

电针足三里穴对糖尿病胃轻瘫大鼠延髓多巴胺能神经元和星形胶质细胞活性的影响^{*}

秦 明¹ 杨 琦¹ 王景杰¹ 饶志仁² 赵曙光¹ 黄裕新^{1△} 叶文广¹ 姚庆林¹

(1 第四军医大学唐都医院 消化内科 陕西 西安 710038; 2 第四军医大学神经科学研究所 陕西 西安 710032)

摘要 目的 研究电针足三里穴对糖尿病胃轻瘫大鼠延髓多巴胺能神经元内酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 和星形胶质细胞内胶质原纤维酸性蛋白 (Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP) 表达的影响。方法 32 只实验大鼠分为空白对照 (空白) 组、糖尿病胃轻瘫模型 (模型) 组、模型组 + 电针足三里穴 (足三里) 组和模型组 + 电针非经非穴 (非经非穴) 组 (每组 8 只)。模型制备采用腹腔注射 5% 四氧嘧啶和熟地灌胃诱导的方法。实验 3 周后取大鼠延髓进行抗 TH 和抗 GFAP 的单一和双重免疫组化染色, 观察并计数 TH 和 GFAP 在延髓内的表达。结果 与空白组比较, 各实验组 TH 阳性多巴胺能神经元和 GFAP 阳性星形胶质细胞集中表达于延髓迷走孤束复合体内, 有明显的定位特点。高倍镜下观察到 TH 阳性神经元周围有大量 GFAP 阳性星形胶质细胞包绕。各组 TH 和 GFAP 表达以模型组最高, 而足三里组 TH 阳性多巴胺能神经元数量明显减少 ($31.3 \pm 4.4 \rightarrow 16.8 \pm 3.2$), GFAP 阳性产物表达明显降低 ($113.8 \pm 7.6 \rightarrow 95.4 \pm 8.4$), 且它们之间有统计学意义 ($P < 0.01$)。非经非穴组与模型组之间差异没有统计学意义。结论 针刺调节糖尿病胃运动功能障碍大鼠与其调控延髓多巴胺能神经元及其周围的星形胶质细胞功能活动有关。

关键词 电针; 胃轻瘫; 胃电; 延髓; 神经元; 星形胶质细胞

中图分类号 Q95-3, R245, R587.2 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012) 06-1006-03

Effects of Electroacupuncture on Medullary Dopaminergic Neurons and Astrocytes Activation in Diabetic Gastroparesis Model Rats^{*}

QIN Ming¹, YANG Qi¹, WANG Jing-jie¹, RAO Zhi-ren², ZHAO Shu-guang¹, HUANG Yu-xin^{1△}, YE Wen-guang¹, YAO Qing-lin¹

(1 Department of Gastroenterology, Tangdu Hospital, Xi'an 710038, China;

2 Institute of Neuroscience, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the neural mechanisms of electroacupuncture (EA) effects on the diabetic gastroparesis (DGP), and to investigate the expression of tyrosine hydroxylase (TH) in dopaminergic neurons and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in astrocytes in bulbus of diabetic rats. **Methods:** 32 Rats were divided into 4 groups: control group, DGP model group, DGP plus EA Zusanli acupoint group and DGP plus EA non-acupoint group. DGP model rats were induced by intraperitoneal injection (i.p.) 5% alloxan plus poured libosch. After 3 weeks, the expression of TH and GFAP immunoreactivity in bulbus was investigated and calculated by using single or double immunohistochemical method. **Results:** In the experimental groups, the TH-positive dopaminergic neurons and GFAP-positive astrocytes expressed mainly in the vagal-solitary complex (VSC) of bulbus. Under the high microscope, those dopaminergic neurons were surrounded with their neighboring astrocytes. In the DGP group and EA non-acupoint group, the expression of TH and GFAP immunoreactivity were higher than those in the EA Zusanli groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** EA can improve the gastric motility in DGP model rats. This function may be connected with its regulating the TH-positive dopaminergic neurons and GFAP-positive astrocytes activation in VSC.

Key words: Electroacupuncture; Dopaminergic neurons; Astrocytes; Gastroparesis

Chinese Library Classification: Q95-3, R245, R587.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)06-1006-03

前言

糖尿病胃轻瘫 (diabetic gastroparesis, DGP) 是继发于糖尿病基础上以胃运动功能障碍为特点的常见临床疾患。临床观察证实针刺对 DGP 具有良性的调整作用^[1,2], 但有关其作用的内在机制仍不明确。本课题组前期实验观察到^[3], 电针足三里穴后

糖尿病大鼠胃电的平均频率和振幅较电针前有明显升高, 同时迷走孤束复合体内神经元和胶质细胞出现可塑性变化。但 VSC 内被激活的神经元属于何种类型神经元? 该神经元与星状胶质细胞是否存在形态学相互关系等问题仍不明确。在此基础上, 本实验采用单一和双重免疫组化染色方法观察延髓 TH 和 GFAP 的表达, 以进一步探讨在针刺调控糖尿病大鼠胃运动功

^{*} 基金项目 国家自然科学基金资助项目 (30801487) 陕西省中医药管理局中医药科研课题基金资助项目 (36)

作者简介 秦明 (1972), 男, 医学博士, 主治医师, 讲师。主要从事胃肠疾病相关神经生物学机制的研究。

△通讯作者 黄裕新, E-mail: tianli123@yahoo.cn

(收稿日期: 2011-06-08 接受日期: 2011-07-18)

能障碍中的相关神经机制。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

成年雄性 SD 大鼠 32 只,体重 200-250 g (第四军医大学动物中心提供),安静、温暖(20℃)、避强光的环境中饲养 72 h,实验前 12 h 禁食禁水。血糖检测结果均为阴性。随机分为空白对照(空白)组、糖尿病胃轻瘫模型(模型)组、模型组+电针足三里穴(足三里)组和模型组+电针非经非穴(非经非穴)组。每组 8 只。

1.2 胃运动功能障碍模型建立^[4,5]

给大鼠腹腔注射(ip) 5%四氧嘧啶水溶液 120 mg/Kg,连续 2d。第 3 d 后向胃内灌入熬制好的熟地(浓度为 200%), 2 ml/100 g,按 1 次/d,共 2 周。在给药后的第 1 和第 2 周末测量记录血糖,选取血糖持续 2 周 >11.1 ml/L 的大鼠作为胃运动功能障碍模型。(在此期间各组饲养条件相同)。

1.3 电针方法

将大鼠分批装入有机玻璃笼内,固定。用 6805-A 型电针仪(上海医疗仪器厂生产)电针大鼠双侧足三里穴或非经非穴(严格按《实验针灸学》的方法取穴。足三里穴位于大鼠后膝关节下方腓骨小头下约 5 mm 处,直刺 7 mm。非经非穴位于大鼠足三里穴旁开 5 mm 处,直刺 5 mm。),参数选为断续波,频率 50 Hz,以大鼠双下肢轻微抖动为宜,45 min 后放出鼠笼。1 次/d,共 5 d。

1.4 免疫组织化学方法

各组大鼠在电针结束后断尾取血测量记录动物的空腹血糖。用 1%戊巴比妥钠腹腔注射(80 mg/kg)麻醉。多聚甲醛灌注固定后,取延髓组织冰冻切片机切片。切片在 0.01 mol/L-1 PBS 中漂洗后,入含 0.3% Triton X-100 的 0.01 mol/L-1 PBS 中浸泡 30 min(室温)。然后依次按下列步骤进行免疫组织化学染色:(1)入鼠抗 TH 单克隆抗体的抗体稀释液(1:5000, Incstar),孵育 24 小时(室温);(2)生物素标记羊抗鼠 IgG(1:500, Sigma)放置 2-4 小时(室温);(3)生物素-卵白素-HRP 复合物(ABC, 1:500, Sigma)浸泡 2-4 小时(室温)。然后用葡萄糖氧化酶-DAB-硫酸镍铵法呈色,阳性产物呈蓝色。以上每一步骤均用 0.01 mol/L-1 PBS 液充分漂洗 30 min(下同)。显色后切片继续用上述方法进行抗 GFAP 免疫组织化学染色:(1)入兔抗 GFAP 的抗体稀释液(1:3000, Dako),孵育 24 小时(室温);(2)生物素标记羊抗兔 IgG(1:500, Sigma)放置 2-4 小时(室温);(3)生物素-卵白素-HRP 复合物(ABC, 1:500, Sigma)浸泡 2-4 小时(室温)。然后用 DAB-H₂O₂ 溶液中进行棕色反应,阳性产物呈棕色,位于星形胶质细胞胞浆。结束两次染色的切片经漂洗后裱片、晾干、脱水、透明,封固后在光镜下观察并采集图像。抗 TH 和抗 GFAP 单标的操作步骤如上述双标法的一部分。

替代实验:取实验组 1 套切片,用 0.01 mol/L PBS 替代抗 TH 抗体稀释液,按 ABC 法进行免疫组化染色,结果为阴性。

1.5 数据处理和统计分析

切片经图像分析仪(Quantimet570C, Leica)处理。每只大鼠随机选取 6 张单标记 TH 的切片,计算延髓内 TH 阳性细胞的总和,而后在每组动物间取均数。每只大鼠随机选取 6 张单标记 GFAP 的切片,采用图像分析软件(LSM)对图像进行数字化

分析,GFAP 阳性星形胶质细胞表达的强弱以灰度值来表示。灰度值的大小可代表 GFAP 阳性星形胶质细胞反应的强弱,值越大,说明反应越强。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS11.0 统计软件作统计处理,各组 TH 和 GFAP 表达的比较采用单因素方差分析的方法分析数据。

2 结果

免疫组化染色发现 空白组可见少量 TH 阳性神经元散在表达于延髓,GFAP 阳性星形胶质细胞表现为细胞胞体小,突起细,染色淡。而模型组、足三里组与非经非穴组的 TH 和 GFAP 阳性免疫反应产物密集表达于 VSC 内,分布有明显的重叠。其中 TH 阳性神经元呈蓝色胞体呈梭形和多角形,可见长的突起。星形胶质细胞表现为胞体变大,突起变粗,GFAP 染色变深(图 1)。TH/GFAP 双标染色在高倍镜下观察到,蓝色 TH 阳性神经元的胞体和突起周围,有大量棕色的 GFAP 阳性星形胶质细胞的突起包绕(图 1C_d)。

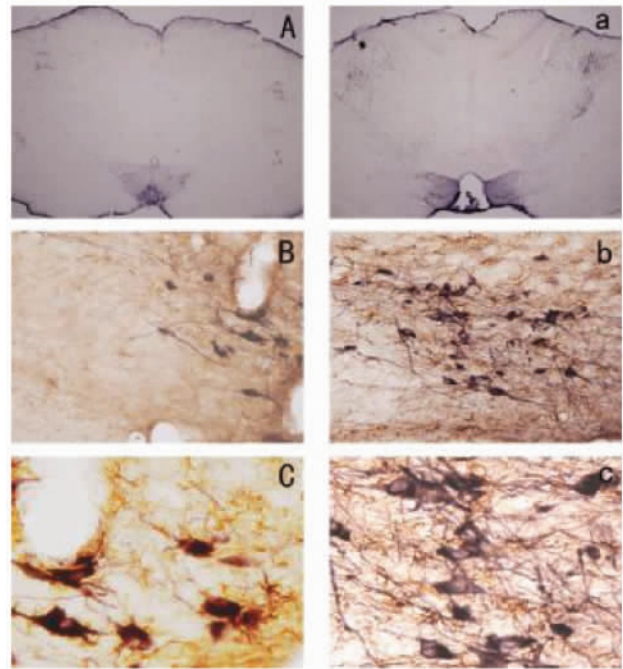


图 1 电针对糖尿病胃轻瘫大鼠延髓 VSC 内 TH 和 GFAP 表达的影响:蓝色梭形和多角形的是 TH,棕色的是 GFAP。Aa 为延髓内 TH 表达的低倍图($\times 40$);Bb 为 VSC 内 TH 表达的高倍图($\times 200$);Cc 为 VSC 内 TH/GFAP 双标表达的高倍图($\times 400$)。ABC 显示的是足三里组;abc 显示的是模型组

Fig.1 The effects of Electroacupuncture on TH and GFAP expression of VSC in Diabetic Gastroparesis Model rats :The blue spindle and polygonal shape is TH expression, the brown is GFAP expression. Figure Aa is the TH expression in VSC under low magnitude ($\times 40$); Figure Bb is the TH expression in VSC under high magnitude ($\times 200$); figure Cc is the double stained TH/GFAP expression in VSC under high magnitude ($\times 400$). Figure ABC is the DGP plus EA Zusanli acupoint group, Figure abc is the DGP model group

比较三组的 TH 和 GFAP 阳性反应产物表达,以模型组和非经非穴组的最高,足三里组最低;足三里组与它们比较差异有统计学意义(表 1)。

表 1 电针对糖尿病胃轻瘫大鼠 VSC 内 TH 和 GFAP 表达的影响 (n=8) $\bar{x} \pm s$ Table 1 The effects of Electroacupuncture on TH and GFAP expression of VSC in Diabetic Gastroparesis Model rats. (n=8) $\bar{x} \pm s$

Group	TH(Number)	GFAP(OD)
Control	2.1± 0.3	63.6 4.3
Model	31.3 4.4*	113.8 7.6*
Zusanli	16.8 3.2	95.4 8.4
Non-acupoint	35.2 4.8*	124.1 12.5*

注:与足三里穴组比较,* P<0.01

Note:Compared with Zusanli group,* P<0.01

3 讨论

中枢延髓孤束核及迷走神经背运动核共同对胃肠道功能起调节作用,其中孤束核属于内脏感觉中继核团,接受胃肠等消化器官的内脏感觉信息的传入,而迷走神经背运动核可发出传出纤维支配胃肠等器官的运动功能。两个核团解剖关系密切,相互影响,共同形成迷走孤束复合体。多巴胺是重要的中枢及外周神经递质之一,在外周它可通过与胃肠道多巴胺受体结合,参与对胃肠动力的调节作用,有研究发现多巴胺能使胃体平滑肌松弛,加强胃容受性舒张,减低胃内压,且还能抑制胃体及胃窦的推进运动,使幽门收缩,延迟胃排空^[6]。因此,抑制外周多巴胺受体可减轻胃动力低下的症状。在中枢它也是脑内重要的神经递质,活化后的多巴胺能神经元可释放出多巴胺与周围的神经元及胶质细胞上的多巴胺受体结合,进而影响它们的功能。本实验观察到,DGP 大鼠 VSC 内多巴胺能神经元数目明显增加,同时其周围的星形胶质细胞亦出现明显活化,而针刺干预后 VSC 内的多巴胺能神经元活性受到抑制,活化的星形胶质细胞亦出现下调。提示延髓 VSC 内多巴胺能神经元和星形胶质细胞参与了针刺对 DGP 大鼠胃运动功能的调控作用。

以往的研究认为,胶质细胞对神经元仅有营养支持作用,不对神经信息发生反应。但随着对其功能研究的深入,目前认为神经胶质细胞在脑的机能活动中起着积极主动的调节作用^[7-11]。在某种刺激下,中枢神经神经元与其周围的胶质细胞同时出现反应。神经元出现激活,周围的胶质细胞亦表现为“兴奋型”,即胞体变大,突起变粗,星形胶质细胞的标志物-胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)的表达上调,亦出现激活状态^[12,13]。电镜下观察到一个神经元可与许多个胶质细胞接触,一个胶质细胞也可与多个神经元接触,形成一个复杂的网络,构成一个整体^[14]。并且在胶质细胞与神经元的接触处还存在多种双向的信息通路,例如突触及缝隙连接结构等^[14,15]。表明神经元与胶质细胞在解剖结构及功能上关系密切,在中枢神经系统的各个部位形成神经元-胶质细胞复合体,共同对机体多种神经信息进行调控。本实验观察到,针刺前后 DGP 大鼠的 TH 和 GFAP 阳性免疫反应产物密集表达于 VSC 内,有明显的定位特点。高倍镜下观察到,蓝色 TH 阳性神经元的胞体和突起周围,有大量棕色的 GFAP 阳性星形胶质细胞的突起包绕,两者在形态学上有密切关系。推测在针刺调节 DGP 大鼠中,多巴胺能神经元与其周围的星形胶质细胞之间存在密切的信息交流,共同参与对针刺信息的调控。但有关多巴胺能神经元与星形胶质细胞之间进行信息交流的具体途径及多巴胺在此信息交流中扮演的角色等仍需进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] 张必萌,黄文燕,徐斯伟,等. 针灸治疗糖尿病性胃轻瘫综合征临床观察[J]. 上海针灸杂志,2009,28 (12) :696-697
Zhang Bi-meng, Huang Wen-yan, Xu Si-wei, et al. Clinical Observations on Acupuncture Treatment for Diabetic Gastroparesis Syndrome [J]. Shanghai Journal of Acupuncture and Moxibustion, 2009, 28 (12) :696-697
- [2] 孔素平. 健脾理气法针刺治疗糖尿病性胃轻瘫 45 例临床观察[J]. 山西中医,2009,25 (4) :31-32
Kong Su-ping. Clinical Observation of Acupuncture with Principle of Invigorating Spleen to Regulate Qi on Diabetic gastroparesis, A Report of 45 Cases [J]. Shanxi Journal of Traditional Chinese Medicine, 2009,25 (4) :31-32
- [3] 秦明,叶文广,姚庆林,等. 电针对糖尿病胃轻瘫大鼠胃电活动与延髓神经元和星状胶质细胞可塑性的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志,2009,17(02) :77-80
Qin Ming, Ye Wen-guang, Yao Qing-lin, et al. Change of electrogastric activity and plasticity of neurons and astrocytes in bulbous in rats with diabetic gastroparesis treated by electroacupuncture [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Digestion, 2009,17(02) :77-80
- [4] 赵劲风,陈昌华,罗团连,等. 熟地所致食滞脾虚小鼠模型初探[J]. 中国现代医学杂志,1999,9 (2) :39-40
Zhao Jin-feng, Chen Chang-hua, Luo Tuan-lian, et al. A study on the model mice which have holding food stagnation and deficiency of spleen healthy energy by libosch [J]. China Journal of modern medicine, 1999,9 (2) :39-40
- [5] 孙泽庭,吴光炯,隋艳华. 四氧嘧啶和熟地诱导糖尿病胃轻瘫大鼠模型初探[J]. 中国中医基础医学杂志,2003,9(1):37-38
Sun Ze-tin, Wu Guang-jun, Sui Yan-hua. A study on the diabetic gastroparesis model mice induced by the alloxan plus libosch[J]. China Journal of Basic Medicine In Traditional Chinese Medicine, 2003, 9 (1):37-38
- [6] Dive A, Foret F, Jamart J, et al. Effect of dopamine on gastrointestinal motility during critical illness [J]. Intensive Care Med, 2000,26 (7): 901-907
- [7] Allen NJ and Barres BA. Glia - more than just brain glue [J]. Nature, 2009, 457: 675-677
- [8] Iadecola C, Nedergaard M. Glial regulation of the cerebral microvasculature[J]. Nature Neuroscience, 2007, 10:1369-1373
- [9] Tsuda M, Inoue K, Salter MW. Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in 'small' glia [J]. Trend in Neurosciences, 2005, 28(2):101-107

(下转第 1020 页)

参考文献 (References)

- [1] Dorer MS, Talarico S, Salama NR. Helicobacter pylori's unconventional role in health and disease [J]. PLoS Pathog, 2009, 5 (e100054410) 1-6
- [2] Zhou YN, Coleman WG Jr, Yang ZX. Regulation of cell growth during serum starvation and bacterial survival in macrophages by the bi-functional enzyme SpoT in Helicobacter pylori [J]. J Bacteriol, 2008, 190(24): 8025-8032
- [3] Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, et al. Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer [J]. New Engl. J. Med, 2001, 345: 784-789
- [4] Ayraud S, Janvier B, Salaun L, et al. Polyphosphate kinase: a new colonization factor of helicobacter pylori [J]. FEMS Microbiol lett, 2005, 243(1): 45-50
- [5] Ayraud S, Janvier B, Salaun L, et al. Modification in the *ppk* gene of helicobacter pylori during single and multiple experimental murine infections [J]. Infect Immun, 2003, 71(4): 1733-9.1: 77-85
- [6] Segal ED, Falkow S, Tompkins LS. Helicobacter pylori attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangements and tyrosine phosphorylation of host cell proteins [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(3): 1259-1264
- [7] Yang ZX, Zhou YN, Yang Y, et al. Polyphosphate binds to the principal sigma factor of RNA polymerase during starvation response in Helicobacter pylori [J]. Mol Microbiol, 2010, 77(3): 618-627
- [8] Suzuki H, Iwasaki E, Hibi T. Helicobacter pylori and gastric cancer. Gastric Cancer, 2009, 12(2): 79-87
- [9] Stasi R, Provan D. Helicobacter pylori and Chronic ITP. Hematology [J] Am Soc Hematol Educ Program, 2008, 206-211
- [10] Chen SJ, Wang LJ, Zhu Q, et al. Effect of H pylori infection and its eradication on hyperammonemia and hepatic encephalopathy in cirrhotic patients [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(12): 1914-1918
- [11] Blaser MJ. An endangered species in the stomach. Sci American [J]. 2005, 292(2): 38-45
- [12] Cover TL, Blaser MJ. Helicobacter pylori in health and disease [J]. Gastroenterology, 2009, 136 (6): 1863-1873
- [13] Ghoshal UC, Chourasia D. Gastroesophageal Reflux Disease and Helicobacter pylori: What May Be the Relationship [J]. J Neurogastroenterol Motil, 2010, 16(3): 243-250
- [14] Amedei A, Codolo G, Del Prete G, et al. The effect of Helicobacter pylori on asthma and allergy [J]. J Asthma Allergy, 2010, 29: 3: 139-147
- [15] Atherton JC, Blaser MJ. Coadaptation of Helicobacter pylori and humans: ancient history, modern implications [J]. J Clin Invest, 2009, 119 (9): 2475-2487
- [16] Proenca-Modena JL, Acrani GO, Brocchi M. Helicobacter pylori: phenotypes, genotypes and virulence genes [J]. Future Microbiol, 2009, 4(2): 223-240
- [17] Ault-Riche D, Fraley CD, Tzeng CM, et al. Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in Escherichia coli [J]. J Bacteriol, 1998, 180 (7): 1841-1847
- [10] Tsuda M, Shigemoto MY, Koizumi S, et al. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury [J]. Nature, 2003, 424, 778-783
- [11] Qin M, Rao ZR, Wang JJ, et al. Effects of response of medullary astrocytes and neurons to visceral pain stimulation rats by carbenoxolone [J]. Progress in modern biomedicine, 2010, 10(18): 3410-3413
- [12] Deck JH, Eng LF, Bigbee J, et al. The role of glial fibrillary acidic protein in the diagnosis of central nervous system tumors [J]. Acta Neuropathol, 1978, 42: 183-190
- [13] Sun YN, Lou JY, Rao ZR, et al. GFAP and Fos immunoreactivity in lumbo-sacral spinal cord and medulla oblongata after chronic colonic inflammation in rats [J]. World Journal of Gastroenterology, 2005, 11 (31): 4827-4832
- [14] Qin M, Wang JJ, Cao R, et al. The lumbar spinal cord glial cells actively modulate subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat [J]. Neuroscience Research, 2006, 55 (4): 442-450
- [15] Duan L, Yuan H, Su CJ, et al. Ultrastructure of junction areas between neurons and astrocytes in rat supraoptic nuclei [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(1): 117-121

(上接第 1008 页)