

·针灸推拿·

本文引用: 周睿璇, 彭嘉颖, 向晶, 焦子远, 张冠林, 王萍, 卓越, 张泓. 电针刺激上巨虚、天枢对溃疡性结肠炎模型大鼠 Th17 相关特异性因子及 Treg 的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(5): 877-884.

# 电针刺激上巨虚、天枢对溃疡性结肠炎模型大鼠 Th17 相关特异性因子及 Treg 的影响

周睿璇<sup>1</sup>, 彭嘉颖<sup>1</sup>, 向晶<sup>1</sup>, 焦子远<sup>1</sup>, 张冠林<sup>1</sup>, 王萍<sup>2</sup>, 卓越<sup>1\*</sup>, 张泓<sup>1\*</sup>

1. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208; 2. 湖南省常德市武陵区疾病预防控制中心, 湖南常德 415000

**[摘要]** 目的 观察电针刺激上巨虚、天枢对溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)模型大鼠辅助性 T 细胞 17(T helper cell 17, Th17)相关特异性因子及调节性 T 细胞(T regulatory cell, Treg)的影响,探讨合募配穴理论指导下电针刺激大肠腑下合穴、募穴治疗 UC 的作用机制,为特定穴的临床应用提供实验依据。**方法** 50 只 SD 大鼠随机分出 10 只作为空白组,剩余 40 只 UC 模型造模成功的大鼠随机分为模型组、合募配穴组、天枢组和上巨虚组,每组 10 只。2,4,6-三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS)/乙醇法制备 UC 大鼠模型。合募配穴组予以电针刺激双侧天枢、上巨虚,天枢组予以电针刺激双侧天枢,上巨虚组予以电针刺激双侧上巨虚,每次 20 min,每天 1 次,共 10 次。观察大鼠一般情况,计算大鼠疾病活动指数(disease active index, DAI);肉眼观察大鼠结肠黏膜损伤情况,评估结肠黏膜损伤指数(colonic mucosa damage index, CMDI),HE 染色观察结肠形态学变化;流式细胞术检测大鼠脾脏 CD4<sup>+</sup>T 细胞中 Treg 细胞百分比,荧光定量 PCR 检测大鼠结肠组织中转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )、维甲酸相关孤儿受体  $\gamma$  t(retinoid acid related orphan receptor gamma t, ROR $\gamma$  t)、白细胞介素-17A(interleukin-17A, IL-17A)mRNA 相对表达量。**结果** (1)与空白组比较,模型组一般情况不佳,肠黏膜坏死,有明显溃疡面,炎性浸润严重,DAI 及 CMDI 评分显著升高( $P<0.05$ ),Treg 细胞百分比及 TGF- $\beta$  mRNA 相对表达量显著降低( $P<0.05$ ),ROR $\gamma$  t、IL-17A mRNA 相对表达量显著升高( $P<0.05$ );(2)与模型组比较,合募配穴组、天枢组及上巨虚组一般情况明显好转,炎性浸润和结肠黏膜坏死情况明显减轻,DAI 及 CMDI 评分显著降低( $P<0.05$ ),Treg 细胞百分比及 TGF- $\beta$  mRNA 相对表达量显著升高( $P<0.05$ ),ROR $\gamma$  t、IL-17A mRNA 相对表达量显著降低( $P<0.05$ );(3)与天枢组和上巨虚组比较,合募配穴组 Treg 细胞百分比显著升高( $P<0.05$ ),ROR $\gamma$  t mRNA 相对表达量显著降低( $P<0.05$ )。**结论** 电针刺激大肠合募穴上巨虚、天枢对 UC 有良好的治疗作用,合募配穴疗效优于单穴疗效,其作用机制可能是通过调节 Th17/Treg 平衡,降低炎性细胞因子表达,以调控肠黏膜免疫失衡状态,恢复肠黏膜免疫稳态,减轻炎症反应。

**[关键词]** 溃疡性结肠炎;电针;辅助性 T 细胞 17/调节性 T 细胞平衡;合募配穴;维甲酸相关孤儿受体  $\gamma$  t;免疫平衡

**[中图分类号]**R245.9

**[文献标志码]**A

**[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.05.017

## Effects of electroacupuncture at 'Shangjuxu' (ST37) and 'Tianshu' (ST25) on Th17-related specificity factors and Treg cells in rats with ulcerative colitis

ZHOU Ruixuan<sup>1</sup>, PENG Jiaying<sup>1</sup>, XIANG Jing<sup>1</sup>, JIAO Ziyuan<sup>1</sup>, ZHANG Guanlin<sup>1</sup>, WANG Ping<sup>2</sup>, ZHUO Yue<sup>1\*</sup>, ZHANG Hong<sup>1\*</sup>

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Changde Wuling District

Center for Disease Control and Prevention, Changde, Hunan 415000, China

**[Abstract]** **Objective** To observe the effects of electroacupuncture (EA) at 'Shangjuxu' (ST37) and 'Tianshu' (ST25), the lower

**[收稿日期]**2023-02-04

**[基金项目]**湖南省研究生科研创新项目(CX20210682);湖南中医药大学一流学科研究生开放基金项目(2020ZXYJH37)。

**[第一作者]**周睿璇,女,硕士研究生,研究方向:经脉-脏腑相关规律与机制研究。

**[通信作者]**\* 张泓,男,教授,博士研究生导师,E-mail:zh5381271@sina.com;卓越,男,博士研究生,E-mail:nedved823@qq.com。

He-sea point and front-Mu point of the large intestine respectively, on T helper cell 17 (Th17)-related specificity factors and T regulatory (Treg) cells in rats with ulcerative colitis (UC), and to explore the mechanism of EA at these two points in treating UC under the guidance of the theory of "He and Mu point combination", so as to provide experimental evidence for the clinical application of the specific points. **Methods** A total of 10 out of 50 SD rats were randomly selected as blank group, and the remaining 40, after being successfully used to establish UC models, were randomly subdivided into model group, "He and Mu point combination" group, 'Tianshu' (ST25) group and 'Shangjuxu' (ST37) group, with 10 rats in each group. The UC rat model was established by enema of 2-4-6 trinitrobenzene sulfonic acid (100 mg/kg) + 50% ethanol (0.25 mL). EA (10 Hz/50 Hz) was respectively performed at bilateral 'Shangjuxu' (ST37) and 'Tianshu' (ST25) of the rats in "He and Mu point combination" group, bilateral 'Shangjuxu' (ST37) in 'Shangjuxu' (ST37) group and bilateral 'Tianshu' (ST25) in 'Tianshu' (ST25) group for 20 min, once a day, for a total of 10 times. The general condition of the rats was recorded to calculate the score of disease activity index (DAI, 0-4 points). Colonic tissue was sampled for colonic mucosal damage index (CMDI) scoring by naked eyes, and histopathological changes were observed by HE staining. Flow cytometry was used to determine the percentage of Treg cells in rat spleen CD4<sup>+</sup>T cells. The relative quantity of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), retinoid acid related orphan receptor gamma t (ROR $\gamma$  t) and interleukin-17A (IL-17A) mRNA in colonic tissue was examined by quantitative real-time PCR. **Results** Compared with blank group, with poor general condition, intestinal mucosal necrosis, obvious ulcers and severe inflammatory infiltration, the scores of DAI and CMDI in model group significantly increased ( $P<0.05$ ), so did the relative quantity of ROR $\gamma$  t and IL-17A mRNA ( $P<0.05$ ), while the percentage of Treg cells, and the relative quantity of TGF- $\beta$  mRNA significantly decreased ( $P<0.05$ ); compared with model group, with the better general condition and obviously alleviated inflammatory infiltration and intestinal mucosal necrosis, the scores of DAI and CDMI in "He and Mu point combination" group, 'Tianshu' (ST25) group and 'Shangjuxu' (ST37) group significantly dropped ( $P<0.05$ ), so did the relative quantity of ROR $\gamma$  t and IL-17A mRNA ( $P<0.05$ ), while the percentage of Treg cells and the relative quantity of TGF- $\beta$  mRNA significantly elevated ( $P<0.05$ ); in contrast with 'Tianshu' (ST25) group and 'Shangjuxu' (ST37) group, the percentage of Treg cells in "He and Mu point combination" group significantly went up ( $P<0.05$ ), while the relative quantity of ROR $\gamma$  t mRNA significantly went down ( $P<0.05$ ). **Conclusion** EA at 'Shangjuxu' (ST37) and 'Tianshu' (ST25) under the guidance of "He and Mu point combination" theory has good therapeutic effects on UC rats. The efficacy of He and Mu point combination is better than that of single acupoint selection, and its mechanism of action may be regulating Th17/Treg balance and reducing the expression of inflammatory cytokines, so as to regulate intestinal mucosal immune imbalance, restore intestinal mucosal immune homeostasis and relieve inflammatory response.

[**Keywords**] ulcerative colitis; electroacupuncture; T helper cell 17/T regulatory cell balance; He and Mu point combination; retinoid acid related orphan receptor  $\gamma$  t; immune balance

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是慢性非特异性肠道炎症性疾病,以腹痛、黏液血便、大便形状/质地改变为常见临床症状表现<sup>[1]</sup>。研究表明,UC在全球范围内的发病率逐年上升,且UC病情易反复、病程长、癌变风险高,已成为世界公认的难治性疾病<sup>[2-3]</sup>。

UC发病机制尚未明确,在诸多发病因素中免疫因素至关重要,有研究表明,肠黏膜免疫失衡是导致UC发生、发展及转归过程的直接原因<sup>[4]</sup>,辅助性T细胞17(T helper cell 17, Th17)/调节性T细胞(T regulatory cell, Treg)平衡失调被认为是导致肠黏膜免疫失衡的主要原因<sup>[5]</sup>。已有研究表明,针灸治疗UC疗效明确,可通过多个靶点保护肠黏膜,抑制其炎症

反应<sup>[6-7]</sup>。下合穴与募穴是中医经典中针灸治疗相应脏腑病变的特定选穴,临床上采用合募配穴治疗相应脏腑病疗效显著<sup>[8-10]</sup>,但是对于治疗UC这一典型大肠腑病的确切治病机制和配伍规律的佐证还有待深入的实验研究。前期有研究表明,电针刺激上巨虚、天枢能明显改善UC模型大鼠临床症状及炎症反应<sup>[11-13]</sup>。同时,有多项研究证明,针灸能调节UC模型大鼠Th17/Treg平衡<sup>[14-15]</sup>。本研究利用2,4,6-三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS)/乙醇法制备UC大鼠模型,选择大肠腑下合穴上巨虚和募穴天枢,观察电针刺激上巨虚、天枢对UC模型大鼠脾脏CD4<sup>+</sup>T细胞中Treg百分比、结肠组织中转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )、

维甲酸相关孤儿受体  $\gamma$  t (retinoid acid related orphan receptor gamma t, ROR $\gamma$  t) 和白细胞介素-17A (interleukin-17A, IL-17A) mRNA 表达的影响, 探讨合募配穴理论指导下电针刺刺激大肠腑下合穴、募穴治疗 UC 的作用机制, 为特定穴的临床治疗提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

50 只 SPF 级健康 SD 大鼠, 雌雄各半, 体质量 (200±20) g。由湖南中医药大学实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号: SYXK(湘)2019-0009。饲养温度 24~26 °C, 相对湿度 50%~70%。动物实验伦理编号: LL2022022305, 实验中对动物的所有处置均严格遵循 2006 年中华人民共和国科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》<sup>[16]</sup>。

### 1.2 主要试剂及药品

5% TNBS(美国 Sigma 公司, 批号: SLCM5598); 乙醇(上海国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20210723); 戊巴比妥钠(德国 Merck KGaA 公司, 编号: P3761, 批号: 2203161); 蒸馏水(常德比克曼生物科技有限公司, 批号: B-ZLS500); 无菌去离子水(北京雷根生物技术有限公司, 批号: 0516A22); Stain Buffer(美国 BD 公司, 批号: 2063415); FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2, HiScript II Q RT Super Mix for qPCR (+gDNA wiper), ChanQ Universal SYBR qPCR Master Mix(均为南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 货号依次为: RC112-01, R233-01, Q711-02); 大鼠脾脏淋巴细胞分离液试剂盒(天津灏洋生物制品科技有限责任公司, 货号: LTS1083PK); Fite anti-rat CD4, APC anti-rat CD25, PE anti-mouse/rat/human FOXP3, True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set(均来自美国 Biolegend 公司, 批号依次为: B336282, B350930, B346122, B360640)。

### 1.3 主要仪器

实时荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司, 型号: Light Cycler480 II); 基因扩增仪(德国耶拿公司, 型号: Biometra TAdvanced 96 SG); 分析流式细胞仪(美国 BD 公司, 型号: BD LSRFortessa SORP); 高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司, 型号: Sorvall ST

16R); 台式高速离心机(湖南湘立科学仪器有限公司, 型号: CenLee 20K); 电针治疗仪(苏州医疗用品厂, 型号: SDZ-V); 环球牌一次性使用无菌平柄针灸针(苏州针灸用品有限公司, 规格: 0.25 mm×25 mm)。

## 2 方法

### 2.1 造模方法

采用改良后 TNBS/乙醇法建立溃疡性结肠炎 SD 大鼠模型<sup>[11,17-18]</sup>。所有造模大鼠常规饲养 7 d 后, 造模前 24 h 禁食不禁水, 称重, 腹腔注射戊巴比妥钠(30 mg/kg), 完全麻醉后, 取直径 2 mm 的 12 cm 长聚丙烯管, 剪开数处侧孔, 从肛门轻柔缓慢插入 8 cm 至结肠部位, 快速注入 TNBS(100 mg/kg)+50% 乙醇 0.25 mL 造模液, 再注入约 0.4 mL 的空气, 以保证造模液全部灌注肠腔, 紧捏肛门, 提取大鼠尾巴使其头部朝下、尾部朝上 3 min, 加深造模液对肠壁浸润, 并防止药液溢出, 待大鼠清醒后正常喂养。观察记录大鼠经过造模后的行为学改变(包括懒动、厌食、便秘或软、大便次数增加、大便带黏液), 有一项记 1 分, 无则记 0 分, 累计总分, 2 分及以上即提示造模成功<sup>[19]</sup>。

### 2.2 分组方法

根据前期预实验数据, 14 d 内模型大鼠死亡率约为 20%(n=10), 50 只 SD 大鼠适应性饲养 7 d 后按随机数字表法随机抽取 10 只为空白组, 剩余 40 只 UC 模型造模成功后二次随机分为模型组、合募配穴组、天枢组和上巨虚组, 每组 10 只。空白组给予与造模组等量生理盐水灌肠。

### 2.3 干预方法

穴位定位参照“十三五”国家规划统编教材《实验针灸学》<sup>[20]</sup>大鼠标准穴位图谱和华兴邦等制定的《大鼠穴位图谱的研制》<sup>[21]</sup>。造模成功 24 h 后, 将大鼠置于特制鼠板上, 仰卧位固定。合募配穴组予双侧天枢 3 mm 直刺, 上巨虚 5 mm 直刺, 天枢组予双侧天枢 3 mm 直刺, 上巨虚组予双侧上巨虚 5 mm 直刺。针刺后接电针治疗仪, 合募配穴组同侧穴位接同对电极, 天枢组与上巨虚组双侧穴接同对电极, 电针时间为 20 min, 每天 1 次, 共 10 次。电针参数为疏密波(疏波 10 Hz/密波 50 Hz), 强度定于该治疗仪“1”

档左右,电源电压9 V,以大鼠肢体末端轻微抖动为宜。模型组行同种固定方式固定20 min,每天1次,共10次。空白组不干预。

## 2.4 一般情况观察

观察各组大鼠一般情况,精神、毛色光泽变化情况、体质量、大便性状及便血情况,以及饮水、摄食、行动等行为学改变情况。

采用DAI评分量表<sup>[22]</sup>评估大鼠疾病活动指数(disease active index, DAI): $DAI=(\text{体质量下降分数}+\text{大便性状分数}+\text{便血情况分数})/3$ 。具体评分细则为:体质量下降率为0,大便正常,无便血,积0分;体质量下降率大于0小于等于5%,积1分;体质量下降率大于5%小于等于10%,大便松散,大便隐血阳性,积2分;体质量下降率大于10%小于等于15%,积3分;体质量下降率大于15%,大便呈稀便,大便显性出血,积5分。

## 2.5 肉眼结合HE染色观察结肠组织形态学变化

治疗结束后,腹腔注射戊巴比妥钠(30 mg/kg),大鼠完全麻醉后,沿腹正中线打开大鼠腹腔,剖取远端结肠部分约8 cm,纵向剪开后用预冷生理盐水冲洗,先行结肠形态损伤指数(colonic mucosa damage index, CMDI)评分<sup>[23]</sup>(具体评分细则见表1),再从肠近端至远端取两份100 mg结肠组织。一份迅速置于-80℃低温冰箱保存,以备检测结肠组织相关蛋白表达用;另一份于4%多聚甲醛中固定,石蜡包埋,行结肠组织HE染色,镜下观察HE染色结果。

表1 CMDI评分细则

评分	结肠黏膜损伤情况
0	结肠无损伤
1	结肠黏膜轻度水肿但没有溃疡
2	结肠黏膜充血且肠黏膜粗糙呈颗粒状
3	结肠黏膜溃疡形成,直径0~1 cm
4	溃疡直径1~2 cm,但肠管与外周脏器无粘连
5	溃疡直径1~2 cm,肠管增厚,肠管与周围脏器粘连严重

## 2.6 流式细胞术检测大鼠脾脏CD4<sup>+</sup>T细胞中Treg细胞百分比

每组随机抽取5只大鼠,剖取200 mg脾脏,依照大鼠脾脏淋巴细胞分离液试剂盒指示,于70 μm筛网上辅以匀浆液剪碎研磨脾脏,收集细胞悬液,经

500 g离心10 min,弃上清;用样本稀释液重悬,调整浓度为 $2 \times 10^8/\text{mL}$ ,取15 mL离心管,加入4 mL淋巴分离液,将稀释后悬液加于分离液液面上,500 g离心20 min;离心后吸取淋巴细胞层细胞,加入10 mL清洗液,重悬混匀,250 g离心弃上清液;加入5 mL清洗液,重悬混匀,250 g离心弃上清液;重复上一步骤再次洗涤,最后加入0.5 mL PBS,重悬混匀为单个核细胞悬液,行流式细胞术检测。

## 2.7 RT-qPCR检测大鼠结肠组织中TGF-β、RORγ t、IL-17A mRNA含量

每组随机抽取5只大鼠,取20 mg结肠组织,根据FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2试剂盒柱式提取总RNA,根据HiScript II Q RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)试剂盒逆转录后得到cDNA,作为扩增模板,扩增条件如下。预变性:95℃ 30 s;循环反应:95℃ 10 s,60℃ 30 s,循环40次;熔解曲线:95℃ 15 s,60℃ 60 s,95℃ 15 s。根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目标mRNA的相对表达量,引物序列详见表2。

表2 引物序列

基因名	引物序列	长度/bp
RORγ t	正向 5'-CTACGCTGGAGACCTTCTACG-3'	240
	反向 5'-GCACATTCTGACGAGGACACTTC-3'	240
IL-17A	正向 5'-TGCCTGATGCTGTTGCTGCTAC-3'	200
	反向 5'-GGTGAAGTGAACGGTTGAGGTAG-3'	200
TGF-β	正向 5'-CGCTGAACCAAGGACGCGGAATAC-3'	384
	反向 5'-GTGTGTCCAGGCTCCAAATGTAGG-3'	384
β-actin	正向 5'-CTGGCTCCTAGCACCATGAA-3'	196
	反向 5'-AAAACGCAGCTCAGTAACAGTC-3'	196

## 2.8 统计学方法

所有数据均用SPSS 20.0软件进行处理。计量资料均以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。若各组数据符合正态分布且方差齐,采用单因素方差分析,组间进一步比较用LSD法;不符合正态分布或方差不齐者则采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 各组大鼠一般情况观察

干预过程中,除空白组外,其余组别均有大鼠死亡,包括模型组2只、合募配穴组1只、天枢组2只、上巨虚组2只。死亡时间主要集中在造模后5 d内,所有死亡大鼠均在死亡前几天有腹胀、不排大便以

及食欲不佳表现。经解剖死亡大鼠后发现,死亡大鼠均有大便堆集在结肠溃疡上段,同时,死亡大鼠均出现不同程度的结肠穿孔。

空白组一般情况良好,二便无明显异常。其余大鼠造模 24 h 后观察出现肉眼便血、稀便、精神萎靡、食量骤减,前 3 天体质量逐天降低,多于第 4、5 天开始缓慢恢复食欲及体质量。模型组大鼠还可见毛色无泽、肛周不洁,甚者出现黏液脓血样便或水样便。合募配穴组、天枢组及上巨虚组在治疗后上述情况均明显改善,且合募配穴组大鼠的腹泻明显改善和大便性状恢复时间基本早于天枢组与上巨虚组 1~2 d。

### 3.2 各组大鼠 DAI 评分比较

与空白组比较,模型组评分显著上升( $P<0.05$ );与模型组比较,合募配穴组、天枢组与上巨虚组评分显著下降( $P<0.05$ )。详见表 3。

表 3 各组大鼠 DAI 评分比较( $\bar{x}\pm s$ ,分)

组别	<i>n</i>	DAI 评分
空白组	10	0.00±0.00
模型组	8	2.00±0.50 <sup>#</sup>
合募配穴组	9	0.59±0.52 <sup>△</sup>
天枢组	8	0.83±0.47 <sup>#△</sup>
上巨虚组	8	0.83±0.47 <sup>#△</sup>

注:与空白组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ 。

### 3.3 各组 CDMI 评分及大鼠结肠组织病理形态比较

与空白组比较,模型组评分显著上升( $P<0.05$ );与模型组比较,合募配穴组、天枢组和上巨虚组评分均显著下降( $P<0.05$ )。详见表 4。

肉眼观察各组大鼠结肠发现:空白组结肠组织表面光滑完整,呈浅淡粉白色,未见肠壁增厚,结肠内部未见水肿、充血、溃疡等病理表现;模型组结肠组织可见部分肠壁增厚,部分肠段质地变硬,内部可

表 4 各组大鼠 CDMI 评分比较( $\bar{x}\pm s$ ,分)

组别	<i>n</i>	CDMI 评分
空白组	10	0.00±0.00
模型组	8	2.88±0.83 <sup>#</sup>
合募配穴组	9	1.33±0.87 <sup>#△</sup>
天枢组	8	1.38±0.92 <sup>#△</sup>
上巨虚组	8	1.38±0.92 <sup>#△</sup>

注:与空白组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ 。

见局部红肿充血、溃疡面深浅不一,甚者在剖取时与脏器粘连;合募配穴组、天枢组和上巨虚组结肠黏膜溃疡、充血、水肿明显好转。光镜下观察,空白组大鼠结肠黏膜完整,隐窝规则排列,未观察到明显炎性浸润;模型组大鼠结肠组织隐窝结构改变,出现明显炎性异常浸润,可见明显隐窝炎;合募配穴组、天枢组与上巨虚组大鼠结肠组织均可见少量基底部浆细胞增多、少量杯状细胞黏液分泌减少,隐窝结构较模型组规则,炎性浸润好转。详见图 1。

### 3.4 大鼠脾脏 CD4<sup>+</sup>T 细胞中 Treg 细胞百分比比较

与空白组比较,模型组 Treg 细胞百分比显著下降( $P<0.05$ );与模型组比较,合募配穴组、天枢组和上巨虚组的 Treg 细胞百分比显著上升( $P<0.05$ );与天枢组和上巨虚组比较,合募配穴组的 Treg 细胞百分比显著上升( $P<0.05$ )。详见图 2、表 5。

### 3.5 各组大鼠结肠组织 TGF- $\beta$ 、ROR $\gamma$ t、IL-17A mRNA 表达的比较

与空白组相比,模型组大鼠结肠组织中 TGF- $\beta$  表达显著下降( $P<0.05$ ),ROR $\gamma$  t 及 IL-17A 表达显著上升( $P<0.05$ );与模型组相比,合募配穴组、天枢组及上巨虚组大鼠的结肠组织中 TGF- $\beta$  表达均显著上升( $P<0.05$ ),ROR $\gamma$  t 及 IL-17A 表达均显著下降( $P<0.05$ );与天枢组及上巨虚组相比,合募配穴组大鼠的结肠组织中 ROR $\gamma$  t 表达显著下降( $P<0.05$ )。详见表 6。

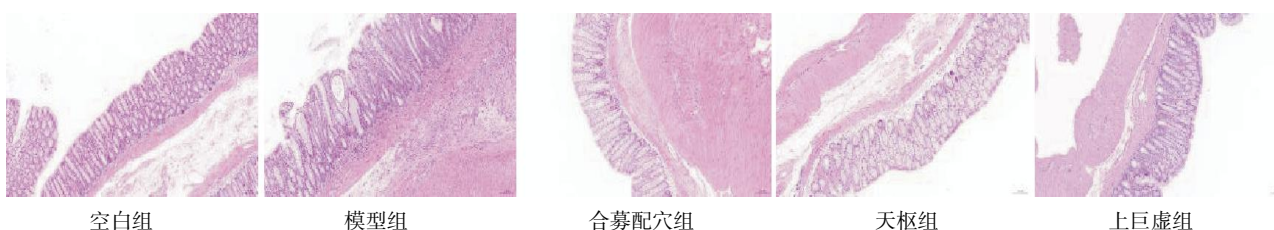
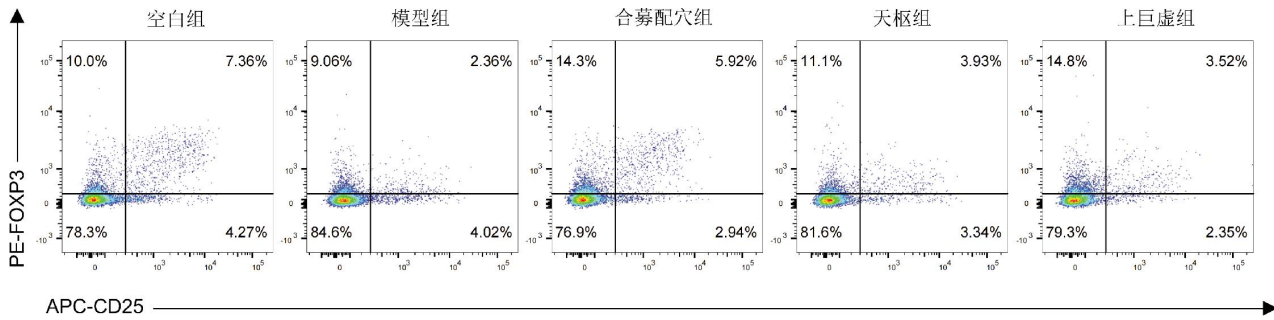


图 1 各组大鼠结肠组织形态学比较(HE,×100)



图 2 各组大鼠脾脏 CD4<sup>+</sup>T 细胞中 Treg 细胞百分比表 5 各组大鼠脾脏 CD4<sup>+</sup>T 细胞中 Treg 细胞百分比比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	n	Treg 细胞百分比
空白组	5	7.64±0.51
模型组	5	2.44±0.29 <sup>#</sup>
合募配穴组	5	5.69±0.64 <sup>#△*&amp;</sup>
天枢组	5	4.21±1.22 <sup>#△</sup>
上巨虚组	5	3.70±0.71 <sup>#△</sup>

注:与空白组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ;与天枢组比较,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ;与上巨虚组比较,<sup>&</sup> $P<0.05$ 。

表 6 各组大鼠结肠组织 TGF- $\beta$ , ROR $\gamma$  t, IL-17A mRNA 表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	TGF- $\beta$	ROR $\gamma$ t	IL-17A
空白组	5	0.99±0.25	0.95±0.88	0.86±0.15
模型组	5	0.37±0.09 <sup>#</sup>	2.31±0.17 <sup>#</sup>	3.28±0.54 <sup>#</sup>
合募配穴组	5	0.86±0.12 <sup>△</sup>	1.13±0.20 <sup>△*&amp;</sup>	1.19±0.40 <sup>△</sup>
天枢组	5	0.70±0.16 <sup>#△</sup>	1.42±0.30 <sup>#△</sup>	1.40±0.57 <sup>△</sup>
上巨虚组	5	0.67±0.14 <sup>#△</sup>	1.42±0.27 <sup>#△</sup>	1.53±0.46 <sup>#△</sup>

注:与空白组相比,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与模型组相比,<sup>△</sup> $P<0.05$ ;与天枢组相比,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ;与上巨虚组相比,<sup>&</sup> $P<0.05$ 。

## 4 讨论

UC 发病机制尚未完全明确,现有研究认为 UC 发病机制主要包括黏膜屏障缺陷、免疫学因素、肠道菌群失调、肠道感染及精神神经因素。在众多发病因素中以免疫因素最为重要,其中 Th17/Treg 平衡失调是导致肠黏膜免疫失调及肠黏膜屏障受损的主要原因,与 UC 发生发展密切相关<sup>[5,24-25]</sup>。临床研究显示,在 UC 患者外周血及肠黏膜组织中的 Th17 细胞明显增多,而 Treg 细胞明显减少,Th17/Treg 比例明显失衡,并与肠道炎症活动度密切相关<sup>[26-27]</sup>。

CD4<sup>+</sup>T 细胞是适应性免疫应答的关键效应细胞,受不同的微环境影响,可分化为不同的细胞亚

群。其中,Th17 细胞是一类具有促炎作用的 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群,通过释放白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、IL-17A 等多种炎症因子调节炎症发生,Treg 细胞则是 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群中具有抗炎作用的一种细胞,能够通过释放细胞因子白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)和 TGF- $\beta$ ,并通过直接接触 Th 细胞表面来抑制其他辅助性 T 细胞(T helper cells, Th)亚型,参与对抗细菌激增的免疫反应,起到免疫抑制作用<sup>[28]</sup>。研究显示,Treg 细胞分泌的细胞因子可能可以抑制效应 T 细胞,对维持肠黏膜稳态具有重要意义<sup>[29]</sup>。Th17 细胞与 Treg 细胞在功能上相互拮抗,共同维持肠道免疫稳态。在环境、遗传等多重因素的作用下,原始 CD4<sup>+</sup>T 细胞分化向 Th17 偏移,Th17 细胞增多,IL-17A 等炎症因子分泌增加,Treg 细胞的分化受到抑制,TGF- $\beta$ 、IL-10 等细胞因子分泌减少,肠黏膜免疫系统紊乱,是导致 UC 肠道免疫炎症反应过度激活和难于自限的直接原因<sup>[30]</sup>。TGF- $\beta$  是诱导 CD4<sup>+</sup>T 细胞向 Treg 分化的重要因子,并可抑制其向 Th17 的分化,已有研究证实,在高浓度 TGF- $\beta$  的微环境下,ROR $\gamma$  t 表达被抑制,CD4<sup>+</sup>T 细胞分化向 Treg 方向偏移<sup>[31]</sup>。ROR $\gamma$  t 是 Th17 细胞的特异性转录因子,在 ROR $\gamma$  t 缺陷小鼠中,Th17 细胞已被证明显著减少<sup>[18]</sup>。有大量文献证明,ROR $\gamma$  t 对 CD4<sup>+</sup>T 细胞分化向 Th17 偏移的积极影响<sup>[32-33]</sup>。ROR $\gamma$  t 的表达上升,会促使 CD4<sup>+</sup>T 细胞向 Th17 方向偏移,Th17 细胞在 CD4<sup>+</sup>T 细胞中的占比增加,而 Th17 细胞分泌的标志性炎症因子 IL-17A 的含量及表达也会明显升高,进而诱导其他促炎因子和趋化因子,导致炎症反应加剧<sup>[34]</sup>。

中医学将溃疡性结肠炎归属于“痢疾”“肠癖”“久痢”等范畴<sup>[35]</sup>,主要病机包括湿热下注、肝郁脾

虚、脾肾阳虚等类型,病位在大肠,涉及脾、肝、肾、肺诸脏,为本虚标实之证。下合穴与募穴是中医经典中针灸治疗相应脏腑病变的特定选穴,对于“合募配穴”,古今医家及医籍均有大量的论述和记载,如:《针灸大成·杂病穴法歌》载“足三里配中脘……主治胃脘痛”;《针灸大成·百症赋》有“天枢配巨虚主治痢疾”等。大量文献报道,合募配穴应用于临床针灸治病,疗效显著<sup>[36-37]</sup>。本研究取上巨虚、天枢两穴,上巨虚为足阳明胃经之腧穴,大肠之下合穴,主治胃肠病。研究证明,针刺上巨虚能减轻 UC 模型大鼠肠黏膜损伤,抑制炎症反应,产生治疗效果<sup>[12-13]</sup>。天枢属足阳明胃经之腧穴、大肠经之募穴,为大肠经气所聚之处,为气机升降之枢纽,针刺天枢通过神经、体液调节,抑制胃肠蠕动,起到缓急止痛的效果<sup>[38]</sup>。下合穴重在通降,募穴主重在内腑或阳病,两者相结合治疗六腑疾病,可到达协同作用,增加疗效。下合穴其位在下,与脏腑纵向关联;募穴其位在上,与脏腑有横向关联,属上下近远配穴。阴阳互助,一降一升,纵横协调,远近相配,其腑病可除。

本研究中模型组 ROR $\gamma$  t、IL-17A 表达显著升高,提示 Th17 细胞比例上升,TGF- $\beta$  表达显著下降,脾脏 CD4<sup>+</sup>T 细胞中 Treg 细胞百分比显著降低,提示 Treg 细胞比例降低,二者说明 CD4<sup>+</sup>T 细胞分化向 Th17 方向偏移,大鼠体内 Th17/Treg 失衡;合募配穴组、天枢组及上巨虚组 Treg 百分比、TGF- $\beta$  mRNA 表达显著上升,提示 Treg 细胞比例上升,ROR $\gamma$  t、IL-17A mRNA 表达显著降低,提示 Th17 细胞比例下降,二者说明电针治疗下,CD4<sup>+</sup>T 细胞分化向 Treg 细胞偏移,Th17/Treg 平衡失衡得到改善。同时,TGF- $\beta$  是抗炎因子,IL-17A 是促炎因子,TGF- $\beta$  mRNA 表达的上升和 IL-17A mRNA 表达的下降,可提示电针治疗下 UC 大鼠体内炎症反应减轻。与天枢组及上巨虚组比较,合募配穴组 Treg 细胞比例显著升高,ROR $\gamma$  t 表达显著降低,提示合募配穴对于 Th17/Treg 平衡影响优于单穴,TGF- $\beta$  表达量有升高趋势,IL-17 有降低趋势,但差异无统计学意义,原因可能在于样本量偏少,后期实验加大样本量或可得到更准确的结果。

综上所述,电针对 UC 有良好的治疗作用,且合募配穴疗效优于单穴疗效,其作用机制可能是通过

提高 TGF- $\beta$  表达、抑制 ROR $\gamma$  t 表达,促使 CD4<sup>+</sup>T 细胞分化向 Treg 细胞偏移,调节 Th17/Treg 平衡,降低 IL-17A 表达,以调控肠黏膜免疫失衡状态,恢复肠黏膜免疫稳态,减轻炎症反应。

## 参考文献

- [1] SEGAL J P, LEBLANC J F, HART A L. Ulcerative colitis: An update[J]. *Clinical Medicine (London, England)*, 2021, 21(2): 135-139.
- [2] LUI R N S, NG S C. The same intestinal inflammatory disease despite different genetic risk factors in the east and west?[J]. *Inflammatory Intestinal Diseases*, 2016, 1(2): 78-84.
- [3] WEI S C, SOLLANO J, HUI Y T, et al. Epidemiology, burden of disease, and unmet needs in the treatment of ulcerative colitis in Asia[J]. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 2021, 15(3): 275-289.
- [4] DE LANGE K M, BARRETT J C. Understanding inflammatory bowel disease via immunogenetics[J]. *Journal of Autoimmunity*, 2015, 64: 91-100.
- [5] LUO S, WEN R Y, WANG Q, et al. Rhubarb Peony Decoction ameliorates ulcerative colitis in mice by regulating gut microbiota to restoring Th17/Treg balance[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2019, 231: 39-49.
- [6] 秦亚梅. 针灸结合白头翁汤治疗溃疡性结肠炎大鼠的实验研究[J]. *临床医学研究与实践*, 2021, 6(21): 9-11.
- [7] 林思睿, 张何骄子, 吴巧凤. 针灸对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织中信号转导与转录活化因子 3 和低氧诱导因子-1 $\alpha$  表达的影响[J]. *针刺研究*, 2020, 45(9): 696-701, 719.
- [8] 谢林延, 卢家庆. 针灸联合中药内服治疗慢性溃疡性结肠炎临床观察[J]. *中医临床研究*, 2022, 14(16): 39-41.
- [9] 赵强, 刘雅男, 乔培超, 等. “以火逐龙火”法配合合募配穴针刺治疗急性溃疡性结肠炎的临床研究[J]. *中国中医急症*, 2018, 27(2): 233-236.
- [10] 黄磊, 蔡植, 朱莹, 等. 溃结宁膏穴位贴敷治疗脾肾阳虚型溃疡性结肠炎: 随机对照研究[J]. *中国针灸*, 2013, 33(7): 577-581.
- [11] 曹倩茹, 凌晨, 刘梦君, 等. 电针“上巨虚”和“天枢”对溃疡性结肠炎大鼠核转录因子- $\kappa$ B/NOD 样受体热蛋白结构域 3 信号通路相关蛋白表达的影响[J]. *针刺研究*, 2022, 47(4): 314-320.
- [12] 田浩梅, 陈楚淘, 陈平国, 等. 电针不同穴位对溃疡性结肠炎模型大鼠血清 IL-6、IL-10 含量的影响[J]. *湖南中医杂志*, 2012, 28(3): 123-125.
- [13] 艾坤, 易细芹, 张泓, 等. 电针上巨虚等下合穴对溃疡性结肠炎模型大鼠 TNF- $\alpha$  及 NF- $\kappa$ B 的影响[J]. *中华中医药学刊*,

- 2016, 34(3): 544-547, 3.
- [14] 王程玉林, 曾琳岚, 耿煜, 等. 电针对溃疡性结肠炎小鼠脾脏淋巴细胞 Treg/Th 17 免疫平衡的影响[J]. 针刺研究, 2016, 41(1): 55-59.
- [15] 张博, 熊壮, 姜鑫. 自拟扶正平溃汤联合针灸治疗慢性溃疡性结肠炎的疗效及对肠道菌群失调和 Th17/Treg 细胞免疫平衡的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27(11): 1164-1167, 1171.
- [16] 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见[S]. 国科发财字[2006]398号, 2006-09-30.
- [17] 马秀兰, 王秀萍, 王佳林, 等. 大鼠溃疡性结肠炎模型的建立[J]. 中医药临床杂志, 2021, 33(9): 1754-1759.
- [18] IVANOV I I, MCKENZIE B S, ZHOU L, et al. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells[J]. Cell, 2006, 126(6): 1121-1133.
- [19] 惠毅, 闫曙光, 李京涛, 等. 大鼠慢性溃疡性结肠炎模型建立方法探讨[J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(10): 62-65.
- [20] 唐勇. 实验针灸学[M]. 3版. 上海: 上海科学技术出版社, 2021: 146.
- [21] 华兴邦, 周浩良. 大鼠穴位图谱的研制[J]. 实验动物与动物实验, 1991(1): 1-5.
- [22] COONEY R M, WARREN B F, ALTMAN D G, et al. Outcome measurement in clinical trials for Ulcerative Colitis: Towards standardisation[J]. Trials, 2007, 8: 17.
- [23] LUK H H, KO J K, FUNG H S, et al. Delineation of the protective action of zinc sulfate on ulcerative colitis in rats[J]. European Journal of Pharmacology, 2002, 443(1/2/3): 197-204.
- [24] LAI H M, YANG Z B, LOU Z H, et al. Root extract of *Lindera aggregata* (Sims) kosterm. modulates the Th17/treg balance to attenuate DSS-induced colitis in mice by IL-6/STAT3 signaling pathway[J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 12: 615506.
- [25] FAN Y H, FAN Y Q, LIU K F, et al. Edible bird's nest ameliorates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in C57BL/6J mice by restoring the Th17/treg cell balance[J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 12: 632602.
- [26] GONG Y, LIN Y F, ZHAO N, et al. The Th17/treg immune imbalance in ulcerative colitis disease in a Chinese Han population[J]. Mediators of Inflammation, 2016, 2016: 7089137.
- [27] 刘雪平, 赵中松, 李建华, 等. 溃疡性结肠炎治疗前后 Treg 及 Th17 细胞的变化及意义[J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(29): 4525-4529.
- [28] VALENCIA X, STEPHENS G, GOLDBACH-MANSKY R, et al. TNF downmodulates the function of human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> T-regulatory cells[J]. Blood, 2006, 108(1): 253-261.
- [29] HUNDORFEAN G, NEURATH M F, MUDTER J. Functional relevance of T helper 17 (Th17) cells and the IL-17 cytokine family in inflammatory bowel disease[J]. Inflammatory Bowel Diseases, 2012, 18(1): 180-186.
- [30] YAN J B, LUO M M, CHEN Z Y, et al. The function and role of the Th17/treg cell balance in inflammatory bowel disease[J]. Journal of Immunology Research, 2020, 2020: 8813558.
- [31] ZHOU L, LOPES J E, CHONG M M, et al. TGF- $\beta$ -induced Foxp3 inhibits T(H) 17 cell differentiation by antagonizing ROR $\gamma$  function[J]. Nature, 2008, 453(7192): 236-240.
- [32] MICKAEL M E, BHAUMIK S, BASU R. Retinoid-related orphan receptor ROR $\gamma$ t in CD4<sup>+</sup> T-cell-mediated intestinal homeostasis and inflammation[J]. The American Journal of Pathology, 2020, 190(10): 1984-1999.
- [33] ZHANG C, JU J Y, WU X H, et al. Tripterygium wilfordii polyglycoside ameliorated TNBS-induced colitis in rats via regulating Th17/treg balance in intestinal mucosa[J]. Journal of Inflammation Research, 2021, 14: 1243-1255.
- [34] YANG X O, NURIEVA R, MARTINEZ G J, et al. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs[J]. Immunity, 2008, 29(1): 44-56.
- [35] 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.
- [36] 邢家铭, 盛雪燕, 张延菊, 等. 合募配穴理论在针灸治疗胃溃疡中的应用[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(2): 411-413.
- [37] 张迪, 袁星星, 王炳予, 等. 合募配穴灸法治疗慢性萎缩性胃炎临床观察[J]. 上海针灸杂志, 2017, 36(12): 1401-1405.
- [38] 柏琳, 任玉兰, 李宁, 等. 募穴在临床诊断中应用的文献计量学分析[J]. 中医杂志, 2017, 58(1): 64-68.

(本文编辑 匡静之)