

本文引用:王园园,张国山,李 菲,刘 霞,刘 密,郁 洁.针刺预处理对急性胃黏膜损伤大鼠EGF、TGF- α 及TFF3含量的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(11):1253-1257.

针刺预处理对急性胃黏膜损伤大鼠EGF、TGF- α 及TFF3含量的影响

王园园,张国山,李 菲,刘 霞,刘 密*,郁 洁*

(湖南中医药大学,湖南 长沙 410208)

[摘要] 目的 观察针刺预处理中脘、足三里穴对急性胃黏膜损伤大鼠胃组织中表皮生长因子(EGF)、转化生长因子- α (TGF- α)及胃黏膜中三叶因子家族-3(TFF3)的影响。方法 将32只健康SD大鼠随机分为4组,即空白组、模型组、针刺组、针刺非穴组。针刺预处理8d采用无水乙醇灌胃的方法制备急性胃黏膜损伤模型。光镜下观察大鼠胃黏膜病理组织形态变化,免疫组化法测定胃黏膜组织中EGF、TGF- α 及TFF3的含量。结果 与空白组相比,模型组大鼠中胃黏膜损伤指数、EGF、TGF- α 及TFF3的表达增强($P<0.01$);与模型组、针刺非穴组相比,针刺穴位组TGF- α 、EGF的表达升高($P<0.01$),而TFF3、胃黏膜损伤指数降低($P<0.01$)。结论 针刺足三里、中脘穴能够降低无水乙醇对胃黏膜的损伤指数,可通过调节EGF、TGF- α 及TFF3的含量,来提高胃黏膜损伤修复的程度,且针刺穴位组对胃黏膜损伤的保护作用具有穴位特异性。

[关键词] 急性胃黏膜损伤;针刺预处理;中脘;足三里;胃黏膜保护因子

[中图分类号]R245;R573 [文献标志码]A [文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.11.007

Effect of Acupuncture Pretreatment on Levels of EGF, TGF- α , and TFF3 in Rats with Acute Gastric Mucosal Injury

WANG Yuanyuan, ZHANG Guoshan, LI Fei, LIU Xia, LIU Mi*, YU Jie*

(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of acupuncture pretreatment at Zhongwan and Zusani points on the epidermal growth factor (EGF) and transforming growth factor-alpha (TGF- α) in gastric tissue and the trefoil factor 3 (TFF3) in gastric mucosa in rats with acute gastric mucosal injury. **Methods** Thirty -two healthy Sprague -Dawley rats were randomly divided into four groups: blank group, model group, acupuncture group, and non-acupoint acupuncture group. After 8 days of acupuncture pretreatment, an acute gastric mucosal injury model was prepared by intragastric administration of absolute ethanol. The pathological changes of gastric mucosa in rats were evaluated by optical microscopy. The levels of EGF, TGF- α , and TFF3 in gastric mucosa were measured by immunohistochemistry. **Results** Compared with the blank group, the model group had significantly increased gastric mucosal injury index and expression levels of EGF, TGF- α , and TFF3 ($P<0.01$). Compared with the model group and non-acupoint acupuncture group, the acupoint acupuncture group had significantly higher expression levels of TGF- α and EGF ($P<0.01$), but significantly lower level of TFF3 and gastric mucosal injury index ($P<0.01$). **Conclusion** Acupuncture at Zusani and Zhongwan points can reduce the injury index of gastric mucosa caused by absolute ethanol. It can promote the recovery from gastric mucosal injury by regulating the levels of EGF, TGF- α , and TFF3. The protective effect of acupuncture against gastric mucosal injury has acupoint specificity.

[Keywords] acute gastric mucosal injury; acupuncture pretreatment; Zhongwan; Zusani; gastric mucosal protective factor

[收稿日期]2018-08-10

[基金项目]国家自然科学基金项目(81603705,81774438);湖南省自然科学基金项目(2017JJ3245);湖南省中医药科研计划项目重点课题(201911)。

[作者简介]王园园,女,在读硕士研究生,研究方向:针灸经络及针灸治病机制的研究。

[通讯作者]*刘密,男,博士,副教授,E-mail:7417091@qq.com;*郁洁,女,博士,副教授,E-mail:47060463@qq.com。

胃黏膜损伤主要为胃炎、胃溃疡及胃癌等相关胃病的共同病理环节,在临幊上较常见,严重危害到了人们的健康,且并发症较多^[1-2]。针灸是中医治未病的重要手段,也为中医传统特色治疗方法之一^[3-5],近年来大量研究表明艾灸能通过调节胃黏膜保护因子来增强急性胃黏膜损伤的修复能力^[6-10]。而在单纯针刺方面的研究相对较少。本研究主要探讨针刺中脘、足三里穴对胃黏膜相关保护因子的调节作用,为临幊治疗急性胃黏膜损伤提供部分理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康 SPF 级 SD 大鼠 32 只,体质量 200~250 g,雌雄各半。实验动物均来自湖南中医药大学实验动物中心,动物合格证号:SCXK<湘>2011-0003,饲养于 SPF 级实验动物房。实验动物房温度为 22~25 ℃,湿度 50%~70%。实验过程中对动物的处置符合 2007 年科技部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》以及相关动物伦理学的规定^[11]。

1.1.2 主要器材与试剂 20% 乌拉坦(长沙生物科技有限公司);4% 多聚甲醛溶液(上海生物有限公司);石蜡,苏木精染液,伊红,二甲苯,PBS 缓冲液,冰生理盐水,蒸馏水,梯度乙醇(湖南中医药大学实验室提供);手术器械 1 套(上海医疗器械有限公司);包埋机(常州中威电子仪器,BMJ);华佗牌无菌针灸针(0.25 mm×35 mm,苏州医疗用品厂有限公司)。转化生长因子- α (TGF- α)、表皮生长因子(EGF)及三叶因子家族-3(TFF3)免疫组化法检测试剂盒(福州飞净科技有限公司);DAB 显色试剂盒(福州飞净科技有限公司)。

1.1.3 动物分组 采用随机数表法将 32 只健康 SPF 大鼠进行分组,即空白组(A 组)、模型组(B 组)、针刺穴位组(C 组)、针刺非穴组(D 组),每组 8 只。

1.1.4 取穴 取穴定位参照《实验针灸学》常用动物穴位定位法及拟人对照法定位^[12]。针刺穴位组取穴:(1) 中脘: 脐与胸骨剑突连线中点, 约脐上 20 mm 处;(2) 足三里: 膝关节后外侧, 在腓骨小头下约 5 mm 处。针刺非穴组(对照点组)取穴:(1) 中脘对照点: 中脘穴右外侧旁开 1 cm 的非穴点;(2) 足三里

对照点:膝关节内侧与足三里平行的非穴位点。

1.2 实验方法

实验开始第 1~8 天,A、B 组大鼠每天捆缚于鼠板上 30 min, 其他不做任何处理,C、D 组大鼠每天捆缚后再进行针刺预处理 30 min。将 C 组大鼠仰卧位捆缚于鼠板上,利用电动式大鼠剃毛器进行针刺穴位局部脱毛,再进行针刺穴位的标记。针刺部位进行消毒,将无菌针灸针垂直刺入相应部位(足三里、中脘穴),将 D 组大鼠仰卧位捆缚于鼠板上,针刺部位进行消毒,将无菌针灸针垂直刺入相应部位(穴位对照点)C、D 两组都为手针刺激,针刺深度 5 mm, 平补平泻, 5 min 行针 1 次, 留针 30 min。每日 1 次, 连续干预 8 d。第 8 天针刺预处理结束后, 各组大鼠 24 h 禁食不禁水后, 采用灌胃针头按 0.5 mL/100 g 的剂量将无水乙醇注入 B 组、C 组、D 组大鼠胃内, 制备急性胃黏膜损伤大鼠模型, 而正常组则采用灌胃针头按 0.5 mL/100 g 的剂量将生理盐水注入大鼠胃内。灌胃 1 h 之后, 麻醉大鼠(20% 乌拉坦 10 mL/kg 进行腹腔注射)剖腹取材并测定各项指标。

1.3 观察指标及检测方法

1.3.1 胃黏膜损伤指数 参考相关文献^[13], 胃黏膜损伤指数按 GUTH 标准进行计算 UI: 糜烂斑点<1 mm 计 1 分; 糜烂长度<1 mm 计 2 分; 1 mm<糜烂长度<2 mm 计 3 分; 2 mm<糜烂长度<3 mm 计 4 分; 糜烂长度>4 mm 计 5 分; 宽度>1 mm 时 UI 分值加倍。

1.3.2 胃黏膜组织形态学观察及其 EGF、TGF- α 、TFF3 的含量测定 首先进行胃黏膜组织的石蜡包埋切片置于二甲苯中 10 min, 共 2 次。然后依次放置于梯度乙醇内 5 min, 用蒸馏水洗 3 次; 入 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液, 微波炉加热至沸腾后断电, 间隔 8 min 后, 反复 2 次, 冷却后用 PBS 溶液洗涤 3 次; 加入 3% H₂O₂, 室温 10 min, PBS 溶液冲洗 3 次; 滴加适量稀释的鼠一抗, 室温 2 h 过夜, PBS 溶液冲洗 3 min×3 次; 滴加抗鼠 IgG 抗体, 室温 30 min, PBS 溶液冲洗 3 min×3 次; 滴加 DAB 显

色剂,镜下控制反应时间;苏木素复染,PBS 返蓝,梯度乙醇脱水,每级 5 min,中性树胶封片,显微镜下观察。免疫组化法检测结果以黄褐色染色区域为阳性反应,对各组免疫组化染色切片采用普通的电脑采像,并用图像分析软件 IPP(Image-Pro-Plus)进行分析。设定一个长为 10 cm、宽为 5 cm 的方框,测得每张照片中方框内阳性结果的 OD 值,每例标本取 8 张照片,其平均值作为该例标本的代表值。

1.4 统计学方法

所有数据采用 SPSS 22.0 软件进行分析处理。测量所得数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”差的形式表示,所有资料均进行正态性检验与方差齐性检验,所有资料满足正态性分布($P > 0.05$),多组数据比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),所有数据满足方差齐性,故采用方差齐的两两比较方法(LSD 或 SNK 法),组间比较均以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 针刺预处理对胃黏膜组织形态学的影响

结果表明:A 组大鼠的胃黏膜组织内毛细血管丰富,上皮结构完整且胃黏膜表面无明显的损伤,黏膜下层和平滑肌层清晰可区分,细胞排列有序,未见明显的炎性细胞浸润;与 A 组比较,B 组大鼠胃黏膜组织内毛细血管增生出血,胃黏膜结构破坏,胃黏膜损伤严重,细胞排列无序,炎症细胞浸润明显,表明急性胃黏膜损伤模型复制成功;与 B 组比较,C 组大鼠胃黏膜组织内毛细血管增生出血明显好转,胃

黏膜损伤情况明显得到改善,炎细胞明显减少,胃黏膜结构基本恢复正常,说明针刺预处理后,实验大鼠的胃黏膜有不同程度的恢复,提示针刺预处理对急性胃黏膜损伤大鼠具有预防保护作用;与 C 组比较,D 组大鼠胃黏膜表面破损较严重,胃黏膜细胞部分坏死脱落,细胞排列无序,炎细胞浸润较明显。见图 1。

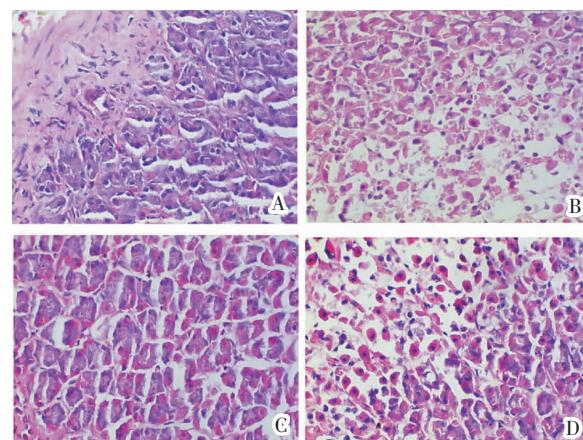


图 1 各组大鼠胃黏膜组织形态学的光镜图(HE, $\times 400$)

2.2 针刺预处理对胃黏膜损伤指数及相关保护因子的影响

结果显示:(1)与 A 组相比,B 组大鼠胃黏膜中损伤指数升高($P < 0.01$),EGF、TGF- α 及 TFF3 的含量提高($P < 0.01$);(2)与 B 组相比,C 组大鼠胃黏膜中 TGF- α 、EGF 的表达明显增强($P < 0.01$),而胃黏膜损伤指数降低($P < 0.01$),TFF3 含量降低($P < 0.01$);(3)与 C 组相比,D 组胃黏膜损伤指数较高($P < 0.01$),TGF- α 、EGF 的含量低于 C 组($P < 0.01$),TFF3 的含量较 C 组上升($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组大鼠胃黏膜中损伤指数、TGF- α 、EGF 及 TFF3 含量的变化($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	损伤指数/分	TGF- α /(ng·mL $^{-1}$)	EGF/(ng·mL $^{-1}$)	TFF3/(ng·mL $^{-1}$)
A 组	12.521±0.171	0.443±0.017	0.052±0.002	0.561±0.011
B 组	28.864±0.241 ^{△△}	0.552±0.013 ^{△△}	0.080±0.004 ^{△△}	0.677±0.014 ^{△△}
C 组	16.182±0.208 ^{◆◆}	0.642±0.013 ^{◆◆}	0.116±0.005 ^{◆◆}	0.540±0.017 ^{◆◆}
D 组	26.630±0.535 ^{▲▲}	0.581±0.010 ^{▲▲}	0.098±0.009 ^{▲▲}	0.616±0.009 ^{▲▲}

注:与 A 组相比, $\triangle \triangle P < 0.01$;与 B 组比较 $\blacklozenge \blacklozenge P < 0.01$;与 C 组比较 $\blacktriangle \blacktriangle P < 0.01$ 。

3 讨论

胃黏膜在维持胃的生理功能中起着非常重要的作用,胃黏膜损伤为胃炎、胃溃疡及胃癌等相关胃病

的共同病理环节,胃黏膜损伤的快速恢复是防治胃部疾病的关键,胃黏膜损伤除了外部刺激外还由于自身防御、修复力下降导致,因此在注重外部刺激侵袭因素之外,自身的防御修复功能也同等重要。胃黏膜

损伤的修复主要通过损伤后的上皮移行及细胞增生来实现。而多种保护因子参与了胃黏膜的细胞增值修复的过程,增强了胃黏膜的保护及防御作用^[14-16]。

EGF为胃黏膜的保护因子,能够促进胃黏膜的损伤增值修复与分化,有研究^[17-19]表明EGF能够抑制胃酸分泌,使胃黏膜免受外来不良刺激因子的侵害来保护胃黏膜的完整性,TGF- α 是EGF家族细胞修复增值的另一种调节肽,促进多种细胞的有丝分裂,能够与受体EGFR结合,将细胞分裂信号传导到细胞内,为细胞增值分化中的内源性保护因子,能够调节胃黏膜上皮细胞的增值分化,所以TGF- α 也被称为“黏膜完整肽”。本实验中无水乙醇灌胃后,模型组大鼠胃黏膜组织中EGF、TGF- α 的含量升高($P<0.01$),说明了模型大鼠胃黏膜损伤后出现了细胞增殖修复反应。经针刺预处理后,胃黏膜组织中($P<0.01$),故认为TFF3参与了无水乙醇灌胃所致的大鼠胃黏膜损伤的修复反应。雷毅军等^[20]认为TFF3能引起转化生长因子TGF- α 的释放,并与其特异性受体表皮生长因子受体EGFR结合,所以可认为TFF3主要是通过与TGF- α 、EGF的共同作用来增强胃黏膜的修复能力。

急性胃黏膜损伤属中医“胃痛”“呕吐”“吐酸”“痞满”等范畴。中医治疗方法宜和胃止痛。针刺治疗为我国中医传统治疗方法之一,针刺预处理是指在疾病未发生之前,通过提前运用针刺刺激某些特定穴位,来激发机体潜在的抗病能力的一种以预防疾病发生或减轻疾病损害为主的方法,为中医治未病的重要手段。本实验主要研究针刺预处理对急性胃黏膜损伤的预防保护作用。

足三里穴为足阳明胃经之合穴,又为胃腑之下合穴。故胃腑有病,当首选足三里。《灵枢》中有:“邪在脾胃,则病肌肉痛,阳气有余,阴气不足,则热中善饥;阳气不足,阴气有余,则寒中肠鸣腹痛。”《四总穴歌》中有:“肚腹三里留。”《马丹阳十二穴歌》中有:“能通心腹胀,善治胃中寒,肠鸣并泄泻。”《灵枢》中指出:“合治内府”,这都说明足三里在胃肠疾病中的作用至关重要。现代研究也证明足三里穴能够防治

胃系疾病^[21-23]。中脘穴别名上纪、太仓、胃脘。属任脉。又为胃之募穴。八会穴之腑会。故可用治一切腑病。尤为胃腑优先。《针灸甲乙经》:“胃胀者,腹满胃脘痛,鼻闻焦臭,妨于食,大便难”,“心痛有塞,难以俯仰,心病冲胃,死不如人”,“腹胀不通,寒中伤饱,食欲不化”。而中脘穴又位居心蔽骨与脐连线的正中,内部适当胃的中部,所以能治疗胃部疾病。足三里与中脘配伍,属“合募配穴”,针灸足三里、中脘穴可和胃健脾、通腑降气,二穴配伍能治疗腹胀、腹痛、胃脘痛、急慢性胃炎等疾病。现代研究也表明中脘配足三里能够健脾和胃,治疗各种胃系疾病^[24-27]。刘琼等^[28]证明艾灸梁门、足三里穴能够增强急性胃黏膜损伤大鼠胃黏膜内细胞增值修复能力。易受乡等^[29]也证明艾灸足三里、梁门穴预处理可减轻急性胃黏膜大鼠胃黏膜组织的损伤程度。综上所述本实验选取“足三里”“中脘”二穴,主要在于二者在主治上都能治疗胃部疾病,合用更能增强疗效。

本实验结果表明针刺预处理足三里、中脘穴可通过上调急性胃黏膜损伤大鼠胃黏膜损伤指数及EGF、TGF- α 含量,使TFF3的含量恢复正常水平,维持TFF3的正常表达,来促进胃黏膜损伤的增值修复能力。可认为针刺足三里、中脘穴可刺激机体经气,从而启动了机体的内源性保护机制,调动了机体的自我反馈和调节反应,并可诱导TFF3与EGF、TGF- α 共同作用,增强了胃黏膜的增值修复能力。且针刺穴位组的治疗效果优于针刺非穴组,说明针刺足三里、中脘穴对促进胃黏膜损伤修复具有穴位特异性。

参考文献:

- [1] ZHENG S Q, HONG X D, CHEN T S, et al. Effects of caspase-1 inhibitor VX765 on cold-restraint stress-induced acute gastric ulcer in mice[J]. Zhonghua Shao Shang Za Zhi, 2017, 33(11): 688-693.
- [2] KOU N, XUE M, YANG L, et al. Panaxquinquefoliussaponins combined with dual antiplatelet drug therapy alleviate gastric mucosal injury and thrombogenesis through the COX/PG pathway in a rat model of acute myocardial infarction[J]. PLoS One,

- 2018,13(3): e0194082.
- [3] 向丽婷,李飞,刘芳,等.从迷走神经通路研究艾灸对胃粘膜损伤修复机制的研究进展[J].针灸临床杂志,2016,32(7):84-87.
- [4] 易受乡,彭艳,常小荣,等.艾灸对应激性胃溃疡大鼠胃粘膜细胞增殖和凋亡的影响及其与热休克蛋白表达关系的研究[J].针刺研究,2006,31(5):259-263.
- [5] 彭亮,刘密,常小荣,等.孤束核损毁对艾灸预处理调节大鼠胃黏膜 EGF、SS 含量及 HSP-70 表达作用的影响[J].中华中医药杂志,2013,28(12):3688-3693.
- [6] 李飞.孤束核损毁对艾灸“足三里”穴调节胃粘膜损伤模型大鼠 Bcl-2/Bax 和 HSP70 蛋白合成的影响[D].长沙:湖南中医药大学,2017:1-7.
- [7] 张瑞.电针对 CIA 模型大鼠 TNF- α 、IL-1 β 和 ICAM-1 影响的实验研究[D].北京:北京中医药大学,2016:3-10.
- [8] 黎喜平,严洁.针灸对胃粘膜损伤保护作用机制的研究进展[J].针刺研究,2005,30(1):60-63.
- [9] HORIKAWA Y, MIMORI N, MIZUTAMARI H, et al. Proper muscle layer damage affects ulcer healing after gastric endoscopic submucosal dissection[J]. Dig Endosc,2015,27(7): 747-753.
- [10] SUEMORI S, LYNCH-DEVANEY K, PODOLSKY D K. Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1991,88(24): 11017-11021.
- [11] 王禄增,王捷,贺争鸣,等.起草“关于善待实验动物的指导性意见”草案溯源的探讨[J].中国比较医学杂志,2007,17(8):534-537.
- [12] 李忠仁.实验针灸学[M].北京:中国中医药出版社,2007:56.
- [13] 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[J].中华中医药杂志,2014,29(6):2001-2003.
- [14] 郭礼娜,刘薇薇,谭成富,等.艾灸、电针预处理对急性胃黏膜损伤大鼠 TGF- α 、PCNA 的影响[J].湖南中医药大学学报,2016,36(4):45-48.
- [15] 薛翔,时南.肠三叶因子对胃肠道保护作用的研究进展[J].医学研究生学报,2014,27(4):439-443.
- [16] 唐忠辉,陈华生,邹宗楷,等.TFF3 和 CD147 在不同胃黏膜病变中的表达及其与血管生成的关系[J].世界华人消化杂志,2008,16(32):3631-3636.
- [17] 王晓颖,盛强,索玉平,等.不同针灸方法逆转环磷酰胺致大鼠胃黏膜损害的实验研究[J].实用医技杂志,2012,19(6):585-586.
- [18] 赵伟国,李冀,柴剑波,等.大黄黄连泻心汤、理中丸对醋酸涂抹型胃溃疡寒、热证大鼠模型胃组织 EGF、TGF- α 的影响[J].辽宁中医杂志,2012,39(1):49-52.
- [19] 胡素敏,张小萍,谢斌,等.张氏益胃汤对乙酸性胃溃疡大鼠生长因子的影响[J].江西中医学院学报,2010,22(5):64-66.
- [20] 雷毅军.基于 PAR/TFF 介导的 ERK 信号转导途径研究艾灸预处理对急性胃黏膜损伤的保护机制[D].长沙:湖南中医药大学,2015:64.
- [21] 薛亚楠,曲怡,王建波,等.电针双侧“足三里”穴对脾气虚模型大鼠小肠及下丘脑组织促生长素和血管活性肠肽表达影响的研究[J].中华中医药学刊,2017,35(8):2081-2084.
- [22] 殷茵,余芝,原萌谦,等.电针足三里、中脘对 M 受体基因敲除小鼠胃运动的时效差异研究[J].时珍国医国药,2017,28(3):731-733.
- [23] 向娟,陈果,欧阳里知,等.艾灸“足三里”对胃黏膜损伤大鼠内源性保护因子含量及相关蛋白表达的影响[J].北京中医药大学学报,2016,39(5):406-412.
- [24] 邢家铭,盛雪燕,张延菊,等.合募配穴理论在针灸治疗胃溃疡中的应用[J].时珍国医国药,2016,27(2):411-413.
- [25] 杨兆坤.电针足三里或中脘穴对急性胃黏膜损伤大鼠胃感觉和运动的调控[D].北京:中国中医科学院,2015:65.
- [26] 林亚平,易受乡,彭宏,等.艾灸对急性胃黏膜损伤大鼠 HSP60、HSP70 表达的影响[J].中国现代医学杂志,2012,22(20):5-8.
- [27] 孟醒,齐淑兰.针灸治疗消化性溃疡病的选穴规律研究[J].中国针灸,2016,36(4):437-441.
- [28] 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[J].中医杂志,2014,55(24):2129-2133.
- [29] 易受乡,彭艳,常小荣,等.艾灸足三里、梁门穴对应激性溃疡大鼠胃黏膜细胞凋亡的干预作用[J].世界华人消化杂志,2006,14(33):3163-3168.

(本文编辑 匡静之)