

☆ XXXX ☆

电针“足三里”减轻大肠癌移植瘤小鼠5-FU化疗后结肠黏膜损伤及其对NF- κ B和AQP8蛋白的影响

张学君¹, 杨晓丹¹, 赵锦燕^{2,3,4}, 杨婷煌¹, 林久茂^{2,3,4}

(¹福建中医药大学针灸推拿学院, 福州 350122; ²福建中医药大学中西医结合研究院, 福州 350122; ³福建省中西医结合老年性疾病重点实验室, 福州 350122; ⁴福建省中西医结合高校重点实验室, 福州 350122)

【摘要】 目的:观察电针“足三里”对大肠癌移植瘤小鼠5-氟尿嘧啶(5-FU)化疗后结肠黏膜损伤、核因子 κ B(NF- κ B)和水通道蛋白8(AQP8)蛋白的影响,探讨其可能的作用机制。方法:选取BALB/c小鼠皮下注射大肠癌细胞株CT26建立大肠癌移植瘤动物模型。待瘤体生长至100~300 mm³时,将造模成功的小鼠随机分为荷瘤组、化疗组和化疗+电针组,每组6只。另取6只正常BALB/c小鼠作为正常组。化疗组和化疗+电针组于分组当天开始腹腔注射5-FU溶液(50 mg/kg, 0.01 mL/g),每日1次,共5 d;化疗+电针组每日在化疗后随即给予电针双侧“足三里”,连续波,频率2 Hz,强度1~2 mA, 5 min/次,共5 d。实验期间,每日进行小鼠疾病活动指数(DAI)评分;干预过程中,每天测量1次肿瘤体积,取材后测量小鼠瘤体质量、结肠长度;采用HE染色法观察结肠组织形态;ELISA检测血清中二胺氧化酶(DAO)和D-乳酸(D-LA)含量;免疫组织化学法检测结肠水通道蛋白8(AQP8)蛋白表达情况;免疫荧光法检测结肠核因子 κ B(NF- κ B)核转位情况;Western blot法检测结肠NF- κ B、AQP8蛋白表达水平。结果:与正常组相比,荷瘤组小鼠各项指标差异均无统计学意义。与荷瘤组相比,化疗组DAI评分升高($P<0.05$),结肠长度、瘤体质量和肿瘤质量降低($P<0.05$),血清DAO和D-LA含量升高($P<0.05$),结肠NF- κ B蛋白表达及核转位增加($P<0.05$),结肠组织AQP8蛋白表达水平降低($P<0.05$)。与化疗组相比,化疗+电针组小鼠DAI评分及血清DAO、D-LA含量降低($P<0.05$),结肠NF- κ B蛋白表达及核转位减少($P<0.05$);结肠组织AQP8蛋白表达水平升高($P<0.05$)。HE染色结果显示,正常组与荷瘤组小鼠的结肠组织结构未见异常,而化疗小鼠结肠组织出现隐窝结构破坏、炎性细胞浸润等结肠组织病理损伤;与化疗组相比,化疗+电针组小鼠结肠绒毛长度增加,组织细胞的排列紊乱改善,炎性细胞的浸润减轻。结论:电针“足三里”能抑制NF- κ B信号通路的过度激活,上调AQP8蛋白的表达,减少肠黏膜损伤,降低DAO和D-LA的释放量,从而维持肠道屏障功能。

【关键词】 电针;移植性结肠癌;5-氟尿嘧啶;肠黏膜损伤;结肠组织;核因子 κ B;水通道蛋白8

Effect of electroacupuncture at Zusanli (ST36) on colonic mucosal injury and expression of colonic NF- κ B and AQP8 proteins in mice with transplanted colorectal cancer after 5-FU chemotherapy

ZHANG Xue-jun¹, YANG Xiao-dan¹, ZHAO Jin-yan^{2,3,4}, YANG Ting-huang¹, LIN Jiu-mao^{2,3,4} (¹College of Acupuncture moxibustion and Tuina, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; ²College of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122; ³Fujian Key Laboratory of Integrative Medicine on Geriatrics, Fuzhou 350122; ⁴Key Laboratory of Integrative Medicine of Fujian Province University, Fuzhou 350122)

【ABSTRACT】 Objective To observe the effect of electroacupuncture (EA) at “Zusanli” (ST36) on colonic mucosa injury, expression of nuclear factor κ B (NF- κ B), and Aquaporin 8 (AQP8) in mice with transplanted colorectal

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20250960

引用格式:张学君,杨晓丹,赵锦燕,等.电针“足三里”减轻大肠癌移植瘤小鼠5-FU化疗后结肠黏膜损伤及其对NF- κ B和AQP8蛋白的影响[J].针刺研究,XXXX,XX(X):1-10.

项目来源:福建省自然科学基金项目(No.2024J01135)

通信作者:林久茂, E-mail: linjiu-mao@fjtc.edu.cn

cancer (CRC), so as to explore its mechanisms underlying improvement of colonic mucosal injury. **Methods** A colorectal cancer cell strain CT26 was subcutaneously injected into BALB/c mice to establish an animal model of transplanted CRC. When the tumor grew to 100–300 mm³, the mice were randomly divided into the tumor-bearing model, chemotherapy, and chemotherapy + EA groups, with 6 mice in each group. Another 6 normal BALB/c mice were used as the normal group. The mice of the chemotherapy group and the chemotherapy + EA group received intraperitoneal injection of 5-FU solution (50 mg/kg, 0.01 mL/g), once daily for 5 days. For mice of the chemotherapy + EA group, EA (2 Hz, 1–2 mA) was applied to bilateral ST36 for 5 min immediately after chemotherapy. During the experiment, the mouse daily Disease Activity Index (DAI) score, was determined for assessing the disease severity. The tumor volume was measured once daily. At the end of the experiment, the mice were sacrificed to measure the tumor mass and colonic length. Histopathological changes of the colon tissue were observed after H.E. staining. The serum contents of diamine oxidase (DAO) and D-lactate (D-LA) were detected using ELISA for assessing the extent of colonic intestinal damage. The immunoactivity of colonic AQP8 was detected using immunohistochemistry, the immunofluorescence intensity of colonic NF- κ B was detected using immunofluorescence staining for assessing the nuclear translocation status, and the expression levels of colonic NF- κ B and AQP8 proteins were detected using Western blot. **Results** Compared with the normal group, the tumor-bearing model group had no significant changes in the DAI score, contents of serum DAO and D-LA, immunoactivity, immunofluorescence intensity and protein expression levels of colonic NF- κ B and AQP8 proteins. In comparison with the tumor-bearing model group, the DAI score in chemotherapy group, and serum DAO and D-LA contents, nuclear translocation and protein expression levels of NF- κ B in the chemotherapy group were considerably increased ($P < 0.05$), while the colonic length, tumor volume, tumor mass, and the immunoactivity level of AQP8 were strikingly decreased ($P < 0.05$). Comparison between the chemotherapy and chemotherapy+EA groups showed that the DAI score, serum DAO and D-LA contents, nuclear translocation and protein expression levels of NF- κ B in the chemotherapy + EA group were significantly lower than those in the chemotherapy group ($P < 0.05$), while the immunoactivity level of AQP8 in the chemotherapy+EA group were notably higher than those in the chemotherapy group ($P < 0.05$), and no significant differences were found between the chemotherapy and chemotherapy+EA groups in the levels of colonic length, tumor volume and mass. H.E. staining showed that the colonic tissue structure in the tumor-bearing group had no abnormal changes, and that in the chemotherapy group displayed pathological injury, including shortening and thickening of intestinal villi, destruction of glandular structure, increased shedding of goblet cells, infiltration of inflammatory cells, and enlargement of cell nuclei. Compared with the chemotherapy group, the colonic structure in the chemotherapy + EA group was improved, including increase in the villi length, and reduction in the disordered arrangement of the tissue cells and infiltration of inflammatory cells. **Conclusion** EA of ST36 can mitigate intestinal mucosal damage to maintain intestinal barrier function in mice with transplanted CRC, which may be related with its functions in inhibiting the excessive activation of the NF- κ B signaling pathway, up-regulating the expression levels of AQP8 protein, and reducing DAO and D-LA release.

[KEYWORDS] Electroacupuncture; Transplanted colorectal cancer; 5-fluorouracil; Intestinal mucosal injury; Colonic tissue; NF- κ B; AQP8

大肠癌是临床上常见的消化道恶性肿瘤^[1]。5-氟尿嘧啶(5-FU)是大肠癌的一线化疗药物,但是约50%~80%接受化疗方案的患者会出现不同程度的肠道黏膜损伤,其中约15%的患者因严重腹泻而需要住院治疗,约1%~5%的患者死于5-FU相关腹泻^[2]。由化疗引起的肠黏膜损伤被称为“化疗性肠黏膜损伤”(CIMI),临床主要表现为腹泻、腹痛、便血等胃肠道症状,目前以支持治疗和症状管理为主,尚无特效药物,仅局限于缓解疼痛、抗腹泻和控制感染等手段^[3]。

核因子 κ B(NF- κ B)是调控各种炎性因子分泌的重要转录因子之一,与肠道炎性反应紧密相关^[4],是肠道炎性反应中的重要通路^[5]。水通道蛋白8(AQP8)与消化系统的水代谢紧密相关,其下调会造成肠道水肿,破坏肠黏膜屏障,诱发肠黏膜炎性反应,造成腹泻的发生^[6-7]。这可能在化疗导致的肠道屏障功能障碍中起到关键作用^[8]。

足三里为胃经之下合穴,可扶正补虚、健脾益胃,以壮气血生化之源。研究表明,针刺“足三里”可恢复肠黏膜屏障功能,对肠黏膜组织具有保护作

用^[9],但其机制尚不明确。本研究通过观察电针“足三里”对大肠癌移植瘤小鼠5-FU化疗后肠黏膜损伤的影响,探讨其作用机制,以期为临床治疗化疗后肠黏膜损伤提供进一步的实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性BALB/c小鼠24只,4~6周龄,体质量18~20 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,生产许可证号:SYXK(闽)2019-0007。动物饲养于恒温恒湿的环境中,温度(20±2)℃、湿度(50±10)%,保持12 h的光暗循环和连续通风,并提供正常的食物和水。本实验通过福建中医药大学实验动物伦理委员会审批(批准文号:FJTCMIACUC 2022196),实验过程中对动物的处置遵循中华人民共和国科学技术部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》及相关伦理规定^[10]。

1.2 主要试剂与仪器

RPMI1640培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、青霉素-链霉素混合液和基质胶(美国Life Technologies),5-FU注射液(上海旭东海普药业),粪便隐血(OB)试剂(珠海贝索),DAB染色液和免疫组织化学染色试剂盒(福州迈新),苏木精染色液、伊红染色液(北京索莱宝),小鼠二胺氧化酶(DAO)和D-乳酸(D-LA)ELISA试剂盒(江苏酶免实业),增强型RIPA裂解液、蛋白酶抑制剂(武汉博士德),AQP8抗体(江苏亲科),NF-κB抗体(北京安诺伦),HRP-山羊抗小鼠、HRP-山羊抗兔抗体(武汉三鹰)。

电子分析天平(上海奥豪斯),细胞计数仪(美国Countstar),0.25 mm×13 mm华佗牌针灸针、电子针疗仪(苏州医疗用品厂有限公司),冷冻离心机(广州吉迪),石蜡切片机(德国徕卡),生物组织摊烤片机(孝感亚光),正置光学显微镜(日本Nikon),酶标仪(德国Tecan),PowerPAC™HC高电流电泳仪、ChemiDoc XRS凝胶成像系统(美国Bio-Rad),激光扫描共聚焦显微镜(德国Zeiss),Image J图像分析软件(美国NIH)。

1.3 造模方法与分组

大肠癌模型:参考本课题组前期造模^[10],大肠选取CT26细胞株制备细胞密度为 1×10^6 /mL的单细胞悬液。BALB/c小鼠适应性喂养1周后,于右侧腋窝下部位进行脱毛处理,每只小鼠在此部位皮下接种0.1 mL CT26细胞悬液。当瘤体生长至100~300 mm³时即为大肠癌移植瘤造模成功。造模成功

当天进行分组,将造模成功的小鼠按随机数字表法分为3组,即荷瘤组、荷瘤+化疗组(简称化疗组)和荷瘤+化疗+电针组(简称化疗+电针组),每组6只。同时随机选取6只未接种的BALB/c小鼠作为正常组。

化疗后肠黏膜损伤模型:参照Zhang等^[11]方法,在肠癌移植瘤造模完成并分组后,立即将5-FU注射液用1×PBS溶液配制为浓度50 mg/kg的溶液进行腹腔注射(注射剂量0.1 mL/10 g),每天1次,连续5 d;正常组和荷瘤组注射等量0.9%氯化钠溶液。

1.4 干预方法

化疗+电针组小鼠在每次给予5-FU腹腔注射后立即进行电针干预操作,每日1次,共5 d。5-FU化疗和电针干预频次相同。电针干预参考课题组前期方法^[12],选取小鼠双侧“足三里”,即小鼠膝关节后方外侧,腓骨小头下约2 mm处^[13],使用0.25 mm×13 mm规格的毫针直刺2~3 mm,随后接入电子针疗仪,双侧“足三里”连接一对电极,采用连续波,频率2 Hz,强度1~2 mA(以肌肉振动为度)。根据课题组前期实验研究^[9],电针“足三里”留针时间5 min可减轻化疗所致慢性肠黏膜损伤,因此本研究刺激时间设定为5 min。正常组、荷瘤组和化疗组进行与化疗+电针组相同的抓取、固定等操作,不给予电针刺激。各组小鼠均于同等条件下进行饲养。

1.5 观察指标及检测方法

疾病活动指数(DAI)评分:干预开始当天(第1天)至干预结束(第6天),每日观察1次小鼠一般情况及状态(皮毛光泽和精神状态等),分组完成当天开始干预,于干预给药前记录小鼠体质量、测试粪便隐血及腹泻指数。体质量下降百分比计算公式:(本次称重-上次称重)÷上次称重×100%。粪便隐血及腹泻情况观察:将小鼠放置在清洁、独立的饲料笼中,收集小鼠粪便,将粪便放在干净滤纸上,观察其软硬程度并评分,随后将粪便涂抹于贝索便隐血试纸上,滴加试剂并计时,记录试纸出现紫色时间。将得到的数据记录并计算小鼠疾病指数DAI。疾病活动指数(DAI)计算方式:DAI=体质量下降评分+粪便隐血评分+腹泻指数评分。DAI评分表示肠道损伤严重程度,分数越高说明肠道损伤越严重。

取材:小鼠麻醉处死后,取出结直肠。取近肛门端长约1.5 cm的结肠组织,置于4%多聚甲醛溶液中固定,24 h后置于70%乙醇保存,用于后续相关形态学检测。剩余结肠组织分装于1.5 mL离心

管中,并放入干冰保存,随后转移至 -80°C 超低温冰箱保存,用于后续Western blot检测。

瘤体体积、肿瘤质量、结肠长度测量:于干预当天开始,每天测量1次肿瘤体积,肿瘤体积计算公式为: $V(\text{mm}^3)=L\times W^2\div 2$ (L 为长度, W 为宽度)。取材时,剪开小鼠肋部皮肤,沿着皮肤取下完整的肿瘤组织进行称重记录;取出完整结肠后,测量其长度并拍照。

ELISA法检测血清DAO和D-LA含量:取材当日,小鼠眼眶取血后,静置1~2 h,所取血样于 4°C 离心15 min后取上清,分装至200 μL 离心管中。取96孔板,设置标准品孔和样本孔,标准品孔各加不同浓度的标准品50 μL ,样本孔先加待测样本10 μL ,再加样本稀释液40 μL ,随后标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶标记的检测抗体100 μL ,于 37°C 恒温箱温育60 min。弃去液体,洗板5次,每孔加入底物A、B各50 μL , 37°C 避光孵育15 min。每孔加入终止液50 μL ,在酶标仪450 nm波长处测定各孔的吸光度值,按照标准曲线计算样品DAO、D-LA含量。

HE染色法观察小鼠结肠病理形态:结肠组织经4%多聚甲醛固定后,去除多余结缔组织,修剪成长度为0.8 cm的小段进行脱水包埋。选取所需组织蜡块修切成厚度为4 μm 的切片,脱蜡复水后染色,封片。于光学显微镜下观察结肠组织形态($\times 40$, $\times 100$)。

免疫组织化学法检测AQP8蛋白表达:将结肠组织进行固定、脱水、包埋、切片、脱蜡操作。切片置于 100°C 抗原修复液中10 min,随后冷却至常温,用PBS清洗5 min $\times 3$ 次。用免疫组织化学笔圈出载玻片上的组织,滴加0.3% Triton X-100破膜剂,湿盒中常温反应10 min。滴加内源性过氧化物酶阻断剂,常温孵育10 min,PBS清洗后滴加封闭液, 37°C 孵育40 min。滴加AQP8一抗工作液(稀释比例1:200), 4°C 孵育17~18 h。PBS清洗后将二抗工作液滴加于样本上,置于 37°C 恒温箱中孵育40 min。滴加链霉素,于 37°C 孵育35 min,用超纯水和DAB的A、B、C溶液按照17:1:1:1的比例避光配制DAB显色液,滴加于组织上,于光学显微镜下观察到组织呈现棕黄色颗粒样阳性表达,随后用超纯水洗净组织。将载玻片放入苏木精中复染35~40 s,用超纯水洗净后,PBS溶液浸泡返蓝3 min。封片后在光学显微镜下观察($\times 400$),用Image J图像分析软件对其进行半定量分析,计算AQP8阳性表达率。

免疫荧光法检测NF- κB 核转位情况:结肠组织切片进行脱蜡复水、抗原修复后,用免疫组织化学笔圈出载玻片上的组织,滴加0.3% Triton X-100破膜剂,湿盒中常温反应10 min,用PBS清洗5 min $\times 3$ 次。滴加5% BSA封闭液, 37°C 孵育1 h。甩干封闭液,滴加一抗NF- κB 工作液(1:200), 4°C 孵育17~18 h。PBS清洗后避光滴加二抗工作液 37°C 孵育1 h。PBS洗涤后,滴加含DAPI的抗荧光淬灭封片剂,盖玻片封片。采用激光共聚焦显微镜采集图像,以Image J图像分析软件进行分析荧光阳性面积百分比。

Western blot法检测结肠NF- κB 和AQP8蛋白表达:取100~150 μg 结肠组织块,加入适量的蛋白酶抑制剂和RIPA裂解液,置于研磨仪中充分匀浆。 4°C 下离心15 min,吸取上清,BCA测定蛋白浓度。根据目的蛋白分子量配制所需浓度的凝胶后上样进行电泳,之后400 mA恒流转膜。使用5%脱脂奶粉室温封闭1 h,TBST洗涤5 min $\times 3$ 次。将膜置于NF- κB 和AQP8一抗(稀释比例均为1:1 000)溶液中 4°C 摇床过夜,转移至TBST中洗涤5 min $\times 3$ 次。根据一抗来源选择相应的用HRP标记的二抗(1:5 000),室温孵育1 h。通过化学发光成像仪器曝光成像。将得到的条带用Image J分析软件测定灰度值。以目的蛋白与内参蛋白GAPDH灰度值的比值作为目的蛋白相对表达量。

1.6 统计学分析

采用SPSS24.0软件对数据进行分析。计量数据符合正态分布,用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。组间比较用方差分析,进一步两两比较,方差齐则选用LSD检验,方差不齐则选用Games Howell检验。以 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

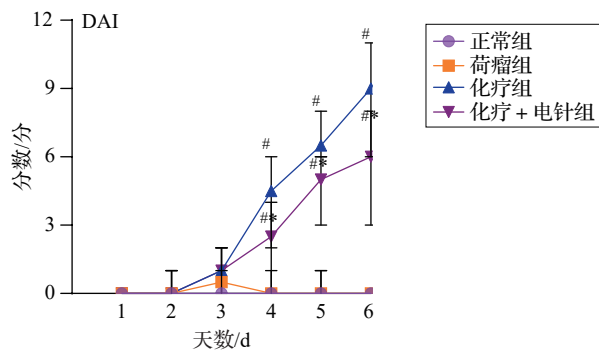
2 结果

2.1 各组小鼠DAI评分比较

与正常组相比,荷瘤组小鼠DAI差异无统计学意义;干预第4、5、6天,与荷瘤组相比,化疗组和化疗+电针组小鼠DAI均升高($P<0.05$);与化疗组相比,化疗+电针组小鼠DAI降低($P<0.05$)。见图1。

2.2 各组小鼠结肠长度比较

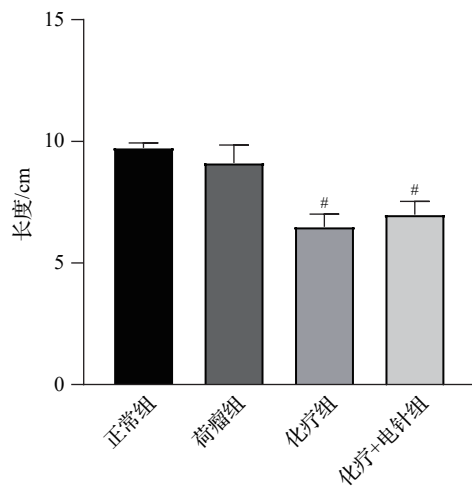
与正常组相比,荷瘤组结肠长度差异无统计学意义;与荷瘤组相比,化疗组和化疗+电针组小鼠结肠长度降低($P<0.05$);与化疗组相比,化疗+电针组结肠长度增加,但差异无统计学意义。见图2。



注:DAI为疾病活动指数。与荷瘤组比较,[#] $P<0.05$;
与化疗组比较,^{*} $P<0.05$ 。

图1 各组小鼠DAI分数比较($\bar{x}\pm s$,6只鼠/组)

Fig. 1 Comparison of DAI scores of mice in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 mice/group)



注:与荷瘤组比较,[#] $P<0.05$ 。

图2 各组小鼠结肠长度比较($\bar{x}\pm s$,6只鼠/组)

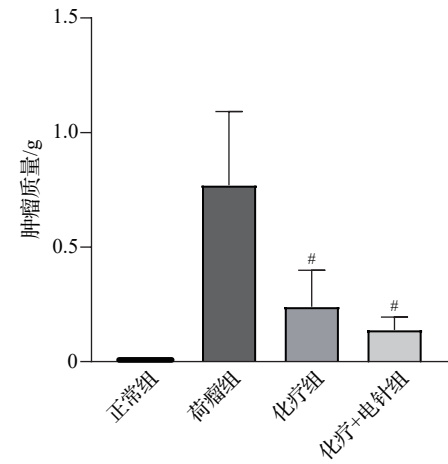
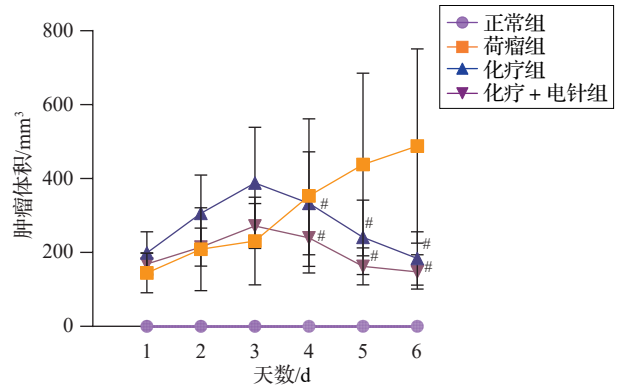
Fig. 2 Comparison of colon length of mice in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 mice/group)

2.3 各组小鼠瘤体体积和肿瘤质量比较

与荷瘤组相比,化疗组和化疗+电针组小鼠瘤体体积(干预第4、5、6天)和肿瘤质量降低($P<0.05$);与化疗组相比,化疗+电针组小鼠瘤体体积和肿瘤质量差异无统计学意义。见图3。

2.4 各组小鼠结肠组织形态比较

正常组与荷瘤组小鼠的结肠组织结构未见异常,结肠腺体排列整齐。化疗组小鼠结肠组织出现结肠隐窝结构破坏,肠绒毛长度变短增粗,腺体结构破坏,杯状细胞脱落增多,炎性细胞浸润,细胞核增大等病理变化。与化疗组相比,化疗+电针组小鼠结肠绒毛长度增加,组织细胞的排列紊乱改善,炎性细胞的浸润减轻。见图4。



注:与荷瘤组比较,[#] $P<0.05$ 。

图3 各组小鼠瘤体体积和质量比较($\bar{x}\pm s$,6只鼠/组)

Fig. 3 Comparison of volume and quality of muroma bodies of mice in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 mice/group)

2.5 各组小鼠血清DAO和D-LA含量比较

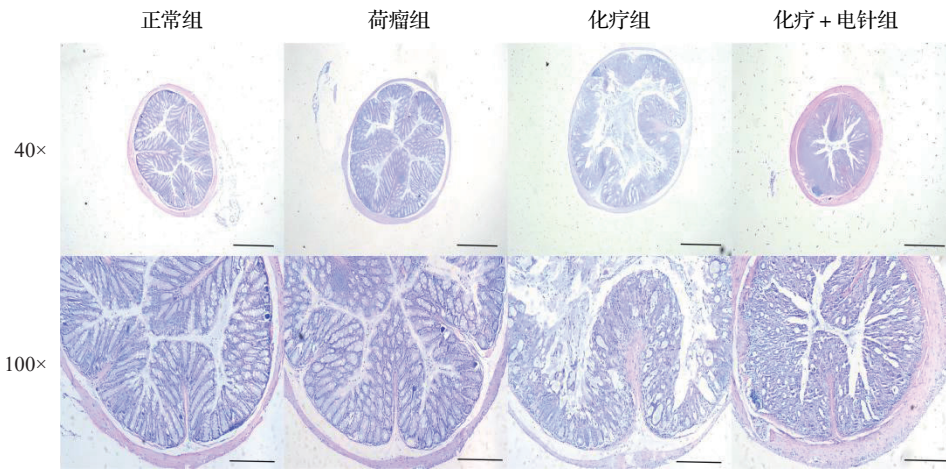
与正常组相比,荷瘤组小鼠血清中DAO和D-LA含量差异无统计学意义;与荷瘤组相比,化疗组小鼠血清中DAO和D-LA含量升高($P<0.05$);与化疗组相比,化疗+电针组小鼠血清中DAO和D-LA含量降低($P<0.05$)。见图5。

2.6 各组小鼠结肠组织AQP8蛋白阳性表达比较

与正常组相比,荷瘤组小鼠结肠AQP8蛋白表达差异无统计学意义;与荷瘤组相比,化疗组小鼠结肠AQP8蛋白阳性表达减少($P<0.05$);与化疗组相比,化疗+电针组结肠AQP8蛋白阳性表达增加($P<0.05$)。见图6。

2.7 各组小鼠结肠组织NF-κB核转位情况比较

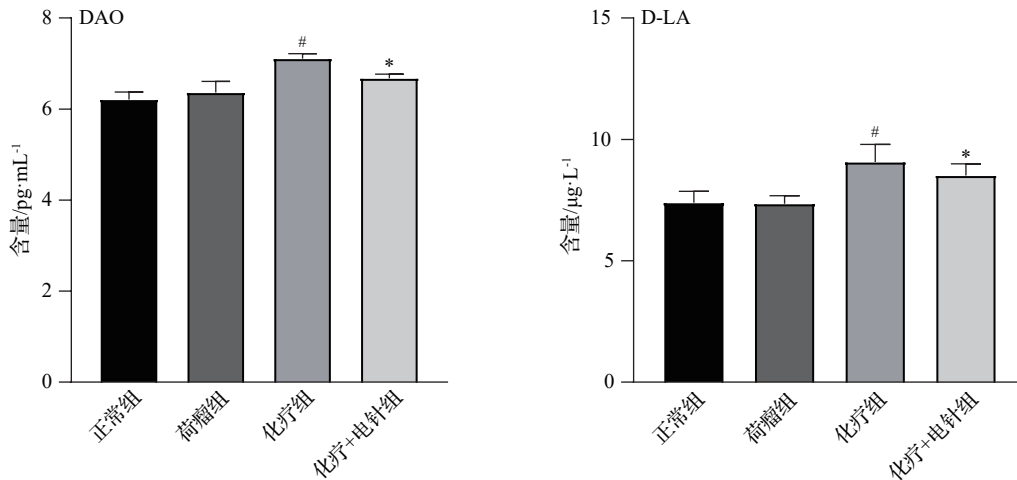
与正常组相比,荷瘤组小鼠结肠NF-κB蛋白核转位表达差异无统计学意义;与荷瘤组相比,化疗组小鼠结肠NF-κB蛋白核转位表达百分比增加($P<0.05$);与化疗组相比,化疗+电针组小鼠结肠NF-κB蛋白核转位表达百分比减少($P<0.05$)。见图7。



注:第1行标尺=400 μm;第2行标尺=200 μm。

图4 各组小鼠结肠黏膜损伤病理形态比较(HE染色)

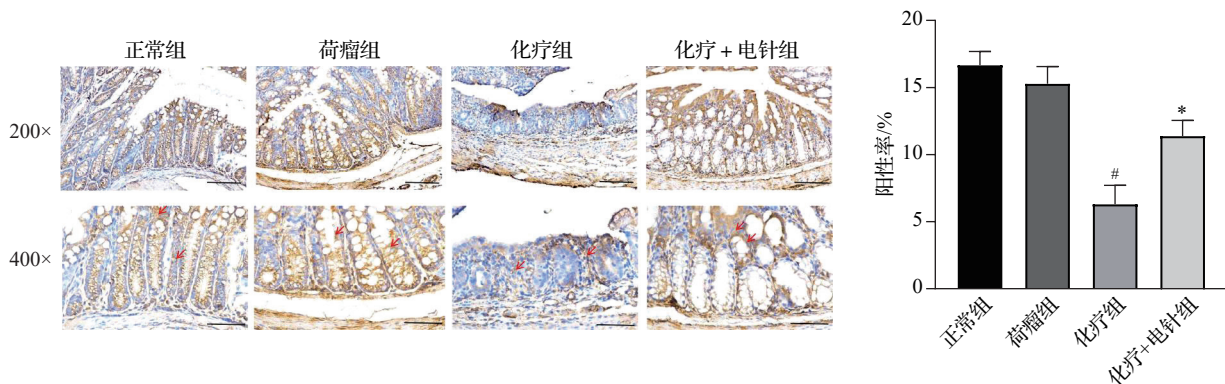
Fig. 4 Comparison of colostal mucus damage of mice in the 4 groups(HE staining)



注:DAO为二胺氧化酶,D-LA为D-乳酸。与荷瘤组比较,[#] $P < 0.05$;与化疗组比较,^{*} $P < 0.05$ 。

图5 各组小鼠血清DAO、D-LA含量比较($\bar{x} \pm s$, 6只鼠/组)

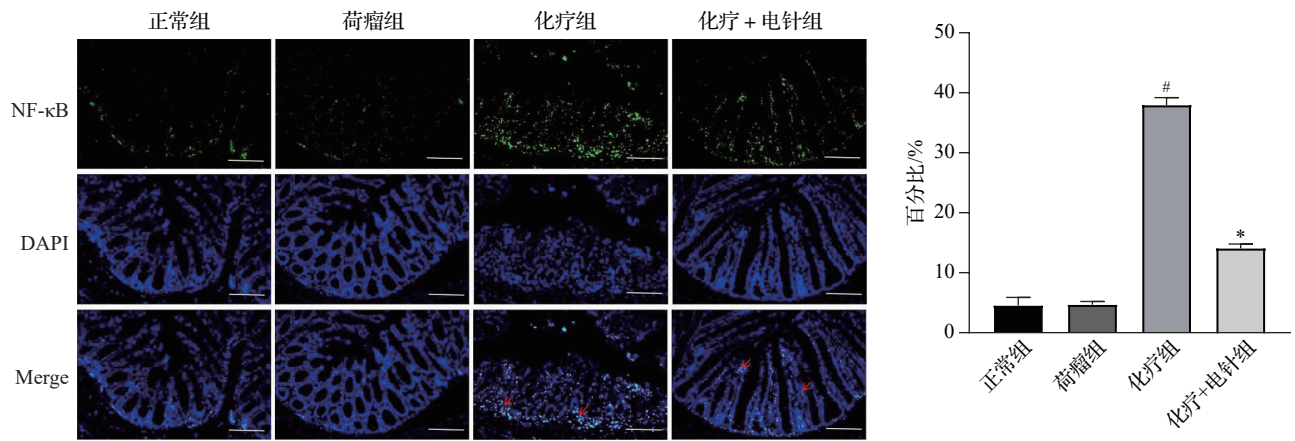
Fig. 5 Comparison of serum DAO and D-LA contents of mice in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 6 mice/group)



注:AQP8为水通道蛋白8。200×标尺=100 μm;400×标尺=50 μm。箭头示AQP8在细胞质中表达。与荷瘤组比较,[#] $P < 0.05$;与化疗组比较,^{*} $P < 0.05$ 。

图6 各组小鼠结肠AQP8蛋白阳性表达比较(免疫组织化学染色, $\bar{x} \pm s$, 6只鼠/组)

Fig. 6 Comparison of the positive expression rate of AQP8 protein in the colon of mice in the 4 groups (immunohistochemical staining, $\bar{x} \pm s$, 6 mice/group)



注: NF-κB 为核因子 κB。标尺=100 μm。箭头所指处红色荧光和蓝色荧光重叠部分为 NF-κB 蛋白核转位。与荷瘤组比较, [#] $P < 0.05$; 与化疗组比较, ^{*} $P < 0.05$ 。

图7 各组小鼠结肠组织 NF-κB 核转位情况比较(免疫荧光染色, $\bar{x} \pm s$, 6只鼠/组)

Fig. 7 Comparison of NF-κB nucleus translocation in colon tissues of mice in the 4 groups (immunofluorescence staining, $\bar{x} \pm s$, 6 mice/group)

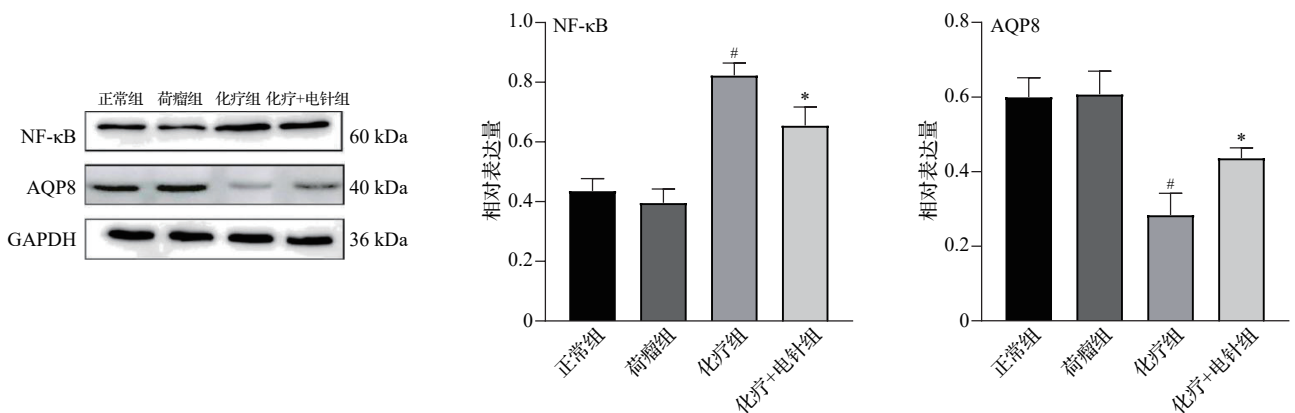
2.8 各组小鼠结肠组织 NF-κB 和 AQP8 蛋白表达水平比较

与正常组相比, 荷瘤组小鼠结肠 NF-κB 和 AQP8 蛋白表达差异均无统计学意义; 与荷瘤组相比, 化疗组小鼠结肠 NF-κB 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$), AQP8 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$); 与化疗组相比, 化疗+电针组结肠 NF-κB 蛋白表达水平降低, AQP8 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$)。见图 8。

泄泻等症状多因脾失运化, 功能失调^[14]。现代研究表明, 中焦脾胃受损可导致肠黏膜屏障结构发生病理性改变, 影响肠黏膜的生理功能, 因此脾胃功能正常是肠黏膜屏障发挥作用的基础^[15]。足阳明胃经循行属胃络脾, 足三里为足阳明胃经之合穴, 长于治疗胃肠道疾病。针灸刺激此穴, 有疏通经络之作用, 并可调节脾胃之清浊、气机之升降, 使肠黏膜损伤相关症状得以缓解。针刺“足三里”可以通过调控紧密连接蛋白的表达水平, 减轻炎性细胞因子对肠上皮细胞紧密连接的损害, 降低肠道黏膜通透性, 以此保护肠黏膜机械屏障^[16-18]。由于 5-FU 不具有组织特异性, 因此在杀伤肿瘤细胞的同时, 亦破坏结肠组织结构, 使肠绒毛萎缩, 导致便血、腹泻等症状的发生^[19]。本研究 5-FU 化疗过程中, 小鼠出现便血、腹泻等症状, DAI 显著升高, 结肠长度变短,

3 讨论

化疗药物的主要不良反应之一是对肠道黏膜的影响, 其能杀死快速分化的肠道黏膜细胞, 导致肠道黏膜损伤, 症状包括腹泻、腹痛和便秘等^[2]。按其症状特点可归于中医“泄泻”“腹痛”等范畴。《景岳全书》记载“泄泻之本, 无不由于脾胃”, 患者出现



注: NF-κB 为核因子 κB, AQP8 为水通道蛋白 8。与荷瘤组比较, [#] $P < 0.05$; 与化疗组比较, ^{*} $P < 0.05$ 。

图8 各组小鼠结肠组织 NF-κB、AQP8 蛋白相对表达量比较($\bar{x} \pm s$, 3只鼠/组)

Fig. 8 Comparison of colon in NF-κB and AQP8 protein expression levels of mice in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 3 mice/group)

同时 HE 染色显示,正常组与荷瘤组小鼠的结肠组织结构未见异常,结肠绒毛排列整齐,提示单纯荷瘤未对小鼠造成肠损伤;而 5-FU 化疗后的小鼠出现结肠组织隐窝结构破坏、炎性细胞大量浸润等结肠组织病理损伤;经过电针“足三里”治疗后,小鼠化疗后肠黏膜损伤相关症状及结肠组织病理情况有所改善。以上结果说明电针治疗有效缓解了便血和腹泻情况,降低 DAI 评分,在一定程度上改善了小鼠结肠长度的缩短及结肠组织病理损伤程度,可能因干预时间较短,化疗+电针组小鼠结肠长度、瘤体体积和肿瘤质量差异无统计学意义。

临床上化疗方案中 5-FU 对于消化系统毒性反应明显,其损伤主要特征包括广泛的隐窝细胞凋亡现象、小肠上皮细胞增殖能力的下降及肠道屏障功能破坏等^[20-21]。研究表明,5-FU 通过引发肠上皮细胞凋亡等致使肠黏膜结构发生变化,影响肠上皮结构中紧密连接相关蛋白及结肠黏液层黏蛋白,使肠道通透性增加,进一步诱发肠道炎性反应,导致肠道内水和电解质分泌紊乱,从而发生腹泻^[22-23]。

DAO 为肠黏膜上层绒毛中一种具有高度活性的细胞内酶,对维持肠道的正常生理功能具有不可或缺的作用;D-LA 是肠道细菌发酵代谢产物。当肠黏膜受损时,大量的 DAO 和 D-LA 进入血液循环,使得外周血中 DAO 和 D-LA 水平升高,故检测血清中 DAO 和 D-LA 水平可评估肠上皮完整性和通透性,直接反映肠黏膜受损程度^[24-26]。血清中 DAO 和 D-LA 的含量越高,通常表明肠损伤越严重。本研究结果显示,由于肿瘤未损伤肠黏膜组织,因此荷瘤组小鼠血清中 DAO 和 D-LA 含量与正常组相比无明显差异;相比于荷瘤组,化疗组和化疗+电针组小鼠血清中 DAO 和 D-LA 含量升高,表明小鼠肠屏障在 5-FU 使用后受到损伤。

肠黏膜屏障由 4 种屏障构成,其中,肠上皮屏障是关键的防御屏障,肠上皮屏障的完整性参与调控多种消化道疾病,包括炎性肠病和结直肠癌等^[27]。NF- κ B 作为一种关键的转录因子,在肠黏膜破坏的发生和发展进程中有着关键意义,与黏膜炎性反应紧密相关。NF- κ B 一般以无活性状态存在于细胞质中,而在细胞遭到出血、炎性反应和损伤的刺激时将其激活,由非活性转为活性形式,随后进入胞核中结合相应的目标序列。在 5-FU 诱导的肠黏膜炎模型中,NF- κ B 的表达显著升高^[28]。本研究 Western blot 和免疫荧光检测结果显示,化疗组小鼠结肠组织 NF- κ B 蛋白表达显著升高,结果表明 5-FU

可以激活肠道细胞 NF- κ B 表达,进而释放多种炎性因子。

AQP8 在人结肠黏膜广泛表达,参与结肠大量水分子及丙三醇的转运,对维持肠道液体平衡有重要作用,是肠道水液代谢常用的检测指标^[29]。Sakai 等^[8]研究显示 5-FU 化疗后,肠道中 AQP8 的表达水平降低^[8]。研究显示 AQP8 在疾病恢复期表达下调,表明肠上皮极性丢失,从而促进盐类和水分吸收及分泌紊乱,诱发肠黏膜炎^[30]。另有研究证实 AQP8 的表达量与肠组织含水量的变化呈正相关,AQP8 的下调会造成肠道水肿和肠道损伤,从而破坏肠黏膜屏障,诱发肠黏膜水肿及炎性反应^[6]。这说明异常的水代谢和肠通透性可能参与了肠黏膜损伤的发病机制。此外,AQPs 与紧密连接蛋白的表达相关,有效沉默 AQPs 可引起肠屏障结构变化及紧密连接相关蛋白的表达异常,明显降低肠黏膜屏障的完整性^[31-32]。干扰 ROCK 或抑制 NF- κ B 的表达可部分恢复肠黏膜损伤中 AQP8 的表达下降,从而减轻肠黏膜损伤程度^[33];NF- κ B 抑制剂可上调肠易激综合征中 AQP8 的表达,表明 NF- κ B 通路可调控 AQP8 的表达^[34]。本研究结果显示经 5-FU 治疗后小鼠结肠组织 AQP8 蛋白表达降低,NF- κ B 蛋白表达升高;而电针“足三里”抑制了小鼠结肠组织 NF- κ B 蛋白表达,上调小鼠结肠组织 AQP8 蛋白表达。

综上所述,电针“足三里”能抑制 NF- κ B 信号通路的过度激活,上调 AQP8 蛋白的表达,减少肠黏膜损伤,减少 DAO 和 D-LA 的释放,从而维护肠道屏障功能。然而 AQPs 与紧密连接蛋白在肠屏障调控中存在密切互动,后者是维持肠屏障结构完整性的关键分子,其表达与功能直接影响肠屏障稳定性。本研究仅通过 DAO、D-LA 等功能指标及 AQP8 表达间接推断肠屏障状态,缺乏对 ZO-1、Occludin 等紧密连接蛋白的表达量与定位验证,因此无法明确电针“足三里”通过上调 AQP8 维持肠屏障功能的过程中,是否调控了紧密连接蛋白的表达与分布。未来研究需进一步检测紧密连接相关蛋白,探究其与 AQP8 的调控关联,以完善电针“足三里”保护肠屏障的分子机制。

利益冲突 作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, GODING S A, et al. Colorectal cancer statistics, 2020 [J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(3): 145-164.

- [2] DENG S H, WU D M, LI L, et al. TBHQ attenuates ferroptosis against 5-fluorouracil-induced intestinal epithelial cell injury and intestinal mucositis via activation of Nrf2[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2021, 26(1): 48.
- [3] GAN Y X, AI G X, WU J Z, et al. Patchouli oil ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats via protecting intestinal barrier and regulating water transport [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 250: 112519.
- [4] ZOU Y T, MA L L, ZHAO Y, et al. Inhibition of Rho kinase protects against colitis in mice by attenuating intestinal epithelial barrier dysfunction via MLC and the NF- κ B pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2017: 430-438.
- [5] VLANTIS K, WULLAERT A, POLYKRATIS A, et al. NEMO prevents RIP kinase 1-mediated epithelial cell death and chronic intestinal inflammation by NF- κ B-dependent and-independent functions[J]. *Immunity*, 2016, 44(3): 553-567.
- [6] YANG L L, BIAN Y Y, LI Z J, et al. Identification of potential biomarkers and pathways in ulcerative colitis with combined public mRNA and miRNA expression microarray data analysis [J]. *J Gastrointest Oncol*, 2019, 10 (5) : 847-858.
- [7] RICANEK P, LUNDE L S, FRYE S, et al. Reduced expression of aquaporins in human intestinal mucosa in early stage inflammatory bowel disease[J]. *Clin Exp Gastroenterol*, 2015: 49.
- [8] SAKAI H, SAGARA A, MATSUMOTO K, et al. Neutrophil recruitment is critical for 5-fluorouracil-induced diarrhea and the decrease in aquaporins in the colon [J]. *Pharmacol Res*, 2014, 87: 71-79.
- [9] 樊雨倩,袁思成,王和生. 针灸对肠道黏膜屏障保护机制的研究进展[J]. *湖南中医杂志*, 2022, 38(1): 184-187.
- FAN Y Q, YUAN S C, WANG H S. Research progress on protective mechanism of acupuncture and moxibustion on intestinal mucosal barrier (in Chinese)[J]. *Hunan Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2022, 38(1): 184-187.
- [10] 《针刺研究》编辑部.《针刺研究》实验动物福利伦理审查清单 [J]. *针刺研究*, 2024, 49(2): 220.
- Editorial Board of *Acupuncture Research*. Review list of welfare ethics of experimental animals in *Acupuncture Research* (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2024, 49 (2): 220.
- [11] ZHANG S, LIU Y N, XIANG D C, et al. Assessment of dose-response relationship of 5-fluorouracil to murine intestinal injury[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 910-916.
- [12] 张学君,林久茂,林晨捷,等. 电针“足三里”减轻大肠癌小鼠化疗后肠黏膜损伤及其对氧化应激和细胞凋亡的影响[J]. *针刺研究*, 2023, 48(12): 1249-1257.
- ZHANG X J, LIN J M, LIN C J, et al. Protective effect of electroacupuncture at ST36 against damage of intestinal mucosa, oxidative stress and apoptosis induced by 5-FU chemotherapy in mice with colon cancer (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2023, 48(12): 1249-1257.
- [13] 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位 第3部分: 小鼠[J]. *针刺研究*, 2021, 46(5): 445-446.
- China Association of Acupuncture-Moxibustion. Names and location of commonly used acupoints in experimental animals Part 3: Mice (in Chinese)[J]. *Acupuncture Research*, 2021, 46(5): 445-446.
- [14] 刘杰民, 蔺晓源, 王敏, 等. 基于肠道黏膜免疫的“脾为之卫”理论探讨[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2013, 19(4): 460-460, 466.
- LIU J M, LIN X Y, WANG M, et al. Discussion on the theory of “spleen is the defense” based on intestinal mucosal immunity (in Chinese) [J]. *Journal of Basic Chinese Medicine*, 2013, 19(4): 460-460, 466.
- [15] 许雅青, 吴月滢, 李小雅, 等. 健脾类中药修复肠黏膜屏障损伤的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(14): 235-241.
- XU Y Q, WU Y Y, LI X Y, et al. Efficacy of spleen-invigorating Chinese medicinals in repairing intestinal mucosal barrier injury: a review (in Chinese)[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2021, 27(14): 235-241.
- [16] 李湘力, 蔡敬宙, 林泳, 等. 针刺疗法调节 IBS-D 大鼠肠道菌群结构和促进肠紧密连接的作用研究[J]. *广州中医药大学学报*, 2019, 36(7): 1022-1028.
- LI X L, CAI J Z, LIN Y, et al. Study on acupuncture therapy in regulating gut microbiota and promoting intestinal tight junction in IBS-D rats (in Chinese)[J]. *Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine*, 2019, 36 (7) : 1022-1028.
- [17] 文坛, 张二帅, 张春青, 等. 电针调控 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 信号通路对急性结肠炎大鼠的膈穴特异性研究[J]. *中国中医急症*, 2023, 32(4): 601-605.
- WEN T, ZHANG E S, ZHANG C Q, et al. Study on the acupoint specificity of electroacupuncture in regulating acute colitis based on NLRP3/Caspase-1/IL-1 β signaling pathway in rats (in Chinese)[J]. *Journal of Emergency in Traditional Chinese Medicine*, 2023, 32(4): 601-605.
- [18] 季春莲, 占靛卉, 郑静茹, 等. 电针预处理对脓毒症小鼠肠黏膜屏障功能保护作用及 MLCK/MLC 信号通路的调节作用[J]. *上海针灸杂志*, 2023, 42(10): 1092-1101.
- JI C L, ZHAN L H, ZHENG J R, et al. Protective effect of electroacupuncture pretreatment on intestinal mucosal barrier function and its regulatory effect on MLCK/MLC signaling pathway in sepsis mice (in Chinese)[J]. *Shanghai Journal of Acupuncture and Moxibustion*, 2023, 42(10): 1092-1101.
- [19] 刘慧, 冯丹青, 邵诗芸, 等. 健脾解毒方调控 TLRs/NF- κ B 信号通路对 5-FU 致大鼠肠黏膜炎的保护作用[J]. *上海中医药杂志*, 2020, 54(12): 84-90.
- LIU H, FENG D Q, SHAO S Y, et al. Jianpi Jiedu Formula alleviated 5-FU-induced intestinal mucositis in rats through inhibiting TLRs/NF- κ B signaling pathway (in Chinese)[J]. *Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2020, 54 (12): 84-90.
- [20] WU L, XI Y, YAN M, et al. Berberine-based carbon

- quantum dots improve intestinal barrier injury and alleviate oxidative stress in C57BL/6 mice with 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis by enhancing gut-derived short-chain fatty acids contents[J]. *Molecules*, 2023, 28(5): 2148.
- [21] WU J Z, GAN Y X, LUO H J, et al. β -patchoulene ameliorates water transport and the mucus barrier in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis rats via the cAMP/PKA/CREB signaling pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 689491.
- [22] 宗静,陈羽飞,刘玉琴,等. 5-FU对小鼠肠屏障的影响及益生菌/菌的保护作用[J]. *医学研究杂志*, 2020, 49(7): 77-81.
- ZONG J, CHEN Y F, LIU Y Q, et al. Effects of 5-fluorouracil on intestinal barrier in mice and the protective effects of probiotics and prebiotics (in Chinese)[J]. *Journal of Medical Research*, 2020, 49(7): 77-81.
- [23] 李仲南,汪昱,秦环龙. 化疗药物对肠屏障功能的损伤机制及防治进展[J]. *山东医药*, 2008, 48(26): 113-115.
- LI Z N, WANG Y, QIN H L. Mechanism and prevention of intestinal barrier function injury caused by chemotherapy drugs (in Chinese)[J]. *Shandong Medical Journal*, 2008, 48(26): 113-115.
- [24] USUDA H, OKAMOTO T, WADA K. Leaky gut: effect of dietary fiber and fats on microbiome and intestinal barrier[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(14): 7613.
- [25] REN S N, CHEN A, TIAN Y P, et al. *Lactobacillus paracasei* from koumiss ameliorates diarrhea in mice via tight junctions modulation[J]. *Nutrition*, 2022, 98: 111584.
- [26] YANG J Q, XIONG P, BAI L, et al. The association of altered gut microbiota and intestinal mucosal barrier integrity in mice with heroin dependence [J]. *Front Nutr*, 2021, 8: 765414.
- [27] BARDENBACHER M, RUDER B, BRITZEN-LAURENT N, et al. Permeability analyses and three dimensional imaging of interferon gamma-induced barrier disintegration in intestinal organoids [J]. *Stem Cell Res*, 2019, 35: 101383.
- [28] WANG C H, YANG S X, GAO L, et al. Carboxymethyl pachyman (CMP) reduces intestinal mucositis and regulates the intestinal microflora in 5-fluorouracil-treated CT26 tumour-bearing mice[J]. *Food Funct*, 2018, 9(5): 2695-2704.
- [29] 王俊平,侯晓华,马瑞军. 腹泻型肠易激综合征患者临床特征与结肠黏膜水通道蛋白8的表达[J]. *中华内科杂志*, 2006, 45(12): 1000-1003.
- WANG J P, HOU X H, MA R J. The clinical features and colonic epithelium AQP8 expression in diarrhea-irritable bowel syndrome (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Internal Medicine*, 2006, 45(12): 1000-1003.
- [30] MIN M, PENG L H, SUN G, et al. Aquaporin 8 expression is reduced and regulated by microRNAs in patients with ulcerative colitis[J]. *Chin Med J*, 2013, 126(8): 1532-1537.
- [31] KAWEDIA J D, NIEMAN M L, BOIVIN G P, et al. Interaction between transcellular and paracellular water transport pathways through Aquaporin 5 and the tight junction complex[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(9): 3621-3626.
- [32] 张文杰. RNA干扰抑制水通道蛋白3对肠粘膜上皮屏障影响的实验研究[D]. 南京: 南京医科大学, 2012.
- ZHANG W J. Effects of down-regulating Aquaporin3 gene expression on intestinal mucosal barrier by RNA interference (in Chinese) [D]. Nanjing: Nanjing Medical University, 2012.
- [33] ZHAO H, SUN X N, TONG J. Role of ROCK/NF- κ B/AQP8 signaling in ethanol-induced intestinal epithelial barrier dysfunction[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(3): 2253-2262.
- [34] CHAO G Q, ZHANG S. Aquaporins 1, 3 and 8 expression in irritable bowel syndrome rats' colon via NF- κ B pathway[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(29): 47175-47183.

收稿日期:2025-09-07 修回日期:2026-01-17