

不同施灸方向对寒凝血瘀证大鼠血管收缩与舒张因子的影响

王宽 呼雪庆 黄玉萨 王清然 高春鹏 刘民 刘慧荣

【摘要】 目的 观察不同施灸方向对寒凝血瘀证模型大鼠血管收缩与舒张因子的影响。**方法** 选取清洁级 Wistar 大鼠 32 只,随机分组:正常组(A)、模型组(B)、顺经灸组(C)和逆经灸组(D),每组 8 只。在成功建立大鼠寒凝血瘀证模型后,对顺经灸和逆经灸两组大鼠实施不同操作方向的艾灸治疗,即沿膀胱经分别行“由上至下”及“由下至上”的单向反复操作,共治疗 14 天。治疗结束后,各组大鼠腹主动脉取血,采用酶联免疫吸附法检测大鼠血浆内皮素-1(endothelin-1, ET-1)及一氧化氮(nitric oxide, NO)的浓度。按照大鼠症状和体征量化评分表对大鼠的活动、毛发、大便、小便及脉络瘀血等情况进行相应评分,并最终计算大鼠寒凝血瘀的程度。**结果** 与正常组比较,模型组大鼠症状和体征量化积分及血浆 ET-1 浓度均明显升高($P<0.05$),NO 浓度明显下降($P<0.05$);与模型组比较,顺经灸组和逆经灸组大鼠症状和体征量化积分及血浆 ET-1 浓度均明显下降($P<0.05$),NO 浓度均明显升高($P<0.05$);顺经灸组大鼠症状和体征量化积分及血浆 NO 浓度较逆经灸组均有明显差异($P<0.05$)。**结论** 顺经灸与逆经灸大鼠足太阳膀胱经均能明显促进寒凝血瘀证大鼠血浆 NO 的释放,抑制血浆 ET-1 的释放,改善大鼠寒凝血瘀症状,且顺经灸的治疗效应稍优于逆经灸。

【关键词】 艾灸; 方向; 寒凝血瘀证; 血浆内皮素-1; 一氧化氮

【中图分类号】 R245.81 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.01.001

Effects of different moxibustion-performed directions on the vascular contraction and relaxation factor on rats with cold gaused blood stasis syndrome WANG Kuan, HU Xue-qing, HUANG Yu-sa,

et al. Shanghai Institute of Acupuncture-Moxibustion and Meridian, Shanghai 200030, China

Corresponding author: LIU Hui-rong, E-mail: lhr_tcm@126.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of different moxibustion-performed directions on the vascular contraction and relaxation factors in rats with cold gaused blood stasis syndrome. **Methods** 32 Wistar rats were divided into control group (A), model group (B), moxibustion performed along the meridian group (C) and moxibustion performed against the meridian group (D), 8 rats in each group. After successful established the model of rats with cold gaused blood stasis syndrome, the moxibustion along or against the bladder meridian on rats were performed directionally and repeatedly, the treatment was for 14 days. After treatment, the levels of ET-1 and NO of the blood taken from rats' aortaventralis were detected by ELISA. According to the table of the quantificational score of symptom, observe the activities, hair, excrement, urinate and choroid blood stasis of rats, and calculate the degree of rats with cold gaused blood stasis syndrome. **Results** Compared with the A group, the quantificational score of symptom and the level

基金项目:国家重点基础研究发展(973 计划)(2015CB554500);上海中医药大学研究生“创新能力培养”专项

作者单位:200030 上海中医药大学上海市针灸经络研究所[王宽(硕士研究生)、刘慧荣],药物安全评价中心(呼雪庆、黄玉萨、王清然);上海中医药大学岳阳临床医学院[刘民(硕士研究生)];上海中医药大学联合培养研究基地苏州市中医院(高春鹏)

作者简介:王宽(1989-),2013 级在读硕士研究生。研究方向:针灸治疗肠道疾病临床与基础研究。E-mail: wangkuan271@163.com

通讯作者:刘慧荣(1976-),女,博士,研究员,博士生导师。研究方向:针灸治疗肠道疾病临床与基础研究。E-mail: lhr_tcm@126.com

of ET-1 in the B group were all increased with statistically significant difference ($P < 0.05$) and the NO level was decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with the B group, the quantificational score of symptom and the level of ET-1 in the C and D group were reduced significantly ($P < 0.05$), and the NO level increased apparently ($P < 0.05$). The quantificational scores of symptom and NO levels in C and D group has statistical difference ($P < 0.05$). **Conclusions** Both moxibustion groups can promote the NO release, inhibit the ET-1 release and improve the symptom in rats with cold gaused blood stasis syndrome. Moreover, the therapeutic effect of C group is better than D group.

【Key words】 Moxibustion; Direction; Cold gaused blood stasis syndrome; Endothelin-1; Nitric oxide

灸疗法是中国传统中医疗法中的一项重要组成部分,是经过悠久历史沉淀的颇具中医特色的外治法之一。正是由于艾灸具有预防保健、强健体魄、延缓衰老以及延年益寿的功效,使得艾灸被广大的民众所熟识,甚至远扬国外,相关灸法的研究也受到国内外学者的高度重视。寒凝血瘀证是中医临床常见证型,艾灸活血化瘀的显著作用,可作为治疗寒凝血瘀证的一项优势疗法。本实验基于古代医籍中有关艾灸方向的论述,选取寒凝血瘀证动物模型,观察不同施灸方向对寒凝血瘀证大鼠血管收缩和舒张因子的影响,以期进一步规范临床艾灸操作流程,完善艾灸的相关效应机制,提高艾灸疗效。

1 材料与方法

1.1 实验动物

Wistar 大鼠 32 只,雌雄各半,体重(200±20)g,购自上海中医药大学医学实验动物中心[许可证号:SCXK(沪)2012-0002],适应性喂养 7 天。

1.2 试剂及仪器

0.1% 盐酸肾上腺素(上海禾丰制药有限公司生产,批号:W131106)。医用红外耳式体温计:江苏鱼跃医疗设备股份有限公司;ELISA 试剂盒:武汉基因美生物科技有限公司;酶标仪:芬兰(Labsystems Multiskan MS)公司;洗板机:芬兰(Thermo Labsystems)公司;离心机:微量高速离心机(国产);移液器:吉尔森 P 型移液器(Pipetman);培养箱:隔水式恒温培养箱(国产);其他所需耗材均为国产。

1.3 动物分组及模型制备

将 32 只大鼠随机分为正常组、模型组、顺经灸组和逆经灸组,每组 8 只。模型组、顺经灸组和逆经灸组寒凝血瘀证大鼠模型参照相关文献^[1-4]制备。具体方法为:采用背部皮下注射 0.1% 盐酸肾上腺

素的方式,按 0.3 mL/kg 标准计算注射量,用生理盐水稀释 5 倍后分 2 次注射。第 1 次注射后 1 小时,将大鼠置于 4~6℃ 冰水中冰浴 4 分钟,1 小时后进行第 2 次注射,共持续 4 周,前 2 周造模每天进行,后 2 周造模隔天进行,且后 2 周只冰浴不注射盐酸肾上腺素。正常组大鼠除称重均不作其他任何处理。

1.4 艾灸治疗

本实验选取大鼠背部脊柱两旁膀胱经连线的经段(“大椎”至“十七椎下”),大鼠膀胱经连线距背正中线 0.9~1.2 cm。具体定位:大椎:第七颈椎与第一胸椎间,背部正中;十七椎下:第 6 腰椎横突的前内侧。在大鼠寒凝血瘀证模型制备成功后,即开始进行艾灸治疗。顺经灸组治疗时艾条移动的方向与逆经灸组彼此相反,且均为单向操作。治疗所用艾条均为自制艾条(长约 15 cm、直径约 1 cm),施灸时,艾条距施术部位皮肤 1~2 cm,移动均匀缓慢(单向移动一次约 3~5 秒),顺经灸和逆经灸两组大鼠的艾灸操作分别按照“顺膀胱经循行的方向”和“逆膀胱经循行的方向”进行,每天 10 分钟,共治疗 14 天。治疗期间,正常组大鼠不作处理,模型组大鼠与两个治疗组行同样抓取动作。

1.5 大鼠症状和体征观察

参照相关文献及中医证候研究^[3,5-7],制定寒凝血瘀证大鼠症状和体征量化评分表,详见表 1。通过观察大鼠活动、毛发、大便、小便及脉络瘀血等一般情况,按照大鼠症状和体征量化评分表对其进行相应评分,并最终计算大鼠寒凝血瘀的程度。评分每周 1 次,共计 6 次。

1.6 大鼠耳温检测

用红外耳式体温计分别于造模第 1 天、8 天、16 天、24 天和 28 天对大鼠耳温进行检测。

1.7 大鼠血浆内皮素-1 及一氧化氮浓度检测

治疗结束后,大鼠麻醉,行腹主动脉取血,抗凝

处理,采用 ELISA 法检测大鼠血浆内皮素-1 (endothelin-1,ET-1)及一氧化氮(nitric oxide,NO)的浓度。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计学分析软件,资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,大鼠症状和体征量化积分(第 28 天)以及大鼠血浆 ET-1、NO 浓度均同时满足正态性和方差齐性条件,故采用方差分析;而大鼠症状和体征量化积分(治疗第 7、14 天)及大鼠耳温不同时满足正态性和方差齐性条件,采用完全随机设计多个样本间的多重比较,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠症状、体征量化积分

模型制备过程中,大鼠逐渐表现出畏寒蜷缩、寒战、毛发枯干无光泽、大便量多质稀甚则不成形、小便清长、口舌暗淡、肛周紫黯等中医寒凝血瘀的表征。如表 2 所示,在造模结束时(第 28 天),与正常组比较,模型组、顺经灸组及逆经灸组

大鼠症状和体征量化积分均明显升高($P<0.05$),且达到寒凝血瘀的重度水平,而三组大鼠症状和体征量化积分之间无明显差异。后经过 2 周时间的艾灸治疗,顺经灸和逆经灸两组大鼠以上寒凝血瘀的表现均有明显好转,从表 2 可以看出,治疗结束后,顺经灸组和逆经灸组大鼠的症状和体征量化积分较模型组均显著下降($P<0.05$),而且顺经灸组大鼠的症状和体征量化积分较逆经灸组降低更加明显($P<0.05$)。

2.2 大鼠耳温变化

正常组大鼠在模型制备过程中耳温变化不明显,最低时(36.20 ± 0.17)℃,最高时(36.40 ± 0.11)℃,而模型组、顺经灸组和逆经灸组大鼠耳温变化明显。随着模型制备过程的进行,模型组、顺经灸组和逆经灸组大鼠耳温均有“先上升后下降”的变化趋势(如图 1),在造模结束时,模型组、顺经灸组和逆经灸组大鼠耳温[(35.56 ± 0.13)℃、(35.66 ± 0.34)℃、(35.70 ± 0.25)℃]较正常组明显降低($P<0.05$),且三组大鼠耳温无明显差异($P>0.05$),详见表 3。

表 1 寒凝血瘀证大鼠症状和体征量化评分表

畏寒蜷缩	毛发情况	大便情况	小便情况(敷料)	脉络瘀血	评分
正常	正常	正常	正常	正常	0
少动,尚无寒战	稍有不整,尚有光泽	量稍多,成形	3 天更换	1 个部位	1
少动,偶有寒战	不整,无光泽	量多质软,尚成形	2 天更换	2~3 个部位	2
不动,寒战明显	毛发枯槁	量多质稀,不成形	每天更换	≥3 个部位	3

注:总积分 1~5 分为轻度,6~10 分为中度,11~15 分为重度。

表 2 各组大鼠症状和体征量化积分($\bar{x}\pm s$,分)

分组	n	造模阶段				治疗阶段	
		第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 7 天	第 14 天
正常组	8	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	8	3.38±1.06	6.25±1.58	8.38±1.51	10.63±0.92 ^a	10.13±0.99 ^a	8.88±1.13 ^a
顺经灸组	8	2.75±0.89	6.25±0.89	8.00±1.20	11.25±1.28 ^a	8.13±0.84 ^a	3.63±0.74 ^{ab}
逆经灸组	8	2.87±0.35	6.75±0.89	8.87±1.13	11.38±0.92 ^a	8.50±0.93 ^a	5.13±0.84 ^{abc}

注:与正常组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与顺经灸组比较,^c $P<0.05$ 。

表 3 各组大鼠耳温变化($\bar{x}\pm s$,℃)

分组	n	造模第 1 天	造模第 8 天	造模第 16 天	造模第 24 天	造模第 28 天
正常组	8	36.40±0.11	36.25±0.26	36.20±0.17	36.35±0.09	36.36±0.13
模型组	8	36.43±0.09	36.41±0.33	36.56±0.28	36.15±0.15	35.56±0.13 ^a
顺经灸组	8	36.38±0.23	36.18±0.23	36.45±0.22	35.63±0.33	35.66±0.34 ^a
逆经灸组	8	36.38±0.13	36.45±0.24	36.33±0.12	35.91±0.24	35.70±0.25 ^a

注:与正常组比较,^a $P<0.05$ 。

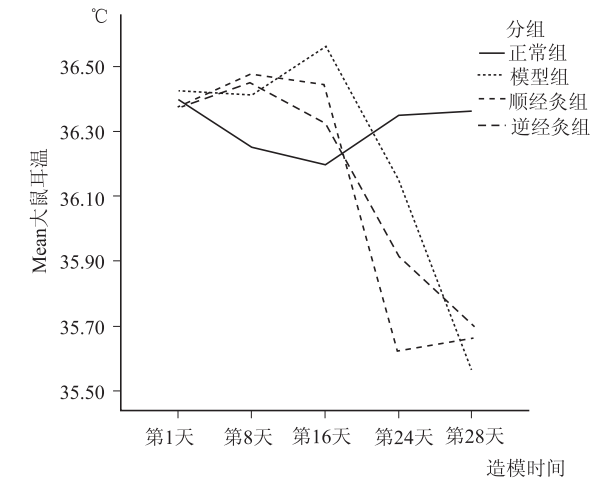


图 1 各组大鼠耳温变化

2.3 大鼠血浆 ET-1 及 NO 浓度变化

如表 4 所示,与正常组比较,模型组大鼠血浆 ET-1 浓度明显上升($P<0.05$),血浆 NO 浓度明显下降($P<0.05$);与模型组比较,顺经灸组和逆经灸组大鼠血浆 ET-1 浓度显著下降($P<0.05$),血浆 NO 浓度显著上升($P<0.05$),其中顺经灸组大鼠血浆 NO 浓度水平明显高于逆经灸组($P<0.05$)。

表 4 各组大鼠血浆 ET-1 及 NO 浓度($\bar{x}\pm s$,ng/L)

组别	n	ET-1	NO
正常组	8	112.26±14.62	132.60±9.79
模型组	8	131.20±9.88 ^a	102.14±7.23 ^a
顺经灸组	8	104.13±14.92 ^b	136.32±7.49 ^b
逆经灸组	8	108.82±19.48 ^b	119.46±6.34 ^{bc}

注:与正常组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与顺经灸组比较,^c $P<0.05$ 。

3 讨论

寒凝血瘀证主要表现为畏寒肢冷、口唇紫黯、舌暗淡(舌下脉络瘀曲)、大便量多质稀甚或便溏、小便清长等一系列体征和症状,其特点为“寒致瘀”。寒邪为阴邪而主收引,寒性凝滞,无论外寒还是内寒,均能导致机体血液运行不畅,而终成血瘀,其病因病机主要为:寒邪侵袭,血得寒则凝,凝则不通,不通即瘀。《诸病源候论》中指出“寒则血结,温则血消”,《素问·调经论》中也有:“气血者,喜温而恶寒,寒则泣(涩)而不行,温则消而去之。”这些古文献不但总结了以上寒凝血瘀证的病因病机,同时又启示临床治疗寒凝血瘀证的治疗原则,即温通。

艾灸疗法是传统中医中颇具特色的外治法之一,艾灸具有温经通脉、活血化瘀、补虚培本等功

效,有“灸治百病”之说,对某些病症的治疗效果更是超过了针和药^[8-9]。《千金要方灸例》中提到:“凡灸当先阳后阴,言从头向左而渐下,次后从头向右而渐下,先上后下。”《明堂》中也有:“凡病先灸于上,后灸于下,先灸于少,后灸于多,皆宜审之。”可见古代医家通过大量的临床实践总结归纳出了有关艾灸操作的方向和顺序,这在当时应该是被认为是会影响艾灸疗效的关键因素。在当代,活血化瘀被公认为是艾灸疗法最显著的作用之一,艾灸活血化瘀的作用机制与改善血液流变学异常,纠正自由基代谢紊乱,调节血管上皮细胞因子,增强机体免疫功能,稳定内环境等有关^[10-12]。

血管内皮是介于血液和血管壁组织之间的单层扁平上皮,是分割血液和组织的屏障,血管内皮细胞可通过内分泌、自分泌及旁分泌产生一系列血管活性物质,从而发挥调节血管收缩和舒张、防止血小板黏附和血栓形成、调节血管平滑肌细胞增殖以及抑制血管壁炎症反应等功能。ET 和 NO 均是血管上皮细胞分泌的血管活性物质,是调节心血管功能的重要因子,其中 ET 被认为是迄今为止最强的缩血管物质,而 NO 则是内皮细胞产生的最重要的舒血管物质。有研究表明^[13-17],艾灸可有效调节血管 ET-1 及 NO 水平,保护血管上皮功能。本实验中寒凝血瘀证动物模型的病机特点可概括为“寒则凝,凝则瘀”,模型制备过程中,模拟中医“寒则血瘀”的发病机制,给予长时间的冷刺激,结合皮下注射盐酸肾上腺素,大鼠逐渐表现出寒、瘀的表征,在经过长达 28 天的造模过程后,大鼠的整个机体都表现出瘀的病理状态,这与中医的整体观念是基本相符的,同时也说明制备寒凝血瘀证大鼠模型是成功的,而且具有中医表征特点。研究结果表明顺经灸的治疗效果优于逆经灸,这为规范临床艾灸操作流程提供了一定的实验依据,不同施灸方向作为影响艾灸疗效的关键因素之一也应予以重视,相关机制仍需开展后续研究加以解决。

参 考 文 献

[1] Su S, J Duan, W Cui, et al. Network-based biomarkers for cold coagulation blood stasis syndrome and the therapeutic effects of shaofu zhuyu decoction in rats [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013;901943.

[2] 杨佳敏,沈小雨,张玲,等. 寒凝血瘀证动物模型制备方法的评价与选择[J]. 中医学报, 2014, 29(1): 53-54.

[3] 周华妙,郭勇. 寒凝血瘀证小鼠动物模型的建立及评价[J]. 中国中医药科技, 2010, 17(1): 1-2, 7.

- [4] 滕久祥,彭芝配,郭建生,等. 九气拈痛胶囊对大鼠“寒凝血瘀”模型的影响[J]. 新中医,1998,30(11):33-34.
- [5] 尹军祥,田金洲,王永炎,等. 血瘀证模型大鼠舌象评价标准研究[J]. 北京中医药大学学报,2007,30(8):529-531,578.
- [6] 杜正彩,郝二伟,邓家刚. 寒凝血瘀证模型大鼠中医表征指标量化研究[J]. 世界中西医结合杂志,2012,7(7):566-569.
- [7] 尹军祥,田金洲,王永炎,等. 寒凝血瘀证表征模型的建立[J]. 北京中医药大学学报,2006,29(10):682-685,722.
- [8] 吴焕淦,严洁,余曙光,等. 灸法研究的若干思考[J]. 上海针灸杂志,2008,27(11):35.
- [9] 常小荣,严洁,易受乡,等. 关于灸法标准化研究的思考[J]. 世界科学技术(中医药现代化),2010,12(2):172-176.
- [10] 唐照亮,宋小鸽,王宁新,等. 艾灸活血化瘀作用机制的研究[J]. 安徽中医学院学报,2004,23(2):24-28.
- [11] 金末淑. 艾灸膈俞穴对寒凝血瘀证模型大鼠血液流变学的实验研究[D]. 北京:北京中医药大学,2009:93.
- [12] 谭琳莹,刘慧荣,吴焕淦,等. 艾灸疗法活血化瘀作用研究进展[J]. 中华中医药学刊,2009,27(2):272-274.
- [13] 陈思宇,李艳霞,唐素珍. 艾灸对寒凝血瘀证模型大鼠内皮素及一氧化氮的影响[J]. 实用中医药杂志,2011,27(5):292-293.
- [14] 杨继军,孙立虹,余延芬,等. 隔物灸对寒湿凝滞型原发性痛经患者内皮素和一氧化氮含量的影响[J]. 针刺研究,2008,33(6):409-412.
- [15] Ye X, Zhang H. Influence of moxibustion temperatures on blood lipids, endothelin-1, and nitric oxide in hyperlipidemia patients [J]. J Tradit Chin Med,2013,33(5):592-596.
- [16] Pan P, X Zhang, H Qian, et al. Effects of electro-acupuncture on endothelium-derived endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension [J]. Exp Biol Med (Maywood),2010,235(5):642-648.
- [17] Yang J J, L H Sun, Y F She, et al. Influence of ginger-partitioned moxibustion on serum NO and plasma endothelin-1 contents in patients with primary dysmenorrhea of cold-damp stagnation type[J]. Zhen Ci Yan Jiu,2008,33(6):409-412.

(收稿日期:2015-10-13)

(本文编辑:蒲晓田)