

# 针刺联合补脾强力方治疗对自身免疫性重症肌无力的免疫调控

王晓玲<sup>1</sup>, 范晓艳<sup>2△</sup>, 赵鹏涛<sup>1</sup>, 曾天文<sup>1</sup>

(1. 渭南市中心医院 陕西 渭南 714000; 2. 陕西省康复医院 陕西 西安 710065)

**摘要** 目的: 探讨针刺联合补脾强力方治疗对自身免疫性重症肌无力的免疫调控作用。方法: SD 大鼠 40 只随机分为空白组、模型组、补脾强力方组、针刺治疗组和针刺联合补脾强力方组, 除空白组外, 其余组采用免疫乳剂的制备构建重症肌无力大鼠模型。造模成功后第 2 天, 按不同组给予相应治疗, 持续治疗 21 d。进行肌无力评分; 流式细胞检测 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 含量; ELISA 检测血清 IgG、IgA、IgM、IFN- $\gamma$  和 IL-18 水平; qRT-PCR 检测胸腺组织 IL-10、FOXP3 mRNA 表达; Western Blot 检测胸腺组织 CD19、CD4 蛋白表达。结果: 与空白组比较, 模型组肌力评分、CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 水平、血清 IgG、IgA、IgM、IFN- $\gamma$ 、IL-18 水平及 CD19、CD4 表达明显升高, CD8<sup>+</sup> 水平及 FOXP3 mRNA 表达明显降低, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 联合治疗组可明显降低肌力评分、CD3<sup>+</sup>、IgG、IgA、IgM、IFN- $\gamma$ 、IL-18 水平及 CD19、CD4 蛋白表达, 明显升高 CD8<sup>+</sup> 水平及 FOXP3 mRNA 表达, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论: 针刺联合补脾强力方治疗能下调重症肌无力大鼠中 CD3<sup>+</sup>、免疫球蛋白分泌及 CD19、CD4 蛋白表达, 可介导免疫调控, 缓解重症肌无力。

**关键词** 重症肌无力; 针刺; 补脾强力方; 免疫平衡

中图分类号: R246.6 文献标识码: A

DOI: 10.19917/j.cnki.1005-0779.022015

## Immunomodulatory Effect of Acupuncture Combined with Bupi Qiangli Formula on Autoimmune MG

WANG Xiaoling<sup>1</sup>, FAN Xiaoyan<sup>2△</sup>, ZHAO Pengtao<sup>1</sup>, ZENG Tianwen<sup>1</sup>

(1. Weinan Central Hospital, Weinan 714000, China; 2. Shaanxi Rehabilitation Hospital, Xi'an 710065, China)

**Abstract Objective:** To explore the immunomodulatory effect of acupuncture combined with Bupi Qiangli Formula on autoimmune myasthenia gravis (MG). **Methods:** 40 SD rats were randomly divided into the control group, the model group, the Bupi Qiangli Formula group, the acupuncture group and the combination group (acupuncture combined with Bupi Qiangli Formula). MG model was established by immune emulsion. On the 2nd day after successful modeling, the rats were given corresponding interventions for 21 days. The scores of muscle strength were assessed, the contents of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> were detected by flow cytometry, the serum levels of IgG, IgA, IgM, IFN- $\gamma$  and IL-18 were detected by ELISA, the mRNA expressions of IL-10 and FOXP3 in thymus tissues were detected by qRT-PCR, and the protein expressions of CD19 and CD4 in thymus tissues were detected by Western Blot. **Results:** Compared to those in the blank group, the scores of muscle strength, the contents of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, the serum levels of IgG, IgA, IgM, IFN- $\gamma$  and IL-18, as well as the expressions of CD19 and CD4 were significantly increased, whereas the level of CD8<sup>+</sup> and the mRNA expression of FOXP3 were significantly decreased in the model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Compared to those in the model group, the scores of muscle strength, the levels of CD3<sup>+</sup>, IgG, IgA, IgM, IFN- $\gamma$  and IL-18, as well as the protein expressions of CD19 and CD4 were significantly decreased, whereas the level of

基金项目: 重点研发-社发攻关 编号: 2019-ZDYF-SFGG-59。

作者简介: 王晓玲 (1983-), 女, 主治医师, 研究方向: 针灸治疗神经康复方面的研究。

△通讯作者: 范晓艳 (1979-), 女, 主任医师, 研究方向: 针灸结合康复运动治疗卒中后肩痛的研究。

CD8<sup>+</sup> and the mRNA expression of FOXP3 were significantly increased in the combination group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Acupuncture combined with Bupi Qiangli Formula can down-regulate the secretions of CD3<sup>+</sup> and immunoglobulin, lower the protein expressions of CD19 and CD4 in rats with MG. The therapy can mediate immune regulation and alleviate MG.

**Key words** Myasthenia gravis; Acupuncture; Bupi Qiangli Formula; Immune balance

重症肌无力(Myasthenia Gravis, MG)是一种以神经肌肉接头传递功能障碍为特征的自身免疫性疾病,与乙酰胆碱受体(AchR)结合的抗体引起补体级联激活和突触后膜破坏,导致神经肌肉接头AChR的丢失,产生依赖T细胞的抗体,进而导致耐受机制的崩溃以及骨骼肌无力和疲劳的临床表现<sup>[1]</sup>。MG的常用治疗方法包括乙酰胆碱酯酶抑制剂、皮质类固醇和免疫抑制剂、静脉免疫球蛋白(IVIG)或血浆置换等<sup>[2]</sup>。但仍有1/3的患者经历了MG的加重,对标准治疗的反应很差,与疾病和治疗相关的发病率仍然很高<sup>[3]</sup>。辅助性T细胞(T follicular helper cells, TFH)及以CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>细胞为特征的T调节细胞(T-regulatory cells, Tregs)是参与体液免疫反应的主要T细胞亚群,在自身免疫性疾病中起着关键作用<sup>[4]</sup>。因此,重点评价Treg缺陷或功能障碍在MG相关自身免疫病理中的作用,可能为一种潜在的治疗策略。

补充替代医学因其远期疗效好、副作用少等优点,越来越多地被用于治疗MG,针灸是最常用的补充医学形式之一<sup>[5]</sup>。如今,越来越多的MG患者向补充医学和替代医学寻求帮助。针灸作为中医的重要组成部分,长期以来一直被用于治疗MG疾病,可以缓解患者的症状<sup>[6]</sup>。然而,目前尚无系统评价针刺治疗MG的机制。而中医具有补脾益损、升阳举陷治法,在患有自身免疫性疾病的患者中,由于中医药具有有效、廉价且相对安全的特性致使用率上升<sup>[7]</sup>。补脾强力方由黄芪、党参、苍术、土茯苓、陈皮、丹参、淫羊藿、锁阳、生地、制附片组成,具有补脾养肾兼以养肝的效果<sup>[8]</sup>。鉴于针刺治疗自身免疫性疾病的研究现状及补脾强力方的特性,本研究旨在评价针刺联合补脾强力方对自身免疫性MG的免疫调控作用,为MG的治疗提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

SD 雄性大鼠 40 只, 体重(240 ± 10) g, 8 周龄, 购于成都达硕实验动物有限公司, 使用许可证号: SYXK(川) 2018-119, 生产许可证号: SCXK(川) 2019-031。大鼠饲养于恒温(20 ~ 25 °C)、恒湿(50% ± 5%)、自然采光和自由饮水条件下, 符合《实验动物管理条例》要求。

### 1.2 药物与仪器

大鼠 AChR97-116 肽购自中国上海中肽有限公司; 补脾强力方(黄芪 6.6 g, 党参 6 g, 苍术 2.2 g, 土茯苓 4 g, 陈皮 2 g, 丹参 3.6 g, 淫羊藿 1.5 g, 锁阳 2.2 g, 生地 4 g, 制附片 3.5 g) 中药配方颗粒, 由广东一方制药有限公司生产, 取相应剂量, 加入 10 倍量的水, 浸泡 8 h 后煮沸, 提取 5 h, 将药液过滤去渣, 滤液浓缩至生药含量为 1.5 g/mL; IgG(批号: ZC-37002)、IgA(批号: ZC-37000)、IgM(批号: ZC-37006)、IFN- $\gamma$ (批号: ZC-36294) 及 IL-18(批号: ZC-36389) 试剂盒购自上海茁彩生物公司; FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司); TRIzol 试剂 RNA 提取试剂盒(批号: 14105) 购买自 Invitrogen 公司(卡尔斯巴德, 美国); PCR 扩增试剂盒(批号: AK9906) 购买自 TaKaRa 公司(日本); CD19(批号: sc-373897)、CD4(批号: sc-19641) 相关抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司(美国)。

### 1.3 分组与造模

大鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为空白组、模型组、补脾强力方组、针刺治疗组和针刺联合补脾强力方组。通过免疫乳剂的制备构建实验动物模型<sup>[7]</sup>: 首先将鼠源性 AchR- $\alpha$  亚基 97-116 肽段序列(R97-116)、完全弗氏佐剂(CFA)和磷酸缓冲液(PBS)三者按 1:1.5:1.5 的比例充分混匀制成免疫乳剂; 首次免疫: 取乳剂 200  $\mu$ L(含 R97-116: 100  $\mu$ g) 于造模鼠足垫、腹部和背部多点皮下注射, 空白组皮下注射等量 PBS; 首次免疫后第 30 天及第 45 天, 将 R97-116、不完全弗氏佐剂(IFA)和 PBS 三者按 1:3:3 的比例充分混匀制成免疫乳剂后, 再取乳剂 200  $\mu$ L(含 R97-116: 50  $\mu$ g) 加强免疫, 空白组注射等量 PBS。3 次免疫结束后对大鼠进行肌力评分, 按 Lennon<sup>[9]</sup> 症状分级评分法对大鼠的肌无力症状进行评定, 评分标准为 0 级: 正常肌力; 1 级: 撕咬无力, 四肢力量较差, 在光滑地而上前肢打滑, 活动减少且易疲劳; 2 级: 明显无力, 体息时身体呈隆起姿势, 头尾下垂, 大腿外展, 前肢趾弯曲, 动作笨拙, 行走不稳; 3 级: 严重无力表现, 无撕咬动作, 肌肉震, 呼吸困难, 濒死或死亡。当 Lennon 症状分级评分  $\geq 1$  级, 则判定大鼠模型复制成功。

### 1.4 治疗方法

1.4.1 空白组、模型组 相同条件下饲养, 每日抓取,

不予其他干预。

1.4.2 补脾强力方组 每日以 10 g/kg 补脾强力方灌胃。

1.4.3 针刺治疗组 将大鼠固定于柔软型大鼠固定器上,选取大鼠的手三里、足三里、脾俞和肾俞;除手三里穴直刺 5 mm 外,其余穴位均直刺 6 mm,针刺后行平补平泻手法,使针下沉紧,操作结束后在针上加高约 1 cm 的艾炷,连续灸 3 壮,并留针 30 min,每日操作 1 次。穴位定位参照《大鼠穴位图谱的研制》以及李忠仁版的《实验针灸学》<sup>[10]</sup>。

1.4.4 针刺联合补脾强力方组 灌胃补脾强力方 + 针刺治疗,持续治疗 21 d。补脾强力方根据临床成人剂量换算动物临床等效剂量为 10 g/kg,使用时以蒸馏水配制成所需浓度。

### 1.5 大鼠肌力评分

大鼠肌力评分,通过重复抓握练习进行检测以及将大鼠放置在平台上观察其是否有无力的表现进行临床评分<sup>[11]</sup>:0 分:力量正常,无异常;1 分:轻度活动减少,握力或哭声较弱,运动结束时更明显;2 分:运动前出现临床体征(震颤,头朝下,驼背,握力弱);3 分:运动前出现严重临床体征,无握力,奄奄一息;4 分:运动结束时出现临床体征(震颤,头朝下,驼背,握力较弱)。

### 1.6 标本采集与检测

1.6.1 流式细胞检测 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 含量 取抗凝血 100 μL 加入流式测定管中,分别加入 5 μL APC 标记的 CD3 McAb 及 5 μL FITC 标记的 CD4 McAb、5 μL PE 标记的 CD8 McAb 后混匀,避光孵育约 20 min,加 2 mL 溶血素,避光孵育约 10 min,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清液,加 PBS 洗 2 遍,弃上清液,加入 PBS 缓冲液,调整细胞浓度至 1 × 10<sup>6</sup> 个细胞/mL,于 FACSCalibur 流式细胞仪检测 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 水平。

1.6.2 ELISA 检测血清因子 腹主动脉采血 3 mL,分离血清,按照 ELISA 试剂盒说明检测血清 IgG、IgA、IgM、IFN-γ 及 IL-18 水平。

1.6.3 qRT-PCR 检测胸腺组织 IL-10、FOXP3 mRNA 表达 处死大鼠,取胸腺组织,TRIzol<sup>®</sup> 试剂提取样本总 RNA,RT 试剂盒反转录。严格按照逆转录试剂盒和相关引物的说明书加入相应量的试剂进行聚合酶链反应,GAPDH 作为内参。引物序列:IL-10:上游 5'-GCTCAGCACTGCTATGTTGC-3',下游 5'-TGTTGTCC AGCTGCTCCTTC-3';Foxp3:上游 5'-CACCTATGCCACCCCTTATCCG-3',下游 5'-CATGCGAGTA-AACCAATGGTAGA-3';GAPDH:上游 5'-AGTCGGT-GAAC GGATTG-3',下游 5'-GGGGTCGTTGATGGCAA-CA-3'。记录 CT 值,采用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法分析 mRNA 相对表达水平。

1.6.4 WB 检测胸腺组织 CD19、CD4 蛋白表达 取胸腺组织,RIPA 裂解液提取样本总蛋白,BCA 进行蛋白质定量,SDS-PAGE 分离,PVDF 转膜,5% 的脱脂奶粉封闭 1 h,按照实验目的结合一抗 CD19、CD4 和 β-catin 4 °C 孵育过夜,随后与辣根过氧化物酶偶联的二抗室温孵育 1 h,TBST 清洗,ECL 暗室显色,Bio-Rad 全能成像系统采集图像,Image-ProPlus 分析光密度,以 β-actin 为内参,阴性对照组目标蛋白质相对含量为 1,计算各组蛋白质的相对表达量,实验重复 3 次。

### 1.7 统计学处理

应用 SPSS 22.0 软件进行数据统计分析,数据均表示为平均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ),采用 Shapiro Wilk 检验数据是否符合正态分布,对于符合正态分布的数据,两组间均数比较采用 LSD-t 法分析,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),对于非正态分布的数据比较采用非参数 Mann-Whitney U 检验。对于所有分析 P < 0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠肌力评分比较

与空白组比较,模型组肌力评分明显升高,差异具有统计学意义(P < 0.01),与模型组比较,补脾强力方组、针刺治疗组和联合治疗组的肌力评分均明显降低,差异具有统计学意义(P < 0.05 或 P < 0.01)。见表 1。

表 1 各组大鼠肌力评分比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	肌力评分(分)
空白组	8	0.00 ± 0.00
模型组	8	1.93 ± 0.14 <sup>**</sup>
补脾强力方组	8	1.45 ± 0.05 <sup>#</sup>
针刺治疗组	8	1.29 ± 0.03 <sup>##</sup>
联合治疗组	8	1.06 ± 0.02 <sup>##</sup>

注:与空白组比较,<sup>\*\*</sup>P < 0.01,<sup>\*</sup>P < 0.05;与模型组比较,<sup>##</sup>P < 0.01,<sup>#</sup>P < 0.05。

### 2.2 各组大鼠 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 及 CD8<sup>+</sup> 水平比较

与空白组比较,模型组 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 水平明显升高,CD8<sup>+</sup> 水平明显降低,差异具有统计学意义(P < 0.05 或 P < 0.01);与模型组比较,联合治疗组可明显降低 CD3<sup>+</sup> 水平,补脾强力方组、针刺治疗组可明显降低 CD4<sup>+</sup> 水平,差异具有统计学意义(P < 0.05),补脾强力方组、针刺治疗组和联合治疗组 CD8<sup>+</sup> 水平升高,但差异无统计学意义(P > 0.05)。见表 2、图 1。

表 2 各组大鼠 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 及 CD8<sup>+</sup> 水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	CD3 <sup>+</sup> (%)	CD4 <sup>+</sup> (%)	CD8 <sup>+</sup> (%)
空白组	8	50.48 ± 3.95	33.88 ± 2.99	32.09 ± 1.49
模型组	8	63.41 ± 4.49 <sup>**</sup>	40.35 ± 2.12 <sup>*</sup>	19.52 ± 0.34 <sup>**</sup>
补脾强力方组	8	60.60 ± 3.13	33.15 ± 1.24 <sup>#</sup>	23.55 ± 7.96
针刺治疗组	8	58.47 ± 4.11	32.97 ± 6.68 <sup>#</sup>	24.74 ± 1.35
联合治疗组	8	54.35 ± 1.46 <sup>#</sup>	35.10 ± 1.70	24.86 ± 2.22

注:与空白组比较,<sup>\*\*</sup>P < 0.01,<sup>\*</sup>P < 0.05;与模型组比较,<sup>##</sup>P < 0.01,<sup>#</sup>P < 0.05。

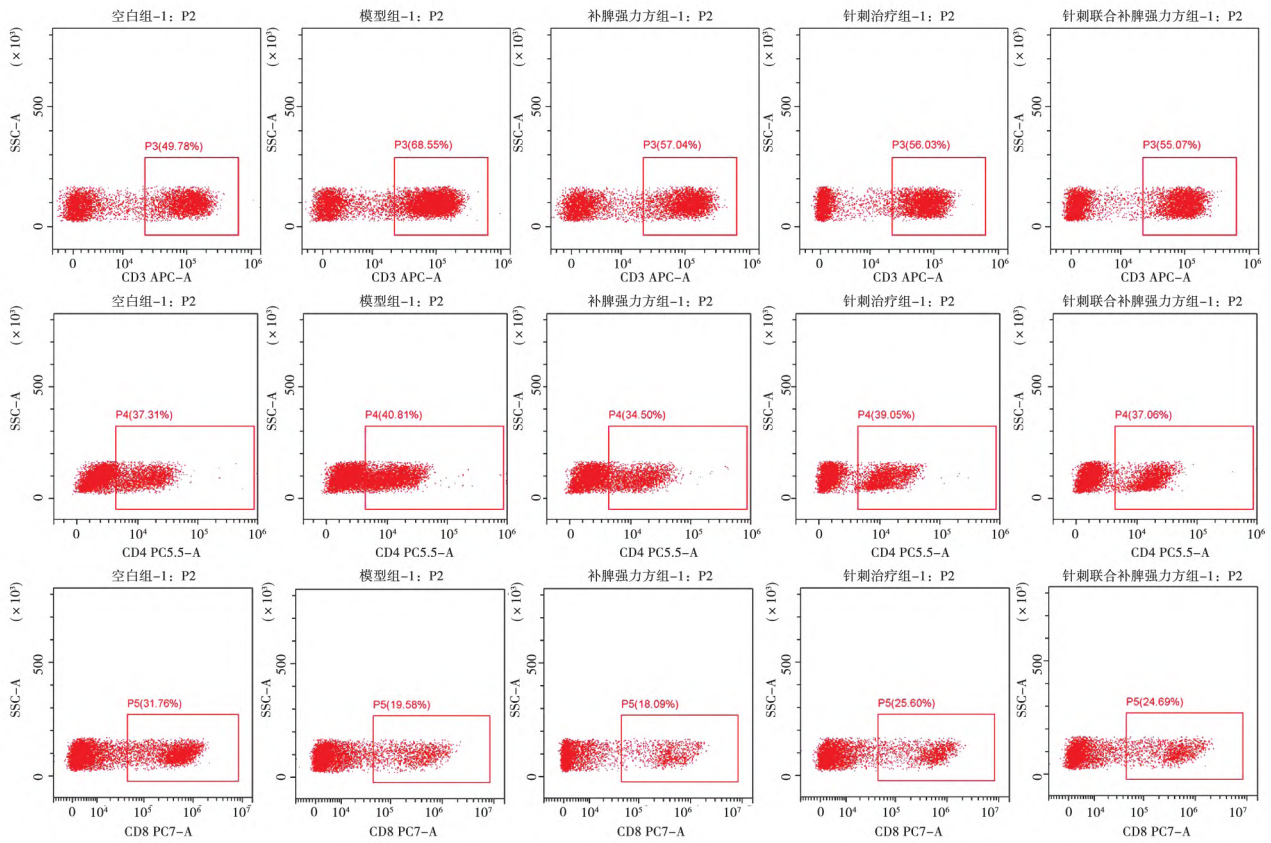


图1 各组大鼠 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 及 CD8<sup>+</sup> 流式细胞图

2.3 各组大鼠 IgG、IgA、IgM 及 IFN-γ、IL-18 水平比较

与空白组比较,模型组 IgG、IgA、IgM、IFN-γ 及 IL-18 水平均明显升高,差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,仅联合治疗组可明显降低 IgG、IgA、IgM、IFN-γ 及 IL-18 水平,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见表 3。

2.4 各组大鼠胸腺组织 CD19、CD4 蛋白表达比较

与空白组比较,模型组 CD19、CD4 蛋白表达明显升高,差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,补脾强力方组、针刺治疗组和联合治疗组可明显降低 CD19、CD4 蛋白表达,联合治疗组效果更佳,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见表 4、图 2。

表 3 各组大鼠 IgG、IgA、IgM 及 IFN-γ、IL-18 水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	IgG (pg/mL)	IgA (μg/mL)	IgM (μg/mL)	IFN-γ (pg/mL)	IL-18 (pg/mL)
空白组	8	2.22 ± 0.09	46.94 ± 1.39	166.89 ± 6.17	274.29 ± 8.67	20.13 ± 0.33
模型组	8	2.41 ± 0.04**	52.90 ± 2.07**	186.09 ± 7.88**	297.35 ± 5.79**	23.07 ± 1.05**
补脾强力方组	8	2.39 ± 0.05	51.86 ± 1.82	183.83 ± 5.39	287.14 ± 5.36	22.25 ± 1.05
针刺治疗组	8	2.31 ± 0.03	51.54 ± 1.13	176.48 ± 6.09	290.30 ± 9.21	21.91 ± 1.25
联合治疗组	8	2.26 ± 0.02###	48.92 ± 1.30#	173.88 ± 3.54#	279.21 ± 9.19#	20.76 ± 0.47#

注:与空白组比较, \*\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ 。

表 4 各组大鼠胸腺组织 CD19、CD4 的蛋白表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	CD4	CD19
空白组	8	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.10
模型组	8	1.70 ± 0.10**	2.01 ± 0.07**
补脾强力方组	8	1.26 ± 0.06###	1.59 ± 0.20#
针刺治疗组	8	1.23 ± 0.11###	1.43 ± 0.20###
联合治疗组	8	1.01 ± 0.18###	1.30 ± 0.25###

注:与空白组比较, \*\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ 。

2.5 各组大鼠胸腺组织 IL-10、FOXP3 mRNA 表达

与空白组比较,模型组 IL-10 mRNA 表达明显升高,FOXP3 mRNA 表达明显降低,差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,仅联合治疗组可明显降低 IL-10 mRNA 表达,明显升高 FOXP3 mRNA 表达,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 5、图 3。

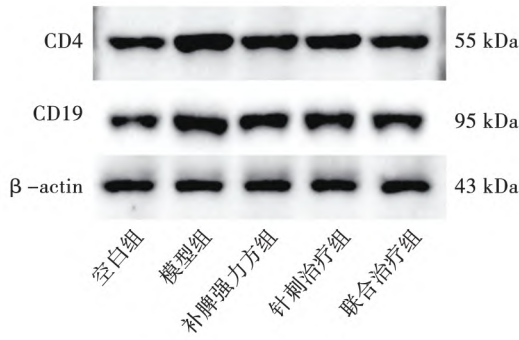


图2 各组大鼠胸腺组织 CD4、CD19 蛋白电泳条带

表5 各组大鼠胸腺组织 IL-10、FOXP3 mRNA 表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	IL-10	FOXP3
空白组	8	1.01 ± 0.10	1.01 ± 0.19
模型组	8	1.68 ± 0.19**	0.58 ± 0.07**
补脾强力方组	8	1.47 ± 0.21	0.72 ± 0.06
针刺治疗组	8	1.45 ± 0.12	0.76 ± 0.09
联合治疗组	8	1.30 ± 0.11#	0.88 ± 0.12#

注:与空白组比较, \*\*P < 0.01; 与模型组比较, #P < 0.05。

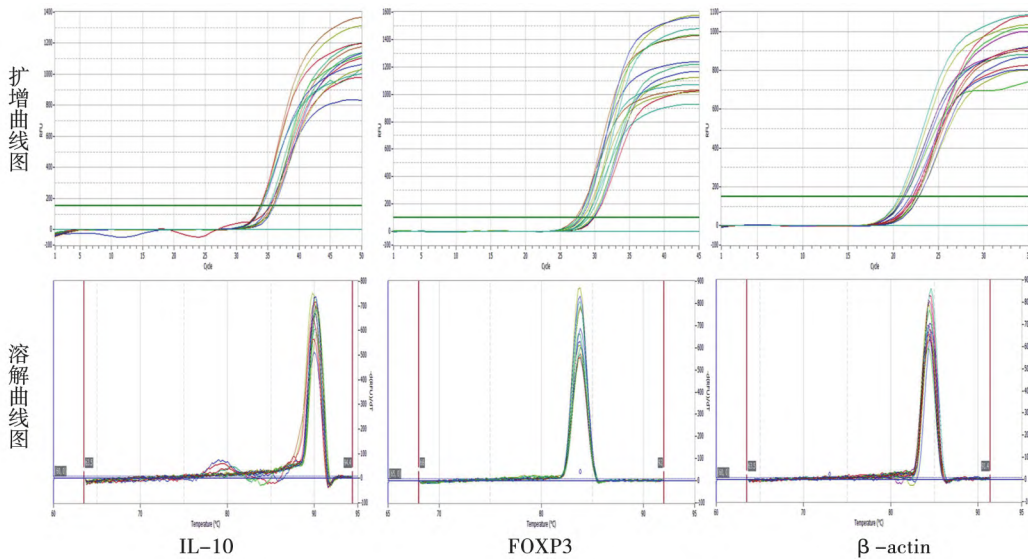


图3 IL-10、FOXP3 PCR 相关曲线图

### 3 讨论

MG 是一种具有复杂发病机制的获得性自身免疫性疾病, 研究显示 MG 主要由致病性抗 AChR - Ab 引起<sup>[1]</sup>。在病理条件下, 激活的 Th 细胞分泌多种细胞因子, 进而刺激 B 细胞增殖、分化并分泌补体结合的抗乙酰胆碱受体, 最终触发膜攻击复合物的形成, 破坏神经肌肉接头突触后膜。因此, AChR 表达的减少阻碍了神经递质乙酰胆碱有效传递到适当的细胞<sup>[12]</sup>。故本实验通过 AChR97 - 116 肽构建自身免疫性 MG 大鼠模型, 评价针刺联合补脾强力方治疗对自身免疫性 MG 大鼠的免疫调控作用。

研究证实 CD4<sup>+</sup>T 细胞在 MG 患者的发病机制中起重要作用, 活化的 CD4<sup>+</sup>T 细胞与合成低亲和力抗 AChR - Ab 的 B 细胞相互作用, 触发 IgG 基因的体细胞突变, 从而诱导产生高亲和力的抗 AChR - Ab, AChR 特异性的 CD4<sup>+</sup>T 细胞主要存在于 MG 患者的胸腺中, 许多 MG 患者在胸腺切除或抗 CD4<sup>+</sup>T 细胞治疗后肌肉无力得到缓解<sup>[13]</sup>。此外, 动物实验表明 CD4<sup>+</sup>T 细胞功能缺陷的小鼠不能诱发 EAMG, 分化后的 CD4<sup>+</sup>T 细胞可根据其分泌的细胞因子分为不同的亚

群, Th1 主要分泌促炎症细胞因子, 促进补体结合免疫球蛋白的分泌; Th2 主要分泌 IL - 4 和 IL - 10, 可以诱导 B 细胞增殖和分化, 促进抗体分泌<sup>[14]</sup>。CD3<sup>+</sup>可参与 T 细胞识别抗原和传递信号, 而 CD8<sup>+</sup>具有抑制 B 细胞生成抗体及降低 T 细胞活性等作用, 从而抑制体液和细胞免疫<sup>[15]</sup>。本研究结果表明 MG 大鼠外周血 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 细胞比例明显高于空白组, CD8<sup>+</sup>水平明显低于空白组; 而补脾强力方组、针刺治疗组可明显降低 CD4<sup>+</sup>水平; MG 大鼠 IgG、IgA、IgM、IFN - γ 及 IL - 18 水平较空白组明显升高; 针刺联合补脾强力方治疗可明显降低 IgG、IgA、IgM、IFN - γ 及 IL - 18 水平。提示 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 细胞参与 MG 发病, 针刺联合补脾强力方治疗可有效缓解这一进展。

研究报道 MG 病情严重程度与外周血淋巴细胞中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>GITR<sup>+</sup>Tregs 比例降低呈正相关<sup>[16]</sup>。然而一些研究显示 MG 患者中没有 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 功能障碍<sup>[17]</sup>。此外, MG 患者存在 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>Tregs 抑制缺陷, 这与 IL - 6、IL - 10、IL - 17 及 IFN - γ 水平变化有关, 自身抗体依赖机制被认为是各种自身免疫性疾病的重要原因, 致病性自身抗体直接或以免疫复

合物的形式作用于自身抗原,导致疾病的发生<sup>[18]</sup>。CD19 通过可影响 B 淋巴细胞的活化和分化,CD19 缺陷会导致体液反应受损,总体上增加感染的易感性,在单次注射抗 CD19 单抗两周后,小鼠中的大多数成熟 B 细胞被耗尽,血清 IgM、IgG 和 IgA 抗体水平显著降低<sup>[19]</sup>。本研究发现模型组 CD4、CD19 蛋白及 IL-10 mRNA 表达明显升高,而 FOXP3 mRNA 表达明显降低;补脾强力方组、针刺治疗组和联合治疗组可明显降低 CD19、CD4 蛋白表达,且联合治疗组效果明显。此外,IL-10 还作为一种多效性细胞因子,促进炎症和自身免疫的发展。提示 CD19、CD4 及 IL-10 在 MG 发病机制中的重要作用。此外,对于重症肌无力的诊断和治疗,仍然需要长期甚至终生的治疗。本研究实验表明针刺联合补脾强力方可以缓解 MG 的症状,针刺联合补脾强力方从中医的整体观念出发,抓住 MG 的病机关键,对 MG 具有良好的治疗作用,且中医治疗可进行长期有效治疗,产生的副作用较小。由此,将针刺结合中医药作为 MG 的治疗方法之一,能够有效提高 MG 的治疗水平。

综上所述,针刺联合补脾强力方治疗可明显降低自身免疫性重症肌无力大鼠 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 细胞及 CD19 水平,降低免疫球蛋白的分泌,对重症肌无力具有明显改善作用。

参考文献:

[1] 王静,李欣,李立敏,等.重症肌无力患者认知功能特征[J].中华行为医学与脑科学杂志,2020,28(3):256-261.  
 [2] GOTTERER L,LI Y. Maintenance immunosuppression in myasthenia gravis[J]. J Neurol Sci,2016,369:294-302.  
 [3] 康丽萍,杨云英,崔晓演,等.中医外治法干预重症肌无力患者的临床结局评价研究[J].广州中医药大学学报,2020,37(5):833-837.  
 [4] OLIVEIRA L,CORREIA A,CRISTINA C A,et al. Deficits in endogenous adenosine formation by ecto-5'-nucleotidase/CD73 impair neuromuscular transmission and immune competence in experimental autoimmune myasthenia gravis[J]. Mediators Inflamm,2015,2015:460610.  
 [5] SHI S,JI X,WANG Y,et al. Acupuncture for patients with myasthenia gravis: A systematic review protocol[J]. Medicine (Baltimore),2019,98(42):e17563.  
 [6] ZHANG X,DING W,WANG Z,et al. The effectiveness and safety of

acupuncture for the treatment of myasthenia gravis: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Ann Palliat Med,2019,8(5):576-585.  
 [7] 朱洁,程杨,许骏尧,等.升降汤对实验性自身免疫性重症肌无力大鼠免疫机制研究[J].中华中医药学刊,2017,35(3):717-720.  
 [8] 王强,杜洪志,吴寿芝,等.补脾强力方对实验性自身免疫重症肌无力大鼠作用研究[J].中药药理与临床,2017,33(5):131-134.  
 [9] LENNON V A,LINDSTROM J M,SEYBOLD M E. Experimental autoimmune myasthenia: A model of myasthenia gravis in rats and guinea pigs[J]. J Exp Med,1975,141(6):1365-1375.  
 [10] 李忠仁.实验针灸学[M].北京:中国中医药出版社,2007:255-257.  
 [11] JING F,YANG F,CUI F,et al. Rapamycin alleviates inflammation and muscle weakness,while altering the Treg/Th17 balance in a rat model of myasthenia gravis[J]. Biosci Rep,2017,37(4):BSR20170767.  
 [12] TRUFFAULT F,NAZZAL D,VERDIER J,et al. Comparative analysis of thymic and blood treg in myasthenia gravis: thymic epithelial cells contribute to thymic immunoregulatory defects[J]. Front Immunol,2020,11:782.  
 [13] WANG N,YUAN J,KARIM M R,et al. Effects of mitophagy on regulatory T cell function in patients with myasthenia gravis[J]. Front Neurol,2020,11:238.  
 [14] 来小音,孙家兰,胡荣郭,等. T 淋巴细胞亚群失衡与全身型重症肌无力临床症状加重及缓解的相关性研究[J].诊断学理论与实践,2019,18(2):199-203.  
 [15] NISHIMURA T,INABA Y,NAKAZAWA Y,et al. Reduction in peripheral regulatory T cell population in childhood ocular type myasthenia gravis[J]. Brain Dev,2015,37(8):808-816.  
 [16] HU Y,WANG J,RAO J,et al. Comparison of peripheral blood B cell subset ratios and B cell-related cytokine levels between ocular and generalized myasthenia gravis[J]. Int Immunopharmacol,2020,80:106130.  
 [17] QI G,GU S,LIU P,et al. Effects of combined traditional Chinese medicine with immunosuppressive agents for patients with myasthenia gravis[J]. Int J Clin Exp Med,2015,8(10):19044-19050.  
 [18] FORSTHUBER T G,CIMBORA D M,RATCHFORD J N,et al. B cell-based therapies in CNS autoimmunity: differentiating CD19 and CD20 as therapeutic targets[J]. Ther Adv Neurol Disord,2018,11:1756286418761697.  
 [19] AN X,GU Y,WANG C,et al. Unbalanced expression of membrane-bound and soluble inducible costimulator and programmed cell death 1 in patients with myasthenia gravis[J]. Clin Immunol,2019,207:68-78.

收稿日期:2020-12-08