

· 针灸推拿 ·

本文引用:尹秀婷,张泓,张健,许明,刘寄生,林居财.不同时辰艾灸对急性胃黏膜损伤模型大鼠 EGF 及 TGF- α 的影响[J].湖南中医药大学学报,2017,37(3):294-297.

不同时辰艾灸对急性胃黏膜损伤模型大鼠 EGF 及 TGF- α 的影响

尹秀婷¹,张泓^{2*},张健¹,许明¹,刘寄生¹,林居财²

(1.湖南中医药大学研究生院,湖南长沙 410208;2.湖南中医药大学康复教研室,湖南长沙 410208)

〔摘要〕目的 观察不同时辰艾灸对急性胃黏膜损伤模型大鼠表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)及转化生长因子- α (transforming growth factor- α ,TGF- α)的影响,探讨不同时辰艾灸对大鼠急性胃黏膜损伤修复是否存在差异,期以阐述施灸时机对艾灸疗效的影响。**方法** 40只SD大鼠随机分为空白组(A)、模型组(B)、辰时艾灸组(C)、未时艾灸组(D)、戌时艾灸组(E),每组8只,除A组以外,采用无水乙醇灌胃法将其余大鼠制备成急性胃黏膜损伤模型,其中A组、B组不予施灸;余三组选用两组穴位:(1)“足三里”(双)“中脘”;(2)“脾俞”(双)“胃俞”(双)施温和灸20 min。各组予以相应处理7 d后,取胃组织肉眼观察胃黏膜损伤指数(UI),Elisa法检测胃黏膜组织中EGF、TGF- α 的含量。**结果** (1)相比于A组,其余各组UI值明显提高($P<0.01$);相比于B组,各艾灸组UI值明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);艾灸组之间比较,C组、E组UI值低于D组($P<0.05$)。(2)与B组相比,各艾灸组胃黏膜EGF、TGF- α 含量显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$);艾灸组之间比较,C组胃黏膜EGF、TGF- α 的含量高于D组、E组($P<0.05$)。**结论** (1)不同时辰艾灸“足三里”“中脘”“脾俞”“胃俞”对大鼠急性胃黏膜损伤具有一定的修复作用,可能是通过提高胃黏膜中EGF、TGF- α 的表达发挥修复作用的;(2)以辰时艾灸组疗效最优,提示辰时艾灸存在相对特异性,部分证实施灸时机对艾灸效应的影响。

〔关键词〕 时辰;急性胃黏膜损伤;艾灸;表皮生长因子;转化生长因子- α

〔中图分类号〕R245.81 **〔文献标识码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.03.017

Effects of Different Time Moxibustion on EGF and TGF- α in Acute Gastric Mucosal Lesion Model Rats

YIN Xiuting¹, ZHANG Hong^{2*}, ZHANG Jian¹, XU Ming¹, LIU Jisheng¹, LIN Jucan²

(1. Graduate School of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Department of Rehabilitation, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

〔Abstract〕 Objective To observe the effect of different time moxibustion on EGF and TGF- α contents in acute gastric mucosal lesion model rats, and to investigate whether differences exist in different time moxibustion on acute stomach membrane damage repair. To elaborate the effect of moxibustion at different time. **Methods** 40 SD rats were randomly divided into the control group (group A), model group (group B), moxibustion at 7 a.m to 9 a.m group (group C), moxibustion at 1 p.m to 3 p.m group (group D), moxibustion at 7 p.m to 9 p.m group (group E), eight rats in each group. The gastric mucosal injury rats models besides group A were built by intragastric administration of absolute alcohol. Group A and B were not given moxibustion. The other three groups were treated with mild moxibustion for 20 min at two sets of acupoints, (1) "Zusanli"(two), "Zhongwan", (2) "Pishu"(two), "Weishu"(two). After treatment for 7 d, the UI (gastric mucosal injury index) of gastric tissue was observed under naked eyes. The EGF and TGF- α in gastric tissue were determined by Elisa.

〔收稿日期〕2016-11-13

〔基金项目〕国家自然科学基金(85010001031);湖南省研究生科研创新课题项目(0141-090100200311)。

〔作者简介〕尹秀婷,女,在读硕士研究生,主要研究方向:针灸治病机理研究。

〔通讯作者〕*张泓,男,教授,博士研究生导师,E-mail:zh5381271@sina.com。

Results (1) Compared with group A, the UI index in other groups increased significantly ($P<0.01$). Compared with group B, UI index in other groups decreased markedly ($P<0.01$ or $P<0.05$). The UI of group C and group E was lower than that of group D ($P<0.05$). (2) Compared with group B, EGF and TGF- α in the groups increased significantly ($P<0.01$ or $P<0.05$), while the EGF and TGF- α in group C were higher than that in group D and group E ($P<0.05$). **Conclusion** (1) Different time moxibustion at "Zusanli" "Zhongwan" "Pishu" and "Weishu" have repairing effect on acute gastric mucosal injury rats, its repairing effect was probably played by up-regulating EGF and TGF- α protein expression. (2) The moxibustion at the day of from 7 a.m to 9 a.m shows strongest effect on acute acute gastric mucosal lesion, which demonstrate that there is a relative specificity of different time moxibustion on the effect of moxibustion, partially confirm time on moxibustion effect.

[**Keywords**] time; acute gastric mucosal lesions; moxibustion; EGF; TGF- α

急性胃黏膜损伤是多种胃疾病的始动环节^[1],是消化系统的最常见病变之一。大量的临床实践和实验研究已证实针灸有保护和促进胃黏膜损伤修复的作用^[2]。前期研究表明^[3-4],常规针刺基础上结合子午流注针法对胃黏膜损伤修复的疗效更优,提示针刺时机是影响疗效的重要因素。本项目从时辰是影响艾灸疗效因素的假说为切入点,以急性胃黏膜损伤模型大鼠为研究对象,通过观察胃黏膜损伤指数 (ulcer index, UI) 与表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、转化生长因子- α (transforming growth factor- α , TGF- α) 的水平表达,探讨不同时辰艾灸治疗效应是否存在差异,以进一步阐述施灸时机对艾灸疗效的影响,期为临床艾灸治疗胃黏膜损伤性疾病及择时艾灸以提高临床疗效提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

40 只,雌雄各半,10~12 周龄,体质量 200~250 g,健康 Sprague-Dawley 大鼠,SPF 级,饲养温度 20~25 $^{\circ}\text{C}$,湿度 50%~70%,湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供[动物许可证号:SCXK(湘)2013-0004]。大鼠适应性喂养 1 周后用于本实验,40 只大鼠按随机数字表法为空白组(A)、模型组(B)、辰时艾灸组(C)、未时艾灸组(D)、戌时艾灸组(E),每组 8 只。实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》^[5] 相关动物伦理学标准的条例。

1.2 主要试剂与仪器

艾条:李时珍蕲艾条微烟艾条(规格:4 mm \times 10 cm, 100 支/盒);自制艾灸架:用于固定艾条;隔热材料:薄纸板,再在此板上打一个直径为 3 mm 的小孔,用于暴露穴位处皮肤;16 号灌胃针;EGF、TGF- α 酶联免疫 ELISA 试剂盒,TGL-16 台式高速冷冻离心机(长沙科威实业有限公司);AEU-210 电子分析天平

(长沙湘仪天平仪器厂);PW-812 全自动酶标洗板机(济南安畅医疗设备有限公司);MB-530 酶标仪(济南安畅医疗设备有限公司);THZ-C 恒温振荡器(长沙强乐有限公司);Motic B 1 显微镜(福建麦克奥迪实业集团有限公司);OLYMPUS Bx-70 显微镜成像系统(日本 OLYMPUS 公司);图像分析软件 Image Pro-Plus(美国 Media Cybernetics 公司);石蜡切片机(美国 820 型 AO 切片机);10%水合氯醛;0.9%生理盐水;95%乙醇;10%中性福尔马林溶液。

1.3 造模方法

空白组大鼠以生理盐水(0.6 mL/100 g)灌胃,同时其余各组大鼠以 95%无水乙醇灌胃(0.6 mL/100 g)制备成急性胃黏膜损伤大鼠模型。急性胃黏膜损伤大鼠模型造模成功标准^[6]:(1)肉眼可见模型组胃体前壁黏膜层见缺损状病灶,周围充血水肿,黏膜表面附有出血,胃体部见多处出血、糜烂;(2)在光镜下模型组大鼠胃黏膜出现明显破损、脱落、出血、水肿,黏膜下可见炎症细胞浸润。

1.4 治疗方法

穴位定位参照李忠仁主编的“十一五”国家级规划教材《实验针灸学》^[7]大鼠标准穴位图谱定位并模拟人体骨度分寸法量取,以胸锁联合和耻骨联合连线下 1/4 与上 3/4 交点为肚脐。足三里:膝关节后外侧,腓骨小头下约 5 mm 处;中脘:脐与胸骨剑突连线中点,约脐上 20 mm 处;脾俞:第十二胸椎下,旁开 5 mm;胃俞:第十三胸椎下,旁开 5 mm。艾灸方法:从急性胃黏膜损伤模型造模后的第 1 天开始,A 组、B 组大鼠不予施灸;每天捆绑缚于鼠板约 20 min;C 组(7:00—9:00)、D 组(13:00—15:00)、E 组(19:00—21:00)大鼠捆绑固定于鼠板上施灸,选用两组穴位:(1)“足三里”(双)、“中脘”;(2)“脾俞”(双)、“胃俞”(双),两组穴每天交替进行。定穴后局部剪毛,用透明胶布把隔热纸板粘贴覆盖大鼠局部,自制艾灸架用于固定艾条,使艾条垂直距离大鼠穴位体表 2~3 cm,点燃施灸,并随时调整艾条与穴位之

间的距离,施灸前用体表温度计测量大鼠表皮温度,灸后复测大鼠表皮温度,以便观察记录。每日1次,每次每穴(点)灸20 min,共7 d。

1.5 观察指标及检测方法

治疗结束后第二天将各组大鼠用10%水合氯醛以(3.5 mL/kg)腹腔麻醉。将胃的幽门部和贲门部分别用结扎线结扎,在两结扎线的两端切断食道及十二指肠,摘下全胃。沿胃大弯剖开,用冰生理盐水冲洗,放在冰块上用10倍放大镜肉眼观察大鼠的胃黏膜损伤情况,参照Guth法^[8-9]计算UI值。Guth法的计算标准是:斑点糜烂计1分;糜烂长度<1 mm计2分;糜烂长度1~2 mm计3分;糜烂长度2~3 mm计4分;糜烂长度>4 mm计5分;宽度>1 mm时分值×2。取胃组织一小块(5 mm×10 mm),然后放入40 g/L多聚甲醛中4℃固定,用于HE染色,另取一小块(10 mm×10 mm)入氮液冻存于-80℃冰箱,用于Elisa法检测EGF及TGF-α的表达。

EGF、TGF-α的含量测定:严格按酶联免疫EGF、TGF-α试剂盒说明书进行操作。

1.6 统计学处理

所有数据使用SPSS 17.0软件进行处理。数据用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。所有资料进行正态性检验。符合正态分布者,多组计量资料之间比较采用单因素方差分析,方差齐者用LSD和SNK法,方差不齐者用Tamhane's T2或Dun-nett's T3法;不符合正态分布者采用多组资料的秩和检验。

2 结果

2.1 各组大鼠胃黏膜损伤指数比较

由表1可见,与A组相比,其余各组UI值显著升高($P<0.01$),说明无水乙醇灌胃导致胃黏膜损伤,造模成功;C组、D组、E组UI值明显低于B组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),说明艾灸能明显降低胃黏膜损伤指数,对胃黏膜有修复作用;与D组相比,C组、E组UI值呈降低趋势($P<0.05$);C组UI值稍低于E组,差异无统计学意义($P>0.05$)。

表1 各组大鼠UI值的比较 ($\bar{x}\pm s$,分)

组别	n	UI
空白组(A)	8	6.25±4.62
模型组(B)	8	32.88±10.60**
辰时艾灸组(C)	8	15.13±4.88**▲◆
未时艾灸组(D)	8	24.13±8.24**▲
戌时艾灸组(E)	8	21.88±7.30**▲▲

注:与A组比较,** $P<0.01$;与B组比较,▲▲ $P<0.01$,▲ $P<0.05$;与D组相比,◆ $P<0.05$ 。

2.2 艾灸对急性胃黏膜损伤大鼠胃黏膜EGF、TGF-α含量的影响

从表2中可知,相比于A组,其余各组胃黏膜EGF、TGF-α含量升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),表明无水乙醇灌胃后,胃黏膜损伤周围EGF、TGF-α表达增强;相比于B组,各艾灸组胃黏膜EGF、TGF-α含量明显增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$);三个不同时辰艾灸组之间比较,C组胃黏膜EGF、TGF-α的含量高于D组、E组($P<0.05$)。表明不同时辰艾灸能提高大鼠急性胃黏膜损伤EGF、TGF-α的含量,且以辰时艾灸效果最佳。

表2 各组大鼠胃黏膜中EGF、TGF-α含量比较 ($\bar{x}\pm s$,n=8,μg/μL)

组别	EGF	TGF-α
空白组(A)	23.756±8.398	20.135±5.200
模型组(B)	32.705±6.444*	27.631±7.044*
辰时艾灸组(C)	53.768±5.894**▲◆◆◆	51.534±5.267**▲◆◆◆
未时艾灸组(D)	40.819±8.944**▲	36.790±7.651**▲
戌时艾灸组(E)	43.584±9.108**▲▲	43.884±6.393**▲▲

注:与A组比较,** $P<0.01$,* $P<0.05$;与B组比较,▲▲ $P<0.01$,▲ $P<0.05$;与D组比较,◆◆ $P<0.01$,◆ $P<0.05$;与E组比较,● $P<0.05$ 。

3 讨论

急性胃黏膜损伤(acute gastric mucosal lesion, AGML)是指由于严重创伤、药物、酒精或辛辣饮食等应激性因素所导致的一种急性胃黏膜病变,它以胃黏膜的糜烂、溃疡甚至出血为主要特征,是消化系统最常见的一种病理变化。它属于中医学中的“胃脘痛”范畴,其病位在脾胃,与足阳明经密切相关,气血循环中足阳明胃经是多气多血之经,是临床上治疗胃腑病证的首选经脉。针灸治疗胃黏膜损伤性疾病,俞募配穴和下合穴是常用的取穴方法,胃之下合穴(足三里),脾之背俞穴(脾俞),胃之背俞穴(胃俞)和胃之募穴(中脘)这4个穴位是针灸治疗胃黏膜损伤性疾病使用频率最高的主要穴位^[10-12]。艾灸疗法作为一种温热良性刺激原,具有温热、温补、温通的作用,在促进胃黏膜损伤后修复、防治胃溃疡性疾病等方面,具有较高的临床应用价值。

EGF能促进胃黏膜上皮细胞DNA合成、分裂及细胞增殖,具有很强的抑制胃酸分泌作用^[13]。TGF-α是维持黏膜完整性的重要介质,它参与内皮结构重建,促进上皮细胞增殖及黏液生成,增加胃黏膜微循环,在受损胃黏膜修复及维持完整性中起重要作用^[14]。艾灸可通过提高胃组织表皮生长因子、转化生长因子的表达,两者均结合EGFR,激活后的

EGFR 介导 ERK 磷酸化从而激活 EGFR/ERK 信号传导通路,因而起到保护胃黏膜、促进胃黏膜增殖修复的作用^[15]。本实验研究结果显示不同时辰艾灸“足三里”“中脘”“脾俞”“胃俞”均能提高胃黏膜中 EGF、TGF- α 的表达水平,说明不同时辰艾灸“足三里”“中脘”“脾俞”“胃俞”对大鼠急性胃黏膜损伤都有一定的修复作用,一定程度上是通过提高胃组织 EGF、TGF- α 的表达发挥作用的。其中以辰时艾灸组对急性胃黏膜损伤修复作用最强,表明施灸时机对艾灸效应的影响,提示时辰可能是影响艾灸效应的内在机制之一。

子午流注法是把时间因素和针灸施治紧密结合在一起,着重以择时作为针灸施治的主要条件,认为不同时辰机体气血盛衰状况不同,针灸效应也不同。《素问·针解》说:“补泻之时,与气开阖相合也。”血气应时而至为盛,血气过时而去为衰,逢时而开,过时为阖。子午流注中“开”是指开放、宣通的意思,经气流注相应脏腑时,刺激与该脏腑密切相关的腧穴可使气血宣通畅达而达到治疗目的。子午流注纳支法中与胃腑相对应的时辰为“辰”时,此时气血流经相应的经脉脏腑,气血大盛,故选取与胃腑密切相关腧穴灸之,达到最佳治疗效应。考虑到大鼠是昼伏夜行动物,一般认为与人的生理节律相反,所以设置了“辰”时的对应时辰“戌”时作为对照时辰进行观察。至于选择“未”时作为对照观察时间点是因为“未”时为“辰”时和“戌”时的中间点。本实验结果证实“辰”时的艾灸治疗效应优于其它两组,印证了“谨候其时,病可与期,失时反候者,百病不治”(《灵枢·卫气行篇》)的经典论述。也表明“辰”时艾灸对急性胃黏膜损伤的修复具有相对的时辰特异性,说明了施灸时机对艾灸疗效有着较为重要的作用,值得临床重视。至于“戌时”效应相对较差是否与实验过程中人为的打乱了动物的生理节律有关亦或大鼠的生理节律本来就与人类相一致值得进一步研究。

综上所述,本研究表明(1)不同时辰艾灸“足三里”“中脘”“脾俞”“胃俞”对大鼠急性胃黏膜损伤具有一定的修复作用,可能是通过提高胃黏膜中 EGF、TGF- α 的表达发挥修复作用的;(2)以辰时艾灸组疗效最优,提示辰时艾灸存在相对特异性,部分证实施灸时机对艾灸效应的影响,其具体内涵仍需

进一步研究。

参考文献:

- [1] 孙玉鹤,张春风.胃溃疡研究进展[J].亚太传统医药,2014,10(11):46-49.
- [2] Nie B, Luo RH, Chen RI, et al. Clinical research of moxibustion therapy on gastralgia due to deficiency and cold [J]. Journal of Acupuncture and Tuina Science, 2011, 9(2): 98-100.
- [3] 丁乐,何可,张泓,等.子午流注针法配合常规针刺对急性胃黏膜损伤家兔 EGF、TGF- α 的影响 [J]. 中国中医药科技,2014,21(3):240-242.
- [4] 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[J].中医药导报,2013,19(3):9-12.
- [5] Adolphe M, Parodi AL. Ethical issues in animal experimentation [J]. Bulletin de L Academie Nationale de Medicine, 2009,193(8):1803-1804.
- [6] 易受乡,郁洁,常小荣,等.艾灸促进胃黏膜细胞 HSP70 表达上调对细胞凋亡线粒体信号转导途径的影响[J].世界华人消化杂志 2008,16(24):2689-2694.
- [7] 李忠仁.实验针灸学[M].北京:中国中医药出版社,2007:242-257.
- [8] Lee YJ, Curetty L, Hou ZZ, et al. Effect of ph on quercetin-induced suppression of heat shock gene expression and thermo-tolerance development in HT-29 cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1992, 186(2) :1121-1128.
- [9] Elia G, Santoro M G. Regulation of heat shock protein synthesis by quercetin in human erythroleukaemia cells [J]. Bio-chem J,1994, 300(Pt 1):201-209.
- [10] 李彤彤.针刺健脾不同穴组对脾虚大鼠血清胃泌素和 D-木糖含量的影响[J].辽宁中医药大学学报,2013,15(5):235-236.
- [11] 王朝辉,张娇娇,王富春.不同腧穴配伍防治应激性胃溃疡的效应规律[J].中国针灸,2014,34(2):149-151.
- [12] 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):49-51,55.
- [13] Josh V. RayGS Gslidenring Jg Inhibition of pariehl cellacid secretion is mediated by the elassical epideanal growth Factor receptor[J]. Dig Dis Sci,1997, 42: 1194-1198.
- [14] Ko JK, Cho CH, Lam SK. Adaptive cytoprotection through modulation of nitric oxide in ethanolevoked gastritis [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10: 2503-2508.
- [15] 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[J].针刺研究,2014,39(5):351-357.

(本文编辑 匡静之)