

• 论著 •

电针足三里对内毒素所致大鼠肝损伤保护机制的研究

胡 森^{1a}, 宋 琪², 王海滨^{1b}, 吕 艺^{1a}, 于 勇^{1b}, 王 磊², 周国勇^{1a}, 石 现², 盛志勇^{1a}

(1. 解放军总医院第一附属医院④全军烧伤研究所休克与多器官障碍实验室, ⑥检验科, 北京 100037;

2. 解放军总医院针灸科, 北京 100853)

【摘要】 目的: 研究电针足三里(ST36)对内毒素所致大鼠肝损伤保护作用的机制。方法: 于尾静脉注射革兰阴性(G⁻)菌 O111 : B4 脂多糖(LPS)5 mg/kg 制备大鼠肝损伤模型。按随机数字表法将 70 只雄性 Wistar 大鼠分为: ①假手术组、②LPS 组、③电针治疗组、④迷走神经切断(迷切)组、⑤迷切后电针组、⑥ $\alpha 7$ 亚基阻断组、⑦ $\alpha 7$ 亚基阻断后电针组 7 组, 每组 10 只。组④和⑤于制模后切断双侧迷走神经干; 组⑥和⑦制模后经尾静脉注射胆碱能 N 受体 $\alpha 7$ 亚基阻断剂 α 银环蛇毒素(α -bungarotoxin, α -BGT, 1 μ g/kg); 组③、⑤和⑦在制模后和(或)切断迷走神经, 或静脉注射 α -BGT 后给予电针足三里治疗。各电针组持续针刺双侧足三里 1.5 h, 强度为 2 mA, 2~100 Hz。于注射内毒素后 2 h 处死各组大鼠, 检测肝组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量和血浆丙氨酸转氨酶(ALT)活性。结果: 电针足三里可显著降低静脉注射内毒素引起的大鼠肝组织 TNF- α 含量和血浆 ALT 活性升高(P 均 <0.05); 电针前切断迷走神经或阻断胆碱能 N 受体 $\alpha 7$ 亚基能显著减轻或消除电针足三里的上述作用。结论: 胆碱能抗炎通路可能是电针足三里发挥抗炎和肝损伤保护作用的主要机制。

【关键词】 肝损伤; 电针刺; 足三里; 内毒素; 大鼠; 机制

中图分类号: R245.97; R256.4 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2007)05-0296-03

Study on the protective effect and mechanism of electroacupuncture at Zusanli point (足三里) on endotoxin induced hepatic injury in rats HU Sen^{1a}, SONG Qi², WANG Hai-bin^{1b}, LÜ Yi^{1a}, YU Yong^{1b}, WANG Lei², ZHOU Guo-yong^{1a}, SHI Xian², SHENG Zhi-yong^{1a}. 1a. Laboratory of Shock and Multiple Organ Dysfunction, Burns Institute; 1b. Department of Laboratory Medicine, First Hospital Affiliated to General Hospital of PLA, Beijing 100037, China; 2. Department of Acupuncture and Moxibustion of General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

【Abstract】 Objective: To investigate the protective effect and mechanism of electroacupuncture (EA) at Zusanli (足三里, ST36) on endotoxin induced hepatic injury in rats. **Methods:** Seventy male Wistar rats were randomly divided into seven groups (each $n=10$): ① sham control, ② lipopolysaccharide (LPS) alone, ③ LPS+EA, ④ LPS + vagotomy, ⑤ LPS + vagotomy + EA, ⑥ LPS + α -bungarotoxin (α -BGT) and ⑦ LPS+ α -BGT + EA. All animals except those in sham control were injected Gram-negative bacteria O111 : B4 LPS 5 mg/kg into the caudal vein to produce hepatic injury. Zusanli point (ST36) were electroacupunctured with constant voltage (2-100 Hz, 2 mA for 1.5 hours) immediately in group ③, ⑤ and ⑦ after LPS challenge. Bilateral cervical vagotomy was performed in rats in group ④ and ⑤. α -BGT (1 μ g/kg), an antagonist of cholinergic N receptor $\alpha 7$ subunit was injected into vena caudalis for animals in group ⑥ and ⑦ after LPS injection. All animals were sacrificed at 2 hours after LPS injection. The content of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in liver tissue and the activity of alanine aminotransferase (ALT) in plasma were detected. **Results:** LPS injection resulted in significant increase of TNF- α in liver tissue and ALT in plasma. EA at Zusanli point obviously lowered the increase of TNF- α and ALT (both $P<0.05$), and alleviated hepatic insult at 2 hours after LPS challenge. Injection of α -BGT or vagotomy could weaken or eliminate the effects of EA. **Conclusion:** It is suggested that cholinergic anti-inflammatory pathway be one of the main mechanisms of hepatic protective effect of EA at ST36.

【Key words】 hepatic injury; electroacupuncture; Zusanli point; endotoxin; rat; mechanism

基金项目: 军队“十一五”专项课题基金资助项目(06Z055)

作者简介: 胡 森(1959-), 男(汉族), 山东省人, 博士, 研究员, 主要从事休克、脓毒症和多器官功能障碍综合征研究 (Email: hs82080@yahoo.com.cn)。

在创伤和感染引起脓毒症和多器官功能障碍综合征(MODS)发病过程中, 肝脏既是清除细菌和内毒素的场所, 同时又是该病理过程中最易受损的器官之一。研究表明, 内毒素和凝血因子能激活库普弗

细胞和肝内单核/巨噬细胞释放大量炎症介质,引起肝组织过度炎症反应而造成急性肝损伤^[1,2]。有效抑制炎症介质释放,保护肝脏免受过度的炎症损害,具有重要的临床意义。已知针刺治疗能双向调节神经内分泌-免疫系统,保护脏器功能,但其作用机制尚不清楚^[3,4]。本研究拟观察电针足三里能否降低内毒素模型大鼠肝组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量和血浆丙氨酸转氨酶(ALT)活性,从而起到肝保护作用;并从胆碱能抗炎通路的角度探讨电针足三里对肝损伤保护作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备与分组^[5]:内毒素用革兰阴性菌 O111 : B4 脂多糖(LPS, Sigma);胆碱能 N 受体 α 7 亚单位拮抗剂用 α -银环蛇毒素(α -BGT)。雄性 Wistar 大鼠(中国医学科学院动物实验中心提供)70 只,体重(220 \pm 20)g,实验前适应性饲养 1 周,术前 12 h 禁食,自由饮水。按随机数字表法将动物分为:①假手术组、②LPS 组、③电针治疗(LPS+EA)组、④迷走神经切断(迷切)组、⑤迷切+EA 组、⑥ α -BGT 组、⑦ α -BGT+EA 组 7 组,每组 10 只。制模时让动物钻入自制布袋后固定,实验操作均在清醒状态下进行。除组①外,其余各组大鼠均于尾静脉注射 LPS 5 mg/kg,造成大鼠急性肝损伤。组④和组⑤动物先用质量分数为 3%的戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(30 mg/kg),无菌分离双侧颈部迷走神经干后挂线标记,待大鼠清醒后 6 h 尾静脉注射 LPS,再切断双侧颈部迷走神经干;组⑥和组⑦动物制模后静脉注射 α -BGT 1 μ g/kg;电针组常规消毒大鼠双下肢并备皮,取三里穴(膝关节后外侧、腓骨小头下约 5 mm 处)直刺 7 mm^[6],针刺后接电针仪(国产 HANS, LH202H)持续刺激 1.5 h,刺激强度 2 mA, 2~100 Hz。制模后 2 h 自大鼠主动脉抽血并处死。

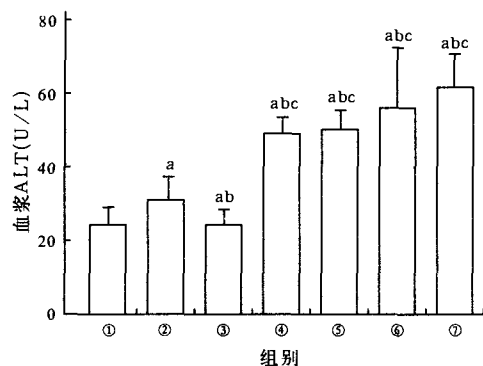
1.2 检测指标及方法:①用全自动分析仪(日立, HITACHI 7170)检测血浆 ALT 活性。②取 100 mg 肝组织,加 0.9 ml 生理盐水用冰浴匀浆,1 500 \times g 离心 30 min 后取上清液,采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测 TNF- α 含量,试剂盒购于深圳市炬英生物科技有限公司,在酶标仪(美国 DYNEX, Spectra MR MRW)上于波长 450 nm 处读数。肝组织匀浆蛋白含量测定采用考马斯亮蓝法,试剂盒购于南京建成生物工程研究所,结果以 1 mg 蛋白肝组织中的 TNF- α 含量表示。

1.3 统计学分析:用 SPSS12.0 软件处理数据,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 t 检验,

$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

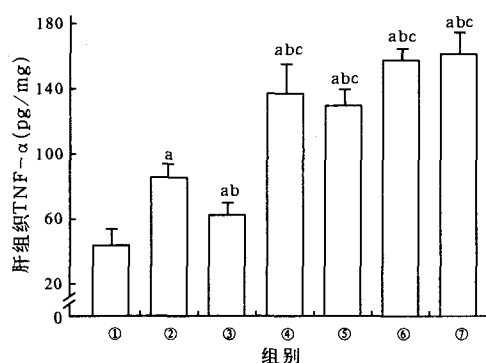
2.1 血浆 ALT 活性变化(图 1):与假手术组比较,注射 LPS 后 2 h,各组大鼠血浆 ALT 活性均显著增加(P 均 <0.05);与 LPS 组比较,LPS+EA 组血浆 ALT 活性显著降低($P<0.05$),迷切和 α -BGT 及其各处理组血浆则均显著增加(P 均 <0.05);与 LPS+EA 组比较,迷切和 α -BGT 及其各处理组 ALT 活性均显著升高(P 均 <0.05)。



注:与组①比较:^a $P<0.05$;与组②比较:^b $P<0.05$;
与组③比较:^c $P<0.05$

图 1 注射 LPS 后 2 h 各组大鼠血浆 ALT 活性变化
Figure 1 Change of plasma ALT activity at 2 hours after LPS injection in each group

2.2 肝组织 TNF- α 含量(图 2):与假手术组比较,注射 LPS 后 2 h,各组大鼠肝组织 TNF- α 含量均显著增加(P 均 <0.05);与 LPS 组比较,LPS+EA 组肝组织 TNF- α 含量显著降低($P<0.05$),迷切和 α -BGT 及其各处理组均显著增加(P 均 <0.05);与 LPS+EA 组比较,迷切和 α -BGT 及其各处理组 TNF- α 含量均显著升高(P 均 <0.05)。



注:与组①比较:^a $P<0.05$;与组②比较:^b $P<0.05$;
与组③比较:^c $P<0.05$

图 2 注射 LPS 后 2 h 各组大鼠肝组织 TNF- α 含量变化
Figure 2 Change of TNF- α in liver tissue at 2 hours after LPS injection in each group

3 讨论

以往的研究表明,内毒素除能直接损害肝细胞外,更重要的是通过激活库普弗细胞和肝内单核/巨噬细胞释放促炎介质间接损害肝细胞^[7,8],其中起关键作用的是 TNF- α 。TNF- α 是一种多功能促炎细胞因子,大部分在肝脏合成,当其大量增加时易与其他细胞因子相结合,并刺激单核/巨噬细胞生成一系列介质形成“瀑布效应”,最终导致肝功能损害并诱发脓毒症甚至 MODS。本研究结果表明,电针足三里对内毒素所致大鼠肝损伤具有明显保护作用,可降低异常升高的肝组织中 TNF- α 含量和血浆 ALT 活性。但若先切断双侧迷走神经干,电针的治疗作用则明显减弱或消失,说明迷走神经完整性在其发挥抗炎和器官保护效应时具有至关重要的作用。可能因迷走神经被切断后,机体向大脑传递的致炎信号和迷走神经发出相应的传出信号被阻断,使电针失去治疗作用。这与以往的研究认为副交感神经在针刺调节免疫反应中主要起促进作用和针刺足三里可使传出迷走神经的兴奋性增高^[9,10]相一致。

胆碱能抗炎通路是指中枢神经系统通过胆碱能神经及其递质调节或对抗全身性炎症反应的通路^[11,12]。国内外的研究均证明,电刺激大鼠传出迷走神经能抑制内毒素引起的血浆和肝组织 TNF- α 和 IL-6 等促炎细胞因子含量增加^[11,13]。胆碱能神经作用是通过其 M 和 N 两种受体(M 和 N 受体又存在多种亚型)发挥多种复杂功能,Wang 等^[14]进一步证明,兴奋胆碱能神经发挥抗炎作用的分子基础是存在于巨噬细胞表面的胆碱能 N 受体 $\alpha 7$ 亚基。在本研究中,通过预先静脉注射胆碱能 N 受体 $\alpha 7$ 亚基拮抗剂 α -BGT,显示电针对肝组织 TNF- α 含量和血浆 ALT 活性的影响亦显著减弱或消失,说明电针足三里的抗炎和肝脏保护主要通过胆碱能 N 受体 $\alpha 7$ 亚基实现。因此,我们认为胆碱能抗炎通路是电针对内毒素所致大鼠肝损伤发挥保护作用的主要机制之一。本研究中还观察到,与 LPS 组比较,迷切和 α -BGT 及其各处理组 TNF- α 含量和 ALT 活性均显著增加,表明促炎/抗炎细胞因子水平的平衡受交感肾上腺素能神经与副交感胆碱能神经调节,当副交感胆碱能神经的作用被阻断后,表现出交感肾上腺素能神经的促炎作用,表现为促炎细胞因子的水平升高和组织炎症反应加重。

从中医角度看,给予外源性内毒素属外邪侵袭,其表现具有类似气分证乃至营分证的一些特点,病机应为邪盛内陷、内闭外脱、邪热炽盛、正邪交争、阴

津耗损。足三里为足阳明胃经的合穴,主治消化系统疾病,本穴有免疫调节作用,为保健要穴,可通过经络对人体进行双向调节。另有观点认为,通腑攻下以存阴是治疗感染性 MODS 的重要措施之一,泻下能排毒解毒、荡涤积滞,抑制过度发酵^[15];通过攻下作用可使大量细菌和内毒素随肠内容物排出体外,减少内毒素吸收^[16]。本实验中观察到,电针足三里穴大鼠多有泄泻表现,味多腥臭,表明电针足三里不仅能兴奋胆碱能 N 受体发挥抗炎作用,可能也兴奋了胆碱能 M 受体发挥促进胃肠蠕动和排毒作用。

参考文献:

- [1] Riordan S M, Skinner N A, Kurtovic J, et al. Toll-like receptor expression in chronic hepatitis C: correlation with pro-inflammatory cytokine levels and liver injury[J]. *Inflamm Res*, 2006, 55(7): 279-285.
- [2] Wan J M, Sit W H, Lee C L, et al. Protection of lethal toxicity of endotoxin by *Salvia miltiorrhiza* BUNGE is via reduction in tumor necrosis factor alpha release and liver injury[J]. *Int Immunopharmacol*, 2006, 6(5): 750-758.
- [3] 赵建础. 针刺调节免疫反应途径的初步研究[J]. *针刺研究*, 1997, 22(1-2): 91.
- [4] 王今达. 开展中西医结合治疗急性危重病的思路和方法[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2000, 7(6): 323-325.
- [5] 宋琪, 石现, 胡森, 等. 电针治疗全身炎症反应综合征大鼠模型的研究[J]. *感染、炎症、修复*, 2006, 7(4): 222-224.
- [6] 李忠仁. *实验针灸学*[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 327-328.
- [7] Yuan G J, Gong Z J, Sun X M, et al. Tea polyphenols inhibit expressions of iNOS and TNF-alpha and prevent lipopolysaccharide-induced liver injury in rats[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2006, 5(2): 262-267.
- [8] 王宇明, 丁健, 顾长海, 等. 内毒素/肿瘤坏死因子在肝细胞损害中的作用[J]. *医学检验与临床*, 2000, 11(4): 9-12.
- [9] 易受香, 严洁, 林亚平, 等. 针刺胃经穴对 M 受体阻断大鼠胃电及脑肠肽的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2002, 10(4): 203-206.
- [10] 刘健华, 李江山, 严洁, 等. 针刺“足三里”对大鼠孤束核 P 物质的影响[J]. *针刺研究*, 2003, 28(1): 5-9.
- [11] Borovikova L V, Ivanova S, Zhang M, et al. Vague nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin[J]. *Nature*, 2000, 405(6785): 458-462.
- [12] 姜小国, 石德光, 胡森, 等. 迷走神经及其递质乙酰胆碱的抗炎研究进展[J]. *中国危重病急救医学*, 2003, 15(1): 59-61.
- [13] 石德光, 胡森, 姜小国, 等. 迷走神经兴奋对内毒素致大鼠心脏炎症反应的影响[J]. *中国危重病急救医学*, 2003, 15(1): 26-28.
- [14] Wang H, Yu M, Ochani M, et al. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation[J]. *Nature*, 2003, 421(6921): 384-388.
- [15] 盛志勇, 胡森. *多器官功能障碍综合征*[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 165-166.
- [16] 崔克亮, 曹书华, 王今达. 大承气汤对多器官功能障碍综合征防治作用的临床研究[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2003, 10(1): 12-15.

(收稿日期: 2007-04-02 修回日期: 2007-07-10)

(本文编辑: 李银平)