

隔药灸对急性胃黏膜损伤家兔穴区线粒体及 I 型胶原蛋白的影响

周志刚^{1,2} 罗薇絮² 张学强² 覃 肯² 窦传宇¹ 吴焕淦¹

(1 上海中医药大学, 上海, 201203; 2 江西中医药大学, 南昌, 330004)

摘要 目的: 观察隔药灸对急性胃黏膜损伤家兔胃黏膜损伤指数、穴区局部线粒体结构、I 型胶原蛋白表达的影响, 从胃黏膜修复及腧穴局部能量代谢角度探讨隔药灸对急性胃黏膜损伤的起效机制。方法: 新西兰兔随机分为正常组、模型组、隔药灸组和西药组。在成功制备急性胃黏膜损伤模型的基础上, 隔药灸组取“后三里穴”进行治疗, 西药组以硫糖铝灌胃治疗。各组治疗干预结束后, 留取胃黏膜和穴区局部组织, 采用 Guth 法对各组的胃黏膜损伤指数进行评分, 透射电镜观察后三里穴位局部组织线粒体形态结构, 免疫组化法检测穴区 I 型胶原蛋白的表达。结果: 与正常组比较, 模型组、西药组和隔药灸组家兔胃黏膜损伤指数均显著升高 (均 $P < 0.01$); 模型组穴区细胞线粒体空泡化, I 型胶原蛋白表达降低 ($P < 0.01$); 隔药灸组仅有少数线粒体水肿; 西药组线粒体数目少、出现肿胀, 线粒体嵴不明显。与模型组比较, 隔药灸组和西药组胃黏膜损伤指数显著下降 (均 $P < 0.01$), I 型胶原蛋白表达升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。隔药灸组胃黏膜损伤指数低于西药组 ($P < 0.01$), I 型胶原蛋白表达高于西药组, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论: 隔药灸能够改善急性胃黏膜损伤家兔“后三里”穴区线粒体形态、提高急性胃黏膜损伤家兔后三里穴局部组织的 I 型胶原蛋白的表达, 这可能是其修复胃黏膜损伤的起效途径之一。

关键词 隔药灸; 急性胃黏膜损伤; 线粒体; I 型胶原蛋白; 胃黏膜保护

Effect of Herbs-Partitioned Moxibustion on The Point Area Mitochondria and Collagen Type I of Acute Gastric Mucosal Injury Rabbits

Zhou Zhigang^{1,2}, Luo Weixu², Zhang Xueqiang², Qin Ken², Dou Chuanzi¹, Wu Huanan¹

(1 Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China; 2 Jiangxi University of TCM, Nanchang, Jiangxi 330004, China)

Abstract Objective: To observe the effect of moxibustion on gastric mucosa injury index, the local structure of mitochondria and expression of type I collagen in acute gastric mucosal injury rabbits, and discuss the working mechanism of moxibustion on acute gastric mucosal injury from the perspective of gastric mucosal repair and energy metabolism of local acupoint. **Methods:** A group of New Zealand rabbits were randomly divided into normal group, model group, moxibustion group and western medicine group. As acute gastric mucosal injury model was successfully prepared, moxibustion group used ST36 (Housanli) treatment, western medicine group used sucralfate gavage treatment. After the intervention, gastric mucosa and acupoint local tissue was reserved, using Guth method to observe index of gastric mucosal injury and transmission electron microscope to view local tissue mitochondrial morphology of ST36 (Housanli). Also, immunohistochemistry was used to detect the expression of type I collagen. **Results:** Compared with the normal group, gastric mucosal injury index of rabbits in model group, western medicine group and herbs-partitioned moxibustion group were significantly increased ($P < 0.01$). Cells in acupoint of model group appeared mitochondrial vacuolation, and expression of type I collagen was decreased ($P < 0.01$). Besides, only a few mitochondria showed edema in moxibustion group and mitochondria decreased and mitochondrial cristae was not obvious in the western medicine group. Compared with the model group, gastric mucosal injury index decreased significantly ($P < 0.01$), while the expression of type I collagen increased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$) in moxibustion group and Western medicine group. Gastric mucosal injury index in moxibustion group was lower than that in western medicine group ($P < 0.01$), thus type I collagen expression was higher than that in western medicine group, but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion:** Herbs-partitioned moxibustion could improve mitochondrial morphology and increase the expression of collagen type I in acute gastric mucosal injury rabbits, which may be an effective

基金项目: 上海市教委预算内科研项目 (编号: 2013JW53); 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 资助项目 (编号: 2009CB522900)

作者简介: 周志刚 (1971—), 男, 江西莲花县人, 博士, 副教授, 研究方向: 灸法作用的基本原理与应用规律研究

通信作者: 窦传宇 (1984—), 男, 山东青岛人, 博士, 助理研究员, 研究方向: 针灸治疗胃肠疾病, E-mail: dchuanzi@126.com;

吴焕淦 (1956—), 男, 浙江仙居人, 博士, 教授, 研究方向: 灸法作用的基本原理与应用规律研究, E-mail: wuhuanan@126.com

tive approach to repair gastric mucosal injury.

Key Words Herbs-partitioned moxibustion; Acute gastric mucosal injury; Mitochondria; Collagen type I; Gastric mucosal protection

中图分类号:R245;R573.4 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.11.034

灸法是以常见的艾绒为材料,点燃后直接或间接熏灼穴位的传统疗法,具有悠久的历史。《扁鹊心书》就提到“保命之法,艾灼第一”,《医学入门》中记载“凡病药之不及,针之不到,必须灸之”。现代研究认为,艾灸时产生的温热刺激、红外辐射以及艾灸生成物均是其起效的重要因素,而人体对温热刺激、红外辐射等的反应是艾灸起效的科学基础。艾灸的局部起效机制研究发现,施灸局部皮下和肌肉层都不同程度的受到施灸影响,从而产生温度变化,并推测可能是温度的变化改变了多种感受器的活动^[1]。我们前期实验结果显示,隔药灸可以提高急性胃黏膜损伤家兔穴区局部 Na^+/K^+ -ATP 酶的活性,改善胃黏膜 AB/PAS 阳性层厚度,提示艾灸的修复效应与提高膈穴局部组织 Na^+/K^+ -ATP 酶活性有关。ATP 能量代谢和疾病的病理状态密切相关,艾灸的近红外光谱与膈穴自发的红外光谱具有相似性,这可能引发共振,从而促进机体 ATP 能量代谢^[2-3]。越来越多的证据显示,艾灸发挥效应与穴区局部的能量代谢存在联系。线粒体是合成 ATP,参与能量代谢的主要场所,由 ATP 水解反应所释放的生物能量可沿着蛋白质分子进行传递^[4]。在此基础上,选取急性胃黏膜损伤家兔模型,观察胃黏膜损伤指数,隔药灸对急性胃黏膜损伤家兔后三里穴区组织线粒体形态的影响以及 I 型胶原蛋白表达的变化,探讨隔药灸对急性胃黏膜损伤的起效机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 新西兰家兔 36 只,体重约 (2.2 ± 0.5) kg,雌雄各 18 只,由上海中医药大学动物中心提供。家兔购回后适应性饲养 7 d,饮食及一般情况正常者纳入实验。

1.2 主要试剂和仪器 艾绒、动物用艾条(南阳市卧龙汉医艾绒厂);硫糖铝(四川锡成药业有限公司,0.250g/片);无水乙醇(上海高韵化工有限公司);甲醛、戊二醛(上海国药集团);柠檬酸钠缓冲溶液、中性树脂(上海基尔顿);I 型胶原蛋白一抗、二抗(上海基免实业有限公司);组织脱水机(TPI020 型,德国徕卡公司);石蜡包埋机(EG1160 型,德国徕卡公司);组织切片机(RM2235 型,德国徕卡公司);封片机(CV5030 型,德国徕卡公司);电

子天平(PL203 型,梅特勒-托利多);制冰机(上海久景制冷设备有限公司);不锈钢电热重蒸馏水器(ZLSC-5 型,上海申安医疗器械厂);电恒温水浴槽(DK-8A 型,上海精宏实验设备有限公司);荧光显微镜(BA400 型,MOTIC);Motic 图像分析系统(麦克奥迪实业集团有限公司);PHILIPS CM-120 透射电镜(PHILIP)。

1.3 模型制备 采用无水乙醇灌胃的方法制备家兔急性胃黏膜损伤模型^[5]。造模前各组动物均禁食 48 h,造模家兔采用无水乙醇(按 2.35 mL/kg)灌胃,正常组用生理盐水(按 2.35 mL/kg)灌胃,24 h 后各组家兔恢复普通饮食。造模结束后,随机选取 3 只急性胃黏膜损伤模型家兔和 1 只正常组家兔,处死后取胃黏膜进行 HE 染色,光镜下观察胃黏膜损伤情况,判断造模成功与否。

1.4 分组与治疗 采用随机数字表法将 24 只急性胃黏膜损伤家兔随机分为模型组、隔药灸组和西药组,每组各 8 只,并与正常组家兔作对照。将家兔置于固定架内固定,保持双后腿伸出,用剃毛器将家兔左、右后肢外侧“后三里”穴毛发剃除,适应室温 10 min,按照以下方法进行干预处理:正常组和模型组,仅做家兔固定和剃毛,不进行任何治疗;隔药灸组,采用附子、肉桂、丹参等中药,研成细粉,用适量黄酒调和拌成厚糊状,采用模具压制成直径 0.5 cm、厚 0.3 cm 大小的圆柱形药饼。选取精制艾绒约 90 mg,制作成小椎体状艾柱。将制好的药饼分别置于家兔双侧后三里穴上,上置艾柱,1 次/d,每次灸 6 壮,连续治疗 7 d;西药组,采用硫糖铝灌胃治疗。根据体表面积法计算硫糖铝用量,1 次/d,每次按 25 mg/kg 体重灌药,连续治疗 7 d。膈穴定位方法:依据《实验针灸学》穴位定位^[6],后三里穴位于家兔小腿背外侧上 1/5 折点处,约当胫骨嵴后 1 cm,腓骨头下 1.2 cm。

1.5 指标检测

1.5.1 胃黏膜损伤指数评价 参考 Guth 法^[7]进行溃疡指数的计分:点状出血为 1 分;线状出血,长度 $<1 \text{ mm}$ 为 2 分;1~2 mm 为 3 分;2~4 mm 为 4 分; $>4 \text{ mm}$ 为 5 分;宽度 $>1 \text{ mm}$ 时分值乘以 2。

1.5.2 后三里穴组织线粒体结构观察 取下“后三

里”穴位置约0.1 cm×1 cm 组织,置于2.5%戊二醛中固定,梯度乙醇脱水,石蜡包埋并切片,染色后由透射电子显微镜进行观察。

1.5.3 后三里穴组织 I 型胶原蛋白表达的检测
取下“后三里”穴合适位置组织,约0.1 cm×1 cm,置于福尔马林中固定48 h,逐级乙醇脱水,常规石蜡包埋,切片,脱蜡、水化,置于0.01 M 柠檬酸钠缓冲溶液中95℃抗原修复15 min,PBS 洗涤,封闭,一抗、二抗孵育,透明,中性树胶封片。

1.6 统计学方法 汇总数据,用SPSS 19.0 软件进行统计分析。对数据资料进行正态性检验,符合正态分布者,采用单因素方差分析(One-way ANOVA);方差齐采用LSD 和SNK 法,方差不齐时用Tamhane's T2 或Dunnett's T3 法。不符合正态分布则采用秩和检验。

2 结果

2.1 胃黏膜损伤指数 与正常组相比,模型组、隔药灸组和西药组家兔胃黏膜损伤指数均明显升高,差异具有统计学意义(均 $P<0.01$);与模型组相比,隔药灸组和西药组胃黏膜损伤指数均显著下降,差异具有统计学意义(均 $P<0.01$);隔药灸组胃黏膜损伤指数低于西药组,差异具有统计学意义($P<0.01$)。见表1。

表 1 各组家兔胃黏膜损伤指数评分比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	胃黏膜损伤指数
正常组	8	7.75±1.91 ^{△△}
模型组	8	34.25±4.83 ^{**}
隔药灸组	8	18.25±2.96 ^{△△**}
西药组	8	28.50±2.88 ^{△△**}

注:与正常组比较,** $P<0.01$,与模型组比较,△△ $P<0.01$ 。

2.2 “后三里”穴组织线粒体结构观察 见图1。

2.3 “后三里”穴组织 I 型胶原蛋白表达的比较
与正常组比较,模型组、隔药灸组和西药组家兔“后三里”穴组织 I 型胶原蛋白的阳性目标总面积明显降低,差异存在统计学意义(均 $P<0.01$);与模型组比较,隔药灸组和西药组家兔“后三里”穴组织 I 型胶原蛋白的阳性目标总面积明显升高,差异存在统计学意义($P<0.01,P<0.05$);隔药灸组家兔“后三里”穴组织 I 型胶原蛋白的阳性目标总面积略高于西药组,但无统计学意义($P>0.05$)。与正常组比较,模型组和西药组家兔“后三里”穴组织 I 型胶原蛋白的积分光密度明显降低,差异存在统计学意义(均 $P<0.01$);与模型组比较,隔药灸组家兔“后三里”穴组织 I 型胶原蛋白的积分光密度明显升高,差

异存在统计学意义($P<0.01$);隔药灸组家兔“后三里”穴组织 I 型胶原蛋白的积分光密度略高于西药组,但无统计学意义($P>0.05$)。见表2。

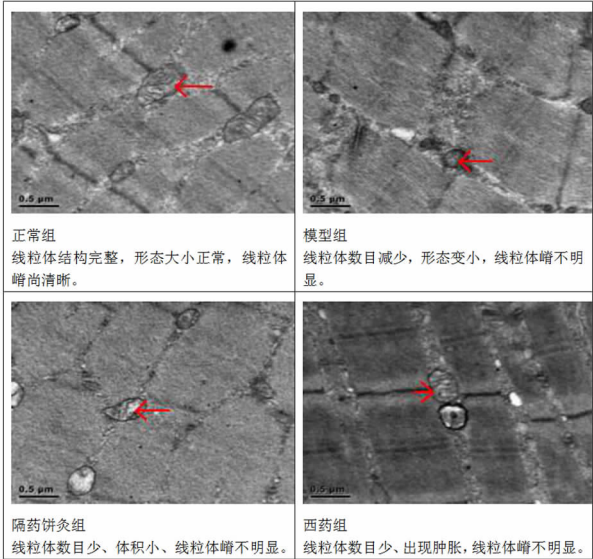


图 1 各组家兔“后三里”穴组织线粒体结构观察

表 2 各组家兔“后三里”穴组织 I 型胶原蛋白表达的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	阳性目标总面积(μm^2)	平均光密度值
正常组	8	969.13±24.33	7883.75±1295.88
模型组	8	648.25±53.82 ^{**}	4688.88±474.81 [*]
隔药灸组	8	816.82±132.62 ^{***}	6892.50±958.37 ^{△△}
西药组	8	747.25±51.26 ^{**△}	5676.38±950.46 [*]

注:与正常组比较* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$ 。

3 讨论

腧穴是人体脏腑经络气血输注于体表的特殊部位,是发生疾病时的反应点和针灸干预的刺激点。足三里为足阳明胃经之合穴,具有调理脾胃、补中益气等功效,也是胃腑之下合穴,为主治胃腑病的首选穴,临床主治与胃经有关的疾病。中医古籍中关于足三里治疗胃脘痛的记载有很多,如:明代针灸家徐凤在《针灸大全》记载足三里“善治胃中寒”和“合治内府”,“肚腹三里留”又是《四总穴歌》对足三里主治作用的经典概括,《针灸精粹》也有记载,足三里能够“理胃病,兼治腹中一切疾病”。已有研究发现,艾灸足三里穴能保护胃黏膜,诱导机体产生内源性保护物质,通过抗炎(如抑制IL-1 β 、TNF- α 等)、抗氧化、抑制凋亡等发挥保护和修复胃黏膜作用^[8-9]。但穴区局部的起效机制仍不明确。腧穴作为艾灸刺激的作用点,在施灸过程中可能发生某种改变,从而影响到艾灸效应的发挥。研究发现^[10-12],

某些冠心病患者的部分腧穴(如劳宫、内关、神门等)在一定范围内的红外辐射光谱显著低于正常人,一些溃疡性结肠炎患者的冲阳穴在某些波长范围内的辐射强度明显低于正常人^[13]。我们前期研究发现,急性胃黏膜损伤会导致腧穴能量代谢障碍,表现为线粒体结构异常, Na^+/K^+ -ATP 酶活性降低,出现细胞层面线粒体功能受损为核心的能量代谢低下。纤维状蛋白是能量传递和信息传递的重要载体,胶原纤维与经络现象中的能量传输有关,I 型胶原蛋白可以接受红外光谱的刺激,参与能量传递^[14-16]。研究认为,艾灸可产生 $0.8 \sim 5.6 \mu\text{m}$ 的红外光谱,且峰谱多数集中在 $1.5 \sim 3.5 \mu\text{m}$ 附近,与腧穴波谱相似从而可能引发共振^[17-18]。由此推论,艾灸产生的红外辐射作用于穴区局部,引起局部的能量代谢的变化,表现为线粒体 Na^+/K^+ -ATP 酶活性增强,这一能量变化引起蛋白质分子比如 I 型胶原蛋白分子的酰胺键产生振动,使得生物能量得以沿蛋白质分子进行传递^[15],最终产生局部的靶器官修复效应。综上所述,隔药灸能够改善急性胃黏膜损伤家兔“后三里”穴穴区线粒体形态、提高急性胃黏膜损伤家兔后三里穴穴区组织中 I 型胶原蛋白的表达,提示隔药灸修复急性胃黏膜损伤与其提高腧穴局部组织的能量代谢有关,但其能量的具体传输机制还有待于进一步探讨。

参考文献

- [1] 陈日新,陈明人,康明非,等. 重视热敏灸感是提高灸疗疗效的关键[J]. 针刺研究,2010,35(4):311-314.
- [2] 丁光宏,沈雪勇,褚君浩,等. 中医灸与人体穴位红外辐射光谱特性研究[J]. 中国生物医学工程学报,2002,21(4):356.
- [3] 沈雪勇,丁光宏,褚君浩,等. 人体穴位和艾灸红外辐射光谱与穴位红外传输[J]. 上海中医药大学学报,2001,15(4):33.
- [4] 庞小峰. 生物能量在蛋白质分子中传递的特性和理论研究[J]. 应用物理,2011(1):47-60.
- [5] 严洁,常小荣,刘健华,等. 电针足阳明经穴对家兔胃粘膜损伤防御性保护作用的研究[J]. 中国针灸,2001,21(6):350.
- [6] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京:中国中医药出版社,2007:209-210.
- [7] Guth PH, Aures D, paulsen G. Topical Aspirin Plus Hcl Gastic Lesion in the Rat Cytoprotective effect of Prostaglandin, cimetidine and probanthine[J]. Gastroenterology, 1979, 76(1):88-93.
- [8] 刘密,常小荣,严洁,等. 艾灸预处理对大鼠应激性胃黏膜损伤的保护作用[J]. 中华中医药杂志,2012,27(1):58-62.
- [9] 林亚平,封迎帅,史冬梅,等. 艾灸对 Hp 胃炎大鼠胃组织炎性细胞因子表达的影响[J]. 中国免疫学杂志,2013,29(9):900-905.
- [10] 沈雪勇,丁光宏,邓海平,等. 冠心病患者内关穴红外辐射光谱病理信息分析[J]. 红外与毫米波学报,2006,25(6):443-446.
- [11] 刘汉平,沈雪勇,邓海平,等. 冠心病患者劳宫穴红外辐射光谱研究[J]. 上海中医药杂志,2004,38(4):52-53.
- [12] 周榆,沈雪勇,丁光宏,等. 寸口脉太渊穴红外辐射光谱病理信息探测[J]. 上海针灸杂志,2006,25(10):37-40.
- [13] 周榆,沈雪勇,丁光宏,等. 跌阳脉冲阳穴红外辐射光谱病理信息探测[J]. 中国中医药科技,2006,13(6):369-371.
- [14] 冯盛才.“经络学说”又出新说[J]. 中医药临床杂志,2013,25(3):223.
- [15] 庞小峰. 生命体吸收的红外光的非热生物效应的研究[J]. 物理,2001,30(9):525-532.
- [16] Pang XF. The properties of bio-energy transport and influence of structure nonuniformity and temperature of systems on energy transport along polypeptide chains[J]. Prog Biophys Mol Biol,2012,108(1-2):1-46.
- [17] 丁光宏,沈雪勇,褚君浩,等. 中医灸与人体穴位红外辐射光谱特性研究[J]. 中国生物医学工程学报,2002,21(4):356-360.
- [18] 洪文学,蔡建红,景军,等. 传统中医艾灸疗法的热辐射光谱特性的研究[J]. 生物医学工程研究,2003,22(4):27-30.

(2015-05-11 收稿 责任编辑:张文婷)