

刺血疗法结合壮医药线点灸对急性痛风性关节炎大鼠TLRs/MyD88 信号通路的影响



扫描二维码
查看原文

朱丹萌¹, 黄玉莹¹, 罗统安¹, 贺长源¹, 陈日兰^{2*}

【摘要】 背景 随着环境及人们饮食结构的改变,急性痛风性关节炎(AGA)已成为临床常见疾病,AGA易反复发作对患者健康造成危害,临床工作中刺血疗法结合壮医药线点灸对AGA有确切的疗效,但其作用机制尚未明确。目的 基于Toll样受体(TLRs)/髓样分化因子88(MyD88)信号通路探讨刺血疗法结合壮医药线点灸治疗AGA的作用机制。方法 实验时间为2021年5月—2022年3月,将60只SD大鼠随机分为空白组、模型组、刺血组、药线组、秋水仙碱组、刺血结合药线组,每组10只。除空白组外,其余各组均将尿酸钠悬浮液注入大鼠右踝关节腔内制备AGA模型,于造模24h后秋水仙碱组予秋水仙碱悬浮液灌胃治疗,刺血疗法组予阿是穴点刺放血治疗,药线组予壮医药线围灸病灶处,刺血结合药线组先予阿是穴点刺放血再行围灸法。观察造模后6、12、24、72h右踝关节肿胀程度;苏木素-伊红染色观察右踝关节滑膜组织病理改变;采用酶联免疫吸附试验检测大鼠血清中白介素(IL)-10、IL-8及环氧合酶2(COX-2)水平;蛋白质印迹法检测右踝关节滑膜组织中MyD88和IKK-β蛋白表达。结果 模型组、刺血组、药线组、秋水仙碱组造模后6、12、24、48、72h右踝关节外踝横截面直径均高于空白组,刺血结合药线组造模后6、12、24、48h右踝关节外踝横截面直径高于空白组,刺血组、药线组、秋水仙碱组、刺血结合药线组造模后48、72h右踝关节外踝横截面直径低于模型组($P<0.05$)。刺血组、药线组、秋水仙碱组及刺血结合药线组右踝关节其炎性细胞的浸润情况较模型组有所改善。模型组、刺血组、药线组、秋水仙碱组以及刺血结合药线组大鼠IL-8、COX-2水平高于空白组,IL-10水平低于空白组,秋水仙碱组、刺血结合药线组、刺血组、药线组IL-8、COX-2水平低于模型组,IL-10水平高于模型组,刺血组、药线组大鼠IL-8、COX-2水平高于秋水仙碱组,IL-10水平低于秋水仙碱组,刺血组、药线组大鼠IL-8、COX-2水平高于刺血结合药线组,IL-10水平低于刺血结合药线组($P<0.05$)。模型组、药线组、刺血组、刺血结合药线组MyD88、IKK-β水平高于空白组,秋水仙碱组MyD88水平高于空白组,药线组、秋水仙碱组MyD88、IKK-β水平低于模型组,刺血组、刺血结合药线组MyD88水平低于模型组($P<0.05$)。结论 刺血疗法结合壮医药线点灸能通过调节TLRs/MyD88信号通路来改善AGA关节炎性症状,起到治疗作用,刺血疗法结合壮医药线点灸可能是AGA的潜在替代疗法。

【关键词】 关节炎, 痛风性; 壮族医药学; 壮医药线点灸疗法; 髓样分化因子88; TLRs/MyD88信号通路; 大鼠

【中图分类号】 R 589.7 R 291.8 **【文献标识码】** A DOI: 10.12114/j.issn.1007-9572.2022.0775

【引用本文】 朱丹萌, 黄玉莹, 罗统安, 等. 刺血疗法结合壮医药线点灸对急性痛风性关节炎大鼠TLRs/MyD88信号通路的影响[J]. 中国全科医学, 2023, 26(20): 2525-2531. DOI: 10.12114/j.issn.1007-9572.2022.0775. [www.chinagp.net]

ZHU D M, HUANG Y Y, LUO T A, et al. Effect of pricking-bloodletting therapy combined with Zhuang-medicine-thread moxibustion on TLRs/MyD88 signal pathway in a rat model of acute gouty arthritis [J]. Chinese General Practice, 2023, 26(20): 2525-2531.

Effect of Pricking-bloodletting Therapy Combined with Zhuang-medicine-thread Moxibustion on TLRs/MyD88 Signal Pathway in a Rat Model of Acute Gouty Arthritis ZHU Danmeng¹, HUANG Yuying¹, LUO Tong'an¹, HE Changyuan¹, CHEN Rilani^{2*}

1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China

2. Department of Acupuncture and Moxibustion, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China

*Corresponding author: CHEN Rilani, Chief physician/Professor; E-mail: lanlani10000@163.com

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81960908); 广西中医药大学2021年研究生教育创新计划项目(YCXJ2021092) 1.530001 广西壮族自治区南宁市, 广西中医药大学 2.530011 广西壮族自治区南宁市, 广西中医药大学附属瑞康医院针灸科

*通信作者: 陈日兰, 主任医师/教授; E-mail: lanlani10000@163.com

本文数字出版日期: 2022-11-28

【 Abstract 】 Background With the change of people's environment and diet structure, acute gouty arthritis (AGA) has become a common clinical disease, which is prone to recurrence, causing harm to patients' health. Pricking-bloodletting therapy combined with Zhuang-medicine-thread moxibustion (moxibustion with a thread prepared with Zhuang herbal medicine) has proven to have a definite therapeutic effect on AGA clinically, but the mechanism of action is not very clear. **Objective** To assess the effect of pricking-bloodletting therapy combined with Zhuang-medicine-thread moxibustion on toll-like receptors/myeloid differentiation factor 88 (TLRs/MyD88) signal pathway in a rat model of AGA to explore the mechanism of action of this treatment in AGA. **Methods** The experiment lasted from May 2021 to March 2022, sixty SD rats were equally randomized into 6 groups: blank group, model group, pricking-bloodletting group, medicated thread group, colchicine group and pricking-bloodletting with medicated thread group. Except for the blank group, the other groups received sodium urate suspension injected into the right ankle cavity to prepare the AGA model. Twenty-four hours after the modelling, colchicine group received intragastric administration of colchicine suspension, pricking-bloodletting group received bloodletting after pricking the Ashi acupoint with a needle, medicated thread group received Zhuang-medicine-thread moxibustion at the site of lesion, and pricking-bloodletting with medicated thread group first received bloodletting after pricking the Ashi acupoint with a needle, then Zhuang-medicine-thread moxibustion at the site of lesion. The swelling degree of the right ankle joint was observed at 6, 12, 24 h and 72 h after modeling. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the pathological changes of the synovium of the right ankle joint. The serum levels of interleukin (IL)-10, IL-8 and cyclooxygenase-2 (COX-2) were determined by ELISA. The expressions of MyD88 and IKK- β in the synovium of the right ankle were detected by western blotting. **Results** The transverse diameter of right lateral malleolus in model group, pricking-bloodletting group, medicated thread group or colchicine group was larger than that in blank group at 6, 12, 24, 48 h and 72 h after modeling ($P<0.05$). The transverse diameter of right lateral malleolus in pricking-bloodletting with medicated thread group was larger than that in blank group at 6, 12, 24 h and 48 h after modeling ($P<0.05$). The transverse diameter of the right lateral malleolus of the pricking-bloodletting group, medicated thread group, colchicine group or pricking-bloodletting with medicated thread group was smaller than that of the model group at 48 h and 72 h after modeling ($P<0.05$). Compared with model group, the inflammatory cell infiltration of right ankle in pricking-bloodletting group, medicated thread group, colchicine group and pricking-bloodletting with medicated thread group was improved. The blank group had lower levels of IL-8 and COX-2 and higher level of IL-10 than each of the other 5 groups ($P<0.05$). The model group had higher levels of IL-8 and COX-2 and lower level of IL-10 than colchicine group, pricking-bloodletting with medicated thread group, pricking-bloodletting group or medicated thread group ($P<0.05$). The colchicine group had lower levels of IL-8 and COX-2 and higher level of IL-10 than pricking-bloodletting group or medicated thread group ($P<0.05$). The pricking-bloodletting with medicated thread group had lower levels of IL-8 and COX-2 and higher level of IL-10 than pricking-bloodletting group or medicated thread group ($P<0.05$). The blank group had lower level of MyD88 than each of the other 5 groups ($P<0.05$). The blank group had lower level of IKK- β than model group, medicated thread group, pricking-bloodletting group or pricking-bloodletting with medicated thread group ($P<0.05$). The model group had higher IKK- β level than medicated thread group or colchicine group ($P<0.05$). The model group had higher MyD88 level than medicated thread group, colchicine group, pricking-bloodletting group or pricking-bloodletting with medicated thread group ($P<0.05$). **Conclusion** Pricking-bloodletting with Zhuang-medicine-thread moxibustion is effective in improving the symptoms of AGA by regulating the TLRs/MyD88 signaling pathway, which may be a potential alternative therapy for AGA.

【 Key words 】 Arthritis, gouty; Chuang medicine; Zhuang thread moxibustion therapy; Myeloid differentiation factor 88; TLRs/MyD88 signal pathway; Rats

痛风性关节炎 (GA) 是一种代谢性疾病, 是由于尿酸钠晶体 (MSU) 沉积在关节腔引起的关节炎^[1], 急性发作时常表现为病变关节红肿、局部皮肤温度升高、疼痛剧烈, 具有起病急、易反复、预后差的特点。在我国大约有 1.1% 的人口患有 GA^[2], 发病率逐年升高^[3], 并且年轻化趋势越发明显。有研究表明, 随着 GA 发病率的上升, 并发肥胖、高血压、高血脂症、糖尿病等疾病的概率升高^[4-5], 严重影响患者的健康、生活质量, 造成沉重的经济负担^[6]。

中医认为 GA 急性发作时其病机主要为毒热、痰湿交结于关节, 以实热证为主。刺血疗法是中医外治疗法中的一种, 即在病变部位迅速点刺以泄出一定量的血液来达到泄热、活血化痰作用。壮医药线点灸为极具岭南地区特色的一种民族医药疗法, 选取相关穴位利用壮医药线来进行点灸, 通过药线的温热及药效对穴位进行刺激, 使通路传导通畅、三气复归同步来引热外出、散瘀活血、消炎止痛等。

Toll 样受体 (TLRs) / 髓样分化因子 88 (MyD88)

信号通路调控着 GA 的发生发展^[7], GA 急性发作时 MSU 直接激活 TLR, 激活的 TLR 可通过 MyD88 的 C 端 Toll/ 白介素 -1 受体 (TIR) 结构域形成复合物, 最终激活核因子 κ B (NF- κ B)^[8]。NF- κ B 被活化后, 启动相关基因的转录, 促进炎症细胞因子的释放, 不断增强放大炎症反应。IKK- β 在 NF- κ B 激活的过程中作为关键元件和双向调节分子, 在整个信号通路的表达当中起到至关重要的调节作用。有研究表明薊痹历节清方具有很好的降尿酸效果, 同时还可减轻痛风关节的局部炎症, 其干预靶点为 TLR4、MyD88、IKK- β 和 NF- κ B 抑制物 α 同分异构体 (IKK- α)^[9]。壮医药线灸及刺血疗法对 GA 具有确切的疗效可能是其通过上调局部抗炎因子来发挥其抗炎作用, 减少炎症细胞浸润, 改善 GA 局部组织坏死, 促进受损关节功能恢复^[10-12]。在本研究中通过将尿酸钠悬浮液注入关节腔构建急性痛风性关节炎 (AGA) 大鼠模型, 探讨基于 TLRs/MyD88 信号通路上刺血疗法以及壮医药线灸对 AGA 的治疗作用和抗炎机制。无论是刺血疗法亦或是壮医药线灸, 其操作均十分简便, 具有显著的疗效, 不良反应较小, 经济负担较轻, 尤为适合在基层医院推广。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 2021 年 5 月—2022 年 3 月选取 SPF 级 SD 雄性大鼠 60 只, 体质量 (200±20) g, 购于湖南斯莱克公司 [实验动物许可证号: SCXK (湘) 2019-0004]。本研究取得广西中医药大学伦理委员会批准 (DW20210426-055)。实验大鼠均分笼饲养于广西中医药大学科学实验中心动物实验室, 饲养条件: 室温 (22±1) °C, 湿度 (50±10) %, 实行 12 h : 12 h 光暗照明循环, 保持动物房环境安静, 饲养期间自由进食饮水, 定期清洁、消毒。

1.1.2 实验试剂 秋水仙碱 (合肥博美生物科技有限公司, 货号: QC8624); 尿酸钠 (美国 Sigma-Aldrich 公司, 货号: U2875); 苏木素-伊红 (HE) 染色试剂盒 (武汉百仟度生物科技有限公司, 货号: B1002); 环氧酶 2 (COX-2) (货号: RA22955)、白介素 (IL)-8 (货号: RA20553)、IL-10 (货号: RA20090) 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒购自 Biowamp 公司; BCA 蛋白定量试剂盒购自 BIOSHARP 公司 (货号: BL521A); MyD88 (货号: bs-1047R)、IKK- β (货号: bs-4880R) 抗体购于北京博奥森生物技术有限公司; GAPDH (货号: 60004-1-Ig) 购于武汉三鹰生物技术有限公司; 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 (货号: A0208)、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 (货号: A0216) 均购于上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物分组 适应性饲养 7 d 后, 将 60 只大鼠随机分为 6 组: 空白组、模型组、刺血组、药线组、秋水仙碱组、刺血结合药线组, 每组 10 只。

1.2.2 AGA 大鼠模型制备 将 0.9% 氯化钠溶液 0.2 mL 注射至空白组大鼠右侧踝关节腔内。将剩余 4 组大鼠放至小动物麻醉机中, 吸入异氟烷麻醉后抽取 0.2 mL 的尿酸钠悬浮液, 于大鼠右侧踝关节后侧 30°~40° 方向进针进入关节腔, 针下有明显的落空感时将尿酸钠悬浮液注入到关节腔内, 踝关节对侧关节囊鼓起即为 AGA 大鼠造模成功。

1.2.3 右踝关节内外踝横截面直径 观察造模 6、12、24、48、72 h 后右踝关节肿胀度, 在干预治疗前采取游标卡尺测量各组大鼠右踝关节内外踝横截面直径, 每只大鼠连续测量右踝关节 3 次, 读取数值取平均值并记录。

1.2.4 干预治疗方式 于造模 24、48、72 h 后进行干预治疗, 每次治疗前对大鼠进行称重, 灌胃标准为每 100 g 给药 1 mL。秋水仙碱组给予 5% 秋水仙碱混悬液进行灌胃; 刺血组选取 AGA 大鼠右踝关节局部最肿胀点即阿是穴, 用 6 号注射针头在该处进行点刺放血, 放血量约为 0.1 mL。药线组沿着大鼠阿是穴采用壮医梅花围灸法进行药线灸, 即以阿是穴为中心点, 围着中心点环形均匀点灸 6 壮。刺血结合药线组则为两种治疗方法结合进行治疗, 操作方法与刺血组和药线组一致, 即在阿是穴处先进行刺血疗法后再进行壮医梅花围灸法治疗。除秋水仙碱组以外的各组大鼠均以等量纯水灌胃。

1.2.5 大鼠标本采集 末次干预治疗结束后, 腹腔注射 10% 水合氯醛对大鼠麻醉后于腹主动脉采血, 4 °C, 3 000 r/min (离心半径 8 cm), 离心 15 min, 取上清液放入 -80 °C 冰箱冻存。取血结束后立即处死大鼠, 充分打开右踝关节腔, 可看到关节软骨下的淡黄透亮光滑有韧性的组织, 即为关节滑膜, 每组随机选取 7 只大鼠右踝关节滑膜组织放至冻存管保存于液氮中用于蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测, 将剩下 3 只大鼠右踝关节取下后, 放至离心管中, 加入 4% 的多聚甲醛溶液使组织固定用于 HE 染色。

1.2.6 右踝关节滑膜组织病理改变 将固定好的大鼠右踝关节依次梯度乙醇进行脱水, 将样品包埋在石蜡中并切片。按照 HE 染色试剂盒说明书步骤进行操作, 中性树脂胶封片, 显微镜下观察右踝关节滑膜组织病理改变。

1.2.7 血清 IL-8、IL-10、COX-2 水平 按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作, 检测各组大鼠血清 IL-8、IL-10、COX-2 水平。

1.2.8 右踝关节滑膜组织 MyD88、IKK- β 水平 取各组大鼠右踝关节滑膜组织, 加入裂解液进行组织裂解提

取总蛋白,使用BCA试剂盒进行蛋白浓度测定,上样、电泳、转膜,5%脱脂牛奶封闭1h。加入MyD88、IKK-β、GAPDH一抗,4℃低温孵育过夜,将膜用TBS-T缓冲液冲洗5次,加入相应的二抗在37℃下孵育1h,洗膜后,使用ECL发光液使蛋白质条带可视化并采用一体式化学发光仪拍摄照片,运用Image J软件进行分析。

1.3 统计学方法 采用SPSS 21.0统计学软件进行数据分析,符合正态分布的计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较使用LSD-*t*检验;重复测量资料采用两因素重复测量方差分析。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 空白组大鼠正常进食饮水,精神状态方面良好,毛发颜色自然有光泽,活动自如,反应迅速,动作敏捷;造模大鼠精神状态不佳,进食减少,毛发粗糙、暗黄、杂乱无序,右踝局部肤温升高,发红肿胀,活动量明显减少;干预治疗后刺血组、药线组、秋水仙碱组、刺血结合药线组大鼠较模型组一般情况均改善明显;秋水仙碱组大鼠出现腹泻,刺血组、药线组及刺血结合药线组大鼠二便正常。

2.2 各组大鼠造模后右踝关节内外踝横截面直径 组间与时间对大鼠造模后右踝关节外踝横截面直径存在交互作用($P < 0.05$),组间和时间对大鼠造模后右踝关节外踝横截面直径主效应均显著($P < 0.05$)。6组间造模后右踝关节外踝横截面直径比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);6组各时间点造模后右踝关节外踝横截面直径比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。模型组、刺血组、药线组、秋水仙碱组造模后6、12、24、48h、72h右踝关节外踝横截面直径均高于空白组,刺血结合药线组造模后6、12、24、48h右踝关节外踝横截面直径高于空白组,刺血组、药线组、秋水仙碱组、刺血结合药线组造模后48、72h右踝关节外踝横截面直径低于模型组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

2.3 各组大鼠右踝关节滑膜组织病理变化影响 空白组大鼠右踝关节滑膜组织及细胞结构完整,胶原纤维有序排列,组织未见有明显炎性细胞;模型组大鼠右踝关节滑膜组织严重损伤,大面积坏死脱落,可见大量炎性细胞浸润。刺血组、药线组、秋水仙碱组及刺血结合药线组右踝关节其炎性细胞的浸润情况较模型组有所改善,滑膜组织结构轻度异常,炎性细胞浸润较少,详见图1。

2.4 各组大鼠血清IL-8、IL-10、COX-2水平比较 6组大鼠血清IL-8、IL-10、COX-2水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。模型组、刺血组、药线组、秋水仙碱组以及刺血结合药线组大鼠IL-8、COX-2水平高于空白组,IL-10水平低于空白组,秋水仙碱组、刺血结合药线组、刺血组、药线组IL-8、COX-2水平低于模型组,IL-10水平高于模型组,刺血组、药线组大鼠IL-8、COX-2水平高于秋水仙碱组,IL-10水平低于秋水仙碱组,刺血组、药线组大鼠IL-8、COX-2水平高于刺血结合药线组,IL-10水平低于刺血结合药线组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

2.5 各组大鼠滑膜组织MyD88、IKK-β水平比较 6组间MyD88、IKK-β水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。模型组、药线组、刺血组、刺血结合药线组MyD88、IKK-β水平高于空白组,秋水仙碱组MyD88水平高于空白组,药线组、秋水仙碱组MyD88、IKK-β水平低于模型组,刺血组、刺血结合药线组MyD88水平低于模型组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图2、表3。

3 讨论

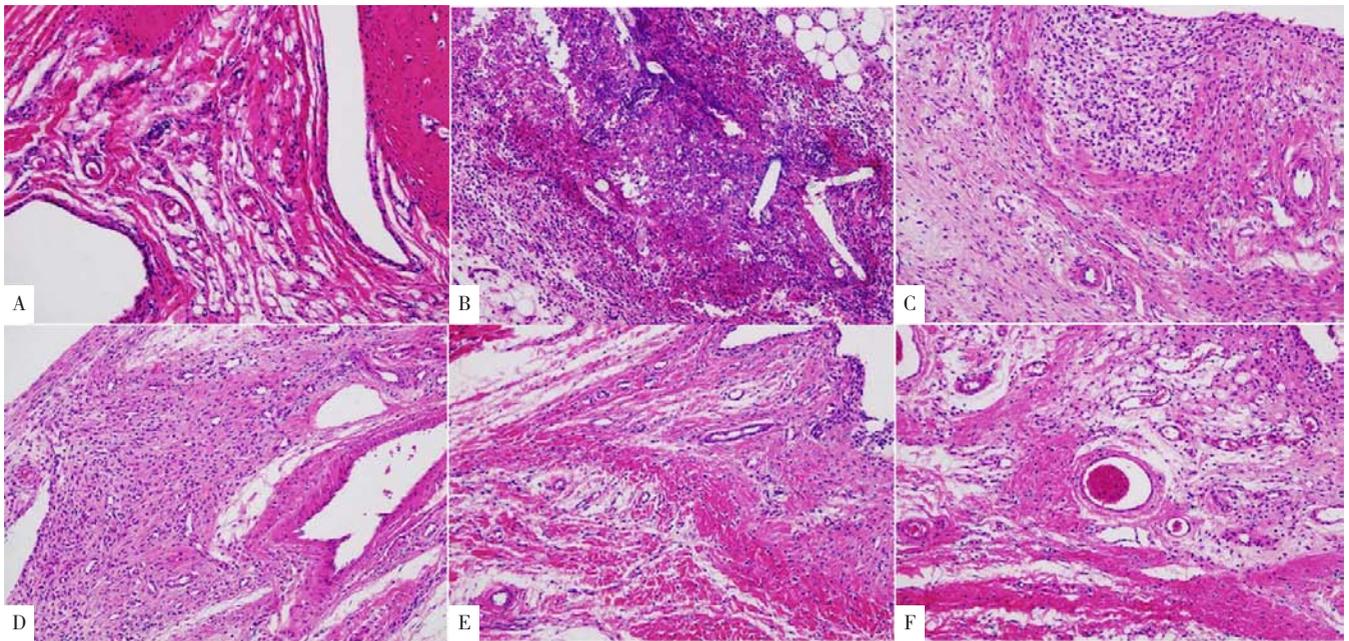
AGA的发生和发展是饮食、遗传、环境等多种因素共同作用的结果^[13],中医学认为AGA属于“痹症”“白虎历节风”等范畴,“痛风”这一概念最早是由朱丹溪提出来的,《格致余论·痛风论》中记载:“痛风者,大率因血受热……寒凉外搏,热血得寒,汗浊凝滞,所以作痛”,其病因病机主要为先天禀赋不足或机体感受

表1 各组大鼠造模后右踝关节外踝横截面直径对比($\bar{x} \pm s$, cm)

Table 1 The transverse diameter of right lateral malleolus in rats in six groups at the time after modeling

组别	只数	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
空白组	10	0.71 ± 0.02	0.71 ± 0.03	0.71 ± 0.04	0.72 ± 0.04	0.71 ± 0.04
模型组	10	0.97 ± 0.03 ^a	1.06 ± 0.07 ^a	0.97 ± 0.08 ^a	0.89 ± 0.06 ^a	0.85 ± 0.05 ^a
刺血组	10	0.95 ± 0.05 ^a	1.05 ± 0.06 ^a	0.94 ± 0.09 ^a	0.84 ± 0.04 ^{ab}	0.80 ± 0.05 ^{ab}
药线组	10	0.97 ± 0.07 ^a	1.08 ± 0.06 ^a	0.97 ± 0.07 ^a	0.84 ± 0.06 ^{ab}	0.81 ± 0.06 ^{ab}
秋水仙碱组	10	0.95 ± 0.06 ^a	1.04 ± 0.07 ^a	0.96 ± 0.11 ^a	0.80 ± 0.05 ^{ab}	0.76 ± 0.04 ^{ab}
刺血结合药线组	10	0.95 ± 0.07 ^a	1.08 ± 0.08 ^a	0.95 ± 0.08 ^a	0.78 ± 0.05 ^{ab}	0.74 ± 0.03 ^b
F值		$F_{交互} = 15.375, F_{组间} = 40.361, F_{时间} = 235.846$				
P值		$P_{交互} < 0.001, P_{组间} < 0.001, P_{时间} < 0.001$				

注: ^a表示与空白组比较 $P < 0.05$, ^b表示与模型组比较 $P < 0.05$ 。



注: A 为空白组, B 为模型组, C 为刺血组, D 为药线组, E 为秋水仙碱组, F 为刺血结合药线组。

图1 各组大鼠右踝关节滑膜组织病理变化(HE染色, ×100)

Figure 1 Pathological changes of synovial tissue of the right ankle of rats in six groups of rats

外邪, 邪气滞留关节, 或内伤饮食, 嗜食肥甘厚味, 日久积而化热生痰, 瘀毒痰浊相杂痹阻关节所致。而西医学上则认为 MSU 结晶沉积是导致 AGA 发生的关键因素, 体内巨噬细胞可识别并吞噬 MSU, 激活相关炎症信号

表2 各组大鼠血清 IL-8、IL-10、COX-2 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	只数	IL-8	IL-10	COX-2
空白组	10	10.39 ± 4.96	58.59 ± 13.49	6.78 ± 4.83
模型组	10	76.06 ± 11.07 ^a	4.47 ± 2.33 ^a	62.58 ± 10.16 ^a
刺血组	10	67.12 ± 9.87 ^{abcd}	15.95 ± 11.02 ^{abcd}	54.13 ± 8.95 ^{abcd}
药线组	10	65.95 ± 12.15 ^{abcd}	14.94 ± 10.01 ^{abcd}	53.65 ± 9.39 ^{abcd}
秋水仙碱组	10	36.27 ± 7.34 ^{ab}	40.44 ± 9.75 ^{ab}	25.32 ± 6.95 ^{ab}
刺血结合药线组	10	30.48 ± 10.62 ^{ab}	45.02 ± 6.82 ^{ab}	23.87 ± 10.19 ^{ab}
F 值		71.593	48.553	65.619
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: IL-8= 白介素 8, IL-10= 白介素 10, COX-2= 环氧化酶 2; ^a 表示与空白组比较 $P < 0.05$, ^b 表示与模型组比较 $P < 0.05$, ^c 表示与秋水仙碱组比较 $P < 0.05$, ^d 表示与刺血结合药线组比较 $P < 0.05$ 。

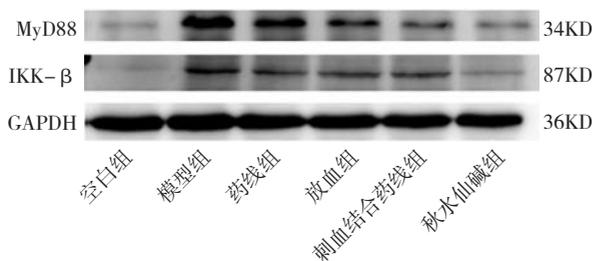


图2 各组大鼠滑膜组织蛋白质印迹法蛋白条带图

Figure 2 Western blotting of protein bands of synovial tissue of rats in six groups

转导通路并释放炎症因子, 产生强烈的炎症反应, 引起剧烈疼痛, 临床上一般表现为皮肤局部红肿, 皮肤温度升高, 剧痛拒按等症状。本研究通过将 MSU 注射至大鼠右踝关节制备 AGA 大鼠模型, 其右踝表现与 AGA 临床症状基本相符合, 结合滑膜组织病理学的改变, 即滑膜组织表现不同程度损伤坏死、存在大量炎症细胞浸润, 说明造模成功。在本次研究中, 模型组在造模后逐渐出现右踝关节肿胀, 12 h 达到高峰, 经治疗后, 秋水仙碱组、刺血组、药线组及刺血结合药线组均能不同程度缓解关节肿胀, 其中造模 72 h 后, 空白组与刺血结合药线组大鼠右踝关节肿胀度比较, 差异无统计学意义, 说明刺血疗法结合壮医药线灸在改善踝关节肿胀方面最优。秋水仙碱组大鼠在治疗期间出现腹泻, 考虑为秋水仙碱

表3 各组大鼠滑膜组织 MyD88、IKK-β 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, mg/mL)

Table 3 Comparison of MyD88 and IKK-β levels in the synovium of rats in six groups

组别	只数	MyD88	IKK-β
空白组	7	0.31 ± 0.02	0.42 ± 0.02
模型组	7	1.00 ± 0.03 ^a	0.77 ± 0.05 ^a
刺血组	7	0.58 ± 0.04 ^{ab}	0.64 ± 0.06 ^a
药线组	7	0.77 ± 0.09 ^{ab}	0.58 ± 0.03 ^{ab}
秋水仙碱组	7	0.41 ± 0.01 ^{ab}	0.45 ± 0.02 ^b
刺血结合药线组	7	0.53 ± 0.05 ^{ab}	0.64 ± 0.08 ^a
F 值		85.941	21.616
P 值		<0.001	<0.001

注: MyD88= 髓样分化因子 88, IKK-β= IκB 激酶 β; ^a 表示与空白组比较 $P < 0.05$, ^b 表示与模型组比较 $P < 0.05$ 。

引起的胃肠道反应,而余治疗各组大便正常,说明在刺血疗法及壮医药线点灸不仅能有效改善AGA关节症状,且不良反应少。

《灵枢·小针解》中指出:“满则泄之者,气口盛则当泄之也。宛陈则除之者,去血脉也”,道出了对于血实、热毒、湿热、气滞血瘀等的实证的疾病应当予刺血疗法来治疗,起到泄热、活血化瘀、调节气血、淤血去则新生等作用。在岭南地区因其特殊的地理环境气候造就了疾病多具有湿热瘀毒特征,壮医学认为“寒手热背肿在梅”,指的是肿块类型的疾病,可选择以最肿胀部位为中心,围着肿块围灸,呈梅花形分布,能软坚散结、活血消肿、解毒消炎。故从中医学结合民族医学的角度出发,刺血疗法结合壮医药线点灸可用于AGA的治疗。GA急性发作期间,MSU晶体的吞噬作用能诱导细胞膜的溶解、溶酶体和炎性递质的释放,以及单核细胞趋化蛋白1、趋化因子蛋白8、IL-8等趋化因子把中性粒细胞募集到炎性组织中,这些过程都会引起持续的炎症反应^[14-15]。在免疫系统中,细胞因子在炎症和感染期间参与免疫反应,是最重要的信使分子和效应分子。TLRs参与机体的固有免疫,激活后既可促进多种炎性因子如IL-1 β 、IL-8等大量释放,进而在AGA炎症过程中产生炎症级联反应。故观察刺血疗法以及壮医药线点灸能否降低炎症反应,便可确定该治疗方法对AGA的应用价值。有研究表明对于内毒素致热的家兔,与单纯拔罐疗法相比,刺血疗法结合拔罐疗法能抑制粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、IL-1 β 、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-6的水平,抗炎、退热作用更优^[16]。在沈谷丰等^[17]研究中采用中药结合刺络放血法治疗GA患者能有效降低促炎因子TNF- α 、IL-8、IL-1 β 水平,利于尿酸的排泄,改善GA的临床症状。在壮医药线点灸联合针刺疗法治疗膝骨性关节炎研究当中,IL-1 β 、IL-18水平明显下降,关节炎症得到改善,关节软骨的修复功能得到恢复^[18]。在本研究当中,IL-10作为典型的抗炎细胞因子,减少炎症反应,改善临床症状^[19]。IL-8是趋化因子中的一种,参与着炎症反应的整个过程。COX-2是一种诱导酶,调节着细胞的生长、迁移、增殖、自噬、凋亡和免疫反应,能促进前列腺素的合成,在组织损伤、炎症反应时表达较高,从而诱发明显的疼痛^[20-21]。ELISA检测结果显示模型组大鼠中IL-8和COX-2水平升高,IL-10水平降低,说明AGA大鼠右踝关节出现过度的炎症反应,给予大鼠干预治疗后,AGA大鼠IL-8和COX-2水平降低,IL-10水平升高,提示刺血疗法及壮医药线点灸对AGA炎症反应具有一定的抑制作用,且秋水仙碱组与刺血结合药线组之间差异无统计学意义,说明在两者疗效相当,相比单纯刺血疗法或壮医药线点灸疗法,两者结合疗效最好。通过本次研究,

证实了刺血疗法结合壮医药线点灸治疗AGA大鼠能有效抑制促炎因子分泌以及促进抗炎因子的释放。对于炎症反应来说,降低炎症因子,控制炎症风暴反应至关重要,本研究为刺血疗法结合壮医药线点灸治疗AGA提供了一定的可靠依据。

TLRs是一个特征明确的模式识别受体家族,在TLRs中除了TLR3外,其他TLR均需利用MyD88依赖性信号通路^[22]。TLRs属于I型跨膜蛋白,MyD88是机体内十分重要的信号传导蛋白,也是TLRs先天免疫反应信号途径和信号通路中介导的关键接头分子,其是经典激活途径中炎症递质NF- κ B所必需的,而IKK- β 作为NF- κ B抑制物激酶复合物的主要催化亚基,又是激活NF- κ B所必需的,从而诱导许多促炎因子分泌和其他免疫相关蛋白产生效应^[23-24]。TLR/MyD88信号传导通路是目前GA发病机制研究最多的信号通路,GA急性发作时TLRs激活,并与通过MyD88依赖性途径触发先天免疫反应并启动下游信号通路,调节多种炎症相关基因的表达,通过MyD88的TIR结构域传递细胞内信号,进而激活转录因子,促进IL-8、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等多种炎性因子的释放,产生炎症反应^[25]。有研究表明痛风发作与体内MSU对I型跨膜蛋白受体及激活其下游信号通路有关,异牡荆素可以降低关节肿胀程度,减轻炎症反应,改善AGA症状^[26]。由此可知,TLRs/MyD88信号通路是改善AGA病情及减轻炎症的作用靶点。本研究刺血疗法结合壮医药线点灸能显著抑制AGA大鼠滑膜MyD88、IKK- β 蛋白的表达。此外,刺血疗法结合壮医药线点灸可以抑制相关炎性因子以及促进对抗炎因子的分泌,对TLRs/MyD88信号传导通路起到抑制作用,调节炎性因子,对AGA起到治疗作用。

综上所述,本研究结果表明刺血疗法结合壮医药线点灸能更好降低关节肿胀程度,减轻炎症反应,与下调MyD88和IKK- β 表达有关,TLRs/MyD88炎症反应信号传导通路的多靶点拮抗作用可能是该信号通路治疗AGA的抗炎机制之一。中医药以及民族医药是中国独有的宝库,希望通过本研究能为刺血疗法结合壮医药线点灸治疗AGA在临床工作中提供新的思路和相关理论依据,以期中医以及民族医学能得到更进一步的发展。

作者贡献:朱丹萌负责文章的构思、论文撰写及论文的修订;黄玉莹、罗统安、贺长源进行整理数据、研究结果的分析;陈日兰负责文章的质量控制及审校,对文章整体质量进行监督管理。

本文无利益冲突。

参考文献

- [1] MARTINS D, TONON C R, PACCA R L, et al. Gout storm [J]. Am J Case Rep, 2021, 22: e932683. DOI: 10.12659/ajcr.932683.
- [2] 中华医学会内分泌学分会. 中国高尿酸血症与痛风诊疗指南

- (2019) [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2020, 36 (1): 1-13. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6699.2020.01.001.
- [3] DEHLIN M, JACOBSSON L, RODDY E. Global epidemiology of gout: prevalence, incidence, treatment patterns and risk factors [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2020, 16 (7): 380-390. DOI: 10.1038/s41584-020-0441-1.
- [4] ELFISHAWI M M, ZLEIK N, KVRGIC Z, et al. The rising incidence of gout and the increasing burden of comorbidities: a population-based study over 20 years [J]. *J Rheumatol*, 2018, 45 (4): 574-579. DOI: 10.3899/jrheum.170806.
- [5] 王旭, 罗冬平, 茹彦海, 等. 从慢性肾脏病角度看高尿酸血症与痛风的指南更新要点 [J]. 中国全科医学, 2021, 24 (33): 4191-4195. DOI: 10.12114/j.issn.1007-9572.2021.00.573. WANG X, LUO D P, RU Y H, et al. Interpretation of the major updates of guidelines regarding hyperuricemia and gout in chronic kidney disease [J]. *Chinese General Practice*, 2021, 24 (33): 4191-4195. DOI: 10.12114/j.issn.1007-9572.2021.00.573.
- [6] LIN X, SHAO T, HUANG L, et al. Simiao Decoction alleviates gouty arthritis by modulating proinflammatory cytokines and the gut ecosystem [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 955. DOI: 10.3389/fphar.2020.00955.
- [7] 周丽雅, 柴晶美, 杨阿龙, 等. 上中下通用痛风汤对大鼠急性痛风性关节炎模型 TLR/MyD88 信号通路影响的研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2018, 24 (5): 604-606. DOI: 10.19945/j.cnki.issn.1006-3250.2018.05.014.
- [8] WANG W C, XIA Y M, YANG B, et al. Protective effects of tyrosol against LPS-induced acute lung injury via inhibiting NF- κ B and AP-1 activation and activating the HO-1/Nrf2 pathways [J]. *Biol Pharm Bull*, 2017, 40 (5): 583-593. DOI: 10.1248/bpb.b16-00756.
- [9] 郭玉星, 周彪, 熊辉, 等. 薏苡历节清方对痛风细胞模型中 TLR4/NF- κ B 信号通路主要元件的影响 [J]. 中药药理与临床, 2019, 35 (1): 155-160.
- [10] 蒙继勇, 肖敬, 蒋耀平, 等. 壮医药线灸治疗类风湿关节炎合并周围神经病变的疗效观察 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34 (8): 3864-3866.
- [11] 左政, 黄培冬, 王馨悦, 等. 基于 TLR4/IL-1 β 信号通路探讨阿是穴刺血治疗痛性关节炎疗效观察 [J]. 上海针灸杂志, 2020, 39 (9): 1176-1180. DOI: 10.13460/j.issn.1005-0957.2020.09.1176.
- [12] 刘波, 周颖, 仝乐, 等. 刺血流派的源流及主要学术思想 [J]. 中国针灸, 2022, 42 (4): 451-456. DOI: 10.13703/j.0255-2930.20210110-k0002.
- [13] WU Z D, YANG X K, HE Y S, et al. Environmental factors and risk of gout [J]. *Environ Res*, 2022, 212 (pt c): 113377. DOI: 10.1016/j.envres.2022.113377.
- [14] GALOZZI P, BINDOLI S, DORIA A, et al. Autoinflammatory features in gouty arthritis [J]. *J Clin Med*, 2021, 10 (9): 1880. DOI: 10.3390/jcm10091880.
- [15] SZEKANECZ Z, SZAMOSI S, KOVÁCS G E, et al. The NLRP3 inflammasome - interleukin 1 pathway as a therapeutic target in gout [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2019, 670: 82-93. DOI: 10.1016/j.abb.2019.01.031.
- [16] 裴莹, 陈泽林, 金颖, 等. 刺络拔罐法对内毒素致家兔血清细胞因子水平的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37 (6): 1385-1388.
- [17] 沈谷丰, 刘坚林, 陆佳龙. 萆薢除痹汤联合刺络拔罐治疗痛风湿热痹阻证疗效及对血清炎症因子的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2021, 30 (1): 74-77. DOI: 10.3969/j.issn.1008-8849.2021.01.016.
- [18] 张燕珍, 梁超, 鲍春龄, 等. 壮医药线灸联合针刺治疗寒湿痹阻型膝骨性关节炎的临床观察 [J]. 广州中医药大学学报, 2021, 38 (12): 2656-2662. DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.12.019.
- [19] OUYANG W, O'GARRA A. IL-10 family cytokines IL-10 and IL-22: from basic science to clinical translation [J]. *Immunity*, 2019, 50 (4): 871-891. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.03.020.
- [20] NIRANJAN R, MISHRA K P, THAKUR A K. Inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) initiates autophagy and potentiates MPTP-induced autophagic cell death of human neuroblastoma cells, SH-SY5Y: an inside in the pathology of parkinson's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55 (10): 8038-8050. DOI: 10.1007/s12035-018-0950-y.
- [21] CHEN H, QIAN Z, ZHANG S, et al. Silencing COX-2 blocks PDK1/TRAF4-induced AKT activation to inhibit fibrogenesis during skeletal muscle atrophy [J]. *Redox Biol*, 2021, 38: 101774. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101774.
- [22] LI L, ACIOGLU C, HEARY R F, et al. Role of astroglial toll-like receptors (TLRs) in central nervous system infections, injury and neurodegenerative diseases [J]. *Brain Behav Immun*, 2021, 91: 740-755. DOI: 10.1016/j.bbi.2020.10.007.
- [23] BALK K R, DE NARDO D. Understanding early TLR signaling through the myddosome [J]. *J Leukoc Biol*, 2019, 105 (2): 339-351. DOI: 10.1002/jlb.mr0318-096r.
- [24] LU W, MENG Z, HERNANDEZ R, et al. Fibroblast-specific IKK- β deficiency ameliorates angiotensin II-induced adverse cardiac remodeling in mice [J]. *JCI Insight*, 2021, 6 (18): e150161. DOI: 10.1172/jci.insight.150161.
- [25] WANG X, ZHOU J J, YANG J, et al. Role of TLR4/MyD88/NF- κ B signaling in the contrast-induced injury of renal tubular epithelial cells [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20 (5): 115. DOI: 10.3892/etm.2020.9243.
- [26] SUN X, LI P, QU X, et al. Isovitein alleviates acute gouty arthritis in rats by inhibiting inflammation via the TLR4/MyD88/NF- κ B pathway [J]. *Pharm Biol*, 2021, 59 (1): 1326-1333. DOI: 10.1080/13880209.2021.1979595.

(收稿日期: 2022-09-13; 修回日期: 2023-01-05)

(本文编辑: 邹琳)