

• 实验研究 •

眼针疗法对腹泻型肠易激综合征模型大鼠结肠神经激肽 1 表达的影响

王艳杰 刘慧慧 关洪全 赵金茹 柴纪严 刘旭东 王德山*

辽宁中医药大学基础医学院, 辽宁省沈阳市皇姑区崇山东路 79 号, 110032)

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)资助项目(2007CB512702)

* 通讯作者: wddss5768@sina.com, (024)31207093

[摘要] 目的 探讨眼针疗法对腹泻型肠易激综合征(D-IBS)的治疗作用及机制。方法 将 40 只 Wistar 大鼠随机分为 4 组, 对照组、模型组、匹维溴铵组和眼针组, 每组 10 只。采用慢性应激结合束缚方法建立 D-IBS 模型, 眼针组采用眼针治疗, 针刺下焦区、大肠区、肝区、脾区; 匹维溴铵组用匹维溴铵灌胃治疗, 两组均治疗 7 天。HE 染色观察结肠组织病理学变化; 实时定量 PCR 测定结肠组织神经激肽 1(NK1)的 mRNA 表达变化; 免疫组化法测定结肠组织 NK1 的蛋白表达变化。结果 各组大鼠结肠组织病理学无差异。与对照组比较, 模型组结肠组织中 NK1 的 mRNA 表达水平显著升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 眼针组结肠组织中 NK1 的 mRNA 表达水平显著降低($P < 0.01$); 与模型组比较, 匹维溴铵组结肠组织中 NK1 的 mRNA 表达水平无统计学意义($P > 0.05$)。NK1 免疫反应阳性细胞在结肠黏膜层、腺腔内、肌间神经丛、黏膜下神经丛等部位。与对照组比较, 模型组结肠组织中 NK1 的蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 眼针组和匹维溴铵组结肠组织中 NK1 的蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)。结论 眼针能够降低 D-IBS 模型大鼠结肠组织中 NK1 的表达, 从而对 D-IBS 起到治疗作用。

[关键词] 眼针; 肠易激综合征; 神经激肽

Effect of Eye-acupuncture Therapy on Expression of Colic Neurokinin1 of Diarrhea Irritable Bowel Syndrome Model Rats

WANG Yanjie, LIU Huihui, GUAN Hongquan, ZHAO Jinru, CHAI Jiyuan, LIU Xudong, WANG Deshan

(School of Basic Medical Sciences, Liaoning University of Chinese Medicine, Shenyang 110032)

ABSTRACT Objective To explore the effect and functional mechanism of eye-acupuncture therapy on the diarrhea irritable bowel syndrome (D-IBS). **Methods** Forty Wistar rats were randomized into four groups, control group, model group, pinaverium bromide group, and eye-acupuncture group, with 10 in each. We used chronic stress in combination with binding to make D-IBS models. The eye-acupuncture group was treated with eye-acupuncture at the auricular points Lower-jiao, Large intestine, Liver, and Spleen, and the pinaverium bromide group was treated with pinaverium bromide for intragastric feeding, for 7 days. The histopathological changes of colon were observed by HE staining, the Neurokinin1(NK1) mRNA expression changes were detected by realtime-PCR, and the colic NK1 protein expression changes were determined by immunohistochemical method. **Results** The result of HE staining showed that there was no morphological changes of colic tissues. Compared with the control group, the NK1 mRNA expression of colic tissues in the model group was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the NK1 mRNA expression of colic tissues in the eye-acupuncture group was significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the NK1 mRNA expression of colic tissues in the pinaverium bromide group was without statistical significance ($P > 0.05$). NK1 immunoreaction positive cells were existing in the colonic mucous layer, lumen of gland, intermuscular plexus, and submucous plexus. Compared with the control group, the colic NK1 protein expression in the model group was significantly increased ($P < 0.05$); compared with the model group, the colic NK1 protein expression in the eye-acupuncture group and pinaverium bromide group was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Eye-acupuncture could effectively decrease the colic NK1 expression of D-IBS model rats, playing a therapeutic role in treatment of D-IBS. **Key Words** eye-acupuncture; irritable bowel syndrome (IBS); neurokinin 1 (NK1)

眼针疗法是我院已故老中医彭静山根据《黄帝内经》“观眼察病”和《证治准绳》对眼的脏腑划分理论, 于 1974 年开创的一种独特的针刺疗法^[1-2]。应用于临床 30 余年来, 其在治疗胃肠道功能性疾病和

腹痛方面有显著疗效。前期研究表明眼针疗法能够调节肠易激综合征(IBS) 模型大鼠血清和结肠中 P 物质(SP) 含量, 从而对 IBS 起到治疗作用^[3], 针刺眼周穴区能够调控相应脏腑的功能。为了进一步探索眼针对脏腑功能的调控机制, 本实验观察眼针对腹泻型肠易激综合征(D-IBS) 模型大鼠结肠组织中 SP 的受体——神经激肽 1(NK1) 表达的影响, 进一步从 SP 信号转导通路角度探索眼针对 D-IBS 治疗的作用机制。

1 材料与方法

1.1 药物、试剂和仪器

匹维溴胺片(法国苏威制药, 批号: 610994); Trizol、RT-PCR 试剂盒、引物、琼脂糖等[宝生物工程(大连)有限公司, 批号: 2010010304]; 兔抗大鼠 NK1 抗体(美国 ADL 公司)、SABC 试剂盒和 DAB 等(武汉博士德生物工程有限公司)。

WD-9413B 凝胶成像分析仪, 北京市六一仪器厂生产; RM2235 型手动石蜡切片机、EG1150C 型包埋机、HI1220 型烘片机均为德国 Leica 提供; BX51 型反射荧光显微镜, 日本 Olympus 公司生产。

1.2 动物分组、模型建立及治疗

SPF 级雄性 Wistar 大鼠 40 只, 北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验动物许可证号: SCXK(京)2007-0001, 体重(220±20)g。采用随机数字表法分为对照组、模型组、匹维溴胺组、眼针组, 每组 10 只。分笼饲养, 标准颗粒饲料喂养 7 天以适应实验室环境。

除对照组外, 其余 30 只大鼠采用慢性应激结合束缚方法建立 D-IBS 模型。参考 Katz 等^[4]的方法, 在 18 天中大鼠随机循环接受 6 种不同的应激刺激, 包括: ①冷水游泳(14℃, 5min); ②夹尾(180s); ③禁水(24h); ④禁食(24h); ⑤电击(电压为 30V, 电击 5s, 间歇 5s, 共 120s); ⑥高温(温箱 40℃, 30min); 每天随机接受 1 种刺激, 18 天内平均每 3 天接受 1 种刺激, 18 天内平均每 3 天接受 1 种刺激。同时参考 Williams 等^[5]的方法, 每天给予 30% 水合氯醛(3ml/kg)腹腔注射麻醉, 用胶带束缚前肩、前上肢及胸部, 限制其搔抓头面部, 束缚时间 1h。

观察大鼠一般状态、结肠组织病理学、结肠转运功能和肠道敏感性等的变化对模型进行评价, 30 只大鼠均造模成功。眼针组给予眼针治疗, 每 12h 治疗 1 次, 每日治疗 2 次, 针刺 7 天。眼针取穴及刺法: 用 31 号 13mm 针灸针(苏州医疗用品厂有限公司, 批号: 201006), 于大鼠眶周 2mm 处针刺, 定位

参照人体取穴方法, 取下焦区、大肠区、肝区、脾区针刺。手法: 平刺, 进针 3mm, 留针 20min。匹维溴胺组给予匹维溴胺治疗 7 天, 采用医用蒸馏水将匹维溴胺配制成 1mg/ml 混悬液, 实验剂量按照实验动物研究“等效剂量”的计算方法, 每天 15mg/kg, 分两次灌胃给药。在眼针组治疗期间, 对照组和模型组大鼠固定四肢于大鼠固定板上 20min, 不做任何治疗处理。

1.3 体重和一般状态观察

于造模前后和实验结束时分别进行体重测量, 造模过程中每日在刺激进行时, 观察大鼠是否有出躲避、畏惧、嘶叫、激惹及轻度好斗倾向; 观察排便次数、颗粒数及性状改变。

1.4 结肠组织病理学测定

采血后麻醉, 打开腹腔取出大鼠结肠下段, 用 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 常规石蜡切片脱蜡, 采用 HE 染色, 光镜下观察结肠组织病理学变化。

1.5 结肠组织 NK1 的 mRNA 表达水平测定

采用 Real Time PCR 方法测定 NK1 基因的 mRNA 进行相对表达量分析。利用 RNAiso(tm) Plus 进行总 RNA 的提取, 用 DNaseI 处理、精制后, 利用 SYBR(r) Prime Script(tm) RT-PCR Kit 采用 SYBR Green I 荧光染料嵌合法, 以 Total RNA 反转录获得的 cDNA 作为标准品, 分别对管家基因 Actb 和目的基因 NK1 制作标准曲线。采用双标准曲线法进行结果分析, 利用标准曲线分别对各样品管家基因和目的基因进行定量, 通过管家基因的校正, 对各样品目的基因相对表达量进行分析。引物序列见表 1。

表 1 实时定量 PCR 的引物序列

引物	序列	扩增片段(bp)
Actb-F	5-CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC-3'	171
Actb-R	5-ATGGAGCCACCGATCCACA-3'	
NK1-F	5-ATGCCCAGCAGAGTCGTGTG-3'	133
NK1-R	5-CAGTGTACGCGTAGCCGATCA-3'	

1.6 结肠组织 NK1 的蛋白表达水平测定

利用多聚赖氨酸进行防脱片处理, 切片常规脱蜡。3% H₂O₂ 灭活内源性酶, 蒸馏水洗 3 次。热修复抗原, 冷却后 PBS 洗涤 1~2 次。滴加 5% BSA 封闭液, 室温 20min。滴加适当稀释的一抗(1:100), 4℃ 过夜。PBS 洗 2min×3 次。滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG, 20~37℃ 孵育 20min。PBS 洗

5min×2 次。滴加试剂 SABC,在室温下孵育 30min。PBS 洗 5min×4 次。DAB 显色,室温显色,镜下控制反应时间。蒸馏水洗涤。苏木素轻度复染,脱水,透明,封片。显微镜观察,拍照。采用 BI2000 医学图像分析系统进行图像分析,选取 200 倍图像,观察结肠黏膜固有层和肌层,细胞质呈棕黄色为 SP 阳性表达细胞,每张切片随机选取 3~5 个高倍视野测定平均光密度值,平均光密度值代表阳性表达参数,平均光密度值越大,阳性表达越强。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理,结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多样本均数的比较采用方差分析,组间比较采用 LSD 法。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时间体重和一般状态比较

表 2 示,实验第 1 天各组大鼠体重无显著差异。与对照组比较,实验第 18 天,其他各组大鼠体重显著降低($P < 0.01$);与对照组比较,实验第 25 天,模型组大鼠体重显著降低($P < 0.01$),与模型组比较,眼针组、匹维溴铵组体重显著升高($P < 0.01$)。造模过程中每日在刺激进行时,大鼠表现烦躁,畏惧和嘶叫,随着造模天数增多,大鼠逐渐出现激惹及好斗倾向。排便次数逐渐增多、便质变稀,刺激时便不成形。眼针治疗后,大鼠的排便次数明显减少,便质逐渐恢复正常。

表 2 各组大鼠实验不同时间体重比较($g, \bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第 1d	第 18d	第 25d
对照组	10	237.24±13.78	361.04±30.04	378.36±33.54
模型组	10	236.64±11.34	304.83±18.03*	308.73±22.29*
眼针组	10	238.96±8.90	303.54±24.77*	327.91±24.70#
匹维溴铵组	10	236.88±10.28	299.29±17.78**	328.35±19.44#

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.01$

2.2 各组大鼠结肠组织病理学变化

各组大鼠结肠组织结构完整,均未见充血、水肿、溃疡;黏膜、黏膜下层、肌层及浆膜层结构清晰;结肠黏膜上皮完好,细胞与腺体排列规则,上皮内可见大量杯状细胞,黏膜和肌层无弥漫性炎症细胞浸润等病理组织学改变。

2.3 各组大鼠结肠组织中 NK1 的 mRNA 相对表达量比较

表 3 示,模型组大鼠结肠组织中 NK1 的 mRNA 显著升高,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);眼针组大鼠结肠组织中 NK1 的 mRNA

显著降低,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。匹维溴铵组结肠组织中 NK1 的 mRNA 相对表达量和模型组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 各组大鼠结肠组织中 NK1 的平均光密度值比较

表 3 示,模型组结肠组织中 NK1 的平均光密度值显著升高,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);眼针组结肠组织中 NK1 平均光密度值显著降低,与模型组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 3 各组大鼠结肠组织中 NK1 的 mRNA 相对表达量及平均光密度值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	mRNA 相对表达量	平均光密度值
对照组	10	1.06±0.24**	0.20±0.03*
模型组	10	2.27±0.62	0.29±0.04
眼针组	10	1.12±0.50**	0.21±0.03*
匹维溴铵组	10	2.02±0.39	0.23±0.01*

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3 讨论

为了进一步探索眼针是如何作用于内脏及其调整胃肠道功能的机制,本课题组提出“眼周八区十三穴络脑通脏腑”,并认为五脏六腑之精华皆注于目,脏腑功能气血盛衰均与眼穴相关联,眼针刺激外周相关穴位,能够启动靶器官神经递质、细胞因子等释放和分泌,启动其靶细胞内的信号转导通路,从而调控局部血运与代谢、改善其功能效应,达到治疗效果。为此本课题组从 SP 信号转导通路的变化入手来探索眼针的作用机制。

近年来随着神经胃肠病学研究的深入,逐渐认识到中枢神经系统和肠神经丛功能失调,导致的脑—肠轴功能异常可能是 D-IBS 患者对各种应激反应增强和内脏敏感性增加的主要原因。脑肠肽在调节脑—肠轴功能方面具有重要作用。SP 是最早发现的一种脑肠肽,属于速激肽家族。SP 能神经纤维主要分布在肠壁肌层^[6],在环形肌和纵形肌层和黏膜本身都含有大量 SP 神经纤维^[7]。Lijffler 等^[8]研究表明,SP 可能参与了分泌运动反射,SP 可以刺激小肠和结肠分泌水和电解质。董文珠等^[9]研究表明,IBS 患者肠黏膜 SP 免疫反应阳性纤维表达显著增强。说明 SP 作为兴奋性神经递质,在消化道的运动和分泌中起着重要作用,能够加速胃肠蠕动,促进胃肠道平滑肌收缩和胃肠道运动,加强结肠的集

团推进运动,导致患者排便次数增多。同时 SP 在 IBS 的应激、肠道感染、内脏敏感性增高及与之相关的神经免疫内分泌调控机制中均有重要作用。神经激肽受体有 3 种: NK1、NK2、NK3,其中 SP 与受体 NK1 的结合力最强,又将 NK1 受体特称为 SP 受体,因此,SP 及其 NK1 受体在神经内分泌免疫网络的信息传递过程中可能具有重要作用。Tough 等^[10]研究表明 SP 通过激活 NK1 受体和 NK2 受体,刺激直肠黏膜的离子交换与 IBS 的发生相关。研究表明给大鼠注射 P 物质的受体拮抗剂,能够改变大鼠结肠、直肠的运动和排便情况,如 Okano 等^[11]用选择性 NK1 受体拮抗剂 TAK-637 注射大鼠后抑制了粪便的排出,认为 TAK-637 将在 IBS 的治疗中发挥作用,P 物质受体的拮抗剂可能起到治疗和预防 IBS 的作用。因此从 SP 的信号转导通路入手,将能够进一步揭示 IBS 的发生机制。

中医学认为 IBS 的病位在大肠,但也与肝脾密切相关,肝郁脾虚是本病的基本病机之一。本实验采用慢性应激结合急性束缚的方法建立了由精神应激引起的 IBS 大鼠模型,中医辨证属于肝郁脾虚型,因此本实验以整体观念为理论基础,以辨证论治为治疗原则,结合眼针选穴方法,确定疏肝健脾为治疗法则,选取下焦区、大肠区、肝区、脾区为治疗腧穴,共奏调理脏腑、平衡阴阳之效。结果表明,眼针治疗之后能够降低 IBS 模型大鼠血清和结肠组织中 SP 的含量,降低结肠组织 NK1 的 mRNA 和蛋白表达,说明眼针能够调控 SP 的受体 NK1 的转录和翻译,从而调控 SP 信号转导通路,改善了脑-肠轴功能的异常,对 IBS 起到了治疗作用。进一步说明眼针刺刺激外周相关穴位,启动了靶器官的 SP 等神经递质的释放和分泌,调控 SP 受体的表达水平,从而调控了结肠的运动与代谢功能、改善其功能效应。说明调控 SP 信号转导通路,改善神经和内分泌功能,调控脑-肠轴功能可能是眼针调控脏腑功能的作用途径之一,为“眼周八区十三穴络脑通脏腑”提供了实验依据。

参考文献

- [1]彭静山. 眼针疗法[J]. 中国针灸, 1988, 8(6): 21.
- [2]董文毅, 彭敏. 眼针疗法的研究进展[J]. 针灸学报, 1991, 7(3): 48-51.
- [3]王艳杰, 王德山, 关洪全, 等. 眼针对肠易激综合征大鼠血清和结肠组织中 P 物质及血管活性肠肽含量的影响[J]. 针刺研究, 2010, 35(1): 8-11, 26.

- [4]Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: Implications for a model of depression [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 1981, 5(2): 247-251.
- [5]Williams CL, Villar RG, Peterson JM, et al. Stress-induced changes in intestinal transit in the rats: a model for irritable bowel syndrome [J]. *Gastroenterology*, 1988, 94(3): 611-621.
- [6]Hokfelt T, Pernow B, Wahren J. Substance P: a pioneer amongst neuropeptides[J]. *J Intern Med*, 2001, 249(1): 27-40.
- [7]林琳, 赵志泉, 殷咏梅. 胃肠激素与肠易激综合征的相关性[J]. *江苏医药杂志*, 2001, 27(1): 166-168.
- [8]Lijffler S, Holzer P, Maggi CA, et al. Inhibition of NK1 receptors of the electrically evoked release of acetylcholine from guinea pig myenteric neurons [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1994, 349 (Suppl): R88.
- [9]董文珠, 李兆申, 许国铭. 肠易激综合征肥大细胞与 P 物质免疫反应阳性神经纤维的实验研究[J]. *中华消化杂志*, 2003, 22(11): 656-659.
- [10]Tough IR, Lewis CA, Fozard J, et al. Dual and selective antagonism of neurokinin NK1 and NK2 receptor-mediated responses in human colon mucosa[J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2003, 367(2): 104-108.
- [11]Okano S, Nagaya H, Ikeura Y, et al. Effects of TAK-637, a novel neurokinin-1 receptor antagonist, on colonic function in vivo[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 298(2): 559-564.

(收稿日期: 2010-10-25; 修回日期: 2011-04-15)

[编辑: 侯建春]

欢迎邮购《动物本草》

《动物本草》是由杨仓良主任医师主编的我国第一部动物药本草专著, 出版后受到著名医药学家、动物药专家姜凤梧、谢海洲、谢宗万、邓明鲁等的一致好评(见《新中医》2002 年 2 期, 2004 年 9 期, 2006 年 10 期的书评)。专家认为本书有: “体例设计新颖, 品种收录齐全, 辨析药物名实, 突出临床应用, 提炼古籍精华, 广集今贤经验, 提示不良反应, 防止中毒损害”的特点, 是一部有较高学术价值的好书。

《动物本草》是作者继《毒药本草》(曾 3 次获奖重印 4 次)、《毒剧中药古今用》(曾 2 次获奖重印 3 次)等书后的又一力作。《动物本草》128 元, 《毒药本草》88 元, 《现代中医内科临床评价与进展》45 元, 《华佗神秘秘方》10 元。凡邮寄一套者可获赠《名医与名方》等相关资料。汇款请寄: 银川市金凤区满城南街 20 号宁夏秦杨疑难病研究院赵伟收, 邮政编码: 750011, 电话: 13014278765(需要相关内容介绍者可通过手机发短信索取即可免费赠阅)。