

·针灸推拿·

本文引用: 谢映, 刘慧慧, 曹徵良, 夏云, 朱沁泉, 胡国恒. 基于肠道菌群和代谢组学探讨“脑肠共治”电针对孤独症大鼠的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(5): 828–837.

基于肠道菌群和代谢组学探讨“脑肠共治”电针对孤独症大鼠的作用机制

谢映^{1,2}, 刘慧慧², 曹徵良¹, 夏云¹, 朱沁泉¹, 胡国恒^{1,2*}

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007; 2. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208

【摘要】目的 观察“脑肠共治”电针对孤独症大鼠的社交能力及对肠道菌群、代谢产物的影响。**方法** 采用丙戊酸钠腹腔注射法制备孤独症大鼠模型, 选取造模成功的大鼠随机分为4组, 每组10只, 分别为模型组、基础电针组、针药结合组、脑肠共治电针组。另外选取10只正常大鼠为对照组。基础电针组予以电针百会、神庭、心俞; 针药结合组在基础电针组的基础上再予以益生菌灌胃治疗; 脑肠共治电针组在基础电针组基础上再结合电针足三里、曲池。均每日1次, 连续4周。采用三箱社交实验评估行为学改变, 16S rDNA测序分析肠道菌群分布情况, 超高效液相色谱串联质谱分析血浆中的差异代谢组分, 并结合 Spearman 相关性分析进行肠道菌群与代谢组学之间的关联分析。**结果** 与对照组相比, 模型组大鼠社交能力和社交新颖性均减弱 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 基础电针组、针药结合组、脑肠共治电针组的社交新颖性增强 ($P < 0.01$); 与基础电针组比较, 针药结合组、脑肠共治电针组社交新颖性增强 ($P < 0.01$)。肠道菌群研究发现, 与对照组比较, 模型组的弯曲菌门相对丰度上调, 嗜黏蛋白阿克曼菌相对丰度下调; 而与模型组相比, 针药结合组、脑肠共治电针组的弯曲菌门相对丰度下调, 嗜黏蛋白阿克曼菌相对丰度上调。LEfSe 分析发现, 脑肠共治电针组与模型组共筛选出嗜黏蛋白阿克曼菌等21个关键菌, 如与模型组比较, 脑肠共治电针组可上调嗜黏蛋白阿克曼菌、卷曲乳杆菌, 同时下调梭状芽胞杆菌等。代谢组学分析共筛选出12个差异代谢物, 通路分析显示, 其主要与氨基酸代谢、磷酸盐代谢、嘌呤代谢、花生四烯酸代谢等通路相关。**结论** 电针百会、神庭、心俞、足三里、曲池对孤独症大鼠社交能力有明显的改善作用, 调控肠道菌群如嗜黏蛋白阿克曼菌等菌属丰度, 同时影响代谢物水平, 且部分代谢物的改变与肠道菌群存在复杂相关性, 可能与氨基酸代谢、磷酸盐代谢、嘌呤代谢、花生四烯酸代谢等通路相关。

【关键词】 孤独症谱系障碍; 电针; 脑肠共治; 肠道菌群; 代谢组学; 社交能力

【中图分类号】 R245

【文献标志码】 A

【文章编号】 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.05.016

Mechanism of action of electroacupuncture targeting both brain and intestine on autistic rats based on intestinal flora and metabolomics

XIE Ying^{1,2}, LIU Huihui², CAO Zhengliang¹, XIA Yun¹, ZHU qinquan¹, HU Guoheng^{1,2*}

1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

【Abstract】Objective To observe the effects of electroacupuncture (EA) targeting both brain and intestine on the social ability, intestinal flora, and metabolites in autistic rats. **Methods** The autistic rat model was prepared by intraperitoneal injection of

【收稿日期】 2023-12-01

【基金项目】 湖南省中医药科研计划重点项目(A2023036); 湖南省卫生健康委员会科研课题(202206010043); 湖南省卫生健康委员会科研计划项目(D202306048765); 湖南省中医药科研课题(B2023121)。

【通信作者】 * 胡国恒, 男, 博士, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, E-mail: hugh9198@163.com。

sodium valproate, the successfully modeled rats were randomized into model group, basic EA group, acupuncture–medicine group, and EA targeting both brain and intestine group, with 10 rats in each group. In addition, 10 normal rats were selected as control group. The basic EA group was given EA at "Baihui" (GV20), "Shenting" (GV24), and "Xinshu" (BL15) acupoints, the acupuncture–medicine group was treated with probiotics by gavage on the basis of the basic EA group, and the EA targeting both brain and intestine group was treated with EA at "Zusanli" (ST36) and "Quchi" (LI11) acupoints on the basis of the basic EA group, once a day, for 4 consecutive weeks. The behavioral changes were assessed by three–chamber social experiments, the intestinal flora distribution was analyzed by 16SrDNA sequencing, the differential metabolic components in plasma were analyzed by ultra–high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, and the correlation between intestinal flora and metabolomics was analyzed by Spearman. **Results** Compared with the control group, the social ability and social novelty of rats in the model group were weakened ($P<0.01$). Compared with the model group, the social novelty of the basic EA group, acupuncture–medicine group, and EA targeting both brain and intestine group was enhanced ($P<0.01$). Compared with the basic EA group, the social novelty of acupuncture–medicine group and the EA targeting both brain and intestine group was enhanced ($P<0.01$). The study of intestinal flora found that compared with the control group, the relative abundance of *Campylobacter* in the model group was up–regulated, while the relative abundance of *Akkermansia muciniphila* was down–regulated. Compared with the model group, the relative abundance of *Campylobacter* in the acupuncture–medicine group and the EA targeting both brain and intestine group was down–regulated, while the relative abundance of *Akkermansia muciniphila* was up–regulated. LEfSe analysis found that a total of 21 key bacteria were screened out in the EA targeting both brain and intestine group and the model group, such as compared with the model group, the EA targeting both brain and intestine group can up regulated *Akkermansia muciniphila* and *Lactobacillus crispatus* and down–regulated *Clostridium*. A total of 12 differential metabolites were screened out by metabolomics analysis, and pathway analysis showed that they were mainly related to amino acid metabolism, phosphate metabolism, purine metabolism, arachidonic acid metabolism, and other pathways. **Conclusion** EA at "Baihui" (GV20), "Shenting" (GV24), "Xinshu" (BL15), "Zusanli" (ST36), and "Quchi" (LI11) acupoints can significantly improve the social ability of autistic rats, regulate the abundance of intestinal flora such as *Akkermansia muciniphila*, and affect the level of metabolites at the same time. Moreover, there is a complex correlation between the changes of some metabolites and intestinal flora, which may be related to amino acid metabolism, phosphate metabolism, purine metabolism, arachidonic acid metabolism, and other pathways.

[**Keywords**] autism spectrum disorder; electroacupuncture; treatment targeting both brain and intestine; intestinal flora; metabolomics; social ability

儿童孤独症谱系障碍(autism spectrum disorder, ASD)属神经发育障碍性疾病,据美国疾病控制与预防中心报道,孤独症的患病率呈显著上升趋势^[1]。SUN等^[2]于2019年发表的一篇多中心研究资料显示,我国儿童孤独症的患病率约1%,男女发病率之比约为4:1。临床暂无有效治疗ASD儿童核心症状的药物,主要通过康复训练改善症状^[3]。研究表明,中医治疗可明显改善ASD的症状^[4]。目前,该病的发病机制并不明确,考虑与遗传、环境、肠–脑轴等有关。近年来,肠–脑轴的研究模式已在ASD研究中逐步获得国内外学者的认可,肠道菌群亦成为探讨ASD的研究热点,肠道微生物组可以影响血脑屏障(blood–brain barrier, BBB)通透性,改变血清代谢谱,可能与ASD病理生理学相关^[5]。本实验拟从菌–肠–脑轴的角度出发,为电针治疗ASD提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年健康SD雄鼠和雌鼠各10只,SPF级,体质量为350~400g,于湖南斯莱克景达实验动物有限公司采购。实验动物质量合格证号:SYXK(湘)2019–0004。大鼠饲养在湖南中医药大学实验动物中心,实验在SPF级动物实验房进行,光照和黑暗交替12h,20~25℃室温,45%~65%相对湿度,控食并自由饮水。实验按照湖南中医药大学有关实验动物管理和使用规定严格执行。本实验经湖南中医药大学第一附属医院伦理委员会批准(伦理审查编号:ZY-FY20210813–24)。

1.2 主要试剂及仪器

丙戊酸钠(批号:1069–66–5,美国Sigma公司);双歧三联活菌胶囊(批号:国药准字S10950032,上

海上药信谊药厂有限公司)。华佗牌脉冲电子针疗仪、华佗牌毫针0.35 mm×13 mm(型号:SDZ-Ⅲ、V278013,苏州医疗用品公司);自动跟踪成像系统(型号:856-300W,北京众实迪创科技发展有限公司);三室社交箱60 cm×40 cm×20 cm(型号:XR-XJ117,上海欣软信息科技有限公司);高分辨质谱仪、超高效液相仪器(型号:LTQ Orbitrap XL ETD、U3000,美国 Thermo Fisher Scientific 公司);高通量测序仪(型号:NextSeq 500,美国 Illumina 公司)。

1.3 动物造模及分组

参考文献[6]的建模方法,将雌雄鼠按1:1比例在晚上7:00分别放置在同一鼠笼中过夜,于第2天早晨7:00将雄鼠取出,并观察雌鼠是否有阴栓,若雌鼠存在阴栓脱落,则将当天计为妊娠(embryonic day, E)第1天(E1),所有孕鼠均单独饲养在干净的鼠笼内。在大鼠怀孕11 d时给予浓度为100 mg/mL的丙戊酸钠600 mg/kg腹腔注射。后代大鼠出生的第28天选取雄性大鼠,通过三箱社交实验对行为学进行评估来确定造模是否成功^⑥。选取造模成功的40只大鼠随机分成4组,分别为模型组、基础电针组、针药结合组、脑肠共治电针组,每组10只。将另一组健康孕鼠腹腔注射同等剂量生理盐水,随机选取所产后代大鼠10只记录为对照组。

1.4 干预方法

按照《实验针灸学》提供的定位方法并类比人体腧穴骨度。基础电针组选取大鼠百会、神庭、心俞作为基础穴针刺,百会穴位于顶骨正中,神庭穴位于前正中线上,在额顶骨缝交界线前方处,心俞穴位于第5胸椎下两旁肋间。局部消毒后针刺单侧穴位,百会斜刺2 mm、神庭斜刺3 mm、心俞直刺2 mm,三穴直下2 mm处作为附点,穴位连接电针仪负极,相应附点接通正极,波形选择疏密波(疏波20 Hz,密波100 Hz),强度以穴位皮肤轻轻抖动为度,留针时间30 min。脑肠共治电针组予生理盐水2 mL/d灌胃,每日1次,选取基础穴结合足三里、曲池,足三里位于大鼠后肢膝关节外下方腓骨小头下约5 mm处,曲池位于桡骨近端关节外侧,足三里直刺5 mm、曲池直刺3 mm,两穴直下2 mm处作为附点,穴位连接电针仪负极,相应附点接通正极,波形选择疏密波(疏波20 Hz,密波100 Hz),强度以穴位皮肤轻轻抖动为度。针药结合组电针同基础电针组,结合予益生菌(每克含双歧杆菌不低于 1.0×10^8 CFU)灌胃^⑦。对照组、模型组除不针刺,其余同基础电针组。各组

干预均每日1次,连续4周。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 三箱社交实验评估 ASD 大鼠行为学 分别于造模后及治疗完成后进行两次三箱社交实验评估社交行为:第1次为造模后模型组通过与对照组的社交行为比较,验证造模是否成功;第2次为治疗后比较各组的社交行为。三箱社交实验主要通过观察实验动物在3个箱子之间的活动,了解其对陌生动物的社交兴趣和社交能力。三箱社交行为箱,中间被两块医用有机挡板均分为3个独立小室,一个圆形的社交笼子(直径12 cm)被放置在房间的左下角(社交房间)。此外,社交笼周围的面积(直径16 cm)设置为一个社会区域。在右房间与左房间的对称位置均放置一个空笼子。实验分为3个阶段:(1)适应阶段:提前1天将所有待测大鼠背朝实验者放入行为箱的中央室,使其在社交箱中自由活动10 min,充分熟悉环境;(2)社交能力检测:10 min后在右房间的社交笼中放入一只同种不同胎相似年龄段的大鼠(陌生鼠1),另一个保持空置,将测试鼠重新放至中央室使其自由活动10 min并记录;(3)社交新颖性检测:10 min后,75%乙醇消毒,再次将陌生鼠1放在右侧社交笼中,对侧社交笼放入另一只同种不同胎相似年龄段的大鼠(陌生鼠2),再次将测试鼠放入使其自由活动10 min并记录。

1.5.2 代谢组学检测 各组大鼠分别于基线期、治疗完成当天采血。血标本保持4℃存放,在15~30 min内离心15 min(离心力为 $2000 \times g$),置于-80℃冰箱中保存,用于血浆超高效液相色谱串联质谱非靶标代谢组学。入组后进行统一的样本代谢物混合制备成质控样本,再进行一级、二级质谱数据采集。通过ProteoWizard软件将原始数据转换为mzXML格式,再使用R程序包进行峰识别、峰提取、峰对齐和积分等处理,然后通过与BiotreeDB 2.1自建二级质谱数据库匹配对物质进行注释。

1.5.3 肠道微生物检测 用专用无菌粪便采集盒搜集大鼠粪便,采集约5 g粪便。样本采集后,按照50 μL/g样本的比例添加浓度为100 mg/mL叠氮化钠,混匀后分装样本至200 mg/管,然后立即用液氮速冻处理30 s以上,保存至-80℃冰箱,足量干冰低温运送。使用CTAB从不同的样本中提取16S rDNA,采用美国Illumina公司测序仪和配套试剂进行测序。同时,所有样本进行生物信息数据分析,并确定菌群特征。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件对数据进行处理并完成统计学分析。计量资料均符合正态分布,用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,运用独立样本 t 检验进行两组间数据比较,运用单因素方差分析进行多组间比较,运用 Tukey HSD 法进行组间两两比较。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ASD 模型建立指标结果

2.1.1 各组大鼠的三箱社交实验结果比较

(1) 干预后各组大鼠社交能力比较

模型组大鼠空笼接触时间长于对照组大鼠($P<0.01$),且模型组大鼠与陌生鼠接触时间短于对照组大鼠($P<0.01$),故模型组社交能力出现障碍,模型建立成功。详见表 1、图 1。

表 1 模型组与对照组大鼠社交能力比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	空笼接触时间	与陌生鼠接触时间
对照组	10	52.26 \pm 5.12	69.76 \pm 6.23
模型组	10	61.57 \pm 3.27**	29.16 \pm 4.36**

注:与对照组比较,** $P<0.01$ 。

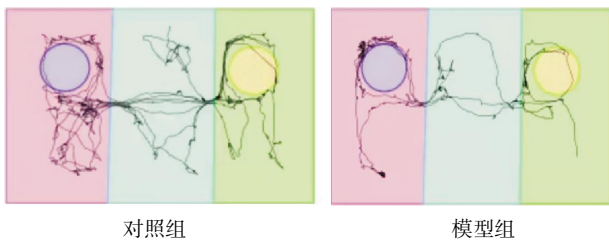


图 1 模型组与对照组大鼠三箱社交能力轨迹图

(2) 干预后各组大鼠社交新颖性比较

治疗后,与对照组比较,模型组接触陌生鼠 2 时间减少($P<0.01$);与模型组比较,基础电针组、针药结合组、脑肠共治电针组与陌生鼠 2 接触时间增加($P<0.05$);针药结合组、脑肠共治电针组接触陌生鼠 2 时间多于基础电针组($P<0.05$)。说明基础电针组、针药结合组、脑肠共治电针组均改善社交新颖性,其中针药结合组、脑肠共治电针组更明显。详见表 2、图 2。

表 2 各组大鼠社交新颖性比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	接触陌生鼠 1 时间	接触陌生鼠 2 时间
对照组	10	77.51 \pm 3.67	125.23 \pm 5.23
模型组	10	62.12 \pm 5.26	51.47 \pm 4.35**
基础电针组	10	76.07 \pm 7.59	77.23 \pm 3.37 [#]
针药结合组	10	76.88 \pm 7.46	87.25 \pm 6.27 ^{#Δ}
脑肠共治电针组	10	72.27 \pm 5.13	113.02 \pm 6.37 ^{#Δ}

注:与对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$;与基础电针组比较, ^{Δ} $P<0.01$ 。

2.2 各组大鼠肠道菌群比较

2.2.1 测序结果的丰富度与 α 多样性分析 本次研究基于扩增序列变体(amplicon sequence variant, ASV)聚类分析结果,共获得 9 571 个 ASV,Chao 指数曲线趋于平坦时,说明测序数据量足够大。本次实验曲线趋向平坦时,说明测序数据量渐近合理,样品均具有较好的丰富度。详见图 3。

2.2.2 β 多样性分析 与模型组比较,基础电针组、针药结合组、脑肠共治组与陌生鼠 2 接触时间增加。NMDS 图形中点与点之间的距离表示样品之间差异程度。通常会给出该模型的 stress 值,用于判断该图形是否能准确反映数据排序的真实分布。通常认为 stress <0.2 时 NMDS 有一定的解释意义,故 5 组 NMDS 分析有显著差异。详见图 4。

2.2.3 各组大鼠肠道菌群在门、属水平上的差异 通过对各组大鼠门水平上丰度比较发现,与对照组比较,模型组 Campylobacterota(弯曲菌门)相对丰度上调,Verrucomicrobiota(疣微菌门)、Actinobacteriota(放线菌门)相对丰度下调;与模型组比较,针药结合组、脑肠共治电针组 Proteobacteria(变形菌门)、Desulfobacterota(脱硫菌门)相对丰度上调,campylobacterota(弯曲菌门)相对丰度下调(图 5A)。在属水平上,与对照组比较,模型组 Muribaculaceae(木杆菌)相对丰度上调,Akkermansia(嗜黏蛋白阿克曼菌)相对丰度下调;与模型组比较,针药结合组 Akkermansia(嗜黏蛋白阿克曼菌)相对丰度上调,Muribaculaceae(木杆菌)相对丰度下调;与模型组比较,脑肠共治电针组 Ligilactobacillus(乳杆菌)、Akkermansia(嗜黏蛋白阿

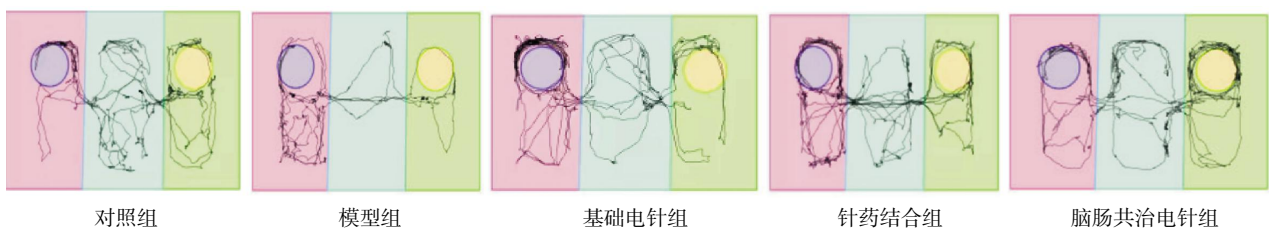


图 2 各组大鼠社交新颖性轨迹图

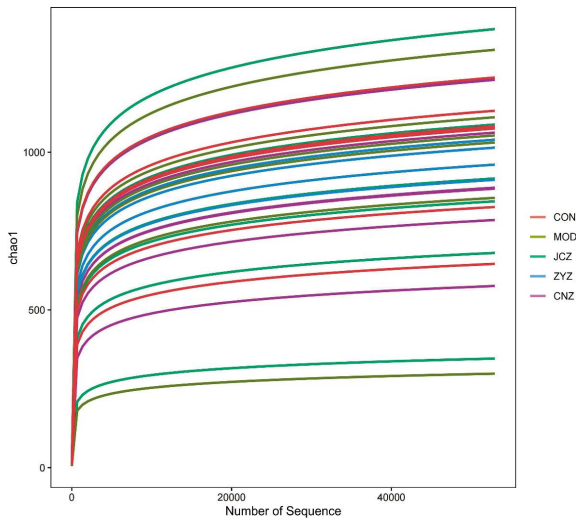


图 3 样本丰富度分析

注: CON.对照组; MOD.模型组; JCZ.基础电针组; ZYZ.针药结合组; CNZ.脑肠共治组。

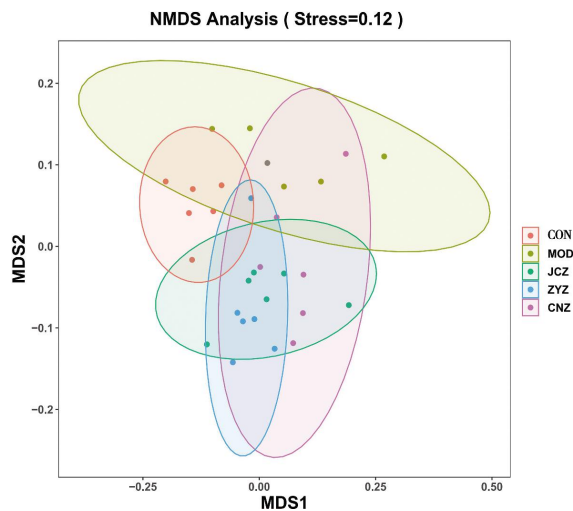


图 4 β 多样性分析

注: CON.对照组; MOD.模型组; JCZ.基础电针组; ZYZ.针药结合组; CNZ.脑肠共治电针组。

克曼菌)相对丰度上调,Clostridiales(梭状芽孢杆菌)相对丰度下调(见图 5B)。

2.2.4 LEfSe 差异分析 采用 LEfSe 法分析模型组

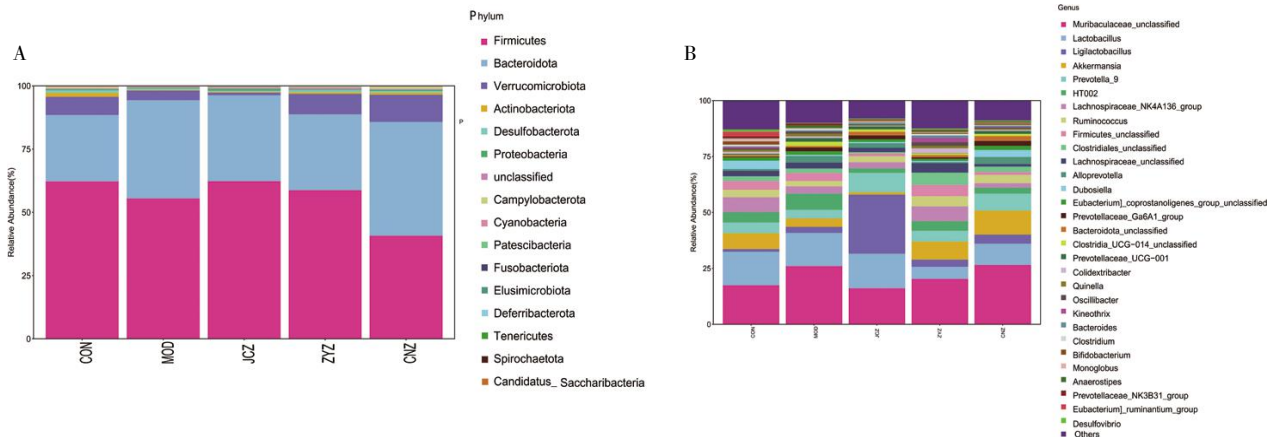


图 5 各组大鼠肠道菌群在门、属水平差异

注: A.门水平物种排名; B.属水平物种排名; CON.对照组; MOD.模型组; JCZ.基础电针组; ZYZ.针药结合组; CNZ. 脑肠共治电针组。

与脑肠共治电针组,寻找关键菌。一共筛选出 21 种组间具有显著差异的物种 ($P < 0.05$ 且 LDA 分数 > 3 分), 结果显示,模型组中考拉杆菌属(*g__Phascolarctobacterium*)、考拉杆菌种(*s__Phascolarctobacterium-faecium*)、梭状芽孢杆菌科(*f__Clostridiaceae*)等相对丰度较高,脑肠共治电针组中另枝菌属(*g__Alis-tipes*)、多雷亚菌属(*g__Dorea*)、紫单胞菌属(*g__Odoribacter*)、紫单胞菌属种(*s__Odoribacter*)、阿克曼菌科(*f__Akkermansiaceae*)、阿克曼菌种(*s__Akkermansia*)、阿克曼菌属(*g__Akkermansia*)、疣微菌目(*o__Verrucomicrobiales*)、卷曲乳杆菌种(*s__Lactobacillus-crispatus*)相对丰度较高。详见图 6。

2.3 各组大鼠代谢组学分析

2.3.1 样本间的主成分分析 基于 QE 的代谢组学数据具有高维(检测出代谢物种类多)、小样本(检测样本量偏少)的特性,所以采用正交偏最小二乘法-判别分析(partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA)的统计方法对结果进行分析。以下主要展示 POS 模式下,对照组、模型组与脑肠共治电针组 3 组间样本数据得分散点图。详见图 7。

2.3.2 脑肠共治电针组与模型组血清差异性代谢物

基于 OPLS-DA 对正、负离子模式下检测到的所有代谢物进行差异分析,绘制正、负离子模式下的代谢物火山图(见图 8),观察差异代谢的分布。以同时满足 $VIP > 1.5$ 、 $P < 0.05$ 作为条件筛选差异代谢物,并结合 HMDB、KEGG 等数据库,最终共筛选 12 个差异代谢物,其中正离子模式下 4 个、负离子模式下 8 个。详见表 3。

2.3.3 差异代谢物的相关通路分析 基于 KEGG 分析差异代谢物,筛选潜在的关键代谢通路,结果提示其可能与调节氨基酸代谢、磷酸盐代谢、嘌呤代谢、花生四烯酸代谢等通路有关。详见图 9。

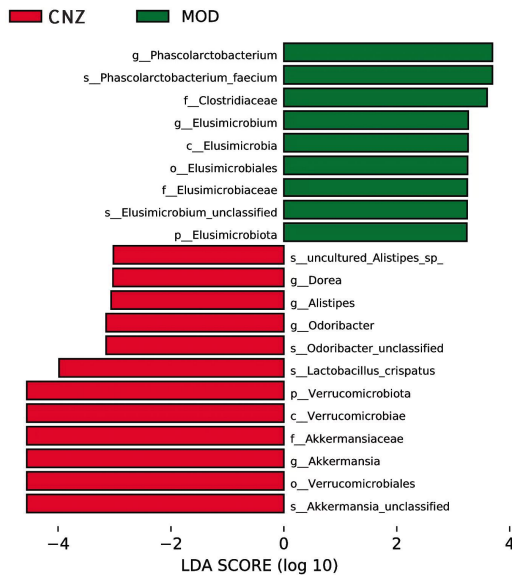


图6 模型组与脑肠共治电针组大鼠肠道菌群 LEfSe 差异结果分析

注: MOD.模型组; CNZ.脑肠共治电针组。

2.4 肠道菌群与代谢组学关联分析

对模型组和脑肠共治电针组肠道菌群与代谢组学进行 Spearman 相关性分析:卷曲乳杆菌与血浆中

代谢物甘氨酸呈正相关,与β-氨基异丁酸酯呈显著负相关;另枝菌属与琥珀酸半醛脱氢酶呈正相关,与谷氨酰胺呈显著负相关;梭状芽孢杆菌与磷酸胆碱呈显著负相关;嗜黏蛋白阿克曼菌与磷酸胆碱呈显著正相关,与谷氨酰胺呈显著负相关。详见图10。

3 讨论

ASD的病因尚未完全明确,部分孤独症患者存在染色体异常和基因变异,同时,部分患者在胃肠道症状方面也表现异常^[8]。中医学认为,本病病因多与先天胎禀不足或后天失养导致髓海不充有关^[9]。因此,髓海不足会出现“五迟”“童昏”“视无情”症状。脾为后天之本,孤独症患儿先天禀赋不足,脾胃功能相对薄弱,而饮食偏嗜,可加剧脾胃虚弱,脾为气血生化之源,小儿脾常不足,后天失养,不能化气上奉于心,致心血不足,心神失养,出现行为异常^[10]。孤独症患者中较高比例的胃肠道异常症状与患者肠道微生物紊乱关系密切,因此推论,微生物、肠道与大脑构成的菌-肠-脑轴可能在孤独症的发病过程中起重要作用。本文选取经典的腹腔注射丙戊酸钠造模,

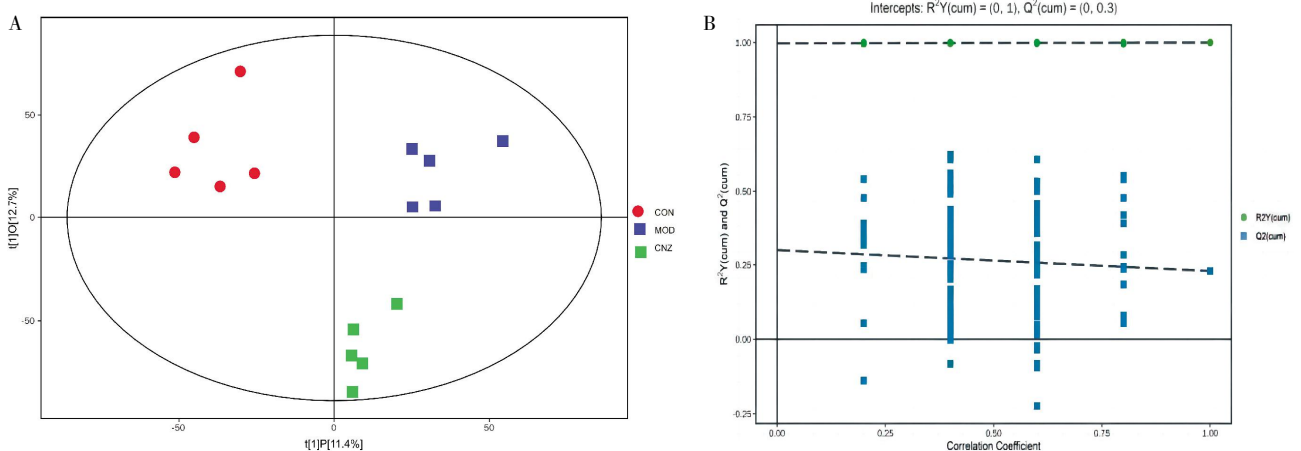


图7 3组大鼠血浆代谢物血浆代谢物的 OPLS-DA 分析图

注:A.OPLS-DA 散点图;B.OPLS-DA 置换检验图;CON.对照组;MOD.模型组;CNZ.脑肠共治电针组。

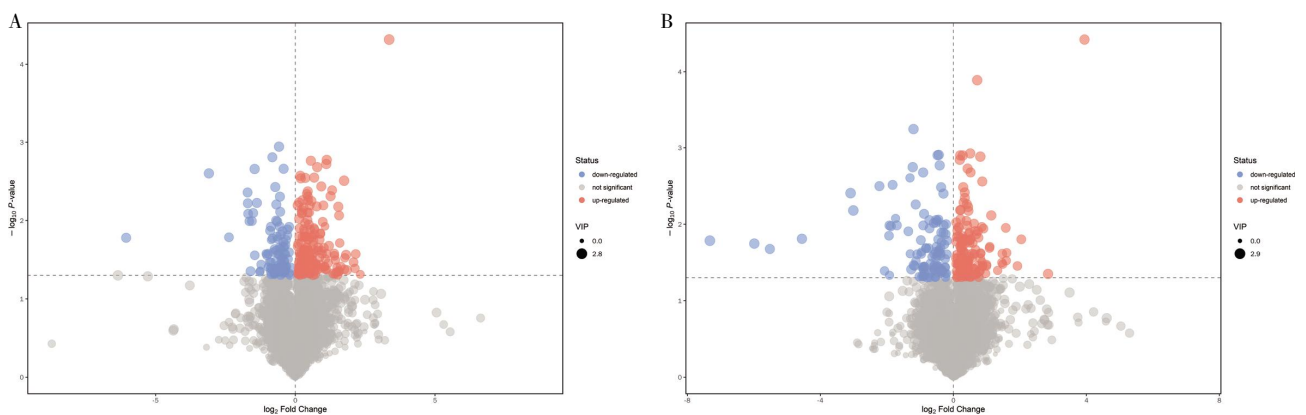


图8 不同离子模式下模型组和脑肠共治电针组代谢物火山图

注:A.正离子模式下火山图;B.负离子模式下火山图;CON.对照组;MOD.模型组;CNZ.脑肠共治电针组。

表 3 正、负离子模式显著性差异代谢物

模式	差异代谢物	变化趋势	m/z	VIP 值	P 值
P	Glycine(甘氨酸)	↑	407.19	1.87	0.012
	Sphingosine1-phosphate (鞘氨醇-1-磷酸)	↑	467.25	2.02	0.017
	Succinic semialdehyde(琥珀酸半醛脱氢酶)	↑	467.35	2.07	0.003
	Hypoxanthine (次黄嘌呤)	↑	650.29	2.15	0.046
N	Phosphorylcholin(磷酸胆碱)	↑	801.75	2.35	0.008
	L-valine(缬氨酸)	↑	264.54	1.83	0.036
	L-Arginine(精氨酸)	↓	388.46	1.76	0.013
	D-Glutamine(谷氨酰胺)	↓	643.22	2.13	0.021
	Beta-Amino Isobutyrate(β -氨基异丁酸酯)	↑	723.91	2.52	0.011
	Taurine(牛磺酸)	↑	580.17	1.93	0.003
	hepoxilin B3	↑	527.38	2.15	0.023
	Eicosapentaenoic acid (二十碳五烯酸)	↑	436.21	2.45	0.028

注: ↑表示与模型组比较,脑肠共治电针组差异代谢物呈上调趋势; ↓表示与模型组比较,脑肠共治电针组差异代谢物呈下调趋势。

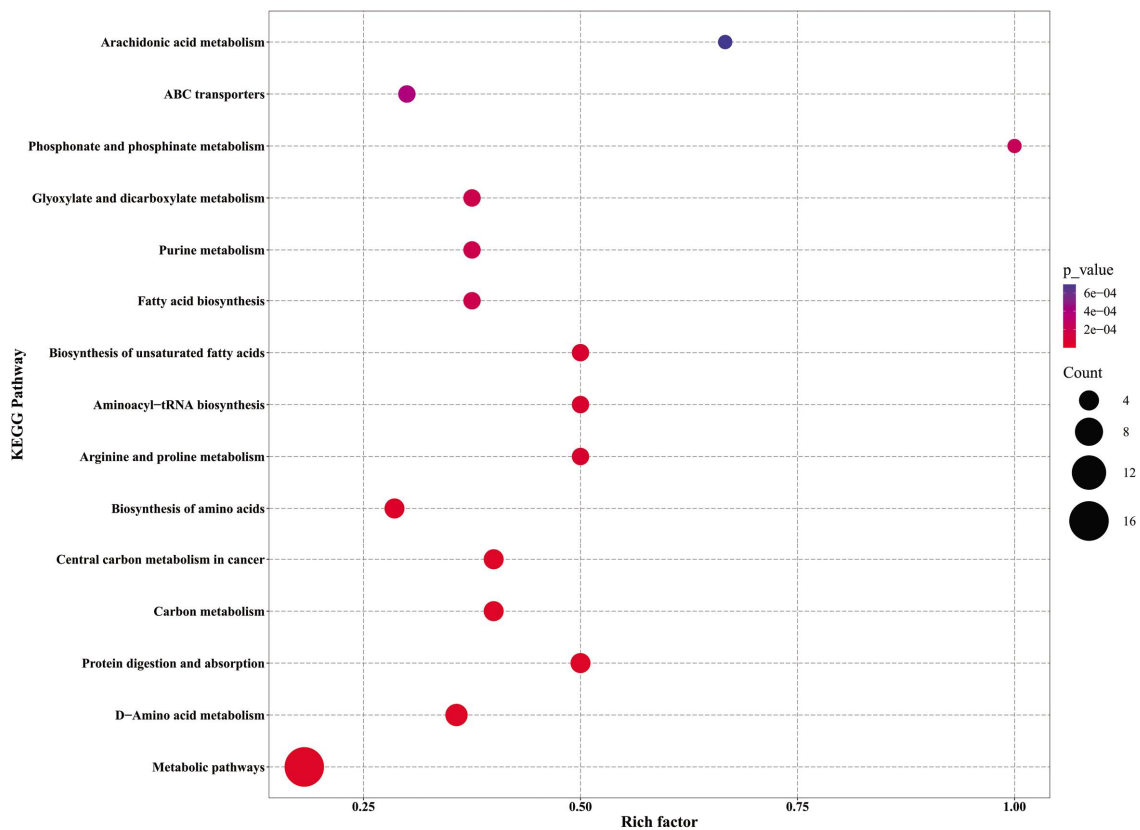


图 9 KEGG 富集通路图

丙戊酸钠啮齿类动物模型除了与 ASD 患者在行为学和解剖学上具有一定相似性外,还表现出与 ASD 患者相似的肠道菌群失调,这使得丙戊酸钠啮齿类动物模型成为研究 ASD 的最佳模型之一^[11]。

行为学检测为评估 ASD 模型的主要手段之一^[12]。本研究对各组大鼠进行了行为学检测。腹腔注射 VPA 造模后,通过三箱社交实验发现,模型组大鼠社交能力明显减弱,判定造模成功。干预后,比较各组大鼠的社交能力和新颖性,与模型组比较,基础

电针组、针药结合组、脑肠共治电针组与陌生鼠接触时间较长,且 3 组与陌生鼠 2 接触时间大于与陌生鼠 1 接触时间,大鼠社交新颖性得到改善,其中针药结合组、脑肠共治电针组社交新颖性优于基础电针组,证明针药结合组及脑肠共治电针组可更有效改善 ASD 大鼠症状。

为了探讨脑肠共治电针治疗 ASD 的作用机制,本研究采用 16S rDNA 观察其对 ASD 大鼠肠道菌群的影响。结果显示,与模型组相比,脑肠共治电针

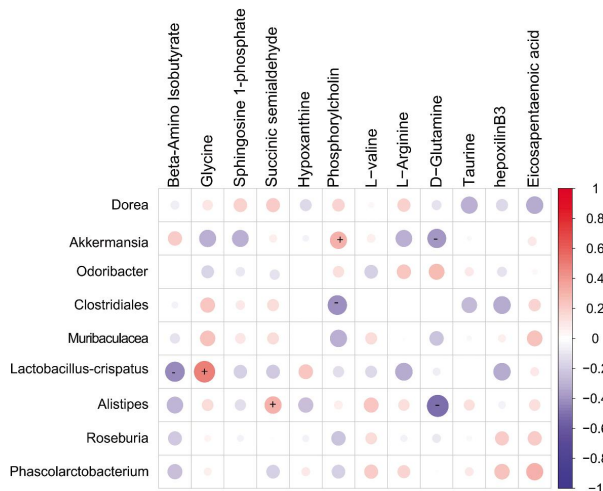


图 10 肠道菌群和代谢组学的联合分析

组可上调嗜黏蛋白阿克曼菌相对丰度,嗜黏蛋白阿克曼菌是一种肠道中的黏蛋白降解细菌,孤独症儿童嗜黏蛋白阿克曼菌相对丰度低。增加嗜黏蛋白阿克曼菌丰度可以作用于肠道上皮细胞和肠道黏膜中存在的相关受体,减轻炎症反应,增强上皮细胞的屏障功能^[13]。此外,与模型组相比,脑肠共治电针组可显著降低梭状芽孢杆菌属相对丰度,有学者发现,肠道梭状芽孢杆菌与丙酸产生有关,服用丙酸或其前体产品的孤独症患者表现出更深刻的孤独症行为和胃肠道症状^[14]。以上提示,电针可能通过降低梭状芽孢杆菌的丰度来减少如丙酸等的水平。值得注意的是,LEfSe 分析显示脑肠共治电针组可显著提高大鼠肠道卷曲乳杆菌相对丰度。有学者发现,卷曲乳杆菌与 ASD 相关指标如炎症程度相关蛋白负相关^[15]。也有研究发现,卷曲乳杆菌可能通过调节肠道菌群来调节神经递质分泌水平^[16]。以上结果提示,脑肠共治电针组可能通过上调嗜黏蛋白阿克曼菌、卷曲乳杆菌等益生菌发挥作用,同时通过下调梭状芽孢杆菌等有害细菌相对丰度来改善肠道菌群。

结合代谢组学进一步分析发现,脑肠共治电针对 ASD 大鼠体内代谢物的影响。代谢组学结果提示,脑肠共治电针组可上调甘氨酸、鞘氨醇-1-磷酸、琥珀酸半醛脱氢酶、次黄嘌呤、磷酸胆碱、缬氨酸,下调精氨酸、 β -氨基异丁酸酯、谷氨酰胺等差异代谢物含量。有研究表明,甘氨酸在突触可塑性和学习记忆中起重要作用,甘氨酸信号传导的改变与社会和认知障碍有关^[17]。鞘氨醇-1-磷酸是磷脂代谢过程中产生的脂质介质之一。作为调节细胞生长的第二信使,S1P 参与神经系统疾病的病理生理过程,与 ASD 的行为损害有关^[18]。琥珀酸半醛脱氢酶缺乏症影响 γ -氨基丁酸的分解代谢及兴奋性和抑制性神

经传递失衡有关,琥珀酸半醛脱氢酶不足可能与孤独症刻板行为相关^[19]。有研究表明,ASD 患儿次黄嘌呤水平较低,影响黄嘌呤、鸟嘌呤代谢,从而导致神经系统功能异常^[20]。磷酸胆碱能通过丝裂原活化蛋白激酶信号通路,对学习和记忆障碍起保护作用^[21]。缬氨酸等在 ASD 大鼠的脑皮质中显著降低^[22]。二十碳五烯酸属脂肪酸,其补充剂对孤独症症状早产儿的人际关系适应行为有很大的益处^[23]。精氨酸通过一氧化氮/N-甲基-D-天冬氨酸路径,在 MS 诱导的小鼠孤独症样行为中发挥重要作用^[24]。 β -氨基异丁酸酯是一种非蛋白质氨基酸,可代谢形成丙酸,与行为问题相关^[25]。谷氨酰胺是一种重要的代谢燃料,经脱氨反应转化为谷氨酸。研究发现,孤独症患者杏仁核海马区域中谷氨酸/谷氨酰胺的浓度显著升高^[26]。以上报道结合本研究筛选的差异代谢产物结果,提示脑肠共治电针治疗 ASD 可能通过调控多个代谢物共同发挥作用。同时,对上述差异代谢物进行 KEGG 通路分析,发现与调控氨基酸代谢、磷酸盐代谢、花生四烯酸代谢、嘌呤代谢等通路有关,这为后期深入开展脑肠共治电针治疗 ASD 作用机制提供了研究基础。

本研究对肠道菌群与代谢组学进行了关联分析,以进一步探讨肠道菌群与代谢产物是否有依存关系,发现某些血浆代谢产物与那些组间存在显著性差异的肠道菌群存在着很强的关联性,这些代谢产物可能是肠道菌群作用于 ASD 的重要物质。结果提示,给予脑肠共治电针治疗后差异菌如卷曲乳杆菌与血浆中代谢物 β -氨基异丁酸酯呈显著负相关,与甘氨酸呈正相关。有研究发现,在一些 ASD 个体中观察到,卷曲乳杆菌是来自乳酸杆菌的微生物,其在肠上皮屏障的维持中发挥重要作用^[27]。另枝菌属与琥珀酸半醛脱氢酶呈正相关,与谷氨酰胺呈显著负相关。有研究表明,另枝菌属的植入能改善 VAP 诱导的孤独症小鼠的行为,涉及 5-羟色胺能突触和谷氨酸能突触通路的信号传导,这些与行为改变有关^[28]。本次研究发现,梭状芽孢杆菌与磷酸胆碱呈显著负相关,当梭状芽孢杆菌数量增加时,梭状芽孢杆菌会在肠道内生成丙酸,儿童孤独症与此有直接关系。与此同时,关联分析还显示嗜黏蛋白阿克曼菌与谷氨酰胺呈显著负相关,与磷酸胆碱呈显著正相关。嗜黏蛋白阿克曼菌被认为与肠道免疫稳态有关,且与孤独症行为表现直接相关^[29]。最后,基于 KEGG 分析差异代谢物,筛选潜在的关键代谢通路,表明与氨基酸代谢、磷酸盐代谢、嘌呤代谢等通路相关。

通过分析,发现一个肠道菌群可以与多个代谢物相关,提示肠道菌群与代谢物之间存在复杂关系。

本研究采用丙戊酸钠腹腔注射法制备孤独症大鼠模型,造模成功后的大鼠随机分为模型组、基础电针组、针药结合组、脑肠共治电针组。基础电针组中的调脑神穴位,已有研究表明,其治疗 ASD 的疗效肯定^[30]。脑肠共治电针是在此基础上加用足三里、曲池,此两穴位为手足阳明经合穴,两者同用,可通腑调气,取同气相求之意。且二穴均可主治神志病^[31]。而益生菌作为目前临床基于“脑-肠轴”治疗 ASD 的较常用西药^[32],将其作为阳性对照,以进一步验证脑肠共治电针的特色与优劣。各组大鼠行为学检测结果提示,与模型组比较,基础电针组、针药结合组、脑肠共治电针组对孤独症大鼠社交能力均有改善作用,但针药结合组、脑肠共治电针组更为显著。肠道菌群研究分析发现,与对照组比较,模型组的肠道菌群弯曲菌门相对丰度上调,嗜黏蛋白阿克曼菌相对丰度下调;而针药结合组、脑肠共治电针组的弯曲菌门相对丰度下调,嗜黏蛋白阿克曼菌相对丰度上调,提示针药结合组和脑肠共治电针组均可调节肠道菌群趋向于对照组。为了进一步探讨脑肠共治电针对 ASD 大鼠的肠道菌群及代谢通路的具体影响,进行脑肠共治电针组与模型组的比较,利用 LEfSe 比较分析,发现关键菌共 21 个。其中与模型组比较,脑肠共治电针组可上调嗜黏蛋白阿克曼菌、卷曲乳杆菌等益生菌,同时下调梭状芽胞杆菌等有害细菌相对丰度来改善肠道菌群。结合代谢组学进一步分析,脑肠共治电针组与模型组的代谢物($VIP>1.5$ 、 $P<0.05$),最终共筛选 12 个差异代谢物,将其肠道菌群与代谢组学进行 Spearman 相关性分析,发现某些血浆代谢产物与两组间存在显著性差异的肠道菌群存在着很强的关联性,提示这些代谢产物可能是肠道菌群作用于 ASD 的重要物质。最后基于 KEGG 分析差异代谢物,筛选潜在的关键代谢通路,表明其与氨基酸代谢、磷酸盐代谢、嘌呤代谢、花生四烯酸代谢等通路相关。

综上所述,ASD 是儿童最常见的严重的神经发育障碍性疾病之一,目前临床无针对性治疗药物^[33]。因此,探索可能有益的治疗方法对 ASD 患儿预后具有重要意义。既往研究表明,肠道微生物与 ASD 的关系密切^[34]。百会、神庭、心俞聪脑调神,而足三里、曲池治肠调神,脑肠共治能明显改善孤独症大鼠社交能力^[35]。通过行为学检测、肠道菌群及代谢组学联

合分析发现,本研究中选用电针百会、神庭、心俞、足三里、曲池,调控 ASD 大鼠肠道菌群嗜黏蛋白阿克曼菌、卷曲乳杆菌、梭状芽胞杆菌等菌属丰度,同时可以影响代谢物水平,且部分代谢物的改变与肠道菌群存在复杂相关性,与氨基酸代谢、磷酸盐代谢、嘌呤代谢、花生四烯酸代谢等途径相关。本研究可为脑肠共治电针干预 ASD 的作用提供实验依据,同时可为进一步临床应用提供参考,但其具体机制尚需进一步研究,在今后可进行信号通路的深入研究。

参考文献

- [1] MAENNER M J, WARREN Z, WILLIAMS A R, et al. Prevalence and characteristics of autism spectrum disorder among children aged 8 years—autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2020[J]. *Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance Summaries*, 2023, 72(2): 1–14.
- [2] SUN X, ALLISON C, WEI L P, et al. Autism prevalence in China is comparable to Western prevalence[J]. *Molecular Autism*, 2019, 10: 7.
- [3] 闫海虹, 张喜莲, 戎 萍, 等. 中西医疗儿童孤独症谱系障碍的临床研究进展[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(2): 933–938.
- [4] 耿亮亮, 郭亚雄, 马艳芳, 等. 中医药治疗孤独症谱系障碍概况[J]. *中医药导报*, 2020, 26(16): 137–141.
- [5] GONÇALVES C L, DOIFODE T, REZENDE V L, et al. The many faces of microbiota–gut–brain axis in autism spectrum disorder[J]. *Life Sciences*, 2024, 337: 122357.
- [6] DE THEIJE C G, WOPEREIS H, RAMADAN M, et al. Altered gut microbiota and activity in a murine model of autism spectrum disorders[J]. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2014, 37: 197–206.
- [7] 陈丹凤, 张 泓, 谢菊英, 等. 从“脑病治肠”探讨电针对血管性痴呆大鼠肠道菌群及血清 IL-1 β 及 IL-18 的影响[J]. *针刺研究*, 2022, 47(3): 216–223.
- [8] GONG X R, YOU X R, GUO M R, et al. Children autism spectrum disorder and gut microbiota: A bibliometric and visual analysis from 2000 to 2023[J]. *Medicine*, 2023, 102(52): e36794.
- [9] 张 也, 郭亚雄, 罗世杰, 等. 基于中医脾肾–脑相通理论浅谈孤独症谱系障碍[J]. *河南中医*, 2021, 41(1): 20–23.
- [10] 韩 笑, 林成仁, 任钧国, 等. 中医对孤独症儿童三大核心障碍的认识[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2016, 22(3): 431–433.
- [11] LIU F, HORTON–SPARKS K, HULL V, et al. The valproic acid rat model of autism presents with gut bacterial dysbiosis similar to that in human autism[J]. *Molecular Autism*, 2018, 9: 61.
- [12] GONÇALVES A M, SOUSA N, JACINTO L, et al. The Shank3–InsG3680 (+/+) mouse model of autism spectrum disorder displays auditory avoidance in a novel behavioral test[J]. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2023, 17: 1205507.
- [13] WANG L, CHRISTOPHERSEN C T, SORICH M J, et al. Low

- relative abundances of the mucolytic bacterium *Akkermansia muciniphila* and *Bifidobacterium* spp. in feces of children with autism[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(18): 6718–6721.
- [14] ZHENG Y P, VERHOEFF T A, PEREZ PARDO P, et al. The gut–brain axis in autism spectrum disorder: A focus on the metalloproteases ADAM10 and ADAM17[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 22(1): 118.
- [15] YU R R, ZHANG M C, AHMED T, et al. Metabolic and proteomic profiles reveal the response of the ASD-associated resistant strain 6–1 of *Lactobacillus plantarum* to propionic acid[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022, 19(24): 17020.
- [16] LIU W H, CHUANG H L, HUANG Y T, et al. Alteration of behavior and monoamine levels attributable to *Lactobacillus plantarum* PS128 in germ-free mice[J]. *Behavioural Brain Research*, 2016, 298(Pt B): 202–209.
- [17] PILORGE M, FASSIER C, CORRONC H L, et al. Genetic and functional analyses demonstrate a role for abnormal glycinergic signaling in autism[J]. *Molecular Psychiatry*, 2016, 21(7): 936–945.
- [18] ABU BAKAR N, WAN IBRAHIM W N, ZULKIFLLI A R, et al. Embryonic mercury exposure in zebrafish: Alteration of metabolites and gene expression, related to visual and behavioral impairments[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2023, 256: 114862.
- [19] TOKATLY LATZER I, HANSON E, BERTOLDI M, et al. Autism spectrum disorder and GABA levels in children with succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency[J]. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 2023, 65(12): 1596–1606.
- [20] MA Y, ZHOU H, LI C P, et al. Differential metabolites in Chinese autistic children: A multi-center study based on urinary 1H-NMR metabolomics analysis[J]. *Frontiers in Psychiatry*, 2021, 12: 624767.
- [21] YU X, WANG L N, MA L, et al. *Akebia saponin D* attenuates ibotenic acid-induced cognitive deficits and pro-apoptotic response in rats: Involvement of MAPK signal pathway[J]. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 2012, 101(3): 479–486.
- [22] KIM H Y, LEE Y J, KIM S J, et al. Metabolomics profiling of valproic acid-induced symptoms resembling autism spectrum disorders using ¹H NMR spectral analysis in rat model[J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 2022, 85(1): 1–13.
- [23] BOONE K M, KLEBANOFF M A, ROGERS L K, et al. Effects of Omega-3-6-9 fatty acid supplementation on behavior and sleep in preterm toddlers with autism symptomatology: Secondary analysis of a randomized clinical trial[J]. *Early Human Development*, 2022, 169: 105588.
- [24] KHALEDI F, DEHKORDI H T, ZAREAN E, et al. Possible role of NO/NMDA pathway in the autistic-like behaviors induced by maternal separation stress in mice[J]. *PLoS One*, 2023, 18(10): e0292631.
- [25] QURESHI F, ADAMS J B, AUDHYA T, et al. Multivariate analysis of metabolomic and nutritional profiles among children with autism spectrum disorder[J]. *Journal of Personalized Medicine*, 2022, 12(6): 923.
- [26] PAGE L A, DALY E, SCHMITZ N, et al. In vivo 1H-magnetic resonance spectroscopy study of amygdala-hippocampal and parietal regions in autism[J]. *The American Journal of Psychiatry*, 2006, 163(12): 2189–2192.
- [27] YU Y, ZHAO F Q. Microbiota-gut-brain axis in autism spectrum disorder[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2021, 48(9): 755–762.
- [28] WANG J F, CAO Y, HOU W L, et al. Fecal microbiota transplantation improves VPA-induced ASD mice by modulating the serotonergic and glutamatergic synapse signaling pathways[J]. *Translational Psychiatry*, 2023, 13(1): 17.
- [29] LIU X, CUI Y, ZHANG Y H, et al. Rescue of social deficits by early-life melatonin supplementation through modulation of gut microbiota in a murine model of autism[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapie*, 2022, 156: 113949.
- [30] 徐 珊. 吕英教授运用“益土载木”法治疗孤独症谱系障碍的经验总结及网络药理学研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2023.
- [31] 朱力立, 陈 栋, 张怡颖, 等. 吴旭“调肠治神”针法治疗孤独症谱系障碍经验[J]. *中医杂志*, 2020, 61(11): 950–953.
- [32] KANG D W, ADAMS J B, COLEMAN D M, et al. Long-term benefit of Microbiota Transfer Therapy on autism symptoms and gut microbiota[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 5821.
- [33] BONG G, KIM J H, HONG Y, et al. The feasibility and validity of autism spectrum disorder screening instrument: Behavior development screening for toddlers (BeDevel)—a pilot study[J]. *Autism Research*, 2019, 12(7): 1112–1128.
- [34] LI H, GUO W, LI S J, et al. Alteration of the gut microbiota profile in children with autism spectrum disorder in China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1326870.
- [35] 李少红. 针刺治疗孤独症谱系障碍临床特征及疗效评价研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2022.

(本文编辑 匡静之)