

· 基础研究 ·

针刺足三里穴对冷应激性溃疡大鼠下丘脑与肾上腺 NOS 表达的影响

孙锦平 尹岭 田淑君 母义明

【摘要】目的 研究针刺足三里穴对急性胃溃疡(由冷应激引起)的保护作用,以及冷应激对大鼠下丘脑及肾上腺一氧化氮合成酶(NOS)表达的影响。方法 通过计算胃粘膜溃疡指数和应用 RT-PCR 技术,对大鼠下丘脑、肾上腺 NOS 的表达情况进行半定量研究。结果 实验数据表明,针刺足三里穴可以明显减少溃疡(由冷应激导致)指数;同时发现下丘脑 NOS1 不参与冷应激溃疡病理过程,针刺足三里穴可在生理范围内上调下丘脑 NOS1 的表达水平;下丘脑 NOS2 参与了冷应激溃疡病理过程,针刺足三里穴可下调其表达,减轻病理损害程度;NOS3 也参与了冷应激溃疡病理过程,针刺可以下调其表达水平,但下调程度较轻微;肾上腺 NOS1 及 NOS3 表达水平在应激过程中增高,针刺只能抑制 NOS1 表达,肾上腺 NOS2 不参与该应激过程。结论 针刺对冷应激溃疡具有一定的保护作用,该保护作用是通过生理性上调下丘脑 NOS1 表达、下调 NOS2 及 NOS3 病理性高表达以及抑制肾上腺 NOS1 表达而实现的。

【关键词】 针刺; 足三里; 冷应激; 一氧化氮合成酶; 应激性溃疡

Effect of acupuncture at acupoint ST 36 on the expression of NOS in hypothalamus and adrenal in rats with cold-restrained stress-induced ulcer SUN Jin-ping*, YIN Ling, TIAN Shu-jun, MU Yi-ming. * Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Medical College of Qindao University, Qindao 266003, China

【Abstract】 Objective To study the protection effect of acupuncture at acupoint ST 36 in rat with cold-restrained stress-induced ulcer, and to observe the expression of NOS in hypothalamus and adrenal. Methods Ulcer Index in rats was used to study the protection effect of acupuncture, and RT-PCR was employed to study the expression of NOS in hypothalamus and adrenal. Images were analyzed with semi-quantitative method. Results The ulcer Index was significantly decreased in rats with stress-induced ulcer by acupuncture as indicated by a comparison with those without acupuncture. The expression of NOS1 in hypothalamus was increased by acupuncture protect stress-induced ulcer. The increased expression of NOS2 was involved in stress-induced ulcer, and acupuncture decreased its expression. The expression of NOS3 in hypothalamus had the similar reaction to NOS2, but the decreased effect of acupuncture was limited. The expression of NOS1 and NOS3 in adrenal were increased by cold stress, only the expression of NOS1 could be repressed with acupuncture. There was no NOS2 expression in adrenal in stress-induced ulcer rats. Conclusion The protection effect in stress-induced ulcer exerted by acupuncture at acupoint ST 36 were mediated by increase of the physiological expression of NOS1 in hypothalamus as well as decrease of the expression of NOS2, NOS3 in hypothalamus and repress of the expression of NOS1 in adrenal.

【Key words】 Acupuncture; ST36; Cold-restrained stress; NOS; Stress ulcer

下丘脑是控制内脏活动较高级的神经中枢之一,除负责内脏功能外,还调控着体温、内分泌、情绪反应等重要生理过程;如果下丘脑功能发生紊乱,可引起一系列病理反应,例如急性胃粘膜病变等等;同时还发现心理性或躯体性应激也可造成急性胃粘膜病变,而肾上腺在机体应激过程中具有重要作用。相关研究表明,这种机体应激反应与一氧化氮合成酶(nitric oxide

synthase, NOS)水平密切相关;然而当机体发生急性胃粘膜病变时,下丘脑及肾上腺 NOS 的表达情况目前并不十分清楚。本研究采用冷应激方法制作大鼠急性胃粘膜病变模型,并观察针刺足三里穴对大鼠急性胃粘膜病变的保护作用以及针刺对下丘脑、肾上腺 NOS 表达水平的影响。现将结果报道如下。

材料与方法

一、实验动物及分组

共选取 22 只 SD 雄性大鼠,由解放军总医院实验动物中心提供,大鼠体重(200 ± 50)g。将其随机分为正常对照组(6 只)、单纯应激组(8 只)及针刺预防组

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30171135);国家科技部基础研究重大项目前期研究专项(No. 2001CCA00700)

作者单位:266003 青岛大学医学院附属医院急诊神经内科(孙锦平);解放军总医院神经信息中心(尹岭、田淑君);解放军总医院内分泌实验室(母义明)

(8 只)共 3 组。单纯应激组大鼠只给予冷刺激;针刺预防组大鼠则预先给予针刺足三里穴处理(持续 1 周),然后再给予冷刺激;正常对照组大鼠则不给予任何刺激。3 组大鼠均在相同条件下喂养。

二、模型制备及处理

1. 冷应激胃溃疡动物模型制备:将实验大鼠禁食 24 h,该期间可自由饮水,活动不受限制,于实验前 1 h 禁水,称重后用乙醚轻度麻醉,并将其四肢固定于特制木板上。待大鼠清醒后,置入 $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$ 冷室内持续 3 h,如通过解剖显微镜观察到大鼠腺胃部出现点状出血及线状或直径为 1~2 mm 的表浅圆形溃疡,即表明冷束缚应激性溃疡模型制作成功。

2. 主要实验试剂:逆转录试剂盒由宝生物工程(大连)有限公司提供;PCR 反应所需试剂、酶、Agrose 均由美国 Sigma 公司提供;引物则由北京赛百盛公司提供。

3. 电针处理方法:将针刺预防组大鼠置入特制鼠笼内,充分暴露双后肢,根据中国针灸学会实验针灸研究会制定的“动物针灸穴位图谱”选取大鼠双侧足三里穴,于每日上午 9~10 时给予电针刺激,每次 30 min,共持续 1 周。电针刺激仪选用 WQ1002K 型治疗仪,设置治疗参数如下:疏密波,频率 2~20 Hz,起始强度为 2 V,每作用 10 min 则刺激强度增加 1 V。正常对照组大鼠则不给予任何刺激。当实验结束时,将上述 3 组大鼠断头处死,取其下丘脑及肾上腺组织,置入液氮中冻存;同时取大鼠胃粘膜组织,分别计算损伤指数,然后置入 10% 福尔马林溶液中固定并行 HE 染色。胃粘膜损伤指数采用 Guth^[1]计算方法:即斑点状糜烂计为 1 分;糜烂长度 <1 mm 计为 2 分;1~2 mm 计为 3 分;2~3 mm 计为 4 分;>4 mm 则计为 5 分。

三、样本检测

下丘脑与肾上腺总 RNA 提取:按照 Trizol 介绍的一步法提取,使用紫外线分光光度计进行吸光度测定,以确定样品浓度及纯度。取 20 μg 总 RNA 逆转录合成 cDNA,逆转录体系共 40 μl ,PCR 每个反应体系共 30 μl 。大鼠组织中 NOS1 的引物序列为:rNOS1-sense——5' > CGC AGA ACA CAT CAC AGG < 3'; rNOS1-Antisense——5' > AGA ACG GGG AGA AAT TCG < 3',扩增片断长度为 450 bp;rNOS2-sense——5' > TGT TCC ATG CAG ACA ACC < 3', rNOS2-antisense——5' > TTC AGA AGC AGA ATG TGA CC < 3',扩增片断长度为 407 bp;rNOS3-sense——5'CCT TTG ATC TCA ATG TCG < 3', rNOS3-antisense——5' > TAC GAA GAA TGG AAG TGG < 3',扩增片断长度为 374 bp;扩增对照选用 β -actin,引物序列为 5' > AAC CCT AAG GCC AAC CTG GAA AAG < 3' 和 5' > TCG

TGA GGT AGT CTG TCA GGT < 3',扩增片断长度为 241 bp。PCR 扩增采用 2% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色显示,使用凝胶图像分析系统进行照相,应用 Image-Pro-Plus 图像分析系统对数据进行半定量研究。

四、统计学分析

采用 SPSS 10.0 版软件包进行统计学分析,胃溃疡指数采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,实验所得数据比较采用 t 检验或 ANOVA 单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠胃溃疡指数结果比较

单纯应激组大鼠胃溃疡指数结果为 (26.25 ± 4.40) 分,针刺预防组指数为 (9.75 ± 1.91) 分,正常对照组指数为 0。针刺预防组与单纯应激组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

二、各组大鼠下丘脑 NOS mRNA 表达水平比较

1. NOS1 mRNA 表达水平比较:3 组大鼠实验结果经半定量分析后发现,正常对照组大鼠下丘脑 NOS1 mRNA 表达与 β -actin 的比值(以下简称为比值)为 (0.69 ± 0.05) ,单纯应激组比值为 (0.77 ± 0.09) ,针刺预防组比值为 (1.87 ± 0.15) ;其中针刺预防组与正常对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),单纯应激组与正常对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2. NOS2 mRNA 表达水平比较:正常对照组大鼠下丘脑 NOS2 mRNA 表达比值为 (0.06 ± 0.02) ,单纯应激组比值为 (0.24 ± 0.05) ,针刺预防组比值为 (0.12 ± 0.06) ;其中针刺预防组与单纯应激组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),单纯应激组与正常对照组比较,差异亦有统计学意义($P < 0.001$)。

3. NOS3 mRNA 表达水平比较:正常对照组大鼠下丘脑 NOS3 mRNA 表达比值为 (0.30 ± 0.08) ,单纯应激组比值为 (0.63 ± 0.14) ,针刺预防组比值为 (0.45 ± 0.14) ;其中针刺预防组与单纯应激组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),针刺预防组及单纯应激组分别与正常对照组比较,差异亦均有统计学意义(P 分别 < 0.05 或 0.01);各组大鼠的具体 RT-PCR 图像(下丘脑 NOS mRNA)详见图 1。

三、各组大鼠肾上腺 NOS mRNA 表达水平比较

1. NOS1 mRNA 表达水平比较:正常对照组大鼠肾上腺 NOS1 mRNA 表达与 β -actin 的比值(以下简称为比值)为 (0.43 ± 0.09) ,单纯应激组比值为 (0.98 ± 0.23) ,针刺预防组比值为 (0.77 ± 0.22) ;其中针刺预防组与单纯应激组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),单纯应激组及针刺预防组分别与正常对照组

比较,差异亦均有统计学意义(P 分别 <0.001 或 0.01)。

2. NOS2 mRNA 表达水平比较:各组大鼠肾上腺组织中均未发现 NOS2 mRNA 表达。

3. NOS3 mRNA 表达水平比较:正常对照组大鼠肾上腺 NOS3 mRNA 表达比值为 (0.71 ± 0.25) ,单纯应激组比值为 (2.54 ± 1.15) ,针刺预防组比值为 (1.70 ± 0.86) ;针刺预防组与单纯应激组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),针刺预防组与正常对照组比较,差异亦无统计学差异($P > 0.05$),而单纯应激组与正常对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);各组大鼠的具体 RT-PCR 图像(肾上腺 NOS mRNA)详见图 2。

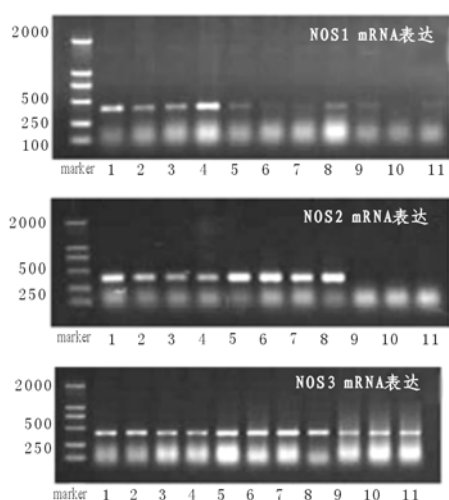


图1 针刺足三里穴对应激性溃疡大鼠下丘脑 NOS mRNA 表达的影响

注:1,2,3,4 为针刺预防组;5,6,7,8 为单纯应激组;9,10,11 为正常对照组

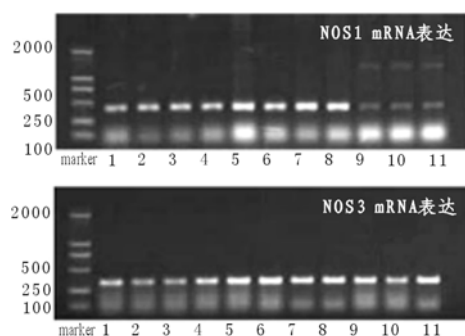


图2 针刺足三里穴对应激性溃疡大鼠肾上腺 NOS mRNA 表达的影响

注:1,2,3,4 为针刺预防组;5,6,7,8 为单纯应激组;9,10,11 为正常对照组

讨 论

目前研究已经证明,NO 对胃粘膜具有保护及损

伤双重作用,其保护作用机制主要与 NO 能减缓胃粘膜内中性粒细胞浸润、增加胃粘膜厚度、促进溃疡边缘血管增生^[2]及增加胃粘膜血流量等有关^[3]。此外,NO 可作为神经介质与感觉神经肽共同参与胃粘膜的生理或病理性充血反应,增加胃粘膜血流量,介导传入神经的胃粘膜保护作用^[4,5]。NO 对胃粘膜的损伤作用主要表现为:NO 可与氧自由基形成氧化亚硝酸盐,从而导致细胞脂质过氧化损伤。例如感染、内毒素、细胞因子等诸多刺激均可诱导 NOS2 合成大量 NO,引起组织及细胞损伤,这种损伤机制是通过增加细胞内的 Ca^{2+} 浓度来实现的^[6]。

现已确定的 NOS 亚型共有 3 种:分别为神经元型 NOS(NOS1)、内皮型 NOS(NOS3)及诱导型 NOS(NOS2)^[7]。NOS1 主要分布于神经元中,与神经元突触可塑性、神经再生、神经传导、神经元发育及神经内分泌调节等多种中枢神经功能密切相关^[8],NOS2 主要表达于各种胶质细胞中,NOS3 则主要分布于血管内皮细胞中。其中 NOS1、NOS3 又被称为结构型 NOS(cNOS),在生理状态下即有表达,由它催化生成的 NO 主要起着神经递质及第二信使的作用。从本实验结果可以看出,冷应激对下丘脑 3 种亚型 NOS 的影响各不相同,而针刺对各亚型 NOS 也具有不同的调节作用。冷应激对下丘脑 NOS1 的影响与正常对照组比较,差异无统计学意义,说明下丘脑内 NOS1 没有参与冷应激反应,而针刺预防组大鼠的 NOS1 表达显著高于正常对照组及单纯应激组,说明针刺足三里穴可上调下丘脑 NOS1 表达,使 NOS1 能够催化合成更多 NO,从而对因冷应激引发的胃粘膜损伤起保护作用。从 NOS3 的表达结果可以看出,冷应激可引起 NOS3 表达水平显著增高,与正常对照组存在极显著性差异,而针刺足三里穴可以抑制 NOS3 病理性高表达,但其抑制效应不够全面,只能在一定程度内发挥下调作用,并不能完全抑制 NOS3 对机体的不利影响,这与既往的文献报道结果不同,考虑是由于 NOS3 的外周反应及中枢反应间存在差异造成,具体机制有待进一步探寻。

本实验结果还表明,肾上腺 NOS1、NOS3 与中枢作用过程不完全一致。相同之处为 NOS3 均参与了冷应激性溃疡的病理性过程,针刺虽然可以抑制这种病理性高表达反应,但其抑制程度微弱(差异无统计学意义);不同之处为肾上腺 NOS1 也参与了该病理性应激过程,而针刺对该病理过程有明显的抑制作用。

NOS2 可能主要在病理状态下表达,其表达受内皮素、白细胞介素-1 等因子诱导,一旦表达即可持续合成高浓度的 NO,从而参与神经损伤病理过程^[9]。本实验结果表明,冷应激可引起下丘脑 NOS2 表达水平明显升高,与对照组比较,有极显著性差异,充分证

实了下丘脑 NOS2 水平与胃粘膜及血浆中 NOS2 的变化规律一致,它的过度表达参与了胃粘膜病变的病理生理过程,而针刺足三里穴可以明显抑制这种过度表达反应,使机体得到最大程度的保护。

综上所述,可以证明下丘脑 NOS1 不参与病理性应激反应,NOS2 参与病理性应激反应,与既往文献报道相吻合^[10];同时还发现 NOS3 亦参与了冷应激反应,与既往报道不甚符合^[11],分析其原因可能与众多 NOS3 研究都并非专门针对脑组织有关。对于在本次冷应激溃疡研究中,3 种亚型 NOS 表达在下丘脑及肾上腺间所出现的差异,考虑与 NOS 的不同组织来源有关,其具体的协同作用关系及中间介导过程有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Guth PH, Aures D, Paulsen G. Topical aspirin plus HCl gastric lesions in the rat. Cytoprotective effect of prostaglandin, cimetidine, and probanthine. *Gastroenterology*, 1979, 76:88-93.
- 2 张国锋, 陈易人, 张明璈. 一氧化氮、内皮素与胃粘膜损伤. *胃肠病学和肝病杂志*, 1999, 8:293-296.
- 3 Blazowski T, Konturek SJ, Sliwowski Z, et al. Role of L-arginine, a substrate for nitric oxide synthase in gastroprotection and ulcer healing. *J Gastroenterol*, 1998, 32:442-452.
- 4 Geraldo J, Perraz P, Wallace JL. Prostaglandins modulate the responsiveness of the gastric microcirculation of sodium nitroprusside in cirrhotic rats. *Hepatology*, 1996, 23:123-129.
- 5 Gislason H, Varhaug P, Sorbye H, et al. Role of adenosine and nitric oxide in the hyperemic response to superficial and deep gastric mucosal injury and H⁺ back-diffusion in rats. *Scand Gastroenterol*, 1996, 31:14-23.
- 6 杨院平. 一氧化氮与内皮素在胃粘膜损伤中的作用与关系. *陕西医学杂志*, 2002, 31:137-140.
- 7 Bolanao JP, Almeida A. Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. *Biochem Acta*, 1999, 1411:415-436.
- 8 Drew B, Leeuwenburgh C. Aging and the role of reactive nitrogen species. *Ann NY Acad Sci*, 2002, 959:66-81.
- 9 Higuchi Y, Hattori H, Hattori R, et al. Increased neurons containing neuronal nitric oxide synthase in the brain of a hypoxia-ischemic neonatal rat model. *Brain Dev*, 1996, 18:369-375.
- 10 Wada K, Chatzipanteli K, Busto R, et al. Role of nitric oxide in traumatic brain injury in the rat. *J Neurosurg*, 1998, 89:807-818.
- 11 聂时南, 李兆申, 湛先保, 等. 一氧化氮合酶在心理性应激胃黏膜损伤中的作用. *上海医学*, 2002, 5:302-304.

(修回日期:2005-01-20)

(本文编辑:易 浩)

· 消息 ·

解放军总医院举办“慢性软组织损害的诊断与治疗”及“神经康复新技术”学习班通知

由解放军总医院康复医学科举办的 2005 年全军继续教育项目“慢性软组织损害的诊断与治疗”及“神经康复新技术”学习班将分别于 2005 年 8 月 2~7 日和 8~19 日在北京举办,各班均计划招生 80 人。学习班将由军内外资深康复医学专家及攻关课题组成员担纲授课,由我院经验丰富的医生和治疗师承担实习带教。

“慢性软组织损害的诊断与治疗”学习班主要内容:(1)慢性软组织损害的研究进展、诊断和治疗;(2)颈腰痛的手法治疗与疑难病例的分析;(3)骨关节疾病的临床指南;(4)颈腰椎疾病的解剖基础与临床;(5)慢性骨筋膜综合征所致慢性腰痛的诊断和治疗;(6)颈源性眩晕的手法治疗;(7)疼痛的康复评定方法及其在腰痛评定中的应用;(8)椎间盘内破裂的诊断与治疗。招生对象:各级医院从事或拟开展慢性软组织损害诊断与治疗工作的医、护、治疗人员。学费及学分:学费每人 900 元,食宿统一安排,费用回原单位报销。凡参加学习者均可获 I 类学分 6 分。时间安排:2005 年 8 月 2 日 8~18 时报到,3~6 日授课。报名时间从即日起至 2005 年 8 月 2 日为止。

“神经康复新技术”学习班主要内容:(1)脑血管病诊断治疗的新进展;(2)脑血管病三级临床康复研究;(3)脊髓损伤的康复评价和治疗新进展;(4)功能恢复与神经影像学新进展;(5)减重步行训练在脑与脊髓损伤康复中的应用;(6)偏瘫患者下肢矫形器的临床应用;(7)强制使用疗法在脑损伤患者康复中的应用;(8)脑血管病患者的肌力评价和训练;(9)肌痉挛评价与治疗;(10)失语症的评估与康复;(11)认知障碍的评估与康复;(12)脑血管病的康复护理;(13)康复机器人在神经康复领域的应用;(14)循证医学与脑血管病康复。招生对象:各级医院开展神经康复工作的医、护、治疗人员。学费及学分:学费每人 1 500 元,食宿统一安排,费用回原单位报销。凡参加学习者均可获 I 类学分 12 分。时间安排:2005 年 8 月 7 日 8~18 时报到,8~19 日授课。报名时间从即日起至 2005 年 8 月 8 日为止。

欢迎各级医院康复医学科、神经内科、神经外科、理疗科、综合科、骨科、中医科、针灸科等的医护、治疗人员踊跃报名参加。报到地点:解放军总医院康馨大厦 829 室(康馨大厦地处北京复兴路 28 号解放军总医院东侧 50m)。联系方式:100853 北京复兴路 28 号解放军总医院康复医学科;联系人:徐军;联系电话:010-66937492 或 010-66937575。