

穴位埋线治疗实验性结肠炎大鼠的机制探讨

张夏毅 沈霖 范恒 梁丽 廖弈

(华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科,湖北省武汉市解放大道 1277 号,430022)

摘要 目的:检测 TNBS 诱导实验性结肠炎大鼠在穴位埋线治疗前后的 NF- κ Bp65 和 STAT6mRNA 的表达水平,初步阐明穴位埋线治疗实验性结肠炎大鼠的作用机理。方法:18 只雄性大鼠随机分为正常组、模型组、穴位埋线组,每组 6 只。除正常对照组未行造模外,其余 2 组大鼠均采用 TNBS 造模。模型组不设干预,正常饮食;穴位埋线组进行穴位埋线治疗。治疗 15d 后观察大鼠的结肠病理组织学改变,用 western blot 法检测大鼠脾淋巴细胞 NF- κ Bp65 蛋白的表达;用 RT-PCR 法检测大鼠结肠组织 STAT6mRNA 的表达。结果:穴位埋线组的大鼠腹泻、黏液脓血便症状得到较快改善,大鼠黏膜组织损伤也明显改善。与正常组相比,模型组大鼠 NF- κ Bp65 和 STAT6mRNA 增多($P < 0.01$);与模型组比较,穴位埋线组 NF- κ Bp65 和 STAT6mRNA 减少($P < 0.01$)。结论:穴位埋线能通过 NF- κ B 和 STAT6 双信号途径下调炎症因子,从而发挥治疗作用。

关键词 结肠炎;穴位埋线;NF- κ Bp65;STAT6

On Mechanism of Acupoint Embedment Treatment for Rats with Colitis

Zhang Xiayi, Shen Lin, Fan Heng, et al.

(Department of Integrative Chinese and Western Medicine, Xiehe Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, add.: No. 1277, Jiefang Avenue, Wuhan, Hubei Province, post code: 430022)

Abstract Objectives: To determine the expression of NF- κ Bp65 and STAT6mRNA prior to and after acupoint embedment treatment in rats with TNBS induced colitis, and to investigate mechanism of action of the treatment. **Methods:** The male rats ($n = 18$) were randomized to normal group, model group and treatment group. The model was established using TNBS. The model group received no intervention, and was on normal diet. acupoint embedment treatment. On D15 the histopathology of colon was observed, NF- κ Bp65 expression was determined by western blot, and STAT6mRNA expression was determined by RT-PCR. **Results:** The treatment group recovered more fast from diarrhea and bloody purulent stool, and mucous membrane injury was significantly improved. Compared with the normal group, the model group had significantly higher expression of NF- κ Bp65 and STAT6mRNA ($P < 0.01$), while the treatment group had significantly lower expression ($P < 0.01$). **Conclusion:** The effectiveness of acupoint embedment treatment is achieved by down regulation of inflammatory factor through NF- κ Bp65, STAT6mRNA.

Key Words Colitis, acupoint embedment treatment, NF- κ Bp65, STAT6

炎症性肠病(Inflammatory Bowel Disease, IBD)的发病率逐年提高,据研究发现,IBD 的发病机制与肠道黏膜的局部免疫异常有关,促炎细胞因子和抑炎细胞因子的平衡失调被认为是 IBD 的一个重要发病机制^[1-3]。由于三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitro-benzene-sulfonic Acid, TNBS)主要致炎机理是乙醇破坏肠黏膜屏障, TNBS 渗入结肠黏膜组织与大分子物质结合,形成全抗原,引起肠壁一系列免疫应答和炎症反应。通过 TNBS 造模后会出现腹泻,黏液脓血便,体质量下降,活动减少等症状。病变侵犯全黏膜层,表现为水肿、充血、糜烂、溃疡,镜下可见大量中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞浸润。在病理学和免疫学特征上与活动期炎症性肠病患者相似。于是,我们建立 TNBS 实验性结肠炎模型大鼠,观察 TNBS 诱导实验性结肠炎大鼠在穴位埋线治疗前后的脾淋巴细胞核因子-

κBp65(NF- κ Bp65)及信号转导和转录激活因子 6(STAT6mRNA)的表达水平,为阐明 TNBS 诱导实验性结肠炎大鼠的致病机理和穴位埋线治疗炎症性肠病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 SD 大鼠 18 只,SPF 级,体重 250~350g,购自华中科技大学同济医学院实验动物中心,实验动物生产许可证 SCKY(鄂)2004-0007,实验动物使用许可证 SYXX(鄂)2004-0028。2,4,6 三硝基苯磺酸购自 Sigma 公司。western blot 检测:小鼠抗 NFκBp65 抗体(Mouse NFκBp65 antibody)购自 SANTA 公司,货号为 sc-8008。可吸收性外科缝线(医用羊肠线)由上海医用缝合针厂生产,规格 3/01000mm。RT-PCR 试剂:Trizol Reagent 试剂盒购自 Invitrogen Cat, NO. 15596-026。引物资料:Rat-STAT6-F,5-GTT-GACTTTCCACAACACCT-3;Rat-STAT6-R,5-CT-GATAGATGCTCTCCAAGG-3;片段长度,210bp;Rat-

β - actin - F, 5 - GAGAGGAAATCGTGCGTGAC - 3 ;
Rat - β - actin - R, 5 - CATCTGCTGGAAGGTGGACA -
3 ; 片段长度, 452bp。

1.2 方法

1.2.1 分组 正常对照组 6 只, 从实验开始到结束正常饮水、喂食; 其他 2 组各 6 只, 用 TNBS 造模 24h 后, 模型组不设干预, 正常饮食; 穴位埋线组先将医用羊肠线剪成 0.5cm 线段若干, 浸泡在 75% 的乙醇内备用。10% 水合氯醛麻醉大鼠后, 将 12 号腰椎穿刺针芯退出少许, 羊肠线放入针头内, 垂直穴位快速进针后稍做提插, 推动针芯将肠线留于穴内即可, 第 16 天禁食 24h 后处死大鼠。

1.2.2 穴位定位 穴位定位根据大鼠穴位图谱提供的方法并拟人比较法制订。上巨虚: 大鼠后肢足三里向下约 5mm 处。天枢穴: 相当于脐中旁开 5mm。大肠俞: 在腰部, 当第 4 腰椎棘突下, 旁开 5mm, 双取。

1.2.3 造模 参照 TNBS 造模法^[4], 操作如下: SD 大鼠饲养 7d, 适应实验室环境。禁食不禁水 24h 后, 10% 水合氯醛 0.35mL/100g, 腹腔麻醉。将一直径 2.7mm 的 8 号导尿管由肛门经缓慢插入 8cm, 将 50% 乙醇溶液 0.3mL 和 5% TNBS 液 0.6mL, 先后用注射器推入导尿管, 注入后将大鼠尾巴提起, 持续倒置 30s。结束后使动物平躺, 自然清醒, 自由饮食。

1.2.4 标本制备 将各组大鼠以 10% 水合氯醛 0.35mL/100g, 腹腔麻醉后, 仰位固定于手术台上, 剖腹暴露全腹, 随后无菌取脾, 分离脾脏淋巴细胞, 取出结肠组织, 待检。

1.2.5 观察指标和检测方法 1) 观察大鼠的毛发光泽度、饮食、活动度、体重、大便、精神状态等。2) 用 western blot 法检测大鼠脾淋巴细胞 NF - κ Bp65 蛋白, 做化学发光, 得到胶片。SDS - PAGE 凝胶浓度为 12%; 阳性条带以 Gel pro4.0 版凝胶光密度分析软件进行分析, 测其 IOD 值。3) 大鼠溃疡性结肠组织中 STAT6mRNA 的表达: 用 RT - PCR 法检测大鼠结肠组织 STAT6mRNA 的表达, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 加样量为 10 μ L, 电压 120V, 电泳完毕后在溴化乙锭(EB)中染色, 在紫外灯下观察结果并照相, 得到凝胶图片与 IOD 值。

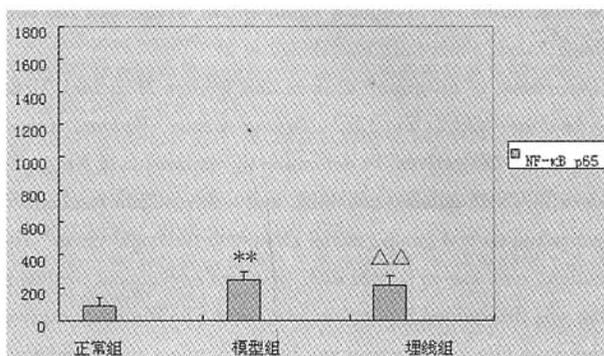
1.3 统计学方法 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析和最小显著差异 *t* 检验(LSD - 检验), 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 正常对照组大鼠体重、大便、毛发光泽度、精神状态良好。其余 2 组大鼠在 TNBS 造模后 2d 内均出现腹泻、稀便, 伴食欲下降、体重下降、毛发干枯、喜静, 可见成堆现象, 部分出现黏液脓血便。穴位埋线组大鼠经过治疗后, 第 7 天体重即恢复到造模前的体质量, 且进食逐渐增多。1 周后, 肛周稀便逐渐减少, 大便成形。15d 治疗结束后, 大鼠毛发逐渐恢复光泽, 未见黏液脓血便和稀便。模型组大鼠稀便未能缓解, 消瘦, 毛发干枯, 懒动。

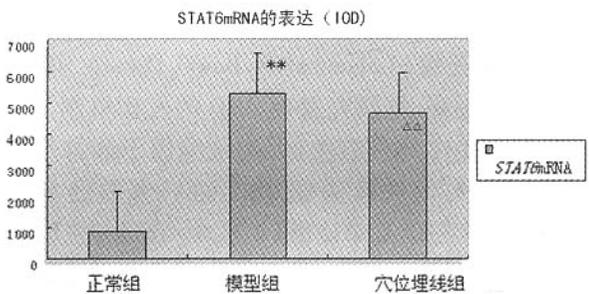
2.2 大鼠脾淋巴细胞 NF - κ Bp65 蛋白的表达 与正常组比较, 模型组的 NF - κ Bp65 的免疫印迹增强, 2 组存在明显差异 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 埋线组的 NF - κ Bp65 的免疫印迹减弱, 2 组存在明显差异 ($P < 0.01$)。

图 1 各组大鼠脾淋巴细胞 NF - κ Bp65 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)



注: 正常组与模型组比较, ** $P < 0.01$; 模型组与埋线组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图 2 各组实验性结肠炎大鼠 STAT6mRNA 的 IOD 值



注: 模型组和正常组比较, ** $P < 0.01$; 穴位埋线组和模型组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

2.3 大鼠结肠组织 STAT6mRNA 的表达 在电泳照片中可见模型组的区域内密度加深, 而正常组与穴位埋线组区域内的密度较浅, 明显区别于正常组和穴位埋线组 (见图 2)。

3 讨论

现代医学认为 IBD 的发病机制与免疫异常有关, 尤其是促炎细胞因子和抑炎细胞因子的平衡失调被认为是 IBD 的一个重要发病机制^[5-7]。随着研究的深

入,近年来有不少研究发现致炎细胞因子和抗炎细胞因子的功能,数量之间的平衡可能与核因子的活化,信号传导和转录激活因子有关。其中 κ 基因结合核转录因子(NF- κ B)是一种能与多种基因启动子或增强子部位 κ B 位点发生特异性结合并促进其相关基因转录的核因子。活化入核的 NF- κ B 可在基因启动子或增强子部位有 NF- κ B 结合位点的细胞因子结合并促进这些细胞因子的转录。此外,NF- κ B 在免疫系统中掌管着许多基因的表达,在调节机体免疫功能,细胞凋亡,应激反应,增殖与分化等多种生物进程中发挥着中枢作用^[8-10],并在多种疾病中发挥重要作用^[11-12]。细胞抗凋亡作用的信号传导是在外界与内生存因子刺激下,激活 NF- κ B 信号耦联途径,既可以诱导促炎症基因,促进细胞凋亡,又能诱导生存基因的表达,起抗凋亡作用^[13]。由此可见,NF- κ B 活化可能是 IBD 发生发展的关键点^[14]。STAT6 即是介导 Th2 的关键转录因子之一,在维持 Th1/Th2 的平衡中起重要作用^[15-16]。近年来发现的一类转录因子是信号传导和转录激活因子蛋白家族,包括 STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5a、STAT5b、STAT6 等 7 个成员。当细胞受某些细胞外多肽刺激时,STATs 被激活,从而形成二聚体或异二聚体,从胞浆转移到胞核,并与 DNA 结合,调节基因表达,与免疫调节密切相关。

近代中医学者对 IBD 有了进一步研究,分 3 期认识该病的演变过程:初发期为湿热蕴积大肠(湿热证);慢性间歇发作为脾虚湿热并存(虚实夹杂);慢性持续严重期为脾肾气血俱亏(虚证)。天枢穴为大肠经的募穴,大肠俞为大肠经的俞穴,两穴配伍符合腧穴配伍的基本原则,即“俞募配穴”法;而大肠经的下合穴是上巨虚,中医认为“合治内腑”,此上 3 穴合用,共奏疗效。在本实验中,TNBS 主要致炎机理是乙醇破坏肠黏膜屏障,TNBS 渗入结肠黏膜组织与大分子物质结合,形成全抗原,引起肠壁一系列免疫应答和炎症反应。本实验用 TNBS 造模后均出现腹泻,黏液脓血便,体质量下降,活动减少等症状。病变侵犯全黏膜层,表现为水肿、充血、糜烂、溃疡,镜下可见大量中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞浸润。在病理学和免疫学特征上与活动期炎症性肠病患者相似。与正常组相比,模型组的大鼠 NF- κ Bp65 和 STAT6mRNA 增多($P < 0.01$);与模型组比较,穴位埋线组大鼠脾淋巴细胞 NF- κ Bp65 和 STAT6mRNA 减少($P < 0.01$)。经穴位埋线治疗后,大鼠脾淋巴细胞 NF- κ Bp65 及 STAT6mRNA 的表达显著降低($P < 0.01$)。可能是穴位埋线一方面直接阻断 NF- κ Bp65 及 STAT6mRNA

的激活,另一方面通过减少 NF- κ Bp65 及 STAT6mRNA 的活化诱导因素,从而降低了 NF- κ Bp65 及 STAT6mRNA 的表达。总之,下调 NF- κ Bp65 及 STAT6mRNA 的表达在 TNBS 诱导实验性结肠炎大鼠的致病过程中发挥重要作用。穴位埋线能通过阻断 NF- κ Bp65 及 STAT6mRNA 的激活,从而快速起到抗炎和黏膜修复作用,因而对 IBD 起到一定的防治作用。

参考文献

- [1] Papadakis KA, Targan SR. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Med*, 2000, 51: 289-298.
- [2] MacDonald TT, Monteleone G, Pender SL. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol*, 2000, 51(1): 2-9.
- [3] Ardizzone S, Bianchi Porro G. Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment. *J Intern Med*, 2002, 252(6): 475-496.
- [4] Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989; 96: 795-803.
- [5] MacDonald TT, Monteleone G, Pender SL. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel diseases. *Scand J Immunol* 2000, 51: 2-9.
- [6] Papadakis KA, Targan SR. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Med*, 2000, 51: 289-298.
- [7] Ardizzone S, Bianchi Porro G. Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment. *J Intern Med*, 2002, 252: 475-496.
- [8] Karin M, Lin A. NF- κ B at the crossroads of life and death. *Immunol*, 2002, 3: 221.
- [9] Li Q, Verma I. M NF- κ B regulation in the immune system. *Nat. rev. Immunol*, 2002, 2: 725.
- [10] Ming-Qing Xu, Yu-Ping Suo, Jian-Ping Gong, Augmented regeneration of partial liver allograft induced by nuclear factor- κ B decoy oligodeoxynucleotides-modified dendritic cells. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(4): 573-578.
- [11] Zhang XP, Zhang L, Chen LJ, et al. Influence of dexamethasone on inflammatory mediators and NF- κ B expression in multiple organs of rats with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(4): 548-56.
- [12] Salazar-Montes A, Ruiz-Corro L, Sandoval-Rodriguez A, et al. Increased DNA binding activity of NF- κ B, STAT-3, SMAD3 and AP-1 in acutely damaged liver. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(37): 5995-6001.
- [13] Wallach D, Volfmeier EE, Malinin NL, et al. Tumor necrosis factor receptor and fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol*, 1999, 17: 331.
- [14] Masaru Shimamoto, Yoshitaka Ueno, Shinji Tanaka, et al. Selective decrease in colonic CD56+ T and CD161+ T cells in the inflamed mucosa of patients with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(45): 5995-6002.
- [15] Wang Y, Malabarba MG, Nagy ZS, et al. Interleukin 4 regulates phosphorylation of serine 756 in the transactivation domain of Stat6. Roles for multiple phosphorylation sites and Stat6 function. *J Biol Chem*, 2004, 279: 25196-25203.
- [16] Zhang WJ, Koltun WA, Thompson JL, et al. Human B lymphoblast cell lines defective of Stat6 signaling produce high levels of proinflammatory cytokines IL-12, TNF α and IFN γ . *Int J Oncol*, 2004, 24: 447-453.

(2010-11-26 收稿)