

针刺不同穴位对大鼠顶核神经元自发放电的影响

梁超¹ 王媛² 徐斌¹ 余芝¹

摘要 目的 通过观察针刺不同部位腧穴对小脑顶核(fastigial nucleus, FN)神经元自发放电的影响,探讨不同部位针刺信号是否传入小脑顶核及相应的效应特征。**方法** 120 只 SD 雄性大鼠,在 20% 乌拉坦麻醉状态下定位右侧小脑顶核(坐标:AP 11.6 mm, RL 1.0 mm, H 5.6 mm),采用细胞外玻璃微电极记录的方法,记录该神经元自发放电作为基线。采用随机顺序依次针刺足三里、曲池、胃俞、中腕穴,与每次针刺前基线比较,观察对小脑顶核神经元放电的影响。**结果** 与同穴位针刺前比较,针刺足三里、曲池、胃俞、中腕穴过程中 FN 神经元放电频率均增高($P < 0.01$, $P < 0.05$)。中腕穴对 FN 放电反应率为 56.00% (28/50),足三里、曲池、胃俞穴反应率分别为 35.00% (21/60)、34.62% (18/52)、36.36% (20/55),中腕穴反应率明显高于其他穴位,差异有统计学意义($F = 2.101$, $P < 0.05$)。**结论** 针刺足三里、曲池、胃俞、中腕穴均可增高小脑顶核神经元自发放电频率,中腕穴对小脑 FN 具有优势调节作用。

关键词 针刺;胃运动;小脑顶核;神经元电活动

Effect of Acupuncture at Different Acupoints on Electric Activities of Rat Cerebellar Fastigial Nucleus LIANG Chao¹, WANG Yuan², XU Bin¹, and YU Zhi¹ 1 Lab of Acupuncture Combined Drugs, Second Clinical College, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing (210046), China; 2 Faculty of Chinese Materia Medica, Shandong Drug and Food Vocational College, Shandong (264210), China

ABSTRACT Objective To explore whether different acupuncture signals were afferent to the cerebellar fastigial nucleus (FN) neuron and to find out their corresponding effect features through observing the effect of spontaneous discharge of cerebellar FN neuron by needling at different acupoints. **Methods** Totally 120 male SD rats were anesthetized by 20% urethane and their right cerebellar FN were positioned (AP 11.6 mm, RL 1.0 mm, H 5.6 mm). Extracellular discharge was recorded by glass microelectrode (AP: -11.6 mm, R: 1.0 mm, H: 5.7 - 7.0 mm), using extracellular microelectrode recording method, recording the spontaneous discharge of cerebellar FN neurons as a baseline. Random order of needling at Zusanli (ST36), Quchi (LI11), Weishu (BL21), and Zhongwan (CV12) were compared with the baseline before each acupuncture. Their effects on the discharge of cerebellar FN neurons were observed and compared with baselines. **Results** The frequency of FN neuronal discharge could be elevated by needling at Zusanli (ST36), Quchi (LI11), Weishu (BL21), and Zhongwan (CV12) ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The response rate of needling at Zhongwan (CV12, 56.00%) was higher than that of needling at Zusanli (ST36), Quchi (LI11), and Weishu (BL21) (35.00%, 34.62%, 36.63%, respectively) with statistical difference ($P < 0.05$). The response rate of needling at Zhongwan (CV12) was obviously higher than that of needling at other points ($F = 2.101$, $P < 0.05$). **Conclusions** Needling at Zusanli (ST36), Quchi (LI11), Weishu (BL21), and Zhongwan (CV12) could elevate the spontaneous discharge frequency of cerebellar FN neurons. Needling at Zhongwan (CV12) had advantageous roles in regulating cerebellar FN.

KEYWORDS acupuncture; gastric motility; cerebellar fastigial nucleus; electric activity of neurons

基金项目:国家重点基础研究发展计划(“973”)资助项目(No. 2011CB505206);国家自然科学基金资助项目(No. 81202744);国家自然科学基金资助项目(No. 8133749);江苏省高校自然科学研究面上项目(No. 11KJB360008);江苏省特色优势学科资助项目;江苏省高校青蓝工程优秀科技创新团队资助项目

作者单位:1.南京中医药大学第二临床医学院针药结合实验室(南京 210046);2.山东药品食品职业学院中药系(山东 威海 264210)

通讯作者:余芝, Tel: 025-86798095, E-mail: mickey28282@sina.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.04.0476

针灸是治疗疾病的常用方法之一,是一种“内病外治”的方式,通过经络及腧穴的传导作用,以及一定的操作手法,调节机体整体平衡来治疗相关疾病。《灵枢·逆顺》言:“上工刺其未生者也”^[1],说明了针灸在中医治疗中的地位。针灸的疗效虽然显著,但相关效应规律及其确切机制尚无定论。近些年,有动物实验研究和临床报道表明,针刺可通过影响外周、中枢神经及内分泌系统从而调节机体^[2],然而针刺对小脑相关影响及作用规律的研究甚少。传统上认为,小脑作为皮质下运动调节中枢,参与躯体的感觉—运动整合,然而近些年研究证明,小脑还参与调节内脏活动的非躯体功能^[3-5]。小脑顶核(fastigial nucleus, FN) 是小脑—下丘脑投射的起源核团之一,相关研究发现电刺激小脑 FN 可启动预防性及治疗性中枢神经源性神经保护机制,如增加局部脑血流,抑制炎症反应,减轻脑水肿,保护神经组织结构,改善神经传导,促进神经功能恢复等^[6,7]。针刺的调节信号通过小脑^[8,9],小脑可能参与针刺调节效应的中枢通路。因此本文通过观察针刺对小脑 FN 神经元自发放电影响,研究不同部位腧穴刺激信号对传入小脑 FN 产生的影响,为针刺调节机制研究提供新的方向。

材料与方法

1 动物 120 只成年健康 SD 雄性大鼠, SPF 级,体重 250~300 g。南京医科大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(苏)2013-0005,分批饲养于南京中医药大学实验动物中心。室温(22 ± 2) °C,光照时间 08:00—20:00。

2 主要试剂及仪器 乌拉坦(化学纯,上海沪试,批号:30191228); 滂胺天蓝(Sigma, 美国,批号:24410); 无水乙酸钠(0.5 mol/L, 分析纯,南京化学试剂有限公司,批号:070860271); 针灸针(0.30 mm × 25 mm, 苏州东邦医疗器械有限公司,批号:SD13A0505)微电极操作器控制(NARISHIGE, 日本,型号:PC-5N07017); 脑立体定位仪(David Kopf Instruments, 美国,型号:107021L); 细胞外电生理记录放大器(A-M systems, 美国,型号:L-FDQ-1); Micro3-1401 生理信号采集分析系统(CED, 英国,型号:M4097); 数显直流稳压电源(DC Power Supply, 温州市宏州贸易有限公司,型号:DF1730SL2A)。

3 方法

3.1 小脑定位 FN 20% 乌拉坦(7 mL/kg)腹腔注射麻醉后,将大鼠至于脑立体定位仪上,并用电热板维持其体温于 37 °C 左右,呈俯卧位,双耳用耳棒固定,上齿钩挂在鼠头夹中,口鼻部用鼠头夹夹紧。于颅

正中线纵向切开皮肤,分离切除皮下组织,去除骨膜暴露出前后肉,将前后囟调至同一水平面。按照 Paxinos G 和 Watson C 图谱^[10],定位大鼠小脑右侧 FN(坐标:AP 11.64 mm, RL 1.0 mm, H 5.6 mm)。

3.2 取穴和刺激方法 参考《实验针灸学》^[11]进行腧穴定位,均取左侧。足三里(后三里):膝关节后外侧,在腓骨小头下约 5 mm 处;曲池:桡骨近端的关节外侧前方的凹陷中;胃俞:第 13 胸椎下两旁肋间;中脘:脐上约 20 mm 处。手针刺激,平补平泻,120~180 次/min 捻转,每穴刺激 1 min,待神经元放电背景恢复正常后,再进行下 1 个穴位。

3.3 神经元放电记录 采用玻璃微电极(尖端 0.5~2 μm),内充溶有 1% 滂胺天蓝的 0.5 mol/L 醋酸钠电解液(阻抗:10~20 mΩ),通过微电极操作器控制到达目标核团,探查神经元放电,进行细胞外记录^[12,13]。当神经元自发放电信号出现时,上下调节推进器位置至信噪比较大(放电幅度稳定在同一水平且信噪比 > 1/3),停止推进,电极尖端停留在放电神经元处,待其放电稳定后开始记录。

3.4 样本数据记录 神经元自发放电出现后,待神经元放电稳定,首先记录正常放电 1 min 作为基线对照,然后针刺穴位观察对 FN 神经元电活动的影响,干预完成后待神经元自发放电稳定恢复至正常,重新记录基线进行下 1 次干预,每次针刺干预,足三里、曲池、胃俞及中脘穴采用随机顺序依次进行。当完整记录一个循环(基线—针刺—恢复)保存为该穴位组的样本数据。

3.5 组织学定位 每次实验完成后,对于记录到神经元数据的大鼠,采用数显直流稳压电源刺激器向微电极通以逆向直流电(10 μA, 20 min)将玻璃微电极中的滂胺天蓝微量电泳至电极尖端的记录点,随后取脑,固定于 4% 多聚甲醛,1 周后用冰冻切片机制备 40~60 μm 厚的脑切片,检查记录点位置。

3.6 样本数据筛选标准 对于未记录到神经元稳定放电的大鼠,重新定位 FN 后重复上述操作,2~3 次仍未记录到,该数据不予保存。记录过程中,任意一组出现放电异常,如放电消失,等待放电再次出现或上下调整推进器位置至放电稳定后重新记录循环,若重复后仍未完整记录一个循环,待再次恢复后进行下组干预。对于记录到神经元大鼠,组织学定位检测,偏离目标核团者,剔除相关数据。完整记录一个循环数据,作为最终统计分析数据。

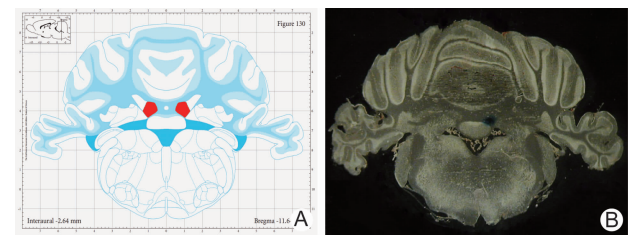
3.7 数据采集与分析 记录小脑顶核神经元放电信号,并经前置放大器放大,输入生理信号采集系统进行数据采集,使用 Spike 2 软件进行数据记录及分

析,通过比较针刺神经元放电频率与针刺前神经元自发基础放电频率,计算放电频率变化。计算方法:放电频率(%)=(针刺时-针刺前)/针刺前×100%。频率变化率的绝对值≥15%视为兴奋/抑制,<15%为无变化。

3.8 统计学方法 数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,针刺前后比较采用配对 *t* 检验,等级资料采用 *Ridit* 分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 神经元数据的统计(图 1) 通过上述实验方法排除多次定位未记录到神经元放电的数据,对于完整记录一个循环(基线—针刺—恢复)数据的相应大鼠进行核团定位,根据脑冠状切面图(Bregma-11.64 mm)标识的 FN 位点即红色区域(图 1 A),观察脑组织切片蓝染点是否偏离核团位置(图 1 B),此相关数据进行最终统计分析。结果表明,足三里穴共记录到 60 个神经元放电,曲池穴共记录到 52 个神经元放电,胃俞穴记录到 55 个神经元放电,中脘穴共记录到 50 个神经元放电。



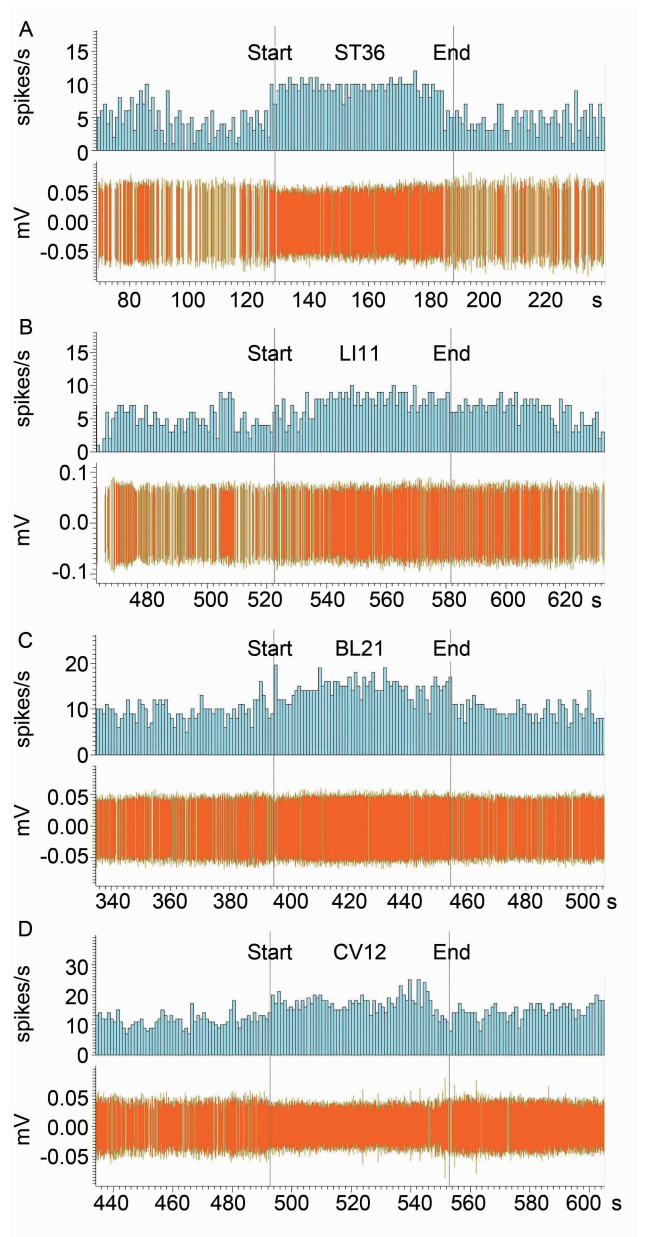
注:A 为组织重建图示冠状切面 FN 所在位置(Bregma-11.64 mm),图中红色区域;B 为脑组织切片图(Bregma-11.6 mm),蓝染处为 FN 记录点

图 1 大鼠脑组织定位示意图

2 针刺不同穴位对 FN 神经元放电频率的影响(表 1,图 2) 与同穴位针刺前比较,针刺足三里、曲池、胃俞及中脘穴过程中 FN 神经元放电频率均增高,差异有统计学意义(*P* < 0.01, *P* < 0.05)。不同的针刺信号传入神经元并对神经元产生兴奋效应。

表 1 针刺不同穴位大鼠 FN 神经元放电频率比较 ($\bar{x} \pm s$)			
穴位	<i>n</i>	时间	FN 放电频率 (spike/s)
足三里	60	针刺前	32.519 5 ± 15.039 5
		针刺中	34.990 1 ± 15.607 6 **
曲池	52	针刺前	31.592 4 ± 14.374 1
		针刺中	34.840 5 ± 15.009 7 *
胃俞	55	针刺前	30.862 3 ± 15.331 3
		针刺中	32.456 3 ± 15.531 2 *
中脘	50	针刺前	29.077 8 ± 14.131 1
		针刺中	31.951 5 ± 15.948 2 *

注:与同穴位针刺前比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01



注:A 为针刺足三里穴;B 为针刺曲池穴;C 为针刺胃俞穴;D 为针刺中脘穴

图 2 针刺不同穴位对大鼠 FN 神经元放电的影响

3 针刺不同穴位时 FN 放电反应率比较(表 2) 中脘穴反应率高于足三里穴、曲池穴及胃俞穴反应率,差异有统计学意义(*F* = 2.101, *P* < 0.05)。

表 2 针刺不同穴位对大鼠 FN 放电反应率比较					
穴位	<i>n</i>	兴奋效应 (<i>n</i>)	抑制效应 (<i>n</i>)	无效应 (<i>n</i>)	反应率 (%)
足三里	60	19	2	39	35.00 *
曲池	52	18	0	34	34.62 *
胃俞	55	18	2	35	36.36 *
中脘	50	25	3	22	56.00

注:与中脘穴比较,**P* < 0.05

讨 论

脑的各级中枢和脊髓接受内外环境信息的传入,整合后经自主神经系统、内分泌系统、免疫系统等将信息作用于相应效应器。但针刺信号在脑中传递的神经通路、确切的中枢机制研究并未完全清晰。以往对小脑的认识,局限于皮质下运动中枢,然而最新的神经解剖学、神经生理学、脑功能成像等研究成果拓展了我们对小脑功能的认识。小脑不仅具有经典的躯体性运动调节功能,在机体的某些高级神经活动及躯体—内脏功能的调制上发挥重要作用^[14]。

已有影像学证据表明,针刺能够激活小脑脑区的不同部位^[15],本实验通过定位观察 FN 神经元自发放电频率,比较针刺位于躯体不同部位的 4 个穴位足三里(下肢)、曲池(上肢)、胃俞(背部)及中脘穴(腹部)对 FN 神经元放电频率的影响,目的在于探析针刺信号是否传入小脑 FN、不同部位穴位之间产生的效应是否存在差异。结果表明,足三里、曲池、胃俞及中脘穴均能增高神经元放电频率($P < 0.01$, $P < 0.05$),说明针刺时产生的信号,可以传入小脑 FN,小脑 FN 可能是针刺调节效应的中枢机制之一。临床研究表明,针刺特定穴可治疗小脑共济失调(肿瘤所致除外)、小脑萎缩和小脑脑干梗死所致眩晕等,疗效显著^[16-18],但相应机制缺乏深入研究,这一实验结果为临床针灸治疗小脑相关疾病提供实验基础。

通过进一步分析对 FN 放电频率的影响,结果表明针刺中脘对 FN 自发放电的影响优于足三里、曲池及胃俞穴($P < 0.05$),提示中脘穴对 FN 有更特异性的调节作用。中脘穴,属任脉,胃之募穴,八会穴之腑会,临床上胃肠相关疾病,如呃逆、呕吐、胃溃疡等^[19-21],针刺中脘穴具有明显的优势性调节。FN 是小脑中影响胃肠活动的主要结构^[22],可以通过调节交感和迷走神经的电活动增强或抑制胃及十二指肠的运动,是小脑一下丘脑投射的起源核团之一。有学者发现 FN 神经元的轴突经小脑上脚和小脑上脚交叉直接投射到下丘脑^[23],下丘脑广泛参与胃的各种功能的调节,包括胃的运动、胃酸分泌、胃黏膜血流量等^[24]。而下丘脑又有相应的直接纤维投射到小脑 FN,因此这一环路很可能是小脑调控胃肠功能神经基础之一。此外,电、化学刺激 FN 对胃黏膜应激性损伤及胃缺血再灌注损伤模型大鼠具有明显保护作用,提示小脑 FN 可能是对内脏损伤起调控作用的中枢部位^[25,26],参与了调节内脏活动的神经通路。中脘穴可以有效调节胃肠活动,而针刺中脘时产生的信号,能够特异性激活小

脑 FN,提示小脑可能针刺调节胃肠活动的中枢机制之一。

结合上述研究表明,针刺不同部位腧穴产生的信号传入小脑 FN,小脑 FN 可能参与针刺调节效应的中枢通路,为临床针刺治疗小脑相关疾病提供一定科学理论基础,具体的神经通路有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] 田代华主编. 灵枢经 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 111.
- [2] 颜纯钊, 林亚平, 彭艳, 等. 针刺对胃运动的影响与中枢神经核团关系的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(1): 128-130.
- [3] Bostan AC, Dum RP, Strick PL. The basal ganglia communicate with the cerebellum [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(18): 8452-8456.
- [4] Ulug AM, Vo A, Argyelan M, et al. Cerebello-thalamocortical pathway abnormalities in torsin ADYT1 knock-in mice [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 108(16): 6638-6643.
- [5] Strick PL, Dum RP, Fiez JA. Cerebellum and non-motor function [J]. Annu Rev Neurosci, 2009, (32): 413-434.
- [6] Golanov EV, Zhou P. Neurogenic neuroprotection [J]. Cell Mol Neurobiol, 2003, 23(4-5): 651-663.
- [7] 董为伟. 电刺激小脑顶核与中枢神经源性神经保护 [J]. 中国工程科学, 2001, 3(11): 32-38.
- [8] 刘恩涛, 王淑侠, 赖新生, 等. 针刺外关穴和假穴小脑激活的 PET 脑功能成像研究 [J]. 广东医学, 2012, 33(8): 1181-1183.
- [9] 刘华, 单保慈, 高殿帅, 等. 针刺太冲、合谷两穴位引起的小脑响应的差异: fMRI 研究 [J]. 中国医学影像技术, 2006, 22(8): 1165-1167.
- [10] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates [M]. 4th ed. San Diego: Academic Press, 1998: 60-69.
- [11] 李忠仁主编. 实验针灸学 [M]. 第 2 版. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 255-256.
- [12] 任晓暄, 朱兵, 高昕妍, 等. 针刺不同穴位对雌性大鼠下丘脑 GnRH 相关神经元活动的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(3): 192-193.
- [13] 王述菊, 孙国杰, 吴绪平, 等. 孤束核在针刺“内关”调节胃运动中的作用研究 [J]. 针灸临床杂志, 2010, 26(1): 48-49.
- [14] 朱景宁, 张月萍, 王建军. 小脑参与内脏活动调节的研究进展 [J]. 中国神经科学杂志, 2003, 19(4): 268-272.

- [15] 王葳, 李坤成, 单保慈, 等. 针刺正常老年人四关穴的脑功能 MRI 研究[J]. 中国医学影像技术, 2006, 22(6): 82.
- [16] 陈维渝. 针刺治疗小脑共济失调[J]. 中国针灸, 2000, (1): 46-47.
- [17] 庞勇. 针刺治验小脑萎缩一例[J]. 广西中医药, 1993, 16(3): 24-25.
- [18] 王元. 针刺治疗小脑脑干梗死所致眩晕疗效观察[J]. 新中医, 2013, 45(4): 116-117.
- [19] 位娜娜, 刘锦. 中脘穴温针灸为主治疗呃逆 18 例[J]. 中国中医药科技, 2013, 7(4): 342-343.
- [20] 董莉莉, 刘安国, 王军燕, 等. 合募配穴对应激性胃溃疡大鼠下丘脑促性腺激素释放激素和物质 mRNA 表达的影响[J]. 针刺研究, 2013, 8(4): 291-295.
- [21] 董明, 郭欣欣, 吴焕淦, 等. 合募配穴的理论依据及在脾胃病中的应用[J]. 河南中医, 2014, 34(1): 139-141.
- [22] 张润峰, 陈运贞, 罗再贵, 等. 电刺激小脑顶核的基础研究与临床应用现状[J]. 中国临床康复, 2005, 9(13): 140-143.
- [23] 吴亚芳, 毛伟峰, 邱一华, 等. 小脑顶核-下丘脑神经纤维投射的形态学观察[J]. 南通大学学报, 2008, 28(5): 321-323.
- [24] 周秀萍, 张建福, 阎长栋, 等. 下丘脑外侧区对大鼠胃缺血-再灌注损伤调控的神经机制[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(5): 632-635.
- [25] Zhu JZ, Fei SJ, Zhang JF, et al. Lateral hypothalamic area mediated the aggravated effect of microinjection of Baclofen into cerebellar fastigial nucleus on stress gastric mucosal damage in rats[J]. Neurosci Lett, 2012, 509(2): 125-129.
- [26] 蒋信伟, 杜东书, 张建福, 等. 电刺激小脑顶核对大鼠胃缺血-再灌注损伤的神经调控[J]. 生理学报, 2009, 61(5): 451-457.

(收稿:2013-06-27 修回:2014-08-28)

· 征订启事 ·

欢迎订阅 2015 年《中国中西医结合杂志》

《中国中西医结合杂志》是由中国科学技术协会主管、中国中西医结合学会和中国中医科学院主办的中西医结合综合性学术期刊。1981 年创刊,由中国科学院院士陈可冀担任总编辑。设有述评、专家论坛、专题笔谈、临床论著、基础研究、临床报道、综述、学术探讨、思路与方法学、临床试验方法学、病例报告、中医英译、会议纪要等栏目。本刊多次获国家科委、中宣部、新闻出版署及国家中医药管理局颁发的全国优秀期刊奖;2001 年被新闻出版署评为“双效期刊”,列入中国期刊方阵;2003—2012 年连续 10 年被评为“百种中国杰出学术期刊”;3 次获中国科协择优支持基础性和高科技学术期刊专项资助;4 次获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”资助;4 次获“中国科协精品科技期刊工程项目期刊”。并被多种国内外知名检索系统收录,如:中国科学引文数据库、中国生物医学文献数据库、美国医学索引(MEDLINE)、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、日本《科学技术文献速报》(JST)、美国《乌利希期刊指南》(Ulrich's PD)、波兰《哥白尼索引》(IC)、英国《国际农业与生物科学研究中心》(CABI)、WHO 西太平洋地区医学索引(WPRIM)等;为中国科技论文统计源期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,被编入《中文核心期刊要目总览》,每年影响因子及总被引频次在中医药类期刊中均名列前茅。

《中国中西医结合杂志》为大 16 开本,月刊,128 页;铜版纸印刷,彩色插图。国内定价:25.00 元/期。全年定价:300.00 元。国际标准刊号:ISSN 1003-5370,国内统一刊号:CN 11-2787/R,国内邮发代号:2-52,国外代号:M640。国内外公开发售,在各地邮局均可订阅,也可直接汇款至本社邮购。

地址:北京市海淀区西苑操场 1 号,中国中西医结合杂志社,邮政编码:100091;电话:010-62886827, 62876547, 62876548;传真:010-62874291;E-mail: cjim@cjim.cn; 网址: http://www.cjim.cn。