

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2020.16.015

实验研究

电针对功能性消化不良大鼠十二指肠紧密连接蛋白及浆细胞的影响

王丹^{1,2}, 张红星^{*}, 荣培晶^{*}, 侯理伟², 李少源², 王瑜², 王俊英²,
张金铃², 国笑², 赵斌², 张悦², 张紫璇², 王艺霏², 何家恺²

1. 湖北中医药大学, 湖北省武汉市武昌区昙华林特 1 号, 430061; 2. 中国中医科学院针灸研究所

摘要 目的 探讨电针干预功能性消化不良 (FD) 的可能作用机制。方法 将 30 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、电针组, 每组 10 只。除空白组外, 其余两组大鼠采用多因素干预法制备功能性消化不良模型。造模成功后电针组予以电针“足三里”“太冲”穴 14 天, 其他组不采取干预措施。干预结束后采用免疫组化法检测各组大鼠十二指肠闭锁蛋白、紧密连接蛋白 (ZO-1) 表达情况。电镜观察十二指肠紧密连接情况和浆细胞变化。结果 与空白组比较, 模型组大鼠十二指肠闭锁蛋白、ZO-1 阳性表达产物显著降低 ($P < 0.01$)。电镜下十二指肠紧密连接缝隙模糊、增宽, 浆细胞粗面内质网增多、扩张, 胶原纤维沉积。与模型组比较, 电针组大鼠十二指肠闭锁蛋白、ZO-1 阳性反应产物显著增高 ($P < 0.05$), 十二指肠上皮细胞间紧密连接较清晰, 浆细胞粗面内质网减少, 无扩张, 无胶原纤维沉积。结论 电针可能通过上调十二指肠闭锁蛋白、ZO-1 表达, 减轻肠低度炎症, 调节浆细胞活跃状态, 从而修复肠黏膜屏障而发挥治疗 FD 的作用。

关键词 功能性消化不良; 电针; 闭锁蛋白; 紧密连接蛋白; 浆细胞; 胶原纤维

功能性消化不良 (functional dyspepsia, FD) 是由一种非器质性胃肠病, 其症状多来源于胃和十二指肠, 主要包括餐后不适、早饱、上腹痛、上腹灼烧等^[1-2]。虽然 FD 并不会危及生命, 但其发病率高达 12% ~ 15%^[3], 不仅降低患者生活质量, 还严重增加了社会医疗负担^[4]。FD 发病机制与脑肠互动异常、胃肠动力障碍、内脏高敏感、肠道菌群失调、胃肠低度炎症等因素有关^[5-6]。当肠道通透性增加时, 肠腔内毒素、外源微生物、抗原等通过肠上皮细胞及细胞间隙, 引发肠黏膜免疫反应或损伤肠黏膜屏障^[7]。FD 患者肠黏膜电阻抗值显著低于正常人, 提示十二指肠黏膜屏障受损^[8]。目前, FD 的治疗方案有促进胃肠运动、改善内脏敏感性、抗幽门螺杆菌感染、调节肠道菌群或抗焦虑等^[9], 但药物存在副作用、疗效不确切且易复发。研究^[10]显示, 电针疗法治疗 FD 具有复发率低, 无

药物毒副作用。因此本研究采用电针干预 FD 大鼠, 并从十二指肠机械屏障、免疫屏障角度探究肠道屏障在 FD 发病机制中的作用及电针治疗 FD 的靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 30 只, 体重 (200 ± 20) g, 购自三峡大学实验动物中心, 实验动物许可证号: SCXK (鄂) 2017-0012。饲养于 SPF 级动物房, 室温 22 ~ 25 °C, 相对湿度 50% ~ 70%。每笼 5 只。适应性喂养 1 周后开始试验。喂养期间自由饮水、摄食。

1.2 主要试剂与仪器

紧密连接蛋白 (ZO-1) 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, 批号: 21773-1-AP); 闭锁蛋白抗体 (英国 Abcam 公司, 批号: Ab216327); 免疫组化显色试剂盒 (丹麦 DAKO 公司, 批号: K5007); 戊二醛 (德国 Alfa Aesar 贸易公司, 批号: A17876); 水合氯醛 (批号: 40935760)、3% 的

基金项目: 国家自然科学基金 (81473790); 广东省珠江学者计划 (A1-AFD018113905)

* 通讯作者: zhxzj99@aliyun.com; drrongpj@163.com

H₂O₂ (批号: 10011218)、无水乙醇 (批号: 20190820)、氯化钾 (批号: 10016318)、氯化钠 (批号: 10019318)、磷酸二氢钾 (批号: 10017618)、磷酸氢二钠 (批号: 10020318)、二甲苯 (批号: 20190812)、丙酮 (批号: 20181210)、硝酸铅 (批号: F20060512), 均为上海国药集团公司生产; 山羊血清 (博士德生物有限公司, 批号: AR1009); 苏木素 (美国 Sigma 公司, 批号: H9627); 钼酸 (美国 TED PELLA 公司, 批号: 18456); 醋酸铀 (CHEMAPOL 公司, 批号: 4961)。

0.35 mm × 25 mm 华佗牌无菌针灸针 (苏州医疗用品厂有限公司, 批号: 苏械注准 20162270970); HANS-200A 型韩式穴位神经刺激仪 (南京济生医疗科技有限公司); RM 2016 型轮转式病理切片机 (德国 Leica 公司); BX53 型生物显微镜 (奥林巴斯公司); SKG1601 型电陶炉 (广东艾诗凯奇智能科技有限公司); HT7700-SS/FEI Tecnai G20 TWIN 电镜 (日本日立公司)。

1.3 动物分组及造模方法

将 30 只 SD 大鼠按顺序编号后采用随机数表法分为空白组、模型组及电针组, 每组 10 只。模型组及电针组大鼠参考多因素干预法^[14]制备 FD 模型, 即冰生理盐水灌胃后进行夹尾刺激, 逢单日禁食, 饮水正常。造模 20 天, 每日 21 时称大鼠体重并登记。经模型评价, 两组 20 只大鼠造模均成功^[10-11], 在造模期间空白组大鼠不予任何处置。

1.4 干预方法

造模结束后第 2 天开始电针组大鼠进行电针干预: 大鼠穿上自制鼠衣后悬挂于自制悬挂架上, 参照《实验针灸学》^[12], 选取“足三里”“太冲”穴, 酒精局部消毒后, 采用 0.35 mm × 25 mm 毫针分别直刺深度约 12.5、5 mm; 将双侧“足三里”接韩氏穴位神经刺激仪, 连续波, 频率 2 Hz, 强度 1 mA; 双侧“太冲”仅留针。每次干预时间 30 min, 每日干预 1 次 (早 9:00—11:00), 干预 14 天。空白组和模型组大鼠在干预期间给予电针组大鼠同样的穿鼠衣及悬吊, 不予其他任何处置, 在安静环境隔离。每只大鼠每日均给予 200 g 饲料, 保证每日称大鼠体重时饲料有剩余, 自由饮水。电针组最后一次干预结束, 将各组大鼠称重并禁食 24 h 后采用 8% 水合氯醛 (0.35 ml/100 g) 麻醉大鼠后, 剖开大鼠腹部, 取十二直肠球部组织。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 各组大鼠体重变化情况 于造模前、造模 20 天、干预 14 天分别称取各组大鼠体重。

1.5.2 免疫组化法检测十二指肠组织闭锁蛋白和 ZO-1 表达 取十二指肠组织石蜡切片, 常规二甲苯、无水乙醇、梯度酒精脱蜡后用电陶炉进行抗原修复 15 min, 注意抗原修复液液面高于切片。当抗原修复液降至室温后 PBS 冲洗切片 3 遍。用 3% 的 H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶后用山羊血清封闭。滴加闭锁蛋白抗体或 ZO-1 抗体置于 4℃ 冰箱内孵育过夜。PBS 冲洗切片 3 次后滴加二抗, 37℃ 湿盒内孵育 20 min。DAB 显色 1 min, PBS 冲洗。DAB 显色后苏木素复染, 随后脱水、封片。最后于 BX53 型生物显微镜下观察, 注意镜下控制显色时间。细胞膜和细胞质中见棕色或棕褐色深染区定义为闭锁蛋白和 ZO-1 的阳性染色。100 倍光镜下每张切片随机选取 5 个视野, 每个视野下随机选取 3 个区域运用 Image-Pro Plus 6.0 软件 (Media Cybernetics 公司) 计算闭锁蛋白和 ZO-1 的积分光密度 (IOD) 值、有效目标分布区域 (Area) 值, 以 IOD/Area 为平均光密度值。平均光密度值升高或下降即可认定为相应蛋白表达的升高或下降。

1.5.3 透射电镜观察十二指肠超微结构 取 1 cm² 十二指肠组织块迅速置于 2.5% 的戊二醛固定液中, 并于 4℃ 固定 4 h。随后移除固定液, 用 PBS 漂洗 3 次, 每次 15 min。用 1% 的钼酸和 PBS 20℃ 固定 2 h 后再次用 PBS 漂洗 3 次, 每次 15 min。按无水乙醇梯度上行脱水, 每次 15 min。采用丙酮渗透过夜后 60℃ 聚合 48 h, 随后切成 60 nm 超薄切片。铀铅双染色 (2% 醋酸铀饱和水溶液、硝酸铅溶液各染色 15 min) 切片室温干燥过夜后用电镜观察。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组比较采用单因素方差分析。经正态性及方差齐性检验后, 若呈正态分布且方差齐, 则组间两两比较采用 LSD 法; 若不符合, 则采用 Dunnett's T3 法。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时间体重比较

表 1 示, 造模前各组大鼠体重差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与空白组比较, 造模 20 天模型组及电针组大鼠体重显著降低 ($P < 0.01$)。与模型

组比较, 干预 14 天电针组大鼠体重显著增加 ($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠不同时间体重比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	造模前	造模 20 天	干预 14 天
空白组	10	213.15 $\pm$ 5.17	273.41 $\pm$ 8.67	346.19 $\pm$ 7.08
模型组	10	209.41 $\pm$ 5.42	190.99 $\pm$ 5.41*	232.80 $\pm$ 8.16*
电针组	10	209.15 $\pm$ 4.07	191.31 $\pm$ 7.07*	271.16 $\pm$ 8.36* Δ

注: 与空白组同时时间比较, * $P < 0.01$; 与模型组同时时间比较, $\Delta P < 0.01$

2.2 各组大鼠十二指肠闭锁蛋白和 ZO-1 表达情况

图 1、2 示 (彩图见后插一), 闭锁蛋白和 ZO-1 在空白组十二指肠肠上皮组织中均呈明显的阳性表达, 为棕色或棕褐色; 与空白组比较, 模型组大鼠肠上皮组织中棕褐色分布减少, 电针组大鼠肠上皮组织中棕褐色分布明显增加。表 2 示, 与空白组比较, 模型组闭锁蛋白、ZO-1 表达显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 电针组闭锁蛋白、ZO-1 表达均显著增加 ($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠十二指肠组织闭锁蛋白、ZO-1 平均光密度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

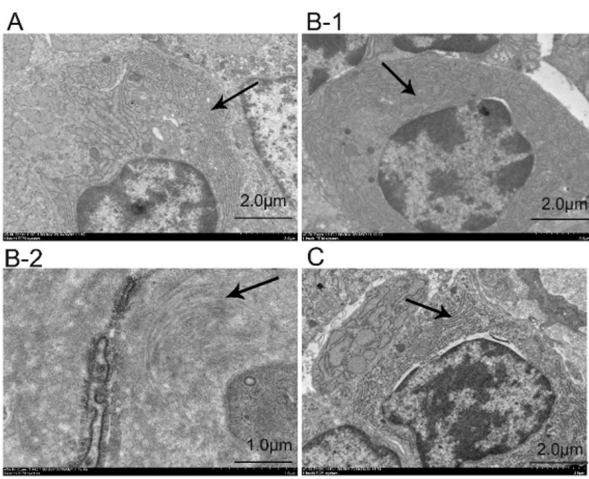
组别	鼠数	闭锁蛋白	ZO-1
空白组	10	0.109 $\pm$ 0.022	0.109 $\pm$ 0.021
模型组	10	0.033 $\pm$ 0.008*	0.029 $\pm$ 0.020*
电针组	10	0.064 $\pm$ 0.006 Δ	0.069 $\pm$ 0.035 Δ

注: ZO-1, 紧密连接蛋白; 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

2.3 各组大鼠十二指肠透射电镜下观察结果

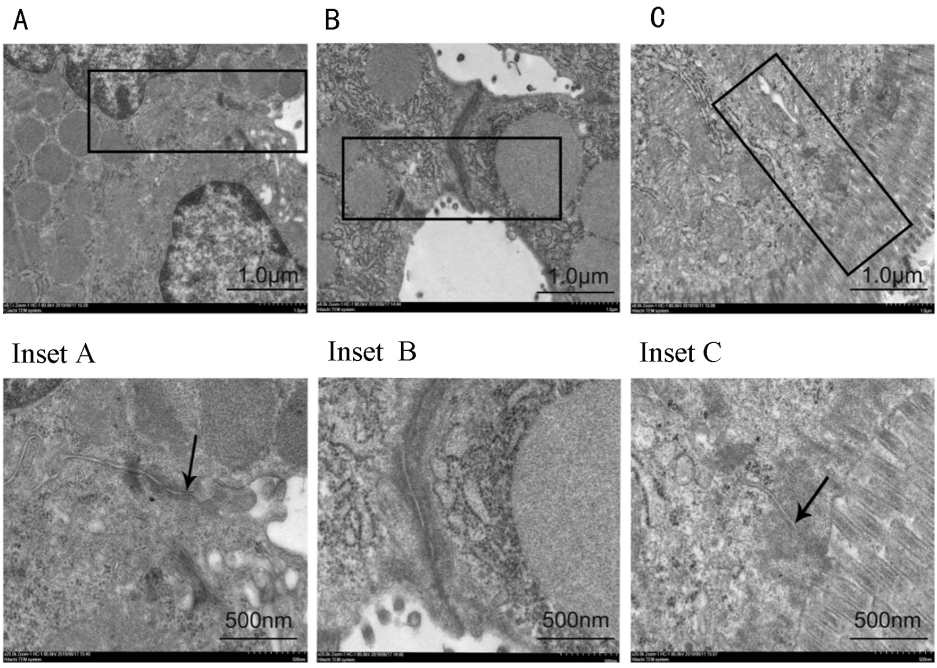
图 3 示, 空白组大鼠十二指肠上皮细胞间隙正常, 模型组大鼠十二指肠上皮细胞间隙增宽, 紧密连接模糊, 电针组大鼠十二指肠上皮细胞间隙较清晰, 无增宽。

图 4 示, 透射电镜下观察十二指肠固有层浆细胞超微结构的变化: 空白组大鼠浆细胞粗面内质网无扩张, 细胞膜完整。模型组大鼠浆细胞粗面内质网发达且轻度扩张, 细胞膜间隙增大, 固有层存在大量胶原纤维。电针组大鼠粗面内质网无扩张, 线粒体未见肿胀, 细胞膜完整。



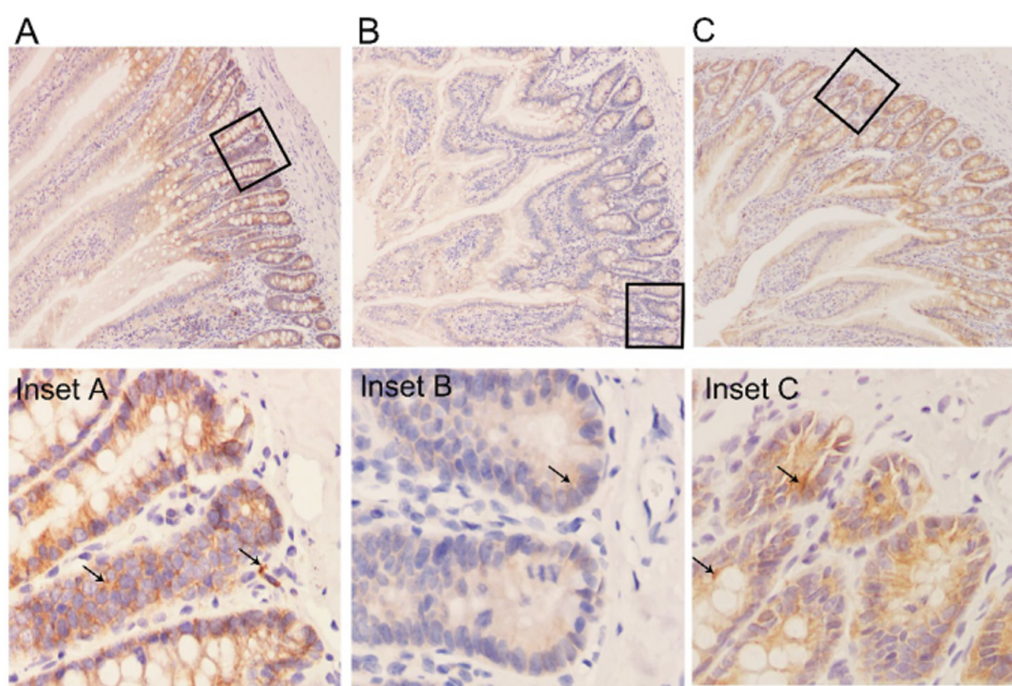
注: A, 空白组; B-1、B-2, 模型组; C, 电针组; A、B-1、C, 箭头示浆细胞; B-2 箭头示固有层胶原纤维

图 4 各组大鼠十二指肠固有层电镜观察结果 ($\times 15.0k$)



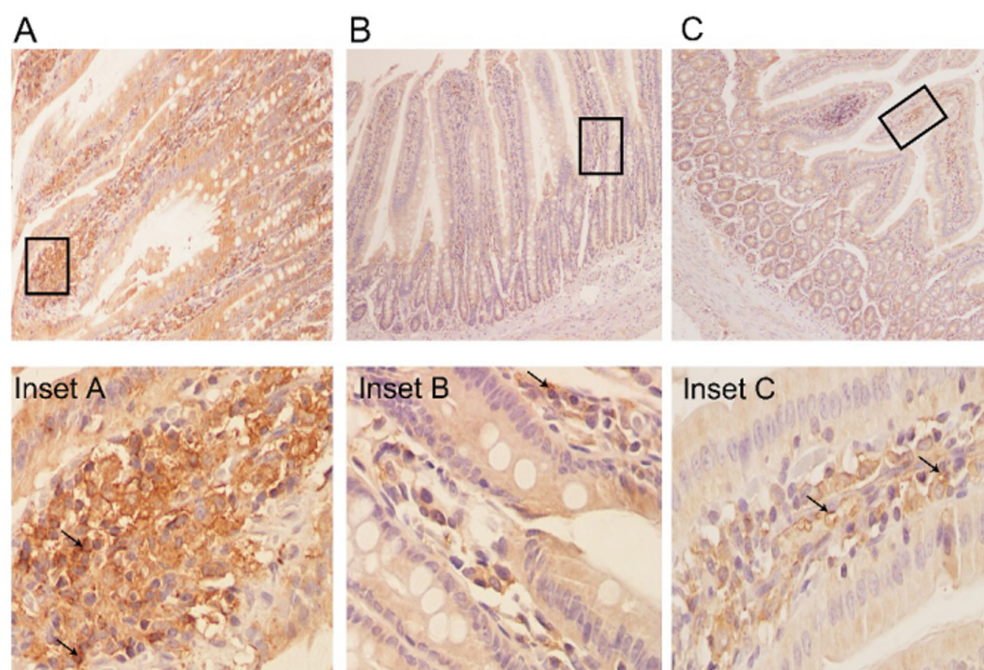
注: A, 空白组; B, 模型组; C, 电针组; Inset A、Inset B、Inset C 分别为各组放大图, 箭头示紧密连接

图 3 各组大鼠十二指肠紧密连接电镜结果观察 ($\times 20.0k$)



注: A, 空白组; B, 模型组; C, 电针组; $\times 100$; Inset A、Inset B、Inset C 分别为各组 $\square$ 内放大图, $\times 400$; 棕色或棕褐色深染区为阳性表达, 箭头示闭锁蛋白阳性表达

图 1 各组大鼠十二指肠闭锁蛋白免疫组化结果



注: A, 空白组; B, 模型组; C, 电针组; $\times 100$; Inset A、Inset B、Inset C 分别为各组 $\square$ 内放大图, $\times 400$; 棕色或棕褐色深染区为阳性表达, 箭头示紧密连接蛋白阳性表达

图 2 各组大鼠十二指肠紧密连接蛋白免疫组化结果

3 讨论

中医学认为 FD 属于“痞满”“胃脘痛”“嘈杂”等范畴,其中饮食不节和情志失调是主要病因。因此,本研究采用多因素复合干预造模法,以饮食不节、情志失调为致病因素复制 FD 模型。饮食不节则脾失健运,情志失调则肝失疏泄。肝疏泄失职,升降失常,亦会加重运化失调,损伤脾胃之气。足三里为足阳明胃经合穴,也是胃腑下合穴,可健脾益胃,滋后天生化之源。配合肝经原穴太冲,舒肝理气,调和肝脾,使脾胃气机升降得以正常,气机条达,脾胃自和,诸症自除。研究^[3]表明,电针可降低 FD 模型大鼠胃内残留率、提高小肠推进率,提示电针干预可增强胃肠动力,改善 FD 相关症状。本研究结果显示,电针干预后,FD 大鼠体重明显增加。

近年来发现,FD 患者存在十二指肠黏膜通透性增加,并认为可能与肠道低度炎症或免疫反应有关^[4-15]。肠黏膜通透性增加是肠黏膜屏障损伤的表现,机械屏障的主要结构基础是肠上皮细胞间的紧密连接。紧密连接蛋白包括跨膜蛋白、外周膜蛋白和细胞骨架蛋白等^[6],可防止肠腔有害物质损伤肠黏膜上皮细胞,对调节肠黏膜通透性起着重要作用。闭锁蛋白是跨膜蛋白,可调节紧密连接的通透性,维持细胞极性;ZO-1 是一种外周膜蛋白,与闭锁蛋白和细胞骨架蛋白共同维持紧密连接的完整性^[7]。因此,闭锁蛋白、ZO-1 的表达是反应肠黏膜屏障功能的重要指标。肠固有层浆细胞受抗原刺激后合成分泌的免疫球蛋白 E (IgE) 可参与速发型变态反应,调节肠道免疫系统,抵御外源病菌侵袭,是肠道黏膜免疫屏障的主要重要保卫者^[8]。因此,当肠道免疫激活时,浆细胞合成分泌代谢活跃。

本研究结果显示,电针组大鼠体重增加大于模型组。模型组大鼠十二指肠闭锁蛋白与 ZO-1 表达降低,且电镜下紧密连接间隙变宽、边缘模糊,提示 FD 大鼠十二指肠黏膜机械屏障受损;另外模型组大鼠浆细胞粗面内质网增加、扩张,浆细胞处于合成分泌活跃状态,表明 FD 大鼠十二指肠黏膜受损,免疫屏障激活。经电针干预后,FD 大鼠模型十二指肠闭锁蛋白与 ZO-1 表达显著增加,且电镜下紧密连接间隙恢复至与空白组相似,边界清晰;固有层浆细胞粗面内质网无扩张。以上结果提示在 FD 大鼠模型中,电针干预可上调十二指肠闭锁蛋白

与 ZO-1 表达,恢复十二指肠黏膜机械屏障及黏膜屏障稳态。各组大鼠中,只有模型组大鼠十二指肠固有层出现大量胶原纤维,提示模型组大鼠十二指肠存在炎症反应,这与肠道低度炎症参与 FD 发病研究一致^[3],而电针干预可减轻肠道低度炎症,减少胶原纤维沉积。FD 与十二指肠紧密连接损伤,紧密连接蛋白表达减少有关,这与前人研究^[9-20]结果一致。本研究发现,电针不仅可减轻紧密连接损伤,还通过调节浆细胞活跃程度而调控肠道黏膜免疫并减轻肠道炎症。关于电针干预如何调控肠黏膜屏障从而缓解 FD 症状仍需进一步探索。

参考文献

- [1] TACK J, TALLEY NJ, CAMILLERI M, et al. Functional gastroduodenal disorders [J]. *Gastroenterology*, 2006, 130 (5): 1466-1479.
- [2] SUZUKI H. The application of the rome IV criteria to functional esophagogastrroduodenal disorders in Asia [J]. *J Neurogastroenterol Motil*, 2017, 23(3): 325-333.
- [3] EL-SERAG HB, TALLEY NJ. The prevalence and clinical course of functional dyspepsia [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2004, 19(6): 643-654.
- [4] HALLING K, KULICH K, CARLSSON J, et al. An international comparison of the burden of illness in patients with dyspepsia [J]. *Dig Dis*, 2008, 26(3): 264-273.
- [5] KOMORI K, IHARA E, MINODA Y, et al. The altered mucosal barrier function in the duodenum plays a role in the pathogenesis of functional dyspepsia [J]. *Dig Dis Sci*, 2019, 64(11): 3228-3239.
- [6] SHADI SY, JENNIFER C. Functional dyspepsia in review: pathophysiology and challenges in the diagnosis and management due to coexisting gastroesophageal reflux disease and irritable bowel syndrome [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2013; 351086. doi:10.1155/2013/351086.
- [7] RAO S, WEBER HC. New treatment targets for the management of irritable bowel syndrome [J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2014, 21(1): 9-14.
- [8] TALLEY NJ, HOLTMANN G, WALKER MM. Therapeutic strategies for functional dyspepsia and irritable bowel syndrome based on pathophysiology [J]. *J Gastroenterol*, 2015, 50(6): 601-613.
- [9] 李朵朵,岳增辉,许丽超,等. 电针治疗功能性消化不良远期疗效的临床观察与评价 [J]. *针灸临床杂志*, 2014, 30(2): 1-4.
- [10] 王煜姣,凌江红,张玉琴,等. 复合病因造模法制备功能性消化不良大鼠模型 [J]. *世界华人消化杂志*, 2014, 22(2): 210-214.

- [1] VANHEEL H, VANUYTSEL T, VAN OL, et al. Post-prandial symptoms originating from the stomach in functional dyspepsia [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2013, 25(11): 911-9703.
- [2] 李忠仁. 实验针灸学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 68-70.
- [3] 潘小丽, 王计雨, 康朝霞, 等. 电针“足三里”对功能性消化不良模型大鼠胃窦 Cajal 间质细胞自噬的影响 [J]. *中医杂志*, 2019, 60(16): 1407-1411.
- [4] TALLEY NJ, WALKER MM, ARO P, et al. Non-ulcer dyspepsia and duodenal eosinophilia: an adult endoscopic population-based case-control study [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2007, 5(10): 1175-1183.
- [5] VANHEEL H, VICARIO M, VANUYTSEL T, et al. Impaired duodenal mucosal integrity and low-grade inflammation in functional dyspepsia [J]. *Gut*, 2014, 63(2): 262-271.
- [6] YANG Y, ESTRADA EY, THOMPSON JF, et al. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27(4): 697-709.
- [7] UGALDE-SILVA P, GONZALEZ-LUGO O, NAVARRO-GARCIA F. Tight junction disruption induced by type 3 secretion system effectors injected by enteropathogenic and enterohemorrhagic escherichia coli [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2016, 6(24): 87-98.
- [8] 陈小林, 任宏宇. 肠道微生物群组与肠道免疫的关系 [J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2014, 23(11): 1245-1248.
- [9] TAKI M, OSHIMA T, LI M, et al. Duodenal low-grade inflammation and expression of tight junction proteins in functional dyspepsia [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2019, 31(10): e13576. doi: 10.1111/nmo.13576.
- [10] LEE HS, KIM DK, KIM YB, et al. Effect of acute stress on immune cell counts and the expression of tight junction proteins in the duodenal mucosa of rats [J]. *Gut Liver*, 2013, 7(2): 190-196.

Effects of Electroacupuncture on Duodenal Tight Junction Protein and Plasma Cells in Functional Dyspepsia Model Rats

WANG Dan^{1,2}, ZHANG Hongxing¹, RONG Peijing², HOU Liwei², LI Shaoyuan², WANG Yu², WANG Junying², ZHANG Jinling², GUO Xiao³, ZHAO Bin², ZHANG Yue², ZHANG Zixuan², WANG Yifei², HE Jiakai²

1. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan, 430061; 2. Institute of Acupuncture and Moxibustion, China Academy of Chinese Medical Sciences

ABSTRACT Objective To explore the action mechanism of electroacupuncture (EA) on functional dyspepsia (FD). **Methods** A total of 30 SD rats were randomly divided into a blank group, a model group and an EA group, with 10 rats in each group. Except for the blank group, the other rats were given multi-factor intervention to prepare FD models. After successfully modeling, EA group was treated with EA for 14 days at “Zusanli (ST36)” and “Tai Chong (LR3)”, while the other groups did not give any intervention. The expression of Occludin and tight junction protein ZO-1 of duodenum was detected by immunohistochemistry after intervention finished. The changes of duodenal tight junction and plasma cells were observed by electron microscope. **Results** Compared with the blank group, the positive expression of Occludin and ZO-1 in the model group were significantly reduced ($P < 0.01$). Under electron microscope, the duodenal tight junctions were blurred and widened, the rough endoplasmic reticulum (RER) of plasma cells increased and expanded, as well as deposition of collagen fibers. Compared with the model group, the duodenal Occludin and ZO-1 positive expression in the EA group were significantly increased ($P < 0.05$), the tight junctions between the duodenal epithelial cells were relatively clear, the rough endoplasmic reticulum reduced in plasma cells, and there was no expansion and collagen fiber deposition. **Conclusion** EA play a role in the treatment of FD by up-regulating expression of occludin and ZO-1, reducing intestinal low-grade inflammation, regulating plasma cell activity, repairing the intestinal mucosal barrier.

Keywords functional dyspepsia; electroacupuncture; occludin; tight junction protein (ZO-1); plasma cells; collagen fibers

(收稿日期: 2019-09-15; 修回日期: 2020-05-15)

编辑: 焦爽