小型猪四肢荧光素钠循经迁移的初步观察

熊枫¹, 宋晓晶¹, 贾术永¹, 王广军¹, 李宏彦¹, 顾鑫², 王泽³, 张维波^{1*}

1. 中国中医科学院针灸研究所, 北京 100700;

2. 北京中医药大学针灸推拿学院, 北京 100029;

3. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053

* 联系人, E-mail: 1507307638@qq.com

收稿日期: 2020-05-07; 接受日期: 2020-07-16; 网络版发表日期: 2020-09-21

中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(批准号: ZZ20191606)资助

摘要 经络是中医理论的核心概念. 以往大量的研究表明, 经络存在于间质中, 其中可能有组织液的流动. 荧光素钠是一种亲水的小分子荧光物质, 用经络定位仪测量5只健康小型猪四肢的低电阻点(low impedance point, LIP)及其构成的循经低电阻线(low impedance line along meridians, LILM), 然后在LIP及旁开高电阻点(high impedance point, HIP)注射微量荧光素钠. 使用装有窄带滤色镜的数码相机与一组蓝光闪光灯采集注射前及注射后不同时刻的荧光迁移轨迹图像, 观察荧光素迁移分布的特征. 对部分体表荧光素轨迹, 采用静脉显像仪定位浅表静脉后比较两者的位置. 对部分体表荧光素轨迹, 在干冰冷冻后观察其横切面的分布特征. 结果发现, 沿四肢的LILM共出现可重复的7条体表循经迁移轨迹, 其中前肢外侧和内侧各有三条, 后肢内侧有一条, 迁移轨迹的平均长度为5.13 cm, 而在HIP注射后仅出现接近圆形的局部扩散, 两者的长度、宽度和长宽比均有极显著性差异($P < 0.01$). 迁移轨迹与LILM的吻合度为81.4%, 与体表静脉投影不重合, 迁移轨迹在横切面的形状多为倒三角形, 沿肌肉间隙分布, 提示经络可能是一种未知的间质通道.

关键词 经络, 荧光素钠, 循经低电阻线, 间质通道, 小型猪

几千年来, 经络学说一直指导着中医临床实践, 但对于经络的客观存在与实质的研究在20世纪中叶才刚刚起步. 20世纪80年代, 刘亦鸣等人^[1]发明了基于低频脉冲阻抗测量原理的经络定位仪, 祝总骧等人^[2]用该仪器发现了与经脉线基本重合的循经低电阻点(low impedance point (LIP) along meridians). 90年代, 穆祥等人^[3]用该仪器在小型猪上测出了循经低电阻线(low impedance line along meridians, LILM). 可视化是证明经脉客观存在的有力证据, 也是探明经脉本质的途径

之一. 孟竞璧等人^[4]使用^{99m}Tc-高锝酸钠(^{99m}Tc)示踪经脉, 发现^{99m}Tc的迁移路线与古典经脉的路线基本吻合. 依据同位素示踪的多种特征, 结合放射性自显影的结论^[5], 孟竞璧认为同位素运行于脉管之外, 因与《黄帝内经》“卫行脉外”说法相吻合, 将其命名为卫行脉外小分子循经运输通道^[6], 该认识与日本藤田六郎的经络脉管外体液路径学说^[7]相互印证. 20世纪90年代, 为解释同位素循经迁移现象, 张维波^[8]根据组织液流动的达西定律和连续性方程, 推测经脉具有低流阻特性,

引用格式: 熊枫, 宋晓晶, 贾术永, 等. 小型猪四肢荧光素钠循经迁移的初步观察. 中国科学: 生命科学, 2020, 50: 1453–1463

Xiong F, Song X J, Jia S Y, et al. Preliminary observation of the migration of sodium fluorescein along meridians in the limbs of mini-pigs (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2020, 50: 1453–1463, doi: 10.1360/SSV-2020-0144

并存在组织液向经脉的汇聚和沿经脉的流动。随后, 张维波等人^[9,10]使用生物力学方法证明了经脉的低流阻特性, 又结合同位素和阿尔新蓝示踪等技术, 在人和小型猪上发现了循经低流阻通道^[8]。经脉的同位素示踪研究因其 γ 射线的穿透性强, 在 γ 相机上需安装直准器定位, 而直准器的数目有限, 故其分辨率较低, 也难以跟其他的形态学方法进行联合观察。更为重要的是, 同位素辐射较强, 对人体有一定伤害, 且污染环境, 因此限制了研究的深入开展, 故对经脉的可视化和物质基础研究需引入新技术。

近年来, 郭静科等人^[11]用荧光探针尾静脉注射在大鼠腹部观察到与中医经络在人体腹部的循行位置相似的荧光线性轨迹。李宏义等人^[12]用磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)等成像方法观察到, 在尸体或断肢上可出现与经络循行特征类似的长程的示踪剂迁移轨迹。本团队使用阿尔新蓝染料在透明鱼上发现了类经脉的迁移轨迹^[13,14], 随后又使用荧光素钠和荧光照相法在大鼠任脉上发现了循经迁移轨迹^[15]。但由于大鼠的四肢较小, 难以观察十二经脉在四肢的分布情况, 故选择体型较小的小型猪, 观察荧光素钠在小型猪身体特别是在四肢远心部位的迁移规律。

1 材料与方法

1.1 实验动物及饲养方法

选用中国实验用小型猪(北京市琉璃河科兴实验动物养殖中心)5只(雄性3只, 雌性2只), 体重 (9 ± 2) kg, 毛色白, 实验动物使用许可证号SCXK(京)2017-0003。每日提供浓缩饲料(希望饲料有限公司): 8:00给料150 g, 20:00给料100 g, 饮水不限量, 单笼饲养。动物房温度 $(20\pm 2)^{\circ}\text{C}$, 湿度(relative humidity) $50\%\pm 10\%$ Rh。整个实验获得中国中医科学院针灸研究所伦理委员会批准。

1.2 主要仪器及试剂

3%戊巴比妥钠(德国分装, 含量 $>99\%$), 速眠新II(吉林省华牧动物保健品有限公司, 长春), R620IE通用型动物麻醉机(深圳市瑞沃德生命科技有限公司, 深圳), R409 PLUS大动物呼吸机(深圳市瑞沃德生命科技有限公司, 深圳), 荧光素钠(上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 上海), 干冰(安阳飞客商贸有限责任公司, 安阳), WQ6F30经络定位仪(北京海淀区东华电子仪器

厂, 北京), 生物流阻仪(自制), 5D Mark2相机(Canon, 日本), MC UV 77mm窄带滤色镜(kenko, 日本), Nikon D5000相机(日本, 带105 mm微距镜头), 600EX II-RT闪光灯(Canon), Filmer 600SLED灯(Starison, 上海), 滤色纸(春兴牌彩色灯光滤色片), V800P投影式红外血管成像仪(深圳中科微影, 深圳)。

1.3 实验方法

(1) 麻醉与备皮。使用3%的戊巴比妥钠溶液 (0.5 mL/kg) 和速眠新II (0.1 mL/kg) 分别注射小型猪两侧臀部肌肉进行麻醉。用电推剪去毛, 暴露四肢部皮肤, 脏污处用75%的酒精棉球擦干净、晾干。对于时间较长的实验, 使用动物麻醉机与大动物呼吸机给予小型猪异氟烷(输出浓度2%)与氧气 (1.5 L/min) 的混合吸入进行麻醉状态的维持。

(2) 循经低电阻线的测定。使用经络定位仪 $(60\sim 80\text{ Hz}$ 脉冲, 电流范围 $50\text{ }\mu\text{A})$ 进行LIP和LILM的定位。测定时, 将定位仪的参考电极固定于小型猪的耳廓侧, 用探测电极作与四肢长轴垂直的匀速扫描, 约隔1 cm扫描一次, 观察微安表, 若在扫描中骤然出现一大于 $8\text{ }\mu\text{A}$ 的指针偏转的点, 该点即为LIP, 用彩笔给予标记, 如此重复, 这些点的连线即为LILM^[3]。小型猪前后肢内外侧均可探测到可重复的3条LILM, 共12条, 左右对称, 一共24条(图1)。以靠近头部的称为头侧线, 靠近尾部的称为尾侧线, 在两者中间的称为中部线, 再以前后肢和内外侧区分, 12条LILM分别命名为前肢外侧头侧线(forelimb outside cephalic line, FOCL)、前肢外侧中部线(forelimb outside middle line, FOML)、前肢外侧尾侧线(forelimb outside tail line, FOTL)、前肢内侧头侧线(forelimb inside cephalic line, FICL)、前肢内侧中部线(forelimb inside middle line, FIML)、前肢内侧尾侧线(forelimb inside tail line, FITL)、后肢内侧头侧线(hindlimb inside cephalic line, HICL)、后肢内侧中部线(hindlimb inside middle line, HIML)、后肢内侧尾侧线(hindlimb inside tail line, HITL)、后肢外侧头侧线(hindlimb outside cephalic line, HOCL)、后肢外侧中部线(hindlimb outside middle line, HOML)、后肢外侧尾侧线(hindlimb outside tail line, HOTL)。

(3) 示踪剂的注射。首先对小型猪在注射不同剂量 $(0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1\text{ mL})$ 、不同浓度 $(1\%, 2.5\%, 5\%,$

图 1 小型猪四肢部的十二条循经低电阻线示意图. 虚线为头侧线、实线为中部线、虚线箭头为尾侧线. 线条轨迹仅供参考, 实际LILM并非示意图所示的规则直线

Figure 1 Schematic of the 12 LILM in the four limbs of mini-pig. The dotted line is the cephalic line, the solid line is the middle line, and the dotted arrow is the tail line. Line tracks are for reference only, as LILM is not regular, as shown in the schematic

7.5%, 10%)以及不同注射深度(1, 3, 5 mm)的迁移情况进行观察, 确定使用5%、0.4 mL、深度3~4 mm的注射参数, 体表荧光素钠的迁移显示最清晰. 然后选取LILM在腕踝部的一点作为注射点(LIP组), 选取位于两条LILM之间的一个高电阻点作为对照点(旁开组). 用1 mL注射器垂直于皮肤表面刺入, 深度3~4 mm, 然后缓慢推注5%的荧光素钠溶液0.4 mL.

(4) 成像环境. 环境温度为 $(25 \pm 1)^{\circ}\text{C}$, 相对湿度30%~60%, 室内外通风隔绝. 在荧光剂注射及拍照过程中, 室内无阳光照射、无灯光, 保持暗室状态.

(5) 荧光照相法. 小型猪以侧卧位放置于实验台上. 使用安装了窄带滤色镜的Canon 5D2数码相机, 镜头正对被观察部位, 距离0.5~1 m, 手动调节焦距和曝光量. 采用闪光灯组(1个主控闪光灯+1个从属闪光灯)作为激发光源, 主从闪光灯的灯头均加装蓝色滤光纸. 将主控闪光灯安装在相机上, 位于动物一侧稍高的地方, 在动物另一侧的较低位置放置从属闪光灯, 主从闪光灯之间通过无线电传输保持闪光的同步. 加蓝色滤光纸的LED灯放置在动物附近, 用于照相机取景和对焦时的照明(图2).

(6) 用静脉显像仪显示浅表静脉. 小型猪以侧卧位放置于实验台上. 将静脉显像仪置于荧光素钠轨迹上方, 打开仪器, 调整仪器与体表荧光素钠轨迹的距离, 使投影图像最清晰, 分辨率最高. 将投影模式调为红光模式, 以跟黄绿色的荧光素钠轨迹更好地区别. 分别用静脉显像仪和Canon相机拍摄小型猪腿部静脉和荧光素钠轨

迹迁移图像.

(7) 体表未出现荧光迁移轨迹低电阻线解剖观察. 选取2只小型猪, 在肢体区域未观察到荧光素体表迁移轨迹的右侧胃经低电阻线躯干部位, 测量循经低流阻点(low hydraulic resistance point, LHRP)^[16], 然后在LHRP注射5%荧光素钠(1只0.6 mL, 1只1 mL). 注射后30 min, 过量注射3%戊巴比妥钠处死, 用手术刀剥离皮肤, 暴露肌肉, 用Canon相机采集皮下荧光素钠的迁移轨迹图像.

(8) 出现荧光迁移轨迹低电阻线横切面切片观察. 选取3只小型猪, 在四肢部位的低电阻点注射5%荧光素钠0.4 mL, 待体表出现荧光迁移轨迹后, 在皮肤上出现荧光素钠轨迹一带覆盖干冰. 干冰持续冷冻30 min后, 过量注射3%戊巴比妥钠处死. 对于其中的两只猪, 将含有荧光素钠轨迹的组织块切下放入有干冰的盒子里, 用Canon相机对其横切面进行拍照, 然后切掉约1 mm厚的组织再拍照, 直到切完. 对另一只猪, 先切除距体表荧光素钠轨迹一端一段距离的一块组织, 在体暴露组织的横切面, 然后以1 mm间隔厚度切除组织, 直至横切面可以观察到荧光, 然后用带105 mm微距镜头和窄带滤色镜的NikonD 5000相机对横切面进行在体拍照, 随后以1 mm间隔厚度横切荧光素钠轨迹组织并连续拍摄, 直到横切面上的荧光消失为止.

(9) 同侧肢体3条低电阻线上同一水平线3点同时注射荧光素钠观察. 完成小型猪LILM的测量后, 以垂直于四肢长轴的水平线与3条LILM在腕踝部的交点为注射点, 用3根并联到微量注射器的针头分别垂直刺入皮肤表面2 mm(较之前注射深度更为表浅), 然后在这3个点同步注射5%荧光素钠0.4 mL, 注射后采集荧光素钠的体表迁移轨迹.

1.4 观察指标

分别在注射前和注射后2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 min时, 对小型猪四肢注射点部位一带进行荧光照相, 观察荧光素钠体表迁移的动态轨迹, 测量60 min时荧光素钠体表迁移轨迹的长度及与循经低电阻线的吻合度.

体表迁移长度: 分别测量小型猪四肢各注射点照片中荧光素钠体表迁移的纵向长度与横向宽度, 然后计算两者的比例. 以一侧方向的迁移长度比另一侧大

图2 荧光照相装置示意图

Figure 2 Schematic of fluorescence photographic apparatus

1/3以上为有明显迁移方向的标准。

循经吻合度: 对小型猪四肢注射点荧光素钠体表迁移轨迹与该注射点的低电阻线的吻合程度进行测算。

1.5 统计学方法

数据处理采用SPSS22.0统计学软件进行分析, 计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。符合正态分布的数据采用方差齐性检验, 方差齐时, 采用单因素方差分析; 若数据为非正态分布或方差不齐时, 采用Kruskal-Wallis H检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 小型猪四肢LIP组及旁开组注射荧光素钠后的体表迁移轨迹观察

在小型猪四肢12条低电阻线的腕踝处分别注射荧光素钠后, 可以观察到7条以注射点为中心沿低电阻线循行方向出现的线状迁移轨迹。在12条低电阻线中, H1ML有9例出现线状迁移(左右侧肢体均出现为2例, 以下同), F1ML有8例出现线状迁移, F1TL有5例出现线状迁移, F1CL有6例出现线状迁移, F0ML有7例出现线状迁移, F0TL有5例出现线状迁移, F0CL有6例出现线状迁移。7条循经迁移轨迹共计46例, 其典型图像如图3A~G所示。旁开组11例均未出现线状迁移, 体表荧光轨迹通常以注射点为中心向四周扩散(图3H)。

结果表明, 不同部位荧光素的体表迁移长度不同, 后肢内侧面的平均长度长于前肢。不同部位荧光素体表轨迹的出现时间也不同, 后肢内侧面的迁移轨迹在注射后5 min即可明显地观测到, 之后再随着时间延长只会宽度扩散变宽而长度不再增加; 前肢内侧面与前肢外侧面的迁移轨迹出现较后肢内侧面较慢, 在注射后30 min时长度达到最长。

2.2 小型猪四肢LIP组与旁开组荧光素钠体表迁移图像的比较

小型猪四肢7条L1LM注射荧光素的体表迁移轨迹与旁开HIP注射荧光素钠的体表轨迹的比较如表1所示。

结果表明, 与旁开组比较, 四肢LIP组总体荧光素钠体表迁移长度极显著延长($P < 0.001$); 四肢LIP组总体荧光素钠的体表迁移宽度极显著小于旁开组($P < 0.001$); 四肢LIP组总体荧光素钠体表迁移的长宽比均极显著大于旁开组($P < 0.001$)。

测量小型猪后肢的平均长度(从踝横纹到腹股沟横纹)为13.4 cm, 迁移长度占后肢长度的百分比为38.3%。H1ML出现的平均迁移长度最长, 为8.03 cm, 占后肢长度的百分比为59.9%。

2.3 小型猪四肢LIP组荧光素钠体表迁移线与L1LM的吻合度

以LIP点位于荧光素钠迁移轨迹区域内为吻合, 小型猪四肢LIP组荧光素钠体表迁移线与L1LM的吻合情况如表2所示。结果表明, 7条荧光素钠体表迁移轨迹与L1LM的总吻合度为81.4%。

2.4 荧光素钠体表迁移轨迹与浅表静脉位置的比较

使用静脉显像仪在2只小型猪上进行荧光素钠体表迁移轨迹与浅表静脉在体表投影位置的比较, 左右后肢内侧面中部线各观察1例, 共4例。4例体表荧光素钠迁移轨迹均与浅表静脉体表投影位置交叉而不重合, 图4显示其中1例。

由图4可以看出, 红色所代表的浅表静脉的体表投影与黄绿色代表的荧光素钠体表迁移轨迹无重合, 但两者有一定的交叉。

图 3 LILM及旁开HIP注射荧光素钠后体表出现的迁移轨迹. A: 小型猪右HIML注射后60 min时的迁移图像; B: 小型猪左FOML注射后60 min时的迁移图像; C: 小型猪右FOTL注射后60 min时的迁移图像; D: 小型猪左FOCL注射后60 min时的迁移图像; E: 小型猪右FIML注射后60 min时的迁移图像; F: 小型猪左FITL注射后60 min时的迁移图像; G: 小型猪右FICL注射后60 min时的迁移图像; H: 小型猪右后肢外侧面旁开高电阻点注射后的局部扩散. 绿色“×”为注射点位置

Figure 3 Migration tracks of sodium fluorescein (SF) after injection at LILM and HIPs. A: Image of migration of SF 60 min after injection into the right HIML of a mini-pig; B: image of migration of SF 60 min after injection into the left FOML of a mini-pig; C: image of migration of SF 60 min after injection into the right FOTL of a mini-pig; D: image of migration of SF 60 min after injection into the left FOCL of a mini-pig; E: image of migration of SF 60 min after injection into the right FIML of a mini-pig; F: image of migration of SF 60 min after injection into the left FITL of a mini-pig; G: image of migration of SF 60 min after injection into the right FICL of a mini-pig; H: local diffusion of SF after injection into a HIP at the outside of the right hind limb. The green “×” represents the injection points

表 1 小型猪四肢LIP组与旁开组荧光素钠迁移轨迹的比较($\bar{x} \pm s$, cm)^{a)}

Table 1 Comparison of the migration tracks of SF between the LIP group and the lateral group of mini-pigs ($\bar{x} \pm s$, cm)^{a)}

部位	例数	长(cm)	宽(cm)	长/宽
HIML	9	8.03±2.17***	0.44±0.12***	19.14±6.12***
FIML	8	4.41±1.24***	1.41±0.55**	3.26±0.63***
FITL	5	4.52±1.36**	1.1±0.34***	4.35±1.56**
FICL	6	3.32±0.74*	1.08±0.27***	3.21±0.98***
FOML	7	5.54±1.11***	1.49±0.31**	3.75±0.45***
FOTL	5	5.14±2.05*	0.62±0.18***	8.71±3.49**
FOCL	6	3.58±0.8**	0.82±0.32***	5.1±2.68***
总计	46	5.13±2.12***	0.99±0.5***	7.39±6.78***
旁开组	11	2.5±0.62	2.08±0.43	1.21±0.21

a) 与旁开组的迁移轨迹比较, *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$

2.5 LIP组未出现荧光素体表迁移轨迹的解剖观察

LIP组未出现荧光素体表迁移轨迹的循经低电阻

线共5条, 后肢外侧3条, 后肢内侧2条, 分别为HOCL, HOML, HOTL, HICL, HITL. 对肢体未出现荧光素钠体表迁移轨迹的HOCL和HOML, 在其躯干部位的LHRP注射荧光素钠后, 一例HOCL(胃经)和一例

表 2 小型猪四肢LIP组荧光素钠循经迁移线与LILM的吻合度

Table 2 Goodness of fit between SF migration tracks in the LIP group and LILM in the four limbs of mini-pigs

部位	例数	与低电阻点吻合数	循行区域低电阻点总数	吻合度
HICL	9	55	79	69.6%
FIML	8	47	48	97.9%
FITL	5	24	28	85.7%
FICL	6	30	32	93.8%
FOML	7	30	41	73.2%
FOTL	5	26	32	81.3%
FOCL	6	24	30	80.0%
总计	46	236	290	81.4%

图 4 4号猪左后肢内侧面静脉显像仪图像及静脉显像仪体表投影图像与荧光轨迹图像比较。A和B: 静脉显像仪照相图像, 图A为原始图像, 图B为仪器处理后图像; C: 在蓝光照射下用Canon相机拍摄的荧光素轨迹与静脉图像比较

Figure 4 Inner left hindlimb image from the projection vein finder of pig number 4, and the comparison with the body surface projection image and the fluorescence migration image. A and B: Photographic images of the projection vein finder, (A) is the original image, and (B) is the image processed by the instrument; C: comparison of fluorescence tracks and vein images taken with a Canon camera under blue light exposure

HOML(胆经)仅在局部体表小范围扩散(图5A和B), 另一例HOCL(胃经)在体表出现了离心迁移轨迹(图5B), 长度6.3 cm, 与低电阻线相距2~4 mm.

在体表观察之后, 再将皮肤掀起, 可在皮下和皮肤的反面观察到荧光素钠的带状迁移(图5C), 长度约为14.2 cm, 宽度约为4.3 cm, 在向心和离心两个方向上的长度基本相等. 另一只猪在HOCL和HOML躯干段的皮下和皮肤反面也出现了带状迁移, 长度和宽度分

图 5 小型猪右侧胃经与胆经体表荧光观察与皮肤剥离后的皮下荧光观察。A: 3号猪胃经体表未观测到荧光素迁移; B: 4号猪胆经(上)与胃经(下)注射后图像, 胆经未观测到荧光素迁移, 胃经观测到离心迁移; C: 图A所示部位皮肤掀起后观察到的荧光素循经迁移; D: 图B所示部位皮肤掀起后观察到的荧光素循经迁移。绿色“×”所示为注射点位置

Figure 5 The surface fluorescence observation of the mini-pig's right stomach meridian and gallbladder meridian, and the subcutaneous fluorescence observation after peeling off the skin (Canon camera). A: Image without the fluorescence migration track on the surface of stomach meridian of pig number 3; B: image of the gallbladder meridian and stomach meridian after injection of pig number 4; there was no fluorescence migration track observed along the gallbladder meridian, but a centrifugal migration track was observed along the stomach meridian; C: fluorescence migration track along the meridian observed after the skin was peeled off, as shown in (A); D: fluorescence migration tracks along the meridians observed after the skin was peeled off, as shown in (B). The green “×” represents the injection points

别为10.5 cm与3.5 cm, 主要分布在注射点的离心方向(图5D).

2.6 后肢内侧出现的多条平行荧光素迁移轨迹

三点同步注射荧光素钠实验共进行25例, 其中前肢外侧8例, 前肢内侧面5例, 后肢外侧5例, 后肢内侧面7例. 其中在后肢内侧面可观察到多条不等的长距离迁移线. 其中有一只猪的左右两侧后肢内侧面, 各出现了6~7条基本平行的荧光素钠迁移轨迹, 从接近脚踝部的注射点出发, 平行延伸到腹股沟附近(图6).

2.7 荧光素钠沿LILM迁移轨迹的横切面观察

对5号小型猪右前肢外侧面荧光素体表迁移轨迹(图7A)组织的横切面进行观察, 发现迁移轨迹在横切面上呈现一倒三角形形状(图7B), 在体表处较宽, 往深处逐渐变窄, 在深层延伸成近似条形, 其中可见明显的肌肉边界, 染料在两个肌肉边界之间, 并扩散到肌肉内一

图 6 5号猪后肢内侧多条平行荧光素轨迹. A: 小型猪左后肢内侧; B: 小型猪右后肢内侧

Figure 6 Several parallel fluorescence tracks were found on the inside of the hindlimb on pig number 5. A: The inside of the left hindlimb of the mini-pig; B: the inside of the right hindlimb of the mini-pig

定距离.

体表轨迹的深部有荧光素钠的连续存在(图7B中20所处的位置为体表上最后能观察到荧光素轨迹的位置), 另外在体表观察不到荧光轨迹的迁移延长线(有低电阻)上的深部, 还能观察到横切面倒三角结构的延续. 在图7B中, 第20号横切面在体表的对应位置已观察不到荧光素轨迹, 但横切面上仍可看到, 并延续到第21号, 直到第22号横切面, 该结构才完全消失, 其结构在皮肤以下延长了约5 mm.

图8为3号猪体表迁移轨迹下面的横切面荧光素分布, 其基本结构也为倒三角形, 构成三角形的三个边的荧光素浓度较高. 用碳素墨汁细笔标记体表荧光轨迹的边界范围, 发现在横切面上的荧光素结构比体表轨迹要宽一些. 实际上, 体表轨迹的边界不是绝对的, 边界外也能隐约看到荧光素的分布.

3 讨论

3.1 四肢LIP注射荧光素钠后的体表循经迁移规律

本研究观察到7条荧光素钠沿LILM的体表迁移轨迹, 轨迹的形状在低电阻线的纵向与其宽度方向上明显不对称, 长宽比为7.39, 具有线状迁移的特征, 在循经方向上有明显的优势迁移. 而在非经脉的部位注射, 荧光素钠向四周扩散, 呈现纵横比很接近的圆形或椭圆

图 7 5号猪右前肢外侧面中部线(A)和右前肢外侧面中部线荧光迁移轨迹切片后横切面照片(B). 图A中白色竖线为切片位置. 图B中八张横切面照片分别对应图A中1, 5, 7, 10, 13, 17, 20, 23的横切面位置

Figure 7 FOML of the right forelimb (A) and transverse section of the right forelimb (B) of pig number 5 after SF migration track. The white vertical line in (A) is the section position. The eight transverse section photos in (B) correspond to the transverse section positions of 1, 5, 7, 10, 13, 17, 20 and 23 in (A), respectively

圆形, 应为浓度梯度驱动下的各向同性扩散, 两者差异很大. 该结果与人体上肢在非经穴注射同位素后出现的局部淤积情况相同^[17]. 本结果进一步证明, 经脉组织是渗透性较好、流阻较低的生物组织, 与以往对经脉组织渗透性和流阻的测量结果一致^[9,10].

荧光素钠体表迁移轨迹与低电阻线的吻合度为81.4%, 这一结果表明, 四肢LIP体表荧光素钠循经迁移线与体表低电阻线具有较高的吻合性. 根据经络定位仪在人体上测定的低电阻线与人体表经络循行基本一致的结果^[1], 可以推知动物体表的低电阻线与经络

图 8 3号猪右前肢外侧面中部线(FOML)的体表迁移轨迹(A)与横切面(B)照片。图B切片位置对应图A的白直线位置;图B中的白波浪线以下为横切面,白线以上为在横切面照相时同时拍摄到的体表图像;绿线为体表荧光素钠迁移范围,图A和B中红色圆圈内为同一低电阻点,蓝色圆圈为图A体表轨迹在图B切片上的位置

Figure 8 A migration track on the body surface (A) and the transverse section (B) of FOML on pig number 3. The position of the section in (B) corresponds to the position of the white straight line in (A). In (B), the image below the white line is the transverse section, and the image above the line is the body surface taken at the same time. The green line represents the edge of the surface fluorescence track. The red circles mark the same LIP in panels (A) and (B). The blue circles mark the positions of the surface track in (A) and the corresponding positions on the transverse section in (B)

是相近的^[3]。进一步说明了早期用生物物理学方法测量出来的体表经脉线与皮下的循经低流阻通道在位置上基本重合。低电阻线是低流阻通道在体表的投影,两者会有一点错位。以往小型猪的研究表明,两者的平均距离为1.4 mm^[18]。在LIP注射,荧光素钠进入组织中会有一定的扩散,即使没有准确地注射在循经低流阻通道上,也可经短暂的扩散到达通道中,再循经迁移,这段时间在同位素经络研究中被成为“潜伏期”^[4]。用LIP定位经脉,然后注射荧光素钠对经脉进行显像的方法学是可行的。

顾鑫等人^[15]在大鼠任脉的LIP注射荧光素钠,发现从体表难以直接观察到循经迁移,需剥开皮肤后才能观察到迁移轨迹。本研究在小型猪的四肢LIP注射荧光素钠,可在不剥开皮肤的情况下,直接从体表观察到循经迁移轨迹。该方法有可能用于人体经脉观察,是经络研究方法学的重大进步。

小型猪是理想的经脉研究模型,其四肢远比大鼠粗大,使得原来难以在大鼠上进行的四肢经脉观察成为可能,而四肢经脉是经脉系统最重要的部分。本研究不仅在四肢发现了荧光素钠的线状迁移,还通过同步注射观察到这些迁移轨迹平行分布延伸至腹股沟的经脉特征,用静脉成像仪证明这些轨迹与血管的分布并不重合,其宽度又远大于淋巴管,可能为一种新的通道。

3.2 荧光素钠的体内循经迁移规律

在小型猪的四肢可观察到7条体表循经迁移线,在后肢外侧的3条LILM上无法从体表观察到线状迁移。但在后肢低电阻线在躯干部位的低流阻点注射荧光素钠后,有时可从体表观察到线状迁移,其位置与循经低流阻通道基本吻合,方向离心,与用高锗酸钠观察到的胃经躯干段的离心迁移规律相一致^[8],也符合经络理论所描述的足阳明胃经由头走足的流注方向。

无论能否在体表观察到线状迁移,揭开皮肤后,都能在皮下观察到带状的循经迁移,说明体表观察并不能完全反映荧光素钠在体内的分布情况,对迁移轨迹横切面的观察结果也支持这一判断。对5号小型猪体表迁移轨迹的连续横切面观察发现,在体表轨迹消失的皮下仍有一段荧光素钠的迁移轨迹。而3号猪在横切面上的荧光素钠分布与体表观察到的也有一定差异,说明体表照相有其局限,若要全面准确地观察经脉通道,仍需使用穿透性更强的同位素。

3.3 经络的间质通道实质

间隙及其中的间质是神经和血管之外可贯通全身的第三种结构,以往认为该结构仅为分隔和联结组织,没有通道的功能。早期研究使用 γ 照相^[4]、PET(positron emission computed tomography)^[19,20]以及后来的MRI^[12]等影像技术对经脉进行了示踪,发现存在与经脉线基本吻合的示踪轨迹;使用生物物理方法发现经脉线具有低电阻等特性^[21],使用形态学方法发现经脉线上神经末梢、肥大细胞和毛细血管等相对密集^[22,23]。上述研究尚不能说明经脉的实质,故有经络为神经、血管乃至电磁驻波或孤立波等各种猜测。近年的研究逐渐将视线集中在经络与结缔组织和组织液的关系上。原林等人^[24]证明筋膜分布与经脉有较高重合度,丁光宏等人^[25]证明了循经毛细血管存在有利于组

织液流动的平行排列. 张维波等人在发现了循经低流阻通道之后^[8], 对该通道运输水液、营养物质、信息物质和药物的功能进行了系列研究^[26], 又在凝胶盐水模型上模拟出经脉的低电阻和高导声特性^[27].

阻抗是反映体液分布的重要指标, Langevin团队^[28]使用3.3 kHz恒流四电极阻抗测量, 发现心包经的阻抗显著低于旁开区域, 但脾经未达到显著性差异. Xu等人^[29]使用阻抗谱法测量了12原穴的阻抗, 发现部分穴位的阻抗显著低于周围区域, 且阻抗与肢体的角度有关, 认为该结果说明经络通道位于间质中. 本团队^[30,31]近年来使用生物阻抗谱法先后对胃经的大腿段和胃经与胆经的小腿段进行了测量, 用Cole-Cole曲线拟合法分离细胞内外液阻抗, 发现两经脉的细胞外液阻抗均显著低于旁开区域, 而细胞内液阻抗基本相同, 提示上述经脉中的组织液更为丰富.

一系列的研究提示, 经络可能是间质中的一种组织液通道. 但间质中是否存在可流动的液态组织液, 国际学术界并无定论. 早期生理学认为, 组织液是不流动的凝胶态, 1993年, 挪威的Aukland和Reed^[32]提出了组织液由凝胶态和液态构成的两相说, 但液态组织液的存在一直未得到实验证实. 直到2018年, 美国Benias等人^[33]用激光共聚焦内窥镜观察到荧光素钠标记

的液态组织液与其周围的固态成分形成网格结构, 该结构在脱水处理后消失, 证明了液态组织液的存在, 同时为经络是间质中的组织液流动通道提供了重要支持.

激光共聚焦内窥镜的观察范围较小, 其视野范围只有几百微米, 而中医经脉的长度可达几十厘米, 因此, 用该仪器尚难以显示经脉的完整结构. 本团队在美国工作的启发下, 使用荧光照相法在大鼠皮下发现了循经迁移的荧光素钠轨迹^[15], 又使用激光共聚焦内窥镜对其微观结构进行了观察, 证明其中存在大量的组织液及相关纤维状结构, 共同构成了一种特殊的间质通道^[34]. 进一步对该通道的体表宏观分布和三维结构进行观察, 证明该通道存在于皮肤和肌肉组成的间隙之中, 在空间上是立体的、贯穿整个组织的“河道”样结构, 其上端可至体表, 下端可达骨面, 通道两侧的约束是相对的、半封闭的, 不同于由细胞组成的封闭式脉管结构, 由此可以理解为什么针刺经穴可在不同的深度上操作. 这种由组织间隙和组织液构成的流动结构是生物进化的早期循环模式, 现在看来, 高等哺乳类动物虽然进化出了快速的脉管循环, 这种慢速的、非脉管的早期循环系统仍隐秘地存在着, 它正是中医理论所说的经络气道的生物学本质.

致谢 感谢中国中医科学院针灸研究所孟竞璧教授在示踪剂注射方面提供的重要帮助.

参考文献

- 1 Liu Y M, Zhu Z X, Yu S Z, et al. Three skin impedance instruments were used to measure the low impedance characteristics on the line of latent propagated sensation along Large intestine meridian (in Chinese). *Chin Acup Moxib*, 1986, 3: 32–34 [刘亦鸣, 祝总骧, 于书庄, 等. 三种皮肤阻抗测定仪测定大肠经隐性感传线的低阻抗特性. *中国针灸*, 1986, 3: 32–34]
- 2 Xie J G, Xu R M, Zhu Z X, et al. An experimental study of locating the line of latent propagated sensation along stomach meridian and its low impedance characteristic (in Chinese). *Chin J Nat*, 1989, 11: 840–844 [谢君国, 徐瑞民, 祝总骧, 等. 胃经隐性感传线的定位及其低阻抗性的实验研究. *自然杂志*, 1989, 11: 840–844]
- 3 Mu X, Gao L Y, Wu X Q, et al. Studies on the low impedance line along meridian of mini-pigs (in Chinese). *J Beijing Univ Agric*, 1993, 2: 79–84 [穆祥, 高立云, 吴学清, 等. 小型猪循经低阻线的观察 I. *北京农学院学报*, 1993, 2: 79–84]
- 4 Meng J B, Tian J H, Gao H H, et al. Radionuclide scintigraphy of the meridian system in normal subjects (in Chinese). *Acup Res*, 1989, S4: 1 [孟竞璧, 田嘉禾, 高慧合, 等. 放射性核素-闪烁照相技术对健康人十二经脉循行的研究. *针刺研究*, 1989, S4: 1]
- 5 Yan P, Zhou D X, Zhang P F, et al. Study on tissue structure of transmission route of human meridian with 32P light microscopic radioautography (in Chinese). *Chin J Anat*, 2002, 2: 119–122 [阎平, 周迪湘, 张鹏飞, 等. 用32P光镜放射自显影示踪对人体经脉循行路线组织结构的研究. *解剖学杂志*, 2002, 2: 119–122]
- 6 Meng J B, Tian J H. An Exploration of Imaging the Fourteen Meridians (in Chinese). Beijing: China Press of Science and Technology, 1998. 76–

- 79 [孟竞璧, 田嘉禾. 十四经脉显像探秘. 北京: 中国科学技术出版社, 1998. 76–79]
- 7 Fujita R. Keiraku-gaku nyumon, kiso-hen. In: An Introduction to Meridianology Fundamental Part. Osaka: Sogen-sha, 1980
- 8 Zhang W B. What Is the Meridian (in Chinese)? Beijing: China Press of Science and Technology, 1997: 55–65, 74–77, 88–90 [张维波. 经络是什么. 北京: 中国科学技术出版社, 1997. 55–65, 74–77, 88–90]
- 9 Zhang W B, Zhuang F Y, Li H, et al. An improve Guyton's method to measure hydraulic conductance and its use in meridian tissue of animals (in Chinese). Beijing Biomed Eng, 1997, 4: 199–204 [张维波, 庄逢源, 李宏, 等. 一种改进的Guyton流测定法及对动物经脉流导的测量. 北京生物医学工程, 1997, 4: 199–204]
- 10 Zhang W B, Jing X H, Li C H, et al. Study on the interstitial fluid permeability of meridian in rats (in Chinese). Basic Clin Med, 1994, 1: 68 [张维波, 景向红, 李翠红, 等. 大白鼠经脉线组织体液渗透性的研究. 基础医学与临床, 1994, 1: 68]
- 11 Guo J, Rao P. Is acupuncture meridians a novel system for superoxide disposition? In: Marcelo S, ed. Acupuncture Concepts and Physiology. Croatia: InTech, 2011, 81–100
- 12 Li H, Yang C, Yin Y, et al. An extravascular fluid transport system based on structural framework of fibrous connective tissues in human body. *Cell Prolif*, 2019, 52
- 13 Zhang W, Song X, Wang Z, et al. Longitudinal directional movement of Alcian blue in *Gephyrocharax melanocheir* fish: Revealing interstitial flow and related structure. *World J Acup-Moxib*, 2019, 29: 127–132
- 14 Wang Z, Zhang W, Jia S, et al. Finding blue tracks in *Gephyrocharax melanocheir* fish similar to the locations of acupuncture meridians after injecting Alcian blue. *J Acup Meridian Stud*, 2015, 8: 307–313
- 15 Gu X, Wang Y P, Wang G J, et al. *In vivo* display of low hydraulic resistance channels along conception vessel in rats by photofluorography (in Chinese). *Acup Res*, 2020, 45: 227–232 [顾鑫, 王燕平, 王广军, 等. 荧光照相法对大鼠任脉低流阻通道的活体显示. 针刺研究, 2020, 45: 227–232]
- 16 Zhang W B, Tian Y Y, Li H, et al. A method to measure hydraulic resistance of subcutis continuously and the study of low hydraulic resistance points (in Chinese). *Acta Biophys Sin*, 1998, 2: 181–186 [张维波, 田宇瑛, 李宏, 等. 一种连续测量流阻的方法与皮下低流阻点的研究. 生物物理学报, 1998, 2: 181–186]
- 17 Wen C, Gao H H, Chang B Q, et al. An observation on the migration traces of radioactive nuclein injected into non-meridian and non-acupoint on the upper limbs (in Chinese). *Acup Res*, 1989, S4: 28–32 [文琛, 高惠合, 常宝琪, 等. 上肢非经非穴注入放射性核素后迁移轨迹的观察. 针刺研究, 1989, S4: 28–32]
- 18 Zhang W B, Tian Y Y, Li H, et al. A discovery of low hydraulic resistance channel along meridians. *J Acup Meridian Stud*, 2008, 1: 20–28
- 19 Zhu Z X, Xu R M, Tian J H, et al. Positron emission computed tomography (PET) study on the 3-dimensional pathway of isotopic tracer migration along meridian of human body (in Chinese). *Chin J Nat Med*, 2003, 3: 129–132 [祝总驷, 徐瑞民, 田嘉禾, 等. 正电子断层扫描显示经脉血气运行的三维定位. 中国自然医学杂志, 2003, 3: 129–132]
- 20 Chen Y M, Tian J H, He Y J, et al. Three dimensional tomography and scenograph of the migration line of 18F-FDG along meridians (in Chinese). *Chin Acup Moxib*, 2002, 9: 28–30 [陈英茂, 田嘉禾, 何义杰, 等. 体内¹⁸F-FDG循经迁移线的三维断层及透视观察. 中国针灸, 2002, 9: 28–30]
- 21 Zhu Z X, Hao J K. Biophysics in Acupuncture & Meridian—Scientific Verification of Chinese First Great Invention (in Chinese). Beijing: Beijing Press, 1998. 202 [祝总驷, 郝金凯. 针灸经络生物物理学——中国第一大发明的科学验证. 北京: 北京出版社, 1998. 202]
- 22 Cheng S L. A combining display of mast cells, blood vessels and nerves along meridians (in Chinese). *J Xi'an Jiaotong Univ (Med Sci)*, 1996, 17: 520 [成少利. 经脉线上肥大细胞、血管和神经的联合显示. 西安医科大学学报(中文版), 1996, 17: 520]
- 23 Shen X Y, Dang R S, Chen E Y, et al. Relation of acupoints of the stomach channel with structure of connective tissue and accumulation of calcium (in Chinese). *Chin Acup Moxib*, 1998, 18: 595 [沈雪勇, 党瑞山, 陈尔瑜, 等. 胃经腧穴与结缔组织结构和钙元素富集的关系. 中国针灸, 1998, 18: 595]
- 24 Yuan L, Bai Y, Huang Y, et al. Anatomical discovery of meridians and collaterals and the theory of fasciaology (in Chinese). *Shanghai J Acup Moxib*, 2011, 30: 1–5 [原林, 白宇, 黄泳, 等. 经络的解剖学发现与筋膜学理论. 上海针灸杂志, 2011, 30: 1–5]
- 25 Ding G H, Yang J, Chen E Y, et al. The directional flow of interstitial fluid and meridians (in Chinese). *Prog Nat Sci*, 2001, 8: 29–36 [丁光宏, 杨静, 陈尔瑜, 等. 人体组织液定向流动与经络. 自然科学进展, 2001, 8: 29–36]
- 26 Zhang W B, Wang G J, Fuxe K. Classic and modern meridian studies: a review of low hydraulic resistance channels along meridians and their relevance for therapeutic effects in traditional Chinese medicine. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 1–14

- 27 Zhang W B, Zhuang F Y. A simulating study of biophysical features along meridians on gel model (in Chinese). *J Biomed Eng*, 2001, 18: 357–361 [张维波, 庄逢源. 使用凝胶模型法对经络生物物理特性的模拟研究. *生物医学工程学杂志*, 2001, 18: 357–361]
- 28 Ahn A C, Wu J, Badger G J, et al. Electrical impedance along connective tissue planes associated with acupuncture meridians. *BMC Complement Altern Med*, 2005, 5: 10
- 29 Xu J J, Yang F, Han D H, et al. Low impedance nature of 12 acupoints on the limbs, and the unexpected dependence on limb angle. *J Tradit Chin Med*, 2018, 38: 287–298
- 30 Yun J, Wang Y P, Zhang W B, et al. Preliminary observation on the body fluid distribution along meridian using bioimpedance spectroscopy method (in Chinese). *J Basic Chin Med*, 2015, 21: 853–856 [云洁, 王燕平, 张维波, 等. 应用生物阻抗频谱法对循经体液分布的初步观察. *中国中医基础医学杂志*, 2015, 21: 853–856]
- 31 Gu F F, Wang Y P, Wang G J, et al. Comparison of extrace and intracellular fluid distribution between stomach meridian or gallbladder meridian and their neighboring tissue of lower leg in healthy volunteers (in Chinese). *Acup Res*, 2018, 43: 718–721 [古菲菲, 王燕平, 王广军, 等. 小腿段胃经和胆经与经外细胞内外液分布的比较. *针刺研究*, 2018, 43: 718–721]
- 32 Aukland K, Reed R K. Interstitial-lymphatic mechanisms in the control of extracellular fluid volume. *Physiol Rev*, 1993, 73: 1–78
- 33 Benias P C, Wells R G, Sackey-Aboagye B, et al. Structure and distribution of an unrecognized interstitium in human tissues. *Sci Rep*, 2018, 8: 4947
- 34 Song X J, Zhang W B, Jia S Y, et al. Preliminary observation of the interstitial fluid distribution along the meridian path of abdominal wall in rats by *in vivo* laser confocal imaging (in Chinese). *J Basic Chin Med*, 2020, 27: 474–478 [宋晓晶, 张维波, 贾术永, 等. 应用小动物活体激光共聚焦成像系统对大鼠腹壁循经组织组织液分布的初步观察. *中国中医基础医学杂志*, 2020, 27: 474–478]

Preliminary observation of the migration of sodium fluorescein along meridians in the limbs of mini-pigs

XIONG Feng¹, SONG XiaoJing¹, JIA ShuYong¹, WANG GuangJun¹, LI HongYan¹, GU Xin²,
WANG Ze³ & ZHANG WeiBo¹

¹ Institute of Acupuncture and Moxibustion, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

² School of Acupuncture-Moxibustion and Tuina, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

³ Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China

Meridians are a core concept in traditional Chinese medicine (TCM) theory. It has been shown in many previous studies that meridians exist in the interstitium, the space through which interstitial fluids flow. Sodium fluorescein (SF) is a small, fluorescent, hydrophilic molecule. SF was injected into the low impedance points (LIPs) or the high impedance points (HIPs) on the limbs of healthy mini-pigs, as determined by a low impedance meridian locator (WQ6F30). Migration tracks were scanned by a digital camera (Canon 5D2) with a narrow band filter and colored flash lamps prior to and after SF injection. The relationships between superficial veins and SF tracks were analyzed using a projection vein finder (V800P). Tissues were frozen on dry ice, and the distribution of SF in the transverse sections of SF tracks was observed. Results reliably showed that seven migrating tracks along the low impedance line along meridians (LILM) were found when SF was injected at LIPs, three of which were on the outside of forelimb, three of which were on the inside of forelimb, and one of which was on the inside of hind limb. The average length of these migration tracks was 5.13 cm. The migration tracks were 81.4% consistent with LILM, while no overlap was observed with veins. The shape of injected SF in the transverse sections was similar to an inverted triangle, and distributed in the muscle gap. No linear migration was observed when SF was injected at HIP, and the shapes of injected SF were nearly round by local diffusion. The length, width and length-width ratio of SF shapes between injections at LIPs and HIPs were significantly different ($P < 0.01$). These results imply that the concept of the meridian in TCM may be an unknown interstitial channel.

meridians, sodium fluorescein, low impedance line along meridians, interstitial channel, mini-pigs

doi: 10.1360/SSV-2020-0144