

针灸对克罗恩病患者结肠黏膜基因表达谱的影响

翁志军^{1,2}, 汪迪², 郑寒丹^{1,2}, 施茵^{1,2}, 刘雅楠^{1,2}, 包春辉^{1,2}, 陆嫒^{1,2}, 吴焕淦^{1,2}, 刘慧荣^{1,2}, 马晓芃^{1,2}, 吴璐一³, 黄艳^{1,2}
(1. 上海市针灸经络研究所, 上海 200030; 2. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, 上海 200437; 3. 上海中医药大学针灸免疫效应重点实验室, 上海 200030)

【摘要】 目的 从基因表达谱的角度, 探讨针灸治疗克罗恩病(CD)的效应机制。**方法** 受试者签署知情同意书进行结肠镜检查, 收集 CD 患者和健康者结肠黏膜。采用基因芯片技术检测健康志愿者及 CD 患者针灸治疗前后结肠黏膜的基因表达谱, 筛选出针灸治疗 CD 的差异表达基因, 结合生物信息学方法, 对差异表达的基因进行 GO 和 Pathway 分析。**结果** 针灸治疗 CD 后结肠黏膜组织炎症反应较治疗前明显减轻; 与健康者比较, CD 结肠黏膜差异表达基因共有 3449 个(上调 2250 个, 下调 1199 个)。与治疗前比较, 针灸治疗后 CD 结肠黏膜差异表达基因共有 1926 个(上调 536 个, 下调 1390 个), 其中 CD 结肠黏膜差异表达的基因能被针灸逆转的有 388 个(上调 62 个, 下调 326 个); 针灸可调控的 CD 中差异表达基因与疾病密切相关的生物功能主要有转录因子 STAT 磷酸化、ATP 酶活性、B 细胞介导的免疫、自然杀伤细胞相关免疫等, 相关的通路主要有 Toll-like 受体信号通路、自噬调节系统、自然杀伤细胞介导的细胞毒作用。**结论** 针灸能有效减轻 CD 患者结肠炎症反应, 影响 CD 结肠黏膜组织异常的基因表达谱, 其差异表达基因主要涉及细胞周期、免疫炎症反应、细胞自噬等生物学过程。

【关键词】 针灸疗法; 克罗恩病; 基因表达谱; 信号通路; 免疫

【中图分类号】 R246.1 **【文献标志码】** A

DOI:10.13460/j.issn.1005-0957.2020.13.1036

Effect of Acupuncture-moxibustion on Colon Mucosal Gene Expression Profile in Crohn's Disease Patients

WENG Zhi-jun^{1,2}, WANG Di², ZHENG Han-dan^{1,2}, SHI Yin^{1,2}, LIU Ya-nan^{1,2}, BAO Chun-hui^{1,2}, LU Yuan^{1,2}, WU Huan-gan^{1,2}, LIU Hui-rong^{1,2}, MA Xiao-peng^{1,2}, WU Lu-yi³, HUANG Yan^{1,2}. 1.Shanghai Research Institute of Acupuncture and Meridian, Shanghai 200030, China; 2.Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China; 3.Key Laboratory of Acupuncture-moxibustion and Immunological Effects, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200030, China

[Abstract] Objective To discuss the action mechanism of acupuncture-moxibustion in treating Crohn's disease (CD) from the perspective of gene expression profile. **Method** The subjects all signed the informed consent form to receive colonoscopy and colon mucosa was collected from the CD patients and healthy subjects. Gene microarray technique was used to detect the colon mucosal gene expression profile in the healthy volunteers and CD patients before and after acupuncture-moxibustion treatment. The differentially expressed genes in acupuncture-moxibustion treatment of CD were screened to undergo GO and Pathway analyses in combination with bioinformatic method. **Result** Significant reduction of inflammatory response was found in colon mucosal tissues in CD after acupuncture-moxibustion treatment. Compared with the healthy volunteers, there were 3449 differentially expressed genes in CD colon mucosa (2250 up-regulated and 1199 down-regulated). The expressions of 1926 genes (536 up-regulated and 1390 down-regulated) in

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(81904303); 上海市卫生局中医药科研基金资助项目(2014LQ065A); 上海市科技启

明星计划基金资助项目(16QA1403400); 上海市优秀学术带头人计划资助项目(17XD1403400)

作者简介: 翁志军(1984—), 男, 助理研究员, Email:wzj200_3@139.com

通信作者: 吴璐一(1984—), 女, 副研究员, 博士, 硕士生导师, Email:luyitcm@163.com

黄艳(1976—), 女, 副研究员, 博士, 硕士生导师, Email:zyshy2015@126.com

colon mucosa differed after acupuncture-moxibustion treatment of CD compared with the pre-treatment state, and 388 (62 up-regulated and 326 down-regulated) out of the differentially expressed genes in CD colon mucosa were reversed by acupuncture-moxibustion; the CD-related differentially expressed genes that could be modulated by acupuncture-moxibustion were mainly associated with biological functions including transcription factor STAT phosphorylation, ATPase activity, B cell-mediated immunity and natural killer cell-related immunity, and the relevant pathways mainly were toll-like receptor signaling pathway, autophagy regulation system, natural killer cell-mediated cytotoxicity. **Conclusion** Acupuncture-moxibustion can effectively reduce colonic inflammatory response in CD patients, influence the abnormal gene expression profile in CD colon mucosal tissues, and the differentially expressed genes are mainly involved in biological processes such as cell cycle, immune inflammatory response and cellular autophagy.

[Key words] Acupuncture-moxibustion; Crohn disease; Gene expression profile; Signaling pathway; Immune

克罗恩病(Crohn's Disease, CD)是一种涉及胃肠道全层的慢性非特异性肉芽肿性炎症性肠病。目前,该病病因尚不明确,与遗传易感性、免疫、肠道菌群失调、环境、精神等多方面因素有关^[1]。欧美地区发病率较高,亚洲发病率较低。有研究显示,CD在英国发病率为 $10.1/10^5$ 人~ $11.1/10^5$ 人,患病率为 $55/10^5$ 人~ $140/10^5$ 人,每年大约有13 300例新发病例^[2]。我国CD总体发病率及患病率分别为 $0.848/10^5$ 人和 $2.29/10^5$ 人^[3],虽总体低于欧美国家,但呈上升趋势,已成为消化系统常见的难治性疾病之一。临床常用5-氨基水杨酸、激素、免疫抑制剂、生物制剂等为主进行治疗,可较好地控制急性症状,诱导缓解;但撤药时疾病容易反复发作或药物的不良反应使临床应用受限^[4]。

针灸在治疗炎症性肠病上有不同程度的疗效^[5-6]。本课题组前期研究也发现,隔药灸治疗CD疗效确切,不仅可以改善轻度、中度CD患者的临床症状(近期有效率为72.5%),还能降低活动期CD患者的克罗恩病疾病活动指数(CDAI),改善结肠组织炎症,提高患者的生活质量^[7-8]。相关机制研究发现针灸能通过上调CD患者结肠上皮紧密连接蛋白的表达,修复肠上皮屏障病变,减轻肠道炎症反应^[9]。但针灸治疗CD的作用机制尚未阐明。

基因表达谱的改变和功能异常在免疫功能调节和自身免疫性疾病(包括CD)的进展中起着关键作用^[10]。单细胞测序(single-cell RNA-seq)技术的成熟开展,能从外周血、结肠中分离的稀有细胞的层面研究CD的发病机制,目前单细胞测序研究较多的是转录组学^[11-12]。LncRNA/miRNA-mRNA调控网络介导的分子机制成为CD发病机制研究的热点^[13-14],而 messenger RNA

(mRNA)作为蛋白翻译调控的重要RNA,实现了遗传信息在蛋白质上的表达,能直接影响蛋白质合成和细胞表型。已有研究证实CD患者结肠炎症部位的黏膜组织中有多种与CD相关的mRNA表达的异常^[15],本课题组前期研究也发现艾灸能调控CD大鼠结肠黏膜免疫和自噬相关基因的表达异常^[16]。因此,本研究进一步采用基因芯片技术对CD进行全面的mRNA表达谱的研究,筛选出针灸治疗CD患者结肠黏膜的差异表达的基因,再对差异表达的基因进行GO分析和Pathway生物信息学分析,探索针灸治疗CD的相关信号通路,以期对针灸治疗CD效应机制研究提供新的研究方向,现报道如下。

1 临床资料

1.1 一般资料

本研究的3名CD受试者来源于本课题组上海市针灸经络研究所的1项克罗恩病的临床试验;并在复旦大学附属中山医院内镜中心招募健康受试者3名作为对照。该试验已通过上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院伦理委员会审核。

1.2 纳入标准

①符合CD的诊断标准^[17];②经确诊的轻度、中度CD患者(CDAI为151~450分);③前3个月未服用与本病治疗相关的药物;④同意参加本试验并签署知情同意书。

1.3 排除标准

1.3.1 CD排除标准

①重度CD患者或缓解期患者(CDAI>450分或<150分);②妊娠或哺乳期患者;③伴有心、脑、肝、肾及造血系统严重疾病的患者;④精神病或其他严重疾

病患者。

1.3.2 健康受试者排除标准

肠镜下肉眼观察有结肠炎症、肿瘤者。

1.4 剔除脱落标准

①误诊、误纳的患者;②依从性差或有严重不良反应者;③治疗期间病情恶化必须实施紧急措施者;④主动退出或失访者;⑤未能完成全部治疗及随访者。

2 治疗方法

CD 患者采用隔药灸配合针刺治疗。

2.1 隔药灸治疗

取穴分 2 组,①天枢(双)、气海、水分穴;②双侧肾俞、大肠俞穴,两组穴位交替使用。穴位定位参照《经穴部位(GB1234690)》标准。将附子、肉桂、丹参、红花等中药研末成粉,用黄酒调和药粉成厚糊状,并用模具制成直径 2.3 cm、厚约 0.5 cm 的药饼。常规消毒后,将药饼放在相关穴位皮肤上,再将高 1.7 cm、重约 1.8 g 的艾炷(河南南阳卧龙汉医艾绒有限责任公司)置于药饼上,点燃艾炷后施灸,治疗 30 min。每日 1 次,每周 6 次,12 次为 1 个疗程,疗程间休息 3 d,共治疗 6 个疗程。

2.2 针刺治疗

取穴分两组,①足三里、上巨虚、曲池、合谷穴;②T₆-L₁ 夹脊穴,两组穴位交替使用。局部常规消毒后,采用 0.30 mm×40 mm 毫针直刺 20~40 mm,得气后行平补平泻法,留针 30 min。隔日 1 次,每周 3 次,两周为 1 个疗程,疗程间休息 3 d,共治疗 6 个疗程。

3 治疗效果

3.1 观察指标

3.1.1 结肠黏膜组织

所有健康志愿者及 CD 患者在治疗前后分别进行结肠镜检并采集结肠黏膜,通过结肠镜检查确定无任何胃肠道疾病,取距结肠息肉旁 5 cm 处取肉眼正常的

结肠黏膜。标本离体后分装于 10%甲醛固定和冻存管,冻存管立即内置于液氮中,随后保存于 -80℃ 冰箱。

3.1.2 组织病理学观察

将 10%甲醛溶液固定的结肠黏膜组织脱水包埋,每片切成 4 μm 厚制成玻片,先脱蜡,再脱水。采用苏木素-伊红(HE)染色,观察结肠黏膜组织病理学改变。

3.1.3 mRNA 芯片检测及数据分析

采用 Trizol 方法提取总 RNA,参照厂家提供的实验方法(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA),采用 1%的琼脂糖凝胶电泳进行 RNA 质检,Nanodrop (ND-1000, Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA)检测其质量和定量;采用 1%的琼脂糖凝胶电泳观察总 RNA 完整性,安捷伦 2100(Agilent Technologies)进行样本的质检,RNA integrity number(RIN)值>7 的 RNA 样本用于芯片分析。RNA 样本保存在 -80℃ 冰箱备用。芯片微阵列于 Affymetrix fluidics station 450 中洗涤后,先用链霉亲和素/藻红蛋白染色。对每个样本,用生物素化的山羊抗链霉亲和素孵育后,再用链霉亲和素/藻红蛋白进行二次孵育以进一步增强信号强度,然后测量第二轮强度。使用由 Affymetrix Microarray Suite 软件控制的 Affymetrix 扫描仪扫描微阵列。

基因芯片检测后,使用 GenePix 4000B 芯片扫描芯片的荧光强度,并将实验结果转换成数字型数据保存,对 Raw data 和 Clean data 进行深度评估,mapping 到基因组上,mapping reads 数超过总 reads 数的 90%,对基因表达水平进行标准化,得到基因的表达式。设定基因表达上调或下调为其相对表达式 $\log_2 \text{fold change (FC)} \geq |\pm 1|$,对差异基因进行筛选、聚类分析、基因本体(Gene Ontology, GO)和信号转导通路(Pathway)富集分析研究。

3.2 结果

3.2.1 CD 患者治疗后结肠黏膜组织病理学比较(见表 1)

表 1 CD 患者治疗后结肠黏膜组织病理学比较

患者	治疗前	治疗后
A	有较多淋巴细胞、浆细胞等炎症细胞浸润,伴有伪脓肿	黏膜下层修复好,愈合性陈旧性病变
B	有大量淋巴细胞、浆细胞浸润,左侧小肉芽肿	黏膜层充血,炎症、水肿较轻,愈合较好,有少许恢复的上皮细胞
C	腺上皮轻度病变,有大量的浆细胞、淋巴细胞浸润	黏膜内轻度充血,间质纤维组织增生,少量淋巴细胞、浆细胞浸润

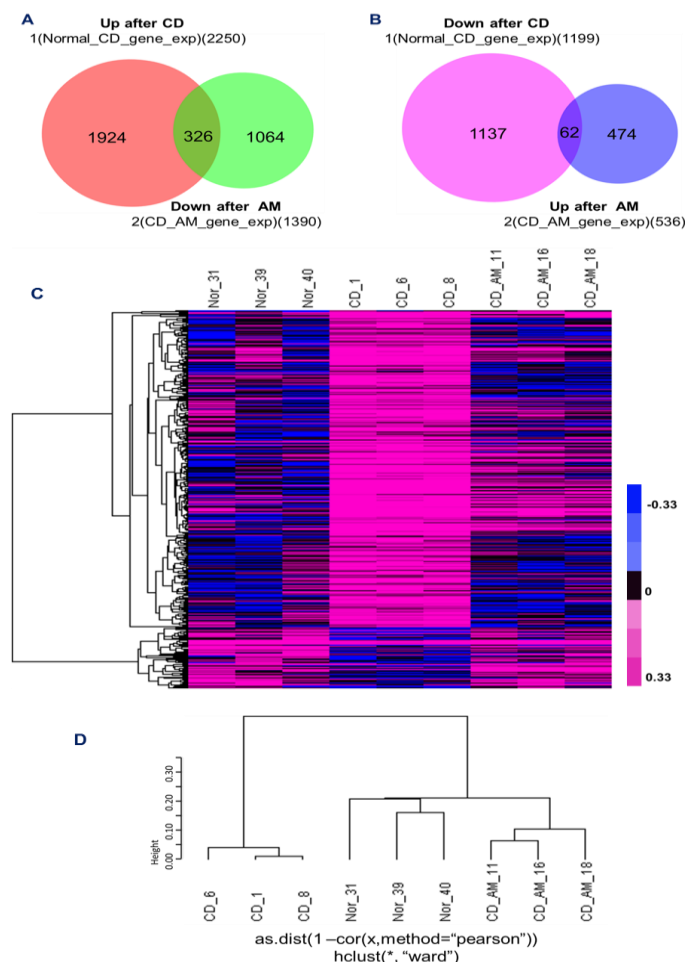
3.2.2 针灸治疗 CD 结肠黏膜差异表达基因及聚类分析

运用基因芯片检测健康志愿者及 CD 患者治疗前后结肠黏膜组织的基因表达谱。芯片结果用 Limma 进行统计 (Linear Models and Empirical Bayes Methods for Assessing Differential Expression in Microarray Experiments), 在 36333 个探针 (NimbleGen HG 18.0) 中, 健康志愿者和 CD 患者治疗前共有 3449 个基因存在显著性差异, 其中 CD 患者治疗前较健康志愿者上调 2250 个, 下调 1199 个; CD 患者治疗后与治疗前有显著性差异的基因有 1926 个, 其中治疗后较治疗前上调 536 个, 下调 1390 个 ($P < 0.05$, $FDR < 0.05$)。

为了进一步研究各组基因表达的不同, 本研究采用 Venn Diagrams 分析差异基因的交集。将 CD 患者治

疗前与健康志愿者差异表达的 3449 个 mRNA 和 CD 患者治疗后与治疗前差异表达的 1926 个 mRNA 取交集, 发现共有 388 个交集基因。其中, 治疗后下调的差异基因与治疗前相对于健康志愿者上调的表达基因共有 326 个; 而治疗后上调的差异表达基因与治疗前相对于健康人下调的共表达基因有 62 个 (见图 1A-B)。说明针灸更趋于抑制过高表达的基因。

采用 Cluster 3.0 和 Treeview 软件对基因芯片数据进行聚类分析。将 3 组交集的 388 个基因的表达量均取 10 为底的对数处理, 热图体现了 CD 病理状态下上调和下调的基因在各个样本中的表达, 同时体现了针灸后这些病理改变的差异表达基因可以被逆转 (见图 1C)。聚类图体现健康志愿者与 CD 患者治疗后基因表达类似, 而与 CD 患者治疗前基因表达不同 (见图 1D)。



注:A、B 为基于基因芯片的数据作 Venn diagrams, A 中红圈代表 CD 患者治疗前相对于健康志愿者上调的差异基因数, 绿圈代表 CD 患者治疗后相对于 CD 患者治疗前下调的差异基因数; B 中玫红圈代表 CD 患者治疗前相对于健康志愿者下调的差异基因数, 蓝圈代表 CD 患者治疗后相对于 CD 患者治疗前上调的差异基因数; C 为 3 组交集的差异表达基因热图, 玫红代表基因 positive 表达, 黑色代表基因表达没有差异, 蓝色代表基因 negative 表达; D 为 9 个样本的聚类图

图 1 组间差异表达基因的 Venn diagrams 及热图和聚类分析

3.2.3 差异表达基因筛选

由于针灸治疗可调控的 CD 患者治疗前较健康志愿者的差异表达基因较多,本研究分别将针灸后逆转 CD 病理性基因中上调的 62 个基因和下调的 326 个基因,按照 $\log_2(FC)$ 大小排列,前 30 个差异表达基因列

见表 2。其中,在 CD 患者治疗前表达上调,且在 CD 患者治疗后下调的倍数均 >3 的基因有 4 个,即 CPS1、SCIN、C12orf27 和 GJB1。而在 CD 患者治疗前表达下调 2 倍以上,能被针灸逆转的基因倍数 >2 的基因只有 CKB。详见表 2、表 3。

表 2 针灸逆转的 CD 中前 30 个上调差异表达基因

Name	Description	$\log_2(FC)$	
		CD/Nor	CD_AM/CD
MGAM	maltase-glucoamylase (alpha-glucosidase)	5.37	-2.73
GSTA1	glutathione S-transferase A1	4.81	-1.01
CPS1	carbamoyl-phosphate synthetase 1, mitochondrial	4.48	-3.20
MUC3B	mucin 3B, cell surface associated	4.19	-1.86
SCIN	scinderin	3.99	-3.22
C12orf27	chromosome 12 open reading frame 27	3.96	-4.23
C10orf81	chromosome 10 open reading frame 81	3.75	-2.35
LOC653180	similar to UDP-glucuronosyltransferase 2B15 precursor (UDPGT) (UDPGTh-3) (HLUG4)	3.73	-2.39
FLJ20273	RNA-binding protein	3.72	-2.90
TM9SF2	transmembrane 9 superfamily member 2	3.71	-1.57
TCN2	transcobalamin II; macrocytic anemia	3.65	-1.81
CLDN15	claudin 15	3.56	-1.63
ATP1A1	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 1 polypeptide	3.52	-2.49
MAX	MYC associated factor X	3.51	-1.45
MOGAT2	monoacylglycerol 0-acyltransferase 2	3.44	-2.88
LOC134147	similar to mouse 2310016A09Rik gene	3.34	-2.90
MS4A8B	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 8B	3.29	-1.66
TUBAL3	tubulin, alpha-like 3	3.27	-2.14
UGT2B11	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B11	3.25	-1.37
LOC653562	similar to solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 8	3.25	-2.32
GJB1	gap junction protein, beta 1, 32kDa (connexin 32, Charcot-Marie-Tooth neuropathy, X-linked)	3.23	-3.52
CDK8	cyclin-dependent kinase 8	3.19	-1.34
GLUD1	glutamate dehydrogenase 1	3.14	-1.63
DAK	dihydroxyacetone kinase 2 homolog (S. cerevisiae)	3.08	-1.68
WDR23	WD repeat domain 23	3.07	-1.40
LOC646675	similar to aconitase 2 precursor	3.06	-1.39
TCF7L2	transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box)	3.02	-2.17
FOLH1	folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1	2.99	-2.77
OACT5	0-acyltransferase (membrane bound) domain containing 5	2.98	-1.66
GSTA3	glutathione S-transferase A3	2.97	-1.10

表 3 针灸逆转的 CD 中前 30 个下调差异表达基因

Name	Description	log ₂ (FC)	
		CD/Nor	CD_AM/CD
AQP8	aquaporin 8	- 6.07	1.22
CKB	creatine kinase, brain	- 5.06	2.58
HSPB1	heat shock 27kDa protein 1	- 3.37	1.79
SLC2A4	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4	- 3.11	1.83
CD177	CD177 molecule	- 2.99	0.88
LOC642819	similar to zinc finger protein 12 (KOX 3)	- 2.50	1.76
XRCC2	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2	- 2.32	1.04
LILRB3	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 3	- 2.30	1.92
TRPM8	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 8	- 2.20	1.79
MGC13114	hypothetical protein MGC13114	- 2.10	1.57
FLJ36070	hypothetical protein FLJ36070	- 2.09	1.09
SPON2	spondin 2, extracellular matrix protein	- 2.08	1.96
CHST2	carbohydrate (N-acetylglucosamine-6-0) sulfotransferase 2	- 2.06	1.35
LIMK1	LIM domain kinase 1	- 1.89	1.08
ADAM17	ADAM metalloproteinase domain 17 (tumor necrosis factor, alpha, converting enzyme)	- 1.88	1.12
BARX2	BarH-like homeobox 2	- 1.85	1.13
MGC12981	hypothetical protein MGC12981	- 1.84	1.25
LOC653342	similar to Complement C1r subcomponent precursor (Complement component 1, r subcomponent)	- 1.84	2.12
VPS24	vacuolar protein sorting 24 homolog (S. cerevisiae)	- 1.78	1.41
NOXO1	NADPH oxidase organizer 1	- 1.76	1.03
CCL1	chemokine (C-C motif) ligand 1	- 1.75	1.31
NEXN	nexilin (F actin binding protein)	- 1.73	1.30
PRIC285	peroxisomal proliferator-activated receptor A interacting complex 285	- 1.71	1.20
EHBP1L1	EH domain binding protein 1-like 1	- 1.71	1.31
SIGLEC10	sialic acid binding Ig-like lectin 10	- 1.67	1.37
LOC126248	hypothetical protein LOC126248	- 1.67	1.02
EFEMP2	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2	- 1.62	1.91
ICAM2	intercellular adhesion molecule 2	- 1.62	1.73
CSRP2BP	lysine acetyltransferase 14	- 1.61	1.16
BCAS4	breast carcinoma amplified sequence 4	- 1.60	1.11

3.2.4 差异表达基因的 Gene Ontology (GO) 和 Pathway 功能分析

本研究对针灸后相对于 CD 患者的结肠差异基因进行显著性 GO 和 Pathway 分析。按照生物途径, 分子功能和细胞定位对基因进行注释和分类, 通过对差异

表达基因进行 GO terms 富集度统计学的分析, 其前 30 个 GO 功能富集主要体现了针灸对 CD 患者免疫系统、神经信号转导、基因的转录调控 3 个方面的调节, 主要包括转录因子 STAT 磷酸化、ATP 酶活性、B 细胞介导的免疫、自然杀伤细胞相关免疫等(见图 2)。通过将

差异表达基因进行 KEGG Pathway 富集分析, 寻找显著性差异变化的生物学调控通路, 其富集较多的前 30 个通路主要体现在针灸对 CD 患者免疫系统、基因的转录

调控两方面信号通路的调节, 主要包括 Toll-like 受体信号通路、自噬调节系统、自然杀伤细胞介导的细胞毒作用(见图 3)。



注: Enrich Factor 指差异表达的基因中位于该 GO 条目的基因数目与所有注释基因中位于该 GO 条目的基因总数的比值, Enrich Factor 越大, 表示富集的程度越大。P value 取值范围为 0~1, 越接近于零, 表示富集越显著。圆形代表生物途径、三角形代表细胞定位和正方形代表分子功能。形状的大小代表了差异表达基因的多少, 越大代表该 GO 条目中的差异表达基因数目就多。图中只展示富集程度排名前 30 的 GO 条目

图 2 CD 患者治疗后差异表达基因前 30 个 GO 分析



注: Enrich Factor 指差异表达的基因中位于该 Pathway 条目的基因数目与所有注释基因中位于该 Pathway 条目的基因总数的比值, Enrich Factor 越大, 表示富集的程度越大。P value 取值范围为 0~1, 越接近于零, 表示富集越显著。图中只展示富集程度排名前 30 的 Pathway 条目

图 3 CD 患者治疗后差异表达基因前 30 个 Pathway 功能分析

4 讨论

克罗恩病是一种自身免疫性炎症性肠病,其关键作用因素尚未完全明确。基于数据库的基因表达谱研究和蛋白-蛋白相互作用网络已部分揭示了与CD发病机制密切相关的基因和信号转导途径^[18]。目前,全基因组关联性研究已经确定了170多个与CD相关的基因位点,对CD相关基因的整合和网络分析将有助于充分明确疾病的预测基因以及了解CD的发病机制^[19-20]。研究表明CD患者结肠中有多种与炎症相关基因的表达失调,如C4BPB、IL1RN、CXCL1、CXCL11、MMP7、SOD2等^[21]。因此,检测和比较健康志愿者及CD患者针灸治疗前后结肠中的基因差异,也有利于发现针灸可调控基因的潜在功能,从而更好地阐释针灸的免疫效应机制。本研究运用基因芯片技术,发现CD患者治疗前与健康志愿者结肠黏膜有上千个差异表达的mRNAs,而针灸可调控CD中388个mRNA的表达。有研究通过数据库分析鉴定出927个与CD相关的差异表达基因,其中PPAR信号通路中的LDLR、TLR2、FOXM1、NPY、LPL被认为是参与CD发病机制的重要基因^[18]。Hong SN等^[22]运用RNA-seq研究了正常黏膜、非炎症和炎症部位的CD黏膜之间的全基因组转录组差异,在950个差异表达基因中,CD炎症部位黏膜组织中ANGPT2、CHN1、CPXM1、CPZ、CXCL1、FCN3、GJC1、HSD11B1、LZTS1、MEOX1、MMP12、PLA1A、SERPINE1、SGIP1和TRPC4等16个基因显著上调,而FAM189、PDE6A、SLC38A4和HMGCS2基因显著下调。多重基因检测发现CD患者结肠炎症部位的黏膜组织中炎症因子IL17A、IL17F、IL23R、CCR6及IFN- γ 的基因,编码抗菌肽的DEFB4和HAMP基因以及REG1A、LCN2、NOS2、CXCL1-2和S100A9基因等均明显上调^[23-24]。还有研究通过定量基因表达分析了与CD相关的氧化应激和细胞凋亡相关基因,在CD病情恶化时,STAT1和PSKH1的特定表达上调,ABCB1和FASL表达下调,而在活动期患者中,FASR和NFKB1基因表达上调明显^[25]。经对比发现,本研究所得到的CD差异表达基因与以往的研究有很大不同,这可能是与检测分析方法、样本量的多少等因素有关。本研究可能获得了许多新的与CD相关的基因靶点,这将为CD的机制研究提供新的思路。

针灸在治疗CD上具有明显的优势^[8-9],以往研究证实针灸能通过上调A20表达水平,抑制TNF- α 介导的细胞凋亡途径,缓解CD肠上皮细胞凋亡的增加^[26],并能

调节TNF- α -NF- κ B-MLCK通路的异常激活,修复CD肠上皮黏膜屏障^[27]。本研究发现针灸可以逆转CD患者结肠中多种差异表达的基因,笔者重点关注了上下调控显著的前30个基因。目前这些基因与CD关系的研究较少,也尚未有针灸调控CD中这些基因表达的报道。但是,其中的GSTA1是一种谷胱甘肽-S-转移酶- α ,大肠杆菌脂多糖刺激可以通过GSTA1加重CD结肠黏膜炎症^[28],而TCN2基因多态性也被证实是CD的易感基因^[29]。笔者的基因芯片的结果显示针灸可以下调CD中GSTA1和TCN2基因的高表达。因此,针灸可能通过调控GSTA1和TCN2的表达起到缓解CD结肠黏膜炎症的作用。但是GSTA1和TCN2具体的作用以及其他显著差异表达基因是否在针灸治疗CD中发挥了作用还有待深入研究和证实。

研究证实多种免疫炎症因子和免疫信号通路参与CD的发生发展,如Treg/Th17相关因子、IL-12/IL-23通路、JAK-STAT信号通路、TLR4-NF- κ B信号等^[30-34],自噬相关基因对CD的生理病理也有很大的影响^[35]。CD结肠黏膜中的差异表达基因在通路水平的分析显示,CD中的病毒感染和自身免疫通路明显上调^[36]。笔者也分析了针灸调控的差异显著的前30个上调和下调mRNA涉及的通路,发现主要有转录因子STAT磷酸化、ATP酶活性、B细胞介导的免疫、自然杀伤细胞相关免疫等与免疫调节相关的生物功能,并参与了Toll-like受体信号通路、自噬调节系统、自然杀伤细胞介导的细胞毒作用等与免疫炎症相关的信号通路,这与以往研究与CD发生发展相关的信号通路具有一致性。因此,针灸可能通过调控关键mRNA的表达,影响其生物功能和与疾病相关的多种因子和免疫信号通路,从而起到改善和缓解CD肠道免疫炎症的作用。

综上所述,CD患者结肠黏膜组织存在基因表达谱的改变,针灸治疗可以调节部分疾病状态下差异表达的基因,其参与和涉及了多种与免疫炎症相关的生物功能和信号通路,提示针灸能有效治疗CD的机制与影响了结肠黏膜中的基因表达谱相关,主要参与细胞周期、免疫炎症反应、细胞自噬和组织重建等生物学过程,相关的通路主要有Toll-like受体信号通路、自噬调节系统、自然杀伤细胞介导的细胞毒作用。该研究结果为后期研究提供了方向,如细胞自噬的作用、免疫调节的Toll-like受体信号通路、自然杀伤细胞介导的细胞毒作用等。后期可结合多组学的系统生物学研

究,将转录组学与 DNA 甲基化、非编码 RNA 介导的 mRNA 沉默、肠道菌群、组蛋白修饰、宏基因组学、代谢组学和蛋白组学等高通量测序结果结合分析,有助于探索新的作用机制。

参考文献

- [1] Manuc TE, Manuc MM, Diculescu MM. Recent insights into the molecular pathogenesis of Crohn's disease: a review of emerging therapeutic targets[J]. *Clin Exp Gastroenterol*, 2016, 9:59-70.
- [2] Williams JG, Roberts SE, Ali MF, et al. Gastroenterology services in the UK. The burden of disease, and the organisation and delivery of services for gastrointestinal and liver disorders: a review of the evidence[J]. *Gut*, 2007, 56 Suppl 1(Suppl 1):1-113.
- [3] Zheng JJ, Zhu XS, Huangfu Z, et al. Prevalence and incidence rates of Crohn's disease in mainland China: a meta-analysis of 55 years of research[J]. *J Dig Dis*, 2010, 11(3):161-166.
- [4] Clark M, Colombel JF, Feagan BC, et al. American gastroenterological association consensus development conference on the use of biologics in the treatment of inflammatory bowel disease, June 21-23, 2006[J]. *Gastroenterology*, 2007, 133(1):312-339.
- [5] Joos S, Brinkhaus B, Maluche C, et al. Acupuncture and moxibustion in the treatment of active Crohn's disease: a randomized controlled study[J]. *Digestion*, 2004, 69(3):131-139.
- [6] Song G, Fiocchi C, Achkar JP. Acupuncture in Inflammatory Bowel Disease[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2019, 25(7):1129-1139.
- [7] 施茵,包春辉,吴焕淦,等.隔药灸结合针刺对克罗恩病患者肠黏膜 TNF- α 、TNFR1、TNFR2 表达及肠上皮细胞凋亡的影响[J].上海中医药杂志,2011,45(1):46-50.
- [8] Bao CH, Zhao JM, Liu HR, et al. Randomized controlled trial: moxibustion and acupuncture for the treatment of Crohn's disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(31):11000-11011.
- [9] Shang HX, Wang AQ, Bao CH, et al. Moxibustion combined with acupuncture increases tight junction protein expression in Crohn's disease patients[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(16):4986-4996.
- [10] Clark PM, Dawany N, Dampier W, et al. Bioinformatics analysis reveals transcriptome and microRNA signatures and drug repositioning targets for IBD and other autoimmune diseases[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2012, 18(12):2315-2333.
- [11] Martin JC, Chang C, Boschetti G, et al. Single-Cell Analysis of Crohn's Disease Lesions Identifies a Pathogenic Cellular Module Associated with Resistance to Anti-TNF Therapy[J]. *Cell*, 2019, 178(6):1493-1508.e20.
- [12] Uniken Venema WT, Voskuil MD, Vila AV, et al. Single-Cell RNA Sequencing of Blood and Ileal T Cells From Patients With Crohn's Disease Reveals Tissue-Specific Characteristics and Drug Targets[J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(3):812-815.
- [13] Chen D, Liu J, Zhao HY, et al. Plasma long noncoding RNA expression profile identified by microarray in patients with Crohn's disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(19):4716-4731.
- [14] Palmieri O, Creanza TM, Bossa F, et al. Functional Implications of MicroRNAs in Crohn's Disease Revealed by Integrating MicroRNA and Messenger RNA Expression Profiling[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(7):1580.
- [15] Russo E, Lombardelli L, Giudici F, et al. Crohn's Colitis: Development of a multiplex gene expression assay comparing mRNA levels of susceptibility genes[J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2017, 41(4):435-444.
- [16] Zhao JM, Liu YN, Zheng HD, et al. Effect of Herb-Partitioned Moxibustion on Autophagy and Immune-Associated Gene Expression Profiles in a Rat Model of Crohn's Disease[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019:3405146.
- [17] 中华医学会消化病学分会炎症性肠病协作组.中国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见[J].中华内科杂志,2008,47(1):73-79.
- [18] Bo L, Fu H, Yang J. Comprehensive analysis of gene expression profiles provides insight into the pathogenesis

- of Crohn's disease[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18 (3) :2643–2650.
- [19] Jostins L, Ripke S, Weersma RK, *et al.* Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease[J]. *Nature*, 2012, 491 (7422) : 119–124.
- [20] Gettler K, Giri M, Kenigsberg E, *et al.* Prioritizing Crohn's disease genes by integrating association signals with gene expression implicates monocyte subsets[J]. *Genes Immun*, 2019, 20 (7) :577–588.
- [21] Dobre M, Milanesi E, Mănuc TE, *et al.* Differential Intestinal Mucosa Transcriptomic Biomarkers for Crohn's Disease and Ulcerative Colitis[J]. *J Immunol Res*, 2018, 2018:9208274.
- [22] Hong SN, Joung JG, Bae JS, *et al.* RNA-seq Reveals Transcriptomic Differences in Inflamed and Noninflamed Intestinal Mucosa of Crohn's Disease Patients Compared with Normal Mucosa of Healthy Controls[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2017, 23 (7) :1098–1108.
- [23] Giudici F, Lombardelli L, Russo E, *et al.* Multiplex gene expression profile in inflamed mucosa of patients with Crohn's disease ileal localization: A pilot study[J]. *World J Clin Cases*, 2019, 7 (17) :2463–2476.
- [24] Holgersen K, Kutlu B, Fox B, *et al.* High-resolution gene expression profiling using RNA sequencing in patients with inflammatory bowel disease and in mouse models of colitis[J]. *J Crohns Colitis*, 2015, 9 (6) :492–506.
- [25] Iborra M, Moret I, Rausell F, *et al.* Different Genetic Expression Profiles of Oxidative Stress and Apoptosis-Related Genes in Crohn's Disease[J]. *Digestion*, 2019, 100 (1) :27–36.
- [26] Zhou J, Wu LY, Chen L, *et al.* Herbs-partitioned moxibustion alleviates aberrant intestinal epithelial cell apoptosis by upregulating A20 expression in a mouse model of Crohn's disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25 (17) :2071–2085.
- [27] Shi Y, Guo Y, Zhou J, *et al.* Herbs-partitioned moxibustion improves intestinal epithelial tight junctions by upregulating A20 expression in a mouse model of Crohn's disease[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109149.
- [28] Russo I, Luciani A, De Cicco P, *et al.* Butyrate attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation in intestinal cells and Crohn's mucosa through modulation of antioxidant defense machinery[J]. *PLoS One*, 2012, 7 (3) :e32841.
- [29] Zheng S, Wu C, Yang W, *et al.* An Analysis of Transcobalamin II Gene Polymorphisms and Serum Levels of Homocysteine, Folate and Vitamin B12 in Chinese Patients with Crohn's Disease[J]. *Dig Dis*, 2017, 35 (5) :463–471.
- [30] 孙怡, 周竞, 郭娅静, 等. 隔药灸对肿瘤坏死因子- α 介导克罗恩病肠上皮细胞凋亡途径的影响[J]. *针刺研究*, 2019, 44 (1) :1–7.
- [31] Li N, Shi RH. Updated review on immune factors in pathogenesis of Crohn's disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24 (1) :15–22.
- [32] Ramos GP, Faubion WA, Papadakis KA. Targeting Specific Immunologic Pathways in Crohn's Disease[J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2017, 46 (3) :577–588.
- [33] Christophi GP, Rong R, Holtzaple PG, *et al.* Immune markers and differential signaling networks in ulcerative colitis and Crohn's disease[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2012, 18 (12) :2342–2356.
- [34] 阮水良, 官俏兵. 热休克转录因子 2 通过 HMGB1-TLR4-NF- κ B 信号促进克罗恩病炎症反应的作用机制研究[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2019, 24 (4) :369–375.
- [35] Nguyen HT, Lapaquette P, Bringer MA, *et al.* Autophagy and Crohn's disease[J]. *J Innate Immun*, 2013, 5 (5) :434–443.
- [36] Yang L, Tang S, Baker SS, *et al.* Difference in Pathomechanism Between Crohn's Disease and Ulcerative Colitis Revealed by Colon Transcriptome[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2019, 25 (4) :722–731.

收稿日期 2020-03-02