

· 基础研究 ·

自血穴注对二硝基氯苯诱导小鼠特异性
皮炎免疫炎症的影响黄晋权¹ 曾智文¹ 陈永^{1,2} 张东淑¹

摘要 目的 观察自血穴注对 2, 4-二硝基氯苯 (DNCB) 诱导 Balb/c 小鼠特异性皮炎 (AD) 免疫炎症的影响, 探讨其抗炎与免疫调节效应机制。方法 将 30 只 Balb/c 雌性小鼠随机分为正常组 (A 组)、模型组 (B 组)、自血穴注组 (C 组)、自血臀肌注射组 (D 组)、地塞米松组 (E 组), 除 A 组外, 其余各组均采用 0.5% DNCB 诱导 AD 模型, 造模第 3 周开始, C 组采用自体全血注射双侧足三里 (ST36)、曲池 (LI11), 每穴 0.05 mL, D 组自体全血 0.2 mL 注射双侧臀肌 (尾根部 1 cm 非穴点), E 组腹腔注射地塞米松 (1.5 mg/kg), 每周 3 次, 连续 3 周。采用 HE、甲苯胺蓝染色观察皮损组织病理学与肥大细胞计数, 采用 ELISA 法检测血清免疫球蛋白 E (IgE)、 γ -干扰素 (IFN- γ)、IL-4 水平, 实时定量 PCR 检测皮损组织 IFN- γ 、IL-4、IL-33 mRNA 表达。结果 与 B 组比较, C 组可降低 AD 小鼠皮损评分, 减轻皮损组织炎症细胞浸润, 抑制表皮过度增生与降低肥大细胞数量 ($P < 0.01$), 降低血清 IgE、IL-4、IFN- γ 水平与皮损组织 IL-4、IFN- γ 、IL-33 mRNA 表达 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。D 组干预后除肥大细胞数量与模型组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 其余与 C 组疗效相当。结论 自血穴注可改善 DNCB 诱导 Balb/c 小鼠 AD 皮损症状, 其机制可能与降低肥大细胞数量与下调血清 IgE 水平、抑制炎症细胞因子表达和 IL-33 信号激活有关。

关键词 自血穴注; 特异性皮炎; 免疫炎症; 免疫球蛋白 E; 白细胞介素 -33

Effect of Acupoint Autohemotherapy on DNCB-induced Atopic Dermatitis-like Symptoms in Balb/c Mice HUANG Jin-quan¹, ZENG Zhi-wen¹, CHEN Yong^{1, 2}, and ZHANG Dong-shu¹ 1 Department of Acupuncture and Moxibustion, TCM College, Southern Medical University, Guangzhou (510515); 2 Department of Rheumatology and Immunology, Shenzhen People's Hospital Affiliated to Jinan University, Shenzhen (518020)

ABSTRACT Objective To observe the effect of acupoint autohemotherapy on 2, 4-dinitrochlorobenzene (DNCB) -induced atopic dermatitis (AD) -like symptoms in Balb/c mice and to study its mechanisms of anti-inflammation and immunomodulation. **Methods** Thirty Balb/c mice were randomly divided into five groups, i.e., normal, model, acupoint autohemotherapy, non-acupoint autohemotherapy, and Dexamethasone (DXM) groups. Except mice in the normal group, 0.5% DNCB was applied on the shaved dorsal skin to induce AD model. From the 3rd week, mice in the acupoint autohemotherapy group were injected with autologous whole blood (0.05 mL per point) at Zusanli (ST36) and Quchi (LI11). Mice in the non-acupoint autohemotherapy group were injected with 0.2 mL autologous whole blood into bilateral gluteus muscle (nonacupoints located 1 cm distal to tail base). Mice in DXM group were intraperitoneal injected with DXM (1.5 mg/kg). All the operations were performed three times per week for 3 successive weeks. Histopathological changes of lesional skin tissue and mast cells (MCs) were observed by HE staining and toluidine blue staining. ELISA was used to detect the levels of IgE, IFN- γ , and

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No.81774390); 广东省中医药管理局面上项目 (No.20201022); 广东省中医药管理局面上项目 (No.20211258)

作者单位: 1. 南方医科大学中医药学院 (广州 510515); 2. 暨南大学附属深圳市人民医院风湿免疫科 (广东 518020)

通讯作者: 张东淑, Tel: 020-61647120, E-mail: nyzds@sina.com

DOI: 10.7661/cjim.20211021.367

IL-4. mRNA expression levels of IL-4, IFN- γ , and IL-33 were detected by real-time fluorescent quantitative (PCR).

Results Compared with the model group, the lesional skin score of AD was reduced, the infiltration of inflammatory cells was attenuated, excessive proliferation of dermal cells was inhibited, and mast cells number was reduced ($P < 0.01$), serum levels of IgE, IL-4, and IFN- γ , as well as mRNA expressions of IL-4, IFN- γ and IL-33 in lesional skin tissue decreased ($P < 0.01$, $P < 0.05$) in acupoint autohemotherapy group. There was no difference in all indices except the number of mast cells after treatment between the model group and non-acupoint autohemotherapy group. Equivalent effects in acupoint autohemotherapy group were obtained as non-acupoint autohemotherapy group. **Conclusion** Acupoint autohemotherapy improved DNCB induced lesional skin symptoms of AD possibly by down-regulating serum IgE levels, reducing mast cells numbers, suppressing cytokine expressions, as well as activating IL-33 signal.

KEYWORDS acupoint autohemotherapy; atopic dermatitis; immune-inflammation; immunoglobulin E; interleukin-33

特应性皮炎 (atopic dermatitis, AD) 又称异位性湿疹 (atopic eczema, AE), 在我国又称为慢性湿疹^[1], 是以多种免疫功能异常为特征性疾病^[2]。过去 30 年, 约 15%~30% 的儿童和 2%~10% 的成人罹患 AD, 这一数字在发达国家中增长了 2~3 倍^[3]。有研究表明, AD 是一种异质性很强的复杂疾病, 保湿剂、局部类固醇、口服 H1 抗组胺药和钙调神经磷酸酶抑制剂等治疗药物, 主要着眼于症状缓解, 然而效果并不理想^[4]。近年来靶向 Th2 免疫反应以及免疫球蛋白 (immunobulin E, IgE) 的生物制剂 (IgE 单抗 Omalizumab、IL-5 单抗 Mepolizumab、IL-4/IL-13 单抗 Dupilumab 等) 也在 AD 患者中进行了尝试, 但其安全性、有效性还有待进一步评估^[5]。

近年来自血疗法作为治疗 AD 等自身免疫性疾病的替代疗法在国外备受关注^[6], 自血疗法是指抽取自身静脉血, 即刻臀肌注射, 用于治疗过敏性皮肤疾患^[7], 此法在我国的重要改良源自 20 世纪 60 年代, 靳瑞教授将自血疗法与经络穴位结合, 作为国家中医药管理局适宜推广技术“自血穴位注射疗法”不断实践运用^[7]。近年来, 随机对照临床试验、系统评价显示自血疗法可有效改善免疫炎症, 降低复发率、重建免疫稳态、减轻西药不良反应^[8, 9], 本课题组在前期动物实验研究中也发现, 自血穴位注射具有明确的抗炎与免疫调节效应, 但其免疫调节的确切分子机制尚不清楚^[10]。本实验旨在观察自血穴位注射对 DNCB 诱导 Balb/c 小鼠 AD 皮损的影响, 初步探讨其抗炎与免疫调节效应机制, 为其临床推广提供实验依据。

材料与方法

1. 动物及分组 SPF 级雌性 Balb/c 小鼠 30 只, 6 周龄, 体重 18~20 g, 由南方医科大学实验动物中心提供 [动物合格证编号: 44002100024224, 生产

许可证号: SCXK (粤) 2016-0041], 并通过广州市疾病预防控制中心动物伦理委员会批准 (No.GZCDC-ECAR-2021P0011), 均饲养于广州市疾病预防控制中心 SPF 级动物房, 饲养温度 (22 ± 2) °C, 相对湿度 40%~60%, 自由摄食饮水, 12 h/12 h 明暗周期。适应性喂养 2 周后, 采用随机数字法分为正常组 (简称 A 组)、模型组 (简称 B 组)、自血穴注组 (简称 C 组)、自血臀肌注射组 (简称 D 组)、地塞米松组 (简称 E 组), 每组 6 只。

2. 药物 地塞米松溶液购自广州沛瑜生物制品有限公司, 批号: 20200420, -20 °C 保存。原液浓度为 1 mg/mL, 使用时用生理盐水稀释成 0.15 mg/mL, 按照 10 mL/kg 的剂量注射 (注射剂量参考 Yang HR 等^[11]的研究)。

3. 试剂及仪器 二硝基氯苯 (2, 4-dinitrochlorobenzene, DNCB, 批号: LOT:LSC0S73), 购自广州沛瑜生物制品有限公司, 常温保存。血清 IgE、 γ -干扰素 (interferon, IFN- γ)、IL-4 双抗体夹心酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测试剂盒 (货号: EK275-96、EK280/3-96、EK204/2-96), 购自杭州联科生物技术股份有限公司, 4 °C 保存。RT First Strand cDNA Synthesis Kit (货号: G3330)、SYBR Green qPCR Master Mix (货号: G3322) 和引物购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 显微镜购自日本 Nikon 公司 (型号: E100); 酶标检测仪购自美国 BioTeK 公司 (型号: Epoch); 荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司 (型号: CFX Connect)。

4 方法

4.1 动物模型复制 参考文献 [12] 将 DNCB 溶解在丙酮和橄榄油 (丙酮/橄榄油 = 3:1) 中制备 0.5% DNCB 溶液; 实验前 1 天在小鼠背部去毛, 面积约 2.5 cm × 1.5 cm, 实验第 1 天使用 0.5% DNCB

溶液 200 μL 涂抹于剃毛区域, 连续 3 天, 之后每周用 200 μL 0.5% DNCB 溶液于背部刺激致敏的皮肤 3 次, 持续 5 周。备皮时动作轻柔, 防止刮破皮肤, 涂抹 DNCB 溶液时尽量使药物均匀分布体表。以小鼠出现局部皮肤 AD 样皮损^[11]与组织病理改变^[13]为造模成功的标准。

4.2 治疗方法 于造模第 3 周开始采用尾静脉注射固定器固定小鼠, 剪去尾毛后消毒, 用乙醇反复擦拭使尾部血管扩张。用剪刀割去尾尖 1~2 mm, 使血液自由滴入 1.5 mL EDTA 抗凝 EP 管。血流过慢时可从小鼠尾巴根部向尾尖挤出血液, 采血量与穴位注射量根据前期研究基础拟定^[14], 采血 0.2 mL, 采血结束, 伤口消毒并压迫止血。然后 C 组用 1 mL 注射器吸取 EP 管中的血液, 左手抓取小鼠, 右手持注射器, 助手固定其肢体, 局部消毒, 参照《实验针灸学》^[15]小鼠穴位定位进行双侧足三里(膝关节后外侧, 在腓骨头下约 5 mm 处, 直刺 2 mm)、曲池穴(桡骨近端的关节外侧前方凹陷中, 直刺 2 mm)注射, 0.05 mL/穴^[10], 每周 3 次, 连续治疗 3 周。D 组采血后双侧臀肌注射(尾根部 1 cm 非穴点, 直刺 2 mm)^[16]共 0.2 mL, E 组以地塞米松溶液(1.5 mg/kg)腹腔注射。治疗时间与疗程同 C 组; A 组、B 组用等量的 0.9% 氯化钠溶液腹腔注射。

4.3 皮损积分 皮损评分参照欧洲 AD 研究组(European AD Research Group, ETFAD)提出的 SCORAD 评分标准中皮损严重程度评分^[12], 包括红斑、丘疹或水肿、渗出或结痂、表皮脱落、干燥和苔藓样变, 各项临床症状按照 0 分(无)、1 分(轻度)、2 分(中度)和 3 分(严重)等级评分, 分别于造模开始第 7、14、21、28、35 天进行评价, 计算各组的皮损评分。

4.4 病理观察 取皮损局部组织, 以 4% 多聚甲醛溶液固定, 经脱水、透明处理、石蜡包埋后切片、苏木素-伊红(HE)染色, 封片后于显微镜下观察病理改变。在显微镜(100 倍)下, 每组随机挑选 3 张非连续切片, 随机取 5 个非重叠视野/片。采用 Image Pro Plus 6.0 软件定量测定小鼠表皮、真皮厚度。甲苯胺蓝染色观察肥大细胞(mast cells, MCs)浸润情况, 记录每个视野中总 MCs 数量, 计算单位 mm^2 的平均 MCs 数量。

4.5 ELISA 法检测血清炎症因子 治疗完成后, 麻醉小鼠, 于下腔静脉取血 1.5~2 mL, 3 000 r/min 离心 10 min 取血清冻存, 采用 ELISA 法按照试剂盒说明书操作, 用酶标仪测定 OD 值, 计算出血清 IgE、

IFN- γ 、IL-4 含量。

4.6 实时荧光定量 PCR 法检测皮损组织 IL-4、IFN- γ 、IL-33 mRNA 表达 治疗完成后, 取背部皮损组织, 采用 Trizol 法提取总 RNA, 使用 Nanodrop 2000 超微量分光光度计检测 RNA 浓度及纯度, 逆转录生成 cDNA, PCR 扩增仪检测 LncRNA-IL-4 mRNA、LncRNA-IFN- γ mRNA 表达水平。采用 Primer 5.0 软件设计引物, PCR 扩增体系为 14 μL , 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 1 min, 进行 40 个循环。每个基因设 3 复孔, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法表示 LncRNA-IL-4 mRNA、LncRNA-IFN- γ mRNA 和 LncRNA-IL-33 mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因名称	引物序列(5' -3')	产物长度(bp)
IL-4	上游: TGTCATCCTGCTCTTCTTCTCG	138
	下游: TTTGGCACATCCATCTCCGT	
IFN- γ	上游: CTCAAGTGGCATAGATGTGGAAG	251
	下游: TGACCTCAAACCTGGCAATACTC	
IL-33	上游: CAAAGTTCAGCAGCACCCGC	278
	下游: TGTGTCAACAGACGCAGCAAA	
GAPDH	上游: CCTCGTCCCGTAGACAAAATG	133
	下游: TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT	

4.7 统计学方法 采用 SPSS 24.0 统计软件进行数据分析, 计量资料如正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 成组比较采用方差分析, 符合方差齐性组间两两比较采用 LSD 检验, 方差不齐采用 Dunnett T3 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠背部皮损表现与评分比较(图 1, 表 2) A 组小鼠皮肤无明显改变。B 组小鼠背部皮肤从致敏第 3 天开始出现红斑、水肿样变化, 随后症状加重, 出现表皮脱落/侵蚀和苔藓样变, 继而出现糜烂、结痂改变。第 21 天时, 出现全身浸润性红斑、皮疹, 背部表皮脱落、侵蚀和苔藓样变。随后毛发不同程度恢复生长, 皮疹、红斑、结痂和干燥样变持续。第 28 天时, 糜烂结痂演变为疤痕, 范围逐渐缩小, 皮疹、红斑和干燥样变持续(与莫俊奎等^[17]文献报道一致)。而 C、D、E 组小鼠造模第 21 天(接受治疗后 7 天)开始出现背部皮损皮疹、红斑、结痂、干燥样变不同程度减轻, 毛发恢复生长, 第 28 天时开始仅余刺激部位和正常皮肤交界处有轻微的干燥样变, 刺激部位已被正常毛发覆盖。皮损评分结果显示, 与 B 组比较, 造模后第 21(除 D 组外)、28、35 天 C、



图 1 各组小鼠皮损表现

表 2 各组小鼠皮损评分变化比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	症状评分				
		第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 35 天
A	6	—	—	—	—	—
B	6	2.17 ± 0.41	8.67 ± 0.52	11.33 ± 1.21	7.67 ± 0.52	6.00 ± 1.10
C	6	2.67 ± 0.52	8.83 ± 0.98	9.50 ± 0.55**	5.67 ± 0.82**	4.17 ± 0.41**
D	6	2.67 ± 0.52	8.67 ± 1.03	10.33 ± 0.82	6.67 ± 0.82*	4.83 ± 0.75*
E	6	2.33 ± 0.52	8.33 ± 0.82	8.67 ± 1.03**	5.50 ± 0.84**	4.17 ± 0.41**

注: 与 B 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

D、E 组小鼠皮损评分显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

2 各组小鼠皮损局部组织病理学观察与表皮、真皮厚度比较 (图 2, 表 3) HE 染色结果显示 (A1~E1): A 组小鼠皮肤组织病理无异常改变, 表皮层扁平整齐, 真皮层组织及附属结构清晰可辨, 细胞形态饱满, 未见炎性细胞浸润; B 组小鼠皮损处表皮明显增厚、角化过度, 毛囊结构少见, 中度海绵水肿, 真皮层大量炎症细胞浸润; C、D、E 组治疗后病理表现为血管扩张充血较模型组减轻, 炎性细胞减少, 组织水肿减轻。

甲苯胺蓝染色显示 (A2~E2): A 组肥大细胞散在分布, 且数量少; B 组肥大细胞分布密集, 数量明显多于 A 组 ($P < 0.01$); D 组干预后肥大细胞数量较

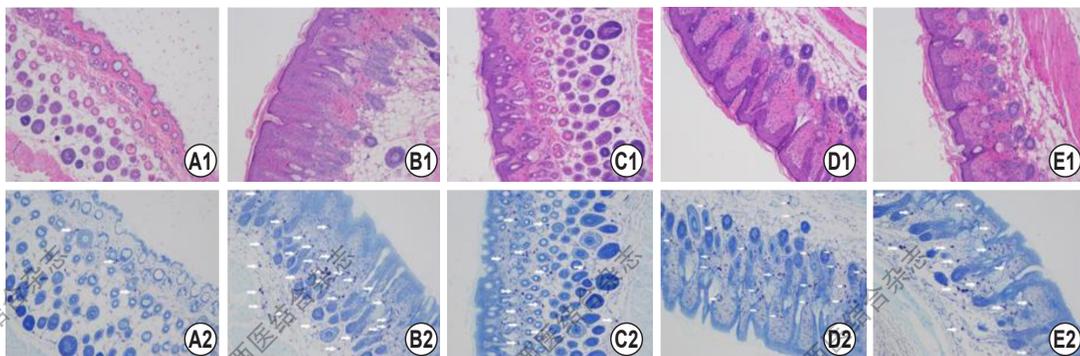
模型组减少, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); C、E 组肥大细胞数量较 B 组显著减少 ($P < 0.01$)。

与 A 组比较, B 组小鼠表皮、真皮厚度均显著增加 ($P < 0.01$); 与 B 组比较, C、D、E 组小鼠表皮、真皮厚度均显著明显减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 3 各组小鼠皮损组织肥大细胞计数及表皮、真皮厚度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	肥大细胞 (个/mm ²)	表皮厚度 (μm)	真皮厚度 (μm)
A	6	36.78 ± 1.39	18.62 ± 2.18	222.92 ± 16.10
B	6	190.67 ± 14.44*	114.09 ± 9.84*	380.71 ± 18.88*
C	6	144.67 ± 12.81 ^{△△}	79.91 ± 9.40 ^{△△}	310.87 ± 45.89 ^{△△}
D	6	172.33 ± 7.88	79.73 ± 4.02 ^{△△}	319.11 ± 11.28 [△]
E	6	161.22 ± 11.03 ^{△△}	72.03 ± 4.71 ^{△△}	316.37 ± 7.60 ^{△△}

注: 与 A 组比较, * $P < 0.01$; 与 B 组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$



注: A1~E1 为 HE 染色; A2~E2 为甲苯胺蓝染色; 图中白色箭头表示肥大细胞

图 2 各组小鼠皮损组织病理学观察 (×100)

3 各组小鼠血清 IgE、IFN- γ 及 IL-4 水平比较 (表 4) 与 A 组比较, B 组小鼠血清 IgE、IFN- γ 、IL-4 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与 B 组比较, C、D 组小鼠血清 IgE、IFN- γ 、IL-4 水平显著降低 ($P < 0.01$); E 组小鼠血清 IFN- γ 水平亦降低 ($P < 0.01$)。

表 4 各组小鼠治疗后血清 IgE、IFN- γ 及 IL-4 水平比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	IgE	IFN- γ	IL-4
A	6	92.56 \pm 20.19	174.70 \pm 56.03	9.34 \pm 4.54
B	6	290.36 \pm 44.96*	345.68 \pm 42.44*	21.64 \pm 7.26*
C	6	221.50 \pm 38.88 Δ	212.91 \pm 46.05 Δ	10.23 \pm 4.01 Δ
D	6	222.62 \pm 29.41 Δ	213.45 \pm 38.21 Δ	10.68 \pm 3.58 Δ
E	6	261.82 \pm 34.41	233.72 \pm 91.07 Δ	15.96 \pm 4.08

注: 与 A 组比较, * $P < 0.01$; 与 B 组比较, $\Delta P < 0.01$

4 各组小鼠皮损组织 IL-4、IFN- γ 、IL-33 mRNA 表达水平比较 (表 5) 与 A 组比较, B 组小鼠皮损组织 IL-4、IFN- γ 、IL-33 mRNA 表达均明显上调 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 与 B 组比较, C、D 组 IL-4、IFN- γ 、IL-33 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); E 组 IL-4、IL-33 mRNA 表达明显下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 5 各组小鼠皮损组织 IL-4、IFN- γ 及 IL-33 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-4	IFN- γ	IL-33
A	6	1.34 \pm 1.20	1.03 \pm 0.31	1.01 \pm 0.18
B	6	2.69 \pm 0.99**	1.59 \pm 0.28*	1.82 \pm 0.49**
C	6	1.57 \pm 0.55 Δ	0.76 \pm 0.34 $\Delta\Delta$	0.95 \pm 0.21 $\Delta\Delta$
D	6	1.57 \pm 0.42 Δ	0.77 \pm 0.25 $\Delta\Delta$	0.95 \pm 0.27 $\Delta\Delta$
E	6	1.72 \pm 0.52 Δ	1.17 \pm 0.57	1.05 \pm 0.13 $\Delta\Delta$

注: 与 A 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 B 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

讨 论

自 1913 年首次报道, 自血疗法在欧洲各国、南美、韩国和日本应用于 AD、慢性荨麻疹、银屑病等自身免疫性疾病与过敏性疾患已超过百年历史^[18]。20 世纪 60 年代, 靳瑞教授将自血疗法与经络穴位结合, 成为“靳三针”特色疗法, 对皮肤系统的荨麻疹、湿疹, 呼吸系统的哮喘、过敏性鼻炎等疾病疗效尤其显著, 一直沿用至今^[7]。现代临床与动物实验研究业已证明, 自血穴注疗法能通过活化 CD4⁺T 细胞^[19] 和降低血清总 IgE 水平, 抑制患者血清中 Th2 细胞因子的释放^[20], 调节 Th1/Th2 免疫失衡。本课题组前期研究表明, 全血足三里注射后穴区模拟血肿在穴下肌肉组织内的吸收过程, 发生炎症反应吞噬和清除血

液成分, 这可能是穴位刺激产生治疗效果的基础^[22]。通过临床观察进一步推测, 自体血液可以作为个体化的复合疫苗, 自体全血中的生物化学物质可以看作是抗原, 在注射到肌肉组织后, 由于含有与血清中不同的化学物质, 从而引起局部炎症反应, 在此过程中, 抗原决定簇可能被暴露和识别, 以诱导反复治疗后的免疫记忆^[22]。有趣的是, 最近的研究显示, AD 患者自体血液总 IgG 反复肌肉注射激活了调节性 T 细胞 (Treg) 与 Th1 细胞, 抑制过敏原特异性 IgE 抗体, 增强过敏原特异性 IgG 抗体, 通过对致病性抗体产生中和或抑制效应发挥免疫调节作用^[23]。这些研究表明, 自身血液中受损的免疫细胞及其分泌的细胞因子能够引发免疫器官源源不断产生中和或制约 AD 免疫失衡的抗体或调节因子, 从而重建 T 细胞免疫稳态。然而自血穴注促进 AD 病理进程中 T 淋巴细胞活化抑制 IgE 介导的免疫炎症的效应机制, 尚待深入阐明。

近年来关于 AD 的遗传背景和病理生理学研究也取得了较多进展。AD 患者具有全身性 Th2 细胞极化的遗传背景, 其特征是血清 IgE 水平升高和 Th2 型细胞因子表达显著增高^[24]。本实验结果与 Harada D 研究一致, DNCB 诱导的小鼠 AD 模型表现为血清 IgE 和 Th2 细胞因子 IL-4 升高^[25]。IgE 是 Th2 细胞活化的关键下游生物标志物, 能与嗜碱性粒细胞和肥大细胞上的 Fc ϵ R13 结合, 诱导其成熟和活化, 释放包括组胺、前列腺素和其他促炎细胞因子 (如 IL-4、IL-5、IL-13) 等炎症介质, 增强 Th2 型免疫反应^[26]。经典的 Th2 细胞因子如 IL-4 总是与 Th1 型细胞因子 IFN- γ 在同一患者相同的 AD 区域内被观察到, 这表明 AD 实际上是 T 细胞活化的双相模式^[27], Th1 反应在 AD 发病中同样起着重要作用, 尤其是 IFN- γ 与 AD 的严重程度与慢性化关系密切^[28]。我们的实验结果显示, 自血穴注可降低 AD 模型小鼠肥大细胞数量与血清 IgE 水平, 同时降低血清 IL-4、IFN- γ 水平, 这可能是自血穴注不仅能降低 AD 严重程度而且预防 AD 慢性化的潜在原因。

新的组织源性细胞因子 IL-33 被认为在 AD 中起着重要作用^[29]。IL-33 是新近发现的一种细胞因子, 属于 IL-1 超家族, 常表达于皮肤、肺和胃肠道等屏障组织细胞。IL-33 作为提醒免疫系统启动的警报器, 在 AD 的病理发展中起重要作用, 高水平的 IL-33 是疾病活动与严重程度的标志物^[30]。AD 的已知触发因素如接触过敏原、刺激物, 抓挠会上调 AD 病变皮肤中 IL-33 含量, 从而激活肥大细胞、Th2 淋巴细胞和嗜酸性粒细胞产生 Th2 细胞因子。本实验结果显示,

自血穴注下调 AD 模型小鼠皮损组织 IL-33、IL-4、IFN- γ mRNA 表达。这些结果表明, 自血疗法可改善 DNCB 诱导 Balb/c 小鼠 AD 皮损症状, 减轻皮损组织水肿与炎性细胞浸润、降低抑制表皮过度增生, 发挥抗炎与免疫调节效应, 其机制可能与抑制 IL-33 信号激活、降低肥大细胞数量、抑制 Th2 细胞增殖, 从而下调 IgE 介导的免疫炎症反应有关; 同时, 自血穴注也对 AD 病理进程中产生的 Th1 细胞因子有调节作用, 从而纠正 AD 免疫失衡、重建免疫稳态。而自血臀肌注射干预后, 除肥大细胞数量与模型小鼠比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); 皮损评分与自血穴注小鼠比较, 下降较少, 但差异亦无统计学意义 ($P>0.05$), 其余在降低血清 IgE 水平与血清、皮肤组织炎性细胞因子 IL-4、IFN- γ 、IL-33 水平方面, 两者均疗效相当, 提示在纠正 AD 小鼠病理性免疫失衡过程中, 自身血液作为复合型疫苗, 主要通过对致病性抗体或效应细胞产生中和或抑制效应发挥免疫稳态重建作用; 而曲池、足三里穴位刺激可能尚存在其他途径发挥治疗效应。由此, 笔者推测实验操作过程中, 臀肌的非穴点注入自身血液后, 可能通过发挥自身血液的局部免疫应答启动效应, 从而诱导机体全身免疫耐受, 发挥对 AD 免疫炎症的抑制作用。

然而, 根据自血穴注疗法的自身规律与特点, 自血穴注疗法如何启动穴区局部炎症反应激活 T 细胞免疫应答重建全身免疫稳态的始动机制及其关键路径, 尚待今后实验进一步阐明。

利益冲突: 本研究不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Jiao R, Yang Z, Wang Y, et al. The effectiveness and safety of acupuncture for patients with atopic eczema: a systematic review and meta-analysis[J]. *Acupunct Med*, 2020, 38 (1): 3-14.
- [2] Bieber T. Atopic dermatitis[J]. *Ann Dermatol*, 2010, 22 (2): 125-137.
- [3] Weidinger S, Novak N. Atopic dermatitis[J]. *Lancet*, 2016, 387 (10023): 1109-1122.
- [4] Akdis CA, Akdis M, Bieber T, et al. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergy and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Report[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 118 (1): 152-169.
- [5] Weidinger S, Beck LA, Bieber T, et al. Atopic dermatitis[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4 (1): 1.
- [6] Schäfer T. Complementary and alternative medicine (CAM) and atopic eczema[J]. *Allergol Select*, 2017, 1 (1): 44-52.
- [7] 张东淑, 刘璐, 李俊雄, 等. 调和阴阳, 以平为期——基于 Th1/Th2 免疫平衡的自血穴位注射效应机制探索[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2017, 19 (5): 791-796.
- [8] 李彩彩, 尹业辉, 杨会生, 等. 穴位自血疗法治疗慢性湿疹疗效与安全性的系统评价[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2018, 24 (11): 1597-1599.
- [9] Oomen-Welke K, Huber R. Intramuscular autologous blood therapy—a systematic review of controlled trials[J]. *BMC Comple Altern Med*, 2019, 19 (1): 248.
- [10] 黄晋权, 曾智文, 张东淑. 自血穴注疗法对痤疮小鼠 Th1/Th2 免疫偏移的调节作用[J]. *广州中医药大学学报*, 2020, 37 (8): 1529-1533.
- [11] Yang HR, Lee H, Kim JH, et al. Therapeutic effect of *Rumex japonicus* Houtt. on DNCB-induced atopic dermatitis-like skin lesions in Balb/c mice and human keratinocyte HaCaT cells[J]. *Nutrients*, 2019, 11 (3): 573.
- [12] 赵一丁, 李文彬, 姜姗姗, 等. 镇心安神方对 DNCB 致敏诱导特异性皮炎小鼠皮肤组织 TRPs 表达的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39 (10): 1219-1224.
- [13] Choi YA, Yu JH, Jung HD, et al. Inhibitory effect of ethanol extract of *Ampelopsis brevipedunculata* Rhizome on atopic dermatitis-like skin inflammation[J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 238: 111850.
- [14] 张东淑, 林少霞, 韩强, 等. 小鼠颌下静脉丛采血法改良[J]. *毒理学杂志*, 2018, 32 (6): 499-500.
- [15] 李忠仁主编. 实验针灸学[M]. 第2版. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 255.
- [16] Kim S, Zhang X, O'Buckley SC, et al. Acupuncture resolves persistent pain and neuroinflammation in a mouse model of chronic overlapping pain conditions[J]. *J Pain*, 2018, 19 (12): 1381-1384.
- [17] 莫俊鑫, 周继昌, 刘小立, 等. DNCB 致敏诱导 BALB/c 小鼠特异性皮炎模型的建立[J]. *中国热带医学*, 2013, 13 (12): 1439-1442.

- [18] 张东淑, 方茜, 柳涛, 等. 靳氏经络注血疗法治疗痤疮临床研究 [J]. 中医学报, 2014, 29 (12): 1835-1837.
- [19] 邹宇, 吕欣桐, 唐清体. 针灸联合自血疗法治疗慢性荨麻疹 (血虚风燥型) 效果及对 UAS 评分、外周血 T 淋巴细胞 STAT3 mRNA 表达水平的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37 (7): 1781-1784.
- [20] 张婉容, 郎娜. 走罐配合自血穴位注射治疗慢性荨麻疹及对患者血清 IL-4、IgE 的影响 [J]. 中国针灸, 2014, 34 (12): 1185-1188.
- [21] Yong C, Yongpu L, Sufen B, et al. What happened in the acupoint area of mouse after blood injection?[J]. J South Med Univ, 2020, 40 (9): 1225-1229.
- [22] 王欣欣, 刘季平, 李思佳, 等. 中药治疗特应性皮炎疗效和安全性的系统评价 [J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35 (24): 3054-3059.
- [23] Cho SM, Kim ME, Kwon B, et al. Immunomodulatory effects induced by intramuscular administration of autologous total immunoglobulin G in patients with atopic dermatitis[J]. Int Immunopharmacol, 2017, 52: 1-6.
- [24] Ju HP, Jun SJ, Ki CK, et al. Anti-inflammatory effect of *Centella asiatica* phytosome in a mouse model of phthalic anhydride-induced atopic dermatitis[J]. Phytomedicine, 2018, 43: 110-119.
- [25] Harada D, Takada C, Tsukumo Y, et al. Analyses of a mouse model of the dermatitis caused by 2, 4, 6-trinitro-1-chlorobenzene (TNCB) -repeated application[J]. J Dermatol Sci, 2005, 37 (3): 159-167.
- [26] 朱聪聪, 潘会君, 朱全刚. Th2 相关炎症因子在湿疹发病中的作用机制 [J]. 药学实践杂志, 2019, 37 (1): 9-13.
- [27] Grewe M, Gyufko K, Schöpf E, et al. Lesional expression of interferon-gamma in atopic eczema[J]. Lancet, 1994, 343 (8888): 25-26.
- [28] Tomimori Y, Tanaka Y, Goto M, et al. Repeated topical challenge with chemical antigen elicits sustained dermatitis in NC/Nga mice in specific-pathogen-free condition[J]. J Invest Dermatol, 2005, 124 (1): 119-124.
- [29] Brunner PM, He H, Pavel AB, et al. The blood proteomic signature of early-onset pediatric atopic dermatitis shows systemic inflammation and is distinct from adult long-standing disease[J]. J Am Acad Dermatol, 2019, 81 (2): 510-519.
- [30] Liu X, Xiao Y, Pan Y, et al. The role of the IL-33/ST2 axis in autoimmune disorders: friend or foe?[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2019, 50: 60-74.

(收稿: 2021-04-23 在线: 2021-12-02)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶

《中国中西医结合杂志》再次荣获“百种中国杰出学术期刊”

2021 年 12 月 27 日, 中国科技论文 2020 年统计结果在京发布。中国科学技术信息研究所每年出版《中国科技期刊引证报告》发布中国科技论文与引文数据库收录的中国科技论文核心期刊的 20 余项文献计量指标, 从 1999 年开始以此为基础, 研制了中国科技期刊综合评价指标体系, 对期刊进行综合评定。根据 2020 年引证报告,《中国中西医结合杂志》被收录为“中国科技核心期刊”,《中国中西医结合杂志》再次荣获“百种中国杰出学术期刊”。

2002 年开始, 中国科学技术信息研究所每年评选一次百种中国杰出学术期刊。此次是《中国中西医结合杂志》自 2002 年首次评选以来, 连续第 18 次入选, 充分彰显我刊的学术影响力。

感谢长期以来广大作者、读者以及专家对中国中西医结合杂志社的大力支持, 在此表示由衷的感谢。杂志社愿与广大科研工作者一起努力, 共同促进中西医结合事业发展。

(本刊讯)