

• 论著—实验研究 •

痛泻要方联合穴位埋线对肝郁脾虚型溃疡性结肠炎大鼠 5-HT 和 SP 的影响*

刘雅璇¹ 董慧¹ 段逸腾² 王燧霁² 朱莹¹

[摘要] 目的:观察痛泻要方联合穴位埋线对肝郁脾虚型溃疡性结肠炎大鼠结肠、海马组织中 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、神经递质 P 物质(neurotransmitter substance P, SP)的影响,并探讨其作用机制。方法:将 48 只 SPF 级 SD 雄性大鼠随机分为空白组(12 只)、造模组(36 只)。采用 2,4,6-三硝基苯磺酸/乙醇混合剂灌肠+束缚+饮食节律+夹尾刺激制备肝郁脾虚型溃疡性结肠炎模型。将成模大鼠随机分为模型组、痛泻要方组、痛泻要方联合穴位埋线组;痛泻要方联合埋线组予以痛泻要方汤剂灌胃,连续 14 d,同时于足三里、天枢、肝俞、期门、脾俞、大肠俞、膈俞各穴位处理线,每 7 d 进行 1 次,共 2 次;痛泻要方组予痛泻要方汤剂灌胃;空白组和模型组予等体积纯净水进行灌胃,1 次/d,干预 14 d。采用苏木精-伊红染色观察结肠组织病理变化,免疫组织化学法检测大鼠结肠、海马组织中 5-HT、SP 的表达;ELISA 法检测大鼠血清、海马组织中 5-HT、SP 的表达;RT-qPCR 法检测结肠组织中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-6、IL-1 β 、IL-23 含量的变化。结果:与空白组相比,余 3 组血清、海马及结肠组织中 5-HT、SP 的表达量明显增加($P < 0.05$),结肠组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-23 的含量显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,痛泻要方组、痛泻要方联合穴位埋线组血清、海马及结肠组织中 5-HT、SP 的表达量明显减少($P < 0.05$),结肠组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-23 的含量显著降低($P < 0.05$)。结论:痛泻要方联合穴位埋线可以显著下调大鼠血清、海马及结肠组织中 5-HT、SP 的表达水平,并抑制炎症因子的表达,达到对肝郁脾虚型溃疡性结肠炎大鼠的治疗作用。

[关键词] 溃疡性结肠炎;穴位埋线;痛泻要方;5-羟色胺;神经递质 P 物质;脑肠轴;肿瘤坏死因子- α

DOI:10.3969/j.issn.1671-038X.2023.05.08

[中图分类号] R574.62 [文献标志码] A

Effect of Tongxie Yaofang combined with acupoint catgut embedding on 5-HT and SP in ulcerative colitis rats with liver stagnation and spleen deficiency

LIU Yaxuan¹ DONG Hui¹ DUAN Yiteng² WANG Yipei² ZHU Ying¹

(¹Department of Spleen and Stomach Diseases, the First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410007, China; ²Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine)

Corresponding author: ZHU Ying, E-mail: zhuying089@126.com

Abstract Objective: To observe the effects of Tongxie Yaofang combined with acupoint catgut embedding on 5-hydroxytryptamine(5-HT) and neurotransmitter substance P(SP) in colonic and hippocampal tissues of rats with ulcerative colitis of liver depression and spleen deficiency, and to explore its mechanism. **Methods:** Totally 48 SPF SD male rats were randomly divided into blank group(12 rats) and modeling group(36 rats). The ulcerative colitis models of liver depression and spleen deficiency pattern is established by 2, 4, 6-tritrobenzene sulfonic acid/ethanol mixture enema combined with physical restraint, disorder diet and tail-clipping. The successfully established rat models were randomly divided into model group, Tongxie Yaofang group and Tongxie Yaofang combined with embedding group. The Tongxie Yaofang group and the combination group were treated with Tongxie Yaofang decoction by gavage for 14 days, and the combination group was also treated with acupoint embedding at "Zusanli", "Tianshu", "Ganshu", "Qimen", "Pishu", "Dachangshu" and "Geshu", seven days/time, a total of two times; and the blank group and model group were given same amount of purified water by gavage for 14 days. HE staining was used to observe the pathological changes of colon tissue and the expression of 5-HT and SP in colonic

*基金项目:国家自然科学基金(No:81874466);湖南省教育厅科学研究项目(No:20A378)

¹湖南中医药大学第一附属医院脾胃病科(长沙,410007)

²湖南中医药大学第二附属医院消化内科

通信作者:朱莹, E-mail: zhuying089@126.com

and hippocampal tissues of rats was detected by immunohistochemistry. 5-HT and SP in serum and hippocampal tissue were detected by ELISA, and tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6(IL-6), IL-1 β and IL-23 in colon tissue were detected by Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction(RT-qPCR). **Results:** Compared with blank group, the expression levels of 5-HT and SP in serum, hippocampus and colon tissues were significantly increased($P < 0.05$), and the contents of TNF- α , IL-6, IL-1 β and IL-23 in colon tissues were significantly increased($P < 0.05$). Compared with model group, the expressions of 5-HT and SP in serum, hippocampus and colon tissue of Tongxie Yaofang group and Tongxie Yaofang combined with acupoint catgut group were significantly decreased($P < 0.05$), and the contents of TNF- α , IL-6, IL-1 β and IL-23 in colon tissue were significantly decreased($P < 0.05$). **Conclusion:** Tongxie Yaofang combined with acupoint catgut can significantly down-regulate the expression levels of 5-HT and SP in serum, hippocampus and colon tissue, and reduce the expression of inflammatory factors, so as to treat ulcerative colitis of liver depression and spleen deficiency.

Key words ulcerative colitis; acupuncture point embedding; Tongxie Yaofang; 5-hydroxytryptamine; neurotransmitter substance P; cerebral gut axis; tumor necrosis factor- α

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种慢性的直肠、结肠黏膜非特异性炎症,以反复发作的腹泻、黏液脓血便为主要临床症状,活动期和缓解期交替出现^[1],其发病原因与机制尚未明确,目前认为该病的发生是遗传易感性^[2]、免疫紊乱^[3]、饮食^[4]等多个因素交互影响、共同作用的结果。流行病学资料显示,近年来我国 UC 的发病率呈上升趋势^[5-6]。随着现代社会人们生活压力的增加,精神心理因素对本病的影响也逐渐受到重视,5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、神经递质 P 物质(neurotransmitter substance P, SP)是精神心理因素致病中重要的脑肠肽。当前 UC 的西医治疗主要包括氨基水杨酸、类固醇、免疫抑制剂、生物制剂^[7],但长期应用带来不良反应多,且疗效有限。中医药治疗方式多样且疗效可观,其优势逐渐凸显。痛泻要方及穴位埋线均为我国传统医学中有效且安全的治疗 UC 的手段^[8-10]。

本课题组旨在研究痛泻要方联合穴位埋线对大鼠 SP、5-HT 及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-6、IL-1 β 、IL-23 的影响,从脑肠轴理论阐述痛泻要方联合穴位埋线的可能机制,为临床应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 SPF 级 SD 雄性大鼠 48 只,体重(200 \pm 20) g,由湖南省斯莱克景达实验动物有限公司提供[动物合格证号:SCXK(湘)2019-0004]。饲养于湖南中医药大学 SPF 级实验室,室内温度(23 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度 50%~70%。适应性喂养 1 周。本研究经湖南中医药大学第一附属医院伦理委员会批准(No:ZYFY20210526)。

1.2 实验药物制备方法

痛泻要方(由湖南中医药大学第一附属医院新绿药颗粒 NGP 提供),由白术、白芍、陈皮、防风按 6:4:3:2 的比例组成,中药免煎颗粒剂用纯净水配置成 1 g/mL 浓度的中药试剂,装瓶置于 4 $^{\circ}\text{C}$

冰箱中,待用,用时摇匀。

1.3 主要试剂与仪器

2,4,6 三硝基苯磺酸(TNBS, Sigma 公司,货号:SLCG2297);多聚甲醛(Biosharp 公司,货号:BL539A);Trizol(美国 Thermo,货号:15596026);SP、5-HT 试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,货号分别为:CSB-E08358r、CSB-E08364r);mRNA 逆转录试剂盒、miRNA 逆转录试剂盒(中国北京康为世纪公司,货号分别为:CW2569、CW2141);7 号一次埋线针(批号:20200515;4-0,山东博达),可吸收胶原蛋白线(批号:BD200801,山东博达),摇床(型号:TS-1,海门其林贝尔),恒温箱(型号:DHP-500,北京光明),台式高速冷冻离心机(型号:H1650R,湖南湘仪),RT-qPCR 仪(型号:PIKO-REAL96,美国 Thermo),生物样品均质仪(型号:BioPrep-24,杭州奥盛),酶标洗板机(型号:PW-812,深圳汇松),酶标分析仪(型号:MB-530,深圳汇松),电泳仪(型号:DYY-2C,北京六一),电泳槽(型号:DYCP-31DN,北京六一),生物样品均质仪(型号:BioPrep-24,杭州奥盛)。

1.4 造模及分组

采用随机数字表法将 48 只大鼠随机分为空白组(12 只)和造模组(36 只),造模期间空白组自由进食、饮水,造模组采用慢性束缚+饮食失节+夹尾刺激进行模型制作^[11],用自制的大鼠束缚装置每日限制大鼠 8 h 左右的自由活动,并以尾夹夹尾 30 min 激怒大鼠,隔日喂食模拟饥饱失常;2 周后,造模组大鼠禁食不禁水 24 h,腹腔注射氯胺酮(80 mg/kg)和甲苯噻嗪(5 mg/kg)麻醉。将聚丙烯管送至距肛门口约 8 cm 处,注入由 5% TNBS 按 100 mg/kg(约 0.2 mL/100 g 的 TNBS 原液)配 0.25 mL 50% 乙醇混合灌肠剂,保持大鼠倒置 2 min,试剂充分于肠腔渗透,后归笼待自然清醒,自由摄食饮水。抽验造模,于空白组及造模组各随机抽取 3 只大鼠,取结肠组织,观察其形态学改变,光镜下观察病理表现。成模后造模组大鼠倦

怠蜷缩易激惹,食量明显减少,体重较前明显减轻,粪便溏稀、伴黏液脓血;结肠肉眼可见斑片状/点状糜烂或深凹陷性溃疡,周围黏膜充血水肿明显,肠管明显粘连及短缩。光镜下可见大鼠结肠组织结构紊乱,黏膜显著充血水肿,隐窝扭曲、上移,基底淋巴细胞聚集,广泛溃疡形成,提示造模成功。将造模组随机分为模型组、痛泻要方组、痛泻要方联合穴位埋线组,每组 11 只。

1.5 干预方法

造模成功后第 3 日进行干预,痛泻要方联合穴位埋线组选穴定位参考《实验针灸学》中拟人比照法^[12]对穴位进行定位,选取足三里、天枢、大肠俞、脾俞、肝俞、膈俞、期门埋线。选穴定位后备皮,络合碘消毒,使用一次性无菌埋线针将 0.5 cm 羊肠线埋入相应穴位,确保线头不外露,完毕后在对应皮肤处覆盖无菌敷料保护,穴位埋线每 7 d 进行 1 次,共操作 2 次,同时每日按 1 mL/100 g 予以痛泻要方药液灌胃(按人-大鼠体表面积等效剂量公式^[13]计算得出,约为人有效剂量的 6.3 倍);痛泻要方组每日予以痛泻要方药液灌胃(1 mL/100 g),1 次/d;疗程共计 14 d。空白组、模型组予等量纯净水(1 mL/100 g)灌胃,连续 14 d。

1.6 指标检测与方法

1.6.1 标本采集与处理 治疗完成后大鼠禁食不禁水 24 h,腹腔注射麻醉,腹主动脉后采血,离心机 3 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液,留取血清备检 ELISA;距肛门 6~10 cm 取肠段,冰盐水清洗,滤纸吸干,一部分备检 RT-qPCR,另一部分放入 4%多聚甲醛中固定,待做病理切片完善苏木精-伊红染色及免疫组织化学实验;在冰块操作台上快速剥出大鼠大脑并分离出海马组织,一半装入 EP 管内,液氮速冻 5 min 后暂存于-80 °C 冰箱备用,用时加 PBS,用玻璃匀浆器研磨制成 10%组织匀浆液,3 000 r/min 离心 15 min 吸取上清液,完善 ELISA 检测;一半放入 4%多聚甲醛固定以进行后续免疫组织化学实验。

1.6.2 一般情况观察 记录各组大鼠的一般情况、重量及食量改变,日常观察大鼠粪便改变,邻联甲苯胺法检测大鼠粪便隐血;将人肝郁脾虚型 UC 症状逐一按照《中药新药临床研究指导原则》^[14]与《大鼠/小鼠辨证论治实验方法学》^[15]转化为大鼠的宏观表征,使大鼠证候可视化^[16],肝郁脾虚证临床证候诊断要求具备主症 3 项(第 1 项必须符合)或主症 2 项(第 1 项必须符合)、次症 2 项,大鼠证候判别与此标准一致。见表 1。

1.6.3 结肠炎症评价指标 ①疾病活动指数(disease activity index, DAI):结合大鼠体重、大便性状、便血情况,完善 DAI 评分^[17],DAI 评分标准:体重不变为 0 分,减轻 1%~5%为 1 分,减轻 6%~

10%为 2 分,减轻 11%~15%为 3 分,减轻 >15%为 4 分。粪便性状正常为 0 分,呈半稀状为 2 分,稀疏黏稠为 4 分。粪便无潜血为 0 分,潜血阳性为 2 分,显性血便为 4 分。 $DAI = (\text{体重下降} + \text{大便性状分数} + \text{便血分数}) / 3$ 。②结肠黏膜损伤指数(colonic mucosa damage index, CMDI 评分):取大鼠距肛门 6~10 cm 处肠段,洗净并吸干水分后,肉眼观察结肠组织充血水肿情况,进行 CMDI 评分^[18]。CMDI 评分标准:未见肠黏膜损伤为 0 分;肠黏膜轻度充血水肿,未出现溃疡为 1 分;肠黏膜充血水肿,出现轻度糜烂、粘连,无溃疡为 2 分;肠黏膜充血水肿、中度糜烂,见单个溃疡为 3 分;肠黏膜充血水肿、高度糜烂,见多处溃疡为 4 分;肠黏膜充血水肿、重度糜烂,见 >1 cm 溃疡为 5 分。③结肠组织学损伤指数(tissues damage index, TDI):取病变肠段进行苏木精-伊红染色后,光镜下观察组织病理学改变,进行 TDI 评分^[19]。TDI 评分标准:结肠黏膜无损伤为 0 分;黏膜和(或)黏膜下炎症浸润、充血水肿较弱,糜烂轻度,黏膜基层完整为 1 分;在记 1 分的基础上,范围达标本的 50%为 2 分;炎症浸润、充血水肿明显,溃疡形成且延伸至黏膜下层与黏膜基层,少量炎症细胞浸润黏膜固有层且无基层坏死为 3 分;记 3 分的基础同时范围达标本 50%及以上为 4 分;可见广泛溃疡,有凝固性坏死,中性粒细胞大量浸润,细胞坏死至黏膜固有肌层为 5 分;在记 5 分的基础上,范围达标本的 50%可记 6~8 分。

表 1 临床四诊信息与大鼠宏观表征转化

临床四诊信息	大鼠宏观表征
主症	主要依据
胃脘或胁肋胀痛,腹胀	喜蜷卧,行动迟缓
食少纳呆	体重增长缓慢,进食量少
便溏不爽	大便稀溏
次症	主要依据
情绪抑郁或急躁易怒,善太息	抓取反抗微弱或激烈
肠鸣矢气,腹痛即泻、泻后痛减	拉尾排便次数增加
舌苔白或腻	舌体多津
脉弦或细	

1.6.4 ELISA 检测血清、海马组织中 5-HT、SP 含量 按 ELISA 试剂盒说明书检测血清及海马组织标本,在 96 孔酶标板内进行操作,经过显色后在酶标仪内以 450 nm 波长依序检测各孔吸光度(A 值)并根据标准曲线获得样品检测目标的浓度。

1.6.5 苏木精-伊红染色观察结肠病变情况 选取高质量的石蜡切片 60 °C 烤片 12 h;二甲苯脱蜡

处理后梯度乙醇脱水;苏木精-伊红染色,脱水,透明;中性树胶封固晾干,待拍照分析。

1.6.6 免疫组织化学法检测海马、结肠组织中 5-HT、SP 的表达 组织切片用二甲苯脱蜡,经各级浓度乙醇水化,切片浸入枸橼酸盐缓冲液电炉加热至沸腾后断电,连续煮 20 min,冷却 20 min 后拿出,冷却至室温后用 PBS 洗涤 3 min×3 次。1%高碘酸室温封闭 60 min;一抗 4 ℃ 过夜孵育, PBS 漂洗 5 min×3 次;然后与一抗相对应的二抗 37 ℃ 孵育 30 min, PBS 漂洗 5 min×3 次;滴加预制好的显色剂 DAB 工作液,适度显色后蒸馏水终止反应;苏木精复染,脱水,透明中性树胶封固;采用 Image-Pro-Plus 6.0 对所观察视野进行分析,以平均 A 值作为阳性表达程度并评定结果。

1.6.7 RT-qPCR 检测结肠组织 TNF-α、IL-6、IL-1β、IL-23 的含量 Trizol 提取结肠组织总 RNA,以组织总 mRNA 为模板,逆转录 cDNA,按照说明书要求进行 RT-qPCR 扩增,扩增条件:95 ℃ 预变性 10 min,95 ℃ 循环 15 s,60 ℃ 循环 30 s,共 40 个循环。引物序列见表 2,以 GAPDH 作为参比对照,用 2^{-ΔΔCt} 相对定量法进行分析。

表 2 各基因 PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')	产物长度 / bp
GAPDH	F:ACAGCAACAGGGTGGTGGAC	252
	R:TTTGAGGGTGCAGCGAAGCTT	
TNF-α	F:CCCCTCTATTTATAATTGCACCT	167
	R:CTGGTAGTTTAGCTCCGTTT	
IL-6	F:TCACTATGAGGTCTACTCGG	141
	R:CATATTGCCAGTTCTTCGTA	
IL-1β	F:CAGCAGCATCTCGACAAGAG	123
	R:AAAGAAGGTGCTTGGGTCTCT	
IL-23	F:CCTGCTGGACTCGGACAT	85
	R:GCCCAGTAGGGAGGTATGAA	

1.7 统计学方法

采用 SPSS 25.0 统计软件进行数据统计分析,

计量资料均采用 $\bar{X} \pm S$ 来表示。两样本均数间比较符合正态分布采用独立样本 *t* 检验,不符合正态性分布采用两样本秩和检验;多样本间的比较符合正态性分布采用单因素方差分析(one way ANOVA)检验,不符合正态性分布采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

造模完成后,可见空白组大鼠正常饮水摄食,精神及活动度均良好,毛发光亮洁净,体重明显增加,大便性状良好,无血便及稀便。余 3 组大鼠均可见毛发黄枯凌乱,眼周分泌物多,体重减轻,肛周污浊,血迹明显,粪便夹黏液脓血,粪便隐血提示强阳性,兼见肝郁脾虚之症:动作迟缓,倦怠喜卧,抓取时易怒,食少,大便稀溏,排便次数明显增加。经干预 5 d 后,痛泻要方联合穴位埋线组大鼠精神状态开始好转,修饰动作逐渐增多,易激惹状态缓解,进食量增加,大便溏泻、粪便隐血开始改善;给药 7 d 后,痛泻要方组一般情况开始好转,进食量较前增加,大便溏泻、粪便隐血开始改善,两组大鼠毛发逐渐恢复光泽,皮肤黏膜逐渐红润。经过 14 d 治疗后,痛泻要方组及痛泻要方联合穴位埋线组大鼠症状、体征均有不同程度改善,两组大鼠肝郁脾虚证候表现均有缓解,可见活泼灵敏,进食量及体重增加,毛发光泽,大便次数减少且粪便基本成形,肛周干燥清洁,粪便隐血逐渐转为阴性;而痛泻要方联合穴位埋线组情况优于痛泻药方组且恢复时间更快。模型组大鼠病情迁延未愈,精神萎靡,毛发失荣,鼠尾脏污,肛周血便、黏液附着,体重增长较慢,实验末期粪便始渐成形,粪便隐血持续至实验结束。

2.2 各组大鼠结肠炎症评分比较

与空白组相比,模型组、痛泻要方组、痛泻要方联合穴位埋线组 DAI、CMDI 及 TDI 评分均显著上升,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组相比,痛泻要方组与痛泻要方联合穴位埋线组 DAI、CDMI 及 TDI 评分较模型组均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与痛泻要方组相比,痛泻要方联合穴位埋线组 DAI、CDMI 及 TDI 评分下降更明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠 DAI、CMDI 及 TDI 评分的比较

组别	例数	DAI	CMDI	TDI
空白组	9	0.53±0.17	0	0
模型组	11	2.57±0.16 ¹⁾	4.10±0.70 ¹⁾	4.16±0.38 ¹⁾
痛泻要方组	11	1.91±0.23 ¹⁾²⁾	2.92±0.35 ¹⁾²⁾	2.83±0.32 ¹⁾²⁾
痛泻要方联合穴位埋线组	11	1.09±0.25 ¹⁾²⁾³⁾	1.82±0.44 ¹⁾²⁾³⁾	1.77±0.34 ¹⁾²⁾³⁾

与空白组相比,¹⁾ $P < 0.05$;与模型组相比,²⁾ $P < 0.05$;与痛泻要方组相比,³⁾ $P < 0.05$ 。

2.3 各组大鼠结肠组织病理变化比较

空白组大鼠结肠组织未见损伤,结构完整,无溃疡或炎性细胞浸润;模型组大鼠结肠组织结构排列紊乱,可见隐窝分支,多发溃疡,杯状细胞减少,黏膜层见中性粒细胞大量浸润,各层分界不清;痛泻要方组大鼠结肠组织肠腺排列较连续,杯状细胞数量稍减,见增生的肉芽组织,炎性细胞浸润减轻;痛泻要方联合穴位埋线组大鼠结肠组织各层结构清晰,黏膜层杯状细胞数量可,肠腺排列规整,可见肉芽组织,炎性细胞浸润显著减轻。见图 1。

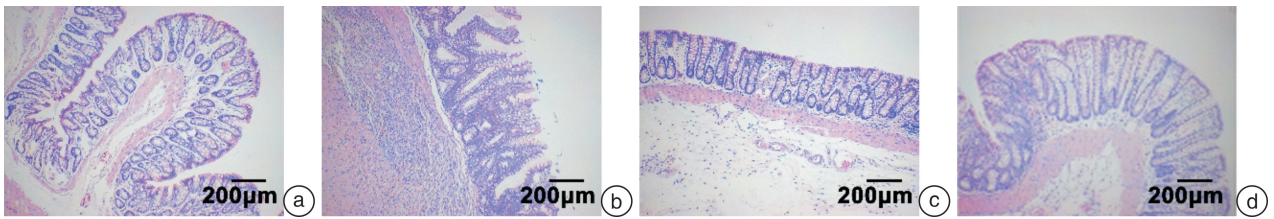
2.4 ELISA 检测大鼠海马组织、血清中 5-HT、SP 的含量

与空白组相比,其余 3 组大鼠海马组织、血清中 5-HT、SP 的含量明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);经治疗后,与模型组相比,痛泻要方联

合穴位埋线组、痛泻要方组海马组织、血清中 5-HT、SP 的含量明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与痛泻要方组相比,痛泻要方联合穴位埋线组海马组织、血清中 5-HT、SP 的含量降低更明显,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

2.5 免疫组织化学法检测大鼠海马、结肠组织中 5-HT、SP 的表达

与空白组相比,其余 3 组大鼠海马及结肠组织中 5-HT、SP 的表达量明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);相较于模型组,痛泻要方组、痛泻要方联合穴位埋线组大鼠海马、结肠组织中 5-HT、SP 的表达量减少,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与痛泻要方组比较,痛泻要方联合穴位埋线组大鼠海马、结肠组织中 5-HT、SP 的表达量减少更为明显,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 5、图 2。



a: 空白组; b: 模型组; c: 痛泻要方组; d: 痛泻要方联合穴位埋线组。

图 1 各组大鼠结肠组织病理改变(苏木精-伊红染色 ×100)

表 4 各组大鼠海马组织及血清中 5-HT、SP 含量的比较

组别	例数	海马组织		血清	
		5-HT	SP	5-HT	SP
空白组	3	1.27 ± 0.13	55.88 ± 1.46	5.34 ± 0.80	14.59 ± 2.80
模型组	3	2.09 ± 0.17 ¹⁾	89.11 ± 2.90 ¹⁾	20.26 ± 2.06 ¹⁾	32.93 ± 1.01 ¹⁾
痛泻要方组	3	1.76 ± 0.05 ¹⁾²⁾	75.33 ± 0.90 ¹⁾²⁾	9.99 ± 0.48 ¹⁾²⁾	26.02 ± 0.71 ¹⁾²⁾
痛泻要方联合穴位埋线组	3	1.50 ± 0.05 ¹⁾²⁾³⁾	63.96 ± 3.45 ¹⁾²⁾³⁾	7.53 ± 0.42 ¹⁾²⁾³⁾	21.03 ± 1.39 ¹⁾²⁾³⁾

与空白组相比,¹⁾ $P < 0.05$;与模型组相比,²⁾ $P < 0.05$;与痛泻要方组相比,³⁾ $P < 0.05$ 。

2.6 RT-qPCR 检测大鼠结肠组织中 TNF-α、IL-6、IL-1β、IL-23 的含量

与空白组相比,其余 3 组大鼠结肠组织中 TNF-α、IL-6、IL-1β、IL-23 的含量显著升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);经治疗后,与模型组相比,痛泻要方联合穴位埋线组、痛泻要方组大鼠结肠组

织中 TNF-α、IL-6、IL-1β、IL-23 的含量明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与痛泻要方组相比,痛泻要方联合穴位埋线组大鼠结肠组织中 TNF-α、IL-6、IL-1β、IL-23 的含量降低更明显,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 6。

表 5 各组大鼠海马、结肠组织中 5-HT、SP 表达的比较

组别	例数	海马组织		结肠组织	
		5-HT	SP	5-HT	SP
空白组	3	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.03	0.13 ± 0.03	0.09 ± 0.01
模型组	3	0.30 ± 0.03 ¹⁾	0.30 ± 0.02 ¹⁾	0.65 ± 0.11 ¹⁾	0.37 ± 0.03 ¹⁾
痛泻要方组	3	0.22 ± 0.04 ¹⁾²⁾	0.23 ± 0.01 ¹⁾²⁾	0.40 ± 0.05 ¹⁾²⁾	0.26 ± 0.00 ¹⁾²⁾
痛泻要方联合穴位埋线组	3	0.15 ± 0.02 ¹⁾²⁾³⁾	0.13 ± 0.01 ¹⁾²⁾³⁾	0.25 ± 0.04 ¹⁾²⁾³⁾	0.14 ± 0.01 ¹⁾²⁾³⁾

与空白组相比,¹⁾ $P < 0.05$;与模型组相比,²⁾ $P < 0.05$;与痛泻要方组相比,³⁾ $P < 0.05$ 。

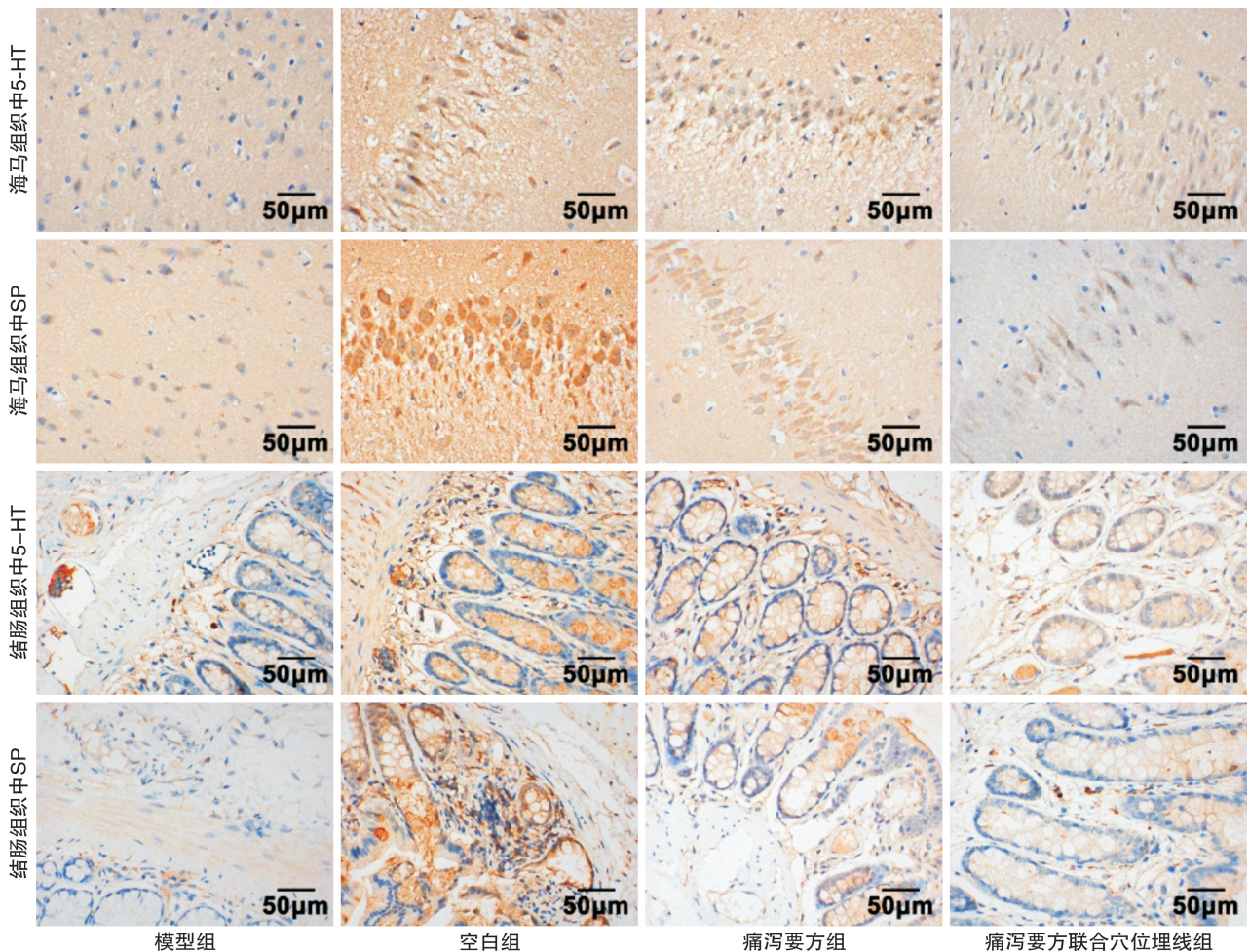


图 2 各组大鼠海马、结肠组织中 5-HT、SP 的免疫组织化学观察 (×400)

表 6 各组大鼠结肠组织中 TNF-α、IL-6、IL-1β、IL-23 含量的比较

组别	例数	TNF-α	IL-6	IL-1β	IL-23
空白组	3	1.30±0.38	1.07±0.37	1.22±0.22	1.15±0.24
模型组	3	7.04±0.74 ¹⁾	9.73±1.75 ¹⁾	7.90±1.36 ¹⁾	9.59±1.12 ¹⁾
痛泻要方组	3	4.25±0.35 ¹⁾²⁾	6.50±0.67 ¹⁾²⁾	5.62±1.14 ¹⁾²⁾	7.03±0.34 ¹⁾²⁾
痛泻要方联合穴位埋线组	3	3.26±0.35 ¹⁾²⁾³⁾	3.74±1.72 ¹⁾²⁾³⁾	3.77±0.49 ¹⁾²⁾³⁾	4.44±0.91 ¹⁾²⁾³⁾

与空白组相比,¹⁾P<0.05;与模型组相比,²⁾P<0.05;与痛泻要方组相比,³⁾P<0.05。

3 讨论

UC 归属于中医学“肠风”“脏毒”“休息痢”“久痢”等范畴^[20],其病程长、复发率高、治愈难度大。痛泻要方由炒白术、炒芍药、炒陈皮、防风组成,为治疗肝郁脾虚型 UC 的首选方剂^[21]。穴位埋线是在穴位局部埋入羊肠线,对穴位产生物理及生化刺激,获得一种“长效针感”效应,从而达到治疗的作用^[22]。中医认为肝郁脾虚是本病的重要病机^[23],素体脾胃虚弱,情志内伤致肝气郁滞,横逆犯脾,脾胃运化失司,大肠传导失节,水湿下注,湿浊蕴结,气血凝滞,肠络受损,血败肉腐,日久迁延,发为此病。现代医学脑肠轴学说中提到,精神心理因素可导致体内脑肠肽分泌异常,从而成为致病的关键,这与中医肝郁脾虚之病机不谋而合,二者存在相同

的理论基础,通过实验研究可探索二者共同的物质基础。

脑肠轴是将认知和情感中枢与神经内分泌、肠神经系统和免疫系统联系起来的双向通路^[24],其物质基础是同时存在于中枢神经系统和胃肠道的脑肠肽。脑肠互动是中枢神经系统与胃肠道之间通过脑肠轴联系,进行交互调节的方式^[25-26]。现代医学认为,UC 患者存在脑肠互动异常^[27]。5-HT、SP 作为重要的脑肠肽,可影响肠道动力,造成分泌功能失衡,促使免疫细胞过度活化、改变肠上皮细胞通透性等,参与多种病理过程的发生^[28-29];5-HT 受体存在肠道、大脑、肝脏等处,5-HT 参与肠道炎症反应,可诱导动物结肠炎性反应加重^[30]。一项研究发现,UC 患者的结肠炎性黏膜较健康者的结

肠黏膜释放更多 5-HT, 5-HT 释放量与 UC 活动度呈正相关; SP 是一种兴奋性神经递质, 可引起胃肠部位平滑肌的收缩, 促进肠蠕动^[31]。SP 主要通过高亲和力神经激肽 1 受体结合^[32], 可在肠道炎症发生、发展中诱导促炎因子的释放^[33]。一项实验将 0.1 μmol/L 的 SP 与 UC 患者结肠组织共培养, 发现 SP 可以诱导炎症因子 TNF-α、IL-6、IL-1β 的产生^[34]。TNF-α、IL-6、IL-1β、IL-23 是具有促炎作用的细胞因子^[35-36], 与 UC 炎症反应密切相关, 炎性细胞在局部组织的浸润及释放炎症因子促进了 UC 的发生。

中枢神经系统的 SP 可调节感觉、运动和情绪, 5-HT 的表达可致精神、行为障碍^[37]。现代实验研究已证实, 痛泻要方可通过脑肠轴途径调节 5-HT 及其受体的表达^[38-39], 也可以下调中枢神经系统中 SP 含量^[40]; 穴位埋线和电针具有相近的效果^[41], 可抑制脊髓神经元控制释放 SP。5-HT_{1A}R 是 5-HT 受体的亚型, 与神经系统的血清素介导的生物反应有重要相关性, 脊髓 5-HT_{1A}R 和 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体的 GluN1 亚基对于炎症病变中穴位埋线的作用机制有重大意义^[42]。本实验中模型组大鼠海马组织中 5-HT、SP 升高, 经干预后其含量显著下降, 其机制可能是痛泻要方直接通过脑肠轴途径下调 5-HT、SP 的表达, 同时在穴位埋线的持续刺激下, 可能存在以脑肠轴为基础的神经反馈过程, 通过脊髓神经元及脊髓 5-HT_{1A}R 和 NMDA 受体水平的下降以负反馈调节的形式降低了 UC 大鼠海马组织中 5-HT、SP 的表达。

本实验结果显示, 与模型组比较, 痛泻要方组及痛泻要方联合穴位埋线组均可改善大鼠一般情况, 可见大鼠行动恢复活泼, 烦躁状态缓解, 大便次数减少且逐渐成形, 肝郁脾虚证候表现好转。同时降低了肠道炎症评价指标, 修复了 UC 模型大鼠结肠组织的病变黏膜, 减少了血清、结肠及海马组织中 5-HT、SP 的表达, 下调结肠组织中 TNF-α、IL-6、IL-1β、IL-23 的水平。各项实验结果对比发现, 痛泻药方联合穴位埋线组较痛泻要方组下调各项指标更为明显, 大鼠宏观表征更趋于正常, 更大程度地缓解了病情, 其机制可能是穴位埋线直接降低 5-HT、SP 水平从而与痛泻要方起到了协同作用, 也可能是穴位埋线辅助了痛泻要方的吸收, 提高了血药浓度从而达到了更优的效果, 但本实验中未能单独设置穴位埋线组, 本课题组也将进一步深化研究穴位埋线对 5-HT、SP 的影响及穴位埋线对痛泻要方的协同作用机制。

4 结论

基于上述研究结果, 本课题组认为 5-HT、SP 参与了 UC 的发病, 且 5-HT、SP 为肝郁脾虚现代证候学的物质基础。痛泻要方联合穴位埋线可以

有效缓解肝郁脾虚型 UC, 其机制可能是通过下调外周及肠道中 5-HT、SP 的表达, 抑制局部炎症因子的分泌, 起到了抗炎作用, 也可能是通过下调海马组织中 5-HT、SP 的表达, 以脑肠互动的形式促进肠道功能恢复、调畅情志, 从多个方面对肝郁脾虚型 UC 大鼠进行调节。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ordás I, Eckmann L, Talamini M, et al. Ulcerative colitis[J]. Lancet, 2012, 380(9853): 1606-1619.
- [2] Uniken Venema WT, Voskuil MD, Dijkstra G, et al. The genetic background of inflammatory bowel disease: from correlation to causality[J]. J Pathol, 2017, 241(2): 146-158.
- [3] Yu FY, Huang SG, Zhang HY, et al. Comparison of 5-hydroxytryptophan signaling pathway characteristics in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome and ulcerative colitis[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(12): 3451-3459.
- [4] Lee D, Albenberg L, Compher C, et al. Diet in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases[J]. Gastroenterology, 2015, 148(6): 1087-1106.
- [5] Ye YL, Pang Z, Chen WC, et al. The epidemiology and risk factors of inflammatory bowel disease[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(12): 22529-22542.
- [6] 吴开春, 梁洁, 冉志华, 等. 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见(2018年·北京)[J]. 中国实用内科杂志, 2018, 38(9): 796-813.
- [7] Harbord M, Eliakim R, Bettenworth D, et al. Third European evidence-based consensus on diagnosis and management of ulcerative colitis. part 2: current management[J]. J Crohns Colitis, 2017, 11(7): 769-784.
- [8] 李宏军, 李国萍, 李宏岩. 穴位埋线治疗溃疡性结肠炎临床观察[J]. 中国针灸, 2006, 26(4): 261-263.
- [9] 朱莹, 袁伟建, 白晓明. 穴位埋线对溃疡性结肠炎淋巴细胞凋亡调控蛋白的影响[J]. 中医杂志, 2007, 48(6): 526-528.
- [10] 朱向东, 李兰珍, 段永强, 等. 痛泻要方对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织病理形态及血清中相关因子含量的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2013, 20(4): 41-43.
- [11] 胡政. 痛泻要方对肝郁脾虚型 UC 模型大鼠 VIP、TGF-β 含量的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2016.
- [12] 郭义. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2008: 414-417.
- [13] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [14] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则: 试行[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 365-365.
- [15] 方肇勤. 大鼠/小鼠辨证论治实验方法学[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 99-101.
- [16] 李玉波. 抑郁症肝郁脾虚证大鼠模型的建立及其生物

- 学基础研究[D]. 北京:北京中医药大学,2014.
- [17] Murano M, Maemura K, Hirata I, et al. Therapeutic effect of intracolonicly administered nuclear factor kappa B (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis [J]. *Clin Exp Immunol*, 2000, 120(1): 51-58.
- [18] Ekstrom GM. Oxazolone-induced colitis in rats: effects of budesonide, cyclosporin A, and 5-aminosalicylic acid[J]. *Scand J Gastroenterol*, 1998, 33(2): 174-179.
- [19] Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, et al. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines[J]. *Clin Exp Immunol*, 1998, 114(3): 385-391.
- [20] 龙丹, 朱莹. 从伏毒论治溃疡性结肠炎[J]. *南京中医药大学学报*, 2022, 38(6): 550-553.
- [21] 张声生, 沈洪, 郑凯, 等. 溃疡性结肠炎中医诊疗专家共识意见(2017)[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(8): 3585-3589.
- [22] 王钰嘉, 于千惠, 卢雨微, 等. 穴位埋线联合艾灸对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织 IL-6/JAK/STAT3 信号通路的影响[J]. *针刺研究*, 2022, 47(6): 525-530.
- [23] 梁玉杰, 张元澧, 朱立鸣. 从肝郁脾虚论治溃疡性结肠炎[J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(7): 1768-1769.
- [24] 张莉华, 方步武. 脑肠轴及其在胃肠疾病发病机制中的作用[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2007, 13(2): 199-201.
- [25] 李夏, 王风云, 吴皓萌, 等. 基于脑-肠互动功能探讨痛泻要方治疗腹泻性肠易激综合征机制的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(20): 229-234.
- [26] 罗琦. 基于心胃相关理论组方中药对 IBS 模型大鼠脑肠轴 CRH 及肥大细胞的干预作用[D]. 广州: 广州中医药大学, 2012.
- [27] 王佳俊, 袁健梅, 王立映, 等. 基于脑肠轴研究黄连厚朴汤治疗小鼠溃疡性结肠炎的作用机制[J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(11): 3038-3048.
- [28] Mashaghi A, Marmalidou A, Tehrani M, et al. Neuropeptide substance P and the immune response[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(22): 4249-4264.
- [29] 臧希. 痛泻要方调控脑肠肽 5-HT、SP、NPY 治疗 IBS 肝郁脾虚证的疏肝止泻机制研究[D]. 太原: 山西中医药大学, 2020.
- [30] Chen ML, Gao L, Chen P, et al. Serotonin-exacerbated DSS-induced colitis is associated with increase in MMP-3 and MMP-9 expression in the mouse colon [J]. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016: 5359768.
- [31] 任天华, 吕敏敏, 安晓萌, 等. 溃疡性结肠炎患者结肠黏膜 5-HT 信号通路的变化特点[J]. *国际消化病杂志*, 2019, 39(3): 222-227.
- [32] Karagiannides I, Pothoulakis C. Substance P, obesity, and gut inflammation[J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2009, 16(1): 47-52.
- [33] 王佳俊, 任救宏, 李勇, 等. SP/NK-1R 系统对溃疡性结肠炎的双重调节及中医药调控的研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(12): 112-118, 295.
- [34] Dai LY, Perera DS, Burcher E, et al. Hemokinin-1 and substance P stimulate production of inflammatory cytokines and chemokines in human colonic mucosa via both NK1 and NK2 tachykinin receptors [J]. *Neuropeptides*, 2020, 82: 102061.
- [35] 娄余, 肖运婷, 朱莹, 等. 基于 NF- κ B 信号通路的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.
- [36] 丁凌辉, 贾育新, 成映霞, 等. 参苓白术散对脾虚湿困型溃疡性结肠炎大鼠结肠 IL-13, IL-23 及 COX-2, CREB 表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(11): 67-72.
- [37] 叶虹玉. 痛泻要方对 IBS 模型肠运动作用与脑-肠轴调控关系的研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2015.
- [38] 张旭飞, 蒋志滨, 高洁, 等. 基于 5-HT 信号系统探讨痛泻要方治疗肝郁脾虚型溃疡性结肠炎的作用机制[J]. *中医学报*, 2021, 36(10): 2116-2121.
- [39] 张薇, 葛文静, 王慧森, 等. 痛泻要方加减引经药防风对肠易激综合征大鼠水液代谢和 5-HT 系统的调控作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(11): 56-62.
- [40] 胡莹, 郑依玲, 梅全喜, 等. 痛泻要方破壁饮片对腹泻型肠易激综合征大鼠脑肠肽的影响[J]. *中药材*, 2020, 43(7): 1726-1731.
- [41] Cui WQ, Sun WS, Xu F, et al. Spinal serotonin 1A receptor contributes to the analgesia of acupoint catgut embedding by inhibiting phosphorylation of the N-methyl-d-aspartate receptor GluN1 subunit in complete Freund's adjuvant-induced inflammatory pain in rats[J]. *J Pain*, 2019, 20(1): 16. e1-16. 16. e16.
- [42] Salazar-Colocho P, Del Rio J, Frechilla D. Serotonin 5-hT1A receptor activation prevents phosphorylation of NMDA receptor NR1 subunit in cerebral ischemia [J]. *J Physiol Biochem*, 2007, 63(3): 203-211.

(收稿日期:2023-01-12)