



中国针灸
Chinese Acupuncture & Moxibustion
ISSN 0255-2930, CN 11-2024/R

《中国针灸》网络首发论文

题目： 基于 ROS/TXNIP/NLRP3 通路探讨“邵氏五针法”预处理对哮喘大鼠气道炎性反应的影响

作者： 龚佳佳, 陈放, 张优雅, 冯嘉鑫, 华金双

DOI: 10.13703/j.0255-2930.20221230-k0002

收稿日期: 2022-12-30

网络首发日期: 2023-10-09

引用格式: 龚佳佳, 陈放, 张优雅, 冯嘉鑫, 华金双. 基于 ROS/TXNIP/NLRP3 通路探讨“邵氏五针法”预处理对哮喘大鼠气道炎性反应的影响[J/OL]. 中国针灸. <https://doi.org/10.13703/j.0255-2930.20221230-k0002>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

DOI: 10.13703/j.0255-2930.20221230-k0002

中图分类号: R245.3 文献标志码: A

机制探讨

基于 ROS/TXNIP/NLRP3 通路探讨“邵氏五针法”预处理对哮喘大鼠气道炎性反应的影响*

龚佳佳^{1△}, 陈放¹, 张优雅¹, 冯嘉鑫¹, 华金双^{1,2}✉

(¹河南中医药大学, 郑州 450008; ²河南中医药大学中医学学院(仲景学院), 郑州 450046)

[摘要] 目的: 探讨“邵氏五针法”预处理对哮喘大鼠气道炎性反应可能的作用机制。方法: 将 40 只 SPF 级 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、针刺组和西药组, 每组 10 只。采用雾化吸入卵蛋白致敏及激发方法制备哮喘模型。针刺组取“大椎”及双侧“肺俞”“风门”针刺干预, 每次 20 min, 起针后进行激发试验, 每日 1 次, 连续 7 d; 西药组予腹腔注射地塞米松磷酸钠溶液, 用药后激发, 每日 1 次, 连续 7 d。观察各组大鼠行为体征, ELISA 法检测大鼠血清炎症因子白细胞介素 (IL)-1 β 、IL-18 含量, 免疫荧光染色法检测大鼠肺组织中活性氧簇 (ROS) 阳性表达, Western blot 法检测大鼠肺组织中硫氧还原蛋白反应蛋白 (TXNIP)、NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3)、凋亡相关斑点蛋白 (ASC) 以及半胱氨酸天冬氨酸特异蛋白酶 (Caspase-1) 蛋白表达。结果: 空白组大鼠精神行为状态良好; 模型组大鼠出现呼吸急促, 抓耳挠腮, 烦躁不安等情况; 与模型组比较, 针刺组、西药组大鼠呼吸较平稳, 反应相对灵敏。与空白组比较, 模型组大鼠血清 IL-18、IL-1 β 含量升高 ($P<0.01$), ROS 阳性表达强度增高, 肺组织中 TXNIP、NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 针刺组、西药组大鼠血清 IL-18、IL-1 β 含量降低 ($P<0.01$), ROS 阳性表达强度降低, 肺组织中 TXNIP、NLRP3、

*河南省重点研发与推广专项(科技攻关): 222102310581; 河南省中医药科学研究专项: 2022ZY1107; 国家中医药管理局全国中医学术流派传承工作室第二轮建设项目: 国中医药人教函〔2019〕62; 河南中医药大学 2021 年度研究生科研创新项目: 2021KYCX005

✉通信作者: 华金双, 教授。E-mail: hjsh2002@126.com


△龚佳佳, 河南中医药大学硕士研究生。E-mail: gongjiaj910@163.com

ASC、Caspase-1 蛋白表达降低 ($P<0.01$)。与西药组比较, 针刺组大鼠肺组织中 ASC 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。

结论: “邵氏五针法”预处理可通过降低 ROS, 减少 ROS/TXNIP/NLRP3 炎性通路相关蛋白的聚集与激活, 进而减少下游 IL-1 β 、IL-18 炎性因子的分泌, 改善哮喘大鼠气道炎性反应, 这可能是“邵氏五针法”防治哮喘的作用机制之一。

[关键词] 哮喘; 针刺; “邵氏五针法”; 白介素 1 β ; 活性氧; 硫氧还原蛋白反应蛋白; NOD 样受体蛋白 3; 半胱氨酸天冬氨酸特异蛋白酶

Effects of "Shao's Five-Needle Technique" pretreatment on airway inflammatory responses in asthmatic rats based on the ROS/TXNIP/NLRP3 pathway

GONG Jia-jia¹, CHEN Fang¹, ZHANG You-ya¹, FENG Jia-xin¹, HUA Jin-shuang^{1,2} [✉] (¹Henan University of CM, Zhengzhou 450008, China; ²College of TCM, Henan University of CM, Zhengzhou 450046)

ABSTRACT **Objective** To explore the possible mechanisms of "Shao's Five-Needle Technique" pretreatment on airway inflammatory responses in asthmatic rats. **Methods** Forty SPF-grade SD rats were randomly divided into a blank group, a model group, an acupuncture group, and a medication group, with 10 rats in each group. The asthma model was established by aerosol inhalation of ovalbumin. The rats in the acupuncture group were treated with acupuncture at "Dazhui" (GV 14) and bilateral "Feishu" (BL 13) and "Fengmen" (BL 12), with each session lasting for 20 minutes. When acupuncture was given, a stimulation test was conducted, once daily for seven consecutive days. The rats in the medication group were treated with intraperitoneal injection of dexamethasone sodium phosphate solution, followed by an stimulation test, once daily for seven days. Behavioral signs of the rats were observed in each group; ELISA method was used to detect the levels of inflammatory cytokines interleukin (IL)-1 β and IL-18 in rat serum; immunofluorescence staining method was performed to assess the expression of reactive oxygen species (ROS) in lung tissues; Western blotting method was used to measure the protein expression of thioredoxin-interacting protein (TXNIP), NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), and caspase-1 in lung tissues. **Results** The rats in the blank group exhibited normal behavior, while those in the model group showed signs of respiratory distress, ear scratching, cheek rubbing, and dysphoria. Compared with the model group, the rats in the acupuncture group and medication group showed stable respiration and relatively sensitive responses. Compared with the blank group, the serum levels of IL-18 and IL-1 β was elevated ($P<0.01$), the expression intensity of ROS was increased, and the protein expression of TXNIP, NLRP3, ASC, and caspase-1 in lung tissues was increased ($P<0.01$) in the model group. Compared with the model group, the serum levels of IL-18 and IL-1 β was reduced ($P<0.01$), the expression intensity of ROS was lowered, and the protein expression of TXNIP, NLRP3, ASC, and caspase-1 in lung tissues was reduced ($P<0.01$) in the the acupuncture group and medication group. Compared with the

medication group, the protein expression of ASC in lung tissues was reduced in the acupuncture group ($P<0.05$). **Conclusion** Pretreatment of "Shao's Five-Needle Technique" could alleviate airway inflammatory responses in asthmatic rats by reducing ROS levels and decreasing the aggregation and activation of inflammatory pathway-related proteins in the ROS/TXNIP/NLRP3 pathway, ultimately leading to decreased secretion of IL-1 β and IL-18. This mechanism may contribute to the effectiveness of "Shao's Five-Needle Technique" in preventing and treating asthma.

KEYWORDS asthma; acupuncture; "Shao's Five-Needle Technique"; Interleukin-1 β ; reactive oxygen species; Thioredoxin-Interacting Protein; NOD-like receptor protein 3; Caspase-1

哮喘是现代医学较为困扰的常见呼吸系统疾病^[1-2]，其发病机制主要与气道炎性反应、细胞免疫、变态反应、气道高反应性、神经内分泌等有关。其中气道炎性反应的发生发展是哮喘病理过程的核心，大量炎性细胞的浸润导致气道高反应性、气道阻塞、黏液过度产生以及气道重塑。活性氧簇（reactive oxygen species, ROS）是诱导氧化应激的信号，大量 ROS 的产生会诱导硫氧还原蛋白反应蛋白（thioredoxin interacting protein, TXNIP）与硫氧还蛋白（thioredoxin, Trx）活性部位解离并与 NOD 样受体蛋白 3（nod-like receptor protein 3, NLRP3）结合，介导 NLRP3 炎性小体与凋亡相关斑点蛋白（apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC）以及半胱氨酸天冬氨酸特异蛋白酶（cysteine-specific proteinase 1, Caspase-1），激活炎性小体，从而促进炎性因子白细胞介素（interleukin, IL）-1 β 、IL-18 释放，加重哮喘症状^[3-4]。研究显示 ROS/TXNIP/NLRP3 通路在加重哮喘气道炎性反应方面发挥了重要作用。

“邵氏五针法”来源于针灸大家邵经明治疗哮喘的经验效穴，经过多中心临床随机对照观察，证实其治疗哮喘穴少效宏，安全可靠^[5-6]。采用针刺预处理早干预、早治疗哮喘，不仅可以提前阻断病情，有效控制哮喘发生，更可通过调动机体的潜能，启动内源性保护机制，提高机体内在的抗病与应变能力，减少哮喘复发和并发症的发生^[7]。本研究旨在进一步从 ROS/TXNIP/NLRP3 炎性通路探讨“邵氏五针法”预处理改善哮喘大鼠气道炎性反应的机制，为针刺防治哮喘提供实验依据。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SPF 级雄性健康 SD 大鼠 40 只，8 周龄，体质量（170 \pm 20）g，购买于郑州大学实验动物中心 [动物生产许可证号：SCXK（豫）2020-0004]。饲养环境：室温 22~26 $^{\circ}$ C，相对湿度 50%~70%，自由饮水饮食。将 40

只大鼠随机分为空白组、模型组、针刺组、西药组，每组 10 只。本实验经河南中医药大学实验动物伦理委员会审查批准（审批号：DWLL202208013），实验过程中遵循动物使用的 3R 原则。

1.2 主要仪器和试剂

雾化器（大连欧姆龙公司），一次性毫针（0.25 mm×13 mm，苏州医疗用品厂有限公司），酶标仪（深圳 Rayto 公司），研磨仪（武汉 Servicebio 公司），扫描仪（日本 EPSON 公司），高速冷冻离心机（北京 DRAGONLAB 公司），轮转式切片机（德国 Leica 公司），化学发光仪（上海 CLINX 公司），灰度分析软件（美国 Alpha Innotech 公司），正置荧光显微镜（日本尼康公司）。

氢氧化铝干粉（上海麦克林公司），卵蛋白（北京索莱宝公司），ROS 染液（上海 SIGMA 公司），大鼠 IL-1 β 、IL-18 Elisa 试剂盒（南京博研生物公司），抗-TXNIP 抗体（武汉三鹰公司），抗-NLRP3 抗体、抗-ASC 抗体、抗-Caspase-1 抗体（江苏 Affinity 公司），HRP-山羊抗鼠（GB25301）、HRP-山羊抗兔（GB23303）均购自北京索莱宝公司，DAPI 染液、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、显影定影试剂均购自武汉 Servicebio 公司。

1.3 模型制备

参考文献 [8] 制备大鼠哮喘模型。模型组、针刺组、西药组大鼠在实验的第 1、8 天，腹腔注射 1 mL 10% OVA/Al(OH)₃ 混合液致敏。第 15 天起开始激发，将各组大鼠分别置于密闭雾化箱内，压缩雾化器喷入 1% OVA 溶液激发哮喘。每次 30 min，每天 1 次，连续 7 d。造模成功的标准为：大鼠出现抓耳挠腮，呼吸加快，连续激发后甚则呼吸减慢或节律不齐，轻度紫绀，俯伏不动，四肢瘫软，反应迟钝，毛色逐渐暗淡失去光泽。

空白组用 0.9%NaCl 溶液代替致敏剂和激发剂。

1.4 干预方法

针刺组：实验第 15 天起，取“大椎”及双侧“肺俞”“风门”针刺干预。自制高台鼠板，将一长两短的三块木板进行装订，形成长度约 60 cm 的 Z 形鼠板，将鼠板长端置于约 1 m 高的桌面，短而窄的一端用来放置大鼠并进行针刺，以减少大鼠活动空间，有利于留针。操作：大鼠置于自制鼠板，穴位局部常规消毒，采用 0.25 mm×13 mm 一次性毫针，“大椎”“肺俞”“风门”均直刺 5~6 mm，施平补平泻手法，留针 20 min，起针后激发，每日 1 次，连续 7 d。

西药组：实验第 15 天起，腹腔注射地塞米松磷酸钠溶液（0.5mg/kg）^[9]，用药后激发，每日 1 次，连续 7 d。

空白组、模型组不予任何干预。

1.5 观察指标及检测方法

（1）大鼠一般情况

造模后和实验结束，分别观察各组大鼠一般情况，包括精神状态、呼吸情况、毛发色泽、饮食、二便。

（2）ELISA 法检测大鼠血清 IL-1 β 、IL-18 含量

大鼠采用 2%戊巴比妥钠（0.2 mL/100 g）腹腔注射麻醉后取腹主动脉血 5 mL，离心 10 min，留取血清存放于-80 °C冰箱中保存待测。检测时将 IL-1 β 、IL-18 标准品和待测样本以及 HRP 标记抗体加入微孔，再按试剂盒进行操作，恒温箱温育 1 h 后依次加入洗涤液、显色底物、终止液，15 min 内用酶标仪测定吸光度（波长 450 nm），读取吸光度值。利用标准曲线方程计算血清 IL-1 β 、IL-18 的含量。

（3）免疫荧光染色法检测大鼠肺组织中 ROS 表达强度

干预结束后，大鼠采用 2%戊巴比妥钠（0.2 mL/100 g）腹腔注射麻醉后，剪取左肺下叶放于冻存管中，-80 °C冰箱保存待检测。取保存于-80°C中的肺脏组织，冰冻切片在室温下复温，控干水分加入自发荧光淬灭剂 5 min，流水冲洗 10 min。滴加 ROS 染液染色，避光恒温箱 37°孵育 30 min。PBS 摇床上洗涤 5 min×3 次。滴加 DAPI 染液进行细胞核复染，避光室温孵育 10 min。玻片置于 PBS 摇床上洗涤 5 min×3 次。切片稍甩干后用抗荧光淬灭封片剂封片。置于荧光显微镜下观察分析。

（4）Western Blot 法检测大鼠肺组织中 TXNIP、NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达

大鼠 2%戊巴比妥钠（0.2 mL/100 g）腹腔注射麻醉后，剪取右肺中叶放于冻存管中，-80 °C冰箱保存待检测。检测时，剪成小块置于匀浆管中，加入 10 倍组织体积的裂解液（使用前数分钟内加入蛋白酶抑制剂），匀浆，离心，取上清；BCA 蛋白试剂盒测定蛋白浓度，沸水浴变性 15 min，收入-20°C冰箱保存备用；SDS-PAGE 电泳（浓缩胶：75V，20 min；分离胶：120 V，120 min），300mA 恒流转膜 30 min，PVDF 膜置于 5% 脱脂奶粉中孵育 30min 后放入稀释后的一抗（ β -actin1：2000，TXNIP 1：1000，NLRP3 1：1000，ASC 1：1000，Caspase-1 1：1000），4°C摇床过夜，洗膜，孵育二抗（羊抗小鼠 IgG 1：5 000，羊抗兔 IgG1：5000），室温

摇床 30min, TBST 洗涤 5 min×3 次, ECL 显影曝光 2 min; 用 Image J 测量蛋白条带灰度值, 目的蛋白的相对表达量用目的蛋白灰度值比内参蛋白 (β -actin) 灰度值表示。

1.6 统计学处理

数据采用统计软件 SPSS23.0 进行分析, 计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 若方差齐两两比较采用 LSD 法, 方差不齐则用 Tamhane's t_2 法, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

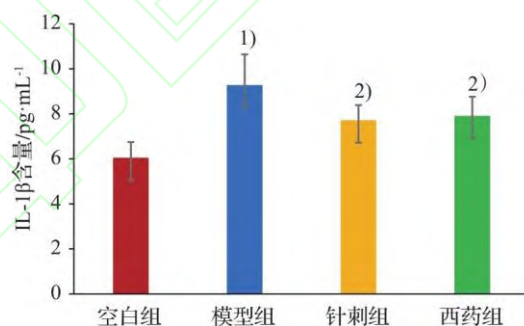
2 结果

2.1 各组大鼠一般情况

造模前, 各组大鼠状态较好, 呼吸均匀, 精神良好, 毛色光泽, 活动敏捷, 饮水、饮食量正常, 二便无异常。造模后, 模型组、针刺组、西药组大鼠均出现烦躁不安、呼吸急促、抓耳挠腮、呛咳, 时有打喷嚏症状, 随着激发次数增加, 大鼠精神逐渐萎靡, 反应迟缓, 神情呆滞, 毛色暗淡, 饮水、饮食量明显减少, 小便颜色变黄, 大便干结, 气味难闻。针刺组、西药组大鼠经针刺和西药干预后, 精神状态明显好转, 情绪平缓, 反应较前灵敏, 呼吸好转, 呛咳、抓耳挠腮和打喷嚏次数明显减少, 饮水、饮食量增多, 小便颜色趋于正常, 大便基本正常。

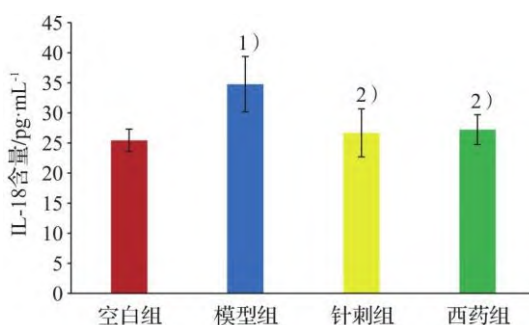
2.2 各组大鼠血清 IL-1 β 、IL-18 含量比较

与空白组比较, 模型组大鼠血清 IL-1 β 、IL-18 含量升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 针刺组、西药组大鼠血清 IL-1 β 、IL-18 含量降低 ($P<0.01$); 针刺组和西药组血清 IL-1 β 、IL-18 含量比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 1、图 2。



注: 与空白组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.01$ 。

图 1 各组大鼠血清 IL-1 β 含量比较 ($\bar{x}\pm s$, 10 只鼠/组)

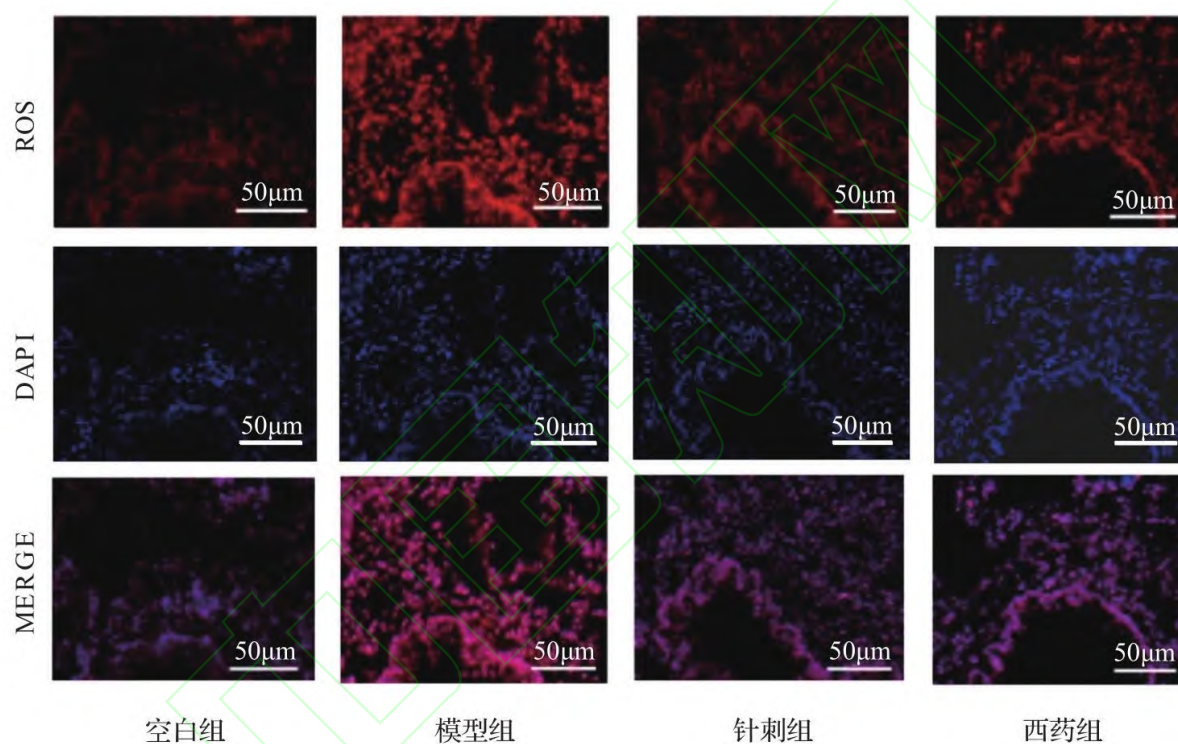


注：与空白组比较，¹⁾ $P<0.01$ ；与模型组比较，²⁾ $P<0.01$ 。

图 2 各组大鼠血清 IL-18 含量比较 ($\bar{x}\pm s$, 10 只鼠/组)

2.3 各组大鼠肺组织中 ROS 荧光强度比较

与空白组比较，模型组大鼠 ROS 阳性表达明显增高，支气管壁周围聚集增多；与模型组比较，针刺组、西药组大鼠 ROS 阳性表达明显降低。见图 3。

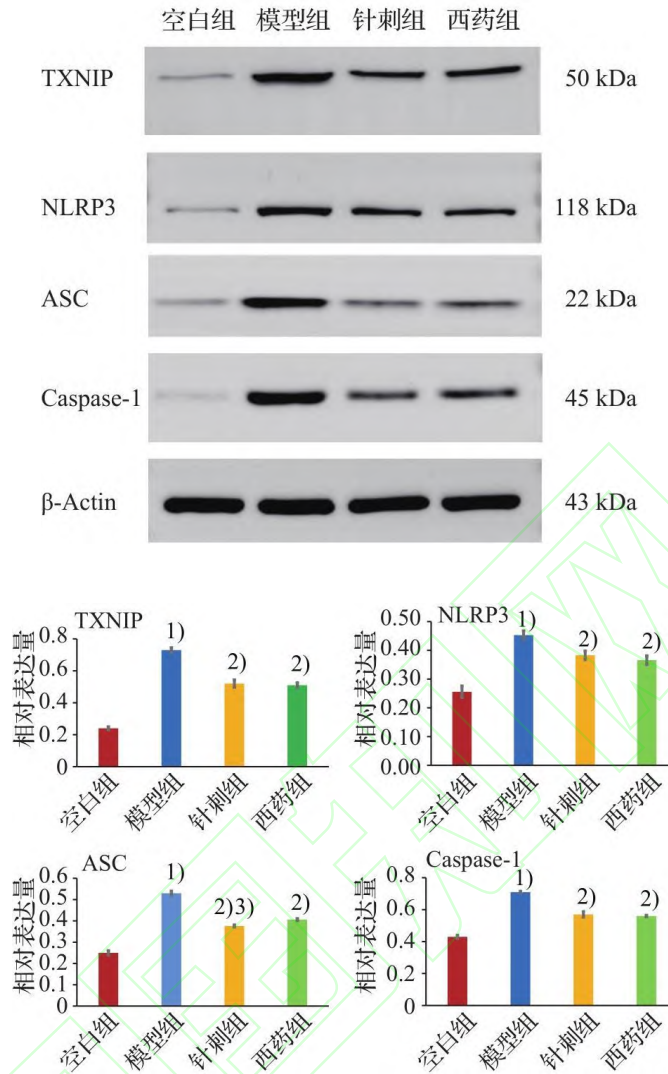


注：红色为 ROS 阳性表达。

图 3 各组大鼠肺组织中 ROS 阳性表达 (免疫荧光染色)

2.4 各组大鼠肺组织中 TXNIP、NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达比较

与空白组比较，模型组大鼠肺组织中 TXNIP、NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，针刺组、西药组大鼠肺组织中 TXNIP、NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达降低 ($P<0.01$)；与西药组比较，针刺组大鼠肺组织中 ASC 蛋白表达降低 ($P<0.05$)，针刺组和西药组大鼠肺组织中 TXNIP、NLRP3、Caspase-1 蛋白表达比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 4。



注：与空白组比较，¹⁾ $P < 0.01$ ；与模型组比较，²⁾ $P < 0.01$ ；与西药组比较，³⁾ $P < 0.05$ 。

图4 各组大鼠肺组织中TXNIP、NLRP3、ASC、Caspase-1蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, 3只鼠/组)

3 讨论

针灸治疗哮喘最早见于《素问·骨空论》：“其上气有音者，治其喉中央，在缺盆中者。”中医认为哮喘以痰饮内伏为宿根，以痰阻气道、肺失宣降为病机，病位在肺。“邵氏五针法”是邵经明教授在80余年的临床实践中，经过不断改进技术、筛选穴位，并进行三因素（肺俞、大椎、风门）两水平（深、浅）的正交试验，总结出的行之有效的哮喘防治方法^[10]。肺俞调理肺气，止咳平喘。针刺和艾灸“肺俞”可改善肺通气功能，提高肺通气顺应性，减轻气道内嗜酸性粒细胞的浸润，缓解哮喘气道炎性反应^[11-12]。大椎通阳泻热，理气肃肺。艾灸“大椎”可通过抑制NGF介导的相关神经反应减轻神经源性炎性反应，降低气道的狭窄和高阻性，达到治疗哮喘的目的^[13]。风门疏风固卫，祛邪平喘。三穴合用，精巧配穴，有调理肺气、宣肺固表、止咳平喘之功。

IL-1 β 是 IL-1 的主要分泌因子，能增加血管细胞粘附分子、细胞间粘附分子、E 选择素的合成、表达和释放，可促使嗜酸性粒细胞和中性粒细胞聚集浸润，刺激单核巨噬细胞，促进嗜酸性粒细胞脱颗粒，增强其细胞毒性，直接诱发哮喘。IL-18 是 IL-1 超家族成员，单独诱导嗜碱性粒细胞、肥大细胞、T 细胞后产生 Th2 细胞因子，促进哮喘炎症反应^[14-16]。段文秀等^[17]研究发现，大鼠肺组织毛细血管通透性、淋巴细胞浸润与 IL-1 β 炎症因子含量密切相关。张景鸿等^[18]研究发现 OVA 哮喘模型小鼠支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中 IL-1 β 、IL-18 含量与肺组织中性粒细胞和 BALF 中炎性细胞计数呈正相关。两者研究结果一致。本实验结果显示，模型组大鼠血清 IL-1 β 、IL-18 含量高于空白组，针刺治疗后，大鼠血清 IL-1 β 、IL-18 含量明显降低，提示针刺通过降低促炎因子 IL-1 β 、IL-18 的分泌，从而抑制哮喘气道炎症反应。

研究证明 OVA+氢氧化铝腹腔致敏是目前经典的哮喘造模方式，NLRP3 炎性小体则是此类铝佐剂的作用靶点^[19]。NLRP3 炎性小体是一种细胞内蛋白复合体，由核心蛋白 NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3)、转接蛋白凋亡相关斑点蛋白 (ASC) 以及效应蛋白半胱氨酸天冬氨酸特异蛋白酶 (Caspase-1) 组成，激活后的生物学效应广泛存在于多种细胞组织中，参与调节机体炎症反应^[20-21]，NLRP3 能感知信号刺激并作为支架蛋白结合 ASC，ASC 招募并水解 pro-caspase-1，形成具有酶活性的 Caspase-1，促进下游炎症因子 IL-1 β 、IL-18 的加工、成熟及释放^[22]。哮喘中的 NLRP3 炎性小体可通过模式识别受体激活，识别病原体、各类毒素及代谢物的刺激^[23]，在激酶 NEK7 (NIMA-related kinase 7) 的作用下分离出 Caspase-1，而后在核因子- κ B (NF- κ B) 的参与下，活化的 Caspase-1 与 ASC 的 N 端募集，IL-1 β 、IL-18 被裂解为具有生物活性的 IL-1 β 、IL-18，从而引发瀑布式炎症级联反应，加重哮喘^[24-25]。研究^[26]发现在支气管上皮细胞中，敲除 NLRP3 基因可降低粉尘螨介导的哮喘的细胞凋亡及炎症因子 IL-1 β 分泌。徐万超等^[27]通过建立哮喘模型发现，模型组小鼠肺组织中炎性小体蛋白 NLRP3、ASC、Caspase-1 表达增高，支气管周围及肺泡组织有大量炎性细胞浸润，气道管腔狭窄，基底膜增厚。本研究结果证实，模型组大鼠肺组织中炎性小体蛋白 NLRP3、ASC、Caspase-1 表达均高于空白组，与上述徐万超等^[27]研究结果一致。说明哮喘大鼠气道炎症反应受 NLRP3 炎性小体调控，通过激活 Caspase-1 启动瀑布式炎症级联反应，是哮喘发生的关键因素之一。哮喘模型大鼠针刺预处理后 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达均明显降低，提示针刺预处理可抑制 NLRP3 炎性小体从而影响通路下游炎症因子 IL-1 β 、

IL-18 的分泌，减轻哮喘炎症反应。既往研究^[28]也证实给予药物干预后可降低哮喘大鼠 NLRP3、Caspase-1 蛋白表达，缓解哮喘症状。

活性氧簇（ROS）是引起机体过氧化反应和炎症反应的重要信号因子^[29]，在组织细胞缺氧复氧损伤中，ROS 扮演着介导细胞损伤和触发炎症反应的关键作用。哮喘炎症反应的发生会导致大量 ROS 的产生，ROS 的过度产生又可促进硫氧还原蛋白反应蛋白（TXNIP）的表达，NLRP3 炎性小体在 TXNIP 的参与下被激活，进而推动下游炎症因子的成熟和分泌，加剧哮喘炎症反应。另一方面，ROS 又可进一步激活 NLRP3 炎性小体，增加 IL-1 β 及 IL-18 成熟释放，从而促进哮喘^[30]。TXNIP 是硫氧还蛋白（Trx）的内源性抑制剂^[31]，破坏细胞内氧化还原平衡，促进氧化应激，最终可诱导炎症反应或细胞凋亡。ROS 大量产生会诱导 TXNIP 与 NLRP3 结合，从而加重哮喘炎症反应的发生发展。实验研究^[32]发现哮喘小鼠肺泡灌洗液中 ROS 和肺组织中 TXNIP、NLRP3、Caspase-1 蛋白表达明显增加，药物干预后哮喘小鼠肺泡灌洗液中 ROS、IL-1 β 含量及肺组织中 TXNIP、NLRP3、Caspase-1 蛋白表达均降低。说明哮喘炎症反应的发生与 ROS/TXNIP/NLRP3 信号通路密切相关，通过调控 ROS/TXNIP/NLRP3 信号通路可以影响哮喘炎症反应的发生发展。本实验结果显示，模型组大鼠肺组织中 ROS 表达强度增高，而 TXNIP、NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达以及炎症因子 IL-18、IL-1 β 水平亦明显增高，提示 ROS 可以触发 TXNIP 与 NLRP3 结合，激活 NLRP3，促进细胞中 Caspase-1 前体裂解及 IL-1 β 、IL-18 的释放，进一步诱导炎症反应。而针刺预处理后大鼠肺组织中 ROS 表达强度和 TXNIP、NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达以及炎症因子 IL-1 β 、IL-18 水平均明显降低。提示针刺预处理可能通过调控 ROS/TXNIP/NLRP3 通路从而影响哮喘炎症反应的发生发展。

综上所述，ROS/TXNIP/NLRP3 通路调控哮喘大鼠气道炎症反应可能是哮喘发生发展的机制之一，针刺预处理可通过降低 ROS 的产生从而减少 TXNIP 与 NLRP3 的结合，进而减少下游炎症因子 IL-1 β 、IL-18 的分泌，阻断哮喘瀑布式炎症级联反应，从而有效改善哮喘大鼠气道炎症反应，这可能是“邵氏五针法”防治哮喘的作用机制之一。

参考文献

- [1] 2017 哮喘全球倡议指南中关于哮喘的定义、类型和诊断[J].中国全科医学,2018(13):1584.
- [2] 连杰,杨丽娟,林娜.IL-18 在支气管哮喘中的研究进展[J].右江医学,2022,50(5):384-387.
- [3] Swanson KV, Deng M, Ting JPY. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics[J]. Nat Rev Immunol,2019,19(8):477-489.

- [4] Ather JL, Ckless K, Martin R, et al. Serum amyloid A activates the NLRP3 inflammasome and promotes Th17 allergic asthma in mice[J]. *J Immunol*, 2011, 187(1):64–73.
- [5] 张君, 邵素菊, 任重, 等. "五针法"与常规针刺对寒饮伏肺型哮喘单项症状体征改善的对比研究[J]. *中国针灸*, 2018, 38(1):7–11.
- [6] 华金双, 冯罡, 邵素菊, 等. 邵经明治疗哮喘经验浅析[J]. *辽宁中医杂志*, 2016, 43(4):712–713.
- [7] 华金双, 李菡洁, 陈放, 等. 针刺预处理结合磷脂酰肌醇激酶阻断剂对哮喘大鼠气道炎症反应的影响[J]. *针刺研究*, 2022, 47(9):778–784.
- [8] 李才, 任立群. 人类疾病动物模型的复制[M], 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2017.
- [9] Nair A, Morsy MA, Jacob S. Dose translation between laboratory animals and human in preclinical and clinical phases of drug development[J]. *Drug Dev Res*, 2018, 79(8):373–382.
- [10] 邵素菊, 张应虎. 邵氏"五针法"治疗哮喘的源流探讨[J]. *辽宁中医杂志*, 2018, 45(5):1042–1045.
- [11] 秦中银, 陈盼碧, 唐徐韵, 等. 针刺调节丝裂原活化蛋白激酶通路影响哮喘大鼠肺组织嗜酸性粒细胞凋亡的机制研究[J]. *针刺研究*, 2022, 47(8):690–695.
- [12] 张国山, 邱冉冉, 潘江, 等. 艾灸对哮喘大鼠"肺俞"穴局部皮肤中组胺和神经肽的影响[J]. *针刺研究*, 2020, 45(2):117–121.
- [13] 张伟, 熊俊. 热敏灸大椎穴对哮喘大鼠神经源性炎症的影响[J]. *时珍国医国药*, 2015, 26(3):749–751.
- [14] 董健, 曾鹏, 车立纯, 等. 血清高迁移率族蛋白 B1、白细胞介素-1 β 及半乳糖凝集素-3 对过敏性哮喘患儿病情发展的诊断价值[J]. *中国临床医生杂志*, 2022, 50(9):1108–1110.
- [15] 王金海, 张婷卓, 李兴兰, 等. 头穴针刺对局灶性脑缺血大鼠海马旁回炎症反应相关细胞因子表达及脑梗死体积的影响[J]. *针刺研究*, 2019, 44(6):405–411.
- [16] Kim MK, Kim KB, Yoon K, et al. IL-1 α and IL-1 β as alternative biomarkers for risk assessment and the prediction of skin sensitization potency[J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2018, 81(17):830–843.
- [17] 段文秀, 吴子建, 胡玲, 等. 不同浓度艾烟对大鼠肺功能及血浆、肺组织中肿瘤坏死因子- α 和白介素-1 β 含量的影响[J]. *针刺研究*, 2018, 43(2):98–103.
- [18] 张景鸿, 韦丽莹, 陈一平. 1,25-二羟维生素 D₃ 通过 NLRP3/caspase-1/GSDMD 信号轴干预中性粒细胞性哮喘[J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(9):1327–1333.
- [19] Franchi L, Núñez G. The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1 β secretion but dispensable for adjuvant activity[J]. *Eur J Immunol*, 2008, 38(8):2085–2089.
- [20] Guarda G, Zenger M, Yazdi AS, et al. Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells[J]. *J Immunol*, 2011, 186(4):2529–2534.
- [21] Ji J, Hou JW, Xia YH, et al. NLRP3 inflammasome activation in alveolar epithelial cells promotes myofibroblast differentiation of lung-resident mesenchymal stem cells during pulmonary fibrogenesis[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2021, 1867(5):166077.
- [22] Sun XL, Jiao XF, Ma YR, et al. Trimethylamine N-oxide induces inflammation and endothelial dysfunction in human umbilical vein endothelial cells via activating ROS-TXNIP-NLRP3 inflammasome[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 481(1/2):63–70.

- [23] Man SM, Kanneganti TD. Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2016,16(1):7-21.
- [24] 张维康,潘灵辉.NOD样受体蛋白3炎症小体在呼吸机相关性肺损伤中的作用机制研究[J].*中华危重病急救医学*,2015(10):821-825.
- [25] Hui C,Liu X.Regulatory effect of NLRP3 on airway inflammatory response and pyroptosis in mice with asthma[J].*Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 2021, 23(9): 959-964.
- [26] Tsai YM, Chiang KH, Hung JY, et al. Der f1 induces pyroptosis in human bronchial epithelia via the NLRP3 inflammasome[J]. *Int J Mol Med*, 2018 ,41(2):757-764.
- [27] 徐万超,虞坚尔,薛征,等.平喘方对哮喘小鼠 NLRP3 炎症小体信号通路表达的影响[J].*中国免疫学杂志*,2022,38(6):681-686.
- [28] 白鑫宇,冯程程,石琬岚,等.加味五味石膏汤通过调节 Th1/Th2 免疫失衡及抑制 NLRP3/caspase-1 炎症小体对支气管哮喘小鼠的保护作用[J].*中药药理与临床*,2018,34(6):15-19.
- [29] Ye XC,Zuo DD,Yu L,et al. ROS/TXNIP pathway contributes to thrombin induced NLRP3 inflammasome activation and cell apoptosis in microglia[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2017,485(2): 499-505.
- [30] An X,Zhang YH,Cao Y,et al. Punicalagin protects diabetic nephropathy by inhibiting pyroptosis based on TXNIP/NLRP3 pathway[J]. *Nutrients*,2020,12(5):1516.
- [31] 王亚静,张静,宋卫卫,等.大黄素通过调控 ROS/TXNIP/NLRP3 轴介导的细胞焦亡途径减轻重症肺炎大鼠肺损伤[J].*中国病理生理杂志*,2021,37(7):1240-1245.
- [32] 端瑾,滕媛媛,杜莹莹.芍药苷对哮喘小鼠炎症的作用及其机制研究[J].*江苏科技信息*,2021,38(19):60-64.

(收稿日期: 2022-12-30, 编辑: 朱琦)