

DOI: 10.3969/j.issn.1006-9771.2013.10.010

· 综述 ·

# 针刺干预脊髓损伤肠道功能障碍生物钟基因研究进展

朱毅<sup>1</sup>, 李凝<sup>2</sup>

**[摘要]** 脊髓损伤后, 结肠运动生物节律性丧失, 该节律性的分子基础即“钟基因”, 本文对于针刺干预该基因的作用机制进行综述。

**[关键词]** 脊髓损伤; 钟基因; 针刺; 综述

**Mechanism of Impacts of Acupuncture on Genes in the Disorders of Gastrointestinal after Spinal Cord Injury (review)** ZHU Yi, LI Ning, the 2nd Clinical Medical School, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, Jiangsu, China

**Abstract:** The gastrointestinal motility in which clock genes play a role as molecular basis loses rhythm after spinal cord injury. This article reviewed the mechanism of impacts of acupuncture on the genes.

**Key words:** spinal cord injury; clock genes; acupuncture; review

**[中图分类号]** R651.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1006-9771(2013)10-0939-03

**[本文著录格式]** 朱毅, 李凝. 针刺干预脊髓损伤肠道功能障碍生物钟基因研究进展[J]. 中国康复理论与实践, 2013, 19(10): 939-941.

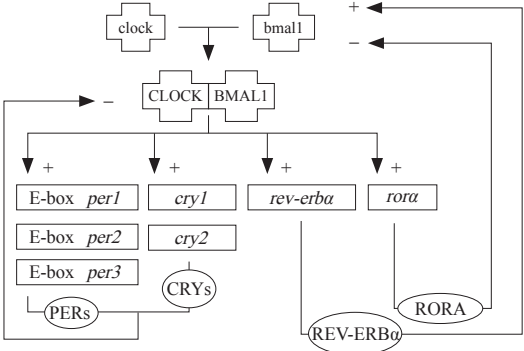
神经源性肠功能障碍(neurogenic bowel)逐渐被认为是影响脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)患者身心健康的一个重要因素<sup>[1-3]</sup>。20 世纪末国外调查示, 约 1/3 的脊髓损伤患者认为脊髓损伤稳定后直、结肠功能障碍比膀胱及性功能障碍对身心健康的影响更严重, 其中 41% 患者认为排便功能障碍是中等或严重影响寿命的问题<sup>[1]</sup>。脊髓损伤后, 整个结肠传输延迟, 肠平均内容物传输速度明显减慢<sup>[1,4]</sup>; 结肠基本电节律(basic electrical rhythm, BER)发生明显紊乱、频率降低; 肠道蠕动(主要单袋结肠、远端结肠)和直肠肛管的协调性丧失<sup>[5]</sup>。目前的研究热点——肠肌丛的 Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)虽然作为肠道慢波活动的起搏器和传导者<sup>[6-7]</sup>, 但产生的慢波达到阈值才能完成起搏活动<sup>[8]</sup>, 因此难以解释结肠功能障碍。目前肠道节律运动研究显示, 肠道肌间神经丛内钟基因(clock gene)主要调节结肠节律性运动, 并在脱离节律相位的作用核心——视交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN)时, 其调节作用仍然存在<sup>[9]</sup>。针刺研究发现足三里可以对脊髓损伤胃肠动力障碍有调整作用, 具有经济性、安全性、便捷性, 动物实验亦提供相应依据<sup>[10-11]</sup>。因此针对脊髓损伤结肠功能障碍, 针刺对结肠节律性收缩、整体周期性运动的调节作用及机制的进一步明确, 对缓解脊髓损伤患者肠道症状具有重要意义。

## 1 *per2* 基因与脊髓损伤后肠功能障碍

### 1.1 钟基因与结肠节律性收缩

结肠运动具有生物节律性, 该节律性的分子基础即“钟基因”( *per-1, 2, 3, clock, cry1-2, bmal1, tim, rev* 等)及其产物<sup>[12]</sup>, 见图 1。CLOCK/BMAL1 复合物启动周期性节律(circadian rhythmicity), 同时促进 *per1*、*per2*、*per3* 基因转录-翻译, 产生蛋白产物抑制 CLOCK/BMAL1 引起的周期性节律。鼠和人体都存在 *per1*、*per2*、*per3* 3 种亚型, 其中只有 *per2* 在中枢和外周组织都有表达, 调控节律的周期和振幅。结肠中 *per2* 基因位于黏

膜上皮细胞和纵肌肌间神经丛(longitudinal muscle myenteric plexus, LMMP)神经节细胞内——富集调节结肠运动的神经递质, 其表达呈现周期性, 并能脱离 SCN 单独存在<sup>[12-13]</sup>。*per2* 基因控制神经型一氧化氮合成酶(nNOS)基因的周期性转录-翻译(主要为 micro RNA), 产生的 nNOS 合成 NO, 一方面抑制肠外副交感神经节后递质乙酰胆碱(ACh)去极化作用; 一方面使平滑肌细胞膜超极化, 产生抑制性接头电位(IJPs), 破坏或明显减少环肌和纵肌自发性电节律性活动, 降低慢波波幅值。直接影响到周围平滑肌, 调节结肠节律性收缩<sup>[9]</sup>。因此, *per2* mRNA 和 nNOS mRNA 对结肠节律性收缩起重要作用。



注: 首先 CLOCK/BMAL1 复合物转录 *per-*、*cry-*、*rora*-和 *rev-erba* 基因, 随后 PER 和 CRY 蛋白反过来抑制 CLOCK/BMAL1 复合物的转录, REV-ERBA 抑制 *bmal1* 的转录, RORA 促进 *bmal1* 的转录。

图 1 钟基因生物节律反馈路径

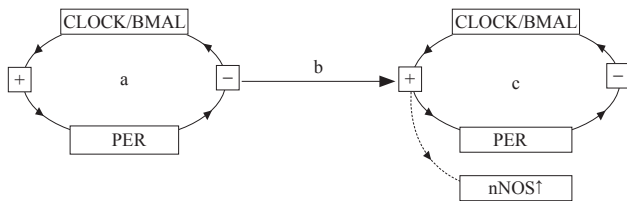
### 1.2 *per2* 基因和结肠功能障碍

结肠运动的周期性会因外界环境变化打破, 如时差、轮班制、疾病等, 导致腹胀不适及大便异常<sup>[9,14-19]</sup>等症状产生, 这些临床表现在脊髓损伤患者中频繁出现。结肠运动异常与结肠内

基金项目: 1.2012 年国家自然科学基金(No. 81202735); 2.江苏省高校“青蓝工程”优秀青年骨干教师项目。

作者单位: 1.南京中医药大学第二临床医学院, 江苏南京市 210046; 2.中南大学湘雅二医院康复医学科, 江苏南京市 410011。作者简介: 朱毅(1981-), 男, 江苏南京市人, 博士, 讲师, 副主任治疗师, 主要研究方向: 中西医结合康复。

“分子钟”(即钟基因)<sup>[9]</sup>和 nNOS 紊乱有关。研究显示,疾病导致机械-电活动显示结肠蠕动和节律性收缩减弱时,PER 蛋白表达增加,提示 *per2* mRNA 增加,促进 nNOS mRNA 转录加快(见图2),合成 NO 抑制副交感节后纤维 ACh 释放,出现结肠平滑肌舒张。但脊髓损伤模型大鼠结肠运动的周期性有待研究,从大便失禁或便秘等排便时相及 BER 紊乱<sup>[5]</sup>推测结肠运动周期性被打破,结肠内“分子钟”破坏。



注: a 为 SCN 内核心钟, c 为周围组织的钟基因,核心钟与昼夜交替同步并调节周围钟基因,该调节机制 b 未知。

图2 钟基因抑制性作用调节结肠运动

## 2 *per2* 基因与 ACh

目前已知胃肠道神经系统中最主要的兴奋性神经递质是 ACh<sup>[20]</sup>,最主要的抑制性神经递质是 NO,两型神经元遍布整个消化道,对胃肠道运动、消化道分泌吸收、平滑肌功能以及胃肠的电生理均有重要的作用。Hoogerwerf 等发现 ACh 去极化作用受 nNOS 周期性调节而呈现结肠运动的周期性:正常情况下晨起 1 h(ZT1)内结肠收缩活动及排便增加,晨起 12 h 后(ZT13)明显减弱;使用 Na<sup>+</sup>通道阻断剂神经毒性河豚毒素(neurotoxin TTX)后,结肠收缩在 ZT1 显著加强<sup>[21-22]</sup>;使用 nNOS 拮抗剂 L-NAME 时,结肠收缩在 ZT1 显著加强<sup>[23-25]</sup>;大鼠敲除 nNOS 基因后两段时相结肠收缩和排便均减弱,且无显著性差异<sup>[21]</sup>。而 nNOS 周期性变化依赖 *per2* 基因对其转录-翻译的调节。

## 3 *per2* 基因与 Cajal 间质细胞

结肠节律的发生起源于结肠内的 ICC。ICC 节律性产生慢波(slow wave, SW)即 BER,并在由 ICC 组成的网络中传播,最后经 ICC 和平滑肌细胞间的缝隙连接传播至平滑肌细胞而引发平滑肌细胞周期收缩。超极化激活性环核苷酸门控性阳离子非选择性通道(hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation nonselective channel, HCN)有 4 个亚型,其中 HCN1 特异地分布在胃肠道肌间神经丛周围 ICC 细胞膜上及细胞内质网内,可能是 ICC 产生自发电节律的起始通道<sup>[26]</sup>。它受儿茶酚胺类(去甲肾上腺素)、ACh 等神经递质调节。结肠周期性运动主要由钟基因和 nNOS 调节<sup>[9,21]</sup>,nNOS 的周期性变化使 ACh 周期性产生去极化作用,因此推测这种周期性变化影响 HCN1 周期性开放,使结肠产生周期性节律性收缩。

## 4 电针足三里对结肠运动的调节作用

### 4.1 横断大鼠脊髓对电针作用的影响

韩济生等研究发现, T<sub>10</sub>或 T<sub>11</sub>处切断脊髓后,给 3 V 恒频电针足三里一律无效,只有用 3 V 变频电针或 9 V 强电针时才能使用尾反射潜伏期(TFL)轻度升高<sup>[27]</sup>。说明电针足三里的传入信息虽有可能在脊髓水平抑制尾反射,但更重要的是需要上传至胸髓以上的结构(例如低位脑干),再通过下行抑制通路,才能对尾反射产生强烈的抑制作用。足三里穴区的皮肤和肌

肉有腓浅神经和腓深神经支配。穴区的传入冲动则是通过躯体神经和血管(主要是胫前动脉)壁的神经丛两条途径上行,投射至 T<sub>6</sub>~S<sub>1,3</sub> 脊神经节<sup>[28]</sup>,与支配结肠的肠外副交感神经节有重叠部分,故高频电针强刺激对横断脊髓的大鼠仍可起到刺激作用。但结肠本身有内在神经系统——肠神经系统(由包埋入胰腺、胆囊及胃肠道壁内的神经节及初级、次级、第三级神经纤维构成,在消化道管壁形成不同层次的神经丛),使大鼠结肠离体后仍产生周期性节律性收缩。这些结构成为电针足三里对结肠运动调节的物质基础。

### 4.2 电针足三里对结肠运动的调节

既往大量临床资料显示,电针足三里对胃肠运动有双向调节作用,但对脊髓损伤后结肠运动关注较少,由于脑肠肽概念的提出,人们对肠神经系统起主要作用的神经递质 ACh、NO 关注减少。一项临床研究显示,电针显著缩短患者全结肠及各节段结肠的结肠转运时间(colonic transit time, CTT),血清胃动素(MTL)、缩胆囊素(CCK)水平上升,血管活性肠肽(VIP)水平有所下降<sup>[29]</sup>。动物实验中,艾灸足三里能使猫胃运动波幅明显升高,具有增强胃运动的作用;而在侧脑室注入阿托品后,艾灸增强效应消失,提示这种作用与中枢胆碱能神经 M 受体有关<sup>[30]</sup>。杨波等在针刺大鼠足三里及下巨虚两穴后,大鼠肠肌间丛中前脑啡肽原 mRNA 的表达明显增加,使脑啡肽的合成增加,从而调节胃肠功能<sup>[31]</sup>。雷亚宁等电针大鼠双侧足三里后,大鼠小肠壁黏膜下神经丛和肌间神经丛内脑啡肽免疫反应性明显降低,而 SP 免疫反应性明显增高,可能 SP 在针刺后释放减少<sup>[32]</sup>。这些研究说明针灸体表刺激即可上行到中枢,通过中枢下行到周围或直接作用于周围,对肠道运动起到调节作用。

洪丽莉等对脊髓损伤后肠功能障碍大鼠经过电针足三里的治疗,电针组与模型组和穴旁组相比较, iNOS 和 iNOS mRNA 的表达显著减少<sup>[10]</sup>。提示胃肠壁内氮能神经合成 NO 增多,一方面延缓胃的排空率,另一方面使小肠的推进比下降,这与脊髓损伤后胃肠动力下降的结果相一致;治疗后,与模型组比较,莫沙必利组、电针组胃肠壁内 NOS 阳性表达显著减弱,提示胃肠壁内氮能神经合成 NO 减少,降低了对平滑肌的抑制作用,进而提高胃、十二指肠运动,这亦与电针脊髓损伤大鼠的胃肠动力的提高一致。

电针频率对疗效有重要的影响,不同频率的电针有不同的神经化学机制。韩济生等认为不同脑区中的核团对不同频率的刺激信号有所偏好,不同的频率能促进不同的中枢神经递质的释放,脉冲的频率对于激活中枢神经系统中物质释放起着关键作用,低频(2 Hz)促进前脑啡肽原(PPE)表达,而高频(100 Hz)电针促进前强啡肽(PPD)的表达,变频促进脑啡肽和强啡肽的共同释放,显示出明显的频率响应的特异性<sup>[10]</sup>。洪丽莉等<sup>[10]</sup>和贾萍<sup>[33]</sup>的研究认为,对于脊髓损伤所伴随的胃肠功能障碍,选取低频的 3 Hz 电针频率最为适宜。

## 5 小结

以上研究证据提示,电针足三里很可能作为外界刺激和改变 *per2* 基因周期性变化,影响 nNOS 基因的周期性转录-翻译,使产生 nNOS 在时相上周期性紊乱或周期性未改变而使恢复数量正常,使其恢复对肠外副交感神经节后递质 ACh 去极化的周期性调节作用,从而促进结肠节律性收缩。另外足三里部位的传入神经——腓深神经与支配结肠的副交感阶段发生重叠,因

此针刺足三里还可通过较弱的节段反射, 促进副交感节后纤维释放 ACh, 产生的电流与慢波结合达到阈值形成动作电位, 促进结肠收缩。所以研究电针足三里对 *per2* 基因调节脊髓损伤后结肠周期性节律性运动的干预影响, 可以进一步明确脊髓损伤肠功能障碍的发病机制及针刺干预机制, 对改善脊髓损伤患者肠功能障碍, 具有较大的理论指导意义和较高的临床运用价值。

#### [参考文献]

- [1] 王红星, 周士枋. 脊髓损伤后肠道功能障碍[J]. 中国康复理论与实践, 2002, 8(3): 174-177.
- [2] De Vivo MJ, Vogel LC. Epidemiology of spinal cord injury in children and adolescents [J]. J Spinal Cord Med, 2004, 27(Suppl): S4-10.
- [3] Noonan VK, Kopec JA, Zhang H, et al. Impact of associated conditions resulting from spinal cord injury on health status and quality of life in people with traumatic central cord syndrome [J]. Arch Phys Med Rehabil, 2008, 89(6): 1074-1082.
- [4] Liu CW, Huang CC, Yang YH, et al. Relationship between neurogenic bowel dysfunction and health-related quality of life in persons with spinal cord injury [J]. J Rehabil Med, 2009, 41(1): 35-40.
- [5] 白春宏. 骶神经电刺激对脊髓损伤后肠道菌群移位和内毒素血症的实验研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2010.
- [6] Wahl-Schott C, Biel M. HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function [J]. Cell Mol Life Sci, 2009, 66(3): 470-494.
- [7] Harzheim D, Pfeiffer KH, Fabritz L, et al. Cardiac pacemaker function of HCN4 channels in mice is confined to embryonic development and requires cyclic AMP [J]. EMBO J, 2008, 27(4): 692-703.
- [8] Herrmann S, Stieber J, Ludwig A. Pathophysiology of HCN channels [J]. Pflugers Arch, 2007, 454(4): 517-522.
- [9] Hoogerwerf WA. Role of clock genes in gastrointestinal motility [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010, 299(3): 549-555.
- [10] 洪丽莉. 脊髓损伤模型大鼠的胃肠动力障碍及电针调节作用的研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2008.
- [11] 胡波, 郭长青. 足阳明胃经生理功能解析[J]. 中华中医药杂志, 2007, 22(2): 90-92.
- [12] Hoogerwerf WA, Hellmich HL, Cornélissen G, et al. Clock gene expression in the murine gastrointestinal tract: endogenous rhythmicity and effects of a feeding regimen [J]. Gastroenterology, 2007, 133(4): 1250-1260.
- [13] Sládek M, Rybová M, Jindraková Z, et al. Insight into the circadian clock within rat colonic epithelial cells [J]. Gastroenterology, 2007, 133(4): 1240-1249.
- [14] Caruso CC, Lusk SL, Gillespie BW. Relationship of work schedules to gastrointestinal diagnoses, symptoms, and medication use in auto factory workers [J]. Am J Ind Med, 2004, 46(6): 586-598.
- [15] Mendoza J. Circadian clocks: setting time by food [J]. J Neuroendocrinol, 2007, 19(2): 127-137.
- [16] Andrzejczak D, KapaBa-Kempa M, Zawilska JB. Health consequences of shift work [J]. Przegl Lek, 2011, 68(7): 383-387.
- [17] Wang XS, Armstrong ME, Cairns BJ, et al. Shift work and chronic disease: the epidemiological evidence [J]. Occup Med (Lond), 2011, 61(2): 78-89.
- [18] Lu WZ, Gwee KA, Ho KY. Functional bowel disorders in rotating shift nurses may be related to sleep disturbances [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2006, 18(6): 623-627.
- [19] Knutsson A, Bøggild H. Gastrointestinal disorders among shift workers [J]. Scand J Work Environ Health, 2010, 36(2): 85-95.
- [20] Cellek S, Thangiah R, Jarvie EM, et al. Synergy between 5-HT<sub>4</sub> receptor activation and acetylcholinesterase inhibition in human colon and rat forestomach [J]. Neurogastroenterol Motil, 2008, 20(5): 539-545.
- [21] Hoogerwerf WA, Shahinian VB, Cornélissen G, et al. Rhythmic changes in colonic motility are regulated by period genes [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010, 298(2): 143-150.
- [22] Wood JD. Excitation of intestinal muscle by atropine, tetrodotoxin, and xylocaine [J]. Am J Physiol, 1972, 222(1): 118-125.
- [23] Aubé AC, Blottière HM, Scarpignato C, et al. Inhibition of acetylcholine induced intestinal motility by interleukin 1 beta in the rat [J]. Gut, 1996, 39(3): 470-474.
- [24] Van Geldre LA, Lefebvre RA. Interaction of NO and VIP in gastrointestinal smooth muscle relaxation [J]. Curr Pharm Des, 2004, 10(20): 2483-2497.
- [25] Wiklund CU, Wiklund NP, Gustafsson LE. Modulation of neuroeffector transmission by endogenous nitric oxide: a role for acetylcholine receptor-activated nitric oxide formation, as indicated by measurements of nitric oxide/nitrite release [J]. Eur J Pharmacol, 1993, 240(2-3): 235-242.
- [26] 章鹏宇, 朱琳, 王景杰. 大鼠小肠缺血改变后电生理及 HCN-1 表达的变化[J]. 山西医科大学学报, 2011, 42(10): 802-804.
- [27] 韩济生, 张敏. 横断大鼠脊髓对电针镇痛和吗啡镇痛的影响[J]. 科学通报, 1986, (3): 228-231.
- [28] 李瑞午, 李翠红, 汪智民. 足三里穴区不同层次感觉和运动神经元的节段性分布研究[J]. 中国针灸, 2000, 20(3): 161-163.
- [29] 王新宇, 石现, 何磊. 电针对急性胰腺炎患者胃肠动力的影响及其机制研究[J]. 针刺研究, 2007, 32(3): 199-200.
- [30] 孙世晓, 王新梅, 张江红. 艾灸猫“足三里”穴增强胃运动的中枢作用机理研究[J]. 针灸临床杂志, 2001, 17(4): 53-54.
- [31] 杨波, 殷光甫, 曹福元. 电针对大鼠肠肌间丛神经元前脑啡肽原 mRNA 的影响[J]. 针刺研究, 1999, 24(2): 135-137.
- [32] 雷亚宁, 胡道松, 茹立强. 电针足三里穴对大鼠小肠 ENK 能和 SP 能神经的影响[J]. 上海针灸杂志, 1995, 14(6): 268.
- [33] 贾萍, 田宁. 不同频率电针对小鼠胃肠推进功能的影响[J]. 江西中医学院学报, 2004, 16(3): 42-44.

(收稿日期: 2012-11-29)