

·针推经络·

艾灸、电针预处理对急性胃黏膜损伤大鼠 TGF- α 、PCNA 的影响

郭礼娜,刘薇薇,谭成富,潘思安,刘 密*,王 超,常小荣
(湖南中医药大学针灸推拿学院,湖南 长沙 410208)

[摘要] 目的 对比观察艾灸预处理和电针预处理两种不同方法对急性胃黏膜损伤大鼠转化生长因子(TGF- α)和增殖细胞核抗原(PCNA)表达的影响差异。**方法** 将40只SPF级的SD大鼠随机的分为4组(空白组、模型组、艾灸预处理组和电针预处理组),艾灸预处理组和电针预处理组选取“足三里穴”、“中脘穴”分别行艾灸和电针预处理8d后,除空白组外造模,选用无水乙醇灌胃的方法(0.5 mL/100 g)制成大鼠急性胃黏膜损伤模型。造模1h后,用20%乌拉坦(0.6 mL/100 g)进行腹腔注射麻醉,再取材。在光镜下观察大鼠的胃黏膜组织形态学的改变,免疫组化法检测胃黏膜TGF- α 、PCNA的表达。**结果** 与空白组相比较,模型组胃黏膜中TGF- α 、PCNA的表达明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组相比较,艾灸预处理组和电针预处理组胃黏膜中TGF- α 、PCNA的表达均有不同程度升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与艾灸预处理组相比较,电针预处理组胃黏膜中TGF- α 的表达明显降低,具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而胃黏膜中PCNA的表达则无明显差异($P>0.05$)。**结论** 艾灸预处理与电针预处理均可以减轻无水乙醇对胃黏膜造成的损伤,促进胃黏膜保护因子(TGF- α 、PCNA)的表达,但艾灸预处理稍优于电针预处理。

[关键词] 急性胃黏膜损伤;电针;艾灸;预处理;TGF- α ;PCNA

[中图分类号] R245;R256.3

[文献标识码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.04.012

Effects of the Moxibustion and Acupuncture Preconditioning on TGF- α and PCNA of Rats with Acute Gastric Mucosal Lesions

GUO Lina, LIU Weiwei, TAN Chengfu, PAN Sian, LIU Mi*, WANG Chao, CHANG Xiaorong

(Acupuncture and Massage College of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] Objective To observe the effects of the moxibustion preconditioning and acupuncture preconditioning on TGF- α and PCNA in rabbits with acute gastric mucosal lesions. **Methods** 40 SPF-class SD rats were randomly divided into four groups: blank group, model group, moxibustion preconditioning group and electroacupuncture preconditioning (EA) group. The moxibustion preconditioning group and EA group were pretreated at "Zusanli point" and "Zhongwan point" for 8 days. The model of rats with acute gastric mucosal lesions was established by absolute ethanol irrigation (0.5 mL/100g). After 1 hour of modeling, the rats were anesthetized by 20% urethane (0.6 mL/100 g), and then fetch gastric tissue. Histomorphology changes of gastric mucosa in rats were observed by light microscopy. The expression of PCNA and TGF- α was detected by immunohistochemistry method. **Results** Compared with blank group, the expression of TGF- α and PCNA were increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with model group, the expression of TGF- α and PCNA in moxibustion preconditioning and EA groups was increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with moxibustion preconditioning group, the expression of TGF- α in EA group was decreased obviously ($P<0.05$ or $P<0.01$),but the expression of PCNA has no

[收稿日期] 2015-12-15

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2015CB554502);国家自然科学基金项目(81202770, 81574082);高等学校博士学科点专项科研基金新教师类课题(20124323120002);湖南省自然科学基金项目(13JJ6060);湖南省优秀博士学位论文获奖作者科研项目(YB2013B037);湖南省教育厅资助科研项目(14B129);2013年湖湘青年科技创新创业平台项目;2013年湖南省高层次卫生人才“225”工程培养项目资助。

[作者简介] 郭礼娜,女,在读硕士研究生,研究方向:针灸治病机制的研究。

[通讯作者] *刘 密,男,副教授,E-mail:newmean9722@qq.com。

significant difference ($P>0.05$). **Conclusion** Moxibustion and EA pretreatment can reduce the damage caused by ethanol on gastric mucosa, and promote the expression of gastric mucosal protective factor (TGF- α , PCNA), but moxibustion is better than that of EA pretreatment.

[**Keywords**] acute gastric mucosal lesions; electroacupuncture; moxibustion; preconditioning; TGF- α ; PCNA

急性胃黏膜损伤 (Acute Gastric Mucosal lesions, AGML) 是指以胃黏膜产生不同程度的溃疡、糜烂和出血等为特点的病变, 其病因主要包括酒精中毒以及非甾醇类抗炎药如阿司匹林等。急性胃黏膜损伤的修复主要是经过损伤后早期重建以及细胞增生。目前实验研究均已证明, 许多生长因子和细胞因子都参与了胃黏膜上皮损伤的修复调节, 如转化生长因子 α (transforming growth factor- α , TGF- α) 可以促进胃黏膜上皮细胞迁移和增殖。增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 是反映细胞增殖状态的直接衡量指标。大量的实验研究和临床实践已证明, 艾灸和电针均对胃黏膜具有很好的保护作用, 不仅可以改善患者临床症状, 还可以促进溃疡组织的愈合^[1-3]。本实验旨在探讨艾灸预处理和电针预处理两种不同干预方法对胃黏膜预防保护作用是否相同, 或各有特点。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

SPF 级 SD 大鼠 40 只, 由湖南中医药大学动物实验中心提供, 动物合格证号: SCXK (湘)2011-0003。饲养温度 20~25 $^{\circ}\text{C}$, 湿度 50%~70%, 体质量 200~220 g, 雌雄各半。随机分为 4 组, 空白组、模型组、艾灸预处理组、电针预处理组。实验程序经湖南中医药大学实验动物中心动物伦理委员会批准。

1.2 主要试剂与仪器

20% 乌拉坦 (上海化学试剂公司); 4% 多聚甲醛溶液 (湖南中医药大学免疫组化实验室配置); 枸橼酸盐缓冲液、苏木素 (Wellbio)。华佗牌 1 寸毫针 (杭州丹顿医疗器械有限公司); SDZ-V 型华佗牌电子针疗仪 (苏州医疗用品有限公司); 温灸纯艾条 (南阳市卧龙汉医艾绒厂, 规格 4 mm \times 120 mm, 10 支/盒); 简易艾灸架、隔热薄膜、电阻温度测定仪 (自制); TGL-16 台式冷冻离心机 (长沙湘仪离心机仪器有限公司); THZ-C 恒温振荡器 (太仓市强乐实验设备有限公司); OLYMPUS Bx-70 显微镜成像系统 (OLYMPUS 公司); TS-92 摇床 (其林贝尔仪器制造

有限公司); YD-315 切片机 (浙江金华益迪试验器材); BMJ-A 包埋机 (常州中威电子仪器); BA210T 显微镜 (Motic)。

1.3 造模方法

选用无水乙醇灌胃的方法制备大鼠急性胃黏膜损伤模型。需造模的各组大鼠于实验第 8 天预处理后禁食不禁水 24 h, 再每只大鼠采用灌胃针灌服无水乙醇 (0.5 mL/100 g), 造模时间为 1 h。而空白组大鼠用灌胃针灌服生理盐水 (0.5 mL/100 g), 时间为 1 h, 再麻醉取材。

1.4 穴位定位和处理方法

1.4.1 穴位定位 参考李忠仁主编《实验针灸学》常用动物穴位定位法及拟人对照法定位, 足三里穴 (后三里穴) 处于实验大鼠膝关节后外侧, 腓骨小头下约 5 mm 处。中脘穴处于大鼠脐上约 20 mm (以胸锁联合和耻骨联合连线下 1/4 与上 3/4 交点为大鼠肚脐)。

1.4.2 处理方法 空白组和模型组大鼠每天捆绑固定在鼠板上 30 min, 连续捆绑 8 d; 艾灸预处理组大鼠每天捆绑固定于鼠板上后, 选取大鼠双侧足三里穴和中脘穴, 并将艾条固定在自制的简便灸架上, 同时对准各施灸穴位, 距离约 2 cm 处点燃施灸, 用电阻温度测定仪 (自制) 测量大鼠体表温度, 其体表温度大约达到 42 $^{\circ}\text{C}$, 每天持续灸 30 min, 1 次/d, 连续 8 d。电针预处理组大鼠行同样的固定, 同时选取双侧的足三里穴和中脘穴, 将毫针直刺入穴位大约 3 mm 后, 采用提插捻转 (平补平泻) 的手法 1 min, 然后连接 SDZ-V 型华佗牌电针治疗仪, 波形选用疏密波 (疏波与密波频率之比为 10/50 Hz), 其刺激强度为 2 mA (以上肢轻微颤抖为度), 时间持续为 30 min, 1 次/d, 连续治疗 8 d。

1.5 观察指标及检测方法

1.5.1 胃黏膜组织形态学观察 在胃黏膜损伤最严重处取 1 小块 (约 0.5 cm \times 1 cm), 用冰生理盐水冲洗干净, 放入 4% 多聚甲醛中固定 24~48 h, 常规梯度乙醇脱水, 石蜡包埋, 间断连续切片 (厚度 4 μm)、烤片、常规脱蜡; 光镜下观察胃黏膜组织形态学改变。

1.5.2 胃黏膜 PCNA、TGF- α 检测(免疫组化法) 在胃黏膜损伤明显处选取 1.0 cm \times 0.5 cm 组织块,用冷生理盐水清洗,滤纸吸干,将其装入 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(含 4%多聚甲酸、0.05%戊二酸和 15%饱和苦味酸,pH 7.4)中室温下固定待检。石蜡包埋后连续切片,60 $^{\circ}$ C烤片 30~60 min;切片脱蜡至水;将切片浸入到 0.01 M 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)当中,用微波炉或电炉加热到沸腾后再断电,大约间隔 5~10 min 后,重复 1~2 次。冷却后 0.01M PBS(pH 7.2~7.6)清洗 3 min,重复清洗 3 次;加入 3% H_2O_2 ,室温放置 10 min 以便灭活内源性酶。PBS 清洗 3 min,重复清洗 3 次;再滴加适当稀释过的一抗,37 $^{\circ}$ C放置 1~2 h 或 4 $^{\circ}$ C过夜。用 PBS 清洗 5 min,重复清洗 3 次;滴加 50~100 μ L 抗兔/鼠 IgG 抗体-HRP 多聚体,37 $^{\circ}$ C下孵育 30 min,再用 PBS 清洗 5 min,重复清洗 3 次;配置 DAB 溶液显色,蒸馏水洗涤;苏木素复染,各级酒精 60%~100%脱水,取出后置于二甲苯 10 min,2 次,中性树胶封片、显微镜观察。数据分析采像为普通电脑采像;图像分析软件是 IPP(Image-Pro-Plus)进行平均光密度的分析。结果判断:阳性染色为黄色或棕黄色染色。

1.6 统计学分析

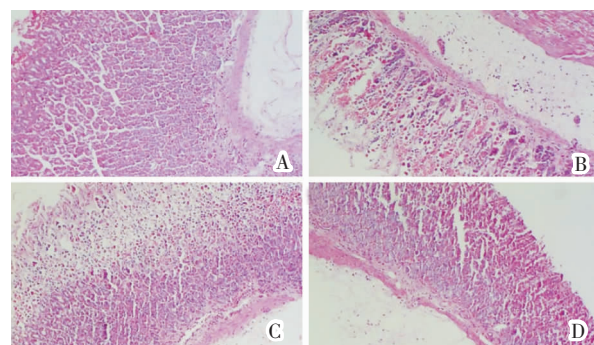
采用 SPSS17.0 统计软件进行分析。数据均以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。所有数据进行正态性检验,满足正态性时,采用单因素方差分析(One-way ANOVA);组间对比方差齐时采用 LSD 法检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组胃黏膜光镜下观察

光镜下,空白组(图 1-A)可见胃黏膜上皮结构连续完整,细胞排列整齐,细胞核和细胞质轮廓清晰可见,未见明显胃黏膜损伤;与空白组比较,模型组(图 1-B)大鼠胃黏膜结构明显破坏,胃腺细胞大量坏死,杂乱无序,细胞内充血并水肿,可见明显胃黏膜损伤;与模型组相比较,艾灸预处理组(图 1-C)和电针预处理组(图 1-D)大鼠胃黏膜表面细胞相对而言比较完整,细胞核与细胞质结构均比较清晰,胃黏膜的表面有少许脱落,胃黏膜破损情况较模型组明显改善,说明艾灸和电针预处理可以有效预防无水乙醇对正常大鼠导致的胃黏膜损伤。

2.2 艾灸预处理和电针预处理对 AJML 大鼠胃黏



A.空白组 B.模型组 C.艾灸预处理组 D.电针预处理组

图 1 各组胃黏膜光镜下观察图($\times 100$)

膜中 TGF- α 、PCNA 的影响

与空白组相比较,模型组胃黏膜 TGF- α 、PCNA 的表达显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),说明无水乙醇造模后可以使胃黏膜出现增殖修复反应;与模型组相比较,艾灸预处理组和电针预处理组胃黏膜 TGF- α 、PCNA 的表达显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),说明艾灸预处理和电针预处理能够提高胃黏膜增殖修复能力。与艾灸预处理组相比较,电针预处理组胃黏膜 TGF- α 的表达显著降低($P<0.01$),而胃黏膜中 PCNA 的表达未见明显差异($P>0.05$),说明艾灸预处理对胃黏膜的增殖修复能力优于电针预处理组。见表 1。

表 1 各组胃黏膜 TGF- α 、PCNA 表达的比较 ($n=10,\bar{x}\pm s$)

组别	TGF- α	PCNA
空白组	0.006 \pm 0.02	0.021 \pm 0.010
模型组	0.011 \pm 0.002*	0.036 \pm 0.014*
艾灸预处理组	0.025 \pm 0.003** $\Delta\Delta$	0.054 \pm 0.010** Δ
电针预处理组	0.014 \pm 0.003** $\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle$	0.0527 \pm 0.012** Δ
F 值	106.70	17.41
P 值	0.00	0.00

注:与空白组相比较 * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型组相比较 $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与艾灸预处理组相比较 $\blacktriangle\blacktriangle P<0.01$ 。

3 讨论

TGF- α 是 EGF 家族中参与胃黏膜损伤之后修复的主要调节肽之一。在胃肠道当中,TGF- α 尤以胃窦黏膜中表达量为最高,是胃体黏膜的 3 倍,它不仅参与了黏膜上皮的更新,还介入了黏膜损伤后的修复,并且它是保持黏膜完整性的重要物质,且对多种细胞有促进有丝分裂功用,如上皮细胞、内皮细胞、纤维细胞以及黏膜组织等^[4]。研究表明 TGF- α 可

能作为黏膜保护因子,在胃黏膜损伤相关疾病中发挥黏膜修复及保护作用,它可以促进细胞增殖、抑制胃酸分泌、降低溃疡指数、加速溃疡的愈合^[5]。PCNA是由 Miyahci 等在 1978 年从系统性红斑狼疮病患的血清当中发现的,因它存在于增殖性细胞中而得名。实验研究表明,PCNA 与细胞的 DNA 合成有密切的关系,在启动细胞增殖上具有重要作用。PCNA 是一种细胞周期调控蛋白,它反映了细胞增殖率及 DNA 合成率,近年来被普遍的应用于胃黏膜增殖活性的研究当中^[6-7]。

电针疗法是指将毫针刺入人体腧穴后,将电针机连接到毫针上,在通以微量低频脉冲电流的一种治疗方法,有止痛、镇静、促进气血循环等功效。而艾灸疗法是用艾叶为主要灸料,借灸火的热力功用,经过经络腧穴的作用,起到防治疾病的一种治法,具有温经散寒、行气通络等作用。“针灸预处理”是指预先用针灸的手段在机体的穴位上进行刺激,以增强机体的抗病与应变能力,并起到抑制或减弱随后疾病对机体组织器官损伤的功用,是“治未病”现代运用的方式之一。针灸“治未病”实践的积累和机制的研究使其获得了较高的社会认可程度,且其适应面广、简便安全、较为经济。因此运用针灸防治胃黏膜损伤相关疾病的发生、发展具有一定的临床价值。电针和灸法的治疗作用具有相似性,但又有差别。古有“灸治百病”之说,艾灸在“治未病”和防治胃黏膜损伤相关疾病独具优势。艾灸相对电针而言,操作更方便,适用性更广。对于晕针、惧针人来讲,艾灸的选择性更好,更易被人接受。目前关于艾灸预处理对急性胃黏膜损伤的预保护作用的实验研究较多,然而关于电针预处理对急性胃黏膜损伤的预保护作用的研究较少,而关于艾灸预处理和电针预处理之间对于急性胃黏膜损伤的保护作用机制的差异性研究亦鲜有报道。本课题组前期研究大多是关于艾灸预处理对胃黏膜损伤的预保护,它可以通过调整细胞的多种因子、清除氧自由基、抑制炎症细胞因子等,来减轻胃黏膜损伤的程度而达到保护胃黏膜的作用^[8-12]。本实验在前期研究的基础上,对比了艾灸预处理与电针预处理对大鼠急性胃黏膜损伤胃组织形态学和胃黏膜保护因子(TGF- α 、PCNA)的差异,探讨电针预处理对急性胃黏膜损伤的预保护作用,及艾灸预处理与电针预处理对胃黏膜保护功用

是否有差别。实验结果显示:艾灸预处理与电针预处理可有效的减轻无水乙醇对大鼠胃黏膜组织的损伤,并且可以促进胃黏膜中 TGF- α 、PCNA 表达的升高,且艾灸预处理对胃黏膜中 TGF- α 表达的升高高于电针预处理。表明艾灸预处理和电针预处理可以促进胃黏膜增殖修复因子(TGF- α 、PCNA)的合成和分泌,启动胃黏膜修复机制,从而加强胃黏膜细胞增殖作用。但艾灸预处理的修复作用可能优于电针预处理。其具体差异可能与其刺激方式不同有关,有待更进一步研究。

参考文献:

- [1] 徐国林,于翠华,王大志.辨证施灸治疗胃痛 30 例[J].中医外治杂志,2005,14(2):44-44.
- [2] 胡敏.电针加隔姜灸治疗寒邪客胃型胃痛 68 例[J].成都中医药大学学报,2010,33(2): 23-24.
- [3] 唐润霞.针灸治疗胃脘痛 50 例疗效观察[J].河南中医学院学报,2005,20(3):59-59.
- [4] Playford RJ. Peptides and gastrointestinal mucosal integrity. Gut, 1995;37:595-597.
- [5] Yetkin G, Celebi N, Ozer C, et al. The healing effect of TGF- α on gastric ulcer induced by acetylsalicylic acid in rats[J]. Int J Pharm, 2004,277(1-2):163-172.
- [6] Muskhelishvili L, Latendresse JR, Kodell RL, Henderson EB. Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA,Ki-67 (MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA [J]. J Histochem Cytochem, 2003, 51(12):1 681-1 688.
- [7] 李铁浪,栗艳梅,祁芳,等.艾灸对脾虚胃溃疡模型大鼠血清 TFF 及胃黏膜 ERK1/2、PCNA 的影响 [J]. 湖南中医药大学学报,2015,35(2):49-55.
- [8] 常小荣,彭娜,易受乡,等.艾灸预处理对应激性胃溃疡大鼠胃黏膜 HSP70 蛋白及 mRNA 表达的影响[J].世界华人消化杂志,2006,14(13):1 252-1 256.
- [9] 刘密,常小荣,严洁,等.艾灸对胃黏膜损伤大鼠胃黏膜表皮生长因子、转化生长因子- α 及其受体的影响[J].针刺研究,2011,36(6):403-408.
- [10] 刘密,常小荣,严洁,等.艾灸预处理对大鼠应激性胃黏膜损伤增殖修复相关因子的影响[J].世界华人消化杂志,2012,20(1):53-59.
- [11] 刘密,常小荣,严洁,等.艾灸预处理对大鼠应激性胃黏膜损伤的保护作用[J].中华中医药杂志,2012,27(1):58-62.
- [12] 刘密,常小荣,严洁,等.艾灸预处理对大鼠应激性胃黏膜损伤大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-10 的影响[J].中国中医急症,2011,20(6):906-908.

(本文编辑 匡静之)