

蜂巢结合针刺对变应性鼻炎模型大鼠的治疗作用研究

秦良卿¹, 马玉奎², 薛云², 刘兆华³

(1. 山东省临朐县人民医院, 山东 临朐 262600; 2. 山东省药学科学院, 济南 250100; 3. 山东大学药学院, 济南 250012)

【摘要】 目的 探讨蜂巢结合针刺对 AR 大鼠的治疗作用及其机制。**方法** 采用卵白蛋白制备变应性鼻炎 (AR) 大鼠模型, 给予蜂巢结合针刺治疗 10d 后, 以行为学观察评分、血清中组胺、IgE、IFN- γ 、IL-4 含量、鼻腔分泌物量、鼻粘膜中嗜酸细胞和肥大细胞数以及胸腺和脾脏系数为考察指标, 同时采用丙酸氟替卡松鼻喷雾剂为阳性对照, 全面考察蜂巢结合针刺对 AR 大鼠的治疗作用及其机制。**结果** 与模型组比较, 蜂巢结合针刺治疗后大鼠行为学评分降低; 血清中组胺、IgE、IL-4 含量、鼻腔分泌物量、鼻粘膜中嗜酸细胞和肥大细胞数量显著减少; 血清中 IFN- γ 含量增多; 胸腺系数升高, 脾脏系数明显降低。**结论** 蜂巢结合针刺对 AR 模型大鼠具有明显的治疗作用。

【关键词】 针刺; 蜂巢; 变应性鼻炎; 大鼠

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 05-0058-05

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2016. 005. 009

Effects of acupuncture combined with honeycomb on allergic rhinitis rat model

QIN Liang-qing¹, MA Yu-kui², XUE Yun², LIU Zhao-hua³

(1. People's Hospital of Linqu County, Shandong Linqu 262600, China; 2. Shandong Pharmaceutical Academy, Jinan 250100, China; 3. School of pharmaceutical sciences Shandong university, Jinan 250012, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects and mechanism of acupuncture combined with honeycomb on allergic rhinitis (AR) rat model. **Methods** AR rat model was induced by ovalbumin (OVA). AR rats were treated with acupuncture combined with honeycomb for ten days. Fluticasone propionate nasal spray was selected as positive control in the text. Behavior analysis were observed and the content of histamine, IgE, IFN- γ and IL-4 in serum, the weight of nasal drainage and the number of eosinophils and mast cells, the index of spleen and thymus were detected to evaluate the effects of acupuncture combined with honeycomb on AR rats. **Results** Compared with model group, acupuncture combined with honeycomb treatment groups displayed markedly lower behavior scores, histamine, IgE and IFN- γ in serum, the weight of nasal drainage and the number of eosinophils and mast cells, the index of spleen as well as higher IL-4 in serum and index of thymus. **Conclusion** Acupuncture combined with honeycomb displayed significant effects on AR rat model.

【Key words】 Acupuncture; Honeycomb; Allergic rhinitis; Rat

变应性鼻炎 (allergic rhinitis, AR) 即过敏性鼻炎, 是耳鼻喉科常见病和多发病, 属于 IgE 介导的 I 型变态反应性疾病, 临床的主要表现为阵发性喷

嚏、鼻塞、鼻痒、分泌大量清水样鼻涕等^[1]。长期以来, 医学界对变应性鼻炎的临床治疗一直停留在快速解除症状上, 使用 H₁ 受体拮抗剂或糖皮质激素

【基金项目】 山东省自然科学基金项目 (2012HM056)。

【作者简介】 秦良卿 (1973 -), 男, 主治医师, 本科, 研究方向: 耳鼻喉疾病研究。

【通讯作者】 马玉奎 (1975 -), 男, 副主任药师, 博士, 研究方向: 新药药理毒理评价。E-mail: yukuima@sina.com。

等抗过敏药物,但这些治疗措施一方面只能暂时性缓解鼻炎症状,另一方面也存在诸多不良反应。蜂巢即蜜蜂房或蜜蜂巢脾,具有抗炎、免疫调节、抑制细菌、镇痛和抗肿瘤等作用。我国民间积累了蜂巢治疗鼻炎的丰富经验,可以有效地预防和缓解变应性鼻炎的症状^[2]。同样针灸作为一种中医治疗方法已经在变应性鼻炎中得到应用,并取得了一定的疗效^[3]。但蜂巢或针灸单用疗效均有限,且以往的研究多为临床的总结,缺乏实验观察及机制研究。本文采用变应性大鼠鼻炎模型,研究了蜂巢结合针刺的治疗作用,并初步探讨了其作用机制,为临床推广应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物及饲养环境 SPF 级 SD 大鼠 40 只,雌雄各半,体重 180 ~ 220 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK(京)2012-0001】。饲养于 SPF 级动物房,相对湿度 40% ~ 70%,室温 20 ~ 26℃。实验动物使用许可证号【SYXK(鲁)2014-0008】。

1.1.2 药品与试剂 蜂巢(济南养蜂堂蜂产品有限公司提供, -18℃ 冷冻后粉碎,过 20 目筛,加入 6 倍体积水后 98℃ 水浴三次,每次 1 h,过滤除蜡,浓缩备用);丙酸氟替卡松鼻喷雾剂(葛兰素史克制药集团提供,批号: H20140117);大鼠组胺、IgE、IL-4、IFN- γ 试剂盒(上海森雄科技实业有限公司提供);卵白蛋白(北京索莱宝有限公司提供,批号: 326A052);氢氧化铝(国药集团化学试剂有限公司提供,批号: 20120907)。

1.1.3 仪器 HC-3018R 型高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司制造);Spectra Max I3 多功能读板机(美国 MD 公司制造);ST-96W 全自动洗板机(北京誉朗诺科技有限公司制造);微量加样器(美国艾本德公司制造);一次性针灸针(环球牌, 0.18 mm × 13 mm)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠变应性鼻炎模型的建立^[4]

每只大鼠腹腔注射抗原佐剂混悬液 1 mL(含卵白蛋白 0.3 mg,氢氧化铝 30 mg)进行致敏,隔日 1 次,共 7 次。末次致敏后第 2 天进行激发,每只大鼠给予 5% 卵白蛋白生理盐水溶液滴鼻(50 μ L/侧),同时超声雾化吸入 1% 卵白蛋白溶液 5 min,每天 1

次,连续 7 d。正常组大鼠以相同的操作方法于相同的时间给予等容积的生理盐水。

1.2.2 行为学观察评分^[5]

末次激发后采用症状评分判断大鼠是否造模成功,给药结束评分判断干预效果。记分方法为喷嚏:1 ~ 3 个为 1 分,4 ~ 10 个为 2 分, ≥ 11 个为 3 分;鼻痒:轻度瘙痒 1 ~ 2 次为 1 分,剧烈瘙痒抓鼻四周为 2 分;流涕:流至鼻孔为 1 分,超出前鼻孔为 2 分,涕流满面为 3 分。叠加总分 5 分以上为造模成功。

1.2.3 动物分组及给药

选取造模成功大鼠 30 只,按行为学观察评分均衡地分为 3 组,分别为模型组、丙酸氟替卡松鼻喷雾剂阳性对照组和蜂巢结合针刺组。阳性对照组给予丙酸氟替卡松鼻喷雾剂,每只鼻孔每次喷入约 50 μ g,每日 1 次,连续 10 d;蜂巢结合针刺组每日灌胃给予蜂巢水提溶液 1 mL/100g,每次灌胃后针刺迎香、肺俞、合谷和足三里,针刺深度约为 1 cm,针柄接脉冲电疗仪,采用疏密波,频率 2 ~ 100 Hz,电流强度 1 ~ 2 mA,每次 10 min,每日 1 次,连续 10 d^[6]。另取 10 只正常大鼠为正常组,正常组和模型组不进行任何干预。

1.2.4 大鼠血清中组胺、IgE、IFN- γ 、IL-4 含量测定

实验结束后腹主动脉采血,分离血清,按照试剂盒说明应用双抗体夹心法(ELISA 法)测定标本中组胺、IgE、IFN- γ 、IL-4 含量。用纯化的大鼠相应抗体包被微孔板,制成固相抗体,向包被单抗的微孔中依次加组胺、IgE、IFN- γ 、IL-4,再与 HRP 标记的相应抗体结合,形成抗体-抗原-酶标抗体复合物,洗涤后加底物 TMB 显色。HRP 酶可催化 TMB 转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色,样品中的待测成分含量决定了颜色的深浅。用酶标仪在 450 nm 波长下测定样本的 OD 值,通过标准曲线计算组胺、IgE、IFN- γ 、IL-4 的浓度。

1.2.5 大鼠鼻腔分泌物、嗜酸细胞及肥大细胞数测定

将滤纸剪成 2 cm × 0.2 cm 的形状,末次给药后反复吸取鼻腔内液体,采用减重法记录鼻腔分泌物重量。将大鼠 1% 戊巴比妥钠麻醉后采血测试 1.2.4 项下指标,处死后沿鼻中线剪开鼻腔,暴露鼻中隔及两侧鼻腔,将鼻中隔中段剪下,剥离双侧粘膜固定于甲醛溶液中。一侧 HE 染色后在高倍光学显微镜下计算任意 10 个视野中嗜酸细胞(EOS)数;另一侧甲苯胺蓝染色,同法计数肥大细胞数。

1.2.6 大鼠胸腺和脾脏系数测定

实验结束后取大鼠胸腺和脾脏称重,计算脏器系数(脏器系数 = 脏器重量/体重 $\times 100$,单位为 g/100 g 体重)。

1.2.7 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件,各组数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 蜂巢结合针刺对 AR 大鼠行为学影响

末次激发后,30 只造模大鼠症状评分均大于 5 分,说明造模成功。与模型组比较,给予蜂巢结合针刺后大鼠的行为学评分明显减轻,与模型组比较有显著性差异($P < 0.01$),丙酸氟替卡松鼻喷雾剂组大鼠行为学评分亦有明显减轻,与蜂巢结合针刺组比较无显著性差异($P > 0.05$),说明蜂巢结合针刺疗效与丙酸氟替卡松鼻喷雾剂相当(图 1)。

2.2 蜂巢结合针刺对 AR 大鼠血清中组胺、IgE、IFN- γ 、IL-4 含量的影响

与模型组比较,给予蜂巢结合针刺或丙酸氟替卡松鼻喷雾剂后大鼠血清中组胺、IgE 和 IL-4 含量明显减少,IFN- γ 含量明显增多,与模型组比较均有显著性差异($P < 0.01$);蜂巢结合针刺组与丙酸氟

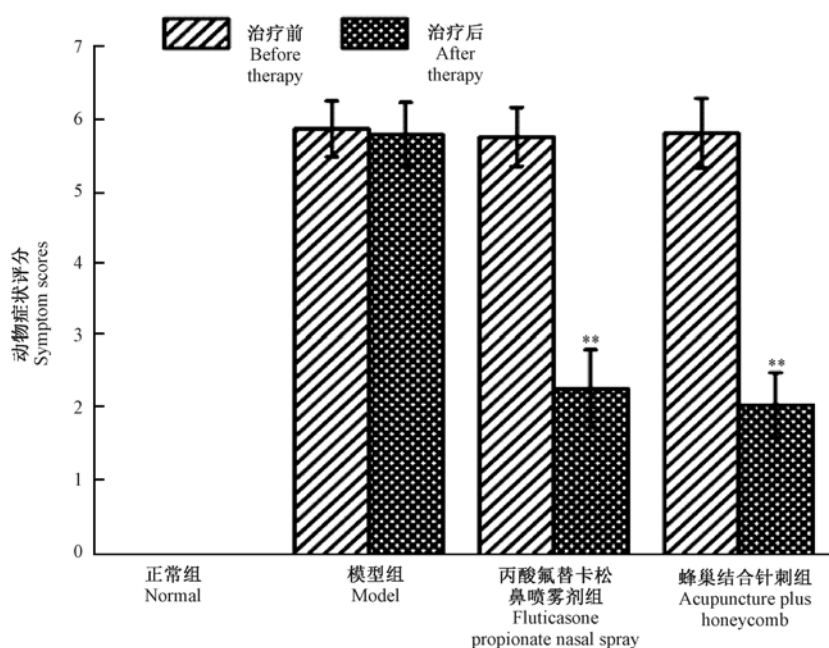
替卡松鼻喷雾剂组比较,以上指标无显著性差异($P > 0.05$)。以上结果说明蜂巢结合针刺和丙酸氟替卡松鼻喷雾剂对变应性鼻炎均有较好的治疗效果,两者效果相当(表 2)。

2.3 蜂巢结合针刺对 AR 大鼠鼻腔分泌物、嗜酸细胞及肥大细胞数的影响

与正常组比较,模型组大鼠鼻腔分泌物和鼻粘膜中嗜酸细胞及肥大细胞数显著增多($P < 0.01$)。与模型组比较,给予蜂巢结合针刺后大鼠鼻腔分泌物和鼻粘膜中嗜酸细胞及肥大细胞数均明显减少($P < 0.01$);丙酸氟替卡松鼻喷雾剂组大鼠以上指标亦显著减少($P < 0.01$),但与蜂巢结合针刺组比较无显著性差异($P > 0.05$),说明蜂巢结合针刺疗效与丙酸氟替卡松鼻喷雾剂相当(图 3)。

2.4 蜂巢结合针刺对 AR 大鼠胸腺和脾脏系数的影响

与正常组比较,模型组大鼠胸腺系数明显降低,而脾脏系数明显升高($P < 0.05$),提示卵白蛋白致敏可降低大鼠胸腺系数和升高脾脏系数;与模型组比较,给予蜂巢结合针刺后大鼠胸腺系数明显升高,脾脏系数明显降低($P < 0.05$);其升高胸腺系数和降低脾脏系数程度与丙酸氟替卡松鼻喷雾剂组基本一致,无统计学差异($P > 0.05$)(图 4)。

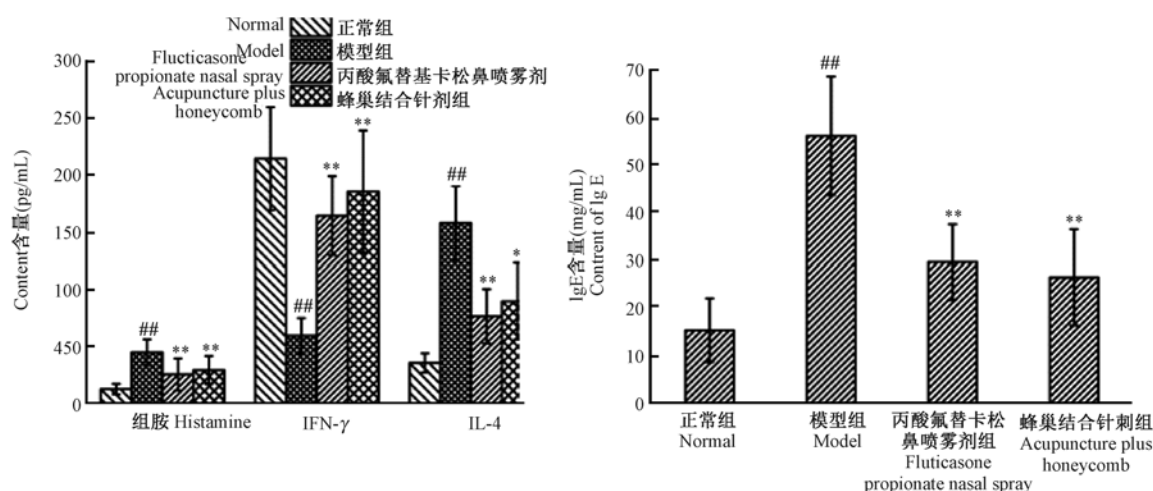


注: ** $P < 0.01$, vs 模型组。

图 1 蜂巢结合针刺对 AR 大鼠行为学的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Note: ** $P < 0.01$, vs model group.

Fig. 1 The effects of acupuncture combined with honeycomb on behavior of AR rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

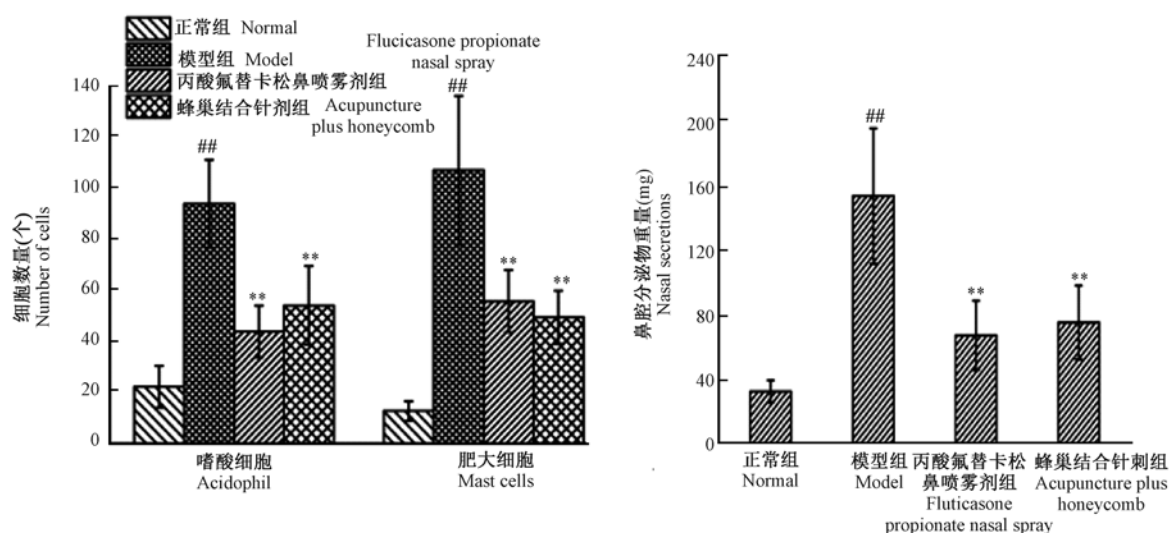


注: ** $P < 0.01$, vs 模型组; ## $P < 0.01$, vs 正常组。

图2 蜂巢结合针刺对 AR 大鼠血清中组胺、IgE、IFN- γ 、IL-4 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Note: ** $P < 0.01$, vs model group; ## $P < 0.01$, vs normal group.

Fig. 2 The effects of acupuncture combined with honeycomb on the content of histamine, IgE, IFN- γ and IL-4 in serum of AR rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)



注: ** $P < 0.01$, vs 模型组; ## $P < 0.01$, vs 正常组。

图3 蜂巢结合针刺对 AR 大鼠鼻腔分泌物、嗜酸细胞及肥大细胞数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

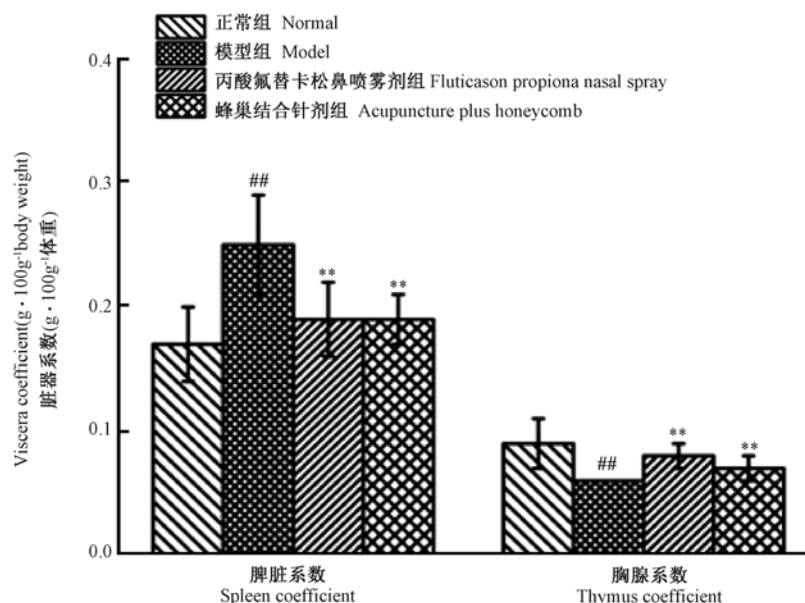
Note: ** $P < 0.01$, vs model group; ## $P < 0.01$, vs normal group.

Fig. 3 The effects of acupuncture combined with honeycomb on the weight of nasal secretions and the number of acidophils and mast cells ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3 讨论

变应性鼻炎是以鼻粘膜变应性验证为主要特征,是由多种免疫活性细胞和多种细胞因子共同参与的 IgE 介导的 I 型超敏反应性疾病。在其发病过程中, T 淋巴细胞、嗜酸性粒细胞和肥大细胞作用最为明显。从免疫学的角度看,体内外环境因素作用于机体导致 Th1 和 Th2 细胞因子免疫反应失衡是引起变应性鼻炎发病的关键因素。Th1 细胞主要分泌

IFN- γ , IFN- γ 通过抑制嗜酸性细胞在气道上的浸润在 AR 中起到负性调节作用^[7]。Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-13 和 IL-15 等细胞因子。其中 IL-4 是最重要的特征性细胞因子,可以刺激 B 细胞转化为浆细胞并合成 IgE 抗体, IgE 抗体可特异性与肥大细胞交联,引起肥大细胞脱颗粒,释放组胺等炎性介质,同时大量的嗜酸性粒细胞浸润鼻粘膜,从而引起阵发性喷嚏、鼻塞、鼻痒、分泌大量清水样鼻涕等临床症状^[8]。



注: * $P < 0.05$, vs 模型组; # $P < 0.05$, vs 正常组。

图 4 蜂巢结合针刺对 AR 大鼠胸腺和脾脏系数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Note: * $P < 0.05$, vs model group; # $P < 0.05$, vs normal group.

Fig. 4 The effects of acupuncture combined with honeycomb on the index of spleen and thymus of AR rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

对于过敏性鼻炎的治疗主要以抗组胺药、糖皮质激素、过敏反应介质阻断剂、白三烯受体拮抗剂和免疫调节剂为主,这些药物能够快速缓解 AR 症状,但这些药物尤其是糖皮质激素类具有严重的不良反应,对于化药有禁忌症的患者或慢性期需要长久性治疗的患者,化药并不合适。而传统医学和中医药却可以弥补化药的不足,对于改善过敏体质防止复发具有重要意义。已有研究表明^[2,6],针刺和蜂巢治疗 AR 均具有一定的效果,但两者单用疗效有限,短时间内改善 AR 的疗效不如化学药物,但两者均没有任何不良反应。本文尝试将蜂巢和针刺结合起来,用于治疗 AR,观察是否能起到更好的疗效,是否能够替代化药用于 AR。本实验采用了卵白蛋白制备 AR 大鼠模型,给予蜂巢结合针刺治疗 10 d 后,以行为学观察评分、血清中组胺、IgE、IFN- γ 、IL-4 含量、鼻腔分泌物量、鼻粘膜中嗜酸细胞和肥大细胞数以及胸腺和脾脏系数为考察指标,同时采用丙酸氟替卡松鼻喷雾剂为阳性对照,全面考察蜂巢结合针刺对 AR 大鼠的治疗作用及其机制。实验结果表明,与模型组比较,蜂巢结合针刺治疗后大鼠行为学评分降低;血清中组胺、IgE、IL-4 含量、鼻腔分泌物量、鼻粘膜中嗜酸细胞和肥大细胞数量显著减少;血清中 IFN- γ 含量增多;胸腺系数升高,脾脏系数明显降低。本实验结果充分证明,蜂巢结

合针刺对 AR 具有明显的疗效,其改善程度与丙酸氟替卡松鼻喷雾剂基本一致,临床上完全可以替代糖皮质激素类药物用于 AR 的治疗。

参考文献:

- [1] Zheng T, Yu J, Oh MH, *et al.* The atopic march: progression from atopic dermatitis to allergic rhinitis and asthma[J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2011, 3 (2): 67 - 73.
- [2] 罗岳雄, 赵红霞, 张学锋, 等. 蜂巢提取物改善过敏性鼻炎患者生活质量的研究[J]. *中国蜂业*, 2014, 65(7): 49 - 51.
- [3] 陈益丹, 金肖青, 俞迈红, 等. 针刺治疗中重度变应性鼻炎疗效观察[J]. *中国针灸*, 2015, 35(4): 339 - 341.
- [4] 吴春晓, 陈莹, 陈静, 等. 针刺对变应性鼻炎模型大鼠的治疗作用及其机理研究[J]. *江苏中医药*, 2013, 45 (12): 69 - 71.
- [5] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会, 中华医学会耳鼻咽喉科分会. 变应性鼻炎的诊疗原则和推荐方案(2004 年兰州). *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*[J]. 2005, 40(3): 166.
- [6] 赵义造, 黄益灯, 黄加云, 等. 电针对变应性鼻炎大鼠模型 IL-4 及 IFN- γ 表达的影响[J]. *浙江中医杂志*, 2010, 45 (12): 916 - 918.
- [7] 潘刚强, 袁岳沙, 陈杰, 等. Th1/Th2 细胞因子在过敏性鼻炎患者表达水平研究[J]. *检验医学与临床*, 2010, 7(22): 2472 - 2473.
- [8] Diamant Z, Boot JD, Mantzouranis E, *et al.* Biomarkers in asthma and allergic rhinitis[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2011, 23 (60): 468 - 481.

[修回日期]2016-02-01