

针灸足三里对佐剂性关节炎模型大鼠胃肠动力的调节作用

<https://doi.org/10.12307/2022.815>李佳¹, 李柏村², 蔡国伟², 李静²

投稿日期: 2020-12-24

采用日期: 2021-06-03

修回日期: 2021-09-22

在线日期: 2021-10-17

中图分类号:

R459.9; R245; R318

文章编号:

2095-4344(2022)26-04141-06

文献标识码: B

文章快速阅读:

文章特点一

△明确了佐剂性关节炎大鼠模型存在胃肠动力改变及空肠神经纤维增多的现象,进一步说明了佐剂性关节炎模型大鼠患有胃肠功能障碍。

△证实针+灸配合干预佐剂性关节炎模型大鼠可改善胃肠动力并降低肠道敏感性,可为针刺缓解和治疗类风湿关节炎的胃肠道问题提供新的理论依据。

60只雌性SD大鼠

分为正常组、模型组、针刺组、艾灸组、针+灸组

检测指标:

- (1) 苏木精-伊红染色观察膝关节病理形态变化;
- (2) 检测大鼠肠蠕动波次数,检测首粒黑便排出时间,计算大鼠的胃排空率和肠推进率;
- (3) 以离体灌流装置检测大鼠空肠平滑肌肌条收缩水平;
- (4) 应用免疫荧光染色法观察空肠神经纤维。

结论:

- (1) 佐剂性关节炎大鼠模型存在关节肿胀和关节面破坏的问题,同时胃肠动力减弱并胃肠敏感性增强;
- (2) 针刺组、艾灸组和针+灸组均能改善关节肿胀和胃肠动力及敏感性问题;
- (3) 相对于针刺组和艾灸组,针+灸组的治疗效果更为明显。

文题释义:

佐剂性关节炎大鼠模型: 又称是弗氏佐剂关节炎,是免疫性关节炎动物模型的基本方法。通过在大鼠足跖底部注射药物,从而足跖部明显肿胀,出现继发性炎症反应,表现为前肢或对侧肢体甚至耳、尾部红肿或炎性结节出现,模拟出人类类风湿关节炎状况。

胃肠动力: 可反映胃肠功能,是胃肠部肌肉的收缩蠕动力,包括胃肠部肌肉收缩的力量和频率。在此文中通过结肠蠕动波测定方法检测大鼠肠蠕动波次数、活性炭悬液灌胃法检测首粒黑便排出时间以及离体灌流装置检测大鼠空肠平滑肌肌条收缩水平,进一步说明佐剂性关节炎模型大鼠存在胃肠功能障碍。

摘要

背景: 类风湿关节炎患者存在胃肠动力不足的问题逐渐受到关注,针灸作为类风湿关节炎的一种治疗方法,是否能够改善其胃肠动力不足的问题,值得进一步探究。

目的: 制备佐剂性关节炎大鼠模型,探讨针灸足三里对大鼠胃肠动力的影响。

方法: 将60只清洁级健康3月龄雌性SD大鼠随机分为5组,即正常组、模型组、针刺组、艾灸组和针+灸组,每组12只,除正常组外其余4组均采用弗氏完全佐剂建立佐剂性关节炎模型。针刺组、艾灸组和针+灸组于造模第1天取足三里穴治疗,15 min/次,1次/d,一共14 d。针刺组大鼠采用针刺干预,艾灸组大鼠则用艾灸干预,而针+灸组大鼠在使用针刺的基础上联合使用艾灸方法。所有大鼠于相应处理结束后,采用跖围法测大鼠跖围长度,采用苏木精-伊红染色观察其膝关节的病理形态变化,运用结肠蠕动波测定方法检测大鼠肠蠕动波次数,应用活性炭悬液灌胃法观察首粒黑便排出时间,计算大鼠的胃排空率和肠推进率,以离体灌流装置检测大鼠空肠平滑肌肌条收缩水平,应用免疫荧光染色法观察空肠神经纤维。

结果与结论: ①针灸足三里治疗后,大鼠跖关节肿胀程度明显降低,软骨破坏和炎性细胞明显减少,肠蠕动波次数增加,全胃肠活性炭排出时间缩短,胃排空率和肠推进率得到提升,空肠平滑肌肌条收缩基础张力增强,空肠神经纤维减少;②3组针灸方法中针+灸干预最为明显;③提示针灸足三里对佐剂性关节炎大鼠胃肠动力障碍具有防治作用,并且针刺联合艾灸疗效优于单纯针刺或艾灸治疗。

关键词: 针灸;足三里;针刺;艾灸;佐剂性关节炎;类风湿关节炎;肠动力

Effect of acupuncture and moxibustion at Zusanli on gastrointestinal motility in adjuvant arthritis rats

Li Jia¹, Li Baicun², Cai Guowei², Li Jing²

¹School of Acupuncture and Moxibustion and Orthopedics/Hubei Collaborative Innovation Center for Preventive Treatment of Acupuncture and Moxibustion, Wuhan 430061, Hubei Province, China; ²Department of Acupuncture and Moxibustion, Wuhan Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Li Jia, MD, Associate professor, School of Acupuncture and Moxibustion and Orthopedics/Hubei Collaborative Innovation Center for Preventive Treatment of Acupuncture and Moxibustion, Wuhan 430061, Hubei Province, China

Corresponding author: Li Jing, MD, Associate chief physician, Department of Acupuncture and Moxibustion, Wuhan Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

¹湖北中医药大学针灸骨伤学院/针灸治未病湖北省协同创新中心,湖北省武汉市 430061; ²华中科技大学同济医学院附属协和医院针灸科,湖北省武汉市 430022

第一作者: 李佳,男,1983年生,湖北省人,汉族,2012年湖北中医药大学毕业,博士,副教授,主要从事针灸防治胃肠疾病的机制研究。

通讯作者: 李静,博士,副主任医师,华中科技大学同济医学院附属协和医院针灸科,湖北省武汉市 430022

<https://orcid.org/0000-0003-0444-2263> (李佳)

基金资助: 国家自然科学基金课题(81804165),课题名称:电针足三里介导PKC调节IBS大鼠平滑肌细胞收缩蛋白的作用机制,项目负责人:李佳;

国家自然科学基金课题(81774410),课题名称:基于软骨细胞骨架蛋白探讨温针灸对骨关节炎的调节作用,项目负责人:蔡国伟;

湖北省卫健委项目(ZY2019M041),课题名称:基于Wnt/β-catenin信号通路探讨温针灸干预骨关节炎软骨退变的机制研究,项目负责人:李静

引用本文: 李佳,李柏村,蔡国伟,李静. 针灸足三里对佐剂性关节炎模型大鼠胃肠动力的调节作用[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(26):4141-4146.



Abstract

BACKGROUND: Insufficient gastrointestinal motility in patients with rheumatoid arthritis has been gradually concerned. As a treatment of rheumatoid arthritis, whether acupuncture can improve insufficient gastrointestinal motility is worthy of further exploration.

OBJECTIVE: To explore the effect of acupuncture and moxibustion treatment at *Zusanli* (ST 36) on gastrointestinal motility in a rat model of adjuvant arthritis.

METHODS: A total of 60 clean and healthy 3-month-old Sprague-Dawley rats were randomly divided into 5 groups: normal group, model group, acupuncture group, moxibustion group, and acupuncture plus moxibustion group, with 12 rats in each group. Adjuvant arthritis models were established in the latter four groups using Freund's complete adjuvant. The acupuncture group, moxibustion group, and acupuncture plus moxibustion group were treated with acupuncture, moxibustion or both at *Zusanli* on the 1st day of modeling, for 15 minutes per day, for 14 continuous days. At the end of the corresponding treatment, all rats were measured for plantar circumference. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the pathological changes of the knee joint. The number of peristaltic waves in the rat intestine was measured by the method of colonic peristaltic wave. The first black stool discharge time was observed after gavage with activated carbon suspension, to calculate the gastric emptying rate and intestinal propulsion rate. The contraction degree of jejunum smooth muscle strips of rats was detected by an *in vitro* perfusion device, and the distribution of jejunal nerve fibers were observed by immunofluorescence staining.

RESULTS AND CONCLUSION: After acupuncture and moxibustion at *Zusanli*, sacroiliac joint swelling in rats was significantly reduced, cartilage destruction and inflammatory cells decreased, the number of intestinal peristaltic waves was increased, the total gastrointestinal activated carbon discharge time was shortened, gastric emptying rate and intestinal propulsion rate were improved, the contraction of the jejunal smooth muscle strip increased, and the amount of jejunal nerve fibers decreased. The combination of acupuncture and moxibustion achieved the best results. To conclude, acupuncture and moxibustion at *Zusanli* can prevent and treat bowel dysfunction in adjuvant arthritis rats, and acupuncture combined with moxibustion method is better than acupuncture or moxibustion used alone.

Key words: acupuncture and moxibustion; *Zusanli*; acupuncture; moxibustion; adjuvant arthritis; rheumatoid arthritis; intestinal motility

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81804165 (to LJ) and 81774410 (to CGW); Hubei Provincial Health Commission Project, No. ZY2019M041 (to LJ)

How to cite this article: LI J, LI BC, CAI GW, LI J. Effect of acupuncture and moxibustion at *Zusanli* on gastrointestinal motility in adjuvant arthritis rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(26):4141-4146.

0 引言 Introduction

类风湿性关节炎是世界公认的难治病之一，该病多以对称性、多关节炎为主要表现，在其发生发展过程中，可以侵袭体内多种脏器^[1]，其中消化器官最常被累及，影响胃肠道的消化、吸收或运动功能，胃肠道敏感性增高而出现不同的胃肠道临床表现^[2]。近年来循证医学研究表明，治疗类风湿性关节炎应早期使用改变病情抗风湿药和细胞毒药物，此类药物自开始应用至出现临床疗效所需时间较长，维持疗效需长期服用^[3]；但是这类药物多具有明显不良反应而限制其临床应用，其中发生率最高的是恶心、呕吐、腹痛、腹泻等胃肠道反应，因此不管用药与否，胃肠动力障碍已成为风湿病的临床常见问题。

在现代医学治疗类风湿性关节炎一筹莫展之际，中医药治疗类风湿性关节炎的整体疗效好和不良反应少为广大患者所接受，尤其是针灸疗法，作为公认的绿色疗法，在治疗类风湿性关节炎、调节胃肠功能以及各种慢性代谢性疾病方面深受广大患者青睐^[4]。基于此，此课题拟在前期研究针灸防治类风湿性关节炎和胃肠疾病实验研究的基础上^[5-8]，采用单穴足三里，进一步探讨针灸对类风湿性关节炎关节的保护以及胃肠动力的调节作用，初步观察其作用机制，为针灸在类风湿性关节炎胃肠动力障碍方面的临床应用提供实验依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验，对于正态分布数据采用方差分析和 *t* 检验，非正态分布数据采用 Mann-Whitney *U* 检验，率的显著性比较采用 χ^2 检验。

1.2 时间及地点 实验于 2018 年 12 月至 2019 年 12 月在湖北中医药大学针灸骨伤学院实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 3 月龄 SPF 级雌性 SD 大鼠 60 只，适应性喂养 1 周后，按随机数字表法分为 5 组，正常组、模型组、针刺组、

艾灸组和针 + 灸组，每组 12 只。动物喂养在湖北中医药大学实验动物中心完成，生产合格证号：SCXK(鄂)2015-0018 号，环境温度 21-25℃，湿度 40%-60%。光照时间每日 12 h，大鼠可自由取食饮水。

此次实验严格遵守中华人民共和国科技部 [2006]398 号文件《关于善待实验动物的指导性意见》要求。

1.3.2 主要试剂及仪器 $\Phi 0.30\text{ mm}\times 13\text{ mm}$ 华佗牌毫针 (苏州医疗器械厂)；特制香烟型纯艾条 (直径 1 cm，南阳市卧龙汉医艾绒厂)；肌肉张力换能器 (ZH-Z 型离体器官测试系统) (上海锦沙科教仪器设备有限公司)；SMUP-PC 型生物信号处理系统 (上海嘉龙仪器厂)；Axio Observer.Z1 全自动倒置荧光显微镜 (德国 Zeiss 公司)；Axiovert 40CFL 显微镜 (德国 Zeiss)；弗氏完全佐剂 (美国 Sigma 公司)；羧甲基纤维素钠、奶粉、糖、淀粉、碳素墨水加蒸馏水配制成的黑色半固体糊状物；石蜡、甲醛、二甲苯、无水乙醇、苏木精、伊红 (珠海贝索公司)；PGP9.5 抗体 (Abcam 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 类风湿关节炎模型制备 除了正常组，其他 4 组均制备类风湿关节炎模型，方法如下：将 1 : 2 的羊毛脂与液体石蜡混合后加热至 80℃ 下充分混匀，高压消毒后与充分研磨的卡介苗按 1 mL : 7.5 mg 的比例配成完全弗氏佐剂，于大鼠右后足跖底部常规皮肤消毒后，采用微量注射器按照 0.15 mL/ 只进行皮内注射；正常组大鼠用同样方法于右后足跖底部注射等量生理盐水。实验过程中可见各模型组大鼠第 3 天右后足跖部明显肿胀，出现继发性炎症反应，表现为前肢或对侧肢体甚至耳、尾部红肿或炎性结节出现，提示造模成功。

1.4.2 治疗方法 于注射佐剂后当天采用针灸干预，参照中国针灸学会实验针灸研究会制定的“实验动物针灸穴位图谱”，选取双侧后三里，即大鼠的足三里穴，位于膝关节下外侧的腓骨小头下方约 5 mm 处。针刺操作：大鼠足三

组织工程实验动物造模过程的相关问题

造模目的	探讨针灸足三里对佐剂性关节炎模型大鼠胃肠动力的影响
选择动物的条件	3月龄 SPF 级雌性 SD 大鼠
模型与所研究疾病的关系	通过完全弗氏佐剂免疫动物而引发的慢性多发性关节炎, 其病理过程、病理形态学改变、血清学指标变化与人类的类风湿性关节炎类似
动物来源及品系	湖北中医药大学实验动物中心提供的 SD 大鼠
造模技术描述	将 1 : 2 的羊毛脂与液体石蜡混合后加热至 80°C 下充分混匀, 高压消毒后与充分研磨的卡介苗按 1 mL : 7.5 mg 的比例配成完全弗氏佐剂, 于大鼠右后足跖底部常规皮肤消毒后, 采用微量注射器按照 0.15 mL/ 只进行皮内注射
动物数量及分组方法	60 只雌性 SD 大鼠随机分为 5 组: 正常组、模型组、针刺组、艾灸组和针 + 灸组, 每组 12 只
造模成功评价指标	实验过程中可见各造模后大鼠第 3 天右后足跖部明显肿胀, 出现继发性炎症反应, 表现为前肢或对侧肢体甚至耳、尾部红肿或炎性结节出现, 提示造模成功
造模后观察指标	①跖围法测量大鼠足跖肿胀度; ②苏木精 - 伊红染色法观察膝关节; ③肠蠕动波测定法检测大鼠肠蠕动波次数; ④检测大鼠全胃肠活性炭排出时间; ⑤离体灌流装置检测大鼠空肠平滑肌肌条收缩水平; ⑥免疫荧光染色法观察空肠神经纤维
造模后动物处理	活体实验完成后, 大鼠颈椎脱臼处死, 取大鼠膝关节和胃组织、小肠组织以及空肠组织, 进行下一步实验
伦理委员会批准	实验方案经湖北中医药大学针灸骨伤学院动物实验伦理委员会批准

里穴位针刺深度约 5 mm, 行手法行针, 平补平泻, 频率约 120 次/min, 强度以大鼠耐受为度, 每隔 4 min 行针 1 min, 共留针 15 min; 艾灸方法: 用特制香烟型纯艾条离穴位 2 cm 处悬灸^[9], 15 min/次。针刺组、艾灸组和针 + 灸组大鼠均用自制鼠衣固定, 治疗频率为 1 次/d, 共 14 d; 其中针刺组大鼠采用针刺干预, 艾灸组大鼠则用艾灸干预, 而针 + 灸组大鼠在使用针刺的基础上联合使用艾灸方法; 干预期间正常组及模型组大鼠同样鼠衣固定但不治疗。

1.4.3 跖围法测量大鼠足跖肿胀度 从造模第 1 天开始, 分别于每天上午 9 时测量干预时间段的第 1, 3, 7, 14 天跖围长, 各组大鼠在同一时间用手术线环绕大鼠右下足跖部相应骨性标志处, 测量其跖围长度, 每只大鼠每次分别测量 3 次, 取其平均值。

1.4.4 肠蠕动波测定法检测大鼠肠蠕动波次数 于实验结束后, 即实验进行第 14 天, 每组 12 只大鼠, 以 2% 戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 尾静脉注射麻醉大鼠, 体温维持在 37.5 °C 左右, 将自制的结直肠扩张刺激球囊插入大鼠肛门内, 记录单位时间 (30 min) 内的肠蠕动波个数。

1.4.5 大鼠全胃肠活性炭排出时间 大鼠肠蠕动波实验检测结束后, 所有大鼠独笼饲养 ($n=12$), 给予 1 g/mL 活性炭悬液灌胃 (10 mL/kg), 记录各组大鼠首粒黑便排出时间, 以 min 为单位进行分析。

1.4.6 胃排空和肠推进率计算 记录完各组大鼠首粒黑便排出时间后, 于实验第 15 天, 每组 12 只大鼠继续饲养, 24 h

禁食不禁水, 提前称取黑色半固体糊状物进行灌胃 (W1), 灌胃以 1 g/mL 的半固体糊 0.8 mL/只, 30 min 后, 大鼠麻醉后颈椎脱臼处死, 开腹取胃和小肠, 分别记录胃总质量 (W2) 和胃净质量 (W3), 并记录小肠全长 (L1) 及黑色半固体推进距离 (L2)。

计算公式如下, 胃排空率 = $[1 - (W2 - W3) / W1] \times 100\%$, 小肠推进率 = $L2 / L1 \times 100\%$ 。

1.4.7 苏木精 - 伊红染色法观察膝关节 于实验第 15 天, 将上述处死的大鼠同时取膝关节和空肠组织, 将膝关节标本用体积分数 10% 中性甲醛固定液固定, 脱钙后常规蜡块包埋, 制作 4 μm 厚石蜡切片, 按照苏木精 - 伊红染色步骤操作。空肠组织则分为两部分, 一部分用于肠肌标本收缩实验, 另一部分用于免疫荧光染色实验。

1.4.8 体外肠平滑肌肌条收缩水平 于实验第 15 天, 取大鼠空肠上段 2 cm 置于盛有体积分数 95%O₂ + 5%CO₂ 的 4 °C Kerbs 液的培养皿中, 清除肠系膜, 沿肠系膜剪开肠组织, 于肠管平行方向制成 2 条纵行肌条 (约 2 mm × 5 mm)。肌条置于挂钩上平衡后, 调标本负荷至 1.0 g 左右的预初张力, 待自发活动稳定后, 以浴槽中滴加 1×10^{-9} mol/L 溴化乙酰胆碱溶液, 观察给药前后纵行肌条张力基线情况。

1.4.9 免疫荧光染色法观察空肠神经纤维 于实验第 15 天, 取大鼠剩余的空肠组织, 1 mL PBS 反复冲洗肠腔, 肠道组织标本用体积分数 10% 的中性甲醛固定液固定, 脱水后常规蜡块包埋, 制作 4 μm 厚石蜡切片, 苏木精染色, 按照免疫荧光染色步骤操作。

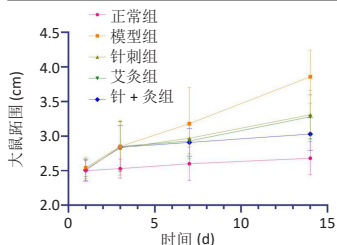
1.5 主要观察指标 ①跖围法测量大鼠足跖肿胀度; ②苏木精 - 伊红染色法观察膝关节; ③肠蠕动波测定法检测大鼠肠蠕动波次数; ④大鼠全胃肠活性炭排出时间; ⑤离体灌流装置检测大鼠空肠平滑肌肌条收缩水平; ⑥免疫荧光染色法观察空肠神经纤维。

1.6 统计学分析 实验中所有数据均采用 GraphPad Prism 8.3.0 软件进行统计分析并绘制图表, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对于正态分布数据采用方差分析和 t 检验, 非正态分布数据采用 Mann-Whitney U 检验, 率的显著性比较采用 χ^2 检验。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 纳入 SD 大鼠 60 只, 在实验过程中, 模型组和针刺组在饲养过程中各死亡 1 只, 正常组在麻醉过程死亡 1 只, 最终纳入实验 SD 大鼠 57 只, 其中正常组 11 只, 模型组 11 只, 针刺组 11 只, 艾灸组 12 只, 针 + 灸组 12 只。

2.2 针灸对大鼠跖围的影响 正常组 SD 大鼠毛色雪白明亮有光泽, 足关节无肿胀疼痛, 正常进食, 活动自如。模型制备过程中, 大鼠逐渐表现出活动量减少, 毛色呈浅黄, 光泽度减少, 并且跖关节肿胀, 大鼠活动时出现跳步、跛行。根据大鼠跖围的重复测量数据方差分析显示, 组间差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 见图 1。



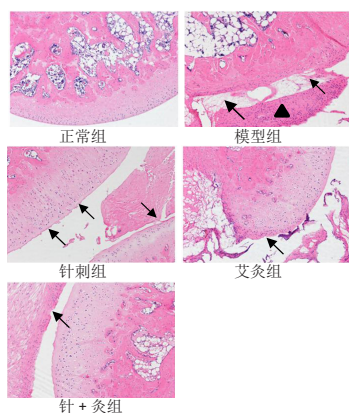
图注：大鼠经注射完全弗氏佐剂后，从第3天开始，其关节肿胀程度显著高于正常组，跖围增加 ($P < 0.05$)；从第7天开始，针刺组、艾灸组和针+灸组大鼠关节肿胀程度较模型组减轻，跖围减少 ($P < 0.05$)，其中针+灸组大鼠改变最为明显

图1 | 各组大鼠不同时点跖围的比较

Figure 1 | Comparison of the toe circumference of rats among groups at different times

大鼠经注射完全弗氏佐剂后，从第3天开始，其关节肿胀程度显著高于正常组，跖围增加 ($P < 0.05$)；经治疗后，从第7天开始，针刺组、艾灸组和针+灸组大鼠关节肿胀程度较模型组减轻，跖围减少 ($P < 0.05$)；其中针+灸组大鼠改变最为明显，至第14天，与针刺组和艾灸组相比差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。

2.3 针灸对膝关节的影响 见图2。



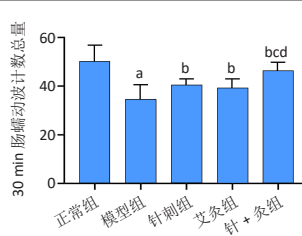
图注：箭头所指的方向均为关节面破损处，在模型组中▲标注的地方为脱落的关节面，可见模型组关节面破损严重；正常组关节面光滑无破损；针刺组、艾灸组及针+灸组均可见不同程度的破损和粗糙

图2 | 各组大鼠膝关节的苏木精-伊红染色情况(x100)

Figure 2 | Hematoxylin-eosin staining of the rat knee joint (x100)

图2可见，正常组的关节面光滑，软骨细胞排列整齐，未见炎性细胞浸润；而模型组的关节面粗糙，并见部分关节面破坏，可见大量淋巴细胞、单核细胞浸润；针刺组和艾灸组与模型组比较，其软骨破坏和炎性细胞明显减少；针+灸组其关节面的恢复效果较单纯的针刺和艾灸更加显著。

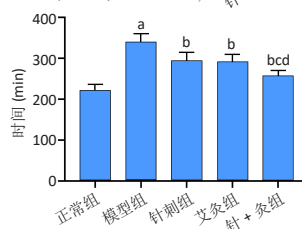
2.4 针灸对胃肠动力的影响 模型制备过程中，大鼠出现食欲减退，体质量增长较正常组减少。通过检测肠蠕动波、全胃肠活性炭排出时间、计算胃排空和肠推进率以及空肠平滑肌肌条收缩情况发现，与正常组比较，模型组大鼠肠蠕动波次数减少，胃肠蠕动减慢，首粒黑便排出时间明显延长，胃排空和肠推进率显著降低，且空肠平滑肌收缩水平降低 ($P < 0.05$)；经治疗后，针刺组、艾灸组和针+灸组大鼠肠蠕动波显著增加，胃肠蠕动变快，首粒黑便排出时间明显缩短，胃排空和肠推进率有所提升，空肠平滑肌收缩水平升高，与模型组比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$)，其中针+灸组大鼠胃肠动力改变最为明显，与针刺组和艾灸组相比差异有显著性意义 ($P < 0.05$)，见图3-6。



图注：与正常组比较，^a $P < 0.01$ ；与模型组比较，^b $P < 0.05$ ；与针刺组比较，^c $P < 0.05$ ；与艾灸组比较，^d $P < 0.05$

图3 | 各组大鼠肠蠕动波30 min的计数总量比较

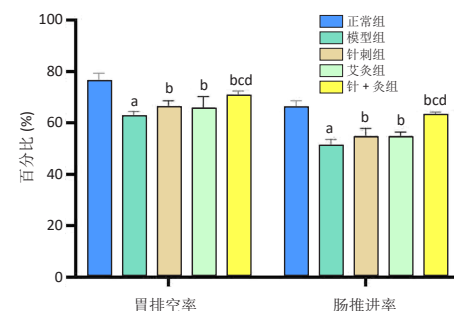
Figure 3 | The number of peristaltic waves in the rat intestine within 30 minutes



图注：与正常组比较，^a $P < 0.01$ ；与模型组比较，^b $P < 0.05$ ；与针刺组比较，^c $P < 0.05$ ；与艾灸组比较，^d $P < 0.05$

图4 | 各组大鼠首粒黑便排出时间比较

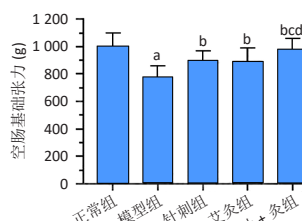
Figure 4 | Comparison of the first black stool discharge time among groups



图注：与正常组比较，^a $P < 0.01$ ；与模型组比较，^b $P < 0.05$ ；与针刺组比较，^c $P < 0.05$ ；与艾灸组比较，^d $P < 0.05$

图5 | 各组大鼠胃排空率和肠推进率比较

Figure 5 | Comparison of the gastric emptying rate and intestinal propulsion rate among groups

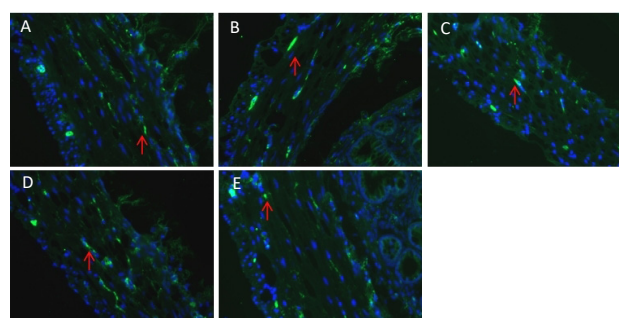


图注：与正常组比较，^a $P < 0.01$ ；与模型组比较，^b $P < 0.05$ ；与针刺组比较，^c $P < 0.05$ ；与艾灸组比较，^d $P < 0.05$

图6 | 各组大鼠空肠基础肌张力比较

Figure 6 | Comparison of jejunal basal muscle tension among groups

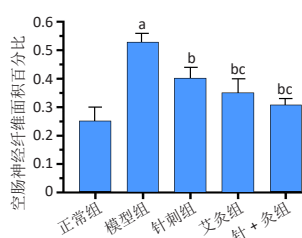
2.5 针灸对空肠神经纤维的影响 结果见图7, 8。



图注：图A-E分别为正常组、模型组、针刺组、艾灸组及针+灸组。红色箭头标注的位置为神经纤维，正常组中有少量神经纤维分布，模型组中神经纤维分布多、面积大，针刺组、艾灸组及针+灸组均可见神经纤维分布减少

图7 | 各组大鼠的空肠神经纤维分布情况(x40)

Figure 7 | Distribution of jejunal nerve fibers in rats (x40)



图注：与正常组比较，^a $P < 0.01$ ；与模型组比较，^b $P < 0.05$ ；与针刺组比较，^c $P < 0.05$

图8 | 各组大鼠空肠神经纤维面积百分比的比较

Figure 8 | Percentage of jejunal nerve fiber area in rats

采用免疫荧光染色法,神经纤维呈棕黄色,采用单盲法计算阳性区域面积,在荧光显微镜下,每只大鼠分别取6张空肠纵行铺片标本,从每张标本中随机选取5个不重叠的高倍视野($\times 40$),计算每个高倍视野中神经纤维面积。与正常组相比,模型组空肠黏膜下神经从神经纤维显著增多($P < 0.05$),而针刺组、艾灸组和针+灸组则较模型组显著减少;与模型组比较,差异有显著性意义($P < 0.05$),其中针+灸组较针刺组和艾灸组减少则更为明显,差异有显著性意义($P < 0.05$)。

3 讨论 Discussion

类风湿性关节炎是一种常见的以关节组织慢性炎症为主要表现的自身免疫性疾病,其病变关节主要表现为炎症细胞浸润、滑膜增生、血管翳形成以及由此引发的软骨和骨的损伤^[10]。尽管造成类风湿性关节炎关节破坏的发病机制尚未完全阐明,越来越多的文献表明,胃肠道可能在类风湿性关节炎的发病机制中起主要作用^[11],并其提出肠-关节轴的假说^[12-13]。DEMORUELLE等^[14]认为类风湿性关节炎相关的自身免疫可能在关节症状发作之前很久就在肠道黏膜部位开始。同时现代医学研究中发现,黏膜免疫系统被认为是执行局部特异性免疫功能的重要场所,是具有重要而独特功能的一个相对独立的免疫系统,肠道黏膜相关免疫组织亦属于其中之一^[15]。肠黏膜淋巴组织激活T细胞,释放出抑制性细胞因子,降低自身免疫性疾病患者病灶处的炎症细胞数,从而抑制炎症反应。并且肠道微生物会影响先天性和适应性免疫系统的发育,因此也可能在自身免疫的发展中发挥作用,在肠道微生物与类风湿性关节炎的相关研究中也进一步说明了两者相互影响的关系。在动物实验中发现,胃肠道中的分段的丝状细菌已被证明可诱导TH-17细胞活性^[16],这些细胞与类风湿性关节炎的发病机制有关^[13],并分泌促炎细胞因子,包括白细胞介素17、肿瘤坏死因子 α 等细胞因子。相关学者通过研究正常人群和类风湿性关节炎患者的粪便微生物群发现,类风湿性关节炎患者的肠道微生物多样性降低,并且这与疾病持续时间和自身抗体水平相关^[17]。而据临床报道,类风湿性关节炎患者不仅出现吞咽困难、烧心、反酸的食管反流临床表现,而且可因小肠蠕动减慢,出现饱腹感、恶心、呕吐、胃痉挛、餐后腹痛或腹胀等内脏敏感性增强的现象^[18],这些均说明类风湿性关节炎与胃肠道功能紧密相关。

由上可知,肠道功能紊乱是类风湿性关节炎发病的主要特征之一,因而选择从调节胃肠功能、改善肠道黏膜免疫细胞功能,消除炎症损伤,并调节肠道微生物达到治疗类风湿性关节炎的目的,这是治疗类风湿性关节炎新的靶点和突破口^[19]。通过作者初步实验探索发现,模型组大鼠跖关节肿胀程度明显并且其膝关节的关节面粗糙,有大面积破损,有炎症细胞浸润;而针灸足三里治疗后,大鼠跖关节肿胀程度明显低于模型组,说明针灸足三里可改善佐剂性关节炎大鼠的关节炎症状,改善其肿胀程度,并且其膝关节的关节面的

软骨破坏和炎症细胞明显减少,这与以往报道相一致^[20-21];与模型组相比针灸足三里可以改善肠蠕动波次数增加,首粒黑便排出时间缩短,胃排空率和肠推进率有明显提高,空肠平滑肌肌条收缩基础张力增强,并且空肠神经纤维减少,说明针和灸足三里均可改善佐剂性关节炎大鼠的肠动力,使得佐剂性关节炎大鼠的胃肠功能受损情况得到恢复,并且针刺联合艾灸治疗效果最为明显。说明针灸可有效缓解类风湿引起的内脏高敏感性,促进胃肠动力,利于关节恢复。通过上述实验研究结果,作者发现针灸足三里不仅改善了佐剂性关节炎大鼠的关节炎情况并且其胃肠动力也得到一定程度的恢复,说明针灸足三里穴可以从整体上调节佐剂性关节炎大鼠的功能状态。

《针灸大成·治病要穴》中云:“足三里:主中风中湿,诸虚耳聋,上牙疼,痹风,水肿,心腹鼓胀,噎膈哮喘,寒湿脚气。上、中、下部疾,无所不治”^[22]。足三里为多气多血之足阳明经合穴,有调理脾胃、通畅气机、通经活络之功效。在现代研究中发现通过针刺足三里,可增强小肠运动能力,并调节与小肠运动相关的激素的分泌^[23]。郝锋等^[24]通过动物实验发现,艾灸足三里可降低佐剂性关节炎大鼠血清中白细胞介素23/白细胞介素17的水平并抑制PI3K/Akt/mTOR通路活性,改善局部炎症反应,从而缓解关节炎的症状。此次实验选用针刺联合艾灸疗法,不仅具有针刺的调节作用,同时艾灸温热可以借针体向探部传导,因此其临床疗效较一般针刺和艾灸治疗为优。作者先前的研究也证明了针刺联合艾灸疗法优于普通针灸的良好疗效^[25],而在类风湿性关节炎选穴规律研究中证实,在整体取基本穴中,足三里使用的频率最高^[26]。足三里可以从3个方面发挥治疗作用,一是能益气健脾化水湿,二是补益气血扶正气,三是疏通经络止疼痛,在治疗类风湿性关节炎方面标本兼顾。在之前对于类风湿性关节炎的研究中,并未涉及到针灸对于其胃肠动力的调节作用,而作者选用针刺加艾灸足三里联合治疗类风湿性关节炎,不仅反映了其对局部关节炎具有调节作用,同时也为类风湿性关节炎所发生的胃肠动力问题提供了新的治疗思路。

综上所述,针灸足三里可以改善类风湿关节炎症状,有效调节胃肠运动,影响大鼠空肠黏膜层神经纤维发生变化,对机体整体具有较好的调节作用。从以上实验结果可以看到针灸足三里调节肠道功能可能是治疗类风湿性关节炎的另一个途径,而其具体机制还需要进一步研究,或许这将成为针灸足三里穴治疗类风湿性关节炎新的研究机制。

致谢:感谢湖北中医药大学针灸骨伤学院实验室提供实验场地,感谢每一位为这篇文章做出贡献的作者,感谢自然科学基金委和湖北省卫健委的课题项目的支持。

作者贡献:李静负责实验设计和论文撰写,李柏村负责实验实施,李佳负责统计分析,蔡国伟负责论文审订。

经费支持:该文章接受了“国家自然科学基金(81804165, 81774410)及湖北省卫健委项目(ZY2019M041)”的基金资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经湖北中医药大学针灸骨伤学院动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经由湖北中医药大学生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] KLARESKOG L, RÖNNELID J, SAEVARSDOTTIR S, et al. The importance of differences; On environment and its interactions with genes, and immunity in the causation of rheumatoid arthritis. *J Intern Med.* 2020; 287(5):514-533.
- [2] SCHER JU, NAYAK RR, UBEDA C, et al. Pharmacomicrobiomics in inflammatory arthritis: gut microbiome as modulator of therapeutic response. *Nat Rev Rheumatol.* 2020;16(5):282-292.
- [3] BUCKLEY F, FINCKH A, HUIZINGA TW, et al. Comparative Efficacy of Novel DMARDs as Monotherapy and in Combination with Methotrexate in Rheumatoid Arthritis Patients with Inadequate Response to Conventional DMARDs: A Network Meta-Analysis. *J Manag Care Spec Pharm.* 2015;21(5):409-423.
- [4] VAN DEN BERG-WOLF M, BURGOON T. Acupuncture and Cutaneous Medicine: Is It Effective? *Med Acupunct.* 2017;29(5):269-275.
- [5] LI J, LI J, CHEN R, et al. Targeting NF- κ B and TNF- α Activation by Electroacupuncture to Suppress Collagen-induced Rheumatoid Arthritis in Model Rats. *Altern Ther Health Med.* 2015;21(4):26-34.
- [6] 蔡国伟, 李柏村, 李佳, 等. 温针灸对骨关节炎大鼠软骨组织 Clock、Bmal1 蛋白的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2019,39(10): 1225-1229.
- [7] 蔡国伟, 李佳, 李静. 温针灸对类风湿性关节炎大鼠关节滑膜组织沉默信息调节因子 2 相关酶 1 和核转录因子 - κ B 蛋白的影响 [J]. *针刺研究*, 2017,42(5):397-401.
- [8] 冉国平, 刘嘉颖, 杨大业, 等. 电针足三里对肠易激综合征腹泻型大鼠炎症损伤的机制研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2019,39(3): 342-346.
- [9] 陈斌, 白羽, 陈芮, 等. 艾灸对诱导性大鼠关节炎及肠道菌群的影响 [J]. *中国微生态学杂志*, 2019,31(6):632-637.
- [10] 李哲. 艾拉莫德在类风湿关节炎中通过调节自噬及线粒体自噬的抗炎机制研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2020.
- [11] CRAIG E, CAPPELLI LC. Gastrointestinal and Hepatic Disease in Rheumatoid Arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2018;44(1):89-111.
- [12] LERNER A, MATTHIAS T. Rheumatoid arthritis–celiac disease relationship: Joints get that gut feeling. *Autoimmun Rev.* 2015;14(11): 1038-1047.
- [13] MORTIER C, GOVINDARAJAN S, VENKEN K, et al. It Takes “Guts” to Cause Joint Inflammation: Role of Innate-Like T Cells. *Front Immunol.* 2018;9:1489.
- [14] DEMORUELLE MK, DEANE KD, HOLERS VM. When and where does inflammation begin in rheumatoid arthritis? *Curr Opin Rheumatol.* 2014;26(1):64-71.
- [15] 周正任. 浅谈粘膜免疫机制 [J]. *中国微生态学杂志*, 2000,12(6): 311+316.
- [16] ATARASHI K, TANOUE T, SHIMA T, et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science.* 2011;331(6015): 337-341.
- [17] CHEN J, WRIGHT K, DAVIS JM, et al. An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis. *Genome Med.* 2016;8(1):43.
- [18] 皮珍平. 类风湿性关节炎患者的关节外表现临床分析 [J]. *中国现代医生*, 2009,47(30):36-37.
- [19] 赵宁, 贾红伟, 吴萍, 等. 从黏膜免疫探讨中医治疗类风湿性关节炎的作用机理 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2002,8(3):6-8.
- [20] CHEN Y, LI H, LUO X, et al. Moxibustion of Zusanli (ST36) and Shenshu (BL23) Alleviates Cartilage Degradation through RANKL/OPG Signaling in a Rabbit Model of Rheumatoid Arthritis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2019;2019:6436420.
- [21] DONG ZQ, ZHU J, LU DZ, et al. Effect of Electroacupuncture in “Zusanli” and “Kunlun” Acupoints on TLR4 Signaling Pathway of Adjuvant Arthritis Rats. *Am J Ther.* 2018;25(3):e314-e319.
- [22] 杨继洲. 针灸大成 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1984.
- [23] JANG JH, LEE DJ, BAE CH, et al. Changes in small intestinal motility and related hormones by acupuncture stimulation at Zusanli (ST 36) in mice. *Chin J Integr Med.* 2017;23(3):215-220.
- [24] 郝锋, 吴立斌, 胡骏, 等. 艾灸对类风湿性关节炎模型大鼠足跖滑膜组织 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响 [J]. *中国针灸*, 2020,40(11): 1211-1216.
- [25] 蔡国伟, 彭锐, 李佳, 等. 温针灸对类风湿性关节炎大鼠关节软骨 vimentin 蛋白的影响 [J]. *上海针灸杂志*, 2017,36(11):1361-1366.
- [26] 白玉, 武平, 熊燕, 等. 针灸治疗类风湿关节炎临床选穴规律探讨 [J]. *亚太传统医药*, 2018,14(4):95-97.

(责任编辑: GD, ZN, ZJP)