

针刺对胃黏膜损伤家兔表皮生长因子、生长抑素及生长抑素受体基因表达的影响

易受乡, 阳仁达, 严洁, 常小荣, 林亚平

易受乡, 阳仁达, 严洁, 常小荣, 林亚平, 湖南中医学院针灸推拿系 湖南省长沙市 410007
国家自然科学基金资助课题, No. 30171136
湖南省教育厅资助课题, No. 01A013
项目负责人: 易受乡, 410007, 湖南省长沙市韶山中路 113 号, 湖南中医学院针灸推拿系. yishouxian@yahoo.com
电话: 0731-5381161 传真: 0731-5557891
收稿日期: 2003-12-10 接受日期: 2004-02-18

摘要

目的: 为了证实针刺足阳明经对胃黏膜损伤的保护作用, 对表皮生长因子(EGF)、生长抑素(SS)及生长抑素受体基因(SSR₁ mRNA)表达影响, 从多层次探讨经脉-脏腑相关的特异性。

方法: 40 只家兔随机分为: A 对照组, B 胃溃疡模型组, C 足阳明胃经(胃经)组, D 足少阳胆经(胆经)组, E 足太阳膀胱经(膀胱经)组。乙醇灌胃造成家兔胃溃疡模型后, 采用经络刺激仪对 C - E 组分别针刺胃经、胆经、膀胱经(穴) 7 d。治疗结束后测定以上各组胃黏膜损伤指数, 用放射免疫及 RT - PCR 法分别测定胃黏膜 EGF、SS 及 SSR₁ mRNA 表达。

结果: 模型组 EGF 含量(73.6 ± 14.8)较正常组(91.3 ± 14.9)明显降低($P < 0.01$); 胃黏膜损伤指数(24.88 ± 6.29)、SS 含量(2978.6 ± 587.6)及 SSR₁ mRNA 表达(2.56 ± 0.25)较正常组(8.50 ± 2.98)、(1852.4 ± 361.7)、(1.04 ± 0.36)显著升高($P < 0.01$)。胃经组 EGF(92.2 ± 6.7)、胃黏膜损伤指数(10.88 ± 3.23)、SS 含量(1800.2 ± 488.1)及 SSR₁ mRNA 表达(1.07 ± 0.08)与模型组比较有显著差异($P < 0.01$)。但胆经及膀胱经组与模型组比较上述指标未得到改善, 与胃经组比较有显著差异($P < 0.01$ 或 0.05)。

结论: 针刺足三阳经对家兔胃黏膜损伤的保护作用以胃经组的作用最强, 其机制可能是通过调整有关脑肠肽及生长抑素受体基因表达有关。上述结果为经脉-脏腑相关的特异性提供了一定实验依据。

易受乡, 阳仁达, 严洁, 常小荣, 林亚平. 针刺对胃黏膜损伤家兔表皮生长因子、生长抑素及生长抑素受体基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2004; 12(7): 1721 - 1723

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1721.asp>

0 引言

在以往的研究中发现, 针刺足阳明经穴对家兔胃黏膜损伤有明显的保护作用^[1], 为进一步探讨其作用机制

及经脉作用的特异性, 本研究以实验性胃溃疡家兔为模型, 比较了针刺足阳明、足少阳及足太阳等不同经脉(穴位)对家兔胃黏膜损伤指数、相关脑肠肽及胃黏膜生长抑素受体基因表达的影响, 力求从多层次、多水平探讨足阳明经与胃相关的规律性。

1 材料和方法

1.1 材料 TRIZOL 试剂(GZBCO BRL 公司), 逆转录试剂盒, Tag DNA 聚合酶(Progemo 公司)。表皮生长因子(EGF)和生长抑素(SS)放免试剂盒由北京华英放免技术研究所提供。Eppendorf 低温冷冻离心机, Strategene Eagle Eye 图像分析处理系统(美国 STRATAGENE 公司), 玄手牌经络疏通仪(中国和平经济技术咨询公司)

1.2 方法

1.2.1 实验性胃溃疡模型制备 采用乙醇造模法^[2]。动物禁食 48 h, 用无水乙醇按 2.35 mL/kg 体重剂量灌胃造模, 24 h 后恢复普通饮食, 对照组用等量生理盐水灌胃。

1.2.2 动物分组及处理方法 新西兰纯种家兔 40 只, 体重 1.5 - 2.5 kg, 月龄 3 - 4 mo, 雌雄兼用, 由本院实验动物中心提供。将 40 只家兔随机分为 5 组, 每组 8 只。即 A: 空白对照组(空白组); B: 胃溃疡模型组(模型组); C: 针刺足阳明经穴组(胃经组); D: 针刺足少阳经穴组(胆经组); E: 针刺足太阳经穴组(膀胱经组)。A 组采用生理盐水灌胃, B - E 组采用无水乙醇灌胃造模, 造模后 C - E 组分别针刺胃经、胆经及膀胱经各 7 d。疗程结束后各组动物处死, 摘取胃黏膜作指标检测。

1.2.3 穴位定位与针刺方法 穴位定位参照《实验针灸学》^[3]常用实验动物的针灸穴位定位及拟人比照法^[4]制订。足阳明经取“内庭”、“解溪”、“足三里”、“梁丘”、“天枢”、“梁门”6 个穴位为刺激点, 其他经脉均以此为参照, 选取同水平段上相应部位的穴(点)为对照刺激点。针刺方法: 采用玄手牌经络疏通仪行循经逐点动态刺激法^[5]。仪器启动后进入编程状态: 选择单向运行时序, 步进速度为 0.5 s。刺激参数选择双向脉冲、连续波, 频率 50 Hz, 波宽 0.5 ms。将仪器输出夹分别夹在沿体表所选经脉穴位固定的 6 根不锈钢的针柄上, 使刺激兴奋顺序由下肢传向躯干, 反复运行, 输出强度控制在“2 - 3”档之间。针刺每日 1 次, 每次刺激时间均为 30 min, 连续 7 d。

1.2.4 指标检测

1.2.4.1 胃黏膜损伤指数 针刺治疗 7 d 后动物处死, 剖腹取出胃, 从幽门至贲门剪开胃, 清洗胃内容物, 依

照 Guth 记分法^[6]计算胃黏膜损伤指数。

1.2.4.2 EGF、SS 测定 胃黏膜组织匀浆后,按试剂盒要求处理标本,采用放射免疫法检测 EGF、SS 含量。

1.2.4.3 SSR₁ mRNA 表达水平测定 SSR₁ mRNA 表达水平采用 RT-PCR 法: (1)RNA 的提取与纯化:用消毒手术刀切取胃黏膜组织1小块,置于盛有液氮的研钵中研磨成细粉,采用 Trizol 试剂盒,以一步法提取组织总 RNA。电泳可见明显的 28S、18S、5S rRNA 条带,所有样本总 RNA 的 A260/A280 比值在 1.7-1.95 之间。(2)逆转录(RT)反应:以 Oligo(dT)₁₈ 为引物(30 pmol/L)于 65 °C, 5 min 逆转录 2 μg 总 RNA 样品中的 mRNA 为 cDNA, 20 μL 逆转录反应体系中含 20 u RNA 酶抑制剂(Promega 公司)、0.5 mmol/L dNTP, 10 u AMV 逆转录酶及 5 × RT 缓冲液。(3)聚合酶链反应(PCR):用下列引物(由上海博亚公司提供)进行 PCR 反应。SSR₁(生长抑素受体有 5 个亚型,本实验只做在胃黏膜表达最强的第 1 个,即 SSR₁)有义引物为: 5' -CAAGACGACGCCACCGTGAGCCA-3', 反义引物为: 5' -GGGGTTGGCAGCTGTTG-3'; 内对照亲环素蛋白(Cyclophilin, cyc)有义引物为: 5' -CCATCGTGTTCATCAAGGACTTCAT-3', 反义引物为: 5' -TTGCCATCCAGCCAGGAGGTCT-3'。50 μL PCR 反应体系中含 10 × PCR 反应缓冲液 5 μL, MgCl₂ 1.5 mol/L, dNTP 200 μmol/L, 模板 cDNA 5 μL, 特异引物均为 0.1 mmol/L, Taq DNA 聚合酶 3 u, 石蜡油覆盖。SSR₁ 和 cyc cDNA 的 PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 26 个循环; 经最后一次循环后于 72 °C 再延伸 5 min。(4)电泳:取 10 μL × PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, SSR₁ 产物为 66 bp, cyc 产物为 216 bp, 经溴乙锭染色后,紫外灯下照相,并经图像识别分析系统进行电泳条带光密度扫描, SSR₁ mRNA 的相对表达水平用 SSR₁/cyc 的比值计算。

统计学处理 所有数据均以 mean±SD 表示,用 SPSS10.0 软件进行统计学处理。组间比较若方差齐时选择 LSD 法, 方差不齐时选择 DunnettT3 法进行方差分析和两两比较, P < 0.05 具有统计学意义。

2 结果

2.1 针刺对胃黏膜损伤指数影响 模型组胃黏膜损伤指数最高,与空白对照组比较具有显著性差异(P < 0.01)。电针治疗后,胃经组与模型组比较,损伤指数明显降低(P < 0.01),而其他各针刺组与模型组比较,无显著性差异(P > 0.05)。各电针治疗组之间比较,胃经组损伤指数明显低于针刺足少阳、足太阳经组(P < 0.01)(表 1)。说明:针刺足阳明经穴能显著降低实验性胃溃疡家兔胃黏膜损伤指数。

2.2 针刺对胃黏膜 EGF 及 SS 含量的影响 空白组胃黏膜 EGF 含量明显高于模型组,SS 含量明显低于模型组,且均有显著性差异(P < 0.01)。胃经组胃黏膜 EGF 含量明显

高于模型组及其他各针刺组,SS 含量明显低于模型组及其他各针刺组(P < 0.01 或 P < 0.05)(表 2)。说明:针刺足阳明经穴使胃溃疡家兔胃黏膜 EGF 含量明显升高,使 SS 含量明显降低。

表 1 各组胃黏膜损伤指数比较(mean±SD)

组别	n	胃黏膜损伤指数(记分法)
空白组	8	8.50 ± 2.98 ^b
模型组	8	24.88 ± 6.29 ^d
胃经组	8	10.88 ± 3.23 ^b
胆经组	8	19.38 ± 3.66 ^d
膀胱经组	8	24.13 ± 1.64 ^d

^bP < 0.01 vs 模型组; ^dP < 0.01 vs 胃经组。

表 2 各组胃黏膜 EGF、SS 含量比较(mean±SD)

组别	n	EGF(pg/mL)	SS (mIU/mL)
空白组	8	91.3 ± 14.9 ^b	1 852.4 ± 361.7 ^b
模型组	8	73.6 ± 14.8 ^d	2 978.6 ± 587.6 ^d
胃经组	8	92.2 ± 6.7 ^b	1 800.2 ± 488.1 ^b
胆经组	8	74.9 ± 9.0 ^d	2 441.0 ± 488.1 ^{ac}
膀胱经组	8	65.4 ± 12.8 ^d	2 592.7 ± 426.8 ^d

^aP < 0.05, ^bP < 0.01 vs 模型组; ^cP < 0.05, ^dP < 0.01 vs 胃经组。

2.3 针刺对胃黏膜 SSR₁ mRNA 表达的影响 空白组胃黏膜 SSR₁ mRNA 表达强度明显低于模型组,且二者有显著性差异(P < 0.01)。比较针刺不同经脉组对胃黏膜 SSR₁ mRNA 表达的影响,其减低程度依次为针刺足阳明经组 > 针刺足少阳经组 > 针刺足太阳经组,与胃经组比较有显著差异(P < 0.05 或 P < 0.01)(表 3)。说明:针刺足阳明经穴对实验性胃溃疡家兔生长抑素受体基因表达的抑制作用最强。

表 3 各组胃黏膜 SSR₁ mRNA 表达的比较(SSR₁/cyc)

组别	n	mean±SD
空白组	3	1.04 ± 0.36 ^b
模型组	3	2.56 ± 0.25 ^d
胃经组	3	1.07 ± 0.08 ^b
胆经组	3	1.73 ± 0.16 ^{ab}
膀胱经组	3	2.39 ± 0.39 ^d

^bP < 0.01 vs 模型组; ^aP < 0.05, ^dP < 0.01 vs 胃经组。

3 讨论

细胞保护(Cytoprotection)是指某些物质具有防止或明显减轻有害物质对消化道上皮细胞损伤和致坏死作用的能力,也包括拮抗溃疡作用。本研究显示针刺足阳明

经穴可降低胃黏膜损伤指数,说明对胃黏膜损伤具有一定的保护作用。

EGF 主要由唾液腺、十二指肠勃氏(Brunner)腺及胰腺分泌^[7],具有较强的抗酸性,能抵抗胃蛋白酶、胰蛋白酶和糜蛋白酶的破坏,抑制胃酸、胃蛋白酶分泌,增加胃黏膜细胞黏液产生,刺激黏膜上皮细胞增生,增加黏膜 DNA 合成,防止溃疡的形成^[8-10]。临床显示 EGF 可使胃、十二指肠溃疡愈合速度明显加快^[11-13]。本研究发现,针刺足阳明经穴能显著升高实验性胃溃疡家兔胃黏膜 EGF 的含量,且与模型组及其他各针刺组比较,有显著性差异。说明针刺足阳明经可能通过调整 EGF 促进胃黏膜的修复。

生长抑素是消化道中主要起抑制作用的激素,能抑制胃肠激素的释放与活性。生长抑素受体(SSR)广泛存在于胃肠道及中枢神经系统中,由5个亚型组成,其中 SSR₁ 在胃的表达最强。SS 由这些受体介导抑制胃泌素、组胺及胃酸的分泌,在胃酸的调节中起十分重要的作用。SS 还可抑制消化道血流及胃肠上皮细胞的增生^[14-16]。SS 在溃疡病中的变化,结果报告不一^[17-18]。认为溃疡病 SS 降低的理由是溃疡病胃黏膜 SS 贮存量及释放量减低,不足以制约胃酸,以至呈现高胃酸状态而引起溃疡;认为 SS 水平升高的理由是高胃酸状态反馈性刺激所出现的代偿机制,机体企图藉此加强对胃酸的抑制。本研究结果显示实验性胃溃疡家兔 SS 及 SSR₁ 表达升高,可能是由于代偿反馈所致。

Konturek et al^[19]发现胃黏膜 SS 可发挥生长抑制作用,拮抗许多 EGF 等生长因子的营养作用,抑制胃黏膜、胃肠上皮细胞增生和黏膜的愈合,因而在很大程度上抑制了实验性大鼠溃疡的愈合。Pfeiffer et al^[20]也发现:大鼠实验性胃溃疡愈合过程中表皮生长因子受体表达增多,而生长抑素受体表达减少,在溃疡灶部位甚至是持久性缺乏。本研究显示针刺足阳明经后 SS 及 SSR₁ 表达均较模型组低,一方面可能是由于针刺减轻了溃疡损伤,因而代偿反馈作用减弱;另一方面提示在溃疡愈合过程中,SS 对细胞增生作用减弱,意味着允许生长因子的营养性充分表现,从而促进溃疡愈合,对修复过程中是有益的表现^[21]。

本研究比较了针刺足三阳经穴对实验性胃溃疡家兔胃黏膜损伤保护作用的强弱,结果表明针刺足阳明经穴作用最强,足少阳经穴次之,足太阳经穴作用最差。说明:足阳明经与胃关系最为密切,足少阳经次之,足太阳经与胃的联系不密切。这一结果与传统经络理论及针灸临床实践相吻合,同时也再次证实了足阳明经与胃的相关特异性。

4 参考文献

- 1 严洁,常小荣,刘建华,邓常青,李铁浪,李江山,易受乡,林亚平.电针足阳明经穴对家兔胃黏膜损伤防御性保护作用的研究.中国针灸 2001;21:350-352
- 2 常小荣,严洁,李江山,林亚平,易受乡.针刺足阳明经穴对兔胃黏膜损伤前后胃运动功能的影响.中国针灸 2002;22:675-677
- 3 林文注,王佩.实验针灸学.第1版.上海:上海科学技术出版社,1999:279-291
- 4 易受乡,阳仁达,严洁,常小荣,林亚平,臧敬跃.逐点动态刺激足阳明经对大鼠胃黏膜损伤保护作用的实验观察.湖南中医学院学报 1996;16:53-56
- 5 易受乡,阳仁达,严洁,常小荣,林亚平,臧敬跃.胃经循经逐点动态刺激对家兔胃排空影响的观察.湖南中医学院学报 1995;15:50-53
- 6 Cuth PH, Aures D, Paulsen G. Topical aspirin plus HCL gastric lesions in the rats. Cytoprotective effect of prostaglandin, cimetidine, and probanthine. *Gastroenterology* 1979;76:88-93
- 7 Konturek JW, Bielanski W, Konturek SJ, Bogdal J, Oleksy J. Distribution and release of epidermal growth factor in man. *Gut* 1989;30:1194-1200
- 8 贾赤宇,陈璧. EGF, TGFβ₁, 抗 TGFβ₁ 中和抗体对大鼠深度烫伤创面愈合的影响. 第四军医大学学报 1999;20:427-430
- 9 Brazozowski T, Konturek SJ, Majka J, Dembinski A, Drozdowicz D. Epidermal growth factor, Polyamines, and prostaglandins in healing of stress-induced gastric lesions in rats. *Dig Dis Sci* 1993;38:276-283
- 10 Kelly SM, Hunter JO. Epidermal growth factor stimulates synthesis and secretion of mucus glycoproteins in human gastric mucosa. *Clin Sci (Lond)* 1990;79:425-427
- 11 Reeves JR, Richards RC, Cooke T. The effects of intracolonic EGF on mucosal growth and experimental carcinogenesis. *Br J Cancer* 1991;63:223-226
- 12 Challacombe DN, Wheeler EE. Trophic action of epidermal growth factor on human duodenal mucosa cultured in vitro. *Gut* 1991;32:991-993
- 13 杨春梅,陈寿坡.表皮生长因子对大鼠胃黏膜的保护作用及机制探讨.中华消化杂志 1996;16:200-203
- 14 McIntosh CHS. Gastrointestinal somatostatin: Distribution, secretion and physiological significance. *Life Sciences* 1985;37:2043-2058
- 15 Corness JD, Demchysyn LL, Seeman P, Van Tol HH, Srikant CB, Kent G, Patel YC, Niznik HB. A human somatostatin receptor (SSTR3), Located on chromosome 22, displays preferential affinity for somatostatin-14 like peptide. *FEBS Lett* 1993;321:279-284
- 16 陈元方, Yamada T. 胃肠肽类激素基础与临床. 第1版,北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997:257-266
- 17 冷恩仁,桂先勇,徐有奇,曹克荣,袁立功.胃十二指肠溃疡患者血浆生长抑素、胃泌素水平分析.第三军医大学学报 1991;13:387-388
- 18 黄跃,陈宏斌,林国伟,李剑英,张娅东,陈生兰,张明诚.胃黏膜组织激素与胃癌、消化性溃疡的相关性研究.胃肠病学和肝病学杂志 2002;11:156-158
- 19 Konturek SJ, Brzozowski T, Dembinski A, Warzecha Z, Konturek PK, Yanaihara N. Interaction of growth hormone-releasing factor and somatostatin on ulcer healing and mucosal growth in rats:role of gastrin and epidermal growth factor. *Digestion* 1988;41:121-128
- 20 Pfeiffer A, Kromer W, Friemann J, Ruge M, Herawi M, Schatzl M, Schwegler U, May B, Schatz H. Muscarinic receptors in gastric mucosa are increased in peptic ulcer disease. *Gut* 1995;36:813-818
- 21 王承党,萧树东,莫剑忠,张德中.氨对实验性胃溃疡大鼠胃黏膜生长抑素受体表达的影响.中华消化杂志 1998;18:124-125