

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.17.015

电针对功能性消化不良肝郁脾虚模型大鼠胃电节律及胃窦 Cajal 间质细胞表达的影响

潘小丽, 康朝霞, 毛玮, 范建超, 王计雨, 韩永丽, 张红星, 徐派的*

(湖北中医药大学, 湖北省武汉市武昌区昙华林 188 号, 430061)

摘要 目的 探讨电针治疗功能性消化不良肝郁脾虚证的可能机制。方法 30 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组和电针组, 每组 10 只。除空白组外均采用多因素干预法制备功能性消化不良肝郁脾虚大鼠模型。造模成功后电针组大鼠进行电针刺激 14 天, 空白组和模型组在治疗期间给予安静环境隔离, 不予任何处置。干预结束后进行胃电节律的测定, 免疫荧光法测定大鼠胃窦组织中 Cajal 间质细胞 (ICCs) 表达。结果 空白组 ICCs 表达为 $(20.19 \pm 1.12) \%$, 模型组为 $(5.32 \pm 0.97) \%$, 电针组为 $(26.87 \pm 2.23) \%$ 。与空白组比较, 模型组胃电慢波主频率与主功率明显减小, ICCs 表达降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 电针组大鼠胃电慢波主频率与主功率明显增加, 且 ICCs 表达明显增多 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 电针能够显著地增加胃电慢波节律和胃窦组织中 ICCs 表达水平, 从而影响胃肠运动, 恢复胃肠道运动功能, 这可能是电针治疗功能性消化不良肝郁脾虚证的作用机制之一。

关键词 功能性消化不良; 肝郁脾虚; 电针; 胃电节律; Cajal 间质细胞; 酪氨酸激酶受体

功能性消化不良 (functional dyspepsia, FD) 是多因素综合作用的结果, 目前最为公认的病因是胃肠道动力障碍、内脏高敏感性、脑肠轴-脑肠肽异常、心理因素和基因调控^[1]。大量研究已经证实, 胃肠道动力障碍是 FD 发生的重要病理生理基础^[2-3]。FD 是临床上最常见的功能性胃肠病 (FGIDs) 症候群的一种, 其症状反复而持久, 严重降低患者生活质量^[6-8]。Cajal 间质细胞 (interstitial cells of Cajal, ICCs) 作为胃肠道慢波活动的起搏细胞, 可产生慢波和传导电兴奋, 并与胃肠神经和平滑肌细胞通过突触和紧密的缝隙连接形成神经纤维-ICCs-平滑肌细胞 (ENS-ICCs-SMC) 网络, 介导神经递质的产生和调节, 成为胃肠道动力功能的基本单位^[9]。研究表明, 针灸可有效改善 FD 的胃肠动力障碍, 但有关治疗机制尚不完全明确^[2-3]。本研究从 ICCs 表达和胃电节律角度, 探索电针治疗 FD 的相关机制。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 2 月龄雄性 SD 大鼠 30 只, 体质量 (200 ± 20) g, 由三峡大学实验动物中心提供, 实验动物合格证号: 42010200000871。动物饲养于 SPF 级动物房, 温度 $22 \sim 25^{\circ}\text{C}$, 湿度 $50\% \sim 70\%$ 。适应性喂养 7 天后开始实验。

1.2 主要试剂与仪器

免疫组化试剂盒 (DAKO 公司, 批号 K5007); 兔抗酪氨酸激酶受体 (c-kit) 抗体 (Abcam 公司, 批号 ab5506); Alex Fluor 594 驴抗小鼠荧光二抗 (Invitrogen 公司, 批号 A21203); Alex Fluor 488 驴抗兔荧光二抗 (Invitrogen 公司, 批号 A21206); DAPI 染色液 (Sigma 公司, 批号 32670); 水合氯醛 (上海国药集团公司, 批号 40935760); 0.9% NaCl 注射液 (江苏苏中药业集团股份有限公司, 批号 17032507)。

华佗牌 32 号 25 mm 和 13 mm 无菌针灸针 (苏州医疗用品厂有限公司); HANS-200A 型韩式穴位神经刺激仪 (南京济生医疗科技有限公司); BL-420S 型生物机能实验系统 (成都泰盟科技有限公司); Forma Scientific 超低温冰箱 (美国 Thermo 公

基金项目: 国家自然科学基金 (81473790, 81704178); 2016 年度黄鹤英才 (专项) 计划 (武人才办 [2017] 2 号); 湖北省教育厅科研计划 (B2017103); 湖北中医药大学青苗计划 (2016ZZX011)

* 通讯作者: xupaidi@hbtcm.edu.cn

司); SP8 型共聚焦显微镜、EG1150 型石蜡包埋机、RM223 型组织切片机, 均为德国 Leica 公司产品; 自制大鼠鼠衣及悬吊装置。

1.3 动物分组及造模

30 只大鼠根据随机数字表分为空白组、模型组、电针组, 每组 10 只。参考文献 [9] 方法, 模型组和电针组大鼠采用多因素干预法制备功能性消化不良肝郁脾虚模型: 夹尾刺激 (用长尾夹包裹纱布以免损伤大鼠尾部, 夹在大鼠尾部后 2/3 处) 每天 2 次, 每次 30 min 逢单日常禁食, 饮水正常, 并用 -4°C 0.9% NaCl 注射液灌胃每次 2 ml, 每日 1 次, 造模 14 天。大鼠体重出现负增长、毛发枯乱发黄、粪便呈黄绿色稀便, 活跃程度减弱、抓捕反应迟钝, 情绪由开始的易怒烦躁转为情绪低落等即为造模成功 [8-9]。模型组和电针组大鼠 20 只均造模成功。空白组大鼠造模期间给予安静环境隔离, 不予任何处置。

1.4 电针刺激

造模后第 2 天开始电针刺激。电针组大鼠穿鼠衣束缚后悬挂于自制悬挂装置上, 参照文献 [10] 取大鼠的“后三里”穴, 用 32 号 25 mm 毫针直刺 7.5 ~ 12.5 mm, 然后接韩氏穴位神经刺激仪, 连续波, 频率 2 Hz/100 Hz, 强度 1 mA “太冲”穴, 用 32 号 13 mm 毫针斜刺 2.6 ~ 5.2 mm, 静留针; 每次治疗时间 30 min, 每 24 h 治疗 1 次。治疗 14 天。空白组和模型组在治疗期间给予安静环境隔离, 不予任何处置。

1.5 胃电图检测

实验前 24 h 禁食。腹腔注射 8% 水合氯醛 (0.35 ml/100 g) 麻醉大鼠, 用自制鼠板将大鼠固定, 剪去大鼠腹部正中中线脐部区域的毛发。根据文献 [11] 分别将 3 根 Ag/AgCl 电极垂直刺入胃窦、胃体体表投影区及相关电极放置区。采用 BL-420S 生物机能实验系统采集大鼠体表胃电描记, 测定胃电慢波主频率和主功率。采集频率 400 Hz, 描记时间 30 min。

1.6 免疫荧光法观察大鼠胃窦 ICCs 表达

治疗结束后禁食 24 h, 称重。完成胃电图检测以后, 固定大鼠四肢, 剖开腹腔, 结扎胃贲门和幽门, 然后沿胃大弯剪开胃体, 用 0.9% NaCl 注射液冲洗干净胃内容物后, 剪取胃窦部分放于冻存管中, 放置于 -80°C 冰箱中待测。将包埋好的组织切片首先烤片, 58°C 1 h; 将石蜡切片脱蜡至水中准备修复; 抗原修复后进行封闭; 加一抗 4°C 过夜 (37°C 孵育 1 h), 之后进行复温; 加兔抗 c-kit 37°C

孵育 30 min, TBS 洗 5 min $\times$ 3 次, 用 DAPI (1 : 100) 染核, 避光孵育 10 min; TBS 洗 5 min $\times$ 3 次; 用防荧光淬灭剂封片; 采用激光共聚焦显微镜观察。

1.7 统计学方法

应用 SPSS 16.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 首先进行方差齐性检验, 数据齐性, 多组间比较用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠胃电图结果比较

表 1 示, 与空白组比较, 模型组胃电慢波主频率和主功率明显减小 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 电针组大鼠胃电慢波主频率和主功率明显增大 ($P < 0.05$)。提示电针能够显著增加胃电慢波节律, 恢复胃肠道运动功能。

表 1 各组大鼠胃电慢波频率和主功率及胃窦 ICCs 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	主频率 (mHz)	主功率 (mV)	ICCs (%)
空白组	10	4.05 ± 0.44	52.23 ± 2.70	20.19 ± 1.12
模型组	10	$2.73 \pm 0.64^*$	$2.01 \pm 2.03^*$	$5.32 \pm 0.97^*$
电针组	10	$3.89 \pm 0.28^{\Delta}$	$46.61 \pm 2.82^{\Delta}$	$26.87 \pm 2.23^{\Delta\Delta}$

注: ICCs, Cajal 间质细胞; 与空白组比较, $* P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.2 各组大鼠胃窦 ICCs 表达比较

正常情况下, 光镜下胃窦组织 c-kit 呈 (+) ICCs 表达为肌层之间夹杂的亮红色, 形状为圆形或边缘不规则。图 1 (见后插一) 示, 空白组 c-kit 呈 (+) ICCs 数量较多。表 1 示, 与空白组比较, 模型组大鼠 c-kit 呈 (+) 的 ICCs 表达减少 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 电针组大鼠 c-kit 呈 (+) 的 ICCs 表达显著增加 ($P < 0.01$)。

3 讨论

研究证实, 胃肠动力障碍是 FD 发生的重要病理生理基础 [12]。胃肠运动功能障碍是胃电节律紊乱、胃排空下降、胃窦动力指数降低、消化间期移行性运动复合波 III 期 (强力收缩期) 持续时间缩短或缺失等一系列表现的总称 [13]。目前临床对 FD 的治疗, 主要采用药物治疗, 难以适应复杂的个体差异。非药物疗法尤其是针灸治疗 FD 疗效较好, 研究表明, 电针足三里穴、太冲穴治疗 FD 能够恢复胃肠动力障碍和恢复 FD 异常胃肠激素水平 [14-15]。

ICCs 是胃肠道平滑肌中胃电慢波电位的起搏

细胞,可以产生、传导电兴奋到 ENS-ICCs-SMC 的网络结构,介导神经递质的产生和调节,是消化系统重要的信息交换通道^[14]。ICCs 经电偶联将肠道神经系统的兴奋或抑制信号通过缝隙连接传递到平滑肌细胞,使胃肠道的平滑肌细胞产生收缩或舒张,因此 ICCs 是胃肠道基本动力单位 ENS-ICCs-SMC 最重要的协调者。越来越多的证据表明,ICCs 的减少、损害或网状结构异常均可以导致胃肠道的动力障碍的发生,这对胃肠运动障碍疾病有重要的病理生理学意义^[17-19]。ICCs 已经被广泛地认可为治疗胃肠动力障碍性疾病的必要靶点^[20-21]。c-kit 是胃肠道 ICCs 的特异性受体,又称干细胞因子受体。干细胞因子(SCF)作为 c-kit 特异性配体与 c-kit 通过胞外结构域 1-3 区结合后激活的一系列信号分子,进而调节胃肠道中 ICCs 的增殖、分化、发育和结构完整性^[14]。

本研究以多因素刺激法使大鼠激怒、疲劳、饮食失节,形成最接近肝郁脾虚证型的 FD 模型。胃平滑肌的电活动包括静息膜电位、慢波电位及动作电位。慢波也称电控活动或起搏点电位,决定了胃收缩运动的最大频率、传播速度和传播方向。通过胃电图测定可以比较客观地反映胃电的节律和功率^[11]。电针能够显著提高 FD 大鼠胃电慢波频率,可以较为客观地反映电针对 FD 大鼠胃肠动力的促进作用。同时,免疫荧光检测提示电针能够有效地提高胃窦中 c-kit 呈(+)的 ICCs 的表达,说明电针是通过上调 ICCs 的表达,增强胃电慢波的产生和传导,从而促进胃肠道动力活动,这可能是电针能够有效治疗 FD 胃肠动力障碍的内在机制。

参考文献

- [1] YARANDI SS, CHRISTIE J. Functional dyspepsia in review: pathophysiology and challenges in the diagnosis and management due to coexisting gastroesophageal reflux disease and irritable bowel syndrome [J]. Gastroenterol Res Pract, 2013, 351086. doi: 10.1155/2013/351086.
- [2] 徐派的, 张红星, 杨云, 等. 电针对功能性消化不良模型大鼠胃肠动力及 VIP 和 CGRP 水平的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(3): 360-364.
- [3] 康朝霞, 张红星, 徐派的, 等. 电针对功能性消化不良大鼠胃窦 ghrelin 及 mTOR 的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 25(17): 1553-1557.
- [4] 徐派的, 杨云, 张红星, 等. 电针对功能性消化不良肝郁脾虚型大鼠中枢及外周 VIP 及其受体 VPAC-1 的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(8): 3020-3024.
- [5] 徐派的, 辛玉, 张红星, 等. 电针对功能性消化不良肝郁脾虚型大鼠中枢及外周降钙素基因相关肽及受体活性修饰蛋白的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2015, 23(21): 3433-3439.
- [6] TALLEY NJ, FORD AC. Functional dyspepsia [J]. N Engl J Med, 2015, 373: 1853-1863. doi: 10.1056/NEJMra1501505.
- [7] ABDEL-AZIZ H, WADIE W, ZAKI HF, et al. Novel sequential stress model for functional dyspepsia: Efficacy of the herbal preparation STW5 [J]. Phytomedicine, 2015, 22(5): 588-595.
- [8] VANHEEL H, VANUYTSEL T, VAN OUDENHOVE L, et al. Postprandial symptoms originating from the stomach in functional dyspepsia [J]. Neurogastroenterol Motil, 2013, 25(11): 911-e703. doi: 10.1111/nmo.12227.
- [9] BLAIR PJ, RHEE PL, SANDERS KM, et al. The significance of interstitial cells in neuro-gastroenterology [J]. Neurogastroenterol Motil, 2014, 20(3): 294-317.
- [10] YIN CS, JEONG HS, PARK HJ, et al. A proposed transpositional acupoint system in a mouse and rat model [J]. Res Vet Sci, 2008, 84(2): 159-165.
- [11] 张月, 张国山, 刘雨儿, 等. 电针足三里对功能性消化不良大鼠胃电节律的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(26): 3953-3957.
- [12] LI HAI, CHEN Y, LIU SHI, et al. Long-pulse gastric electrical stimulation protects interstitial cells of Cajal in diabetic rats via IGF-1 signaling pathway [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(23): 5353-5363.
- [13] MIWA H, WATARI J, FUKUI H, et al. Current understanding of pathogenesis of functional dyspepsia [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2011, 26(3): 53-60.
- [14] 邹燃, 王琼, 杨云, 等. 电针对功能性消化不良模型大鼠胃排空及血清胃动素的影响 [J]. 湖北中医杂志, 2016, 38(10): 1-3.
- [15] 杨云, 徐派的, 张红星, 等. 神经降压素介导的脑-肠轴在电针治疗功能性消化不良大鼠中的作用 [J]. 针刺研究, 2016, 41(1): 35-39, 50.
- [16] 车轩, 金宏波, 杨永滨, 等. Cajal 间质细胞及其可塑性的研究进展 [J]. 现在医学生物进展, 2016, 16(10): 1988-1990.
- [17] CAMBOROVA P, HUBKA P, SULKOVA I, et al. The pacemaker activity of interstitial cells of Cajal and gastric electrical activity [J]. Physiol Res, 2003, 52(3): 275-284.
- [18] HUIZINGA JD, LAMMERS WJ. Gut peristalsis is governed by a multitude of cooperating mechanisms [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009, 296(1): G1-G8.
- [19] ZHANG G, XIE S, HU W. Effects of electroacupuncture on interstitial cells of cajal (ICC) ultrastructure and connexin 43 protein expression in the gastrointestinal tract of functional dyspepsia (FD) rats [J]. Med Sci Monit, 2016,

22: 2021 - 2027.

[20] YUN HY, SUNGR, KIMYC, et al. Regional distribution of interstitial cells of cajal (ICC) in human [J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2010, 14(5): 317 - 324.

[21] ANDERSON DM, LYMAN SD, BAIRD A, et al. Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms [J]. Cell, 1990, 63(1): 235 - 243.

Effect of Electro-Acupuncture on Gastric Electrical Rhythm and Expression of Cajal Interstitial Cells of Functional Dyspepsia Model Rats with Liver Stagnation and Spleen Deficiency

PAN Xiaoli, KANG Zhaoxia, MAO Wei, FAN Jianchao, WANG Jiyu, HAN Yongli, ZHANG Hongxing, XU Paidi

(Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan, 430061)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of electro-acupuncture (EA) on rats with liver stagnation and spleen deficiency syndrome of functional dyspepsia (FD). **Methods** A total of 30 rats were randomly divided into blank group, model group, and EA group with 10 rats in each group. Except for the blank group, multiple factor intervention method was used to prepare the rat model with liver stagnation and spleen deficiency of functional dyspepsia. Electro-acupuncture therapy has been used for successfully established FD models for 14 days. Rats in blank group and model group were isolated in a silent environment during the treatment without any intervention. Gastric electrical rhythm was determined after intervention. Immunofluorescence method was used to measure the expressions of ICCs in rats' sinuses ventriculi textura. **Results** The expressions of ICCs of the blank group was (20.19 ± 1.12) % and the model group was (5.32 ± 0.97) %, the EA group was (26.87 ± 2.23) %. Compared with the blank group, the ratio of gastric electrical slow wave/main power and the expressions of ICCs were obviously decreased ($P < 0.05$). Compared with model group, the ratio of gastric electrical slow wave/main power and the expressions of ICCs were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Electro-acupuncture therapy can significantly increase the level of ICCs expression and gastric electrical slow wave, furthering influence the gastrointestinal motility and recovery of gastrointestinal motility disorder, which indicates electro-acupuncture therapy could be the possible mechanism on liver stagnation and spleen deficiency syndrome of functional dyspepsia.

Keywords Functional dyspepsia; liver stagnation and spleen deficiency; electro-acupuncture; gastric electrical rhythm; Cajal interstitial cell; c-kit

(收稿日期: 2018-01-01; 修回日期: 2018-06-05)

编辑: 王利芬

第九届国际中医妇科学术大会参会通知 (第一轮征文)

由世界中医药学会联合会妇科专业委员会主办, 湖北福人药业股份有限公司协办的“第九届国际中医妇科学术大会”, 以“生殖障碍性疾病及妇科炎性病变中医诊疗研究”为主题, 拟定于 2018 年 11 月在湖北省举行, 届时将举办妇科炎性病变中医诊疗高级论坛, 同时邀请国内外著名妇科专家进行专题学术讲座, 并设“福人杯”金刚藤胶囊有奖征文活动, 评选优秀学术论文。现将有关事宜通知如下:

一、征文内容

1. 名老中医对妇科炎症及生殖障碍性疾病的诊疗方案及学术经验; 2. 妇科炎症及生殖障碍性疾病的中医诊治优势及其特色疗法; 3. 新技术、新疗法在诊治妇科炎症及生殖障碍性疾病中的应用及最新研究进展; 4. 医家诊治妇科炎症及生殖障碍性疾病经验挖掘与文献整理; 5. 金刚藤胶囊组方研究、药理作用及临床应用; 6. 金刚藤胶囊药效基础及安全性观察; 7. 金刚藤胶囊深层次开发思路及远景规划。

二、征文要求

1. 论文要求主题鲜明, 论据充分, 内容详实, 文责自负。2. 每篇论文均以 word 格式投稿, 全文篇幅 4000 字左右。3. 所有论文一律采用电子投稿 (fkfh189@163.com), 请自留底稿, 恕不退稿。

三、特别提示

1. 本次征文一经选用, 即收入学术大会论文集。2. 会期评选优秀学术论文, 颁发“福人杯”金刚藤胶囊有奖征文一、二、三等奖奖金及证书。3. 论文投稿截止日期: 2018 年 9 月 30 日。

四、会议负责人及联系方式: 刘丹卓: 13787132521, fkfh189@163.com; 通讯地址: 410007, 湖南省长沙市雨花区韶山中路 113 号湖南中医药大学