

本文引用: 张之涵, 刘羽彤, 顾玲, 赵旭宇, 花炆, 葛飞, 陈美娟. 基于5-HT探讨电针刺激天枢、足三里对 IBS-D 大鼠的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(12): 2264-2271.

基于 5-HT 探讨电针刺激天枢、足三里对 IBS-D 大鼠的影响

张之涵¹, 刘羽彤¹, 顾玲¹, 赵旭宇¹, 花炆¹, 葛飞^{2*}, 陈美娟^{1*}

1. 南京中医药大学医学院, 江苏 南京 210023; 2. 南京中医药大学附属海安市中医院, 江苏 海安 226600

[摘要] **目的** 观察电针刺激天枢、足三里对腹泻型肠易激综合征(diarrheal irritable bowel syndrome, IBS-D)模型大鼠血清 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)含量及对结肠 5-羟色胺受体 3A 型(5-hydroxytryptamine 3A receptor, 5-HT3AR)蛋白表达量的影响,探讨“同经异腑合募配穴”指导下,电针刺激天枢、足三里治疗 IBS-D 大鼠的作用机制,为电针的临床应用提供实验依据。**方法** 将 24 只 SD 雄性大鼠随机分为空白组、模型组、阿洛司琼组及电针组,每组 6 只。除空白组外,其余 3 组大鼠采用慢性束缚、避水应激及灌服番泻叶煎剂相结合的方法建立 IBS-D 大鼠模型。造模成功后,对电针组予以电针刺激双侧天枢、足三里,15 min/次;空白组、模型组和电针组均给予 1 mL/100 g 体质量生理盐水灌胃;阿洛司琼组给予 1 mg/mL 浓度的阿洛司琼溶液按 1 mL/100 g 体质量灌胃;4 组均治疗 1 次/d,连续治疗 14 d。观察大鼠一般情况;通过腹壁回缩反射(abdominal wall retraction reflex, AWR)实验进行内脏敏感性评估;记录大鼠体质量增长率的变化;计算大鼠粪便含水量;HE 染色观察结肠组织形态;ELISA 法检测血浆中的 5-HT 含量;Western blot 检测目的蛋白 5-HT3AR 相对表达量。**结果** (1)大鼠一般情况:与模型组比较,电针组大鼠精神良好,活动正常,大便干湿适中,为成形粪粒。(2)体质量增长率:与治疗前比较,治疗后空白组、模型组、阿洛司琼组及电针组体质量增长率显著降低($P<0.001$);与空白组比较,模型组与阿洛司琼组体质量增长率降低($P<0.01, P<0.05$);与模型组、阿洛司琼组比较,电针组体质量增长率升高($P<0.05$)。(3)粪便含水量:与治疗前比较,电针组粪便含水量显著降低($P<0.01$);与空白组比较,模型组、阿洛司琼组粪便含水量高($P<0.001, P<0.05$);与模型组、阿洛司琼组比较,电针组的粪便含水量降低($P<0.01, P<0.05$)。(4)肠道容量阈值:与空白组比较,模型组肠道容量阈值显著降低($P<0.001$);与模型组比较,阿洛司琼组与电针组肠道容量阈值升高($P<0.05$)。(5)组织 HE 染色:与模型组比较,阿洛司琼组黏膜上皮完整,坏死范围明显减小;电针组黏膜上皮完整,吸收细胞呈柱状,黏膜皱壁中可见淋巴细胞和少量中性粒细胞等炎细胞浸润。与阿洛司琼组比较,电针组上皮完整,无坏死炎症损伤程度轻。(6)5-HT 通路检测:与空白组比较,模型组血清中 5-HT 的含量上升($P<0.05$);与模型组比较,电针组血清中 5-HT 含量下降($P<0.05$)。(7)结肠 5-HT3AR 蛋白表达:与空白组比较,模型组结肠的 5-HT3AR 蛋白表达升高($P<0.05$);与模型组比较,阿洛司琼组和电针组结肠的 5-HT3AR 蛋白表达均显著降低($P<0.001$);与阿洛司琼组比较,电针组结肠 5-HT3AR 蛋白表达显著降低($P<0.001$)。**结论** 在“同经异腑合募配穴”指导下,电针刺激天枢、足三里对 IBS-D 大鼠有显著的治疗效果,其作用机制可能通过降低血清 5-HT 含量及结肠 5-HT3AR 蛋白表达,恢复肠道运动和内脏感觉功能,从而缓解 IBS-D 的临床症状。

[关键词] 腹泻型肠易激综合征;同经异腑合募配穴;内脏高敏感性;5-HT;5-HT3AR

[中图分类号] R245.9

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.12.017

Effects of electroacupuncture stimulation of "Tianshu" (ST25) and "Zusanli" (ST36) on IBS-D rats based on 5-HT

ZHANG Zhihan¹, LIU Yutong¹, GU Ling¹, ZHAO Xuyun¹, HUA Yang¹, GE Fei^{2*}, CHEN Meijuan^{1*}

1. School of Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210023, China; 2. Hai'an Hospital of Chinese Medicine affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Hai'an, Jiangsu 226600, China

[收稿日期] 2023-09-09

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81503374);江苏省自然科学基金项目(BK20181235);江苏省创新训练项目(202210315047Y)。

[第一作者] 张之涵,女,本科,研究方向:针灸对肠易激综合征的调控机制研究。

[通信作者] * 葛飞,男,主任医师,硕士研究生导师,E-mail:ha9099@163.com;陈美娟,女,教授,硕士研究生导师,E-mail:mjchen@njucm.edu.cn。

[Abstract] Objective To observe the effects of electroacupuncture at "Tianshu" (ST25) and "Zusanli" (ST36) on 5-hydroxytryptamine (5-HT) content in serum and 5-hydroxytryptamine 3A receptor (5-HT_{3A}R) protein expression in colon of model rats with diarrheal irritable bowel syndrome (IBS-D), and to explore the mechanism of action of treating IBS-D rats by electroacupuncture stimulation of "Tianshu" (ST25) and "Zusanli" (ST36) under the guidance of "combining he and mu points from the same type of meridians of different fu-organs", thus providing experimental evidence for the clinical application of electroacupuncture. **Methods** Twenty-four SD male rats were randomized into blank group, model group, alosetron group, and electroacupuncture group, with six rats in each group. Except the blank group, the other three groups of rats were used to establish IBS-D rat models by the combination of chronic restraint, water avoidance stress, and oral administration of Fanxieye (*Sennae Folium*) decoction. After successful modeling, the electroacupuncture group was given electroacupuncture at bilateral "Tianshu" (ST25) and "Zusanli" (ST36), 15 min each time. The blank group, model group, and electroacupuncture group were administered 1 mL/100 g normal saline by gavage according to the body mass of rats, while the alosetron group was given 1 mg/mL concentration of alosetron solution by gavage at a dose of 1 mL/100 g based on body mass. All the four groups were treated once a day for 14 consecutive days. The general condition of rats was observed. Visceral sensitivity was evaluated by abdominal wall retraction reflex (AWR) experiment. In addition, the changes of body mass growth rate were recorded and the fecal water content was calculated. Besides, the morphology of colonic tissues was observed by HE staining, the 5-HT content in plasma was determined by ELISA, and the relative expression of target protein 5-HT_{3A}R was measured by Western blot. **Results** (1) General condition of rats: Compared with the model group, the rats in electroacupuncture group were in good spirit with normal activity, and the stool were moderately dry and wet with well-formed faecal pellets. (2) The growth rate of body mass: Compared with that before treatment, the growth rate of body mass in the blank group, model group, alosetron group, and electroacupuncture group decreased significantly after treatment ($P<0.001$). Additionally, compared with the blank group, the growth rate of body mass in model group and alosetron group decreased ($P<0.01$, $P<0.05$). Besides, compared with the model group and alosetron group, the growth rate of body mass in electroacupuncture group increased ($P<0.05$). (3) Fecal water content: Compared with that before treatment, the fecal water content in electroacupuncture group significantly decreased ($P<0.01$); compared with the blank group, the fecal water content in model group and alosetron group was higher ($P<0.001$, $P<0.05$). Moreover, compared with the model group and alosetron group, the electroacupuncture group showed a decrease in fecal water content ($P<0.01$, $P<0.05$). (4) Intestinal volume threshold: Compared with the blank group, the intestinal volume threshold in model group significantly decreased ($P<0.001$). Besides, compared with the model group, the intestinal volume threshold of alosetron group and electroacupuncture group increased ($P<0.05$). (5) Tissue HE staining: Compared with the model group, the mucosal epithelium in alosetron group was intact, and the necrotic area was obviously reduced. Additionally, in the electroacupuncture group, the mucosa epithelium was also intact, the absorptive cells were columnar, and the inflammatory cells such as lymphocytes and a small amount of neutrophils were infiltrated in the mucosal folds. Compared with the alosetron group, the electroacupuncture group exhibited intact epithelium with a mild degree of necrotic inflammatory damage. (6) Pathway of 5-HT determination: Compared with the blank group, the serum 5-HT content in the model group increased ($P<0.05$), while compared with the model group, the serum 5-HT content in electroacupuncture group decreased ($P<0.05$). (7) Protein expression of colonic 5-HT_{3A}R: Compared with the blank group, the model group showed an increased protein expression of colonic 5-HT_{3A}R ($P<0.05$). In addition, compared with the model group, both the alosetron and electroacupuncture groups exhibited significantly decreased protein expression of colonic 5-HT_{3A}R ($P<0.001$). Furthermore, compared with the alosetron group, the electroacupuncture group showed a significant reduction in colonic 5-HT_{3A}R protein expression ($P<0.001$). **Conclusion** Under the guidance of "combining he and mu points from the same type of meridians of different fu-organs", electroacupuncture at "Tianshu" (ST25) and "Zusanli" (ST36) had notable therapeutic effects on IBS-D rats. Its mechanism of action may involve reducing the content of 5-HT in serum and the protein expression of 5-HT_{3A}R in colon, restoring intestinal motility and visceral sensory function, thereby alleviating the clinical symptoms of IBS-D.

[Keywords] diarrheal irritable bowel syndrome; combining he and mu points from the same type of meridians of different fu-organs; visceral hypersensitivity; 5-hydroxytryptamine; 5-hydroxytryptamine 3A receptor

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种临床上较为常见的消化系统紊乱的功能障碍性综合征,病变部位以胃肠为主^[1]。其临床表现为慢性或间歇性的腹痛,腹部不适,并伴有大便性状和排便

习惯的异常变化,且受环境、饮食、情绪等诸多因素影响。临床上,根据排便特点和粪便性状分为腹泻型、便秘型和混合型3种。其中,腹泻型肠易激综合征(diarrheal irritable bowel syndrome, IBS-D)在我国

IBS患者中占比最多^[2]。除消化系统症状外,IBS-D患者大多数还存在情绪易激动、烦躁易怒等精神心理症状,这对患者及其家属的生活质量、精神状态产生极大的影响^[3]。

IBS-D的发病机制较为复杂。目前认为,其发病机制与胃肠动力学异常、内脏超敏反应等相关^[4]。5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)是一种重要的神经递质,与肠道运动和内脏感觉功能密切相关。5-HT通过激活肠道神经元上的5-HT受体,如5-羟色胺受体3A型(5-hydroxytryptamine 3A receptor, 5-HT3AR),增加肠道神经元的兴奋性。导致肠道神经传导异常,使肠道对触摸、压力和其他刺激产生过度的反应,从而导致肠道高敏感^[5]。研究表明,可通过针刺天枢、内关、足三里等穴位,作用于白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、5-HT、降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)等多个靶点,保护肠黏膜抑制炎症反应,从而有效缓解肠道高敏感性^[6]。

相关文献研究显示,针灸治疗消化系统疾病具有疗效佳、预后好、难复发、成本低、患者依从性强等优势^[7]。腧穴的选择作为针灸处方的第一组成要素,与针灸的治疗效果密切相关。本研究在中医学“合募配穴”的指导思想下,基于IBS-D发病机制的多样性,提出“同经异腑合募配穴”的刺灸方案,选择手阳明大肠经募穴天枢和足阳明胃经下合穴足三里,以期更好地改善IBS-D的临床症状。传统针灸是通过在人体穴位上针刺来刺激经络系统,以达到治疗疾病的目的。而电针则在传统针灸的基础上引入了现代的电子设备,通过电流刺激穴位,从而增强治疗效果。电针是针灸的一种现代形式,是传统中医融入现代科技的典型代表,故本研究将采用电针来刺激穴位。

为进一步探究电针对IBS-D降低肠道高敏感性、缓解腹泻症状等优势,本实验以IBS-D大鼠作为研究对象,观察经“同经异腑合募配穴”电针干预后,对IBS-D大鼠一般体征、内脏高敏感性及结肠组织形态学等影响,初步从5-HT/5-HT3R通路探讨电针治疗IBS-D的作用机制,以期电针治疗IBS-D的临床应用提供科学客观的实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

选取6~8周龄SPF级SD雄性大鼠共24只,体

质量(190±90)g。由南京市江宁区青龙山动物繁殖场提供,实验动物许可证号:SCXK(浙)2019-0002。实验大鼠饲养于南京中医药大学医学院动物房,饲养温度18~25℃,相对湿度为40%~70%,噪音低于50dB,光照时间与黑暗时间各12h,并给予正常饮食饮水,实验中对动物的所有处置均严格遵循2006年中华人民共和国科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[8]。动物实验已通过南京中医药大学实验动物中心动物实验伦理委员会批准(伦理批号:202309A023)。

1.2 药物制备

根据需要进行造模的各组大鼠体质量计算所需番泻叶药液量(按10 mL/kg计算),再计算出番泻叶(海安市中医院中药房,批号:20221008)生药量,称取后用约4倍番泻叶体积的沸水浸泡番泻叶30 min,用纱布过滤网过滤药渣,再煎煮浓缩,制成生药含量为0.45 g/mL的番泻叶药液。称取一定质量的阿洛司琼(上海麦克林生化科技有限公司,批号:A125218),用纯水溶解最终配制成2 mg/mL的浓溶液。称取一定质量的乌来糖(上海源叶生物科技有限公司,批号:S30HS196618),用纯水溶解最终配制成20%的乌来糖溶液。以上药液制备完成后放置于4℃冰箱保存备用,阿洛司琼使用时用纯水将2 mg/mL的浓溶液稀释成1 mg/mL的阿洛司琼溶液。

1.3 主要试剂及药品

Western及IP细胞裂解液、BCA蛋白浓度定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为:21309264、111622221213);5-HT ELISA检测试剂盒(武汉Elabscience生物有限公司,批号:PA088P8J0805);5-HT3A一抗(英国Abcam公司,批号:1017902-1);GAPDH单克隆抗体(美国Proteintech公司,批号:00119680);HRP山羊抗兔IgG二抗(美国Cell Signaling Technology公司,批号:C15140851)。

1.4 主要仪器

凝胶成像分析仪器、垂直电泳仪[伯乐生命医学产品(上海)有限公司,型号:Universal Hood II、PowerPac™ Basic];酶标仪(美国伯腾仪器有限公司,型号:BioTek-Elx800);高通量组织研磨器(宁波新芝生物科技股份有限公司,型号:Scientz-48);电子分析天平(上海YEASEN生物科技有限公司,型号:FA2004N);制冰机[斯科茨曼制冰系统(上海)有限

公司,型号:AF100AS];标准型旋转混匀仪、金属浴恒温器[大龙兴创实验仪器(北京)股份公司,型号分别为:MX-S、5012101200];台式低速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,型号:LX-100);低温高速离心机[赛默飞世尔科技(中国)有限公司,型号:D3024R];超纯水仪(南京易普易达科技发展有限公司,型号:PLUS-E2-10TJ);华佗牌毫针(苏州针灸用品厂,规格:0.25 mm×25 mm);华佗牌电针仪(苏州医疗用品有限公司,型号:SDZ-II)。

2 方法

2.1 分组与造模方法

SD 雄性大鼠适应性喂养 7 d 后开始进行实验,采用随机数字表法,将 24 只大鼠随机分为 4 组,分别为空白组、模型组、阿洛司琼组及电针组,每组各 6 只。选择灌服番泻叶煎剂联合慢性束缚及避水应激建立 IBS-D 动物模型。第 1~21 天,将模型组、阿洛司琼组及电针组大鼠束缚在自制鼠瓶内,限制其活动,时长为 2 h;第 8~21 天,以上 3 组大鼠束缚后灌服番泻叶溶液,给药体积为 10 mL/kg;第 15~21 天,在一个透明的塑料容器(73 cm×54 cm×44 cm)中心位置固定一个圆形平台(12 cm×12 cm×20 cm),在容器里加入室温以下的水,水面低于平台面 1 cm,将大鼠放置在平台上 1 h,并避免外界干扰,连续造模 21 d。将每组大鼠分开放置于代谢笼中,分别记录各组大鼠 6 h 内排出的稀便数与总排便数。以稀便率(稀便数/总排便数×100%)≥25%作为造模成功标准^[9]。

2.2 干预方法

造模成功后,对空白组、模型组与电针组大鼠予以生理盐水按 1 mL/100 g 体质量灌胃,对阿洛司琼组大鼠予以 1 mg/mL 浓度的阿洛司琼溶液按 1 mL/100 g 体质量灌胃,1 次/d,连续灌胃 14 d。对电针组大鼠每日 16:00 开始进行电针治疗,大鼠在 5%异氟烷伴 70%氮气和 30%氧气诱导麻醉后,以 1%~2%的浓度维持麻醉。取大鼠仰卧位,穴位定位参照《实验针灸学》^[10]大鼠标准穴位图谱,选取实验大鼠的单侧足三里、天枢,次日选取对侧穴位。用 0.25 mm×25 mm 华佗牌毫针直刺,天枢直刺 3 mm、足三里直刺 5 mm 后进行电针干预治疗,正极连天枢,负极连足三里,两毫针间隔超过 0.5 mm 且不接触,避免短路。电针参数为疏密波(疏波 10 Hz/密波 50 Hz),强度定于

该治疗仪“1”档左右,频率 2/100 Hz,电源电压 9 V,电针时间 15 min,1 次/d,连续治疗 14 d。

2.3 大鼠内脏敏感性评估

腹壁回撤反射(abdominal wall retraction reflex, AWR)实验^[11]:0 分为无行为反应,4 分为骨盆抬起、身体呈弓状,0~4 分随着大鼠结肠扩张时的行为表现增强而评分增加。具体过程如下:大鼠评分前 18 h 禁食不禁水,用乙醇棉片对大鼠肛门进行消毒,再将 8 号导尿管前端用甘油进行润滑,然后将导尿管从大鼠肛门慢慢插入,直至球囊距肛门 1 cm 左右时停止(应轻柔不可暴力),此时实验人员用手将导尿管与大鼠尾根部固定在一起。待大鼠平静后用 5 mL 注射器连接好导尿管并向球囊内缓慢均匀注水使其扩张,观察并记录大鼠 AWR 实验达到 4 分时所需的注水量。连续测量 3 次,每次 20 s,每次间隔 5 min,最终结果取 3 次测量结果的平均值。AWR 实验为相同施术者进行操作以减少实验误差。

2.4 样本采集与指标检测

2.4.1 动物取材 实验结束前 1 天,各组大鼠禁食不禁水。实验结束当天用 20%乌来糖溶液进行麻醉,剂量按大鼠体质量 1 mL/100 g 计算。于大鼠颈动脉取血后,在离心机中以 4 000 r/min 离心 10 min(离心半径 40 cm),分离血清。再将标本放置-80 ℃冰箱保存,用于 5-HT ELISA 试剂盒检测。解剖分离大鼠末端结肠,均剪取同一部位约 1 cm 结肠末端组织,用生理盐水将结肠组织冲洗干净后;一半放置于浓度为 10%的中性甲醛溶液中固定,用于结肠 HE 染色;另一半直接放置在 1.5 mL 离心管并置于-80 ℃冰箱保存,用于 Western blot 实验。

2.4.2 一般指标检测 (1)一般情况观察:观察每天各组大鼠外观、活动情况、情志等变化。(2)体质量增长率(%)=(2 周后的大鼠体质量-2 周前的大鼠体质量)/2 周前的大鼠体质量×100%。

2.4.3 粪便含水量 取小鼠的新鲜粪便,称取湿重(g),于烘箱烘干 72 h 后再称取其干重(g)以计算粪便含水量。粪便含水量(%)=(新鲜粪便-粪便干重)/新鲜粪便×100%。

2.4.4 HE 染色观察结肠组织形态 将 4%多聚甲醛固定大鼠结肠组织经石蜡包埋、切片后,经过 PBS、苏木精染液浸泡,清洗过后,再由酸性乙醇浸润,碳酸锂、伊红染液浸泡后由乙醇、二甲苯溶液浸

泡封片后。在光学显微镜下观察大鼠结肠组织形态病变情况。

2.4.5 血清中 5-HT 浓度的测定 ELISA 法检测血浆中 5-HT 含量。分别按照试剂盒操作步骤,检测血清中 5-HT 含量的变化。

2.4.6 Western blot 验证目的蛋白含量的改变 (1)组织总蛋白的提取:用 RIPA 裂解缓冲液提取大鼠结肠组织中的总蛋白。(2)蛋白含量测定:用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白质定量。(3)SDS-PAGE 电泳:电泳过后,将总蛋白转移至硝化纤维素膜上转膜过程 90 min,转膜结束后将膜浸泡在含一抗(1:1000)溶液中 4 ℃孵育过夜,TBST 清洗后再与二抗(1:1000)孵育 2 h。最后,曝光后分析蛋白 5-HT3AR 的相对表达量。

2.5 统计学方法

本研究使用 GraphPad Prism 9.0 对实验数据进行统计。数据差异比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠一般情况观察

空白组实验期间活动正常,精神正常,毛发有光泽,反应敏捷,大便成型,肛门无粪染。造模成功后的大鼠(模型组、阿洛司琼组、电针组)出现精神疲倦,活动减少,扎堆蜷缩于角落,易激惹,未见黏液血便,肛门可见不成形粪便黏附,粪染明显,垫料污染严重。电针治疗期间及电针治疗后,模型组一般情况无明显改善;阿洛司琼组精神一般,较造模后好动,大便成形,为粪粒状;电针组精神良好,活动正常,毛色恢复光泽,大便干湿适中,为成形粪粒。

3.2 各组大鼠体质量增长率比较

与治疗前比较,治疗后空白组、模型组、阿洛司琼组及电针组体质量增长率显著降低($P < 0.001$);与空白组比较,模型组与阿洛司琼组体质量增长率降低($P < 0.01, P < 0.05$);与模型组、阿洛司琼组大鼠比较,电针组大鼠的体质量增长率升高($P < 0.05$)。详见表 1。

3.3 各组大鼠粪便含水量比较

与治疗前比较,电针组粪便含水量显著降低($P < 0.01$);与空白组比较,模型组及阿洛司琼组粪便含

表 1 各组大鼠体质量增长率变化($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	治疗前	治疗后
空白组	6	0.450±0.050	0.090±0.004 ^{△△△}
模型组	6	0.310±0.060	-0.010±0.006 ^{△△△**}
阿洛司琼组	6	0.320±0.030	0.010±0.014 ^{△△△*}
电针组	6	0.320±0.020	0.070±0.049 ^{△△△**}

注:与治疗前比较,^{△△△} $P < 0.001$;与空白组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$;与阿洛司琼组比较,[§] $P < 0.05$ 。

水量高($P < 0.001, P < 0.05$);与模型组、阿洛司琼组比较,电针组的粪便含水量降低($P < 0.001, P < 0.05$)。详见表 2。

表 2 各组大鼠粪便含水量变化($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	治疗前	治疗后
空白组	6	0.43±0.23	0.37±0.12
模型组	6	0.82±0.15	0.82±0.06 ^{***}
阿洛司琼组	6	0.81±0.10	0.66±0.10 [*]
电针组	6	0.82±0.06	0.42±0.09 ^{△△△**}

注:与治疗前比较,^{△△} $P < 0.01$;与空白组比较,^{*} $P < 0.05$,^{***} $P < 0.001$;与模型组比较,[#] $P < 0.01$;与阿洛司琼组比较,[§] $P < 0.05$ 。

3.4 各组大鼠肠道敏感性比较

与治疗前比较,治疗后空白组、模型组、阿洛司琼组及电针组大鼠肠道容量阈值差异无统计学意义($P > 0.05$);与空白组比较,模型组肠道容量阈值显著降低($P < 0.001$);与模型组比较,阿洛司琼组与电针组肠道容量阈值升高($P < 0.05$);与阿洛司琼组比较,电针组大鼠肠道容量阈值差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见表 3。

表 3 各组大鼠肠道容量阈值变化($\bar{x} \pm s, \text{mL}$)

组别	n	治疗前	治疗后
空白组	6	2.63±0.15	2.57±0.21
模型组	6	1.67±0.42	1.27±0.16 ^{***}
阿洛司琼组	6	1.47±0.42	2.00±0.35 [#]
电针组	6	1.60±0.35	2.00±0.26 [#]

注:与空白组比较,^{***} $P < 0.001$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$ 。

3.5 各组大鼠结肠组织病理形态比较

空白组结肠黏膜上皮完整、吸收细胞呈柱状,上皮内混有少量杯状细胞,上皮下的隐窝排列规则、高度正常,隐窝内含大量杯状细胞,细胞密度适中。模型组可见黏膜局部糜烂坏死,坏死灶疏松、毛细血管扩张、少量炎细胞浸润。阿洛司琼组可见隐窝局部坏死、间质疏松、毛细血管扩张充血、少量炎细胞浸润。

电针组黏膜上皮完整,吸收细胞呈柱状,黏膜皱壁中可见炎细胞浸润,炎细胞主要是淋巴细胞和少量中性粒细胞。与模型组比较,阿洛司琼组黏膜上皮完整,坏死范围明显减小。与模型组比较,电针组上皮尚且完好,且无坏死灶。与阿洛司琼组比较,电针组上皮完整,无坏死炎性损伤程度轻。详见图 1。

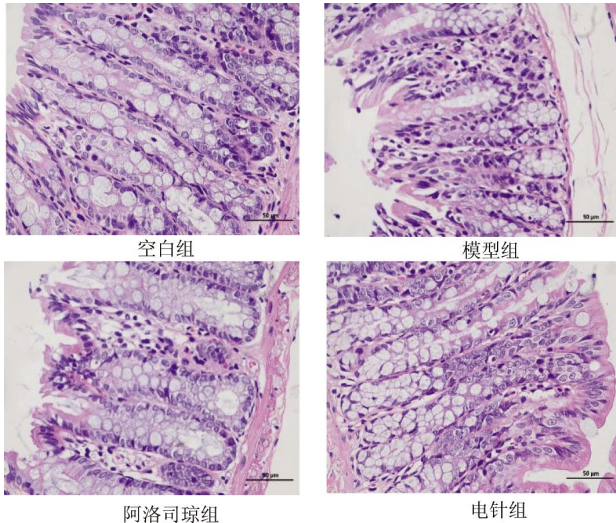


图 1 各组大鼠结肠组织病理形态相比(HE, $\times 200$, 标尺=50 μm)

3.6 各组大鼠血清中 5-HT 含量比较

与空白组比较,模型组血清中 5-HT 的含量上升 ($P < 0.05$);与模型组比较,电针组血清中 5-HT 含量下降 ($P < 0.05$);与阿洛司琼组比较,电针组血清中 5-HT 的含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。详见表 4。

表 4 各组大鼠血清 5-HT 含量 ($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

组别	n	5-HT
空白组	6	256.60 \pm 92.12
模型组	6	1 656.00 \pm 1 109.00*
阿洛司琼组	6	307.80 \pm 134.70
电针组	6	467.80 \pm 149.20*

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,* $P < 0.05$ 。

3.7 各组大鼠结肠 5-HT3AR 蛋白表达比较

与空白组比较,模型组结肠的 5-HT3AR 蛋白表达升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,阿洛司琼组和电针组结肠的 5-HT3AR 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.001$);与阿洛司琼组比较,电针组结肠 5-HT3AR 蛋白表达显著降低 ($P < 0.001$)。详见图 2、表 5。

4 讨论

IBS-D 病机复杂,内脏敏感性增高是其主要病

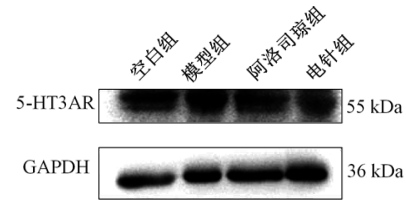


图 2 各组大鼠结肠 5-HT3AR 蛋白表达量结果

表 5 各组大鼠结肠 5-HT3AR 蛋白表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	5-HT3AR/GAPDH
空白组	6	2.04 \pm 0.16
模型组	6	2.32 \pm 0.11*
阿洛司琼组	6	1.76 \pm 0.07 ^{###}
电针组	6	1.29 \pm 0.04 ^{####}

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,^{###} $P < 0.001$;与阿洛司琼组比较,^{####} $P < 0.001$ 。

理生理机制之一^[12]。慢性束缚应激可以导致大鼠神经内分泌和免疫系统紊乱,出现焦虑、抑郁等情绪障碍,进而影响内脏感觉传入神经的功能,导致内脏高敏感性^[13]。结合课题组前期预实验,使用长期单一的慢性应激并不能稳定制备大鼠内脏高敏感模型。避水应激作为一种急性应激源,可加重大鼠的心理压力,进一步加重内脏高敏感性^[14]。以上两种手段结合造模结束后,各组大鼠结肠容量阈值较空白组显著降低,说明慢性束缚叠加避水应激成功诱导 IBS-D 大鼠的内脏高敏感性。番泻叶是一种天然的泻药,其主要成分为番泻苷,具有刺激肠道蠕动和分泌的作用。番泻叶灌胃后,番泻苷可以迅速吸收进入血液循环,作用于肠道平滑肌,增加肠道蠕动频率和力度,引发腹泻^[15]。用以上 3 种方法相结合的造模方式造模结束后,与空白组大鼠相比各实验组大鼠的粪便含水量显著升高,说明本实验成功建立 IBS-D 大鼠模型。研究表明,针刺对 IBS-D 患者具有显著的治疗效果,但其机制并不明确^[16]。5-HT 是一种重要的神经递质,与肠道运动和内脏感觉功能密切相关。在 IBS-D 患者中,5-HT 含量与受体 5-HT3AR 蛋白表达异常升高,导致出现肠道动力学紊乱和腹泻症状^[17]。本研究发现,电针可以显著降低 IBS-D 模型大鼠血清中 5-HT 含量,并下调 IBS-D 模型大鼠结肠 5-HT3AR 蛋白表达。同时,提高 IBS-D 模型大鼠的体质量,降低其粪便含水量及其内脏敏感性,改善 IBS-D 模型大鼠的状态,为电针治疗 IBS-D 提供实验依据。阿洛司琼是一种选择性 5-HT₃ 受体拮抗剂,通过阻断

肠道神经元上的 5-HT₃ 受体,减少 5-HT 在肠道中的生物活性,从而达到缓解腹泻的作用^[18]。这与本研究电针治疗 IBS-D 的机制相似,为电针治疗 IBS-D 提供了有效的参照。电针作为一种非药物治疗,具有副作用小、安全性高的特点,在各方面相较于阿洛司琼具有一定的优势。

中医学将 IBS-D 归属于“腹痛”“腹胀”“泄泻”等中焦失养范畴,病位以脾胃、大小肠为主,五脏六腑气机失调是此病发病的关键^[19]。IBS-D 初期病机为肝失疏泄、气机紊乱引发肝气乘脾烦胃,继而脾胃失职,清扬不升,浊阴不降,肠腑失司,泄泻不止。脾为气血生化之源,后期病机为脾虚日久,脾阳亏虚,肾阳失于温煦,疾病由虚转实,绵延难愈。中医论治,先辨其脏腑,IBS-D 病在胃肠,胃肠属六腑,六腑泻而不藏,以通为用,其病多实。所以,IBS-D 的中医治疗原则是通降腑气以治疗胃肠实证。针灸在调虚实、通气机等方面,有重要作用。而腧穴的选择是针灸处方的第一组成要素,与针灸的治疗效果直接相关。腧穴的选择主要涵盖选穴原则和配穴方法两部分。在选穴原则方面,可以从临证选穴的原因入手。天枢属足阳明胃经,为大肠的募穴。张景岳注释《素问·六微旨大论篇》写道“枢,枢机也。居阴阳升降之中,是为天枢”,说明天枢有调节情志、和胃止痛、健脾止泻的功效,可用于治疗腹痛、便秘、腹泻等胃肠病^[20]。足三里为下合穴,属足阳明胃经,《素问·咳论篇》云:“治腑者,治其合。”说明下合穴是治疗腑病的关键,故足三里可以作为调理胃肠的腧穴。此外《灵枢·五乱》提及:“气在于肠胃者……不下者,取之三里。”也解释了此穴可引腑气下行,调三焦腑气,治肚腑疾病^[21]。

本研究从配穴方法的角度出发,对“同经异腑合募配穴”法进行深入的剖析和探索。《灵枢·本输》记载“大肠小肠,皆属于胃,是足阳明也”,提示 IBS-D 可以通过足阳明胃经治疗^[22]。古今多有医家记载“合募配穴”的协同作用,但此次选用的“同经异腑合募配穴”法也能体现相互配合、疏通经脉、提高疗效、易于操作等优势。下合穴其位居于下,纵向作用于内腑,偏于通降。足三里为胃经的下合穴,有降胃气之效。《会元针灸学·足阳明胃经》曰:“天枢者……清气达胃府,上通肺金,转浊气通肠部,故名‘天枢’。”说明天枢具有转运胃气入肠腑的功效。足三里

与天枢相配,调畅胃经上胃腑与下肠腑气机的通畅,一上一下,一远一近,升降气机,斡旋上下,气机通畅,阴阳相合,可有效改善 IBS-D 患者腹痛、腹泻与情志不舒的症状,这与当代医学所提倡的舒缓情志的方式相契合^[23]。在此之前,“合募配穴”法是治疗肠道疾病的常用方法之一。合募配穴是指将本腑的下合穴与募穴相配。所以,单纯的胃腑疾病一般取胃的合募两穴:中脘和足三里。但根据已有研究发现,此二穴在病理条件下,对胃的运动和内脏感觉基本是无异的^[24],二者配伍也并未达到“1+1>1”的效果^[25]。基于对 IBS-D 的辨脏腑分析,该病并非是单纯的胃腑疾病,故本实验针对 IBS-D 病位的不单一性提出一种新型的“合募配穴”,也就是用同经异腑的合募相配,比如用大肠经的募穴配伍胃经的下合穴或者用胃经的募穴和大肠经的下合穴相配。此前也有大数据显示,天枢、足三里是治疗 IBS 常用穴中的首要穴位^[26]。最终,本实验在“合募配穴”的指导思想下,秉承着针灸“辨证与辨经相结合”的诊治原则,提出了“同经异腑合募配穴”法,选择用电针刺刺激足阳明胃经的天枢、足三里,以期电针提高 IBS-D 的临床疗效奠定良好的基础与可供借鉴的思路。

本实验提出“同经异腑合募配穴”法治疗 IBS-D,有效降低了 IBS-D 模型大鼠的内脏高敏感,缓解其腹痛、腹泻症状。在前人的临床研究发现,针灸可以降低 IBS-D 患者的血清 5-HT 水平^[27],与本实验结果相一致,证明针灸在调节 5-HT 水平方面具有普遍性。通过研究发现,对于 5-HT 这一通路的深入研究,大多数是探究针灸对于 5-HT 上游合成通路的影响^[28],而本研究则是首次探究电针对于 IBS-D 模型大鼠 5-HT₃AR 这一 5-HT 受体的调控作用,这为今后进一步探讨针灸调节 IBS-D 的机制提供了方向。随着人们对健康认识的深化,针灸的补泻手法走进大众的视野中,目前通过补泻手法提高 IBS-D 的疗效的机制尚不明确,未来可以结合“同经异腑合募配穴”法进一步展开研究,希望本实验能为往后的学者提供相关领域的研究方向

综上,本实验结果显示,经过“同经异腑合募配穴”法进行电针干预治疗后,IBS-D 模型大鼠血清中 5-HT 含量及结肠 5-HT₃AR 蛋白表达均显著降低,提示“同经异腑合募配穴”电针法对 IBS-D 患者可能表现出更好的临床疗效,这为日后电针治疗 IBS-D 提供新的实验依据和实验思路。

参考文献

- [1] 丁宁, 彭天书, 熊之焰. 参苓白术散合穴位贴敷治疗腹泻型肠易激综合征 36 例临床观察[J]. 湖南中医杂志, 2020, 36(2): 4-6.
- [2] 杨芳, 严晶, 刘丽娜, 等. 肠易激综合征病因及发病机制研究的新进展[J]. 河北医科大学学报, 2020, 41(8): 987-992.
- [3] 王丹, 李慧, 田耀洲, 等. 伴焦虑抑郁的腹泻型肠易激综合征的中医药治疗进展[J]. 云南中医中药杂志, 2022, 43(7): 93-96.
- [4] 张媛, 王建成, 齐洪军. 从微生物-脑-肠轴理论探析消食化滞法治疗腹泻型肠易激综合征的机制[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2023, 31(11): 892-896.
- [5] LUO M, ZHUANG X J, TIAN Z Y, et al. Alterations in short-chain fatty acids and serotonin in irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis[J]. BMC Gastroenterology, 2021, 21(1): 14.
- [6] 袁媛. 逍遥丸联合针灸治疗肠易激综合征肝郁脾虚型临床观察[J]. 实用中医药杂志, 2023, 39(7): 1311-1313.
- [7] 杜文. 针灸联合远红外照射治疗脾胃不合同型失眠的临床效果与预后质量[J]. 中国医疗器械信息, 2021, 27(11): 143-144, 154.
- [8] 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见[S]. 国科发财字[2006]398号, 2006-09-30.
- [9] 仝理, 吴立斌, 李难, 等. 基于 5-羟色胺信号通路探讨艾灸治疗腹泻型肠易激综合征的机制[J]. 针刺研究, 2020, 45(7): 535-540.
- [10] 唐勇. 实验针灸学 [M]. 3 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2021: 146-149.
- [11] AL-CHAER E D, KAWASAKI M, PASRICHA P J. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development[J]. Gastroenterology, 2000, 119(5): 1276-1285.
- [12] 周绪柳, 王华, 吴松, 等. “标本配穴”艾灸与针刺对腹泻型肠易激综合征大鼠肠道敏感性和自主神经功能影响的比较[J]. 针刺研究, 2023, 48(11): 1134-1141.
- [13] 杨焱麟. 痛泻要方“抑木”组方对 IBS-D 内脏高敏相关脑肠肽的影响[D]. 成都: 成都中医药大学, 2021.
- [14] 胡莹, 郑依玲, 梅全喜, 等. 痛泻要方破壁饮片对慢性避水应激大鼠内脏高敏感性的调节作用[J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(3): 322-331.
- [15] 蓝思林, 刘倩影, 俞泳儿, 等. 番泻叶致小鼠急性腹泻模型的建立[J]. 天津农学院学报, 2023, 30(1): 70-73.
- [16] LI H Y, CHEN Y, HU Z Y, et al. Comparison of acupuncture and pinaverium bromide in the treatment of irritable bowel syndrome: A protocol for systematic review and meta-analysis[J]. Medicine, 2021, 100(16): e25604.
- [17] 曹佳男, 刘霞, 刘涛, 等. 艾灸对腹泻型肠易激综合征大鼠结肠 5-HT 及 5-HT_{3R} 的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(10): 1493-1497.
- [18] MAYER E A, BRADESI S. Alosetron and irritable bowel syndrome[J]. Expert Opinion on Pharmacotherapy, 2003, 4(11): 2089-2098.
- [19] 谢小玲, 黄适, 何锦轶, 等. 基于中医病因学说探讨 HMGB1 与 IBS-D 的相关性[J]. 西部中医药, 2023, 36(5): 112-115.
- [20] 文钱. 电针大肠俞募穴对 STC 大鼠胃肠传输功能及 ENS-ICC-SMC 网络形态学影响的研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2019.
- [21] 任玲, 周竞颖, 来奕恬, 等. “肚腹三里留”的理论内涵及临床应用探析[J]. 湖南中医杂志, 2023, 39(10): 107-111.
- [22] 孟迪, 唐小春, 万娟, 等. 从足阳明胃经论治功能性胃肠病的理论探究[J]. 云南中医中药杂志, 2021, 42(1): 99-101.
- [23] MARGOLIS K G, CRYAN J F, MAYER E A. The microbiota-gut-brain axis: From motility to mood[J]. Gastroenterology, 2021, 160(5): 1486-1501.
- [24] 杨兆坤. 电针足三里或中脘穴对急性胃黏膜损伤大鼠胃感觉和运动的调控[D]. 北京: 中国中医科学院, 2015.
- [25] 殷茵. 不同次序电针足三里、中脘调节小鼠胃运动的效应特征及其自主神经机制[D]. 南京: 南京中医药大学, 2017.
- [26] 廖柳. “以俞调枢”针刺法对 IBS-D 大鼠 PI3K/AKT 信号通路影响的研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2021.
- [27] 陈茜, 周愉, 张孟, 等. 针刺配合隔盐灸治疗脾虚型腹泻型肠易激综合征疗效观察[J]. 上海针灸杂志, 2021, 40(4): 400-405.
- [28] ZHU X W, LIU Z B, NIU W M, et al. Effects of electroacupuncture at ST25 and BL25 in a Sennae-induced rat model of diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome [J]. Acupuncture in Medicine, 2017, 35(3): 216-223.

(本文编辑 田梦妍)