

艾灸足三里脊髓响应通路的实验研究

王 明¹ 蔡 辉¹ 吴焕淦² 余 芝¹ 王欣君¹ 陈智宇¹ 金传阳¹ 张建斌^{1,3}

(1 南京中医药大学第二临床医学院, 南京, 210023; 2 上海中医药大学上海市针灸经络研究所, 上海, 200030;

3 江苏省第二中医院, 南京, 210017)

摘要 目的:研究艾灸“以温促通”的传入通路和脊髓背角神经元响应的关系。方法:选用成年雄性 SD 大鼠 40 只,玻璃微电极细胞外记录 L₄ 节段脊髓背角神经元活动(放电频率),分别给予足三里肌注 150 μL 的 0.01M 辣椒素(Capsaicin, CAP)和 49 ℃ 艾灸 30 s 刺激,观察不同刺激后神经元放电的变化。结果:1)脊髓背角神经元对足三里注射辣椒素有响应,其效应特征以兴奋性作用为主;2)49 ℃ 艾灸足三里穴与辣椒素穴位注射足三里可以在脊髓背角的同一个神经元中汇聚;3)脊髓背角神经元对 49 ℃ 艾灸的响应,也存在与足三里辣椒素注射不一致效应。结论:高温热灸的传入通路和脊髓响应,部分是由辣椒素敏感的 C 纤维和 TRPV1 通道介导的。

关键词 艾灸;足三里;传导通路;辣椒素

Moxibustion in Conduction Response Pathway between Zusanli and Spinal Cord

Wang Ming¹, Cai Hui¹, Wu Huangan², Yu Zhi¹, Wang Xinjun¹, Chen Zhiyu¹, Jin Chuanyang¹, Zhang Jianbin^{1,3}

(1 Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2 Shanghai University of Chinese Medicine,

Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200030, China;

3 Jiangsu Second Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210017, China)

Abstract Objective: To study the relationship between the afferent pathway of moxibustion and the response of dorsal horn neurons of the spinal cord, warming the meridians to eliminate stagnation. **Methods:** There were 40 Adult male SD rats selected, extracellular recording the activity of spinal dorsal horn neurons of L₄ by glass microelectrode (discharge frequency), given intramuscular injection of 150 μL 0.01M capsaicin at Zusanli and at 49 degrees for 30 s to observe the changes of different neuron discharge before and after different stimulation. **Results:** 1) Spinal dorsal horn neurons gave response to capsaicin stimulation, which was characterized by excitatory effect. 2) 49 degrees of moxibustion at Zusanli point and capsaicin injection could converge on the same neurons in the dorsal horn of spinal cord. 3) The response of spinal dorsal horn neurons to the 49 degrees of moxibustion were inconsistent with that of capsaicin injection at Zusanli. **Conclusion:** The afferent pathway and the spinal cord response with high temperature moxibustion were mediated by capsaicin sensitive C fibers and TRPV1 channels partially.

Key Words Moxibustion; Capsaicin; Conductive pathway; Zusanli (ST36)

中图分类号: R245.81 文献标识码: A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.12.008

艾灸施术简便,疗效显著,古今临床广泛应用。在艾灸现代原理研究中,施灸部位的温热刺激及其产生的温通效应,受到关注,并形成了“以温促通”的艾灸温通理论^[1-2]。但是,从施灸部位的温热刺激到温通效应产生的通路和环节尚不十分清晰。1997 年,一个能被辣椒素(Capsaicin, CAP)激活的受体被克隆,被称为辣椒素受体。根据其离子通道特性,此受体属于瞬时感受器电位离子(Transient Receptor Potential, TRP)通道家族,主要存在于温度敏感神经元等,对外周和中枢温度信息起着重要介导作用^[3-5]。TRPV1 是 TRP 的重要亚型,分布于全身,包括大脑、脊髓以及外周神经系统,可被大于 43 ℃ 的

热刺激激活,因此也被称为“热敏感”通道^[6-7]。

艾灸“以温促通”的传入通路,首先应该是由施灸部位或穴位局部到脊髓中枢的过程。脊髓背角神经元对外周施灸刺激的响应,是艾灸“以温促通”的关键环节之一,脊髓背角 TRPV1 阳性神经元激活可能是艾灸“以温促通”的脊髓中枢调制环节。本实验通过电生理学技术和手段,研究外周穴位施灸后的脊髓背角神经元响应,探索“以温促通”的传入通路。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级健康雄性 SD 成年大鼠 40 只,体质量 300 ~ 450 g,由南京中医药大学提供(许

基金项目:国家重点基础研究发展计划(“973”计划)项目(编号:2009CB522905;2015CB554501);国家自然科学基金项目(编号:81373750)

作者简介:王明(1992—),女,汉族,江苏常州人,2010 级针灸推拿七年制在读生

通信作者:张建斌(1967—),男,汉族,江苏无锡人,研究方向:针灸理论的临床应用, E-mail: zhangjianbin@njucm.edu.cn

可证号:GCXK(沪)2013-0016),在室温(22±2)℃、光照8:00—20:00、自由进食饮水等同等标准环境下饲养1周。

1.2 实验仪器 脑立体定位仪(David Kopf Instruments,美国),微电极操作器控制(NARISHIGE,日本),细胞外电生理记录放大器(A-M systmes,美国),Micro3-1401生理信号采集分析系统(CED,英国),玻璃微电极拉制仪(WD-1,成都仪器厂),玻璃微电极(长度100 mm,外径1.2 mm,南京市泉水教学实验器材厂),纯艾条(南阳市卧龙汉医艾绒厂),红外测温仪(Fluke 566)。

1.3 实验试剂 乌拉坦(氨基甲酸乙酯,上海青析化工科技有限公司),滂胺天蓝(Sigma,美国),无水乙酸钠(南京化学试剂有限公司),辣椒素(Sigma,美国),吐温80(南京化学试剂有限公司),无水乙醇(南京化学试剂有限公司),生理盐水(南京化学试剂有限公司),石蜡油(南京化学试剂有限公司)。

1.4 细胞外记录方法 将麻醉大鼠俯卧位固定于脑立体定位仪上,用咬骨钳开脊髓,暴露大鼠第四腰椎,用手术显微镊剥离硬脊膜,用蘸有生理盐水的棉球小心地将周围的血擦干净,注意操作中尽可能的避免碰到脊髓,剥离硬脊膜后尽快滴38℃左右的石蜡油防止脊髓水分蒸发。实验过程中,用加热板维持大鼠体温在(37±0.5)℃。手术完成后,休息30 min等待大鼠状态平稳。拉制玻璃微电极(尖端直径1~2 μm,内含0.5 mol/L的醋酸钠灌注和2%的滂胺天蓝,阻抗为5~10MΩ),并固定于微电极操作器上,通过微电极操作器(步进1 μm/s)控制到达脊髓背角(前正中裂旁开:0.5~1.0 mm,深度:250~1 500 mm。),探查神经元,进行细胞外记录。干预前记录30 s作为基线对照。记录的放电信号经前置放大器放大后,输入多道生理信号采集系统,使用Spike2软件系统进行数据采集及分析,通过比较干预反应时间内神经元放电频率变化率来判断神经元的反应。放电频率计算率计算公式为:(干预时-干预前)/干预前×100%,变化率的绝对值≥15%视为兴奋/抑制,<15%视为无变化。

1.5 取穴和刺激方法 参照《实验针灸学》^[8]取大鼠左侧“足三里”,记录到稳定的神经元放电后,先记录30 s,然后依次开始注射150 μL的0.01M辣椒素和49℃艾灸(30 s)。每个干预均等到神经元放电恢复到干预前水平后才开始下一个干预刺激。在以上记录过程中,随时补充38℃的温石蜡油保持脊髓湿润,并保持安静,以减少周围环境的干扰。

1.6 统计学方法 采用SPSS 23统计软件进行分析,计量数据用均数±标准差表示,组间比较采用方差分析,计数资料比较采用卡方检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脊髓背角神经元对辣椒素的响应 在40只大鼠的脊髓L₄段,共记录到自发稳定放电的脊髓背角神经元共60个,其中46个(76.67%)对辣椒素有反应。46个有反应的神经元中,38个(82.61%)神经元对辣椒素刺激产生了兴奋放电,8个(17.39%)神经元对该刺激产生了抑制放电。放电频率特征见表1。

表1 脊髓背角神经元对辣椒素的响应($\bar{x} \pm s$)					
足三里刺激	反应	数量	注射辣椒素前	注射辣椒素后	
150 μL的0.01M 辣椒素	兴奋	38	10.64±6.72	17.23±10.99	
	抑制	8	6.66±4.23	5.16±3.28	

2.2 脊髓背角神经元对49℃艾灸的响应 在40只大鼠脊髓背角L₄段60个自发稳定放电的神经元中,24个(40.00%)对49℃艾灸30 s有反应。24个有反应的神经元中,18个(75.00%)神经元对49℃艾灸产生了兴奋放电;6个(25.00%)神经元对该刺激产生了抑制放电。放电频率特征见表2。

表2 脊髓背角神经元对49℃艾灸的响应($\bar{x} \pm s$)					
足三里刺激	反应	数量	49℃艾灸前	49℃艾灸后	
49℃艾灸30 s	兴奋	18	11.00±9.90	16.91±14.13	
	抑制	6	6.94±5.13	5.49±3.94	

2.3 脊髓背角神经元接受不同刺激后效应特征 在40只大鼠脊髓背角L₄段60个自发稳定放电的神经元中,分别有46个、24个神经元对0.01M辣椒素150 μL足三里穴位注射和49℃艾灸30 s有响应,经卡方检验,两者效应特征差异有统计学意义(P<0.05)。在有响应的脊髓背角神经元中,对足三里辣椒素注射和49℃艾灸30 s均以兴奋性响应为主,但也有少量神经元产生抑制响应。刺激后效应特征见表3,图1、图2。

表3 脊髓背角神经元接受不同刺激后效应特征						
刺激	数量	兴奋	抑制	无效应	兴奋率	抑制率
辣椒素	60	38*	8	14	63.33%	13.33%
49℃艾灸	60	18	6	36	30.00%	10.00%

注:*为与49℃艾灸兴奋性神经元进行对比P<0.05。

值得注意的是,在24个对49℃艾灸有响应的神经元中,有6个(25.00%)神经元对辣椒素注射无响应;在38个对辣椒素产生兴奋性响应的神经元

中,对 49 ℃ 艾灸 30 s 刺激产生兴奋性响应的神经元有 10 个,抑制性响应的 4 个,占全部艾灸响应神经元的 58.33% (14/24)。

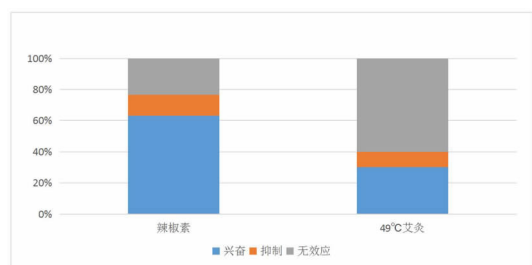


图1 脊髓背角神经元接受不同刺激后效应特征

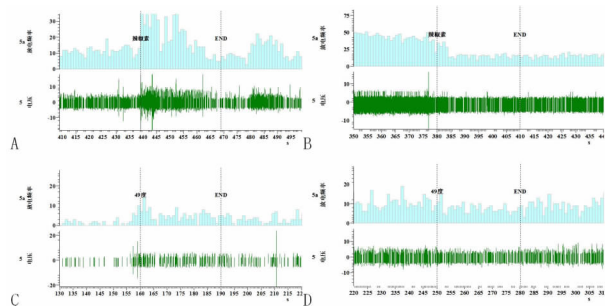


图2 脊髓背角神经元接受刺激后变化图

注:A 为注射辣椒素后神经元兴奋的变化图;B 为注射辣椒素后神经元抑制的变化图;C 为 49 ℃ 艾灸后神经元兴奋的变化图;D 为 49 ℃ 艾灸后神经元抑制的变化图。

3 讨论

足三里穴广泛应用于消化系统、神经系统、心脑血管系统等疾病,其结构基础与神经支配和相应的中枢传入传出有关。足三里穴所在区的皮肤和肌肉由脊髓 L₄-S₂ 段发出的腓浅、腓深神经支配^[9]。研究发现,用辣椒过氧化物酶逆行追踪足三里穴位的脊髓投射节段为 T₁₂-S₂,尤其以 L₅-S₂ 的标记最多^[10]。研究还发现,大鼠脊髓背根 L₄-S₁ 切断后,针刺足三里对胃平滑肌电的改善作用呈显著减弱,即足三里的效应被抑制^[11]。因此,脊髓背角 L₄-S₂ 段是针灸足三里穴的初级传入中枢,在足三里穴区的各种刺激,可以通过传入通路在脊髓背角 L₄-S₂ 段得到响应。本实验也证实,49 ℃ 艾灸足三里穴区,可以激活大鼠脊髓 L₄ 段背角神经元,L₄ 段脊髓背角神经元是艾灸足三里“以温促通”传入通路的主要响应靶区之一。

本实验还证实,大鼠脊髓 L₄ 段背角神经元除了响应足三里穴区 49 ℃ 艾灸外,还可以同时响应足三里穴区的辣椒素注射。辣椒素具有明显细胞特异性,激活神经 C 纤维上的非特异性离子通道——TRPV1 受体,产生生物学活性^[12]。辣椒素浓度的不同,对初级感觉神经元的作用不同,机体由此产生的

效应也不同。低浓度的辣椒素能兴奋辣椒素敏感神经元^[13];高浓度的辣椒素可以使感觉神经元失敏^[14-15]。新生大鼠皮下注射 50 mg/kg 辣椒素是目前实验室主要的阻断感觉神经中痛纤维的方法。为了兴奋辣椒素敏感神经元,本实验选用 0.01M (低浓度)的辣椒素,实验结果也证实了该浓度能激活 TRPV1 通道,对 L₄ 脊髓背角神经元产生以兴奋为主的作用。值得注意的是,在 38 个辣椒素兴奋性神经元中,对 49 ℃ 艾灸 30 s 刺激有响应的神经元有 14 个,占全部艾灸响应神经元的 58.33% (14/24),49 ℃ 艾灸足三里穴与辣椒素足三里两种干预均可以在脊髓背角的同一个神经元中汇聚,提示了 49 ℃ 艾灸足三里穴与辣椒素足三里存在共同传入通路和相近的效应作用,都可能与 TRPV1 通路有关。任何形式的伤害性刺激只要达到一定强度,对组织发生损伤作用,组织就会释放某些致痛物质,如 K⁺、H⁺、组胺、5-羟色胺、缓激肽、前列腺素等,作用于游离的神经末梢,产生冲动,由传导伤害信息的 Aδ(Ⅲ)类和 C(Ⅳ)类纤维传入中枢引起痛觉^[16]。49 ℃ 艾灸和辣椒素对足三里穴的刺激都属于伤害性刺激,都能通过上述通道传入中枢,实验中有同一神经元对两种刺激产生相同效应,也证实了共同通路的存在。

但是,实验还提示,49 ℃ 艾灸足三里穴区 30 s 引起的脊髓背角神经元响应,与 0.01M 辣椒素 150 μL 足三里穴位注射引起的脊髓背角神经元响应,还存在不完全一致的差异。这种差异,主要表现在:1)不是全部辣椒素敏感的神经元,都响应艾灸 49 ℃ 艾灸;2)有部分响应 49 ℃ 艾灸的神经元,对辣椒素穴位注射不敏感;3)49 ℃ 艾灸足三里穴和 0.01M 辣椒素穴位注射,也可以分别引起神经元的抑制作用。我们分析认为,导致这种差异的原因,一方面可能与足三里穴刺激方式和刺激量有关,另一方面也与脊髓背角的神经元类型有关。高温热灸刺激除了具有温热特性能打开 TRPV1 通道外,还可以引起受刺激局部体表组织中某些生物活性物质含量的改变,如 H⁺、组胺、缓激肽等,这些物理化学刺激均可以被感觉神经末梢上相应的离子通道(受体)所感知;还能在施灸穴位局部皮肤中产生与皮肤免疫相关蛋白物质如 MhC-、IL-12、CD80 等,这些高温艾灸产生的物质传入中枢的通路或许就是与辣椒素通路存在差异的地方之一。本次实验,仅采用了 49 ℃ 30 s 艾灸足三里与 0.01M 辣椒素 150 μL 穴位注射的比较,无论是艾灸的温度、艾灸的持续时间,都存在可变性,尚需要在今后的研究中进一步探究艾灸刺激方式和刺

剂量与脊髓背角神经元响应的量效关系。

综上所述,高温热灸的传导通路部分是由辣椒素敏感的 C 纤维介导,并且在脊髓背角部分辣椒素敏感性神经元得到响应。但是,高温热灸在脊髓背角神经元响应中也存在独特的效应规律,其机制和原理,尚需要进一步的实验支持。

参考文献

- [1] 张建斌,王玲玲,胡玲,等. 艾灸温通作用的理论探讨[J]. 中国针灸,2011,31(1):51-54.
- [2] 张建斌,王玲玲,吴焕淦,等. 艾灸温通温补概念的内涵分析[J]. 中国针灸,2012,32(11):1000-1003.
- [3] Walder RY, Radhakrishnan R, Loo L, et al. TRPV1 is important for mechanical and heat sensitivity in uninjured animals and development of heat hypersensitivity after muscle inflammation[J]. Pain,2012,158(8):1664-1672.
- [4] Alawik, Keeble J. The paradoxical role of the transient receptor potential vanilloid receptor in inflammation[J]. Pharmacol Ther,2010,125(2):181-195.
- [5] Baylie RL, Brayden JE. TRPV channels and vascular function[J]. Acta Physiol (Oxf),2011,203(1):99-116.
- [6] 吴楠,张丹龙,衡立军,等. TRPV1 与 pJNK 在树脂毒素致痛模型大鼠脊髓背角的表达变化[J]. 神经解剖学杂志,2015,31(2):155-160.
- [7] Romanovsky AA. Thermoregulation: some concepts have changed

functional architecture of the thermoregulatory system. American journal of physiology[J]. Regulatory, integrative and comparative physiology,2007,292(1):R37-46.

- [8] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 2 版. 北京:中国中医药出版社,2007:255-256.
- [9] 许巍,熊俊,陈日新,等. 基于现代文献的麦粒灸临床治疗病症谱研究[J]. 辽宁中医杂志,2016,43(3):598-600.
- [10] 赵敏生,余安胜,李西林. 辣椒过氧化物酶追踪“足三里”穴的脊髓投射研究[J]. 中国针灸,1999,19(9):39-41.
- [11] 汪克明,王月兰,吴子建,等. 脊髓通路 with 针刺“足三里”效应关系的研究[C]//中国针灸学会经络分会. 中国针灸学会经络分会第十届学术会议论文集. 中国针灸学会经络分会,2009:2.
- [12] 骆昊,万有,韩济生. 辣椒素及其受体[J]. 生理科学进展,2003,34(1):11-15.
- [13] 华兴邦,何志娟,朱玲英,等. 中枢机能状态对电针效应的影响[J]. 南京中医学院学报,1985(3):40-42.
- [14] 朱丽霞,黎春元,吉长福. 辣椒素对 C 类神经纤维传导的影响[J]. 生理科学,1988,8(5):340.
- [15] 刘乡,黄平波,蒋曼春. 辣椒素阻断腓总神经 C 纤维的效应及其对电针“足三里”镇痛作用的影响[J]. 针刺研究,1997,22(4):295-303.
- [16] 刘乡. 以痛制痛——针刺镇痛的基本神经机制[J]. 科学通报,2001,46(7):609-616.

(2016-12-07 收稿 责任编辑:洪志强)

(上接第 2542 页)

- [23] 柴玉. 艾有新意[J]. 亚太传统医药,2016,12(3):封2.
- [24] 邢海辉,王玲玲,张建斌,等. 温和灸不同时间参数对高胆固醇血症患者疗效的影响[J]. 中国针灸,2010,30(11):937-940.
- [25] 王士超,王耀帅,王玲玲,等. 温和灸不同灸量调节血脂的效应比较[J]. 辽宁中医药大学学报,2011,13(1):33-35.
- [26] 林巧云. 不同灸时温和灸对高脂血症血管内皮功能的影响[D]. 南京:南京中医药大学,2012.
- [27] 王耀帅,王士超,张建斌,等. 不同灸时温和灸对急性高脂血症大鼠施灸局部缝隙连接蛋白 43 表达的影响[J]. 广州中医药大学学报,2013,30(1):44-46.
- [28] 陈仲杰. 高脂血症“温灸和之”有效性及不同灸治时程对调脂效应的影响[D]. 北京:中国中医科学院,2012.
- [29] 王荃,夏晓红,叶敏,等. 不同灸量艾灸对克罗恩病大鼠结肠组织损伤积分和血清 IgG、IgA、IgM 水平的影响[J]. 天津中医药大学学报,2014,33(1):22-25.
- [30] 丁凤,王婧吉,储浩然. 温和灸不同灸量对治疗血脂异常最佳灸量研究[J]. 中医临床杂志,2016,28(2):237-239.
- [31] 常小荣,谢华,严洁,等. 温和灸不同灸治时间对浅表性胃炎脾胃虚寒证患者临床疗效及胃肠激素的影响[J]. 中华中医药学刊,2011,29(11):2381-2383.
- [32] 谢华,刘密,常小荣,等. 不同施灸时间对脾胃虚寒型浅表性胃炎临床疗效的观察[J]. 针刺研究,2012,37(4):318-323.
- [33] 张伟,陈明人,熊俊. 不同灸量悬灸“大椎”穴对哮喘大鼠细胞免疫学机制的影响[J]. 针刺研究,2012,37(3):202-205.
- [34] 薛斐然. 不同时程温和灸对中风后肩痛患者肩髃穴热敏化影响及临床疗效观察[D]. 北京:北京中医药大学,2010.

- [35] 周攀,张建斌,王玲玲,等. 不同灸温的艾灸抗炎效应及 TRPV1 作用机制研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2015,9(9):1143-1145.
- [36] 季辉,王玲玲,周攀,等. 不同灸温对急性佐剂性关节炎大鼠血清 IL-1 β 、IL-2 及 TNF- α 含量的影响[J]. 上海针灸杂志,2015,34(7):597-599.
- [37] 王耀帅. 艾灸以温促通效应与 TRPV1 的相关性研究[D]. 南京:南京中医药大学,2012.
- [38] 高建芸,王桂英,王玲玲. TRPV1 介导不同温度艾灸调脂通脉效应的临床研究[J]. 时珍国医国药,2015,26(9):2182-2184.
- [39] 张会芳. 不同灸温调脂通脉效应及 TRPV1 介导灸法“以温促通”效应机制研究[D]. 南京:南京中医药大学,2013.
- [40] 王桂英,王耀帅,卢开信,等. 不同灸温对高脂血症小鼠胆固醇及“神阙”穴皮肤的影响[J]. 中国针灸,2016,36(1):59-63.
- [41] 孙申田,李娟,盛泽民,等. 不同温度的艾条对家兔结肠运动和结肠电影响的实验研究[J]. 针灸学报,1987,4(1):31-34.
- [42] 李亮. 不同热灸温度和面积刺激对大鼠延髓背侧网状核神经元的激活作用[D]. 北京:中国中医科学院,2007.
- [43] 于颖梅,李冰,张博,等. 不同频次温灸对气虚血瘀型中风先兆患者血脂水平的影响[J]. 北京中医药,2012,31(6):443-446.
- [44] 王云. 不同间隔时间温和灸治疗原发性高脂血症的临床研究[D]. 南京:南京中医药大学,2010.
- [45] 王春华,胡玲,王健平,等. 不同施灸频度温和灸对亚健康状态影响的研究[J]. 上海针灸杂志,2016,35(4):379-382.
- [46] 圣海蓉. 不同疗程温和灸对原发性高脂血症疗效的临床研究[D]. 南京:南京中医药大学,2010.

(2016-12-07 收稿 责任编辑:洪志强)