

艾灸对*Helicobacter pylori*胃炎大鼠单核细胞NF- κ B、I κ B α 含量的影响

林亚平, 封迎帅, 易受乡, 彭艳, 史冬梅, 侯艳玲

林亚平, 易受乡, 彭艳, 史冬梅, 侯艳玲, 湖南中医药大学针灸推拿学院经穴脏腑相关重点实验室 针灸生物信息分析重点实验室 湖南省长沙市 410007

封迎帅, 湖南省人民医院康复理疗科针灸室 湖南省长沙市 410005

林亚平, 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. 81072867

作者贡献分布: 此课题由林亚平、易受乡及彭艳设计; 研究过程由林亚平、封迎帅、彭艳、史冬梅及侯艳玲操作完成; 研究所用工具由林亚平提供; 数据分析由封迎帅、易受乡及林亚平完成; 本论文写作由封迎帅完成。

通讯作者: 林亚平, 教授, 博士生导师, 410007, 湖南长沙市韶山中路113号, 湖南中医药大学针灸推拿学院。

lyp5381161@126.com

电话: 0731-85381161

收稿日期: 2012-03-17 修回日期: 2013-04-10

接受日期: 2013-08-13 在线出版日期: 2013-09-08

Effect of moxibustion treatment on expression of NF- κ B and I κ B α in peripheral blood monocytes of rats with *Helicobacter pylori*-associated gastritis

Ya-Ping Lin, Ying-Shuai Feng, Shou-Xiang Yi, Yan Peng, Dong-Mei Shi, Yan-Ling Hou

Ya-Ping Lin, Shou-Xiang Yi, Yan Peng, Dong-Mei Shi, Yan-Ling Hou, Key Laboratory of Correlation between Points on Meridian and Viscera & Key Laboratory of Acupuncture Biological Information Analysis, College of Acupuncture and Massage, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China

Ying-Shuai Feng, Department of Rehabilitation and Physiotherapy, the People's Hospital of Hunan Province, Changsha 410007, Hunan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81072867

Correspondence to: Ya-Ping Lin, Professor, College of Acupuncture and Massage, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, 113 Shaoshan Middle Road, Changsha 410007, Hunan Province, China. lyp5381161@126.com

Received: 2012-03-17 Revised: 2013-04-10

Accepted: 2013-08-13 Published online: 2013-09-08

Abstract

AIM: To explore the effect of moxibustion treatment on gastric inflammatory injury and expression of NF- κ B and I κ B α in peripheral blood

monocytes of rats with *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)-associated gastritis, to reveal the mechanisms underlying the protective effect of moxibustion treatment against gastric inflammatory injury.

METHODS: Fifty healthy rats were randomly divided into five groups, namely, a control group (A), a *H. pylori* model group (B), a moxibustion at acupoints group (C), a moxibustion at non-acupoints group (D) and an electro-acupuncture group (E). Gastritis was induced by oral gavage with live *H. pylori*. The expression of NF- κ B and I κ B α in peripheral blood monocytes was detected by Western blot.

RESULTS: Compared to group A, gastric mucosal inflammation score and expression of NF- κ B in monocytes were significantly increased (0 ± 2.0 vs 2.5 ± 2.5 , $0.54 \pm 0.11/\beta$ -actin vs $0.36 \pm 0.13/\beta$ -actin, both $P < 0.01$), and expression of I κ B α in monocytes was significantly decreased in group B ($0.21 \pm 0.03/\beta$ -actin vs $0.65 \pm 0.18/\beta$ -actin, $P < 0.01$). Compared to group B, gastric mucosal inflammation score and expression of NF- κ B in monocytes were significantly decreased (2.5 ± 2.5 vs 0 ± 2.00 , $0.36 \pm 0.13/\beta$ -actin vs $0.50 \pm 0.04/\beta$ -actin, both $P < 0.01$), and expression of I κ B α in monocytes was significantly increased in group C ($0.65 \pm 0.18/\beta$ -actin vs $0.24 \pm 0.06/\beta$ -actin, $P < 0.01$). Compared to group D, gastric mucosal inflammation score and expression of NF- κ B in monocytes were significantly decreased (3.00 ± 2.5 vs 0 ± 2.00 , $0.36 \pm 0.12/\beta$ -actin vs $0.50 \pm 0.04/\beta$ -actin, both $P < 0.01$), and expression of I κ B α in monocytes was significantly increased in group C ($0.64 \pm 0.19/\beta$ -actin vs $0.24 \pm 0.06/\beta$ -actin, $P < 0.01$). Compared to group E, gastric mucosal inflammation score and expression of NF- κ B in monocytes were significantly decreased (3 ± 2.75 vs 0 ± 2.00 , $0.35 \pm 0.10/\beta$ -actin vs $0.50 \pm 0.04/\beta$ -actin, both $P < 0.01$), and expression of I κ B α in monocytes was significantly increased in group C ($0.52 \pm 0.17/\beta$ -actin vs $0.24 \pm 0.06/\beta$ -actin, $P < 0.01$).

■背景资料

本组以往从艾灸对胃黏膜保护作用进行了系统研究,发现艾灸足三里等穴能诱导eHSP72表达,增强机体免疫功能,干预胃黏膜炎症损伤过程;但是艾灸对幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)胃炎的干预作用,是否与细胞核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)、I κ B α 有关还有待进一步研究。

■同行评议者

郑鹏远, 教授, 主任医师, 郑州大学第二附属医院消化科

■研究前沿

艾灸、NF- κ B与胃黏膜炎性损伤有密切关系, 研究报道艾灸穴位处理能增强机体免疫功能, 干预胃黏膜炎性损伤。艾灸对*H. pylori*所致胃黏膜损伤的保护是否与NF- κ B、I κ B α 有关, 艾灸是否能通过调节NF- κ B、I κ B α 的表达来干预胃黏膜局部炎性细胞的浸润, 是本研究的主要目的。

CONCLUSION: Moxibustion at acupoints can reduce *H. pylori*-induced gastric mucosal inflammatory injury possibly *via* mechanisms associated with reducing NF- κ B expression in monocytes and decreasing the release of inflammatory cytokines.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Moxibustion; *Helicobacter pylori* gastritis; Extracellular heat shock protein 72; NF- κ B; I κ B α

Lin YP, Feng YS, Yi SX, Peng Y, Shi DM, Hou YL. Effect of moxibustion treatment on expression of NF- κ B and I κ B α in peripheral blood monocytes of rats with *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(25): 2563-2570 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2563.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i25.2563>

摘要

目的: 探讨艾灸对幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)胃炎大鼠胃黏膜HE染色镜检胃黏膜炎症积分值和单核细胞核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)、I κ B α 含量的影响, 初步揭示艾灸干预*H. pylori*胃黏膜炎性损伤, 保护胃黏膜的机制。

方法: 50只健康大鼠随机分为5组, 即A空白组、B模型组、C艾灸组、D艾灸非穴点组和E电针组, 每组10只。采用*H. pylori*灌胃造模, 蛋白免疫印迹法检测大鼠外周血单核细胞NF- κ B、I κ B α 的含量。

结果: 与A组比较, B组大鼠胃黏膜HE染色镜检胃黏膜炎症积分值和单核细胞NF- κ B含量显著升高(0 ± 2.0 vs 2.5 ± 2.5 , $0.54 \pm 0.11/\beta$ -actin vs $0.36 \pm 0.13/\beta$ -actin, $P < 0.01$), I κ B α 含量显著降低($0.21 \pm 0.03/\beta$ -actin vs $0.65 \pm 0.18/\beta$ -actin, $P < 0.01$); 与B组比较, C组大鼠胃黏膜HE染色镜检胃黏膜炎症积分值和单核细胞NF- κ B含量显著减低(2.5 ± 2.5 vs 0 ± 2.00 , $0.36 \pm 0.13/\beta$ -actin vs $0.50 \pm 0.04/\beta$ -actin, $P < 0.01$), I κ B α 含量显著升高($0.65 \pm 0.18/\beta$ -actin vs $0.24 \pm 0.06/\beta$ -actin, $P < 0.01$); 与D组相比, C组大鼠胃黏膜HE染色镜检胃黏膜炎症积分值和单核细胞NF- κ B含量明显升高(3.00 ± 2.5 vs 0 ± 2.00 , $0.36 \pm 0.12/\beta$ -actin vs $0.50 \pm 0.04/\beta$ -actin, $P < 0.01$), I κ B α 含量显著降低($0.64 \pm 0.19/\beta$ -actin vs $0.24 \pm 0.06/\beta$ -actin, $P < 0.01$); 与E组相比, C组大鼠胃黏膜HE染色镜检胃黏膜炎症积分值和单核细胞NF- κ B含量明显升高(3 ± 2.75 vs 0 ± 2.00 , $0.35 \pm 0.10/\beta$ -actin vs $0.50 \pm$

$0.04/\beta$ -actin, $P < 0.01$), I κ B α 含量显著降低($0.52 \pm 0.17/\beta$ -actin vs $0.24 \pm 0.06/\beta$ -actin, $P < 0.01$)。

结论: 艾灸穴位可减轻*H. pylori*胃炎胃黏膜炎性损伤, 此作用可能与艾灸诱导单核细胞I κ B α 大量表达, 抑制NF- κ B表达, 减少炎性细胞因子的释放, 减轻胃黏膜炎症损伤有关。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 艾灸; 幽门螺杆菌相关性胃炎; 胃黏膜组织HE染色镜检炎症程度评分积分值; 核因子 κ B; I κ B α

核心提示: 本研究从细胞核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)入手探讨艾灸穴位是否能干预幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)所致胃黏膜炎性损伤, 是否通过调节NF- κ B、I κ B α 的释放来抑制胃黏膜局部炎性细胞的浸润, 减轻胃黏膜炎性损伤, 从而为艾灸防治*H. pylori*胃炎提供理论依据。

林亚平, 封迎帅, 易受乡, 彭艳, 史冬梅, 侯艳玲. 艾灸对*Helicobacter pylori*胃炎大鼠单核细胞NF- κ B、I κ B α 含量的影响. 世界华人消化杂志 2013; 21(25): 2563-2570 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2563.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i25.2563>

0 引言

研究认为核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)可参与炎症反应, 介导多种炎性细胞因子的生成^[1-4], I κ B α 的降解和磷酸化是NF- κ B活化的关键因素^[5]。幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染是引起胃黏膜炎性损伤的主要病因^[6], 本组前期研究发现艾灸穴位预处理能增强机体免疫功能^[7], 减轻*H. pylori*胃炎大鼠的胃黏膜炎性损伤^[8], 但是艾灸是否可以通过调节NF- κ B、I κ B α 的释放来干预*H. pylori*胃炎的炎性损伤过程还不明确。因此, 本研究采用*H. pylori*灌胃建立大鼠*H. pylori*胃炎模型, 观察艾灸对*H. pylori*胃炎大鼠NF- κ B、I κ B α 的影响, 初步探讨灸干预*H. pylori*胃黏膜炎性损伤的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 健康SD大鼠, SPF级, 雌雄各半, 体重180-220 g, 共50只, 由湖南中医药大学实验动物中心提供(合格证号SCXK(湘)2009-2004), 饲养于湖南中医药大学实验动物中心。控制室温20℃-22℃, 相对湿度65%-70%, 大鼠在自然光暗周期的环境中饲养, 所用颗粒饲料和垫料

均由湖南中医药大学动物实验中心提供。施灸材料为苏州东方艾绒厂生产的“神灸300灸”艾炷(型号: 东方一型), 直径0.5 cm, 高0.8 cm。*H. pylori*菌株(由南华大学微生物实验室提供*H. pylori*国际标准菌株SS1菌种, 湖南中医药大学微生物实验室培养*H. pylori*菌株); 小牛血清(上海瑞齐生物科技有限公司), *H. pylori*快速尿素酶试验试剂盒(三明市安信生物技术有限公司), 10%乌拉坦、0.9%NaCl和多聚甲醛(湖南中医药大学针灸推拿实验室配制); 阿莫西林(华北制药); 华佗牌针灸针由苏州医疗用品厂有限公司生产, G6805-2型电针治疗仪(上海医用电器厂); AUE-210电子分析天平(长沙湘仪天平仪器厂); DK-8B电热恒温水槽(上海精宏实验设备有限公司); ZLSC-5型不锈钢电热重蒸馏水器(上海申安医疗器械厂); DHG-9246A型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); 石蜡切片机(美国820型AO切片机); 低温离心机(上海安亭科学医学仪器厂); MDF-U32V超低温冰箱(日本三洋); BCD-216/226STC海尔冰箱(海尔公司); 淋巴细胞的分离(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司); NF- κ B抗体(EPI 1546-1)、I κ B α 抗体(EPI 1130-s)、 β -actin(Santa Sc-1616r)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组: 所有大鼠按随机数字表法分为5组: A: 空白组, B: *H. pylori*胃炎模型(模型组), C: 模型+艾灸穴位组(艾灸组), D: 模型+艾灸非穴位组(艾灸对照点组), E: 模型+电针穴位组(电针组), 每组10只。

1.2.2 穴位定位: 动物穴位定位参考李忠仁主编《实验针灸学》常用动物穴位定位法及拟人对照法定位^[9]。足三里: 膝关节后外侧, 腓骨小头下约5 mm处; 中脘: 脐与胸骨剑突连线中点; 关元: 脐与耻骨联合上缘连线上3/5与下2/5交点, 约脐下25 mm处; 脾俞: 第十二胸椎棘突下, 旁开5 mm; 胃俞: 第十三胸椎棘突下, 旁开5 mm; 足三里的对照点: 在足阳明经和足太阳经之间, 平足三里; 中脘、关元的对照点: 分别在平中脘、关元穴的左侧腰部; 脾俞、胃俞的对照点: 在腋后线和肩胛下角的中线上, 分别平胸12、胸13。

1.2.3 动物造模方法: (1)*H. pylori*胃炎造模: 大鼠禁食12 h, 先以NaHCO₃+消炎痛溶液0.5 mL/只灌胃, 禁食6 h后再以*H. pylori*(含量10⁹/mL)1.5 mL/只灌胃, 隔天1次, 连续5次, 灌胃完毕后, 禁食禁水4 h, 之后正常喂养; (2)造模成功指标: 尿素酶试验阳性, 胃黏膜涂片革兰染色发现*H. pylori*,

胃黏膜组织HE染色镜检显示有炎性损伤即胃黏膜上皮细胞脱落并有炎性细胞浸润。

1.2.4 艾灸、电针方法: (1)艾灸方法: 取大鼠双侧足三里、中脘、关元、双侧脾俞和双侧胃俞穴及这些穴位的对照点(非穴点)。局部剪毛, 艾炷粘于穴位或非穴对照点上点燃施灸。单日大鼠仰卧位固定, C组灸足三里、中脘和关元穴, D组灸足三里、中脘和关元穴的对照点; 双日大鼠俯卧位固定, C组灸脾俞和胃俞, D组灸脾俞和胃俞的对照点。采用苏州东方艾绒厂提供的“神灸300灸”艾炷进行施灸, 每个艾灸部位连续艾灸5壮, 总延时约20 min左右, 每日1次, 连续16 d; (2)电针方法: 取大鼠双侧足三里、中脘、关元、双侧脾俞和双侧胃俞穴后穴位局部剪毛、络合碘消毒, 采用1寸、30号的华佗牌针灸针分别进行针刺, 针刺深度约4 mm左右, 针刺后连电针, 其中两侧足三里穴接在G6805-2型电针仪的第一组输出线上, 中脘和关元、两侧脾俞、两侧胃俞分别接在电针仪的第二、三、四组输出线上。单日大鼠仰卧位固定, E组电针足三里、中脘和关元穴; 双日大鼠俯卧位固定, E组电针脾俞和胃俞。一只大鼠每次共接两组输出线, 采用疏密波, 频率4-50 Hz, 脉宽0.5 ms, 输出电压2-4 V, 强度以肢体出现轻微颤抖为度, 电针时间20 min, 1次/d, 连续16 d。

1.2.5 实验步骤: 所有动物分组后予以浓度为2.5 g/L的阿莫西林生理盐水溶液0.5 mL/只灌胃, 2次/d, 连续3 d(杀灭大鼠上消化道可能定植的*H. pylori*); 第4天起每天13点所有大鼠捆绑于鼠板上, A、B组每日仅捆绑不做治疗, C、D组予以艾灸治疗, E组予以电针治疗, 1次/d, 连续16 d; 同时, 从实验第11天(即艾灸的第8天)开始灌胃, 隔天1次, 连续5次(即9 d), 灌胃前所有的大鼠禁食12 h, 上午10点左右A组先予以生理盐水0.5 mL/只灌胃, B、C、D、E组予以NaHCO₃+消炎痛溶液0.5 mL/只灌胃; 再禁食不禁水6 h后, 在下午16:30开始进行第2次灌胃, A组予以生理盐水1.5 mL/只灌胃, B、C、D、E组予以*H. pylori*(1 \times 10⁹)1.5 mL/只灌胃, 灌胃完毕后, 禁食禁水4 h, 之后正常喂养; 于最后一次灌胃(艾灸)结束后的第4周(28 d), 禁食12 h后全部大鼠以10%乌拉坦(1 mL/100 g)麻醉固定取材。胃黏膜处理: 大鼠剖腹取胃, 沿胃大弯剖开, 用冷生理盐水冲洗胃内残留物, 计数胃黏膜损伤指数。血清处理: 腹主动脉采血, 常温放置2-3 h, 4 $^{\circ}$ C 2000 r/min, 离心10 min, 取上清液, EP管分装, -20 $^{\circ}$ C保存, 待测。

■相关报道

研究发现艾灸对胃黏膜损伤有保护作用, 灸疗对机体的免疫作用是一切作用的基础, 目前从单核细胞NF- κ B、I κ B α 方面来研究艾灸的免疫调节作用是近年研究的热点。

■创新盘点

本研究结果显示艾灸足三里等穴可降低*H. pylori*胃炎大鼠胃黏膜HE染色镜检胃黏膜炎症积分值, 增高单核细胞I κ B α 含量, 降低NF- κ B含量, 说明艾灸足三里等穴能通过调节单核细胞I κ B α 、NF- κ B含量, 达到对胃黏膜的保护作用, 并有一定穴位特异性。

1.2.6 观察指标: (1)胃黏膜组织HE染色镜检炎症程度评分积分值, 根据参考文献[10-13], 从下面3个方面对胃组织炎症损伤进行评分: (1)炎症细胞浸润: 无(0分), 炎症细胞较少(1分), 数量较多(2分), 炎症细胞密集(3分); (2)浸润深度: 局限于黏膜浅层不超过黏膜层的1/3(1分), 炎症细胞浸入黏膜下层黏膜全层的2/3(2分), 浸入黏膜全层或肌层(3分); (3)破损程度: 无(0分), 上皮(1分), 黏膜固有层(2分), 黏膜肌层(3分)。将上述分值相加作为炎症损伤总分值进行组间比较。胃黏膜组织HE染色镜检按下面步骤进行HE染色: 组织入4%多聚甲醛固定24 h以上; 梯度乙醇脱水: 750 mL/L乙醇(ALC)2-4 h, 80%ALC 2-4 h, 95%ALC 3-4 h, 无水乙醇4 h, 二甲苯透明4 h; 包埋、自然冷却后修整蜡块置低温保存备用; 切片: 切片厚4-5 μ m, 铺片, 60 $^{\circ}$ C温箱中烤片; 染色: 切片脱蜡, 二甲苯2次各10 min, 无水乙醇3-5 min, 950 mL/L乙醇3-5 min, 800 mL/L乙醇5-10 min, 自来水洗约5 min, 苏木素液染色约5-10 min, 自来水洗去多余染液, 入750 mL/L乙醇(100 mL乙醇中加浓盐酸1 mL)分色数秒钟立即水洗并蓝化; 1%伊红水液染色3-5 min水洗; 入750-800 mL/L乙醇分色2-4 min, 950 mL/L乙醇脱水3-5 min, 无水乙醇脱水3-5 min; 二甲苯透明中性树胶封片; 干后镜下观察并显微采图; (2)外周血单核细胞NF- κ B、I κ B α 含量测定: 按照EPI公司的大鼠外周血单核细胞NF- κ B、I κ B α 的测定检测试剂盒的要求, 采用蛋白免疫印记检测, 具体步骤如下: 蛋白提取: 在每 10^6 单核细胞中加250 μ L细胞总蛋白提取试剂(使用前数分钟内加入cocktail、PMSF和磷酸化蛋白酶抑制剂), 振荡。如果需要提高蛋白浓度, 可以适当减少细胞总蛋白提取试剂体积; 将加有蛋白提取试剂的细胞放在冰上孵育30 min。其间每5 min用200 μ L移液器反复吹打。直至悬液清澈、不黏稠; 1200 r/min离心10 min, 上清即为提取的总蛋白。蛋白浓度测定: 采用Bradford方法测定; 标准曲线制作: 10 mg/mL BSA用生理盐水稀释为1 mg/mL; 样品浓度测定: 900 μ L Bradford加入1 μ L待测蛋白和99 μ L 0.9%生理盐水, 混匀后在595 nm处检测吸光度。根据标准品做出的标准曲线上计算出各样本蛋白浓度; 测完蛋白含量后, 计算含40 μ g蛋白的溶液体积即为上样量; 在蛋白标本中加入适当体积的蛋白上样缓冲液, 沸水浴5 min; SDS-PAGE电泳: 清洗玻璃板; 灌胶与上样: 将玻璃板对齐后放入夹中卡紧, 操作时要使两玻璃

对齐, 以免漏胶; 按实验安排配制分离胶, 加入TEMED后立即摇匀即可灌胶。大约45 min后可倒去胶上层水并用吸水纸将剩余水吸干; 按前面方法配5%的浓缩胶, 加入TEMED后立即摇匀即可灌胶。将剩余空间灌满浓缩胶然后将梳子插入浓缩胶中; 加足够的电泳液后上样电泳: 将样品加入电泳孔中, 电泳; 浓缩胶电压75 V, 分离胶用120 V; 电泳至溴酚蓝刚跑出即可终止电泳, 进行转膜; 转膜: 准备6张7 cm \times 9 cm的滤纸和一张大小适中的0.45 μ m PVDF膜, PVDF膜在使用之前要先用甲醇活化; 在加有转移液的盆里放入转膜用的夹子, 两块海绵垫, 一支玻棒, 滤纸和经过活化的PVDF膜; 将夹子打开使黑的一面保持水平; 在垫子上垫海绵、三层滤纸; 小心剥下分离胶盖于滤纸上, 将膜盖于胶上, 并除气泡; 在膜上盖三张滤纸并除去气泡, 最后盖上另一个海绵垫; 转膜条件: 200 mA, 1 h; 免疫反应: 将转好的膜于室温下脱色摇床上用5%的脱脂牛奶(0.5%TBST配), 封闭1 h; 稀释一抗(TBST溶解的5%脱脂牛奶), 4 $^{\circ}$ C过夜; 用TBST在室温下脱色摇床上洗3次, 每次5 min; 将二抗用TBST稀释3000倍, 室温下孵育30 min后, 用TBST在室温下脱色摇床上洗3次, 每次5 min; 化学发光: 将A和B两种试剂在离心管中等体积混合, 将膜蛋白面朝上与此混合液充分接触, 1-2 min后, 去尽残液, 包好, 放入X-光片夹中曝光; 根据不同的光强度调整曝光条件, 显影、定影; 凝胶图像分析: 将胶片进行扫描存档, Alpha软件处理系统分析目标带的灰度值, 以目的蛋白的灰度值除以内参 β -actin的灰度值以校正上样误差, 最后与对照组比较, 测定其相对光密度值即蛋白表达差异倍数(单位为 β -actin), 其中光密度值高说明表达多, 光密度值低说明表达少。

统计学处理 所有资料进行正态性检验, 符合正态分布的数据用mean \pm SD表示, 多组计量资料采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 方差齐者用LSD法, 方差不齐者用Tamhane's T2法; 非正态分布数据用中位数与四分位数间距[M(Q)]表示, 采用秩和检验。所有数据使用SPSS19 for Windows软件进行处理, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃黏膜涂片革兰氏染色检查 空白组胃黏膜革兰染色后镜检没有发现有红色的弧形或*H. pylori*; 模型组胃黏膜染色后镜检可见大量红

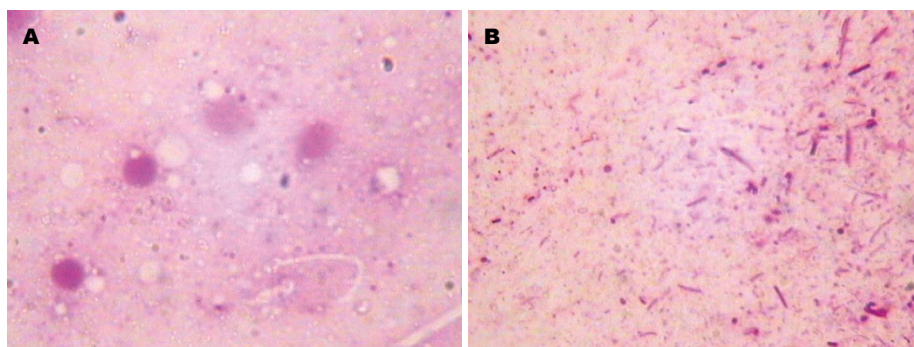


图1 空白组和模型组大鼠胃黏膜涂片革兰氏染色镜检结果. A: 空白组; B: 模型组.

■同行评价
本文设计合理, 实验方法科学, 结论中肯, 具有一定指导意义.

表1 艾灸对*H. pylori*胃炎大鼠胃黏膜炎症程度评分积分值影响 [$n=10$, $M(Q)$]

分组	胃黏膜炎症程度评分积分值
空白组	0(0)
模型组	3(2.5) ^b
艾灸组	0(0) ^d
艾灸对照点组	3(2.5)
电针组	2.5(2.0)

^b $P<0.01$ vs A组; ^d $P<0.01$ vs B组; ^c $P<0.01$ vs D组; ^h $P<0.01$ vs E组.

色的弧形或*H. pylori*(图1), 说明*H. pylori*灌胃后大鼠感染了*H. pylori*.

2.2 艾灸对各组大鼠HE染色镜检胃组织形态学变化的影响 与A组比较, B、D、E组大鼠胃黏膜上皮明显破损、脱落, 固有层中腺体浅层被破坏, 有少数炎症细胞浸润, 胃黏膜上皮损伤明显; 与B、D、E组比较, C组大鼠胃黏膜破损、脱落较轻, 炎症细胞浸润较少, 说明艾灸预处理对胃黏膜损伤的炎症浸润有抑制作用, 能促进胃黏膜的修复(图2).

2.3 艾灸对*H. pylori*胃炎大鼠胃黏膜组织HE染色镜检炎症程度评分积分值影响 与A组比较, B组大鼠胃黏膜组织HE染色镜检炎症程度评分积分值升高($P<0.01$); 与B组相比, C组大鼠胃黏膜组织HE染色镜检炎症程度评分积分值降低($P<0.01$), D、E组大鼠胃黏膜组织HE染色镜检炎症程度评分积分值无明显降低($P>0.05$); 与D、E组相比, C组大鼠胃黏膜组织HE染色镜检炎症程度评分积分值明显降低($P<0.01$), 以上结果提示: *H. pylori*灌胃造模后, 胃黏膜受损; 艾灸预处理可降低胃黏膜组织HE染色镜检炎症程度评分积分值, 减轻胃黏膜炎症损伤, 且减轻胃黏

膜炎症性损伤作用优于艾灸非穴位与电针组(表1).

2.4 艾灸对*H. pylori*胃炎大鼠外周血单核细胞I κ B α 、NF- κ B表达的影响 与A组比较, B组大鼠单核细胞I κ B α 含量降低($P<0.05$); 与B组比较, C组大鼠单核细胞I κ B α 含量增加($P<0.05$), D、E组大鼠单核细胞I κ B α 含量无明显增加($P>0.05$); 与D、E组比较, C组大鼠单核细胞I κ B α 表达增加($P<0.05$), 以上提示: *H. pylori*灌胃造模后, 大鼠单核细胞I κ B α 表达量显著下降, 艾灸穴位组可以使*H. pylori*胃炎大鼠单核细胞I κ B α 表达增加, 而电针穴位和艾灸对照点组不能增加*H. pylori*胃炎大鼠单核细胞I κ B α 含量, 艾灸穴位组增加大鼠单核细胞I κ B α 表达效果优于电针和艾灸非对照点组的效果(表2, 图3). 与A组比较, B组大鼠单核细胞NF- κ B表达量增强($P<0.01$); 与B组比较, C组大鼠单核细胞NF- κ B表达量下降($P<0.01$), D、E组大鼠单核细胞NF- κ B表达量无明显下降($P>0.05$); 与D、E组比较, C组大鼠单核细胞NF- κ B表达降低($P<0.01$), 提示: *H. pylori*灌胃造模后, 大鼠单核细胞NF- κ B表达量显著上升, 艾灸穴位组可以使*H. pylori*胃炎大鼠单核细胞NF- κ B表达降低, 而电针穴位和艾灸对照点预处理不能降低*H. pylori*胃炎大鼠单核细胞NF- κ B表达, 艾灸穴位组降低大鼠单核细胞NF- κ B表达效果优于电针和艾灸非对照点组的效果(表2, 图3).

3 讨论

慢性胃炎属于祖国医学“胃脘痛”范围, 临床上约70%-80%的患者可无任何症状, 有症状者主要表现为上腹不适、饱胀、钝痛、烧灼痛等非特异性的消化不良症状^[6]. *H. pylori*感染是导致胃炎的主要原因, *H. pylori*感染活动期胃黏膜固有层、小凹上皮和腺上皮之间可出现中性粒细胞浸润, 炎症的静息期则以淋巴细胞和浆细

表 2 艾灸对 *H. pylori* 胃炎大鼠单核细胞 I κ B α 、NF- κ B 相对光密度值的影响 ($n = 5$, mean \pm SD)

分组	I κ B α (相对光密度值)/ β -actin)	NF- κ B(相对光密度值)/ β -actin)
空白组	0.54 \pm 0.11	0.21 \pm 0.03
模型组	0.36 \pm 0.13 ^a	0.65 \pm 0.18 ^b
艾灸组	0.50 \pm 0.04 ^{c, eg}	0.24 \pm 0.06 ^{d, fh}
艾灸对照点组	0.36 \pm 0.12	0.64 \pm 0.19
电针组	0.35 \pm 0.10	0.52 \pm 0.17

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 空白组; ^c $P < 0.05$, ^e $P < 0.01$ vs 模型组; ^d $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ vs 艾灸对照点组;

^g $P < 0.05$, ^h $P < 0.01$ vs 电针组.

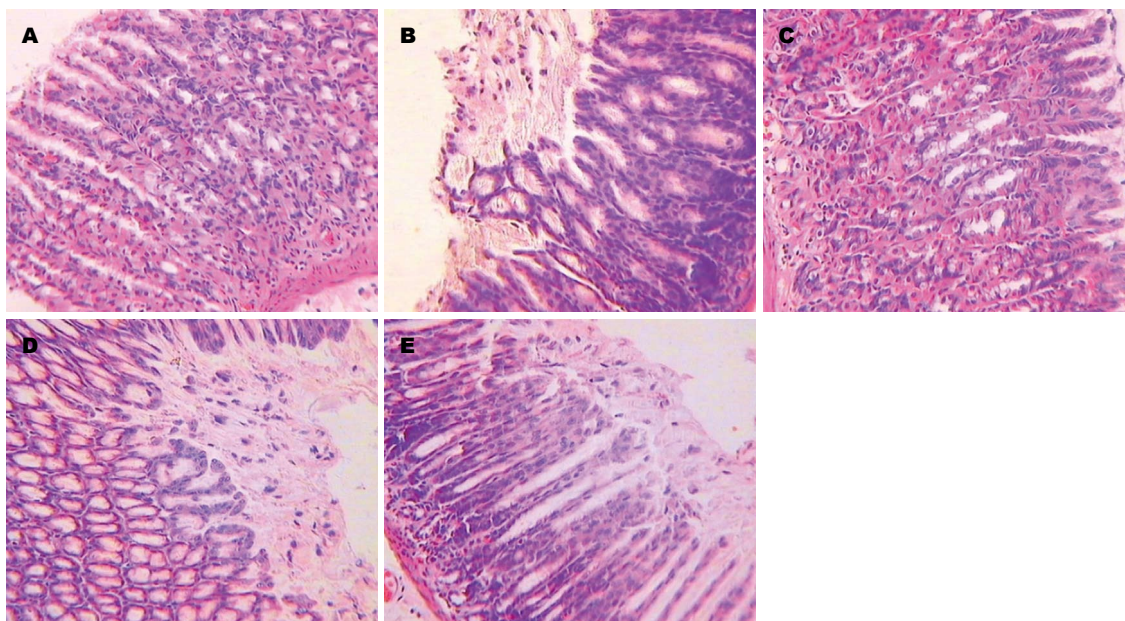


图 2 各组胃组织HE染色后镜检形态学比较($\times 250$). A: 空白组; B: 模型组; C: 艾灸组; D: 艾灸对照点组; E: 电针组.

胞慢性炎症浸润为主. 目前关于 *H. pylori* 相关性慢性胃炎的诊断主要是组织学、尿素酶、细菌培养、¹⁴C-尿素呼气试验任一项阳性证实有 *H. pylori* 现症感染, 病理切片检查有慢性胃炎的组织学改变^[14].

NF- κ B 命名是因为他是作为 B 细胞细胞核转录因子被发现, 免疫球蛋白 κ 轻链基因是他的结合位点, 他是以 p50/p65 异二聚体形式存在于哺乳动物细胞浆中的转录因子, 在静息状态下, 与抑制性蛋白 I κ B 结合在一起, 以无活性的形式存在于细胞质中. 当他被细菌、病毒、LPS、氧化剂和自由基等刺激后^[15-17], I κ B 被磷酸化和降解, 使 NF- κ B 与 I κ B 解离, 游离的 NF- κ B 转入细胞核内, 启动基因转录^[18], 诱导细胞因子的转录. NF- κ B 被认为是最重要的炎症调节信号通路之一^[19,20]. 抑制蛋白 I κ B 主要由 I κ B α 、I κ B β 和 I κ B ϵ 3 种分子组成的蛋白家族, 其中 I κ B α 是 NF- κ B

激活途径中主要的调节分子, I κ B 与 NF- κ B 结合可以阻止细胞质中的 NF- κ B 进入细胞核和调控其转录功能, 抑制 NF- κ B 活化^[21]. NF- κ B 信号通路^[22] 参与了感染、炎症、免疫反应和细胞凋亡等病理过程^[23-25], I κ B α 的降解和磷酸化是 NF- κ B 活化的最关键因素. 因此, 研究证明可以通过阻止 I κ B α 降解来抑制 NF- κ B 的活化, 从而阻断 NF- κ B 炎性信号转导途径, 缓解组织炎性损伤^[19,20].

总之, *H. pylori* 灌胃造模后, 大鼠胃黏膜 HE 染色镜检胃黏膜炎症积分值和单核细胞 NF- κ B 含量显著升高, I κ B α 含量显著降低; 艾灸穴位处理后大鼠胃黏膜 HE 染色镜检胃黏膜炎症积分值和单核细胞 NF- κ B 含量显著降低, I κ B α 含量显著增加; 电针穴位和艾灸对照点处理后大鼠胃黏膜 HE 染色镜检胃黏膜炎症积分值和单核细胞 NF- κ B 无明显降低, I κ B α 含量无明显增加; 提示: *H. pylori* 直接灌胃后, 大鼠胃黏膜明显受损; 电

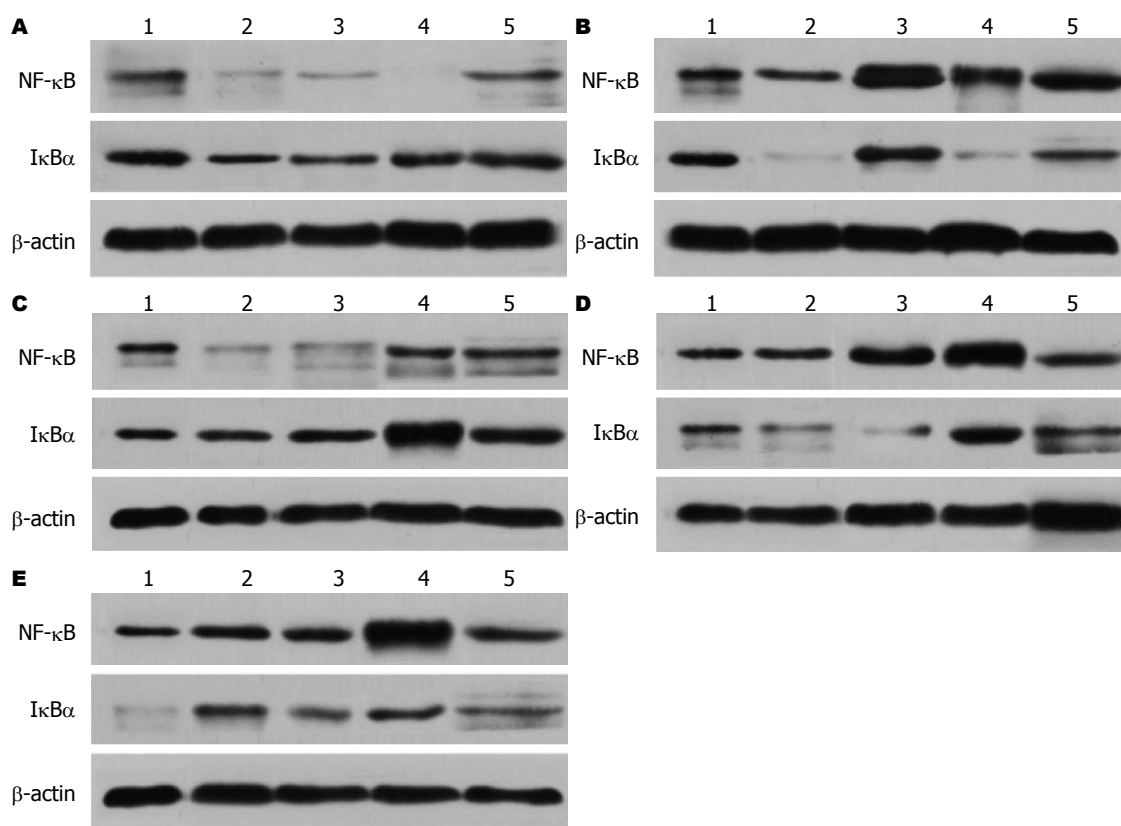


图3 各组大鼠单核细胞NF- κ B相对光密度值比较. A: 空白组; B: 模型组; C: 艾灸组; D: 艾灸对照点组; E: 电针组.

针穴位和艾灸对照点处理不能减轻对*H. pylori*胃炎的炎性损伤; 艾灸穴位可减轻*H. pylori*胃炎胃黏膜炎性损伤, 此作用可能与艾灸诱导单核细胞I κ B α 大量表达, 抑制NF- κ B表达, 减少炎性细胞因子的释放, 干预胃黏膜局部炎性细胞的浸润, 减轻胃黏膜炎症损伤有关.

4 参考文献

- Mizgerd JP, Spieker MR, Doerschuk CM. Early response cytokines and innate immunity: essential roles for TNF receptor 1 and type I IL-1 receptor during *Escherichia coli* pneumonia in mice. *J Immunol* 2001; 166: 4042-4048 [PMID: 11238652]
- Mizgerd JP, Lupa MM, Hjoberg J, Vallone JC, Warren HB, Butler JP, Silverman ES. Roles for early response cytokines during *Escherichia coli* pneumonia revealed by mice with combined deficiencies of all signaling receptors for TNF and IL-1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286: L1302-L1310 [PMID: 14966082 DOI: 10.1152/ajplung.00353.2003]
- Jones MR, Simms BT, Lupa MM, Kogan MS, Mizgerd JP. Lung NF-kappaB activation and neutrophil recruitment require IL-1 and TNF receptor signaling during pneumococcal pneumonia. *J Immunol* 2005; 175: 7530-7535 [PMID: 16301661]
- Lee JS, Frevert CW, Matute-Bello G, Wurfel MM, Wong VA, Lin SM, Ruzinski J, Mongovin S, Goodman RB, Martin TR. TLR-4 pathway mediates the inflammatory response but not bacterial elimination in *E. coli* pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 289: L731-L738 [PMID: 16024722 DOI: 10.1152/ajplung.00196.2005]
- Perkins ND. The Rel/NF-kappa B family: friend and foe. *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 434-440 [PMID: 10973057 DOI: 10.1016/S0968-0004(00)01617-0]
- 王吉耀, 廖二元, 胡品津. 内科学. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 414-418
- 张淑君. 试论灸法“治未病”. *中国针灸* 2008; 28: 739-741
- 封迎帅, 易受乡, 林亚平, 彭艳, 史冬梅, 侯艳玲. 艾灸预处理对幽门螺杆菌胃黏膜炎性损伤大鼠血清IgG和eHSP72含量的影响. *世界华人消化杂志* 2012; 20: 1131-1136
- 李忠仁. 实验针灸学. 第1版. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 327-329
- Price AB. The Sydney System: histological division. *J Gastroenterol Hepatol* 1991; 6: 209-222 [PMID: 1912431 DOI: 10.1111/j.1440-1746.1991.tb01468.x]
- Nagahata Y, Kawakita N, Azumi Y, Numata N, Yano M, Saitoh Y. Etiological involvement of *Helicobacter pylori* in "reflux" gastritis after gastrectomy. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 2130-2134 [PMID: 8855735]
- 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会. 慢性胃炎的中西医结合诊治方案(草案). *中国中西医结合杂志* 2005; 25: 172-175
- 陈曦, 杨世忠, 迟宝荣. 大鼠炎症性肠病模型的复制及中药的干预作用. *吉林大学学报(医学版)* 2008; 34: 262-266
- 中华医学会消化病学分会, 全国慢性胃炎研讨会共识意见. *中华消化杂志* 2000; 20: 199-201
- Grumont RJ, Gerondakis S. Rel induces interferon regulatory factor 4 (IRF-4) expression in lymphocytes: modulation of interferon-regulated gene

- expression by rel/nuclear factor kappaB. *J Exp Med* 2000; 191: 1281-1292 [PMID: 10770796 DOI: 10.1084/jem.191.8.1281]
- 16 Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem* 1999; 45: 7-17 [PMID: 9895331]
- 17 Gugasyan R, Grumont R, Grossmann M, Nakamura Y, Pohl T, Nesic D, Gerondakis S. Rel/NF-kappaB transcription factors: key mediators of B-cell activation. *Immunol Rev* 2000; 176: 134-140 [PMID: 11043773 DOI: 10.1034/j.1600-065X.2000.00615.x]
- 18 May MJ, Ghosh S. Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol Today* 1998; 19:80-88 [PMID: 9509763]
- 19 Janssen-Heininger YM, Poynter ME, Baeuerle PA. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1317-1327 [PMID: 10924851 DOI: 10.1016/S0891-5849(00)00218-5]
- 20 Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999; 18: 6853-6866 [PMID: 10602461 DOI: 10.1038/sj.onc.1203239]
- 21 史艳晖, 卢圣栋. 转录因子NFκB的研究现状及其应用前景. *中国生物工程杂志* 2007; 27: 110-112
- 22 Silverman N, Maniatis T. NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev* 2001; 15: 2321-2342 [PMID: 11562344 DOI: 10.1101/gad.909001]
- 23 Aradhya S, Nelson DL. NF-kappaB signaling and human disease. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11: 300-306 [PMID: 11377967 DOI: 10.1016/S0959-437X(00)00194-5]
- 24 Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001; 107: 7-11 [PMID: 11134171 DOI: 10.1172/JCI11830]
- 25 Baldwin AS. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest* 2001; 107: 3-6 [PMID: 11134170 DOI: 10.1172/JCI11891]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊

本刊讯 2011-12-02, 中国科学技术信息研究所在北京发布2010年中国科技论文统计结果, 经过中国精品科技期刊遴选指标体系综合评价, 《世界华人消化杂志》被评为2011年度中国精品科技期刊. 中国精品科技期刊以其整体的高质量示范作用, 带动我国科技期刊学术水平的提高. 精品科技期刊的遴选周期为三年. (《世界华人消化杂志》编辑部)