

针刺血清对胃溃疡大鼠胃黏膜细胞磷脂酶C γ -1活性的影响

杨宗保, 严洁, 邹晓平, 易受乡, 常小荣, 林亚萍, 唐森

杨宗保, 严洁, 邹晓平, 易受乡, 常小荣, 林亚萍, 唐森, 湖南中医药大学针灸推拿学院 湖南省长沙市 410007
国家自然科学基金重大项目, No. 90209023
通讯作者: 严洁, 410007, 湖南省长沙市韶山中路113号, 湖南中医药大学针灸推拿学院, yj5381159@yahoo.com.cn
电话: 0731-5381159 传真: 0731-5381159
收稿日期: 2006-02-13 接受日期: 2006-02-18

Effect of acupuncture serum on activity of phospholipase C γ -1 in gastric mucosal cells of rats with gastric ulcer

Zong-Bao Yang, Jie Yan, Xiao-Ping Zou, Shou-Xiang Yi, Xiao-Rong Chang, Ya-Ping Lin, Sen Tang

Zong-Bao Yang, Jie Yan, Xiao-Ping Zou, Shou-Xiang Yi, Xiao-Rong Chang, Ya-Ping Lin, Sen Tang, Department of Acupuncture and Moxibustion, HuNan College of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 90209023

Correspondence to: Jie Yan, Department of Acupuncture and Moxibustion, HuNan College of Traditional Chinese Medicine, 113 Shaoshan Middle Road, Changsha 410007, China. yj5381159@yahoo.com.cn

Received: 2006-02-13 Accepted: 2006-02-18

Abstract

AIM: To observe the activity of phospholipase C γ -1 (PLC γ -1) in gastric mucosal cells of rats with gastric ulcer after treatment with acupuncture serum.

METHODS: Sixty rats were randomly divided into model serum (MS) group, gastric meridian serum (GMS) group, gallbladder meridian serum (GBMS) group, GMS plus PD153035 group and GBMS plus PD153035 group. Rat model of gastric ulcer was established by water immersion and restrained stress methods, and the gastric mucosal cells were separated by pronase digestion and then incubated by serum and inhibitor of epidermal growth factor receptor PD153035, respectively. The activity of PLC γ -1 in gastric mucosal cells was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: In comparison with that in MS

group (6.5 ± 0.3 nkat/g), the acupuncture serum in GMS group had a tendency to improve the activity of PLC γ -1 (13.0 ± 7.5 nkat/g) in gastric mucosal cells ($P = 0.01$), and this tendency existed in GBMS group (7.2 ± 1.8 nkat/g) but with no significant difference ($P > 0.05$). The activity of PLC γ -1 was also significantly higher in GMS group than that in GBMS group (7.2 ± 1.8 nkat/g, $P = 0.02$) or GMS plus PD153035 group (7.4 ± 2.7 nkat/g, $P = 0.02$).

CONCLUSION: The serum after acupuncture of gastric meridian can stimulate the PLC γ -1 activity in gastric mucous cells, and there is specific correlation of meridian and internal organ.

Key Words: Acupuncture; Serum; Gastric ulcer; Gastric mucosal cell; Phospholipase C γ -1

Yang ZB, Yan J, Zou XP, Yi SX, Chang XR, Lin YP, Tang S. Effect of acupuncture serum on activity of phospholipase C γ -1 in gastric mucosal cells of rats with gastric ulcer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(10):985-988

摘要

目的: 观察针刺胃经穴后的血清对胃溃疡大鼠胃黏膜细胞磷脂酶C γ -1(PLC γ -1)活性的影响。

方法: 大鼠60只随机分为溃疡血清组、胃经血清组、胆经血清组、胃经血清+PD153035组和胆经血清+PD153035组, 采用水浸束缚法制作胃溃疡模型, 利用链霉蛋白酶消化法分离胃黏膜细胞, 分别用表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂PD153035和血清孵育胃黏膜细胞, 应用酶联免疫吸附(ELISA)法检测PLC γ -1活性。

结果: 胃经血清组(13.0 ± 7.5 nkat/g)大鼠胃黏膜细胞PLC γ -1活性与溃疡血清组(6.5 ± 0.3 nkat/g)比较有显著性差异($P = 0.01$); 胃经血清组大鼠胃黏膜细胞PLC γ -1活性与胆经血清组(7.2 ± 1.8 nkat/g)比较有显著性差异($P = 0.02$); 胃经血清组大鼠胃黏膜细胞PLC γ -1活性与胃经血清+PD153035组(7.4 ± 2.7 nkat/g)比较有显著性差异($P = 0.02$)。

■背景资料

细胞信号转导在介导细胞的分裂和增殖过程中起着重要的作用。胃黏膜损伤是一种常见的病理过程, 针刺对其有很好的修复作用, 利用针刺血清学方法、动物实验等手段研究针刺参与胃黏膜损伤修复的信号转导机制是一种很重要的研究方法。

■研发前沿

表皮生长因子受体在介导胃黏膜损伤修复过程中具有重要作用, 关于表皮生长因子受体后的信号传导机制已成为目前细胞生物学的前沿和热点。

■创新盘点

本文采用针刺血清学的研究方法,发现针刺胃经穴后的血清能刺激胃黏膜细胞中PLC γ -1的活化,并且存在经脉-脏腑的特异性联系。

结论: 针刺胃经穴后的血清能刺激胃黏膜细胞中PLC γ -1的活化,并且存在经脉-脏腑的特异性联系。

关键词: 针刺; 血清; 胃溃疡; 胃黏膜细胞; PLC γ -1

杨宗保, 严洁, 邹晓平, 易受乡, 常小荣, 林亚萍, 唐森. 针刺血清对胃溃疡大鼠胃黏膜细胞磷脂酶C γ -1活性的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(10):985-988

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/985.asp>

0 引言

针刺疗法是祖国医学的传统治疗方法之一,其历史可追溯到三千多年前,近年来在西方发达国家作为一种补充替代疗法而备受人们青睐^[1-3]。经脉与脏腑相关是针刺理论中的重要内容之一,我们以往研究表明足阳明胃经与胃特异相关,针刺胃经上的“四白”穴、“足三里”穴,“梁门”穴对胃的运动、分泌以及胃黏膜损伤修复皆有明显的调节作用^[4],并且发现针刺胃经穴后所激发的经气可促使机体内脑肠肽类物质的释放,该效应物质作为细胞外信号分子作用于胃黏膜细胞,诱导细胞膜上EGFR及受体后信号转导通路的活化,最终导致细胞的生长和分裂^[5]。然而目前对针刺参与胃黏膜细胞分裂和增殖的信号转导机制仍未完全明了,细胞磷脂酶C γ -1(PLC γ -1)作为EGF受体后信号转导通路中的信号分子是否参与了针刺对胃黏膜损伤修复的信号转导过程,国内外尚未有报道,值得做进一步研究,我们拟借助针刺血清的研究方法^[6],观察针刺胃经穴后血清对胃溃疡大鼠胃黏膜细胞PLC γ -1的影响,以便为更深入揭示针刺作用的体液机制及其信号转导机制奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料 健康SD大鼠,雌雄不限,200-230 g,购自湖南农业大学实验动物中心。链霉蛋白酶(pronase)和DTT购自Merk公司;BSA购自Biosharp公司;DMEM购自Hyclone公司;Trypan blue购自Biomedicals公司;其他试剂均为市售化学纯;Elx800自动酶标仪(Bio-Tek Instruments, Inc);HEPES和PLC γ -1免疫测定试剂盒购自BIOSOURCE公司;缓冲液A(mmol/L: 0.5 NaH₂PO₄, 1.0 Na₂HPO₄, 20.0 NaHCO₃, 80.0 NaCl, 5.0 KCl, 50.0 HEPES, 11.0 glucose, 20 g/L BSA, 2.0 EDTA, pH 7.4);缓冲液B(mmol/L: 0.5 NaH₂PO₄, 1.0 Na₂HPO₄, 20.0 NaHCO₃, 80.0 NaCl,

5.0 KCl, 50.0 HEPES, 11.0 glucose, 10 g/L BSA, 1.0 CaCl₂, 1.5 MgCl₂, pH 7.4);缓冲液C(mmol/L: 80.0 NaCl, 0.5 NaH₂PO₄, 1.0 Na₂HPO₄, 20.0 NaHCO₃, 5.0 KCl, 50.0 HEPES, 11.0 glucose, 1 g/L BSA, 1.0 CaCl₂, 1.5 MgCl₂, 1.0 DTT, pH 7.4);MAP消化酶: pronase溶于缓冲液A(MA)中,浓度为1 g/L,临用前配置。细胞抽提缓冲液(mmol/L: 10 Tris, pH 7.4, 100 NaCl, 1 EDTA, 1 EGTA, 1 NaF, 20 Na₂P₂O₇, 2 Na₃VO₄, 10 g/L Triton X-100, 100 mL/L glycerol, 1 g/L SDS, 5 g/L deoxycholate, 1.0 PMSF)。血清制备及处理^[7]: 将各组大鼠按照试验程序要求处理后行颈动脉取血,移入离心管中,37℃下静置2 h,用离心机2 500 r/min离心10 min,用吸管小心吸取血清,将同组血清混合,过滤除菌,EP管分装,-20℃冻存。试验时将胃黏膜细胞悬浮液与10 μ mol/L PD153035共同孵育30 min,然后将1:10稀释度的血清在37℃下与胃黏膜细胞共同孵育30 min后观察血清对细胞效应的影响^[8-9]。

1.2 方法

1.2.1 动物模型及分组 动物模型拟采用目前较成熟的水浸束缚法^[10],实验动物造模前禁食不断水24 h,将大白鼠固定于木板上,将动物直立浸于23±1℃的恒温水槽中,液面保持在胸骨剑突水平,浸泡10 h。将60只大鼠随机分为溃疡血清组、胃经血清组、胆经血清组、胃经血清+PD153035组和胆经血清+PD153035组。每组皆随机选4只作为血清供体,另8只作为血清受体,胃经血清组由四白、梁门、足三里三个穴位组成,胆经血清组由阳白、日月、阳陵泉三个穴位组成,取穴采用华兴邦动物穴位谱并结合模拟人体经穴法^[11]进行。大鼠:足三里:膝关节后外侧,在腓骨小头下约5 mm处;梁门:腹正中线与乳头线之间的中线上,脐上4寸;四白:眶下缘正中;阳白:眶上缘正中;日月:锁骨中线上,第七肋骨下缘;阳陵泉:腓骨小头下方凹陷处。电针刺激用G6805型电针仪,疏密波,电针频率疏波4 Hz,密波20 Hz,强度以肌肉或针柄微颤为度,电针时间30 min。

1.2.2 大鼠胃黏膜细胞分离 采用链霉蛋白酶消化法分离胃黏膜细胞^[12],试验大鼠100 g/L乌拉坦10 mL/kg腹腔麻醉后,在剑突及以下3 cm作动物手术切口,用手术刀片切开腹腔,找到胃后在贲门和胃体部、幽门和胃窦部分别结扎,将胃取出,生理盐水冲洗,在胃底做一小切口,用玻璃棒将胃翻转,用生理盐水清洗掉胃内容物和血

■应用要点

本实验研究结果提示针刺胃经穴后提取的血清能明显增强胃黏膜细胞PLC γ -1的活性,说明针刺胃经穴对胃黏膜损伤的修复的确有体液机制的参与,其特异相关活性物质有待从蛋白质组学角度作进一步深入研究。

迹, 用纸将胃黏液擦干, 用注射器将消化酶注入胃袋, 每胃2.5 mL, 在胃底和胃体之间结扎, 将胃袋放入缓冲液A中, 37℃水浴消化90 min, 水浴振荡速度150次/min, 在30 min和60 min时换1次新鲜的缓冲液A. 整个过程缓冲液A中皆充以950 mL/L O₂+50 mL/L CO₂. 消化结束后将胃袋放入缓冲液B, 在室温下用磁力搅拌器轻轻搅拌60 min. 打下的细胞每10 min收集1次, 过200目筛, 3 000 r/min, 离心5 min, 沉淀用缓冲液C洗2次, 每次3 000 r/min, 离心5 min, 最后沉淀用移液枪充分吸打, 并用无血清的DMEM培养基悬浮, 使成单个游离胃黏膜细胞, 将细胞调至10⁹/L, 此为胃黏膜细胞悬浮液。

1.2.3 指标检测 将处理好的胃黏膜细胞用冰冷的PBS洗2次, 去掉上清液, 收集细胞沉淀物, 在冰上将细胞沉淀物溶解于细胞抽提缓冲液中30 min, 每隔10 min用涡流器震动1次(每1×10⁶个胃黏膜细胞加0.1 mL细胞抽提液), 然后将细胞抽提物移入超微离心管中, 在4℃下以13 000 g速度离心10 min, Lowry法测定膜蛋白含量。0孔加100 μ L “标准稀释缓冲溶液”, 空白孔不加样, 标准液、质控和样本各加100 μ L到相应孔内, 加样前样本用“标准稀释缓冲溶液”10倍稀释(10 μ L样本+90 μ L “标准稀释缓冲溶液”), 加样后轻敲酶标板边缘使充分混匀, 黏上密封膜后在室温(20-25℃)下孵育2 h, 弃孔内液体, 吸水纸上拍干, 洗板液洗4次, 吸水纸上拍干洗板液后每孔加入“抗PLC γ -1抗体溶液”(空白孔不加), 轻敲酶标板边缘使充分混匀, 黏上密封膜后在室温(20-25℃)下孵育1 h, 弃孔内液体, 吸水纸上拍干, 洗板液洗4次, 吸水纸上拍干洗板液后每孔加入100 μ L “抗兔IgG辣根过氧化物酶抗体工作液”(空白孔不加), 黏上密封膜后在室温(20-25℃)下孵育30 min, 弃孔内液体, 吸水纸上拍干, 洗板液洗4次, 吸水纸上拍干洗板液后每孔加入100 μ L “显色原液”(注: 加入后的液体将慢慢变蓝), 黏上密封膜后在室温(20-25℃)下避光孵育30 min, 每孔加入100 μ L终止液终止显色反应, 轻敲酶标板边缘使混匀, 此时孔内液体由蓝变黄色, 以空白孔作为对照孔(“清零”)在酶标仪上读取吸光度值(加入终止液后2 h内读吸光度值为最佳)。计算机自动拟合四参数曲线并计算样本内PLC γ -1浓度。

统计学处理 所有数据均以mean \pm SD表示, 采用SPSS 11.5统计软件进行单因素方差分析, 组间比较若方差齐时选择LSD法, 方差不齐时选

表1 各组大鼠胃黏膜细胞PLC γ -1活性比较(mean \pm SD)

分组	PLC γ -1活性(nkat/g)
溃疡血清	6.5 \pm 0.3 ^a
胃经血清	13.0 \pm 7.5
胆经血清	7.2 \pm 1.8 ^a
胃经血清+PD153035	7.4 \pm 2.7 ^a
胆经血清+PD153035	5.5 \pm 0.3

^aP<0.05 vs 胃经血清组。

择Dunnett T₃法进行方差分析和两两比较。

2 结果

大鼠胃黏膜细胞PLC γ -1活性 胃经血清组大鼠胃黏膜细胞PLC γ -1活性与溃疡血清组比较有显著性差异(P=0.01<0.05); 胃经血清组大鼠胃黏膜细胞PLC γ -1活性与胆经血清组比较有显著性差异(P=0.02<0.05); 胃经血清组大鼠胃黏膜细胞PLC γ -1活性与胃经血清+PD153035组比较有显著性差异(P=0.02<0.05)(表1)。

以上结果提示: 针刺胃经穴后提取的血清能明显提高胃溃疡大鼠胃黏膜细胞PLC γ -1活性, 经PD153035阻断EGF受体后其活性皆减退, 说明针刺后激发的经气可提高PLC γ -1的活性; 并且发现针刺胃经穴提取的血清与针刺胆经穴后提取的血清更加明显的增强PLC γ -1的活性, 说明经穴脏腑确实存在一定的特异性联系。

3 讨论

胃黏膜保护是指胃黏膜长期暴露于腔内各种理化因素的广泛变化而不受损伤的一种防御机制。参与黏膜防御的各种因素被看成是一个相互联系相互作用的网络体系, 美国Wallow将此网络体系分成5级, 第一级包括分泌到胃腔内的各种具有防御功能的物质; 第二级是指黏膜上皮细胞之间形成的紧密连接能显著抵抗氢离子的逆向扩散, 上皮一旦受损还能进行快速重建与修复; 第三级为黏膜的微循环; 第四级是指黏膜的免疫系统; 最后一级则是黏膜损伤时, 上皮和腺体的修复和生长。以往临床资料表明针刺足阳明经穴能增强胃黏膜的保护机制, 对胃肠疾病有很好的疗效, 实验研究显示针刺胃经穴位对胃电, 胃运动, 胃分泌, 胃黏膜血流量等均有明显调整作用, 并对胃黏膜损伤有很好的修复作用, 并且认为针刺对胃黏膜保护和修复效应与GAS, MTL, CCK, SP, VIP, SS等脑肠肽密切相关^[13-15]。

■名词解释

针刺血清: 是指从针刺处理后的人或动物体上采集到的血清, 作为效应物质加入到另一个反应系统中, 同在体或离体器官、组织、细胞或分子等靶目标接触, 通过他们的功能或形态学的改变, 直接地观察针刺处理后产生的效应。这比仅以症状体征的变化来评估针刺治疗的作用, 无论在观念或方法上都是重要的进步, 已引起了医药界人士的广泛关注。

■同行评价

本文探讨了针刺血清对胃溃疡大鼠胃黏膜细胞PLC γ -1活性的影响, 题目准确, 内容较先进, 设计合理, 结论可靠。

近年报道表皮生长因子受体(EGFR)在介导胃黏膜损伤修复过程中起着非常重要的作用, EGFR属于跨膜受体酪氨酸蛋白激酶家族, 他广泛分布于人体的上皮细胞膜上, 其信号可介导细胞的代谢、增殖、分化和迁移等生命现象^[16]。很多研究表明在胃黏膜损伤修复中有EGFR的高度表达, 对胃黏膜的保护及其损伤的修复有很重要的作用^[17], 故EGFR及其下游信号转导通路及胃黏膜损伤修复的关系日益受到人们的关注与重视, 其效应是配体与EGFR结合可引起erbB家族成员内部二聚体受体复合物的形成, 激活该受体的酪氨酸蛋白激酶, 结合一个ATP分子, 启动一系列级联反应, 与下游含有SH2和PTB区域的信号分子(如PLC γ -1)结合, 并进一步激活IP $_3$ /Ca $^{2+}$ 和DG/PKC双信号系统以及Ras信号通路, 导致受体本身及细胞内酪氨酸残基的磷酸化, 从而引起细胞的分裂增殖^[18]。针刺对胃黏膜损伤修复的信号转导机制是否通过EGFR介导PLC γ -1活化并进一步激活IP $_3$ /Ca $^{2+}$ 和DG/PKC双信号系统以及Ras信号通路目前尚未完全明了, 本试验结果提示针刺胃经穴后提取的血清能明显提高胃溃疡大鼠胃黏膜细胞PLC γ -1活性, 经PD153035阻断EGF受体后其活性皆减退, 说明针刺胃经穴在胃黏膜损伤的修复过程中的确有体液机制的参与, 并且针刺胃经穴后所激发的经气可能通过EGR受体介导PLC γ -1活化并进一步激活IP $_3$ /Ca $^{2+}$ 和DG/PKC双信号转导通路, 从而诱导胃黏膜细胞的增殖; 本研究还发现针刺对照点后提取的血清对胃溃疡大鼠胃黏膜细胞PLC γ -1的表达明显弱于针刺胃经穴提取的血清对胃溃疡大鼠胃黏膜细胞PLC γ -1的表达, 但高于正常血清对胃溃疡大鼠胃黏膜细胞PLC γ -1的表达, 说明经穴脏腑确实存在一定的特异性联系, 其血清中存在的相关物质基础及其作用机制有待作进一步研究。

4 参考文献

- 1 Sherman KJ, Cherkin DC, Eisenberg DM, Erro J, Hrbek A, Deyo RA. The practice of acupuncture:

- who are the providers and what do they do? *Ann Fam Med* 2005; 3: 151-158
- 2 Eisenberg DM, Cohen MH, Hrbek A, Grayzel J, Van Rompay MI, Cooper RA. Credentialing complementary and alternative medical providers. *Ann Intern Med* 2002; 137: 965-973
- 3 Lu W. Acupuncture for side effects of chemoradiation therapy in cancer patients. *Semin Oncol Nurs* 2005; 21: 190-195
- 4 Yue ZH, Yan J, Chang XR, Lin YP, Yi SX, Cao XP, Shen J. Effects of cake-separated moxibustion on ultrastructures of endothelial cells of aorta in the rabbit of hyperlipemia. *Zhongguo Zhenjiu* 2005; 25: 64-67
- 5 张泓, 易受乡, 严洁, 常小荣, 刘玉群, 林亚平, 邓元江. 电针足三阳经穴对家兔脑肠肽类物质影响的比较研究. *中国临床康复* 2004; 8: 2290-2291
- 6 马淑兰, 杨永清, 崔龙苹, 张英英, 王宇. 针刺血清对高嗜酸粒细胞血症大鼠外周嗜酸粒细胞数目的影响. *针刺研究* 2002; 27: 145-148
- 7 杨永清, 崔龙萍, 马淑兰, 陈汉平, 王宇, 金明明. 过敏性哮喘大鼠针刺血清的抗哮喘作用. *上海针灸杂志* 2002; 21: 42-43
- 8 李建玲, 易红, 冯雪萍, 陈主初, 肖志强. 大鼠胃黏膜细胞EGFR通过ERK-1/2信号传导通路激活AP-1. *中国医师杂志* 2003; 5: 1170-1172
- 9 李瑞午, 张静龄, 郭莹, 李翠红. 针刺血清对体外培养神经细胞内钙离子浓度的影响. *中西医结合学报* 2004; 2: 453-455
- 10 聂时南, 李兆申, 湛先保, 许国铭, 屠振兴, 龚燕芳, 满晓华. 乳癌相关肽在应激诱导的胃黏膜损伤中的修复作用. *胃肠病学* 2002; 7: 14-17
- 11 Lin WZ, Wang P. *Shiyan Zhenjiu Xue*. 1th edition. Shanghai: Shanghai Science and technology Publishing Press, 1999: 280-290
- 12 乔伟丽, 张咏梅, 阎长栋, 王琳. 改良的大鼠胃黏膜壁细胞分离方法. *徐州医学院学报* 2004; 24: 242-243
- 13 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: 1721-1723
- 14 李江山, 严洁, 常小荣. 电针足阳明经穴对家兔胃运动和胃动素的影响. *中国中医基础医学杂志* 2004; 10: 36-39
- 15 常小荣, 严洁, 林亚平, 易受乡, 刘辉. 针刺足阳明经穴对健康人血浆胃动素及胃泌素含量的影响. *中国中西医结合消化杂志* 2001; 9: 69-70
- 16 Mendelsohn J. Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1S-13S
- 17 Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2958-2970
- 18 Ford AC, Grandis JR. Targeting epidermal growth factor receptor in head and neck cancer. *Head Neck* 2003; 25: 67-73

电编 张敏 编辑 潘伯荣