

· 研究简报 ·

激光针灸对慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜三叶因子表达的影响

邵雪辉 王建国 张晓丽 高建武

【摘要】目的 观察激光针灸干预对慢性萎缩性胃炎(CAG)大鼠胃黏膜组织三叶因子家族 1(TFF1)及三叶因子家族 3(TFF3)表达的影响。**方法** 共选取清洁级健康 Wistar 大鼠 50 只,随机取 9 只大鼠纳入正常组,采用综合法将余下大鼠制成 CAG 动物模型,待病理检查确认造模成功后,将 CAG 造模动物随机分为模型对照组、给药组及激光针灸组。给药组大鼠采用延参健胃胶囊及康复新液进行灌服,激光针灸组选择足三里作为针灸穴位并给予氩氦激光穴位照射。经 14 d 干预后采集各组大鼠标本,采用免疫组织化学法检测各组大鼠胃黏膜中 TFF1 及 TFF3 表达。**结果** 正常组大鼠胃黏膜中 TFF1 表达较强,模型组 TFF1 表达较正常组明显减弱($P<0.05$),给药组、激光针灸组 TFF1 表达则较模型组明显增强($P<0.05$);正常组大鼠胃黏膜中 TFF3 表达较弱,模型组 TFF3 表达较正常组明显增强($P<0.05$),激光针灸组 TFF3 表达较模型组明显减弱($P<0.05$);给药组、激光针灸组 TFF1 及 TFF3 表达与正常组间差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 激光针灸干预对 CAG 大鼠胃黏膜具有防御及修复损伤功能,其治疗机制可能与促进 TFF1 表达、降低 TFF3 表达有关。

【关键词】 激光针灸; 慢性萎缩性胃炎; 三叶因子 1; 三叶因子 3

基金项目:河北省科技支撑项目(14277778D);河北省卫生厅科研基金项目(20150051)

Fund program: Science and Technology Support Program of Hebei Province(14277778D); Scientific Research Foundation of Hebei Provincial Health Office(20150051)

慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)是胃黏膜发生腺体萎缩性改变的慢性炎症,特别是 CAG 伴肠上皮化生和异常增生者,其癌变率高达 10%^[1]。CAG 的发生、进展涉及多个环节,三叶因子家族(trefoil factor family, TFF)是一类对胃肠黏膜具有保护作用的小分子蛋白,在人胃肠道上皮呈特异性表达。本研究通过对 CAG 模型大鼠进行药物、激光针灸干预,并观察治疗后大鼠胃黏膜细胞 TFF1 及 TFF3 变化情况,探讨激光针灸对 CAG 大鼠胃黏膜修复的影响,为进一步指导激光针灸的临床应用提供理论基础。

材料与方 法

一、实验材料

选取由北京首都医科大学实验动物部提供的清洁级健康 Wistar 大鼠 50 只,动物合格证号为 SCXK(京)2010-0006,雄性,鼠龄 3~4 个月,体重 180~220 g,大鼠常规分笼饲养,饲养环境温度 22~26℃,湿度为 44%~50%,通风 12 次/小时,光照每 12 小时明暗交替。主要实验药物有延参健胃胶囊(天圣制药集团股份有限公司生产,国药准字 Z20120004)、康复新液(四川好医生攀西药业有限责任公司生产,国药准字 Z51021834);主要实验试剂包括水杨酸钠(天津永晟精细化工有限公司)、兔抗人 TFF1 和 TFF3 多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司)等;主要实验仪器包括 ZYS 型氩氦激光治疗机(吉林产)、BX40 型

Olympus 显微镜、图像分析系统等。

二、分组及处理

50 只 Wistar 大鼠经实验室适应性饲养 1 周后开始实验,随机取 9 只大鼠纳入正常组,常规自然喂养,不给予特殊干预;余下大鼠按文献[2]介绍的 CAG 造模方法每日灌服 2%水杨酸钠和 30%酒精混合溶液,并给予饥饿失节、运动劳累多种干预。造模过程中实验大鼠因灌胃不当死亡 6 只。待 CAG 造模完成后,随机抽取 5 只大鼠进行病理组织学检查,如胃黏膜出现不同程度充血、出血、萎缩、炎性细胞浸润、上皮化生等典型 CAG 表现则确定 CAG 造模成功。采用随机数字表法将 CAG 模型大鼠分为模型组、给药组及激光针灸组,每组 10 只。各组大鼠每天置于大鼠固定器内制动 1 次,每次制动 5 min;给药组大鼠在制动期间给予延参健胃胶囊(每千克体重 0.7 g)和康复新液(每千克体重 0.6 ml)灌服;激光针灸组大鼠置于固定器后,参照《实验针灸学》^[3]取左、右两侧足三里穴并进行氩氦激光照射,氩氦激光经耦合光纤输出,输出功率为 30 mW,波长 632.8 nm,光斑直径 2 cm,光斑中心对准穴位点,光纤头距皮肤 10 cm,分别照射左、右侧足三里穴 3 min。以上干预均为每日 1 次,连续干预 14 d。

三、免疫组织化学染色

各组大鼠于末次干预结束后禁食、不禁水 24 h,再次进行体重测量,应用 10%水合氯醛腹腔注射麻醉、剖腹,沿胃小弯取胃窦及部分胃体黏膜组织,常规石蜡切片,采用免疫组织化学法检测胃黏膜中 TFF1 及 TFF3 表达。主要检测步骤如下:首先石蜡切片常规脱蜡至水,双氧水灭活内源性酶 10 min,蒸馏水冲洗,抗原修复,再滴加 5% BSA 封闭液,在室温环境下反应 20 min。甩去多余液体,滴加适当 1:100 稀释的一抗(兔 IgG),置于 4℃冰箱内过夜,经磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)冲洗后滴加生物素化山羊抗兔 IgG,37℃孵育 20 min,

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2017.04.018

作者单位:075000 张家口,河北北方学院医学物理教研室(邵雪辉、高建武);张家口学院理学院(王建国);河北北方学院生命科学中心(张晓丽)

通信作者:高建武,Email:2914437760@qq.com

经 PBS 冲洗后滴加试剂 SABC, 37℃ 孵育 20 min, 经 PBS 冲洗后进行 DAB 显色。苏木素复染细胞核, 随后进行脱水、透明、封片处理。每张切片均置于 100 倍高倍镜下显微照相, 随机选取 5 个视野, 如胃黏膜细胞胞浆或胞膜中呈现棕黄色颗粒为 TFF1 或 TFF3 阳性表达, 采用 Motic image advanced 6.0 版图像分析软件检测 TFF1 和 TFF3 阳性信号平均光密度值。

四、统计学方法

所得计量数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 采用 SPSS 17.0 版统计学软件包进行数据分析, 多组间比较采用 One Way Anova 方差分析, 两组间比较采用最小显著差异法 (least-significant difference, LSD), $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

正常组大鼠胃黏膜细胞 TFF1 表达较强 (图 1), 模型组大鼠胃黏膜 TFF1 表达 (图 2) 较正常组明显减弱 ($P < 0.05$), 给药组 (图 3) 和激光针灸组 (图 4) 胃黏膜 TFF1 表达均较模型组显著增强 ($P < 0.05$), 给药组及激光针灸组胃黏膜中 TFF1 表达与正常组间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 具体结果见表 1。

表 1 各组大鼠胃黏膜组织 TFF1 及 TFF3 光密度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	TFF1 光密度值	TFF3 光密度值
正常组	9	0.48±0.03 ^b	0.32±0.08 ^a
模型组	10	0.37±0.08	0.48±0.16
给药组	10	0.45±0.09 ^a	0.41±0.18
激光针灸组	10	0.46±0.06 ^b	0.35±0.11 ^a

注: 与模型组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

正常组大鼠胃黏膜细胞 TFF3 表达较弱 (图 5), 模型组胃黏膜中 TFF3 表达 (图 6) 较正常组明显增强 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 给药组胃黏膜 TFF3 表达 (图 7) 虽有降低, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而激光针灸组胃黏膜 TFF3 表达 (图 8) 则

明显减弱 ($P < 0.05$); 给药组、激光针灸组胃黏膜细胞 TFF3 表达与正常组间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 具体数据见表 1。

讨 论

CAG 是指胃黏膜已发生萎缩的慢性炎症病变, 其基本病理特征是胃黏膜出血、充血、腺体萎缩、肠上皮化生、炎性细胞浸润等^[4-5]。目前临床对于 CAG 的发病机制尚无定论, 多认为与感染、免疫等因素有关。三叶因子是由胃肠道黏膜上皮合成、分泌的一组具有特定三叶结构域的小分子多肽, 在黏膜损伤修复过程中具有重要作用。相关研究发现, 三叶因子参与黏膜损伤不同阶段愈合过程, 在调节细胞免疫、促进黏膜再生和修复、调节细胞间连接、促进细胞迁移等方面均发挥重要作用^[6]。

激光针灸是在中医理论指导下, 以低强度激光束直接聚焦或扩束照射特定穴位, 从而达到防病、治病、保健目的^[7-8]。足三里穴为胃经合穴, 是治疗胃部疾患的常用穴位之一。《内经海论篇》认为“胃者水谷之海, 其输上在气街, 下至三里”, 对于消化系统疾病患者均可取足三里穴进行刺激; 现代医学研究也发现, 刺激足三里穴具有调整胃肠激素水平、调节机体免疫、抑制腺体萎缩与增生等作用^[9-12]。相关报道指出, 氦氖激光穿透力强, 可穿透组织深度达 1.5 cm, 当照射穴位时具有传统针灸治疗作用^[13-14], 故本研究选取足三里穴进行氦氖激光穴位刺激。

TFF1 是胃肠道激素中的一种, 主要表达于胃黏膜表面, 具有促进细胞迁移及修复损伤等功能^[15-16]。TFF3 是三叶肽家族成员之一, 在 1991 年由 Suemori 首次在大鼠空肠中发现^[17], 该因子在黏膜防御、修复、再生以及免疫系统和神经系统中发挥重要作用, 其异常表达与疾病发生、发展密切相关^[18]。本研究发现 CAG 大鼠 TFF1 阳性表达较弱, 这与 Taupin 等^[19]报道结果基本一致, 推测 TFF1 降低可能与 CAG 发生具有一定关系, 如当胃黏膜受损时, TFF1 不能正常表达

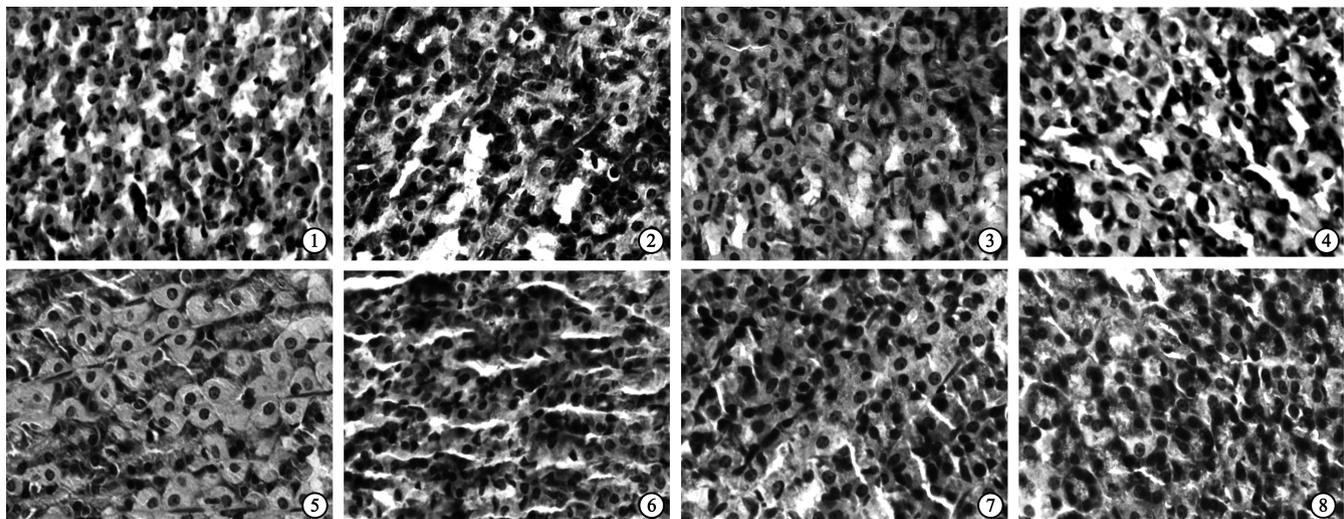


图 1 正常组大鼠胃黏膜 TFF1 表达 (免疫组织化学染色, ×400) 图 2 模型组大鼠胃黏膜 TFF1 表达 (免疫组织化学染色, ×400) 图 3 给药组大鼠胃黏膜 TFF1 表达 (免疫组织化学染色, ×400) 图 4 激光针灸组大鼠胃黏膜 TFF1 表达 (免疫组织化学染色, ×400) 图 5 正常组大鼠胃黏膜 TFF3 表达 (免疫组织化学染色, ×400) 图 6 模型组大鼠胃黏膜 TFF3 表达 (免疫组织化学染色, ×400) 图 7 给药组大鼠胃黏膜 TFF3 表达 (免疫组织化学染色, ×400) 图 8 激光针灸组大鼠胃黏膜 TFF3 表达 (免疫组织化学染色, ×400)

会导致胃黏膜损伤修复能力减弱。本研究中 CAG 模型大鼠经药物或激光针灸治疗后,其 TFF1 阳性表达增强,并以激光针灸组增强幅度较显著,提示激光针灸干预能有效提高胃黏膜中 TFF1 阳性表达,从而增强胃黏膜防御能力,促进受损胃黏膜重建及修复,这可能是激光针灸保护胃黏膜的重要机制之一。

另外,本研究结果还显示正常组大鼠胃黏膜中 TFF3 表达较低,模型组大鼠胃黏膜中 TFF3 表达较正常组明显增强 ($P < 0.05$),即胃黏膜损伤与 TFF3 表达具有正相关性,与韦维等^[20]报道结果基本一致。与模型组比较,激光针灸组胃黏膜中 TFF3 表达水平显著降低 ($P < 0.05$),提示激光针灸干预能抑制胃黏膜中 TFF3 表达,进一步证明低水平 TFF3 有助于受损胃黏膜再生及修复,对胃黏膜具有保护作用;给药组大鼠胃黏膜 TFF3 表达虽较模型组有所降低,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$),可能与选取样本量偏少有关。

综上所述,本研究结果显示,激光针灸干预能促进 CAG 模型大鼠胃黏膜细胞 TFF1 表达,降低 TFF3 表达,对受损胃黏膜具有促再生及促修复作用,其治疗效果优于单纯药物干预;至于在激光针灸治疗 CAG 过程中 TFF1 与 TFF3 之间的相互关系,还有待后续研究进一步探讨。

参 考 文 献

[1] 中华医学会消化病学分会.中国慢性胃炎共识意见[J].胃肠病学,2013,18(1):24-36.DOI:10.3969/j.issn.1008-7125.2013.01.007.

[2] 邵雪辉,王建国.大鼠实验性慢性萎缩性胃炎的建立[J].张家口医学院学报,2002,19(2):11-13.DOI:10.3969/j.issn.2095-1396.2002.02.005.

[3] 林文注,王佩.实验针灸学[M].上海:上海科学技术出版社,1999:288

[4] 李琼,刘晏,吴坚炯.慢性萎缩性胃炎的治疗进展[J].中医学报,2013,28(1):114-115.DOI:10.16368/j.issn.1674-8999.2013.01.019.

[5] Futagami S, Shimpuku M, Yin Y, et al. Pathophysiology of functional dyspepsia[J]. J Nippon Med Sch, 2011, 78(5): 280-285. DOI: 10.1272/jnms.78.280.

[6] 余果宇,张勇,张云.三叶因子的研究进展[J].山西医科大学学报,2011,42(1):87-90.DOI:10.3969/j.issn.1007-6611.2011.01.024.

[7] 赫君,彭玉峰,牧凯军,等.激光针灸的原理及其在临床上的应用[J].应用激光,2008,28(1):84-87.DOI:10.3969/j.issn.1000-372X.2008.01.023.

[8] 李媛,邓海平.低强度激光对糖尿病及其并发症的影响[J].中国康

复,2015,30(2):143-145.DOI:10.3870/zgkf.2015.02.024.

[9] 李金华,王瑞辉,马婷婷,等.针刺对功能性消化不良神经内分泌调节的研究概况[J].中医临床研究,2015,7(4):142-144.DOI:10.3969/j.issn.1674-7860.2015.4.072.

[10] 严开伟,赵凌,杨洁,等.针刺治疗功能性消化不良机制研究进展[J].中国针灸,2015,35(9):973-976.DOI:10.13703/j.0255-2930.2015.09.035.

[11] 施茵,吴焕途.足三里穴在免疫功能调节中的应用[J].现代中医药,2003,23(3):3-6.DOI:10.13424/j.cnki.mtcm.2003.03.002.

[12] Lima FA, Ferreira LE, Pace FH. Acupuncture effectiveness as a complementary therapy in functional dyspepsia patients [J]. Arq Gastroenterol, 2013, 50(3): 202-207. DOI: 10.1590/S0004-28032013000200036.

[13] 张彦娜,李谊,赵颜颜,等.氩氦激光加康复新液治疗外伤性鼓膜穿孔的疗效观察[J].山东医药,2016,56(1):108.DOI:10.3969/j.issn.1002-266X.2016.01.042.

[14] 曾常春,王先菊,李子孺,等.激光针灸的研究及其信息模拟[J].中国临床康复,2005,17(9):175-177.DOI:10.3321/j.issn.1673-8225.2005.17.097.

[15] 陈彦竹,何小艳,曾斌芳.养阴活胃合剂对慢性萎缩性胃炎模型大鼠胃黏膜淋巴细胞瘤-2 基因和三叶因子 1 表达的影响[J].环球中医药,2015,8(12):1437-1440. DOI: 10.3969/j.issn.1674-1749.2015.12.004.

[16] 刘晓玲,王汝俊,莫旺福,等.补中益气汤对脾虚大鼠胃粘膜 TFF1mRNA 与蛋白表达的影响[J].中药药理与临床,2012,28(3):25-28.DOI:10.13412/j.cnki.zyyj.2012.03.020.

[17] Suemori S, Lynch-Devaney K, Podolsky DK. Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991, 88(24): 11017-11021. DOI: 10.1073/pnas.88.24.11017.

[18] 周帅,符国珍.三叶因子 3 研究进展[J].海南医学,2012,23(8):123-125.DOI:10.3969/j.issn.1003-6350.2012.08.058.

[19] Taupin D, Pedersen J, Familiari M, et al. Augmented intestinal trefoil factor (TFF3) and loss of pS2 (TFF1) expression precedes metaplastic differentiation of gastric epithelium[J]. Lab Invest, 2001, 81(3): 397-408. DOI: 10.1038/labinvest.3780247.

[20] 韦维,林寿宁,朱永革.安胃汤对慢性萎缩性胃炎模型大鼠肠三叶因子基因表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(3):159-162. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9903.2011.03.050.

(修回日期:2016-09-20)

(本文编辑:易浩)