

针刺足三里穴对大鼠冷应激性溃疡下丘脑NOS表达的影响

孙锦平, 田淑君, 田庆华, 尹岭, 母义明

孙锦平, 田淑君, 田庆华, 尹岭, 中国人民解放军总医院神经信息中心
北京市 100853

母义明, 中国人民解放军总医院内分泌实验室 北京市 100853

孙锦平, 女, 1969-02-26 生, 江苏省东海县人, 汉族, 1995 年于哈尔滨医科大学硕士研究生毕业, 2004 年于解放军总医院博士研究生毕业, 副主任医师, 主要从事神经内分泌的研究。

国家自然科学基金资助项目, No.30171135

项目负责人: 尹岭, 150086, 北京市复兴路 28 号, 中国人民解放军总医院神经信息中心. yinling1955@sina.com

电话: 010-66937547

收稿日期: 2004-03-15 接受日期: 2004-04-15

Effect of NOS expression in hypothalamus with cold restraint stress-induced ulcer in rats by acupuncturing acupoint ST36

Jin-Ping Sun, Shu-Jun Tian, Qing-Hua Tian, Ling Yin, Yi-Ming Mu

Jin-Ping Sun, Shu-Jun Tian, Qing-Hua Tian, Ling Yin, Center of Neuroinformatics, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China
Yi-Ming Mu, Endocrinological Lab, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

Supported by the National Nature Science Foundation of China, No. 30171135

Correspondence to: Dr. Ling Yin, 28 Fuxing Road, Center of Neuroinformatics, General hospital of PLA, Beijing 100853, China.

yinling1955@sina.com

Received: 2004-03-15 Accepted: 2004-04-15

Abstract

AIM: To study the protective effect in cold-restraint stress-induced ulcer with acupuncturing the acupoint ST 36, and the expression of NOS related with stress in hypothalamus.

METHODS: Ulcer index in rats and RT-PCR were used to study the protective effect in stress-induced ulcer with acupuncture, and the expression of NOS in hypothalamus. Images were analyzed with semi-quantitative methods.

RESULTS: The ulcer index was significantly decreased in stress-induced ulcer rats by acupuncturing in contrast with only stress-induced ulcer rats (control group 0, stress ulcer group 26.25 ± 4.40 , and acupuncture group 9.75 ± 1.91 ; Acupuncture group vs stress ulcer group, $P < 0.01$). The expression of NOS1 was increased by acupuncturing protective stress-induced ulcer (0.69 ± 0.05 , 0.77 ± 0.09 , 1.87 ± 0.15 , $P < 0.01$). The increased expression of NOS2 was related with stress-induced ulcer, and acupuncture would decreased its expression (0.06 ± 0.02 , 0.24 ± 0.05 , 0.12 ± 0.06 , $P < 0.01$). The expression of NOS3 had the similar reaction to NOS2, but the decreased effect of acupuncture was limited (0.30 ± 0.08 , 0.63 ± 0.14 , 0.45 ± 0.14 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: The protective effects in stress-induced ulcer with acupuncturing the acupoint ST 36 are realized by increase of the physiological expression of NOS1 as well as decrease of the expression of NOS1 and NOS3.

Sun JP, Tian SJ, Tian QH, Yin L, Mu YM. Effect of NOS expression in hypothalamus with cold restraint stress-induced ulcer in rats by acupuncturing acupoint ST36. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(9): 2095-2098

摘要

目的: 本实验采用冷应激的方法, 研究针刺足三里穴对急性胃溃疡的保护作用, 以及应激大鼠下丘脑与应激有关的 NOS 的表达情况。

方法: 应用胃黏膜溃疡指数的计算和 RT-PCR 的方法研究针刺足三里对大鼠的冷应激性胃溃疡的保护和下丘脑一氧化氮合成酶(NOS)的表达情况, 经图像分析系统照相并进行半定量。

结果: 针刺足三里穴可以明显减少冷应激造成的溃疡指数(正常对照组为 0, 单纯应激组为 26.25 ± 4.40 , 针刺预防溃疡组为 9.75 ± 1.91 , 针刺预防溃疡组与单纯应激组相比 $P < 0.01$)。下丘脑 NOS1 不参与冷应激溃疡病理过程, 针刺足三里穴可以在生理范围内上调下丘脑的 NOS1 的表达过程(正常对照组为 0.69 ± 0.05 , 单纯应激组为 0.77 ± 0.09 , 针刺预防应激组为 1.87 ± 0.15 , 针刺预防应激组与正常对照组相比 $P < 0.01$)。下丘脑 NOS2 参与了冷应激溃疡病理过程, 针刺足三里穴可以下调其表达(正常对照组为 0.06 ± 0.02 , 单纯应激组为 0.24 ± 0.05 , 针刺预防应激组为 0.12 ± 0.06 , $P < 0.01$)。减少病理损害程度; NOS3 也参与了冷应激溃疡这一病理过程, 针刺可以下调其表达作用(正常对照组为 0.30 ± 0.08 , 单纯应激组为 0.63 ± 0.14 , 针刺预防应激组为 0.45 ± 0.14 , 针刺预防应激组与单纯应激组与正常对照组相比 $P < 0.05$, 单纯应激组与正常对照组相比 $P < 0.001$)。

结论: 针刺对冷应激溃疡具有保护作用, 该种保护作用是通过生理性上调 NOS1 的生理性表达, 下调 NOS2、NOS3 的病理性表达而实现的。

孙锦平, 田淑君, 田庆华, 尹岭, 母义明. 针刺足三里穴对大鼠冷应激性胃溃疡下丘脑 NOS 表达的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12(9):2095-2098

<http://www.wjnet.com/1009-3079/12/2095.asp>

0 引言

下丘脑是较高级的调节内脏活动的中枢，他与边缘系统和脑干网状结构有紧密的形态和功能方面的联系，并与垂体、肾上腺构成了人体的主要应激系统，该系统除调节内脏功能活动外，还调节着体温、内分泌、情绪反应等重要的生理过程，下丘脑功能紊乱可以造成急性胃黏膜病变。心理性和躯体性应激也可造成急性胃黏膜病变。这些应激反应均与一氧化氮合成酶(NOS)有关^[1-2]。研究证明，在NOS的三种亚型(NOS1、NOS2、NOS3)中，NOS1与NOS3主要与胃黏膜的保护作用和溃疡的愈合有关，而NOS2则与溃疡的形成有关^[3-4]。而急性胃黏膜病变时，下丘脑内NOS的改变情况并不明确。我们采用冷应激的方法造成大鼠的急性胃黏膜病变，观察针刺足三里对急性胃黏膜病变的保护作用，以及针刺对下丘脑与应激有关的NOS的表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 SD ♂大鼠22只(由解放军总医院实验动物中心提供)，体重200 ± 50 g，动物随机分成正常对照组(6只)、单纯应激组(8只)、针刺预防应激组(8只)，共3组。冷应激组只给与冷刺激；针刺预防组先给与针刺足三里穴1 wk，然后给与冷应激；正常对照组不给与任何刺激，与其他两组在相同条件下喂养。SD ♂大鼠禁食24 h，可自由饮水，活动不受限制。实验前1 h禁水。称重，乙醚轻度麻醉，四肢束缚于特制木板上，待其清醒后，置于4 ± 1 °C冷室内，经过3 h，腺胃部出现点状出血与线状或直径为1-2 mm的表浅性圆形溃疡，即制成冷束缚应激性溃疡模型。

1.2 方法 将大鼠放置于特制的鼠笼内，双后肢充分暴露，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”选取双侧足三里穴，每日上午09:00/10:00时给予电针刺刺激，每次30 min，持续1 wk。刺激仪选用WQ1002K型济生多用治疗仪。刺激参数：疏密波，频率2-20 Hz，起始强度为2 V，每刺激10 min强度增加1 V。正常对照组：不给予任何刺激。将3组大鼠处置后立即断头，按大鼠脑解剖图谱取下丘脑，放入液氮冻存。同时取胃黏膜，分别用Guth^[5]计算方法计算胃黏膜损伤指数：斑点糜烂计为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计为5分。

采用Trizol一步法提取脑内总RNA，紫外分光光度计进行吸光度测定，确定其浓度与纯度。取20 μg总RNA逆转录合成cDNA，逆转录体系共40 μL，包括：Oligo dT1.5 μL，25 mmol/L的dNTPs 2 μL，加DEPC水至26 μL混匀，PCR仪中加热至65 °C持续5 min，然后取出置于冰上，离心30 s加入5 × buffer 8 μL，0.1 mmol/L DTT4 μL，42 °C 5 min后加Superscript II逆转录酶各2 μL，42 °C加热45 min，75 °C加热10 min以灭活逆转录酶，-20 °C保存。PCR反应步骤：每个反应体系共30 μL，包括：10 × buffer 3 μL，dNTPs

(2.5 mmol/L) 1.8 μL，sense primer (10 mmol/L) 1.2 μL，antisense primer (10 mmol/L) 1.2 μL，cDNA (per) 2 μL，MilliQ H₂O 0.3 μL。反应体系预变性5 min，加入Taq酶0.5 μL，94 °C变性30 s，58 °C复性30 s，72 °C延伸1 min，NOS(包括3型：NOS1、NOS2、NOS3)和ET-1均为32个循环。大鼠脑组织中的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扩增用2%琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭染色显示，用凝胶图像分析系统进行照相，应用Image-pro-plus图像分析系统对图片进行半定量研究。

统计学处理 采用SPSS软件包进行统计分析及作图，溃疡指数计算采用mean ± SD表示，结果应用均数的t检验。RT-PCR数据采用ANOVA单因素方差分析。

2 结果

单纯应激组溃疡指数为26.25 ± 4.40，针刺预防溃疡组为9.75 ± 1.91，正常对照组为0。针刺预防溃疡组与单纯应激组相比P < 0.01，统计学差异极显著。

2.1 NOS1 mRNA的表达 正常对照组大鼠下丘脑的NOS1 mRNA表达与β-actin的比值(以下简称为比值)为0.69 ± 0.05；单纯应激组为0.77 ± 0.09；针刺预防应激组为1.87 ± 0.15；其中，针刺预防应激组与正常对照组相比，有显著差异(P < 0.01)；应激组与正常对照组相比，无统计学差异(P > 0.05，见图1)。

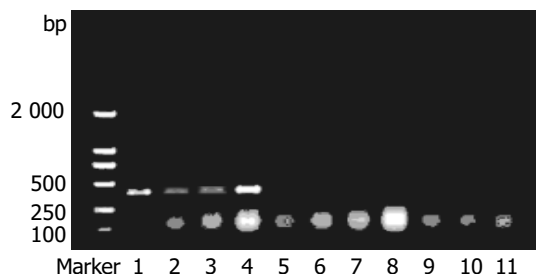


图1 针刺足三里穴对应激性溃疡大鼠下丘脑NOS1 mRNA表达的影响。1、2、3、4为针刺预防应激溃疡组；5、6、7、8为单纯应激溃疡组；9、10、11为正常对照组。

2.2 NOS2 mRNA的表达 正常对照组大鼠下丘脑的NOS2 mRNA表达比值为0.06 ± 0.02；单纯应激组为0.24 ± 0.05；针刺预防应激组为0.12 ± 0.06；针刺预防应激组与单纯应激组相比有显著统计学差异(P < 0.01)；单纯应激组与正常对照组相比有极显著差异(P < 0.001，见图2)。

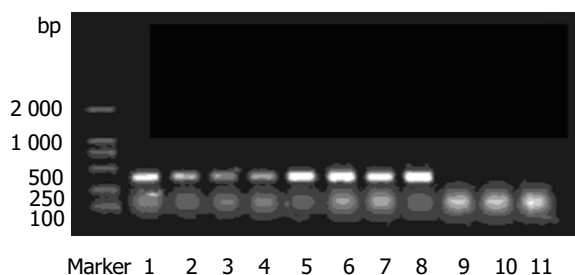


图2 针刺足三里穴对应激性溃疡大鼠下丘脑 NOS2 mRNA 表达的影响。1、2、3、4 为针刺预防应激溃疡组；5、6、7、8 为单纯应激溃疡组；9、10、11 为正常对照组。

2.3 NOS3 mRNA 的表达 正常对照组大鼠下丘脑的 NOS3 mRNA 表达比值为 0.30 ± 0.08 ; 单纯应激组为 0.63 ± 0.14 ; 针刺预防应激组为 0.45 ± 0.14 ; 针刺预防应激组与单纯应激组相比有统计学差异 ($P < 0.05$); 针刺预防应激组与正常对照组相比亦有统计学差异 ($P < 0.05$); 单纯应激组与正常对照组相比有极显著差异 ($P < 0.001$, 见图 3)。

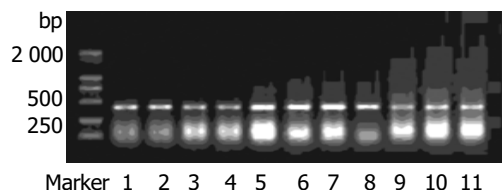


图3 针刺足三里穴对应激性溃疡大鼠下丘脑 NOS3 mRNA 表达的影响。1、2、3、4 为针刺预防应激溃疡组；5、6、7、8 为单纯应激溃疡组；9、10、11 为正常对照组。

3 讨论

近年研究推测 NO/ET 失衡可致胃黏膜血流量减少, 导致胃黏膜损伤^[6-7]。研究已经证明 NO 对胃黏膜具有保护和损伤双重作用, 这主要与产生 NO 的 NOS 的亚型有关^[8]。NO 可作为神经递质与感觉神经肽共同参与胃黏膜的生理或病理性充血反应, 增加胃黏膜的血流量^[9], 介导传入神经的胃黏膜保护作用, 也可以作为一种抗氧化剂起到对神经系统的保护作用^[10]。NO 是由 NOS 催化生成的, 兼有第二信使和神经递质的性能, 同时又是效应分子, 在中枢神经系统中参与众多的生理功能, 在病理情况下, NO 主要通过其还原型亚硝酸离子与超氧阴离子反应形成过氧化亚硝酸阴离子, 从而抑制腺苷酸环化酶等多种酶活性, 干扰 CNS 正常的物质和能量代谢、信息传递以及细胞内稳态的维持, 导致血管的通透性增高、神经元死亡、神经递质释放和传递障碍, 进而影响组织的生理功能^[11-12]。

中枢神经系统中的 NOS 亚型有 3 种: 神经元型 NOS (NOS1)、内皮型 NOS (NOS3) 和诱导型 NOS (NOS2)^[13]。NOS1 主要分布于神经元, 在突触可塑性、神经再生、神经传导与神经元的发育、神经内分泌的调节等多种中枢神经系统生理功能相关^[14-15], NOS2 主要在各种胶质细胞中表达, NOS3 主要在血管内皮细胞中表达。其中

NOS1、NOS3 又被称为结构型 NOS (eNOS), 常在生理状态下即有表达, 由他催化生成的 NO 主要起着神经递质和第二信使的作用。研究发现安乃近诱发大鼠胃黏膜病变过程中, 可以见到 eNOS 的活性明显抑制, NO 的生成量也下降^[16]; eNOS 与胃黏膜血流量在溃疡的形成过程中起着保护作用^[17]。本结果表明, 冷束缚应激对下丘脑 NOS 三种类型的影响各不相同, 而针刺对 NOS 的调节作用也是不同的。冷应激对下丘脑 NOS1 的影响与正常对照组无明显差异, 说明, 下丘脑内的 NOS1 没有参与冷应激反应, 针刺预防组的 NOS1 表达明显高于正常对照组和单纯应激组, 说明针刺足三里穴可以上调 NOS1 的表达, 使 NOS1 能够催化合成更多的 NO, 从而对冷应激引起的胃黏膜损伤起到保护作用, 从 NOS3 的表达结果可以看出, 与 NOS1 不同的是, 冷应激也可以引起其表达的明显增高, 与正常对照组存在极其显著的差异, 针刺足三里穴同样也可以抑制这种表达, 这种针刺的抑制作用是不完全的, 只是在一定的程度上起到了下调的作用, 并不能完全抑制 NOS2 这种对机体不利的表达, 这与既往的文献报道的结果不同, 考虑对于 NOS3 外周的反应和中枢是否存在差异, 有待于进一步证实。

NOS2 可能主要在病理状态下表达, 其表达受内皮素、白介素 -1 等的诱导, 一旦表达可以持续合成高浓度的 NO; NO 同时他也是一种致炎因子, 能够促进巨噬细胞等炎性细胞分泌炎性递质, 从而诱导多型核白细胞的聚集, 生成氧自由基和硝基自由基, 参与神经损伤后的病理过程^[18-19]; 已经有实验证明, 在门静脉高压模型大鼠上, 胃黏膜的 NOS2 在蛋白水平和 mRNA 水平的表达都明显增加, 而应用 NOS2 的抑制剂进行灌胃在大剂量时可以抑制溃疡的形成及胃黏膜 NOS2 的表达^[20], NOS2 表达的增高主要发生于溃疡最为严重的第 1 d 至第 3 d^[21]。NOS2 与 COX2 则共同参与了应激造成的神经系统的过氧化损伤^[22]。本实验结果显示, 冷应激可以引起下丘脑 NOS2 表达的明显升高, 与对照组有极显著的差异, 充分证实了下丘脑的 NOS2 也和胃黏膜及血浆中的变化规律相同: 他的过度表达参与了胃黏膜病变的病理生理过程。针刺足三里可以明显的抑制这种过度表达, 对机体的损伤起到了最大限度的保护作用。本实验证实, NOS1 不参与病理性应激反应, NOS2 参与病理性应激反应, 与既往的文献报道相吻合; 而 NOS3 也参与了应激后的溃疡过程, 与既往所得出的实验结果不甚符合, 但有报道, NOS1、NOS2、NOS3 都参与了溃疡的愈合过程^[23]。总之, 本实验充分证明了冷应激时下丘脑的 NOS2、NOS3 参与了病理性应激过程。而针刺足三里穴位则可以上调 NOS1 参与机体的生理反应, 对胃黏膜起到保护作用, 对 NOS2、NOS3 则是通过抑制其表达而起到保护作用的。

4 参考文献

- 1 Masood A, Banerji B, Vijayan VK, Ray A. Pharmacological and biochemical studies on the possible role of nitric oxide in stress adaptation in rats. *Eur J Pharmacol* 2004;493:111-115
- 2 McLeod TM, Lopez-Figueroa AL, Lopez-Figueroa MO. Nitric oxide, stress, and depression. *Psychopharmacol Bull* 2001;35:24-41
- 3 Brzozowska I, Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ, Kwiecien S, Pajdo R, Drozdowicz D, Pawlik M, Ptak A, Hahn EG. Role of prostaglandins, nitric oxide, sensory nerves and gastrin in acceleration of ulcer healing by melatonin and its precursor, L-tryptophan. *J Pineal Res* 2002;32:149-162
- 4 Ohta Y, Nishida K. L-arginine protects against stress-induced gastric mucosal lesions by preserving gastric mucus. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002;29:32-38
- 5 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
- 6 张国锋, 陈易人, 张明敏. 一氧化氮、内皮素与胃黏膜损伤. 胃肠病学和肝病学杂志 1999;8:293-296
- 7 杨院平, 邓长生, 朱允庆. 一氧化氮与内皮素在胃黏膜损伤中的作用与关系. 陕西医学杂志 2002;31:137-140
- 8 Cho CH. Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders. *J Physiol Paris* 2001;95:253-256
- 9 Salomone S, Caruso A, Cutuli VM, Mangano NG, Prato A, Amico-Roxas M, Bianchi A, Clementi G. Effects of adrenomedullin on the contraction of gastric arteries during reserpine-induced gastric ulcer. *Peptides* 2003;24:117-122
- 10 Mohanakumar KP, Thomas B, Sharma SM, Muralikrishnan D, Chowdhury R, Chiueh CC. Nitric oxide: an antioxidant and neuroprotector. *Ann N Y Acad Sci* 2002;962:389-401
- 11 Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Nitric oxide-mediated Ca⁺⁺-influx in neuronal nuclei and cortical synaptosomes of normoxic and hypoxic newborn piglets. *Neurosci Lett* 2002;318:93-97
- 12 Xie Z, Wei M, Morgan TE, Fabrizio P, Han D, Finch CE, Longo VD. Peroxynitrite mediates neurotoxicity of amyloid beta-peptide1-42- and lipopolysaccharide-activated microglia. *J Neurosci* 2002;22:3484-3492
- 13 Bolanao JP, Almeida A. Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. *Biochim Biophys Acta* 1999;1411:415-436
- 14 Drew B, Leeuwenburgh C. Aging and the role of reactive nitrogen species. *Ann N Y Acad Sci* 2002;959:66-81
- 15 Barrachina MD, Panes J, Esplugues JV. Role of nitric oxide in gastrointestinal inflammatory and ulcerative diseases: perspective for drugs development. *Curr Pharm Des* 2001;7:31-48
- 16 Sanchez S, Martin MJ, Ortiz P, Motilva V, Herrerias JM, Alarcon de la Lastra C. Role of prostaglandins and nitric oxide in gastric damage induced by metamizol in rats. *Inflamm Res* 2002;51:385-392
- 17 West SD, Helmer KS, Chang LK, Cui Y, Greeley GH, Mercer DW. Cholecystokinin secretagogue-induced gastroprotection: role of nitric oxide and blood flow. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G399-410
- 18 Wada K, Chatzipanteli K, Busto R, Dietrich WD. Role of nitric oxide in traumatic brain injury in the rat. *J Neurosurg* 1998;89:807-818
- 19 余道, 许友芝, 周晓阳, 欧阳静萍, 涂淑珍, 陈志桥, 陈静. 大鼠急性肺损伤时 iNOS mRNA 和 eNOS mRNA 表达的时相变化. 武汉大学学报(医学版) 2003;24:24-27
- 20 Hsieh JS, Wang JY, Lin SR, Lian ST, Chen FM, Hsieh MC, Huang TJ. Overexpression of inducible nitric oxide synthase in gastric mucosa of rats with portal hypertension: correlation with gastric mucosal damage. *J Surg Res* 2003;115:24-32
- 21 Guo JS, Cho CH, Wang WP, Shen XZ, Cheng CL, Koo MW. Expression and activities of three inducible enzymes in the healing of gastric ulcers in rats. *World J Gastroenterol* 2003;9:1767-1771
- 22 Madrigal JL, Garcia-Bueno B, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Leza JC. Relationship between cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in rat cortex after stress. *Eur J Neurosci* 2003;18:1701-1705
- 23 Araki H, Komoike Y, Matsumoto M, Tanaka A, Takeuchi K. Healing of duodenal ulcers is not impaired by indomethacin or rofecoxib, the selective COX-2 inhibitor, in rats. *Digestion* 2002;66:145-153

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 影响因素

影响因素是国际通行的期刊评价指标之一, 是反映期刊重要性的宏观定量指标. 通常影响因素越大, 期刊的学术影响力和作用也越大. 总被引频次是指期刊自创刊以来所刊登的全部论文在统计当年被引用的总次数, 是一个非常客观实际的评价指标, 可以显示该刊被使用和重视的程度, 以及在科学交流中的作用和地位. 美国科学信息研究所(ISI)出版的期刊引证报告(JCR): 《*World Journal of Gastroenterology*, WJG》2002 年影响因素为 2.532, 被引频次为 1 535. WJG 2002 年影响因素在国际胃肠病学和肝病学领域的 45 种期刊中排名第 13 位, 在 SCI 收录的所有 5876 种国际科学期刊中排名第 797 位. WJG 2001 年影响因素 1.445, 被引频次为 722; WJG 2000 年影响因素 0.993, 被引频次 327 次. 1998 年以来发表的全文电子版(ASP, PDF) 已与 PubMed 中的文摘进行了链接, 全世界的读者在利用 PubMed 检索时即可免费阅读到 WJG 发表的全文, 使本刊作者发表的论文在全球得到及时广泛的传播, 期刊的影响因子逐年上升, 国际影响逐年扩大.