

· 基础研究 ·

激光穴位照射对类风湿性关节炎大鼠血清炎性介质、细胞因子及脑 β -内啡肽的影响

李大可 武宏 赵宏兵

【摘要】目的 探讨激光穴位照射对类风湿性关节炎模型大鼠血清组织胺(Hm)、5-羟色胺(5-HT)、白细胞介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及脑 β -内啡肽(β -EP)的影响及其意义。**方法** 将 60 只 Wistar 大鼠随机分为空白组、造模组、药物组和激光组,除空白组外,各组大鼠应用 Freund's 完全佐剂制作关节炎模型。药物组采用药物治疗,激光组同时给予激光穴位照射及药物治疗。检测大鼠血清 Hm、5-HT、IL-1、TNF- α 及脑 β -EP 的含量。**结果** 激光穴位照射有下调关节炎模型大鼠异常升高的血清 Hm、5-HT、IL-1 和 TNF- α 的作用,并可明显上调下丘脑内 β -EP 含量,疗效优于对照组($P < 0.05$)。**结论** 激光穴位照射可抑制血清炎性细胞因子,具有中枢镇痛作用,对类风湿性关节炎大鼠有较好的治疗效果。

【关键词】 激光; 类风湿性关节炎; 组胺; 5-羟色胺; 白细胞介素-1; 肿瘤坏死因子- α ; β -内啡肽

The effect of laser irradiation on the level of histamine, 5-HT, IL-1 and TNF- α in serum and β -EP in brain tissue in rat with rheumatoid arthritis LI Da-ke*, WU Hong, ZHAO Hong-bing. * Teaching Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250011, China

【Abstract】 Objective To observe the effect of laser irradiation on the level of histamine (Hm), 5-hydroxytryptamine(5-HT), interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor α (TNF- α) in serum and β -endorphin (β -EP) in brain tissue in rat model of rheumatoid arthritis. **Methods** A total of 60 Wistar rats were randomly divided into four groups: a normal group, a model group (RA without treatment), a laser + drug treatment group (RA treated by laser and drug) and a drug treatment group (RA treated by drug alone). All the groups, except the normal one, were injected with complete Freund's adjuvant to make animal model of adjuvant arthritis. All the animals were then treated accordingly. The level of Hm, 5-HT, IL-1 and TNF α in serum and β -EP in brain tissue were measured. **Results** Laser downregulated the content of Hm, 5-HT, IL-1 and TNF α in serum and increased the content of β -EP in brain tissue. **Conclusion** Laser irradiation is an effective modality for treating the animal model of rheumatoid arthritis.

【Key words】 Laser; Rheumatoid arthritis; Histamine; 5-hydroxytryptamine; Interleukin-1; Tumor necrosis factor- α ; β -endorphin

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以慢性炎症侵蚀关节为主要特征的自身免疫性疾病,本质上是一种自身免疫性炎症反应,其病理改变与自身免疫性炎症反应有密切关系。经临床观察,激光配合药物治疗 RA 已取得了良好的效果^[1]。本研究以佐剂性关节炎大鼠模型为实验对象,研究激光对大鼠血清炎性介质、细胞因子及脑 β -内啡肽(β -endorphin, β -EP)的影响,旨在对激光穴位照射治疗 RA 的机制进行初步探讨。

资料与方法

一、实验动物和材料

实验动物: Wistar 雄性大鼠,体重 160 ~ 200 g,由山东大学西校区动物中心提供,合格证号为鲁动质字 20030004 号。

药物: 火把花根片(昆明山海棠之根),重庆市中药研究院制药厂生产,批号为渝卫药准字(1997)第 005661 号。

试剂: Freund's 完全佐剂,由美国 Gibico 公司生产;白细胞介素(interleukin-1, IL-1)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)放免试剂盒,购自北京东亚放免技术研究所;¹²⁵I- β -EP 放免试剂盒,由上海第二军医大学提供。

基金项目:山东省发展计划项目(022130111)

作者单位:250011 济南,山东中医药大学附属医院风湿免疫科(李大可);山东大学物理与微电子学院(武宏);解放军第四五六医院(赵宏兵)

仪器:GMJ 型 γ -全自动放射免疫计数器,由江苏医疗电子研究所提供;日本产 MPF-4 型荧光分光光度计;TG328B 型电子分析天平;DDL-5 型冷冻离心机,由上海安亭科学仪器厂生产;北京产 Sundom-300I 型 GaAlAs 半导体激光治疗机。

二、实验分组

取雄性 Wistar 大鼠 60 只,体重 160 ~ 200 g,随机分为空白组、造模组、药物组和激光组,每组 15 只。

三、模型制作方法

参照文献[2]介绍的方法制作佐剂性关节炎模型,将 Freund's 完全佐剂(Freund's adjuvant complete)加热、振荡并混匀,分别于造模组、药物组和激光组大鼠右踝关节下 0.5 cm 处皮下注射,每只注射 0.1 ml。

四、治疗方法

造模后第 4 天,药物组给予火把花根片混悬液灌胃,剂量为 45 mg/kg 体重,每日 1 次,连续 20 d。激光组在药物灌胃的基础上给予激光照射,应用 Sundom-300I 型 GaAlAs 半导体激光治疗仪,先采用连续方式,直接照射炎症关节局部,波长为 810 nm,输出功率为 400 mW,光斑直径为 5 mm,每个部位照射 10 min;再采用脉冲方式,输出功率为 800 mW,光斑直径为 1 mm,点击炎症关节局部阿是穴及足三里穴^[3],以局部皮肤有灼伤反应(皮肤汽化或炭化)为度。隔日照射 1 次,共 10 次。空白组、模型组分别灌服等量生理盐水,每日 1 次。

五、取材与检测方法

造模后第 24 天各组大鼠断尾取血,测定血清组胺(Histamine, Hm)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、IL-1、TNF- α 含量,以观察炎症介质及细胞因子的变化。造模后第 27 天各组大鼠快速断头,剥离脑组织,测定 β -EP 含量,以观察中枢性镇痛物质的变化。

1. 血清 Hm、5-HT、IL-1 和 TNF- α 的测定:Hm、5-HT 测定依照 Shellenberger 等^[3]介绍的方法并加以改进,IL-1、TNF- α 的测定按试剂盒说明书要求操作。

2. 脑 β -EP 的测定:采用放射免疫法进行测定,按试剂盒说明书的要求操作。

六、统计学分析

检测结果均应用 SAS8.0 版统计软件包进行统计学分析,采用双侧检验, $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义。计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,样本均数的比较采用方差分析(ANOVA)。

结 果

一、佐剂性关节炎大鼠模型的观察

造模后第 2 天,造模各组大鼠注射局部红、肿胀、皮温较高,第 2 ~ 4 天最为明显,第 3 ~ 7 天左右开始消

退(药物组和激光组早于造模组),至第 12 天左右关节又明显肿胀,随后逐渐减轻。造模后约第 14 天,大鼠左后足跖肿胀显著,继发性关节炎模型形成,作为造模成功的标志。

另外,造模组 6 只大鼠出现尾部结节,耳、鼻或前肢、包皮红肿,药物组和激光组未见结节及红肿。

二、激光照射对血清 Hm、5-HT 的影响

药物组和激光组均可见异常升高的血清 Hm、5-HT 下调,与造模组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$);激光组与药物组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 激光照射对血清 Hm、5-HT 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	Hm($\mu\text{g/ml}$)	5-HT($\mu\text{g/ml}$)
空白组	15	0.21 $\pm$ 0.09	0.64 $\pm$ 0.17
造模组	15	0.28 $\pm$ 0.05	1.30 $\pm$ 0.36
药物组	15	0.23 $\pm$ 0.12 ^a	1.06 $\pm$ 0.20 ^a
激光组	15	0.21 $\pm$ 0.13 ^a	0.89 $\pm$ 0.25 ^{ab}

注:与造模组相比,^a $P < 0.05$;与药物组相比,^b $P < 0.05$

三、激光照射对血清 IL-1、TNF- α 和脑 β -EP 的影响

药物组和激光组均可见异常升高的血清 IL-1 和 TNF- α 下调,与造模组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),还可见下丘脑 β -EP 的含量明显上调,与造模组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),接近空白组水平;激光组与药物组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 激光照射对血清 IL-1、TNF- α 及脑组织 β -EP 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	IL-1 (ng/ml)	TNF- α (ng/ml)	β -EP (pg/ml)
空白组	15	0.18 $\pm$ 0.21	1.01 $\pm$ 0.36	283.4 $\pm$ 35.2
造模组	15	0.47 $\pm$ 0.32	1.41 $\pm$ 0.46	226.5 $\pm$ 37.9
药物组	15	0.29 $\pm$ 0.25 ^a	1.14 $\pm$ 0.27 ^a	246.6 $\pm$ 33.7 ^a
激光组	15	0.26 $\pm$ 0.14 ^a	1.02 $\pm$ 0.32 ^{ab}	267.6 $\pm$ 32.8 ^{ab}

注:与造模组相比,^a $P < 0.05$;与药物组相比,^b $P < 0.05$

讨 论

RA 的本质是一种自身免疫性炎症反应疾病,其病理改变,不论是滑膜炎、血管翳,还是引起 RA 关节外表现的血管炎,均与自身免疫性炎症反应有密切关系。环境中的抗原进入机体后,通过 T 细胞免疫反应和滑膜细胞免疫反应,使滑膜细胞数量增加、体积增大,滑膜明显增厚,而 T 细胞活化后产生的细胞因子可进一步刺激巨噬细胞及 T 细胞,分别通过旁分泌和自分泌的方式产生 IL-1 和 TNF,继之刺激滑膜成纤维细胞和软骨细胞产生胶原酶、中性蛋白酶、前列腺素及其他炎症介质,造成软骨坏死及血管翳形成。细胞因

子在以上 T 细胞免疫反应和滑膜细胞免疫反应中起重要的调节作用。IL-1 和 TNF 是 RA 发病中两大重要的细胞因子^[5]。有研究显示, RA 患者血中存在 IL-1 β 且其水平与疾病活动性相关联^[6], 这与本研究观察到的活动期 RA 患者血清 IL-1 和 TNF- α 水平显著升高的结果相一致。IL-1 的生物学作用除引起发热, 促进急性反应蛋白(如 C 反应蛋白)合成, 粒细胞、巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)增加外, 还可促进关节局部的多形核白细胞、淋巴细胞、单核细胞的趋化反应, 使白细胞吸附于内皮细胞; 促进成纤维细胞增殖, 刺激成纤维细胞及软骨细胞产生胶原酶及前列腺素 E_2 , 使胶原产生增加; 刺激 T 细胞及 B 细胞等^[5]。TNF 的作用与之相似。因此, 降低血清 IL-1 和 TNF 水平是控制 RA 炎症反应的有效方法。

激光具有五种生物学效应, 包括热效应、压强效应、光化效应、电磁效应和刺激效应。半导体激光近年来在医学上发展较快, 已在不同医学领域逐步替代 He-Ne 激光、氩激光, 成为激光治疗的新光源。GaAlAs 半导体激光是近红外线激光, 有广泛的生物学作用, 对组织的穿透力比 He-Ne 激光更深, 且组织对光能量吸收良好。我们采用的激光穴位照射治疗思路源于祖国医学传统的灸法和火针疗法。高功率激光具有切割功能好, 但对组织烧灼力差的特点, 相当于火针的穴位扎孔; 弱激光则烧灼力强、切割功能差, 相当于火针的“淬”, 即对组织的烧灼。通过强、弱激光的联合应用, 可达到治疗目的。因此激光穴位照射治疗不仅通过刺激经络穴位, 对生物场和皮肤神经末梢起直接作用, 同时还提供能量, 在治疗局部起到活血化瘀的作用; 还能提高机体免疫功能, 促进机体代谢, 增强各种酶活性, 影响细胞膜通透性, 改善机体各系统功能, 恢复局部异常的肿胀与松弛。

利用激光的热效应对局部病变进行烧灼, 可使微量免疫抗原抗体复合物部分灭活。部分灭活的免疫复合物存在于组织中, 有效激发机体神经-内分泌-免疫系统, 从而调节机体的免疫功能。激光对外周血 T 细胞亚群调节作用的研究显示, 经半导体激光照射后, 患者外周血 CD_3^+ 有明显上升趋势, CD_4^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 比值也有所上升; 根据各人免疫功能的原有实际水平进行分组分析, 发现激光照射可上调低于正常水平者的 CD_4^+/CD_8^+ 比值, 而下调高于正常水平者的 $CD_4^+/$

CD_8^+ 比值。这种双向调节作用对维持机体的正常免疫功能具有重要意义^[7]。激光烧灼组织后, 机体迅速调动神经-体液系统、免疫系统来消除这种烧伤炎症, 同时也消除了局部关节的炎症, 使局部微循环得到改善, 从而提高病变关节的功能。

低能量激光能改变神经纤维对 K^+ 、 Na^+ 的通透性, 使神经末梢动作电位增高, 同时刺激神经轴突, 促进内啡肽的生成^[8]。另外, 激光作为一种较强的电磁波, 作用于机体时, 可使体内甲硫氨酸脑啡肽等物质浓度升高^[9], 从而达到镇痛的目的。激光的生物学刺激效应也可作用于感觉神经, 降低其兴奋性, 减小组织对外界刺激的感应性及传导性, 从而使痛阈得到提高。激光还可通过光化学反应激发中枢神经-体液系统多方面的反射性调控, 消除局部炎症, 增强组织新陈代谢, 消除肿胀, 松弛肌肉, 起到消炎止痛的作用^[10]。

总之, 本实验证实, 激光照射能显著抑制 RA 大鼠原发性与继发性关节炎症反应, 下调血清中异常升高的 Hm、5-HT、IL-1、TNF- α 等水平, 同时上调下丘脑 β -EP 水平, 起到中枢镇痛作用。我们认为激光治疗对细胞免疫及体液免疫均具有一定的抑制作用, 可用于 RA 的辅助治疗。

参 考 文 献

- [1] 武宏, 李大可, 王笑红, 等. 激光穴位照射与药物联合治疗类风湿性关节炎. 中华物理医学与康复杂志, 2003, 25: 667-668.
- [2] 徐淑云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1982; 534.
- [3] 李忠仁. 实验针灸学. 北京: 中国中医药出版社, 2003; 360.
- [4] 蒋晓玲. 荧光法测定大鼠脑组织和血液中单胺类物质的方法探讨. 南京体育学院学报(自然科学版), 2002, 1: 85-87.
- [5] 张乃峥. 临床风湿病学. 上海: 上海科学技术出版社, 1999; 122.
- [6] 蔡青. IL-1 和 TNF α 与类风湿性关节炎. 上海免疫学杂志, 1998, 18: 62-63.
- [7] 徐清, 成柏华. 半导体激光血管内照射对人体外周血 T 淋巴细胞亚群及 NK 细胞的调节作用. 激光生物学报, 1997, 6: 1105-1109.
- [8] 何怀, 矫勇铁. 半导体激光穴位照射的镇痛作用及其机制初探. 苏州医学院学报, 2000, 20: 206-208.
- [9] 罗乐, 周章武. 激光镇痛及其机理分析. 应用激光, 1997, 17: 47-48.
- [10] 卞学平, 卞红艳. GaAs 半导体激光照射足三里穴对人体痛阈的影响. 中国激光医学杂志, 1999, 8: 169-171.

(修回日期: 2008-02-15)

(本文编辑: 吴倩)