

咳喘散穴位敷贴对支气管哮喘大鼠炎症因子的影响

★ 喻晓 石克华 王丽新 熊必丹 (上海中医药大学附属市中医医院呼吸内科 上海 200071)

摘要:目的:观察咳喘散穴位敷贴对哮喘大鼠血清中炎症因子的影响及探讨其可能作用机制。方法:将 50 只雄性 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、地塞米松组(DX 组)、中药敷贴组、中药敷贴+地塞米松(DX)组,共 5 组,每组 10 只。以卵蛋白致敏并诱发哮喘模型。穴位选取大鼠颈部相当于“大椎”穴(G14)处,中药敷贴组在背部备皮予以咳喘散穴位敷贴,DX 组予 DX(1 mg/kg)灌胃,中药敷贴+DX 组同时予咳喘散穴位敷贴和 DX 灌胃。疗程结束 24 小时内取大鼠肺组织固定、HE 染色,观察其炎症情况,同时采血离心血清,采用 ELISA 法测定血清中 IFN- γ 、IL-4、IgE、ECP 水平。结果:与正常组相比,模型组 IFN- γ 降低,IL-4 升高,差别有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组相比,中药敷贴组、DX 组 IL-4 降低,IFN- γ 升高,中药敷贴组 ECP 下降,差别具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。各组之间 IgE 水平均无显著性差异($P > 0.05$)。结论:咳喘散穴位敷贴可抑制气道炎症,调节 Th₁/Th₂ 细胞因子之间的平衡。

关键词:咳喘散;穴位敷贴;哮喘;炎症因子

中图分类号:R 244.9 **文献标识码:**A

中药穴位敷贴治疗哮喘是中医学的传统疗法,源于《张氏医通》的白芥子涂法,沿用至今疗效显著。我院开展中药穴位敷贴防治慢性哮喘疾病 40 余年,取得了较好的临床疗效,并筛选出了疗效肯定的中药外敷方咳喘散。本研究通过观察咳喘散对哮喘模型大鼠外周血 Th₁、Th₂ 型细胞因子表达水平以及对 IgE、ECP 的影响,探讨咳喘散穴位敷贴治疗哮喘的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验动物:雄性 SD 大鼠 50 只,SPF 级,体重(160 ± 10)g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公

司(动物合格证号:0052294)。主要仪器:压缩喷雾治疗仪(Eurosol Aerosol Apparatus):意大利梅法;隔水式恒温培养箱(GNP-9050):上海精宏实验设备有限公司;电子恒温水浴锅(HHV-T4):上海医疗器械五厂;离心机(KUBOTA5200):日本久保田株式会社;酶标仪(Labsystems Duagon Wellscan MK3):芬兰雷勃公司;BH-2 光学显微镜:Olympus 公司;MIAS 医学图像分析管理系统(真彩色病理图像分析系统版本 4.0):北京麦克奥迪图像技术有限公司。主要试剂:卵白蛋白(上海伯奥生物科技有限公司),IgE、ECP、IFN- γ 、IL-4 酶联免疫试剂盒(由上海元象医疗器械有限公司提供美国 R&D 进口分装试剂

进行临床客观的、合理的、科学的研究,对取穴、治疗时机、针刺手法、疗程等作多方位进一步研究。

本文通过文献计量学的方法将针灸治疗本病的经穴使用大体规律、治疗方法特点、以及将近 10 年在本病治疗过程中具有代表性的文献和特色治疗方法作了客观的评价,并无参杂作者的主观评判,以期将针灸治疗此病的大体情况尽可能详尽的罗列,为今后的临床工作者提供可用的依据。

参考文献

- [1]周惠民. 针灸配合口内放血涂芥菜法治疗颜面神经瘫痪[J]. 山东医药,1958,(4):12-13.
- [2]潘华,李守然. 电针与常规针灸治疗周围性面神经麻痹对照研究[J]. 中国针灸,2004,24(8):531-533.
- [3]吴滨,李宁,刘屹等. 针灸对急性期 Bell's 面瘫疗效的影响:随机对照研究[J]. 中国针灸,2006,26(3):157-159.

- [4]瞿群威,熊涛. 电针治疗不同病期周围性面瘫的临床观察[J]. 中国针灸,2005,25(5):323-325.
- [5]何希俊,谭吉林,李国辉. 局部取穴与循经取穴治疗周围性面神经麻痹的对比研究[J]. 新中医,2006,38(6):58-59.
- [6]王顺,胡海超,王东升. 针刺补法治疗贝尔麻痹恢复期随机对照研究[J]. 中国针灸,2008,28(2):111-114.
- [7]周瑞堂. 电针治疗周围性面神经麻痹预后与年龄相关性研究[J]. 上海针灸杂志,2008,27(7):13-14.
- [8]李瑛,梁繁荣,余曙光等. 针灸治疗贝尔麻痹的多中心大样本随机对照试验[J]. 中国临床康复,2005,9(33):97-99.
- [9]张超云,陈礼娇. 激素类药物对针灸治疗面神经麻痹疗效的影响[J]. 中国针灸,2001,21(5):281.
- [10]陈颖,王麟鹏,刘志凌. Bell's 面瘫急性期电针灸与激素治疗临床对照观察[J]. 北京中医,2004,23(2):105-107.
- [11]李炎村,唐湘祁. 激素与针灸在特发性面神经麻痹治疗中的疗效观察[J]. 湖南师范大学学报(医学版),2006,3(3):46-48.

(收稿日期:2009-08-25 责任编辑:查青林)

盒),4%多聚甲醛(北京鼎国生物技术有限责任公司),3%戊巴比妥钠。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组 50只雄性SD大鼠,SPF级,体重(160±10)g(上海斯莱克实验动物有限责任公司提供),随机分为正常对照组、哮喘模型组、地塞米松组(DX)、中药敷贴组、中药敷贴+地塞米松(DX)组共5组,每组10只。

1.2.2 模型建立 哮喘模型采用吕氏^[1]等、吴氏^[2]等介绍的方法进行,分致敏和激发两步。除正常对照组外,其他各组大鼠腹腔注射含卵蛋白100mg+氢氧化铝100mg的生理盐水混悬液(自配)1ml致敏,第8天再次致敏,第15天以5L/分钟流速雾化吸入5%卵蛋白生理盐水溶液40分钟激发哮喘,连续3周。以大鼠出现烦躁、呼吸频率加快,腹式呼吸明显和点头运动,严重者呼吸节律不齐,轻度紫绀,四肢瘫软,行动迟滞或俯伏不动,反应迟钝等症状为造模成功。

1.2.3 实验药物 敷贴主要药物为白芥子15%、甘遂30%、细辛15%、白芷15%、黄芩15%等。上药研为细末(过80目筛),用姜汁调制成糊状,做成直径为1cm的药饼(约含生药2.5g),由上海市中医医院制剂室提供。西药:地塞米松片0.75mg/片;上海第九制药厂。

1.2.4 给药方法 各治疗组均从造模第15天(即激发第1天)起给药直至处死,每日1次,共3周。将大鼠颈背部脱毛约3cm×2cm面积,药贴膜固定于大鼠颈背部相当于人体大椎穴(GV14)处;每日1次,每次3小时,连续贴3周为一个疗程。DX组:灌胃地塞米松1mg/kg/天,每日1次。用量按体型系数的折算公式,将人临床用药剂量估算为实验动物用药^[3],疗程同前。中药敷贴+DX组:在中药敷贴的同时给予地塞米松灌胃,方法及疗程同前。正常组:灌胃生理盐水10ml/kg/天,疗程同上,模型组:灌胃生理盐水10ml/kg/天,疗程同前。

1.2.5 取材 各组大鼠在最后一次激发18~24小时以内处死取材;3%戊巴比妥钠60mg/kg腹腔注射麻醉,腹主动脉取血,置于含有1%肝素(每ml全血10μl)和抑肽酶(每ml全血500单位)的抗凝管内,3500r/pm、4℃条件下低温离心20分钟,移取上清血浆入1.5ml离心管,置-20℃低温冰箱保存待测。取右肺组织于4%的多聚甲醛固定,待作HE染色。

1.2.6 待测指标的检测 大鼠血清中IFN-γ、IL-4、IgE、ECP含量采用双抗体夹心ELISA法测定。

1.2.7 肺组织病理学检查 取各组大鼠的肺组织,以4%的多聚甲醛溶液固定24小时后经脱水、石蜡包埋,制备厚4μm的标准切片,按操作常规行苏木精-伊红(HE)染色,观察肺组织普通病理学变化并摄片。

2 统计学处理

应用SPSS14.0统计软件,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组样本均数先进行方差齐性检验。计量资料用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 判定为具有统计学意义。

3 结果

3.1 中药穴位敷贴对大鼠淋巴细胞分泌细胞因子水平的影响

与模型组相比,正常组、DX组、中药敷贴组IL-4降低,IFN-γ水平升高,差别有显著性意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),与正常组相比,模型组、DX组、中药敷贴组明显升高($P < 0.05$)。中药敷贴组与DX组、中药敷贴+DX组IL-4与IFN-γ差别无显著性差异($P > 0.05$)。(见表1)

表1 各组大鼠淋巴细胞

分泌细胞因子水平的比较($n = 10, \bar{x} \pm s, \text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$)

组别	IFN-γ	IL-4
正常组	11.435 ± 2.192 *	1.197 ± 0.141 *
模型组	9.916 ± 4.606 [△]	2.366 ± 0.513 [△]
DX组	15.430 ± 4.394 ** [△]	1.363 ± 0.291 *
中药敷贴组	16.873 ± 1.668 ** [△]	0.961 ± 0.218 **
中药敷贴+DX组	16.333 ± 3.088 * [△]	1.542 ± 1.403 [△]

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 模型组, $\Delta P < 0.05$. vs 正常组。

3.2 中药穴位敷贴对大鼠IgE、ECP的影响

各组之间IgE水平差别均无显著性差别($P > 0.05$),与模型组相比,正常组、中药敷贴组ECP水平均下降,差别具有显著性意义($P < 0.05$)。

表2 各组大鼠IgE、ECP水平的比较($n = 10, \bar{x} \pm s, \text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$)

组别	IgE	ECP
正常组	23.655 ± 5.861	0.187 ± 0.051 *
模型组	26.431 ± 8.823	0.362 ± 0.018
DX组	22.610 ± 5.120	0.289 ± 0.091
中药敷贴组	20.439 ± 2.024	0.251 ± 0.030 *
中药敷贴+DX组	22.286 ± 4.532	0.296 ± 0.146

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 模型组。

3.3 肺组织病理改变

正常组大鼠气道壁薄,气管粘膜结构完整,肺泡隔窄,气道平滑肌薄,未见明显炎症细胞反应,肺泡腔透亮,无炎性物质渗出。模型组支气管平滑肌肥大、增厚,黏膜充血、水肿,黏膜层增厚,并有炎性细胞浸润,管腔内充满大量黏液,支气管壁周围有炎性细胞浸润,肺泡充血、水肿。DX组气道壁增购皱襞

增多,但较模型组轻,肺泡隔及气道平滑肌的厚度与模型组相似,支气管及肺泡炎性细胞浸润轻于模型组。中药敷贴组、中药敷贴 + DX 组气道壁及皱襞轻微增厚,肺泡隔及气道平滑肌的厚度比激素组薄,炎性细胞浸润与激素组相似。

4 讨论

支气管哮喘是由多种细胞包括气道的炎症细胞和结构细胞参与的气道慢性炎症性疾病。现代研究表明:辅助性 T 淋巴细胞 Th_2/Th_2 亚群比例失衡和功能失衡是哮喘的主要免疫发病机制。正常情况下,原始未受抗原刺激的 Th_0 按一定比例向 Th_1 和 Th_2 型细胞分化, Th_1 和 Th_2 型细胞因子互相抑制彼此表型的分化和功能,两者处于相对平衡状态,维持机体正常的细胞和体液免疫功能^[4,5]。当两者功能失衡时,机体便会出现疾病状态,主要表现为 Th_1 亚群功能低下, Th_2 亚群功能亢进。此时, Th_2 细胞数目增多,分泌高浓度的 IL-4,IL-4 是气道变态反应性炎症形成的关键所在^[6];IFN- γ 和 IL-4 分别代表了 Th_1 、 Th_2 细胞亚群的功能,IFN- γ /IL-4 的比例反映了 Th_1/Th_2 细胞因子平衡的情况^[7,8]。IgE 介导的 I 型变态反应是哮喘的重要发病机制之一,而 IL-4 对 IgE 合成有正反馈调节作用,IFN- γ 则起负反馈调节作用^[9]。哮喘的严重程度与血清 ECP 呈正相关,ECP 为诊断与判读哮喘疗效和气道炎症是否控制指标之一^[10]。

咳喘散通过穴位敷贴,防治支气管哮喘,达到温阳散寒、祛痰定喘的作用,在减少哮喘发作次数,减轻发作程度,防止复发,提高患者生命质量方面有显著的疗效。咳喘散的主要药物组成为甘遂、细辛、白芥子、白芷、黄芩。白芥子辛温通脉,温肺化饮,利气散结,清肃通络,善治“皮里膜外之痰”。《本草经疏》谓“白芥子味极辛,气温,能搜刮内外痰结及胸膈寒痰,冷涎壅塞者殊效”;甘遂苦寒性降,善行经隧之水湿,泻水逐饮力峻,是攻逐脏腑经络痰饮的首选用药之一,药理研究表明它还具有抑制 IgE 引导的肥大细胞活化作用而具有一定的抗过敏作用^[11];细辛辛散温燥,既可祛风散寒,达表入里,又能下气消痰,温肺化饮;白芷芳香上达,善散阳明经湿邪,进而可散肺脾之湿;黄芩反佐,避免辛温药物温热太过,损伤阴液,并有抗炎和抗变态反应作用^[12]。

本实验结果显示,造模后,哮喘模型组大鼠与正常组大鼠比较外周血清中 IFN- γ 含量降低,IL-4、ECP 含量则明显增高,且与正常组比较,模型组支气管平滑肌肥大、增厚,黏膜充血、水肿,黏膜层增厚,

并有炎性细胞浸润,管腔内充满大量黏液,支气管壁周围有炎性细胞浸润,肺泡充血、水肿。说明造模成功,哮喘大鼠具有明显的 Th_1/Th_2 细胞因子表达转移。DX 组与中药敷贴 + DX 组大鼠呼吸急促、口唇紫绀、腹肌收缩等症状较其他组剧烈,且各项指标与模型组差别无显著意义,可能与长期灌服地塞米松后机体抵抗力下降,造成其他感染引起。敷贴组 IL-4、ECP 水平较模型组明显降低,IFN- γ 水平则升高,但 IgE 水平下调不明显,可能与咳喘散对不同 T 细胞亚群的调节有关:一方面药物可能通过阻断或抑制 Th_2 细胞的活化而减少 IL-4 的分泌,另一方面可能通过激活 Th_1 细胞,促进 IFN- γ 的分泌而下调 IL-4 水平,从而使哮喘大鼠的 IgE 水平降低。总之,本实验结果提示,咳喘散穴位敷贴可有效调节哮喘模型大鼠外周血 Th_1/Th_2 比例失衡状态,对 ECP 的表达及炎性细胞浸润有一定的抑制作用,可能与其调节机体的免疫功能有关,但具体的作用机制仍有待进一步研究。

参考文献

- [1] 吕国平,崔德健,郭英江等. 介绍一种建立大鼠哮喘模型的实验方法[J]. 中华结核和呼吸杂志,1995,18(6):377-378.
- [2] 吴玉晶,姜之炎. 支气管哮喘动物的造模方法及传统方剂对其影响的研究[J]. 中华实用中西医杂志,2004,4(17):1816-1817.
- [3] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1994,7:33-34.
- [4] 刘国梁,林耀广. 树突细胞与哮喘 Th_1/Th_2 失衡[J]. 基础医学和临床,2004,24(4):361-364.
- [5] 陈慧中,朱春梅. 支气管哮喘的免疫学发病机制[J]. 实用儿科临床杂志,2004,19(12):1015-1017.
- [6] 张宁. 辅助性 T 细胞功能分化的分子机制. 国外医学[J]. 呼吸系统分册,2003,23(2):57-59.
- [7] Meiler F, Zimmermann M, Blaser K, et al. T-cell subsets in the pathogenesis of human asthma[J]. Curr Allergy Asthma Rep. 2006,6(2):91-96.
- [8] Liu LY, Mathur SK, Sedgwick JB, et al. Human airway and peripheral blood eosinophils enhance Th_1 and Th_2 cytokine secretion[J]. Allergy. 2006,61(5):589-97.
- [9] 刘永琦. 医学免疫学[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:33-104.
- [10] 李明华,殷凯生,蔡映云. 哮喘病学(第二版)[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:156.
- [11] Satoshi N, Susumu K, Chisei R. 3-O-13-O-decanoylgenol from Euphorbia kansui suppresses IgE-Mediated Mast Cell Activation [J]. VoBiol Pharm Bull,2006,29(2):286-290.
- [12] 丁安伟. 现代中药临床手册[M]. 南京:江苏科学技术出版社,2000:43.

(收稿日期:2009-05-29 责任编辑:查青林)