

针刺脾气虚证模型大鼠“足三里”穴后肠系膜淋巴结免疫功能的变化

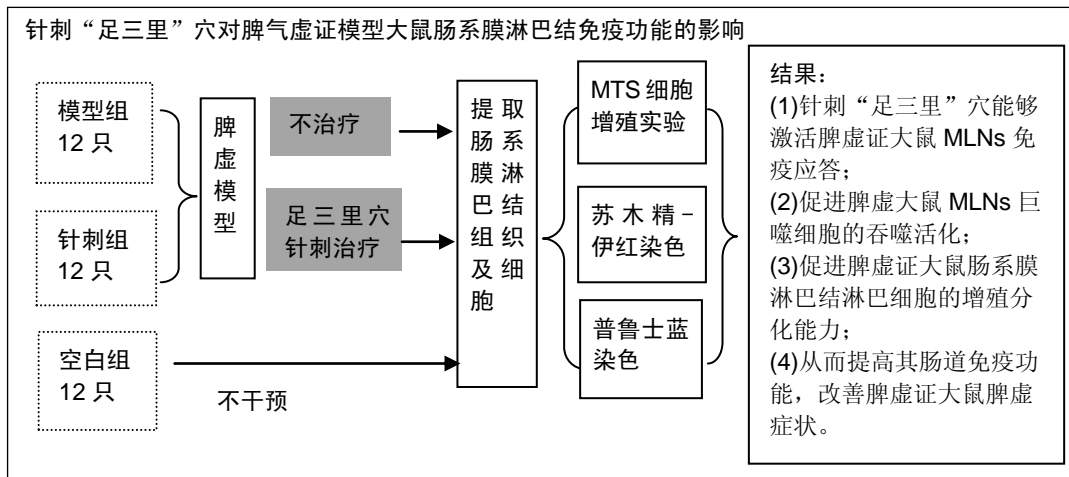
· 研究原著 ·

曾荣华, 吴慧婷, 周露, 欧阳厚淦, 高书亮, 汪建民, 欧阳彦楚, 崔田田(江西中医药大学, 江西省南昌市 330004)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0698

ORCID: 0000-0001-5263-4564(曾荣华)

文章快速阅读:



曾荣华, 男, 1990 年生, 湖北省荆州市松滋市人, 汉族, 江西中医药大学在读硕士, 主要从事人体解剖学的研究。

共同第一作者: 吴慧婷, 女, 1993 年生, 江西省南昌市人, 汉族, 江西中医药大学在读硕士, 主要从事人体解剖学的研究。

通讯作者: 欧阳厚淦, 博士, 副教授, 江西中医药大学, 江西省南昌市 330004

中图分类号:R318

文献标识码:B

稿件接受: 2018-09-11



文题释义:

黏膜免疫系统: 是机体整个免疫网络的重要组成部分, 又是具有独特结构和功能的独立免疫体系, 它在抵抗感染方面起着极其重要的作用, 黏膜表面与外界抗原直接接触, 是机体抵抗感染的第一道防线, 它可以将外来病原微生物或其他外来抗原在侵入机体组织之前被消灭, 不至于对机体组织造成损伤。

巨噬细胞: 来源于骨髓, 在骨髓分化为前单核细胞进入血液, 分化为成熟的单核细胞随后迁徙居留到不同组织中分化为具有不同功能的异质性吞噬细胞亚群。吞噬细胞具有两种基本功能, 吞噬作用和获得性免疫。巨噬细胞在抵抗病原微生物入侵的免疫应答中主要发挥吞噬病原微生物的作用, 同时巨噬细胞能够分泌释放多种细胞因子和强力的趋化因子, 可以对抗原进行识别和递呈。

摘要

背景: 肠道及相关淋巴组织是构成肠道免疫的重要组成部分, 在脾虚免疫失衡中肠道免疫起到了重要的调节作用。

目的: 观察针刺对脾虚证大鼠肠系膜淋巴结组织结构的变化、淋巴细胞增殖活化及巨噬细胞吞噬功能的影响, 探讨脾虚与肠道黏膜免疫之间相关性及针刺治疗脾虚证的作用机制。

方法: 选用 36 只 SPF 级雌性 SD 大鼠(购于安徽医科大学实验动物中心)随机分为 3 组, 模型组及针刺组通过劳倦伤脾加饮食失节多因素复合法建立脾虚大鼠模型, 通过脾虚模型体征评分及尿 D-木糖排泄率检测证实造模成功后, 针刺组大鼠针刺双侧“足三里”穴(1 次/d, 连续 14 d), 模型组自然恢复, 空白组不予干预。治疗结束后摘取小肠肠系膜淋巴结, 采用 MTS 法测定淋巴细胞增殖分化能力, 苏丹 III-伊红染色法观察肠系膜淋巴结组织形态学改变, Perls stain(普鲁士蓝)染色法检测肠系膜淋巴结巨噬细胞数量。

结果与结论: ①肠系膜淋巴结组织结构改变: 空白组结构正常; 模型组淋巴结网架结构遭到破坏, 淋巴小结等结构不完整, 淋巴结副皮质区弥漫性扩大变宽, 淋巴结功能亢进; 针刺组淋巴结小梁构成的实质网架结构基本趋于完整, 淋巴小结等结构基本恢复; ②肠系膜淋巴结淋巴细胞增殖功能: T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞的增殖转化呈相同的趋势, 但 T 淋巴细胞增殖率要高于 B 淋巴细胞($P < 0.01$); 模型组的 T、B 淋巴细胞增殖率均低于空白组($P < 0.01$); 针刺组 T 淋巴细胞增殖率高于模型组($P < 0.01$), 与空白组比较差异无显著性意义($P > 0.05$); 针刺组 B 淋巴细胞增殖率低于空白组($P < 0.01$), 与模型组比较差异无显著性意义($P > 0.05$); ③巨噬细胞计数: 针刺组的淋巴窦巨噬细胞分部密度高于模型组, 低于空白组($P < 0.01$)。提示: 针刺“足三里”穴能激活脾虚证大鼠肠系膜淋巴结免疫应答, 增强其淋巴细胞的增殖分化及巨噬细胞的吞噬活化能力(其中对 T 淋巴细胞增殖分化影响最明显), 进而提高其肠道免疫功能, 改善脾虚证大鼠脾虚症状, 调整肠道消化功能紊乱状态。

关键词:

脾虚; 针刺; 肠系膜淋巴结; 肠道免疫; 组织构建

主题词:

针刺疗法; 肠系膜; 免疫; 淋巴结; 巨噬细胞; 组织工程

基金资助:

国家自然科学基金项目(81360601); 江西省卫计委中医药科研计划项目(2014A075); 江西中医药大学校级课题(2013ZR0046)

Zeng Ronghua, Master candidate, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, Jiangxi Province, China

Wu Huiting, Master candidate, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, Jiangxi Province, China

Zeng Ronghua and Wu Huiting contributed equally to this work.

Corresponding author: Ouyang Hougan, MD, Associate professor, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, Jiangxi Province, China

Changes of immune function of mesenteric lymph nodes in rats with spleen deficiency syndrome after acupuncture at Zusanli

Zeng Ronghua, Wu Huiting, Zhou Lu, Ouyang Hougao, Gao Shuliang, Wang Jianmin, Ouyang Yanchu, Cui Tiantian (Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, Jiangxi Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Intestinal tract and lymphoid tissue are important parts of intestinal immunity, and intestinal immunity plays a critical role in spleen deficiency.

OBJECTIVE: To observe the change of the structure of mesenteric lymph node tissues, lymphocyte proliferation and activation, and macrophage phagocytosis in rats with spleen deficiency syndrome, and to explore the correlation between spleen deficiency and intestinal mucosal immunity and the mechanism of acupuncture for spleen deficiency syndrome.

METHODS: Thirty-six female Sprague-Dawley rats of SPF grade provided by the Experimental Animal Center, Anhui Medical University were randomly divided into three groups: model group, acupuncture group and blank control group. A rat model of spleen deficiency was established by compounding fatigue and spleen-inflicted and eating disorders. The urine D-xylose excretion rate was measured during the model establishment and during the treatment period. After the model was successfully established, rats in the acupuncture control group were acupunctured at bilateral Zusanli (St36), once daily for 14 consecutive days. The model group naturally recovered, and the blank control group received no intervention. At the end of treatment, mesenteric lymph nodes were harvested and the ability of proliferation and differentiation of lymphocytes was measured by MTS method. Morphological changes of mesenteric lymph nodes were observed by hematoxylin-eosin staining. Perls Prussian blue stain staining was used to detect the number of mesenteric lymph node macrophages.

RESULTS AND CONCLUSION: Mesenteric lymph node tissue changes showed that: in the blank control group, the structure was complete. In the model group, the mesenteric lymph node network structure destroyed, lymph nodes and other structures were incomplete, lymph node subcortical area was in diffuse enlargement and widened, showing hyperfunction. In the acupuncture group, the mesenteric lymph node trabecula showed a substantial network structure, and the structure of lymphoid nodules basically recovered. The proliferation ability of mesenteric lymph nodes: the trend of T and B lymphocytes was the same, but the proliferation rate of T lymphocytes was significantly higher than that of B lymphocytes ($P < 0.01$). The proliferation rates of T and B lymphocytes in the model group were significantly lower than those in the blank control group ($P < 0.01$). The proliferation rate of T lymphocytes in the acupuncture group was significantly higher than that in the model group ($P < 0.01$). There was no significant difference in the proliferation rate of T lymphocytes between acupuncture and blank control groups ($P > 0.05$). The proliferation rate of B lymphocytes in the acupuncture group was significantly lower than that in the blank control group ($P < 0.01$). The proliferation rate of B lymphocytes did not differ significantly between acupuncture and model groups ($P > 0.05$). The macrophage count in the acupuncture group was significantly higher than that in the model group, and significantly lower than that in the blank control group ($P < 0.01$). Our findings suggest that acupuncture at Zusanli can activate the immune response of mesenteric lymph nodes of spleen asthenia rats, promote phagocytosis and activation of mesenteric lymph node macrophages, and promote the proliferation and differentiation of lymphocyte of mesenteric lymph nodes, especially T lymphocyte proliferation. Therefore, the intestinal immune function can be improved, the spleen deficiency syndrome is improved, and the digestive function disorder of the intestine is adjusted.

Subject headings: Acupuncture Therapy; Mesentery; Immunity; Lymph Nodes; Macrophages; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81360601; the Chinese Medicine Research Program of Health and Family Planning Commission of Jiangxi Province, No. 2014A075; the Project of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, No. 2013ZR0046

0 引言 Introduction

脾虚证指因脾气血、脾阳亏虚所呈现的一系列临床症状群的抽象归类,在现代医学消化、血液、内分泌等多个系统疾病中都能找到辨证为脾虚的症状,其主要表现为倦怠乏力,少气懒言及胃肠道消化吸收下降及水液代谢紊乱^[1]。流行病学调查发现脾虚证在疾病总体发生率为33.9%,在大部分的疾病中都可见辨证为脾虚证型,在不同疾病人群中,脾虚证的发病率存在显著差异,消化性疾病脾虚证发生率明显大于非消化性疾病^[2-4]。中医学认为脾主运化,乃后天之本,为气血生化之源,四季脾旺不受邪,脾虚则气血生化不足,气血不足会导致免疫功能降低,李东垣在《脾胃论》中云:“百病皆由脾胃衰而生也”,可见脾功能健旺与否不仅关系着人体正常的生理功能,且对疾病的转归起着至关重要的作用。正所谓“正气存内,邪不可干”,脾虚则正气之不足,正气不足则邪之所凑,邪之所凑则其气必虚,这样就形成一个恶性循环。可见脾虚证与免疫功能低下的互为因果作用。中医典籍中这些关于脾胃生理及病理的论述,均反映了脾胃与机体防御功能(免疫功能)之间的关系,脾的防卫功能与现代医学免疫功存在诸多相似之处。

大量研究表明,脾虚的本质与免疫功能的低下有密切的关系,脾脏具有更广泛的免疫学内涵^[5]。有研究也表明脾虚与肠道消化吸收及黏膜免疫功能低下存在密切关系^[6],现代医学认为黏膜免疫系统是人体最大的免疫器官,而肠及相关淋巴组织是构成肠道黏膜免疫屏障的重要组成部分^[7]。目前学术界关于脾虚与免疫功能关系的研究,主要集中在细胞免疫和细胞因子活性水平这一层面上,近些年来胃肠道黏膜免疫功能正日益受到重视,但关于脾虚与肠道黏膜免疫的研究主要集中在肠道内相关淋巴样组织及淋巴细胞,而肠道外淋巴样组织(MLN)在肠道黏膜免疫的研究还处于空白,肠系膜淋巴结是位于肠系膜的淋巴结群,肠系膜淋巴结是淋巴细胞进入血流的中间站,进入肠道内的淋巴细胞及肠源非淋巴样细胞在肠系膜淋巴结滞留活化后迁移到其他肠道相关淋巴样组织,淋巴细胞具有黏附于肠系膜淋巴结内的高内皮静脉的能力,很可能是肠道与外周免疫系统发生接触的位点^[8-9],但从肠道局部黏膜来探讨针灸与脾虚证的相关性,以及脾虚与肠道黏膜免疫之间的实质目前还处于空白,研究尚不明确。为此作者设计了实验,从脾虚与肠道免疫、针灸与免疫这2个角度,试图阐述

脾虚的科学内涵及腧穴对其调节机制, 丰富脾虚、针灸与免疫学的内涵, 提高针灸在免疫等理论指导下的临床应用和发展, 提高针灸治疗脾虚证的临床效果。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2016年4月至2017年3月在江西中医药大学基础医学院实验中心科研平台完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物及分组 选择一至二月龄SPF级雌性SD大鼠, 共96只, 体质量(180±210) g, 购于安徽医科大学实验动物中心, 许可证编号: SCXK(皖)2011-002。动物饲养条件: 动物房温度18-26 °C、湿度45%-55%。实验前适应性喂养1周, 造模前称质量挑选出体质量±10 g大鼠43只, 合格大鼠53只; 将合格大鼠预游泳, 挑选出游泳时间±5 min的大鼠, 合格大鼠共40只; 将合格的大鼠进行造模, 剔除体评分和客观评分离散程度大的25只大鼠, 再随机剔除1只, 剩余24只, 将此造模成功的24只大鼠采用随机数表法随机分为2组: 脾虚模型组(简称为模型组), 针刺治疗组(简称为针刺组), 每组12只; 再次从造模前称质量挑选出体质量±10 g的43只大鼠中采用随机数表法随机挑选出12只大鼠作为空白组。最后纳入实验模型组、针刺组及空白组各12只, 共36只。

1.3.2 实验主要设备与试剂 代谢笼、D-木糖检测试剂盒(南京建成生物研究所), 对溴苯胺试剂(上海化学试剂公司), unic7200可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司), 针灸针(华佗牌), 10%水合氯醛(天津大茂化学试剂公司), 200目细胞筛(上海易佰聚经贸有限公司), 二氧化碳培养箱(赛默飞世尔科技有限公司), 小型台式离心(Eppendorf 公司), 全波长酶标仪(美国MD公司), 脏器器淋巴细胞分离液(北京索莱宝科技公司), MTS检测试剂盒(凯基生物有限公司), 完全RPMI-1640培养基(凯基生物有限公司), Hanks液(凯基生物有限公司), 红细胞裂解液(上海澄绍生物科技有限公司), 脂多糖、刀豆蛋白A9(美国Sigma), 普鲁士蓝染色试剂盒(索莱宝科技公司), 苏木精-伊红染色试剂盒(北京康为世纪生物有限公司), Leica切片机(德国莱卡), 奥林巴斯显微镜(日本奥林巴斯)。

1.4 实验方法

1.4.1 动物造模 模型组及针刺组大鼠通过劳倦伤脾加饮食失节多因素复合法建立脾气虚大鼠模型^[10], 造模前观察记录每只大鼠的体质量、肛温、进食量及宏观体征变化, 包括精神状态、粪便情况、毛发状况、饮食状况等。劳倦伤脾通过将大鼠置于(25±1) °C温水的塑料浴桶中游泳, 让大鼠游泳至耐力极限(大鼠头部首次没入水中3 s); 饮食失节通过隔日喂食隔日禁食; 共造模31 d。空白组正常饲养不施加任何干预^[11]。

1.4.2 脾虚模型评价标准

(1)脾虚模型体征评价标准: 参照脾虚证中医诊疗专家

共识意见(2017)^[12], 宏观体征: ①便溏, 甚至泄泻; ②纳差; ③消瘦, 体质量下降; ④神态萎靡, 毛色枯槁; ⑤扎堆蜷缩。第①、②项为主症, ③、④、⑤项为兼症, 具备2项主症与2项兼症, 脾虚模型评分表≥4分即可判定为模型建立成功。见表1。

表1 脾虚证大鼠模型体征评价标准

Table 1 Criteria for assessing the physical sign of rat models of spleen deficiency

评价指标	典型症状评分		
	0分	1分	2分
精神状态	无变化	拱背, 扎堆	神态萎靡
粪便情况	无变化	时干时稀	便溏、泄泻
毛发状况	无变化	毛色稀少,	色淡、无光
饮食状况	无变化	蓬松	食量明显减少
		食量减少	
体质量变化	无变化	增长减慢	体质量下降

(2)脾虚模型客观检测指标评价标准: D-木糖是一种戊醛糖, 口服后经小肠吸收, 吸收后不能被肝脏所利用, 在体内无法代谢, 从肾脏中迅速排出, 故口服D-木糖后测定尿液中D-木糖排泄量即可相对反映小肠对碳水化合物的吸收能力。尿D-木糖排泄率检测实验是临床上具有广泛应用价值的一个指标, 目前在临床及基础研究中被公认为一个相对特异性和敏感性的脾虚证诊断指标^[13-15], 参考文献[16]采用比色法测定大鼠尿D-木糖排泄率。

1.4.3 针灸治疗 取双侧足三里穴, 参考《实验针灸学》^[17], 定位: 大鼠膝关节外下侧, 距腓骨小头下方约5 mm处。造模结束后第1天予以针灸治疗, 将针刺组和模型组均束缚于固定台, 但模型组不予治疗, 让其自然恢复; 空白组不加任何干预。刺法: 直刺4 mm, 刺入肌肉层^[18], 用补法, 捻转补泻, 拇指向前, 食指向后, 捻转角度10°-60°, 施针时间1 min, 留针20 min。每日针刺1次, 共针刺14 d。

1.4.4 取材及染色观察 干预治疗结束第2天, 各组大鼠经体积分数10%水合氯醛麻醉后颈动脉放血法处死。在生物安全柜中迅速解剖大鼠, 摘取小肠肠系膜淋巴结。用生理盐水漂洗后用眼科镊轻轻剥离淋巴结被膜, 提取原代淋巴细胞后进行原代淋巴细胞培养, 采用MTS法检测肠系膜淋巴结淋巴细胞增殖分化功能。未剥离包膜的淋巴结经40 g/L多聚甲醛固定后, 常规脱水、透明、浸蜡、包埋, 3 μm切片, 采用苏木精-伊红染色法观察肠系膜淋巴结组织形态学变化; 采用Perls stain(普鲁士蓝)染色法检测肠系膜淋巴结巨噬细胞吞噬活化能力, 在光镜10, 20, 40倍物镜下随机选择8个完整视野拍片, 观察肠系膜淋巴结组织形态结构的病理学变化及巨噬细胞染色情况, 使用Image pro plus 6.0软件对巨噬细胞进行计数。

1.5 主要观察指标 ①肠系膜淋巴结淋巴细胞增殖分化功能; ②肠系膜淋巴结组织形态学的改变; ③肠系膜淋巴结巨噬细胞吞噬活化能力。

1.6 统计学分析 采用SPSS 19.0统计软件,数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,统计前进行正态分布检验和方差齐性检验,组间两两比较采用单因素方差分析,组间前后比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用大鼠36只,分为3组,实验期间未有大鼠脱失,进入结果分析共36只。

2.2 脾虚模型评价 脾虚模型体征评分及大鼠尿D-木糖排泄率结果证实脾虚大鼠模型建模成功。

2.2.1 造模期间各组大鼠行为学特征及宏观体征评分 模型组和针刺组在造模第24天开始出现脾虚症状和体征,第28天表现出明显的脾虚症状和体征,主要表现为纳差、大便时软时溏、体质量下降,眯眼、弓背,倦怠懒动,游泳耐力的下降,毛发失容等。

宏观体征评分模型组与针刺组明显高于空白组,差异有显著性意义($P < 0.01$);模型组和针刺组体征评分相较无明显差异($P > 0.05$);造模期间空白组各项体征无明显变化。结果表明,模型组和针刺组大鼠在劳倦伤脾加饮食失节多因素复合法作用下出现明显的脾虚症状,各组大鼠体征评分,见图1。

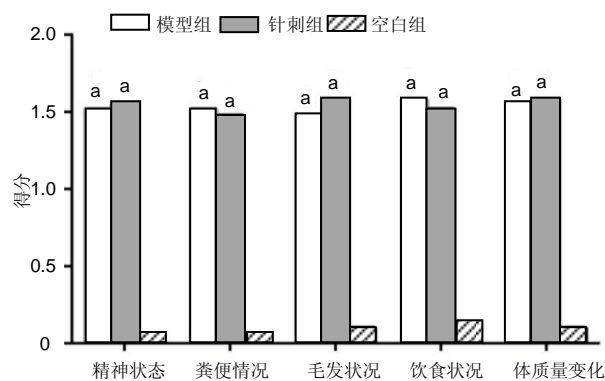


图1 各组大鼠造模期间宏观体征评分

Figure 1 Gross scores of rats in each group during modeling

图注:与空白组比较,^a $P < 0.01$ 。

2.2.2 造模期间各组大鼠尿D-木糖排泄率检测结果 造模前3组大鼠尿D-木糖排泄率比较无差异($P > 0.05$);与空白组比,造模第7天模型组、针刺组尿D-木糖排泄率稍降低($P < 0.05$),造模第14天模型组、针刺组大鼠尿D-木糖排泄率明显降低($P < 0.01$);造模第21,28天模型组、针刺组大鼠尿D-木糖排泄率仍然在降低($P < 0.01$),但趋向于稳定,见表2。

2.3 肠系膜淋巴结淋巴细胞增殖功能 ①ConA诱导的T淋巴细胞增殖转化与脂多糖诱导的B淋巴细胞增殖转化实验呈相同的趋势,T淋巴细胞增殖率要高于B淋巴细胞,差异有显著性意义($P < 0.01$);②T淋巴细胞增殖率比较:针刺组低于空白组,但差异无显著性意义($P > 0.05$),模型组明显低于空白组,差异有统计学意义($P < 0.01$);③B淋巴细胞增殖率

比较:针刺组低于空白组,差异有显著性意义($P < 0.01$);模型组明显低于空白组,差异有显著性意义($P < 0.01$);针刺组高于模型组,但差异无显著性意义($P > 0.05$),见表3。

表2 各组大鼠造模期间尿D-木糖排泄率比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=12$, %)

Table 2 Excretion rate of urinary D-xylose of rats in each group during modeling

时间	模型组	针刺组	空白组
0 d	28.13±6.12	27.87±3.13	28.02±2.34
7 d	25.23±5.14 ^a	25.12±7.24 ^a	30.22±4.23
14 d	18.47±4.38 ^b	19.08±5.34 ^b	34.67±2.45
21 d	10.13±1.11 ^b	10.27±1.12 ^b	38.86±1.33
28 d	10.10±1.01 ^b	10.18±0.78 ^b	39.03±4.56

表注:与空白组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$ 。

表3 各组大鼠肠系膜淋巴结淋巴细胞增殖率 ($\bar{x}\pm s$, $n=12$, %)

Table 3 Proliferation rate of mesenteric lymph node of rats in each group

组别	T淋巴细胞增殖率	B淋巴细胞增殖率
模型组	8.297±2.481 ^a	6.289±2.673 ^a
针刺组	10.400±1.353 ^b	8.837±1.673 ^c
空白组	11.208±1.640	9.604±1.839

表注:与空白组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$ 。

2.4 肠系膜淋巴结组织形态的改变 模型组与空白组相比较组织散乱,皮质与髓质界限不清区分不明,网架结构遭到破坏,淋巴小结等结构不完整;淋巴结副皮质区弥漫性扩大变宽,窦隙狭窄、不清晰,以致淋巴结结构模糊。针刺组组织结构基本上趋向于正常,大体结构基本完整,与模型组相比由小梁构成的实质网架结构基本趋于完整,淋巴小结等结构基本恢复,副皮质区较空白组扩大,生发中心较模型组增大。空白组肠系膜淋巴结组织结构完整,小梁构成的实质网架结构完整。淋巴小结与周围组织界限清楚,其内生发中心无萎缩,副皮质区皮质和髓质分界明显,见图2。

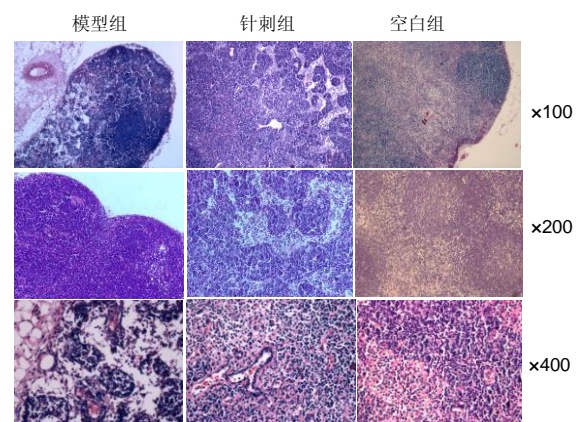


图2 各组大鼠肠系膜淋巴结苏木精-伊红染色

Figure 2 Hematoxylin-eosin staining of rat mesenteric lymph nodes in each group

2.5 肠系膜淋巴结Perls stain染色结果及巨噬细胞计数 图3中Perls stain染色可见巨噬细胞主要分布于肠系膜淋

巴结被膜下淋巴窦的区域。巨噬细胞计数结果：针刺组明显高于模型组($P < 0.01$)，模型组明显低于空白组($P < 0.01$)，针刺组与空白组比较差异无显著性意义($P > 0.05$)，见图4。

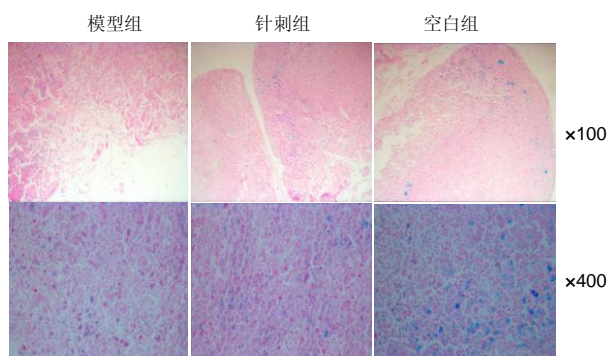


图3 各组大鼠肠系膜淋巴结 perls stain 染色
Figure 3 Perls Prussian blue staining of rat mesenteric lymph nodes in each group

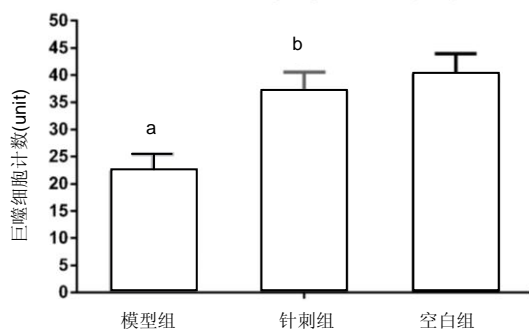


图4 各组大鼠肠系膜淋巴结巨噬细胞计数
Figure 4 Count of rat mesenteric lymph node macrophages in each group

图注：与空白组比较，^a $P < 0.01$ ；与模型组比较，^b $P < 0.01$ 。

3 讨论 Discussion

实验发现造模第24天，大鼠模型开始出现脾虚症状和体征，表现为纳差，大便时软时溏、体质量下降，眯眼、弓背，倦怠懒动，游泳耐力的下降，毛发失容，模型组、针刺组大鼠尿D-木糖排泄率相比空白组明显降低；D-木糖主要在空肠上段吸收，部分在体内破坏，大部分经肾脏从尿中排出，尿D-木糖排出量可以反映小肠相对吸收量，可以反映机体胃肠吸收能力，是判定脾虚证的一个重要指标^[19-20]；造模第28天针刺组和模型组出现明显的脾虚证症状体征，尿D-木糖排泄率趋向于稳定，宏观体征及客观指标达到了脾虚证模型评价标准，继续造模3 d以稳定模型，共造模31 d。针刺脾虚证大鼠“足三里”穴8 d后脾虚大鼠食量开始增加，毛发渐光泽，自主活动增加，进食量明显增加，便溏、泄泻等症状明显改善，模型组脾虚症状改变不甚明显，空白组各项体征无明显变化。

肠系膜淋巴结是肠道淋巴液的滤器及免疫应答的重要场所，其大小、形态结构及细胞成分的变化与肠道的免疫状态密切相关。正常的淋巴结在无外来抗原刺激下淋巴小结少

而小，生发中心不明显或无，皮质区薄而均匀。当肠系膜淋巴结出现体液免疫应答时，次级淋巴小结形成并扩大，生发中心明显，小结帽的小淋巴细胞排列密集。当肠系膜淋巴结出现细胞免疫应答时，副皮质区迅速扩大，细胞排列密集，其中可见大量增殖活化的大淋巴细胞及细胞有丝分裂象，此时肠系膜淋巴结内各种结构均十分发达。当外来抗原被清除后，免疫应答的高峰消失，淋巴结内的结构又渐缩小并消退，恢复到接近健康的状态^[21]。实验结果发现脾虚模型组肠系膜淋巴结网架结构遭到破坏，淋巴小结等结构不完整，淋巴结副皮质区弥漫性扩大变宽，淋巴窦狭窄不清晰以至于结构模糊，表明脾虚模型组在受到外来抗原的入侵下，机体免疫功能低下以至于无法清除入侵的抗原，淋巴结组织结构遭到破坏；针刺组肠系膜淋巴结小梁构成的实质网架结构基本趋于完整，淋巴小结等结构基本恢复，说明针刺组在针刺治疗后免疫功能得到了提高，能够及时清除入侵的抗原，淋巴结结构能及时恢复到接近健康的状态。

巨噬细胞来源于骨髓，在骨髓分化为前单核细胞进入血液，分化为成熟的单核细胞随后迁徙居留到不同组织中分化为具有不同功能的异质性吞噬细胞亚群。巨噬细胞的这种多态性使得巨噬细胞具有多种功能，吞噬细胞具有两种基本功能，吞噬作用和获得性免疫。在感染的部位，巨噬细胞可识别并吞噬入侵体内的病原微生物，巨噬细胞在抵抗病原微生物入侵的免疫应答中主要发挥吞噬病原微生物的作用，同时巨噬细胞能够分泌释放多种细胞因子和强力的趋化因子，可以对抗原进行识别和递呈。大多数抗原需经巨噬细胞和树突状细胞等APC(抗原递呈细胞)的识别处理后才能递呈给淋巴细胞。肠系膜淋巴结被膜下淋巴窦的区域内分布大量巨噬细胞淋巴细胞丛和树突状细胞淋巴细胞丛，处于淋巴细胞的包围之中并与淋巴细胞间有着紧密的膜接触，为抗原的递呈提供了优良的条件，刺激淋巴细胞的增殖和活化^[22]。肠系膜淋巴结位于肠道淋巴回流的通路上，当病原微生物等有害成分侵入肠道内很容易随淋巴回流到达肠系膜淋巴结淋巴结，淋巴窦的窦腔不规则，较宽大，容积极大，在抗原入侵的急性时期，可致淋巴窦扩张和窦内巨噬细胞大量增多，因此淋巴液在淋巴窦内流动变得极为缓慢，使得淋巴液中的有害成分在迂回曲折流动时能够充分与淋巴窦内的巨噬细胞相接触，使得绝大多数有害成分及时被清除或局限在淋巴结内，有效地防止了有害成分进入血液循环侵害机体的其他部位。巨噬细胞做为APC和CD4⁺T细胞存在多种相互作用形式，一般分为直接接触和细胞因子分泌的巨噬细胞和CD4⁺T细胞会通过CD40-CD40L的结合相互作用，促进CD4⁺T细胞的活化。巨噬细胞上的PD-L1(免疫检查点受体分子-配体分子)、CD48、HVEM(疱疹病毒侵入介质)与CD4⁺T细胞上相应受体PD-L1、BTLA(B、T淋巴细胞衰减因子)结合后能够诱导T细胞的凋亡和耗竭。该实验结果发现针刺组肠系膜淋巴结被膜下淋巴窦区域巨噬细胞大量活化聚集，使得多数有害

成分能够及时被清除或局限在淋巴结内，利于抗原的识别提呈，促进CD4⁺T细胞的活化，激活机体的免疫力。

中医学认为脾主运化，运化水谷精微以及运化水液，因此脾虚证主要表现食少纳呆、形体消瘦、便溏泄泻等消化系统症状，现代医学认为中医学的脾脏是一个以消化系统为主的多系统(神经、内分泌、免疫等)多功能的综合单位^[23]。机体的消化功能和肠道免疫保护功能密切相关，肠道免疫是人体免疫中的重要组成部分之一，因此在以脾虚水液代谢障碍为主要消化道症状中肠道黏膜免疫起到了重要的调节作用^[24]。肠道黏膜免疫系统是人体最大的免疫器官，是人体免疫系统抵御外界抗原及病原微生物入侵的第一道防线^[25]，同时保持肠道低反应性的免疫监视状态，调动免疫耐受机制，从而维持肠道内环境的稳态，胃肠道黏膜免疫屏障功能正日益受到重视^[26]。

足三里穴具有良好的免疫调节功能，且具有整体性和双向性^[27]。足三里穴为足阳明胃经之合穴，为土中土穴，脾胃相表里，统脾胃皆疾，功善培土化元、补益扶正，能增强机体特异性和非特异性免疫功能，因此，足三里穴在临床上可治疗免疫低下或免疫缺陷疾病，又可治疗免疫亢进疾病，而体现了针灸所特有的双向良性调整作用^[28]。有研究发现足三里穴位处淋巴管数量与非穴位处有着显著性差异，针刺时牵拉骨骼肌挤压毛细淋巴管，促进毛细淋巴管的淋巴微循环，促进了淋巴细胞向淋巴结的归巢这可能与足三里穴调节免疫功能有关^[29]。

综上所述，针刺“足三里”穴能够明显改善脾虚证大鼠脾虚症状，提高小其消化吸收能力，促进肠系膜淋巴结淋巴的增殖分化，调节脾虚证大鼠肠系膜淋巴结T淋巴细胞亚群的平衡，从而提高其肠道免疫功能，维持肠道黏膜免疫耐受及免疫稳态。

作者贡献: 设计为欧阳厚淦、曾荣华、吴慧婷；资料收集为曾荣华、周露、吴慧婷；评估为高书亮、汪建民。欧阳厚淦审核并对文章负责。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金项目(81360601)；江西省卫计委中医药科研计划项目(2014A075)；江西中医药大学校级课题(2013ZR0046)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程，没有因其岗位角色影响文章观点和对数据结果的报道，不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经江西中医药大学动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在水合氯醛麻醉下进行所有的手术，并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《动物实验体内实验研究报告规范指南》(ARRIVE指南)。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经江西中医药大学学校生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] 施茵,吴焕淦.足三里穴在免疫功能调节中的应用[J].现代中医药, 2003,2(3):3-6.
- [2] 陈玉龙,符仁,刘紫阳,等.脾虚证发生率研究[J].光明中医, 2012,27(3):614-615.
- [3] 陈玉龙,符仁,刘学俊,等.脾虚证症状规律的文献研究[J].中医学报, 2013,28(1):150-152.
- [4] 陈小野,邹世洁.脾气虚证多态性的初步探讨[J].中医杂志, 1996, 30(2):113-116.
- [5] 熊斌,钱会南.中医脾虚证与免疫功能关系研究进展[J].湖北中医杂志, 2013,35(6):76-78.
- [6] 逢紫千,李秋明,袁洪平. 针灸对脾虚证肠道局部免疫的作用机制[J].长春中医药大学学报,2007,23(2):84-85.
- [7] 叶芳旭,徐芳,张烁. 由“气血津液”学说浅析脾虚证对胃肠免疫功能的影响[J]. 浙江中西医结合杂志,2017,27(9):808-810.
- [8] 王为,周国华. 肠道相关淋巴样组织与肠道黏膜免疫[J].实用医学杂志, 2009,25(21):3720-3722.
- [9] 卓缘圆,吴家满,叶鑫璇,等. 针灸治疗脾虚证概况[J].针灸临床杂志, 2012,28(1):66-68.
- [10] 张彩云,肖满珊,廖双叶,等.实验性大鼠脾气虚证模型的建立及指标检测[J]. 广东药学院学报,2015,31(6):808-810.
- [11] 陈雷,李德新,崔家鹏,王彩霞.用模糊数学中模式识别方法进行脾气虚大鼠模型评价的实验研究[J].中国中医基础医学杂志, 2006, 12(2):118-120.
- [12] 张声生,胡玲,李茹柳. 脾虚证中医诊疗专家共识意见(2017)[J].中医杂志, 2017,58(17):1525-1530.
- [13] 陈贵廷. 中医虚证辨证标准的客观化问题[J].中国中西医结合杂志, 1983,3(2):73-76.
- [14] 修宗昌,余绍源,黄穗平. 脾虚证临床诊断标准浅议[J].中华中医药学刊, 2003,21(2):219-220.
- [15] 李灿,张海艇,陈玉龙. 采用唾液淀粉酶和D-木糖排泄率对利血平脾虚证模型的评价研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2011,17(7):746-748.
- [16] 高小玲,郭文峰,李茹柳,等. 四君子汤对脾虚大鼠尿木糖排泄率及肠黏膜ATP的影响[J]. 中药材,2009,32(8):1242-1245.
- [17] 李忠仁,方剑乔,易受乡,等. 实验针灸学[M].北京:中国中医药出版社. 2003:327-329.
- [18] 田阳春,郑玲,袁英,等.不同深度针刺足三里穴对健康大鼠外周血细胞形态数量及淋巴细胞增殖能力和胸腺指数的影响[J].中国组织工程研究, 2008,12(29):5687-5690.
- [19] 李斌,侯伟龙,王彩霞,等. 脾虚动物水液代谢特征研究[J].辽宁中医杂志, 2016,43(31):150-153.
- [20] 赵彬. 艾灸对脾虚泄泻大鼠尿D-木糖排泄率和唾液淀粉酶分泌的影响[D]. 沈阳:辽宁中医药大学,2014.
- [21] 何裕隆,王亮. 淋巴结组织结构与功能及胃癌淋巴转移的组织学基础[J]. 消化肿瘤杂志(电子版),2014,6(1):51-56.
- [22] 韩振民,谢遵江,崔宏波,等.小鼠肠系膜淋巴结在黏膜免疫应答中的形态学观察[J]. 哈尔滨医科大学学报,2003,37(2):131-132.
- [23] 王文波,谢湘峰,程艳荣. 脾虚证胃肠黏膜屏障保护功能的研究集要[J]. 中华中医药学刊,2002,20(4):504.
- [24] 王富春,逢紫千. 针灸天枢穴对脾虚泄泻大鼠肠道功能影响的实验研究[J]. 长春中医药大学学报,2005,21(1):52-54.
- [25] Brandtzaeg P.The secretory immunoglobulin system: regulation and biological significance. Focusing on human mammary glands. Adv Exp Med Biol. 2002;503:1-16.
- [26] Hart AL, Lammers K, Brigidi P,et al.Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. Gut. 2004;53(11):1602-1609.
- [27] 于茜楠,陈以国. 针灸对固有免疫双向调节研究概况[J].实用中医内科杂志,2015,29(3):137-139.
- [28] 杨丽霞. 针刺调节慢性疲劳大鼠神经-免疫功能的研究[D]. 广州:广州中医药大学,2007.
- [29] 余安胜,赵英侠. 足三里穴的显微结构[J]. 中国针灸,1999,2(1):27-28.