

· 论著 ·

# 针刺调节急性胃黏膜损伤大鼠胃黏膜细胞增殖信号通路相关分子的表达

王晨光<sup>1,2</sup>, 杨宗保<sup>1</sup>, 左彬荣<sup>2</sup>, 谢宇峰<sup>3</sup>, 刘琼<sup>2</sup>( <sup>1</sup>厦门大学医学院, 厦门 361005; <sup>2</sup>江西中医药大学, 南昌 330004; <sup>3</sup>深圳福田区中医院, 深圳 518000 )

**摘要:** 目的: 研究针刺对急性胃黏膜损伤大鼠胃黏膜细胞增殖相关信号分子表达的影响。方法: 大鼠随机分为空白组、模型组、胃经穴组和对照点组, 采用乙醇灌胃法制作胃黏膜损伤大鼠模型, 肉眼下观察大鼠胃黏膜损伤指数, 酶联免疫吸附测定法(ELISA法)检测丝裂原激活的蛋白激酶1(MAPK1)、磷酸化细胞外信号调节激酶(pERK2)、磷酸肌醇3激酶(PI3K)、蛋白激酶B(PKB/Akt)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(PAK)的表达。结果: 与模型组比较, 胃经穴组和对照点组大鼠胃溃疡指数均显著降低( $P < 0.05$ ), 胃经穴组大鼠胃黏膜细胞MAPK1、pERK2、PI3K、Akt、PAK表达显著升高( $P < 0.05$ ); 与对照点组比较, 胃经穴组大鼠胃溃疡指数和胃黏膜细胞MAPK1、pERK2、PI3K、Akt、PAK表达均显著升高( $P < 0.05$ )。结论: 针刺可促进胃黏膜损伤修复, 降低胃黏膜细胞增殖相关信号分子表达。

**关键词:** 针刺; 胃黏膜损伤; MAPK信号通路; PI3K/Akt-PAK1信号通路

**基金资助:** 国家自然科学基金(No.30960484, No.81260556)

## Expression of the proliferation signaling pathway on the gastric mucosa cells in rats with acute gastric mucosa injury treated by acupuncture

WANG Chen-guang<sup>1,2</sup>, YANG Zong-bao<sup>1</sup>, ZUO Bin-rong<sup>2</sup>, XIE Yu-feng<sup>3</sup>, LIU Qiong<sup>2</sup>( <sup>1</sup>Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, China; <sup>2</sup>Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; <sup>3</sup>Futian Hospital of TCM, Shenzhen 518000, China )

**Abstract:** Objective: To study the expression of the proliferation signaling pathway on the gastric mucosa cells in rats with acute gastric mucosa injury treated by acupuncture. Methods: Rats were randomly divided into normal group, model group, stomach meridian group and control point group. The acute gastric mucosa injury model was established by the method of ethanol intragastric administration. The gastric mucosal injury indexes in rats were observed, the expression of the mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), phospho-extracellular signal-regulated kinase 2 (pERK2), phosphoinositide 3-kinase (PI3K), protein kinase B (PKB/Akt) and protein activated kinase (PAK) in gastric mucosal cell were tested with ELISA method. Results: Compared with model group, the gastric mucosa damage index in rats of stomach meridian and control point group were decreased ( $P < 0.05$ ), and the expression of the MAPK1, pERK2, PI3K, Akt and PAK in gastric mucosa cells in stomach meridian group rats were decreased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with control point group, the expression of the MAPK1, pERK2, PI3K, Akt, PAK and gastric mucosa damage index in gastric mucosa cells in stomach meridian group rats were increased significantly ( $P < 0.05$ ). Conclusion: The acupuncture could promote the gastric mucosa injury repair and decrease the expression of the proliferation signaling molecular in gastric mucosa cells.

**Key words:** Acupuncture; Gastric mucosa injury; MAPK signaling pathway; PI3K/Akt-PAK1 signaling pathway

**Fund assistance:** National Natural Science Foundation of China (No.30960484, No.81260556)

急性胃黏膜损伤是机体在应激状态下引起的急性胃黏膜炎症、糜烂或出血<sup>[1]</sup>。急性胃黏膜损伤若不及时治疗, 则易演变成溃疡或癌变。现代医学治疗急性胃黏膜损伤主要以祛除病因、保护胃黏膜、抗菌和抑制胃酸分泌为主, 但易反复发作。针灸防治急性胃

黏膜损伤的优势越来越明显, 通过调节激素分泌、调整胃黏膜血流量、清除氧自由基和加强胃壁屏障等促进胃黏膜损伤修复<sup>[2]</sup>。然而目前对于针灸防治胃黏膜损伤的信号转导机制尚未明了, 笔者在前期研究基础上进一步开展针刺调节胃黏膜损伤细胞增殖

通讯作者: 杨宗保, 福建省厦门市思明区思明南路422号厦门大学医学院, 邮编: 361005, 电话: 0592-2189673

E-mail: yangzb@xmu.edu.cn

相关信号通路表达的研究,这对于揭示针刺防治胃黏膜损伤疾病的作用机制具有重要意义。

### 材料与方法

1. 动物 健康清洁级Sprague-Dawley大鼠28只,8周龄,空腹体质量为200-220g,雌雄各半。由厦门大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(闽)2008-0001。实验前将大鼠每笼7只分笼饲养于厦门大学中医实验室,饲养温度23-25℃,相对湿度65%-70%,给予充足的标准饲料和饮用水,自然光暗周期内适应性饲养1周后进行实验。

2. 造模 采用乙醇灌胃法制作急性胃黏膜损伤大鼠模型<sup>[3]</sup>,实验动物造模前禁食不禁水24h,后按0.8mL/100g无水乙醇给予大鼠灌胃处理,用水合氯醛麻醉,摘出全胃,沿胃底剪开胃腔,肉眼观察胃黏膜呈潮红充血状态,胃体部有数处斑点状糜烂、溃疡、出血,则说明成功复制急性胃黏膜损伤模型。

3. 分组及处理 28只大鼠按随机数字表法分为4组,每组7只,①空白组:鼠板束缚,每次30min,每日1次,持续12d;②模型组:造模后,鼠板束缚,每次30min,每日1次,持续12d;③胃经穴位:造模后,鼠板束缚,针刺胃经梁门、足三里穴位,每次30min,每日1次,持续12d;④对照点组:造模后,鼠板束缚,针刺对照点,每次30min,每日1次,持续12d。

4. 取穴方法 胃经穴位选取胃经梁门、足三里两穴,对照点组选取梁门、足三里穴外侧旁开0.5cm处为对照刺激点。穴位定位参考林文注主编《实验针灸学》<sup>[4]</sup>常用动物穴位定位法。

5. 针刺方法 将大鼠固定,用0.25mm×13mm针刺梁门、足三里和对照点,针刺深度5mm,平补平泻法,每10min运针1次,每日1次,每次30min,每次取单侧,两侧交替使用,共12d。

6. 标本处理 大鼠麻醉后摘出全胃,于胃黏膜损伤明显处,取1.0cm×0.5cm大小的胃组织作标本,取100mg胃黏膜组织,用1×PBS洗去血污,剪成小块放入组织研磨器中,加入1mL 1×PBS,制成匀浆,然后置于-20℃过夜。经过反复冻融2次处理破坏细胞膜后,将组织匀浆于2-8℃、5 000r/min离心5min,取适量上清液立即进行实验。

### 7. 指标检测

7.1 胃黏膜溃疡指数 按Guth P H等<sup>[5]</sup>标准详细记录指数:斑点糜烂计1分;糜烂长度<1mm计2分;糜烂长度1-2mm计3分;糜烂长度2-3mm计4分;糜烂长度>4mm计5分;宽度>1mm时分值×2。溃疡指数=胃黏膜各处糜烂的计分值之和。

7.2 胃黏膜细胞增殖信号分子丝裂原激活的

蛋白激酶(MAPK1)、磷酸化细胞外信号调节激酶(pERK2)、磷酸肌醇3激酶(PI3K)、蛋白激酶B(Akt)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(PAK)的表达 取各组胃黏膜细胞上清液按照ELISA试剂盒说明操作。

8. 统计学分析 用SPSS 16.0软件进行处理。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,满足正态性时,采用单因素方差分析,组间比较若方差齐时选择LSD法,方差不齐时用方差分析Tamhane's T2检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

### 结果

1. 针刺对急性胃黏膜损伤大鼠胃溃疡指数的影响 见表1。空白组胃溃疡指数记分最低,模型组胃溃疡指数记分最高,两组间差异显著( $P < 0.05$ ),说明成功复制急性胃黏膜损伤大鼠模型;与模型组比较,胃经穴位、对照点组胃溃疡指数均显著降低( $P < 0.05$ );与对照点组比较,胃经穴位胃溃疡指数值降低更为显著( $P < 0.05$ ),表明针刺能有效促进胃黏膜损伤的修复。

表1 针刺对急性胃黏膜损伤大鼠胃溃疡指数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

组别	溃疡指数
空白组	1.14±1.44
模型组	28.01±5.11*
对照点组	21.18±3.89 <sup>△</sup>
胃经穴位	16.22±3.63 <sup>△▲</sup>

注:与空白组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ;与对照点组比较,<sup>▲</sup> $P < 0.05$ 。下表同。

2. 针刺调节急性胃黏膜损伤大鼠胃黏膜细胞MAPK/ERK信号通路的表达 表2结果显示:与空白组比较,模型组大鼠胃黏膜细胞MAPK1、pERK2表达显著升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,胃经穴位胃黏膜细胞MAPK1、pERK2表达显著升高( $P < 0.05$ ),对照点组胃黏膜细胞pERK2表达显著升高( $P < 0.05$ );与对照点组比较,胃经穴位胃黏膜细胞MAPK1、pERK2表达显著升高( $P < 0.05$ )。

表2 针刺对急性胃黏膜损伤大鼠胃黏膜细胞MAPK1及pERK2表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

组别	MAPK1	pERK2
空白组	1.66±0.10	4.58±0.25
模型组	1.92±0.07*	5.09±0.22*
对照点组	2.06±0.08	5.62±0.17 <sup>△</sup>
胃经穴位	2.15±0.04 <sup>△▲</sup>	5.76±0.25 <sup>△▲</sup>

3. 针刺调节急性胃黏膜损伤大鼠胃黏膜细胞PI3K/Akt-PAK信号通路的表达 见表3。与空白组比

较,模型组大鼠胃黏膜细胞PI3K、Akt、PAK表达显著升高( $P<0.05$ );与模型组比较,胃经穴组大鼠胃黏膜细胞PI3K、Akt、PAK表达显著升高( $P<0.05$ );与对照点组比较,胃经穴组大鼠胃黏膜细胞PI3K、Akt、PAK表达显著升高( $P<0.05$ ),表明针刺胃经穴能升高急性胃黏膜损伤大鼠胃黏膜细胞PI3K、Akt、PAK的表达。

表3 针刺调节急性胃黏膜损伤大鼠胃黏膜细胞PI3K、Akt及PAK的表达( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=7$ )

组别	PI3K	Akt	PAK
空白组	97.58±4.11	108.60±6.25	195.03±9.04
模型组	105.55±4.68*	117.54±4.36*	214.49±5.10*
对照点组	114.47±4.36	126.72±4.35	231.36±7.50
胃经穴组	119.49±5.26 <sup>△△</sup>	130.26±5.33 <sup>△△</sup>	232.04±7.83 <sup>△△</sup>

## 讨论

胃黏膜损伤是多种胃部疾病的共同始动病理环节,其发病因素与急性应激、机械损伤、甾体药物等密切相关。现代医学尚无特异有效的防治方法,针灸作为中医最具特色的外治方法之一,对胃黏膜损伤疾病有很好的防治作用。丁乐等<sup>[6]</sup>研究发现,使用子午流注结合常规针刺法能够降低急性胃黏膜损伤家兔的胃黏膜损伤指数,提示该治疗方法对胃黏膜的修复作用可能与MT、HSP70的表达密切相关。易受乡等<sup>[7]</sup>也发现艾灸预处理对大鼠急性胃黏膜损伤具有一定的保护作用,其机制可能为诱导eHSP70升高,上调NF- $\kappa$ B p65的表达。

胃黏膜损伤修复涉及复杂的细胞信号通路调节,参与急性胃黏膜损伤信号通路主要以MAPKs信号通路、PI3K/Akt信号通路为主<sup>[8]</sup>。MAPKs信号通路对细胞的增殖和分裂具有重要的调控作用,刘密等<sup>[9]</sup>研究发现艾灸预处理使应激性胃黏膜损伤大鼠胃黏膜EGFR、p-ERK1/2、AP-1上调,实现促进胃黏膜细胞增殖的修复作用。Hyeyoung Kim<sup>[10]</sup>发现胃黏膜炎症和损伤可能与MAPK信号通路的激活有关。B L Slomiany等<sup>[11]</sup>也发现MAPK/ERK通路的激活可以使幽门螺旋杆菌诱导胃黏膜表达COX-2和iNOS,它们都参与了胃黏膜的炎性病变过程。本课题组前期研究发现电针胃黏膜损伤大鼠后提取的血清能明显上调大鼠胃黏膜细胞ERK磷酸化水平,提示ERK可能参与了电针胃经穴对胃黏膜损伤修复的信号转导<sup>[12]</sup>。PI3K/Akt细胞信号通路也参与了胃黏膜损伤修复的过程中,周云<sup>[13]</sup>研究发现不同基因型的H.pylori培养上清液可下调胃黏膜上皮细胞内PTEN表达和上调PI3K的表达及Akt的磷酸化,提示H.pylori可以同时激活胃黏膜上皮细胞内PI3K/Akt的促增殖信号途

径,这可能是H.pylori引起相关疾病乃至胃癌的致病机制之一。

本实验研究发现针刺对急性胃黏膜损伤大鼠的胃黏膜修复有着很好的效果。针刺胃经穴组大鼠的胃黏膜呈鲜红色,皱襞完整,未见缺损,可见少量点状瘀点,而模型组大鼠的胃黏膜皱襞多处缺损,呈紫红色,胃窦部可见斑点状、线状糜烂、溃疡、瘀血。说明针刺胃经穴可以有效修复受损的胃黏膜。同时,针刺能够明显升高大鼠胃黏膜细胞MAPK信号通路中MAPK1、pERK2的表达,以及PI3K/Akt信号通路中PI3K、PKB、PAK的表达,说明针刺能够有效促进细胞相关信号通路中关于细胞增殖蛋白的表达,从而减轻炎症造成的细胞损伤。说明针刺在调节急性胃黏膜损伤大鼠胃黏膜细胞增殖相关信号传导通路中起着非常重要的作用。而且笔者还发现针刺胃经穴组的大鼠情况明显好于针刺对照组大鼠,也从另一个角度证明了经络-脏腑的相关性理论。

## 参考文献

- [1] 易受乡,杜燕,林亚平,等.艾灸及烟条灸预处理对急性胃黏膜损伤大鼠热休克蛋白和炎性细胞因子的影响.中国中医药信息杂志,2011,18(4):26-28
- [2] 黎喜平,严洁.针灸对胃粘膜损伤保护作用机制的研究进展.针刺研究,2005,20(1):60-63
- [3] 王慧,周星,张一云,等.小鼠三种急性胃溃疡模型比较.实验动物与比较医学,2012,32(1):17-19,22
- [4] 曹志群,吕林懋,房芯.胃癌前病变中医治法的现代研究概述.山东中医药大学学报,2011,35(4):374-376
- [5] Guth P H, Aures D, Paulsen G. Topical aspirin plus HCl gastric lesions in the rat. Cytoprotective effect of prostaglandin, cimetidine and probanthine. Gastroenterology, 1979, 76(1):88-93
- [6] 丁乐,张泓,张娟,等.子午流注结合常规针刺法对胃黏膜损伤家兔褪黑素及HSP70的影响.中医药导报,2013,19(3):9-12
- [7] 易受乡,杜燕,林亚平,等.艾灸预处理对急性胃黏膜损伤大鼠血清中eHSP70及胃黏膜细胞NF- $\kappa$ B的影响.中华中医药杂志,2010,25(6):1462-1467
- [8] 陈黄钟,张志坚.细胞信号转导通路与应激性胃黏膜损伤的研究进展.南昌大学学报(医学版),2012,52(12):98-101
- [9] 刘密,常小荣,易受乡,等.艾灸对大鼠应激性胃黏膜损伤修复及p-ERK1/2蛋白表达的影响.中华中医药杂志,2012,27(10):2640-2643
- [10] Hyeyoung Kim. Oxidative stress in Helicobacter pylori-induced gastric cell injury. InflammoPharmacology, 2005(13):63-74
- [11] B L Slomiany, A Slomiany. Induction in gastric mucosal prostaglandin and nitric oxide by Helicobacter pylori is dependent on MAPK/ERK-mediated activation of IKK- $\beta$  and cPLA2: modulatory effect of ghrelin. InflammoPharmacology, 2013(21):241-251
- [12] 杨宗保,严洁,易受乡,等.电针胃经穴的大鼠血清上调胃黏膜细胞ERK磷酸化.基础医学与临床,2009,29(2):135-138
- [13] 周云.幽门螺旋杆菌对GES-1细胞PI3K/AKT通路、P21WAF1和Bax的影响和意义.南昌:南昌大学,2009

(收稿日期:2013年7月22日)