

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.18.013

麦粒灸对溃疡性结肠炎模型小鼠结肠组织 JAK2/STAT3 信号通路的影响

朱涛¹, 李洁², 尹浩², 程艳婷², 冀雨芳², 王海军², 冀来喜²✉

1. 成都中医药大学针灸推拿学院, 四川省成都市温江区柳台大道 1166 号, 611137; 2. 山西中医药大学第二临床学院

[摘要] 目的 观察麦粒灸“中脘”“天枢”“上巨虚”穴对溃疡性结肠炎(UC)小鼠结肠组织的影响并探讨其可能作用机制。方法 40 只 C57BL/6 雄性小鼠随机分为空白组、模型组、麦粒灸组、美沙拉嗪组, 每组 10 只。除空白组外, 其余各组小鼠采用自由饮用 3% 葡聚糖硫酸钠盐溶液法制备 UC 小鼠模型。造模成功后麦粒灸组小鼠予麦粒灸“中脘”“天枢”“上巨虚”干预, 每穴 3 壮, 每壮时间约为 30 s; 美沙拉嗪组给予 300 mg/kg 美沙拉嗪肠溶片溶液灌胃; 空白组、模型组仅抓取固定, 不予任何干预。各组干预均每日 1 次, 连续 7 天。观察各组小鼠一般情况并对小鼠疾病活动指数(DAI)进行评分; 检测结肠长度、肠重指数及结肠黏膜损伤评分; ELISA 法检测血清细胞间黏附分子 1(ICAM-1)、白细胞介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)含量; HE 染色法观察结肠组织病理学变化; 实时荧光定量 PCR 法和免疫组化法分别检测小鼠结肠组织中非受体酪氨酸蛋白激酶 2(JAK2)、信号转导及转录激活蛋白 3(STAT3)、细胞因子信号转导抑制因子 3(SOCS3) mRNA 及阳性表达; 免疫荧光双标染色法检测小鼠结肠组织 JAK2、SOCS3 平均荧光强度表达。结果 与空白组比较, 模型组小鼠肛周不洁、大便不成形, 结肠黏膜形态破坏; 体质量降低, 结肠长度缩短, DAI 评分、肠重指数、结肠黏膜损伤及组织病理评分、血清 ICAM-1、IL-6、TNF- α 含量增加, 结肠组织 JAK2、STAT3 mRNA 及蛋白表达升高, JAK2 平均荧光强度表达升高, SOCS3 mRNA、蛋白及平均荧光强度表达降低($P<0.01$)。与模型组比较, 麦粒灸组、美沙拉嗪组小鼠肛周得到改善, 结肠黏膜形态较为完整; 体质量、结肠长度增加, DAI 评分、肠重指数、结肠黏膜损伤及组织病理评分、血清 ICAM-1、IL-6、TNF- α 含量减少, 结肠组织 JAK2、STAT3 mRNA 及蛋白表达降低, JAK2 平均荧光强度表达降低, SOCS3 mRNA、蛋白及平均荧光强度表达升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。麦粒灸组与美沙拉嗪组各指标比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 麦粒灸“中脘”“天枢”“上巨虚”能够改善 UC 模型小鼠结肠黏膜的损伤, 其机制可能与 SOCS3 调控 JAK2/STAT3 信号通路相关。

[关键词] 溃疡性结肠炎; 麦粒灸; 结肠黏膜; 细胞因子信号转导抑制因子 3; 非受体酪氨酸蛋白激酶 2; 信号转导及转录激活蛋白

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种慢性非特异性肠道炎症, 是以结肠局部溃疡和慢性炎症为主要病理特征的难治性肠道疾病^[1]。其发病机制复杂, 涉及遗传、免疫、肠道菌群失衡等多种因素^[2], 其中结肠黏膜持续性炎症反应是 UC 发病及进展的关键病理机制^[3]。有研究表明, 非受体酪氨酸蛋白激酶 2(JAK2)/信号转导及转录激活

蛋白 3(STAT3)信号通路是一种高度进化保守的通路, 参与细胞增殖、分化、凋亡和炎症, 在 UC 的发生发展中发挥重要作用^[4]; 而细胞因子信号转导抑制因子 3(SOCS3)是 JAK2/STAT3 信号通路的负调控因子, 在调节炎症反应中起关键作用^[5]。既往研究^[6]发现, 中脘、天枢、上巨虚在针刺治疗炎症性肠病中使用频次最高且疗效显著。前期基础实验^[7]亦证明, 针刺“中脘”“天枢”“上巨虚”能够修复 UC 模型大鼠结肠损伤, 减轻炎症反应。

基金项目: 国家自然科学基金(82074549)

✉ 通讯作者: tyjilaixi@126.com

麦粒灸属于艾灸疗法的一种,通过艾绒燃烧后产生的热量刺激特定穴位从而发挥防治疾病的功效,具有温通经脉、扶正补虚的作用,且治疗 UC 疗效确切^[8-9]。本研究以 SOCS3 调控 JAK2/STAT3 信号通路为切入点,观察麦粒灸“中脘”“天枢”“上巨虚”对 UC 模型小鼠结肠黏膜的影响,并探讨可能作用机制,以期麦粒灸的临床应用提供实验依据。本实验经山西中医药大学实验动物伦理委员会审核批准(伦理审批号:2021DW256)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 40 只,6~8 周龄,体重 16~18 g,购自北京维通利华实验动物有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2020-0006。饲养在山西中医药大学针灸针法实验室,温度 22~25℃,湿度 45%~55%,12 h 明暗交替,自由进食(予常规饲料)和饮水。

1.2 主要试剂与仪器

美沙拉嗪肠溶片(货号:200708,黑龙江葵花药业集团股份有限公司);葡聚糖硫酸钠盐(DSS,货号:MB5535,大连美仑生物技术有限公司);戊巴比妥钠(货号:57-43-2,美国 Sigma 公司);4%多聚甲醛固定液(货号:P0099)、Trizol(货号:R0016),上海碧云天生物技术有限公司;JAK2 抗体(货号:AF6022)、STAT3 抗体(货号:AF6294),江苏亲科生物研究中心有限公司;SOCS3 抗体(货号:A0694,武汉爱博泰克生物科技有限公司);HE 染色试剂盒(批号:G1076)、DAPI 染色剂(货号:GB1012)、Alexa Fluor 488 标记的山羊抗兔 IgG(绿色荧光探针,货号:GB25303)、Cy3 标记山羊抗兔 IgG(红色荧光探针,货号:GB21303)、RNA 提取液(货号:G3013)、2×SYBR Green qPCR 预混液(货号:G3322)、一步法实时荧光 PCR 试剂盒(货号:G3335),武汉赛维尔生物科技有限公司;细胞间黏附分子 1(ICAM-1,货号:H065-1-2)、白细胞介素 6(IL-6,货号:H007-1-1)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α ,货号:H052-1-2)ELISA 试剂盒,南京建成生物工程研究所有限公司。

10 年陈艾绒,南阳艾顺堂艾制品有限公司;DM4B 型正置相差显微镜,德国 Leica 公司;5810 R 型台式离心机,德国 Eppendorf 公司;LT1002 型电子天平,沈阳龙腾电子有限公司;KZ-III-F 型研磨仪,武汉赛维尔生物科技有限公司;800TS 型多功

能酶标仪,美国 BioTek 公司;ES-2 型紫外分光光度仪,日本 Malcom 公司;Tanon-5200Multi 型化学发光/荧光成像仪,上海天能科技有限公司;C1000 型实时定量 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司。

1.3 分组及造模

40 只小鼠适应性饲养 7 天后,采用随机数字表法分为空白组、模型组、麦粒灸组、美沙拉嗪组,每组 10 只。参考文献[10]制备 UC 小鼠模型:模型组、麦粒灸组、美沙拉嗪组小鼠均给予 3% DSS 溶液自由饮用 7 天。小鼠出现腹泻、体质量下降、粪便松散或粪便隐血阳性为 UC 造模成功的标准^[11]。空白组小鼠同期自由饮用蒸馏水。

1.4 干预方法

全部小鼠造模成功。造模成功后第 2 天进行干预,空白组、模型组仅抓取固定,不予任何干预。麦粒灸组参考《实验针灸学》^[12],选取“中脘”(位于腹正中线上,剑突和耻骨联合上缘连线的上 1/3 与下 2/3 交点处)、双侧“天枢”(位于剑突和耻骨联合连线上 7/12 和下 5/12 处旁开 3 mm 处)、双侧“上巨虚”(小腿背外侧上 2/5 折点处,约当后二里穴下 1.5 cm)进行施灸。将小鼠固定后,施灸穴位处剃毛,艾绒制成麦粒大小(约 5 mg/粒)的艾炷,置于涂抹凡士林的穴位上,线香引燃,待小鼠出现强力扭转身体时立即移除剩余艾绒。每穴 3 壮,每壮约 30 s。美沙拉嗪组予美沙拉嗪肠溶片溶液 300 mg/kg 灌胃。以上干预均每日 1 次,连续 7 天。

1.5 观察指标与方法

1.5.1 小鼠一般情况 于干预前后分别观察各组小鼠体质量变化、粪便性状、便血程度。末次干预后,对每组小鼠的疾病活动指数(DAI)^[13]进行评分,DAI 评分=(体质量下降计分+大便性状计分+大便便血情况计分)/3。

1.5.2 检测结肠长度、肠重指数及结肠黏膜损伤评分 末次干预后第 2 天,小鼠腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg),通过摘眼球取血约 500 μ l,室温下静置 30 min,4℃、3000 r/min(离心半径 8 cm)离心 10 min,收集上清。脱颈处死小鼠,于无菌操作台上取小鼠结肠组织,每组取一部分小鼠结肠组织放置于 4% 多聚甲醛中固定,用于 HE 染色;剩余小鼠结肠组织保存于-80℃冰箱,以待后续相关蛋白及基因检测。

肠重指数及结肠黏膜损伤评分:测量小鼠回盲部至肛门上 1 cm 的结肠长度,拍照并称重,计算肠重指数,肠重指数=结肠质量/小鼠体质量 $\times$ 100%。

将收集起来的结肠组织迅速沿着肠系膜纵轴剪开，生理盐水冲洗干净，观察结肠黏膜的溃疡和炎症情况，根据结肠黏膜损伤评分表^[14]评分。评分标准：无损伤为0分；充血，无溃疡为1分；小溃疡，未见明显炎症为2分；广泛的溃疡、坏死或粘连为3分；巨结肠/狭窄/穿孔为4分。

1.5.3 ELISA 法检测小鼠血清 ICAM-1、IL-6、TNF-α 含量 将收集好的上清按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作，在酶标仪波长 450 nm 处检测吸光度值，绘制标准曲线图，并依据标准曲线计算血清 ICAM-1、IL-6、TNF-α 含量。

1.5.4 HE 染色法观察小鼠结肠组织病理学变化并评分 每组采用随机数字表法选取4只小鼠结肠组织，4%多聚甲醛进行固定，将固定好的结肠组织制成石蜡蜡块，切成约5 μm厚的组织切片，脱蜡、复水，苏木精和伊红染色，95%乙醇中梯度脱水，二甲苯清洗，中性树胶封片。置于光学显微镜下观察结肠病变情况。参考Geboes评分标准^[15]阅片评分，评分结果取均值。评分标准：隐窝结构无改变为0分；慢性炎性浸润（固有层可见慢性炎性浸润）为1分；固有层中性粒细胞和嗜酸性粒细胞浸润为2分；上皮可见中性粒细胞浸润为3分；隐窝破坏为4分；糜烂或溃疡为5分。

1.5.5 实时荧光定量 PCR 法检测小鼠结肠组织 JAK2、STAT3、SOCS3 mRNA 表达 每组采用随机数字表法选取4只小鼠结肠组织，Trizol 试剂盒提取结肠组织总 RNA，紫外分光光度仪检测其浓度及纯度，反转录合成 cDNA，并进行 PCR 扩增。引物由生工生物工程（上海）股份有限公司提供，序列见表1。反应条件：预变性95℃30 s；95℃15 s，60℃退火延伸30 s，扩增循环40次；75℃→95℃，

每20 s升温1℃获得熔解曲线。以 GAPDH 为内参基因，采用2^{-ΔΔCt}法计算目的基因的相对表达量。

1.5.6 免疫组化法检测小鼠结肠组织 JAK2、STAT3、SOCS3 阳性表达 选取1.5.4中各组小鼠结肠组织石蜡切片进行脱蜡、修复抗原，将切片放入3%过氧化氢溶液中孵育，并用3% BSA溶液封闭，滴加稀释后的JAK2一抗、STAT3一抗、SOCS3一抗，稀释比例均为1：100。在4℃条件下孵育过夜，次日PBS清洗掉一抗后，用HRP标记的山羊抗兔IgG（稀释比例为1：200）室温孵育50 min，苏木精染色细胞核，将切片脱水透明并封片。置于光学显微镜下进行拍照保存，ImagePro Plus 6.0软件计算平均光密度值，以平均光密度值为阳性表达水平。

1.5.7 免疫荧光双标法检测小鼠结肠组织 JAK2、SOCS3 平均荧光强度 选取1.5.4中各组小鼠结肠组织石蜡切片、脱蜡、修复抗原，将切片放入3%过氧化氢溶液中孵育，10%血清封闭液封闭30 min，滴加稀释后的JAK2一抗（稀释比例为1：100）、SOCS3一抗（稀释比例为1：50），4℃下孵育过夜。次日PBS清洗3次，滴加相应二抗，37℃恒温箱孵育30 min，DAPI复染细胞核，抗荧光淬灭封片剂封片。置于荧光镜下拍照保存，采用Image-Pro Plus 6.0软件分析平均荧光强度。

1.6 统计学方法

采用SPSS 25.0软件进行统计学分析。计量数据均符合正态分布以均值±标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）描述，多组间比较采用单因素方差分析，若方差齐两组间比较采用LSD检验，若方差不齐则用Tamhane's *T*检验。*P* < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠一般情况和 DAI 评分比较

正常组小鼠饮食正常，肛周光洁，粪便成形，垫料干燥；模型组小鼠饮食量减少，肛周不洁，大便不成形，隐血实验阳性或肉眼可见血便，垫料潮湿。麦粒灸组、美沙拉嗪组小鼠肛周较干净，大便较成形，垫料湿润度下降。表2示，干预前，与空白组比较，其余各组小鼠体质量均降低（*P* < 0.01）。干预后，与空白组比较，模型组小鼠体质量降低，DAI评分升高（*P* < 0.01）；与模型组比较，麦粒灸组、美沙拉嗪组体质量升高，DAI评分降低（*P* < 0.01）；麦粒灸组与美沙拉嗪组小鼠体质量、DAI评分比较差异无统计学意义（*P* > 0.05）。

表1 小鼠结肠组织 JAK2、STAT3、SOCS3 引物序列
Table 1 Primer sequences of AK2, STAT3, SOCS3 in colon tissue

基因	引物 (5'-3')	片段长度/ bp
JAK2	上游: GTGGGTTGCGATCTCTTTCC	190
	下游: TTCACAGTGTGGTGCTCCTT	
STAT3	上游: CCTTCCTTCTTGGCTCTCA	78
	下游: GGCAGAAGGATTCGGTGTTT	
SOCS3	上游: GCAGGAGAGCGGATTCTACT	165
	下游: TGGATGCGTAGGTTCTTGGT	
GAPDH	上游: CCTCGTCCCGTAGACAAAATG	133
	下游: TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT	

注：JAK2，非受体型酪氨酸蛋白激酶2；STAT3，信号转导及转录激活蛋白3；SOCS3，细胞因子信号转导抑制因子3。

表2 各组小鼠体重及DAI评分比较

Table 2 Comparison of body weight and DAI score of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	体重/g		DAI评分/分
		干预前	干预后	
空白组	10	21.83±0.94	23.22±0.83	0.17±0.18
模型组	10	19.25±0.53 ^{a)}	18.34±0.47 ^{a)}	3.13±0.58 ^{a)}
麦粒灸组	10	19.25±0.31 ^{a)}	20.53±0.53 ^{b)}	2.10±0.79 ^{b)}
美沙拉嗪组	10	18.65±0.44 ^{a)}	21.08±0.67 ^{b)}	1.13±0.56 ^{b)}

注：DAI，疾病活动指数。

a) 与空白组同时间比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组同时间比较， $P<0.01$ 。

2.2 各组小鼠结肠长度、肠重指数及结肠黏膜损伤评分比较

表3示，与空白组比较，模型组小鼠结肠长度缩短，肠重指数及结肠黏膜损伤评分增加 ($P<0.01$)；与模型组比较，麦粒灸组和美沙拉嗪组小鼠结肠长度增加，肠重指数及结肠黏膜损伤评分减少 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；麦粒灸组与美沙拉嗪组小鼠结肠长度、肠重指数及结肠黏膜损伤评分比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表3 各组小鼠结肠长度、肠重指数及结肠黏膜损伤评分比较

Table 3 Comparison of colon length, intestinal weight index and mucosal injury score of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	结肠长度/cm	肠重指数/%	结肠黏膜损伤评分/分
空白组	10	8.79±0.54	1.07±0.16	0.00±0.00
模型组	10	5.39±0.45 ^{a)}	1.75±0.17 ^{a)}	3.80±0.42 ^{a)}
麦粒灸组	10	6.32±0.52 ^{b)}	1.39±0.19 ^{b)}	3.10±0.74 ^{c)}
美沙拉嗪组	10	6.89±0.62 ^{b)}	1.29±0.19 ^{b)}	2.60±0.52 ^{b)}

注：a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

2.3 各组小鼠血清ICAM-1、IL-6、TNF- α 含量比较

表4示，与空白组比较，模型组血清ICAM-1、

IL-6、TNF- α 含量增加 ($P<0.01$)；与模型组比较，麦粒灸组和美沙拉嗪组血清ICAM-1、IL-6、TNF- α 含量减少 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；麦粒灸组与美沙拉嗪组小鼠血清ICAM-1、IL-6、TNF- α 含量比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表4 各组小鼠血清ICAM-1、IL-6、TNF- α 含量比较

Table 4 Comparison of serum ICAM-1, IL-6, and TNF- α levels of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	ICAM-1/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	IL-6/ $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$	TNF- α / $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$
空白组	10	26.95±12.54	52.09±15.38	27.06±8.72
模型组	10	73.91±15.95 ^{a)}	96.36±19.77 ^{a)}	77.89±15.13 ^{a)}
麦粒灸组	10	48.63±13.08 ^{b)}	71.43±13.69 ^{c)}	51.80±14.70 ^{b)}
美沙拉嗪组	10	40.73±15.37 ^{b)}	65.26±19.20 ^{b)}	41.19±11.78 ^{b)}

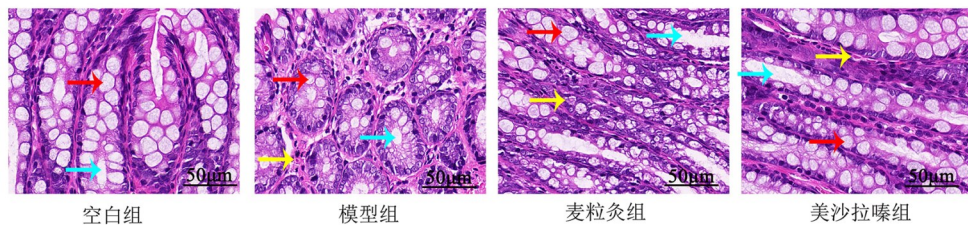
注：ICAM-1，细胞间黏附分子1；IL-6，白细胞介素6；TNF- α ，肿瘤坏死因子 α 。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

2.4 各组小鼠结肠组织病理学变化及病理评分

图1示，空白组小鼠结肠黏膜结构完整，腺体排列整齐，隐窝正常，未见到明显的炎性细胞浸润；模型组小鼠结肠黏膜形态破坏，肠腺排列紊乱、隐窝萎缩，有明显的炎性细胞浸润；与模型组比较，麦粒灸组、美沙拉嗪组小鼠结肠黏膜形态相对保存较好，腺体与隐窝结构得到了改善，炎性细胞浸润减少。

空白组小鼠结肠组织病理评分为0分，模型组为(3.50±0.53)分，麦粒灸组为(2.40±0.70)分，美沙拉嗪组为(1.90±0.74)分。与空白组比较，模型组小鼠结肠组织病理评分升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，麦粒灸组和美沙拉嗪组小鼠结肠组织病理评分均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；麦粒灸组与美沙拉嗪组小鼠结肠组织病理评分比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。



注：黄色箭头指示为炎性细胞浸润；蓝色箭头指示结肠组织中隐窝结构；红色箭头指示结肠组织中肠腺结构。

图1 各组小鼠结肠组织病理形态图 (HE染色， $\times 200$)

Figure 1 Histopathological morphology of colon tissues of mice in each group (HE staining, $\times 200$)

2.5 各组小鼠结肠组织中 JAK2、STAT3、SOCS3 mRNA 表达比较

表 5 示, 与空白组比较, 模型组小鼠结肠组织中 JAK2、STAT3 mRNA 表达升高, SOCS3 mRNA 表达降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 麦粒灸组和美沙拉嗪组小鼠结肠组织中 JAK2、STAT3 mRNA 表达降低, SOCS3 mRNA 表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 麦粒灸组与美沙拉嗪组小鼠结肠组织 JAK2、STAT3、SOCS3 mRNA 表达比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 5 各组小鼠结肠组织中 JAK2、STAT3、SOCS3 mRNA 表达比较

Table 5 Comparison of mRNA expression of JAK2, STAT3, and SOCS3 in colon tissue of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	JAK2	STAT3	SOCS3
空白组	4	1.00±0.04	1.00±0.09	1.00±0.10
模型组	4	1.91±0.15 ^{a)}	2.02±0.12 ^{a)}	0.34±0.09 ^{a)}
麦粒灸组	4	1.57±0.10 ^{b)}	1.62±0.15 ^{b)}	0.66±0.08 ^{b)}
美沙拉嗪组	4	1.45±0.13 ^{b)}	1.59±0.16 ^{b)}	0.79±0.11 ^{b)}

注: JAK2, 非受体型酪氨酸蛋白激酶 2; STAT3, 信号转导及转录激活蛋白 3; SOCS3, 细胞因子信号转导抑制因子 3。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$ 。

2.6 各组小鼠结肠组织 JAK2、STAT3、SOCS3 免疫组化阳性表达比较

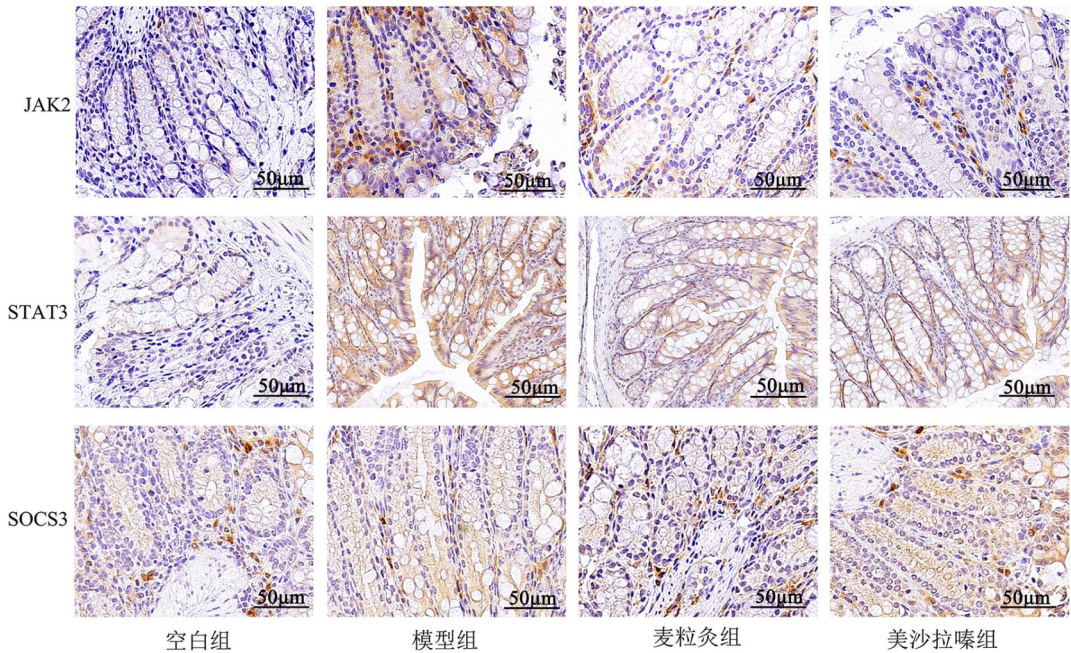
表 6 示, 与空白组比较, 模型组小鼠结肠组织 JAK2、STAT3 阳性表达升高, SOCS3 阳性表达降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 麦粒灸组和美沙拉嗪组小鼠结肠组织 JAK2、STAT3 阳性表达降低, SOCS3 阳性表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 麦粒灸组和美沙拉嗪组小鼠结肠组织 JAK2、STAT3、SOCS3 阳性表达比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。各组小鼠结肠组织中 JAK2、STAT3、SOCS3 免疫组化染色见图 2。

表 6 各组小鼠结肠组织中 JAK2、STAT3、SOCS3 阳性表达比较

Table 6 Comparison of positive expression of JAK2, STAT3, and SOCS3 in colon tissue of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	JAK2	STAT3	SOCS3
空白组	4	0.42±0.06	0.50±0.14	0.72±0.07
模型组	4	1.14±0.16 ^{a)}	1.34±0.12 ^{a)}	0.41±0.06 ^{a)}
麦粒灸组	4	0.81±0.03 ^{b)}	1.06±0.15 ^{c)}	1.06±0.15 ^{b)}
美沙拉嗪组	4	0.71±0.02 ^{b)}	0.98±0.11 ^{b)}	1.17±0.12 ^{b)}

注: JAK2, 非受体型酪氨酸蛋白激酶 2; STAT3, 信号转导及转录激活蛋白 3; SOCS3, 细胞因子信号转导抑制因子 3。



注: 图中棕黄色颗粒为阳性表达。
JAK2, 非受体型酪氨酸蛋白激酶 2; STAT3, 信号转导及转录激活蛋白 3; SOCS3, 细胞因子信号转导抑制因子 3。

图 2 各组小鼠结肠组织中 JAK2、STAT3、SOCS3 阳性表达免疫组化图

Figure 2 Immunohistochemical staining of the positive expression of JAK2, STAT3 and SOCS3 in colon tissue of mice in each group

2.7 各组小鼠结肠组织中 JAK2、SOCS3 免疫荧光平均荧光强度比较

表 7 示, 与空白组比较, 模型组小鼠结肠组织 JAK2 平均荧光强度升高, SOCS3 平均荧光强度降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 麦粒灸组和美沙拉嗪组小鼠结肠组织 JAK2 平均荧光强度降低, SOCS3 平均荧光强度升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 麦粒灸组与美沙拉嗪组小鼠结肠组织 JAK2、SOCS3 平均荧光强度比较差异无统计学意义 ($P>$

表 7 各组小鼠结肠组织中 JAK2、SOCS3 平均荧光强度表达比较

Table 7 Comparison of mean fluorescence intensity of JAK2 and SOCS3 in colon tissue of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	JAK2	SOCS3
空白组	4	29.56 $\pm$ 2.38	50.57 $\pm$ 4.02
模型组	4	65.69 $\pm$ 7.39 ^{a)}	7.78 $\pm$ 2.01 ^{a)}
麦粒灸组	4	41.83 $\pm$ 2.93 ^{b)}	35.45 $\pm$ 6.51 ^{b)}
美沙拉嗪组	4	33.93 $\pm$ 4.54 ^{b)}	42.61 $\pm$ 8.28 ^{b)}

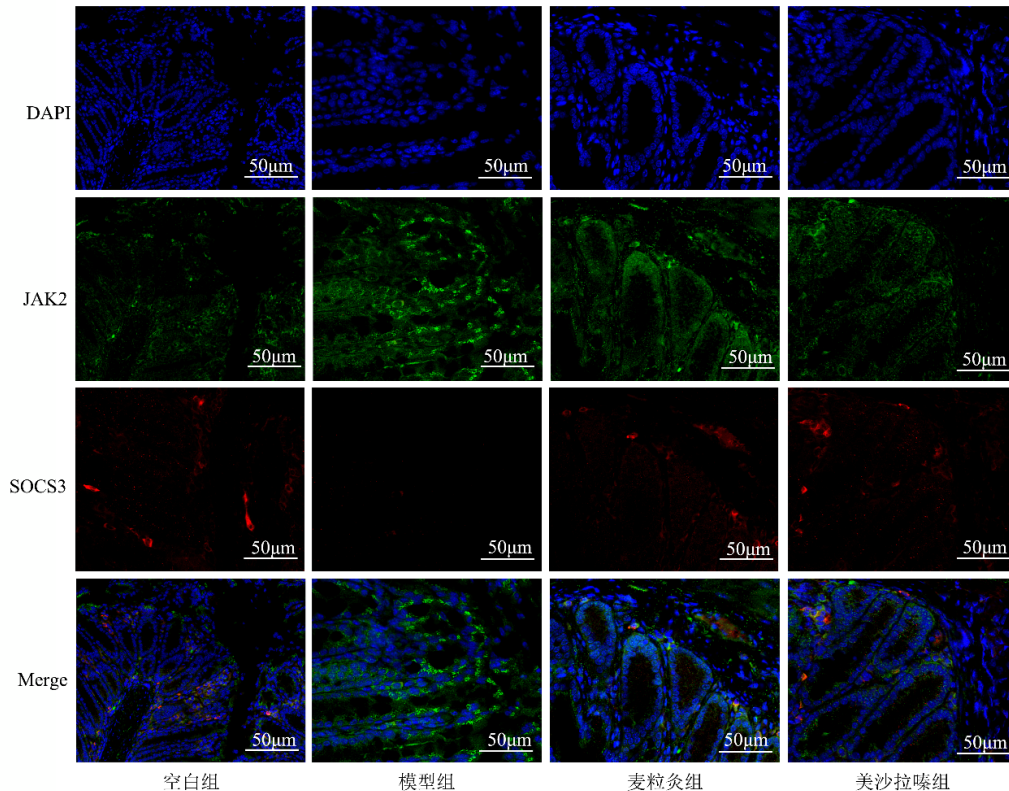
注: JAK2, 非受体酪氨酸蛋白激酶 2; SOCS3, 细胞因子信号转导抑制因子 3。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$ 。

0.05)。各组小鼠结肠组织中 JAK2、SOCS3 平均荧光强度情况见图 3。

3 讨论

UC 属于中医学“痢疾”“肠癖”“滞下”等范畴, 病位在肠, 主要责之于脾胃^[16]。《古今医鉴》记载:“夫肠癖者, 大便下血也。”课题组前期基础实验^[17-18]证实, 针刺“中脘”“天枢”“上巨虚”能够有效缓解 UC 的症状, 其机制可能与减轻炎症反应、促进结肠细胞自噬等有关。中脘为胃之募穴, 八会穴之腑会, 具有理气和胃、健脾祛湿的作用; 天枢为大肠之募穴, 具有疏调肠腑、理气行滞的作用; 上巨虚为手阳明大肠经之下合穴, 具有补益气血、调理肠胃的作用。上巨虚、中脘和天枢配伍属于“合募配穴”, 能够相互协调、增强疗效。美沙拉嗪是一种用于治疗溃疡性结肠炎的药物, 属于 5-氨基水杨酸类药物, 主要是通过抑制炎症过程中的前列腺素合成, 减少炎症介质的产生, 从而发挥抗炎作用^[19], 故本研究选择其作为阳性对照药物。本实验采用自由饮用 DSS 溶液制备 UC 小鼠模型, 小鼠出现肛周不洁、大便性状不成形、体质量



注: 图中绿色荧光为 JAK2 表达; 红色荧光为 SOCS3 表达。

JAK2, 非受体酪氨酸蛋白激酶 2; SOCS3, 细胞因子信号转导抑制因子 3。

图 3 各组小鼠结肠组织中 JAK2、SOCS3 表达免疫荧光图 ($\times 200$)

Figure 3 Immunofluorescence images of JAK2-SOCS3 in colon tissue of mice in each group ($\times 200$)

减轻,提示造模成功。经过麦粒灸/美沙拉嗪干预后,小鼠大便较成形、肛周较干净、体质量逐渐增加,说明麦粒灸“中脘”“天枢”“上巨虚”能够有效改善小鼠的胃肠功能,疗效与美沙拉嗪相当。另外,麦粒灸和美沙拉嗪在改善结肠长度、肠重指数及结肠黏膜损伤评分方面效果亦相当。

持续性炎症反应是 UC 发生发展的重要环节,是外周血白细胞通过血管迁移至炎症部位发生聚集和活化,需要多种不同的黏附分子和其受体的相互作用才能完成^[20]。ICAM-1 作为跨膜糖蛋白和炎症中白细胞的重要黏附分子,能够介导免疫细胞的黏附和迁移,并在促炎细胞因子(如 IL-6、TNF- α)的诱导下过度表达,参与炎症和免疫反应^[21]。IL-6、TNF- α 被认为是 UC 肠道炎症的关键介质,可反映体内炎症的严重程度^[22]。IL-6 作为体内炎症的触发因素,是反映炎症程度的重要指标^[23]。TNF- α 是一种多效性细胞因子,具有强烈的促炎和免疫调节特性,在炎症性肠病中起着关键作用^[24]。本实验发现,模型组小鼠血清 ICAM-1、TNF- α 、IL-6 含量显著升高,提示 DSS 诱导的 UC 小鼠结肠组织损伤产生了一系列炎症反应;而麦粒灸组和美沙拉嗪组小鼠血清 ICAM-1、IL-6、TNF- α 含量显著减少,提示麦粒灸和美沙拉嗪可通过减少血清 ICAM-1、IL-6、TNF- α 的释放,减少炎症细胞的浸润,从而起到对结肠黏膜的保护作用,这与 HE 染色和结肠组织病理评分结果相吻合。上述研究结果均说明麦粒灸能够减轻 UC 小鼠的结肠黏膜损伤,减轻炎症反应,与美沙拉嗪效果相当。

JAK2/STAT3 信号通路作为主要的信号转导通路之一,在炎症反应中发挥关键作用,同时也在 UC 的发生发展中发挥着重要作用^[25]。JAK2 是一种非受体酪氨酸激酶,广泛分布于多种组织和细胞中,可被多种细胞因子激活^[26]。STAT3 是 STAT 家族的成员,也是许多细胞因子和生长因子受体的重要信号介质,在细胞生长、细胞存活、细胞分化、免疫和炎症反应中起重要作用^[27]。由于 JAK2 是 STAT3 信号传导的上游激活剂,JAK2 磷酸化能级联诱导 STAT3 的磷酸化,招募炎症细胞到免疫损伤部位,加剧免疫损伤和扩大炎症反应^[28]。SOCS3 属于细胞因子信号转导抑制蛋白 SOCS 家族,是生长因子和炎症信号转导的诱导型负反馈调节因子,参与 JAK2/STAT3 信号通路的负反馈调节,在调节炎症反应中发挥着重要作用^[29]。相关研究^[30]表明,SOCS3 可结合并抑制 JAK2 激酶的活性,从而

阻断 STAT3 的激活。本研究发现,模型组小鼠结肠组织 JAK2、STAT3 mRNA 及阳性表达均升高,SOCS3 mRNA 及阳性表达降低,表明 JAK2/STAT3 信号通路及 SOCS3 参与了 DSS 诱导的炎症反应。分别经麦粒灸和美沙拉嗪肠溶片干预后均能显著升高 SOCS3 mRNA 及阳性表达,抑制 JAK2、STAT3 mRNA 及阳性表达,免疫荧光结果亦相同。以上结果表明两种干预方法均可通过 SOCS3 调控 JAK2/STAT3 信号通路抑制促炎因子的释放,减轻结肠损伤,改善受损肠黏膜屏障。

综上所述,麦粒灸干预 UC 小鼠肠黏膜屏障损伤的作用机制可能是通过 SOCS3 调控 JAK2/STAT3 信号通路关键因子,抑制炎症介质的过度释放,减轻结肠组织损伤及肠道炎症反应,保护肠黏膜结构的完整性,修复肠黏膜屏障损伤。本实验仍存在局限性:首先,观察时间短和样本量小,为进一步研究麦粒灸的治疗机制,今后的研究可通过延长干预过程和增加样本量来进一步观察;其次,目前的研究主要集中在信号通路的邻近分子上而不是全部,故对于麦粒灸治疗 UC 的作用机制仍有待于后续研究进一步探讨。

参考文献

- [1] UNGARO R, MEHANDRU S, ALLEN PB, et al. Ulcerative colitis[J]. *Lancet*, 2017, 389(10080):1756-1770.
- [2] 崔婉婉,孙峥嵘. 溃疡性结肠炎发病机制研究进展[J]. *现代免疫学*, 2019, 39(1):77-81.
- [3] JIA K, WANG Y, TONG X, et al. KGF is delivered to inflammatory and induces the epithelial hyperplasia in trinitrobenzene sulfonic acid-induced ulcerative colitis rats[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14:217-231. doi: 10.2147/DDDT.S227651.
- [4] LU Z, XIONG W, XIAO S, et al. Huanglian Jiedu Decoction ameliorates DSS-induced colitis in mice via the JAK2/STAT3 signalling pathway[J]. *Chin Med*, 2020, 15:45. doi: 10.1186/s13020-020-00327-9.
- [5] FANG S, FENG J, ZHANG H, et al. MiR-455 targeting SOCS3 improve liver lipid disorders in diabetic mice[J]. *Adipocyte*, 2020, 9(1):179-188.
- [6] 程艳婷,路晓红,王艳珍,等. 中脘、天枢、上巨虚为肠病基本方的古代文献研究[J]. *江苏中医药*, 2011, 43(7):79-80.
- [7] 徐慧超,武荣林,蒋子文,等. 电针调节巨噬细胞极化改善大鼠溃疡性结肠炎的机制研究[J]. *针刺研究*, 2023, 48(10):1033-1040.
- [8] 徐娜. 麦粒灸不同穴位处方对 UC 大鼠结肠组织炎症介

- 质及黏膜屏障的影响[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2016.
- [9]徐娜, 马铁明. 麦粒灸治疗溃疡性结肠炎[J]. 实用中医内科杂志, 2015, 29(4): 145-147.
- [10]ZHANG C, HU Y, YUAN Y, et al. Liposome-embedded SOD attenuated DSS-induced ulcerative colitis in mice by ameliorating oxidative stress and intestinal barrier dysfunction[J]. Food Funct, 2023, 14(9): 4392-4405.
- [11]许和鹏, 董伟波, 魏伟, 等. 不同浓度葡聚糖硫酸钠诱导小鼠急性溃疡性结肠炎模型的评价[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(10): 1627-1633.
- [12]余曙光, 徐斌. 实验针灸学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2016: 287-290.
- [13]ZHANG Z, LI S, CAO H, et al. The protective role of phloretin against dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice [J]. Food Funct, 2019, 10(1): 422-431.
- [14]COOPER HS, MURTHY SN, SHAH RS, et al. Clinico-pathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis[J]. Lab Invest, 1993, 69(2): 238-249.
- [15]PAI RK, JAIRATH V, VANDE CASTEELE N, et al. The emerging role of histologic disease activity assessment in ulcerative colitis [J]. Gastrointest Endosc, 2018, 88(6): 887-898.
- [16]中华中医药学会《溃疡性结肠炎中医诊疗指南》项目组. 溃疡性结肠炎中医诊疗指南(2023)[J]. 中医杂志, 2024, 65(7): 763-768.
- [17]祁超, 闫丽萍, 燕平, 等. 电针膈穴“肠病方”对 UC 模型大鼠 IL-6 及 NF- κ Bp65 的影响[J]. 山西中医学院学报, 2013, 14(4): 2-4.
- [18]武荣林, 徐慧超, 蒋子文, 等. 电针“肠病方”对急性溃疡性结肠炎大鼠结肠自噬及 AMPK/mTOR 信号通路的影响[J]. 针刺研究, 2023, 48(8): 818-824.
- [19]逢曜玮, 曹彬, 张炜, 等. 美沙拉嗪治疗轻中度溃疡性结肠炎患者的肠黏膜愈合率分析[J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(8): 844-846.
- [20]OAKLEY OR, KIM H, EL-AMOURI I, et al. Periovalvular leukocyte infiltration in the rat ovary [J]. Endocrinology, 2010, 151(9): 4551-4559.
- [21]WEI X, YI X, ZHU XH, et al. Histone methylation and vascular biology[J]. Clin Epigenetics, 2020, 12(1): 30.
- [22]GU X, MA Z, FANG J, et al. Obesity enhances antioxidant capacity and reduces cytokine levels of the spleen in mice to resist splenic injury challenged by escherichia coli [J]. J Immunol Res, 2020, 2020: 5948256. doi: 10.1155/2020/5948256.
- [23]HUANG S, ZHU X, XIAO D, et al. Therapeutic effect of percutaneous kyphoplasty combined with anti-osteoporosis drug on postmenopausal women with osteoporotic vertebral compression fracture and analysis of postoperative bone cement leakage risk factors: a retrospective cohort study[J]. J Orthop Surg Res, 2019, 14(1): 452.
- [24]WANG X, CAO J, SUN BW, et al. Exogenous carbon monoxide attenuates inflammatory responses in the small intestine of septic mice[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(40): 5719-5728.
- [25]LIU M, LI Y, LIANG B, et al. Hydrogen sulfide attenuates myocardial fibrosis in diabetic rats through the JAK/STAT signaling pathway [J]. Int J Mol Med, 2018, 41(4): 1867-1876.
- [26]POPOVA M, ISAYEV O, TROPSHA A. Deep reinforcement learning for de novo drug design [J]. Sci Adv, 2018, 4(7): eaap7885. doi: 10.1126/sciadv. aap7885.
- [27]LI P, HUANG Z, WANG J, et al. Ubiquitin-specific peptidase 28 enhances STAT3 signaling and promotes cell growth in non-small-cell lung cancer [J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 1603-1611. doi: 10.2147/OTT.S194917.
- [28]周斌, 万少兵, 王瑛, 等. SOCS3 通过调控 JAK2/STAT3 信号通路改善急性肺损伤[J]. 山西医科大学学报, 2023, 54(6): 778-784.
- [29]WANG T, TSIRUKIS DI, SUN Y. Targeting Neuroinflammation in Neovascular Retinal Diseases [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 234. doi: 10.3389/fphar. 2020.00234.
- [30]YUAN K, LEI Y, CHEN HN, et al. HBV-induced ROS accumulation promotes hepatocarcinogenesis through Snail-mediated epigenetic silencing of SOCS3 [J]. Cell Death Differ, 2016, 23(4): 616-627.

Effect of Grain-sized Moxibustion on JAK2/ STAT3 Signaling Pathway in Colon Tissue of Ulcerative Colitis Mice

ZHU Tao¹, LI Jie², YIN Hao², CHENG Yanting², JI Yufang², WANG Haijun², JI Laixi²

1. College of acupuncture, moxibustion and Massage, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, 611137;
2. The Second Clinical College, Shanxi University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the effect of grain-sized moxibustion at "Zhongwan (RN12)" "Tianshu (ST25)" and "Shangjuxu (ST37)" on the colon tissue of mice with ulcerative colitis (UC), and to analyze the potential mechanism.

Methods Forty C57BL/6 male mice were randomly divided into blank group, model group, moxibustion group and mesalazine group, with 10 mice in each group. In all the groups except for the blank group, UC mouse model was prepared by freely drinking 3% sodium dextran sulfate solution. After successful modeling, the moxibustion group was treated with grain-sized moxibustion at Zhongwan, Tianshu and Shangjuxu, 3 cones per acupoint, 30 s of each cone. The mesalazine group was given 300 mg/kg of mesalazine enteric-coated tablet solution by gavage. The blank group and the model group were only fixed by grasping without any intervention. Each group was intervened once a day for 7 consecutive days. The general condition of mice in each group was observed, and the disease activity index (DAI) score was evaluated. The colon length, intestinal weight and colon mucosal injury score were detected. The contents of serum intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected by ELISA. The pathological changes of colon tissue were observed by HE staining. The mRNA and protein expressions of non-receptor tyrosine protein kinase 2 (JAK2), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) in colon tissue of mice were detected by real-time fluorescence quantitative PCR and immunohistochemistry, respectively. The mean fluorescence intensity of JAK2 and SOCS3 in colon tissue of mice was detected by immunofluorescence double staining. **Results** Compared to the blank group, the mice in the model group had unclean perianal area, unformed stool, destroyed colonic mucosal morphology, shortened body weight and colon length, increased DAI score, intestinal weight index, colonic mucosal injury and pathological score, serum ICAM-1, IL-6 and TNF- α levels, increased mRNA and protein expression of JAK2 and STAT3 in colon tissue, and decreased mRNA and protein expression of SOCS3 ($P < 0.01$). Compared to those in the model group, the perianal area of mice in the moxibustion group and the mesalazine group was improved, and the colonic mucosal morphology was more complete; body weight and colon length increased, while DAI score, intestinal weight index, colonic mucosal injury and pathological score, serum ICAM-1, IL-6 and TNF- α levels decreased, with decreased mRNA and protein expression of JAK2 and STAT3 in colon tissue, and increased SOCS3 mRNA and protein expression ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). There was no significant difference in any index between the moxibustion group and the mesalazine group. **Conclusion** Grain-sized moxibustion at "Zhongwan", "Tianshu" and "Shangjuxu" can improve the damage of colon mucosa in UC model mice, and the mechanism may be related to the key factors regulating JAK2 / STAT3 signaling pathway based on SOCS3.

Keywords ulcerative colitis; grain-sized moxibustion; colon mucosa; cytokine signal transduction inhibitor 3; non-receptor tyrosine protein kinase 2; signal transducer and activator of transcription protein

(收稿日期: 2024-04-09; 修回日期: 2024-07-11)

[编辑: 邓媛]