

电针对急性痛风性关节炎大鼠踝关节滑膜组织 TLR/MYD88 信号通路的影响*

张超男, 黄学宽[△], 骆言, 蒋娟, 万磊, 王玲

重庆医科大学 中医药学院 (重庆 401331)

【摘要】 目的 探讨电针对急性痛风性关节炎(acute gouty arthritis, AGA)大鼠踝关节滑膜组织 TOLL 样受体(TLR)/髓样分化因子 88 (MYD88)信号通路相关蛋白表达的影响。**方法** 将 50 只 SD 雄性大鼠随机分为正常组、硅晶体(SMD)组、AGA 模型组、西药组、电针组, 每组 10 只; 正常组常规喂养, SMD 组采用 SMD 溶液注入关节腔, 作为关节炎模型对照, 其余各组采用尿酸钠溶液注射法建立急性痛风性关节炎模型。正常组、SMD 组与 AGA 模型组大鼠造模前 2 d 开始按 20 mL/kg 予以生理盐水灌胃, 西药组按 1 mg/kg 予以秋水仙碱溶液灌胃, 电针组选取大鼠受试侧三阴交、解溪、昆仑穴位施针, 频率 1.5~2 Hz, 疏密波, 电压 9 V, 电流强度 1~3 mA, 留针 20 min, 上述处理均为 1 次/d, 连续 9 d。定期观察各组大鼠受试关节肿胀指数, 并采用免疫组化法检测受试关节滑膜组织中 TLR2、MYD88 蛋白的表达。**结果** 与正常组比较, SMD 组大鼠受试关节肿胀指数增加($P<0.05$)、而受试踝关节滑膜组织中 TLR2、MYD88 蛋白的表达差异无统计学意义($P>0.05$); 模型组大鼠受试关节肿胀指数、滑膜组织 TLR2、MYD88 的表达则明显增加($P<0.05$); 与模型组比较, 西药组和电针组大鼠受试踝关节肿胀指数减小($P<0.05$), 大鼠受试踝关节滑膜组织中 TLR2、MYD88 蛋白的表达降低($P<0.05$); 电针组与西药组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 电针能够减轻急性痛风性关节炎的症状, 这可能与调节 TLR/MYD88 信号通路中 TLR2、MYD88 蛋白的表达有关。

【关键词】 电针 急性痛风性关节炎 Toll 样受体 2 髓样分化因子 88

The Effects of Electro-acupuncture on the Signaling Pathway of TLR/MYD88 in Ankle Joint Synovial Tissue of Acute Gouty Arthritis Rats ZHANG Chao-nan, HUANG Xue-kuan[△], LUO Yan, JIANG Juan, WAN Lei, WANG Ling. College of TCM, Chongqing Medical University, Chongqing 401331, China

[△] Corresponding author, E-mail: xkhuang2002@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of electro-acupuncture (EA) on the related protein expression of the signaling pathway of the toll-like receptor2 (TLR2)/myeloid differentiation factor (MYD) 88 in ankle joint synovial tissue of acute gouty arthritis (AGA) rats. **Methods** Fifty male SD rats were randomly divided into 5 groups: normal group, SMD group, AGA model group, medication group and EA group, 10 rats in each group. SMD group established model by inducing SMD, other groups established AGA model by inducing monosodium urate, except the normal group. Two days before model was established, normal and SMD and AGA model groups were lavaged with normal saline (20 mL/kg), medication group was lavaged with colchicine solution (1 mg/kg), EA (1.5-2 Hz, D.-D. wave, 9 V, 1-3 mA) was applied to “Sanyinjiao” (SP6), “Jiexi” (ST41) and “kunlun” (BL60) for 20 min, once daily, continuously for 9 days. Then the joint swelling index was observed periodically, the protein expression of TLR2 and MYD88 was determined by immunohistochemistry. **Results** Compared to the normal group, the joint swelling of the SMD group in test joint increased significantly ($P<0.05$) and the protein expression of TLR2 and MYD88 in synovial tissue has not statistically significant ($P>0.05$), the joint swelling and protein expression of TLR2 and MYD88 in synovial tissue of model group increased significantly ($P<0.05$); The medication and EA group compared to the model group, the protein expression of TLR2 and MYD88 in synovial tissue decreased significantly ($P<0.05$), the joint swelling in test joint decreased significantly ($P<0.05$); There were not statistically significant between the EA group and the medication group ($P>0.05$). **Conclusion** EA can alleviate the symptoms of AGA, which may be related to regulation of the protein expression of TLR2 and MYD88 in the TLR/MYD88 signaling pathway.

【Key words】 Electro-acupuncture Acute gouty arthritis Toll-like receptor2 Myeloid differentiation factor 88

急性痛风性关节炎(acute gouty arthritis, AGA)为痛风的典型表现之一, 由于尿酸钠晶体(monosodium urate, MSU)析出并沉淀于关节腔

* 重庆市卫生局科技项目(No. 2010-2-25)资助
[△] 通讯作者, E-mail: xkhuang2002@163.com

内,导致大量炎性细胞浸润,从而引起患者关节剧烈疼痛、红肿及出现功能障碍^[1]。近年对 TOLL 样受体(TOLL-like receptor, TLR)/髓样分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MYD88)信号通路的研究越来越受到关注,它通过识别“危险因子”(DAMPs),并向下游转导信号,从而参与炎症的反应过程^[2],其中 TLR2 是 TLRs 家族成员之一,主要参与关节炎的发病机制^[3],而 MYD88 则是 TLR/MYD88 信号通路的重要衔接蛋白^[4]。本课题采用 MSU 溶液关节腔内注射法建立 AGA 大鼠模型,因其关节炎病理表现与 AGA 患者相似,皆由中性粒细胞诱导的炎症,故本实验拟观察电针对 AGA 大鼠滑膜组织 TLR/MYD88 信号通路相关蛋白表达的影响,以期探讨电针治疗 AGA 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级 SD 雄性大鼠 50 只,体质量为(200±20) g,由重庆医科大学实验动物中心提供〔动物合格证号 SCXK(渝)2012-0001,环境合格证号 SYXK(渝)2012-0001〕。

1.2 药品、试剂与仪器

秋水仙碱片(昆明制药集团股份有限公司);尿酸钠晶体(MSU,美国 Sigma 公司),硅晶体(SMD,美国 Sigma 公司),S-P Rabbit HRP Kit (DAB)兔 Streptavidin-HRP 试剂盒(北京中杉金桥生物科技有限公司),TLR2 一抗(武汉博士德生物工程有限公司)、MYD88 一抗(武汉博士德生物工程有限公司)等。BH-2 型光学显微镜、显微摄影仪(Olympus),HM-6805-I 型经穴治疗仪(恒明牌),一次性针刺毫针(华佗牌)等。

1.3 实验方法

1.3.1 分组与治疗 大鼠适应性喂养 1 周后,随机分为正常组、SMD 组、AGA 模型组、西药组及电针组,每组 10 只。正常组、SMD 组和 AGA 模型组:造模前 2 d 开始,按 20 mL/kg 予以生理盐水灌胃,1 次/d,连续 9 d;西药组:造模前 2 d 开始按 1 mg/kg 予以秋水仙碱溶液(生理盐水溶解稀释)灌胃^[5],1 次/d,连续 9 d;电针组:造模前 2 d 开始施针,参照《实验针灸学》取受试侧三阴交、解溪、昆仑穴位,毫针直刺,平补平泻,进针后接经穴治疗仪,电流强度 1~3 mA,电压 9 V,频率 1.5~2 Hz 的疏密波,强度以大鼠局部皮肤肌肉微颤为度,留针 20 min,1 次/d,连续 9 d。

1.3.2 造模方法 在上述分组进行干预治疗的同时,根据文献方法^[6]加以改进,从第 3 d 起,大鼠腹腔注射 10%水合氯醛溶液麻醉后,用 6 号注射针在大鼠右踝关节后侧,针尖斜面与胫骨成 45°夹角插入直至踝关节腔,AGA 模型组、西药组及电针组大鼠将浓度为 2.5 g/100 mL 的 MSU 溶液 0.2 mL 注入关节腔内,以关节囊对侧鼓胀为准。而正常组、SMD 组分别用同样方法注射等体积生理盐水、SMD 溶液(10 mg/mL)作为正常对照及关节炎模型对照。

1.3.3 观察指标

1.3.3.1 观察受试关节肿胀指数 分别于造模前 1 h、造模后 8 h、处死前 1 h 采用缚线法于大鼠受试关节同一部位测量周径(取平均值),并计算各阶段肿胀指数。

肿胀指数=[测量时间点关节周径-初始周径(即造模前 1 h 测得关节周径)]/初始周径。

1.3.3.2 检测受试关节滑膜组织 TLR2、MYD88 蛋白的表达 末次灌胃 2 h 后断头处死大鼠,取受试关节滑膜组织放入 4%多聚甲醛(体积分数)中固定,石蜡包埋、切片,按免疫组化试剂盒说明进行操作。

结果判定:以显微镜下细胞浆及胞膜内呈棕黄色颗粒为阳性表达。参考文献^[7]以阳性细胞百分比与染色强度的乘积判断目标蛋白的表达。每只大鼠踝关节取 2 张切片,在 400 倍光镜下每张切片取 5 个视野进行评分判定。阳性细胞百分比评分:无阳性细胞为 0 分,阳性细胞 1%~10%为 1 分,阳性细胞 11%~50%为 2 分,阳性细胞 51%~80%为 3 分,阳性细胞 81%~100%为 4 分。染色强度评分:阴性为 0 分,弱阳性为 1 分,阳性为 2 分,强阳性为 3 分。

1.4 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 *t* 检验进行统计分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 受试关节肿胀指数比较

与正常组比较,SMD 组、AGA 模型组大鼠受试踝关节肿胀指数增加($P < 0.05$);与 AGA 模型组比较,经西药和电针治疗后,西药组和电针组大鼠受试踝关节肿胀指数减小($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 受试关节滑膜组织 TLR2、MYD88 蛋白的表达

表 1 各组大鼠踝关节肿胀指数在不同时期的比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of the ankle swelling index in each group of rats with different periodsjoin ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	1 h before modeling	8 h before modeling	1 h before execution
Normal	10	0	0.023 0±0.020 8	0.035 3±0.029 7
SMD	10	0	0.197 5±0.018 5△	0.184 2±0.018 9△
AGA model	10	0	0.243 3±0.026 6△	0.228 0±0.025 5△
Medical	10	0	0.250 8±0.021 9△	0.189 7±0.015 1*
EA	10	0	0.239 4±0.016 9△	0.173 7±0.016 3*

△ $P<0.05$, vs. normal group; * $P<0.05$, vs. AGA model group

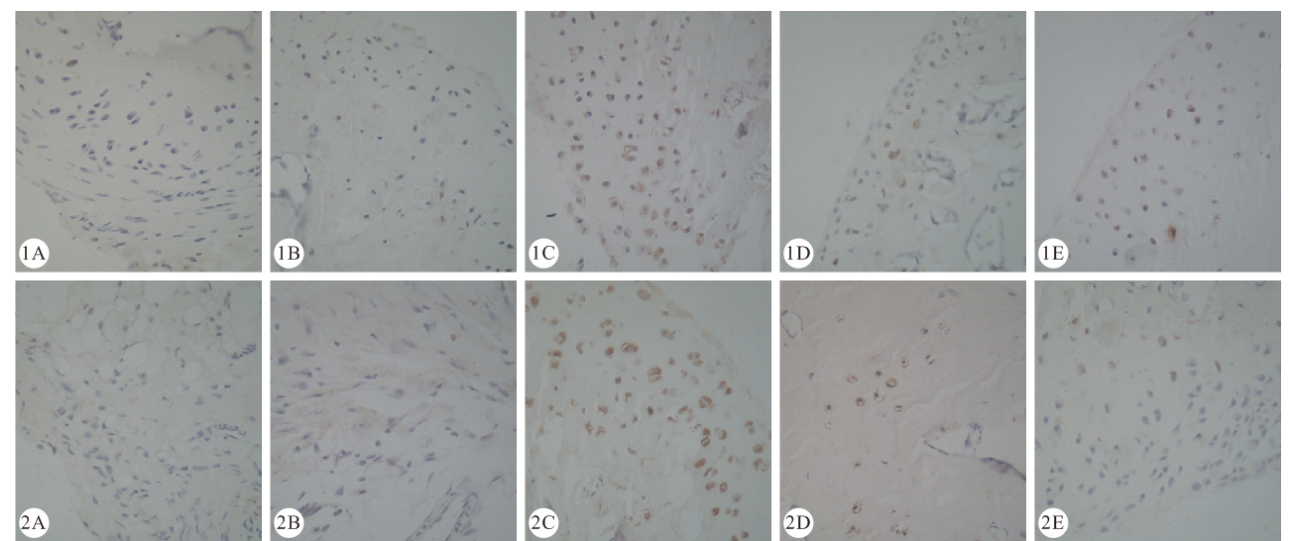


图 1 各组大鼠踝关节滑膜组织中 TLR2 蛋白的表达。SP ×400

图 2 各组大鼠踝关节滑膜组织中 MYD88 蛋白的表达。SP ×400

Fig 1 The expression of TLR2 on synovial tissue of ankle joint in each group of rats. SP ×400

Fig 2 The expression of MYD88 on synovial tissue of ankle joint in each group of rats. SP ×400

A: Normal group; B: SMD group; C: AGA model group; D: Medical group; E: EA group

表 2 各组大鼠踝关节滑膜组织中 TLR2、MYD88 蛋白的表达($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Expression of TLR2, MYD888 in synovial tissue of ankle joint in each group of rats ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	TLR2		Expression of TLR2 protein	MYD88		Expression of MYD88 Protein
		Positive cell (%)	The staining intensity		Positive cell (%)	The staining intensity	
Normal	10	21.20±14.34	0-1	2.00±1.05	16.20±8.48	0-1	1.90±0.99
SMD	10	18.80±9.13	0-1	1.70±0.67	17.40±7.38	0-1	1.80±1.03
AGA model	10	41.00±13.77△	2-3	5.50±1.58△	41.00±10.33△	2-3	5.30±1.64△
Medical	10	24.20±13.65*	1-2	3.40±1.35*	27.00±15.70*	1-2	3.60±1.84*
EA	10	19.20±12.35*	1-2	2.80±1.62*	26.10±12.59*	1-2	3.60±1.58*

△ $P<0.05$, vs. normal group; * $P<0.05$, vs. AGA model group

3 讨论

急性痛风性关节炎属中医“湿热痹”范畴,本病常因饮食不节,脾失健运而湿浊内生,或平素体虚感受湿热之邪,而湿热之邪留滞关节筋骨,日久累及肝肾而出现关节肿大疼痛、屈伸不利等症状,属正虚邪实之候,治疗当从脾肾入手,“宛陈则除之”、“热则疾之”,采用补虚泻实法。《针灸甲乙经》云:“足下热痛不能久坐,湿痹不能行,三阴交主之”,三阴交为足三阴经交会穴,而电针三阴交有清热利湿、补益肝脾肾

与正常组比较,SMD 组大鼠受试踝关节滑膜组织中 TLR2、MYD88 蛋白的表达无明显变化($P>0.05$),AGA 模型组大鼠受试踝关节滑膜组织中 TLR2、MYD88 蛋白的表达增加($P<0.05$);与 AGA 模型组比较,经西药和电针治疗后,西药组与电针组大鼠受试踝关节滑膜组织中 TLR2、MYD88 蛋白的表达降低($P<0.05$);电针组与西药组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 1、图 2,表 2。

之功;解溪、昆仑分别为脾经、膀胱经经穴,可沟通五脏六腑表里之所在,也是脏腑经络之气流注聚集于体表之所在,故电针解溪、昆仑能激发脾肾经气传导至疼痛关节,即“气至病所”^[8]。有实验研究表明,电针对关节炎大鼠有显著镇痛效果,可改善 AGA 的局部症状^[9]。

本实验研究发现,模型组大鼠在造模后其受试关节肿胀指数明显高于正常组,提示 MSU 溶液能诱导出现关节肿胀,故造模成功。TLR2/MYD88 信号通路是一条与炎症反应密切相关的信号通路,

其中 TLR2 是 TLRs 家族中识别微生物及其产物种类最多、表达范围最广的成员,其胞外段为白细胞介素(interleukin-1, IL-1)受体同源的结构域,称之为 TIR(Toll/IL-IR),而 MYD88 则是此信号通路重要的衔接蛋白,其 C-端同样为 TIR 结构域。当 MSU 作为 DAPMs 被 TLR2 识别并激活 TLR2 后,TLR2 与 MYD88 通过 TIR 结构域结合,募集相关蛋白激酶,从而促使 AGA 的产生^[10,11]。当 TLR2 被激活后,多种促炎因子表达上调,进而启动或加强炎症反应^[12],而 MYD88 过度表达则可激活 NF- κ B^[13],产生炎症级联放大效应。由此可知,TLR2 与 MYD88 的高表达可能促进了炎症反应的进展。本实验还发现,AGA 模型组大鼠受试关节滑膜组织 TLR2、MYD88 蛋白表达明显高于正常组,SMD 组大鼠受试关节肿胀度明显高于正常组,即急性关节炎表现,而滑膜组织 TLR2、MYD88 蛋白表达与正常组比较无明显差异。由此可见,虽然 MSU 与 SMD 晶体均可造成大鼠受试关节肿胀,但仅有 MSU 晶体能够诱导 TLR2、MYD88 蛋白表达的增高,提示 MSU 晶体可能通过被识别并启动 TLR/MYD88 信号通路,激活 TLR2,并促进 TLR2 与 MYD88 结合,从而加重 AGA 大鼠踝关节组织的炎症反应,而 SMD 晶体则无法被识别,因而无法启动此信号通路。近年研究发现,缺失 TLR2、MYD88 基因的小鼠无法产生内毒素脂多聚糖(eLPS)诱导的气道炎症反应^[14],而 TLR2、MYD88 则是与 MSU 诱导引起的 AGA 密切相关的两个蛋白^[15],可见,降低 TLR2、MYD88 的表达可能有减轻 AGA 关节炎症的作用。本实验结果表明,与模型组比较,电针组和西药组的 TLR2、MYD88 表达降低,可能与踝关节内炎症反应逐步减轻有关。

本实验研究显示,随着 TLR2、MYD88 蛋白的上调,大鼠关节肿胀指数明显升高,AGA 的症状出现显著恶化,而经电针或西药治疗后,随着 TLR2、MYD88 蛋白表达的下调,大鼠关节肿胀指数也明显降低,AGA 症状有显著改善,提示 TLR2、MYD88 在 AGA 的病情进展过程中发挥着重要作用,这可作为今后临床治疗急性痛风性关节炎的新靶点。总之,TLR2 与 MYD88 是调节 TLR/MYD88 信号通路的至关重要的两个蛋白,也是与 AGA 密切相关的蛋白,通过调节这两个蛋白则有抑制或加强 AGA 的炎症反应作用。本实验研究还发现,电针可减轻 AGA 大鼠受试踝关节的炎症反应,减小受试关节肿胀程度,并改善 AGA

的症状,这可能与电针通过抑制 TLR/MYD88 信号通路的转导,减轻 AGA 大鼠踝关节滑膜组织中 TLR2、MYD88 蛋白的表达有关。但 TLR/MYD88 信号通路在 AGA 方面的实验研究甚少,其机理还有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 钟南山,路再英,谢毅等.内科学.第7版.北京:人民卫生出版社,2008:830-835.
- 2 Mnrtinon F, Petrilli V, Mayor A, *et al.* Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*, 2006; 440(7081):23-241.
- 3 奚正德,胡峻熊. Toll 样受体信号转导在关节炎发病中的作用. *国际内科学杂志*, 2009; 36(6):361-365.
- 4 Akira S. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem*, 2003; 278(40):38105-38108.
- 5 袁鹰,罗艳,李长贵.氧化应激及白细胞介素 1 β 在痛风性关节炎中的作用及丙丁酚对其影响. *中华内分泌代谢杂志*, 2010; 26(3):225-228.
- 6 黄火高,胡明,孙运峰等.大鼠急性痛风性关节炎模型的建立及特点. *军事医学科学院院刊*, 2005; 29(6):538-542.
- 7 Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, *et al.* Cox-2 is expressed in human pulmonary colonic and mammary tumors. *Cancer*, 2000; 89(12):2637-2645.
- 8 石焱,陈华德.五输穴与十二经脉气灌注的关系. *中华中医药学刊*, 2007; 25(9):1971-1972.
- 9 张皓,王建,陈新勇等.电针对佐剂性关节炎大鼠镇痛作用及内啡肽的影响. *青岛大学医学报*, 2010; 46(5):390-392.
- 10 O' Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domaincontaining adaptors in Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol*, 2007; 7(5):353-364.
- 11 Shi Y, Evals JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*, 2003; 425(6957):516-521.
- 12 陈雪梅,张学冬.高糖对视网膜色素上皮细胞 TOLL 样受体 2 表达的影响. *第三军医大学学报*, 2012; 34(1):70-73.
- 13 李悦华,哈团柱,陈琪等. MYD88 依赖性核因子-KB 信号途径在心肌肥大发生过程中的调控作用. *中华医学杂志*, 2005; 85(4):267-272.
- 14 Barboza R, Câmara NO, Gomes E, *et al.* Endotoxin exposure during sensitization to *blomia tropicalis* allergens shifts TH2 immunity towards a TH17-mediated airway neutrophilic inflammation: role of TLR4 and TLR2. *PLoS One*, 2013; 8(6): e67115. Print 2013.
- 15 Liu-Bryan R, Scott P, Sydlaske A, *et al.* Innate immunity conferred by Toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation. *Arthritis Rheum*, 2005; 52(9):2936-2946.

(2014-03-27 收稿, 2014-07-21 修回)

编辑 沈进