

火针和毫针干预对佐剂性关节炎模型大鼠的比较研究

曲圣元 陈荷清 车蕊 张明 刘柳青 马文珠

【摘要】 目的 探究火针和毫针干预对于佐剂性关节炎模型大鼠的影响。**方法** 实验以佐剂性关节炎(AA)模型大鼠作为研究对象,将雄性 Wistar 大鼠适应性饲养 1 周后,随机分为空白对照组、火针组、毫针组、模型对照组,每组 10 只。每隔 3 天测量各组大鼠踝部肿胀情况、体质量变化并进行疼痛测量评定。在造模后第 28 天每组随机处死 2 只大鼠,观察左侧踝关节组织切片和足三里部位组织切片。**结果** 40 只大鼠均进入结果分析。火针组、毫针组大鼠经针刺后左踝直径与模型对照组比较有显著性降低($P<0.05$),关节疼痛评分与模型对照组比较也有显著性降低($P<0.05$)。踝关节切片也可见局部组织炎症反应得到改善,观察足三里部位组织切片可见火针针刺可对肌肉组织造成损伤,但愈合较好。**结论** 火针和毫针干预对于佐剂性关节炎大鼠的症状改善有一定作用,两种针刺方式对肌肉组织损伤较小且愈合良好。

【关键词】 针灸; 火针; 佐剂性关节炎模型

【中图分类号】 R245.3 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.11.006

基金项目: 2015 国家级创新训练项目(201510026033)

作者单位: 100029 北京中医药大学针灸推拿学院[曲圣元(本科生)、陈荷清、车蕊、张明、刘柳青、马文珠]

作者简介: 曲圣元(1994-),女,2012 级在读本科生。研究方向: 影响针灸效应相关参数的研究。E-mail: 497984361@qq.com

通讯作者: 马文珠(1960-),女,硕士,教授。研究方向: 影响针灸效应相关参数的研究。E-mail: mawenzhu@139.com

Comparative study of fire needle and filiform needle on adjuvant arthritis model rats QU Sheng-yuan, CHEN He-qing, CHE Rui, et al. *Institute of acupuncture and tuina, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China*

Corresponding author: MA Wen-zhu, E-mail: mawenzhu@139.com

【Abstract】 Objective To explore and compare the influence of fire needle and filiform needle on adjuvant arthritis model rats. **Methods** Adjuvant arthritis (AA) model rats were used for this study. After the male Wistar rats were allowed to acclimate for 1 week, the rats were randomly divided into normal group, AA model group, acupuncture needle group, fire needle group, 10 rats in each group. The swelling rate of ankle, weight, joint pain score of each group were measured every 3 days. 28 days after the molding, 2 rats were sacrificed in each group randomly, the tissue section of the left ankle joint and “Zusanli” were observed. **Results** Totally 40 rats were involved in the result analysis. Compared with the model group, the left ankle diameter and joint pain score of the filiform needle and fire needle group were decreased significantly ($P < 0.05$). Pathology of the joint indicated that acupuncture has the effect of relieving the inflammation; pathology of “Zusanli” showed that fire needle may damage the muscle, but well healed. **Conclusion** Fire needle and filiform needle has a certain effects on improving the symptoms of adjuvant arthritis model rats, the two methods have small damage to the muscle and good healing.

【Key words】 Acupuncture; Fire needle; Adjuvant arthritis model

1 材料与方法

1.1 动物与分组

雄性 Wistar 大鼠 50 只, 体质量 (190 ± 10) g, 清洁级, 由北京维通利华实验动物中心提供 [许可证号: SCXK(京)2012-0001], 室温 (23 ± 1) °C。适应性饲养 1 周后, 将 50 只大鼠随机分为空白对照组、造模组, 其中空白对照组 10 只, 造模组 40 只, 将造模成功的 30 只大鼠随机分为模型对照组、火针组、毫针组。实验过程中对动物的处置符合 2006 年科技部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》规定。

1.2 主要实验试剂与仪器

完全弗氏佐剂 (美国 Sigma 公司)、电子秤 (北京健力园公司)、针灸针 (华佗牌, $0.30 \text{ mm} \times 13 \text{ mm}$)、师氏火针 (北京健乐康公司, $0.5 \text{ mm} \times 75 \text{ mm}$)、 0.02 游标卡尺、半自动轮转式切片机 [(德国徕卡 (Leica) 仪器有限公司)、自动化智能型正置研究级显微镜 (奥林巴斯有限公司)]。

1.3 模型制备

将造模组大鼠固定后暴露后肢, 从大鼠左后足跖底部向踝关节方向注射完全弗氏佐剂 0.1 mL ^[1], 注射后 6 小时可见后爪红肿, 出现梭形趾, 踝关节活动受限, 三足跛行, 48 小时可见全身多发性关节炎, 表现为前后肢、耳部、尾部红肿或炎性结节, 并出现体质量下降和滑膜炎反应的病理表现^[2]。造模成功, 其中 30 只大鼠造模稳定, 将其随机分为模型对照组、火针组、毫针组, 每组 10 只。空白组处理方法

与其他组相同, 仅以 0.1 mL 0.9% 氯化钠溶液代替完全弗氏佐剂。

1.4 取穴

参照教材《实验针灸学》^[3] 的大鼠标准穴位图谱定位取足三里穴、申脉穴。足三里穴: 膝关节后外侧, 腓骨小头下约 5 mm 处。申脉穴: 后肢外踝正下方凹陷中。

1.5 干预方法

空白对照组: 将大鼠固定后, 暴露后肢, 不予以任何操作; 模型对照组: 将大鼠固定后, 暴露后肢, 不予以任何操作; 火针组: 造模后第 6 天, 将大鼠固定, 暴露后肢, 用 $0.5 \text{ mm} \times 75 \text{ mm}$ 细火针烧红后迅速点刺左侧足三里、申脉穴, 点刺深度 2 mm , 3 天治疗一次, 共治疗 7 次; 毫针组: 造模后第 6 天, 将大鼠固定, 暴露后肢, 用 $0.3 \text{ mm} \times 13 \text{ mm}$ 毫针针刺左侧足三里、申脉穴, 留针 20 分钟, 3 天治疗一次, 共治疗 7 次。

1.6 观察指标及检测方法

(1) 一般情况及体质量测定: 一般情况观察各组大鼠活动度、皮毛色泽、粪便、左侧踝关节的变化; 体质量测定为造模日及开始治疗后每隔 3 天测量各组大鼠体质量。(2) 踝关节直径: 测定大鼠左侧踝关节外踝尖至内踝尖距离。在每次治疗前将大鼠固定后暴露后肢, 用 0.02 mm 游标卡尺外测量爪分别对准大鼠左踝关节外踝尖与内踝尖, 读数即为大鼠左侧踝关节直径。(3) 关节疼痛评分测定: 将大鼠固定后暴露后肢, 稳定 10 分钟后进行测定。缓慢屈伸大鼠左侧踝关节, 10 秒内完成一次, 共 5

次。若大鼠无嘶叫或短促而明显的缩腿反应则评分为 0;若出现嘶叫或短促而明显的缩腿反应则评分为 1;嘶叫和短促而明显的缩腿反应两种反应均出现则评分为 2^[4]。(4)关节组织病理切片观察:在造模后第 28 天,用 10% 水合氯醛(0.4 mL/100 g)腹腔麻醉后于腹主动脉抽血处死。分离大鼠左侧踝关节,去除皮毛肌肉,分别在距关节两侧约 0.3 cm 处剪断骨干,放入 4% 多聚甲醛固定、5.6% EDTA-2Na 脱钙后,进行石蜡包埋、组织切片,常规 HE 染色,光镜下观察。(5)足三里部位切片观察:大鼠麻醉处死后去除左侧足三里部位皮毛,取 1 cm×1 cm 横截面的肌肉,厚度约 0.5 cm。4% 多聚甲醛固定后,进行石蜡包埋、组织切片,然后常规 HE 染色,光镜下观察。

1.7 统计学处理

所有数据采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间差异采用单因素方差分析,继以 LSD 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠的一般情况及体质量变化

(1)一般情况:空白对照组大鼠无明显变化,各造模组与空白对照组相比,体质量下降,精神萎靡,皮毛晦暗,粪便稀溏,活动减少,三足跛行,有舔舐左后足行为。其踝关节 6 小时左右出现红、肿、热症状,但治疗后各组与模型对照组相比,一般情况有所改善,进食增加,便溏情况改善,活动增加;(2)体质量变化:各组大鼠在实验过程中体质量变化均值总体呈上升趋势。与空白对照组相比,造模后第 6 天各造模组大鼠体质量均明显下降($P < 0.05$),造模后第 21 天火针组与空白对照组相比无显著性差异,毫针组、模型组与空白对照组相比仍有差异($P < 0.05$)。说明大鼠体质量增长受到造模影响而降低,造模成功。与模型对照组相比,火针组和毫针组大鼠体质量并未有显著性降低($P > 0.05$)。

2.2 各组大鼠踝部直径变化

各造模组大鼠在实验过程中左踝部直径变化均值总体呈下降趋势。与空白对照组相比,造模后大鼠左后足肿胀明显,踝部直径明显增大,直至造模后第 24 天治疗结束后各造模组踝直径仍显著性增加($P < 0.05$),提示造模成功。与模型对照组相比较,从造模 15 天后开始,火针组和毫针组大鼠左踝

显著性降低($P < 0.05$),但火针组与毫针组两组间比较差异并无统计学意义($P > 0.05$),说明火针及毫针治疗对于 AA 大鼠踝部肿胀情况有所缓解,但治疗 24 天后仍不能完全治愈,且两种治疗方式对于踝部肿胀改善并无明显差异。

2.3 各组大鼠疼痛评分测定

各造模组与空白对照组大鼠相比,造模后大鼠屈伸疼痛评分显著性增加($P < 0.05$),提示造模成功。与模型对照组相比较,从造模后第 18 天开始,毫针组疼痛评分有显著性降低($P < 0.05$),造模后第 24 天火针组疼痛评分显著性降低($P < 0.05$),而两组治疗组组间比较无显著性差异($P > 0.05$),说明火针及毫针治疗对于 AA 大鼠踝部肿胀情况有所缓解,治疗 24 天后仍不能完全治愈,且毫针的缓解疼痛效果早于火针。空白对照组在造模第 15 天测定时组内大鼠均未出现嘶叫或短促而明显的缩腿反应,故数据为 0。

2.4 关节组织病理切片观察

空白对照组踝关节 HE 染色切片中可见软骨面光滑,平整而清晰;软骨细胞大小较为均匀清楚,细胞形态完整,排列有序,无明显炎性细胞浸润,也无新生小血管。模型对照组的踝关节切片中可见软骨表面粗糙、不平整,部分出现剥脱;局部软骨细胞发生凝固性坏死,软骨细胞核发生固缩、碎裂、溶解,切片显示有坏死残留的无细胞区;坏死灶周围有部分软骨细胞反应性增生,形成排列紊乱的软骨细胞团;局部组织中可见炎性细胞浸润以及新生的小血管,提示造模成功。毫针组的踝关节切片则可见软骨的表面较为光滑而连续,稍有不平整;有局部软骨组织发生坏死而形成点状的红染无细胞区;在坏死组织周围有软骨细胞发生增生性反应,形成大小不等的软骨细胞团;还有少量炎性细胞浸润。火针组的踝关节切片也可见软骨的表面较为光滑,连续,有部分不平整;此外切片显示有部分软骨组织坏死,存在点状、片状的红染无细胞区;还有软骨细胞增生形成的大小不等的新生软骨细胞,以及少量炎性细胞浸润和新生的小血管,提示火针及毫针干预均能改善 AA 大鼠踝关节局部炎性反应,且两种干预方式无显著差异,见图 1。

2.5 足三里部位切片观察

足三里穴位于胫骨前肌上,属骨骼肌,空白对照组肌纤维排列整齐,少有分支,表面光滑;肌细胞核位于肌纤维周缘,呈椭圆形,核仁明显;模型

表 1 各组大鼠不同时间平均体质量测定结果

组别	造模日	造模后 6 天	造模后 9 天	造模后 12 天	造模后 15 天	造模后 18 天	造模后 21 天	造模后 24 天
空白对照组	248.46±6.51	291.40±13.13	301.61±13.81	321.29±18.82	330.15±17.79	344.85±20.92	356.58±20.32	367.92±21.32
模型对照组	251.97±13.38	264.49±19.30 ^a	278.70±18.47 ^a	295.73±21.7 ^a	303.31±22.18 ^a	323.02±28.26 ^a	327.83±21.78 ^a	340.26±22.01 ^a
火针治疗组	255.90±17.46	269.25±20.41 ^a	275.18±21.49 ^a	298.56±23.54 ^a	304.64±25.04 ^a	318.53±26.22 ^a	333.98±27.11	346.64±26.17
毫针治疗组	241.41±21.03	257.97±28.06 ^a	268.79±34.00 ^a	287.58±36.26 ^a	296.22±35.65 ^a	310.47±32.8 ^a	326.78±32.28 ^a	342.70±33.15 ^a

注：与空白对照组同期比较，^a $P<0.05$ 。

表 2 各组大鼠不同时间平均左踝直径测定结果

组别	造模后 6 天	造模后 9 天	造模后 12 天	造模后 15 天	造模后 18 天	造模后 21 天	造模后 24 天
空白对照组	8.206±0.661	8.092±0.704	8.114±0.452	8.536±0.363	8.404±0.257	8.406±0.516	8.384±0.391
模型对照组	11.692±0.579 ^a	12.344±0.420 ^a	12.100±0.473 ^a	12.210±0.345 ^a	11.813±0.485 ^a	11.320±0.530 ^a	11.164±0.504 ^a
火针治疗组	12.132±0.301 ^a	11.922±0.460 ^a	11.860±0.326 ^a	11.532±0.385 ^{abc}	11.290±0.121 ^{ab}	10.884±0.370 ^{ab}	10.430±0.500 ^{ab}
毫针治疗组	11.976±0.538 ^a	11.756±0.538 ^{ab}	11.768±0.600 ^a	11.144±0.345 ^{abc}	10.922±0.490 ^{ab}	10.804±0.381 ^{ab}	10.330±0.564 ^{ab}

注：与空白对照组同期比较，^a $P<0.05$ ；与模型对照组同期比较，^b $P<0.05$ ；火针组与毫针组同期比较，^c $P<0.05$ 。

表 3 各组大鼠不同时间平均疼痛评分测定结果

组别	造模后 6 天	造模后 9 天	造模后 12 天	造模后 15 天	造模后 18 天	造模后 21 天	造模后 24 天
空白对照组	0.1±0.316	0.6±1.578	0.2±0.422	0	0.1±0.316	0.2±0.422	0.3±0.483
模型对照组	4.4±2.914 ^a	4.6±3.373 ^a	3.0±1.247 ^a	5.5±2.635 ^a	5.7±1.767 ^a	3.6±1.578 ^a	5.6±1.647 ^a
火针治疗组	3.3±1.829 ^a	4.4±3.170 ^a	3.8±2.486 ^a	1.9±1.595 ^a	2.3±1.494 ^a	1.8±1.033 ^a	2.4±1.350 ^{ab}
毫针治疗组	4.5±2.506 ^a	3.9±2.601 ^a	2.5±1.434 ^a	3.5±2.759 ^a	1.9±0.994 ^{ab}	1.4±0.700 ^{ab}	2.0±2.310 ^{ab}

注：与空白对照组同期比较，^a $P<0.05$ ；与模型对照组同期比较，^b $P<0.05$ 。

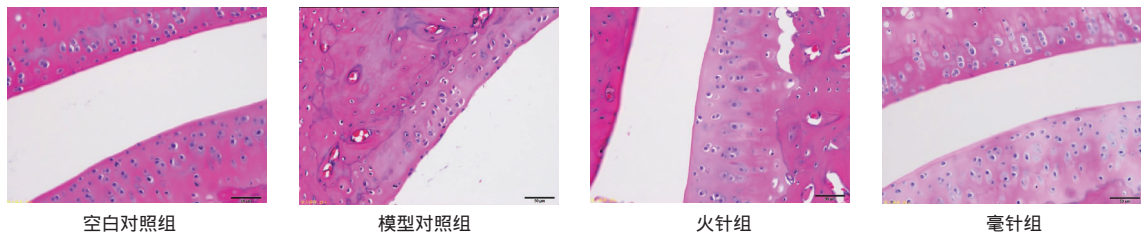


图 1 各组大鼠踝关节组织 HE 染色切片(×40)

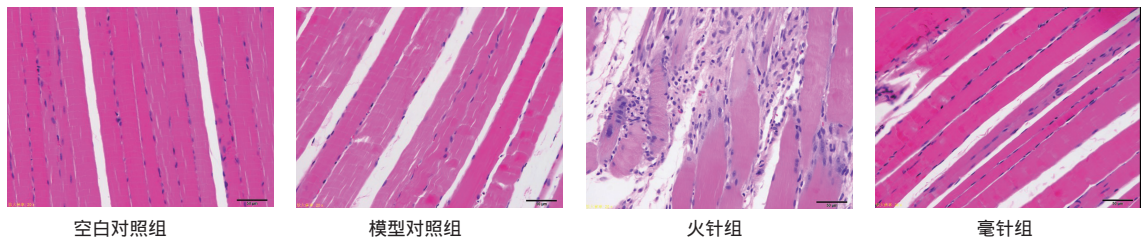


图 2 各组大鼠足三里部位组织 HE 染色切片(×40)

组可见肌纤维排列略杂乱,肌纤维间界限较模糊,表面不光滑;散见少量红细胞,分析认为肌肉受造模影响,出现少量红细胞可能与取材时操作有关;毫针组肌纤维排列较整齐,表面较光滑,程度介于空白组和模型组之间;肌细胞核位于肌纤维周缘,呈椭圆形,核仁明显;红细胞极少,说明针刺对造模造成的肌肉损伤可能有缓解作用,且无明显局部损伤;火针组可见肌纤维断裂、扭曲,排列无规则;肌细胞核少见,位于肌纤维周缘,呈椭圆形,核仁明

显;肌纤维周围可见肉芽组织;散见新生小毛细血管、大量成纤维细胞、炎性细胞浸润,说明火针对于施针部位的局部组织有所损伤,但愈合良好,见图 2。

3 讨论

类风湿关节炎属于中医“痹症”范畴,临床中多选用患部局部及经脉所过的临近穴位^[5]。申脉位于足太阳膀胱经,为八脉交会穴之一,通于阳跷脉。

膀胱经主一身之阳气,且申脉为阳跷所发,可调一身之阳,运行气血,濡养肢节,故善治疗四肢疾患,尤以下肢疾患居多^[6];足三里为胃经之合穴,土经之土穴,土属中焦脾胃,能促进机体的各种特异性和非特异性免疫功能^[7]。《针灸大成·治症总要》中提到脚弱无力先取“公孙、三里、绝骨、申脉”^[8],故本实验选择申脉、足三里穴两穴。

本实验通过制备 AA 大鼠模型,测定各组大鼠体质量、踝直径、疼痛评分并观察踝关节和针刺部位切片。研究结果显示,与空白对照组相比,各造模组大鼠踝关节直径相对增加,提示踝关节局部发生炎症性出血,有血液成分渗出。造模后大鼠关节屈伸疼痛评分显著性增加,说明局部的渗出物和炎性介质作用于神经末梢产生了炎症性疼痛^[3]。踝关节 HE 染色切片可见软骨表面不平整、局部可见炎性细胞浸润,其组织学特点与人类类风湿性关节炎病理改变基本一致,说明本实验制备的慢性佐剂性关节模型复制获得成功。与模型对照组相比,火针及毫针组大鼠一般情况有所改善,但体质量并没有显著差异,说明体质量尚不能作为判断症状缓解的指标。火针和毫针针刺后踝关节直径降低,说明针刺干预对 AA 大鼠踝关节肿胀有缓解作用,两种方式无显著性差异;火针及毫针干预后疼痛评分降低,说明针刺可以缓解疼痛症状,毫针的缓解疼痛效果早于火针,可能与火针造成肌肉损伤有关。毫针针刺后缓解疼痛症状,可能与激发了中枢神经系统中镇痛物质而产生了调节功能有关^[9],针刺后白介素 1、白介素 6、肿瘤坏死因子- α 、 β -内啡肽等多种炎性介质水平由异常升高趋向正常范围,能促进炎症局部渗出物的吸收,减轻和消除炎症水肿,抑制病变的进展,从而减轻局部炎症反应,同时针刺对于免疫紊乱炎症反应也有良性应激作用^[10],《灵枢·刺节真邪》曰:“用针之类,在于调气”,针刺的双向调节作用可以有利于治疗疾病,达到“阴平阳秘,精神乃至”的状态。对皮质醇的分泌影响、对自由基的影响^[11]、提高疼痛阈值也可能是针刺治疗类风湿性关节炎的机制。火针结合了毫针与艾灸疗法,有消肿止痛、活血化瘀、化湿除痹的作用,火针点刺可以加快局部血液循环,有消退关节肿胀疼痛的效果,文献表明火针镇痛后效应可维持 2~4 小时,长于毫针针刺^[2]。其治疗类风湿性关节炎的机制除了与毫针针刺重合之外,还可以加快新陈代谢速

率、激活机体的应激性反应。但是相对于毫针针刺,火针可能留下烧伤痕迹和瘢痕,《针灸聚英》谓“切忌妄行火针于两脚内及足”,因此使用火针疗法应注意操作规范和使用禁忌。踝关节切片中可见软骨表面较为光滑、稍有不平整,局部也可见少量炎性细胞浸润、软骨细胞增生,证明两种干预方式对于佐剂性关节炎大鼠症状有所缓解,且无明显差异。观察足三里部位组织切片可见毫针组大鼠肌纤维较整齐,火针组肌纤维断裂扭曲,排列无规则,可见成纤维细胞、炎性细胞浸润,说明火针针刺可能对施针部位的局部组织有所损伤,但愈合良好。火针和毫针都是类风湿性关节炎治疗中的优势方案,在临床中有更好的运用前景,其治疗机制有待进一步深入研究,使其在临床中应用更加完善。

参 考 文 献

- [1] Huang C, Hu Z P, Long H, et al. Attenuation of mechanical but not thermal hyperalgesia by electroacupuncture with the involvement of opioids in rat model of chronic inflammatory pain [J]. Brain Research Bulletin, 2004, 63(2): 99-103.
- [2] 张传英,邵芙蓉,蔡荣林,等. 艾灸对类风湿性关节炎大鼠关节滑膜组织转录信号转导因子 1、细胞因子信号负调控因子基因表达的影响[J]. 针刺研究, 2015, 40(3): 205-209.
- [3] 张露芬. 实验针灸学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 221-222.
- [4] 黄怡然. 单穴和双穴电针对慢性佐剂性关节炎模型大鼠相关细胞因子影响的研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2010.
- [5] 杨介宾,宋开源,梁繁荣,等. 针灸疗法对佐剂性关节炎大鼠外周镇痛机理的研究[J]. 中国针灸, 1999, 6: 364.
- [6] 申伟,汤继芹,张永臣. 申脉穴古代主治病证及刺灸特点分析[J]. 四川中医, 2015, 33(3): 21-22.
- [7] 施茵,吴焕淦. 足三里穴在免疫功能调节中的应用[J]. 现代中医药, 2003, (3): 3-5.
- [8] 明·杨继洲. 针灸大成[M]. 靳贤,补辑重编. 黄龙祥,整理. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 328-332.
- [9] 唐成林. “缪刺法”对佐剂性关节炎大鼠的镇痛效应及机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2008.
- [10] 李辉,李晓泓,张露芬,等. 电针“大椎”“命门”对佐剂性关节炎大鼠应激相关因子影响的实验研究[J]. 针刺研究, 2006, 31(1): 8-11.
- [11] 孙云廷. 针灸治疗类风湿性关节炎动物实验研究进展[J]. 光明中医, 2007, 22(2): 51-53.

(收稿日期: 2016-05-30)

(本文编辑: 董历华)