

• 实验研究 •

基于 NALP3 炎性体信号通路观察火针对尿酸钠诱导的 痛风性关节炎大鼠 IL-1 β 表达的影响*

陈楚云, 卢翠娜, 李丽霞 Δ , 黄应杰, 谢丽琴

(广州市中医医院针灸科, 广东 广州 510130)

摘要: **目的** 基于 NALP3 炎性体信号通路观察火针对尿酸钠诱导的痛风性关节炎大鼠 IL-1 β 表达的影响, 探讨火针治疗痛风性关节炎抗炎机制。**方法** 健康 Wistar 大鼠 75 只随机分为 A、B、C、D、E 5 组, 每组 15 只, 除 A 组空白组外分别参照氧嗪酸钾造模法、Coderre 造模法依次制备高尿酸血症、急性痛风性关节炎大鼠模型, 两次造模间隔 2d, B 组为模型组, C、D、E 3 组分别予火针、普通针刺、秋水仙碱干预, 治疗 7d 后处死大鼠, 取右后踝关节行组织形态学检查和 NALP3、IL-1 β 检测。**结果** 与空白组对比, 其它组滑膜组织、血管、胶原组织增生, 炎性细胞浸润, 关节软骨破坏; 火针组、秋水仙碱组与针刺组、模型组对比, 滑膜组织、血管、胶原组织增生较轻, 炎性细胞浸润较少, 关节软骨破坏较轻。高尿酸血症、急性痛风性关节炎造模成功后, 与空白组比较, 其他各组滑膜组织的 NALP3、IL-1 β 水平均明显升高, $P < 0.05$; 治疗后火针组、针刺组、秋水仙碱组滑膜组织的 NALP3、IL-1 β 水平显著低于模型组, $P < 0.05$, 火针组、针刺组、秋水仙碱组 3 组间比较差异无统计学意义, $P > 0.05$ 。**结论** 火针能有效抑制白细胞分裂和募集, 抑制关节滑膜 NALP3 炎性体及 IL-1 β 表达水平, 从而改善病变关节的病理损伤, 迅速止痛消肿。

关键词: NALP 炎性体; IL-1 β ; 痛风性关节炎; 火针

中图分类号: R245.31+6

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2017)02-0001-06

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.02.001

痛风急性期关节红、肿、热、痛属于中医热痹范畴, 认为本病多因“火”“热”等外邪引起, 《素问》云: “火郁发之”, 火针“一为引气之功, 二为发散之功”(《针灸聚英》)切合痛风性关节炎的病机, 通过火热的作用将体内毒邪引出体外, 从而起到止痛消肿的作用。现代研究表明, 火针刺血疗法具有调节体内嘌呤代谢的作用, 刺血量越多, 疗效越好, 同时火针有降低 TNF- α 、IL-1 β 水平, 抑制致炎因子等作用^[1-4]。

痛风性关节炎急性发作时局部温度升高, 使单钠尿酸盐(MSU)的可溶性升高, 从而使 MSU 逐渐被溶解和吸收^[5], MSU 是痛风发作过程的核心^[6], NALP3 炎性体能识别凋亡细胞释放出的 MSU, 激活炎性体信号通路, 释放 IL-1 β , 引发级联反应; 而 IL-1 β 的生成被认为是引起自身炎症反应的关键因素^[7]; MSU

诱导的 NALP3 炎性体信号通路的活化有多种因素的参与, 也受到多种因素的调控^[8-9]。

针对痛风的“火”“热”, 火针作用的机制是什么? 本文基于 NALP3 炎性体信号通路观察火针对尿酸钠诱导的痛风性关节炎大鼠 IL-1 β 表达的影响, 探讨火针治疗痛风性关节炎抗炎机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选用 8 周龄 Wistar SPF 雄性大鼠共 60 只, 体质量(200 $\pm$ 20)g, 由广州中医药大学动物实验中心提供(合格证号: NO.44005800002975), 适应性喂养 1 周。

1.2 材料、试剂

尿酸钠(美国 Sigma 公司, 批号 201502), 取 500mg 微晶尿酸钠, 加入至 4.5mL 的生理盐水中, 再加

* 基金项目: 广东省中医药管理局科研项目(20161201)

收稿日期: 2017-02-21

作者简介: 陈楚云(1977-), 女, 广东汕头人, 医学硕士, 副主任中医师, 研究方向: 针灸特色疗法的临床应用、针灸古籍的开发应用。

Δ 通信作者: 李丽霞, E-mail: llxia701@126.com

0.5mL 吐温 80, 加热搅拌, 配成 5mL 尿酸钠溶液。5g 的羧甲基纤维素钠 (广州晶欣科技有限公司, 批号 201511) 加入 1 000mL 的热水中, 不断搅拌至完全溶解, 冷却沉淀, 取上清液。将氧嗪酸钾 (上海 TCI 科技有限公司, 批号 YQ34L-TN), 研钵研磨成细粉, 溶于 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液中, 搅拌摇匀, 分别配成 0.3g/kg、1g/kg 和 1.5g/kg 的混悬液。秋水仙碱 (云南植物药业有限公司生产, 批号国药准字 H53020166) 计算每只大鼠剂量, 以 0.48g/kg 溶解于 2mL 蒸馏水中, 摇匀, 制成混悬液。将 5g 水合氯醛 (国药集团化学试剂有限公司, 批号 20150812) 晶体加入 50mL 生理盐水中, 搅拌溶解, 配成 10% 水合氯醛溶液。4% 多聚甲醛溶液 (广州晶欣生物科技有限公司, 批号 201601)。IL-1 β 一抗, 兔抗鼠 IL-1 β (博士德生物技术有限公司, 批号 BA2782), IL-1 β ELISA 试剂盒 (武汉华美有限公司, 货号 (Catalog Number) CSB-E08055r); NALP3 一抗, 兔抗鼠 NLRP3 (美国 Affinity 抗体公司, 批号 DF7438), NALP3 ELISA 试剂盒 (武汉优尔生科技股份有限公司, 货号 SEK115Ra); SABC, 兔 IgG 免疫组化试剂盒 (博士德生物技术有限公司, 批号 SA1022); DAB (博士德生物技术有限公司, 批号 AR1022); 尿酸检测试剂盒 (美国博世生物有限公司, 货号 DIUA-48)

1.3 主要仪器

LEICA RM2015 型切片机 (德国 Leica 公司, RM2015), YX400AI 高压蒸汽消毒器, 低温高速离心机, 电子天平, -20℃ 冰箱, 电热恒温干燥箱, Multi-skan Mk3 型酶标仪 (赛默飞世尔 (上海) 仪器有限公司, Mk3 型), Unique 系列超纯水机, BK-DM500 型数码生物显微镜 (重庆奥特, BK-DM500 型), 计算机图像处理分析系统 (IPP6.0 病理图象分析软件)。

1.4 实验方法

1.4.1 动物分组

健康 Wistar 大鼠 75 只随机分为 A、B、C、D、E 5 组, 每组 15 只, A 组空白组, B 组模型组, C 组火针组, D 组普通针刺组, E 组秋水仙碱组。自由摄食, 自然光照, 并定时清洁、消毒。

1.4.2 制作模型

(1) 高尿酸血症模型: 参照氧嗪酸钾造模方法^[10-11], B-E 组采用氧嗪酸钾灌胃联合腹腔注射的方法, 第 1~10 天用 1.0g/kg 氧嗪酸钾溶液灌胃, 每日 1 次; 第

11~20 天改良造模方法, 用 1.5g/kg 氧嗪酸钾溶液灌胃并 0.3g/kg 氧嗪酸钾溶液腹腔注射, 每日 1 次; 空白组予 5% 的羧甲基纤维素钠溶液灌胃至第 20 天, 第 11~20 天加用 1mL/g 生理盐水腹腔注射, 每日 1 次。造模完成后, 检测每只大鼠血清尿酸水平, B-E 组血清尿酸升高与空白组比较具有统计学意义, 说明高尿酸血症模型造模成功。

(2) 急性痛风性关节炎模型 (AGA): 参照 Coderre 造模方法^[12-13], B-E 组于第 23 天予腹腔注射 10% 水合氯醛溶液 0.35mL/100g 麻醉后, 用 6 号注射针在大鼠右侧后肢踝关节后侧插入, 针口斜面朝前上方与胫骨成 45° 夹角穿入至跟腱内侧, 注射 0.2mL 尿酸钠溶液, 以制备急性痛风性关节炎模型, 空白组在大鼠右侧后肢踝关节后注入等量的生理盐水。以大鼠步态评分、炎症指数及踝关节肿胀度评价急性痛风性关节炎模型是否造模成功^[14-15]。

1.4.3 干预措施

(1) 空白组: 于第 20 天开始予 2mL 的生理盐水灌胃。

(2) 模型组: 高尿酸血症模型造模成功后, 开始予 2mL 生理盐水灌胃。

(3) 火针组: ①取穴: 于第 20 天高尿酸血症模型造模成功后, 开始火针治疗, 以双侧行间、太冲、内庭、陷谷、曲池、合谷、阳陵泉、阴陵泉为配穴, 每次选取 2 个穴位; 以大鼠右侧后肢踝关节局部为主穴 (主穴于急性痛风性关节炎造模后开始治疗)。②定位^[16]: 太冲: 后肢第 1、第 2 跖骨间凹陷处; 内庭: 后肢第 2、第 3 跖趾关节后缘; 曲池: 桡骨近端的关节外侧前方凹陷中; 合谷: 前肢第 1、第 2 掌骨之间; 阴陵泉: 在小腿胫骨内侧髁后方的凹陷处; 阳陵泉: 距后三里上外侧 5mm。体位: 大鼠取仰卧位, 助手固定大鼠, 暴露针刺部位。④方法: 以上穴位安尔碘消毒后, 左手持点燃的酒精灯, 右手用持笔式的手势拿着细火针 (规格 0.4mm×35mm, 北京科苑达医疗器械有限公司), 在酒精灯的外焰加热针体, 烧红针尖, 迅速准确地刺入 0.1~0.2cm, 针刺完毕后用跌打万花油 (广州白云山敬修堂敬业股份有限公司, 批号 F09034) 外敷针孔促使火针口愈合; 每个配穴点刺 1 针, 主穴围着大鼠右侧后肢踝关节前后、左右各点刺 1 针。

(4) 普通针刺组: ①取穴与定位同火针组。②方法: 穴位安尔碘消毒后, 用 0.3mm×25mm 针灸针 (佳

健医疗,无锡佳健医疗器械股份有限公司,批号391626)针刺穴位,行捻转泻法后出针;病灶处以快速点刺,刺入约0.1~0.2cm,主穴围着大鼠右侧后肢踝关节前后、左右各点刺1针。

(5)秋水仙碱组:于第20天高尿酸血症造模型成功后开始予秋水仙碱溶液灌胃,用量0.48g/kg。

疗程:以上各组均1次/d,共7d。

1.4.4 标本采集

治疗结束后,腹腔麻醉,剔除右后肢局部毛发,将大鼠仰位固定,酒精消毒,持3号手术刀纵行切开右后踝关节正中皮肤,剥开皮肤,暴露关节,于关节上下各1.0cm处的区域,剪下踝关节,去除部分大块肌肉,保存于4%多聚甲醛溶液中。行关节滑膜组织形态学检查和免疫组化检测。

1.4.5 检测方法

(1)关节滑膜组织形态学检查

评分标准根据文献改良,操作步骤如下:标本在4%多聚甲醛溶液固定1周后,经脱水、石蜡包埋,制备3 μ m切片,行苏木素-伊红染色。HE染色具体操作步骤:二甲苯I 10min,100%乙醇5min,80%乙醇5min,70%乙醇5min,蒸馏水浸泡5min,蒸馏水洗,苏木精染色1min,自来水冲洗1min,1%盐酸酒精分化30s,流水冲洗5min,伊红染色3min,自来水洗30s,95%乙醇I 5min,95%乙醇II 5min,100%乙醇I 5min,100%乙醇II 5min,二甲苯I 5min,二甲苯II 5min,中性树脂封片,观察组织病理变化。观察各组大鼠踝关节滑膜组织血管充血、炎性细胞浸润、滑膜增生及组织坏死情况。

(2)关节滑膜NALP3、IL-1 β 检测

标本制备,石蜡切片用二甲苯常规脱蜡、水化。抗原修复和染色:1)石蜡切片放入3% H₂O₂浸泡,室温封闭10min,以消除内源性过氧化氢酶的作用;2)用蒸馏水洗5min/次 $\times$ 3次;3)抗原微波热修复:将组织切片放入0.01M枸橼酸钠缓冲溶液(pH6.0),在微波炉里加热5min至沸腾后,断电,冷却到室温,反复2次。PBS洗2次,每次5min;4)滴加5%BSA封闭液,室温30min,甩去多余液体;5)每张切片滴加适量一抗(需完全覆盖待检组织),4℃过夜;6)用PBS洗5min/次 $\times$ 3次;7)每张切片滴加生物素化二抗,37℃孵育30min;8)用PBS洗5min/次 $\times$ 3次;9)每张切片加一滴试剂SABC(需完全覆盖待检组织),37℃孵育

30min;10)用PBS洗5min/次 $\times$ 4次;11)DAB显色液:DAB显色试剂盒(AR1022),取1mL蒸馏水,加试剂盒中A,B,C试剂各1滴,混匀;12)每张切片加一滴上述DAB显色液,室温显色5~30min(可在镜下掌握显色程度);13)蒸馏水复洗;14)苏木素复染1min、饱和磷酸氢二钠分化;15)脱水、透明、封片、镜检。阴性对照用PBS代替一抗孵育,其余步骤、条件均同前。显色结果采用免疫组化化学半定量测定,光镜下胞质及薄膜呈棕黄或棕褐色为阳性细胞,同等光强度 $\times$ 400倍光镜下采图,每张切片随机选取5个视野,应用IPP6.0病理图象分析软件测定各组免疫阳性产物的光密度值(OD值),然后作为该样本的OD值。

1.5 统计学方法

计量资料采用均数+标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用SPSS22.0统计软件进行分析,计量资料方差分析。 $P < 0.05$ 时,差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠关节病理情况

空白组关节表面光滑,可见透明软骨,软骨上覆有薄层滑膜细胞,滑膜组织未见增生及炎性细胞浸润;模型组滑膜组织增生,呈绒毛状或指状伸入关节腔中,AGA造模前可见少量炎性细胞浸润,AGA造模后炎性细胞增多,大量浸润,血管增生,关节软骨破坏,胶原组织增生明显;火针组治疗后,滑膜组织轻度增生,少量炎性细胞浸润,病理改变不明显;针刺组治疗后,滑膜组织稍增生,炎性细胞浸润较多;秋水仙碱组治疗后,关节表明光滑,滑膜细胞轻度增生,少量炎性细胞浸润,病理改变不明显。见图1、图2。

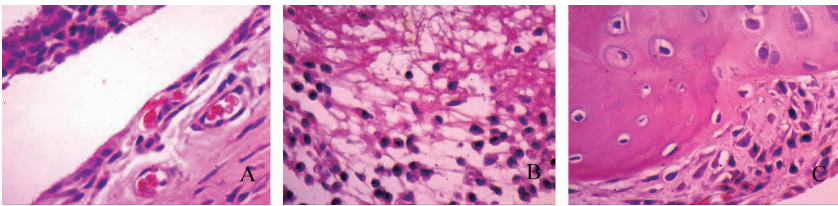
2.2 关节滑膜NALP3平均光密度水平

从表1可见,高尿酸血症造模成功后第1天,模型各组NALP3水平均明显升高,与空白组比较具有统计学意义($P < 0.05$),反映血中高尿酸水平于关节滑膜沉积;AGA造模成功后,造模各组NALP3处于较高水平,与空白组比较具有统计差异($P < 0.05$);治疗第7天,火针组、针刺组、秋水仙碱组与模型组比较,NALP3水平显著低于模型组,具有统计学意义($P < 0.05$),与空白组比较无统计学意义($P > 0.05$),火针组、针刺组、秋水仙碱组3组间比较无统计学意义($P > 0.05$),说明3种干预手段对关节局部炎症均有治疗作用,并且疗效相当。见图3。

表 1 大鼠关节滑膜 NALP3 平均光密度($\bar{x} \pm s$)

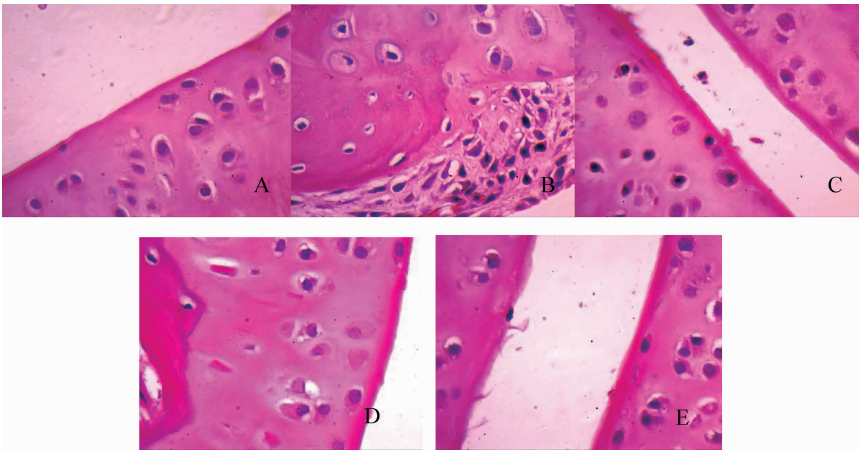
组别/时间	<i>n</i>	治疗第 1 天 (高尿酸血症造模后)	治疗第 4 天 (AGA 造模后)	治疗第 7 天
空白组	5	0.150±0.010	0.167±0.006	0.197±0.006
模型组	5	0.398±0.012*	0.410±0.000*	0.417±0.006*
火针组	5	0.406±0.015*	0.300±0.000 [#]	0.260±0.000 ^{#△}
针刺组	5	0.387±0.036*	0.337±0.023 [#]	0.327±0.006 ^{#△}
秋水仙碱组	5	0.392±0.000*	0.305±0.006 [#]	0.257±0.029 ^{#△}

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与空白组比较,[△] $P>0.05$



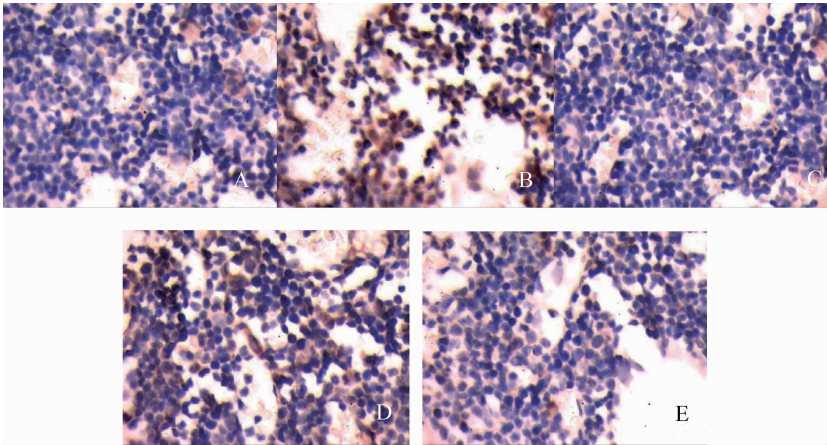
A: AGA 造模前;B: AGA 造模后;C:生理盐水干预后

图 1 模型组大鼠关节病理组织学观察结果($\times 400$)



A: 空白组;B: 模型组;C: 火针组;D: 针刺组;E: 秋水仙碱组

图 2 治疗后各组大鼠关节病理组织学观察结果($\times 400$)



A: 空白组;B: 模型组;C: 火针组;D: 针刺组;E: 秋水仙碱组

图 3 治疗后各组大鼠关节滑膜 NALP3 平均光密度水平

2.3 关节滑膜 IL-1 β 检测结果

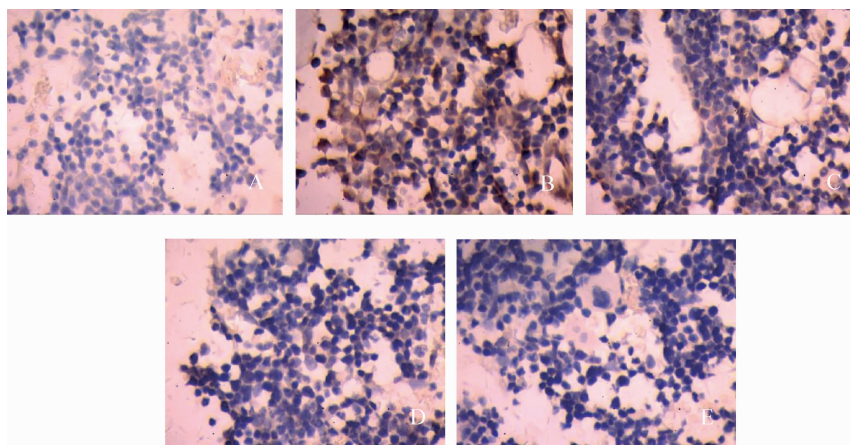
从表 2 可见,高尿酸血症造模成功后第 1 天,模型各组 IL-1 β 水平均明显升高,与空白组比较具有统计学意义($P<0.05$),反映血中高尿酸水平于关节滑膜沉积;AGA 造模成功后,造模各组 IL-1 β 处于较高水平,与空白组比较具有统计差异($P<0.05$);治疗

第 7 天,火针组、针刺组、秋水仙碱组与模型组比较,IL-1 β 水平显著低于模型组,具有统计学意义($P<0.05$),与空白组比较无统计学意义($P>0.05$),火针组、针刺组、秋水仙碱组 3 组间比较无统计学意义($P>0.05$),说明 3 种干预手段对关节局部炎症均有治疗作用,并且疗效相当。见图 4。

表 2 大鼠关节滑膜 IL-1 β 平均光密度($\bar{x}\pm s$)

组别/时间	<i>n</i>	治疗干预第 1 天	治疗干预第 4 天 (复制 AGA 模型)	治疗干预第 7 天
空白组	5	0.193 $\pm$ 0.012	0.207 $\pm$ 0.012	0.247 $\pm$ 0.015
模型组	5	0.410 $\pm$ 0.010*	0.393 $\pm$ 0.029*	0.413 $\pm$ 0.006*
火针组	5	0.415 $\pm$ 0.026*	0.368 $\pm$ 0.021* [#]	0.260 $\pm$ 0.010* [#] Δ
针刺组	5	0.397 $\pm$ 0.015*	0.374 $\pm$ 0.029* [#]	0.310 $\pm$ 0.020* [#] Δ
秋水仙碱组	5	0.403 $\pm$ 0.010*	0.366 $\pm$ 0.006* [#]	0.263 $\pm$ 0.015* [#] Δ

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,* $P<0.05$;与空白组比较, Δ $P>0.05$



A: 空白组; B: 模型组; C: 火针组; D: 针刺组; E: 秋水仙碱组

图 4 治疗后各组大鼠关节滑膜 NALP3 平均光密度水平

3 讨论

急性痛风性关节炎是尿酸盐结晶在关节沉淀引起的反复发作性关节炎症。痛风大鼠的组织病理学与人类痛风相似,所以常用痛风大鼠作为研究痛风治疗的模型^[17]。本研究造模分两步进行,先以氧嗪酸钾造高尿酸血症模型,高尿酸血症模型成功后开始治疗,治疗 3d 后开始以尿酸钠制作急性痛风性关节炎模型。不同品种大鼠,对造模剂的敏感性不同,本实验选用 Wistar 雄性大鼠,在高尿酸血症模型造模结束,各组血清尿酸水平均见升高,说明造模成功,但维持时间短,体内尿酸代谢迅速。直接向大鼠右后关节腔内注射尿酸钠后,可见注射侧关节弯曲、肿胀明显,不敢着力,甚至三足着地,局部红斑,骨性标志消

失。

目前痛风性关节炎急性发作仍以秋水仙碱为首选药物,故以秋水仙碱为对照药物^[18]。造模各组在 HUA 造模后,尿酸升高,大鼠关节出现滑膜组织增生,少量炎性细胞浸润,滑膜组织的 NALP3 炎性体和 IL-1 β 的表达增多,考虑为尿酸盐结晶激活 NLRP3 炎性体促进 IL-1 β 的成熟和分泌所致。急性痛风性关节炎造模后,造模各组关节滑膜组织增生严重,大量炎性细胞浸润,局部软骨细胞破坏,关节腔大量渗出,滑膜组织的 NALP3 炎性体及 IL-1 β 维持在较高水平。由此可知,NLRP3 炎性体和 IL-1 β 参与介导 MSU 诱导痛风性关节炎的发生发展。虽治疗后针刺组、火针组、秋水仙碱组大鼠滑膜组织的 NALP3 炎性

体和 IL-1 β 的表达水平差异无统计学意义,但火针组、仙水仙碱组两组大鼠关节病理损害的程度大致相同均较普通针刺组轻,说明火针在改善大鼠关节病理损害方面疗效相当于秋水仙碱且优于普通针刺组。

本病属于祖国医学之“痹证”范畴,急性期主要表现为湿热蕴结证,行间、内庭分别为肝经、胃经的荥穴,太冲、陷谷分别为肝经和胃经的俞穴,荥主身热,俞主体重节痛,四穴共奏清热消肿,活血止痛之功效;曲池、合谷清泻阳明经热,阳陵泉为足少阳之合穴和下合穴,有清热通利胆腑之功效;阴陵泉为脾经之合穴,具有健脾利湿的作用,阴、阳陵泉两穴合用,具有和胃清热利湿,理气止痛之功效;曲池、合谷清泻阳明之热。火针是特色针法之一,《医宗金鉴》云:“火针轻者使毒气随火而散,重者拔引毒,通内外。”提出火针以热引热,驱邪外出的作用,现代临床研究提出^[19-20],火针具有“火郁发之”的作用,火针可借助灯上烧红的火力,驱除火热毒邪以外泄,使机体气血运行通畅。痛风性关节炎急性发作时所表现的红肿热痛的症状,为痰热湿浊郁阻于体内化热所致,适用于火针以热引热的治疗。

火针“火郁发之”治疗急性痛风性关节炎的分子机制可能为火针能有效抑制白细胞分裂和募集,抑制关节滑膜 NALP3 炎性体及 IL-1 β 表达水平,从而改善病变关节的病理损伤,迅速止痛消肿。

参考文献:

- [1] 考希良. 从毒邪角度探讨痛风性关节炎中医病因病机[J]. 环球中医药, 2011, 4(6): 460-461.
- [2] 黄海胜,康健,黄锦才. 火针不同刺血量治疗足部急性痛风性关节炎观察[J]. 中外医学研究, 2014, 12(33): 131-132.
- [3] 文绍敦. 火针不同刺血量治疗足部急性痛风性关节炎观察[J]. 中国针灸, 2005, 25(11): 779-780.
- [4] 韩润霞,杨晶,张天生. 火针对类风湿性关节炎大鼠血清白介素-1 和肿瘤坏死因子- α 的影响[J]. 针刺研究, 2012, 37(2): 114-118.
- [5] 吴中朝,王彤. 火针疗法完全图解[M]. 北京:人民军医出版社, 2013: 8-11.
- [6] Kingsbury SR, Conaghan PG, McDermott MF. The role of the NLRP3 inflammasome in gout[J]. J Inflamm Res, 2011, 4(1): 39-49.
- [7] Martinon F, Petrilli V, Mayor A, et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome[J]. Nature, 2006, 440(7081): 237-241.
- [8] Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, et al. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases[J]. Rheumatology, 2010, 49(9): 1618-1631.
- [9] 王缘,白雪,王艳秋,等. NALP3 在痛风炎症反应中的作用[J]. 黑龙江医药科学, 2015, 38(3): 17-18.
- [10] 杨桂梅,黄胜华,连希艳,等. 大鼠高尿酸血症模型的建立[J]. 实验动物科学, 2011, 28(3): 25-28.
- [11] 钱伯初,史红,郑晓亮. 尿酸钠结晶诱导痛风性关节炎动物模型研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(6): 65-69.
- [12] Coderre TJ, Wall PD. Ankle joint urate arthritis (AJUA) in rats: an alternative animal model of arthritis to that produced by Freund's adjuvant[J]. Pain, 1987, 28(3): 379-393.
- [13] Coderre TJ, Wall PD. Ankle joint urate arthritis in rats provides a useful tool for the evaluation of analgesic and anti-arthritic agents[J]. Pharmacol Biochem Behav, 1988, 29(3): 461-466.
- [14] 贺石林,李元建. 医学科研方法学[M]. 北京:人民军医出版社, 2004: 226-228.
- [15] Chen SY, Chen CL, Shen ML, et al. Clinical features of familial gout and effects of probable genetic association between gout and its related disorders[J]. Metabolism, 2001, 50(10): 1203-1207.
- [16] 余曙光,徐斌. 实验针灸学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2012: 270-271.
- [17] 党荣敏,刘元忠,谢洪书,等. 黑骨藤抗急性痛风性关节炎的实验研究[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(9): 1295-1298.
- [18] 曾学军. 《2010 年中国痛风临床诊治指南》解读[J]. 中国实用内科杂志, 2012, 32(6): 438-441.
- [19] 张英,梁作辉,刘秀红,等. 火针燮刺法治疗急性期带状疱疹 30 例疗效观察[J]. 云南中医中药杂志, 2016, 37(1): 50-52.
- [20] 林国华,李丽霞,陈楚云,等. 火针对急性期带状疱疹皮损的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2011, 28(2): 136-139.

(编辑:徐建平)