



申请代码	H0307
受理部门	
收件日期	
受理编号	<b>81252835</b>

国家自然科学基金

# 申 请 书

(2012 版)

资助类别：面上项目

亚类说明：

附注说明：

项目名称：长脉冲胃电刺激促进 Cajal 间质细胞修复的机制研究

申 请 人：刘诗 电话：13871162084

依托单位：华中科技大学

通讯地址：湖北省武汉市解放大道 1277 号

邮政编码：430022 单位电话：027-87543437

电子邮箱：shiliugao@yahoo.com

申报日期：2012年3月3日

国家自然科学基金委员会



## 基本信息

申请人信息	姓 名	刘诗	性 别	女	出生年月	1964 年 5 月	民 族	汉族
	学 位	博士	职 称	教授	每年工作时间 (月)		6	
	电 话	13871162084		电子邮箱	shiliugao@yahoo.com			
	传 真			国别或地区	中国			
	个 人 通 讯 地 址	湖北省武汉市解放大道 1277 号						
	工 作 单 位	华中科技大学 / 同济医学院附属协和医院						
	主 要 研 究 领 域	胃肠动力性疾病基础与临床						
依托单位信息	名 称	华中科技大学						
	联 系 人	陈小锋		电子邮箱	kjcjcb@hust.edu.cn			
	电 话	027-87543437		网站地址	www.hust.edu.cn			
合作研究单位信息	单 位 名 称							
项目基本信息	项目名称	长脉冲胃电刺激促进Cajal间质细胞修复的机制研究						
	英文名称	Mechanism of long pulse gastric electrical stimulation on promoting renovation of interstitial cells of Cajal						
	资助类别	面上项目				亚 类 说 明		
	附注说明							
	申请代码	H0307: 消化道动力异常及功能性胃肠病				C110204: 消化生理		
	基地类别							
	研究期限	2013 年 1 月 — 2016 年 12 月						
	申请经费	85.0000 万元						
中 文 关 键 词		胃电刺激;Cajal 间质细胞;ICC 前体细胞;修复						
英 文 关 键 词		Gastric electrical stimulation;Interstitial cells of Cajal;ICC precursor cells;renovation						



中文摘要	<p><b>(限 400 字):</b> 胃肠动力障碍性疾病与胃肠道 ICC 缺失或严重损伤有关。胃电刺激 (GES) 作为一种非常有潜力的治疗胃动力障碍性疾病的方法越来越受到重视,长脉冲 GES 可恢复紊乱的胃慢波电节律及改善延迟的胃排空,但具体机制不明确。我们前期研究首次从 ICC 表型转化角度发现 GES 对损伤的 ICC 有修复作用 (NSFC, 30670775)。近期研究发现,除 ICC 表型转化外,ICC 修复可通过促进 ICC 前体细胞发展,增加成熟 ICC 存活和增殖途径而达到,因此 GES 修复 ICC 的机制需进一步深入研究。本研究以糖尿病胃轻瘫大鼠为模型,探讨 GES 是否通过 ICC 前体细胞补充或促进 ICC 存活和增殖修复损伤的 ICC;进一步研究 GES 能否通过影响 SCF/Kit、Insulin/IGF-I 通路及调节 ICC 生存增殖的相关因子而促进 ICC 修复;并寻求最佳 GES 参数。深入研究 GES 促进 ICC 修复的机制,为 GES 治疗胃动力障碍疾病提供新的理论依据。</p>
英文摘要	<p><b>(限 3000 Characters):</b> Gastrointestinal motility disorders were related with lack of or serious injury of ICC in the gastrointestinal tract. Gastric electrical stimulation (GES), as a potential treatment method of gastric motility disorders, was increasingly being taken seriously. Long pulse GES could recover the dysrhythmia of the gastric slow waves and improve the delayed gastric emptying, but its specific mechanism was not clear. Our previous study for the first time found that GES could repair injured ICC through the transformation of the ICC phenotype (NSFC, 30670775). Recent studies had found that the repair of ICC could be achieved by promoting the development of the ICC precursor cell and increasing the survival and proliferation of mature ICC in addition to the transformation of the ICC phenotype. Our study, with diabetic gastroparesis rat as a model, will explore whether GES repair injured ICC through the complement of the ICC precursor cells or promoting survival and proliferation of ICC. Furthermore, we will research whether GES promote the repair of ICC by affecting the SCF/Kit, Insulin/IGF-I pathway and regulating related factors for survival and proliferation of ICC, and seek the best GES parameters. Further study on the mechanisms of GES promoting the repair of the ICC is needed, to provide a new theoretical basis for the GES treatment of gastric motility disorders.</p>



## 项目组主要参与者（注：项目组主要参与者不包括项目申请人）

编号	姓 名	出生年月	性别	职 称	学 位	单位名称	电话	电子邮箱	项目分工	每年工作 时间 (月)
1	杜凡	1983-7-23	女	主治医师	博士	华中科技大学	027-85726678	dufan511@yahoo.com.cn	电镜研究	4
2	余姣	1982-3-4	女	博士生	硕士	华中科技大学	027-85726421	liusu1982@163.com	流式细胞学与免疫荧光	8
3	廖奕	1980-3-20	男	博士生	硕士	华中科技大学	027-85726447	799643347@QQ.com	动物模型与分子生物学	8
4	周建宁	1978-9-21	男	主治医师	硕士	华中科技大学	027-85726678	dede2000@163.com	免疫荧光共聚焦检测	4
5	谢小平	1962-8-7	男	主管技师	学士	华中科技大学	027-85726421	xiexiaoping63@126.com	分子生物学实验及指导	4
6	陈艳	1983-9-6	女	硕士生	学士	华中科技大学	027-85726447	chenyanfeihong0906@163.com	分子生物学实验	8
7	巴莹	1985-1-21	女	硕士生	学士	华中科技大学	027-85726421	baying.1986@163.com	电生理学试验	6
8	熊艳华	1987-10-8	女	硕士生	学士	华中科技大学	027-85726113	461171887@qq.com	胃排空测定	8
9										

总人数	高级	中级	初级	博士后	博士生	硕士生
9	1	3			2	3

说明： 高级、中级、初级、博士后、博士生、硕士生人员数由申请人负责填报（含申请人），总人数由各分项自动加和产生。



## 经费申请表

(金额单位: 万元)

科目	申请经费	备注 (计算依据与说明)
<b>一. 研究经费</b>	62.8000	
1. 科研业务费	16.5000	
(1) 测试/计算/分析费	10.1000	电镜, 流式, 共聚焦
(2) 能源/动力费	1.4000	实验室水电费
(3) 会议费/差旅费	3.0000	国内学术交流
(4) 出版物/文献/信息传播费	2.0000	版面费、文献检索费
(5) 其他		
2. 实验材料费	46.3000	
(1) 原材料/试剂/药品购置费	41.8000	试验用各种抗体, 药物, 动物等
(2) 其他	4.5000	各种低质易耗品的购置, 显微手术器械, 试验用一次性耗材
3. 仪器设备费	0.0000	
(1) 购置		
(2) 试制		
4. 实验室改装费		
5. 协作费		
<b>二. 国际合作与交流费</b>	8.0000	
1. 项目组成员出国合作交流	8.0000	参加国际会议 DDW 交流
2. 境外专家来华合作交流		
<b>三. 劳务费</b>	10.0000	直接参加项目研究的研究生、博士后的劳务费用
<b>四. 管理费</b>	4.2000	不得超过申请经费的 5%
<b>合 计</b>	85.0000	
与本项目相关的 其他经费来源	国家其他计划资助经费	
	其他经费资助 (含部门匹配)	
	<b>其他经费来源合计</b>	0.0000



申请者在撰写报告正文时，请遵照以下要求：

- 1、 请先选定“项目基本信息”中的“资助类别”，再填写报告正文；
- 2、 在撰写过程中，不得删除系统已生成的撰写提纲（如误删可点击“查看报告正文撰写提纲”按钮，通过“复制/粘贴”恢复）；
- 3、 请将每部分内容填写在提纲下留出的空白区域处；
- 4、 对于正文中出现的各类图形、图表、公式、化学分子式等请先转换成 JPG 格式图片，再粘贴到申请书正文相应位置
- 5、 本要求将作为申请书正文撰写是否规范的评判依据，请遵照要求填写。

## 报告正文

### （一）立项依据与研究内容（4000-8000 字）：

1. **项目的立项依据**（研究意义、国内外研究现状及发展动态分析，需结合科学研究发展趋势来论述科学意义；或结合国民经济和社会发展中迫切需要解决的关键科技问题来论述其应用前景。附主要参考文献目录）；

Cajal 间质细胞（interstitial cells of Cajal, ICC）是一类起源于间充质干细胞的特殊细胞，以网络状结构分布于胃肠神经末梢和平滑肌细胞之间。现已证实，ICC 是胃肠道起搏细胞，具有产生、传播慢波的功能，并能作为胃肠神经系统调控平滑肌的中介，传导神经系统至平滑肌的信号。目前，国内外大量研究认为人类多种胃肠动力紊乱疾病如糖尿病胃轻瘫、特发性胃轻瘫、慢传输型便秘、先天性肠闭锁、Hirschsprung's 病等与胃肠道 ICC 网络缺失或严重损伤有关<sup>[1]</sup>，这类疾病可不同程度地影响患者的工作与生活，并降低其生活质量，因缺乏确切且令人满意的治疗方法常占用大量有限的医疗资源。因此，寻找新的有效的治疗方法成为亟待解决的问题。近年来，胃电刺激（gastric electrical stimulation, GES）作为一种非常有潜力的治疗胃动力障碍性疾病方法越来越受到人们重视，但其具体机制尚不明确。我们前期首次从成熟 ICC 表型转化角度研究了胃电刺激的作用机制（NSFC, NO.30670775, 2007-2009 年），随着近两年国内外该领域研究的发展，新的更深入的机制有待于我们进一步阐明。

目前的研究进展表明，生理状态下，消化道 ICC 网络处于动态平衡，一方面 ICC 可以转化，细胞死亡，另一方面 ICC 可补充，增殖<sup>[2]</sup>。病理情况下，ICC 减少/缺失可引起因于细胞死亡（凋亡、坏死）或发生表型转化。而 ICC 修复可通过前体细胞发展，增加 ICC 存活或增加 ICC 增殖途径而达到<sup>[3]</sup>。我们前期的研究表明，GES 能通过 ICC 表



型转化的方式来修复糖尿病大鼠胃损伤的 ICC (NSFC, 30670775), 然而, GES 是否通过其他方式 (ICC 前体细胞补充或促进 ICC 存活增殖) 修复损伤的 ICC 目前仍不明确, 其影响 ICC 的作用机制也不清楚, 进一步阐明其作用途径及可能的作用机制可为 GES 在临床中治疗 ICC 损伤所致胃动力障碍疾病提供理论依据。

胃肠道中仅 ICC 和极少数肥大细胞表达 c-Kit, c-Kit 是依靠基因产物 Kit 编码的一种跨膜酪氨酸激酶受体, 其配体为干细胞因子 (Stem cell factor, SCF)。Ano1 (anoctamin1, 以往也称 FLJ10261, DOG-1, TMEM16A) 是一种  $\text{Ca}^{2+}$  激活的  $\text{Cl}^-$  通道蛋白, 其联合 Kit 可作为胃肠道 ICC 高选择性的标志物<sup>[4, 5]</sup>。近期研究表明  $\text{CD44}^+$ 、 $\text{CD34}^+$ 、胰岛素受体 (insulin receptor, Insr) 和胰岛素样生长因子-I 受体 (insulin-like growth factor I receptor, IGF-IR/Igf1r) 阳性而 Kit 低表达的细胞 ( $\text{Ano1}^+\text{Kit}^{\text{low}}\text{CD44}^+\text{CD34}^+\text{Insr}^+\text{Igf1r}^+$ ) 是 ICC 前体细胞, 体内、体外研究均表明它具有一些干细胞的特点。这种前体细胞在成年阶段可持续存在, 尽管数量很少<sup>[6]</sup>。SCF 作为 c-Kit 的配体在体内以膜型 SCF (M-SCF) 和可溶型 SCF (S-SCF) 两种形式存在, 多数认为 M-SCF 对成熟 ICC 的分化、存活和表型维持起主要作用<sup>[7]</sup>。ICC 前体细胞在 M-SCF 和外源性胰岛素 (Insulin)/胰岛素样生长因子-I (IGF-I) 作用下可向成熟的 ICC ( $\text{Ano1}^+\text{Kit}^{\text{high}}\text{CD44}^+\text{CD34}^+\text{Insr}^+\text{Igf1r}^+$ ) 分化, 在 S-SCF 及 Insulin/IGF-I 作用下前体细胞可发生增殖<sup>[5, 6]</sup>。我们的前期研究检测结果显示 GES 后糖尿病鼠胃组织 M-SCF 表达增加 (NSFC, 30670775), 因此推测 GES 可能通过影响内源性 M-SCF 等因素而促进 ICC 前体细胞的分化, 从而促进 ICC 修复。但在病理情况下, 胃电刺激是否可促进机体内 ICC 前体细胞增殖或使前体细胞向成熟 ICC 分化及其具体作用机制目前未见报道, 需进一步研究。

胃电刺激除可能通过影响 ICC 前体细胞而修复 ICC 网络外, 其影响成熟 ICC 的存活、增殖的相关因素也可能是重要部分, 对其深入研究将有助于进一步了解胃电刺激的作用机制。目前研究认为 ICC 分化及维持成熟 ICC 表型所需的 SCF 和 IGF-I 主要来源于平滑肌细胞<sup>[8]</sup>, Insulin 及 IGF-I 可刺激 SCF 的表达。Horvath 等<sup>[9]</sup>在糖尿病胃轻瘫研究中发现成熟 ICC 上并不存在 Insulin 或 IGF-I 受体, Insulin/IGF-I 很可能是直接作用于胃平滑肌细胞上的相应受体, 改善糖尿病胃平滑肌细胞病变, 使其合成 SCF 的能力增强, 进而对 ICC 病变起保护作用。因此, 可以推测 Insulin 和 IGF-I 通过调节平滑肌细胞合成的 SCF 对 ICC 存活和成熟 ICC 表型维持起重要作用。尽管我们的前期研究发现 GES 后糖尿病鼠胃 M-SCF 表达增加, 但其具体机制如何, 是否通过影响胰岛素或 IGF-I 而作用平滑肌细胞, 使 SCF 生



成增加，最终影响成熟 ICC 存活有待进一步研究。

现已明确，SCF/Kit 启动的细胞内信号通路对 ICC 发育、分化、表型形成、出生后和成年期表型维持是必需的。最新的研究提示影响成熟 ICC 存活的因素除了经典的 SCF/Kit 途径及上述 Insulin/IGF-I 途径外，影响 ICC 增殖的因素还包括 5-HT<sub>2B</sub> 受体介导的 5-HT 途径，神经源性 NO、血红素氧合酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 及 IL-9 等因子<sup>[3]</sup>。ICC 表达多种 5-HT 受体，Wouters 等<sup>[10]</sup>研究发现外源性 5-HT 可使体外培养的 ICC 数量明显增加；而 5-HT<sub>2B</sub> 受体拮抗剂可抑制 5-HT 的作用，因而认为 5-HT 可通过作用于 ICC 表面的 5-HT<sub>2B</sub> 受体调节 ICC 的增殖。NO 与 ICC 均参与调节胃肠运动，ICC 缺失常伴有氮能神经受损，在多种胃肠动力障碍性疾病中二者的改变存在很大的一致性；在 ICC 的原代细胞培养基中添加神经元型 NOS (nNOS) 来源的 NO 可增加 ICC 数量，表明神经源性 NO 能够调控 ICC 的生长与网络形成，是 ICC 生存和增殖的调控因子之一<sup>[11]</sup>。ICC 在氧化应激状态下损伤明显，体内研究表明通过影响 HO-1 上调，可促进组织中巨噬细胞介导的 CO 释放，从而保护 ICC 细胞<sup>[12]</sup>。另有研究发现，体外培养中予适当浓度的 IL-9 能促进 ICC 的生长发育，维持其网络结构和功能，推测 IL-9 也可能是参与胃肠道正常 ICC 维持和受损后 ICC 修复的重要因子<sup>[13]</sup>。上述对 ICC 的增殖有调节作用的因子都可能参与到胃电刺激修复 ICC 的机制中，目前未见相关研究报道，需要进一步的研究证实。

胃电刺激已被应用于胃动力障碍性疾病的动物研究和临床实践中，目前可植入式的电刺激仪使 GES 可能成为对动力障碍性疾病安全可行的治疗手段<sup>[14]</sup>。然而，GES 刺激方式（根据脉冲宽度不同分长脉冲、短脉冲或串脉冲）和参数（不同的刺激能量，包括频率、振幅）不同对临床的疗效也不同，目前仍在研究和摸索中。长脉冲低频胃电刺激 (low-frequency GES with long pulse) 因其频率与生理性慢波频率很相似，又称胃电起搏 (gastric electric pacing, GEP)，其主要作用是能纠正胃电节律紊乱，促进胃排空<sup>[15]</sup>。因 GES 的刺激方式和刺激能量与其刺激效应密切相关，结合目前研究现状及我们的前期研究基础，本研究拟以长脉冲作为 GES 切入点寻求可能对 ICC 修复有作用的合适参数，并进一步深入研究其作用途径及相关机制。

综上所述，本课题拟以糖尿病胃轻瘫大鼠为模型，探讨长脉冲胃电刺激对损伤的 ICC 的作用，研究 GES 是否通过 ICC 前体细胞补充或促进 ICC 存活增殖修复损伤的 ICC；并进一步研究 GES 是否通过影响 SCF/Kit、Insulin/IGF-I 通路及调节 ICC 生存、增殖的





相关因子而促进 ICC 修复。深入研究胃电刺激促进 ICC 修复的机制，为胃电刺激治疗胃动力障碍性疾病提供理论依据。

## 参考文献

1. Streutker CJ, Huizinga JD, Driman DK, et al. Interstitial cells of Cajal in health and disease. Part I: normal ICC structure and function with associated motility disorders. *Histopathology* 2007; 50: 176-89.
2. Gibbons SJ, De Giorgio R, Pellegrini MS, et al. Apoptotic cell death of human interstitial cells of Cajal. *Neurogastroenterol Motil* 2009; 21: 85-93.
3. Huizinga JD, Zarate N, Farrugia G. Physiology, injury, and recovery of interstitial cells of Cajal: basic and clinical science. *Gastroenterology* 2009; 137: 1548-56.
4. Gomez-Pinilla PJ, Gibbons SJ, Bardsley MR, et al. Anol is a selective marker of interstitial cells of Cajal in the human and mouse gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296: G1370 - 81.
5. Bardsley MR, Horvath VJ, Asuzu DT, et al. Kit<sup>low</sup> stem cells cause resistance to Kit/platelet-derived growth factor alpha inhibitors in murine gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology* 2010; 139: 942-52.
6. Lorincz A, Redelman D, Horvath VJ, et al. Progenitors of interstitial cells of Cajal in the postnatal murine stomach. *Gastroenterology* 2008; 134: 1083-93.
7. Rich A, Miller SM, Gibbons SJ, et al. Local presentation of steel factor increases expression of c-kit immunoreactive interstitial cells of Cajal in culture. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284: G313-20.
8. Ward SM, Ordog T, Bayguinov IR, et al. Development of interstitial cells of Cajal and pacemaking in mice lacking enteric nerves. *Gastroenterology* 1999; 117: 584-94.
9. Horvath VJ, Vittal H, Lorincz A, et al. Reduced stem cell factor links smooth myopathy and loss of interstitial cells of cajal in murine diabetic gastroparesis. *Gastroenterology* 2006; 130: 759-70.
10. Wouters MM, Gibbons SJ, Roeder JL, et al. Exogenous serotonin regulates proliferation of interstitial cells of Cajal in mouse jejunum through 5-HT2B receptors. *Gastroenterology*



2007; 133: 897-906.

11. Choi KM, Gibbons SJ, Roeder JL, et al. Regulation of interstitial cells of Cajal in the mouse gastric body by neuronal nitric oxide. *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19: 585-95.
12. Choi KM, Gibbons SJ, Nguyen TV, et al. Heme oxygenase-1 protects interstitial cells of Cajal from oxidative stress and reverses diabetic gastroparesis. *Gastroenterology* 2008; 135: 2055-64.
13. Ye J, Zhu Y, Khan WI, et al. IL-9 enhances growth of ICC, maintains network structure and strengthens rhythmicity of contraction in culture. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 687-94.
14. Bortolotti M. Gastric electrical stimulation for gastroparesis: A goal greatly pursued, but not yet attained. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 273-82.
15. Zhu H, Sallam H, Chen DD, et al. Therapeutic potential of synchronized gastric electrical stimulation for gastroparesis: enhanced gastric motility in dogs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 293: R1875-81.

## 2. 项目的研究内容、研究目标, 以及拟解决的关键科学问题 (此部分为重点阐述内容);

### 研究目标:

- 1) 选择合适的长脉冲 GES 参数。
- 2) 研究长脉冲胃电刺激是否通过影响 ICC 前体细胞补充/发展或促进成熟 ICC 存活增殖而修复损伤的 ICC, 并进而改善紊乱的胃慢波电节律和胃排空延迟。
- 3) 研究长脉冲胃电刺激能否通过影响 SCF/ Kit、胰岛素/IGF-I 通路变化及调节 ICC 生存和增殖的相关因子而促进 ICC 修复。
- 4) 深入研究胃电刺激促进 ICC 修复的机制, 为胃电刺激治疗胃动力障碍性疾病提供理论依据。

### 研究内容:

- 1) 建立糖尿病胃轻瘫和胃电刺激动物模型。
- 2) 选择合适的长脉冲胃电刺激参数:
  - ① 细胞内微电极法记录分析不同参数长脉冲 GES 对胃慢波电活动的影响;



- ②  $^{13}\text{C}$  辛酸呼气试验法测定不同参数长脉冲 GES 对胃排空的影响;
  - ③ 初步检测不同参数长脉冲 GES 后总 ICC 的变化 (包括超微结构、分子水平和蛋白表达);
  - ④ 综合评价不同刺激参数 GES 的刺激效应, 选取最佳参数用于后续研究。
- 3) ICC 前体细胞在胃电刺激修复 ICC 中的作用及其相关机制:
- ① 观察 GES 对 ICC 前体细胞的影响, 以 ICC 前体细胞特异性的表面标志 ( $\text{Ano1}^+ \text{Kit}^{\text{low}} \text{CD44}^+ \text{CD34}^+ \text{Insr}^+ \text{Igflr}^+$ ) 鉴定 ICC 前体细胞, 定量检测 GES 对 ICC 前体细胞数量的影响, 并测定其增殖变化;
  - ② 观察 GES 对 S-SCF、M-SCF、Insulin 和 IGF-I 表达的影响及与 ICC 前体细胞表达和增殖是否具有相关性;
  - ③ 观察分别内源性阻断 SCF、Insulin/IGF-I 后 GES 对 ICC 前体细胞的影响。
- 4) 胃平滑肌细胞 (SMC)、Insulin/IGF-I 及 SCF/Kit 通路在胃电刺激修复成熟 ICC 中的作用:
- ① 观察 GES 对胃平滑肌细胞影响, 包括超微结构变化, 相应分子水平和蛋白表达变化, 细胞增殖变化; 观察 GES 对平滑肌细胞上 Insulin/IGF-I 受体表达的影响;
  - ② 观察 GES 对 Insulin/IGF-I 表达、SCF/Kit 通路的影响及 SCF、Insulin、IGF-1 变化与平滑肌细胞变化之间的相关性;
  - ③ 观察 GES 对成熟 ICC ( $\text{Ano1}^+ \text{Kit}^{\text{high}} \text{CD44}^+ \text{CD34}^- \text{Insr}^- \text{Igflr}^-$ ) 表达的影响, 包括超微结构的变化, 表达定量和增殖变化, 分析平滑肌细胞、Insulin/IGF-I 及 SCF 的变化与成熟 ICC 表达之间的相关性;
  - ④ 观察分别内源性阻断 SCF、Insulin/IGF-I 后 GES 对 ICC 成熟细胞的影响。
- 5) 与 ICC 生存、增殖相关的几种因子在胃电刺激修复 ICC 中的作用:
- ① 观察 GES 对 5-HT 及 5-HT<sub>2B</sub> 受体、nNOS/NO、HO-1/CO、IL-9 表达的影响及其与成熟 ICC 表达和增殖的相关性;
  - ② 分别观察内源性阻断各因子后 GES 对 ICC 修复的影响。

### 拟解决的关键科学问题

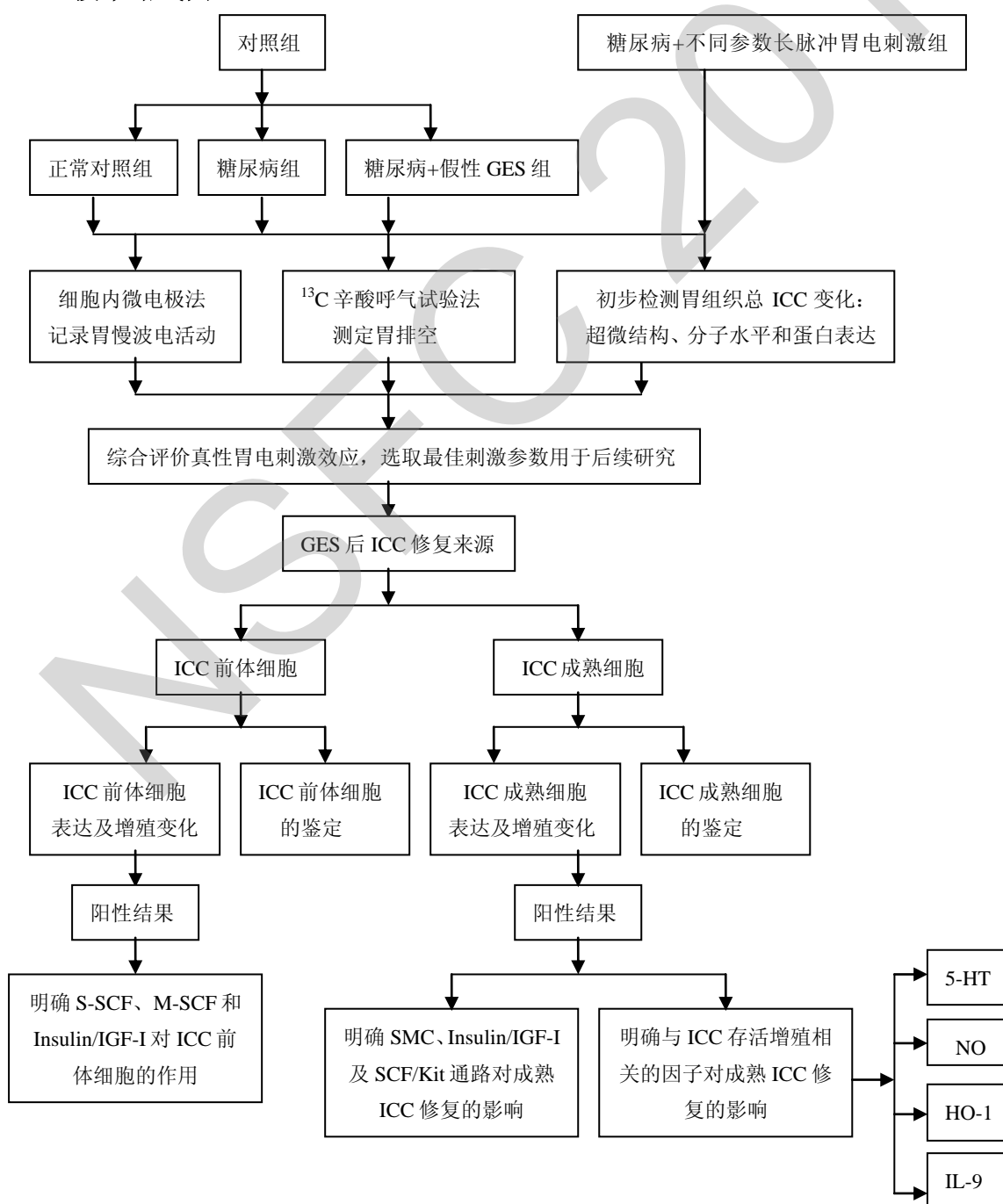
ICC 前体细胞和成熟细胞的鉴定: 以往广泛应用 c-Kit 抗体标记 ICC, 有一定特异性。但最新研究表明 ICC 前体细胞和成熟细胞的区分仅依赖 Kit 不能达到, 两者的鉴定需结



合 ICC 不同时期的表面标志 (kit、Ano1、CD44、CD34、InsR 和 IGF-IR) 共同确定。最近国外有研究联合流式细胞术及荧光细胞活化分选系统、免疫荧光染色共聚焦显微镜观察等成功鉴定不同时期 ICC，对我们的研究有参考价值（具体参见参考文献 6）。

### 3. 拟采取的研究方案及可行性分析。（包括研究方法、技术路线、实验手段、关键技术等说明）；

#### 技术路线图





## 研究方案

### 1) 模型制备及分组

#### ① 实验分组

对象：大白鼠（Sprague-Dawley 大鼠）；实验分组：分为正常对照组、糖尿病组（不埋电极，不给予刺激）、糖尿病+假性胃电刺激组（埋电极后，仅与刺激器连接，不给予刺激）和糖尿病+真性胃电刺激组（埋电极，并给予长脉冲慢性胃电刺激）。

#### ② 胃电刺激模型制备

胃电刺激电极植入方法：将两对电极埋在大鼠胃大弯侧浆膜面并固定，远端电极距幽门 0.5cm，近端电极距远端电极 1.5cm，每对电极的电极间距 0.3cm，电极导线引出体外固定好，实验时连接电刺激仪。大鼠术后恢复 2 周后可行糖尿病造模。

#### ③ 建立糖尿病胃轻瘫大鼠模型

糖尿病组和各糖尿病+刺激组采用链脲佐菌素（streptozotocin, STZ）溶液 60mg/kg 腹腔注射，正常对照组给予 STZ 稀释溶液（如柠檬酸缓冲液）腹腔注射，每周监测血糖，同时测体重，并观察大鼠的食量、尿量、饮水情况等；血糖  $\geq 16.9\text{mmol/L}$  为糖尿病诊断标准。

### 2) 选择合适的长脉冲胃电刺激参数

#### ① 胃电刺激方法

根据目前研究现状结果及我们的前期研究基础选取约 5 个长脉冲胃电刺激参数，参数选择范围为 3-12cpm，100-600ms，2-10mA（如我们前期研究采用的参数 5.5cpm，550ms，2mA 仍列入选择内）。刺激时间为慢性刺激，自糖尿病病程开始，共 4 周。（参数选择参考文献 Bortolotti M. Gastric electrical stimulation for gastroparesis: A goal greatly pursued, but not yet attained. World J Gastroenterol 2011; 17: 273-82.）

#### ② 记录分析各组胃慢波电活动

采用细胞内微电极技术记录各组胃慢波电活动（具体方法参见文献 Ordog T, et al. J Physiol 1999, 518: 257-69.）。新鲜分离各组完整胃窦、胃体组织，沿胃小弯剪开，在 kreb's 液中去胃内容物，将组织浆膜层面朝上平铺并固定于灌流槽中，打开温水浴，充氧，灌流液灌流，解剖显微镜下用显微镊剥离浆膜层，待组织标本稳定 1 h 后，用微操仪将充满 KCl（3mol/L）的玻璃微电极插入标本。微电极拉制的电阻 40-100M $\Omega$ ，用微电极放大器记录结果。对记录到的慢波进行分析，比较不同刺激参数胃电刺激对慢波的影响。



### ③测定胃排空

胃排空检测采用  $^{13}\text{C}$  辛酸呼气试验法（具体方法参见文献 Choi KM, et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2007; 293: G1039–45.），测定前将大鼠置于集气箱中 30min 以适应环境，利用抽气泵收集基础状态（0 时相）及给予标准餐后各时间点的呼出气样（前 60min 每 5min 收集 1 次，后 180min 每 15min 收集 1 次），收集时间为 15s/次。用选择性同位素红外线能谱分析仪（IRIS）对收集的呼出气样进行测定并分析获得参数  $^{13}\text{CO}_2$  峰值（ $\text{C}_{\text{max}}$ ）与半排空时间（ $\text{T}_{1/2}$ ），各组大鼠  $\text{T}_{1/2}$  与正常对照组比较确定是否存在胃排空延迟。比较不同刺激参数胃电刺激对胃排空的影响。

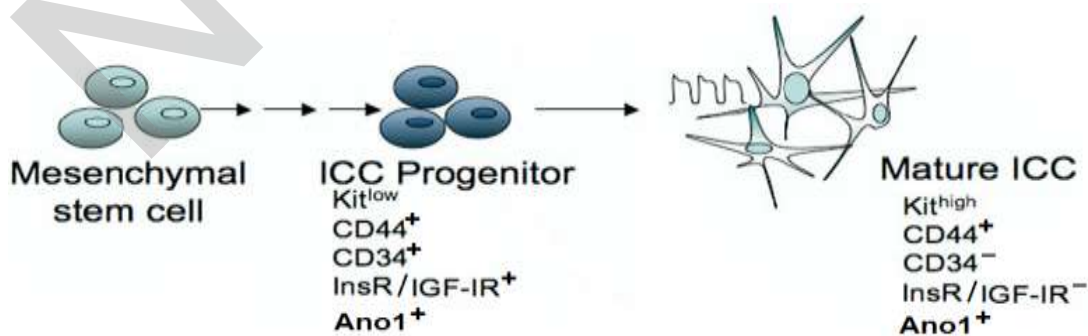
### ④综合评价不同参数的胃电刺激效应

除记录并分析不同参数胃电刺激对胃慢波电活动和胃排空的影响外，初步检测总 ICC 变化，包括电镜下观察 ICC 超微结构变化，实时荧光定量 PCR 法（Real-time PCR）检测 c-Kit mRNA 表达，免疫荧光双标共聚焦显微镜观察及 Western blot 法检测 c-Kit 蛋白表达变化。根据以上指标综合评价不同参数的胃电刺激效应，选取最佳参数进行后续研究。

## 3) ICC 前体细胞在胃电刺激修复 ICC 中的作用

### ①ICC 前体细胞的鉴定

ICC 前体细胞的鉴定：不同时期 ICC 细胞表面标志见下图（参考文献：Huizinga JD, et al. Gastroenterology 2008; 134: 1252-4. Gomez-Pinilla PJ, et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2009; 296: G1370 - 81.）



(IGF-IR, insulin-like growth factor I receptor; InsR, insulin receptor; Ano1, anoctamin1)

应用流式细胞术及荧光细胞活化分选系统（FACS）、免疫荧光染色共聚焦显微镜观察对 ICC 前体细胞进行筛选及鉴定。ICC 表面标志 Ano1 有助于区分肥大细胞。

### ②ICC 前体细胞表达及增殖变化

新鲜分离各组胃窦、胃体组织标本，解剖显微镜下分别去除粘膜层和粘膜下层，剥



离完整的肌间层固定后行免疫荧光染色,共聚焦显微镜观察结果;用流式细胞术检测 ICC 前体细胞的表达并行定量分析,比较各组之间是否具有差异性。以 BrdU 标记检测 ICC 前体细胞增殖情况。若检测到胃电刺激后 ICC 前体细胞及其变化则进一步确定 S-SCF、M-SCF 和 Insulin/IGF-I 对 ICC 前体细胞的作用。

### ③ ICC 前体细胞表达及增殖变化的影响因素

用胰岛素放射免疫法 (RIA) 和酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测血清中 S-SCF 和 Insulin/IGF-I 的表达, Real-time PCR 检测胃组织 S-SCF、M-SCF、IGF-I mRNA 的表达, Western blot 法检测蛋白表达变化。分析三者的变化与 ICC 前体细胞的表达变化及增殖是否有相关性。

分别给予相应拮抗剂内源性阻断 Insulin、IGF-1、S-SCF 及 M-SCF 后,给予胃电刺激,观察胃电刺激后 ICC 前体细胞的变化。

## 4) 胃平滑肌细胞、胰岛素/IGF-I 及 SCF/Kit 信号通路在胃电刺激修复成熟 ICC 中的作用

### ① 成熟 ICC 表达变化

电镜下观察各组成熟 ICC 细胞超微结构;解剖显微镜下分离完整的胃肌间层,用 FACS 和免疫荧光染色共聚焦显微镜观察检测各组胃窦、胃体组织肌间层 ICC 成熟细胞的表达变化(成熟 ICC 表面标志见上图);Ki67 标记检测 GES 后是否存在成熟 ICC 增殖及其增殖变化。

### ② 胃平滑肌细胞及 Insulin 和 IGF-I 受体表达变化

电镜下观察各组胃平滑肌细胞超微结构变化;用免疫组化染色、Real-time PCR 和 Western blot 法测定各组大鼠胃平滑肌细胞  $\alpha$ -SMA、myosin11 mRNA 和蛋白表达;以 Ki67 和  $\alpha$ -SMA 进行免疫荧光双标,检测胃电刺激后是否存在平滑肌细胞增殖及其增殖变化。用免疫荧光双重染色法及激光共聚焦显微镜观察检测各组平滑肌细胞上胰岛素和 IGF-I 受体表达变化。

### ③ Insulin/IGF-I 表达和 SCF/Kit 信号通路的变化

用胰岛素放射免疫法 (RIA) 和 ELISA 法检测各组大鼠血清中 Insulin 和 IGF-I, S-SCF 的表达水平;用 Real-time PCR 和 Western blot 法检测各组胃窦、胃体组织中 S-SCF、M-SCF、IGF-I mRNA 及蛋白表达变化。分析平滑肌细胞、Insulin/IGF-I 及 SCF 的变化与成熟 ICC 表达之间的相关性。



分别给予相应拮抗剂内源性阻断 Insulin、IGF-1、S-SCF 及 M-SCF 后，给予胃电刺激，观察胃电刺激后 ICC 成熟细胞的变化。

## 5) 与 ICC 生存和增殖相关的因子在胃电刺激修复 ICC 中的作用

### ①5-HT 及 5-HT<sub>2B</sub> 受体在 ICC 修复中的作用

用 ELISA 法检测各组血清中 5-HT 的表达变化；用免疫荧光双重染色法及激光共聚焦显微镜观察各组 ICC 上 5-HT<sub>2B</sub> 受体表达变化。

将糖尿病+真性 GES 组分为拮抗剂组和空白对照组，给拮抗剂组大鼠分别注射 5-HT<sub>2</sub> 受体拮抗剂 ritanserin 或 5-HT<sub>2B</sub> 受体拮抗剂 SB204741，空白组注射生理盐水后，检测胃电刺激对成熟 ICC 数量的影响、组织形态学变化及增殖变化。

### ②nNOS 来源的 NO 在 ICC 修复中的作用

用 Real-time PCR 和 Western 印迹法检测各组胃组织中 nNOS 表达，比较其与 ICC 变化是否具有一致性。

将糖尿病+真性 GES 组分为拮抗剂组和空白对照组，给拮抗剂组大鼠注射 NOS 抑制剂 L-NNA，空白组注射生理盐水后，检测胃电刺激对成熟 ICC 数量的影响、组织形态学变化及增殖变化。

### ③HO-1 在 ICC 修复中的作用

用 Real-time PCR 和 Western 印迹法检测各组胃组织中 HO-1 表达。

将糖尿病+真性 GES 组分为拮抗剂组和空白对照组，给拮抗剂组大鼠注射 HO 抑制剂 CrMP，空白组注射生理盐水后，检测胃电刺激对成熟 ICC 数量的影响、组织形态学变化及增殖变化。

### ④IL-9 在 ICC 修复中的作用

用 ELISA 法检测各组血清中 IL-9 的表达。

将糖尿病+真性 GES 组分为拮抗剂组和空白对照组，给拮抗剂组大鼠注射 IL-9 拮抗剂抗 IL-9 抗体 MH9A3，空白组注射生理盐水后，检测胃电刺激对成熟 ICC 数量的影响、组织形态学变化及增殖变化。

## 可行性分析：

### 1) 技术方面：

①课题组所在单位承担了两项胃电刺激相关的国家自然科学基金项目





(NO.30170350; 30500233)，前期工作已解决了胃电刺激相关技术问题。申请人亦负责一项国家自然科学基金项目（《胃电刺激对 ICC 表型及 ICC-ENS 突触连接可塑性的影响》NO.30670775）。课题组有丰富的研究胃电刺激的经验。

② ICC 的分离及电生理记录：我们已经掌握了解剖显微镜下分离大鼠胃组织粘膜下层、肌间层和肠肌层的方法，并成功进行 ICC 相关蛋白的免疫荧光染色。同时我们实验室具备记录慢波电活动的电生理记录仪，并熟练掌握细胞内微电极记录技术。

③ 课题组主要成员由从事胃肠动力和分子生物学研究的专业人员共同组成。本课题组负责人长期从事胃肠动力方面的研究，已掌握了与本实验有关的细胞生物学和分子生物学技术，并有指导本项研究的工作能力。课题组其他成员也掌握了本课题所需要的动力研究、病理学、免疫组化、分子生物学技术等。

## 2) 实验条件：

华中科技大学同济医学院具备完成本项目的所有仪器和设备，实验所需的试剂及各种抗体都已商品化，均可购得。因此，本课题组已具备较强的技术力量及仪器设备等，为本课题的顺利完成提供了保证。

## 4. 本项目的特色与创新之处；

我们前期从成熟 ICC 与平滑肌表型转化角度研究了胃电刺激对 ICC 有修复作用。但近 2 年新的研究进展显示 ICC 的修复除了与 ICC 表型转化有关外，一定条件下 ICC 前体细胞向成熟 ICC 分化及促进成熟 ICC 的存活和增殖相关因素也可能是重要部分。本课题拟更进一步探讨胃电刺激后修复的 ICC 的来源，胃电刺激能否通过影响 Insulin/IGF-I、SCF/Kit 信号通路变化及调节 ICC 生存和增殖的相关因子而促进 ICC 表型修复，深入研究胃电刺激促进 ICC 修复的机制，并寻找对 ICC 修复有作用的最佳胃电刺激参数，为胃电刺激治疗胃动力障碍性疾病提供新的理论依据。

## 5. 年度研究计划及预期研究结果。（包括拟组织的重要学术交流活动、国际合作与交流计划等）。

### 1) 年度研究计划

#### 第一阶段（2013.1—2013.12）



进行各项准备工作，包括试剂购买等；制备糖尿病及胃电刺激大鼠模型；选择合适的长脉冲 GES 参数。

#### **第二阶段（2014. 1—2014. 12）**

研究 ICC 前体细胞在胃电刺激修复 ICC 中的作用及其影响因素。

#### **第三阶段（2015. 1—2015. 12）**

研究胃平滑肌细胞、胰岛素/IGF-I 及 SCF/Kit 信号通路在胃电刺激修复成熟 ICC 中的作用；

#### **第四阶段（2016. 1—2016. 12）**

研究与 ICC 生存和增殖相关的几种因子 5-HT、NO、HO-1 和 IL-9 等在胃电刺激修复成熟 ICC 中的作用。

整理资料，统计数据，分析结果，论文撰写和结题工作。

### **2) 预期研究结果**

#### **可预见结果**

① 通过完成本项目，将选出最佳胃电刺激参数，明确胃电刺激后修复的 ICC 的来源，胃电刺激能否通过影响 Insulin/IGF-I、SCF/Kit 信号通路变化及调节 ICC 生存和增殖的相关因子而促进 ICC 表型修复。为丰富与发展胃电刺激在调节胃肠道运动、治疗胃肠动力障碍性疾病中的作用提供理论依据。

② 培养硕士研究生 3-5 名，博士研究生 2 名。

③ 在国内外杂志上发表论文 5-7 篇。

#### **不可预见结果**

研究过程中可能出现一些新问题，对此深入研究可能有新的发现；也可能部分预期结果不能得到，而得到一些其他有价值的结果。总之，研究过程中，应该细心发现实验中的新现象，及时作出相应调整，以期得到更多有价值的结果。

## **（二）研究基础与工作条件**

1、**工作基础**（与本项目相关的研究工作积累和已取得的研究工作成绩）；

1) 申请者 2007 年中标的国家自然科学基金课题（《胃电刺激对 ICC 表型及 ICC-ENS



突触连接可塑性的影响》N0. 30670775），从成熟 ICC 表型转化角度研究了胃电刺激对 ICC 有修复作用。目前已顺利结题，实验室研究已获得相关资料：

① **胃 ICC 表型在病程早期起向平滑肌表型转化。**

糖尿病（DM）组大鼠胃 c-Kit mRNA 和蛋白表达随 DM 病程延长而下降；对照组胃 c-kit 的 mRNA 和蛋白表达均无显著变化（图 1）。

电镜水平：DM 第 4 周起电镜下可见兼具 ICC 和平滑肌超微结构特征的“中间状态”的 ICC 细胞，富含微丝和中间丝，并成束状与细胞外缘并行，也有胞膜小凹和线粒体，外观类似平滑肌细胞，细胞质密度高于邻近的平滑肌细胞（图 2）。

② **慢性胃电刺激可促使胃部分向平滑肌表型转化的 ICC 表型逆转。**

电镜水平：慢性胃电刺激 4 周后，较假性刺激组更易见到兼具 ICC 和平滑肌超微结构特征的 ICC 细胞（图 3）。

光镜水平：慢性胃电刺激 4 周后，较假性刺激组更易见到 c-kit 和 desmin、c-kit 和 SMHC 双重阳性免疫荧光染色的 ICC 细胞（图 4A、B）。

③ **早期开始的慢性的胃电刺激使胃组织 M-SCF 表达增加更明显**（图 5）。

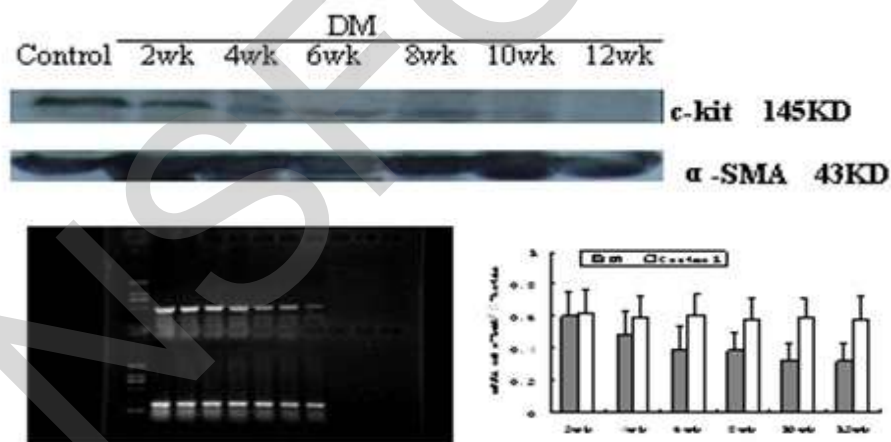


图 1 糖尿病大鼠胃 ICC 蛋白和 mRNA 水平的变化

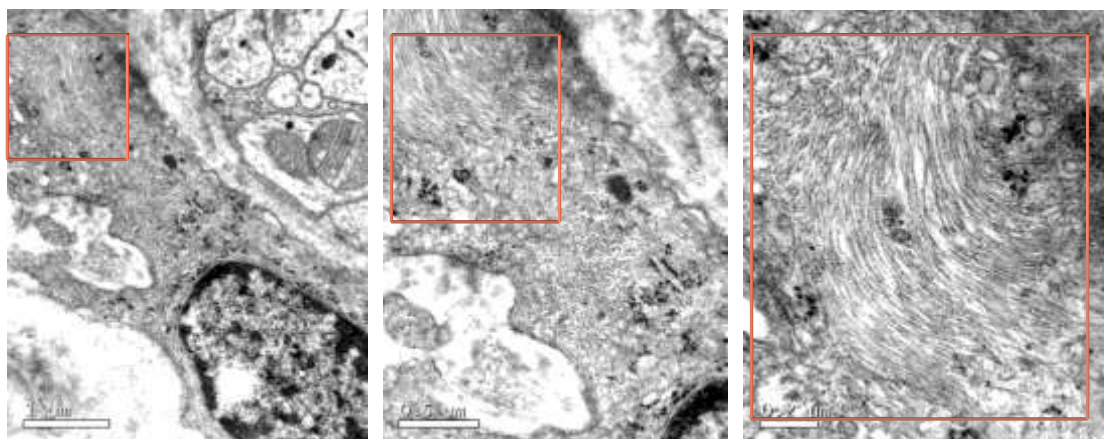


图 2 糖尿病大鼠胃“中间状态”的 ICC 的超微结构

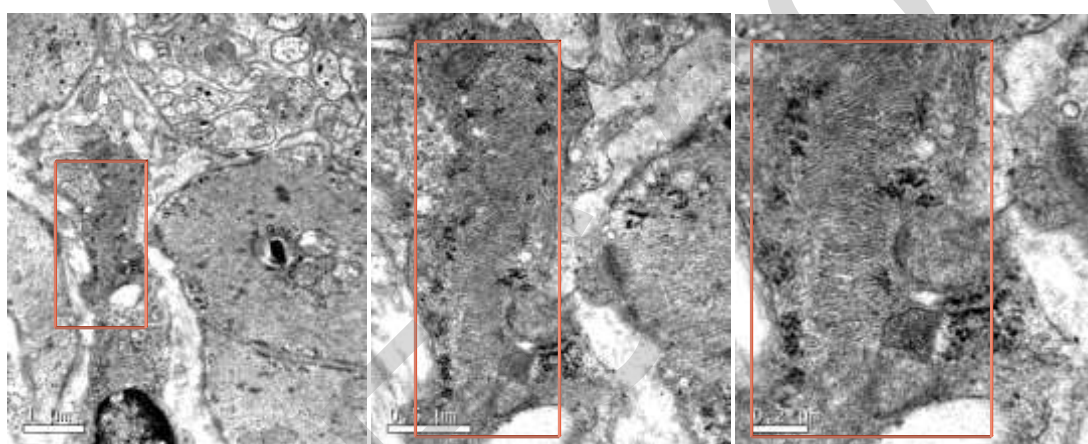


图 3 长脉冲胃电刺激对糖尿病大鼠胃肌间层 ICC 超微结构的影响

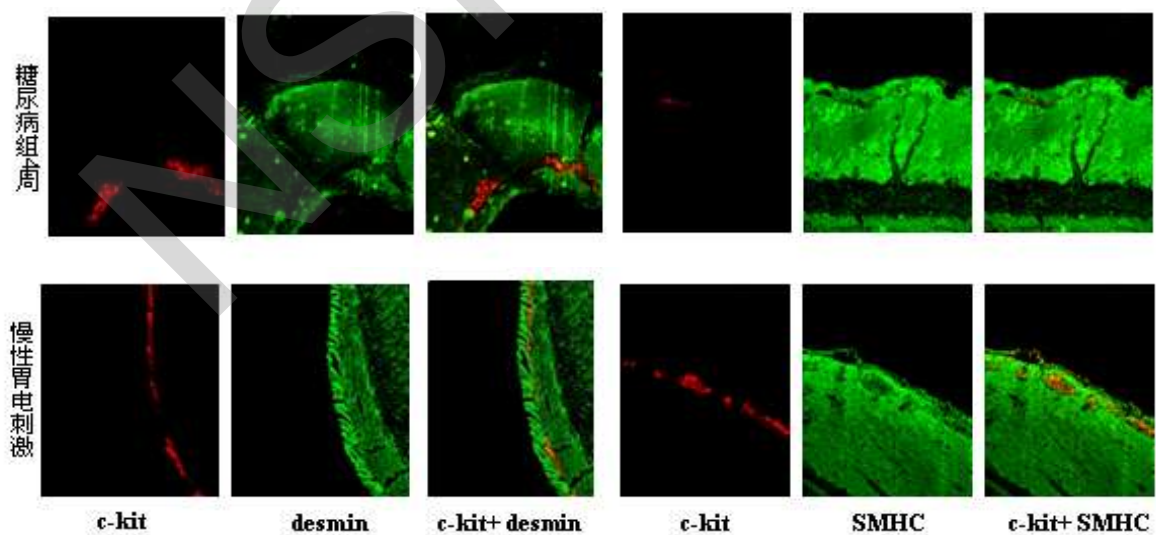


图 4A 长脉冲胃电刺激后 c-kit 和 desmin 的双重免疫荧光染色 图 4B 长脉冲胃电刺激后 c-kit 和 SMHC 的双重免疫荧光染色

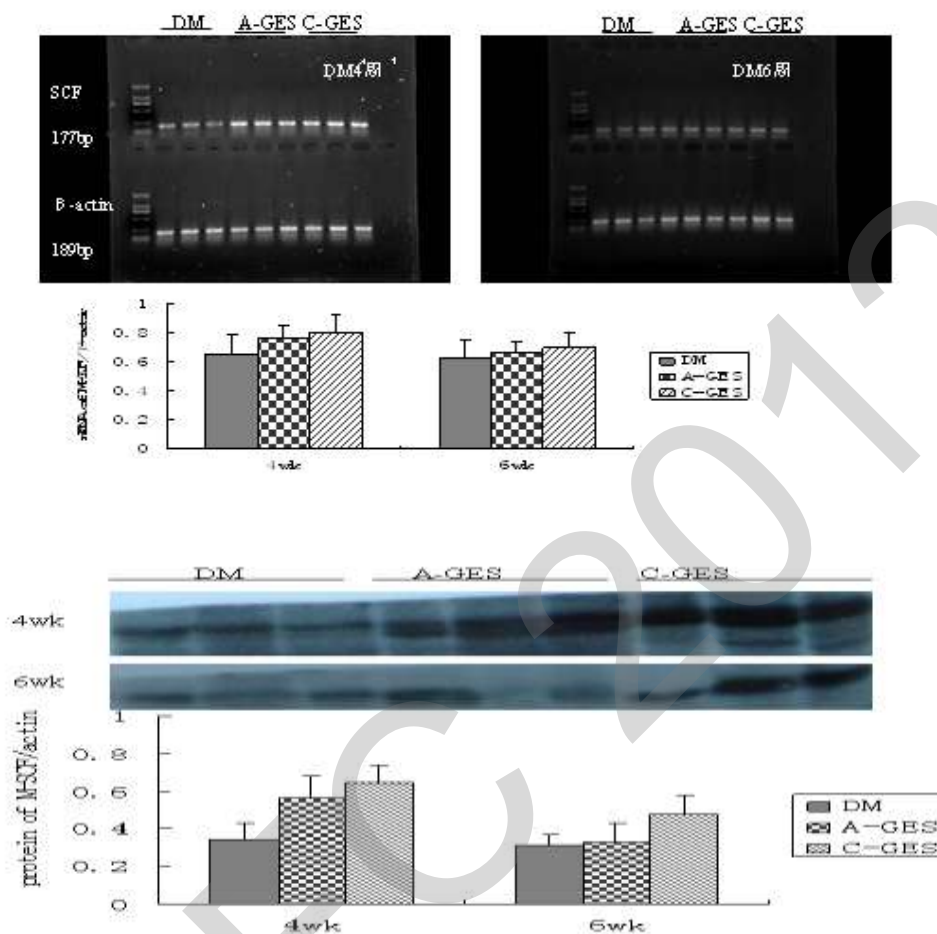


图 5 长脉冲胃电刺激对 DM 大鼠 M-SCF 的影响

这些实验结果为本课题的顺利开展奠定了良好的技术基础，同时本课题也是前次课题的深入研究。

2、工作条件（包括已具备的实验条件，尚缺少的实验条件和拟解决的途径，包括利用国家实验室、国家重点实验室和部门重点实验室等研究基地的计划与落实情况）；

1) 本课题组所在单位开展胃肠动力性疾病研究二十多年，在胃电刺激对胃肠运动的作用及机制方面进行了较深入的研究，积累了丰富经验，取得了一系列成绩。申请人多年从事胃肠运动方面研究，在国外相关实验室进修学习期间，主要进行电刺激与胃肠运动方面研究，积累了经验，并在国际SCI刊物发表数篇论著。

2) 本课题依托单位华中科技大学同济医学院拥有系列条件优越的实验室：同济医学院实验技术公共平台、湖北省生物靶向治疗重点实验室、武汉协和医院中心实验室等。实





验设备完善,有电生理学实验室、分子生物学室、病理、超微病理室,配备有电生理记录系统、显微操纵器系列、超薄切片机,激光共聚焦显微镜,电镜等。因此具备实施本课题所需的全部实验条件和设备。

3) 在长期的科研过程中,项目组成员熟练掌握了本研究项目所需的多种实验技术,如免疫荧光、real-time PCR、Western Blot、流式细胞术、放射免疫分析、细胞内微电极记录技术、激光共聚焦、电镜等关键实验技术。因此,本项目组成员在分子生物学和电生理实验技术方面已有良好基础。

总之,申请者及其项目组主要成员已掌握了本项目的核心技术。项目组成员结构合理,具有高质量完成此项研究的技术力量及研究实力。

**3、承担科研项目情况**(申请人和项目组主要参与者正在承担的科研项目情况,包括自然科学基金的项目,要注明项目的名称和编号、经费来源、起止年月、与本项目的关系及负责的内容等);

无

**4、完成自然科学基金项目情况**(对申请人负责的前一个已结题科学基金项目(项目名称及批准号)完成情况、后续研究进展及与本申请项目的关系加以详细说明。另附该已结题项目研究工作总结摘要(限 500 字)和相关成果的详细目录)。

申请者负责承担国家自然科学基金课题《胃电刺激对 ICC 表型及 ICC-ENS 突触连接可塑性的影响》(NO. 30670775)的研究,起止时间为 2007.1-2009.12,资助金额 27 万元。实验工作已完成,并已完成结题工作。

项目 30670775 从成熟 ICC 与平滑肌表型转化角度研究了胃电刺激对 ICC 有修复作用。近 2 年新的研究进展显示 ICC 的修复除了与 ICC 表型转化有关外,一定条件下 ICC 前体细胞向成熟 ICC 分化及促进成熟 ICC 的存活和增殖相关因素也可能是重要部分。本课题在上一个已完成课题的基础上更深入探讨胃电刺激后修复的 ICC 的来源,进一步明确胃电刺激能否通过影响胰岛素/IGF-I、SCF/Kit 信号通路变化及调节 ICC 生存和增殖的相关因子而促进 ICC 修复,深入研究胃电刺激促进 ICC 修复的机制,为胃电刺激治疗胃



动力障碍性疾病提供新的理论依据。

《胃电刺激对 ICC 表型及 ICC-ENS 突触连接可塑性的影响》(NO. 30670775) 工作总结摘要:

Cajal 间质细胞 (ICC) 是胃肠道神经与肌肉之间连接所不可缺少的细胞。SCF/Kit 信号在 ICC 的生长分化和表型维持中以及神经元突触可塑性过程中起重要作用。本研究以糖尿病胃轻瘫大鼠为模型, 研究疾病不同时期 ICC 表型和 ICC-ENS 突触连接的变化以及 SCF/KIT 信号通路的变化, 进而了解胃电刺激对其影响。主要数据与结论: 糖尿病大鼠胃内 ICC 表型可能在病程第 4 周起向平滑肌表型转化, 病程中伴有胃内肌间层神经变性, 突触囊泡和所含的神经递质随糖尿病病程延长而减少。糖尿病胃轻瘫大鼠 ICC 外向钾电流增大, 且更易激活, 内向整流钾电流减少且翻转电位由 -88mV 变为 -105mV, 表明 ICC 兴奋性降低并有助于负电位的维持。SCF 表达第 2 周起显著下降且随其病程延长而减少, 且与 c-kit 表达呈正相关。长脉冲胃电刺激能增加糖尿病大鼠胃 ICC-ENS 突触重塑, 可能通过增高 M-SCF 表达来影响 ICC 表型, 早期、慢性的胃电刺激效果更佳。慢性胃电刺激 4 周可能促使糖尿病大鼠胃内部分向平滑肌转化的 ICC 表型逆转。本研究说明胃电刺激能促使 ICC 表型逆转和突触重塑来恢复胃肠动力, 为功能型胃肠病的治疗提供了新思路。

项目 30670775 已有如下成果, 其他资料正在整理中, 相关论文正陆续投稿和相继发表。

#### 相关成果:

参加2009年美国DDW会议, 壁报交流两篇。

参加2009年在韩国首尔举办的第一届亚洲胃肠神经动力会, 大会发言。

已发表文章:

1. Li C, **Liu S**, Guan Y, Qian W, Du F, Hou X. Long pulse gastric electrical stimulation induces regeneration of myenteric plexus synaptic vesicles in diabetic rats. *Neurogastroenterol Motil.* 2010; 22: 453-461.
2. Li C, **Liu S**, Guan Y, Qian W, Hou X. Long pulse gastric electric stimulation induces regeneration of myenteric plexus neurons and synaptophysin in diabetic rats. *Gastroenterology* 2009, 136, Supplement 1, A-274.



3. Li C, **Liu S**, Guan Y, Qian W, Hou X. Effects of long pulse gastric electrical stimulation on phenotype plasticity of ICC in diabetic rats induced by STZ. Gastroenterology 2009, 136, Supplement 1, A-580.
4. 田爱霞, 钱伟, **刘诗**. 糖尿病胃轻瘫大鼠胃窦PSD95和Synapsin- I 的表达和意义. 世界华人消化杂志 2010; 18: 1417-1421.(通讯作者)
5. Xu J, Chen Y, **Liu S**, Hou X. Electroacupuncture at Zusanli (ST-36) restores impaired interstitial cells of Cajal and regulates stem cell factor pathway in the colon of diabetic rats. J Evid Based Complementary Altern Med. (SCI 收录, 已接收, 通讯作者, 通过该杂志的网站可查到该文章, DOI: 10.1177/2156587211436235)

**(三) 经费申请说明** 购置单项经费 5 万元以上固定资产及设备, 须逐项说明与项目研究的直接相关性及其必要性。

本项目申请经费合计 85 万元, 包括:

1. 研究经费 62.8 万元

1) 科研业务费 16.5 万元

① 测试/计算/分析费 10.1 万元

检测项目 1: 流式 (100 元/标本\*80\*2=1.6 万)

检测项目 2: 共聚焦 (150 元/小时\*140 小时=2.1 万)

检测项目 3: 电镜 (400 元/标本, 共 6.4 万元)

② 能源/动力费: 实验室水、电、煤等费用, 共 14000 元

③ 会议费/差旅费: 参加国内学术交流 6 人次, 每人次 5000 元, 共 3 万元。

④ 出版物/文献/信息传播费 2 万元

拟发表 SCI 论文 4 篇, 中文论文 3 篇, 版面费约 1.6 万元;

资料、印刷、文献检索与信息传播费, 约 0.4 万元。

⑤ 其他: 无

2) 实验材料费 46.3 万元

① 原材料/试剂/药品购置费 41.8 万元

材料 1: SD 大鼠 (25 元/只\*80 只=0.2 万; 饲料 2.8 元/斤\*500 斤=1400 元; 垫料 2 包/天\*30 天\*20 元/包=1200 元)

材料 2: STZ (1500 元/支\*2 支=0.3 万)

材料 3: 血糖试纸 (250 元/盒\*10 盒=0.25 万)





材料 4: 抗体(Kit, Ano1, CD44, CD34, IGF-IR, InsR, SCF, HO-1, nNOS, SMA, myosin11, ki67, Brdu 等, 共 12 万)

材料 5: ELISA 试剂盒 (S-SCF, 5-HT, IL-9, IGF-1 等, 共 3 万)

材料 6: Western Blot (M-SCF, n NOS, HO-1 等, 共 15 万)

材料 7: Real-time PCR (M-SCF, n NOS, HO-1 等, 共 5.5 万)

材料 8: 胰岛素放射免疫法 (10 元/个\*80 个=800 元)

材料 9: 拮抗剂等其他试剂共 5.21 万

② 其他 4.5 万元

购买离心管、吸头及其它试验用一次性耗材; 显微解剖镊及手术器械。

3) 仪器设备费

① 购置: 无

② 试制: 无

4) 实验室改装费

无

5) 协作费

无

2. 国际合作与交流费 8 万元

1) 项目组成员出国合作交流 8 万元

项目组成员参加国际学术交流 2 人次, 每人次 4 万元, 共 8 万元。

2) 境外专家来华合作交流 无

3. 劳务费 10 万元

直接参加项目研究的硕士生、博士生共 5 名, 每人每月 500 元, 共 10 万元

4. 管理费 依托单位科研部门提取的课题管理费 4.2 万元

**(四) 申请人简介** (包括申请人和项目组主要参与者的学历 (从大学本科开始) 和研究工作经历, 近 3 年来已发表的与本项目有关的主要论著目录和获得学术奖励情况及在本项目中承担的任务。论著目录要求详细列出所有作者、论著题目、期刊名或出版社名、年、卷 (期)、起止页码等; 奖励情况也须详细列出全部获奖人员、奖励名称等级、授奖年等)



申请者：刘诗

### 1、个人简介（应包含本项目中承担的任务）

刘诗，教授，主任医师，博士生导师。专业：消化内科。承担工作：项目负责人

1986 年本科毕业于同济医科大学，1991 年获同济医科大学消化内科硕士学位。2005 年获得华中科技大学同济医学院消化内科博士学位。多年从事胃肠运动疾病的基础和临床研究。2003 作为访问学者赴美国德州大学医学分部交流学习 2 年，主要从事胃肠电刺激对胃肠运动的影响及机制研究。至今在国内以及国际学术杂志发表数篇相关论文。承担并完成了国家自然科学基金 2007.1-2009.12 资助项目“胃电刺激对 ICC 表型及 ICC-ENS 突触连接可塑性的影响”（No. 30670775），主要参与了国家科技支撑计划课题项目及国家高科技研究发展计划（863 计划）项目各一项。

### 2、大学开始受教育经历

例：××年—××年，单位，院系所，学历/学位，导师

1981 年-1986 年，同济医科大学，临床医学系，本科/学士学位

1988 年-1991 年，同济医科大学，消化内科，硕士研究生/硕士学位，易粹琼

2002 年-2005 年，华中科技大学同济医学院附属协和医院，消化内科，  
博士研究生/博士学位，侯晓华

### 3、研究工作经历

例：××年—××年，单位，院系所，职务

1986 年-1988 年，华中科技大学同济医学院附属协和医院，住院医师

1993 年-2000 年，华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科，主治医师

2000 年-2006 年，华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科，副教授，  
副主任医师

2006 年-2012 年，华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科，教授，主任医师

### 4、科研成果

1. Shi Liu, Suifeng Pen, Xiaohua Hou, Meiyun Ke, JD Chen. Transcutaneous electroacupuncture improves dyspeptic symptoms and increases high frequency heart rate variability in patients with functional dyspepsia. Neurogastroenterol Motil 2008; 20: 1204-1211. (SCI 收录)
2. Dan Luo, Shi Liu, Xiaopin Xie, Xiaohua Hou. Electroacupuncture at Acupoint ST-36 promotes contractility of distal colon via a cholinergic pathway in conscious rats. Dig Dis



- Sci. 2008; 53: 689-693. (SCI 收录, 通讯作者)
3. F Du, L Wang, W Qian, **S Liu**. Loss of enteric neurons accompanied by decreased expression of GDNF and PI3K/Akt pathway in diabetic rats. *Neurogastroenterol Motil*. 2009; 21: 1229-e114. (SCI 收录, 通讯作者)
4. Li C, **Liu S**, Guan Y, Qian W, Du F, Hou X. Long pulse gastric electrical stimulation induces regeneration of myenteric plexus synaptic vesicles in diabetic rats. *Neurogastroenterol Motil*. 2010; 22: 453-461 (SCI 收录, 并列第一作者)
5. Chu D, Cheng P, Xiong H, Zhang J, **Liu S**, Hou X. Electroacupuncture at ST-36 relieves visceral hypersensitivity and decreases 5-HT(3) receptor level in the colon in chronic visceral hypersensitivity rats. *Int J Colorectal Dis*. 2011; 26: 569-574. (SCI 收录, 通讯作者)
6. Juanjuan Xu, Yan Chen, **Shi Liu**, Xiaohua Hou. Electroacupuncture at Zusanli (ST-36) restores impaired interstitial cells of Cajal and regulates stem cell factor pathway in the colon of diabetic rats. *J Evid Based Complementary Altern Med*. (SCI 收录, 已接收, 通讯作者, 通过该杂志的网站可查到该文章, DOI: 10.1177/2156587211436235)
7. 史宁, **刘诗**, 谢小平, 侯晓华. 经皮电神经刺激针灸穴位对慢传输型便秘患者的疗效。中华医学杂志 2009; 89: 947-950. (通讯作者)
8. 张俊君, 熊会玲, 褚丹, 程鹏飞, 钱伟, **刘诗**. 电针刺激足三里对内脏高敏感大鼠的影响及其机制。胃肠病学 2010; 15: 665-668. (通讯作者)

## 项目组主要参与者：杜凡

### 1、个人简介（应包含本项目中承担的任务）

杜凡, 主治医师。专业：内科学（消化）专业。承担工作：电镜观察

2006 年在华中科技大学同济医学院获得临床学士学位, 2006 年-2011 年在华中科技大学同济医学院附属协和医院硕博连读, 攻读博士学位, 于 2011 年获得博士学位, 师从刘诗教授。2011 年博士毕业后留院工作, 任同济医学院附属协和医院消化内科主治医师。研究生期间参与国家自然科学基金课题《胃电刺激对 ICC 表型及 ICC-ENS 突触连接可塑性的影响》(NO.30670775) 的研究。

### 2、大学开始受教育经历

例：××年—××年, 单位, 院系所, 学历/学位, 导师



2001 年-2006 年，华中科技大学同济医学院，临床医学系，本科/学士学位

2006 年-2011 年，华中科技大学同济医学院附属协和医院，消化内科，硕博连读  
博士研究生/博士学位，刘诗

### 3、研究工作经历

例：××年—××年，单位，院系所，职务

2006 年-2008 年，华中科技大学同济医学院附属协和医院，硕士研究生

2008 年-2011 年，华中科技大学同济医学院附属协和医院，博士研究生

2011 年-2012 年，华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科，主治医师

### 4、科研成果

1. **F Du**, L Wang, W Qian, S Liu. Loss of enteric neurons accompanied by decreased expression of GDNF and PI3K/Akt pathway in diabetic rats. *Neurogastroenterol Motil.* 2009; 21: 1229-e114.
2. C Li, S Liu, Y Guan, W Qian, **F Du**, X Hou. Long pulse gastric electrical stimulation induces regeneration of myenteric plexus synaptic vesicles in diabetic rats. *Neurogastroenterol Motil.* 2010; 22: 453-461, e108.
3. Wang L, **Du F**, Mao H, Wang HX, Zhao S. Prevalence and related risk factors of peripheral arterial disease in elderly patients with type 2 diabetes in Wuhan, Central China. *Chinese Medical Journal (Engl)* 2011, 124: 4264-4268.
4. 杜凡, 刘诗. 饮食疗法在肠易激综合征治疗中的作用. *临床消化杂志* 2008; 20: 262-263.
5. Yaser ALDUAIS, 孔浩, 谢小平, 杜凡, 刘诗, 侯晓华. 不透 X 线标记物法在评价结肠传输功能中的作用. *胃肠病学* 2011; 16: 337-340.

### (五) 其他需要说明的问题

无

### (六) 其他附件清单 (附件材料复印后随纸质《申请书》一并上交)

(随纸质申请书一同报送的附件清单, 如: 不具有高级专业技术职务、



同时也不具有博士学位的申请人应提供的推荐信；在职研究生申请项目的导师同意函等。在导师的同意函中，需要说明申请项目与学位论文的关系，承担项目后的工作时间和条件保证等）

NSFC 2012



Neurogastroenterol Motil (2006) 18, 62–68

doi: 10.1111/j.1365-2982.2005.00739.x

## Neural mechanisms involved in the inhibition of intestinal motility induced by intestinal electrical stimulation in conscious dogs

S. LIU,\* J. LIU\* & J. D. Z. CHEN\*\*

\*Division of Gastroenterology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA  
\*\*Transneurix, Mt Arlington, NJ, USA

**Abstract** The effects and mechanisms of intestinal electrical stimulation (IES) with long pulses on intestinal motility were investigated in conscious dogs. Eighteen dogs were equipped with serosal electrodes and an intestinal cannula in the small bowel. The first experiment was designed to study the effect of one-channel IES on intestinal motility and the extent of this effect. The second experiment was conducted to study the effect of IES on intestinal motility and the involvement of neural pathway. The IES with long pulses significantly inhibited intestinal motility. Intestinal motility of the entire measured segment (40–220 cm distal to the stimulation electrodes) was inhibited by 60–74% with the single-channel IES with long pulses. Hexamethonium, guanethidine, phentolamine, propranolol partially, but not  $N^G$ -nitro-L-arginine (L-NNA), ondansetron and naloxone prevented the inhibitory effect of IES on intestinal motility. We conclude that single-channel IES inhibits intestinal motility within a distance of at least 2 m. This inhibitory effect induced by IES with long pulses is mediated via sympathetic but not nitrergic, serotonergic 5-HT<sub>3</sub> and opiate pathway.

**Keywords** gastrointestinal motility, intestinal pacing, nitric oxide, obesity, sympathetic nerves.

### INTRODUCTION

While a number of studies have been performed regarding intestinal electrical stimulation (IES), the

effect of IES on intestinal contractile activity is not well known. Some studies have applied IES to slow down the intestinal transit for a possible treatment of dumping syndrome or short bowel syndrome,<sup>1,2</sup> or to enhance intestinal absorption.<sup>3</sup> More recent studies have shown an entrainment of intestinal slow waves,<sup>4,5</sup> an acceleration of intestinal transit,<sup>6</sup> and a decrease of fat absorption<sup>7</sup> with intestinal stimulation in dogs or rats. Apparently, all of these measurements, including intestinal transit, absorption and slow waves, are associated with small intestinal contractile activity or motility. In other words, intestinal motility plays an important role in the transit and absorption. However, little is known about the effect of IES on small intestinal motility.<sup>8</sup>

Different patterns of stimulus have been used for electrical stimulation of the stomach,<sup>9</sup> including: (i) long-pulse stimulation at the physiological frequency (the pulse width is in the order of milliseconds);<sup>4,10,11</sup> (ii) short-pulse and high-frequency stimulation (the pulse width is in the order of a few hundred microseconds);<sup>12</sup> (iii) stimulation with trains of short pulses.<sup>13,14</sup> However, the pattern of stimuli used for IES has been consistent: long pulse at a frequency close to the frequency of the intestinal slow waves.<sup>1–6,8</sup>

The aims of this study were therefore: (i) to investigate the effect of IES with long pulses on small intestinal contractile activity or motility; (ii) to study whether one-channel IES would be effective for the entire length of the small intestine; (iii) to investigate possible neural mechanisms by which the effect of IES on intestinal motility is mediated.

### MATERIALS AND METHODS

#### Preparation of animals

Eighteen healthy female hound dogs (22–29 kg) were selected for this study. After an overnight fast, a

Address for correspondence  
Jiande Chen PhD, GI Research, Route 0632, Room 221,  
Microbiology Building, 1108 The Strand, Galveston, TX  
77555-0632, USA.  
Tel: 409-747-3071, fax: 409-747-3084;  
e-mail: jianchen@utmb.edu  
Received: 14 December 2004  
Accepted for publication: 12 July 2005



## Transcutaneous electroacupuncture improves dyspeptic symptoms and increases high frequency heart rate variability in patients with functional dyspepsia

S. LIU,\* S. PENG,\* X. HOU,\* M. KE† & J. D. Z. CHEN‡

\*Division of Gastroenterology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan, China

†Division of Gastroenterology, Peijing Union Medical College Hospital, Beijing, China

‡Division of Gastroenterology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA

**Abstract** The aim of the study was to evaluate the therapeutic value and possible mechanisms of transcutaneous electroacupuncture (TEA) in a double-blind and cross-over study in patients with functional dyspepsia (FD). Twenty-seven patients with FD were enrolled and the study consisted of two parts: (i) acute effects of TEA at PC6 and ST36 on gastric slow waves and heart rate variability and (ii) chronic (2 weeks) effects of TEA at PC6 and ST36 on dyspepsia symptoms, gastric slow waves, heart rate variability and neuropeptide Y (NPY) and motilin. The results of this study are: (i) The dyspepsia symptom score was decreased by 55% at the end of chronic TEA and the improvement was significant ( $P < 0.01$ ); (ii) the high frequency (HF) assessed from the spectral analysis of heart rate variability was markedly increased with both acute TEA (76% increase,  $P = 0.01$ ) and chronic TEA (75% increase,  $P = 0.025$ ); (iii) gastric slow waves were not altered by either acute or chronic TEA; and (iv) the plasma level of NPY but not motilin was increased after chronic TEA. Non-invasive and needleless transcutaneous electroacupuncture at ST36 and PC6 markedly improves dyspepsia symptoms and the improvement may be associated with the increase in HF heart rate variability and the modulation of NPY.

**Keywords** acupuncture, functional dyspepsia, gastric myoelectrical activity, gastrointestinal motility, heart

rate variability, transcutaneous electrical nerve stimulation.

### INTRODUCTION

Functional dyspepsia (FD) is a symptom complex characterized by postprandial upper abdominal discomfort or pain, early satiety, nausea, vomiting, abdominal distension, bloating and anorexia in the absence of organic disease. Gastrointestinal motor abnormalities, altered visceral sensation and psychosocial factors have been reported to play pathophysiological roles in patients with FD. However, the underlying aetiology of FD remains poorly understood.

The outcome of the treatment for FD is unsatisfactory. Prokinetics, despite a sound pathophysiological basis, have given modest results in clinical trials, and the situation is similar for visceral analgesics.<sup>1</sup> Other drugs, such as acid suppressants and antidepressants have a therapeutic benefit in some patients with FD.<sup>2,3</sup> The patients with FD who fail to respond to conventional medications need further treatment options.

Acupuncture has been used to treat gastrointestinal symptoms in China for thousands of years. The most commonly used acupuncture points (acupoints) for the treatment of gastrointestinal symptoms are Neiguan (PC6) and Zusanli (ST36). In clinical research, manual acupuncture is commonly replaced with electroacupuncture that is more reproducible. In a comparative study, electroacupuncture was found to be as effective as manual acupuncture in treating pain.<sup>4</sup> Electroacupuncture at ST36 and PC6 has been documented to increase the regularity of gastric slow waves and accelerate gastric emptying of liquids in animals.<sup>5</sup> In recent studies, electroacupuncture was reported to

#### Address for correspondence

Jiande Chen PhD, G1 Research, Route 0632, Room 221, Microbiology Building, 108 The Strand, Galveston, TX 77555-0632, USA.

Tel: +1 409 747 3071; fax: +1 409 747 3084;

e-mail: jianchen@utmb.edu

Received: 16 October 2007

Accepted for publication: 26 May 2008



## neurogastroenterology &amp; motility

Neurogastroenterol Motil (2009) 21, 1229–e114

doi: 10.1111/j.1365-2982.2009.01379.x

## Loss of enteric neurons accompanied by decreased expression of GDNF and PI3K/Akt pathway in diabetic rats

F. DU,\* L. WANG,† W. QIAN\* &amp; S. LIU\*

\*Division of Gastroenterology, Union Hospital, Tongji medical college, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, China

†Division of Endocrinology, Center Hospital of Wuhan, Wuhan, China

**Abstract** To investigate the enteric neuropathy in diabetic rats and the role of glia cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and its signalling pathway PI3K/Akt in regulating enteric neurons survival. Male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into normal control group, diabetic groups (rats with diabetes for 4, 8 and 12 weeks respectively). Proximal and distal colon specimens were obtained from each rat. Phosphoinositol-3-kinase signalling pathway was analysed by Akt phosphorylation. Protein gene product 9.5 (PGP9.5) used as a pan-neuronal marker. The expressions of GDNF, phospho-Akt (p-Akt), neuronal nitric oxide synthase (nNOS) neurons, cholinergic [choline acetyltransferase (CHAT) stained] neurons and total neurons were measured by immunohistochemical streptavidin-biotin complex (SABC) methods. Western blot and real-time polymerase chain reaction methods for each specimen. (i) Expression of GDNF was significantly decreased in diabetes 8 and 12 weeks group compared with the control group in both proximal ( $P < 0.01$ ) and distal ( $P < 0.01$ ) colon. The change of GDNF expression was greater in the 12 weeks group than that in the 8 weeks group ( $P < 0.05$ ). There were no significant differences between the 4 weeks group and the control group in expression of GDNF ( $P > 0.05$ ). (ii) The change trend of Akt phosphorylation was the same with GDNF. (iii) The numbers of nNOS, CHAT neurons and total neurons in proximal and distal colon were decreased significantly during the course of

diabetes ( $P < 0.05$ ). Diabetes can significantly induce enteric neuropathy. This change may be mediated, in partly, via a reduction of GDNF and its main downstream signalling pathway PI3K/Akt, which is a survival signal for enteric neurons.

**Keywords** diabetes, enteric neuropathy, GDNF, PI3K/Akt.

## INTRODUCTION

Gastrointestinal (GI) symptoms are common among patients with diabetes mellitus (DM), as many as 75% patients with DM experience various GI symptoms, such as abdominal pain or discomfort, early satiety, postprandial fullness, bloating, nausea, vomiting, diarrhoea, constipation and heartburn.<sup>1</sup> These symptoms are related with dysfunction of the GI motility. The pathogenesis underlying the GI dysfunction in diabetes is still under research, and the role of enteric nervous system (ENS) and its neurotransmitters have gained significance over the past few years. The ENS presents throughout the entire GI tract, and comprise excitatory and inhibitory neurons which control and coordinate the motility of the GI tract. Altered GI function in diabetes may be associated with peripheral enteric neuropathy. Previous studies reported that the mechanisms of diabetic enteric neuropathy include increased neuronal apoptosis, oxidative stress, advanced glycation end product and their receptors, changes of nerve growth factors and impaired brain-gut interactions.<sup>2</sup> Loss of enteric neurons has been described in short-term diabetes<sup>3</sup> and nearly all parts of GI tract in diabetes.<sup>2</sup> However, the exact mechanism of enteric neuronal damage in diabetes is not well understood.

Glia cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) is a very important neurotrophic factor for the ENS,<sup>4</sup> which is involved in regulating many critical aspects

Address for correspondence:

Shi Liu, PhD, 1277# Jie Fang Road, Wuhan, Hubei 430022, China.

Tel: 86 27 85726381; fax: 86 27 85726930;

e-mail: shiliugao@yahoo.com

Received: 12 November 2008

Accepted for publication: 15 July 2009





Int J Colorectal Dis  
DOI 10.1007/s00384-010-1087-2

## ORIGINAL ARTICLE

## Electroacupuncture at ST-36 relieves visceral hypersensitivity and decreases 5-HT<sub>3</sub> receptor level in the colon in chronic visceral hypersensitivity rats

Dan Chu · Pengfei Cheng · Huiling Xiong ·  
Junjun Zhang · Shi Liu · Xiaohua Hou

Accepted: 27 October 2010  
© Springer-Verlag 2010

### Abstract

**Purpose** Visceral hypersensitivity is an important pathological mechanism of irritable bowel syndrome. Electroacupuncture (EA) could relieve chronic visceral hypersensitivity (CVH) in rats. However, little information is available about the mechanism. The aim of this study was to confirm the effects of EA at acupoint ST-36 (Zusanli) on CVH induced by the chemical colorectal irritation during postnatal development of rats, and to explore the possible 5-HT<sub>3</sub> receptor mechanism.

**Methods** Rats were randomized into four groups, including the normal control group, CVH group, CVH with EA group, and CVH with sham EA group. The abdominal electromyogram (EMG) in response to colorectal distension was selected as the index for measurement of visceral hypersensitivity. 5-HT<sub>3</sub> receptors were analyzed through reverse transcription-polymerase chain reaction and western blot.

**Results** EA at ST-36 significantly decreased evoked EMG. The expression of 5-HT<sub>3</sub> receptor in the colon was increased in rats with CVH, and decreased after EA treatment.

**Conclusions** EA at acupoint ST-36 attenuates CVH in rats and decreases 5-HT<sub>3</sub> receptor level in the colon. Decreased 5-HT<sub>3</sub> receptor level in the colon may mediate the beneficial effect of EA in rats with CVH.

**Keywords** Electroacupuncture · ST-36 · Visceral hypersensitivity · Colorectal distension · 5-HT<sub>3</sub> receptor

Dan Chu and Pengfei Cheng contributed equally to this work.

D. Chu · P. Cheng · H. Xiong · J. Zhang · S. Liu (✉) · X. Hou  
Division of Gastroenterology, Union Hospital, Tongji Medical  
College, Huazhong University of Science and Technology,  
1277 Jie Fang Road,  
Wuhan, Hubei, China 430022  
e-mail: shiliugao@yahoo.com

### Introduction

Chronic visceral hypersensitivity (CVH) has been recognized as a characteristic of patients with irritable bowel syndrome (IBS). There is general agreement that patients with IBS are more sensitive to colorectal distension (CRD) than healthy controls. Nowadays, we know CVH plays an important role in the pathogenesis of gastrointestinal functional disorders, and there have been some drugs which could be used to attenuate visceral hypersensitivity in patients [1]. However, the treatment was not satisfactory as well as the slow onset, and the side effects could not be overcome. Therefore, it is necessary to find an effective and low-cost treatment for IBS patients.

Acupuncture has been used empirically in clinical practice in oriental countries for several millennia and appears to be a promising treatment for IBS [2]. Recently, a few investigations showed that acupuncture can attenuate CVH in rats [2, 3]. However, it is still necessary to provide consolidated evidences to validate the efficacy of acupuncture on visceral hypersensitivity. Electroacupuncture (EA) is a modification of acupuncture that stimulates acupoints with electrical current instead of manual manipulations, and appears to have more consistently reproducible results in both clinical and research settings [4, 5]. ST-36 (Zusanli) is one of the most commonly used acupoints for gastrointestinal diseases.

5-hydroxytryptamine (5-HT), also called serotonin, is an important neurotransmitter as well as a vaso-active substance. 5-HT could influence the motion, sense, and secretion of gastrointestinal tract by different subtype receptors. Some studies showed that dual inactivation of both 5-HT<sub>4</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors induces visceral analgesia [6] and 5-HT<sub>3</sub> receptors are involved in visceral nociceptive transmission, perhaps located on primary afferent or spinal

Published online: 10 November 2010

Springer



## neurogastroenterology &amp; motility

Neurogastroenterol Motil (2010) 22, 453–e108

doi: 10.1111/j.1365-2982.2009.01420.x

## Long pulse gastric electrical stimulation induces regeneration of myenteric plexus synaptic vesicles in diabetic rats

C. LI,\* S. LIU,\* Y. GUAN,† W. QIAN,\* F. DU\* &amp; X. HOU\*

\*Division of Gastroenterology, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, China

†Research Center of Ultrastructural Pathology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, China

## Abstract

**Background** Gastric electrical stimulation (GES) may improve delayed gastric emptying in diabetic gastroparesis, but whether enteric nervous system (ENS) is directly involved in its mechanism of improvement in gastric motility is unclear. The aims were to investigate the correlation between the changes in ENS and effects of long pulse GES on them in diabetic rats induced by streptozotocin (STZ). **Methods** Electron microscopy, immunohistochemistry, RT-PCR and western blot were used to evaluate changes of myenteric plexus neurons and synaptic vesicles in different stages of the diabetic rats. The effects of GES were detected by same methods after pacing wires were implanted and then diabetes was induced and followed by long pulse GES. **Key Results** Since 6 weeks after STZ injection, the nerve fibres were incompact and synaptic vesicles in myenteric neurons reduced. Furthermore, the myenteric neurons showed severe damage such as partial depletion of the axon, swelling of mitochondria and seriously decreased synaptic vesicles in 12 weeks after STZ injection. The synaptophysin and PGP9.5-positive area and expressions of synaptophysin mRNA and protein decreased with the duration of diabetes. Long pulse GES could induce increase of myenteric neuronal synaptic vesicles, synaptophysin and PGP9.5-positive area and in myenteric plexus. The synaptophysin

mRNA and protein expression rose after GES, whatever GES beginning early or late, short-term or long-term. **Conclusions & Inferences** The longer duration of diabetes, the more significant damages to myenteric neurons and synaptic vesicles of diabetic rats; long pulse GES could induce regeneration of myenteric plexus synaptic vesicles, thereby reform gastric motility.

**Keywords** diabetes mellitus, enteric nervous system, gastric electrical stimulation, long pulse, synaptic vesicles, synaptophysin.

## INTRODUCTION

Delayed gastric emptying is frequently observed in patients with long-standing type 1 and type 2 diabetes mellitus, and potentially impacts on upper gastrointestinal symptoms, glycaemic control, nutrition and oral drug absorption.<sup>1</sup> There was no any exact role of pharmacological management in case of diabetics but a number of recent non-pharmacological therapies show promise, including gastric electrical stimulation (GES) that both low and high-frequency stimulation may alleviate symptoms.<sup>2–8</sup>

Although some researches, primarily in animals, point to a defect in the enteric nervous system as a major molecular cause of abnormal gastric motility in diabetes, but the previous studies seldom investigated effects of GES on enteric nervous system. Liu *et al.*<sup>9</sup> found that GES normalized delayed gastric emptying in diabetic rats and this normalization was not attributed to the effect of GES on gastric slow waves. In addition, Song *et al.*<sup>10</sup> demonstrated that the effect of synchronized GES on gastric emptying was mediated via the

## Address for correspondence

Xiaohua Hou MD, PhD, Division of Gastroenterology, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022, China.  
Tel: 86-27-85726930; fax: 86-27-85776343;  
e-mail: houxh@public.wh.hb.cn

Received: 11 March 2009

Accepted for publication: 10 September 2009



## 签字和盖章页

申请人：刘诗

依托单位：华中科技大学

项目名称：长脉冲胃电刺激促进 Cajal 间质细胞修复的机制研究

资助类别：面上项目

亚类说明：

附注说明：

### 申请人承诺：

我保证申请书内容的真实性。如果获得资助，我将履行项目负责人职责，严格遵守国家自然科学基金委员会的有关规定，切实保证研究工作时间，认真开展工作，按时报送有关材料。若填报失实和违反规定，本人将承担全部责任。

签字：

### 项目组主要成员承诺：

我保证有关申报内容的真实性。如果获得资助，我将严格遵守国家自然科学基金委员会的有关规定，切实保证研究工作时间，加强合作、信息资源共享，认真开展工作，及时向项目负责人报送有关材料。若个人信息失实、执行项目中违反规定，本人将承担相关责任。

编号	姓 名	工作单位名称	项目分工	每年工作 时间 (月)	签 字
1	杜凡	华中科技大学	电镜研究	4	
2	余姣	华中科技大学	流式细胞学与免疫荧光	8	
3	廖奕	华中科技大学	动物模型与分子生物学	8	
4	周建宁	华中科技大学	免疫荧光共聚焦检测	4	
5	谢小平	华中科技大学	分子生物学实验及指导	4	
6	陈艳	华中科技大学	分子生物学实验	8	
7	巴莹	华中科技大学	电生理学试验	6	
8	熊艳华	华中科技大学	胃排空测定	8	
9					

### 依托单位及合作研究单位承诺：

已按填报说明对申请人的资格和申请书内容进行了审核。申请项目如获资助，我单位保证对研究计划实施所需要的人力、物力和工作时间等条件给予保障，严格遵守国家自然科学基金委员会有关规定，督促项目负责人和项目组成员以及本单位项目管理部门按照国家自然科学基金委员会的规定及时报送有关材料。

依托单位公章

合作研究单位公章 1

合作研究单位公章 2

日期：

日期：

日期：



申请代码	H0307
受理部门	
收件日期	
受理编号	8157041097



# 国家自然科学基金 申 请 书

(2015 版)

资助类别：	面上项目		
亚类说明：			
附注说明：	常规面上项目		
项目名称：	电针刺激诱导MSC归巢与分化修复胃肠道ICC的机制研究		
申 请 人：	刘诗	电 话：	13871162084
依托单位：	华中科技大学		
通讯地址：	湖北省武汉市解放大道1277号		
邮政编码：	430022	单位电话：	027-87543437
电子邮箱：	shiliugao@yahoo.com		
申报日期：	2015年03月03日		

国家自然科学基金委员会



## 基本信息

申请人信息	姓名	刘诗	性别	女	出生年月	1964年05月	民族	汉族
	学位	博士	职称	教授	每年工作时间（月）		8	
	电话	13871162084		电子邮箱	shiliugao@yahoo.com			
	传真			国别或地区	中国			
	个人通讯地址	湖北省武汉市解放大道1277号						
	工作单位	华中科技大学/协和医院						
	主要研究领域	胃肠动力性疾病基础与临床						
依托单位信息	名称	华中科技大学						
	联系人	游超	电子邮箱	kjcjcb@hust.edu.cn				
	电话	027-87543437	网站地址	www.hust.edu.cn				
合作研究单位信息	单位名称							
项目基本信息	项目名称	电针刺激诱导MSC归巢与分化修复胃肠道ICC的机制研究						
	英文名称	Mechanism of electroacupuncture stimulation on inducing MSC homing and differentiation to repair interstitial cells of Cajal						
	资助类别	面上项目				亚类说明		
	附注说明	常规面上项目						
	申请代码	H0307						
	基地类别							
	研究期限	2016年01月 -- 2019年12月				研究方向：食道胃动力异常		
	申请经费	97.0320万元						
中文关键词		电针刺激；Cajal间质细胞；间充质干细胞；归巢；定向分化						
英文关键词		Electroacupuncture stimulation; Interstitial cells of Cajal; Mesenchymal stem cells; Homing; Directed differentiation						



中文摘要	<p>胃肠道ICC缺失或严重损伤是多种胃肠道动力障碍性疾病的发病机制。目前已证实胃肠道ICC来源于间充质干细胞，我们前期研究发现电针足三里可促进ICC增殖修复损伤ICC从而增加胃肠动力。但电针足三里如何促进ICC增殖以及间充质干细胞来源分化机制尚不明确。本项目拟在前期工作基础上，采用GFP标记的间充质干细胞移植等技术，探讨电针刺激是否通过影响SDF-1/CXCR4介导PI-3K/AKT、MAPK/ERK1/2通路的活化以及相关趋化因子及受体表达，促进间充质干细胞迁移归巢，并进一步研究电针刺激是否通过影响Wnt和TGF-<math>\beta</math>通路变化来促进间充质干细胞定向分化ICC前体细胞，从而促进ICC增殖来修复损伤的ICC；同时探讨电针刺激是否通过影响Ano1和SCF/c-kit通路及MEK/ERK信号通路最终促进ICC增殖。深入研究电针刺激促进ICC修复的机制，为电针刺激治疗胃肠道动力障碍性疾病提供新的理论依据。</p>
英文摘要	<p>Deletion or serious injury of ICC in the gastrointestinal tract is the pathogenesis of a variety of gastrointestinal motility disorders. It has been proved that ICC in the gastrointestinal tract is derived from mesenchymal stem cells. Our previous study found that electroacupuncture could repair the damaged ICC through promoting the proliferation of ICC, thereby increasing the gastrointestinal motility. However, how does electroacupuncture promote the proliferation of ICC and the differentiation mechanism of mesenchymal stem cells is not clear. On the basis of our previous work, this project intends to investigate whether electroacupuncture is affected by SDF-1/CXCR4 to activate PI-3K/AKT and MAPK/ERK1/2 pathways to regulate the migration and homing of MSC, further promotes mesenchymal stem cell differentiation to ICC precursors through Wnt and TGF-<math>\beta</math> pathways using the transplantation technology of GFP labeled mesenchymal stem cell, further promote the proliferation of ICC to repair the damaged ICC; at the same time to investigate whether electroacupuncture stimulation affects Ano1 and SCF/c-kit pathways and intracellular MEK/ERK signaling pathway to promote the proliferation of ICC. Study on the mechanisms of electroacupuncture promoting the repair of ICC is needed, as electroacupuncture provides a new theoretical basis for the treatment of gastrointestinal motility disorders.</p>



## 项目组主要参与者（注：项目组主要参与者不包括项目申请人）

编号	姓名	出生年月	性别	职 称	学 位	单位名称	电话	电子邮箱	每年工作 时间（月）
1	杜凡	1983-07-23	女	主治医师	博士	华中科技大学	027-85723678	dufan511@163.com	8
2	陈艳	1983-09-06	女	博士生	硕士	华中科技大学	027-85726421	chenyanfeihong0906@163.com	8
3	李海	1988-01-05	男	博士生	学士	华中科技大学	027-85726113	66856709@qq.com	8
4	田陆高	1987-03-16	男	博士生	学士	华中科技大学	027-85726113	358537169@qq.com	8
5	周建宁	1978-09-21	男	主治医师	硕士	华中科技大学	027-85726447	deqe2000@163.com	4
6	谢小平	1962-08-07	男	主管技师	学士	华中科技大学	027-85726113	xiexiaoping63@126.com	4
7	余明蔚	1990-06-09	女	硕士生	学士	华中科技大学	027-85726241	mingweiyu59@gmail.com	6
8	朱贝贝	1992-10-11	女	硕士生	学士	华中科技大学	027-85726113	121688893@qq.com	8

总人数	高级	中级	初级	博士后	博士生	硕士生
9	1	3			3	2



## 国家自然科学基金项目资金预算表（定额补助）

项目名称：电针刺激诱导MSC归巢与分化修复胃肠道ICC的机制研究

项目负责人：刘诗

金额单位：万元

序号	科目名称	金额	备注
	(1)	(2)	(3)
1	一、项目资金支出	97.0320	/
2	（一）直接费用	80.8600	
3	1、设备费	0.0000	
4	（1）设备购置费	0.0000	
5	（2）设备试制费	0.0000	
6	（3）设备改造与租赁费	0.0000	
7	2、材料费	49.0000	试验用各种抗体，药物，动物等
8	3、测试化验加工费	10.8000	电镜，流式，共聚焦
9	4、燃料动力费	0.5000	实验室水电费
10	5、差旅费	2.5000	国内学术交流
11	6、会议费	0.0000	
12	7、国际合作与交流费	6.0000	参加国际会议DDW交流
13	8、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	3.5000	版面费、文献检索费
14	9、劳务费	8.5600	直接参加项目研究的硕士生、博士生的劳务费
15	10、专家咨询费	0.0000	
16	11、其他支出	0.0000	
17	（二）间接费用	16.1720	
18	其中：绩效支出	4.0430	
19	二、自筹资金	0.0000	





## 预算说明书

本项目申请经费合计97.03万元，包括：

（一）直接费用 80.86 万元

1、设备费0万元

2、材料费：49.0万元，主要用于实验试剂、药品和实验动物等

1) 试剂/药品购置费：48.55万元

材料1：野生型C57BL/6小鼠（20元/只\*100只=0.20万元；饲料2.8元/斤\*170斤=500元；GFP-转基因C57BL/6小鼠（500/只\*20只=1万元）

材料2：STZ（1500元/支\*2支=0.3万）

材料3：血糖试纸（250元/盒\*12盒=0.3万）

材料4：抗体c-kit, Anol, CD44, CD34, IGF-IR, InsR, SCF, MEK, ERK, Wnt,  $\beta$ -catenin, TGF- $\beta$ 1, Smad, CXCR4, AKT, ki67, Brdu等，共15万；

材料5：ELISA试剂盒（SCF, SDF-1等，共1.7万）

材料6：Western Blot 相关抗体试剂等，共13万；

材料7：Real-time PCR 荧光标记引物、试剂盒 等，共6.5万；

材料8：拮抗剂等其他试剂共5.5万；

材料9：购买体表电针、离心管、吸头及其它试验用一次性耗材；显微解剖镊及手术器械等共5万元

2) 实验动物的繁殖与饲养：0.45万元

动物房饲养费1.5元/只\*100只\*30天=4500元，共0.45万

3、测试化验加工费：10.8 万元

检测项目1：流式细胞术（100元/标本\*100\*2=2万）

检测项目2：共聚焦（150元/小时\*160小时=2.4万）

检测项目3：电镜（600元/标本，共6.4万元）

4、燃料动力费0.5万元

5、差旅费2.5万元：用于课题组成员参加国内学术交流的费用。参加国内学术交流5人次，每人5000元，共2.5万元。

6、会议费0万元

7、国际合作与交流费6万元

1) 项目组成员出国合作交流6万元：

项目组成员参加国际学术交流2人次，每人3万元，共6万元。

2) 境外专家来华合作交流 无

8、出版/文献/信息传播/知识产权事务费3.5万元

拟发表SCI论文4篇，中文论文3篇，版面费约2.5万元；

资料、印刷、文献检索与信息传播费，约1万元。

9、劳务费 8.56万元

直接参加项目研究的硕士生、博士生共5名，2名硕士研究生每年共计工作14个月，4年总费用为500元/月 $\times$ 14月 $\times$ 4年=2.8万元；3名博士研究生每年共计工作24个月，4年总费用为600元/月 $\times$ 24月 $\times$ 4年=5.76万元。共计8.56万元。

10、专家咨询费 0 万元

11、其它0万元

（二）间接费用：16.17 万元，其中绩效支出 4.04 万元



## 报告正文

### (一) 立项依据与研究内容 (4000-8000 字):

1. 项目的立项依据 (研究意义、国内外研究现状及发展动态分析, 需结合科学研究发展趋势来论述科学意义; 或结合国民经济和社会发展中迫切需要解决的关键科技问题来论述其应用前景。附主要参考文献目录);

胃肠动力障碍性疾病如婴幼儿增生性幽门狭窄、糖尿病胃轻瘫、慢性假性肠梗阻、慢传输型便秘、先天性肠闭锁、先天性巨结肠等是近年来消化道研究的热点, 此类疾病发病率高达 70%, 目前缺乏长期有效的治疗方法, 严重影响患者的正常工作生活, 同时给社会增加了大量医疗负担。电针刺激 (electroacupuncture, EA) 是将针灸针连到一个电脉冲发生器上, 通过电脉冲刺激针灸穴位, 因重复性好、副作用小而广泛应用于临床治疗和科学研究中。足三里 (ST36) 是足阳明胃经之主穴, 大量研究证实电针足三里对功能性消化不良、糖尿病胃轻瘫、慢传输型便秘等多种胃肠动力紊乱性疾病具有良好疗效<sup>[1]</sup>, 为电针疗法的临床应用提供了广阔的前景。我们早期研究亦显示电针足三里能明显改善功能性消化不良和慢传输型便秘患者的症状<sup>[2, 3]</sup>, 但其具体作用机制尚不明确, 有待进一步探讨。

Cajal 间质细胞 (interstitial cells of Cajal, ICC) 是胃肠道的起搏细胞, 以网络状结构分布于胃肠神经末梢和平滑肌细胞之间, 是胃肠道平滑肌运动的始动者与协调者。大量研究证实多种胃肠动力紊乱疾病如糖尿病胃轻瘫、慢传输型便秘、先天性巨结肠等与胃肠道 ICC 缺失或严重损伤有关<sup>[4]</sup>。同时, 我们前期研究显示电针足三里能加快糖尿病大鼠延迟的胃排空和结肠传输, 促进胃肠道 ICC 增殖, 修复损伤的 ICC<sup>[5, 6]</sup>。因此, 我们认为电针足三里可能通过促进胃肠道 ICC 增殖, 从而增加胃肠道动力, 治疗胃肠动力障碍性疾病。但电针足三里影响胃肠道 ICC 增殖的作用机制尚不清楚, 进一步阐明其影响 ICC 的作用途径及可能的作用机制, 可为电针疗法在临床中治疗 ICC 损伤所致胃肠动力障碍性疾病提供理论依据。

目前的研究表明损伤后 ICC 增殖可能来源于 ICC 前体细胞补充或者成熟 ICC 增殖<sup>[7]</sup>。早期研究证明, ICC 发展来源于组织局部的 ICC 前体细胞, 此类细胞在成年阶段可持续存在, 尽管数量很少, 但具有一些干细胞的特点, 在 c-kit 信号



的持续表达和刺激下，可分化为成熟 ICC<sup>[8]</sup>。c-kit 是表达于 ICC 表面的一种酪氨酸激酶受体，其配体为干细胞因子（stem cell factor, SCF）。此外，Ano1（anoctamin1）是一种  $\text{Ca}^{2+}$  激活的  $\text{Cl}^-$  通道蛋白，联合 c-kit 可特异性标记 ICC，同时最新研究证实 Ano1 参与 ICC 增殖的调节<sup>[9]</sup>。近期研究证实 CD44、CD34、胰岛素受体（insulin receptor, Insr）和胰岛素样生长因子-I 受体（insulin-like growth factor I receptor, IGF-IR/Igf1r）阳性而 Kit 低表达的细胞（Ano1<sup>+</sup> Kit<sup>low</sup> CD44<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> Insr<sup>+</sup> Igf1r<sup>+</sup>）是 ICC 前体细胞，可在 SCF/c-kit 信号作用下向成熟表型 ICC（Ano1<sup>+</sup> Kit<sup>high</sup> CD44<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup> Insr<sup>-</sup> Igf1r<sup>-</sup>）分化，因此 SCF/c-kit 信号在正常 ICC 网络的发育和维持中发挥重要作用<sup>[10]</sup>。此外，ICC 增殖亦可受多种下游细胞内信号转导通路的调节，其中 MEK/ERK 信号通路在细胞增殖分化中起着重要作用，近来研究报道 MEK/ERK 信号通路可维持 ICC 生存的核转录因子的稳定和表达，从而影响 ICC 的生存<sup>[11]</sup>。电针足三里能否通过影响 SCF/c-kit 信号及相关下游细胞内 MEK/ERK 信号通路，促进 ICC 前体细胞向成熟 ICC 增殖分化而修复损伤的 ICC，有待进一步研究。

目前已证实胃肠道 cajal 间质细胞起源于间充质干细胞（mesenchymal stem cells, MSC），胚胎肠外间充质中存在 kit<sup>+</sup>间充质细胞，持续表达 kit 的间充质细胞最终发育为 cajal 间质细胞表型。MSC 是存在于骨髓基质和组织器官血管周围微环境中的一群具有向多种细胞系分化潜能的非造血干细胞，因骨髓中含量最为丰富，又称骨髓间充质干细胞。MSC 无特异性分子标志物，常采用多种分子标志物联合鉴定（CD29、CD71、CD90 和 CD106 阳性表达而 CD45 和 CD34 阴性表达）。有研究证明<sup>[12-14]</sup>骨髓来源的 MSC 是胃肠道 ICC 的重要来源，移植的绿色荧光蛋白（Green fluorescent protein, GFP）标记的骨髓细胞迁移到胃肠道 ICC 网络并出现 GFP<sup>+</sup> kit<sup>+</sup>细胞，说明移植的骨髓细胞中的部分细胞能转化为 ICC 并加入 ICC 网络，从而改善小鼠因缺乏 ICC 所致的胃肠道运动障碍。同时研究亦证实归巢至糖尿病小鼠胃肠道的 GFP<sup>+</sup>骨髓细胞减少是糖尿病小鼠胃肠道 ICC 减少的重要原因<sup>[14]</sup>。另有研究表明 MSC 可在一定条件下分化为 ICC 前体细胞，ICC 前体细胞可进一步分化为成熟 ICC<sup>[15]</sup>。因此，我们推测电针足三里可能通过促进 MSC 向 ICC 前体细胞转化，并进一步分化为成熟 ICC 而修复 ICC，目前未见相关研究报道，需进一步的研究证实。



MSC 是一种循环的干细胞,在机体组织受损伤时,可经骨髓动员迁移归巢到损伤部位,参与自身修复。迁移归巢的机制尚不完全清楚,其中多种趋化因子/生长因子及受体、黏附分子以及损伤性电场是调节 MSC 迁移归巢的重要因素。近年来已证实,趋化因子受体 CXCR4 与其配体 stromal cell-derived factor (SDF)-1 在骨髓细胞动员及向损伤组织趋化过程中起着重要的介导作用<sup>[17]</sup>,SDF-1 通过剂量依赖的方式介导骨髓中 MSC 迁移至损伤部位。多项研究表明通过使用 CXCR4 特异性拮抗剂 AMD3100,SDF-1 介导的 MSC 迁移将被抑制。细胞外信号如 SDF-1 通过细胞膜受体转导至细胞内的 PI-3K/AKT 和 MAPK/ERK1/2 等下游信号转导通路是执行多种生物学功能的信号调控系统,调节 MSC 的迁移归巢<sup>[18]</sup>。PI-3K 在电场介导的细胞迁移归巢中起到核心作用,而 PI-3K 抑制剂 LY294002 会显著降低细胞迁移归巢速率。此外,MAPK/ERK1/2 信号通路亦在 SDF-1 介导的 MSC 迁移归巢中起到重要作用,SDF-1 介导的 MSC 迁移归巢需要胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 的活化,而 ERK 抑制剂 PD98059 会显著减慢 SDF-1 介导的 MSC 迁移归巢速率。同时有研究表明,溶血磷脂酸 (Lysophosphatidic acid, LPA) 与粒细胞集落刺激因子 (Granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF) 亦会影响 MSC 迁移归巢。阻断 LPA 受体 LPA<sub>1</sub> 后, MSC 的迁移归巢被明显抑制,而 G-CSF 则被证明能增加骨髓中被动员的 MSC 细胞数目。迁移归巢至损伤部位的 MSC 在局部微环境诱导下及 Wnt/ $\beta$ -catenin 和 TGF- $\beta$  1/Smad 信号转导通路作用下定向分化为特异的组织细胞<sup>[16]</sup>。在 MSC 定向分化为相应细胞时, $\beta$ -catenin 及 Smad 表达量显著增高,而阻断 Wnt 或 TGF- $\beta$  1 信号后 MSC 定向分化被明显抑制。同时,有研究证明电针刺激可以促进移植的 MSC 的存活、迁移归巢和定向分化,促进脊髓损伤后的神经元修复<sup>[19, 20]</sup>。因此,在糖尿病胃肠道 ICC 缺失和损伤的情况下,电针刺激是否也能通过促进 MSC 向胃肠道组织迁移,并进一步分化为 ICC 前体细胞及具体作用机制有待进一步研究。

电针刺激因疗效好,安全及价廉已被广泛地应用于胃肠动力障碍性疾病的动物研究和临床实践。然而,电针刺激的波形(连续波、疏密波及断续波)及参数(刺激频率和电流)都可能影响治疗效果,目前仍需要大量的工作加以选择和最优化。以往的经验及目前的研究现状提示断续波主要应用于电针刺激治疗胃肠道



症状和疾病中。同时，我们前期研究中发现低频（10Hz）和低频（100Hz）电针刺激能明显促进胃肠道 ICC 增殖，加快胃排空和结肠传输<sup>[5,6]</sup>。基于目前研究现状及我们的前期研究基础，本研究拟采用断续波的电针刺激（频率分别为 10 和 100Hz，电流 1mA）作用于足三里，探讨电针刺激是否能够促进骨髓 MSC 向胃肠道组织迁移归巢，定向分化为 ICC 前体细胞进一步发展为成熟 ICC，从而修复胃肠道损伤 ICC 网络，增加胃肠动力。

综上所述，本课题拟以糖尿病胃轻瘫小鼠为模型，探讨电针刺激对 ICC 的促增殖作用，研究电针刺激是否通过促进间充质干细胞向 ICC 前体细胞分化，从而促进 ICC 增殖来修复损伤的 ICC；并进一步研究电针刺激是否通过影响趋化因子 SDF-1/CXCR4 等活化来调节 MSC 的迁移归巢及调节 Wnt 和 TGF- $\beta$  通路促进 MSC 定向分化为 ICC 前体细胞；同时探讨电针刺激是否通过影响 Ano1 及 SCF/c-kit 通路及细胞内 MEK/ERK 信号通路最终促进 ICC 增殖。深入研究电针刺激促进 ICC 网络修复的机制，为电针刺激治疗胃肠动力障碍性疾病的临床应用提供理论依据。

## 参考文献

1. Ouyang H, Chen JD. Review article: therapeutic roles of acupuncture in functional gastrointestinal disorders. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004; 20: 831-41.
2. Liu S, Peng S, Hou X, et al. Transcutaneous electroacupuncture improves dyspeptic symptoms and increases high frequency heart rate variability in patients with functional dyspepsia. *Neurogastroenterol Motil.* 2008; 20: 1204-11.
3. 史宁，刘诗，谢小平，侯晓华。经皮电神经刺激针灸穴位对慢传输型便秘患者的疗效。中华医学杂志 2009; 89: 947-950.
4. Streutker CJ, Huizinga JD, Driman DK, et al. Interstitial cells of Cajal in health and disease. Part I: normal ICC structure and function with associated motility disorders. *Histopathology.* 2007; 50: 176-89.
5. Chen Y, Xu JJ, Liu S, Hou XH. Electroacupuncture at ST36 Ameliorates Delayed Gastric Emptying and Renovates Networks of Interstitial Cells of Cajal in the Stomach of Diabetic Rats. *PLoS One.* 2013; 8: e83904.
6. Xu J, Chen Y, Liu S, Hou X. Electroacupuncture regulates apoptosis/proliferation



- of intramuscular interstitial cells of cajal and restores colonic motility in diabetic constipation rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013; 2013: 584179.
7. Huizinga JD, Zarate N, Farrugia G. Physiology, injury, and recovery of interstitial cells of Cajal: basic and clinical science. *Gastroenterology*. 2009; 137: 1548-56.
  8. Lorincz A, Redelman D, Horvath VJ, et al. Progenitors of interstitial cells of Cajal in the postnatal murine stomach. *Gastroenterology*. 2008; 134: 1083-93.
  9. Stanich JE, Gibbons SJ, Eisenman ST, et al. Ano1 as a regulator of proliferation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011; 301: G1044-51.
  10. Rich A, Miller SM, Gibbons SJ, et al. Local presentation of steel factor increases expression of c-kit immunoreactive interstitial cells of Cajal in culture. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003; 284: G313-20.
  11. Chi P, Chen Y, Zhang L, et al. ETV1 is a lineage survival factor that cooperates with KIT in gastrointestinal stromal tumours. *Nature*. 2010; 467: 849-53.
  12. Liu D, Wang F, Zou Z, et al. Bone marrow derivation of interstitial cells of cajal in small intestine following intestinal injury. *J Biomed Biotechnol*. 2010; 2010: 164986.
  13. Ishii S, Tsuji S, Tsujii M, et al. Restoration of gut motility in Kit-deficient mice by bone marrow transplantation. *J Gastroenterol*. 2009; 44: 834-41.
  14. Li Y, Kojima H, Fujino K, et al. Homing of the bone marrow-derived interstitial cells of Cajal is decreased in diabetic mouse intestine. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011; 26: 1072-8.
  15. Huizinga JD, White EJ. Progenitor cells of interstitial cells of Cajal: on the road to tissue repair. *Gastroenterology*. 2008; 134: 1252-4.
  16. Hwang NS, Zhang C, Hwang YS, et al. Mesenchymal stem cell differentiation and roles in regenerative medicine. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2009; 1: 97-106.
  17. Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C, et al. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*. 2004; 104: 2643-5.
  18. Li L, Jiang J. Regulatory factors of mesenchymal stem cell migration into injured



tissues and their signal transduction mechanisms. *Front Med.* 2011; 5: 33-9.

19. Yan Q, Ruan JW, Ding Y, et al. Electro-acupuncture promotes differentiation of mesenchymal stem cells, regeneration of nerve fibers and partial function recovery after spinal cord injury. *Exp Toxicol Pathol.* 2011; 63:151-6.
20. Wu W, Zao H, Xie B, et al. Implanted spike wave electric stimulation promotes survival of the bone marrow mesenchymal stem cells and functional recovery in the spinal cord injured rats. *Neurosci Lett.* 2011; 491:73-8.

## 2. 项目的研究内容、研究目标,以及拟解决的关键科学问题(此部分为重点阐述内容);

### 研究内容:

#### 第一部分 电针刺激对间充质干细胞在胃肠道 ICC 网络修复的作用

- 1) 建立 GFP 骨髓移植小鼠模型及糖尿病小鼠模型。
- 2) 评价胃肠动力改变:
  - ①细胞内微电极法记录电针刺激后小鼠胃肠组织的慢波情况,分析电针刺激对胃肠慢波电活动的影响;
  - ②器官浴槽技术记录分析电针刺激对胃肠不同部位肌条收缩活动的影响;
  - ③酚红排空法测定电针刺激对胃排空和小肠传输的影响及 Evans 蓝灌胃测定整个胃肠道传输的影响;
- 3) 检测电针刺激后胃肠不同部位及不同类型 ICC 的变化,以及 GFP 阳性 ICC 的表达情况,包括超微结构、分子水平和蛋白表达。

#### 第二部分 电针刺激促进骨髓间充质干细胞迁移归巢的机制研究

- 1) 观察电针刺激对骨髓间充质干细胞的影响包括超微结构变化,相应分子水平和蛋白表达变化,胃肠 MSC 及 GFP 阳性 MSC 数量变化;
- 2) 观察电针刺激对 SDF-1/CXCR4 在骨髓间充质干细胞迁移归巢的作用;观察阻断 SDF-1 后电针刺激对骨髓间充质干细胞迁移归巢的影响;
- 3) 观察电针刺激对骨髓间充质干细胞内 PI-3K/AKT 和 MAPK/ERK1/2 信号通路活化的影响;观察分别特异性阻断 PI-3K/AKT、MAPK/ERK1/2 通路后电针刺激对骨髓间充质干细胞迁移归巢的影响。
- 4) 观察电针刺激对趋化因子 LPA, G-CSF 在骨髓间充质干细胞迁移归巢的作用;



观察阻断相应分子后电针刺激对骨髓间充质干细胞迁移归巢的影响。

### 第三部分 电针刺激促进间充质干细胞的定向分化为 ICC 前体细胞的机制研究

- 1) 观察电针刺激对 ICC 前体细胞 (Ano1<sup>+</sup> Kit<sup>low</sup> CD44<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> Insr<sup>+</sup> Igf1r<sup>+</sup>) 的数量及增殖变化的影响
- 2) 观察电针刺激对 Wnt/ $\beta$ -catenin、TGF- $\beta$ 1/Smad 的表达影响, 分析其与 ICC 前体细胞数量及增殖的关系;
- 3) 观察内源性阻断 Wnt/ $\beta$ -catenin、TGF- $\beta$ 1/Smad 后电针刺激对 ICC 前体细胞数量和增殖的影响。

### 第四部分 电针刺激促进胃肠道 ICC 增殖的调控机制研究

- 1) 观察电针刺激对胃肠不同部位及不同类型 ICC 的增殖数量变化;
- 2) 观察电针刺激对 SCF/c-kit、Ano1 的表达影响及与 ICC 增殖是否具有相关性; 观察内源性阻断 SCF/c-kit、Ano1 后电针刺激对 ICC 增殖的影响;
- 3) 观察电针刺激对 ICC 增殖的下游细胞内 MEK/ERK 信号通路的作用; 观察内源性阻断 MEK/ERK 信号通路后电针刺激对 ICC 增殖的影响;

#### 研究目标:

- 1) 研究电针刺激是否通过影响间充质干细胞向 ICC 前体细胞分化, 进一步促进 ICC 增殖而修复损伤的 ICC 网络, 从而改善紊乱的胃肠道运动功能。
- 2) 研究电针刺激是否通过影响 SDF-1/CXCR4 介导 PI-3K/AKT、MAPK/ERK1/2 通路的活化以及其它相关趋化因子及受体 (LPA/LPA1, G-CSF) 表达, 促进间充质干细胞迁移归巢而促进 ICC 修复。
- 3) 研究电针刺激是否通过影响 Wnt 和 TGF- $\beta$  通路变化来促进间充质干细胞定向分化 ICC 前体细胞进而促进 ICC 增殖。
- 4) 研究电针刺激是否通过 SCF/c-kit、Ano1 通路促进 ICC 增殖, 进一步通过下游 MEK/ERK 信号通路影响 ICC 增殖。
- 5) 深入研究电针刺激促进 ICC 网络修复的机制, 为电针刺激治疗胃肠动力障碍性疾病提供理论依据。

#### 拟解决的关键科学问题

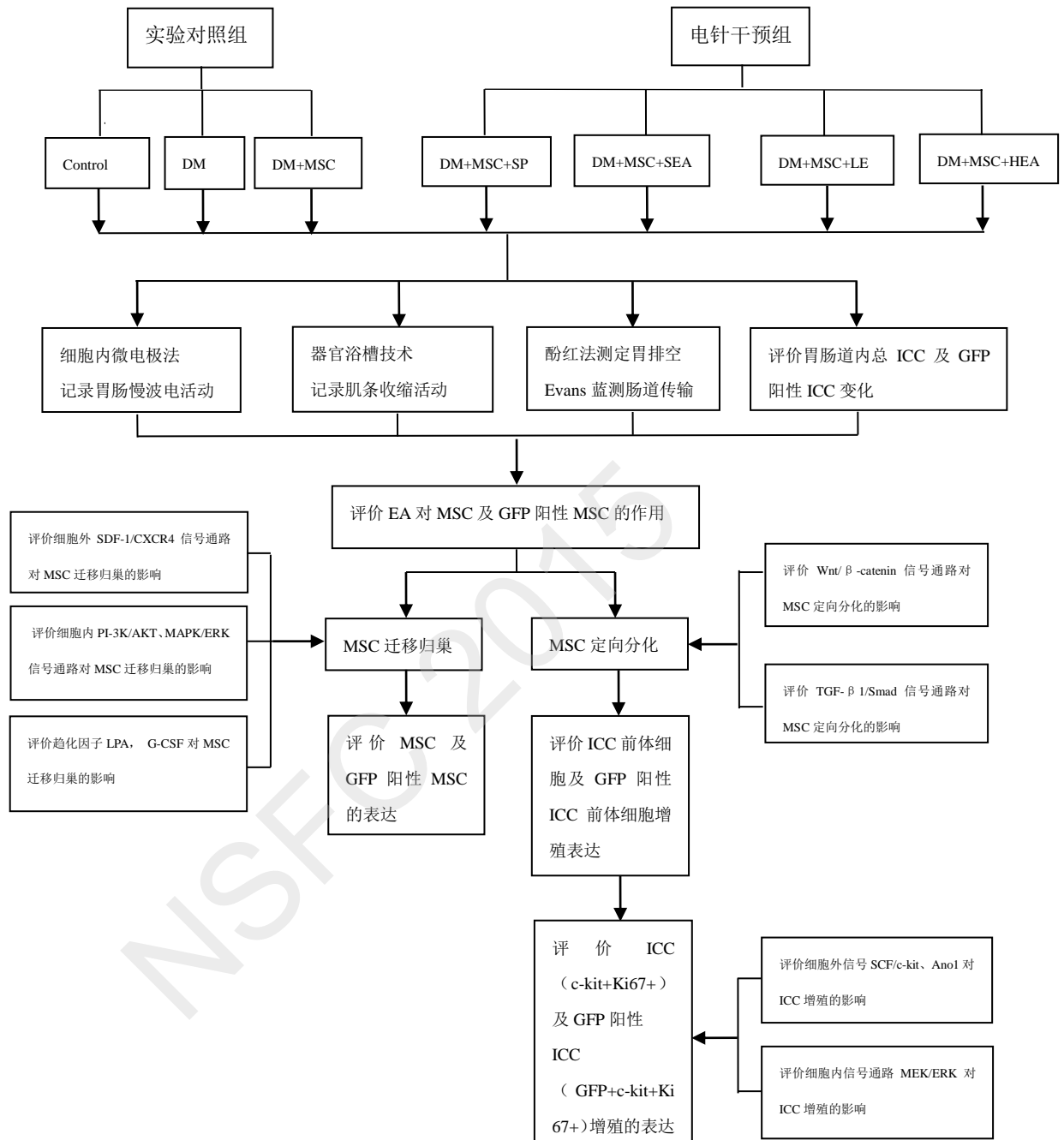




- 1) 胃肠慢波电活动记录: 采用细胞内微电极技术记录各组小鼠胃肠慢波电活动, 以往有文献报道记录方法, 但设备要求高, 实际操作中存在困难, 易被外界噪声干扰, 我们将采用密闭实验室减少外界干扰, 完成可信度高的慢波电活动记录。
- 2) MSC 标记: MSC 无特异性分子标志, 常需多种分子标志物联合鉴定, 一般认为骨髓间充质干细胞的重要标志物为整合素家族成员 CD29 及粘附分子 CD71、CD90、CD106 阳性而白细胞共同抗原 CD45 和造血干细胞标志物 CD34 阴性表达。
- 3) ICC 前体细胞标记: ICC 前体细胞的鉴定需结合 ICC 不同时期的表面标志 (kit、Ano1、CD44、CD34、InsR 和 IGF-IR) 共同确定, 最近国外有研究联合流式细胞术及荧光细胞活化分选系统、免疫荧光染色共聚焦显微镜观察等成功鉴定不同时期 ICC, 为我们鉴定 ICC 前体细胞奠定了基础。

3. 拟采取的研究方案及可行性分析 (包括研究方法、技术路线、实验手段、关键技术等说明);

技术路线





## 研究方案

### 第一部分 电针刺激对间充质干细胞在胃肠道 ICC 网络修复的作用研究

#### 1. 实验动物

GFP-转基因 C57BL/6 小鼠 (GFP-Tg 小鼠) 作为间充质干细胞的移植供体; 野生型 C57BL/6 小鼠 (6-8 周) 作为间充质干细胞的移植受体。

#### 2. 骨髓细胞 (bone marrow-derived cells, BMDCs) 准备

麻醉过量处死 GFP-转基因 C57BL/6 小鼠, 移除四肢, 用冷的 DMEM/F12 培养基 (含 10% 胎牛血清、100 IU 肝素、1% 双抗) 冲洗胫骨和股骨的髓腔, 充分吸取骨髓样品, 50- $\mu$ m 细胞滤网过滤, 离心, 用 DMEM/F12 培养基重悬细胞, 分析细胞活力 ( $\geq 95\%$ , 台盼蓝排除实验), 流式鉴定细胞表型和分析细胞浓度, 调整细胞浓度至  $1 \times 10^7/350 \mu\text{L}$  (每个受体接受的剂量)。

#### 3. 骨髓移植

野生型 C57BL/6 小鼠作为移植受体。辐照前 10 天及辐照后 2 周应用抗生素 (280 mg 红霉素和 320 mg 硫酸庆大霉素/L) 预防感染。骨髓细胞移植受体小鼠被给予致死性 9 Gy 的全身性辐照, 辐照后 3h 内, 尾静脉注射  $1 \times 10^7/350 \mu\text{L}$  的骨髓细胞, 对照组注射等体积的生理盐水。

#### 4. 糖尿病模型制备

糖尿病小鼠采用链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 溶液 150mg/kg (溶于 0.1 N 柠檬酸盐缓冲液, pH 4.5) 腹腔注射, 诱导糖尿病, 检测血糖持续升高  $\geq 250 \text{ mg/dL}$  为造模成功标准; 对照组注射等量的柠檬酸盐缓冲液。每两周监测血糖一次, 同时测体重, 并观察小鼠的食量、尿量、饮水情况等。

#### 5. 体表电针刺激

电针仪为 G6805-2A 型 (上海华谊医用仪器有限公司), 针灸针长为 7mm, 干预时直刺 3.5mm。足三里 (ST-36) 位于胫骨和腓骨之间, 胫骨前结节下侧约 3.5 mm 处。电针刺激为断续波, 参数为 10/100Hz、1 mA、30 min/天。刺激时间为慢性刺激, 共 4 和 8 周。

#### 6. 实验分组

共分为 6 组: 正常对照组 (Control group), 糖尿病组 (DM group), 糖尿病+MSC 移植组 (DM+MSC group), 糖尿病+ MSC 移植+非穴电针刺激



组 (DM+MSC+SP group, 于足三里穴位旁开 2 毫米处针刺), 糖尿病+ MSC 移植+假性电针刺激组 (DM+MSC+SEA group, 电针足三里穴位, 只针刺不通电), 糖尿病+ MSC 移植+低频电针刺激组 (DM+MSC+LEA group, 电针足三里, 频率为 10Hz), 糖尿病+ MSC 移植+高频电针刺激组 (DM+MSC+HEA group, 电针足三里, 频率为 100Hz)。

#### 7. 记录分析各组胃肠慢波电活动

采用细胞内微电极技术记录各组胃肠慢波电活动 (具体方法参见文献 Ordog T, et al. J Physiol 1999, 518: 257 - 69; Erickson JC, et al. IEEE Trans Biomed Eng 2009, 56: 2181-9.)。新鲜分离各组完整胃窦、胃体、肠道组织, 沿胃小弯及肠道纵向剪开, 在 krebs' s 液中去除胃肠道内容物, 将组织浆膜层面朝上平铺并固定于灌流槽中, 打开温水浴, 充氧, 灌流液灌流, 解剖显微镜下用显微镊剥离浆膜层, 待组织标本稳定 1 h 后, 用微操仪将充满 KCl (3mol/L) 的玻璃微电极插入标本。微电极拉制的电阻 40-100M $\Omega$ , 用微电极放大器记录结果。对记录到的慢波进行分析, 比较不同刺激参数电针刺激对慢波的影响。

#### 8. 器官浴槽技术记录分析胃肠道收缩活动

按常规方法去掉黏膜层, 分别取胃、小肠、结肠纵行肌和环行肌肌条长 8mm, 宽 2mm 分别安置在盛有 37 $^{\circ}$ C Krebs 液的恒温灌流肌槽不同通道内, 肌槽内持续供给 95%O<sub>2</sub> 和 5%CO<sub>2</sub> 的混合气体, 肌槽的外套管由超级恒温器提供循环 37 $^{\circ}$ C 的温水使肌槽保持恒温。肌条的一端固定在肌槽底部的玻璃弯钩上, 另一端固定在张力传感器上, 用记录仪记录肌条的等长收缩活动。肌条在 1 g 的前负荷下温育, 每 20min 更换 1 次 Krebs 液, 待肌条的自发收缩活动平衡 1h 达到平稳后, 开始加药乙酰胆碱 (Ach), 加入的药物容量为 25mL。观察肌条机械收缩情况。

用化学药物亚甲蓝 50 mmol/L+光照 50 mW/cm<sup>2</sup> 选择性破坏 ICC。光源采用可调聚光灯, 为可见光, 光波长 532.0 nm, 照射在距光源 3-5 cm 的组织表面, 照射时间为 5 min, 光照强度用数字测光表测出。该方法只破坏 ICC 结构而不破坏肌间神经网络及平滑肌细胞 (Liu LW, et al. Am J Physiol 1994; 266: G485-G496)。观察 ICC 破坏后肌条收缩情况, 以及 ICC 破坏前后肌条



收缩的改变。

## 9. 胃排空和肠传输测定

按照 Nagakura 等的方法, 以 0.3 ml 2.5% Evans 蓝(溶解于 1.5% 甲基纤维素溶液中)灌胃后, 将小鼠单独放置于白纸上, 利用粪便颜色的变化分析整个胃肠道传输时间(Nagakura Y, et al. Eur J Pharmacol. 1996; 311: 67-72.)。

胃排空及小肠传输时间的测定: 以 0.3 ml 0.05% 酚红(溶解于 1.5% 甲基纤维素溶液中)灌胃后 20min, 剖腹, 结扎贲门和幽门, 取出整个胃, 胃内容物在 0.1 N NaOH 中搅拌均匀, 采用分光光度法分析, 按照 Mashimo 等的方法计算胃排空, 计算公式: 胃排空率 =  $(1 - \text{实测酚红吸收光度值} / \text{标准酚红吸光度值}) \times 100\%$ 。小肠传输时间测定方法同胃排空检测, 取出胃及小肠后, 将小肠平铺于白纸上, 分别测量幽门至回盲肠部全长及幽门至酚红前沿的距离, 小肠传输则以酚红在小肠中的移行距离与小肠全长的百分比乘以 100% 作为小肠传输百分率来评价小肠传输速度(Mashimo H, et al. Gastroenterology. 2000; 119: 766-73.)。

## 10. 胃肠道 ICC 的表达

检测胃肠道组织总 ICC 表达及 GFP 阳性 ICC 的表达情况, 包括电镜下观察 ICC 超微结构变化, 实时荧光定量 PCR 法(Real-time PCR)检测 c-kit mRNA 表达, Western blot 法检测 c-kit 蛋白表达变化, 流式细胞术检测成熟 ICC ( $\text{Kit}^{\text{high}} \text{CD44}^+ \text{CD34}^- \text{Insr}^- \text{Igflr}^- \text{Ano1}^+$ ) 及 GFP 阳性 ICC 数目, 免疫荧光双标共聚焦显微镜观察切片和铺片各层次 ICC 和 GFP 阳性 ICC 的表达情况。

# 第二部分 电针刺激促进骨髓间充质干细胞迁移归巢的机制研究

## 1. 骨髓间充质干细胞的表达

应用流式细胞术及荧光细胞活化分选系统检测骨髓、外周血及胃肠组织 GFP 阳性 MSC 的数目, 免疫荧光共聚焦显微镜观察骨髓、外周血及胃肠组织 GFP 阳性 MSC 的表达情况。

## 2. SDF-1/CXCR4 介导 MSC 迁移归巢的作用



观察 SDF-1/CXCR4 信号通路：体外跨膜趋化实验评价各组 MSC 向 SDF-1 趋化能力；ELISA 法检测血清中 SDF-1 的表达；Western blot 法检测胃肠组织 CXCR4 mRNA 及蛋白表达。比较各组之间是否有显著性差异，同时分析上述通路的变化与胃肠道组织中 MSC 表达变化是否有相关性。

将糖尿病+MSC 移植+低/高频电针刺激组分为拮抗剂组和空白对照组，给拮抗剂组小鼠注射抗 CXCR4 中和抗体阻断 SDF-1/CXCR4 信号通路，空白组注射生理盐水后，观察电针刺激对骨髓、外周血及胃肠道 GFP 阳性 MSC 数量和迁移功能的影响。

### 3. *PI-3K/AKT、MAPK/ERK1/2 通路在 MSC 迁移归巢的作用*

观察 PI-3K/AKT、MAPK/ERK 信号通路：Western blot 法检测胃肠组织磷酸化 AKT、ERK、MEK 蛋白表达。比较各组之间是否有显著性差异，同时分析上述通路的变化与胃肠组织中 GFP 阳性 MSC 表达变化是否有相关性。

将糖尿病+MSC 移植+低/高频电针刺激组分为拮抗剂组和空白对照组，给拮抗剂组小鼠分别注射特异性阻断剂 LY294002（阻断 PI-3K/AKT 细胞内信号通路）和 PD0325901（阻断 MAPK/ERK 细胞内信号通路），空白组注射生理盐水后，观察电针刺激对胃肠组织中 GFP 阳性 MSC 数量和迁移功能的影响。

### 4. *相关趋化因子 LPA，G-CSF 在 MSC 迁移归巢的中的作用*

观察相关趋化因子及受体：ELISA 法检测血清中 LPA 和 G-CSF 表达水平变化，Western blot 法检测胃肠组织 LPA 受体 LPA<sub>1</sub> 表达水平变化；同时分析上述变化与胃肠组织中 GFP 阳性 MSC 表达量变化是否有相关性。

将糖尿病+MSC 移植+低/高频电针刺激组分为拮抗剂组和空白对照组，给拮抗剂组小鼠分别注射 LPA 受体阻断剂 Ki16425 及 G-CSF 拮抗剂，空白组注射生理盐水后，观察电针刺激对胃肠组织中 GFP 阳性 MSC 数量和迁移功能的影响。

## 第三部分 电针刺激促进 MSC 定向分化为 ICC 前体细胞的机制研究

### 1. *胃肠道 ICC 前体细胞的表达*



应用流式细胞术及荧光细胞活化分选系统(FACS)检测胃肠道组织 ICC 前体细胞 (Ano1<sup>+</sup> Kit<sup>low</sup> CD44<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> Insr<sup>+</sup> Igf1r<sup>+</sup>) 及 GFP 阳性 ICC 前体细胞数目, 免疫荧光共聚焦显微镜观察切片和铺片各层次 ICC 前体细胞和 GFP 阳性 ICC 前体细胞的表达情况。以 BrdU 标记检测 ICC 前体细胞增殖情况。

## 2. *Wnt/β-catenin 通路在 MSC 定向分化的作用*

观察 Wnt/β-catenin 信号通路: Western blot 法检测胃肠组织 Wnt、β-catenin 蛋白表达及磷酸化水平变化。比较各组之间是否有显著性差异, 同时分析上述通路的变化与 ICC 前体细胞的表达变化及增殖是否有相关性。

将糖尿病+MSC 移植+低/高频电针刺激组分为拮抗剂组和空白对照组, 给拮抗剂组小鼠注射 Wnt/β-catenin 信号通路受体阻断剂 DKK1, 空白组注射生理盐水后, 观察电针刺激对 ICC 前体细胞的表达及增殖的影响。

## 3. *TGF-β1/Smad 通路在 MSC 定向分化的作用*

观察 TGF-β1/Smad 信号通路: Western blot 法检测胃肠组织 TGF-β1、Smad 蛋白表达及磷酸化水平变化。比较各组之间是否有显著性差异, 同时分析上述通路的变化与 ICC 前体细胞的表达变化及增殖是否有相关性。

将糖尿病+MSC 移植+低/高频电针刺激组分为拮抗剂组和空白对照组, 给拮抗剂组小鼠注射 TGF-β1/Smad 信号通路阻断剂 SB505124, 空白组注射生理盐水后, 观察电针刺激对 ICC 前体细胞的表达及增殖的影响。

# 第四部分 电针刺激促进胃肠道 ICC 增殖的调控机制研究

## 1. *胃肠道 ICC 的增殖情况*

检测胃肠道组织总 ICC 及 GFP 阳性 ICC 增殖情况, 主要通过应用 c-kit 与 Ki67 双标流式细胞术及免疫荧光共聚焦显微镜观察切片和铺片不同部位各层次 ICC 增殖情况。

## 2. *SCF/c-kit、Ano1 通路在 ICC 增殖中的作用*

观察 SCF/c-kit、Ano1 信号通路: Western blot 法和 Real-time PCR 检测胃肠组织中 SCF、c-kit、Ano1 蛋白及 mRNA 表达变化, 酶联免疫吸附法



(ELISA) 检测血清中 SCF 的表达。比较各组之间是否有显著性差异, 同时分析上述通路的变化与 ICC 增殖是否有相关性。

将糖尿病+MSC 移植+低/高频电针刺激组分为拮抗剂组和空白对照组, 给拮抗剂组小鼠分别注射 SCF/c-kit 阻断剂 SCF 中和抗体和 T16A<sub>inh</sub>-A01 阻断 Ano1, 空白组注射生理盐水后, 观察电针刺激对 ICC 增殖变化的影响。

### 3. 电针刺激对 ICC 增殖相关的下游信号通路的作用

观察与 ICC 的增殖相关的下游 MEK/ERK 信号通路: Western blot 法检测胃肠组织中 MEK、ERK 蛋白表达及磷酸化水平变化。分析 MEK/ERK 信号通路的变化与 ICC 增殖是否有相关性。

将糖尿病+MSC 移植+低/高频电针刺激组分为拮抗剂组和空白对照组, 给拮抗剂组小鼠注射 MEK/ERK 信号通路阻断剂 PD0325901, 空白组注射生理盐水后, 观察电针刺激对 ICC 增殖变化的影响。

#### 可行性分析:

1. 理论基础: 间充质干细胞可定向分化为多种细胞, 细胞治疗也是目前的热点。目前已证实 ICC 可来源于间充质干细胞。我们前期研究证实电针刺激可修复损伤 ICC, 促进 ICC 增殖, 本课题基于先前大量工作基础提出的, 是我们前期工作的延续和深入。
2. 技术条件: 申请人亦负责两项国家自然科学基金项目 (《胃电刺激对 ICC 表型及 ICC-ENS 突触连接可塑性的影响》NO.30670775; 《长脉冲胃电刺激促进 cajal 间质细胞修复的机制研究》NO. 81270548)。课题组有丰富的电刺激研究及动力检测的经验。我们实验室已经熟练掌握 MSC 的分离与纯化技术, 并精通解剖显微镜下分离大鼠胃组织粘膜下层、肌间层和肠肌层的方法, 并成功进行 ICC 相关蛋白的免疫荧光染色及流式细胞技术。
3. 人员力量: 课题组主要成员由从事胃肠动力和分子生物学研究的专业人员共同组成。本课题组负责人长期从事胃肠动力方面的研究, 已掌握了与本实验有关的细胞生物学和分子生物学技术, 并有指导本项研究的工作能力。课题组其他成员也掌握了本课题所需要的动力研究、病理学、细胞学、分





子生物学技术等。

4. 实验设备：华中科技大学同济医学院具备完成本项目的所有仪器和设备包括激光共聚焦显微镜、流式细胞仪、荧光实时定量 PCR 仪，凝胶成像分析系统，实验所需的试剂及各种抗体都已商品化，均可购得。因此，本课题组已具备较强的技术力量及仪器设备等，为本课题的顺利完成提供了保证。

#### 4. 本项目的特色与创新之处；

1. 本课题围绕 MSC 可定向分化为 ICC 这一主题，从 ICC 的来源及发展角度研究了电针刺激对 ICC 有修复作用。通过多角度多方法多水平研究验证，电针刺激可促进 MSC 向 ICC 前体细胞定向分化从而促进 ICC 修复。
2. 尽管目前研究证实 MSC 来源可修复胃肠道 ICC 缺失，本研究在此基础上给予电针干预更有利于胃肠道 ICC 修复和改善胃肠道动力。本课题拟更进一步探讨电针刺激能否通过影响 Wnt/ $\beta$ -catenin、TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路促进 MSC 定向分化，及通过 PI-3K/AKT、MAPK/ERK1/2 信号通路促进 SDF-1/CXCR4 介导的 MSC 迁移归巢到胃肠道组织而促进 ICC 修复。
3. 本研究深入探讨了电针刺激促进 ICC 增殖修复的相关机制，为广泛应用电针刺激治疗胃肠动力障碍性疾病提供新的理论依据。

#### 5. 年度研究计划及预期研究结果（包括拟组织的重要学术交流活动、国际合作与交流计划等）。

##### 1) 年度研究计划

##### 第一阶段（2016.1—2016.12）

进行各项准备工作，包括试剂购买等；购买 GFP 标记小鼠，分离与纯化 MSC，制备糖尿病及骨髓移植小鼠模型。

研究电针刺激对 MSC 在胃肠道 ICC 网络修复的作用。

##### 第二阶段（2017.1—2017.12）

电针刺激通过调节 PI-3K/AKT、MAPK/ERK1/2 信号通路促进 SDF-1/CXCR4 介导的 MSC 迁移归巢到胃肠道组织的机制研究。拟派出 1 名课题主要参与成员进行国际学术交流。

##### 第三阶段（2018.1—2018.12）



研究电针刺激通过调控 Wnt/ $\beta$ -catenin、TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路促进 MSC 的定向分化为 ICC 前体细胞的机制研究。

#### 第四阶段（2019.1—2019.12）

研究电针刺激对胃肠道组织 ICC 增殖的作用及通过 SCF/c-kit、Ano1 和下游 MEK/ERK 信号通路对 ICC 增殖影响的机制研究。拟派出 1 名课题主要参与成员进行国际学术交流。

整理资料，统计数据，分析结果，论文撰写和结题工作。

### 2) 预期研究结果

#### 可预见结果

- ① 通过完成本项目，将明确电针刺激后 MSC 迁移归巢及定向分化从而修复 ICC，电针刺激治疗能否通过影响 Wnt/ $\beta$ -catenin、TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路调节 MSC 的定向分化及调节 PI-3K/AKT、MAPK/ERK1/2 信号通路促进 SDF-1/CXCR4 介导的 MSC 迁移归巢至胃肠道组织而促进 ICC 修复，进一步通过 SCF/c-kit, Ano1 及下游 MEK/ERK 信号通路影响 ICC 增殖。为丰富与发展电针刺激在调节胃肠道运动、治疗胃肠动力障碍性疾病中的作用提供理论依据。
- ② 培养硕士研究生 3-5 名，博士研究生 2-4 名。
- ③ 在国内外杂志上发表论文 5-7 篇。

#### 不可预见结果

研究过程中可能出现一些新问题，对此深入研究可能有新的发现；也可能部分预期结果不能得到，而得到一些其他有价值的结果。总之，研究过程中，应该细心发现实验中的新现象，及时作出相应调整，以期得到更多有价值的结果。

## （二）研究基础与工作条件

1. 工作基础（与本项目相关的研究工作积累和已取得的研究工作成绩）；

1) 申请者 2007 年中标的国家自然科学基金课题（《胃电刺激对 ICC 表型及 ICC-ENS 突触连接可塑性的影响》NO.30670775），从成熟 ICC 表型转化角度研



究了胃电刺激对 ICC 有修复作用。目前已顺利结题，已发表的文章如下：

1. Li C<sup>(#)</sup>, **Liu S<sup>(#)</sup>**, Guan Y, Qian W, Du F, Hou X<sup>(\*)</sup>. Long pulse gastric electrical stimulation induces regeneration of myenteric plexus synaptic vesicles in diabetic rats. Neurogastroenterol Motil. 2010; 22: 453-461. (SCI 收录)
2. Li C<sup>(#)</sup>, **Liu S<sup>(#)</sup>**, Guan Y, Qian W, Hou X<sup>(\*)</sup>. Long Pulse Gastric Electric Stimulation Induces Regeneration of Myoenteric Plexus Neurons and Synaptophysin in Diabetic Rats. Gastroenterology 2009, 136, Supplement 1, A-274.
3. Li C<sup>(#)</sup>, **Liu S<sup>(#)</sup>**, Guan Y, Qian W, Hou X<sup>(\*)</sup>. Effects of Long Pulse Gastric Electrical Stimulation On Phenotype Plasticity of ICC in Diabetic Rats Induced By STZ. Gastroenterology 2009, 136, Supplement 1, A-580.
4. F. Du<sup>(#)</sup>, L. Wang, W. Xian, **S. Liu<sup>(\*)</sup>**. Loss of enteric neurons accompanied by decreased expression of GDNF and PI3K/Akt pathway in diabetic rats. Neurogastroenterol Motil. 2009; 21: 1229-e114. (SCI 收录)

实验室研究已获得相关资料：

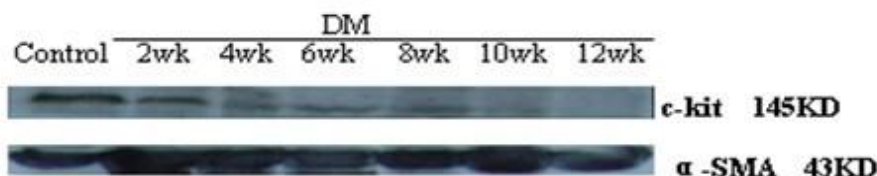
① **胃 ICC 表型在病程早期起向平滑肌表型转化。**

糖尿病 (DM) 组大鼠胃 c-Kit mRNA 和蛋白表达随 DM 病程延长而下降 (图 1)。DM 第 4 周起电镜下可见兼具 ICC 和平滑肌超微结构特征的“中间状态”的 ICC 细胞 (图 2)。

② **慢性胃电刺激可促使胃部分向平滑肌表型转化的 ICC 表型逆转。**

慢性胃电刺激 4 周后，较假性刺激组更易见到兼具 ICC 和平滑肌超微结构特征的 ICC 细胞；免疫染色更易见到 c-kit 和 desmin、c-kit 和 SMHC 双重阳性免疫荧光染色的 ICC 细胞 (图 3)。

③ **早期开始的慢性的胃电刺激使胃组织 M-SCF 表达增加更明显 (图 4)。**



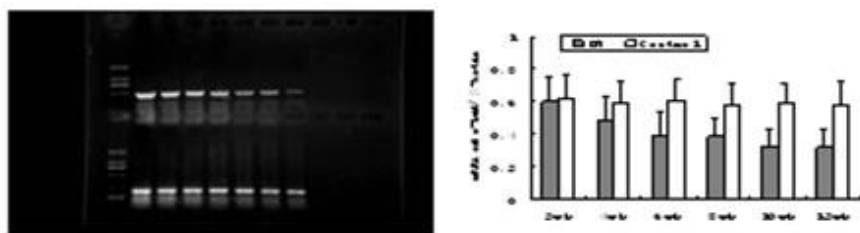


图 1 糖尿病大鼠胃 ICC 蛋白和 mRNA 水平的变化

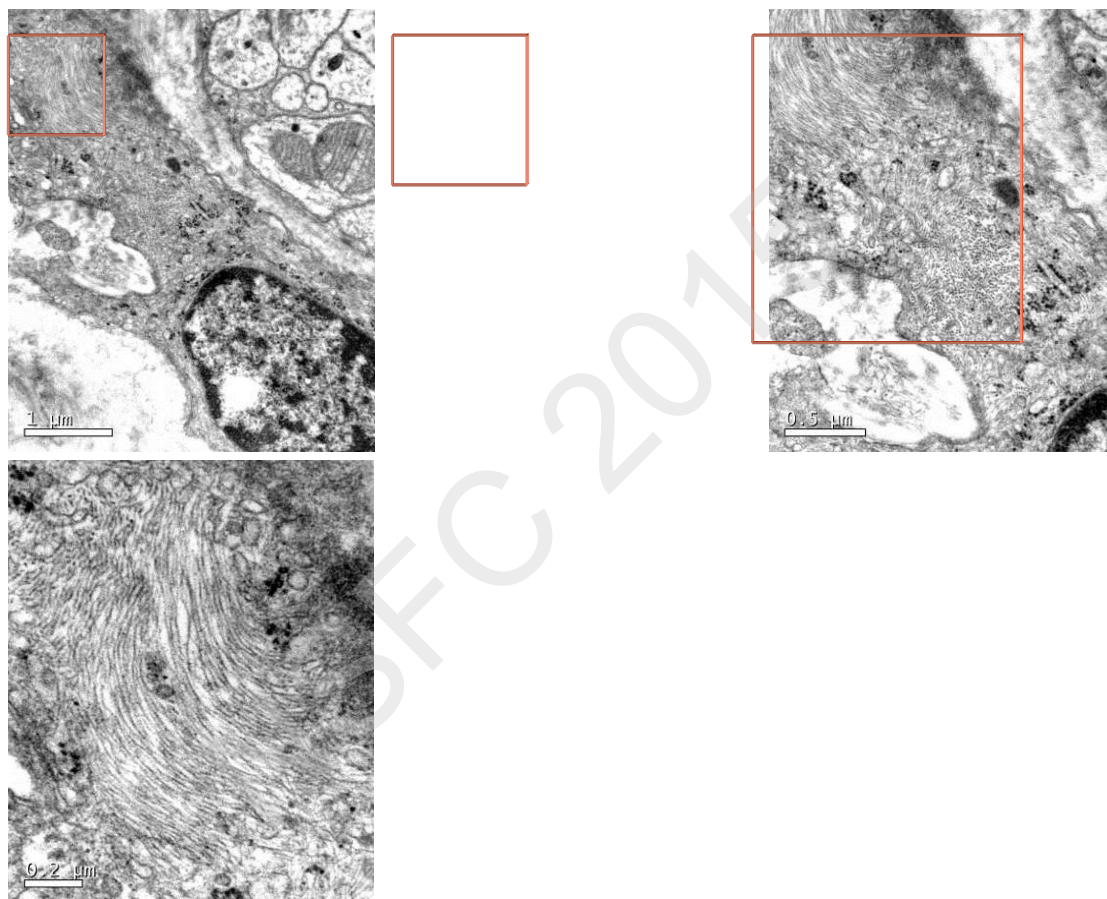
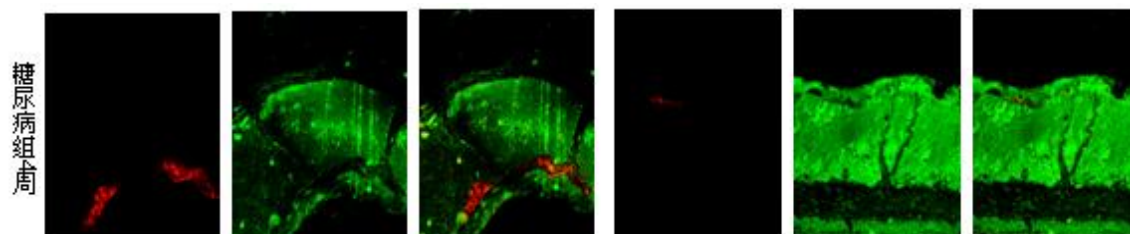


图 2 糖尿病大鼠胃“中间状态”的 ICC 的超微结构



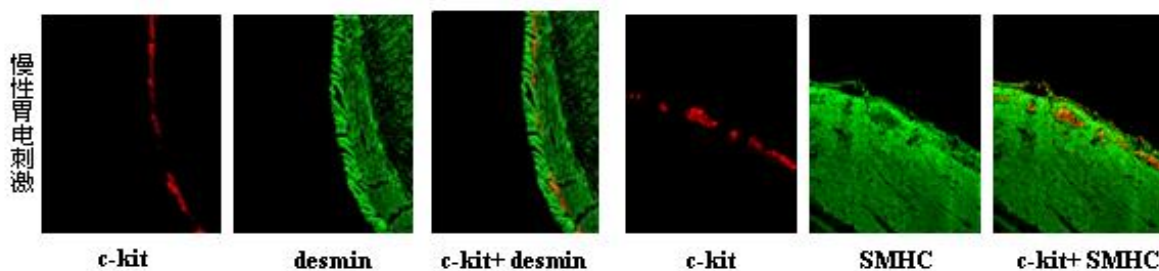


图 3A 长脉冲胃电刺激后 c-kit 和 desmin 的双重免疫荧光染色

图 3B 长脉冲胃电刺激后 c-kit 和 SMHC 的双重免疫荧光染色

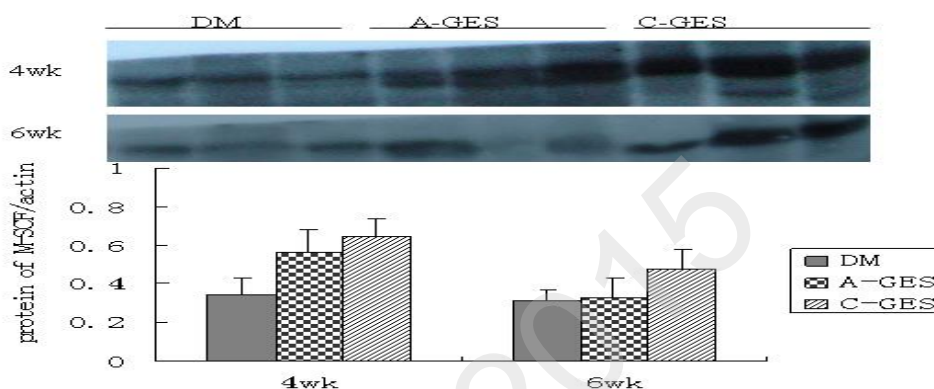


图 4 长脉冲胃电刺激对 DM 大鼠 M-SCF 的影响

2) 我们前期研究《电针足三里对糖尿病大鼠胃窦 cajal 间质细胞的作用机制研究》，从不同类型 ICC 的增殖角度研究电针刺激对 ICC 的恢复作用，已发表的相关论文如下：

1. Chen Y<sup>(#)</sup>, Xu JJ, **Liu S<sup>(\*)</sup>**, Hou XH. Electroacupuncture at ST36 Ameliorates Delayed Gastric Emptying and Renovates Networks of Interstitial Cells of Cajal in the Stomach of Diabetic Rats. PLoS One. 2013; 8: e83904. (SCI 收录)
2. Xu J<sup>(#)</sup>, Chen Y, **Liu S<sup>(\*)</sup>**, Hou X. Electroacupuncture regulates apoptosis/proliferation of intramuscular interstitial cells of cajal and restores colonic motility in diabetic constipation rats. Evid Based Complement Alternat Med. 2013; 2013: 584179. (SCI 收录)
3. Chen Y<sup>(#)</sup>, Xu J, **Liu S<sup>(\*)</sup>**, Hou X. Electroacupuncture at ST36 Increases Contraction of the Gastric Antrum and Improves the SCF/c-kit Pathway in Diabetic Rats. Am J Chin Med. 2013, 41:1233-1249. (SCI 收录)
4. Xu J<sup>(#)</sup>, Chen Y, **Liu S<sup>(\*)</sup>**, Hou X. Electroacupuncture at ST-36 restores impaired interstitial cells of Cajal and regulates stem cell factor pathway in the colon of



diabetic rats. J Evid Based Complement Alternat Med. 2012, 17: 117-125.

5. Min Hu<sup>(#)</sup>, Fan Du, **Shi Liu**<sup>(\*)</sup>. Electroacupuncture at ST-36 rescues the enteric neuronal loss in the stomach of diabetic rats. J Evid Based Complement Alternat Med. 2013, 18: 5-14.

已取得相应结果:

### ①电针足三里增加不同类型ICC 表达

激光共聚焦免疫荧光染色显示,糖尿病组胃窦 ICC-IM, ICC-MY 明显减少,经低频及高频电针刺激足三里后 ICC 表达明显增加(图5)。

通过透射电镜显示电针刺激能明显改善不同 ICC 病理损伤(如图6)。

### ②电针足三里可促进ICC 增殖增加

应用铺片技术免疫染色显示,糖尿病大鼠 8 周时,不同类型 ICC-IM, ICC-MY, ICC-SM 增殖数量明显减少,经电针刺激干预后 ICC 增殖数量明显增加,亦是 ICC 网络改善的重要因素(图7)。

### ③电针足三里增加ICC 表达与SCF/c-kit 通路有关

Western blot结果显示,糖尿病组大鼠胃窦总c-kit与SCF蛋白表达均明显降低,低频和高频刺激均能明显增加c-kit与SCF蛋白表达(图8)。



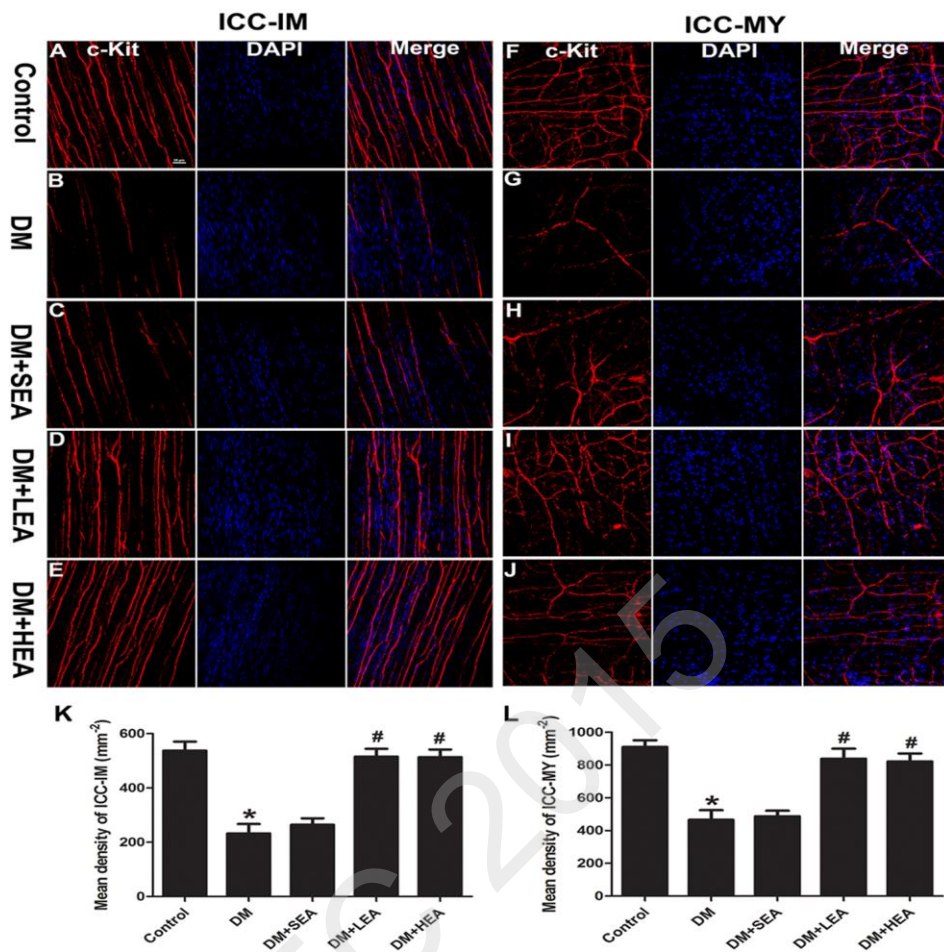


图5 免疫荧光染色显示电针足三里增加 ICC 表达

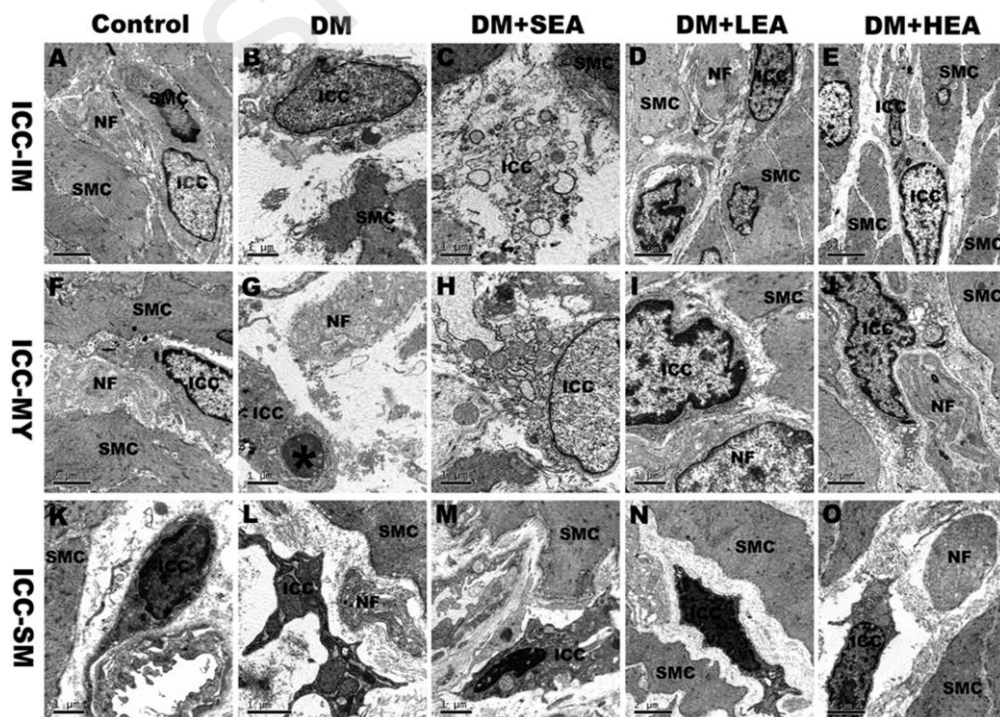


图6 电针足三里改善各层 ICC 的超微结构损伤

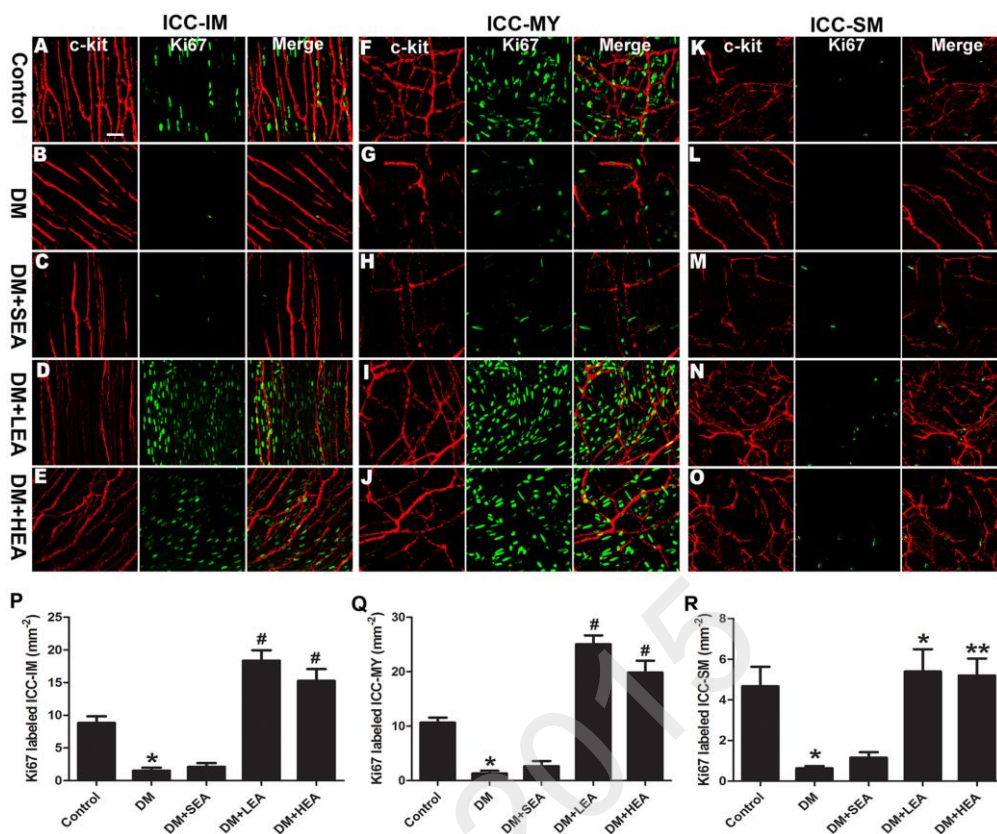


图7 电针足三里促进 ICC 增殖增加

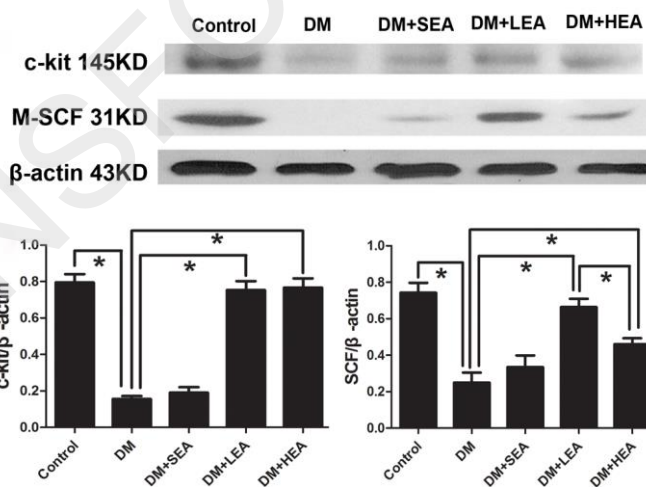


图8 糖尿病8周时, 电针足三里增加 c-kit 与 SCF 的表达

4) 我们实验室前期工作基础《小鼠骨髓基质干细胞向肠道神经分化的机制研究》，在 MSC 的分离鉴定，培养及诱导分化上奠定了基础。

1. Lin R<sup>(#)</sup>, Ma H, Ding Z, Shi W, Qian W, Song J, Hou X<sup>(\*)</sup>. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells favor the immunosuppressive T cells skewing in a *Helicobacter pylori* model of gastric cancer. *Stem Cells Dev.* 2013, 22(21):





2836-2848. (SCI 收录)

以下为取得的相应成果（图 9，10）。

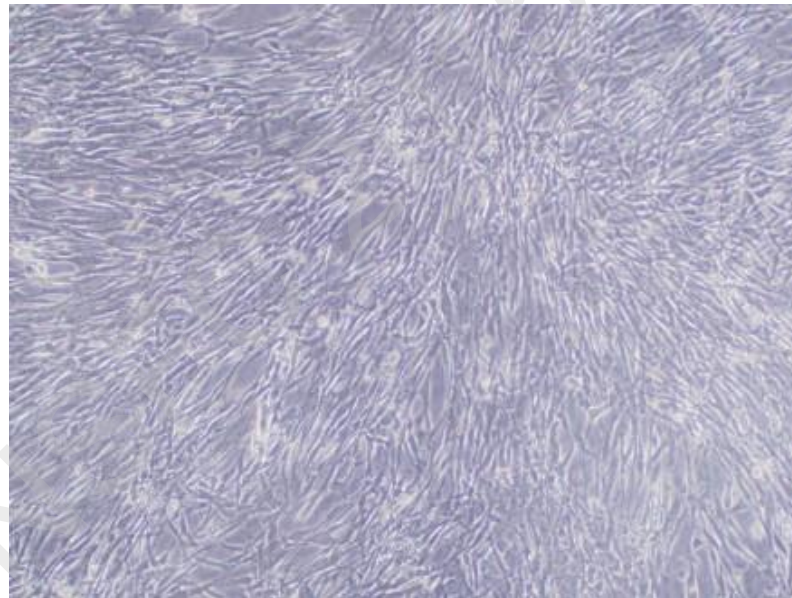
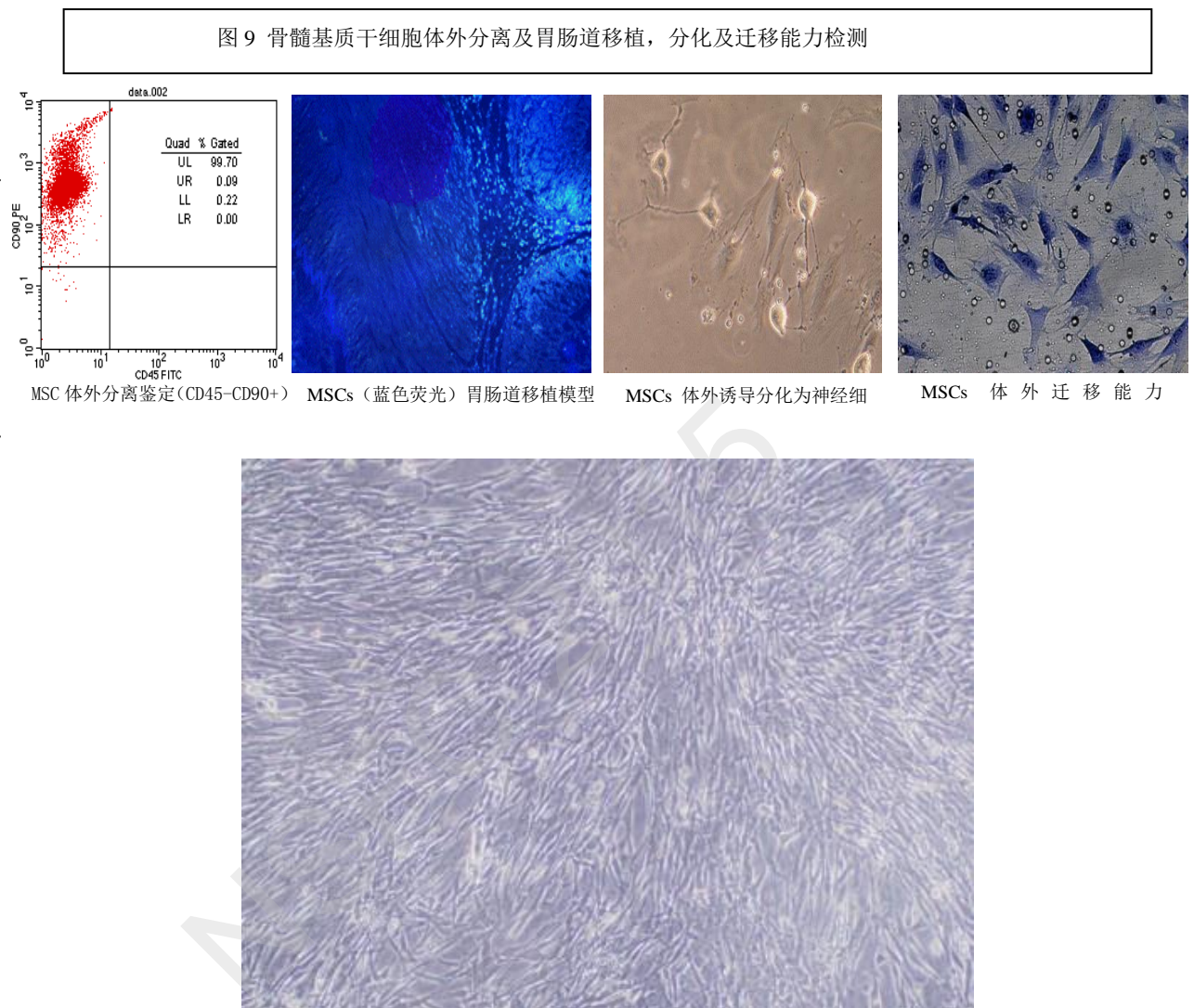


图 10 骨髓基质干细胞（第六代）

4) 我们实验室前期工作基础《长脉冲胃电刺激促进 Cajal 间质细胞修复的机制研究》，在 ICC 及前体细胞分离与鉴定方面奠定了基础。

采用正常 6W 龄 KM 小鼠胃窦组织，在显微操作下将肌层分离，运用流式细胞学技术检测组织细胞中成熟 ICC 与 ICC 前体细胞比例。通过 CD34 和 c-kit 双标 (PC5-anti-F4/80、-CD11b、-CD45 去除吞细胞、造血细胞等相关细胞)，R6 表示  $\text{Kit}^{\text{low}}\text{CD34}^+$  ICC 前体细胞；R7 表示  $\text{Kit}^+\text{CD34}^{\text{low}}$  分化成熟前的 ICC 细胞；P11 表示  $\text{Kit}^+\text{CD34}^-$  成熟 ICC 细胞。(图 11)

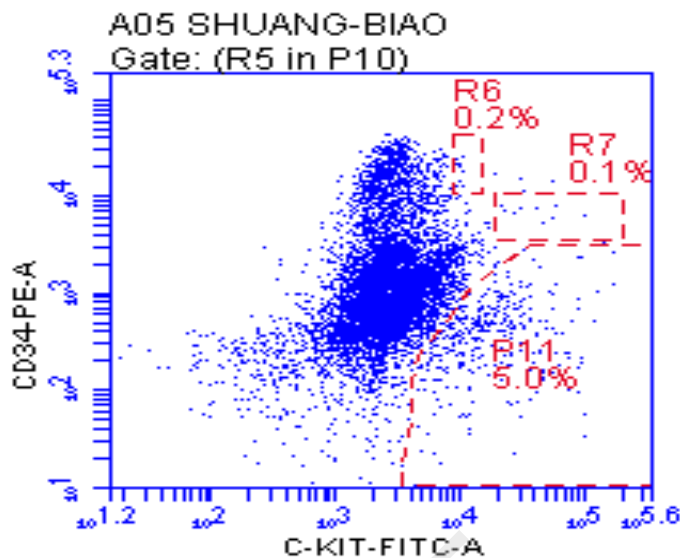


图 11 流式细胞术检测组织细胞中成熟 ICC 与 ICC 前体细胞比例

这些实验结果为本课题的顺利开展奠定了良好的技术基础，同时本课题也是以往研究的深入。

2. 工作条件（包括已具备的实验条件，尚缺少的实验条件和拟解决的途径，包括利用国家实验室、国家重点实验室和部门重点实验室等研究基地的计划与落实情况）；

- 1) 本课题组所在单位开展胃肠动力性疾病研究二十多年，在胃电刺激及电针刺激对胃肠运动的作用及机制方面进行了较深入的研究，积累了丰富经验，取得了一系列成绩。申请人多年从事胃肠运动方面研究，在国外相关实验室进修学习期间，主要进行电刺激与胃肠运动方面研究，积累了经验，并在国际SCI刊物发表数篇论著。
- 2) 本课题依托单位华中科技大学同济医学院拥有系列条件优越的实验室：同济医学院实验技术公共平台、湖北省生物靶向治疗重点实验室、武汉协和医院中心实验室等。实验设备完善，有电生理学实验室、分子生物学室、病理、超微病理室，配备有电生理记录系统、显微操纵器系列、超薄切片机，激光共聚焦显微镜，流式细胞仪，电镜等。因此具备实施本课题所需的全部实验条件和设备。
- 3) 在长期的科研过程中，项目组成员熟练掌握了本研究项目所需的多种实验技



术,如免疫荧光、real-time PCR、Western Blot、流式细胞术、放射免疫分析、细胞内微电极记录技术、激光共聚焦、电镜等关键实验技术。因此,本项目组成员在分子生物学和电生理实验技术方面已有良好基础。

总之,申请者及其项目组主要成员已掌握了本项目的核心技术。项目组成员结构合理,具有高质量完成此项研究的技术力量及研究实力。

**3. 承担科研项目情况**(申请人和项目组主要参与者正在承担的科研项目情况,包括国家自然科学基金的项目,要注明项目的名称和编号、经费来源、起止年月、与本项目的关系及负责的内容等);

申请者负责承担国家自然科学基金课题《长脉冲胃电刺激促进 cajal 间质细胞修复的机制研究》(NO. 81270548)的研究,起止时间为 2013.1-2016.12,资助金额 70 万元。实验工作已有序进行中,为本项目的进行提供技术和理论基础。

**4. 完成国家自然科学基金项目情况**(对申请人负责的前一个已结题科学基金项目(项目名称及批准号)完成情况、后续研究进展及与本申请项目的关系加以详细说明。另附该已结题项目研究工作总结摘要(限 500 字)和相关成果的详细目录)。

申请者负责承担国家自然科学基金课题《胃电刺激对 ICC 表型及 ICC-ENS 突触连接可塑性的影响》(NO.30670775)的研究,起止时间为 2007.1-2009.12,资助金额 27 万元。实验工作已完成,并已完成结题工作。

项目 30670775 从成熟 ICC 与平滑肌表型转化角度研究了胃电刺激对 ICC 有修复作用。近期研究表明 ICC 的修复除与 ICC 表型转化有关外,一定条件下 ICC 前体细胞向成熟 ICC 分化及促进成熟 ICC 的存活和增殖相关因素也可能是重要部分。本课题在上一个已完成课题的基础上更深入探讨电针刺激促进 ICC 增殖从而修复损伤 ICC 的作用机制。探讨电针刺激是否通过促进间充质干细胞向 ICC 前体细胞分化,从而促进 ICC 增殖;并进一步研究电针刺激是否通过影响 SDF-1/CXCR4 活化来调节 MSC 的迁移归巢及调节 Wnt 和 TGF- $\beta$  通路促进 MSC 定向分化为 ICC 前体细胞;同时探讨电针刺激是否通过影响 Ano1 及 SCF/c-kit 通路及细胞内 MEK/ERK 信号通路最终促进 ICC 增殖。为电针刺激治疗胃肠动力障碍性疾病提供新的理论依据。



## 《胃电刺激对 ICC 表型及 ICC-ENS 突触连接可塑性的影响》(NO. 30670775)

## 工作总结摘要:

Cajal 间质细胞 (ICC) 是胃肠道神经与肌肉之间连接所不可缺少的细胞。SCF/Kit 信号在 ICC 的生长分化和表型维持中以及神经元突触可塑性过程中起重要作用。本研究以糖尿病胃轻瘫大鼠为模型, 研究疾病不同时期 ICC 表型和 ICC-ENS 突触连接的变化以及 SCF/KIT 信号通路的变化, 进而了解胃电刺激对其影响。主要数据与结论: 糖尿病大鼠胃内 ICC 表型可能在病程第 4 周起向平滑肌表型转化, 病程中伴有胃内肌间层神经变性, 突触囊泡和所含的神经递质随糖尿病病程延长而减少。糖尿病胃轻瘫大鼠 ICC 外向钾电流增大, 且更易激活, 内向整流钾电流减少且翻转电位由 -88mV 变为 -105mV, 表明 ICC 兴奋性降低并有助于负电位的维持。SCF 表达第 2 周起显著下降且随其病程延长而减少, 且与 c-kit 表达呈正相关。长脉冲胃电刺激能增加糖尿病大鼠胃 ICC-ENS 突触重塑, 可能通过增高 M-SCF 表达来影响 ICC 表型, 早期、慢性的胃电刺激效果更佳。慢性胃电刺激 4 周可能促使糖尿病大鼠胃内部分向平滑肌转化的 ICC 表型逆转。本研究说明胃电刺激能促使 ICC 表型逆转和突触重塑来恢复胃肠动力, 为功能性胃肠病的治疗提供了新思路。

## 项目 30670775 的相关成果:

参加2009年美国DDW会议, 壁报交流两篇。

参加2009年在韩国首尔举办的第一届亚洲胃肠神经动力会, 大会发言。

## 已发表文章:

1. Li C<sup>(#)</sup>, **Liu S<sup>(#)</sup>**, Guan Y, Qian W, Du F, Hou X<sup>(\*)</sup>. Long pulse gastric electrical stimulation induces regeneration of myenteric plexus synaptic vesicles in diabetic rats. *Neurogastroenterol Motil.* 2010; 22: 453-461. (SCI 收录)
2. Li C<sup>(#)</sup>, **Liu S<sup>(#)</sup>**, Guan Y, Qian W, Hou X<sup>(\*)</sup>. Long Pulse Gastric Electric Stimulation Induces Regeneration of Myenteric Plexus Neurons and Synaptophysin in Diabetic Rats. *Gastroenterology* 2009, 136, Supplement 1, A-274.



3. Li C<sup>(#)</sup>, **Liu S**<sup>(#)</sup>, Guan Y, Qian W, Hou X<sup>(\*)</sup>. Effects of Long Pulse Gastric Electrical Stimulation On Phenotype Plasticity of ICC in Diabetic Rats Induced By STZ. Gastroenterology 2009, 136, Supplement 1, A-580.
4. F. Du<sup>(#)</sup>, L. Wang, W. Xian, **S. Liu**<sup>(\*)</sup>. Loss of enteric neurons accompanied by decreased expression of GDNF and PI3K/Akt pathway in diabetic rats. Neurogastroenterol Motil. 2009; 21: 1229-e114. (SCI 收录)
5. Chen Y<sup>(#)</sup>, Xu JJ, **Liu S**<sup>(\*)</sup>, Hou XH. Electroacupuncture at ST36 Ameliorates Delayed Gastric Emptying and Renovates Networks of Interstitial Cells of Cajal in the Stomach of Diabetic Rats. PLoS One. 2013; 8: e83904. (SCI 收录)
6. Xu J<sup>(#)</sup>, Chen Y, **Liu S**<sup>(\*)</sup>, Hou X. Electroacupuncture regulates apoptosis/proliferation of intramuscular interstitial cells of cajal and restores colonic motility in diabetic constipation rats. Evid Based Complement Alternat Med. 2013; 2013: 584179. (SCI 收录)
7. Chen Y<sup>(#)</sup>, Xu J, **Liu S**<sup>(\*)</sup>, Hou X. Electroacupuncture at ST36 Increases Contraction of the Gastric Antrum and Improves the SCF/c-kit Pathway in Diabetic Rats. Am J Chin Med. 2013, 41:1233-1249. (SCI 收录)
8. Xu J<sup>(#)</sup>, Chen Y, **Liu S**<sup>(\*)</sup>, Hou X. Electroacupuncture at ST-36 restores impaired interstitial cells of Cajal and regulates stem cell factor pathway in the colon of diabetic rats. J Evid Based Complement Alternat Med. 2012, 17: 117-125.
9. Min Hu<sup>(#)</sup>, Fan Du, **Shi Liu**<sup>(\*)</sup>. Electroacupuncture at ST-36 rescues the enteric neuronal loss in the stomach of diabetic rats. J Evid Based Complement Alternat Med. 2013, 18: 5-14.
10. 田爱霞<sup>(#)</sup>, 钱伟, **刘诗**<sup>(\*)</sup>. 糖尿病胃轻瘫大鼠胃窦 PSD95 和 Synapsin- I 的表达和意义。世界华人消化杂志 2010; 18: 1417-1421.

### (三) 资金预算说明

购置单项经费 5 万元以上固定资产及设备, 须逐项说明与项目



研究的直接相关性及必要性。

无，经费预算说明见前经费表。

#### **(四) 其他需要说明的问题**

无

NSFC 2015



## 刘诗 简历

华中科技大学同济医学院附属协和医院，消化内科，教授、主任医师

### 教育经历（按时间倒排序）

2002/09-2005/06 华中科技大学同济医学院附属协和医院，消化内科，博士，导师：侯晓华

2003/02-2005/02 美国德州大学医学分部，消化内科，导师：陈建德

1988/09-1991/06 同济医科大学同济医学院附属协和医院，消化内科，硕士，导师：易粹琼，张锦坤

1981/09-1986/06 同济医科大学同济医学院，临床医学系，学士

### 工作经历（科研与学术工作经历，按时间倒序排序）

2006/11-至今 华中科技大学同济医学院附属协和医院，消化内科，教授、主任医师

2000/07-2006/11 华中科技大学同济医学院附属协和医院，消化内科，副教授、副主任医师

1993/07-2000/07 华中科技大学同济医学院附属协和医院，消化内科，主治医师

1986/07-1988/07 华中科技大学同济医学院附属协和医院，内科，住院医师

### 曾使用证件信息（限3个）

无

### 主持或参加科研项目及人才计划项目情况（按时间倒序排序）：

- 1、国家自然科学基金面上项目，81270548、长脉冲胃电刺激促进cajal间质细胞修复的机制研究、2013/01-2016/12、70万元、在研、主持。
- 2、国家自然科学基金面上项目，30670775、胃电刺激对ICC表型及ICC-ENS突触连接可塑性的影响、2007/01-2009/12、27万元、已结题、主持。



## 主要论著

1. Chen Y<sup>(#)</sup>, Xu JJ, **Liu S**<sup>(\*)</sup>, Hou XH. Electroacupuncture at ST36 Ameliorates Delayed Gastric Emptying and Renovates Networks of Interstitial Cells of Cajal in the Stomach of Diabetic Rats. PLoS One. 2013; 8: e83904. (SCI收录)
2. Xu J<sup>(#)</sup>, Chen Y, **Liu S**<sup>(\*)</sup>, Hou X. Electroacupuncture regulates apoptosis/proliferation of intramuscular interstitial cells of cajal and restores colonic motility in diabetic constipation rats. Evid Based Complement Alternat Med. 2013; 2013: 584179. (SCI 收录)
3. Chen Y<sup>(#)</sup>, Xu J, **Liu S**<sup>(\*)</sup>, Hou X. Electroacupuncture at ST36 Increases Contraction of the Gastric Antrum and Improves the SCF/c-kit Pathway in Diabetic Rats. Am J Chin Med. 2013, 41:1233-1249. (SCI 收录)
4. Min Hu<sup>(#)</sup>, Fan Du, **Shi Liu**<sup>(\*)</sup>. Electroacupuncture at ST-36 rescues the enteric neuronal loss in the stomach of diabetic rats. J Evid Based Complement Alternat Med. 2013, 18: 5-14.
5. Xu J<sup>(#)</sup>, Chen Y, **Liu S**<sup>(\*)</sup>, Hou X. Electroacupuncture at ST-36 restores impaired interstitial cells of Cajal and regulates stem cell factor pathway in the colon of diabetic rats. J Evid Based Complement Alternat Med. 2012, 17: 117-125.
6. Chu D<sup>(#)</sup>, Cheng P, Xiong H, Zhang J, **Liu S**<sup>(\*)</sup>, Hou X. Electroacupuncture at ST-36 relieves visceral hypersensitivity and decreases 5-HT(3) receptor level in the colon in chronic visceral hypersensitivity rats. Int J Colorectal Dis. 2011; 26: 569-574. (SCI 收录)
7. 张俊君<sup>(#)</sup>, 熊会玲, 褚丹, 程鹏飞, 钱伟, **刘诗**<sup>(\*)</sup>. 电针刺激足三里对内脏高敏感大鼠的影响及其机制. 胃肠病学 2010; 15: 665-668.
8. Li C<sup>(#)</sup>, **Liu S**<sup>(#)</sup>, Guan Y, Qian W, Du F, Hou X<sup>(\*)</sup>. Long pulse gastric electrical stimulation induces regeneration of myenteric plexus synaptic vesicles in diabetic rats. Neurogastroenterol Motil. 2010; 22: 453-461 (SCI 收录)
9. F Du<sup>(#)</sup>, L Wang, W Qian, **S Liu**<sup>(\*)</sup>. Loss of enteric neurons accompanied by decreased expression of GDNF and PI3K/Akt pathway in diabetic rats. Neurogastroenterol Motil. 2009; 21: 1229-e114. (SCI 收录)
10. 史宁<sup>(#)</sup>, **刘诗**<sup>(\*)</sup>, 谢小平, 侯晓华. 经皮电神经刺激针灸穴位对慢传输型便秘患者的疗效. 中华医学杂志 2009; 89: 947-950.
11. **Shi Liu**<sup>(#)</sup>, Suifeng Pen<sup>(#)</sup>, Xiaohua Hou, Meiyun Ke, JD Chen<sup>(\*)</sup>. Transcutaneous electroacupuncture improves dyspeptic symptoms and increases high frequency heart rate variability in patients with functional dyspepsia. Neurogastroenterol Motil. 2008; 20: 1204-1211. (SCI 收录)
12. Dan Luo<sup>(#)</sup>, **Shi Liu**<sup>(\*)</sup>, Xiaopin Xie, Xiaohua Hou. Electroacupuncture at Acupoint ST-36 promotes contractility of distal colon via a cholinergic pathway in conscious rats. Dig Dis Sci. 2008; 53: 689-693. (SCI 收录)





## 杜凡简历(参加者)

华中科技大学同济医学院附属协和医院，消化内科，主治医师、讲师

### 教育经历（从大学本科开始，按时间倒排序）：

2006/09-2011/06 华中科技大学同济医学院附属协和医院，消化内科，硕博连读，博士，导师：刘诗

2001/09-2006/06 华中科技大学同济医学院，临床医学专业，学士

### 工作经历（科研与学术工作经历，按时间倒排序）：

2011/07-至今 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科，主治医师，讲师

2008/09-2011/06 华中科技大学同济医学院附属协和医院，博士研究生

2006/09-2008/06 华中科技大学同济医学院附属协和医院，硕士研究生

### 曾使用证件信息（限 3 个）

无

### 主持或参加科研项目及人才计划项目情况（按时间倒排序）：

- 1、国家自然科学基金面上项目，81270458、长脉冲胃电刺激促进 Cajal 间质细胞修复的机制研、2013/01-2016/12、70 万元、正在进行、参加。
- 2、国家自然科学基金面上项目，813705、调控 SREBP-2 促进脂质自噬对 NAFLD 中脂滴的作用及其机、2014/01-2017/12、65 万元、正在进行、参加。

### 主要论著

1. Min Hu<sup>(#)</sup>, **Fan Du**, Shi Liu<sup>(\*)</sup>. Electroacupuncture at ST-36 rescues the enteric neuronal loss in the stomach of diabetic rats. J Evid Based Complement Alternat Med. 2013, 18: 5-14.
2. Yaser ALDUAIS<sup>(#)</sup>, 孔浩, 谢小平, **杜凡**, 刘诗<sup>(\*)</sup>, 侯晓华. 不透 X 线标记物法在评价结肠传输功能中的作用. 胃肠病学 2011; 16: 337-340.
3. Wang L<sup>(#)</sup>, **Du F**, Mao H, Wang HX, Zhao S<sup>(\*)</sup>. Prevalence and related risk factors of peripheral arterial disease in elderly patients with type 2 diabetes in Wuhan, Central China. Chinese Medical Journal (Engl) 2011, 124: 4264-4268.
4. C Li<sup>(#)</sup>, S Liu, Y Guan, W Qian, **F Du**, X Hou<sup>(\*)</sup>. Long pulse gastric electrical



stimulation induces regeneration of myenteric plexus synaptic vesicles in diabetic rats. *Neurogastroenterol Motil.* 2010; 22: 453-461, e108.

5. **F Du**<sup>(#)</sup>, L Wang, W Qian, S Liu<sup>(\*)</sup>. Loss of enteric neurons accompanied by decreased expression of GDNF and PI3K/Akt pathway in diabetic rats. *Neurogastroenterol Motil.* 2009; 21: 1229-e114.

6. **杜凡**<sup>(#)</sup>, 刘诗<sup>(\*)</sup>. 饮食疗法在肠易激综合征治疗中的作用。临床消化杂志 2008; 20: 262-263.

NSFC 2015



## 周建宁简历(参加者)

华中科技大学同济医学院附属协和医院，消化内科，主治医师

### 教育经历（从大学本科开始，按时间倒排序）：

1993/09-2000/06 华中科技大学同济医学院，临床医学专业七年制，医学硕士

### 工作经历（科研与学术工作经历，按时间倒排序）：

2004/07-至今 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科，主治医师

2000/07-2004/07 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科，住院医师

### 曾使用证件信息（限 3 个）

无

### 主持或参加科研项目及人才计划项目情况（按时间倒排序）：

1、国家自然科学基金面上项目，81270548、长脉冲胃电刺激促进 cajal 间质细胞修复的机制研究、2013/01-2016/12、70 万元、正在进行、参与。



## 谢小平简历(参加者)

华中科技大学同济医学院附属协和医院，消化内科，主管技师

### 教育经历（从大学本科开始，按时间倒排序）：

1985/09-1988/06 华中科技大学同济医学院，医学临床检验专业，学士

### 工作经历（科研与学术工作经历，按时间倒排序）：

1990/07-至今 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科，主管技师

1982/07-1990/07 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科，技师

### 曾使用证件信息（限 3 个）

无

### 主持或参加科研项目及人才计划项目情况（按时间倒排序）：

1、国家自然科学基金面上项目，81270548、长脉冲胃电刺激促进 cajal 间质细胞修复的机制研究、2013/01-2016/12、70 万元、正在进行、参与。



## 近5年（2010年1月1日以后）代表性研究成果列表

- 1、 Yan Chen<sup>(#)</sup>, Juan Juan Xu, Shi Liu<sup>(\*)</sup>, Xiao Hua Hou, Electroacupuncture at ST36 ameliorates gastric emptying and rescues networks of interstitial cells of Cajal in the stomach of diabetic rats., PLoS One, 2013, 8 (12) 。SCI 期刊论文
- 2、 Yan Chen<sup>(#)</sup>, Juanjuan Xu, Shi Liu<sup>(\*)</sup>, Xiaohua Hou, Electroacupuncture at ST36 increases contraction of the gastric antrum and improves the SCF/c-kit pathway in diabetic rats., Am J Chin Med, 2013, 41 (6) : 1233-1249。SCI 期刊论文
- 3、 Juanjuan Xu<sup>(#)</sup>, Yan Chen, Shi Liu<sup>(\*)</sup>, Xiaohua Hou, Electroacupuncture Regulates Apoptosis/Proliferation of Intramuscular Interstitial Cells of Cajal and Restores Colonic Motility in Diabetic Constipation Rats, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013, 2013 (2013) 。SCI 期刊论文
- 4、 Min Hu<sup>(#)</sup>, Fan Du, Shi Liu<sup>(\*)</sup>, Electroacupuncture at Zusanli Rescues the Enteric Neuronal Loss in the Stomach of Diabetic Rats, Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine, 2013, 18 (1) : 5-14。SCI 期刊论文
- 5、 Juanjuan Xu<sup>(#)</sup>, Yan Chen, Shi Liu<sup>(\*)</sup>, Xiaohua Hou, Electroacupuncture at Zusanli (ST-36) Restores Impaired Interstitial Cells of Cajal and Regulates Stem Cell Factor Pathway in the Colon of Diabetic Rats, Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine, 2012, 17 (2) : 117-125。SCI 期刊论文
- 6、 Dan Chu<sup>(#)</sup>, Pengfei Cheng, Huiling Xiong, Junjun Zhang, Shi Liu<sup>(\*)</sup>, Xiaohua Hou, Electroacupuncture at ST-36 relieves visceral hypersensitivity and decreases 5-HT(3) receptor level in the colon in chronic visceral hypersensitivity rats., International Journal of Colorectal Disease, Clinical and Molecular Gastroenterology and Surgery, 2011, 26 (5) : 569-574。SCI 期刊论文
- 7、 C. LI<sup>(#)</sup>, S. LIU<sup>(\*)</sup>, Y. GUAN, W. QIAN, F. DU, X. HOU, Long pulse gastric electrical stimulation induces regeneration of myenteric plexus synaptic vesicles in diabetic rats, Neurogastroenterol Motil, 2010, 22 (4) : 453-461。SCI 期刊论文



## 附件信息

序号	附件名称	备注	附件类型
1	PLOS CY		代表性论著
2	AJCM CHEN		代表性论著
3	EVID XJJ2		代表性论著
4	INT CHU		代表性论著
5	NM LI		代表性论著

NSFC 2015

**签字和盖章页(此页自动生成, 打印后签字盖章)**

申请人: 刘诗

依托单位: 华中科技大学

项目名称: 电针刺激诱导MSC归巢与分化修复胃肠道ICC的机制研究

资助类别: 面上项目

亚类说明:

附注说明: 常规面上项目

**申请人承诺:**

我保证申请书内容的真实性。如果获得资助, 我将履行项目负责人职责, 严格遵守国家自然科学基金委员会的有关规定, 切实保证研究工作时间, 认真开展工作, 按时报送有关材料。若填报失实和违反规定, 本人将承担全部责任。

签字:

**项目组主要成员承诺:**

我保证有关申报内容的真实性。如果获得资助, 我将严格遵守国家自然科学基金委员会的有关规定, 切实保证研究工作时间, 加强合作、信息资源共享, 认真开展工作, 及时向项目负责人报送有关材料。若个人信息失实、执行项目中违反规定, 本人将承担相关责任。

编号	姓名	工作单位名称	每年工作时间(月)	签字
1	杜凡	华中科技大学	8	
2	陈艳	华中科技大学	8	
3	李海	华中科技大学	8	
4	田陆高	华中科技大学	8	
5	周建宁	华中科技大学	4	
6	谢小平	华中科技大学	4	
7	余明蔚	华中科技大学	6	
8	朱贝贝	华中科技大学	8	
9				

**依托单位及合作研究单位承诺:**

已按填报说明对申请人的资格和申请书内容进行了审核。申请项目如获资助, 我单位保证对研究计划实施所需要的人力、物力和工作时间等条件给予保障, 严格遵守国家自然科学基金委员会有关规定, 督促项目负责人和项目组成员以及本单位项目管理部门按照国家自然科学基金委员会的规定及时报送有关材料。

依托单位公章

日期:

合作研究单位公章1

日期:

合作研究单位公章2

日期: