

温和灸对慢性内脏痛敏模型大鼠结肠 CRFR2 表达的影响

戚莉^{1,2} 易韬³ 张建斌⁴ 常小荣⁵ 杨玲¹ 刘慧荣¹ 丰晓溟¹ 吴焕淦¹

(1 上海中医药大学上海市针灸经络研究所,上海,200030; 2 上海中医药大学中医内科学 E-研究院,上海,201203; 3 复旦大学附属华山医院中西医结合科,上海,200040; 4 南京中医药大学,南京,210023; 5 湖南中医药大学,长沙,410208)

摘要 目的:观察温和灸对慢性内脏痛敏(Chronic Visceral Hyperalgesia, CVH)模型大鼠行为学及结肠组织促肾上腺皮质激素释放因子2型受体(Corticotrophin Releasing Factor Receptor 2, CRFR2)蛋白及其 mRNA 表达的影响。方法:采用乳鼠结肠扩张(Colorectal Distention, CRD)刺激建立 CVH 大鼠模型,模型制备成功后选取双侧天枢、上巨虚穴分别进行温和灸及假灸干预,1次/d,连续7d。全部干预结束后,以腹部撤回反射(Abdominal Withdrawal Reflex, AWR)评分作为检测大鼠内脏痛敏的行为学指标;采用免疫组织化学法、实时荧光定量 PCR 法观察结肠组织 CRFR2 蛋白及其 mRNA 的表达。结果:在不同强度的 CRD 刺激下,与正常组相比,模型大鼠 AWR 评分升高($P < 0.01$)。温和灸组干预后,大鼠 AWR 评分下降($P < 0.01$)。模型组大鼠 CRFR2 蛋白及其 mRNA 表达均高于正常组($P < 0.01$),温和灸干预后,CRFR2 蛋白及其 mRNA 表达进一步升高($P < 0.01$)。假灸组与模型组比较,差异无统计学意义。结论:温和灸有效缓解 CVH 模型大鼠内脏痛敏状态,与其升高结肠组织 CRFR2 蛋白及其 mRNA 的表达有关。

关键词 温和灸;慢性内脏痛敏;结肠;促肾上腺皮质激素释放因子2型受体;大鼠

Warming Moxibustion's Effect on Chronic Visceral Hyperalgesia and Expression of CRFR2 in Colon of Rats

Qi Li^{1,2}, Yi Tao³, Zhang Jianbin⁴, Chang Xiaorong⁵, Yang Ling¹, Liu Huirong¹, Feng Xiaoming¹, Wu Huangan¹

(1 Shanghai Institute of Acupuncture-Moxibustion and Meridian, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200030, China; 2 E-Institute of Shanghai Municipal Education Committee, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 3 Institute of Integrative Medicine, Huashan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China; 4 Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 5 Hunan university of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

Abstract Objective: To observe the anti-CVH effect of warming moxibustion and its influence on the expression of CRFR2 (protein and mRNA) in the colon. **Methods:** CVH rat model induced by mechanical colorectal distention (CRD) and abdominal withdrawal reflex (AWR) scores were assessed by acute CRD after warming moxibustion treatment. The protein and mRNA expressions of CRFR2 in the colon were determined by immunohistochemistry and real-time PCR, respectively. **Results:** Warming moxibustion markedly attenuated the abdominal withdrawal reflex (AWR) scores in response to acute CRD in IBS rats; The expressions of CRFR2 (protein and mRNA) in the colon were significantly increased in the model rats than in the normal rats. Warming moxibustion increased the expression of CRFR2 (protein and mRNA) in the model rats. **Conclusion:** WM treatment may attenuate CRD-induced CVH in rats and this effect may be related to WM upregulation of colonic CRFR2.

Key Words Warming moxibustion; Chronic visceral hyperalgesia; Irritable bowel syndrome; Corticotrophin releasing factor receptor 2; Colon

中图分类号:R245.81 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.12.005

肠易激综合征(Irritable Bowel Syndrome, IBS)是一种以腹痛或腹部不适伴排便习惯改变为特征的功能性肠病。近年来,由慢性内脏痛敏(Chronic Visceral Hyperalgesia, CVH)被认为可能是产生 IBS 症状(腹痛和肠道动力异常等)的主要原因^[1-4]。但其

确切的神经生物学机制尚不清楚。有研究认为,促肾上腺皮质激素释放因子2受体(Corticotrophin Releasing Factor Receptor 2, CRFR2)在内脏痛觉信号传导过程中起到重要调节作用,CRFR2 信号途径的激活可缓解结肠扩张导致的内脏痛敏^[4-5]。课题组前

期研究显示^[6],在乳鼠结直肠扩张(Colorectal Distention, CRD)刺激建立的 CVH 模型大鼠,结肠组织 CRF(Corticotrophin Releasing Factor, CRF)、促肾上腺皮质激素释放因子 1 受体(Corticotrophin Releasing Factor Receptor 1, CRFR1)蛋白及 mRNA 表达升高,而温和灸干预降低结肠组织异常升高的 CRF、CRFR1 蛋白及 mRNA 表达。那么,在 IBS 慢性内脏痛敏大鼠模型,CRFR2 是否存在关键性作用?基于此模型,本研究率先从结肠组织 CRFR2 角度探讨温和灸缓解 IBS 慢性内脏痛敏的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 SD(Sprague Dawley)新生大鼠(出生后 5 d),由复旦大学上海医学院实验动物中心提供。每 8~10 只乳鼠与母鼠同笼直到 28 d,鼠乳喂养,母鼠自由饮食。3 d 后,无不良反应乳鼠,纳入实验。

1.2 主要试剂与仪器 特制细艾条(南阳汉医艾绒有限责任公司),组织脱水机(TP1020 型,德国徕卡公司),石蜡包埋机(EG1160),组织切片机(RM2235 型,德国徕卡公司),封片机(GV5030 型,德国徕卡公司),Rabbit anti-CRFR2(Abcam),光学显微镜(日本 OLYMPUS 公司),Canon PowerShot A640(日本佳能公司),Gene Cyclo PCR 扩增仪(美国伯乐 Bio-rad 公司),Real-time 检测仪(7500Sequence Detection System, Applied Biosystems 美国),qPCR™ Core Kit (Shanghai DaWei'K Biology Technology Co. Ltd),Motie 图像分析系统(麦克奥迪视野集团有限公司)。

1.3 模型制备 造模大鼠在出生后第 8~21 天,在清醒状态下,每天上午固定时间接受 1 次 CRD 刺激。具体操作如下^[7]:使用自制的刺激球囊(气囊在实验前应充气过夜),蘸少许石蜡油,自肛门内轻柔插入。避免粗暴操作,深度约 1~2 cm,大致达到大鼠的降结肠部位。球囊充气 0.2 mL,产生局部的扩张,持续 1 min,撤气,缓慢抽出刺激球囊。连续 2 周造模结束后,继续饲养至第 6 周,随机抽取 2 只正常大鼠、2 只造模大鼠,进行一般情况观察、AWR 评分、结肠病理组织学观察,以确定模型是否成功。

1.4 分组与治疗 确认模型成功后,大鼠随机分为 4 组:温和灸组,假灸组,模型组,正常组,每组 8 只。温和灸组大鼠选取双侧天枢、上巨虚穴进行干预,以特制动物用艾条,点燃悬于穴位上约 2 cm 处施灸,1 次/d,每次每穴温和灸 10 min,共 7 d。假灸组大鼠选取双侧天枢、上巨虚穴进行假干预,以特制动物用艾条,点燃倒置,悬于穴位上约 2 cm 处施灸,1 次/d,

每次每穴温和灸 10 min,共 7 d。正常组与模型组大鼠做与其他组相同的固定,不做任何干预。

1.5 指标检测

1.5.1 内脏痛敏反应测定 在全部干预结束后 15~90 min 内对大鼠行急性 CRD 刺激,对 AWR 进行半定量评分,检测大鼠慢性内脏痛敏。CRD 刺激与 AWR 评分方法如前所述^[7],相应的 AWR 评分标准参照 Al-chaer 的方法^[8]:对 CRD 无行为反应,评为 0 分;给予刺激,大鼠有动作停顿并见短暂的头部运动行为,评为 1 分;刺激期间,见有腹部肌肉的收缩,评为 2 分;如有腹部抬起行为,评为 3 分;身体拱起,并抬起盆腔和阴囊者,评为 4 分。

1.5.2 结肠组织 CRFR2 免疫组织化学检测及图像分析 自肛门向上约 5 cm 处取长 1 cm 的降结肠标本,常规石蜡包埋,切片。石蜡切片常规脱蜡至水,滴加适当稀释的一抗(Rabbit anti-CRFR2 1:100),滴加 EnVision 试剂,DAB 显色,苏木素复染,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封片,光镜下观察。运用 Motie Med 6.0 医学图像分析系统进行图像分析处理。阳性目标呈棕黄色表达。每份样本随机取 3 个非重叠视野,取其平均值为该样本阳性目标积分光密度,分析过程中所有切片光源强度均相同。

1.5.3 结肠组织 CRFR2mRNA 实时荧光定量 PCR 检测 1)PCR 引物、探针序列 CRFR2 上游引物 5'-TGAACCCATTTTGGATGACA-3',下游引物 5'-GTT-GATGATGAGGGCGATTC-3',长度 206bp;GAPDH 上游引物 5'-CCGAGGGCCCACTAAAGG-3',下游引物 5'-GCTGTTGAGTCACAGGAGCAA-3',长度 106bp;2)组织总 RNA 的抽提;3)逆转录 cDNA;4)定量 PCR 检测。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 18.0 统计软件进行统计学处理。数据若服从正态分布或近似正态分布,用($\bar{x} \pm s$)表示,并用单因素方差分析。方差齐性采用 LSD-t、SNK-q 或 Dunnett-t 检验比较组间差异性,方差不齐用 Dunnett T3 或 Games-Howel 比较组间差异性。 $P < 0.05$ 为有统计学意义,检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 温和灸对 CVH 模型大鼠行为学的影响 如表 1 所示,在不同强度(20、40、60、80 mmHg)的 CRD 刺激下,与正常组大鼠相比,模型组 AWR 评分增加($P < 0.01$)。与模型组大鼠相比,温和灸组大鼠 AWR 评分降低($P < 0.01$)。假灸组与模型组比较,差异无统计学意义。

2.2 温和灸对 CVH 模型大鼠结肠组织 CRFR2 表达的影响 CRR2 免疫反应阳性组织主要分布在肠黏膜上皮细胞、腺体细胞,黏膜固有层的淋巴细胞、中性粒细胞及纤维组织处,黏膜下及肌层也可见。正常组大鼠结肠黏膜有少量 CRFR2 阳性表达,染色较浅。模型组 CRFR2 阳性表达增加,密集分布于腺体周围,染色加深,与正常组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$)。温和灸组大鼠 CRFR2 呈强阳性表达,染色为棕黄色,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。假灸组与模型组比较,差异无统计学意义(图1,表2)。

表1 各组大鼠 AWR 评分比较($n = 8$)

组别	AWR 评分			
	20 mmHg	40 mmHg	60 mmHg	80 mmHg
正常组	0.20 ± 0.09	1.35 ± 0.09	2.25 ± 0.16	3.29 ± 0.23
模型组	1.49 ± 0.20 **	2.45 ± 0.13 **	3.43 ± 0.09 **	3.85 ± 0.10 **
温和灸组	0.62 ± 0.09 * $\Delta\Delta$	1.76 ± 0.15 $\Delta\Delta$	2.36 ± 0.16 $\Delta\Delta$	3.40 ± 0.37 $\Delta\Delta$
假灸组	1.33 ± 0.07 **	2.43 ± 0.45 **	3.50 ± 0.07 **	3.78 ± 0.06 **

注: ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs 正常组; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs 模型组。

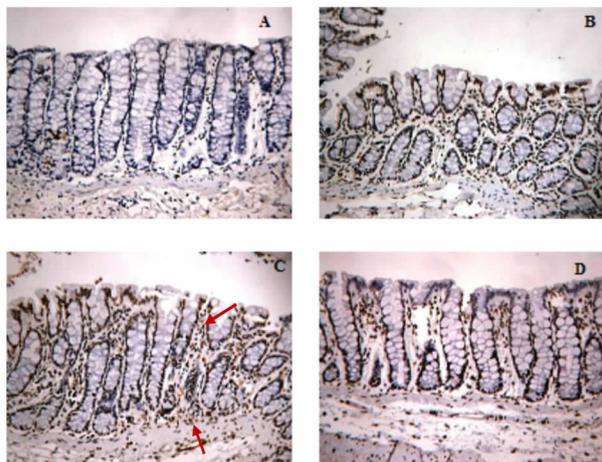


图1 各组大鼠结肠 CRFR2 表达(免疫组化)

注:A:正常组;B:模型组;C:温和灸组;D:假灸组($\times 200$)。

表2 各组大鼠结肠 CRFR2 表达的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IOD
正常组	8	7118.12 ± 993.98
模型组	8	17485.61 ± 1320.96 **
温和灸组	8	21089.39 ± 1630.23 ** $\Delta\Delta$
假灸组	8	17774.14 ± 1207.45 **

注: ** $P < 0.01$ vs 正常组; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs 模型组。

2.3 温和灸对 CVH 模型大鼠结肠组织 CRFR2 mRNA 表达的影响 如表3,图2所示,与正常组比较,模型组大鼠结肠组织 CRFR2 mRNA 的相对表达升高($P < 0.05$)。与模型组相比,温和灸组大鼠结肠组织 CRFR2 mRNA 的相对表达进一步升高($P < 0.05$)。假灸组与模型组比较,差异无统计

学意义。

表3 各组大鼠结肠 CRFR2 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CRFR2 mRNA 相对表达量
正常组	8	0.16 ± 0.05
模型组	8	0.52 ± 0.21 *
温和灸组	8	0.83 ± 0.12 ** Δ
假灸组	8	0.57 ± 0.14 **

注: ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs 正常组; $\Delta P < 0.05$ vs 模型组。

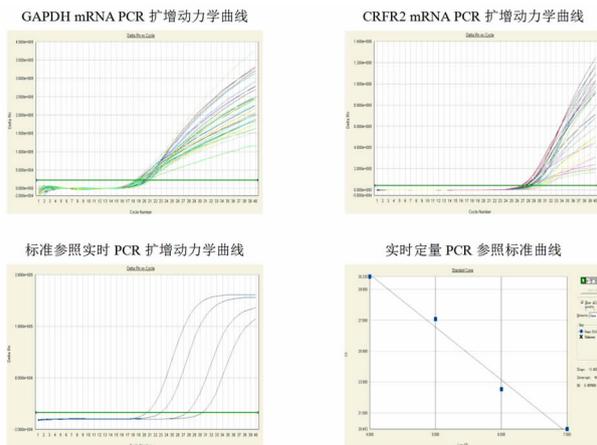


图2 各组大鼠结肠 CRFR2 mRNA 扩增动力学曲线

3 讨论

研究表明,CRF 是导致 IBS 发病的关键因素^[9-10]。CRF 通过与 CRF 受体结合发挥生物学效应,众多研究提示:CRF-CRFR1 信号途径与应激导致的 CVH 相关^[11-12]。与 CRFR1 相比,CRFR2 的功能研究较少,主要集中于情志疾病如抑郁、焦虑等的研究。报道显示:CRFR2 的激活在减少压力与焦虑中起到重要的作用^[13-15]。也有研究发现,CRFR2 的激活可以减少清醒大鼠结直肠扩张引起的内脏痛敏^[5,16]。

在利用乳鼠 CRD 刺激建立的 CVH 模型大鼠上,我们发现,CRFR2 免疫反应阳性组织主要分布在肠黏膜上皮细胞、腺体细胞,黏膜固有层的淋巴细胞、中性粒细胞及纤维组织处,黏膜下及肌层也可见,模型组 CRFR2 蛋白及其 mRNA 表达高于正常大鼠,提示结肠组织 CRFR2 在 IBS 大鼠慢性内脏痛敏形成和调制中起重要作用。温和灸干预后,大鼠结肠组织 CRFR2 蛋白及其 mRNA 表达进一步升高,提示结肠组织 CRFR2 参与了温和灸干预 CVH 大鼠的过程。升高 CRFR2 的表达是温和灸缓解 IBS 大鼠内脏痛敏的机制之一。结合课题组前期研究结果^[6,17],CRFR2 在结肠组织的分布与 CRF、CRFR2 具有一致性,我们推测,在伤害性刺激(急性 CRD 刺激)下,应激促使外周结肠 CRF 大量表达,其分别与 CRFR1 和 CRFR2 结合,CRF-CRFR1 信号途径的激

活导致内脏痛敏,CRF-CRFR2 信号途径的激活缓解内脏痛敏。在 IBS 样慢性内脏痛敏过程中,CRF-CRFR1 信号途径占优势。温和灸干预刺激下,抑制 CRF-CRFR1 信号途径,进一步激活 CRF-CRFR2 信号途径,CRF-CRFR2 信号途径占优势,从而发挥缓解 CVH 的作用。

参考文献

[1] Barshop K, Staller K. New Pathways, New Targets: Visceral Hypersensitivity Pathogenesis in Irritable Bowel Syndrome [J]. *Clinical and translational gastroenterology*, 2016, 7: e146.

[2] De Winter BY, Deiteren A, De Man JG. Novel nervous system mechanisms in visceral pain [J]. *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 2016, 28 (3): 309-315.

[3] Akbar A, Walters JR, Ghosh S. Review article: visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome: molecular mechanisms and therapeutic agents [J]. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 2009, 30 (5): 423-435.

[4] Huang Y, Zhu Y, Huang WY, et al. Advances in experimental studies of acupuncture-moxibustion treatment for intestinal disease-induced visceral pain [J]. *Shanghai J Acupunct Moxibust*, 2014, 33 (11): 1073-1076.

[5] Spiller RC. Treatment of Irritable Bowel Syndrome [J]. *Current treatment options in gastroenterology*, 2003, 6(4): 329-337.

[6] Million M, Wang L, Wang Y, et al. CRF2 receptor activation prevents colorectal distension induced visceral pain and spinal ERK1/2 phosphorylation in rats [J]. *Gut*, 2006, 55(2): 172-181.

[7] 易韬, 戚莉, 吴璐一, 等. 温和灸对慢性内脏痛敏大鼠 CRF-CRFR1 信号途径的调节作用 [J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29 (5): 1402-1405.

[8] Qi L, Liu HR, Yi T, et al. Warming Moxibustion Relieves Chronic Visceral Hyperalgesia in Rats: Relations to Spinal Dynorphin and Orphanin-FQ System [J]. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2013, 2013: 920675.

[9] Al-Chaer ED, Kawasaki M, Pasricha PJ. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during

postnatal development [J]. *Gastroenterology*, 2000, 119 (5): 1276-1285.

[10] Bravo JA, Dinan TG, Cryan JF. Alterations in the central CRF system of two different rat models of comorbid depression and functional gastrointestinal disorders [J]. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum*, 2011, 14(5): 666-683.

[11] Keightley PC, Koloski NA, Talley NJ. Pathways in gut-brain communication: evidence for distinct gut-to-brain and brain-to-gut syndromes [J]. *The Australian and New Zealand journal of psychiatry*, 2015, 49 (3): 207-214.

[12] Tache Y. Corticotrophin-releasing factor 1 activation in the central amygdale and visceral hyperalgesia [J]. *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 2015, 27(1): 1-6.

[13] Camilleri M. Review article: new receptor targets for medical therapy in irritable bowel syndrome [J]. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 2010, 31(1): 35-46.

[14] Bale TL, Contarino A, Smith GW, et al. Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress [J]. *Nature genetics*, 2000, 24(4): 410-414.

[15] S T, N K, V DL, et al. Lack of association between the corticotrophin-releasing hormone receptor 2 gene and panic disorder [J]. *Psychiatr Genet*, 2006, 16(3): 93-97.

[16] Kishimoto T, Radulovic J, Radulovic M, et al. Deletion of crhr2 reveals an anxiolytic role for corticotropin-releasing hormone receptor-2 [J]. *Nature genetics*, 2000, 24(4): 415-419.

[17] Heinrichs SC, Tache Y. Therapeutic potential of CRF receptor antagonists: a gut-brain perspective [J]. *Expert opinion on investigational drugs*, 2001, 10(4): 647-659.

[18] Liu HR, Fang XY, Wu HG, et al. Effects of electroacupuncture on corticotropin-releasing hormone in rats with chronic visceral hypersensitivity [J]. *World journal of gastroenterology*, 2015, 21 (23): 7181-7190.

(2016 - 12 - 07 收稿 责任编辑:洪志强)

(上接第 2528 页)

可能与实验人群的选择为正常人群,实验前没有微循环不良状态(无需改善)有关。

参考文献

[1] 世界卫生组织确定健康的 10 项标准 [J]. *中国健康教育*, 2001, 17(4): 210.

[2] 刘蔚巍, 连之伟, 邓启红. 基于平均皮肤温度的个体热舒适评价模型 [J]. *东南大学学报*, 2010, 26(2): 254-257.

[3] 王富春. 雀啄灸: 灸法医鉴 (国家 973 计划项目) [M]. 北京: 北京科学技术文献出版社, 2009: 88-89.

[4] Lu RL, Wu BY. Detecting methods of skin blood microcirculation and its new progress [J]. *Medical Recapitulate*, 2006, 12(2): 124-128.

[5] 李春华, 陈滢如, 余延芬, 等. 针灸对微循环影响的研究进展 [J]. *上海针灸杂志*, 2014, 33(1): 1-4.

[6] 李迎红, 李敏, 刘崑, 等. 从皮肤微循环血流灌注量看身柱穴特异性 [J]. *上海针灸杂志*, 2016, 35(2): 199-201.

[7] 董雪红, 胡仁明. 微循环功能的检测方法及其在糖尿病中的应用 [J]. *国际内科学杂志*, 2009, 36(4): 196-199.

[8] 高希言, 陈岩, 王鑫. 腹部透灸时温度变化的研究 [J]. *中国针灸*, 2015, 35(1): 45-49.

[9] 汪亚群, 吴人照, 芦丹, 等. BILT 治疗仪在脑卒中偏瘫康复治疗中的运用研究 [J]. *浙江中医药大学学报*, 2014, 38(4): 383-385.

(2016 - 12 - 07 收稿 责任编辑:洪志强)