

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.10.014

电针对结直肠扩张刺激模型大鼠 内脏伤害性痛反应的影响

胡嘉同¹, 王晓宇^{2*}, 何伟², 宿杨帅², 张晓宁², 万红叶², 李志刚^{2*}

(1. 北京中医药大学, 北京市朝阳区北三环东路 11 号, 100029; 2. 中国中医科学院针灸研究所)

摘要 目的 探讨不同强度、不同穴位电针刺激对结直肠扩张刺激引起的大鼠内脏伤害性痛反应的影响及其可能机制。方法 SD 大鼠 54 只, 分别进行电生理实验 (30 只) 和形态学实验 (24 只)。电生理实验中先选出 6 只大鼠用于结直肠扩张 (CRD) 刺激诱导腹直肌肌电发生阈值观察, 其余大鼠随机分为足三里组、天枢组和曲池组, 每组 8 只, 麻醉状态下给予 CRD 刺激造成大鼠内脏伤害性疼痛, 采用 1 mA 和 3 mA 电流强度电针刺激大鼠“足三里”“天枢”“曲池”, 持续时间 140 s, 记录其对腹直肌肌电活动的曲线下面积、频率、振幅。形态学实验大鼠随机分为正常组、模型组、1 mA 足三里组、1 mA 天枢组、1 mA 曲池组、3 mA 足三里组、3 mA 天枢组、3 mA 曲池组, 每组 3 只, 电针刺激持续时间 30 min, 采用免疫组化方法观察不同强度不同穴位电针刺激对 CRD 刺激造成孤束核 c-fos 阳性神经元表达的影响。结果 60 mmHg 的 CRD 可诱发大鼠内脏痛, 表现为腹直肌肌电的曲线下面积、频率和振幅明显增加, 与 CRD 前相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 故将其选为 CRD 刺激值。1 mA 电针“天枢”可以显著改善伤害性刺激引起的腹直肌肌电的发放 ($P < 0.05$), c-fos 阳性神经元在延髓孤束核表达的数量和密度均明显减少 ($P < 0.05$)。而 1 mA 电针“足三里”和“曲池”, 对 CRD 引起的腹直肌肌电发放没有显著改善。3 mA 电针“足三里”和“天枢”, 均可以明显抑制 CRD 引起的腹直肌肌电的发放 ($P < 0.01$), 并减少 CRD 造成 c-fos 在孤束核的表达增加 ($P < 0.05$)。结论 电针“天枢”和“足三里”均可以显著改善 CRD 引起的伤害性痛反应, 减少 c-fos 阳性神经元在大鼠延髓孤束核的表达, 但同节段“天枢”抑制内脏痛所需的刺激量较小。

关键词 内脏痛; 刺激强度; 电针; 孤束核; c-fos

内脏痛是一种较为常见的临床症状, 长期发作可造成患者继发性躯体痛敏和负面情绪, 严重影响生活质量^[1]。目前, 内脏痛的西药治疗主要包括阿片类及阿片受体激动剂, 但存在成瘾等问题^[2-3]。研究显示, 针灸可以明显缓解内脏痛^[4-5], 如足三里穴经皮电刺激可有效缓解肠易激综合征患者 (IBS) 内脏高敏感和排便异常^[6], 并使其心理评分趋于正常^[7], 缓解其不良情绪。另有研究观察发现, 内脏痛动物模型的镇痛效应与针刺对伤害性信息在脊髓和上位中枢的汇聚、脑肠肽的合成与分泌以及肠道内在神经系统的调节相关^[8-10]。既往有研究观察了不同电针刺激强度对针刺镇痛效应的影响^[11-12], 也有研究聚焦于不同穴位的穴位特异性在针刺镇痛中发挥效应的差

异^[13], 但是对于不同强度电针不同穴位对内脏痛的镇痛效应比较还未见详细的研究。

结直肠扩张 (colorectal distension, CRD) 是较为理想的内脏伤害性刺激模型, 广泛运用在内脏痛的动物实验研究中^[14]。本研究采用结直肠扩张造成内脏伤害性刺激, 以腹直肌肌电的发放作为内脏伤害性反应指标, 观察不同强度电针不同穴位对伤害性痛反应的抑制作用, 同时观察孤束核中 c-fos 反应阳性神经元的变化, 比较不同强度电针不同穴位对内脏伤害性反应的影响及其机制, 为针灸临床选穴提供科学依据。本研究经中国中医科学院动物福利伦理审查, 审查证号: 中科针伦 (D2018-04-13-4)。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 54 只, 7 ~ 9 周龄,

基金项目: 国家自然科学基金 (81673884)

* 通讯作者: lizhigang620@126.com, xiaorain_wang@hotmail.com

体质量 200 ~ 250 g, 由中国食品药品检定研究院提供, 实验动物生产许可证号: SCXK (京) 2014-0013, 实验动物使用许可证号: SYXK (京) 2016-0021。动物在自然光照环境下分笼饲养, 环境温度 (22 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 湿度 (55 ± 5) %, 适应性饲养 3 天后开始实验, 实验前一天禁食不禁水 12 h。

54 只大鼠采用随机数字表法选择 30 只大鼠用于电生理实验, 选择其中 6 只大鼠用于 CRD 刺激诱导腹直肌肌电发放阈值的观察, 选定实验阈值。其余 24 只大鼠采用随机数字表法分为足三里组、天枢组、曲池组, 每组 8 只, 每组大鼠再按照随机数字表产生的顺序先后完成 1 mA 和 3 mA 的电针刺激。另外 24 只大鼠用于形态学实验, 通过随机数字表法分为正常组、模型组、1 mA 足三里组、1 mA 天枢组、1 mA 曲池组、3 mA 足三里组、3 mA 天枢组、3 mA 曲池组, 每组 3 只。

1.2 主要仪器与试剂

PowerLab8/35 型生理信号处理系统 (澳大利亚 ADI 公司), NEURCLOGNL900D 型桥式放大器及生物电放大器 (英国 Digitimer 公司), 铂金丝电极 (批号 772000, 美国 A-M Systems 公司), R500 型呼吸麻醉机 (瑞沃德生命科技有限公司), HA-100 型韩式电针仪 (南京济生医疗科技有限公司), FV1200 型全光谱扫描共聚焦显微镜 (日本奥林巴斯公司)。

4% 多聚甲醛溶液 (批号 P1110)、封闭山羊血清 (批号 SL038)、曲拉通 Triton X-100 (批号 T8200), 均为中国索莱宝公司产品; c-fos 抗体 (批号 ab190289, 美国 Abcam 公司); 绿色荧光尼氏小体二抗 (批号 NeuroTrace 500/525)、羊抗兔 IgG 第二抗体 (批号 Alexa Fluor Plus 594), 均为美国 Thermo Fisher 公司; 异氟烷 (批号 H19980141), 河北一品制药; 乌拉坦 (批号 94300-250), 美国 Sigma-Aldrich 公司。羊血清封闭液 [羊血清溶于 0.5% TritonX-100 的 0.1 mol/L 浓度的磷酸缓冲液 (PBS)] ; 自配磷酸缓冲液: 1L 0.1 mol/L 浓度磷酸缓冲液中含无水磷酸二氢钠 (批号 20040818) 2.96 g, 磷酸氢二钠 32.14 g (批号 10020318), 均为中国国药集团化学试剂有限公司。

1.3 结直肠扩张和腹直肌肌电记录

用于腹直肌肌电记录实验^[3]的 30 只大鼠在异氟烷 (流量 1L, 浓度 0.8%) 麻醉下, 仰卧位固定于手术台。将涂抹石蜡油后的自制扩张气囊经大鼠肛门插入直肠内 6 ~ 7cm, 球囊导管用胶带固定

于大鼠尾根部, 距肛门 1cm 处。气囊导管末端连接三通管, 三通管一端连接加压用注射器, 另一端与桥式放大器相连。大鼠腹部剃毛, 切开皮肤后拨离皮下组织暴露腹直肌肌腹, 将两根铂金丝电极埋置入大肌肉内 (电极间距 3 mm), 并用生理盐水浸润过的纱布覆盖于伤口表面。生物电放大器与两根铂金丝相连记录到稳定的腹直肌肌电后, 首先给予 6 只用于观察 CRD 刺激诱导腹直肌肌电发放阈值的大鼠持续时间为 20 s 不同强度的 CRD 刺激, 选定 CRD 造成腹直肌肌电明显变化的压力阈值。然后给予其余 24 只大鼠压力阈值的 CRD 刺激, 记录 CRD 刺激前后腹直肌肌电的变化。休息 5 min 后, 足三里组、天枢组、曲池组分别于相应穴位进行不同强度 1 mA 和 3 mA 的电针刺激, 直方波, 频率 2 Hz, 持续时间 140 s, 两次电针间隔 10 min。取穴参照《实验针灸学》的大鼠标准穴位图谱^[4]并根据大鼠解剖及生理特点定位。穴位选取“足三里”“天枢”“曲池”, 采用直径为 0.18 mm × 13 mm 的针灸针 (批号 212180419, 北京中研太和医疗器械有限公司), 两根针灸针针尖距离 1 mm, 直刺, 深度 2 ~ 4 mm, 两根针灸针分别连接于韩式电针仪正负极给予电针刺激。在实验过程中全程记录大鼠腹直肌肌电的发放, 并于电针开始后 60 s 给予 20 s 的 CRD 刺激。在每个穴位组分别给予 1 mA、3 mA 强度电针刺激后, 对比电针干预前后, 大鼠腹直肌肌电曲线下面积、频率和振幅的差异。

1.4 免疫荧光观察延髓孤束核 c-fos 表达

用于形态学实验 24 只大鼠腹腔注射 10% 的乌拉坦溶液 (1 ml/100 g) 进行麻醉。正常组实验动物不进行任何操作, 模型组动物在麻醉 10 min 后给予大鼠压力阈值的 CRD 刺激, 持续时间 30 min。1 mA 足三里组、1 mA 天枢组、1 mA 曲池组、3 mA 足三里组、3 mA 天枢组、3 mA 曲池组在 CRD 刺激同时给予电针刺激, 采用疏密波, 频率 2 ~ 100 Hz, 持续时间 30 min。给予电针刺激的两根针灸针针尖距离 1 mm, 直刺, 深度 2 ~ 4 mm, 两根针灸针连接于韩式电针仪。CRD 刺激和电针干预结束 15 min 后使用 4% 的多聚甲醛溶液经心脏灌流处死动物并取材。

c-fos 抗体可以特异性地与神经元表面受体结合, 用于判断神经元是否被伤害性刺激激活。将采集到的延髓样本放入 4% 的多聚甲醛溶液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下固定 2 h 后, 放入 25% 的蔗糖溶液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下脱水 12 h。脱水样本切片后经 3% 羊血清封闭

液封闭 30 min, 兔来源 c-fos 抗体溶液 (浓度 1 : 500), 4℃ 条件下孵育过夜。经 0.1 mol/L PBS 冲洗 3 次后, 滴入羊抗兔 IgG 第二抗体 (浓度 1 : 500) 和绿色荧光尼氏小体第二抗体 (浓度 1 : 500) 常温孵育 2 h 后盖上盖玻片。所有样本均使用全光谱扫描共聚焦显微镜进行观察。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件进行数据处理, 计量资料以均数 $\pm$ 标准误 ($\bar{x} \pm s$) 表示。符合正态分布且方差齐者采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 SNK- q 检验; 不满足方差齐性或正态分布则采用 Kruskal-Wallis H 检验。配对样本数据采用配对样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 产生明显内脏痛现象的结直肠扩张压力阈值测定

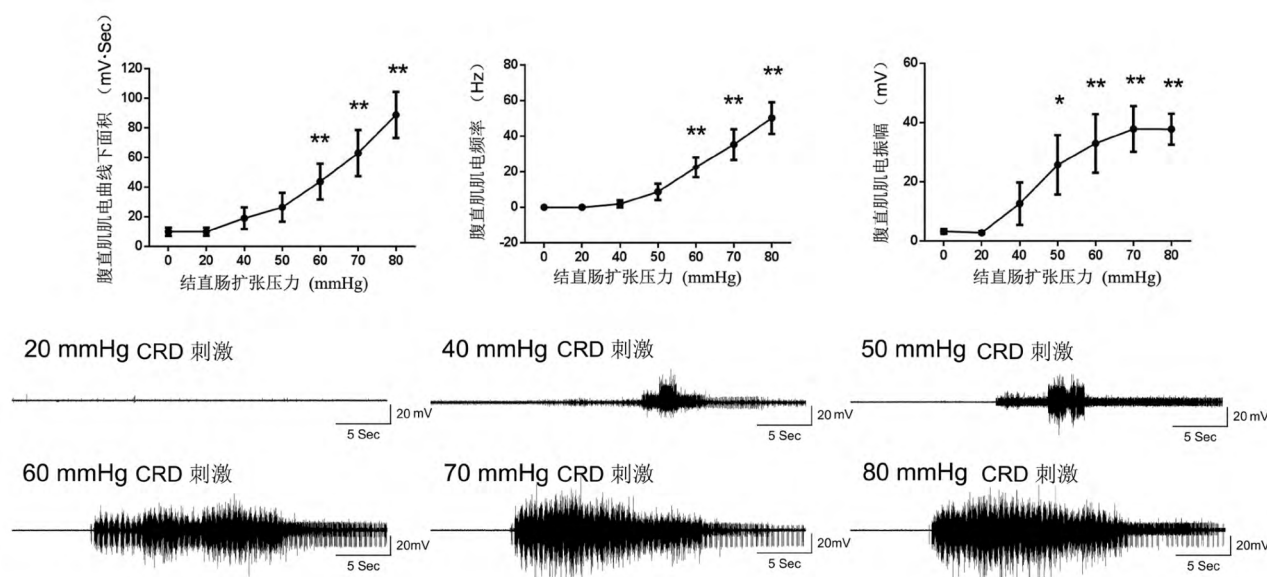
给予吸入麻醉的大鼠不同同步阶压力 (20、40、50、60、70 和 80 mmHg) 的 CRD 刺激。通过对腹直肌肌电的曲线下面积、放电频率和振幅进行计算, 观察到腹直肌肌电的发放逐渐增加。与扩张前相比, 60 mmHg、70 mmHg 和 80 mmHg 扩张压力引起的腹直肌肌电发放明显增加, 表现为腹直肌肌电曲线下面积、放电频率和振幅均显著增加 ($P < 0.01$), 且 60 mmHg、70 mmHg、80 mmHg 合指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 故以 60 mmHg 作为诱发结直肠扩张的压力阈值。见图 1。

2.2 不同强度电针刺激不同穴位对 60 mmHg 结直肠扩张压力诱发腹直肌肌电活动抑制作用的比较

天枢组 1 mA 干预后, 腹直肌肌电的曲线下面积 (24.25 ± 14.28) mV · Sec、放电频率 (19.63 ± 6.77) Hz 和振幅 (23.80 ± 6.44) mV, 与电针前 (42.29 ± 6.08) mV · Sec、(34.25 ± 4.91) Hz、(42.04 ± 9.12) mV 相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。足三里组和曲池组 1 mA 干预后, 与本组电针前相比, 大鼠腹直肌肌电曲线下面积、放电频率和振幅差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 2。

足三里组 3 mA 干预后, 腹直肌肌电的曲线下面积 (16.38 ± 2.99) mV · Sec、放电频率 (10.49 ± 2.64) Hz 和振幅 (22.79 ± 5.57) mV 均显著减少, 与电针前的 (43.66 ± 9.69) mV · Sec、(31.10 ± 3.19) Hz、(39.98 ± 5.47) mV 相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。天枢组 3 mA 干预后, 腹直肌肌电的曲线下面积 (14.47 ± 15.65) mV · Sec、放电频率 (12.41 ± 4.58) Hz 和振幅 (8.63 ± 4.28) mV 均显著减少, 与电针前 (55.61 ± 11.51) mV · Sec、(35.29 ± 5.65) Hz、(44.94 ± 6.67) mV 相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。曲池组 3 mA 干预后, 与电针前相比大鼠腹直肌肌电曲线下面积、放电频率和振幅均无明显差异 ($P > 0.05$)。见图 3。

足三里组中与 1 mA 相比, 3 mA 电针可降低



注: 与结直肠扩张前比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 1 不同结直肠扩张压力对大鼠腹直肌肌电的影响比较

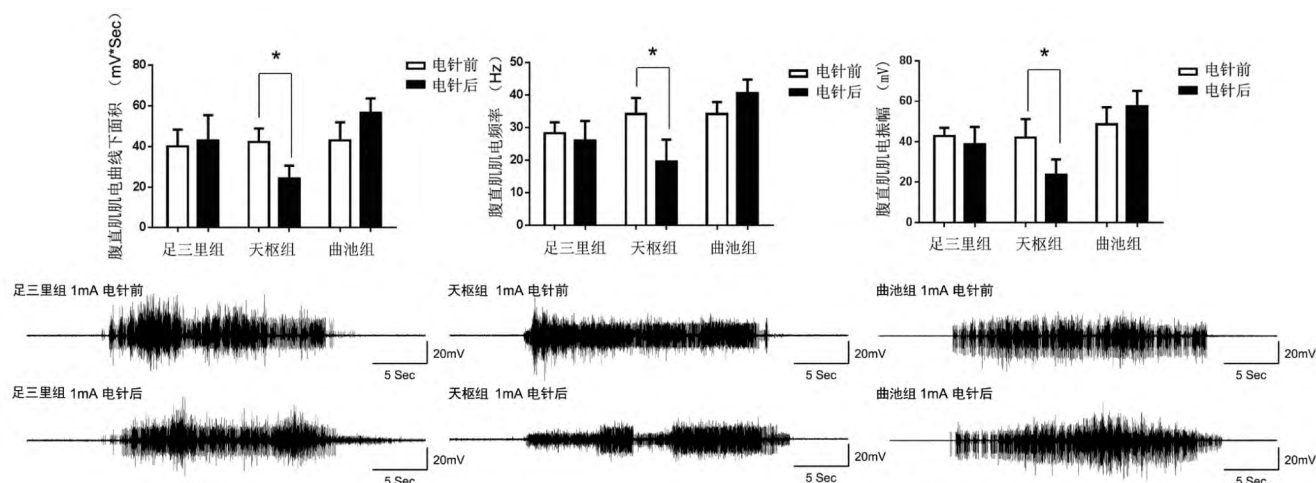


图2 各组大鼠在 1 mA 强度电针刺激前后腹直肌电活动比较

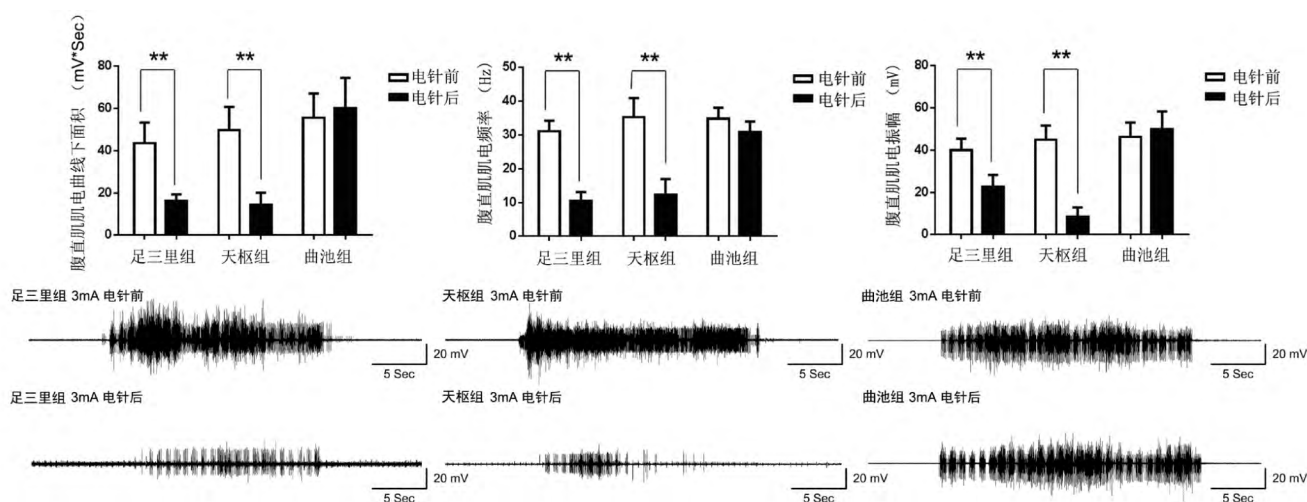


图3 各组大鼠在 3 mA 强度电针刺激前后腹直肌电活动比较

CRD 刺激造成的大鼠腹直肌肌电的曲线下面积、放电频率和振幅减少, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。天枢组中 1 mA 和 3 mA 电针均可降低 CRD 刺激造成的大鼠腹直肌肌电的曲线下面积、放电频率和振幅数值, 但两者之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。曲池组中 1 mA 和 3 mA 电针对 CRD 刺激造成的大鼠腹直肌肌电的曲线下面积、放电频率和振幅的增加无明显影响, 且两者之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 不同强度电针刺激不同穴位对 60 mmHg 压力结直肠扩张所致延髓孤束核 c-fos 表达的影响

持续给予大鼠 60 mmHg CRD 刺激 30 min 后, 模型组大鼠 c-fos 阳性神经元在孤束核区域表达数量为 (58.17 ± 4.59) 个、荧光强度为 (3.59 ± 0.55) AU, 均较正常组的 (4.67 ± 1.10) 个、

(0.54 ± 0.12) AU 显著增加 ($P < 0.01$)。

1 mA 天枢组大鼠孤束核的 c-fos 阳性细胞数量为 (38.33 ± 3.97) 个, 荧光强度 (1.37 ± 0.16) AU, 与模型组相比明显降低 ($P < 0.05$)。1 mA 足三里组和 1 mA 曲池组对孤束核中 c-fos 阳性细胞没有明显的抑制作用 ($P > 0.05$)。见图 4 (彩图见前插一页)。

3 mA 足三里组大鼠孤束核的 c-fos 阳性细胞数量为 (36.83 ± 5.12) 个, 荧光强度 (1.86 ± 0.32) AU, 与模型组相比明显下降 ($P < 0.05$)。3 mA 天枢穴组大鼠孤束核的 c-fos 阳性细胞数量 (31.50 ± 3.62) 个, 荧光强度 (1.40 ± 0.27) AU, 与模型组相比明显下降 ($P < 0.05$)。3 mA 曲池组大鼠孤束核中 c-fos 阳性细胞没有明显的抑制作用 ($P > 0.05$)。这些结果与伤害性肌电发放的

结果一致。见图 5 (彩图见前插一页)。

与 1 mA 足三里组相比, 3 mA 足三里组可明显抑制 CRD 刺激造成的大鼠孤束核中 c-fos 神经元的表达, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。1 mA 天枢组和 3 mA 天枢组均可降低 CRD 刺激造成的大鼠孤束核中 c-fos 神经元表达的增强, 但两者之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。1 mA 曲池组和 3 mA 曲池组对 CRD 刺激造成的大鼠孤束核中 c-fos 神经元表达的增强无明显影响, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

本研究观察到 1 mA 电针天枢穴、3 mA 电针足三里和天枢穴均可显著减少 CRD 刺激引起的伤害性痛反应, 缓解大鼠内脏痛, 减少 c-fos 阳性神经元在大鼠延髓孤束核中的表达。与大量的研究中观察到电针可有效减少大鼠内脏痛痛行为的现象一致, 也与针刺镇痛的节段性和全身性的规律一致^[10, 17]。

疼痛调控的闸门学说为针刺节段性镇痛提供了科学基础, 激活 A 类纤维可以抑制 C 纤维的伤害性传入。穴位所处的神经节段和内脏痛镇痛效果的关系十分密切, 且低强度电针的节段性镇痛效应部分地由 Aδ 神经纤维上的酸敏感离子通道 3 (ASIC3) 受体介导的^[18]。大鼠结肠传入神经节段位于脊髓水平 T13-L2、L6-S1^[19-20], 与天枢感觉传入的神经节段大致相同。也有研究观察到同神经节段水平下 C-纤维反射的痛行为可以通过低于 Aδ 纤维激活阈值强度的电针来抑制^[21]。在本研究中观察到 1 mA 电针天枢穴能够抑制 CRD 伤害性痛反应与经 Aδ 类神经纤维传入在脊髓中枢而发挥节段性镇痛效应相关。

以往有研究表明, 较强的电针刺激可兴奋传导痛信息的 C 纤维, 并激活中缝大核痛负反馈机制, 引起全身性强而广泛的镇痛效应^[22]。足三里神经节段位于脊髓水平 L3-L6^[23], 与结肠的神经节段支配相比, 两者仅在部分神经节段有支配的重合。本研究中观察到 1 mA 电针足三里的镇痛效应不如 3 mA 电针的镇痛效应明显, 与足三里对 CRD 刺激下同节段脊髓广动力 (WDR) 神经元激活反应的研究中观察到 1 mA 电针抑制率为 (11.43 ± 3.40)%, 而 4 mA 电针抑制率达到 46% 的结果^[24]相似。大量研究中也观察到与 1 mA 的电针强度相比, 足三里 2~3 mA 电针对关节炎大鼠有即时较好镇痛作用^[25], 以及高强度较低强度电针小鼠“后

三里”后更易出现异位痛阈增高的现象^[26]。孤束核是内脏感觉在大脑中继站, 其尾端接受来自胃肠道的内脏传入信息^[27]。c-fos 作为一种即刻早期基因, 被认为是神经元活动的细胞标记物和评估伤害性刺激程度的指标^[28-29]。有研究表明, 不同形式的内脏伤害性刺激均可诱发 c-fos 在孤束核等不同部位大量表达^[30-31]。本研究中使用免疫荧光染色技术对结直肠伤害性刺激和不同穴位电针刺激信息在中枢的汇聚表达进行观察。结果显示, 与电针前相比, 1 mA 天枢组、3 mA 天枢组与 3 mA 足三里组干预后, 大鼠延髓内脏带内孤束核区域 c-fos 阳性神经元的数量和密度均显著减少。这与其他研究中^[32-33]所观察到针刺双侧“足三里”可显著下调 c-fos 的阳性神经元在孤束核内的表达结果相一致。说明 3 mA 电针天枢和足三里能够明显抑制 CRD 伤害性痛反应可能与较强的电针刺激可兴奋传导痛信息的 C 纤维, 引起广泛的镇痛效应有关。

曲池穴位于上肢肘关节外侧, 其神经节段和直结肠明显不同^[34]。本研究中未观察到 1 mA 和 3 mA 曲池穴电针对 CRD 刺激引起的伤害性痛反应的抑制。我们也会尝试 5 mA 电针刺激“曲池”的效应, 但是由于刺激量过大, 大鼠出现震颤等反应; 而如果加大麻醉量, 会造成其实验背景与其他穴位刺激组不同, 所获得的数据无法进行比较。曲池在临床中较多用于改善患者结直肠功能紊乱, 缓解内脏运动失调的症状^[35-36], 而不是治疗结直肠内脏痛的常用穴。3 mA 电针“曲池”对结直肠内脏痛抑制效应的缺失也有待我们进一步的研究。

通过以上研究可得出如下结论, 电针大鼠“天枢”和“足三里”均可以显著改善由 CRD 引起的伤害性痛反应, 减少 c-fos 阳性神经元在大鼠延髓内脏带内孤束核的表达, 但同节段“天枢”抑制内脏痛所需的刺激量较小。

参考文献

- [1] GIAMBERARDINO MA. Recent and forgotten aspects of visceral pain [J]. Eur J Pain, 1999, 3(2): 77-92.
- [2] CAMILLERI M, BOECKXSTAENS G. Dietary and pharmacological treatment of abdominal pain in IBS [J]. Gut, 2017, 66(5): 966-974.
- [3] 王美青, 潘寅兵, 钱燕宁. 腹腔镜胆囊切除术后疼痛的原因及对策 [J]. 临床麻醉学杂志, 2013, 29(11): 1126-1129.
- [4] 刘春亮, 熊源长, 卢军, 等. 腕踝针治疗腹腔镜胆囊术后疼痛疗效观察 [J]. 上海针灸杂志, 2016, 35(3):

297-300.

- [5] 李芳. 艾灸疗法在肠腑病内脏痛中镇痛的效应及作用机制研究 [J]. 中医临床研究, 2014, 6(21): 113-114.
- [6] XING J, LARIVE B, MEKHAIL N, et al. Transcutaneous electrical acustimulation can reduce visceral perception in patients with the irritable bowel syndrome: a pilot study [J]. Altern Ther Health Med, 2004, 10(1): 38-42.
- [7] XIAO WB, LIU YL. Rectal hypersensitivity reduced by acupoint TENS in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: a pilot study [J]. Dig Dis Sci, 2004, 49(2): 312-319.
- [8] 李为民, 吴根诚. 电针对急性内脏痛大鼠腹部撤回反射和腹直肌肌电的影响 [J]. 中国临床康复, 2004, 8(10): 1899-1901.
- [9] 周娟, 李为民. 针刺治疗内脏痛的基础研究进展 [J]. 上海针灸杂志, 2007, 26(10): 45-48.
- [10] 吴璐一, 翁志军, 窦传宇, 等. 针灸对 IBS 内脏痛大鼠结肠肌间神经丛神经元 P2X₂ 受体表达的调节 [J]. 世界中西医结合杂志, 2014, 9(6): 601-604.
- [11] 付宏伟, 阎丽娟, 刘阳阳, 等. 不同电针刺激参数对镇痛效应影响的研究概述 [J]. 上海针灸杂志, 2018, 37(11): 1331-1335.
- [12] 王友京, 王双坤. 不同强度和频率电针的镇痛效应 [J]. 针刺研究, 1993, 18(1): 44-47.
- [13] 王珊, 高誉珊, 蓝莹, 等. 电针“内关”“天枢”穴对肠易激综合征大鼠结肠动力及结肠 D2 受体的影响 [J]. 针刺研究, 2018, 43(1): 24-28.
- [14] 杨建平. 大鼠结直肠扩张内脏痛模型的建立与行为学评价 [J]. 中华实验外科杂志, 2003, 20(12): 62-64.
- [15] ZHOU YY, WANNER NJ, XIAO Y, et al. Electroacupuncture alleviates stress-induced visceral hypersensitivity through an opioid system in rats [J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(48): 7201-7211.
- [16] 张露芬. 实验针灸学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 219-221.
- [17] 吴红金, 薛峥, 茹立强. 电针抗大鼠急性炎症性内脏痛的肠神经机制 [J]. 针刺研究, 1999, 24(2): 138-142.
- [18] XIN J, SU Y, YANG Z, et al. Distinct roles of ASIC3 and TRPV1 receptors in electroacupuncture-induced segmental and systemic analgesia [J]. Front Med, 2016, 10(4): 465-472.
- [19] KEAST JR, DE GROAT WC. Segmental distribution and peptide content of primary afferent neurons innervating the urogenital organs and colon of male rats [J]. J Comp Neurol, 1992, 319(4): 615-623.
- [20] QIAO LY, GRIDER JR. Up-regulation of calcitonin gene-related peptide and receptor tyrosine kinase TrkB in rat bladder afferent neurons following TNBS colitis [J]. Exp Neurol, 2007, 204(2): 667-679.
- [21] ZHU B, XU WD, RONG PJ, et al. A C-fiber reflex inhibition induced by electroacupuncture with different intensities applied at homotopic and heterotopic acupoints in rats selectively destructive effects on myelinated and unmyelinated afferent fibers [J]. Brain Res, 2004, 1011(2): 228-237.
- [22] 刘乡. 以痛制痛: 针刺镇痛的基本神经机制 [J]. 科学通报, 2001, 46(7): 609-616.
- [23] CUI JJ, ZHU XL, SHI H, et al. The expression of calcitonin gene-related peptide on the neurons associated Zusanli (ST 36) in rats [J]. Chin J Integr Med, 2015, 21(8): 630-634.
- [24] 余玲玲, 李亮, 秦庆广, 等. 内脏伤害性传入易化穴位对大鼠脊髓广动力型神经元的激活效应 [J]. 针刺研究, 2014, 39(5): 390-395.
- [25] 朱丽霞, 李文武, 吉长福, 等. 不同强度电针对痛觉异常治疗作用的比较 [J]. 中国疼痛医学杂志, 1996, 2(1): 26-32.
- [26] 辛娟娟, 宿杨帅, 杨兆坤, 等. 不同强度电针、热灸样刺激对香草酸瞬时受体亚型 1 基因敲除小鼠痛阈的影响 [J]. 针刺研究, 2012, 37(6): 431-439.
- [27] LEE CH, JUNG HS, LEE TY, et al. Studies of the central neural pathways to the stomach and Zusanli (ST36) [J]. Am J Chin Med, 2001, 29(2): 211-220.
- [28] TANIDA M, TAO Z, SUN L, et al. Anaphylactic hypotension causes renal and adrenal sympathoexcitation and induces c-fos in the hypothalamus and medulla oblongata: Anaphylaxis affects the brain and activates sympathetic nerves [J]. Exp Physiol, 2018, 103(6): 790-806.
- [29] STAM R, EKKELENKAMP K, FRANKHUIJZEN AC, et al. Long-lasting changes in central nervous system responsiveness to colonic distention after stress in rats [J]. Gastroenterology, 2002, 123(4): 1216-1225.
- [30] OKUSHA Y, HIRAI Y, MAEZAWA H, et al. Effects of intraperitoneally administered L-histidine on food intake, taste, and visceral sensation in rats [J]. J Physiol Sci, 2017, 67(4): 467-474.
- [31] 陈良为, 晋光荣, 饶志仁, 等. 大鼠胃肠道伤害性刺激引起的中枢神经系统 c-fos 表达 [J]. 神经解剖学杂志, 1993, 9(2): 185-191, 264.
- [32] 秦明, 黄裕新, 王景杰, 等. 电针“足三里”穴对内脏痛大鼠延髓内脏带内 c-fos 和 GFAP 表达的影响 [J]. 针刺研究, 2006, 31(3): 136-139, 148, 193.
- [33] 易春霞, 胡道松. 电针抗胃炎性痛对内脏感觉 c-fos 及 NOS 阳性神经元的影响 [J]. 针刺研究, 2004, 29(1): 24-30.

- [4] 王伟东, 岳柏林, 孔抗美, 等. 电针刺激曲池穴在颈脊髓效应的功能磁共振成像研究 [J]. 中国实用医药, 2014, 9(29): 1-2.
- [5] 齐琳婧, 苏同生, 刘志顺, 等. 针刺曲池上巨虚治疗功

能性肠病临床观察 [J]. 陕西中医, 2014, 35(2): 224-225.

- [6] 盛蓉蓉, 章薇. 曲池穴的临床应用和实验研究进展 [J]. 中国医药指南, 2013, 11(20): 81-82.

Effects of Electroacupuncture on Visceral Nociceptive Pain Response of Rats Induced by Colorectal Distention Stimulation

HU Jiatong¹, WANG Xiaoyu², HE Wei², SU Yangshuai², ZHANG Xiaoning², WAN Hongye², LI Zhigang¹

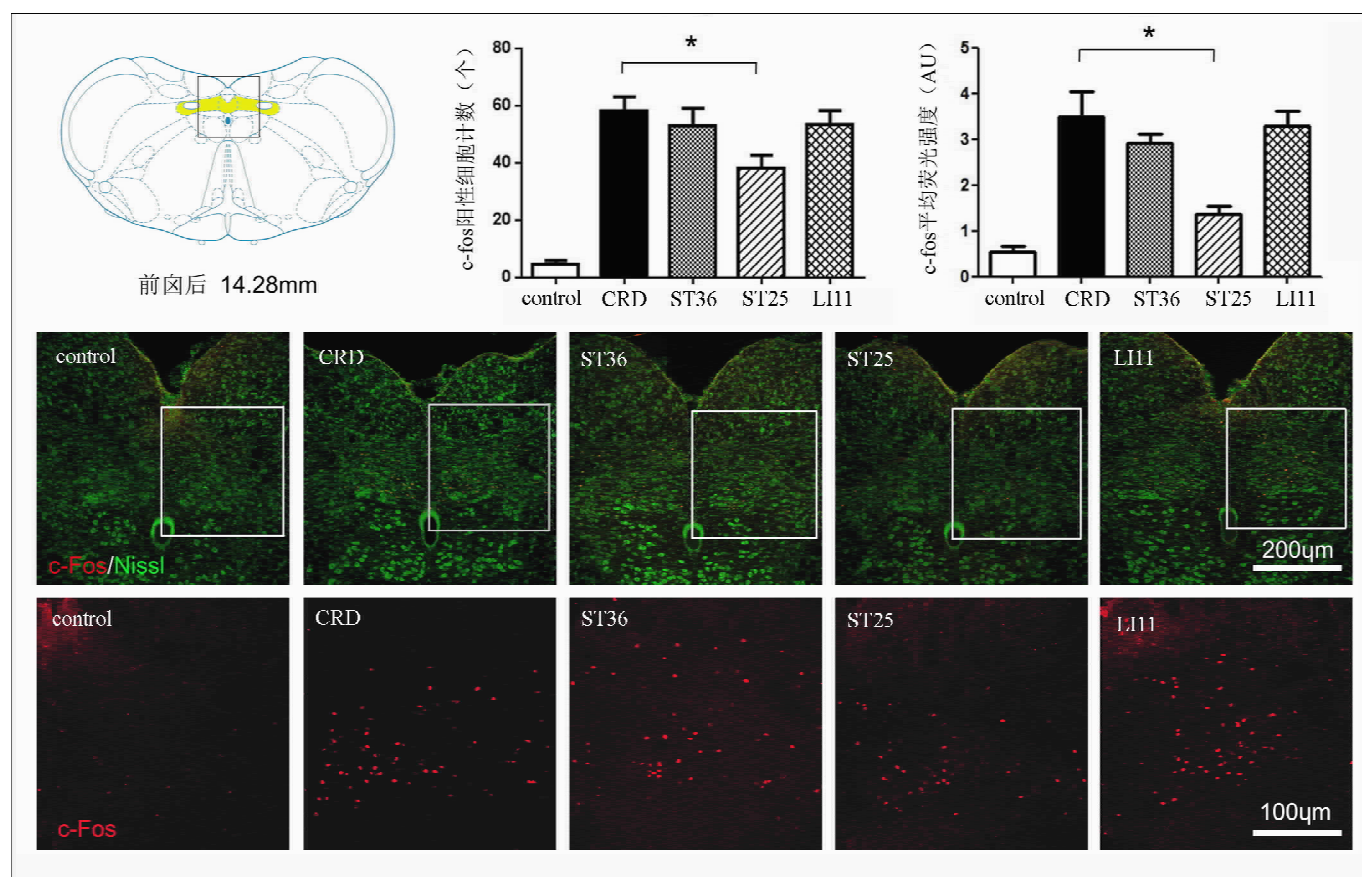
(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700; 2. Institute of Acupuncture and Moxibustion, China Academy of Chinese Medical Sciences)

ABSTRACT Objective To discuss the effects of different intensity electroacupuncture (EA) at different acupoints on visceral nociceptive pain response induced by colorectal distention (CRD) and its possible mechanism. **Methods** A total of 54 Sprague-Dawley (SD) rats were received electrophysiological experiments (30 rats) and morphological experiments (24 rats). In electrophysiological experiments, 6 rats were selected for CRD stimulation to induce the rectus abdominis myoelectricity threshold. The remaining rats were randomly divided into Zusanli (ST36) group, Tianshu (ST25) group and Quchi (LI11) group, with 8 rats in each group. Under inhalation anesthesia with isoflurane, CRD stimulation was given to cause visceral injury pain. EA with current of 1 mA and 3 mA were used to stimulate rats' "Zusanli" (ST36), "Tianshu" (ST25), and "Quchi" (LI11), for 140 s. The area, frequency, and amplitude of the curve of the rectus abdominis myoelectric activity were recorded. The rats for morphological experiments were randomly divided into normal group, model group, 1 mA Zusanli (ST36) group, 1 mA Tianshu (ST25) group, 1 mA Quchi (LI11) group, 3 mA Zusanli (ST36) group, 3 mA Tianshu (ST25) group and 3 mA Quchi (LI11) group, with 3 rats in each group. EA stimulation last for 30 min. Immunohistochemical method was used to observe the effects of EA stimulation with different intensity at different acupoints on the expression of c-fos positive neurons in solitary tract nucleus. **Results** CRD of 60 mmHg could induce visceral pain of rats, which showed that the area, frequency and amplitude of the rectus abdominis myoelectric curve increased significantly, and the difference was statistically significant than before CRD stimulation ($P < 0.01$), so it was selected as CRD stimulus value. 1 mA EA at "Tianshu" (ST25) could significantly improve the release of rectus abdominis myoelectricity caused by noxious stimulation ($P < 0.05$), and the number and density of c-fos positive neurons in the nucleus tractus solitarius were significantly decreased ($P < 0.05$). The 1 mA EA at "Zusanli" (ST36) and "Quchi" (LI11) did not significantly improve the rectus abdominis myoelectrical delivery caused by CRD. 3 mA EA at "Zusanli" (ST36) and "Tianshu" (ST25) significantly inhibited the activity of EMG induced by CRD ($P < 0.01$), and also significantly reduced the number and fluorescence intensity of c-fos positive neurons in nucleus tractus solitarius ($P < 0.05$). **Conclusion** EA at "Tianshu" (ST25) and "Zusanli" (ST36) significantly inhibited the nociceptive response induced by CRD, and decreased the expression of c-fos positive neurons in nucleus tractus solitarius of rats. In the same segment of the spinal cord, EA at "Tianshu" (ST25) needed less intensity to produce inhibitory effects.

Keywords visceral pain; stimulation intensity; electroacupuncture; nucleus tractus solitarius; c-fos

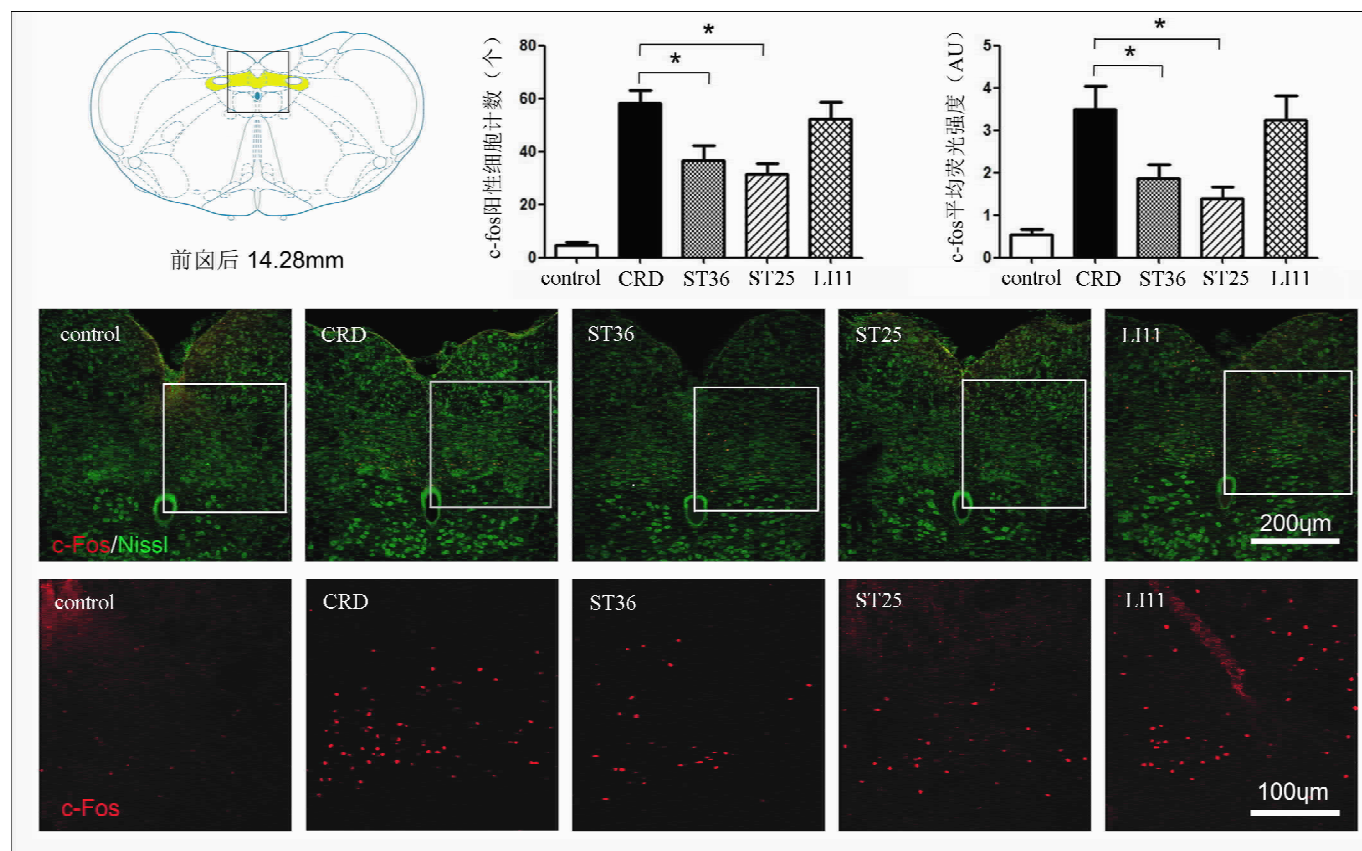
(收稿日期: 2019-02-02; 修回日期: 2019-03-21)

编辑: 焦爽



注: control, 正常组; CRD, 模型组; ST36, 1 mA 足三里组; ST25, 1 mA 天枢组; LI11, 1 mA 曲线组; 与模型组比较, * $P < 0.05$

图 4 1 mA 强度电针刺激下各组大鼠延髓孤束核内 c-fos 神经元阳性细胞计数、平均荧光强度比较



注: control, 正常组; CRD, 模型组; ST36, 1 mA 足三里组; ST25, 1 mA 天枢组; LI11, 1 mA 曲线组; 与模型组比较, * $P < 0.05$

图 5 3 mA 强度电针刺激下各组大鼠延髓孤束核内 c-fos 神经元阳性细胞计数、平均荧光强度比较