

艾灸足三里和梁门穴诱导热休克蛋白70抗大鼠胃黏膜氧化损伤作用

常小荣, 彭娜, 易受乡, 彭艳, 严洁

常小荣, 彭娜, 易受乡, 彭艳, 严洁, 湖南省中医学院针灸推拿学院 湖南省长沙市 410007
国家自然科学基金资助项目, No. 30572310
湖南省自然科学基金资助项目, No. 05JJ4008
通讯作者: 常小荣, 410007, 湖南省长沙市韶山中路113号, 湖南中医学院针灸推拿学院. xrchang1956@sina.com
电话: 0735-5381163 传真: 0735-5557891
收稿日期: 2006-02-28 接受日期: 2006-03-11

Moxibustion at Zusanli and Liangmen prevents gastric mucosa from oxidation injury through inducing high expression of heat shock protein 70

Xiao-Rong Chang, Na Peng, Shou-Xiang Yi, Yan Peng, Jie Yan

Xiao-Rong Chang, Na Peng, Shou-Xiang Yi, Yan Peng, Jie Yan, College of Acupuncture and Massage, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China.

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30572310 and the Natural Science Foundation of Hunan Province, No. 05JJ4008

Correspondence to: Xiao-Rong Chang, College of Acupuncture and Massage, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, 113 Shaoshan Middle Road, Changsha 410007, Hunan Province, China. xrchang1956@sina.com

Received: 2006-02-28 Accepted: 2006-03-11

Abstract

AIM: To observe the effects of moxibustion at Zusanli and Liangmen on the expression of heat shock protein 70 (HSP70) in gastric mucosa in rats with stress-induced ulcer (SU), and explore the mechanism of moxibustion at the acupoints of Foot-Yangming meridian in preventing gastric mucosa from oxidative injury.

METHODS: A total of 60 Sprague Dawley rats were randomly averagely divided into blank group, model group, Zusanli and Liangmen moxibustion group and non-moxibustion control group. After 7 days of pretreatment, the rats, except those in blank group, received water restraint stress (WRS) to induce stress ulcer.

The gastric mucosal blood flow (GMBF) was measured by Laser Doppler Flowmetry (LDF) and the ulcer index (UI) was evaluated by Guth method. HSP70 expression and malondialdehyde (MDA) content in gastric mucosa were determined by immunohistochemical and thio-barbiturate technique.

RESULTS: Moxibustion at Zusanli and Liangmen obviously relieved gastric mucosal injury in SU rats, the UI value was markedly lower than that in the model and control group (14.100 ± 5.425 vs 26.800 ± 9.807 , 26.200 ± 7.729 , $P < 0.01$). At the same time, Moxibustion at Zusanli and Liangmen significantly induced HSP70 higher expression (0.133 ± 0.035 vs 0.077 ± 0.057 , 0.059 ± 0.038 , $P < 0.01$), decreased MDA content ($2.586 \pm 0.252 \mu\text{mol/L}$ vs 3.906 ± 0.768 , $3.464 \pm 1.502 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$) and increased GMBF ($279.827 \pm 172.862 \text{ mL/min}$ vs 139.489 ± 33.133 , $141.512 \pm 58.450 \text{ mL/min}$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Moxibustion at Zusanli and Liangmen can prevent gastric mucosa from oxidative injury through inducing high expression of HSP70 and decreasing mucosal MDA content, with the relative specificity of acupoints.

Key Words: Moxibustion; Zusanli; Liangmen; Heat shock protein 70; Malondialdehyde

Chang XR, Peng N, Yi SX, Peng Y, Yan J. Moxibustion at Zusanli and Liangmen prevents gastric mucosa from oxidation injury through inducing high expression of heat shock protein 70. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(35):3405-3408

摘要

目的: 观察艾灸足三里和梁门穴对应激性溃疡大鼠胃黏膜热休克蛋白70(HSP70)表达的影响, 探讨艾灸足阳明经穴抗胃黏膜氧化损伤的作用机制。

方法: 将SD大鼠60只完全随机平均分为空白组、模型组、艾灸足三里等穴组和艾灸非

■背景资料

热休克蛋白(HSPs)是一种细胞保护蛋白, 他参与重要的细胞生理活动, 是保护细胞的物质基础, 已成为胃黏膜保护机制的一个研究热点。故设法寻找一种没有毒副作用的HSPs诱导剂或方法, 诱导HSPs合成, 增加机体对细胞的保护过程, 已成为国内外研究的活跃领域。

■研发前沿

HSPs、针灸与胃黏膜保护有着密切关系, 具相关文献报道针灸能诱导HSPs的表达, 针灸对胃黏膜的保护是否与HSPs有关, 针灸是否能诱导HSPs的表达, 是我们研究的主要目的。

■创新盘点

本文不仅探讨了针灸保护胃黏膜是否与HSPs有关,还进一步阐明针灸启动内源性保护作用的内在机制,既能证明针灸防治疾病的科学价值,还能在中医药宝库中挖掘有效的HSPs诱导方法,激发机体内在抗病潜力,调动整体调节机能,达到防病保健的目的。

穴对照点组,采用水浸-束缚应激法制备应激性溃疡模型。按Guth法计算胃黏膜损伤指数(UI),用激光多普勒血流仪测定胃黏膜血流量(GMBF),用免疫组织化学法和硫代巴比妥酸染色法对处理后大鼠检测其胃黏膜HSP70的表达和丙二醛(MDA)的含量。

结果:与模型组和艾灸非穴组比较,艾灸足三里等穴可使应激性溃疡大鼠胃黏膜损伤指数明显下降(14.100 ± 5.425 vs 26.800 ± 9.807 , 26.200 ± 7.729 , $P < 0.01$), HSP70表达上调(0.133 ± 0.035 vs 0.077 ± 0.057 , 0.059 ± 0.038 , $P < 0.01$)、血流量增高(279.827 ± 172.862 mL/min vs 139.489 ± 33.133 , 141.512 ± 58.450 mL/min, $P < 0.05$)、MDA含量减少(2.586 ± 0.252 μ mol/L vs 3.906 ± 0.768 , 3.464 ± 1.502 μ mol/L, $P < 0.05$)。

结论:艾灸足三里和梁门穴能诱导胃黏膜HSP70高表达并降低MDA含量,以达到其抗氧化损伤作用,并有相对的穴位特异性。

关键词: 艾灸; 足三里; 梁门; 热休克蛋白70; 丙二醛

常小荣, 彭娜, 易受乡, 彭艳, 严洁. 艾灸足三里和梁门穴诱导热休克蛋白70抗大鼠胃黏膜氧化损伤作用. 世界华人消化杂志 2006;14(35):3405-3408

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3405.asp>

0 引言

大量临床和实验研究均表明,针灸通过对胃黏膜前列腺素E、血流量、胃液、胃运动和胃肠激素的影响而达到保护胃黏膜的作用^[1-5],但其机制并未彻底弄清。目前研究发现,一种细胞保护蛋白-热休克蛋白(HSPs)有很好的对抗应激损伤作用,其中HSP70是胃黏膜保护中一类重要蛋白^[6]。我们针对艾灸对胃黏膜是否具有抗氧化损伤作用,其作用是否与HSP70的诱导有关,进行了艾灸足三里和梁门诱导热休克蛋白70抗胃黏膜氧化损伤的实验研究。

1 材料和方法

1.1 材料 健康SD大鼠60只,雌雄各半,体质量200-250 g,由湖南农业大学动物科技学院提供。随机分为4组: A空白组, B模型组, C艾灸足三里等穴组, D艾灸非穴对照点组, 每组15只。兔抗大鼠热休克蛋白70(HSP70)亲和纯化抗体(武汉博士德公司); 即通用型SP系列检测试剂盒兔SP Kit(北京中山金桥生物技术有限公司); 棕黄色

DAB显色试剂盒(北京中山金桥生物技术有限公司); PBS缓冲液(武汉博士德公司); MDA检测试剂盒(解放军总医院科技开发中心放免所), 其余试剂均系国产分析纯。

1.2 方法 穴位定位参考林文注主编《实验针灸学》常用动物穴位定位法及拟人比照法。对照点设在梁门穴旁开1 cm和膝关节内侧与足三里平行的任意非穴处。所有大鼠捆绑于鼠板, A, B组不作处理, C, D组大鼠取单侧穴位, 定位剪毛, 艾炷黏于穴位或非穴对照点上点燃施灸, 每天每穴或非穴连续灸四壮, 总延时约半小时, 每日左右交替艾灸, 所有处理连续8 d。艾炷来源于苏州东方艾绒厂(“神灸300灸”, 东方一型)。预处理7 d后, 采用WRS法制作急性应激性溃疡模型^[7]。大鼠禁食不禁水24 h后, 束缚于鼠板上, 置于温度为20℃水中, 水面平胸骨剑突水平, 10 h后取出松绑。所有动物于造模后24 h, 用100 g/L乌拉坦以10 mL/kg ip麻醉。每组随机抽取5只大鼠, 取胃前, 先将幽门部用线结扎, 然后用注射器抽取40 g/L多聚甲醛3 mL, 自食道注入胃内, 拔出针头结扎贲门。在两结扎线的两端切断食管及十二指肠, 摘下全胃, 10 min后沿胃大弯剖开, 用冰生理盐水冲洗, 然后放入40 g/L多聚甲醛中4℃固定24 h, 石蜡包埋备用。其余大鼠剖腹取胃, 沿胃大弯剖开, 用冰生理盐水冲洗胃内残留物, 计数胃黏膜损伤指数后分析天平称质量, 按1.5 mL/400 mg加入生理盐水, 用玻璃匀浆机研磨40-50次, 制成胃黏膜组织匀浆, 35 000 r/min 4℃离心15 min, 取上清液, -20℃低温保存, 待测。

1.2.1 胃黏膜损伤指数(UI) 按GUTH法计算: 全胃各病灶长度之和为损伤指数, 以mm表示。损伤 ≤ 1 mm(包括糜烂点)为1分; $1 \text{ mm} < \text{损伤} \leq 2 \text{ mm}$ 为2分; $2 \text{ mm} < \text{损伤} \leq 3 \text{ mm}$ 为3分; $3 \text{ mm} < \text{损伤} \leq 4 \text{ mm}$ 为4分; $> 4 \text{ mm}$ 为5分; 损伤宽度 $> 2 \text{ mm}$ 者UI加倍。

1.2.2 GMBF 大鼠麻醉后, 从腹中线打开腹腔, 暴露胃, 采用美国BIOPAC公司生产的激光多普勒血流仪, 选用迷你型接触式探头, 血流计将采集的信号由MP150型模-数转换器转换成血流灌注量单位(blood perfusion unit, BPU), 其值输入计算机, 通过Acqknowledgev3.5软件进行曲线描记。测量时在大鼠胃大弯处剪一个2 cm小口, 将激光探头先后置于胃窦、胃底及胃大、小弯4点检测, 当显示器测量稳定后开始取值, 每只大鼠每点各测3次, 每次测15 s, 取稳定的曲线10 s算其平均值进行统计学分析。

■应用要点

本研究结果显示, 艾灸足三里等穴可使应激性溃疡大鼠胃黏膜损伤指数明显下降, 增高HSP70蛋白及其基因表达, 增加胃黏膜血流量, 降低MDA含量, 说明艾灸足三里等穴能通过增强HSP70的蛋白和基因表达, 达到对胃黏膜的保护作用, 并有一定的穴位特异性。

表 1 艾灸对胃黏膜UI, GMBF, MDA和HSP70的影响(mean ± SD)

分组	UI	GMBF (mL/min)	MDA (μmol/L)	HSP70 (面密度)
A组	12.000 ± 5.944 ^d	363.806 ± 168.551 ^d	2.925 ± 0.625 ^c	0.021 ± 0.010 ^c
B组	26.800 ± 9.807 ^b	139.489 ± 33.133 ^a	3.906 ± 0.768 ^a	0.077 ± 0.057 ^b
C组	14.100 ± 5.425	279.827 ± 172.862	2.586 ± 0.252	0.133 ± 0.035
D组	26.200 ± 7.729 ^b	141.512 ± 58.450 ^a	3.464 ± 1.502 ^a	0.059 ± 0.038 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs C组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs B组.

1.2.3 HSP70 采用SP法. (1)石蜡块间断连续切片(厚度4 μm)、烤片、常规脱蜡至水, 新鲜配置30 mL/L H₂O₂室温10 min, 蒸馏水洗3次; (2)切片入0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液微波炉高火加热至沸腾后断电, 间隔10 min反复两次; (3)滴加正常山羊血清封闭液, 室温湿盒20 min; (4)滴加适当稀释的兔HSP70抗体, 室温湿盒2 h; (5)滴加生物素化羊抗兔HSP70 IgG, 室温湿盒30 min; (6)滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液, 室温湿盒30 min, 从(4)-(6)步后均用0.01 mol/L PBS洗3min×3次; (7)DAB室温显色, 镜下控制显色时间; (8)苏木素轻度复染. 用PBS代替一抗作阴性对照, 染色结果采用MIAS医学图像分析系统, 光镜下10×40倍每张切片随机分析5个视野, 计其面密度, 取平均值.

1.2.4 MDA 按试剂盒说明书采用硫代巴比妥法检测.

统计学处理 实验结果以均数±标准差表示, 使用SPSS 11.5软件进行数据分析, 所用统计方法为单因素方差分析.

2 结果

2.1 艾灸对胃黏膜UI, GMBF, MDA的影响 所有大鼠经各种处理后, C组UI极显著低于B组和D组($P < 0.01$), 与A组比较无显著性差异($P > 0.05$), B组UI极显著高于A组($P < 0.01$); C组MDA明显低于B组($P < 0.05$), 与A组比较无显著性差异($P > 0.05$), B组MDA明显高于A组($P < 0.05$); C组GMBF明显高于B组($P < 0.05$), 与A组比较无显著性差异($P > 0.05$), B组GMBF明显低于A组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$, 表1).

2.2 艾灸对胃黏膜HSP70表达的影响 HSP70表达结果: 免疫组化标记后, HSP70阳性部位位于胞质, 呈棕黄色, 以胃腺部最明显. C组HSP70表达极显著高于B组($P < 0.01$)、明显高于D组($P < 0.05$), 与A组比较无显著性差异($P > 0.05$), B组

HSP70表达明显高于A组($P < 0.05$, 表1).

3 讨论

HSPs是生物体(或离体培养细胞)在不良环境因素作用下所产生的一组具有高度保守性的应激蛋白, 他普遍存在于整个生物界, 几乎所有的细胞均能合成HSPs. 大多数HSPs在因环境情况改变而被诱导, 如热损伤、缺血、氧化应激、射线、组织损伤、病毒、细菌及其产物等损伤因素及应激刺激以及某些化学物质作用下可被诱导^[8]. HSP70在大鼠诱导急慢性胃溃疡、慢性萎缩性胃炎、人胃癌的胃黏膜中均有过度表达, 而且以病变部位最明显^[9-11]. 这种过度表达, 通过增加胃黏膜血流量、促进细胞增殖、抑制胃黏膜细胞凋亡、保护细胞免受氧自由基损伤、加强胃黏膜细胞蛋白合成和细胞修复等机制而达到细胞保护作用以促进溃疡愈合^[12-17]. 艾灸作为一种生理性温热刺激原, 可诱导HSP70的产生, 作为免疫源激活免疫系统而治疗一些疾病^[18-19]. 从本实验研究结果看, 应激后(模型组)大鼠胃黏膜的HSP70表达均较未应激大鼠(空白组)增强($P < 0.05$), 而经艾灸预处理的大鼠在应激后其表达较模型组更显著($P < 0.01$), 胃黏膜的损伤程度也明显减轻($P < 0.01$). 说明, 艾灸预处理能通过诱导胃黏膜HSP70高表达而达到保护作用.

氧化应激是应激性胃黏膜损害的重要因素, 可能参与导致细胞凋亡, Allen法应激后3 h MDA即有显著变化, 6-12 h达高峰^[20], 并随着应激时间的延长, 机体产生的自由基大量增加, 活性增强的清除系统不足以及时将其清除掉致胃黏膜损伤^[21]. 电针足三里可降低血浆MDA, 影响氧自由基代谢水平, 抗应激损伤^[22]. 本实验结果中, B组胃黏膜MDA含量明显高于A组和C组($P < 0.05$), 显示艾灸可降低胃黏膜应激后增高的MDA, 达到抗氧化损伤的作用. 艾灸是借热力给人体以温热性刺激, 通过经络腧穴的作用, 以

■名词解释

HSPs: 一类在进化上高度保守的应激蛋白, 是生物细胞在受高温、缺血、病原体或其他多种损伤因素的应激刺激后发生热休克反应所产生的一组蛋白质. 根据分子量大小和各自的诱导条件不同, HSPs可分为不同家族, HSPs的主要功能是提高细胞对应激因素的耐受, 使细胞维持正常的生理功能, 增加细胞对致死性刺激的防御和适应力.

同行评价

文章的科学性、可读性较好,但是如果能在研究中进行二穴同时取与取一穴进行对比则更有意义。

达到治病、防病的一种方法。具有温通经络、行气活血、祛湿逐寒、消肿散结、回阳救逆及防病保健的作用。《医学入门》载:“药之不及,针之不到,必须灸之”。《名医别录》载:“艾叶苦,微温,无毒,主灸百病”。《孟子·离娄篇》有:“七年之病,求三年之艾”之说。现代大量的临床和实验研究证实,艾灸具有镇痛、改善血液循环、调整代谢紊乱、调节免疫功能和调整脏腑功能等作用^[23]。足三里穴是胃之下合穴、胃经之合穴,是治疗胃病的首选穴,《灵枢·四时气》记载“胃气逆则呕苦……取足三里以下胃气逆”,明·徐凤《针灸大全·马丹阳天星十二穴并治杂病歌》也指出足三里“善治胃中寒”,“合治内府”、《四总穴歌》“肚腹三里留”又是对其主治作用的经典概括。梁门穴也是足阳明胃经的又一重要穴位。本实验研究结果显示,与艾灸非穴对照点组比较,艾灸足三里、梁门穴组大鼠胃黏膜的HSP70表达均明显增强、MDA含量明显减少($P<0.05$)、胃黏膜损伤程度明显减轻($P<0.01$)。由此可看出,足三里和梁门穴在抗胃黏膜氧化损伤作用上有一定的穴位特异性,为临床运用艾灸治疗消化系统疾患提供了科学依据。

参考文献

- 乔雪峰, 殷克敬. 艾灸对大鼠实验性胃溃疡的治疗作用及其机理研究. 针刺研究 1992; 4: 270-273
- 江庆洪, 许文波, 杨丹红. 艾灸对大鼠胃粘膜血流量的影响及与胃肠激素的关系. 现代康复 2000; 4: 40-41
- 孙世晓, 王新梅, 张江红. 艾灸猫“足三里”穴增强胃运动的中枢作用机理研究. 针灸临床杂志 2001; 17: 53-54
- 王世勇, 陈曦, 高权国. 艾灸治疗肠道易激综合征(IRS)30例临床观察. 针灸临床杂志 2003; 19: 43-44
- 孙华. 温针灸在术后胃瘫治疗中的作用. 针灸临床杂志 2003; 19: 38-40
- Bunce MW, Gonzales ML, Anderson RA. Stress-ING out: phosphoinositides mediate the cellular stress response. *Sci STKE* 2006; 2006: pe46
- 聂时南, 李兆申, 许国铭, 湛先保, 屠振兴, 龚燕芳. 肠三叶因子在胃黏膜应激适应性细胞保护中的作用. 中华消化杂志 2003; 23: 19-22
- Isomoto H, Oka M, Yano Y, Kanazawa Y, Soda H, Terada R, Yasutake T, Nakayama T, Shikuwa S, Takeshima F, Udono H, Murata I, Ohtsuka K, Kohno S. Expression of heat shock protein (Hsp) 70 and Hsp 40 in gastric cancer. *Cancer Lett* 2003; 198: 219-228
- Guo JS, Chau JF, Shen XZ, Cho CH, Luk JM, Koo MW. Over-expression of inducible heat shock protein 70 in the gastric mucosa of partially sleep-deprived rats. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 510-515
- Targosz A, Pierzchalski P, Krawiec A, Szczyrk U, Brzozowski T, Konturek SJ, Pawlik WW. Helicobacter pylori inhibits expression of heat shock protein 70 (HSP70) in human epithelial cell line. Importance of Cag A protein. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57: 265-278
- 贾长河, 张沂, 张玲霞, 徐俊荣, 江梅, 张宁霞, 曹广周. 热盐水所致大鼠萎缩性胃炎胃黏膜HSP及p53蛋白的表达. 世界华人消化杂志 2003; 11: 29-32
- Pierzchalski P, Krawiec A, Ptak-Belowska A, Baranska A, Konturek SJ, Pawlik WW. The mechanism of heat-shock protein 70 gene expression abolition in gastric epithelium caused by Helicobacter pylori infection. *Helicobacter* 2006; 11: 96-104
- Targosz A, Pierzchalski P, Krawiec A, Szczyrk U, Brzozowski T, Konturek SJ, Pawlik WW. Helicobacter pylori inhibits expression of heat shock protein 70 (HSP70) in human epithelial cell line. Importance of Cag A protein. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57: 265-278
- Wada I, Otaka M, Jin M, Odashima M, Komatsu K, Konishi N, Matsushashi T, Horikawa Y, Ohba R, Itoh H, Watanabe S. Expression of HSP72 in the gastric mucosa is regulated by gastric acid in rats-correlation of HSP72 expression with mucosal protection. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 349: 611-618
- Konturek PC, Brzozowski T, Ptak A, Kania J, Kwiecien S, Hahn EG, Konturek SJ. Nitric oxide releasing aspirin protects the gastric mucosa against stress and promotes healing of stress-induced gastric mucosal damage: role of heat shock protein 70. *Digestion* 2002; 66: 160-172
- Cesar JR, Yang J. Expression patterns of ubiquitin, heat shock protein 70, alpha-actin and beta-actin over the molt cycle in the abdominal muscle of marine shrimp Litopenaeus vannamei. *Mol Reprod Dev* 2006
- 陈国裕, 王志荣, 陈锡美. 热休克蛋白在胃黏膜保护中的作用. 世界华人消化杂志 2002; 10: 969-971
- 刘旭光, 宋开源, 郝亮, 余曙光, 黄迪君. 艾灸对实验性RA大鼠热休克蛋白(HSP70)表达的影响. 中医学刊 2003; 21: 1034-1039
- Otaka M, Konishi N, Odashima M, Jin M, Wada I, Matsushashi T, Horikawa Y, Ohba R, Watanabe S. Is Mongolian gerbil really adequate host animal for study of Helicobacter pylori infection-induced gastritis and cancer? *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 347: 297-300
- 王天懿, 朱玉群, 杨昭徐. 氧自由基和细胞凋亡在大鼠应激性溃疡中的作用. 中华现代内科学杂志 2005; 2: 492-493
- 许燕, 张芸. 应激时大鼠胃粘膜中MDA含量和CAT、Ca²⁺-ATPase活性的变化. 南京铁道医学院学报 2000; 19: 241-243
- 白艳丽, 张曼莉, 张养民, 陶秦瑜. 电针足三里对大鼠氧自由基和前列腺素的影响. 现代检验医学杂志 2002; 17: 16-18
- 谢莉莉, 刘光谱. 艾灸的治疗作用和机理研究进展. 针灸临床杂志 2000; 16: 55-57

电编 张敏 编辑 潘伯荣