

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

易受乡, 郁洁, 常小荣, 吴伋用, 李振海, 唐森, 周国祥, 王小顺

易受乡, 郁洁, 常小荣, 吴伋用, 李振海, 唐森, 周国祥, 王小顺, 湖南中医药大学针灸推拿学院 湖南省长沙市 410007

易受乡, 教授, 主要从事针灸治病机制研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30772707

作者贡献分布: 易受乡对此文作主要贡献; 此课题由易受乡与常小荣设计; 研究过程由郁洁、吴伋用、李振海、唐森、周国祥及王小顺操作完成; 数据分析由郁洁与吴伋用完成; 论文写作由易受乡与郁洁完成。

通讯作者: 易受乡, 410007, 湖南省长沙市韶山中路113号, 湖南中医药大学东塘校区, 针灸推拿学院. yishouxiang@yahoo.com.cn
电话: 0731-5381161

收稿日期: 2008-06-16 修回日期: 2008-07-26

接受日期: 2008-07-29 在线出版日期: 2008-08-28

Effect of moxibustion-induced up-regulation of HSP70 expression on mitochondrial signal transduction pathway during gastric mucosal cell apoptosis in rats

Shou-Xiang Yi, Jie Yu, Xiao-Rong Chang, Ji-Yong Wu, Zhen-Hai Li, Sen Tang, Guo-Xiang Zhou, Xiao-Shun Wang

Shou-Xiang Yi, Jie Yu, Xiao-Rong Chang, Ji-Yong Wu, Zhen-Hai Li, Sen Tang, Guo-Xiang Zhou, Xiao-Shun Wang, College of Acupuncture, Moxibustion and Massage, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30772707

Correspondence to: Professor Shou-Xiang Yi, College of Acupuncture, Moxibustion and Massage, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, 113 Shaoshan Middle Road, Changsha 410007, Hunan Province, China. yishouxiang@yahoo.com.cn

Received: 2008-06-16 Revised: 2008-07-26

Accepted: 2008-07-29 Published online: 2008-08-28

Abstract

AIM: To explore the mechanism of pre-moxibustion inhibiting cell apoptosis and protecting gastric mucosal damage.

METHODS: Thirty-two healthy rats were randomly and averagely assigned into 4 groups, namely control group (group A), model group (group B), moxibustion groups (group C and D, pre-moxibustion at acupoints and non-acupoints

respectively for 8 d). The models of acute gastric mucosal damage were established by gastric injection of absolute ethyl alcohol in all the rats except those in group A. Western blot was used to detect the expression of cytochrome C (Cyt-C) while immunohistochemical method was used to detect the expression of heat shock protein 70 (HSP70), apoptosis protease activator protein-1 (Apaf-1), Caspase-9 and Caspase-3 as well as cell apoptosis in gastric mucosa.

RESULTS: As compared with those in group A, the expression of HSP70, cell apoptosis index (AI), Cyt-C in cytoplasm, Apaf-1, Caspase-9, and Caspase-3 contents were significantly increased in group B (2.93 ± 0.29 vs 2.51 ± 0.22 ; 3.52 ± 0.77 vs 2.25 ± 0.53 ; 1.63 ± 0.36 vs 0.75 ± 0.23 ; 4.32 ± 0.67 vs 3.44 ± 0.86 ; 4.05 ± 1.01 vs 3.76 ± 0.82 ; 3.55 ± 0.86 vs 2.35 ± 0.71 ; $P < 0.01$ or 0.05). In comparison with those in group B, the expression of HSP70 (3.93 ± 0.36) was significantly increased ($P < 0.01$), but the AI (1.53 ± 0.45), Cyt-C in cytoplasm (0.97 ± 0.26), Apaf-1 (2.24 ± 0.49), Caspase-9 (2.43 ± 0.73), and Caspase-3 (1.97 ± 0.61) contents were significantly decreased in group C (all $P < 0.01$). In compared with those in group C, the expression of HSP70 (3.35 ± 0.34) was significantly decreased ($P < 0.01$), but the AI (3.06 ± 0.81), Cyt-C in cytoplasm (1.45 ± 0.29), Apaf-1 (3.16 ± 0.66), Caspase-9 (3.33 ± 0.76), and Caspase-3 (2.98 ± 0.86) contents were significantly increased in group D ($P < 0.01$ or 0.05).

CONCLUSION: Moxibustion may up-regulate the expression of HSP70 in gastric mucosa, and then act on the targets associated with mitochondrial signal transduction pathway to inhibit gastric mucosal cell apoptosis and protect gastric mucosa. And this protective effect is acupoint-specific to some extent.

Key Words: Moxibustion; Heat shock protein 70; Cell apoptosis; Mitochondrion; Cytochrome C; Caspase-9; Caspase-3; Immunohistochemistry

Yi SX, Yu J, Chang XR, Wu JY, Li ZH, Tang S, Zhou GX,

■背景资料

近年来研究表明, 针灸预处理具有“缺血预适应”的类似作用, 即能诱导机体内源性保护物质的释放, 激发机体自身保护潜能, 增强机体的适应性及抗损伤能力。该过程与中医扶正固本、“治未病”等理论有密切联系。而针灸的这种作用又与热休克蛋白(HSPs)有关。HSP70在保护心肺组织及中枢神经系统等免受内外源性损伤中发挥重要作用, 并对炎症、肿瘤、自身免疫过程均有重要调控作用。故寻找没有毒副作用的HSP70诱导剂或方法, 诱导HSP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。

■同行评议者

徐列明, 教授, 上海中医药大学附属曙光医院(东)肝二科

■研究前沿

艾灸预处理对HSP70表达及胃黏膜细胞凋亡有一定影响,但艾灸上调HSP70后通过什么途径来干预细胞凋亡并实现其对胃黏膜损伤的保护作用有待研究。线粒体信号转导途径是HSP70影响细胞凋亡的重要途径之一,该途径通过影响凋亡通路中线粒体膜通透性、凋亡诱导因子及调控因子等关键位点来干预细胞凋亡的进程。故揭示艾灸-热休克蛋白-线粒体信号通路-细胞凋亡-胃黏膜细胞保护的内在机制已成为中国传统医学中亟待探索的问题。

Wang XS. Effect of moxibustion-induced up-regulation of HSP70 expression on mitochondrial signal transduction pathway during gastric mucosal cell apoptosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(24): 2689-2694

摘要

目的: 探讨艾灸预处理抑制细胞凋亡、保护胃黏膜损伤的机制。

方法: 32只健康Wister大鼠随机分为4组,即捆绑组(A组)、模型组(B组)、艾灸穴位组(C组)和艾灸非穴位组(D组),每组8只。艾灸穴位组和艾灸非穴位组大鼠艾灸预处理8 d,捆绑组和模型组大鼠只捆绑,不艾灸。除捆绑组外,其余各组采用无水乙醇灌胃法制备大鼠急性胃黏膜损伤模型。采用Western blot法检测大鼠胃黏膜细胞色素C(Cyt-C)的表达,免疫组织化学方法检测大鼠胃黏膜HSP70、胃黏膜细胞凋亡、凋亡活化因子1(Apaf-1)、Caspase-9和Caspase-3的表达。

结果: 与A组相比,B组大鼠胃黏膜HSP70表达,胃黏膜细胞凋亡指数(AI),胞质Cyt-C、Apaf-1、Caspase-9和Caspase-3含量明显增加(2.93 ± 0.29 vs 2.51 ± 0.22 , 3.52 ± 0.77 vs 2.25 ± 0.53 , 1.63 ± 0.36 vs 0.75 ± 0.23 , 4.32 ± 0.67 vs 3.44 ± 0.86 , 4.05 ± 1.01 vs 3.76 ± 0.82 , 3.55 ± 0.86 vs 2.35 ± 0.71 , $P < 0.01$ 或 0.05)。与B组相比,C组大鼠胃黏膜HSP70表达(3.93 ± 0.36)明显增加($P < 0.01$),而细胞凋亡指数(1.53 ± 0.45),胞质Cyt-C(0.97 ± 0.26)、Apaf-1(2.24 ± 0.49)、Caspase-9(2.43 ± 0.73)、Caspase-3(1.97 ± 0.61)均显著降低($P < 0.01$)。与C组相比,D组大鼠胃黏膜HSP70表达(3.35 ± 0.34)显著降低($P < 0.01$),而凋亡指数(3.06 ± 0.81),Cyt-C(1.45 ± 0.29),Apaf-1(3.16 ± 0.66),Caspase-9(3.33 ± 0.76),Caspase-3(2.98 ± 0.86),显著升高($P < 0.01$ 或 0.05)。

结论: 艾灸通过上调大鼠胃黏膜细胞HSP70表达,继而作用于凋亡线粒体信号转导途径相关靶点,由此抑制胃黏膜细胞凋亡,达到保护胃黏膜损伤的作用,且这种保护作用具有一定的穴位特异性。

关键词: 艾灸; HSP70; 细胞凋亡; 线粒体; 细胞色素C; Caspase-9; Caspase-3; 免疫组化

易受乡, 郁洁, 常小荣, 吴俊用, 李振海, 唐森, 周国祥, 王小顺. 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. *世界华人消化杂志* 2008; 16(24): 2689-2694
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2689.asp>

0 引言

本组前期工作表明艾灸预处理可以诱导应激性胃溃疡大鼠胃黏膜HSP70大量表达,从而抑制大鼠胃黏膜细胞凋亡,保护损伤胃黏膜^[1-2]。但是艾灸抑制胃黏膜细胞凋亡的信号转导途径尚未见报道。故本研究从细胞凋亡线粒体信号转导通路入手,对艾灸促进胃黏膜HSP70表达上调对急性胃黏膜损伤细胞凋亡线粒体信号转导途径的相关作用靶点及其有关物质进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料 健康Wister大鼠32只,雌雄各半,体质量220-250 g,月龄3-4 mo.由河南实验动物中心提供(动物合格证号: scxk(豫)2005-0001)。艾条为中国南阳市卧龙汉医艾绒厂生产的“天然华佗念盈艾条”(型号: mg-454),规格: 18 mm×200 mm。自制简易艾灸支架。兔抗大鼠HSP70抗体、Caspase-9抗体、Caspase-3抗体、Apaf-1抗体、Cyt-c抗体(NeoMarkers);细胞凋亡免疫组化试剂盒(武汉博士德公司)。Poly-l-lysine、棕黄色DAB显色剂(北京中杉金桥生物技术有限公司);0.1 mol/L PBS、TBS缓冲液(武汉博士德公司)。细胞及组织总蛋白抽提试剂盒(KangChen, KC-415);BCA蛋白质定量试剂盒(KangChen, KC-430);生物素的标志的蛋白分子质量标准(KangChen, KC-410);KCTM化学发光试剂盒(KangChen, KC-420)。全部实验使用的吸头、容器等均高压灭菌。石蜡切片机(美国820型AO切片机);DHG-9246A型电热恒温鼓风干燥箱(上海精密实验设备有限公司);MIAS医学图像分析系统(北京航空航天大学)。低温离心机(上海安亭科学医学仪器厂);电泳仪(北京六一仪器厂);磁力搅拌器(太仓华美生化仪器厂);扫描仪(上海天能仪器有限公司);图像分析软件Image J。

1.2 方法

1.2.1 实验步骤: 所有大鼠按随机数字表法分为4组: A捆绑组, B模型组, C艾灸穴位组, D艾灸非穴位组, 每组8只。动物穴位定位法及拟人对照法定位参考文献[3]。足三里穴对照点取膝关节内侧与足三里同一水平的两经之间的非穴点。梁门穴对照点取梁门穴外侧旁开1 cm的两经之间的非穴点。所有大鼠捆绑于鼠板, A-B组每天捆绑约30 min; C-D组大鼠取单侧穴位, 定位剪毛, 将艾条固定于自制艾灸支架上, 使艾灸穴位孔(直径2-3 mm)垂直距离大鼠穴位或者非穴对照点约0.5 cm, 点燃施灸, 每天每穴艾灸约30 min。

各组每天处理后松绑, 回笼正常饲养, 连续处理8 d. 第8天, 所有处理完毕后将大鼠松绑回笼, 禁食不禁水24 h. 第9天B-D组均以无水乙醇按照0.6 mL/100 g剂量ig 2 h造成急性胃黏膜损伤模型^[4], A组大鼠同时以等量蒸馏水ig. 造模后, 全部大鼠仰卧位固定于鼠板, 迅速取出大鼠胃标本. 取胃前, 将幽门部和贲门部结扎, 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, 用冰生理盐水冲洗干净. 每组按随机数字表法随机抽取4个胃组织标本, 于标本胃窦部剪取组织一小块(约5 mm×10 mm), 迅速装入冻存管中入液氮罐, 用Western blot方法检测Cyt-c的表达; 剩余组织块与另外4个胃组织全部放入40 g/L多聚甲醛中4℃固定24 h, 石蜡包埋, 用免疫组化方法检测HSP70、Apaf-1、Caspase-9、Caspase-3和细胞凋亡.

1.2.2 HSP70、细胞凋亡指数、Apaf-1、Caspase-9和Caspase-3检测: HSP70、细胞凋亡指数、Apaf-1、Caspase-9和Caspase-3检测采用免疫组织化学法: (1)石蜡块间断连续切片(厚度4 μm)、烤片、常规脱蜡. 新鲜配置3% 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2次; (3)滴加正常山羊血清封闭液, 室温湿盒20 min; (4)滴加1:125稀释的兔HSP70多克隆抗体, 室温湿盒2 h; (5)滴加生物素化羊抗兔IgG, 室温湿盒30 min; (6)滴加辣根酶标志链霉卵白素工作液, 室温湿盒30 min. 除(1)、(3)外, 其余每步后均用0.1 mol/L PBS洗3 min×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. 细胞凋亡检测按博士德公司凋亡试剂盒说明书处理, 阳性判断标准为细胞核中出现棕黄色细颗粒, 阳性细胞计数采用MIAS医学图像分析系统进行测定, 每张切片随机选取5个高倍视野(10×40倍), 计算细胞凋亡的数密度(阳性细胞数/统计场面积, 单位: 个/μm², 由MIAS系统自动设定), 取其平均值, 细胞凋亡数密度设定为细胞凋亡指数(AI)^[1]. HSP70、Apaf-1、Caspase-9和Caspase-3蛋白阳性判定标准为细胞质中出现棕黄色细颗粒状, 图像分析及计数方法同上.

1.2.3 细胞色素C(Cyt-c)表达测定: 采用Western blot方法检测. (1)切一小块放入管中. 加入预冷的含抑制剂的蛋白质抽提试剂, 匀浆, 离心15 min; (2)配置BCA工作液. 分别吸25 μL标准品和2.5 μL待测样品至微孔板对应孔中, 并加入

22.5 μL稀释液; (3)SDS-PAGE电泳: 制备分离胶(pH8.8)和积层胶(pH6.8), 加入电泳缓冲液, 上样, 电泳; (4)蛋白质转移: 以吸水纸-滤纸-凝胶-PVDF膜-滤纸-吸水纸的顺序装配于转移装置上. 30 mA恒流条件下, 4℃转移过夜; (5)膜在5% BSA溶液中室温孵育1 h以封闭膜上的非特异结合. KCTM化学发光试剂盒中两种试剂等比例混合为反应液. 将膜置于反应液中室温孵育5 min, 去除过量的溶液, 将膜夹在两塑料薄膜之间, 以X光胶片曝光. 每张膜上做一种目的蛋白和相应的内参蛋白. 图片扫描保存为电脑文件, 并用ImageJ分析软件将图片上每个特异条带灰度值数字化.

统计学处理 所有数据用mean±SD表示, 并进行正态性检验. 符合正态分布者, 多组计量资料采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 方差齐者用LSD和SNK法, 方差不齐者用Tamhane's T2或Dunnett's T3法; 不符合正态分布, 采用多个独立样本比较的秩和检验(K Independent Samples). 所有数据使用SPSS11.5 for Windows软件进行处理.

2 结果

2.1 艾灸对大鼠胃黏膜HSP70、AI、Apaf-1、Caspase-9和Caspase-3表达的影响 与A组比较, B组大鼠胃黏膜HSP70表达升高($P<0.05$), 胃黏膜细胞凋亡指数(AI)、胞质Apaf-1、Caspase-9和Caspase-3表达亦明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与B组相比, C组HSP70表达显著增加($P<0.01$), AI、Apaf-1、Caspase-9和Caspase-3表达则明显减少($P<0.01$); D组HSP70表达低于C组($P<0.01$), 而AI、Apaf-1、Caspase-9和Caspase-3表达则明显高于C组($P<0.05$ 或 $P<0.01$). 以上结果提示: 无水乙醇灌胃后, 大鼠胃黏膜HSP70表达上调, 同时细胞凋亡指数升高, 胞质Apaf-1、Caspase-9和Caspase-3表达增多. 艾灸足三里、梁门穴预处理可以促进模型大鼠胃黏膜HSP70大量表达, 同时抑制胃黏膜Apaf-1、Caspase-9和Caspase-3表达和细胞凋亡(表1, 图1).

2.2 艾灸预处理对大鼠胃黏膜细胞Cyt-c表达的影响 (1)B组大鼠胃黏膜细胞胞质内Cyt-c表达明显高于A组(1.63 ± 0.36 vs 0.75 ± 0.23 , $P<0.01$); (2)与B组相比, C组大鼠胃黏膜细胞Cyt-c含量明显减少(0.97 ± 0.26 vs 1.63 ± 0.36 , $P<0.01$); (3)D组大鼠胃黏膜胞质Cyt-c含量明显高于C组(1.45 ± 0.29 vs 0.97 ± 0.26 , $P<0.05$). 以上结果表明: 无

■ 相关报道

近年来我国学者从脑缺血、脊髓损伤、心肌缺血再灌注、胃黏膜细胞损伤、溃疡性结肠炎、创伤应激后胸腺细胞及RA大鼠T细胞等方面探讨了针灸具有抗细胞凋亡的细胞保护作用. 也显示针灸具有促进热休克蛋白表达上调作用. 但针灸是否通过诱导HSPs, 并通过何种信号转导途径实现其对细胞凋亡的影响, 报道不多见.

■创新盘点

本研究提出艾灸预处理可启动机体体内源性保护机制,上调胃黏膜细胞热休克蛋白表达,通过干预急性胃黏膜损伤细胞凋亡线粒体信号转导通路的相关靶点,抑制细胞凋亡,由此增强机体对外来有害刺激的抵抗及耐受力,进而达到扶正固本、调和脏腑的分子生物学机制。

表 1 艾灸对大鼠胃黏膜细胞HSP70、Al、Apaf-1、Caspase-9和Caspase-3表达的影响($\times 10^{-4}$ 个/ μm^2 , $n = 8$, mean \pm SD)

分组	HSP70	Al	Apaf-1	Caspase-9	Caspase-3
A组	2.51 \pm 0.22	2.25 \pm 0.53	3.44 \pm 0.86	3.76 \pm 0.82	2.35 \pm 0.71
B组	2.93 \pm 0.29 ^a	3.52 \pm 0.77 ^b	4.32 \pm 0.67 ^a	4.05 \pm 1.01 ^b	3.55 \pm 0.86 ^b
C组	3.93 \pm 0.36 ^{bd}	1.53 \pm 0.45 ^{ad}	2.24 \pm 0.49 ^{bd}	2.43 \pm 0.73 ^d	1.97 \pm 0.61 ^d
D组	3.35 \pm 0.34 ^{bcd}	3.06 \pm 0.81 ^{af}	3.16 \pm 0.66 ^{de}	3.33 \pm 0.76 ^e	2.98 \pm 0.86 ^e

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs A组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs B组; ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ vs C组。

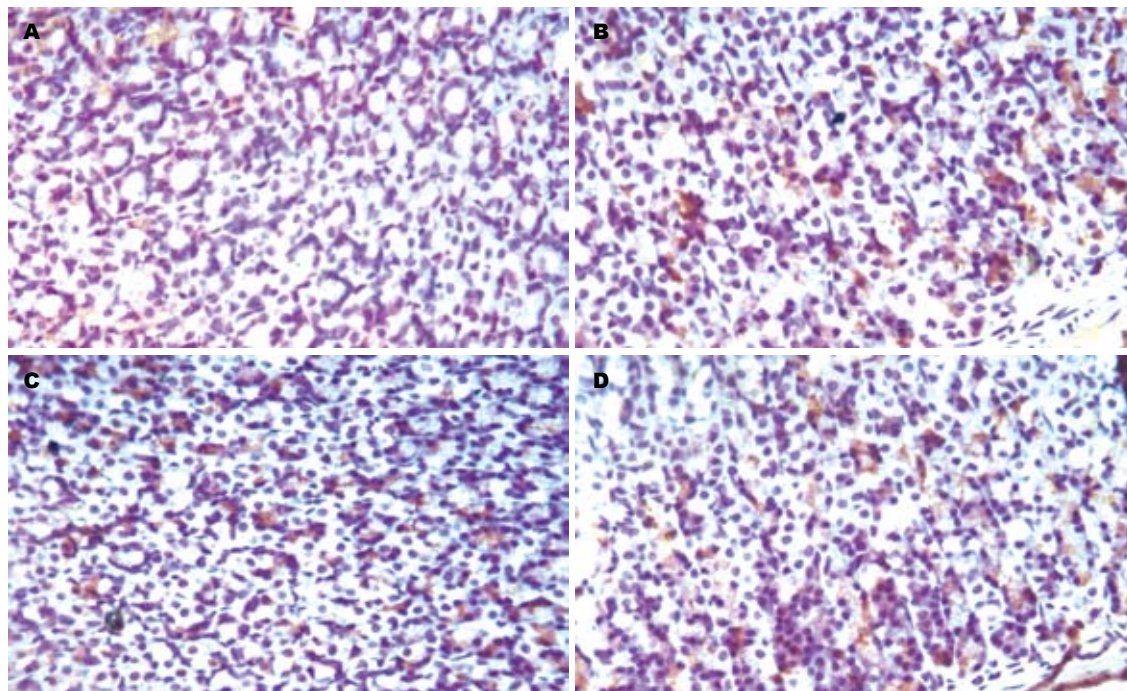


图 1 各组大鼠胃黏膜细胞凋亡表达。A: A组; B: B组; C: C组; D: D组。

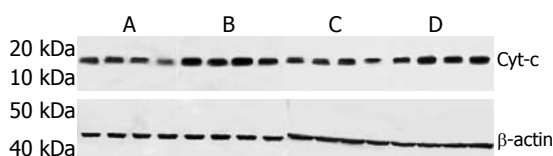


图 2 各组大鼠胃黏膜Cyt-c表达。A: A组; B: B组; C: C组; D: D组。

水乙醇ig后,胃黏膜细胞胞质Cyt-c表达升高;艾灸足三里、梁门穴预处理可抑制胃黏膜细胞Cyt-c的表达(图2)。

3 讨论

近年来我国学者从脑缺血^[5-6]、脊髓损伤^[7]、心肌缺血再灌注^[8-9]、胃黏膜细胞损伤^[10]、溃疡性结肠炎^[11]、创伤应激后胸腺细胞及RA大鼠T细胞^[12]等方面探讨了针灸具有抗细胞凋亡的细胞保护作用,也显示针灸具有诱导热休克蛋白表

达上调作用^[1-2]。针灸诱导HSP70抑制细胞凋亡的分子机制与什么信号转导通路有关?这方面的研究国内外尚未见报道。

关于细胞凋亡的主要信号通路,研究表明大多数情况下来自于细胞外的凋亡刺激因素作用于细胞后要转化为细胞凋亡信号,并通过胞内不同的信号转导通路,导致细胞凋亡。目前认为细胞凋亡的主要信号转导通路有两条:即死亡受体信号转导通路和线粒体信号转导通路^[13-15]。线粒体信号转导通路是20世纪90年代后期提出的^[16-18],目前已证实,一些凋亡刺激因素如射线、化疗、药物等,经过一些目前尚未充分了解的途径,使线粒体膜的通透性转换孔(permeability transition pore, PTP)打开,进而促使线粒体释放凋亡启动因子(Cyto-C、AIF、Apaf-1等)和procaspase-3入胞质。上述因子可通过下述多种机制导致细胞凋亡:(1)Cyto-C在

dATP存在的情况下, 与Apaf-1结合, 使Apaf-1暴露其上的CARD(caspase activation and recruitment domain)基序, 并与procaspase-9的CARD结合形成凋亡复合体(apoptosome), 导致procaspase-9激活, 后者进一步激活Caspase-3, 6等, 从而诱导细胞凋亡. (2)AIF通过促进线粒体释放细胞色素C而增强凋亡信号, 并可快速激活核酸内切酶. (3)Smac/Diablo可能通过阻断凋亡抑制蛋白(inhibitors of apoptosis protein, IAPs)的作用参与细胞凋亡的调控.

近年来已有文献证实了HSPs与线粒体通路的关系^[19-22]. HSP70过度表达可阻止双氧水诱导的线粒体通透跃迁减少和线粒体肿胀, 产生抗凋亡作用; HSP70可调控细胞色素C释放的凋亡途径下游; 抑制热应激所致的细胞色素C从线粒体的释放, 并能与凋亡蛋白酶活化因子1(Apaf-1)的Caspase募集结构域直接结合, 抑制凋亡蛋白酶活化因子1的寡聚化及Caspase-9的活化; 能抑制过氧化氢所致细胞色素C从线粒体释放, 进而抑制Caspase-3活化及随后的心肌细胞凋亡等. 线粒体释放的第二种Caspases激活物(Smac)是2000年发现的一种促凋亡分子. 他正常时位于线粒体膜间隙, 在凋亡诱导因子的作用下, 可释放入胞质, 与凋亡抑制蛋白(IAPs)结合并解除其对Caspases的抑制作用, 从而使Caspases-3, 9活性增强, 促进细胞凋亡发生. 严洁 *et al*^[26]发现热休克预处理在诱导HSP70等蛋白表达增多的同时, 也抑制了Smac从线粒体向胞质的释放及Caspase-3的激活, 从而抑制细胞凋亡发生.

Rokutan *et al*^[23]对HSP70在线粒信号转导通路中抑制胃黏膜细胞凋亡的作用位点进行了概括性的总结: (1)HSP70的表达上调使变性的蛋白质复性和解聚, 阻止凋亡程序的开始. (2)HSP70可以干扰c-jun氨基端激酶激活信号的传导, 抑制细胞凋亡的发生. (3)HSP70的表达增加可以防止线粒体静息膜电位的下降, 减少了Cyt-C和AIF的外溢, 这是HSP阻止凋亡最主要的途径. (4)HSP70可与已溢出的Cyt-C和AIF结合从而阻断了他们与Caspase-9的结合, 中断了凋亡信号的传导. (5)HSP70家族中的一些成员可作为门冬氨酸酶的假底物与之反应, 阻止了门冬氨酸酶启动凋亡程序. 以上(3)(4)(5)点均与线粒体通路有关.

以往研究显示针灸对胃黏膜损伤具有肯定的保护作用^[24-25], 本课题组在针刺足阳明经穴对胃黏膜保护作用方面进行了长期大量的研究,

分别从针灸对胃黏膜血流量的影响、对内源性保护因子(PGE₂、NO等)的作用; 对相关脑肠肽(如生长抑素、表皮生长因子、转化生长因子、P物质)的合成和释放, 对胃黏膜细胞凋亡、肠三叶肽因子的调节作用等方面探讨了各种因素造成胃黏膜损伤状态下, 针灸对胃黏膜细胞保护的作用机制^[26-31]. 近期发现艾灸足三里对应激性胃溃疡的胃黏膜保护作用与其诱导HSP70高表达, 刺激胃黏膜细胞增殖, 抑制其凋亡有关^[11,32-33]. 但是艾灸诱导HSP70抑制胃黏膜细胞凋亡的信号转导通路途径及其调控因子的研究鲜有报道.

基于以上工作基础, 我们推测艾灸对胃黏膜损伤细胞的保护作用可能与其上调HSP70表达, 并通过他干预凋亡线粒体信号转导通路上的不同靶点有关. 故本研究观察艾灸预处理对急性胃黏膜损伤细胞凋亡及HSP70影响, 并探讨其对胃黏膜细胞凋亡通路的分子机制, 以期揭示艾灸-热休克蛋白-线粒体信号转导通路-细胞凋亡的内在关系.

通过本实验我们观察到, 大鼠急性胃黏膜损伤后出现细胞凋亡, 与捆绑组大鼠相比, 可见细胞凋亡明显升高($P<0.01$), 同时胃黏膜细胞Cyt-c、Apaf-1、Caspase-9、Caspase-3表达也明显上调, 表明模型大鼠胃黏膜细胞凋亡经由线粒体介导的信号途径启动, 通过Cyt-c→Apaf-1→Caspase-9→Caspase-3级联反应链进入凋亡不可逆程序. 经过艾灸预处理, 艾灸穴位组大鼠胃黏膜HSP70表达比模型组明显增加, 细胞凋亡明显减少; 同时, Cyt-c、Apaf-1、Caspase-9和Caspase-3表达明显减少, 表明了艾灸足三里、梁门穴上调胃黏膜细胞HSP70表达的同时, 抑制了细胞凋亡线粒体信号途径相关因子Cyt-c、Apaf-1、Caspase-9、Caspase-3的表达, 使得Cyt-c→Apaf-1→Caspase-9→Caspase-3级联反应诱导的细胞凋亡减少, 最终抑制胃黏膜细胞凋亡, 实现保护胃黏膜损伤的作用.

与模型组比较, 艾灸非穴组大鼠HSP70表达也出现升高, 其细胞凋亡指数有所下降; Cyt-c、Apaf-1、Caspase-9和Caspase-3的表达亦呈不同程度下调. 但艾灸非穴以上4种物质的含量下降程度不及艾灸穴位组. 提示艾灸非穴对细胞凋亡线粒体信号转导途径相关因子的影响效应不及艾灸穴位明显, 故该组细胞凋亡指数高于艾灸穴位组. 由此也证明艾灸上调大鼠胃黏膜HSP70表达对细胞凋亡的干预效应并非艾

■应用要点

本研究为艾灸治疗溃疡病的临床应用提供实验与理论依据, 并为阐明传统“逆针灸”激发机体内源性保护潜能, 从而达到扶正固本、调和脏腑的中医理论奠定科学基础.

同行评价

本文有一定的创新性,反映出我国当前基础研究存在的较为普遍的问题和现有水平,但很难说是先进水平。

灸的单纯作用,而是与艾灸和经络腧穴的“综合效应”有关^[34]。

总之,艾灸足三里、梁门穴预处理可以通过上调大鼠胃黏膜细胞HSP70表达,抑制了细胞凋亡线粒体信号转导途径中相关因子Cyt-c、Apaf-1、Caspase-9、Caspase-3的表达,使细胞免于进入细胞凋亡的不可逆程序,从而抑制损伤胃黏膜细胞凋亡。艾灸可能正是通过上调胃黏膜HSP70表达,干预了细胞凋亡线粒体信号转导途径不同靶点,达到抑制胃黏膜细胞凋亡、保护胃黏膜损伤的作用,而且这种作用的发挥与艾灸及经络腧穴的“综合作用”是分不开的。

参考文献

- 易受乡,彭艳,常小荣,彭娜,严洁,林亚平. 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. 针刺研究 2006; 31: 259-271
- Yi SX, Peng Y, Chang XR, Peng N, Yan J, Lin YP. Effect of pre-moxibustion on apoptosis and proliferation of gastric mucosa cells. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2174-2178
- 李忠仁. 实验针灸学. 第1版. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 314-329
- Takano H, Satoh M, Shimada A, Sagai M, Yoshikawa T, Tohyama C. Cytoprotection by metallothionein against gastroduodenal mucosal injury caused by ethanol in mice. *Lab Invest* 2000; 80: 371-377
- 姜国华,唐伟,孙忠人. 针刺对大鼠全脑缺血后神经元凋亡的影响. 中医药学报 2003; 31: 31-32
- 周利,郑国庆. 针刺对缺血性脑损伤保护作用的分子机制研究进展. 中国针灸 2003; 23: 303-305
- 梁文明,吴仁昌,李刚,白荣杰. 电针对急性脊髓损伤后Fas和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3表达的影响. 中国临床康复 2006; 10: 111-113
- 田岳凤,吴富东,乔海法,韩秀珍,单秋华. 针刺手厥阴心包经穴对心肌缺血再灌注损伤细胞凋亡的影响. 中国针灸 2003; 23: 685-687
- 张红星,周利,黄国付,张唐法. 电针对心肌缺血再灌注损伤家兔心肌细胞凋亡的影响. 中国康复 2006; 21: 222-224
- 周国平,严洁,李江山,邓常青,刘健华. 电针足三里对胃黏膜损伤大鼠细胞凋亡及其调控基因Bcl-2、Fas蛋白表达的影响. 新中医 2005; 37: 92-94
- 吴焕淦,黄臻,刘慧荣,张卫,施茵,朱毅,崔云华,刘世敏. 针灸对大鼠溃疡性结肠炎结肠上皮细胞凋亡影响的实验研究. 中国针灸 2005; 25: 119-122
- 汪军,孙静,王彦青,俞瑾,曹小定,吴根诚. 电针对创伤应激大鼠胸腺细胞凋亡的影响. 针刺研究 2006; 31: 12-14, 26
- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-776
- 王德成,高洪. 细胞凋亡信号转导途径及调控的研究进展. 动物医学进展 2003; 24: 4-7
- 杨绍杰,孟金萍,屈祎,刘云波. 细胞凋亡信号传导通路的研究进展. 中国比较医学杂志 2007; 17: 297-301
- Cui J, Chen C, Lu H, Shen P. Modelling of the mitochondrial apoptosis network. *Int J Bioinform Res Appl* 2008; 4: 172-187
- Feng Y, Lu Y, Lin X, Gao Y, Zhao Q, Li W, Wang R. Endomorphins and morphine limit anoxia-reoxygenation-induced brain mitochondrial dysfunction in the mouse. *Life Sci* 2008; 82: 752-763
- Hasenjäger A, Gillissen B, Müller A, Normand G, Hemmati PG, Schuler M, Dörken B, Daniel PT. Smac induces cytochrome c release and apoptosis independently from Bax/Bcl-x(L) in a strictly caspase-3-dependent manner in human carcinoma cells. *Oncogene* 2004; 23: 4523-4535
- Li CY, Lee JS, Ko YG, Kim JI, Seo JS. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem* 2000; 275: 25665-25671
- Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 476-483
- Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maise C, Daugas E, Zamzami N, Mak T, Jäätelä M, Penninger JM, Garrido C, Kroemer G. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 839-843
- 肖卫民,蒋碧梅,石永忠,刘梅冬,唐道林,肖献忠. 热休克蛋白抑制过氧化氢所致C₂C₁₂(12)细胞凋亡的机制. 中南大学学报(医学版) 2004; 29: 6-10
- Rokutan K. Role of heat shock proteins in gastric mucosal protection. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15 Suppl: D12-D19
- 黎喜平,严洁. 针灸对胃黏膜损伤保护作用机制的研究进展. 针刺研究 2005; 30: 60-63
- 于天源. 针灸对胃黏膜保护作用研究述评. 中国医药学报 2003; 18: 626-627
- 严洁,常小荣,邓元江,易受乡,林亚平,周国平. 电针足阳明经穴对家兔胃黏膜损伤细胞保护作用的研究. 针刺研究 2001; 26: 264-269
- 常小荣,严洁,林亚平,易受乡,邓沅江. 电针足三里对兔胃粘膜损伤细胞保护作用的影响. 中国中医药信息杂志 2002; 9: 26-27
- 阳仁达,易受乡,严洁,常小荣,林亚平,刘玉群,张泓,王超,罗志勇,刘水平. 针刺对胃粘膜损伤家兔胃粘膜生长抑素及其受体基因表达的影响. 针刺研究 2004; 29: 8-11
- 严洁,黎喜平,易受乡,常小荣,林亚平,黄艾,胡蓉. 电针对应激性胃黏膜损伤大鼠胃黏膜肠三叶因子基因表达的影响. 中国针灸 2006; 26: 66-68
- 杨宗保,严洁. 表皮生长因子受体及其信号转导通路对胃粘膜损伤修复研究. 中医药导报 2006; 12: 66-68
- 周国平,严洁,李江山,邓常青,刘健华. 电针“足三里”对胃黏膜损伤大鼠Bcl-2、Fas蛋白表达的影响. 针刺研究 2004; 29: 31-34
- 常小荣,彭娜,易受乡,彭艳,严洁. 艾灸足三里和梁穴诱导热休克蛋白70抗胃黏膜氧化损伤. 世界华人消化杂志 2006; 14: 3405-3408
- 常小荣,彭娜,易受乡,彭艳,严洁. 艾灸预处理对应激性胃溃疡大鼠胃黏膜HSP70蛋白及mRNA表达的影响. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1252-1257
- 易受乡,林亚平,吴芳,向志勇. 神阙穴隔药饼灸、单纯灸及灯光灸对胃黏膜损伤保护作用的对比研究. 中国中医药信息杂志 2005; 12: 30-32

编辑 李军亮 电编 何基才