

引用:胡蓉,刘样,曾斯琴,李新宇,王晶. 艾灸足三里对变应性鼻炎大鼠鼻黏膜免疫功能的影响[J]. 湖南中医杂志,2023,39(5):149-153.

艾灸足三里对变应性鼻炎大鼠鼻黏膜免疫功能的影响

胡 蓉,刘 样,曾斯琴,李新宇,王 晶

(湖南中医药高等专科学校,湖南 株洲,412012)

[摘要] 目的:探讨艾灸足三里对变应性鼻炎(AR)大鼠鼻黏膜免疫功能的影响。方法:将 40 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、对照组和治疗组,每组 10 只。采用卵清蛋白致敏法制备 AR 大鼠模型。造模成功后对照组与治疗组进行艾灸治疗,正常组、模型组只捆绑不艾灸,疗程 14 d。观察 4 组行为学评分,鼻黏膜组织病理情况,分泌性免疫球蛋白 A(sIgA)、CD4⁺、CD8⁺表达水平。结果:治疗后,治疗组的行为学评分较模型组降低,差异有统计学意义($P<0.05$);治疗后,正常组、治疗组嗜酸性粒细胞、鼻咽冲洗液 sIgA 表达及 CD4⁺、CD8⁺水平与模型组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:艾灸足三里可改善 AR 大鼠行为学评分及鼻黏膜组织病理情况,降低嗜酸性粒细胞数,并能下调鼻黏膜 sIgA、CD4⁺、CD8⁺表达,这可能是其治疗 AR 的免疫机制之一。

[关键词] 变应性鼻炎;艾灸;足三里;免疫功能;实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:**10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2023.05.037

Effect of moxibustion at Zusanli point on the immune function of nasal mucosa in rats with allergic rhinitis

HU Rong, LIU Yang, ZENG Siqin, LI Xinyu, WANG Jing

(Hunan Traditional Chinese Medical College, Zhuzhou 412012, Hunan, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of moxibustion at Zusanli point on the immune function of nasal mucosa in rats with allergic rhinitis (AR). Methods: A total of 40 Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal group, model group, control group, and treatment group, with 10 rats in each group. Ovalbumin sensitization was used to establish a rat model of AR. After successful modeling, the rats in the control group and treatment group were given moxibustion, while those in the normal group and the model group were tied up alone without moxibustion, and the course of treatment was 14 days. The four groups were observed in terms of behavioral score, pathology of nasal mucosa, and expression levels of secretory immunoglobulin A (sIgA) and CD4⁺ and CD8⁺ cells. Results: After treatment, the treatment group had a significant reduction in behavioral score compared with the model group ($P<0.05$), and there were significant differences in eosinophils and the expression levels of sIgA and CD4⁺ and CD8⁺ cells in rhinopharynx flush fluid between the normal/treatment group and the model group ($P<0.05$ or $P<0.01$). Conclusion: In rats with AR, moxibustion at Zusanli point can improve behavioral score and the pathology of nasal mucosa, reduce the number of eosinophils, and downregulate the expression levels of sIgA and CD4⁺ and CD8⁺ cells in nasal mucosa, which might be one of the immune mechanisms of moxibustion in the treatment of AR.

[Keywords] allergic rhinitis; moxibustion; Zusanli; immune function; experimental study

基金项目:湖南省中医药科研计划项目(201393)

第一作者:胡蓉,女,教授,研究方向:针灸治疗变应性鼻炎机制研究

变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)以阵发性鼻痒、连续喷嚏、鼻塞、鼻涕清稀量多为主要症状,有反复发作、迁延难愈的特点。其属于特应性个体接触致敏原后由IgE介导,免疫活性细胞、促炎细胞及细胞因子相互作用产生的一种鼻黏膜慢性炎症反应性疾病。呼吸道黏膜免疫系统作为黏膜免疫系统的重要组成部分,是保护机体特别是呼吸道免于病原体侵犯的重要屏障^[1-2]。随着对AR研究的不断深入,近年来有研究证实通过调节鼻黏膜免疫系统能缓解AR的发作^[3]。

AR在中医学中属于“鼻鼽”范围,首见于《素问·脉解》:“所谓客孙脉则头痛鼻鼽腹肿者,阳明并于上,上者则其孙络太阴也,故头痛鼻鼽腹肿也”。《灵枢·经脉》记载:“(足阳明胃经)是主血所生病者……汗出,鼽衄”^[4],说明古人很早就认识到鼻鼽与阳明经存在一定联系。《针灸大全·八脉图并治症穴》记载“鼻流清涕,腠理不密,喷嚏不止”的治疗主穴取足三里。现代学者发现肺俞、迎香、大椎、印堂、合谷、足三里为治疗AR最常用穴位,其中足三里累计频率达55.27%^[5]。由此可见足阳明胃经及其合穴、下合穴——足三里穴治疗AR符合针灸循经取穴的特征。因此,本研究通过制备AR大鼠模型,从黏膜免疫功能角度探讨艾灸足三里对AR大鼠行为学、鼻黏膜病理组织学及鼻咽冲洗液中分泌型免疫球蛋白A(sIgA)、鼻黏膜中免疫细胞CD4⁺和CD8⁺表达的影响,以期为临床提供依据。

1 实验材料

1.1 动物 40只SPF级SD大鼠,雌雄各半,6~8周龄,体质量(225±25)g,由成都达硕实验动物有限公司提供,生产许可证号:SCXK(川)2020-030。动物质量合格证号:51203500018176。伦理批准单位:湖南省中医药研究院,批准号:D002020611。

1.2 药物 艾条(汉医牌温灸清纯艾条,南阳卧龙汉医艾绒厂,规格:0.5 cm×20 cm);卵清蛋白(OVA,美国Sigma公司,A5503);氢氧化铝[Al(OH)₃,上海歌凡生物科技有限公司,BS010];sIgA酶联免疫试剂盒(美国ADL公司,ml001917);CD4⁺、CD8⁺及二抗(中山生物技术有限公司,ab183685、ab33786及A0208)。

1.3 主要仪器 电热压力蒸汽消毒器(上海博讯实业公司,货号:YXQ-LS-100A);高速台式离心机(湘仪离心仪器公司,货号:TG16-WS);电子分析天平(Precisa公司,货号:XB120A);酶联免疫检测仪(美国宝特公司,货号:Bio-TekDT200);电热压力蒸汽消毒器(上海博讯实业有限公司,货号:YXQ-LS-100A);电热恒温鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司,货号:GZX-9140MBE);倒置显微镜(OLYMPUS公司,货号:CK-40);纯水仪(MILLIPORE公司,货号:ELIX3);切片机(Leica公司,货号:RM2235);展片机(Leica公司,货号:HI1210);烤片机(Leica公司,货号:HI1210)。

2 实验方法

2.1 动物分组及造模 将40只大鼠运用SPSS软件进行随机分组,分为正常组、模型组、艾灸非穴位(以下称为对照组)及艾灸足三里组(以下称为治疗组),每组各10只,雌雄各半。正常组不予造模,其余3组采用目前国内常用的卵清白蛋白注射及鼻黏膜刺激法^[6]进行造模。以OAV 10 mg、Al(OH)₃ 30 mg及0.9%氯化钠注射液1 ml混合后腹腔注射,隔天1次,连续7次,进行初次免疫;第15天进行加强免疫,每一侧鼻腔每天给予5% OVA 20 μg滴鼻和1% OVA喷雾吸入5 min,连续7 d。模型成功标准:于末次滴鼻致敏后即刻至1、2、3、6 h观察大鼠搔鼻、喷嚏、鼻溢等行为,采用叠加量化记分法,总分>5分表示造模成功。1)鼻痒:轻度瘙痒1~2次,计1分;剧烈瘙痒抓鼻四周,计2分。2)喷嚏:1~3个,计1分;4~10个,计2分;11个以上,计3分。3)清涕:流至鼻孔,计1分;超出前鼻孔,计2分;涕流满面,计3分。

2.2 干预方法 1)穴位定位:参照《实验针灸学实验指导》^[7]中的大鼠标准穴位图谱进行定位。治疗组选取足三里穴(双侧):大鼠膝关节后外侧,腓骨小头下约5 mm处;对照组选取足三里对照点(双侧):位于膝关节内侧与足三里平行的非穴位点,距离胫骨内侧5 mm处。2)干预措施:对照组与治疗组造模成功后采用艾灸治疗。用固定夹将大鼠固定,将艾条固定在自制简易灸架上,对准施灸部位(覆盖、固定隔热薄膜,中央小孔直径为3 mm),距离约2 cm处点燃施灸,每天9:00开始,连续灸

30 min,每天 1 次。干预 14 d。正常组、模型组只捆绑不艾灸,疗程与其余组相同。

2.3 观察指标 1)大鼠行为学:观察大鼠搔鼻、喷嚏、鼻溢等行为的变化。2)组织病理学:取大鼠鼻中隔鼻黏膜,用 0.9%氯化钠注射液冲洗干净,入 4%多聚甲醛[焦碳酸二乙酯(DEPC)]中固定约 4 h,石蜡包埋,常规切片行苏木精-伊红染色,光学显微镜下观测大鼠鼻黏膜组织学改变。3)嗜酸性粒细胞:每张病理切片随机选取 5 个高倍视野(10×40)计算鼻黏膜组织中嗜酸性粒细胞数量。4)鼻咽冲洗液 sIgA 表达:治疗结束后处死大鼠,剖开胸腔,暴露气管,从气管中部剪断,移液器吸取 200 μl 的磷酸盐缓冲液从断端向上冲洗鼻咽部,收集从鼻、咽流出的冲洗液,冲洗 3 次,共 600 μl,即为鼻咽冲洗液。2000 r/min,离心 10 min,-20℃保存备用。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测鼻咽冲洗液中 sIgA 表达。5)鼻黏膜中 CD4⁺和 CD8⁺:取大鼠鼻中隔鼻黏膜,用 0.9%氯化钠注射液冲洗干净,入 4%DEPC 中固定约 4 h。鼻黏膜中 CD4⁺和 CD8⁺的检测采用免疫组化法测定(二步法)。显微镜下随机选取 5 个高倍视野(×400),用麦克奥迪医学图像分析系统测定平均光密度值,取每视野的均数。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,数据符合正态分布且方差齐时,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验,方差不齐采用 Games-Howell 法。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组大鼠行为学评分比较 模型组、对照组及治疗组造模后出现了明显的连续打喷嚏、搔鼻及流涕,其行为学评分均高于 5 分,提示造模成功。此 3 组治疗前与正常组比较,差异均有统计学意义($P<0.01$)。治疗后,治疗组的行为学评分较模型组降低($P<0.05$),且与治疗前比较,差异亦有统计学意义($P<0.05$);而对照组与模型组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。(见表 1)

3.2 各组大鼠鼻黏膜组织病理学比较 正常组鼻黏膜表现为假复层纤毛柱状上皮,由纤毛柱状上皮

细胞、杯状细胞等组成,血管数量很少,无炎性细胞浸润及血管改变。模型组纤毛脱落、倒伏,小血管增生扩张明显,大量嗜酸性粒细胞浸润,黏膜下腺体数量明显增加,腺体扩张。治疗后,治疗组的纤毛脱落、血管扩张及嗜酸性粒细胞浸润现象较模型组有所改善。(见图 1)

表 1 各组大鼠行为学评分比较($\bar{x}\pm s$,分)

组别	只数	治疗前	治疗后
正常组	10	0.34±0.58	0.22±0.47
模型组	10	6.60±1.07 ^a	6.72±0.81
对照组	10	6.47±1.21 ^a	5.89±0.62
治疗组	10	6.54±0.98 ^a	4.33±0.57 ^{bc}

注:与正常组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与本组干预前比较,^c $P<0.05$ 。

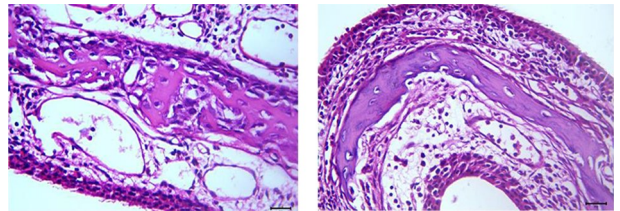


图 1-1 正常组 图 1-2 模型组

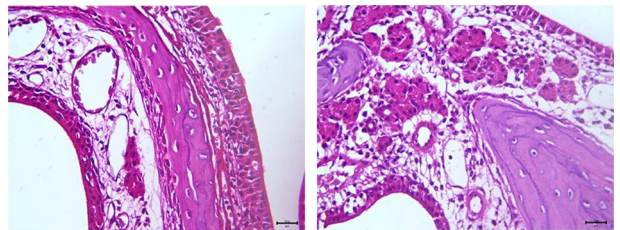


图 1-3 对照组 图 1-4 治疗组

图 1 各组大鼠鼻黏膜组织病理学比较(×400)

3.3 各组大鼠嗜酸性粒细胞计数比较 治疗后,治疗组嗜酸性粒细胞减少,与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.01$);正常组与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);而对照组与模型组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。(见表 2)

表 2 各组大鼠嗜酸性粒细胞计数比较($\bar{x}\pm s$,细胞平均个数/mm²)

组别	只数	嗜酸性粒细胞
正常组	10	5±2 ^a
模型组	10	52±9
对照组	10	48±12
治疗组	10	22±8 ^b

注:与模型组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$ 。

3.4 各组大鼠鼻咽冲洗液 sIgA 表达比较 sIgA 可以中和黏膜表面的病原体 and 变应原。呼吸道感染时病原微生物入侵并黏附于上皮,刺激黏膜局部产生免疫应答,使 sIgA 的合成与分泌增加^[7]。模型组的 sIgA 较正常组升高($P<0.05$)。治疗后,治疗组 sIgA 较模型组下降($P<0.05$)。而对照组与模型组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。(见表 3)

表 3 各组大鼠鼻咽冲洗液 sIgA 表达比较
($\bar{x}\pm s, \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)

组别	只数	sIgA
正常组	10	15.38±1.26 ^a
模型组	10	20.93±1.85
对照组	10	18.87±1.67
治疗组	10	15.89±1.38 ^a

注:与模型组比较,^a $P<0.05$ 。

3.5 各组大鼠鼻黏膜 CD4⁺、CD8⁺表达比较 AR 患者鼻腔受到变应原刺激后首先会启动局部免疫调节,当抗原到达黏膜下层淋巴组织,激活黏膜下 T 细胞,辅助 B 细胞进行 IgA 类型转化,通过抗原提呈细胞(APC)产生 CD4⁺、CD8⁺T 细胞反应,从而开启呈递作用。模型组大鼠 CD4⁺、CD8⁺较正常组增高($P<0.01$),说明在 AR 急性发作期存在免疫功能紊乱。治疗后,治疗组 CD4⁺、CD8⁺表达水平下降($P<0.01$)。而对照组与模型组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。(见表 4)

表 4 各组大鼠鼻黏膜 CD4⁺、CD8⁺表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	CD4 ⁺	CD8 ⁺
正常组	10	0.87±0.55 ^a	0.53±0.41 ^a
模型组	10	1.55±0.58	1.61±0.78
对照组	10	1.47±0.82	1.59±0.67
治疗组	10	0.45±0.36 ^a	0.68±0.44 ^a

注:与模型组比较,^a $P<0.01$ 。

4 讨 论

由于全球工业化进程加快以及现代生活方式改变等因素影响,AR 已成为耳鼻喉科最常见的疾病之一。研究显示,2010—2016 年 AR 全球患病人数由 10%~20%增加到 10%~40%^[8]。在国内流行病学调查中,2011 年成人 AR 自报患病率为 17.6%(18 个城市)^[9]。一项 2006—2016 年的 Meta 分析显示儿童 AR 患病率达 15.79%^[10],对社会经济和人民健康造成巨大的负担。

中医学将 AR 归属于“鼻鼽”范畴,认为本病为内外因素共同作用的结果,脏腑虚损,正气不足,导致腠理疏松,卫表不固,风邪、寒邪或时邪从口鼻侵袭,邪正相搏,肺气不宣,发为鼻鼽。《素问遗篇·刺法论》记载:“正气存内,邪不可干;邪之所凑,其气必虚。”中医药治疗该病的优势在于其调节机体内环境平衡,防止疾病复发^[11]。针灸治病临床强调以经络辨证为主体,重视腧穴特异性的运用^[12]。有文献报道,针灸治疗 AR 的处方中频数排前 5 位的特定穴依次是背俞穴、五输穴、原穴、下合穴、募穴^[13]。五输穴和下合穴中主要选用了足三里,足三里能补益脾胃,激发阳气,为强壮要穴。《备急千金要方》中记载:“若要安,三里常不干。”《外台秘要》中记载:“三里养先后天之气,灸三里可使元气不衰,故称为长寿之灸。”近年来有研究证实,艾灸足三里能发挥温补作用,能让局部皮肤产生免疫反应,体现了针灸治疗 AR 重视补益阳气的特点^[14]。且有研究证实艾灸具有免疫调节作用,可抑制机体过激的免疫反应^[15-18]。AR 作为一种鼻黏膜慢性炎症性疾病,上皮屏障存在结构和功能上的缺陷^[19]。因此,本研究干预措施选择与鼻有联系的足阳明胃经之合穴、下合穴——足三里,并实施艾灸,从鼻黏膜上皮细胞屏障及黏膜免疫角度观察其对 AR 治疗作用。实验结果显示,治疗组的行为学评分较模型组降低($P<0.05$),且与治疗前比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。治疗组的病理改变较模型组有所改善,与模型组比较,嗜酸性粒细胞减少($P<0.05$)。模型组鼻咽冲洗液中 sIgA 和鼻黏膜中 CD4⁺、CD8⁺较正常组升高($P<0.05$);与模型组比较,治疗组的 sIgA、CD4⁺及 CD8⁺水平下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。说明艾灸足三里可改善 AR 行为学评分及鼻黏膜组织学变化,降低嗜酸性粒细胞数。艾灸足三里对 AR 大鼠鼻黏膜 sIgA、CD4⁺及 CD8⁺高免疫状态有下调作用,这可能是其治疗 AR 的免疫机制之一。而对照组与模型组比较无显著性差异,说明经穴存在效应特异性。

临床上 AR 患者多为吸入变应原后诱发一连贯过敏反应,进而出现典型的鼻部症状,还有部分患者对冷热刺激、病毒感染及精神压力等产生应激性反应。本次造模方法采用传统 OVA+Al(OH)₃ 联合

经腹腔注射致敏,与自然发病过程存在一定差异性,故本造模方法需要进一步优化,若采用雾化吸入致敏原及冷水浸足方式激发造模,更接近AR的自然发病过程^[20]。目前不少学者已经开始重视预防性治疗在AR治疗体系中的作用^[21],下一步研究将探索艾灸足三里减轻AR最轻炎症持续状态(MPI)炎症反应进程的免疫调节机制,为艾灸足三里用于MPI预防及防止AR复发的可行性提供数据支持,从而丰富针灸“经穴效应循经特异性”相关理论。

参考文献

- [1] 来薛,赵丹,俞庆声,等. 中医药对呼吸道黏膜免疫影响的研究进展[J]. 中华中医药杂志,2013,28(1):164-167.
- [2] 敬然,陈曦,冯薪宇,等. 基于鼻黏膜上皮细胞屏障探讨中医药熏蒸治疗变应性鼻炎研究进展[J]. 时珍国医国药,2021,32(9):2240-2243.
- [3] 陈慧,郭素香,李晓丹. 温肺通窍方对儿童肺气虚寒型过敏性鼻炎黏膜免疫影响的临床研究[J]. 广州中医药大学学报,2021,38(3):464-468.
- [4] 灵枢经[M]. 田代华,刘更生,整理. 北京:人民卫生出版社,2017:32-33.
- [5] 宋婷. 针灸治疗变应性鼻炎选穴规律的研究[J]. 中医药导报,2017,23(8):65-67.
- [6] 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咽喉科杂志,2013,21(5):325-328.
- [7] 郭义,赵雪. 实验针灸学实验指导[M]. 北京:中国中医药出版社,2016:415.
- [8] BROZEK JL,BOUSQUET J,AGACHE I,et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma(ARIA) guidelines 2016 revision[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology,2017,140(4):950-958.
- [9] WANG XD,ZHENG M,LOU HF,et al. An increased prevalence of self reported allergic rhinitis in major Chinese cities from 2005 to 2011[J]. Allergy,2016,71(8):1170-1180.
- [10] 胡思洁,魏萍,寇巍,等. 变应性鼻炎患病率及危险因素Meta分析[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2017,31(19):1485-1491.
- [11] 岳冬辉,毕岩,宋岩,等. 中医药预防流感与黏膜免疫相关性研究[J]. 中医药临床杂志,2015,27(12):1655-1658.
- [12] 梁繁荣,曾芳,唐勇. 关于构建针灸临床辨证体系的思考[J]. 中国针灸,2008,28(8):551-553.
- [13] 王璇,谭静,张晓燕,等. 针灸治疗过敏性鼻炎的选穴规律分析[J]. 中医药导报,2021,27(2):155-159.
- [14] 谢璐璐,赵娜,杨惠,等. 艾灸对瞬时受体电位香草酸亚型1基因敲除小鼠局部皮肤中肿瘤坏死因子- α 表达的影响[J]. 针刺研究,2018,43(5):296-301.
- [15] 杨杰,闫晓,张玲莉,等. 艾灸对机体免疫调节的研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志,2013,19(9):1111-1114.
- [16] 刘平,潘秀颖,韩丽,等. 长期艾烟干预对Wistar大鼠外周血T淋巴细胞亚群及CD4⁺CD25⁺Treg的影响[J]. 中国针灸,2013,33(2):145-148.
- [17] 许焕芳,崔莹雪,黄茶熙,等. 艾燃烧生成物对SAMP8小鼠血清Th1/Th2细胞因子的影响[J]. 中华中医药杂志,2012,27(5):1387-1390.
- [18] 刘宏. 不同含量艾烟浓度对大鼠免疫系统水平调节的影响[J]. 辽宁中医杂志,2018,45(12):2649-2651.
- [19] 张晓文,张慧云,王维,等. 变应性鼻炎患者血液嗜酸性粒细胞富集群中TLR2、TLR4、TLR7和TLR9的变化及其相关性[J]. 西安交通大学学报:医学版,2018,39(4):537-541,572.
- [20] 顾晓娜,程向荣,张鹏,等. 变应性鼻炎动物模型的优化[J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志,2018,26(3):194-197,202.
- [21] 邢志敏,王梓敬,李世昌. 重视预防治疗在变应性鼻炎治疗体系中的作用[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2017,31(1):6-8.

(收稿日期:2022-11-03)

[编辑:刘珍]