

DOI:10.16305/j.1007-1334.2024.2404101

隔药饼灸对克罗恩病肠纤维化大鼠结肠氧化应激和 Nrf2 的调节作用

张智英¹, 赵敏¹, 李琪¹, 韩冬¹, 吴焕淦^{1,2}, 乔宇¹, 郑寒丹², 翁志军², 张方², 刘慧荣^{1,2}

1. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院针灸免疫效应重点研究室(上海 200437); 2. 上海市针灸经络研究所(上海 200030)

【摘要】 目的 观察隔药饼灸对克罗恩病(CD)肠纤维化大鼠结肠氧化应激标志物和核因子E2相关因子2(Nrf2)表达的影响,以探究其治疗CD肠纤维化的效应机制。方法 将SD大鼠分为正常组、模型组、隔药饼灸组,每组各6只,通过三硝基苯磺酸(TNBS)与乙醇混合液灌肠制备CD肠纤维化大鼠模型(每周1次,连续6周)。隔药饼灸组选取大鼠“天枢穴”和“气海穴”进行隔药饼灸治疗(每日1次,连续10 d)。治疗结束后,测量大鼠结肠长度,观察结肠病理形态表现;Western blot法检测结肠 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、胶原蛋白I(Collegan I)表达;硫代巴比妥酸(TBA)法检测结肠丙二醛(MDA)含量;羟胺法检测结肠超氧化物歧化酶(SOD)活性;比色法检测谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性;酶联免疫吸附测定(ELISA)及实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)法检测结肠Nrf2蛋白及其mRNA表达。结果 ①模型组大鼠结肠长度较正常组显著缩短($P<0.05$);隔药饼灸组大鼠结肠长度较模型组明显增加($P<0.05$)。②模型组大鼠结肠组织较正常组结构紊乱,并可见CD典型裂隙样溃疡及大量胶原纤维组织沉积($P<0.05$);隔药饼灸组大鼠结肠组织较模型组排列整齐,溃疡组织表层可见新生上皮细胞修复,结肠胶原纤维组织沉积明显减少($P<0.05$)。③模型组大鼠结肠 α -SMA、Collegan I、MDA表达水平较正常组明显增高($P<0.05$);隔药饼灸组大鼠结肠 α -SMA、Collegan I、MDA蛋白表达较模型组明显降低($P<0.05$)。④模型组大鼠结肠SOD、GSH-Px、Nrf2表达较正常组明显降低($P<0.05$);隔药饼灸组大鼠结肠SOD、GSH-Px、Nrf2表达较模型组均明显增高($P<0.05$)。结论 隔药饼灸能够抑制CD大鼠肠纤维化,缓解肠道炎症及氧化损伤,促进结肠组织修复,其机制可能与隔药饼灸能够调节Nrf2并转导其下游相关抗氧化物酶有关。

【关键词】 克罗恩病;肠纤维化;隔药饼灸;艾灸;氧化应激;核因子E2相关因子2;作用机制

Regulatory effects of herb-partitioned moxibustion on colonic oxidative stress and Nrf2 expression in rats with Crohn's disease-induced intestinal fibrosis

ZHANG Zhiying¹, ZHAO Min¹, LI Qi¹, HAN Dong¹, WU Huangan^{1,2}, QIAO Yu¹, ZHENG Handan², WENG Zhijun², ZHANG Fang², LIU Huirong^{1,2}

1. Key Laboratory of Acupuncture Immune Effects, Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China; 2. Shanghai Research Institute of Acupuncture and Meridian, Shanghai 200030, China

Abstract: Objective To investigate the effects of herb-partitioned moxibustion on oxidative stress markers and Nrf2 expression in the colons of rats with Crohn's disease (CD)-induced intestinal fibrosis, and to explore its therapeutic mechanism for treating CD-induced intestinal fibrosis. **Methods** SD rats were randomly divided into three groups ($n=6$ per group): normal group, model group, and herb-partitioned moxibustion group. CD-induced

intestinal fibrosis was modeled in rats using TNBS-ethanol enema (once a week for 6 weeks). The herb-partitioned moxibustion group received moxibustion at "Tianshu (ST25)" and "Qihai (CV6)" acupoints (once daily for 10 consecutive days). After treatment, colon length was measured, and histopathological changes were observed. Western blot was used to detect the expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) and Collagen I (Col I) in the colon. The thiobarbituric acid (TBA) method was used to detect the content of malondialdehyde (MDA), the hydroxylamine method was used to detect superoxide dismutase (SOD) activity, and the colorimetric

〔基金项目〕国家自然科学基金项目(81873374);国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目(zyyzdxk-2023068);上海市自然科学基金项目(21ZR1460000);上海市科委科技计划项目(20MC1920500)

〔作者简介〕张智英,女,硕士研究生,主要从事针灸治疗胃肠疾病的临床与基础研究工作

〔通信作者〕刘慧荣,研究员,博士研究生导师;

E-mail: lhr_tcm@139.com

method was used to detect glutathione peroxidase (GSH-Px) activity. Nrf2 protein and mRNA expression in the colon were detected using Nrf2-linked enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR). **Results** ①The colon length in the model group was significantly shorter than that in the normal group ($P<0.05$); however, the colon length in the herb-partitioned moxibustion group was significantly longer than that in the model group ($P<0.05$). ②Compared with the normal group, the model group showed disorganized colon tissue structure, with fissure-like ulcers and significant collagen fiber deposition ($P<0.05$). Compared with the model group, the herb-partitioned moxibustion group showed more intact colon tissue, with new epithelial cell repair on the ulcer surface and significantly reduced collagen fiber deposition ($P<0.05$). ③Compared with the normal group, the model group had significantly higher expression levels of α -SMA, Col I, and MDA in the colon ($P<0.05$); however, compared with the model group, the herb-partitioned moxibustion group showed significantly lower expression levels of α -SMA, Col I, and MDA in the colon ($P<0.05$). ④Compared with the normal group, the model group had significantly lower expression levels of SOD, GSH-Px, and Nrf2 in the colon ($P<0.05$); however, compared with the model group, the herb-partitioned moxibustion group showed significantly higher expression levels of SOD, GSH-Px, and Nrf2 in the colon ($P<0.05$). **Conclusion** Herb-partitioned moxibustion can inhibit intestinal fibrosis, alleviate intestinal inflammation and oxidative damage, and promote the repair of colon tissue in rats with CD. The mechanism may be related to the regulation of Nrf2 and the activation of downstream antioxidant enzymes by herb-partitioned moxibustion.

Keywords: Crohn's disease; intestinal fibrosis; herb-partitioned moxibustion; moxibustion; oxidative stress; Nrf2; mechanism of action

肠纤维化是克罗恩病(Crohn's disease, CD)患者出现肠道组织形态及功能障碍(如肠道狭窄、梗阻、癌变)等严重并发症的关键病理机制,也是CD临床治疗中的一大难点^[1]。目前暂无针对肠纤维化的特效药物,逆转肠纤维化的病理发展过程似乎也难以实现,仅能通过手术切除暂时缓解患者临床症状。针对肠纤维化的手术治疗主要有内镜球囊扩张术、狭窄成形术和肠切除术等方法。然而,即使手术切除后规律进行氨基水杨酸类药物、糖皮质激素、生物制剂、抗菌药物、肠道微生态制剂等对症治疗,仍然难以控制肠纤维化的术后复发问题^[2]。CD并发肠纤维化的病理机制极其复杂,主要由CD患者存在先天免疫功能异常引起。这种异常可导致效应性免疫细胞过度激活,产生大量促炎性细胞因子,持续的肠道炎症刺激促使细胞因子、生长因子、转化生长因子- β (TGF- β)等信号分子激活肠道肌成纤维细胞,其能够大量分泌胶原纤维组织,进而导致肠道组织出现纤维化、平滑肌肥大和肠系膜脂肪肥大等病理变化^[2-3]。据临床研究^[4]显示,氧化应激反应是维持CD患者体内慢性炎症的关键因素,且氧化应激水平与CD的病情严重程度呈正相关性,大多数需要手术干预的重症患者表现出机体氧化系统失衡,氧化损伤标志物显著升高。因此,检测CD患者的氧化应激水平已经成为诊断和评估病情变化的一个重要监测指标。核因子E2相关因子2(Nrf2)是机体内维持氧化系统平衡的核心转录因子。国内外多项研究^[5-7]表明,Nrf2能够在多种不同纤维化相关疾病中发挥抗纤维化的保护作用。因此,Nrf2及其相关信号通路已经成为多种纤维化疾病的研究热点,更有学者提出Nrf2很可能是未来治疗CD并发肠纤维化的新靶点^[6]。

现代研究^[8-9]提示,艾灸能够通过降低体内活性氧、清除自由基,并提高机体抗氧化物酶活性,以发挥抗氧

化应激的功效。课题组前期研究^[10-15]证实,隔药饼灸能够明显缓解轻、中度CD患者腹痛、腹泻、便血等活动期症状,同时能够通过抑制转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、成纤维细胞激活,减少 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、胶原蛋白I(Collegan I)的表达,发挥治疗CD肠纤维化的作用。然而,目前对于隔药饼灸治疗CD肠纤维化的效应机制是否与调节氧化应激有关尚不明确。因此,本研究拟通过观察隔药饼灸对Nrf2的调节作用,阐释隔药饼灸治疗CD肠纤维化的部分效应机制,以期为临床应用隔药饼灸治疗CD肠纤维化提供更多的研究角度和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SPF级成年雄性SD大鼠,24只,体质量(180 ± 20)g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。动物生产许可证号:SCXK(沪)2017-0005。动物饲养于上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院实验动物中心,控制温度为(20 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度为50%~70%,光照时间为12 h/12 h明暗循环。实验过程严格遵照《关于善待实验动物的指导性意见》,并经上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院实验动物福利与伦理委员会批准(伦理编号:YYLAC-2019-045-2)。

1.1.2 药物与试剂 三硝基苯磺酸(TNBS)、戊巴比妥钠(批号分别为P2297、P3761),美国Sigma公司;Nrf2酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号:SDR0063),上海司鼎生物科技有限公司; α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)一抗(批号:19245S),美国CST公司;胶原蛋白I(Collegan I)一抗(批号:ab34710),英国Abcam公司;谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测试盒、丙二醛(MDA)测定试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒、苏木精-伊红(HE)染色试剂盒、马松(Masson)染色

试剂盒(批号分别为 A005、A003-1、A001-1、D006-1-4、D026-1-3),南京建成生物工程研究所;RT reagent Kit 逆转录试剂盒、TB Green qPCR 试剂盒(批号分别为 RR047A、RR420A),日本 Takara 公司。

1.1.3 主要仪器 全自动组织脱水机、石蜡包埋机和石蜡切片机(型号分别为 RM2235、HI1210、HI1220),德国 Leica 公司;光学显微镜(型号:BX53),日本 Olympus 公司;分光光度计,酶标仪(型号分别为 Evolution350、MultiskanFC),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;实时荧光定量 PCR 仪(型号:lightcycler480),瑞士 Roche 公司。

1.2 分组与造模 采用 SPSS 软件将 24 只大鼠随机分为正常组($n=8$)和造模组($n=16$)。造模方法^[16]:戊巴比妥钠溶液(20 g/L)按照 0.25 mL/100 g 标准给大鼠腹腔注射进行麻醉,将提前配制好的 TNBS 灌肠液[TNBS (50 g/L)与体积分数为 50% 的乙醇按照体积比 2:1 的比例进行混合配制]按 0.3 mL/100 g 的剂量进行灌肠。造模组大鼠灌肠时先将灌胃针与注射器连接,待大鼠麻醉后倒提大鼠尾部并充分暴露肛门,按照标准抽取灌肠液,然后将灌胃针从肛门轻柔插入约 6 cm,缓缓注入灌肠液后慢慢退出,保持大鼠头朝下倒提 1~2 min 后放回饲养笼。正常组大鼠灌肠操作同造模组,仅将灌肠液换为同体积的氯化钠溶液(9 g/L)。造模周期为每周 1 次,共 6 次。实验过程中有 2 只大鼠死亡,造模结束后,随机抽取正常组和造模组大鼠各 2 只进行模型鉴定,确认模型制备成功后,将造模组大鼠随机分为模型组($n=6$)和隔药饼灸组($n=6$)。

1.3 干预 隔药饼灸组参照《实验针灸学》^[17]对大鼠“天枢穴”和“气海穴”进行定位,给予隔药饼灸干预。施灸前将穴区皮肤进行备皮,大鼠取仰卧位固定。隔药饼灸具体操作如下:将特制中药粉(附子 10 g、肉桂 2 g、丹参 3 g、红花 3 g、木香 2 g 等)用黄酒调制为泥状,再用特制模具压制成药饼(直径 0.5 cm,厚度 0.3 cm);将药饼放置在“天枢穴(双侧)”和“气海穴”上,药饼上放置 90 mg 精细艾绒做成的艾炷,每次每穴灸两壮^[18]。治疗周期:每日 1 次,连续 10 d。正常组和模型组仅给予隔药饼灸组大鼠相同的抓取和固定,不进行其他干预。治疗结束后,采用戊巴比妥钠溶液(20 g/L)对大鼠进行麻醉。大鼠麻醉后充分暴露腹腔,取自耻骨联合上段至盲肠端的大鼠结肠,然后延肠系膜纵向剪开并用 4 °C 预冷的氯化钠溶液(9 g/L)清理肠道内壁,肉眼观察结肠大体损伤,并剪取结肠病变严重的部位约 1 cm 放入多聚甲醛溶液(40 g/L)中进行固定,剩余结肠组织于冰上充分剪碎后分装于冻存管中,存放于-80 °C 冰箱备用。

1.4 检测指标与方法

1.4.1 结肠长度 采用戊巴比妥钠溶液(20 g/L)对大鼠进行腹腔注射麻醉,充分暴露腹腔,取自耻骨联合上段至盲肠段结肠,测量其长度。

1.4.2 结肠病理 取出在多聚甲醛溶液(40 g/L)内固定 48 h 后的大鼠结肠组织,放入石蜡组织包埋框内,流水反复冲洗 60 min 后进行全自动脱水,取出脱水后的组织制成石蜡块,然后使用石蜡切片机将组织蜡块切制成厚度约为 5 μ m 的组织蜡片。对组织蜡片进行 HE 染色观察结肠炎症损伤,Masson 染色观察结肠纤维化情况:组织切片 60 °C 烤片 45 min,常规脱蜡至水,按照 HE、Masson 染色试剂盒操作说明进行染色,封片后置于光学显微镜下观察。

1.4.3 α -SMA、Collegan I 蛋白表达 采用 Western blot 法检测大鼠结肠组织中纤维化标志物 α -SMA、Collegan I 蛋白表达水平。取适量大鼠结肠组织冰上裂解 30 min,4 °C 离心机收集上清液。二辛可宁酸(BCA)法测定总蛋白浓度,制备上样量;配制分离胶及浓缩胶进行蛋白分离。将分离后的蛋白电转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。转膜后加入体积分数 5% 牛血清白蛋白溶液(BSA)封闭 1 h,封闭后加入一抗 α -SMA(1:1 000)、Collegan I (1:1 000)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(1:1 000),4 °C 摇床孵育过夜;磷酸盐吐温缓冲液(PBST)洗膜,加入二抗 IgG(H+L)(1:1 000),室温摇床孵育 90 min。凝胶成像系统显影并采集条带图像,采用 ImageJ 软件对目的蛋白和内参条带进行分析,计算条带灰度值。

1.4.4 氧化应激水平 大鼠结肠组织与氯化钠溶液按照质量(mg):体积(μ L)=1:9 的比例在冰水浴的条件下制成 10% 的匀浆液,3 000 r/min,4 °C,离心 10 min,取上清液。采用羟胺法检测大鼠结肠组织 SOD 的表达水平,比色法检测大鼠结肠组织 GSH-Px 的表达水平,硫代巴比妥酸(TBA)法检测大鼠结肠组织 MDA 的表达水平。

1.4.5 Nrf2 含量及其 mRNA 表达 采用 ELISA 法检测大鼠结肠中 Nrf2 的含量。提取各组大鼠结肠组织蛋白,按照试剂盒说明书操作,根据样品光密度(OD)值计算出各组大鼠结肠组织 Nrf2 的含量。采用实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)法检测大鼠结肠组织中 *Nrf2* mRNA 表达水平,取大鼠结肠组织 100 mg 置于研磨管中,上机研磨至粉状,加入 1 mL TRIzol 试剂及 200 μ L 氯仿提取总 RNA。根据 Takara 公司 RR047A 操作说明书进行逆转录制备 cDNA。以 *GAPDH* 基因为内参,检测各组大鼠结肠组织中 *Nrf2* 基因的表达水平。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法表示 *Nrf2* 基因的相对表达量。引物序列见表 1。

1.5 统计学方法 研究数据采用 SPSS 24.0 软件进行

表1 引物序列

基因	引物序列	引物长度/bp
GAPDH	上游:5'-TTCAACGGCACAGTCAAGG-3'	19
	下游:5'-CTCAGCACCAGCATCACC-3'	18
Nrf2	上游:5'-TACTCCCAGGTTGCCACATT-3'	21
	下游:5'-CTCATGGTCATCTACAAATGGGAA-3'	24

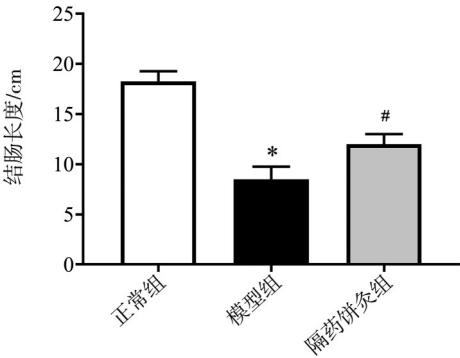
注:GAPDH为甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因,Nrf2为核因子E2相关因子2基因。

统计学分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,符合正态分布者,采用单因素方差分析进行组间差异比较,方差齐时采用最小显著差法进行两两比较,方差不齐时采用Games-Howell法进行两两比较;不符合正态分布者,采用秩和检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 隔药饼灸对CD肠纤维化大鼠结肠炎症损伤的影响 结肠长度短缩情况能够间接反映CD大鼠结肠炎症程度,对各组大鼠进行结肠长度测量后发现,模型组大鼠结肠长度较正常组显著短缩($P<0.05$);隔药饼灸组大鼠结肠长度较模型组显著增加($P<0.05$)。以上结果提示,隔药饼灸能够明显改善结肠短缩情况,减轻CD肠纤

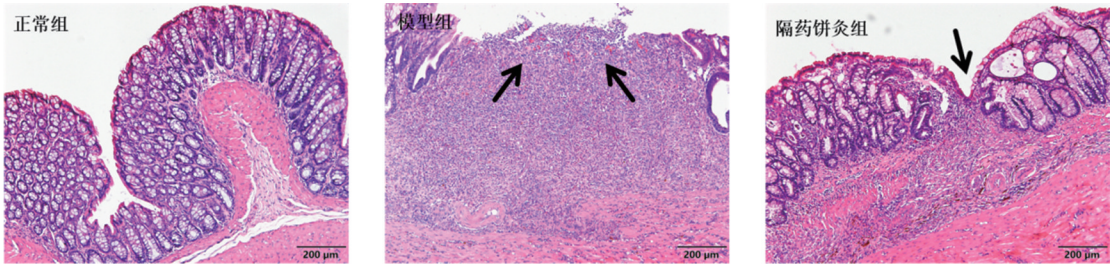
维化大鼠结肠炎症反应,促进结肠组织修复。见图1。



注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;n=6, $\bar{x}\pm s$ 。

图1 各组大鼠结肠长度的比较

HE染色结果显示,正常组大鼠结肠组织结构完整,腺体排列整齐,黏膜下层无充血、水肿等表现;模型组大鼠结肠组织结构排列紊乱,单层柱状上皮消失或变形,部分黏膜组织脱落或腺体排列不规则,黏膜下层和固有层可见CD典型裂隙样溃疡及大量成纤维细胞增生;隔药饼灸组大鼠结肠组织结构较模型组完整,溃疡组织表层可见新生上皮细胞,结肠黏膜组织较完整,炎症细胞浸润明显减少。见图2。



注:模型组箭头指示处可见典型裂隙样溃疡,隔药饼灸组箭头指示处可见新生上皮细胞。

图2 各组大鼠结肠病理表现(HE染色,×100)

2.2 隔药饼灸对大鼠结肠胶原纤维组织沉积的影响 Masson染色结果显示,正常组大鼠结肠组织结构整齐,仅有少量胶原纤维组织在黏膜层和黏膜下层沉积;与正常组比较,模型组大鼠结肠组织结构紊乱,可见大量胶原纤维组织沉积在黏膜组织,胶原纤维组织面积占比显著增加($P<0.05$);与模型组比较,隔药饼灸组大鼠结肠组织较完整,胶原纤维组织面积占比明显减少($P<0.05$)。以上结果提示,隔药饼灸干预能够明显减少CD肠纤维化大鼠结肠胶原纤维组织的沉积,减轻CD肠纤维化程度。见图3。

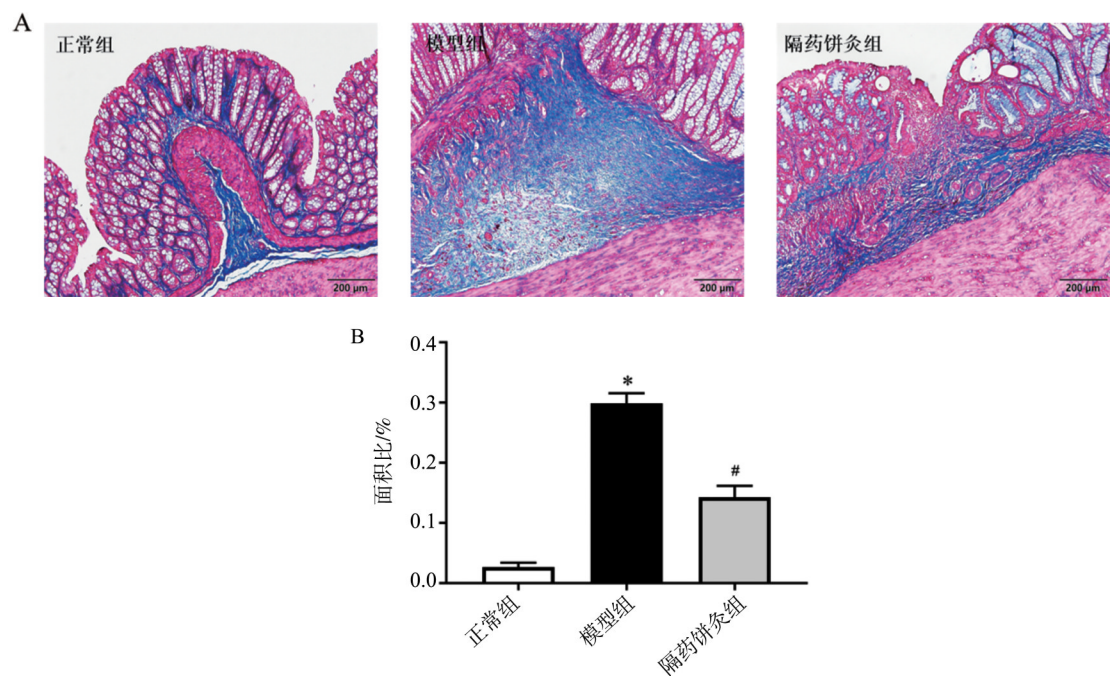
2.3 隔药饼灸对大鼠结肠纤维化标志物 α -SMA和Collegan I蛋白表达的影响 Western blot法检测显示,模型组大鼠结肠 α -SMA、Collagen I蛋白表达较正常组显著增加($P<0.05$);隔药饼灸组大鼠结肠 α -SMA、Collagen I蛋白表达较模型组显著降低($P<0.05$)。上述结果提示,隔药饼灸能够降低肠纤维化相关标志物

α -SMA、Collagen I的表达,以改善CD肠纤维化。见图4。

2.4 隔药饼灸对大鼠结肠氧化应激标志物MDA,SOD和GSH-Px表达的影响 结果显示,与正常组比较,模型组大鼠结肠组织MDA表达显著上升($P<0.05$),SOD、GSH-Px含量明显降低($P<0.05$);与模型组比较,隔药饼灸组大鼠结肠组织MDA表达显著下降($P<0.05$),SOD、GSH-Px含量明显升高($P<0.05$)。上述结果提示,隔药饼灸能够明显升高CD肠纤维化大鼠结肠组织中抗氧化酶SOD、GSH-Px表达,同时降低氧化损伤标志物MDA表达,进而改善CD肠纤维化大鼠结肠氧化应激水平。见图5。

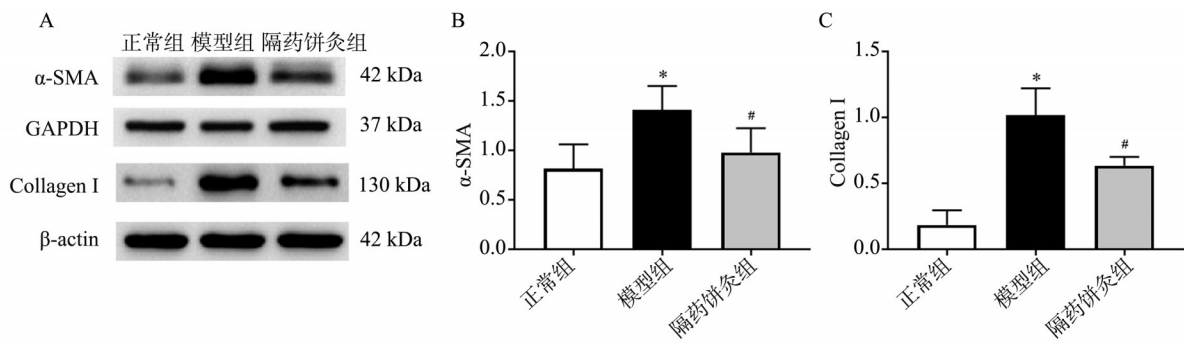
2.5 隔药饼灸对大鼠结肠Nrf2表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠结肠组织Nrf2含量及其mRNA显著降低($P<0.05$);与模型组比较,隔药饼灸组大鼠结肠组织Nrf2含量及其mRNA明显升高($P<0.05$)。以上结果提示,隔药饼灸可明显提高CD肠纤维化大鼠结肠组织

中 Nrf2 含量及其 mRNA 的表达。见图 6。



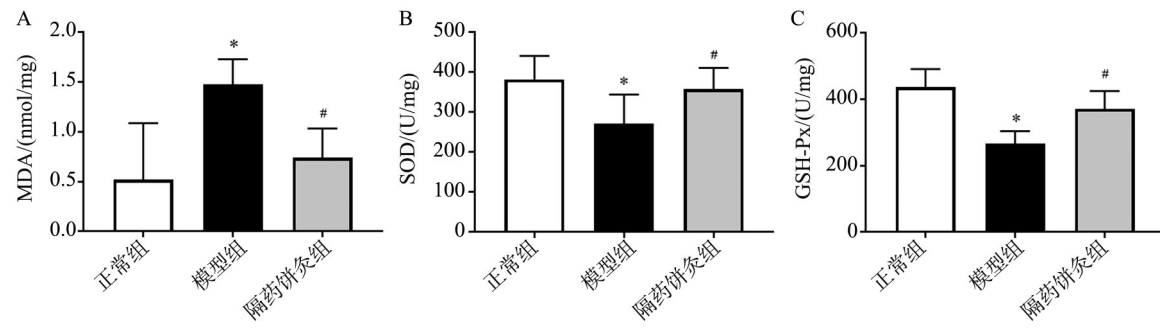
注:A为大鼠结肠胶原纤维组织沉积分布图(Masson染色,×100),B为大鼠结肠组织胶原纤维面积比。与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$; $n=6, \bar{x}\pm s$ 。

图3 各组大鼠结肠胶原纤维组织沉积占比



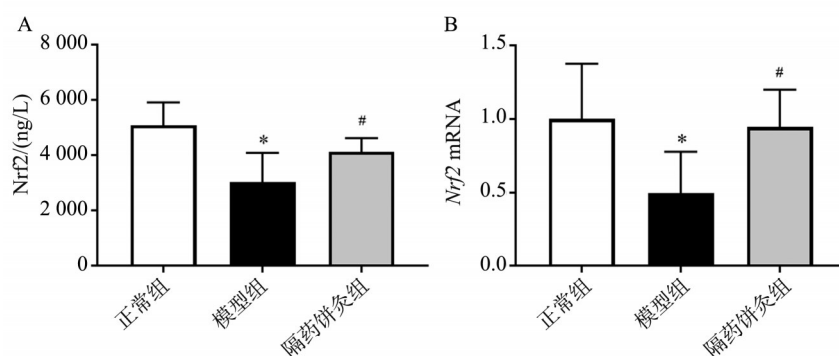
注:α-SMA为α-平滑肌动蛋白,GAPDH为甘油醛-3-磷酸脱氢酶,Collagen I为胶原蛋白I,β-actin为β-肌动蛋白。A为α-SMA、Collegen I蛋白表达条带图,B为α-SMA蛋白相对表达量图,C为Collegen I蛋白相对表达量图。与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$; $n=6, \bar{x}\pm s$ 。

图4 各组大鼠结肠α-SMA、Collegen I蛋白表达



注:MDA为丙二醛,SOD为超氧化物歧化酶,GSH-Px为谷胱甘肽过氧化物酶。A为MDA含量图,B为SOD含量图,C为GSH-Px含量图。与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$; $n=6, \bar{x}\pm s$ 。

图5 各组大鼠结肠氧化应激标志物表达比较



注: Nrf2 为核因子 E2 相关因子 2。A 为 Nrf2 含量图, B 为 Nrf2 mRNA 相对表达图。与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$; $n = 6$, $\bar{x} \pm s$ 。

图 6 各组大鼠结肠组织中 Nrf2 表达

3 讨论

肠纤维化是 CD 临床常见的一种并发症, 目前研究^[19]认为, CD 并发肠纤维化的主要机制是由于肠道组织慢性炎症反复刺激, 促使大量成纤维细胞异常增殖、细胞外基质 (ECM) 过度沉积所致。转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 是经典的促纤维化因子之一, 在肠纤维化的病理发展过程中具有重要作用, 其主要通过 SMADs 通路进行信号转导。研究^[20-21]发现, CD 患者肠道分离的成纤维细胞经过 TGF- $\beta 1$ 刺激后, 可以使成纤维细胞转化为能够大量分泌 Collagen I、Collagen III 和纤连蛋白的肌成纤维细胞。这些物质沉积在黏膜下间隙和肌肉组织中会导致组织增厚, 最终引起组织纤维化改变。本研究结果显示, 隔药饼灸干预后 CD 肠纤维化大鼠结肠胶原纤维沉积情况明显减少, 结肠 α -SMA、Collagen I 蛋白表达明显降低, 这提示隔药饼灸干预能够发挥抑制 CD 肠纤维化的作用, 与课题组前期研究结果一致。由于 CD 先天或适应性的免疫应答失常, 效应性免疫细胞被过度激活, 使促炎性细胞因子异常活化, 造成肠道炎症反应, 诱使活性氧过度生成和堆积, 进而导致组织氧化应激, 这种恶性循环也是 CD 慢性炎症维持的关键机制之一^[2,22]。Nrf2 作为机体内维持氧化系统平衡的核心转录因子, 能够诱导机体内多种抗氧化酶 (如 SOD、GSH-Px 等) 的生成、以清除过氧化产物, 进而发挥维持机体氧化系统平衡的重要作用^[23]。在多种纤维化疾病研究^[24-26]中均显示, Nrf2 及其相关下游因子能够发挥减轻氧化应激和炎症损伤、抑制促纤维因子活化的保护作用。在葡聚糖硫酸钠盐 (DSS) 诱导的溃疡性结肠炎动物模型研究^[7,27]中发现, Nrf2 能够通过清除活性氧转导的 TGF- $\beta 1$ /SMADs 信号通路, 发挥抑制肠纤维化的作用。因此, 我们推测隔药饼灸很可能是通过调节 Nrf2 转录因子的激活, 进而发挥抗纤维化的治疗作用。

目前临床暂无针对 CD 肠纤维化的特效药物, 仅能通过手术干预暂时缓解症状, 但术后复发率极高, 多次手术还可导致 CD 患者出现严重的短肠综合征^[28-29]。因此, 深入研究 CD 肠纤维化的发病机制, 阻止 CD 肠纤维

化的发展进程, 寻找经济安全、简便有效的治疗方法具有十分重要的现实意义。课题组前期研究^[13,15,30-31]显示, 隔药饼灸“天枢穴”和“气海穴”能够通过调节免疫细胞炎症因子和促纤维化因子, 以抑制 CD 肠道炎症反应, 从而保护肠道黏膜屏障, 改善肠上皮细胞凋亡, 调节肠道纤维化水平。天枢穴是大肠之募穴, 自古就被应用于肠腑病的治疗, 是临床治疗肠道疾病的首选要穴。气海穴乃全身气血汇聚之处, 具有补肾固本、培补元气之功效。《黄帝明堂经》曰: “气海主少腹疝气, 游行五藏, 腹中切痛。”因此, 临床多将天枢穴与气海穴联合应用于肠腑疾病的治疗, 二穴联用能够发挥补肾益气、通调肠腑的功效。CD 临床以腹痛、腹泻、便血、腹部包块等为典型表现, 中医认为本病以肠道湿热、湿瘀互结、脾肾阳虚、肝郁脾虚等为病机关键^[18]。本研究选用附子、肉桂以补火助阳、散寒除湿止痛, 木香、黄连共奏清肠化湿、行气导滞之功, 丹参、红花等可活血通经、散瘀止痛。诸药合用, 并借艾灸温热之力, 以奏温阳健脾、通调气血之功。针灸疗法最本质的功能是其具有整体性、良性双向调整的特征, 不仅能够治疗疾病、干预疾病的发展, 还能够预防疾病, 起到未病先防的保护作用^[32]。艾灸更是能够提高机体抗氧化酶活性, 发挥抗氧化的保护作用。课题组前期研究^[8,33-34]显示, 艾灸干预“天枢穴”能明显降低溃疡性结肠炎大鼠结肠组织活性氧 (ROS) 含量, 减轻组织氧化应激水平, 发挥抗氧化反应的保护作用。本研究结果显示, 模型组大鼠结肠 Nrf2 的表达显著减少, 过氧化产物 MDA 的含量明显增加, 这提示 CD 肠纤维化大鼠结肠组织的确存在氧化损伤; 在进行隔药饼灸干预后, 能够明显上调 Nrf2 的表达, 显著减少过氧化产物 MDA 的含量, 减轻组织氧化损伤水平; 同时增加机体内源性抗氧化酶 SOD、GSH-Px 的含量, 发挥抗氧化的重要作用。以上结果证实, Nrf2 能够在 CD 肠纤维化大鼠的疾病发展过程中发挥抗纤维化的保护作用, 很可能与其调节机体氧化系统平衡的功能有关。可见, 隔药饼灸很可能是通过调节 Nrf2 的表达, 减轻组织氧化应激水平, 进而达到治疗 CD 肠

纤维化的作用。

综上所述,我们认为隔药饼灸能够通过调节 Nrf2, 并转导其下游相关抗氧化酶的活化,清除过氧化产物,调节 CD 肠纤维化大鼠肠道氧化应激水平,并抑制组织炎症反应,从而发挥对 CD 肠纤维化的治疗作用。但本次实验尚未阐明 Nrf2 在 CD 肠纤维化中具体分子转导机制,未来仍需进一步的相关通路研究,以期为临床治疗 CD 肠纤维化提供更多的研究资料和治疗选择。

参考文献:

- [1] PARK J M, KIM J, LEE Y J, et al. Inflammatory bowel disease-associated intestinal fibrosis[J]. *J Pathol Transl Med*, 2023, 57(1): 60-66.
- [2] DOLINGER M, TORRES J, VERMEIRE S. Crohn's disease[J]. *Lancet*, 2024, 403(10432): 1177-1191.
- [3] SANTACROCE G, LENTI M V, DI SABATINO A. Therapeutic targeting of intestinal fibrosis in Crohn's disease[J]. *Cells*, 2022, 11(3): 429.
- [4] LUCERI C, BIGAGLI E, AGOSTINIANI S, et al. Analysis of oxidative stress-related markers in Crohn's disease patients at surgery and correlations with clinical findings[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2019, 8(9): 378.
- [5] BOURGONJE A R, KLOSKA D, GROCHOT-PRZECZEK A, et al. Personalized redox medicine in inflammatory bowel diseases: an emerging role for HIF-1 α and NRF2 as therapeutic targets[J]. *Redox Biol*, 2023, 60: 102603.
- [6] POMPILI S, SFERRA R, GAUDIO E, et al. Can Nrf2 modulate the development of intestinal fibrosis and cancer in inflammatory bowel disease?[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(16): 4061.
- [7] GUAN Y, TAN Y, LIU W, et al. NF-E2-related factor 2 suppresses intestinal fibrosis by inhibiting reactive oxygen species-dependent TGF- β 1/SMADs pathway[J]. *Dig Dis Sci*, 2018, 63(2): 366-380.
- [8] 窦传字,吴焕淦,王硕硕,等.艾烟溶液干预人肺腺癌细胞活性氧和超氧化物歧化酶的活性[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(7): 1057-1062.
- [9] 陆成轩,许骞,叶儒琳,等.45℃艾灸“足三里”改善高脂血症大鼠血管内皮的氧化应激[J]. *针刺研究*, 2023, 48(4): 331-338.
- [10] 包春辉,吴璐一,吴焕淦,等.针灸治疗活动期克罗恩病:随机对照研究[J]. *中国针灸*, 2016, 36(7): 683-688.
- [11] 康萌萌,黄艳,刘慧荣,等.艾灸疗法治疗克罗恩病的现代研究概况[J]. *江西中医药*, 2021, 52(9): 66-71.
- [12] 赵琛,丁菊英,马金丹,等.针灸对克罗恩病大鼠结肠组织碱性成纤维细胞生长因子及 I 型胶原的影响[J]. *针灸推拿医学(英文版)*, 2011, 9(1): 1-6.
- [13] 刘慧荣,谭琳莹,崔云华,等.艾灸大鼠天枢、气海穴对结肠成纤维细胞分泌胰岛素样生长因子 I、转化生长因子 β 1 的调控作用[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(49): 9878-9881.
- [14] BAO C H, ZHAO J M, LIU H R, et al. Randomized controlled trial: moxibustion and acupuncture for the treatment of Crohn's disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(31): 11000-11011.
- [15] ZHAO M, WENG Z, HUANG Y, et al. Herb-partitioned moxibustion improves Crohn's disease-associated intestinal fibrosis by suppressing the RhoA/ROCK1/MLC pathway[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 2247953.
- [16] MORRIS G P, BECK P L, HERRIDGE M S, et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon[J]. *Gastroenterology*, 1989, 96(3): 795-803.
- [17] 余曙光,郭义.实验针灸学[M].上海:上海科学技术出版社, 2009: 150-152.
- [18] 孙怡,周竞,郭娅静,等.隔药灸对肿瘤坏死因子- α 介导克罗恩病肠上皮细胞凋亡途径的影响[J]. *针刺研究*, 2019, 44(1): 1-7.
- [19] CHAN W P W, MOURAD F, LEONG R W. Crohn's disease associated strictures[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2018, 33(5): 998-1008.
- [20] KARSDAL M A, NIELSEN S H, LEEMING D J, et al. The good and the bad collagens of fibrosis-Their role in signaling and organ function[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 121: 43-56.
- [21] LIU R M, DESAI L P. Reciprocal regulation of TGF- β and reactive oxygen species: A perverse cycle for fibrosis[J]. *Redox Biol*, 2015, 6: 565-577.
- [22] TIAN T, WANG Z, ZHANG J. Pathomechanisms of oxidative stress in inflammatory bowel disease and potential antioxidant therapies[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 4535194.
- [23] MA Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2013, 53: 401-426.
- [24] ZHU H, LI Y R. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence[J]. *Exp Biol Med(Maywood)*, 2012, 237(5): 474-480.
- [25] AN L, PENG L Y, SUN N Y, et al. Tanshinone II A activates nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 to restrain pulmonary fibrosis via regulation of redox homeostasis and glutaminolysis[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, 30(15): 1831-1848.
- [26] LATELLA G. Concise commentary: Is Nrf2 a master regulator of intestinal fibrosis?[J]. *Dig Dis Sci*, 2018, 63(2): 381-382.
- [27] WANG R, WANG D, WANG H, et al. Therapeutic targeting of Nrf2 signaling by maggot extracts ameliorates inflammation-associated intestinal fibrosis in chronic dss-induced colitis[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 670159.
- [28] HARB W J. Crohn's disease of the colon, rectum, and anus[J]. *Surg Clin North Am*, 2015, 95(6): 1195-1210.
- [29] GORBATYUK O, SOLEIKO D, KURYLO H, et al. Urgent surgical operations for Crohn's disease in children[J]. *Georgian Med News*, 2020(306): 61-66.
- [30] 魏凯,张丹,窦传字,等.艾灸对克罗恩病大鼠结肠 NF- κ B p65 及 TNF- α 、IL-1 β 调节作用的研究[J]. *世界中医药*, 2013, 8(8): 862-866, 870.
- [31] 司敏.克罗恩病的证治规律分析[D].南京:南京中医药大学, 2018.
- [32] 邱曼丽,袁旭,陶杰,等.针灸干预机体亚健康症状的运用与思考[J]. *上海中医药杂志*, 2024, 58(3): 6-9.
- [33] 苗蕊蕊,邓志玲,赵彩娇.基于沉默信息调节因子 1/p53 信号通路探讨艾灸“足三里”延缓衰老的作用机制[J]. *针刺研究*, 2023, 48(6): 571-577.
- [34] 刘力,卢云琼,曹姚佳妮,等.艾灸“天枢”穴对溃疡性结肠炎模型大鼠结肠组织铁死亡及氧化损伤的影响[J]. *中医杂志*, 2023, 64(15): 1576-1584.

编辑:马丽亚

收稿日期:2024-04-22