省级项目平台

DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.06.037

从 LncRNA－UCA1 探讨针刺调节 miRNA－331－3p/BRD4 轴改善脾虚大鼠肠道炎症作用机制

刘继东[1,2],张家豪[1],王建波[1,2],曲怡[1,2],薛亚楠[1,2]

(1. 辽宁中医药大学,辽宁 沈阳 110847; 2. 辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室,辽宁 沈阳 110847)

摘要:目的 从长链非编码RNA尿路上皮癌相关基因1(LncRNA－UCA1)探讨针刺调节 miRNA－331－3p/溴结构域蛋白4(BRD4)轴改善脾虚大鼠肠道炎症作用机制,探讨"健益脾气"针刺疗法改善脾虚便溏症状现代作用机制。方法 将60只SD雄性大鼠以随机数字表法分为正常组、模型组、非经非穴组、针刺组,每组15只。除正常组外,其余3组采用劳倦过度和不规律饮食复合方法建立脾虚证大鼠模型。造模成功后,针刺组电针"足三里"穴及"脾俞"穴干预治疗,非经非穴组给予电针尾尖作为对照干预,每日1次/20 min,共治疗14 d。治疗结束后,取大鼠血清及结肠组织。qPCR法检测大鼠结肠组织 LncRNA－UCA1、miRNA－331－3p/BRD4 轴相关基因的表达;ELISA 法检测大鼠血清中白介素－1β(IL－1β)、白细胞介素－6(IL－6)的含量;HE 染色法观察大鼠结肠组织病理形态变化;免疫组化法观察结肠中 BRD4、白细胞介素－8(IL－8)的表达情况;免疫荧光法观察 IL－1β、IL－6、肿瘤坏死因子－α(TNF－α)及核因子－κBp65(NFκBp65)的表达水平;TUNEL 染色法观察各组结肠组织凋亡情况。结果 与正常组比较,模型组、非经非穴组大鼠结肠组织 miRNA－331－3p 的表达水平明显下降($P<0.05$),LncRNA－UCA1、BRD4、NF－κB p65、IL－1β、IL－6、IL－8、TNF－α 的 mRNA 表达水平有所升高($P<0.05$);与模型组比较,针刺组大鼠结肠组织 miRNA－331－3p 的表达水平明显升高($P<0.05$),LncRNA－UCA1、BRD4、NF－κB p65、IL－1β、IL－6、IL－8、TNF－α 的 mRNA 表达水平有所降低($P<0.05$)。与正常组比较,模型组大鼠血清中促炎因子 IL－1β、IL－6 表达水平明显升高($P<0.05$),与模型组比较,针刺组大鼠结肠组织中促炎因子 IL－1β、IL－6 的表达水平有所降低($P<0.05$)。免疫组化法结果显示与正常组比较,模型组大鼠结肠组织 BRD4、IL－8 表达有所升高($P<0.05$);与模型组比较,针刺组的 BRD4 表达有所降低($P<0.05$)。免疫荧光结果显示与正常组比较,模型组、非经非穴组结肠组织 IL－1β、IL－6、TNF－α、NF－κB p65 免疫荧光平均吸光度值升高($P<0.05$);与模型组比较,针刺组大鼠结肠组织中 IL－1β、IL－6、TNF－α、NF－κB p65 免疫荧光平均吸光度值降低($P<0.05$)。另外 HE 染色结果显示,针刺治疗可有效减轻结肠黏膜组织中炎症细胞浸润和杯状细胞的损失;TUNEL 染色结果显示,针刺治疗可以改善脾虚大鼠结肠炎症,抑制结肠黏膜细胞凋亡。结论 电针"足三里""脾俞"穴可以干预 LncRNA－UCA1 调节 miRNA－331－3p/BRD4 轴,抑制肠道炎症和促炎症介质的表达,进而抑制结肠黏膜细胞凋亡,提高机体免疫力,从而改善脾虚便溏症状。

关键词:足三里;脾俞;脾虚;肠道炎症;LncRNA－UCA1;miRNA－331/BRD4

中图分类号:R245 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)06-0183-10

Exploring Mechanism of Intestinal Inflammation in Rats with Spleen Deficiency Treated with Acupuncture Based on LncRNA(UCA1) Regulation of miRNA－331/BRD4 Axis

LIU Jidong[1,2], ZANG Jiahao[1], WANG Jianbo[1,2], QU Yi[1,2], XUE Yanan[1,2]

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, Liaoning, China;
2. Key Laboratory of The Theory and Application of Viscera in Chinese Medicine, Ministry of Education, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, Liaoning, China)

Abstract: *Objective* The aim of this study is to investigate the regulatory mechanism of LncRNA(UCA1) on the miRNA－331－3p/bromine domain protein 4(BRD4) axis through acupuncture, in order to ameliorate colonic inflammation in rats with spleen deficiency. Additionally, this study seeks to explore the contemporary mechanism of "strengthening spleen and benefiting Qi" acupuncture therapy in improving symptoms of spleen deficiency and loose stools. *Methods* Sixty male SD rats were randomly assigned to four groups: normal group, model group, non－meridian non－acupuncture group and acupuncture group, with 15 rats in each group. With the exception of the normal group, the remaining three groups were utilized to establish a rat model of spleen deficiency through the compound method of overwork and irregular diet. Following successful modeling, the acupuncture group re-

基金项目:辽宁省教育厅高等学校基本科研项目(LJKZ0886);辽宁省科学技术计划项目(2021－MS－248)

作者简介:刘继东(1976－),男(锡伯族),辽宁沈阳人,副教授,博士,研究方向:针灸作用机制。

ceived electro – acupuncture at "Zusanli(ST36)" and "Pishu(BL20)", while the non – meridian non – acupuncture group was treated with electro – acupuncture at the tail tip as a control. The treatment was administered once daily for 20 minutes over a period of 14 days. After treatment, serum and colonic tissues were collected from the rats. The expressions of LncRNA(UCA1) and miRNA – 331 – 3p/BRD4 axis – related genes in rat colon tissue were detected by qPCR. The contents of interleukin – 1β(IL – 1β) and interleukin – 6(IL – 6) in rat serum were detected by ELISA. The pathological morphological changes of rat colon tissue were observed by HE staining. The staining of BRD4 in colon was observed by immunohistochemistry method. The immunoactivities of IL – 1β, IL – 6, tumor necrosis factor – α(TNF – α) and NFκB p65 expression levels were detected by immunofluorescence histochemistry. The apoptosis in colon tissues of each group was detected by TUNEL staining. *Results* Compared with those of the normal group, the expression levels of miRNA – 331 – 3p in colon tissues of rats in the model group and non – meridian non – acupuncture group were significantly decreased($P<0.05$), and the mRNA expression levels of LncRNA(UCA1), BRD4, nuclear factor kappa – B(NF – κB) p65, IL – 1β, IL – 6, IL – 8 and TNF – α were increased($P<0.05$). Compared with those of the model group, the expression levels of miRNA – 331 – 3p in the colon tissue of rats were significantly increased($P<0.05$) in the acupuncture group, and the mRNA expression levels of LncRNA(UCA1), BRD4, NF – κB p65, IL – 1β, IL – 6, IL – 8 and TNF – α were decreased($P<0.05$). Compared with those of the normal group, the expression levels of IL – 1β and IL – 6 in the serum of rats in the model group were significantly increased($P<0.05$), and the expression levels of IL – 1β and IL – 6 in the colon tissue of rats in the acupuncture group were decreased($P<0.05$) compared with those in the model group. Immunohistochemical results showed that the expression of BRD4 in the colon tissue of rats in the model group was increased compared with that in the normal group($P<0.05$). Compared with that in the model group, the expression of BRD4 in the acupuncture group was decreased($P<0.05$). The immunofluorescence histochemistry results showed that the mean absorbance values of IL – 1β, IL – 6, TNF – α and NF – κB p65 immunofluorescence in colon tissues of the model group and non – meridian non – acupuncture group were increased compared with those of the normal group($P<0.05$). Compared with those of the model group, the mean absorbance values of IL – 1β, IL – 6, TNF – α and NF – κB p65 immunofluorescence in colon tissues of rats in the acupuncture group were decreased($P<0.05$). In addition, HE staining results showed that acupuncture could effectively reduce inflammatory cell infiltration and loss of cupped cells in colonic mucosal tissues. TUNEL staining results showed that acupuncture could improve colonic inflammation and inhibit apoptosis of colonic mucosal cells in spleen deficiency rats. *Conclusion* Electro – acupuncture at "Zusanli(ST36)" and "Pishu(BL20)" can interfere with the LncRNA(UCA1) regulating miRNA – 331 – 3p/BRD4 axis, inhibit the expressions of intestinal inflammation and pro – inflammatory mediators, and then inhibit the apoptosis of colonic mucosal cells and improve the immunity of the body, thus improving the symptoms of spleen deficiency and loose stools.

Keywords: Zusanli (ST36); Pishu (BL20); spleen deficiency; intestinal inflammation; LncRNA – UCA1; miRNA – 331/BRD4

《素问·灵兰秘典论篇》曰:"脾胃者,仓廪之官,五味出焉。"李中梓《医宗必读》也写道:"一有此身,必资谷气,谷入于胃,洒陈于六腑而气至,和调于五脏而血生,而人资之以为生者也,故曰后天之本在脾。"脾把饮食物化生为人体所需精微,并将这些精微吸收转输至全身,人体脏腑赖脾胃后天濡养,气血化生得源而获充足的营养滋润[1]。而脾胃虚弱,不能受纳水谷并运化精微,纳化停滞,清浊杂混而下,则成便溏。李东垣《脾胃论》曰:"历观诸篇而参考之,则元气之充足,皆由脾胃之气无所伤,而后能滋养元气。"《内经》也记载:"正气存内,邪不可干",脾胃虚弱,气血元气生化乏源,机体抗邪功能降低,免疫系统失衡,则会诱发肠道炎症[2]。现代免疫学认为,免疫防御系统是机体抵抗各种致病微生物侵袭,维持机体协调平衡性的重要生理功能,脾虚引起便溏,免疫防御被破坏,导致肠道菌群失调,容易引起致病菌的增加,诱发肠炎变成本虚标实的症状。故此,脾虚是诱发肠道炎症的一个重要因素。现代研究表明,肠上皮细胞凋亡进程可由多种炎症因子[如白介素 – 1β(IL – 1β)、白细胞介素 – 6(IL – 6)]活性增加而驱动[3]。研究还发现在炎症部位可观察到结肠上皮黏膜细胞的凋亡增加,这会破坏结肠黏膜结构完整和屏障功能,进一步加强结肠炎症反应[4]。

长非编码RNA(LncRNA)多数位于细胞质中,是一种长度超过200个核苷酸,因缺少可译框架而没有蛋白质编码功能的RNA[5]。LncRNAs已被证明参与多种炎症过程,并通过与核酸和蛋白质相互作用、引诱miRNAs、激活或抑制单个分子而与免疫疾病的发病机制有关[6]。已发现UCA1与多种炎症及肿瘤密切相关并在其发生中发挥作用,可发挥促炎功能[7]。已知微小RNA(miRNAs)结合靶mRNA的3'非翻译区(3' – UTR)并调节其表达,多种mRNA可由单个miRNA同时靶向,从而调节各个基因的基因表达[8]。miRNAs已被证明可以调节多种生物活性,包括炎症、细胞死亡和癌症进展[9]。已发现miR – 331 – 3p参与多种疾病的炎症反应过程且UCA1通过调节miR – 331 – 3p可以改善肠道炎症[10]。BRD4是溴和末端外(BET)家族的重要成员,其溴结构域可以结合乙酰化组蛋白和转录因子以调节多种病理生理活性,包括癌症和炎症[11]。BRD4是参与炎症反应的重要溴和末端外蛋白且BRD4是调节炎症的NF – κB通路的关键调节因子[12]。现代研究发现BRD4是miR – 331 – 3p的直接靶点,BRD4受miR – 331 – 3p调节,BRD4的消耗逆转了miR – 331 – 3p抑制对LPS处理的FHC中的细胞活力、细胞凋亡和炎症的影响[10]。

脾虚失健,运化失司,T淋巴细胞功能下降,从而促使机体免疫能力降低,进一步加重便溏。研究表明脾虚和肠道炎症有密切的联系,且于临床上广泛应用针灸改善脾虚症状,但其作

用机制与是否调控相关肠道炎症尚缺乏充足的理论及系统的研究。本实验通过观察电针脾虚大鼠干预 LncRNA－UCA1 调节 miRNA－331－3p/BRD4 轴的治疗作用，探讨其健运脾气、抵抗炎症、抑制细胞凋亡的效果，为临床针灸治疗脾虚提供科学实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 SPF 级 SD 大鼠 60 只，8 周龄，体质量 180～200 g，购于辽宁长生生物技术股份有限公司，动物生产许可证号[SCXK(辽)2020－0001]。饲养环境：辽宁中医药大学实验动物中心，使用许可证号[SYXK(辽)2019－0004]，湿度为(45±5)%，温度为(22±2)℃。依据随机数字表法将大鼠分为 4 组，为正常组、模型组、非经非穴组和针刺组，每组 15 只。实验过程中严格按照中华人民共和国科技部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》对动物进行处置。本实验通过辽宁中医药大学动物伦理审查批准实施[2021－016]。

1.2 主要仪器与试剂 Stratagene Mx3000p 荧光 PCR 仪(Agilent Technologies)，M8 数字切片扫描成像系统(Precipoint)，针灸针(0.19 mm×10 mm，苏州医疗用品厂有限公司)，电子针疗仪(苏州医疗用品厂有限公司)，酶标仪(赛默飞世尔科技公司)，TNF－α 一抗(华安生物，ER65189)，miRNA 提取试剂盒(29122，康为世纪)，miRNA 反转试剂盒(25722，康为世纪)，miRNA 扩增试剂盒(02422，康为世纪)，免疫组化试剂盒(KIT－9710，福州迈新生物技术开发有限公司)，组织自发荧光淬灭剂(G1221，武汉赛维尔生物科技有限公司)。

1.3 造模方法 采用劳倦过度和不规律饮食复合造模法建立 SD 大鼠模型。适应性饲养 1 周后开始造模。正常组每日自由进食及饮水，其余 3 组先饱食 1 d，再禁食 2 d，3 d 为 1 个周期，并每日力竭游泳(尾部系 5% 体质量保险丝)，每日 1 次，前后相差 10 min，水温保持在 25 ℃，水深保持在 50 cm，持续 21 d。以大鼠出现食欲不振、形体消瘦、倦怠神疲、毛发失荣、大便不调(便溏)，扎堆嗜睡等症状，符合《中医实验动物模型方法学》中对于脾虚大鼠的评定标准。

1.4 干预方法 造模成功后，针刺组选取“足三里”及“脾俞”进行电针治疗，定位参考中国针灸学会实验动物研究会制定的《动物针灸穴位图谱》，固定后，采用疏密波、频率 2 Hz/100 Hz，输出电压 2 V，20 min/d，持续 14 d。非经非穴组确定大鼠尾尖为非经非穴点，给予同等条件下的电针处理。正常组和模型组大鼠在每天同一时间固定，不给予电针干预。

1.5 观察指标及检测方法 取腹主动脉血：以上 4 组均用 10% 水合氯醛进行腹腔麻醉注射(3 mL/kg 体质量)，酒精消毒，充分暴露腹腔，棉球剥离开脏器，分离出粉色腹主动脉，右手持取血针，针尖接近平行刺入腹主动脉，回血后，取血针另一端连接真空抗凝采血管，收集 3/4 管后拔出。

取结肠：暴露腹腔并剪取结肠，0.9% 氯化钠溶液冲洗肠腔，取部分结肠置于 4% 多聚甲醛固定，另将剩余结肠置于－80 ℃保存。

实时定量荧光 PCR 观察大鼠结肠组织 LncRNA－UCA1、miRNA－331－3p、BRD4、P65、IL－1β、IL－6、IL－8、TNF－α mRNA 表达：于－80 ℃取出结肠组织，并使用 Trizol 法提取总 RNA，后逆转录为 cDNA；miRNA 则按 miRNA 提取及转录试剂盒说明书提取并转录为 cDNA，设定条件：95 ℃，10 min；95 ℃，15 s；60 ℃，1 min，40 个循环，扩增所用引物见表 1，荧光定量 PCR 仪进行检测，溶解反应按 Mx3000p 自动设定的条件进行。$2^{-\triangle\triangle CT}$法对 PCR 结果进行定量分析。

表 1 引物序列

基因	引物序列(5′→3′)	产物长度/bp
miRNA－331－3p	上游：UCAUUUUACCCUCCACCAGGGGG	(加尾法)
LncRNA－UCA1	上游：GAGCCCTGTCCTTTGATG	279
	下游：GATAGACTGTGACCCGATA	
BRD4	上游：GAGGAAAGAAACAGGGACA	77
	下游：TCTGCGGAGAAGTTGATG	
NFκBp65	上游：ACAACTATGAGATGAACTCCGGG	114
	下游：GATAGCAGTGGGCTGTCTCC	
IL－6	上游：ATCAAGAGTCAACTGGCTCAACTCA	142
	下游：TGTTGGGCGCACATAGCTTATC	
IL－8	上游：CCCCCATGGTTCAGAAGATTG	125
	下游：TTGTCAGAAGCCAGCGTTCAC	
TNFα	上游：CCACGCTCTTCTGTCTACTG	145
	下游：GCTACGGGCTTGTCACTC	
IL－1β	上游：TGTGATGTTCCCATTAGAC	131
	下游：AATACCACTTGTTGGCTTA	
β－actin	上游：CCTCTATGCCAACACAGT	155
	下游：AGCCACCAATCCACACAG	

ELISA 检测大鼠血清中 IL－1β、IL－6 的含量：室温血液自然凝固 15 min，离心 20 min(3000 r/min)后，收集上清液加样酶标板，标准品梯度稀释加入标准品孔，空白孔加入 40 μL 样品稀释液再加入 10 μL 待测样品，充分混匀，封板后以 37 ℃温育 30 min，弃去液体并甩干，每孔加满 20 倍稀释洗涤液，静置 30 s 弃去(重复 5 次)后拍干。加入酶标试剂温育并洗涤。每孔先后加入显色剂 A、B 各 50 μL，37 ℃避光显色 15 min 每孔加终止液 50 μL。450 nm 波长(酶标仪)下测定吸光度，计算 IL－1β、IL－6 的表达量。

HE 染色法观察结肠组织形态学变化：将 4% 多聚甲醛固定好的结肠组织取出，乙醇梯度脱水，二甲苯透明，常规石蜡包埋、切片，经脱蜡、清洗后进行 HE 染色，显微镜下观察组织形态学变化。

免疫组化染色法观察结肠 BRD4 表达：取出 4% 多聚甲醛固定好的结肠组织，石蜡包埋，切片 4 μm 厚，放入 60 ℃恒温箱中加热 3 h，取出冷却至室温。将切片脱蜡、水化，水流冲洗。置于柠檬酸缓冲液中 95～100 ℃下孵育 20 min，以用于抗原提取。静置冷却至室温后，分别用阻断内源性过氧化物酶、非特异染色阻断剂孵育 10 min。一抗，4 ℃孵育过夜。分别用 IgG 聚合物、加链霉菌抗生物素蛋白－过氧化氢酶室温孵育 10 min，DBA 显色。采用生物显微镜阅片，Image J 软件对图像进行光密度分析。

免疫荧光染色法观察结肠 IL－1β、IL－6、TNF－α、NFκBp65 的表达：取结肠石蜡切片，经过脱蜡后，将切片充分浸泡在柠檬酸钠抗原修复液内，95～100 ℃下孵育 20 min，取出自然冷却至室温。切片甩干，滴加组织自发荧光淬灭剂 A 液，室温孵育 30 min，BSA 牛血清白蛋白封闭 40 min。一抗，4 ℃孵育过夜。荧光二抗避光孵育 50 min，洗涤后加入 DAPI，避光孵育 10 min，最后用荧光显微镜观察。采集图像后用 Image J 软件进行图像分析。

TUNEL染色法观察结肠组织细胞凋亡：取4%多聚甲醛固定好的样本，石蜡包埋后切片处理，按照TUNEL染色试剂盒操作步骤检测结肠组织细胞凋亡。荧光显微镜观察采集图像及分析。

1.6 统计学方法 采用SPSS 26.0软件进行统计分析，数据采用均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，所有数据均行正态性及方差齐性检验，均满足正态分布。组间比较使用单因素方差分析。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠体质量、抓力及结肠长度比较 见表2、表3。

表2 各组大鼠体质量比较 单位：g

组别	n	造模前体质量	治疗前体质量	治疗后体质量
正常组	15	215.40±6.69	402.20±17.76	483.40±29.62
模型组	15	212.40±6.77	181.80±5.26*	223.00±12.53*
非经非穴组	15	217.20±4.77	185.20±13.77*	236.60±9.99*
针刺组	15	211.60±7.77	194.40±13.24*	284.00±10.93*#

注：*与正常组比较，$P<0.05$；#与模型组比较，$P<0.05$。

表3 各组大鼠抓力及结肠长度比较

组别	n	造模前抓力/(N)	治疗前抓力/(N)	治疗后抓力/(N)	结肠长度/(cm)
正常组	15	887.40±27.37	1020.10±68.12	1278.00±22.31	8.88±0.34*
模型组	15	874.00±19.65	798.20±23.91*	807.00±54.14*	7.30±0.42*
非经非穴组	15	891.80±25.58	775.40±45.32*	785.40±26.47*	7.43±0.57*#
针刺组	15	893.40±16.89	803.40±36.86*	869.40±23.45*#	8.08±0.15

注：*与正常组比较，$P<0.05$；#与模型组比较，$P<0.05$。

2.2 各组大鼠结肠LncRNA-UCA1、miRNA-331-3p、BRD4、P65、IL-1β、IL-6、IL-8、TNF-α基因表达 与正常组比较，模型组、非经非穴组大鼠结肠组织miRNA-331-3p的表达水平明显下降（$P<0.05$），LncRNA-UCA1、BRD4、P65、IL-1β、IL-6、IL-8、TNF-α的mRNA表达水平有所升高（$P<0.05$）；与模型组比较，针刺组大鼠结肠组织miRNA-331-3p的表达水平明显升高（$P<0.05$），LncRNA-UCA1、BRD4、P65、IL-1β、IL-6、IL-8、TNF-α的mRNA表达水平有所降低（$P<0.05$）。见表4、表5。

2.3 各组大鼠血清中IL-1β、IL-6含量的比较 与正常组比较，模型组、非经非穴组大鼠结肠组织中促炎因子IL-1β、IL-6表达水平明显升高（$P<0.05$），与模型组比较，针刺组大鼠结肠组织中促炎因子IL-1β、IL-6的表达水平有所降低（$P<0.05$）。见图1。

表4 针刺对脾虚大鼠UCA1及miRNA-331-3p/BRD4轴mRNA表达影响

组别	n	miRNA-331-3p	UCA1	BRD4	NFκB P65
正常组	15	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	15	0.68±0.32*	1.80±0.12*	2.02±0.38*	1.97±0.25*
非经非穴组	15	0.70±0.59*	1.88±0.11*	2.13±0.49*	1.97±0.24*
针刺组	15	0.87±0.95*#	1.30±0.11*#	1.41±0.80#	1.37±0.19#

注：*与正常组比较，$P<0.05$；#与模型组比较，$P<0.05$。

表5 针刺对脾虚大鼠IL-1β、IL-6、IL-8、TNF-α的mRNA表达影响（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	IL-1β mRNA	IL-6 mRNA	IL-8 mRNA	TNF-α mRNA
正常组	15	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	15	2.22±0.54*	1.39±0.22*	2.10±0.55*	1.88±0.23*
非经非穴组	15	1.81±0.25*	1.34±0.16*	1.86±0.10*	1.43±0.20*#
针刺组	15	1.42±0.19#	0.97±0.16#	1.19±0.30#	1.14±0.27#

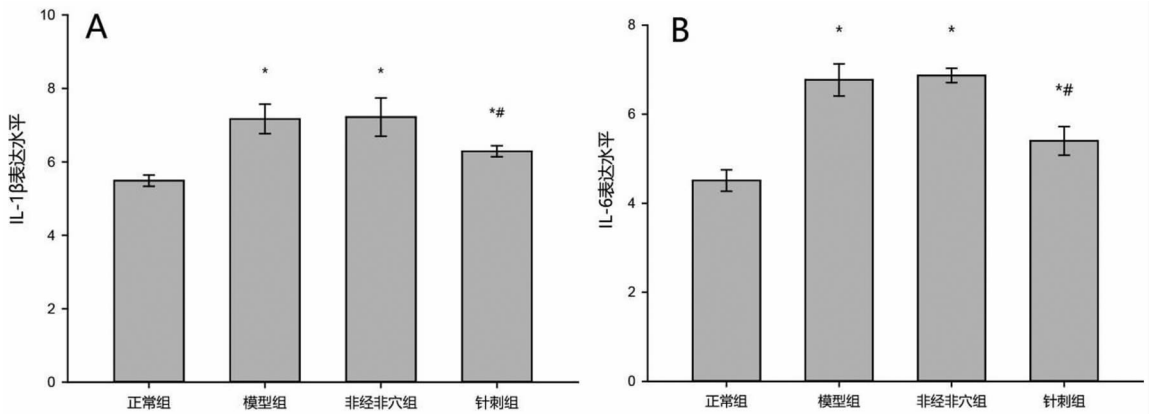
注：*与正常组比较，$P<0.05$；#与模型组比较，$P<0.05$。

2.4 各组大鼠结肠组织病理变化 正常组中结肠组织隐窝边缘规则，杯状细胞和隐窝结构正常；模型组、非经非穴组中炎性细胞增加，隐窝边缘不规则，且杯状细胞减少；针刺组可见炎性细胞有所减少，杯状细胞数量和隐窝结构得到一定程度的恢复。见插页XXⅦ图2。

2.5 各组大鼠结肠组织BRD4、IL-8的表达 与正常组相比，模型组、非经非穴组大鼠结肠组织中BRD4、IL-8的表达量明显增加，差异有统计学意义（$P<0.05$）；与模型组相比，针刺组大鼠结肠组织中BRD4、IL-8的表达量有所减少，差异有统计学意义（$P<0.05$）。见插页XXⅧ图3。

2.6 各组大鼠结肠组织IL-1β、IL-6、TNFα及NFκBp65免疫荧光表达比较 由插页XXⅧ图4、插页XXⅨ图5及表6可见，阳性表达呈现绿色，细胞核表达呈现蓝色，Merge为两者共表达。与正常组比较，模型组及非经非穴组IL-1β、IL-6、TNF-α、NF-κB p65的免疫荧光表达有所升高（$P<0.05$）。与模型组比较，针刺组IL-1β、IL-6、TNF-α、NF-κB p65的免疫荧光表达有所降低（$P<0.05$）。

2.7 TUNEL染色检测各组大鼠结肠上皮黏膜细胞凋亡 正常组中绿色荧光标记的凋亡细胞数量最少，凋亡细胞与总细胞重合最少，凋亡阳性细胞表达率最低；与正常组比较，模型组、



注：A. IL-1β表达水平；B. IL-6表达水平。*与正常组比较，$P<0.05$；#与模型组比较，$P<0.05$。

图1 针刺对脾虚大鼠相关因子影响

表 6 各组大鼠中 IL－1β、IL－6、TNF－α 及 NF－κB p65 平均荧光强度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL－1β	IL－6	TNF－α	NFκB P65
正常组	15	102.90±2.52	98.34±4.80	105.44±2.14	87.58±3.05
模型组	15	131.89±6.14*	146.54±3.66*	135.30±2.38*	120.96±4.54*
非经非穴组	15	128.25±9.64*	148.83±6.58*	131.57±2.56*	111.51±2.80*#
针刺组	15	113.54±3.76#	124.41±3.78*#	115.86±2.60*#	98.42±4.28*#

注：*与正常组比较，$P<0.05$；#与模型组比较，$P<0.05$。

非经非穴组结肠组织细胞凋亡情况最为严重，凋亡细胞与总细胞重合最多，凋亡阳性细胞表达率升高($P<0.05$)；与模型组比较，针刺组细胞凋亡率下降明显，凋亡细胞与总细胞重合均减少($P<0.05$)。见插页XXX图 6。

3 讨论

《医宗必读·肾为先天脾为后天论》曰："脾为中宫之土，土为万物之母[13]。"脾中央土以灌四傍，主运化水谷，布散精微，为"后天之本"，脾将饮食水谷化为精微，并将其转输至全身。《素问·阴阳应象大论篇》云："清气在下，则生飧泄；浊气在上，则生腹胀。"《儒门事亲》亦云："故湿之气……其化在天为雨，在地为泥，在人为脾，甚则为泄。"脾胃虚弱，无法受纳水谷并运化精微，水谷停滞，清浊混杂而下，遂成便溏。《景岳全书·泄泻》载："泄泻之本无不由于脾胃，若饮食失节……不能输化，致合污下降，而泻利作矣。"论述了脾胃与便溏的紧密的联系。脾胃亏虚，脏腑不得充养，机体的抵抗力降低[14]。且便溏日久，使肠道屏障功能逐渐减弱，无法发挥正常功能，机体免疫系统作用减弱，则易产生肠道炎症[15]。肠道炎症会破坏肠黏膜的完整性且降低肠黏膜屏障功能，进而促进肠黏膜细胞凋亡[16]。

因此本研究以"从脾论治"入手，通过电针足三里、脾俞干预 LncRNA－UCA1 调节 miRNA－331－3p/BRD4 轴治疗脾虚肠道炎症的机制。足三里穴出自《灵枢·本输》，为足阳明胃经合穴、胃之下合穴，属于"四总穴""回阳九针"之一[17]。故此选择针刺足三里以健脾，符合从脾论治之法。脾俞穴出自《灵枢·背俞》，属足太阳膀胱经，脾之背俞穴。背俞穴广泛用于治疗相应的脏腑病证及有关的组织器官病证，故脾俞穴是治疗脾胃病的要穴，除可用于治疗背痛等局部病证外，还善于治疗脾胃疾患如腹胀、腹泻、痢疾、纳呆、水肿等[18]。

肠道轻度炎性反应目前被认为与脾虚有关，可以通过针刺调节脾虚，从而降低炎性，改善结肠黏膜功能[19]。本研究结果显示，大鼠体质量降低，抓力降低，病理改变呈现出轻度炎性反应，与有关研究结果一致。针刺干预后，大鼠体质量增加，抓力升高，肠道炎性反应减轻。相关实验表明针刺可调节脾虚，降低炎性反应，改善肠道功能及完整性，减轻便溏症状[20]。

LncRNAs 已被证明与 DNA 或 RNA 特异性碱基配对，这使它们能够调节基因表达并参与几种生物学过程[21]。据报道 LncRNA 在各种场合参与炎症活动，且已经在肠道炎症中鉴定出 LncRNA 的失调[22]。诸多研究表明，miRNAs 可能与肠道炎症的进展有关，其机制可能通过控制肠道炎症相关基因参与炎症的发病[23]。现代研究揭示了 miR－331－3p 被 UCA1 靶向并反向调节，本研究中也证明了这一点[10]。据报道，BRD4 是炎性疾病中的重要调节因子且 BRD4 是 miR－331－3p 的直接靶点，miR－331－3p 的缺失会导致 BRD4 的高表达来促使炎症发生。NF－κB 是一种转录因子，控制着一系列参与炎症信号级联反应的促炎基因，在肠道炎症的发病机制中起着重要作用[24]。研究已表明，BRD4 是调节炎症的 NF－κB 通路的关键调节因子，NF－κB 信号可以被 BRD4 激活[25]。本实验结果表明 BRD4 可以通过激活肠道炎症中的 NF－κB 信号通路促进结肠上皮细胞损伤。

本研究探讨了电针治疗 LncRNA－UCA1 干预 miR－331－3p/BRD4 轴对细胞凋亡的影响。结果发现，BRD4 的过度表达及 miR－331－3p 低表达会促进结肠上皮细胞凋亡，而 BRD4 的表达下调及 miR－331－3p 高表达则表现出相反的作用。此外，炎症结肠中促炎细胞因子(IL－1β、IL－6 等)的水平显著升高，会破坏肠黏膜完整性并且降低肠黏膜屏障功能，进而促进肠黏膜细胞凋亡。

总之，本研究首先证明电针治疗 LncRNA－UCA1 干预 miR－331－3p/BRD4 轴在肠道炎症的调节中起重要作用。LncRNA－UCA1 的过表达通过抑制结肠 miR－331－3p 并加强 BRD4 的表达从而促进炎症。本研究显示电针足三里、脾俞可以抑制 LncRNA－UCA1 的表达，进一步抑制 BRD4 并促进 miR－331－3p 的表达，从而抑制炎症因子的表达。LncRNA－UCA1、miR－331－3p 和 BRD4 在炎症性结肠病变中的差异表达可能为针刺治疗脾虚提供一个有希望的生物标志物。LncRNA－UCA1 干预 miR－331－3p/BRD4 轴是脾虚治疗的潜在治疗靶点。

参考文献

[1] 余思邈，李萍，李园，等. 基于肠道菌群探讨从脾胃论治肝性脑病的作用机制[J]. 中医杂志，2022，63(23)：2234－2238.
[2] 陈亮，顾庆华，景姗，等. 健脾化滞方对脾虚湿热型轻中度溃疡性结肠炎患者肠道菌群及血清炎症因子的影响[J]. 中国中西医结合杂志，2023，43(6)：680－687.
[3] MALOY K J，POWRIE F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease [J]. Nature (London)，2011，474(7351)：298－306.
[4] GüNTHER C，NEUMANN H，NEURATH M F，et al. Apoptosis，necrosis and necroptosis：cell death regulation in the intestinal epithelium[J]. Gut，2013，62(7)：1062－1071.
[5] RAO M R S. History，Discovery and classification of lncRNAs[M]. Singapore：Springer Singapore Pte，Limited，2017：1－46.
[6] HALASZ H，CARPENTER S. Challenges and future directions for LncRNAs and inflammation[J]. Advances in experimental medicine and biology，2022，1363：179.
[7] ZHAO Y J，CHEN Y E，ZHANG H J，et al. LncRNA UCA1 remits LPS－engendered inflammatory damage through deactivation of miR－499b－5p/TLR4 axis [J]. IUBMB life，2021，73(2)：463－473.
[8] 姜晓雪，金智生，金彩云，等. miRNA 相关信号通路对糖尿病肾病的作用机制及中医药干预研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志，2023，29(4)：228－235.
[9] LIU R，ZHONG L，WANG C，et al. MiR－3646 accelerates inflammatory response of Ang II－induced hVSMCs via CYP2J2/EETs axis in hypertension model[J]. Clinical and experimental hypertension (1993)，2023，45(1)：2166948.

DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.06.038

肺康喘宁丸治疗慢性阻塞性肺疾病迁延期肺肾气虚证的疗效及对AKT/mTOR通路的影响

柴树人,杨征,贾旭锦,杜学宏
(宁波市中医院,浙江 宁波 315000)

摘要:目的 探讨肺康喘宁丸治疗慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease,COPD)迁延期肺肾气虚证的疗效及对蛋白激酶B/雷帕霉素靶蛋白(protein kinase B/mammalian target of rapamycin,AKT/mTOR)通路的影响。方法 选择2021年5月—2023年5月就诊的慢性COPD迁延期肺肾气虚证患者84例,采用随机数字表法分成常规组(42例)与中药组(42例)。常规组采用常规治疗,中药组在此基础上给予肺康喘宁丸治疗。观察两组患者的中医证候积分、肺功能、AKT/mTOR通路蛋白水平、临床疗效、不良反应发生情况。结果 治疗后,中药组患者中医证候积分、AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR水平均低于常规组($P<0.05$);中药组患者用力肺活量(forced vital capacity,FVC)、1秒用力呼气容积(forced expiratory volume in one second,FEV1)、呼气峰流量(peak expiratory flow,PEF)与FEV1/FVC水平均高于常规组($P<0.05$);中医组患者治疗总有效率高于常规组($P<0.05$);两组不良反应总发生率差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 肺康喘宁丸能够改善患者肺功能,降低中医证候积分,提高临床疗效,降低AKT/mTOR通路蛋白水平,安全性较高。

关键词:慢性阻塞性肺疾病;迁延期;肺肾气虚证;肺康喘宁丸;肺功能;临床疗效;不良反应
中图分类号:R259.6 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)06-0188-04

Effect of Feikang Chuanning Pills(肺康喘宁丸) on Chronic COPD with Prolonged Lung-Kidney Qi Deficiency Syndrome and Its Influence on AKT/mTOR Pathway

CHAI Shuren,YANG Zheng,JIA Xujin,DU Xuehong
(Ningbo Hospital of Traditional Chinese Medicine,Ningbo 315000,Zhejiang,China)

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2022RC250);宁波市科技计划项目(2022S079);浙江中医药大学校级科研项目(2021FSYYEY07)
作者简介:柴树人(1984-),男,浙江宁波人,副主任医师,硕士,研究方向:中西医结合诊治急危重症。
通讯作者:杜学宏(1966-),男,甘肃张掖人,主任医师,学士,研究方向:中西医结合急危重症救治。

[10] RAO J,SHAO L,LIN M,et al. LncRNA UCA1 accelerates the progression of ulcerative colitis via mediating the miR-331-3p/BRD4 axis[J]. International journal of general medicine,2021,14:2427-2435.
[11] CHAI O,TANG N,GUO R,et al. Downregulation of BRD4 attenuates high glucose-induced damage of trophoblast cells by inhibiting activation of AKT/mTOR pathway[J]. Reproductive biology,2023,23(2):100751.
[12] FANG M,LUO J,ZHU X,et al. BRD4 silencing protects angiotensin ii-induced cardiac hypertrophy by inhibiting TLR4/NF-κB and activating Nrf2-HO-1 pathways[J]. Cardiology Research and Practice,2022,2022:1-11.
[13] 李中梓. 医宗必读[M]. 北京:中国中医药出版社,2005.
[14] 蒋锐沅,蓝巧玉,王伟,等. 脾气亏虚和炎症状态对肝癌荷瘤小鼠肠道菌群的影响及健脾益气方的干预作用[J]. 中华中医药杂志,2023,38(1):341-347.
[15] 钟强. 白术茯苓汤高中低剂量对脾气虚克罗恩病大鼠炎症因子的影响[D]. 成都:成都中医药大学,2014.
[16] HAO R,ZHOU X,ZHAO X,et al. Flammulina velutipes polysaccharide counteracts cadmium-induced gut injury in mice via modulating gut inflammation,gut microbiota and intestinal barrier[J]. Science of The Total Environment,2023,877:162910.
[17] 曾林,陈泽斌,王华,等. 浅析"肚腹三里留"[J]. 时珍国医国药,2023,34(3):653-655.
[18] 高珊,李瑞,田环环,等. 电针"胰俞"穴对2型糖尿病大鼠HPA轴相关激素的影响[J]. 中国针灸,2014,34(11):1099-1105.
[19] 葛文静,单朋涛,李兵杰,等. 补中益气汤加减升麻、柴胡对脾虚泄泻大鼠胃肠、免疫功能及肠黏膜屏障的影响差异[J]. 中药新药与临床药理,2023,34(6):722-729.
[20] 贾小萌,陈伟健,钟悦,等. 针刺调神方联合参苓白术散治疗脾虚湿盛腹泻型肠易激综合征的临床观察[J]. 广州中医药大学学报,2022,39(7):1573-1577.
[21] HERMAN A B,TSITSIPATIS D,GOROSPE M. Integrated lncRNA function upon genomic and epigenomic regulation[J]. Molecular Cell,2022,82(12):2252-2266.
[22] 刘路路,邹松,钱小宝,等. 长链非编码RNA在脂多糖刺激的大鼠肠巨噬细胞中的差异表达[J]. 中国普通外科杂志,2017,26(4):488-493.
[23] 李中梓. 医宗必读校注[M]. 西安:三秦出版社, 2005:6.
[24] LI X,MO K,TIAN G,et al. Shikimic acid regulates the NF-κB/MAPK signaling pathway and gut microbiota to ameliorate DSS-induced ulcerative colitis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2023,71(23):8906-8914.
[25] 黄迪,訾慧. 淫羊藿及其活性成分防治骨质疏松症的研究进展[J]. 实用中医内科杂志,2022,36(6):54-57.

从 LncRNA－UCA1 探讨针刺调节 miRNA－331－3p/BRD4 轴改善脾虚大鼠肠道炎症作用机制

（正文见 183－187 页）

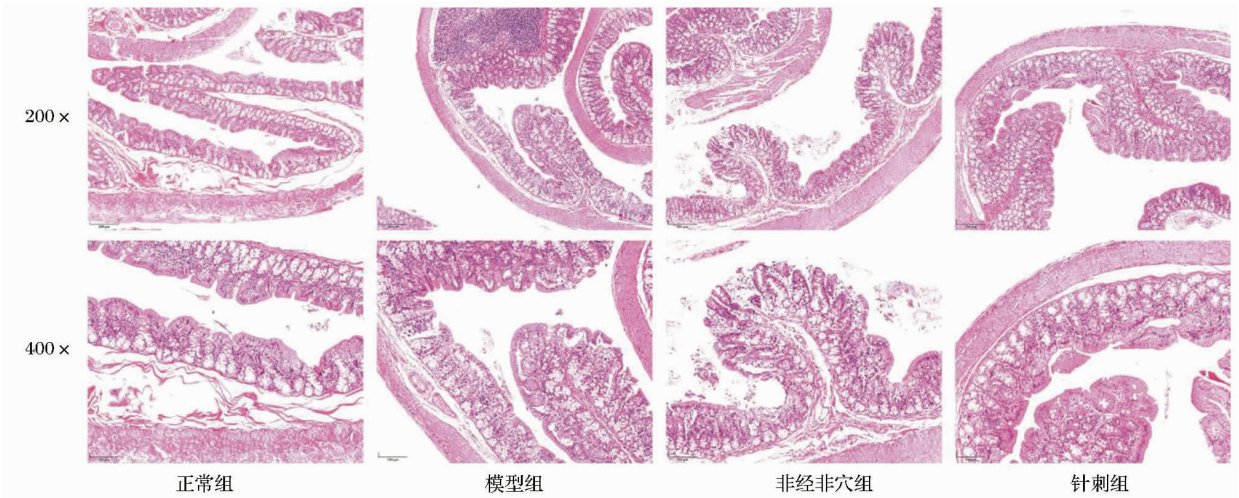
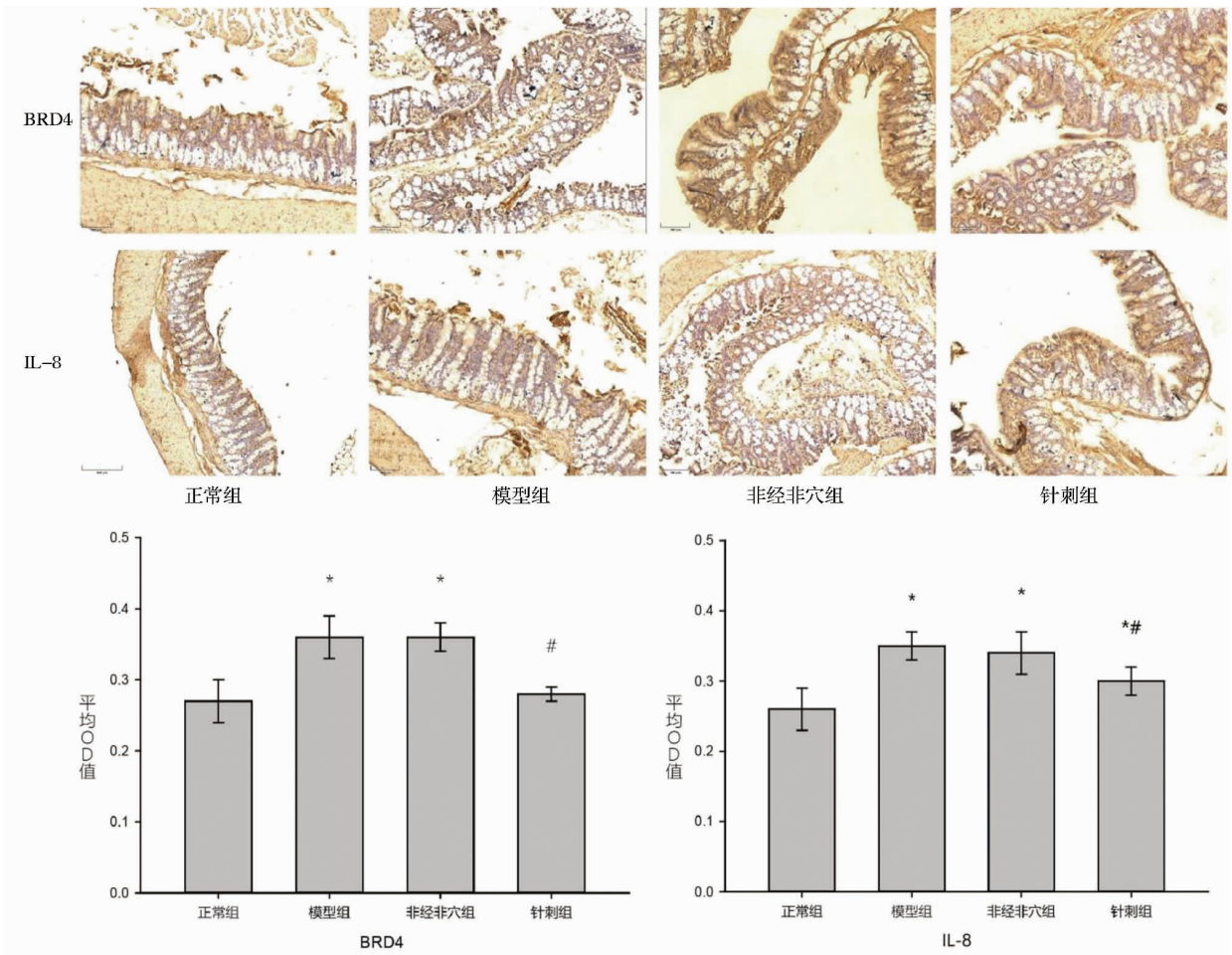


图 2　各组大鼠肠黏膜组织病理观察（HE）



注：＊与正常组比较，$P<0.05$；#与模型组比较，$P<0.05$。

图 3　各组大鼠结肠组织 BRD4、IL－8 的表达（400×）

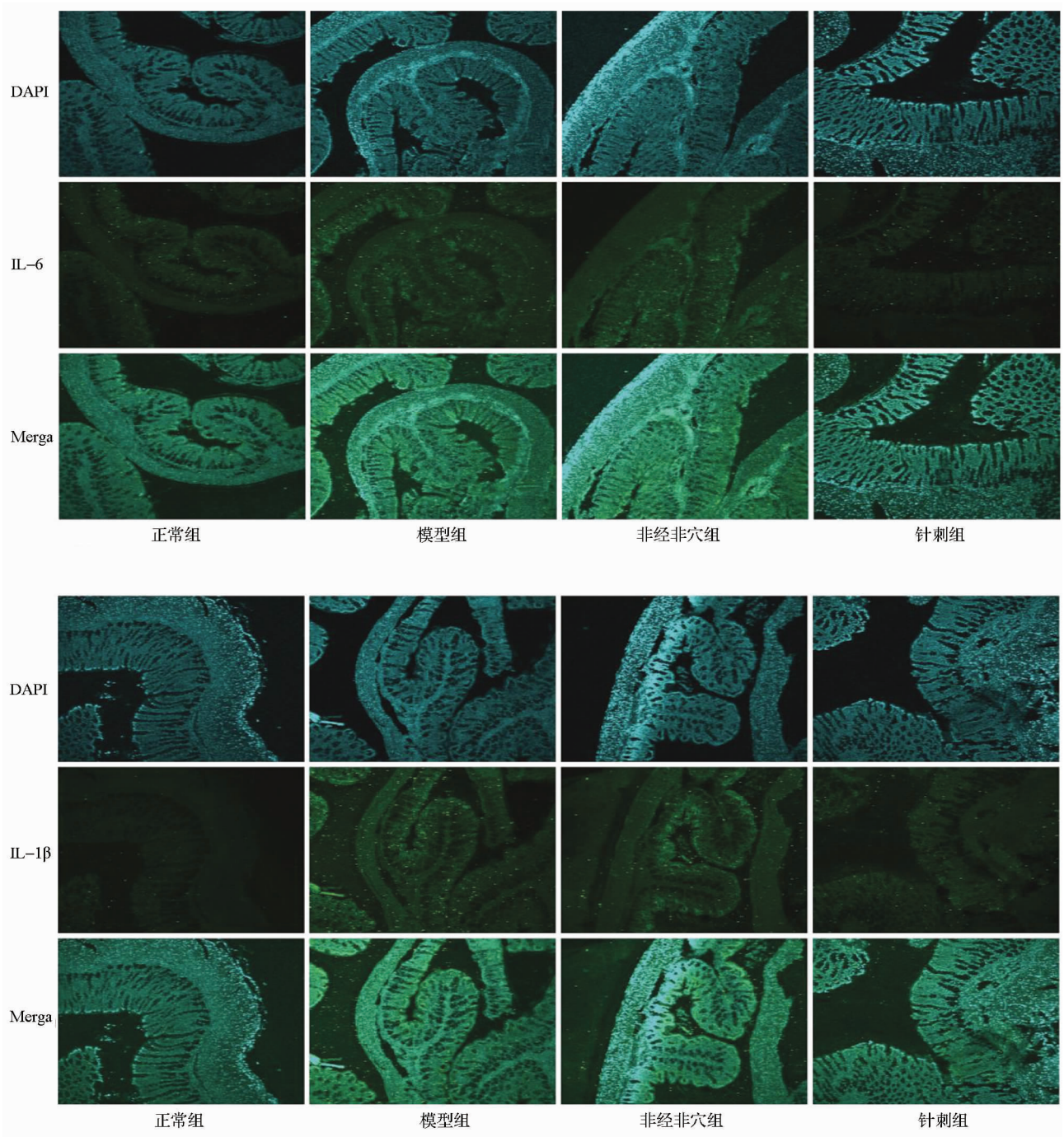


图 4　各组大鼠结肠组织 IL－6、IL－1β 免疫荧光染色图

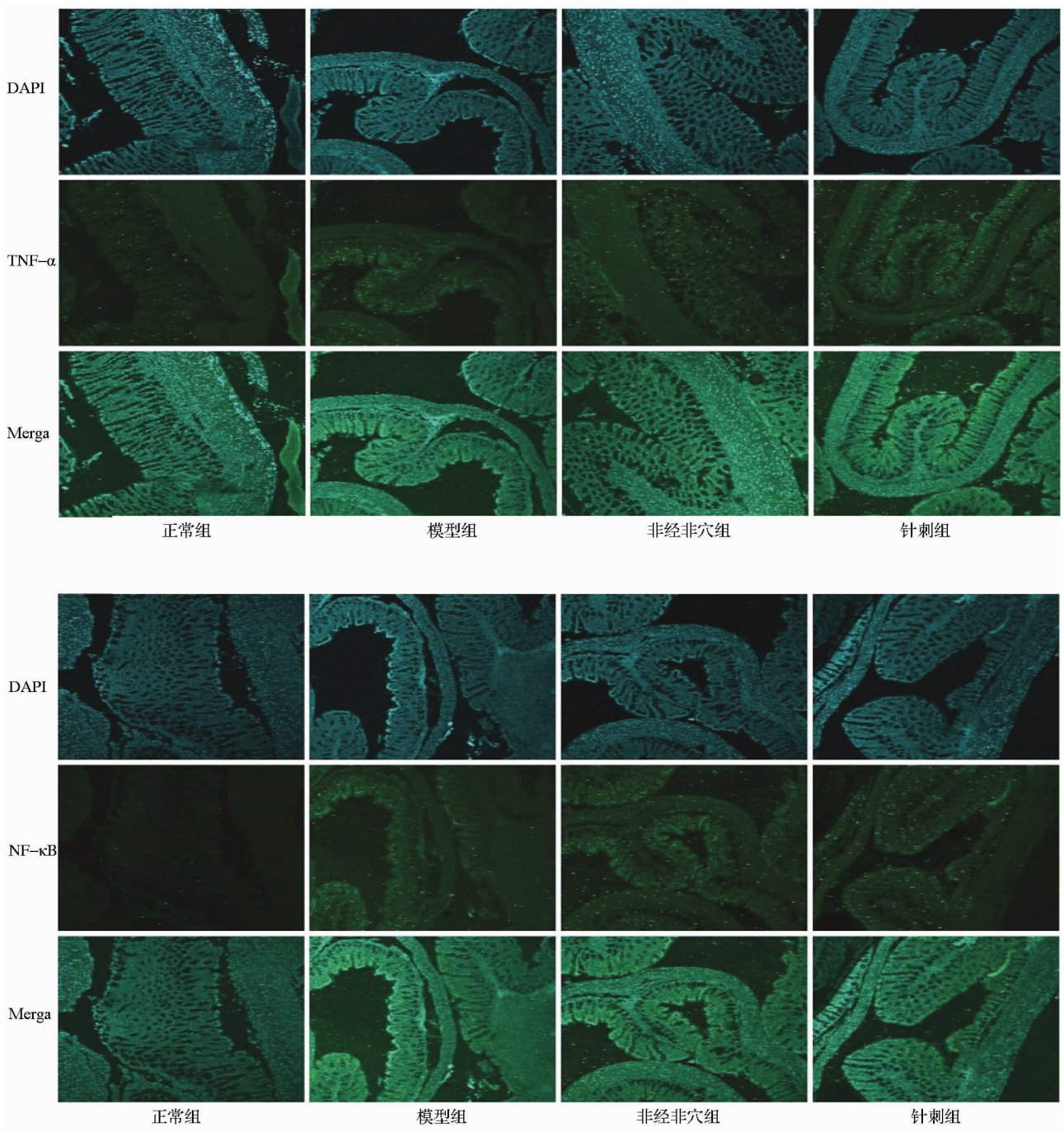


图 5 各组大鼠结肠组织 TNF－α、NF－κB p65 免疫荧光染色图

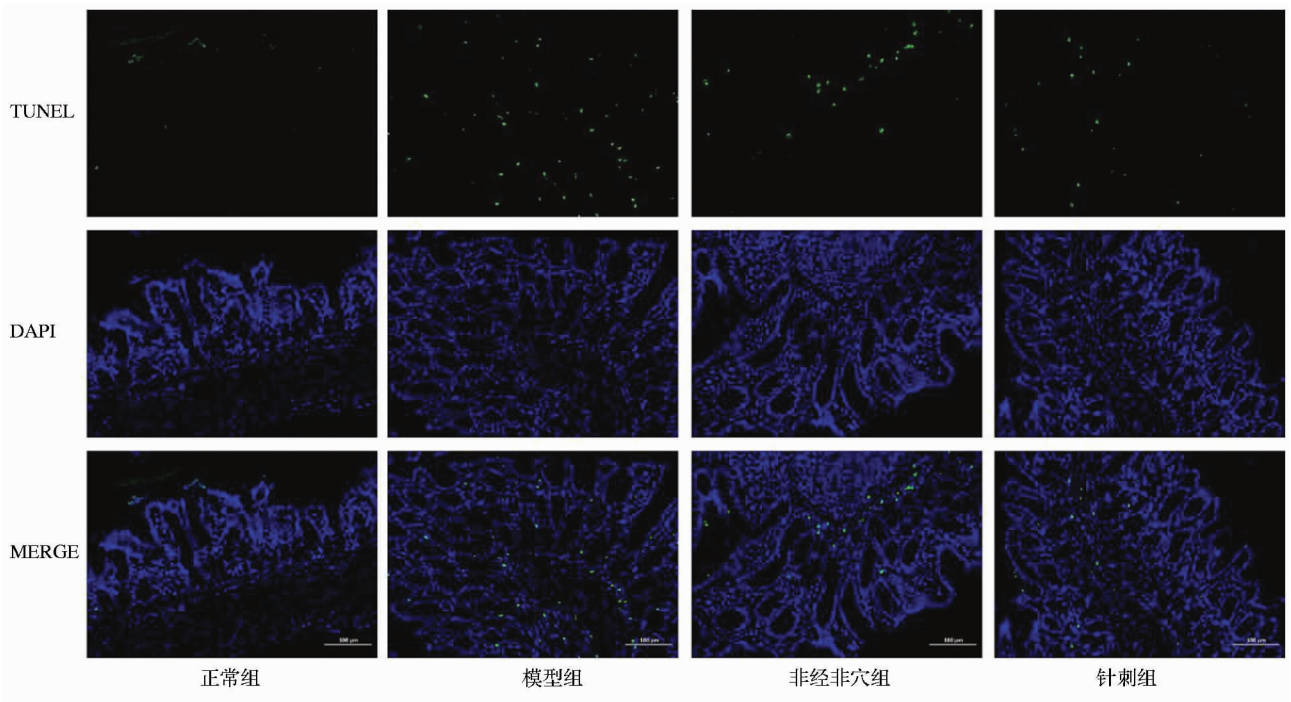
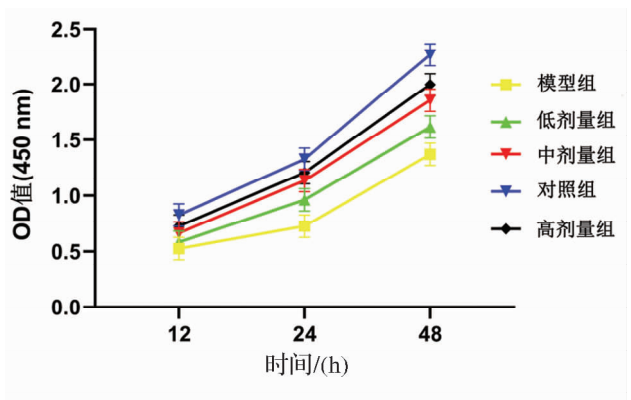


图 6　各组大鼠结肠上皮黏膜细胞凋亡情况(200 ×)

茯苓多糖通过抑制炎症和氧化应激改善阿霉素诱导的心肌细胞损伤

(正文见 239 – 243 页)



注：* 与对照组比较，$P < 0.05$；# 与模型组比较，$P < 0.05$。

图 1　各组 AC16 细胞增殖能力比较