

艾灸治疗对腹泻型肠易激综合征(IBS - D) 大鼠肠组织 NO 的影响*

吴飞扬¹ 仝理¹ 吴立斌¹ 何雨霞¹ 储浩然**

(1. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230038; 2. 安徽中医药大学第二附属医院, 安徽 合肥 230061)

摘要:目的 通过对腹泻型肠易激综合征大鼠结肠组织中一氧化氮(Nitric Oxide, NO)、稀便率及内脏敏感性的测定,探讨艾灸治疗腹泻型肠易激综合征(Diarrhea Predominant Irritable Bowel Syndrome, IBS-D)的机制。方法 把大鼠随机分为空白组、模型组、艾灸组,每组10只。模型组和艾灸组建立IBS-D模型。艾灸组温和灸“上巨虚”“天枢”穴,每穴灸30 min,每d一次,连续施灸7 d后测定肠组织中NO含量和内脏敏感性。结果 治疗后艾灸组稀便率低于模型组($p < 0.05$)。大鼠肠组织NO水平空白组低于艾灸组、艾灸组低于模型组($p < 0.05$)。腹部回缩反射的最小容量阈值艾灸组高于模型组、艾灸干预后高于艾灸干预前($p < 0.05$)。NO水平与稀便率呈正相关($0 < r_1 < 1, p < 0.05$),NO水平与大鼠腹壁收缩反射的最小容量痛阈值呈负相关($-1 < r_2 < 0, p < 0.05$)。结论 艾灸天枢和上巨虚通过影响IBS-D大鼠结肠组织中NO水平,改善IBS-D大鼠的肠道运动和降低肠道敏感性,从而改善IBS-D的腹泻症状。

关键词: 艾灸; 腹泻型肠易激综合征; NO; 稀便率; 内脏敏感性

中图分类号: 574.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-1340(2021)03-0092-05

DOI: 10.13424/j.cnki.jsctcm.2021.03.020

肠易激综合征(Irritable Bowel Syndrome, IBS)是与正常肠蠕动改变相关的功能性胃肠疾病。IBS的临床症状包括腹痛或不适,大便不规则、腹胀和其它合并症^[1]。IBS在临床有多种亚型,腹泻型在临床上较为多见,严重影响患者的工作家庭,降低患者的生活质量^[2-3]。在亚洲,欧洲和美国进行了许多针灸研究,使用艾灸的随机对照试验相对较少^[4]。我们课题组通过长期、系统地对艾灸治疗IBS-D的临床观察,认为艾灸对其有独特的疗效,能显著改善患者的症状、体征,并通过动物实验证明艾灸上巨虚、天枢可降低IBS-D模型大鼠血清炎症因子和改善大鼠的肠功能紊乱状态^[5-6]。NO与IBS发病有密切相关性,可影响结肠初级传入神经兴奋性增加导致疼痛和内脏超敏反应^[7-8]。本研究通过分析大鼠结肠组织中的NO水平、内脏敏感性,探索艾灸治疗IBS-D的机制。

1 材料

1.1 试验对象 SD雄性6月龄大鼠30只(220.18 ± 14.089 g),许可证号: sexk(皖)2017-001,购自安徽医科大学实验动物中心。对SD大鼠所使用的各种处理方法均遵照动物的使用及伦理学规定。按随机数表方法,随机分为空白组、模型组、艾灸组,每组10只。

1.2 仪器和药品 细艾条(批号:20181006、厂家:南阳宛北艾绒厂),番泻叶(安徽中医药大学第二附属医院制剂提供),一氧化氮检测试剂盒(批号:S0021 & 052218190219,厂家:碧云天生物技术),细胞与组织裂解液(批号:S3090 & 081618190122,厂家:碧云天生物技术),酶标仪(型号:RT-6000,厂家:雷杜),漩涡混合器(型号:GL-88B,厂家:其林贝尔仪器制造公司),离心机(型号:JW3021HR,厂家:安徽嘉文),电热恒温箱

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81774399);安徽省名老中医储浩然工作室建设项目(卫办秘[2015]404号)

** 通讯作者:储浩然,主任医师,硕士生导师。E-mail:chuhaoran62@163.com

(型号:DNP-9052BS-Ⅲ、厂家:上海三发)。

2 实验方法

2.1 造模 IBS-D大鼠模型采用精神心理应激法加化学刺激法,本实验中采用比较简单易行的束缚应激作为精神心理应激,化学刺激物选用具有中医特色的番泻叶制剂。将模型组和艾灸组大鼠称重记录,按照每100 g体质量1 mL换算灌胃量。将冰箱中的番泻叶制剂取出复温至室温,用注射器抽取适宜灌胃量浓度为0.45 g/mL番泻叶制剂进行灌胃。待所有大鼠灌胃完毕,用粗制棉绳束缚大鼠双后肢,限制其活动,放入标记序号的饲养箱中,记录开始束缚时间并用闹钟定时1 h,1 h后解开束缚放回普通饲养箱。连续14天后行稀便率和内脏敏感性测试,达到IBS-D临床诊断标准^[9-10]。

2.2 空白组处理 将空白组大鼠称重记录,按照每100 g体重1 mL换算灌胃量,用注射器抽取适宜灌胃量蒸馏水进行灌胃,不予以束缚,连续14天行稀便率和内脏敏感性测试。

2.3 艾灸治疗 艾灸组大鼠取双侧上巨虚、天枢(参照林文注《实验针灸学》中大鼠穴位的定位)。将艾灸组大鼠置于特制大鼠艾灸架限制其活动,采用直径0.5 cm细艾条,点燃后悬于穴位上,燃烧点距离穴位2 cm~3 cm,每天1次,每次每穴灸30 min,每日一次,连续7 d。

2.4 观察指标与检测

2.4.1 稀便率的计算 在造模和治疗后一天,将各组大鼠单笼饲养。笼下放置滤纸,滤纸有污迹计为稀便,等待6 h,计算稀便率。 $(R = L/A \times 100\%, R$ 稀便率, L 稀便数, A 总便数)。

2.4.2 内脏敏感性评估 采用结直肠球囊扩张反射测定肠内脏敏感性。在两次稀便率试验结束后实验大鼠禁食不禁水12 h,适量七氟烷中轻度麻醉大鼠,将大鼠固定于大号透明实验鼠固定器上,经肛门将润滑后的8F导尿管插入肠内,球囊末端距肛门约为1 cm,用胶带将导尿管在大鼠尾根部固定在合适位置。大鼠清醒后,待其适应,用注射器将26~28℃生理盐水注入球囊内,腹壁收缩反射被观察到时,记下使大鼠腹壁收缩反射的最小容量阈值。恢复20 min后再次进行测试,记

录3次测试值得出平均值,为该大鼠的最小容量阈值。

2.4.3 测定NO含量 第二次内脏敏感性评估进行结束后,经腹腔注射10%的水合氯醛(3 mL/kg)麻醉,打开腹腔找到肠组织,在肛门到近端的结肠中取1 cm结肠,剪开结肠,在装有生理盐水的瓶中清洗干净后,把结肠组织剪切成细小的碎片。按照每20毫克组织加入100~200微升裂解液的比例加入裂解液。用玻璃匀浆器匀浆。充分裂解后,10000~14000 g离心3~5 min,取上清液0.9% NaCl稀释备用。取出Griess Reagent I和II,使回复室温。0.9% NaCl稀释标准品。按50 μL/孔,在96孔板中加入标准品及结肠组织上清液。按50 μL/孔,在各孔中加入室温Griess Reagent I。按50 μL/孔,各孔中加入室温Griess Reagent II。酶标仪540 nm测定吸光度。

2.5 统计学方法 采用SPSS21.0软件处理数据,符合正态分布用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组与组之间的差异采用方差分析比较,若方差齐,用LSD法分析,若方差不齐,则使用Tamhan's法分析;配对样本 t 检验用于干预前后比较。有统计学意义时设为 $p < 0.05$ 。相关性分析采用Pearson或Spearman相关系数,若两组均服从正态分布,则使用双变量相关分析中的Pearson相关分析;若两组不全部服从正态分布,则使用Spearman相关分析。若 $p < 0.05$,为两个变量存在相关性,若相关系数为 $0 < r < 1$ 之间,为呈正相关,在 $-1 < r < 0$ 之间,为呈负相关。

3 结果

3.1 三组大鼠肠组织NO水平、稀便率、内脏敏感性 艾灸组和模型组在造模后稀便率均高于空白组($p < 0.05$)。艾灸组稀便率在治疗后低于模型组($p < 0.05$)。大鼠腹壁收缩反射的最小容量阈值在模型组和未干预的温和艾灸组均低于正常组($p < 0.05$);温和灸干预之后,大鼠腹壁收缩反射的最小容量痛阈值相较于模型组均偏高($p < 0.05$)。三组大鼠肠组织NO水平具有可比性($p < 0.05$)。与空白组比较,模型组和艾灸组大鼠肠组织NO水平升高($p < 0.05$);与模型组比较,艾灸组大鼠肠组织NO降低($p < 0.05$)。

表 1 各组稀便率、最小容量阈值和肠组织 NO 的比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	治疗前稀便率(%)	治疗后稀便率(%)	治疗前最小容量阈值(mL)	治疗后最小容量阈值(ml)	NO (μmol/L)
空白组	0	0	1.4990 ± 0.1336	1.4870 ± 0.5643	25.3197 ± 1.35100
模型组	49.3000 ± 8.7056 *	39.7000 ± 3.8887 *	0.8950 ± 0.0817 *	1.0460 ± 0.4190 *	37.8580 ± 1.19943 *
艾灸组	45.9000 ± 7.2180 *	11.4000 ± 12.7819 *△▲	0.8640 ± 0.0937 *	1.3630 ± 0.1118 *△▲	31.4803 ± 1.54342 *△

注:各组稀便率与治疗前比较, * $p < 0.05$;与对照组比较, △ $p < 0.05$ 。各组最小容量阈值与空白组比较, * $p < 0.05$;与模型组比较, △ $p < 0.05$;与治疗前比较, ▲ $P < 0.05$ 。肠组织 NO 与正常组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, △ $P < 0.05$ 。

3.2 三组大鼠肠组织 NO 水平与稀便率、内脏敏感性相关性分析 根据散点图判断大鼠结肠组织 NO 水平与稀便率、内脏敏感性之间存在线性关系,分析表明 NO 水平与稀便率呈正相关

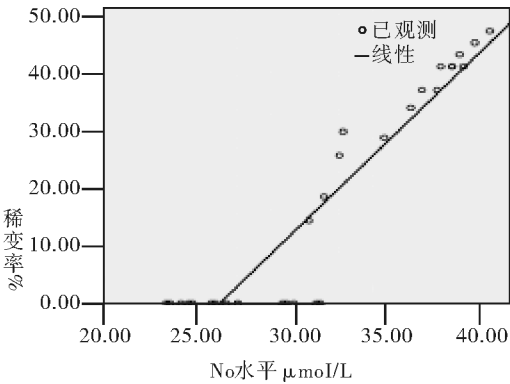


图 1 注:与稀便率相关性 $r_1 = 0.932, p < 0.05$

4 讨论

腹泻型肠易激综合征属中医“泄泻”范畴,针灸治疗常涉及到的经脉以足阳明胃经、足太阳膀胱经和任脉,特定穴以募穴、下合穴、背俞穴、五输穴。天枢穴气血强盛,气血物质与大肠经特性相符,向外传输是输入大肠经所在的天部层次,为大肠经气血的主要来源之处,对于大肠生理功能具有双向调节作用。《内经》曰“合治内腑”,上巨虚为大肠下合穴,多用于肠胃功能失调性疾病,对功能性肠病具有调节作用^[11]。储浩然主任^[12]通过临床与实验室研究反复验证了艾灸以及针刺天枢、上巨虚穴对 IBS-D 治疗的有效性。张艳倩等^[13]基于数据挖掘的针灸治疗腹泻型肠易激综合征的取穴规律研究中发现天枢穴使用频次最高的为天枢、足三里、上巨虚。大肠为传导之官,其功能失常而为泄泻,故治疗取大肠之下合穴上巨虚、募穴天枢为主穴,起到调理肠胃气机、泌别清浊的作用。艾灸作为一种有效的 IBS-D 治疗方法。热刺激、光辐射和艾烟的组合对改善 IBS-D 模型大鼠的

($0 < r_1 < 1, P < 0.05$)图 1;NO 水平与大鼠腹壁收缩反射的最小容量痛阈值呈负相关($-1 < r_2 < 0, p < 0.05$)图 2。

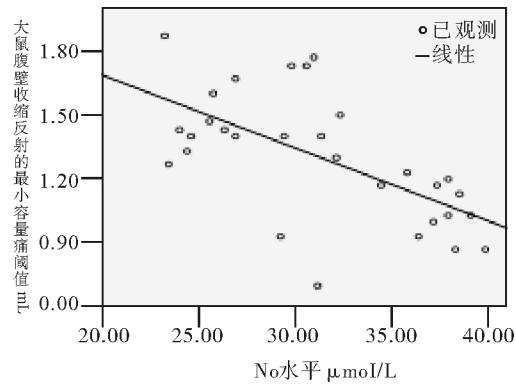


图 2 注:与最小容量阈值 $r_2 = -0.620, p < 0.05$

内脏疼痛和水代谢具有最佳效果。其中,热刺激和光辐射可能起主要作用^[14]。临床艾灸场所内有害物质浓度远低于各毒理试验中艾烟可对机体产生不良效应的浓度。在临床应用中可有效保证艾灸疗法的安全性^[15]。此外艾灸治疗方式温和、操作简便,治疗时患者感到温热舒适,为大多数患者所接受。

相关研究表明 IBS 患者的结肠组织 NO 水平显著高于健康对照组,与一氧化氮合成酶基因有关,该基因激活可促进 NO 产生,有助于抗微生物和抗病原活性。通过诱导型一氧化氮合成酶(Induced nitric oxide synthase, iNOS)的上调产生的 NO 包含多种作用,其利弊取决于产生的数量,持续时间和解剖部位。在炎症性肠病中,iNOS 介导的 NO 产生成为免疫反应失调的一部分,从而导致慢性炎症性疾病。肠上皮细胞中 NO 的产生增加与肠道炎症的发生和维持密切相关^[16-17]。神经源性一氧化氮合成酶(Neurogenic nitric oxide synthase, nNOS)是应激状态下 Cajal 间质细胞的

生物标志物,活化的 nNOS 会在肌间神经丛中合成 NO,并通过平滑肌松弛在蠕动和结肠转运时间中发挥重要作用。IBS-D 大鼠肠运动活跃促进粪便运动,从而缩短了结肠中水的吸收时间,从而导致了 IBS-D 大鼠大便含水量的增加^[18]。内脏超敏反应与周围感觉神经元中瞬时受体电位阳离子通道(transient receptor potential vanilloid, TRPV)的上调和敏化有关。表达 TRPV 的感觉神经元在整个肌小节的消化道中发现,当被辣椒素,热,酸和炎性介质激活时,会产生疼痛或烧灼感。TRPV4 激动剂特异性激活阳离子电流和钙流入,剂量依赖性引起内脏高敏感。在内脏高敏感中起关键作用^[19]。NO 是香草素受体 4 (Transient receptor potential vanilloid, TRPV4),瞬时感受器电位离子通调控的下游信号分子。TRPV4 受体的激活,导致具有钙离子依赖性的一氧化氮合成酶促进 L-精氨酸合成 NO。被合成的 NO 是参与介导伤害性疼痛信号传递中的重要介质,它既能通过 cGMP-PKG 通路促进兴奋性神经递质-谷氨酸的释放,又能通过此通路减缓抑制性神经递质-氨基丁酸电流^[20-21]。本研究也证实 NO 与内脏敏感性具有很强的相关性。

艾灸天枢和上巨虚通过降低 IBS-D 大鼠结肠组织中 NO 水平,降低大鼠稀便率,提高大鼠腹壁收缩反射的最小容量阈值,改善 IBS-D 大鼠的肠道运动和降低肠道敏感性,从而改善 IBS-D 的腹泻症状。本实验验证艾灸治疗肠易激综合征的有效性为临床治疗提供了一定的理论依据,也证明了艾灸治疗肠易激综合征与 NO 的相关性,为进一步研究艾灸治疗与 NO 相关通路提供一定的理论依据。

参考文献

- [1] Ying Li, Gaichao Hong, Min Yang, et al. Fecal bacteria can predict the efficacy of rifaximin in patients with diarrhea - predominant irritable bowel syndrome[J]. Pharmacological Research, 2020, 159: 104936.
- [2] Gupta K, Ghuman HS. Review of Rifaximin: Latest Treatment Frontier for Irritable Bowel Syndrome Mechanism of Action and Clinical Profile[J]. Clinical medicine insights Gastroenterology, 2017, 10: 117955221772890.
- [3] Lam Ching, Tan Wei, Leighton Matthew, et al. A mechanistic multicentre, parallel group, randomised placebo -

- controlled trial of mesalazine for the treatment of IBS with diarrhoea (IBS - D). [J]. Gut, 2016, 65(1).
- [4] Joyce K. Anastasi, Bernadette Capili, Michelle Chang. Development of Acupuncture and Moxibustion Protocol in a Clinical Trial for Irritable Bowel Syndrome[J]. Journal of Acupuncture and Meridian Studies, 2017, 10(1) 62-66.
 - [5] 储浩然, 李难, 程红亮. 温针灸治疗肝郁脾虚型肠易激综合征疗效观察[J]. 上海针灸杂志, 2015, 34(5): 424-425.
 - [6] 储浩然, 吴立斌, 程红亮, 等. 艾灸对腹泻型肠易激综合征模型大鼠血清白细胞介素-6 水平和结肠组织 β -防御素-2 及其 mRNA 表达的影响[J]. 安徽中医药大学学报, 2018, 37(1): 36-40.
 - [7] 李倩, 戴桃李, 韩炜, 等. 血管内皮细胞活化在感染后肠易激综合征发病机制中的作用[J]. 山东大学学报(医学版), 2016, 54(12): 58-61 + 66.
 - [8] Najjar Sarah A, Davis Brian M, Albers Kathryn M. Epithelial - Neuronal Communication in the Colon: Implications for Visceral Pain. [J]. Trends in neurosciences, 2020, 43(3): 170-181.
 - [9] 唐洪梅, 廖小红, 房财富, 等. 肝郁脾虚型大鼠肠易激综合征模型的建立及评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6): 138-140.
 - [10] 任培培, 汪龙德, 刘俊宏, 等. 腹泻型肠易激综合征肝郁脾虚型病证结合大鼠模型的研究方法[J]. 中医研究, 2019, 32(6): 49-52.
 - [11] 齐琳婧, 苏同生, 刘志顺, 等. 针刺曲池上巨虚治疗功能性肠病临床观察[J]. 陕西药医, 2014, 35(2): 224-225
 - [12] 储浩然, 吴立斌, 李难, 等. 艾灸天枢、上巨虚治疗腹泻型肠易激综合征的临床与动物实验研究[A]. 中国针灸学会. 2017 世界针灸学术大会暨 2017 中国针灸学会年会论文集[C]. 中国针灸学会: 中国针灸会, 2017: 1.
 - [13] 张艳洁, 杨丹, 陈祥林, 等. 基于数据挖掘的针灸治疗腹泻型肠易激综合征的取穴规律研究[J]. 时珍国药, 2020, 31(4): 990-993.
 - [14] Xiaomei Wang, Qin Qi, Yuanyuan Wang, et al. Gut microbiota was modulated by moxibustion stimulation in rats with irritable bowel syndrome[J]. BioMed Central, 2018, 13(1).
 - [15] 张夏菲, 陈超, 韩娟, 等. 艾烟有效性及安全性机制的研究进展[J]. 陕西中医药大学报, 2020, (3): 096-100.
 - [16] KoC, ak E, Akbal E, Köklü S, et al. The Colonic Tissue Levels of TLR2, TLR4 and Nitric Oxide in Patients with

- Irritable Bowel Syndrome[J]. Internal medicine ,2016,55 (9):1043-1048
- [17] Baranipour Saeed, Amini Kadijani Azade, Qujeq Durdi, et al. Inducible nitric oxide synthase as a potential blood – based biomarker in inflammatory bowel diseases. [J]. Gastroenterology and hepatology from bed to bench, 2018, 11 (Suppl 1):S124-S128.
- [18] Jang Da Eun, Bae Ji Hyun, Chang Yoo Jin, et al. Neuronal Nitric Oxide Synthase Is a Novel Biomarker for the Interstitial Cells of Cajal in Stress – Induced Diarrhea – Dominant Irritable Bowel Syndrome. [J]. Digestive diseases and sciences, 2018, 63(3).
- [19] 王陆军, 于岩瀑, 高树中, 等. 脐疗对 IBS – D 模型大鼠结肠 TRPV 受体表达影响的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(11):2807-2810.
- [20] 韩磊, 李艺, 郭广进, 等. 模拟腰椎旋转手法抑制瞬时感受器电位离子通道香草素受体 4/一氧化氮疼痛转导通路的作用研究[J]. 安徽医药, 2020, 24(4):677-680.
- [21] 张蓓, 袁凤娟, 洪煜鹏, 等. 金仁陈子方对 IBS 模型大鼠的治疗作用及机理研究[J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(2):149-152.
- (收稿日期:2020-07-06 编辑:蒲瑞生)