

电针胃经穴的大鼠血清对胃黏膜细胞 EGFR 阻断后 c-myc 的影响^{*}

★ 杨宗保¹ 严洁^{2**} 易受乡² 常小荣² 钟艳² (1. 江西中医学院 学科建设办公室 南昌 330004; 2. 湖南中医药大学 针灸推拿学院 长沙 410007)

摘要:目的:探讨电针胃经穴的大鼠血清对胃黏膜细胞 EGFR 阻断后 c-myc 基因的影响。方法:72 只大鼠随机分为正常组、模型组、胃经组、胆经组、胃经 + PD153035 组和胆经 + PD153035 组,链霉菌蛋白酶消化法分离胃黏膜细胞,分别用表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂 PD153035 和 100 ml/L 血清孵育胃黏膜细胞,RT-PCR 法检测 c-myc 基因的表达水平。结果:胃经组和胆经组胃黏膜细胞 c-myc 基因的表达水平明显升高,与正常组、模型组比较均有非常显著性差异($P < 0.01$);胃经组胃黏膜细胞 c-myc 基因的表达水平升高最为明显,与胆经组比较有非常显著性差异($P < 0.01$);当用 PD153035 阻断 EGFR 后,胃经 + PD153035 组胃黏膜细胞 c-myc 基因的表达水平明显降低,与胃经组比较有非常显著性差异($P < 0.01$)。结论:电针胃经穴的大鼠血清能上调胃黏膜细胞 c-myc 基因的表达水平,并且存在经脉-脏腑的特异性联系。

关键词:电针;血清;胃黏膜细胞;ERK;磷酸化

中图分类号:R 245.31⁺9 文献标识码:A

The up-regulation of the ERK phosphorylation in gastric mucosal cell influenced by the serum derived from the rats treated with electroacupuncture at stomach meridian acupoints

YANG Zong-bao¹, YAN Jie², YI Shou-xiang², CHANG Xiao-rong², ZHONG Yan²

1. Discipline Construction Office, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004

2. College of Acupuncture and Moxibustion and Massage, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007

Abstract: Objective: To study the Extracellular Regulated protein Kinase (ERK) phosphorylation in gastric mucosal cell by the serum derived from the rats treated with electroacupuncture at stomach meridian acupoints. Methods: 72 rats were randomly divided into Normal group, Model group, Stomach meridian group, Gallbladder meridian group, Stomach plus PD153035 group and Gallbladder plus PD153035 group, gastric mucosal cells were separated by using pronase digestion method, and incubated by PD153035, a EGFR inhibitor and 100ml/L serum in sequence, ERK phosphorylation in gastric mucosal cells was tested by Western blot. Results: In both Stomach meridian group and Gallbladder meridian group, compared with the Normal group or Model group, the ERK phosphorylation in gastric mucosal cell were more reinforcement ($P < 0.01$). Furthermore, the effects in Stomach meridian group were more obvious than those in Gallbladder meridian group ($P < 0.01$). Compared with Stomach meridian group, the reduction of the ERK phosphorylation in Stomach plus PD153035 group was more significant ($P < 0.01$). Conclusions: The serum derived from the rats treated with electroacupuncture at stomach meridian acupoints can activate the ERK phosphorylation in gastric mucosal cells, which also could be one proof for the TCM theory "Relative particularity between Meridian and Viscera".

Key words: Electroacupuncture; Serum; Gastric mucosal cell; ERK; Phosphorylation

* 基金项目:国家自然科学基金(30672724);高等学校博士学科点专项科研基金(20050541003)

** 通讯作者

近年来随着细胞生物学技术的发展,在微观水平上研究针灸对机体产生的效应,揭示针灸效应在细胞内发生的变化,已成为针灸作用机理研究的热点。已有研究表明 EGFR 与胃黏膜损伤修复密切相关,EGFR 的活化可激活细胞内 Ras/Raf/ERK 信号传导通路,从而引起细胞的增殖、分化等。本研究拟借用血清药理学的方法,利用 PD153035 阻断胃黏膜细胞 EGFR,观察电针胃穴后提取的血清对同种异体大鼠胃黏膜细胞 c-myc 基因表达的影响,为揭示针刺作用的体液机理及其信号转导途径提供理论依据。

1 材料和方法 **1.1 试剂及仪器** 链霉菌蛋白酶 (Merk); PD153035 (Calbiochem); TRIzol 试剂盒 (Invitrogen 公司); RNase-free DNA 酶、RNA 酶抑制剂、100bpDNA ladder (Promega 公司); $5 \times$ RT buffer、DNTps、Taq 酶、AMV 逆转录酶 (Promega 公司); c-myc mRNA/GAPDHmRNA 引物 (上海博亚公司); 其他试剂均为市售化学纯。

1.2 动物分组及处理 健康 SD 大鼠 72 只,清洁级,雌雄兼配,体重 200 ~ 230 g,购自湖南农业大学实验动物中心 (许可证号:20030316),大鼠在自然光暗周期的室温环境中分组饲养,自由饮水和进食。大鼠随机分为正常组、模型组、胃经组、胆经组、胃经 + PD153035 组和胆经 + PD153035 组,每组 12 只。随机选 4 只作为血清供体亚组,正常饲养,不作任何处理,7 d 后颈动脉取血,分离血清;另 8 只作为血清受体亚组,正常饲养,不作任何处理,待血清供体亚组提取血清后,即分离胃黏膜细胞。胃经组由四白、梁门、足三里三个穴位组成,胆经组由阳白、日月、阳陵泉三个穴位组成,取穴采用华兴邦动物穴位谱并结合模拟人体经穴法进行。大鼠:足三里:膝关节后外侧,在腓骨小头下约 5 mm 处;梁门:腹正中线与乳头线之间的中线上,脐上 4 寸;四白:眶下缘正中;阳白:眶上缘正中;日月:锁骨中线上,第七肋骨下缘;阳陵泉:腓骨小头下方凹陷处。电针刺激用 G6805 型电针仪,疏密波,电针频率疏波 4Hz,密波 20Hz,强度以肌肉或针柄微颤为度,电针时间 30 min。

1.3 造模方法 采用水浸束缚法制作应激性胃黏膜损伤大鼠模型^[1]。

1.4 大鼠胃黏膜细胞分离方法 采用链霉菌蛋白酶消化法分离胃黏膜细胞^[2]。

1.5 血清制备及处理 颈动脉取血,制备血清。实验时将胃黏膜细胞悬浮液与 $10 \mu\text{mol/L}$ PD153035 在 37°C 下共同孵育 30 min,然后用 HEPES 液将各

组血清稀释成 1/10 的浓度,与胃黏膜细胞悬浮液在 37°C 下共同孵育 30 min 后即行指标检测^[3,4]。

1.6 大鼠胃黏膜细胞 c-myc 基因表达的检测 采用 RT-PCR 法检测大鼠胃黏膜细胞 c-myc 基因的表达水平。c-mycmRNA 及内参 GAPDH 随机引物由 Invitrogen 生物技术公司合成,引物序列如下:c-myc 上游, 5-TCAAGAGGCCACAGCAAAC-3, 下游, 5-AAAAGCTACGCTTCAGCTCG-3; GAPDH 上游, 5-TGCTGAGTATGTCGTGGAGTC-3, 下游, 5 AAGGC-CATGCCAGTGAGCTTC-3。抽提大鼠胃黏膜细胞总 RNA 后依次进行 RNA 鉴定及 RT-PCR 反应 (按试剂盒说明书操作),最后取扩增液做琼脂糖凝胶电泳。待电泳完成后,取出凝胶,存入凝胶成像分析系统待分析,以目的基因与 GAPDH 的电泳带面积灰度值比作为该例标本的基因表达的相对数值。

1.7 统计学分析 所有数据均以均数 $\pm$ 标准差表示,采用 SPSS11.5 统计软件进行单因素方差分析,组间比较若方差齐时选择 LSD 法,方差不齐时选择 Dunnett3 法进行方差分析和两两比较。

2 结果

2.1 电针胃经 (穴) 的大鼠血清对胃黏膜细胞 c-myc 基因表达的影响 经电针胃经 (穴) 或胆 (穴) 的大鼠血清孵育后,胃经组和胆经组胃黏膜细胞 c-myc 基因表达水平明显高于正常组和模型组 ($P < 0.01$);与胆经组比较,胃经组胃黏膜细胞 c-myc 基因表达水平升高最明显 ($P < 0.01$)。

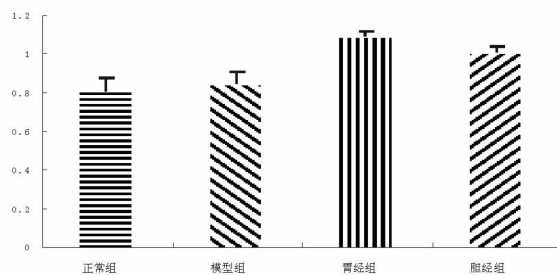


图1 电针胃经 (穴) 的大鼠血清对胃黏膜细胞 c-myc 基因影响

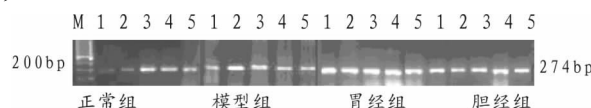


图2 大鼠胃黏膜细胞 c-myc 基因 PCR 产物电泳图

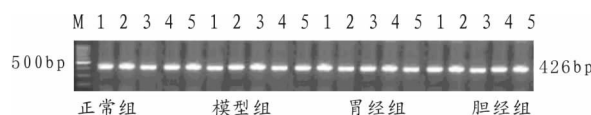


图3 大鼠胃黏膜细胞内参 GAPDH 基因 PCR 产物电泳图

2.2 电针胃经(穴)的大鼠血清对胃黏膜细胞 EGFR 阻断后 c-myc 基因表达的影响 经电针胃经(穴)或胆经(穴)的大鼠血清孵育后,与胆经组比较,胃经组大鼠胃黏膜细胞 c-myc 基因表达水平明显升高($P < 0.01$);与胃经组比较,胃经 + PD153035 组大鼠胃黏膜细胞 c-myc 基因表达水平明显下降($P < 0.01$)。

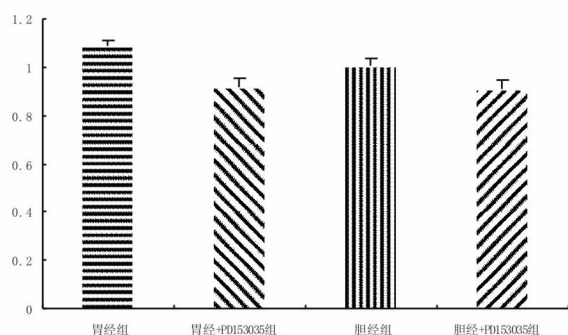


图4 电针足阳明经(穴)对大鼠胃黏膜细胞 EGFR 阻断前后 c-myc 基因影响柱状图

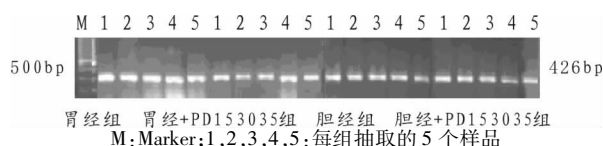


图5 大鼠胃黏膜细胞 c-myc 基因 PCR 产物电泳图

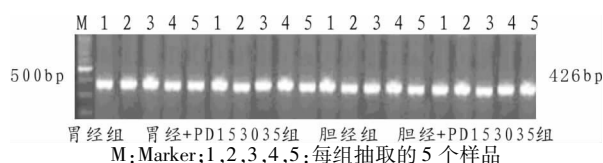


图6 大鼠胃黏膜细胞内参 GAPDH 基因 PCR 产物电泳图

3 讨论

EGFR 在介导胃黏膜损伤修复过程中起着非常重要的作用,很多研究表明在胃黏膜损伤修复中有

EGFR 的高度表达,对胃黏膜的保护及其损伤的修复有很重要的作用^[5]。ERK 是 Boulton 等于 90 年代分离鉴定的一种蛋白激酶,共有 5 个亚族,为脯氨酸导向的丝氨酸/苏氨酸激酶,它正常定位于细胞胞浆中,多种刺激如生长因子、细胞因子、病毒和离子射线等可以使脯氨酸相邻的丝氨酸/苏氨酸磷酸化,调节不同细胞的生长和分裂。

针刺对胃黏膜损伤修复的信号转导机制是否通过 EGFR 介导 ERK 磷酸化并进一步激活 Ras 信号通路目前尚未明了,本研究结果表明:电针胃黏膜损伤大鼠后提取的血清能明显上调大鼠胃黏膜细胞 ERK 磷酸化水平,与正常大鼠和模型大鼠提取的血清比较均有显著性差异,并且电针胃经(穴)后提取的血清其效应明显强于电针胆经(穴)后提取的血清,说明 ERK 参与了电针胃经(穴)对胃黏膜损伤修复的信号转导,当胃黏膜细胞 EGFR 被 PD153035 阻断后,电针后提取的血清对大鼠胃黏膜细胞 ERK 磷酸化水平的影响呈现明显减弱趋势,EGFR 是电针胃经(穴)对胃黏膜损伤修复的调节位点,EGFR 介导了电针胃经(穴)对胃黏膜损伤修复的信号转导途径,同时亦表明 ERK 可能是胃与足阳明经相关的重要物质基础。

参考文献

- [1] 宋晓斌,张学春,张平,等. 生长激素对大鼠急性胃黏膜病变的保护作用[J]. 吉林大学学报:医学版,2007,33(3):503-507.
- [2] 乔伟丽,张咏梅,阎长栋,等. 改良的大鼠胃黏膜壁细胞分离方法[J]. 徐州医学院学报,2004,24:242-243.
- [3] 李建玲,易红,冯雪萍,等. 大鼠胃黏膜细胞 EGFR 通过 ERK-1/2 信号传导通路激活 AP-1[J]. 中国医师杂志,2003,5:170-172.
- [4] 李瑞午,张静龄,郭莹,等. 针刺血清对体外培养神经细胞内钙离子浓度的影响[J]. 中西医结合学报,2004,2:453-455.
- [5] 莫耘松,孙晓珍,张桂珍,等. EGFR 和 TGF- α 在胃黏膜病变组织中的表达及 Hp 对其影响的研究[J]. 浙江临床医学,2007,9(4):509-510.

(收稿日期:2009-04-21)

《江西中医药》征订启事

《江西中医药》创刊于 1951 年,是新中国创办最早的中医药杂志,也是第一批进入中文核心期刊的中国医药类核心期刊,并被多家知名权威检索期刊及数据库确定为固定信息源。五十多年来,《江西中医药》发表了数以万计的优秀论文,一大批中医药学者就是从这里走向成功、走向成名的。21 世纪,《江西中医药》迎来了更大的发展机遇,2002 年评为华东地区优秀期刊、江西省优秀期刊,2004 年评为全国高校优秀期刊。2003 年成功改为月刊,赢得了更多读者的青睐。本着“面向临床,面向基层,坚持传统,注重实用”的办刊思路,我们进一步充实内容,调整栏目,使文章更具可读性、实用性、信息性,以满足读者的需要。

《江西中医药》(ISSN 0411-9584,CN 36-1095/R)为月刊,国内外公开发行。国内邮发代号为 44-5,国外代号为 BM1012。每期定价:4.80 元。