

- [13] 梁宜,周杰,房军帆,等.一种用于清醒大鼠的柔性固定器:201420473579.9.2014-12-24
- [14] 华兴邦,周浩良.大鼠穴位图谱的研制.实验动物与动物实验,1991,2(1):1-5
- [15] 李芸,傅志俭.臭氧治疗炎性痛的应用研究.中国疼痛医学杂志,2016,22(3):168-171
- [16] Old E A, Clark A K, Malcangio M. The role of glia in the spinal cord in neuropathic and inflammatory pain. *Handb Exp Pharmacol*, 2015, 227: 145-170
- [17] Beyer A, Schäfer M, Stein C. Antinociceptive effects of dynorphin peptides in a model of inflammatory pain. *Pain*, 1997, 70(2-3): 141-147
- [18] M Lukács, K Warfvinge, J Tajti, et al. Topical dura mater application of CFA induces enhanced expression of c-fos and glutamate in rat trigeminal nucleus caudalis: attenuated by KYNA derivative (SZR72). *Journal of Headache & Pain*, 2017, 18(1): 39-46
- [19] 温存, 杜俊英, 房军帆, 等. 电针干预慢性炎性痛大鼠痛情绪的前扣带皮层PKC ζ 调控机制. *浙江中医药大学学报*, 2017, 41(1): 25-31, 45
- [20] 池细绿, 方芳, 方剑乔, 等. BAM22多肽对慢性炎性痛大鼠痛阈和电针镇痛作用的影响. *上海针灸杂志*, 2014, 33(5): 468-471
- [21] 林丽莉, 陈惠娥, 张志灿, 等. 脊髓小胶质细胞激活与电针镇痛效应研究. *辽宁中医杂志*, 2015, 42(12): 2300-2303
- [22] 陆琪璜, 陈颖, 崔光卫, 等. 电针结合吗啡对骨癌痛大鼠痛觉敏化及脊髓星形胶质细胞的活化作用. *上海中医药杂志*, 2016, 50(5): 77-82
- [23] 庄伊泮, 陈玄, 叶笑然, 等. 宽波电脉冲电针足三里防治下肢肌萎缩研究. *上海针灸杂志*, 2016, 35(6): 742-744
- [24] 石艳红, 邵秀芹, 冯珍, 等. 正中神经电刺激对脑外伤后昏迷促醒治疗的参数研究. *中国康复理论与实践*, 2017, 23(2): 207-210

(收稿日期: 2017年12月26日)

· 论著 ·

艾灸干预胃溃疡大鼠胃黏膜脑肠肽的动态表达

何其达^{1,2,3}, 刘密⁴, 连林宇³, 张媛⁴, 沈佳成^{1,2}, 刘彩春^{1,2}, 黄妙森³, 张琬滨^{1,2},
钱林超^{1,2}, 常小荣⁴, 杨宗保^{1,2}

(¹厦门大学深圳研究院, 深圳 518000; ²厦门大学医学院, 厦门 361102; ³福建中医药大学针灸学院, 福州 350000; ⁴湖南中医药大学针灸推拿学院, 长沙 410000)

摘要: 目的: 观察艾灸干预胃溃疡大鼠胃黏膜相关脑肠肽的动态表达, 探讨艾灸干预胃溃疡的时效关系。方法: SD大鼠72只随机分为3批, 各批分为正常组、模型组、胃经穴位组和非经穴位组 ($n=6$)。采用70%乙醇灌胃复制胃溃疡大鼠模型。胃(非)经穴位组的大鼠进行艾灸1、4、7d (30min/d)。干预结束后于光镜下观察胃黏膜形态, RT-PCR测定胃黏膜增殖细胞核抗原(PCNA)及P物质(SP)表达。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠胃黏膜溃疡灶明显, 胃黏膜PCNA表达降低 ($P<0.05$), SP表达升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 干预1d后胃经穴位组大鼠胃黏膜PCNA表达升高 ($P<0.05$), 干预4d后胃经穴位组PCNA表达升高 ($P<0.05$), SP降低 ($P<0.05$); 干预7d后各组大鼠胃黏膜PCNA及SP表达无显著差异。结论: 艾灸胃经穴位能有效调节相关脑肠肽指标, 促进胃黏膜损伤修复, 并具有一定的时效关系。

关键词: 艾灸; 胃溃疡; 胃经; 时效关系; 脑肠肽

基金资助: 深圳创新科技计划项目 (No.JCYJ20160406140612883), 国家自然科学基金项目 (No.81473751), 国家重点基础研究发展计划 (973计划) (No.2015CB54502)

Effects of moxa-wool moxibustion on dynamic expression of brain-gut peptide in gastric mucosa of rats with gastric ulcer

HE Qi-da^{1,2,3}, LIU Mi⁴, LIAN Lin-yu³, ZHANG Yuan⁴, SHEN Jia-cheng^{1,2}, LIU Cai-chun^{1,2}, HUANG Miao-sen³,
ZHANG Long-bin^{1,2}, QIAN Lin-chao^{1,2}, CHANG Xiao-rong⁴, YANG Zong-bao^{1,2}

通讯作者: 杨宗保, 广东省深圳市南山区高新南四道19号虚拟大学园厦门大学深圳研究院, 邮编: 518000, 电话: 0592-2183069
E-mail: yzbldq@163.com

(¹Shenzhen Research Institute, Xiamen University, Shenzhen 518000, China; ²Medical College, Xiamen University, Xiamen 361102, China; ³College of Acupuncture and Moxibustion, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350000, China; ⁴College of Acupuncture-moxibustion and Massage, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410000, China)

Abstract: Objective: To observe the effects of moxa-wool moxibustion on dynamic expression of brain-gut peptide in gastric mucosa of rats with gastric ulcer, and to explore the time effect relationship of moxa-wool moxibustion in treating gastric ulcer. Methods: Seventy-two SD rats were randomly divided into three batches. Each batch was divided into control group, model group, stomach meridian acupoint group and non acupoints group ($n=6$). Rats model of gastric ulcer were established by 70% ethanol intragastric administration. The stomach meridian acupoint group and non acupoint moxibustion group were treated with moxa-wool moxibustions in 1d, 4d, 7d (30min/d). After intervention, morphology of gastric mucosa was observed under light microscope. The expressions of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and substance P (SP) in gastric mucosa were measured by RT-PCR. Results: Compared with the control group, the gastric mucosal ulcer in the rats of model group was obvious, the expression of PCNA in the gastric mucosa significantly decreased ($P<0.05$), and the expression of SP significantly increased ($P<0.05$). Compared with the model group, the PCNA expression in gastric mucosa of stomach meridian acupoints group increased after moxa-wool moxibustion in 1d ($P<0.05$). After moxa-wool moxibustion 4 days, the expression of PCNA in stomach meridian acupoints group was increased ($P<0.05$), and SP was decreased ($P<0.05$). After moxa-wool moxibustion 7 days, there was no significant difference in the expression of PCNA and SP in each group. Conclusion: Moxa-wool moxibustion on the stomach meridian acupoints could effectively regulate the related brain gut peptide index, promote the repair of gastric mucosal injury, and has certain time-effect relationship.

Key words: Moxa-wool moxibustion; Gastric ulcer; Stomach meridian; Time-effect relationship; Brain-gut peptide

Funding: Shenzhen Innovation and Technology Plan Project (No.JCYJ20160406140612883), National Natural Science Foundation of China (No.81473751), National Key Basic Research Program of China (973 Program) (No.2015CB554502)

胃溃疡是消化系统常见疾病, 经过临床及基础研究发现艾灸对胃溃疡能起到较好疗效^[1-2]。研究表明, 艾灸能调节脑肠肽水平, 降低胃黏膜溃疡指数及增加胃黏膜血流量, 起到保护胃黏膜、促进胃黏膜损伤修复的作用^[3-5]。但艾灸治疗胃溃疡的时效关系研究较少。本研究采用病理形态学及分子生物学方法, 探究艾灸干预胃溃疡的时效关系。

材料与方 法

1. 动物与分组 普通级雄性7周龄SD大鼠72只, 180~220g, 购自吴氏实验动物中心, 许可证号: SCXK(浙)160803004, 分笼饲养于厦门大学医学院中医系动物房, 自然照明, 自由饮食。适应环境1周后, 按每批24只分为3批, 每批根据随机数字表法随机分为正常组、模型组、胃经穴位组、非经穴位组、每组6只。

2. 试剂与仪器 70%乙醇、水合氯醛、多聚甲醛(上海国药, 生产批号分别为: 10009259、30037516、80096618)。TaKaRa LA Taq[®]试剂盒[Takara, 型号: RR02MB(A × 4)]; Trans2K DNA Marker(TransGen Biotech, 型号: BM101-02); 艾条(南阳汉医, 规格: 0.6cm × 1.5cm)。PCR反应扩增仪(ABI, 型号: 7900HT); 移液器(Gilson, 型号: Pipetman P); 微量分光光度计(Thermo, 型号: Nanodrop 2000c); 离心机(Eppendorf, 型号: 5424R); 病理切片(Leica, 型号: CM1850)。

3. 大鼠模型建立 动物造模前, 将大鼠禁食不禁水24h, 后除正常组外各组大鼠一次性给予70%乙

醇灌胃(4mL/kg), 正常组给予等量纯净水^[6]。

4. 干预方法 胃经穴位组和非经穴位组大鼠捆绑于鼠板, 用特定的动物艾条艾灸, 30min/d, 3批大鼠分别连续干预时间为1、4、7d。胃经穴位组选取“梁门”及“足三里”, 非经穴位组选取“梁门”及“足三里”外旁开5mm处。正常组及模型组捆绑于鼠板30min/d, 不予干预措施, 至本批次实验干预结束。

5. 标本采集与处理 采集标本之前, 各组大鼠均禁食不禁水24h, 称量大鼠体质量, 将10%水合氯醛腹腔注射麻醉(0.35mL/100g)^[7], 取出胃部, 用0.9%氯化钠溶液清洗, 后切取胃窦部放置于-80℃冰箱中保存, 以备检测使用。

6. 指标检测

6.1 胃黏膜病理学观察 从样本中取出胃组织, 切取胃窦部位约0.5cm × 0.5cm用0.9%氯化钠溶液洗净, 放入4%多聚甲醛溶液中固定处理48h, 常规石蜡包埋, 苏木素-伊红染色, 于光镜下观察胃黏膜病理形态。

6.2 RT-PCR检测 从上述备用组织中剪取0.5cm × 0.5cm, 将0.1mol/L冰PBS缓冲液加入放置组织碎块的移液管中(组织块重量: 缓冲液体积=1:9), 并采用匀浆机于冰块上进行匀浆(10 000r/min), 将匀浆液移入洁净的离心管中, 以4℃ 3 000r/min离心15min。提取上清液, 转移至洁净的EP管中。

利用Trizol法提取总RNA并取1μg反转录成cDNA。其扩增条件为: 94℃ 1min预变性; 94℃ 30s,

60℃ 30s, 72℃ 30s, 72℃ 1min, 共40个循环。扩增循环之后导出CT值, 并使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值计算方法分析增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 和P物质 (substance P, SP) 的mRNA相对表达量。

7. 统计学方法 所有数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 通过SPSS 17.0软件分析数据, 检验各组数据是否呈正态分布, 若满足正态分布且方差齐时采用单因素方差分析LSD法, 方差不齐时选择Dunnnett T3法进行方差检验, 同时选择两两比较; 若不满足正态分布, 则使用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结果

1. 各组大鼠胃黏膜病理学观察 见图1-图3。各正常组胃黏膜上皮形态结构完整, 上皮细胞排列整齐且上皮细胞形态完整, 未见溃疡性损害。①干预1d后, 模型组、胃经穴位组及非经穴位组可肉眼观察到胃黏膜明显充血潮红, 胃体处可见多处溃疡灶, 并可见明显出血点, 胃黏膜层破坏, 胃黏膜下可见上皮细胞排列不整且出现细胞水肿。②干预4d后, 模型组与非经穴位组的胃黏膜仍可见溃疡性损害, 上皮细胞排列不整, 细胞充水状态有所改善。③干预7d后, 模型组胃黏膜未见溃疡性损害, 少量细胞存在充水状态, 胃经穴位组与非经穴位组黏膜形态基本完整, 上皮细胞排列基本整齐, 仅有少部分细胞存在充水状态。

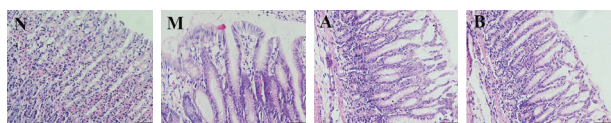


图1 艾灸1d大鼠胃黏膜病理情况 (HE×400)

注: N. 正常组; M. 模型组; A. 胃经穴位组; B. 非经穴位组。下图同。

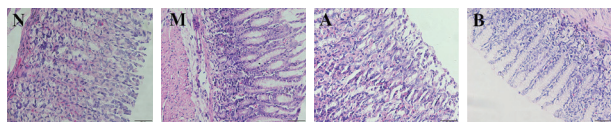


图2 艾灸4d大鼠胃黏膜病理情况 (HE×400)

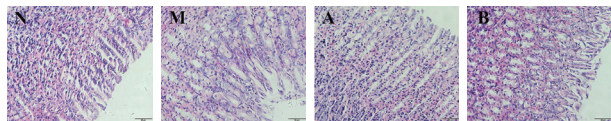


图3 艾灸7d大鼠胃黏膜病理情况 (HE×400)

2. 各组大鼠胃黏膜PCNA和SP表达 见表1-表2。干预1d后, 与正常组比较, 模型组的胃黏膜PCNA表达显著降低 ($P < 0.05$), SP表达显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 胃经穴位组和非经穴位组PCNA表达显著升高 ($P < 0.05$), SP无显著差异;

与非经穴位组比较, 胃经穴位组的PCNA显著升高 ($P < 0.05$), SP无显著差异, 说明艾灸1d胃经穴位更能提高PCNA表达量。

表1 各组大鼠胃黏膜PCNA相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	1d	4d	7d
正常组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	0.74±0.04 [*]	0.74±0.05 [*]	0.94±0.04
胃经穴位组	1.63±0.06 ^{*△▲}	1.73±0.04 ^{*△▲□}	1.13±0.07 [■]
非经穴位组	1.23±0.05 ^{*△}	1.33±0.07 ^{*△}	0.93±0.05 [■]

注: 与正常组同期比较, ^{*} $P < 0.05$; 与模型组同期比较, [△] $P < 0.05$; 与非经穴位组同期比较, [▲] $P < 0.05$; 与同组干预1d时比较, [□] $P < 0.05$; 与同组干预4d时比较, [■] $P < 0.05$ 。下表同。

表2 各组大鼠胃黏膜SP相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	1d	4d	7d
正常组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	1.53±0.03 [*]	1.43±0.06 [*]	1.13±0.04
胃经穴位组	1.50±0.05 [*]	1.13±0.04 ^{△▲□}	1.00±0.03 [■]
非经穴位组	1.48±0.03 [*]	1.33±0.02 ^{△□}	1.04±0.03 [■]

干预4d后, 与正常组比较, 模型组的胃黏膜PCNA表达显著降低 ($P < 0.05$), SP表达显著升高 ($P < 0.05$), 胃经穴位组的胃黏膜SP表达无明显差异; 与模型组比较, 胃经穴位组和非经穴位组PCNA表达显著升高 ($P < 0.05$), SP表达量显著降低 ($P < 0.05$); 与非经穴位组比较, 胃经穴位组的PCNA显著升高 ($P < 0.05$), SP表达显著降低 ($P < 0.05$)。

干预7d后, 各组大鼠胃黏膜PCNA及SP表达量均无显著差异。说明艾灸7d后大鼠PCNA及SP已基本恢复正常水平。

与同组干预1d时比较, 干预4d时胃经穴位组PCNA的相对表达量显著升高 ($P < 0.05$), 胃经穴位组和非经穴位组的SP相对表达量显著降低 ($P < 0.05$); 与同组干预4d时比较, 干预7d时胃经穴位组和非经穴位组PCNA及SP的相对表达量均显著降低 ($P < 0.05$)。

讨论

胃溃疡是诱发多种胃部疾病的起始环节, 现代医学认为主要是胃酸、胃蛋白酶、幽门螺杆菌等与胃黏膜的免疫屏障失衡有关^[8]。本课题组的前期研究表明, 艾灸能有效促进胃黏膜损伤的修复^[9-10]。根据大量的实验报道, 胃溃疡大鼠可通过调节自身的免疫系统以促进溃疡的愈合^[11]。

PCNA是参与细胞周期调节的一种蛋白, 与细胞修复、增殖有着密切的联系, 可反应细胞增殖的情

况^[12-13]。在胃溃疡中PCNA表达升高可反应胃黏膜处于修复阶段。SP属于促炎性感觉性神经肽类,多处于胃肠道与神经系统之中^[14],SP表达量增加可反应神经焦虑及疼痛发生^[15-16]。大鼠胃黏膜的溃疡面可刺激胃壁神经,增强疼痛感。PCNA和SP因能有效反应胃肠功能状态,因此在基础研究领域被广泛应用。

在本实验中,发现大鼠在胃溃疡造模1d后,胃黏膜上皮细胞增殖减少,焦虑感和疼痛感提升,艾灸1d后能明显促进胃黏膜上皮细胞增殖,加速胃黏膜损伤修复,其中艾灸干预胃经穴位较非经穴位改善更加明显,然而对焦虑感和疼痛感并无明显改善。干预4d后,胃黏膜上皮细胞增殖较干预1d后显著提升,能显著降低疼痛以及焦虑感,并且艾灸干预胃经穴位较非经穴位改善更加明显。干预7d后,模型组、胃经穴位组与非经穴位组的胃黏膜上皮细胞增殖水平以及疼痛焦虑感同正常组无显著差异。结合病理图片表明,胃溃疡大鼠胃黏膜经艾灸干预4d后胃黏膜形态较模型组有所改善,7d时基本自愈恢复正常。

综合本实验结果,艾灸“足三里”及“梁门”干预胃溃疡1d与4d后对胃黏膜细胞的增殖和修复具有显著疗效,4d后对降低疼痛焦虑感有显著疗效,且大鼠胃黏膜于7d病理形态、胃黏膜细胞增殖情况及焦虑疼痛感基本自愈恢复正常。本实验为艾灸干预胃溃疡大鼠的时效关系进行初步探究,为后续艾灸治疗胃溃疡的研究提供实验依据。

参 考 文 献

- [1] 徐小茹,刘畅,韩明娟,等.针灸治疗胃溃疡取穴及配伍规律分析.中华针灸电子杂志,2014,3(6):32-36
- [2] 张民英,李恒,翟夏,等.温胃舒颗粒联合艾灸对胃溃疡患者(脾胃虚寒型)血清NO、NOS表达水平的影响.中医药导报,2016,22(8):48-51
- [3] 龚安,杨宗保,施彬彬,等.艾灸对急性胃溃疡大鼠胃黏膜组织形态学和血流量的影响.中华中医药杂志,2014,29(6):2001-2003
- [4] 张泓,郭华,张雨辰,等.艾灸对脾虚胃溃疡模型大鼠胃组织表皮生长因子受体、磷酸化细胞外信号调节激酶的影响.针刺研究,2014,39(5):351-357
- [5] 邓雪,任路,李静,等.电针“肝俞”穴对抑郁型胃溃疡大鼠胃窦黏膜、下丘脑组织P物质和海马5-羟色胺的影响.针刺研究,2014,39(2):124-129
- [6] Pradeepkumar Singh L,Kundu P,Ganguly K,et al.Novel role of famotidine in downregulation of matrix metalloproteinase-9 during protection of ethanol-induced acute gastric ulcer.Free Radical Biology and Medicine,2007,43(2):289
- [7] 孙安会,谷捷,吴涛,等.四种常用实验麻醉药物对大鼠心血管系统的影响.中国实验动物学报,2016,24(2):120-126
- [8] 覃慧林,王爱玲,邓为,等.木瓜乙酸乙酯部位对小鼠急性胃溃疡的保护作用.中药药理与临床,2015,31(2):45-49
- [9] 刘琼,杨宗保,王晨光,等.艾灸“梁门”“足三里”穴对应激性胃溃疡大鼠胃黏膜细胞相关蛋白质磷酸化水平的影响.中医杂志,2014,55(24):2129-2133
- [10] 杨宗保,王晨光,龚安,等.艾灸调节急性胃溃疡大鼠胃黏膜细胞相关标志蛋白质表达的研究.中国针灸,2013,33(11):1017-1021
- [11] 刘建平,卜涛,白建乐,等.EGF、TGF- α 及EGFR在大鼠胃溃疡自愈过程中的表达及意义.中国药理学通报,2003,19(10):1185-1188
- [12] 韦玉娜,张静,王文杰,等.胃炎I号对慢性萎缩性胃炎PCNA、Bcl-2和Bax表达的影响.世界华人消化杂志,2015(6):944-948
- [13] Peng L,Xie Y,Wang C,et al.Moxibustion alleviates gastric precancerous lesions lesions in rats by promoting cell apoptosis and inhibiting proliferation-relates oncogenes.African Journal of Traditional Complementary&Alternative Medicines,2017,14(2):148-160
- [14] 李晓红,梁媛,谢宇晴,等.逍遥散对慢性束缚应激肝郁脾虚证模型大鼠SP、VIP基因表达的影响.中国中医基础医学杂志,2014(7):901-903
- [15] 石宏,程斌,李江慧,等.肥大细胞和P物质参与急性胃黏膜损伤大鼠体表穴位的敏化过程.针刺研究,2010,35(5):323-329
- [16] Zhao X,Cheng Q,Qian Y,et al.Insect tea attenuates hydrochloric acid and ethanol-induced mice acute gastric injury.Experimental & Therapeutic Medicine,2017,14(5):5135-5142

(收稿日期:2018年1月3日)