

本文引用:王 渊,杨晓航,牛文民,朱先伟,王 强,刘思洋,王卫刚,刘智斌.电针迎香穴对嗅觉功能障碍大鼠胰岛素样生长因子-1的影响[J].湖南中医药大学学报,2017,37(3):298-301.

电针迎香穴对嗅觉功能障碍大鼠 胰岛素样生长因子-1的影响

王 渊¹,杨晓航¹,牛文民¹,朱先伟¹,王 强¹,刘思洋²,王卫刚³,刘智斌^{1*}

(1.陕西中医药大学,陕西 咸阳 712046;2.西安医学院,陕西 西安 710021;3.陕西中医药大学附属医院,陕西 咸阳 712000)

〔摘要〕目的 探讨电针迎香穴对嗅觉功能障碍大鼠胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor 1,IGF-1)的影响。**方法** 将50只SD大鼠随机分为5组,分别是正常组、嗅觉功能障碍组、嗅觉功能障碍+眶下神经切断组、嗅觉功能障碍+电针组、嗅觉功能障碍+眶下神经切断+电针组,电针干预迎香穴后,运用嗅觉迷宫实验和对大鼠嗅球组织及血液中IGF-1进行ELISA、免疫组织化学等方法进行分析研究。**结果** 嗅觉功能障碍+电针组大鼠与正常组相比,其嗅觉功能明显改善($P<0.01$),其嗅球组织及血液中IGF-1表达明显升高($P<0.05$),而嗅觉功能障碍+眶下神经切断+电针组大鼠与正常组相比,其嗅觉功能和嗅球组织及血液中IGF-1表达无明显改善($P>0.05$)。**结论** 电针迎香穴对嗅觉功能障碍模型大鼠具有显著干预效应,其作用机制可能是通过三叉神经通路,促进大鼠体内IGF-1的产生,从而有利于嗅觉系统嗅感神经元(ORN)再生,改善嗅觉功能障碍。

〔关键词〕 嗅觉功能障碍;胰岛素样生长因子-1;迎香穴

〔中图分类号〕 R245.3;R765

〔文献标识码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.03.018

Effect of Yingxiang Acupoint on Insulin-like Growth Factors-1 in Olfactory Dysfunction Rats

WANG Yuan¹, YANG Xiaohang¹, NIU Wenmin¹, ZHU Xianwei¹, WANG Qiang¹, LIU Siyang², WANG Weigang³, LIU Zhibin^{1*}

(1. Shanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shanxi 712046, China; 2. Xi'an Medical College, Xi'an, Shanxi 710021, China; 3. The Affiliated Hospital of Shanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shanxi 712000, China)

〔Abstract〕 Objective To investigate the effect of Yingxiang acupoint on insulin-like growth factors-1 (IGF-1) in olfactory dysfunction rats. **Methods** The 50 SD rats were randomly assigned into five groups, normal control group, olfactory dysfunction group, olfactory dysfunction+infraorbital nerve transection group, olfactory dysfunction+EA group, olfactory dysfunction+infraorbital nerve transection+EA group. After electro-acupuncture intervention at Yingxiang acupoint, the IGF-1 in olfactory bulb tissue and blood of rats was analyzed by using olfactory maze test, ELISA and immunohistochemistry methods. **Results** Compared with the normal group, the olfactory function of the olfactory dysfunction+EA group rats were significantly improved ($P<0.01$), IGF-1 in the olfactory bulb tissue and blood increased significantly ($P<0.05$). While the IGF-1 in olfactory dysfunction+infraorbital nerve cut+EA group had no significant improvement ($P>0.05$). **Conclusion** Electroacupuncture Yingxiang acupoint has a significant intervention effect on olfactory dysfunction model rats and its mechanism may be through the trigeminal nerve pathway, promote the production of IGF-1 in rats. It is conducive to the olfactory mucosa olfactory sense (ORN) of neuronal regeneration and improve olfactory dysfunction.

〔Keywords〕 olfactory dysfunction; insulin-like growth factors-1; Yingxiang acupoint

〔收稿日期〕 2016-07-11

〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(81273859);陕西省教育厅专项科学研究项目(11JK0679)。

〔作者简介〕 王 渊,男,副教授,研究方向:针灸推拿治疗脊柱疾病和老年病的基础与临床研究。

〔通讯作者〕 * 刘智斌,男,二级教授,E-mail:lbz210396@163.com。

嗅觉在人类的各种生理、心理活动中发挥着重要作用。本研究针对嗅觉功能障碍所选穴位迎香,《玉龙歌》中所载:“不闻香臭从何治?迎香穴二穴可堪攻,先补后泻分明效,一针未出气先通”,其中歌赋中所载的“不闻香臭”即指现代医学范畴的嗅觉功能障碍,包括嗅觉减退和嗅觉丧失,流行病学调查结果显示,人群中嗅觉功能障碍实际总发生率20岁以上占19.1%,50岁以上高达24.5%,而在这些患病人群中,末梢神经性嗅觉功能障碍患者占全体嗅觉功能障碍患者的30%以上^[1-2]。因此,电针迎香穴被广泛应用于治疗末梢神经性嗅觉功能障碍^[3-5]。嗅觉受体神经细胞作为唯一具备持续再生能力的神经元,其中含有各种气味结合蛋白,通过一系列机制参与嗅觉的整个形成过程,胰岛素样生长因子-1(IGF-1)是调节嗅觉受体神经再生的主要分子。本项目在前期研究基础上,对于末梢神经性嗅觉功能障碍动物模型,本研究团队采用Triton X-100灌注大鼠双侧鼻孔进行复制,采用电针迎香穴干预嗅觉功能障碍模型和切断眶下神经嗅觉功能障碍模型,通过嗅觉迷宫观察大鼠行为学、ELISA法观察大鼠嗅球组织及血液中IGF-1的表达、免疫组化法观察鼠嗅球组织IGF-1的表达等方法,分析电针迎香穴干预嗅觉功能障碍的效应机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康清洁级雄性SD大鼠50只,体质量(250±20)g,由西安交大实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(陕)2016.038)。随机分为正常组、嗅觉功能障碍组、嗅觉功能障碍+眶下神经切断组、嗅觉功能障碍+电针组、嗅觉功能障碍+眶下神经切断+电针组,每组10只。

1.2 主要仪器及试剂

Morris水迷宫实验系统(北京现代太极电子有限公司),Multiskan MK3全自动酶标仪(美国Bio-Rad公司),Rat Insulin-like Growth Factor 1 IGF-1(IGF-1)ELISA KIT(Thermo Fisher Scientific),SDZ-II型电子针疗仪(苏州医疗用品厂有限公司出品)。

1.3 模型制备

1.3.1 嗅觉功能障碍模型制备

麻醉剂采用0.3%

戊巴比妥钠,将大鼠麻醉后,选用由PBS配制的0.7%Triton X-100,并将其吸注于微量注射器中,再将磨钝的针头探入大鼠的双侧鼻孔,一次性灌注量为100 μL,时间1 min^[6]。

1.3.2 眶下神经切断模型制备

首先对大鼠双侧眶下皮肤区域进行常规消毒,然后沿两侧眶下缘做一长约0.5 cm的水平切口,接着对视野内的皮下脂肪进行钝性分离直至将眶下孔充分暴露出来,再将眶下神经及其同名动静脉进行仔细分离,最后在避开血管的情形下,对眶下神经施行切断术^[7]。

1.4 实验方法

穴位选择:迎香穴(双侧)。穴位定位:大鼠鼻孔外侧上端,有毛与无毛交界处^[8]。操作方法:常规消毒穴位,选择30号、0.5寸“华佗牌”不锈钢毫针,迎香向内上方斜刺0.3 cm;电针仪正极和负极各接一侧迎香穴,以穴区保持轻微抖动为适宜刺激强度,每次电针刺激10 min,每日1次,1个干预疗程为5次,休息2 d,再进行下一个干预疗程,共观察2个疗程。对于正常组和嗅觉功能障碍模型组大鼠,每日于同一时间段进行捉拿固定,不施加任何干预措施。

1.5 观察指标

1.5.1 嗅觉迷宫实验

将圆形迷宫等分为6个小格,将新鲜鼠料(0.5 g)随机置于大鼠仅靠嗅觉才能找到而不能直接看见的小格后面。将大鼠放置于迷宫中间,对于大鼠从进入迷宫开始到用前爪抓住食物小球啃噬的时间进行记录,待大鼠进食结束后将其放回笼中,将大鼠的排泄物和食物残渣取出,为了防止对后面测试的干扰,用水和70%的乙醇对迷宫进行清洁;阳性对照是将食物小球放置在大鼠能够直接看见小格外。对于300 s(5次测试的平均值)内未找到食物小球的大鼠,即定为嗅觉丧失^[9]。

1.5.2 酶联免疫吸附测定

在疗程结束后取下大鼠头颅,参照The Rat Brain大鼠图谱,使用电钻在大鼠头颅前凶前3.2 mm的位置对后界开窗,使得左侧嗅球充分暴露,刀片采用厚度为0.5 mm的规格,在视野清晰的条件下,将其由后界垂直插入,进一步将嗅球组织取出并切成碎片^[10],接下来依照每10 mg组织对应100 μL PBS的比例将组织进行匀浆,为了破坏细胞膜,采用超声波对匀浆液进行进一步处理,最后将上清液吸出并且置于-80℃超低温

温冰箱之中。对于嗅球组织中 IGF-1 的表达采用 ELISA 法进行检验分析。

1.5.3 免疫组织化学 将大鼠嗅球组织进行石蜡包埋并切片,采用梯度酒精和二甲苯对切片进行水化,使用 pH 值 6.0 的 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液对抗原进行修复,非特异性结合位点的封闭采用山羊血清工作液,在 37 ℃ 30 min 的条件下,滴加比例为 1:200 的 IGF-1R 抗体并且在 4 ℃ 条件下过夜,采用 0.01 mol/L PBS 对其进行漂洗,将生物素化山羊抗鼠/兔 IgG 二抗滴加于其中,在 37 ℃ 30 min 的条件下,对其进行 PBS 漂洗,将辣根过氧化物酶标记链霉卵蛋白试剂滴加于其中,在 37 ℃ 30 min 的条件下,对其进行 PBS 漂洗,并进行 DAB 显色,采用苏木素将其轻度复染,接下来采用酒精梯度对其脱水,最后进行中性树胶封片。

1.6 统计方法

采用 SPSS 17.0 进行统计学处理,实验数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,多因素比较采用单因素方差分析,用 LSD 法进一步多重比较,所有检验结果以 $P < 0.05$ 为评定差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 嗅觉迷宫实验结果

与正常对照组相比,嗅觉功能障碍组与嗅觉功能障碍+眶下神经切断组在嗅觉迷宫中所用时间均大于 300 s,差异有显著统计学意义($P < 0.01$),说明这两组大鼠嗅觉丧失;与嗅觉功能障碍组相比,嗅觉功能障碍+电针组大鼠在嗅觉迷宫实验中所用的时间明显缩短,差异有显著统计学意义($P < 0.01$)而嗅觉功能障碍+眶下神经切断+电针组大鼠在嗅觉迷宫实验中所用的时间大于 300 s,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

组别	n	时间
正常对照组	10	55.7±5.2
嗅觉功能障碍组	10	303±3.8 ^{##}
嗅觉功能障碍+眶下神经切断组	10	308±6.1 ^{##}
嗅觉功能障碍+电针组	10	67.2±4.8 ^{**}
嗅觉功能障碍+眶下神经切断+电针组	10	310±6.8 ^{##}

注:与正常对照组比较,## $P < 0.01$;与嗅觉功能障碍组比较,** $P < 0.01$ 。

2.2 酶联免疫吸附分析结果

与嗅觉功能障碍模型组比较,嗅觉功能障碍+电针组大鼠嗅球组织和血液中的 IGF-1 表达增加

($P < 0.05$),嗅觉功能障碍+眶下神经切断组大鼠嗅球组织和血液中的 IGF-1 表达无显著变化,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠嗅球组织及血液中 IGF-1 的表达 ($n=10, \bar{x} \pm s$, ng/mL)

组别	嗅球组织中 IGF-1	血液中 IGF-1
正常对照组	1.36±0.15	2.76±0.32
嗅觉功能障碍组	0.74±0.18 [#]	1.78±0.43 [#]
嗅觉功能障碍+眶下神经切断组	0.43±0.22 [#]	1.66±0.27 [#]
嗅觉功能障碍+电针组	1.01±0.23 [*]	2.08±0.47 [*]
嗅觉功能障碍+眶下神经切断+电针组	0.68±0.28 [#]	0.75±0.13 [#]

注:与正常对照组比较, # $P < 0.05$;与嗅觉功能障碍组比较, * $P < 0.05$ 。

2.3 免疫组织化学分析结果

图 1,表 3 结果说明,与嗅觉功能障碍模型组比较,嗅觉功能障碍+电针组大鼠嗅球组织 IGF-1 的阳性表达明显增加($P < 0.05$),嗅觉功能障碍+眶下神经切断组大鼠嗅球组织中 IGF-1 的阳性表达无显著变化,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

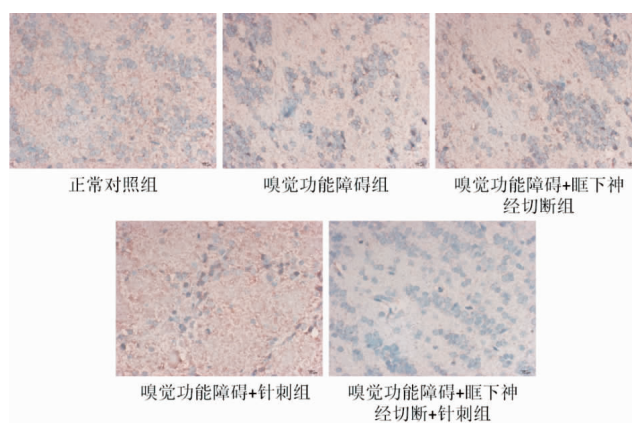


图 1 各组大鼠嗅球组织中 IGF-1 表达 (免疫组化染色, IHC×400)

表 3 各组大鼠嗅球中 IGF-1 的表达 ($n=10, \bar{x} \pm s$, ng/mL)

组别	IGF-1
正常对照组	0.36±0.12
嗅觉功能障碍组	0.16±0.21 [#]
嗅觉功能障碍+眶下神经切断组	0.18±0.08 [#]
嗅觉功能障碍+电针组	0.31±0.11 [*]
嗅觉功能障碍+眶下神经切断+电针组	0.17±0.07 [#]

注:与正常对照组比较, # $P < 0.05$;与嗅觉功能障碍组比较, * $P < 0.05$ 。

3 讨论

迎香穴的解剖学定位位于鼻翼外缘中点旁、当鼻唇沟中,此位置恰好是作为三叉神经分支之一的上颌支的分布区域,而鼻睫神经由三叉神经分支之一的眼支分出,其分布于嗅上皮区域,并包含在鼻腔粘膜中,在解剖学分布模式上三叉神经与嗅觉神经

具有重叠分布性,且嗅觉的产生有赖于三叉神经系统和嗅觉神经系统的协同作用,故我们推断,通过电针刺激迎香穴可以对三叉神经产生激活效应。

嗅觉迷宫实验结果表明,采用 Triton X-100 灌注能够成功复制大鼠嗅觉功能障碍模型,嗅觉功能障碍组和嗅觉功能障碍+眶下神经切断组大鼠行为学中均以嗅觉丧失为主要表现。电针迎香穴干预嗅觉功能障碍大鼠后嗅觉显著改善,然而,电针迎香穴嗅觉障碍+眶下神经切断大鼠后嗅觉无显著改善。研究表明,作为三叉神经主要分支之一的眶下神经,在其完整的情况下,电针迎香穴发挥了改善嗅觉的作用,而在其被切断后,电针迎香穴没有发挥相应效应,故推断电针迎香穴之所以能够发挥对嗅觉功能障碍的良性调节效应可能是基于三叉神经的完整性之上的。

IGF-1 由肝细胞、肾细胞、脾细胞等十几种细胞自分泌和旁分泌而成,是生长激素产生生理作用过程中必须的一种活性蛋白多肽物质。IGF-1 可以调节细胞 DNA 的合成,是人体内重要细胞有丝分裂的促进剂,对维持细胞分化有关蛋白质水平具有关键作用。有研究表明,嗅觉刺激可以增加 IGF-1 在体内的产生,因此,本研究选择 IGF-1 作为整个实验的观测指标,而本实验研究结果显示,IGF-1 浓度含量的变化与针刺的干预作用具有明显相关性。研究发现,嗅觉功能障碍组大鼠嗅球或血液中的 IGF-1 表达减少,电针迎香穴干预嗅觉功能障碍大鼠后嗅球或血液中的 IGF-1 表达显著增加,然而,电针迎香穴嗅觉障碍+眶下神经切断大鼠嗅球或血液中的 IGF-1 表达无显著变化。提示经电针迎香穴干预嗅觉障碍大鼠后能够增加 IGF-1 的表达,且此干预效应的发挥是基于三叉神经通路的完整性之上的。

嗅觉障碍或嗅觉传导通路失常与很多疾病密切相关,其严重影响患者的生活质量。选用电针迎香穴时,三叉神经被激活,一种类似嗅觉的信号向大脑进行传递,大脑在这样的信号影响下,促进肝细胞、肾细胞等细胞旁细胞分泌和 IGF-1,增加其产生,IGF-1 的增加有利于嗅觉受体神经的再生。因此,电针迎香穴可以改善大鼠嗅觉,促进嗅觉受体神经的再生,促进大鼠体内 IGF-1 的产生,其机制可能是基于三叉神经的完整性而发挥良性调节效应。

参考文献:

- [1] 刘巧平,刘建华.针刺内迎香治疗嗅觉下降[J].北京中医药大学学报(中医临床版),2011,18(2): 21-22.
- [2] 张 伟,张 罗.嗅觉功能障碍的诊断与治疗[J].首都医科大学学报,2013,34(6):814-819.
- [3] 牛文民,刘智斌,杨晓航,等.嗅三针治疗嗅觉功能障碍 100 例[J].陕西中医,2008,29(8):1054-1055.
- [4] 倪道凤,刘剑峰,王 剑,等.国内嗅觉障碍研究[J].中国医学文摘?耳鼻咽喉科学,2007,(4):212-213.
- [5] 郭 义.实验针灸学[M].北京:中国中医药出版社,2008.
- [6] 秦照萍,叶树明,杜继曾,等.Triton 损伤成年大鼠嗅上皮对嗅球钙结合蛋白-D 和小白蛋白表达的影响[J].中国药理学与毒理学杂志,2005,19(3):226-228.
- [7] 王 强,刘智斌,牛文尼,等.电针迎香穴对嗅觉障碍大鼠嗅粘膜 Ki-67、IGF-IR 吸嗅球 IGF-1-I 表达的影响[J].陕西中医,2016,37(11):1547-1550.
- [8] 郭 义.实验针灸学[M].北京:中国中医药出版社,2008.
- [9] 李小松,唐 玲,汪克建,等.小鼠嗅黏膜中水通道蛋白 1 对嗅觉形成的作用[J].第三军医大学学报,2010,32(23):2483-2487 .
- [10] Jonas KO, Maria J, Ingrid E, et al. Long-term episodic memory decline is associated with olfactory deficits only in carriers of ApoE-e4 [J]. Neuropsychologia. 2016, 85: 1-9.

(本文编辑 匡静之)