本文引用: 罗 容, 钟 峰, 殷 伶, 叶 勇. 基于全转录组测序分析电针大肠俞、天枢改善慢传输型便秘大鼠肠动力的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2026, 46(1): 70-81.

基于全转录组测序分析电针大肠俞、天枢改善慢传输型便秘大鼠肠动力的作用机制

罗 容[1],钟 峰[1],殷 伶[2],叶 勇[1]*

1.湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙 410007;2.湖南中医药大学第一中医临床学院,湖南 长沙 410007

〔**摘要**〕**目的** 基于全转录组测序技术,观察电针大肠俞、天枢对慢传输型便秘(STC)大鼠肠道动力的影响,并探讨其潜在的分子调控机制。**方法** 9只SD大鼠中随机抽取3只作为空白组,其余大鼠采用洛哌丁胺灌胃法构建STC大鼠模型,造模成功后再随机分为模型组和电针组,每组3只。电针组选取双侧大肠俞、天枢进行电针干预,连续14 d;空白组予以生理盐水灌胃,模型组予以盐酸洛哌丁胺混悬液灌胃维持模型稳定,电针组在模型组的基础上选取双侧大肠俞、天枢进行电针干预,均连续干预14 d。观察并记录大鼠首粒红便排出时间,干预14 d后24 h内粪便粒数及质量、小肠推进率;采集结肠组织进行全转录组测序,筛选差异表达基因;运用GO功能和KEGG通路富集分析探讨电针干预的生物学功能,筛选关键核心靶点并分析其调控关系,选取关键差异表达基因进行RT-qPCR验证。**结果** 与空白组比较,模型组、电针组首粒红便排出时间均延长($P<0.05$,$P<0.01$),24 h粪便粒数及质量、小肠推进率降低($P<0.05$,$P<0.01$),证实STC模型构建成功;与模型组比较,电针组24 h粪便粒数及质量、小肠推进率均升高($P<0.05$,$P<0.01$)。全转录组测序筛选出412个差异mRNA、25个差异lncRNA、6 789个差异circRNA及12个差异miRNA。GO功能与KEGG通路富集分析表明,模型组的铁死亡与缺氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路异常激活相关;电针的效应机制与Janus激酶-信号转导及转录激活因子(JAK-STAT)、核因子-κB(NF-κB)信号通路,以及补体与凝血级联反应的调控密切相关。RT-qPCR验证显示,与空白组比较,模型组激活转录因子3(Atf3)、丝氨酸肽酶抑制剂Kazal 1型(Spink1)、活化T细胞核因子1(Nfatc1)及微小RNA-27a-5A(miR-27a-5p)相对表达量显著上调($P<0.01$),同源盒基因A6(HoxA6)、蛋白激酶cAMP激活催化亚基β(Prkacb)下调($P<0.05$);与模型组比较,电针组Atf3、Spink1、Nfatc1及miR-27a-5p相对表达量显著下调($P<0.01$),HoxA6、Prkacb上调($P<0.05$),趋势与测序结果一致。**结论** 电针大肠俞、天枢可能通过调控HIF-1、JAK-STAT及NF-κB等信号通路,并影响miR-27a-5p等关键基因表达,协同改善肠道炎症、能量代谢与神经可塑性,从而多靶点治疗STC大鼠肠道动力障碍。

〔**关键词**〕慢传输型便秘;电针;肠动力;全转录组测序;差异表达基因

〔**中图分类号**〕R245 〔**文献标志码**〕A 〔**文章编号**〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2026.01.009

Mechanism of action of electroacupuncture at "Dachangshu (BL25)" and "Tianshu (ST25)" in improving intestinal motility in rats with slow transit constipation based on whole transcriptome sequencing analysis

*LUO Rong[1], ZHONG Feng[1], YIN Ling[2], YE Yong[1]**

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

2. The First Clinical College of Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

〔**Abstract**〕 **Objective** To observe the effects of electroacupuncture (EA) at "Dachangshu (BL25)" and "Tianshu (ST25)" on intestinal motility in rats with slow transit constipation (STC) based on whole transcriptome sequencing technology, and explore the underlying

〔**收稿日期**〕2025-07-21

〔**基金项目**〕国家自然科学基金面上项目(82374595);湖南省自然科学基金项目(2024JJ6356);湖南省卫生健康委员会卫生科研项目(W20243084);湖南省卫生健康委员会高层次人才(湘卫函〔2024〕43号)。

〔**通信作者**〕* 叶 勇,男,博士,主任医师,硕士研究生导师,E-mail:472064545@qq.com。

potential molecular regulatory mechanisms. **Methods** Three rats were randomly selected from nine SD rats as the blank group, while the remaining rats were used to establish STC rat model via loperamide gavage. After successful modeling, the model rats were randomly divided into the model group and the EA group, with three rats in each group. The EA group received intervention at bilateral "Dachangshu (BL25)" and "Tianshu (ST25)" for 14 consecutive days; the blank group received gavage of normal saline for 10 consecutive days; and the model group received gavage of loperamide hydrochloride suspension for 7 consecutive days. The time to the first red stool excretion was observed and recorded. After 14 days of intervention, the number and weight of feces within 24 hours, as well as the small intestinal transit rate, were measured. Colonic tissues were collected for whole transcriptome sequencing to screen differentially expressed genes (DEGs). Gene Ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed to explore the biological functions of EA intervention, to screen key core targets and analyze their regulatory relationships, and to select key DEGs for verification by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR). **Results** Compared with the blank group, the time to the first red stool excretion was prolonged in both the model group and the EA group ($P<0.05$, $P<0.01$), while the number and weight of feces within 24 hours and the small intestine transit rate reduced ($P<0.05$, $P<0.01$), confirming the successful construction of the STC model. Compared with the model group, the number and weight within 24 hours, as well as the small intestine transit rate, increased in the EA group ($P<0.05$, $P<0.01$). Whole transcriptome sequencing identified 412 differentially expressed mRNAs, 25 differentially expressed lncRNAs, 6789 differentially expressed circRNAs, and 12 differentially expressed miRNAs. GO function and KEGG pathway enrichment analyses showed that ferroptosis in the model group was associated with abnormal activation of the hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) signaling pathway; the effect mechanism of EA is closely related to the regulation of the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT), nuclear factor-κB (NF-κB) signaling pathways, as well as the complement and coagulation cascade reactions. RT qPCR validation showed that compared with the blank group, the relative expression levels of activating transcription factor 3 (Atf3), serine peptidase inhibitor kazal type 1 (Spink1), nuclear factor of activated t cells 1 (Nfatc1), and microRNA-27a-5p (miR-27a-5p) in the model group were significantly upregulated ($P<0.01$), while homeobox A6 (HoxA6) and protein kinase camp-activated catalytic subunit β (Prkacb) were downregulated ($P<0.05$); Compared with the model group, the relative expression levels of Atf3, Spink1, Nfatc1, and miR-27a-5p in the electroacupuncture group were significantly downregulated ($P<0.01$), while HoxA6 and Prkacb were upregulated ($P<0.05$), consistent with the sequencing results. **Conclusion** Electroacupuncture at "Dachangshu (BL25)" and "Tianshu (ST25)" may regulate signaling pathways including HIF-1, JAK-STAT and NF-κB, and affect the expression of key genes such as miR-27a-5p, thereby synergistically ameliorating intestinal inflammation, energy metabolism and neural plasticity, and exerting a multi-target therapeutic effect on intestinal motility disorders in STC rats.

〔**Keywords**〕 slow transit constipation; electroacupuncture; intestinal motility; whole transcriptome sequencing; differentially expressed genes

慢传输型便秘(slow transit constipation, STC)是一种全球高发的胃肠功能障碍性疾病,一项针对全球的流行病学调查显示,其患病率在成人中达10%~15%,且随年龄增长显著升高[1-2]。现有治疗手段包括渗透性泻剂、促动力药等,短期内能有效缓解症状,但长期疗效有限,且存在药物依赖性等毒副作用[3]。近年来,电针疗法在改善结肠动力障碍方面展现出独特优势[4-5],然而其多靶点调控机制尚未在转录组学层面获得系统分析。随着高通量测序技术的发展,全转录组分析为揭示疾病分子网络提供了全新视角[6-7]。大肠俞募配穴作为治疗 STC 的高频腧穴,多项高质量研究均表明其能有效调节肠动力[8-9],这一调控机制的分子生物学基础亟待阐明。

本研究以“俞募配穴”理论为指导,采用电针刺激 STC 模型大鼠双侧大肠俞、天枢穴。通过整合结肠组织 mRNA、miRNA、lncRNA 和 circRNA 表达谱,结合 KEGG 通路富集与蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络拓扑分析筛选关键靶标,并采用RT-qPCR 进行实验验证,从大肠俞募配穴改善结肠动力的分子机制方面,为阐释穴位配伍效应提供多组学证据。本研究采用电针干预 STC 模型大鼠,利用全转录组测序技术系统分析结肠组织中各类 RNA 的表达差异,以期深入探讨电针改善 STC 大鼠结肠动力的分子生物学基础,探索其潜在的关键靶点与信号通路,为大肠俞募穴治疗STC 提供多组学层面的证据支持。

1 材料

1.1 主要试剂

盐酸洛哌丁胺(上海阿拉丁生化科技股份有限

公司,批号:L129465);mirVana™miRNA 分离试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司,货号:AM1560);Ribo-off rRNA Depletion Kit、VAHTS Universal V6 RNA-seq Library Prep 试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,货号:N407、NR604);TransScript All-in-One SuperMix、PerfectStart™Green SuperMix(北京全式金生物技术有限公司,货号:AT341、AQ601)。

1.2 主要仪器

超微量分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司,型号:NanoDrop 2000);生物分析仪(美国 Agilent Technologies 公司,型号:Agilent 2100);PCR 扩增仪(美国 Applied Biosystems公司,型号:GeneAmp 9700);高通量测序平台(美国 Illumina 公司,型号:NovaSeq 6000);荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司,型号:LightCycler 480 Ⅱ);台式低速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,型号:TDZ5-WS)。

1.3 实验动物

健康成年 SD 大鼠 9 只,体质量 180~220 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(湘)2021-0002。动物饲养于湖南中医药大学第一附属医院实验动物中心动物房,实验大鼠分笼饲养(每笼不超过 5 只),置于标准动物房内,室内温度控制在(22±3) ℃,相对湿度 50%~70%,并予以 12 h/12 h 昼夜交替照明。实验期间,保持垫料干燥清洁(每天更换 1 次),大鼠自由摄食、饮水。本研究已获得湖南中医药大学第一附属医院伦理委员会批准(批准号:HN-LL-SWJW-2023-059)。

2 方法

2.1 动物造模及分组

采用随机数字表法选取 3 只大鼠作为空白组,其余大鼠作为造模组。根据前期研究基础并查阅相关文献[10],造模组每天按 10 mg/kg 盐酸洛哌丁胺溶液灌胃 7 d 建立 STC 大鼠模型;空白组以同等剂量生理盐水灌胃 7 d。造模后,所有大鼠禁食 24 h,将自制的红色酚红悬浊液 2 mL(10 g 阿拉伯树胶+100 mL 纯水+5 g 酚红)按 1 mL/100 g 灌入胃中,立即转移至代谢笼,记录首粒红便排出时间,当空白组与造模组首粒红便排出时间存在统计学差异($P<0.05$)时,即为造模成功[11]。将造模成功的大鼠按随机数字表法进一步分为模型组和电针组,每组 3只。

2.2 干预方法

2.2.1 空白组 每天按 10 mL/kg 标准予以生理盐水灌胃,1 次/d,连续干预 14 d。

2.2.2 模型组 每天按 10 mL/kg 标准予以盐酸洛哌丁胺混悬液灌胃以维持模型稳定,1 次/d,连续干预 14 d。

2.2.3 电针组 在模型组干预方法的基础上,进行电针干预。参考《实验针灸学》[12]进行大鼠穴位定位:天枢位于腹部,脐中旁开 5 mm;大肠俞位于腰部,第 4 腰椎棘突下缘水平,后正中线旁开 5 mm。操作:采用自制双面针灸实验固定装置仰卧位固定,选用 0.25 mm×25 mm 一次性针灸针缓慢直刺大肠俞、天枢 5 mm,捻转至针下有紧涩感后,双侧大肠俞/天枢连接华佗牌 SDZ-Ⅲ型电针仪,调节至疏密波,频率 2 Hz/15 Hz,电流强度0.1~1 mA,以大鼠肢体末端轻微抖动为宜。留针 15 min,1 次/d,连续干预 14 d。

2.3 观察指标及检测方法

2.3.1 24 h 粪便粒数及质量 干预 14 d 后,将大鼠置于代谢笼内,禁食不禁水,收集 24 h 内排出的粪便,记录以下结果:(1)24 h 粪便粒数:计数每只大鼠 24 h 内排出的粪便颗粒总数;(2)24 h 粪便质量:将收集的粪便称重,记录为粪便湿重。

2.3.2 肠道推进率 各组大鼠灌胃给予 2 mL 印度墨水,30 min 后,使用异氟烷(维持浓度为 3.5%)进行麻醉,进入腹腔结扎贲门并取出整个肠道(从贲门到肛门)。测量从幽门至肛门的肠道总长度(L1)和充满墨水部分的肠道长度(L2),并进行计算:肠道推进率(%)=L2/L1×100%。

2.4 全转录组测序方法

2.4.1 RNA 提取与质量控制 采用 mirVana™ miRNA 分离试剂盒按标准操作流程提取总 RNA。使用分光光度计鉴定 RNA 纯度和定量,使用生物分析仪评估 RNA 完整性,仅保留 RNA 完整性指数(RNA integrity number, RIN)≥7 的样本进行后续分析。

2.4.2 文库构建与测序 先利用 Ribo-off rRNA Depletion Kit 进行核糖体 RNA 的去除,再使用VAHTS Universal V6 RNA-seq Library Prep 试剂盒依照说明书构建得到转录组文库。文库质量经生物分析仪和高灵敏度 DNA 芯片验证合格后,在高通量测序平台上进行双端测序,读长为 2×150 bp。

2.4.3 dif-mRNA、dif-miRNA、dif-lncRNA 和 dif-circRNA 的筛选 利用 DESeq2 软件进行差异表达基因分析,并采用 NB(负二项分布检验的方式)进行显著性检验,其中符合 $P<0.05$ 且差异倍数(fold change, FC)>2 或 FC<0.5 阈值的基因用于鉴定差异显著的 mRNA、miRNA、lncRNA 及 circRNA。通过 pheatmap R 软件包对标准化后的表达数据(如 FP-

KM、RPB 或 counts)进行聚类分析并绘制热图,直观展示各差异 RNA 在不同样本中的表达模式。

2.4.4　差异 mRNA 富集途径的分析　基于超几何分布算法对差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)进行GO 功能和 KEGG 通路富集分析,用于筛选显著富集功能条目。

2.4.5　差异 mRNA 的 PPI 网络和模块分析　基于 STRING 数据库(V10.0;https://string-db.org/cgi/input.pl),以大鼠的 DEGs 为输入集,筛选高置信度 PPI(评分阈值设定为 0.4),构建 PPI 网络。通过 Cytoscape 软件(V3.2.0;https://cytoscape.org/)可视化网络,并利用 CytoNCA 插件(V2.1.6;https://apps.cytoscape.org/apps/cytonca)分析网络拓扑特性(参数:无权重模式),依据节点中心性指标(如度值、介数中心性)筛选关键节点。进一步采用 MCODE 插件(V1.4.2;https://apps.cytoscape.org/apps/MCODE)识别显著聚类模块(模块得分阈值≥5),提取模块内基因进行 GO-生物过程(biological process, BP)富集分析,筛选条件为富集基因数≥2 且 $P<0.05$,以解析关键功能模块的生物学意义。

2.4.6　miRNA 测序方法分析　原始测序数据经碱基识别和质量过滤[去除低质量序列、引物、poly(A)尾及长度异常序列]后获得 clean reads,通过 Bowtie 软件将序列与 Rfam 数据库(http://www.sanger.ac.uk/software/Rfam)进行比对,注释出 rRNA、scRNA、Cis-reg、snRNA、tRNA 等序列并做过滤处理,随后用 Bowtie 软件再依次和 cDNA 序列、物种重复序列库 Repbase 数据库、miRBase 数据库(http://www.mirbase.org/)进行比对注释去除降解的转录本序列和重复序列,并实现对已知 miRNA 的鉴定和注释,同时对不同样品中已知的 miRNA 表达模式进行分析。计算差异表达的 miRNAs 时,默认以 $P<0.05$ 且FC>2 或者 FC<0.5 为阈值进行过滤筛选。进行靶基因预测时,差异 miRNA 的靶基因使用 miranda 软件进行预测,其参数为:比对评分(score, S)≥150,结合自由能(energy, ΔG)≤-30 kcal/mol,要求严格的 5′种子配对。使用 R 包基于超几何分布分别对差异表达 miRNA 的靶基因进行 GO 富集和 KEGG 通路富集分析。

2.4.7　dif-lncRNA-dif-mRNA 和 dif-circRNA-dif-mRNA 的共表达分析　本研究基于差异表达矩阵(dif-lncRNA/dif-circRNA/dif-mRNA),通过皮尔逊相关分析分别计算 mRNA-lncRNA、mRNA-circRNA 的表达相关性,经统计检验($|r|>0.8$ 且 $P<0.05$)筛选显著正相关共表达对,最终获得 mRNA-lncRNA 和 mRNA-circRNA 两组高置信度共表达关系数据集。

2.4.8　dif-lncRNA、dif-circRNA 和 dif-miRNA 的 KEGG 通路富集分析　整合差异 miRNA-mRNA 调控关系及 mRNA-lncRNA/circRNA 共表达数据,通过 clusterProfiler 对 miRNA 靶基因及其共表达关联的 lncRNA/circRNA 进行 KEGG 通路富集分析。筛选标准为:lncRNA/circRNA/miRNA 相关通路需满足 $P<0.05$ 显著条目,最终通过气泡图可视化 3 组RNA 组分共同参与的核心信号通路。

2.4.9　PPI 网络及模块提取　使用 Cytoscape(V3.10.0)插件 MCODE 对 PPI 进行模块挖掘,参数设置如下:度阈值(Degree Cutoff)为 2,节点得分阈值(Node Score Cutoff)为 0.4,K 核值(K-Core)为 2,最大深度(Max. Depth)为 100。筛选得分(MCODE Score)≥5 的模块进行后续功能富集分析,最终保留拓扑结构紧密且生物学意义显著的核心模块。

2.5　RT-qPCR 验证

候选验证基因的筛选基于多重标准:首先依据统计显著性,筛选错误发现率(false discovery rate, FDR)<0.05 且对数差异倍数($\log_2$ fold change, $\log_2$FC)绝对值最大的基因;其次考量其是否位于显著富集通路[如 Janus 激酶-信号转导及转录激活因子(Janus kinase-signal transducer and activator of transcription, JAK-STAT)、核因子-κB(nuclear factor-κB, NF-κB)];同时参考与胃肠动力相关的文献证据;最终结合实验可行性,确定核心验证靶点:激活转录因子 3(activating transcription factor 3, Atf3)、丝氨酸肽酶抑制剂 Kazal 1 型(serine peptidase inhibitor Kazal type 1, Spink1)、同源盒基因A6(homeobox A6, HoxA6)、蛋白激酶 cAMP 激活催化亚基 β(protein kinase camp-activated catalytic subunit β, Prkacb)、活化 T 细胞核因子 1(nuclear factor of activated T cells 1, Nfatc1)以及微小 RNA-27a-5p(microRNA-27a-5p, miR-27a-5p)。上述基因及内参基因的引物序列详见表 1。

RT-qPCR 验证实验采用全式金 Trans Script All-in-One Super Mix 进行逆转录,取 0.5 μg 总 RNA 于 42 ℃反应 15 min 合成互补 DNA(complementary DNA, cDNA),经 85 ℃灭活后稀释至 100 μL 备用;荧光定量 PCR 使用 PerfectStar™ Green Super Mix 及特异性引物,每孔 9 μL 体系(含 5 μL 预混液、上下游引物各0.2、1 μL cDNA 模板和2.8 μL 无

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	方向	引物序列(5′-3′)	长度/bp
Atf3	正向	GTCACTGGTGTTTGAGGATT	130
	反向	TCTGTTGTTGATGGTGACTG	
Spink1	正向	CTTTCTTCTCAGTGCTTTGG	85
	反向	CTTAGGGCAATTAGGCGTT	
HoxA6	正向	TACCAACAGTCCAACTCGG	89
	反向	CCACTGAGGTCCTTATCAGAAT	
Prkacb	正向	CGAAGTGGAGAGCGTGAA	93
	反向	TCAAGCCCAGCATTACTCG	
NFATC1	正向	TCGAGATCACCTCCTATCTGG	88
	反向	TTGCAGCTAGGAAGTACGTC	
miRNA-27a-5p	正向	ACACTCCAGCTGGGAGCTA-CATTGTCTGC	22
	反向	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCG-GCAATTCAGTTGAGGAAACCCA	
ACTB	正向	GCGAGTACAACCTTCTTGC	72
	反向	TATCGTCATCCATGGCGAAC	

酶水)于荧光定量PCR 仪运行 45 个循环(94 ℃ 5 s变性→60 ℃ 30 s退火/延伸),熔解曲线分析验证引物特异性,实验结束后利用仪器自带软件自动分析并导出循环阈值(cycle threshold, Ct)。

3 结果

3.1 各组大鼠首粒红便排出时间、24 h 粪便粒数及质量、小肠推进率比较

与空白组相比,模型组、电针组首粒红便排出时间均延长($P<0.05$,$P<0.01$),24 h 粪便粒数及质量、小肠推进率均降低($P<0.05$,$P<0.01$)。与模型组相比,电针组 24 h 粪便粒数及质量、小肠推进率均升高($P<0.05$,$P<0.01$)。详见表 2。

表 2 各组大鼠首粒红便排出时间、24 h 粪便粒数及质量、小肠推进率比较($\bar{x}\pm s$,n=3)

Table 2 Comparison of the time to the first red stool excretion, the number and weight of feces within 24 hours, and the small intestinal transit rate in rats of different groups ($\bar{x}\pm s$, n=3)

分组	首次红便排出时间/min	24 h 粪便粒数/粒	24 h 粪便质量/g	小肠推进率/%
空白组	455.60±10.43	52.40±4.28	14.76±1.93	97.90±2.31
模型组	700.40±77.33*	21.80±8.23**	4.38±1.16**	57.27±9.93**
电针组	694.20±22.47**	30.60±4.04**#	7.84±1.60**##	85.84±5.24*##

注:与空白组比较,*$P<0.05$,**$P<0.01$;与模型组比较,#$P<0.05$,##$P<0.01$。

3.2 全转录组测序结果分析

3.2.1 差异表达分析 本研究通过差异表达分析发现,模型组与空白组比较:共鉴定到 412 个差异 mRNA(175 个上调、237 个下调),25 个差异 lncRNA(11 个上调、14 个下调),6 789 个差异 circRNA(3 388 个上调、3 401 个下调)以及 12 个差异 miRNA(10 个上调、2 个下调)。干预后,与模型组相比,电针组呈现 146 个差异 mRNA(46 个上调、100 个下调),17 个差异 lncRNA(8 个上调、9 个下调),3 763 个差异circRNA(527 个上调、3 236 个下调),5 个差异 miRNA(2 个上调、3 个下调)。

双向聚类热图显示,模型组与空白组(见图 1)、电针组与模型组(见图 2)的样本在组内表达模式一致,组间呈现显著分离,验证了差异表达分析结果的可靠性。各类型差异 RNA(DEmRNAs、DElncRNAs、DEcircRNAs、DEmiRNAs)的表达谱详见图 1—2。

3.2.2 差异 mRNA 的 GO 功能富集分析 通过对空白组与模型组差异 mRNA 的 GO 功能富集分析,发现两组基因在 BP 方面呈现显著差异:上调基因主要富集于细胞黏附、免疫与炎症反应、氧运输与代谢;下调基因显著关联胚胎发育与形态发生、类固醇激素代谢,同时突触功能和膜通道活性也显著降低。

通过对模型组与电针组差异 mRNA 的 GO 功能富集分析,发现两组基因在 GO-BP 中呈现显著差异:上调基因主要富集于神经发育与可塑性、激素与代谢调控、离子通道功能;下调基因显著关联炎症与免疫调控、凝血与血管生成、突触修剪等。上调或下调的差异化 mRNA 富集的排名前 10 的 GO-BP 条目详见图 3。

3.2.3 差异 mRNA 的 KEGG 通路富集分析 通过对模型组与空白组差异表达基因的 KEGG 通路富集分析,筛选出显著富集的上下调通路(Top20),模型组中显著上调的通路主要包括铁死亡、缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)信号通路、α-亚麻酸代谢、嘌呤代谢等,模型组中显著下调的通路主要包括环鸟苷酸-蛋白激酶 G(cyclic GMP-protein kinase G, cGMP-PKG)信号通路、化学致癌作用通路、类固醇激素生物合成、氮代谢。

通过对电针组与模型组差异表达基因的 KEGG通

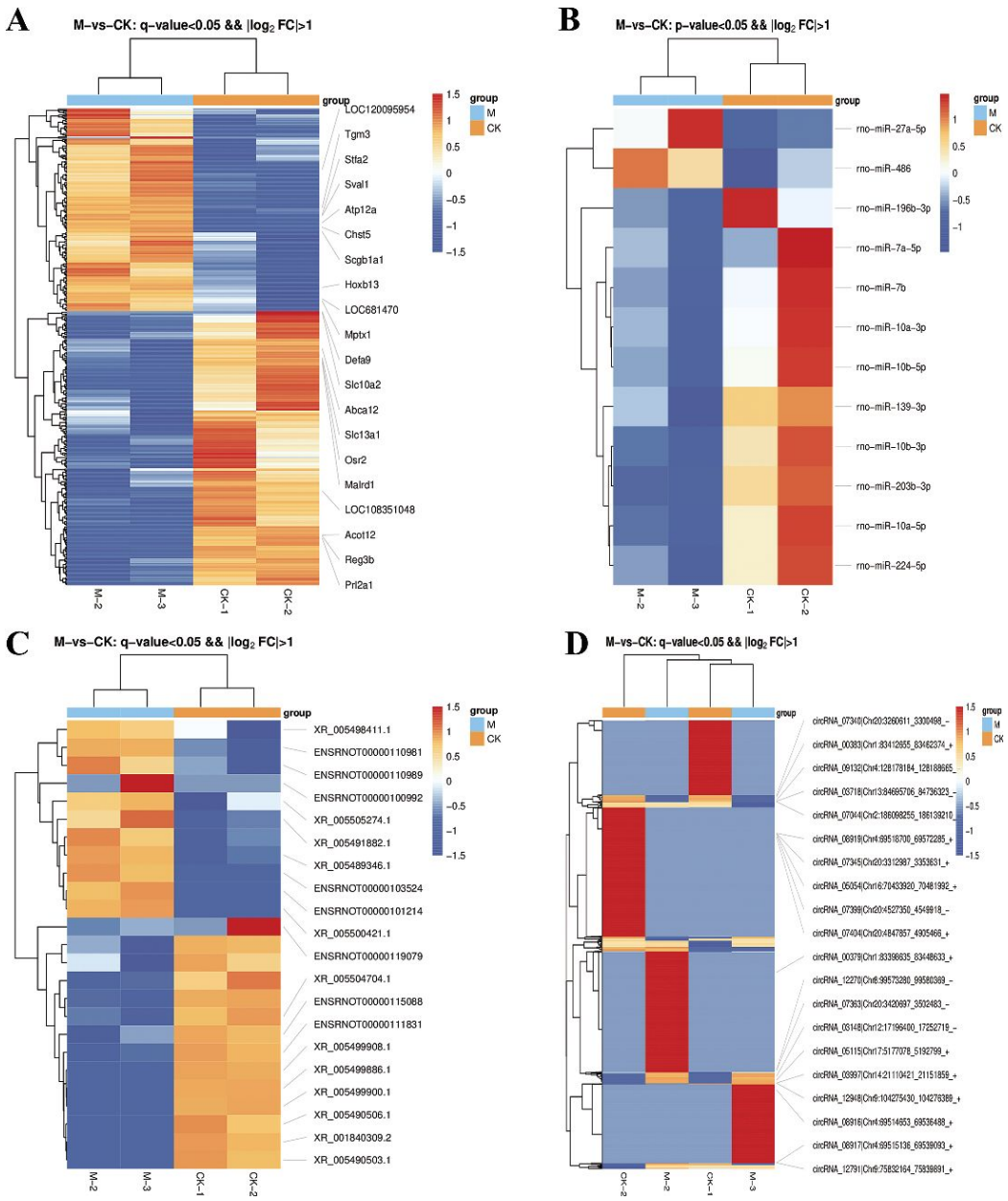

图 1　模型组与空白组的差异表达分子热图

Fig.1　Heatmap of differentially expressed molecules from the model group and the blank group

注：A.差异表达 mRNA 的热图；B.差异表达 miRNA 的热图；C.差异表达 lncRNA 的热图；D.差异表达 circRNA 的热图；色阶代表相对表达量，红色代表相对高表达水平，蓝色代表相对低表达水平。

路富集分析发现，电针组中显著上调的通路主要包括 JAK-STAT 信号通路、细胞黏附分子及细胞因子-细胞因子受体相互作用，显著下调的通路主要包括吞噬体、NF-κB 信号通路及补体和凝血级联反应。筛选出显著富集的上调或下调的排名前 20 的通路详见图 4。

3.2.4　PPI 网络及模块提取　模型组与空白组相比：基于 dif-mRNA 的 PPI 网络由 357 个节点和 3 639 对相互作用组成。具有高拓扑评分的节点可被视为网络的关键节点，使用 Cytoscape 插件 MCODE(评分>5)，从 PPI 网络中聚合并提取了 3 个关键子网络模块(见图 5)。其中，模块 A(评分=17.222)包含 55个节点和 465 对相互作用，以羧酸酯酶2 h(carboxylesterase 2 h, Ces2 h)(度=29)蛋白最多。模块 B(评分=9.023)包含 87 个节点和 388 对相互作用，包括 Tlr4(度=25)蛋白最多；模块 C(评分=6.435)包含 93 个节点和 296 对相互作用，其中溶质载体家族 20 成员 1 (solute carrier family 20 member 1, Slc20a1)(度=

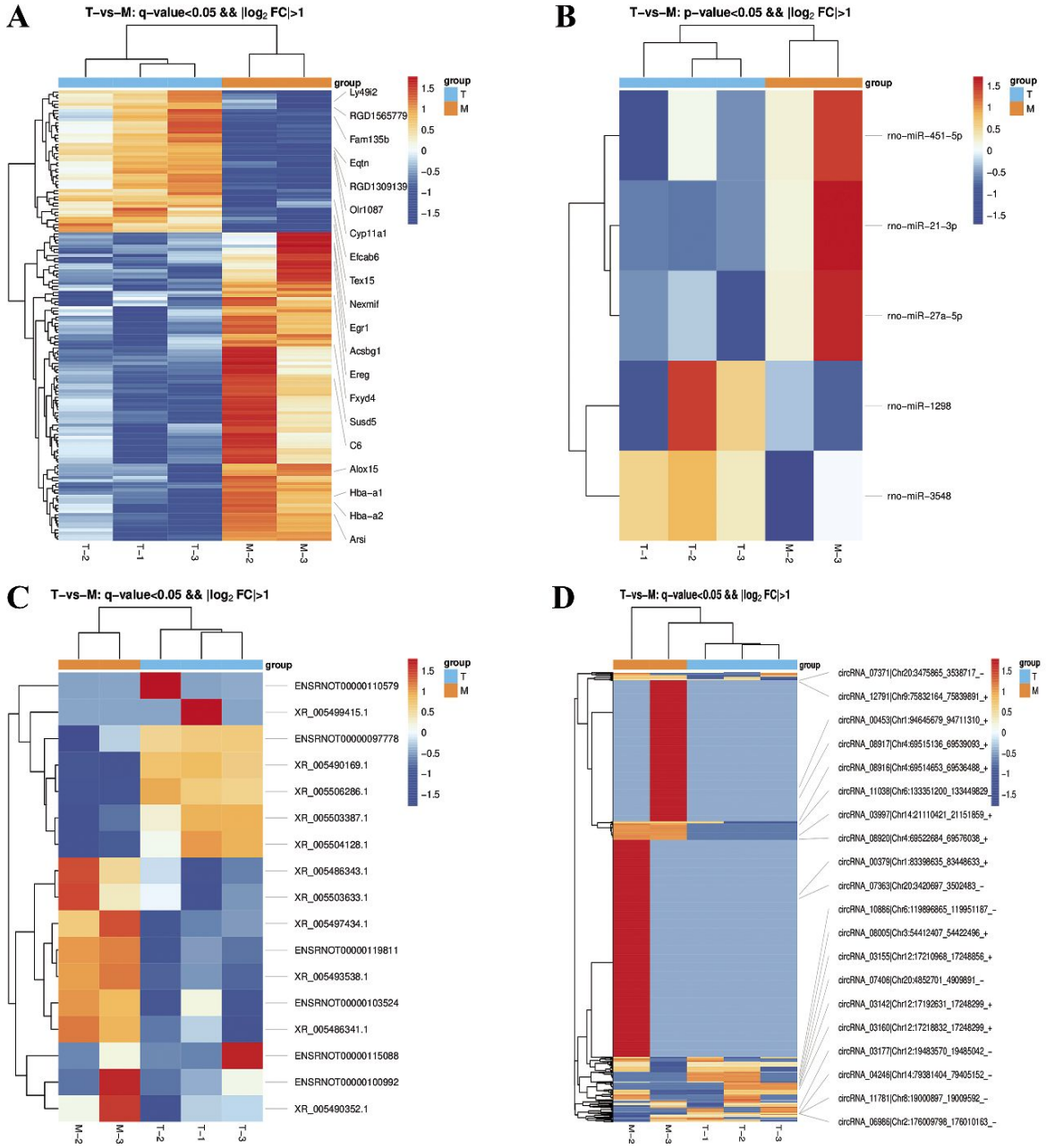

图 2　电针组与模型组的差异表达分子热图

Fig.2　Heatmap of differentially expressed molecules from the EA group and the model group

注：A.差异表达 mRNA 的热图；B.差异表达 miRNA 的热图；C.差异表达 lncRNA 的热图；D.差异表达 circRNA 的热图；色阶代表相对表达量，红色代表相对高表达水平，蓝色代表相对低表达水平。

19）、溶质载体家族 4 成员 4（solute carrier family 4 member 4, Slc4a4）（度=19）为核心蛋白。

模型组与电针组相比：基于差异 mRNA 的 PPI 网络由 120 个节点和 892 对相互作用组成。具有高拓扑评分的节点可被视为网络的关键节点，使用Cytoscape 软件中的 MCODE 插件（评分>5 分），从 PPI 网络中聚合并提取了 2 个关键子网络模块（见图6）。模块 A（评分=19.543 分）包含 36 个节点和 342 对相互作用，其中 C-X-C 基序趋化因子配体 12（C-X-C motif chemokine ligand 12, Cxcl12）（度=28）为核心蛋白。模块 B（评分=6.24 分）包含 26 个节点和 76 对相互作用，其中骨甘蛋白聚糖（osteoglycin, Ogn）蛋白（度=12）为核心蛋白。

此外，对上述 PPI 网络核心模块中的基因进行 GO-BP 富集分析（见图 7）。模型组与空白组相比（见图 7A）：模块 A 中显著富集的 BP 包括蛋白水解、磷酸离子运输、脂肪酸生物合成过程等，这些过程在细胞代谢、信号传导和组织发育中发挥重要作

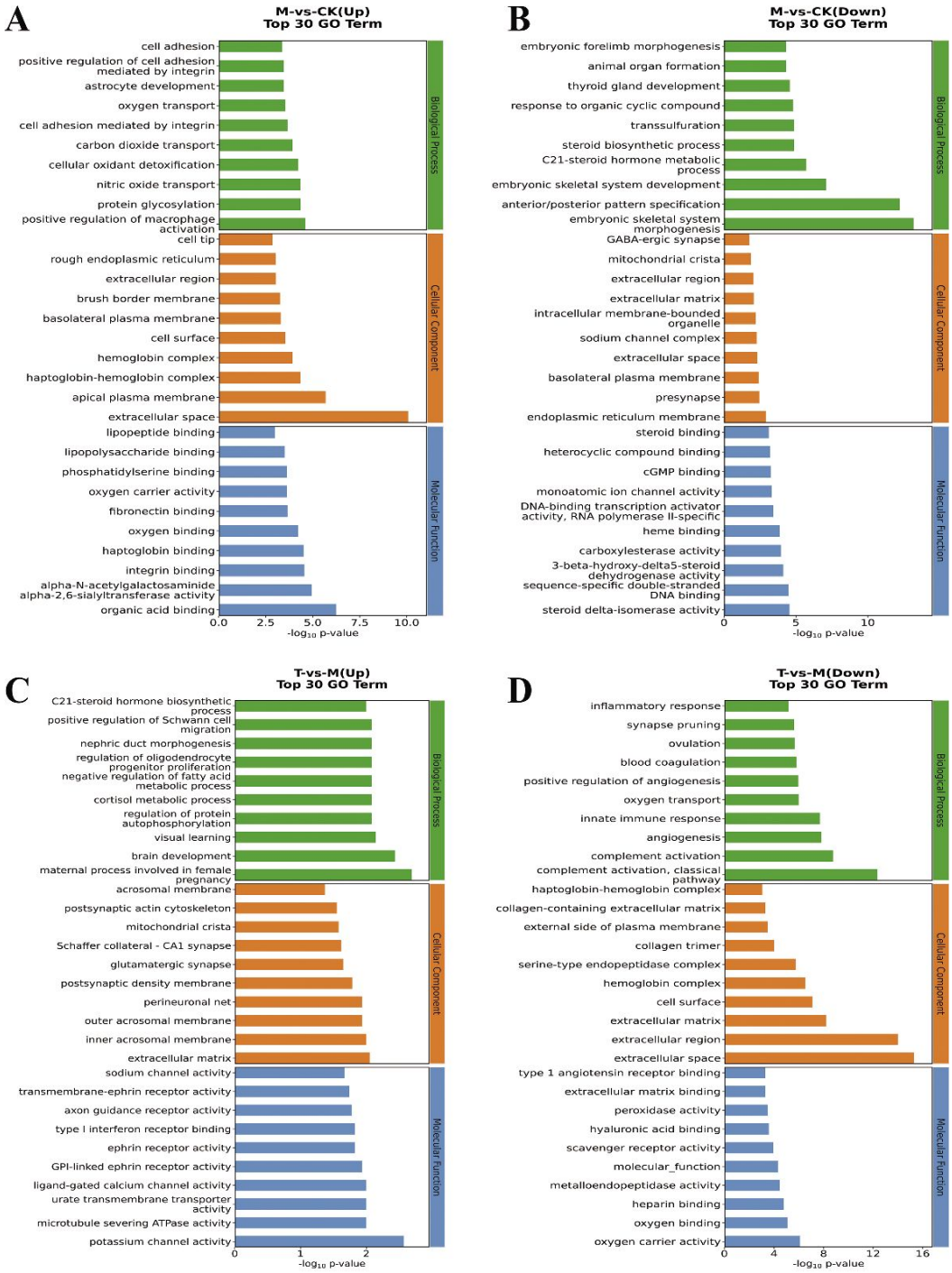

图 3　各组差异 mRNA 的 GO 功能富集分析

Fig.3　GO functional enrichment analysis of differentially expressed mRNAs in different groups

注：A~B.模型组对比空白组，通过上调、下调基因富集的排名前 10 位的 GO-BP 条目；C~D.电针组对比模型组，通过上调、下调基因富集的排名前 10 位的 GO-BP 条目。

用；模块 B 中显著富集的 BP 包括雄性生殖器官发育、口腔发育、跨膜磷酸离子运输和对雌激素的反应，这些过程主要涉及生殖系统发育和激素反应；模块 C 中显著富集的 BP 包括蛋白 O-连接糖基化、对异生物质刺激的反应、细胞内定位的建立和长链脂肪酸代谢过程，这些过程在细胞信号传导、代谢调控和细胞定位中具有重要作用。电针组与模型组相比（见图 7B）：模块 A 中显著富集的 BP 包括脂多糖反应、细胞增殖的负调控、膜攻击复合物激活的正调控和趋化因子介导的信号通路，这些过程在免疫反应和细胞行为调控中发挥重要作用；模块 B中显著富集的 BP 包括胚胎眼形态发生、二氧化碳运输、骨化和卵巢卵泡的排卵，这些过程主要涉及胚胎发育、代谢和生殖系统功能。

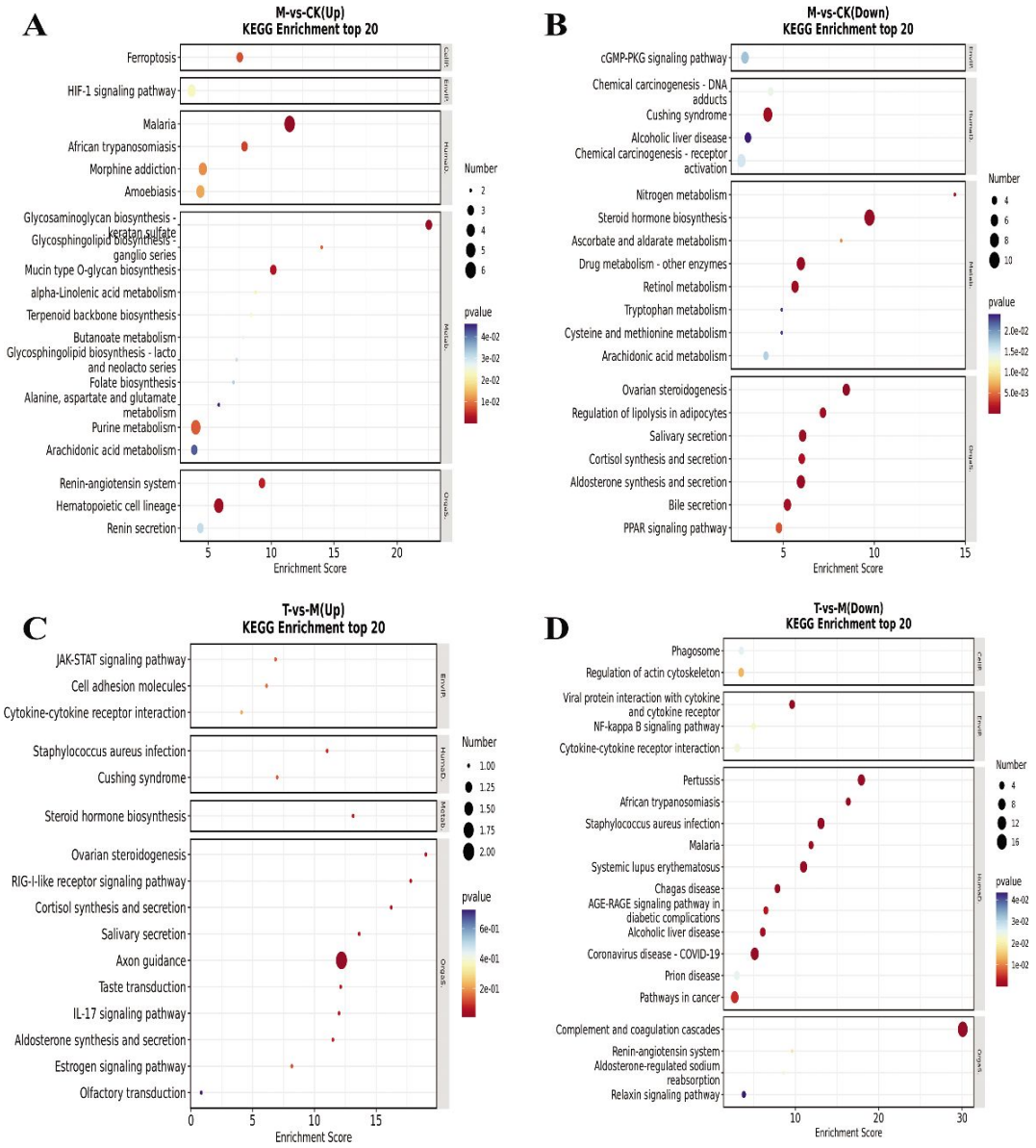

图 4 各组差异 mRNA 的 KEGG 通路富集分析

Fig.4 KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed mRNAs in different groups

注:A~B.模型组对比空白组,通过上调、下调基因富集的排名前 20 位的通路;C~D.电针组对比模型组,通过上调、下调基因富集的排名前 20 位的通路。

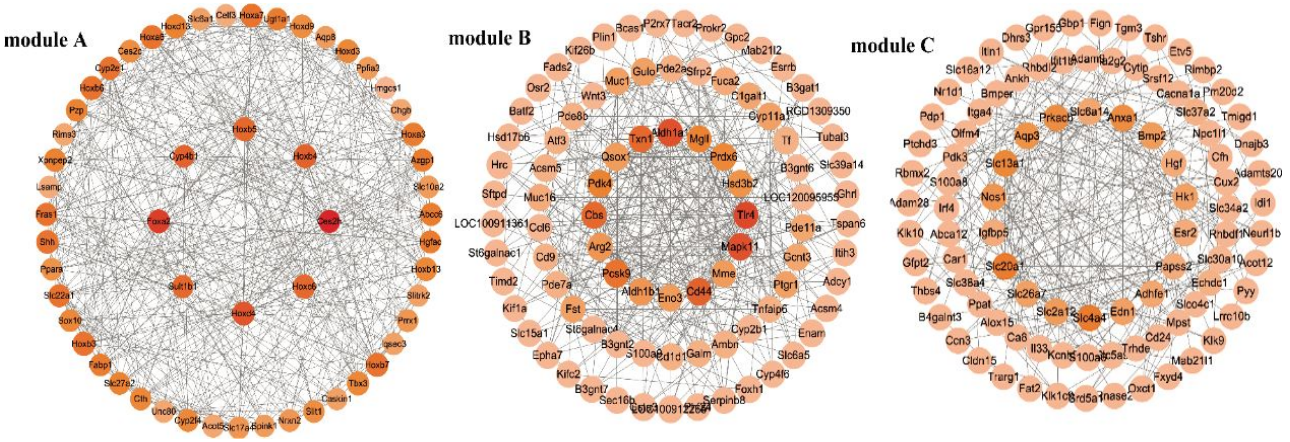

图 5 模型组与空白组的 PPI 网络及模块提取

Fig.5 PPI network and module extraction from the model group and the blank group

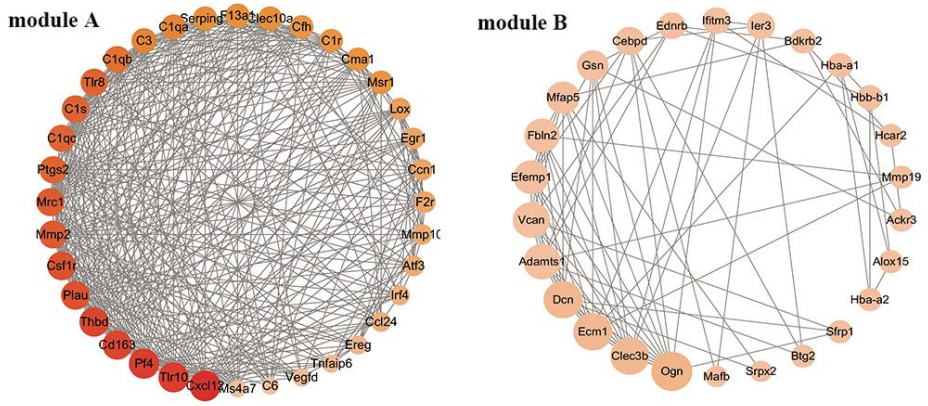

图 6　模型组与电针组的 PPI 网络及模块提取

Fig.6　PPI network and module extraction from the model group and the EA group

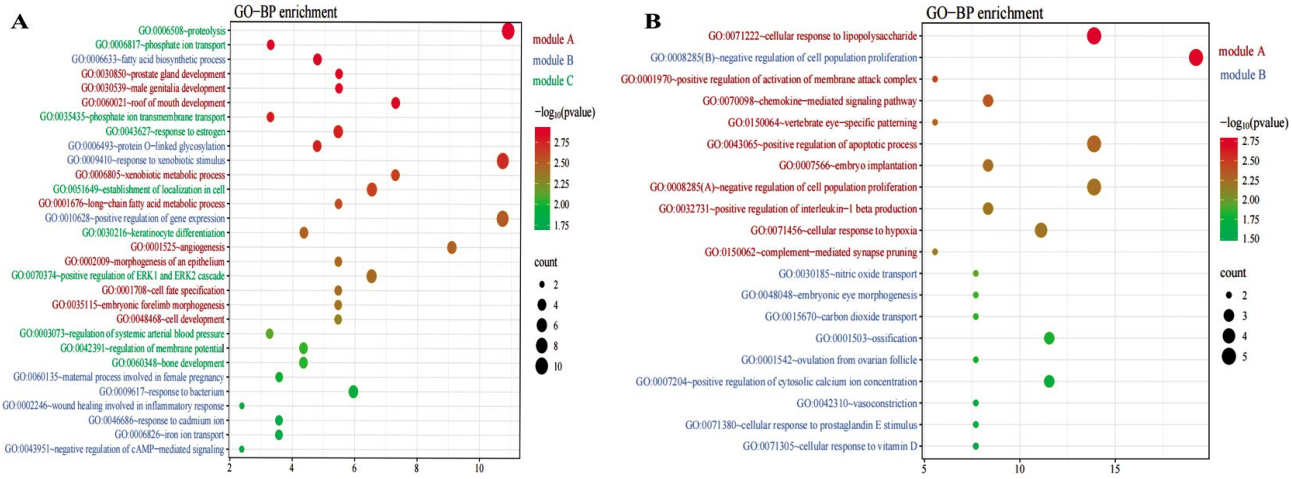

图 7　各组模块基因 GO-BP 富集分析

Fig.7　GO-BP enrichment analysis of module genes in different groups

注：A.模型组对比空白组，每个模块排名前 10 位的 GO-BP 富集分析；B.电针组对比模型组，每个模块排名前 10 位的 GO-BP 富集分析。

3.3　差异表达基因的 RT-qPCR 验证

选取 5 个差异表达的 mRNA(Atf3、Hoxa6、Spink1、Prkacb、Nfatc1)和 1 个差异表达的 miRNA(miR-27a-5p)进行 RT-qPCR 检测，以验证测序结果的可靠性。与空白组相比，模型组 Atf3、Spink1、Nfatc1 及miR-27a-5p 相对表达量均显著上调(P<0.01)，而 HoxA6、Prkacb 相对表达量下调(P<0.05)；与模型组相比，电针组 Atf3、Spink1、Nfatc1 及 miR-27a-5p 相对表达量显著下调(P<0.01)，HoxA6、Prkacb 相对表达量上调(P<0.05)。详见图 8。上述 RT-qPCR 结果趋势与转录组测序分析结果一致。

4　讨论

STC 是临床常见的功能性肠病，以结肠动力不足、传输时间显著延长为主要特征。本病可归属于中医学“便秘”“脾约”等范畴，其病机与大肠传导失常密切相关。大肠俞募配穴是针灸治疗肠腑病的经典配穴[13-14]，能顺达大肠腑气，恢复其“传导之官”的正常功能。本研究通过肠道传输功能评价结合全转录组分析，旨在揭示电针的多通路、多分子协同作用的网络调控机制。实验结果表明，电针能显著改善 STC 大鼠粪便粒数及质量、小肠推进率，提示电针可能优先改善肠道持续运动功能而非初始排便反射[15-16]，其机制或与肠神经-平滑肌协调性调节的时效性差异有关[17]。

通过对差异表达 RNA 的深入分析发现，与空白组相比，共鉴定出 412 个差异 mRNA、25 个 lncRNA、6 789 个 circRNA 及 12 个 miRNA。经电针干预后，与模型组相比，各类差异 RNA 数量显著减少(差异 mRNA 降至 146 个，lncRNA 降至 17 个，circRNA 降至 3 763 个，miRNA 降至 5 个)。分析结果显示，STC 模型大鼠的肠道组织呈现出以铁死亡和 HIF-1 信号

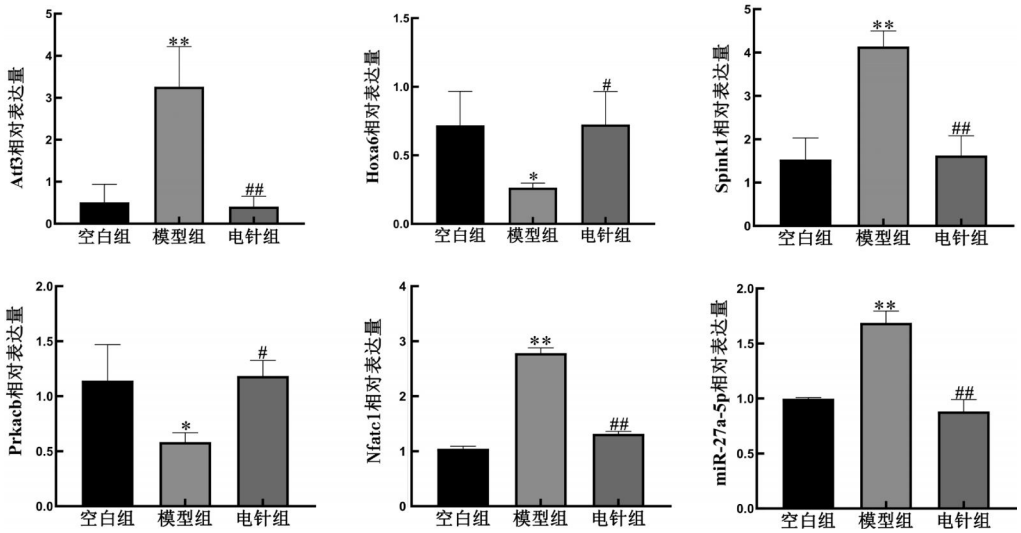

图 8 各组大鼠 6 个差异表达基因相对表达量比较($\bar{x}\pm s$, n=3)

Fig.8 Comparison of relative expression levels of 6 differentially expressed genes in each group of rats ($\bar{x}\pm s$, n=3)

注:与空白组比较,*P<0.05,**P<0.01;与模型组比较,#P<0.05,##P<0.01。

通路异常激活为特征的代谢应激状态,同时伴随类固醇激素合成的抑制。这些发现与既往研究结果一致[18-19],共同表明 STC 肠道动力低下与铁死亡激活、缺氧应激及代谢紊乱密切相关。其中,HIF-1 通路的异常激活可通过调节下游靶基因表达,增强肠道上皮紧密连接,进而影响肠道屏障功能的稳定性[20],而肠道屏障功能损伤被证实是功能性便秘的发病机制之一[21]。此外,受抑制的类固醇激素生物合成可能导致其代谢产物紊乱,进而影响肠道微生物的群落结构[22],而肠道菌群失衡与慢性便秘的发病机制密切相关,二者可形成恶性循环[23-24]。

值得注意的是,电针干预并未直接逆转上述模型中的核心异常通路,而是激活了以免疫与炎症调控为核心的分子程序。具体表现为激活 JAK-STAT 通路,同时抑制 NF-κB 信号通路及补体与凝血级联反应。NF-κB 是一种与免疫及炎症反应密切相关的核转录因子,其激活会促进白细胞介素(interleukin, IL)-1β、IL-6、IL-17 等炎症因子的表达,引发炎症反应,从而加重便秘症状[25]。电针对此通路的抑制效应,与既往研究报道的针灸抗炎作用一致[26]。

PPI 网络分析显示,模型组关键模块(如 TLR4)富集于免疫反应,提示肠道屏障损伤可能通过TLR4介导的先天免疫异常加剧便秘[27-28];而电针干预后,CxcL12 等趋化因子主导的模块显著调控细胞增殖与免疫应答,提示其可能通过趋化因子网络重塑肠黏膜微环境[29]。

RT-qPCR 验证结果表明,电针能够显著下调 STC 大鼠肠道中高表达的 miR-27a-5p。由此推测,其作用机制是一个多层次的协同调控网络:通过调节 NF-κB 信号通路影响肠道炎症,缓解免疫屏障损伤[30];靶向调控 HoxA6 等能影响细胞增殖与凋亡的基因[31];且网络中涉及的其他因子(如通过钙信号影响的Nfatc1[32])则关系到平滑肌收缩的动力环节[33]。

综上,电针可能通过上调 miR-27a-5p,协同调控下游的 Tlr4/Cxcl12 等基因与 JAK-STAT、NF-κB 等通路,形成一个多靶点的网络化调控,从而改善 STC 肠道动力。这为大肠俞募配穴治疗便秘提供了新的分子水平假说。本研究仅为初步探索,受限于样本规模与动物模型的转化差异,后续计划围绕miR-27a-5p 等核心枢纽,利用基因干预手段进一步验证其确切的调控功能,以深化对电针效应机制的研究。

参考文献

[1] BARBERIO B, JUDGE C, SAVARINO E V, et al. Global prevalence of functional constipation according to the Rome criteria: A systematic review and meta-analysis[J]. The Lancet Gastroenterology & Hepatology, 2021, 6(8): 638-648.

[2] PARK H, LIM J, BAEK J Y, et al. Status of constipation and its association with sarcopenia in older adults: A population-based cohort study[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2021, 18(21): 11083.

[3] BASSOTTI G, USAI SATTA P, BERTI G, et al. Pharmacotherapeutic advances for chronic idiopathic constipation in adults[J]. Expert Opinion on Pharmacotherapy, 2022, 23(18): 2053-2078.

[4] 刘安琪, 唐学贵. 针刺治疗慢传输型便秘选穴规律探究[J]. 中国肛肠病杂志, 2024, 44(5): 36-39.

[5] 何元琴, 刘家峰, 刘浩鑫. 针刺治疗慢传输型便秘作用机制的研究进展[J]. 针刺研究, 2023, 48(4): 411-414.

[6] MA J F, GAO R, XIE Q X, et al. Whole transcriptome sequencing analyses of islets reveal ncRNA regulatory networks underlying impaired insulin secretion and increased β-cell mass in high fat diet-induced diabetes mellitus[J]. PLoS One, 2024, 19(4): e0300965.

[7] LIU T, SU X S, KONG X M, et al. Whole transcriptome sequencing identifies key lncRNAs, circRNAs, and mRNAs for exploring the pathogenesis and therapeutic target of mouse pneumoconiosis[J]. Gene, 2024, 901: 148169.

[8] 曹　洋, 钟　峰, 文　钱, 等. 基于胶质细胞源性神经营养因子甲基化修饰探讨电针改善慢传输型便秘大鼠肠动力的作用机制[J]. 针刺研究, 2022, 47(2): 141-147, 153.

[9] 岳　灵, 李　颖, 高　蕊, 等. 基于 BDNF 蛋白表达研究电针俞募穴对便秘大鼠脑肠交互作用的影响机制[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(10): 2438-2441.

[10] 李　桐, 刘筱羽, 王晓宇, 等. 不同强度电针“天枢”对大鼠远端结肠运动的双向调控[J]. 中国针灸, 2025, 45(4): 460-472.

[11] 张双双, 徐天成, 余　芝, 等. 电针“天枢”对链脲佐菌素诱导的 2 型糖尿病大鼠不同肠段氮能神经元的调节效应[J]. 针刺研究, 2022, 47(9): 785-792.

[12] 张露芬. 实验针灸学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 225-230.

[13] 郝嘉欣, 赵英慧, 李玟茜, 等. 基于数据挖掘分析针刺治疗功能性便秘选穴规律[J]. 河南中医, 2025, 45(9): 1317-1322.

[14] 刘奕彤, 秦　琪, 陈　栋, 等. 基于数据挖掘的针刺治疗功能性便秘的选穴规律分析[J]. 实用临床医药杂志, 2025, 29(2): 75-79.

[15] KUANG H J, ZHANG C S, ZHANG W, et al. Electroacupuncture improves intestinal motility through exosomal miR-34c-5p targeting SCF/c-kit signaling pathway in slow transit constipation model rats[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2022, 2022: 8043841.

[16] LI X, LIU S, LIU H, et al. Acupuncture for gastrointestinal diseases[J]. Anatomical Record, 2023, 306(12): 2997-3005.

[17] SCHNEIDER S, WRIGHT C M, HEUCKEROTH R O. Unexpected roles for the second brain: Enteric nervous system as master regulator of bowel function[J]. Annual Review of Physiology, 2019, 81: 235-259.

[18] YAO T, LI L J. The influence of microbiota on ferroptosis in intestinal diseases[J]. Gut Microbes, 2023, 15(2): 2263210.

[19] DIVICCARO S, GIATTI S, CIOFFI L, et al. The gut-microbiota-brain axis: Focus on gut steroids[J]. Journal of Neuroendocrinology, 2025, 37(7): e13471.

[20] ROBRAHN L, JIAO L, CRAMER T. Barrier integrity and chronic inflammation mediated by HIF-1 impact on intestinal tumorigenesis[J]. Cancer Letters, 2020, 490: 186-192.

[21] 王志欣, 张相安, 郭海霞, 等. 基于胆汁酸-肠道菌群轴探讨功能性便秘肝郁脾虚病机的生物学内涵[J/OL]. 中医学报, 1-13 [2025-12-25]. https://link.cnki.net/urlid/41.1411.R.20250506.1537.004.

[22] DE VOS W M, TILG H, VAN HUL M, et al. Gut microbiome and health: Mechanistic insights[J]. Gut, 2022, 71 (5): 1020-1032.

[23] 黄小明, 张　敏. 肠道菌群与慢性便秘关系的研究进展[J]. 安徽医药, 2020, 24(2): 220-224.

[24] 陈启仪, 李　宁, 姜　军. 慢性便秘与脑肠菌群轴的关系[J]. 中华胃肠外科杂志, 2021, 24(12): 1048-1053.

[25] 姚玉乔, 许淑珍, 杨沛月, 等. 枳术汤调控 AQP3、NF-κB 通路对功能性便秘大鼠的改善作用及机制[J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(18): 4507-4511.

[26] 曹文斌, 周　晗, 刘　洋, 等. 三仁汤对慢传输型便秘大鼠治疗作用及对 MAPK/NF-κB 信号通路影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(9): 24-28, 221.

[27] LIU B H, PIAO X H, NIU W, et al. Kuijieyuan decoction improved intestinal barrier injury of ulcerative colitis by affecting TLR4-dependent PI3K/AKT/NF-κB oxidative and inflammatory signaling and gut microbiota[J]. Frontiers in Pharmacology, 2020, 11: 1036.

[28] 廖　勇, 贺海波, 李　洁, 等. 基于 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路和肠黏膜屏障保护因子探讨魔芋润肠复合膳食纤维治疗便秘大鼠作用机制[J]. 中药药理与临床, 2022, 38(6): 75-83.

[29] SMITH J M, JOHANESEN P A, WENDT M K, et al. CXCL12 activation of CXCR4 regulates mucosal host defense through stimulation of epithelial cell migration and promotion of intestinal barrier integrity[J]. American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology, 2005, 288(2): G316-G326.

[30] 高　俊, 朱跃坤. 便秘的免疫调节机制研究进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2025, 46(9): 878-882.

[31] WU S S, WU F X, JIANG Z. Effect of HOXA6 on the proliferation, apoptosis, migration and invasion of colorectal cancer cells[J]. International Journal of Oncology, 2018, 52(6): 2093-2100.

[32] 徐光瑶, 黄　灿. 干涉 NFATc1 表达影响细胞周期运转抑制结肠癌细胞增殖的机制[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(10): 1701-1706.

[33] 于红珍, 付明海, 吉小平, 等. 简述胃肠动力调节机制的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2020, 28(23): 1183-1191.

(本文编辑　匡静之)