

穴位注射对变应性鼻炎嗅觉障碍大鼠嗅觉功能及嗅黏膜细胞凋亡的影响

石佳惠, 梁欣, 卢晓晓, 侯珣瑞, 戴方盈, 罗小婷, 李丽红
(贵州医科大学附属医院, 贵阳 550004)

【摘要】 目的:观察穴位注射对变应性鼻炎(AR)嗅觉障碍大鼠嗅觉功能、嗅黏膜组织形态、嗅黏膜细胞凋亡及凋亡相关蛋白表达的影响,探讨穴位注射治疗AR嗅觉障碍的效应及机制。方法:SD大鼠随机取9只作为正常组,其余大鼠采用卵清蛋白致敏制备AR嗅觉障碍模型,造模成功后随机分为模型组、非经非穴注射组、穴位注射组,每组9只。穴位注射组取双侧“迎香”注射等比地塞米松和利多卡因混合液,每穴0.05 mL,每3 d治疗1次,共4次;非经非穴注射组取双侧“后海”与“环跳”连线中点处注射,药物、频次、疗程同穴位注射组。观察各组大鼠鼻部症状并进行评分,采用食物埋藏小球实验(BFPT)评估嗅觉功能,HE染色及透射电子显微镜观察嗅黏膜组织形态及超微结构,ELISA法检测血清白细胞介素(IL)-4、IL-5、IL-13、IL-17含量,免疫荧光法检测嗅黏膜嗅觉标记蛋白(OMP)表达,TUNEL法检测嗅黏膜细胞凋亡情况,Western blot法检测嗅黏膜半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)、B淋巴细胞瘤-2相关基因X蛋白(Bax)、B淋巴细胞瘤-2基因蛋白(Bcl-2)蛋白表达。结果:模型组大鼠嗅黏膜上皮脱落严重,固有层细胞变性、坏死且伴有炎性浸润;线粒体外膜出现模糊和断裂,嵴结构溶解消失。穴位注射组嗅黏膜形态结构较模型组明显改善,线粒体外膜完整,内膜可见清晰嵴结构。与正常组比较,模型组鼻部症状学积分、寻找食物小球时间、嗅黏膜细胞凋亡率、血清IL-4、IL-5、IL-13及IL-17含量、嗅黏膜Caspase-3及Bax蛋白表达均升高($P<0.01$);嗅黏膜OMP及Bcl-2蛋白表达降低($P<0.01$)。与模型组比较,非经非穴注射组和穴位注射组以上指标均发生逆转($P<0.05$, $P<0.01$),且穴位注射组较非经非穴注射组变化更为显著($P<0.01$)。结论:穴位注射可显著改善AR嗅觉障碍大鼠嗅觉功能及嗅黏膜损伤,其机制可能与抑制炎性反应对嗅黏膜的损伤、调控嗅黏膜细胞凋亡有关。

【关键词】 穴位注射;变应性鼻炎;嗅觉障碍;细胞凋亡;凋亡相关蛋白

Effect of acupoint injection on olfactory dysfunction and apoptosis of olfactory mucosal cells in rats with allergic rhinitis

SHI Jia-hui, LIANG Xin, LU Xiao-xiao, HOU Xun-rui, DAI Fang-ying, LUO Xiao-ting, LI Li-hong (The Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

【ABSTRACT】 **Objective** To observe the effect of acupoint injection on olfactory function, olfactory mucosa structure, olfactory mucosa apoptosis and apoptosis-related protein expression in rats with olfactory dysfunction of allergic rhinitis (AR), so as to explore its mechanisms underlying improvement of AR olfactory dysfunction. **Methods** Thirty-six SD rats were used in the present study. Nine of them were randomly selected to be used as the normal group, and the rest of the rats were used to prepare the AR olfactory dysfunction model by ovalbumin sensitization. After successful modeling, the AR model rats were allocated to the model, non-meridian non-acupoint injection, and acupoint injection groups, with 9 rats in each group. For rats of the acupoint injection group, an isotonic mixture (0.05 mL/point) of dexamethasone and lidocaine was injected into the bilateral "Yingxiang" (LI20) once every 3 days, for a total of 4 times. For rats of the non-meridian non-acupoint injection group, the same mixture solution (0.05 mL/point) was

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20250492

引用格式:石佳惠,梁欣,卢晓晓,等.穴位注射对变应性鼻炎嗅觉障碍大鼠嗅觉功能及嗅黏膜细胞凋亡的影响[J].针刺研究,2026,51(6):740-748.

项目来源:国家自然科学基金项目(No.82360891)

通信作者:李丽红,E-mail:1109718711@qq.com

injected into the midpoint of the line connecting “Houhai” (GV1) and “Huantiao” (GB30) on both sides. The frequency and course of treatment were the same as those of the acupoint injection group. The rats’ nasal symptoms were observed and scored, the olfactory function was evaluated by buried food pellet test (BFPT). The histopathological changes and ultrastructure of the olfactory mucosa were observed by H. E. staining and transmission electron microscopy. The contents of serum interleukin (IL) 4, IL-5, IL-13 and IL-17 were detected by ELISA. The expression of olfactory marker protein (OMP) in the olfactory mucosa was detected by immunofluorescence method, and apoptosis of olfactory mucosal cells was detected by TUNEL method. The expression levels of cysteine aspartate protease-3 (Caspase-3), B lymphoblastoma-2 related gene X protein (Bax), and B lymphoblastoma-2 gene (Bcl-2) proteins of the nasal mucosa were detected by Western blot. **Results** The histopathological and ultrastructural observations showed that in the model group, the olfactory mucosal epithelium was severely shed, and the intrinsic layer cells were degenerated and necrotic with inflammatory infiltration; the outer mitochondrial membrane was blurred and broken, and the cristae structure dissolved and disappeared. But compared with the model group, the acupoint injection group had an apparent improvement in the structure of the olfactory mucosa, and a relatively complete and unambiguous structure in the outer mitochondrial membrane and cristae of the inner membrane. Compared with the normal group, the model group had a significant increase in the nasal symptom score, search time for food goblet, apoptosis rate of olfactory mucosal cells, contents of serum IL-4, IL-5, IL-13 and IL-17, and expression of Caspase-3 and Bax proteins in the nasal mucosa ($P<0.01$), and a notable decrease in the immunofluorescence density of OMP and expression of Bcl-2 in the olfactory mucosa tissue ($P<0.01$). After non-meridian non-acupoint injection and acupoint injection, both the increase and decrease of the indexes mentioned above were all reversed ($P<0.05$, $P<0.01$). Comparison between the two injection groups showed that the effects of the acupoint injection group were significantly superior to those of the non-meridian non-acupoint injection group in all indexes ($P<0.01$). **Conclusion** Acupoint injection can significantly improve olfactory function and olfactory mucosal damage in rats with AR olfactory dysfunction, which may be related to its functions in inhibiting the inflammatory damage and reducing cell apoptosis of the olfactory mucosa.

【KEYWORDS】 Acupoint injection; Allergic rhinitis; Olfactory dysfunction; Apoptosis; Apoptosis-related protein

嗅觉是人类最重要的感觉之一,在人类生活工作中占据重要的位置。嗅觉障碍是指部分或全部嗅觉功能下降、丧失或异常。变应性鼻炎(AR)是常见的嗅黏膜炎性反应性疾病,也是临床上引起嗅觉障碍的主要原因之一。嗅觉障碍是AR患者的常见症状,且随着AR严重程度的增加而增加,是影响AR患者生活质量最重要的疾病因素之一。研究表明,AR嗅觉障碍可能是由于一种炎性机制导致嗅神经元(ORNs)出现功能障碍或死亡^[1-2],炎性因子对ORNs的毒性作用,损伤了嗅上皮组织和ORNs,破坏了ORNs凋亡平衡,无法产生神经冲动^[3-4],嗅信号无法传导到嗅球及大脑皮层嗅觉中枢,从而引起嗅觉障碍。临床研究^[5-6]表明,穴位注射能有效改善嗅觉障碍患者的嗅觉功能。本课题组前期研究^[7-9]证实,鼻局部穴位注射能通过有效抑制炎性介质和炎性因子释放,减轻鼻黏膜炎性损伤,且嗅觉功能得到改善。但穴位注射是否通过抑制炎性反应对嗅黏膜及ORNs的损伤,从而调控嗅黏膜细胞凋亡,改善嗅觉功能尚不清楚。故本研究以AR嗅觉障碍大鼠为研究对象,观察“迎香”穴位注射对AR嗅觉障碍大鼠鼻部过敏症状、嗅觉功能、嗅黏膜组织病

理形态及超微结构、相关炎性因子、嗅黏膜嗅觉标记蛋白(OMP)、嗅黏膜细胞凋亡情况及凋亡相关蛋白表达的影响,探讨“迎香”穴位注射抑制炎性反应调控细胞凋亡平衡治疗AR嗅觉障碍的作用机制,为临床治疗AR嗅觉障碍提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性健康SD大鼠70只,体质量200~250g,购于广东维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(粤)2022-0063。所有动物分笼饲养于贵州医科大学附属医院临床研究中心,饲养温度22~24℃,湿度60%~70%。大鼠自由摄食饮水,自然昼夜节律光照,适应性饲养1周。实验获贵州医科大学实验动物伦理委员会批准,批号:2304575,实验过程中对动物的处理遵守科技部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》相关规定。

1.2 主要仪器和试剂

冷冻高速离心机(湖南可成),分析天平(常州幸运),病理切片机、超薄切片机(德国Leica),包埋机、脱水机、组织摊烤片机(武汉俊杰),电泳仪(北京六一),转膜仪(金斯瑞生物),化学发光成像系统

(杭州申花),酶标仪(美国 Thermo Scientific),光学显微镜、荧光显微镜(日本 Nikon),透射电子显微镜(日本 Hitachi)。

卵清蛋白、苏木精、伊红、枸橼酸铅、硝酸铅(美国 Sigma),氢氧化铝(北京索莱宝),利多卡因(江苏悦兴),地塞米松(海南倍特),白细胞介素(IL)-4、IL-5、IL-13及IL-17 ELISA试剂盒(武汉酶免),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)、B淋巴细胞瘤-2相关基因 X 蛋白(Bax)、B淋巴细胞瘤-2 基因蛋白(Bcl-2)一抗(武汉三鹰),HRP 标记羊抗兔二抗、羊抗小鼠二抗、OMP 抗体(武汉博士德),RIPA 裂解液(大连 Meilunbio),胞浆核蛋白提取试剂盒(南京凯基生物),BCA 蛋白浓度测定试剂(广州 GBCBIO),ECL 底物液(常州 Affinity),钨酸(美国 Ted Pella Inc),醋酸铀(美国 SPI),TUNEL 检测试剂盒(南京诺唯赞)。

1.3 大鼠模型建立及分组

大鼠适应性饲养1周后,随机取9只为正常组,其余大鼠根据文献[10]的方法和课题组前期研究[7]基础进行AR模型制备。基础致敏阶段:腹腔注射含卵清蛋白0.3 mg、氢氧化铝凝胶30 mg的混悬液1 mL,隔日1次,共7次。强化致敏阶段:基础致敏结束第2天,以5%卵清蛋白0.9%氯化钠溶液滴鼻(双侧),每侧0.05 mL,每日1次,连续7 d。强化致敏结束后观察大鼠30 min行为学变化,采用叠加量化计分法^[10]进行症状学积分评估:轻度抓鼻1~2次计1分;重度四处抓鼻脸计3分;两者之间计2分。喷嚏1~3次计1分;4~10次计2分;>10次计3分。流涕至鼻孔前计1分;超出前鼻孔计2分;涕流满面计3分。总分>5分表明模型制备成功。

埋藏食物小球实验(BFPT)^[11]筛选出嗅觉障碍大鼠:对AR造模成功大鼠,在实验前2 d开始对大鼠进行限食饲养(每只鼠24 h给予0.2 g饲料),可自由饮水,并每日将大鼠放于实验箱熟悉实验环境10 min。嗅觉实验每日1次,共5次。将0.5 g食物小球埋藏在3 cm深的垫料表面下0.5 cm处,每次随机更换食物小球位置,记录将大鼠置于笼中至用前爪或牙齿抓取食物小球的时间,让大鼠食用食物后放回笼中。若大鼠300 s(5次测试的平均值)内未找到食物小球即认为存在嗅觉功能障碍。取27只造模成功的AR嗅觉障碍大鼠纳入实验,随机分为模型组、非经非穴注射组、穴位注射组,每组9只。

1.4 干预方法

造模结束后次日进行干预,参照《实验针灸

学》^[12]大鼠标准穴位图谱定位。将大鼠固定于自制固定板上进行干预。穴位注射组:双“迎香”注射利多卡因和地塞米松等比例混合液,每穴0.05 mL,每隔3 d治疗1次,共4次。非经非穴注射组:双“后海”与“环跳”连线中点处进行注射,注射药物、剂量、频次、疗程同穴位注射组。空白组、模型组每日常规饲养,仅抓取固定,不予治疗干预。

1.5 观察指标及检测方法

大鼠行为学观察:造模后及治疗结束后分别观察大鼠的行为学变化30 min,采用叠加量化计分法^[10]评估大鼠鼻部症状,方法同上。

嗅觉功能评估:造模后及干预完成后用BFPT^[11]对大鼠进行嗅觉功能评估,方法同上。

取材方法:嗅觉功能评估结束后,大鼠用3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉,仰卧位固定于鼠板,心脏取血3 mL,离心10 min,分离血清转移至EP管放置于-80℃冰箱备测相关指标。大鼠处死后以两侧鼻骨为解剖标志物,矢状位切割,取出鼻中隔,分离嗅黏膜,分别按照HE染色、电镜检测、免疫荧光、TUNEL及Western blot检测要求制备样本保存。

HE染色观察嗅黏膜组织形态学变化:4%多聚甲醛固定的嗅黏膜梯度乙醇脱水后二甲苯透明,浸蜡、包埋、切片(厚度4 μm),切片脱蜡后苏木精、伊红染色,脱水,透明,封片。光学显微镜下观察嗅黏膜的形态学变化。

透射电镜观察嗅黏膜超微结构:2.5%戊二醛固定的嗅黏膜用1%钨酸避光室温固定2 h,漂洗、脱水、包埋、聚合、超薄切片(厚度60~80 nm),醋酸铀和枸橼酸铅双重染色,透射电镜下观察各组大鼠嗅黏膜超微结构。

ELISA法检测血清IL-4、IL-5、IL-13、IL-17含量:每组取4只大鼠的血清样本,严格按照ELISA试剂盒步骤进行配液、加样、温育后洗涤、孵育显色、终止反应操作。450 nm波长依序测量各孔的吸光度值,绘制标准品曲线后得到回归方程,并根据回归方程计算样品实际含量

免疫荧光法检测嗅黏膜OMP表达:每组取3只大鼠嗅黏膜,用4%多聚甲醛固定24 h,脱水、石蜡包埋、切片(厚度4 μm)、脱蜡,抗原修复,滴加稀释好的正常山羊血清,室温封闭30 min,加OMP一抗(1:100)于4℃湿盒中孵育过夜,加荧光二抗(1:100)湿盒中37℃孵育1 h,滴加DAPI复染核,用含抗荧光淬灭剂的封片液封片。荧光显微镜下观

察采集图像并计算平均吸光度值。

TUNEL法检测嗅黏膜细胞凋亡情况:每组各取3只大鼠嗅黏膜石蜡切片,烤片,脱蜡,PBS润洗后滴加Proteinase K溶液室温孵育,PBS漂洗后滴加平衡液平衡,滴加工作液,DAPI复染核,漂洗,用含抗荧光淬灭剂的封片液封片,荧光显微镜下观察并采集图像。每张切片随机挑选至少3个视野拍照,计算细胞凋亡率。细胞凋亡率(%)=凋亡阳性细胞数÷总细胞数×100%。

Western blot法检测嗅黏膜Caspase-3、Bax及Bcl-2蛋白表达水平:取冻存的每组3只大鼠嗅黏膜组织20 mg提取总蛋白,进行蛋白浓度测定;蛋白上清加入蛋白上样缓冲液沸水浴10 min。上样,恒压180 V电泳40 min,电转移,TBST封闭,加Caspase-3(1:1 000)、Bax(1:3 000)、Bcl-2(1:3 000)和GAPDH(1:10 000)一抗4℃孵育过夜,加HRP标记二抗(1:10 000)室温摇床孵育2 h,显色曝光,晾干扫描胶片,用Image-Pro Plus软件分析目的蛋白条带的灰度值。以目的蛋白与内参蛋白条带灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.6 统计学分析

所有数据使用SPSS26.0软件进行统计分析。数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。经检验,所有资料均满足正态分布及方差齐性,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD检验。以 $P\leq 0.05$ 为差异具有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 各组大鼠行为学比较

造模后,造模大鼠出现明显抓鼻、喷嚏及流涕等一系列症状;与正常组比较,模型组、非经非穴注射组、穴位注射组大鼠症状学积分升高($P<0.01$),提示AR大鼠模型复制成功。治疗后,与正常组比较,模型组大鼠症状学积分升高($P<0.01$);与模型组比较,非经非穴注射组、穴位注射组大鼠症状学积分均降低($P<0.05, P<0.01$);与非经非穴注射组比较,穴位注射组大鼠症状学评分降低($P<0.01$)。见图1。

2.2 各组大鼠寻找食物小球时间比较

造模后,与正常组比较,模型组、非经非穴注射组、穴位注射组大鼠寻找食物小球时间增加($P<0.01$),提示AR嗅觉障碍模型复制成功。治疗后,与正常组比较,模型组大鼠寻找食物小球时间增加($P<0.01$);与模型组比较,非经非穴注射组、穴位注

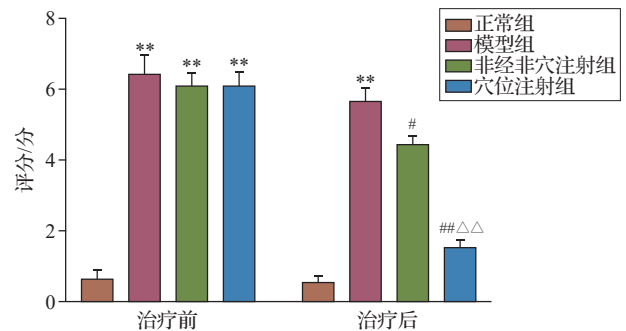
射组大鼠寻找食物小球时间缩短($P<0.01$);与非经非穴注射组比较,穴位注射组大鼠寻找食物小球时间缩短($P<0.01$)。见图2。

2.3 各组大鼠嗅黏膜组织形态学比较

正常组大鼠嗅黏膜结构完整,上皮细胞和纤毛组织排列有序,形态正常,未见水肿、变性或坏死等病理改变;模型组可见嗅黏膜上皮细胞脱落程度严重,固有层细胞变性、坏死且伴有炎性浸润;非经非穴注射组可见嗅黏膜部分脱落,固有层细胞不同程度变性、坏死且伴有轻度炎性浸润;穴位注射组嗅黏膜上皮细胞未见明显脱落,固有层细胞无明显变性、坏死和炎性浸润。见图3。

2.4 各组大鼠嗅黏膜超微结构比较

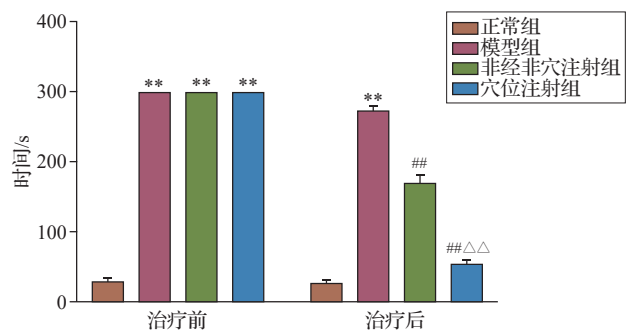
正常组大鼠嗅黏膜线粒体形态结构完整,呈



注:与同时点正常组比较,** $P<0.01$;与同时点模型组比较,## $P<0.05$,# $P<0.01$;与同时点非经非穴注射组比较,△△ $P<0.01$ 。

图1 各组大鼠治疗前后症状学积分比较($\bar{x}\pm s, 9$ 只鼠/组)

Fig. 1 Comparison of symptom scores of rats in the 4 groups before and after treatment ($\bar{x}\pm s, 9$ rats/group)



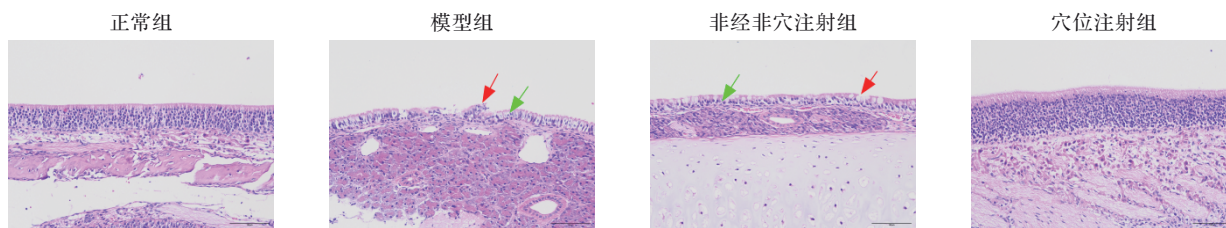
注:与同时点正常组比较,** $P<0.01$;与同时点模型组比较,## $P<0.01$;与同时点非经非穴注射组比较,△△ $P<0.01$ 。

图2 各组大鼠治疗前后寻找食物小球时间比较($\bar{x}\pm s, 9$ 只鼠/组)

Fig. 2 Comparison of the time spent looking for food balls of rats in the 4 groups before and after treatment ($\bar{x}\pm s, 9$ rats/group)

现杆状或圆形结构,线粒体外膜边界清晰,内膜完整可见嵴结构,嵴形态清晰,内部密度较高;模型组外膜出现模糊和断裂,内膜完全模糊,嵴结构溶解消失,内部空泡数量明显增加;非经非穴注射

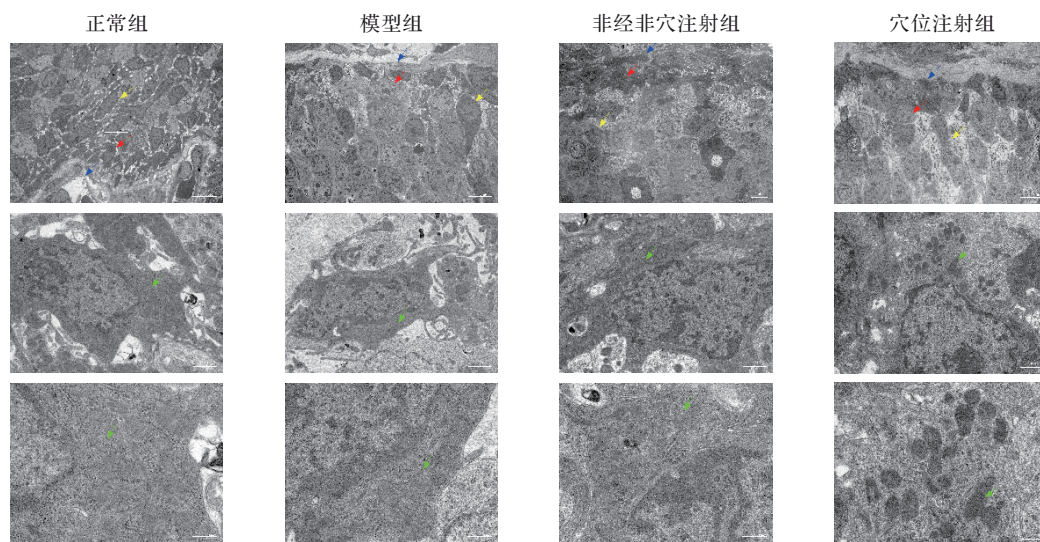
组外膜相对完整,内膜基本模糊,嵴结构紊乱、断裂,内部空泡数量较穴位注射组多;穴位注射组外膜完整,内膜可见嵴结构,嵴结构相对清晰。见图4。



注:标尺=100 μm。红色箭头示黏膜脱落,绿色箭头示炎性细胞。

图3 各组大鼠嗅黏膜组织病理形态比较(HE染色)

Fig. 3 Comparison of pathological morphology of olfactory mucosa of rats in the 4 groups (HE staining)



注:上排标尺=5 μm,中排标尺=1 μm,下排标尺=200 nm。蓝色箭头示基底膜,红色箭头示基底膜细胞,黄色箭头示嗅神经元,绿色箭头示线粒体。

图4 各组大鼠嗅黏膜超微结构比较(透射电子显微镜)

Fig. 4 Comparison of ultrastructure of olfactory mucosa of rats in the 4 groups (transmission electron microscopy)

2.5 各组大鼠血清 IL-4、IL-5、IL-13、IL-17 含量比较

与正常组比较,模型组大鼠血清 IL-4、IL-5、IL-13、IL-17 含量均升高($P < 0.01$);与模型组比较,非经非穴注射组、穴位注射组大鼠血清 IL-4、IL-5、IL-13、IL-17 含量降低($P < 0.05, P < 0.01$);与非经非穴注射组比较,穴位注射组大鼠血清 IL-4、IL-5、IL-13、IL-17 含量降低($P < 0.01$)。见图5。

2.6 各组大鼠嗅黏膜 OMP 阳性表达比较

各组大鼠嗅黏膜均有 OMP 阳性表达,阳性表达呈红色荧光。与正常组比较,模型组大鼠嗅黏膜 OMP 阳性表达降低($P < 0.01$);与模型组比较,非经非穴注射组、穴位注射组大鼠 OMP 阳性表

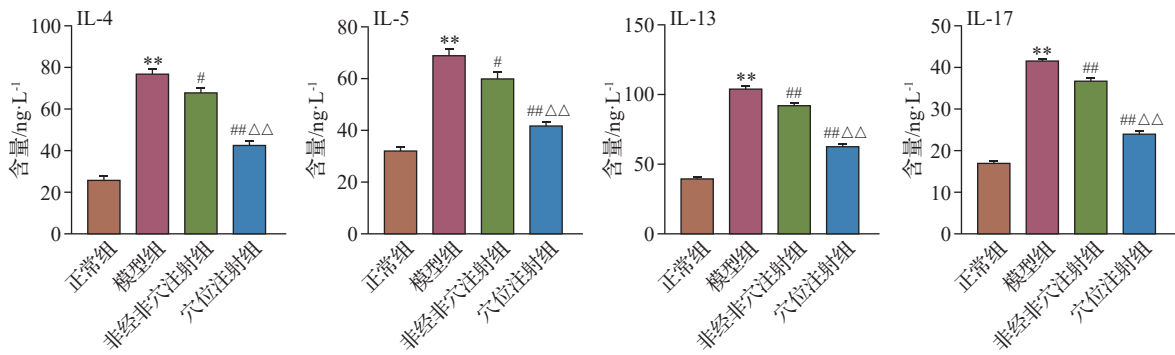
达升高($P < 0.01$);与非经非穴注射组比较,穴位注射组大鼠 OMP 阳性表达升高($P < 0.01$)。见图6。

2.7 各组大鼠嗅黏膜细胞凋亡情况比较

各组大鼠嗅黏膜细胞均存在凋亡情况,凋亡细胞呈红色荧光。与正常组比较,模型组大鼠嗅黏膜细胞凋亡率升高($P < 0.01$);与模型组比较,非经非穴注射组、穴位注射组大鼠嗅黏膜细胞凋亡率降低($P < 0.01$);与非经非穴注射组比较,穴位注射组大鼠嗅黏膜细胞凋亡率降低($P < 0.01$)。见图7。

2.8 各组大鼠嗅黏膜 Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达比较

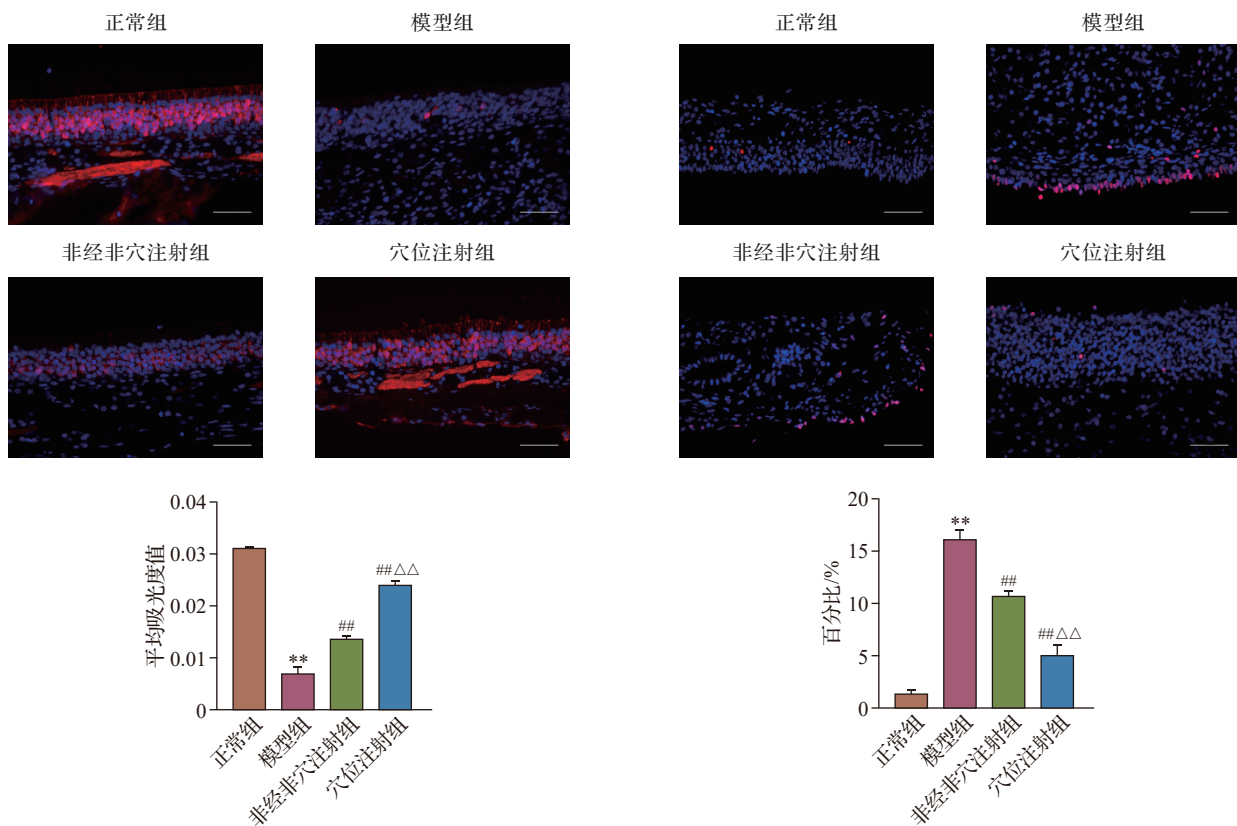
与正常组比较,模型组大鼠嗅黏膜 Caspase-3、



注:IL 为白细胞介素。与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与非经非穴注射组比较,△△ $P<0.01$ 。

图 5 各组大鼠血清中 IL-4、IL-5、IL-13、IL-17 含量比较($\bar{x}\pm s$,4 只鼠/组)

Fig. 5 Comparison of serum contents of IL-4,IL-5,IL-13 and IL-17 of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$,4 rats/group)



注:OMP为嗅觉标志蛋白。上图为各组大鼠嗅黏膜组织中 OMP 免疫荧光染色图,标尺=50 μm ;下图为各组大鼠嗅黏膜组织中 OMP 阳性表达比较的直方图($\bar{x}\pm s$,3 只鼠/组)。

与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$;
与非经非穴注射组比较,△△ $P<0.01$ 。

图 6 各组大鼠嗅黏膜 OMP 表达水平比较

Fig. 6 Comparison of OMP expression levels in olfactory mucosa of rats in the 4 groups

注:标尺=50 μm 。与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$;与非经非穴注射组比较,△△ $P<0.01$ 。

图 7 各组大鼠嗅黏膜细胞凋亡率比较 (TUNEL 染色, $\bar{x}\pm s$,3 只鼠/组)

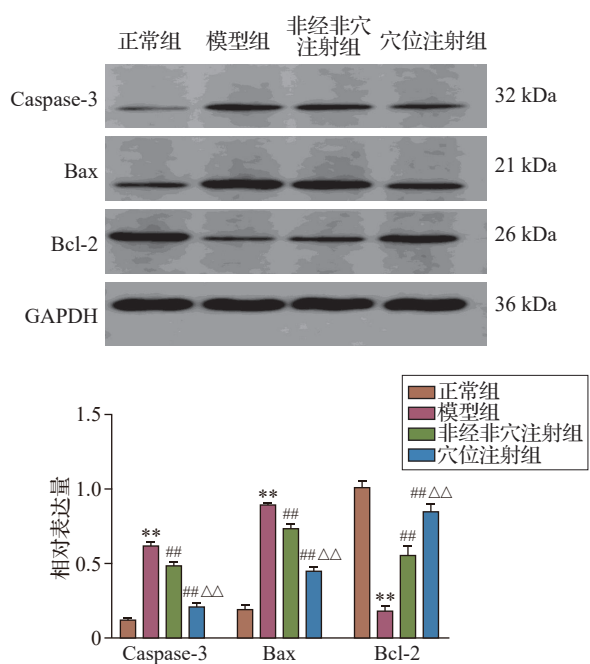
Fig. 7 Comparison of apoptosis rates of olfactory mucosal cells of rats in the 4 groups (TUNEL staining, $\bar{x}\pm s$,3 rats/group)

Bax 蛋白表达水平升高($P<0.01$),Bcl-2 蛋白表达水平降低($P<0.01$);与模型组比较,非经非穴注射组、穴位注射组大鼠嗅黏膜 Caspase-3、Bax 蛋白表达水平均降低($P<0.01$),Bcl-2 蛋白表达水平升高($P<0.01$);与非经非穴注射组比较,穴位注射

组大鼠嗅黏膜 Caspase-3、Bax 蛋白表达水平降低($P<0.01$),Bcl-2 蛋白表达水平升高($P<0.01$)。见图 8。

3 讨论

嗅觉障碍属于中医“鼻聋”“鼻鼈”范畴。《灵枢·



注:Caspase-3为半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3,Bax为B淋巴细胞瘤-2相关基因X蛋白,Bcl-2为B淋巴细胞瘤-2基因蛋白。与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$;与非经非穴注射组比较,ΔΔ $P < 0.01$ 。

图8 各组大鼠嗅黏膜Caspase-3、Bax、Bcl-2蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$,3只鼠/组)

Fig. 8 Comparison of protein expression levels of Caspase-3, Bax and Bcl-2 in the olfactory mucosa of rats in the 4 groups($\bar{x} \pm s$, 3 rats/group)

脉度》云“肺气通于鼻,肺和则鼻能知香臭矣”。鼻为肺之苗窍,肺与大肠相表里。《医述》曰:“人有鼻病,不闻香臭者,病在大肠,气不上行,徒责肺无益也。”《玉龙歌》曰:“不闻香臭从何治?迎香二穴可堪攻。”迎香为手阳明大肠经穴,具有散风清热、宣通鼻窍之功,主治“鼻鼽不利,窒洞气塞”。研究^[13-15]表明,迎香可通过改善鼻腔的局部循环、减轻鼻腔炎性渗出,缓解鼻嗅黏膜的损伤,从而有效治疗AR和嗅觉障碍。穴位注射疗法是根据药物的功能,选用中西医药物注射剂注入人体有关穴位以防治疾病的一种方法,作为针刺疗法的延伸和发展,其通过针刺对穴位的刺激、药物本身的药理作用和药物在吸收过程中对穴位的持续刺激多重作用发挥综合效能。本实验选用了临床广泛用于治疗各种炎性及变应性疾病的糖皮质激素地塞米松和具有抗炎特性的麻醉剂利多卡因混合液进行“迎香”穴位注射。本实验结果显示:穴位注射可显著降低AR大鼠症状学积分、缓解鼻部炎症损伤,缩短AR大鼠寻找食物时间、改善其嗅觉功能,且疗效明显优于非经非穴注射,说明穴位注射在干预过程中可能既

发挥了针刺对穴位的刺激作用和药物本身的药理作用,又发挥了药物在吸收过程中对穴位的持续刺激作用,多重作用发挥综合效能。

AR是一种由免疫球蛋白介导的多种细胞和细胞组分参与的鼻腔炎症性疾病,属于I型变态反应,发病机制可能与辅助性T细胞(Th)1/Th2免疫失衡有关,具体表现为Th2数量大于Th1数量。Th2分泌的IL-4、IL-5、IL-13在细胞免疫中发挥重要作用,致炎细胞Th17分泌IL-17,可激活Th2,参与变态性炎症反应^[16]。现代医学认为AR引起的慢性炎症因子通过与嗅觉受体结合,使鼻黏膜屏障受损,导致鼻腔黏膜充血、水肿,妨碍嗅素分子到达嗅黏膜,引发嗅觉障碍^[17-19]。另有研究^[20]表明,炎症变态反应引起嗅上皮黏膜组织发生病理学变化,是AR患者产生嗅觉障碍的直接原因之一。本实验结果显示,模型组大鼠血清IL-4、IL-5、IL-13、IL-17含量均高于正常组,模型组大鼠嗅黏膜上皮脱落严重,固有层细胞变性、坏死且伴有炎性浸润,线粒体外膜出现模糊和断裂,内膜模糊、嵴结构溶解消失、内部空泡数量明显增加,大鼠寻找食物时间明显延长、出现嗅觉功能障碍;而穴位注射干预后,血清炎症因子IL-4、IL-5、IL-13、IL-17含量明显降低,大鼠嗅黏膜损伤减轻、嗅觉障碍得到改善,且效果明显优于非经非穴注射干预。

嗅黏膜主要由ORNs、支持细胞、基底细胞等构成,其中ORNs为重要组成部分,是嗅上皮的嗅觉感觉单位,具有自我更新的能力,其凋亡异常是嗅觉障碍的主要原因^[21]。生理状态下,ORNs受损后能够启动自身程序性凋亡,并由基底细胞从基底部向顶部迁移、分化成为新的成熟ORNs,新生的ORNs不断更新凋亡的ORNs,二者之间保持动态平衡状态。然而,若ORNs细胞凋亡速度超过了新生细胞增殖成熟的速度,则会引起嗅觉障碍^[22-23]。Caspase参与细胞的生长、分化及凋亡,在细胞凋亡中处于核心地位^[24]。其中Caspase-3被认为是其家族中的关键蛋白酶,广泛参与细胞凋亡途径^[25],与凋亡呈正相关,是细胞凋亡最直接、最关键的执行分子^[26]。Bcl-2和Bax是凋亡相关蛋白,二者具有同源性,在细胞凋亡中起关键作用。Bcl-2是一种抗凋亡蛋白,可以通过调节钙离子信号从而调控细胞凋亡,或在钙离子转运过程中阻断内质网中钙离子释放,抑制Caspase-3活化,从而抑制细胞凋亡^[27];而Bax则是一种促凋亡蛋白,Bax与Bcl-2结合使其失活,抑制Bcl-2蛋白的抗凋亡作用,促进Caspase-3活化,从而

促进凋亡发生^[28-30]。OMP是一种嗅觉转导蛋白,目前所知主要嗅觉通路中可见的唯一标记的脑蛋白,只在成熟的OSN表达,与嗅觉功能密切相关,在OSN嗅觉传导的早期起着关键作用。OMP在许多脊椎动物物种OSNs中高水平表达^[31-32],在气味信号转导、ORNs的发生、发育等方面发挥重要作用^[33],其表达随着嗅觉障碍的加重而减少^[34-35],嗅上皮OMP的表达可以反映OSNs在嗅上皮内的分布数量及ORNs受病理环境的影响。研究^[36]表明,实验动物发现食物的时间与嗅球和嗅上皮的OMP相对密度呈显著的负相关。本实验结果显示,模型组大鼠嗅黏膜细胞凋亡率、Caspase-3和Bax蛋白表达明显升高,Bcl-2蛋白和OMP表达明显降低;而穴位注射干预后大鼠嗅黏膜细胞凋亡率、Caspase-3和Bax蛋白表达明显降低,Bcl-2蛋白和OMP表达明显升高,且变化较非经非穴组明显。

综上所述,穴位注射能明显改善AR大鼠嗅觉功能及嗅黏膜损伤,且作用优于非经非穴注射,其机制可能与穴位注射降低血清炎性因子IL-4、IL-5、IL-13、IL-17水平,抑制炎性反应对嗅黏膜的损伤,调控嗅黏膜细胞凋亡有关。但嗅觉障碍发病机制复杂,本研究仅初步从嗅黏膜局部炎性反应、细胞凋亡角度探讨了穴位注射治疗AR嗅觉障碍相关机制,是否有中枢机制参与尚有待于进一步的后续研究。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] BECKER S, PFLUGBEIL C, GRÖGER M, et al. Olfactory dysfunction in seasonal and perennial allergic rhinitis [J]. *Acta Otolaryngol*, 2012, 132(7): 763-768.
- [2] DOTY R L, MISHRA A. Olfaction and its alteration by nasal obstruction, rhinitis, and rhinosinusitis [J]. *Laryngoscope*, 2001, 111(3): 409-423.
- [3] CARR V M, ROBINSON A M, KERN R C. Tissue-specific effects of allergic rhinitis in mouse nasal epithelia [J]. *Chem Senses*, 2012, 37(7): 655-668.
- [4] GAO X, LI N, ZHANG J S. SB203580, a p38MAPK inhibitor, attenuates olfactory dysfunction by inhibiting OSN apoptosis in AR mice (activation and involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase in olfactory sensory neuronal apoptosis of OVA-induced allergic rhinitis) [J]. *Brain Behav*, 2019, 9(6): e01295.
- [5] 于东歌. “鼻三针”配合穴位注射治疗嗅觉障碍疗效观察 [J]. *中医临床研究*, 2014, 6(25): 23-24.
YU D G. Clinical observation on treating dysosmia with nose 3-needle plus acupoint injection (in Chinese) [J]. *Clinical Journal of Chinese Medicine*, 2014, 6(25): 23-24.
- [6] 庞智慧, 余洪猛, 戴琪. 针灸及穴位注射治疗病毒感染后嗅觉障碍的临床研究 [J]. *中国中西医结合耳鼻喉科杂志*, 2016, 24(1): 23-26.
- [7] PANG Z H, YU H M, DAI Q. Therapeutic effect of acupuncture and acupoint injection on the condition of postvirus-infection olfactory dysfunction (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Otorhinolaryngology in Integrative Medicine*, 2016, 24(1): 23-26.
- [7] 周芊伶, 张倩, 王钰嘉, 等. 穴位注射通过 Toll 样受体 4/激活蛋白-1 信号通路纠正 Th1/Th2 细胞因子失衡改善变应性鼻炎大鼠炎性反应 [J]. *针刺研究*, 2023, 48(4): 366-371.
ZHOU Y L, ZHANG Q, WANG Y J, et al. Acupoint injection ameliorates Th1/Th2 imbalance through Toll-like receptor 4/activator protein-1 signal pathway and improves inflammatory response in rats with allergic rhinitis (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2023, 48(4): 366-371.
- [8] 周芊伶, 王钰嘉, 张倩, 等. 穴位注射通过 p38 丝裂原活化蛋白激酶通路抑制变应性鼻炎大鼠黏蛋白异常分泌及鼻黏膜炎性反应 [J]. *针刺研究*, 2024, 49(11): 1160-1167.
ZHOU Y L, WANG Y J, ZHANG Q, et al. Acupoint injection inhibiting abnormal secretion of mucin and inflammatory reaction of nasal mucosa in rats with allergic rhinitis through the p38 mitogen-activated protein kinase pathway (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2024, 49(11): 1160-1167.
- [9] 杨濛, 李丽红, 王荻, 等. 穴位药物注射治疗大鼠变应性鼻炎的疗效观察及效源因素分析 [J]. *针刺研究*, 2016, 41(3): 220-224.
YANG M, LI L H, WANG D, et al. Analysis on influencing factors of acupoint injection of drugs for improving allergic rhinitis in rats (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2016, 41(3): 220-224.
- [10] DONG J H, XU O, WANG J X, et al. Luteolin ameliorates inflammation and Th1/Th2 imbalance via regulating the TLR4/NF- κ B pathway in allergic rhinitis rats [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2021, 43(3): 319-327.
- [11] 杨晓航, 牛文民, 王渊, 等. 电针迎香穴对大鼠嗅觉功能和嗅黏膜成纤维生长因子的干预效应研究 [J]. *广西中医药大学学报*, 2016, 19(2): 5-7.
YANG X H, NIU W M, WANG Y, et al. Intervention effect of electroacupuncture at Yingxiang point on olfactory function and olfactory mucosa fibroblast growth factor in rats (in Chinese) [J]. *Journal of Guangxi University of Chinese Medicine*, 2016, 19(2): 5-7.
- [12] 李忠仁. 实验针灸学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003.
LI Z R. *Experimental acupuncture* (in Chinese) [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2003.
- [13] 崔林华, 齐丛会, 邢潇. 电针平刺迎香穴治疗青年变应性鼻炎的疗效观察 [J]. *河北中医*, 2018, 40(11): 1732-1735.
CUI L H, QI C H, XING X. Observation on therapeutic effect of electroacupuncture at Yingxiang point on allergic rhinitis in young people (in Chinese) [J]. *Hebei Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2018, 40(11): 1732-1735.
- [14] 油杰. 迎香穴药物注射治疗过敏性鼻炎 [J]. *吉林中医药*, 2003, 23(1): 38.
YOU J. Treatment of allergic rhinitis by drug injection at Yingxiang point (in Chinese) [J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine and Chinese Materia Medica of Jilin*, 2003, 23(1): 38.
- [15] 刘智斌, 牛文民, 杨晓航, 等. 电针迎香穴对嗅觉障碍大鼠嗅黏膜病理改变及神经肽类物质 SP 和 CGRP 的影响 [J]. *陕*

- 西中医药大学学报, 2016, 39(4): 72-75.
- LIU Z B, NIU W M, YANG X H, et al. Effects of electroacupuncture at Yingxiang point on pathological changes of olfactory mucosa and neuropeptide SP and CGRP in rats with olfactory dysfunction (in Chinese)[J]. Journal of Shaanxi University of Chinese Medicine, 2016, 39(4): 72-75.
- [16] 施晓亚, 顾晓春, 傅晓东. 基于Th17/IL-17A信号通路探究鼻敏方治疗变应性鼻炎的抗炎机制[J]. 中药材, 2024, 47(4): 1016-1019.
- SHI X Y, GU X C, FU X D. Based on Th17/IL-17A signaling pathway, the anti-inflammatory mechanism of Bimin recipe in treating allergic rhinitis was explored (in Chinese) [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2024, 47(4): 1016-1019.
- [17] 杨铄, 王晓琼. NLRP3/caspase-1/IL-1 β 信号通路在过敏性鼻炎中作用机制的研究进展[J]. 中国现代医生, 2024, 62(35): 127-130.
- YANG S, WANG X Q. Research progress on the mechanism of NLRP3/caspase-1/IL-1 β signaling pathway in allergic rhinitis (in Chinese) [J]. China Modern Doctor, 2024, 62(35): 127-130.
- [18] 陈兴龙, 赵玲琼, 骆文龙. 变应性鼻炎嗅觉障碍致病机制及治疗的研究进展[J]. 海南医学, 2024, 35(24): 3644-3648.
- CHEN X L, ZHAO L Q, LUO W L. Research progress on pathogenesis and treatment of olfactory dysfunction in allergic rhinitis (in Chinese) [J]. Hainan Medical Journal, 2024, 35(24): 3644-3648.
- [19] LIU P Q, QIN D X, LV H, et al. Activation of dopamine D2 receptor alleviates neuroinflammation in a mouse model of allergic rhinitis with olfactory dysfunction[J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2021, 13(6): 882-895.
- [20] 王晓巍, 倪道凤, 朱莹莹, 等. 倍他米松对变应性鼻炎小鼠嗅觉障碍的干预作用[J]. 协和医学杂志, 2012, 3(2): 154-161.
- WANG X W, NI D F, ZHU Y Y, et al. Effectiveness of betamethasone in treating mice with olfactory dysfunction from allergic rhinitis (in Chinese) [J]. Medical Journal of Peking Union Medical College Hospital, 2012, 3(2): 154-161.
- [21] GLEZER I, MALNIC B. Olfactory receptor function[M]// Smell and Taste. Amsterdam: Elsevier, 2019: 67-78.
- [22] ZHANG J J, HAO C Y, JIANG J X, et al. The mechanisms underlying olfactory deficits in apolipoprotein E-deficient mice: focus on olfactory epithelium and olfactory bulb [J]. Neurobiol Aging, 2018, 62: 20-33.
- [23] 曹磊, 王竹, 李巍, 等. TRPC6与OMP在慢性鼻-鼻窦炎患者嗅上皮中的表达及与嗅觉功能相关性分析[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2021, 27(2): 170-175.
- CAO L, WANG Z, LI W, et al. Expression of TRPC6 and OMP in the olfactory epithelium and its correlation with olfactory function in patients with chronic rhinosinusitis (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Otorhinolaryngology-skull Base Surgery, 2021, 27(2): 170-175.
- [24] 谢天飞, 娄卫华. 嗅黏膜中Caspase-3的表达对嗅神经细胞凋亡的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2015, 40(11): 1434-1437.
- XIE T F, LOU W H. Effects of excessive expression of Caspase-3 on the apoptosis of olfactory receptor neurons (in Chinese) [J]. Journal of Chongqing Medical University, 2015, 40(11): 1434-1437.
- [25] YOULE R J, STRASSER A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(1): 47-59.
- [26] BROTT S, ROGEMOND V, PERROT V, et al. CRMP5 interacts with tubulin to inhibit neurite outgrowth, thereby modulating the function of CRMP2 [J]. J Neurosci, 2010, 30(32): 10639-10654.
- [27] 徐欢成, 郑明学, 古少鹏, 等. 钙信号转导对细胞凋亡的影响[J]. 动物医学进展, 2013, 34(1): 112-115.
- XU H C, ZHENG M X, GU S P, et al. Effect of calcium signal transduction on apoptosis (in Chinese) [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2013, 34(1): 112-115.
- [28] SINGH R, LETAI A, SAROSIEK K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(3): 175-193.
- [29] WARREN C F A, WONG-BROWN M W, BOWDEN N A. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(3): 177.
- [30] 李力, 张燕, 蒲建章, 等. 凋亡相关蛋白Bcl-2和Bax在慢性鼻及鼻窦伴嗅觉障碍患者嗅黏膜中的表达[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2012, 19(1): 29-32.
- LI L, ZHANG Y, PU J Z, et al. Expression of the apoptosis associated protein Bcl-2 and Bax in olfactory epithelium of patients suffering from dysosmia caused by chronic rhinosinusitis (in Chinese) [J]. Chinese Archives of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 2012, 19(1): 29-32.
- [31] KRISHNA N S, GETCHELL T V, MARGOLIS F L, et al. Amphibian olfactory receptor neurons express olfactory marker protein [J]. Brain Res, 1992, 593(2): 295-298.
- [32] BUIAKOVA O I, KRISHNA N S, GETCHELL T V, et al. Human and rodent OMP genes: conservation of structural and regulatory motifs and cellular localization [J]. Genomics, 1994, 20(3): 452-462.
- [33] NAKASHIMA N, NAKASHIMA K, TAKAKU-NAKASHIMA A, et al. Olfactory receptor neurons express olfactory marker protein but not calpain 5 from the same genomic locus [J]. Mol Brain, 2019, 12(1): 54.
- [34] KASS M D, MOBERLY A H, MCGANN J P. Spatiotemporal alterations in primary odorant representations in olfactory marker protein knockout mice [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61431.
- [35] 蒋志明. 不同浓度艾烟环境对大鼠鼻粘膜OMP、iNOS蛋白表达及嗅觉功能的影响[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2021.
- JIANG Z M. Effects of different concentrations of moxa smoke on OMP, iNOS protein expression in rat nasal mucosa and olfactory function (in Chinese) [D]. Hefei: Anhui University of Chinese Medicine, 2021.
- [36] 曾宪平, 陈合新, 付清玲, 等. 成年小鼠嗅觉功能与嗅上皮中成熟嗅觉神经元数量的实验研究[J]. 中国临床解剖学杂志, 2014, 32(2): 192-195, 200.
- ZENG X P, CHEN H X, FU Q L, et al. Relationship between olfactory function and the number of mature olfactory neurons in olfactory epithelium of the adult mouse (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Clinical Anatomy, 2014, 32(2): 192-195, 200.