

针刺上巨虚抑制结肠扩张诱发蓝斑核神经元放电反应的实验研究

朱青艳¹ 王 华² 陈泽斌² 刘溪泉² 金 鑫³

摘要 **目的** 探讨上巨虚与大肠相关的可能机制。**方法** 选用 SD 大鼠 40 只,采用末段结肠扩张作为伤害性结肠传入刺激,应用微电极细胞外记录蓝斑核(LC)神经元活动。针刺大肠下合穴上巨虚和大肠经合穴合谷,观察 LC 神经元放电反应的一般特性、结肠扩张刺激诱发 LC 神经元放电反应及针刺上巨虚、曲池对结肠扩张刺激诱发 LC 神经元放电反应的影响。**结果** 结肠扩张可以诱发 LC 神经元放电增加,增加率为 $127.33\% \pm 45.48\%$,针刺上巨虚和合谷均能抑制这种伤害性反应,抑制率分别为 $38.24\% \pm 7.69\%$ 和 $21.29\% \pm 13.16\%$,差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 针刺上巨虚和结肠伤害性传入信号在 LC 神经元发生会聚和相互作用,针刺上巨虚能显著抑制结肠扩张激活的 LC 神经元放电,可能是上巨虚和大肠相关的机制之一。

关键词 蓝斑核;上巨虚;结肠扩张;神经元放电反应

Acupuncture at Shangjuxu (ST37) to Inhibit Distention of Colon Induced Discharge Reaction of LC: an Experimental Study ZHU Qing-yan¹, WANG Hua², CHEN Ze-bing², LIU Xi-quan², and JIN Xin³ 1 Faculty of Chinese Medicine, Medical School, Jiangnan University, Wuhan (430056), China; 2 Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan (430065), China; 3 Department of Traditional Chinese Medicine, Puren Hospital, Wuhan (430081), China

ABSTRACT **Objective** To study possible mechanisms of Shangjuxu (ST37) and the large intestine. **Methods** Totally 40 SD rats were selected. The distension of end colon was used as injured afferent stimulus. Activities of locus coeruleus (LC) neurons were recorded by extracellular microelectrode technique. Shangjuxu (ST37) and Hegu (LI4) were needled to observe general features of discharge reactions, distention of colon induced discharge reactions of LC, and its effects on distention of colon induced discharge reactions of LC. **Results** Distention of colon could induce increased discharge of LC neurons by $127.33\% \pm 45.48\%$. But needling at Shangjuxu (ST37) and Hegu (LI4) could inhibit this injured response by $38.24\% \pm 7.69\%$ and $21.29\% \pm 13.16\%$ respectively (all $P < 0.01$). **Conclusions** Needling at Shangjuxu (ST37) and afferent signals of colon distension converged and interacted with each other. Needling at Shangjuxu (ST37) could significantly inhibit colon distension induced discharge of LC neurons, which might be one of mechanisms for Shangjuxu (ST37) and the large intestine relationship.

KEYWORDS locus coeruleus; Shangjuxu (ST37); distention of colon; discharge reaction of neurons

蓝斑核(locus coeruleus, LC)是情绪应激导致结肠运动障碍及感觉异常主要中枢部位之一^[1],LC内微量注射应激激素促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin-releasing hormone, CRH)可成功

模拟大鼠应激后结肠传输加快^[2]。应激焦虑导致的下丘脑CRH的释放,可以引起LC内CRH的释放,继而使LC放电频率增加^[3]。在非应激状态下,直结肠扩张,也能引起LC释放CRH,放电频率增加,这种放电增加又伴随着前脑脑电的变化^[4],引起觉醒和注意,可能直接提高在疼痛传导和相应的情绪反应过程中起着十分重要作用的大脑皮层和边缘系统对结肠传入的敏感性,产生腹痛及相关的情绪异常^[4]。这似乎可以解释肠易激综合征(irritable bowel syndrome,

基金项目:973子项目(No.2006CB504507)

作者单位:1.江汉大学医学院中医系(武汉 430056);2.湖北中医药大学(武汉 430065);3.武汉市普仁医院中医科(武汉 430081)

通讯作者:朱青艳, Tel:18986214369, E-mail: zqy-lyh-lyq@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.05.0608

IBS) 患者的肠功能紊乱与心理症状共存,并可被心理应激诱导和加重的现象^[5]。

LC 在多种针刺效应中起到重要作用^[6,7],针刺可引起 LC 单个神经元放电变化,可能是介导针灸效应的中枢部位之一^[8,9]。本实验采用电生理学方法,观察上巨虚穴针刺信号与结肠感觉传入在 LC 神经元的会聚及其相互作用,探讨上巨虚大肠相关的中枢机制,并为针刺治疗应激相关性肠疾病(如 IBS)提供实验依据。

材料和方法

1 动物 健康成年 Sprague-Dawley 雄性大鼠 40 只,体重 300~350 g,中国医学科学院实验动物中心提供(清洁级,合格证号:SCXK-军 2002-007),实验前禁食 12 h,自主饲以 5% 葡萄糖氯化钠溶液。

2 药物、试剂及仪器 脑立体定位仪(日本,Universal Stereotaxic Instrument 公司);颅骨钻(美国,The Freedom Electric Co.公司);微电极推进器(Japan,PF5-1);微电极放大器(USA,Xcell-3 microelectrode amplifier,FHC);CED1401-plus 数据采集系统(UK,Cambridge Electronic Devices);玻璃微电极拉制仪(USA,Modle P-97);乌来糖(分析纯,北京化学试剂公司);0.5 mol/L 滂胺天兰醋酸纳溶液(自配,北京化学试剂公司);37℃液状石蜡(北京化学试剂公司)。

3 LC 神经元放电反应的一般特性的检测 大鼠用 10% 乌拉坦(1.0~1.2 g/kg)腹腔注射麻醉。实验过程动物体温用计算机温度时间控制仪维持在(37±1)℃。动物俯卧,顶部剃毛,沿正中矢状线切开皮肤,分离皮下组织,刮除骨膜,暴露前后囟。根据大鼠脑立体定位图谱^[10],在蓝斑核所在颅骨部位用颅骨钻钻孔。头部用耳棒固定,下齿钩挂在鼠头夹中,口鼻部用鼠头夹压紧。将大鼠移至立体定位仪上,显微镜下分层剥离硬脑膜和软脑膜,暴露的脑组织用温的石蜡油覆盖。在微电极操纵器控制下根据各 LC 核团的三维空间座标^[10](前囟后 9.48~10.32 mm,颅骨缝线旁开 1.0~1.5 mm,深度约为脑表面下 6.6~7.2 mm)将玻璃微电极(尖端 1~1.5 μm,阻抗 10~20 MΩ)插入核团,寻找所需记录的神经元,待其放电稳定后开始记录。神经元放电信号经微电极放大器放大,并输入 CED 1401 计算机数据采集系统。检测大鼠 LC 神经元放电反应的一般特性。

4 结肠扩张(colonal distention,CD)诱发 LC 神经元放电反应及针刺干预作用的观察 将一长约

4 cm 的气囊经肛门插入结肠,气囊末端距肛门约为 5 cm。为避免造成肠壁损伤与肛门刺激,置入时在气囊上涂抹润滑油。气囊用安全套制作而成,捆绑在一外径约为 4 mm 的胶管上。手动气囊通过 T 型管与血压计相连接。根据 LC 神经元的反应性质,检查其放电频率,对夹尾、对侧下肢等机械刺激的反应,当确定所记录神经元为 LC 神经元后,完整的神经元放电记录的程序为:5 s 的神经元背景活动,然后给予 50 s 的 CD 刺激,在第 10 s 的 CD 时再同时进行 30 s 的穴位手针刺刺激,观察同时给予两种刺激时的反应变化情况。停止针刺后再观察 10 s 的 CD 反应,最后停止 CD,记录 5 s 的背景活动。CD 由通过血压计输出 60 mmHg 的压力充盈气囊来实现。为避免出现过度刺激以及结肠可能的敏感化,重复刺激为间隔 5 min 以上。分别选取上巨虚(大鼠后肢膝关节外下方当腓骨小头下约 10 mm 处)、曲池(大鼠前肢膝关节近外踝处),取穴方法参照文献^[11],每个部位刺激前确保神经元放电频率恢复到刺激前水平,再进行另一个部位的刺激和记录。手针刺刺激自始至终由同一个人操作,采用平补平泻手法,垂直进针,针刺深度约 5 mm,均匀地提插捻转,顺时针捻针时插入,逆时针捻转时提出,手法平和,不轻不重,频率 30 次/min。单细胞记录结束后,用刺激器通过隔离器经微电极放大器向玻璃微电极通以直流电,将玻璃微电极内的醋酸滂胺天兰电极液导入脑组织以标记记录位置。动物心脏灌流固定,取脑组织冰冻切片,做中型红染色观察,参考大鼠定位图谱确认记录电极所在的位置将记录部位在 LC 以外的数据删去不用。

5 数据采集及统计学方法 采用 Spike-2 软件和 CED1401+ 数据分析仪进行采样和分析。通过 on-line 或 off-line 制作刺激前后时间直方图(PSTH)分析神经元的活动变化。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用配对比较的 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

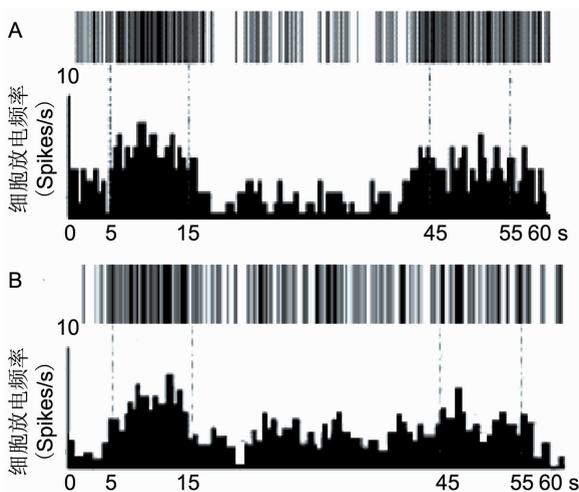
结 果

1 LC 神经元反应的一般特性 雄性 SD 大鼠 40 只,记录细胞数共 58 个,其中经鉴定确定为 LC 细胞共 36 个。LC 神经元自发放电为缓慢、有规则的慢波,频率在 0.5~5 spikes/s,平均(2.55±1.58) spikes/s。对夹尾和对侧后肢刺激均能产生明显的激活反应,其特点为在施加刺激的最初出现爆发放电,随后有一段反应平台期。

2 CD 刺激对 LC 神经元的激活作用 36 个 LC 神经元,26 个在给予 CD 刺激后出现明显的放电频率

增高,4 个在给予 CD 刺激后出现放电频率降低,6 个无变化明显增加。在 18 个对 CD 呈激活反应的 WDR 神经元中,60 mmHg 强度的 CD 情况下,神经元从背景活动时的(2.36 ± 0.89) spikes/s 迅速增加为(5.31 ± 2.43) spikes/s, 增加率是背景活动的 $121.96\% \pm 44.12\%$ 。

3 穴位针刺抑制 CD 引起的 LC 神经元激活反应(图 1) 在 60 mmHg CD 情况下,11 个 LC 神经元激活从背景活动时的(2.31 ± 0.86) spikes/s 迅速增加为(5.28 ± 2.31) spikes/s, 增加率为 $127.33\% \pm 45.48\%$, 在此情况下给予对侧上巨虚针刺, 可使 CD 的激活反应明显抑制, 下降到(3.27 ± 1.5) spikes/s, 抑制率为 $38.24\% \pm 7.69\%$; 在 60 mmHg CD 情况下, 10 个 LC 神经元激活从背景活动时的(2.14 ± 1.01) spikes/s 迅速增加为(4.85 ± 2.27) spikes/s, 增加率为 $128.13\% \pm 41.88\%$ 。在此情况下给予对侧曲池针刺后, LC 神经元放电频率下降到(3.7 ± 1.53) spikes/s, 抑制率为 $21.29\% \pm 13.16\%$ 。针刺上巨虚与曲池均能抑制 CD 激活的 LC 神经元的放电, 针刺上巨虚抑制率明显高于针刺曲池, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。



注:A 为针刺上巨虚;B 为针刺曲池

图 1 不同穴位对 CD 诱发 LC 神经元放电反应的抑制作用示例

讨 论

与盆腔脏器一样,大鼠支配降结肠的盆神经中感觉传入纤维终止于两侧腰骶髓段,以 L6-S1 节段为主。该节段也是支配末段结肠运动的副交感神经核所在部位^[12]。Vizzard MA 等^[13]经由神经轴标记物显示 LC 发出轴突可直达脊髓骶神经节 S1 节段。LC 的

腹侧的 Barrington 核,是脑桥排尿中枢,也能接受末段结肠感觉传入。由于 LC 与 Barrington 核比邻而居,且形态学研究显示 Barrington 核有神经纤维可直接投射到骶副交感神经核,并有分支投射与 LC 和迷走神经背核相联系^[14,15],可以推测来自于末段结肠的神经传入通过盆神经向腰骶段脊髓投射,再上行至 LC,或经由 Barrington 核至 LC,激活 LC 神经元。Lechner SM 等^[4]在对大鼠行直结肠扩张过程中,研究 LC 和前脑皮层激活的关联程度,发现两者在扩张开始时均出现激活,2 min 时激活程度达到高峰,3 min 时两者的激活又均回到基础水平。正是 LC 和前脑被短暂的同时激活触发了对扩张刺激的觉醒和注意,从而调整对直结肠扩张的反应,这种调节反应可能参与了脊髓上中枢对结肠传入信息的整合放大,与应激相关性腹泻及内脏高敏的形成有关。

本实验结果表明:LC 神经元自发放电较为缓慢,能被夹尾和对侧后肢刺激激活,其特点为在施加刺激的最初出现爆发放电,随后有一段反应平台期,这与 Borsody MK 等^[16]的实验结果是一致的。不同程度的末段结肠扩张可诱发 LC 神经元放电增加,在 20 ~ 100 mmHg 范围内,随着 CD 压力的升高,神经元反应的强度也随之增加。40 mmHg 以上的 CD 压力被认为是伤害性刺激^[17],故选择 60 mmHg 末段结肠扩张作为实验观察的伤害性刺激传入,模拟结肠痛觉。针刺上巨虚能显著降低 60 mmHg 末段结肠扩张引起的 LC 神经元的激活反应,表明针刺信息与结肠感觉信息在 LC 神经元水平可发生会聚,会聚的结果是针刺有效抑制了 LC 对结肠的伤害性痛刺激的反应。这种会聚可能是针刺影响结肠传入-传出信息处理的途径之一,也可能是针刺治疗应激相关结肠功能异常(如 IBS)的机制所在。

另外,通过比较发现针刺是有穴位特异性的。大肠下合穴上巨虚抑制 CD 诱发的 LC 神经元放电反应作用明显优于大肠经合穴曲池。考虑这与穴位所处部位的神经支配有关。上巨虚穴所在部位的皮肤和肌肉分别由腓浅神经和腓深神经支配,穴位的传入冲动可能通过躯体神经和血管壁的神丛(主要是腓前动脉神经丛)两条途径上行,投射至 L6-S1 脊神经节,从而干预结肠感觉信息的传入。而曲池穴位于上肢,其感觉传入至脊髓的较高节段,因而对结肠扩张诱发的 LC 神经元放电变化的影响弱于上巨虚。同时也说明,古人设置下合穴是有其科学内涵的。《灵枢·邪气脏腑病形》篇提出“五脏六腑之气,荣输所入为合”,“荣输治外经,合治内腑”,“治

内府奈何,取之于合”。文中随之明确了大肠下合穴,即:“大肠合入于巨虚上廉”。大肠下合穴上巨虚不在上肢本经,也不在相邻的手经,而合于下肢的足经。对此《类经》的解释是:“大肠、小肠、三焦皆手三阳之经,然大小肠为下焦之腑,连属于胃,其经虽在上,而气脉不离于下,故合于足阳明之巨虚上下廉。”可见古人早已认识到,位于腹腔的大肠与足阳经的关系更密切。并通过下合穴的设立,将“合治六腑”的取穴原则运用在大肠腑病的治疗中,弥补了手阳明经治疗大肠腑证之不足。

本实验以正常大鼠为研究对象,如能继续对结肠痛敏大鼠进行相关实验,则可在病理状态下观察大肠下合穴上巨虚与大肠的密切联系,进一步揭示针刺治疗应激相关结肠功能异常(如 IBS)的机制。

参 考 文 献

- [1] Hayashi B, Tsuruoka M, Maeda M, et al. A possible synaptic configuration underlying coeruleospinal inhibition of visceral nociceptive transmission in the rat[J]. *Neurol Sci*, 2011, 33(2): 463-468.
- [2] Mönikes H, Schmidt BG, Tebbe J, et al. Microinjection of corticotropin releasing factor into the locus coeruleus/subcoeruleus nuclei stimulates colonic motor function in rats[J]. *Brain Res*, 1994, 644(1): 101-108.
- [3] Camilleri M, Spiller RC. Irritable bowel syndrome: diagnosis and treatment[M]. USA: Saunders Ltd., 2002: 55-68.
- [4] Lechner SM, Curtis AL, Brons R, et al. Locus coeruleus activation by colon distension: role of corticotropin-releasing factor and excitatory amino acids[J]. *Brain Res*, 1997, 756(1-2): 114-124.
- [5] Park AJ, Collins J, Blennerhassett PA, et al. Altered colonic function and microbiota profile in a mouse model of chronic depression[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2013, 25(9): 733-e575.
- [6] 李在琉, 金元哲, 金吉光, 等. 刺激大鼠蓝斑核区对胃电

和胃运动的影响[J]. *生理学报*, 1986, 23(6): 468.

- [7] 张吉, 张宁. 针刺镇痛机制的探讨[J]. *中国针灸*, 2007, 27(1): 72-75.
- [8] 黄坤厚, 荣培晶. 电针“人中”“足三里”对蓝斑核神经元活动影响的比较观察[J]. *中国针灸*, 1995, 15(3): 27-30.
- [9] 王义光, 蒋乃昌, 殷松生, 等. 电针对急性实验性高血压大鼠的降压效应及中枢机制探讨[J]. *中国针灸*, 1997, 17(2): 105-108.
- [10] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates [M]. Orlando: Academic Press, 2005: 112-119.
- [11] 华兴邦. 大鼠穴位图谱的研制[J]. *实验动物与动物实验*, 1991, 1: 135-137.
- [12] 毕冬松, 李善军, 冯国栋. 支配左半结肠副交感神经肠壁外支的解剖学研究及在直肠癌手术中的应用[J]. *中华普通外科杂志*, 2006, 13(8): 605-606.
- [13] Vizzard MA, Brisson M, De Groat WC. Transneuronal labeling of neurons in the adult rat central nervous system following inoculation of pseudorabies virus into the colon[J]. *Cell Tissue Res*, 2000, 299(1): 9-26.
- [14] Valentino RJ, Chen S, Zhu Y, et al. Evidence for divergent projections of corticotropin-releasing hormone neurons of Barrington's nucleus to the locus coeruleus and spinal cord[J]. *Brain Res*, 1996, 732(1-2): 1-15.
- [15] Rouzade-Dominguez ML, Curtis AL, Valentino RJ. Role of Barrington's nucleus in the activation of rat locus coeruleus neurons by colonic distension[J]. *Brain Res*, 2001, 917(2): 206-218.
- [16] Borsody MK, Weiss JM. Influence of corticotropin-releasing hormone on electrophysiological activity of locus coeruleus neurons[J]. *Brain Res*, 1996, 724(2): 149-168.
- [17] 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.

(收稿:2014-01-04 修回:2015-02-09)