

穴位埋线对变应性鼻炎大鼠鼻黏膜 IFN- γ 、IL-4 的影响

刘 敏¹ 张大铮¹ 李昕蓉² 张福兵³ 王晓培² 齐银辉⁴ 张勤修²

(1.都江堰市人民医院,四川都江堰 611830; 2.成都中医药大学附属医院,四川成都 610075;

3.乐山市中医医院,四川乐山 614000; 4.甘肃省中医院,甘肃兰州 730050)

摘 要 目的:观察穴位埋线治疗变应性鼻炎(AR)大鼠的疗效,并从 IFN- γ 、IL-4 方面探讨其作用机制。方法:将健康 SPF 级 SD 大鼠随机分为空白对照组、模型组、西药组、穴位假埋线组、穴位埋线组。除空白组外,其余各组大鼠采用经改进后的卵蛋白注射及鼻黏膜刺激法制作 AR 模型,分别予不同治法。治疗末日在卵白蛋白激发后,观察 30min,采集鼻中隔黏膜,采用免疫组化方法检测各组大鼠鼻黏膜组织 IFN- γ 、IL-4 的表达情况。结果:模型组大鼠变应性鼻炎行为得分明显高于空白对照组($P<0.05$);西药组和穴位埋线组大鼠治疗后变应性鼻炎行为得分明显低于模型组($P<0.05$),而与空白对照组相当($P>0.05$);西药组和穴位埋线组疗效相当($P>0.05$);穴位假埋线组大鼠症状得分亦明显低于模型组($P<0.05$),但仍然明显高于空白对照组($P<0.05$)。与空白对照组比较,模型组大鼠鼻黏膜组织 IFN- γ 表达明显降低($P<0.05$),IL-4 表达明显升高($P<0.05$);与模型组比较,西药组和穴位埋线组大鼠 IFN- γ 表达明显升高($P<0.05$),IL-4 表达明显降低($P<0.05$);西药组和穴位埋线组大鼠鼻黏膜组织 IFN- γ 、IL-4 表达无统计学差异($P<0.05$)。结论:穴位埋线能明显缓解 AR 大鼠变应性鼻炎症状(喷嚏、流涕、抓搔鼻部),其可能的机制是对 AR 大鼠鼻黏膜中 IFN- γ 、IL-4 含量的调整。

关键词 变应性鼻炎 穴位埋线 鼻黏膜 IFN- γ IL-4 SD大鼠 实验研究

中图分类号 R765.210.5

文献标志码 A

文章编号 1672-397X(2016)04-0078-04

变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)是一种常见病、多发病,中医称“鼻鼽”,是指以突然和反复发作的鼻痒、打喷嚏、流清涕、鼻塞等为主要特征的鼻病,属于免疫性疾病。针灸对免疫具有双向调节作用。有文献报道,电针可以调节 AR 大鼠血清 IL-4 及 IFN- γ 水平,可以维持 Th1/Th2 细胞因子的动态平衡^[1]。穴位埋线是在针灸经络理论的指导下,将医用羊肠线埋入相应穴位区域,肠线在体内软化、分解、液化和吸收时,对穴位产生的生理、物理及化学刺激长达 7d 或更长时间,从而对穴位产生一种缓慢、柔和、持久、良性的“长效针感效应”,达到发挥长期疏通经络的作用。穴位埋线属于一种长效、低创痛的针灸疗法,适用于各种慢性、顽固性疾病的患者。本研究从动物实验的角度观察了穴位埋线对 AR 大鼠的疗效,并从 IFN- γ 、IL-4 方向探讨其在 Th1/Th2 细胞因子动态平衡方面的作用机制,现将结果报告如下。

1 实验材料

1.1 实验动物 SD 大鼠 70 只,SPF 级,3 月龄,体重:180~220g,雌雄各半,由四川省成都达硕生物科技有限公司提供,许可证号:SCXk(川)2008-24。大鼠

饲养于成都中医药大学眼科实验动物中心,实验分组前后均按性别分别关笼饲养。室内温度控制在 20~25℃,湿度控制在 50%~70%。大鼠的喂养由专人负责,采用定时定量喂养的方式,并及时清理大小便。

1.2 埋线器械与材料 穴位埋线针使用高冠牌 9 号埋线针(镇江高冠医疗器械有限公司);埋线材料使用 3-0 可吸收外科缝线(江西龙腾生物高科技有限公司)。

1.3 主要试剂与仪器 鼠抗人 IL-4 多克隆抗体,成都杰纳生物科技有限公司提供,生产批号:C121108;鼠抗人 IFN- γ 多克隆抗体,成都杰纳生物科技有限公司提供,生产批号:C121109;曲安奈德鼻喷剂,昆明源瑞制药有限公司,国药准字 H20010190;卵白蛋白 OVA, Solarbio, From Sigma A8040。紫外分光光度计, SHIMADZU, UV1700, 上海锐翔仪器公司; RT-PCR 扩增仪, 型号: PIKORed96, 美国 ThermoFisher 仪器有限公司生产; Motic BA400 显微摄像系统, 麦克奥迪公司; Thermo 全功能酶标仪, 型号: MK3, 美国 ThermoFisher 仪器有限公司生产; Image-Pro Plus 图像分析系统, Media Cybernetics, Inc.; 倒置相差显微镜, 日本, OLYMPUS 公司。

基金项目:国家自然科学基金项目资助(81273985/H2902)

2 实验方法

2.1 分组与造模 SD大鼠定时定量喂养1周后,按性别分层,根据计算机产生的随机数字表随机分为5组,每组14只(雌性7只,雄性7只),即空白对照组、模型组、西药组、穴位假埋线组、穴位埋线组。除空白对照组以外其余各组大鼠采用目前国内常用的卵蛋白注射及鼻黏膜刺激法制作AR模型^[2]。变应性鼻炎动物模型造模成功标准:于末次滴鼻致敏后观察30min,记录大鼠搔鼻、喷嚏、鼻溢等行为评分,以上各项指标均采用叠加量化记分法,总分>5分表示造模成功。动物变应性鼻炎行为评分标准见表1。

表1 动物变应性鼻炎行为评分标准

症状	轻度(1分)	中度(2分)	重度(3分)
喷嚏	1~3个	4~10个	11个以上
流涕	鼻涕到达鼻前孔处	鼻涕超过鼻前孔	涕流满面
抓鼻	轻抓鼻数次	频繁抓挠鼻、面	全身四处抓挠

2.2 干预方法 造模结束后,即实验第22天后开始干预治疗。

2.2.1 西药组 给予曲安奈德鼻喷剂进行滴鼻治疗,每次激发前30min给药,剂量为6 μ g,每日1次,每次每侧鼻孔1滴,双侧鼻孔给药,每周连续给药5d后停止给药2d,共4周。根据人-大鼠体重等效剂量公式,算出大鼠每次每侧鼻腔滴鼻3.5 μ g曲安奈德喷鼻剂。

2.2.2 穴位埋线组 分两阶段行穴位埋线治疗。第一阶段为造模成功后1~2周,第二阶段为造模成功后3~4周,治疗时间共4周。第一阶段选择穴位为:百会穴、双侧肺腧穴;第二阶段选择穴位为:百会穴、双侧肺腧穴、双侧脾腧穴。穴位的选取依据为《实验针灸学》^[3]及华兴邦等研制的大鼠穴位图谱^[4]。肺俞:第三胸椎棘突下两旁肋间,直刺约5mm。百会:顶骨正中,向前或后斜刺2mm。脾腧:第十二胸椎下两旁肋间,直刺约5mm。埋线方法:穴位及周围皮肤用酒精棉球消毒,选用9号埋线针、000号羊肠线,埋线长度0.2~0.3cm。

2.2.3 穴位假埋线组 穴位选择及操作过程、疗程同穴位埋线组,只是不埋入羊肠线。

2.2.4 空白对照组、模型组 不做处理。

2.3 指标观察 各治疗组于治疗结束后,空白对照组、模型组于造模成功后,每组14只大鼠按性别随机选择8只大鼠(4只雌性,4只雄性),进行变应性鼻炎行为得分统计(评分方法见表1),随后断头处死,取鼻腔黏膜标本进行IFN- γ 、IL-4表达检测。检测方法:采用免疫组化方法检测鼻黏膜组织IFN- γ 、IL-4的表达情况。由第三方检测组织对标本进行检测并提供数据。

2.4 统计学方法 用SPSS17.0软件进行统计分析。数据以($\bar{x}\pm s$)表示,组间采用单因素方差分析,方差齐者组间进行LSD检验,方差不齐者进行Tamhane'sT2检验。

3 实验结果

实验结束时西药组死亡2只,穴位埋线组死亡1只。

3.1 各组大鼠变应性鼻炎行为得分比较 见表2。模型组大鼠变应性鼻炎行为得分明显高于空白对照组($P<0.05$),提示造模成功。西药组、穴位埋线组、穴位假埋线组大鼠得分均明显低于模型组($P<0.05$),西药组、穴位埋线组得分与空白对照组相当($P>0.05$),且此2组间比较无统计学差异($P>0.05$),提示西药组、穴位埋线组对变应性鼻炎的症状均有明显改善作用。假埋线对AR大鼠模型有一定的影响,但作用较穴位埋线差,提示羊肠线穴位长期刺激对AR模型大鼠有肯定的治疗作用。

表2 末次鼻腔激发后各组大鼠变应性鼻炎行为得分比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	得分
空白对照组	8	0.62 $\pm$ 0.518
模型组	8	7.75 $\pm$ 1.035*
西药组	8	1.25 $\pm$ 1.165 $\Delta^{\#}$
穴位假埋线组	8	6.00 $\pm$ 0.756**
穴位埋线组	8	1.12 $\pm$ 1.126 $\Delta^{\#}\bullet$

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$, Δ $P>0.05$;与模型组比较, $\#P<0.05$;与西药组比较, $\bullet P>0.05$ 。

3.2 各组大鼠干预结束后鼻黏膜IFN- γ 、IL-4平均光密度比较 见表3。结果表明,与空白对照组比较,模型组大鼠鼻黏膜IFN- γ 表达明显降低,IL-4表达明显升高($P<0.05$);经西药治疗和穴位埋线后,各组大鼠IFN- γ 、IL-4表达得到调整($P<0.05$),组间疗效相当($P>0.05$)。

表3 各组大鼠干预结束后鼻黏膜IFN- γ 、IL-4平均光密度的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	IFN- γ IOD	IL-4 IOD
空白对照组	8	13776 $\pm$ 4388.32	5782 $\pm$ 2368.10
模型组	8	4871 $\pm$ 1789.94*	16331 $\pm$ 2860.08*
西药组	8	11103 $\pm$ 2486.58 $\Delta^{\#}$	8874 $\pm$ 1987.50 $\Delta^{\#}$
穴位假埋线组	8	56623 $\pm$ 531.22*	15360 $\pm$ 2229.16*
穴位埋线组	8	8946 $\pm$ 1581.37 $\Delta^{\#}\bullet$	10044 $\pm$ 4612.18 $\Delta^{\#}\bullet$

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, $\#P<0.05$;与西药组比较, $\bullet P>0.05$ 。

4 讨论

变应性鼻炎多由正气不足,脏腑虚损,腠理疏松,卫表不固,风邪、寒邪或异气侵袭,寒邪束于皮毛,阳气无从泄越,故喷而上出为嚏。本病多以肺、脾、肾功能失调,气阳虚衰为本,外感风邪为标,临

床辨证分型以虚证为主,特别是肺脾气虚多见,治疗多采用补气固表、健脾益胃、升阳益气法。

鼻属清阳之窍,位居阳中之阳,是血脉多聚之处,又是清阳交会之处。诸多经脉循至鼻部,使鼻部不断得到气血阴阳的濡养,从而发挥其行息司嗅之生理功能。百会穴居颠顶,联系脑部,归属督脉,别名“三阳五会”(《针灸甲乙经》),治疗变应性鼻炎选择此穴位可鼓舞机体的阳气,祛寒外出。肺腧穴是足太阳膀胱经的第13个穴位,是肺之背俞穴,应用背俞穴在正常状态下可以促进和调整脏腑的生理功能,在病理状态下又可以不同程度地促进脏腑功能恢复生理平衡^[9],而鼻为肺之外候,故鼻之病可通过肺俞穴治疗。脾腧穴是足太阳膀胱经的第20个穴位,是脾之背俞穴,变应性鼻炎属脾气虚弱者较多,选择此穴位可补益脾气,鼓舞脾阳,增强机体抗病能力。基于变应性鼻炎的病因病机及鼻与经络的关系,结合SD大鼠穴位分布特点及考虑到可操作性,本研究我们选择双侧肺腧穴、双侧脾腧穴、百会穴进行穴位埋线。

穴位埋线是针灸理论与现代物理医学相结合的产物,通过针具与羊肠线在穴位产生的生理物理作用和生物化学变化,将刺激信息和能量经经络传入人体内,以达“疏其气血,令其条达”,治疗疾病的目的。

从免疫学角度来看,变应性鼻炎是体外环境因素作用于机体,导致异常免疫反应,造成Th1和Th2免疫反应失衡而引发的以鼻腔黏膜Th2免疫反应为主的变应性炎症反应,其主要的免疫病理学特征是组织中大量表达Th2细胞因子的细胞浸润。Th1细胞因子可下调Th2细胞,反之亦然。此两类细胞及各自分泌的相关细胞因子形成复杂的网络体系,共同调节机体的免疫应答过程,并具有相互抑制、相互调节的效应,以维持免疫系统的动态平衡,参与保证机体的正常功能,这表明Th1和Th2免疫反应间存在着互相制衡的机制^[9]。研究普遍认为气道黏膜-血液系统中Th1/Th2细胞失衡是AR的主要发生机制^[7-10]。变应性鼻炎发生中,Th细胞的分化产生偏移,即由Th1反应偏向Th2反应,成为Th2>Th1反应,Th2细胞将诱导B细胞释放IgE。Th2细胞激活后,主要通过释放细胞因子发挥生物效应。

IL-4是Th2细胞释放的关键性细胞因子,IL-4在IgE的合成过程中具有重要的调控作用,它不仅能促进B细胞的分泌和增殖,还能促进IgE的类别转换^[11],它也是一种肥大细胞生长因子,能促进多量IgE分子与肥大细胞表面的IgE受体结合,激发肥大细胞脱颗粒,释放一系列与炎症有关的介质,引

起黏膜水肿,黏液分泌亢进,气道痉挛。除此之外,IL-4还可以通过上调血管细胞黏附分子(VCAM-1)在内皮细胞的表达,上调嗜酸性粒细胞趋化因子的产生,进而促进炎症细胞在局部的浸润。

IFN- γ 与IL-4是一对相互拮抗、相互调节的细胞因子。IFN- γ 为Th1类细胞的标志性细胞因子,能促进抗原特异性T细胞分化成Th1,可抑制Th2细胞的增殖活化,减少IL-4的产生,并拮抗IL-4的各种生物学效应,阻止IgE的合成^[12]。有研究表明,变应性鼻炎患者血清中的IgE水平与IL-4水平呈正相关,而与IFN- γ 呈负相关,说明变应性鼻炎患者体内IL-4增高及IFN- γ 降低导致IgE合成增加,从而促使一系列临床症状发生^[13]。

本研究结果提示,穴位埋线通过在穴位处植入可吸收缝合线发挥持久的经穴效应作用,从而对变应性鼻炎大鼠鼻黏膜Th1/Th2免疫平衡起到良好的干预调节作用,具体表现为降低AR大鼠鼻黏膜中IL-4的含量,升高IFN- γ 的含量,从而在细胞因子层面调节Th1/Th2免疫平衡,减轻AR大鼠变应性鼻炎症状。

统观本次实验研究数据,穴位假埋线对IFN- γ 、IL-4指标也有一定的调节趋势,但无统计学意义,推测其原因可能是穴位假埋线组中未将羊肠线植入穴位,对穴位未起到长时间刺激的作用。这在一定程度上说明了穴位埋线干预变应性鼻炎的机理还可从单纯的短期穴位刺激和羊肠线吸收的长期穴位刺激两个途径作进一步研究。

参考文献

- [1] 赵义造,黄益灯,黄加云,等.电针对变应性鼻炎大鼠模型IL-4及IFN- γ 表达的影响[J].浙江中医杂志,2010,45(12):916.
- [2] 刘敏,张大铮,李昕荣,等.卵白蛋白鼻腔强化激发制作变应性鼻炎大鼠模型效果观察[J].中国中西医结合耳鼻喉科杂志,2013,21(5):325.
- [3] 李忠仁.实验针灸学[M].北京:中国中医药出版社,2003:329.
- [4] 华兴邦.论动物的穴位[J].中医杂志,1987,28(4):65.
- [5] 苏壮.背俞穴主治规律分析[J].医学综述,2008,14(13):2076.
- [6] BACH J F.The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases[J]. N Engl J Med,2002,347(12):911.
- [7] KNIPPING S,HOLZHAUSEN H J,RIEDERER A,et al. Allergic and idiopathic rhinitis:an ultrastructural study [J]. Eur Arch Otorhinolaryngol,2009,266(8):1249.
- [8] SCHÄPER C,GUSTAVUS B,KOCH B,et al.Effect of fluticasone on neuropeptides in nasal lavage in persistent allergic rhinitis[J]. J Invest Allergol Clin Immunol, 2010,20(3):214.

(下转第85页)

- 京:南京中医药大学,2009.
- [14] 曾光,陈国忠,莫喜晶,等.NF- κ B 信号通路在七方胃痛颗粒调控 H.pylori 感染人胃腺癌细胞 TFF1 表达中的作用[J].广西医科大学学报,2012,29(6):837.
- [15] 骆叶.小檗碱抑制肿瘤细胞 Cyclin D1 相关信号通路的研究[D].北京:北京中医药大学,2007.
- [16] 单铁英,刘宇宁,杨书良.枸杞多糖对人食管癌细胞增殖的抑制作用及与 Rb 蛋白表达的关系[J].时珍国医国药,2010,21(9):2405.
- [17] 刘溪.吴茱萸碱诱导人肝癌细胞 HepG2 细胞周期阻滞机制研究[D].哈尔滨:哈尔滨商业大学,2012.
- [18] 包永睿,王帅,孟宪生,等.白茅根水提物对人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞周期及细胞凋亡的影响[J].时珍国医国药,2013,24(7):1584.
- [19] 郑展,王菊勇,王青,等.肺岩宁颗粒对 Lewis 肺癌细胞周期 G1/S 检测点信号通路中 MDM2-P53 生物轴的影响[J].上海中医药大学学报,2011,25(5):70.
- [20] 苗学红.补肾疏肝方对肺腺癌 A549 细胞凋亡及 Notch 信号通路研究[D].郑州:郑州大学,2014.
- [21] 王晶宇,王志平,赵俊丽,等.姜黄素作用 PTEN/PI3K/AKT 通路诱导膀胱癌 EJ 细胞凋亡[J].中药药理与临床,2011,27(1):28.
- [22] JOHNSON S M, GULHATI P, ARRIETA I, et al. Curcumin inhibits proliferation of colorectal carcinoma by modulating Akt/Mtor signaling [J]. Anticancer Res, 2009, 29(8):3185.
- [23] 毛蜀,何密斯,刘桂元,等.姜黄素对髓母细胞瘤 PI3K/Akt 信号通路的作用[J].第三军医大学学报,2013,35(6):518.
- [24] 王晓南,吴青,杨旭,等.雷公藤红素对白血病细胞 Akt 信号通路的影响及在细胞凋亡中的作用[J].中国中西医结合杂志,2011,31(2):228.
- [25] 潘磊,袁海英,陈培丰.蛇六谷提取物对人胃癌 SGC-7901 细胞 MAPK 信号通路的影响[J].中国中医药科技,2013,20(3):254.
- [26] 刘静,范佳玮,吕祥.健脾复方对大肠癌 PI3K/AKT 信号通路的调控作用[J].时珍国医国药,2015,26(4):871.
- [27] 宋坚旗,张亚强,薄海.前列消癥汤对前列腺癌 PC-3 细胞 PI3K/Akt 信号通路表达的影响[J].中国中医基础医学杂志,2014,20(4):455.
- [28] 何小进,曾德华,张雄.姜黄素对人骨肉瘤 MG63 细胞增殖及 Wnt/ β -catenin 信号通路相关基因表达的影响[J].中国生物制品学杂志,2012,25(1):78.
- [29] 任建琳,吕祥,陈文婷,等.健脾复方通过 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制裸鼠人大肠癌转移[J].中国医药科学,2014,4(4):23.
- [30] 贺松其,程旸,朱云,等.鳖甲煎丸对肝细胞癌中 Wnt/ β -catenin 信号通路及抑制基因 DKK-1、FrpHe 表达的影响[J].J South Med Univ, 2013, 33(1):30.
- [31] 张彦博,李琦,刘艳娜,等.左金丸通过 Wnt/ β -catenin 信号通路对幽门螺杆菌感染的人胃癌细胞转移的影响[J].上海中医药大学学报,2015,29(2):44.
- [32] 刘宣,王炎,李丹光,等.丹参酮 II A 对 COX-2 激活 Wnt/ β -catenin 信号通路介导的人肠癌细胞 VEGF 表达的调控作用[J].中华中医药杂志,2013,28(1):108.
- [33] 杜红阳.地黄多糖通过 Notch 信号通路诱导 BMSCs 分化为神经样细胞作用的实验研究[D].沈阳:辽宁中医药大学,2012.
- [34] 刘少琼,杨芳,禹正杨.姜黄素对大肠癌细胞抑制作用 Notch 信号通路的研究进展[J].湖南中医杂志,2013,29(12):163.
- [35] 付航,刘喜平,张炜,等.敦煌平胃丸对胃癌前病变大鼠 Notch 信号通路中 Notch2 和 Jagged1 表达的影响[J].中国民族民间医药,2015,4(1):18.

第一作者:李姜(1988—),女,硕士研究生,研究方向为中医临床肿瘤学。

通讯作者:李烜,博士研究生,副主任医师。
mingminglx@126.com

收稿日期:2015-11-24

编辑:傅如海

(上接第 80 页)

- [9] MAES T, TOURNOY K G, JOOS G F. Gene therapy for allergic airway diseases[J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2011, 11(2):163.
- [10] CHALASTRAS T, NICOLOPOULOU S P, PATSOURIS E, et al. Expression of substance P, vasoactive intestinal peptide and heat shock protein 70 in nasal mucosal smears of patients with allergic rhinitis: investigation using a liquid-based method[J]. J Laryngol Otol, 2008, 122(7):700.
- [11] DURHAM S, GOULD H, THIENES C, et al. 460 Local control of ϵ -gene expression in B cells of the nasal mucosa in hay fever patients following allergen-challenge[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1996(1):297.
- [12] 许丽娟,张嵩玉,杨强.变态反应性鼻炎的某些研究进展[J].中国中西医结合耳鼻喉科杂志,2002,10(1):50.
- [13] 黄少鹏,张锐生.变应性鼻炎患者白细胞介素 4、 γ 干扰素水平与 IgE 的相关性研究[J].福建医药杂志,2004,26(2):14.

第一作者:刘敏(1983—),女,博士研究生,主治医师,研究方向为中西医结合防治变应性鼻炎。

通讯作者:张勤修,博士,教授,博士研究生导师。
zhqinxu@163.com

收稿日期:2016-01-15

编辑:吴宁