

引用:任继刚,王大雪,雷泉. 艾灸对实验性类风湿性关节炎家兔炎症因子、骨桥蛋白及血管内皮细胞生长因子的影响[J]. 湖南中医杂志,2021,37(7):154-156.

艾灸对实验性类风湿性关节炎家兔炎症因子、骨桥蛋白及血管内皮细胞生长因子的影响

任继刚,王大雪,雷 泉

(川北医学院附属医院中医科,四川 南充,637000)

[摘要] 目的:观察艾灸对实验性类风湿性关节炎(RA)家兔炎症因子白细胞介素-10(IL-10)、白细胞介素-17(IL-17)和滑膜液中骨桥蛋白(OPN)、血管内皮细胞生长因子(VEGF)表达的影响,进一步探索艾灸治疗 RA 的效应机制。方法:选用 CL 级日本大耳白兔 30 只,随机分为空白组、RA 模型组、治疗组,每组各 10 只。采用弗氏完全佐剂(FCA)法建立 RA 模型。造模后第 7 天,治疗组采用艾灸(悬灸)肾俞、足三里,每穴各灸 5 壮,每天 1 次,以 6 d 为 1 个疗程,共干预 3 个疗程;空白组、RA 模型组不做任何干预。检测各组外周血 IL-10、IL-17 和滑膜液 OPN、VEGF 的含量,观察滑膜组织中 OPN 的表达。结果:RA 模型组、治疗组 IL-17、OPN 及 VEGF 含量均较空白组明显升高($P<0.01$),IL-10 明显降低($P<0.01$),治疗组各指标水平均优于 RA 模型组($P<0.01$)。与空白组相比,RA 模型组、治疗组滑膜组织 OPN 阳性表达增加($P<0.01$),治疗组 OPN 表达低于 RA 模型组($P<0.05$)。结论:艾灸对实验性 RA 家兔滑膜炎症的抑制作用可能是通过调节 OPN 的表达,进而调节相关炎症因子及 VEGF 的表达,参与对 RA 滑膜炎症及血管翳形成的调节,其可能为艾灸治疗 RA 有效的内在机制。

[关键词] 类风湿性关节炎;家兔;艾灸;OPN;VEGF;实验研究

[中图分类号] R259.932.2 **[文献标识码]** A DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2021.07.053

Effect of moxibustion on inflammatory factors, osteopontin, and vascular endothelial growth factor in experimental rabbits with rheumatoid arthritis

REN Jigang, WANG Daxue, LEI Xiao

(Affiliated Hospital of Chuanbei Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of moxibustion on the inflammatory factors interleukin-10 (IL-10) and interleukin-17 (IL-17) and the expression of osteopontin (OPN) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in synovial fluid in experimental rabbits with rheumatoid arthritis (RA). Methods: A total of 30 clean-class Japanese white rabbits were randomly divided into blank group, RA model group, and treatment group, with 10 rabbits in each group. Freund's complete adjuvant was used to establish a model of RA. On day 7 after modeling, the rabbits in the treatment group were given moxibustion (suspended moxibustion) at Shenshu and Zusanli, with 5 moxa cones for each acupoint, once a day for 3 courses of treatment, and each course of treatment was 6 days; no intervention was given in the blank group and the RA model group. The levels of IL-10 and IL-17 in peripheral blood and the content of OPN and VEGF in synovial fluid were measured, and the expression of OPN in synovial tissue was observed. Results: Compared with the blank group, the RA model group and the treatment group had significant increases in the content of IL-17, OPN, and VEGF ($P<0.01$) and a significant reduction in IL-10 ($P<0.01$), and the treatment group had significantly better indices than the RA model group ($P<0.01$). Compared with the blank group, the RA model group and the treatment group had a significant increase in the expression of OPN in synovial tissue ($P<0.01$), and the treatment group had significantly lower expression of OPN than the RA model group ($P<0.05$). Conclusion: Moxibustion can inhibit synovitis in experimental rabbits with RA by regulating the expression of OPN, associated inflammatory cytokines, and VEGF, and it is involved in the regulation of syn-

基金项目:川北医学院附属医院院内项目(2018JC019)

第一作者:任继刚,男,医师,医学硕士,研究方向:针灸调节神经-免疫-内分泌疾病的机制研究

ovitis and pannus formation in RA, which might be the mechanism of moxibustion in the effective treatment of RA.

[**Keywords**] rheumatoid arthritis; rabbit; moxibustion; osteopontin; vascular endothelial growth factor; experimental study

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种病因和发病机制尚不清楚的自身免疫性疾病,以滑膜细胞增生和血管翳形成为主要病理改变,而血管翳的生成和作用机制一直是 RA 研究的热点,在 RA 软骨和骨破坏过程中发挥了重要作用,其中血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 是目前已知的促进血管翳形成的重要因素。目前研究表明,骨桥蛋白 (OPN) 在 RA 的炎症反应及滑膜血管形成中起着重要作用,OPN 和 VEGF 可能协同参与了 RA 滑膜血管翳生成及软骨破坏等的病理过程^[1]。本研究从 OPN 和 VEGF 的角度出发,探索艾灸治疗 RA 的效应机制。

1 实验材料

1.1 动物 CL 级日本大耳白兔 30 只,雌雄各半,体质量 (2.50±0.25) kg,4~5 月龄,由川北医学院动物实验中心提供,实验动物质量合格证许可证号:SCXK(川)2014-23。

1.2 药物、试剂及仪器 弗氏完全佐剂 (FCA, 美国 Sigma 公司);艾绒 (苏州华佗针灸器械有限公司)。兔 ELISA 试剂盒 (博士德公司,批号:2003191008);0.9%氯化钠注射液 (四川科伦药业股份有限公司,批号:H51021152);酶联免疫检测仪 (中国人民解放军第四军医大学国营华东电子管厂, DG3022)。

2 实验方法

2.1 动物分组 采用随机数字表法将 30 只实验动物随机分为空白组、RA 模型组、治疗组,每组各 10 只。

2.2 模型制备 参照文献[2]对 RA 模型组和治疗组动物进行 RA 模型制备。方法:常规备皮、消毒,以髌韧带外侧凹陷为注射点,予 FCA 按 0.5 ml/kg 平均注射于双侧膝关节腔内,造模后实验动物双侧膝关节逐渐肿胀明显,表明造模成功。

2.3 干预方法 造模后第 7 天进行艾灸治疗,暴露背部及双侧膝关节(穴位处剃毛 2 cm×2 cm),参照《实验针灸学》^[3]及《小动物针灸技法手册》^[4]的动物穴位图谱,每天用小艾炷 (5 mg/壮)悬灸双侧“肾俞”“足三里”穴各 5 壮,每天 1 次,以 6 d 为 1 个疗程,共治疗 3 个疗程,各疗程间间隔 1 d。

2.4 观察指标 治疗 3 个疗程后,采用耳缘静脉注射空气处死家兔,采用心脏采血,并于双后膝关节腔内分别注射 0.3 ml 0.9%氯化钠注射液,局部轻揉后于无菌条件下抽取关节腔内滑膜液 0.3 ml 装入 Eppendorf 管中,-20℃低温冰箱保存待测。采用 ELISA 法检测各组实验动物外周血白细胞介素 (IL)-17、IL-10 的含量和滑膜液中 OPN、VEGF 的含量,用免疫组织化学染色方法检测滑膜组织中 OPN 的表达。参照文献[5],于实验前 20 min 从冰箱取出待测试剂盒,平衡室温 (20℃~25℃),主要实验步骤如下:1) 标准品稀释;2) 加样;3) 温育;4) 配液;5) 洗涤;6) 加酶;7) 再次温育、洗

涤;8) 显色;9) 终止;10) 测定:加入终止液后 15 min 内,以空白孔调零,450 nm 波长依序测量各孔的吸光度 (OD 值)。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计学软件进行处理,以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,采用 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组家兔外周血炎症因子和滑膜液中 VEGF、OPN 比较 RA 模型组、治疗组 IL-17、OPN 及 VEGF 含量均较空白组明显升高 (*P*<0.01),IL-10 水平降低 (*P*<0.01),治疗组各指标含量优于 RA 模型组 (*P*<0.01)。(见表 1)

表 1 各组家兔外周血炎症因子和滑膜液中 VEGF、OPN 比较 ($\bar{x}\pm s$, pg/ml)

组别	只数	IL-10	IL-17	OPN	VEGF
空白组	10	115.21±2.54	141.13±2.88	4.98±0.32	439.03±2.53
RA 模型组	10	103.81±1.46 ^a	239.66±4.32 ^a	8.23±0.31 ^a	539.96±4.09 ^a
治疗组	10	109.41±1.66 ^{ab}	194.87±3.71 ^{ab}	5.29±0.34 ^{ab}	498.55±7.49 ^{ab}

注:与空白组比较,^a*P*<0.01;与 RA 模型组比较,^b*P*<0.01。

3.2 各组家兔滑膜组织 OPN 表达比较 与空白组相比,RA 模型组、治疗组动物滑膜组织的 OPN 阳性表达明显增加 (*P*<0.01);治疗组滑膜组织 OPN 表达较 RA 模型组降低 (*P*<0.01)。(见表 2)

表 2 各组家兔滑膜组织 OPN 表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	平均光密度
空白组	10	0.1880±0.0137
RA 模型组	10	0.2566±0.0309 ^a
治疗组	10	0.1895±0.0121 ^b

注:与空白组比较,^a*P*<0.01;与 RA 模型组比较,^b*P*<0.01。

4 讨论

现代医学认为,在 RA 的病理发展过程中,关节滑膜炎和血管翳形成是其重要的病理改变,贯穿于 RA 整个病理过程始终^[6]。多项研究表明,滑膜细胞的异常致炎与炎症因子 IL-1、肿瘤坏死因子-α (TNF-α)、OPN 和 VEGF 以及抑炎因子 IL-4、IL-10 等的失调密切相关。而 IL-17 作为 RA 病理过程中的关键细胞因子,在关节炎和骨破坏等部位均有明显的表达。在 RA 患者和小鼠模型的研究表明,OPN 在诱导分化辅助性 T 细胞 (Th) 17 的过程中起着关键性作用^[7-8]。OPN 在 IL-17、IL-10 的表达有关键的调节作用,OPN 还通过调节巨噬细胞产生 IL-12 和 IL-10 以促进 1 型免疫反应^[9],参与细胞介导的免疫应答的启动。OPN 通过免疫调节促进 B 细胞的分化及抗体的产生,参与关节炎和骨破坏。OPN 在 RA 患者关节滑液中呈高表达状态,并促进关节软骨的破坏^[10]。VEGF 作为唯一对血管形成具有特异性的重要生长因子,有研究发现 OPN 作为一种分泌糖

蛋白,在血管生成和肿瘤发展过程中起着至关重要的作用。OPN 作为诱导新生血管形成的关键因素,与过氧化氢(H_2O_2)的介导有相关性,但决定 OPN 此项功能的具体结构域,以及如何被翻译、修饰并表达刺激新生血管的形成仍不清楚^[11]。诸多研究已证实,OPN 基因敲除小鼠其新生血管形成机能受到损害,但是决定 OPN 表达的机制仍不清楚。在缺血性损伤的小鼠模型中发现,OPN 超表达的部位新生血管形成增强,而 OPN 表达减少的部位新生血管的产生受到损害。因此,OPN 也可能通过介导 VEGF 的表达进一步参与到 RA 的病理过程中。

临床应用表明艾灸治疗 RA 疗效显著,实验研究结果也证实艾灸可通过中枢和外周作用机制对 RA 产生治疗效应。艾灸可明显调控 RA 滑膜细胞功能,抑制滑膜细胞分泌 IL-1、TNF- α 等炎症相关因子。艾灸可以通过抑制 VEGF 改善大鼠 RA 病情^[12],艾灸 RA 患者可明显改善临床症状及实验室指标,增强常规西药对 RA 患者血清中 VEGF、IL-1 β 表达的抑制作用^[13]。有研究表明艾灸“肾俞”“足三里”等穴位,能够有效调节实验性 RA 滑膜组织中缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、VEGF 蛋白基因表达^[14]。本研究也证实了艾灸对实验性 RA 模型家兔有确切的抗炎效应,可调节其相关炎症因子,减轻炎症反应,调节 OPN 的表达。OPN 也可能通过介导 VEGF 的表达进一步参与到 RA 的病理过程中。因此,艾灸对实验性 RA 家兔滑膜炎的抑制作用可能是通过调节 OPN 的表达,进而调节相关炎症因子及 VEGF 的表达,参与对 RA 滑膜炎及血管翳形成的调节,最终发挥对 RA 的治疗作用,但其具体的调节机制仍有待深入研究。

参考文献

- [1] 刘琼,李向培,钱龙,等. 骨桥蛋白及血管内皮细胞生长因子与类风湿关节炎滑膜血管发生的关联[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志,2007,1(1):43-46.
- [2] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1993:357.

- [3] 林文注. 实验针灸学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1994:286.
- [4] 胡元亮. 小动物针灸技法手册[M]. 北京:化学工业出版社,2009:152.
- [5] 吴菲. 艾灸调控实验性 RA 模型 T 细胞功能的 PD-1/PD-L1 机制研究[D]. 成都:成都中医药大学,2016.
- [6] 张铃铃,沈玉先. 类风湿关节炎的关节滑膜病理生理机制[J]. 生理科学进展,2003,34(2):144.
- [7] CHEN G,ZHANG X,LI R,et al. Role of osteopontin in synovial Th17 differentiation in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum,2010,62(10):2900-2908.
- [8] SHINOHARA ML,KIM JH,GARCIA VA,et al. Engagement of the type I interferon receptor on dendritic cells inhibits T helper 17 cell development:Role of intracellular osteopontin[J]. Immunity,2008,29(1):68-78.
- [9] O'REGAN AI,BERMAN JS. Osteopontin:a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation[J]. Int J Exp Pathol,2000,81(6):373-390.
- [10] 叶一萍. 中西医结合治疗类风湿关节炎的思路和方法[J]. 中华中医药学刊,2007,25(7):1341-1343.
- [11] ALICIA N LYLE,GIJI JOSEPH,AARON EFAN,et al. Reactive oxygen species regulate osteopontin expression in a murine model of post-ischemic neo-vascularization[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2012,32(6):1383-1391.
- [12] 申博,陈迪,林子昊,等. 针刺联合艾灸治疗类风湿性关节炎及血管新生调控因子的作用研究[J]. 山西中医学院学报,2016,17(1):25-27.
- [13] 熊燕,白玉,李媛,等. 艾灸对类风湿性关节炎患者血清中 VEGF、IL-1 β 影响的研究[J]. 中华中医药学刊,2019,37(1):142-145.
- [14] 陈白露,彭麒,熊燕,等. 艾灸对实验性 RA 家兔滑膜 HIF-1 α /VEGF 的调节作用[J]. 时珍国医国药,2016,27(12):3042-3044.

(收稿日期:2020-12-28)

孩子饮食勿放纵 合理调控助健康

老话说“若要小儿安,三分饥和寒”,老话大家都记得,道理也都懂,但是,真正能做到的,却并不多。好多家长唯恐孩子吃得不够多、穿得不够暖,结果消化不良、感冒、咳嗽等各种问题就找上门来了。

经常听到很多家长在抱怨孩子不好好吃饭,挑食得厉害,总是没胃口。出现这种情况,家长应首先从自身找原因。譬如,孩子小的时候,有的家长觉得孩子吃饭不好,就一直追着喂;还有的家长甚至把吃饭与奖励联系在一起,给孩子说吃完这些就带孩子去玩什么或买什么;有的家长对孩子的要求从来不说“不”,只要孩子喜欢,各种垃圾食品准备得比正餐都丰富。时间长了,孩子养成了不好好吃饭的坏习惯。

中医学认为,孩子生病主要是两个系统的问题,一是消化系统,二是呼吸系统,而很多呼吸系统疾病都是在得过多、内有积食的基础上外感风寒所致,所以,日常饮食一定要呵护好孩子脾胃,千万别积食。孩子吃饭,千万别撑着,如果偶尔没有控制好,孩子吃得比较多

的时候,可在医师指导下给孩子服用中成药保和丸,以避免积食的发生。

对于脾胃功能比较弱的孩子来说,家长要注意控制饮食的量,别让宝宝吃撑了,还可以配合一些有助于促进消化的推拿手法,譬如捏脊。方法:孩子俯卧,双手在孩子的腰部提起皮肤,缓慢向上滑动,从腰部到背部、再到颈部。捏脊主要是刺激督脉,并按摩整个脊柱旁边的夹脊穴,以调整脏腑功能。(http://www.cntcm.com.cn/news.html?aid=173511)