

结肠电刺激对肠易激大鼠模型内脏高敏感性的影响

覃晓日¹, 谭 琰², 孙晓宁^{3*}

(1. 南华大学, 湖南 衡阳 421001; 2. 海南医学院附属医院消化内科; 3. 海南省人民医院消化内科)

摘要: **目的** 探讨结肠电刺激对应激诱导产生的内脏高敏感性的影响。 **方法** 48 只大鼠等分为模型组、对照组, 模型组由双重应激诱导产生, 其内脏高敏感性程度由肌电图及腹部撤退反射的分数来评估, 对照组不接受双重应激。建模后在所有大鼠的结肠浆膜层包埋刺激电极, 待手术恢复后分别对各组大鼠进行长脉冲电刺激、短串脉冲电刺激、无电刺激, 刺激结束后再次对模型组、对照组大鼠的内脏高敏感性程度进行评估。 **结果** 通过应激诱导, 模型组大鼠对结肠扩张压力的敏感性与对照组比较有显著增加 ($P < 0.01$)。串短脉冲、长脉冲结肠电刺激相较无电刺激能够显著降低大鼠的内脏高敏感性 ($P < 0.01$)。 **结论** 串短脉冲、长脉冲结肠电刺激能够显著降低大鼠内脏高敏感性。

关键词: 结肠电刺激; 肠易激综合征; 内脏高敏感性; 肌电图

中图分类号: R574.6 **文献标识码:** A

Effect of Colonic Electrical Stimulation on Visceral Hypersensitivity in Rats with Irritable Bowel Syndrome

QIN Xiaori, TAN Yan, SUN Xiaoning

(University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To investigate whether stress-induced visceral hypersensitivity could be alleviated by colonic electrical stimulation (CES). **Methods** 48 male rats were divided into model group and control group, visceral hypersensitivity model was induced by a 6 d heterotypic intermittent stress, the extent of visceral hypersensitivity was quantified by electromyography and abdominal withdrawal reflex scores. After the modeling, all rats were equipped with electrodes in descending colon. After recovering from surgery, CES with long pulses, CES with trains of short pulses, sham CES was performed. Finally, the extent of visceral hypersensitivity will be quantified again in model group. **Results** Rats displayed an increased sensitivity to colorectal distention, after a 6 d heterotypic intermittent stress compared to control group at different distention pressures ($P < 0.01$). CES with trains of short pulses and long pulses significantly attenuated the hypersensitive responses to colorectal distention compared with sham CES group ($P < 0.01$). **Conclusion** CES with long pulses, CES with trains of short pulses all can significantly alleviate stress-induced visceral hypersensitivity.

Key words: colonic electrical stimulation; irritable bowel syndrome; visceral hypersensitivity; electromyography

肠易激综合征 (irritable bowel syndrome, IBS) 是一组持续或间歇发作, 以腹痛、腹胀、排便习惯或大便性状改变为临床表现, 而缺乏胃肠道结构和生化异常的功能紊乱性疾病^[1]。IBS 目前依旧以症状学作为临床诊断和研究, 其病理生理学基础主要是胃肠动力学异常和内脏高敏感性, 内脏高敏感是指内

脏对正常生理性或伤害性刺激的感觉阈值降低, 导致异常的内脏痛觉形成和异常的传出信号通过迷走通路与肠神经系统的联系, 进而影响肠道运动功能。IBS 发病率高、病程长、药物治疗效果有限、影响患者生活质量, 已成为全球性的难题。现今, 体表穴位电刺激已经被广泛用于治疗各种疼痛病症和胃肠道疾病, 包括肠易激综合征、功能性消化不良、便秘、腹泻等^[2]。相比之下, 结肠电刺激 (colonic electrical stimulation, CES) 的研究远远落后于体表穴位电刺

激、神经电刺激、心脏起搏等,在近十年中,一些用来调节大肠蠕动功能的结肠电刺激模式在人体和动物模型中运用^[3],Shafik 等^[4]研究了 9 位 IBS 患者,CES 显著减轻了 7 人 IBS 症状,但其机制尚不明确。研究 CES 治疗慢性内脏痛仍处于起步阶段,很多科学证据是零碎的甚至是矛盾的,因此对 CES 的疗效及其机制的进一步调查是值得的。最近有研究者开发了由双重应激诱导产生 IBS 大鼠模型的新方法^[5-6],结果显示该大鼠模型的结肠组织没有出现明显的炎症或损伤,但在结肠扩张压力(colorectal distention, CRD)下产生的内脏高敏感性程度显著高于对照组,该模型符合 IBS 患者的主要特征,可作为研究 CES 治疗效果的对象。本研究的目的是为了调查 CES 是否对 IBS 大鼠内脏高敏感性产生影响。

1 材料与方法

1.1 动物 48 只体重 195 ~ 205 g 的雄性 SD 大鼠(湖南史莱克金达实验动物有限公司提供),随机分为对照组和模型组,然后每组又平分分为无电刺激组、长电脉冲刺激组、串短脉冲刺激组,每组 8 只,所有大鼠在恒定温度和湿度的环境中自由进食与饮水,实验前一晚所有大鼠禁食不禁水,海南省药物安全性评价中心动物护理和使用委员会批准了该手术和实验方案。

1.2 肠易激综合征大鼠模型的建立

1.2.1 双重应激诱导 模型组大鼠需要完成为期 6 天的双重应激诱导,如文献[5]中所述包括 40 min 的束缚应激及 20 min 的强迫游泳应激。两种压力在上午 8 时 ~ 11 时实施,束缚应激是将大鼠限制在一个透明的塑料容器内(直径 6 cm × 长度 18 cm),容器两头都有 2 cm 直径的开口便于大鼠正常呼吸。休息 1 h 后实施强迫游泳应激,室温下(约 22 ℃)将大鼠置于一只装有水的塑料桶内(高 35 cm × 直径 24 cm),水面距桶上缘约 15 cm。对照组大鼠被带到实验室而不施加压力。

1.2.2 肌电图(EMG, electromyography)测量 造模结束后,对所有大鼠(包含对照组及模型组)进行肌电图测量。测量方法为:将带气囊尿管(F6, 美国巴德公司)涂抹凡士林后经大鼠肛门插入 7 cm 到达结肠,在尾部距肛门 2 cm 处固定,一对电极(美国明尼阿波利斯市美敦力公司)被植入在腹外斜肌外面^[7],电极线另一头与测试设备连接,大鼠置于固

定器(20 cm × 8 cm × 8 cm)(北京合力科创科技发展有限公司)适应 30 min。结肠分级扩张压力是通过注射不同容积的水(1 mL H₂O, 1.5 mL H₂O, 2 mL H₂O)膨胀导尿管气囊完成的^[8],扩张持续 20 s 后休息 2 min(防止肠道缺血坏死)。在滤波为 500 Hz 条件下将肌电信号放大,记录于 BL-420E 生物机能试验系统中(中国成都泰盟科技有限公司),由计算机程序算出每 20 s 膨胀压力下的肌电曲线面积值(AUC)^[9],通过每次膨胀压力期的值减去前 20 s 的基线值得到净值。每只大鼠在 3 种扩张压力下各测试两次,平均值作为该大鼠的肌电评分用于之后的统计分析。

1.2.3 腹部撤回反射分数(abdominal withdrawal reflex scores, AWRs)测量 内脏高敏感性敏程度同样可以依靠不同结肠压力下大鼠的行为反应来评估。通过盲法原则观察大鼠 AWR 分数,评分标准^[10]参考表 1,将各大鼠在每种膨胀压力下的 AWR 评分测试两次,取平均值并用于之后的统计分析。另外,执行 AWRs 及 EMG 分析的工作人员将不参与分配对照组和模型组、假电刺激组和电刺激治疗组等事宜。

表 1 腹壁撤退反射(AWR)评分标准

分值	标准
0 分	给予结直肠扩张刺激时大鼠情绪基本稳定
1 分	给予刺激时变得不稳定,偶尔扭动头部
2 分	腹背部肌肉轻微收缩但腹部未抬离地面
3 分	腹背部肌肉较强烈收缩并把腹部抬离地面
4 分	腹部肌肉强烈收缩,腹部呈弓形并把腹部、会阴部抬离地面

1.3 手术方法 水合氯醛(4 mg/kg)腹腔麻醉大鼠后行腹部正中切口暴露结肠,将一对单相心脏起搏电极(美国明尼阿波利斯市美敦力公司)包埋在距肛门 4 cm 的降结肠浆膜层^[7],两支电极相距约 1 cm,荷包缝合固定。电极线的另一端循着皮下从大鼠颈后部穿出固定和编号,待动物从手术中恢复后行进一步实验(通常为术后 1 周)。

1.4 结肠电刺激 电刺激由 BL-420E 生物机电系统提供。长脉冲 CES 选择的是频率 20 cpm、脉冲宽度 200 ms、振幅 10 mA(恒流输出)的电刺激,短串脉冲 CES 使用的是通电 2 s 后断电 3 s 的成串刺激,频率 40 Hz,脉冲宽度 4 ms,脉冲振幅 10 mA。根

据已有的动物实验^[11]显示此参数的结肠电刺激有促进结肠传输作用。手术康复后,模型组及对照组大鼠根据刺激方法的差异分别随机分为 3 小组(每组 8 只):无电刺激、长脉冲 CES、短串脉冲 CES。完成 40 min 的电刺激后,再次对模型组大鼠的 EMG 和 AWR 分数进行测定。

1.5 统计学方法 使用 SPSS16.0 软件(美国芝加哥)进行统计分析,数据均使用 $\bar{x} \pm s$ 标准差表示,双向重复测量的方差分析用于评估各组间的差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 联合应激诱发了内脏高敏感性 模型组大鼠完成 6 天的联合应激之后测定了 EMG 及 AWR

分数。对照组在 1.0、1.5、2.0 mL 容积的结肠扩张压力下的 AWR 评分分别为 1.2 ± 0.4 、 2.0 ± 0.6 和 2.5 ± 0.7 ,结束最后应激时模型组大鼠的 AWR 评分分别为 2.1 ± 0.5 、 2.9 ± 0.5 和 3.6 ± 0.5 (见图 1A),统计分析结果表明联合刺激后大鼠的腹壁撤退反射程度有显著增加($P < 0.01$,双向重复测量方差分析, $n = 24$)。为了进一步证实联合应激增加了内脏高敏感性,将两组大鼠的肌电图同样进行了对比,对照组在 1.0、1.5、2.0 mL 球囊容积结肠扩张压力下的肌电图曲线下面积值(AUCs)分别为 34.7 ± 3.6 、 43.5 ± 3.0 和 55.6 ± 3.7 ,模型组 AUC 分别为 50.1 ± 2.6 、 65.6 ± 4.4 和 82.7 ± 5.0 (见图 1B、C),统计分析结果表明联合刺激后的大鼠肌电图面积有显著增加($P < 0.01$,双向重复测量方差分析, $n = 24$),充分证明联合刺激可诱发内脏高敏感性。

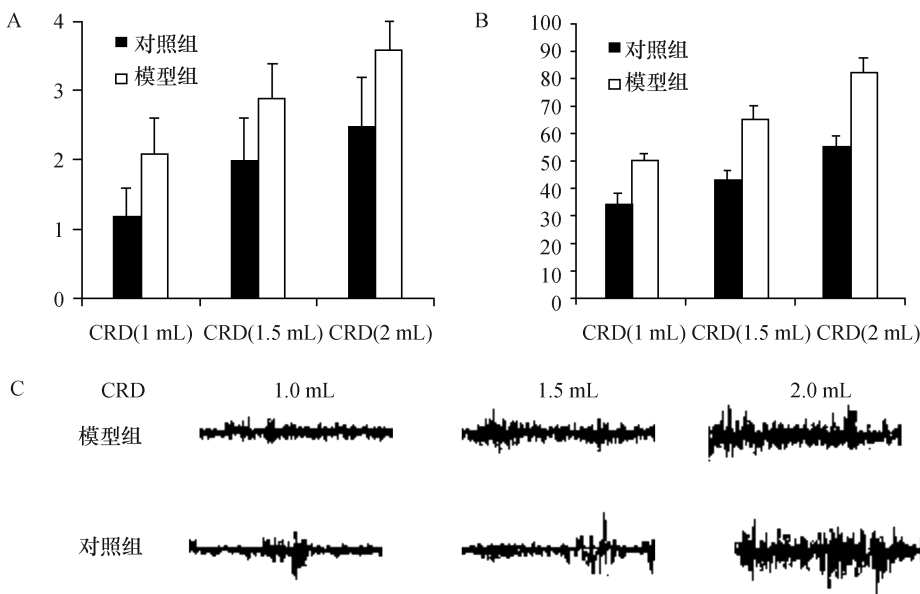


图 1 联合应激诱发了内脏高敏感性 A:AWR 评分;B、C:AUC

2.2 CES 治疗抑制了 IBS 大鼠的内脏高敏感性

将 HIS 大鼠的 CES 组与假 CES 组的 AWR 评分及 EMG 曲线下面积进行比较,来确定联合刺激诱发的内脏高敏感性能否被 CES 所抑制,为了证明 CES 具有明确的止痛作用,假 CES 组植入了电极但不提供电刺激,AWR 评分和 EMG 活动在电刺激结束后再次进行评估。结肠扩张压力、CES 两种因素都显著影响了 AWRs 的值($n = 8$,双向重复测量方差分析,结肠压力的效果, $P < 0.01$; CES 治疗效果, $P < 0.01$)。CES 治疗显著降低了模型组大鼠的 AWR

分数(在 1mL 球囊容积的结肠扩张压力下,假 CES 组、短串脉冲 CES 组、长脉冲 CES 组的 AWRs 值为 2.0 ± 0.6 、 1.4 ± 0.5 、 1.6 ± 0.5 ;在 1.5mL 容积的扩张压力下为 2.7 ± 0.5 、 2.0 ± 0.8 、 2.1 ± 0.7 ;在 2 mL 容积的扩张压力下为 3.6 ± 0.5 、 2.7 ± 0.5 、 2.9 ± 0.4 ;CES 治疗显著降低了模型组大鼠的 AWR 评分($P < 0.01$,双向重复测量方差分析,图 2A)。为了进一步证实 CES 对肠易激大鼠产生了效果,将 CES 组与假 CES 组的 EMG 曲线下面积(AUC)进行比较,结肠扩张压力、CES 两种因素都显著影响 AUC

的值($n=8$,双向重复测量方差分析;结肠扩张压力效果, $P<0.001$;CES 的治疗效果, $P<0.001$)。(图 2B、C)CES 组相比假 CES 组的 AUC 值显著降低(假 CES 组、短串脉冲 CES 组、长脉冲 CES 组,在 1 mL 球囊容积的扩张压力下的 AUC 值为 51.2 ± 3.3 、 40.0 ± 2.7 、 43.6 ± 4.0 ;在 1.5 mL 球囊容积的扩张

压力下为 62.2 ± 4.4 、 51.7 ± 4.4 、 55.9 ± 4.1 ;在 2 mL 球囊容积的扩张压力下为 78.7 ± 5.2 、 64.2 ± 4.8 、 67.0 ± 4.2)。证明了 CES 能显著抑制内脏高敏感性,即在内脏高敏感性大鼠降结肠应用 40 min 的 CES 后能显著减轻由结肠扩张引起的疼痛。

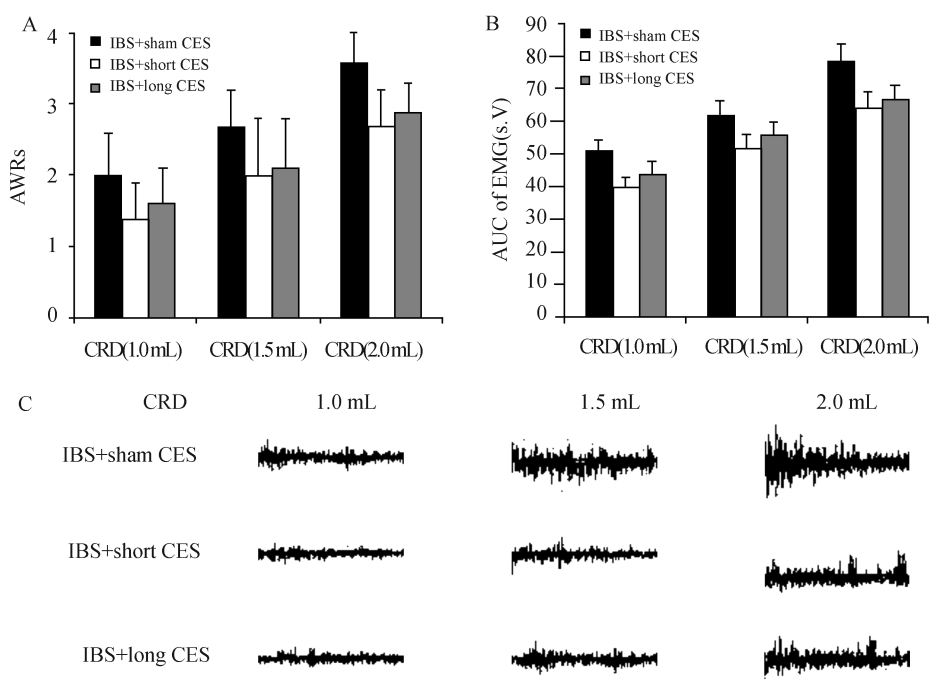


图 2 CES 治疗抑制了 IBS 大鼠的内脏高敏感性 A:AWR 评分;B、C:AUC

3 讨 论

本研究显示,CES 治疗能显著降低结肠扩张下的内脏高敏感性大鼠的 AWR 分数和 EMG 活动,明确表明 CES 对该模型具有镇痛作用。尽管普通电刺激已经在临床上常用于缓解各类疼痛^[12-13],但还没有关于 CES 治疗内脏高敏感性的系统性研究,在本试验中,两种电刺激参数的 CES 都显著抑制了大鼠的内脏高敏感性,所以未来的工作是需要进一步研究 CES 产生镇痛效果的机制,以及寻求更合适的电刺激参数来达到镇痛效果。

内脏高敏感性由多种神经递质在外周、脊髓和中枢之间调控,其部分的工作模式包括^[14]:结肠高敏感反应的痛觉输入,肠黏膜通透性增加从而诱导内脏伤害性驱动,胃肠组织的 microRNA 经由血流、微泡被递送到其它靶器官而改变外周或中枢神经系统的表达等。临床上有许多关于体表电刺激止痛机

制的研究^[15],内源性阿片类机制可以明确解释此效应,关于电刺激镇痛的阿片类机制也通过实验被证实,包括 5-HT 的调节、儿茶酚胺或肾上腺素受体拮抗剂的诱发、细胞单胺含量的消耗等^[16]。

从心脏起搏器到结肠电刺激,它基本的原理是利用不同频率的外部电流来纠正异常电节律,从而达到治疗器官功能障碍的效果^[3],结肠蠕动失常导致了腹痛的发生及排便习惯的改变,这是与 IBS 症状相符的,在本研究中,特定刺激位置及参数的选择就是为了改善肠易激综合征的症状而设定的。根据刺激参数的差异可分为长脉冲电刺激(波宽大于 10 ms),短脉冲电刺激(波宽小于 1 ms 或 5 ms)及串脉冲电刺激(由短串脉冲组成)^[17-18]。不同参数的电刺激对胃肠道产生不同的影响,Shafi 等^[4]研究显示,以 6 mA(波幅)、150 ms(波宽)以及高出结肠波基线水平频率 5% 的结肠电刺激治疗 IBS 患者,通过 6 个月疗程 7/9 的 IBS 患者症状改善;Bertschi

等^[19]在猪的盲肠给予刺激参数为 1 ms、7 ~ 15 mA、120 Hz 的短脉冲,结果显示电刺激可以诱导盲肠的收缩和结肠内容物的运动;Sevcencu 等^[20]表明,几十毫秒长脉冲可以将肌肉细胞直接去极化,而如果脉冲小于 10 ms 则通过胆碱能系统的活化诱导肌肉收缩,另一方面电刺激结肠壁产生的效果是结肠肉收缩及舒张的综合而不是单一的反应;也有研究显示结肠肌肉的舒张主要通过递质释放激活氮能通道所诱导^[21]。

本研究表明 CES 可显著抑制 IBS 大鼠的内脏高敏感性,有望成为一项治疗肠易激综合征的新方法。当然目前的研究也存在一定的局限性,大多数的电刺激模式还只是运用在动物模型中,如果要研究出适用于人类的刺激模式,进一步的实验以及刺激的方法的改进是必要的,这样才能更好的了解结肠电刺激的机制以及运用于临床。

参考文献:

- [1] Cremonini F, Talley NJ. Irritable bowel syndrome: epidemiology, natural history, health care seeking and emerging risk factors [J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2005, 34(2):189-204.
- [2] Schneider A, Streitberger K, Joos S. Acupuncture treatment in gastrointestinal diseases: a systematic review [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13:3417-3424.
- [3] Sevcencu C. Electrical stimulation-an evolving concept in the treatment of colonic motor dysfunctions [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2006, 18:960-970.
- [4] Shafik A, El-Sibai O, Shafik AA, et al. Colonic pacing in the treatment of patients with irritable bowel syndrome: technique and results [J]. *Front Biosci*, 2003, 8:1-5.
- [5] Winston JH, Xu GY, Sarna SK. Adrenergic stimulation mediates visceral hypersensitivity to colorectal distension following heterotypic chronic stress [J]. *Gastroenterology*, 2010, 138:294-304.
- [6] Zhou YY, Wanner NJ, Xiao Y, et al. Electroacupuncture alleviates stress-induced visceral hypersensitivity through an opioid system in rats [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18:7201-7211.
- [7] Larsson M, Arvidsson S, Ekman C, et al. A model for chronic quantitative studies of colorectal sensitivity using balloon distension in conscious mice-effects of opioid receptor agonists [J]. *Neurogastroenterology Motil*, 2003, 15:371-381.
- [8] Xu GY, Shenoy M, Winston JH, et al. P2X receptor-mediated visceral hyperalgesia in a rat model of chronic visceral hypersensitivity [J]. *Gut*, 2008, 57:1230-1237.

- [9] Winston J, Shenoy M, Medley D, et al. The vanilloid receptor initiates and maintains colonic hypersensitivity induced by neonatal colon irritation in rats [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132:615-627.
- [10] Ma XP, Tan LY, Yang Y, et al. Effect of electro-acupuncture on substance P, its receptor and corticotropin-releasing hormone in rats with irritable bowel syndrome [J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15:5211-5217.
- [11] 李文波, 刘诗, 钱伟, 等. 串脉冲和长脉冲结肠电刺激对大鼠结肠传输的影响 [J]. *中华医学杂志*, 2006, 86:3370-3372.
- [12] Sun S, Cao H, Han M, et al. Evidence for suppression of electroacupuncture on spinal glial activation and behavioral hypersensitivity in a rat model of monoarthritis [J]. *Brain Res Bull*, 2008, 75:83-93.
- [13] Kim HN, Park JH, Kim SK, et al. Electroacupuncture potentiates the antiallodynic effect of intrathecal neostigmine in a rat model of neuropathic pain [J]. *J Physiol Sci*, 2008, 58:357-360.
- [14] Zhou Q, Verne GN. New insights into visceral hypersensitivity-clinical implications in IBS [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011, 8:349-355.
- [15] Lin JG, Chen WL. Acupuncture analgesia: a review of its mechanisms of actions [J]. *Am J Chin Med*, 2008, 36:635-645.
- [16] Kim JH, Kim HY, Chung K, et al. Electroacupuncture reduces the evoked responses of the spinal dorsal horn neurons in ankle-sprained rats [J]. *J Neurophysiol*, 2011, 105:2050-2057.
- [17] Sallam HS, Chen JD. Colonic electrical stimulation: potential use for treatment of delayed colonic transit [J]. *Colorectal Dis*, 2013, 15:244-249.
- [18] Vaucher J, Cerantola Y, Gie O, et al. Electrical colonic stimulation reduces mean transit time in a porcine model [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2010, 22:88-92.
- [19] Bertschi M, Schlageter V, Vesin JM, et al. Direct electrical stimulation using a battery-operated device for induction and modulation of colonic contractions in pigs [J]. *Ann Biomed Eng*, 2010, 38:2398-2405.
- [20] Sevcencu C, Rijkhoff NJ, Sinkjaer T. Muscular vs. neural activation in propulsion induced by electrical stimulation in the descending colon of rats [J]. *Neuromodulation*, 2005, 8:131-140.
- [21] Liu S, Chen JD. Colonic electrical stimulation regulates colonic transit via the nitrergic pathway in rats [J]. *Dig Dis Sci*, 2006, 51:502-505.