

· 针灸推拿 ·

本文引用:田岳凤,贾翠娜,翟春涛,邱 桥.隔药饼灸不同灸量对免疫抑制兔体质量及细胞因子的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(10):1200-1203.

隔药饼灸不同灸量对免疫抑制兔体质量及细胞因子的影响

田岳凤,贾翠娜,翟春涛,邱 桥

(山西中医药大学针灸推拿学院,山西 太原 030619)

〔摘要〕目的 在前期证实隔药饼灸对免疫抑制调节作用的基础上,继续观察不同艾灸量对免疫抑制兔体质量及细胞因子IFN- γ 、IL-2及IL-4的影响变化,以探索该项研究中灸量的最佳效应。**方法** 50只大耳白兔随机分为空白组、模型组、隔药饼灸3壮组、隔药饼灸5壮组和隔药饼灸7壮组,每组10只。除空白组外,其余各组经磷酸胺腹腔注射造成免疫抑制模型,造模结束后第2天,3个治疗组分别给予隔药饼灸3壮、5壮及7壮的治疗,隔日施灸,共灸10次。结束治疗后第2天动物称质量、麻醉,解剖取脾脏匀浆,酶联免疫法检测上清液中IFN- γ 、IL-2、IL-4含量。**结果** 与模型组比较,隔药饼灸3壮组、5壮组、7壮组实验前后体质量差值均明显升高,差异有显著统计学意义($P<0.01$);与3壮组比较,5壮组、7壮组体质量差值升高明显,差异有显著统计学意义($P<0.01$)。隔药饼灸治疗后,与模型组比较,3壮组、5壮组、7壮组组织IL-4含量明显升高($P<0.01$, $P<0.05$),5壮组、7壮组IFN- γ 含量明显升高($P<0.01$),3壮组组织IFN- γ 含量有升高趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$)。与3壮组比较,5壮组、7壮组IL-4、IFN- γ 含量明显升高($P<0.05$)。**结论** 不同灸量对环磷酸胺所致动物体质量减轻均有程度不同的改善;隔药饼灸5壮组、7壮组对组织中细胞因子IFN- γ 、IL-4含量均有明显提升作用。

〔关键词〕 环磷酸胺免疫抑制;隔药饼灸;不同灸量;体质量;细胞因子;兔

〔中图分类号〕R245

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.10.024

Effects of Herbal Cake-Separated Moxibustion at Different Doses on Body Weight and Cytokines in Immunosuppressed Rabbits

TIAN Yuefeng, JIA Cuina, ZHAI Chuntao, QIU Qiao

(School of Acupuncture-Moxibustion and Tuina, Shanxi University of Chinese Medicine, Taiyuan, Shanxi 030619, China)

〔Abstract〕Objective To investigate the effects of herbal cake-separated moxibustion at different doses on body weight and cytokines, interferon gamma (IFN- γ), interleukin-2 (IL-2), and interleukin-4 (IL-4), in immunosuppressed rabbits, and to explore the best effect of moxibustion. **Methods** Fifty white rabbits were equally and randomly divided into blank group, model group, 3 moxa cones group, 5 moxa cones group, and 7 moxa cones group. The immunosuppressed model was induced by intraperitoneal injection of phosphamide in all groups except the blank group. At day 2 after the successful establishment of model, the three treatment groups were treated with herbal cake-separated moxibustion with 3 moxa cones, 5 moxa cones, and 7 moxa cones, respectively. The herbal cake-separated moxibustion was applied every other day for 10 times. On the second day after the end of treatment, animals were weighed and anaesthetized, and then the spleen was harvested to make homogenate. The levels of IFN- γ , IL-2, and IL-4 in the supernatant were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** Compared with the model group, the three treatment groups had significantly increased body

〔收稿日期〕2018-03-13

〔基金项目〕国家自然科学基金面上项目(81373742)。

〔作者简介〕田岳凤,女,教授,博士研究生导师,主要从事艾灸防治疾病作用机制的研究,E-mail:tyfsx@163.com。

weight ($P<0.01$); compared with the 3 moxa cones group, the 5 moxa cones group and the 7 moxa cones group had significantly increased body weight ($P<0.01$). Compared with the model group, the three treatment groups had a significantly increased IL-4 level ($P<0.01$, $P<0.05$); the 5 moxa cones group and the 7 moxa cones group had a significantly increased IFN- γ level ($P<0.01$); the 3 moxa cones group had a nonsignificantly increased IFN- γ level ($P>0.05$). Compared with the 3 moxa cones group, the 5 moxa cones group and the 7 moxa cones group had significantly increased levels of IL-4 and IFN- γ ($P<0.05$). **Conclusion** Herbal cake-separated moxibustion at different doses can improve body weight loss in the immunosuppressed animal model induced by cyclophosphamide, and the treatment with 5 moxa cones and 7 moxa cones can significantly increase the levels of IFN- γ and IL-4.

[**Keywords**] cyclophosphamide; herb cake-separated moxibustion; different doses; body weight; cytokine; rabbits

本研究团队在前期采用不同灸法对免疫抑制兔脾脏指数及细胞因子的研究中,证实了隔药饼灸对机体免疫调节的优势所在^[1]。在此基础上,为探索该项研究中的隔药饼灸量的最佳效应,通过不同艾灸量的观察,分析其对免疫抑制兔体质量及细胞因子产生的效应差异。现将结果报道如下。

1 材料

1.1 实验动物

大耳白兔 50 只,3 月龄,体质量(2.5 ± 0.5)kg,雌雄不限,由山西省太原市小店区丰泽园种养农民专业合作社提供[动物合格证号:SCXK(晋)2015-0003]。饲养温度要求 18~25 ℃,相对湿度要求 50%~70%。饮用纯净水,定时定量给予兔生长繁殖饲料[饲料生产许可证号:京饲证(2014)06054]。

1.2 主要药物、试剂与仪器

注射用环磷酰胺:0.2 g/支,由山西普德药业股份有限公司生产(国药准字 H14023686);清艾条、艾绒:江苏盱眙华佗中药厂生产(国药准字 Z32020153);IFN- γ 、IL-2、IL-4 试剂盒:上海酶联生物科技有限公司;婴儿秤(ER70 型):上海花潮电器有限公司;电子天平(JE502 型):上海浦春计量仪器有限公司;匀浆机:美国 PRO 科学股份有限公司;离心机:长沙高新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司。

2 方法

2.1 实验方法

2.1.1 动物分组与造模 50 只大耳白兔采用随机数字表法分为 5 组,每组 10 只,分别是空白组、模型组、隔药饼灸 3 壮组(3 壮组)、隔药饼灸 5 壮组(5 壮组)、隔药饼灸 7 壮组(7 壮组)。

动物适应性喂养 7 d,除空白组外,其余各组按照前期预实验改良后的造模方法进行造模,即每天上午按照 60 mg/kg 剂量腹腔注射生理盐水稀释的环磷酰胺,每日 1 次,连续注射 7 d,制备免疫抑制兔模型。以动物出现精神状态差,饮食少,有脱毛现象及血白细胞计数明显降低为造模成功的标志。每日 1 次,连续 7 d。空白组予以等量的生理盐水注射。

2.1.2 穴位选择 神阙、关元、足三里(双)、脾俞(双)、肾俞(双)。穴位定位参照林文注主编《实验针灸学》^[2]常用动物穴位定位法及拟人比照法。

2.1.3 药饼制备 按照六味地黄汤组方剂量,制备药饼。熟地黄、山茱萸:分别加 10 倍水,浸泡 1 h,煎煮 3 次,前 2 次各 1 h,第 3 次 45 min,滤取煎液,浓缩成膏备用;生山药、牡丹皮、泽泻、茯苓打碎成粉末,过 120 目筛备用。使用时,将上述调制好的膏剂与粉末按照原方比例调匀,用模具压成直径约 1 cm,厚 0.3 cm 的药饼。

2.1.4 艾柱制备 选用江苏盱眙华佗中药厂生产清艾条,剥开后取干净艾绒,使用艾柱制作模具将艾绒制成底径 0.8 cm、高 0.5 cm,质量约 0.3 g 的圆锥形艾柱,备用。

2.1.5 施灸方法 造模结束后第 2 天,除空白组和模型组外,其余各组均进行隔药饼灸治疗。将动物固定于兔台,施灸前将动物穴位处皮毛剪去,暴露其穴位。放置药饼,艾柱置于药饼上,线香点燃,燃尽更换。3 壮组、5 壮组和 7 壮组分别每穴连灸 3 壮、5 壮、7 壮,隔日 1 次,共灸 10 次。空白组和模型组只束缚固定于兔台,不做任何处理。

2.2 样品采集与处理

实验结束后次日,配制 20%乌拉坦溶液,按照

5 mL/kg 剂量将动物麻醉后,摘取脾脏,生理盐水中漂洗,用滤纸吸取表面水分后称取质量。取中段脾脏 0.5 g 组织放入试管中剪碎,加入 PBS(9 mL/g)液溶解;置于匀浆机中离心 20 min,2 500 r/min,收集匀浆上清液,分装于 EP 管中,-20 °C 冰箱中保存。

2.3 指标检测

体质量差值:分别于实验动物编号前及实验结束第 2 天称取体质量,计算实验前后体质量差值。

取冰冻脾组织匀浆液标本,常温消融,混匀后用酶联免疫吸附测定法测定脾组织匀浆液中 IFN- γ 、IL-2 和 IL-4 含量。

2.4 数据处理

全部数据采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析。实验数据均以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,采用单因素方差分析,并进行组间比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同灸量兔实验前后体质量差值的影响

与空白组比较,模型组实验前后体质量差值明显降低($P<0.01$);与模型组比较,3 壮组、5 壮组、7 壮组实验前后体质量差值均明显升高,差异有显著统计学意义($P<0.01$);与 3 壮组比较,5 壮组、7 壮组实验前后体质量差值升高明显,差异有显著统计学意义($P<0.01$);5 壮组与 7 壮组实验前后体质量差值的差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 不同灸量隔药饼灸对免疫抑制兔实验前后体质量

| 差值的影响 | | ($\bar{x}\pm s$, kg) |
|------------|----------|--|
| 组别 | <i>n</i> | 实验前后体质量差值 |
| 空白组 | 10 | 0.72±0.01 |
| 模型组 | 10 | 0.06±0.03 ^{##} |
| 3 壮组 | 10 | 0.29±0.03 ^{**} |
| 5 壮组 | 10 | 0.45±0.03 ^{**Δ} |
| 7 壮组 | 10 | 0.47±0.08 ^{**Δ} |
| <i>F</i> 值 | | 40.98 |
| <i>P</i> 值 | | <0.01 |

注:与空白组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.01$;与 3 壮组比较, $\Delta P<0.05$ 。

3.2 不同灸量隔药饼灸对兔细胞因子的影响

造模后,与空白组比较,模型组组织 IFN- γ 、IL-4 含量明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$),组织

IL-2 含量有降低趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$)。隔药饼灸治疗后,与模型组比较,3 壮组、5 壮组、7 壮组组织 IL-4 含量明显升高,差异有显著的统计学意义($P<0.01$, $P<0.05$);5 壮组、7 壮组组织中 IFN- γ 含量明显升高,差异有显著统计学意义($P<0.01$);3 壮组组织中 IFN- γ 含量有升高趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$)。与 3 壮组比较,5 壮组、7 壮组组织 IL-4、IFN- γ 含量明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。7 壮组组织 IL-4、IFN- γ 含量与 5 壮组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 2 不同灸量隔药饼灸对免疫抑制兔

| 细胞因子的影响 | | (ng/L) | | |
|------------|----------|---|-----------|--|
| 组别 | <i>n</i> | IFN- γ | IL-2 | IL-4 |
| 空白组 | 10 | 165.31±196.63 | 6.16±0.90 | 131.73±11.62 |
| 模型组 | 10 | 780.30±197.22 ^{##} | 5.24±0.60 | 94.02±11.20 ^{##} |
| 3 壮组 | 10 | 840.47±146.13 | 5.28±1.17 | 107.90±8.80* |
| 5 壮组 | 10 | 1017.24±168.13 ^{**Δ} | 5.42±1.16 | 119.29±6.67 ^{**Δ} |
| 7 壮组 | 10 | 1046.85±123.39 ^{**Δ} | 6.27±0.88 | 119.96±9.35 ^{**Δ} |
| <i>F</i> 值 | | 7.03 | 1.78 | 14.82 |
| <i>P</i> 值 | | <0.01 | >0.05 | <0.01 |

注:与空白组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 3 壮组比较, $\Delta P<0.05$ 。

4 讨论

灸量即施灸用量,是影响灸效的重要因素之一。艾灸作为我国民族医学的精髓,已有千百年的历史,影响灸量使用因素也在不断地变化,最初包括年龄、体质、施灸部位、病情和病性等影响因素,随着时代的发展和中医事业的进步,增加了天时、地理、艾炷大小、有无灸感、施灸次数和根据发灸疮与否及灸疮颜色等控制灸量的因素,使灸法和灸量的逐渐趋于系统化^[3-4]。孙思邈在《备急千金要方》中对艾灸的用法、用量进行了总结,从年龄、疾病性质、疾病轻重等方面,阐述了不同灸量的应用^[5]。

艾灸效应的产生需要一定灸量的积累,但并非灸量越大效果越好。机体对艾灸及药物的吸收有一定限度,在达到机体自身的阈值之前,艾灸及药物产生的效果会随着灸量加大而增加;但当达到机体的阈值,效应则呈相对固定状态。早年研究^[6]即用雷公藤甲素给健康大鼠灌胃后白细胞下降,脾脏和胸腺

萎缩;对艾灸组分别给予不同灸量,观察得知艾灸 7 壮组比艾灸 3 壮组和艾灸 5 壮组白细胞数值显著升高,逐渐趋于正常值;5 壮组对脾脏和胸腺的影响更为明显。近年研究发现,溃疡性结肠炎模型大鼠经过不同灸量的艾灸后,9 壮组能够更好地调节 IL-8、IL-10 的含量,6 壮组次之,3 壮组的效果最不明显^[7]。因此,不同灸量对机体的免疫调节作用的效应受多重因素的影响,差异较大。

此次实验研究在我们前期证实隔药饼灸对脾组织 IFN- γ 、IL-4 含量调节作用基础上^[1]的隔药饼灸量-效关系的研究。结果显示:隔药饼灸 3 壮组、5 壮组和 7 壮组均可以明显改变实验前后体质量差值,5 壮组、7 壮组效果更为突出,二者疗效相当。在对细胞因子影响的研究中发现,隔药饼灸 3 壮组、5 壮组和 7 壮组对组织 IL-4 含量均有显著的影响,5 壮组和 7 壮组对 IFN- γ 调节显著。研究表明:不同灸量对环磷酰胺所致动物体质量减轻均有程度不同的改善;隔药饼灸 5 壮组、7 壮组对组织中细胞因子 IFN- γ 、IL-4 含量均有明显提升作用。从总体效应分析,隔药饼灸 5 壮组是此项研究中的最佳灸量。

同前期研究结果一样,隔药饼灸后对组织中 IL-2 含量仍无明显影响。IL-2 作为免疫系统中的一

类细胞生长因子,能调控免疫系统中白血球的细胞活性,促进 Th0 和 CTL 的增殖,参与抗体反应、造血和肿瘤监视,并作为免疫佐剂可提高机体保护性免疫应答的水平。在我们两个阶段的研究中,均出现艾灸对 IL-2 无显著影响的情况,是否是在艾灸的免疫效应中,对 IL-2 无靶向作用?亦或是免疫应答不敏感?这些都将是我們今后进一步研究的内容。

参考文献:

- [1] 单增天,田岳凤,李雷勇,等.不同灸法对免疫抑制兔脾脏指数及细胞因子的影响[J].湖南中医药大学学报,2016,36(11):83-86.
- [2] 林文注,王佩.实验针灸学[M].上海:上海科学技术出版社,1994:283-287.
- [3] 张昆.灸法的古今文献研究[D].济南:山东中医药大学,2011.
- [4] 白桦.基于古代文献的艾灸灸量研究[D].北京:北京中医药大学,2013.
- [5] 张绍华,符文彬.《备急千金要方》灸法灸量应用浅探[J].中医杂志,2011,52(9):803-804.
- [6] 李守栋.艾灸的不同刺激量对雷公藤甲素毒副作用的影响[J].甘肃中医,2007,20(1):49-50.
- [7] 马铁明,韩洋,马贤德,等.不同灸量对溃疡性结肠炎大鼠结肠上皮形态学及血清中炎症细胞因子、结肠组织中炎症细胞信号转导通路的影响[J].针刺研究,2014,39(1):20-26.

(本文编辑 匡静之)