

·针灸推拿·

本文引用: 陈琳, 邱渊铭, 赵洋, 阳晶晶, 曹思慧, 何灏龙, 杨宗保, 常小荣, 刘琼, 刘密. 电针对应激性溃疡小鼠十二指肠黏膜内 CD4、CD8、SIgA 及炎症因子表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(9): 1672-1678.

## 电针对应激性溃疡小鼠十二指肠黏膜内 CD4、CD8、SIgA 及炎症因子表达的影响

陈琳<sup>1</sup>, 邱渊铭<sup>2</sup>, 赵洋<sup>1</sup>, 阳晶晶<sup>1</sup>, 曹思慧<sup>1</sup>, 何灏龙<sup>1</sup>, 杨宗保<sup>2</sup>, 常小荣<sup>1</sup>, 刘琼<sup>1\*</sup>, 刘密<sup>1\*</sup>

1. 湖南中医药大学针灸推拿与康复学院, 湖南长沙 410208; 2. 厦门大学医学院, 福建厦门 361102

**【摘要】目的** 观察电针对应激性溃疡小鼠的十二指肠黏膜结构与组织内白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ )、免疫功能相关分化抗原 4(cluster of differentiation 4, CD4)、分化抗原 8(cluster of differentiation 8, CD8)及分泌型免疫球蛋白 A(secretory immunoglobulin A, SIgA)的影响,探讨电针对十二指肠黏膜损伤修复的作用机制。**方法** SPF 级雄性 KM 小鼠 40 只,随机分为空白组( $n=12$ )和造模组( $n=28$ ),造模组采用束缚冷应激法复制应激性溃疡模型。模型制备成功后,将造模组 24 只小鼠随机分为模型组、手三里组及足三里组,每组 8 只。空白组与模型组小鼠每天进行束缚处理;手三里组及足三里组小鼠则进行电针干预,每日 1 次,连续 7 d。采用 HE 染色观察十二指肠黏膜组织形态变化,ELISA 和 RT-PCR 法检测十二指肠黏膜组织中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、CD4、CD8、SIgA 含量与 mRNA 表达。**结果** HE 染色结果显示,空白组小鼠十二指肠黏膜组织上皮完整,结构清晰,腺管结构正常;与空白组比较,模型组十二指肠黏膜组织固有层明显变薄,有广泛的炎性细胞浸润;与模型组比较,手三里组及足三里组病理切片提示十二指肠黏膜组织固有层厚度增加,固有层细胞增加,排列整齐。与空白组比较,模型组十二指肠黏膜组织内 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、SIgA 蛋白含量及 mRNA 表达量明显升高( $P<0.01$ ),CD4、CD8 蛋白含量及 mRNA 表达量下降( $P<0.01$ )。与模型组相比,足三里组 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、SIgA 蛋白含量及 mRNA 表达量下降( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ),CD4、CD8 蛋白含量及 mRNA 表达量升高( $P<0.05$  或  $P<0.01$ );手三里组 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  蛋白含量及 mRNA 表达量下降( $P<0.05$ )。与手三里组相比,足三里组 CD8 蛋白含量及 mRNA 表达量上升( $P<0.05$ ),SIgA mRNA 表达量下降( $P<0.05$ )。**结论** 电针干预对应激性溃疡小鼠十二指肠黏膜损伤具有修复作用,其作用机制可能是通过调节十二指肠黏膜组织中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、CD4、CD8 及 SIgA 表达水平,降低炎症反应,改善免疫功能紊乱,从而促进十二指肠黏膜的修复,且足三里穴较手三里穴调节十二指肠黏膜免疫功能的效果更佳。

**【关键词】** 应激性溃疡;十二指肠黏膜;电针;足三里;手三里;作用机制

**【中图分类号】**R245.9

**【文献标志码】**A

**【文章编号】**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.09.018

## Effects of electroacupuncture on the expressions of CD4, CD8, SIgA and inflammatory factors in duodenal mucosa of mice with stress ulcer

CHEN Lin<sup>1</sup>, QIU Yuanming<sup>2</sup>, ZHAO Yang<sup>1</sup>, YANG Jingjing<sup>1</sup>, CAO Sihui<sup>1</sup>, HE Haolong<sup>1</sup>, YANG Zongbao<sup>2</sup>,  
CHANG Xiaorong<sup>1</sup>, LIU Qiong<sup>1\*</sup>, LIU Mi<sup>1\*</sup>

1. School of Acupuncture-moxibustion, Tuina and Rehabilitation, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. School of Medicine, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361102, China

**【收稿日期】**2023-05-10

**【基金项目】**国家自然科学基金项目(81202770);湖南省自然科学基金项目(2023JJ30457);湖南省中医药科研计划项目(C2022027);国家中医药管理局 2022 年青年岐黄学者培养项目(国中医药人教函[2022]256 号);湖南省“芙蓉学者奖励计划”项目(湘教通[2020]58 号);湖南省中医药管理局一般项目(B2023109);长沙市自然科学基金项目(kq2208183);湖南中医药大学校级科研基金项目(2021XJJ013);湖南中医药大学校级研究生创新课题(2022CX108)。

**【第一作者】**陈琳,女,硕士研究生,研究方向:针灸治病机制的研究。

**【通信作者】**\* 刘密,男,博士,教授,博士研究生导师,E-mail:newmean9722@qq.com;刘琼,女,博士,讲师,E-mail:121181998@qq.com。

**[Abstract] Objective** To observe the effects of electroacupuncture on the duodenal mucosa structure and interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ , tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), cluster of differentiation (CD4), cluster of differentiation (CD8) and secretory immunoglobulin (SIgA) in duodenal mucosal tissue of mice with stress ulcer, so as to explore the mechanism of electroacupuncture on the repair of duodenal mucosal injury. **Methods** Forty SPF male KM mice were randomly divided into blank group ( $n=12$ ) and modeling group ( $n=28$ ). The stress ulcer model was replicated by restraint cold stress in the modeling group. After successful modeling, 24 mice in the modeling group were randomly subdivided into model group, "Shousanli" (LI10) group, and "Zusanli" (ST36) group, with 8 mice in each group. Mice in the blank group and model group were subjected to daily restraint treatment, while mice in the "Shousanli" (LI10) and "Zusanli" (ST36) groups were treated with electroacupuncture, once a day, continuously for 7 d. The morphological changes of duodenal mucosal tissue were observed by HE staining, and the content and mRNA expressions of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , CD4, CD8, and SIgA in duodenal mucosal tissue were examined by ELISA and RT-PCR. **Results** HE staining showed that the epithelium of duodenal mucosal tissue in the blank group was intact, the structure was clear, and the glandular tube structure was normal. Compared with the blank group, the lamina propria of duodenal mucosal tissue in the model group was significantly thinner, with extensive inflammatory cell infiltration. Compared with the model group, the pathological sections of "Shousanli" (LI10) and "Zusanli" (ST36) group showed thicker lamina propria of duodenal mucosal tissue and increased lamina propria cells with neat arrangement. Compared with the blank group, the protein content and mRNA expressions of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and SIgA in duodenal mucosal tissue of the model group significantly increased ( $P<0.01$ ), while the protein content and mRNA expressions of CD4 and CD8 decreased ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the protein content and mRNA expressions of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and SIgA in the "Zusanli" (ST36) group decreased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), while the protein content and mRNA expressions of CD4 and CD8 increased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). The protein content and mRNA expressions of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in the "Shousanli" (LI10) group decreased ( $P<0.05$ ). Compared with the "Shousanli" (LI10) group, the protein content and mRNA expression of CD8 in the "Zusanli" (ST36) group increased ( $P<0.05$ ), but the mRNA expression of SIgA decreased ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Electroacupuncture intervention has repair effects on duodenal mucosal injury in mice with stress ulcer, and its mechanism of action may be through regulating the expressions of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , CD4, CD8, and SIgA in duodenal mucosal tissue, reducing inflammatory response, and improving immune dysfunction to promote the repair of duodenal mucosal. Moreover, "Zusanli" (ST36) has better effects on regulating duodenal mucosal immune function than "Shousanli" (LI10).

**[Keywords]** stress ulcer; duodenal mucosa; electroacupuncture; "Zusanli" (ST36); "Shousanli" (LI10); mechanism of action

应激性溃疡是临床常见胃肠疾病之一,其主要临床特征以胃和十二指肠黏膜的溃疡、糜烂为主,且病程后期病变部位多集中于十二指肠部<sup>[1]</sup>。随着社会的快速发展,人们的压力日益增大,加上环境污染、饮食作息不规律等社会问题,使人们长期处于有害的应激状态之中,致使胃肠溃疡的患病率逐年攀升<sup>[2]</sup>。目前,临床上多选用克拉霉素、甲硝唑、奥美拉唑、西咪替丁及盐酸度洛西汀等药物联合应用为主<sup>[3]</sup>,但药物的长期使用容易引发多种不良反应<sup>[4-5]</sup>。

针灸作为我国传统的外治疗法之一,被广泛应用于胃肠病的治疗中,与药物治疗相比具有绿色、便捷及毒副作用小等优势<sup>[6-9]</sup>。既往研究表明,针刺可有效调节消化性溃疡大鼠胃肠组织的炎症因子水平,减轻肠道炎症,改善胃肠黏膜损伤,实现对胃肠

疾病的治疗作用<sup>[10-13]</sup>。有关研究证实,电针能显著提高机体免疫功能水平,通过提高免疫应答能力从而增强胃肠功能<sup>[14-15]</sup>。但目前较少有关于针灸通过改善肠道炎症反应,调节肠道免疫功能,促进十二指肠黏膜损伤修复,从而治疗应激性溃疡的研究。因此,本实验以此为切入点,建立应激性溃疡模型小鼠,并分别对“手三里”“足三里”进行电针干预,观察各组小鼠十二指肠黏膜组织形态学改变,以及炎症细胞因子白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、免疫功能相关分化抗原4(cluster of differentiation 4, CD4)、分化抗原8(cluster of differentiation 8, CD8)及分泌型免疫球蛋白(secretory immunoglobulin A, SIgA)的表达水平,探讨电针对十二指肠黏膜损伤修复的

作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物与分组

SPF 级雄性 KM 小鼠 40 只,体质量 38~45 g,由厦门大学实验动物中心提供,实验动物使用许可证号:SYXK(闽)2018-0009。小鼠分笼饲养于厦门大学实验动物中心实验室,昼夜交替周期为 12 h,饲养温度 24~26 ℃,相对湿度 60%~70%。适应性饲养 1 周后,将 40 只 KM 小鼠完全随机分为空白组 12 只和造模组 28 只,造模组建立应激性溃疡模型。造模结束后在空白组和造模组中分别随机抽取 4 只小鼠进行模型评价,确认模型制备成功后,将造模组剩余 24 只小鼠二次随机分为 3 组:模型组、手三里组及足三里组,每组 8 只。实验过程遵循国家科技部发布的《关于善待实验动物的指导意见》,动物实验伦理号:XMULAC20190142。

### 1.2 主要试剂与仪器

4%多聚甲醛(上海沪试实验器材股份有限公司,批号:342004);RNA 提取试剂盒(北京艾德莱生物技术有限公司,批号:RN03);逆转录试剂盒(日本 TOYOBO 公司,批号:FSQ-101);Agarose(德国 Biofrox 公司,批号:1110GR100);50×TAE(北京索莱宝科技有限公司,批号:T1060-500);4SGreen Plus 无毒核酸染料(上海生物工程股份有限公司,批号:EA26BA0029);2×HiEff™ PCR(上海翊胜生物科技有限公司,批号:10102ES08);Trans2K Maker(北京全式金生物技术有限公司,批号:BM101);IL-1β Elisa 试剂盒、CD4 Elisa 试剂盒、CD8 Elisa 试剂盒、SIgA Elisa 试剂盒、TNF-α Elisa 试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:H002、H156、H157、H108-2、H052)。

低温高速离心机、低速离心机(美国 SCIOGBX 公司,型号:D3024R、S1010E);GloMax 酶标仪(美国 Promega 公司,型号:GM3030);振荡仪、摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司,型号:10RTEX-5、TSB-108);电泳仪(美国 BIO-RAD 公司,型号:041BR126545);超微量分光光度计(美国 NanoVue 公司,型号:NanoVue Plus);荧光显微镜、组织包埋机、组织切片机(德国 Leica 公司,型号:DM4B、EG1150、RM2235);一次性无菌针灸针(北京汉医医疗器械有限公司,规格:0.17 mm×7 mm);电针治疗仪(苏州医疗用品厂有限公司,型号:SDZ-II);小鼠束缚器(哈尔滨市香坊区昕楚实验室用品有限公司,规格:110 mm×40 mm×30 mm)。

### 1.3 造模方法

本研究使用束缚-冷浸法制备应激性溃疡模型<sup>[16]</sup>。造模前,将小鼠禁食不禁水 24 h,然后用束缚器(110 mm×40 mm×30 mm)固定,将小鼠连同束缚器垂直立浸于 41 ℃水箱中,水平面齐平胸骨剑突,1 h 后取出小鼠,暖风吹干,之后恢复常规饲料喂养、饮水。造模结束后,在空白组和造模组中分别随机抽取 4 只小鼠进行模型评价:空白组小鼠镜下十二指肠黏膜固有层细胞排列规整,腺体排列整齐,未见炎性细胞浸润;造模组小鼠镜下可见十二指肠黏膜组织固有层变薄,组织深染,腺体排列不规整,组织内有广泛的炎性细胞浸润等反应,提示模型制备成功<sup>[17]</sup>。

### 1.4 治疗方法

穴位定位参考实验针灸学动物穴位定位法<sup>[18]</sup>。足三里:膝关节下方,腓骨小头下约 0.3 cm 处的肌沟中;手三里:前臂背外侧上 1/4 分点处的肌沟中。模型制备成功后,手三里组小鼠每日用束缚器固定并电针手三里穴 1 次;足三里组小鼠每日用束缚器固定并电针足三里穴 1 次;空白组及模型组仅用束缚器固定。所有干预每次 30 min,每日 1 次,连续 7 d。

电针方法:使用汉医牌一次性无菌针灸针(0.17 mm×7 mm)分别在足三里、手三里直刺 1 针,穴位旁开 1 mm 处,再直刺 1 针辅助针,深度约 5 mm,两针连接一对电针治疗仪电极。采用疏密波(疏波时间 5 s,密波时间 10 s,疏波 4 Hz,密波 50 Hz,负载电压 2~4 V;输出脉冲宽度 0.5 ms),强度以毫针针体出现轻微颤动为度。

### 1.5 检测方法

1.5.1 HE 染色 将各组小鼠十二指肠组织置于 4%多聚甲醛中固定,修块后放进包埋盒中;用流水将多聚甲醛完全冲洗后,乙醇脱水,过夜;石蜡包埋,切片展片(片厚 5 μm)。片子置于 60 ℃烘箱 2 h 后进行梯度脱蜡,并用 PBS 清洗 3 次;苏木精染色后冲洗片子,使用 1%氨水返蓝;再使用 1%伊红染色 15 s 后冲洗,再次梯度脱水后使用中性和树胶封片。分别在 100、400 倍率下观察十二指肠黏膜结构以及腺体,并使用图像采集系统将病理图片进行采集。

1.5.2 ELISA 检测 将各组小鼠十二指肠组织匀浆,置于 4 ℃、12 000 r/min、半径 8 cm 离心 20 min,取上清液备用;配制不同浓度的标准品,并取 100 μL 加入标准孔;取 100 μL 待测样品加入其他孔,混匀后封板温育;弃去液体甩干后加生物素化抗体工作液,混匀封板温育;洗板,去液体,用洗涤液浸泡后吸去液体;甩干,洗板 5 次;接着每孔加 90 μL 底物

溶液,封板温育,最后加终止液 50  $\mu\text{L}$ ,终止反应;15 min 以内于 450 nm 波长处测量各孔的吸光度(OD)值。根据标准曲线,计算每个组织指标含量。

**1.5.3 RT-PCR 检测** 将各组小鼠十二指肠组织用两步法进行 RT-PCR 检测。首先设计引物(表 1);提取 mRNA,组织液氮研磨后 Trizol 裂解、离心(4  $^{\circ}\text{C}$ , 12 000 r/min,半径 8 cm,10 min);取上清液,加入 0.2 mL 氯仿(每毫升裂解液),震荡、孵育、离心(4  $^{\circ}\text{C}$ , 12 000 r/min,半径 8 cm,10 min);取上清液,加上清水相体积一半的乙醇,混匀离心后转移到吸附柱;加去蛋白液后再离心(室温,12 000 r/min,半径 8 cm,45 s),然后加漂洗液漂洗两次,离心(室温,12 000 r/min,半径 8 cm,45 s);加水洗脱 RNA,酶标仪测 RNA 浓度;加 Primer mix、RT Enzyme mix、5 $\times$ RT buffer 混匀孵育 cDNA;接着 cDNA 与 Primer F、Primer R、2 $\times$ Hieff<sup>TM</sup> PCR、DEPC 水混匀;经 qPCR 程序后琼脂糖凝胶电泳,成像计算各指标含量,RT-PCR 图片采用 ImageJ 软件进行灰度分析,数据结果与相应的内参进行对比,通过均一化处理进行数据标准化。

表 1 RT-PCR 引物信息

基因	引物序列(5'-3')	产物长度/bp
IL-1 $\beta$	正向 CTCAACTGTGAAATGCCACC	151
	反向 TGATGTGCTGCTGCGAGA	
TNF- $\alpha$	正向 GCGGTCGCTATGTCTCA	177
	反向 CCTCCACTTGGTGGTTTGT	
CD4	正向 ACTCACCTCAAGATACCC	119
	反向 GAGCCACTTTCATCACCA	
CD8	正向 CATCCACAACAAGATAACG	188
	反向 CTGAAGGACTGGCAGCAG	
SIgA	正向 CAGTGGCGCATATTCAA	161
	反向 GGCATGTCAGGACAAGAG	
$\beta$ -actin	正向 TATCGGTATGGAGTCTGC	182
	反向 TCTTCATGGTCTGGGAG	

## 1.6 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,计量资料用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。数据符合正态分布和方差齐性,则

使用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验;若不符合方差齐性,则用 Dunnett T3 分析;若数据不符合正态分布,采用秩和检验。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组小鼠一般情况观察

空白组小鼠精神状态良好,反应灵敏,进食量、饮水量及二便正常,毛发光泽柔顺,体质量增加。造模后,模型组、手三里组及足三里组小鼠精神状态欠佳,活动量减少,进食饮水量减少,大便稀软,毛发枯槁易脱落,体质量下降。随着治疗进行,足三里组小鼠精神状态逐渐改善,进食饮水量、体质量稳定增加,毛发逐渐恢复光泽,大便成形;手三里组小鼠一般情况较模型组小鼠有所改善,但改变不及足三里组小鼠明显。

### 2.2 各组小鼠十二指肠黏膜组织形态学比较

HE 染色结果显示,空白组小鼠十二指肠黏膜组织固有层细胞排列整齐,腺体排列规则,未见明显炎性细胞浸润。模型组小鼠十二指肠黏膜组织固有层明显变薄,排列不规则,组织深染,十二指肠腺体排列不规整,有广泛的炎性细胞浸润。手三里组与足三里组小鼠十二指肠黏膜组织固有层厚度增加,固有层细胞增加,排列整齐。详见图 1。

### 2.3 各组小鼠十二指肠黏膜免疫屏障相关蛋白含量比较

与空白组相比,模型组十二指肠黏膜组织内 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、SIgA 蛋白含量明显升高( $P<0.01$ ),CD4、CD8 蛋白含量明显下降( $P<0.01$ )。与模型组相比,足三里组 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、SIgA 蛋白含量下降( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),CD4、CD8 蛋白含量升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );手三里组 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  蛋白含量下降( $P<0.05$ ),CD4、CD8、SIgA 蛋白含量差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与手三里组相比,足三里组 CD8 蛋白含量上升( $P<0.05$ ),IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、CD4 及 SIgA 蛋白含

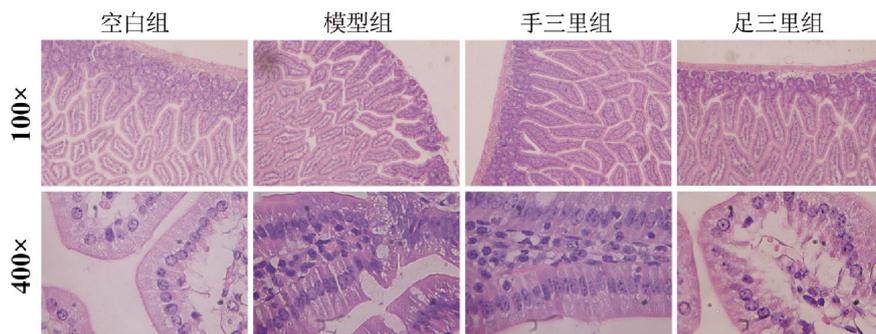


图 1 各组小鼠十二指肠组织 HE 染色观察结果

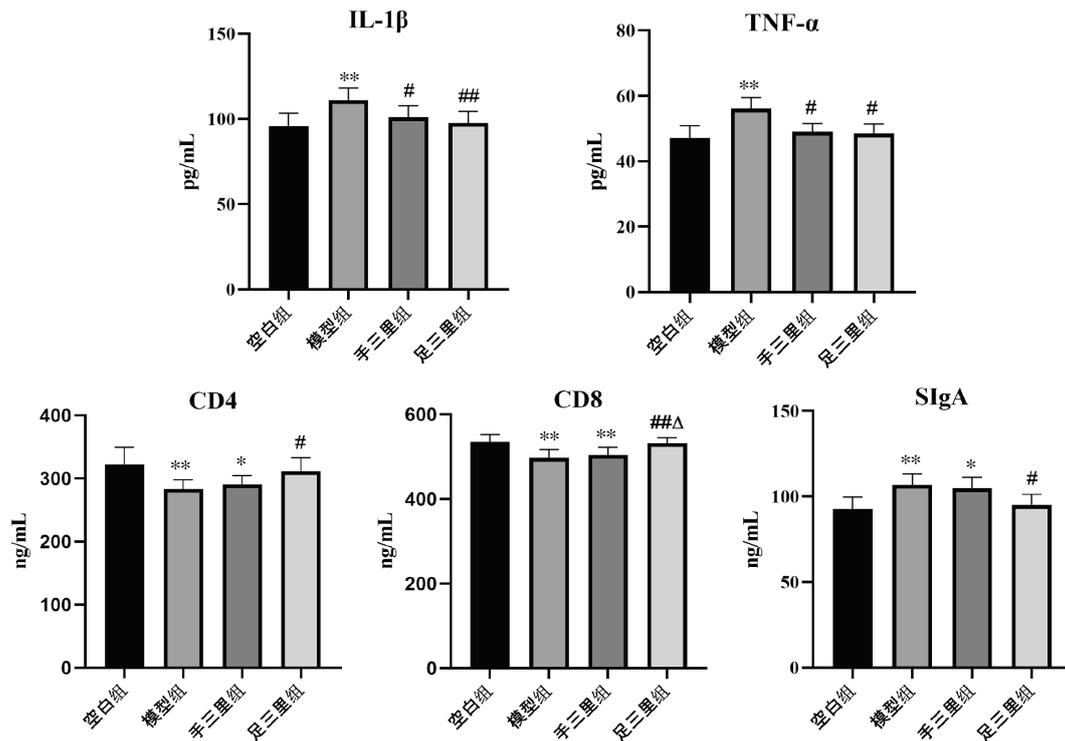


图2 各组小鼠十二指肠黏膜 CD4、CD8、SIgA、IL-1β、TNF-α 蛋白表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

注:与空白组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与模型组相比,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$ ;与手三里组相比,Δ $P<0.05$ 。

量差异无统计学意义( $P>0.05$ )。详见图2。

#### 2.4 各组小鼠十二指肠黏膜免疫屏障相关基因比较

与空白组相比,模型组 IL-1β、TNF-α、SIgA 的 mRNA 表达量显著升高( $P<0.01$ ),CD4、CD8 的 mRNA 表达量显著下降( $P<0.01$ )。与模型组相比,足三里组 IL-1β、TNF-α、SIgA 的 mRNA 表达量下降( $P<0.05$ ),CD4、CD8 的 mRNA 表达量升高( $P<0.05$ );手三里组 IL-1β、TNF-α 的 mRNA 表达量下降( $P<0.05$ ),CD4、CD8、SIgA 的 mRNA 差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与手三里相比,足三里组 CD8 mRNA 表达量上升( $P<0.05$ ),SIgA mRNA 表达量下降( $P<0.05$ ),IL-1β、TNF-α、CD4 的 mRNA 差异无统计学意义( $P>0.05$ )。详见图3。

### 3 讨论

应激性溃疡是指机体在应激状态下发生的以炎症糜烂、浅表性溃疡及胃肠道出血为特征的急性胃肠黏膜病变,属于中医学“痞满”“胃痛”“嘈杂”等范畴,病位在脾胃<sup>[19]</sup>。脾胃居中焦,为后天之本,气血生化之源,乃气机升降之枢纽。若脾胃素虚,或久病年老,脾胃衰败,运化失职,气机不畅,易致脘腹不通则痛;脾胃气血化生不足,易致脘腹不荣则痛。《灵枢·本输》曰:“大肠属上,小肠属下,足阳明胃脉也,大肠小肠,皆属于胃,是足阳明也。”足三里为足阳明胃

经的合穴,可健脾和胃、调和气血。现代研究表明,刺激足三里可增强迷走神经紧张性,进而提高胆碱能抗炎通路的活力,实现改善胃肠道炎症的作用<sup>[20]</sup>。手三里属手阳明大肠经,《针灸大全·席弘赋》中记载其主“肩上痛连脐不休,食癖气块”,更有十四经主治歌诀中提到“三里消胀穴在手,腹胀不仁瘫难走”,可见手三里为古代治疗腹痛、腹胀常用穴位。现代临床应用中发现,手三里具有镇痛、抗炎的作用<sup>[21-24]</sup>。故本研究选用手三里穴作为对照组,以探究足三里穴治疗应激性溃疡是否具有特异性。

应激性溃疡的发生与胃肠黏膜损伤的因素增加及屏障的保护机制减弱有关<sup>[25]</sup>。研究表明,机体处于应激状态下可能出现胃肠黏膜的炎症和免疫反应的变化,产生大量炎性细胞浸润和各种细胞因子渗出,使促炎细胞因子与抗炎细胞因子失衡,导致胃肠黏膜损伤<sup>[26]</sup>。TNF-α 作为细胞增殖和凋亡的主要促炎细胞因子,在炎性反应性肠病的发病机制中具有重要的调节作用<sup>[27-29]</sup>,可通过诱导内皮细胞进一步合成释放 IL-1β 等<sup>[30]</sup>。研究证明,IL-1β 的升高可对血管内皮功能造成损害,并促使自由基的合成诱发高凝状态,导致微循环血栓,影响溃疡的治疗与预后<sup>[31-32]</sup>。本实验证实,应激性溃疡时,模型组小鼠十二指肠黏膜内 IL-1β 及 TNF-α 的表达水平较空白组小鼠升高,说明应激可诱发胃肠黏膜炎症,进而激活肠道内免

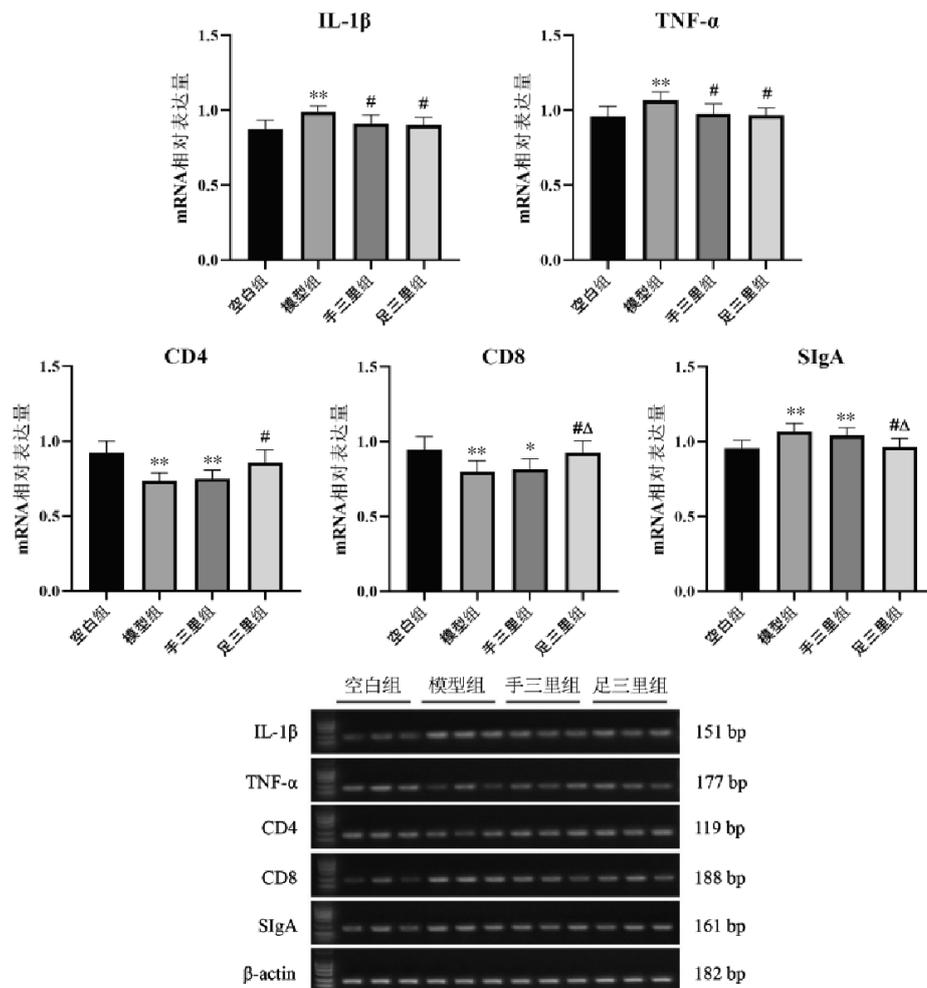


图3 各组小鼠十二指肠黏膜 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、CD4、CD8、SIgA 基因表达水平比较( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ )

注:与空白组相比, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ;与模型组相比, # $P<0.05$ ;与手三里组相比,  $\Delta P<0.05$ 。

疫反应。与模型组相比,经电针干预后的足三里组及手三里组小鼠十二指肠黏膜组织中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  促炎细胞因子表达水平下降,且两组 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  差异无统计学意义,提示电针足三里和手三里可能通过降低 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的表达水平,从而减轻十二指肠炎症。

肠道内的促炎因子分泌增多可影响补体、杀伤细胞及吞噬细胞的活性,调节肠黏膜免疫屏障功能进而介导组织损伤过程。肠黏膜免疫屏障主要由体液免疫和细胞免疫构成,二者共同诱导机体产生免疫应答,发挥肠道免疫调节作用<sup>[39]</sup>。T 淋巴细胞亚群是构成细胞免疫的重要组成部分,CD4<sup>+</sup> T 细胞可以调控和辅助其他淋巴细胞发挥功能,CD8 蛋白是杀伤性 T 细胞的主要表面标志物,CD8<sup>+</sup> T 细胞通过表面的 I 类主要组织相容性复合物分子与 CD4<sup>+</sup> 等其他免疫细胞的 II 类主要组织相容性复合物分子结合,从而识别其他免疫细胞表面结合的抗原物质,产

生杀伤作用,以此对抗致病原<sup>[34]</sup>。SIgA 是肠道内体液免疫的重要参与者,是肠黏膜屏障的第一道屏障,其主要功能是阻断病原微生物对黏膜的吸附,抑制病原体或细菌增殖、中和毒素,从而达到保护肠道黏膜的作用<sup>[35]</sup>。有研究表明,CD4 蛋白表达水平降低可刺激 B 细胞分泌活跃,从而使体液免疫亢进<sup>[36]</sup>。与其结果相似,在本研究中,模型组小鼠 CD4、CD8 蛋白及 mRNA 表达水平较空白组小鼠降低,SIgA 蛋白及 mRNA 表达水平升高,提示在应激性溃疡发生时,肠道内免疫功能紊乱,使肠道黏膜更易受损。与模型组相比,足三里组小鼠 CD4、CD8 蛋白及 mRNA 表达升高,SIgA 蛋白及 mRNA 表达水平显著下降,而手三里组 CD4、CD8、SIgA 蛋白及 mRNA 表达差异无统计学意义,表明电针足三里可通过调整细胞和体液免疫,促进十二指肠黏膜损伤修复。

综上所述,电针能够改善应激性溃疡小鼠十二指肠黏膜病理改变,有效调节十二指肠炎症因子水

平,调整肠道内细胞和体液免疫,从而促进十二指肠黏膜损伤的修复,且足三里穴较手三里穴调节十二指肠黏膜免疫功能效果更佳。

## 参考文献

- [1] 柏 愚,李延青,任 旭,等. 应激性溃疡防治专家建议(2018版)[J]. 中华医学杂志, 2018, 98(42): 3392-3395.
- [2] ALI T, HARTY R F. Stress-induced ulcer bleeding in critically ill patients[J]. *Gastroenterology Clinics of North America*, 2009, 38(2): 245-265.
- [3] TARASCONI A, COCCOLINI F, BIFFL W L, et al. Perforated and bleeding peptic ulcer: WSES guidelines[J]. *World Journal of Emergency Surgery*, 2020, 15: 3.
- [4] THONGON N, PENGUY J, KULWONG S, et al. Omeprazole suppressed plasma magnesium level and duodenal magnesium absorption in male Sprague-Dawley rats[J]. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 2016, 468(11): 1809-1821.
- [5] 赵 霞,徐薇薇,刘益萌,等. 中国大陆地区幽门螺杆菌对常用抗生素耐药性的临床分析[J]. 基础医学与临床, 2022, 42(7): 1077-1082.
- [6] 龚建中,刘会怡. 黄芪建中汤加减联合针刺治疗消化性溃疡[J]. 中国继续医学教育, 2021, 13(10): 157-161.
- [7] 张红林,王晓玲. 温针灸联合小建中汤治疗脾胃虚寒型消化性溃疡临床观察[J]. 光明中医, 2021, 36(22): 3756-3758.
- [8] 康 欢. 香砂六君子汤加减联合针灸法在胃溃疡患者中的应用[J]. 中国药物经济学, 2020, 15(11): 58-60.
- [9] 李翠英,李金香,潘诗敏,等. 基于湖湘五经配伍理论针刺治疗消化性溃疡的临床观察[J]. 中国针灸, 2017, 37(8): 799-804.
- [10] 袁 伟,李岩松,刘淑媛,等. 电针对应激性溃疡大鼠胃组织炎症因子以及缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 、环氧化酶-2蛋白表达水平的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2022, 17(2): 272-276, 302.
- [11] 凌 希,张 泓,易细芹,等. 电针胃肠胆腑下合穴对十二指肠溃疡大鼠血清肿瘤坏死因子- $\alpha$ 及组织烟碱型乙酰胆碱受体 $\alpha 7$ 等的影响[J]. 针刺研究, 2016, 41(2): 108-112.
- [12] 张 泓,易细芹,凌 希,等. 电针下合穴对溃疡性结肠炎模型大鼠 IL-1 $\beta$  与 HMGB 1 等表达的影响[J]. 世界针灸杂志, 2015, 25(4): 25-31.
- [13] 尹鸿智,赵 娟,刘 倩,等. 针刺对慢性萎缩性胃炎大鼠“足三里”穴区 HRH2, SP 及炎症因子表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(2): 259-264.
- [14] 万红叶,张知云,张晓宁,等. 电针对乳腺癌小鼠抑瘤作用的时间窗及其免疫学机制的初步观察[J]. 世界中医药, 2022, 17(21): 3039-3044.
- [15] 王 虎. 电针大脘俞募穴治疗溃疡性结肠炎的临床研究[J]. 辽宁中医杂志, 2022, 49(11): 173-175.
- [16] KOO M W L, CHO C H, OGLE C W. Effects of cold-restraint stress on gastric ulceration and motility in rats[J]. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1986, 25(4): 775-779.
- [17] ERBEN U, LODDENKEMPER C, DOERFEL K, et al. A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2014, 7(8): 4557-4576.
- [18] 余曙光,郭 义. 实验针灸学[M]. 2版. 上海: 上海科学技术出版社, 2014: 145.
- [19] 李 杰,陈旭义,刘小伟,等. 重型颅脑创伤继发应激性溃疡的机制及治疗研究进展[J]. 山东医药, 2015, 55(16): 99-101.
- [20] 朱 兵. 经脉循行与身体分节的对应[J]. 针刺研究, 2021, 46(10): 815-820.
- [21] 宋如意,杨佳曼,田雅云,等. 点按手三里治疗急性腹痛的机制探讨[J]. 中国民间疗法, 2018, 26(5): 3-5.
- [22] 汪平健. 手三里穴位注射治疗急性咽炎、急性扁桃体炎疗效观察[J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志, 2001, 9(2): 92.
- [23] 张 薇,赵 菲. 手三里穴位注射治疗慢性咽炎的临床观察[J]. 光明中医, 2006, 21(11): 32-33.
- [24] 马 克. 针刺手三里足三里建里组穴治疗脾胃虚弱型痞满临床观察[J]. 光明中医, 2023, 38(3): 512-515.
- [25] 付晨露,马佳佳,关翰宇,等. 艾灸对应激性溃疡模型大鼠血清和下丘脑中 GAS、SS 表达的影响[J]. 中国中医急症, 2019, 28(5): 854-857.
- [26] 徐 寅,喻 斌. 肝胃百合汤对慢性应激胃溃疡模型小鼠 Th1/Th2 细胞平衡及 HPA 轴的影响[J]. 中医药学报, 2019, 47(4): 32-36.
- [27] 郑海涵,吴正祥. TNF- $\alpha$  在 IBD 发病机制中的调节[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2011, 20(2): 191-193.
- [28] 段秋琴. 消化性溃疡患者治疗前后血清 Gas, TGF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  和 hs-CRP 检测的临床意义[J]. 放射免疫学杂志, 2011, 24(1): 37.
- [29] 胡 森,张立俭,白慧颖,等. 电针足三里对脓毒症大鼠组织肿瘤坏死因子和多脏器功能损害的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(2): 353-356.
- [30] 周 利,张红星,刘灵光,等. 头针对急性脑缺血再灌注大鼠促炎性反应因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量的影响[J]. 针刺研究, 2008, 33(3): 173-178.
- [31] 邱红生. Ghrelin、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  在膝骨关节炎不同 Mankin 病理分级软骨及滑膜中的表达及其意义[D]. 南宁: 广西医科大学, 2019.
- [32] DELHANTY P J D, VAN DER EERDEN B C J, VAN LEEUWEN J P T M. Ghrelin and bone[J]. *Biofactors*, 2014, 40(1): 41-48.
- [33] JIN M L, ZHU Y M, SHAO D Y, et al. Effects of polysaccharide from mycelia of *Ganoderma lucidum* on intestinal barrier functions of rats[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 94: 1-9.
- [34] 李朝政,成光宇,仇志凯,等. 参红补血颗粒对血虚证模型动物血清 T 淋巴细胞亚群标记物 CD3、CD4、CD8 分子表达的影响[J]. 人参研究, 2015, 27(1): 24-27.
- [35] 鞠金涛. 游泳训练对水浸束缚应激大鼠免疫功能及胃肠粘膜细胞凋亡影响的研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2007.
- [36] 王海滨,张景萍,郭 峰,等. 血细胞天然免疫粘附肿瘤细胞的现象及意义[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2001, 21(3): 263-266.