

·针灸推拿·

不同灸法对免疫抑制兔脾脏指数及细胞因子的影响

单增天¹, 田岳凤^{1*}, 李雷勇², 吴爱花¹, 王 军¹

(1.山西中医学院针灸推拿学院, 山西 太原 030619; 2.山西医科大学第二医院, 山西 太原 030001)

〔摘要〕目的 观察不同灸法对环磷酰胺所致免疫抑制兔脾脏指数及细胞因子 IFN- γ 、IL-2 及 IL-4 的影响。方法 将大耳白兔 50 只随机分为空白组、模型组、隔药饼灸组、艾灸组和假药饼灸组 5 组。除空白组外,其余 4 组均腹腔注射环磷酰胺 60 mg/kg,造成免疫抑制模型。3 个治疗组分别给予隔药饼灸、艾灸、假药饼灸治疗,隔日灸,共灸 10 次。治疗结束次日动物麻醉,取动物脾脏计算其脾脏指数,采用 ELISA 法测定匀浆上清液中 IFN- γ 、IL-2、IL-4 含量。结果 环磷酰胺造模后,脾脏指数与空白组比较显著升高,差异具有显著的统计学意义 ($P<0.01$),3 个治疗组脾脏指数与模型组比较差异均有显著统计学意义 ($P<0.01$),与空白组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与空白组比较,艾灸组 IFN- γ 、IL-4 明显降低,模型组、假药饼组 IL-4 明显降低,差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。与模型组比较,艾灸组 IFN- γ 明显降低,隔药饼灸组 IL-4 显著升高,差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。结论 不同灸法对免疫抑制兔脾脏指数均有调节作用;隔药饼灸可使因环磷酰胺所致下降的 IL-4 显著提升。

〔关键词〕 环磷酰胺;隔药饼灸;艾灸;脾脏指数;细胞因子

〔中图分类号〕R245.8

〔文献标识码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.11.022

Influence of Different Moxibustion on Spleen Index and Cytokines in Immunosuppressive Model Rabbits

SHAN Zengtian¹, TIAN Yuefeng^{1*}, LI Leiyong², WU Aihua¹, WANG Jun¹

(1.Acupuncture and Massage College of Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Shanxi, Taiyuan 0306191, China;

2.The Second Hospital of Shanxi Medical University, Shanxi, Taiyuan 030001, China)

〔Abstract〕 Objective To observe the inhibitory effect of different moxibustion methods on rabbit spleen index, the contents of IFN- γ , IL-2 and IL-4 in cyclophosphamide induced immunosuppression model rabbits. **Methods** The 50 rabbits were randomly divided into five groups, namely black group, model group, herb-cake-separated moxibustion group, moxibustion group, sham-cake-separated moxibustion group. In addition to the black group, the other four groups were injected with cyclophosphamide 60 mg/kg to make immunosuppressive model. Three treatment groups were respectively given herb-cake-separated moxibustion, moxibustion, sham-cake-separated moxibustion treatment every other day, for 10 times. The next day after finished moxibustion, the animals were anesthetized, the spleen index was detected, the IFN- γ , IL-2, IL-4 in supernatant of spleen homogenate were determined by ELISA. **Results** Compared with the black group, the spleen index of model group was significantly higher, it was statistically significant ($P<0.01$). The spleen index in the three treatment group was statistically significant comparing with the model group ($P<0.01$), while the difference between the treatment groups and blank group was not statistically significant ($P>0.05$). Compared with the blank group, the IFN- γ and IL-4 in the moxibustion group were lower significantly, the IL-4 in model group and sham-cake-separated group was reduced, the differences were statistically significant ($P<0.05$). Compared with the model group, the content of IFN- γ was decreased in moxibustion group, and the content of IL-4 increased in herb-cake-separated moxibustion group was increased, the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Different moxibustion shows a regulating effect on spleen index in immunosuppressive rabbits. The herb-cake-separated moxibustion could significantly increase the decline content of IL-4 induced by cyclophosphamide.

〔Keywords〕 cyclophosphamide; herb-cake-separated moxibustion; moxibustion; spleen index; cytokines

〔收稿日期〕2016-06-17

〔基金项目〕国家自然科学基金面上项目(81373742)。

〔作者简介〕单增天,男,在读硕士研究生,研究方向:艾灸防治疾病。

〔通讯作者〕* 田岳凤,女,教授,博士研究生导师,E-mail:tyfsx@163.com。

艾灸防病治病在我国已有数千年历史,现代实验研究证实艾灸有提高机体免疫功能的作用,可改善机体的免疫抑制状态。隔药饼灸是将药物、艾灸、穴位三者有机结合作用于机体,本文从这一角度研究隔药饼灸对免疫抑制兔机体脾脏指数及细胞因子IFN- γ 、IL-2、IL-4的影响,并与艾灸组及假药饼组相比较,为艾灸提高机体免疫力提供明确的实验依据,同时促进临床艾灸的发展和进步。

1 材料

1.1 实验动物

大耳白兔50只,北京昌扬西山养殖场提供(动物许可证号:SCXK(京)2011-0010),体质量(2.5±0.3)kg,雌雄不限。饲养温度:20~25℃,湿度:50%~70%。

1.2 主要药物、试剂和仪器

清艾条:江苏盱眙华佗中药厂(批号:Z32020153);注射用环磷酰胺(CTX):200mg/瓶,山西普德药业股份有限公司(批号:H14023686);0.9%NaCl注射液500mL:石家庄四药有限公司;酶联免疫试剂盒:上海酶联生物科技有限公司;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 动物造模 将50只大耳白兔随机分为5组,每组10只,分别为空白组、模型组、隔药饼灸组、艾灸组和假药饼灸组。动物适应性饲养一周,模型组、隔药饼灸组、艾灸组和假药饼灸组均腹腔注射环磷酰胺60mg/kg(环磷酰胺用0.9%NaCl注射液稀释),连续7d,每天上午造模,造成免疫抑制模型,空白组注射等量0.9%NaCl注射液。

2.1.2 穴位选择 神阙、关元、足三里(双)、脾俞(双)、肾俞(双)。穴位定位参照林文主编《实验针灸学》^[1]常用动物穴位定位法及拟人比照法。

2.1.3 药物制作 按六味地黄丸组方剂量将熟地黄、山茱萸、山药、泽泻、牡丹皮、茯苓粉碎,过120目筛备用,用75%酒精将药物粉末调匀用模具制作药饼,直径1cm、厚0.3cm;假药饼原料采用面粉,制作方法与药饼相同。

2.1.4 施灸方法 施灸前将动物穴位处皮毛剪去,将其固定于兔台。将清艾条折断,取出艾绒,制成大小相等,底径0.8cm、高0.5cm的圆锥形艾柱,置于药饼和假药饼上,以线香点燃,燃尽更换,每穴连灸3壮,隔日灸,共灸10次;将3壮艾柱量的艾绒制作成小艾条,置于自制艾灸架在穴位施灸。隔日灸,共灸10次。

2.2 样品采集及处理

治疗结束次日,耳缘静脉麻醉,解剖取出脾脏,称取脾脏质量。取中段脾脏0.5g左右放入试管,剪碎,按照每克组织加入9mL PBS溶解,放入匀浆机中匀浆,离心20min,2500r/min,收集上清液备用。

2.3 指标观察

脾脏指数=脾脏质量(g)/兔子体质量(kg)×10。

采用ELISA法检测脾脏匀浆上清液中IFN- γ 、IL-2、IL-4的含量。

2.4 数据处理

全部数据由统计人员采用SAS8.2统计软件进行专业分析。实验数据均以均数“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,采用单因素方差分析(one way-ANOVA)并进行组间比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同灸法对脾脏指数的影响

与空白组比较,模型组脾脏指数显著升高,差异具有显著的统计学意义($P<0.01$),隔药饼组、艾灸组和假药饼组差异无统计学意义($P>0.05$)。与模型组比较,空白组、隔药饼组、艾灸组和假药饼组差异有显著统计学意义($P<0.01$)。说明不同灸法对脾脏指数的改变均有调节作用。见表1。

表1 不同灸法对免疫抑制兔脾脏指数的影响 ($\bar{x}\pm s$,mg/g)

组别	n	脾脏指数
空白组	10	4.13±1.10**
模型组	10	5.60±1.50◆◆
隔药饼组	10	3.79±1.04**
艾灸组	10	3.74±1.06**
假药饼组	10	3.59±1.04**
F值		5.03
P值		<0.01

注:与空白组比较◆◆ $P<0.01$;与模型组比较** $P<0.01$ 。

3.2 不同灸法对细胞因子的影响

与空白组比较,艾灸组 IFN- γ 、IL-4 明显降低,模型组、假药饼组 IL-4 明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);IL-2 差异无统计学意义($P>0.05$)。与模型组比较,隔药饼灸组 IL-4 显著升高,艾灸组 IFN- γ 降低明显,差异具有统计学意义($P<0.05$)。表明隔药饼灸对免疫因子 IL-4 的良性调整作用。见表 2。

表 2 不同灸法对免疫抑制兔 IFN- γ 、IL-2、IL-4 的影响

(x \pm s,mg/L)				
组别	n	IFN- γ	IL-2	IL-4
空白组	10	1 092.95 \pm 231.61*	5.93 \pm 1.12	121.61 \pm 18.88*
模型组	10	874.20 \pm 79.32	4.93 \pm 0.70	105.21 \pm 14.30*
隔药饼组	10	986.75 \pm 134.11	5.22 \pm 0.63	120.95 \pm 11.91*
艾灸组	10	800.45 \pm 303.81**	5.30 \pm 1.39	103.16 \pm 13.67*
假药饼组	10	990.50 \pm 161.61	5.66 \pm 0.74	105.66 \pm 17.65*
F 值		3.28	1.65	3.48
P 值		< 0.05	> 0.05	< 0.05

注:与空白组比较 ◆ $P<0.05$;与模型组比较 * $P<0.05$ 。

4 讨论

脾脏是机体最大的免疫器官,占全身淋巴组织总量的 25%,含有大量的 B 淋巴细胞、T 淋巴细胞和巨噬细胞,是免疫细胞居住和产生应答的重要场所。脾脏还具有合成和分泌细胞因子、补体等作用,因此脾脏指数的高低能够较为客观地反应机体的免疫能力。细胞因子主要由免疫细胞合成、分泌的一类具有广泛生物学活性的小分子蛋白质。白细胞介素、干扰素是重要的细胞因子,主要参与机体免疫应答、免疫细胞分化发育等。INF- γ 即 II 型干扰素,主要由活化的 T 细胞和 NK 细胞产生,具有广泛的生物学活性。INF- γ 具有激活巨噬细胞并促进其功能和激活中性粒细胞功能和 NK 细胞杀伤力等作用。IL-2 主要由 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞产生,NK 细胞和转化的 B 细胞亦可产生。IL-2 具有多种生物学作用,最早被称为 T 细胞生长因子,是引起 T 细胞增殖的主要细胞因子;IL-2 还可刺激 NK 细胞的生长和增强他们的杀伤能力,并激发 B 细胞生长及产生抗体;IL-2 在体内是参与免疫应答的重要细胞因子,并参与炎症反应。IL-4 主要由 Th2 细胞产生,可刺激活化 B 细胞和 T 细胞增殖、CD4⁺T 细胞分化成 II 型辅助 T 细胞,它也在调节体液免疫和适应性免疫中起关键作用,诱导 B 细胞抗体类别转换向 IgE,上调第二

型主要组织相容性复合体的产生。在机体免疫调节方面,INF- γ 、IL-2、IL-4 起着重要的生物学作用。

有实验研究表明,环磷酰胺能够造成脾脏和胸腺明显萎缩,进而降低脾脏指数和胸腺指数,还可以降低 IL-2、IL-4、TNF- α 和 INF- γ 等细胞因子,使机体体液免疫和细胞免疫功能下降^[2]。但也有实验研究表明,环磷酰胺可使脾脏指数显著升高,并抑制正常小鼠 DTH 程度、NK 细胞活性及细胞因子 IL-2、IL-4、IL-10、INF- γ 分泌水平^[3]。环磷酰胺的免疫抑制作用,随着时间的推移,其免疫抑制作用慢慢消失,脾脏指数出现代偿性增高^[4-5]。本实验研究中,环磷酰胺造模结束后,脾脏代偿性增大,模型组脾脏指数明显高于空白组,隔药饼组、艾灸组和假药饼组脾脏指数降低明显,接近空白组,表明三种治疗方法均可拮抗环磷酰胺免疫抑制作用,减少环磷酰胺的毒性作用,使脾脏指数在较短的时间内恢复到正常水平。

神阙穴可温通阳气、回阳救逆,关元穴为元阴元阳之气闭藏之门户,灸关元可壮元阳、补肾精、益骨髓;足阳明胃经之合穴为足三里,根据《内经》“合治内腑”的理论,凡六腑之病皆可用之,具有调理脾胃、补中益气、通经活络、扶正祛邪的作用;脾俞、肾俞均为背俞穴,是脾脏和肾脏气血汇聚之地,长灸之可健脾益气、滋阴补肾。实验研究表明,艾灸肾俞、足三里等穴可以提高环磷酰胺导致的小鼠免疫功能损伤和脾脏指数降低,对小鼠脾脏起到修复和保护作用^[6]。艾灸肝俞、脾俞、肾俞能增强脾淋巴细胞增殖转化能力、增加血清 IL-2 和 TNF- α 含量,改善机体免疫功能^[7]。实验观察表明,灸肾俞穴能提高正常及免疫功能低下小鼠胸腺、脾脏指数及 IL-1、IL-2 的含量,增强和调节免疫功能的作用^[8]。逆针灸关元可调节脾脏组织细胞 HSP 70 及其基因的表达,调节血清免疫因子 IL-2、TNF- α 的含量,对调整更年期免疫功能紊乱具有一定作用^[9]。

六味地黄丸为滋补肾阴的经典名方,能促进胸腺细胞增殖及抑制脾细胞凋亡,提高机体的免疫功能^[10]。六味地黄汤能多途径增强氢化可的松所致免疫功能低下小鼠免疫功能^[11],对佐剂性关节炎大鼠脾细胞 IFN- γ 、IL-4 和 IL-10mRNA 的表达具有明显促进作用,对 IL-2mRNA 的表达具有显著抑制作用,对佐剂性关节炎大鼠脾脏表达的细胞因子水平

有调节作用,发挥纠正机体平衡紊乱的作用^[12],并可抑制烫伤后大鼠腹腔巨噬细胞 TN F 分泌和降低血清 IL-6 水平,对烫伤引起的大鼠腹腔巨噬细胞吞噬活性、脾脏淋巴细胞转化增殖、分泌 IL-2、NK 细胞活性抑制有不同程度的拮抗作用,从而调节机体免疫功能^[13]。

隔药饼灸是临床常用灸法之一,是将中药与艾灸有机结合的一种方法,具有艾灸、药物、腧穴三重效应,通过艾灸的温热作用促进皮肤对滋阴补肾药物的吸收,经经络传输从而发挥药物归经之效能。我们十余年的临床研究结果充分表明隔药饼灸对机体免疫功能的良好调节作用^[14-16]。

本实验结果表明,造模后 IFN- γ 含量低于空白组, IL-4 含量明显低于空白组 ($P < 0.05$),表明动物免疫功能受到抑制。隔药饼灸神阙、关元、足三里(双)、脾俞(双)、肾俞(双)后,免疫抑制兔脾脏组织中 IFN- γ 、IL-4 含量明显回升,与空白组比较差异不明显,免疫抑制兔脾脏指数恢复到接近正常水平,表明隔药饼灸可调节 IFN- γ 、IL-4 含量,提高免疫抑制兔的免疫功能。艾灸组和假药饼灸组 IL-4 含量与模型组比较无明显差异,与空白组差异显著,说明艾灸组、假药饼灸治疗效果不佳。然而不同灸法对 IL-2 含量无明显影响,同时,艾灸组 IFN- γ 含量明显低于模型组,出现这一结果是否与艾灸量有关?或是样本含量不够大?值得我们在下一步的研究中深入探讨。

参考文献:

[1] 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.

- [2] 费东亮,王宏军,苏禹刚,等.南五味子多糖对环磷酰胺所致免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J].饲料研究,2014,38(15):89-91.
- [3] 颜爱,李波,李润成,等.香菇多糖和黄芪多糖对免疫抑制小鼠免疫功能调节的研究[J].中国免疫学杂志,2012,28(11):999-1001.
- [4] 张俊,Yong-Seong Shin,胡安君,等.环磷酰胺致大鼠免疫抑制和免疫亢进模型的建立与评价[J].中国实验动物学报,2015,23(4):395-400.
- [5] 王彩英,邢善田,周金黄.环磷酰胺对小鼠 B、T 淋巴细胞及巨噬细胞活力的影响[J].重庆医药,1984,13(1):56-59.
- [6] 王延超,于冬冬,滕迎春,等.针灸对 CTX 化疗荷瘤小鼠脾脏指数影响的研究[J].辽宁中医杂志,2015,42(9):1794-1795.
- [7] 曾进,黄瑾,吕明庄.艾灸对慢性疲劳大鼠免疫功能的影响[J].针灸临床杂志,2011,27(9):56-59.
- [8] 唐照亮,余新欣,陈全珠,等.6-羟多巴胺化学损毁小鼠外周交感神经对艾灸免疫调节作用的影响[J].针刺研究,2001,26(4):299-302.
- [9] 李晓泓,王洪彬,徐莉莉,等.逆时针“关元”穴对更年期大鼠脾脏热休克蛋白 70 及其 mRNA 表达和血清白介素-2、肿瘤坏死因子- α 含量的影响[J].针刺研究,2009,34(2):83-88.
- [10] 吴军,赵凤鸣,王明艳,等.四君子汤、六味地黄汤对环磷酰胺致小鼠免疫抑制的拮抗作用实验研究[J].四川中医,2007,25(10):12-14.
- [11] 徐瑶,杨解人,卞国武.六味地黄汤对氢化可的松模型小鼠的免疫调节作用[J].现代中西医结合杂志,2000,9(13):1204-1206.
- [12] 方鉴,张永祥,茹祥斌,等.六味地黄汤对佐剂性关节炎大鼠脾脏细胞表达细胞因子的影响[J].中国中药杂志,2001,26(2):56-59.
- [13] 徐瑶,卞国武,吴敏毓,等.六味地黄汤对大鼠烫伤后免疫功能的影响[J].中国实验方剂学杂志,2000,6(2):31-34.
- [14] 田岳凤,靳聪妮,李雷勇,等.隔药饼灸对红细胞免疫黏附活性的影响[J].中医临床杂志,2007,19(6):598-599.
- [15] 郭孟琦,田岳凤,袁叶,等.隔药饼灸对不同年龄机体 IgA、IgG、IgM 及补体 C3 的影响[J].山西中医学院学报,2013,14(3):26-27.
- [16] 阳仁达,郑秋菊,谭静,等.隔药饼灸对慢性支气管炎模型大型血清 IgG、IgA 水平的影响[J].湖南中医药大学学报,2013,33(5):37-40.

(本文编辑 匡静之)