

本文引用:孙璐,谭静,阳仁达,言芳,廖宗力,魏星,罗明.隔药饼灸对慢性支气管炎模型大鼠肺组织 TNF- $\alpha$  蛋白及其 mRNA 含量的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(11):1273-1277.

## 隔药饼灸对慢性支气管炎模型大鼠肺组织 TNF- $\alpha$ 蛋白及其 mRNA 表达的影响

孙璐,谭静\*,阳仁达\*,言芳,廖宗力,魏星,罗明  
(湖南中医药大学,湖南长沙 410208)

**[摘要]** **目的** 观察隔药饼灸对慢性支气管炎大鼠肺组织中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )蛋白及其 mRNA 含量的影响。**方法** 将 48 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、隔药饼灸组、隔纸垫灸组,每组 12 只。采取改良烟熏法复制慢性支气管炎大鼠模型,观察用隔药饼灸治疗后大鼠的一般情况,并与空白组、模型组、隔纸垫灸组进行对照,大鼠肺组织中的 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达用 RT-PCR 法检测,肺组织中 TNF- $\alpha$  的蛋白表达用 Western blot 法检测。**结果** 与模型组相比,隔药饼灸组和隔纸垫灸组大鼠肺及气管的病理损伤均有好转;隔药饼灸组和隔纸垫灸组都能使慢支大鼠肺组织 TNF- $\alpha$  mRNA 及 TNF- $\alpha$  蛋白含量表达降低( $P<0.05$ ),且隔药饼灸组效果更好( $P<0.05$ )。**结论** 隔药饼灸能改善慢支大鼠一般症状及气道炎症,提示其机制可能是通过下调 TNF- $\alpha$  蛋白及其 mRNA 的表达达到治疗慢性支气管炎的目的。

**[关键词]** 慢性支气管炎;隔药饼灸;肿瘤坏死因子 $\alpha$ ;肿瘤坏死因子 $\alpha$ 信使 RNA

**[中图分类号]**R256.1;R245.8

**[文献标志码]**A

**[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.11.011

### Effect of Herbal Cake-Separated Moxibustion on the Expression of TNF- $\alpha$ Protein and Its mRNA in Lung Tissue of Chronic Bronchitis Model Rats

SUN Lu, TAN Jing\*, YANG Rendang\*, YAN Fang, LIAO Zongli, WEI Xing, LUO Ming  
(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the effect of herbal cake-separated moxibustion on the content of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) protein and its mRNA in the lung tissue of rats with chronic bronchitis (CB). **Methods** Forty-eight Sprague-Dawley rats were randomly and equally divided into four groups, including blank group, model group, herbal cake-separated moxibustion group, and paper pad-separated moxibustion group. CB model rats were prepared by modified fumigation. The general status of rats after herbal cake-separated moxibustion was observed and compared with that in the other three groups. The expression of TNF- $\alpha$  mRNA in rat lung was measured by RT-PCR, and the protein expression of TNF- $\alpha$  in lung tissues was measured by Western blot. **Results** The pathological injury of lung and trachea of rats in herbal cake-separated moxibustion group and paper pad-separated moxibustion group was improved compared with that in the model group. Herbal cake-separated moxibustion and paper pad-separated moxibustion can reduce the expression of TNF- $\alpha$  mRNA and TNF- $\alpha$  protein in the lung tissues of CB rats ( $P<0.05$ ), and the effect of herbal cake-separated moxibustion was better ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Herbal cake-separated moxibustion can improve the general symptoms and airway inflammation of CB rats, possibly by down-regulating the expression of TNF- $\alpha$  protein and its mRNA.

**[Keywords]** chronic bronchitis; herbal cake-separated moxibustion; tumor necrosis factor- $\alpha$ ; tumor necrosis factor- $\alpha$  mRNA

**[收稿日期]**2018-08-09

**[基金项目]**湖南省教育厅创新平台项目(16K068);湖南省大学生创新实验项目(017-132)。

**[作者简介]**孙璐,女,在读硕士研究生,研究方向:针灸的临床疗效及机制研究。

**[通讯作者]**\*谭静,女,硕士,讲师,E-mail:307372567@qq.com;阳仁达,男,博士,博士研究生导师,E-mail:Yangrd11@163.com。

慢性支气管炎(chronic bronchitis, CB)是一种以反复发作的咳嗽、咳痰或伴随喘息为首要临床特点的慢性非特异性呼吸系统疾病,属于中医“咳嗽”“痰症”等范畴<sup>[1]</sup>。近年来,我国患慢性支气管炎的病人数不断增加,已经严重影响部分病人的日常生活,因此该病的防治越来越重视<sup>[2]</sup>。纠正紊乱的免疫功能以控制炎症,被认为是慢性支气管炎防治的重点。中医认为:“凡病药之不及,针之不到,必须灸之”,体现了艾灸在培补正气中的重要作用。隔药饼灸即通过将艾炷放在中药饼上在穴位处点燃施灸,通过综合温热效应刺激穴位,促进穴位皮肤的药物吸收,激活体内的经络系统,实现对疾病“灸、药、穴”的综合防治。我们的前期研究表明<sup>[3]</sup>,隔药饼灸能明显提高慢性支气管炎模型大鼠血清内免疫球蛋白 G(Immunoglobulin G, IgG)和免疫球蛋白 A(Immunoglobulin A, IgA)等免疫球蛋白水平的表达,改善气道炎症反应,在此基础上,本实验进一步探讨隔药饼灸对慢性支气管炎大鼠肺组织中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )蛋白及其 mRNA 表达的影响及相关作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与分组

健康 SD 大鼠 48 只,由湖南中医药大学动物实验中心提供 [动物合格证编号:SCXK (湘)2017-0003],保持饲养温度 20~25 °C,湿度 50%~70%。将其随机分成 4 组,即空白组、模型组、隔药饼灸组、隔纸垫灸组,每组 12 只,雌雄各半。

### 1.2 主要试剂与仪器

TNF- $\alpha$  Elisa 试剂盒(美国 RD)、PCR Mix 试剂盒(立陶宛 Fermentas)、DNA 缓冲液(美国 ProMab)、Bradford 蛋白浓度测定试剂盒(中国碧云天生物)、PCR 仪(美国 ABI,9600 型)、电泳仪(北京鼎国生物科技发展中心, DG-III 双稳数显电泳仪)、高速离心机(德国 SIGMA, 1-13)、Motic B5 显微摄像系统(麦克奥迪实业集团公司)。

### 1.3 实验药物

艾炷:选用“神灸 300 灸”由艾炷苏州东方艾绒厂出产(型号:东方 1 型)。玉屏风散:按 1:2:2 的比例称取防风、黄芪、白术(炒)(均由湖南中医药大学

第一附属医院中药房提供)。以上 3 种中药经称取重量后晒干再研成粉状等程序,按要求粉末应过 200 目筛才算合格<sup>[4]</sup>,实验用时以姜汁调成糊状,制成 2~4 mm,直径为(1.0 $\pm$ 0.2) cm 的药饼。

### 1.4 模型复制方法

参考相关文献[5],采用改良烟熏法复制慢性支气管炎大鼠模型。造模时空白组安排于无烟环境中,其余 3 组将大鼠放置于特制的 1 m $\times$ 1 m $\times$ 1 m 的玻璃房中,用各 50 g 的烟叶、锯末、刨花,点燃对大鼠进行烟熏,每天上午、下午分别 1 次,每次 30 min,持续 1 个月。

### 1.5 隔药饼灸施灸方法

1.5.1 选穴 I 组:肺俞、肾俞;II 组:关元、足三里。取穴定位参照十二五规划教材《实验针灸学》<sup>[6]</sup>。

1.5.2 隔药饼灸组 施灸方法造模成功后的第一天起进行干预实验,找到大鼠相应穴位,先用剪刀减去较长的毛发,注意不可损伤皮肤,根部绒毛可用 100 g/L 硫化钠进行脱除,将事先准备好的药饼放置穴位皮肤上并用胶布固定,点燃进行施灸,待艾炷燃完后,再换另外一壮,每穴持续灸 3 壮(20 min),每天 1 次, I 组与 II 组穴位隔天可交替进行施灸操作,持续干预 14 d。

1.5.3 隔纸垫灸组 施灸方法撕开纸垫下方的胶纸,直接将带底座艾炷粘附于穴位上点燃施灸。施灸的穴位、时间、频次、疗程与隔药饼灸组相同。与此同时,空白组及模型组动物捆绑对照。

### 1.6 取材及指标检测

实验期间观察并记录实验动物体质量、毛色、精神状态、大小便等。待治疗结束,禁食不禁水 12 h 后处死动物。剖取 4 组大鼠气管、右肺组织,用于病理观察及 TNF- $\alpha$  及其 mRNA 检测。

支气管及肺组织病理改变:采血处死大鼠后,取大鼠右肺部分组织放于 4% 的甲醛溶液中固定 1 d,再用乙醇进行脱水,石蜡包埋,4~5  $\mu$ m 切片,进行 HE 染色,在光镜下察看各组大鼠支气管肺组织的病理组织变化。

肺组织 TNF- $\alpha$  的蛋白测定:将各组肺组织匀浆后超声破碎,低温离心 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液用相关法测定蛋白样品浓度。再使用电泳仪进行分离蛋白,用 Western blot 法检测肺组织 TNF- $\alpha$  的表达。

肺组织 TNF- $\alpha$  mRNA 的测定:取大鼠肺组织,按试剂使用说明提取总 RNA,逆转录成 cDNA。取 2  $\mu$ L cDNA 作为模板,加上、下游引物各 1  $\mu$ L,用半定量 RT-PCR 检测肺组织中 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达。

### 1.7 统计学处理

所有数据均输入计算机,用 SPSS 20.0 windows 软件进行统计分析,所有数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。经正态性检验后,组间比较方差齐时采用 LSD 法,方差不齐时采用 Tamhane's 法进行方差分析, $P<0.05$  提示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般状态观察

空白组大鼠整体情况较好、无咳嗽气喘等症状、精神状态活跃,反应灵敏、饮食正常、大小便正常;模型组大鼠喜静不喜动,且该组大鼠造模 7 d 后开始出现口鼻流有些许分泌物,出现咳嗽气喘、呼吸困难等症状,伴出现精神不振、食少、毛发枯槁、甚至不同程度的出现腹泻等症状;隔药饼灸组造模后症状同

模型组,经过治疗干预后,隔药饼灸组大鼠咳嗽、气喘、呼吸困难明显好转,大鼠口鼻分泌物减少,饮食较好、毛发色泽光亮,二便情况等都有所好转;隔纸垫灸组大鼠经过治疗后上述情况也有所好转。

### 2.2 病理形态学改变

4 组大鼠光镜下观察气管和肺组织的病理改变:空白组大鼠呼吸道肺组织以及支气管均正常,无明显其他病理学形态的改变(见图 1-2);模型组大鼠肺泡扩张,支气管腔不规则,可见有细胞脱落,纤毛不齐甚有缺失,气管黏膜下层镜下可见炎症细胞浸润,呈现典型的慢性支气管炎的病理改变(见图 3-4),说明模型组造模成功;隔药饼灸组大鼠肺泡及支气管较正常,支气管黏膜细胞脱落情况较模型组明显减少,纤毛较整齐,肺分泌物和炎性细胞明显减少,说明经过隔药饼灸治疗后,炎症反应得到一定的控制(见图 5-6);与模型组比,隔纸垫灸组大鼠经过治疗后肺及气管的损伤也正逐渐好转,炎症细胞也在减少(见图 7-8)。

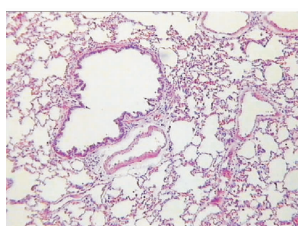


图 1 空白组肺组织(HE $\times$ 100)

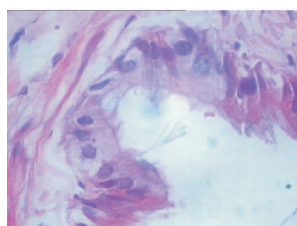


图 2 空白组纤毛(HE $\times$ 1000)

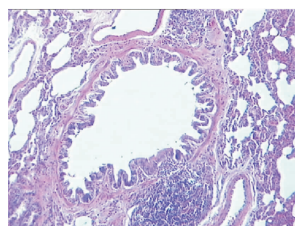


图 3 模型组肺组织(HE $\times$ 100)

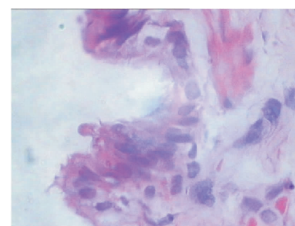


图 4 模型组纤毛(HE $\times$ 1000)

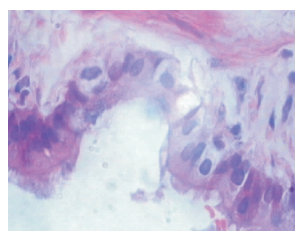
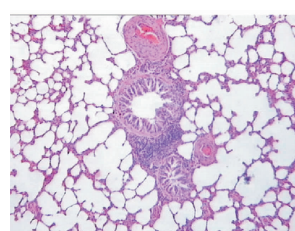
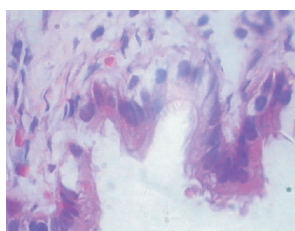
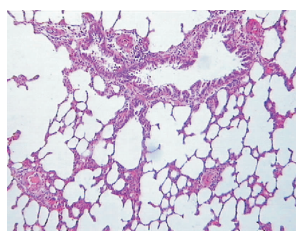


图 5 隔药饼灸组肺组织(HE $\times$ 100)图 6 隔药饼灸组纤毛(HE $\times$ 1000)图 7 隔纸垫灸组肺组织(HE $\times$ 100) 图 8 隔纸垫灸组纤毛(HE $\times$ 1000)

### 2.3 大鼠肺组织内 TNF- $\alpha$ 及 TNF- $\alpha$ mRNA 蛋白表达

治疗前,与空白组相比较,模型组大鼠肺组织中 TNF- $\alpha$  及 TNF- $\alpha$  mRNA 蛋白表达增加显著( $P<0.05$ );治疗后,与模型组比较,隔药饼灸组、隔纸垫灸组大鼠肺组织中 TNF- $\alpha$  及 TNF- $\alpha$  mRNA 蛋白表达降低( $P<0.05$ ),且隔药饼灸组下降更明显( $P<0.05$ ),提

示隔药饼灸与隔纸垫灸都能使肺组织中 TNF- $\alpha$  及 TNF- $\alpha$  mRNA 蛋白的表达下降,且隔药饼灸治疗效果更好,见表 1。

## 3 讨论

本研究表明,隔药饼灸及隔纸垫灸均能改善模

表1 4组大鼠肺组织中 TNF- $\alpha$  及 TNF- $\alpha$  mRNA 蛋白含量( $\bar{x} \pm s, \times 10^{-3} \text{pg/mL}$ )

组别	n	TNF- $\alpha$		TNF- $\alpha$ mRNA	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
空白组	12	30.82 $\pm$ 12.09	32.72 $\pm$ 14.76	25.23 $\pm$ 10.87	28.57 $\pm$ 16.37
模型组	12	78.56 $\pm$ 24.68*	79.53 $\pm$ 11.95	66.47 $\pm$ 18.42*	75.37 $\pm$ 22.29
隔药饼灸组	12	73.60 $\pm$ 18.66*	33.74 $\pm$ 15.14 $\star$	71.19 $\pm$ 22.65*	29.95 $\pm$ 16.37 $\star$
隔纸垫灸组	12	75.87 $\pm$ 17.97*	54.42 $\pm$ 10.87 $\star\Delta$	77.20 $\pm$ 9.38*	54.03 $\pm$ 11.91 $\star\Delta$

注:与空白组比较,★ $P < 0.05$ ;与模型组比较,☆ $P < 0.05$ ;与隔纸垫灸组比较,△ $P < 0.05$ 。

型动物的一般状态及气道的炎症状态,降低模型大鼠肺组织内 TNF- $\alpha$  的含量及其 mRNA 的表达。研究表明,TNF- $\alpha$  与慢支的发生、发展关系密切。TNF- $\alpha$  主要由单核巨噬细胞、淋巴细胞产生,是目前发现的在炎症反应过程中出现最早、作用最强的介质<sup>[7]</sup>。TNF- $\alpha$  作为一种具有广泛生物活性的前炎症细胞因子,在慢性支气管炎的发生、发展过程中,发挥着重要作用,具体表现为<sup>[8-11]</sup>:TNF- $\alpha$  可参与诱导毛细支气管组织多种炎症细胞和非炎症细胞表达诱生型一氧化氮合酶,持续大量产生 NO;可促进 IL-1、IL-6、IL-8 等促炎细胞因子的产生,引起支气管炎发病过程中多种炎症细胞的级联反应;继而可刺激气道平滑肌细胞分泌内皮素,提高平滑肌收缩能力,增强气道平滑肌自身收缩反应性,从而导致气道细胞黏液腺化生、脉管增多、扩张、气道细胞增殖,微血管漏的形成,最终引起气道重建,造成气道不可逆的阻塞,加重慢性支气管炎的发作。由此可知,当机体中的相关因子 TNF- $\alpha$  蛋白及其 mRNA 处于上升时,机体可能产生一些炎症反应,如机体呼吸道支气管内出现炎性分泌物,上皮细胞增厚甚至脱落,继而出现咳嗽、气喘等症状;通过实验观察得出,隔药饼灸能明显降低 TNF- $\alpha$  蛋白及其 mRNA 含量,继而减轻模型大鼠的炎症反应,从而减轻慢支症状。

此次选用隔药饼灸进行干预治疗,结果显示其比普通隔药灸效果好,充分体现了灸、药与穴位三者合一的治疗效果。隔药饼灸实际上是一种间接灸,就是在穴位上放置由一种或多种药物粉末混合而成的药饼,再在药饼上放一艾炷,点燃艾灸即可。此原理为:艾灸燃烧时产生的热效应,加上药饼中药物小分子通过皮肤渗透到皮下甚至毛细血管,再加上腧穴的治疗作用,通过经络循行而达病所,最后起到舒筋活络,调理脏腑治疗效果<sup>[12]</sup>。一直以来,

隔药饼灸在治疗慢性疾病有着尤为突出的优势,其能促进机体的新陈代谢,增强机体免疫力,还可以运用于疾病的预防和保健方面。张馨等<sup>[13]</sup>使用隔物灸治疗慢性支气管炎,结果显示隔药饼灸能明显缓解临床症状。研究表明<sup>[14]</sup>艾灸及艾烟可通过影响 ApoE<sup>+</sup>小鼠血清 TNF- $\alpha$ 、hs-CRP 含量,从而降低疾病病变过程中的炎症反应。单增天等<sup>[15]</sup>通过实验得出不同灸法对免疫抑制兔脾脏指数均有调节作用,且隔药饼灸可使因环磷酸胺所致下降的 IL-4 显著提升。季辉等<sup>[16]</sup>通过实验得出艾灸的抗炎机制可能是通过降低血清中 IL-1、TNF- $\alpha$  含量而提高 IL-2 含量来缓解机体炎症反应。

本次主要取肺俞、肾俞、关元、足三里作为施灸部位,旨在补益肺肾,培元固本。中医认为慢支与肺脾肾三脏生理活动失调有关,正常情况下,肺气应下行归肾,而肾气又摄纳来自上部肺气的作用。若出现肺气不能下行或者肾气不能摄纳时,则导致气机失调而引起相关症状。其肺俞穴是主治肺脏疾患的重要腧穴,古书《针灸资生经》里提到:肺俞穴可以治疗喘症与哮症。肺主气,司呼吸,当肺气亏虚时,肺失宣降则咳嗽,因此肺俞穴能治疗因肺脏气机功能失常所产生的一些症状,能有效改善肺功能,故有解表宣肺、肃降肺气的作用。肾俞穴是背俞穴之一,肾主纳气,若肾气不足,根本不固,吸入之气不能归纳于肾,就会出现动则咳嗽喘急、呼吸困难等症状,因此针对慢支一般可用肺俞和肾俞,达到补肺益肾的功效。关元穴为回阳固脱之要穴,可以补益元气、调和气血。足三里是胃经穴位之一,胃经为多气多血之经,因此足三里穴为保健要穴,它具有调理脾胃、补中益气、通经活络、疏风化湿、扶正祛邪之功能。配合上述穴位,通过提高机体免疫力和调气机达到防治疾病的效果。

隔药饼灸中所采用的中药饼其选取了元·朱丹

溪的玉屏风散,该方由白术、黄芪、防风三味中医组成,是中医扶正固本的经典方剂,具有益气健脾的重要作用。方中黄芪益气固表,白术健脾扶正,防风祛风解表,胜湿止痛,配伍则固表而不留邪,驱邪而不伤正。现代研究表明<sup>[17-18]</sup>:小青龙汤合玉屏风散可以使慢性支气管炎大鼠 TNF- $\alpha$  及 TNF- $\alpha$  mRNA 含量明显减少。玉屏风颗粒联合西药治疗后,慢支患者的免疫功能相关指标得到改善,TNF- $\alpha$ 、IL-6 等炎症因子均明显下降,说明该方能调节患者免疫功能,抑制炎症反应。本实验研究经过相关的实验样本的检测,得出数据证实了隔药饼灸能改善慢支大鼠一般症状及气道炎症,并且降低大鼠肺组织中 TNF- $\alpha$  蛋白及其 mRNA 含量,但其具体作用机制、具体通过哪条信号通路进行还需继续深入研究。

#### 参考文献:

- [1] 温丽雅,余红,张淑娟,等.中医药治疗慢性支气管炎临床与基础研究进展[J].中国老年学杂志,2011,31(10):1934-1937.
- [2] 徐爱民,刘秋红.中医治疗 50 例老年慢性支气管炎[J].中国实用医药,2009,4(22):186.
- [3] 阳仁达,郑秋菊,谭静,等.隔药饼灸对慢性支气管炎模型大鼠血清 IgG、IgA 水平的影响[J].湖南中医药大学学报,2013,33(5):37-40.
- [4] 刘汝安,刘冠军,刘兴民.灸疗药饼制备方法的研究[J].临床医药文献电子杂志,2017,4(37):7321-7322.
- [5] 白云苹,李建生,李庆磊,等.基于现代名老中医经验的慢性支气管炎病因病机及证素规律研究[J].中华中医药杂志,2017,32(11):4921-4924.
- [6] 余曙光,徐斌.实验针灸学[M].北京:人民卫生出版社,2012:269-270.
- [7] 李海鹏,姚建华,孙天胜.中性粒细胞在炎症反应中的作用及机制[J].医学综述,2015,21(9):1576-1578
- [8] 张森,旺建伟,关子赫,等.胆仙咳喘宁胶囊对慢性支气管炎大鼠 NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$  的影响[J].上海中医药大学学报,2017,31(5):81-85.
- [9] 田伟,张淑香,江柏华.清肺止咳灵糖浆对慢性支气管炎急性发作期大鼠肺组织病理学及血清 IL-8、TNF- $\alpha$  的影响[J].上海中医药杂志,2016,50(11):78-81.
- [10] 赵会娟.毛细支气管炎患儿血清 TNF- $\alpha$ 、VEGF 的检测及临床意义[D].石家庄:河北医科大学,2015.
- [11] 孙希.基于 P38MAPK 探讨隔药饼灸对慢性支气管炎模型大鼠肺组织 TNF- $\alpha$  的影响及作用机理[D].长沙:湖南中医药大学,2013.
- [12] 刘未艾,常小荣,刘密,等.不同灸量隔药饼灸对高脂血症患者血脂及血液流变学的影响[J].辽宁中医杂志,2013,40(9):1787-1790.
- [13] 张馨.隔物灸治疗慢性支气管炎的临床观察[J].内蒙古中医药,2012,31(24):20.
- [14] 刘耀萌,崔莹雪,哈略,等.艾灸及艾烟对动脉粥样硬化模型小鼠血清 TNF- $\alpha$ 、hs-CRP 及 vWF 的影响[J].中华中医药杂志,2016,31(4):1377-1379.
- [15] 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.
- [16] 季辉,王玲玲,周攀,等.不同灸温对急性佐剂性关节炎大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-2 及 TNF- $\alpha$  含量的影响[J].上海针灸杂志,2015,34(7):597-599.
- [17] 马兆楠.基于 NF- $\kappa$ B 通路探讨小青龙汤合玉屏风散对变应性鼻炎大鼠 TNF- $\alpha$  和 TNF- $\alpha$ mRNA 的影响[D].沈阳:辽宁中医药大学,2017.
- [18] 陶静怡,李敏,胡利江,等.玉屏风颗粒联合西药对反复上呼吸道感染肺气虚证患者免疫功能及血清 IL-6、TNF- $\alpha$  水平的影响[J].浙江中西医结合杂志,2018,28(4):263-266,270.

(本文编辑 匡静之)