

# 喘可治穴位注射治疗慢性持续期支气管哮喘的表观遗传学机制

周 晨,张 舒\*,王海涛,蔡 峰,范艳红,许 靖,李 挺

(上海市第七人民医院 呼吸内科,上海 200137)

**摘要:**目的:探讨喘可治穴位注射治疗慢性持续期支气管哮喘病人的表观遗传学机制。方法:90例慢性持续期支气管哮喘病人随机分为观察组和对照组。对照组给予常规治疗,观察组在对照组基础上给予喘可治治疗。比较两组病人治疗前后的哮喘控制测试评分和肺功能指标。比较两组IFN- $\gamma$ 、IL-4和IL-17水平。比较两组的5-mC和5-hmC水平。结果:经治疗后,观察组病人的ACT评分显著高于对照组( $t=12.75, P=0.006$ )。治疗后观察组FEV1、FVC和PEF的水平显著高于对照组( $t=9.876, 13.75, 5.136, P=0.015, 0.008, 0.022$ )。观察组病人的5-mC和5-hmC水平显著低于对照组( $t=7.152, 9.586, P=0.003, 0.008$ )。观察组病人的IFN- $\gamma$ 水平显著高于对照组( $t=12.56, P=0.000$ ),IL-4和IL-17水平显著低于对照组( $t=15.78, 10.76, P=0.000, 0.008$ )。结论:喘可治穴位注射治疗慢性持续期支气管哮喘病人,能显著改善病人的哮喘控制症状和肺功能,推测可能与调控机体DNA甲基化和羟甲基化,调节免疫反应有关。

**关键词:**喘可治;穴位注射;慢性持续期支气管哮喘;临床疗效;表观遗传学

**中图分类号:**R562.2+5

**文献标识码:**B

**文章编号:**2095-512X(2020)06-0599-04

支气管哮喘的特征在于对各种刺激敏感性发作和广泛发作的气道阻塞。在全球范围内,它影响着3亿多各个年龄段的人。若不能较好的控制,哮喘会限制病人的日常生活,甚至导致死亡。支气管哮喘是一种复杂的疾病,遗传因素和环境因素均在哮喘的发展和表现中起作用<sup>[1]</sup>。目前国内外研究认为DNA甲基化的表观遗传变化可能导致哮喘的异质性炎症反应<sup>[2]</sup>。推测目标基因异常甲基化在哮喘的发病中发挥重要作用。相关研究显示支气管哮喘病人的DNA甲基化及羟甲基化与哮喘的严重程度有关<sup>[3]</sup>。此外哮喘是无法治愈的,没有一种治疗方法能够长期有效地治疗炎症或气道重塑,只能通过控制症状暂时来改善,药物是应用于哮喘的一线治疗方法。现代药理学研究表明喘可治注射液具有消炎、平喘、止咳、免疫调节、增强应激能力等作用,近年来逐渐应用于改善呼吸症状和气流受限,在减轻炎症反应和提高免疫功能方面疗效显著<sup>[4]</sup>。本研究旨在探讨喘可治穴位注射治疗慢性持续期支气管哮喘病人是否对其表观遗传调控产生影响并获得临床疗效,为探索其作用机制提供依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

收集2018-02~2019-02上海市第七人民医院呼吸科支气管哮喘慢性持续期病人共90例为研究对象,全部病人均符合支气管哮喘的诊断标准<sup>[5]</sup>。排除标准:排除近30天合并肺部感染者,排除肺癌,气管或喉癌病史的病人。随机分为观察组和对照组各45例。其中观察组男25例,女20例,对照组男23例,女22例。观察组年龄42~73岁,平均年龄 $61.5 \pm 9.7$ 岁,对照组年龄40~75岁,平均年龄 $63.1 \pm 8.5$ 岁,两组病人的性别、年龄一般资料相比无统计学差异,具有可比性。

### 1.2 方法

对照组给予常规解痉平喘等西药治疗,观察组在常规治疗基础上加用喘可治足三里穴位注射。每次穴位注射1支喘可治(2mL),每周2次,连续治疗2个月。

穴位注射方法:注射前告知可能有轻微疼痛感。取2mL针筒,抽取1支喘可治,定位治疗穴位,注射药液。

收稿日期:2020-07-17;修回日期:2020-10-29

基金项目:浦东新区卫生和计划生育委员会学科建设主攻课题(PWZzb2017-12)

作者简介:周晨(1986-),男,上海市第七人民医院呼吸内科主治医师。

通讯作者:张舒,副主任医师,硕士研究生导师,E-mail:allan\_zhang945@hotmail.com 上海市第七人民医院呼吸内科,200137

### 1.3 评价标准

于治疗前后分别评估两组病人的哮喘控制测试评分(ACT)。采用肺功能检测仪测定两组治疗前后第一秒用力呼气量(FEV<sub>1</sub>)、肺活量(FVC)及最高呼气流速(PEF)。采用ELISA法检测血清细胞因子干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )、白介素-4(IL-4)、白介素-17(IL-17)的含量。

外周血DNA甲基化及羟甲基化的测定:采用

酚-氯仿法抽提外周血基因组DNA,并进行亚硫酸盐修饰,应用甲基化DNA定量试剂盒测定DNA甲基化及羟甲基化。

## 2 结果

### 2.1 两组病人治疗前后ACT评分的比较

表1 两组患者ACT评分的比较

| 组别       | ACT评分        |                |
|----------|--------------|----------------|
|          | 治疗前          | 治疗后            |
| 对照组      | 11.65 ± 1.94 | 17.21 ± 2.87*  |
| 观察组      | 12.68 ± 2.07 | 23.60 ± 3.25** |
| <i>t</i> | 0.596        | 12.75          |
| <i>P</i> | 0.327        | 0.006          |

### 2.2 两组肺功能指标的比较

表2 两组肺功能指标的比较

| 组别       | FEV <sub>1</sub> (L) |               | FVC(L)      |               | PEF(L/s)    |               |
|----------|----------------------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|
|          | 治疗前                  | 治疗后           | 治疗前         | 治疗后           | 治疗前         | 治疗后           |
| 对照组      | 1.88 ± 0.29          | 2.15 ± 0.58*  | 1.63 ± 0.26 | 1.98 ± 0.25*  | 1.69 ± 0.43 | 2.53 ± 0.39*  |
| 观察组      | 1.83 ± 0.35          | 2.69 ± 0.62** | 1.66 ± 0.30 | 2.52 ± 0.44** | 1.73 ± 0.35 | 3.17 ± 0.23** |
| <i>t</i> | 0.638                | 9.876         | 0.359       | 13.75         | 0.758       | 5.136         |
| <i>P</i> | 0.139                | 0.015         | 0.126       | 0.008         | 0.236       | 0.022         |

### 2.3 两组病人治疗前后5-mC和5-hmC活性的比较

表3 两组5-mC和5-hmC的比较

| 组别       | 5-mC活性( $\mu$ mol/L) |               | 5-hmC活性( $\mu$ mol/L) |               |
|----------|----------------------|---------------|-----------------------|---------------|
|          | 治疗前                  | 治疗后           | 治疗前                   | 治疗后           |
| 对照组      | 6.82 ± 1.39          | 4.72 ± 1.16*  | 46.75 ± 9.23          | 35.91 ± 8.72* |
| 观察组      | 6.65 ± 2.07          | 2.85 ± 1.87** | 47.14 ± 8.65          | 26.35 ± 6.69* |
| <i>t</i> | 1.036                | 7.152         | 0.852                 | 9.586         |
| <i>P</i> | 0.233                | 0.003         | 0.229                 | 0.008         |

### 2.4 两组病人细胞因子的比较

表4 两组患者细胞因子的比较

| 组别       | IFN- $\gamma$ (pg/mL) |                | IL-4(pg/mL)   |                | IL-17(pg/mL) |               |
|----------|-----------------------|----------------|---------------|----------------|--------------|---------------|
|          | 治疗前                   | 治疗后            | 治疗前           | 治疗后            | 治疗前          | 治疗后           |
| 对照组      | 29.68 ± 5.19          | 40.75 ± 5.37*  | 139.76 ± 8.15 | 102.87 ± 4.93* | 5.32 ± 0.63  | 4.19 ± 0.36*  |
| 观察组      | 30.16 ± 4.75          | 65.78 ± 6.18** | 142.39 ± 6.73 | 73.56 ± 7.03** | 5.18 ± 0.51  | 2.28 ± 0.40** |
| <i>t</i> | 0.579                 | 12.56          | 0.957         | 15.78          | 0.759        | 10.76         |
| <i>P</i> | 0.208                 | 0.000          | 0.125         | 0.000          | 0.197        | 0.008         |

## 3 讨论

哮喘是一种气道慢性炎性疾病,哮喘最初可以

发生在任何年龄<sup>[6,7]</sup>。全世界约有3亿人受哮喘影响,每年约有1050万的成年因哮喘而就医<sup>[8]</sup>。了解哮喘的发作机制对于临床诊断和治疗至关重要<sup>[9]</sup>。

在中医中,哮喘属于喘息综合征和气喘综合征,关于这种疾病的记录最早见于汉代(约公元200年),即《黄帝内经》,认为而作喘咳痰则与肺、脾、肾三脏有关<sup>[10]</sup>。非急性期支气管哮喘的治疗以通络、泄郁肃肺为主。此时采用针刺取穴,具有宣肺、解表的作用,本研究拟通过喘可治注射液穴位注射治疗的方法探索其表观遗传学机制。

穴位注射疗法是指将药物(中草药提取物,西药,维生素,生理盐水等)注射到某些穴位或特定部位。该疗法的优点是针刺刺激和药物给药同时完成。近年来一些系统评价表明,穴位注射疗法可以预防术后肠梗阻,并能治疗口灼症<sup>[11]</sup>。同时,某些随机对照试验表明,穴位注射无论是西药还是中国中药可改善症状哮喘病人,穴位注射(分别使用山莨菪碱和重组人干扰素 $\gamma$ )加上基本治疗与基本治疗相比能显示改善哮喘控制的平均时间(-1.50天,95% CI, -2.36~-0.64; -2.48天,95% CI, -4.03~-0.93)<sup>[12]</sup>。且穴位注射组和对照组之间发生的不良事件无差异性显著。穴位注射组的不良事件包括局部皮肤发红,肿胀和疼痛,全部不良反应均能迅速得到缓解,纳入的随机对照试验中未报告严重不良事件。足三里穴位健脾益气化痰的功效,本研究采用足三里穴位注射喘可治,治疗组病人的哮喘控制测试评分显著升高。此外本研究将FEV<sub>1</sub>、FVC和PEF的水平作为肺功能的观察指标,提示喘可治穴位注射显著改善非急性发作期哮喘病人的肺功能。

当前的表观遗传学方法正在应用于临床前药物开发,药物与机体的遗传机制正在建立联系。Li和Ampleford等已证明遗传多态性与哮喘和过敏症的发生风险相关<sup>[13]</sup>。5-mC和5-hmC是稳定的表观遗传标记,在哮喘早期发展和疾病发病机理中起着关键作用<sup>[14,15]</sup>。因此探讨药物治疗哮喘的表观遗传调控的影响,能够为探索其作用机制和治疗方向提供新思路。本研究测定了全基因组5-mC,5-hmC水平,喘可治注射液治疗组病人的5-mC和5-hmC水平显著低于对照组。提示喘可治穴位注射疗法能降低机体的DNA甲基化和羟甲基化反应。

已有研究证明DNA甲基化的表观遗传变化与T效应细胞极化有关,靶向效应细胞是解决哮喘的重要潜在机制。TH2和TH17途径均涉及哮喘发作过程,该途径中免疫应答的细胞因子特性对于维持呼吸道上皮的稳定性是必不可少的。Vroman等等研究显示轻度至中度哮喘病人中过敏原暴露或环境触发会导致TH2介导的嗜酸性粒细胞炎症。

树突状细胞(DCs)的激活状态对于TH2和TH17细胞分化均至关重要。Liu等研究显示了以TH2/TH17为主的哮喘病人中肺细胞灌洗液(BALF)中的IL-1 $\beta$ ,IL-6,IL-23,补体C3a和血清淀粉样蛋白A水平升高,且IL-1 $\beta$ 与C3a水平相关。此外研究还发现了TH2/TH17型哮喘病人中IL-1 $\beta$ 途径起关键作用。哮喘病人肺细胞灌洗液(BALF)中的IL-1 $\alpha$ ,IL-6,IL-8,粒细胞集落刺激因子和GM-CSF水平也显著升高。IL-1 $\alpha$ 直接参与IL-8的产生,并可能导致嗜中性哮喘。因此,Chairakaki等建议将TH2和TH17途径作为潜在的治疗哮喘的通路。本研究观察哮喘病人在接受治疗后DNA甲基化发生变化时,结果显示喘可治能够调节Th1/Th2平衡和Th17型免疫反应。

IFN- $\gamma$ 是巨噬细胞的强激活剂,其主要功能是保护宿主免受细胞内感染,在机体感染机制中,IL-10通过抑制IFN- $\gamma$ 的表达使宿主清除病原体的能力下降,促进炎症的进展。在宿主清除病原体,炎症消除的过程中,IFN- $\gamma$ 水平上调。IL-4和IL-17也是涉及严重炎症疾病的主要介体因子,能够通过结合其受体诱导其他炎症因子(如IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-4)的释放。近年来研究显示DNA甲基化表观遗传学异常参与哮喘的发生发展过程,推测其机制可能与DNA甲基化推进哮喘发病基因表达增加,由炎症因子介导的机体平衡被打破,从而造成哮喘病情的难以控制。本研究结果显示观察组在经治疗后IFN- $\gamma$ 水平显著升高,IL-4和IL-17水平显著降低,也进一步提示机体DNA甲基化和羟甲基化等遗传学的改变可能与调节炎症免疫反应密切相关。

综上所述,喘可治穴位注射能显著改善哮喘病人的哮喘控制症状和肺功能,推测其机制可能与调控机体DNA甲基化和羟甲基化,同时调节免疫反应有关。本研究为进一步研究喘可治穴位注射治疗哮喘的作用机制提供依据。

## 参考文献

- [1] Marta M, Wójcik-Pszczol Katarzyna, Milena P, et al. Fibroblast-to-myofibroblast transition in bronchial asthma[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2018;75(21): 3943-3961
- [2] Jamniczky HA, Boughner JC, Rolian C, et al. Rediscovering Waddington in the post-genomic age: Operationalising Waddington's epigenetics reveals new ways to investigate the generation and modulation of phenotypic variation. Bioessays, 2010;32(7):553-558

(下转第609页)

等基础研究增加资料储备。本文仅就呼和浩特市一年的气传花粉数据进行了分析报道,总体样本量仍较少,这确为研究的不足之处,今后我们将继续收集数据扩大样本量,同时对现有的日播报平台进行不断探索与改进,期望切实为AR的防治提供不同途径的策略与方法。

## 参考文献

- [1] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会鼻科组,中华医学会耳鼻咽喉头颈外科分会鼻科学组. 变应性鼻炎诊断及治疗指南(2015年,天津). 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2016;51(1):6-24
- [2] 关凯,王良录. 从花粉症看过敏性疾病的整体诊疗策略[J]. 山东大学耳鼻咽喉眼学报, 2019;33(1):13-19
- [3] 张克生,裴杨,乌兰,等. 内蒙呼和浩特地区气传致敏花粉调查[J]. 佳木斯医学院学报, 1986;9(4):315-318
- [4] Wang X D, Zheng M, Lou H F, et al. An increased prevalence of self-reported allergic rhinitis in major Chinese cities from 2005 to 2011[J]. Allergy, 2016;71(8):1170-1180
- [5] Wang X.-Y, Ma T.-T, Wang X.-Y, et al. Prevalence of pollen-induced allergic rhinitis with high pollen exposure in grasslands of northern China[J]. Allergy, 2018;73(6):1232-1243
- [6] 王晓艳,宁慧宇,韩班布拉,等. 草原地区气传花粉可诱发变应性鼻炎[J]. 基因组学与应用生物学, 2017(07):218-223
- [7] 吕靓,张华. 气传花粉研究新进展[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2014;28(5):355-358
- [8] 王晓艳,田宗梅,宁慧宇,等. 北京城区气传花粉分布与过敏性疾病就诊关系分析[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2017;31(10):757-760
- [9] 胡伟倪,朱丽,谢立锋,等. 北京市三年内每日花粉浓度与变应性鼻炎患者就诊比例的关联分析[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2017;52(1):31-36
- [10] Wakamiya S, Matsune S, Okubo K, et al. Causal Relationships Among Pollen Counts, Tweet Numbers, and Patient Numbers for Seasonal Allergic Rhinitis Surveillance: Retrospective Analysis[J]. Journal of medical Internet research. 2019;21(2):e10450
- [11] Lipiec A, Rapiejko P, Furmańczyk K, et al. The dynamics of pollen seasons of the most allergenic plants - 15-year observations in Warsaw[J]. Otolaryngol Pol. 2018;72(6):44-53
- [12] 武静,宋岚,刘淑梅. 呼和浩特市气传致敏花粉调查与花粉症临床资料分析[J]. 职业与健康. 2013;29(3):266-269
- [13] Kaidashev I, Morokhovets H, Rodinkova V, et al. Patterns in Google Trends Terms Reporting Rhinitis and Ragweed Pollen Season in Ukraine[J]. Int Arch Allergy Immunol 2019;178:363-369
- [14] 谢水祥,马廉兰,刘志刚,等. 气传致敏花粉飘散与气象七要素的相关性[J]. 中国临床康复. 2006;10(12):56-58
- [15] 欧阳昱晖,范尔钟,李颖,等. 春季花粉浓度对过敏性鼻炎患者的影响[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科. 2011;18(12):628-630
- (上接第601页)
- [3] Perry M M, Lavender P, Scott Kuo C H, et al. DNA methylation modules in airway smooth muscle are associated with asthma severity[J]. European Respiratory Journal, 2018;51(4):1701068
- [4] 郑文江,彭紫荆,张天鸽,等. 喘可治注射液穴位注射治疗慢性阻塞性肺疾病稳定期的Meta分析及试验序贯分析[J]. 中药新药与临床药理, 2019;30(06):725-732
- [5] Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary[J]. The European respiratory journal, 2018;7(12):143-146
- [6] Barnes P J. Recent Advances in Asthma Management[J]. European Respiratory & Pulmonary Diseases, 2018;4(1):15-19
- [7] 李叶荣,吕晓春,王欢,等. 规范化管理对儿童支气管哮喘反复的影响[J]. 内蒙古医科大学学报, 2016;38(S1):146-150
- [8] Nunes C, Pereira A M, Múrio Morais-Almeida. Asthma costs and social impact[J]. asthma research & practice, 2017;3(1):1
- [9] Keglowski L F, Borger P. The Three A's in Asthma - Airway Smooth Muscle, Airway Remodeling & Angiogenesis[J]. The Open Respiratory Medicine Journal, 2015;9(1):70-80
- [10] 李现军,陈建军,马宏鹏. 中医治疗非急性发作期支气管哮喘临床观察[J]. 河北医学, 2014(6):1025-1027
- [11] Yan Z, Ding N, Hua H. A systematic review of acupuncture or acupoint injection for management of burning mouth syndrome[J]. Quintessence International, 2012;43(8):695-701
- [12] Wang M, Gao Y H, Xu J, et al. Zusanli (ST36) acupoint injection for preventing postoperative ileus: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials[J]. Complementary Therapies in Medicine, 2015;23(3):469-483
- [13] Li X, Ampleford E J, Howard T D. Genome-wide association studies of asthma indicate opposite immunopathogenesis direction from autoimmune diseases[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2012;130(4):861-868
- [14] Brand S, Kesper D A, Teich, et al. DNA methylation of TH1/TH2 cytokine genes affects sensitization and progress of experimental asthma[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2012;129(6):1602-1610
- [15] Turgeon P J, Sukumar A N, Marsden P A. Epigenetics of Cardiovascular Disease - A New "Beat" in Coronary Artery Disease[J]. Med Epigenet, 2014;2(1):37-52