

不同灸量艾灸对克罗恩病大鼠结肠组织损伤积分和血清 IgG、IgA、IgM 水平的影响*

王 荃, 夏晓红, 叶 敏, 江 莉, 吴思丹
(安徽中医学院, 合肥 230038)

摘要: [目的] 观察不同灸量艾灸对克罗恩病 (CD) 大鼠结肠组织损伤积分和血清免疫球蛋白 IgG、IgA、IgM 水平的影响。 [方法] 将 45 只 SD 大鼠随机分成正常组、模型组、艾灸 A 组、艾灸 B 组和艾灸 C 组共 5 组, 每组 9 只。采用三硝基苯磺酸 (TNBS) 液灌肠制备大鼠 CD 模型, 造模后每组随机取 1 只进行模型判定。艾灸 A 组: 艾条温和灸双侧“天枢”穴, 用小艾条点燃后, 在穴位上方 1~2 cm 处温和灸 5 min, 每日 1 次, 共灸治 14 d; 艾灸 B 组: 方法同艾灸 A 组, 每次艾灸时间为 15 min, 共治疗 14 d; 艾灸 C 组: 方法同艾灸 A 组, 每次艾灸时间为 25 min, 共治疗 14 d; 模型组和正常组只做相同固定, 不做治疗。治疗结束后剖取结肠组织, 苏木精-伊红染色 (HE) 法观察大鼠结肠组织病理学变化, 计算结肠组织损伤积分; 经腹主动脉取血检测大鼠血清 IgG、IgA、IgM 水平。 [结果] 每组取 8 只进入结果分析。模型组大鼠结肠组织损伤积分以及血清 IgG、IgA、IgM 水平明显上升 ($P < 0.01$); 艾灸均能降低 CD 大鼠结肠组织损伤积分以及血清 IgG、IgA、IgM 水平, 但灸治 5 min 效果不显, 灸治 15 min 和灸治 25 min 作用相同, 差异无统计学意义 ($P > 0.01$)。 [结论] 合适的灸量能显著降低血清 IgG、IgA、IgM 水平, 调节免疫水平, 抑制 CD 过激的免疫反应, 从而减轻 CD 肠道炎症。

关键词: 艾灸; 克罗恩病; 大鼠; 结肠组织损伤积分; 免疫球蛋白

中图分类号: R245.81

文献标识码: A

文章编号: 1673-9043(2014)01-0022-04

克罗恩病 (CD) 是一种以腹痛、腹泻、腹部结块为主要特征的炎症性肠病, 病变后期 CD 患者常因肠道慢性炎症的反复发作和组织损伤修复, 出现肠纤维化, 最终导致肠腔狭窄和肠壁僵硬等病理改变。目前认为, 免疫反应是 CD 发生发展的重要机制之一, 西医主要采用 5-氨基水杨酸、糖皮质激素、硫唑嘌呤等免疫调节剂治疗, 但不良反应较大且疗效欠佳^[1]。本研究探索运用艾灸治疗实验性 CD 大鼠, 观察不同灸量艾灸对大鼠结肠组织损伤积分和血清免疫球蛋白 IgG、IgA、IgM 的影响。

1 实验动物与方法

1.1 实验动物 雄性清洁级 SD 大鼠 45 只, 体重 (180±20) g。安徽医科大学实验动物中心提供。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组与造模 将 45 只大鼠随机分成正常组、模型组、艾灸 A 组、艾灸 B 和艾灸 C 组共 5 组, 每组 9 只。其中对模型组、艾灸组 36 只大鼠

进行实验 CD 造模, 模型制备参照目前国际公认的 Morris^[2]法, 采取三硝基苯磺酸 (TNBS) 溶液灌肠制备。

大鼠于造模前 24 h 禁食但不禁水。1) TNBS 灌肠液制备: 先将无水乙醇加双蒸水, 配制成 50% 的乙醇, 再将 50% 乙醇与 TNBS 以 1:2 比例混合配制成 TNBS 灌肠液。2) 动物麻醉: 使用 2% 戊巴比妥钠按照 20 mg/kg 进行动物腹腔注射麻醉。3) 灌肠: 造模组大鼠以 TNBS 溶液按 100 mg/kg 灌肠。大鼠体位为肛门朝上, 头朝下, 以灌胃针插入肛门约 6~8 cm, 注入灌肠液后拔出灌胃针, 保持肛门朝上体位约 5 min, 防止灌肠液溢出。7 d 后重复灌肠 1 次, 总计灌肠 4 次。4) 模型鉴定: 为确定 CD 大鼠模型制备成功, 每组于造模结束后随机抽取 1 只大鼠进行结肠组织形态学观察。

1.2.2 治疗方法

 造模结束后进行治疗。

艾灸 A 组 ($n=8$): 取天枢 (双), 穴位定位根据《实验针灸学》^[3] 确定, 在天枢穴行艾条温和灸, 用小艾条点燃后距离穴位上方 1~2 cm 施灸, 每日 1 次, 双侧天枢各灸 5 min, 共治疗 14 d。艾灸 B 组 ($n=8$):

* 基金项目: 安徽省科技计划 2012 年度重点项目 (11070403060)。
作者简介: 王 荃 (1964-), 男, 医学博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事针灸免疫研究。

方法同艾灸 A 组,每次艾灸时间为 15 min,共治疗 14 d。艾灸 C 组($n=8$):方法同艾灸 A 组,每次艾灸时间为 25 min,共治疗 14 d。正常组($n=8$):不进行任何处理,只做与治疗组相同的固定。模型组($n=8$):不进行任何处理,只做与治疗组相同的固定。

1.3 实验检测

1.3.1 大鼠结肠组织损伤积分 治疗结束后,经腹主动脉取血后处死动物,约距肛门 6~8 cm 处截取 2~3 cm 长结肠一段,用生理盐水反复冲洗后,置于 10%福尔马林溶液中固定。

采用苏木精-伊红染色(HE)法染色后进行结肠组织病理学观察。取固定后的结肠组织,按照常规脱水、透明、石蜡包埋、切片,然后将厚度约 4 μm 的石蜡切片贴片后置 58 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱烤片 24 h,常规脱蜡至水,分别于二甲苯 I、II 中浸泡各 20 min,后于无水乙醇、95%乙醇 I、II 中各 10 min,流水冲洗 1 min 后苏木精衬染 10 min,再水洗 1 min,最后伊红着色 10 s,常规脱水并树脂封片后,显微镜下观察结肠组织病理变化。统计结肠组织损伤积分,观察结肠炎症、黏膜溃疡、腺体排列、黏膜下层充血水肿及纤维增生 5 方面指标,每个指标以“+”号代表结肠病损程度,计算积分时每 1 个“+”号计 1 分。

1.3.2 大鼠血清 IgG、IgA、IgM 水平检测 大鼠麻醉后腹部朝上固定,以手术剪沿腹中线依次剪开皮肤、皮下组织、腹膜,暴露腹腔,在腹腔正中找到腹主动脉,右手持穿刺针,针尖斜面朝下,入针角度约 25~30 $^{\circ}$,朝向心端方向刺入,深度以 5 mm 左右为宜,抽吸血液 8~10 mL 入试管内,将试管置高速离心机内以 2 000 r/min 离心 15 min,取血清于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存后 ELISA 法检测大鼠血清 IgG、IgA、IgM 含量。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据处理。计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 各组大鼠结肠组织学损伤积分 见表 1。

表 1 显示,与正常组比较,各组结肠组织学损伤积分差异均有统计学意义($P<0.01$),治疗组中,除艾灸 A 组外,其余两组与模型组比较差异均有统计学意义($P<0.01$),但艾灸 B 组与艾灸 C 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 各组大鼠血清 IgG、IgA、IgM 水平 见表 2、表 3、表 4。

表 1 各组大鼠结肠组织学损伤积分比较($\bar{x}\pm s$) 分

组别	n	损伤积分
正常组	8	0.750 0 \pm 0.366 0*
模型组	8	9.125 0 \pm 0.515 4 [#]
艾灸 A 组	8	8.000 0 \pm 0.567 0 [#]
艾灸 B 组	8	4.250 0 \pm 0.250 0 [#]
艾灸 C 组	8	4.125 0 \pm 0.226 6 ^{#Δ}

注:与模型组比较,* $P<0.01$;与正常组比较,[#] $P<0.01$;与艾灸 B 组比较, $\Delta P>0.05$ 。

表 2 各组大鼠外周血 IgA 水平比较($\bar{x}\pm s$) g/L

组别	n	IgA
正常组	8	0.361 3 \pm 0.184 0*
模型组	8	1.998 8 \pm 0.605 2 [#]
艾灸 A 组	8	1.313 8 \pm 0.290 3 [#]
艾灸 B 组	8	0.630 0 \pm 0.221 8 ^{*Δ}
艾灸 C 组	8	0.672 5 \pm 0.317 5 ^{*$\Delta$$\square$}

注:与模型组比较,* $P<0.01$;与正常组比较,[#] $P<0.01$;与艾灸 A 组比较, $\Delta P<0.01$;与艾灸 B 组比较, $\square P>0.05$ 。

表 2 显示,模型组大鼠外周血 IgA 水平明显上升,治疗组治疗后 IgA 水平有明显下降,但艾灸 A 组与正常组比较差异亦有统计学意义($P<0.01$)。艾灸 B 组与艾灸 C 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 3 各组大鼠外周血 IgG 水平比较($\bar{x}\pm s$) g/L

组别	n	IgG
正常组	8	0.640 0 \pm 0.294 0*
模型组	8	5.363 8 \pm 0.835 6 [#]
艾灸 A 组	8	4.388 8 \pm 0.833 7 [#]
艾灸 B 组	8	1.188 8 \pm 0.452 9 ^{*Δ}
艾灸 C 组	8	1.423 8 \pm 0.539 7 ^{*$\Delta$$\square$}

注:与模型组比较,* $P<0.01$;与正常组比较,[#] $P<0.01$;与艾灸 A 组比较, $\Delta P<0.01$;与艾灸 B 组比较, $\square P>0.05$ 。

表 3 显示,治疗后各组大鼠外周血 IgG 水平与模型组比较差异均有统计学意义($P<0.01$),但除艾灸 A 组外,其余两组与正常组比较差异亦有统计学意义($P<0.01$)。治疗组中,艾灸 A 组与艾灸 B 组、艾灸 C 组比较,差异有统计学意义($P<0.01$),艾灸 B 组与艾灸 C 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 4 各组大鼠外周血 IgM 水平比较($\bar{x}\pm s$) g/L

组别	n	IgM
正常组	8	0.220 0 \pm 0.094 1*
模型组	8	1.227 5 \pm 0.207 8 [#]
艾灸 A 组	8	0.695 0 \pm 0.125 1 [#]
艾灸 B 组	8	0.245 0 \pm 0.058 3 ^{*Δ}
艾灸 C 组	8	0.263 8 \pm 0.048 7 ^{*$\Delta$$\square$}

注:与模型组比较,* $P<0.01$;与正常组比较,[#] $P<0.01$;与艾灸 A 组比较, $\Delta P<0.01$;与艾灸 B 组比较, $\square P>0.05$ 。

表4显示,各组大鼠外周血 IgM 水平与模型组比较差异均有统计学意义($P<0.01$),但艾灸 A 组血 IgM 水平虽有下降,与正常组比较差异有统计学意义($P<0.01$),与艾灸 B 组和艾灸 C 组比较差异亦有统计学意义($P<0.01$);艾灸 B 组与艾灸 C 组血 IgM 水平下降差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

克罗恩病(CD),又称局限性肠炎、节段性肠炎和肉芽肿性肠炎,是一种病因尚未完全明了的以末端回肠与邻近结肠发病为多见的炎症性肠病。临床主要表现为慢性起病、反复发作的腹痛、腹泻、腹部肿块、肠瘘和肛门病变,可伴有发热、贫血、体质量下降等全身症状及关节、皮肤、眼、口腔黏膜等肠外损害。重症患者常因肠道慢性炎症的反复发作和组织的损伤修复,导致肠纤维化,从而出现肠腔狭窄和肠壁僵硬等病理改变,使病情迁延难愈,预后不良。近年来,国内外流行病学研究显示在经济发达的地区及城市其发病率呈上升趋势^[4-6]。尽管 CD 病因与发病机制尚不明确,目前一致认为 CD 的发病与环境、免疫及遗传等因素密切相关,上述因素引发机体及肠道组织的过激免疫反应是 CD 发生发展的关键。临床研究显示,CD 患者肠黏膜上皮屏障完整性受损,紧密连接被破坏,上皮细胞凋亡或坏死,肠上皮通透性增加,从而肠腔抗原反复刺激并大量摄入使肠免疫系统错误识别,引起免疫级联反应,从而导致 CD 慢性肠道炎症^[7]。CD 作为炎症性肠病的一种,免疫反应异常是其发病的重要机制^[8-9]。

艾灸具有温散寒邪、温通经络、活血逐瘀、消肿散结的功效。近年来,艾灸对免疫系统、神经-内分泌-免疫网络系统、消化系统以及机体代谢等方面的调节作用研究越来越收到广泛关注,尤其是艾灸对免疫功能的影响正成为目前研究的热点。研究表明,灸疗对免疫功能有双向调整作用,对存在免疫障碍者可提高患者的特异性和非特异性免疫功能^[10-11],使血清中免疫球蛋白明显增高,特异性抗体滴度增加,血清总补体含量升高。而对免疫反应过激者,艾灸具有抗炎与免疫调节作用,其机制可能是通过抑制炎症因子的释放,纠正炎症时自由基代谢的紊乱,改善去甲肾上腺素、5-羟色胺等神经递质的失衡,稳定机体内环境等多方面作用来实现的^[12],灸疗要产生一定疗效,首先必须有一定的灸量积累,当灸量积累到一定程度时,易产生灸感,获得一定的灸感后产生灸效。所以,灸量是灸疗起效的关键因素。但

并非灸量越大,灸效越好,灸量与灸效之间不呈完全的线性关系。影响灸量的因素主要包括灸火势大小、施灸时间、灸治温度和灸治频度等^[13]。张京英等^[14]观察不同灸法、灸量对家兔全血组胺含量的影响,实验表明灸后 90 min,各艾灸组家兔全血中组胺含量有很大差异。艾条强刺激时,皮肤温度达到 55℃,持续 5 min,全血组胺明显升高;艾炷强刺激时,皮肤温度达 190℃,持续 90 s 左右,全血组胺含量并无升高,与灸前相近;弱刺激中,艾条灸时皮肤温度保持在 40℃左右,对家兔全血组胺无影响,小艾炷灸时皮肤温度达 150℃约 50 s 左右,全血组胺反而明显下降。说明灸效与不同灸法、刺激量的大小有密切关系。过强(大艾炷)或过弱(艾条弱刺激)的艾火刺激均不能使血中组胺发生变化,而较强的(艾条强刺激)艾火刺激可使家兔全血中组胺明显升高,中强的(小艾炷)艾火刺激可降低全血组胺的含量。李守栋^[15]研究灸法不同刺激量对雷公藤甲素不良反应的影响,结果提示不同刺激量艾灸拮抗雷公藤甲素毒性反应的作用不同,一个中等程度的刺激更较轻刺激或强刺激有利于机体的脏器抵抗药物的不良反应。张英等^[16]采用不同灸治时程治疗阳虚小鼠模型,结果显示:不同灸治时程对阳虚小鼠模型的 T 淋巴细胞酯酶阳性率、白细胞介素 2 的影响存在差异,灸 15 min 可显著提高阳虚小鼠 T 淋巴细胞酯酶阳性率($P<0.01$),灸 5、25 min 则无显著作用;灸 15、25 min 均可显著提高阳虚小鼠白细胞介素 2 活性,两者之间无统计学差异,而灸 5 min 无显著作用。

本研究选取灸治时间这一重要灸量因素治疗 CD 显示,CD 模型大鼠外周血 IgA、IgG、IgM 水平明显升高,不同灸量艾灸后,尽管各组大鼠血清 IgA、IgG、IgM 水平均有下降的趋势,但艾灸 B 组和艾灸 C 组大鼠血清 IgA、IgG、IgM 水平下降最为明显,且肠道炎性损伤最小,具有显著的优势,艾灸 B 组和艾灸 C 组之间无统计学差异,说明灸效并非与灸量完全正相关,合适的灸量能显著降低血清 IgA、IgG、IgM 水平,调节免疫水平,从而抑制 CD 过激的免疫反应。

参考文献:

- [1] 朱峰,刘晓红,姚方,等.克罗恩病的个案治疗讨论[J].临床药物治疗杂志,2003,1(4):49.
- [2] Morris GP, Beck PL, Herridge MS, et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon[J]. Gastroenterology, 1989, 96: 795-803.

- [3] 李忠仁.实验针灸学[M].北京:中国中医药出版社,2003.
- [4] 布立民,韩英.克隆氏病:临床面临的挑战[J].诊断学·理论与实践,2003,2(2):158-159.
- [5] 汪正芳,郭前坤,张声生.疏肝健脾方对腹泻型肠易激综合征大鼠血浆及结肠组织5-HT、SP、VIP的影响[J].天津中医药,2012,29(5):459-462.
- [6] 戴宝林.溃疡性结肠炎因病机探讨及辨治体会[J].天津中医药大学学报,2001,20(2):37-38.
- [7] Schmitz H, Barmeyer C. Altered tight junction structure contributes to impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis[J]. Gastroenterology, 1999,116: 301-309.
- [8] Nielsen OH, Kirman I, Rudiger N, et al. Upregulation of interleukin-12 and-17 in active inflammatory bowel disease[J]. Scand J Gastroenterol, 2003,38:180-185.
- [9] 祁向争,刘洁.溃疡性结肠炎动物模型研究进展[J].天津中医药大学学报,2010,29(4):220-222.
- [10] 李丽萍,华金双,孙忠人,等.艾灸百会和太冲穴对慢性应激抑郁模型大鼠细胞因子的影响[J].中医药学刊,2006,24(9):1757-1759.
- [11] 高希言,王燕.艾灸强壮要穴对衰老小鼠免疫功能的影响[J].河南中医,2005,25(11):24-26.
- [12] 唐照亮,宋小鸽,章复清,等.艾灸治疗类风湿性关节炎抗炎免疫作用机理的研究[J].针刺研究,2003,28(4):292-298.
- [13] 王云,王玲玲.艾灸间隔时间与疗效相关性的研究概述[J].天津中医药,2009,26(5):436-437.
- [14] 张京英,刘农虞,杨兆民,等.不同灸法、灸量对家兔全血组胺含量的影响及其意义[J].中国针灸,1994,13(6):27-29.
- [15] 李守栋.灸法不同刺激量对雷公藤甲素副作用的影响[J].甘肃中医,2007,20(1):49-50.
- [16] 张英,刘又香,孙国杰.不同灸治时程对阳虚小鼠免疫功能影响的比较[J].湖北中医杂志,1998,20(2):53-54.

(收稿日期:2013-10-16)

Influence of different quantity of moxibustion on colon damage and serum IgG, IgA, IgM level in rats with crohn's disease

WANG Jing, XIA Xiao-hong, YE Min, JANG Li, WU Si-dan
(Anhui College of TCM, Hefei 230038, China)

Abstract: [Objective] To explore the effects and mechanism in treating Crohn's Disease (CD) with different quantity of moxibustion (moxi). [Methods] Forty-five rats with CD were divided into 5 groups: normal group, model group, moxi A group, moxi B group and moxi C group. At the fourteenth days after disposing, their integral score of the colon damage and the serum IgG, IgA, IgM level were observed. [Results] The integral score of the intestinal injury and the serum IgG, IgA and IgM level in model group was higher than that in the rest of group ($P < 0.01$), moxi can lower the integral score of colon damage, the serum IgG, IgA and IgM level and was benefited for the colon inflammatory response. But the effect of moxi for 5 min was not significant, the effect of moxi for 15 min was as significant as the effect of moxi for 25 min ($P > 0.01$). [Conclusion] Proper moxibustion quantity can significantly lower the integral score of colon damage and the serum IgG, IgA and IgM level, improve the immune system, alleviate the colon inflammatory changes in rats with CD.

Key words: moxibustion; Crohn's Disease; rats; the integral score of intestinal injury; immune globulin