

温针灸对类风湿性关节炎大鼠血清免疫球蛋白、 IL-1、TNF- α 的影响*

田时志, 吴 瑕, 周晓奇, 董 剑[△]

(重庆市大足区人民医院检验科, 重庆 402360)

摘要: **目的** 探讨分析温针灸对类风湿性关节炎大鼠疾病治疗机制。**方法** 将 40 只雄性 Wistar 大鼠随机分为对照组、模型组、甲氨蝶呤组以及温针灸组。大鼠右后足跖底部皮内注射弗氏完全佐剂建立类风湿性关节炎动物模型, 对照组使用生理盐水代替弗氏完全佐剂。甲氨蝶呤组大鼠每周 2.0mg/kg 甲氨蝶呤灌胃, 治疗 4 次; 温针灸组大鼠取足三里、悬钟、肾俞穴温针灸治疗, 3d 治疗 1 次, 治疗 28d。比较各组大鼠右后足肿胀度, 血清 IgG、IgA、IgM 水平以及 IL-1、TNF- α 水平。**结果** 比较大鼠足肿胀度, 造模 3 周、造模 5 周, 甲氨蝶呤组以及温针灸组大鼠足肿胀度较模型组明显改善 ($P < 0.05$), 且两组大鼠比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。比较各组大鼠血清 IgG、IgA 以及 IgM 水平, 与对照组比较, 其余各组模型大鼠均显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 甲氨蝶呤组与温针灸组大鼠有所降低 ($P < 0.05$); 甲氨蝶呤组与温针灸组大鼠无显著差异 ($P > 0.05$)。比较各组大鼠血清 IL-1、TNF- α 水平, 与对照组比较, 其余各组模型大鼠均显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 甲氨蝶呤组与温针灸组大鼠有所降低 ($P < 0.05$); 甲氨蝶呤组与温针灸组大鼠无显著差异 ($P > 0.05$)。**结论** 温针灸可缓解类风湿性关节炎大鼠后肢肿胀, 有效控制病情进展, 其作用可能与降低血清免疫球蛋白、IL-1、TNF- α 水平, 减轻大鼠炎症反应有关。

关键词: 温针灸; 类风湿性关节炎; 免疫球蛋白; 白细胞介素-1; 肿瘤坏死因子- α ; 大鼠

中图分类号: R245

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2017)06-0018-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.06.005

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以侵蚀性、对称性多关节炎为主要临床特征的慢性自身免疫性疾病, 主要病理变化为慢性滑膜炎, 并逐渐表现为软骨以及骨破坏, 最终可能导致患者发生关节畸形甚至关节功能散失^[1-2]。类风湿性关节炎呈全球性分布趋势, 具有着较高的发病率, 是致残以及劳动能力丧失的一个重要原因^[3]。大量临床研究显示, 多种针灸方法, 如针刺、温针灸、电针、激光针灸、穴位敷贴等均能够有效改善关节疼痛和晨僵, 针灸疗法副作用小且临床疗效较高而被广泛运用^[4]。研究显示^[5], 针灸治疗能够促进骨关节软骨炎性物质的吸收, 从而抑制关节液中过度生产白介素类细胞因子, 减轻关节软骨的病变进程, 但是其具体作用机制目前尚未阐明。本研究通过温针灸对类风湿性关节炎

大鼠血清免疫球蛋白、白介素-1 (IL-1) 以及肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平的影响, 分析温针灸对类风湿性关节炎大鼠免疫功能及机体炎症反应的影响机制, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

使用 6~8 周龄 SPF 级 Wistar 大鼠 40 只, 雄性, 体质量 (200 \pm 20)g, 购于重庆医科大学实验动物中心。饲养环境温度 25 $^{\circ}$ C、湿度 70%, 将实验动物随机分为对照组、模型组、甲氨蝶呤组以及温针灸组, 每组 10 只。

1.2 主要试剂与仪器

弗氏完全佐剂 (美国 sigma 公司); 甲氨蝶呤注射液 (澳大利亚 Pfizer (Perth) Pty Limited, H20090207, 规格: 500mg/20mL); 华佗牌毫针 (苏州医疗用品厂);

* 基金项目: 四川省卫生厅科研课题 (110010)

收稿日期: 2017-12-06

作者简介: 田时志 (1963-), 男, 重庆铜梁人, 副主任检验技师, 从事临床检验工作。

[△]通信作者: 董剑, E-mail: 591377076@qq.com

IL-1 试剂盒(上海森雄公司,生产批号:20160319); TNF- α 试剂盒(上海森雄公司:生产批号:11020131); 酶联免疫检测仪(iMARK, BIO-RAD)。

1.3 动物模型

造模前先适应性饲养动物1周,模型组、甲氨蝶呤组以及温针灸组大鼠使用5%水合氯醛腹腔麻醉,常规消毒大鼠右后足跖部皮肤,分3点皮下注射0.1mL 弗氏完全佐剂造模,观察3d,造模成功:大鼠24h内足部出现急性炎性反应肿胀,48h内继发全身多发性关节炎,表现出大鼠前肢或侧肢出现明显肿胀,且耳部、尾部或出现炎性结节。对照组大鼠使用生理盐水替代弗氏完全佐剂,其他操作相同。

1.4 实验方法

造模成功1周后,将温针灸组大鼠使用自制鼠衣固定,参照中国针灸学会实验针灸研究会制定的“实验动物针灸穴位图谱”取大鼠足三里、悬钟、肾俞穴。针刺双侧穴位,针刺深度为5mm,针刺强度以大鼠的耐受度为准(适当改变针刺深度,观察大鼠反应,以大鼠无疼痛反应为准),将艾绒搓团捻裹于针柄之上,距离穴位2cm,3日1次,15min/次,共针刺治疗28d。甲氨蝶呤组大鼠使用2.0mg/kg 甲氨蝶呤灌胃治疗,每7d进行1次灌胃,共治疗4周。

1.5 观察指标

分别于造模前、造模1周、造模3周、造模5周检测各组大鼠右后足足跖部肿胀度,使用带刻度10mL 试管装适量水,固定大鼠,将大鼠后肢,包括足掌深入液面下,以胫骨下段内踝处作为解剖标志点,记录各组大鼠水面上升的数值,将其作为大鼠足肿胀度。

造模5周治疗结束后,使用5%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,取各组大鼠2mL 腹主动脉血,分离血清,采用全自动生化分析仪检测各组大鼠血清免疫球蛋白水平,包括IgG、IgA 以及 IgM;采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法检测各组大鼠血清 IL-1 以及 TNF- α 水平。

1.6 统计学分析

采用统计学软件 SPSS 22.0 进行数据处理分析,2 组计量资料比较采用 *t* 检验,3 组及以上计量资料比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠足部肿胀度比较

造模前各组大鼠足部肿胀度无明显差异 ($P >$

0.05);造模1周,模型组、甲氨蝶呤组以及温针灸组大鼠足肿胀度明显高于对照组 ($P < 0.05$);造模3周、造模5周,甲氨蝶呤组以及温针灸组大鼠足肿胀度较模型组明显改善 ($P < 0.05$),而甲氨蝶呤组与温针灸组大鼠比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表1。

表1 不同时间各组大鼠足部肿胀度比较($\bar{x} \pm s, n=10, \text{mL}$)

组别	造模前	造模1周	造模3周	造模5周
对照组	1.21 \pm 0.41	1.31 \pm 0.50	1.24 \pm 0.42	1.28 \pm 0.49
模型组	1.30 \pm 0.48	2.48 \pm 0.74*	2.73 \pm 0.81*	2.36 \pm 0.76*
甲氨蝶呤组	1.25 \pm 0.36	2.37 \pm 0.83*	2.15 \pm 0.59**	1.73 \pm 0.70**
温针灸组	1.29 \pm 0.44	2.56 \pm 0.93*	2.07 \pm 0.47**	1.68 \pm 0.65**
F 值	0.938	2.341	3.418	
P 值	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,** $P < 0.05$;与甲氨蝶呤组比较,[^] $P < 0.05$

2.2 各组大鼠血清免疫球蛋白水平比较

与对照组比较,其余各组模型大鼠血清 IgG、IgA 以及 IgM 水平均显著升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,甲氨蝶呤组与温针灸组大鼠血清 IgG、IgA 以及 IgM 水平有所降低 ($P < 0.05$);甲氨蝶呤组与温针灸组大鼠血清 IgG、IgA 以及 IgM 水平无显著差异 ($P > 0.05$),见表2。

表2 各组大鼠血清免疫球蛋白水平比较($\bar{x} \pm s, n=10, \text{mg/mL}$)

组别	IgG	IgA	IgM
对照组	1.36 \pm 0.452	0.27 \pm 0.18	0.17 \pm 0.09
模型组	5.98 \pm 0.77*	0.68 \pm 0.21*	1.26 \pm 0.48*
甲氨蝶呤组	3.95 \pm 0.68**	0.45 \pm 0.17**	0.76 \pm 0.21#
温针灸组	3.86 \pm 0.82**	0.41 \pm 0.18**	0.70 \pm 0.24#
F 值	3.958	2.796	4.561
P 值	<0.05	<0.05	<0.05

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,** $P < 0.05$;与甲氨蝶呤组比较,[^] $P < 0.05$

2.3 各组大鼠血清 IL-1、TNF- α 水平比较

与对照组比较,其余各组模型大鼠血清 IL-1、TNF- α 水平均显著升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,甲氨蝶呤组与温针灸组大鼠血清 IL-1、TNF- α 水平有所降低 ($P < 0.05$);甲氨蝶呤组与温针灸组大鼠血清 IL-1、TNF- α 水平无显著差异 ($P > 0.05$),见表3。

表3 各组大鼠血清IL-1、TNF- α 水平比较
($\bar{x} \pm s, n=10, \text{pg/mL}$)

组别	IL-1	TNF- α
对照组	25.74 \pm 9.38	26.93 \pm 7.37
模型组	158.49 \pm 41.27*	139.66 \pm 38.75*
甲氨蝶呤组	98.57 \pm 21.31*#	73.17 \pm 25.62*#
温针灸组	90.55 \pm 25.63*#	68.75 \pm 28.56*#
F值	12.482	10.958
P值	<0.05	<0.05

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与甲氨蝶呤组比较, $\Delta P<0.05$

3 讨论

类风湿性关节炎活动期可出现关节红肿热痛、活动受限、僵硬等临床症状,随着疾病进展,晚期可引发关节畸形以及关节功能障碍^[6]。治疗类风湿性关节炎目的在于缓解患者疼痛、延缓病情进展,从而有效保护患者关节功能。目前治疗类风湿性关节炎,甲氨蝶呤是公认的首选药物,可通过细胞周期阻滞作用而抑制RA滑膜细胞的增殖,从而防止滑膜组织对周围组织的侵蚀而发挥治疗作用^[7]。本研究以甲氨蝶呤作为阳性药物,分析温针灸对类风湿性关节炎大鼠血清球蛋白、IL-1以及TNF- α 水平的影响,研究显示^[8],甲氨蝶呤可有效改善类风湿性关节炎大鼠机体免疫及炎症反应。类风湿性关节炎在中医学属痹证范畴,涉及肝、脾、肾三脏,病因以风、寒、湿、热为主^[9]。病机主要为机体正气亏虚,外感受风、寒、湿邪,导致经脉壅塞,深入筋骨而引发本病,治疗以扶助正气、温经通络、祛风除湿为主^[10]。本研究选取足三里、悬钟以及肾俞穴作为治疗穴位,足三里为足阳明胃经合穴,研究显示,针刺RA大鼠足三里穴能够有效提高大鼠胸腺糖皮质激素水平,有效降低相关炎症因子表达,诱导T淋巴细胞凋亡,促进RA大鼠免疫功能的恢复^[11]。悬钟属足少阳胆经,八会穴之髓会,具有祛风除湿、强壮筋骨的作用,有助于促进类风湿性关节炎机体免疫功能的恢复;肾俞属足太阳膀胱经,为肾气输注于背腰部的腧穴点,由于肾藏精,精化气,且肾在体合骨,针刺肾俞穴可激发机体正气的同时,又可改善骨关节疼痛、肿胀、变形等症状,起到标本同治的效应^[12]。

本研究结果显示,在弗氏完全佐剂刺激作用下,大鼠足部肿胀,血清IL-1、TNF- α 水平升高,发生炎

性细胞浸润。甲氨蝶呤组大鼠以及温针灸组大鼠足肿胀度均较模型组有明显改善,同时甲氨蝶呤组与温针灸组改善程度无明显差异,表明温针灸与甲氨蝶呤治疗均可获得相似的临床治疗疗效,可有效抑制病变进展而改善关节功能。研究报道显示^[13-14],免疫球蛋白在RA发病机制中其中关键作用。RA患者机体免疫球蛋白水平的显著升高,与机体自身抗体阳性有着密切联系^[15]。研究显示,甲氨蝶呤组与温针灸组大鼠免疫球蛋白水平较模型组有明显降低,且甲氨蝶呤组与温针灸组之间无明显差异。提示温针灸对类风湿性关节炎的治疗可能与改善机体免疫球蛋白水平紊乱有关。在众多促炎性因子中,IL-1、TNF- α 是其中的关键因子,IL-1可诱导急性期反应,在RA活动期,IL-1水平可激活血管内皮细胞从而增加内皮细胞黏附分子的表达分泌,导致免疫性炎症反应的加重^[16-17];而TNF- α 在RA发病中可能为致热原作用,对B细胞、中性粒细胞、单核巨噬细胞以及血管内皮细胞等具有激活作用,从而介导免疫反应的发生,此外,TNF- α 可诱导前列腺素、胶原酶等炎性介质的分泌,介导滑膜炎性与软骨破坏^[18-19]。因此,降低IL-1、TNF- α 水平对RA治疗具有着重要影响^[20]。本研究结果显示,甲氨蝶呤组与温针灸组大鼠血清IL-1、TNF- α 水平较模型组大鼠明显降低,而甲氨蝶呤组与温针灸组大鼠血清IL-1、TNF- α 水平无差异。提示温针灸可有效降低类风湿性关节炎大鼠血清IL-1、TNF- α 水平,且其作用与甲氨蝶呤相似。

综上所述,温针灸可有缓解类风湿性关节炎大鼠后肢肿胀,有效控制病情进展,其作用机制可能与降低血清免疫球蛋白、IL-1、TNF- α 水平有关。

参考文献:

- [1] 李晶晶, 眭明红, 林诗雨, 等. 利用微透析技术测定火针对类风湿性关节炎大鼠病变组织中5-羟色胺、组胺和前列腺素E2的影响[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2017, 38(4): 314-321.
- [2] 关丽, 史冉庚, 毋丹丹, 等. 类风湿性关节炎动物模型的建立及其与肠道通透性的相关性研究[J]. 南昌大学学报(医学版), 2017, 57(3): 11-15.
- [3] 马文彬, 刘旭光, 周海燕, 等. 择时艾灸对类风湿性关节炎大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴昼夜节律的影响[J]. 针刺研究, 2016, 41(2): 100-107.

- [4] 张星华,朱博雯,赵彬元,等. 针灸治疗类风湿性关节炎随机对照临床研究 Meta 分析 [J]. 中国中医药信息杂志, 2015, (2): 42-46.
- [5] 李晶晶,张英,睦明红,等. 火针对类风湿性关节炎大鼠痛阈及 IL-1、TNF- α 的影响 [J]. 上海针灸杂志, 2016, 35(5): 583-587.
- [6] 吴利,袁斓,兰颖. 针灸对类风湿性关节炎免疫功能影响的动物实验研究进展 [J]. 现代临床医学, 2015, (5): 326-328.
- [7] Li J, Li J, Chen R, et al. Targeting NF- κ B and TNF- α activation by electroacupuncture to suppress collagen-induced rheumatoid arthritis in model rats [J]. Altern Ther Health Med, 2015, 21(4): 26-34.
- [8] 包龙飞. 针灸与独活寄生汤联合西药治疗类风湿性关节炎随机平行对照研究 [J]. 实用中医内科杂志, 2015, 29(1): 149-151.
- [9] 陈玉兴,卓俊城,黄雪君,等. 痹痛消胶囊对大鼠类风湿性关节炎的作用及其机制 [J]. 中成药, 2016, 38(6): 1211-1215.
- [10] 沈甜,张彩荣,伏荣红,等. 火针对类风湿性关节炎大鼠踝关节 JNK、p38 丝裂原活化蛋白激酶的影响 [J]. 南京中医药大学学报, 2016, 32(6): 548-552.
- [11] Shetty GB, Mooventhan A, Anagha N. Effect of electroacupuncture, massage, mud, and sauna therapies in patient with rheumatoid arthritis [J]. J Ayurveda Integr Med, 2015, 6(4): 295-299.
- [12] 苏荣华,刘颖,吕明庄,等. 太乙神针对类风湿性关节炎大鼠 TNF- α 和可溶性 CD4、CD8 的影响 [J]. 贵阳医学院学报, 2015, 40(10): 1033-1035.
- [13] 周萍,陈欧娜,苏咏梅,等. 温经散寒通络汤联合针灸治疗类风湿性关节炎寒湿痹的临床研究 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014, (4): 784-789.
- [14] 高皖皎,邓秋狄,白殊同,等. 佐剂型关节炎大鼠滑膜成纤维细胞模型建立及特征分析 [J]. 中国药理学通报, 2015, (12): 1693-1698.
- [15] 任继刚,罗薇,周海燕,等. 类风湿性关节炎的针灸疗法及其作用机制研究进展 [J]. 湖南中医杂志, 2016, 32(6): 188-190.
- [16] 钱康,范永升. 清肺方对类风湿性关节炎相关间质性肺炎模型大鼠的 TGF- β 1 作用的实验研究 [J]. 中国中医急症, 2017, 26(7): 1163-1166.
- [17] Seca S, Kirch S, Cabrita AS, et al. Evaluation of the effect of acupuncture on hand pain, functional deficits and health-related quality of life in patients with rheumatoid arthritis -- a study protocol for a multicenter, double-blind, randomized clinical trial [J]. J Integr Med, 2016, 14(3): 219-227.
- [18] 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.
- [19] 刘剑芬,陈文伟,潘略韬. 独活寄生汤加减联合针灸治疗类风湿性关节炎的临床观察 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2015, 25(10): 47-49.
- [20] 田森林. 温经散寒通络方辅助针灸对类风湿性关节炎寒湿痹患者的作用 [J]. 光明中医, 2017, 32(21): 3145-3146, 3163.

(编辑:徐建平)