

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.22.015

穴位贴敷对过敏性哮喘大鼠血清转化生长因子 $\beta 1$ 和尾加压素 II 的影响

金禹彤¹, 吴凌韬¹, 陈姍¹, 宣丽华^{2*}

(1. 浙江中医药大学第一临床医学院, 浙江省杭州市滨江区滨文路 548 号, 310053; 2. 浙江中医药大学附属第一医院)

摘要 目的 探讨穴位贴敷治疗过敏性哮喘的可能作用机制。方法 将 40 只 Wistar 大鼠随机分为空白组、模型组、贴敷 2 h 组、贴敷 4 h 组, 每组 10 只。除空白组外, 其余各组大鼠用鸡卵白蛋白 (OVA) 和生理盐水的混悬液皮下多点注射及雾化吸入致敏制造过敏性哮喘模型。造模结束后第 15 天起, 空白组和模型组正常饲养; 贴敷 2 h 组、贴敷 4 h 组于大鼠肺俞、脾俞、肾俞穴位贴敷, 分别贴敷 2 h、4 h, 隔天 1 次, 共贴 7 次。观察各组大鼠引喘潜伏期和发作总持续时间; ELISA 法检测大鼠血清中转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 和尾加压素 II (U II) 含量; HE 染色观察大鼠支气管和肺组织病理结构改变。结果 与模型组比较, 贴敷 2 h、4 h 组引喘潜伏期延长、发作总持续时间缩短, 血清 TGF- $\beta 1$ 和 U II 水平明显降低 ($P < 0.01$); 支气管和肺组织结构不清, 支气管黏膜水肿、充血及气道壁增厚等改变显著改善。贴敷 4 h 组与贴敷 2 h 组相比, 引喘潜伏期、发作总持续时间、血清 TGF- $\beta 1$ 与 U II 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 穴位贴敷能降低血清 TGF- $\beta 1$ 和 U II 含量, 从而改善气道重塑, 可能是其治疗过敏性哮喘的机制之一。

关键词 过敏性哮喘; 穴位贴敷; 气道重塑; 转化生长因子 $\beta 1$; 尾加压素 II

过敏性哮喘是由多种细胞和细胞组份参与的气道慢性炎症性疾病, 反复发作会引起不可逆性气道破坏及纤维化导致气道重塑, 使哮喘迁延不愈。目前推荐的治疗方法为应用小剂量糖皮质激素, 具有局部抗炎作用强且起效快的特点, 可以在发作期较好地控制炎症及症状, 但不能减少缓解期哮喘发作次数, 远期效果并不理想^[1], 且长期应用激素其副作用较多, 如可引起消化性溃疡以及诱导组织变性^[2-4]等, 很多患者还会对其产生终身的药物依赖, 严重影响生活质量。穴位贴敷作为传统的中医外治疗法, 对支气管哮喘的防治效果显著, 大量研究表明, 穴位贴敷不仅可以有效控制过敏性哮喘发作, 且可显著降低复发率, 对哮喘的远期症状控制良好^[5-7]。本研究从气道重塑方面探讨其控制过敏性哮喘反复发作的可能相关机制。

1 材料及方法

1.1 实验动物

SPF 级 Wistar 雄性大鼠 40 只, 6 周龄, 体重

(180 ± 20) g, 由浙江中医药大学动物实验中心提供, 实验动物许可证号: SYXK (浙) 2013-0184。实验方案通过浙江中医药大学实验动物伦理委员会批准, 批准号: ZSLL-2016-26。动物饲养在室温 $21 \sim 25^{\circ}\text{C}$ 、湿度 60% ~ 70% 的环境中, 分笼常规颗粒饲料饲养, 12 小时昼夜节律, 1 周后使用。

1.2 药品

穴位贴敷贴膏, 由白芥子、细辛、延胡索、甘遂组成, 比例为 2 : 2 : 1 : 1, 浙江省中医院自制。

1.3 主要试剂及仪器

卵白蛋白 (OVA, 批号: SLBB430V), 美国 Sigma 公司; 氢氧化铝 $[\text{Al}(\text{OH})_3]$ 凝胶 (自行配制); 地塞米松磷酸钠注射液 批准文号: 兽药字 (2011) 140061147, 江西博莱大药厂有限公司; 转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) ELISA 试剂盒 (批号: CSB-E04727r)、尾加压素 II (U II) ELISA 试剂盒 (批号: CSB-EL025771RA) 均由 Cusabio 公司提供; HE 染色试剂盒 (批号: C0105), 碧云天生物技术有限公司。402AI 型超声雾化器, 江苏鱼跃医疗设备股份有限公司; 自制 $30 \text{ cm} \times 40 \text{ cm} \times 50 \text{ cm}$ 玻璃箱; DMI3000M 光学显微

基金项目: 浙江省科技计划 (2014C03046-2)

* 通讯作者: xlh1083@163.com

镜,德国 Leica 公司; 80-2 型电动离心机,常州奥华仪器公司。

1.4 大鼠造模、分组及给药

将 40 只大鼠按随机数字表法分为空白组、模型组、贴敷 2 h 组、贴敷 4 h 组,每组 10 只。除空白组外其余 Wistar 大鼠参照 Palmans 的方法^[8]改良后建立过敏性哮喘大鼠模型。第 1 天和第 8 天皮下多点注射 1 ml 的生理盐水混悬液 [含 10 mg OVA 和 100 mg Al (OH)₃ 凝胶] 致敏,第 15 天开始将大鼠放入透明玻璃箱内,雾化吸入 1% 的 OVA 生理盐水溶液激发哮喘,隔天 1 次,每次激发 30 min。直至第 56 天雾化结束。大鼠出现烦躁、打喷嚏、呼吸频率加快、腹式呼吸明显、鼻痒抓鼻、四肢无力瘫软、反应迟钝甚至跌倒等症状视为激发成功^[9]。

造模后正常饲养 14 天。第 15 天起,空白组和模型组正常饲养;贴敷 2 h 组、贴敷 4 h 组将大鼠背部剃毛,并在大鼠肺俞、脾俞、肾俞穴位贴敷 1 cm × 1 cm 的膏药,用胶布固定,分别于 2 h、4 h 后取下膏药,隔天 1 次,共贴 7 次。穴位均取双侧,定位参考《实验针灸学》^[10]。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 行为学观察 最后 1 次给药后 2 h 将所有大鼠用 1% 的 OVA 生理盐水溶液雾化激发 30 min,从雾化激发开始到大鼠出现烦躁、抓鼻、腹式呼吸明显等哮喘样表现的时间为引喘潜伏期,雾化期间出现这些表现的持续时间总和为发作总持续时间。

1.5.2 血清指标检测 最后 1 次给药后 12 h,取 1% 戊巴比妥钠腹腔注射 (40 mg/kg) 麻醉大鼠。各组大鼠心脏取血 5 ml,静置 2 h,3000 r/min 离心 10 min,分离血清,取上清液,放置 -80℃ 冰箱保存。用 ELISA 法检测大鼠血清 TGF-β1 和 U II 水平,检测步骤严格遵循试剂盒说明进行。

1.5.3 支气管和肺组织病理检测 各组大鼠心脏取血结束后脱颈处死,取右中肺,用 4℃ 生理盐水漂洗,置于 10% 的中性甲醛溶液中固定 24 h,脱水、石蜡包埋切片并进行 HE 染色,置于光学显微镜下观察支气管和肺组织病理改变。

1.6 统计学方法

应用 SPSS 22.0 软件分析,计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,符合正态分布及方差齐性的资料,多样本均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验,以 $P < 0.01$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠引喘潜伏期与发作总持续时间比较

表 1 示,与空白组比较,模型组引喘潜伏期显著缩短,发作总持续时间显著延长 ($P < 0.01$);与模型组比较,贴敷 2 h、4 h 组引喘潜伏期均延长,发作总持续时间均缩短 ($P < 0.01$),且两组间各项差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠引喘潜伏期及发作总持续时间比较 ($s, \bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	引喘潜伏期	发作总持续时间
空白组	10	358.26 ± 19.54	44.13 ± 8.66
模型组	10	73.16 ± 7.77*	558.59 ± 59.12*
贴敷 2 h 组	10	152.89 ± 9.77 [△]	274.13 ± 23.35 [△]
贴敷 4 h 组	10	136.63 ± 11.97 [△]	251.49 ± 18.16 [△]

注:与空白组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

2.2 各组大鼠血清 TGF-β1、U II 水平比较

表 2 示,与空白组比较,模型组大鼠血清 TGF-β1 和 U II 水平明显升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,贴敷 2 h、4 h 组血清中 TGF-β1 及 U II 水平均显著降低 ($P < 0.01$),且两组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠血清 TGF-β1、U II 水平比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TGF-β1	U II
空白组	10	4649.51 ± 772.27	8.19 ± 0.76
模型组	10	7346.37 ± 664.71*	73.20 ± 5.13*
贴敷 2 h 组	10	6474.33 ± 538.51 [△]	58.45 ± 5.65 [△]
贴敷 4 h 组	10	6037.77 ± 512.13 [△]	55.10 ± 3.32 [△]

注:TGF-β1,转化生长因子 β1;U II,尾加压素 II;与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

2.3 各组大鼠支气管和肺组织病理情况

图 1 示,空白组支气管及肺实质无异常炎性改变,支气管上皮及肺泡结构完整,无气道壁增厚,血管壁及肺泡间隔周围极少量炎性细胞浸润。模型组支气管及肺组织结构不清,支气管黏膜水肿、充血,气道上皮细胞坏死及脱落,管腔内黏液分泌物增多,管腔狭窄,气道平滑肌增厚,肺泡内、肺泡间隔及细支气管见明显炎性细胞浸润。贴敷 2 h 组与模型组相比,支气管及肺组织结构相对清晰,支气管黏膜水肿、充血及分泌物均减少,气道平滑肌增厚有所改善,肺泡内、肺泡间隔及细支气管炎性细胞浸润减少。贴敷 4 h 组支气管上皮完整,肺组织结构清晰,支气管黏膜轻度水肿、充血,少量分泌物,气道平滑肌稍有增厚,炎性细胞少量浸润。

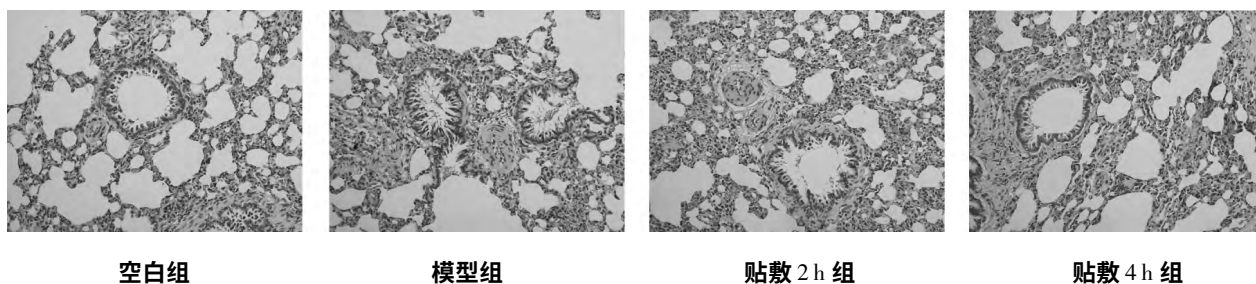


图 1 各组大鼠支气管和肺组织病理形态 (×200)

3 讨论

过敏性哮喘属于中医学“哮病”范畴。哮喘的病机总属顽痰伏肺，肺、脾、肾三脏受损。宿痰伏于肺，加之外感六淫、饮食劳倦、情志失调等诱因，致使痰阻气道，肺气上逆，从而引发哮喘，日久则脾肾受损。治宜祛痰平喘。本研究穴位贴敷药物以白芥子为君药理气祛痰散结，朱丹溪曰“痰在胁下及皮里膜外，非白芥子不能达”。细辛辛温，用以温里散寒，发汗解表，与甘遂、元胡索共用加强化痰平喘的作用。

过敏性哮喘发生发展与气道重塑密切相关^[1]。气道重塑使气道壁结构改变，从而导致气道不可逆性狭窄和持续的气道高反应^[2]。HOSHINO 等^[3]证明，气道重塑的发生与炎性细胞释放出的细胞因子 TGF-β1 有关。TGF-β1 可以作为一种促炎因子参与气道炎症反应，对细胞的增殖、分化过程起重要作用^[4]。气道和肺内的成纤维细胞和成肌纤维细胞在过敏性哮喘发病过程中可被 TGF-β1 激活，若 TGF-β1 持续增高，可促进成纤维细胞不断增殖^[5]，并使其向纤维蛋白转化，即支气管内组织纤维化，导致气道壁及气道平滑肌增厚。同时，TGF-β1 也可促进胶原蛋白及蛋白聚糖等在细胞外基质中的沉积，减少细胞外基质的降解，引起气道重塑及慢性气道阻塞，诱发和加重过敏性哮喘的发作^[6]。

U II 为气道平滑肌细胞的强丝裂原^[7]，可以通过收缩气道平滑肌而促使和加重气流阻塞，此外，U II 可提高常氧和低氧下大鼠肺动脉平滑肌细胞 DNA 合成速率^[8]，诱导气道平滑肌及内皮细胞增殖，并促胶原合成，从而干预哮喘发病^[9]。研究表明，在哮喘发病过程中 U II 始终维持在较高水平^[10]。

引喘潜伏期和发作总持续时间反映哮喘发作的严重程度。引喘潜伏期越短、发作总持续时间越长，哮喘症状越严重。本研究结果发现，与空白组比较，模型组大鼠血清中 TGF-β1 和 U II 的含量明

显升高，引喘潜伏期明显缩短，发作总持续时间显著延长，且气道中上皮细胞坏死脱落、气道壁增厚，提示过敏性哮喘模型造模成功，TGF-β1 和 U II 通过参与气道重塑的过程参与过敏性哮喘的发生与发展。给予穴位贴敷治疗后，引喘潜伏期均延长，发作总持续时间均缩短，血清中 TGF-β1 和 U II 的浓度显著降低，且病理切片显示气道炎症及气道重塑情况明显缓解，提示穴位贴敷对气道重塑具有良性调节作用。但不同的贴敷时间对于过敏性哮喘治疗效果及血清中 TGF-β1 和 U II 影响并不显著，即此疗法没有时间依赖性。

综上所述，穴位贴敷疗法能有效治疗过敏性哮喘，其作用机制可能为下调血清 TGF-β1 及 U II 浓度，抑制内皮细胞、纤维细胞的增殖及胶原蛋白沉积，延缓因气道壁及支气管平滑肌的增厚引起的气道重塑，从而减少气道阻塞来改善症状，并预防过敏性哮喘反复发作。

参考文献

- [1] 李月梅, 刘强, 李向阳. 新型透皮吸收贴剂穴位贴敷治疗缓解期哮喘及对患者相关转录因子的影响 [J]. 中国针灸, 2012, 32(5): 459-463.
- [2] ALLEN CS, YEUNG JH, VANDERMEER B, et al. Bisphosphonates for steroid-induced osteoporosis [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2016, 10: CD001347.
- [3] TSENG CL, CHEN YT, HUANG CJ. Short-term use of glucocorticoids and risk of peptic ulcer bleeding: a nationwide population-based case-crossover study [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2015, 42(5): 599-606.
- [4] SPANG C, CHEN J, BACKMAN LJ. The tenocyte phenotype of human primary tendon cells in vitro is reduced by glucocorticoids [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2016, 17(1): 467.
- [5] 陈卫华, 辛坤, 蔡臣安, 等. 中药穴位贴敷治疗支气管哮喘疗效观察 [J]. 中国针灸, 2009, 29(4): 272-274.
- [6] 林洁, 夏以琳, 封玉琳, 等. 哮喘散敷贴治疗支气管哮喘的疗效观察 [J]. 中成药, 2002, 24(9): 731-732.
- [7] 高修安, 朱锦善. 海龙蠲痹方合咳喘平涌泉穴位贴敷治疗小儿支气管哮喘发作期临床观察 [J]. 中国中西医结合

合杂志, 2005, 25(8) : 738-740.

[5] PALMANS E, KIPS JC, PAUWELS RA. Prolonged allergen exposure induces structural airway changes in sensitized rats [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 161(2) : 627-635.

[6] 吉宁飞, 卞涛, 陈力, 等. 支气管哮喘大鼠模型的建立与气道反应性的测定 [J]. 南京医科大学学报, 2006, 26(11) : 1018-1020.

[7] 李忠仁. 实验针灸学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 301-307.

[8] 朱晓洁, 王珺, 张予阳. 多机制多通路参与哮喘新说 [J]. 沈阳药科大学学报, 2014, 31(4) : 325-330.

[9] 张朝蕾, 薄建萍, 李江波. 地塞米松对大鼠支气管哮喘气道重塑及 PDGF-BB 表达的影响 [J]. 当代医学, 2010, 16(30) : 10-11.

[10] HOSHINO M, NAKMURA Y, SIM JJ, et al. Expression of growth factors and remodeling of the airway wall in bronchial asthma [J]. Thorax, 1998, 53(1) : 21-27.

[11] 刘鑫, 刘希, 彭光耀. TGF- β 1 在哮喘大鼠模型中动态变化及柴朴汤的干预研究 [J]. 四川中医, 2011, 29(5) : 16-20.

[12] GAO Y, XU X, DING K, et al. Rapamycin inhibits trans-

forming growth factor β 1-induced fibrogenesis in primary human lung fibroblasts [J]. Yonsei Med J, 2013, 54(2) : 437-444.

[13] BOTTOMS SE, HOWELL JE, REINHARDT AK, et al. TGF- β isoform specific regulation of airway inflammation and remodeling in a murine model of asthma [J]. PLoS One, 2010, 5(3) : e9674. doi: 10.1371/journal.pone.0009674.

[14] RUSSELL FD, MEYERS D, GALBRAITH AJ, et al. Elevated plasma levels of human urotensin-II immunoreactivity in congestive heart failure [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 285(4) : 1576-1581.

[15] 张维溪, 梁亚峰, 聂颖, 等. 布地奈德对哮喘气道重塑大鼠尾加压素-II 及 mRNA 表达的影响 [J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(6) : 427-430.

[16] TAKAHASHI K, TOTSUNE K, MURAKAMI O, et al. Expression of urotensin II and its receptor in adrenal tumors and stimulation of proliferation of cultured tumor cells by urotensin II [J]. Peptides, 2003, 24(2) : 301-306.

[17] 孟庆红, 赵翠芬, 孔清玉, 等. 尾加压素 II 对大鼠肺动脉平滑肌细胞胶原合成的影响 [J]. 山东大学学报, 2013, 51(5) : 15-19.

Impact of Acupoint Application on Serum Transforming Growth Factor β 1 and Urotensin II in Allergic Asthma Model Rats

JIN Yutong¹, WU Lingtao¹, CHEN Shan¹, XUAN Lihua²

(1. First Clinical Medical School, Zhejiang University of Chinese Medicine, Hangzhou, 310053; 2. First Affiliated Hospital of Zhejiang University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of acupoint application in treating allergic asthma.

Methods Forty Wistar rats were randomized into a blank group, a model group, an application 2 h group, and an application 4 h group, with 10 in each group. Rats in all groups were made allergic asthma models by suspension of chicken ovalbumin (OVA) and normal saline multi-point subcutaneous injection and by aerosol inhalation sensitization, except those in the blank group. From the 15th day after modeling, the blank group and the model group were fed as usual. The application 2 h group and the application 4 h group were given acupoint application at rats' "Feishu" (BL 13), "Pishu" (BL 20) and "Shenshu" (BL 23) for 2 h and 4 h, respectively once every 2 days, for 7 times. Rats' latent period of inducing asthma and total duration of seizures in each group were examined. Rats' serum levels of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) and urotensin II (U II) were detected with Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method. Pathological changes of bronchus and lung tissue of rats were examined with hematoxylin and eosin (HE) stain. **Results** Compared with those in the model group, the latent period of inducing asthma extended, the total duration of seizures reduced, and the serum levels of TGF- β 1 and U II decreased ($P < 0.01$), and also the pathological changes such as unclear structure of bronchus and lung, bronchial mucosal edema, hyperemia and airway wall thickening, etc. were obviously improved in the application 2 h group and the application 4 h group. There were no significant differences in latent period of inducing asthma, total duration of seizures, and serum levels of TGF- β 1 and U II between the application 4 h group and the application 2 h group ($P > 0.05$). **Conclusion** Acupoint application might reduce the serum levels of TGF- β 1 and U II to improve airway remodeling, which might be one of the mechanisms in treating allergic asthma.

Keywords allergic asthma; acupoint application; airway remodeling; transforming growth factor β 1; urotensin II
(收稿日期: 2017-05-03; 修回日期: 2017-07-14)

编辑: 王利芬