

· 实验研究 ·

大鼠“足三里”穴区一氧化氮合酶
阳性神经纤维的来源*熊克仁¹ 李怀斌¹ 汪 桐²

内容提要 目的:观察大鼠“足三里”穴区一氧化氮合酶(NOS)阳性神经纤维的来源。方法:采用辣根过氧化物酶(HRP)逆行追踪与还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶(NADPH-d)相结合方法。结果: $L_4 \sim S_1$ 脊神经节内有 NOS 阳性神经元的周围突分布于“足三里”穴区, $L_4 \sim S_1$ 脊髓第 IX 板层有 NOS 阳性神经元投射到“足三里”穴区。结论:“足三里”穴区的 NOS 阳性神经纤维联系可能是“足三里”穴针刺效应的重要形态学依据之一。

关键词 足三里 一氧化氮合酶 大鼠

Origin of Nitric Oxide Synthase Positive Nerve Fibers at Zusanli Area in Rats Xiong Keren, Li Huaibin, Wang Tong
Anatomy Department, Wannan Medical College, Anhui (241001)

Objective: To find the origin of nitric oxide synthase (NOS) positive nerve fiber at the area around Zusanli point (St. 36). **Methods:** The combined method of retrograde transport of horse radish peroxidase and nicotinamide adenosine dinucleotide phosphate diaphorase were adopted. **Results:** Some peripheral processes of NOS positive neurons were distributed in the Zusanli point from the ganglia of L_4 to S_1 , and some were projected from the lamina IX of L_4 to S_1 in spinal cord. **Conclusion:** The distributions of NOS positive nerve fibers in the Zusanli area might be one of the morphological foundations of acupuncture effect of Zusanli point.

Key words Zusanli point, nitric oxide synthase, rat

NO 是细胞与细胞间信息传递的重要调节因子,作为第二信使和神经递质而起着各种不同的功能,与神经信息的传递、血压的调节、内脏活动、伤害性刺激及疼痛的调控等都有较密切的关系^[1,2]。足三里穴是足阳明胃经的重要穴位,针刺该穴对消化系统疾病具有较好的治疗效果,因此,其临床应用、功能及形态学研究甚多,但由于 NO 是近年来新发现的神经递质,NO 对脊髓的作用报道很少^[3]。尚未见“足三里”穴一氧化氮合酶(NOS)阳性神经纤维起源的报道。本研究采用先进技术为“足三里”这一重要穴位的多种治疗作用提供一些形态学依据。

材料与方法

实验用 SD 种大鼠 12 只,由南京医科大学实验动物供应中心提供,雌雄不拘,体重 220~260g,20% 辣根过氧化物酶(HRP, Sigma VI)30 μ l,注入一侧“足三里”,72h 后,

用含 2% 多聚甲醛及 1.25% 戊二醛的磷酸缓冲液经心脏灌注固定,剖取脊髓 L~S 节段和脊神经节,入 20% 磷酸蔗糖液中,冰箱 4℃ 过夜。冰冻切片,脊髓片厚 40 μ m,脊神经节片厚 25 μ m,切片先用 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,而后入含 1mmol/L β -还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸(β -NADPH, Sigma 公司)、1.2mmol/L 硝基四氮唑蓝(上海前进化学试剂厂)和 0.3% 三硝基甲苯(Triton X-100)的 0.1mol/L 磷酸缓冲液(pH 8.0)内,温育(37℃)1h,将切片移入 PBS(pH 7.4)内清洗,再按四甲基联苯胺-钨酸钠(TMB-ST)法^[3]显示 HRP 标记细胞,贴片、脱水、透明、封片, Olympus 显微镜下观察。

结 果

单纯 HRP 标记神经元只见胞浆内呈现大小均匀青色颗粒;单纯 NOS 阳性神经元的胞质呈紫红色,胞核染色较淡或不着色;HRP-NOS 双标记神经元为紫红色的胞质内分布着大小均匀的青色颗粒。

脊髓的 HRP-NOS 双标记神经元主要为大型多角细胞,分布于 $L_4 \sim S_1$ 脊髓节段的第 IX 板层,其中 $L_5 \sim L_6$ (见图

* 国家攀登计划基金资助课题(JL93022)

1. 皖南医学院解剖教研室(安徽 241001);2. 皖南医学院中西医结合研究室

1.2) 脊髓节段的数量较多 L_4 脊髓节段次之, S_1 脊髓节段较少。出现 HRP 颗粒的双标记细胞多为 NOS 中等阳性神经元。 $L_4 \sim S_1$ 脊髓节段也观察到少量 HRP 单标记神经元, 其数量约占总标记细胞的 1/8。

$L_4 \sim S_1$ 脊神经节内观察到大、中、小型 HRP-NOS 双标记神经元, 随机测量 100 个 HRP-NOS 双标记细胞, 其中大型细胞占 44%, 中等大小细胞为 15%, 小型细胞为 41%。 L_5 和 L_6 (见图 3) 脊神经节内的 HRP-NOS 双标记神经元较多, L_4 (见图 4) 和 S_1 脊神经节内较少, 双标记神

经元主要为卵圆形和圆形细胞。脊神经节内也见到少量 HRP 单标记神经元, 其数量占总标记细胞的 1/5 左右。

本研究对 12 只大鼠的每只大鼠 $L_4 \sim S_1$ 各脊髓节段和脊神经节分别各取切片 4 张, 即总共取 $L_4 \sim S_1$ 各脊髓节段切片 48 张和各脊神经节切片 48 张, 进行 NOS 阳性神经元的计数(见附表)。

此外, 在脊髓和脊神经节内约 2% 的标记细胞因 HRP 十分浓染, 无法分辨为单标记还是双标记细胞者, 不列入分析材料。

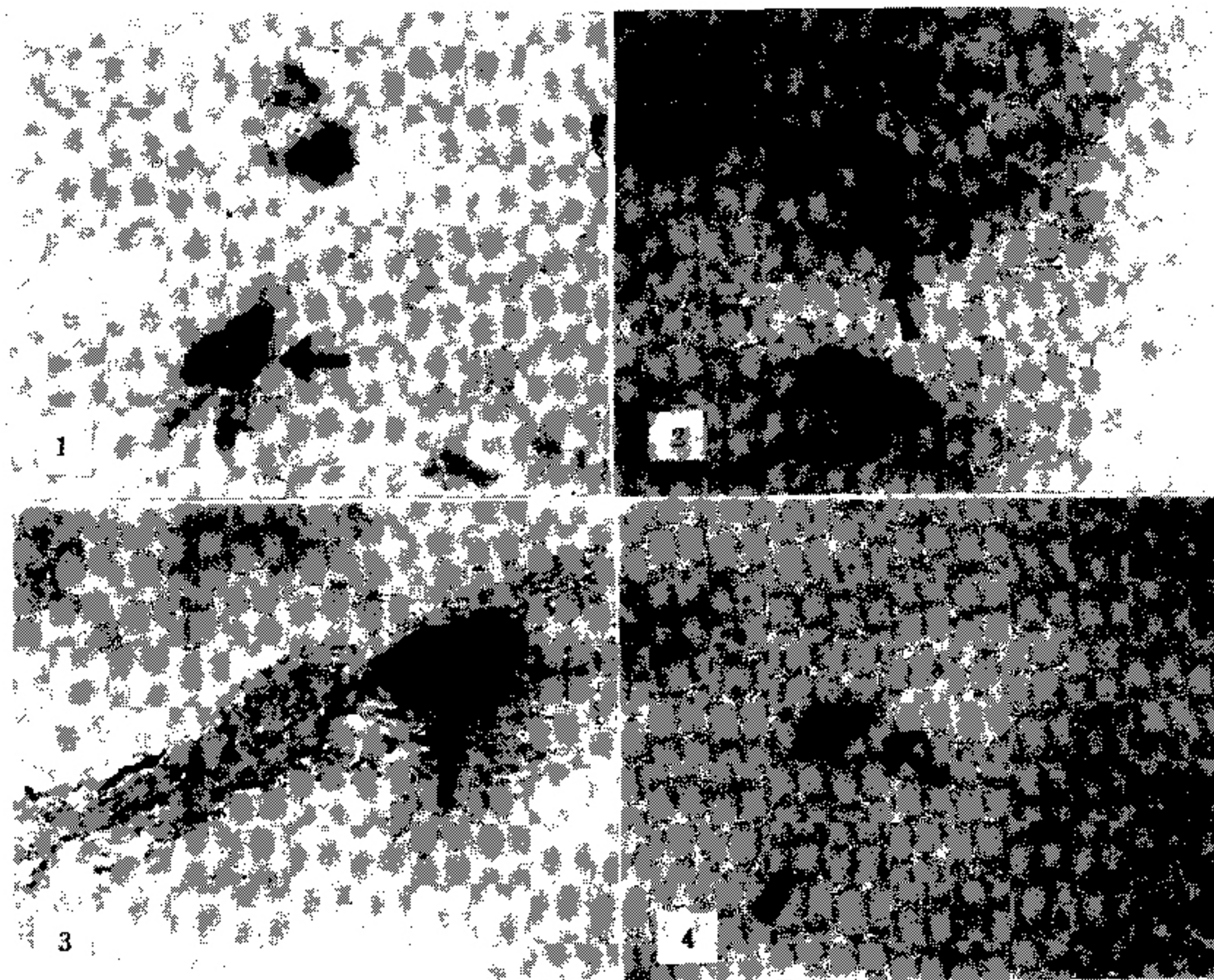


图 1 L_5 脊髓第Ⅷ板层 HRP-NOS 双标记细胞(箭头所示为 HRP-NOS 双标记细胞, 其余为 NOS 单标记细胞) $\times 132$; 图 2 L_6 脊髓第Ⅷ板层 HRP-NOS 双标记细胞 $\times 132$; 图 3 L_4 脊神经节 HRP-NOS 双标记细胞 $\times 132$; 图 4 L_6 脊神经节 HRP-NOS 双标记细胞 $\times 66$

附表 脊髓和脊神经节 HRP-NOS 双标记细胞分布 (个, $\bar{x} \pm s$)

	HRP-NOS 双标记细胞			
	L ₄	L ₅	L ₆	S ₁
脊髓	1.90 ± 0.43	2.40 ± 0.52	2.60 ± 0.41	1.40 ± 0.62
脊神经节	2.60 ± 0.86	3.50 ± 1.27	3.40 ± 1.09	2.70 ± 1.01

注:表中数据为每张切片的 NOS 阳性神经元数

讨 论

TMB-ST 法的灵敏度比 Mesulam 的 TMB-硝普钠法高,且反应产物稳定^[4]。本研究将 TMB-ST 法与 NADPH-d 法结合,对 NOS 阳性神经元的投射进行逆行追踪,其结果是 NOS 阳性神经元、HRP 单标记神经元及 HRP-NOS 双标记神经元均清晰可辨,表明这种结合法是追踪 NOS 阳性神经元投射的一种较好的方法。

电针“足三里”穴与电刺激腓神经对痛反应均有抑制效应,镇痛效果相似,说明针刺的镇痛作用主要是通过神经产生的^[5]。本研究所观察到的 HRP-NOS 双标记神经元呈现的脊髓节段和脊神经节与足三里和阳陵泉区由腓神经支配^[6]的观点相符合。

本研究细胞大小的标准:胞体直径大于 35 μ m 为大型细胞,25~35 μ m 为中等大小细胞,小于 25 μ m 者为小型细胞^[7]。根据这一标准,脊髓第 IX 板层内主要为大型 HRP-NOS 双标记神经元,脊神经节内主要为大型和小型 HRP-NOS 双标记神经元。通常认为脊神经节中神经元的大小与其所参与传递的感觉信息的类型有密切关系,小型神经元主要感受温热刺激和伤害性刺激信息,而大型神经元主要参与触觉及深感觉信息的传导^[8]。

脊髓前角是否存在 NOS 阳性神经元,存在着争议^[2,9,10]。本结果表明腰骶髓第 IX 板层有 NOS 阳性神经元投射到“足三里”穴区。李继硕^[11]将 HRP 注入腓神经,于前角运动区的第 IX 板层观察到标记终末。结合本实验,可以认为“足三里”穴区与腰骶髓的第 IX 板层间存在着往返纤维联系,其传入联系纤维是否为 NOS 阳性纤维,有待进一步研究。

NO 作为一种信使分子在神经传递中发挥作用,在针刺镇痛机制中可能起重要作用^[12]。NO 作为一种新的胃肠动力的抑制性神经递质被发现后,有作者研究表明,大鼠脊髓后角 I 层内有 NOS 阳性纤维和终末,而且绝大部分为脊神经节内 NOS 阳性细胞向中枢的投射,提示 NO 在躯体和内脏感觉初级传入活动中起重要作用^[9]。足三里穴主治胃肠道疾病及下肢疼痛等已被公认。本研究表明,“足三里”穴区的传入和脊髓向此区的传出纤维主要

为 NOS 阳性纤维,这可能与“足三里”穴区感觉信号的传入、对疼痛及内脏活动的调控有关。

参 考 文 献

1. 刘耕陶. 一氧化氮的研究前景. 中华医学杂志 1996;76(8): 563—564.
2. 楚宪襄, 方智慧, 孔天翰, 等. 大鼠中枢神经内一氧化氮合酶阳性神经元的特异性分布. 解剖学杂志 1994;17(增刊):148—149.
3. 廖柏松, 鞠 躬, 杨 浩, 等. 一氧化氮对脊髓及背根神经节细胞体外存活及活性的影响. 解剖学杂志 1996;19(增刊):113.
4. 顾耀铭, 陈以慈, 叶鹿鸣. 钨酸钠做为稳定剂的新的灵敏 HRP-TMB-I, 光镜研究. 神经解剖学杂志 1990;6(1):121—126.
5. 高膝基一郎, 王昌立, 何维为. 电针刺激猫“足三里”的脊髓突触变化的实验形态学研究. 神经解剖学杂志 1989;5(2):157—164.
6. 邱树华. 用辣根过氧化物酶法研究家兔“阳陵泉”区的感觉支配节段. 中西医结合杂志 1982;2(2):109—112.
7. 武胜昔, 吕葆真, 李继硕. Calcitonin-D28KmRNA 在大鼠三叉神经节和背根节初级传入神经中的表达. 神经解剖学杂志 1995;11(4):337—340.
8. Sugiura Y, Hosoya Y, Ito R, et al. Ultrastructural features of functionally identified primary afferent neurons with C (unmyelinated) fibers of the guinea pig: Classification of dorsal root ganglia cell type with reference to sensory modality. J Comp Neurol 1988;276:265—278.
9. 丁玉强, 楼新法, 王亚奇, 等. 一氧化氮合酶阳性神经元及纤维在大鼠脊髓的分布及其来源. 神经解剖学杂志 1993;9(1):81—88.
10. 贾铎生, 鞠 躬. 神经系统中的一氧化氮和一氧化氮合酶. 神经解剖学杂志 1993; 9(1):1—6.
11. 李继硕, 蔡秉志, 吕少文. 家兔坐骨神经初级传入纤维在脊髓内的定位投射—HRP 跨越神经节追踪研究. 神经解剖学杂志 1987; 3(1):39—48.
12. 范天生, 楚宪襄, 方智慧, 等. 中缝大核内一氧化氮合酶(NOS)阳性神经元及纤维的分布特点. 解剖学杂志 1994;17(增刊): 148.

(收稿:1997-02-25 修回:1997-10-08)