关节滑膜细胞超微结构的影响 [J]. *针刺研究*, 2011, 36(2): 105 - 109.

[10] 魏铮, 杨露晨, 杨馨, 等. 艾灸对类风湿性关节炎家兔滑膜细胞 CyclinD1 及 CDK4 蛋白表达的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2012, (7): 1503 - 1505.

[11] 张传英, 蔡荣林, 唐照亮. 艾灸对类风湿性关节炎大鼠炎症因子和滑膜细胞凋亡的影响 [J]. *北京中医药大学学报*, 2014, 37(3): 190 - 194.

[12] 杨慎峭, 刘旭光, 余曙光, 等. 艾灸对类风湿性关节炎家兔关节滑膜液 IL - 1 β , TNF - α 含量的影响 [J]. *成都中医药大学学报*, 2005, 28(3): 11 - 12.

[13] 杨馨, 黄艺, 金荣疆, 等. 艾灸对基因干扰类风湿性关节炎家兔血清 IL - 17 影响的研究 [J]. *成都中医药大学学报*, 2014, 37(1): 24 - 28.

[14] 胡玲, Lars DH, 宋小鸽, 等. Effect of Moxibustion on IL - 1 β and IL - 2 in Rat Models of Rheumatoid Arthritis [J]. *针灸推拿医学 (英文版)*, 2010, 08(3): 149 - 53.

[15] 杨馨, 刘旭光, 王月, 等. 艾灸对类风湿性关节炎家兔滑膜细胞 JAK - STAT 通路负反馈调节家族细胞因子信号抑制因子的影响 [J]. *针刺研究*, 2013, 38(2): 129 - 33.

[16] 高骏, 刘旭光, 黄迪君, 等. HPA 在艾灸调控类风湿性关节炎大鼠滑膜组织 NF - κ B 信号通路中的作用 [J]. *针刺研究*, 2010, 35(3): 198 - 203.

[收稿日期 2018 - 01 - 08; 责任编辑 梁毅]