

电针上巨虚穴、尺泽穴对溃疡性结肠炎大鼠肺、肠肿瘤坏死因子 α 及结肠病理的比较研究

李胜杰 李志同 杨伟宁 赵雅芳 解桔萍

【摘要】 目的 观察电针上巨虚穴、尺泽穴对溃疡性结肠炎大鼠不同器官中肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 含量及结肠黏膜病理改变的影响,探讨大肠下合穴上巨虚及肺经合穴尺泽对溃疡性结肠炎的影响及机制。**方法** 将 Wistar 雄性大鼠 28 只随机分为正常组、模型组、上巨虚组及尺泽组,每组 7 只。采用乙酸灌肠法制备溃疡性结肠炎模型。于造模后第 3 天起,上巨虚组电针双侧上巨虚穴,尺泽组电针双侧尺泽穴,每次 15 分,每天一次,频率 2/100 Hz,连续治疗 7 天;其余两组只抓取、束缚,不做治疗,每次 15 分,每天一次,7 天后取材。放射免疫法测定肺、结肠 TNF- α 的含量;结肠组织 HE 染色,观察病理形态学变化。**结果** (1) TNF- α 的含量:结肠组织中,模型组显著高于正常组 ($P < 0.05$),上巨虚组、尺泽组显著低于模型组 (P 值均 < 0.05),两治疗组比较未见显著性差异 ($P > 0.05$);肺脏中,尺泽组 TNF- α 含量显著低于上巨虚组 ($P < 0.05$),其他组间则未见显著性差异 (P 值均 > 0.05)。(2) 结肠与肺的比值,上巨虚组显著低于模型组和尺泽组 (P 值均 < 0.05),其他各组间未见显著性差异 ($P > 0.05$)。(3) 模型组大鼠结肠光镜观察可见溃疡形成和炎症,上巨虚组和尺泽组大鼠结肠黏膜病理损伤减轻,其中上巨虚组减轻更为明显。**结论** (1) 上巨虚和尺泽分别作为肺经的合穴和大肠的下合穴,均可降低 TNF- α 在结肠中的含量,有效阻抑 UC 所致的结肠炎症反应及改善结肠粘膜的病理改变,为“合主逆气而泄”、“合治内府”理论提供了实验依据。(2) 上巨虚与尺泽作用的特异性靶器官可能不同,上巨虚对肠源性腹泻更有效,而尺泽对于肠炎引起的肺部损伤较上巨虚更有优势。

【关键词】 电针; 上巨虚; 尺泽; 溃疡性结肠炎; 肿瘤坏死因子 α

【中图分类号】 R245.9+7 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2014.06.004

Comparative study of electroacupuncture at Shangjuxu (ST 37) and Chize (LU 5) on TNF-alpha content in the lung and colon and morphology of colonic mucosa in rats with ulcerative colitis LI

Sheng-jie, LI Zhi-tong, YANG Wei-ning, et al. School of Acupuncture, Moxibustion and Tuina, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Corresponding author: XIE Jie-ping, E-mail: xiejieping@sina.com

【Abstract】 Objective To probe into the mechanisms of electroacupuncture (EA) at Shangjuxu (ST 37, lower He-sea acupoint) and Chize (LU 5, He-sea acupoint) for treatment of the ulcerative colitis (UC), through observing TNF-Alpha content in different organs and morphology of colonic mucosa in UC rats. **Methods** Twenty-eight male Wistar rats were randomly divided into 4 groups: a control group, a model group, an EA-Shangjuxu (EA-ST 37) group and an EA-Chize (EA-LU 5) group, 7 rats in each group. The UC rat model was made with by enema with 10% acetic acid, and the change of TNF- α content in the Lung and Colon and morphology of colonic mucosa after EA at Shangjuxu (ST 37) and Chize (LU

基金项目:北京中医药大学自主选题项目(2011-JYBZZ-XS099)

作者单位:100029 北京中医药大学针灸推拿学院[李胜杰(硕士研究生)、李志同(硕士研究生)、杨伟宁(硕士研究生)、赵雅芳、解桔萍]

作者简介:李胜杰(1986-),女,2011 级在读硕士研究生。研究方向:腧穴特异性研究。E-mail: lishengjie1201@163.com

通讯作者:解桔萍(1961-),女,博士,教授,主任医师。研究方向:腧穴特异性研究。E-mail: xiejieping@sina.com

5) were observed. The treatment began from day 3 after establishing models. EA(2/100HZ) was applied to bilateral Chize (LU 5) and Chize (LU 5) for 15 min, once daily for 7 days. The control group and model group bound only for 15min, once daily for 7 days. TNF- α content in the lung and colon was determined by RIA. Morphology of colonic mucosa were observed under a light microscope by hematoxylin-eosin (HE) Staining. **Results** (1) EA at Shangjuxu (ST 37) and Chize (LU 5) could significantly decrease the TNF- α level in the colic tissues with significant differences as compared with the model group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the TNF- α content was obviously increased in the model group ($P < 0.05$). No significant difference can be seen between EA-Shangjuxu group and EA-Chize group. The TNF- α content in EA-Chize group was significantly decreased in the lung tissues comparing with EA-Shangjuxu group ($P < 0.05$). No significant difference can be seen among the other groups ($P > 0.05$). (2) The ratio of TNF levels in the colon and lung in EA-Shangjuxu group was significantly decreased comparing with the model group ($P < 0.05$) and EA-Chize group ($P < 0.05$). No significant differences among the other groups ($P > 0.05$). (3) Ulceration and inflammation of colon can be observed in the model group. Pathological lesions of colonic mucosa were reduced in the EA-Shangjuxu group and EA-Chize group. The EA-Shangjuxu group was more obvious. **Conclusions** (1) EA at Shangjuxu (ST 37) and Chize (LU 5) could significantly decrease the TNF- α level in the colic tissues, effectively prevent inflammatory response of colon and improving pathological changes of colonic mucosa, which has provided the experimental basis for the theory of "he-sea points governing vomiting and diarrhea" and "Curing viscera diseases by he-sea points". (2) Maybe Shangjuxu (ST 37) and Chize (LU 5) have different target organs. Shangjuxu (ST 37) is better for enterogenic diarrhea, while Chize (LU 5) has more advantages than Shangjuxu (ST 37) for lung injury caused by enteritis.

[Keywords] Electroacupuncture; Shangjuxu (ST 37); Chize (LU 5); Ulcerative Colitis; Tumor necrosis factor α

“合穴”是五输穴之一,是脉气由此深入,进而汇合于脏腑的部位。《难经·六十八难》曰“合主逆气而泄”,其本义为合穴主治“呕吐、泄泻”等胃肠类疾病^[1]。尺泽为肺经合穴,临床有报道使用尺泽穴治疗呕吐、泄泻,疗效显著^[2-3]。“下合穴”是六腑下合于足三阳经的特定穴,《灵枢·邪气脏腑病形》提出“合治内府”,即“下合穴”多用于治疗相应腑病。上巨虚为大肠的“下合穴”,可用于治疗大肠病变,临床试验也证明上巨虚是治疗腹痛、腹泻、便秘等肠腑病的主穴之一^[4-5]。那么,五输穴中的合穴与大肠下合穴治疗肠腑病的作用是否一致?为研究这个问题,本实验建立了溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)大鼠模型,通过观察电针刺激双侧上巨虚穴及尺泽穴,观察结肠、肺内肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)含量的变化,探讨大肠下合穴及肺经合穴在治疗肠腑疾病时的作用规律。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级 Wistar 雄性大鼠 21 只,6 周龄,体重 180 ~ 220g,于 2011 年 5 月购自北京市海淀区兴隆实验动

物养殖厂,合格证号:SCXK-(军)2007-004。普通饲料喂养,自由进水。饲养条件:动物置于清洁柜中,12 小时白昼,12 小时黑夜,温度(23 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,湿度 50% 左右。

1.2 主要试剂与仪器

冰醋酸(批号:10000292)、乌拉坦(批号:T20070921),由北京化学试剂公司提供;TNF- α 放免试剂盒(批号:20080305),由北京康源瑞得生物技术有限公司提供;佳健电子针灸治疗仪 CMNS6-1 型,北京健乐康医疗器械有限公司;汉医针灸针(用规格 0.25 mm \times 25 mm 自制),天津杏林书院医疗器械有限公司;AND 公司电子秤 ER-182A;eppendorf 公司高速冷冻离心机 5810R。

1.3 模型制备

根据冰醋酸造模方法^[6]改良,造模前 24 小时禁食,可自由饮水。造模时,抓取大鼠,以头低脚高位,将直径为 2 mm 的聚氯乙烯管插入大鼠肛门内 8 cm,按 10% 的冰醋酸 1 ml/100 g 体重缓慢注入后,提起尾巴倒置 20 秒,造模 1 次即可。造模后,根据行为学观察,大鼠出现稀便及光镜下病理见结肠黏膜上皮组织充血、水肿、溃疡、炎性细胞浸润,腺体结构不完整,则可判断造模成功。

1.4 分组与处理

将 28 只大鼠按随机法分为正常组、模型组、上巨虚组、尺泽组,每组 7 只。正常组在第 1 天肛门灌肠注入与模型组等量的生理盐水,模型组、上巨虚组及尺泽组用同样方法在第 1 天肛门灌注冰醋酸造模。

参照大鼠标准穴位图谱^[7]及拟人比照法取穴:尺泽:大鼠上肢肘横纹凹陷处,上巨虚:大鼠后肢足三里向下约 5 mm 处。电针方法:将毫针刺入穴区 3~5 mm,另一针刺入非穴区皮下(在经脉线方向,距离穴位 1 mm),两针接电子针灸治疗仪,疏密波,频率 2/100 HZ,刺激强度以动物肢体微微抖动为度,波宽为 0.175 ms,留针 15 分。上巨虚、尺泽组从第 3 天下午 2 点起,开始治疗,连续治疗 7 天;正常组、模型组与上巨虚组同时抓取,每天束缚 15 分,不做针刺治疗,7 天后取材。实验中,模型组、上巨虚组、尺泽组大鼠各有 1 只死亡,共 3 只大鼠脱落。最终纳入数据统计的共 28 只大鼠,其中正常组、模型组、上巨虚组、尺泽组,每组各 7 只。

1.5 组织匀浆液制备

各组大鼠处死后,迅速分离右肺、结肠,生理盐水洗净后,各组织切取约 200 mg,与生理盐水按 1:4 放入匀浆管中,放置在冰上研磨,制成匀浆液,以 3500 r/min 离心 15 分钟,取上清液, -20℃ 冻存备用。

1.6 观测指标及方法

(1) 观察各组大鼠毛发、精神、饮食、粪便、体重等一般情况。各组大鼠腹主动脉放血处死后,迅速分离出距肛门 3 cm 以上的结肠组织,肉眼观察结肠粘膜损伤情况。(2) 结肠粘膜组织病理切片:将分离出的结肠组织,常规石蜡包埋,切片,HE 染色,光镜下观察病理变化。(3) 放免法检测肺、结肠 TNF-α 含量,按试剂盒说明操作。

1.7 统计学处理

实验数据用 SPSS 17.0 软件包进行统计学处理,若数据呈正态分布,方差齐,采用单因素方差分析(one-way ANOVA),多组间采用 LSD 法进行两两比较,数据以均值 ± 标准误,即表示;若数据呈非正态分布,用秩和检验,用两个独立非参进行两两比较,数据以中位数(四分位间距),即 M(QR)表示。以 $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 一般情况

正常组大鼠一般情况良好。模型组、上巨虚组、尺泽组大鼠造模 2 天后出现稀便,肛门附近有粪便残留物,并伴有精神不振,厌食,体重下降等。电针治疗 7 天后,模型组大鼠大便仍不成形,尺泽组稀便基本消失或仍有软便,上巨虚组大鼠稀便消失,食欲及精神情况良好。

2.2 电针对 UC 大鼠结肠中 TNF-α 含量的影响

各组数据经单因素方差分析, $F = 3.092$, $P = 0.047 < 0.05$,差异有显著统计学意义。经 LSD 法两两比较,结肠中 TNF-α 在模型组中的含量显著高于正常组($P = 0.014 < 0.05$)。上巨虚组、尺泽组结肠中 TNF-α 的含量显著低于模型组(上巨虚组 $P = 0.031$ 、尺泽组 $P = 0.026$, P 值均 < 0.05)。上巨虚组与尺泽组两者水平相当,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.3 电针对 UC 大鼠肺中 TNF-α 含量的影响

各组数据均正态,方差不齐,经秩和检验, $\chi^2 = 4.843$, $P = 0.184 > 0.05$,无显著性差异。经两个独立非参进行两两比较,尺泽组肺中 TNF-α 含量显著低于上巨虚组($Z = -2.000$, $P = 0.046 < 0.05$),其他组间则未见显著性差异(P 值均 > 0.05)。见表 1。

2.4 TNF-α 含量在结肠与肺中的比值

各组数据经秩和检验, $\chi^2 = 9.068$, $P = 0.028 < 0.05$,差异有显著统计学意义。经两个独立非参进行两两比较,模型组与正常组相比,差异无显著统计学意义($Z = -1.868$, $P = 0.062 > 0.05$)。与模型组相比,上巨虚组和尺泽组的比值均有降低趋势,尺泽组无显著性差异($Z = -0.286$, $P = 0.775 > 0.05$),上巨虚组有显著性差异($Z = -2.492$, $P = 0.013 < 0.05$)。上巨虚组的比值低于尺泽组的比值,差异有统计学意义($Z = -2.143$, $P = 0.032 < 0.05$)。见表 1。

表 1 TNF-α 含量的变化(pg/ml, $n = 7$)

组别	结肠	肺	结肠/肺
正常组	34.269 ± 3.749	52.630(27.060)	0.647(0.415)
模型组	54.529 ± 5.961 ^a	55.175(35.239)	0.873(0.885)
尺泽组	37.082 ± 4.549 ^b	37.095(22.501)	0.839(0.732)
上巨虚组	37.681 ± 6.023 ^b	60.938(63.744) ^c	0.511(0.295) ^{bc}

注:与正常组相比,^a $P < 0.05$;与模型组相比,^b $P < 0.05$;与尺泽组相比,^c $P < 0.05$

2.5 结肠肉眼观察

正常组大鼠结肠组织肉眼未见异常。模型组大鼠结肠组织肉眼可见明显增厚,充血,部分肠管与周围组织明显粘连,纵向剖开结肠后可以观察到结肠组织表面覆盖有黄色伪膜,溃疡面周围明显充血;尺泽组大鼠结肠组织肉眼可见肠壁轻度增厚及充血,纵向剖开结肠后可见散在的溃疡面,其面积小于模型组;上巨虚组大鼠结肠组织肉眼未见明显增厚、充血,纵向剖开结肠后肠壁偶见白色点状溃疡面。相同组别内的大鼠病变程度大致相同。

2.6 结肠组织病理变化

结肠组织病理变化如图 1 所示。

正常组:结肠黏膜上皮组织完好,腺体排列整齐,结构清晰,无炎性细胞浸润,无溃疡、无糜烂,黏膜及黏膜下的肌层组织未见明显异常。

模型组:结肠黏膜上皮组织溃疡、糜烂,部分结肠黏膜缺损,腺体结构消失,间质明显出现水肿、充血,黏膜及黏膜下的肌层组织中有大量中性炎性细胞浸润;

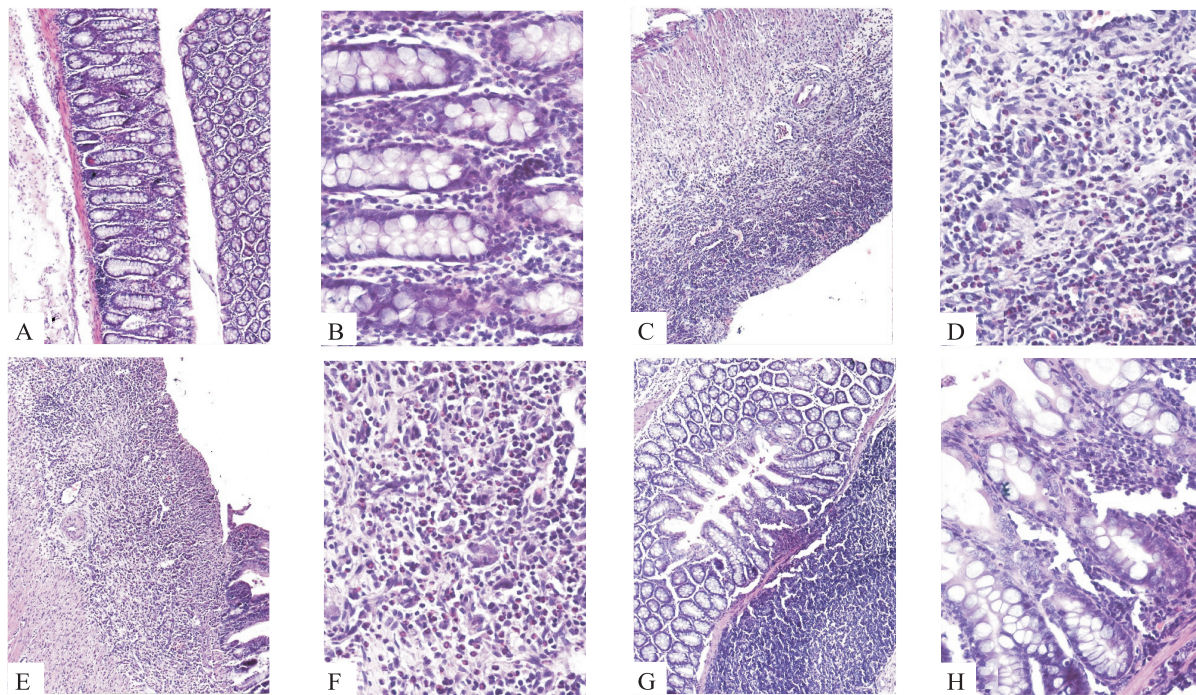
尺泽组:结肠黏膜组织充血、水肿程度有所减轻,溃疡处黏膜上皮组织的腺体覆盖不完全,炎性细胞的浸润减少。

上巨虚组:大鼠结肠黏膜组织完整,腺体结构排列尚且规则,间质中未见明显水肿、充血,腺体间有纤维组织修复的疤痕组织形成。

3 讨论

TNF- α 是由巨噬细胞分泌的一种小分子蛋白,是一个多效的炎症性细胞因子,在炎症的早期首先释放,通过一系列的细胞因子产生急性反应期的细胞毒性作用,从而促炎^[8]。研究表明 TNF- α 参与溃疡性结肠炎的发病^[9],可协同干扰素 γ 改变肠上皮细胞的形态结构和屏障特性,导致黏膜通透性增加,还可诱导结肠上皮细胞凋亡,促进 UC 的发生^[10]。多数临床研究证实,UC 患者血清 TNF- α 明显增高,其表达水平与病情严重程度呈正相关^[11-13]。Trine Olsen 等^[14] 研究提示 TNF- α 在 UC 中的表达可作为炎症分级的相关指标并与内镜分级相关。可见,TNF- α 是 UC 发病过程中的重要细胞因子。

本实验结果显示:模型组结肠组织内 TNF- α 含量较正常组显著升高,该现象与 TNF- α 的促炎作用及前人研究结果一致^[15]。电针治疗后,上巨虚组、尺泽组结肠内 TNF- α 的含量显著低于模型组($P < 0.05$),说明上巨虚穴和尺泽穴均可以阻抑 UC 大鼠结肠内炎症反应程度。模型组结肠病理见:结肠黏膜上皮组织充血、水肿、溃疡、炎性细胞浸润,证明实验造模成功。光镜下,上巨虚组结肠黏膜及腺体结构较尺泽组完整且排列规则,水肿、充血及炎症情况均较尺泽组程度减轻。结合笔者团队对 UC 大



A 正常组($\times 100$) B 正常组($\times 400$) C 模型组($\times 100$) D 模型组($\times 400$)
E 尺泽组($\times 100$) F 尺泽组($\times 400$) G 上巨虚组($\times 100$) H 上巨虚组($\times 400$)

图 1 结肠组织病理切片(HE 染色)

鼠肠系膜微循环的研究,发现上巨虚比尺泽在改善肠系膜微循环方面更为显著^[16],因此,笔者团队认为上巨虚比尺泽穴在减轻 UC 所致的大鼠结肠组织充血水肿,以及改善 UC 的炎症方面作用更优。

造模后,肺中 TNF- α 含量较正常组有升高趋势,但未见显著性差异,说明结肠炎症对肺脏炎症造成了一定影响,但尚不明显。电针后,尺泽组较上巨虚组在肺中的 TNF- α 显著降低($P < 0.05$),说明尺泽穴在改善肺部炎症方面较上巨虚有相对优势。通过结肠与肺中 TNF- α 含量的比值,观察 TNF- α 在两脏器之间的分布变化规律,以探讨肺与大肠的关系及上巨虚与尺泽的作用特点有何不同。从本实验结果看,正常组、模型组、尺泽组比较均无显著性差异,但是,上巨虚组却较尺泽组显著降低,从上巨虚组肺中 TNF- α 的实际数值看,这个变化主要是因为上巨虚组肺中 TNF- α 增加的结果,这意味着上巨虚未能有效阻抑肠炎对肺部的影响,而尺泽则有效的阻抑了肠炎对肺部的影响,因此结肠与肺中 TNF- α 含量的比值变化反而不显著。同时,说明电针穴位后,上巨虚组肠中的 TNF- α 在肺肠之间产生了一定的位移,即大肠中的 TNF- α 向肺中位移,这印证了中医理论中“肺与大肠相表里”的认识是正确的。因为尺泽是肺经的合穴,因此对肺损伤的保护则更为明显,故尺泽组 TNF- α 在肺肠之间位移反而不显著。

本实验结果证实:肺经“合穴”、大肠“下合穴”均可治疗 UC 引起的“泄泻”,但上巨虚穴作为大肠的“下合穴”较肺经的“合穴”尺泽治疗 UC 具有相对特异性。笔者团队可以认为,“合穴”与“下合穴”治疗腹泻时,大肠“下合穴”上巨虚对于肠源性腹泻的治疗效果优于“合穴”尺泽,而尺泽对于肠源性腹泻效果虽不如上巨虚,但对于肠源性炎症引起的肺部损伤,尺泽则优于上巨虚,说明二者的特异性靶器官不同,尺泽主要在肺,而上巨虚主要在肠。结合本课题组前期实验结果^[17],是否尺泽对于肺源性的肠炎腹泻更有效,值得进一步研究,对于进一步理解“合穴”与“下合穴”的内涵具有重要意义。

4 结论

(1) 尺泽和上巨虚分别作为肺经的合穴和大肠的下合穴,均可降低 TNF- α 在结肠中的含量,有效阻抑 UC 所致的结肠炎症反应及改善结肠粘膜的病理改变,为“合主逆气而泄”、“合治内府”理论提供了实验依据。(2) 尺泽与上巨虚作用的特异性靶器

官可能不同,上巨虚对肠源性腹泻更有效,而尺泽对于肠炎引起的肺部损伤较上巨虚更有优势。

参 考 文 献

- [1] 李胜杰,解枯萍,李志同,等. 关于“合主逆气而泄”的古今文献研究与思考[J]. 北京中医药大学学报(中医临床版), 2013, 20(5): 36-39.
- [2] 郭文炳. 针刺尺泽治愈急性吐泻[J]. 上海针灸杂志, 1986, 5(2): 10.
- [3] 黄金宝,彭素敏. 尺泽静脉放血治疗急性胃肠炎[J]. 中国针灸, 1999, 6(7): 42.
- [4] 王素玲. 针刺下合穴治疗慢性细菌性痢疾 87 例[J]. 河南中医, 2005, 25(6): 63.
- [5] 张昶,谭程. 电针天枢上巨虚治疗糖尿病性便秘随机对照研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2001, 12(4): 114-116.
- [6] 于海食,洪纛,王玉蓉,等. 肠安康新方胃肠分解给药对大鼠乙酸性结肠炎的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(6): 385-389.
- [7] 林文注,王佩. 实验针灸学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1994: 290.
- [8] 王彦霞. 血管活性肠肽对慢性阻塞性肺疾病患者 PBMC 中 NF- κ B 及 TNF- α 的影响[D]. 河北医科大学, 2009.
- [9] Leon S A, Shapiro B, Sklaroff D M, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy[J]. Cancer Res, 1977, 37(3): 646-650.
- [10] Schinzari F, Armuzzi A, De Pascalis B, et al. Tumor necrosis factor-alpha antagonism improves endothelial dysfunction in patients with Crohn's disease[J]. Clin Pharmacol Ther, 2008, 83(1): 70-76.
- [11] 宋爱玲. TNF- α 、IL-6、IL-8 与溃疡性结肠炎严重程度相关研究[J]. 中国实用医药, 2008, 3(36): 3-4.
- [12] 王觅柱,邹彩虹,陈吉. 溃疡性结肠炎患者血清 IL-1B、TNF- α 和 IL-10 的表达及其意义[J]. 国际消化病杂志, 2009, 2(5): 362-364.
- [13] 贾长河,许泼实,康谊. 溃疡性结肠炎患者血清 IL-8、IL-10、TNF- α 的水平及临床意义[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2008, 22(8): 574-578.
- [14] Trine Olsen, Rasmus Goll, Cui Guang-lin. Tissue levels of tumor necrosis factor-alpha correlates with grade of inflammation in untreated ulcerative colitis[J]. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 2007, 42(11): 1315-1317.
- [15] Wang Xiao-Mei, Lu Yuan, Wu Lu-Yi, et al. Moxibustion inhibits interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha and modulates intestinal flora in rat with ulcerative colitis[J]. World Journal of Gastroenterology, 2012, 18(46): 6819-6828.
- [16] 李志同. 电针合穴(尺泽)、下合穴(上巨虚)对 UC 大鼠肠微循环及 VIP 等的影响研究[D]. 北京中医药大学, 2013.
- [17] 杨伟宁. 电针合穴、下合穴对 COPD 大鼠肠系膜微循环及 VIP 等的影响研究[D]. 北京中医药大学, 2012.

(收稿日期:2013-12-05)

(本文编辑:黄凡)