

☆ XXXX ☆

不同温度热刺激足三里抑制急性结肠黏膜损伤大鼠内脏痛和SRD神经元电活动

李亚妮, 张知云, 孙小月, 王晓宇, 邓廖禹贤, 郑 好, 陈俊康, 王莉莉, 宿杨帅, 李 亮, 景向红
(中国中医科学院针灸研究所, 北京 100700)

【摘 要】 目的:观察不同温度热刺激足三里缓解急性结肠黏膜损伤大鼠内脏痛敏,探索其量效关系,并研究该作用对延髓背侧网状亚核(SRD)电活动的影响。**方法:**试验采用雄性SD大鼠。(1)18只大鼠随机分为正常组、模型组,每组9只,采用芥子油灌肠建立急性结肠黏膜损伤模型,通过结肠内窥镜、HE染色观察结肠组织的机构及病理形态变化,采用免疫荧光染色检测大鼠结肠组织降钙素基因相关肽(CGRP)与瞬时受体电位香草酸亚型1(TRPV1)表达。(2)30只大鼠随机分为正常组、模型组及44、48、52℃热刺激组,造模后对各刺激组大鼠“足三里”分别施加相应温度的热刺激。采用直结肠扩张诱发内脏痛,以腹直肌肌电记录评价各组大鼠腹直肌肌电曲线下面积(AUC),并计算不同温度热刺激对伤害性肌电的抑制率。(3)取3只正常大鼠,运用伪狂犬病毒逆行示踪技术标记同时接受足三里与结肠投射的延髓SRD核团神经元。(4)32只模型大鼠随机分为模型组及44、48、52℃热刺激组,每组8只,采用多通道在体电生理技术记录大鼠SRD神经元的电活动,观察急性灌注芥子油1 h内SRD神经元的放电变化及不同温度热刺激对其放电的抑制作用。**结果:**正常组大鼠结肠黏膜结构完整,未见明显炎症改变;芥子油灌注后,大鼠结肠黏膜充血、水肿、结构破坏及明显的炎性细胞浸润,TRPV1和CGRP阳性神经纤维分布显著增加($P<0.05$)。模型大鼠腹直肌肌电AUC较正常组显著升高($P<0.001$),48℃和52℃热刺激后,诱发的腹直肌肌电明显减少($P<0.001$);而44℃热刺激前后AUC差异无统计学意义。与44℃相比,48和52℃的抑制率均升高($P<0.05$),且呈温度依赖性趋势($P<0.05$),而48和52℃之间差异无统计学意义。在延髓SRD脑区可观察到分别由结肠壁和足三里逆向标记的阳性神经元,以及双标记的阳性神经元。芥子油灌肠5 min后,SRD神经元的放电频率迅速增加,并持续30 min($P<0.05$),在此高放电期内,对足三里进行不同温度热刺激后,48℃和52℃干预显著降低了SRD神经元放电频率($P<0.01$, $P<0.05$),而44℃热刺激无此效应。**结论:**48℃和52℃伤害性热刺激可有效缓解急性结肠黏膜损伤大鼠的内脏痛敏,其机制可能与抑制延髓SRD神经元的伤害性放电有关;综合中枢抑制效应与局部皮肤安全性,48℃热刺激可能是发挥该效应合适的干预温度。

【关键词】 热刺激;内脏痛敏;温度;延髓背侧网状亚核

Temperature-dependent effects of thermal stimulation at “Zusanli” (ST 36) on visceral hyperalgesia and SRD neuronal electrical activity in rats with acute colonic mucosal injury

LI Ya-ni, ZHANG Zhi-yun, SUN Xiao-yue, WANG Xiao-yu, DENG Liao-yu-xian, ZHENG Hao, CHEN Jun-kang, WANG Li-li, SU Yang-shuai, LI Liang, JING Xiang-hong (Institute of Acupuncture and Moxibustion, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

【ABSTRACT】 Objective To observe the effect and dose-response relationship of thermal stimulation at different temperatures at “Zusanli” (ST 36) on alleviating visceral hyperalgesia in rats with acute colonic mucosal injury, so as to explore its underlying mechanism focusing on the electrical activity of the subnucleus reticularis dorsalis (SRD) in the medulla. **Methods** (1) Eighteen SD rats were randomly divided into normal and model groups, with 9 rats in each group. The acute colonic mucosal injury model was established by mustard oil enema. The structural and pathological

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20260676

引用格式:李亚妮,张知云,孙小月,等.不同温度热刺激足三里抑制急性结肠黏膜损伤大鼠内脏痛和SRD神经元电活动[J].针刺研究,XXXX,XX(X):1-11.

项目来源:国家自然科学基金资助项目(No.82130122,82074568)

通信作者:景向红, jxhtjb@263.net

changes of colonic tissue were observed by colonoscopy and HE staining. The expression of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in rat colonic tissue was detected by immunofluorescence staining. (2) Thirty SD rats were randomly divided into normal, model, 44 °C, 48 °C, and 52 °C thermal stimulation groups (n=6 in each group). After modeling, thermal stimulation at the corresponding temperature was applied to “Zusanli” (ST 36) in each stimulation group. Visceral pain was induced by colorectal distension. The area under the curve (AUC) of rectus abdominis electromyogram (EMG) was evaluated by EMG recording, and the inhibition rate of noxious EMG by thermal stimulation at different temperatures was calculated. (3) Pseudorabies virus (PRV) retrograde tracing was employed in 3 normal rats to label SRD neurons receiving dual projections from both ST 36 and the colon. (4) Thirty-two model rats were randomly divided into a model group and 44, 48, and 52 °C thermal stimulation groups, with 8 rats in each group. Multi-channel in vivo electrophysiological technique was used to record the electrical activity of SRD neurons. The changes in SRD neuronal discharge within 1 h of acute mustard oil perfusion and the inhibitory effect of thermal stimulation at different temperatures on their discharge were observed. **Results** After modeling and compared with the normal group, the rats’ colonic mucosa showed congestion, edema, structural destruction, and obvious inflammatory cell infiltration, with significantly increased distribution of CGRP- and TRPV1-positive nerve fibers ($P<0.05$) and a significantly increased AUC of rectus abdominis EMG ($P<0.001$). After 48°C and 52°C thermal stimulation, the evoked rectus abdominis EMG was significantly reduced ($P<0.001$); while there was no statistically significant difference in AUC before and after 44°C thermal stimulation. The inhibition rates at 48°C and 52°C were significantly higher than that at 44°C ($P<0.05$), displaying a temperature-dependent trend ($P<0.05$), with no significant difference between 48°C and 52°C. Morphologically, PRV retrograde tracing revealed neurons in the medullary SRD region that were single-labeled from the colon or ST 36, as well as double-labeled neurons. Electrophysiologically, the firing frequency of SRD neurons increased rapidly at 5 min after mustard oil instillation, and the increase persisted for 30 min ($P<0.05$). During this high-firing period, thermal stimulation at 48 °C and 52 °C significantly suppressed the firing frequency ($P<0.01$, $P<0.05$), whereas 44 °C stimulation had no such effect. **Conclusion** Noxious thermal stimulation at 48 °C and 52 °C can effectively alleviate visceral hyperalgesia in rats with acute colonic mucosal injury, which may be related to inhibiting nociceptive discharge of medullary SRD neurons. Considering both central inhibitory effect and local skin safety, 48 °C appears to be the optimal intervention temperature.

【KEYWORDS】 Thermal stimulation; Visceral hyperalgesia; Temperature; Subnucleus reticularis dorsalis

艾灸通过温热刺激穴位,在躯体及内脏痛症治疗中疗效确切^[1-3]。“凡灸诸病必火足气到,始能求愈”,提示温热刺激需达到特定量才能起效。以往研究表明,艾灸对躯体疼痛的镇痛效应具有温度依赖性^[4],45 °C灸温对福尔马林 I 相急性痛的缓解作用优于 35 °C^[5];47 °C和 52 °C对肌肉炎性痛及神经病理性疼痛的镇痛效果亦优于中低温(37 °C和 42 °C)^[6]。依据针灸科学研究行动计划,深入探究关键变量-效应关系,明确刺激参数至关重要^[7]。然而,针对内脏痛这一特殊疼痛类型,艾灸这类温热刺激的镇痛效应及与温度的量效关系目前尚不确切。

课题组前期研究表明,44~48 °C热刺激可剂量依赖性地抑制结直肠扩张(CRD)诱发的脊髓背角广动力神经元放电,并在 48 °C时达到饱和^[8]。然而,在内脏痛病理状态下,热刺激是否仍可抑制内脏伤害性传入信息,其在脊髓上中枢的整合机制如何?延髓背侧网状亚核(SRD)是痛觉调控重要的脊髓上中枢,也是内脏-躯体痛觉信息整合的关键枢纽^[9-10]。SRD参与弥漫性伤害抑制性控制(DNIC)

效应,通过“脊髓-SRD-脊髓”负反馈环路介导下行疼痛抑制^[11-12],该核团内的全部伤害性会聚神经元对躯体及内脏的各类伤害性刺激呈现强度依赖性响应^[13-14],提示SRD可能是探索体表热刺激缓解内脏痛量效特征的关键。

前期研究观察到,电针“足三里”抑制急性内脏痛所致SRD神经元放电的效应随干预强度的增加而增加^[15]。但是,作用于“足三里”的刺激信号如何调控内脏疼痛信号,以及不同温度梯度热刺激“足三里”是否也对SRD神经元放电具有温度依赖性的抑制作用,是本研究关注的重点。因此,本研究拟以急性结肠黏膜损伤大鼠为模型,结合腹直肌肌电记录、在体电生理记录及伪狂犬病毒(PRV)逆向跨突触示踪技术,系统评估不同温度热刺激“足三里”缓解内脏痛敏的效应规律,在此基础上观察“足三里”穴区与结肠的神经支配在SRD是否存在确切的解剖学会聚,进而从SRD神经元的电活动探索相关的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

清洁级雄性SD大鼠83只,体质量为 (210 ± 20) g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0010。实验前于中国中医科学院针灸研究所动物房适应性饲养1周,饲养条件为:室温 $(20 \pm 2)^{\circ}\text{C}$,湿度 $(55 \pm 5)\%$,12 h光照/12 h黑暗循环,自由摄食饮水。所有实验程序均遵循中华人民共和国科学技术部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》,并经中国中医科学院针灸研究所动物伦理审查委员会批准(批号:D2024-01-26-05)。

将大鼠按实验目的随机分为以下组别:(1)结肠形态学观察及免疫荧光检测:18只大鼠随机分为正常组9只,模型组9只。(2)腹直肌肌电记录:30只大鼠随机分为正常组、模型组、 44°C 热刺激组、 48°C 热刺激组、 52°C 热刺激组,每组6只。(3)PRV神经示踪:正常大鼠3只,用于逆向跨突触病毒示踪实验。(4)SRD神经元电生理记录:24只模型大鼠随机分为 44°C 热刺激组、 48°C 热刺激组、 52°C 热刺激组,每组8只。

1.2 主要试剂与仪器

芥子油(美国Sigma),异氟烷(临沂鲁南贝特),三溴乙醇(南京爱贝),乌拉坦(上海阿拉丁),0.9%氯化钠溶液、多聚甲醛(上海国药),苏木精伊红染色试剂盒(北京索莱宝),山羊抗降钙素基因相关肽(CGRP)抗体、小鼠抗瞬时受体电位香草酸亚型1(TRPV1)抗体、Alexa Fluor 350荧光素化的phalloidin、Alexa Fluor 488荧光素化的驴抗山羊二抗、Alexa Fluor 647荧光素化的驴抗小鼠二抗(英国Abcam),逆向跨突出示踪病毒PRV-GFP、PRV-mRFP(武汉枢密)

内窥镜、光学显微镜(日本Olympus),血压计(江苏鱼跃),10 μL 微量注射器(上海Hamilton),共聚焦显微镜(日本尼康),小动物麻醉机、冷冻切片机(深圳瑞沃德),32通道阵列电极(美国NeuroNexus),生物电放大器(英国Digitimer),显微操作器(日本Narishige),前置放大器、多通道数据采集系统(美国Blackrock Microsyste),Powerlab信号采集分析系统(澳大利亚AD),立体定位仪(日本光电),恒温水浴锅(浙江力辰),小型循环蠕动泵(上海卡川尔)。

1.3 造模方法

除正常组外,其余各组大鼠禁食不禁水12 h,自

由活动。按摩大鼠腹部,促进排空粪便。用棉签在模型组和各温度组大鼠肛周涂抹少量凡士林,随后用直灌胃针从肛门缓慢插入5 cm,灌注5%芥子油混合液(以石蜡油稀释)0.5 mL。灌注后立即抬高大鼠臀部约 $30^{\circ}\sim 40^{\circ}$,保持头低臀高位30 s,以防止液体外溢并确保芥子油充分吸收^[15]。造模成功的判定标准为:灌注芥子油后,大鼠腹直肌肌电发放较正常组显著增加。正常组不予任何处理。

1.4 干预方法

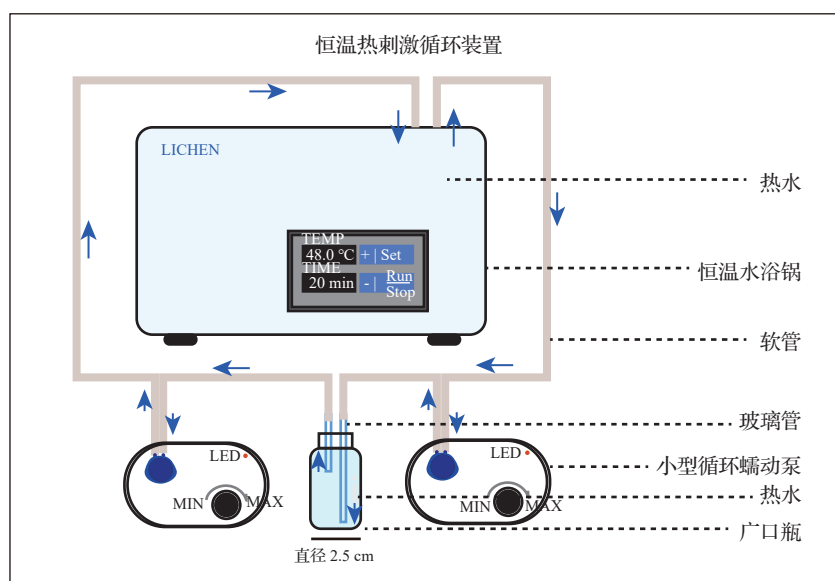
采用自制恒温广口瓶循环装置进行热刺激干预(图1),广口瓶底部直径25 mm、高10 mm,实验开始前30 min开启装置预热,以确保循环水温恒定。干预期间,将广口瓶底部紧贴于大鼠右侧“足三里”区域的裸露皮肤上,持续1 min。使用红外测温仪实时监测广口瓶底部与皮肤接触区域的温度,确保刺激温度精准维持在 44°C 、 48°C 或 52°C (偏差在 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 内)。各热刺激组大鼠仅接受相应温度的热刺激干预1次,正常组与模型组大鼠不予任何热刺激干预。

1.5 观察指标及检测方法

内窥镜观察大鼠局部结肠组织结构变化:造模前后,取正常组与模型组大鼠各3只,经腹腔注射10%乌拉坦(1.5 mL/100 g)麻醉,用棉棒蘸取少量石蜡油涂抹于大鼠肛周及内窥镜镜身,将内窥镜经肛门轻轻旋转插入结直肠约5 cm,观察正常组和模型组大鼠远端结肠黏膜的形态学变化。

HE染色观察大鼠局部结肠组织的病理形态变化:取正常组与模型组大鼠各6只,经10%乌拉坦(1.5 mL/100 g)腹腔注射麻醉后,依次经心脏灌注0.9%氯化钠溶液和4%多聚甲醛进行组织固定。取距肛门4~6 cm处的远端结肠组织约2 cm,其中1 cm经梯度脱水、透明、浸蜡包埋后,行横向切片,厚度5 μm 。石蜡切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化后,依次进行苏木精染色、1%盐酸乙醇分化、0.2%氨水返蓝及伊红染色。染色后经梯度乙醇脱水、透明,中性树胶封片,于光学显微镜下观察结肠组织病理形态变化。

免疫荧光染色检测大鼠结肠组织CGRP与TRPV1表达:将上述剩余的1 cm结肠组织置于4%多聚甲醛中后固定2 h,在25%的蔗糖溶液中脱水。然后进行冷冻切片,厚度40 μm 。采用TRPV1和CGRP双重荧光免疫组织化学染色法标记神经纤维:用疏水笔在切片上圈定好组织,滴加含3%驴血清和0.5% Triton X-100的0.1 mol/L PB(pH 7.4)



注:蓝色箭头表示水流方向。

图1 热刺激恒温循环干预装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the constant-temperature circulatory thermal stimulation device

封闭液,室温孵育 30 min;加入小鼠抗 TRPV1 抗体 (1:500)和山羊抗 CGRP 抗体 (1:500)混合液,4℃孵育过夜;次日用 0.1 mol/L PB 清洗 3 次后,用 Alexa Flour 350 荧光素化的 phalloidin (1:500)、Alexa Flour 647 荧光素化的驴抗小鼠二抗 (1:500)和 Alexa Flour 488 荧光素化的驴抗山羊二抗 (1:500)混合液,室温下孵育 30 min。清洗 3 次后,用 50% 甘油封片。使用激光共聚焦显微镜观察两组大鼠结肠组织中的 TRPV1 和 CGRP 的荧光表达情况,并用 Image J 软件统计平均荧光强度值。

腹直肌肌电记录大鼠内脏痛敏的变化:各组大鼠经 4% 异氟烷诱导麻醉 2 min 后,以 1% 异氟烷维持浅麻醉状态。腹部剃毛,仰卧位固定于手术台,并抬高臀部。将自制的球囊(外涂石蜡润滑)经肛门插入结直肠约 5 cm,用胶带将导管固定于距肛门 1 cm 处的大鼠尾根部。球囊导管末端经三通管分别连接血压计和 10 mL 注射器,用于施加 CRD 刺激。将两根 0.25 mm×13 mm 的针灸针作为记录电极,平行刺入同侧腹直肌(间距 5 mm),连接生物放大器记录肌电信号。参照既往研究^[16],选用 60 mmHg(1 mmHg≈0.133 kPa)压力的 CRD 刺激,持续 20 s 以诱发腹直肌放电。芥子油灌肠后,先记录各组大鼠在 60 mmHg CRD 刺激下 20 s 内的腹直肌肌电,作为干预前基础值。随后,于各热刺激组大鼠右侧“足三里”施加相应温度(44、48、52℃)的热刺激 1 min。刺激结束后,再次记录同样 CRD 参

数诱发的腹直肌肌电,作为干预后值。计算各组大鼠干预前后 CRD 诱发的腹直肌肌电曲线下面积(AUC, mV/s),并进一步计算抑制率:抑制率(%)=(干预前 AUC-干预后 AUC)÷干预前 AUC×100%。

PRV 病毒示踪观察“足三里”和结肠伤害信号在脊髓上中枢的神经支配在延髓的会聚区域:采用正常大鼠,分别于“足三里”穴区和结肠注射逆向跨突触示踪病毒 PRV-EGFP 和 PRV-mRFP,观察延髓水平的神经元标记情况。大鼠经异氟烷气体麻醉后,仰卧位固定,腹部及右后肢剃毛消毒。于下腹部前正中线做长约 5 cm 的纵向切口,用蘸有 0.9% 氯化钠溶液的棉签轻轻拨开内脏,暴露远端结肠。左手持棉签轻托结肠,右手持微量注射泵,将玻璃电极尖端刺入结肠黏膜层 3 mm 深,以 50 nL/min 的速度注射 PRV-mRFP 病毒 0.5 μL/位点。注射完毕留针 1 min 以防止病毒外溢。每只大鼠结肠共注射 10 个位点,总注射体积 5 μL。在右侧“足三里”穴区,将微量注射器钢针刺入约 5 mm 深,以 100 nL/min 的速度注射 PRV-EGFP 病毒 5 μL,注射完毕留针 3 min。整个手术过程中,大鼠置于恒温加热垫上,并使用直肠温度计实时监测体温,维持体温在 37℃ 左右。术后将大鼠继续置于保温毯上直至完全苏醒。病毒注射 5 d 后,经心脏灌注固定,取全脑置于 4% 多聚甲醛中后固定 2 h,然后移入 25% 蔗糖溶液(4℃)脱水。待组织沉底后行冰冻切片,厚

度 40 μm , 用 50% 甘油封片。使用激光共聚焦显微镜观察延髓脑区的病毒标记情况

多通道细胞外电生理记录 SRD 神经元电活动: 各组大鼠经腹腔注射 10% 乌拉坦 (1.5 mL/kg) 麻醉后, 置于恒温加热垫上, 使用直肠温度计实时监测并维持体温在 37 $^{\circ}\text{C}$ 左右, 俯卧位固定于立体定位仪。双耳用耳棒固定, 头部屈曲使延髓表面保持水平, 门齿用棉线固定于门齿板, 确保头部位置稳定。沿颈部正中中线切开皮肤, 钝性分离肌肉, 充分暴露枕骨大孔。用 11 号手术刀尖端沿枕骨大孔边缘环形切开硬脊膜, 暴露菱形窝。参考大鼠脑立体定位图谱^[17], SRD 脑区定位坐标为: 以延髓菱形窝底端门部 (obex) 为原点, 向后 1.0~2.0 mm, 正中线上旁开

1.0~1.5 mm, 延髓表面下 600~2000 μm 。使用微电极推进器将 32 通道阵列电极垂直插入延髓, 记录 SRD 神经元的电活动。在四肢及尾部交替施加伤害性钳夹刺激和非伤害性毛刷刺激。对各部位伤害性刺激均产生激活反应, 而对毛刷刺激无反应的神经元, 鉴定为 SRD 神经元^[15]。在模型建立后 5~32 min 为 SRD 神经元放电相对平稳期, 其间给予 1 min 的 44、48 或 52 $^{\circ}\text{C}$ 热刺激, 记录刺激前后 SRD 神经元放电频率的变化。为明确不同温度热刺激的抑制效应, 统计热刺激后放电频率下降或升高的神经元比例, 并计算刺激前后放电频率的变化率: 变化率 (%) = (干预后放电频率 - 干预前放电频率) $\div$ 干预前放电频率 $\times 100\%$

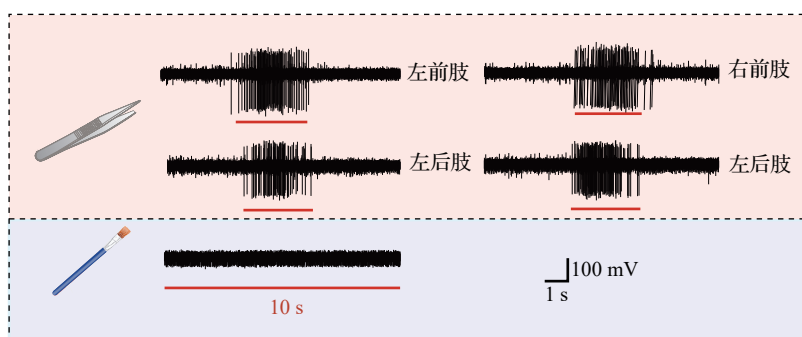


图 2 延髓背侧网状亚核 (SRD) 神经元鉴别例图

Fig. 2 Example figure for identifying subnucleus reticularis dorsalis (SRD) neurons

1.6 统计分析

实验数据由 SPSS22.0 统计学软件分析处理, 统计数据之前先进行正态性检验与方差齐性检验。计量资料经 Shapiro-Wilk 检验证实符合正态分布, 以均数 $\pm$ 标准误 ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) 表示, 不符合正态分布的计量资料以中位数 (四分位数) [$M(P_{25}, P_{75})$] 表示。同一神经元干预前后放电频率比较采用配对 t 检验。多组间比较: 若数据方差齐, 则采用单因素方差分析, Tukey's HSD 检验用于组间两两比较, 非正态分布资料多组比较采用 Kruskal-Wallis 检验。针对温度梯度组采用方差分析线性趋势检验评估剂量-效应关系, 以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义的标准。

2 结果

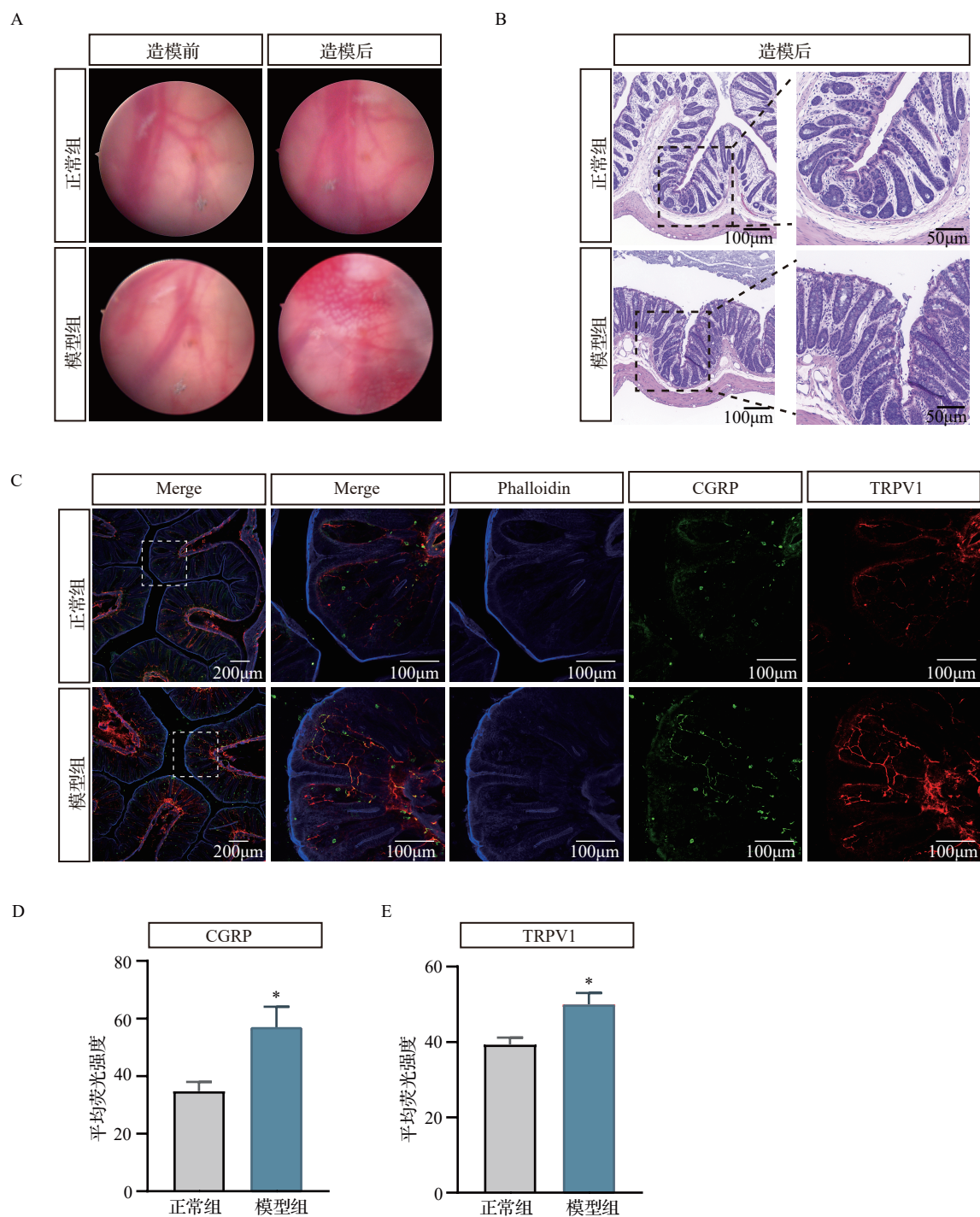
2.1 芥子油诱导大鼠急性结肠黏膜损伤, 结肠组织中的伤害性神经肽的表达增加

采用内窥镜, 我们观察到正常组大鼠远端结肠黏膜光滑, 色泽红润, 黏膜下血管纹理清晰。而经芥子油灌肠的模型大鼠结肠黏膜充血水肿, 血管纹

理模糊紊乱, 并伴随肠道内黏液分泌增多 (图 3A)。结肠组织的 HE 染色结果显示, 正常组结肠组织结构完整, 上皮细胞排列整齐紧密, 腺体分布规则, 黏膜及黏膜下层未见水肿及明显炎性细胞浸润, 而模型组大鼠结肠黏膜结构的完整性被破坏, 可见褶皱处上皮细胞脱落, 固有层腺体排列紊乱, 伴有明显的炎性细胞浸润及间质水肿 (图 3B)。免疫荧光染色结果显示, 与正常组相比, 模型组结肠组织中 TRPV1 和 CGRP 的阳性表达增加 ($P < 0.05$), 提示结肠局部伤害性神经肽含量增高。以上结果表明, 芥子油灌肠可对肠道黏膜造成明显的刺激和损伤 (图 3C、图 3D)。

2.2 不同温度热刺激“足三里”降低急性结肠黏膜损伤大鼠内脏痛敏

急性结肠黏膜损伤后, CRD 诱导该模型大鼠的腹直肌诱发肌电的 AUC 较正常大鼠明显增加 ($P < 0.001$)。48 $^{\circ}\text{C}$ 和 52 $^{\circ}\text{C}$ 刺激“足三里”后, 腹直肌诱发肌电 AUC 较模型组均显著减少 ($P < 0.001$), 而 44 $^{\circ}\text{C}$ 组大鼠的腹直肌诱发肌电 AUC 值较模型组差异无统计学意义。进一步分析显示, 44、48、52 $^{\circ}\text{C}$ 热



注:A为正常组和模型组大鼠造模前后局部结肠组织内窥镜图像;B为正常组和模型组大鼠结肠组织HE染色结果,右图为左图方框部分的放大图;C为正常组和模型组大鼠结肠降钙素基因相关肽(CGRP,绿色)、瞬时受体电位香草酸亚型1(TRPV1,红色)、鬼笔环肽(Phalloidin,蓝色)免疫荧光染色结果,右4列为左1列图中虚线方框部分的放大图;D、E为CGRP和TRPV1阳性表达的平均荧光强度统计图,与正常组相比,* $P < 0.05$ ($\bar{x} \pm s$, 6只鼠/组)。

图3 急性结肠黏膜损伤大鼠结肠组织的形态学特征及伤害性神经肽的表达

Fig. 3 Morphological characteristics and expression of noxious neuropeptides in colonic tissue of rats with acute colonic mucosal injury

刺激对腹直肌肌电AUC的抑制率分别为9.09%、51.46%和48.72%。线性趋势检验结果表明,该抑制效应随刺激温度的升高呈现显著的线性递增趋势($P < 0.05$),提示明确的剂量-效应关系。多重比

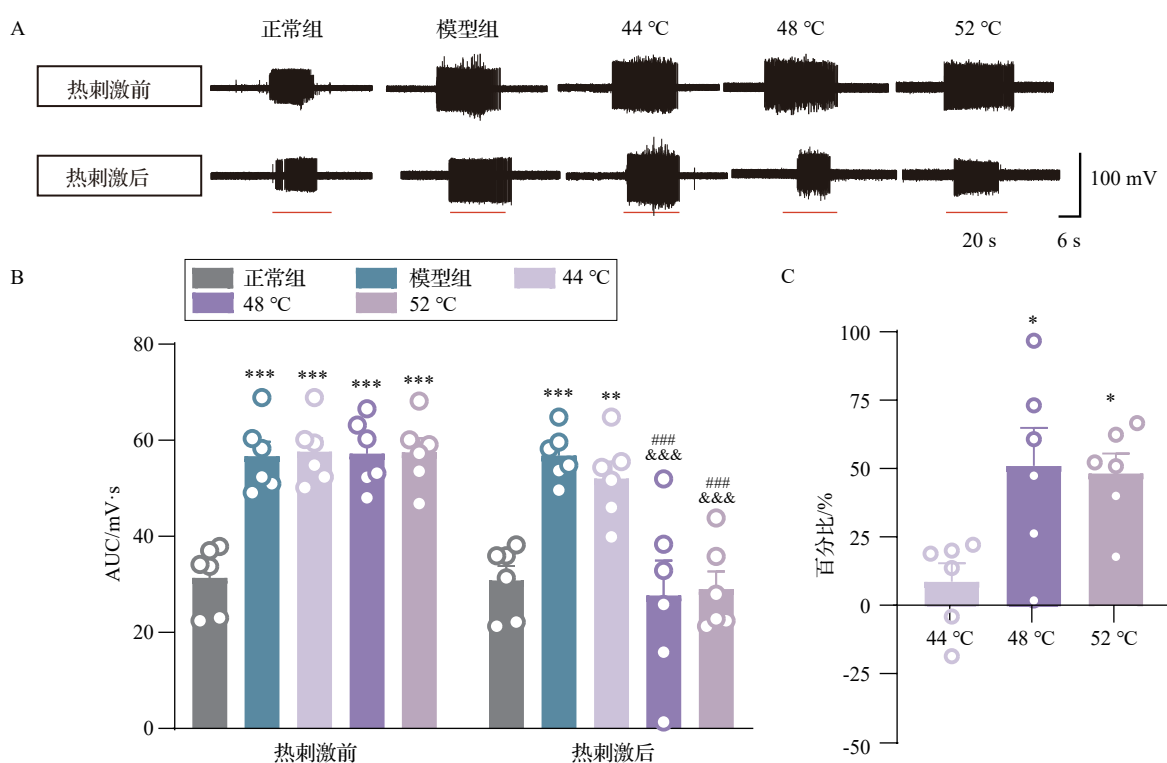
较分析进一步证实,48℃与52℃热刺激的抑制率均显著高于44℃($P < 0.05$),然而48℃组与52℃组之间差异无统计学意义。以上结果表明,达到伤害性阈值的热刺激能够有效缓解急性结肠黏膜损伤大

鼠的内脏痛敏,且该镇痛效应可能在48℃时即已达到平台期,继续升温至52℃未能进一步提升肌电抑制效果。见图4。

2.3 “足三里”和结肠神经向延髓SRD的投射

在大鼠“足三里”穴区和结肠黏膜局部分别注射偶联不同荧光的示踪病毒PRV-EGFP和PRV-

mRFP,病毒注射5d后,在延髓SRD脑区观察到PRV-EGFP和PRV-mRFP双标记的神经元和单一标记的阳性神经元。以上结果表明,延髓SRD脑区存在可同时支配“足三里”穴区和结肠的神经元,提示这两个部位的支配信息在SRD脑区发生会聚。见图5。



注:A为热刺激“足三里”前后各组大鼠腹直肌肌电例图;B为热刺激“足三里”前后各组大鼠腹直肌诱发肌电曲线下面积(AUC)统计图;C为不同温度热刺激“足三里”对急性结肠黏膜损伤大鼠腹直肌肌电AUC的抑制率。与正常组相比,*** $P<0.001$;与模型组相比,### $P<0.001$;与44℃热刺激组相比, $^{\&}$ $P<0.05$, $^{\&\&\&}$ $P<0.001$ 。

图4 不同温度热刺激“足三里”抑制急性结肠黏膜损伤大鼠的腹直肌诱发肌电($\bar{x}\pm s_x$,6只鼠/组)

Fig. 4 Inhibitory effects of thermal stimulation at different temperatures at the “Zusanli” (ST36) acupoint on evoked rectus abdominis electromyographic (EMG) activity in rats with acute colonic mucosal injury($\bar{x}\pm s_x$,6 rats/group)

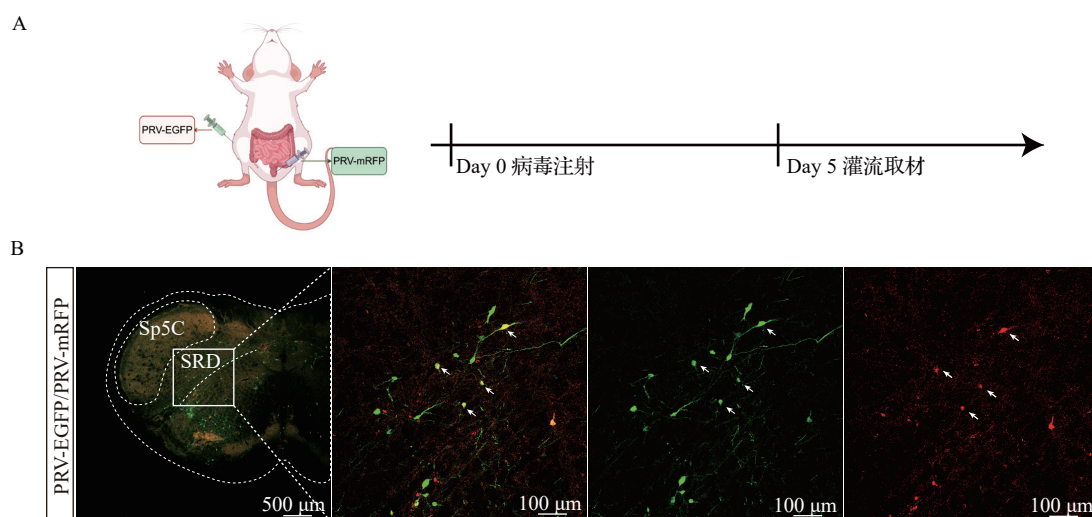
2.4 不同温度热刺激“足三里”抑制急性结肠黏膜损伤大鼠SRD神经元放电

采用多通道在体电生理技术记录延髓SRD神经元的电活动。造模前,大鼠SRD神经元自发放电较少,频率为(7.94 ± 1.44)Hz;造模后,SRD神经元的放电频率在第5 min时迅速增加至(20.37 ± 3.33)Hz,并维持高频发放至造模后第32 min[(19.74 ± 5.27)Hz],与造模前比较具有显著统计学差异($P<0.05$),随后放电频率逐渐下降。基于此时间窗口,于造模后第5~32 min内对急性结肠黏膜损伤大鼠右侧“足三里”进行热刺激,结果显示,48℃和52℃热刺激后大鼠SRD神经元放电频率均显著减少,48℃组大鼠的SRD神经元放电频率由刺激前的

(19.86 ± 1.80) Hz下降至(13.24 ± 1.39) Hz($P<0.01$);52℃组大鼠的SRD神经元放电频率由刺激前的(16.56 ± 1.81)Hz下降至(13.00 ± 1.72)Hz($P<0.05$);而44℃热刺激前后大鼠SRD神经元放电频率无明显变化[刺激前(19.41 ± 1.95)Hz,刺激后(18.86 ± 1.89)Hz]。以上结果表明,48℃和52℃的热刺激可抑制急性结肠黏膜损伤大鼠SRD神经元的伤害性电活动。见图5。

2.5 不同温度热刺激足三里抑制急性结肠黏膜损伤大鼠SRD神经元放电频率的抑制率比较

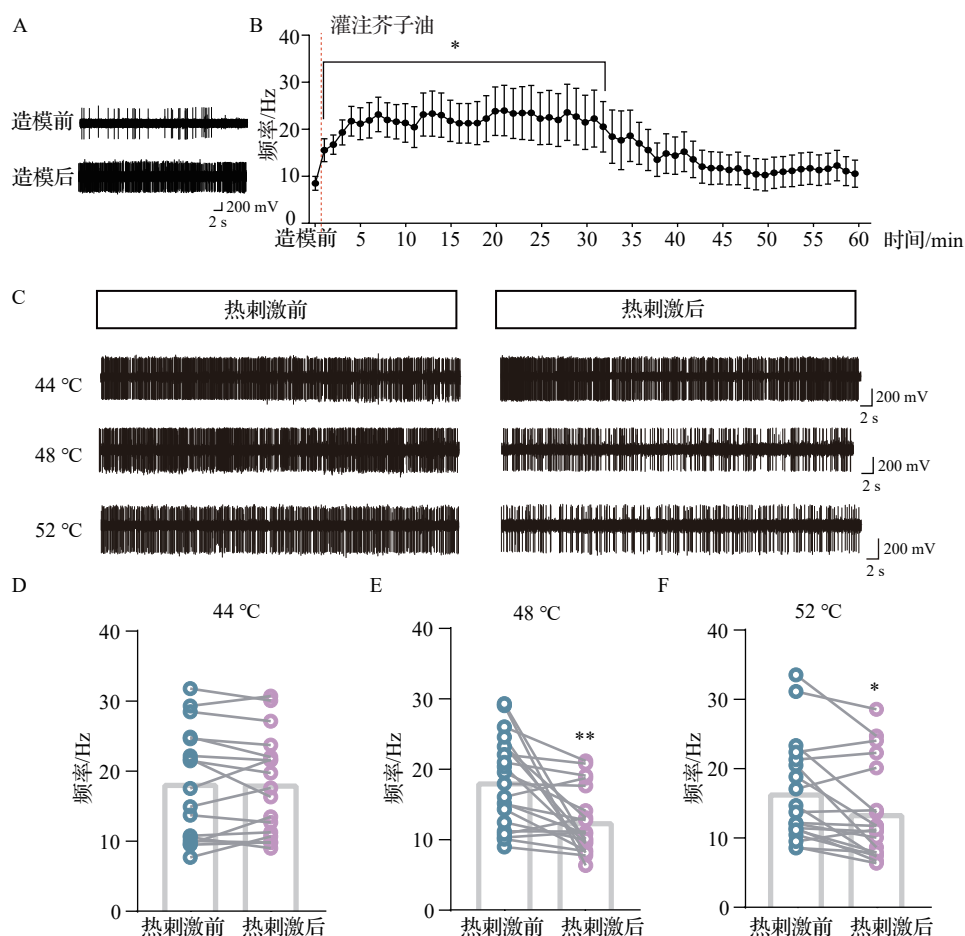
根据热刺激前后急性结肠黏膜损伤大鼠SRD神经元放电频率的上升和下降对神经元进行归类,44、48、52℃组中放电频率下降的神经元占比分别



注:A为伪狂犬病毒(PRV)示踪实验流程示意图,分别于大鼠右侧“足三里”和结肠壁注射PRV-EGFP和PRV-mRFP,5 d后观察SRD核团内神经元标记情况;B为延髓背侧网状亚核(SRD)中由PRV-EGFP(绿色)和PRV-mRFP(红色)标记的神经元例图,箭头示双标神经元(黄色),Sp5C延髓背角。

图5 “足三里”与结肠的神经支配在SRD的会聚

Fig. 5 Convergence of innervation from the “Zusanli” (ST36) acupoint region and the colon at the SRD



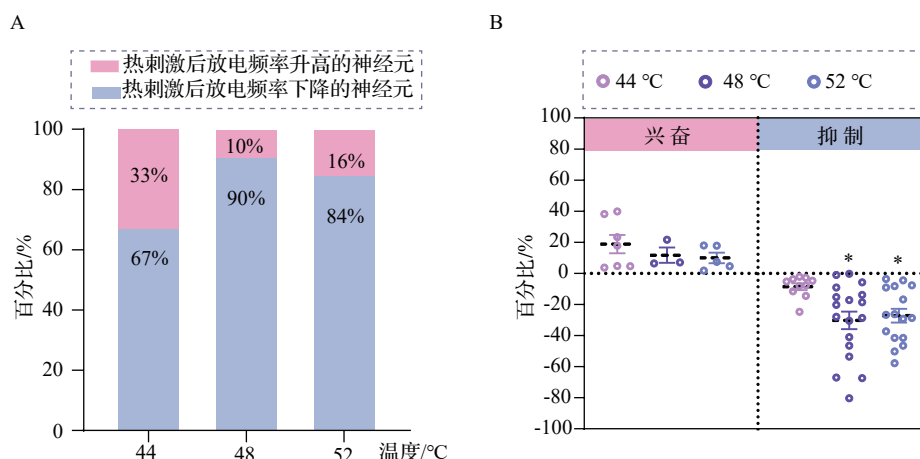
注:A为造模前后急性结肠黏膜损伤大鼠SRD神经元电活动例图;B为急性结肠黏膜损伤模型大鼠造模前1 min和造模后连续60 min放电频率统计图($n=8$),与造模前相比, $^*P<0.05$;C为44、48、52℃组大鼠热刺激前后SRD神经元放电例图;D、E、F分别为44、48、52℃组大鼠热刺激前后SRD神经元放电频率统计图,与热刺激前相比, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01(\bar{x}\pm s_x, 8\text{只/组})$ 。

图6 不同温度热刺激“足三里”抑制急性结肠黏膜损伤大鼠SRD神经元放电

Fig. 6 Inhibition of SRD neuronal discharge by thermal stimulation at different temperatures at “Zusanli” (ST36) in rats with acute colonic mucosal injury

为67%、90%和84%,放电频率升高的神经元占比分别为33%、10%和16%。比较这两类神经元放电频率的变化率,44、48和52℃组SRD神经元放电频率的抑制率分别为8.53%、30.23%和27.14%,其中48和52℃组的抑制率均大于20%;兴奋率分别为7.71%、6.74%和4.64%,均小于10%。线性趋势检验结果表明,SRD放电抑制率随刺激温度的升高呈现显著的线

性递增趋势($P<0.05$);进一步多重比较结果显示,48℃和52℃热刺激对SRD神经元放电的抑制效应均显著强于44℃组($P<0.05$);而48℃组与52℃组之间差异无统计学意义。以上结果表明,相比于44℃,48和52℃的伤害性热刺激能够更有效地抑制急性结肠黏膜损伤大鼠SRD神经元的伤害性电活动,且该中枢抑制效应在48℃时进入平台期。见图6。



注:A为44、48、52℃组大鼠SRD神经元放电频率下降(抑制)和上升(兴奋)的神经元占比分布图;B为44、48、52℃组大鼠SRD神经元放电频率下降和上升神经元的变化率。与44℃热刺激组相比,* $P<0.05$ [$M(P_{25}, P_{75})$, 8只/组]

图7 不同温度热刺激“足三里”对急性结肠黏膜损伤大鼠SRD神经元放电的抑制效应比较

Fig. 7 Comparative effects of varying thermal stimulation temperatures at “Zusanli” (ST36) on the suppression of SRD neuronal firing in the acute colonic mucosal injury rat model.

3 讨论

本研究观察了不同温度热刺激“足三里”对急性结肠黏膜损伤大鼠伤害性腹直肌肌电的抑制效应,并从延髓SRD神经元探索了潜在的作用机制。结果显示,结肠内注射芥子油可引起急性结肠黏膜损伤并诱发腹直肌肌电AUC增加。48℃和52℃热刺激“足三里”能有效降低急性结肠黏膜损伤大鼠腹直肌诱发肌电AUC,同时抑制其SRD神经元的伤害性放电,而44℃热刺激的效应不明显。PRV病毒示踪结果显示,“足三里”穴区和结肠的神经支配在延髓SRD区域存在解剖学会聚。本研究从形态学上明确了“足三里”穴区和结肠在SRD传入的会聚,通过电生理方法证明了不同温度热刺激“足三里”对结肠伤害性传入的抑制作用,且其效应呈温度依赖性特征。

不同温度热刺激的效应差异与其对穴区伤害性感受器的差异性激活有关。既往针刺镇痛机制研究提示,针刺信号可在不同中枢水平整合疼痛信号发挥镇痛效应^[18-19]。在外周水平,热刺激与针刺

具有相似的传入通路,均能激活穴区多模态感受器——TRPV1。TRPV1可被辣椒素、热($>43^{\circ}\text{C}$)、酸($\text{pH}<5.9$)、机械刺激激活^[20-21],主要分布于A δ 和C纤维末梢,参与伤害性信号的转导。达到一定强度的电针和热刺激均能通过激活TRPV1阳性C纤维传入而发挥镇痛效应^[22-23]。进一步研究^[24]表明,针刺与48℃热刺激对C纤维介导的伤害性反应具有相近的抑制幅度和时间,且均可被纳洛酮逆转。这提示达到特定温度阈值的伤害性热刺激与针刺类似,均依赖于外周A δ 和C纤维的激活。因此,本研究中44℃热刺激无明显效应,可能是因其尚未达到激活TRPV1等伤害性传入的阈值。以往研究^[25]也表明,44℃条件下即使增大刺激面积,仍无法抑制内脏痛诱发的SRD神经元放电,甚至对SRD神经元的活动产生易化效应;直至温度升至46℃以上,才开始出现稳定的抑制作用。然而,也有研究^[1]显示,连续7d、每天10min的45℃温和灸可缓解小鼠慢性内脏痛,这种差异主要考虑刺激时长与干预频次的不同——热刺激的生物学效应是刺激温度、面

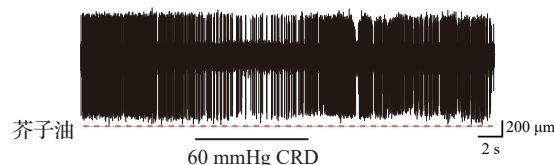
积与作用时间的综合结果。本研究仅采用单次 1 min 刺激, 44 ℃ 的累积刺激量不足以触发中枢抑制效应, 若延长刺激时间或增加干预频次, 非伤害性温热刺激也可能产生累积镇痛效应。

与 44 ℃ 的非伤害性温热刺激不同, 48 ℃ 与 52 ℃ 均属于阈上伤害性热刺激, 可充分激活穴区伤害性神经传入纤维, 从而诱发上位中枢参与的下行痛觉调制作用, 其效应本质上属于 DNIC 机制。DNIC 是指施加于身体某一部位的伤害性条件刺激, 能够有效抑制另一部位伤害性刺激所诱发的中枢(如脊髓及三叉神经尾侧核)会聚神经元的放电活动^[12]。SRD 是参与 DNIC 效应的重要核团^[14, 26], 可广泛接收来自躯体与内脏的机械、热及化学等多种类型的会聚性伤害传入, 能在脑干水平对躯体与内脏伤害性信息进行整合^[27-28]。本研究中, “足三里”穴区的伤害性热刺激抑制了 SRD 神经元对结肠来源疼痛信号的伤害性反应, 并通过 PRV 逆向示踪进一步证实, “足三里”穴区与结肠的神经投射可在 SRD 核团发生会聚, 这为躯体干预调控内脏痛的脊髓上机制补充了确切的解剖学证据。因此, SRD 可能是“足三里”热刺激缓解内脏痛的潜在关键节点。

另外, 实验过程中观察到, 肉眼可见 48 ℃ 刺激仅引发局部一过性轻度皮肤潮红; 52 ℃ 刺激虽并未引起皮肤出现水疱或破溃等烫伤样现象, 但诱发的局部皮肤潮红更加明显, 提示其诱发了更强的急性热痛反应。进一步的量效关系分析显示, 48 ℃ 已充分触发 DNIC 效应, 且与 52 ℃ 诱发的效应相比并无统计学差异, 提示 48 ℃ 灸温即可充分诱发上位中枢对疼痛的下行抑制效应。因此, 48 ℃ 既能“以痛镇痛”, 又有效减少了 52 ℃ 可能造成的组织损伤风险, 更符合临床“以患者耐受为度”的安全原则, 是本研究中发挥该效应的合适的干预温度。

腹直肌肌电是量化评估内脏痛敏的稳定客观指标。本研究中, 结肠芥子油灌注可立即诱发腹直肌肌电增加, 但该反应仅维持约 5 min 即恢复基线。与此不同, SRD 神经元在芥子油灌注后表现为持续约 30 min 的高频放电平台, 且在此期间叠加 CRD 刺激并未进一步增强放电, 反而出现抑制(图 8)。这提示 SRD 对多重内脏伤害输入的整合并非线性叠加, 其机制可能涉及上位中枢的 γ -氨基丁酸能神经元负反馈抑制^[29-30], 以及化学性与机械性传入通路在中枢水平的交互抑制。为避免此类干扰, 本研究中, CRD 仅作为行为学肌电实验的量化手段, 而电生理实验则用于观察热刺激对芥子油致敏状态下

SRD 持续性放电的直接调控。



注: SRD 为髓背侧网状亚核, CRD 为结肠扩张。灌注芥子油 5 min 后, 给予 60 mmHg CRD 刺激时, SRD 神经元放电被抑制。

图 8 急性结肠黏膜损伤大鼠 SRD 神经元放电例图

Fig. 8 Representative recording of SRD neuronal firing in a rat with acute colonic mucosal injury

本研究仍存在以下局限性: 第一, 本研究揭示了热刺激“足三里”穴区调控结肠伤害性反应的温度剂量一效应关系, 考虑到 SRD 神经元响应外周刺激的伤害性放电不具备明显的部位特异性, 本研究并未设置非穴及其他穴位等对照组, 因此无法验证躯体温度刺激抑制内脏痛的效应是否具备穴位特异性。第二, 本研究通过 PRV 逆行示踪和电生理记录提示“足三里”和结肠相关神经通路在 SRD 存在解剖与功能会聚, 并不能说明躯体刺激在 SRD 核团调控内脏伤害性信息的具体机制, 未来还需要结合光遗传、化学遗传技术精准操控 SRD 神经元, 以提供更直接的因果证据。

综上所述, 本研究揭示了热刺激“足三里”缓解急性结肠黏膜损伤大鼠内脏痛敏的温度依赖性和中枢机制。伤害性热刺激均能显著抑制由结肠急性黏膜损伤诱发的 SRD 神经元伤害性放电, 且该镇痛效应在 48 ℃ 时可能即达到平台期, 呈现出温度饱和和特性。上述结果不仅阐明了“足三里”热刺激的温度-效应关系, 也提示在临床艾灸实践中, 在病人耐受的溫度范围内, 适度升高刺激温度可能更有效地激活 SRD 相关的中枢抑制机制, 从而实现更佳的镇痛效果。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。景向红为本刊副主编, 但未参与本文的审理。

参考文献

- [1] 郑桂芝, 李哈, 吴焕淦, 等. 温和灸皮肤神经性 TRPV1 启动机制及对内脏痛的效应机制研究[J]. 世界中医药, 2016, 11(12): 2515-2520.
Zheng G Z, Li H, Wu H G, et al. Effect of warm moxibustion on cutaneous neuronal TRPV1 and visceral pain (in Chinese) [J]. World Chinese Medicine, 2016, 11(12): 2515-2520.
- [2] 戚莉, 李娜, 刘慧荣, 等. 艾灸治疗 IBS 临床及其镇痛效应的研究[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(12): 2224-2227.
Qi L, Li N, Liu H R, et al. Clinical and experimental studies

- on moxibustion for treatment of irritable bowel syndrome (in Chinese) [J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2010, 25(12): 2224-2227.
- [3] Lee M S, Choi T Y, Kang J W, et al. Moxibustion for treating pain: a systematic review [J]. *Am J Chin Med*, 2010, 38(5): 829-838.
- [4] 余曙光, 唐勇, 尹海燕, 等. 艾灸刺激穴位局部感受的生物学基础 [J]. *世界中医药*, 2013, 8(8): 867-870.
- Yu S G, Tang Y, Yin H Y, et al. Biological basis of local acupoint responses to moxibustion stimulation (in Chinese) [J]. *World Chinese Medicine*, 2013, 8(8): 867-870.
- [5] 李佰承. 不同灸温镇痛效应的差异及 TRPV1 相关机制 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2015.
- Li B C. TRPV1 mediates analgesic effect of different thermal moxibustion in acute pain (in Chinese) [D]. Chengdu: Chengdu University of TCM, 2015.
- [6] 周薇. 不同灸温艾灸的镇痛效应及其 DRG 疼痛信号分子响应研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2017.
- Zhou W. Study on the analgesic effect of different moxibustion temperature and the molecular response of DRG pain signal (in Chinese) [D]. Chengdu: Chengdu University of TCM, 2017.
- [7] 针灸科学研究联盟. 针灸科学研究行动计划 [J]. *针刺研究*, 2025, 50(1): 1-2.
- Acupuncture Scientific Research Alliance. A plan for acupuncture-moxibustion scientific research (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2025, 50(1): 1-2.
- [8] 李亮, 荣培晶, 余玲玲, 等. 热灸对结肠伤害性扩张抑制效应的脊髓机制研究 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2011, 17(10): 1140-1145.
- Li L, Rong P J, Yu L L, et al. Study on spinal cord mechanism of inhibitory effect of hot moxibustion on nociceptive dilatation of rectum (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine*, 2011, 17(10): 1140-1145.
- [9] Roy J C, Bing Z, Villanueva L, et al. Convergence of visceral and somatic inputs onto subnucleus reticularis dorsalis neurones in the rat medulla [J]. *J Physiol*, 1992, 458: 235-246.
- [10] Martins I, Tavares I. Reticular formation and pain: the past and the future [J]. *Front Neuroanat*, 2017, 11: 51.
- [11] Bing Z, Villanueva L, Le Bars D. Ascending pathways in the spinal cord involved in the activation of subnucleus reticularis dorsalis neurons in the medulla of the rat [J]. *J Neurophysiol*, 1990, 63(3): 424-438.
- [12] Le Bars D, Dickenson A H, Besson J M. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat [J]. *Pain*, 6(3): 283-304.
- [13] Bing Z, Villanueva L, Le Bars D. Acupuncture-evoked responses of subnucleus reticularis dorsalis neurons in the rat medulla [J]. *Neuroscience*, 1991, 44(3): 693-703.
- [14] Bouhassira D, Villanueva L, Bing Z, et al. Involvement of the subnucleus reticularis dorsalis in diffuse noxious inhibitory controls in the rat [J]. *Brain Res*, 1992, 595(2): 353-357.
- [15] 李亚妮, 孙小月, 张知云, 等. 不同强度电针对内脏痛大鼠的镇痛作用 [J]. *针刺研究*, 2025, 50(3): 243-250.
- Li Y N, Sun X Y, Zhang Z Y, et al. Analgesic effects of electroacupuncture at different intensities on visceral pain in rats (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2025, 50(3): 243-250.
- [16] 胡嘉同, 王晓宇, 何伟, 等. 电针对结肠扩张刺激模型大鼠内脏伤害性痛反应的影响 [J]. *中医杂志*, 2019, 60(10): 869-875.
- Hu J T, Wang X Y, He W, et al. Effects of electroacupuncture on visceral nociceptive pain response of rats induced by colorectal distention stimulation (in Chinese) [J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2019, 60(10): 869-875.
- [17] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates [M]. 6th edition. San Diego: Academic Press, 2007.
- [18] Wang Z H, Qin P, Chen Y Y, et al. Exploring the spatial effects of acupuncture analgesia [J]. *Neuroscience*, 2025, 573: 300-314.
- [19] Dou Z Q, Su N, Zhou Z Y, et al. Modulation of visceral pain by brain nuclei and brain circuits and the role of acupuncture: a narrative review [J]. *Front Neurosci*, 2023, 17: 1243232.
- [20] Negri L, Lattanzi R, Giannini E, et al. Impaired nociception and inflammatory pain sensation in mice lacking the prokineticin receptor PKR1: focus on interaction between PKR1 and the capsaicin receptor TRPV1 in pain behavior [J]. *J Neurosci*, 2006, 26(25): 6716-6727.
- [21] Caterina M J, Schumacher M A, Tominaga M, et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway [J]. *Nature*, 1997, 389(6653): 816-824.
- [22] Zhi-han, Lin, Guo-rui, et al. Role of transient receptor potential vanilloid subfamily 1 in mediating the analgesic effects of acupuncture on pathological pain [J]. *World J Acupunct Moxibustion*, 2023, 33(3): 204-212.
- [23] Xin J J, Su Y S, Yang Z K, et al. Distinct roles of ASIC3 and TRPV1 receptors in electroacupuncture-induced segmental and systemic analgesia [J]. *Front Med*, 2016, 10(4): 465-472.
- [24] Bing Z, Villanueva L, Le Bars D. Acupuncture and diffuse noxious inhibitory controls: naloxone-reversible depression of activities of trigeminal convergent neurons [J]. *Neuroscience*, 1990, 37(3): 809-818.
- [25] Li L, Rong P J, Gao X Y, et al. Medulla oblongata mechanism of inhibitory effect of thermal stimulation to nociceptive colorectal distention in rats [J]. *World J Tradit Chin Med*, 2016, 2(2): 65-71.
- [26] Patel R, Dickenson A H. A study of cortical and brainstem mechanisms of diffuse noxious inhibitory controls in anaesthetised normal and neuropathic rats [J]. *Eur J Neurosci*, 2020, 51(4): 952-962.
- [27] Yu L L, Li L, Rong P J, et al. Changes in responses of neurons in spinal and medullary subnucleus reticularis dorsalis to acupoint stimulation in rats with visceral hyperalgesia [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014: 768634.
- [28] Villanueva L, Bing Z, Bouhassira D, et al. Encoding of electrical, thermal, and mechanical noxious stimuli by subnucleus reticularis dorsalis neurons in the rat medulla [J]. *J Neurophysiol*, 1989, 61(2): 391-402.
- [29] Almeida A, Cobos A, Tavares I, et al. Brain afferents to the medullary dorsal reticular nucleus: a retrograde and anterograde tracing study in the rat [J]. *Eur J Neurosci*, 2002, 16(1): 81-95.
- [30] Martins I, Carvalho P, de Vries M G, et al. GABA acting on GABAB receptors located in a medullary pain facilitatory area enhances nociceptive behaviors evoked by intraplantar formalin injection [J]. *Pain*, 2015, 156(8): 1555-1565.