

壮医针挑疗法对哮喘模型小鼠 TSLP、OX40L 及 Th2 优势分化应答的影响^①

李克明,唐汉庆^②,王有科,程初勇,王露瑶,梁凌玲,郑建宇

(右江民族医学院,广西 百色 533000 E-mail:4895235@qq.com)

摘要:目的 探讨壮医针挑疗法对哮喘模型小鼠胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)、协同刺激分子配体(OX40L)及辅助性 T 细胞 2(Th2)优势分化的影响和作用机制。**方法** 将 50 只 6~8 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠分为对照组、模型组、针挑组、沙丁胺醇阳性对照组(阳性组)、假针挑组(假针组)5 组($n=10$)。应用卵清蛋白致敏及激发对模型组、针挑组、阳性组、假针组进行造模。针挑组在模型基础上应用壮医针挑疗法干预。干预 1 个周期后检测 OX40LmRNA 表达水平,血清 IL-4、IL-5、IL-10、IL-13、IL-12 水平以及 TSLP 表达。**结果** 和对照组比较,模型组的 TSLP 蛋白、OX40LmRNA 表达及 IL-4、IL-5、IL-10、IL-13 水平均升高而 IL-12 水平下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$);和模型组比较,针挑组的 TSLP 蛋白、OX40LmRNA 表达及 IL-4、IL-5、IL-10、IL-13 水平均降低而 IL-12 水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 壮医针挑疗法能够降低 TSLP 蛋白和 OX40LmRNA 的过度表达、抑制 Th2 优势分化,减轻哮喘的炎症反应,推测这是壮医针挑疗法临床治疗哮喘的起效环节之一。

关键词: 壮医;针挑;哮喘;机制

中图分类号: R29 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2017)03-0176-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2017.03.004

Effects of needle-pricking therapy of Zhuang medicine on TSLP, OX40L and Th2-dominated differentiation immune response in mouse models of asthma

Li Keming, Tang Hanqing, Wang Youke, Cheng Chuyong,
Wang Luyao, Liang Lingling, Zheng Jianyu

(Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China
E-mail: 4895235@qq.com)

Abstract: **Objective** To explore the changes of thymic stromal lymphopoietin (TSLP), costimulatory molecules ligand(OX40L) and T helper cell 2 (Th2)-dominated differentiation in mouse models of asthma after the treatment with needle-pricking of Zhuang medicine and to discuss its therapeutic mechanisms. **Methods** Fifty BALB/c mice aged from six to eight weeks old with SPF grade were randomly divided into five groups: a control group, a model group, and a needle-pricking group, salbutamol positive group and sham needle-pricking group with ten mice in each group. The mouse models of asthma of the model group, of the needle-pricking group, of the positive group and of the sham needle-pricking group were established by ovalbumin (OVA) sensitization and stimulating. The needle-pricking group was added with needle-pricking treatment. After a therapeutic course was finished, the expression of OX40L mRNA was detected by RT-PCR, the levels of serum IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 and IL-12 were measured by ELISA, and the expression of TSLP protein was measured by Western blot. **Results** Compared with the control group, in the model group both the expressions of TSLP protein and OX40L mRNA and the levels of serum IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13 increased significantly while the level of serum IL-12 reduced ($P<0.05$ or $P<0.01$). The expressions of TSLP protein and OX40LmRNA and the levels of serum IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13 reduced significantly while the level of serum IL-12 increased in the needle-pricking group, compared with model group, there were statistically significant differences ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** Needle-pricking therapy of Zhuang medicine can im-

① 基金项目:国家自然科学基金项目(81560809)

② 通信作者,E-mail:phdtanghanqing@163.com

prove symptoms of asthma by reducing the overexpression of TSLP protein and OX40LmRNA and by inhibiting Th2-dominated differentiation, which was supposed to be one of the possible therapeutic mechanisms for asthma.

Key words: Zhuang medicine; needle-pricking; asthma; mechanism

在哮喘炎症反应过程中, T细胞的激活及释放细胞因子是哮喘炎症过程的关键环节, 辅助性 T 细胞 2 (Th2) 及其释放的细胞因子白细胞介素(IL)-4、IL-13 等与炎症反应联系紧密^[1], 胸腺基质淋巴细胞生成素(thymic stromal lymphopoietin, TSLP)与 Th2 细胞优势分化免疫应答密切相关^[2], 协同刺激分子配体(OX40L)在 Th2 细胞优势分化免疫应答中也起着重要作用, TSLP 与 OX40L 的异常表达与哮喘的发生发展密切相关。本研究探讨壮医针挑疗法对 TSLP、OX40L 及相关细胞因子的影响及起效的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 50 只 SPF 级 BALB/c 6~8 周龄小鼠, 体重(24±6)g, 由本院动物实验中心购买并提供, 合格证编号 SCXK(京)2015-0002。

1.1.2 主要试剂和仪器 IL-4、IL-5、IL-10、IL-13、IL-12 ELISA 试剂盒(R&B 公司, USA); 兔抗 TSLP 多克隆抗体、β-actin 多克隆抗体(Sigma, USA); 羊抗兔 IgG(武汉博士德公司); 电泳仪; 酶标仪; PCR 仪; 紫外分光光度仪。

1.2 方法

1.2.1 动物分组处理 小鼠按数字随机法分 5 组, 即空白对照组(对照组)、假针挑组(假针组)、沙丁胺醇阳性对照组(阳性组)、模型组、针挑组, 每组 10 只。应用卵清蛋白致敏及激发对模型组、针挑组、阳性组、假针组进行造模, 该 4 个组第 1 d、4 d、7 d、10 d、13 d, 每天 1 次腹腔注射卵清蛋白混悬液(含氢氧化铝 400 μg 和卵清蛋白 100 μg)基础致敏, 第 14 d 雾化吸入卵清蛋白激发 30 min, 连续 1 周激发。对照组以生理盐水注射和雾化。针挑组第 14 d 起, 激发后 1 h, 取大椎、肺俞、定喘、风门、肾俞、脾俞穴位, 将这些穴位作为针挑点, 应用壮医针挑疗法, 挑出皮下部分纤维组织; 假针组用针按压挑刺点但不挑刺; 阳性组以沙丁胺醇(沙丁胺醇以生理盐水稀释至 0.5% 浓度), 按 10 ml/kg 雾

化吸入, 均是每天 1 次, 7 d 为 1 个疗程, 共进行 1 个疗程干预治疗; 模型组只连续 2 周激发但不做特殊处理; 对照组则以生理盐水雾化吸入。

1.2.2 取材 疗程结束后第 1 d, 收集血清于 -70 °C 保存。取肺组织滤纸吸干, -70 °C 保存, 用于检测肺组织 OX40LmRNA 表达和 TSLP 蛋白表达。

1.2.3 IL-4、IL-5、IL-10、IL-13、IL-12 指标检测 ELISA 法检测。严格按照 ELISA 试剂盒说明书步骤进行操作。

1.2.4 OX40LmRNA 表达检测 RT-PCR 法检测。PCR 扩增反应产物经过凝胶电泳分析系统, 得到目的基因灰度值, 目的基因 mRNA 的相对表达量 = 目的基因灰度值 / β-actin 基因灰度值。

1.2.5 TSLP 蛋白表达检测 采用 Western Blot 法检测。以软件分析条带灰度, 目标蛋白相对表达量 = 目标蛋白条带灰度值 / 内参蛋白灰度值。

1.2.6 统计学方法 全部数据采用 SPSS 17.0 统计软件分析处理, 计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较, 方差齐时采用 *t* 检验, 若方差不齐时采用校正 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-4、IL-5、IL-10、IL-13 及 IL-12 检测结果 和对照组比较, 模型组以及假针组的 IL-4、IL-5、IL-10、IL-13 水平平均升高而 IL-12 水平降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 和模型组比较, 针挑组以及阳性组的 IL-4、IL-5、IL-10、IL-13 水平平均降低而 IL-12 水平升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 1。

2.2 TSLP 蛋白表达和 OX40LmRNA 表达检测结果 和对照组比较, 模型组以及假针组的 TSLP 蛋白表达和 OX40LmRNA 表达升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 和模型组比较, 针挑组以及阳性组的 TSLP 蛋白表达和 OX40LmRNA 表达均降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图 1、图 2。

表 1 各组 IL-4、IL-5、IL-10、IL-13 及 IL-12 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	IL-4	IL-5	IL-10	IL-13	IL-12
对照组	10	16.32±0.78	118.53±21.32	76.33±26.18	98.65±36.55	54.84±23.13
模型组	10	116.35±15.22 ^b	301.27±36.14 ^b	192.12±38.02 ^a	186.15±46.85 ^a	16.25±8.65 ^a
针挑组	10	18.23±1.26 ^d	130.01±28.65 ^d	96.26±33.16 ^c	113.11±31.23 ^c	43.05±18.12 ^c
假针组	10	126.11±14.51 ^b	291.03±30.55 ^b	206.02±40.36 ^a	180.22±40.25 ^a	15.32±8.89 ^a
阳性组	10	26.23±3.68 ^c	136.25±32.11 ^d	86.05±30.23 ^c	120.02±33.68 ^c	48.22±18.92 ^c

注: 与对照组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; 与模型组比较, c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$

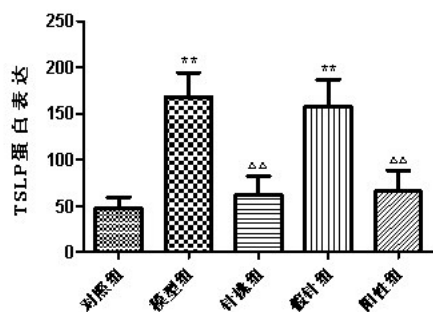


图1 各组 TSLP 蛋白表达比较

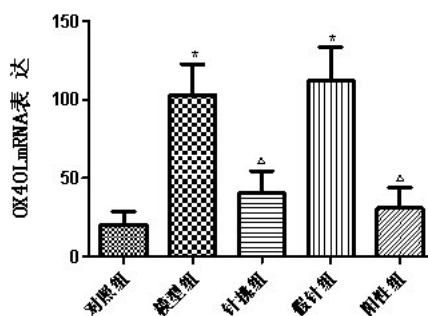
注:与对照组比较,**: $P < 0.01$;与模型组比较,△△: $P < 0.01$ 

图2 各组 OX40L mRNA 表达比较

注:与对照组比较,*: $P < 0.05$;与模型组比较,△: $P < 0.05$

3 讨论

哮喘是以 DC 介导的 Th2 优势分化免疫应答为特征的慢性气道变应性疾病,其中来源于上皮细胞的 TSLP 可以激活人骨髓源性 DC,促进 T 细胞向 Th2 分化及增殖^[3]。TSLP 此种作用的发挥有赖于 OX40L 的介导,OX40L 在外界因素刺激下,促进 T 细胞向 Th2 分化及增殖,刺激 Th2 产生免疫应答^[4],从而引起 Th2 型细胞因子如 IL-4、IL-5、IL-10、IL-13 等水平显著升高,促使哮喘炎症反应。

在本实验工作中观察到,模型组的 TSLP 蛋白表达及 OX40L mRNA 表达均高于对照组,提示 TSLP、OX40L 与哮喘的发病关系紧密,此外,在 Th2 优势分化应答中的最重要细胞因子 IL-4、IL-5、IL-10、IL-13^[5],其水平在模型组中也均升高,而 Th1 型细胞因子 IL-12 水平降低,表明 TSLP 可能通过 OX40L 对 Th2 优势分化应答进行调控。因此,如果能抑制或降低 TSLP 和 OX40L 的过度表达,使之保持在正常状态,可能为哮喘治疗找到新的切入点。

针挑疗法是壮医颇具特色的医技疗法,在壮族地区应用较久,但对于针挑疗法治病的机制研究仍未广泛开展。报道认为针挑疗法的作用机理与疏通经络、促进免疫功能发挥有关,认为效果是值得肯定的^[6-8]。研究^[9]认为针挑疗法对常见病如哮喘或一些症状如头痛、失眠等有较好的治疗或调理作用。中医学认为哮喘和肺、脾、肾关系较密切,肺主气,脾为气机枢纽,肾为气之根。肺俞、肾俞、脾俞三俞穴在气机中的调节作用值得重视,三俞穴相配伍,有调畅气机、扶正固本的作用。大椎、定喘、风门在临床报道中常作为哮喘治疗的经验穴位^[10],肺俞、肾俞、脾俞和大椎、定喘、风门相配,可有增强纳气平喘的作用。

本实验结果表明,针挑组小鼠应用针挑疗法治疗后,和模型组比较,针挑组的 TSLP 蛋白表达和 OX40L mRNA 表达均下降,同时,Th2 型细胞因子 IL-4、IL-5、IL-10、IL-13 水平下降而 Th1 型细胞因子 IL-

12 水平升高,显示针挑疗法能降低 TSLP 和 OX40L 的过度表达,抑制 Th2 优势分化和哮喘炎症反应,可能是壮医针挑疗法起效的一个环节。

参考文献:

- [1] Lee SY, Kim SJ, Kwon SS, et al. Distribution and cytokine production of CD4 and CD8 T-lymphocyte subsets in patients with acute asthma attacks [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2001,86(6):659-664.
- [2] Seshasayee D, Lee WP, Zhou M, et al. In vivo blockade of OX40 ligand inhibits thymic stromal lymphopoietin driven atopic inflammation [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(12):3868-3878.
- [3] Liu YJ. Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation [J]. *J Exp Med*, 2006, 203(2):269-273.
- [4] Vogel KU, Edelmann SL, Jeltsch KM, et al. Roquin paralogs 1 and 2 redundantly repress the Icos and Ox40 costimulator mRNAs and control follicular helper T cell differentiation [J]. *Immunity*, 2013, 38(4):655-668.
- [5] Bellini A, Marini MA, Bianchetti L, et al. Interleukin (IL)-4, IL-13, and IL-17A differentially affect the profibrotic and proinflammatory functions of fibrocytes from asthmatic patients [J]. *Mucosal Immunol*, 2012, 5(2):140-149.
- [6] 黄汉儒. 壮医理论体系概述 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 1996, 2(6):3-7.
- [7] 庞声航, 黄东挺, 王小平, 等. 壮医特色针挑疗法对支气管哮喘患者肺功能影响的研究 [J]. *广西中医药*, 2008, 31(6):53-55.
- [8] 王小平, 蒋桂江, 黄东挺, 等. 壮医针挑治疗哮喘 120 例 [J]. *辽宁中医杂志*, 2011, 38(5):965-967.
- [9] 林辰, 蒋桂江, 陈攀, 等. 壮医针刺研究的新进展 [J]. *中国民族医药杂志*, 2011(5):65-67.
- [10] 刘硕. 针刺治疗支气管哮喘的进展 [J]. *中国现代药物应用*, 2011, 5(16):126-127.

收稿日期:2017-04-12;修回日期:2017-06-12