

悬灸对湿热痹阻型 RA 大鼠 类风湿因子表达影响的研究

马重兵 朱田田 刘安国 赵中亭 严兴科*

(甘肃中医药大学针灸推拿学院,甘肃 兰州 730000)

摘要:目的 观察悬灸对 RA 模型大鼠双侧踝关节温度及类风湿因子(RF)表达的影响。方法 60 只 Wistar 大鼠随机分出空白组(12 只)正常饲养,其余复制湿热痹阻型 RA 大鼠模型,造模成功后随机分为模型组、温和灸组、回旋灸组和雀啄灸组,每组 12 只。模型组不处理,不同悬灸组给予不同悬灸法,治疗前后采用红外热成像仪检测双侧踝关节局部温度,治疗后采用 ELISA 法检测各组大鼠血清中 RF 的表达。结果 与空白组相比,模型组大鼠双侧踝关节局部温度明显升高($P < 0.01$),悬灸治疗后温度明显降低($P < 0.01$);与温和灸组相比,回旋灸组和雀啄灸组大鼠左侧踝关节温度降低($P < 0.01$),右侧踝关节无明显差异($P > 0.05$),回旋灸与雀啄灸组比较无明显差异($P > 0.05$)。与空白组相比,模型组大鼠 RF 表达明显升高($P < 0.01$),悬灸治疗后大鼠 RF 表达明显降低($P < 0.05$),悬灸组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 悬灸法能降低湿热痹阻型 RA 大鼠踝关节区温度,显著改善 RA 大鼠关节局部红肿症状,明显降低血清抗体 RF 表达,有效调整免疫功能紊乱。

关键词:类风湿性关节炎; 湿热痹阻型; 热证可灸; 悬灸; 类风湿因子

DOI 标识:doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2018.11.086

中图分类号:R245.81 文献标识码:A 文章编号:1008-0805(2018)11-2789-03

Study on Rheumatoid Factor of Suspended Moxibustion for Dampness – heat Type RA Model Rats

MA Chong-bing, ZHU Tian-tian, LIU An-guo, ZHAO Zhong-ting, YAN Xing-ke*

(College of Acupuncture and Tuina, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou Gansu, 730000, China)

Abstract: Objective To observe the effect of suspended moxibustion for rheumatoid factor (RF) of dampness – heat type RA model rats. **Methods** Firstly, 60 Wistar rats were randomly divided into control group, normal feeding. Secondly, the replication of dampness – heat type RA model, the rats were randomly divided into model group, mild moxibustion group, circling moxibustion group and bird pecking moxibustion group, 12 rats in each group. The model group without treatment, different moxibustion group was given different suspended moxibustion method. The local temperature of bilateral ankle joints was measured by infrared thermography before and after treatment. RF content in serum of rats in each group was detected by ELISA method after treatment. **Results** compared with the blank group, the local ankle temperature in the model group was significantly increased ($P < 0.01$), the temperature decreased significantly after treatment with suspended moxibustion ($P < 0.01$), compared with mild moxibustion group, the temperature of the left ankle joint decreased in the circling moxibustion group and bird pecking moxibustion group ($P < 0.01$), but there was no significant difference in the right ankle joint ($P > 0.05$), and there was no significant difference between the circling moxibustion group and bird pecking moxibustion group ($P > 0.05$). Compared with the blank group, the content of RF in the model group was significantly increased ($P < 0.01$), which the RF content decreased significantly after treatment with suspended moxibustion ($P < 0.05$), there was no significant difference between the suspended moxibustion groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Suspended moxibustion method can reduce the zone temperature of ankle, so as to improve the RA rat articular swelling symptoms, the serum antibody RF content of dampness – heat type RA model rats, adjusting the disorder of immune function.

Key words: Rheumatoid arthritis; Dampness – heat type RA model; Moxibustion can be used for heat syndrome; Suspended moxibustion; Rheumatoid factor

类风湿性关节炎(Rheumatoid Arthritis, RA)是临床常见的慢

性全身性自身免疫性疾病^[1,2]。RA 在国外发病率约为 1% ~ 2%,个别地区高达 5%;我国 RA 发病率为 0.32% ~ 0.36%^[3],女性多发^[4]。其致残率极高^[5],使患者丧失生产劳动和社会参与能力,给其工作、生活造成极大影响,是世界五大医学难题之一^[6,7]。药物治疗仍是 RA 早期治疗的主要手段,主要包括非甾体抗炎药、糖皮质激素、抗风湿类药物、生物制剂、免疫调节类药物等^[8],均存在服药疗程长、副作用大、价格昂贵等缺点。而中医的灸法治疗 RA 具有安全、简便、经济、毒副作用小、疗效肯定等优点,在临床得到较为广泛的应用^[9]。本研究在项目组前期

收稿日期:2018-03-29; 修订日期:2018-10-16

基金项目:国家自然科学基金地区项目(81560791)

作者简介:马重兵(1989-),男(汉族),甘肃天水人,甘肃中医药大学在读博士研究生,硕士学位,主要从事针灸调节效应的生物学机制研究工作。

* 通讯作者简介:严兴科(1974-),男(汉族),甘肃武威人,甘肃中医药大学针灸推拿学院教授,博士研究生导师,博士学位,主要从事针灸调节效应的生物学机制研究工作。

研究的基础上,从双侧踝关节温度和类风湿因子(RF)表达角度来观察和探讨悬灸干预早期活动性RA的分子免疫机制,为灸法治疗早期RA病变提供充分的实验依据。

1 实验材料与仪器

1.1 实验动物 本实验选择 SPF 级健康成年雌性 Wistar 大鼠 60 只,日龄 56 天,体质量 180~220g,由中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物中心提供,兰州大学检验检疫。实验动物质量合格证编号:62000600000269,许可证号:SCXK(甘)2015-0001。

1.2 实验仪器与设备 红外热成像仪(T425,美国 FLIR 公司);多功能酶标分析仪(AT858,中国上海安泰分析仪器有限公司);高速冷冻离心机(3K15,德国 SIGMA 公司)。

1.3 实验试剂与药品 牛 II 型胶原蛋白(Chondrex 公司,批号 20022);不完全弗氏佐剂(Chondrex 公司,批号 7002);完全弗氏佐剂(Chondrex 公司,批号 7001);Rat RF ELISA KIT(上海酶联生物科技有限公司,批号 m1430137-2)

2 实验方法

2.1 实验分组 本实验采用 SPSS24.0 软件先将 60 只 Wistar 大鼠随机分为空白组 12 只和造模组 48 只。造模组的 48 只大鼠待模型复制成功后再随机分为模型组、温和灸组、回旋灸组和雀啄灸组,每组 12 只。

2.2 复制动物模型 本实验采用“生物因子+风、湿、热环境因素复合造模法”复制“病证结合”的湿热痹阻型 RA 大鼠模型^[10]。具体方法为:在 CIA 诱导的同时,模拟湿热痹阻证的证型特点,每天给予大鼠风、湿、热三种外界人工环境刺激进行“病证结合”模型的建立。

2.3 艾灸治疗

2.3.1 腧穴选择及定位 本实验中腧穴的选取以退热要穴和局部阿是穴为主,包括“曲池”穴、“大椎”穴、局部“阿是穴”。具体的穴位定位参照《实验针灸学》^[11]及《大鼠断层解剖彩色图谱》^[12]相关内容进行,定位方法如下。

“曲池”:桡骨近端的关节外侧前方的凹陷中。

“大椎”:第 7 颈椎与第 1 胸椎间,背部正中。

“阿是穴”:双后肢踝关节局部。

腧穴准确定位后用记号笔标记,并将穴位局部剃毛备皮,暴露 1cm×1cm 大小的区域。

2.3.2 不同悬灸操作方法 将各治疗组模型大鼠先用固定衣固定,暴露施灸部位,然后使用上官氏微烟艾条(Φ=4mm×10cm)进行施灸。将艾条一端点燃,待其充分燃烧后,按照以下操作方法对各治疗组模型大鼠进行干预治疗。

温和灸组:艾条燃烧端距腧穴表面 2cm 进行施灸,并且艾条对准腧穴的位置固定不动,每穴施灸 10min。

回旋灸组:艾条燃烧端距腧穴表面 2cm 进行施灸,并且艾条围绕腧穴做反复旋转移动,频率约为 120 次/min,移动范围直径约 1cm,每穴施灸 10min。

雀啄灸组:艾条燃烧端距腧穴表面一定距离进行施灸。并且艾条对准腧穴做反复上下移动,频率约为 120 次/min,移动范围距离皮肤表面 0.5~2.0cm,每穴施灸 10min。

空白组和模型组以同样的方法和时间进行抓取固定,但不进行悬灸干预治疗。

2.3.3 施灸时间及疗程 每日悬灸干预治疗均在上午 8:00~12:00 进行。各治疗组大鼠的所有腧穴均同时施灸,双侧穴位隔日交替进行。每天治疗 1 次,6d 为一疗程,疗程间休息 1d,共治疗 3 个疗程。

2.4 关节表面红外热谱观察 本实验在治疗前后用红外热成像仪采集大鼠踝关节局部红外热谱,并将所采集的红外热谱采用

FLIR QuickPlot version 1.2.10173.1002 软件分析,整理出各组大鼠双后肢踝关节局部的平均温度。

2.5 ELISA 法检测血清中 RF 表达 各组大鼠分别于悬灸干预治疗结束后,立即抽取动脉血后离心出血清。采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测各组大鼠血清中 RF 表达,参照试剂盒提供步骤操作。

2.6 统计学分析 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,若数据符合正态分布,采用组间 One-way ANOVA(单因素方差)进行分析,方差齐时选用 LSD(最小显著差异法)检验,方差不齐时采用 Dunnett-t(新复极差法)检验;若数据不符合正态分布,则采用 W-H 秩和检验。所有检验水准均以 $P \leq 0.05$ 作为差异具有统计学意义的标准,以上数据采用 SPSS24.0 统计软件进行统计学处理。

3 实验结果

3.1 大鼠踝关节局部红外热谱 如图 1 所示,空白组大鼠双后肢踝关节及足垫部温度分布均匀,未见异常的高低温区;模型组大鼠双后肢踝关节及足垫部出现片状、大小不一的高温区,并向膝关节蔓延,右侧高温区的范围大于左侧;温和灸组大鼠双后肢踝关节及足垫部异常的高温区基本消失,回旋灸组大鼠双后肢踝关节及足垫部异常的高温区面积缩小,以踝关节局部为主;雀啄灸组大鼠双后肢踝关节及足垫部异常的高温区明显缩小。

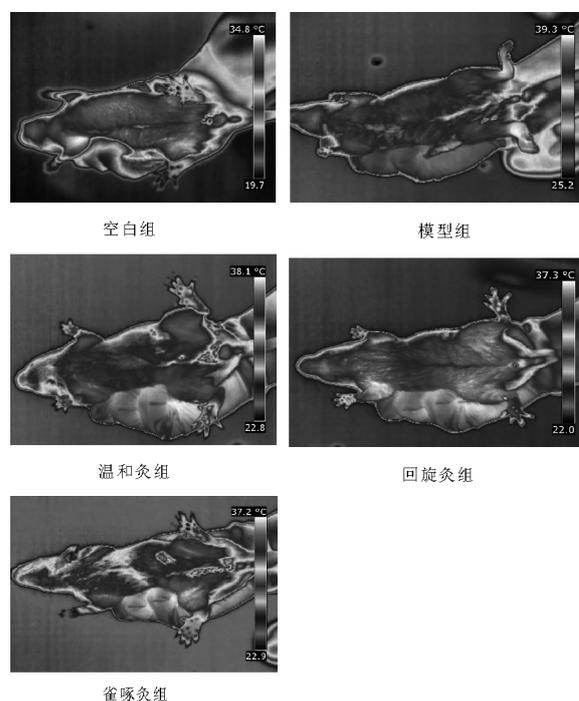
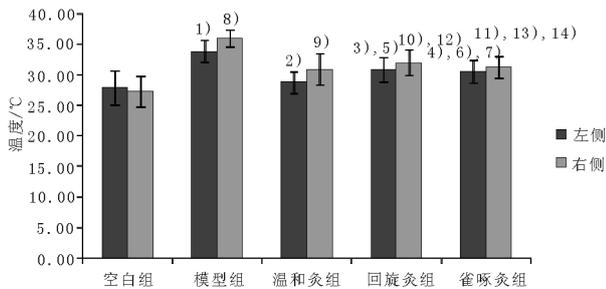


图 1 各组大鼠踝关节局部红外热谱图

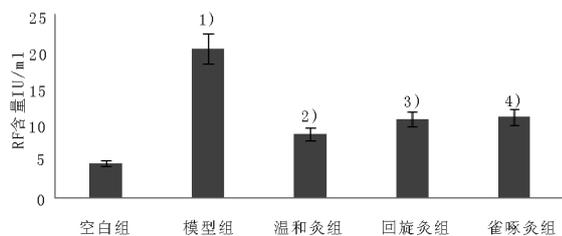
3.2 大鼠踝关节局部温度 如图 2 所示,与空白组相比,模型组大鼠双后肢踝关节局部温度明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。表明模型复制可导致大鼠踝关节出现无菌性炎症和发热症状,造模成功;与模型组相比,悬灸组大鼠的双后肢踝关节局部温度显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$),表明三种悬灸方法均可明显改善踝关节局部无菌性炎症反应,抑制发热症状;与温和灸组相比,回旋灸组和雀啄灸组大鼠左侧踝关节温度降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$);右侧踝关节温度未见明显降低,差异无统计学意义($P > 0.05$);与回旋灸组相比,雀啄灸组大鼠双侧踝关节局部温度未见明显降低,差异无统计学意义($P > 0.05$)。表明回旋灸和雀啄灸对 RA 大鼠双侧踝关节局部温度的影响无差异。



左侧:与空白组相比:¹⁾ $P < 0.01$;与模型组相比:²⁾ $P < 0.01$,
³⁾ $P < 0.01$,⁴⁾ $P < 0.01$;与温和灸组相比:⁵⁾ $P < 0.01$,
⁶⁾ $P < 0.05$ 与回旋灸组相比:⁷⁾ $P > 0.05$ 。右侧:与空白组相比:
⁸⁾ $P < 0.01$;与模型组相比:⁹⁾ $P < 0.01$,¹⁰⁾ $P < 0.01$,
¹¹⁾ $P < 0.01$;与温和灸组相比:¹²⁾ $P > 0.05$,
¹³⁾ $P > 0.05$ 与回旋灸组相比:¹⁴⁾ $P > 0.05$

图2 各组大鼠双侧后肢踝关节局部温度柱状图

3.3 大鼠血清自身抗体 RF 比较 如图3所示,与空白组相比,模型组大鼠血清自身抗体 RF 的表达明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$),表明模型复制可导致大鼠出现免疫功能紊乱,RF 抗体产生;与模型组相比,温和灸组、回旋灸组和雀啄灸组大鼠血清自身抗体 RF 的表达明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$),表明温和灸、回旋灸和雀啄灸均可降低 RF 的表达,纠正免疫紊乱。悬灸组大鼠血清中 RF 的表达未见明显变化,差异无统计学意义($P > 0.05$),表明温和回旋灸、雀啄灸和温和灸对大鼠血清自身抗体 RF 的影响无差异。



与空白组相比:¹⁾ $P < 0.01$;与模型组相比,
²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.05$

图3 各组大鼠 RF 表达

4 讨论

RA 以持续性、进行性和侵蚀性关节滑膜炎为主要病理特征^[2]。RA 起病隐匿,呈进行性加重^[13]。临床研究表明,约 70% 的 RA 患者呈隐匿起病^[14],发病 1 年内即会有轻微的功能丧失,在发病 2 年内即可出现不可逆性关节炎、骨质破坏和关节间隙变窄^[15]。早期诊断 RA,对活动性 RA 早期的干预治疗可使病情得到有效控制,甚至完全缓解,是 RA 治疗获效的关键阶段,对于改善预后、提高 RA 患者的生活质量具有极为重要的临床意义^[7]。红外热像技术已广泛用于各科某些疾病的诊断^[16]。红外热像诊断早期血管病变发挥着重要作用,局部炎症表现为热区明显增多,面积增大,周围无冷热交叉,温度较健侧增高 1~2.5°C^[17]。关节局部温度的变化是判断中医寒痹和热痹的重要指标之一,本研究示,造模后大鼠双踝关节及足垫区出现片状的异常高温区,悬灸治疗后异常高温区明显变小,温度降低,提示模型复制成功,表明悬灸可以有效改善无菌性炎症的发热症状。

RA 是一种自身免疫性疾病,抗原诱导和抗体反应是 RA 发病的中心免疫环节^[18],因此血清特异自身抗体和抗原的大量出

现在 RA 的发生、发展中发挥着重要作用。RF 作为诊断 RA 的重要血清指标具有较高的灵敏度^[19]。本研究示,造模后大鼠 RF 抗体表达明显增高,悬灸治疗后 RF 抗体表达明显降低,表明悬灸可以有效调节大鼠免疫功能紊乱,温和灸、回旋灸及雀啄灸改善程度无差异。

灸法治疗“热证”具有引热外达、活血化痰、清化湿热、益阴扶阳等作用,可达到退热、清热的目的^[20]。现代研究表明灸法干预“热证”主要是通过调控体温调定点、抗感染、调控外周和中枢体液因子代谢以及调节机体的免疫功能来实现的。“热证可灸”符合我国传统医学中的反佐治法。

综上所述,本研究发现不同悬灸法能够降低湿热痹阻型 RA 大鼠踝关节及足垫区温度,减小异常高温区范围,降低血清抗体 RF 表达,从而改善 RA 大鼠关节局部红肿症状,调整免疫功能紊乱,为临床灸法治疗 RA 提供实验依据。

参考文献:

- [1] 葛均波,徐永健.内科学,第8版[M].北京:人民卫生出版社,2013:808.
- [2] 杜欢,许霞.近5年来类风湿关节炎发病机制研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2015,17(10):77.
- [3] 袁立霞,李青原,易国仲,等.当归拈痛汤防治类风湿性关节炎大鼠滑膜病变的蛋白质组学研究[J].中药新药与临床药理,2013,24(6):565.
- [4] 蔡辉.新编风湿病学[M].北京:北京军医出版社,2007:265.
- [5] McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. New Engl J Med, 2011, 365(23):2205.
- [6] 林晓蓉,吴宽裕.类风湿性关节炎的分期辨证施治研究进展[J].陕西中医学院学报,2009,32(6):92.
- [7] 兰由玉,王友强,何成松.五项检测指标在类风湿关节炎早期诊断中的临床价值[J].中国卫生检验杂志,2013,23(9):2130.
- [8] 池里群,周彬,高文远.治疗类风湿性关节炎常用药物的研究进展[J].中国中药杂志,2014,39(15):2851.
- [9] 万欢.中西药物治疗类风湿性关节炎的研究进展[J].实用心脑血管病杂志,2010,18(9):1379.
- [10] Wakamatsu K, Nanki T, Miyasaka N, et al. Effect of a small molecule inhibitor of nuclear factor- κ B nuclear translocation in a murine model of arthritis and cultured human synovial cell[J]. Arthritis Res Ther, 2005, 7(6):1348.
- [11] 李忠仁.实验针灸学[M].北京:中国中医药出版社,2008.
- [12] 李云庆.大鼠断层解剖彩色图谱[M].武汉:华中科技大学出版社,2010.
- [13] 栗战国,张奉春,鲍春德.类风湿性关节炎[M].北京:人民卫生出版社,2009:49.
- [14] 邓志军.早期类风湿性关节炎的调肝扶正治疗[J].按摩与康复医学,2012,3(5):176.
- [15] 李强.影像学方法在早期类风湿和脊柱关节炎诊断与治疗的临床应用观察性研究[D].第四军医大学硕士学位论文,2013.
- [16] 王晓非,张洪峰,蒋莉,等.红外热象技术在早期风湿性疾病诊断中应用探讨[J].中国药物与临床,2003,3(1):60.
- [17] 李惠军,刘兆平,张美娜.红外热成像诊断增生、炎症和癌症的临床价值[J].中国医学影像技术,2001,17(7):681.
- [18] 缪怡,胡朝英,钱柳,等.类风湿性关节炎免疫学研究进展[J].上海交通大学学报,2011,31(7):1035.
- [19] 熊鄯兰,付华珍,熊爱华.血清类风湿因子与抗环瓜氨酸肽抗体诊断类风湿性关节炎的临床应用[J].实验与检验医学,2017,35(1):98.
- [20] 翟春涛,田岳凤.热证可灸的理论基础及作用机制探讨[J].世界中西医结合杂志,2016,11(3):424.