

## · 针灸推拿 ·

本文引用:雷俊,罗玲艳,孙艺,乔松. 基于IL-27/STAT1通路探讨针刺肺俞穴纠正哮喘模型大鼠Th1/Th2免疫平衡的机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(6): 986-993.

# 基于IL-27/STAT1通路探讨针刺肺俞穴纠正哮喘模型大鼠Th1/Th2免疫平衡的机制

雷俊<sup>1\*</sup>, 罗玲艳<sup>2</sup>, 孙艺<sup>3</sup>, 乔松<sup>1</sup>

(1.武汉市中医医院肺系病科,湖北武汉430000;2.长江大学医学部,湖北荆州433200;  
3.上海市浦东新区公利医院肿瘤科,上海200135)

**〔摘要〕**目的 从白细胞介素(interleukin, IL)-27信号转导和转录激活因子1(signal transducer and activator of transcription 1, STAT1)探究针刺肺俞穴改善哮喘大鼠辅助性T细胞(helper T cell, Th)1/Th2免疫平衡的可能机制。方法 取140只SD雄性大鼠,随机分为正常组、模型组、IL-27预防组、IL-27治疗组、针刺肺俞组、STAT1抑制剂组、针刺肺俞加STAT1抑制剂组,每组20只。除正常组外,其余各组均进行卵白蛋白反复致敏建立哮喘模型。肺功能仪检测气道高反应性;ELISA法检测血清及肺泡灌洗液中IL-4、干扰素 $\gamma$ (interferon  $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、免疫球蛋白E(immunoglobulin, IgE)水平;流式细胞仪检测脾脏Th1/Th2比例;HE染色观察肺组织病理变化;免疫组化法检测IL-4、IFN- $\gamma$ 、磷酸化STAT1(p-STAT1)阳性表达;Western blot法检测IL-27、STAT1、IL-4、IFN- $\gamma$ 、T-bet及GATA3蛋白表达。结果 与正常组相比,模型组大鼠气道高反应性升高,脾脏Th1/Th2比例降低,血清及肺泡灌洗液中IL-4水平升高而IFN- $\gamma$ 水平降低,肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞比例升高,肺组织支气管黏膜水肿及炎性细胞浸润等病理损伤加重,促Th1/Th2比例平衡相关通路IL-27/STAT1处于抑制状态( $P<0.05$ )。与模型组相比,IL-27预防组、IL-27治疗组及针刺肺俞组均可缓解大鼠肺组织损伤,促进IL-27/STAT1活化,纠正Th1/Th2平衡,改善哮喘大鼠气道高反应性( $P<0.05$ );其中,IL-27预防组对哮喘大鼠的上述改善作用均优于针刺肺俞组( $P<0.05$ )。此外,STAT1抑制剂可加重哮喘大鼠肺组织损伤,促进气道高反应性及Th1/Th2免疫平衡紊乱,并削弱针刺肺俞穴发挥的促IL-27/STAT1活化、纠正Th1/Th2免疫平衡等作用( $P<0.05$ )。结论 针刺肺俞穴治疗哮喘大鼠的作用机制,可能与促进IL-27/STAT1通路活化,纠正Th1/Th2免疫平衡有关。

**〔关键词〕**哮喘;白细胞介素-27;信号转导和转录激活因子1;免疫平衡;针刺;肺俞穴

**〔中图分类号〕**R256.12 **〔文献标志码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.06.018

## Mechanism of acupuncture at "Feishu" (BL13) to correct Th1/Th2 immune balance in asthma model rats based on IL-27/STAT1 pathway

LEI Jun<sup>1\*</sup>, LUO Lingyan<sup>2</sup>, SUN Yi<sup>3</sup>, QIAO Song<sup>1</sup>

(1. Department of Pulmonary Diseases, Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan, Hubei 430000, China;  
2. Medical Department of Yangtze University, Jinzhou, Hubei 433200, China; 3. Oncology Department, Shanghai Gongli Hospital of Pudong District, Shanghai 200135)

**〔Abstract〕 Objective** To explore the potential mechanism of acupuncture at "Feishu" (BL13) to improve the immune balance of helper T cell (Th)1/Th2 in asthma rats based on interleukin (IL)-27/signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1). **Methods** A total of 140 male SD rats were randomly divided into normal group, model group, IL-27 prevention group, IL-27 treatment group, acupuncture Feishu group, STAT1 inhibitor group and acupuncture Feishu plus STAT1 inhibitor group, with 20 rats in each group. Except the normal group, the other groups were repeatedly sensitized with ovalbumin to establish asthma model. Airway hyperresponsiveness was measured by pulmonary function instrument; the levels of interleukin (IL)-4, interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and

**〔收稿日期〕**2021-11-13

**〔基金项目〕**武汉市卫生健康委员会医学科研项目(WZ21C57)。

**〔第一作者〕**雷俊,男,医学硕士,副主任医师,研究方向:呼吸疾病基础与临床研究,E-mail:junlei1985@126.com。

immunoglobulin E (IGE) in serum and alveolar lavage fluid were detected by ELISA; the ratio of Th1/Th2 in spleen was detected by flow cytometry; HE staining was used to observe the pathological changes of lung tissue; positive expression of IL-4, IFN- $\gamma$  and phosphorylated STAT1 (p-STAT1) were detected by immunohistochemistry; protein expression levels of IL-27, STAT1, IL-4, IFN- $\gamma$ , T-bet and GATA3 were detected by Western blot. **Results** Compared with the normal group, the airway hyperresponsiveness of model group increased, the ratio of spleen Th1/Th2 decreased, the levels of IL-4 in serum and alveolar lavage fluid increased, and the level of IFN- $\gamma$  decreased, the proportion of eosinophils in alveolar lavage fluid increased, the pathological damage such as bronchial mucosal edema and inflammatory cell infiltration in lung tissue aggravated, and the related pathway of promoting Th1/Th2 ratio balance IL-27/STAT1 was inhibited ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, IL-27 prevention group, IL-27 treatment group and acupuncture Feishu group can alleviate lung tissue injury, promote IL-27/STAT1 activation, correct Th1/Th2 balance and improve airway hyperresponsiveness in asthma rats ( $P<0.05$ ); among them, the above improvement effects of IL-27 prevention group on asthma rats were better than that of acupuncture Feishu group ( $P<0.05$ ). In addition, STAT1 inhibitor can aggravate lung tissue injury, promote airway hyperresponsiveness and Th1/Th2 immune balance disorder in asthma rats, and weaken the effects of acupuncture at "Feishu" (BL13) on promoting IL-27/STAT1 activation and correcting Th1/Th2 immune balance ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The mechanism of acupuncture at "Feishu" (BL13) in the treatment of asthma rats may be related to promoting IL-27/STAT1 pathway activation and correcting Th1/Th2 immune balance.

[**Keywords**] asthma; interleukin-27; signal transducer and activator of transcription 1; immune balance; acupuncture; "Feishu" (BL13)

哮喘是一种严重的慢性疾病,若治疗不及时、不规范,可危及生命<sup>[1]</sup>。目前研究认为,哮喘是一种以辅助性T细胞(helper T cell, Th)1/Th2免疫平衡失调介导的气道炎症反应性疾病<sup>[2]</sup>。已有研究发现,白细胞介素(interleukin, IL)-27可刺激信号转导和转录激活因子1(signal transducer and activator of transcription 1, STAT1)磷酸化活化,来促进Th1分化、抑制Th2分化,维持机体Th1/Th2免疫平衡,发挥哮喘保护作用<sup>[3]</sup>,提示调控IL-27/STAT1通路可能是哮喘治疗的新通路及靶点。

中医治疗哮喘具有丰富的临床经验,并取得了较大进展<sup>[4]</sup>,其中以针灸治疗哮喘的疗效较为突出<sup>[5]</sup>。已有研究显示,针刺治疗可显著改善急性发作期哮喘患者的肺功能及炎症症状<sup>[6]</sup>。肺俞穴位于足太阳膀胱经,是治疗肺疾的重要腧穴,有调理肺脏、止咳平喘之功。王执中《针灸资生经》曰“因与人治哮喘,只谬肺俞,不谬他穴”<sup>[7]</sup>,提示肺俞穴在治疗哮喘疾病中起到重要作用。故对肺俞、脾俞、肾俞等穴位进行针灸可抑制Th17、Th2生成,改善Th1/Th2免疫平衡,推测肺俞穴可通过调控Th1/Th2免疫平衡,改善哮喘疾病<sup>[8]</sup>。目前,针刺肺俞穴治疗哮喘的具体机制还不甚明确,这不利于我国传统医学的发展及推广应用。因此,本研究建立大鼠哮喘模型,从IL-27/STAT1通路探究针刺肺俞穴对哮喘Th1/Th2免疫平衡及气道炎症反应的影响,以期阐明针刺肺俞穴治疗哮喘的分子机制,并为其临床应用提供客观实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

SD大鼠140只,6~8周龄,体质量180~200g,清洁级,雄性,购自河北省实验动物中心[河北医科大学实验动物学部,SCXK(冀)2021-002]。试验符合3R原则,经医院伦理委员会批准[IACUC-01(202100013)]。

卵白蛋白(批号:2021032,上海一研生物科技有限公司);IL-4 ELISA试剂盒(批号:2021839,滁州仕诺达生物科技有限公司);干扰素 $\gamma$ (interferon  $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )ELISA试剂盒(批号:cyy202173,武汉菲恩生物科技有限公司);免疫球蛋白E(immunoglobulin, IgE)ELISA试剂盒(批号:20216381,上海木栾科技有限公司);HE染色液(批号:20217392,北京伊塔生物科技有限公司);兔抗大鼠抗体:IL-4(批号:877133)、IFN- $\gamma$ (批号:732193)、STAT1(批号:381036)、磷酸化STAT1(p-STAT1)(批号:381749)、T-bet(批号:746173)、GATA3(批号:184629)均购自美国Abcam公司。

### 1.2 模型建立及分组干预

取140只SD雄性大鼠,随机分为:正常组、模型组、IL-27预防组、IL-27治疗组、STAT1抑制剂组、针刺肺俞组、针刺肺俞+STAT1抑制剂组,每组20只。除正常组外,其余各组均参照文献[9]于试验第1天及第7天经腹腔注射含100mg卵白蛋白及100mg氢氧化铝的混合溶液进行致敏,第8天至第

15天每天用50  $\mu\text{L}$ 的1%卵蛋白(10 mg 卵白蛋白溶于1 mL生理盐水中)滴鼻激发致敏,建立哮喘模型。

正常组于相同时间给予生理盐水处理,作为正常对照。IL-27预防组在造模试验前1~7 d,经鼻腔滴入50 ng的IL-27溶液(50 ng的IL-27溶于50  $\mu\text{L}$ 磷酸缓冲溶液中,剂量设置及给药方式参照文献[9]进行),2次/d,50  $\mu\text{L}$ /次,连续7 d。IL-27治疗组于模型造模的第15天开始连续7 d经鼻滴注IL-27溶液进行干预治疗,滴注剂量及给药次数同IL-27预防组。针刺肺俞组参照文献[10]于造模的第15天开始,用0.30 mm $\times$ 13 mm的一次性毫针,取大鼠脊柱两侧肺俞穴(第3胸椎下旁开1.5寸)直刺6 mm(平补平泻法,每次留针20 min,每10 min行针1次)进行治疗,1次/d,连续7 d。STAT1抑制剂组于造模的第15天开始参照文献[11]腹腔注射80 mg/kg的STAT1抑制剂氟达拉滨(8 mg溶于1 mL磷酸缓冲溶液中,10 mL/kg体积腹腔注射)1次/d,连续7 d。针刺肺俞+STAT1抑制剂组大鼠针刺肺俞穴治疗的同时,腹腔注射STAT1抑制剂氟达拉滨进行干预治疗。正常组及模型组大鼠腹腔注射给予10 mL/kg磷酸缓冲溶液进行干预。

### 1.3 观察指标

1.3.1 大鼠血清及肺泡灌洗液中IL-4及IFN- $\gamma$ 水平、灌洗液中嗜酸性粒细胞比例检测 各组大鼠给药结束后,随机取6只,取腹主动脉血3 mL,于3000 r/min、离心半径25 cm的条件下离心10 min后,用ELISA法检测血清IL-4、IFN- $\gamma$ 、IgE水平,处死大鼠,取左右两肺脏,各用生理盐水2 mL灌洗后,收集灌洗液,用ELISA法检测IL-4、IFN- $\gamma$ 水平;取肺泡灌洗液,于4  $^{\circ}\text{C}$ 、1500 r/min、离心半径25 cm的条件下离心5 min后收集上清液,用瑞氏染色后,于流式细胞仪上检测嗜酸性粒细胞比例。

1.3.2 大鼠气道高反应性检测 在各组大鼠中,随机取6只大鼠,参照文献[12]的方法,给予大鼠琥珀胆碱(0、12.5、25、50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )激发后,用肺功能检测仪检测大鼠气道反应情况。

### 1.3.3 流式细胞仪检测大鼠脾脏Th1/Th2细胞比例

剩余8只大鼠,断头处死后取左右两肺,左肺置于-80  $^{\circ}\text{C}$ 保存,右肺置于4%多聚甲醛中固定24 h后,制成厚为5  $\mu\text{m}$ 的石蜡切片备用。迅速摘取大鼠脾脏,剪取1 g脾脏组织,加入淋巴细胞分离液充分研磨至无块状物后,用尼龙网过滤,20  $^{\circ}\text{C}$ 、800 r/min

(离心半径25 cm)离心10 min后取单核细胞层,1640培养基洗涤及培养16 h后,取100  $\mu\text{L}$ 细胞悬液(约 $1\times 10^7$ 个)放入流式管中,加入CD4-APC单克隆抗体,4  $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min后,加入Icfixation Buffer室温孵育30 min,流式缓冲液洗涤后,进行固定/破膜处理后,加入Permeabilization Buffer室温孵育15 min,依次加入anti-rat-IL-4-PE、anti-rat-IFN- $\gamma$ -FITC,在4  $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光孵育30 min,1 mL流式细胞缓冲液重悬后,进行上机检测,Flowjo 7.61软件分析IFN- $\gamma$ -FITC、IL-4-PE比例,以二者比例代表Th1/Th2细胞比例。

1.3.4 肺组织病理损伤观察 取肺组织石蜡切片,烤片、脱蜡、脱水及抗原修复处理后进行HE染色,光镜下观察支气管肺组织病理变化。

1.3.5 肺组织IL-4、IFN- $\gamma$ 、p-STAT1免疫组化染色检测 取肺组织石蜡切片,烤片、脱蜡、水化、抗原修复及山羊血清封闭30 min后,滴加IL-4、IFN- $\gamma$ 、p-STAT1一抗(1:200)于4  $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中孵育过夜,滴加生物素标记的IgG二抗室温孵育20 min,DAB显色及苏木素复染后,光镜下观察拍照,Image-Pro Plus 6.0图像分析系统检测阳性染色区域的平均光密度值。

1.3.6 Western blot法检测肺组织蛋白表达 取冰冻肺组织,4  $^{\circ}\text{C}$ 解冻,经机械粉碎后匀浆提取蛋白,BCA法检测蛋白浓度,制备分离胶及浓缩胶,取60  $\mu\text{g}$ 蛋白行电泳及转膜反应,滴加1:500的IL-27、STAT1、p-STAT1、IL-4、IFN- $\gamma$ 、T-bet、GATA3一抗及1:800的 $\beta$ -actin内参抗体于4  $^{\circ}\text{C}$ 湿盒孵育过夜,次日多次清洗之后使用1:1000的HRP山羊抗兔二抗室温孵育25 min,取出PVDF膜于增强化学发光液中孵育3 min后,用曝光相机拍照,ImageJ软件分析计算条带相对灰度值。

### 1.4 统计学分析

采用SPSS 23.0软件统计数据,符合正态分布的计量数据用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。两组独立样本间用 $t$ 检验进行检测,3组及以上样本用单因素方差分析及snk- $q$ 检验进行检测,差异有统计学意义用 $P<0.05$ 表示。

## 2 结果

### 2.1 针刺肺俞穴对大鼠气道反应性的影响

与正常组相比,模型组大鼠琥珀胆碱激发浓度为12.5、25、50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,气道高反应值升高( $P<$

0.05)。与模型组相比,针刺肺俞组、IL-27 预防组及 IL-27 治疗组气道高反应值降低( $P<0.05$ );STAT1 抑制剂组大鼠气道高反应值在原基础上进一步升高( $P<0.05$ )。IL-27 预防组琥珀胆碱激发浓度为 50.0、100.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,气道高反应值较针刺肺俞组降低( $P<0.05$ )。针刺肺俞+STAT1 抑制剂组大鼠琥珀胆碱浓度为 12.5、25、50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,气道高反应值较针刺肺俞组升高( $P<0.05$ )。详见表 1。

## 2.2 针刺肺俞穴对大鼠血肿周围组织病理损伤的影响

正常组大鼠肺泡结构完整,周围组织未见水肿;肺间隔及肺泡上皮细胞未见异常。模型组大鼠支气管黏膜上皮水肿及变性严重,毛细管扩张、小支气管和终末细支气管黏液栓形成、肺泡腔融合扩大明显,支气管和血管周围及管腔内巨噬细胞、嗜酸性粒细胞及淋巴细胞等炎症细胞浸润及渗出严重。针刺肺俞组及 IL-27 治疗组大鼠支气管黏膜上皮细胞有少量水肿及变性,炎症细胞浸润及渗出较模型减轻。IL-27 预防组大鼠支气管黏膜上皮细胞未见水肿、变性和脱落,支气管周围炎症细胞浸润、嗜酸性粒细胞渗出较模型组减少。STAT1 抑制剂组大鼠肺组织

支气管黏膜脱落、黏液栓形成、肺泡腔融合扩大及炎症细胞浸润等病理损伤较模型组严重。针刺肺俞+STAT1 抑制剂组大鼠肺组织病理损伤较针刺肺俞组严重。详见图 1。

## 2.3 针刺肺俞穴对大鼠血清及肺泡灌洗液中 IL-4、IFN- $\gamma$ 水平的影响

与正常组相比,模型组大鼠血清及肺泡灌洗液中 IL-4 升高( $P<0.05$ ),IFN- $\gamma$  水平降低( $P<0.05$ )。与模型组相比,针刺肺俞组、IL-27 预防组、IL-27 治疗组血清及肺泡灌洗液中 IL-4 均降低( $P<0.05$ ),IFN- $\gamma$  水平均升高( $P<0.05$ );STAT1 抑制剂组大鼠血清及肺泡灌洗液中 IL-4 升高( $P<0.05$ ),IFN- $\gamma$  水平降低( $P<0.05$ )。IL-27 预防组血清及肺泡洗液中 IL-4 低于针刺肺俞组( $P<0.05$ ),IFN- $\gamma$  水平高于针刺肺俞组( $P<0.05$ )。与针刺肺俞组相比,针刺肺俞+STAT1 抑制剂组血清及肺泡灌洗液中 IL-4 升高( $P<0.05$ ),IFN- $\gamma$  水平降低( $P<0.05$ )。详见表 2。

## 2.4 针刺肺俞穴对大鼠血清 IgE 水平及肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞水平的影响

与正常组相比,模型组大鼠血清 IgE 及肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞比例升高( $P<0.05$ )。与模型组

表 1 各组大鼠气道高反应比较( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别	琥珀胆碱激发浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$				
	0	12.50	25.00	50.00	100.00
正常组	0.72 $\pm$ 0.03	1.07 $\pm$ 0.13	1.21 $\pm$ 0.01	1.84 $\pm$ 0.18	2.24 $\pm$ 0.18
模型组	0.79 $\pm$ 0.04	1.69 $\pm$ 0.09 <sup>&amp;</sup>	1.98 $\pm$ 0.19 <sup>&amp;</sup>	2.63 $\pm$ 0.26 <sup>&amp;</sup>	3.43 $\pm$ 0.36 <sup>&amp;</sup>
针刺肺俞组	0.77 $\pm$ 0.05	1.21 $\pm$ 0.15 <sup>*</sup>	1.33 $\pm$ 0.13 <sup>*</sup>	2.16 $\pm$ 0.19 <sup>*</sup>	2.86 $\pm$ 0.27 <sup>*</sup>
IL-27 预防组	0.72 $\pm$ 0.04	1.17 $\pm$ 0.13 <sup>*</sup>	1.29 $\pm$ 0.12 <sup>*</sup>	1.82 $\pm$ 0.18 <sup>**</sup>	2.32 $\pm$ 0.28 <sup>**</sup>
IL-27 治疗组	0.76 $\pm$ 0.05	1.22 $\pm$ 0.11 <sup>*</sup>	1.36 $\pm$ 0.13 <sup>*</sup>	2.10 $\pm$ 0.18 <sup>*</sup>	2.87 $\pm$ 0.29 <sup>*</sup>
STAT1 抑制剂组	0.75 $\pm$ 0.06	1.99 $\pm$ 0.25 <sup>**</sup>	2.57 $\pm$ 0.25 <sup>**</sup>	2.99 $\pm$ 0.26 <sup>**</sup>	3.96 $\pm$ 0.32 <sup>**</sup>
针刺肺俞+STAT1 抑制剂组	0.70 $\pm$ 0.05	1.66 $\pm$ 0.34 <sup>#</sup>	1.94 $\pm$ 0.18 <sup>#</sup>	2.60 $\pm$ 0.25 <sup>#</sup>	3.40 $\pm$ 0.35 <sup>#</sup>

注:与正常组相比,<sup>&</sup> $P<0.05$ ;与模型组相比,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ;与针刺肺俞组相比,<sup>#</sup> $P<0.05$ 。

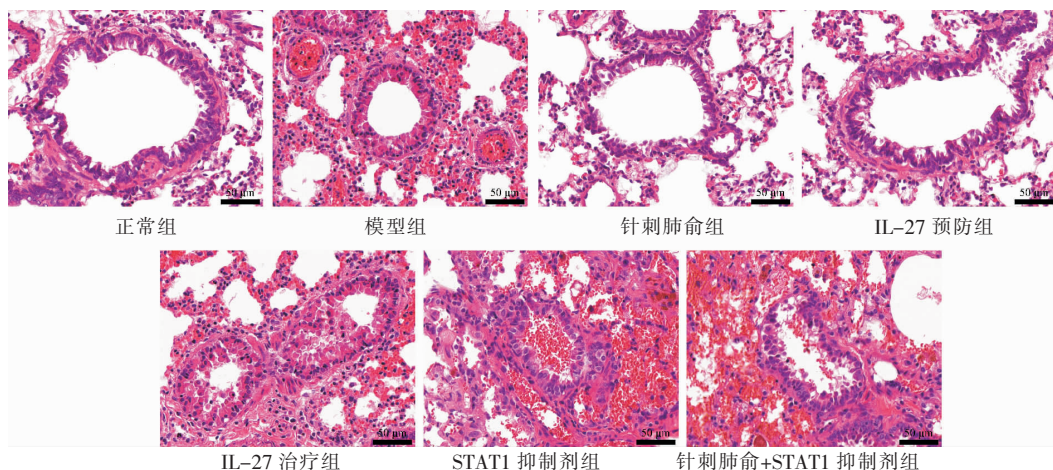


图 1 各组大鼠肺组织 HE 染色结果( $\times 400$ )

表2 各组大鼠血清及支气管灌洗液中 IL-4、IFN- $\gamma$  水平比较 ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别	IL-4/(pg·mL <sup>-1</sup> )		IFN- $\gamma$ /(pg·mL <sup>-1</sup> )	
	血清	肺泡灌洗液	血清	肺泡灌洗液
正常组	10.55±0.94	1.08±0.12	21.48±2.07	32.89±2.06
模型组	33.11±1.52 <sup>△</sup>	17.06±1.88 <sup>△</sup>	11.59±0.94 <sup>△</sup>	13.76±1.00 <sup>△</sup>
针刺肺俞组	19.25±1.07*	9.62±0.73*	16.33±1.05*	20.64±1.53*
IL-27 预防组	11.18±0.91**	4.04±0.42**	19.97±1.11**	29.82±1.86**
IL-27 治疗组	20.13±1.72*	10.21±0.92*	16.45±1.24*	20.22±1.47*
STAT1 抑制剂组	49.23±2.30**	25.14±1.90**	7.64±0.78**	8.06±0.75**
针刺肺俞+STAT1 抑制剂组	32.94±1.60 <sup>#</sup>	16.86±1.75 <sup>#</sup>	11.94±0.90 <sup>#</sup>	13.07±1.05 <sup>#</sup>

注:与正常组相比,<sup>△</sup> $P<0.05$ ;与模型组相比,\* $P<0.05$ ;与针刺肺俞组相比,<sup>#</sup> $P<0.05$ 。

相比,针刺肺俞组、IL-27 预防组、IL-27 治疗组血清 IgE 及肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞比例降低 ( $P<0.05$ );STAT1 抑制剂组大鼠血清 IgE 及肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞比例升高 ( $P<0.05$ )。IL-27 预防组血清 IgE 及肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞比例低于针刺肺俞组 ( $P<0.05$ )。与针刺肺俞组相比,针刺肺俞+STAT1 抑制剂组血清 IgE 及肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞比例升高 ( $P<0.05$ )。详见表 3。

表3 各组大鼠血清 IgE 及肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞比例比较 ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别	血清 IgE/(ng·mL <sup>-1</sup> )	嗜酸性粒细胞比例/%
正常组	60.00±6.00	0.04±0.01
模型组	158.01±7.08 <sup>△</sup>	0.29±0.02 <sup>△</sup>
针刺肺俞组	109.44±5.97*	0.15±0.01*
IL-27 预防组	79.78±3.41**	0.08±0.02**
IL-27 治疗组	110.00±5.60*	0.16±0.01*
STAT1 抑制剂组	251.25±10.80**	0.45±0.04**
针刺肺俞+STAT1 抑制剂组	155.36±6.29 <sup>#</sup>	0.26±0.02 <sup>#</sup>

注:与正常组相比,<sup>△</sup> $P<0.05$ ;与模型组相比,\* $P<0.05$ ;与针刺肺俞组相比,<sup>#</sup> $P<0.05$ 。

## 2.5 针刺肺俞穴对大鼠脾脏 Th1、Th2 比例及 Th1/Th2 的影响

与正常组相比,模型组大鼠 Th1 比例、Th1/Th2 比例降低 ( $P<0.05$ ),Th2 比例升高 ( $P<0.05$ )。与模型组相比,针刺肺俞组、IL-27 预防组及 IL-27 治疗组 Th1 比例、Th1/Th2 升高 ( $P<0.05$ ),Th2 比例降低 ( $P<0.05$ );STAT1 抑制剂组 Th1 比例、Th1/Th2 降低 ( $P<0.05$ ),Th2 比例升高 ( $P<0.05$ )。IL-27 预防组 Th1 比例、Th1/Th2 高于针刺肺俞 ( $P<0.05$ ),Th2 比例低于针刺肺俞组 ( $P<0.05$ )。与针刺肺俞组相比,针刺肺俞+STAT1 抑制剂组 Th1 比例、Th1/Th2 降低 ( $P<0.05$ ),Th2 比例升高 ( $P<0.05$ )。详见表 4。

表4 各组大鼠脾脏 Th1、Th2 比例及 Th1/Th2 比较 ( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

组别	Th1 比例/%	Th2 比例/%	Th1/Th2
正常组	14.01±0.78	0.42±0.07	33.32±1.89
模型组	0.46±0.04 <sup>△</sup>	10.64±0.70 <sup>△</sup>	0.04±0.01 <sup>△</sup>
针刺肺俞组	8.33±0.14*	2.28±0.30*	3.65±0.13*
IL-27 预防组	10.35±0.52**	0.71±0.07**	14.57±0.72**
IL-27 治疗组	8.24±0.10*	2.33±0.26*	3.57±0.16*
STAT1 抑制剂组	0.14±0.01**	17.63±0.87**	0.01±0.00**
针刺肺俞+STAT1 抑制剂组	0.45±0.03 <sup>#</sup>	10.58±0.71 <sup>#</sup>	0.04±0.02 <sup>#</sup>

注:与正常组相比,<sup>△</sup> $P<0.05$ ;与模型组相比,\*\* $P<0.05$ ;与针刺肺俞组相比,<sup>#</sup> $P<0.05$ 。

## 2.6 针刺肺俞穴对大鼠肺组织 IL-4、IFN- $\gamma$ 、p-STAT1 阳性表达的影响

与正常组相比,模型组大鼠肺组织 IFN- $\gamma$ 、p-STAT1 阳性表达降低 ( $P<0.05$ ),IL-4 阳性表达升高 ( $P<0.05$ )。与模型组相比,针刺肺俞组、IL-27 预防组及 IL-27 治疗组肺组织 IFN- $\gamma$ 、p-STAT1 阳性表达升高 ( $P<0.05$ ),IL-4 阳性表达降低 ( $P<0.05$ );STAT1 抑制剂组大鼠肺组织 IFN- $\gamma$ 、p-STAT1 阳性表达降低 ( $P<0.05$ ),IL-4 阳性表达升高 ( $P<0.05$ )。IL-27 预防组 IFN- $\gamma$ 、p-STAT1 阳性表达高于针刺肺俞组 ( $P<0.05$ ),IL-4 阳性表达低于针刺肺俞组 ( $P<0.05$ )。与针刺肺俞组相比,针刺肺俞+STAT1 抑制剂组肺组织 IFN- $\gamma$ 、p-STAT1 阳性表达降低 ( $P<0.05$ ),IL-4 阳性表达升高 ( $P<0.05$ )。详见图 2、表 5。

## 2.7 针刺肺俞穴对大鼠肺组织 IL-27/STAT1 通路相关蛋白表达的影响

与正常组相比,模型组大鼠肺组织 IL-27、p-STAT1/STAT1、IFN- $\gamma$ 、T-bet 蛋白表达降低 ( $P<0.05$ ),GATA3、IL-4 蛋白表达升高 ( $P<0.05$ )。与模型组相比,针刺肺俞组、IL-27 预防组及 IL-27 治疗组肺组织 IL-27、p-STAT1/STAT1、IFN- $\gamma$ 、T-bet 蛋白表达升高 ( $P<0.05$ ),GATA3、IL-4 蛋白表达降低 ( $P<0.05$ );STAT1 抑制剂组大鼠肺组织 IL-27、p-STAT1/STAT1、IFN- $\gamma$ 、T-bet 蛋白表达降低 ( $P<0.05$ ),GATA3、IL-4 蛋白表达升高 ( $P<0.05$ )。IL-27 预防组 p-STAT1/STAT1、IFN- $\gamma$ 、T-bet 蛋白表达高于针刺肺俞组 ( $P<0.05$ ),GATA3、IL-4 蛋白表达低于针刺肺俞组 ( $P<0.05$ )。与针刺肺俞组相比,针刺肺俞+STAT1 抑制剂组肺组织 IL-27、p-STAT1/STAT1、IFN- $\gamma$ 、T-bet 蛋白表达降低 ( $P<0.05$ ),GATA3、IL-4 蛋白表达升高 ( $P<0.05$ )。详见表 6、图 3。

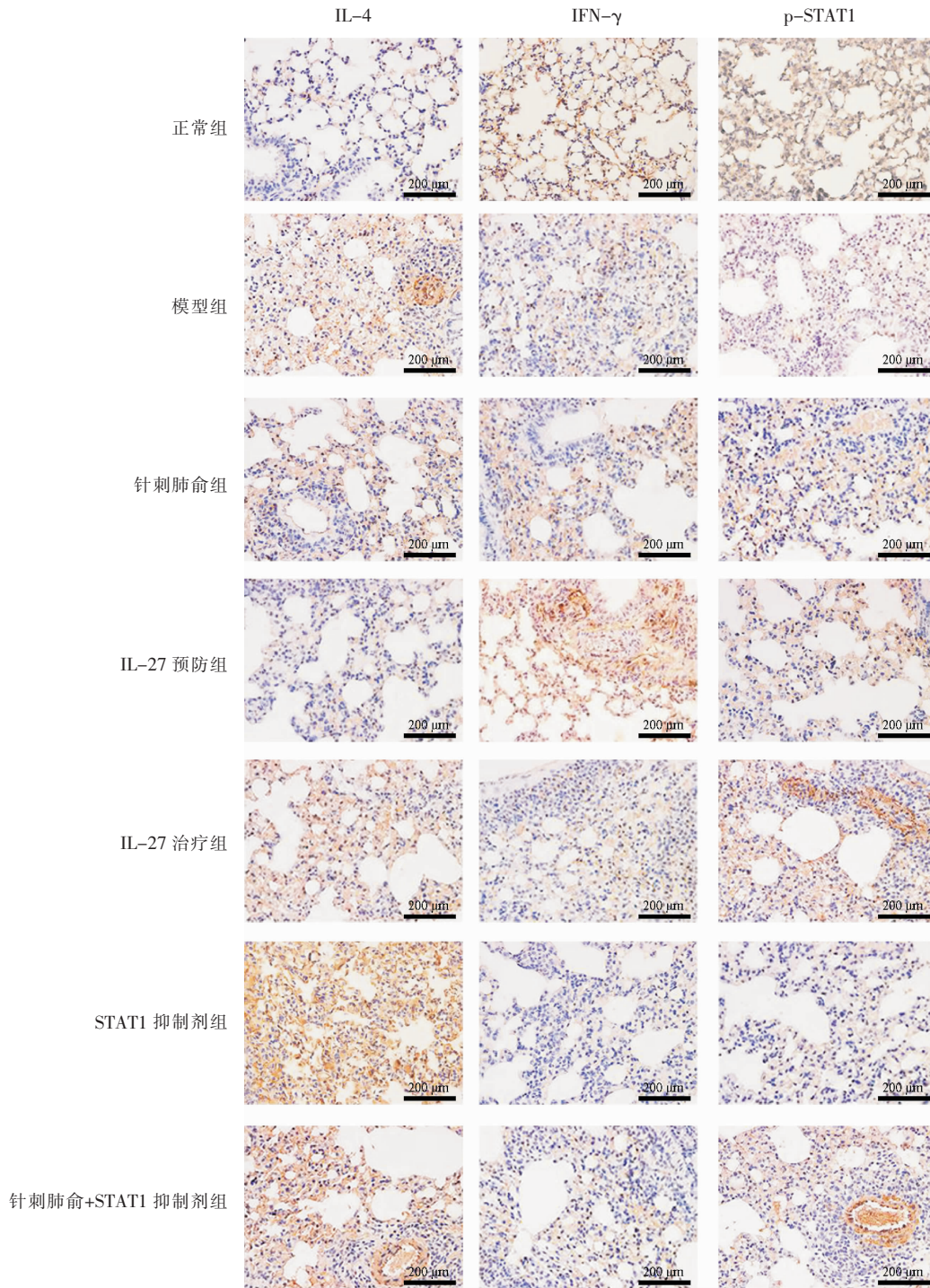


图2 各组大鼠肺组织 IL-4、IFN-γ、p-STAT1 免疫组化染色图(×200)

表5 各组大鼠肺组织 IL-4、IFN-γ、p-STAT1 阳性表达比较(n=8,  $\bar{x} \pm s$ , 平均光密度值/mm<sup>2</sup>)

组别	IL-4	IFN-γ	p-STAT1
正常组	0.18±0.01	1.12±0.08	1.19±0.09
模型组	1.46±0.14 <sup>△</sup>	0.34±0.03 <sup>△</sup>	0.44±0.04 <sup>△</sup>
针刺肺俞组	0.93±0.09*	0.78±0.07*	0.71±0.07*
IL-27 预防组	0.45±0.04* <sup>#</sup>	1.01±0.08* <sup>#</sup>	1.07±0.09* <sup>#</sup>
IL-27 治疗组	0.94±0.10*	0.73±0.06*	0.70±0.06*
STAT1 抑制剂组	2.04±0.21* <sup>#</sup>	0.13±0.01* <sup>#</sup>	0.11±0.01* <sup>#</sup>
针刺肺俞+STAT1 抑制剂组	1.44±0.13 <sup>#</sup>	0.38±0.02 <sup>#</sup>	0.49±0.04 <sup>#</sup>

注:与正常组相比,<sup>△</sup>P<0.05;与模型组相比,\*P<0.05;与针刺肺俞组相比,<sup>#</sup>P<0.05。

表 6 各组大鼠肺组织 IL-27、p-STAT1/STAT1、IFN- $\gamma$ 、IL-4、T-bet 及 GATA3 蛋白表达比较 ( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

组别	IL-27/ $\beta$ -actin	p-STAT1/STAT1	IFN- $\gamma$ / $\beta$ -actin	IL-4/ $\beta$ -actin	T-bet/ $\beta$ -actin	GATA3/ $\beta$ -actin
正常组	1.13 $\pm$ 0.07	1.10 $\pm$ 0.09	1.19 $\pm$ 0.13	1.00 $\pm$ 0.09	1.15 $\pm$ 0.09	1.17 $\pm$ 0.09
模型组	0.36 $\pm$ 0.03 <sup>*</sup>	0.33 $\pm$ 0.03 <sup>*</sup>	0.29 $\pm$ 0.02 <sup>*</sup>	2.01 $\pm$ 0.18 <sup>*</sup>	0.41 $\pm$ 0.04 <sup>*</sup>	2.19 $\pm$ 0.22 <sup>*</sup>
针刺肺俞组	0.77 $\pm$ 0.07 <sup>*</sup>	0.70 $\pm$ 0.06 <sup>*</sup>	0.65 $\pm$ 0.06 <sup>*</sup>	1.66 $\pm$ 0.17 <sup>*</sup>	0.80 $\pm$ 0.07 <sup>*</sup>	1.81 $\pm$ 0.19 <sup>*</sup>
IL-27 预防组	1.00 $\pm$ 0.09 <sup>*#</sup>	1.04 $\pm$ 0.10 <sup>*#</sup>	1.03 $\pm$ 0.09 <sup>*#</sup>	1.10 $\pm$ 0.09 <sup>*#</sup>	1.10 $\pm$ 0.08 <sup>*#</sup>	1.11 $\pm$ 0.12 <sup>*#</sup>
IL-27 治疗组	0.74 $\pm$ 0.06 <sup>*</sup>	0.69 $\pm$ 0.06 <sup>*</sup>	0.68 $\pm$ 0.05 <sup>*</sup>	1.67 $\pm$ 0.06 <sup>*</sup>	0.79 $\pm$ 0.06 <sup>*</sup>	1.80 $\pm$ 0.20 <sup>*</sup>
STAT1 抑制剂组	0.14 $\pm$ 0.04 <sup>*#</sup>	0.16 $\pm$ 0.04 <sup>*#</sup>	0.07 $\pm$ 0.02 <sup>*#</sup>	2.77 $\pm$ 0.20 <sup>*#</sup>	0.12 $\pm$ 0.01 <sup>*#</sup>	2.89 $\pm$ 0.29 <sup>*#</sup>
针刺肺俞+STAT1 抑制剂组	0.32 $\pm$ 0.03 <sup>#</sup>	0.30 $\pm$ 0.03 <sup>#</sup>	0.26 $\pm$ 0.02 <sup>#</sup>	1.99 $\pm$ 0.18 <sup>#</sup>	0.38 $\pm$ 0.03 <sup>#</sup>	1.97 $\pm$ 0.21 <sup>#</sup>

注:与正常组相比,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ;与模型组相比,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ;与针刺肺俞组相比,<sup>#</sup> $P<0.05$ 。

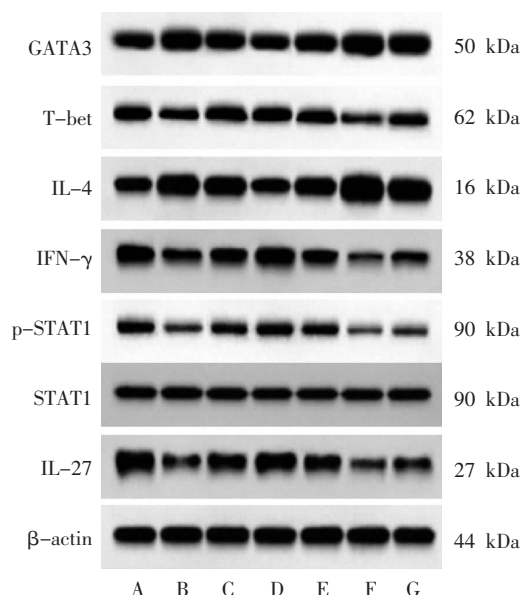


图 3 各组大鼠肺组织 IL-27、p-STAT1/STAT1、IFN- $\gamma$ 、IL-4、T-bet 及 GATA3 蛋白表达免疫印迹图

注:A.正常组;B.模型组;C.针刺肺俞组;D.IL-27 预防组;E.IL-27 治疗组;F. STAT1 抑制剂组;G.针刺肺俞+STAT1 抑制剂组。

### 3 讨论

目前,全球约 3 亿人罹患哮喘,中国哮喘患者约 3000 万人<sup>[13]</sup>。Th1/Th2 细胞免疫失衡是哮喘气道免疫炎症反应发生的关键原因<sup>[14]</sup>。Th1 抗炎及 Th2 促炎效应既相互联系又相互制约,而哮喘患者 Th1 抗炎效应被抑制,Th2 促炎效应异常增强,导致 Th1/Th2 细胞免疫失衡,是引起哮喘患者发生速发型变态反应和气道炎症反应发生的重要原因<sup>[15]</sup>。IFN- $\gamma$  由 Th1 免疫细胞分泌,可促进 Th1 细胞分化,IL-4 由 Th2 免疫细胞分泌,即可诱导 T 细胞炎症反应的早期启动,来增强黏附类、趋化类蛋白表达,来促进呼吸道内炎性细胞聚集、活化,加重支气管哮喘急性发作的次数和症状,又可维持 Th2 细胞增殖,抑制 Th1 细胞分化,诱发 Th1/Th2 平衡紊乱,IFN- $\gamma$ 、IL-4 含量变化是评判哮喘病情的重要指标<sup>[15]</sup>。升高 IFN- $\gamma$  表达,降低 IL-4 分泌,促进 Th1/Th2 平衡是治疗哮喘

的重要思路<sup>[16]</sup>。本研究用卵蛋白血清<sup>[9]</sup>反复致敏后发现,大鼠气道高反应性升高,Th1 细胞比例及其分泌的 IFN- $\gamma$  因子降低,Th2 细胞比例及其分泌的 IL-4 因子升高,血清 IgE 水平及支气管肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞数目升高,提示造模成功。病理学进一步观察可见大鼠肺支气管黏膜上皮水肿、脱落,毛细血管充血扩张,支气管黏液栓形成及肺泡腔扩大,炎性细胞浸润明显,进一步验证了模型。

近年来,中医治疗哮喘的案例逐渐增多,具有方法多样、安全性高等优势,针灸配合穴位治疗被证实可改善肺脏功能、调畅气机、改善哮喘气道阻塞及咳嗽症状<sup>[17]</sup>。肺俞穴是治疗肺疾、哮喘的重要穴位。有大量临床实践证实,针刺肺俞穴改善哮喘患者咳嗽、咳痰、咽痒、气息急促等临床症状的总有效率达 92.98%,且其改善哮喘症状的作用机制可能与调节免疫、恢复 Th1/Th2 平衡有关<sup>[18-19]</sup>。本研究发现,针刺肺俞穴治疗哮喘大鼠后,大鼠气道高反应性降低,肺组织炎症浸润及支气管水肿、脱落等病理损伤显著缓解,血清及支气管肺泡灌洗液 IFN- $\gamma$  升高,IL-4 分泌降低,Th1/Th2 比例逐渐恢复平衡,提示针刺肺俞穴治疗哮喘与纠正 Th1/Th2 免疫平衡有关,但具体分子机制有待进一步探究。

IL-27/STAT1 通路被证实可促进 Th1/Th2 免疫平衡。IL-27 可促进 Th1 型细胞免疫反应,抑制 Th2 细胞应答,刺激自然杀伤细胞产生 IFN- $\gamma$ ,来抑制 Th2 型细胞及因子 IL-4 的生成,纠正 Th2 型细胞免疫的漂移,维持 Th1/Th2 比例平衡<sup>[20]</sup>。另外,IL-27 还可与 Th 细胞表面的 IL-27 受体结合,促使 p-STAT1 转入细胞核,来结合及转录 Th 细胞特定的转录因子 T-bet 而促进 Th1 细胞分化并分泌 IFN- $\gamma$ ,上调 IL-12R $\beta$ 2 表达间接抑制 Th2 细胞特异性转录因子 GATA3 表达,抑制 Th2 细胞分化和分泌 IL-4<sup>[21]</sup>。Lu 等<sup>[22]</sup>研究发现哮喘动物模型机体内存在 STAT1 磷

酸化障碍,可抑制 IL-27 表达,影响 Th1/Th2 平衡,证实 IL-27/STAT1 通路参与调控 Th1/Th2 免疫平衡及哮喘症状。研究发现,哮喘大鼠肺组织中 IL-27、p-STAT1 及下游促 Th1 细胞分化相关因子 T-bet 表达减弱,促 Th2 细胞分化相关因子 GATA3 表达均明显升高,给予 IL-27 预防及 IL-27 滴鼻治疗后,大鼠气道高反应性降低,IL-27、p-STAT1 及下游 T-bet 表达均增强,Th1/Th2 趋于平衡,肺组织损伤明显缓解,而阻断 IL-27/STAT1 通路活性后,大鼠气道高反应性、肺组织损伤、Th1/Th2 比例失衡等哮喘病理症状加重,提示增强 IL-27/STAT1 通路活性是改善哮喘 Th1/Th2 免疫平衡紊乱的潜在机制。为证实针刺肺俞穴通过调控 IL-27/STAT1 通路发挥作用,在针刺肺俞穴的同时抑制 STAT1,发现大鼠 IL-27/STAT1 通路被抑制,Th1/Th2 平衡被破坏,提示针刺肺俞穴通过 IL-27/STAT1 通路发挥作用。

综上所述,针刺肺俞穴治疗哮喘作用,可能与促进 IL-27/STAT1 通路活化、纠正 Th1/Th2 免疫平衡有关。这为阐明针刺肺俞穴治疗哮喘的分子机制提供一定依据,也为中医药的开发及推广做出一定贡献。但中医学治疗哮喘的靶点较多,针刺肺俞穴治疗哮喘的其他机制,还需进一步探究。

## 参考文献

- [1] ZHANG X X, LAI Z D, QIU R H, et al. Positive change in asthma control using therapeutic patient education in severe uncontrolled asthma: A one-year prospective study[J]. *Asthma Research and Practice*, 2021, 7(1): 10.
- [2] LI Q, ZHAI C M, WANG G D, et al. Ginsenoside Rh1 attenuates ovalbumin-induced asthma by regulating Th1/Th2 cytokines balance[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2021, 85(8): 1809-1817.
- [3] LU D G, LU J M, JI X Q, et al. IL-27 suppresses airway inflammation, hyperresponsiveness and remodeling via the STAT1 and STAT3 pathways in mice with allergic asthma[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2020, 46(2): 641-652.
- [4] 郭钊明,黄楚栓,刘建博,等.难治性哮喘的中医辨治思考[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(7): 2928-2931.
- [5] 张雪,程颢,史阳琳,等.针灸对哮喘相关免疫细胞调节作用的研究进展[J]. *上海针灸杂志*, 2020, 39(11): 1465-1472.
- [6] 杨永清,尹磊森,朱维良,等.源自针灸的靶标发现之科学路径:以针刺防治哮喘为例[J]. *科学通报*, 2020, 65(32): 3520-3525.
- [7] 张锐红,许金森,陈铭,等.基于肥大细胞和 P 物质探讨哮喘大鼠背部腧穴敏化机制[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(11): 5759-5763.
- [8] 张伟,邓焕华,涂敏芳.悬灸对哮喘大鼠 Th2、Th17 的免疫调节作用[J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(10): 2540-2545.
- [9] SU X Q, PAN J, BAI F X, et al. IL-27 attenuates airway inflammation in a mouse asthma model via the STAT1 and GADD45 $\gamma$ /p38 MAPK pathways[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2016, 14(1): 283.
- [10] 胡晓京,邵素菊,华金双,等.针灸“肺俞”“大椎”“风门”对哮喘大鼠肺组织中 CC 趋化因子配体 1、CC 趋化因子受体 8 表达的影响[J]. *针刺研究*, 2020, 45(5): 363-367.
- [11] CUI S J, ZHANG T, FU Y, et al. DPSCs attenuate experimental progressive TMJ arthritis by inhibiting the STAT1 pathway[J]. *Journal of Dental Research*, 2020, 99(4): 446-455.
- [12] 陈叶,胡智立,贺守第,等.冬凌草甲素对急性哮喘小鼠 Th1 细胞/Th2 细胞平衡的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2019, 35(7): 651-653.
- [13] HINDS D, AGGARWAL B, DU X, et al. Asia Pacific survey of physicians on asthma and allergic rhinitis (ASPAIR): Data from China[J]. *Chinese Medical Journal*, 2019, 132(11): 1264-1271.
- [14] 毕俊杰,倪振华,王雄彪.2 型固有淋巴细胞与哮喘发病机制关系的研究进展[J]. *现代免疫学*, 2021, 41(1): 70-73.
- [15] ASKARI V R, ALAVINEZHAD A, RAHIMI V B, et al. Immunomodulatory effects of methanolic extract of *Ferula szowitsiana* on isolated human Th1/Th2/Treg cytokines levels, and their genes expression and nitric oxide production[J]. *Cytokine*, 2021, 138: 155387.
- [16] 曹红艳,喻海忠,袁建芬,等.哮喘宁颗粒对哮喘慢性持续期患者的临床疗效分析[J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(8): 45-49.
- [17] 杨勤军,杨程,童佳兵,等.近 30 年中医药治疗支气管哮喘临床应用规律数据挖掘研究[J]. *北京中医药大学学报*, 2019, 42(8): 697-704.
- [18] 徐金兰.穴位敷贴联合针灸对咳嗽变异性哮喘患者血清炎症因子水平的影响[J]. *中医外治杂志*, 2020, 29(5): 46-47.
- [19] 张锐红,许金森,陈铭,等.基于肥大细胞和 P 物质探讨哮喘大鼠背部腧穴敏化机制[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(11): 5759-5763.
- [20] PEREIRA A B M, DE OLIVEIRA J R, TEIXEIRA M M, et al. IL-27 regulates IL-4-induced chemokine production in human bronchial epithelial cells[J]. *Immunobiology*, 2021, 226(1): 152029.
- [21] GAN Y L, GUO S L, ZHU Y M, et al. Exogenous intrapleural injection of interleukin-27 may improve outcome and prognosis in patients with tuberculous pleural effusion[J]. *Medical Hypotheses*, 2019, 131: 109319.
- [22] LU D G, LU J M, JI X Q, et al. IL-27 suppresses airway inflammation, hyperresponsiveness and remodeling via the STAT1 and STAT3 pathways in mice with allergic asthma[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2020, 46(2): 641-652.