

本文引用: 谢 映, 刘慧慧, 李旭华, 曹徵良, 夏 云, 朱沁泉, 胡国恒. 基于肠道菌群和代谢组学探讨刘氏小儿推拿干预孤独症谱系障碍儿童的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(1): 86–94.

基于肠道菌群和代谢组学探讨刘氏小儿推拿干预孤独症谱系障碍儿童的作用机制

谢 映^{1,2}, 刘慧慧², 李旭华¹, 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** 观察刘氏小儿推拿配合康复训练对孤独症谱系障碍儿童的核心症状及肠道菌群、代谢产物的影响。**方法** 将 60 例 3~8 岁孤独症谱系障碍儿童随机分为观察组和对照组, 每组 30 例。两组均进行康复训练, 观察组给予刘氏小儿推拿干预, 对照组给予常规推拿干预, 每天 1 次, 每周 5 次, 连续干预 12 周。两组分别在入组时、治疗 12 周后接受儿童孤独症评定量表(CARS)、第三版孤独症心理教育评定量表(PEP-3)、中医脾胃疾病症状量表评定, 统计两组之间的疗效差异。治疗结束当天行肠道菌群检测、血浆代谢组学检测, 并采用 *Spearman* 相关分析方法, 探讨肠道菌群与代谢组学之间的关联。基于 KEGG 分析差异代谢物, 筛选潜在的關鍵代谢通路。**结果** 治疗后, 观察组有效率(96.67%)高于对照组(73.33%)($P<0.05$)。治疗后, 两组 PEP-3 评分均上升($P<0.05$), 且观察组高于对照组($P<0.05$); 观察组中医脾胃疾病症状量表评分降低($P<0.05$), 且低于对照组($P<0.05$)。与对照组比较, 观察组的肠道菌群在门水平上, 放射菌门(Actinobacteriota)水平上调、厚壁菌门(Firmicutes)水平下调; 在属水平上, 双歧杆菌(*Bifidobacterium*)相对丰度上调、埃氏菌属-志贺菌属(*Escherichia-Shigella*)相对丰度下调。观察组与对照组共筛选出双歧杆菌等 9 个关键菌, 代谢组学分析共筛选出 6 个显著差异代谢物。KEGG 通路分析结果显示, 差异代谢物主要与氨基酸代谢、蛋白质消化与吸收、氨酰 tRNA 生物合成等通路相关。**结论** 刘氏小儿推拿能明显改善孤独症谱系障碍儿童的核心症状, 调控肠道菌群如双歧杆菌等菌属丰度, 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的相关性, 可能与氨酰 tRNA 生物合成、氨基酸代谢、蛋白质消化与吸收等途径相关。

〔关键词〕 刘氏小儿推拿; 孤独症谱系障碍; 肠道菌群; 代谢组学; 社交能力

〔中图分类号〕 R242

〔文献标志码〕 B

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.01.012

Mechanism of action of Liu's pediatric tuina intervention in children with autism spectrum disorders based on intestinal flora and metabolomics

XIE Ying^{1,2}, LIU Huihui², LI Xuhua¹, 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 Liu's pediatric tuina combined with rehabilitation training on the core symptoms, intestinal flora, and metabolites in children with autism spectrum disorders (ASD). **Methods** Sixty children aged three to eight years with ASD were randomized into observation group and control group, with 30 children in each group. Both groups

〔收稿日期〕 2024-07-15

〔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。

underwent rehabilitation training, with the observation group receiving Liu's pediatric tuina intervention and the control group receiving conventional tuina intervention, once a day, five times a week, for 12 consecutive weeks. Both groups were assessed using the Childhood Autism Rating Scale (CARS), Psycho-educational Profile-3rd Edition (PEP-3), and the Chinese Medicine Spleen and Stomach Disease Symptom Scale at baseline and after 12 weeks of treatment. The efficacy differences between the two groups were statistically analyzed. On the last day of treatment, intestinal flora testing and plasma metabolomics analysis were performed, and the Spearman correlation analysis was used to explore the correlation between intestinal flora and metabolomics. Based on the KEGG analysis, differential metabolites were analyzed to screen for potential key metabolic pathways. **Results** After treatment, the effective rate in the observation group (96.67%) was higher than that in the control group (73.33%) ($P < 0.05$). After treatment, the PEP-3 scores of both groups increased ($P < 0.05$), with the observation group showing higher scores than the control group ($P < 0.05$). The Chinese Medicine Spleen and Stomach Disease Symptom Scale scores in the observation group decreased ($P < 0.05$), and were lower than those in the control group ($P < 0.05$). Compared with the control group, at the phylum level, the Actinobacteriota level was upregulated, while the Firmicutes level was downregulated in the intestinal flora in the observation group. At the genus level, the relative abundance of Bifidobacterium was upregulated, while that of Escherichia-Shigella was downregulated. Nine key bacteria, including Bifidobacterium, were identified in both the observation group and the control group, and six significantly different metabolites were screened through metabolomics analysis. The KEGG pathway analysis showed that the differential metabolites were mainly related to amino acid metabolism, protein digestion and absorption, aminoacyl-tRNA biosynthesis, and other pathways. **Conclusion** Liu's pediatric tuina can significantly alleviate the core symptoms of children with ASD, regulate the abundance of intestinal flora such as Bifidobacterium, and affect metabolite levels at the same time. Moreover, some changes in metabolites have complex correlations with intestinal flora, which may be related to aminoacyl-tRNA biosynthesis, amino acid metabolism, protein digestion and absorption, and other pathways.

[**Keywords**] Liu's pediatric tuina; autism spectrum disorders; intestinal flora; metabolomics; social skills

孤独症谱系障碍(autism spectrum disorders, ASD)是一种神经发育障碍性疾病,其核心症状分为狭隘兴趣与刻板行为、社会和(或)沟通障碍两大类^[1]。ASD 起病于儿童发育早期,大多数 ASD 患儿常伴有身心发育不全、智力发育低下等问题,是导致我国儿童精神残疾的首要因素^[2]。据流行病学调查显示,美国 8 岁年龄段儿童中 ASD 的总体患病率已达 13.1%~31.4%^[3],在我国 ASD 患病率约为 1%^[4]。ASD 患病率呈上升趋势,给家庭、社会带来沉重的负担^[5]。目前,ASD 临床无特效治疗药物,在诸多治疗手段中,以教育康复方法应用最为广泛。但大部分患儿效果仍不满意,因此,探索有益的治疗方法对 ASD 患儿预后具有重要意义。

中医学认为,脾为后天之本,ASD 儿童先天禀赋不足,而饮食偏嗜,则加剧脾胃虚弱,不能化气血上奉于心,致心血不足,心神失养,出现行为异常^[6]。刘氏小儿推拿是由我国知名中医推拿专家刘开运所创立的推拿体系,用于治疗小儿脑病,目前广泛运用于临床,现已在湖南省 20 多个地市级基地进行全面

推广应用。刘氏小儿推拿学术流派具有自身创立的一套疾病分类与治疗原则,首创“五经”治法,包括“小五经”和“大五经”^[7]。“小五经”是指 5 个施术部位,为儿童手部十指螺纹面上的相应穴位区域——脾、肝、心、肺、肾;“大五经”是按照五脏命名的疾病分类,即“脾经”病、“肝经”病、“心经”病、“肺经”病和“肾经”病。本研究主要通过观察 ASD 核心症状的改善情况来评价刘氏小儿推拿“运脾调神”配合康复训练的临床干预疗效,比较其与常规推拿配合康复训练之间的疗效差异,明确其干预 ASD 的优越性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

2024 年 1 月至 2024 年 6 月,在征得患儿监护人同意并签署知情同意书的基础上,募集来源于湖南中医药大学第一附属医院儿童康复专科及长沙市民生项目(0~6 岁孤独症减免筛查)的 ASD 患儿。文献研究表明^[8-10],本病的发病率约为 1%,推拿干预平均有效率为 93.33%,常规治疗组平均有效率为 73.33%。

取 $\alpha=0.05, \beta=0.10, (\mu_1-\alpha)/2=1.96$, 检验效能为 90%。由等效或优效性试验样本量计算公式进行计算, 估算出每组例数应为 26 例。按照最大脱落率为 20% 估算, 再增加 20% 样本量, 即每组入组 32 人, 最终应纳入 64 例。本研究共纳入患者 64 例, 试验过程中脱落 4 例, 最终入组 60 例(观察组 30 例, 对照组 30 例)。观察组男 22 例、女 8 例, 年龄 (3.41 ± 0.62) 岁, 病程 (1.26 ± 0.34) 年; 对照组男 23 例、女 7 例, 年龄 (3.27 ± 0.48) 岁, 病程 (1.14 ± 0.88) 年。两组性别、年龄、病程比较, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 具有可比性。本研究通过湖南中医药大学第一附属医院伦理审查委员会批准(伦理审查编号: HN-LL-KY-2024-003-01)。

1.2 诊断标准

1.2.1 西医诊断标准 采用第 5 版《美国精神病诊断统计手册》^[11]中制定的 ASD 诊断标准: (1) 不同环境下表现出社交与沟通障碍; (2) 重复且局限的活动、兴趣或行为; (3) 在发育早期出现症状; (4) 社交、沟通缺陷以及刻板重复的行为导致社交、职业等方面的障碍; (5) 智力发育障碍或整体发育迟缓不能较好解释这些症状。若满足上述标准可确诊 ASD, 其中, (1)(2) 为 ASD 的核心症状。

1.2.2 中医诊断标准 中医诊断标准参照《儿童孤独症谱系障碍中西医结合干预专家共识》^[12]的临床表现: 少语或不语, 刻板动作, 行为孤僻, 举止失常, 对指令充耳不闻, 不易管教。

1.3 纳入标准

(1) 符合 ASD 西医、中医诊断标准; (2) 性别不限, 年龄 3~8 周岁; (3) 患儿的监护人配合度较高且对临床干预方法知情, 能配合患儿完成全部治疗周期; (4) 患儿在近 30 d 内没有采用其他干预方式和参加过其他临床观察; (5) 患儿监护人同意自愿加入本研究, 并在知情同意书上签字。

1.4 排除标准

(1) 合并其他儿童精神类疾病; (2) 重度听力障碍及视力障碍; (3) 合并严重心、肺、肾等重要脏器器质性病变。

1.5 剔除、脱落及终止试验标准

(1) 依从性差、未按规定治疗或资料不全者; (2) 治疗过程中产生严重的不良事件, 不能或不宜继

续坚持治疗的患儿; (3) 疗程中自行退出者; (4) 在治疗过程中使用其他治疗方法, 或自行中途更换治疗方法者。

1.6 干预方法

1.6.1 观察组 采取刘氏小儿推拿结合康复训练。

刘氏小儿推拿: (1) 开窍手法。开天门(双手拇指交替直推天门)24 次, 推坎宫(双手拇指同时由内向外分推坎宫)24 次, 推太阳(双手拇指同时由太阳推至耳门穴)24 次, 手按总筋(右手拇指快速点按总筋)24 次, 分阴阳(双手拇指同时分推总筋两旁)24 次。(2) 推五经。补脾经 300 次, 补心经 200 次, 补心经后加清心经 100 次, 补肺经 150 次, 清肝经 100 次, 补肾经 200 次。推五经穴按照左手拇、食指和余指夹持患儿左手, 右手食指、中指和环指固定穴位, 以拇指向指根推为清, 以旋推为补。(3) 头部腧穴。揉百会穴、四神聪、神庭各 100 次, 揉风池穴、天柱穴各 50 次。(4) 脾胃配穴。运水入土(沿小天心、掌小横纹推运至小指指根止, 呈单方向反复推运)80 次, 揉板门 30 次, 掐四横纹 10 次, 中脘逆时针按揉 50 次, 按揉脾俞、胃俞各 50 次, 捏脊 3 遍。(5) 关窍: 拿肩井 5 次。连续治疗 5 d, 休息 2 d, 共治疗 12 周。

康复训练: 以第 3 版孤独症心理教育评定量表(psychological educational profile-3, PEP-3)^[13]评估患儿的心理状况后, 依据患儿的具体情况进行康复干预, 并在早期对其进行语言认知训练、行为分析法训练及社交游戏训练, 其中合并有感觉统合失调的患儿, 实施感觉统合治疗。一对一执行康复训练, 综合评估患儿的能力, 若能力提高可以为患儿安排集体的文化课程和结构化的教育课程。康复训练治疗频次为每周 6 d, 每天至少 4 h(包括康复治疗师一对一的训练, 以及在康复治疗师培训指导下由家长实施的训练的两者总时长)。共治疗 12 周。

1.6.2 对照组 采取常规推拿结合康复训练。开天门 50 次, 推坎宫 50 次, 揉太阳 50 次, 揉耳后高骨 50 次, 揉百会穴、四神聪、神庭各 100 次, 揉风池穴、天柱穴各 50 次。连续治疗 5 d, 休息 2 d, 共治疗 12 周。康复训练方法及疗程同观察组。

1.7 观察指标

1.7.1 儿童孤独症评定量表(childhood autism rating scale, CARS)^[14] 该量表从 15 个主要方面对孤

独症儿童进行评估。量表满分为 60 分,总得分>36 分为重度孤独症;得分 30~36 分为轻至中度孤独症;得分<30 分为非孤独症。

1.7.2 PEP-3 评分^[15] 包含语言表达、语言理解、认知、模仿等 10 个方面,测评分数越高提示其能力发展越好。

1.7.3 中医脾胃疾病症状评估表 参考《脾胃病症状量化标准专家共识意见(2017)》和丑易倩^[16-17]的评分表,共有 14 个条目,包含反酸、呕吐、纳差、善食易饥、呃逆、腹痛、腹胀、腹泻、大便失禁、便秘、口臭、失眠、四肢无力、消瘦,每个条目计 0~3 分。0 分为无该症状;3 分为程度最高。评分越高代表其症状程度越重。

1.7.4 代谢组学检测 两组患者于治疗完成当天采血。标本保持 4 ℃存放,在 15~30 min 内离心 15 min (2 000×g),取血浆置于-80 ℃冰箱中保存,用于超高效液相色谱-串联质谱非靶标代谢组学检测。使用乙腈和甲醇的混合溶剂对血浆样本中的代谢物进行提取。将提取后的样品经过浓缩和重溶、去杂质等处理后,注入超高效液相色谱系统,使用 C₁₈ 色谱柱进行分离。以 0.1%甲酸水溶液和乙腈作为流动相,按梯度洗脱条件分离代谢物。随后连接质谱仪,进行一级和二级质谱数据采集。通过 ProteoWizard 3.0 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。通过与 BiotreeDB 2.1 自建二级质谱数据库匹配进行物质注释,Cutoff 值设为 0.3。鉴定出的两组显著差异代谢物映射到 KEGG 数据库,获取其对应富集的生物通路。

1.7.5 肠道微生物检测 用专用无菌粪便采集盒搜集粪便,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 的叠氮化钠,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 Illumina Miseq 测序平台对 V3~V4 可变区进行扩增和测序,并利用线性判别分析效应大小(linear discriminant analysis effect size,LEfSe)和 R 软件进行表达和分析。

1.7.6 肠道菌群与代谢组学检测 采用 Spearman 进行血浆代谢产物相关性分析,选取差异肠道菌群

与差异代谢物联合分析,整合肠道微生物群和代谢组学数据,分析其相关性。

1.8 疗效评价标准

参考相关文献制定评价标准^[18],CARS 评分越低说明社交障碍改善越明显。显效:CARS 评分总分较治疗前降低至少 5 分;有效:总分较治疗前降低 1~5 分;无效:总分较治疗前降低<1 分。总有效率为有效与显效之和。

1.9 统计学方法

采用统计学软件 SPSS 22.0 分析实验数据。计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,两组比较,若资料满足正态性和方差齐性采用 *t* 检验,否则采用 Wilcoxon 秩和检验;计数资料以“例(%)”表示,采用卡方检验;等级资料采用 Wilcoxon Mann-Whitney *U* 检验。以 *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患儿临床疗效比较

观察组总有效率(96.67%)高于对照组(73.33%)(*P*<0.05)。详见表 1。

表 1 两组患儿临床疗效比较[例(%)]

Table 1 Comparison of clinical efficacy between the two groups of pediatric patients [case(%)]

组别	<i>n</i>	显效	有效	无效	总有效
观察组	30	19(63.34)	10(33.33)	1(3.33)	29(96.67)
对照组	30	12(40.00)	10(33.33)	8(26.67)	22(73.33)
χ 值					4.71
<i>P</i> 值					0.03

2.2 两组患儿 PEP-3 评分比较

治疗前,两组 PEP-3 评分比较,差异均无统计学意义(*P*>0.05)。与治疗前比较,两组治疗后 PEP-3 评分均升高(*P*<0.01),且观察组评分高于对照组(*P*<0.01)。详见表 2。

表 2 两组患儿 PEP-3 评分比较($\bar{x}\pm s$,分)

Table 2 Comparison of PEP-3 scores between the two groups of pediatric patients ($\bar{x}\pm s$, points)

组别	<i>n</i>	治疗前	治疗后	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
观察组	30	140.25±3.12	218.63±4.21	81.93	<0.01
对照组	30	139.73±4.36	185.12±3.59	44.01	<0.01
<i>t</i> 值		1.80	33.17		
<i>P</i> 值		0.077	<0.01		

2.3 两组患儿中医脾胃疾病症状量表评分比较

治疗前,两组中医脾胃疾病症状量表评分比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。与治疗前比较,治疗后,观察组中医脾胃疾病症状量表评分降低($P<0.01$),且低于对照组($P<0.01$);对照组中医脾胃疾病症状量表评分差异无统计学意义($P>0.05$)。详见表 3。

表 3 两组患儿中医脾胃疾病症状量表评分比较($\bar{x}\pm s$,分)

Table 3 Comparison of Chinese Medicine Spleen and Stomach Disease Scale scores between the two groups of pediatric patients ($\bar{x}\pm s$, points)

组别	<i>n</i>	治疗前	治疗后	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
观察组	30	16.26±1.12	5.43±1.39	31.82	<0.01
对照组	30	18.21±3.58	17.76±5.62	0.37	0.713
<i>t</i> 值		0.87	11.27		
<i>P</i> 值		0.389	<0.01		

2.4 两组患儿肠道菌群比较

2.4.1 测序结果的丰富度与 α 多样性分析 本研究基于扩增子序列变体(amplicon sequence variant, ASV)聚类分析结果,共获得 7 618 个 ASV,Chao1 指数曲线趋于平坦,说明测序数据量足够大。实验曲线的趋势较为平缓,提示测序数据量接近合理,样品具有较好的丰富度。详见图 1。

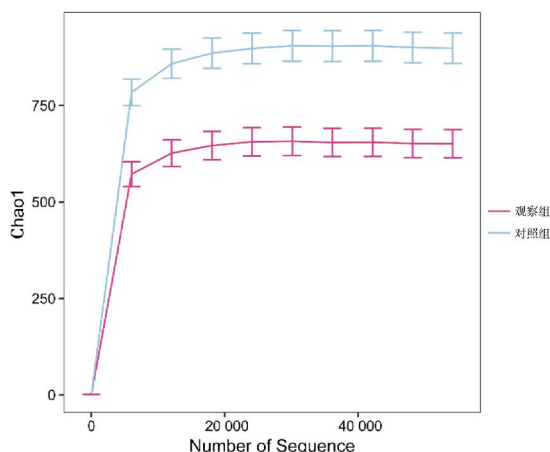


图 1 Chao1 指数曲线图

Fig.1 Chao1 index curve plot

2.4.2 β 多样性分析 非度量多维尺度分析(non-metric multidimensional scaling, NMDS)结果提示,两组有显著差异(stress=0.15)。详见图 2。

2.4.3 两组肠道菌群在门、属水平上的差异 与对

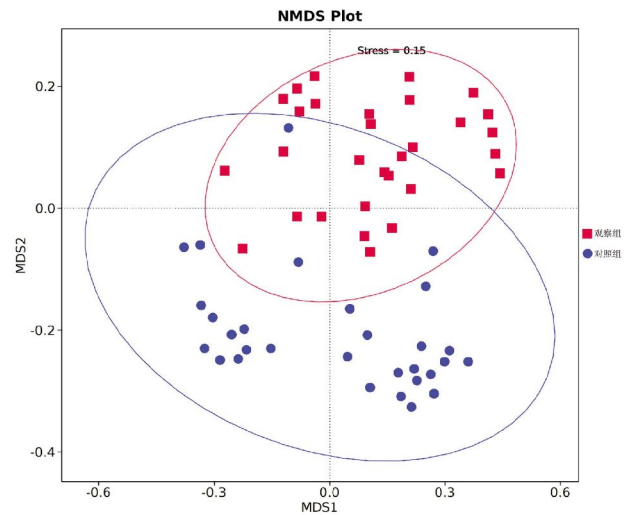


图 2 β 多样性分析图

Fig.2 β diversity analysis plot

注:点与点之间的距离表示样品之间的差异程度。

照组比较,观察组的肠道菌群在门水平上,放线菌门(Actinobacteriota)水平上调,厚壁菌门(Firmicutes)水平下调;在属水平上,双歧杆菌(*Bifidobacterium*)相对丰度上调,埃氏菌属-志贺菌属(*Escherichia-Shigella*)相对丰度下调。详见图 3—4。

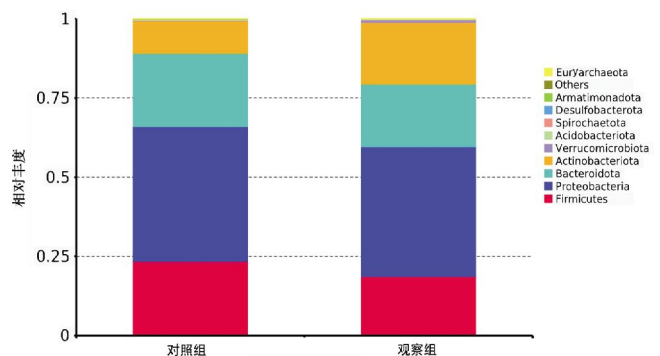


图 3 两组门水平物相对丰度排名图

Fig.3 Relative abundance ranking plot of phylum-level taxa in the two groups

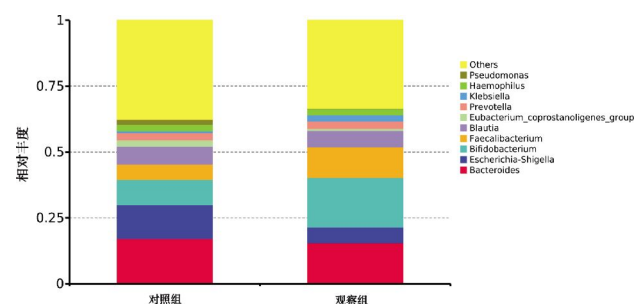


图 4 两组属水平物相对丰度排名图

Fig.4 Relative abundance ranking plot of genus-level taxa in the two groups

2.4.4 LEfSe 差异分析 通过 LEfse 分析发现,两组在门、纲、目、科、属水平上共筛选出 9 种具有差异的物种($P<0.05$ 且 LAD 分数 >4)。结果显示,对照组中假单胞菌目(o__Pseudomonadales)、假单胞菌科(f__Pseudomonadaceae)、假单胞菌属(g__Pseudomonas)、普通拟杆菌(s__Bacteroides plebeius)富集;观察组中放线菌门(p__Actinobacteriota)、放线菌纲(c__Actinobacteria)、双歧杆菌目(o__Bifidobacteriales)、双歧杆菌科(f__Bifidobacteriaceae)、双歧杆菌属(g__Bifidobacterium)富集。详见图 5。

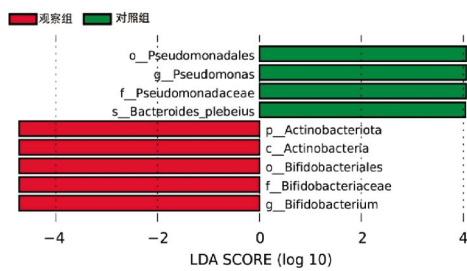


图 5 LEfSe 差异分析图

Fig.5 LEfSe differential analysis plot

2.5 两组代谢组学分析

2.5.1 两组样本间的 OPLS-DA 分析 将质谱采集的数据信息导入 R 软件,进行多元数据处理,包括主成分分析(principal component analysis,PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis,OPLS-DA)。两组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。为了可视化组分离和

发现显著变化的代谢物,采用 OPLS-DA 的统计方法对结果进行分析。经置换检验,回归线呈向上趋势,说明不存在过拟合趋势,证实模型稳定可靠。详见图 6。

2.5.2 两组血浆差异性代谢物分析 基于 OPLS-DA 对在正、负离子模式下检测到的所有代谢物进行差异分析,筛选差异代谢物需要同时满足 $VIP>2.5$ 、 $P<0.05$ 两个条件。通过 KEGG、HMDB 等数据库,最后筛选出 6 个差异代谢物,包含正离子模式下 4 个和负离子模式下 2 个。在正离子模式下,与对照组比较,观察组的甘氨酸、前列腺素 E2、甲状腺素上调,L-组氨酸下调($P<0.05$);在负离子模式下,与对照组比较,观察组的环甘氨酸脯氨酸上调,L-丝氨酸下调($P<0.05$)。详见表 4。

表 4 两组正、负离子模式下的显著性差异代谢物

Table 4 Metabolites with significant differences in positive and negative ion modes of the two groups

模式	差异代谢物	变化趋势	m/z	VIP 值	P 值
正离子	甘氨酸	↑	76.04	2.543	0.006
	前列腺素 E2	↑	335.21	2.517	0.004
	甲状腺素	↑	387.32	2.637	0.003
	L-组氨酸	↓	650.29	2.546	0.006
负离子	L-丝氨酸	↓	433.67	2.651	0.002
	环甘氨酸脯氨酸	↑	132.07	2.726	0.000

注:↑代表与对照组比较,观察组差异代谢物呈上调趋势;↓代表与对照组比较,观察组差异代谢物呈下调趋势。

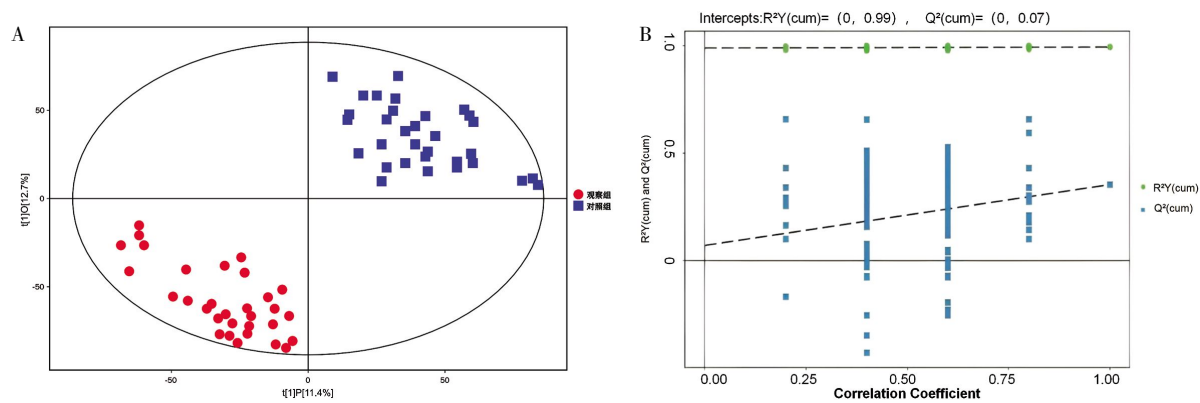


图 6 血浆代谢物的 OPLS-DA 图

Fig.6 OPLS-DA plot of plasma metabolites

注:A. OPLS-DA 散点图;B. OPLS-DA 置换检验图。

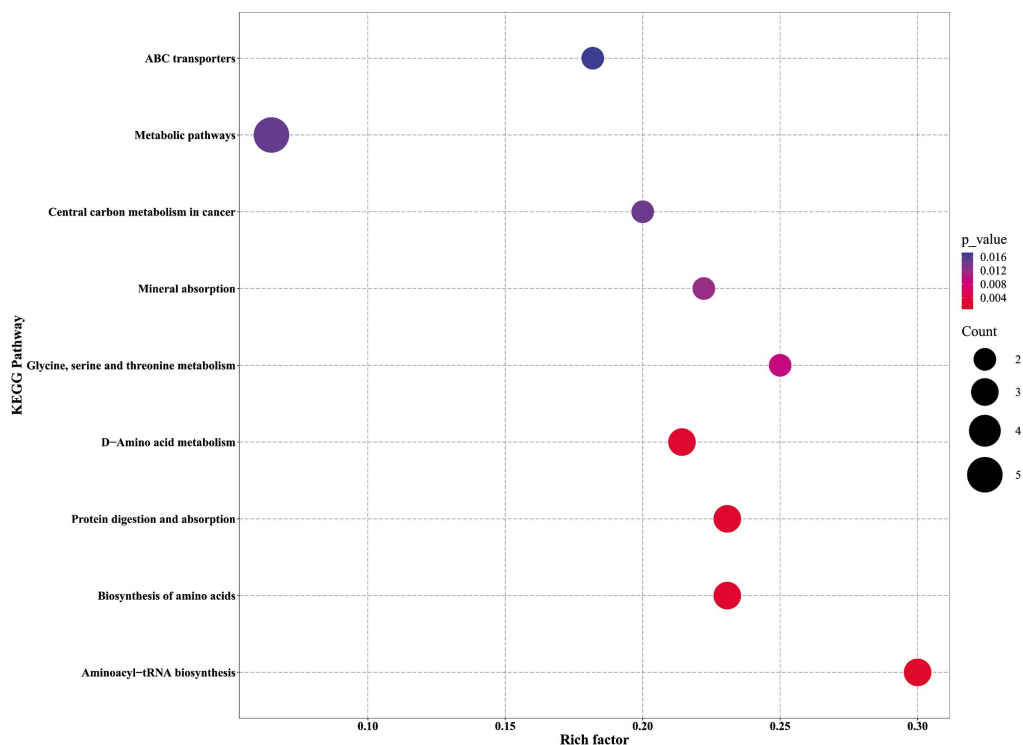


图 7 KEGG 富集通路图

Fig.7 KEGG enrichment pathway diagram

2.5.3 两组差异代谢物的相关通路分析 KEGG 通路分析结果表明,差异代谢物主要与氨酰 tRNA 生物合成、氨基酸代谢、蛋白质消化与吸收等通路相关。详见图 7。

2.6 肠道菌群与代谢组学关联分析

两组肠道菌群与代谢组学关联分析结果显示,甘氨酸水平与双歧杆菌、粪杆菌呈正相关,与埃氏菌属-志贺菌属呈负相关;组氨酸水平与埃氏菌属-志贺菌属呈正相关,与双歧杆菌呈负相关;环甘氨酰脯氨酸水平与埃氏菌属-志贺菌属呈负相关。详见图 8。

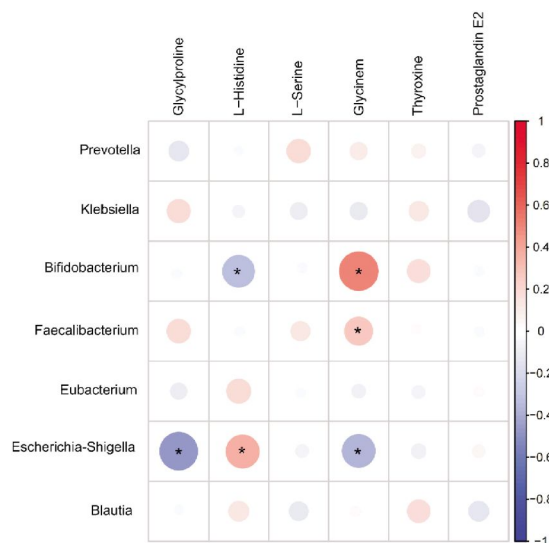


图 8 肠道菌群与代谢物的相关性热图

Fig.8 Correlation heatmap of intestinal flora and metabolites

3 讨论

目前,西医认为“菌-肠-脑轴”可能在 ASD 的发病过程中起重要作用。因此,本研究主要目标为探讨刘氏小儿推拿治疗 ASD 儿童的疗效及对肠道菌群、代谢组学的影响。刘氏小儿推拿运用大五经与小五经的理论,针对心脾两虚证制定推五经方案,包括补脾经、补心经、补肺经、补肾经、清肝经和清心经。补脾经和心经旨在健脾益气、养心安神,结合小儿“肺常不足”“肾常虚”的生理特性,兼补肺、肾以益脾气、温脾阳、健脾运;针对小儿“心常有余”,在补心经后

加用清法,以防引动心火,并清肝经以防肝风内动。本研究中,两组均进行康复训练,观察组采用刘氏小儿推拿进行干预,对照组采用常规推拿,治疗 12 周后,观察组的总有效率显著高于对照组,提示刘氏小儿推拿配合康复训练对 ASD 具有明显的临床疗效,能有效改善孤独症的核心症状。

为探讨刘氏小儿推拿对肠道菌群的影响,本研

究采用 16S rDNA 测序方法进行分析。结果显示,观察组在门水平上,放线菌门丰度上调,厚壁菌门丰度下调;在属水平上,双歧杆菌相对丰度上调,埃氏菌属-志贺菌属相对丰度下调。利用 LEfSe 进一步分析,发现双歧杆菌等益生菌相对丰度上调,假单胞菌等有害细菌相对丰度下调,从而改善肠道菌群。既往研究表明,厚壁菌门的丰度与 ASD 的严重程度相关^[19];ASD 患者的双歧杆菌水平显著减少^[20]。在 ASD 模型小鼠中,补充双歧杆菌可改善社交行为、增强肠道屏障功能、降低血清中的炎症因子和内毒素水平^[21]。埃氏菌属-志贺菌属近年来在 ASD 研究中备受关注,研究表明 ASD 患者中其丰度增加^[22]。本研究结果表明,刘氏小儿推拿能够调节肠道微生物群,增加有益细菌双歧杆菌等的相对丰度,降低埃氏菌属-志贺菌属等有害细菌的相对丰度。

代谢组学结果显示,观察组相比对照组筛选出 6 个差异代谢物:环甘氨酸脯氨酸、甘氨酸、前列腺素 E2、甲状腺素水平上调,L-组氨酸、L-丝氨酸水平下调。研究表明,环甘氨酸脯氨酸可提高血清中新生儿胰岛素样生长因子-1 水平,从而改善 ASD 症状^[23];甘氨酸可能通过影响谷氨酸水平而改善 ASD 症状^[24];妊娠期低甲状腺素水平在两性小鼠后代中诱导 ASD 样表型,包括行为异常、促炎标志物和谷氨酸能蛋白表达改变^[25];前列腺素 E2 水平与 ASD 严重程度呈负相关^[26];组氨酸水平差异与 ASD 发病相关,可能与线粒体功能障碍和脂肪酸代谢变化有关^[25]。结合本研究筛选的差异代谢物,提示刘氏小儿推拿治疗 ASD 可能通过调控多个代谢物共同发挥作用。

结合肠道菌群与代谢组学 Spearman 相关分析结果,发现甘氨酸水平与双歧杆菌、粪杆菌呈正相关,与埃氏菌属-志贺菌属呈负相关;组氨酸水平与埃氏菌属-志贺菌属呈正相关,与双歧杆菌呈负相关;环甘氨酸脯氨酸水平与埃氏菌属-志贺菌属呈负相关。将肠道菌群和代谢组学数据进行综合,结果表明刘氏小儿推拿可以明显改变 ASD 血浆代谢产物和肠道菌群组成结构,同时肠道菌群的改变与部分血浆代谢物的变化明显相关,提示刘氏小儿推拿既能改变肠道菌群组成结构,又对代谢表型产生影响,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,表明差异代谢物与氨基酸代谢、蛋白质消化与吸收、氨酰 tRNA 生物合成等通路相关。

综上所述,ASD 是当前儿童精神疾病中的高发疾病,尚无特效的西医治疗方法。近年来研究发现,ASD 的发病与肠道微生物密切相关^[27-28]。本研究发现,刘氏小儿推拿可改善 ASD 儿童的核心症状,并通过肠道菌群及代谢组学联合分析,揭示其作用机制可能为调节 ASD 儿童的肠道菌群及其代谢产物,进而影响氨基酸代谢、蛋白质消化与吸收、氨酰 tRNA 生物合成等关键通路。本研究为刘氏小儿推拿干预 ASD 的作用提供了客观依据,在当前 ASD 缺乏特效治疗方法的情况下,刘氏小儿推拿具有潜在的治疗优势。然而,本研究样本量偏小,具体机制尚需进一步研究。未来可通过多中心研究和深入探讨信号通路,进一步验证刘氏小儿推拿在 ASD 治疗中的作用机制。

参考文献

- [1] 邹小兵, 邓红珠. 美国精神疾病诊断分类手册“孤独症谱系障碍诊断标准”解读[J]. 中国实用儿科杂志, 2013, 28(8): 561-563.
- [2] 周豪钦, 陈艳妮, 郭凤宜, 等. 孤独症谱系障碍综合治疗模式介绍及解读建议[J]. 中国实用儿科杂志, 2021, 36(4): 266-274.
- [3] SHAW K A, MAENNER M J, BAIO J, et al. Early identification of autism spectrum disorder among children aged 4 years—early autism and developmental disabilities monitoring network, six sites, United States, 2016[J]. Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance Summaries, 2020, 69(3): 1-11.
- [4] SUN X, ALLISON C, WEI L P, et al. Autism prevalence in China is comparable to Western prevalence[J]. Molecular Autism, 2019, 10: 7.
- [5] 占红, 白淑霞, 王金堂. 儿童孤独症谱系障碍发病机制的研究进展[J]. 中国中西医结合儿科学, 2021, 13(2): 112-116.
- [6] 陈霄, 严隽陶, 尹露. 重复经颅磁刺激在孤独症谱系障碍中的应用进展[J]. 中国医学物理学杂志, 2021, 38(5): 643-646.
- [7] 梁枝懿. 脾虚体质儿童的尿液代谢组学特征及刘氏小儿推拿对其影响的研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2023.
- [8] 宓宝来. 振腹推拿干预孤独症儿童临床疗效观察及肠道菌群变化[D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
- [9] 刘安南, 姜志梅, 公超. 孤独症谱系障碍推拿治疗研究进展[J]. 按摩与康复医学, 2023, 14(7): 70-74.

- [10] 王 静, 刘 芸, 黄浩宇, 等. 推拿疗法对孤独症谱系障碍儿童核心症状及胃肠道疾病症状的影响[J]. 教育生物学杂志, 2023, 11(3): 207–211, 217.
- [11] CHRSTIAN SZ J A, GRAY K M, TAF FE J, et al. Autism spectrum disorder in the DSM –5: Diagnostic sensitivity and specificity in early childhood[J]. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 2016, 46: 2054–2063.
- [12] 湖南省中医药和中西医结合学会儿科专业委员会. 儿童孤独症谱系障碍中西医结合干预专家共识[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(2): 169–175.
- [13] FAILLA C, SCARCELLA I, VETRANO N, et al. Autism, intelligence, language, and adaptive behavior, disentangling a complex relationship[J]. *Frontiers in Psychiatry*, 2024, 15: 1411783.
- [14] HUANG C Y, CHEN K S, LEE K Y, et al. Different autism measures targeting different severity levels in children with autism spectrum disorder[J]. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 2024, 274(1): 27–33.
- [15] HU C Q, YANG T, CHEN J, et al. Phenotypic characteristics and rehabilitation effect of children with regressive autism spectrum disorder: A prospective cohort study[J]. *BMC Psychiatry*, 2024, 24(1): 514.
- [16] 中华中医药学会脾胃病分会. 脾胃病症状量化标准专家共识意见(2017)[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(8): 3590–3596.
- [17] 丑易倩. 基于菌肠脑轴探讨以脾为核心辨治孤独症谱系障碍的疗效及机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2020.
- [18] STEVANOVIC D, COSTANZO F, FUCÀ E, et al. Measurement invariance of the Childhood Autism Rating Scale (CARS) across six countries[J]. *Autism Research*, 2021, 14(12): 2544–2554.
- [19] 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.
- [20] STRATI F, CAVALIERI D, ALBANESE D, et al. New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders[J]. *Microbiome*, 2017, 5(1): 24.
- [21] HSIAO E Y, MCBRIDE S W, HSIEN S, et al. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders[J]. *Cell*, 2013, 155(7): 1451–1463.
- [22] STRATI F, CAVALIERI D, ALBANESE D, et al. New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders[J]. *Microbiome*, 2017, 5(1): 24.
- [23] STEINMAN G, MANKUTA D. The role of oligopeptides in preventing autism[J]. *Medical Hypotheses*, 2020, 138: 109604.
- [24] COLLINGRIDGE G L, VOLIANSKIS A, BANNISTER N, et al. The NMDA receptor as a target for cognitive enhancement[J]. *Neuropharmacology*, 2013, 64: 13–26.
- [25] GONZÁLEZ-MADRID E, RANGEL-RAMÍREZ M A, OPAZO M C, et al. Gestational hypothyroxinemia induces ASD-like phenotypes in behavior, proinflammatory markers, and glutamatergic protein expression in mouse offspring of both sexes[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2024, 15: 1381180.
- [26] LIU X, SUN X, GUO C, et al. Untargeted urine metabolomics and machine learning provide potential metabolic signatures in children with autism spectrum disorder[J]. *Frontiers in Psychiatry*, 2024, 15: 1261617.
- [27] NICKEL K, MENKE M, ENDRES D, et al. Altered markers of mitochondrial function in adults with autism spectrum disorder[J]. *Autism Research*, 2023, 16(11): 2125–2138.
- [28] LI H, GUO W, LI S, et al. Alteration of the gut microbiota profile in children with autism spectrum disorder in China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2024, 14: 1326870.

(本文编辑 周 旦)