

• 基础研究 •

艾炷灸贴预处理对 AA 大鼠足肿胀率及应激激素的影响

郑玲^{1a}, 李晓泓^{1a}, 张露芬^{1a}, 倪健^{1b}, 李辉², 周登芳^{1a}, 翟景慧^{1a}, 何玉伟^{1a}

[摘要] 目的 观察艾炷灸贴预处理对随后佐剂性关节炎(AA)大鼠早期和继发期足肿胀率及下丘脑应激激素的影响。方法 将 40 只 Wistar 大鼠随机分为正常组、模型早期组和继发组、预灸贴早期组和继发组共 5 组,于造模前用中药膜剂贴敷大鼠大椎穴后加艾灸,观察其对随后 AA 大鼠下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)、 β -内啡肽(β -EP)、神经肽 Y(NPY)及足肿胀率的影响。结果 造模后,模型早期组和继发组大鼠的右足肿胀率明显升高($P < 0.01$),预灸贴各组较同期模型组降低($P < 0.05 \sim 0.01$);下丘脑 CRH 水平造模后升高($P < 0.05 \sim 0.01$),但预灸贴早期组较同期模型组有下调趋势,预灸贴继发组下降($P < 0.05$); β -EP 水平造模后早期组明显升高($P < 0.01$),继发组变化不大;与同期模型组相比,预灸贴早期组 β -EP 明显下降,而继发组 β -EP 却明显升高(均 $P < 0.01$);下丘脑 NPY 水平造模后升高($P < 0.05 \sim 0.01$),预灸贴继发组 NPY 较同期模型组下降($P < 0.05$)。结论 艾炷灸贴预处理可减轻随后 AA 大鼠足肿胀程度,机理可能与其调节下丘脑 CRH、 β -EP 及 NPY 水平有关。

[关键词] 艾炷灸贴预处理;佐剂性关节炎;应激;促肾上腺皮质激素释放激素; β -内啡肽;神经肽 Y

Effect of Dressing and Moxibustion pretreatment on Local Feet Swelling and Stress Hormone in Hypothalami of Rats with Adjuvant Arthritis at Early and Secondary Stages ZHENG Ling, LI Xiao-hong, ZHANG Lu-fen, et al. The School of Acupuncture, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: **Objective** To observe the effect of dressing and moxibustion pretreatment on the local joint swelling and stress hormone in hypothalami of rats with adjuvant arthritis (AA) at early and secondary stages. **Methods** Forty Wistar rats were randomly divided into 5 groups: normal group, early and secondary model groups, early and secondary pre-dressing and moxibustion (PDM) groups. The dressing with Chinese herb and moxibustion was stuck on Dazhui point (GV14) before the AA model established. The effects of dressing and moxibustion pretreatment on the feet swelling and corticotropin-releasing hormone (CRH), beta-endorphin (β -EP) and neuropeptide Y (NPY) in hypothalami were observed. **Results** The right feet swelling rate at early and secondary stages obviously increased after modeling ($P < 0.01$), and it became lower in early and secondary PDM groups than in model groups at the same phases ($P < 0.05 \sim 0.01$). The level of hypothalamic CRH was higher after modeling ($P < 0.05 \sim 0.01$), compared with early model group, it had a tendency to going down in early PDM group, moreover, in secondary PDM group the level was similar with the normal group. The level of hypothalamic β -EP increased significantly in early model group ($P < 0.01$), and lightly changed in secondary model group, it decreased in early PDM group but increased in secondary PDM group, compared with model groups at the same stages ($P < 0.05$). The level of hypothalamic NPY increased significantly after modeling, and it declined in the secondary PDM group ($P < 0.05$). **Conclusion** Dressing and moxibustion pretreatment can relief feet swelling of AA rats, which may be related with its regulative effect on the level of hypothalamic CRH, β -EP and NPY.

Key words: dressing and moxibustion pretreatment; adjuvant arthritis; stress; corticotropin-releasing hormone; beta-endorphin; neuropeptide Y

[中图分类号] R245.81 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2006)08-0696-03

[本文著录格式] 郑玲, 李晓泓, 张露芬, 等. 艾炷灸贴预处理对 AA 大鼠足肿胀率及应激激素的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2006, 12(8): 696-698.

艾炷灸贴预处理是指预先在无病机体穴位上用中药膜贴敷再加艾炷灸的方法,属于“逆针灸”的范畴,符合中医“治未病”的理论,即在伤害性刺激作用于机体之前,预先给机体一个适宜的刺激,启动机体的内源性保护机制,提高机体的耐受与应变能力,从而减轻随后

的伤害性刺激给机体带来的损伤。本实验选用佐剂性关节炎(adjuvant arthritis, AA)大鼠制作免疫性炎症模型,观察艾炷灸贴预处理对随后 AA 大鼠早期和继发期足肿胀率及下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin-releasing hormone, CRH)、 β -内啡肽(beta-endorphin, β -EP)和神经肽 Y(neuropeptide Y, NPY)的影响,以揭示其对机体防御保护作用的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 健康成年 Wistar 大鼠 40 只,雄性,体重 180 ~ 220 g,清洁级,购自北京维通利华实

基金项目:1. 国家自然科学基金课题项目资助(No. 90209026);2. 北京市自然科学基金课题项目资助(No. 7052037)

作者单位:1. 北京中医药大学 a. 针灸学院; b. 药学院,北京市 100029; 2. 中日友好医院,北京市 100013。作者简介:郑玲(1981-),女,辽宁大连市人,硕士研究生,主要研究方向:针灸与“治未病”。

验动物技术有限公司,常规饲养 1 周后随机分为 5 组(每组 8 只),即正常组(不造模,不做预灸贴)、模型早期组和继发组(造模,不做预灸贴)、预灸贴早期组和继发组(造模前先进行预灸贴,然后造模)。

1.2 方法

1.2.1 艾炷灸贴预处理 中药药膜主要由淫羊藿等中药组成,由北京中医药大学中药学院制剂室监制。预灸贴各组大鼠处于自然状态下,将大椎穴(定位参见《实验针灸学》大鼠标准穴位图谱)处剪毛,先用自制中药膜贴敷(约 2×2 cm,厚约 0.5 cm),然后在药膜中央位置以小号艾炷施灸(艾炷直径 6 mm,高 1 cm,重量约 2 g,底托直径 1.5 cm,厚 0.5 cm),每次仅灸 1 壮,灸至大鼠因热烫出现甩头(通常艾炷已接近燃尽)。隔日贴敷加灸 1 次,共 8 次。

1.2.2 模型制备 按李氏方法^[1]制备福氏完全佐剂(Freunds complete adjuvant, FCA),于模型早期组和继发组、预灸贴早期组和继发组大鼠右后足掌皮下注射 0.1 ml/只。

1.2.3 取材 早期组和继发组大鼠分别于造模后第 3 天和第 16 天断头处死,取下丘脑,在生理盐水中煮 5 min 以灭活酶;称重后加入 1 N HCl 1 ml 制成匀浆,室温放置 100 min,溶解生物活性肽;加入 1 N NaOH 0.8~1 ml 中和,4000 r/min 离心 10 min,去上清,-20℃保存备用。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 下丘脑 CRH、β-EP、NPY 含量测定 均采用平衡法,加样程序按试剂盒说明书操作(CRH、β-EP、NPY 放免试剂盒由北京华英生物技术研究生产)。

1.3.2 足肿胀率测定 采用特制的鼠足容积测定器,于造模前、造模后第 3 天和第 15 天测量大鼠右足(注射佐剂足)的足爪容积,并按下列公式计算足肿胀率:肿胀率 E(%)=[(Vt-Vn)/Vn]×100%,Vt 为造模后足容积,Vn 为造模前足容积。

1.4 统计学处理 所有数据以($\bar{x}\pm s$)表示,用 SPSS 10.0 统计软件对各组间差异进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 艾炷灸贴预处理对 AA 大鼠足肿胀率的影响 模型和预灸贴各组大鼠于造模 4~8 h 后开始出现明显的原发右足肿胀,24~72 h 达到高峰,3 d 后肿胀逐渐减轻,至继发期(注射后 10 d)肿胀再度回升,第 14~16 天再次达到高峰,且肿胀率均比正常组明显升高($P<0.01$),但预灸贴各组的肿胀程度明显轻于同期模型组($P<0.05\sim 0.01$),见表 1。

2.2 艾炷灸贴预处理对 AA 大鼠早期和继发期下丘脑 CRH、β-EP、NPY 的影响:①CRH 水平:各模型组均高于正常组($P<0.05\sim 0.01$),预灸贴早期组较模

型早期组有下降的趋势,且预灸贴继发组下降($P<0.05$),接近正常组;②β-EP 水平:模型早期组明显高于正常组($P<0.01$),模型继发组与正常组相似;与同期模型组相比,预灸贴早期组 β-EP 下降,而继发组 β-EP 却升高(均 $P<0.05$);③NPY 水平:造模后各组均高于正常组($P<0.05\sim 0.01$),预灸贴继发组较同期模型组下降($P<0.05$),见表 2。

表 1 艾炷灸贴预处理对 AA 大鼠早期和继发期右足肿胀率的影响($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	右足早期肿胀率	右足继发期肿胀率
正常组	0.009±0.018	0.009±0.018
模型组	2.128±0.262 ^a	1.608±0.177 ^a
预灸贴组	1.315±0.153 ^{a,b}	1.010±0.111 ^{a,b}
F	16.410	12.252

注:a.与正常组比较, $P<0.01$;b.与模型组比较, $P<0.01$ 。

表 2 艾炷灸贴预处理对 AA 大鼠早期、继发期下丘脑 CRH、β-EP 及 NPY 的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	CRH (ng/mlg)	β-EP (pg/mlg)	NPY (pg/mlg)
正常组	8	187.1385±30.91836	13735.30±906.1692	6213.496±1299.075
模型早期组	8	541.6544±54.86056 ^b	24155.71±1577.411 ^b	10992.570±1519.478 ^b
预灸贴早期组	8	455.1783±77.18697 ^b	17372.46±1264.215 ^{a,c}	12830.170±803.9566 ^b
模型继发组	8	520.7731±43.24320 ^b	15864.44±1004.264	14293.080±1194.968 ^b
预灸贴继发组	8	320.4751±87.94426 ^d	20899.13±1419.583 ^{b,c}	10963.190±779.814 ^{a,d}
P		5.710	10.814	6.942

注:a.与正常组比较, $P<0.05$;b.与正常组比较, $P<0.01$;c.与模型早期组比较, $P<0.01$;d.与模型继发组比较, $P<0.05$;e.与模型继发组比较, $P<0.01$ 。

3 讨论

佐剂对机体而言属外源性伤害性应激原,可引起体内应激激素的异常变化,造成免疫性炎症的病理应激。大量实验表明,在应激原作用下,下丘脑分泌的 CRH 启动下丘脑-垂体-肾上腺皮质(hypothalamus-pituitary-adrenocortical, HPA)轴,诱导产生多种激素和肽类物质,从而发挥生理调节功能,因此 CRH 是体内重要的应激激素^[2]。β-EP 是源于阿片黑皮质素原(proopiomelanocortin, POMC)的应激性神经肽之一,广泛分布于下丘脑和外周组织器官,参与体内多种生理活动,涉及疼痛、免疫与应激调节等诸多方面,其作用是使机体在不同应激条件下保持稳态^[3]。NPY 是中枢神经系统尤其是下丘脑中含量较高的神经肽之一,在外周交感神经末梢与去甲肾上腺素(noradrenalin, NE)共同存在和释放,是交感神经系统的代表性递质,在应激反应过程中发挥重要作用^[4]。

研究表明,CRH 在淋巴器官和炎症灶均有受体表达^[5],并可诱导免疫细胞产生神经肽或激素,调节局部免疫细胞功能,具有一定的抗炎免疫作用^[6]。因此,CRH 的适量分泌可对机体产生积极的影响。在应激条件下,下丘脑分泌的 CRH 显著增多^[7],CRH 诱导合成 POMC 并进一步产生 β-EP 等^[8]。β-EP 是神经、内

分泌和免疫系统之间相互作用的重要递质。在病理应激条件下,HPA 轴过度兴奋,引起的应激激素及诸多细胞因子大量增加是导致组织损伤和免疫功能紊乱的主要原因。 β -EP 对免疫系统的作用复杂,因不同刺激引起的应激反应程度及机体功能状态的差异,表现为促进或抑制的调节方式^[9]。另有研究显示,CRH 与 NPY 之间存在的负反馈调节是其调节内分泌及自主神经功能活动相互作用的基础^[10]。伤害性刺激作用于机体, NPY 释放增加,促使交感神经释放 NE^[11],引起血管平滑肌强烈收缩,组织缺血缺氧,造成神经源性炎症反应。此外, Whe way 等的研究显示, NPY 通过影响 T 细胞及抗原呈递细胞的功能,实现对免疫系统的双重调节模式^[12]。

现代应激学认为,应激是机体对内外环境刺激作出的非特异性防御适应反应,表现为以 HPA 轴和交感-肾上腺髓质系统(sympathetic adrenomedullary system, SAS)兴奋为主的一系列神经内分泌免疫反应。适当的应激可增强机体对外界有害因素的免疫力和抵御能力,但应激负荷过于持久或强烈,可导致机体生理功能紊乱,产生病理性应激^[13]。本实验于造模前预先用中药膜贴敷加艾炷灸大鼠大椎穴进行干预,观察其对随后佐剂造成的机体不良应激反应的影响。实验结果表明,艾炷灸贴预处理可明显减轻佐剂引起的大鼠早期和继发期足肿胀程度,并对佐剂作用下的下丘脑 CRH、 β -EP、NPY 等应激激素的紊乱状态具有不同程度的调节作用。艾炷灸贴预处理对继发组 CRH 的调节更为明显,激素水平与正常组接近,而且对异常升高的 NPY 也有下调的作用;同时,能够明显降低 AA 早期骤然增高的 β -EP 水平,但在继发期又有所回升,其确切原因尚不清楚。由此可见,艾炷灸贴预处理作为一种良性刺激,可通过调节下丘脑应激激素水平,平衡 HPA 轴及 SAS 的功能活动,并借助神经内分泌免疫网络,调动机体内源性保护机制,减轻随后的强烈伤害性刺激引起的不良应激^[14]。本实验选用的大椎穴为手足三阳与督脉的交会穴,与脑、肾、肝关系密切,具有通过平抑亢进的 HPA 轴功能、调节整体功能状态,从而达到调肝补肾、通督利脑的作用^[15]。本实验自制的中药膜剂主要成分为淫羊藿提取物,富含淫羊藿总黄酮,后者对 HPA 轴有明显调节作用^[16]。

我们以前的研究显示,中药膜贴预处理可减轻随后 AA 大鼠的早期炎症反应和关节病理损害程度^[17],本实验将传统的艾炷灸与药物贴敷的方法相结合,通过药物分子以及温热效应预先作用于大椎穴,使机体处于良性应激状态中,减轻随后 AA 大鼠下丘脑 CRH、 β -EP、NPY 等应激激素的紊乱和足肿胀程度,对机体产生一定的抗病保护作用。

[参考文献]

- [1] Li H, Li XH, Zhang LF, et al. Effects of electroacupuncture on CRH, IL-2 and β -EP contents in the hypothalamus in the rat of adjuvant arthritis[J]. Zhongguo Zhen Jiu, 2005, 25(11): 793—796.
- [2] Slominski A, Zbytek B, Szczesniowski A, et al. CRH stimulation of corticosteroids production in melanocytes is mediated by ACTH[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005, 288(4): E701—706.
- [3] 金惠铭. 病理生理学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002: 107—121.
- [4] Heilig M. The NPY system in stress, anxiety and depression[J]. Neuropeptides, 2004, 38(4): 213—224.
- [5] Wang W, Ji P, Riopelle RJ, et al. Functional expression of corticotropin-releasing hormone (CRH) receptor 1 in cultured rat microglia[J]. J Neurochem, 2002, 80(2): 287—294.
- [6] Gravanis A, Margioris AN. The corticotropin-releasing factor (CRF) family of neuropeptides in inflammation: potential therapeutic applications[J]. Curr Med Chem, 2005, 12(13): 1503—1512.
- [7] Knuepfer MM, Rowe KD, Schwartz JA, et al. Role of angiotensin II and corticotropin-releasing hormone in hemodynamic responses to cocaine and stress[J]. Regul Pept, 2005, 127(1-3): 1—10.
- [8] Fukuda Y, Kageyama K, Nigawara T, et al. Effects of corticotropin-releasing hormone (CRH) on the synthesis and secretion of proopiomelanocortin-related peptides in the anterior pituitary: a study using CRH-deficient mice[J]. Neurosci Lett, 2004, 367(2): 201—204.
- [9] 张纭. β -内啡肽的免疫调节作用与运动[J]. 中国运动医学杂志, 2003, 22(6): 597—599.
- [10] Campbell RE, Grove KL, Smith MS. Distribution of corticotropin-releasing hormone receptor immunoreactivity in the rat hypothalamus: coexpression in neuropeptide Y and dopamine neurons in the arcuate nucleus[J]. Brain Res, 2003, 973(2): 223—232.
- [11] Donoso MV, Delpiano AM, Huidobro Toro JP. Modulator role of neuropeptide Y in human vascular sympathetic neuroeffector junctions[J]. EXS, 2006, 95: 65—76.
- [12] Whe way J, Mackay CR, Newton RA, et al. A fundamental bimodal role for neuropeptide Y1 receptor in the immune system[J]. J Exp Med, 2005, 202(11): 1527—1538.
- [13] 钱令嘉. 应激与应激医学[J]. 疾病控制杂志, 2003, 7(5): 393—396.
- [14] 李晓泓. 针灸“治未病”与“针灸良性预应激假说”[J]. 北京中医药大学学报, 2003, 26(3): 82—85.
- [15] 李晓泓, 韩巍, 张露芬, 等. 艾灸“大椎”穴抗应激作用的实验研究[J]. 中国行为医学科学, 2002, 11(5): 495—497.
- [16] 蒋淑君, 许兰芝. 淫羊藿总黄酮的药理作用研究进展[J]. 中医药学报, 2004, 32(4): 60—62.
- [17] 周登芳, 李晓泓, 张露芬, 等. 中药膜贴预处理对随后佐剂性关节炎大鼠早期炎症的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2005, 11(6): 441—442.

(收稿日期: 2006-03-03)