

电针足三里对功能性消化不良模型大鼠内脏高敏感性的影响

<https://doi.org/10.12307/2022.108>范建超¹, 徐派的¹, 韩永丽¹, 文彩玉珠², 张红星¹, 潘小丽¹

投稿日期: 2021-03-10

送审日期: 2021-03-11

采用日期: 2021-04-28

在线日期: 2021-07-19

中图分类号:

R459.9; R318; R57

文章编号:

2095-4344(2022)05-00663-06

文献标识码: B

文章快速阅读:

文章亮点—

△功能性消化不良大鼠胃底组织中环核苷酸直接激活的交换蛋白1(EPAC1)、机械敏感性离子通道蛋白PIEZO2转录水平增高,血清及胃底组织5-羟色胺水平升高,导致内脏敏感性异常增高。足三里穴具有健脾和胃、通经活络止痛之效,电针能调节功能性消化不良大鼠胃高敏感性,疗效显著。

△功能性消化不良大鼠胃底组织EPAC1和PIEZO2转录水平造模后异常升高,而经电针足三里治疗后显著下降,表明EPAC1和PIEZO2可能参与介导内脏敏感性,这可能是电针调节功能性消化不良内脏高敏感性的重要途径。

分组、造模及干预

- (1) 随机将SD大鼠分为空白组、模型组及电针组;
- (2) 模型组、电针组大鼠采用碘乙酰胺溶液灌胃+不规则饮食+改良郭氏夹尾刺激法序贯干预的方式复制功能性消化不良大鼠模型;
- (3) 空白组、模型组不干预,电针组取双侧足三里穴进行电针治疗。

观察指标

- (1) 记录3组大鼠在基线期、造模后、电针干预7d和14d后的体质量;
- (2) 采用电子测痛仪检测大鼠足底机械痛阈值,反映大鼠内脏敏感性;
- (3) ELISA法检测血清及胃底黏膜组织中5-羟色胺水平;
- (4) 实时荧光定量PCR检测胃底黏膜组织EPAC1、PIEZO2转录水平。

研究结论

- (1) 电针足三里穴能显著下调功能性消化不良大鼠内脏高敏感性,疗效确切;
- (2) EPAC1和PIEZO2可能参与介导内脏敏感性,在电针调节功能性消化不良内脏高敏感性过程中发挥重要作用。

文题释义:

功能性消化不良:是临床最常见的功能性胃肠疾病之一,是起源于胃和十二指肠的非器质性消化系统疾病,以早饱、进食后饱胀不适或上腹部疼痛、灼烧感为主要症状,伴随恶心、嗝气等症状,也可出现焦虑、抑郁等精神状态的改变。

内脏高敏感性:是指内脏感觉异常或感觉过敏,可表现为对生理性刺激不适或对伤害性刺激反应强烈,表现为胃肠道对机械或者化学刺激反应增强或过敏,进而出现上腹痛或灼烧感等消化系统症状,是功能性消化不良的主要病理机制之一。

摘要

背景:功能性消化不良发病机制复杂,内脏高敏感性是其最主要的病理机制之一,但从内脏高敏感性机制层面论证电针治疗功能性消化不良的研究报道较少。

目的:探讨电针足三里调节功能性消化不良大鼠内脏高敏感性的效应及其可能机制。

方法:将24只雄性7d龄SD乳鼠随机分为空白组、模型组、电针组,每组8只,后2组采用多因素应激干预法(碘乙酰胺灌胃+不规则喂养+改良郭氏夹尾刺激法)复制功能性消化不良大鼠模型,大鼠8周龄即进行电针干预。电针组给予针刺大鼠双侧后肢足三里穴7-10mm,连接韩式穴位神经刺激仪,参数设置为疏密波,频率2/100Hz,强度1mA,每次电针干预20min,1次/d,每周连续5d后休息2d,共2周。计算各组大鼠不同阶段平均体质量,采用足底机械痛阈值反映各组大鼠内脏敏感性,ELISA法检测各组大鼠血清和胃底黏膜组织5-羟色胺表达水平,实时荧光定量PCR法检测各组大鼠胃底黏膜组织环核苷酸直接激活的交换蛋白1、机械敏感性离子通道蛋白PIEZO2 mRNA表达水平。

结果与结论:①与空白组相比,模型组大鼠平均体质量、足底机械痛阈值均显著降低,血清和胃底黏膜组织5-羟色胺水平升高,差异有非常显著性意义($P < 0.01$);胃底黏膜组织环核苷酸直接激活的交换蛋白1、PIEZO2 mRNA表达水平升高($P < 0.01$);②与模型组相比,电针组大鼠干预7、14d后的平均体质量、足底机械痛阈值均升高,差异有显著性意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),血清和胃底黏膜组织5-羟色胺水平及胃底黏膜组织环核苷酸直接激活的交换蛋白1、PIEZO2 mRNA水平均降低($P < 0.01$);③提示电针足三里可以显著改善功能性消化不良大鼠内脏高敏感性,其作用机制可能与调节肠嗜铬细胞5-羟色胺释放及环核苷酸直接激活的交换蛋白1、PIEZO2表达有关。

关键词:功能性消化不良;电针;内脏高敏感性;环核苷酸直接激活的交换蛋白1;PIEZO2;大鼠

缩略语:环核苷酸直接激活的交换蛋白1: exchange protein 1 directly activated by cAMP, EPAC1

Effects of electroacupuncture at Zusanli acupoint on visceral hypersensitivity in rats with functional dyspepsia

Fan Jianchao¹, Xu Paidi¹, Han Yongli¹, Wen Caiyuzhu², Zhang Hongxing¹, Pan Xiaoli¹

¹Department of Acupuncture and Bone Traumatology, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei Province, China; ²Department of Reproductive Medicine, The Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Fan Jianchao, PhD candidate, Department of Acupuncture and Bone Traumatology, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei Province, China
Corresponding author: Pan Xiaoli, PhD, Assistant teacher, Department of Acupuncture and Bone Traumatology, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei Province, China

¹湖北中医药大学针灸骨伤学院,湖北省武汉市430061; ²郑州大学第三附属医院生殖医学科,河南省郑州市450052

第一作者:范建超,男,1992年生,湖北省武穴市人,汉族,湖北中医药大学针灸骨伤学院在读博士,主要从事针灸防治功能性胃肠疾病的临床及机制研究。

通讯作者:潘小丽,博士,助教,湖北中医药大学针灸骨伤学院,湖北省武汉市430061

<https://orcid.org/0000-0001-6406-1302> (范建超)

基金资助:国家自然科学基金青年项目(81704178),项目负责人:徐派的;湖北中医药大学“青苗计划”资助项目(2021zzx009),

项目负责人:潘小丽

引用本文:范建超,徐派的,韩永丽,文彩玉珠,张红星,潘小丽.电针足三里对功能性消化不良模型大鼠内脏高敏感性的影响

[J].中国组织工程研究,2022,26(5):663-668.



Abstract

BACKGROUND: The pathogenesis of functional dyspepsia is complex, and visceral hypersensitivity is one of the most important pathological mechanisms. However, there are few reports on electroacupuncture treatment of functional dyspepsia from the perspective of visceral hypersensitivity mechanism.

OBJECTIVE: To observe the effects and its possible mechanism of electroacupuncture at *Zusanli* (ST36) on visceral hypersensitivity in rats with functional dyspepsia.

METHODS: Twenty-four 7-day-old male Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups: a control group, a model group, and an electroacupuncture group ($n=8$). The visceral hypersensitivity model of functional dyspepsia rats was prepared with multi-factor stress methods (intragastric administration of iodoacetamide+irregular feeding+Guo's moderate clipping tail). In the electroacupuncture group, rats aged 8 weeks were treated with electroacupuncture intervention. A disposable sterile acupuncture needle was pierced into 7–10 mm at *Zusanli* acupoints of bilateral hind limbs of rats, which was connected with Hans-acupoint nerve stimulator (dilatational wave, 2/100 Hz, 1 mA). Electroacupuncture was performed 20 minutes per day, 5 consecutive days as one session with 2 days off, for 2 sessions in total. The average body mass of rats in different stages was computed. Mechanical pain threshold of the plantar was tested to detect visceral sensitivity of rats. Enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA) was applied to detect the level of 5-hydroxytryptamine in serum and gastric fundus mucosa tissue. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to assess the expression of exchange protein 1 directly activated by cAMP (EPAC1) and PIEZO2 mRNA in gastric fundus mucosa tissue.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the control group, the average body mass and plantar mechanical pain threshold were significantly decreased in the model group, and the level of 5-hydroxytryptamine in serum and gastric fundus mucosa was significantly increased (all $P < 0.01$). The mRNA expression levels of EPAC1 and PIEZO2 in gastric fundus mucosa were significantly increased in the model group compared with the control group ($P < 0.01$). Compared with the model group, in the electroacupuncture group, the average body mass and plantar mechanical pain threshold were significantly increased after 7 and 14 days of treatment ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while the mRNA expression levels of EPAC1 and PIEZO2 in gastric fundus mucosa were significantly decreased ($P < 0.01$). These findings indicate that electroacupuncture at *Zusanli* can significantly improve the visceral hypersensitivity of functional dyspepsia rats, which is possibly mediated by regulating the release of 5-hydroxytryptamine from enterochromaffin cells and the mRNA expression of EPAC1 and PIEZO2.

Key words: functional dyspepsia; electroacupuncture; visceral hypersensitivity; exchange protein 1 directly activated by cAMP; PIEZO2; rat

Funding: the National Natural Science Foundation of China (Youth Program), No. 81704178 (to XPD); Qingmiao Program of Hubei University of Chinese Medicine, No. 2021zzx009 (to PXL)

How to cite this article: FAN JC, XU PD, HAN YL, WEN CYZ, ZHANG HX, PAN XL. Effects of electroacupuncture at *Zusanli* acupoint on visceral hypersensitivity in rats with functional dyspepsia. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(5):663-668.

0 引言 Introduction

功能性消化不良是经检查后排除各种器质性病变的基础上,以早饱、进食后饱胀不适或上腹部疼痛、灼烧感为主要症状的综合征,是临床最常见的功能性胃肠疾病之一^[1-3]。流行病学研究表明,功能性消化不良在全球的患病率为5%–40%,国内高达20.65%^[4]。功能性消化不良发病机制复杂,其中最主要的病理机制之一是内脏高敏感性^[5-6],与餐后腹痛、嗝气、体质量减轻等症状密切相关^[7]。5-羟色胺是一种主要由肠嗜铬细胞分泌的神经递质,在功能性胃肠疾病内脏高敏感性中发挥重要作用,且针灸能够通过调节5-羟色胺水平发挥治疗作用^[8-11]。研究表明功能性消化不良患者对胃扩张存在超敏反应的发生率为35%–50%^[12],表明胃肠机械转导功能异常参与了功能性消化不良的发病。近年来研究发现机械敏感性离子通道蛋白PIEZO2大量分布于胃肠组织中,且与肠嗜铬细胞存在共定位表达,位于肠嗜铬细胞5-羟色胺囊泡附近,可感知胃肠内各种压力和机械刺激进而调控5-羟色胺的释放^[13-16],而环核苷酸直接激活的交换蛋白1(exchange protein 1 directly activated by cAMP, EPAC1)在介导机械疼痛和内脏高敏感性的过程中同样发挥了重要作用^[17-18]。

此次研究旨在通过观察电针足三里对功能性消化不良大鼠内脏敏感性及其胃底黏膜组织EPAC1、PIEZO2转录水平和5-羟色胺表达水平的影响,进而探讨电针调节功能性消化不良内脏高敏感性的可能作用机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验,单因素方差分析,组内比较采用配对样本 t 检验,方差齐、不齐者分别选用LSD和Tamhanes' T2法。

1.2 时间及地点 于2020年10月至2021年1月在湖北中医药大学针灸研究所进行。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 选用SPF级雄性Sprague-Dawley 7 d龄乳鼠24只,体质量(20±5)g,母鼠6只(为乳鼠提供母乳),由三峡大学实验动物中心提供,许可证号:SYKK(鄂)2018-0104。饲养于SPF实验动物房,房温保持22–25℃,光照周期遵循正常昼夜节律为12 h/12 h,相对湿度50%–60%。母鼠全价颗粒饲料喂养,自由饮水,幼鼠母乳喂养,保持动物房内安静,24只幼鼠适应性3 d后采用随机数字表法分成空白组、模型组和电针组,每组8只(每笼饲养1只母鼠和4只幼年大鼠)。此次研究整个实验期间均按照《湖北省动物管理条例》中善待实验动物的相关具体伦理学规定执行。

1.3.2 主要试剂和仪器设备

试剂: 碘乙酰胺[阿拉丁试剂(上海)有限公司,货号: I105563], 蔗糖(国药集团化学试剂有限公司,货号: 10021418), 氯化钠注射液(武汉滨湖双鹤药业责任有限公司,货号: H42020475), 大鼠5-羟色胺ELISA试剂盒(武汉华美生物,货号: CSB-E08364r), 医用滤纸(Whatman 3MM CHR), TRIZOL(Thermo), DNase and RNase-free Water(上海生工生物,货号: B541018), 甲醇(上海生工生物,货号: 506806), 异丙醇(上海生工生物,货号: A507048), Fast SYBR™ Green Master Mix(Thermo, 货号: 4385610)。

仪器和设备: Electric Von Frey 电子测痛仪(美国, IITC Life Science Inc), 匀浆器(上海净信科技, 货号: F6/10), 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司, CPA), –80℃超低温冰箱(Thermo, 货号: 8950086V), 台式高速冷冻离心机(上海继谱电子科技有限公司, HI650TG16KR), 微量移液器(Thermo), 实时荧光定量PCR仪(ABI QuantStudio 6), 紫

外分光光度 (Nanodrop 2000), 酶标仪 (Thermo Multiskan™ FC), 韩式穴位神经刺激仪 (南京济生医疗科技有限公司, HANS-200A), 一次性无菌针灸针 (苏州医疗用品厂有限公司, 0.28 mm×25 mm)。

1.4 方法

1.4.1 造模方法 按大鼠日龄不同阶段采用碘乙酰胺溶液灌胃 + 不规则饮食 + 改良郭氏夹尾刺激法序贯干预的方式造模^[19-21]: ① 11-16 d 龄: 空白组给予 0.2 mL 2% 蔗糖溶液灌胃, 模型组和电针组给予 0.2 mL 2% 蔗糖溶液与 0.1% 碘乙酰胺的混合液灌胃, 1 次/d, 连续 6 d; ② 17-21 d 龄: 3 组大鼠不予任何干预措施, 正常饲养至 21 d 后断奶; ③ 22-49 d 龄: 空白组每笼每日给予 200 g 全价饲料, 余两组隔日喂食; ④ 50-56 d 龄: 空白组不予干预, 余两组采用改良郭氏夹尾法进行干预, 用包裹海绵的长止血钳稍加用力夹取每只大鼠尾部中远端 1/3 处, 以激起大鼠暴怒, 并与同笼其他大鼠厮打, 同时尽量减少尾部皮肤破溃避免引起感染, 每次刺激 30 min, 3 次/d, 2 次刺激间隔 4 h 以上, 连续刺激 6 d。以大鼠精神萎靡、倦怠, 毛发无光泽如枯草状、大便变得稀溏甚至呈水糊样, 进食量显著减少, 活动由活跃逐渐变得倦卧扎堆, 情绪低落而不像造模开始时的烦躁易怒等为主要特征, 且胃肠组织经过解剖后未发现明显结构性病变, 提示造模成功。

组织工程实验动物造模过程的相关问题

造模目的	探讨电针足三里调节功能性消化不良大鼠内脏高敏感性的效应及其可能的机制
选择动物的条件	雄性 SPF 级 SD 大鼠, 体质量 (20±5) g, 7 d 龄
模型与所研究疾病的关系	能较好地模拟功能性消化不良疾病
动物来源及品系	SD 大鼠, 由三峡大学实验动物中心提供
造模技术描述	碘乙酰胺灌胃 + 不规则饮食 + 改良郭氏夹尾刺激复制功能性消化不良模型
动物数量及分组方法	24 只大鼠, 采用随机数字表法分为空白组、模型组和电针组, 每组 8 只
造模成功评价指标	以大鼠精神萎靡、倦怠, 毛发无光泽如枯草状、大便变得稀溏甚至呈水糊样, 进食量显著减少, 活动由活跃逐渐变得倦卧扎堆, 情绪低落而不像造模开始时的烦躁易怒等为主要特征, 且胃肠组织经过解剖后观察未发现明显结构性病变, 提示造模成功
造模后观察指标	造模后各组平均体质量、足底机械痛阈值、ELISA 法检测血清和胃底组织 5-羟色胺水平, 实时荧光定量 PCR 技术检测胃底组织 EPAC1、PIEZO2 mRNA 表达水平
造模后动物处理	电针组选取大鼠双侧足三里穴, 体积分数 75% 的乙醇消毒双侧穴位后, 用 0.28 mm×25 mm 一次性无菌毫针刺 7-10 mm, 提插捻转至指下有沉滞感后将韩式穴位神经刺激仪连接在双侧针柄上, 选用疏密波、频率和电流强度分别为 2/100 Hz、1 mA、20 min/次, 1 次/d, 第 1 周连续 5 d, 休息 2 d 后第 2 周继续治疗 5 d
伦理委员会批准	湖北中医药大学动物实验伦理委员会批准, 批准号: HUCMS201805001

1.4.2 电针干预 大鼠 8 周龄即进行电针干预。3 组大鼠均穿鼠衣固定后悬挂鼠架上, 暴露双下肢, 空白组、模型组不予电针干预, 电针组选取大鼠双侧足三里穴, 定位参考《实验针灸学》^[22], 位于双后肢腓骨小头外下方 5 mm 处, 体积分数 75% 乙醇消毒双侧穴位后, 手持 0.28 mm×25 mm 一次性无菌毫针刺 7-10 mm, 快速进针, 提插捻转至指下有沉滞感后将韩式穴位神经刺激仪的正负极分别连接在双侧针柄上, 选用频率和电流强度分别为 2/100 Hz、1 mA, 控制施术双下肢的振动幅度, 避免抖动剧烈减轻大鼠痛苦。每次电针干预 20 min, 1 次/d, 第 1 周连续 5 d, 休息 2 d 后第 2 周继续治疗 5 d^[23-25]。

1.4.3 取材 干预结束后, 各组大鼠禁食不禁水 12 h, 根据 2 mL/kg 的剂量腹腔注射 2% 戊巴比妥钠溶液进行麻醉, 迅速打开腹腔, 经腹主动脉取 2 mL 动脉血, 离心 15 min 后吸取上清液, 保存于 -80 °C 中备检。剪取部分胃底黏膜组织, 放入预冷的 PBS 中清洗干净, 医用滤纸吸干多余水分, 放入液氮中冷冻后 -80 °C 冰箱保存。

1.5 主要观察指标

1.5.1 平均体质量 记录 3 组大鼠在基线期、造模后、电针干预 7 d 和 14 d 后的体质量, 观察 3 组大鼠不同阶段平均体质量增长情况, 明确造模及电针干预对大鼠平均体质量增长的影响。

1.5.2 内脏敏感性检测^[26] 采用 Electric Von Frey 电子测痛仪检测 3 组大鼠造模成功后、电针干预 7, 14 d 后的足底机械痛阈值, 以反映大鼠内脏敏感性, 每次由固定检测人员在固定时间段进行检测。具体方法如下: 准备大小 25 cm×10 cm×10 cm 鼠笼, 按顺序依次将大鼠放置于悬空的鼠笼中, 充分暴露笼底, 待大鼠安静后开始检测。安装调试好测痛仪后, 检测人员左手持测痛仪手柄, 右手点按“CLR”与“MAX”键后, 探头垂直于大鼠足底脚垫之间的区域缓慢向上加力, 确保显示屏的读数以个位数缓慢增加, 在排除大鼠行走、跳跃情况下大鼠明显缩足时, 将探针迅速移开, 显示屏上呈现的数据即代表大鼠一侧的足底机械痛阈值, 取双足机械痛阈值平均数为大鼠 1 次足底机械痛阈值, 每只大鼠需检测 3 次, 同一只大鼠 2 次检测间至少间隔 2 min, 取 3 次数据中差值最小的 2 次数据的均值作为该大鼠最终的足底机械痛阈值。

1.5.3 血清及胃底黏膜组织中 5-羟色胺水平检测

血清样本: 采用大鼠 5-羟色胺 ELISA 试剂盒直接检测各组血清样本 5-羟色胺水平, 按照试剂盒说明书的步骤严格操作。

胃底黏膜组织样本: 从 -80 °C 冰箱中取出组织样本, 称质量后将胃底黏膜组织剪碎, 加入相应体积的 PBS (按照 1 : 9 比例), 放入手动匀浆器中制备组织匀浆液, 4 °C 低温离心机离心 10-15 min, 12 000 r/min, 取上清液进行检测。检测前先用 BCA 法进行蛋白定量。

1.5.4 胃底黏膜组织 EPAC1、PIEZO2 水平 采用实时荧光定量 PCR 技术检测各组大鼠胃底黏膜组织 EPAC1、PIEZO2 转录水平。

目的基因引物设计参照 NCBI gene 数据库基因序列, 所有引物均由北京擎科公司合成。

EPAC1 上游引物为 5'-CCA GGT GAG AAC CAC TGG CA -3', 下游引物为 5'-CGA ACA CTA GCT GGT AAG AGC A-3', 扩增片段长度: 166 bp;

PIEZO2 上游引物为 5'-TTT CCT CTC ACG GAT GCG AC -3', 下游引物为 5'-AGT TTG AGT CAC TGG GTG CC -3', 扩增片段长度: 133 bp;

选择 GAPDH 为对照, 上游引物为 5'-AGT GCC AGC CTC GTC TCA TA-3', 下游引物为 5'-TGA ACT TGC CGT GGG TAG AG-3', 扩增片段长度: 189 bp。

取 1 mL Trizol 溶液加入约 100 mg 的胃底黏膜组织样本, 用匀浆器将其充分研磨成浆糊状, 裂解 8-10 min, 按照 Trizol 法提取大鼠总 RNA, 分别测定 RNA 浓度及纯度, 取相应体积的 RNA 反转录合成 cDNA, 具体操作方法严格按照产品说明书进行。每个样本均进行 EPAC1、PIEZO2 和 GAPDH 的 qPCR 检测。qPCR 反应体系: cDNA(10× 稀释) 4 μL, 前后引物 (10 μmol/L) 各 0.4 μL, 反应液 Mix 10 μL, DNase and RNase-free Water 4.2 μL。qPCR 反应条件: ①激活: 95 °C 2 min, 1 cycle; ②变性退火: 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 40 cycle; ③绘制熔解曲线, 采用 2^{-ΔΔCt} 法进行 EPAC1 mRNA、PIEZO2 mRNA 的相对定量分析。

1.6 统计学分析 应用 SPSS 26.0 软件对研究所得数据进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间数据经验证符合正态分布后采用单因素方差分析, 组内比较采用配对样本 *t* 检验, 方差齐、不齐者分别选用 LSD 和 Tamhanes' T2 法, 以 *P* < 0.05 为差异有显著性意义, *P* < 0.01 为差异有非常显著性意义; 采用 Graphpad Prism 8.0 绘制图表。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 共纳入 24 只大鼠, 空白组、模型组及电针组每组 8 只, 全部进入结果分析, 无脱失。

2.2 各组大鼠不同阶段平均体质量比较 在基线期, 3 组大鼠平均体质量经统计学比较差异无显著性意义 (均 *P* > 0.05); 造模后, 与空白组相比, 模型组、电针组大鼠平均体质量下降, 差异有非常显著性意义 (均 *P* < 0.01), 模型组、电针组两组间比较差异无显著性意义 (*P* > 0.05); 分别干预 7 d 和 14 d 后, 与空白组比较, 模型组、电针组大鼠平均体质量下降, 差异有非常显著性意义 (均 *P* < 0.01); 且电针组大鼠平均体质量高于模型组大鼠平均体质量 (均 *P* < 0.05), 见表 1。

表 1 | 各组大鼠不同阶段平均体质量比较 ($\bar{x} \pm s, n=8, g$)
Table 1 | Comparison of average body mass of rats in different stages among groups

组别	基线期	造模后	干预 7 d	干预 14 d
空白组	16.22±1.13	259.92±24.99	319.57±25.51	382.15±23.92
模型组	15.88±0.43	178.85±14.92 ^a	222.62±15.70 ^a	269.77±16.17 ^a
电针组	16.81±0.87	192.00±13.26 ^a	244.88±13.49 ^{ab}	307.04±14.32 ^{ac}

表注: 与空白组比较, ^a*P* < 0.01; 与模型组比较, ^b*P* < 0.05, ^c*P* < 0.01

2.3 各组大鼠足底机械痛阈值比较 造模后, 与空白组比较, 模型组、电针组两组大鼠足底机械痛阈值下降, 差异有非常显著性意义 (均 *P* < 0.01), 且模型组、电针组两组间比较, 差异无显著性意义 (*P* > 0.05); 干预 7 d 后, 与空白组比较, 余 2 组大鼠足底痛阈值均下降, 差异有显著性意义 (*P* < 0.01, *P* < 0.05); 与模型组比较, 电针组大鼠足底机械痛阈值升高, 差异有显著性意义 (*P* < 0.05); 干预 14 d 后, 与空白组比较, 模型组大鼠足底机械痛阈值下降, 经统计学检验差异有非常显著性意义 (*P* < 0.01), 电针组痛阈值高于模型组, 差异有非常显著性意义 (*P* < 0.01), 而空白组、电针组间经统计学比较差异无显著性意义 (*P* > 0.05), 见图 1。

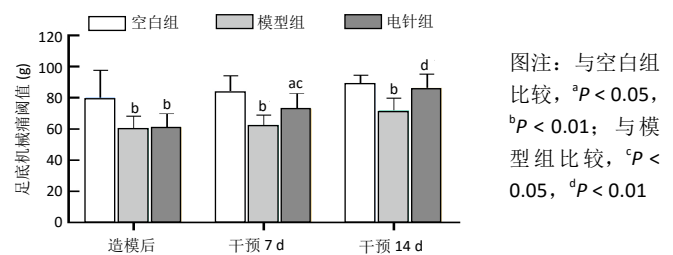


图 1 | 各组大鼠足底痛阈值比较

Figure 1 | Comparison of plantar pain thresholds among groups

2.4 各组大鼠血清和胃底黏膜组织 5-羟色胺水平比较 与空白组相比, 模型组大鼠血清和胃底黏膜组织中 5-羟色胺水平升高, 差异有显著性意义 (均 *P* < 0.05); 与模型组比较, 电针组大鼠血清和胃底黏膜组织中 5-羟色胺水平降低, 差异有非常显著性意义 (均 *P* < 0.01), 见表 2。

表 2 | 各组大鼠血清和胃底黏膜组织 5-羟色胺水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)
Table 2 | Comparison of 5-hydroxytryptamine level in serum and gastric fundus mucosa of rats among groups

组别	血清 5-羟色胺 (μg/L)	胃底黏膜组织 5-羟色胺 (μg/g)
空白组	9.230±1.354	4.317±0.162
模型组	21.099±4.455 ^a	6.011±0.234 ^a
电针组	13.359±1.230 ^b	4.631±0.125 ^b

表注: 与空白组比较, ^a*P* < 0.01; 与模型组比较, ^b*P* < 0.01

2.5 各组大鼠胃底黏膜组织 EPAC1、PIEZO2 mRNA 表达 与空白组相比, 模型组胃底黏膜组织 EPAC1、PIEZO2 mRNA 表达升高, 差异有非常显著性意义 (均 *P* < 0.01); 与模型组比较, 电针组大鼠胃底黏膜组织 EPAC1、PIEZO2 mRNA 表达降低, 差异有非常显著性意义 (均 *P* < 0.01), 见图 2。

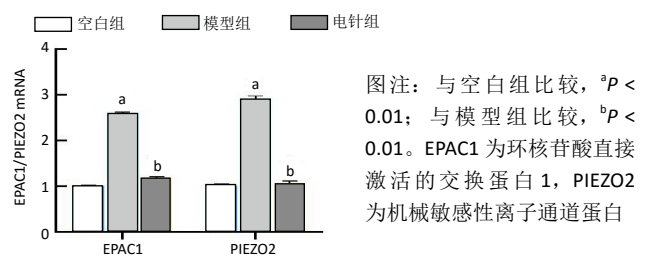


图 2 | 各组大鼠胃底黏膜组织 EPAC1、PIEZO2 mRNA 表达

Figure 2 | mRNA expression of EPAC1 and PIEZO2 in gastric fundus mucosa of rats in each group

3 讨论 Discussion

功能性消化不良症状复杂,其病程长且易反复,显著影响患者生活质量,降低工作效率,给社会带来沉重的医疗和经济负担^[27-28]。研究已证明内脏高敏感性与非腐蚀性食管胃食管反流病、肠易激综合征和功能性消化不良等多种功能性胃肠疾病密切相关,内脏超敏患者相较于健康受试者而言,对胃球囊扩张刺激表现出超敏反应,如内脏感觉敏感性增强以及对疼痛的阈值降低等^[29],并且功能性消化不良内脏高敏感性与腹痛、嗝气、体质量减轻等症状具有相关性^[7]。

中医典籍中并无“功能性消化不良”这一具体的病名,而“胃脘痛”“痞满”“嗝气”等涵盖了其主要症状特点,功能性消化不良病位在胃,与肝脾密切相关,饮食、情志等因素与其发病密切相关。此次研究采用幼鼠碘乙酰胺灌胃联合成年后大鼠不规则饮食和夹尾刺激的方法建立功能性消化不良大鼠模型,能较好地模拟功能性消化不良临床发病过程中早期炎症以及后天饮食、情志因素在发病过程中的作用,造模时间从幼年到成年,符合功能性消化不良慢性成病的病程特点。内脏高敏感性是指胃肠道病理状态下的内脏感觉异常,因其感觉阈值降低而表现为生理性刺激不适或对伤害性刺激反应强烈。研究表明,支配大鼠后足感觉的脊髓神经节段与支配胃、十二指肠的脊髓神经节段有重叠^[16]。ZHOU等^[30]利用三硝基苯磺酸诱导大鼠结肠炎模型,采用冯·弗雷丝纤维刺激大鼠后足检测内脏高敏感程度。此次实验结果表明,与空白组大鼠相比,功能性消化不良模型组、电针组大鼠足底机械痛阈值降低,提示功能性消化不良大鼠内脏敏感性增高;造模后,与模型组相比,电针组大鼠足底痛阈值无明显差异,经电针治疗后,痛阈值显著升高,表明电针能够降低功能性消化不良引起的大鼠内脏高敏感性,从而发挥对功能性消化不良的治疗作用,这与OUYANG等^[31]研究得出的电针能显著改善功能性消化不良大鼠内脏高敏感性的结果相一致。

足三里穴是足阳明胃经合穴、胃腑下合穴,具有健脾和胃、补益气血、通经活络之效,是治疗胃肠局部及相关疾病的要穴。刘武等^[32]运用数据挖掘技术探索针灸治疗功能性消化不良的取穴规律,发现足三里穴为选用频率最高的穴位。实验研究也表明电针“足三里”可有效改善功能性消化不良胃肠动力障碍、恢复胃肠道功能^[33-34]。此次研究结果显示,电针足三里干预后,大鼠平均体质量及足底机械痛阈值相较于模型组均提高,提示电针足三里可以恢复功能性消化不良大鼠体质量,降低内脏高敏感性。

5-羟色胺是一种单胺类神经递质,在中枢神经系统和胃肠道中都有不同分布(分别占人体总量的5%和95%),与人体疼痛信号传递密切相关,而5-羟色胺信号系统异常会导致内脏敏感性增高。在生理状态下,胃肠道中90%的5-羟色胺由肠嗜铬细胞在色氨酸羟化酶1作用下合成,在机械或化学刺激信号下5-羟色胺从肠嗜铬细胞中释放,并与相应受体结合进而调节内脏敏感性。临床研究表明内脏高敏感性增高的功能性消化不良患者近端胃黏膜肠嗜铬细胞增多伴

随着5-羟色胺浓度升高和肥大细胞数量、脱颗粒的增多,且内脏感觉超敏引起的上腹痛、灼伤等主诉和症状与5-羟色胺介导的放大级联反应密切相关^[35]。有研究认为,功能性消化不良大鼠内脏敏感性增高与肠嗜铬细胞5-羟色胺及相应受体表达水平增高有关^[19]。此次研究结果发现,模型组大鼠血清及胃底黏膜组织中5-羟色胺水平较空白组大鼠增高,表明5-羟色胺表达水平异常与功能性消化不良内脏敏感增高有关。电针组大鼠血清及胃底黏膜组织中5-羟色胺水平高于模型组大鼠,且与空白组大鼠无明显差异,提示电针足三里可能通过调节血清及胃底黏膜组织5-羟色胺水平,进而改善功能性消化不良大鼠内脏高敏感性。

PIEZO蛋白是一种机械敏感离子通道,可允许阳离子非选择性通过^[36],根据其分布及功能的不同,可分为PIEZO1和PIEZO2两种亚型:PIEZO1主要分布于液体压力和流动性的非感觉组织中如血液、膀胱、肾脏等;PIEZO2主要分布于感觉组织中,如背根神经节、感觉神经、皮肤的Merkel细胞等,在触觉、伤害性感觉等机械转导中发挥重要作用^[37]。根据人类蛋白质图谱数据,PIEZO2在胃肠道中高度表达,肠嗜铬细胞亦可表达PIEZO2,并参与调节5-羟色胺释放及内脏感觉^[13, 38]。EPAC1是cAMP下游的重要效应蛋白家族之一,主要分布于脑部、肾脏等,当细胞内cAMP激活后,可通过EPAC1介导细胞内各种信号转导从而发挥相应的生理功能,如机械转导、细胞增殖、分化凋亡等^[39-40]。EPAC1被激活后可增强机械敏感性神经元诱导产生PIEZO2通道电流,而蛋白激酶A激活却不能增强PIEZO2通道电流,因此EPAC1可选择性增强PIEZO2蛋白介导的机械转导,从而导致疼痛敏感^[17]。有研究表明,EPAC1过表达于内脏高敏感性大鼠的胃肠组织中^[16, 41]。此次研究结果显示,功能性消化不良大鼠胃底黏膜组织中EPAC1 mRNA和PIEZO2 mRNA表达水平较对照组升高,提示功能性消化不良大鼠对伤害性感觉刺激的机械转导增加,经过电针干预后,胃底黏膜组织中EPAC1 mRNA和PIEZO2 mRNA表达水平下降,且与空白组比较差异无显著性意义,表明电针足三里可以降低功能性消化不良大鼠内脏高敏感性,减少伤害性感觉刺激的机械转导向中枢系统的传递。

综上所述,电针足三里穴能够显著改善功能性消化不良大鼠的内脏高敏感性,其作用机制可能与调节5-羟色胺及EPAC1、PIEZO2的表达有关,此次研究结果为临床上电针治疗功能性消化不良内脏高敏感性和进一步研究提供了重要依据。

致谢:感谢湖北中医药大学针灸研究所老师及所有参与实验但因版面原因未署名的师弟、师妹对此次研究的支持与帮助。

作者贡献:第一、二、六作者负责实验设计,第一、三、四作者负责实验实施,第五作者负责实验评估。

经费支持:该文章接受了“国家自然科学基金青年项目(81704178)及湖北中医药大学‘青苗计划’资助项目(2021zzx009)”的基金资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程, 不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经湖北中医药大学动物实验伦理委员会批准, 批准号: HUCMS201805001。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经湖北中医药大学生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

[1] 中华医学会消化病学分会胃肠动力学组, 中华医学会消化病学分会胃肠功能性疾病协作组. 中国功能性消化不良专家共识意见(2015年, 上海)[J]. 中华消化杂志, 2016,36(4):217-229.

[2] TALLEY NJ, GOODSALL T, POTTER M. Functional dyspepsia. Australian Prescriber, 2017.

[3] DROSSMAN DA. functional gastrointestinal disorders: history, pathophysiology, clinical features and Rome IV. Gastroenterology. 2016;150:1262-1279.

[4] FANG YJ, LIOU JM, CHEN CC, et al. Distinct aetiopathogenesis in subgroups of functional dyspepsia according to the Rome III criteria. Gut. 2015;64(10):1517-1528.

[5] ENCK P, AZPIROZ F, BOECKSTAENS G, et al. Functional dyspepsia. Nat Rev Dis Primers. 2017;3:17081.

[6] WANG YP, HERNDON CC, LU CL. Non-pharmacological Approach in the Management of Functional Dyspepsia. J Neurogastroenterol Motil. 2020;26(1):6-15.

[7] SIMRÉN M, TÖRNBLM H, PALSSON OS, et al. Visceral hypersensitivity is associated with GI symptom severity in functional GI disorders: consistent findings from five different patient cohorts. Gut. 2018;67: 255-262.

[8] STANGHELLINI V, CHAN FK, HASLER WL, et al. Gastrointestinal Disorders. Gastroenterology. 2016;150:1380-1392.

[9] MAWE GM, HOFFMAN JM. Serotonin signalling in the gut—functions, dysfunctions and therapeutic targets. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2013;10(10):564-564.

[10] 陈海军. 辨证针刺治疗功能性消化不良的临床观察及对肝胃不和型FD大鼠5-HT的影响[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2015.

[11] 潘小丽, 周丽, 王丹, 等. 电针“足三里”对功能性消化不良大鼠胃排空及自噬信号通路的影响[J]. 针刺研究, 2019,44(7):486-491.

[12] TACK J, CAENEPEEL P, FISCHLER B, et al. Symptoms associated with hypersensitivity to gastric distention in functional dyspepsia. Gastroenterology. 2001;121:526-535.

[13] ALCAINO C, KNUTSON KR, TREICHEL AJ, et al. A population of gut epithelial enterochromaffin cells is mechanosensitive and requires Piezo2 to convert force into serotonin release. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018;115(32):E7632-E7641.

[14] DICKSON I. Gut mechanosensors: enterochromaffin cells feel the force via PIEZO2. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2018;15(9):519.

[15] WANG F, KNUTSON K, ALCAINO C, et al. Mechanosensitive ion channel Piezo2 is important for enterochromaffin cell response to mechanical forces. J Physiol. 2017;595(1):79-91.

[16] 石啸双. 基于EPAC1-PIEZO2轴探讨EC在FD内脏高敏感中的作用及香砂六君子汤的干预研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.

[17] EIJKELKAMP N, LINLEY JE, TORRES JM, et al. A role for Piezo2 in EPAC1-dependent mechanical allodynia. Nature Commun. 2013;4:1682.

[18] SINGHMAR P, HUO XJ, EIJKELKAMP N, et al. Critical role for Epac1 in inflammatory pain controlled by GRK2-mediated phosphorylation of Epac1. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113(11):3036-3041.

[19] ZHAO J, ZHAO L, ZHANG S, et al. Modified Liu-Jun-Zi decoction alleviates visceral hypersensitivity in functional dyspepsia by regulating EC cell-5HT3r signaling in duodenum. J Ethnopharmacol. 2020;250:112468.

[20] 王煜姣, 凌江红, 张钰琴, 等. 复合病因造模法制备功能性消化不良大鼠模型[J]. 世界华人消化杂志, 2014(2):210-214.

[21] 吴震宇, 张声生, 李培彩, 等. 碘乙酰胺灌胃联合夹尾应激诱导大鼠FD模型的建立及评价[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2015,23(7): 18-22.

[22] 郭义, 方剑乔. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012.

[23] 张晓明, 辛玉, 康朝霞, 等. 电针通过SCF/c-kit通路对功能性消化不良模型大鼠Cajal间质细胞以及Cx43表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2018,33(11):426-429.

[24] 唐雷, 徐派的, 张红星. 电针对功能性消化不良大鼠胃窦AMPK化及mTOR的影响[J]. 中国中医急症, 2019,28(2):196-199.

[25] 王丹, 张红星, 荣培晶, 等. 电针对功能性消化不良肝郁脾虚大鼠十二指肠黏膜机械屏障及其调节蛋白的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2020,26(12):1843-1845,1882.

[26] 吴强. 电针敏化穴位对KOA模型大鼠的效应及对关节局部炎症因子的调节作用研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2019

[27] LACY BE, WEISER KT, KENNEDY AT, et al. Functional dyspepsia: the economic impact to patients. Aliment Pharmacol Ther. 2013; 38(2): 170-177.

[28] TALLEY NJ, FORD AC. Functional Dyspepsia. N Engl J Med. 2015;373(19): 1853-1863.

[29] BARLOW W, ORLANDO R. The pathogenesis of heartburn in nonerosive reflux disease: a unifying hypothesis. Gastroenterology. 2005;128: 771-778.

[30] RITCHIE J. Pain from distension of the pelvic colon by inflating a balloon in the irritable colon syndrome. Gut. 1973;14:125-132.

[31] ZHOU Q, PRICE DD, CAUDLE RM, et al. Visceral and somatic hypersensitivity in TNBS-induced colitis in rats. Dig Dis Sci. 2008;53(2): 429-435.

[32] OUYANG X, LI S, ZHOU J, et al. Electroacupuncture Ameliorates Gastric Hypersensitivity via Adrenergic Pathway in a Rat Model of Functional Dyspepsia. Neuromodulation. 2020;23(8): 1137-1143.

[33] 刘武, 马懿, 王富春, 等. 基于数据挖掘的功能性消化不良针灸取穴规律[J]. 亚太传统医药, 2019,15(10):157-159.

[34] 徐派的, 张红星, 杨云, 等. 电针对功能性消化不良大鼠胃肠动力及VIP和CGRP水平的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2017,37(3): 360-364.

[35] 潘小丽, 范建超, 徐派的, 等. 电针对功能性消化不良肝郁脾虚模型大鼠胃电节律及胃窦Cajal间质细胞表达的影响[J]. 中医杂志, 2018,59(17):1503-1506.

[36] KULIG G, KLUPINRS KAG, JOCHYMSKI C, et al. Evaluation of the number of enterochromaffin cells in gastric mucosa in subjects with functional dyspepsia. Pol Merkur Lekarski. 2009;26(155):370-372.

[37] COSTE B, MATHUR J, SCHMIDT M, et al. Piezo1 and Piezo2 Are Essential Components of Distinct Mechanically Activated Cation Channels. Science. 2010;330(6000):55-60.

[38] 高瑞桐, 许林琪, 李峰. 机械敏感性离子通道蛋白Piezo在机体机械转导中作用的研究进展[J]. 吉林大学学报(医学版), 2019,45(3): 725-730.

[39] YANG J, ZHANG J, YANG H, et al. The potential role of Piezo2 in the mediation of visceral sensation. Neurosci Lett. 2016:158-163.

[40] PARNELL E, SMITH BO, YARWOOD SJ. The cAMP sensors, EPAC1 and EPAC2, display distinct subcellular distributions despite sharing a common nuclear pore localisation signal. Cell Signal. 2015;27(5): 996-999.

[41] PEREIRA L, REHMANN H, LAO DH, et al. Novel Epac fluorescent ligand reveals distinct Epac1 vs Epac2 distribution and function in Cardiomyocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(13):3991-3996.

[42] 杨静, 李坤, 雷晓斐, 等. Epac1对大鼠内脏高敏感的调控作用及其机制[J]. 山东医药, 2016,56(24):9-12.

(责任编辑: GD, ZN, SX)