

·针灸推拿·

本文引用:肖瑶,刘百祥,封迎帅,余闾,吴海金,袁利群. 加味椒艾丸贴敷神阙穴对轮状病毒腹泻小鼠 NOD1/NF- κ B 信号通路的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(7):1042-1047.

加味椒艾丸贴敷神阙穴对轮状病毒腹泻小鼠 NOD1/NF- κ B 信号通路的影响

肖瑶¹, 刘百祥^{1*}, 封迎帅¹, 余闾¹, 吴海金², 袁利群¹

(1. 湖南省人民医院/湖南师范大学附属第一医院, 湖南长沙 410005; 2. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208)

〔摘要〕 **目的** 观察加味椒艾丸贴敷神阙穴对轮状病毒腹泻小鼠 NOD1/NF- κ B 信号通路的影响, 探讨其干预轮状病毒感染性腹泻的机制。**方法** 将 40 只 SPF 级 ICR 乳鼠中的 10 只分为正常对照组, 其余 30 只采用猴轮状病毒 SA11 株悬液灌胃造模 2 d, 造模成功后随机分为模型组、丁桂贴组、加味椒艾丸组, 每组 10 只。药物干预敷贴连续 5 d, 末次给药并禁食 12 h 后取材。收集各组小鼠粪便进行粪便评分; ELISA 检测各组血清 TNF- α 、IL-1 β 、Caspase-1 含量; Western blot 检测各组小鼠小肠组织 p65、NF- κ B 蛋白表达; HE 染色观察各组小鼠肠组织病理形态。**结果** (1) 与正常对照组比较, 模型组小鼠粪便评分明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 丁桂贴组和加味椒艾丸组粪便评分明显降低 ($P < 0.05$)。 (2) 与正常对照组比较, 模型组血清中 TNF- α 、Caspase-1 含量明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 丁桂贴组及加味椒艾丸组 TNF- α 、Caspase-1 含量明显下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与加味椒艾丸组比较, 丁桂贴组 Caspase-1 含量明显降低 ($P < 0.01$)。 (3) 与正常对照组比较, 模型组 p65、NF- κ B 蛋白表达升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 丁桂贴组、加味椒艾丸组 p65、NF- κ B 蛋白表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。 (4) 正常对照组小鼠回肠和结肠黏膜上皮未见异常; 模型组小鼠回肠和结肠黏膜上皮变性坏死, 部分黏膜上皮缺失, 且伴有不同程度的黏膜层血管扩张; 丁桂贴组和加味椒艾丸组小鼠回肠和结肠黏膜上皮部分缺失, 黏膜层血管少量扩张。**结论** 加味椒艾丸贴敷神阙穴能改善轮状病毒腹泻症状, 可能通过降低血清中 TNF- α 、Caspase-1 含量及小肠组织中 p65、NF- κ B 蛋白表达来调控 NOD1/NF- κ B 信号通路。

〔关键词〕 轮状病毒腹泻; 加味椒艾丸; 神阙穴; 敷贴; NOD1/NF- κ B 信号通路; 粪便评分

〔中图分类号〕 R256.34

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.07.012

Effect of Jiawei Jiaoai Pills Applied to Shenque (RN8) Acupoint on NOD1/NF- κ B Signalling Pathway in Rotavirus Diarrhea Rats

XIAO Yao¹, LIU Baixiang^{1*}, FENG Yingshuai¹, YU Tian¹, WU Haijin², YUAN Liqun¹

(1. Hunan Provincial People's Hospital/The First Affiliated Hospital of Hunan Normal University, Changsha, Hunan 410005, China; 2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

〔Abstract〕 Objective To observe the effect of Jiawei Jiaoai Pills applied to Shenque (RN8) acupoint on NOD1/NF- κ B signalling pathway of rotavirus diarrhea rats, and to explore the mechanism in treating rotavirus diarrhea. **Methods** The 10 of 40 SPF neonatal rat randomly selected as the control group, the remaining 30 rats by gastric perfusion of suspension of simian rotavirus SA11 strain for two days to establishment of rotavirus diarrhea rat model, which rats were randomly divided into

〔收稿日期〕 2021-04-14

〔基金项目〕 湖南省自然科学基金科卫联合项目(2019JJ80003)。

〔作者简介〕 肖瑶, 女, 博士, 主治医师, 研究方向: 中西医结合内科。

〔通信作者〕 * 刘百祥, 女, 主任医师, E-mail: 489581159@qq.com。

the model group, Dinggui application group and Jiawei Jiaoai Pills group, with 10 rats in each group. The drug intervention application continued for 5 days. The samples were taken from the 12 hours after the last acupoint application. The feces of mice in each group were collected for diarrhea score; the content of serum TNF- α , IL-1 β , Caspase-1 was detected by ELISA; the expression levels of p65, NF- κ B were analyzed by Western blot; HE staining was used to observe the pathological morphology of intestinal tissues in each group. **Results** (1) Compared with the control group, faeces score of model group was significantly increased ($P<0.01$); compared with the model group, faeces score was obvious decreased in the Dinggui application group and Jiawei Jiaoai Pills group ($P<0.05$). (2) Compared with the control group, the levels of serum TNF- α , Caspase-1 were significantly reduced in model group ($P<0.01$); compared with the model group, the levels of serum TNF- α , Caspase-1 were obvious decline in the Dinggui application group and Jiawei Jiaoai Pills group ($P<0.05$, $P<0.01$); compared with Jiawei Jiaoai Pills group, the level of Caspase-1 was declined in the Dinggui application group ($P<0.01$). (3) Compared with the control group, the expression levels of p65, NF- κ B were higher in model group ($P<0.01$); compared with the model group, the expression levels of p65, NF- κ B were declined in the Dinggui application group and Jiawei Jiaoai Pills group ($P<0.05$, $P<0.01$). (4) There was no abnormality in the ileum and colon mucosal epithelium in the control group, while the ileum and colon mucosal epithelium in the model group was degenerated and necrotic, with partial loss of mucosal epithelium and accompanied by different degrees of vascular dilatation in the mucosal layer. Mucosal epithelium of ileum and colon in Dinggui application group and Jiawei Jiaoai Pills group were partially absent, and blood vessels of mucosal layer were slightly dilated. **Conclusion** Jiawei Jiaoai Pills applied to Shenque (RN8) acupoint can improve the diarrhea symptoms of rotavirus diarrhea of rats, and regulate NOD1/NF- κ B signaling pathway by down regulating the protein expression of serum TNF- α , Caspase-1 and intestinal tissue p65, NF- κ B.

[**Keywords**] rotavirus diarrhea; Jiawei Jiaoai Pills; Shenque (RN8) acupoint; NOD1/NF- κ B signaling pathway; faeces score

轮状病毒(rotavirus, RV)是全球婴幼儿腹泻最常见的病原体,是儿童腹泻的主要原因,尤其是3岁以下儿童发病率较高^[1-2]。RV感染的急性腹泻婴幼儿会伴有明显肠道菌群失衡、血清炎症因子水平升高现象,其发病主要原因是自身免疫功能降低,病原微生物入侵,导致炎症感染,RV感染性肠炎在一定程度上会导致呼吸、心肌及神经系统损害^[3-4]。目前,对于RV腹泻并无特效药物,近年来,研究^[5-6]表明,中医药在治疗腹泻方面具有一定的临床疗效。治疗RV腹泻的早期临床研究^[7-8]表明,加味椒艾丸穴位贴敷涌泉穴或神阙穴治疗婴幼儿RV腹泻较贴脐疗效更优,能缩短病程,并且在治疗婴幼儿急性腹泻的临床疗效优于单纯西医治疗。但加味椒艾丸穴位贴敷治疗RV腹泻具体作用机制尚不明确,本次动物实验通过研究加味椒艾丸贴敷神阙穴对RV腹泻小鼠的NOD1/NF- κ B信号通路的影响,从分子生物学水平阐明加味椒艾丸贴敷治疗RV腹泻的作用机制,为临床治疗RV腹泻提供理论依据。

1 材料

1.1 动物

SPF级ICR乳鼠40只,鼠龄9~10d,体质量(7.9 \pm 0.4)g,动物伦理审批号:2020(3)009,许可证号:SYXK(湘)2020-0015。实验前所有乳鼠粪便予RV抗原快速检测试剂检测结果为阴性,乳鼠由湖南省人民医院临床研究所实验动物中心提供。

1.2 RV毒种及增殖

感染病毒为猴RV细胞系(RV SA11株),由湖南省人民医院临床研究所实验动物中心提供。罗猴胎肾细胞MA104细胞系用于病毒增殖(批号:HZ-CC100930,武汉华美生物工程有限公司)

1.3 药物

加味椒艾丸药物组成:川椒、干姜、赤石脂、乌梅、熟艾、黄连、黄芩、槟榔,均由药剂专业人员专门采购,以上8味药各3g等比配伍,研磨成粉备用,用醋调匀成糊状封存,使用时制成直径0.5cm \times

0.5 cm,质量约 0.5 g 的药帖,置于医用胶布上备用^①。加味椒艾丸(湖南振兴中药有限公司),丁桂儿脐贴 1.6 g/贴(批号:2002901A,亚宝药业集团股份有限公司)。

1.4 主要试剂

小鼠 RV 抗原 ELISA 试剂盒(批号:CSB-EQ027718 MO)、Caspase-1 ELISA 试剂盒(批号:CSB-EL004543 MO)、小鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α) ELISA 试剂盒(批号:CSB-E04741m)、小鼠白介素 1 β (IL-1 β) ELISA 试剂盒(批号:CSB-E08054m)均购自武汉华美生物工程有限公司;A 群 RV 抗原检测试剂盒[批号:2020101285,英科新创(厦门)科技有限公司];兔抗 NF- κ B1 多克隆抗体(批号:13586,美国 CST 公司);p65[批号:sc-8008,圣克鲁斯生物技术(上海)有限公司]。

1.5 主要仪器

352 型酶标仪、AC8 型洗板机均购自上海雷勃生物技术有限公司;TG16W 型微量高速离心机(湘仪离心机仪器有限公司);GNP-9080 型隔水式恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司);PP-1105 型电泳仪(北京凯元信瑞仪器有限公司);TGL-16c 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂);TGL-16 型冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);L4158 型扫描仪[爱普生(中国)有限公司]。

2 方法

2.1 模型的建立

40 只 SPF 级 ICR 乳鼠实验性饲养 1 周后,随机选取 10 只设为正常对照组,其余 30 只小鼠进行造模,采用经口灌服(自然吸允法)法,用微量加样器将猴 RV SA11 株悬液 50 μ L/d 经乳鼠口灌服,1 次/d,连续 2 d^②。分别单笼饲养,第 3 天收集造模组小鼠粪便,用无菌棉拭子采集粪便于无菌试管中,用 RV 抗原快速检测试剂检测,结果呈阳性表明 RV 腹泻模型造模成功。

2.2 分组及给药

模型建立后按随机数字表法分为模型组、加味椒艾丸组、丁桂儿脐贴 3 组,每组 10 只。正常对照组与模型组分别用淀粉调糊敷贴神阙穴,药物干预组

分别用加味椒艾丸、丁桂儿脐贴敷贴神阙穴,1 次/d,敷贴时间 12 h,连续 5 d。

2.3 穴位定位

参照“十五”国家规范统编教材《实验针灸学》实验动物鼠标准穴位图谱定位及拟人对照点法定位^③。神阙穴:根据类比原理,按人体该穴的体表穴位法,取小鼠胸腹正中,胸骨柄上缘至外生殖器连线上 3/4 与下 1/4 交界点。

2.4 观察指标

2.4.1 粪便观察 基于粪便的颜色、形态对粪便进行评分^[11-12],1 分:正常大便;2 分:淡黄色软便;3 分:淡黄色稀便;4 分:水样便。分值 ≥ 2 分为腹泻,无法获得粪便的乳鼠视为无腹泻。

2.4.2 ELISA 检测血清中 TNF- α 、IL-1 β 、Caspase-1 含量 末次给药后,禁食禁饮 12 h,腹腔注射苯巴比妥钠麻醉,以摘眼球取血法收集血样,ELISA 检测各组小鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、Caspase-1 的水平。具体检测方法参照试剂盒提供的流程标准操作。

2.4.3 Western blot 检测肠组织中 p65、NF- κ B 蛋白表达 将胃幽门下端到盲肠前端的肠组织冲洗,取 1/3 肠组织用 PBS 缓冲液漂洗 2~3 次,匀浆后加入蛋白提取试剂。刮下细胞使其充分裂解,30 min 后收集上清液,取一部分使用 BCA 法测定蛋白浓度。剩余部分变性后于 -20 $^{\circ}$ C 保存,按照说明书配制 10% 的丙烯酰胺凝胶,电泳 30 min、转膜 150 min,封闭 1 h,一抗稀释液 4 $^{\circ}$ C 摇床过夜,用 TBST 洗 3 次,二抗室温孵育 30 min,用 TBST 在室温下摇床上洗 4 次后显影成像。

2.4.4 HE 染色观察肠组织病理改变 对剩余的 2/3 结肠与回肠组织进行脱水、浸蜡,并且包埋、切片后,再用 HE 染色对切片进行染色,镜下观察组织病理形态变化。

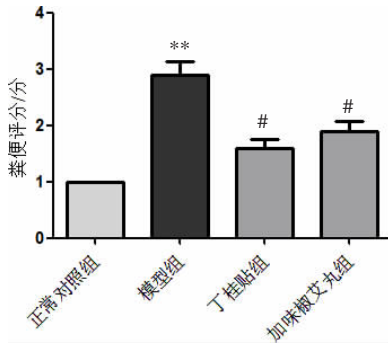
2.5 统计学分析

使用 SPSS 21.0 统计学软件整理数据,计量资料用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,数据满足正态性及方差齐性者用多因素方差分析,两两比较用 *LDS* 检验,若不满足方差齐性用 *Dunnnett T3* 检验。否则用非参数检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠粪便评分比较

与正常对照组比较,模型组小鼠粪便评分明显升高($P<0.01$);与模型组比较,丁桂贴组及加味椒艾丸组评分明显下降($P<0.05$);丁桂贴组与加味椒艾丸组评分比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见图1。

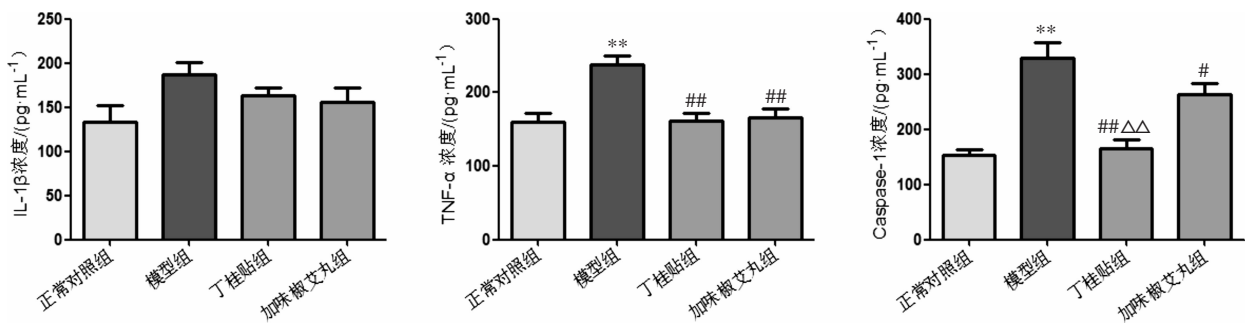


注:与正常对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$ ($n=10, \bar{x} \pm s$)

图1 各组小鼠粪便评分图

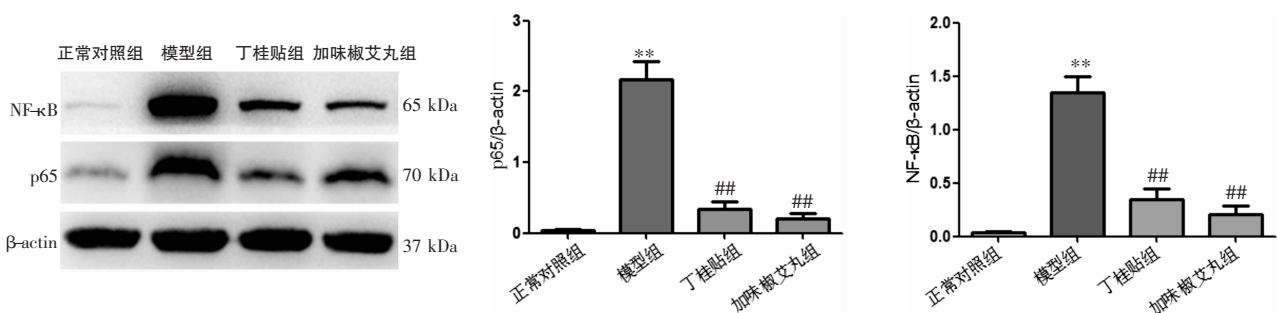
3.2 各组小鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、Caspase-1 含量比较

各组小鼠 IL-1 β 组间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。与正常对照组比较,模型组小鼠 TNF- α 、Caspase-1 表达明显升高,差异有统计学意义($P<$



注:与正常对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与加味椒艾丸组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ ($n=10, \bar{x} \pm s$)

图2 各组小鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、Caspase-1 含量



注:与正常对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ ($n=3, \bar{x} \pm s$)

图3 各组小鼠小肠中 p65、NF- κ B 蛋白量表达

0.01);与模型组比较,丁桂贴组与加味椒艾丸组 TNF- α 、Caspase-1 表达明显下调,差异有统计学意义($P<0.01, P<0.05$);与加味椒艾丸组比较,丁桂贴组 Caspase-1 含量明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。见图2。

3.3 各组小鼠小肠 p65、NF- κ B 蛋白表达比较

与正常对照组比较,模型组 p65、NF- κ B 蛋白表达显著上调,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,丁桂贴组与加味椒艾丸组 p65、NF- κ B 蛋白表达明显下调,差异有统计学意义($P<0.01$);与丁桂贴组比较,加味椒艾丸组 p65、NF- κ B 差异无统计学意义($P>0.05$)。见图3。

3.4 各组小鼠肠组织 HE 染色结果

正常对照组小鼠回肠和结肠黏膜上皮未见异常;模型组小鼠回肠和结肠黏膜上皮变性坏死,部分黏膜上皮缺失,且伴有不同程度的黏膜层血管扩张;丁桂贴组和加味椒艾丸组小鼠回肠和结肠黏膜上皮部分缺失,黏膜层血管少量扩张。见图4。

4 讨论

RV 腹泻属于中医学“泄泻”范畴,其发病多与

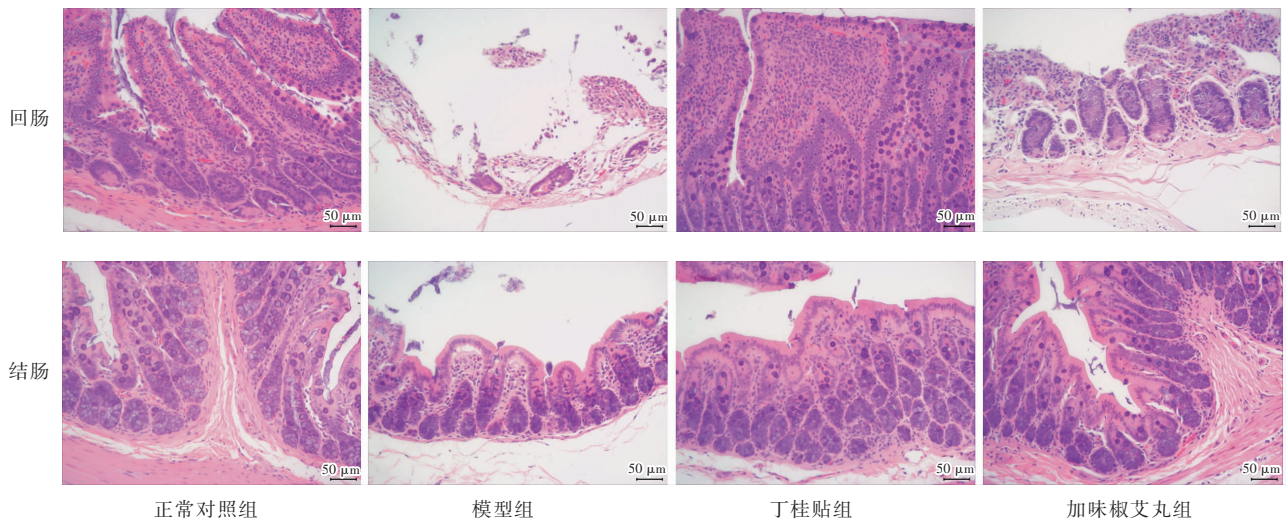


图4 回肠、结肠组织 HE 染色图($\times 200$)

感受外邪,内伤脾胃有关。而小儿脏腑多娇嫩,感受外邪易伤脾胃,导致泄泻。神阙穴属于任脉之穴位,《铜人腧穴针灸图经》载录神阙穴能“治泄利不止”,此亦 RV 腹泻最为常见与最主要的临床症状。现代解剖学证实,神阙穴^[13]周围血运丰富,具有丰富的静脉网,且该处皮肤较薄,有利于药物渗透吸收。前期研究^[8]显示,加味椒艾丸具有燥湿运脾、导滞清痢之功,运用该药贴敷神阙穴有利于药物直达病所,增强疗效。

RV 腹泻与相关炎症因子破坏肠上皮机械屏障有关,如 TNF- α 、IL-6 炎症因子启动炎症反应并形成级联效应损伤肠黏膜导致肠内感染^[14]。NF- κ B 信号通路诱导表达的靶基因主要有 TNF- α 、IL 如 IL-1、IL-6 及 IL-8 等,而 NF- κ B 信号通路介导的细胞凋亡主要与 Caspase 的激活有关^[15]。在疾病的病理进程中,病毒感染后肠组织细胞在相关因子的作用下激活 NF- κ B 信号通路,肠上皮细胞中过度的炎症小体激活足以导致腹泻和病理改变^[16]。RV 腹泻可能的病理机制与肠道炎症反应和细胞凋亡有关,如 RV 感染性腹泻患者在早期的血清检测中 IFN- γ 、IL-6、TGF- β 等炎症因子水平较正常者升高^[17-18]。在 Caspase 家族中,Caspase-1 蛋白具有对 IL 前体的活化作用,参与细胞凋亡,同样 NOD 蛋白活化 NF- κ B 也会介导炎症发生^[19]。如 NOD 样受体家族中含有吡啶结构域-3 (NLRP3) 的炎性小体通过 Caspase-1 的切割和随后的 IL-1 β 和 IL-18 的激活和分

泌负责炎症反应的激活^[20]。在 NOD1 信号通路中,泛素化在信号级联反应中发挥重要作用,可导致 NF- κ B 的亚基 p65、p50 的核易位,NOD 蛋白可介导激活 NF- κ B,通过 NF- κ B 相关信号通路介导下游炎症细胞因子的表达^[21]。

本实验研究表明,经口灌猴 RV 造模的小鼠血清 TNF- α 、Caspase-1 含量明显升高($P < 0.01$);在肠组织蛋白表达检测中,p65、NF- κ B 蛋白表达显著升高($P < 0.01$),表明肠 RV 感染可导致 NOD1/NF- κ B 信号通路激活,导致相关炎症因子释放入血,引起肠组织黏膜层血管扩张,并出现回肠和结肠黏膜上皮变性坏死等病理改变。经加味椒艾丸贴敷干预后,小鼠血清中 TNF- α 、Caspase-1 含量明显下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),p65、NF- κ B 蛋白表达明显下调 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),提示加味椒艾丸敷贴神阙穴通过 NOD1/NF- κ B 信号通路发挥抗炎作用,对治疗 RV 感染性腹泻小鼠的可能作用机制是抑制炎症相关的 TNF- α 、Caspase-1 因子及 NF- κ B 蛋白的表达,起到缓解肠道炎症作用,从而改善腹泻症状及肠组织病理。然而 NOD1/NF- κ B 信号通路尚有诸多分子,且加味椒艾丸敷贴神阙穴治疗 RV 腹泻对相关基因表达调控作用机制尚不明确,有待后续进一步的研究。

参考文献

- [1] 张野.沈阳地区 5 岁以下儿童秋冬季轮状病毒腹泻的流行病学研究[J].航空航天医学杂志,2021,32(2):166-167.

- [2] 忽欣怡,李 雲,李学尧,等.小儿感染性腹泻病因研究进展[J].临床军医杂志,2021,49(1):114-116.
- [3] 章瑀颖,龙 君,王祖蓉,等.急性腹泻婴幼儿轮状病毒感染特征及相关危险因素分析[J].临床消化病杂志,2020,32(4):240-244.
- [4] 杨应雄.轮状病毒性肠炎肠外器官损伤的临床研究[J].中国继续医学教育,2020,12(32):138-140.
- [5] 张 莎,王 文,李 哲,等.穴位敷贴治疗腹泻型肠易激综合征的系统评价[J].湖南中医药大学学报,2017,37(9):1002-1007.
- [6] 李翠联,马 琛,曹 彬.葛根芩连丸治疗成人急性感染性腹泻的研究[J].湖南中医药大学学报,2013,33(4):22-23.
- [7] 刘百祥,余 闾,张 兵,等.椒艾丸穴位贴敷治疗婴幼儿轮状病毒腹泻 57 例[J].湖南中医杂志,2015,31(3):9-11.
- [8] 刘百祥,曹 衍,杨曼琼,等.加味椒艾丸辨证贴敷治疗婴幼儿急性腹泻 60 例疗效观察[J].湖南中医杂志,2016,32(11):7-9.
- [9] 杨蒙蒙,罗佳波,陈 文,等.人轮状病毒感染昆明小鼠乳鼠模型的建立[J].中国比较医学杂志,2009,19(3):45-49,88-89.
- [10] 余曙光,郭 义.实验针灸学[M].上海:上海科学技术出版社,2009.
- [11] BOSCHUIZEN J A, REIMERINK J H, KORTELAND-VAN MALE A M, et al. Changes in small intestinal homeostasis, morphology, and gene expression during Rotavirus infection of infant mice[J]. *Journal of Virology*, 2003, 77(24): 13005-13016.
- [12] 宋丽军,赵文昌,谭晓梅,等.Wa 株轮状病毒感染昆明小鼠乳鼠腹泻模型的建立及影响因素考察[J].辽宁中医药大学学报,2013,15(4):11-14.
- [13] 姜劲峰,徐旺芳,俞兴根,等.基于血管生物学的神阙穴特异性解析[J].中国针灸,2017,37(12):1304-1308.
- [14] 金佳宁,王 伟,王伟明.人感染轮状病毒致病机制中西医研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2021,23(4):98-101.
- [15] 邓冰湘,卢金冬.NF- κ B 信号通路在脑缺血再灌注损伤中的作用及中药有效组(成)分的干预研究[J].湖南中医药大学学报,2014,34(7):54-58.
- [16] RAUCH I, DEETS K A, JI D X, et al. NAIP-NLRC4 inflammasomes coordinate intestinal epithelial cell expulsion with eicosanoid and IL-18 release via activation of caspase-1 and -8[J]. *Immunity*, 2017, 46(4): 649-659.
- [17] 张付丽,李 燕,周海澜,等.轮状病毒感染性腹泻患者感染早期血清中 IL-6, IFN- γ , TGF- β 水平的检验价值[J].国际医药卫生导报,2020,26(16):2441-2443.
- [18] 周晓凤,曹志群,王晓妍,等.轮状病毒与 TLRs 的关系及其中医药研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(17):202-208.
- [19] 郑 媛,安 丽,仇 杰,等.NOD1 和 NOD2 介导的信号通路研究进展[J].中国医药科学,2015,5(23):49-52.
- [20] NAKATA A, NADATANI Y, WATANABE T, et al. NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3 inflammasome activation exacerbates 5-fluorouracil-induced small intestinal mucositis via interleukin-1 β activation[J]. *Digestion*, 2021, 102(2): 298-312.
- [21] ELIA P P, TOLENTINO Y F, BERNARDAZZI C, et al. The role of innate immunity receptors in the pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. *Mediators of Inflammation*, 2015, 2015: 936193.

(本文编辑 匡静之 周 旦)