

隔药灸天枢、气海对慢性炎性内脏痛大鼠痛行为和痛情绪的影响

黄燕¹, 杨延婷¹, 刘晓旭², 赵嫵¹, 丰小溟³, 张丹³, 吴焕淦³, 朱毅³, 黄文燕³, 马晓芑³

1 上海中医药大学, 上海 201203, 中国

2 北京中医药大学, 北京 100029, 中国

3 上海市针灸经络研究所, 上海 200030, 中国

【摘要】目的：观察隔药灸对慢性炎性内脏痛大鼠痛行为和痛情绪的影响，探讨其镇痛机理。**方法：**将 24 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组和隔药灸组。除正常组外，其余两组采用三硝基苯磺酸灌肠制备慢性炎性内脏痛大鼠模型。造模成功后，隔药灸组采用隔药灸天枢、气海治疗，模型组及正常组不治疗，只做与隔药灸组相同的固定。通过腹壁撤回反射(AWR)评分、机械性缩足反射阈值(MWT)和热缩足潜伏期(TWL)评估大鼠内脏和躯体痛觉；通过旷场实验(OFT)和高架十字迷宫测试(EPMT)评估大鼠焦虑、抑郁等疼痛情绪。**结果：**与正常组比较，模型组大鼠 AWR 评分在不同刺激扩张压力水平下均显著升高($P < 0.01$)，MWT 及 TWL 均显著降低($P < 0.05$)，OFT 中水平活动值和垂直活动值均明显下降($P < 0.01$)，EPMT 中开臂进入次数比例及开臂停留时间比例均明显下降 ($P < 0.01$)，提示造模成功。与模型组比较，隔药灸组大鼠 AWR 评分显著下降($P < 0.05$)，MWT 及 TWL 显著增加 ($P < 0.05$)，OFT 中水平活动值和垂直活动值均明显升高($P < 0.01$)，EPMT 中进入开放臂次数比例及进入开放臂时间比例均明显升高($P < 0.01$)。**结论：**隔药灸对慢性炎性内脏痛大鼠有良好的镇痛作用，能显著减轻大鼠内脏和躯体疼痛，同时也能明显改善慢性内脏痛所致的焦虑、抑郁等痛情绪的变化。

【关键词】灸法；穴，天枢；穴，气海；炎性肠病；内脏痛；行为；情绪；大鼠

【中图分类号】R2-03

【文献标志码】A

慢性内脏痛 (chronic visceral pain)是临床上极为常见的症状。根据慢性疼痛性质的不同，主要分为神经性痛和炎性痛两类，而炎症性内脏痛是临床最常见的一种疼痛形式，是患者求治的主要原因。炎症性内脏痛病程长，在给人们带来巨大痛苦的同时也增加了患者的经济负担。随着疼痛医学的不断发展，人们已经认识到疼痛，尤其是慢性疼痛，不仅仅是表现为简单的病理现象，还常常伴随着一系列心理、认知、行为上的改变。

国际疼痛研究协会 (International Association for the Study of Pain, IASP)将疼痛定义为一种与组织损伤或潜在损伤相关的不愉快的主观感觉和情感体验。近年来，越来越多的临床观察也表明，慢性疼痛患者所遭受的恶性情绪，如焦虑、抑郁、恐惧等给病人造成的心身伤害远比疼痛本身更为严重^[1]。

针灸疗法作为中国传统医学的重要组成部分，治疗各种疼痛性疾病是其优势之一。实验研究发现，在佐剂性关节炎大鼠模型中，针灸不仅能缓解大鼠关节慢性炎性疼痛，还具有一定抗抑郁和抗焦虑作用^[2]；但在慢性炎性内脏痛中，尚未发现艾灸对痛情绪作用的相关研究。因此，本实验采用三硝基苯磺酸 (trinitrobenzene

sulfonic acid, TNBS)灌肠建立慢性炎性内脏痛大鼠模型，观察隔药灸天枢、气海穴对慢性炎性内脏痛大鼠痛行为和痛情绪的影响，旨在从行为和情绪角度探讨艾灸对慢性炎性内脏痛的镇痛作用。

1 材料和方法

1.1 动物和分组

健康成年 Sprague-Dawley (SD)雄性大鼠，体重(150±20) g，共 24 只，购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司，合格证号：SCXK(沪)2013-0016。置于 8:00-20:00 光照、20:00-8:00 黑暗的动物房中饲养。饲养室及行为学实验室温度控制在 (20±1)℃，湿度 50%左右。常规适应饲养 1 星期后随机分为正常组、模型组和隔药灸组，每组各 8 只。

1.2 主要仪器与试剂

5% 2, 4, 6-三硝基苯磺酸 (TNBS, Sigma 公司, 美国)；无水乙醇、戊巴比妥钠 (国药集团化学试剂有限公司, 中国)；7420/7445 型大鼠自主行为装置 (Ugo Basile, 意大利)；Ethovision 3.1 EPM 行为分析系统 (Noldus 公司, 荷兰)；Von Frey 纤维毛 (Stoelting 公司, 美国)；

BME2410A 热痛刺激仪 (中国医学科学院生物工程研究所, 中国)。

1.3 模型制备

参照 Morris 法^[3],应用 TNBS 制备大鼠慢性炎性内脏痛模型。大鼠造模前禁食、不禁水 24 h; 将无水乙醇加双蒸水配成 50%乙醇, 然后将 5% 的 TNBS 与 50%乙醇按照 2:1 的体积比混合成 TNBS 灌肠液。大鼠称重后, 用生理盐水配制的 2%戊巴比妥钠[30 mg/(kg·bw)]行腹腔注射麻醉。造模大鼠以 TNBS 灌肠液[3 mL/(kg·bw)]灌肠。灌肠时将灌肠针连接 1 mL 注射器, 抽取适量灌肠液, 大鼠体位为头下尾上, 灌肠时将灌肠针缓缓插入大鼠肛门 6-8 cm, 注入灌肠液, 拔出灌肠针以后再将大鼠倒立 1 min, 以防灌肠液溢出。每 7 d 重复灌肠 1 次, 共 4 次。大鼠造模前后, 均检测腹壁撤回反射 (abdominal withdrawal reflex, AWR)评分、机械性缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT)和热缩足潜伏期 (thermal withdrawal latency, TWL), 以评估大鼠内脏和躯体痛觉。模型建立成功的标志为造模后大鼠出现体重下降、腹泻、稀便、肉眼血便中的任一症状^[4], 以及 AWR、MWT、TWL 的异常改变。

1.4 分组干预

1.4.1 正常组

正常组大鼠不造模, 不进行任何干预, 只做与隔药灸组相同的固定。

1.4.2 模型组

模型组大鼠造模后, 不进行任何干预, 只做和隔药灸组相同的固定。

1.4.3 隔药灸组

隔药灸组大鼠造模后, 进行隔药灸治疗。

穴位及其定位方法: 取双侧天枢, 气海。穴位定位参照《实验针灸学》^[5]中大鼠标准穴位图谱定位及部分相关文献^[6-7]。天枢穴位于大鼠腹部正中线上, 剑突与耻骨联合上缘连线的上 2/3 与下 1/3 交点 (即神阙穴)旁开 5 mm, 左右各一; 气海穴定位为大鼠腹部正中线上, 神阙穴与脐下约 20 mm 的关元穴连线的中点处, 即脐下 10 mm 处。

隔药灸方法: 药饼采用附子等药粉, 用黄酒调和, 并用模具制成直径为 10 mm 的药饼。用模具将艾绒压实制成锥形艾柱, 艾炷重量为 90 mg。每次每穴灸 2 壮, 每日 1 次, 共灸 7 次 (图 1)。

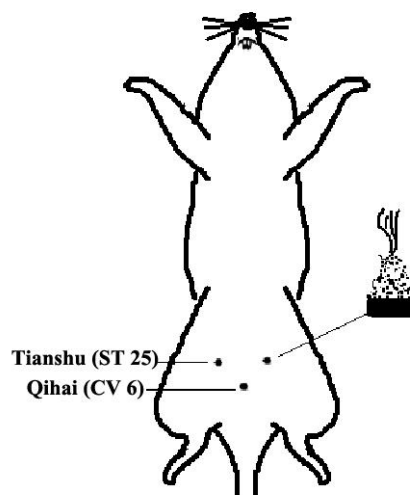


图 1. 隔药灸示意图

1.5 观察参数及检测方法

1.5.1 痛行为评估

内脏敏感性检测: 采用 AWR 进行检测, 评分标准参照相关文献^[8]。结直肠球囊扩张 (colorectal distension, CRD) 刺激采用自制球囊, 通过三通阀, 连接台式血压计和注射器。评分前禁食不禁水 8-12 h, 以减少粪便形成, 扩张刺激前以球囊头端轻触肛门, 促进大鼠排便, 顺大鼠直肠生理曲度缓缓从肛门插入球囊至降结肠部位, 推动注射器给予恒压扩张刺激, 通过连接在三通阀上的血压计来控制球囊扩张的压力大小, 分别给予 20 mmHg、40 mmHg、60 mmHg、80 mmHg 四个不同压力等级的结直肠扩张刺激。每只大鼠测量 3 次 AWR 评分, 每次结直肠扩张刺激 20s, 间隔 5 min 后进行下一次刺激, 共 3 次, 取三次平均值作为最终评分值。

MWT 检测: 采用 von Frey 纤维丝 (折力梯度为 2.0 g、4.0 g、6.0 g、8.0 g 及 15.0 g)以 up-down 法推算 50%阳性反应的缩足阈值^[9]。将一有机玻璃箱 (22 cm × 12 cm × 22 cm)置于金属筛网上, 待大鼠在有机玻璃箱中适应 15 min 后, 用 von Frey 纤维丝垂直刺激大鼠后肢足底中部, 持续时间不大于 4 s, 大鼠出现抬足或舔足行为视为阳性反应, 否则为阴性反应。测定首先从 2.0 g 开始, 当该力度的刺激不能引起阳性反应, 则给予相邻大一级力度的刺激; 如出现阳性反应则给予相邻小一级力度的刺激, 如此连续进行, 直至出现第一次阳性和阴性反应的骑跨。每个折力纤维丝均连续测定 5 次, 每次刺激间隔 30 s。

MWT 最大力度为 15.0 g, 大于此值时记为 15.0 g。

TWL 检测: 将有机玻璃箱置于 3 mm 厚的玻璃板上, 按相关文献用热痛刺激仪照射大鼠足底^[10]。照射开始至大鼠出现抬腿回避时为 TWL 值。自动切断时间为 20.1 s, 以防止组织损伤。热刺激强度在整个实验过程中保持一致。每只动物测定 5 次, 每次间隔 3 min, 去最大、最小值, 取 3 次平均值为大鼠 TWL 值。

1.5.2 痛情绪评估

旷场实验 (open field test, OFT)^[11-12]: 实验室温度、湿度相对稳定, 环境安静。各组大鼠在笼内放置 30 min 后, 进行旷场实验测试。将大鼠置于操作箱内 (90 cm×90 cm×90 cm), 开启连接的电脑及计数器, 自动记录水平活动和垂直活动的数值, 观察大鼠在 5 min 内的活动情况, 每测试完一只大鼠, 用冰醋酸及干毛巾擦拭操作箱内的架板, 清除大鼠的排泄物, 以免影响后面的测试。根据数据分析软件, 记录总路程和直立次数进行统计分析。

高架十字迷宫测试 (elevated plus-maze, EPM)^[13]: 所有动物提前 1 h 进入行为学测试实验室。实验室温度、湿度相对稳定, 环境安静, 光线较暗每只动物测试 5 min。间隔期间用冰醋酸蘸布擦拭迷宫后再进行下一只大鼠测试。将大鼠置于高架十字迷宫的中央平台处, 使其头部正对其中一个开放臂, 释放大鼠后开始记录 5 min 内大鼠在开放臂和闭合臂的进入次数和停留时间, 即进入开放臂次数(open arm entry, OE)、进入开放臂时间(open arm time, OT)、进入封闭臂次数(close arm entry, CE)及进入封闭臂时间(dose arm time, CT)。根据上述数据计算进入开

放臂次数百分数(OE%), 即 $OE\% = OE \div (OE + CE) \times 100\%$; 开放臂停留时间比例 (OT%), 即 $OT\% = OT \div (OT + CT) \times 100\%$ 。

1.5.3 结肠组织病理学观察

取大鼠结肠组织, 进行 HE 染色, 光镜下观察结肠组织病理学变化。

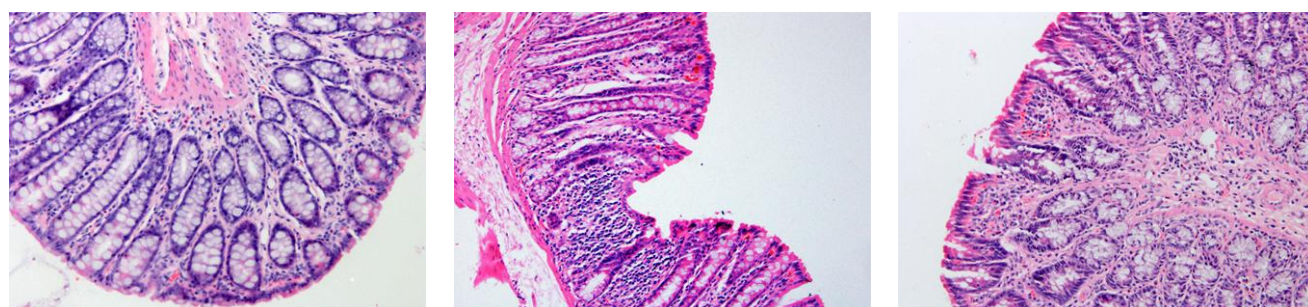
1.6 统计学方法

所有实验数据采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学处理。对数据作正态分布检验和方差齐性检验, 当计量资料符合正态分布时采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 当计量资料为偏态分布时采用中位数和四分位数表示。若资料服从正态分布, 组间差异采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 方差齐时采用最小显著差异法 (least significant difference, LSD) 比较组间差异性, 方差不齐时用 Games-Howell 比较组间差异性。若资料不服从正态分布, 采用秩和检验。检验水准 $\alpha=0.05$, 以 $P<0.05$ 作为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠结肠组织病理学的变化

正常组大鼠结肠上皮结构清晰、完整, 黏膜固有层偶有微量炎性细胞浸润, 未见充血、水肿及溃疡。模型组大鼠结肠组织结构不清, 部分黏膜层缺失, 腺体破坏, 大量中性粒细胞、淋巴细胞浸润, 伴明显重度水肿。隔药灸组大鼠结肠黏膜上皮结构完整, 黏膜固有层明显增厚, 有较多炎性细胞浸润, 黏膜下层结缔组织轻度水肿(图 2)。



正常组

模型组

隔药灸组

图 2. 各组大鼠结肠组织病理学比较

2.2 大鼠AWR评分的变化

对正常组大鼠进行结直肠扩张刺激发现,给予 20 mmHg 及 40 mmHg 扩张压力时,大鼠未出现明显的行为学反应;给予 60 mmHg 扩张压力时,大鼠开始出现轻微的头部活动反应 (评分为 1 分);给予 80 mmHg 扩张压力时,动物出现腹部肌肉收缩的反应 (评分为 2-3 分),随着刺激强度的逐渐增加,大鼠 AWR 评分相应增加,但最高评分不超过 3 分。

对模型组大鼠进行结直肠扩张刺激发现,给予 20 mmHg 扩张压力时,大鼠就出现头部反应,AWR 评分超过正常大鼠,接近于正常组大鼠给予 60 mmHg 扩张时的反应;给予 40 mmHg 的扩

张刺激时,AWR 评分已接近于正常大鼠给予 80 mmHg 扩张时的反应,即出现腹部肌肉收缩的反应;给予 60 mmHg 扩张压力刺激时,大鼠出现明显的腹部肌肉收缩反应,评分达到 3 分;当给予 80 mmHg 扩张压力时,AWR 评分均超过 3 分,疼痛行为反应明显。

对隔药灸组大鼠进行治疗后发现,大鼠对结直肠扩张刺激的反应较模型组明显减轻,AWR 评分基本接近于正常组大鼠的水平。在相同压力刺激强度下,与正常组比较,模型组 AWR 评分均明显增高,差异均有统计学意义 (均 $P<0.01$);与模型组比较,隔药灸组评分均明显降低,差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$), (表 1)。

表 1. 隔药灸对慢性炎性内脏痛大鼠 AWR 评分的影响[M (min~ max)]

组别	n	20 mmHg	40 mmHg	60 mmHg	80 mmHg
正常组	8	0.33 (0.00~0.67)	0.50 (0.33~0.67)	1.00 (0.67~1.33)	2.00 (1.33~2.33)
模型组	8	1.00 (0.67~1.33) ¹⁾	2.00 (1.33~2.33) ¹⁾	2.67(1.67~3.00) ¹⁾	3.33(3.00~3.67) ¹⁾
隔药灸组	8	0.33 (0.00~0.67) ²⁾	0.33 (0.33~1.33) ²⁾	1.17(0.67~2.00) ²⁾	2.00(1.33~3.00) ²⁾

注:与正常组比较,1) $P<0.01$;与模型组比较,2) $P<0.05$

2.3 大鼠MWT的变化

对正常组大鼠进行 MWT 检测,组内比较发现,大鼠造模前、造模后及治疗后三个时间点 MWT 差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$)。

对模型组大鼠进行 MWT 检测,组内比较发现,造模后及治疗后两个时间点大鼠 MWT 均显著低于造模前,差异有统计学意义 (均 $P<0.05$);造模后与治疗后比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。组间比较时发现,与正常组比较,造模前两组 MWT 无统计学差异 ($P>0.05$);造模后及治疗后两个时间点组间比较,模型组大鼠 MWT 均明显低于正常组,差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。

对隔药灸组大鼠进行 MWT 检测,组内比较发现,造模后大鼠 MWT 较造模前显著下降,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。经隔药灸治疗后,大鼠 MWT 较造模后显著提高,差异有统计学意义 ($P<0.05$);组间比较发现,隔药灸组大鼠造模前 MWT 与正常组差异无统计学意义 ($P>0.05$);造模后隔药灸组 MWT 较造模前显著降低,与正常组差异有统计学意义 ($P<0.05$);经隔药灸治疗后,大鼠 MWT 显著提高,基本接近正常组水平,与模型组比较,MWT 显著升高,差异有统计学意义 ($P<0.05$), (表 2)。

表 2. 隔药灸对慢性炎性内脏痛大鼠 MWT 的影响 ($\bar{x} \pm s$, g)

组别	n	造模前	造模后	治疗后
正常组	8	14.07 $\pm$ 4.39	14.52 $\pm$ 0.25	14.92 $\pm$ 1.22
模型组	8	15.00 $\pm$ 0.00	10.00 $\pm$ 5.25 ¹⁾²⁾	8.18 $\pm$ 3.20 ¹⁾²⁾
隔药灸组	8	15.00 $\pm$ 0.00	10.18 $\pm$ 3.17 ¹⁾²⁾	13.22 $\pm$ 1.57 ³⁾⁴⁾

注:与本组造模前比较,1) $P<0.05$;与同期正常组比较,2) $P<0.05$;与本组造模后比较,3) $P<0.05$;与同期模型组比较,4) $P<0.05$

2.4 大鼠TWL的变化

对正常组大鼠行 TWL 测试,组内比较发现,大鼠在造模前、造模后及治疗后三个时间点的 TWL 差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$)。

对模型组大鼠行 TWL 测试,组内比较发现,造模后及治疗后两个时间点大鼠 TWL 均较造模前显著降低,差异有统计学意义 (均 $P<0.05$),而造模后与治疗后比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。组间比较发现,与正常组比较,造模前两组 TWL 差异无统计学意义 ($P>0.05$);造模后及治疗后模型组大鼠 TWL 显著降低,且与正常组差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

对隔药灸组大鼠行 TWL 测试,组内比较发现,造模后大鼠 TWL 较造模前显著下降,差异有统计学意义 ($P<0.05$);经隔药灸治疗后,大鼠 TWL 较造模后显著提高,差异有统计学意义 ($P<0.05$);组间比较发现,大鼠造模前 TWL 与正常组无统计学差异 ($P>0.05$);造模后大鼠 TWL 显著降低,与正常组差异有统计学意义 ($P<0.05$);经隔药灸治疗后,大鼠 TWL 显著提高,且与模型组差异有统计学意义 ($P<0.05$), (表 3)。

表 3. 隔药灸对慢性炎性内脏痛大鼠 TWL 的影响 ($\bar{x} \pm s, s$)

组别	n	造模前	造模后	治疗后
正常组	8	19.20 $\pm$ 1.95	19.01 $\pm$ 0.47	19.24 $\pm$ 0.60
模型组	8	18.38 $\pm$ 3.62	12.55 $\pm$ 0.75 ¹⁾²⁾	13.33 $\pm$ 0.30 ¹⁾²⁾
隔药灸组	8	18.32 $\pm$ 2.87	13.37 $\pm$ 1.92 ¹⁾²⁾	16.78 $\pm$ 1.40 ³⁾⁴⁾

注:与本组造模前比较,1) $P<0.05$;与同期正常组比较,2) $P<0.05$;与本组造模后比较,3) $P<0.05$;与同期模型组比较,4) $P<0.05$

2.5 大鼠OFT的变化

模型组大鼠总路程 (水平活动值)较正常组显著减少,组间差异有统计学意义 ($P<0.01$);隔药灸组大鼠总路程 (水平活动值)虽仍低于正常组水平,但较模型组显著提高,组间差异有统计学意义 ($P<0.01$), (图 3)。

模型组大鼠直立次数 (垂直活动值) 较正常组显著减少,组间差异有统计学意义 ($P<0.01$);隔药灸组大鼠直立次数 (垂直活动值) 较模型组显著升高,组间差异有统计学意义 ($P<0.01$), (图 4)。

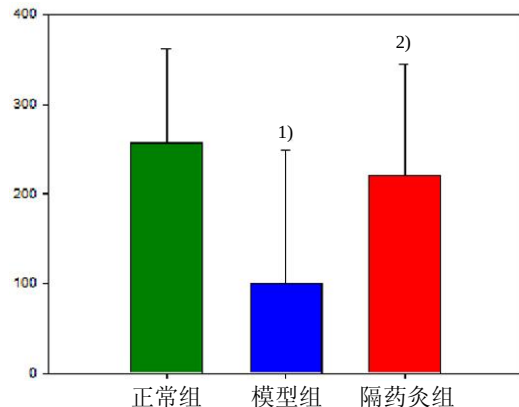


图 3. 各组治疗后OFT水平活动值比较

(注:与正常组比较,1) $P<0.01$;与模型组比较,2) $P<0.01$)

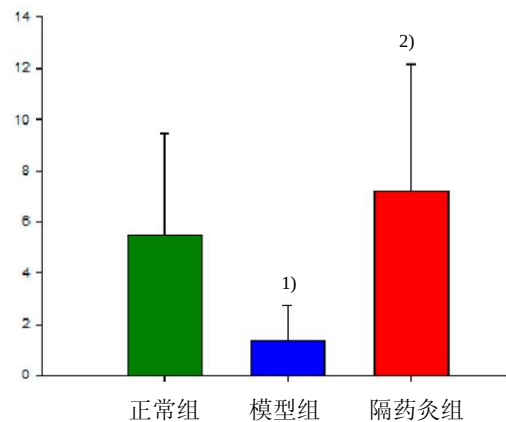


图 4.各组治疗后OFT垂直活动值比较

(注:与正常组比较,1) $P<0.01$;与模型组比较,2) $P<0.01$)

2.6 大鼠EPM的变化

与正常组比较,模型组大鼠 OE%和 OT%均明显降低,差异有统计学意义 (均 $P<0.01$)。隔药灸组大鼠治疗后 OE%和 OT%虽仍低于正常组水平,但与模型组比较均显著升高,差异有统计学意义 (均 $P<0.01$), (图 5)。

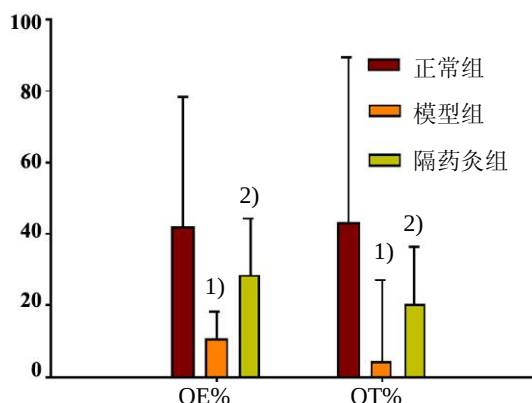


图 5. 各组治疗后EPM比较

(注: 与正常组比较, 1) $P<0.01$; 与模型组比较, 2) $P<0.01$)

3 讨论

慢性内脏痛是临床上的常见病症,也是许多胃肠道疾病,如炎症性肠病、肠易激综合征、慢性肠炎等的典型特征。慢性内脏痛具有病因多源性、表现多样性等特点,因此对慢性内脏痛及其痛过敏机制的认识,始终落后于躯体痛。慢性内脏痛的发生和持续是一个极其复杂的过程,外周伤害性感受器和中枢神经元双重敏化是慢性内脏痛产生的病理基础,其形成机制与内脏感觉的外周-中枢传导通路有关。

目前,对慢性内脏痛的治疗以药物和神经调节疗法为主,但效果差强人意。艾灸疗法的镇痛作用已得到大量临床研究的证实,能有效缓解腹痛、胃痛、痛经等痛症^[14-17]。天枢、气海是本课题组在长期临床实践中总结出来的、用于治疗以胃肠症状为主的内脏疼痛疾病的有效穴位组方。天枢为足阳明胃经穴,是大肠募穴,具有行气消食、止泄止痛等多种功用,在治疗腹痛、腹泻、痢疾等胃肠病证方面具有良好的疗效;气海属任脉,具有调肠通滞、益气固摄、调畅气血的功效。上述两穴合用,共奏运肠健脾、利湿消滞,调理肠胃气血的功效,能有效治疗腹痛、腹泻等病症^[18-22]。因此,本研究选用艾灸天枢、气海治疗慢性炎症性内脏痛。

慢性内脏痛患者常伴有一系列的躯体疼痛表现,如腰痛、头痛和肌肉痛等。这种现象可能由于外周伤害性刺激传入脊髓水平诱发中枢敏化或内脏传入纤维与四肢传出纤维在中枢水平的交汇作用 (cross-talk) 导致^[23]。动物实验表明,内脏伤害性刺激往往会引起内脏和躯体的双重疼痛过敏^[24]。但目前同时观察内脏和躯体痛觉的研究多集中在膀胱、子宫、胰腺等脏器,对

肠道炎症引起的内脏和躯体痛觉的研究甚少,仅有少量研究显示应用 TNBS 诱导的大鼠肠道炎症模型,在导致大鼠内脏痛敏的同时诱发了躯体痛觉过敏,躯体痛觉过敏的表现程度反映肠道炎症向中枢传递的伤害性刺激的信号冲动强弱,并推断这种内脏与躯体痛觉过敏的相关性可能与脊髓中枢多种神经递质的调节有关^[23]。本实验通过隔药灸天枢、气海对 TNBS 诱导的慢性炎症性内脏痛大鼠进行干预,观察艾灸对慢性炎症性内脏痛大鼠内脏和躯体痛觉的调节作用。实验结果发现,AWR 检测时,模型大鼠在给予 20 mmHg 扩张压力时,大鼠就出现头部反应,AWR 评分接近于正常组大鼠给予 60 mmHg 扩张时的反应,且随着刺激强度的逐渐增加,大鼠 AWR 评分也相应增加;当给予 40 mmHg 的扩张刺激时,AWR 评分已接近于正常大鼠给予 80 mmHg 扩张时的反应;给予 60 mmHg 扩张压力刺激时,大鼠出现明显的腹部肌肉收缩反应,评分达到 3 分;给予 80 mmHg 扩张压力时,AWR 评分均超过 3 分,疼痛行为反应明显,表明造模后形成的炎症疼痛使得大鼠痛阈下降,出现明显的疼痛行为表现,对原来不会引起疼痛感觉的刺激表现出强烈的行为反应 (即异常疼痛, allodynia),且在 60 mmHg 和 80 mmHg 扩张压力下的反应也明显强于正常组 (即痛觉过敏, hyperalgesia)。此外,模型大鼠的 MWT 和 TWL 也较正常组明显下降,提示在产生内脏痛觉高敏感的同时,内脏痛大鼠也存在明显的躯体 (机械和热) 痛觉过敏。在隔药灸治疗后发现,大鼠对结直肠扩张刺激的反应明显减轻,AWR 评分基本接近于正常组大鼠的水平,且 MWT 和 TWL 也较模型组显著提高,表明隔药灸能够显著提高内脏痛大鼠的痛阈,减轻疼痛行为的表现,改善疼痛感觉,提示隔药灸对内脏痛大鼠有显著的镇痛作用。内脏痛大鼠这种内脏疼痛与躯体疼痛感觉同时并存现象的具体机制目前尚未得到确证,但有学者推测这表明内脏痛的病理机制并不局限于直接受累的内脏器官而应在更高的水平,如脊髓或大脑^[24]。外周躯体炎症引起外周敏化,使更多冲动传入脊髓,引起可塑性变化,最终导致中枢敏化,中枢对脊髓背角神经元上传信号的调节发生改变,下行性抑制作用减弱,痛阈降低,从而导致痛觉过敏和异常疼痛,形成内脏和躯体的双重痛敏。艾灸对慢性炎症性内脏痛大鼠的内脏和躯体痛觉敏感都有良好的改善作用,可能与艾灸干预引

起脊髓和外周局部神经递质分泌的调节作用有关, 尚有待于进一步深入研究。

感觉分辨和情绪体验是疼痛的两个基本成分。临床观察表明, 慢性内脏痛患者常伴有严重的恶性情绪, 并且这种恶性情绪反过来又在很大程度上增强疼痛的感受和记忆^[25]。因此, 对疼痛伴随产生的恶性情绪也应是疼痛观察的重要指标, 也是判断疼痛治疗方法有效性的的重要标准。过去对痛感觉的研究获得了巨大的进展, 然而, 情绪体验成分的研究并未引起足够的重视, 多数疼痛研究集中关注疼痛感觉的改变, 鲜少有实验在观察疼痛感觉的同时研究疼痛伴随的情绪改变。因此, 本研究在观察艾灸对慢性炎性内脏痛大鼠内脏和躯体疼痛行为改变的同时, 采用旷场实验和高架十字迷宫实验, 观察艾灸疗法对慢性炎性内脏痛大鼠疼痛情绪的影响。OFT 主要检测大鼠自发活动行为和探索行为, 作为研究抑郁和焦虑的主要行为学实验得到了广泛的应用^[11]。EPM 是用于评估动物焦虑行为的非条件反射测试方法, 这种实验方法以自发表行为为基础, 动物不需特殊训练, 实验方法快速简便, 可较为客观地反映动物的焦虑症状^[26]。本实验结果发现 TNBS 诱导的慢性炎性内脏痛大鼠在出现明显的痛行为同时, 也伴有显著的焦虑、抑郁等恶性情绪。造模后, 内脏痛大鼠的 OFT 水平和垂直活动值及 OE%和 OT%值明显下降, 表明慢性炎性内脏疼痛使大鼠表现出明显的焦虑抑郁样行为, 而隔药灸在很大程度上提高了内脏痛大鼠的 OFT 水平和垂直活动值及 OE%和 OT%值, 表明隔药灸对慢性炎性内脏痛伴随的焦虑抑郁情绪有明显的改善作用。

在抑郁症模型中, 研究发现, 艾灸能下调抑郁大鼠血清中升高的白细胞介素 (Interleukin, IL) -2、IL-6 和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) - α 水平进而调节下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamic pituitary adrenal, HPA)轴活性, 减轻抑郁症状^[27]。艾灸能对抗抑郁大鼠皮质和海马神经元的脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 减少, 增加 BDNF 阳性神经元的数量, 提高 BDNF mRNA 表达水平, 推测对皮质和海马神经元的保护作用为艾灸治疗抑郁的机理之一^[28]。由于针灸是通过刺激穴位发挥整体调节作用的^[29-31], 艾灸对慢性炎性内脏痛大鼠痛情绪的调节作用, 其机制可

能涉及中枢和外周多个层面, 尚有待于进一步深入探索^[32-34]。

通过本实验发现, 慢性炎性内脏痛大鼠不仅有典型的内脏痛敏表现, 同时还伴有明显的躯体疼痛感觉过敏及明显的焦虑抑郁等恶性情绪, 这也更符合对疼痛包含疼痛感觉及情绪体验的理解。从痛行为和痛情绪两方面同时进行观察, 能更全面地呈现慢性炎性内脏痛的表现, 并评估艾灸作为治疗手段的有效性。实验结果显示, 隔药灸能显著减轻慢性炎性内脏痛大鼠内脏和躯体疼痛的同时, 也能明显改善慢性炎性内脏痛所致的焦虑抑郁等情绪行为的变化, 发挥一定的抗焦虑抑郁作用。

Conflict of Interest

The authors declared that there was no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by National Natural Science Foundation of China (No. 81273843); Project of Shanghai Municipality Health Bureau (No. 20144Y0153).

Statement of Human and Animal Rights

In this experiment, the treatment of animals conformed to the ethical criteria.

参考文献

- [1] 张玉秋. 痛情绪和相关记忆产生的神经机制. 自然科学进展, 2005, 15 (12): 1409-1415.
- [2] Sun J, Wen J, Wei HF, Zhong DK, Zeng PJ, Li Y, Yang L, Zhang LF. Experimental observation on psychological and behavioral changes by electro-acupuncture at different acupoints in model rats of chronic inflammatory pain. Xiandai Shengwu Yixue Jinzhan, 2011, 11(20): 3820-3825.
- [3] Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. Gastroenterology, 1989, 96(3): 795-803.
- [4] Chen X, Yang SZ, Chi BR. Reproduction of rat inflammatory bowel disease model and intervention effect of Changkangyin on it. Jilin Daxue Xuebao: Yixue Ban, 2008, 34(2): 262-265.
- [5] 郭义. 实验针灸学. 北京: 中国中医药出版社, 2008: 415.

- [6] 李辞容,华兴邦,周浩良,宋大鲁,胡元亮.豚鼠针灸穴位图谱的研制.上海针灸杂志,1992,11(2):28-30.
- [7] 王海军,冀来喜.关于大鼠“神阙”穴的定位. Zhen Ci Yan Jiu, 2007, 32(5): 312.
- [8] Al-Chaer ED, Kawasaki M, Pasricha PJ. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development. Gastroenterology, 2000, 119(5): 1276-1285.
- [9] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. J Neurosci Methods, 1994, 53(1): 55-63.
- [10] Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. Pain, 1988, 32(1): 77-88.
- [11] Shin J, Gireesh G, Kim SW, Kim DS, Lee S, Kim YS, Watanabe M, Shin HS. Phospholipase C beta 4 in the medial septum controls cholinergic theta oscillations and anxiety behaviors. J Neurosci, 2009, 29(49): 15375-15385.
- [12] 杨帅.电针对 IBS 模型大鼠内脏敏感性与情绪心理调节的机制研究.北京中医药大学硕士论文,2013.
- [13] Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. Psychopharmacology (Berl), 1987, 92(2): 180-185.
- [14] 章进,章震.毛茛灸治疗胃脘痛 56 例. Zhongguo Zhen Jiu, 2006, 26(10): 744.
- [15] 张必萌,吴焕淦.灸法在软组织疼痛性疾病中的应用进展.上海针灸杂志,2005,24(2): 43-46.
- [16] Zhou EH, Liu HR, Wu HG, Shi Y, Wang XM, Tan LY, Yao LQ, Zhong YS, Jiang Y, Zhang LL. Suspended moxibustion relieves chronic visceral hyperalgesia via serotonin pathway in the colon. Neurosci Lett, 2009, 451(2): 144-147.
- [17] 张伟.艾灸关元穴治疗原发性痛经的灸时灸感与灸效相关性研究.时珍国医国药,2014,25(5): 1148-1150.
- [18] Liu HR, Hua XG, Yang Y, Wu HG. 腹泻型 IBS 结肠粘膜 5-HT 表达及针灸治疗的临床研究.辽宁中医杂志,2006,33(8): 953-954.
- [19] Wu HG, Shi Z, Zhu Y, Ma XP, Yao Y, Cui YH, Zhao TP, Liu HR. 隔药灸治疗溃疡性结肠炎的临床研究.上海针灸杂志,2007,26(4): 3-4.
- [20] 施茵,吴焕淦.隔药饼灸治疗克隆氏病的临床研究.江西中医药,2003,34(8): 16-17.
- [21] Qi L, Li N, Liu HR, Ma XP, Wu LY, Wang XM, Zhou CL, Wu HG. Clinical and experimental studies on moxibustion for treatment of irritable bowel syndrome. CJTCMP, 2010, 25(12): 2224-2227.
- [22] Liu HR, Qi L, Wu LY. Effects of moxibustion on dynorphin and endomorphin in rats with chronic visceral hyperalgesia. World J Gastroenterol, 2010, 16(32):4079-4083.
- [23] Zhou QQ, Price DD, Caudle RM, Verne GN. Visceral and somatic hypersensitivity in TNBS-induced colitis in rats. Dig Dis Sci, 2008, 53(2): 429-435.
- [24] Tian XL, Wang YF, Chen SL, Mo JZ, Chen WH, Cao ZJ. Intestinal inflammation induces visceral and somatic hypersensitivity. Wei Chang Bing Xue, 2012, 17(7): 399-403.
- [25] Zhang YQ, Zhao ZQ, Ji RR. Emotional distress and related memory of pain: a neurobiological review. Neurosci Bull, 2005, 21(1): 10-17.
- [26] Wang X, Xie M. Comment on the dose-effect relationship of Suanzaoren Decoction on behavior of EPM rat. Zhongguo Shiyan Fangjixue Zazhi, 2004, 10(1): 35-37.
- [27] Li LP, Hua JS, Sun ZR, Sun DW, Huang L. 艾灸百会和太冲穴对慢性应激抑郁模型大鼠细胞因子的影响. Zhongyiyao Xuekan, 2006, 24(9): 1757-1760.
- [28] Li LP, Bi Y. Effect of acupuncture and moxibustion on brain-derived neurotrophic factor in the chronic mild unpredictable stressors depression rats. Zhonghua Zhongyiyao Xuekan, 2008, 26(10): 2287-2290.
- [29] Zhou M, Wang XY, Li WM. Progress on basic study of acupuncture for visceral pain. Shanghai Zhenjiu Zazhi, 2007, 26(10): 45-48.
- [30] Ma XP, Hong J, An CP, Zhang D, Huang Y, Wu HG, Zhang CH, Meeuwse S. Acupuncture-moxibustion in treating irritable bowel syndrome: How does it work? World J Gastroenterol, 2014, 20(20): 6044-6054.
- [31] Takahashi T. Effect and mechanism of acupuncture on gastrointestinal diseases. Int Rev Neurobiol, 2013, 111: 273-294.
- [32] Bao CH, Wu LY, Wu HG, Xu B, Lu Y, Liu HR, Yu SG, Zhao TP, Zhao JM, Zhao BX, Hu L, Chang XR. Study on effect and mechanism of moxibustion inhibit visceral pain of intestinal disease. Zhonghua

Zhongyiyao Zazhi, 2014, 29(2): 419-422.

- [33]Huang RJ, Zhao JM, Wu LY, Dou CZ, Liu HR, Weng ZJ, Lu Y, Shi Y, Wang XM, Zhou CL, Wu HG. Mechanisms underlying the analgesic effect of moxibustion on visceral pain in irritable bowel syndrome: a review. Evid Based Complement Alternat Med, 2014: ID895914.

- [34]Wu HG, Ma XP, Zhou CL, Bao CH, Dou CZ. Current research status and developing strategy of moxibustion. Shijie Zhongyiyao, 2013, 8(8):

845-851.

作者简介：黄燕，博士研究生。

通信作者：马晓芃，医学博士，研究员，博士生导师.

E-mail: pengpengma@163.com

基金项目：国家自然科学基金资助项目(NO.81273843)；
上海市卫生局课题(NO.20144Y0153)

收稿日期：2014-10-10