

# 刺血疗法对急性痛风性关节炎大鼠局部 IL-1 $\beta$ 、IL-10 启动子甲基化的影响

吕凯露<sup>1</sup>, 夏有兵<sup>2\*</sup>, 程洁<sup>2</sup>, 穆艳云<sup>2</sup>, 梁莎<sup>3</sup>, 罗玺<sup>4</sup>

(1. 浙江医院推拿科, 浙江 杭州 310007; 2. 南京中医药大学第二临床医学院, 江苏 南京 210023; 3. 湖南医药学院针灸教研室, 湖南 怀化 418000; 4. 第二军医大学长征医院南京分院针灸科, 江苏 南京 210015)

**摘要:**目的 观察刺血疗法对急性痛风性关节炎大鼠造模关节局部白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白介素-10(IL-10)基因的相对表达及启动子区甲基化水平的影响,探讨刺血疗法治疗急性痛风性关节炎的相关表观遗传调控机制。**方法** 36只SD大鼠随机分为正常组、模型组、药物组、刺血组。右踝关节腔注射尿酸钠建立急性痛风性关节炎大鼠模型。刺血组在右侧昆仑穴点刺放血,药物组以布洛芬灌胃治疗。评价造模关节肿胀程度,光镜下观察关节腔组织形态学改变,qPCR和焦磷酸测序检测大鼠造模关节局部软骨及其周围软组织 IL-1 $\beta$ 、IL-10的 mRNA 表达水平及基因启动子区甲基化水平。**结果** 与模型组、药物组比较,刺血组关节肿胀指数明显降低( $P < 0.01$ )。刺血疗法能减少关节腔内尿酸盐结晶沉积,抑制炎症细胞的浸润,改善关节滑膜的组织形态结构。与模型组比较,刺血组 IL-1 $\beta$  mRNA 的相对表达量明显降低( $P < 0.01$ )。但 IL-1 $\beta$  基因启动子区甲基化水平与其 mRNA 表达不呈负相关。与正常组、模型组、药物组比较,刺血组 IL-10 mRNA 的相对表达量升高( $P < 0.01$ ),IL-10 平均甲基化率降低( $P < 0.05 \sim 0.01$ )。IL-10 基因启动子甲基化水平与其 mRNA 表达呈显著负相关( $r = -0.899, P < 0.01$ )。**结论** 刺血疗法通过 DNA 甲基化的表观遗传修饰调控 IL-10 基因表达可能是刺血疗法发挥抗炎效应的重要机制之一。

**关键词:**刺血疗法;急性痛风性关节炎;IL-1 $\beta$ ;IL-10;DNA 甲基化

**中图分类号:**R285 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-0482(2017)05-0509-06

**DOI:**10.14148/j.issn.1672-0482.2017.0509

## The Effects of Pricking Blood Therapy on Promotor Methylation of IL-1 $\beta$ , IL-10 in Rats Local Ankle Joint with Acute Gouty Arthritis Model

LYU Kai-lu<sup>1</sup>, XIA You-bin<sup>2\*</sup>, CHENG Jie<sup>2</sup>, MU Yan-yun<sup>2</sup>, LIANG Sha<sup>3</sup>, LUO Xi<sup>4</sup>

(1. Tuina Department, Zhejiang Hospital, Hangzhou, 310007, China; 2. The Second Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China; 3. Teaching and Research Office of Acupuncture and Moxibustion, Hunan Medical College, Huaihua, 418000, China; 4. Acupuncture Department, Nanjing Branch of Changzheng Hospital Affiliated to Second Military Medical University, Nanjing, 210015, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To observe the cross section diameter and the effects of pricking blood therapy on acute gouty arthritis rats model's interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-10 (IL-10) mRNA expression and promoter methylation in local ankle, and explore the epigenetics mechanisms of pricking blood therapy's treatment. **METHODS** 36 SD rats were randomly divided into normal control group, urate arthritis group, ibuprofen group and bloodletting group. The acute gouty arthritis model set up by injecting uric acid into the right ankle joint cavity. The ibuprofen group was treated by gastric perfusion of ibuprofen, while the bloodletting group was pricked at the right Kunlun points. The swelling index of the modeling joint was evaluated, and the morphological changes were observed under light microscope. The mRNA expression levels and promoter methylation status of IL-1 $\beta$  and IL-10 in rats local ankle were detected by qPCR and pyrosequencing detection. **RESULTS** Compared with the urate arthritis group and ibuprofen group, the joint swelling index in the bloodletting group was decreased ( $P < 0.01$ ) after the treatment. Pricking blood therapy reduced intracellular deposition of uric acid in the joint cavity, and inhibited inflammatory cells to improve the synovial membrane tissue. Compared with urate arthritis group, the IL-1 $\beta$  mRNA expression levels of blood group was decreased significantly ( $P < 0.01$ ). IL-1 $\beta$  promoter methylation and mRNA expression didn't showed a negative correlation. Compared with normal control group, urate arthritis group and ibuprofen group, the expression levels of IL-10

收稿日期:2016-12-26;修稿日期:2017-02-26

基金项目:国家自然科学基金(81273840)

作者简介:吕凯露(1991-),女,浙江永康人,浙江医院住院医师。\*通信作者:xyb@njmu.edu.cn

mRNA in blood group increased significantly ( $P < 0.01$ ), and the average methylation rate of IL-10 among blood group decreased significantly ( $P < 0.05 \sim 0.01$ ). IL-10 promoter methylation and mRNA expression showed a strong negative correlation ( $r = -0.899$ ,  $P < 0.01$ ). **CONCLUSION** In epigenetics, the methylation of IL-10 can regulate the gene expression, which can be one of important mechanisms which shows anti-inflammatory effects of pricking blood therapy, .

**KEY WORDS:**pricking blood therapy; acute gouty arthritis; IL-1 $\beta$ ; IL-10; DNA methylation

急性痛风性关节炎是由尿酸钠盐结晶沉积于关节软骨、滑膜所导致的。其发病机制与局部的炎性/抗炎细胞因子的失衡有关<sup>[1]</sup>。近年临床报道<sup>[2-3]</sup>刺血疗法治疗急性痛风性关节炎有较好的临床疗效。我们的前期研究结果<sup>[4-5]</sup>已表明刺血疗法能通过快速有效地良性调节局部炎性/抗炎因子含量,减少关节周围炎细胞的浸润,改善关节软骨的超微结构,从而缓解急性痛风性关节炎的局部红肿热痛的症状。

研究表明,多种关节炎的发生发展与炎性/抗炎因子的 DNA 甲基化表观遗传修饰有关<sup>[6-7]</sup>。DNA 甲基化可以通过募集甲基结合蛋白,引起染色质凝集,阻止转录因子的结合,影响基因转录调控。基因启动子区高甲基化能抑制基因转录,低甲基化则能促进基因转录。

IL-1 $\beta$  作为炎症趋化因子及激活因子,在痛风性关节炎的发生、发展过程中起重要作用<sup>[8]</sup>。IL-10 作为抗炎因子,能减少促炎因子 IL-1 $\beta$  表达及 IL-1 $\beta$  前体的分泌来发挥抗炎效应<sup>[9-10]</sup>。

本实验以刺血疗法干预急性痛风性关节炎大鼠模型,观察炎性因子 IL-1 $\beta$ 、抗炎因子 IL-10 基因相对表达及启动子区甲基化水平的改变,并分析两者的相关性,初步探讨刺血疗法治疗急性痛风性关节炎的相关表观遗传调控机制。

## 1 材料

### 1.1 实验动物与分组

健康 SPF 级 SD 雄性大鼠 36 只,体质量(200 $\pm$ 20)g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2012-0001,室温 22~25 $^{\circ}$ C,12/12 h 昼夜节律,自由进食与饮水,适应性饲养 1 周。术后分笼单独饲养。

采用随机数字法将大鼠分为 4 组:正常组、模型组、刺血组、药物组,每组 9 只。实验过程中对动物的处置遵循相关动物伦理学要求。

### 1.2 主要试剂及仪器

尿酸钠(美国 Sigma 公司);布洛芬混悬液(江苏恒瑞医药股份有限公司);Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司);第一链 cDNA 合成试剂盒(美国

Roche 公司);SYBR Green(美国 Thermo 公司);QIAamp DNA Mini and Blood Mini 试剂盒(德国 Qiagen 公司);Investigator Quantiplex 定量试剂盒(德国 Qiagen 公司);EpiTect Bisulfite 试剂盒(德国 Qiagen 公司)、PyroMark PCR 试剂盒(德国 Qiagen 公司)、PyroMark Gold Q96 试剂盒(德国 Qiagen 公司);链霉亲和素包被的磁珠(中国 Streptavidin Sepharose High Performance);热启动 Taq 核酸聚合酶(中国 Takara);焦磷酸测序仪配套使用试剂(德国 Qiagen 公司)。垂直电泳仪(美国 BIO-RAD 公司);垂直、转印电泳槽(美国 BIO-RAD 公司);化学发光成像仪(上海 BIOSHINE 公司);Nano 微量分光光度计(美国 Thermo 公司);分子杂交 PCR 仪(美国 Thermo 公司);qPCR 仪(Mx3000P 美国 Stratagene 公司)。PyroMark Q96 ID 焦磷酸测序仪(德国 Qiagen 公司);9700 型 PCR(美国 Life 公司)。

## 2 方法

### 2.1 模型制备

模型组、刺血组、药物组 3 组大鼠均采用改良关节腔尿酸钠注射法<sup>[11]</sup>制备急性痛风性关节炎模型。

以 10%水合氯醛(每 100 g 注射 0.35 mL)对大鼠进行腹腔注射麻醉。将大鼠右后肢踝关节摆放为直角,充分暴露出右后肢背侧正中踝关节与胫腓骨间的关节间隙。局部消毒后,用 4 号针头按 45 $^{\circ}$ 夹角穿刺入关节腔,微量注射 50  $\mu$ L 的 5%尿酸钠溶液。造模 6 h 后,大鼠出现右后肢踝关节肿胀,关节活动受限,提示造模成功<sup>[11]</sup>。

### 2.2 干预方法

在造模后 6、24 h 2 个时间点分别对所有大鼠进行干预。

刺血组固定患肢,以 0.7 mm 注射器针头在右侧昆仑穴(后肢外踝与跟腱之间的凹陷中)点刺放血(深度约为 0.3 cm),以污血放尽为度。

药物组以布洛芬 120 mg/kg 剂量灌胃。

正常组及模型组分别在 2 个相同时间点以相同方式固定右后肢 1 min。

### 2.3 标本采集

造模 48 h 后,用颈椎脱臼法处死大鼠,每组抽取 6 只大鼠,迅速打开右后肢跗跖关节,剪切取关节软骨及周围软组织,用 10% PBS 洗涤后,冻存于 -80 °C 冰箱,用于 qPCR 检测及焦磷酸测序。每组其余 3 只大鼠,剪取右后肢踝关节(近端及远端各保留 0.5 cm),去皮,置于 10% 的甲醛,用于 HE 染色。

### 2.4 观察指标及检测方法

**2.4.1 关节肿胀程度的评价** 在造模前、造模后 6 h(治疗前)、造模后 48 h(治疗后)3 个时间点,用 2~3 mm 的纸条及直尺测量大鼠右后肢踝关节的周径,各时间点均重复测量 3 次,取平均值,计算关节肿胀指数。关节肿胀指数=(测定时间点关节周径-造模前周径)/造模前周径。以关节肿胀指数评价造模关节肿胀程度。

### 2.4.2 造模关节的 HE 染色及光镜观察

表 1 qPCR 相关引物序列及扩增长度

基因名称	引物序列	产物长度/bp
IL-1 $\beta$	上游引物:5-GGCGGTTCAAGGCATAACAG-3'	246
	下游引物:5-GTCGAGATGCTGCTGTGAGA-3'	
IL-10	上游引物:5-CCTCTGGATACAGCTGCGAC-3'	201
	下游引物:5-AGTAGATGCCGGGTGGTTCA-3'	
GAPDH	上游引物:5-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3'	143
	下游引物:5-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3'	

**2.4.4 焦磷酸测序检测造模关节局部 IL-1 $\beta$ 、IL-10 基因启动子区甲基化水平** 先提取 DNA(检测吸光度均大于 1.6),采用 PCR 仪进行 DNA 转化反应,条件为:95 °C 变性 5 min,60 °C 复性 25 min,95 °C 变性 5 min,60 °C,复性 85 min,95 °C 变性 5 min,60 °C 复性 175 min,20 °C 过夜冷却。前期用 BSP 法确定 IL-1 $\beta$ 、IL-10 基因启动子区的 5CpG 岛,设计合成引物(上海基康生物技术有限公司,序列见表 2)。再进行焦磷酸测序:配制 25  $\mu$ L 反应体系,95 °C 预热 15 min,94 °C 变性 30 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30

醛固定 24 h,10% 硝酸脱钙 3 d(每天更换硝酸),完全脱钙后梯度酒精脱水,石蜡包埋,切片(厚 4  $\mu$ m),常规 HE 染色,光镜观察局部关节腔形态学改变并拍照。

**2.4.3 qPCR 检测造模关节局部 IL-1 $\beta$ 、IL-10 基因的相对表达** 用 Trizol 试剂提取总 RNA,氯仿及异丙醇抽提。微量分光光度计及琼脂糖电泳鉴定 RNA 的浓度及纯度,根据逆转录试剂盒说明反转录合成 cDNA,-20 °C 冻存储存。取 2  $\mu$ L cDNA 进行 PCR 扩增反应,并以 GAPDH 作为内参。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成,序列见表 1。PCR 反应条件:95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 15 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,循环 40 次。测得 Ct 值后,以  $\Delta\Delta$ Ct 计算 Fold change 值作为目的基因的相对表达量。

s,经 45 个循环扩增反应,72 °C 终延伸冷却 10 min。在 96 孔 PCR 反应板中按说明加入反应结合珠 2  $\mu$ L,后将探头上结合珠及 PCR 产物置入 80  $\mu$ L 退火缓冲液(含测序引物 1.6  $\mu$ L),80 °C 变性 2 min,冷却至室温,使引物与范本退火杂交。依次加入底物混合物、酶混合物及 4 种 dNTP,将试剂舱及 PSQ 96 Plate Low 板放入 PyroMark Gold Q96 测序仪的相应位置,PyroMark CpG 软件自动分析每个位点甲基化率。再计算 5CpG 的平均甲基化率。

表 2 焦磷酸测序相关引物序列及生物素标记位置

基因名称	引物序列	生物素标记位置
IL-1 $\beta$	上游引物 5-AACCCAGGTTGAGTGGAGGAAA-3'	5' Biotin
	下游引物 5-ATGGAGA AACTCCTGCAGGAGAA-3'	
	测序引物 5-TCCAGGCTCGTTCTGCCGA-4'	
IL-10	上游引物 5-AACCCAGGTTGAGTGGAGGAAA-3'	5' Biotin
	下游引物 5-AGAAGAGGGAGGAGCCTTTGCC-3'	
	测序引物 5-CACGTCATTGTGACTTACGAGTGCGTG-4'	

### 2.5 统计学处理

计量资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS16.0 进行

统计分析。组内比较,采用配对 t 检验,组间比较采用单因素方差分析(两两比较,方差齐采用 SNK

法,方差不齐则采用 Dunnett's 检验);双变量相关性分析采用 Spearman 秩相关检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 刺血疗法对造模关节肿胀程度的影响

造模 6 h(治疗前),与正常组比较,模型组、药物组及刺血组的关节肿胀指数均显著升高 ( $P < 0.01$ );模型组、药物组及刺血组的关节肿胀指数两两比较,无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。见表 3。

造模 48 h(治疗后),与正常组比较,模型组及药物组的关节肿胀指数均明显升高 ( $P < 0.01$ ),而刺血组关节肿胀指数相对升高,差异无显著性 ( $P > 0.05$ );与模型组比较,药物组及刺血组的关节肿胀指数均明显降低 ( $P < 0.01$ );与药物组比较,刺血组的关节肿胀指数明显降低 ( $P < 0.01$ )。见表 3。

组内比较:与治疗前相比,治疗后药物组、刺血组的大鼠踝关节肿胀指数均明显降低 ( $P < 0.05 \sim 0.$

01)。见表 3。

表 3 各组大鼠关节肿胀指数的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	n	造模 6 h	造模 48 h
正常组	9	0.003 ± 0.006	0.006 ± 0.007
模型组	9	0.213 ± 0.026**	0.229 ± 0.066**
药物组	9	0.210 ± 0.048**	0.134 ± 0.09**##☆☆
刺血组	9	0.188 ± 0.048**	0.046 ± 0.04##△△☆☆

注:与正常组比较, \*\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较, ##  $P < 0.01$ ;与药物组比较, △△  $P < 0.01$ ;与治疗前比较, ☆  $P < 0.05$ , ☆☆  $P < 0.01$ 。

#### 3.2 刺血疗法对造模关节腔形态学的影响

光镜下各组大鼠造模关节腔形态学改变:正常组关节软骨表面光滑无缺损,未见炎细胞浸润,关节腔中无渗出液;模型组关节腔内见大量红染无定形物,滑膜组织见大量炎细胞浸润;药物组关节腔内见少量红染无定形物,滑膜组织见部分炎细胞浸润;刺血组关节腔内见少量红染无定形物,滑膜组织见少量炎细胞浸润。见图 1。

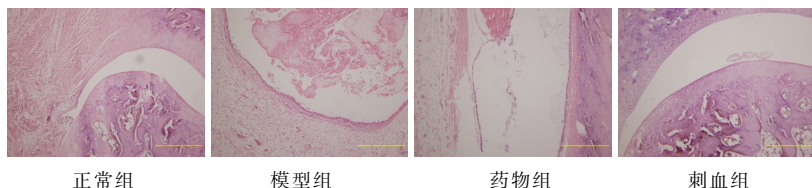


图 1 各组大鼠造模关节腔形态学改变(HE, ×100)

#### 3.3 刺血疗法对造模关节局部 IL-1 $\beta$ 、IL-10 mRNA 相对表达量的影响

与正常组比较,模型组、药物组 IL-1 $\beta$  mRNA 相对表达量明显升高 ( $P < 0.05 \sim 0.01$ );刺血组 IL-1 $\beta$  mRNA 相对表达量升高,但差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。与模型组比较,药物组及刺血组大鼠 IL-1 $\beta$  mRNA 相对表达量均明显降低 ( $P < 0.05 \sim 0.01$ )。与药物组比较,刺血组 IL-1 $\beta$  mRNA 相对表达量降低,但差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。见表 4。

与正常组比较,模型组、药物组及刺血组 IL-10 mRNA 相对表达量均明显升高 ( $P < 0.05 \sim 0.01$ );与模型组比较,刺血组 IL-10 mRNA 相对表达量明显升高 ( $P < 0.01$ );与药物组比较,刺血组 IL-10 mRNA 相对表达量显著升高 ( $P < 0.01$ )。见表 4。

#### 3.4 刺血疗法对造模关节局部 IL-1 $\beta$ 、IL-10 基因启动子区 5CpG 岛甲基化水平的影响

与正常组比较,模型组 IL-1 $\beta$  平均甲基化率明显升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,刺血组、药物组 IL-1 $\beta$  平均甲基化率则明显降低 ( $P < 0.01$ );与药物组比较,刺血组 IL-1 $\beta$  平均甲基化率的改变无显著

性差异 ( $P > 0.05$ )。见表 5。

表 4 各组大鼠造模关节局部 IL-1 $\beta$ 、IL-10 mRNA 相对表达量的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	n	IL-1 $\beta$	IL-10
正常组	6	1.069 ± 0.384	1.01 ± 0.173
模型组	6	4.486 ± 1.919**	1.72 ± 0.584*
药物组	6	2.577 ± 1.907*#	1.839 ± 0.357*
刺血组	6	2.234 ± 1.039##	4.23 ± 0.769**##△△

注:与正常组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ ;与药物组比较, △△  $P < 0.01$ 。

与正常组比较,模型组、刺血组及药物组 IL-10 平均甲基化率则均明显降低 ( $P < 0.05 \sim 0.01$ );与模型组比较,刺血组 IL-10 平均甲基化率则明显降低 ( $P < 0.01$ );与药物组比较,刺血组 IL-10 平均甲基化率明显降低 ( $P < 0.05$ )。见表 5。

#### 3.5 IL-1 $\beta$ 、IL-10 基因启动子区甲基化水平与其 mRNA 表达的相关性

IL-1 $\beta$  基因启动子区甲基化水平与其 mRNA 表达呈正相关 ( $r = 0.720, P = 0.008$ )。IL-10 基因启动子区甲基化水平与其 mRNA 表达呈显著负相关 ( $r = -0.899, P = 0.000$ )。

表5 各组大鼠造模关节局部 IL-1 $\beta$ 、IL-10 基因启动子 5CpG 岛平均甲基化率的比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	IL-1 $\beta$ /%	IL-10/%
正常组	3	77.84 $\pm$ 1.232	64.859 $\pm$ 5.351
模型组	3	84.98 $\pm$ 3.0418**	58.676 $\pm$ 3.708*
药物组	3	80.39 $\pm$ 1.571##	55.213 $\pm$ 2.151**
刺血组	3	80.597 $\pm$ 0.361##	48.294 $\pm$ 2.294***# $\Delta$

注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,## $P < 0.01$ ;与药物组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

#### 4 讨论

急性痛风性关节炎是多种炎症因子及中性粒细胞聚集于关节内的级联反应导致的。沉积的尿酸盐刺激关节软骨及周围软组织释放炎症介质引起局部微血管扩张出现红肿发热,炎症介质及微血管渗出物刺激神经末梢引起疼痛及功能障碍。中医认为急性痛风性关节炎的发病关键是血中瘀热。刺血疗法善治热证、实证、痛症、急症,具有清热、止痛、消肿、祛瘀的直接治疗作用,治疗本病则更具优势,且符合菀陈则除之、血实宜决之、热则疾之的针灸治疗原则。而选用右侧昆仑穴点刺出血,则是以痛为腧,近部取穴。

本实验中,关节腔尿酸钠注射后 6 h,造模关节肿胀明显,关节肿胀指数较正常组明显升高,提示造模成功。刺血疗法能够有效改善造模关节的肿胀程度,且与布洛芬给药相比,具有优效性。形态学观察可知,造模后关节腔内可见大量红染无定形物,红染无定形物的形成是尿酸钠晶体导致的,刺血疗法及布洛芬给药均能减少关节腔内尿酸盐结晶沉积,抑制炎症细胞的浸润,改善关节滑膜的组织形态结构。并且刺血疗法在减少关节腔内尿酸盐结晶沉积,抑制炎症细胞的浸润方面,效果更显著。

IL-1 $\beta$  是炎症发生的始动因素,也可以通过活化血管内皮细胞及其产生的细胞因子如内皮细胞粘附因子-1(ICAM-1)以促进中性粒细胞的聚集粘附来加重炎症反应,在关节软骨的破坏及炎症细胞的浸润方面占有主要地位<sup>[8,12]</sup>。IL-10 作为抗炎因子,则是通过抑制血管内皮细胞的表达及 NLRP3 炎性小体的表达,减少炎症因子如 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 表达,抑制破骨细胞形成,减少骨侵蚀,来发挥抗炎效应<sup>[10,13]</sup>。

在本实验中 qPCR 检测 mRNA 相对表达的结果表明:刺血疗法对造模关节局部软骨及软组织 IL-1 $\beta$  和 IL-10 基因表达分别有下调和上调作用。两者可以相互印证。值得关注的是 IL-10 作为抗炎因

子,造模后与正常组相比在基因和蛋白水平上都发生了上调。我们推测是急性炎症发生后,机体发挥了自身抗炎保护,而刺血法则可以进一步上调 IL-10 的表达。

DNA 甲基化可以调控基因表达的水平。在本实验中我们采用了焦磷酸测序法检测了造模关节局部 IL-1 $\beta$  和 IL-10 基因启动子区甲基化水平。相关结果表明:模型组的 IL-1 $\beta$  基因启动子区甲基化水平明显升高,刺血疗法及布洛芬给药则降低了 IL-1 $\beta$  基因启动子区甲基化水平。IL-1 $\beta$  基因启动子甲基化水平与其 mRNA 表达呈正相关关系,而非负相关关系。我们认为刺血疗法虽然能对 IL-1 $\beta$  基因表达进行调控,但与对其启动子甲基化的影响无关。调控基因表达的因素很多:在 DNA 层面,除了甲基化,还包括乙酰化,羟甲基化,组蛋白修饰等;在转录层面,包括 miRNA, lncRNA 等调控因素<sup>[12]</sup>。因此,有关于刺血疗法对 IL-1 $\beta$  基因表达的调控机制有待进一步研究。

而模型组的 IL-10 基因启动子区甲基化水平明显降低,刺血疗法进一步下调了 IL-10 基因启动子区甲基化水平。IL-10 基因启动子区甲基化水平与其 mRNA 表达呈负相关关系。低甲基化能促进基因转录。因此,我们认为刺血疗法治疗急性痛风性关节炎能通过影响 IL-10 启动子区甲基化程度调控基因表达,进而发挥抗炎效应。

综上所述,刺血疗法治疗急性痛风性关节炎可通过良性调控 IL-1 $\beta$  和 IL-10 的基因表达发挥抗炎效应;而刺血疗法对 IL-10 基因表达的调控,则与其对基因启动子区甲基化的表观遗传修饰作用有关。

#### 参考文献:

- [1] LEE J, LEE SY, LEE J, et al. Monosodium urate crystal-induced triggering receptor expressed on myeloid cells 1 is associated with acute gouty inflammation[J]. *Rheumatology*, 2016, 55(1): 156-161.
- [2] 徐颖,黄微珍,李斌.针刺配合阿是穴刺络放血治疗急性痛风性关节炎疗效观察[J]. *上海针灸杂志*, 2016, 35(1): 66-68.  
XU Y, HUANG WZ, LI B. Observations on the efficacy of acupuncture plus Ashi point pricking bloodletting in treating acute gouty arthritis[J]. *Shanghai J Acupunct Moxib*, 2016, 35(1): 66-68.
- [3] 覃志周,高滔杨,吴金玉,等.刺络拔罐放血疗法治疗急性痛风性关节炎疗效观察[J]. *中医药临床杂志*, 2016, 28(4): 542-545.  
QIN ZZ, GAO MY, WU JY, et al. Clinical observation of pricking blood combined with cupping for acute gouty arthritis [J]. *Clin J Tradit Chin Med*, 2016, 28(4): 542-545.
- [4] 梁莎,夏有兵,程洁,等.刺血疗法对急性痛风性关节炎模型局部关节软骨超微结构的影响[J]. *南京中医药大学学报*, 2014, 30(2): 138-141.

LIANG S, XIA YB, CHENG J, et al. The effects of pricking blood therapy on articular cartilage ultrastructure of acute gouty arthritis model[J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2014, 30(2): 138-141.

[5] 吕凯露,夏有兵,程洁,等.刺血疗法对急性痛风性关节炎大鼠局部抗炎因子的影响[J].中国康复理论与实践,2015, 21(3):276-279.

LYU KL, XIA YB, CHENG J, et al. Effects of pricking blood-letting therapy on local anti-inflammatory cytokine in rats with acute gouty arthritis on ankle[J]. Chin J Rehab Theor Pract, 2015, 21(3): 276-279.

[6] 郑洁,刘煥,郭海英,等.表观遗传调控与骨性关节炎研究进展[J].中国疼痛医学杂志,2014, 20(9):665-667, 670.

ZHENG J, LIU H, GUO HY, et al. Research progress between epigenetic regulation and osteoarthritis[J]. Chin J Pain Med, 2014, 20(9): 665-667, 670.

[7] DEY P, PANGA V, RAGHUNATHAN S. A cytokine signaling network for the regulation of inducible nitric oxide synthase expression in rheumatoid arthritis[J]. PLoS One, 2016, 11(9): e0161306.

[8] AKAHOSHI T, MURAKAMI Y, KITASATO H. Recent advances in crystal-induced acute inflammation[J]. Nippon Rinsho, 2007, 19(2): 146-150.

[9] BROEREN MA, DE VRIES M, BENNINK MB, et al. Suppression of the inflammatory response by disease-inducible interleukin-10 gene therapy in a three-dimensional micromass model of the human synovial membrane[J]. Arthritis Res Ther, 2016, 18(1): 186.

[10] HOFMANN SR, KUBASCH AS, IOANNIDIS C, et al. Altered expression of IL-10 family cytokines in monocytes from CRMO patients result in enhanced IL-1 beta expression and release[J]. Clin Immunol, 2015, 161(2): 300-307.

[11] 梁莎,夏有兵,朱毅,等.急性痛风性关节炎大鼠局部造模方法的改良[J].中国现代医学杂志,2014, 24(2):10-13.

LIANG S, XIA YB, ZHU Y, et al. Modified method with the ankle joint urate arthritis in RATS[J]. China J Mod Med, 2014, 24(2): 10-13.

[12] CHOE JY, KIM SK. Melittin inhibits osteoclast formation through the downregulation of the RANKL-RANK signaling pathway and the inhibition of interleukin-1β in murine macrophages[J]. Int J Mol Med, 2017, 39(3): 539-548.

[13] CLAIRE JG, GARETH WJ, MARI AN, et al. Interleukin-10 regulates the inflammasome-driven augmentation of inflammatory arthritis and joint destruction[J]. Arthritis Res Ther, 2014, 16(4):419.

(编辑:董宇)

(上接 435 页)诊疗体系之中。③执简驭繁:既可继承多元辨证的优势,又能融多元辨证为一体,综合应用,有机组合,由博返约,由繁至简,提纲挈领。④求同存异:但求在治疗原则取得共识,既能提供治法和方药的参考范例,也可发挥各自特色,不同学术流派的风格,彰显各家优势。

参考文献:

[1] 秦伯未,李英麟,殷凤礼,等.中医辨证论治纲要[J].中医杂志, 1961(1):5-9.

QIN BW, LI YL, YIN FL, et al. Outline of TCM syndrome differentiation and treatment[J]. J Tradit Chin Med, 1961(1):5-9.

[2] 方药中.辨证论治研究七讲[M].北京:人民卫生出版社,1979:89-101.

FANG YZ. Chapter Seven of the Study of Syndrome Differentiation Treatment[M]. Beijing: People's medical publishing house, 1979:89-101.

[3] 黄炳山.中医内伤性疾病辨证规律初探:关于统一内伤性疾病辨证方法的刍议[J].中医药学报,1982(1):6-10.

HUANG BS. Study on TCM syndrome differentiation rules of internal injury diseases: discussion on unifying the differentiation method of internal injury diseases[J]. Acta Chin Med Pharm, 1982(1):6-10.

[4] 成肇智.病因和病邪新探[J].湖北中医杂志,1987(6):41-45.

CHENG ZZ. Exploration of etiology and pathogenic factors[J]. Hubei J Tradit Chin Med, 1987(6):41-45.

[5] 沈自尹.微观辨证和辨证微观化[J].中医杂志,1987(5):263-267.

SHEN ZY. Microscopic syndrome differentiation[J]. J Tradit Chin Med, 1987(5):263-267.

[6] 朱文锋.证素辨证学[M].北京:人民卫生出版社,2008:5-37.

ZHU WF. Syndrome Factor Differentiation Science[M]. Beijing: People's medical publishing house, 2008:5-37.

[7] 王永炎.完善中医辨证方法体系的建议[J].中医杂志,2004,45(10):729-731.

WANG YY. Suggestions on improving the TCM syndrome differentiation system[J]. J Tradit Chin Med, 2004, 45(10):729-731.

[8] 靳琦.王琦“辨体-辨病-辨证诊疗模式”的理论要素与临床应用[J].北京中医药大学学报,2006,29(1):41-45.

JIN Q. The theoretical elements and clinical application of Wang Qi's "body-disease-syndrome differentiation, diagnosis and treatment model"[J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2006, 29(1): 41-45.

[9] 梁茂新.现代中医学基本概念逻辑矛盾剖析[J].中华中医药杂志,2009,24(3):278-281.

LIANG MX. Analysis of the logical contradiction of the basic concepts of modern Chinese Medicine[J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2009, 24(3):278-281.

[10] 陈士奎.关于证及证候等概念规范化运用问题的讨论[J].中国中西医结合杂志,2012,32(10):1301-1304.

CHEN SK. Discussion on the standard application of symptom and syndrome[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2012, 32(10):1301-1304.

[11] 周仲瑛,周学平.中医病机辨证学[M].北京:中国中医药出版社,2015:4.

ZHOU ZY, ZHOU XP. TCM Pathogenesis and Syndrome Differentiation[M]. Beijing: China press of traditional Chinese medicine, 2015:4.

(编辑:叶亮)