**学号**: **1325121039**



**电针通过脑肠轴途径对功能性消化不良肝郁脾虚型大鼠作用机制的研究**

**Study of acupuncture treatment on functional dyspepsia rats with syndrome of liver stagnation and spleen deficiency through the brain gut axis way**

**研** 究 生 姓 名：徐派的

**指导教师姓名、职称：张红星 教授学 科（专业）名 称：针灸推拿学**

**研** 究 方 向：针灸防治心脑血管病及

**神经系统疾病的研究学** 位 类 型：学术型

**2016 年 5 月 30 日**

**湖北中医药大学学位论文原创性声明**

本人声明： 所呈交的学位论文是在导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除了论文中特别加以标注和致谢的地方外，本论文不包含其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得湖北中医药大学或其他单位的学位或证书而使用过的材料。对本文的研究做出贡献的个人和集体，均已在论文中作了明确的说明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：

年 月 日

**关于学位论文使用授权的声明**

本人完全了解湖北中医药大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留学位论文，允许学位论文被查阅和借阅；学校可以公布学位论文的全部或部份内容，可以采用复印、缩印或其他手段保留学位论文；学校可以根据国家或湖北省有关部门的规定送交学位论文。同意《中国优秀博硕士论文全文数据库出版章程》的内容。同意授权中国科学技术信息研究所将本人学位论文收录到《中国学位论文全文数据库》。

（保密论文在解密后遵守此规定）

论文作者签名： 导师签名： 年 月 日

目 录

[中文摘要](#_Toc686269660) 4

[结论：](#_Toc686269661) 5

**[Abstract](#_Toc686269662)** 6

[英文缩略词表](#_Toc686269663) 8

[前言](#_Toc686269664) 9

[正文](#_Toc686269665) 12

[第一部分 电针对功能性消化不良肝郁脾虚型大鼠行为学、组织形态学、胃肠动力学的研究](#_Toc686269666) 12

**[1](#_Toc686269667)** [材料](#_Toc686269667) 12

[1.1 实验动物](#_Toc686269668) 12

[1.2 主要试剂](#_Toc686269669) 12

[1.3 实验所需试剂配制](#_Toc686269670) 13

**[2](#_Toc686269671)** [方法](#_Toc686269671) 14

[2.1 分组及造模](#_Toc686269672) 14

[2.2 治疗方法](#_Toc686269673) 15

[2.3 标本采集方法](#_Toc686269674) 16

[2.4 观察指标](#_Toc686269675) 16

[2.5 统计学分析](#_Toc686269676) 17

**[3](#_Toc686269677)** [结果](#_Toc686269677) 17

[3.1 各组大鼠电针治疗前后一般情况观察及评分](#_Toc686269678) 17

[3.3 造模与电针治疗对大鼠日进食增长量的影响](#_Toc686269679) 19

[3.4 造模与电针治疗对大鼠日饮水增长量的影响](#_Toc686269680) 21

[3.5 电针治疗对大鼠胃肠动力学的影响](#_Toc686269681) 22

[3.6 造模和电针治疗对大鼠组织形态学的影响](#_Toc686269682) 22

**[4](#_Toc686269683)** [结论](#_Toc686269683) 23

[4.1 模型评价：](#_Toc686269684) 23

[4.2 电针对功能性消化不良肝郁脾虚型大鼠日常行为学的影响](#_Toc686269685) 23

[4.3 电针对功能性消化不良肝郁脾虚型大鼠胃肠动力学的影响](#_Toc686269686) 23

[4.4 电针对FD肝郁脾虚型大鼠组织形态学的影响](#_Toc686269687) 23

**[5](#_Toc686269688)** [讨论](#_Toc686269688) 24

[5.2 FD肝郁脾虚型动物模型的选择与制备](#_Toc686269689) 24

[5.3 电针对FD大鼠胃肠动力和胃肠道敏感性的影响](#_Toc686269690) 24

[第二部分 电针对](#_Toc686269691)**[FD](#_Toc686269691)**[肝郁脾虚型大鼠中枢及外周](#_Toc686269691)**[VIP](#_Toc686269691)**[及其受体](#_Toc686269691) 25

**[1](#_Toc686269692)** [材料](#_Toc686269692) 25

[1.1 实验动物同第一部分1.1](#_Toc686269693) 25

[1.2 主要试剂](#_Toc686269694) 25

[1.3 实验所需试剂配制](#_Toc686269695) 26

[1.4 主要仪器及器械](#_Toc686269696) 30

**[2](#_Toc686269697)** [方法](#_Toc686269697) 32

[2.1 分组及造模同第一部分2.1](#_Toc686269698) 32

[2.2 治疗方法同第一部分2.2](#_Toc686269699) 32

[2.3 标本采集](#_Toc686269700) 32

[2.4 检测方法](#_Toc686269701) 32

[2.5 统计学分析同第一部分2.5](#_Toc686269702) 37

**[3.](#_Toc686269703)** [结果](#_Toc686269703) 37

[3.1 各组大鼠血清中VIP的含量](#_Toc686269704) 37

[3.3 Western blot法检测胃窦、空肠、下丘脑中VIP、VPAC1蛋白相对表达含量的比较](#_Toc686269705) 38

**[E F](#_Toc686269706)** 40

[3.4 IH法观察并计算出空肠、下丘脑、海马中VIP、VPAC1蛋白表达的比较(表8图12详见附录一：彩图四)](#_Toc686269707) 40

**[4.](#_Toc686269708)** [结论](#_Toc686269708) 43

[1. 电针对FD大鼠VIP的调节作用](#_Toc686269709) 43

[2. 电针对FD大鼠VIP及其相应的受体VPAC1的调节作用](#_Toc686269710) 43

**[5.](#_Toc686269711)** [讨论](#_Toc686269711) 43

[第三部分 电针对](#_Toc686269712)**[FD](#_Toc686269712)**[肝郁脾虚型大鼠中枢及外周](#_Toc686269712)**[CGRP](#_Toc686269712)** [及](#_Toc686269712) 44

**[1.](#_Toc686269713)** [材料](#_Toc686269713) 44

[1.1 实验动物同第一部分1.1](#_Toc686269714) 44

[1.2 主要试剂](#_Toc686269715) 44

[1.3 实验所需试剂配制同第二部分1.3](#_Toc686269716) 45

[1.4 主要仪器及器械同第二部分1.4](#_Toc686269717) 45

**[2.](#_Toc686269718)** [方法](#_Toc686269718) 45

[2.1 分组及造模同第一部分2.1](#_Toc686269719) 45

[2.2 治疗方法同第一部分2.2](#_Toc686269720) 45

[2.3 标本采集同第二部分2.3](#_Toc686269721) 45

[2.4 检测方法](#_Toc686269722) 45

[2.5 统计学分析同第一部分2.5](#_Toc686269723) 45

**[3](#_Toc686269724)** [结果](#_Toc686269724) 45

[3.1 各组大鼠血清中CGRP的含量](#_Toc686269725) 45

[3.3 Western blot法检测胃窦、空肠、下丘脑中CGRP、RAMP1蛋白相对表达含量的比较](#_Toc686269726) 47

[3.4 免疫组化法观察并计算出空肠、下丘脑、海马中CGRP、RAMP1的含量比较(表11图16详见附录一：彩图六)](#_Toc686269727) 49

**[4](#_Toc686269728)** [结论](#_Toc686269728) 51

[1. 电针对FD大鼠CGRP的调节作用](#_Toc686269729) 51

[2. 电针对FD大鼠CGRP及其相应的受体RAMP1的调节作用](#_Toc686269730) 51

**[5](#_Toc686269731)** [讨论](#_Toc686269731) 52

**[1](#_Toc686269732)** [中医学对](#_Toc686269732)**[FD](#_Toc686269732)**[的认识](#_Toc686269732) 52

[1.1 古代医籍对FD的阐述](#_Toc686269733) 52

[1.2 中医学对FD病因病机的认识](#_Toc686269734) 52

[1.3 现代中医药对FD中医证型的确立](#_Toc686269735) 53

[1.4 中医学对脑肠轴在FD发病中作用的认识](#_Toc686269736) 53

**[2](#_Toc686269737)** [现代医学对](#_Toc686269737)**[FD](#_Toc686269737)**[的认识](#_Toc686269737) 54

[2.1 FD的概念及诊断标准](#_Toc686269738) 54

[2.2 FD的流行病学资料](#_Toc686269739) 54

[2.3 FD的发病机制](#_Toc686269740) 54

[2.4 FD的治疗现状](#_Toc686269741) 55

**[3](#_Toc686269742)** [脑肠轴和脑肠肽与](#_Toc686269742)**[FD](#_Toc686269742)** 55

[3.1 脑肠轴与脑肠互动](#_Toc686269743) 55

[3.2 脑肠互动在FD的发病和治疗中的作用](#_Toc686269744) 56

[3.3 脑肠肽代谢与FD发病](#_Toc686269745) 56

**[4](#_Toc686269746)** [电针防治](#_Toc686269746)**[FD](#_Toc686269746)**[的理论依据](#_Toc686269746) 57

[4.1 疏肝健脾治则的理论依据](#_Toc686269747) 57

[4.2 足三里穴、太冲穴的选穴依据](#_Toc686269748) 57

[4.3 针灸治疗FD的优势](#_Toc686269749) 57

**[5](#_Toc686269750)** [电针治疗](#_Toc686269750)**[FD](#_Toc686269750)**[肝郁脾虚模型大鼠作用机制的探讨](#_Toc686269750) 57

[5.1 改善胃肠动力障碍和内脏敏感性可能是电针治疗FD的效应环节目前认为胃肠道动力障碍和感觉异常是FD的主要病理生理学基](#_Toc686269751) 57

[5.2 纠正异常的脑肠肽是电针治疗改善FD症状的重要途径](#_Toc686269752) 58

[5.3 通过脑肠轴神经内分泌网络途径可能是电针治疗FD的起效机制](#_Toc686269753) 58

**[6](#_Toc686269754)** [本研究的特色、存在的问题及展望](#_Toc686269754) 58

[6.1 特色与创新](#_Toc686269755) 58

[6.2 问题与展望](#_Toc686269756) 58

[结论](#_Toc686269757) 59

[参考文献](#_Toc686269758) 59

[附录一：彩图](#_Toc686269759) 64

[附录二](#_Toc686269760)**[:](#_Toc686269760)**[本人在校期间发表论文情况](#_Toc686269760) 68

[附录三：综述](#_Toc686269761) 69

[参考文献](#_Toc686269762) 71

# 中文摘要

**目的：**通过观察电针对功能性消化不良（functional dyspepsia,

FD)肝郁脾虚型大鼠的一般情况、日常行为学改变、胃肠动力学改变、 中枢及外周相关脑肠肽：血管活性肠肽（vasoactive intestinal peptide, VIP）、降钙素基因相关肽（calcitonin gene-related peptide, CGRP）及其相应受体血管活性肠肽1受体（vasoactive intestinal peptide receptor 1, VPAC1）、受体活性修饰蛋白质 1

（receptor activity modifying protein1, RAMP1）的表达，探讨脑肠轴与脑肠肽在肝郁脾虚型FD发病中的作用以及电针通过脑肠轴途径治疗肝郁脾虚型FD模型大鼠可能的作用机制。

**方法：**将72只雌雄各半SPF级SD大鼠（体重200±20g）随机分为空白组、模型组和电针组共三组，每组24只。除空白组大鼠（造模期间远离造模环境，避免造模环境的干扰）以外，模型组和电针组大鼠均采用郭氏夹尾刺激法（2次/d）+不规则饮食法（逢单日禁食，饮水正常）+冰生理盐水灌胃法（-4℃0.9%NaCL注射液2ml, 2次/d）的多因素干预法造模共14d。造模期间观察并记录各组大鼠的一般情况包括大鼠精神状态、毛色毛质、耳廓颜色、活动度、饮食饮水量、排便次数及粪便质量、体重等。造模成功后进行电针治疗，取穴“足三里”和“太冲”穴，治疗时间为28d，1次/d。治疗结束后分别对

3组大鼠进行灌胃处理，解剖取材，测定胃内残留率及小肠推进率；

HE染色观察胃窦、空肠组织；酶联免疫吸附测定法(ELISA)分别测定各组血清VIP、CGRP含量；荧光定量PCR法测定各组大鼠下丘脑、胃、肠组织中VIP、CGRP的表达水平；免疫印迹法(Western blotting)分别测定各组下丘脑、胃窦、空肠的VIP、CGRP、VPAC1、RAMP1的表达；免疫组化（IHC）法观察海马、下丘脑、空肠中VIP、CGRP、VPAC1、

RAMP1的表达。

**结果**：

I

1.治疗前后各组大鼠行为学观察：治疗前，空白组大鼠精神状态以及活动度均良好，皮毛光泽整齐，粪便呈干燥褐色球状。模型组和 电针组大鼠皮毛枯槁打结、活动度明显减低、抓捕反应迟钝、粪便呈黄色稀便。与空白组相比，模型组和电针组大鼠一般情况评分、体重 日增长、饮食饮水日增长均明显降低（*P*＜0.01）；治疗后，电针组大鼠皮毛恢复光泽整洁、活动度良好、饮食量显著增加、抓捕反应敏 捷、粪便呈干燥褐色球状。一般情况评分、体重日增长、饮食饮水日 增长显著性增高（*P*＜0.01）；模型组大鼠较治疗前改变不明显（*P*

＞0.05）。

2.组织形态学改变：光镜(³400)下观察各组大鼠胃窦、空肠组织 未发现器质性改变，胃黏膜及空肠壁各层上皮结构完整，细胞排列整 齐，黏膜下层和肌层层次清楚连续，未见炎性浸润及腺上皮病变等病 理表现。

3.胃肠动力学改变：与空白组相比，模型组大鼠胃内残留率明显升高(*P*＜0.01)，小肠推进率显著降低(*P*＜0.01)；与模型组相比，电针组胃内残留率显著降低(*P*＜0.01)，小肠推进率显著升高(*P*＜0.01)。提示了电针能够有效地促进胃肠功能，增加胃肠动力。

4. 对脑肠肽VIP、CGRP的表达的影响：

①双抗体夹心酶联免疫吸附测定法(ELISA)分别测定各组血清

VIP、CGRP含量：与空白组相比，模型组大鼠血清VIP、CGRP含量明显升高，且均有显著性差异(*P*＜0.01)；与模型组相比，电针组大鼠血清VIP、CGRP的含量显著降低，且均有显著性差异(*P*＜0.01)。

②荧光定量PCR法测定各组大鼠下丘脑、胃窦、空肠组织中

VIPmRNA、CGRPmRNA的相对表达量：与空白组相比，模型组大鼠胃窦、 空肠、下丘脑组织中的VIPmRNA、CGRPmRNA相对表达量增多，差异有统计学意义(*P*＜0.05)；与模型组相比，电针治疗组大鼠胃窦、空肠、 下丘脑组织中的VIPmRNA、CGRPmRNA相对表达量降低，差异均有统计学意义(*P*＜0.05)。提示电针治疗后能够降低胃肠道以及中枢的

VIPmRNA、CGRPmRNA的表达水平。

II

5.对VIP、CGRP的相应受体VPAC1、RAMP1的表达的影响：

①免疫印迹法（Western blotting）测定胃窦、空肠、下丘脑中

VIP、CGRP、VPAC1、RAMP1的表达：与空白组相比，模型组大鼠VIP、

CGRP、VPAC1、RAMP1在胃窦、空肠、下丘脑组织中的表达明显升高（*P*

＜0.05）；与模型组相比，电针组大鼠VIP、CGRP、VPAC1、RAMP1在胃窦、空肠、下丘脑组织中的表达明显降低(*P*＜0.05)。

②免疫组化法（IHC）测定空肠、下丘脑、海马中VIP、CGRP、VPAC1、

RAMP1的表达：与空白组相比，模型组大鼠VIP、CGRP、VPAC1、RAMP1在空肠、下丘脑、海马中的表达明显升高(*P*＜0.05)；与模型组相比，电针组大鼠空肠、下丘脑、海马VIP、CGRP、VPAC1、RAMP1的表达明显降低(*P*＜0.05)。

结论：

1.本实验成功复制出了最接近临床发病和表现的肝郁脾虚型FD大鼠模型，结合组织形态学观察，提示本实验采用的多因素干预方案 建立的功能性消化不良大鼠模型符合功能性消化不良的诊断标准。

2.电针对FD肝郁脾虚型大鼠有显著的治疗作用，能够显著改善

FD肝郁脾虚型大鼠的症状，并且有效的增强胃排空和小肠的推进功能，降低肠道敏感性，说明电针治疗FD的效应环节是改善胃肠动力障碍和感觉异常；

3.模型组大鼠外周及中枢VIP、CGRP的表达显著增多，提示FD的发病与相关脑肠肽分泌异常和脑肠互动异常密切相关；

4.电针治疗28d后能够显著地降低电针组FD肝郁脾虚型大鼠外周及中枢VIP、CGRP及其相应受体VPAC1、RAMP1的表达，提示电针是通过脑-肠轴调节脑肠肽的分泌，纠正异常表达的脑肠肽，从而改善胃肠道的动力障碍和感觉异常，这是电针能够有效调节FD的内在机制。

因此，我们认为脑肠轴与脑肠肽的异常是FD发病的重要病理生理基础，脑肠异常互动，导致相关脑肠肽分泌异常，引起胃肠动力障 碍和感觉异常，最终导致一系列功能性胃肠病的表现。电针能够显著

III

改善FD肝郁脾虚型大鼠的症状，下调外周及中枢VIP、CGRP、VPAC1、

RAMP1的表达，有效改善胃肠动力障碍和感觉异常。电针通过对脑肠轴神经-内分泌网络的不同层次，多靶点的调控，纠正异常的脑肠肽分泌，从而达到治疗FD的目的。

**主题词：**电针；功能性消化不良；脑肠轴-脑肠肽；血管活性肠肽；降钙素基因相关肽；血管活性肠肽1受体；受体活性修饰蛋白质

1

**课题来源：**

国家自然科学基金资助项目：mTOR在电针治疗功能性消化不良中的一种调节机制(No.81473790)；武汉市科技攻关基金资助项目：针 灸治疗功能性胃肠疾病的fMRI研究(No.2013060602010260)；武汉市卫计委2014年度医疗卫生科研基金：电针对功能性消化不良大鼠

Ghrelin介导的脑肠轴的调节作用(No. WZ14B02)。

IV

**Study of acupuncture treatment on functional dyspepsia rats with syndrome of liver stagnation and spleen deficiency through the brain gut axis way**

**Speciality:** Acupuncture and Massage **Author:** PaiDi Xu **Supervisor:** HongXing Zhang

**Abstract**

**Objective:** To observe the influence of electro acupuncture(EA) treatment on functional dyspepsia(FD) rats with synd-rome of liver stagnation and spleen deficiency in general evaluation, daily behavioral changes, gastrointestinal dynamic changes, both central and peripheral related brain gut peptide: VIP CGRP and its receptor VPAC1 RAMP1 expre-ssion. To investigate the role of brain gut axis and explore the mechanism of EA treatment on functional dyspepsia rats with syndrome of liver stagnation and spleen deficiency from the brain-gut axis way.

**Methods:**72 SPF Sprague-Dawley rats(weight 200±20g) with female and male each half were randomly divided into three groups (n = 24 each): a blank group, a model group, and an EA group. Except for the blank group(far away from modeling environment during the modeling period and avoid the interference), the other two groups underwent modeling totally

14 days by tail clamped stimulation(2 times/d), giving an irregular diet (fastingevery other day, with free access to water), and gavage of ice physiological saline (-4℃0.9%NaCl injection 2 mL, 2 times/d). During the modeling period, general situations of rats were observed and recorded, including the

V

Mental state, hair color, ear color, activity, diet and drink, defecation frequency and stool quality, weight and so on. As FD was successfully induced, EA treatment started (28d, once a day) and acupuncture at Zusanli (ST36) and Taichong(LR3). After 28 days, the rats were killed to take tissue samples. The rates of gastric emptying and small intestinal transit were determined; gastricantrum and jejunum tissue were observed by HE staining method; Serum VIP CGRP content were determinated by ELISA; VIP CGRP expression levels of each rat in gastric, intestinal tissue were determinated by PCR; the expression levels of VIP CGRP and receptors VPAC1 RAMP1 in the hypothalamus, gastric and jejunum were determinated respectively by Western blotting; the expression levels of VIP CGRP and their receptors VPAC1 RAMP1 in jejunum, hypoth-alamus and hippocampus were determinated respectively by IHC.

**Results:**

1. Observing the states before and after treatment: Before treatment, the blank group rats in the mental state and activity are good, fur shiny and neat, stool was dry brown globosity. The model group and the EA group rats fur withered knot, activity decreased significantly, arrest unresponsive, stool was watery yellow. Compared with the blank group, the model and EA group rats in general score, body weight growth, growth of food and water intake per day were significantly decreased (*P*<0.01); After treatment, EA group rats fur to restore luster and tidy, good activity, food intake increased significantly, response for catching quick, stool turned to dry brown globosity, general score, body weight growth, growth of food and water intake per day significantly increased (*P*<0.01); the

VI

ModeL group rats did not change significantly than before treatment (*P*> 0.05).

2. The histomorphology: light microscope (³400) observed in the gastric and jejunum tissue of rats, no organic change was found, gastric mucosa and jejunal wall layers of epithetlial structure integrity, cells arranged in neat rows, submucosa and muscle layers is clear and consecutive, no inflammatory infiltration and glandular epithelial lesions pathological manifestations.

3. GI dynamics change: Compared with the blank group, gastric residual rate significantly increased(*P*<0.01), small intestinal transit rate significantly decreased(*P*<0.01) in the model group; compared with the model group, the gastric residual rate decreased significantly(*P*<0.01) and small intestinal propulsion rate increased significantly(*P*<0.01) in the EA group. Suggest that acupuncture can significantly promote gastrointestinal function, increase gastrointestinal motility.

4. Effect of the expression of VIP CGRP:①Serum VIP, CGRP content were determinated by ELISA: Compared with the blank group, the model group rats serum VIP, CGRP content were significantly increased(*P*<0.01); compared with the model group, the EA group rats serum VIP, CGRP content signify-cantly reduced(*P*<0.01).②The relative expression levels of VIPmRNA, CGRPmRNA in gastric, intestine and hypothalamus were determinated by PCR: Compared with the blank group, the model group relative expression levels of VIPmRNA CGRPmRNA both in gastric, intestine and hypothala-mus was significantly

VII

IncrEased(*P*<0.05); compared with the model group, the results were significantly decreased in the EA group(*P*<0.05).

**5.** Effect of the expression of VIP CGRP and corresponding receptor RAMP1, VPAC1:①The expression of VIP CGRP RAMP1 and VPAC1in gastric, jejunum, hypothalamic determinated by WB: Compared with the blank group, the model group relative expression levels of VIP, CGRP, VPAC1 and RAMP1 in gastric, jejunum and hypothalamus significantly increased(*P*<0.05); compared with the model group, the results were significantly decreased in the EA group(*P*<0.05).②The expression of VIP CGRP RAMP1 and VPAC1in jejunum, hypothalamic and hippocampus was determinated by IHC: Compared with the blank group, the model group expression of VIP, CGRP, VPAC1 and RAMP1 in jejunum, hypothalamic and hippocampus significantly increased(*P*<0.05); compared with the model group, the results were significantly decreased in the EA group(*P*<0.05). **Conclusion:**

1. Our experiment successfully reproduced the closest to the clinical onset and symptoms of liver stagnation and spleen deficiency type FD rat model, combining tissue morphology, suggesting the model established by the multifactorial intervention scheme in this study was in line with the diagnostic criteria of functional dyspepsia.

2. EA treatment has significant therapeutic effect on FD rats, can significantly improve the FD symptoms, and effectively enhance the gastric emptying and small intesti-nal propulsion, reduce intestinal sensitivity. It indicates that the effect of EA on FD is the improvement of gastro-intestinal motility disorders and sensory abnormalities.

VIII

3. In the model group, the expression of VIP CGRPin both peripheral and central was significantly increased, which indicated that the abnormal brain gut peptide secretion and brain gut interaction was closely related to the pathogenesis of FD.

4. EA treatment can significantly decrease peripheral and central VIP CGRP and receptors VPAC1 RAMP1 expression. It indicates that EA can regulate the secretion of brain gut peptides through the brain gut axis, correct the abnormal expression of brain gut peptides, thereby improving the gastrointestinal motility disorders and sensory

AbnoRmal-ities, This is the mechanism of EA effective treatment on FD.

Therefore, we believe that: the abnormal brain gut peptide secretion and brain gut interaction which leading to gastrointestinal motility disorder and sensory

Abnormal-lities was the pathophysiological basis of FD. EA can significantly improve the syndrome of FD with stagnation of liver and spleen deficiency, furthermore down regulated VIP CGRP VPAC1 RAMP1 expression in both peripheral and central. Owing to the regulation of different levels and multiple targets through the brain gut axis, EA can correct the abnormal secretion of brain gut peptides, so as to achieve the purpose of treatment on FD.

**Keywords:** Electric acupuncture; Functional dyspepsia; The brain-gut axis and brain gut peptide; VIP; CGRP; VPAC1; RAMP1

IX

**Found assistance:**

National Natural Science Foundation of China, No. 81473790; The Science and Technology Research Fund of Wuhan, No.2013060602010260;

2014 Annual Healthcare Research Fund of Wuhan City Health Development Planning Commission, No. WZ14B02

X

# 英文缩略词表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **缩略词** | **英文名全称** | **中文全称** |
| FD | Functional dyspepsia | 功能性消化不良 |
| FGIDs PDS EPS  HPAA | Functional Gastrointestinal Disorders Postprandial distress syndrome Epigastric pain syndrome  HypoThalamic-pituitary-adrenal axis | 功能性胃肠病 餐后不适综合征上腹痛综合征  下丘脑-垂体-肾上腺轴 |
| BGA | The Brain-Gut Axis | 脑肠轴 |
| BGP | Brain gut peptide | 脑肠肽 |
| ENS | Enteric nevous system | 肠神经系统 |
| CNS | Century nevous system | 中枢神经系统 |
| ANS  NES | Autonomic nevous system  NeurOendocrine system | 自主神经系统  神经内分泌系统 |
| VIP | VasoActive intestinal peptide | 血管活性肠肽 |
| CGRP | CalcItonin gene-related peptide | 降钙素基因相关肽 |
| VPAC1 | VasoActive intestinal peptide receptor 1 | 血管活性肠肽 1 受体 |
| RAMP1  ICC  MTL | RecePtor activity modifying protein1 Interstitial Cells of Cajal  Motilin | 受体活性修饰蛋白质 1  Cajal 间质细胞胃动素 |
| GAS | Gastrin | 胃泌素 |
| CKK | cholecystoki-nin | 胆囊收缩素 |
| MMC | Migrating myoelectric complex | 移动性复合肌电活动 |
| HP | Helicobacter pylori | 胃幽门螺杆菌 |
| SS  SP | Somatostatin  SubsTance P | 生长抑素  P 物质 |
| ELISA  EA | Enzyme-linked immunosorbent assay  Electric acupuncture | 酶联免疫吸附测定法  电针 |

XI

前**言**

功能性消化不良（functional dyspepsia, FD）是以持续或反复发作上腹痛、上腹胀、早饱、嗳气、恶心等上腹部症状为主要表现， 而血生化和内镜等检查无异常发现，难以用器质性疾病解释的一种功能性胃肠疾病[1]，是临床上最常见的一种功能性胃肠病（Functional Gastrointestinal Disorders, FGIDs）。流行病学资料显示，全球范围消化不良的发病率达10%-30%[2]，亚洲FD发病率为8%-23%，我国居民较亚洲FD发病率稍高[3]。FD症状反复而持久，严重影响着患者的生活质量，已逐渐成为严重危害人类健康的最常见消化道症候群。

FD的病因和发病机制无法用单一效应机制去解释，通常被认为是多种综合因素共同作用的结果。大量研究提示可能与胃肠道动力相关因素、内脏感觉异常、脑-肠轴与脑肠肽的变化、胃酸异常的分泌、幽门螺杆菌或其他病原体感染、社会精神心理因素、遗传因素、饮食及环境、生活方式等多种因素有关[4-8]。其中胃肠道动力障碍、内脏高敏感性、脑-肠轴与脑肠肽因素和精神社会心理因素是目前最为公认的发病机制。由此可见FD是一种复杂机制的包括生物-心理-社会多因素的神经内分泌异常病症。

由于胃肠道是机体内唯一由中中枢神经系统（Century nevous

system, CNS）、肠神经系统(Enteric nevous system, ENS)和自主神经系统（Autonomic nevous system, ANS）共同支配的，既有感觉功能又有运动功能。近年来，有关于脑肠轴及脑肠肽与FD的研究逐渐增多，研究者普遍认为脑-肠轴双向通路功能障碍引起的胃肠道动力和感觉异常，是导致FD发生的重要病理生理机制，脑肠互动是FD潜在的发病机制之一已被逐渐认可，脑-肠轴在FD的发病机制中的作用越来越受到重视。

脑肠轴（The Brain-Gut Axis, BGA）是机体内连接肠神经系统与中枢神经系统的，由神经-内分泌和免疫因子介导的、调节大脑皮层和消化系统之间复杂的反射通路。脑肠轴也称神经—内分泌网络，

1

其网络中的任何一个环节异常都会影响胃肠的运动和感觉功能。国际 通用的罗马Ⅲ标准强调了胃肠功能和动力、感知、中枢神经、脑肠轴及肠神经网络的关系，明确脑肠轴与功能性胃肠疾病密切相关[9]。作为同时具备神经递质和激素双重作用的脑肠肽（brain-gut peptide，

BGP），在脑肠轴各个环节中起桥梁和调控作用[10]。脑肠肽作用于中枢神经系统、周围神经系统以及肠神经系统共同调节胃肠运动。不同 的脑肠肽的作用机制不尽相同，脑肠肽通过相应受体，对胃肠道运动 起到兴奋或抑制作用。因此，研究消化道疾病中脑肠肽的活性对胃肠 运动功能的变化具有重要的意义。

现代中医认为本病应归于胃脘痛、嘈杂、痞满、反酸、呕吐等范畴。病性属本虚标实之证。脾虚为本，气滞、血瘀、食积、痰湿为 标。脾主运化，主升，为气机之枢，胃主受纳，主降，脾升胃降的功 能为消化道正常受纳、腐熟、运化功能的根本。病位在胃，而又涉及 肝脾两脏，以肝郁气滞、脾胃虚弱、运化失职、胃失通降为其基本病 机。《证治汇补・痞满》曰：“暴怒伤肝，气逆而痞”，认为本病与情志失调有关，情志不遂，肝气郁滞，横逆犯胃导致。历代医家均对 肝脾两脏与本病的关系有着深刻的认识。

目前临床对功能性消化不良的治疗，主要采用促胃肠动力、内脏感觉调节、抗焦虑和抑郁等药物治疗[11]。由于功能性消化不良发病机制复杂且发病多样，患者临床表现差异大，药物治疗难以适应复杂的个体差异。非药物疗法治疗功能性消化不良，尤其是应用针刺、艾 灸等疗法治疗功能性消化不良更是疗效显著，有极好的应用前景，显 示出独特的优势。FD是针灸临床的优势病种，大量研究[12-15]表明，电针足三里穴、太冲穴对FD的治疗具有改善胃排空，恢复胃肠动力和恢复FD异常胃肠激素水平的作用，可有效地促进消化功能的恢复，缓解焦虑、抑郁等症状，对FD具有显著治疗作用。而相对于临床研究，针对电针治疗FD的内在效应机制的研究仍然是进展缓慢，脑肠轴概念的提出为进一步认识精神心理因素对胃肠道病理生理的影响提供了理论基础，将对此类疾病发生的认识从胃肠局部提升到全身整

2

体的角度，为探索胃肠病发病机制提供了新的研究层面，也为研究电 针对FD治疗的作用及机制提供了新的方向，探讨针灸通过脑肠轴-脑肠肽的神经-内分泌网络治疗FD的确切效应环节和靶点，将为针灸治疗FD提供全新的研究资料和重要线索，具有较好的经济和社会效益。

3

4

# 正文

# 第一部分 电针对功能性消化不良肝郁脾虚型大鼠行为学、组织形态学、胃肠动力学的研究

针灸治疗FD的临床疗效及安全性已经普及，实验中我们采用最接近临床的功能性消化不良肝郁脾虚型大鼠模型，并应用随机对照的研究方法，观察大鼠日常行为，例如一般状态（包括活动度、敏感度、 毛色毛质等）、粪便质量、体重增长、每日饮食饮水量增长、对外界刺激的反应等，评价实验模型方法的可行性以及电针对功能性消化不良肝郁脾虚型大鼠的行为学的影响；同时采用光学显微镜观察胃窦、空肠组织的形态学改变，评价电针对功能性消化不良肝郁脾虚型大鼠的组织形态学影响；并且进一步通过对各组大鼠胃排空、小肠推进率

检测，综合评价电针对功能性消化不良肝郁脾虚型大鼠胃肠动力学的 影响。

## **1** 材料

### 1.1 实验动物

采用SPF级健康成年雌雄各半Sprague-Dawley大鼠72只(weight 200g±20g& Age 3-4month)，由湖北省医学科学研究院实验动物中心提供（动物合格证号：42000600005079）。实验动物喂养于武汉市中西医结合医院中心实验室SPF动物房，雌雄大鼠分别喂养4 只

/笼，饲养温度20℃-25℃，湿度50%-70%，每日8: 30时给每笼添加

200g饲料及300ml饮用水直到实验结束（造模大鼠隔日添加饲料

200g），大鼠可自由摄食及饮水，适应性喂养1周后开始造模实验.

5

### 1.2 主要试剂

|  |  |
| --- | --- |
| 主要药物与试剂 | 生产厂家 |
| 0.9%氯化钠注射液 | 四川科伦药业股份有限公司 |
| 伊利全脂甜奶粉 | 伊利 |
| 白糖 | 赤峰蓝天糖业有限公司 |
| 淀粉 | 昆山臻乐门食品有限公司 |
| 活性炭 | 南县星源活性炭制造有限公司 |
| 检测羧甲基纤维素水合氯醛  多聚甲醛  其他常规化学试剂  所有试验检测用水均为 DEPC 处理过的无菌双蒸水 | 上海国宜化学试剂有限公司上海国宜化学试剂有限公司上海国宜化学试剂有限公司上海国宜化学试剂有限公司 |

### 1.3 实验所需试剂配制

10%水合氯醛

|  |  |
| --- | --- |
| 水合氯醛 | 10g |
| 少量蒸馏水溶解与烧杯中，逐量稀释至 100ml，即 10%水合氯醛溶液，避光处密  封保存待用。（取材当天提前半小时配制） | |

PBS缓冲液

|  |  |
| --- | --- |
| NaCl | 8g |
| KCl  NaH2PO4 KH2PO4 | 0.2g  1.44g  0.24g |
| 调节 pH7.4 后定容至 1L. 然后高压蒸汽灭菌，室温保存。 | |

6

4%多聚甲醛

|  |  |
| --- | --- |
| 多聚甲醛 | 40g |
| 0.1mol/LPBS | 500ml |
| 磁力搅拌器加热搅拌，控制温度在 50-60℃之间，滴加少许 NaOH，调节 PH7.2-7.4，使多聚甲醛完全溶解，最后补足 PBS 定容至 1000ml，充分混匀后放置避光处密  封保存待用。（取材前一天配制） | |

营养性半固体糊的制备[16]

|  |  |
| --- | --- |
| 羧甲基纤维素钠 | 10g |
| 蒸馏水奶 粉 糖  淀粉  活性炭末 | 250ML 16g 8g  8g  2g |
| 搅拌均匀，配制成 300mL 约 300g 的黑色半固体糊状物。取材当日制备放置于冰  箱冷藏，用时提前 2h 取出并恢复至室温。 | |

## **2** 方法

### 2.1 分组及造模

将72只健康成年雌雄各半大鼠随机分为三组即空白组(Blank)、模型组(Model)、电针组(electro acupuncture, EA)。除空白组外，其他2组均采用郭氏夹尾刺激法[17](14d, 2次/d) +不规则饮食法[18](逢单日禁食，饮水正常) +冰生理盐水灌胃法[19](-4℃0.9%NaCl注射液

2 mL, 2次/d）的多因素干预法造模。将每组同笼大鼠，用长海绵钳夹大鼠尾巴远端1/3处，以不破皮为度（如有抓伤破皮，则用0.5%碘伏消毒皮损部位以防感染），令其暴怒，前肢离地，寻衅与其他大鼠撕打，以激怒全笼大鼠。刺激30 min/次，间隔不少于6 h刺激1 次

7

（一般于每日09: 30和15:30进行），2次/d，连续刺激14 d；逢单日禁食，双日给予称质量好的200 g食物，饮水正常；将存放于-4℃冰箱的0.9%NaCl注射液，用大鼠灌胃针抽取2 mL灌胃，2次/d（于每日09: 00和15:00进行）。

造模成功标志是大鼠毛发枯乱发黄、便溏、饮食量显著减少、活跃程度减弱、扎堆甚至倦卧，情绪由开始的易怒烦躁转为情绪低落等

[20]. 解剖大鼠未发现胃肠组织器质性病变，提示造模成功。

造模期间，每日对模型组(Model)和电针组(EA)大鼠开始穿衣训练，避免大鼠过度紧张挣扎产生应激反应对实验结果造成影响。

1.4主要仪器及器械

|  |  |
| --- | --- |
| 主要仪器及器械 | 生产厂家 |
| Forma Scientific 超低温冰箱 | 美国 Thermo 公司 |
| DHG-9246A 型电热恒温鼓风干燥箱 | 上海精法 |
| LABWATER -SZ97 自动三重纯水蒸馏器 | 广州合技 |
| ES-2011S 电子天平 | 长沙湘平科技有限公司 |
| CBV-1500A 型多功能无菌工作台  PHS-3C 型精密 PH 计  RET 加热磁力搅拌器台式冷冻离心机  EG1150 石蜡包埋机RM2235 组织切片机载玻片及盖玻片  Motic 数码显微镜  Motic TeK3.l 图像采集系统  HANS-200A 韩式穴位神经刺激仪环球牌一次性无菌针灸针  大鼠固定板若干 | 上海瑞仰净化装备公司上海雷磁  德国 IKA  德国 sigma 公司德国 Leica  德 国 Leica ThermoFisher  MOTIC CHINA GROUP CO.LTD MOTIC CHINA GROUP CO.LTD  南京济生医疗科技有限公司  苏州针灸用品有限公司自制 |

8

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  |  |
|  | 大鼠鼠衣及悬吊装置  EP 管、Tip 头、冻存管等常规耗材  其他常规实验器械：长海绵夹、灌胃针头等 | 自制  上海碧云天生物技术有限公司 |

### 2.2 治疗方法

2.2.1穴位定位：参照中国针灸学会实验针灸研究会制定的《常用动物腧穴图谱》[21]标准定位大鼠“足三里”穴和“太冲”穴。足三里穴定位：小腿背外侧上1/5处，约当腓骨小头下，胫骨嵴后1cm；太冲穴定位：足背侧，第一、二跖骨结合部之前凹陷处。

2.2.2针具和电针仪：针具：环球牌一次性无菌针灸针，规格：φ0.30

³25mm；电针仪：HANS-200A韩式穴位神经刺激仪。

2.2.3治疗操作：造模成功后称各组大鼠质量，第2天开始对电针组大鼠进行电针治疗，取穴足三里和太冲穴，连续治疗28天。电针治疗组大鼠穿鼠衣束缚后悬挂于自制悬挂装置上，取大鼠的“足三里”

（小腿背外侧上1/5处，约当腓骨小头下，胫骨嵴后1cm）、“太冲”

（足背侧，第一、二跖骨结合部之前凹陷处）两处穴位，用1寸毫针垂

直刺入大鼠的双侧“足三里”穴位0.3-0.5寸；同样用1寸毫针斜刺

（与水平呈45°角）大鼠的双侧“太冲”穴位0.2-0.3寸，快速捻转至针下沉涩感后，在双侧“足三里”穴的毫针尾端连接韩氏治疗仪， 采用疏密波，频率2 Hz/100 Hz，强度1 mA，“太冲”穴处不连接电

针仪（原因是肌肉较薄，连接电针仪后不稳定），30分钟/次，每24

小时治疗1次。

2.2.4注意：空白组(Blank)大鼠在造模和治疗阶段远离造模和治疗环境，避免环境的干扰；为保持实验对照基线的一致性，模型组(Model)大鼠仅穿衣束缚并悬挂，保持与电针组（EA）大鼠的环境一致性。

9

### 2.3 标本采集方法

电针治疗结束后第一日上午称重，将所有大鼠笼内饲料取出，禁食但不禁水24小时，于第二日上午开始取材，每组随机选取8只大

鼠进行麻醉后灌注固定取全脑、胃窦、空肠组织，剩下的每组16 只

大鼠予营养迷糊灌胃，营养米糊灌胃30分钟后对每组16只大鼠进行麻醉、腹主动脉取血、进行胃排空和小肠推进试验，剪取胃窦、空肠组织。

胃肠组织取材：结扎胃贲门和幽门，取胃用滤纸拭干后称全重，然后沿胃大弯剪开胃体，洗去胃内容物后拭干，称胃净重。剪取胃窦部分放于冻存管中；同时迅速取出小肠，测量后用冰生理盐水冲洗干净，剪取空肠部置于冻存管中。一并置于液氮中迅速冻存，放置于

-80℃冰箱中待测。

### 2.4 观察指标

2.4.1一般情况评分[22]

治疗期间每日观察各组大鼠毛发、活动、粪便等情况；根据实验记录本计算出各组大鼠实验期间每日饮食和体重变化，给予相关评分：毛色润泽5分、尚润泽3分、干枯无光泽1分；活动灵敏5分、

较灵敏3分、倦怠1分；食量无变化5分、稍减少3分、明显减少 1

分；体重增加5分、无明显变化3分、明显减轻1分。每只大鼠各项评分累积相加为一般情况评分。比较各组大鼠的一般情况评分。

2.4.2体重日增长变化

称量各组大鼠正常适应喂养期前后、造模前、造模后、治疗前、治疗后各阶段大鼠重量（g），计算出适应性喂养期间、造模期间和治疗期间大鼠体重增长变化（g），分别与适应性喂养期间（7天）、造模期间（14天）、治疗期间（28天）天数的比值，即为每只大鼠每日体重增长值（g）。结合比较各组大鼠的体重日增长。

10

2.4.3饮食日增长量的测定

大鼠一天的平均饮食量（g）=200-剩余的食物重量（g）/一笼中大鼠数量。大鼠饮食日增长量（g）=后一天平均饮食量（g）-前一天平均饮 食量（g），比较各组大鼠的饮食日增长量。（每日上午8: 00给予饲

料200g，次日上午8: 00测量剩余饲料重量）

2.4.4饮水日增长量的测定

大鼠一天的平均饮水量(ml) =300-剩余的食水量(ml) /一笼中大鼠数量。大鼠饮水日增长量(ml) =后一天平均饮水量(ml) -前一天平均饮水量(ml)，比较各组大鼠的饮水日增长量。（每日上午8: 00给予

饮用水300ml，次日上午8: 00测量剩余饮水量）

2.4.5胃排空率测定[23]

以胃全重和胃净重的差值为胃残留物重，以此与所给糊重的百分比为胃内残留率。并结合比较各组的胃排空。

2.4.6小肠推进率测定[23]

测量幽门到盲肠全长(L1)及幽门至黑色半固体糊前沿的距离

（L2），小肠推进率(%) = 100L2/L1，并结合比较各组的小肠推进率。

2.4.7组织形态学检查

常规脱水透明、浸蜡、包埋、切片、烤片，进行脱蜡后；用Harris苏木素液浸染8min、8%盐酸酒精分化2秒、温水返蓝3min；95%酒精清洗1min后伊红浸染2秒，95%酒精、无水酒精清洗，风干后中性树胶封片。在光镜下(³400)的高倍视野下观察。

### 2.5 统计学分析

数据以平均数±标准差（*x*±*s*）表示，采用SPSS 20.0统计软件分析。计量资料首先进行方差齐性检验；组内比较采用配对*t*检验，组间比较用单因素方差分析；各组间均数的两两比较采用*LSD*检验

（方差齐），如方差不齐则采用*Dunnett's*检验，以*P*＜0.05具有统计学意义。

11

## **3** 结果

### 3.1 各组大鼠电针治疗前后一般情况观察及评分

3.1.1各组大鼠一般情况观察

实验前，各组大鼠均未见异常，精神状态良好、皮毛洁白整齐光泽、耳廓呈色泽淡粉、眼角无分泌物、灵敏好动、粪便呈褐色干燥球状。捕捉时各组大鼠均发怒、拼命挣扎撕咬、反抗强烈、攻击性强、 尖叫、双目圆睁、毛须竖立。

造模第4天，空白组大鼠未见异常。模型组和电针组大鼠精神尚可，活动量如前，抓捕时挣脱束缚次数逐渐减少，束缚时反抗、撕叫， 毛发凌乱，警惕性高，粪便褐色球状。

造模第8天，空白组大鼠未见异常。模型组和电针组大鼠活动减少，精神疲倦，皮毛黯淡无光泽并散乱，束缚过程中反抗不激烈，解除束缚后，大多蜷缩在角落，大便呈黄色软便。

造模第12天，空白组大鼠未见异常。模型组和电针组大鼠活动明显减少，神态疲倦，毛发枯泽散乱，耳廓色淡，抓捕时反抗微弱， 叫声细弱，大便时干时溏。

造模第14天，空白组大鼠未见异常。模型组和电针组大鼠扎堆静卧，神态疲倦，毛发杂乱无光泽，上有粪便等分泌物，眼裂黏膜及耳廓色淡，抓捕时反应很小，叫声微弱，大便呈黄绿色，稀溏不成形。

经电针治疗28天后，电针组大鼠精神状态均较前明显好转，活动度明显增加，抓捕时开始挣扎反抗，毛发整洁、耳廓呈淡粉色、粪 便转干。模型组大鼠一般状态较造模时略有好转，但与空白组比较在 活动和反应等情况仍有明显差异。

3.1.2根据一般情况、皮毛、活动、饮食、体重变化得出评分：

①同时期各组组间比较：

治疗前：与空白组大鼠相比较，模型组与电针组大鼠评分比较均有显 著性差异（*P*＜0.01, *P*＜0.01）；治疗后：与空白组大鼠相比较，模

12

型组大鼠差异有显著性差异（*P*＜0.01），电针组大鼠差异具有统计 学意义（*P*＜0.05）；与模型组大鼠相比较，电针组大鼠评分比较有 显著性差异（*P*＜0.01）。

②治疗前后比较：

模型组治疗前后一般评分的比较没有统计学意义（*P*＞0.05）；电针 组治疗后一般评分显著升高，差异具有统计学意义（*P*＜0.01）。

（见表1图1）

**表 1** **各组大鼠电针治疗前后一般情况评分比较（分）（***x***S** n=24**）**

一般情况评分（分）

| 组别 | 例数(n) | 治疗前 | 治疗后 |
| --- | --- | --- | --- |
| 空白组 | 24 | 19.96±0.20 | 19.92±0.28 |
| 模型组 | 24 | b  8.17±0.56 | d  8.75±1.15 |

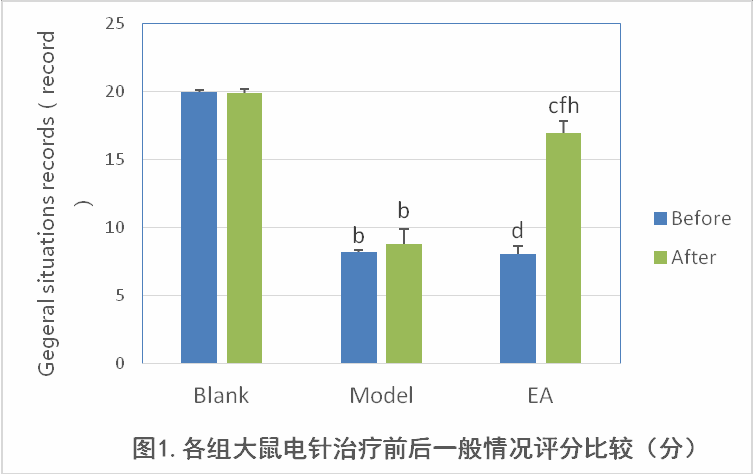
24 8.08±b 16.96±0.86cfh

电针组

0.76

注: bP<0.01 VS同时期（治疗前）空白组；cP<0.05 dP<0.01 VS同时期（治疗后）空白组；

fP<0.01 VS同时期（治疗后）模型组；hP<0.01 VS同组别（电针组）治疗前。



3.1.3造模与电针对大鼠体重日增长的影响

①同时期各组大鼠体重日增长的组间比较

13

造模期14d：与空白组大鼠相比较，模型组和电针组大鼠体重日增长显著降低（*P*＜0.01, *P*＜0.01），与模型组相比较，电针组与模型组 大鼠二者之间的差异无统计学意义（*P*＞0.05）；电针治疗期28d：与空白组大鼠相比较，模型组大鼠体重日增长差异有统计学意义（*P*

＜0.01），电针组与空白组大鼠二者之间的差异无统计学意义（*P*＞

0.05）；与模型组大鼠相比较，电针组大鼠体重日增长显著性增加， 差异具有统计学意义（*P*＜0.01）。

②各时期各组大鼠体重日增长的比较：

与适应性喂养期相比较：造模期空白组大鼠体重日增长变化不明显，差异无统计学意义（P＞0.05），模型组和电针组大鼠体重日增长显著下降，差异有统计学意义（P＜0.01, P＜0.01）；与造模期相比较：电针治疗期空白组大鼠体重日增长变化不明显，差异无统计学意义（P

＞0.05），模型组大鼠体重日增长比造模期略有增加，差异无统计学意义（P＞0.05）；电针组大鼠体重日增长比造模期显著增加，差异有统计学意义（P＜0.01）。（见表2图2a图2b）

**表 2** **各组大鼠各阶段体重日增长比较（g）（***x***S** n=24**）**

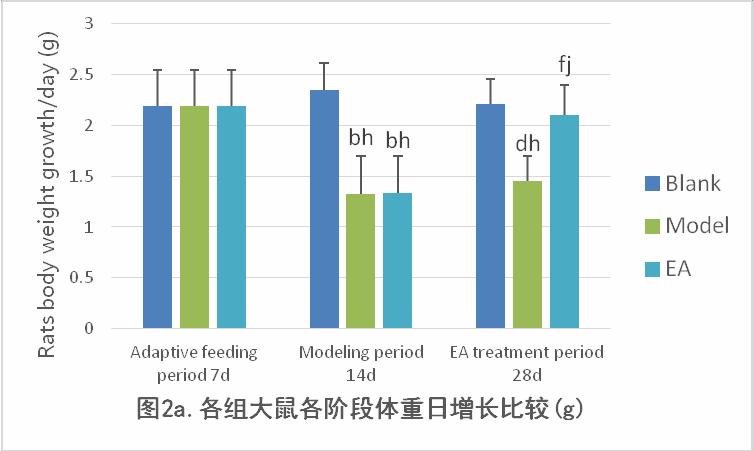
体重日增长（g）

| 组别 | 例数(n) | 适应性喂养期 7d | 造模期 14d | 电针治疗期 28d |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 空白组 | 24 |  | 2.35±0.27 | 2.21±0.25 |
| 模型组 | 24 | 2.19±0.36 | bh  1.32±0.38 | dh  1.47±0.25 |
| 电针组 | 24 |  | 1.33±0.37bh | fj  2.10±0.30 |

注：bP<0.01 VS同时期（造模期）空白组；dP<0.01 VS同时期（电针治疗期）空白组；fP<0.01

VS同时期（电针治疗期）模型组；hP<0.01VS适应性喂养期；jP<0.01VS同组别（电针组）造模期。

14





### 3.3 造模与电针治疗对大鼠日进食增长量的影响

3.3.1同时期各组大鼠日进食增长量的组间比较

造模期14d：与空白组大鼠相比较，模型组和电针组大鼠日进食增长量显著降低（*P*＜0.01, *P*＜0.01），与模型组相比较，电针组与模型组大鼠二者之间的差异无统计学意义（*P*＞0.05）；电针治疗期28d：与空白组大鼠相比较，模型组大鼠日进食增长量具有显著差异（*P*＜

0.01），电针组大鼠日进食增长量差异无统计学意义（*P*＞0.05）；与模型组大鼠相比较，电针组大鼠日进食增长量升高具有显著性差异

（*P*＜0.01）。

15

3.3.2同组大鼠在不同时期的大鼠日进食增长量的比较：

与适应性喂养期相比较：造模期空白组大鼠日进食增长量变化不明显，差异无统计学意义（*P*＞0.05），模型组和电针组大鼠日进食增长量显著下降，差异有统计学意义（*P*＜0.01, *P*＜0.01）；与造模期相比较：电针治疗期空白组大鼠日进食增长量变化不明显，差异无统计学意义（*P*＞0.05），模型组大鼠日进食增长量比造模期略有增加，差异有统计学意义（*P*＜0.01）；电针组大鼠日进食增长量比造模期显著增加，差异有统计学意义（*P*＜0.01）。（见表3图3a图3b）

表 3 各组大鼠各阶段每日进食增长量比较（g）（xS n=24）

|  | 例数  (n) |  | 日进食增长量(g | ) |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组别 |  |  |  |
|  | 适应性喂养期 7d | 造模期 14d | 电针治疗期 28d |
| 空白组 | 24 |  | 2.68±0.43 | 2.55±0.61 |
| 模型组 | 24 | 2.45±0.54 | 1.76±0.29bh | dh  1.89±0.21 |
| 电针组 | 24 |  | 1.81±0.33bh | fj  2.39±0.52 |

注：bP<0.01 VS同时期（造模期）空白组；dP<0.01 VS同时期（电针治疗期）空白组；fP<0.01 VS同时期（电针治疗期）模型组；hP<0.01VS适应性喂养期；jP<0.01VS同组别（电针组）造模期。



16



### 3.4 造模与电针治疗对大鼠日饮水增长量的影响

3.4.1同时期各组大鼠日饮水增长量的组间比较

造模期14d：与空白组大鼠相比较，模型组和电针组大鼠日饮水增长量显著降低（*P*＜0.01, *P*＜0.01），与模型组相比较，电针组与模型组大鼠二者之间的差异无统计学意义（*P*＞0.05）；电针治疗期28d：与空白组大鼠相比较，模型组大鼠日饮水增长量具有显著差异（*P*＜

0.01），电针组大鼠日饮水增长量差异具有统计学意义（*P*＜0.05）；与模型组大鼠相比较，电针组大鼠日饮水增长量升高具有显著性差异

（*P*＜0.01）。

3.4.2同组大鼠在不同时期的大鼠日饮水增长量的比较：

与适应性喂养期相比较：造模期空白组大鼠日饮水增长量差异具有统计学意义（*P*＜0.05），模型组和电针组大鼠日饮水增长量显著下降，差异有统计学意义（*P*＜0.01, *P*＜0.01）；与造模期相比较：电针治疗期空白组大鼠日饮水增长量差异具有统计学意义（*P*＜0.01），模型组大鼠日饮水增长量比造模期略有增加，差异有统计学意义（*P*＜

0.01）；电针组大鼠日饮水增长量比造模期显著增加，差异有统计学意义（*P*＜0.01）。（见表4图4a图4b）

17

表 4 各组大鼠各时期每日饮水增长量比较（ml）（xS n=24）

|  | 例数  (n) |  | 日饮水增长量(ml) | |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组别 |  |  |  |
|  | 适应性喂养期 7d | 造模期 14d | 电针治疗期 28d |
| 空白组 | 24 |  | g  4.14±0.52 | h  4.22±0.36 |
| 模型组 | 24 | 3.86±0.59 | 2.78±0.38bh | dh  3.11±0.37 |
| 电针组 | 24 |  | 2.75±0.33bh | 3.54±0.42cfj |

注: bP<0.01 VS同时期（造模期）空白组；cP<0.05 dP<0.01 VS同时期（电针治疗期）空白组；fP<0.01 VS同时期（电针治疗期）模型组；gP<0.05 hP<0.01VS适应性喂养期；

jP<0.01VS同组别（电针组）造模期。



18

### 3.5 电针治疗对大鼠胃肠动力学的影响

即电针治疗结束后，通过对各组大鼠胃排空、小肠推进率的检测来分析比较大鼠胃肠动力学的变化。与空白组大鼠相比较，模型组大鼠的胃内残留率明显增高，小肠推进率明显降低，差异具有统计学意义(P<0.01)；与模型组相比，电针治疗组大鼠的胃内残留率明显降低，小肠推进率明显增高，差异具有统计学意义（P<0.01）。（见表5图5 ）

表 5 各组大鼠胃内残留率和小肠推进率的比较（ ）（xS n=16）

| 组别 | 例数 | 胃内残留率(%) 小肠推进率(%) | |
| --- | --- | --- | --- |
| 空白组 | 16 | 29.95±4.44 | 62.23±3.78 |
| 模型组 | 16 | 47.50±4.14b | 49.01±5.00b |
| 电针组 | 16 | 32.65±3.28d | 57.61±4.82d |

注：bP<0.01 vs 空白组; dP<0.01 vs 模型组.

### 3.6 造模和电针治疗对大鼠组织形态学的影响



3.6.1胃窦组织：空白组（图A）和电针组（图C）：可见胃黏膜上皮结构完整，胃腺结构和排列未见异常，黏膜下层和肌层层次清楚连续，未见炎性细胞浸润；模型组（图B）：可见胃腺排列疏松及空泡样扩大，黏膜肌下间质有水肿，可见极少许中性粒细胞细胞浸润。

19

3.6.2空肠组织：空白组（图D）和电针组（图F）：可见空肠壁各层结构完整，细胞排列整齐有序，细胞核和胞质结构清晰，空肠黏膜下层未见充血水肿，未见炎性细胞浸润；模型组（图E）：空肠壁各层结构均未见明显异常改变，细胞排列整齐，部分腺体减少胞质增多，可见及少许炎性细胞浸润。



**图6** **.各组大鼠胃窦和空肠组织形态学观察（×400）**

注：A.空白组胃窦B.模型组胃窦C.电针组胃窦D.空白组空肠E.模型组空肠F.电针组空肠

## **4** 结论

### 4.1 模型评价：

根据结果3.1-3.4，通过对各组大鼠一般情况观察评分、活动度、体重日增长、饮食日增长、饮水日增长等日常行为学的观察，造模过程中发现模型组和电针组大鼠活动量较显著减少、毛发凌乱枯槁脱落严重、体重日增长量显著下降、日饮食饮水量显著下降、粪便稀溏、对外界刺激反应降低等消化不良的症候，解剖时亦未发现胃、肠组织有器质性病变，提示造模成功，符合FD的诊断标准[24]。并且通过夹尾刺激使大鼠激怒造成其“肝郁”的证候，通过不规则饮食和冰生理

20

盐水灌胃造成其“脾虚”的证候，说明我们制作的模型是最近接临床 肝郁脾虚型证候的功能性消化不良模型。

### 4.2 电针对功能性消化不良肝郁脾虚型大鼠日常行为学的影响

根据结果3.1-3.4，通过对各组大鼠一般情况观察评分、活动度、体重日增长、日饮食饮水增长量等日常行为学的观察，经过电针治疗后，电针组大鼠较模型组大鼠皮毛恢复整洁光亮，耳廓颜色恢复淡红色，活动度显著增大，饮食饮水量趋于正常，体重增长恢复，对外界刺激反应正常，粪便转为呈干燥褐色球状，但与正常对照组大鼠比较略差。这均提示电针能够有效地干预功能性消化不良肝郁脾虚型大鼠的行为学状况，极大地改善了功能性消化不良的临床症状，促进大鼠消化功能的恢复。

### 4.3 电针对功能性消化不良肝郁脾虚型大鼠胃肠动力学的影响

根据结果3.5，我们可以看出与模型组相比，电针组胃内残留率显著降低，小肠推进率显著增加，说明电针能够显著增加胃排空和小 肠推进功能，这提示了电针能够显著地促进胃肠动力，降低胃肠道敏 感性，有效地改善了功能性消化不良引起的胃肠动力障碍。

综上所述，电针能够有效地改善功能性消化不良肝郁脾虚型大鼠的症状，能够显著地促进胃肠动力，降低胃肠道敏感性，有效地改善 了功能性消化不良引起的胃肠动力障碍和感觉异常。我们可以肯定电 针对功能性消化不良的治疗作用。

### 4.4 电针对FD肝郁脾虚型大鼠组织形态学的影响

根据结果3.6（或图6），我们可以看出模型组大鼠的胃肠组织形态结构没有任何的异常改变，仅伴有少许的炎性细胞浸润，说明我们 的复制的模型是成功的，符合FD的诊断标准的。与空白组和模型组

21

相比较，电针组大鼠胃窦、空肠的组织形态学观察均未见明显异常， 说明电针对FD的治疗是安全有效的。

## **5** 讨论

5.1精神-社会心理因素对功能性消化不良的影响

随着社会的进步与发展，带给我们的是复杂和巨大的社会-生理-心理压力，2002年世界胃肠病学大会制定了胃肠动力性疾病分类的新体系，提出了心因性动力病(psychomotor disorder)这一全新概念，随即医学模式也由简单的生物模式向生物-心理-社会医学模式的转变。

目前大量的临床和实验研究[25]认为精神心理因素与FD的发病关系密切，FD患者普遍存在不同程度的精神心理障碍，FD患者比正常人更易存在失眠、紧张、焦虑、抑郁、敌意和神经过敏等多种精神心理障碍，并加重胃肠道症状[26-27]。精神心理因素不仅影响胃肠生理引起各种消化系统症状，还直接决定了患者对疾病的体验、就医行为、 治疗方案的选择和预后[28]。因此，精神-社会心理因素在FD的发病和治疗和预后都起到重要的作用。

胃肠运动受CNS、ANS、ENS和精神心理因素等多种因素的调节。精神-社会心理因素目前被认为是FD发病的一个重要的影响因素，其对胃肠生理的影响机制也较为复杂，但普遍认为是通过脑肠轴的神经

-内分泌网络和脑肠互动来实现的。CNS接受内外环境变化，由于应激反应产生异常的情绪信号，在边缘系统中合成并通ANS和下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPAA)传递给胃肠道效应细胞，引起胃肠道激素分泌紊乱，导致胃肠动力障碍和感觉异常。ANS由交感神经和副交感神经组成，交感神经调节幽门括约肌的运动和胃部血管的扩张与收缩，并能减缓胃壁平滑肌运动；副交感神经则主控胃液分泌，加速胃的运动。持久的精神心理异常情绪

22

会导致自主神经系统的功能紊乱，胃肠激素分泌异常，胃肠动力障碍， 迷走神经张力降低，内脏敏感性增高等一系列的病理生理变化，从而引起上腹餐后饱胀、早饱、疼痛、嗳气等多种消化不良的症状。



**图7** **.精神心理因素通过脑肠轴影响机体导致肝郁脾虚**

大量相关研究表明，精神心理因素可能通过自主神经通路影响胃肠动力。与健康对照者相比，FGIDs患者在受到心理或生理应激时胃肠运动更为剧烈，强烈的情绪和环境应激导致食管、胃、小肠和结肠运动显著增加，节律紊乱，出现呕吐、腹泻或便秘等症状[29-32]。也有研究表明精神心理因素通过调节胃肠激素分泌引起胃肠动力紊乱，方 正清等[33]研究发现FD大鼠出现胃肠动力障碍、节律紊乱，血浆、下丘脑及胃肠组织内胃动素含量均低于正常组大鼠。

因此，现代医学认为心理状况的改善与FD症状缓解密切相关[34]，对FD的治疗普遍运用抗抑郁药（如阿米替林、氟哌噻吨美利曲辛等）或心理疗法（如认知行为疗法、动力心理治对等）能提高临床治疗效果、改善生活质量及减少复发率[35]。这一观点也正与中医学“七情”致病的病因学观点相吻合，与肝主疏泄，畅达气机，维持人体脏腑阴阳气血平衡的整体观念是高度一致的。

23

### 5.2 FD肝郁脾虚型动物模型的选择与制备

历代医家都认识到FD的发病与肝、脾二脏密切相关，肝为刚脏，主疏泄，喜条达而恶抑郁，肝气顺则气机调达，脾升胃降如常；肝气郁结，气机不畅则肝郁脾虚，下利泄泻。《证治汇补・痞满》曰：“暴怒伤肝，气逆而痞”，认为本病与情志失调有关，情志不遂，肝气郁滞，横逆犯胃导致。《四圣心源》：“木以发达为性，己土湿陷，抑遏乙木发达之气，生意不遂，故郁怒而克脾土，风动而生疏泄。凡腹痛下利……，皆风木之疏泄也。”由此可见，肝郁脾虚证多因情志抑郁，肝气郁结，或暴怒伤肝，肝失疏泄，横逆犯脾，使脾不升清，胃不和降，大肠传导失职，糟粕积滞，而致泄泻。故肝郁脾虚，木乘脾土，脾胃升降失司，乃本病病机之关键。

近年来在实验研究方面，FD的动物模型的制备方法越来越多，由最开始的单因素诱导逐渐发展为多因素干预复合造模法。起初造模主要采用药物注射：四氯化碳(CC14)、前列腺素E2(PGE2)、肾上腺素等，从而诱发胃电节律失常，但造成的胃电节律失常时间短暂，与临床上胃电节律失常差异较大，又多为药理作用所致，无法排除药物代谢对模型的影响。陈道志等[36]通过静脉注入增强或抑制胃运动药，成功复制出狗胃电节律紊乱模型，但器质性病变明显，如胃和十二指肠的糜烂、溃疡。郭海军[17]根据本病肝郁脾虚，肝气犯胃的基本病机特点，采用夹尾造模法成功复制出了FD肝郁脾虚型模型大鼠，具有胃电节律紊乱的表现，并无其他器质性病变，操作简便，但需每日夹尾4次，使大鼠尾部受损严重，甚至断尾，易引发感染和死亡。

目前多采取多因素复合造模法，如不规则喂养法+饮水加酸法[18]打乱大鼠正常的进食习惯，破坏胃内酸碱环境，较成功地建立了大鼠胃电节律失常模型，但人为造成的酸性环境对实验结果的影响不容忽视，且“不规则喂养”只能模拟出饮食失节而致脾虚这一个方面的致病因素，与临床上FD肝郁脾虚的基本病机仍有差距。与此情况类似的还有束缚+冷应激方法[37]。岳利峰等[38]从中医角度分析本病的病机，

24

采用慢性束縛应激+过度疲劳+饮食失节的方法成功模拟了大鼠脾虚日久，木郁乘土，致肝郁脾虚的病理演变过程，但此方法较为繁琐， 难以推广。

因此我们必须紧密结合FD临床肝郁脾虚的基本病机，选择多因素干预复合造模方法，采用“夹尾”法激怒大鼠，形成肝郁气滞的病理状态，且每日仅夹尾2次，间隔不少于6小时，每次30分钟，几乎对大鼠尾部没有造成开放性创口，仅有一些皮损，用碘伏消毒数次， 有效降低了感染率和死亡率；“不规则喂养”则形成日久脾虚的病理状态；冰生理盐水灌胃是用冷应激的方法，造成大鼠胃电节律失常，且不破坏胃内酸性环境。综上，我们采用郭氏夹尾刺激法(14 d, 2次/d) +不规则饮食法（逢单日禁食，饮水正常）+冰生理盐水灌胃法

（-4℃0.9%NaCl注射液2 mL, 2次/d）的多因素干预法，成功模拟出了最接近临床FD发病过程的FD肝郁脾虚型大鼠，并且造模成功率高，没有器质性损害，大鼠感染率、死亡率均为零，易于操作，便于控制， 符合FD诊断标准，紧密围绕中医对功能性消化不良肝郁脾虚的基本病机。

### 5.3 电针对FD大鼠胃肠动力和胃肠道敏感性的影响

由于胃肠动力障碍和内脏感觉异常普遍存在于FD患者，是FGIDs的最重要的病理生理基础。胃肠运动功能障碍：是胃电节律紊乱、胃 排空下降、胃窦动力指数降低、消化间期移行性运动复合波Ⅲ期（强力收缩期）持续时间缩短或缺失等一系列表现的总称[39]。Kusano等[40]研究表明，FD患者存在胃排空延迟、胃电节律的异常等，其早饱和呕吐症状与胃排空延迟有关。内脏感觉过敏主要指低于正常阈值的刺激即可引起不适反应，或不被正常人感知的生理刺激在疾病情况下被感知，主要表现为痛觉过敏、痛觉超敏和自发痛等反应性增强或敏化过程[41, 42]。目前研究证实FGIDs患者中，胃肠道对于机械物理或化学刺激存在高敏感性，使本来属于正常的生理性蠕动、收缩、产生了疼

25

痛、饱胀感等不适的感觉[43]。FGIDs的内脏高敏感性机制尚不清楚，可能是由于：内脏机械性感受器的敏感性改变，研究表明内脏高敏感的初级反应位点可能是肠壁的机械性受体，由肠壁的初级传入神经将内脏感觉信息放大并传入中枢[44, 45]。另外，脊髓背角兴奋性增高，引起神经输入感觉的异常，中枢对疼痛的感觉阈值降低，这些都增强了内脏的敏感性，既可以在外周，又可存在于脊髓及中枢神经，这也导致了FGIDs患者消化道症状的复杂性和多样性。

以往大量研究表明，电针对FD具有显著治疗作用，能够显著改善FD患者上腹饱胀、纳差、嗳气等症状[46,12-15]，改善患者焦虑、抑郁状态[47]。针刺对功能性消化不良的治疗具有改善胃排空，恢复胃动力和恢复功能性消化不良大鼠的胃肠激素水平的作用，可有效地促进消化功能的恢复[15,48-49]。大量研究证实针刺能够提高迷走神经兴奋性的同时降低交感神经兴奋性，从而调节自主神经功能状态，从而显著改善FGIDs患者的内脏敏感性。姚筱梅等[50]研究发现电针足三里、天枢、内关（未连接电针）显著降低FD患者的内脏敏感性。熊会玲等[51]发现针刺对IBS临床疗效显著，可降低IBS慢性内脏高敏感性。

本研究显示电针组大鼠经过电针治疗以后，能够显著增加大鼠胃排空率和小肠推进率，促进胃肠吸收，降低胃肠道敏感性，改善FD的症状，均与文献报道相一致。因此我们认为电针具有显著有效地促进胃肠动力和降低胃肠道敏感性的作用，从而能够全面、安全、有效缓解和治疗FD的多种症状。近年来研究者普遍认为电针是通过调节脑肠轴的双向良性调节通路以达到改善胃肠动力障碍和内脏敏感性的作用，其关键的作用环节和具体的调节机制更有待于深入的研究。

26

# 第二部分 电针对**FD**肝郁脾虚型大鼠中枢及外周**VIP**及其受体

**VPAC1的影响**

在前面研究中我们发现电针能有效地增加FD肝郁脾虚证大鼠胃排空和小肠推进功能，促进胃肠吸收，降低胃肠道敏感性，但电针改 善胃肠动力障碍和内脏敏感性的起效机制和作用环节尚不明确。大量 研究资料表明，功能性消化不良引起的胃肠动力障碍和感觉异常与脑 肠肽密切相关关，脑肠肽能在各种生理刺激下释放，同时起到神经递 质和胃肠激素的作用，不但在中枢起到调节作用，还在外周及局部直 接参与胃肠的运动和感觉的调节，导致功能性消化不良胃肠动力的障 碍和感觉异常。本实验拟在第一部分实验研究基础上运用ELISA及Real-time PCR、Western blot、IHC等技术手段，继续研究电针对

FD肝郁脾虚模型大鼠中枢及外周VIP及其受体VPAC1表达的影响，通过电针对脑肠肽分泌和表达的调控，探讨电针通过脑-肠轴途径治疗功能性消化不良可能的作用机制和关键环节。

## **1** 材料

### 1.1 实验动物同第一部分1.1

### 1.2 主要试剂

|  |  |
| --- | --- |
| 主要药物与试剂 | 生产厂家 |
| 血管活性肠肽(VIP)ELSIA 检测试剂盒 | USCN #CEA380Ra |
| 丙烯酰胺 | Amresco#0341 |
| 甲叉丙烯酰胺 | Amresco#0172 |
| Tris-Base | Amresco#0497 |
| SDS | Amresco#0227 |

27

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  |  |
| 甘氨酸 Glycine TEMED  PMSF  过硫酸铵  Page Ruler prestained protein ladder Cocktail  ECL  曝光胶片 显影定影液  一抗、二抗去除液  Bradford 蛋白浓度测定试剂盒  细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒  Mouse beta-actin antibody Rabbit VIP antibody Mouse VPAC antibody  常用 Secondary Antibody  Trizol® Reagent DNase I  Revert Aid Reverse Transcriptase DNTP mix  RiboLock RNase Inhibitor  All-In-OneTM qPCR Master Mix  引物  其他常规化学试剂 | Amresco#0167 Amresco # 0761  Amresco # 0754  上海国药#10002618 Thermo#26616 ROCHE#04693132001  碧云天#P0018  Kodak, XBT-1 Kodak#6610190  碧云天・中国，Cat. No: P0025  碧云天・中国，Cat. No: P0006 碧云天・中国，Cat. No: P0028 天 津 三 箭 公 司 #KM9001 santa#SC-20727  genetex#GTX16155 天津三箭公司Invitrogen#15596026 Fermentas#EN0521 Fermentas# EP0442 Fermentas# R0191 Fermentas# E00381  GeneCopoeiaTM#AOPR-1200  英俊公司  上海国药化学试剂有限公司 |  |
| 所有试验检测用水均为 DEPC 处理过的无菌双蒸水 | | |

### 1.3 实验所需试剂配制

28

PBS缓冲液

|  |  |
| --- | --- |
| NaCl | 8g |
| KCl  NaH2PO4 KH2PO4 | 0.2g  1.44g  0.24g |
| 调节 pH7.4 后定容至 1L. 然后高压蒸汽灭菌，室温保存。 | |

10×TAE

|  |  |
| --- | --- |
| Tris (MW121.14) | 48.4g |
| 乙酸  0.5 M EDTA ( pH8.0 ) | 20 ml  20 ml |
| 最后用蒸馏水定容至 IL，高温灭菌后室温下保存。 | |

10×核酸电泳loading buffer

|  |  |
| --- | --- |
| pH8.0 EDTA | 10mM |
| 甘油 | 50% |
| 溴酚蓝 | 0.25% |

RNaseA 母液(10 mg/mL)

|  |  |
| --- | --- |
| RNaseA | 0.1g |
| 15mM NaCl  10mM Tris-HCl 调节 pH7.5 | 10 ml |
| 5 分装至 1.5mL 管中,-20℃保存备用。 | |

Agarose 凝肢

|  |  |
| --- | --- |
| 琼脂糖 | 0.2 g |
| 1×TAE | 20 ml |
| 微波炉加热至琼脂糖溶解，冷却至 6℃，加入 8μlEB 染料，倒入胶槽，冷却 20min  左右至凝固。 | |

29

(10MMol/L) PMSF

|  |  |
| --- | --- |
| PMSF | 0.174g |
| 异丙醇 | 100 ml |
| 溶解后，分装于 1.5ml 离心管中，-20°C 保存。 | |

10%SDS

|  |  |
| --- | --- |
| SDS | 10g |
| 蒸馏水至 | 100 ml |
| 50℃水浴下溶解，室温保存。如在长期保存中出现沉淀，水浴溶化后，仍可使用。 | |

10%过硫酸铵（APS）

|  |  |
| --- | --- |
| 过硫酸铵 | 0.1g |
| 超纯水 | 1.0ml |
| 溶解后，4℃保存，时间 1 周。 | |

5×样品缓冲液10ml

|  |  |
| --- | --- |
| 1.0MOl/L Tris-HCl(pH6.8) | 0.6ml |
| 50%的甘油  2-巯基乙醇  10%SDS  1%溴酚蓝蒸馏水 | 5Ml 0.5ml 2ml 1ml  0.9ml |
| 可在 4℃保存数周，或在-20℃保存数月。 | |

电泳缓冲液1L

|  |  |
| --- | --- |
| Tris-Base  甘氨酸  SDS | 3G 14.4g  1g |
| 调节 pH 8.3，加蒸馏水定容至 IL，室温下保存。 | |

30

电泳转移缓冲液

|  |  |
| --- | --- |
| Tris-Base | 3g |
| 甘氨酸  甲醇 | 14.4g  200ml |
| 用蒸馏水定容至 IL 室温下保存。 | |

5%积层胶所用溶液按总体积2.5ml

|  |  |
| --- | --- |
| ddH2O | 1.7ml |
| 30%丙烯酰胺溶液1.0mol/L Tris (PH=6.8) 10%SDS  10%过硫酸铵  TEMED | 0.42Ml 0.315ml  25μl  25μl 3 μl |
| 用蒸馏水定容至 IL 室温下保存。 | |

TBS缓冲液

|  |  |
| --- | --- |
| 1Mol/L Tris·HCI (pH7.5) | 10ml |
| NaCl  蒸馏水至 | 8.8g  1000ml |
| 可以配制成 10×TBS 缓冲液进行保存，稀释 10 倍使用 | |

TBST缓冲液

|  |  |
| --- | --- |
| 20%Tween20 | 1.65ml |
| TBS | 700ml |
| 混匀后即可使用，现用现配 | |

封闭液

|  |  |
| --- | --- |
| 脱脂奶粉 | 5g |
| TBST | 100ml |

31

### 1.4 主要仪器及器械

|  |  |
| --- | --- |
| 主要仪器及器械 | 生产厂家 |
| Forma Scientific 超低温冰箱 | 美国 Thermo 公司 |
| DHG-9246A 型电热恒温鼓风干燥箱 | 上海精法 |
| LABWATER -SZ97 自动三重纯水蒸馏器 | 广州合技 |
| ES-2011S 电子天平 | 长沙湘平科技有限公司 |
| CBV-1500A 型多功能无菌工作  PHS-3C 型精密 PH 计  RET 加热磁力搅拌器台式冷冻离心机  电热恒温培养箱移液器  无添加剂真空采血管 5ml  405LS 微孔板全自动洗板机  MK-3 酶标仪  TS-92 摇床  DYY-6C 电泳仪  电泳电源 DYY-6C 型电源电转仪及附件转膜芯 l 迷你电泳槽  PVDF 膜 Millipore 荧光定量 PCR 仪荧光 PCR 板  SDHC9E15-210 智能防水电磁炉  EG1150 石蜡包埋机  RM2235 组织切片机载玻片及盖玻片  Motic 数码显微镜  Motic TeK3.l 图像采集系统  HANS-200A 韩式穴位神经刺激仪 | 上海瑞仰净化装备公上海雷磁  德国 IKA  德国 sigma 公司  武汉海声达仪器设备公司  ThermoFisher  武汉致远医疗科技有限公司美国 BioTek 公司  美国 Thermo 公司  其林贝尔北京六一北京六一北京六一北京六一  CAT.NO.IPVH00010  美国 Thermo 公司美国 Thermo 公司SUPOR  德国 Leica  德 国 Leica ThermoFisher  MOTIC CHINA GROUP CO. LTD MOTIC CHINA GROUP CO. LTD  南京济生医疗科技有限公司 |

32

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |
|  | 环球牌一次性无菌针灸针大鼠固定板若干  大鼠鼠衣及悬吊装置  EP 管、Tip 头、冻存管等常规耗材 | 苏州针灸用品有限公司自制  自制  碧云天・中国 |  |

## **2** 方法

### 2.1 分组及造模同第一部分2.1

### 2.2 治疗方法同第一部分2.2

### 2.3 标本采集

电针治疗结束后第一天上午称重，所有大鼠禁食不禁水24小时，

第二日上午开始取材，每组随机选取8只大鼠进行麻醉，灌注固定后

取全脑、胃窦、空肠组织；剩下的每组16只大鼠不经灌注固定，直接进行麻醉、腹主动脉取血、剪取胃窦、空肠组织，取下丘脑组织。

2.3.1大鼠灌注固定：（每组随机选取8只大鼠进行灌注固定）将大鼠经10%水合氯醛（0.35ml/100g）腹腔注射麻醉后，固定于清洁的手术板上，无菌环境下打开胸腔和腹腔，用镊子和止血钳剥横膈膜， 暴露出心脏，在心尖部用眼科剪剪开一小口，向主动脉弓方向插入灌注针，直至主动脉弓处，立即用动脉夹固定，用玻璃分针轻轻剥离出腹主动脉，并快速将手术线穿过腹主动脉底部（暂不打结），然后在右心耳处剪2mm小口放出心脏血液后即开始灌注。先快速灌注0.9%NaCl 350-400 ml，观察肝脏颜色由深红转白、右心房流出液澄清后，将腹主动脉用已经穿好的手术线打结闭合（目的使多聚甲醛不能灌注至双下肢，既节省多聚甲醛试剂也可以节省灌注时间），再灌注4%多聚甲醛溶液100-120 ml（先快后慢）。大鼠出现抽搐显示多聚甲醛已灌注至大脑，直至肝脏和双上肢变硬后断头取全脑及胃肠组织，放置于4%多聚甲醛（4℃）浸泡固定48 h待检。

33

2.3.2血清采集：用10%水合氯醛（0.35ml/100g体质量）腹腔注射麻醉各组大鼠(n=16)，打开腹腔后，找到并轻轻剥离腹主动脉，采血针取血5ml后于水浴恒温箱(34℃)存放，30分钟以后将全部三组大鼠的样本-4℃低温离心(3000rpm,15min)，后吸取上层血清密封于EP管中，于-20℃冰箱保存备用，以进行ELISA检测血清VIP，(样本量为43，其中5只大鼠采血量不足5ml)。

2.3.3胃肠组织取材：未经灌注固定后的各组大鼠，结扎胃贲门和幽门，然后沿胃大弯剪开胃体，洗去胃内容物后拭干，剪取胃窦部分放 于冻存管中；同时迅速取出小肠，测量后用冰生理盐水冲洗干净，剪 取空肠部置于冻存管中。一并置于液氮中迅速冻存，放置于-80℃冰箱中以待PCR、Wb检测。经灌注固定的大鼠取胃窦和空肠后将组织存放于已加4ml多聚甲醛试剂的尿杯中保存以待IHC检测。

2.3.4全脑取材：经灌注固定后的各组大鼠处死断头后，纵向剪开大鼠头部背侧头皮，用止血钳顺大鼠枕骨大孔，轻轻逐步咬除背侧颅骨， 暴露大鼠大脑，前自噢球处分离，剪断视神经，完整剥离全脑组织，放入已加4ml多聚甲醛试剂的尿杯中保存以待IHC检测。

2.3.5下丘脑取材：未经灌注固定的大鼠处死断头后，先剥离出全脑

（方法同上），将取出的大脑翻转放置于干冰上进行取材，正中央呈 菱形的部分即为下丘脑，用眼科镊轻轻夹取下丘脑，将取出的下丘脑 放入1.5 mL灭菌的冻存管中，液氮瓶中迅速冷冻，-80℃冰箱保存待测以待PCR、Wb检测。

### 2.4 检测方法

2.4.1 ELISA法检测血清中VIP含量

（1）准备：将ELISA试剂盒从4℃冰箱拿至室温平衡20min后，从铝箔袋中取出板条；

34

（2）加样：设置标准品孔、样本孔和空白孔，将标准品按不同浓度稀释后取50μL分别加入标准品孔，待测样本孔先加样本稀释液25μL，再分别加入待测血清25μL；

（3）加酶标抗体：标准品孔和样本孔中（空白孔不加）加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的检测抗体100μL，用封板膜封住反应孔，恒温箱温育40min；

（4）洗涤：弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液，静置1min，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复洗板5次；

（5）显色：在所有孔均加入底物A、B各50μL，34℃避光孵育15min；

（6）终止：所有孔加入终止液50μL，在15min内，在450nm波长处测定各孔的OD值；

（7）标准曲线绘制：以标准品1600、800、400、200、100、50pg/mL为横坐标，OD值为纵坐标，绘制标准品回归线性曲线，最后按曲线方程计算各样本含量。（标准曲线详见附录一：彩图一）2.4.2Real-time PCR法检测下丘脑胃窦空肠VIPmRNA相对表达量

(1)第一步：RNA的提取

1.每样本加入1ml Trizol试剂消化并充分匀浆，13000rpm离心5min后取上清。

2.加三氯甲烷200 ul，充分混匀，静置10min，4℃离心(13000rpm,

15min)。

3.取上清液于另一灭过菌的EP管内，加入等体积4℃的异丙醇，混匀后放常温放置10min后，4℃离心(13000rmp,10min)；弃上清，管底的白色沉淀即为RNA。

4.加入1ml 75%乙醇，4℃离心，12000rmp，5min。

5.弃上清，再瞬时离心，吸干管内液体，晾干，再加入适量的去离子 水溶解。

6.2%琼脂糖凝胶电泳检测RNA提取质量。

7.去除基因组DNA，按下表加入各组分后34℃孵育30min后65℃10分钟灭活DNase I。

35

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |
|  | Components | Volume |  |
|  | RNA | 1μg |  |
|  | 10×DNase Buffer | 1μl |  |
|  | DNase I | 1μl |  |
|  | Ribolock TM Ribonuclease Inhibitor(40μ/μl) | 0.25μl |  |
|  | RNase free water | Up to 10μl |  |

(2)第二步：逆转录

1.加入

|  |  |
| --- | --- |
| Components | Volume（μl） |
| RNA | X μl（10μg~1μg） |
| 逆转录引物 (20um) | 1μl |
| RNase free H2O | Add to 12.5μl |
| 总体系 | 12.5μl |

2.轻轻混匀，65℃变性10min，后立即置于冰上2min后加入：

|  |  |
| --- | --- |
| Components | Volume（μl） |
| RNA-primer mix | 12.5μl |
| 5×RT Reaction Buffer | 4μl |
| dNTP（10mM） | 2μl |
| RiboLock RNase Inhibitor | 0.5μl |
| RevertAid Reverse Transcriptase | 1μl |
| 总体系 | 20μl |

25℃孵育10min后42℃孵育60min，70℃加热灭活10 min，-20℃保存。

(3)第三步Real-time PCR

1. 引物由primer5.0软件设计，并由英俊公司合成。β-actin为内参照，扩增片断大小为110bp，

R-actin-F: CGTTGACATCCGTAAAGACCTC R-CGRP-R: TAGGAGCCAGGGCAGTAATCTCC

36

VIP扩增片段大小为240bp，

R-actin-F: AGGAAAGACCCAAGGAGGCACCG R-CGRP-R: TAGGGCGTGTCATTCTCCGCTAA

2. 引物的配制

将引物瞬时离心；按照说明书加入去离子水，加盖混匀，配成100uM/L的贮存液；另取一EP管，将上、下游引物稀释为10.0uM/L终浓度的工作液。

3. cDNA的配置：将cDNA从冰箱中取出，加入适量的去离子水，稀释至合适的浓度。

4. 反应体系

|  |
| --- |
| Composition Volume（μl） |
| 2X all-in-OneTM qPCR Mix（含 ROX） 10μl  引物（10pmol/μl） 上下游各 0.4μl |
| ddH2O 4.2μl |
| cDNA（适度稀释） 5μl |
| 总体系 20μl |

5. 反应条件

|  |
| --- |
| Temperature Time |
| 95℃ 10min  95℃ 10s  60℃ 20s 40 个循环  72℃ 20s |

6. 扩增程序图：退火温度为60℃（扩增、曲解曲线详见附录一：彩图三）

(4)第四步：结果处理采用2-ΔΔCT法进行分析

2.4.3 Western blot法检测胃窦、空肠、下丘脑组织中VIP、VPAC1的表达

37

(1)样品制备

1.用剪刀剪取约50mg组织，置于组织匀浆器中，加入1ml总蛋白提取试剂，玻璃匀浆器匀浆5min-20min直到组织充分破碎，然后冰上放置10-20min后，再匀浆5min-20min，将匀浆液吸出放到1.5ml离心管中。

2.放置冰上超声3次，每次3s。

3.9000rpm，离心10min，取适量上清置于新的1.5ml离心管中

4. -20℃冻存。

(2)蛋白浓度检测：按照BCA蛋白定量试剂盒使用说明操作。

1.根据样品数量，按50体积BCA试剂A加1体积BCA试剂B(50: l)配制适量BCA工作液，充分混匀。BCA工作液室温24小时内稳定。

2.完全溶解蛋白标准品，浓度为2mg/ml。

3.将标准品按0，1，2，3，4，5，6μl加到96孔板的标准品孔中，加用于稀释标准品的溶液补足到20μl。

4.加适当体积样品到96孔板的样品孔中，加用于稀释标准品的溶液到20μl。

5.各孔加入200μl BCA工作液，34℃放置30min。

6.测定A562, 540-595nm之间的波长也可接受。根据标准曲线计算出蛋白浓度。

(3)电泳

1.将抗原（组织/细胞裂解液）样品体积：5³loading buffer体积

=5: 1混匀，在100℃加热三分钟以使蛋白质变性。

2.设计加样顺序，作好实验记录，按预定顺序加样。一般每个电泳道加样最大体积为25µl，每个电泳道上样的最低蛋白质量（每一条蛋白质条带）：0.1µg（考马斯亮蓝染色）-2ng（银染色）,最高蛋白质量（蛋白质混合物）：20-40µg。

3.把电泳装置与电源连接好，将电压调至100V，电流应流向阳极，待溴酚蓝迁移到分离胶底部0.5cm处，关闭电源。

4.从电泳装置上卸下凝胶玻璃板，用去离子水冲洗干净。

38

(4)免疫印迹操作-转膜

1.将凝胶玻璃板置于盛有电泳转移缓冲液的容器中，浸泡15-20min.

2.带上手套，裁剪好滤纸和电转膜，滤纸和膜大小为83mm³75mm,尽量避免污染滤纸和膜，将裁减好的滤纸和膜浸泡与电泳转移缓冲液中，驱除留于膜上的气泡。

3.打开转移盒并放置浅盘中，用转移缓冲液将海绵垫完全浸透后将其 放在转移盒壁上，海绵上再放置一张浸湿的滤纸。

4.小心将凝胶放置于滤纸上，避免气泡（用转移缓冲液润湿并戴手套 以转移缓冲液润湿胶面，小心将电转膜放在胶面上，从凝胶的一边开 始轻轻放下可避免气泡，注意一定要戴手套或镊子接触膜）。

5.用去离子水清洗缓冲液槽，在缓冲液槽中放入搅拌子，将另一块海 绵用转移缓冲液浸透后放在凝胶-膜“三明治”上，关上转移盒并插入转移槽。

6.将冰盒装入缓冲液槽，注满4℃预冷的转移缓冲液。

7.将整个装置放在磁力搅拌器上并开始搅拌，连接好转移电极恒流

280mA转移90min。

8.电转完毕后，将电转膜置于5%的脱脂奶粉（PBST配制）中封闭，摇床上34℃³1小时或静置冰箱中4℃过夜。

(5)免疫检测

a. 一抗与靶蛋白的结合：

1.封闭的膜用PBST漂洗2-3次。

2.将加样槽洗涤干净，用蒸馏水润洗，晾干，将膜用一次性手套覆盖好，按标记和实验设计切下膜条（一般为3 mm宽左右）按顺序置于加样槽中，作好实验记录，加入相应的一抗约1ml，注意保证膜的所有部分同溶液接触。

3.室温下于摇床孵育2h或4℃过夜。

4.弃去一抗，膜条仍置于加样槽，每个槽加2-3 mlPBST，上摇床洗涤洗涤5-10min，换液，反复4次。

b. 酶标记二抗与一抗的结合

39

1.根据实验需要和设计选择合适的酶标二抗和稀释浓度（用含0.5%脱脂奶粉的PBS稀释），每个加样槽中加入二抗1ml左右室温下于摇床孵育1h或4℃过夜，注意保证膜的所有部分同溶液接触。

2.弃去二抗，膜条仍置于加样槽，每个槽加2-3 mlPBST，上摇床洗涤洗涤5-10min，换液，反复4次。

(6)化学发光

将膜放于平皿中，风干后按0.125 ml/cm2加ECL化学发光液，待其反应一定时间后，将ECL液浸润的膜移至一张干净塑封膜上，封膜，带入暗室压片曝光，胶片显影约60秒，定影约90秒。

(7)结果检测

每张膜上做一种目的蛋白和相应的内参蛋白，采用Image J分析软件将条带灰度值数字化，将目的蛋白的灰度值除以内参β-actin的灰度值以校正误差，以相对灰度值作为结果。

2.4.4 IHC法检测空肠、下丘脑、海马组织中VIP、VPAC1的表达

（1）将鼠脑灌注固定后并取剥离完整脑组织并置入固定液固定

24-48h，固定好后蒸馏水冲洗30min后，将脑放入脑槽，选择视交叉后2-3mm位置，将取好部位的大鼠脑、肠组织分别经70%、80%、95%、

100%梯度酒精脱水及二甲苯透明处理后进行石蜡包埋后，轮转式石蜡 切片机连续切片片厚4μm。脱蜡前，将组织切片在65℃恒温箱中烘烤至少2个小时。

（2）脱蜡处理/切片的水化，用二甲苯浸洗切片3次，每次5分钟，用

无水乙醇浸洗切片2次，每次10分钟，用95%乙醇浸洗切片2次，每次10分钟，用PBS缓冲液（PH7.4）冲洗3次，每次5min。

（3）抗原修复：组织切片置于盛满EDTA抗原修复缓冲液（Ph9.0）的修复盒中于微波炉内进行抗原修复。中火至沸后断电，间隔10min后中低火至沸，此过程中防止缓冲液过度蒸发，切勿干片。自然冷却后将玻片置于PBS缓冲液中（PH7.4），于脱色摇床上晃动洗涤3次，每次5min。

40

（4）阻断内源性过氧化物酶：切片放入3%过氧化氢溶液中，室温避光孵育20min，将玻片置于PBS缓冲液中（PH7.4），于脱色摇床上晃动洗涤3次，每次5min。

（5）加一抗：切片甩干后用组化笔在组织周围画圈（防止抗体流走）， 在圈内滴加用5% BSA按一定比例稀释好的待测抗体（1︰1000）覆盖组织，并将切片平放于湿盒内4°C孵育过夜。

（6）加二抗：将玻片置于PBS缓冲液中（PH7.4），于脱色摇床上晃动洗涤3次，每次5min。切片甩干后在圈内滴加组化试剂盒内与一抗相应种属的二抗（HRP标记）覆盖组织，室温孵育50min。

（7）DAB显色：将玻片置于PBS缓冲液中（PH7.4），脱色摇床上晃动洗涤3次每次5min。切片甩干后在滴加新鲜配制的DAB显色液，显微镜下控制显色时间，阳性为棕黄色，自来水冲洗切片终止显色。

（8）复染细胞核：Harris苏木素复染3min左右，自来水冲洗，1%的盐酸酒精分化1min，自来水冲洗，氨水返蓝，流水冲洗。

（9）脱水封片：将切片依次放入70%酒精5min、80%酒精5min、90%酒精5min、95%酒精5min、无水乙醇15min、无水乙醇Ⅱ5min、二甲苯

Ⅰ5min、二甲苯Ⅱ5min脱水透明，将切片从二甲苯中取出并晾干，中性树胶封片。

（10）采用BI-2000医学图像分析系统进行图象分析，所有切片均采用同一放大倍数(400倍)，同一光强度进行观察。选择空肠组织固有层肠腺、下丘脑腹内侧核和海马齿状回采集图片，每张切片于400倍光

镜下选取5个视野观察指标阳性表达及分布情况。将图像摄入计算机，设定基础统计面积，分别调定灰度值，滤去非阳性部分，通过计 算机自动分析，得出平均阳性表达面积及面密度。

41

### 2.5 统计学分析同第一部分2.5

## **3.** 结果

### 3.1 各组大鼠血清中VIP的含量

与空白组相比，模型组大鼠血清中VIP含量显著升高，差异有统计学意义（P＜0.05）；与模型组相比，电针组大鼠血清中VIP含量显著降低，且差异有统计学意义（P＜0.05），电针组大鼠血清中VIP含量与空白组相比差异无统计学意义（P＞0.05）。（见表6图9）

表 6 各组大鼠血清中VIP含量比较（pg/ml）（xS n=14）

| 组别 | 例数 血清 VIP（稀释 6 倍）（pg/ml） | |
| --- | --- | --- |
| 空白组 | 14 | 32.52±13.17 |
| 模型组 | 14 | 54.17±6.58b |
| 电针组 | 14 | 43.00±10.79c |

注：bP＜0.01 VS空白组；cP＜0.05 VS 模型组



3.2 Real-time PCR法检测胃窦、空肠、下丘脑组织中VIP/β-actin

mRNA（相对表达量）比较

与空白组相比，模型组大鼠胃窦、空肠、下丘脑组织中VIP mRNA相对表达量均显著升高，差异有统计学意义（*P*＜0.01）；与模型组相比，电针组大鼠胃窦、下丘脑组织中VIP mRNA相对表达量均降低，

42

且差异有统计学意义（*P*＜0.05），电针组大鼠空肠组织中VIP mRNA相对表达量显著降低（*P*＜0.01）；电针组大鼠胃窦、空肠、下丘脑组织中VIP mRNA相对表达量与空白组相比差异无统计学意义（*P*＞

0.05）。（见表7图10）

表7 .各组大鼠胃窦、空肠、下丘脑组织中VIP/β-actin mRNA比较（xS n=8）

|  | 例数  (n) |  | VIP/β-actin mRNA |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组别 |  |  |  |
|  | 胃窦 | 空肠 | 下丘脑 |
| 空白组 | 8 | 1.59±0.32 | 0.76±0.17 | 0.74±0.24 |
| 模型组 | 8 | 2.32±0.60b | 1.07±0.20b | b  1.14±0.30 |
| 电针组 | 8 | 1.68±0.52c | 0.81±0.15d | 0.88±0.12c |

注：bP＜0.01 VS空白组；cP＜0.05 VS 模型组；dP＜0.01VS 模型组



### 3.3 Western blot法检测胃窦、空肠、下丘脑中VIP、VPAC1蛋白相对表达含量的比较

3.3.1各组大鼠胃窦VIP、VPAC1蛋白相对表达含量比较

与空白组相比，模型组大鼠胃窦VIP、VPAC1蛋白的相对表达量均明显升高，差异有统计学意义(*P*＜0.05)；与模型组相比，电针组 胃窦VIP、VPAC1蛋白的相对表达量明显降低，差异有统计学意义（*P*

43

＜0.05）；电针组大鼠胃窦VIP、VPAC1蛋白的相对表达量与正常组相比较差异没有统计学意义(*P*＞0.05)。（见图11A 11B）

3.3.2各组大鼠空肠VIP、VPAC1蛋白相对表达含量比较。

与空白组相比，模型组大鼠空肠VIP和VPAC1蛋白的相对表达量均明显升高，差异有统计学意义(*P*＜0.05)；与模型组相比，电针组空肠VIP和VPAC1蛋白的相对表达量明显降低，差异有统计学意义（*P*

＜0.05）；电针组大鼠空肠VIP和VPAC1蛋白的相对表达量与正常组相比较差异没有统计学意义(*P*＞0.05)。（见图11C 11D）

3.3.3各组大鼠空肠下丘脑VIP、VPAC1蛋白相对表达含量比较

与空白组相比，模型组大鼠下丘脑VIP和VPAC1蛋白的相对表达量均明显升高，差异有统计学意义(*P*＜0.05)；与模型组相比，电针组下丘脑VIP和VPAC1蛋白的相对表达量明显降低，差异有统计学意义(*P*＜0.05)；电针组大鼠下丘脑VIP和VPAC1蛋白的相对表达量与正常组相比较差异没有统计学意义(*P*＞0.05)。（见图11E 11F）

**A B**

**1.5**

**Relative expression level of VIP/β -actin VPAC1/β -actin**

****

**1.0**

**0.5**

**0.0**

**C D**

a

a

VIP

VPAC1

c

c

**1.5**

**Relative expression level of VIP/β -actin VPAC1/β -actin**



**1.0**

**0.5**

**0.0**

44

**gastric**

**intestine**

a

VIP

VPAC1

a

c

c

**E F**

****

a

**0.8**

a

**0.6**

VIP VPAC1

c

**0.4**

c

**0.2**

**0.0**

**1.0**

**Relative expression level of VIP/β -actin VPAC1/β -actin**

**hypothalamus**

**图11。各组大鼠胃窦、空肠、下丘脑组织中VIP、VPAC1**

**蛋白相对表达含量比较**

注：aP＜0.05 VS空白组；cP＜0.05 VS模型组。图11A.11B为胃窦组织；图11C.11D为空肠组织；图11E.11F为下丘脑组织。

### 3.4 IH法观察并计算出空肠、下丘脑、海马中VIP、VPAC1蛋白表达的比较(表8图12详见附录一：彩图四)

3.4.1 IHC法比较各组大鼠空肠、下丘脑、海马VIP蛋白的表达：与空白组相比，模型组大鼠空肠、下丘脑、海马VIP蛋白的表达

均升高，差异有统计学意义(*P*＜0.05)；与模型组相比，电针组大鼠空肠、下丘脑、海马VIP蛋白的表达均下降，差异有统计学意义（*P*

＜0.05）。模型组空肠固有层的肠腺、下丘脑腹内侧核（VMH）、海马齿状回（DG）颗粒细胞层均可见阳性表达增强呈棕黄色，而电针组各组织阳性表达较模型组相比减弱。(见表8a图12a附录一：彩图四)

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **表 8a.** | **IHC 法检** | **测各组大鼠不同组** | **织 VIP 蛋白表达比较（** *x* **±s n=8）** | | |
|  | 例数  (n) |  | Mean density(×10-2) | | |
| 组别 |  |  |  |  |
|  | 空肠 | 下丘脑 |  | 海马 |
| 空白组 | 8 | 3.12±0.42 | 1.40±0.60 |  | 1.56±0.52 |
| 模型组 | 8 | 3.92±0.93a | 2.03±0.55a |  | b  2.91±0.56 |
| 电针组 | 8 | 3.27±0.66c | 1.59±0.37c |  | 2.23±0.57c |

注：aP＜0.05 VS空白组；bP＜0.01 VS空白组；cP＜0.05 VS 模型组

45



3.4.2 IHC法比较各组大鼠空肠、下丘脑、海马VPAC1蛋白的表达：与空白组相比，模型组大鼠空肠、下丘脑、海马VPAC1蛋白的表

达均上升，差异有统计学意义(*P*＜0.05)；与模型组相比，电针组大鼠空肠、下丘脑、海马VPAC1蛋白的表达均下降，差异有统计学意义

（*P*＜0.05）。模型组空肠固有层的肠腺、下丘脑腹内侧核（VMH）、海 马齿状回（DG）颗粒细胞层均可见阳性表达增强呈棕黄色，而电针组各组织阳性表达较模型组相比减弱。(见表8b图12b附录一：彩图四)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **表 8b.IH** | **C 法检测** | **各组大鼠不同组** | **织 VPAC1 蛋白表达比较（** *x* **±s n=8）** | |
|  | 例数  (n) |  | Mean density(×10-2) | |
| 组别 |  |  |  |
|  | 空肠 | 下丘脑 | 海马 |
| 空白组 | 8 | 3.03±0.54 | 1.22±0.39 | 1.74±0.76 |
| 模型组 | 8 | 4.13±0.94a | 2.29±0.83b | 2.65±0.60a |
| 电针组 | 8 | 3.21±0.82c | 1.50±0.61c | 1.93±0.55c |

注：aP＜0.05 VS空白组；bP＜0.01 VS空白组；cP＜0.05 VS 模型组

46



## **4.** 结论

## 1. 电针对FD大鼠VIP的调节作用

根据结果3.1-3.2，通过ELISA法检测对比三组大鼠血清中VIP的含量和Rt-PCR法检测各组大鼠胃窦、空肠、下丘脑组织中VIP mRNA相对表达量，可见模型组大鼠血清VIP含量和胃窦、空肠、下丘脑组织中VIP mRNA相对表达量均是上升的，可见外周和组织中VIP的增多是FD发病的一项因素，而电针组大鼠的血清VIP含量和胃窦、空肠、下丘脑组织中VIP mRNA相对表达量对比模型组均明显下降，这证明了调节VIP在FD治疗过程中的意义，并且电针能够有效地降低FD大鼠外周以及胃肠道、中枢VIP的含量，同时极大地改善了FD的症状，促进大鼠胃肠功能的恢复，提示了电针的起效途径是既包括中枢也包括外周的，多层次多靶点的。

## 2. 电针对FD大鼠VIP及其相应的受体VPAC1的调节作用

根据结果3.3-3.4，分别运用Western blot法和IHC法对大鼠各组织中VIP及其相应的受体VPAC1的表达检测并分析比较，模型组大鼠外周（胃窦、空肠组织）和中枢（下丘脑、海马组织）中VIP及其相应的受体VPAC1的表达均明显升高，而经过电针治疗后，电针组大鼠外周（胃窦、空肠组织）和中枢（下丘脑、海马组织）中VIP 及

47

其相应的受体VPAC1的表达均明显下降，并且与空白组差异无统计学意义。这提示了VIP参与FD的发病是通过与其特异性受体结合来发挥生物学作用的，并且外周（胃窦、空肠组织）和中枢（下丘脑、海马组织）中VIP及其相应的受体VPAC1的表达增多是FD发病的重要因素。而电针通过脑肠轴的神经内分泌网络，调节外周（胃窦、空肠组织）和中枢（下丘脑、海马组织）中VIP及其相应的受体VPAC1的表达，下调VIP、VPAC1的水平以达到恢复胃肠动力和改善胃肠功能的作用，这可能是电针治疗FD的重要途径之一。

## **5.** 讨论

血管活性肠肽（vasoactive intestinal peptide, VIP）是由

28个氨基酸组成的小分子神经肽，有非常强烈扩张血管作用因此得名[52]。VIP主要由中枢神经系统和外周神经系统产生，此外，炎性反应细胞、淋巴细胞和内分泌细胞也产生少量的VIP[53]. VIP广泛分布于消化系统中，主要见于内分泌细胞和黏膜下小神经纤维，粘膜肌间神经丛，包括结肠、回肠、空肠、十二指肠、VIP在脑内分布不均，在下丘脑、大脑皮层、杏仁核、海马等区域，纹状体均较高，也分布在心血管系统。

VIP是一种非胆碱能非肾上腺素能抑制系统的神经肽（神经递质），具有多种生物学功能：：一是胃肠激素功能，能够胃肠平滑肌的松弛、可广泛抑制胃肠平滑肌的运动，引起全胃肠环形肌松弛[54]。参与机体内多种生理过程，如胃的容受性舒张反射、消化道多种括约肌松弛、减缓胃排空、抑制胃酸分泌、小肠蠕动和胆囊收缩抑制等；二是血管活性物质功能，可以广泛舒张血管；三是神经肽功能，参与神经调节；四是免疫调节肽作用，参与调节适应性和先天性免疫应答等。VIP发挥相应的生物学作用主要通过不同的受体，已证实的受体有：VPAC1、VPAC2、PAC1 [55]. VIP引起肠平滑肌缓慢舒张的作用机制可能是通过

48

与特异性受体相结合而导致平滑肌收缩的直接作用和（或）间接通过 促进一氧化氮的释放，松弛胃肠平滑肌的。

许多动物实验[56-58]表明胃肠组织中VIP表达水平升高，抑制胃运动和胃排空作用，提示VIP分泌水平升高可能导致了FD的发病。临床研究证实，存在胃动力障碍的FD患者中，空腹及餐后VIP水平均明显高于正常人，提示VIP在FD胃动力障碍的发病机制中具有一定的作用。这均与本研究得到的结果相一致。

49

# 第三部分 电针对**FD**肝郁脾虚型大鼠中枢及外周**CGRP** 及

**RAMP1的影响**

通过实验一和实验二我们可知脑肠互动与脑肠肽对胃肠道的运动有着调节作用，胃肠动力的效应发挥，是中枢系统接受来自内外环 境的刺激，通过合成分泌胃肠激素（脑肠肽）与受体结合、作用于胃 肠道效应细胞，或将信号传递于肠神经系统等途径实现的。而胃肠道 的感觉功能也是通过脑肠轴对自主神经系统的调节实现的，CGRP等脑肠肽的分泌异常，亦可直接影响胃肠道的敏感性。本实验拟在第一 部分实验研究基础上运用ELISA及Real-time PCR、Western blot、IHC等技术手段，继续研究电针对FD肝郁脾虚模型大鼠中枢及外周CGRP及其受体RAMP1表达的影响，通过电针对脑肠肽分泌和表达的调控，探讨电针通过脑-肠轴途径治疗功能性消化不良可能的作用机制。

## **1.** 材料

### 1.1 实验动物同第一部分1.1

### 1.2 主要试剂

|  |
| --- |
| 主要药物与试剂 生产厂家 |
| 降钙素基因相关肽(CGRP)ELSIA 检测试剂盒 USCN 公司# CEA876Ra Rabbit CGRP antibody epitomics 公司#6785-1  Rabbit RAMP1 antibody 博奥森公司#BS-1567R其余所有试剂均同第二部分 1.2 |

50

### 1.3 实验所需试剂配制同第二部分1.3

### 1.4 主要仪器及器械同第二部分1.4

## **2.** 方法

### 2.1 分组及造模同第一部分2.1

### 2.2 治疗方法同第一部分2.2

### 2.3 标本采集同第二部分2.3

### 2.4 检测方法

2.4.1 ELISA法检测血清中VIP含量

具体步骤同第二部分2.4.1（标准曲线详见附录一：彩图二）

2.4.2 Real-time PCR法检测下丘脑胃窦空肠CGRPmRNA相对表达量

引物由primer5.0软件设计，并由英俊公司合成。β-actin为内参照，扩增片断大小为110bp，R-actin-F: CGTTGACATCCGTAAAGACCTC

R-actin-R: TAGGAGCCAGGGCAGTAATCTCC

C GRP扩增片段大小为126bp，

R-CGRP-F: CCTTTCCTGGTTGTCAGCATCTT R-CGRP-R: CAGTAGGCGAGCTTCTTCTTCAC

其余步骤同第二部分2.4.2（扩增、曲解曲线详见附录一：彩图五）

2.4.3 Western blot法检测胃窦、空肠、下丘脑组织中CGRP、RAMP1的表达

具体步骤同第二部分2.4.3

51

2.4.4 IHC法检测空肠、下丘脑、海马组织中CGRP、RAMP1的表达具体步骤同第二部分2.4.3

### 2.5 统计学分析同第一部分2.5

## **3** 结果

### 3.1 各组大鼠血清中CGRP的含量

与空白组相比，模型组大鼠血清中CGRP含量升高，差异有显著性（*P*＜0.01）；与模型组相比，电针组大鼠血清中CGRP含量显著降低（*P*＜0.01），电针组大鼠血清中CGRP含量与空白组相比差异无统计学意义（*P*＞0.05）。（见表9图13）

表 9 .各组大鼠血清中CGRP含量比较（pg/ml）（xS n=14）

| 组别 | 例数 血清 CGRP（稀释 6 倍）（pg/ml） | |
| --- | --- | --- |
| 空白组 | 14 | 17.30±5.27 |
| 模型组 | 14 | 27.53±5.76b |
| 电针组 | 14 | 20.16±2.36d |

注：bP＜0.01 VS空白组；dP＜0.01 VS 模型组



3.2 Real-time PCR法检测胃窦、空肠、下丘脑组织中CGRP/β-actin mRNA（相对表达量）比较

52

与空白组相比，模型组大鼠胃窦、空肠、下丘脑组织中CGRP mRNA相对表达量均显著升高，差异有统计学意义（*P*＜0.05 *P*＜0.01 *P*＜0.01）；与模型组相比，电针组大鼠胃窦、空肠、下丘脑组织中CGRP mRNA相对表达量均降低，差异有统计学意义（*P*＜0.05）；电针组大鼠胃窦、空肠、下丘脑组织中VIP mRNA相对表达量与空白组相比差异无统计学意义（*P*＞0.05）。（见表10图14）

**表10** **.各组大鼠胃窦、空肠、下丘脑组织中CGRP/β-actin mRNA比较**

（xS n=8）

|  | 例数  (n) |  | CGRP/β-actin mRN | A |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组别 |  |  |  |
|  | 胃窦 | 空肠 | 下丘脑 |
| 空白组 | 8 | 0.75±0.28 | 0.64±0.14 | 0.67±0.11 |
| 模型组 | 8 | 1.13±0.32a | 0.86±0.14b | 0.89±0.16b |
| 电针组 | 8 | 0.83±0.16c | 0.72±0.13c | 0.70±0.15c |

注：aP＜0.05 VS空白组；bP＜0.01 VS空白组；cP＜0.05 VS 模型组；



### 3.3 Western blot法检测胃窦、空肠、下丘脑中CGRP、RAMP1蛋白相对表达含量的比较

3.3.1各组大鼠胃窦CGRP、RAMP1蛋白相对表达含量比较

53

与空白组相比，模型组大鼠胃窦CGRP、RAMP1蛋白的相对表达量均明显升高(*P*＜0.05)；与模型组相比，电针组胃窦CGRP、RAMP1蛋白的相对表达量明显降低(*P*＜0.05)；电针组大鼠胃窦CGRP、RAMP1蛋白的相对表达量与正常组相比较差异没有统计学意义(*P*＞0.05)。

（见图15A 15B）

3.3.2各组大鼠空肠CGRP、RAMP1蛋白相对表达含量比较。

与空白组相比，模型组大鼠空肠CGRP、RAMP1蛋白的相对表达量均明显升高(*P*＜0.05)；与模型组相比，电针组空肠CGRP、RAMP1蛋白的相对表达量明显降低(*P*＜0.05)；电针组大鼠空肠CGRP、RAMP1蛋白的相对表达量与正常组相比较差异没有统计学意义(*P*＞0.05)。

（见图15C 15D）

3.3.3各组大鼠空肠下丘脑CGRP、RAMP1蛋白相对表达含量比较

与空白组相比，模型组大鼠下丘脑CGRP、RAMP1蛋白的相对表达量均显著升高，有显著性差异(*P*＜0.01)；与模型组相比，电针组下丘脑CGRP、RAMP1蛋白的相对表达量明显降低，差异有统计学意义（*P*

＜0.05）；电针组大鼠下丘脑CGRP、RAMP1蛋白的相对表达量与正常组相比较差异没有统计学意义(*P*＞0.05)。（见图15E 15F）

**A B**

**2.0**

a

**1.5**

a

CGRP

RAMP1

**1.0**

c

△

c

**0.5**

**0.0**

**gastric**

**Relative expression level of CGRP/β -actin RAMP1/β -actin**



54

**C D**

**2.0**

**Relative expression level of CGRP/β -actin RAMP1/β -actin**



**1.5**

**1.0**

**0.5**

**0.0**

**E F**

**0.5**

**Relative expression level of CGRP/β -actin RAMP1/β -actin**



**0.4**

**0.3**

**0.2**

**0.1**

**0.0**

**intestine**

a

a

**hypothalamus**

b

b

CGRP

RAMP1

c

c

CGRP RAMP1

c

c

**图15。各组大鼠胃窦、空肠、下丘脑组织中CGRP、RAMP1**

**蛋白相对表达含量比较**

注：aP＜0.05 VS空白组；bP＜0.01 VS空白组；cP＜0.05 VS模型组；图15A.15B为胃窦组织；图15C.15D为空肠组织；图15E.15F为下丘脑组织。

### 3.4 免疫组化法观察并计算出空肠、下丘脑、海马中CGRP、RAMP1的含量比较(表11图16详见附录一：彩图六)

3.4.1 IHC法比较各组大鼠空肠、下丘脑、海马CGRP蛋白的表达：与空白组相比，模型组大鼠空肠、下丘脑、海马CGRP蛋白的表

达均上升，差异有统计学意义(*P*＜0.05)；与模型组相比，电针组大鼠空肠、下丘脑、海马CGRP蛋白的表达均下降，差异有统计学意义(*P*＜0.05)；电针组各组织中CGRP蛋白的表达与空白组相比较，差异

55

无统计学意义(*P*＞0.05)。光镜下观察发现与空白组相比，模型组空肠固有层的肠腺、下丘脑腹内侧核（VMH）、海马齿状回（DG）颗粒细胞层均可见阳性表达增强呈棕黄色，而电针组各组织阳性表达较模 型组相比减弱。（见表11a图16a附录一：彩图六）

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **表 11a.** | **IHC 法检** | **测各组大鼠不同组** | **织 CGRP 蛋白表达比较（** *x* **±s n=8）** | |
|  | 例数  (n) |  | Mean density(×10-2) | |
| 组别 |  |  |  |
|  | 空肠 | 下丘脑 | 海马 |
| 空白组 | 8 | 2.32±0.90 | 0.80±0.20 | 0.96±0.25 |
| 模型组 | 8 | 3.80±1.09b | 1.63±1.01a | 1.41±0.38a |
| 电针组 | 8 | 2.56±1.00c | 0.84±0.17c | 1.04±0.33c |

注：aP＜0.05 VS空白组；bP＜0.01 VS空白组；cP＜0.05 VS 模型组

3.4.2 IHC法比较各组大鼠空肠、下丘脑、海马RAMP1蛋白的表达：与空白组相比，模型组大鼠空肠、下丘脑、海马RAMP1蛋白的表

达均上升，差异有统计学意义(*P*＜0.05)；与模型组相比，电针组大鼠空肠、下丘脑、海马RAMP1蛋白的表达均下降，差异有统计学意义

（*P*＜0.05）；电针组各组织中RAMP1蛋白的表达与空白组相比较，差异无统计学意义(*P*＞0.05)。模型组空肠固有层的肠腺、下丘脑腹内 侧核（VMH）、海马齿状回（DG）颗粒细胞层均可见阳性表达增强呈 棕黄色，而电针组各组织阳性表达较模型组相比减弱。（见表11b 图

16b附录一：彩图六）

56

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **表 11b.I** | **HC 法检测** | **各组大鼠不同组** | **织 RAMP1 蛋白表达比较（** *x* **±s n=8）** | |
|  | 例数  (n) |  | Mean density(×10-2) | |
| 组别 |  |  |  |
|  | 空肠 | 下丘脑 | 海马 |
| 空白组 | 8 | 3.78±1.20 | 2.25±1.09 | 0.81±0.29 |
| 模型组 | 8 | 5.83±1.83b | b  4.16±1.23 | b  1.67±0.69 |
| 电针组 | 8 | 4.19±0.95c | 2.79±1.04c | 1.02±0.48c |

注：bP＜0.01 VS空白组；cP＜0.05 VS 模型组

## **4** 结论



### 1. 电针对FD大鼠CGRP的调节作用

根据结果3.1-3.2，通过ELISA法检测对比三组大鼠血清中CGRP的含量和Rt-PCR法检测各组大鼠胃窦、空肠、下丘脑组织中CGRP mRNA相对表达量，可见模型组大鼠血清CGRP含量和胃窦、空肠、下丘脑组织中CGRP mRNA相对表达量均是上升的，可见外周和组织中CGRP的过表达是FD发病的一项因素，而电针组大鼠的血清CGRP含量和胃窦、空肠、下丘脑组织中CGRP mRNA相对表达量对比模型组均明显下降，这证明了调节CGRP在FD治疗过程中的意义，并且电针能够有效地降低FD大鼠外周以及胃肠道、中枢CGRP的含量，同时极大地改善

57

了FD的症状，促进大鼠胃肠功能的恢复，提示了电针的起效途径是既包括中枢也包括外周的，多层次多靶点的。

### 2. 电针对FD大鼠CGRP及其相应的受体RAMP1的调节作用

根据结果3.3-3.4，分别运用Western blot法和IHC法对大鼠各组织中CGRP及其相应的受体RAMP1的表达检测并分析比较，模型组大鼠外周（胃窦、空肠组织）和中枢（下丘脑、海马组织）中CGRP及其相应的受体RAMP1的表达均明显上升，而经过电针治疗后，电针组大鼠外周（胃窦、空肠组织）和中枢（下丘脑、海马组织）中CGRP及其相应的受体RAMP1的表达均明显下降，并且与空白组差异无统计学意义。这提示了CGRP参与FD的发病是通过与其特异性受体结合来发挥生物学作用的，并且外周（胃窦、空肠组织）和中枢（下丘脑、 海马组织）中CGRP及其相应的受体RAMP1的表达升高是FD发病的重要因素。而电针通过脑肠轴的神经内分泌网络，调节外周（胃窦、空肠组织）和中枢（下丘脑、海马组织）中CGRP及其相应的受体RAMP1的表达，下调CGRP及其相应的受体RAMP1的水平以达到恢复胃肠动力和改善胃肠功能的作用，这可能是电针治疗FD的重要途径之一。

## **5** 讨论

降钙素基因相关肽（calcitoningene-related peptide, CGRP）是一种神经肽，它广泛分布于中枢和外周神经系统，CGRP主要分布于尾核、杏仁核、三叉神经束和脊髓脊角等中枢神经系统中，延髓、 下丘脑、垂体和海马也都有一定分布，在这些分布脊髓中含量最高， 大脑皮层含量则微乎其微。在胃肠道里CGRP主要分布在内脏神经和迷走神经的传入纤维中，以及胃肠道的壁内神经丛中，对辣椒素的作用敏感。胃平滑肌层CGRP含量要高于粘膜层，是因为脊髓传入神经的CGRP主要分布在粘膜下血管壁。含有37个氨基酸的CGRP可分为αCGRP、βCGRP两类，这两类均发挥相似的生物学作用。

58

功能具有多样性有舒张血管和收缩心肌等作用，它能抑制血管平滑肌细胞增殖和凋亡，并参与调节消化和神经系统功能。在现代研究中无论是外周CGRP的释放还是中枢均参与了内脏敏感性变化，人们一直认为内脏高敏感性是功能性胃肠道疾病发生的主要机制之一[59]。CGRP还能够从增加胃粘膜血流、抑制胃酸的分泌、痛觉调制、抑制炎症反应、减缓胃肠运动、拮抗自由基损伤及调节胃肠激素分泌等方面保护胃肠道功能。

与受体跨膜信号转导的信号整合的多样性决定了CGRP功能多样性。CGRP受体是由三个组分组成：降钙素受体样受体(calcitonin receptor-like receptor, CRLR)、受体活性修饰蛋白质1(receptor activity m odifying protein 1, RAMP1)和受体组分蛋白质(receptor com ponent protein, RCP). 其中RAMP1与垂体腺苷酸环化酶激活肽受体、VPAC1、胰高血糖素受体和甲状旁腺素PTH 1、PTH 2均有相互作用和联系[60-61]。

根据动物实验来看，FD大鼠CGRP表达增强的部分有延髓、胸髓，而且在内源性神经元和外源性传入神经中均发现CGRP存在；此外，CGRP在胸髓和延髓中发挥了对于内脏感觉的作用[62]。实验表明HP阳性的FD患者胃扩张时的感受阈值要明显低于对照组，并且CGRP在胃窦黏膜中表达显著升高，两者存在明显的负相关关系。在学者检测FD患者的胃黏膜中CGRP的浓度时发现CGRP浓度高于健康对照组的浓度，提示这有可能与胃机械感觉过敏的情况有关[63]，国内陈求招[64]也发现FD组CGRP含量与健康对照组相比有异常，FD亚组的CGRP含量比较无明显差异。前述的研究结果均提示CGRP可能参与了FD的病理生理过程[65]。本研究得到的结果与文献均一致，都表明了CGRP在FD发病过程中的病理生理意义，电针对CGRP等相关脑肠肽及受体的调控也起到了治疗作用。

59

##### 全文讨论

## **1** 中医学对**FD**的认识

### 1.1 古代医籍对FD的阐述

古代中医文献并没有“功能性消化不良”的病名，中医临床认识该类疾病病主要根据疾病的症状表现结合中医学理论思想总结归纳， 据查证功能性消化不良与中医学古医籍中“痞满”、“胃脘痛”、“嘈杂”、“纳呆”、“反酸”、“呕吐”等病症有高度相关性。

最早在战国时期的《内经》就有对该症状群类似的记载，即否、满、痞塞、痞膈等，“否”与“痞”二者相通，为不通畅之意。取之于《易经》：“否卦，象征闭塞不通。坤下乾上，天气上升，地气下沉，天地阴阳二气互不交合，万物生养不得畅通，为否。”否者，闭



也，所以象征否闭、闭塞。

《说文解字》云：“痞，痛也。从，否声。”

《素问・至真要大论》曰：“太阳之复，厥气上行……心胃生寒，胸隔不利，心痛否满。”《素问・

五常政大论》曰：“备化之纪……其病否，卑监之纪……其病留滞痞塞。”至东汉时期的《伤寒论》云：“但满而不痛者，此为痞，柴胡不中与之，半夏泻心汤主之”。隋²巢元方《诸病源候论²诸痞候》 结合病位病机对病名作出了定义：“诸痞者，营卫不和，阴阳隔绝， 脏腑痞塞而不宣，故谓之否”，“其病之候，但腹内气结胀满，闭塞不通。”元²朱震亨《丹溪心法²痞》则简明之：“痞者与否同，不通泰也。”明²张介宾《景岳全书²痞满》中更明确指出：“痞者，

60

痞塞不开之谓；满者，胀满不行之谓。盖满则近胀，而痞则不必胀也。“ 王肯堂在《证治准绳²痞》中也提出：“腹中，其病有形；痞在心下， 其病无形。”可见对痞满病症候的认识随着历代医家的临床实践不断地日趋完善。

其他“胃脘痛”、“嘈杂”等症，历代也有诸多医籍记载。如《灵枢・胀论》曰：“胃胀者，腹满，胃脘痛，鼻闻焦臭，妨于食，大便难”；《灵枢・邪气脏腑病形》有云：“胃病者，腹䐜胀，胃脘当心而痛”；《景岳全书・嘈杂》云：“腹中空空，若无一物，似饥非饥， 似辣非辣，似痛非痛，而胸膈懊憹，莫可名状，或得食而暂止，或食已而复嘈，或兼恶心，而渐见胃脘作痛”。

脾胃病专家李乾构[66]等主张确立中医病名应与临床类型相联系，指出中医“胃痞”、“胃缓”、“痞满”相当于运动障碍型FD，表现上以腹部痞满为主症；中医“胃脘痛”相当于溃疡型FD，以上腹部或胸骨后疼痛为主症；中医“嘈杂”相当于反流型FD，临床表现以烧心反酸为主症。

因此中医学对此类症候群有着深刻的认识，积累了丰富的经验，形成一套独具特色的整体观念和辩证论治的理论体系。

### 1.2 中医学对FD病因病机的认识

本病病位在胃，涉及到肝、脾两脏，肝脾胃同居中焦，脾主运化， 主升清；胃主受纳，胃主降浊。肝为“刚脏”主疏泄，调节脾胃气机， 协调脾胃升降，三者相互协调，共同完成食物的消化及水谷精微的输布。外感六淫、内伤七情、饮食劳倦、先天禀赋等均可导致FD的发病，如《万病回春》曰：“夫痞满者，非痞块之痞也，乃胸腹饱闷而不舒畅也，有气虚中满，有血虚中满，有食积中满，有脾泄中满，有痰隔中满，皆是七情内伤，六淫外侵，或醉饱饥饿失节，房劳过度，不能运化，故阳自升而阴自降而成天地不交之痞，……”由于病因较为复杂，FD的病因病机的认识也经历了各代医家不断的完善和发展。

61

《内经》认为外感六淫、饮食不节、起居不慎为主要病因。《素问・至真要大论》云：“风淫所胜……民病胃脘当心而痛，上支两胁， 鬲咽不通，饮食不下，舌本强，食则呕，冷泻腹胀，溏泄症瘕水闭……病本于脾”，《灵枢・小针解》曰：“寒温不适，饮食不节，而病生于肠胃”；张仲景认为痞满的病因病机乃外邪循经入里结于胃肠、或伤寒表证未解，误下伤中，邪气内传，中焦气机升降失常。如《伤寒论》：“病发于阴而反下之，因作痞也。”；隋・巢元方强调引起痞满的内在因素，即“忧惠气积，或坠堕内损”。

明代张介宾在之前外感六淫、饮食不节的基础上，更注重肝、脾两脏的关系，提出了暴怒、忧思等情志内伤引起痞满，见《景岳全书》 曰：“若怒气暴伤，肝气未平而痞者”，“虚寒之痞，凡过于忧思，或过于劳倦，或脾胃素弱之人而妄用寒凉剋伐之剂，以致重伤脾气者， 皆能有之……”此后，明清众多医家均强调情志不遂，肝气郁滞，横逆犯胃是本病的最主要病因病机，如《证治汇补・痞满》曰：“暴怒伤肝，气逆而痞”；叶天士的“肝为起病之源，胃为传病之所”；唐容川的“木之性主于疏泄，食气入胃，全赖肝木之气以疏之，而水谷乃化。设肝之清阳不升，则不能疏水谷，渗泄中满之症在所不免。”；

《四圣心源》中亦言：“木以发达为性，己土湿陷，抑遏乙木发达之气，生意不遂，故郁怒而克脾土，风动而生疏泄，凡腹痛下利，……皆风木之疏泄也。”

由此可知本病的关键乃在肝脾二脏。由各种不同成因而致肝气郁滞，失于疏泄，横逆乘脾犯胃，脾胃升降失常；或脾土虚损，运化无力，胃失和降，气机升降失常则胃脘胀满，为本病的基本病机。不论是肝旺乘脾，升降失常或土虚木乘，运化失常，总之，皆离不开“肝郁脾虚”四字。

62

### 1.3 现代中医药对FD中医证型的确立

2009年《消化不良中医诊疗共识意见》[67]指出：以上腹烧灼感、上腹痛为主症对应中医“胃痛”证候；以早饱、餐后腹胀不适为主症对应中医“痞满”和“积滞”证候。

《实用中医消化病学》把FD分为脾胃虚弱证、食滞伤胃证、肝气郁结证、肝气犯胃证、湿热滞胃证、寒热错杂证、痰气交阻证、痰 火阻胃证和胃阴亏虚证9型[68]。

参考《功能性消化不良的中西医结合诊疗共识意见（2010）》[69]中关于FD中医症型分为肝气郁结证、肝气犯胃证、脾胃气虚证、湿热滞胃证、寒热错杂证5种。

许多学者[70-71]结合临床中医辨证论治，通过文献已经报告的FD辨证分型有肝胃不和、肝胃郁热、肝郁脾虚、湿热滞胃、痰浊中阻、 瘀血阻络、饮食积滞、脾胃虚寒、脾胃阴虚、中虚气滞、脾胃虚弱、 寒热错杂等。国内学者通过临床证候学研究发现诱发FD发病的因素虽然呈多样性，但情志不畅、饮食不节居于首位。结合临床证型复杂性，可见肝气郁结、肝气犯胃导致肝胃不和是FD中医证型中最为常见的一型。除了症型复杂多样，FD临床上常两种证型同现，以上证型均可以兼夹食积、痰湿或血瘀，如脾虚痰阻、脾虚食滞等证，临证当以辨主证为主。

### 1.4 中医学对脑肠轴在FD发病中作用的认识

一、在生理上肝、脾胃、脑通过经络相互沟通联络的

足厥阴肝经“起于大指从毛之际……循喉咙之后，上入颃颡，连目系，上出额，与督脉会于巅”（《灵枢²经脉》），“督脉者，起于下极之俞，并于脊里，上至风府，入属于脑”（《难经²二十八难》）， 故肝脑相通。《灵枢²动输》曰：“胃气上注于肺，其悍气上冲头者，

63

循咽，上走空窍，循眼系，入络脑。“而脾与胃互为表里，互有经脉 络属，故脑、肝、脾胃通过经络得以相互沟通联络。

在生理上，脾胃为后天之本，气血生化之源，运化水谷精微之气；肝藏血，主疏泄。肝之疏泄和脾胃之运化功能正常，水谷精微才能得以输布至脑，荣养脑髓，固守脑中元神。故肝藏魂是脑主元神的功能表现；脾主升清，能升清阳上达于脑而荣脑。

二、病理上肝、脾胃、脑互为影响

脾胃运化水谷失职，气血不足，不能上荣头目，则出现头晕、头痛等症状；脾胃运化水液失职，水液停留，凝聚成痰，上达于脑，阻塞清窍；脾不统血，血溢脉外成离经之瘀血，瘀血阻脑，清窍受蒙。反之，脑为“元神之府”，若思虑过度，常导致不思饮食，脘腹胀闷，头目眩晕等脾胃运化升清的障碍。

若肝藏血功能失常，肝血不能上养于脑，脑神失常可见多梦、惊骇、梦游诸神志病变。若肝疏泄功能失常，肝气上逆，气血上冲于脑， 扰乱脑神，肝风内动而致中风即为一证。反之，脑神的失常，也必然涉及于肝，出现相应的病变。正如《辨证奇闻》曰：“脑之气不足则肝之气应之。”临床上如外伤性精神病，本由外伤扰乱脑气，致脑神错乱，但又常可见易怒等肝之病变。

综上所述，痞满证病位在胃，与肝、脾、脑密切相关。一方面，情志不遂导致肝失疏泄，肝气犯胃导致FD；另一方面，肝失疏泄，影响脑主神志，思虑伤脾，进而影响脾胃升降功能，导致FD的发生。因此，FD的发生是肝、脑、脾胃共同作用的结果。

现代医学的脑肠轴理论与中医的整体观念最终殊途同归，认为

FD的发病机制与多种因素相关关，任何一个因素都无法全面的阐述

FD的发病机理，因此，将“脑肠轴”理论引入中医的整体观念中，从整体上认识和探讨针刺对FD的作用。

64

## **2** 现代医学对**FD**的认识

### 2.1 FD的概念及诊断标准

FD是功能性胃肠病FGIDs的一种，是以持续或反复发作上腹痛、上腹胀、早饱、嗳气、恶心等上腹部症状为主要表现，而血生化和内镜等检查无异常发现，难以用器质性疾病解释的一种功能性胃肠疾病。根据罗马III诊断标准[72]为：（1）必须符合以下一项或多项：早饱、餐后饱胀、上腹烧灼感、上腹痛；（2）没有可以解释上述症状的器质性疾病证据；（3）诊断前症状至少出现6个月，近3个月病情发作。从病理生理和治疗角度出发，可将FD分为两个亚组：餐后不适综合征(postprandial distress syndrome PDS)和上腹痛综合征(epigastric pain syndrome EPS)。

通常情况下FD出现多种症状多变、重叠甚至相互转换，病情复杂迁延难愈，不仅仅局限于消化道症状，还伴有睡眠障碍、头痛、头昏等其他功能性症状，且多伴有显著的精神障碍如焦虑、抑郁、强迫 症等，造成患者的生活质量严重下降，使患者承受巨大的社会偏见和 歧视。近20年来，FD逐渐成为人们关注的疾病，也成了社会关注的问题。

### 2.2 FD的流行病学资料

功能性消化不良在全球范围内发病率一直居于高位。流行病学资料显示，全球目前消化不良已达10%-30%的发病率[2]。由于各地对FD诊断时采用不同的诊断标准且一些病例没有经过内镜、消化道钡餐等检查，无法确切排除器质性消化不良，导致各地调研中发病率无法统一，但总体发病率逐年呈上升趋势。相比而言，发达国家如日本、韩国等的FD发病率较发展中国家低，农村FD发病率较城市发病率低，提示生活压力、经济状况、居住的环境均可能是FD发病的影响因素。

65



**图17** **.亚洲地区FD的发病率**[73]

### 2.3 FD的发病机制

普遍观点认为是多种综合因素共同作用导致了FD的发病，但其病因和发病机制至今尚未得到一致的结论。经过研究者们大量的实验研究，胃肠道动力障碍、胃排空延迟、内脏感觉异常、迷走神经抑制、 脑-肠轴功能紊乱、脑肠肽的改变、胃酸异常分泌、HP或其他病原体感染、精神-社会心理因素、遗传因素、饮食结构、环境、生活方式等多种因素均与FD的发生发展密切相关[4-7, 74]。其中胃肠道动力障碍、内脏敏感性增高、脑-肠轴与脑肠肽因素和精神社会心理因素这四大机制得到最广泛的认可。由此可见FD是一种复杂机制的包括生物-心理-社会多因素的神经内分泌异常病症。

2.3.1胃肠动力障碍和内脏高敏感性是FD主要的病理生理基础胃肠动力障碍和内脏高敏感性是FD最主要且最为公认的病理生

理基础，胃肠动力障碍可表现为胃排空能力下降、胃窦动力指数低下、胃节律紊乱、近端胃部容受性障碍、MMCⅢ期时程缩短或缺失等。大

66

量文献均证实FD患者存在胃电节律异常、胃底容受性调节受损及胃排空延迟。

内脏敏感性增高占FD患者中的35%-50%，内脏感觉异常主要是指胃肠黏膜和平滑肌对外界刺激感知的阈值降低，对生理程度的刺激即会感到不适或对伤害性刺激出现强烈反应，如对酸感觉、机械性扩张、容量阈值降低、敏感性增高，甚至对正常胃肠黏膜的敏感性增高， 出现异常性疼痛；或者与相对应内脏的躯体部位的牵涉痛范围也随之扩大，出现异常嗳气和疼痛、反酸等症状。而内脏敏感性异常的诱发因素、潜在机制及范围仍然未知[75-80]。

2.3.2精神-社会心理因素是FD发病的主导因素

大量的研究显示FD是一种与社会心理因素密切相关的疾病，FD患者胃肠道症状严重程度与心理障碍、抑郁、焦虑等精神心理因素呈明显相关。在对FD的一项调查中发现，约有38%患者存在焦虑状态，而健康对照人群仅有4%[81]。精神心理因素对CNS的不良刺激可降低迷走神经张力，导致胃肠感觉过敏，延缓胃排空，引起一系列临床症状。精神心理因素对ENS也有直接的影响，研究[82]发现，慢性心理应激可损伤肠道黏膜，导致肠黏膜屏障破坏，黏膜对大分子的通透性增加，这些分子又可作为抗原刺激肠嗜铬细胞释放大量5-羟色胺(HT)激活IPAN, IPAN与中间神经元形成突触，兴奋和抑制调节胃肠道局部。各种信号刺激ENS释放多种神经递质，造成黏膜周围肥大细胞脱颗粒，释放花生四烯酸、组胺、血小板活化因子等多种代谢产物和介质，再次刺激ENS并放大信号，影响胃肠道激素分泌和运动，从而出现胃肠道症状的多样性[83]。可见精神-社会-心理因素对机体胃肠运动和内脏感觉的影响，临床治疗也证实通过调节自主神经功能和精神性的药物的运用，可进一步缓解FD患者的消化道症状。

2.3.3脑肠轴和脑肠互动是FD发病和治疗的关键机制

大脑的应激反应系统接受各种环境应激因子的刺激，通过脑-肠轴的双向调节的神经-内分泌网络作用于胃肠道靶器官，引起胃肠道感觉、运动、分泌功能异常改变而表现为FD [84]. CNS、ENS不是孤立

67

存在的两个不同的系统，二者通过植物神经系统和神经内分泌系统形成联系，因此精神心理因素可通过植物神经系统和神经内分泌系统作用于CNS和ENS，并产生胃肠道症状，三个系统组成的神经内分泌网络被称为脑-肠轴[85-86]。精神心理长期异常情绪引起交感神经的兴奋性增高，迷走神经抑制，两类神经纤维布于ENS的神经细胞，同时直接支配胃肠道平滑肌、上皮细胞、腺细胞等，而周围神经传入大量信息至内脏感受器又继续传导至脊髓和延髓等各级中枢，在相应的中枢整合后传出至各级效应器，形成脑-肠互动，该机制在心理因素导致FGIDs发病中起重要作用。

2.3.4遗传因素

近年来有关遗传因素与FGIDs的研究日益增多，特别对IBS的家族聚集性已得到普遍认可[87]。多种基因与遗传易感性有直接联系，5-HT信号系统异常引起胃肠道分泌功能和动力异常及内脏敏感性增高[88]，对FD遗传易感性的研究证实了pri-miR-325与SLC6A4的多态性与内脏高敏感有关[89]。而HTR3Ac. -42T等位基因可能与严重的消化不良症状有关，某一区域的基因HTR3Ac. -42C＞T和5-HT转运体启动子区可能是消化不良与精神疾患共同的基因预测区域[90]。

2.3.5 HP感染

前瞻性实验研究表明[91-93]，消化不良的症状表现一般在Hp感染后发生，也被看作是FD发病的一种危险因子（OR1.2～2.3）。国外文献报道：FD患者的Hp阳性率为43%-87%，而国内这一指标却高达

67.3%。临床研究报道，Hp感染的FD患者胃黏膜中CGRP、P物质等感觉神经肽水平较Hp阴性者显著升高，患者对容量扩张的感觉阈值与正常人相比明显降低。

2.3.6其他

一些炎症、肠道菌群失调、环境、饮食因素都可以导致FD的发病。持续存在的炎症不仅可增加内脏敏感性，还可导致部分患者平滑 肌起搏细胞Cajal间质细胞(ICC)形态的改变，以及神经肽含量或其免疫反应神经元数量的增加等[94]。也有一些报道证实肠道菌群失调

68

和食物过敏可以引起内脏高敏感性和胃肠道黏膜内炎症细胞浸润和活化，从而导致FD的发病。

### 2.4 FD的治疗现状

目前对FD的治疗临床上主要釆用药物治疗。包括促胃肠动力药物、抑酸药物、抗HP感染药物、抗抑郁药物及其他一些药物的治疗：

2.4.1促胃肠动力药物：

主要针对FD的胃肠动力障碍，如胃排空延迟引起的早饱、腹胀等，临床上主要分为多巴胺D2受体拮抗剂（多潘立酮片等）、5-HT4受体激动剂（西沙比利和莫沙比利等）和胆碱酯酶抑制剂（伊托必利） 三类等[95]。

2.4.2抑酸药物：

主要通过抑制胃酸分泌针对一些上腹疼痛、烧灼感等不适症状，常用有H2受体拮抗剂（如雷尼替丁、西咪替丁等）和质子泵抑制剂

（PPI），和但PPI制剂会导致部分患者出现恶心、头痛、腹泻、便秘、腹胀等药物不良反应，如奥美拉唑、埃索美拉唑等。

2.4.3抗HP感染药物：

临床用药多用PPI+阿莫西林胶囊+克拉霉素分散片+铋剂（多为胶体果胶铋胶囊）四联疗法联合抗HP治疗，尽管HP（+）患者比例不多，但临床上仍然认为HP感染是FD的可能的潜在病因。

2.4.4抗抑郁药物：

目前常用有氟哌噻吨美利曲辛（黛力新）[96-97]、多虑平(doxepin)等。FD患者普遍存在抑郁、失眠、焦虑状态，有研究表明抗抑郁治疗后患者病理生理均得到一定改善，但单独应用抗抑郁药物起效缓慢， 因此临床上常采用联合药物治疗，即促胃肠动力药物、抑酸药物和抗抑郁药物联合用药，不良反应小，患者易于接受[98]。

2.4.5其他药物治疗：

69

内脏感觉过敏的药物：包括5-HT类制剂和外周Kappa受体激动剂；胃肠激素和胃肠激素受体：如生长抑素、氯谷胺和右氯谷胺等； 助消化药：双歧杆菌三联活菌散（培菲康）和地衣芽胞杆菌活菌颗粒

（整肠生）等[99]。

总之，药物治疗难以针对FD复杂多样的症状，加之副作用大和不良反应发生率高，从而导致难以坚持药物治疗，效果不理想。因此 非药物疗法包括：心理治疗和针刺、艾灸等疗法开始得到越来越多的 认可，表现出极具优势的应用前景。

## **3** 脑肠轴和脑肠肽与**FD**

近年来，随着“肠脑”概念的提出，脑肠互动(brain-gut interaction)成为FGIDs病因病机和治疗的研究热点。大量的研究证实，脑肠轴功能失调是FGIDs发病的重要病机，而针刺对脑肠轴的调节作用是其治疗FGIDs的最主要的效应机制[100-102]。

### 3.1 脑肠轴与脑肠互动

脑肠轴是由神经-内分泌系统（neuroendocrine system）和免疫因子介导的、调节大脑皮层和消化系统之间复杂的反射通路，其一方 面通过高级神经中枢与肠神经链相连结传递机体的内在信息，接受刺激信号从而影响胃肠激素分泌、动力和感觉等；另一方面通过亲内脏 作用，反向调节中枢的情绪、痛感和行为，即胃肠道不适对心理状态有负面影响[103]。

目前认为神经系统是通过三个层次对整个胃肠道运动的相互作用调控来实现：第一层次调控是ENS的局部调控，胃肠道神经丛和内在肌源性的自律性活动对胃肠运动和分泌进行调控，而肠神经

丛又接受自主神经系统的控制，ENS现认被认为是ANS的第3个分支

[104]，由运动神经元、中间神经元、感觉神经元组成，可独立调节胃肠

70

道分泌、吸收、运动、血液循环等功能并不通过CNS[105]；整个胃肠道器官都受此环节支配，它接受ENS和CNS两方面的信息和调控，包括外周交感神经的节后神经元的胞体；第三层次调控胃肠运动的位于CNS，当感受内外环境变化时传入的各种信息经由大脑的各级中枢和脊髓接受体，在整合分析加工后，直接反馈信息，调整胃肠道各段的活动，主要是通过ANS和神经-内分泌系统将信号传出直接作用于胃肠道平滑肌细胞或胃肠道肌间神经丛，从而起到调节胃肠活动的作用[106]。这种在不同层次通过ANS和神经内分泌系统将胃肠道与CNS联系起来的神经-内分泌网络称为脑肠轴。机体通过脑-肠轴之间的神经内分泌网络的双向环路进行胃肠功能的调节称为脑肠互动[107]。



**图18** **.神经系统通过三个层次对胃肠运动进行调节**

### 3.2 脑肠互动在FD的发病和治疗中的作用

脑肠轴建立了CNS与胃肠道的双向联系：一方面，胃肠道内的感受器将各种信息由传入纤维传至CNS, 通过CNS对信息进行整合、翻译及反应；另一方面，CNS可以通过肠神经、交感神经、副交感神经和激素、神经内分泌等途径来调节胃肠道的运动、分泌、血流、免疫

71

等功能[108]。脑和肠之间的双向调节是通过ANS和HPAA来进行的，大脑边缘系统是调节肠道功能的主要部位，也参与内脏疼痛等方面的调 节。脑肠轴中调节作用的关键是自主神经系统，作为脑-肠互动中的重要信息载体，可调控胃肠道感觉和运动，目前对其研究成为热点备受瞩目[109]，以往的多数研究[74,110-111]提示FD患者存在自主神经功能异常，而伴随抑郁或焦虑状态的FD患者更易出现自主神经功能受损。



**图19** **.脑肠轴通过神经-内分泌网络的双向环路对胃肠道进行调节**

近年来，通过应用fMRI技术经颅磁刺激观察脑部刺激后胃肠道的反应；或给予胃肠道刺激后观察大脑功能活动变化[112]，来探究脑肠轴联系CNS与ENS产生的互动以及与FGIDs疾病的关系，研究表明，

FD患者在较低的扩张压力下即可激活痛觉中枢，与健康人群相比其激活程度增高[113, 114]。提示FD患者的内脏高痛觉敏感可能与大脑皮层内脏感觉分析及处理功能异常有关，进一步证明了大脑活动与胃肠道 功能的相关性。

72

### 3.3 脑肠肽代谢与FD发病

同时存在于中枢神经系统和胃肠道中的小分子多肽统称为脑肠肽（brain-gut peptide, BGP）。BGP是脑肠轴神经-内分泌网络的分子基础，具有神经递质和激素的双重功能，通过结合相应受体发挥 生物学效应，调节其他神经递质释放和传递，且通过迷走神经介导，在中枢和外周水平上对胃肠道感觉和运动进行精细调节[115]，在调节内脏感觉、分泌、运动中起着重要作用。目前发现的脑肠肽有40余种，并从功能上大致可分两大类，作用于兴奋性运动神经元，促进胃肠平滑肌收缩包括Ghrelin、MTL、GAS等；作用于抑制性运动神经元，抑制胃肠平滑肌收缩包括VIP、SS、NO等。

3.3.1胃动素(motilin, MTL)

由M细胞分泌，刺激胃肠运动被命名。MTL的生理作用主要是收缩胃平滑肌，或直接作用于胃窦产生胃动力，促进消化道运动，加速胃排空；另外MTL还是激发MMCⅢ相收缩的重要肽类激素[116]。MTL与FD的发病密切相关，对胃肠运动尤其对消化间期移行复合运动有重要调节作用。大量研究发现[117-120]MTL分泌下降与FD胃排空延长和MMCⅢ收缩波时相缩短甚至缺乏密切相关，通过治疗纠正异常表达的脑肠肽，增加MTL在血浆中的表达，可以促进胃排空和MMC，有效改善胃肠动力障碍。

3.3.2胃泌素(gastrin, GAS)

GAS是目前发现的唯一在中枢神经系统、迷走神经和肠神经系统均表现为对胃运动有兴奋作用的脑肠肽。GAS是重要的促胃酸分泌激素，可以促进胃蛋白酶分泌，促进胃黏膜生长，协助胰腺分泌酶类， 协助肝脏分泌胆汁。与MTL类似，GAS也通过作用于平滑肌细胞的特异性受体，激发胃窦平滑肌和幽门括约肌的收缩反应[121]。凌江红等研究发现FD患者外周的GAS含量降低，静脉注射GAS可改善胃肠动力[122]。而Walecka-Kapica等[123]研究却发现FD患者的血清GAS 高

73

于对照组，但是症状的强度与胃泌素无关。因此GAS在FD发病中的作用目前仍有争议。

3.3.3胃促生长素（Ghrelin）

Ghrelin是一种重要的胃肠激素，是目前唯一的GHSR的内源性配体，与MTL在结构上及功能上具有相关性，因此与MTL素表现出许多相同的作用：控制食欲、刺激生长激素的释放、促进胃排空、增强胃动力等，又被称为胃动素相关肽[124,125]。在酰基化和去酰基化两种Ghrelin形式中，酰基化Ghrelin是其主要的活性形式。只有酰基化Ghrelin通过结合其受体GHSR-1a后活化信号传导通路以发挥其生物学作用。周利等[15]研究发现Ghrelin与FD的发病相关，FD模型大鼠为胃排空率下降伴随有血浆Ghrelin表达降低，通过电针治疗，上调Ghrelin的表达，可以有效改善胃排空和恢复胃动力。

3.3.4胆囊收缩素(cholecystoki-nin, CKK)

通过靶器官和肠神经系统CCK-A受体结合，可以调节和促进胆囊收缩及胰液分泌，还能抑制胃酸分泌和胃排空，产生饱胀感觉。研 究表明CCK的增加可以抑制胃排空[126]、诱发胃电节律[127]的失常，从而导致FD发病，并且能够增加结肠黏膜机械感受器的敏感性，可能参与腹痛的产生[128]。

3.3.5生长抑素(somatostatin, SS)

SS具有广泛的抑制胃肠激素分泌及运动的功能，可抑制多处平滑肌如胃肠道和胆囊等的收缩，同时还可以影响多种内分泌因子如MTL、GAS、CCK等的分泌与释放，抑制胰腺的外分泌和胆汁分泌。大量研究发现[129,130]FD患者的胃排空延缓与外周血浆中SS表达增加密切相关。

3.3.6 P物质(substance P, SP)

SP主要来源于广泛分布于胃肠道及神经系统中含SP的节后神经元，并通过特异的神经通路参与胃肠运动调节，对胃平滑肌产生很强 的刺激作用，与胃肠内脏感觉过敏的产生及其信号传递密切相关，并 可参与情绪、心理的调节[131]。研究发现[132]FD大鼠血浆中SP的含量

74

增高，且胃肠道呈敏感性增高；通过降低模型大鼠血浆SP的表达，可降低背角神经元的兴奋性，提高内脏痛阈，消除肠道的高敏感性

[133]。

3.3.7一氧化氮（NO） NO为胃肠运动的主要抑制性递质，也是细胞内的信号分子，可

广泛引起平滑肌的舒张，下段食管括约肌、幽门括约肌、Oddi括约肌和肛门括约肌的肌肉紧张度与NO调节密切相关，参与调节胃底容受性反射弧及肠蠕动反射弧的强度[134]。胃的容受功能中适应性及感知性舒张两种反射与NO的合成及释放密切相关，FD患者早饱及餐后饱胀症状的重要原因之一可能是这两种容受性舒张过程的损害导致的[135]。FD患者对胃扩张的刺激阈值与胆碱能神经功能异常有关，而在这一病理过程中NO及一氧化氮合酶活性的异常可能起到重要的作用[136]。

## **4** 电针防治**FD**的理论依据

### 4.1 疏肝健脾治则的理论依据

功能性消化不良的病性属本虚标实之证，病位在胃，而又涉及肝脾两脏，以肝郁气滞、脾胃虚弱、运化失职、胃失通降为其基本病机。 脾主运化，主升，为气机之枢，胃主受纳，主降，脾升胃降的功能为消化道正常受纳、腐熟、运化功能的根本；而肝主疏泄的功能正常有助于脾胃的升降，肝与脾胃共同完成气机的升降运动。故在治疗肝郁脾虚型FD时，辩证采用疏肝健脾法，使肝的疏泄和脾胃运化功能协调一致，肝脾并治，立法全面，以奏立竿见影之效。

75

### 4.2 足三里穴、太冲穴的选穴依据

“足三里”为足阳明胃经合穴，又是胃的下合穴，“合治内腑”， 善补脾胃，调肠腑，滋后天生化之源。《素问・水热穴论》：“气街、三里、巨虚上下廉，此八者以泻胃中之热也”；《灵枢・五邪》：“邪在脾胃，则病肌肉痛，阳气有余，阴气不足，则热中善饥，阳气不足，阴气有余，则寒中肠鸣，腹痛，阴阳俱有余，若俱不足，则有寒有热， 皆调于三里”；《四总穴歌》：“肚腹三里留”；《玉龙赋》曰：“欲调饱满之气逆，三里可胜”。充分说明了“足三里”穴善治脾胃的特点，在治疗胃肠疾病中有着不可或缺的地位，这也是我选用足三里穴作为电针治疗功能性消化不良的靶标的重要原因。“太冲”穴为足厥阴肝经之原穴、输穴，是疏肝解郁的要穴，配伍此两穴，有疏肝健脾，理气和胃之功。

### 4.3 针灸治疗FD的优势

FD一直以来都是针灸临床的优势病种，而针灸疗法有着独特的思维方式，在中医“整体观念，辨证论治”原则栺导下，通过调理脏腑经络，使机体恢复“阴平阳秘”的平衡状态。其对复杂病症整体把握，以及个体化的治疗理念，对功能性胃肠病复杂的症状具有具有适应症广、早期起效迅速、远期疗效稳定、多途径调节、双向平衡调节、 心身共治、安全无副作用、总有效率高的优势[137]。

针灸治疗FD的效应机制是复杂的，能够广泛作用于神经-内分泌

-免疫网络的不同层次多靶点地调控胃肠功能，并且具有整体性和双向调节作用。针灸的治疗通过“针刺-穴位感受器-传入神经-中枢核团-传出神经-靶器官”发挥作用。一系列研究[112, 138-140]发现针灸治疗功能性胃肠病过程中对中枢神经系统、肠神经系统和自主神经系统都有双向调节作用，并且针刺对脑肠肽有着广泛的双向良性调节作用。

76

因此大量研究肯定了针灸通过作用于脑肠轴的神经内分泌网络的双向交通通路的关键环节起到整体性治疗FD的作用。即针灸通过刺入穴位（皮肤肌肉组织）产生刺激、经感受器和传入神经将信号传入至各级神经系统的调节（脊髓、迷走神经复合体、下丘脑），最后到达大脑皮层内脏神经投影区[141]。各级中枢接受传入的刺激信号，经过分析整合，并将“命令”信号经交感、副交感神经传出，作用于胃肠黏膜神经丛，使之合成释放分泌各种脑肠肽；作用于胃肠肌间神经丛，使胃肠平滑肌收缩或舒张；或作用于自主神经，降低交感神经兴奋性，提高迷走神经兴奋性，调整自主神经的功能恢复平衡状态[142，

143]. 因此针刺通过多层次、多靶点地调控脑肠轴的神经-内分泌网络

的双向通路，纠正异常表达的脑肠肽，进而调节胃肠功能，快速安全有效的防治功能性消化不良，具有极好的应用前景，显示出独特的优 势。

## **5** 电针治疗**FD**肝郁脾虚模型大鼠作用机制的探讨

### 5.1 改善胃肠动力障碍和内脏敏感性可能是电针治疗FD的效应环节目前认为胃肠道动力障碍和感觉异常是FD的主要病理生理学基

础。胃肠动力障碍和内脏敏感性可能是电针治疗FD的一个重要的效应环节。本实验结果显示FD肝郁脾虚模型大鼠体重增长缓慢、饮食饮水量明显降低、一般状况评分显著下降，胃内残留率增高、小肠推 进率明显下降，电针治疗能够使大鼠体重、饮食饮水量、一般状况评分显著增加，胃内残留率明显下降和小肠推进率明显升高。根据FD肝郁脾虚型大鼠症状的改善程度，我们能够肯定电针对FD的治疗作用。并且大量研究也证实了电针能够有效改善胃肠道敏感性，显著促 进胃的排空、小肠推进和吸收功能，这与我们的研究结果相一致。

77

### 5.2 纠正异常的脑肠肽是电针治疗改善FD症状的重要途径

各种外界环境的刺激通过脑肠轴的神经内分泌网络的双向交通影响胃肠功能，是通过多种脑肠肽来介导完成的。脑肠肽的作用方式包括：作为肽能神经递质；直接与相应受体结合发挥效应；调节其他神经递质释放和传递；通过迷走神经介导，在中枢和外周水平上对胃运动和胃排空进行精细调节。

在本实验中，我们采用ELISA、Realtime-PCR、IHC、Western

Blotting方法检测电针对FD肝郁脾虚型大鼠血清、胃窦、空肠、下丘脑、海马等组织中VIP、VPAC1、CGRP、RAMP1表达的变化，以探讨电针对相关脑肠肽表达的影响。研究结果显示FD肝郁脾虚模型大鼠血清、胃窦、空肠、下丘脑、海马组织中VIP、VPAC1、CGRP、RAMP1的表达均增加，提示其存在异常的脑肠肽表达与FD的发病密切相关；电针治疗28d以后能够降低电针组清、胃窦、空肠、下丘脑、海马组织中VIP、VPAC1、CGRP、RAMP1的表达，同时有效地改善FD大鼠胃肠动力障碍和感觉异常，均提示VIP、CGRP的表达与胃肠动力内脏感觉异常有重要的联系，通过纠正异常表达的脑肠肽，改善FD出现的胃肠动力障碍和内脏感觉过敏，这可能是电针治疗FD，改善FD症状的重要途径。

### 5.3 通过脑肠轴神经内分泌网络途径可能是电针治疗FD的起效机制

胃肠道是人体内唯一一个由CNS、ENS和ANS共同支配的系统。机体通过脑-肠轴的神经内分泌双向环路进行精细而复杂的调控胃肠道的功能，其中任何一个环节出现异常，都会引起胃肠功能或结构的损害而产生疾病。各种环境应激因子，尤其是情绪心理因素作用于大 脑的应激反应系统，通过脑-肠轴的双向调节作用于胃肠道靶器官，使胃肠道运动、感觉分泌和免疫功能发生变化，两者相互作用、相互 影响而表现为功能性胃肠病的发病。脑-肠轴和脑肠互动概念的提出

78

将FGIDs发生机制的认识从胃肠局部提升到全身整体的角度。在本实验中，我们釆用IHC和Western Blotting方法，检测电针对FD肝郁脾虚型大鼠下丘脑组织中VIP、VPAC1、CGRP、RAMP1蛋白含量的影响，从脑肠轴机制探讨电针对FD的治疗作用。结果显示FD肝郁脾虚模型大鼠下丘脑中VIP、VPAC1、CGRP、RAMP1蛋白的含量增加，与胃肠道局部组织检测得到的结果一致，提示脑肠轴和脑肠肽在FD发病中的重要意义。电针治疗不仅能够通调控胃肠道局部的脑肠肽的表达，对下丘脑、海马组织中VIP、VPAC1、CGRP、RAMP1蛋白表达含量也能够有效地调控，提示电针的作用方式是广泛作用于中枢系统、外周肠神经系统和自主神经系统的，通过调节脑-肠互动以及纠正脑肠轴神经内分泌中异常表达的脑肠肽，从而使胃肠吸收、运动障碍和感觉异常均得到改善，恢复胃肠功能的平衡正常，从而起到治疗FD的作用，与目前相关研究的结果和观点也是一致的，因此脑肠轴机制可能是电针有效防治FD的最受广泛认可的内在机制。

## **6** 本研究的特色、存在的问题及展望

### 6.1 特色与创新

本研究在中整体观念、辨证论治的指导下，选择FD肝郁脾虚型大鼠作为研究对象，并成功复制出了最接近临床发病过程的FD肝郁脾虚型大鼠模型，依据疏肝解郁治疗原则选取足三里、太冲穴，采用电针作为有效的干预手段，观察电针对FD肝郁脾虚型大鼠的治疗作用，并探讨其通过脑肠轴途径治疗FD的具体起效环节和靶点。结果表明电针对FD胃肠功能的良性调节可能是通过调控脑肠轴的神经-内分泌网络的不同层次和多个靶点以及纠正异常分泌的脑肠肽（外周和中枢）的表达来实现的，这可能是电针通过脑肠轴途径对治疗FD的作用机制。

79

### 6.2 问题与展望

本研究已经证实电针“足三里”、“太冲”穴对FD肝郁脾虚型大鼠的治疗作用，能够有效改善胃肠动力障碍和感觉异常，纠正异常脑肠肽分泌。但是电针“足三里”、“太冲”穴对脑肠肽的调节是否有着特异性？电针调节脑肠肽分泌的具体信号通路和靶点尚未阐述。 电针通过脑肠轴机制治疗FD的具体环节我们仍然还不能确定。下一步我们将在本实验结果的基础上，通过fMRI和NMR深入研究电针治疗FD的中枢效应机制和作用靶点，另外对于电针对脑肠肽表达的调节，我们也将通过具体的信号通路的研究来阐明其内在机制。

80

结**论**

本项目釆用电针干预FD肝郁脾虚型大鼠为研究对象，运用Elisa、Westem-blot、Real time-PCR、IHC等多种检测方法，研究电针对FD肝郁脾虚型胃肠动力、内脏敏感性及相关脑肠肽的影响，从脑肠轴途径探讨电针对FD肝郁脾虚型大鼠的调节机理。总结如下：

1.模型组大鼠一般情况评分、体重日增长和日饮食饮水增长量降低，胃内残留率增加，小肠推进率下降，外周及中枢VIP、CGRP其相应受体VPAC1、RAMP1的表达显著增多，提示FD的发病与相关脑肠肽分泌异常和脑肠互动异常密切相关；本实验也成功复制出了最接近 临床发病过程的FD肝郁脾虚型大鼠模型，且符合FD的诊断标准。

2.通过日常行为学观察和胃肠动力学检测，电针对FD肝郁脾虚型大鼠有显著的治疗作用，能够显著改善FD肝郁脾虚型大鼠的症状，并且有效的增强胃排空和小肠的推进，降低肠道敏感性，说明改善胃肠动力障碍和感觉异常是电针治疗FD的效应环节。

3.治疗结束后能够显著地降低电针组大鼠外周及中枢VIP、CGRP及其相应受体VPAC1、RAMP1的表达，提示电针是通过脑-肠轴调节脑肠肽的分泌，纠正异常表达的脑肠肽，从而改善胃肠道的动力障碍和 感觉异常，这是电针能够有效调节FD的内在机制。

因此，我们认为脑肠轴与脑肠肽的异常是FD发病的重要病理生理基础，脑肠异常互动，导致相关脑肠肽分泌异常，引起胃肠动力障 碍和感觉异常，最终导致一系列功能性胃肠病的表现。电针通过对脑 肠轴神经-内分泌网络的不同层次，多靶点的调控，纠正异常的脑肠肽分泌，有效改善胃肠动力障碍和感觉异常，从而达到治疗FD的目的。

81

参考文献

[1] Tack J, Talley NJ, Camilleri M, et al. Functional gastroduo- denal disorders [J]. Gastroenterology, 2006; 130(3): 1466-1479. [2] Theodor Alexandru, Roxana, et al. Functional Dyspepsia Today [J]. Maedica-A Journal of Clinical Medicine, 2013 January; 8: 68-74. [3] 吴柏瑶, 张法灿, 梁列新. 功能性消化不良的流行病学[J]. 胃肠病学和肝病学杂, 2013; 22(1): 84-88．

[4] Futagami S, Shimpuku M, Yin Y, et al. Pathophysiology of functional dyspepsia[J]. J Nippon Med Sch, 2011; 78(5): 280-285. [5] 李建. 功能性消化不良临床治疗的研究进展[J]. 中国老年学志, 2011; 31(13): 2599-2601.

[6] 韩瑞, 张春晖, 范宏宇. 功能性消化不良的治疗进展[J]. 中国现代药物应用, 2011; 5(7): 137-138.

[7] Hyman PE. Will the Rome Criteria Help[J]. JPediatrGastro-enterolNutr, 2008; 47(5): 700-703.

[8] Takeda H. Recent mechanistic insights into the pathogenesis of functional dyspepsia: focusing on interoceptive system [J]. Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi, 2014; 111(6): 1058-1070. [9] Grundy D, A1-Chaer ED, A zizQ, et al. Fundamentals of neurogastroenterology: basicscience[J]. Gastroenterology, 2006; 130: 1391.

[10] Mayer EA, Naliboff BD, Craig AD. Neuroimaging of the brain-gut axis: from basic understanding to treatment of functional GI disorders[J]. Gastroenterology, 2013; 1(13): 1925-1942．82

[11] Rita Brun, Braden Kuo. Review: Functional dyspepsia[J]. Thstroeutic Advances in Gastroenterology, 2010 May; 3: 145-164. [12] 杨敏, 张红星, 邹燃. 针刺对功能性消化不良症状及胃动力的影响[J]. 中国康复, 2009; 24: 100-102.

[13] 张铭铭, 周利, 张红星. 穴位注射治疗功能性消化不良临床观察[J]. 湖北中医杂志, 2013; 35: 63-64.

[14] 周利, 邹燃, 孙国杰. 辨证针刺治疗功能性消化不良疗效观察[J]. 上海针灸杂志, 2014; 33: 512-513.

[15] 周利, 程艳萍. 电针对功能性消化不良大鼠的胃排空和血浆Ghrelin 的调节作用[J]. 湖北中医杂志, 2014; 36: 19-21. [16] 邢建峰, 封卫毅, 侯家玉. 小鼠胃排空及小肠推进实验方法的探讨[J]. 北京中医药大学学报, 2003; (04): 50-52. [17] 郭海军, 林洁, 李国成. 功能性消化不良的动物模型研究[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2001; 9: 141-142. [18] 张勇, 王振华. 大鼠胃电节律失常模型的建立[J]. 华人消化杂志, 1998; 6: 612-614.

[19] 申国明, 颜贵明, 徐颖, 等. 电针对胃动力紊乱大鼠血管活性肽表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2004; 12(6): 329-331． [20] 于文靖, 陈苏宁, 李慎贤, 等. 胃痛消痞方对功能性消化不良大鼠血清及胃肠组织中CCK、VIP的影响[J]. 实用药物与临床, 2012; 15: 461-463.

[21] 郭义. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2008: 360． [22] 李鸣, 李成银, 巴元明. 保肾1号巴布剂对慢性肾衰竭大鼠ET-1干预的机理研究[J]. 湖北中医杂志, 2013; 35(1): 22-23． [23] 李飞艳, 陈斌, 李福元. 栀子再下及对胄肠运动影响的实验研究[J]. 光明中医, 2010; 25(4): 608-610.

[24] 刘晶, 李峰, 唐旭东, 等. 功能性消化不良动物模型及其在中医研 究中的应用概述[J]. 环球中医药, 2013; 6(12): 955-958．83

[25] Van Oudenhove L, Joris V, Geeraerts B, et al. Determinants of symptom severity and weight loss in functional dyspepsia [J]. Gastroenterology, 2006; 130(Suppl 2): 38.

[26] Bennett EJ, Piesse C, Palmer K, Badcock CA, Tennant CC, Kellow JE. Functional gastrointestinal disorders: psychological, social, and somatic features[J]. Gut, 1998; 42: 414-420.

[27] Talley NJ, Phillips SF, Bruce B, Twomey CK, Zinsmeister AR, Melton LJ 3rd. Relation among personality and symptoms in nonulcer dyspepsia and the irritable bowel syndrome[J]. Gastroenterology, 1990; 99: 327-333

[28] Drossman D A. Do psychosocial factors define sym ptom severity and patient status in irritable bowel syndrome[J]. AmJMed, 1999; 107(5A): 41-50.

[29] Parkman H P, Hasler W L, Fisher R S, et al. American gastroenterologyical association technical review on the diagnosis and treatment of gastroparesis[J]. Gastroenterol, 2004; 127(5): 1592-1622.

[30] Emmanuel AV, Mason HJ, Kamm MA. Relationship between psycho-logyical state and level of activity of extrinsicgut innervation in patients with a functional gut disorder [J]. Gut, 2001; 49(3): 209-213．

[31] Drossman D A, Camilleri M, Mayer E A, et al. AGA technical review on irritable bowelsyndrome[J]. Gastroenterology, 2002; 123(6): 2108-2131.

[32] De la Roca Chiapas JM, Solis Ortiz S, Fajardo Araujo M, et al. Stress profile, coping style, anxiety, depression, and gastric emptying as predictors of functional dyspepsia: a case control study[J]. J Psychosom Res, 2010; 68(1): 73-81．84

[33] 方正清, 张育琴, 许冠苏. 电针和半夏浑心汤对功能性消化不良大鼠胃动素的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2007; 24(5): 379-382. [34] Pajala M, Heikkinen M, Hintikka J, A prospective 1 -year follow-up study in patients with functional or organic dyspepsia changes in gastrointestinal symptoms mental distress and fear of serious illness[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2006; 24(8): 1241-1246.

[35] 叶佳媚, 陈道荣. 精神心理因素与功能性胃肠病的关系[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2010; 19(5): 475-477.

[36] 陈道志, 秦良才, 陈丽萍, 等. 升高或抑制胃运动药对狗胃电影响 的实验观察[J]. 基础医学与临床, 1995; (增刊): 115-116．

[37] 申国明, 颜贵明, 徐颖, 等. 电针对胃动力紊乱大鼠血管活性肽表 达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2004; 12(6): 329-331．

[38] 岳利峰. 逍遥散对肝郁脾虚证模型大鼠海马和杏仁核AMPAR的调节机制[D]. 北京中医药大学, 2008, 05.

[39] Miwa H, Watari J, Fukui H, et al. Current understanding of pathogennesis of functional dyspepsia[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2011; 26(3): 53-60．

[40] Kusano M, Zai H, Shimoyama Y, et al. Rapid gastric emptying, rather than delayed gastric emptying, might provoke functional dyspepsia[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2011; 26(Suppl3): 75-78. [41] Collins S M. Is the irritable gut an inflamed gut[J]. Scand J Gastroenterol, 1992; 192(suppl): 102-105.

[42] 侯晓华, 李启祥, 謝小平, 等. 功能性消化不良患者的胃液体排空 和胃感觉阈异常[J]. 胃脑病学, 2000; 5(3): 166-168.

[43] Holtman G, Gschossmann J, Neufang-Huber J, et al. Differences in gatric mechamosenory function after ramp distentions in non-Consulter with dyspepsia and healthy controls[J]. Gut, 2000; 47(3): 332-336．85

[44] Timmons S, Liston R, Moriarty K J. Functional dyspepsia: motorabnor-malities, sensory dysfunction, and therapeutic options[J]. Am J Gastroenterol, 2004; 99(4): 739-749. [45] Bouin M, Meunier P, Riberdy-Poitras M, et al. Pain hyper sensitivity in patients with functional gastrointestinal disorders: a gastrointestinal specific defect or a general systemic condition[J]. DigDisSci, 2001; 46(2): 2542-2548.

[46] 骆乐, 寿依群, 陈文君. 针刺治疗功能性消化不良临床研究[J]. 中国针灸, 2002; 22: 89-9031.

[47] 彭随风, 杨家耀, 时昭红. 电针改善功能性消化不良胃动力、自主 神经功能及心理状态[J]. 世界华人消化杂志, 2008; 16: 4105-4109 [48] Xu S, Hou X, Zha H, et al. Electroacupuncture accelerates solid gastric emptying andimproves dyspeptic symptoms in patients with functional dyspepsia[J]. Dig Dis Sci, 2006; 51( Nov 3): 2154-2159.

[49] Yin J, Chen JD. Gastrointestinal Motility Disorders and Acupuncture[J]. Auton Neurosci, 2010; 157: 31–37.

[50] 姚筱梅, 姚树坤, 张瑞星, 等. 针刺对功能性消化不良患者内脏敏 感性的影响[J]. 针刺研究, 2006, 31(4): 228-231.

[51] 熊会玲, 褚丹, 刘诗. 内源性阿片肽系统在电针刺激足三里导致肠 易激综合征大鼠内脏敏感性降低中的作用[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2010; 19: 740-745.

[52] Said S I, Mutt V. Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine[J]. Science, 1970; 169(951): 1217-1218.

[53] Delgado M, Abad C, Martinez C, et al. Vasoactive intestinal peptide in the immune system: potential therapeutic role in Inflammatory and autoimmune diseases[J]. J Mol Med(Berl), 2002; 80(1): 16-24.86

[54] 崔莉红. 胃肠激素与结肠运动的调节作用[J]. 医学综述, 2008; 14 (3): 380-382．

[55] Onoue S, Misaka S, Yamada S. Structure activity relationship of vasoactive intestinal peptide (VIP): potent agonists and potential clinical applications[J]. NaunynSchmiede-berg's Arch Pharmacol, 2008; 377(4-6): 579-590. [56] 刘蔚雯, 李冀, 王烨燃, 等. 枳术饮促胃动力作用及其机制研究[J]. 中国自然医学杂志, 2009; 11(1): 1-4． [57] 梁国强, 张露蓉, 江国荣, 等. 胃动方Ⅰ对功能性消化不良大鼠胃肠动力的影响及作用机制[J]. 河北中医, 2010; 32(4): 601-602． [58] 刘未艾, 何亚敏, 刘密, 等. 隔药饼灸对功能性胃肠病肝郁脾虚模型大鼠MTL、GAS、VIP的影响[J]. 实用中医内科杂志, 2013; 27(1): 83-90.

[59] 章菲菲, 莫剑忠. 降钙素基因相关肽在内脏敏感性改变机制中的作用[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2005; 14(2): 200-202． [60] Christopoulos A, et al. N ovel receptor partners and function of receptor activity modifying proteins[J]. J Biol Chem, 2003; 278(5): 3293-3297.

[61] Pondel M D, et al. Cloning and transcriptional analysis of the mouse receptor activity modifying protein-1 gene promoter[J]. BMC Mol Biol, 2005; 6(1): 7.

[62] O'Malley D, Dinan TG, Cryan JF. Altered expression and secretion of colonic interleukin-6 in a stress sensitive animal model of brain-gut axis dysfunction[J]. J Neuroimmunol, 2011; 235(1-2): 48-55.

[63] Howren MB, Lamkin DM, Suls J. Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta analysis[J]. Psychosom Med, 2009; 71(2): 171-186.

87

[64] 陈求招. 功能性消化不良与胃粘膜胃动素、降钙素基因相关肽的 关系[D]. 福州: 福建医科学, 2012: 1-36.

[65] Adachi K, Takashima T, Murao M, et al. Prevalence of functional dyspepsia and its Relationship with Helicobacter pylori infection in a Japanese population[J]. Kawamura A J Gastroenterol Hepatol, 2001; 16(4): 384-388. [66] 李乾构, 周斌, 任蜀兵, 等. 功能性消化不良的辨证论治探析[J]. 中国中西医结合脾胃杂志, 1996; 4(2): 115-116． [67] 中华中医药协会脾胃病分会. 消化不良中医诊疗共识意见(2009) [J]. 中国中西医结合杂志, 2010; 30 (5): 533-537.

[68] 单兆伟, 周学文, 李乾构. 实用中医消化病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 321-322.

[69] 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会. 功能性消化不良的中西医结合诊疗共识意见(2010)[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2011; 31(11): 1545-1549．

[70] 王文明. 功能性消化不良的中医证候学研究[D]. 北京中医药大学, 2009, 06.

[71] 茅霄芸. 功能性消化不良不同亚型的中医证候学特征分析及用药 规律探讨[D]. 南京中医药大学, 2014: 10-11.

[72] Drossman D A. The functional gastrointestinal disorders and the Rome process[J]. Gastroenterology, 2006; 130(5): 1377-1390.

[73] 吴柏瑶, 张法灿, 梁列新. 功能性消化不良的流行病学[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2013; 22(1): 84-88．

[74] 黄纯炽, 李翊, 王春琳. 功能性消化不良与心理因素及自主神经功 能关系的初步研究[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2002; 11(4): 346-348．

[75] Ahluwalia NK, Thompson DG, Mamtora H, et al. Evduation of gastric antralmotor perfromance in patients with dyspepsia

88

UsinG realtime high resolution ultrasound [J]. Neurogastro- enterology & motility,1996; 8(4):333-338.

[76] Miwa H, Watari J, Fukui H, et al. Current understanding of pathogenesis of functional dyspepsia[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2011; 26(3): 53-60.

[77] 王垂杰, 姜窥. 功能性消化不良肝郁模型大鼠胃排空障碍与胃平滑肌超微结构的关系[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2009; 17 (2): 86-88.

[78] Tack J, Bisschops R, Sarnelli G. Pathophysiology and treatment of functional dyspepsia[J]. Gastroenterology, 2004; 127(4): 1239-1255．

[79] 罗金波, 琚坚. 功能性消化不良发病机制的研究进展[J]. 医学综述, 2011, 17(22): 3431-3434.

[80] Grundy D. What activates visceral afferents[J]. Gut, 2004; 53(Suppl2): ii5-ii8．

[81] Tse A W, Lai L H, Lee C C, et al. Validation of Self- administrated Questionnaire for Psychiatric Disorders in Patients with Functional Dyspepsia [J]. J Neurogastroenterol Motil, 2010; 16(1): 52-60.

[82] Wood JD. Enteric nervous system, serotonin, and the irritable bowel syndrome[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2001; 17(1): 91-97．

[83] 杨希林, 方秀才, 刘晓红. 胃肠道肥大细胞与肠神经系统的相互作 用[J]. 胃肠病学, 2010; 15(4): 243-245．

[84] 粱列新. 功能性消化不良的心理社会因素研究[J]. 胃肠病学, 2008; 13(2): 125-127．

[85] Bhatia V, Tandon RK. Stress and the gastrointestinal tract[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2005; 20 (3): 332-339．89

[86] Kirchgessner AL. Orexins in the brain-gut axis[J]. Endocr Rev, 2002; 23(1): 1-15．

[87] Saito YA, Zimmerman JM, Harmsen WS, et al. Irritable bowel syndrome aggregates strongly in families: a family based case-control study[J]. Neurogastroenterol Motil, 2008; 20(7): 790-797．

[88] Mawe GM, Coates MD, Moses PL. review article: Intestinal serotonin signalling in irritable bowel syndrome[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2006; 23(8): 1067-1076．

[89] Arisawa T, Tahara T, Fukuyama T, et al. Genetic polymerphism of pri-microRNA 325, targeting SLC6A4 3'-UTR, is closely associated with the risk of functional dyspepsia in Japan[J]. J Gastroenterol, 2012; 47(10): 1091-1098．

[90] Mujakovic S, ter Linde JJ, de Wit NJ, et al. Serotonin receptor 3A polymorphism c. -42C＞T is associated with severe dyspepsia[J]. BMC Med Genet, 2011; 12: 140．

[91] Ladrón de Guevara L, Peña-Alfaro NG, Padilla L, et al. Evalution of the symptomatology and quality of life function dyspepsia before and after Helicobater pylori eradication treatment[J]. Rev Gastroenterol Mex, 2004; 69(4): 203-208.

[92] 朱振华, 曾志荣, 肖英莲, 等. 根除幽门螺杆菌治疗功能性消化不良临床价值Meta分析[J]. 中国实用内科杂志, 2012; 32(11): 856-858.

[93] Treiber G, Schwabe M, Ammon S, et al. Dyspeptic symptoms associated with Helicobacter pylori infection are influenced by strain and host specific factors[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2004; 19(2): 219-231.

90

[94] Eshraghian A, Eshraghian H. Interstitial cells of Cajal: a novel hypothesis for the pathophysiology of irritable bowel syndrome[J]. Can J Gastroenterol, 2011; 25(5): 277-279．

[95] 徐俊荣, 罗金燕. 动力药物在治疗功能性消化不良中的作用[J]. 临床消化病杂志, 2008; 20(2): 71-72．

[96] 周明文. 黛力新治疗功能性消化不良90例[J]. 中国实用医刊, 2014; 41(21): 113-114．

[97] 邵聪富. 氟哌噻吨联合美利曲辛片治疗功能性消化不良的疗效观 察[J]. 中国处方药, 2013; 13(1): 69-70．

[98] 莫光英. 功能性消化不良的治疗进展[J]. 中国实用医药, 2014; 9 (3): 251-252.

[99] 陈影. 隔药饼灸对功能性胃肠病(肝郁脾虚型)大鼠脑肠肽

Ghrelin、VIP的影响[D].湖南中医药大学,2014:14-15. [100]Bonaz B, Sabate JM. Brain-gut axis dysfunction[J]. Gastroenterol Clin Biol,2009;33(Suppl1): S48-S58. [101]Mertz HR. Overview of functional gastrointestinal

Disorders: dysfunction of the brain-gut axis[J]. Gastroenterol Clin North Am 2003;32:463-476.

[102] Mayer EA, Tillisch K, Bradesi S. Review article: modulation of the brain-gut axis as a therapeutic approach in gastrointestinal disease[J]. Aliment Pharmacol Ther 2006; 24: 919-933.

[103] 李景南, 钱家鸣. 胃肠激素与消化系疾病[J]. 中华消化杂志, 2005; 25(4): 253-254.

[104] Mayer EA. Gut feelings: the emerging biology of gut-brain comm-unication[J]. Nat Rev Neurosci, 2011; 12: 453-466. [105] Benarroch EE. Enteric nervous system: functional organization and neurologic implications[J]. Neurology, 2007; 69: 1953-1957.91

[106] Van Oudenhove L, Demyttenaere K, Tack J, et al. Central nervous system involvement in functional gastrointestinal disorders[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2004; 18: 663-680.

[107] Talley NJ, Howell S, Poulton R. The irritable bowel syndrome and psychiatric disorders in the community: is there a link[J]. AmJGastroenterol, 2001; 96(4): 1072-1079. [108] GrundyD, Al-ChaerED, AzizQ, etal. Fundamentalsofneurogastro-enterology: basicscience[J]. Gastroenterology, 2006; 130: 1391-1411.

[109] 吴改玲, 蓝宇. 符合罗马Ⅲ标准FD患者心理测试及自主神经功能观察44例[J]. 世界华人消化杂志, 2012; 20: 1473-1477. [110] Troncon LE, Thompson DG, Ahluwalia NK, et al. Relations between upper abdominal symptoms and gastric distension abnormalities in dysmotility like functional dyspepsia and after vagotomy[J]. Gut, 1995; 37: 17-22.

[111] 李迎春, 赵宝龙, 周红, 等. 心理状态变化与自主神经功能改变及 胃电节律紊乱在功能性消化不良中的相互关系[J]. 世界华人消化杂志, 2007; 15: 2063-2066.

[112] Mayer EA, Aziz Q, Coen S, et al. Brain imaging approaches to the study of functional GI disorders: a Rome working team report[J]. Neurogastroenterol Motil, 2009; 21(6): 579-596. [113] Sharma A, Lelic D, Brock C, et al. New technologies to investigate the brain-gut axis[J]. World J Gastroenterol, 2009; 15(2): 182-191.

[114] 李延青, 郭玉婷. 肠易激综合征的动物模型研究[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2004; 13(4): 435-439.

92

[115] Mosiienko HP. Role of gastrointestinal hormones in pathogenesis of functional diseases of the digestive system in adolescent[J]. Lik Sprava, 2008; (7-8): 47-50.

[116] Tomita R. Relationship between interdigestive migrating motor complex and gut hormones in human[J]. Hepatogastro- enterology, 2009; 56(91-92): 714.

[117] Ozaki K, Yogo K, Sudo H, et al. Effects of mitemcinal(GM-611), an acid resistant nonpeptide motilin receptor agonist, on the gastrointestinal contractile activity in conscious dogs[J]. Pharmacology, 2007; 79(4): 223-235． [118] Galligan JJ, Vanner S. Basic and clinical pharmacology of new motility promoting agents[J]. Neurogastroenterol Motil, 2005; 17: 643-653.

[119] 胡淑娟, 王小娟, 郭璇, 等. 舒胃汤对功能性消化不良大鼠Cajal间质细胞、胃动素表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011; 17(3): 170-173.

[120] 陈苏宁, 梁靓靓, 史业东. 胃痛消痞方对脾胃虚寒型功能性消化不良大鼠胃肠动力和胃动素的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2010; 18(7): 699-702.

[121] Feighner SD, Tan CP, Mckee KK, et a1. Receptor for motilin identified in the human gastrointestinal system[J]. Science, 1999; 284: 2184-2188.

[122] 凌江红, 韦连明, 张钰琴, 等. 疏肝理气法对功能性消化不良大鼠 下丘脑胃血浆胃泌素的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2009; 36(10): 1812-1813.

[123] Walec kaKapica E, Klupińska G, Stec Michalska K, et al. Gastrin secretion in patients with functional dyspepsia [J]. Pol Merkur Lekarski, 2009; 26(155): 362-365．93

[124] Ohno T, Mochiki E, Kuwano H. The role of motilin and Ghrelin in gastrointestinal motility[J]. Int J Pept, 2010; 16(7): 113-115.

[125] Takakazu Yagi, Akihiro Asakawa, Hirotaka Ueda, et al. The role of Ghrelin in patients with functional dyspepsia and its potential clinical relevance[J]. Medicin, 2013; 32(3): 523-531.

[126] 徐焕海, 陈淑洁, 王良静, 等. 功能性消化不良患者脂肪餐前后血 浆胆囊收缩素水平的变化[J]. 浙江临床医学, 2007, 9(5): 605-606.

[127] 杨宇, 刘丹, 谭志胜, 等. 老年功能性消化不良患者胆囊收缩素与 胃电节律的关系[J]. 中国老年保健医学, 2009; 7(4): 23-24. [128] 马军, 潘锦瑶, 方穗雄, 等. 肠易激综合征不同中医证型与胃肠激 素关系的临床研究[J]. 辽宁中医杂志, 2007; 34(8): 1099-1100.

[129] 于波, 张春莉, 关小军. 功能性消化不良患者血浆胃动素生长抑 素与胃排空的关系[J]. 黑龙江医药, 2008; 21(6): 103-104．

[130] 马薇, 龙霖梓, 彭芝配, 等. 九香止泻片对腹泻型肠易激综合征大 鼠血浆VIP、NPY和肠黏膜5-HT的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2009; 29(6): 29-31.

[131] Ebner K, Singewald N. The role of substance P instress and anxiety responses[J]. Amino Acids 2006; 31: 251-272.

[132] 沈天华, 沈洪, 吴坚, 等. 半夏泻心汤对功能性消化不良大鼠模型 血浆P物质及胃窦黏膜CGRP的影响[J]. 中华中医药杂志, 2011; 26(11): 2737-2739.

[133] 李铁男, 王兵, 刘影, 等. 菝葜提取物对肠易激综合征大鼠血浆SP、CGRP含量的影响[J]. 中医药学报, 2011; 39(4): 26-28.

[134] 石灯汉, 徐珊. NO与功能性消化不良的相关性研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2009; 33(3): 443-445.

[135] 于涛, 赵利娜. 脑肠肽与功能性消化不良[J]. 现代消化及介入诊疗, 2012; 17(4): 241-245.94

[136] Bouin M, Lupien F, Riberdy Poitras M, et al. Tolerance to gastric distension in patients with functional dyspepsia: modulation by acholinergic and nitrergic method[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2006; 18: 63-68.

[137] 周惠芬, 王玲玲, 衣运玲, 等. 针灸治疗功能性胃肠病的优势[J]. 针灸临床杂志, 2010; 26(2): 1-5.

[138] 卢明青, 林静, 余芝, 等. 针刺对胃运动调节效应的机制浅析[J]. 中华中医药杂志, 2012; 27(6): 1511-1514．

[139] Shen GM, Zhou MQ, Xu GS, et al. Role of vasoactive intestinal peptide and nitric oxide in the modulation of electroacupuncture on gastric motility in stressed rats[J]. World J Gastroenterol, 2006; 12(1): 6156- 6160．

[140] 刑翰, 张春红, 张妍, 等. 针刺与交感神经的关系探讨[J]. 江苏中医药, 2010; 42(9): 45-47．

[141] Sato A, Sato Y, Uchida S. Reflex modulation of visceral functions by acupuncture like stimulation in anesthetized rats[J]. International CongressSeries, 2002; 12(38): 111.

[142] 彭随风, 杨家耀, 时昭红. 电针刺激功能性消化不良胃动力、自主 神经功能及心理状态[J]. 世界华人消化杂志, 2008; 16(36): 4105-4109．

[143] 候陈凤, 羊燕群, 陈建永. 针刺对功能性消化不良的神经内分泌调节[J]. 云南中药杂志, 2013; 34(9): 71-73．

95

附录一：彩图



1.2

y = 0.2856x2 - 1.479x + 2.0107

R² = 0.9953

1

0.8

0.6

系列1

多项…

0.4

0.2

0

0

1

**VIP标准曲线**

2

3

**彩图一、**ELISA法检测血清VIP的标准曲线：

VIP(mg /ml)

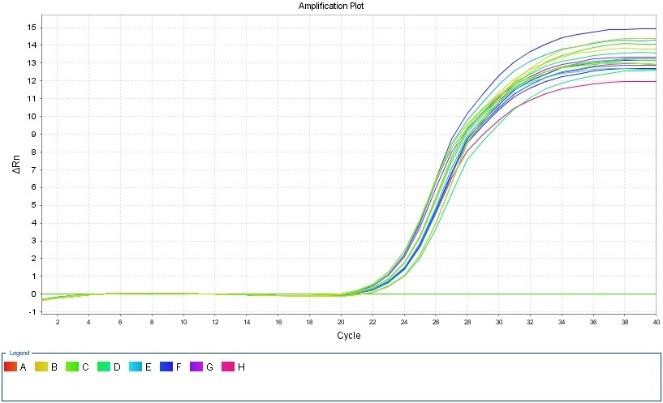
**彩图二、**ELISA法检测血清CGRP的标准曲线



96

**彩图三、**PCR法检测胃窦、空肠、下丘脑组织中VIPmRNA相对表达量的扩增、溶解曲线

**β-ACTIN扩增曲线：VIP扩增曲线：**



**β-ACTIN溶解曲线：VIP溶解曲线：**



97

彩图四、IHC 法检测空肠、下丘脑、海马 VIP 、VPAC1 表达

(1). VIP 的表达：光镜下（×400）

A.空白组海马 DG B 模型组海马 DG



C.电针组海马DG D.空白组下丘脑VMH



E.模型组下丘脑VMH F.电针组下丘脑VMH

98



G.空白组空肠肠腺H.模型组空肠肠腺

I.电针组空肠肠腺

(2). VPAC1 的表达：光镜下（³400）



A.空白组海马DG B.模型组海马DG

99



C.电针组海马DG D.空白组下丘脑VMH



E.模型组下丘脑VMH F.电针组下丘脑VMH



G.空白组空肠肠腺H.模型组空肠肠腺

100



I.电针组空肠肠腺

101

**彩图五、**PCR法检测胃窦、空肠、下丘脑组织中CGRPmRNA相对表达量的扩增、溶解曲线

**β-ACTIN扩增曲线：CGRP扩增曲线：**



**β-ACTIN溶解曲线：VIP溶解曲线：**





102

彩图六、IHC法检测空肠、下丘脑、海马CGRP、RAMP1表达

(1). CGRP的表达：光镜下（×400）



A.空白组海马 DG B.模型组海马 DG



C.电针组海马DG D.空白组下丘脑VMH



E.模型组下丘脑VMH F.电针组下丘脑VMH

103



G.空白组空肠肠腺H.模型组空肠肠腺



I.电针组空肠肠腺

(2). RAMP1的表达：光镜下（³400）



A.空白组海马DG B.模型组海马DG

104



C.电针组海马DG D.空白组下丘脑VMH



E.模型组下丘脑VMH F.电针组下丘脑VMH



G.空白组空肠肠腺H.模型组空肠肠腺

105



I.电针组空肠肠腺

106

附录二**:**本人在校期间发表论文情况

1. **徐派的**，辛玉，张红星\*等.电针对功能性消化不良肝郁脾虚型大鼠中枢及外周降钙素基因相关肽及受体活性修饰蛋白的影响[J].世界华人消化杂志，2015,23（21）：3433-3439

2. **徐派的**，辛玉，张红星\*等.针刺与电针治疗功能性便秘的疗效及机制[J].世界华人消化杂志，2015,23（16）：2665-2670

3. **徐派的**，张红星\*，杨云等.电针对功能性消化不良大鼠胃肠动力学及VIP、CGRP的影响[J].中国中西医结合杂志（已录用）

4. **徐派的**，杨云，张红星\*等. 电针对功能性消化不良肝郁脾虚型大鼠中枢及外周VIP及其受体VPAC1的影响[J].中华中医药杂志（已录用）

5. 杨云，**徐派的**，张红星\*等.电针对功能性消化不良大鼠胃排空功能及NT的影响[J].湖北中医杂志，2015, 37(9)：1-3

6. 杨云，**徐派的**，张红星\*NT介导的脑-肠轴作用在电针治疗功能性消化不良大鼠中的影响[J].针刺研究（已录用）

107

附录三：综述

**脑肠肽与功能性消化不良的研究进展**

（湖北中医药大学湖北武汉430061）

**摘要：**功能性消化不良的病因和发病机制是多因素相互作用的。大量研究集中于脑肠轴的活动异常。大脑中枢神经系统和胃肠道神经系统对内外环境的应激反应，影响脑肠肽的分泌与释放，进一步导致功能性消化不良的发生发展。现就脑肠肽在功能性消化不良的研究中的研究进展进行综述。

关键词：功能性消化不良； 发病机制； 脑肠肽； 研究进展

**The research progress of brain gut peptide and functional dyspepsia**

Abstract: Many factors interaction affect the etiology and pathogenesis of FD. Generous researches focused on the abnormal brain gut axis activity. The regulation of central nervous system in the brain and gastrointestinal nervous system changes, causing the internal and external stress

Reaction, effecting the secretion and release of brain-gut peptide, further leading to the occurrence and development of FD. This article reviews the research progress in brain gut peptide in the study of FD.

**Key Words:** Functional dyspepsia; Pathogenesis; Brain-gut peptide; Research progress

功能性消化不良（functional dyspepsia, FD）是一组常见的功能性胃肠道疾病。随着近年来对FD的深入研究，越来越多的学者一致认为[1]：脑肠轴在FD的发病中起着重要的作用。脑肠轴异常，内外环境的应激反应，影响胃肠激素的分泌与释放，使大脑中枢神经系统

108

和胃肠道神经系统的调节发生了变化，进一步导致FD的发生发展。本文将就脑肠肽与FD的研究进行综述。

1.脑肠轴的定义

脑肠轴是中枢神经系统（CNS）和胃肠道神经系统（ENS）和自主神经系统（ENS）之间双向的神经连接，具有多种生理功能的神经内分泌网络，能够将认知和情感中枢与神经内分泌、肠神经系统和免疫 系统相联系的双向交通通路[2]。机体通过脑肠轴之间的神经内分泌网络的双向环路进行胃肠功能的调节称为脑肠互动[3]。

2.脑肠肽的作用

同时存在于中枢神经系统和消化道中双重分布的肽类统称为脑肠肽（brain-gut peptide, BGP）。作为兼有神经递质和激素双重作用的重要功能因子，BGP起到了搭建连接桥梁和调控功能的作用，是脑肠轴各个环节的调控作用的分子基础[4]。BGP的异常分泌和表达可以诱发胃肠动力障碍和感觉异常，与FD的发病密切相关。

2.1胃动素（motilin, MTL）

MTL因其能够显著促进胃运动而得名，包括胃肠蠕动，提高胃肠道、胆道及oddis括约肌的张力等。MTL对消化道分泌功能也有一定的影响[5]。MTL受体（MTL-R）与Gαq和G13耦联，可分别作用于含神经元组织的N型和平滑肌组织内的M型受体[6]。

目前认为[7, 8]血浆MTL含量降低与FD胃排空下降、胃电节律功能紊乱、胃窦无力和排空功能减慢、胃窦-幽门-十二指肠运动协调失常以及胃周期性肌电复合波（MMC）的Ⅲ期时相缩短或缺如相关。Yogo等报道，促MTL药物通过增加血浆中MTL浓度能从而改善FD症状[9, 10]。

Kamerling[11]等研究表明，依托必利能提高血浆MTL水平，继而改善症状，均说明血浆MTL水平降低与FD有关。

2.2胃泌素（gastrin, GAS）

GAS是目前发现的唯一在CNS、外周神经（即迷走神经）和ENS三个水平上均表现为对胃运动有兴奋作用的胃肠激素。GAS通过其受体发挥其促进胃酸、胃蛋白酶分泌，促进胃肠道黏膜生长，使胃窦和

109

幽门括约肌收缩，延缓胃排空生物学作用。实验研究发现促胃动力作 用机制与GAS分泌增加，增强迷走神经对胃肠平滑肌的兴奋作用有关

[12]。

2.3胆囊收缩素（cholecystokinin, CCK）

可以促使胆囊收缩及胰液分泌，还能延缓胃排空，增强小肠和结肠运动，增强幽门括约肌，收缩弛Oddi括约肌并诱发饱胀感觉。外源性CCK可以刺激具有5-HT释放能力的神经元，从而影响中枢性进食感觉和胃肠运动，CCK对食物诱发的胃排空抑制作用可能是依靠于中枢5-HT受体途径来实现的[13]。Fried等人的研究发现CCK与脂质的消化代谢有关，脂质消化异常可诱发上腹胀、餐后饱胀感等症状， 而使用CCK拮抗剂右氯谷胺能够显著减轻上述症状[14]。

2.4瘦素（leptin）

Leptin参与调节能量代谢与摄食平衡、调节胃肠激素的分泌和脂肪贮存等生理作用，与胃肠道功能的关系十分密切[15]。研究表明进餐后的消化运动期间其血液中leptin水平迅速升高，抗瘦素血清可以有效阻断这一由进食所诱发的分泌水平改变，证明瘦素是启动并参与消化期胃肠运动的激素之一[16]。还有学者研究发现，FD患者中存在血清Leptin水平异常，从而改变了其对摄食及胃运动的调节，产生早饱不适等症状，同时FD患者血清Leptin水平的改变也可能是由于长期摄食减少而导致的机体一种适应性反应[17, 18]。

2.5促生长素（Ghrelin）

Ghrelin是一种重要的胃肠激素，是目前唯一的GHSR的内源性配体，与胃动素表现出许多相同的作用：控制食欲、刺激生长激素的释放、促进胃排空、增强胃动力等，又被称为胃动素相关肽[19, 20]。在酰基化和去酰基化两种Ghrelin形式中，酰基化Ghrelin是其主要的活性形式。只有酰基化Ghrelin通过结合其受体GHSR-1a后活化信号传导通路以发挥其生物学作用。其酰基化过程由Ghrelin酰基转移酶(Ghrelin O Acy ltrasferase, GOAT)来完成。GOAT广泛分布于胃肠道，在胃粘膜的表达有着高度特异性[21, 22]。关于Ghrelin在胃肠动力

110

学中的调节机制，一直是研究功能性消化不良方面的热点。Ghrelin可能是通过迷走神经通路、自分泌、旁分泌作用而增加了胃的排空率， 从而促进胃动力[23, 24]。对于FD以及胃排空障碍的患者，发现其体内血清促生长素的水平明显下降[25-27]。这些都肯定了FD的发生与

ghrelin的密切联系。目前研究表明Ghrelin的合成与分泌受到mTOR(Mammalian Target of Rapamycin)信号通路的调控，且与mTOR信号通路的活性呈负相关。用rapamycin处理的肥胖大鼠可以检测到胃中的propreghrelin和血浆中的ghrelin水平增多[28]。这也可能打开研究mTOR信号通路与胃肠动力障碍的新思路。

2.6肥胖抑制素(Obestatin)

Proghrelin翻译后存在不同剪切方式，经过翻译后的不同片段剪切和不同类型的修饰产生不同的物质。Ghrelin是该前体蛋白经乙酞化修饰后形成；Obestatin则经该前体C末端酞胺化修饰产生。

Ghrelin能够刺激机体增加对食物的摄入，使体质量增加；而

Obestatin可以抑制Ghrelin对食欲增加和空肠收缩的刺激作用，说明Obestatin是Ghrelin的拮抗肽，因而将其称为“反Ghrelin”激素[29]。Lagaud[30]等的研究证实，腹腔注射Ghrelin后大鼠和小鼠皆显著增加摄食量，注射Obestatin则抑制摄食。同等剂量的Ghrelin 和

Obestatin一同注射时互相抵消彼此的作用。

2.7 5-羟色胺（5-hydroxytryptamine, 5-HT）

5-HT具有多种生物学功能，几乎参与人体所有的生理活动和行为功能的调控，包括情感、认知、感觉，以及内分泌功能、胃肠道功能等[31]。尤其是对胃肠动力、胃肠分泌功能、胃肠内脏敏感性有影响。 王深皓等研究发现激活5-HT4受体对健康人缩短MMC周期，Ⅲ期波传播速度增加，Ⅲ期波幅增加，提示激活5-HT4受体后MMC的变化为兴奋性[32]。近来研究显示，5-HT受体分布于肠道环形肌行肌层，尤其是环形肌层，肌间神经丛及Cajal细胞（Icc）附近或表面，5-HT7受体拮抗剂SB-269970可增加回肠及结肠离体平滑肌自发性收缩的

7

111

幅度[33]。另有实验证实5-HT受体亚型可能参与肠运动调节，影响胃肠运动起搏细胞Icc电活动可能是其机制之一。

7

综上所述，BGP是FD的发生发展的过程中重要的分子基础。生理状态下，各种BGP的分泌维持着胃肠道的各种生理过程，病理状态下，在受到体内内分泌代谢、精神心理因素的影响以及社会环境的影响，导致BGP分泌失衡，引起胃肠动力障碍和内脏感觉异常，这一病理过程是FD发病的重要机制之一。目前不断有新型的脑肠肽被发现，已知的BGP也仍然有着更广泛的生理功能等待我们区探索。体内各种

BGP之间存在着复杂的联系，BGP和生物体内多种信号通路的研究，将会阐明BGP产生各种效应的机制，有利于FD发病机制的明确，为研究一些新的治疗胃肠疾病提供新的方法，在基础和临床研究中都有 很强的指导意义。

112

参考文献

[1] 刘未艾. 从脑肠轴途径探讨隔药饼灸对FGIDs肝郁脾虚模型大鼠胃肠动力障碍和感觉异常影响的作用机制[D]. 湖南中医药大学, 2013: 53-54

[2] Mayer EA, Tillisch K. The brain-gut axis in abdominal painsyndromes[J]. Annu Rev Med2011; 62: 381-396．

[3] Jacek Budzyński, et al. Brain-gut axis in the pathogenesis of Helicobacter pylori infection[J]. World J Gastroenterol, 2014; 20(18): 5212–5225.

[4] 张洪领, 杨春敏. 功能性消化不良的脑肠轴机制研究进展[J]. 实用医学杂志2010; 26(17): 3265-3266

[5] 谭康联, 陈志强. 胃动素用于胃肠功能评价的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2011; 19(2): 156.

[6] J Broad, 1 S Mukherjee, 1 M Samadi, et al. Regional and agonist dependent facilitation of human neurogastrointestinal functions by motilin receptor agonists[J]. Br J Pharmacol, 2012; 167(4): 763–774.

[7] 陈鹏, 王春松, 孔令斌. 胃动素与功能性消化不良研究进展[J]. 中国实用医药, 2008; 3(10): 187-189．

[8] Ming-Luen Hu, Christophan K Rayner, Keng-Liang Wu, Effect of ginger on gastric motility and symptoms of functional dyspepsia[J]. World J Gastroenterol, 2011; 17(1): 105–110. [9] Yogo K, Onoma M, Ozaki K, et al. Effects of oral mitemcinal(GM-611), erythromycin, EM-574 and cisapride on gastric emptying in conscious rhesus monkeys[J]. Dig Dis Sci 2008; 53: 912-918

[10] Ozaki K, Yogo K, Sudo H, et al. Takanashi H. Effects of mitemcinal (GM-611), an acid resistant nonpeptide motilin

113

RecePtor agonist, on the gastrointestinal contractile activity in conscious dogs[J]. Pharmacology2007;79:223-235 [11] Kamerling IM, Van Haarst AD, Burggraaf J, et al. Motilin effects on the proximal stomach in patients with functional dyspepsia and healthy volunteers[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,2003;284:776-781.

[12]孙旭娟，李卫平，战丽彬，等.“和胃饮”合剂对功能性消化不良大 鼠胃肠激素的影响[J].大连医科大学学报,2009;31(4):287-290. [13]Yao-Yao Gong, Xin-Min Si, Lin Lin, et al. Mechanisms of cholecystokinin-induced calcium mobilization in gastric antral interstitial cells of Cajal[J]. World J Gastroenterol,2012;18(48):7184–7193.

[14] Fried M, Feinle C. The role of fat and cholecystokinin in functional dyspepsial[J]. Gut,2002;51(Suppl 1):i54-i57. [15]Christos S, Mantzoros, Faidon Magkos, et al. Leptin in human physiology and pathophysiology[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab.2011;301(4):E567–E584.

[16] Shadi S. Yarandi, M. D, et al. Diverse roles of leptin in the gastrointestinal tract: Modulation of motility, absorption, growth, and inflammation[J]. Nutrition,2011; 27(3):269-275.

[17]陈苏宁，礼海，史业东.胃痛消痞方对功能性消化不良大鼠血清及 胃组织中Ghrelin、Leptin的影响[J].世界华人消化杂志,2010; 18(26)：2800-2803.

[18]刘杰民，蔺晓源，蔡莹，等.四磨汤对慢性应激小鼠血清leptin 和

MTL的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011;17(21):100-102. [19]Ohno T, Mochiki E, Kuwano H. The role of motilin and Ghrelin in gastrointestinal motility[J]. Int J Pept,2010;

16(7):113-115.

114

[20] Takakazu Yagi, Akihiro Asakawa, Hirotaka Ueda, et al. The role of Ghrelin in patients with functional dyspepsia and its potential clinical relevance[J]. Medicin,2013 June;32 (3):523-531

[21] Ohgusu H, Takahashi T, Kojima M. Enzymatic characteriza-tion of GOAT, Ghrelin O acyltransferase[J]. Methods Enzymol, 2012;514:147-163.

[22] Chung Tong Lim Bleeina Kola, Marta Korbonites. The Ghrelin/GOAT/GHS-R syatem and energy metabolism[J]. Rev Endocr Metab Disord,2011 Sep;12:173-186

[23]蔡顺天，王巍峰. ghrelin与功能性消化不良[J].胃肠病学和肝病学杂志,2011;20(6):579-582.

[24] Iijima K, Iwabuchi T, Ara N, et al. Reactive increase in gastric mucus secretion is an adaptive defense mechanism against low-dose aspirin-induced gastropathy[J]. Dig Dis Sci, 2013;58(8):2266-2274.

[25] Lee KJ, Cha DY, Cheon SJ, et al．Plasma ghrelin levels and their relation ship with gastric emptying in patients with dysmotility like functional dyspeps[J]. Digestion, 2009;80(1):58-63．

[26]周利，程艳萍.电针对功能性消化不良大鼠的胃排空和血浆

Ghrelin的调节作用[J].湖北中医杂志,2014;36(3):19-21

[27]吴坚，张星星，沈洪.半夏泻心汤对功能性消化不良大鼠胃排空率和胃窦组织Ghrelin的影响[J].四川中医,2014;32(01):70-72 [28]Geyang Xu, Yin Li, Wenjiao An, et al. Gastric Mammalian Target of Rapamycin Signaling Regulates Ghrelin Production and Food Intake[J]. Endocrinology, August 2009;150(8): 3637–3644. [29]Mineko Fujimiya, Akihiro Asakawa, et al. Different effects of ghrelin, desacyl ghrelin and obestatin on gastroduodenal

115

MotiLity in conscious rats[J]. World J Gastroenterol.2008; 14(41):6318–6326.

[30] Lagaud GJ, Young A, Acena A, et al. Obestatin reduces food intake and suppresses body weight gain in rodents[J]. Biochem Biophys Res Commun,2007;357:264-269 [31]章海凤，刘未艾，常小荣，等.隔药饼灸对功能性胃肠病肝郁脾虚模型大鼠结肠5-HT含量及中枢c-fos的影响[J].中华中医药杂志, 2014;29(9):2915-2919

[32]王深皓，董蕾，李路，等.5-HT4受体对人消化间期小肠运动调控及其机制研究[J].胃肠病学和肝病学杂志,2014;23(3):311-314 [33]PRAUSE AS, STOFFEL MH, PORTIER CJ, et al. Expression and function of 5-HT7 receptors in smooth muscle preparations from equine duodenum, ileum, and pelvic flexure[J]. Res Vet Sci,2009;87(2):292-299

116

致**谢**

“雄关漫道真如铁，而今迈步从头越。”回首三年的研究工作始终是在导师张红星教授的指导下进行的。我首先要向导师张红星教授 致以最真挚的感谢和最崇高的敬意！导师治学严谨、一丝不苟，对待工作积极探索、求真务实、精益求精、孜孜不倦，导师踏实奋进、雷 厉风行、谦虚诚恳、积极乐观人格魅力深深的感染了我，是我终生学 习的楷模。他给予我们在困境中乐观向上的正能量，是我们的幕后英 雄，一点一滴引领我们攀登科学和人生的高峰，并且在遇到逆境和低 谷时，用他的乐观积极的态度、海纳百川的胸襟一次次地给我们鼓励 和帮助，重拾我们的信心和勇气。

其次，我要真诚感谢武汉市第一医院针灸科、实验室的全体医护工作人员给予的帮助和支持！我要感谢在课题实验中给予热情支持和无私帮助的武汉市第一医院针灸科周利主任，检验科崔天盆主任，放射科韩瑞医师，感谢湖北中医药大学针灸基础教研室杜艳军教授和针灸教研室李佳老师，杨云师妹、辛玉师妹、何权师弟以及程艳萍师姐， 感谢我的同窗曹婷博士、望庐山博士、卢继东博士、陈丽博士，因为你们的关心和帮助，让我在度过了这人生中最有意义的三年时间，并且收获了我的研究成果，你们是我人生经历过的最美丽的风景。

最后，我要特别感谢我的母亲，是她伟大无私的母爱让我能够坚持走到今天，虽然她是一个平凡的母亲，但是她给了我生命和生活的 意义，给予我无私的爱和理解。

谨向为本研究作出牺牲的实验大鼠致以崇高的敬意！谨向在本文中被参考引用文献的国内外专家学者们致以最崇高的敬意和最诚挚的谢意！

告别过去得与失，不畏前方艰险旅途，我将继续奋力前行，回报所有给予我关心和帮助的人。

117