

针刺足阳明经穴对家兔胃窦平滑肌细胞内钙离子浓度的影响

邓元江^{*} 易受乡^{*} 林亚平^{*} 严洁^{*} 郭晖^{*} 向志勇^{*} 吴芳^{*} 刘卫英^{*}

摘要 目的:探讨针刺足阳明经穴对胃平滑肌细胞内第二信使 Ca^{2+} 的影响。方法:将 45 只家兔随机分为生理盐水组、阿托品模型组、针刺足阳明经穴组、针刺足少阳经穴组、针刺足太阳经穴组,每组 9 只。分组处理后,取胃窦平滑肌,制成活的单个平滑肌细胞悬液,以荧光分光光度计测定细胞内钙离子浓度 $[Ca^{2+}]_i$ 。结果:针刺足阳明经穴组胃窦平滑肌细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 明显高于阿托品模型组 ($P < 0.01$),而其他各组间细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 差异均无显著性意义 ($P > 0.05$)。结论:针刺足阳明经穴对胃运动的影响与胃平滑肌细胞内 Ca^{2+} 释放有关。

主题词 肌,平滑,血管/针灸效应 穴位,胃经 针刺疗法

为了探讨针刺足阳明经穴对胃平滑肌细胞内脑肠肽受体后信息物质 Ca^{2+} 的影响,本研究采用胆碱能受体拮抗剂阿托品静脉滴注,造成胃运动抑制模型,观察针刺足阳明胃经穴对家兔胃窦平滑肌细胞内 Ca^{2+} 浓度 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响,并设立针刺足少阳胆经穴、足太阳膀胱经穴进行对照,报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组:健康成年新西兰大耳白兔 45 只,体重 1.9~2.3kg,雌雄不拘,由本院实验动物中心提供。根据实验需要随机分为 5 组,每组 9 只。实验前禁食 1 天,按 4ml/kg 的剂量,耳缘静脉注射 25% 乌拉坦进行麻醉后,再按分组进行处理:(1)生理盐水组(A 组):耳缘静脉滴注 0.9% NaCl 溶液,滴速为 1ml/分钟,剂量为 10ml/kg。(2)阿托品模型组(B 组):2.5mg/100ml 阿托品耳缘静脉滴注,滴速和剂量同 A 组。(3)针刺足阳明经穴组(C 组), (4)针刺足少阳经穴组(D 组), (5)针刺足太阳经穴组(E 组)。C、D、E 组均在滴注阿托品总量的一半(滴注方法同 B 组)时,开始分别电针双侧足阳明经穴、足少阳经穴、足太阳经穴 30 分钟。

1.2 主要仪器及试剂:AFU-210 型电子天平(长沙湘仪天平仪器厂),TGL16M 型台式高速冷冻离心机(湖

南科威实业有限公司),CBV-1500A 型多功能无菌工作台(上海瑞仰净化装备公司),DKZ-2 型电热恒温振荡水槽(上海精宏实验设备有限公司),XDS-1B 型倒置显微镜(重庆光学仪器厂),SYZ-550 型高纯蒸馏水器(江苏金坛医疗仪器厂),F4000 型荧光分光光度计(日本 Hitachi)。

HEPES、台盼蓝、荧光钙指示剂 fura-2AM(Sigma 公司),胶原酶 II 型、大豆胰蛋白酶抑制剂、L-谷氨酰胺、L-谷氨酸钠(Worthington 公司),牛血清白蛋白(上海伯奥生物科技有限公司),戊二醛(Amresco 公司),乌拉坦(上海第二中学化工厂),阿托品注射液(湖南洞庭药业有限公司生产,1ml/支,0.5mg/支,批号:20030609),其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 取穴及针刺方法

1.3.1 取穴:足阳明经穴组取双侧足三里、天枢、梁门、四白,足少阳经穴组取双侧阳陵泉、带脉、日月、阳白,足太阳经穴组取双侧承筋、背下点、背上点、攒竹。

参照李忠仁《实验针灸学》家兔常用针灸穴位的定位及人体解剖学方法,采用比类法对家兔上述穴位进行定位。足三里:膝关节前外侧,约当腓骨头下 1.2cm,胫骨前嵴旁开 1cm 处。天枢:脐中旁开 2~3cm 处。梁门:在上腹部,当脐中与胸剑联合之中点旁开 2~3cm 处。四白:瞳孔直下,当眶骨下缘的眶下孔凹陷处。阳陵泉:在小腿外侧,当腓骨头前下方凹陷处。带脉:在侧腹部,当第 11 肋骨游离端下方垂线与脐水平线的交点上。日月:胸部乳头下方,第 7 肋间隙。阳白:前额眉弓中点上 1cm 处。承筋:足太阳膀胱经线上与足三里同水平段穴点。背下点:背中线旁开约 1.5cm,平脐中水平处。背上点:背中线旁开约 1.5cm,平梁门穴水平处。攒竹:眉弓内侧端,眶上切迹处。

1.3.2 针刺方法:采用 1 寸长 30 号的华佗牌毫针,以络合碘消毒后进行针刺,足三里直刺 1.2~1.5cm,天枢直刺 0.5~1.0cm,梁门直刺 0.5~1.0cm,四白由外向内平刺入 0.5~0.8cm,针尖抵达眶下孔部;阳陵泉直刺 1.0~1.5cm,带脉直刺 0.5~1.0cm,日月向外平刺 1.0~1.5cm,阳白向眉弓中点平刺 0.5~0.8cm;承筋直刺 0.5~1.0cm,背下点直刺 0.5~1.0cm,背上点

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30171136),湖南省教育厅重点项目(01A013)

* 湖南中医学院针灸推拿系实验针灸教研室,长沙市韶山路 113 号(410007)

收稿日期:2003-12-22;修回日期:2004-02-16

向脊柱方向斜刺 0.5~1.0cm,攒竹向下斜刺 0.5~0.8cm。

各组针刺后,同侧相邻的两个穴位从下至上接在华佗牌 SDE-Ⅱ 型电子针疗仪(苏州医疗用品有限公司生产)的一组输出线上,每只家兔共接 4 组输出线,采用疏密波,频率 3 档,强度适当,电针 30 分钟。

1.4 主要溶液的配制:(1)阿托品溶液:取阿托品注射液 5 支,加于 95ml 的 0.9%NaCl 溶液中,配成 2.5mg/100ml 的阿托品溶液,供滴注用。(2)Hepes-Ringer 缓冲液(mmol/L)组成:HEPES(24.5),NaCl(101),KCl(13), NaH_2PO_4 (2.5), CaCl_2 (1.8), MgCl_2 (1.2),L-谷氨酰胺(2),L-谷氨酸钠(5),葡萄糖(11.5),含 0.1% (w/v)牛血清白蛋白,以双蒸水配制,用 1%NaOH 调 pH 值,以酸度计测 pH 值,终溶液 pH 为 7.4,用针式过滤器以孔径为 0.22 μm 的滤膜过滤除菌,分装, -20℃ 保存。(3)无钙 Hepes-Ringer 缓冲液:成分为 Hepes-Ringer 中不含 CaCl_2 , pH7.4,过滤除菌,分装, -20℃ 保存。(4)含 10%牛血清白蛋白的 Hepes-Ringer 液:取 9.9g 牛血清白蛋白于量筒中,加 Hepes-Ringer 缓冲液使之溶解后,至 100ml,调 pH 为 7.4,过滤除菌,分装, -20℃ 保存。(5)消化液:以 Hepes-Ringer 缓冲液配制,含 0.1%Ⅱ型胶原酶和 0.01%大豆胰蛋白酶抑制剂,过滤除菌、分装, -20℃ 保存。(6)1%台盼蓝染液:取 0.25g 台盼蓝染料溶于 25ml 生理盐水中,摇匀,过滤。(7)2.5%戊二醛固定液:取 50%戊二醛 1ml 加入双蒸水至 20ml, 2~4℃ 冷藏保存。(8)1mmol/L 荧光钙指示剂 fura-2AM 溶液:1mg 荧光钙指示剂 fura-2AM 中加 1ml 二甲亚砜混匀, -20℃ 保存。

1.5 活的单个胃平滑肌细胞的制备:基本参照文献方法^[2],家兔经麻醉、分组处理完毕后,无菌剖腹取胃,剪取胃窦(距幽门 0.8~1cm),沿胃小弯剪开,以冰冷的生理盐水冲洗去食物残渣后,放入冰冷的 Hepes-Ringer 缓冲液中,在无菌工作台中,除掉大网膜,剥去浆膜,用止血钳撕去粘膜,将新鲜的胃窦平滑肌 0.5g 剪成 2mm×2mm 小块,将肌块孵育于一支装有 4ml 消化液带塞子的玻璃离心管中,通以 100% O_2 , 31℃ 水浴 30min 后,离心(1500r/min, 20℃)4min。吸去消化液,在沉渣中再加消化液 4ml,通以 100% O_2 , 31℃ 水浴 30min 后,离心 4min。吸去上清液,在沉渣中加 Hepes-Ringer 缓冲液 4ml,摇匀后,离心 4min,洗 3 次后,肌块重浮于含 10%牛血清白蛋白的 Hepes-Ringer 液中,通入 100% O_2 , 31℃ 水浴振荡(30 次/min)20min。用孔径为 500 μm 的尼龙滤膜,将平滑肌细胞过滤,得到游离的单个平滑肌细胞,并收集于充满 100% O_2 的 30ml 的

小锥形瓶中待用。

得到的游离的单个平滑肌细胞用台盼蓝检查,在光学显微镜下观察,当细胞死亡时将被染成蓝色,活的细胞晶莹透亮,不被染色,实验要求成活细胞在 95% 以上,细胞数目为 $10^5/\text{ml}$ 。

1.6 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 测定方法:参考文献方法^[1],稍有改进。用移液枪取 1ml 活细胞悬液于玻璃离心管中,加入 10 μl , 1mmol/L 的荧光钙指示剂 fura-2AM,终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$,振匀。实验过程中注意用黑纸包严, 31℃ 恒温孵育 40 分钟,注意轻轻摇动,以加速 fura-2AM 进入细胞内。终止孵育,以 1500r/min 离心 6 分钟,弃去上清。在沉淀中加入 3ml Hepes-Ringer 缓冲液,再以 1500r/min 离心 6 分钟,以洗去胞外残存的 fura-2AM,弃去上清。在沉淀中加入 1ml 无钙 Hepes-Ringer 缓冲液,吹打为细胞悬液。用单波长荧光分光光度计 F4000 型测定荧光值,发射波长 510nm,激发波长为 340nm;测了 F 值后,加 1% Triton 10 μl 破膜后测 F_{max} ,再加 30mmol/L 的 EGTA 80 μl 络合钙离子后测 F_{min} 。计算公式如下: $[\text{Ca}^{2+}]_i = kd \times (F - F_{\text{min}}) / (F_{\text{max}} - F)$,其中 kd 为 Ca^{2+} 与 Fura-2 结合的解离常数,其值为 224nmol/L。

1.7 统计学处理:各组实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用统计分析软件 SPSS 10.0 进行 F 分析,两两比较用 q 检验。

2 结果

本实验消化所得的单个家兔的胃窦平滑肌细胞呈梭形,细胞核清晰而居中央,在倒置显微镜下以测微尺测得细胞长度大多在 40~70 μm ,各组家兔胃窦平滑肌 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 见附表。

附表 各组家兔胃窦平滑肌 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	兔数	$[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nmol/L)
A	6	143.26±103.40*
B	7	184.05±69.39*
C	7	381.38±139.33
D	7	189.84±110.68*
E	7	162.85±123.45*

* 与 C 组比较, $P < 0.01$

从附表可见, C 组家兔胃窦平滑肌细胞内钙离子浓度高于其它各组,差异均有显著性意义($P < 0.01$),而其他各组间 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 差异均无显著性意义($P > 0.05$)。表明针刺足阳明经穴提高了家兔胃窦平滑肌 $[\text{Ca}^{2+}]_i$,而针刺其他经穴对家兔胃窦平滑肌 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 无明显影响。

3 讨论

经脉—脏腑相关理论是经络学说的核心问题。足阳明胃经是人体一条重要经脉,其循行分布跨越了人体头颈、胸腹、下肢至足趾,在人体内属胃络脾,其支脉起于胃口,下循腹里,与胃联系十分紧密。据《内经》记载该经具有调理脾胃、助运化等作用。大量的临床实践证明,针刺足阳明经的足三里、天枢、梁门、四白等穴具有调中焦、理脾胃、和胃降逆、疏通胃肠等作用,对胃肠疾病有良好的疗效。

我们从临床和实验研究两方面对足阳明经与胃相关规律进行了研究,研究结果证实,针刺足阳明经穴(如足三里、上巨虚、梁门、天枢、四白等穴)对胃窦面积、胃幽门括约肌张力、胃蠕动、胃排空、胃电功率谱、胃肌电、胃压力波、胃粘膜损伤的保护均有一定影响,并已证实足阳明经与胃存在相对特异性的联系^[3~5],还发现^[6]M 受体阻断后胃电活动及脑肠肽呈下降趋势,针刺足三里可部分取消 M 受体阻断对胃电的抑制效应,同时脑肠肽胃动素、P 物质释放增加,已阐明脑肠肽是足阳明与胃相互联系的重要物质基础。

豚鼠、家兔的胃窦平滑肌细胞膜上,均存在与脑肠肽结合的特异性受体,现有研究表明,脑肠肽对胃肠运动的调控作用的胞内信号转导通路,是脑肠肽与胃平滑肌细胞膜上的特异性受体结合后,通过鸟苷酸调节蛋白(G 蛋白)进行跨膜信号转导^[7,8]。G 蛋白是连接细胞膜受体与效应分子之间的重要“桥梁”,它将受体激活的信号转导给膜内的效应酶,产生胞内第二信使,调节胃肠运动^[9]。

Ca^{2+} 是细胞内重要的第二信使,参与多种细胞生理与生化过程。细胞内 Ca^{2+} 浓度受电压控制 Ca^{2+} 通道与受体控制 Ca^{2+} 通道的开启与关闭,以及 Na^+/Ca^{2+} 交换体与 Ca^{2+} 泵活动的控制。肌浆网释放 Ca^{2+} 会引起肌肉收缩,而经 Ca^{2+} -ATP 酶作用可移去胞浆 Ca^{2+} ,促使肌肉舒张。钙调蛋白(CaM)是细胞内 Ca^{2+} 信号受体。CaM 与 Ca^{2+} 结合,可以激活蛋白激酶与环化核苷酸依赖性酶类,调节细胞运动与物质代谢。

兴奋胃肠运动的脑肠肽与受体—磷脂酶 C 信号转导系统有密切关系,刺激不同的受体可激活不同类型的 G 蛋白,通过调控磷脂酶 C 的活性影响三磷酸肌醇的生成,进而改变胞内 Ca^{2+} 的释放,调节胃肠运动的功能^[10,11]。本研究结果表明,针刺足阳明经穴能使 M 受体阻断后胃运动抑制的胃窦平滑肌 $[Ca^{2+}]_i$ 明显升高,提示针刺足阳明经对胃运动的促进作用是通过升高胃平滑肌 $[Ca^{2+}]_i$ 实现的,进一步提示,针刺足阳明经对胃运动的影响与脑肠肽→脑肠肽受体→G 蛋白

→第二信使 Ca^{2+} →胃平滑肌细胞舒缩效应→调整胃运动的途径有关。

参考文献

- 1 王文颖,周吕,郝维. 八肽胆囊收缩素和胃动素引起大鼠胃平滑肌细胞收缩的胞内钙、 IP_3 释放作用. 中华消化杂志,1997,17(增刊):30—33.
- 2 周吕,王新. 胃动素对大鼠平滑肌细胞收缩活动的作用. 生理学报,1996,48(2):165—172.
- 3 严洁,常小荣,黄必群,等. 针刺足阳明经不同穴点对胃窦面积影响的结果分析. 中国针灸,1999,19(3):167—168.
- 4 易受乡,林亚平,严洁,等. 电针对大鼠胃运动 P 物质和胃动素的影响. 世界华人消化杂志,2001,9(3):284—287.
- 5 易受乡,林亚平,严洁,等. 针刺四白、天枢、足三里对大鼠胃内压调整作用的比较. 中国中医药信息杂志,2000,7(11):29—30.
- 6 易受乡,严洁,林亚平,等. 针刺胃经穴对 M 受体阻断大鼠胃电及脑肠肽的影响. 中国中西医结合消化杂志,2002,10(4):203—205.
- 7 Yu P, Chen Q, Xiao Z, et al. Signal transduction pathways mediating CCK-induced gallbladder muscle contraction. Am J Physiol, 1998, 275 (2 Pt 1):G203—G211.
- 8 Murthy KS, Zhang KM, Jin JG, et al. VIP-mediated G Protein-coupled Ca^{2+} influx activates a constitutive NOS in dispersed gastric muscle cells. Am J Physiol, 1993, 265 (4 Pt 1):G660—G671.
- 9 Makhlof GM, Murthy KS. Signal transduction in gastrointestinal smooth muscle. Cell Signal, 1997, 9(3—4):269—276.
- 10 Murthy KS, Coy DH, Makhlof GM. Somatostatin receptor-mediated signaling in smooth muscle: activation of phospholipase C-beta3 by G betagamma and inhibition of adenylyl cyclase by Galphai 1 and Galphao. J Biol Chem, 1996, 271(38):23458—23463.
- 11 王玲,周吕. 胃动素和胃泌素引起大鼠胃窦平滑肌细胞收缩的信号转导通路. 生理学报,2000,52(4):272—276.

出书宣传 中医古籍出版社帮您忙

《中国当代医疗百科专家专著》系列丛书出版登记表(回执)

姓名	地址	邮编	传真
电话	手机	书稿寄出时间	订购册数
内容简介		是/否请领导(专家)题词	
		是/否参加科技著作大赛或展览	

注:请按此表格内容自制表格寄回,以提前安排出版事宜。

地址:北京市水碓子邮局 43 号信箱,邮编:100026

电话:(010)85832706,85838841(长期有效)

本刊“专题笔谈”栏目征稿

本刊从 2004 年第 10 期起,“专题笔谈”栏目除中药应用专题以外,将陆续推出中医病证、中医治法专题等。现征集中医病证专题稿件,病名如下:反流性食管炎、胃炎、消化性溃疡、胃肠道功能紊乱(以上病名可进一步根据现代医学细分)。包括:病因病机、辨证分型、治则治法、方药加减、典型病例等。内容要有别于教科书,要有个人独到的心得体会。字数限制在 4000 字之内,本刊恕不退稿,不予回执。

投稿地址:北京东直门内南小街 16 号中医杂志社 2 号编辑收,邮编:100700。

ABSTRACTS FROM ORIGINAL ARTICLES

Acupuncture and Moxibustion for Treatment of Bell's Palsy: A Multicenter Randomized Controlled Trial

Liang Fanrong, Yu Shuguang, Li Ying, et al.

Objective: To verify therapeutic effect of acupuncture on Bell's palsy. **Methods:** Of 480 cases enrolled in the present study in 4 clinical centers. 439 cases completed the study and 41 cases missed. All the patients enrolled were randomly divided into a control group and two treatment groups. The control group were treated by basic treatment, i. e. Prednisolone, VitB₁, VitB₁₂ and Dibazole, and the treatment groups were given acupuncture and moxibustion or the basic treatment plus acupuncture and moxibustion for 4 weeks. Symptoms and signs, House-Brackmann Scale and face deformity index (FDI) Scale were adopted to evaluate the therapeutic effects. **Results:** The general data were comparable among the three groups ($P > 0.05$). There were significant differences in the therapeutic effect among the three groups, the treatment groups being superior to the control group, and the therapeutic effect in the acupuncture group was the best ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The therapeutic effect for mild facial palsy and facial palsy at acute stage were superior to those for severe facial palsy and facial palsy at non-acute stage ($P < 0.01$). According to evaluation of House-Brackmann Scale and facial deformity index somatoic function Scale, the therapeutic effects of the treatment groups were better than that of the control group, acupuncture group being the best. **Conclusion:** Acupuncture and moxibustion have a definite therapeutic effect on Bell's palsy, better than that of basic control treatment or basic treatment plus acupuncture and moxibustion.

Author's address: College of Acupuncture and Massage, Chengdu University of TCM, Chengdu City 610075

Key words: Bell's palsy/acup-mox ther; Randomized controlled trial

(Original article on page 584)

Effects of Acupuncture at Acupoints of the Foot-Yangming Channel on Calcium Ion Concentration of Smooth Muscle Cells in Gastric Antrum in the Rabbit

Deng Yuanjiang, Yi Shouxiang, Lin Yaping, et al.

Objective: To investigate effect of acupuncture at acupoints of the Foot-Yangming Channel on Ca^{2+} in smooth muscle cells of stomach. **Methods:** 45 rabbits were randomly divided into normal saline control group, atropine model group, Foot-Yangming Channel acupoint group, Foot-Shaoyang Channel acupoint group and Foot-Taiyang Channel acupoint group. 9 rabbits in each group. After treatment, the isolated rabbit antral circular smooth muscle cells were prepared and the concentration of cytosolic calcium were determined with fluorospectrophotometry. **Results:** The concentration of cytosolic calcium in the Foot-Yangming Channel acupoint group

was significantly higher than those in other groups ($P < 0.01$). There was no significant difference among the other groups ($P > 0.05$). **Conclusion:** The effect of acupuncture at acupoints of the Foot-Yangming Channel on gastric motor is related with release of intercellular Ca^{2+} in smooth muscle of the stomach.

Author's address: Department of Acupuncture and Massage, Hunan College of TCM, Changsha 410007

Key words: Muscle, smooth, vessel/acup-mox effect; Acupoints, the Stomach Channel; Acupuncture therapy

(Original article on page 587)

Clinical Observation on 71 Cases of Chronic Renal Failure Treated by the Method for Regulating and Tonifying the Kidney and Removing Blood Stasis and Toxic Substances

Su Luxia, Zhong Bailing

Objective: To observe therapeutic effect of the method for regulating and tonifying the kidney and removing blood stasis and toxic substance on chronic renal failure. **Methods:** 111 cases were divided into treatment group of 71 cases and a control group of 40 cases. They were respectively treated with Yishen Granules and Niaoduqing. Before and after treatment, blood creatinine (Scr), endogenous creatinine clearance rate (Ccr), blood urea nitrogen (BUN), P, Ca, hemoglobin (Hb), 24-hour urine protein, total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C), low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), plasma endothelin (ET), calcitonin gene related peptide (CGRP) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were determined. **Results:** In the treatment group, 38 cases were markedly effective, 23 cases were effective and 10 cases were ineffective, with a total effective rate of 85.91%, and in the control group 2 cases were markedly effective, 7 cases were effective, 11 cases were ineffective, with a total effective rate of 72.5%. There was a significant difference in the markedly effective rate between the two groups ($P < 0.05$). The improvement of the indexes in the treatment group was superior to the control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** The method for regulating and tonifying the kidney and removing blood stasis and toxic substances can improve clinical symptoms and signs, decrease blood Scr and urine protein, ET, TNF- α , increase Ccr, CGRP, relieve anemia state, regulate metabolic disturbance of lipids and Ca and P in the patient of chronic renal failure. It is an effective therapy for chronic renal failure.

Author's address: Yantai City Yuhuangding Hospital, Yantai City 264000, Shandong Province

Key words: Renal failure, chronic/TCM ther; @Method for regulating and tonifying the kidney and removing blood stasis and toxic substances

(Original article on page 590)