

溃结宁膏穴位敷贴对溃疡性结肠炎大鼠氧化应激损伤的保护作用研究*

吴珊¹,朱莹²,张建伟¹,王生华³,张娜¹,王燧霏^{1△}

1 湖南中医药大学第二附属医院,湖南长沙 410005;

2 湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙 410007; 3 娄底市中医医院,湖南娄底 417000

[摘要]目的:以核因子E2相关因子2(nuclear factor-E2 related factor2,Nrf2)/血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1,HO-1)信号通路调控线粒体融合蛋白-1(mitofusin-1,Mfn1)和线粒体融合蛋白-2(mitofusin-1,Mfn2)为研究切入点,探讨溃结宁膏穴位敷贴对“虚”“瘀”状态下溃疡性结肠炎(ulcerative colitis,UC)大鼠氧化应激损伤的保护作用及其潜在作用机制。方法:将51只SPF级雄性SD大鼠随机分为正常对照组(10只)与造模组(41只)。造模组大鼠采用腺嘌呤+冰番泻叶分阶段灌胃以及2,4,6-三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid,TNBS)/乙醇法制备“虚”“瘀”状态下UC大鼠模型。待造模成功后,造模组大鼠再次随机分为模型组、非穴位敷贴组、穴位敷贴组、柳氮磺吡啶组并予以不同的干预方法。正常对照组、模型组给予无药物的巴布剂基质穴位敷贴;穴位敷贴组给予溃结宁膏穴位敷贴“足三里”“天枢”“肾俞”“膈俞”;非穴位敷贴组给予溃结宁膏穴位敷贴于臀部肌肉丰厚处;柳氮磺吡啶组给予无药物的巴布剂基质穴位敷贴加柳氮磺吡啶溶液灌胃,其余各组给予等量生理盐水灌胃,每日1次,连续干预28天。观察各组大鼠的死亡情况、宏观表征,评估结肠组织肉眼损伤评分与病理损伤评分;运用荧光定量PCR技术检测大鼠结肠组织Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1(Kelch-like ECH-associated protein-1,Keap1)、Nrf2、Mfn1、Mfn2 mRNA的表达水平;采用蛋白免疫印迹法(western blot,WB)检测大鼠结肠组织中Keap1、Nrf2、HO-1蛋白的表达情况。结果:与正常对照组相比,模型组大鼠结肠组织肉眼损伤评分与病理损伤评分升高($P < 0.01$),Keap1蛋白及mRNA表达升高($P < 0.01$),Nrf2蛋白及mRNA、Mfn1 mRNA、Mfn2 mRNA、HO-1蛋白表达明显降低($P < 0.05$);与模型组相比,穴位敷贴组、柳氮磺吡啶组大鼠结肠组织肉眼损伤评分与病理损伤评分降低($P < 0.01$),Keap1蛋白及mRNA表达下调($P < 0.01$),Nrf2蛋白及mRNA、Mfn1 mRNA、Mfn2 mRNA、HO-1蛋白表达升高($P < 0.05$),非穴位敷贴组上述指标变化无统计学意义;与非穴位敷贴组相比,穴位敷贴组大鼠结肠组织肉眼损伤评分与病理损伤评分降低($P < 0.01$),Keap1蛋白及mRNA表达水平降低($P < 0.01$),Nrf2蛋白及mRNA、Mfn1 mRNA、Mfn2 mRNA、HO-1蛋白表达水平升高($P < 0.05$);穴位敷贴组和柳氮磺吡啶组各指标差异无统计学意义。结论:溃结宁膏穴位敷贴可通过激活Nrf2/HO-1信号通路,上调Mfn1、Mfn2 mRNA表达水平,改善线粒体损伤,从而发挥对UC大鼠氧化应激损伤的保护作用。

[关键词] 结肠炎,溃疡性;溃结宁膏;穴位敷贴;信号通路;线粒体融合蛋白1;线粒体融合蛋白2;“虚、瘀”状态

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2096-9600(2025)11-0001-07

Study on the Protective Effects of *Kuijiening* Ointment for Acupoint Application on Oxidative Stress Injury in Ulcerative Colitis Rats

WU Shan¹, ZHU Ying², ZHANG Jianwei¹, WANG Shenghua³, ZHANG Na¹, WANG Yipei^{1△}

1 Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410005, China;

2 First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China;

3 Loudi Hospital of Traditional Chinese Medicine, Loudi 417000, China

Abstract Objective: To discuss the protective effects of *Kuijiening* ointment for acupoint application on oxidative stress injury in ulcerative colitis (UC) rats in "deficiency" and "stagnation" state, and its potential mechanism based on Nrf2/HO-1/Mfn1 and Mfn2. Methods: All 51 SPF-grade male SD rats were randomized into normal control group (10 rats) and the modeling group (41 rats). The modeling group were prepared into UC rat models in "deficiency" and "stagnation" state by intragastric administration of adenine and iced senna leaves in stages and TNBS/ethanol method. After successfully modeling, the modeling group were randomly allocated to the model group, non acupoint application group, acupoint application group and sulfasalazine group, and they received different intervention methods. Normal control group and the model group were given medicine-free cataplasm matrix acupoint application, topical application of *Kuijiening* ointment at *Zusanli* (ST36), *Tianshu* (ST25), *Shenshu* (BL23) and *Geshu* (BL17) was administered to acupoint application group; topical application of *Kuijiening* ointment at well-muscled parts of the buttocks in non acupoint application group; sulfasalazine group received medicine-free cataplasm matrix acupoint application and gastric lavage of sulfasalazine solution, and the remaining groups were drenched with the equivalent amount of physiological saline, once each day, intervened for

28 days consecutively. To observe the mortality and macroscopic representation of the rats in different groups, to assess ocular trauma score (OTS) and pathological injury scores of colon tissue, fluorescent quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR) was adopted to measure the expressions of Keap1, Nrf2, Mfn1 and Mfn2 mRNA in colon tissue of the rats; WB was utilized to detect the levels of Keap1, Nrf2 and HO-1 protein in the colon tissue of the rats. Results: Compared with normal control group, OTS and pathological injury scores of colon tissue were elevated in the model group ($P<0.01$), Keap1 protein and mRNA expressions increased ($P<0.01$), the levels of Nrf2 protein and mRNA, Mfn1 mRNA, Mfn2 mRNA and HO-1 protein remarkably reduced ($P<0.05$); compared with the model group, OTS and pathological injury scores of colon tissue decreased in acupoint application and sulfasalazine group ($P<0.01$), Keap1 protein and mRNA expressions down regulated ($P<0.01$), the expressions of Nrf2 protein and mRNA, Mfn1 mRNA, Mfn2 mRNA and HO-1 protein were raised ($P<0.05$), the differences had no statistical meaning in the changes of the above indexes in non acupoint application group; when acupoint application group was compared with non acupoint application group, OTS and pathological injury scores of colon tissue were lowered ($P<0.01$), the levels of Keap1 protein and mRNA were cut ($P<0.01$), the expressions of Nrf2 protein and mRNA, Mfn1 mRNA, Mfn2 mRNA and HO-1 protein up regulated ($P<0.05$); the difference showed no statistical meaning in the indexes between acupoint application group and sulfasalazine group. Conclusion: *Kuijening* ointment for acupoint application exert the protective effects against oxidative stress injury in UC rats by activating Nrf2/HO-1 signaling pathway, upregulating the levels of Mfn1 and Mfn2 mRNA and improving mitochondrial damage.

Keywords colitis, ulcerative; *Kuijening* ointment; acupoint application; signaling pathway; mfn1; mfn2

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种具有繁杂性、复发性、难治性疾病特点的肠道炎症性疾病,临床表现以血性腹泻、腹痛为主^[1]。UC发病机制复杂,病因尚未明确,多认为与环境因素、遗传因素、肠道微生物生态、免疫失衡有关。其中,炎症、氧化应激和肠上皮屏障功能障碍在UC病理生理中具有重要作用^[2-5]。严重的氧化应激反应使线粒体成为首当其冲的受损靶器官^[6]。研究表明,UC患者肠上皮细胞存在线粒体功能紊乱,且与氧化应激相互作用^[7]。近年来,研究发现,核因子E2相关因子2(nuclear factor-E2 related factor2, Nrf2)/血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)信号通路是机体最主要的抗氧化应激反应通路之一,其能够加速酶促反应,清除氧化物质,维持机体氧化系统与抗氧化系统的动态平衡,保护机体免受损伤^[8-10]。目前,针对“虚”“瘀”状态下的UC,以“温阳化瘀”法为主要治疗方法,但多侧重于中医理论阐述,而对其相关疗效作用机制的研究较少。郭维军、邹君君等^[11-12]通过多年临床实践经验,自创溃结宁膏,采取穴位敷贴中医特色外治法治疗UC,疗效颇佳。前期研究表明,“虚”“瘀”状态下UC大鼠存在氧化应激,且溃结宁膏穴位敷贴可通过激活Nrf2信号通路,抑制氧化应激反应^[13-16]。本研究在前期研究基础上,观察溃结宁膏穴位敷贴对“虚”“瘀”状态下UC大鼠氧化应激的影响,探讨其与Nrf2/HO-1信号通路调控线粒体融合蛋白-1(mitofusin-1, Mfn1)和Mfn2的关系,以期揭示溃结宁膏穴位敷贴治疗UC的作用靶点提供客观依据。

1 材料与方法

1.1 动物 SPF级SD大鼠51只,雄性,8~12周龄,体质量(200±20)g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,饲养于湖南中医药大学第一附属医院SPF级动物房。动物许可证号:SCXK(湘)2019-0004,室温:20~25℃,相对湿度:50%,自由进食进水,12 h/12 h明暗交替,适应性喂养1周。本实验符合湖南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会规定(ZYFY20200825)。

1.2 实验药物 溃结宁膏由炮附子、细辛、丁香、白芥子、延胡索、赤芍、生姜组成,药物比例为1:1:1:1:1:1:2;无药物的巴布剂(经合成橡胶炼胶后依次加入松香、氧化锌及羊毛脂、面粉、食用色素充分搅拌)均由湖南中医药大学第二附属医院药剂科制备;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;柳氮磺吡啶片(sulfasalazine, SASP)(上海三维制药有限公司,批号:09200703,规格:0.25 g×60片)用生理盐水配成10 mg/mL溶液。

1.3 主要试剂与仪器 2,4,6-三硝基苯磺酸(美国Sigma公司,批号:SLCG2384);腺嘌呤(上海源叶生物科技有限公司,批号:S09S10D97125);Keap1兔多抗、Nrf2兔多抗、HO-1兔多抗(湖南艾方生物科技有限公司,批号:AF06660、AF11109、AF300167)。TP-2000E型电子天平(湘仪天平仪器设备有限公司);H1650R型台式冷冻离心机(湖南湘仪动力测试仪器有限公司);PikoReal型96荧光定量PCR仪(美国Thermo公司);DYY-2C型电泳仪、DYCP-31DN型电泳槽、DYCZ-40D型转膜仪(北京六一生

物科技有限公司)。

1.4 分组与造模 将51只SD大鼠随机分为正常对照组(10只)和造模组(41只)。造模组参考文献[16]进行模型制备。造模期间大鼠自由进食进水,首先给予不同药物进行分阶段灌胃,前两周予腺嘌呤混悬液(10 mL/kg)灌胃,后两周予100%冰番泻叶水浸剂(10 mL/kg)灌胃,每日灌胃30 min后用喷雾器给每只大鼠喷4 ℃清水,湿润全身皮毛,然后将大鼠置于电风扇前(1400 r/min)吹干,持续干预28天。第29天禁食不禁水24 h,用10%水合氯醛(4 mL/kg)腹腔注射麻醉,麻醉后提起大鼠尾部,将聚丙烯管插入大鼠肛门上段8 cm处,将2,4,6-三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS)按100 mg/kg(约TNBS原液0.2 mL/100 g)加50%乙醇0.25 mL制成的混合试剂注入大鼠肠腔,倒置大鼠1~2 min,使试剂充分在大鼠肠腔渗透,然后将大鼠放回笼子,待其自然清醒,自由进食进水。造模期间死亡6只大鼠。造模结束后,从正常对照组和模型组中各随机抽取5只大鼠处死以观察结肠组织形态改变情况,并将造模组大鼠再次随机分为模型组(8只)、非穴位敷贴组(7只)、穴位敷贴组(7只)、柳氮磺吡啶组(8只)。

1.5 干预方法 参照《实验针灸学》^[17]及拟人比照法制定干预方法。穴位:足三里(双),在膝关节下侧,腓骨小头下缘5 mm处,左右两侧各一穴;天枢(双):于脐中旁开0.5 cm,左右两侧各一穴;肾俞(双):第2腰椎下旁开5 mm;膈俞(双):第7胸椎下旁开5 mm。非穴位敷贴组:臀部肌肉丰厚处(双)。将各组大鼠选定穴位处与臀部肌肉丰厚处予以剃毛处理,敷贴后予鼠夹固定。正常对照组与模型组给予无药物的巴布剂基质穴位敷贴;非穴位敷贴组给予溃结宁膏非穴位敷贴;穴位敷贴组给予溃结宁膏穴位敷贴;柳氮磺吡啶组给予无药物的巴布剂基质穴位敷贴加柳氮磺吡啶溶液(用生理盐水配成10 mg/mL溶液,给药剂量为50 mg/kg)灌胃,其余各组给予等量生理盐水(5 mL/kg)灌胃。各组于造模结束后第3日开始药物干预,每日1次,每次1~1.5 h,左右交替,疗程均为28天。

1.6 标本处理与采集 治疗28天后大鼠禁食24 h,10%水合氯醛4 mL/kg腹腔注射麻醉,开腹充分暴露腹腔,剪取距肛门6~10 cm的结肠组织,置于冰生理盐水中清洗,观察其肉眼形态病理改变,并用滤纸吸干,一部分组织放入4%多聚甲醛固定,用于苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE);另一部分组织放入冻存管,

用干冰速冻结肠组织,-80 ℃保存,用于荧光定量PCR及蛋白免疫印迹试验(western blot, WB)检测。

1.7 观察指标

1.7.1 大鼠死亡情况 观察实验过程中各组大鼠死亡情况。

1.7.2 大鼠宏观表征 观察各组大鼠精神状态、皮肤颜色、毛发色泽、二便情况、饮食量、体质量等宏观表征改变情况。

1.7.3 结肠组织肉眼损伤评分 采集标本的同时,用肉眼对大鼠结肠黏膜进行量化评分,参考文献[18-19]制定评分标准。0分:肠黏膜无溃疡和炎症;1分:黏膜局灶性充血、水肿,无溃疡;2分:黏膜轻度充血、水肿、糜烂,无溃疡;3分:黏膜中度充血、水肿、糜烂,1处溃疡;4分:黏膜重度充血、水肿、糜烂,散发性溃疡个数>2个;5分:广泛性炎性溃疡,其中有一个溃疡范围>1cm。

1.7.4 结肠组织病理形态学变化 取结肠组织放入4%多聚甲醛浸泡固定、4 ℃密封避光保存的大鼠结肠组织,流水冲洗3次,用不同浓度酒精从低到高脱水,浸蜡包埋,切片、展片、烤片,脱蜡至水,染色,酒精脱水封片,在显微镜(10×)下观察结肠组织病理学形态并评分。评分标准^[16,20-21]如下:0分,肠黏膜正常,无炎性细胞浸润;1分,轻度炎性细胞浸润,黏膜组织完整;2分,轻度炎性细胞浸润,范围≥50%,黏膜组织完整;3分,中度炎性细胞浸润,有溃疡形成,黏膜组织破坏至黏膜下层;4分,在3分基础上,炎性细胞浸润范围≥50%;5分,重度炎性细胞浸润,广泛性溃疡形成,伴坏死,黏膜下组织破坏;6分,在5分基础上,炎性细胞浸润范围≥50%。

1.7.5 荧光定量PCR检测大鼠结肠组织 Keap1、Nrf2、Mfn1、Mfn2的mRNA表达情况 取大鼠结肠组织,Trizol提取总RNA,以组织总mRNA为模板,根据试剂盒步骤,逆转录cDNA,β-actin为内参,进行PCR反应,引物由上海生物工程股份有限公司合成,基因引物序列见表1。

表1 Keap1、Nrf2、Mfn1、Mfn2引物序列

| 名称 | 引物序列(5'-3') | 产物长度(bp) |
|------------------|---------------------------|----------|
| Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1 | 上游 CCCATGCAGCCCGAACCCAA | 131 |
| | 下游 GTCACCTCCGCCTTGCACTCC | |
| 核因子E2相关因子2 | 上游 CGGCTAAAACCTCCTACTGTGA | 193 |
| | 下游 CACTTACACAGAACTAGCCCAA | |
| 线粒体融合蛋白-1 | 上游 TCAACGCTGATGAACACGGA | 103 |
| | 下游 AAGCAGAAGCATCCCAACGA | |
| 线粒体融合蛋白-2 | 上游 GAATCGGCACAGAGGAGACC | 106 |
| | 下游 GGACATCTCGTTTCTAGCTGGT | |
| β-actin | 上游 CATCCGTAAGACCTCTATGCC | 223 |
| | 下游 TACTCCTGCTTGCTGATCCAC | |

1.7.6 WB检测大鼠结肠组织 Keap1、Nrf2、HO-1 蛋白表达情况 取大鼠结肠组织,加入RIPA裂解液,提取蛋白;配制分离胶和浓缩胶;蛋白样品煮沸变性,电泳;电泳后将滤纸、PVDF膜、凝胶等放入转膜仪中进行转膜,转膜完毕后,将膜完全浸入1×PBST配制5%脱脂奶粉中封闭,4℃孵育过夜,一抗孵育,孵育结束后,1×PBST洗3次,每次15 min,然后加入用1×PBST稀释HRP标记的二抗,将稀释后的二抗与膜共同室温孵育90 min,孵育结束后,1×PBST洗3次,每次10 min。ECL显色曝光,运用Imagine J计算蛋白目的条带与相对内参条带灰度值比值。

1.8 统计学方法 采用SPSS 25.0软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间若满足正态性,则采用单因素方差分析;若不满足正态性,则采用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠死亡情况 造模期间死亡3只大鼠;TNBS混合试剂不能耐受死亡3只大鼠;干预过程中模型组、非穴位敷贴组、柳氮磺吡啶组各死亡1只。死亡大鼠数据最终从实验数据中剔除。

2.2 大鼠宏观表征 正常对照组大鼠精神活动、毛发色泽、皮肤颜色、二便情况、饮食量、饮水量、体质量均尚可,大便成形,未见黏液脓血便。模型组从第2周造模开始,相继出现精神萎靡,反应迟钝,嗜睡蜷缩聚堆,毛发枯槁无华,易脱毛,皮肤颜色暗淡,大便变软或溏泄,小便清长,体质量、饮水量、饮食量骤减;TNBS灌肠后大鼠肛周可见大量脓血,伴或不伴腹部膨大如鼓。干预4周后,穴位敷贴组、柳氮磺吡啶组大鼠体质量、饮水量、饮水量与正常对照组相差无几,且大鼠精神状态、毛发色泽、皮肤颜色、大便情况等均有较好的改

善;非穴位敷贴组大鼠改善情况明显低于穴位敷贴组、柳氮磺吡啶组,但较模型组有所好转。

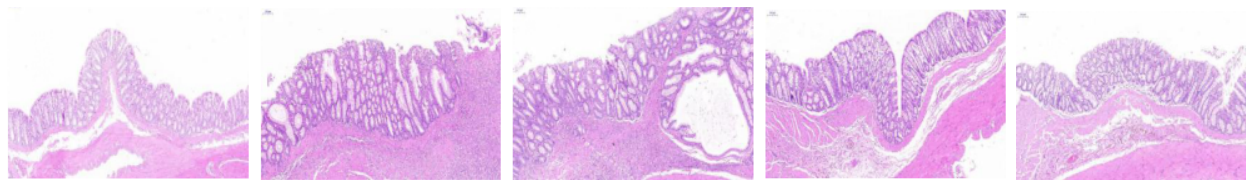
2.3 各组大鼠结肠组织肉眼损伤评分与病理损伤评分 与正常对照组比较,模型组大鼠结肠组织肉眼损伤评分与病理损伤评分升高($P < 0.01$);与模型组相比,穴位敷贴组、柳氮磺吡啶组大鼠结肠组织肉眼损伤评分与病理损伤评分降低($P < 0.01$),非穴位敷贴组肉眼损伤评分与病理损伤评分趋势差异无统计学意义;与非穴位敷贴组相比,穴位敷贴组大鼠结肠组织肉眼损伤评分与病理损伤评分降低($P < 0.01$);穴位敷贴组和柳氮磺吡啶组趋势差异无统计学意义。见表2。

表2 大鼠结肠组织评分比较($\bar{x} \pm s$) 分

| 组别 | 鼠数 | 肉眼损伤评分 | 病理损伤评分 |
|--------|----|---------------------------|---------------------------|
| 正常对照组 | 5 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| 模型组 | 7 | 4.00 ± 0.81 [#] | 4.71 ± 0.95 [#] |
| 非穴位敷贴组 | 6 | 3.33 ± 1.03 | 4.17 ± 0.75 |
| 穴位敷贴组 | 7 | 2.14 ± 0.69 ^{**} | 2.29 ± 0.75 ^{**} |
| 柳氮磺吡啶组 | 7 | 1.86 ± 0.69 [#] | 2.14 ± 0.69 [#] |

注:#表示与正常对照组比较, $P < 0.01$;&表示与模型组比较, $P < 0.01$;*表示与非穴位敷贴组比较, $P < 0.01$

2.4 各组大鼠结肠组织病理形态变化 正常对照组大鼠结肠组织各层结构清晰,黏膜完整,无充血、水肿、溃疡、炎性细胞浸润等病理改变。模型组大鼠结肠组织可见局部溃疡,黏膜缺损,肠腺消失或结构改变,溃疡灶周边可见明显充血、水肿,伴有大量淋巴细胞、中性粒细胞浸润。非穴位敷贴组可见少量溃疡,周边轻度或中度充血、水肿,少量肠腺消失或呈异形样改变,并伴有炎性细胞浸润。穴位敷贴组与柳氮磺吡啶组肠组织未见溃疡,各层结构清晰,黏膜层局部轻度水肿,肠腺数量丰富,结缔组织排列疏松,肠腺间距增宽,黏膜下层结缔组织增生,并伴有少量淋巴细胞浸润。见图1。



正常对照组

模型组

非穴位敷贴组

穴位敷贴组

柳氮磺吡啶组

图1 各组大鼠结肠组织病理切片形态(HE, ×100)

2.5 各组大鼠结肠组织 Keap1、Nrf2、Mfn1、Mfn2 mRNA 表达情况 与正常对照组比较,模型组大鼠结肠组织 Keap1 mRNA 表达升高, Nrf2、Mfn1、Mfn2 mRNA 表达降低($P < 0.01$);与模型组比较,穴位敷贴组、柳氮磺吡啶组大鼠结肠组织 Keap1

mRNA 表达降低, Nrf2、Mfn1、Mfn2 mRNA 表达升高($P < 0.01$),非穴位敷贴组 Keap1、Nrf2、Mfn1、Mfn2 mRNA 趋势差异无统计学意义;与非穴位敷贴组比较,穴位敷贴组大鼠结肠组织 Keap1 mRNA 表达降低, Nrf2、Mfn1、Mfn2 mRNA 表达升高($P < 0.01$)。

穴位敷贴组和柳氮磺吡啶组趋势差异无统计学意义。见表3。

2.6 各组大鼠结肠组织Keap1、Nrf2、HO-1蛋白表达情况 与正常对照组比较,模型组大鼠结肠组织Keap1蛋白表达升高,Nrf2、HO-1蛋白表达降低($P<0.05$);与模型组比较,穴位敷贴组、柳氮磺

吡啶组Keap1蛋白表达降低,Nrf2、HO-1蛋白表达升高($P<0.05$),非穴位敷贴组Keap1、Nrf2、HO-1蛋白表达差异无统计学意义;与非穴位敷贴组比较,穴位敷贴组Keap1蛋白表达降低,Nrf2、HO-1蛋白表达升高($P<0.05$)。穴位敷贴组和柳氮磺吡啶组趋势差异无统计学意义。见表4及图2。

表3 各组大鼠结肠组织Keap1、Nrf2、Mfn1、Mfn2 mRNA表达情况比较($\bar{x}\pm s$)

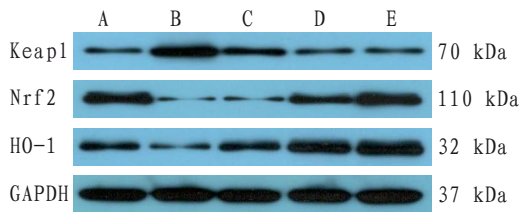
| 组别 | 鼠数 | Keap1 mRNA | Nrf2 mRNA | Mfn1 mRNA | Mfn2 mRNA |
|--------|----|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 正常对照组 | 4 | 0.60 ± 0.03 | 0.95 ± 0.04 | 0.93 ± 0.03 | 0.89 ± 0.04 |
| 模型组 | 4 | 1.59 ± 0.09 [†] | 0.50 ± 0.14 [†] | 0.44 ± 0.13 [†] | 0.46 ± 0.12 [†] |
| 非穴位敷贴组 | 4 | 1.51 ± 0.08 | 0.66 ± 0.07 | 0.60 ± 0.07 | 0.63 ± 0.06 |
| 穴位敷贴组 | 4 | 0.86 ± 0.03 ^{†*} | 1.73 ± 0.17 ^{†*} | 1.74 ± 0.17 ^{†*} | 1.70 ± 0.16 ^{†*} |
| 柳氮磺吡啶组 | 4 | 0.92 ± 0.15 [†] | 1.82 ± 0.30 [†] | 1.86 ± 0.29 [†] | 1.87 ± 0.25 [†] |

注:†表示与正常对照组比较, $P<0.01$;&表示与模型组比较, $P<0.01$;*表示与非穴位敷贴组比较, $P<0.01$

表4 各组大鼠结肠组织Keap1、Nrf2、HO-1蛋白表达情况比较($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 鼠数 | Keap1/GAPDH | Nrf2/GAPDH | HO-1/GAPDH |
|--------|----|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 正常对照组 | 3 | 0.21 ± 0.09 | 0.65 ± 0.19 | 0.53 ± 0.14 |
| 模型组 | 3 | 0.78 ± 0.17 [†] | 0.24 ± 0.08 [†] | 0.22 ± 0.01 ^{††} |
| 非穴位敷贴组 | 3 | 0.62 ± 0.09 | 0.31 ± 0.10 | 0.32 ± 0.15 |
| 穴位敷贴组 | 3 | 0.25 ± 0.06 ^{†*} | 0.73 ± 0.19 ^{†*} | 0.58 ± 0.09 ^{††*} |
| 柳氮磺吡啶组 | 3 | 0.30 ± 0.02 [†] | 0.82 ± 0.11 [†] | 0.76 ± 0.21 [†] |

注:与正常对照组比较,##表示 $P<0.05$,#表示 $P<0.01$;与模型组比较,&&表示 $P<0.05$,&表示 $P<0.01$;与非穴位敷贴组比较,**表示 $P<0.05$,*表示 $P<0.01$



注:A为正常对照组;B为模型组;C为非穴位敷贴组;D为穴位敷贴组;E为柳氮磺吡啶组

图2 大鼠结肠组织Keap1、Nrf2、HO-1蛋白免疫印迹图

3 讨论

UC是消化系统的常见病、多发病。流行病学调查显示,全球范围内UC的发病率与患病率呈持续上升趋势^[22]。目前,西医治疗UC主要采用氨基水杨酸制剂、糖皮质激素、免疫抑制剂及生物制剂,这类药物虽能尽快控制炎症、缓解症状,但存在停药后易复发、长期服药副反应较多等问题。中医强调整体观念,通过辨证施治,综合运用中药内服、外用及针灸等疗法,在治疗UC中展现出显著疗效^[5,23]。

根据UC的临床表现及体征,中医学将其归属于“泄泻”“痢疾”“大瘕泻”“肠癖”等范畴。其病因病机主要以先天禀赋不足、素体脾胃虚弱为主。鉴于UC患者存在高复发率、难治愈等特性,朱莹教授提出“虚”“瘀”的中医病机,并基于此采用温

阳化瘀之法,自创溃结宁膏用于临床治疗。正如《景岳全书》所载:“凡里急后重,病在广肠最下之处,而其病本,则不在广肠,而在脾肾。”脾为后天之本,主一身之运化;肾为先天之本,寓一身之真阳。泄泻日久,脾阳不振,土不制水,进而累及肾阳,使肾阳亏虚,无法温养脾胃。脾胃运化失常,湿邪壅滞肠络,搏结气血,气血瘀滞,血败肉腐,内溃成疡,发为本病。此外,阳虚不能温煦,血行不畅,加之病情迁延不愈,故“久病必瘀”。UC病位在肠,但可累及脾、肾两脏,属本虚标实之证,其中脾肾阳虚是本,血瘀是标,因此可以“虚”“瘀”概括其基本病机。

溃结宁膏组方主要包括炮附子、细辛、丁香、延胡索、赤芍、生姜、白芥子等。方中附子为君药,可温肾阳、壮脾阳、散寒凝;细辛、丁香为臣药,助附子温阳散寒;生姜温脾散寒,赤芍、延胡索行气活血化瘀,白芥子行散通络,四药共为佐药。诸药配伍,共奏温肾暖脾、活血化瘀之效。现代药理研究表明,溃结宁膏中的各味药物均具有抗氧化活性^[24-26]。

本研究基于UC“虚、瘀”的中医病机,在经穴-脏腑相关理论指导下,选取足三里、天枢、肾俞、膈俞作为敷贴穴位。足三里为足阳明胃经之合穴,具有温煦脾阳、疏通经络之效;肾俞乃肾元脏气所输,可温肾阳而补虚;天枢为手阳明大肠经之募

穴,主疏调肠腑而活血导滞;膈俞为血之要会,活血调血之效显著。诸穴配伍,共奏温阳补虚、疏经导滞之功。本研究结果显示,溃结宁膏穴位敷贴可显著改善UC大鼠临床症状,减轻结肠组织病理损伤,对UC大鼠具有较好的保护作用。

Nrf2/HO-1 信号通路是抗氧化应激关键通路之一,在UC病理进展中发挥重要作用。Nrf2作为细胞氧化应激反应的调节中枢,在生理状态下,机体氧化系统与抗氧化系统保持动态平衡。此时,无活性储存于细胞质的Nrf2会与胞质接头蛋白Keap1稳定结合。这种结合一方面抑制Nrf2活性,另一方面促进Nrf2泛素化,使其进一步被蛋白酶降解,从而维持Nrf2的稳定表达并保持其非活性状态。Nrf2的活性主要由Keap1负性调节。在氧化应激状态下,Nrf2活性被激活,与Keap1解离,转移至细胞核,并与小Maf蛋白结合成二聚体。后识别并结合抗氧化酶反应原件上,诱导下游一系列保护基因的表达,进而提高抗氧化应激能力,减轻组织损伤。研究证实,Nrf2在UC患者结肠组织黏膜中呈高表达状态,且与病情严重程度(氧化应激水平)呈正相关^[27-31]。此外,已有研究表明,HO-1作为一种重要的抗氧化酶,在多种疾病状态和器官系统中发挥重要的细胞保护作用^[32-34]。本研究结果显示,与正常对照组相比,模型组大鼠Keap1蛋白及mRNA表达水平升高,而Nrf2蛋白及mRNA、HO-1蛋白表达水平降低;溃结宁膏穴位敷贴干预后,Keap1蛋白及mRNA表达下调,Nrf2蛋白、mRNA及HO-1蛋白表达上调。这表明溃结宁膏穴位敷贴可激活Nrf2/HO-1信号通路的抗氧化应激保护作用,促进肠黏膜愈合。

线粒体是一种具有动态特性的细胞器,由线粒体外膜及内膜包裹,持续进行融合与分裂运动,这种动态的过程被称为线粒体动力学。其中,线粒体融合主要用于维持线粒体的正常功能,而分裂则有助于清除无法修复的受损线粒体。线粒体融合过程主要受位于线粒体外膜的线粒体融合相关蛋白-1、线粒体融合相关蛋白-2,以及位于线粒体内膜的视神经萎缩症蛋白-1(optic atrophy-1,OPA1)调控。作为细胞内活性氧的主要生成场所,线粒体在疾病病理生理过程中的作用机制目前尚未完全阐明,但氧化应激被认为是其中的关键环节。当机体受到氧化应激时,大量氧化物质的产生极易导致线粒体功能紊乱。LI等^[35]研究发现,脂多糖激活蛋白激酶C- α (PKC- α)后,可刺激HO-1蛋白表达,进而通过上调Mfn2和OPA1的表达,同时降低NR8383细胞中Drp1和Fis1的水

平,改善线粒体损伤。JIA等^[36]利用脂多糖刺激大鼠肺泡上皮II型细胞,结果显示细胞中白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 含量降低,同时HO-1、Mfn1、Mfn2和OPA1蛋白表达上调,这表明HO-1/CO途径能促进脂多糖诱导的大鼠AEC II细胞线粒体融合,并减轻炎症反应。ATHALE等^[37]在小鼠急性肺损伤模型中发现,急性肺损伤可促使下游基因Nrf2表达上调,进而增加HO-1的表达,同时加强线粒体的生物合成能力和抗炎反应。本研究结果显示,与正常对照组相比,模型组Keap1蛋白及mRNA表达水平明显升高,而Nrf2蛋白及mRNA、Mfn1 mRNA、Mfn2 mRNA及HO-1蛋白表达水平降低,溃结宁膏穴位敷贴干预明显下调Keap1蛋白及mRNA表达,上调Nrf2蛋白及mRNA、Mfn1 mRNA、Mfn2 mRNA、HO-1蛋白表达,这提示溃结宁膏穴位敷贴能够激活Nrf2/HO-1信号通路,通过增加Mfn1、Mfn2的表达,改善线粒体损伤,发挥抗氧化作用,修复肠黏膜损伤。

综上所述,在针对“虚”“瘀”病机的UC治疗过程中,溃结宁膏穴位敷贴可减轻UC大鼠的临床症状及结肠组织病理损伤,对氧化应激损伤具有保护作用。其作用机制可能与激活Nrf2/HO-1信号通路,上调Mfn1、Mfn2 mRNA水平,改善线粒体损伤有关。

参考文献

- [1] KAENKUMCHORN T, WAHBEH G. Ulcerative colitis: making the diagnosis[J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2020,49(4):655-669.
- [2] UNGARO R, MEHANDRU S, ALLEN P B, et al. Ulcerative colitis[J]. *Lancet*, 2017,389(10080):1756-1770.
- [3] ROSELLI M, FINAMORE A. Use of synbiotics for ulcerative colitis treatment[J]. *Curr Clin Pharmacol*, 2020,15(3):174-182.
- [4] EL-AKABAWY G, EL-SHERIF N M. Zeaxanthin exerts protective effects on acetic acid-induced colitis in rats via modulation of pro-inflammatory cytokines and oxidative stress[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019,111:841-851.
- [5] 莫嘉浩,黄演芬,涂宾奇,等. 中医药治疗溃疡性结肠炎的研究热点及未来展望:基于CiteSpace的可视化分析[J]. *西部中医药*, 2024,37(12):65-70.
- [6] PEOPLES J N, SARAF A, GHAZAL N, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease[J]. *Exp Mol Med*, 2019,51(12):1-13.
- [7] HABERMAN Y, KARNS R, DEXHEIMER P J, et al. Ulcerative colitis mucosal transcriptomes reveal mitochondrial pathology and personalized mechanisms underlying disease severity and treatment response[J]. *Nat Commun*, 2019,10(1):38-45.
- [8] 张谦,赵俊喜,景苗苗,等. 补阳还五汤对一氧化碳中毒迟

- 发性脑病大鼠氧化损伤及Nrf2/HO-1信号通路的影响[J]. 西部中医药, 2023, 36(3): 35-40.
- [9] ZHANG H, YUAN B, HUANG H, et al. Gastrodin induced HO-1 and Nrf2 up-regulation to alleviate H₂O₂-induced oxidative stress in mouse liver sinusoidal endothelial cells through p38 MAPK phosphorylation[J]. Braz J Med Biol Res, 2018, 51(10): 7439.
- [10] SHEN K, JIA Y, WANG X, et al. Exosomes from adipose-derived stem cells alleviate the inflammation and oxidative stress via regulating Nrf2/HO-1 axis in macrophages[J]. Free Radic Biol Med, 2021, 165: 54-66.
- [11] 郭维军, 朱莹, 赵希. 溃结宁膏穴位贴敷治疗脾肾阳虚型溃疡性结肠炎临床研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2013, 20(7): 10-12.
- [12] 邹君君, 朱莹, 张晓江, 等. 溃结宁膏穴位贴敷对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎的临床疗效及其对血清 γ 干扰素、白细胞介素-4的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2013(6): 305-307.
- [13] 王焱霏, 朱莹, 王璇. 溃疡性结肠炎(脾肾阳虚证)大鼠模型的实验研究[J]. 中国中医急症, 2015, 24(8): 1332-1334.
- [14] CATANA C S, MAGDAS C, TABARAN F A, et al. Comparison of two models of inflammatory bowel disease in rats[J]. Adv Clin Exp Med, 2018, 27(5): 599-607.
- [15] 王生华, 朱莹, 王焱霏, 等. 基于Nrf2通路探讨溃结宁膏穴位贴敷治疗溃疡性结肠炎的作用机制[J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41(8): 951-958.
- [16] 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.
- [17] 郭义. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2008: 224.
- [18] GAO W, WANG C, YU L, et al. Chlorogenic acid attenuates dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis in mice through MAPK/ERK/JNK pathway[J]. Biomed Res Int, 2019, 20(11): 676-689.
- [19] JIA K, WANG Y, TONG X, et al. KGF is delivered to inflammatory and induces the epithelial hyperplasia in trinitrobenzene sulfonic acid-induced ulcerative colitis rats[J]. Drug Des Devel Ther, 2020, 14: 217-231.
- [20] 刘朝阳, 吴琳琳, 田茂生, 等. 贻贝粘蛋白粘附性及抗氧化作用对大鼠溃疡性结肠炎的实验研究[J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(5): 570-577.
- [21] 何育佩, 杜正彩, 侯小涛, 等. 溃疡性结肠炎动物模型研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22(2): 423-433.
- [22] DU L, HA C. Epidemiology and pathogenesis of ulcerative colitis[J]. Gastroenterol Clin North Am, 2020, 49(4): 643-654.
- [23] 郭廷洪, 刘凤斌, 张桂林, 等. 当代名中医治疗溃疡性结肠炎多维度诊治思路与临证经验荟萃[J]. 西部中医药, 2023, 36(11): 113-116.
- [24] 张晓琳. 酶辅助提取法制备附子多糖及其体外抗氧化活性研究[J]. 浙江中医杂志, 2016, 51(12): 912-913.
- [25] 马莎莎, 赵震宇, 刘平怀, 等. 丁香不同提取方法提取物的抗氧化活性[J]. 精细化工, 2018, 35(2): 218-227.
- [26] 王向东, 王永存, 马艳芝, 等. 不同生姜品种抗氧化活性的比较[J]. 中国果菜, 2018, 38(5): 14-18.
- [27] 艾来提·塔来提, 吴建江, 王江. 白藜芦醇对氧化应激环境中人脐静脉内皮细胞衰老和增殖及凋亡的影响[J]. 中国医药, 2020, 15(12): 1952-1954.
- [28] 马旭冉, 王彦礼, 邹迪新, 等. 黄芩汤调控Nrf2通路对溃疡性结肠炎大鼠氧化应激作用的影响[J]. 药理学报, 2019, 54(4): 653-659.
- [29] 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.
- [30] 周艳利, 刘丽, 宋淑霞, 等. 核因子-E2相关因子2在溃疡性结肠炎中的表达及其与氧化应激的关系[J]. 中华消化杂志, 2014, 34(6): 401-403.
- [31] QIU S, LI P, ZHAO H, et al. Maresin 1 alleviates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis by regulating NRF2 and TLR4/NF-kB signaling pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 78: 106018.
- [32] CHI X, GUO N, YAO W, et al. Induction of heme oxygenase-1 by hemin protects lung against orthotopic autologous liver transplantation-induced acute lung injury in rats[J]. J Transl Med, 2016, 14: 35.
- [33] HULL T D, BODDU R, GUO L, et al. Heme oxygenase-1 regulates mitochondrial quality control in the heart[J]. JCI Insight, 2016, 1(2): 85817.
- [34] ZHONG Z Y, TANG Y. Upregulation of periostin prevents high glucose-induced mitochondrial apoptosis in human umbilical vein endothelial cells via activation of Nrf2/HO-1 signaling[J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 39(1): 71-80.
- [35] LI X, ZHANG Y, YU J, et al. Activation of protein kinase C- α /heme oxygenase-1 signaling pathway improves mitochondrial dynamics in lipopolysaccharide-activated NR8383 cells[J]. Exp Ther Med, 2018, 16(2): 1529-1537.
- [36] JIA H, SHI J, DONG S A, et al. Effects of heme oxygenase-1/carbon monoxide pathway on the mitochondrial fusion in rat alveolar epithelial type II cells stimulated by lipopolysaccharide[J]. Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue, 2018, 30(3): 209-213.
- [37] ATHALE J, ULRICH A, MACGARVEY N C, et al. Nrf2 promotes alveolar mitochondrial biogenesis and resolution of lung injury in Staphylococcus aureus pneumonia in mice[J]. Free Radic Biol Med, 2012, 53(8): 1584-1594.
-
- 收稿日期: 2025-01-10
- *基金项目: 国家自然科学基金(81874466); 中医内科重大疾病防治研究与转化教育部重点实验室开放基金(ZYNK201705); 湖南省中医药科研计划项目(2020043); 湖南省教育厅科学研究项目(18C0401)。
- 作者简介: 吴珊(1996—), 女, 硕士学位, 医师。研究方向: 消化系统疾病的中医药诊治。
- △通讯作者: 王焱霏(1985—), 女, 硕士学位, 副主任医师。研究方向: 消化系统疾病的中医药诊治。Email: wyp850815@126.com。