

基于环核苷酸门控阳离子通道探讨电针改善 溃疡性结肠炎小鼠结肠动力的机制

李思慧¹, 黄倩慧¹, 黄 琴¹, 吴巧凤^{1,2}, 余曙光¹

(¹成都中医药大学针灸推拿学院, 成都 610075; ²成都中医药大学针灸与内稳态研究所, 成都 610075)

【摘要】 目的:观察电针“上巨虚”通过环核苷酸门控阳离子通道2(HCN2)改善溃疡性结肠炎(UC)小鼠结肠动力障碍的机制。**方法:**雄性C57BL/6J小鼠随机分为空白组、模型组与电针组,每组8只;采用葡聚糖硫酸钠饮用法复制UC小鼠模型。电针组电针“上巨虚”,每日20 min,连续治疗7 d。计算小鼠体质量变化率,评价疾病活动指数(DAI);HE染色观察小鼠结肠组织病理变化;在体/离体电生理技术检测小鼠结肠运动变化;比较小鼠结肠转运时间及肠道推进率;免疫荧光法检测结肠HCN2、5-羟色胺(5-HT)、色氨酸羟化酶(TPH1)、5-HT转运体(SERT)的表达;荧光定量PCR及Western blot法检测结肠TPH1、SERT的mRNA和蛋白表达。Vil1^{MerCreMer}小鼠随机分为载体组与诱导组,每组8只。Vil1^{MerCreMer}小鼠特异性条件敲除肠上皮中HCN2基因。诱导组小鼠注射5 mg/mL的他莫昔芬。ELISA法检测Vil1^{MerCreMer}HCN2^{fl/fl}小鼠血清中5-HT、环核苷酸(cAMP)的含量。将RIN-14B细胞分为正常组与转染组,转染组敲低HCN2的表达。ELISA法检测细胞上清液5-HT、cAMP的表达。实时定量PCR法检测RIN-14B细胞中HCN2、TPH1 mRNA的表达。**结果:**与空白组相比,模型组小鼠一般情况较差,体质量变化显著增大、DAI升高($P<0.001$),结肠黏膜结构紊乱,水肿与炎性浸润明显,病理评分升高($P<0.001$);在体及离体结肠运动的频次、振幅及曲线下面积降低($P<0.001$),结肠转运时间延长、肠道推进率降低($P<0.001$);结肠中HCN2的表达增多($P<0.001$),与5-HT存在共定位现象;结肠5-HT及TPH1、SERT表达升高($P<0.001$)。电针治疗均可逆转上述效应($P<0.001$, $P<0.01$, $P<0.05$)。当条件性敲除肠上皮中HCN2后,诱导组小鼠血清中5-HT、cAMP的含量降低($P<0.001$)。敲低RIN-14B细胞HCN2后,细胞中HCN2、TPH1 mRNA表达降低($P<0.001$),细胞上清液中5-HT、cAMP的含量下降($P<0.001$)。**结论:**电针“上巨虚”可能通过调控肠嗜铬细胞中HCN2的表达,影响5-HT分泌,进而改善UC小鼠肠道动力。

【关键词】 电针;溃疡性结肠炎;结肠动力;肠嗜铬细胞;环核苷酸门控阳离子通道2;5-羟色胺

Research on the underlying mechanisms of electroacupuncture in improving colonic dysmotility in ulcerative colitis mice based on cyclic nucleotide-gated cation channels

Li Sihui¹, Huang Qianhui¹, Huang Qin¹, Wu Qiaofeng^{1,2}, Yu Shuguang¹ (¹College of Acupuncture and Moxibustion, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; ²Institute of Acupuncture & Homeostasis, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075)

【ABSTRACT】 Objective To study the mechanism of electroacupuncture (EA) of “Shangjuxu” (ST37) underlying improvement of colonic dysmotility in ulcerative colitis (UC) mice through regulating cyclic nucleotide-gated cation channel 2 (HCN2). **Methods** Male C57BL/6J mice were randomized into control, model and EA groups, with 8 mice in each group. The UC model was established by giving 2.5% dextran sulfate sodium (DSS) to the mice. EA (2 Hz/100 Hz, 0.9 mA) was applied at bilateral ST37 for 20 min, once a day for 7 d. The body weight, stool appearance and bloody stool conditions were recorded and the disease activity index (DAI) score was determined. The morphological changes of the colonic tissue were observed after H.E. staining. The changes of colonic motility before

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20251010

引用格式:李思慧,黄倩慧,黄琴,等.基于环核苷酸门控阳离子通道探讨电针改善溃疡性结肠炎小鼠结肠动力的机制[J].针刺研究, 2026,51(11):1503-1512.

项目来源:国家重点研发计划项目(No.2022YFC3500703)

通信作者:余曙光, E-mail:ysg@cdutcm.edu.cn

and after EA intervention were assessed by using *in vivo* and *in vitro* electrophysiological methods. The colonic transit time (glass bead method) and intestinal propulsion rate (ink mark method) were calculated. The immunofluorescence intensity values of colonic hyperpolarization activated HCN2, 5-hydroxytryptamine (5-HT), tryptophan hydroxylase 1 (TPH1), and serotonin transporter (SERT) were detected by immunofluorescence staining. The expression levels of TPH1 and SERT mRNAs and proteins were detected using real-time quantitative PCR and Western blot separately. The *Vil1^{MerCreMer}* mice were randomly divided into a control group and an induction group, with 8 mice in each group. The *Vil1^{MerCreMer}* mice were specifically conditionally knocked out the HCN2 gene in the intestinal epithelium. The mice in the induction group were injected with 5 mg/mL tamoxifen. ELISA was used to detect the contents of 5-HT and cyclic nucleotides (cAMP) in the serum. The RIN-14B cells were divided into a normal group and a transfection group. The transfection group knocked down the expression of HCN2 in the RIN-14B cells. ELISA was used to detect the contents of 5-HT and cAMP in the cell supernatants. Real-time quantitative PCR was used to detect the mRNA expressions of HCN2 and TPH1 in the RIN-14B cells. **Results** In contrast to the control group, the model group showed a significant decrease in the body weight and a notable increase in the DAI score and histopathological score (all $P < 0.001$). *In vivo* and *in vitro* electrophysiology showed that DSS mice had significant colonic motility dysfunction, decreased frequency, amplitude, and the area under the curve (AUC) of colonic pressure curves (all $P < 0.001$). Colonic transit time was strikingly prolonged while propulsion rate was significantly lower in DSS mice (all $P < 0.001$). Expression of colonic HCN2, co-localized with 5-HT, were markedly increased ($P < 0.001$), along with elevated expression of 5-HT, TPH1 and SERT (all $P < 0.001$). All the increase and decrease of the indexes mentioned above were reversed by EA ($P < 0.001$, $P < 0.01$, $P < 0.05$). Conditional deletion of HCN2 in the intestinal epithelium markedly reduced the serum contents of 5-HT and cAMP ($P < 0.001$). Knockdown of HCN2 in RIN-14B cells reduced the expression levels of HCN2 and TPH1 mRNAs ($P < 0.001$), along with a significant decrease of the contents of 5-HT and cAMP in the cell supernatant ($P < 0.001$). **Conclusion** EA at ST37 can improve colonic dysmotility in UC mice by modulating the expression of HCN2 in enterochromaffin cells and regulating the release of 5-HT.

【KEYWORDS】 Electroacupuncture; Ulcerative colitis; Colonic motility; Enterochromaffin cell dys; HCN2; 5-HT

溃疡性结肠炎(UC)是一种由多因素共同所致的慢性迁延性疾病,以腹痛、腹泻、里急后重、黏液脓血便等为常见症状和体征^[1-2]。研究^[3]结果提示,UC患者不仅存在持续的肠道炎性反应状态,还具有腹泻、排便次数改变等结肠动力障碍的症状。既往被忽视的结肠动力障碍可能是导致疾病迁延不愈、阻碍UC治愈的重要原因^[4-5]。

研究^[6-7]表明,肠嗜铬细胞(ECs)作为感受肠腔信号的“前哨”,可经离子通道活化,电兴奋后促进5-羟色胺(5-HT)分泌与释放,联合周围邻近免疫炎症细胞的级联反应,完成由“电”到“化学”信息的快速转导,为即时感知肠道刺激并发挥瞬时调控效应提供结构基础。有研究显示,超极化激活环核苷酸门控通道(HCN)与结肠动力紊乱密切相关,环核苷酸(cAMP)门控的HCN2激活后所形成的净内向离子电流,可开放钙离子(Ca^{2+})通道,触发动作电位,促进5-HT释放,将电信号转化为化学信号,影响肠道蠕动^[8-10]。

研究^[11-13]表明,电针治疗UC疗效确切,不仅可以促进肠道局部炎性反应吸收、改善肠道微循环、调节全身促炎/抗炎因子平衡,还能明显改善腹泻

等动力异常症状。但电针是否通过调节ECs中HCN2的表达、影响5-HT分泌,进而参与调控结肠动力的相关研究较少。因此,本研究聚焦于HCN2离子通道,探讨电针“上巨虚”改善UC小鼠结肠动力的内在机制,以期针灸临床治疗UC提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

6~8周龄雄性C57BL/6J小鼠24只,体质量(25 ± 2)g,购自江苏集萃药康生物科技有限公司,生产许可证号:SCXK(苏)2020-034。饲养于室温(23 ± 1)℃、相对湿度40%~70%、光照12 h/黑暗12 h交替环境中,自由摄食饮水。适应性喂养1周后随机分为空白组、模型组与电针组,每组8只。

*Vil1^{MerCreMer}*小鼠[C001433,苏州赛业生物,生产许可证号:SCXK(苏)2020-0006]与HCN2-flox基因型小鼠[S-CKO-02847,苏州赛业生物,生产许可证号:SCXK(苏)2022-0016]进行交叉遗传学操作,能够以时间依赖的方式实现肠上皮中HCN2基因的特异性条件敲除,验证HCN2对5-HT和CAMP表达的影响。将*Vil1^{MerCreMer}*小鼠随机分为载体组与诱导组,

每组8只。诱导组小鼠实验前按照75 mg/kg的剂量,每日1次,连续5 d腹腔注射5 mg/mL的他莫昔芬;载体组则遵同法、按照体质量注射同等体积的玉米油。

将RIN-14B细胞分为正常组与转染组,转染组使用LV-U6-shRNA1(HCN2)-CMV-mCherry-T2A-Puro-WPRE进行转染,正常组为未经转染的RIN-14B细胞。从细胞层面验证HCN2对5-HT和CAMP表达的影响。

本研究已通过成都中医药大学动物实验伦理委员会的审查,伦理审批编号为2024004。

1.2 主要试剂与仪器

他莫昔芬(美国Selleck),葡聚糖硫酸钠(DSS,美国MP Biomedicals),异氟烷(深圳瑞沃德),苏木精-伊红染液、RIPA裂解液、ECL发光液(武汉赛维尔),印度墨水(大连美仑生物),HCN2一抗、5-HT一抗、色氨酸羟化酶1(TPH1)一抗、5-HT转运体(SERT)一抗(英国Abcam),GAPDH一抗、山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗(武汉三鹰),Alexa Fluor488、Alexa Fluor568荧光素标记二抗(美国Invitrogen),BCA蛋白定量试剂盒(美国Thermo),RNA提取试剂盒、反转录试剂盒、荧光定量PCR试剂盒(湖南艾科瑞),RIN-14B细胞(美国ATCC),5-HT、cAMP ELISA试剂盒(江苏晶美),目的基因敲减慢病毒(LV-U6-shRNA1(HCN2)-CMV-mCherry-T2A-Puro-WPRE)购自武汉枢密脑科学技术有限公司。

一次性使用无菌针灸针(0.18 mm×13 mm,苏州华佗),HANS-200A穴位神经刺激仪(南京济生),小动物专用麻醉仪、石蜡切片机(深圳瑞沃德),光学显微镜(德国Leica),PowerLab电生理记录仪、Panlab四腔离体组织系统(澳大利亚AD Instruments),高速冷冻离心机(上海卢湘仪),酶标仪、电泳仪(美国Bio-Rad),核酸测定仪(美国Thermo),实时荧光定量PCR仪(四川杰莱美),转膜仪、曝光机(上海天能),激光共聚焦显微镜(日本Olympus)。

1.3 造模方法

采用DSS饮用法复制UC小鼠模型^[14]。配制2.5%DSS溶液,供小鼠连续自由饮用7 d。实验过程中,监测小鼠的整体状态、体质量减轻程度、粪便外观和质地变化、便血现象等。以体质量低于基线85%且小鼠出现明显腹泻、便血为造模成功的标准^[15]。

1.4 干预方法

电针组小鼠从造模第5天开始干预^[11],此时UC小鼠模型已全部复制成功。参照《实验针灸学》^[16]并

基于比较解剖学的方法定位“上巨虚”,位于小鼠胫骨外侧偏下方6 mm处,直刺5 mm达到肌层。电针组使用1.5%浓度异氟烷吸入麻醉,于每侧“上巨虚”处采用两根毫针一浅一深直刺进针,每侧两针柄分别连接电针仪正负极,选择疏密波,频率2 Hz/100 Hz,电流强度0.9 mA,每日1次,每次20 min,连续治疗7 d。空白组与模型组采用与电针组相同方法麻醉,但无其他干预。

1.5 观察指标与检测方法

体质量监测:每组8只小鼠,每日记录小鼠体质量,并计算体质量变化率,体质量变化率(%)=当日体质量÷第0天体质量×100%(第0天为造模前1 d)。

疾病活动指数(DAI)评定^[17]:每组8只小鼠,每日记录体质量、粪便外观及血便情况并进行评分,评分标准见表1。DAI=(体质量分数+粪便外观分数+血便分数)÷3。

表1 DAI评分标准
Table 1 DAI scoring criteria

体质量丢失率/%	粪便外观	血便	计分/分
0	正常	正常	0
>0且≤5	—	—	1
>5且≤10	松散	隐血阳性	2
>10且≤15	—	—	3
>15	稀便	显性出血	4

注:DAI为疾病活动指数。“—”表示无评分项目。

HE染色法观察小鼠结肠组织病理形态:每组取3只小鼠肛门端前1 cm末端结肠,固定于4%多聚甲醛中,48 h后常规脱水,石蜡包埋、切片(厚度4 μm),经苏木精-伊红染色,采集图像并依据炎症浸润程度、病变深度、隐窝破坏程度进行结肠组织病理评分^[17]。

在体电生理技术检测小鼠结肠运动:治疗结束后每组取6只小鼠,禁食不禁水24 h,1.5%异氟烷吸入麻醉后仰卧位置于37℃恒温毯上。液体石蜡润滑小鼠肛门及自制水囊头端,端头插入距肛门约1.5 cm的远端结肠,经三通阀连接Powerlab电生理记录仪压力传感器。向水囊中注入约0.1 mL 0.9%氯化钠溶液,记录肠道运动。

结肠转运时间:治疗结束后每组取8只小鼠,禁食不禁水24 h,1.5%异氟烷吸入麻醉后仰卧置于

37℃恒温毯上,用液体石蜡润滑小鼠肛门处,利用6F导尿管头端,将直径为3 mm的玻璃珠缓慢推入小鼠远端结肠,深度距肛门约2 cm,记录各组小鼠玻璃珠排出时间。

肠道推进率检测:治疗结束后每组取8只小鼠,禁食不禁水12 h,每只灌胃0.5 mL墨汁,30 min后脱颈处死。迅速剖开腹腔,截取幽门至盆腔紧邻骨盆处肠段,自然拉直,测量墨汁推进长度与肠道总长度,计算肠道推进率。肠道推进率(%)=墨汁推进长度÷肠道总长度×100%。

离体电生理技术检测小鼠结肠运动:治疗结束后每组取8只小鼠,剪取2段长约1.5 cm的结肠,清除肠内容物后固定肠管,施加1 g标准负荷,观察离体肠段的活动曲线。

免疫荧光染色法检测小鼠结肠组织HCN2、5-HT、TPH1、SERT平均荧光强度:每组取3只小鼠各1 cm结肠组织,用4%多聚甲醛组织固定液固定48 h,脱水,石蜡包埋并切片(4 μm),常规脱蜡后抗原修复,血清封闭,加入稀释后的一抗(HCN2为1:1 000,5-HT为1:2 000,TPH1为1:1 000,SERT为1:1 000)孵育过夜,PBS冲洗后加入对应二抗(Alexa Fluor488为1:200,Alexa Fluor568为1:200)37℃孵育1 h,DAPI核染液复染,滴加抗荧光淬灭封片剂封片。利用ImageJ软件中的Colocalization Finder插件分析HCN2与5-HT的共定位情况,每组随机选取3个不重叠的高倍视野(标尺=20 μm),计算Pearson相关系数,以>0.5表示存在共定位现象。同时,利用ImageJ软件计算HCN2阳性细胞个数和5-HT、TPH1及SERT的平均荧光强度。

实时荧光定量PCR法检测结肠TPH1、SERT mRNA表达水平:每组取8只小鼠各10 mg结肠组织,按照总RNA提取试剂盒说明书提取总RNA,采用超微量紫外分光光度计测定RNA浓度及纯度。参照反转录试剂盒将RNA反转录成cDNA,反应条件如下:42℃15 min,85℃5 min。以cDNA为模版进行PCR扩增,扩增反应条件:预变性95℃30 s;变性退火/延伸95℃5 s、60℃30 s,共40个循环,构建熔解曲线。选择GAPDH的表达水平作为内源性对照,并采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目标基因的相对表达量。引物序列见表2,引物由上海生工合成。

Western blot法检测结肠TPH1、SERT蛋白相对表达量:每组取3只小鼠各100 mg结肠组织,依次进行蛋白提取、BCA法测定蛋白浓度、蛋白变

表 2 引物序列
Table 2 Primer sequences

基因	序列(5'→3')	产物长度/bp
TPH1	上游 TTTCTGACCTGGACTTCTGC 下游 ATGTTGTCTTCCCGATAGCC	298
SERT	上游 GATCCCTGCTCAGCTGACATC 下游 CCATAGAACCAAGACACGACGAC	180
GAPDH	上游 TGTCTTCACCACCATGGAGA 下游 CGGCCATCACGCCACAGCTT	300

注:TPH1为色氨酸羟化酶,SERT为5-羟色胺转运体。

性、电泳、转膜、脱脂牛奶封闭,4℃一抗孵育(TPH1稀释比例为1:1 000,SERT为1:1 000,GAPDH为1:5 000)过夜,孵育对应二抗(1:2 000),ECL显影,采集图像后利用ImageJ软件分析蛋白条带灰度值,以目的蛋白与内参GAPDH蛋白条带灰度值的比值为目的蛋白的相对表达量。

ELISA法检测小鼠血清、细胞上清液中5-HT、cAMP含量:取载体组和诱导组小鼠,每组8只,通过眼静脉丛采血约1.5 mL,于4℃离心20 min,取上层血清备用;收集正常组与转染组RIN-14B细胞培养液,于4℃离心20 min,取细胞上清备用。参考ELISA试剂盒说明书进行操作,于酶标仪450 nm波长处测定吸光度值,计算血清及细胞上清液中5-HT、cAMP含量。

LV-HCN2 shRNA慢病毒转染敲低RIN-14B细胞的HCN2表达并采用PCR法进行验证:将RIN-14B细胞以 1×10^6 个/mL的密度接种于6孔板中,置于37℃、5% CO₂培养箱中。待细胞融合度达70%~80%时,弃去原培养基,更换为完全培养基。按照感染复数(MOI)=10加入目的地基因敲减病毒液(LV-U6-shRNA1(HCN2)-CMV-mCherry-T2A-Puro-WPRE)。6 h后换液,弃去含病毒的培养基,更换为完全培养基继续培养。转染48 h后,收集转染组与正常组细胞,利用实时荧光定量PCR法检测HCN2、TPH1 mRNA表达,验证病毒转染效率。引物序列见表3,引物由上海生工合成。

1.6 统计学处理

使用SPSS27.0软件进行分析,GraphPad Prism 9.0软件绘图。计量资料以均数±标准误($\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$)表示。依据正态检验和方差齐性分析,多组间比较使用单因素方差分析及LSD检验(满足正态+方差齐)或Dunnett's *t*检验(方差不齐),两组

表 3 引物序列
Table 3 Primer sequences

基因	序列(5'→3')	产物长度/bp
HCN2	上游 TGTCGGATGGCTCCTATTTTCG	135
	下游 GGTATTCCTCCAGCACCTCGTTG	
TPH1	上游 GCGACATCAACCGAGAACAG	202
	下游 CGCAGAAAGTCCAGGTCAGAA	
GAPDH	上游 GACAGCCGCATCTTCTTGTG	73
	下游 AATCCGTTACACCGACCTT	

注:HCN2为环核苷酸门控阳离子通道2,TPH1为色氨酸羟化酶。

间比较选用 Student *t* 检验或 Mann-Whitney *U* 检验。所有检验均采用双侧检验,以 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 各组小鼠一般情况及病理形态比较

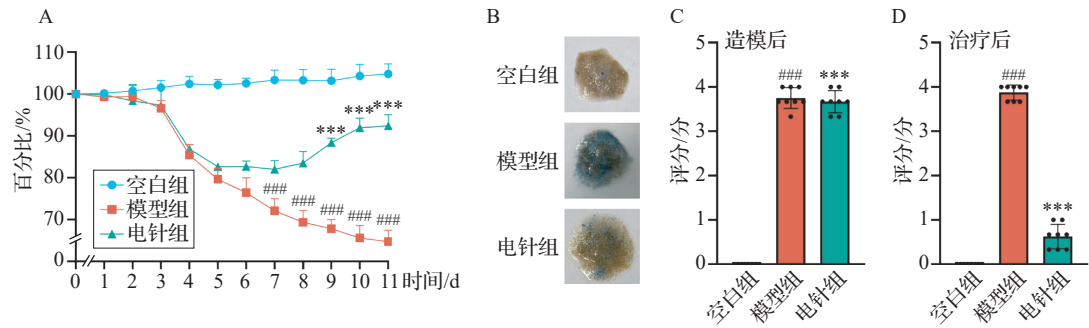
空白组小鼠精神状态良好,毛发光泽,饮食及粪便无异常。模型组小鼠精神萎靡,毛发暗淡,躯

体蜷缩,摄食饮水减少,肛门处可见脓血混合物,体质量明显减轻,体质量变化率较空白组下降($P<0.001$),DAI升高($P<0.001$)。与模型组比较,电针组小鼠精神状态改善,毛发光泽恢复,摄食饮水增多,肛门处脓血混合物减少,体质量下降程度缓解,体质量变化率升高($P<0.001$),DAI降低($P<0.001$)。见图1。

HE染色结果显示,空白组小鼠结肠组织结构完整,黏膜层腺体排列有序,无炎性细胞浸润;与空白组比较,模型组结肠黏膜层水肿明显,结构紊乱,大量炎性细胞浸润,病理评分增高($P<0.001$);与模型组比较,电针组结肠组织黏膜层水肿减轻,炎性浸润程度下降,腺体排列及结构较为完整,病理评分降低($P<0.001$)。见图2。

2.2 各组小鼠远端结肠运动的比较

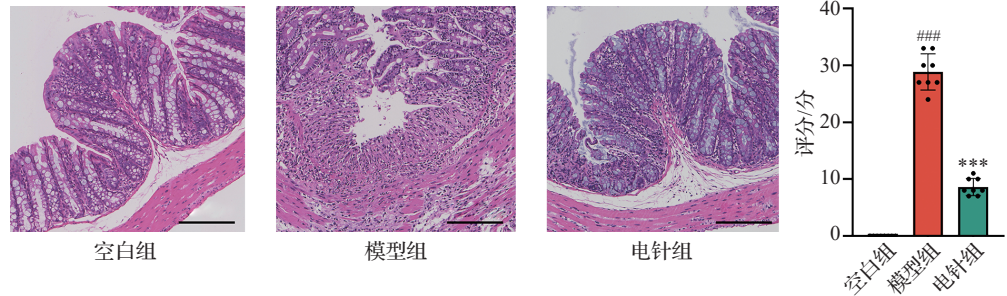
在体和离体电生理结果显示,与空白组比较,模型组小鼠存在显著的结肠动力障碍,在体和离体结肠压力曲线的频次、振幅及曲线下面积均降低($P<0.001$)。电针组小鼠在体和离体远端结肠运动频率、振幅及曲线下面积均升高($P<0.001$, $P<$



注:A为各组小鼠体质量变化率,B为各组小鼠肉眼粪便潜血情况,C、D为各组小鼠造模后、治疗后DAI比较($\bar{x}\pm s_x$, 8只鼠/组)。DAI为疾病活动指数。与空白组比较,### $P<0.001$;与模型组比较,*** $P<0.001$ 。

图1 各组小鼠体质量变化率、潜血情况及DAI比较

Fig. 1 Comparison of body weight loss rate, occult blood status and DAI score of mice in the 3 groups



注:标尺=200 μm 。与空白组比较,### $P<0.001$;与模型组比较,*** $P<0.001$ 。

图2 各组小鼠结肠组织病理形态与病理学评分比较(HE染色, $\bar{x}\pm s_x$, 8只鼠/组)

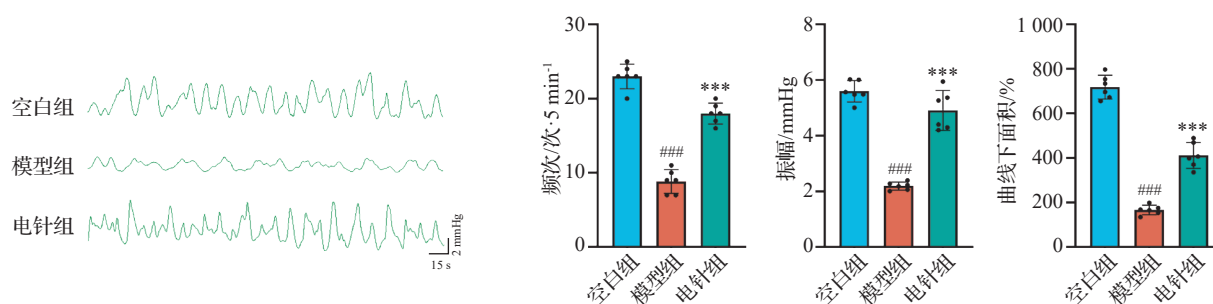
Fig. 2 Comparison of colonic pathological morphology and histopathological scores of mice in the 3 groups (HE staining, $\bar{x}\pm s_x$, 8 mice/group)

0.01, $P < 0.05$)。见图3、图4。与空白组比较,模型组小鼠结肠转运时间显著延长、肠道推进率降低($P < 0.001$);与模型组比较,电针组小鼠结肠转运时间缩短、肠道推进率升高($P < 0.001$)。见图5。

2.3 各组小鼠结肠HCN2表达的比较

研究^[6-7]表明,ECs负责分泌人体中超过90%的5-HT。免疫荧光染色及Pearson相关系数统计提

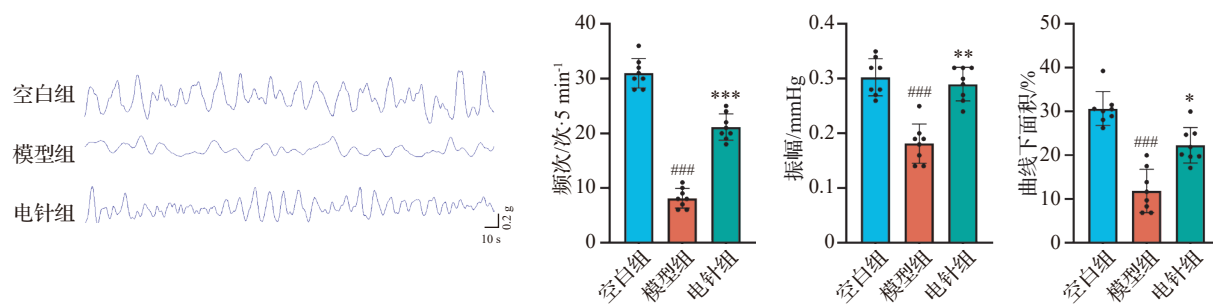
示,结肠组织中HCN2与5-HT存在共定位现象,表明ECs表达HCN2离子通道。与空白组比较,模型组Pearson相关系数升高($P < 0.001$);与模型组比较,电针组Pearson相关系数降低($P < 0.001$),见图6。与空白组比较,模型组小鼠结肠中HCN2阳性表达升高($P < 0.001$);与模型组比较,电针组HCN2阳性表达降低($P < 0.001$)。见图7。



注:1 mmHg $\approx$ 0.133 kPa。与空白组比较,### $P < 0.001$;与模型组比较,*** $P < 0.001$ 。

图3 各组小鼠在体远端结肠运动的频次、振幅及曲线下面积比较($\bar{x} \pm s_x$, 6只鼠/组)

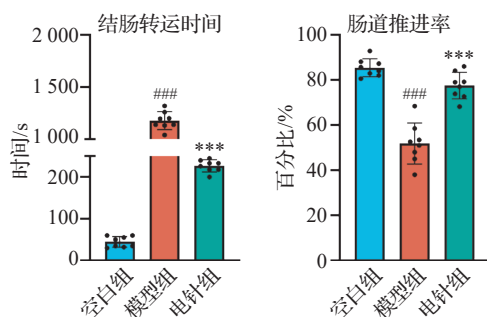
Fig. 3 Comparison of the frequency, amplitude, and area under curves of *in vivo* distal colonic motility of mice in the 3 groups ($\bar{x} \pm s_x$, 6 mice/group)



注:与空白组比较,### $P < 0.001$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图4 各组小鼠离体远端结肠运动的频次、振幅及曲线下面积比较($\bar{x} \pm s_x$, 8只鼠/组)

Fig. 4 Comparison of the frequency, amplitude, and area under curves of *in vitro* distal colonic motility of mice in the 3 groups ($\bar{x} \pm s_x$, 8 mice/group)



注:与空白组比较,### $P < 0.001$;与模型组比较,*** $P < 0.001$ 。

图5 各组小鼠结肠转运时间、肠道推进率比较($\bar{x} \pm s_x$, 8只鼠/组)

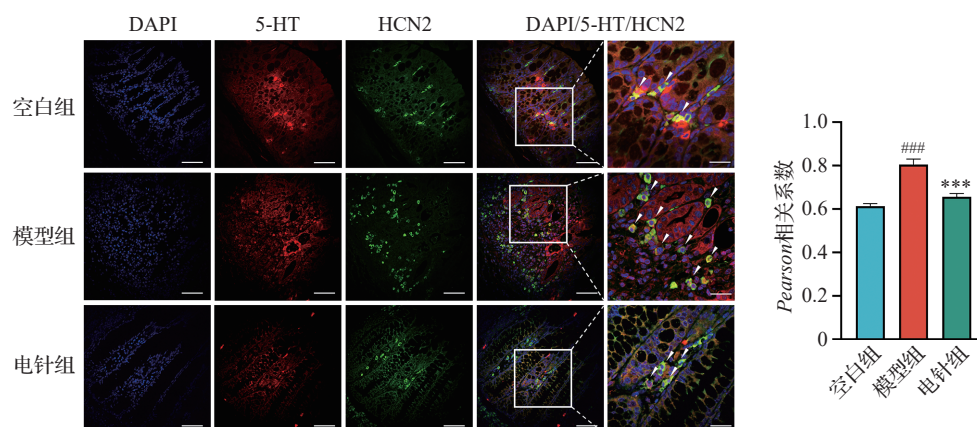
Fig. 5 Comparison of the colonic transit time and propulsion rate of mice in the 3 groups ($\bar{x} \pm s_x$, 8 mice/group)

2.4 各组小鼠结肠5-HT、TPH1及SERT表达比较

免疫荧光染色结果显示,与空白组比较,模型组小鼠结肠中5-HT、TPH1及SERT的阳性表达增加($P < 0.001$);与模型组比较,电针组5-HT、TPH1及SERT的阳性表达减少($P < 0.001$)。见图8—图10。与空白组比较,模型组小鼠结肠中的TPH1、SERT mRNA及蛋白表达水平均升高($P < 0.001$);与模型组比较,电针组TPH1及SERT mRNA及蛋白的表达均降低($P < 0.001$)。见图11。

2.5 HCN2对5-HT基础分泌的影响

当特异性敲除肠上皮中HCN2后,诱导组小鼠血清中5-HT、cAMP的表达水平降低($P <$

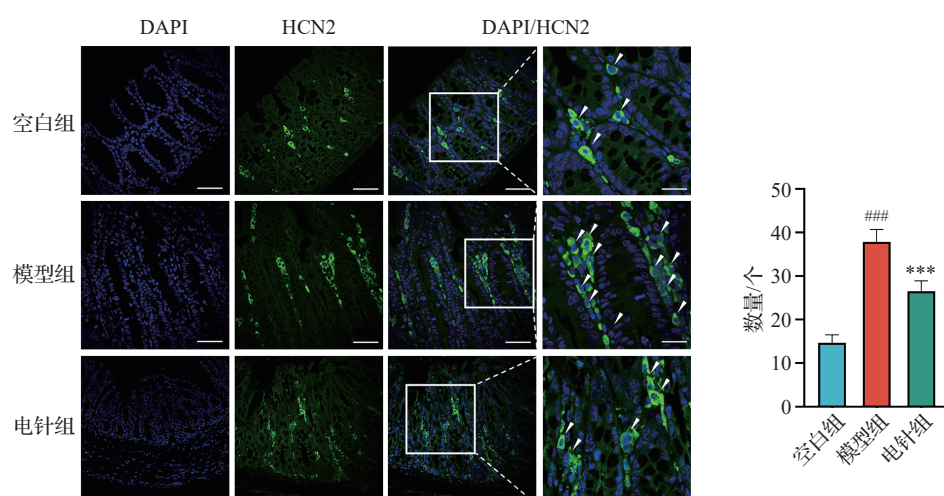


注:5-HT为5-羟色胺,HCN2为环核苷酸门控阳离子通道。左图为各组结肠中HCN2与5-HT共表达免疫荧光染色图,左侧标尺=50 μm,右侧框选处放大图标尺=20 μm,白色箭头示阳性共表达。右图为Pearson相关系数统计图($\bar{x} \pm s_x$, 3只鼠/组)。

与空白组比较,^{###} $P < 0.001$;与模型组比较,^{***} $P < 0.001$ 。

图6 各组小鼠结肠中HCN2与5-HT共定位表达(免疫荧光染色)

Fig. 6 Co-localization expression of HCN2 and 5-HT in the colonic tissue of mice in the 3 groups (immunofluorescence staining)



注:HCN2为环核苷酸门控阳离子通道。左图为各组结肠中HCN2阳性表达的免疫荧光染色图,左侧标尺=50 μm,右侧框选处放大图标尺=20 μm,白色箭头示阳性表达。右图为各组小鼠结肠中HCN2阳性表达细胞数统计图($\bar{x} \pm s_x$, 3只鼠/组)。

与空白组比较,^{###} $P < 0.001$;与模型组比较,^{***} $P < 0.001$ 。

图7 各组小鼠结肠中HCN2阳性表达比较(免疫荧光染色)

Fig. 7 Comparison of colonic HCN2 expression of mice in the 3 groups (immunofluorescence staining)

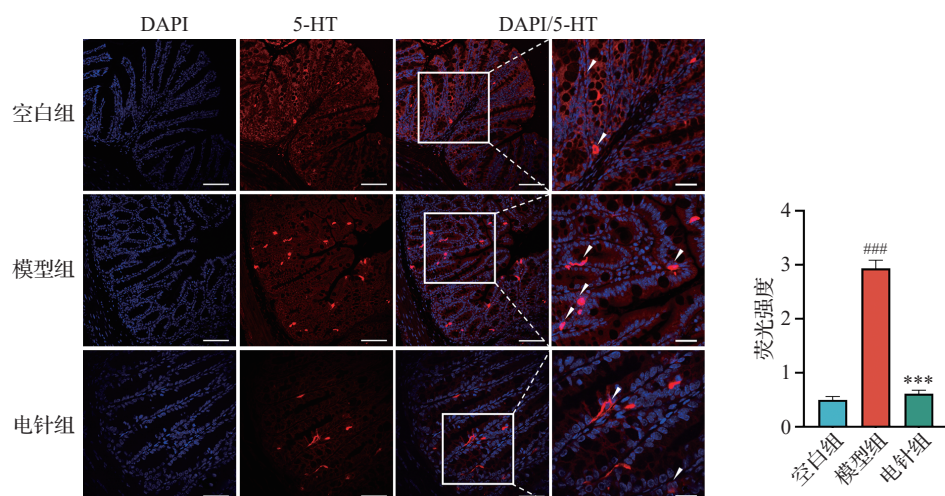
0.001),见图12。当使用LV-HCN2 shRNA转染RIN-14B细胞后,与正常组相比,转染组HCN2、TPH1 mRNA的表达水平下降($P < 0.001$),细胞上清液中5-HT、cAMP的含量降低($P < 0.001$),见图13。

3 讨论

中医认为,UC归属于“泄泻”“痢疾”等范畴,核心为本虚标实之病。上巨虚归属足阳明胃经,为大肠经的下合穴,具有调和脾胃、理气通腑、化滞止泻之功。本研究以DSS诱导的UC模型小鼠、Vil1^{MercreMer}HCN2^{fl/fl}转基因小鼠及RIN-14B细胞为

研究对象,在明确电针“上巨虚”具有减轻肠道炎症损伤与结肠动力障碍的基础上,聚焦于HCN2离子通道,从电-化学转化的角度,探索了电针改善结肠动力障碍的分子响应途径。结果显示,电针具有同步降低HCN2、5-HT自身及相关合成分泌指标(TPH1、SERT)表达的作用。此外,HCN2离子通道具有调控5-HT基础分泌的作用,进一步提示电针“上巨虚”可能通过调控ECs中HCN2离子通道,进而影响5-HT分泌,最终参与结肠动力的调控。

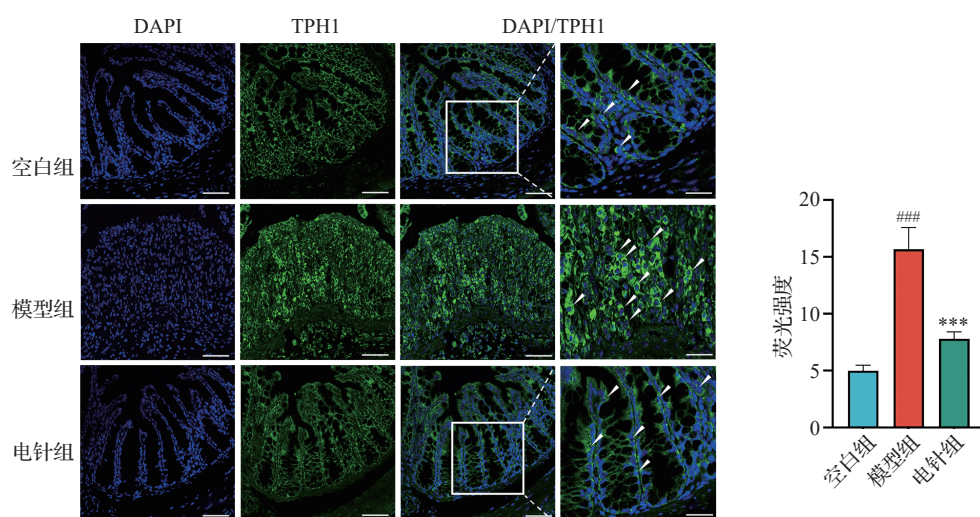
研究表明,尽管ECs仅占肠上皮细胞总数的



注:5-HT为5-羟色胺左图为各组结肠中5-HT阳性表达的免疫荧光染色图,左侧标尺=50 μm ,右侧框选处放大图标尺=20 μm ,白色箭头示阳性表达。右图为各组小鼠结肠中5-HT荧光强度统计图($\bar{x} \pm s_x$, 3只鼠/组)。与空白组比较,^{###} $P < 0.001$;与模型组比较,^{***} $P < 0.001$ 。

图8 各组小鼠结肠中5-HT阳性表达比较(免疫荧光染色)

Fig. 8 Comparison of colonic 5-HT expression of mice in the 3 groups (immunofluorescence staining)



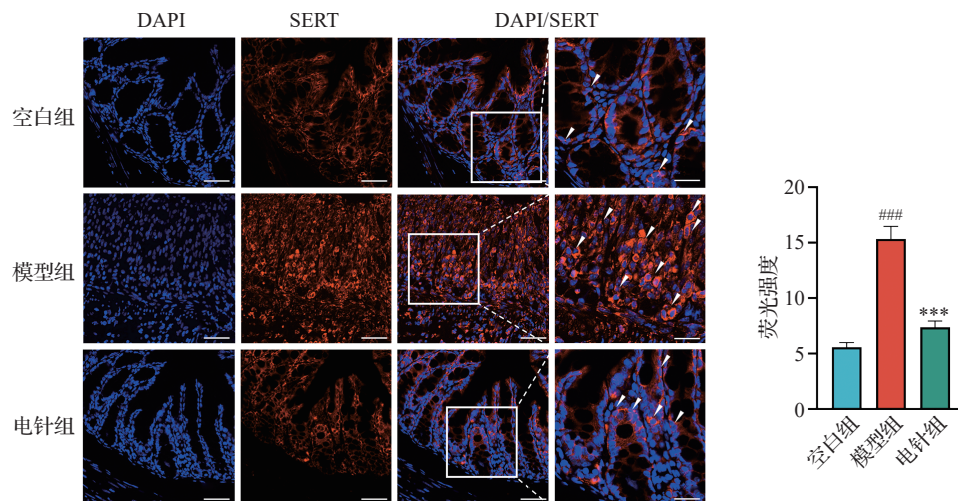
注:TPH1为色氨酸羟化酶1。左图为各组结肠中TPH1阳性表达的免疫荧光染色图,左侧标尺=50 μm ,右侧框选处放大图标尺=20 μm ,白色箭头示阳性表达。右图为各组小鼠结肠中TPH1荧光强度统计图($\bar{x} \pm s_x$, 3只鼠/组)。与空白组比较,^{###} $P < 0.001$;与模型组比较,^{***} $P < 0.001$ 。

图9 各组小鼠结肠中TPH1阳性表达比较(免疫荧光染色)

Fig. 9 Comparison of colonic TPH1 expression of mice in the 3 groups (immunofluorescence staining)

1%,但它们却构成了人体最大的内分泌细胞集^[18],并负责分泌人体中超过90%的5-HT。HCN2是一类受电压和配体双重调控的超极化激活、环核苷酸门控的阳离子通道。研究^[19-20]报道,诸多内分泌细胞中存在HCN2的表达,如GLUTag细胞、胰岛细胞及存储催产素的分泌小泡等,且相应激素的分泌与其胞吐功能均受到HCN2离子通道的调控^[10]。故HCN2离子通道可能是调控ECs分泌5-HT的关键分子“开关”。从电-化学转化角度看,HCN2可感知膜电位变化与胞内cAMP水平,将电针产生的生物电信号转化为ECs内的化学信号,进而影响5-HT

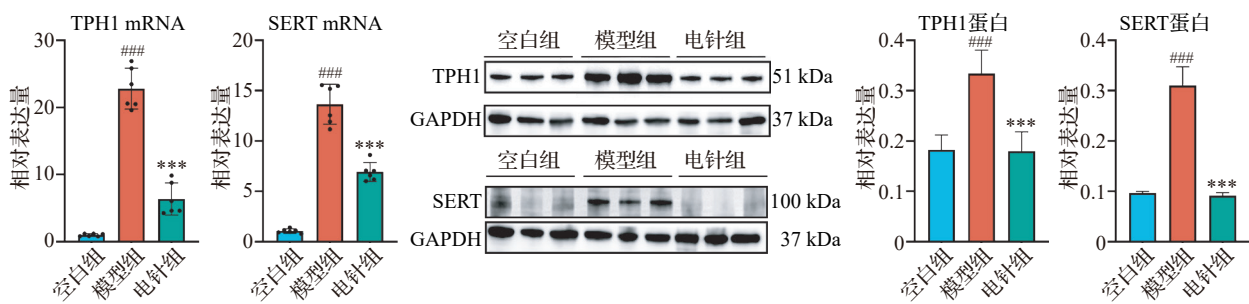
囊泡的胞吐释放。这一特性使其区别于传统电压门控通道,成为连接外部物理刺激与内部化学分泌的独特分子桥梁。研究表明,5-HT分泌的异常会干扰免疫细胞的功能和炎症因子的平衡。如5-HT的异常累积会持续刺激肠道黏膜,导致肠道屏障功能受损,同时联合周围免疫炎症细胞释放的炎症介质,引发级联反应;同时5-HT的异常分泌也会改变平滑肌的收缩频率和强度,导致结肠动力紊乱^[21-22]。故5-HT是影响肠道免疫稳态与结肠动力的核心因素。本研究明确了ECs中存在HCN2表达,而电针可使HCN2、5-HT的表达趋于正常,表明电针可能



注:SERT为5-羟色胺转运蛋白。左图为各组结肠中SERT阳性表达的免疫荧光染色图,左侧标尺=50 μm ,右侧框选处放大图标尺=20 μm ,白色箭头示阳性表达。右图为各组结肠中SERT荧光强度统计图($\bar{x} \pm s_x$, 3只鼠/组)。与空白组比较, $^{###}P < 0.001$;与模型组比较, $^{***}P < 0.001$ 。

图10 各组小鼠结肠中SERT阳性表达比较(免疫荧光染色)

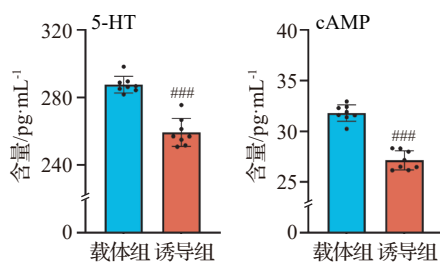
Fig. 10 Comparison of colonic SERT expression of mice in the 3 groups (immunofluorescence staining)



注:TPH1为色氨酸羟化酶1,SERT为5-羟色胺转运蛋白。与空白组比较, $^{###}P < 0.001$;与模型组比较, $^{***}P < 0.001$ 。

图11 各组小鼠结肠中TPH1、SERT mRNA、蛋白表达比较($\bar{x} \pm s_x$, 6只鼠/组)

Fig. 11 Comparison of the colonic TPH1 and SERT mRNA and protein expressions of mice in the 3 groups ($\bar{x} \pm s_x$, 6 mice/group)



注:5-HT为5-羟色胺,cAMP为环核苷酸。与载体组比较, $^{###}P < 0.001$ 。

图12 各组小鼠血清5-HT、cAMP的含量比较($\bar{x} \pm s_x$, 8只鼠/组)

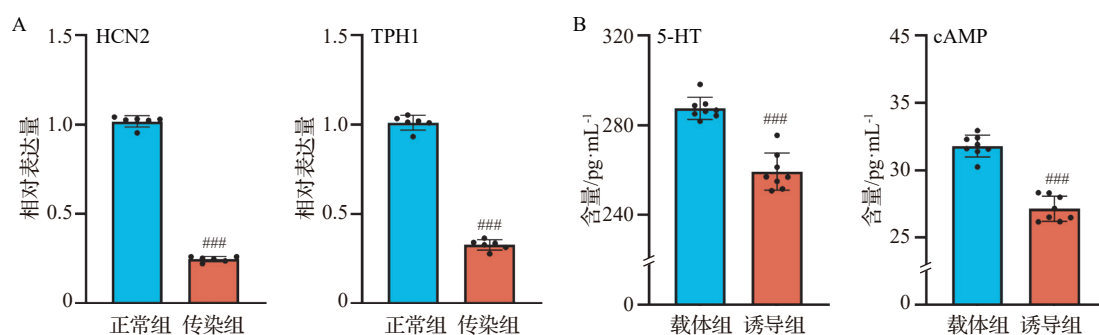
Fig. 12 Comparison of serum 5-HT and cAMP contents of mice in the 2 groups ($\bar{x} \pm s_x$, 8 mice/group)

通过调控ECs中HCN2离子通道,影响5-HT分泌,进而恢复异常的结肠动力。为进一步明确HCN2对5-HT分泌的调控作用,本研究采用慢病毒转染RIN-14B细胞,当HCN2表达被敲减时,

转染组细胞上清液中5-HT与cAMP含量显著降低;且与Vil1^{MercreMer}HCN2^{fl/fl}转基因小鼠血清5-HT、cAMP变化趋势一致。上述体内外实验提示,HCN2是调控ECs分泌5-HT的关键靶点,为电针“上巨虚”经HCN2/5-HT改善结肠动力提供了佐证。

综上,本研究观察到ECs中HCN2离子通道活化后,可影响5-HT的合成与分泌,表明HCN2/5-HT可能是“上巨虚”缓解结肠动力障碍的重要分子途径。聚焦于ECs/HCN2/5-HT,不仅可为上巨虚作为肠病效穴提供分子层面的科学依据,也能为深化腧穴认知、提高临床疗效、促进临床转化等提供有益尝试。本研究是对电针电-化学转化调控机制的创新性探索和补充,但其中涉及的细胞和分子机制仍需更深层次的挖掘与完善。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。作者余曙光为本刊编委,但未参与本文的审理。



注:HCN2为环核苷酸门控阳离子通道2,TPH1为色氨酸羟化酶。A为慢病毒转染后RIN-14B细胞HCN2、TPH1 mRNA的相对表达量;B为慢病毒转染后细胞上清液中5-HT、cAMP含量。与正常组/载体组比较,### $P<0.001$ 。

图13 病毒转染效率验证及敲低HCN2后5-HT和cAMP的含量比较($\bar{x}\pm s_x$, 6孔/组)

Fig. 13 Verification of viral transduction efficiency and comparison of 5-HT and cAMP contents after HCN2 knockdown ($\bar{x}\pm s_x$, 6 wells/group)

参考文献

- [1] Chen X J, Xiang X, Xia W T, et al. Evolving trends and burden of inflammatory bowel disease in Asia, 1990-2019: a comprehensive analysis based on the global burden of disease study[J]. *J Epidemiol Glob Health*, 2023, 13(4): 725-739.
- [2] Danpanichkul P, Suparan K, Arayakarnkul S, et al. Global epidemiology and burden of elderly-onset inflammatory bowel disease: a decade in review[J]. *J Clin Med*, 2023, 12(15): 5142.
- [3] Dou Z L, Zheng H L, Shi Y Y, et al. Analysis of global prevalence, DALY and trends of inflammatory bowel disease and their correlations with sociodemographic index: data from 1990 to 2019[J]. *Autoimmun Rev*, 2024, 23(11): 103655.
- [4] Collins S M. Interrogating the gut-brain axis in the context of inflammatory bowel disease: a translational approach[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2020, 26(4): 493-501.
- [5] Chen Y, Guo Y, Gharibani P, et al. Transitional changes in gastrointestinal transit and rectal sensitivity from active to recovery of inflammation in a rodent model of colitis[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 8284.
- [6] Mawe G M, Hoffman J M. Serotonin signalling in the gut: functions, dysfunctions and therapeutic targets[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013, 10(8): 473-486.
- [7] Yang G B, Lackner A A. Proximity between 5-HT secreting enteroendocrine cells and lymphocytes in the gut mucosa of *Rhesus* macaques (*Macaca mulatta*) is suggestive of a role for enterochromaffin cell 5-HT in mucosal immunity[J]. *J Neuroimmunol*, 2004, 146(1/2): 46-49.
- [8] Calejo A I, Jorgačevski J, Rituper B, et al. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels and cAMP-dependent modulation of exocytosis in cultured rat lactotrophs[J]. *J Neurosci*, 2014, 34(47): 15638-15647.
- [9] Baker E C, Layden M J, van Rossum D B, et al. Functional characterization of cnidarian HCN channels points to an early evolution of ih[J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142730.
- [10] Reimann F, Maziars M, Flock G, et al. Characterization and functional role of voltage gated cation conductances in the glucagon-like peptide-1 secreting GLUTag cell line[J]. *J Physiol*, 2005, 563(Pt 1): 161-175.
- [11] Wei D N, Zhao N, Xie L S, et al. Electroacupuncture and moxibustion improved anxiety behavior in DSS-induced colitis mice[J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2019, 2019: 2345890.
- [12] Liu S B, Wang Z F, Su Y S, et al. A neuroanatomical basis for electroacupuncture to drive the vagal-adrenal axis[J]. *Nature*, 2021, 598(7882): 641-645.
- [13] Liu S B, Wang Z F, Su Y S, et al. Somatotopic organization and intensity dependence in driving distinct NPY-expressing sympathetic pathways by electroacupuncture[J]. *Neuron*, 2020, 108(3): 436-450.e7.
- [14] Chassaing B, Aitken J D, Malleshappa M, et al. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice[J]. *Curr Protoc Immunol*, 2014, 104(1).
- [15] Eichele D D, Kharbanda K K. Dextran sodium sulfate colitis murine model: an indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(33): 6016-6029.
- [16] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 2版. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 257.
- [17] Li Z R. Experimental acupuncture (in Chinese)[M]. 2nd edition. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2007: 257.
- [17] Li S H, Huang Q H, Yang Q Q, et al. The shared mechanism of barrier dysfunction in ulcerative colitis and Alzheimer's disease: DDIT4/IL1 β neutrophil extracellular traps drive macrophages-mediated phagocytosis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2025, 149: 114188.
- [18] Gershon M D. 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract[J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2013, 20(1): 14-21.
- [19] Emery E C, Young G T, Berrocoso E M, et al. HCN2 ion channels play a central role in inflammatory and neuropathic pain[J]. *Science*, 2011, 333(6048): 1462-1466.
- [20] Schnorr S, Eberhardt M, Kistner K, et al. HCN2 channels account for mechanical (but not heat) hyperalgesia during long-standing inflammation[J]. *Pain*, 2014, 155(6): 1079-1090.
- [21] Sikander A, Rana S V, Prasad K K. Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable bowel syndrome[J]. *Clin Chim Acta*, 2009, 403(1/2): 47-55.
- [22] Wei L, Singh R, Ha S E, et al. Serotonin deficiency is associated with delayed gastric emptying[J]. *Gastroenterology*, 2021, 160(7): 2451-2466.e19.

收稿日期:2025-09-17 修回日期:2025-12-11