

# 艾灸血浆对乙醇损伤的人胃黏膜上皮细胞的影响

洪金标, 易受乡, 黄芸, 林亚平, 杜燕, 彭宏, 彭艳

洪金标, 易受乡, 黄芸, 林亚平, 杜燕, 彭宏, 彭艳, 湖南中医药大学针灸推拿学院 经穴与脏腑相关重点实验室 湖南省长沙市 410007

洪金标, 深圳市中医院推拿科 广东省深圳市 518033

洪金标, 博士研究生, 主要从事针灸治病机制的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30772707

教育部博士点科学基金资助项目, No. 20070541003

作者贡献分布: 洪金标与易受乡对此文所作贡献均等; 此课题设计由易受乡指导洪金标完成; 研究过程由洪金标、黄芸、杜燕、彭宏及彭艳操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由林亚平提供; 数据分析由洪金标与黄芸完成; 本论文写作由洪金标与易受乡完成。

通讯作者: 易受乡, 教授, 410007, 湖南省长沙市, 湖南中医药大学针灸推拿学院, yishouxiang@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-08-16 修回日期: 2010-09-06

接受日期: 2010-09-13 在线出版日期: 2010-11-08

## Plasma of individuals undergoing moxibustion has protective effects against alcohol-induced injury to human gastric epithelial cells *in vitro*

Jin-Biao Hong, Shou-Xiang Yi, Yun Huang, Ya-Ping Lin, Yan Du, Hong Peng, Yan Peng

Jin-Biao Hong, Shou-Xiang Yi, Yun Huang, Ya-Ping Lin, Yan Du, Hong Peng, Yan Peng, Key Laboratory of Meridians and Viscera, College of Acupuncture and Massage, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China

Jin-Biao Hong, Department of Manipulation, Shenzhen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518033, Guangdong Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30772707; and the PhD Programs Foundation of Ministry of Education of China, No. 20070541003

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

Received: 2010-08-16 Revised: 2010-09-06

Accepted: 2010-09-13 Published online: 2010-11-08

## Abstract

**AIM:** To investigate whether plasma of individuals undergoing moxibustion has protective effects against ethanol-induced injury to human gastric epithelial cells (GES-1).

**METHODS:** Isolated GES-1 cells were divided into four groups: control group, ethanol injury group, test plasma group (plasma from individ-

uals undergoing moxibustion at specific points), and control plasma group (plasma from individuals undergoing moxibustion at non-specific points). Before and after moxibustion at Zusanli, Zhongwan, Guanyuan or non-specific points, blood plasma was prepared. Cells of the ethanol injury group, test plasma group, and control plasma group were treated with 8% ethanol to induce cell injury. After injured cells were incubated with plasma, cell growth was measured by MTT assay; the contents of LDH, SOD and MDA in culture supernatants were determined by colorimetric assay; and cell cycle progression and apoptosis were detected by flow cytometry.

**RESULTS:** Compared with the control group,  $A_{490}$  value significantly decreased ( $P < 0.01$ ) and the reduced rate of cell growth increased in the ethanol injury group. Compared with the ethanol injury group, both  $A_{490}$  value ( $P < 0.01$ ) and the reduced rate of cell growth decreased significantly in the test plasma group. The reduced rate of cell growth was significantly higher in the control plasma group than in the test plasma group (26.52% vs 22.06%). Compared with the control group, the contents of LDH, MDA and SOD increased in the ethanol injury group (all  $P < 0.01$  or 0.05). Compared with the ethanol injury group, an increase in SOD content ( $P < 0.01$ ) and a decrease in LDH and MDA contents (both  $P < 0.01$ ) were noted in the test plasma group. SOD content decreased ( $34.11 \text{ kU/L} \pm 4.14 \text{ kU/L}$  vs  $38.73 \text{ kU/L} \pm 4.34 \text{ kU/L}$ ,  $P < 0.05$ ) and LDH and MDA levels increased ( $9.26 \text{ U/L} \pm 1.62 \text{ U/L}$  vs  $7.38 \text{ U/L} \pm 1.28 \text{ U/L}$ ;  $3.91 \text{ } \mu\text{mol/L} \pm 0.11 \text{ } \mu\text{mol/L}$  vs  $3.75 \text{ } \mu\text{mol/L} \pm 0.11 \text{ } \mu\text{mol/L}$ , both  $P < 0.05$ ) in the control plasma group compared with the test plasma group. No significant difference was noted in cell cycle progression between the two plasma treatment groups (all  $P > 0.05$ ) though the apoptosis rate was higher in the control plasma group than in the test plasma group ( $1.56\% \pm 0.19\%$  vs  $1.24\% \pm 0.08\%$ ,  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Plasma of individuals undergoing moxibustion at Zusanli, Zhongwan and Guanyuan has protective effects against alcohol-induced injury to human gastric epithelial cells.

## ■背景资料

急性胃黏膜损伤是机体在应激状态下或胃黏膜接触某些有害物质引起的急性胃肠黏膜炎症、糜烂和出血的统称。目前认为其损伤的产生与胃黏膜自身保护作用的减弱与保护/防御性因素失衡密切相关。大量研究证实艾灸对胃黏膜损伤具有抑制作用, 他不仅能抗损伤, 还能促进溃疡修复和愈合。

## ■同行评议者

王富春, 教授, 长春中医药大学针灸推拿学院

## ■ 研究前沿

艾灸预处理能诱导HSP70的产生,对胃黏膜损伤有抑制作用。针灸血清的研究已成为近期针灸界研究热点,有人认为:“针灸血清”之所以具有和药物相类似的作用,关键在于刺激腧穴后,可通过机体内在生理调节机制,引起血清中活性物质的产生,进而实现对脏腑器官的调节作用。艾灸相关穴位后提取的血浆对胃黏膜细胞是否具有保护作用?其作用机制如何,有待进一步研究。

**Key Words:** Moxibustion; Human gastric epithelial cell; Apoptosis; Lactate dehydrogenase; Malondialdehyde; Superoxide dismutase

Hong JB, Yi SX, Huang Y, Lin YP, Du Y, Peng H, Peng Y. Plasma of individuals undergoing moxibustion has protective effects against alcohol-induced injury to human gastric epithelial cells *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(31): 3287-3293

## 摘要

**目的:** 探讨艾灸血浆对乙醇损伤的离体人胃黏膜上皮细胞(GES-1)的保护作用。

**方法:** 将离体胃黏膜上皮细胞(GES-1)分为4组,即空白组、乙醇损伤模型组、艾灸穴位血浆组和艾灸非穴位血浆组。艾灸人体足三里、中脘、关元穴及非穴对照点前后提取并制备艾灸前后的血浆。以含8%乙醇培养液作用于后3组胃黏膜上皮细胞,建立胃黏膜上皮细胞损伤模型。各组分别加入预先提取的灸前血浆、艾灸穴位血浆和艾灸非穴位血浆。采用MTT法检测细胞抑制率,比色法检测细胞培养上清液中液乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的含量,流式细胞技术检测细胞周期及细胞凋亡率。

**结果:** 模型组与空白组比较,细胞 $A_{490}$ 降低( $P<0.01$ ),抑制率明显上升;与模型组比较,艾灸穴位血浆组 $A_{490}$ 升高( $P<0.01$ ),细胞抑制率降低;艾灸非穴位血浆组 $A_{490}$ 低于艾灸穴位血浆组 $A_{490}$ ( $P<0.01$ ),而细胞抑制率高于艾灸穴位血浆组(26.52% vs 22.06%)。与空白组比较,模型组培养液中LDH、MDA、SOD含量均有所提高( $P<0.01$ 或 $0.05$ );艾灸穴位血浆组与模型组比较, SOD水平升高( $P<0.01$ ), LDH、MDA含量降低(均 $P<0.01$ );艾灸非穴位血浆组与艾灸穴位血浆组比较, SOD水平下降( $34.11 \text{ kU/L} \pm 4.14 \text{ kU/L}$  vs  $38.73 \text{ kU/L} \pm 4.34 \text{ kU/L}$ ,  $P<0.05$ ), LDH和MDA水平升高( $9.26 \text{ U/L} \pm 1.62 \text{ U/L}$  vs  $7.38 \text{ U/L} \pm 1.28 \text{ U/L}$ ;  $3.91 \mu\text{mol/L} \pm 0.11 \mu\text{mol/L}$  vs  $3.75 \mu\text{mol/L} \pm 0.11 \mu\text{mol/L}$ , 均 $P<0.05$ )。艾灸非穴血浆组与艾灸穴位血浆组比较,细胞周期中各期无明显差异(均 $P>0.05$ ),凋亡率升高( $1.56\% \pm 0.19\%$  vs  $1.24\% \pm 0.08\%$ ,  $P<0.01$ )。

**结论:** 艾灸足三里、中脘、关元穴后提取的人体血浆对受损人胃黏膜细胞具有一定的保护作用。

**关键词:** 艾灸血浆; 人胃黏膜上皮细胞; 细胞凋亡;

乳酸脱氢酶; 丙二醛; 超氧化物歧化酶

洪金标, 易受乡, 黄芸, 林亚平, 杜燕, 彭宏, 彭艳. 艾灸血浆对乙醇损伤的人胃黏膜上皮细胞的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18(31): 3287-3293

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3287.asp>

## 0 引言

急性胃黏膜损伤是机体在应激状态下或胃黏膜接触某些有害物质引起的急性胃肠黏膜炎症、糜烂和出血的统称。表现为: 黏膜充血、水肿、糜烂、坏死、脱落、浅表溃疡形成。常见的胃黏膜损伤因子有胃酸和胃蛋白酶、幽门螺杆菌、药物、应激、乙醇、手术等。目前认为其损伤的产生与胃黏膜自身保护作用的减弱与保护/防御性因素失衡密切相关<sup>[1]</sup>。大量研究证实艾灸对胃黏膜损伤具有保护作用,他不仅能抗损伤,还能促进溃疡修复和愈合<sup>[2,3]</sup>。本课题组以往的研究证实艾灸预处理能诱导热休克蛋白70(heat shock protein 70, HSP70)的产生,抑制和减轻乙醇所诱发的胃黏膜细胞凋亡,对胃黏膜损伤有保护作用<sup>[4]</sup>。近年来“针灸血清”研究方法的提出为直接观察针灸对离体细胞、组织等的影响提供了重要的思路及方法<sup>[5]</sup>。本研究采用艾灸足三里、中脘、关元穴后提取的血浆作用于乙醇损伤的人胃黏膜GES-1细胞,以细胞抑制率、细胞培养上清液乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、细胞周期及凋亡率等为指标。观察艾灸血浆对乙醇造成的离体胃黏膜上皮细胞(GES-1)损伤的干预效应,进一步在细胞水平上揭示艾灸对胃黏膜细胞保护的作用原理。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** DMEM高糖(Gibco, USA)、小牛血清(湘雅医学院实验中心自制)、青/链霉素双抗(华北制药厂)、胰蛋白酶(Gibco, USA)、EDTA(Sigma, USA)、磷酸盐缓冲液PBS(鼎国, 北京)、MTT(Sigma, USA)、DMSO(Sigma, USA)、LDH(中生北控, 北京)、SOD(建成, 南京)、MDA(建成, 南京)、碘化丙啶(PI, Sigma, USA)、18 mm×200 mm温灸纯艾条(汉医牌, 南阳)、无水乙醇(国产分析纯)、细胞培养板(Corning costar, USA)、CO<sub>2</sub>培养箱(三洋, 日本)、倒置显微镜(重庆光学仪器厂)、酶标仪(TECAN, 奥地利)、流式细胞仪(COULTER EP-

ICS XL, USA). 人胃黏膜上皮细胞(GES-1)购自湘雅医学院实验中心。

## 1.2 方法

1.2.1 艾灸血浆来源及制备: (1)血浆来源: 湖南中医药大学在校健康大学生24名(男女各半), 年龄18-25岁, 排除月经周期、妊娠或哺乳期女性。经常规体检及血尿常规检查无异常, 愿意接受本实验方案; (2)艾灸对象及分组: 24名学生随机分为艾灸穴位组及艾灸非穴位组, 每组12名(男女各半); (3)取穴(非穴位)及定位: 艾灸穴位组取中脘、关元和足三里穴, 穴位定位参照第6版《针灸学》教材。非穴位组取平行于中脘、关元穴右侧3寸非穴位点, 及平行于足三里穴内侧1寸非穴位点; (4)艾灸方法: 艾灸穴位组: 采用艾条温和灸中脘、关元及双侧足三里穴共4穴; 艾灸非穴位组: 同法灸对应非穴位4点, 两组均每日灸30 min, 连续灸10 d后。于艾灸前及艾灸后(第11天)早上7点至8点抽取空腹静脉血; (5)血浆制备: 使用真空负压采血管采取空腹静脉血8 mL, 按10:1比例加入1.5% EDTA抗凝, 离心(3 000 r/min, 15 min), 每例吸取血浆1 mL, 将艾灸前后所得血浆按组别分别等量混合分装, -80 °C保存。

1.2.2 GES-1细胞培养及细胞损伤造模: 细胞培养: GES-1细胞株用含100 mL/L小牛血清的DMEM高糖培养基于标准CO<sub>2</sub>培养箱中常规培养2-3 d, 约90%满瓶时传代。细胞损伤模型的制作: 以含8%乙醇浓度的培养液作用胃黏膜上皮细胞3 h, 造成胃黏膜上皮细胞损伤, 经MTT检测使细胞抑制率达到30%左右。

1.2.3 细胞分组及处理: 将实验细胞分为: 空白组, 模型组, 艾灸穴位血浆处理组, 艾灸非穴位血浆处理组。处理过程如下: 第1步, 取对数生长中期细胞, 调整细胞密度为 $4 \times 10^4$ /mL, 按照每孔3 mL接种入6孔板, 置于37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中常规培养48 h, PBS洗2次, 用不完全培养基同步24 h, PBS洗2次。第2步, 将GES-1细胞分为以上4组, 每组12孔。空白组加入完全培养基3 mL培养3 h后, 吸弃培养基, PBS洗2次; 其他3组加入含8%乙醇培养基3 mL培养3 h后, 吸弃培养基, PBS洗2次。第3步, 空白、模型组加入含10%艾灸前人体血浆DMEM培养液3 mL; 其他2组分别加入含10%艾灸穴位血浆及含10%艾灸非穴位血浆培养基3 mL。各组细胞于37 °C CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h后收集上清液及细胞。

1.2.4 观察指标: 细胞抑制率: 每组随机取5个复孔细胞, 用MTT法检测细胞抑制率。各组细胞经

分别处理后加入完全培养基100 μL于37 °C CO<sub>2</sub>培养箱中培养3 h后, 每孔加入MTT溶液20 μL, 于37 °C CO<sub>2</sub>培养箱中培养4 h; 吸弃上清液, 加入DMSO 150 μL, 振荡10 min以溶解结晶; 用酶标仪在490 nm波长处读取光密度值 $A_{490}$ 。测定前以空白孔调零, 以不含乙醇培养细胞作为对照。细胞抑制率的计算公式为: 细胞抑制率(%) =  $[1 - \text{实验孔光密度} A_{490} / \text{对照孔光密度} A_{490}] \times 100\%$ ; LDH、MDA、SOD检测: 实验结束后收集各组细胞培养上清液, -20 °C保存。每组随机取8个样本分别用化学比色法、TBA法及羟胺法检测LDH、MDA、SOD含量; 细胞凋亡和细胞周期采用流式细胞仪检测: (1)每组随机选取4孔板细胞移入离心管; (2)3 000 r/min, 离心10 min, 吸弃上清液; (3)每管2 mL PBS洗涤, 2 500 r/min, 离心5 min, 弃上清液, 重复2次; (4)向离心管中加入500 μL 70%冰乙醇, 重悬细胞, 移入1.5 mL EP管, 再以500 μL 70%冰乙醇洗涤离心管后移入EP管, 得1 mL样本液; (5)将细胞固定在4 °C、24 h以上; (6)染色: 将固定后的细胞用PBS洗2遍(3 000 r/min, 1 min)。加入100 μL PBS, 0.66 μL RNaseA(1 g/L), 37 °C孵育30 min。加入0.4 mL 50 mg/L PI, 避光染色20 min; (7)用COULTER流式细胞仪检测细胞周期及凋亡率, 每份样品获取 $10^4$ 以上细胞, 分析细胞周期中G<sub>1</sub>期、S期以及G<sub>2</sub>/M期所占的比值及细胞凋亡率, MCYCLE软件分析结果。

统计学处理 采用SPSS16.0统计软件进行处理。组间比较, 符合正态分布者, 采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 方差齐者用LSD或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)。

## 2 结果

2.1 艾灸血浆对受损胃黏膜上皮细胞抑制率的影响 模型组与空白组比较,  $A_{490}$ 明显下降( $P < 0.01$ ), 细胞抑制率上升; 艾灸穴位血浆组与模型组比较,  $A_{490}$ 上升( $P < 0.01$ ), 细胞抑制率下降; 艾灸非穴位血浆组与艾灸穴位血浆组比较,  $A_{490}$ 下降( $P < 0.05$ ), 细胞抑制率高于艾灸穴位血浆组(表1)。

2.2 艾灸血浆对受损胃黏膜上皮细胞上清液中LDH、SOD、MDA含量的影响 模型组与空白组比较, LDH、MDA、SOD均有所提高( $P < 0.01$ 或 $< 0.05$ ); 艾灸穴位血浆组与模型组比较, 上清液中SOD水平升高( $P < 0.01$ ), LDH、MDA含量降低(均 $P < 0.01$ ); 艾灸非穴位血浆组与艾灸穴位血

### ■相关报道

王东生等对大黄蟾虫丸含药血浆与血清进行比较, 发现含药血浆抑制血小板聚集作用显著优于含药血清。



### ■创新盘点

本研究采用艾灸相关腧穴后提取的血浆作为处理因素,以离体人胃黏膜上皮细胞GES-1为受试对象,观察了艾灸血浆对乙醇所致的人胃黏膜上皮细胞损伤的干预效应,发现艾灸血浆能减轻细胞抑制率,抑制胃黏膜细胞凋亡、缩短G<sub>1</sub>期,减少LDH及MDA漏出,在细胞水平上揭示了艾灸对胃黏膜细胞的保护作用。

表 1 艾灸血浆对损伤GES-1细胞光密度及抑制率的影响 (mean ± SD, n = 5)

分组	A <sub>490</sub>	抑制率(%)
空白组	0.547 ± 0.004	6.77
模型组	0.417 ± 0.004 <sup>b</sup>	29.04
艾灸穴位血浆组	0.458 ± 0.004 <sup>f</sup>	22.06
艾灸非穴位血浆组	0.431 ± 0.005 <sup>c</sup>	26.52

<sup>b</sup>P<0.01 vs 空白组; <sup>c</sup>P<0.05 vs 艾灸穴位血浆组; <sup>f</sup>P<0.01 vs 模型组。

浆组比较, SOD水平下降(P<0.05), LDH和MDA水平升高(均P<0.05, 表2)。

2.3 艾灸血浆对受损胃黏膜上皮细胞周期及凋亡率的影响 模型组与空白组比较, GES-1细胞周期中, 模型组的G<sub>1</sub>期占比及凋亡率提高(均P<0.01), S、G<sub>2</sub>/M期占比下降(均P<0.01); 艾灸穴位血浆组与模型组比较, G<sub>1</sub>期占比及凋亡率明显下降(均P<0.01), S、G<sub>2</sub>期占比提高(均P<0.01); 艾灸非穴血浆组与艾灸穴位血浆组比较, 细胞周期各期占比无明显差异(均P>0.05), 凋亡率升高(P<0.01, 表3)。

### 3 讨论

中医学认为艾属温性, 其味芳香, 善通十二经脉, 具有散寒通络、回阳固脱、行气活血、防病保健等作用。《医学入门》提出: “凡一年四季各熏一次, 元气坚固, 百病不生”。现代研究表明艾灸时产生的近红外辐射具有较高的穿透能力, 其药性可通过体表穴位渗透诸经, 起到治疗和预防疾病的作用。

研究报道<sup>[6]</sup>艾灸具有镇痛, 改善血循环, 调整代谢紊乱, 调节免疫功能等作用。在临床实践中对消化系统疾病有着良好的治疗效应<sup>[7]</sup>, 实验研究也证明艾灸有明显减轻胃黏膜损伤的作用<sup>[4]</sup>。本课题组在艾灸对胃黏膜保护作用方面进行了长期大量的研究, 分别从艾灸对胃黏膜血流量的影响、对内源性保护因子前列腺素; 降钙素基因相关肽、表皮生长因子、转化生长因子-α的合成和释放, 在胃黏膜细胞凋亡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, 艾灸对胃黏膜细胞保护的作用机制<sup>[8,9]</sup>。近期发现艾灸对胃黏膜的保护作用与其诱导HSP70的表达, 通过线粒体信号转导途径抑制细胞凋亡, 达到保护胃黏膜损伤的作用<sup>[10,11]</sup>。为了进一步从细胞水平揭示艾灸对胃黏膜细胞的保护机制, 本

研究将艾灸后提取的血浆作用于离体人胃黏膜上皮GES-1细胞, 探讨艾灸血浆对受损伤的GES-1是否具有保护作用。

GES-1来源于胎儿胃黏膜上皮, 为体外稳定传代的永生化细胞。自1992年建成以来, 已证明其为良好的实用型实验细胞体系, 电镜显示具有正常人体胃黏膜上皮细胞多种特性。该细胞株已广泛用于胃及相关疾病研究。如孙涛等<sup>[12]</sup>以蛙皮素作用于GES-1细胞, 观察了其生长的促进作用; 宗红等<sup>[13]</sup>以幽门螺杆菌作用于GES-1细胞, 对其进行了凋亡和X凋亡抑制蛋白表达影响的观察; 李军祥等<sup>[14]</sup>研究三七提取物对GES-1细胞增殖抑制及促凋亡作用; 王刚石<sup>[15]</sup>采用该细胞观察了生长抑素对羟自由基损伤细胞的影响等。

本研究采用GES-1建立了乙醇所致的人胃黏膜上皮细胞损伤模型。在倒置显微镜下观察: 正常GES-1细胞呈菱形或多边形等不规则形状贴壁生长, 中央有圆形核, 生长旺盛, 细胞之间连接紧密, 可见少量细胞老化脱落。乙醇损伤后, 细胞呈圆形或椭圆形状, 随着损伤时间增加或乙醇浓度提高, 细胞间隙变大, 连接减少甚至出现细胞片状脱落, 只有少许细胞贴壁, 大量细胞漂浮于细胞液中, 细胞核固缩, 胞质浓缩, 可见空泡变性, 死亡细胞逐渐增多, 表明乙醇所造成的胃黏膜细胞损伤模型成功。

针灸血浆是指从针刺处理后的人或动物体上采集到的血浆, 作为效应物质加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, 可观察到针灸处理后产生的效应。其思路来源于“针灸血清”<sup>[16]</sup>和贺石林的“血浆药理学”方法<sup>[17]</sup>。血清是血液凝固后除去纤维蛋白与血细胞的液体部分, 血浆指抗凝血液离心后去除血细胞的上清液。由于血清不含纤维蛋白原、凝血酶, 且有凝血、抗凝、纤溶、补体等多个系统的活化, 而不能真实反映体内的状态和准确体现药物的有效成分, 故有学者提出在实验中尽量选择使用血浆, 而不使用血清。贺龙刚等<sup>[18]</sup>观察丹参注射液的含药血清和血浆对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的影响, 评价两者差异, 发现含药血浆组促进鸡胚绒毛尿囊膜血管新生作用强于其血清对照组。王东生等<sup>[19]</sup>对大黄蟪虫丸含药血浆与血清进行比较, 发现含药血浆抑制血小板聚集作用显著优于含药血清。据此本研究尝试采用艾灸血浆作为效应物质加

表 2 艾灸血浆对损伤GES-1细胞上清液中LDH、MDA和SOD的影响 (mean  $\pm$  SD,  $n = 8$ )

分组	LDH(U/L)	MDA(nmol/mL)	SOD(kU/L)
空白组	5.46 $\pm$ 0.80	2.57 $\pm$ 0.13	25.72 $\pm$ 2.28
模型组	10.76 $\pm$ 1.99 <sup>b</sup>	4.05 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	30.23 $\pm$ 3.29 <sup>a</sup>
艾灸穴位血浆组	7.38 $\pm$ 1.28 <sup>f</sup>	3.75 $\pm$ 0.11 <sup>f</sup>	38.73 $\pm$ 4.34 <sup>f</sup>
艾灸非穴位血浆组	9.26 $\pm$ 1.62 <sup>c</sup>	3.91 $\pm$ 0.11 <sup>c</sup>	34.11 $\pm$ 4.14 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 空白组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 艾灸穴位血浆组; <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs 模型组。

表 3 艾灸血浆对GES-1细胞周期及凋亡率的影响 (mean  $\pm$  SD, %,  $n = 4$ )

分组	G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	凋亡率
空白组	36.98 $\pm$ 2.84	31.28 $\pm$ 2.68	31.78 $\pm$ 1.13	0.84 $\pm$ 0.05
模型组	57.90 $\pm$ 1.43 <sup>d</sup>	21.50 $\pm$ 0.35 <sup>d</sup>	20.53 $\pm$ 1.24 <sup>d</sup>	7.42 $\pm$ 0.16 <sup>d</sup>
艾灸穴位血浆组	49.18 $\pm$ 1.72 <sup>b</sup>	25.93 $\pm$ 1.18 <sup>b</sup>	24.88 $\pm$ 1.17 <sup>b</sup>	1.24 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>
艾灸非穴位血浆组	52.50 $\pm$ 2.84	23.55 $\pm$ 1.54	23.95 $\pm$ 1.58	1.56 $\pm$ 0.19 <sup>f</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 模型组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 空白组; <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs 艾灸穴位血浆组。

到受损细胞中, 观察其对胃黏膜细胞的作用。

现代医学表明, 各种理化因素造成组织细胞的急性或慢性损伤, 首先体现在细胞膜的改变, 一旦细胞膜受损, LDH即被释放到细胞外, 造成培养液中该酶活性增高, 且与细胞损伤成正比, 是衡量细胞膜受损的常用指标<sup>[20]</sup>。MDA常作为脂质过氧化程度的检测指标, 能间接反映出细胞受损伤的程度<sup>[21]</sup>。SOD是生物体防御过氧化损伤的关键酶类, 广泛分布于生物体内组织中的抗氧化剂, 其含量的高低, 决定了体内氧化/抗氧化系统的均衡, 反映机体抗氧化保护系统的强弱<sup>[22]</sup>。本实验观察艾灸血浆对受损胃黏膜上皮细胞的影响, 与空白组比较, 模型组 $A_{490}$ 下降( $P < 0.01$ ), 表明乙醇造成了细胞受损, 细胞抑制率上升, 细胞上清液中LDH、MDA含量增加(均 $P < 0.01$ ), 同时诱导细胞自我应激保护, SOD含量提高( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 艾灸穴位血浆组 $A_{490}$ 上升( $P < 0.01$ ), 提示艾灸人体血浆能降低乙醇对细胞的损伤, 细胞抑制率下降, 上清液中SOD水平升高( $P < 0.01$ ), LDH、MDA含量降低(均 $P < 0.01$ ); 与艾灸穴位血浆组比较, 艾灸非穴位血浆组 $A_{490}$ 下降( $P < 0.05$ ), 细胞抑制率升高, SOD水平下降( $P < 0.05$ ), LDH和MDA水平升高(均 $P < 0.05$ ), 提示艾灸穴位血浆能减少受损GES-1细胞LDH和MDA的产生, 提高SOD含量, 对细胞起保护作用, 使细胞抑制率下降, 而对上述指标的影响艾灸非穴位血浆组的作用不如艾

灸穴位血浆组。

细胞凋亡又叫程序性细胞死亡, 是由特定基因调控的自主、有序性的死亡。细胞的增殖遵循细胞周期, 即从 $G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M \rightarrow G_1$ , 在细胞周期中至少存在两个重要的“生长控制点(check-points)”, 一是 $G_1 \rightarrow S$ 转变期; 二是 $G_2 \rightarrow M$ 转变期。当细胞处于生长活跃状态时, 细胞周期中 $G_1$ 期将更多转化进入S期, DNA合成增加, 为下一步M期的有丝分裂做准备, 即 $G_1$ 期占整个细胞周期比例下降, S期、 $G_2$ 期比例上升<sup>[23]</sup>。本研究发现: 与空白组比较, 模型组细胞周期 $G_1$ 期占比及细胞凋亡率明显升高(均 $P < 0.01$ ); S、 $G_2/M$ 占比下降(均 $P < 0.01$ )。提示胃黏膜细胞受损后细胞凋亡率增高, 延长的 $G_1$ 期对 $G_1 \rightarrow S$ 的转变出现延缓, 至细胞增殖活跃程度降低。而艾灸穴位血浆组与模型组比较,  $G_1$ 期占比减少( $P < 0.01$ ), 凋亡率下降( $P < 0.01$ ), S、 $G_2/M$ 占比提高(均 $P < 0.01$ ); 提示艾灸穴位血浆组能降低胃黏膜细胞凋亡率, 促进细胞由 $G_1$ 期尽快进入S期, 加速DNA合成, 加快完成细胞增殖和修复过程。

近年来不少研究已证实针灸血清具有抗哮喘作用和体液调节功能, 还具有改善免疫功能及抗衰老作用<sup>[24]</sup>。孙双历等<sup>[25]</sup>观察艾灸血清对体外培养背根神经节的保护作用, 提示艾灸血清对因衰老所致的机体功能减退有着积极的治疗作用; 杨露晨等<sup>[23]</sup>以艾灸血清作用于实验性类风湿关节炎滑膜细胞, 观察对其细胞增殖及

#### ■应用要点

在确认艾灸血清(血浆)对疾病模型有效性的基础上, 利用蛋白质组和基因组等现代科学技术, 分析提取与针灸相关的效应活性物质, 从而为阐明针灸治疗疾病的现代生物学机制提供新的战略性研究思路, 并为解决当代生命科学重大疑难问题寻求新的突破, 也将为创新药物的发展提供新的途径。

### ■同行评价

本文创新性较好,内容重点突出,实验设计合理,结论可靠,对揭示针灸效应具有一定的启示意义。

细胞周期影响,发现艾灸血清可抑制其增殖及对G<sub>1</sub>/S转换期有延缓作用。在对肿瘤细胞方面影响,马晓芃等<sup>[26]</sup>以艾灸血清作用于小鼠淋巴瘤细胞,发现艾灸血清具有抑制淋巴瘤细胞增殖、诱导其分化的作用。裴建等<sup>[27]</sup>发现艾灸血清能抑制肿瘤细胞生长。陈云飞等<sup>[28,29]</sup>观察艾灸血清对荷瘤小鼠的抑瘤效应,提示艾灸血清具有抑瘤,并诱导肿瘤细胞凋亡的效应。

研究表明针灸血清还能影响细胞内某些信号分子,如李瑞午等<sup>[30]</sup>及罗明富等<sup>[31]</sup>以针刺血清作用于体外神经细胞或心肌细胞,发现针刺血清对离体神经细胞或心肌细胞内钙离子浓度有影响。邓元江等<sup>[32,33]</sup>报道针刺血清能使离体胃窦平滑肌细胞产生收缩效应与其调整细胞内钙离子有关。杨宗保等发现电针胃经穴提取针刺血清能活化表皮生长因子受体和上调胃黏膜细胞c-Myc基因的表达<sup>[34-36]</sup>。李岩等<sup>[37]</sup>在以针灸血清诱导人卵巢癌细胞凋亡相关因子的研究中,表明针灸血清可通过增加凋亡相关因子的表达诱导卵巢癌细胞凋亡。马晓芃等<sup>[26]</sup>观察艾灸血清对体外小鼠淋巴瘤细胞的作用,发现艾灸血清能使环核苷酸/环鸟苷酸比值增加,具有抑制淋巴瘤细胞增殖、诱导其分化的作用。

陈汉平等<sup>[5]</sup>提出:“针灸血清”之所以具有和药物相类似的作用,关键在于刺灸膈穴后,可通过某种内在生理调节机制,引起血清中活性物质含量产生有意义的改变。马淑兰等<sup>[38]</sup>发现针刺血清能降低肾上腺切除大鼠哮喘模型外周血嗜酸粒细胞数目,是因为针刺血清中存在非皮质激素类活性因子。王宇等<sup>[39]</sup>观察针刺血清对哮喘大鼠模型影响的同时,以色谱分析方法初步筛选血清中特异成分表明,针刺血清中存在3种以上的特异性成分。陈云飞等<sup>[40]</sup>以双向电泳研究不同时段艾灸血清中内源性蛋白组分的变化,表明在特定穴位艾灸,可使血清中的蛋白质组分发生改变,其中以酸性蛋白点缺失和蛋白峰度下降最为明显。杨永清等<sup>[41]</sup>从针刺治疗哮喘大鼠的血清中发现了至少4种特异蛋白,有1种蛋白已经明确其结构,并证明该蛋白具有明显的抗哮喘效应,因而认为刺灸穴位激活的异生性蛋白可能是针灸效应的物质基础。

本研究中所采用的是经过艾灸处理后提取的血浆作为效应物质作用于乙醇损伤的离体人胃黏膜上皮GES-1细胞,发现艾灸血浆能减少细胞损伤、抑制细胞凋亡,调整细胞周期,对GES-1细胞具有一定的保护作用。推测其作用机

制是由于艾灸预处理使血浆内产生了某种保护性异生蛋白,可对离体受损细胞产生保护作用。本课题组最近的工作已证实艾灸预处理可使外周血液中的HSP升高(待发表),其作用机制还有待进一步证实。

### 4 参考文献

- 1 朱立, 杨宗诚. 急性胃粘膜损害及其发病机制. 中国烧伤创疡杂志 1997; 9: 7-15
- 2 易受乡, 彭艳, 常小荣, 彭娜, 严洁, 林亚平. 艾灸预处理对应激性溃疡大鼠胃黏膜增殖修复的影响. 世界中西医结合杂志 2007; 2: 21-24
- 3 孙茂峰, 王茵萍, 林昭庚, 吴旭, 王岱. 针灸保护胃粘膜临床与实验研究进展. 中国针灸 2000; 20: 441-445
- 4 易受乡, 彭艳, 常小荣, 彭娜, 严洁, 林亚平. 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. 世界华人消化杂志 2006; 14: 3163-3168
- 5 陈汉平, 裴建. 关于“针灸血清”方法的研究和应用—四论针灸学的开放性. 上海针灸杂志 1998; 17: 1-2
- 6 王磊, 李学武, 张莉. 艾灸疗法作用机理国内外研究进展. 中国针灸 2001; 21: 567-570
- 7 尚秀葵. 长时间温和灸治疗胃肠病临证举要. 上海针灸杂志 2004; 23: 22-23
- 8 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
- 9 杨宗保, 严洁. 表皮生长因子受体及其信号转导通路与胃粘膜损伤修复研究. 中医药导报 2006; 12: 66-68
- 10 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: 3405-3408
- 11 常小荣, 彭娜, 易受乡, 彭艳, 严洁. 艾灸预处理对应激性溃疡大鼠胃黏膜HSP70蛋白及mRNA表达的影响. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1252-1256
- 12 孙涛, 陈原稼, 柯杨, 侯敏, 钱家鸣, 陈元方, 李晓波. 蛙皮素对人胃黏膜上皮永生细胞系GES-1细胞生长作用和机制的研究. 中华消化杂志 2003; 23: 327-331
- 13 宗红, 李建生, 张金平, 陈香宇, 董子明. 幽门螺杆菌对胃上皮细胞株GES-1凋亡及XIAP表达的影响. 山东医药 2005; 45: 11-12
- 14 李军祥, 王志斌, 朱陵群, 朱福玲, 崔巍. 三七提取物对经MNNG转化后的GES-1细胞增殖抑制及促凋亡作用. 中国中西医结合杂志 2005; 25: 719-722
- 15 王刚石, 孙桂华, 陈慎实. 生长抑素对羟自由基损伤的人胃黏膜上皮细胞系GES-1的影响. 中国应用生理学杂志 1999; 15: 180-183
- 16 孙德利, 陈汉平. “针灸血清”的研究方法及意义. 浙江中医学院学报 1999; 23: 59
- 17 贺石林, 葛金文, 贺蓉, 梅志刚. 质疑血清药理学, 加强多层次半体内实验研究. 中国药理学通报 2005; 21: 277-279
- 18 贺龙刚, 周丽, 黄枚, 吴符火. 丹参注射液含药血浆及血清对CAM血管生成的影响. 福建中医学院学报 2008; 18: 28-30
- 19 王东生, 陈方平, 贺石林, 解勤之, 付斌, 李昕, 曹星玉, 陈焱. 大黄(庶虫)虫丸血浆药理学与血清药理学作用的比较研究. 血栓与止血学 2005; 11: 5-8
- 20 何金生, 宗庭益. LDH释放法检测NK细胞活性的方法学研究. 中国实验临床免疫学杂志 1996; 8: 10-13
- 21 Iimuro M, Kaneko M, Matsumoto Y, Fujise Y, Watanabe T, Hayashi H. Effects of an endothelin receptor antagonist TAK-044 on myocardial energy metabolism in ischemia/reperfusion rat hearts. J Cardiovasc Pharmacol 2000; 35: 403-409
- 22 Mügge A, Elwell JH, Peterson TE, Harrison DG. Release of intact endothelium-derived relaxing fac-



- tor depends on endothelial superoxide dismutase activity. *Am J Physiol* 1991; 260: C219-C225
- 23 杨露晨, 魏铮, 吴巧凤, 刘祖光. 艾灸血清对实验性RA滑膜细胞增殖及细胞周期的影响. 成都中医药大学学报 2008; 31: 33-35
- 24 赵英侠, 王静, 秦逸人, 余安胜. 针灸血清作用的研究概况. 上海针灸杂志 2005; 24: 40-42
- 25 孙双历, 汪洋, 宋秀娟, 张海蒙. 艾灸血清对背根神经节神经突起影响的体外观察. 上海针灸杂志 2003; 22: 19-22
- 26 马晓凡, 赵粹英, 李祖剑, 季凤敏, 陈云飞. 艾灸血清体外对小鼠EL-4淋巴瘤细胞作用的实验研究. 中医药学刊 2003; 21: 1949-1950
- 27 裴建, 陈汉平, 赵粹英, 孙丽娟. “艾灸血清”对免疫活性细胞功能的影响. 上海针灸杂志 1999; 18: 38-40
- 28 陈云飞, 赵粹英, 吕琪泳. 艾灸血清抑瘤效应的实验观察. 上海针灸杂志 2000; 19: 39-41
- 29 陈云飞, 赵粹英, 陈汉平, 秦慧莲, 方舫. 小鼠艾灸血清诱导肿瘤细胞凋亡的实验研究. 针刺研究 2000; 25: 38-42
- 30 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
- 31 罗明富, 李翠红, 张金铃, 郭莹, 陈淑萍, 刘俊, 李瑞午. 针刺血清降低大鼠培养心肌细胞内Ca<sup>2+</sup>含量的研究. 中国针灸 2006; 26: 367-370
- 32 邓元江, 易受乡, 严洁, 林亚平, 郭晖, 刘卫英, 向志勇, 吴芳. 足阳明经穴针刺血清对家兔离体胃窦平滑肌细胞舒缩活动的影响. 中医杂志 2005; 46: 264-266
- 33 邓元江, 易受乡, 严洁, 林亚平, 郭晖, 刘卫英, 向志勇, 吴芳. 足阳明经穴针刺血清对家兔离体胃窦平滑肌细胞内钙离子浓度影响的实验研究. 新中医 2005; 37: 91-93
- 34 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 $\gamma$ -1活性的影响. 世界华人消化杂志 2006; 14: 985-988
- 35 杨宗保, 严洁, 邹小平, 常小荣, 易受乡, 林亚平. 电针大鼠胃经后血清对其胃黏膜细胞表皮生长因子受体表达的影响及浓度效应. 中国临床康复 2006; 10: 87-89
- 36 严洁, 杨宗保, 常小荣, 易受乡, 林亚平, 钟艳. 电针大鼠胃经穴的血清对胃黏膜细胞表皮生长因子受体后信息物质表达的影响. 中西医结合学报 2007; 5: 338-342
- 37 李岩, 李彬, 郭刚. 针灸大鼠血清诱导人卵巢癌细胞株SKOV3细胞凋亡及相关因子的研究. 现代妇产科进展 2006; 15: 690-692
- 38 马淑兰, 杨永清, 崔龙萍, 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
- 39 王宇, 马淑兰, 崔建美, 杨永清, 金明明. 针刺抗哮喘大鼠血清差异组份的色谱分析. 上海针灸杂志 2006; 25: 41-43
- 40 陈云飞, 杨文佳, 马晓凡, 洪娴, 刘莺. 不同时段艾灸血清中内生性蛋白组分双向电泳的实验研究. 上海中医药大学学报 2007; 21: 57-60
- 41 杨永清, 陈汉平, 王宇, 崔建美, 王燕, 刘艳艳. 针灸效应物质基础研究. 针刺研究 2007; 32: 399-401

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

# *WJC, WJGE, WJGO, WJGS, WJH, WJR* 6 本期刊 被 PMC 收录

**本刊讯** 我们于2010-08-17收到PubMed Central(PMC)的通知, 经过美国国立医学图书馆机构咨询委员会The Literature Selection Technical Review Committee评定, 决定*WJC, WJGE, WJGO, WJGS, WJH, WJR* 6本期刊被PMC收录. PMC是一个提供生命科学期刊文献的全文数据库, 他是由隶属美国国立医学图书馆(National Library of Medicine)的国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)所创建与管理的. (常务副总编辑: 张海宁 2010-08-17)