

针灸调节大鼠溃疡性结肠炎结肠组织 COX-2 及 IL-1 β 的研究*

★ 施征 马晓芃 吴煥淦 龚烨靛 (上海市针灸经络研究所 上海 200030)

摘要:采用免疫组化方法观察隔药灸、电针天枢穴对大鼠溃疡性结肠炎结肠组织 COX-2 及 IL-1 β 表达的影响。结果发现:与正常大鼠相比,溃疡性结肠炎模型大鼠结肠组织 COX-2、IL-1 β 表达面积和表达强度均显著升高(P 均 <0.01),电针、隔药灸治疗后 COX-2、IL-1 β 表达面积和表达强度均显著降低(与模型对照组比较 P 均 <0.01)。结合组织病理学结果提示:COX-2 与实验性溃疡性结肠炎的发生密切相关,针灸取效与其抑制结肠组织 COX-2 的表达有关;针灸可能通过抑制结肠组织 IL-1 β 等细胞因子的表达,进而减少 COX-2 的产生,达到治疗目的。

关键词:溃疡性结肠炎;针灸疗法;环氧合酶;IL-1 β

中图分类号:R 245 **文献标识码:**A

溃疡性结肠炎(UC)是一种以慢性腹痛、腹泻、粘膜脓血便为主症的炎症性和溃疡性疾病,其病因和发病机制尚未明确。环氧合酶(COX)是花生四烯酸转化为前列腺素(PGs)代谢中的关键酶,目前发现其至少存在两种异构体:结构型 COX-1 和诱生型 COX-2。研究表明 COX-2 是启动炎症反应的关键酶,在 UC 的发生过程中具有重要作用。笔者在既往的研究中,采用隔药灸和电针治疗溃疡性结肠炎已取得良好的临床疗效,并从细胞因子及其基因表达角度探讨其作用机理,证实了艾灸通过调整紊乱的免疫功能,尤其是细胞因子的表达起到治疗作用^[1~4]。鉴于细胞因子(如 IL-1 β 和 TNF- α 等)在诱生型 COX-2 的产生过程中起重要作用,针灸有可能通过抑制 COX-2 的表达起到治疗作用,因此有必要探讨 COX-2 在 UC 发病中的作用及针灸的调节机制。本研究旨在观察针灸对大鼠溃疡性结肠炎结肠组织 COX-2 及 IL-1 β 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 SD 大鼠 36 只,体重(220 $\pm$ 20)g,清洁级,由上海中医药大学实验动物中心提供,自由摄食与饮水。随机分为造模组 28 只和正常对照组 8 只。

1.2 UC 模型制备

造模组大鼠参照《药理实验方法学》采用免疫学方法,并加局部刺激制备成实验性溃疡性结肠炎大鼠模型^[5]。采用溃疡性结肠炎患者术后新鲜结肠粘膜,加适量生理盐水制成粘膜匀浆,冷冻 24 小时,溶冻后以 3 000r/min 离心 30 分钟,取上清液提纯

测定蛋白质含量,并与 Freund 佐剂混合配成乳剂。造模组大鼠首次每只足趾内注射抗原 3 mg,并在第 10、17、24、31 天分别于足趾、背部、腹股沟、腹腔内注射抗原 6 mg(本次注射不加 Freund 佐剂),至血清抗结肠抗体达到一定效价,对模型大鼠用 100 mL/L 水合氯醛腹腔注射麻醉,用 3% 福尔马林 2 mL 灌肠,留置 1 小时,以生理盐水洗净后排出,再用抗原液(4 g/L 不加佐剂)2 mL 灌肠,留置 2 小时,洗净排去。3 天后随机抽取 4 只造模组大鼠处死取其结肠,病理检查确认有充血、水肿、慢性炎细胞浸润、杯状细胞减少及典型溃疡形成等一系列变化。正常对照组大鼠,用生理盐水作与造模组相同处理,作为正常对照。

1.3 分组与治疗

在确定 UC 大鼠模型制备成功的基础上,造模组大鼠随机分为 3 组:模型对照组(8 只),电针组(8 只),隔药灸组(8 只)。(1)电针组:取穴:天枢(双)(穴位定位参照林文注《实验针灸学》),接 G6805 II 型电针仪,连续波,频率 2 Hz,电流强度 4 mA,20 min/次,每日 1 次,共针 14 次。(2)隔药灸组:取穴同电针组,采用隔药灸,艾炷以精制艾绒制成小椎体状,大小约 90 mg/只;药饼制备用附子、肉桂、红花、丹参等药研成细粉,灸前用黄酒调和药粉成糊状,制成 0.5 cm 大小的药饼,每次每穴各灸 2 壮,每日 1 次,共灸 14 次。(3)模型对照组和正常对照组:不作任何治疗,只作与治疗组相同的捆绑固定。

1.4 检测方法

1.4.1 取材 治疗结束后次日,大鼠断头处死,割

* 上海市科委资助项目(No.02DZ19150-3)、国家自然科学基金资助项目(No.30371806)。

取远端结肠 6 cm,置于 10% 中性福尔马林溶液中固定 24 小时,常规脱水,石蜡包埋,切片。

1.4.2 试剂 COX-2、IL-1 β 单克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 公司;Envision 试剂(R)和(M)购自 DaKo 公司;柠檬酸、无水乙醇、二甲苯均为国产分析纯。

1.4.3 结肠粘膜组织病理学观察 HE 染色,光镜观察。

1.4.4 结肠组织 COX-2、IL-1 β 的表达 免疫组化检测。采用免疫组化 SABC 法,并应用 IMS 细胞图像分析系统进行图像分析。

1.5 统计方法

结果用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 SPSS10.0 统计软件进行统计学分析,各组数据比较采用 F 、 q 检验。

2 结果

2.1 UC 大鼠结肠粘膜组织病理学变化

正常对照组大鼠结肠粘膜上皮完整,腺体排列整齐,粘膜血管纹理清晰。模型对照组大鼠结肠粘膜可见充血、水肿、糜烂、溃疡,腺体中杯状细胞减少,大量淋巴细胞、浆细胞、嗜酸性白细胞浸润;电针组与隔药灸组大鼠均可见结肠粘膜下轻度水肿,局部区域粘膜较薄,腺体大小不一,呈新生状腺体,其粘膜下层有局灶性的肉芽组织增生(为溃疡修复处),溃疡粘膜上皮修复。

2.2 针灸对 UC 大鼠结肠组织 IL-1 β 表达的影响

与正常大鼠相比,UC 模型大鼠结肠组织 IL-1 β 表达面积和表达强度均显著升高(P 均 < 0.01),经过电针与隔药灸治疗后,与模型对照组比较 IL-1 β 表达面积和表达强度均显著降低(P 均 < 0.01),而电针组与隔药灸组比较 IL-1 β 表达面积和表达强度均没有显著性差异(P 均 > 0.05)。(见表 1)

表 1 针灸对 UC 大鼠结肠组织 IL-1 β 表达的影响

组别	n	IL-1 β 表达面积/ μm^2	IL-1 β 表达强度
模型对照组	8	64 926.5 $\pm$ 20 675.692 $\star$	14.625 $\pm$ 1.408 $\star$
电针组	8	41 531.125 $\pm$ 8 465.461 $\star$	12.75 $\pm$ 1.389 $\star\star$
隔药灸组	8	37 182 $\pm$ 9 103.753 $\star$	12.375 $\pm$ 1.188 $\star\star$
正常对照组	8	27 488.5 $\pm$ 7 372.866	10.875 $\pm$ 1.246

注: $\star$ 与正常对照组比较 $P < 0.01$; $\star\star$ 与模型对照组比较 $P < 0.01$ 。

2.3 针灸对 UC 大鼠结肠组织 COX-2 表达的影响

与正常大鼠相比,UC 模型大鼠结肠组织 COX-2 表达面积和表达强度均显著升高(P 均 < 0.01),经电针与隔药灸治疗后,与模型对照组比较 COX-2 表达面积和表达强度均显著降低(P 均 < 0.01),而电针组与隔药灸组比较 COX-2 表达面积和表达强度均没有显著性差异(P 均 > 0.05)。(见表 2)

表 2 针灸对 UC 大鼠结肠组织 COX-2 表达的影响

组别	n	COX-2 表达面积/ μm^2	COX-2 表达强度
模型对照组	8	69 980.125 $\pm$ 19 109.037 $\star$	13.5 $\pm$ 1.069 $\star$
电针组	8	43 596.625 $\pm$ 19 628.455 $\star$	10.125 $\pm$ 0.835 $\star\star$
隔药灸组	8	41 012.125 $\pm$ 9 463.849 $\star$	10.875 $\pm$ 1.644 $\star\star$
正常对照组	8	35 259.75 $\pm$ 7 840.866	7.375 $\pm$ 1.408

注: $\star$ 与正常对照组比较 $P < 0.01$; $\star\star$ 与模型对照组比较 $P < 0.01$ 。

3 讨论

溃疡性结肠炎在中医学中归属于“久痢”、“肠澼”范畴,早在《针灸甲乙经》、《卫生宝鉴》等针灸古代文献,就有应用针灸治疗久痢、肠澼的记载。天枢穴为大肠之募穴,通于中焦,为水谷之气升降降浊之枢纽,临床中常运用此穴治疗消化道疾病。天枢穴不仅具有调节胃肠功能的作用,还具有补虚、理血、理气、化湿等功效,是治疗肠腑病的要穴。因此在本实验中选用天枢穴施以电针或隔药灸治疗大鼠溃疡性结肠炎,组织病理学观察结果发现电针、隔药灸天枢穴能够有效减轻 UC 模型大鼠结肠组织的炎症和损伤程度,促进结肠粘膜溃疡的修复,提示电针、隔药灸天枢穴对 UC 有一定的治疗作用。

研究表明 COX-2 在溃疡性结肠炎肠粘膜组织中表达明显增高^[6~7],可能在溃疡性结肠炎的发生过程中起重要作用。正常结肠粘膜不表达 COX-2,而炎症粘膜上皮细胞及结肠固有层单核炎性细胞大量表达 COX-2,并且在炎症活动期结肠固有层和肌间神经丛中 COX-2mRNA 表达水平明显高于非活动期^[7~8]。本研究 UC 模型大鼠结肠组织 COX-2 表达面积和表达强度均显著高于正常大鼠(P 均 < 0.01),表明实验性溃疡性结肠炎大鼠 COX-2 蛋白表达上调,结合组织病理学观察 UC 模型大鼠结肠粘膜可见充血、水肿、糜烂、溃疡,提示 COX-2 与实验性溃疡性结肠炎的发生密切相关;经过电针、隔药灸治疗后,与模型对照组比较 COX-2 表达面积和表达强度均显著降低(P 均 < 0.01),结肠粘膜损伤修复,表明针灸取效与其抑制结肠组织 COX-2 的表达有关。

COX-2 为诱生型酶,在静息状态下不表达,当细胞接受各种刺激后,其表达大量增加^[9~11]。细胞因子(如 IL-1 β)在诱导产生 COX-2 及溃疡性结肠炎形成过程中起重要作用。在用 LPS、IL-1 β 和 TNF- α 处理的巨噬细胞中发现 COX-2、磷脂酶 A₂ (PLA₂) 均明显升高,相应的 PGE₂ 水平上调,这种结肠炎粘膜中前列腺素浓度的明显升高与炎症的严重度相平行。IL-1 作用于肠上皮细胞可激活 PLA₂ 活性,PLA₂ 与 COX-2 蛋白表达及 PGE₂ 水平均有所增加,PGE₂ 增加呈双相性,第一相是由 PLA₂ 蛋白表

针药结合治疗大鼠脑缺血的实验研究

★ 唐英 张保平 (河南仲景保健药业有限公司 郑州 450001)

关键词:针药结合;脑缺血;五味通栓

中图分类号:R 246.6 文献标识码:A

中医药治疗缺血性脑血管病有一定优势,笔者对采用针药结合的方法治疗大鼠脑缺血效果进行了观察,并与单纯针刺和单纯中药的方法进行了对照,现报道如下。

1 实验材料

1.1 动物

Wistar 大鼠 50 只,体重 280~320 g,雌雄各半,河南医科大学动物实验中心提供。

1.2 药物与试剂

五味通栓口服液,山东胜利药业有限公司,批号 990815;乌拉坦,上海元越化工有限公司,批号 990908。

达增加所引起的,第二相是由 COX-2 蛋白表达增加所引起的^[12]。表达 COX-2 的上皮细胞亦表达诱生型一氧化氮合酶(iNOS),两者具有协同作用^[13];COX-2 和 iNOS 是启动子含核因子(NF)- κ B 结合位点的两种诱生型酶,IBD 等炎症反应时 IL-1 β 、TNF- α 等细胞因子水平提高,从而激活 NF- κ B,诱导产生 COX-2 和 iNOS。本研究选用天枢穴进行隔药灸、电针治疗大鼠溃疡性结肠炎,结果提示:与正常大鼠相比,UC 模型大鼠结肠组织 IL-1 β 表达面积和表达强度均显著升高(P 均 <0.01),经过电针、隔药灸治疗后,与模型对照组比较 IL-1 β 表达面积和表达强度均显著降低(P 均 <0.01)。提示针灸可能通过降低结肠组织 IL-1 β 等细胞因子的表达,抑制 NF- κ B 的激活,进而减少 COX-2 的表达,达到治疗之目的。

参考文献

- [1]施征,吴焕淦,王景辉,等.艾灸治疗溃疡性结肠炎的疗效及粘膜免疫学机制[J].世界华人消化杂志,2000,8(特刊):90
- [2]吴焕淦,施征,周丽斌,等.针灸对大鼠溃疡性结肠炎炎症细胞因子表达的影响[J].国际针灸临床杂志,2000,2(3):43
- [3]施征,吴焕淦,华雪桂,等.隔药灸治疗慢性非特异性溃疡性结肠炎的临床[J].亚洲医药,1999,10:103
- [4]Wu Huang, Zhou Libin, Pan Yingying, et al. Study of the mechanisms of acupuncture and moxibustion treatment for ulcerative colitis rats in view of the gene expression of cytokines[J]. World Journal of Gastroenterology, 1999, December 5(6):515

1.3 主要仪器

万分之一电子分析天平,日本岛津公司;DHP-9145A 电热恒温干燥箱,上海-恒科技有限公司;6010 型分光光度计,安捷伦上海分析仪器有限公司。

2 实验方法

2.1 动物分组与处理

动物称重后随机分为 5 组,每组 10 只。假手术组:生理盐水灌胃,3 mL/次,1 次/天。模型组:生理盐水灌胃,3 mL/次,1 次/天。阳性对照组:五味通栓口服液灌胃,9 mL/(kg·d),稀释至 3 mL/次,1 次/天。针刺组:针刺百会、足三里、三阴交、曲池、合

- [5]施征,吴焕淦,陈汉平,等.不同针灸疗法对大鼠实验性溃疡性结肠炎免疫功能的调整作用[J].针灸临床杂志,1996,12(12):23
- [6]方维丽,王邦茂,刘心娟,等.环氧合酶 2 和前列腺素在溃疡性结肠炎中的作用[J].中华内科杂志,2003,42(9):652
- [7]Roberts PJ, Morgan K, Miller R, et al. Neuronal COX-2 expression in human myenteric plexus in active inflammatory bowel disease[J]. Gut, 2001,48(4):468
- [8]Singer II, Kawka DW, Schloemann S, et al. Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease[J]. Gastroenterology, 1998,115:297
- [9]Wu QM, Li SB, Wang Q, et al. The expression of COX-2 in esophageal carcinoma and its relation to clinicopathologic characteristics[J]. World Chin J Digestol, 2001,9:11
- [10]Sun B, Wu YL, Zhang XJ, et al. Effects of Sulindac on growth inhibition and apoptosis induction in human gastric cancer cells[J]. World Chin J Digestol, 2001,9:997
- [11]Sawaoka H, Tsuji S, Tsujii M, et al. Involvement of cyclooxygenase-2 in proliferation and morphogenesis induced by transforming growth factor alpha in gastric epithelial cells[J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1999,61(5):315
- [12]Homaidan FR, Zhao L, Chakroun I, et al. The mechanisms of action of interleukin-1 on rabbit intestinal epithelial cells[J]. Mediators Inflamm, 1999,8(4-5):189
- [13]Masferrer JL, Reddy ST, Zweifel BS, et al. In vivo glucocorticoids regulate cyclooxygenase-2 but not cyclooxygenase-1 in peritoneal macrophages[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1994,270:1340

(收稿日期:2004-04-10)