

· 基础研究 ·

## 耳电针对链脲佐菌素致糖尿病大鼠胃窦Cajal间质细胞的修复效应

陈欢,周静珠,朱伟坚,樊锦青,卢静,张朝晖\*

南京医科大学第一附属医院针灸科,江苏 南京 210029

**[摘要]** 目的:观察低频电针耳穴“胃”对链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)致糖尿病大鼠胃窦病理形态、Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)、血清胃促生长素(Ghrelin)和血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)浓度的影响。方法:24只雄性SD大鼠随机分为模型组、假耳针组、耳针组,每组各8只,腹腔注射STZ(55 mg/kg)诱导糖尿病大鼠模型,造模后第8周假耳针组取耳垂,耳针组取耳穴“胃”进行电针治疗(2 Hz, 20 min/次,每天1次,1周5 d,连续2周),模型组无治疗。比较治疗前、后各组大鼠空腹血清Ghrelin、VIP浓度的改变,治疗结束后取胃窦组织行HE染色、c-Kit免疫组化染色,以及Western blot检测胃窦组织c-Kit蛋白表达水平。结果:治疗后,耳针组血清Ghrelin浓度较治疗前显著上升( $P < 0.05$ ),且高于模型组( $P < 0.05$ );免疫组化及Western blot结果均显示耳针组胃窦c-Kit蛋白的表达均显著高于模型组与假耳针组( $P$ 均 $< 0.01$ )。结论:电针耳穴“胃”能够促进糖尿病大鼠胃窦ICC的修复,可能与上调血清Ghrelin有关。

**[关键词]** 耳穴;电针;糖尿病胃轻瘫;胃Cajal间质细胞;胃促生长素

**[中图分类号]** R245

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2020)03-380-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20200314

## Repairment effect of auricular electro - acupuncture on interstitial cells of Cajal in streptozotocin-induced diabetic rats

CHEN Huan, ZHOU Jingzhu, ZHU Weijian, FAN Jinqing, LU Jing, ZHANG Zhaohui\*

*Department of Acupuncture, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China*

**[Abstract]** **Objective:** This study aims to observe the effects of low - frequency electro - acupuncture (EA) auricular acupoint “stomach” on gastric antrum pathological morphology, interstitial cells of Cajal (ICC), and serum levels of ghrelin and vasoactive intestinal peptide (VIP) in streptozotocin (STZ) - induced diabetic rats. **Methods:** Twenty-four male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into model group, sham auricular acupuncture group and auricular acupuncture group, 8 rats in each group. All of the rats were injected with STZ (55 mg/kg) to induce diabetic model, at the end of the 8th week after injection, animals received 2 weeks-treatment (20 min per time, 5 days a week, 10 times) respectively: model group (no stimulation), sham auricular acupuncture group (2 Hz EA on earlobes), auricular acupuncture group (2 Hz EA on ear point “stomach”). Serum level of Ghrelin and vasoactive intestinal peptide (VIP) were detected before and after EA treatments. At the end point of the experiment, pathological morphology in antrum was observed by hematoxylin-eosin staining. C-Kit expression of ICCs in antrum were analyzed by immunohistochemistry and Western blot. **Results:** Serum level of ghrelin in auricular acupuncture group was increased after EA treatments ( $P < 0.05$ ). Compared to model group, serum level of ghrelin in auricular acupuncture group was significantly higher at the 10th week after STZ injection ( $P < 0.05$ ). C-Kit expression of ICCs in antrum of auricular acupuncture group was higher than that in model group and sham auricular acupuncture group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Low-frequency EA on ear “stomach” point can promote the repair of ICCs in diabetic rats, which may be related to up-regulation of serum ghrelin.

**[Key word]** auricular acupuncture; electro-acupuncture; diabetic gastroparesis; gastric interstitial cells of Cajal; ghrelin

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(03): 380-384]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81503641);江苏省中医药科技项目(YB2017089);江苏省“六大人才高峰”高层次人才C类资助项目(2016-WSN-094)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: z1356@126.com

糖尿病患者胃肠动力障碍的发病率为25%~53%,表现为饱腹感、腹胀、恶心、呕吐、便秘或腹泻<sup>[1]</sup>,针灸疗法对本病疗效显著。我们前期研究发现2 Hz电针耳穴“胃”对糖尿病大鼠胃动力以及氮能信号存在良性调节作用<sup>[2]</sup>。血清胃促生长素(Ghrelin)是胃肠兴奋性迷走神经环路的主要脑肠肽之一,在胃动力的调节中发挥促兴奋作用<sup>[3]</sup>,而血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)则是一种胃肠抑制性脑肠肽,主要在抑制性迷走神经环路中发挥作用<sup>[4]</sup>。为了观察低频电针耳穴“胃”对糖尿病大鼠胃动力效应中相关脑肠肽的影响,我们设计了本研究,观察低频电针耳穴“胃”对链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导糖尿病大鼠胃窦病理形态、Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)c-Kit阳性表达以及血清Ghrelin、VIP浓度的影响,探讨低频电针耳穴“胃”调节糖尿病大鼠胃肠动力的可能作用与机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

LH202H型韩氏穴位神经治疗仪(南京济生医疗科技有限公司);BX43型显微镜(OLYMPUS公司,日本);快速血糖仪和血糖试纸(雅培公司,美国);STZ(Sigma公司,美国);Ghrelin、VIP检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);Mini-Protein Tetra System电泳系统(Bio-RAD公司,美国);ChemiDoc XRS+ System凝胶成像仪(Bio-RAD公司,美国);兔抗大鼠c-Kit抗体(Santa公司,美国),兔抗大鼠GAPDH、二抗羊抗兔IgG(Bioworld公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物与分组

24只清洁级健康成年雄性9周龄Sprague-Dawley(SD)大鼠购自南京医科大学医药实验动物中心,随机分为模型组、假耳针组、耳针组,每组各8只。自由摄食与饮水,适应性喂养1周后进入实验。动物的使用符合南京医科大学实验动物伦理委员会要求。

#### 1.2.2 造模方法

采用一次性腹腔注射STZ(55 mg/kg)的方法建立糖尿病大鼠模型<sup>[5-6]</sup>。选择STZ注射72 h后随机血糖高于16.6 mol/L的大鼠为符合条件的糖尿病大鼠。根据前人研究,STZ诱导的糖尿病大鼠在STZ注射6~8周后会发​​生糖尿病胃轻瘫<sup>[5]</sup>。

#### 1.2.3 电针方法

参考本课题组前期研究<sup>[2]</sup>,假耳针组取双侧耳

垂、耳针组取耳穴“胃”点(CO40,位于耳甲腔内,耳轮脚的消失处)进行针刺,模型组不进行针刺。0.20 mm×25.00 mm规格的一次性无菌针灸针分别刺入相应穴位后,连接电针(2 Hz,0.7~1.0 mA),每次电针治疗30 min,每天1次,1周5 d,连续2周。

#### 1.2.4 血清Ghrelin、VIP浓度的检测

第1次电针治疗前以及最后1次电针治疗后,动物禁食不禁水12 h,麻醉下眼眶取血,按试剂盒说明进行血清Ghrelin、VIP浓度的检测。

#### 1.2.5 胃窦组织HE染色

各组大鼠处死后,取胃窦组织,4%多聚甲醛固定24 h后,制成石蜡组织,连续切片制成4 μm左右的切片,苏木素-伊红染色后,显微镜下进行图像采集,观察组织的病理形态改变。

#### 1.2.6 胃窦组织c-Kit的免疫组化染色

石蜡组织制成4 μm左右的切片,经脱蜡、脱水,封闭内源性过氧化氢酶,热修复抗原,血清封闭,加兔抗大鼠c-Kit抗体(1:100)、羊抗兔IgG(1:1 000),DAB显色,显微镜下观察,出现棕黄色后终止反应。苏木素复染,脱水透明,中性树胶封片。染色结果判定标准:棕色或褐色着色为阳性细胞。采用IPP(Image-professional plus 6.0)软件计算200倍镜下c-Kit表达区域的平均光密度值。

#### 1.2.7 Western blot检测胃窦组织c-Kit的表达

各组大鼠处死后,取胃窦进行组织总蛋白提取,BCA法测定蛋白浓度,制胶后每孔40 μL上样,电泳后转膜,封闭,加入一抗(目的蛋白:c-Kit、内参蛋白:GADPH)孵育,二抗孵育。洗膜、ECL化学发光显影,Image J软件分析各条带光密度。c-Kit相对表达量=c-Kit光密度值/GADPH光密度值×10<sup>4</sup>。

### 1.3 统计学方法

应用SPSS 19.0软件进行统计学处理。计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间差异采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较用LSD-*t*检验。组内治疗前后比较采用配对*t*检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠血清Ghrelin、VIP浓度的比较

如图1A所示:电针治疗前,各组大鼠血清Ghrelin浓度差异无统计学意义( $P > 0.05$ );电针治疗后,耳针组Ghrelin浓度较治疗前显著升高( $P < 0.01$ ),并且高于模型组( $P < 0.05$ );电针治疗后,假耳针组与模型组之间Ghrelin浓度差异无统计学意义,其自

身治疗前后比较 Ghrelin 浓度差异也无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。如图 1B 所示:电针治疗前后,各组大鼠血清 VIP 浓度差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ );模型组与假耳针组,自身治疗前后比较,差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ );耳针组治疗后 VIP 浓度较治疗前有轻度上升的趋势,但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

## 2.2 各组大鼠胃窦组织病理形态改变

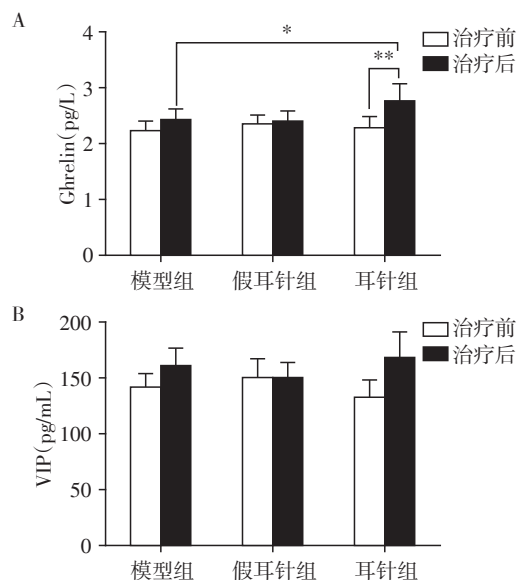
各组大鼠胃窦组织病理形态改变如图 2 所示:模型组大鼠胃窦组织黏膜细胞水肿,黏膜下层充血,局部细胞坏死,细胞间隙大,染色浅、空泡样变等;假耳针组与模型组比较,病理形态无显著改变;耳针组胃黏膜及黏膜下层血管充血减轻,黏膜细胞排列较整齐,细胞间隙稍大,染色较深,少量空泡样变。

## 2.3 免疫组化检测各组大鼠胃窦组织 c-Kit 的表达

如图 3、4 所示:模型组胃窦肌层间细胞不规则堆积,c-Kit 阳性表达颜色较浅,分布散乱;假耳针组可见少量 c-Kit 阳性细胞,其表达量与模型组无显著差异 ( $P > 0.05$ );耳针组胃窦部 c-Kit 呈强阳性表达,且分布较均匀,表达量显著高于模型组 ( $P < 0.05$ )与假耳针组 ( $P < 0.05$ )。

## 2.4 Western blot 检测各组大鼠胃窦组织的 c-Kit 蛋白表达

如图 5 所示,耳针组 c-Kit 的蛋白相对表达量均明显高于模型组 ( $P < 0.01$ )与假耳针组 ( $P < 0.01$ )。



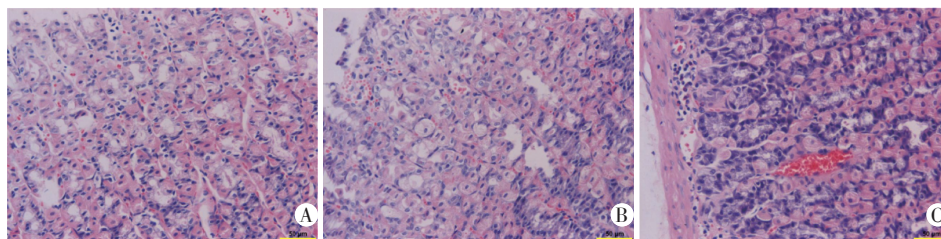
A: 各组血清 Ghrelin 浓度比较 ( $n=6$ ); B: 各组血清 VIP 浓度比较 ( $n=6$ ); 两组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

图 1 各组大鼠血清 Ghrelin、VIP 浓度的比较

Figure 1 Serum levels of Ghrelin and VIP in rats of each group

## 3 讨论

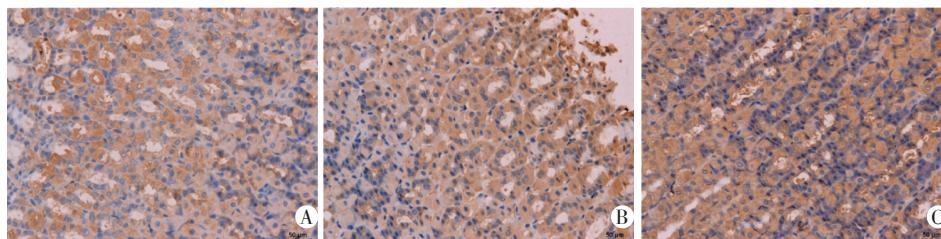
“耳者,宗脉之所聚也”(《灵枢·口问》),十二经脉皆上循或入络于耳。因此,耳与多脏腑、多经络存在密切联系,刺激耳穴可调和五脏六腑、平衡气血阴阳。耳针疗法在临床上也被广泛地运用于心、脑、肺、胃肠等相关疾病的诊疗中。本课题组前期



A: 模型组; B: 假耳针组; C: 耳针组; 标尺=50  $\mu\text{m}$ 。

图 2 各组大鼠胃窦组织病理形态改变(HE 染色,  $\times 200$ )

Figure 2 Pathomorphological changes in gastric antrum of rats in each group (HE Staining,  $\times 200$ )



A: 模型组; B: 假耳针组; C: 耳针组; 标尺=50  $\mu\text{m}$ 。

图 3 各组大鼠胃窦组织 c-Kit 的表达改变(免疫组化,  $\times 200$ )

Figure 3 Expression of c-Kit protein in gastric antrum of rats in each group (IHC,  $\times 200$ )



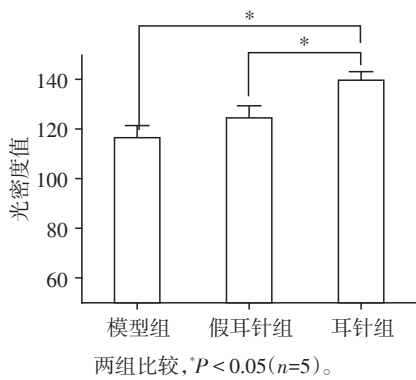


图4 各组大鼠胃窦组织c-Kit表达的光密度值

Figure 4 The optical density value of c-Kit expression in gastric antrum of rats in each group

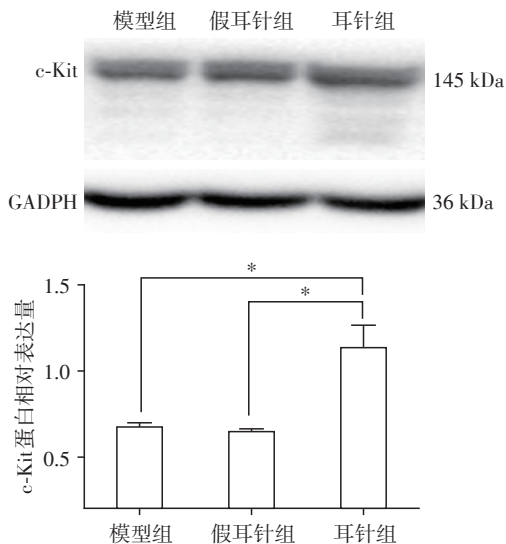


图5 各组大鼠胃窦组织c-Kit蛋白相对表达量

Figure 5 The relative expression of c-Kit protein in gastric antrum of rats in each group

研究发现耳穴疗法对多种类型的胃动力障碍疾病均存在良性调节作用<sup>[2,7-9]</sup>。本研究发现2 Hz电针耳穴“胃”能促进糖尿病大鼠胃窦ICC的修复,同时对血清中与胃动力呈正相关的Ghrelin存在良性调节作用。

ICC是胃电活动的起搏细胞,c-Kit蛋白表达是观察胃肠道ICC的金标准<sup>[10]</sup>。研究发现,持续性高血糖可导致ICC数量减少和/或结构性损伤,最终导致胃肠动力障碍<sup>[10]</sup>。较多研究结果表明,单剂量STZ腹腔注射第8周开始,大鼠出现胃窦ICC网络的损伤,稳定地复制出糖尿病胃轻瘫的大鼠模型<sup>[5]</sup>。我们观察到,STZ注射后大鼠血糖均维持在较高水平,在注射后第10周,模型组大鼠胃窦病理切片表

现为黏膜水肿,细胞坏死,空泡样变,并且免疫组化结果显示c-Kit的蛋白表达稀疏散乱,表明ICC数量减少,与前人研究成果一致<sup>[11]</sup>。自第8周开始,耳针组进行了连续2周的低频电针耳穴“胃”治疗,治疗后胃窦病理形态较模型组明显改善,免疫组化以及Western blot检测耳针组c-Kit蛋白表达均显著高于模型组。这提示低频电针耳穴“胃”可以促进糖尿病大鼠胃窦ICC的修复。

Ghrelin是由胃G细胞以及下丘脑Ghrelin载体神经元分泌而释放的,是一种能加速胃排空的兴奋性脑肽<sup>[12]</sup>。其在中枢可以通过抑制“孤束核-儿茶酚胺-迷走神经背核-胆碱能-抑制胃排空”的途径来促进胃排空,在外周可以兴奋肠神经丛的胆碱能兴奋性神经元,引起强烈的促胃排空效应<sup>[13]</sup>,是下丘脑、垂体和胃之间内分泌调节的联系纽带。本研究结果显示,低频电针耳穴“胃”能够显著提高糖尿病大鼠血清中Ghrelin的浓度,提示耳电针促进了Ghrelin的分泌与释放。虽然目前Ghrelin对ICC的作用机制尚不明确,但有研究发现,Ghrelin可促进体外培养的ICC产生去极化,诱导胃肠道慢波的释放,并且释放程度与Ghrelin的剂量存在正相关,揭示了Ghrelin对胃动力调节的可能机制<sup>[14]</sup>。因此,耳电针上调Ghrelin,可能有助于修复糖尿病大鼠胃窦ICC从而改善胃动力障碍。

与Ghrelin作用相反,VIP是由肠神经丛神经元释放的参与胃肠道平滑肌舒张的抑制性脑-肠肽之一<sup>[4]</sup>,在STZ诱导的糖尿病胃轻瘫小鼠模型中,血VIP浓度出现显著下降<sup>[15]</sup>。本研究结果显示各组大鼠血清VIP的含量均无显著性差异,提示耳电针并不能对糖尿病大鼠血清VIP浓度产生显著的调节作用。前人研究发现电针体穴能通过下调血VIP的浓度而促进正常小鼠与胰腺炎大鼠的胃肠动力<sup>[16-17]</sup>。因此,我们推测耳穴与体穴调节作用机体的靶点可能存在差异。此外,不同疾病模型导致的胃动力障碍对针刺的效应也可能存在显著差异。

综上,本研究认为低频耳电针“胃”可显著促进糖尿病大鼠胃窦ICC的修复,可能与上调血清Ghrelin有关,然而两者之间的关系及其在调节糖尿病胃动力障碍中的作用机制还有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] CAMILLERI M, CHEDID V, FORD A C, et al. Gastroparesis[J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4(1): 41
- [2] CHEN H, ZHU W, LU J, et al. The effects of auricular electro-acupuncture on ameliorating the dysfunction of



- interstitial cells of cajal networks and nNOS mRNA expression in antrum of STZ-induced diabetic rats[J]. *PLoS One*, 2016, 11(12):e0166638
- [3] 余远红,殷璐,丁叶,等. 大鼠孕期和哺乳期高蛋白饮食对子代代谢相关激素的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(7):809-813
- [4] GOYAL R K, GUO Y, MASHIMO H. Advances in the physiology of gastric emptying[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2019, 31(4):e13546
- [5] CELLEK S, FOXWELL N, MONCADA S. Two phases of nitrenergic neuropathy in streptozotocin - induced diabetic rats[J]. *Diabetes*, 2003, 52(9):2353-2362
- [6] 马静,芮海波,陈全战,等. 灵芝多糖对链脲佐菌素诱导的糖尿病肾病小鼠抗炎活性及疗效研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(3):326-331
- [7] ZHANG Z, YIN J, CHEN J D. Ameliorating effects of auricular electroacupuncture on rectal distention - induced gastric dysrhythmias in rats[J]. *PLoS One*, 2015, 10(2):e0114226
- [8] 朱伟坚,徐妍,周静珠,等. 电针耳迷走神经点防治恶性肿瘤患者化疗后恶心、呕吐的临床观察[J]. *中国中医急症*, 2015, 24(2):291-293
- [9] 朱伟坚,刘晓铭,仲远明,等. 食管癌耳穴特异性的临床观察[J]. *针灸临床杂志*, 2012, 28(2):4-7
- [10] BRELAND A, HA S, JORGENSEN B G, et al. Smooth muscle transcriptome browser: offering genome-wide references and expression profiles of transcripts expressed in intestinal SMC, ICC, and PDGFR $\alpha$  + cells[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):387
- [11] POWLEY T L, PHILLIPS R J. Vagal intramuscular array afferents form complexes with interstitial cells of Cajal in gastrointestinal smooth muscle: analogues of muscle spindle organs?[J]. *Neuroscience*, 2011, 186:188-200
- [12] 毛兰芳,汪龙德,张宏伟,等. 功能性消化不良与脑肠肽的研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2015, 23(4):570-576
- [13] MULLER T D, NOGUEIRAS R. Ghrelin[J]. *Mol Metab*, 2015, 4(6):437-460
- [14] KIM J N, KIM B J. The mechanism of action of ghrelin and motilin in the pacemaker potentials of interstitial cells of cajal from the murine small intestine [J]. *Mol Cells*, 2019, 42(6):470-479
- [15] 林旭红,魏丹丹,王慧超,等. 孤儿G蛋白偶联受体55在糖尿病性胃轻瘫小鼠发病中的作用[J]. *生理学报*, 2014, 66(3):332-340
- [16] JANG J H, LEE D J, BAE C H, et al. Changes in small intestinal motility and related hormones by acupuncture stimulation at zusanli (ST 36) in mice [J]. *Chin J Integr Med*, 2017, 23(3):215-220
- [17] GUO H, ZHU S F, ZHANG R R, et al. Electroacupuncture ameliorates acute lung injury through promoting gastrointestinal motility in rats with acute pancreatitis[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014:943596

[收稿日期] 2019-09-03

(上接第379页)

- in disease[J]. *Endocr Connect*, 2017, 6(4):R18-R38
- [18] CHENG Y, GAWLEY N X, LOH Y P, et al. Carboxypeptidase E(NF- $\alpha$ 1): a new trophic factor in neuroprotection [J]. *Neurosci Bull*, 2014, 30(4):692-696
- [19] FAN S, LI X, LI L, et al. Silencing of carboxypeptidase E inhibits cell proliferation, tumorigenicity, and metastasis of osteosarcoma cells[J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9(6):2795-2803
- [20] SUN J, MENG D, LI L, et al. N-terminal truncated carboxypeptidase E expression is associated with poor prognosis of lung adenocarcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(6):4659-4664
- [21] KIM H J, HONG J, YOON H J, et al. Carboxypeptidase E is a novel modulator of RANKL-induced osteoclast differentiation[J]. *Mol Cells*, 2014, 37(9):685-690
- [22] CAWLEY N X, YANIK T, WORONOWICZ A, et al. Obese carboxypeptidase E knockout mice exhibit multiple defects in peptide hormone processing contributing to low bone mineral density [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 299(2):E189-E197
- [23] BURCH T C, MORRIS M A, CAMPBELL-THOMPSON M, et al. Proteomic analysis of disease stratified human pancreas tissue indicates unique signature of type 1 diabetes[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8):e0135663
- [24] CHEN Y C, TAYLOR A J, VERCHERE C B. Islet prohormone processing in health and disease[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2018, 20(Suppl 2):64-76
- [25] 徐一力,沈冲,钱军,等. 经肾活检病理确诊的糖尿病肾病患者贫血相关因素分析[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(10):1376-1383

[收稿日期] 2019-09-21