

· 基础研究 ·

电针足三里对肠易激综合征腹泻型大鼠
炎性损伤的机制研究

冉国平 刘嘉颖 杨大业 李 佳

摘要 **目的** 探讨电针足三里对肠易激综合征腹泻型(IBS-D)大鼠模型肠道炎性物质的影响。**方法** 三月龄SPF级雌性SD大鼠80只,采用随机数字表法分为4组:对照组、模型组、针刺组、假针刺组,每组20只。以高乳糖饲料喂养与束缚应激相结合的方法制备IBS-D大鼠模型,针刺组采用电针足三里治疗,假针刺组选取足三里穴外侧5 mm区域的非穴位区作为针刺点。观察大鼠日常饮食及排便情况,HE染色观察结肠组织病理结构,ELISA定量检测肠道炎性因子IL-1 β 、IL-6的含量,Western blot检测结肠组织蛋白NF- κ B的表达。**结果** 与对照组比较,模型组大鼠2周时体重增长率降低($P < 0.05$),近端结肠肠道炎性因子IL-1 β 、IL-6含量、结肠组织蛋白NF- κ B表达均增高($P < 0.05$);与模型组比较,针刺组体重增长率明显上升($P < 0.05$),近端结肠肠道炎性因子IL-1 β 、IL-6含量、结肠组织蛋白NF- κ B表达均降低($P < 0.05$);假针刺组与模型组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 电针可以有效改善IBS-D体重增长率,降低结肠黏膜组织炎性因子含量;同时调节结肠组织NF- κ B蛋白的表达,减轻炎性损伤。

关键词 电针;足三里;肠易激综合征;腹泻

Mechanism of Electro-acupuncture at Zusanli (ST36) on Inflammatory Injury of Diarrhea-predominant Irritable Bowel Syndrome Rats RAN Guo-ping, LIU Jia-ying, YANG Da-ye, and LI Jia Hubei University of Chinese Medicine, Hubei Provincial Collaborative Innovation Center of Preventive Treatment by Acupuncture and Moxibustion, Wuhan(430061)

ABSTRACT **Objective** To investigate the effect of electro-acupuncture at Zusanli (ST36) on intestinal inflammatory substances by using diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (IBS-D) rat model. **Methods** Eighty three-month-old female Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into four groups with random digital method, i.e., control group, model group, real acupuncture (RA) group and sham-acupuncture (SA) group, 20 rats in each group. IBS-D rat model was prepared by the combination of high lactose feed and restraint stress. Rats in RA group were acupunctured at Zusanli (ST36) while rats in SA group with the non-acupoint area 5 mm away from Zusanli. The daily diet and defecation of rats were observed. The pathological structure of colon tissue was observed by HE staining. The levels of IL-1 β and IL-6 in intestinal tract were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of NF- κ B in colonic tissue was detected by Western blot. **Results** Compared with the control group, the growth rate of the model group was significantly decreased at 2 weeks ($P < 0.05$), the levels of inflammatory factors IL-1 β , IL-6 and the expression of NF- κ B in the colon were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the body weight growth rate of the RA group increased significantly ($P < 0.05$), the expression of IL-1 β , IL-6 and NF- κ B in the proximal colon was significantly decreased ($P < 0.05$). There was no significant difference between SA group and model group ($P > 0.05$). **Conclusion** Electro-acupuncture can effectively improve the growth rate of IBS-D rats and reduce intes-

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81804165); 湖北省自然科学基金课题(No. 2016CFB221); 湖北中医药大学校级课题(No. XJ2014KJ003)

作者单位: 湖北中医药大学针灸骨伤学院, 针灸治未病湖北省协同创新中心(武汉 430061)

通讯作者: 李 佳, Tel: 027-68889115, E-mail: ljljia@163.com

DOI: 10.7661/j. cjim. 20190213. 070

tinal mucositis, reduce the content of inflammatory factors in colonic mucosa and simultaneously regulate the expression of NF- κ B protein in colonic tissue and reduce inflammatory damage.

KEYWORDS electro-acupuncture; Zusanli; irritable bowel syndrome; diarrhea

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种常见的功能性胃肠疾病,以腹痛或腹部不适为主要症状,排便后可改善,常伴随排便习惯及大便形状的改变,便秘和腹泻可交替出现的一种临床综合征^[1]。IBS 可分为 4 个亚型:腹泻型(IBS-D)、便秘型(IBS-C)、腹泻便秘交替型(IBS-A)、不确定型(IBS-U),临床研究发现,IBS 的各种亚型中,IBS-D 最为多见^[2],其具有反复发作倾向,常迁延难愈。西医暂无理想的药物,而针灸在临床上却有明显优势^[3],其针刺作用机制值得探寻。本实验通过针刺足三里,观察其对 IBS 大鼠结肠肠道炎性细胞因子白细胞介素-1 β (interleukin 1- β , IL-1 β)和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)以及结肠组织中蛋白核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)的影响,研究针刺足三里对肠道炎性机制的影响。

材料与方法

1 实验动物 3 月龄 SPF 级雌性 SD 大鼠 80 只,适应性喂养 7 天后,动物喂养在湖北中医药大学实验动物中心完成,生产合格证号:SCXK(鄂)2004—0007,环境温度 21 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$,湿度 40% ~ 60%。光照时间每日 12 h,大鼠可自由取食饮水。本实验严格按照科技部[2006]398 号《关于善待实验动物的指导性意见》文件要求进行实验。经湖北中医药大学动物伦理委员会批准(No. HB1245D)。

2 试剂及仪器 IL-1 β ELISA 试剂盒(96 tests, 美国, Sciencell, 货号: XNDW166)、IL-6 ELISA 试剂盒(96 tests, 美国, Sciencell, EK0412)、NF- κ B p65 抗体(100 μg , 美国, Abcam, ab16502)、 β -actin 抗体(100 μg , 美国, Abcam, ab50591)、0.30 mm $\times$ 13 mm 华佗牌毫针(0.30 mm $\times$ 13 mm, 中国苏州, 华佗牌)。Bio-Rad 化学发光成像系统(Universal Hood II, 美国, Bio-Rad)、Bio-Rad 电泳仪(Power Pac TMHC, 美国, Bio-Rad)、转膜仪(Transblot SD Cell, 美国, Bio-Rad)、电针治疗仪(G6805-2A 型, 中国, 上海华谊医用仪器有限公司)。

3 分组及造模方法 80 只大鼠按照随机数字表法分为 4 组,对照组、模型组、针刺组及假针刺组,每组各 20 只。模型制备:以高乳糖饲料喂养与束缚应激

相结合的方法制备 IBS-D 大鼠模型,参照文献[4]方法加工高乳糖饲料:酪蛋白 22.05%、乳糖 45.58%、蔗糖 15.00%、大豆油 3.75%、纤维素 8%、DL-蛋氨酸 0.4%、胆碱 0.2%、维生素混合物 0.02%、无机盐混合物 5%。略作改进进行束缚应激,造模时采用捆绑器每天捆绑大鼠,固定于高铁架上并倾斜 60 $^{\circ}$ 放置,使大鼠双后肢完全制动,1 h 后解除束缚,造模共 14 日。然后以直肠刺激法测定 IBS-D 模型大鼠的内脏敏感性,结果显示模型组大鼠腹部抬起以及背部拱起的压力阈值显著高于对照组($P < 0.01$),提示模型制备成功。

4 干预方法 于造模同时针刺干预,参照“实验动物针灸穴位图谱”^[5],针刺组选取双侧后三里,即大鼠的足三里,用 0.30 mm $\times$ 13 mm 华佗牌毫针直刺,接 G6805-II 型电针治疗仪,连续波,频率 120 次/min,强度 1 mA,以大鼠双下肢轻微抖动为宜,留针 15 min,每日 1 次,共 14 日。假针刺组选取足三里穴外侧 5 mm 区域的非穴位区作为针刺点,干预方法同电针组。对照组和模型组大鼠正常喂养,不做任何干预处理。

5 检测指标及方法

5.1 一般体征观察 观察并记录各组大鼠生长状态和日常饮食,始体重,每日测体重,计算第 3 天、第 1 周和第 2 周体重增长率[体重增长率(%) = (每日体重 - 初始体重)/初始体重 $\times$ 100%]。

5.2 内脏高敏感性评价 参照参考文献[6]。上述各组大鼠在相应方法干预 2 周后,评价大鼠腹部收缩反射(abdominal withdrawal reflex, AWR)。将血压计、针管与自制指套气囊用三通管连接,大鼠保持清醒并放入固定器内,将气囊经大鼠肛门插入且固定深度约 5 cm。待大鼠适应环境后逐渐打气扩张肠道,观察血压计计数以评价其 AWR,记录引起大鼠腹部抬起以及背部拱起的压力阈值(mm Hg),每次阈值进行 3 次测量取其平均值。

5.3 肠肌标本 HE 染色 取大鼠的结肠组织,肠道组织标本用 10% 中性甲醛固定液固定,脱水后常规蜡块包埋,制作 4 μm 厚石蜡切片,苏木素染色,按照 HE 染色步骤操作。

5.4 结肠段肠道冲洗液的采集及 IL-1 β 和 IL-6 含量的测定 开腹暴露小鼠腹腔,取距回盲瓣 5 cm 处结肠组织,1 mL PBS 反复冲洗肠腔,收集冲洗液 EP

管内, 4 ℃, 3 000 r/min, 10 min 离心, 收集上清、-20 ℃ 保存待测。严格按 ELISA 试剂盒要求对大鼠 IL-1 β 和 IL-6 含量进行检测。

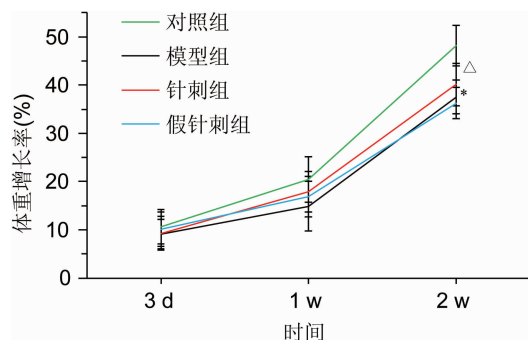
5.5 Western blot 检测 NF- κ B 含量 提取肠黏膜组织核蛋白并测定浓度后, 行聚丙烯酰胺凝胶电泳。结果行计算机扫描, 用图像分析系统, 测定目的条带 NF- κ B 与内参 β -actin 的光密度值 (optical density, OD), 并取两者的比值作半定量分析。

6 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对于正态分布数据采用 t 检验, 非正态分布数据采用 Mann-Whitney U 检验, 计数数据采用率表示, 率的显著性比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠不同时间段体重增长率比较 (图 1)

各组大鼠体质量增长率在 3d 以及 1w 时间段比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 2 周时, 与对照组比较, 模型组大鼠体重增长率明显降低 ($P < 0.05$), 而针刺组较模型组体重增长率较高 ($P < 0.05$)。模型组与假针刺组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

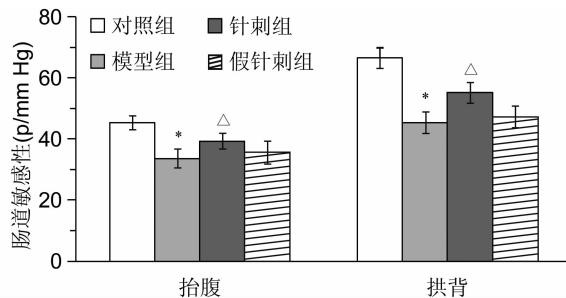
图 1 各组大鼠不同时间段体重增长率比较

2 各组大鼠内脏高敏感性比较 (图 2)

模型组动物在造模后, 其抬腹和拱背的压力阈值均低于对照组 ($P < 0.01$)。针刺组大鼠抬腹和拱背的压力阈值与模型组比较升高 ($P < 0.05$)。而假针刺组与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

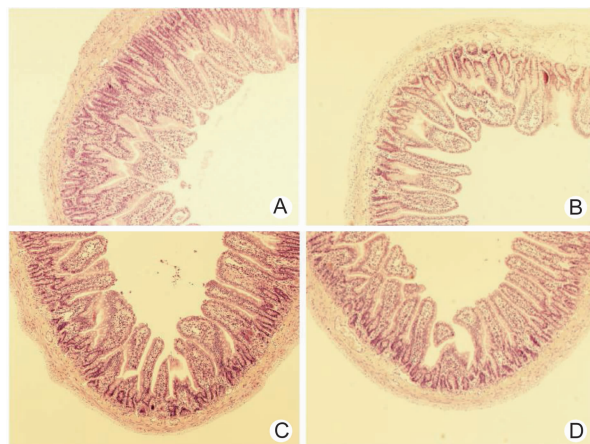
3 各组大鼠结肠组织形态学比较 (图 3)

IBS 结肠组织切片后 HE 染色均未看到明显结肠炎性表现, 黏膜下层结构完整, 纤维结缔组织无增生, 间质无水肿, 无中性粒细胞等浸润, 符合临床 IBS 结肠无形态学异常的特征。各组之间均未见明显的病理结构异常。



注: 与对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

图 2 各组大鼠内脏高敏感性比较

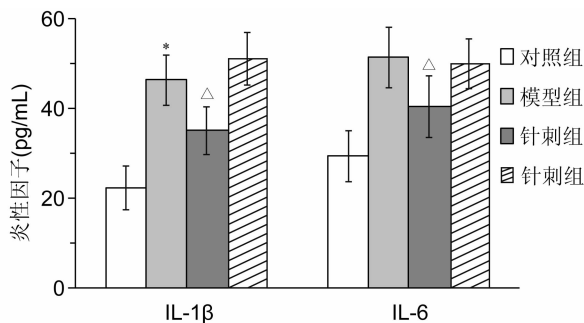


注: A 为对照组; B 为模型组; C 为针刺组; D 为假针刺组

图 3 各组大鼠结肠组织形态学比较 (HE, $\times 40$)

4 各组大鼠结肠段 IL-1 β 和 IL-6 含量比较 (图 4)

与对照组比较, 模型组大鼠结肠段 IL-1 β 和 IL-6 含量增高 ($P < 0.05$), 而针刺组较模型组降低 ($P < 0.05$)。模型组与假针刺组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



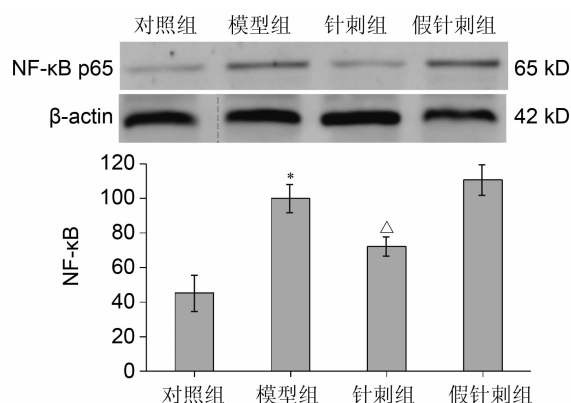
注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

图 4 各组大鼠结肠段 IL-1 β 和 IL-6 含量比较

5 各组大鼠结肠组织 NF- κ B p65 蛋白表达比较 (图 5)

与对照组比较, 模型组大鼠结肠组织中 NF- κ B p65 含量增高 ($P < 0.05$), 而针刺组较模型组降低 ($P < 0.05$)。模型组与假针刺组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

意义($P > 0.05$)。



注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

图5 各组大鼠结肠组织 NF-κB 含量的比较

讨 论

IBS 是现代社会的常见病之一,其中又以 IBS-D 多见,其发病机制比较复杂,目前的研究认为与内脏敏感性、脑-肠轴、肠道炎症与免疫功能的变化、肠动力异常等有关^[7]。中医学认为 IBS-D 多为脾虚气滞,运化失职,肝郁气滞,津液无制而发泄泻。治疗上当宜健脾补虚,行气。足三里为足阳明胃经的合穴,在《四总穴歌》^[8]云“肚腹三里留”,且与足太阴脾经互为表里,具有行气止痛,疏通经络,调理胃肠功能紊乱的作用。《灵枢·邪气藏府病形》载:“黄帝曰:治内府奈何?岐伯曰:取之于合。黄帝曰:合各有名乎?岐伯答曰:胃合于三里……”。焦会元在《古法新解会元针灸学》^[9]对该穴有极高的论述:“此穴治病万端,有白术之强,有桂附之热,有参茸之功,有硝黄之力”。由此看来,足三里不仅善于调理胃肠自身疾病,而且可以通过补益后天胃气达到扶助正气的功效。

目前尚无统一公认的 IBS 动物模型,有中枢兴奋相关的,包括应激刺激、母婴分离等;有外周致敏的,包括机械刺激、化学刺激、食物药物刺激;还有基因敲除模型。对 IBS 认识的重要意义在于它能更好地反映精神心理因素对疾病的影响,体现“生物-心理-社会”医学模式^[10]。国际上以慢性不可预知刺激方法制备 IBS-D 模型较多见,该方法以外界环境的应激刺激造成动物胃肠功能紊乱。笔者基于临床,结合多种刺激方法制备 IBS-D 模型大鼠,改变大鼠饮食习惯以及外界环境,采用高乳糖饲料喂养与束缚应激相结合的方法造模。通过该方法造模后,发现所有大鼠中除对照组大鼠外,余三组大鼠均陆续出现腹泻、稀便甚至黏液便,大鼠精神状态较差,有拱背、毛色发黄、食欲较差等表现。同时,

通过直肠刺激法测定 IBS-D 模型大鼠的内脏敏感性,发现 IBS-D 模型大鼠远高于对照组,说明模型制备成功率较高。对大鼠每日进行体重称取,模型组大鼠体重增长最为缓慢,2w 时间内体重增长仅达到对照组大鼠的一半,而针刺治疗后,针刺组改变明显,体重增长率有所升高,但假针刺组没有明显变化,其趋势和模型组较一致。说明电针足三里能够有效改善 IBS-D 模型体重增长率,这与之前的研究结果相一致^[11,12]。

现有针灸治疗 IBS 机理的相关研究主要从 IBS 可能的发病机制出发研究针刺对内脏敏感性^[13]、肠道微循环^[14]、脑-肠轴相关神经递质^[15]、胃肠激素^[16]的影响以及胃肠动力学异常^[17]和炎症损伤^[18]等方面。但从结肠组织本身研究针刺足三里单穴对 IBS-D 模型炎症损伤的机制研究较少。白介素类细胞因子在炎症过程中起着关键作用,而此炎症通常由协同刺激 T 淋巴细胞以及诱导抗体分泌和急性期蛋白质产生(在清除病原菌时发挥重要作用)等引起^[19]。已证实,肠黏膜屏障的损伤贯穿了整个肠道炎症反应的过程^[20],IBS 病理生理变化系结肠易被激惹而导致的运动功能紊乱,虽然功能障碍的表现呈显著的广泛性,甚至可能涉及整个胃肠道,但结肠本身的运动功能紊乱仍然是 IBS 的一个重要特征。因此,结肠功能的紊乱可作为研究 IBS 的切入点。研究通过对模型大鼠结肠肠道内 IL-1 β 和 IL-6 的测定,电针足三里能够降低 IL-1 β 和 IL-6 的含量,明显低于模型组,说明足三里对减少结肠内炎症损伤具有积极作用。真核细胞核转录因子 NF- κ B 是由可诱导的 3 个亚基组成的复合物,分别为转录因子二聚体(P50 和 P65)和抑制亚基 I- κ B。NF- κ B 可以被脂肪酶、脂多糖或者炎症细胞因子激活^[21]。研究表明:较早释放的炎症介质可通过 I- κ B 的激酶 I- κ K 复合体使 I- κ B 磷酸化,最终导致包括白介素类细胞因子大量释放,而释放出的细胞因子又可进一步活化 NF- κ B 信号转导通路,从而炎症表达随之增加^[22]。因此,可以推测炎症因子的增多与 NF- κ B 信号转导通路均为 IBS-D 产生的重要机制,而且两者之间的相互影响是导致 IBS-D 迁延难愈的重要原因。

研究通过对 IBS-D 模型中 NF- κ B 转导信号转导通路中机体对炎症反应表达的测定,将针刺组与模型组相比,结果显示,针刺组中的 NF- κ B 的核心因子表达水平较模型组明显降低,表明针刺足三里可以抑制 NF- κ B 信号转导通路的核心因子,抑制炎症的发生、发展。电针足三里治疗后,炎症因子 IL-1 β 和 IL-6 的水平降低,NF- κ B 信号转导通路表达也显著降低,可以推断针刺刺激抑制了 NF- κ B 信号转导通路,抑制相

关炎症因子基因的表达,降低炎症反应,从而达到肠道保护作用的目的,这可能是针刺对于 IBS 治疗具有显著疗效重要机制之一。对于这条信号转导通路的抑制,针刺的作用靶点具体在哪里,详细的机制过程如何,以及针刺足三里与其他穴位配合治疗是否会增强疗效等问题还有待今后进行进一步的研究。IBS 是一种复杂的病理过程,其病变涉及多个脏腑,考虑到各组大鼠时间点的一致性,在本实验设计中,针刺干预选择时机为造模的同时给予电针足三里穴治疗,同时也体现了针灸治未病的思想,在疾病形成过程中预先应用针灸方法激发经络之气,增强机体的抗病与应变能力,从而促进健康,减轻随后疾病损害程度。

综上所述可以发现,针刺足三里可以抑制 NF- κ B 信号转导系统的核心因子的表达;NF- κ B、IL-1 β 和 IL-6 水平的降低可能是电针足三里调节 IBS-D 胃肠运动,影响大鼠结肠黏膜层细胞发生变化,从而起到治疗 IBS-D 的作用。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] 曾之恒,汪欢,杨新,等. 肠易激综合征治疗研究进展[J]. 中华内科杂志, 2017, 56(2): 140-143.
- [2] 杨云生,彭丽华. 功能性胃肠病罗马诊断标准与研究现状[J]. 解放军医学院学报, 2013, 34(6): 541-543.
- [3] Yue L, Chen M, Tang TC, et al. Comparative effectiveness of pharmacological treatments for patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: Protocol of a systematic review and network meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(31): e11682.
- [4] Nieto N, Mesa MD, López-Pedrosa JM, et al. Contribution of polyunsaturated fatty acids to intestinal repair in protein-energy malnutrition [J]. *Dig Dis Sci*, 2007, 52(6): 1485-1496.
- [5] Yin CS, Jeong HS, Park HJ, et al. A proposed transpositional acupoint system in a mouse and rat model[J]. *Res Vet Sci*, 2008, 84(2): 159-165.
- [6] 郑苏,胥婧,彭力. 电针足三里对肠易激综合征大鼠胃肠功能及 CGRP、SP、VIP 影响研究[J]. 针灸临床杂志, 2018, 34(3): 66-69.
- [7] 张鸣鸣,姜敏. 肠易激综合征发病机制研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(24): 2484-2490.
- [8] 黄月莲,张燕. 辨证辨病应用“四总穴歌”[J]. 广西中医药, 2013, 36(1): 31-32.

- [9] 焦会元. 古法新解: 会元针灸学[M]. 北京: 泰山堂书庄, 1937: 104.
- [10] 张方,翁志军,吴璐一,等. 病因相关肠易激综合征动物模型研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2018, 26(30): 1772-1777.
- [11] 刘美荣,肖瑞飞,彭芝配,等. 针刺“足三里”“太冲”穴对腹泻型肠易激综合征大鼠胃肠激素的影响[J]. 针刺研究, 2012, 37(5): 363-368.
- [12] 王辉,马海洋,于岩瀑,等. 隔药灸脐法对腹泻型肠易激综合征模型大鼠饮水量、体质量的影响[J]. 山东中医杂志, 2015, 34(9): 696-698.
- [13] Zhao J, Chen L, Zhou C, et al. Comparison of electroacupuncture and moxibustion for relieving visceral hypersensitivity in rats with constipation-predominant irritable bowel syndrome [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 2016: 9410505.
- [14] Zheng H, Li Y, Zhang W, et al. Electroacupuncture for patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome or functional diarrhea: A randomized controlled trial [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(24): e3884.
- [15] 朱文莲,李滢,张露芬,等. 电针足三里和天枢穴对肠易激综合征大鼠脑肠轴不同靶点的效应差异[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(3): 736-738.
- [16] 康美清. 针刺和耳压联合微生态制剂治疗肠易激综合征及患者胃肠激素水平观察[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(12): 2782-2783.
- [17] 石志敏,雷森娜,朱叶珊,等. 天枢、大肠俞子午捣臼法治疗肠易激综合征 20 例[J]. 河北中医, 2010, 32(10): 1527-1528.
- [18] 杜广中. 针灸足三里治疗肠易激综合征模型大鼠的作用机理研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2011.
- [19] Walsh G 著. 王恒樑,谭天伟,苏国富,等译. 蛋白质生物化学与生物技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006, 234-235.
- [20] Xia C, Zhao Y, Jiang L, et al. *Schistosoma japonicum* ova maintains epithelial barrier function during experimental colitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(43): 4810-4816.
- [21] 卢翔,段炜,张力,等. 生长激素对急性坏死性胰腺炎大鼠肠黏膜损害 NF- κ B 表达的影响[J]. 陕西医学杂志, 2013, 42(3): 274-277.
- [22] 李姣. 电针“足三里”、“曲池”穴对高血压前期大鼠 I κ K/NF- κ B 信号通路的实验研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2015.

(收稿: 2017-05-17 在线: 2019-03-06)

责任编辑: 汤静