

观察 TRPV1 受体在电针调节小鼠空肠运动中的作用实验研究

冯 虹 余 芝 徐 斌

摘要 目的 观察电针香草酸瞬时受体亚型 1 (transient receptor potential vanilloid 1, 或 vanilloid receptor 1, TRPV1) 基因敲除小鼠的肠运动变化, 初步探讨 TRPV1 受体在针刺调节肠运动过程中的作用。**方法** 正常野生 CL57BL/6 小鼠和 TRPV1 基因敲除小鼠分别为 B6 组和 TRPV1 组, 各 15 只。使用 JL-F 数显式光热测痛仪与 ALMEMO2450 机械测定仪检测 2 组小鼠光热痛阈值及机械痛阈值, 比较 2 组小鼠之间痛阈值的差异。同时利用自制肠测压头置入空肠, 监测空肠内压, 待肠压力稳定采用 2 mA、2/15 Hz 的刺激量电针曲池、上巨虚、天枢及大肠俞 4 穴, 观察电针腧穴前后肠内压值的变化, 并记录肠内压值变化波形图。**结果** (1) TRPV1 组小鼠光热痛和机械痛较 B6 组小鼠明显迟钝, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。 (2) 肠内压观察实验, 针刺曲池、上巨虚穴, 两组小鼠肠运动变化均不明显 ($P > 0.05$)。 (3) 针刺 TRPV1 组小鼠天枢、大肠俞腧穴可引起肠运动变化, 以抑制肠运动为主, 其变化程度与 B6 组小鼠相当。**结论** 生理状态下, TRPV1 可介导光热及机械刺激, 但 TRPV1 介导的针刺效应较为复杂, 提示 TRPV1 受体可能为介导针刺调节肠运动因素之一。

关键词 基因敲除小鼠; 肠运动; 行为学; 电针; 腧穴

Roles of TRPV1 Receptor in Electroacupuncture Regulating the Jejunal Motility of Mice: an Experimental Study FENG Hong, YU Zhi, and XU Bin Laboratory of Acupuncture and Medicine Combination, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210029), China

ABSTRACT Objective To observe the intestinal movement of transient receptor potential vanilloid 1 or vanilloid receptor 1 (TRPV1) knockout mice after stimulated by electroacupuncture (EA), and to primarily explore the roles of TRPV1 receptor in the jejunal motility regulated by acupuncture. **Methods** Normal wild-type CL57BL/6 and TRPV1 gene knockout mice were recruited in two groups, the B6 group and the TRPV1 group, 15 in each group. The thermal threshold and the mechanical pain threshold were respectively detected using JL-F digital photo thermal analyzer instrument and ALMEMO2450 machine. The difference between the two thresholds were compared. Meanwhile, a self-made pressure head was placed in the jejunum. The internal pressure was monitored. When the pressure was stable, 2 mA 2/15 Hz EA at Quchi (LI11), Tianshu (ST25), Shangjuxu (ST37), and Dachangshu (BL25) to observe the changes of intestinal pressure value between before and after EA. The curve of internal pressures was recorded. **Results** (1) The stimulation of light/heat and mechanical stimulation were obviously slowed in the TRPV1 group than in the B6 group ($P < 0.01$). (2) In the intestinal pressure observation experiment, the bowel movement was not obviously seen in the two groups when acupunctured at Quchi (LI11) and Shangjuxu (ST37) ($P > 0.05$). (3) Acupuncture at Tianshu (ST25) and Dachangshu (BL25) of TRPV1 knockout mice could lead to intestinal movement ($P < 0.05$), mainly inhibited bowel movement. The changing degree was equivalent to that of B6 mice. **Conclusions** Under the physiological condition, TRPV1 might be mediated by thermal and mechanical stimulation. But TRPV1 mediated acupuncture effect was

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (“973”) 资助项目 (No. 2011 CB 505206); 国家自然科学基金资助项目 (No. 81202744, 81373749)。

作者单位: 南京中医药大学国家重点省部共建针药结合实验室 (南京 210029)

通讯作者: 徐 斌, Tel: 13701585979, E-mail: xuux@sina.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.07.0859

quite complex, indicating TRPV1 mice might be one of intestinal movement mediating factors.

KEYWORDS gene knockout mice; intestinal movement; behavior; electroacupuncture; acupoint

香草酸瞬时受体亚型 1 (transient receptor potential vanilloid 1, 或 vanilloid receptor 1, TRPV1) 是目前辣椒素受体中研究较为深入的成员之一, 其为瞬态电压感受器阳离子通道, 主要表达于痛觉神经元, 参与体表感觉、胃肠运动、感觉和吸收等功能过程, 在胃肠道运动失调和功能性胃肠病的内脏高敏感中意义重大^[1,2]。针刺对胃肠运动具有显著调节效应, 可使紊乱的胃肠状态趋于平衡, 其机制涉及神经、化学递质等多方面因素^[3]。鉴于以上两点, 为研究 TRPV1 受体在针刺调节肠运动过程中的作用, 本文观察 TRPV1 受体敲除小鼠 (B6.129X1-Trpv1^{tm1Jui/NJU}) 与 CL57BL/6 野生型小鼠电针后的空肠内压变化, 初步探讨 TRPV1 与针刺调节胃肠运动的关系。

材料与方法

1 动物及分组 健康成年 TRPV1 敲除小鼠雄性 15 只为 TRPV1 组, 体重 (20 ± 5) g, 美国 Jackson Lab 实验室捐赠, 批号: J003770, 由南京大学模式动物中心代为繁育; 健康成年 C57BL/6 野生型小鼠雄性 15 只为 B6 组, 体重 (20 ± 5) g, 购于南京大学模式动物中心, 动物许可证号: SCXK (苏) 2010 - 0001。2 组小鼠均置于 SPF 级别动物房适应性喂养 1 周, 饲养室内温度、湿度、通风良好。实验过程中严格遵循国际“3R”原则, 即减少 (Reduction)、替代 (Replacement) 和优化 (Refinement)。

2 仪器 上海嘉龙教仪厂制造 JL-F 数显式光热测痛仪; AHLBORN 公司制造 ALMEMO2450 痛觉测定仪; 成都仪器厂制造 RM 6240 型四道生理记录仪; 自制内置气囊测压头 (将避孕套套在塑料导管一端, 导管前端与避孕套之间留有一定空隙, 距避孕套前端 1 mm 处用外科结扎线固定, 制成直径 3 mm 的肠内置气囊。气囊及导管内充满双蒸水, 排出气泡。导管另一端通过三通装置与注射器、压力传感器相连); 自制双极针灸针 (天津华鸿医材有限公司制造 0.18 × 13 mm 针灸针, 使用医用纸胶带将两针针柄并列残绕, 露出针柄末端与整个针身, 两针针身相隔 1 mm); 镊子、手术剪、止血钳等手术器械。

3 腧穴 参照《实验针灸学》^[4] 中常用实验动物穴位定位, 在小鼠身上定位曲池、上巨虚、天枢、大肠俞穴。

4 观察指标及方法

4.1 光热法测小鼠痛阈值 方法参考文献 [5]。实验之前 2 组小鼠正常喂养, 每日上午进行实验。将 2 组小鼠固定在痛觉测定仪上, 小鼠头部覆盖黑布以减少光线干扰其情绪。距尾尖 3 cm 处给予光热刺激其尾, 每只小鼠刺激 5 次, 记录甩尾时间, 取记录 5 次数值的平均值。

4.2 机械法测小鼠痛阈值 方法参考文献 [5]。光热法测定实验后, 2 组小鼠均休息 0.5 h 再进行机械测痛实验。实验时, 每次取 1 只小鼠置于特制笼中 10 min, 待其熟悉环境并安静后, 刺激其后肢脚底, 每只小鼠刺激 5 次, 记录下 5 次抬脚时仪器显示的刺激力度数值, 取 5 次数值的平均值。

4.3 空肠内压测定 方法参考文献 [6]。本实验待光热法及机械法测痛阈值后次日进行, 空肠手术前 2 组小鼠禁食 24 h, 禁水 6 h。腹腔注射 20% 氨基甲酸乙酯 (0.005 mL/g 体重) 待其麻醉, 沿剑突下 1 cm 偏右 0.5 cm 处打开腹腔, 暴露十二指肠, 循十二指肠下端约 2 cm 即空肠处剪口, 置入自制气囊测压探头。探头另一端连接压力传感器, 压力传感器连接 RM 6240 记录仪, 将压力信号转变为电信号, 经生物放大器放大后输入 RM 6240 生理信号采集系统显示肠运动。囊内注水维持基础压力在 0.7 kPa 左右, 同步描记肠运动, 待压力稳定开始记录。记录稳定的肠内压 10 min, 使用自制双极针灸针, 取 2 mA、2/15 Hz 刺激量分别电针曲池穴、上巨虚穴、天枢穴及大肠俞穴各 2 min。每个穴位起针后待压力波形恢复或接近基线水平再针刺下一个穴位。4 穴针刺顺序不固定。肠内压基线值和电针值取 2 min 记录的平均压, 采用 Sato A 等^[7] 方法计算单位时间平均肠内压幅值变化, 计算肠内压变化率; 肠内压变化率 (%) = (电针时 - 基线值) / 基线值 × 100%。变化率绝对值 < 5% 视为无效, 绝对值 ≥ 5% 视为兴奋/抑制。同时记录肠内压值变化的波形图。

5 统计学方法 数据分析使用 SPSS 15.0 统计软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示组内及组间比较均采用配对 *t* 检验; 计数资料采用 χ^2 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 两组小鼠痛阈值比较 (表 1) TRPV1 组小鼠

光热痛和机械痛较 B6 组小鼠明显迟钝,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1 两组小鼠行为学阈值比较 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	<i>n</i>	光热痛阈(s)	机械痛阈(g)
TRPV1	15	48.40 ± 1.34 **	5.36 ± 0.19 **
B6	15	24.00 ± 0.60	2.55 ± 0.08

注:与 B6 组比较, * $P < 0.01$

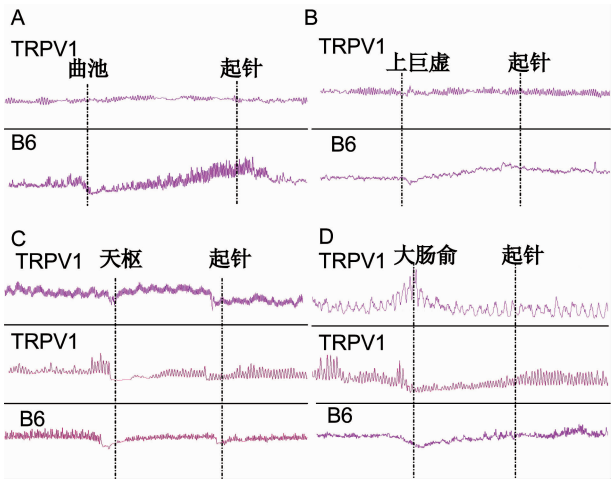
2 两组小鼠针刺前后肠内压变化值比较(表 2) 针刺曲池、上巨虚穴,两组小鼠肠运动变化均不明显($P > 0.05$)。针刺天枢穴时,与针刺前比较,2 组小鼠空肠内压值均明显降低($P < 0.05, P < 0.01$);针刺大肠俞穴时,与针刺前比较,TRPV1 组小鼠同 B6 组小鼠空肠内压均显著降低(均 $P < 0.01$)。

表 2 两组小鼠电针前后空肠内压值比较 (kPa, $\bar{x} \pm s$)						
组别	<i>n</i>	时间	曲池穴	上巨虚穴	天枢穴	大肠俞穴
TRPV1	15	针刺前	0.71 ± 0.06	0.68 ± 0.06	0.71 ± 0.05	0.71 ± 0.03
		针刺后	0.71 ± 0.09	0.68 ± 0.05	0.69 ± 0.04 *	0.68 ± 0.03 **
B6	15	针刺前	0.69 ± 0.04	0.68 ± 0.05	0.71 ± 0.05	0.71 ± 0.04
		针刺后	0.70 ± 0.06	0.70 ± 0.08	0.67 ± 0.06 **	0.66 ± 0.04 **

注:与本组针刺前比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 两组小鼠针刺 4 穴后效应特征(表 3, 图 1) 2 组小鼠电针 4 穴有一定效应差异。其中,电针曲池、上巨虚穴后,TRPV1 组小鼠多无反应,而 B6 组小鼠肠运动兴奋率多于 TRPV1 组小鼠(无 P 值)。电针天枢、大肠俞穴,均以抑制肠运动为主,TRPV1 组小鼠可见少数兴奋效应(无 P 值)。2 组小鼠波形图呈相同结果。电针曲池及上巨虚穴后,均呈现为 TRPV1 组小鼠无肠内压改变;B6 组小鼠则呈现明显的兴奋效应。电针天枢穴后,TRPV1 组小鼠体现为两种效应,有肠内压轻度增加,但大部分为减弱肠蠕动;B6 组小鼠则均为抑制肠运动的效应。大肠俞穴与天枢穴电针效应类同,TRPV1 组小鼠出现了个别肠内压即刻兴奋的现象,但大多数仍以抑制肠运动为主;B6 组电针大肠俞穴后以抑制肠运动为表现形式。

表 3 两组小鼠针刺 4 穴后效应特征							
组别	<i>n</i>	腧穴	兴奋	抑制	无效应	兴奋率 (%)	抑制率 (%)
TRPV1	15	曲池穴	1	4	10	6.67	26.67
		上巨虚穴	3	4	8	20.00	26.67
		天枢穴	1	6	8	6.67	40.00
		大肠俞穴	1	7	7	6.67	46.67
B6	15	曲池穴	5	3	7	33.33	20.00
		上巨虚穴	5	2	8	33.33	13.33
		天枢穴	0	6	9	0.00	40.00
		大肠俞穴	0	8	7	0.00	53.33



注:A 为电针两组曲池穴肠内压变化图;B 为电针两组上巨虚穴肠内压变化图;C 为电针两组天枢穴肠内压变化图;D 为电针两组大肠俞穴肠内压变化图

图 1 两组小鼠电针后肠内压图

讨 论

TRPV1 受体具有伤害性机械刺激感觉传感器的作用,参与人体多种生理病理过程^[8,9]。皮肤中 TRPV1 主要表达于皮肤感觉神经,对温、热、机械痛较敏感。TRPV1 与消化系统关系密切,影响着小肠的运动与吸收,尤其与空肠运动关系微妙^[10,11],背根神经节中支配空肠的传入神经元约 82% 表达 TRPV1^[12]。目前,小肠和 TRPV1 的相关研究以肠道炎性反应和内脏高敏感的内容居多,TRPV1 受体参与肠道黏膜炎性反应的形成,肠道炎性反应也促进 TRPV1 受体的表达^[13]。

CL57BL/6 小鼠是一种近交系小鼠,为许多突变基因提供遗传背景,在相关实验中多作为对照组模型^[14]。基于 TRPV1 自身特征,结合本次实验结果,提示敲除 TRPV1 后,在感受热痛及机械痛方面,较正常动物迟钝,可引起动物相应感觉能力的降低甚至丧失。但对 TRPV1 敲除动物的机械痛感受能力的研究结果并不一致,动物可表现出对机械痛的感受迟钝^[15],也可与正常动物的感觉无差异^[5,16,17]。

针刺与 TRPV1 受体间的关系,可理解为针刺制造了某种伤害性刺激,激活 TRPV1 传入神经通道,传递针刺信息至脊髓背角和三叉神经脊束核,经中枢神经系统整合,对全身进行整体调节。本实验显示,TRPV1 敲除小鼠主要呈现 3 个特征:(1)整体而言,TRPV1 敲除动物对针刺仍有反应,少数小鼠甚至更为敏感,可使肠运动显著改变;(2)针刺后肠运动变化趋势,除无任何效应的情况,TRPV1 敲除小鼠多以减弱

肠运动为主; (3) 从膻穴效应看, 电针 TRPV1 小鼠 4 穴多无明显效应或起抑制作用, 天枢、大肠俞偶见兴奋效应。以上特征的原因考虑: (1) TRPV1 在皮肤初级感觉传入与传导、肠感觉及运动均有作用, 与空肠关系密切, TRPV1 敲除后, 其作用可能得到如 TRPV3、TRPV4 等 TRP 其他家族受体代偿, 均与消化系统相关^[18]。这些尚待深究的同族受体, 也可在针刺对肠运动调节中起到关键作用。TRPV1 敲除小鼠机体状态不稳定, 针刺影响因素增多, 效应更加复杂多样, 如天枢、大肠俞穴出现了个别兴奋效应。可见, TRPV1 对针刺调节肠运动的介导作用并非绝对。(2) 针刺调节肠运动可因不同部位膻穴及刺激量而异。本实验动物为 TRPV1 敲除小鼠, 选取曲池、上巨虚、天枢、大肠俞 4 穴兼顾四肢胸腹穴的运用。电针上、下肢膻穴效应有别于 B6 组小鼠, 而胸腹部膻穴效应基本一致。考虑与膻穴神经节段支配有关^[19], 亦提示不同部位 TRPV1 受体可能对针刺的介导作用大小不一。此外, 实验中 2 mA、2/15 Hz 的电针刺刺激量主要兴奋传入纤维中的 A 类粗纤维。而 TRPV1 主要分布于哺乳动物的伤害感觉神经元, 尤其是无髓鞘的 C 类和部分少髓鞘的 A δ 类纤维^[8], 这两类纤维传导痛觉速度较慢。而皮肤机械感受器介导的触觉, 由较粗的 A β 轴突传导^[19]。因此, 不论是否敲除 TRPV1, 生理状态下大部分的针刺效应可不明显。天枢、大肠俞穴电针效应较为显著, 考虑与膻穴位于躯干靠近内脏及脊髓, 更易受到脊髓的节段性反射有关。(3) 肠运动受植物神经、肠神经系统及体液多因素影响。小肠一方面通过交感和副交感神经接受来自脑的冲动控制, 另一方面受自身肠神经系统的调控。大脑调控在某些情况下可替代肠神经干预肠运动^[20]。TRPV1 敲除小鼠在针刺期间, 机体处于剧烈的应急状态, 大脑的调控可使交感神经系统强烈活动, 抑制肠神经系统本身的作用及其消化功能, 出现抑制为主的电针效应。最后, 鉴于感受器与针刺关系, 躯体感觉很多依赖于机械和痛觉感受器, 两种感受器对不同刺激具有选择性, 传导信息到脑的路径差异也很大^[20]。TRPV1 整合各种疼痛信息, 可视为机械和痛觉感受器的综合体, 作用途径复杂。敲除 TRPV1 是否对其他外周感受器的作用过程产生影响, 导致何种感受器代偿其发挥作用都值得思考。

综上, TRPV1 受体可介导电针对肠运动的调节, 但并非唯一因素。不同部位的 TRPV1 对机体亦产生不同影响, 今后可考虑条件性敲除 TRPV1 受体进行针刺研究。目前, 内脏神经末梢感受器、效应器和各个内脏的各种传入刺激信号在中枢内的传入联系和途径

的认识, 仍处于“若明若暗”的状态^[21], 尚缺乏针刺与外周神经关系的系统性研究, 这也使针刺调节肠功能的机制探索工作变得困难。而研究结果涉及个体差异、针刺方法、刺激量和样本量等多方面, 有待结合多因素进行反复观察总结。

参 考 文 献

- [1] Winston J, Shenoy M, Medley D, et al. The vanilloid receptor initiates and maintains colonic hypersensitivity induced by neonatal colon irritation in rats [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(2): 615–627.
- [2] Akbar A, Yiangou Y, Facer P, et al. Expression of the TRPV1 receptor differs in quiescent inflammatory bowel disease with or without abdominal pain [J]. *Gut*, 2010, 59(6): 767–774.
- [3] 任彬彬, 余芝, 徐斌. 针刺对胃肠运动双向调节作用概述 [J]. *中国针灸*, 2012, 32(8): 765–768.
- [4] 李忠仁主编. 实验针灸学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 257.
- [5] 巩琦, 卢占英, 余立华, 等. 香草酸瞬时受体亚型 1 基因敲除雌性小鼠痛阈的变化 [J]. *第二军医大学学报*, 2011, 32(9): 1013–1015.
- [6] 秦庆广, 王海洋, 刘坤, 等. 针刺天枢对正常、便秘和腹泻模型大鼠不同肠段运动功能的双向调节效应 [J]. *世界中医药*, 2013, 8(3): 245–249.
- [7] 张娜, 余芝, 徐斌. 电针对大鼠不同状态下空肠运动的双向调节效应研究 [J]. *世界中医药*, 2013, 8(3): 255–258.
- [8] Luo XJ, Peng J, Li YJ. Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 650(1): 1–7.
- [9] Alawi K, Keeble J. The paradoxical role of the transient receptor potential vanilloid 1 receptor in inflammation [J]. *Pharmacol Ther*, 2010, 125(2): 181–195.
- [10] Rahmati R. The transient receptor potential vanilloid receptor1 [TRPV1 (VR1)] inhibits peristalsis in the mouse jejunum [J]. *Arch Iran Med*, 2012, 15(7): 433–438.
- [11] Rong W, Hillsley K, Davis JB, et al. Jejunal afferent nerve sensitivity in wild-type and TRPV1 knockout mice [J]. *J Physiol*, 2004, 560 (Pt3): 867–881.
- [12] Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway [J]. *Nature*, 1997, 389(6653): 816–824.
- [13] 穆敬平, 罗杰, 刘莉, 等. TRPV1 在炎症性肠病大鼠结肠

- 黏膜表达及其与肥大细胞相关性研究[J]. 湖北医药学院学报, 2011, 30(6): 553-556.
- [14] Yu Z, Cao X, Xia Y, et al. Electroacupuncture stimulation at CV12 inhibits gastric motility via TRPV1 receptor[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013: 294789.
- [15] Bielefeldt K, Davis BM. Differential effects of ASIC3 and TRPV1 deletion on gastroesophageal sensation in mice[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008, 294(1): G130-G138.
- [16] Immke DC, Gavva NR. The TRPV1 receptor and nociception[J]. Semin Cell Dev Biol, 2006, 17(5): 582-591.
- [17] Walder RY, Radhakrishnan R, Loo L, et al. TRPV1 is important for mechanical and heat sensitivity in uninjured animals and development of heat hypersensitivity after muscle inflammation[J]. Pain, 2012, 153(8): 1664-1672.
- [18] Holzer P. TRP channels in the digestive system[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2011, 12(1): 24-34.
- [19] Li YQ, Zhu B, Rong PJ, et al. Effective regularity in modulation on gastric motility induced by different acupoint stimulation[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(47): 7642-7648.
- [20] 王建军主译. 神经科学探索脑[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 397-485.
- [21] 李继硕主编. 神经科学基础[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 248.

(收稿: 2013-04-25 修回: 2014-04-01)

第十四次全国中西医结合微循环学术会议征文通知

为了交流微循环相关领域的中西医结合基础和临床研究成果, 并为从事微循环基础和临床研究的学者与中医药研究的学者提供交流平台, 中国中西医结合学会微循环专业委员会定于 2014 年 10 月 11—13 日在江苏省苏州市召开第十四次全国中西医结合微循环学术会议(中国中西医结合学会微循环专业委员会 2014 年学术年会), 会议由苏州大学附属第一医院江苏省血液研究所承办, 将邀请相关领域的专家做系统讲演。会议同时, 召开中国中西医结合学会第六届微循环专业委员会全体会议。

会议内容 重点交流微循环领域的中西医结合基础研究和临床研究, 特别关注血栓性疾病与中医药、出血性疾病与中医药、心血管病与中医药、脑血管病与中医药、肾损伤与中医药、肝损伤与中医药、肺损伤与中医药、糖尿病血管合并症与中医药、感染与中医药、介入损伤与中医药、过氧化物与中医药、粘附分子与中医药、血小板与中医药、肥大细胞与中医药、炎性因子与中医药等领域的研究。

征文要求 A4 纸 1 页, 按题目、作者、所属单位、目的、方法、结果、结论的顺序撰写(800 字以内), 请在 2014 年 8 月 20 日以前, 用 E-mail 或邮寄的方式发至会议秘书处。

联系方式 胡仁萍, Tel: 13771866623, E-mail: daikslab@gmail.com

邮寄地址 江苏省苏州市人民路 708 号苏大附一院南区 14 号楼 102 室苏州大学附属第一医院江苏省血液研究所血栓与止血研究室, 邮编 215006