

## 温和灸肾俞穴、关元穴对肾阳虚老年人衰老症状及外周血 Rb 蛋白表达的影响

赵琛 施茵 崔云华 王晓梅 马晓芃 吴蓓玲 吴璐一 刘慧荣

**【摘要】 目的** 观察温和灸对肾阳虚老年人外周血成视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, Rb)蛋白表达以及衰老症状的影响,探讨温和灸的抗衰老作用。**方法** 将60~75岁肾阳虚老年人81例随机分为温和灸治疗组41例和衰老对照组40例。温和灸治疗组采用温和灸肾俞穴、关元穴,18次为一个疗程,连续治疗两个疗程。采用积分表法观察温和灸对老年人治疗后综合情况的影响和症状改善情况,并用流式细胞术检测外周血 Rb 蛋白表达情况。**结果** (1)经温和灸治疗,肾阳虚老年人衰老症状积分较衰老对照组疗效显著降低( $P<0.01$ );(2)温和灸第二疗程末疗效较第一疗程末显著提高( $P<0.01$ );(3)温和灸治疗组老年人外周血单个核细胞 Rb 蛋白阳性表达率显著低于衰老对照组( $P<0.01$ )。**结论** 温和灸可能通过干预肾阳虚老年人外周血 Rb 表达,改善衰老症状,降低衰老见证积分。

**【关键词】** 温和灸; 衰老; 成视网膜母细胞瘤蛋白; 临床研究

**【中图分类号】** R246 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2012.05.008

**Effect of suspended moxibustion on the pRb expression of peripheral blood in the kidney-yang deficiency aged people** ZHAO Chen, SHI Yin, CUI Yun-hua, et al. Acupuncture Department, Yueyang Hospital of Integrative Chinese & Western Medicine Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 200437, China

Corresponding author: ZHAO Chen, E-mail: chris\_0127@126.com

**【Abstract】 Objective** To explore the anti-aging effect of suspended moxibustion on the Rb expressions of the peripheral blood and general symptoms in aged people. **Methods** A total of 81 elderly people were enrolled. The aged people between 60-75 years old were randomly divided into two groups including 41 in suspended moxibustion group and 40 in aging control group. Suspended moxibustion on points Shenshu (BL23) and Guanyuan (CV4) were applied to the treated group under treatment for two courses. The effects of suspended moxibustion on aging symptom of aged people were observed with integral table. The total effective rate of suspended moxibustion was assessed by symptom scores, and the Rb expression of the peripheral blood was measured by flow cytometry. **Results** (1) Symptoms of aging integral of suspended moxibustion group was significantly reduced than that in the aging control group ( $P<0.01$ ); (2) The effect of suspended moxibustion group in the second course was significantly improved than that in the first course ( $P<0.01$ ). (3) The Rb expression rates of the peripheral blood in suspended moxibustion group were lower than that in the aging group ( $P<0.01$ ). **Conclusion** The anti-aging effect of suspended moxibustion may be through decreasing the pRb expression of the peripheral blood in aged people.

**【Key words】** Suspended moxibustion; Aging; Retinoblastoma protein; Clinical study

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2009CB522900);国家自然科学基金(30701124);上海市重点学科建设项目(S30304)

作者单位:200437 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院针灸科(赵琛、刘慧荣);上海中医药大学针灸免疫三级实验室(施茵、崔云华、王晓梅、马晓芃、吴蓓玲、吴璐一)

作者简介:赵琛(1973-),女,博士,副主任医师。研究方向:针灸免疫研究。E-mail:chris\_0127@126.com

衰老是指机体随着年龄的增长而出现各器官功能普遍的、逐渐降低的过程。温和灸延缓衰老具有独特的优势,历来被认为是养生保健、抗衰老的重要方法。有关温和灸延缓衰老机理的研究多为整体、组织、器官水平的,证实其对老年人的内分泌系统、免疫系统、自由基代谢等都有良好的调节作用<sup>[1,2]</sup>。本课题组以往的研究证实,温和灸肾俞穴和关元穴具有抗衰老的作用<sup>[3,4]</sup>,本研究应用流式细胞术检测老年人外周血成视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, Rb)蛋白表达及温和灸对其的影响,以期温和灸在实践中预防衰老和延缓衰老提供新的科学理论依据。

1 对象与方法

1.1 对象

所有观察对象均为 2007 年 1 月至 2008 年 7 月沙溪苑社区及上海市针灸经络研究所门诊部年龄 60~75 岁志愿老年人(无严重疾病者,生活自理者),共 81 例。按随机数字表法分成温和灸治疗组和衰老对照组。温和灸治疗组 41 例,其中男 15 例,女 26 例;年龄最高 75 岁,最低 60 岁,平均(68.07±5.04)岁。衰老对照组 40 例,其中男 17 例,女 23 例;年龄最高 75 岁,最低 60 岁,平均(67.75±4.85)岁。经统计学分析,两组老年人的人口学特征无显著性差异(均  $P>0.05$ ),具有可比性。

1.2 诊断标准

诊断标准参照国家卫生部颁布的《抗衰老药物临床研究指导原则》实行标准<sup>[5]</sup>,及第三次全国中医、中西医结合老年医学研究协作组会议制订的《延缓衰老中药的筛选规程和临床观察规范》的衰老辨证标准中肾阳虚证<sup>[6]</sup>。

表 1 衰老辨证标准中的肾阳虚症状

证型	问 诊		望诊、脉诊
	主要症状	次要症状	
肾阳虚	1. 腰膝酸软	1. 夜尿频	1. 面目虚浮
	2. 畏寒肢冷	2. 精神不振	2. 舌淡胖而
		3. 气短而喘	润,苔白厚
		4. 大便溏薄	3. 脉沉迟,两
		5. 发脱或变白	尺脉弱
		6. 健忘	
		7. 齿摇	
		8. 性欲减退	

注:必备主要症状 2 项,次要症状中任意 3 项和望诊、脉诊中的 1 项,或积分值≥13 分。

1.3 治疗方法

温和灸治疗组( $n=41$ ):温和灸肾俞穴、关元穴,每次治疗取关元穴和单侧肾俞穴,两侧交替,每穴每次灸 20 分钟,每周治疗 3 次,连续治疗 18 次为一疗程。

衰老对照组( $n=40$ ):衰老对照,不做治疗。

1.4 疗效判定标准

(1)衰老症状观察

对温和灸治疗组治疗前及第一、二疗程结束时的临床症状进行观察,同时观察衰老对照组入组时及相当两疗程结束时临床症状的变化。参照《现代老年药学》抗衰老药物临床评价中衰老症状积分标准<sup>[7]</sup>,每项症状记分之总和为衰老见证积分值。

问诊:用统一的语句提问。凡主动说出的症状记 4 分;提示问出的症状,凡症状显著或持续出现,记 3 分;症状时轻时重或间断出现,记 2 分;症状轻或偶尔出现,记 1 分;无症状为 0 分。

望诊和脉诊:具有症状中任意一项者记 6 分。

(2)疗效评定标准

参照第三次全国中医、中西医结合老年医学研究协作组会议制订的《延缓衰老中药的筛选规程和临床观察规范》附件中的疗效判断标准实行<sup>[6]</sup>。显效:治疗后衰老见证积分下降之值 $\geq 2/3$ 治疗前平均衰老见证积分值。有效:治疗后衰老见证积分下降之值在  $1/3 \sim 2/3$  治疗前平均衰老见证积分值之间。无效:治疗后衰老见证积分下降之值 $\leq 1/3$ 治疗前平均衰老见证积分值。

1.5 外周血 Rb 蛋白表达检测

温和灸治疗组第二疗程结束时,采用流式细胞术对外周血 Rb 蛋白表达进行检测,同时检测衰老对照组相当两疗程结束时外周血 Rb 蛋白表达。抽取空腹静脉血,采用流式细胞术检测外周血 Rb 蛋白表达。取肝素抗凝外周血 50  $\mu\text{l}$ 。加 10  $\mu\text{l}$  CD45-PC5,室温孵育 15 分钟。加 100  $\mu\text{l}$  IntraPrep Reagent 1,剧烈振荡混匀,室温避光孵育 15 分钟。加 4 ml PBS-BSA,离心 300 g/min 5 分钟,弃去上清液。加 100  $\mu\text{l}$  IntraPrep Reagent 2,轻轻混匀,室温避光孵育 5 分钟。加入相应剂量的一抗,Rb 2  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{l}$ ,轻轻混匀,室温避光孵育 20 分钟。加 4 ml PBS-BSA,离心 300 g/min 5 分钟,弃去上清液,加入 2  $\mu\text{l}$  二抗 IgG-FITC,轻轻混匀,室温避光孵育 20 分钟。加 4 ml PBS-BSA,离心 300 g/min 5 分钟,弃去上清液。加 1 ml PBS-BSA,重悬,上机检测。同时设

立空白对照,只加 CD45-PC5,其余抗体不加;阴性对照,加 CD45-PC5 和二抗或 IgG1 (mouse)-FITC。

### 1.6 统计学处理

数据使用 SPSS 13.0 统计软件包进行统计分析。两组患者治疗前后衰老症状积分符合正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用两独立样本  $t$  检验。两组间疗效及疗程间疗效比较采用 Ridit 分析。外周血 Rb 蛋白表达符合正态分布,方差齐,用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  被认为差别有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 衰老症状观察

温和灸治疗组衰老症状积分最高 46 分,最低 32 分,平均(39.50±3.70),衰老对照组衰老症状积分最高 45 分,最低 32 分,平均(38.20±3.62)。经统计学分析,无显著性差异。温和灸治疗组治疗后与衰老对照组治疗后比较衰老症状积分,采用两独立样本  $t$  检验,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ),见表 2。

表 2 两组肾阳虚老年人衰老症状积分比较(分,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	治疗前	治疗后
温和灸治疗组	39.50±3.70	19.80±5.12
衰老对照组	38.20±3.62	37.88±5.10

### 2.2 综合疗效情况

温和灸第一疗程末有效率 53.66%,第二疗程末有效率为 90.24%,显著优于衰老对照组。经 Ridit 分析,温和灸治疗组与衰老对照组相比,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );且温和灸治疗第一疗程疗效与第二疗程疗效相比,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。见表 3。

表 3 两组综合疗效分析

组别	显效	有效	无效
温和灸治疗组( $n=41$ )			
第一疗程末	0	22	19
第二疗程末	1	36	4
衰老对照组( $n=40$ )	0	2	38

### 2.3 温和灸对老年人外周血单个核细胞 Rb 蛋白表达的影响

温和灸治疗组老年人外周血单个核细胞 Rb 蛋白阳性表达率显著低于衰老对照组,经单因素方差分析,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。选取温和灸治

疗组患者 30 例在第二疗程进行外周血 Rb 蛋白表达检测,选取衰老对照组患者 30 例在末次衰老症状评分时进行外周血 Rb 蛋白表达检测。两组此次入选对象在人口学特征及入组时衰老症状积分情况无显著性差异。见表 4。

表 4 温和灸对老年人外周血单个核细胞 Rb 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

分组	$n$	阳性表达(%)
温和灸治疗组	30	57.70±9.57
衰老对照组	30	29.66±6.97

## 3 讨论

《黄帝内经》将人类的生命全过程概括为“生、长、壮、老、已”,衰老是这一过程中不可避免的阶段。中医理论认为,肾为“先天之本”,主藏精,主生长发育与生殖,生命过程随肾气旺盛而成长,而后随肾气的衰弱而衰老。如《素问·上古天真论》记载:“丈夫八岁,肾气实,发长齿更;二八肾气盛……三八肾气平均……五八肾气衰……八八天癸竭,精少,肾脏衰。”“女子七岁,肾气盛,齿更发长;二七而天癸至……三七肾气平均……七七任脉虚,太冲脉衰少,天癸竭。”明代虞抟在《医学正传·命门主寿夭》指出“肾气盛则寿延,肾气衰则寿夭”,均说明了肾虚是衰老的主要原因之一。

肾俞穴是背俞穴之一。《类经》中说“十二俞皆通于脏气”。故肾俞为肾脏之气输通出入之处,具有调节和补充肾气的作用,是延缓衰老的重要穴位。关元穴归属于任脉,又是小肠的募穴,足太阴脾经、足少阴肾经、足厥阴肝经与任脉的交会穴。该穴位于下腹部,为男子藏精、女子蓄血之处。《扁鹊心书》曰:“每夏秋之交,即灼关元千壮,久久不畏寒暑。人至三十,可三年一灸脐下三百壮;五十,可二年一灸脐下三百壮;六十,可一年一灸脐下三百壮,令人长生不老。”被认为是保健要穴。关于肾俞穴、关元穴延缓衰老的相关研究有诸多报道,证实通过刺激此二穴可调节机体的自由基、免疫、内分泌等系统功能,从而延缓衰老<sup>[8-11]</sup>。

温和灸是艾灸的一种,具有简便易行、经济实用、无毒副作用、不易产生耐受性等优点,对多种与肾气亏虚相关的疾病具有治疗作用<sup>[12,13]</sup>。本次研究结果显示温和灸关元、肾俞对衰老(肾阳虚性)疗效肯定,可以改善老年人肾阳虚证相关症状,且不



同疗程疗效差异显著,因此在老年人群的健康管理中可发挥积极作用。

衰老的发生可能由许多种信号触发,其中 Rb、P53、P16 等抑癌基因是细胞衰老的关键效应物,是细胞衰老调控网络中的主要环节和关键靶点。Rb 为视网膜母细胞瘤肿瘤抑制基因,定位于人 13 号染色体的长臂 1 区 4 带(13q14)。大量文献表明,Rb 与衰老密切相关,在细胞衰老中起着重要的作用。Rb 蛋白功能的发挥主要受到磷酸化/去磷酸化的控制。在磷酸化状态下,其蛋白活性丧失<sup>[14]</sup>;而在衰老的细胞中,Rb 以其活性的低磷酸化的生长抑制形式存在<sup>[15]</sup>。研究表明 Rb 在衰老细胞与年轻细胞中的表达并无明显变化,但 Rb 蛋白的存在形式不同,在衰老细胞中 Rb 主要以非磷酸化形式存在,因为在细胞周期调控中,低磷酸化 Rb 构成细胞周期的 R 点,维持细胞在 G<sub>0</sub>期和 G<sub>1</sub>期,抑制细胞分裂。Rb 蛋白磷酸化后使细胞从上述限制中释放出来,进入 S 期。可见,Rb 蛋白的磷酸化状态与细胞增值分裂密切相关<sup>[16]</sup>。同时 Rb 与周期素依赖性蛋白激酶负调控因子(CKIs)的 Ink4 家族和 Kip 家族各成员在调控细胞衰老的过程中相互影响,是调控肌体衰老的重要信号途径之一<sup>[15,17-21]</sup>。

在以往的研究中,已观察到温和灸肾俞穴能降低自然衰老大鼠肝组织 Rb mRNA 及蛋白表达<sup>[22]</sup>。本临床研究结果显示:温和灸治疗组老年人外周血单个核细胞 Rb 蛋白阳性表达率均显著低于衰老对照组。表明温和灸可能通过抑制老年人外周血单个核细胞 Rb 的表达,改善衰老相关症状,降低衰老见证积分。具体调节路径仍需进一步临床及动物实验研究证实。

## 参 考 文 献

- [1] 肖达,陈汉平.温和灸对老年人衰老见证和 T 细胞亚群的影响[J].辽宁中医杂志,1996,23(12):563-564.
- [2] 丁菊英,赵粹英,吴恒举,等.温和灸对老年人红细胞免疫及自由基的影响[J].上海针灸杂志,1995,14(1):4-5.
- [3] 崔云华,施茵,张卫,等.艾灸对衰老大鼠肝组织细胞周期及 PKC、PP2A 表达的影响[J].上海针灸杂志,2008,27(6):41-44.
- [4] 崔云华,施茵,国兰琴,等.艾灸对老年人衰老症状及外周血单个核细胞细胞周期的影响[J].辽宁中医杂志,2008,35(5):758-760.
- [5] 中华人民共和国卫生部药政局.新药(中药)治疗老年病临床研究指导原则[J].中国医药学报,1989,4(3):232-234.
- [6] 第三次全国中医、中西医结合老年医学研究协作组会议.延缓衰老中药的筛选规程和临床观察规范[J].中西医结合杂志,1986,6(11):682-684.
- [7] 酆章安,吴福春.现代老年药学[M].北京:中国医药科技出版社,2001:493-494.
- [8] Zhao CY, Yang L, Chen HP, et al. Clinical Study on Anti-aging Action of Herbal Cake-partition Moxibustion[J]. J Acupuncture Tuina Sci, 2009, 7(1):37-40.
- [9] 高希言,王燕.艾灸强壮要穴对衰老小鼠免疫功能的影响[J].河南中医,2005,25(11):24-26.
- [10] 刘星,王红,高洪泉,等.针刺老年大鼠“足三里”、“关元”穴对心、肾 GSH-PX、LIP、NO 含量影响的实验研究[J].中国药理学报,2004,32(1):22-23.
- [11] 李亚东,高洪泉,朱梅,等.针刺老年大鼠“足三里”、“关元”穴对 NO、SOD、MDA 以及免疫影响的实验研究[J].中国针灸,2002,22(11):52-54.
- [12] Zhou EH, Liu HR, Wu HG, et al. Suspended moxibustion relieves chronic visceral hyperalgesia via serotonin pathway in the colon[J]. Neurosci Lett, 2009, 451(2):144-147.
- [13] 宋丰军,郑士立,马大正.针灸治疗排卵障碍性不孕症临床观察[J].中国针灸,2008,28(1):21-23.
- [14] Deng Q, Li Y, Tedesco D, et al. The ability of E1A to rescue ras-induced premature senescence and confer transformation relies on inactivation of both p300/CBP and Rb family proteins[J]. Cancer Res, 2005, 65(18):8298-8307.
- [15] 胡作为,周燕萍,沈自尹,等.p16 基因与细胞衰老关系的研究进展[J].国外医学(遗传学分册),2004,27(4):200-202.
- [16] 王枫,孙晓江. Rb 基因与细胞衰老的研究进展[J].中国临床神经科学,2005,13(1):101-105.
- [17] 韩广明,高晓兰,乔建勇,等.何首乌饮对衰老大鼠脑组织细胞 Rb/p53 信号转导通路影响[J].河北医学,2011,17(1):1-4.
- [18] Schmid G, Kramer MP, Maurer M, et al. Cellular and organismal ageing: Role of the p53 tumor suppressor protein in the induction of transient and terminal senescence[J]. J Cell Biochem, 2007, 101(6):1355-1369.
- [19] 童坦君,张宗玉.细胞衰老主导基因 p16 的作用机理及其负调控[J].中国生物化学与分子生物学报,2002,18(1):104.
- [20] 闫海龙,龚勇珍.氧化应激及 p16 和 p53/p21 与细胞衰老关系的研究进展[J].医学综述,2011,17(5):682-685.
- [21] Klimova TA, Bell EL, Shroff EH, et al. Hyperoxia-induced premature senescence requires p53 and pRb, but not mitochondrial matrix ROS[J]. The FASEB Journal, 2009, 23(3):783-794.
- [22] 谭琳莹,赵天平,国兰琴,等.温和灸对自然衰老模型大鼠肝组织 Rb、P53、Bcl-2、PKC 表达的影响[J].环球中医药,2011,4(6):406-412.

(收稿日期:2012-02-17)

(本文编辑:秦楠)