

胃黏膜损伤大鼠胃组织 P2X₁、P2X₃ 和 P2X₅ 的表达及电针对其影响

朱小香 郑淑霞 萨喆燕 修春英 董亚琴 许金森

【摘要】 目的 观察电针足三里穴对胃黏膜应激损伤大鼠胃组织中 P2X₁、P2X₃、P2X₅ mRNA 表达的影响,探讨电针足三里穴防治胃黏膜损伤的分子机制。**方法** 将 SD 大鼠随机分为正常对照组(正常组)、胃黏膜应激损伤模型组(模型组)和电针足三里穴组(电针组)。采用冷-束缚法制作胃黏膜应激损伤大鼠模型。造模后次日起电针组每天电针足三里穴 20 分钟,连续三天。RT-PCR 法检测胃组织 P2X₁、P2X₃、P2X₅ mRNA 表达。**结果** 各组大鼠均表达 P2X₁、P2X₃、P2X₅ mRNA;模型组与正常组比较,P2X₁ mRNA 表达显著降低($P < 0.01$);电针组与模型组比较,P2X₁ mRNA 表达显著升高($P < 0.05$);P2X₃、P2X₅ mRNA 组间未见显著差异;正常组大鼠胃组织 P2X₃ 和 P2X₅ 呈显著正相关($P < 0.05$)。**结论** 胃黏膜应激损伤大鼠的胃组织 P2X₁ mRNA 表达下降,电针足三里穴可以上调胃黏膜应激损伤大鼠胃组织 P2X₁ mRNA 的表达。

【关键词】 胃黏膜应激损伤; 电针; 足三里; P2X

【中图分类号】 R245.9+7 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.01.009

The expression of P2X in the gastric tissue of rats with gastric mucosal injury and the effect of electro-acupuncture on it ZHU Xiao-xiang, ZHENG Shu-xia, SA Zhe-yan, et al. Fujian Academy of TCM and Pharmacy, Fuzhou 350003, China

Corresponding author: XU Jin-sen, E-mail: xujinsenjls@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of electro-acupuncture(EA)at Zusanli on the expression of P2X₁, P2X₃ and P2X₅ mRNA in the gastric tissue of rats with stress-induced gastric mucosal injury and explore the molecular mechanism for the prevention and treatment of gastric mucosal injury by means of EA at Zusanli. **Methods** SD rats were randomly divided into three groups:normal control group(Normal Group), stress-induced gastric mucosal injury group (Model Group) and EA at Zusanli group (EA Group). The rat model with stress-induced gastric mucosal injury was constructed by cold-restraint method. From the next day after modeling, EA Group received EA at Zusanli 20 minutes a day for three consecutive days. The expression of P2X₁, P2X₃ and P2X₅ mRNA in the gastric tissue were tested by RT-PCR. **Results** The expression of P2X₁, P2X₃ and P2X₅ mRNA in the gastric tissue of rats were observed in all the groups. Compared with the Normal Group, the expression of P2X₁ mRNA in the gastric tissue in the Model Group was significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with the Model Group, the expression of P2X₁ mRNA in the gastric tissue in the EA Group was significantly increased ($P < 0.05$). There was no significant difference among groups in terms of P2X₃ and P2X₅. There was a significant positive correlation between P2X₃ and P2X₅ in the gastric tissue of rats in the Normal Group ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of P2X₁ mRNA in the gastric tissue of rats with stress-induced gastric mucosal injury was decreased, EA at Zusanli could up-regulate the expression of P2X₁ mRNA in the gastric tissue of rats with stress-induced gastric mucosal injury.

【Key words】 Stress-induced gastric mucosal injury; Electro-acupuncture; Zusanli; P2X

基金项目:国家自然科学基金青年基金(81403490);福建省卫生厅青年科研基金(2011-1-42)

作者单位:350003 福建省中医药研究院(朱小香、郑淑霞、萨喆燕、修春英、董亚琴、许金森)

作者简介:朱小香(1980-),女,硕士,实验师。研究方向:针灸经络研究。E-mail:zx9@163.com

通讯作者:许金森(1963-),硕士,研究员,硕士生导师。研究方向:针灸经络研究。E-mail:xujinsenjls@163.com

既往研究表明^[1-3],针刺足三里穴对胃黏膜损伤具有防治作用,然而其具体作用机制仍不清楚。上世纪 70 年代以来发现传统的能量分子 ATP 也是一种神经递质,其参与了从中枢到外周诸多组织细胞的生理生化机能。现代生物学对 ATP 及其受体 P2X 的研究成果为揭示针刺信号的转换机制提供了充足的理论依据。目前研究发现 P2X 有 P2X₁₋₇ 7 个亚型,其中 P2X₁ 被认为与膀胱机能调节密切相关^[4]。越来越多的研究证明 P2X 受体在胃肠道平滑肌的收缩和舒张中发挥着重要作用^[5],但具体亚型在其中所扮演的角色尚未完全清楚。胃和膀胱的共同特点之一是平滑肌都是其运动单元的一个重要组成部分,那么 P2X₁ 等亚型是否也在胃功能调节中起重要作用?另外,电针足三里穴治疗胃黏膜损伤的作用机制是否与 P2X 受体亚型相关?为此,本文运用分子生物学方法从基因转录水平研究正常大鼠和胃黏膜应激损伤大鼠胃组织 P2X₁、P2X₃、P2X₅ 亚型的表达情况以及电针足三里穴对其的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

成年 SD 雄性健康大鼠 24 只(福建医科大学实验动物中心提供,清洁级,许可证号:SCXK(闽)2012-0001。体重(250±25)g。动物称重编号,随机分为 3 组:正常对照组(正常组)、胃黏膜应激损伤模型组(模型组)、电针足三里穴组(电针组)各 8 只。

1.2 胃黏膜应激损伤模型制备

胃黏膜应激损伤大鼠模型制备采用冷-束缚应激法^[6]并加以改良。造模方法:大鼠禁食不禁水 24 小时,束缚四肢于自制铁板上,放入 7℃ 冰箱,冷应激 2.5 小时后取出松绑。模型成功的标准:大鼠安静,萎靡不振,身体蜷缩;形态学上动物胃黏膜有出血点和溃疡灶。除正常组外,其余两组大鼠均按冷-束缚应激法复制胃黏膜应激损伤模型。

1.3 干预方法

模型复制后,次日电针组给予电针治疗:一次性无菌针灸针(0.18×13mm)直刺足三里穴 1 cm(参考《实验针灸学》大鼠针灸穴位图谱定位^[7]),参考电极置于胃经线上足三里穴下 0.5 cm 处,疏密波,10/20Hz,刺激强度 2~3 V,以下肢出现轻微抖动为度,电针 20 分钟,连续三天。模型组和正常组均不进行电针干预。

1.4 主要试剂

总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒均为 Promega 生物公司产品;聚合酶链反应(PCR)试剂盒为 TIANGEN 公司产品;引物由 Invitrogen 生物公司合成;GeneFinder 染料为致善生物公司产品;DNA Marker 为 Bio Flux 公司产品。

1.5 主要仪器

DU530 核酸/蛋白分析仪(Beckman Coulter 公司);Veriti PCR 仪(ABI 公司);Gene Genius 生物成像系统(SYNGENE 公司);WQ-10D1 电针仪(北京欣东华电子仪器有限公司)。

1.6 P2X 亚型 mRNA 检测

电针组治疗结束后 24 小时以 1% 乌拉坦麻醉各组大鼠,剖腹取胃,沿胃大弯剪开、展平并用冰生理盐水清洗胃内容物,全胃剪碎后置于预装有 100 μL 总 RNA 提取裂解液的 EP 管中,液氮研磨后按 Promega 公司 Z3100 总 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA。然后核酸蛋白分析仪检测 RNA 纯度及浓度;取 1 μg 总 RNA,使用 Promega 公司 A3500 反转录试剂盒进行逆转录反应;取 3 μL 逆转录产物进行 P2X 亚型的 PCR 反应,同时设置 β-actin 作内参照。大鼠 P2X₁ 上游引物 5'-AAAGCAGAAAGGAAAGC-CCA-3',下游引物为 5'-ATACAGTCCGTGGAAGT-GG-3',扩增片段长度为 435 bp;P2X₃ 上游引物 5'-CAACTTCAGGTTTGCCAAA-3',下游引物为 5'-TGAACAGTGAGGGCCTAGAT-3',扩增片段长度为 520 bp;P2X₅ 上游引物 5'-AGTCATCAACATTGGT-TCTG-3',下游引物为 5'-CAGGAGACCTTCCGT-GAAA-3',扩增片段长度为 542 bp;β-actin 上游引物为 5'-TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT-3',下游引物为 5'-CACGATGGAGGGGCCGACTCATC-3',扩增片段长度为 240bp。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 3 分钟→(94℃ 变性 40 秒,退火 1 分钟,72℃ 延伸 1 分钟),共循环 35 次→72℃ 延伸 10 分钟;退为温度如下:P2X₁ 为 53℃,P2X₃ 和 P2X₅ 前 6 个循环为 53℃,后 29 个循环为 48.5℃。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,使用生物成像系统对电泳条带进行图像采集和光密度值分析,目的基因与内参 β-actin 电泳条带的光密度比值即为目的基因 mRNA 在组织中的相对表达量。

1.7 统计学处理

数据以均值±标准误($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)表示,采用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析和相关性分析。各组大鼠胃组织 P2X₁、P2X₃、P2X₅ mRNA 表达比较进

行单因素方差分析:本实验数据方差齐,使用 LSD 检验。对正常组大鼠胃组织 P2X₁、P2X₃、P2X₅ 受体亚型作相关性分析:本实验数据符合正态分布,使用 pearson 检验。 $P < 0.05$ 为差异显著性标准。

2 结果

各组大鼠胃组织均表达 P2X₁、P2X₃、P2X₅ mRNA。经单因素方差分析 LSD 检验,模型组与正常组相比,大鼠胃组织 P2X₁ mRNA 表达显著下降($P < 0.01$);而电针组与模型组相比,大鼠胃组织 P2X₁ mRNA 表达显著升高($P < 0.05$)。P2X₃、P2X₅ mRNA 组间未见显著差异。对正常组大鼠胃组织 P2X₁、P2X₃、P2X₅ 受体亚型作相关性分析,发现正常组大鼠胃组织 P2X₃ 和 P2X₅ 呈显著正相关($P < 0.05$, $r_{(3,5)} = 0.755$)。见表 1。

表 1 各组大鼠胃组织 P2X 亚型 mRNA 的比较($\bar{x} \pm S_x$, $n=8$)

组别	P2X ₁ /β-actin	P2X ₃ /β-actin	P2X ₅ /β-actin
正常组	0.1789 ± 0.0342	0.2473 ± 0.0609 ^c	0.6653 ± 0.0669
模型组	0.0543 ± 0.0274 ^a	0.3293 ± 0.1298	0.6853 ± 0.1102
电针组	0.1498 ± 0.0162 ^b	0.4485 ± 0.0743	0.7851 ± 0.0739

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。正常组 3 个亚型作相关性分析,P2X₃ 与 P2X₅ 显著正相关,^c $P < 0.05$, $r_{(3,5)} = 0.755$

3 讨论

P2X 受体是 ATP 门控的离子通道,当它与胞外 ATP 结合时,P2X 通道打开,允许 Ca²⁺、单价阳离子以及小的有机离子通过^[8],继而引起一系列生理或病理变化。P2X 受体广泛表达于从变形虫到人类的一系列生物体中^[9]。目前已克隆出 7 个 P2X 亚型,分别为 P2X₁、P2X₂、…P2X₇^[10]。这些亚单位能够以同聚体或异聚体的形式形成功能性通道^[11-12]。许多细胞同时表达不同类型的 P2X 亚单位,也暗示天然的 P2X 受体通常以异聚体的形式存在。本研究团队对正常组 3 个亚型间的相关性进行分析发现,P2X₃ 与 P2X₅ 呈显著正相关($P < 0.05$),提示在大鼠胃组织中 P2X₃ 和 P2X₅ 二者之间可能在 mRNA 转录水平存在共表达,它们可能以同聚体的方式存在,也可能以异聚体的形式存在。

P2X₁ 亚型在调节膀胱功能方面具有重要作用^[4]。OREILLY 等^[13]于 2001 年用定量 RT-PCR 比较胎儿和成年人的膀胱表达 7 个已知 P2X 受体的情况,发现正常成人膀胱 P2X₁ 在信使 RNA 水平是

主要嘌呤受体。之后,李永刚等^[4]研究发现 P2X₁ 受体在膀胱出口部分梗阻大鼠膀胱组织中表达升高,推测其可能参与慢性膀胱出口梗阻后膀胱的生理或病理功能的调节。杨昕等^[14]认为 P2X₁ 受体可能在介导嘌呤能神经对逼尿肌功能的调节中发挥重要作用。越来越多的研究证明 P2X 受体在胃肠道平滑肌的收缩和舒张中也发挥着重要作用^[5]。本研究发现胃黏膜应激损伤模型组与正常组相比,大鼠胃组织 P2X₁ mRNA 表达显著下降($P < 0.01$),提示 P2X₁ 亚型在胃功能的生理和病理调节中具有重要作用。胃和膀胱的共同特点之一是平滑肌都是其运动单元的一个重要组成部分,结合前人研究结果,笔者推测 P2X₁ 可能在平滑肌功能调节中具有重要的作用。

随着人们对 ATP 及其受体 P2X 功能特点认识的不断深入,有学者推测它们在针刺信号转换机制中可能具有重要的作用^[15]。针刺作为一种机械性刺激为主的复杂刺激源,只有转化为生物信号才能被机体所识别。ATP 所具备的信号分子特征,以及 P2X 受体的组织分布特点,强烈暗示 ATP-P2X 在针刺信号转换中具有重要作用^[15]。因此,本研究团队以临床上疗效较为明确的“针刺足三里调节胃功能”为研究主题,以 P2X₁、P2X₃、P2X₅ 作为观察指标,在针刺信号转换机制研究方面作一尝试。本研究发现电针组大鼠胃组织 P2X₁ mRNA 显著高于模型组($P < 0.05$),提示电针足三里穴对胃黏膜应激损伤的调节机制之一可能与 P2X₁ mRNA 表达上调相关。P2X 受体是 ATP 门控的离子通道,其功能的发挥需要 ATP 的激活。有研究发现高浓度的 ATP 能在短时期内刺激 P2X₁ 受体高表达^[16]。电针足三里刺激穴位可能通过经穴与脏腑的特异联系以及神经-内分泌等途径使支配胃平滑肌的副交感神经末梢释放 ATP 增加以及胃组织表达 P2X₁ 等升高,在这些因素的协同作用下通过改善胃黏膜血流供应、胃组织能量供应等途径促进胃溃疡的愈合。此外,P2X₁ 受体是血小板三种 P2 受体中的一种,其被 ATP 激活后可介导血小板聚集,有利于正常止血^[17],在溃疡病灶的发生发展中,这有利于防止溃疡灶的进一步出血。当然,这只是根据研究结果所做的推测,具体机制还需进一步的实验研究。今后也有必要对针刺局部组织和胃组织中的 ATP 和其他 P2X 受体亚型进行检测,以更明确各个 P2X 受体亚型在针刺效应中的作用。

参 考 文 献

- [1] 黎喜平,严洁. 针灸对胃粘膜损伤保护作用机制的研究进展

- [J]. 针刺研究, 2005, 30(1): 60-63.
- [2] 刘涌. 电针足三里对应激性胃粘膜损伤的保护作用[J]. 安徽中医学院学报, 2000, 19(2): 27-30.
- [3] 朱舜丽, 许冠荪, 陈金珠, 等. 电针足三里穴对应激性胃溃疡大鼠一氧化氮和儿茶酚胺的影响[J]. 中国中西医结合脾胃杂志, 1996, 4(1): 39.
- [4] 李永刚, 钟甘平, 岳中谨, 等. 部分膀胱出口梗阻后 P2X1 嘌呤受体在膀胱的表达[J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(10): 878-880.
- [5] 高显奎, 余跃. P2 嘌呤受体与胃肠运动的研究进展[J]. 临床消化病杂志, 2009, 21(5): 315-317.
- [6] 黄碧兰, 余良主, 刘寿仙. 大鼠孤束核微量注射 γ -氨基丁酸对电针抗应激性胃黏膜损伤的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2011(6): 381-384.
- [7] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 255.
- [8] Valera S, Hussy N, Evans R J, et al. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP[J]. Nature, 1994(6497): 516-519.
- [9] Fountain S J, Parkinson K, Young M T, et al. An intracellular P2X receptor required for osmoregulation in Dictyostelium discoideum[J]. Nature, 2007, 448(7150): 200-203.
- [10] Burnstock G, King B F. Numbering of cloned P2 purinoceptors[J]. Drug development research, 1996, 38(1): 67-71.
- [11] Nicke A, Bäumer H G, Rettinger J, et al. P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels[J]. The EMBO Journal, 1998, 17(11): 3016-3028.
- [12] Stoop R, Thomas S, Rassendren F, et al. Contribution of individual subunits to the multimeric P2X2 receptor: estimates based on methanethiosulfonate block at T336C[J]. Molecular pharmacology, 1999, 56(5): 973-981.
- [13] BA O, AH K, TK C, et al. A quantitative analysis of purinoceptor expression in human fetal and adult bladders[J]. The JOURNAL OF UROLOGY, 2001, 165(5): 1730-1734.
- [14] 杨昕, 宋波, 方强, 等. P2x 受体亚型在大鼠逼尿肌不稳定中的作用研究[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(8): 710-713.
- [15] 聂坤. P2X 受体, ATP 和针刺的信号转换[J]. 上海针灸杂志, 2009, 28(5): 298-300.
- [16] 陈鸣. 大鼠脑创伤后嘌呤受体 P2X1 亚型表达的研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2005.
- [17] 李家增, 侯明, 包承鑫. 血小板疾病[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2009: 237-238.

(收稿日期: 2014-08-22)

(本文编辑: 蒲晓田)

降压通络方对高血压肾损害大鼠肾脏血管紧张素 II 及肾功能的影响

韩琳 秦建国 高誉珊 王媛媛 张晓宇 郭一 宋林梅 罗燕妮 迟笑怡

【摘要】 目的 观察降压通络方对自发性高血压肾损害大鼠肾脏血管紧张素 II (angiotensin II, AngII) 及肾功能的影响, 探讨该方对高血压肾损害大鼠肾脏的保护机制。**方法** 采用 16 周龄自发性高血压大鼠 (Spontaneously Hypertension Rat, SHR) 为研究对象, 将其随机分为模型组、缬沙坦组、降压通络方高、中、低剂量组、并设正常血压大鼠 (Wistar Kyoto, WKY) 为空白对照, 分别灌胃给药。于给药后 4 周和 8 周分别测定大鼠尾动脉压力、心肌酐、尿素氮及肾脏 AngII 蛋白含量, 并进行大鼠肾脏病理组织学检查。**结果** 给药 4、8 周后, 与模型组比较, 各治疗组大鼠血压、肾脏 AngII 含量明显降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 但给药 4 周各组之间比较无统计学意义, 给药 8 周缬沙坦及降压通络方高、中剂量组均明显低于低剂量组 ($P < 0.05$); 缬沙坦及降压通络方能显著降低模型组大鼠心肌酐、尿素氮 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 改善肾小动脉及肾小球硬化, 促进肾组织结构的恢复。**结论** 降压通络方能降低高血压肾损伤大鼠肾脏 AngII 含量, 从而有效降低大鼠血压, 改善肾脏病理损害, 保护肾功能。

基金项目: 国家自然科学基金(811734071), 北京中医药大学自主选题项目(2332012JYBZZ-JS004); 北京市薪火传承郭士魁研究室项目(2011-SZ-A-27); 北京中医药管理局双百工程金章安教授传承项目

作者单位: 100029 北京中医药大学基础医学院解剖教研室[韩琳、高誉珊、王媛媛、宋林梅(硕士研究生)]; 北京中医药大学东方医院肾内科[秦建国、张晓宇(硕士研究生)、郭一(硕士研究生)、罗燕妮(硕士研究生)、迟笑怡(硕士研究生)]

作者简介: 韩琳(1970-), 女, 博士, 副教授。研究方向: 肾脏疾病的临床与基础研究。E-mail: hanlinxf89@sohu.com

通讯作者: 秦建国(1971-), 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师。研究方向: 肾脏疾病的临床与基础研究。E-mail: qintdtg@163.com