

电针大肠俞募穴对功能性便秘小鼠结肠组织 GDNF 表达的影响

张微, 李瑛*, 刘丽莎, 罗芳丽, 郑倩华

(成都中医药大学针灸推拿学院, 四川 成都 610072)

摘要:目的 探讨电针大肠俞募穴治疗功能性便秘的作用机制。方法 32 只小鼠随机分为对照组、模型组、针刺组和 EGC 抑制组。采用复方地芬诺酯灌胃造模法, 电针刺激天枢、大肠俞, 每次 30 min, 共治疗 5 次。运用光镜、电镜、免疫组化及原位杂交技术, 观察电针治疗前后结肠组织上皮细胞形态学改变, 结肠组织中 GDNF 蛋白及 mRNA 表达水平。结果 与对照组比较, 模型组结肠组织 GDNF 蛋白及 mRNA 表达水平显著降低($P < 0.01$)。电针刺激大肠俞募穴可提高结肠中 GDNF 蛋白及其 mRNA 的表达水平($P < 0.05$), 光镜和电镜发现针刺可修复受损上皮细胞, 进而改善肠道传输功能。EGC 抑制组结肠中 GDNF 蛋白表达与模型组比较无显著性差异($P > 0.05$), 与针刺组比较显著降低($P < 0.05$), GDNF mRNA 的表达水平高于模型组($P < 0.05$), 低于针刺组, 但差异无统计学意义($P > 0.05$)。光镜和电镜下 EGC 抑制组结肠组织形态改变较为严重。结论 电针刺激大肠俞募穴可提高 EGC 细胞中 GDNF 蛋白及其 mRNA 的表达水平, 修复受损结肠上皮细胞, 进而改善肠道传输功能。

关键词:电针; 俞募穴; 功能性便秘; GDNF

中图分类号: R245.9⁺7

文献标志码: A

文章编号: 1672-0482(2015)05-0475-05

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2015.0475

Effects of Electroacupuncture at Back-shu and Front-mu Points on Expression of GDNF in Colon Tissue of Functional Constipation Mice

ZHANG Wei, LI Ying*, LIU Li-sha, LUO Fang-li, ZHENG Qian-hua

(College of Acumox and Tuina, Chengdu University of Chinese Medicine, Chengdu, 610072, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the mechanism of electroacupuncture at Back-shu and Front-mu points for functional constipation treatment. **METHODS** 32 mice were randomly divided into control group, model group, electroacupuncture (EA) group and EGC group. Compound diphenoxylate were gavaged for modeling, and electroacupuncture Tianshu and Dachangshu points, 30 min each time for a total of 5 times treatment. By light microscopy, electron microscopy, immunohistochemistry and *in situ* hybridization, the morphology of colonic epithelial structure were observed, and the level of GDNF protein and mRNA expression in colon were detected. **RESULTS** The expression of GDNF protein and mRNA in model group was significantly decreased ($P < 0.01$). Electroacupuncture at back-Shu and front-Mu points improved the expression of GDNF protein and mRNA ($P < 0.05$), and light microscope and electron microscope showed that acupuncture repaired damaged epithelial cells, and then improved the intestinal transmission function. The expression of GDNF protein in EGC group showed no significant difference with the model group ($P > 0.05$), but significantly decreased, compared with EA group ($P < 0.05$). GDNF mRNA was significantly higher than model group ($P < 0.05$), but lower than EA group with no significant difference ($P > 0.05$). The morphology change of colon tissue is more serious. **CONCLUSION** Electroacupuncture at back-Shu and front-Mu points can improve the expression of GDNF protein and mRNA in EGC cells, repair the colonic epithelial cells, and then improve the intestinal transmission function.

KEY WORDS: electroacupuncture; Back-shu and Front-mu points; functional constipation; GDNF

功能性便秘是临床最常见的消化系统疾病之一。它发病率高, 严重影响患者生活质量, 药物治疗效果不理想, 是目前胃肠病研究的热点^[1-2]。功能性便秘是针灸治疗的优势病种, 大量文献和现代临床

试验表明, 针灸治疗功能性便秘疗效确切^[3]; 其中经典的俞募配穴法, 是针灸治疗该病最常用、最具特色的方法^[4]。目前该治疗方法的作用机制研究很少, 其作用途径尚不明确, 在一定程度上影响了俞募配

收稿日期: 2015-01-06; 修稿日期: 2015-05-22

基金项目: 国家自然科学基金(81273853); 四川省应用基础项目(2012jy0039)

作者简介: 张微(1985-), 女, 河北石家庄人, 成都中医药大学 2013 级博士研究生, 实验师。* 通信作者: yingli0213@sina.com

穴法的临床应用。

最新的研究显示,肠神经胶质细胞(Enteric glial cell,EGC)对维护肠神经系统的完整性,调节肠道内环境稳定有着重要作用。EGC 分泌的胶质细胞源性神经营养因子(Glial cell line-derived neurotrophic factor,GDNF)是促进神经元生长、分化和修复最有潜力的营养因子^[5]。本研究以功能性便秘小鼠模型为研究载体,从影响胃肠动力的重要因素 GDNF 入手,探讨大肠俞募配穴治疗功能性便秘的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

SPF 级昆明小鼠 32 只,体质量(30 ± 5)g,购于成都达硕实验动物技术有限公司,动物生产许可证号:scxk(川)2013-24。适应性喂养 3 d 后开始实验。按照性别、体质量用随机数字表法将小鼠分为对照组、模型组、针刺组和 EGC 抑制组,每组 8 只。

1.2 主要仪器和试剂

1.2.1 主要仪器 2015 型转轮式切片机(德国 Leica 仪器有限公司);TSJ-II 型全自动封闭式组织脱水机(常州市中威电子仪器有限公司);PHY-III 型病理组织漂烘仪(常州市中威医疗仪器有限公司);BA200 Digital 数码三目摄像显微摄像系统(麦克奥迪实业集团有限公司);Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统(美国 Media Cybernetics 公司)。

1.2.2 主要试剂 复方地芬诺脂片(批号:20130708,规格:2.5 mg/片,100 片/瓶,江苏常州制药厂),TUNEL 试剂盒(批号:14590300,瑞士罗氏公司),胶质细胞源性神经营养因子抗体(批号:bs-1024R,北京博奥森生物技术有限公司);多聚甲醛(批号:20130813,规格:500 g/瓶,天津市进丰化工有限公司);氟代柠檬酸(批号:F-9634,美国 Sigma 公司),氢氧化钠(批号:20130705,天津市滨海科迪化学试剂有限公司);PBS 磷酸盐缓冲液(批号:ZLI-9062,北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.3 动物造模

1.3.1 模型制备 针刺组、模型组、EGC 抑制组小鼠均使用复方地芬诺酯混悬液以 10 mg/(kg·d)的剂量进行灌胃,灌胃容量为 0.1 mL/10 g;对照组小鼠给予 0.9%生理盐水以相同剂量进行灌胃。持续 14 d^[6]。

1.3.2 模型成功的判定标准 造模结束后动物禁食 12 h,小鼠按照 0.1 mL/10 g 灌入浓度为 100 g/L

的活性炭悬液。从活性炭灌胃完毕开始计时,记录从灌胃到首粒黑便排出时间、6 h 内大便粒数和质量,以与对照组小鼠数据差异有统计学意义($P < 0.05$)为判定模型成功的标准^[7]。

1.4 针刺方法

1.4.1 穴位选择与定位 选用大肠俞募配穴的两个腧穴:大肠俞和天枢,小鼠穴位定位及针刺深度均参照中国针灸学会实验针灸分会制定的《动物针灸穴位图谱》。天枢穴:相当于小鼠脐中(腹部正中)旁开 5 mm;大肠俞:在腰部,当第 4 腰椎棘突下,旁开 5 mm。

1.4.2 针具及电针仪选择 针具选用汉医牌针灸针(天津华鸿医材有限公司生产),0.30 mm×25 mm;电针仪选用 SDZ-II 型华佗牌电针治疗仪(苏州医疗用品有限公司生产)。

1.4.3 处理方法 针刺组、EGC 抑制组小鼠用特制固定板固定后,交替针刺同侧天枢和大肠俞,进针 5 mm 左右,捻转有紧滞感后针柄接电针治疗仪。刺激参数:疏密波(疏波 4 Hz,密波 50 Hz),以小鼠肢体末端轻微抖动为宜。留针 30 min,每日 1 次^[8],连续 5 d。对照组、模型组同法固定,但不接受任何治疗。

1.5 EGC 抑制剂选用及方法

EGC 抑制组小鼠在针刺前采用胶原细胞抑制剂氟代柠檬酸进行腹膜下注射。配制方法:称取 4 mg 氟代柠檬酸钡盐溶于 0.5 mL 盐酸(1 mol),加 1~1.5 滴 Na_2SO_4 (0.1 mol)和 1 mL 磷酸缓冲液(0.1 mol),以 12 000 r/min 离心 5 min,取上清加生理盐水至 4.8 mL,即为 1 nmol/ μL 。20 $\mu\text{mol/kg}$ 进行腹膜内注射,每日 2 次(早上 9 点和下午 6 点),连续 7 d^[9]。

1.6 观察指标

1.6.1 小鼠排便情况 5 d 后各组小鼠采用活性炭混悬液灌胃,小鼠称质量后按照 0.1 mL/10 g 的剂量进行灌胃,记录从灌胃到首粒黑便排出时间、6 h 内大便粒数和质量。

1.6.2 结肠上皮细胞形态学 运用光镜、电镜观察结肠上皮细胞的崩解、增生、迁移及其细胞内线粒体、内质网等变化情况。

1.6.3 GDNF mRNA 及蛋白表达 用动物处死后所取样本,采用原位杂交结合计算机图像分析、免疫组化等技术方法,检测 GDNF mRNA 及蛋白表达。

1.7 检测方法

1.7.1 结肠组织病理观察 取已预固定的结肠标本,经梯度酒精脱水、石蜡包埋、连续切片(厚度为 6 μm)后,行 HE 染色,光镜下重点观察结肠肌间和黏膜下神经丛。每张切片先于 100 倍下观察全部组织,再根据组织大小及表达情况分别选取 3~5 个区域 400 倍采集图像。

1.7.2 结肠组织电镜观察 取预固定结肠组织,1%四氧化锇再固定,丙酮逐级脱水,Epon812 包埋,半薄切片光学定位,超薄切片,醋酸铀及枸橼酸铅双重染色,日立 H-600IV 型透射电镜观察。

1.7.3 免疫组化 载玻片防脱片处理后切片常规脱蜡至水,热修复抗原,滴加稀释的一抗(1:200),4℃过夜,PBS 洗 3 次,酶标记链霉素卵蛋白试剂 30 min(37℃),PBS 洗 4 次,DAB 显色,苏木素轻度复染,脱水,透明,中性树胶封片。

1.7.4 原位杂交 GDNF 寡核苷酸探针序列:5'-CAAGATGGCGGAGGCAGAGGCAGAAGAA-3'; 5'-CGCCGCCAATATGCCTGAAGATTATCCTGAC-3'; 5'-GGCATGGCAGACATCAATCACACCGTATCC-3'。

载玻片防脱片处理后滴加打孔液,室温静置 10

min,滴加预杂交工作液覆盖组织,37℃湿盒内孵育 1.5 h;揭去盖玻片以 0.2 Xssc 室温洗 3 次,每次洗涤 5 min;滴加杂交工作液覆盖组织,37℃湿盒孵育 4 h;以 2 Xssc 37℃洗 3 次,每次洗涤 5 min,0.2 Xssc 37℃洗 3 次,每次洗涤 5 min,PBS 冲洗 3 次,每次洗涤 5 min;滴加高敏过氧化物酶链亲和素复合物工作液,覆盖组织 37℃湿盒孵育 45 min;PBS 冲洗 3 次,每次洗涤 5 min;滴加适量 DAB 显色液,显色后蒸馏水洗涤,终止反应;苏木精复染,脱水、透明,中性树胶封片。

1.8 数据分析

计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS17.0 统计软件包进行数据分析处理。各组数据经过正态检验和方差齐性分析后,组间比较用单因素方差分析,方差齐选用 LSD,方差不齐选用 Tamhane's T2 检验。

2 结果

2.1 小鼠排便情况

5 d 后,每只小鼠单笼饲养禁食不禁水 12 h,称质量后进行活性炭混悬液灌胃,记录每只小鼠首粒黑便排出时间、6 h 大便粒数和质量,结果见表 1。

表 1 各组小鼠排便情况($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	首粒黑便排出时间/min	6 h 大便粒数	6 h 大便质量/mg
对照组	152.75±12.56	11.50±1.60	233.25±22.26
模型组	313.88±14.59**	7.75±1.83**	175.25±40.99**
针刺组	208.50±24.26##	9.87±1.55#	227.00±23.29##
EGC 抑制组	267.38±56.28△△	9.28±2.25	200.38±12.51

注:与对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与针刺组比较,△△ $P<0.01$ 。

2.2 HE 病理学观察

对照组可见结肠黏膜平滑,核染色清晰,平滑肌完整,神经节排列整齐,肌间神经节呈椭圆型,每个神经节内所有细胞数量从数个到数十个不等,所有细胞排列疏密较均匀。神经节之间均匀排列,神经节内可见神经轴突及树突的横切面与纵切面。模型组黏膜下神经元的轴索发生空泡变性,神经微丝和神经微管数量减少,排列紊乱。针刺组病理变化相

对模型组较轻,组织形态学与对照组比较无显著性改变,肌间神经丛大部分神经节无明显变化,仔细寻找并观察肌间神经丛和黏膜下神经丛,其数量较多,且分布有一定规律。EGC 抑制组除与模型组出现相似病理变化以外,还可见到部分神经节排列间隔出现不一致,节内细胞排列紧密或者固缩,炎症细胞浸润,杯状细胞减少等。见图 1。

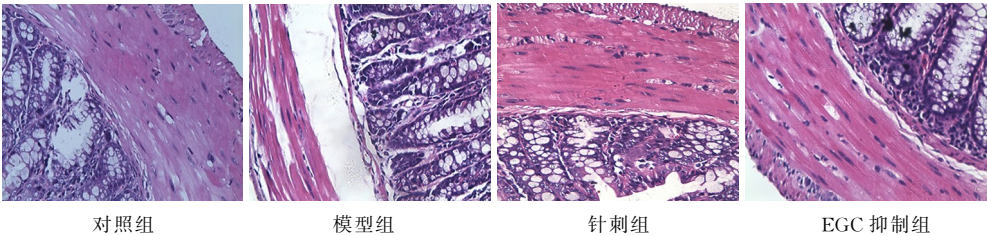
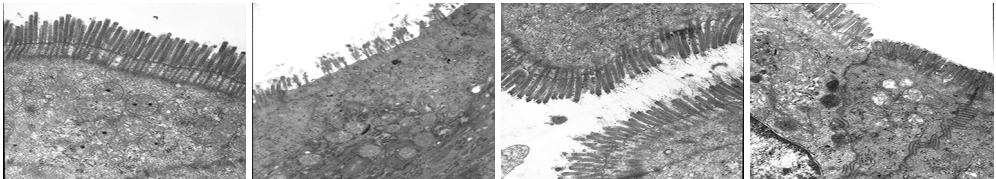


图 1 各组小鼠结肠组织病理观察(HE,×400)

2.3 电镜形态学观察

对照组结肠上皮细胞表面微绒毛排列整齐,上皮细胞核染色质分布均匀,核膜清晰,细胞质内线粒体,粗面内质网,核糖体等细胞器结构清晰;模型组结肠上皮细胞表面微绒毛排列紊乱稀疏,上皮细胞核染色质聚集,部分核固缩,细胞质内线粒体肿胀,

粗面内质网扩张;针刺组结肠上皮细胞表面微绒毛排列整齐,细胞核染色质分布均匀,细胞质内线粒体、粗面内质网、核糖体结构清晰;EGC 抑制组结肠上皮细胞表面微绒毛排列较好,个别微绒毛排列稀疏,细胞核染色质分布均匀,细胞质内线粒体轻度肿胀。见图 2。



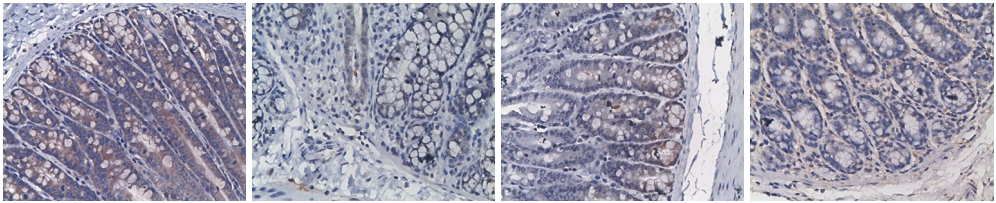
对照组(EA,×15 000) 模型组(EA,×10 000) 针刺组(EA,×15 000) EGC 抑制组(EA,×12 000)

图 2 各组小鼠结肠组织电镜观察

2.4 各组小鼠结肠组织中 GDNF 表达比较

见图 3、表 2。与对照组比较,模型组小鼠结肠组织中的 GDNF 蛋白含量显著降低,差异具有统计

学意义($P<0.01$);与模型组比较,针刺组小鼠结肠组织中 GDNF 含量显著升高($P<0.05$),EGC 抑制组 GDNF 含量无显著性变化($P>0.05$)。



对照组 模型组 针刺组 EGC 抑制组

图 3 各组小鼠结肠组织 GDNF 表达(×400)

表 2 针刺对小鼠结肠组织 GDNF、GDNF mRNA 平均光密度的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	GDNF	GDNF mRNA
对照组	0.072 2±0.012 2	0.191 0±0.008 9
模型组	0.042 3±0.012 4**	0.174 0±0.006 9**
针刺组	0.070 0±0.016 6#	0.184 4±0.008 5#
EGC 抑制组	0.045 6±0.014 9	0.184 2±0.008 7#

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

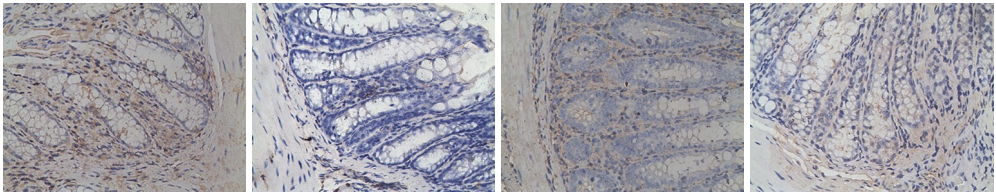
2.5 各组小鼠结肠组织中 GDNF mRNA 表达比较

见图 4、表 2。与对照组比较,模型组小鼠结肠组织 GDNF mRNA 含量显著降低($P<0.01$);与模型组比较,针刺组、EGC 抑制组小鼠结肠组织 GD-

NF mRNA 含量升高,具有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

俞穴、募穴均属特定穴,是脏腑之气输注和汇聚的部位,临床上主要用于治疗相关脏腑的病变。祖国医学认为便秘属大肠传导失司、虚实夹杂之证。大肠俞募穴相配,即天枢(大肠募穴)和大肠俞(大肠背俞穴)合用能疏泄阳明腑气,腑气通调,功能复常,便秘自愈。有研究表明^[4],临床使用频次最高的穴位为天枢、足三里和大肠俞,使用最多的配穴方法为俞募配穴。



对照组 模型组 针刺组 EGC 抑制组

图 4 各组小鼠结肠组织 GDNF mRNA 表达(×400)

EGC 是胃肠道感觉神经和交感神经的卫星细胞,在肠神经系统中含量最多、分布最广,具有维持肠神经系统以及调节神经活动的作用^[10]。成熟的

EGC 可以产生 GDNF,该因子是促进神经元生长、分化和修复最有潜力的营养因子,具有促进运动神经元存活、抗肠上皮细胞凋亡、促肠上皮细胞增生等

作用^[11-12]。破坏 EGC 后,小鼠的肠道动力和传输减慢^[9],渗透功能也会发生相应的变化^[13]。研究表明针刺可以提高 GDNF 的表达水平,还能提高其作用效应^[14-16]。

本研究表明,电针刺激大肠俞募穴能促进功能性便秘小鼠结肠组织的 EGC 细胞分泌 GDNF,修复受损结肠上皮组织,进而改善肠道传输功能;破坏 EGC 后,GDNF 的表达下降,电针刺激对提高 GDNF 的表达水平作用不明显,结肠上皮细胞修复减慢,肠道传输功能降低。本研究从正反两方面证实了 EGC 分泌的 GDNF 在改善功能性便秘小鼠结肠组织的形态结构及肠道传输功能中的作用。

参考文献:

- [1] 魏艳静,卞红磊,赵发.便秘的国内流行病学研究进展[J].中华疾病控制杂志,2004,8(5):449-451.
Wei JY, Bian HL, Zhao F. Internal progress of epidemiology study on constipation[J]. Chin J Dis Control Prev, 2004, 8(5): 449-451.
- [2] 丁美红,林征,王美峰,等.功能性便秘患者症状、精神心理状况、自主神经功能相关性研究[J].护理学报,2010,17(4A):4-7.
Ding MH, Lin Z, Wang MF, et al. Study on correlation of symptoms, psychological status and autonomic nervous function among patients with functional constipation[J]. J Nurs, 2010, 17(4A):4-7.
- [3] 杜文菲,于璐,严兴科,等.针灸治疗便秘随机对照临床研究文献 Meta 分析[J].中国针灸,2012,32(1):92-96.
Du WF, Yu L, Yan XK, et al. Meta-analysis on randomized controlled clinical trials of acupuncture and moxibustion on constipation[J]. Chin Acup Mox, 2012, 32(1):92-96.
- [4] 邱学梅,杜帅,陈少宗.针灸治疗便秘取穴规律文献分析[J].山东中医药大学学报,2014,38(2):113-115.
Qiu XM, Du S, Chen SZ. Analysis of acupoint rules of constipation treated with acupuncture and moxibustion[J]. J Shandong Univ Chin Med, 2014, 38(2):113-115.
- [5] 袁媛,范一宏,张烁,等.肠神经胶质细胞及胶质细胞源性神经营养因子在肠道功能中的作用[J].中华内科杂志,2013,52(11):995-996.
Yuan Y, Fan YH, Zhang S, et al. The role of enteric glial cells and glial cell derived neurotrophic factors in intestinal function[J]. Chin J Intern Med, 2013, 52(11):995-996.
- [6] 姚景春,冯芹,孙宝存.己酮可可碱对慢传输型便秘模型大鼠的结肠黏液分泌和结肠肌电活动的影响[J].中国药理学通报,2011,27(12):1749-1752.
Yao JC, Feng Q, Sun BC. Effects of pentoxifylline on colonic mucus and colonic electromyography in rats with slow transit constipation[J]. Chin Pharmacol Bull, 2011, 27(12):1749-1752.
- [7] 范一宏,徐国萍,冯雯,等.枳术通便汤对慢传输型便秘大鼠结

肠墨汁推进率、GDNF 及 NOS mRNA 表达的影响[J].中国中西医结合杂志,2012,32(4):486-489.

- Fan YH, Xu GP, Feng W, et al. Effects of Zhizhu Tongbian decoction on the colon ink propelling rate, GDNF and NOS mRNA expression in rats with slow transit constipation[J]. Chin J Integr Med, 2012, 32(4):486-489.
- [8] 陈楚洵,严杰,田浩梅,等.电针天枢配大肠俞、天枢配上巨虚对溃疡性结肠炎模型大鼠血清 NO、MDA 影响的比较研究[J].中医药导报,2008,14(12):1-3.
Chen CT, Yan J, Tian HM, et al. Comparative study of electroacupuncture at Tianshu and Dachangshu, Tianshu and Shangjuxu on serum NO and MDA in rats with ulcerative colitis[J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2008, 14(12):1-3.
- [9] Nasser Y, Fernandez E, Keenan CM, et al. Role of enteric glia in intestinal physiology: effects of the gliotoxin fluorocitrate on motor and secretory function[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006, 291(5):G912-G927.
- [10] 孔文成,任乐乐.肠神经胶质细胞——肠黏膜屏障构成家族的新成员[J].肠外与肠内营养,2013,20(6):371-374.
Kong WC, Ren LL. Enteric glial cell: new player of intestinal barrier[J]. Parenter Enter Nutr, 2013, 20(6):371-374.
- [11] Kordower JH, Bjorklund A. Trophic factor gene therapy for Parkinson's disease[J]. Mov Disord, 2013, 28(1):96-109.
- [12] Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, et al. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration[J]. Pharmacol Ther, 2013, 138(2):155-175.
- [13] Aubé AC, Cabarrocas J, Bauer J et al. Changes in enteric neuron phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption[J]. Gut, 2006, 55(5):630-637.
- [14] 马骏,王彦春,王述菊,等.电针对阿尔茨海默病模型大鼠海马区神经营养因子及其受体表达的影响[J].针灸临床杂志,2010,26(7):63-66.
Ma J, Wang YC, Wang SJ, et al. Effect of electroacupuncture therapy on the expression of neurotrophic factor and receptors in hippocampus of the Alzheimerian rats[J]. J Clin Acup Mox, 2010, 26(7):63-66.
- [15] 王彦春,程宇核,马骏,等.电针对帕金森病模型大鼠 GDNF 及其功能性受体 Ret 表达的影响[J].中国针灸,2010,30(9):739-743.
Wang YC, Cheng YH, Ma J, et al. Effects of electroacupuncture on the expression of GDNF and Ret in Parkinson's disease model rats[J]. Chin Acup Mox, 2010, 30(9):739-743.
- [16] Sun H, Zhao H, Ma C, et al. Effects of electroacupuncture on depression and the production of glial cell line-derived neurotrophic factor compared with fluoxetine: a randomized controlled pilot study[J]. J Altern Complement Med, 2013, 19(9):733-739.

(编辑:董宇 杨巍敏)