· 基础研究 ·

基于 Nrf2 通路探讨溃结宁膏穴位敷贴治疗溃疡性结肠炎的作用机制

王生华[1,2]　朱　莹[3]　王燚霈[1]　吴　珊[1]　李擎虎[1]

摘要　目的　基于 Nrf2 信号通路探讨溃结宁膏穴位敷贴在脾肾阳虚型溃疡性结肠炎（UC）大鼠肠黏膜抗氧化应激的作用机制。**方法**　将 65 只雄性 SD 大鼠，随机分为空白组（10 只）、造模组（55 只），造模组采用腺嘌呤、冰番泻叶分阶段灌胃结合外因干预，并予 2,4,6- 三硝基苯磺酸与乙醇复合物灌肠制备 UC 病证结合动物模型，模型评价后将造模组大鼠按照体重随机分为模型组（8 只）、穴位组（7 只）、非穴位组（7 只）、柳氮磺胺吡啶（SASP）组（8 只）、SASP 合穴位组（8 只）。病证结合模型大鼠分别予溃结宁膏穴位敷贴“中脘”“气海”“足三里”“天枢”，溃结宁膏非穴位敷贴于双臀部肌肉丰厚处，SASP 组予 SASP 灌胃，SASP 合穴位组予穴位敷贴合 SASP 灌胃同步处理，每日 1 次，共 28 天。观察大鼠疾病活动指数（DAI）评分、结肠组织病理改变、结肠黏膜损伤指数（CMDI）评分、结肠组织学损伤指数（TDI）评分，同时运用免疫组化法检测结肠组织中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达，PCR 检测 Nrf2、Keap1 mRNA 表达。**结果**　与空白组比较，模型组 CMDI、TDI 评分、Nrf2 和 HO-1 蛋白含量及 Nrf2 和 Keap1mRNA 表达升高（$P<0.05$，$P<0.01$）。与模型组比较，穴位组、SASP 组、SASP 合穴位组 CMDI、TDI 评分降低（$P<0.01$），Nrf2、HO-1 蛋白含量及 Nrf2 mRNA 表达升高（$P<0.01$）而 Keap1 mRNA 表达降低（$P<0.05$，$P<0.01$）；与 SASP 组比较，穴位组、SASP 合穴位组各项指标比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。**结论**　溃结宁膏穴位敷贴通过调控氧化应激反应中的 Nrf2 信号通路，上调 Nrf2、HO-1 蛋白和 Nrf2 mRNA 的表达，并下调 Keap1 mRNA 的表达，抵御结肠氧化应激反应，减轻肠黏膜炎症，促进结肠黏膜愈合，进而发挥治疗 UC 的作用。

关键词　溃疡性结肠炎；脾肾阳虚证；溃结宁膏；Nrf2；HO-1；Keap1

Mechanism of Acupoint Application of Kuijiening Plaster in Treatment of Ulcerative Colitis Based on NRF2 Pathway

WANG Sheng-hua[1,2], ZHU Ying[3], WANG Yi-pei[1], WU Shan[1], and LI Qing-hu[1]　*1 Department of Spleen and Gastric Diseases, Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha (410005); 2 Department of Pulmonary Spleen and Gastric Diseases, Loudi Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hunan (417000); 3 First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha (410007)*

ABSTRACT　Objective　To study the mechanism of anti-oxidative stress in intestinal mucosa of ulcerative colitis (UC) rats with Pi-Shen yang deficiency syndrome (PSYDS) based on Nrf2 signaling pathway. **Methods**　Sixty-five male SD rats were randomly divided into blank group (n=10) and model group (n= 55). The rat model was established by gavage of the decoction of *Folium Sennae* and adenine at different stages combined with external cause intervention, as well as enema with the compound of 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid and alcohol. After model evaluation, rats in the model group were randomly divided into model group (n=8), acupoint group (n=7), non-acupoint group (n=7), salazosulfapyridine (SASP) group (n=8),

基金项目：湖南省中医药科研计划项目一般课题（No.201942，No.2020043）

作者单位：1. 湖南中医药大学第二附属医院消化内科（长沙 410005）；2. 湖南省娄底市中医医院肺脾胃病科（湖南 417000）；3. 湖南中医药大学第一附属医院（长沙 410007）

通讯作者：李擎虎，Tel：0731-84917852，E-mail：357811614@qq.com

DOI：10. 7661/j. cjim. 20210705.180

中国中西医结合杂志

and SASP combined acupoint group（*n*=8）according to weight. The acupoint application group was given Kuijienning Plaster（KJNP）on acupoint application（Zhongwan，Qihai，Zusanli，Tianshu）. Non-acupoint application group was given KJNP to the rich muscles of both buttocks. SASP group was given intragastric administration of SASP，while the SASP combined acupoint group was given SASP combined with acupoint application at the same time，once a day，for a total of 28 days. The general condition，disease activity index（DAI）score，pathological changes of colon tissue，colonic mucosal injury index（CMDI）score and tissue damage index（TDI）score were observed. Meanwhile，the expressios of Nrf2 and HO-1 protein in colon tissue were detected by immunohistochemical method. Nrf2 and KEAP1 mRNA expressions were detected by PCR. **Results** Compared with blank group，CMDI and TDI scores，the protein contents of Nrf2 and HO-1,and mRNA expressios of Nrf2 and Keap1 in model group increased（$P<0.05$，$P<0.01$）. Compared with model group，the CMDI and TDI scores in acupoint group, SASP group and SASP combined acupoint group decreased ($P<0.01$). The protein contents of Nrf2 and HO-1 and mRNA expression of Nrf2 increased（$P<0.01$），while the mRNA expression of KEAP1 decreased（$P<0.05$，$P<0.01$）. Compared with SASP group，there was no statistical significance in each index between acupoint group，and SASP combined acupoint group（$P>0.05$）. **Conclusions** KJNP acupoint application regulated Nrf2 signaling pathway in oxidative stress response，which might be achieved by up-regulating expressions of Nrf2 and HO-1 protein and Nrf2 mRNA，and down-regulating KEAP1 mRNA expression，thus resisting colon oxidative stress，reducing intestinal inflammation，promoting the healing of colon mucosa.

KEYWORDS ulcerative colitis；Pi-Shen yang deficiency syndrome；Kuijiening Plaster；Nrf2；HO-1；Keap1

溃疡性结肠炎（ulcerative colitis，UC）以腹痛、腹泻、黏液脓血便为主要临床表现，是一种肠道非特异性免疫疾病，病因不明确，病程长，易复发易癌变[1]，是临床难治性疾病之一[2]。目前 UC 的发病在全世界呈逐年上升的趋势，其发病原因及机制复杂，免疫和炎症反应失衡、氧化应激反应激活、肠黏膜屏障功能损伤、肠道菌群紊乱等与 UC 的发生、进展密切相关[3-5]。氧化应激反应过度激活是近年来新发现的与 UC 相关的病理环节，过度激活的氧化应激反应会引起氧自由基生成增多并造成肠黏膜屏障功能损伤[6, 7]。氧化应激是指身体遭受有害刺激后，导致活性氧产生不断增加，活性氧自由基的含量超出机体清除能力，打破机体氧化系统和抗氧化系统的平衡，从而导致机体组织的损伤，其在 UC 的发病中可能发挥着诱导和加重的作用[8]。本课题组前期针对溃结宁膏穴位敷贴调节炎症平衡方面做了大量研究，发现溃结宁膏能够通过调节相关炎症因子与抑炎因子的平衡，达到修复肠黏膜机械屏障，从而发挥治疗脾肾阳虚型 UC 的良好疗效[9-13]，但并未研究阐述抗氧化应激的作用机制。故本研究在前期研究基础上，基于 Nrf2 信号通路探讨溃结宁膏穴位敷贴抗氧化应激反应，促进结肠黏膜修复的作用机制。

材料与方法

1 实验动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 65 只，210~240 g，SPF 级，购自斯莱克景达实验动物公司（湖南），合格证号：110727201100869382。动物饲养于湖南中医药大学第一附属医院 SPF 级动物实验中心，动物房内温度 19~22 ℃，相对湿度 80%~85%，饲料、饮水供应充足。适应性喂养一周。本实验通过湖南中医药大学第一附属医院动物实验伦理委员会审批（No.ZYFY20200820-1）。

2 药物、试剂与仪器 溃结宁膏：由炮附子 1 g、细辛 1 g、丁香 1 g、白芥子 1 g、延胡索 1 g、赤芍 1 g 等 7 味药物组成，由湖南中医药大学第二附属医院药剂科制成巴布剂。2，4，6- 三硝基苯磺酸（TNBS），美国 Sigma 公司，批号：SLCG2384。腺嘌呤（adenine），源叶生物科技有限公司，批号：S09S10D97125，加蒸馏水配置为 20 g/L 混悬液。番泻叶，购自湖南中医药大学第二附属医院新汇药房，批号：200401，以沸水浸泡制成 100% 番泻叶水浸剂（以番泻叶质量：水质量 = 1∶5 的比例预备，先将番泻叶开水浸泡 30 min，继以水浴锅文火熬制 10 min，最后用旋转蒸发仪配置成 1∶1 的水浸剂，放置在冰箱中冷藏保存）。水合氯醛：上海联硕宝为生物科技有限公司，批号：RH127822。柳氮磺胺吡啶（salazosulfapyridine，SASP），上海信宜天平药业有限公司，批号：09190501，0.25 g/ 片，采用生理盐水配成 10 mg/mL 溶液。通用型组织固定液（中性），武汉塞维尔生物科技有限公司，批号：

中国中西医结合杂志

HJ194602。0.9% 氯化钠注射液、蒸馏水、50% 乙醇均购自湖南中医药大学第二附属医院。3% D- 木糖溶液，北京雷根生物技术有限公司，批号：0924A20。粪便隐血定性检测试剂盒（临联甲苯胺法），北京雷根生物技术有限公司，批号：0924A20。电子天平：湘仪天平仪器设备有限公司，TP-2200B。电风扇：佛山市顺德区勒流风飞扬电器厂，FE-45A。水浴锅：Leica（HI1210）。旋转蒸发仪：亚荣生化机器厂（上海），RE-5210A。

3　分组与造模　65 只 SD 大鼠随机分为空白组（10 只）、造模组（55 只）。除空白组外，其余 5 组参照课题组前期研究[14]进行脾肾阳虚型 UC 模型大鼠制备：每天上午，予腺嘌呤按 10 mL/kg 剂量灌胃，连续 2 周，从第 3 周起开始每日予冰番泻叶（浓度 100%）按 10 mL/kg 灌胃，连续 2 周，造模周期共 4 周，造模期间自由饮食；每日灌胃 0.5 h 后用喷雾器给每只大鼠均匀喷 4 ℃冰水 50 mL，湿润皮毛，然后将大鼠置于电风扇前（1 400 r/min）吹干处置，连续 4 周后于第 29 天禁食不禁水 24 h，用 10% 水合氯醛（4 mL/kg）麻醉后，将聚丙烯管插入大鼠肛门上段 8 cm 处，注入 5% TNBS 按 100 mg/kg（约 TNBS 原液 0.2 mL/100g）加 50% 乙醇 0.25 mL 制成的混合试剂，提起大鼠尾部，保持倒置 1~2 min，大鼠轻放置于笼子，待其自然清醒，自由饮食饮水。正常对照组大鼠则同期予相应剂量的 0.9% 氯化钠注射液灌胃和灌肠处理。造模结束，随机在空白组选取 5 只，造模组随机共选取 7 只，验证造模成功。造模结束后，除空白组 5 只外，将 37 只模型大鼠称重后按照随机数字表法重新分组，其中穴位组与非穴位组 7 只，模型组、SASP 组及 SASP 合穴位组各 8 只。

4　干预方法　除非穴位组大鼠外，其余 5 组大鼠选取以下穴位：中脘、气海、足三里（双侧）、天枢（双侧）。各穴定位[15]如下：中脘：脐上约 20 mm 左右。气海：脐下约 12 mm 左右。足三里：在膝关节下侧，腓骨小头下缘 5 mm 处，左右两侧各 1 穴。天枢：在脐旁 0.5 cm，左右两侧各 1 穴。敷贴位置先用剪刀将毛剪短，再用剃毛器将毛剃净，每次剃毛 2 cm × 2 cm 大小，贴药至穴位处后予鼠夹固定。（1）空白组、模型组：用水调好的淀粉敷于选定穴位，胶布、鼠夹固定，1 次 / 天，1~1.5 h/ 天。（2）穴位组：用溃结宁膏药饼（1 cm 大小）置于以上选定穴位，1 贴 / 穴，4 穴 / 次，双侧足三里与双天枢穴每天交替轮换。胶布、鼠夹固定，1 次 / 天，1~1.5 h/ 次。（3）非穴位组：用溃结宁膏药饼（1cm 大小）置于双臀部肌肉丰厚处，4 贴 / 次，胶布、鼠夹固定，1 次 / 天，1~1.5 h/ 次。（4）SASP 组：以预备 10 mg/mL 的 SASP 溶液灌胃，给药剂量为 50 mg /（kg · d）。（5）SASP 合穴位组：按照穴位组和 SASP 组联合治疗 1 次 / 天。各组均持续干预 28 天。

5　一般情况观察　实验期间每天监测并记录各组大鼠体重、饮食饮水量，观察各组大鼠大便性状、大便次数和血便程度及背毛光泽程度、活动度、精神状态等一般状况。

6　疾病活动指数（disease activity index，DAI）评分　大鼠体质量、大便性状、血便情况，按表 1 中 DAI 评分标准[16]进行评分，即 DAI=（体质量下降指数评分 + 大便性状评分 + 出血情况评分）/ 3。

表 1　DAI 评分

体重下降（%）	大便性状	大便隐血 / 肉眼血便	评分
0	正常	正常	0
1~5	正常	正常	1
5~10	半稀便	隐血阳性	2
10~15	半稀便	隐血阳性	3
>15	稀便	肉眼血便	4

7　结肠黏膜损伤指数（colonic mucosa damage index，CMDI）评分　治疗 28 天后大鼠禁食不禁水 24 h，以 10% 水合氯醛（4 mL/kg）腹腔注射麻醉，剪开腹壁，快速取结肠组织，肉眼观察结肠病变组织肠黏膜形态，以正常、糜烂、溃疡分级描述，进行结肠黏膜大体形态损伤指数评分，具体评分标准[17]见表 2。

表 2　CMDI 评分

记分	肉眼观察结肠黏膜变化
0	无损伤
1	黏膜充血、水肿，未出现溃疡
2	黏膜充血、水肿、轻度糜烂，无溃疡
3	黏膜充血、水肿、中度糜烂，有单个溃疡
4	黏膜充血、水肿、高度糜烂，有多出溃疡
5	黏膜充血、水肿、重度糜烂，有 >1 cm 溃疡

8　结肠组织病理学及组织学损伤指数（tissue damage index，TDI）评分　取 1~2 cm 大小的结肠肠段用通用型组织固定液（中性）固定，按照脱水、包埋、切片（厚度 2.5 ~ 3 μm）、常规 HE 染色顺序制作病理切片，然后在光学显微镜下观察结肠组织病理变化，并按照表 3 中评分标准进行结肠组织学损伤指数评分[18]。

9　免疫组化法检测结肠组织中 Nrf2、

中国中西医结合杂志

表 3 TDI 评分

记分	显微镜下观察到的表现
0	结肠黏膜无损伤
1	较弱的黏膜和（或）黏膜下炎症浸润和充血水肿，轻度糜烂，黏膜基层保持完整
2	在记 1 分的基础上，范围达标本的 50%
3	显著的炎症浸润和充血水肿，有溃疡形成并延伸到黏膜下层和黏膜基层，较少的炎症细胞浸润黏膜固有层但无基层坏死
4	在记 3 分的基础上，范围达标本的 50% 及以上
5	广泛的溃疡形成，伴有凝固性坏死，大量中性粒细胞浸润，细胞坏死达到黏膜固有肌层
6~8	在记 5 分的基础上，范围达标本的 50%

HO-1 蛋白表达　将结肠组织切片脱蜡、水化后抗原修复；阻断、封闭后加一抗（1∶1 000），二抗后继续操作，3，3- 四盐酸二氨基联苯胺（3，3'-Diaminobenzidine，DAB）显色。按照细胞呈现黄色、棕黄色、棕黑色等程度不同区分阳性程度。按免疫组化链霉菌抗生物素蛋白 - 过氧化物酶连接法对 Nrf2、Keap1 进行蛋白分析。

10　逆转录聚合酶链反应（RT-PCR）检测结肠组织中 Nrf2、Keap1 mRNA　采用 Trizol 法提取结肠组织中的总 RNA；按反转录试剂盒说明书进行 cDNA 合成。Real time PCR 引物（表 4）均由武汉塞维尔生物科技有限公司设计合成。PCR 反应体系为 2× qPCR Mix 7.5 μL，2.5 μmoL/ 基因引物 1.5 μL，反转录产物 2.0 μL，ddH_2O 4.0 μL。PCR 扩增条件预变性 95 ℃，10 min；循环 40 次（95 ℃，15 s；60 ℃，30 s）。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物并在紫外灯下检测条带。以 β-actin 作为内参，以目的基因 / β-actin 表示 mRNA 相对表达水平。以 $2^{-\triangle\triangle ct}$ 法计算各基因相对表达量。

表 4 引物序列

基因名称		引物序列（5'-3'）	产物大小（bp）
Nrf2	上游	TGGAGACGGCCATGACTGATT	88
	下游	CACTGTAACTCGGGAATGGAAA	
Keap1	上游	GGTGGTGTCCATTGAAGGCAT	293
	下游	GGTTGAAGAACTCCTCCTCCCC	

11　统计学方法　应用 SPSS 21.0 统计软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，检测各组数据正态性分布及方差齐性，同时符合正态性及方差齐性，采用多组间比较的单因素方差分析，方差齐性时用 *LSD-t* 法，否则采用非参数检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　果

1　各组大鼠一般情况比较　实验第 2 周（造模第 1 周）起直至造模结束造模组大鼠逐渐出现精神萎顿，嗜睡懒动，体毛逐渐枯槁且易脱落，畏寒蜷缩集聚，饮食（水）量逐渐减少，小便清长，大便溏泄，肛门可见黏液脓血样污秽，部分甚至出现腹胀如鼓。经过 28 天治疗，穴位组、SASP 组及 SASP 合穴位组大鼠黏液脓血便、神态萎顿、嗜睡懒动，拱背蜷缩聚集等症状逐渐消失，饮食（水）逐渐恢复正常；模型组及非穴位组大鼠持续解黏液便，偶可见鲜红色血便，精神持续变差，少气懒动，体毛枯槁脱落，小便量多，饮食（水）量进一步减少，体重较前继续下降。实验过程中空白组大鼠无死亡，造模期间因灌胃死亡 3 只，冻死 3 只，TNBS 不耐受死亡 5 只。在治疗期间模型组、非穴位组、SASP 组、SASP 合穴位组各意外死亡 1 只。

2　各组大鼠治疗前后体重、饮食（水）量量化比较（表 5）　治疗前，与空白组比较，模型组大鼠体重下降，饮食、饮水量明显减少（$P<0.01$）。治疗后，与模型组比较，穴位组、SASP 组、SASP 合穴位组，体重、饮食（水）量增加（$P<0.01$）；与本组治疗前比较，穴位组、SASP 组、SASP 合穴位组体重、饮食、饮水量明显增加（$P<0.05$，$P<0.01$）；与 SASP 组比较，穴位组、SASP 合穴位组体重、饮食（水）量比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。

表 5 各组大鼠治疗前后体重、饮食及饮水量比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	*n*	时间	体重（g）	食量（g/d）	饮水量（ml/d）
空白	5	治疗前	329.52 ± 10.02	25.05 ± 1.59	39.43 ± 20.37
		治疗后	422.72 ± 18.16	28.56 ± 2.84	54.94 ± 4.21
模型	7	治疗前	288.56 ± 20.37*	18.28 ± 3.59*	60.38 ± 3.85*
		治疗后	257.54 ± 13.51	25.89 ± 2.53	41.56 ± 6.99
穴位	7	治疗前	294.10 ± 18.19	19.08 ± 3.18	67.70 ± 4.24
		治疗后	378.61 ± 26.59△▲▲	22.88 ± 2.59△▲	63.10 ± 6.53△▲
非穴位	6	治疗前	293.62 ± 17.20	17.45 ± 2.12*	60.62 ± 4.54
		治疗后	285.45 ± 27.60	16.22 ± 1.51	42.25 ± 4.74
SASP	7	治疗前	299.54 ± 16.10	18.37 ± 2.55	58.09 ± 3.47
		治疗后	394.83 ± 28.24△▲▲	22.12 ± 3.14△▲	66.63 ± 4.36△▲▲
SASP 合穴位	7	治疗前	294.63 ± 16.79	17.53 ± 3.12	59.88 ± 4.26
		治疗后	369.44 ± 11.52△▲▲	24.57 ± 3.21△▲▲	65.57 ± 5.23△▲

注：与空白组比较，*$P<0.01$；与模型组比较，△$P<0.01$；与本组治疗前比较，▲$P<0.05$，▲▲$P<0.01$

3　各组大鼠治疗前后 DAI 评分比较（表 6）　治疗前后与空白组比较，模型组评分升高（$P<0.01$）；治疗后与模型组比较，穴位组、SASP 组、SASP 合穴位组均有明显降低（$P<0.01$，$P<0.05$），但穴位组、SASP 合穴位组与 SASP 组比较差异无统计

中国中西医结合杂志

学意义（P>0.05）。

表 6　各组大鼠治疗前后 DAI 分评比较　（分，$\bar{x} \pm s$）

组别	n	治疗前	治疗后
空白	5	1.08 ± 0.06	1.09 ± 0.11
模型	7	2.95 ± 0.37*	3.09 ± 0.25*
穴位	7	3.27 ± 0.31	2.43 ± 0.17△
非穴位	6	2.96 ± 0.29	2.89 ± 0.17
SASP	7	2.91 ± 0.19	2.43 ± 0.17△
SASP 合穴位	7	2.80 ± 0.20	1.48 ± 0.18△△

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

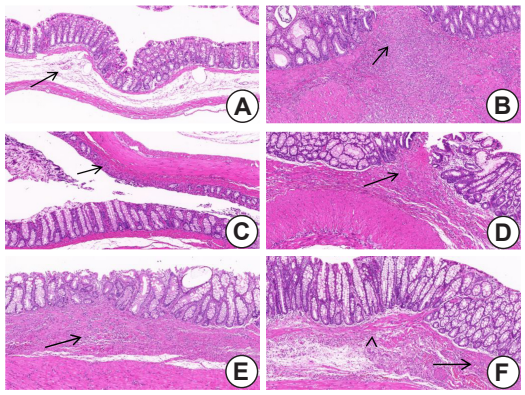
4　各组大鼠 CMDI、TDI 评分比较（表 7）　与空白组比较，模型组评分较高（P<0.01）。与模型组比较，穴位组、SASP 组和 SASP 合穴位组评分降低（P<0.01）。与 SASP 组比较，穴位组、SASP 合穴位组，差异无统计学意义（P>0.05）。

表 7　各组大鼠 CMDI、TDI 评分比较　（分，$\bar{x} \pm s$）

组别	n	CMDI 评分	TDI 评分
空白	5	0.40 ± 0.55	0.20 ± 0.45
模型	7	3.86 ± 0.90*	5.57 ± 1.27*
穴位	7	1.57 ± 0.53△	1.71 ± 0.76△
非穴位	6	4.33 ± 0.82	5.33 ± 1.03
SASP	7	1.57 ± 0.30△	1.71 ± 0.76△
SASP 合穴位	7	1.43 ± 0.53△	1.29 ± 0.76△

注：与空白组比较，*P<0.01；与模型组比较，△P<0.01

5　各组大鼠结肠组织病理形态观察（图 1）　（1）空白组：肠组织各层结构清晰；黏膜层上皮完整，肠腺数量丰富，排列紧密；黏膜下层轻度水肿，结缔组织排列疏松；组织未见明显炎症，未见溃疡。（2）模型组：肠组织局部溃疡，损伤侵及肌层；溃疡灶处少量肠腺消失被增生的结缔组织取代，并伴有大量中性粒细胞浸润。（3）穴位组：肠组织各层结构清晰；黏膜层较大面积糜烂，中等量的肠腺消失，周围结缔组织增生，并伴有少量淋巴细胞浸润。（4）非穴位组：肠组织局部溃疡，损伤侵及黏膜下层；溃疡灶处少量肠腺消失被增生的结缔组织取代，并伴有中等量的中性粒细胞浸润。（5）SASP 组：肠组织各层结构清晰；黏膜层肠腺数量丰富，排列紧密，偶见肠腺扩张，上皮扁平化；黏膜肌层局部消失被增生的结缔组织取代，结缔组织增生至黏膜下层，并伴有中等量的淋巴细胞浸润；组织未见溃疡。（6）SASP 合穴位组：肠组织各层结构清晰；黏膜层局部中度水肿，结缔组织排列疏松，肠腺间距增宽；黏膜下层结缔组织增生，并伴有中等量的淋巴细胞浸润；组织未见溃疡。



注：A 为正常组；B 为模型组；C 为穴位组；D 为非穴位组；E 为 SASP 组；F 为 SASP 合穴位组；箭头示炎症部位

图 1　各组结肠组织病理改变（HE，×100）

6　各组大鼠结肠组织中 Nrf2、HO-1 阳性细胞数和评分比较（图 2、表 8）　空白组正常组织中 Nrf2 少量出现于胞浆中，呈现淡黄色，与模型组比较阳性表达与评分较低（P<0.01，P<0.05）；模型组和非穴位组中 Nrf2 出现于胞浆和细胞核中，呈现不均一的棕黄色，弱阳性表达，两组比较，差异无统计学意义（P>0.05）；穴位组、SASP 组和 SASP 合穴位组中 Nrf2 出现于胞浆和细胞核中，呈深棕黄色颗粒强阳性表达，三组间差异无统计学意义（P>0.05），但与模型组比较，阳性表达与评分升高（P<0.01）。HO-1 主要出现在胞浆中，空白组正常组织中表达较少，呈浅棕黄色，与模型组比较阳性表达与评分降低（P<0.01）；模型组和非穴位组中 HO-1 呈棕黄色弱阳性表达，两组比较差异无统计学意义（P>0.05）；穴位组、SASP 组和 SASP 合穴位组中 HO-1 呈深棕黄色颗粒强表达，三组差异无统计学意义（P>0.05），但与模型组比较，阳性表达与评分升高（P<0.01）。

7　各组结肠组织中 Nrf2、Keap1mRNA 表达比较（表 9）　与空白组比较，模型组 Nrf2、Keap1 mRNA 表达增高（P<0.01）；与模型组比较，穴位组、SASP 组、SASP 合穴位组中 Nrf2 mRNA 表达增高（P<0.01），Keap1 mRNA 降低（P<0.01，P<0.05），但非穴位组与模型组差异无统计学意义（P>0.05）；与 SASP 组比较，穴位组、SASP 合穴位组 Nrf2、Keap1 mRNA 比较差异均无统计学意义（P>0.05）。

讨　论

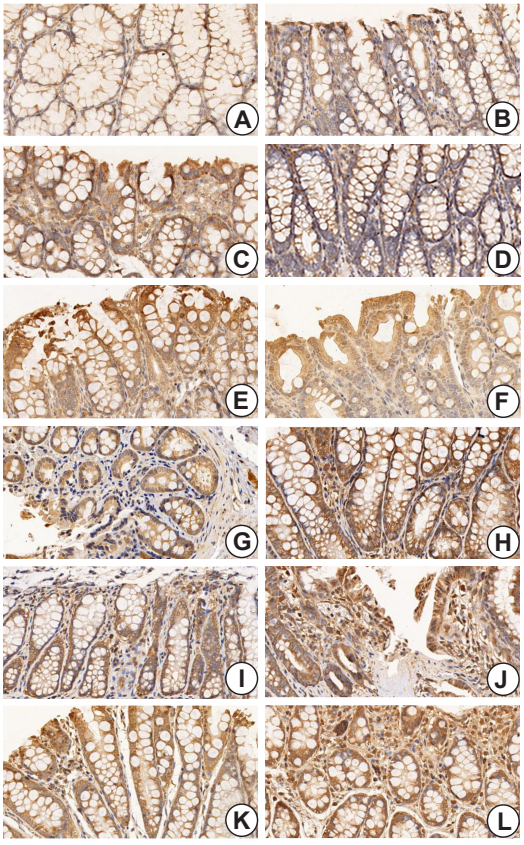
UC 作为现代临床的疑难病、多发病，严重威胁人类健康。其病因、病机涉及遗传、环境、饮食、心理、免疫等多个方面[19]。近年来研究发现，氧化应激反应过度激活与 UC 的发病密切相关。正常生理状

中国中西医结合杂志

表 8 各组大鼠结肠组织中 Nrf2 和 HO-1 阳性细胞数和评分比较 （$\bar{x} \pm s$）

组别	n	Nrf2 细胞（个 /mm^2）	Nrf2 评分（分）	HO-1 细胞（个 /mm^2）	HO-1 评分（分）
空白	4	2464.50 ± 153.09	7.68 ± 0.39	2279.00 ± 136.41	7.45 ± 0.24
模型	4	2960.75 ± 63.17*	8.35 ± 0.17*	2945.00 ± 120.53*	8.60 ± 0.22*
穴位	4	4174.00 ± 202.40△	10.25 ± 0.39△	3698.25 ± 131.55△	10.98 ± 0.22△
非穴位	4	2871.50 ± 53.08	8.23 ± 0.10	2775.25 ± 100.18	8.65 ± 0.13
SASP	4	4154.75 ± 73.82△	10.58 ± 0.45△	3794.25 ± 124.15△	10.38 ± 0.91△
SASP 合穴位	4	3994.75 ± 149.31△	10.70 ± 0.29△	3808.25 ± 129.06△	10.85 ± 0.48△

注：与空白组比较，*P<0.01；与模型组比较，△P<0.01



注：A 为空白组 Nrf2；B 为模型组 Nrf2；C 为穴位组 Nrf2；D 为非穴位组 Nrf2；E 为 SASP 组 Nrf2；F 为 SASP 合穴位组 Nrf2；G 为空白组 HO-1；H 为模型组 HO-1；I 为穴位组 HO-1；J 为非穴位组 HO-1；K 为 SASP 组 HO-1；L 为 SASP+ 穴位组 HO-1

图 2 各组大鼠结肠组织中 Nrf2、HO-1 的表达（IHC，×400）

表 9 各组大鼠结肠组织 Nrf2、Keap1 mRNA 表达比较 （$\bar{x} \pm s$）

组别	n	Nrf2 mRNA	Keap1 mRNA
空白	4	0.97 ± 0.02	0.89 ± 0.04
模型	4	1.37 ± 0.01*	1.65 ± 0.02*
穴位	4	2.37 ± 0.01△	0.94 ± 0.02△△
非穴位	4	1.38 ± 0.03	1.60 ± 0.03
SASP	4	2.38 ± 0.04△	0.94 ± 0.03△△
SASP 合穴位	4	2.40 ± 0.02△	0.92 ± 0.02△

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

态下，机体氧化与抗氧化处于相对平衡状态。在外界有害刺激因素作用下，机体活性氧自由基过度激活，导致细胞结构功能紊乱，机体组织损伤，最终诱导和加重 UC[6]。近年来，氧化应激反应 UC 发病中的作用倍受关注。肠黏膜内的氧化应激反应过度激活能够损伤肠黏膜屏障。肠黏膜屏障包括机械屏障、生物学屏障、免疫屏障及化学屏障，其中上皮细胞间紧密连接所形成的机械屏障最为重要。Nrf2 属于 bZip 转录因子和 CNC 转录因子家族，是维持细胞内氧化还原稳态的中枢调节物质及参与氧化应激反应的关键细胞因子之一，能够对外源性损伤及病原分子产生应答。Keap1 是 Nrf2 的负调节器[20]。在生理状态下，Nrf2 多存在于胞浆中与 Keap1 结合，处于被抑制状态；当受到机体内氧化应激信号刺激后，迅速与 Keap1 解离，以稳态形式转入细胞核中，启动抗氧化反应元件（antioxidant responsive element，ARE），并与之结合启动下游多中基因的转录与翻译，从而上调抗氧化物质的表达，以此方式减轻各种损伤因素造成的氧化应激反应。Nrf2 /HO-1 路径是机体最主要的抗氧化应激反应通路之一，参与机体肿瘤、细胞凋亡、炎症反应、黏膜修复等多方面[21, 22]。HO-1 是血红素降解的限速酶，广泛分布于机体组织，具有细胞保护作用，不仅在生理状态下发挥作用，更重要的是在机体应激状态下发挥重要作用[23]。它是一种可诱导的蛋白质，当机体处于缺血、缺氧的应激环境时，其表达可成倍增加。研究发现，HO-1 与其代谢产物具有显著的抗氧化作用[24]。HO-1 发挥抗氧化作用主要与两方面有关：一方面 HO-1 阻止游离血红素参与氧化反应，另一方面 HO-1 可与其降解产物 CO、胆红素一起发挥抗氧化、抗炎、扩血管、改善微循环和抑制细胞凋亡等作用[25]。在肠组织中，HO-1 主要在肠黏膜上皮细胞中表达，通过减少炎症细胞浸润发挥保护肠黏膜的作用。本课题研究显示，在模型大鼠结肠组织中，Nrf2 和 HO-1 蛋白及 Nrf2 mRNA 表达明显增加，提示氧化应激反应过度激活与

中国中西医结合杂志

UC 的发病密切相关。

现代医学对于 UC 的病因及发病机制尚无定论，亦无治愈的方法，目前治疗的主要目的是控制急性发作，维持缓解，减少复发及防治并发症。治疗药物主要包括括糖皮质激素、免疫抑制剂、氨基水杨酸类药、抗生素以及一些生物治疗药物[26]。但这些治疗药物都具有不同程度的不良反应及药物依赖性等弊端，虽然对于治愈 UC 的药物研发在不断创新，但目前仍未研发出能够彻底治愈 UC 的药物。结合中医学对于 UC 病因病机的认识，以中医学整体观念和辨证论治为基石，寻求更有效的治疗方案，UC 归属中医学的“泄泻”“久痢”“肠澼”“便血”等范畴。导师朱莹教授结合多年临证经验及 UC 患者病程长易复发的特点，发现多数 UC 患者存在明显脾肾阳虚症状，认为其病位在大肠，与脾肾密切相关，虚、瘀是 UC 的病机关键，故而创制出具有温补脾肾、活血化瘀功效的溃结宁膏。方中以炮附子温肾暖脾、散寒止痛为君；臣以细辛、丁香助君药温脾肾散寒凝；佐以赤芍、延胡索活血散瘀止痛，白芥子理气散结、通络止痛；以温中散寒之生姜捣汁调药，以助药力为使。特结合 UC 的病机特点，选取胃、肠经的募穴“中脘”和“天枢”，以及大肠经的下合穴“足三里”等以中药透皮技术由外治内，以更好地发挥穴位治疗的良性调节作用，从而达到温补脾肾，活血散瘀止痛之功。

课题组前期通过大量动物实验证实，溃结宁膏穴位敷贴可以通过降低血清及结肠组织促炎因子与升高抗炎因子的水平调节多条炎症信号通路平衡，从而达到治疗脾肾阳虚型 UC 的作用[9-13]。本课题研究以之前课题研究为基础，以 Nrf2 信号通路入手，从抗氧化应激反应探讨溃结宁膏穴位敷贴治疗 UC 的作用机制。研究证明，UC 的发病、进展与氧化应激反应的过度激活密切相关，且氧化应激反应过度激活能促进 Nrf2 的代偿性过度激活，从而导致 HO-1 的表达增高。而溃结宁膏穴位敷贴可以通过调控 Nrf2 信号通路，下调 Keap1 的表达，从而发挥抗氧化应激反应、治疗 UC 的作用。

本研究表明，溃结宁膏穴位敷贴可以明显改善脾肾阳虚型 UC 大鼠症状，其机制可能是通过上调结肠组织中 Nrf2 蛋白及 mRNA、HO-1 蛋白的表达，并下调 Keap1 mRNA 的表达，通过调控氧化应激反应中的 Nrf2 信号通路修复肠黏膜屏障对 UC 产生一定的治疗作用。但溃结宁膏穴位敷贴与西药内服并未产生协同作用，其疗效与单一穴位敷贴或单一西药治疗无明显差异。

利益冲突：无。

参 考 文 献

[1] Farraye FA，Odze RD，Eaden JO，et al. AGA technical review on the diagnosis and management of colorectal neoplasia in inflammatory bowel disease[J]. Gastroenterology，2010，138（2）：746–774.

[2] Klotz C，Barret M，Dhooge M，et al. Management of diagnosis and treatment in ulcerative colitis[J]. Presse Médicale，2015，44（2）：144.

[3] Malik TA. Inflammatory bowel disease：historical perspective，epidemiology，and risk factors[J]. Surg Clin North Am，2015，95（6）：1105–1122.

[4] Yuan H，Chen Z. Inflammatory bowel disease related innate immunity and adaptive immunity[J]. Am J Transl Res，2016，8（6）：2490–2497.

[5] 马涛 . 溃疡性结肠炎组织中 NOX1、NOX2 表达量与肠黏膜氧化应激反应、屏障功能损伤的相关性 [J]. 海南医学院学报，2017，23（19）：2638–2641.

[6] Patlevič P，Vašková J，Jr PŠ，et al. Reactive oxygen species and antioxidant defense in human gastrointestinal diseases[J]. Integr Med Res，2016，5（4）：250–258.

[7] Tomasello G，Mazzola M，Leone A，et al. Nutrition，oxidative stress and intestinal dysbiosis：influence of diet on gut microbiota in inflammatory bowel diseases[J]. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub，2016，160（4）：461.

[8] 朱娟，刘志峰 . 溃疡性结肠炎患儿血清炎症因子及氧化应激水平变化及意义 [J]. 现代中西医结合杂志，2016，25（14）：1492–1494.

[9] 王璇，朱莹，邹君君 . 溃结宁膏穴位敷贴对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠血清及结肠组织促炎因子与抗炎因子的影响 [J]. 中国中医药信息杂志，2016，23（3）：42–46.

[10] 邹君君，朱莹，王璇，等 . 溃结宁膏穴位敷贴预处理对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜的保护作用及机制研究 [J]. 中医药导报，2017，23（1）：22–26.

[11] 毛婧，朱莹，周瑾，等 . 溃结宁膏穴位敷贴对实验性溃疡性结肠炎大鼠 IL-6/JAK2/STAT3 信号通路的影响 [J]. 中国中医急症，2018，27（7）：1167–1170.

中国中西医结合杂志

[12] 郑洁，朱莹，高昂 . 溃结宁膏穴位敷贴对溃疡性结肠炎（脾肾阳虚证）大鼠 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路的影响 [J]. 广州中医药大学学报，2019，36（10）：1593–1598.

[13] 娄余，肖运婷，朱莹，等 . 基于 NF-κB 信号的通路溃结宁膏穴位敷贴对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜炎症反应的影响 [J]. 中国中医药信息杂志，2021，28（4）：75–80.

[14] 郑洁，朱莹，高昂，等 . 脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠模型的研制 [J]. 中国中西医结合消化杂志，2016，24（3）：182–187.

[15] 郭义主编 . 实验针灸学 [M]. 北京：中国中医药出版社，2008：415.

[16] Tonk M，Vilcinskas A，Rahnamaeian M. Insect antimicrobial peptides：potential tools for the prevention of skin cancer[J]. Appl Microbiol Biotechnol，2016，100（17）：7397–7405.

[17] Song L，Wang Z，Wang Y，et al. Natural cyclopeptide RA-Ⅻ，a new autophagy inhibitor，suppresses protective autophagy for enhancing apoptosis through AMPK/mTOR/P70S6K pathways in $HepG_2$ cells [J]. Molecules，2017，22（11）：1934.

[18] 张艳丽，贾永森，等 . 通莲Ⅰ号方抑制小鼠食管癌移植瘤生长作用及其机制研究 [J]. 江苏中医药，2015，47（4）：75–77.

[19] 甄建华，黄光瑞 . 溃疡性结肠炎病因和发病机制的现代医学研究进展 [J]. 世界华人消化杂志，2019，27（4）：245–251.

[20] 姚娟，吴平安，李芸，等 .Keap1-Nrf2-ARE 信号通路及其激活剂的研究进展 [J]. 中国药理学通报，2019，35（10）：1342–1346.

[21] Cui W，Bai Y，Miao X，et al. Prevention of diabetic nephropathy by sulforaphane：possible role of Nrf2 upregulation and activation[J]. Oxid Med Cell Longev，2012：821936.

[22] 张玉琴，李鸷，李煌，等 . 栝蒌桂枝颗粒激活 Nrf2 信号通路减轻脑缺血再灌注损伤大鼠氧化应激损伤作用 [J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23（21）：112–116.

[23] 胡流芳，王迎，任汝静，等 .Keap1-Nrf2/ARE 信号通路的抗氧化应激作用及其调控机制 [J]. 国际药学研究杂志，2016，43（1）：146-152+166.

[24] Mahmoud AM，Germoush MO，Khalid M，et al. *Commiphora molmol* protects against methotrexate-induced nephrotoxicity by up-regulating Nrf2/ARE/HO-1 signaling[J]. Biomed Pharmacotherapy，2018，106：499–599.

[25] Sarinya，Veerapol K Auemduan P，et al. Crucial role of heme oxygenase-1 on the sensitivity of cholangiocarcinoma cells to chemotherapeutic agents[J]. PLoS One，2012，7（4）：e34994.

[26] 黎琮毅 . 溃疡性结肠炎的中西医治疗进展 [J]. 湖南中医杂志，2019，35（8）：158–161.

（收稿：2021–03–13　在线：2021–08–02）

责任编辑：李焕荣

英文责编：张晶晶

中国中西医结合杂志 中国中西医结合杂志 中国中西医结合杂志 中国中西医结合杂志 中国中西医结合杂志