

本文引用: 钟叶蓓, 林巧婷, 杨尚林, 裴鑫, 杨小慧, 符晴, 李铁浪. 背俞功能带推法对慢性疲劳综合征大鼠肠道菌群及色氨酸代谢的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(6): 1042-1050.

## 背俞功能带推法对慢性疲劳综合征大鼠肠道菌群及色氨酸代谢的影响

钟叶蓓, 林巧婷, 杨尚林, 裴鑫, 杨小慧, 符晴, 李铁浪\*

湖南中医药大学针灸推拿与康复学院, 湖南长沙 410208

**〔摘要〕** 目的 探究背俞功能带推法改善慢性疲劳综合征(chronic fatigue syndrome, CFS)大鼠的症状, 以及对其肠道菌群和色氨酸代谢的影响。方法 选取 SPF 级 SD 大鼠 24 只, 随机分为空白组 8 只, 造模组 16 只, 造模组制备 CFS 模型 21 d, 模型制备成功后随机分为模型组和推法组, 每组 8 只。推法干预 14 d, 做旷场实验及力竭游泳实验等行为学实验后, 取大鼠血清、结肠进行酶联免疫吸附法检测血清色氨酸(tryptophan, TRP)、犬尿氨酸(kynurenine, KYN)及结肠吲哚胺 2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO), 取肠道粪便进行 16 s rRNA 测序分析肠道菌群结构及多样性。结果 与空白组大鼠相比, 模型组大鼠总路程、跨格数、中心区时间和路程、进入中心区次数力竭游泳时间均显著减少( $P<0.01$ ); 与模型组相比, 推法组大鼠上述各项指标均增加( $P<0.05$ )。在门水平, 与空白组相比, 模型组厚壁菌门、拟杆菌门和疣微菌门比例下降, 变形菌门和酸杆菌门比例明显上升; 与模型组相比, 推法组厚壁菌门和酸杆菌门比例下降, 而拟杆菌门和变形菌门比例升高。在属水平上, 与空白组相比, 模型组中罗姆布茨菌属(*Romboutsia*)和疣微菌科 *UCG-005* 菌属(*Ruminococcaceae\_UCG-005*, 简称 *UCG-005*)的比例明显降低, 而乳杆菌属(*Lactobacillus*)和双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)比例明显增加; 与模型组相比, 推法组 *Lactobacillus* 和杜氏杆菌属(*Dubosiella*)比例下降, 而 *Romboutsia* 和 *UCG-005* 比例上升。Alpha 和 Beta 多样性分析, 与空白组相比, 模型组的菌群丰富度和多样性均降低; 与模型组相比, 推法组大鼠菌群丰富度和多样性有明显上升; 但组间差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。LEfSe 分析中, 与空白组相比, 模型组的优势物种主要聚集在目、科、属, 推法组的优势物种主要聚集在科、属。与空白组大鼠相比, 模型组大鼠血清 TRP 含量显著降低( $P<0.01$ ), 血清 KYN 和结肠 IDO 含量明显升高( $P<0.01$ ); 与模型组相比, 推法组大鼠血清 TRP 含量明显升高( $P<0.01$ ), 血清 KYN 和结肠 IDO 含量降低( $P<0.05$ )。相关性分析发现, 与 TRP 相关性较大的菌属包括 *Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*、*Lactobacillus*、*Romboutsia* 等( $P<0.05$ ), 与 KYN 相关性较大的菌属包括 *Bifidobacterium05*、*Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*、*UCG-005* ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 与 IDO 相关性较大的菌属包括 *Allobaculum*、*Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*、*Romboutsia* ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。结论 背俞功能带推法能明显改善 CFS 大鼠的疲劳以及焦虑症状, 调节菌群代谢物 TRP、KYN 及结肠 IDO 含量, 对肠道菌群结构及其多样性有一定的调节作用, 且部分菌属与 TRP、KYN、IDO 具有相关性。

**〔关键词〕** 慢性疲劳综合征; 推法; 背俞功能带; 肠道菌群; 色氨酸; 犬尿氨酸; 相关性分析

**〔中图分类号〕** R245

**〔文献标志码〕** A

**〔文章编号〕** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.06.015

## Effects of Back-Shu functional area pushing manipulation on gut microbiota and tryptophan metabolism in rats with chronic fatigue syndrome

ZHONG Yebei, LIN Qiaoting, YANG Shanglin, PEI Xin, YANG Xiaohui, FU Qing, LI Tielang\*

**〔收稿日期〕** 2023-12-21

**〔基金项目〕** 湖南省自然科学基金面上项目(2023JJ30454); 湖南省教育厅科学研究重点项目(22A0273); 国家级大学生创新创业训练计划项目(202210541035); 湖南中医药大学研究生创新项目(2023CX77)。

**〔通信作者〕** \* 李铁浪, 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, E-mail: litielang810@163.com。

*School of Acupuncture-moxibustion, Tuina and Rehabilitation, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China*

**[Abstract] Objective** To explore the relief of symptoms in rats with chronic fatigue syndrome (CFS) through the Back-Shu functional area pushing manipulation, and its effects on their gut microbiota and tryptophan metabolism. **Methods** Twenty-four SPF-grade SD rats were selected and randomized into blank group ( $n=8$ ) and modeling group ( $n=16$ ). The modeling group was used to prepare the CFS model for 21 d, which, after the successful modeling, was randomly subdivided into model group and pushing manipulation (PM) group, with eight rats in each group. The intervention of pushing manipulation lasted for 14 d. After conducting the open-field test and exhaustive swimming experiment, the rat serum and colon were collected. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to examine serum tryptophan (TRP) and kynurenine (KYN), and colonic indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO). Fecal samples from the intestines were collected and subjected to 16s rRNA sequencing for the analysis of gut microbiota structure and diversity. **Results** Compared with the blank group, the model group showed significant reductions in the total distance travelled, the number of grid crossing, the time and distance travelled in the central area, the number of entries into the central area, and the swimming time to exhaustion ( $P<0.01$ ); the PM group showed increases in all the aforementioned parameters compared with the model group ( $P<0.05$ ). At the phylum level, compared with the blank group, the model group showed a decrease in the proportions of Firmicutes, Bacteroidetes and Verrucomicrobia, while a significant increase in those of Proteobacteria and Acidobacteria; compared with the model group, the PM group showed a decrease in the proportions of Firmicutes and Acidobacteria, while an increase in those of Bacteroidetes and Proteobacteria. At the genus level, compared with the blank group, the model group showed a significant decrease in the proportions of *Romboutsia* and *Ruminococcaceae UCG-005 (UCG-005)*, while a significant increase in those of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*; compared with the model group, the PM group showed a decrease in the proportions of *Lactobacillus* and *Dubosiella*, while an increase in those of *Romboutsia* and *UCG-005*. Alpha and Beta diversity analysis showed that, compared with the blank group, the model group's microbial richness and diversity were decreased; compared with the model group, the PM group showed a significant increase in microbial richness and diversity; however, the differences between the groups were not statistically significant ( $P>0.05$ ). LEfSe analysis showed that compared with the blank group, the dominant species in the model group were mainly clustered in the order, family, and genus levels, while the dominant species in the PM group were mainly clustered in the family and genus levels. Compared with the blank group, the model group had a significant decrease in serum TRP content ( $P<0.01$ ) and a significant increase in serum KYN and colonic IDO content ( $P<0.01$ ); compared with the model group, the PM group had a significant increase in serum TRP content ( $P<0.01$ ) and a decrease in serum KYN and colonic IDO content ( $P<0.05$ ). Correlation analysis revealed that the bacterial genera with greater correlation with TRP included *Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*, *Lactobacillus*, and *Romboutsia* ( $P<0.05$ ), those with greater correlation with KYN included *Bifidobacterium05*, *Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*, and *UCG-005* ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), and those with greater correlation with IDO included *Allobaculum*, *Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*, and *Romboutsia* ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). **Conclusion** The Back-Shu functional area pushing manipulation can significantly relieve fatigue and anxiety symptoms in CFS rats, regulate the content of microbial metabolites TRP, KYN, and colonic IDO, and has a certain regulating effect on the structure and diversity of the gut microbiota. Moreover, some bacterial genera have a correlation with TRP, KYN, and IDO content.

**[Keywords]** chronic fatigue syndrome; pushing manipulation; Back-Shu functional area; gut microbiota; tryptophan; kynurenine; correlation analysis

慢性疲劳综合征(chronic fatigue syndrome, CFS)是一种影响中枢神经和免疫系统功能的慢性综合征,主要症状为持续6个月以上的慢性疲劳,患者患病后往往伴有多种症状,如肢体酸痛、失眠、抑郁、便

秘及腹泻等,严重者甚至长期卧床不起<sup>[1]</sup>。随着生活节奏日益加快、压力日益严重,CFS发病率逐年升高,有研究指出,中国总患病率为12.54%且呈上升趋势<sup>[2-3]</sup>。近期有学者发现,CFS患者存在肠道菌群

失调、菌群多样性降低、色氨酸(tryptophan, TRP)代谢异常和犬尿氨酸(kynurenine, KYN)途径活性降低<sup>[4]</sup>。肠道菌群可通过直接或间接调节代谢物的方式,在肠道疾病、自身免疫性疾病与神经系统疾病等许多疾病中发挥重要作用。在人体背部第1胸椎棘突到第4骶椎棘突下缘,背部正中线旁开3寸的带状区域被称为背俞功能带<sup>[5]</sup>。课题组前期研究表明,干预背俞功能带可有效缓解CFS患者的疲劳症状<sup>[6]</sup>。推法作为传统推拿手法之一,近年来在治疗CFS上疗效显著<sup>[7-8]</sup>,且背俞功能带推法可使背部阳气得到激发,五脏六腑功能得以调节。本研究将从肠道菌群及其代谢物角度入手,探讨背俞功能带推法对缓解CFS症状的作用机制。

## 1 材料与仪器

### 1.1 动物

选取24只健康成年SD大鼠(SPF级),雌雄各半。由湖南中医药大学动物实验中心提供,体质量180~200 g,分笼饲养于湖南中医药大学动物中心实验室,饲养温度24~26℃,湿度50%~70%。本研究符合湖南中医药大学伦理委员会要求(伦理编号:LLBH-202209170001)。

### 1.2 主要试剂及仪器

TRP、KYN、吲哚胺2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)酶联免疫吸附测定试剂盒(厦门仑昌硕生物科技有限公司,货号分别为YD34609、YD36947、YD34620)。

酶标分析仪、通用冷冻离心机(型号:RT-6100、ST8R,深圳雷杜生命科学股份有限公司);大鼠旷场视频分析系统(型号:Labmaze 3.0,北京众实科技有限公司);小动物吸入麻醉机(型号:VMR,美国Matrix公司);推法刺激仪(专利号:ZL202121852010.X,

湖南中医药大学针灸推拿与康复学院自制)。

## 2 方法

### 2.1 分组及造模方法

24只大鼠随机分为空白组8只、造模组16只,空白组不予造模、正常饲养,对造模组采用多因素复合应激刺激法建立CFS模型<sup>[9-11]</sup>。模型制备成功后随机分为模型组和推法组,保证造模成功后两组均有8只大鼠入组。造模周期为21 d,具体方法如下。

2.1.1 强迫负重游泳 模型组大鼠采取力竭性训练,尾部增加自身体质量3%的焊锡丝,于水温(25±2)℃、水深超过40 cm的水桶内(确保大鼠完全进入水中而不触碰水桶底部)强迫游泳至力竭。每日1次,持续21 d。力竭标准:大鼠四肢失调,无法继续游泳,身体完全沉入水下超过10 s,无法浮起。

2.1.2 慢性应激刺激 造模期间,每日随机采用两种应激刺激,刺激强度控制在可承受范围内。应激刺激方式包括12 h禁食、12 h禁水、通宵照明、夹尾1 min、噪声干扰(分贝量110 dB持续1 h)、足底电击(强度控制在1 mA,30 V,每次持续30 s,刺激后间隔1 min进行下次刺激,共计进行5次)。每日1次,持续21 d。

2.1.3 造模成功标准 根据文献<sup>[11-12]</sup>中实验大鼠一般情况半定量评分观察表(表1),对大鼠精神状态、粪便性状、皮毛色泽及耳尾颜色进行评价,总评分≥4分则表明造模成功。

### 2.2 干预措施

造模成功后,空白组及模型组予以正常饲养。推法组使用团队自制的推法刺激仪在大鼠背部背俞功能带(背部第1胸椎棘突到第4骶椎棘突下缘,背部正中线旁开3寸的带状区域<sup>[5]</sup>)操作推法。在团队前期研究成果基础上,将推法参数设定为操作时间

表1 实验大鼠一般情况半定量评分

项目	0分	1分	2分	3分
精神状态	神态安静,活泼好动,眼睛有神	易激怒好争斗、自主活动减少	懒动倦怠,眼神暗淡无光,反应能力降低	精神萎靡,缩肩拱背,攻击性、对抗性行为减少
粪便形状	粪便干,成形	粪便黏软有形	粪便不成形,但不稀薄	粪便溏状,黏腻恶臭
皮毛色泽	皮肤与脂肪连接紧密,皮毛光洁整齐	皮肤略松弛,毛发枯黄无光泽	皮肤松弛易抓取,毛发干枯或结穗打卷,无光泽	皮肤松弛,皮肤无脂肪,抓之触骨,全身毛发干枯,稀疏脱落
耳尾颜色	红润光泽	淡红少泽	淡白少泽	苍白或透青色

20 min、频率 15 次/min、力度 500 g。大鼠麻醉后,固定在操作台上,用气麻机维持麻醉,从大鼠颈部往尾部单方向操作,推动距离以大鼠实际的背部长度为准。每日 1 次,连续 14 d。

### 2.3 行为学检测

2.3.1 旷场实验 将大鼠放置于旷场箱(100 cm×100 cm×40 cm)的中央,让其自由探索 6 min,大鼠在箱子内的活动情况由自动视频信息采集系统记录,大鼠运动总距离代表大鼠活动度及运动能力,大鼠进入中央格次数越少、时间越短、距离越短,提示焦虑程度越高<sup>[13]</sup>。在每只大鼠结束运动后的间隙,用 75%乙醇擦拭箱底和侧壁,清除遗留的气味信息。

2.3.2 力竭游泳 将大鼠放置于水温(25±2)℃、水深超过 40 cm 的水桶内(确保大鼠完全进入水中而不触碰水桶底部),以鼻尖沉入水中 10 s 不能浮出水面为标准,记录力竭游泳时间<sup>[14]</sup>。

### 2.4 标本采集与处理

2.4.1 血清 TRP、KYN、肠 IDO 含量检测 行为学检测结束后,各组大鼠用 10%水合氯醛腹腔注射麻醉,剖开腹腔进行腹主动脉采血,室温静置 30 min 后,4℃ 1 000×g 离心 15 min,分离血清,4℃ 保存,剪下大鼠结肠立即放置液氮中后转入-80℃ 冰箱保存。酶联免疫吸附法检测各组大鼠血清中 TRP、KYN 及肠 IDO 含量,严格按照酶联免疫吸附法测定试剂盒说明书进行。

2.4.2 肠道菌群高通量测序 采血后,剪开大鼠结肠,取结肠内粪便 1~2 颗,装入无菌冻存管内,立刻放入液氮并转移至-80℃ 冰箱保存。将该大鼠粪便采用 16 s rRNA 扩增子测序进行肠道菌群检测。样品 16 s rRNA 检测由武汉金开瑞生物工程有限公司完成,对细菌 16 s V3-V4 区进行 PCR 扩

增,扩增引物为 341F(5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3)、806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'),PCR 反应条件:95℃ 预变性 3 min;95℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 15 s,72℃ 延伸 5 min。共扩增 25 个循环,扩增完成后进行电泳检验,最后检测合格的文库使用 Illumina MiSeq 平台进行高通量测序。

2.4.3 肠道菌群数据分析 将原始数据进行筛选后得到有效数据,然后通过 Overlap 将 Reads 拼接成 Tags,并在特定的相似度下将 Tags 聚类成操作分类单元(operational taxonomic units, OTU)或扩增序列变体(amplicon sequence variants, ASV)。基于聚类结果进行多种多样性分析及测序深度检验。通过与数据库比对,进行分类注释。使用 Rstats 包 Kruskal 方法比较样本间或组间门、纲、目、科、属各分类水平的差异。

### 2.5 统计学方法

所有研究结果均采用 SPSS 26.0 软件进行统计。计量资料用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,采用单因素方差分析,方差不齐时,组间两两比较采用邓尼特 T3 检验,方差齐时,组间两两比较则采用 LSD 检验;菌群相对丰度采用 Kruskal Wallis 秩和检验和 Wilcoxon 秩和检验;相关性分析采用 Pearson 法。均以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 背俞功能带推拿对旷场实验及力竭游泳时间的影响

与空白组相比,模型组大鼠总路程、跨格数、中心区时间和路程、进入中心区次数、力竭游泳时间均显著减少( $P<0.01$ );与模型组相比,推拿组大鼠上述各项指标均明显增加( $P<0.05$ )。详见表 2。

表 2 3 组大鼠旷场实验结果及力竭游泳时间比较( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	总路程/cm	中心区路程/cm	中心区时间/s	进入中心区次数/次	跨格数/个	力竭游泳时间/min
空白组	2 431.51±926.91	438.54±202.52	69.52±15.73	24.88±11.70	83.50±20.21	24.88±10.49
模型组	845.55±484.26**	69.68±26.94**	9.55±3.47**	7.50±3.34**	26.86±17.28**	7.00±2.45**
推拿组	1 672.67±475.73 <sup>△</sup>	188.85±95.84* <sup>△</sup>	18.30±7.72** <sup>△</sup>	16.13±6.10* <sup>△</sup>	49.38±23.31** <sup>△</sup>	12.13±3.64* <sup>△</sup>

注:与空白组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ 。

### 3.2 背俞功能带推法对肠道菌群结构的影响

3.2.1 3组大鼠肠道菌群物种组成 在门水平,各组大鼠厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidota)、酸杆菌门(Actinobacteriota)和变形菌门(Proteobacteria)占比最多。与空白组相比,模型组厚壁菌门、拟杆菌门和疣微菌门(Verrucomicrobiota)比例下降,变形菌门和酸杆菌门比例明显上升;与模型组相比,推法组厚壁菌门和酸杆菌门比例下降,而拟杆菌门和变形菌门比例升高。在属水平上,各组大鼠占较大比重的菌属大致相同。与空白组相比,模型组中罗姆布茨菌属(*Romboutsia*)和疣微菌科 *UCG-005* 菌属(*Ruminococcaceae\_UCG-005*,简称 *UCG-005*)的比例明显降低,而乳杆菌属(*Lactobacillus*)和双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)比例明显增加;与模型组相比,推法组 *Lactobacillus* 和 *Dubosiella* 比例下降,而 *Romboutsia* 和 *UCG-005* 比例上升。详见图 1。

3.2.2 3组大鼠肠道菌群 Alpha 多样性 Chao1 和 Ace 是评估群落丰富度的指数,指数越大对应的群

落丰富度越高;Shannon 和 Simpson 均为评估群落多样性的指数,Shannon 指数越高表明多样性越高,Simpson 指数越低表明群落多样性越高<sup>[5]</sup>。与空白组相比,模型组的菌群丰富度和多样性均降低;与模型组相比,推法组大鼠菌群丰富度和多样性有明显上升。但组间差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。详见图 2。

3.2.3 3组大鼠肠道菌群 Beta 多样性 模型组样本可与空白组和推法组明显分开,聚集在右侧,且模型组样本之间距离较近,表明相似度较高,组间样本差异较小。而空白组和推法组样本主要集中在左侧,并不能明显分开,表明两者肠道菌群结构差异较小,而模型组与空白组和推法组菌群结构差异较大。详见图 3。

3.2.4 3组大鼠肠道菌群 LEfSe 分析 LEfSe 分析以线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA)阈值大于 3 代表肠道菌群具有显著差异,结果显示,和空白组相比,模型组的优势物种主要聚集在目、科、属,推法组的优势物种主要聚集在科、属。详见图 4。

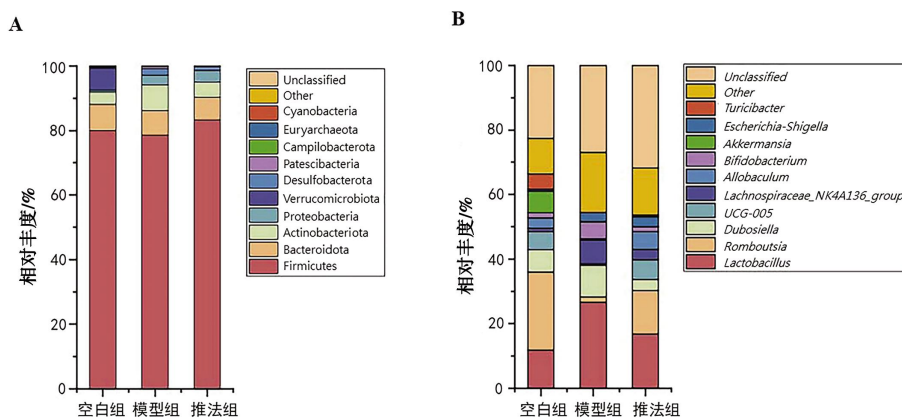


图 1 3组大鼠肠道菌群物种组成

注: A.在门水平的物种相对丰度; B.在属水平的物种相对丰度。

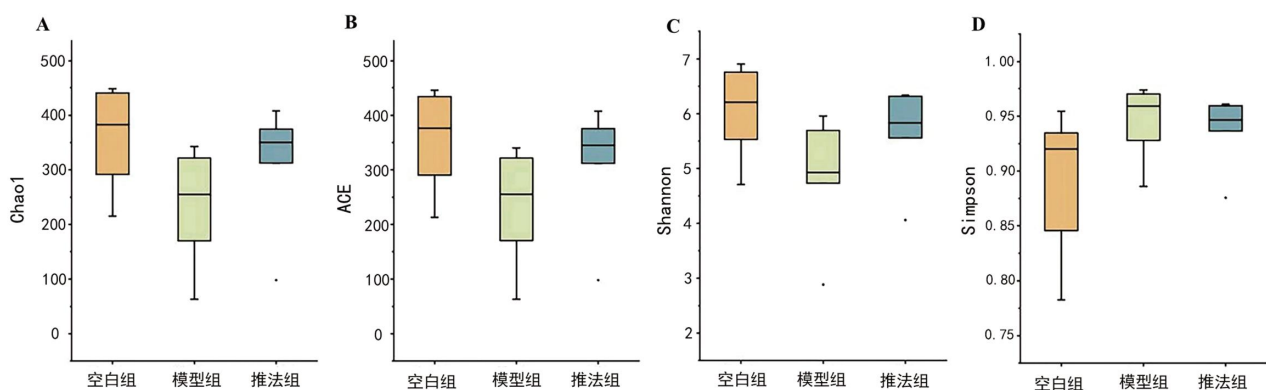


图 2 3组大鼠  $\alpha$  多样性指数比较

注: A.Chao1 指数柱状图; B.ACE 指数柱状图; C.Shannon 指数柱状图; D.Simpson 指数柱状图。

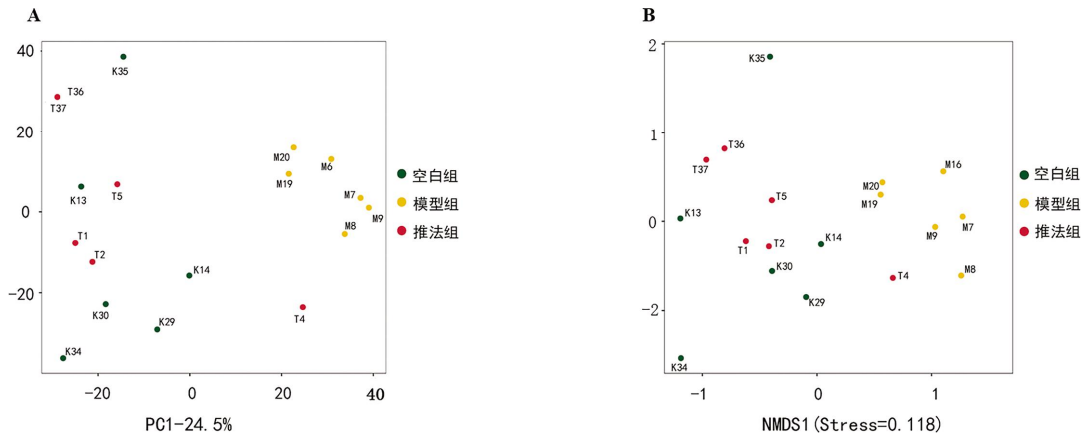


图 3 3 组大鼠肠道菌群 PcoA 和 NMDS 分析  
注:A.PcoA 主坐标分析图;B.NMDS 非度量多维排列图。

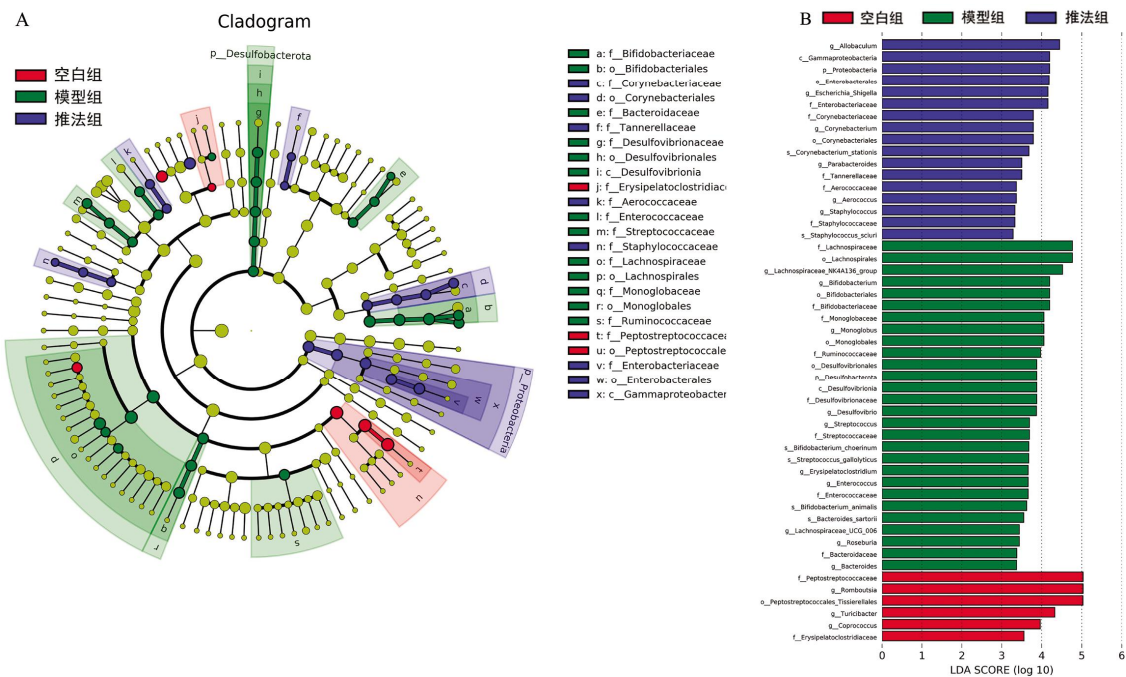


图 4 基于 LEfSe 分析发现的 3 组大鼠差异菌群  
注:A.多级物种层级结构图;B.LDA 判别柱形图。

### 3.3 背俞功能带推法对血清 TRP、KYN 和结肠 IDO 的影响

与空白组大鼠相比,模型组大鼠血清 TRP 含量显著降低( $P<0.01$ ),血清 KYN 和结肠 IDO 含量明显升高( $P<0.01$ );与模型组相比,推法组大鼠血清 TRP 含量明显升高( $P<0.01$ ),血清 KYN 和结肠 IDO 含量降低( $P<0.05$ )。详见表 3。

表 3 3 组大鼠血清 TRP、KYN 及结肠 IDO 含量比较( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	TRP( $\mu\text{mol/L}$ )	KYN( $\text{nmol/L}$ )	IDO( $\text{pg/mL}$ )
空白组	91.69 $\pm$ 8.11	910.08 $\pm$ 103.34	1 035.89 $\pm$ 178.25
模型组	60.01 $\pm$ 11.00**	1 493.49 $\pm$ 217.44**	1 725.97 $\pm$ 177.08**
推法组	78.60 $\pm$ 11.60* $\Delta\Delta$	1 140.24 $\pm$ 237.33* $\Delta$	1 279.88 $\pm$ 212.82* $\Delta$

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

### 3.4 肠道菌群与行为学指标、血清 TRP、KYN 及结肠 IDO 的相关性分析

在属水平上,筛选出占比较大的 10 个代表性菌属:阿克曼菌属(*Akkermansia*)、异杆菌属(*Allobaculum*)、*Bifidobacterium*、*Dubosiella*、埃氏菌属-志贺氏菌属(*Escherichia-Shigella*)、毛螺菌属 NK4A136 组(*Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*)、*Lactobacillus*、*Romboutsia*、苏黎世杆菌属(*Turicibacter*)、*UCG-005*。进行相关性分析发现,与血清 TRP 相关性较大的菌属有 *Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*、*Lactobacillus*、*Romboutsia* 等( $P<0.05$ );与血清 KYN 相关性较大的菌属包括 *Bifidobacterium*、*Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*、

UCG-005( $P<0.05$  或  $P<0.01$ );与结肠 IDO 相关性较大的菌属包括 *Allobaculum*、*Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*、*Romboutsia*( $P<0.05$  或  $P<0.01$ );与行为学指标相关性较大的菌属主要有 *Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*、*Romboutsia*、*Turicibacter* 等( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。详见图 5。

### 4 讨论

CFS 在中医学中没有对应病名,根据临床表现,可归为“虚劳”范畴。虚劳是由于素体正气不足和外在致病因素所致,如中医所说的“五劳七伤”,即过度的劳累和损伤,会反复作用在人体之上,逐渐消耗和削弱人体的正气。当这种劳累和损伤超出了人体的承受限度时,就会导致疾病的发生<sup>[16]</sup>。气血耗伤则中焦运化失职,五脏六腑功能失司,痰湿、瘀血等病理产物阻滞肢节、脑窍等部位。肢节气血受阻则出现身体酸重、肢软疲乏等躯体疲劳症状,脑部气血阻滞则出现精神倦怠、失眠、健忘、迟钝等脑部疲劳症状<sup>[17]</sup>。致病因素虽复杂,但总体治则应立足于调阴阳、补气血,使人体恢复到阴平阳秘、气血充盈、情志舒畅、精神内守的状态。

《素问·生气通天论篇》言:“阳气者,精则养神,柔则养筋。”太阳经为巨阳,太阳经脉不畅,思维神

志活动异常,出现注意力难以集中、记忆力下降、睡眠障碍等脑力疲劳症状<sup>[17]</sup>。背俞功能带是督脉、膀胱经通行区域,背俞穴及夹脊穴也位于此区域,该区域布达的阳气,推动人体进行正常的生理活动。《灵枢·卫气》中指出,胸腹之气输注于背俞穴<sup>[18]</sup>。督脉和膀胱经上的背俞穴通过腹背阴阳与脏腑相连,加强了督脉与胸腹部的联系,胸腹部脏腑则能进一步借道背俞穴与督脉进行沟通。夹脊穴为督脉和背俞穴经气重叠处,是协助督脉阳气输注于膀胱经并将脏腑经络信息传递向督脉的重要枢纽<sup>[19]</sup>。阳明经为多气多血之经,若全身气血运行不畅则脾胃运化失责,故百病所生与阳明胃肠关系密切。背俞功能带推法是用手掌着力于背俞功能带区域,向一定方向推动,可振奋阳气、通调元神、豁达情志,同时行气止痛、温经活络,刺激内脏疾病的体表反应区。研究发现,在 CFS 患者背部区域进行推法操作既能疏通经络、调整脏腑功能,也能行气散瘀、通调全身阳气,从而促进疾病的恢复<sup>[20]</sup>。

本研究采用多因素复合应激刺激法建立 CFS 模型,包括强迫负重游泳和慢性应激刺激。CFS 是身心皆疲劳的综合性疾病,通过强迫负重游泳造成身体的疲劳状态,同时伴随着焦虑情绪,这也是疲劳发展的最终阶段<sup>[21]</sup>。慢性应激刺激包括多种方法,通过

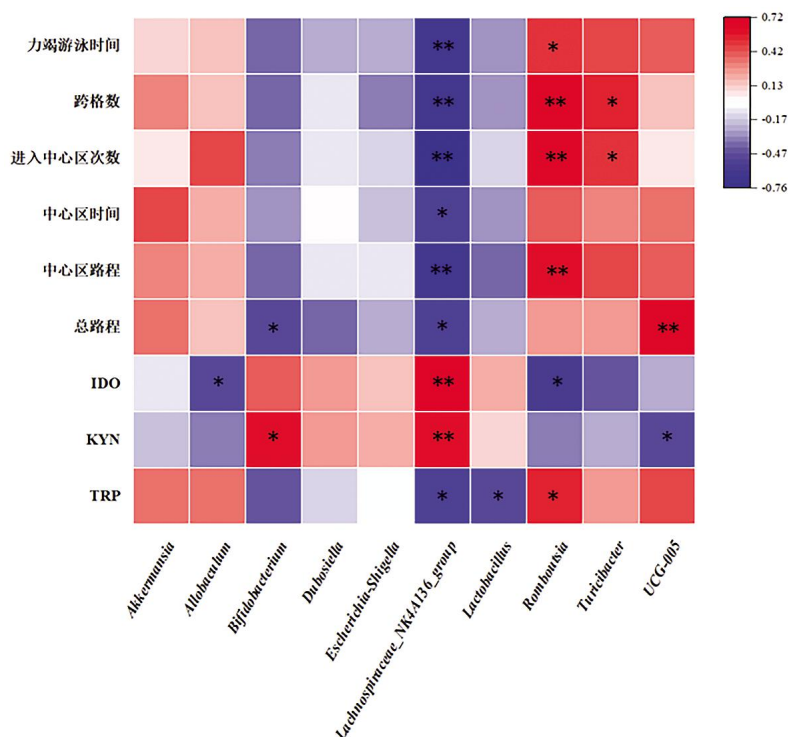


图 5 肠道菌群与行为学指标、血清 TRP、KYN 及结肠 IDO 的相关性分析

注: \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。

给大鼠不可预知的刺激,建立心理上恐惧、焦虑及抑郁的状态。通过多重因素复合应激,可与人体疾病状态相接近,制备出较合适的模型。旷场实验和力竭游泳实验是常用的评估疲劳和抑郁焦虑状态的指标<sup>[22]</sup>。在本研究中,与空白组相比,模型组各项行为学指标降低,明显出现了疲劳状态,经过背俞功能带推法治疗后,推法组与模型组相比行为学各项指标显著好转,疲劳和焦虑状态显著恢复。

CFS发病原因十分复杂,然而具体机制尚未明确。近期研究显示,肠道菌群的变化与CFS的发生密切相关<sup>[4]</sup>。肠道菌群通过神经、免疫以及代谢物等途径将大脑情感认知和肠道功能紧密联系在一起,对肠道神经系统和中枢神经系统进行双向调节<sup>[23]</sup>。TRP是一种必需氨基酸,TRP代谢是一种重要的信号通路,在胃肠道上皮和肠道菌群之间的相互作用,有助于调节激素和免疫反应,向下可改变微生物多样性,向上则对行为、运动等产生影响<sup>[23]</sup>。超过90%的TRP在IDO和色氨酸-2,3-双加氧酶的作用下代谢产生KYN,且有证据表明,KYN代谢途径会影响神经系统疾病的情绪认知障碍<sup>[24]</sup>。有研究发现,在炎症状态下IDO的活性被激活,会加快TRP代谢为KYN,从而降低TRP含量,增加KYN含量<sup>[25-26]</sup>。本研究发现,模型组的结肠IDO含量明显高于空白组,而血清TRP含量显著低于空白组,说明大量的TRP被代谢生成KYN,背俞功能带推法治疗后TRP含量显著提高。KYN继续代谢可产生神经毒性的代谢物喹啉酸(quinolinic acid, QUIN)和具有神经保护性的代谢物犬尿酸(kynurenine acid, KYNA),而在CFS体内似乎存在着较高水平的QUIN和较低水平的KYNA,导致存在过多的神经毒性代谢物,从而出现神经退行性变化<sup>[27]</sup>。本研究结果显示,与空白组相比,模型组的血清KYN明显升高,经过推法治疗后,推法组大鼠血清KYN含量显著低于模型组,表明背俞功能带推法能有效降低的CFS大鼠血清中的KYN含量。

肠道菌群可能通过KYN代谢途径,影响宿主TRP降解和循环TRP浓度。在无菌动物中,由于肠道菌群缺乏,KYN代谢途径中的KYN/TRP比率降低,在无菌动物中定植正常菌群则发现KYN/TRP比率增加和血浆TRP降低<sup>[28]</sup>。肠道菌群主要涉及厚壁

菌门、拟杆菌门、变形菌门、放线菌门、疣微菌门和梭杆菌门等<sup>[29]</sup>,在CFS患者中发现厚壁菌门水平下降,粪杆菌属的水平显著降低,双歧杆菌科含量较低<sup>[4]</sup>,细菌多样性和丰富度降低。本研究结果显示,模型组厚壁菌门、拟杆菌门和疣微菌门明显下降,推法组拟杆菌门和变形菌门升高;Alpha多样性提示,在肠道菌群多样性和丰富度方面,模型组明显降低,推法组则明显升高;Beta多样性的结果表明,空白组和推法组之间的肠道菌群结构差异较小,模型组与空白组和推法组菌群结构差异较大。结合相关分析发现:*Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*和*Lactobacillus*与血清TRP呈负相关,*Romboutsia*与血清TRP呈正相关;*Bifidobacterium*和*Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*与血清KYN呈正相关,与*UCG-005*呈负相关;*Allobaculum*和*Romboutsia*与结肠IDO呈负相关,*Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*与结肠IDO呈正相关。这表明肠道菌群与TRP代谢物和行为学指标存在相关性,随着菌属水平上*Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*的增加,观察到血清TRP含量下降,而血清中KYN和结肠IDO的含量上升。此外,行为学各项指标也出现了下降。综上所述,背俞功能带推法对CFS大鼠有一定的改善疲劳、缓解焦虑的作用,可能是通过调节肠道菌群结构,恢复菌群多样性和丰富度,调节菌群代谢产物从而改善疲劳焦虑症状。

## 参考文献

- [1] NACUL L, O'BOYLE S, PALLA L, et al. How myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS) progresses: The natural history of ME/CFS[J]. *Frontiers in Neurology*, 2020, 11: 826.
- [2] 伍 侨, 高 静, 柏丁兮, 等. 中国人群慢性疲劳综合征患病率的Meta分析[J]. *右江医学*, 2020, 48(10): 727-735.
- [3] GBD MULTIPLE SCLEROSIS COLLABORATORS. Global, regional, and national burden of multiple sclerosis 1990-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016[J]. *The Lancet Neurology*, 2019, 18(3): 269-285.
- [4] KÖNIG R S, ALBRICH W C, KAHLERT C R, et al. The gut microbiome in myalgic encephalomyelitis (ME)/chronic fatigue syndrome (CFS)[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 628741.
- [5] 崔承斌, 王京京, 吴中朝. 从背俞穴与夹脊穴的关系论背俞功能带[J]. *中国针灸*, 2005, 25(7): 483-486.
- [6] 李 甜, 朱晓晴, 张晨晨, 等. 扶阳罐干预背俞功能带对慢性疲



- 劳综合征患者临床疗效及皮质醇影响[J]. 中医药导报, 2023, 29(5): 94-98.
- [7] 尚 坤, 付玉娜, 刘隰君, 等. 基于慢性疲劳综合征的背部推拿法对免疫功能调节的研究[J]. 长春中医药大学学报, 2019, 35(5): 909-911.
- [8] 胡 琼, 周娟芳, 王 超, 等. 推拿背腰部膀胱经穴对慢性疲劳综合征 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  含量的影响[J]. 湖北中医药大学学报, 2016, 18(4): 18-21.
- [9] 杨添淞, 许 骏, 于国强, 等. 电针对 CFS 模型大鼠海马与下丘脑中 Smad4 蛋白表达的影响[J]. 中医学报, 2016, 44(2): 49-51.
- [10] CHI A P, SHEN Z M, ZHU W F, et al. Characterization of a protein-bound polysaccharide from *Herba Epimedii* and its metabolic mechanism in chronic fatigue syndrome[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2017, 203: 241-251.
- [11] 冯楚文, 屈媛媛, 孙忠人, 等. 电针抑制 NF- $\kappa$ B 活性改善慢性疲劳综合征大鼠认知功能障碍的实验研究[J]. 针刺研究, 2021, 46(9): 775-781.
- [12] 高怀林, 吴以岭, 朱慧明, 等. 慢性疲劳综合征动物模型的建立及对血管内皮功能的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2009, 15(12): 904-906, 919.
- [13] 李 威, 周 鑫, 谢志艳, 等. 自主跑轮运动通过促进海马神经发生改善甲醛所致小鼠的负性情绪[J]. 解剖学报, 2021, 52(5): 686-691.
- [14] 李宗源, 郝莉雨, 孙建辉, 等. 三种气虚证动物模型的评价[J]. 中医杂志, 2022, 63(18): 1773-1778.
- [15] 余 涛, 丁 明, 喻强强, 等. 益气温阳护卫汤对哮喘大鼠肺组织炎症及肠道菌群的影响[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(4): 1924-1928.
- [16] 赵 敏, 陈召起, 罗天帮, 等. 国医大师张磊治疗慢性疲劳综合征经验[J]. 中医学报, 2023, 38(5): 1021-1026.
- [17] 伍宏萱, 崔 瑾. 基于《伤寒论》六经辨证和针药结合思想辨治慢性疲劳综合征[J]. 贵州中医药大学学报, 2024, 46(1): 5-9.
- [18] 张千旭, 孙贵香, 孙豪娴, 等. 基于红外热成像技术探讨阴虚体质大学生膻穴温度特点及马王堆导引术的干预作用[J]. 中医药导报, 2023, 29(5): 107-111.
- [19] 张雪萍, 张佳乐, 计辰洋, 等. “泛督脉”视域下的脏腑疾病诊治思路及临床应用探讨[J]. 北京中医药大学学报, 2023, 46(1): 100-105.
- [20] 齐凤军, 王宗佼, 代 瑜, 等. 推拿背腰部膀胱经穴对慢性疲劳综合征患者血清 IL-6、CHRM1 含量的影响及临床疗效观察[J]. 湖北中医药大学学报, 2020, 22(3): 63-66.
- [21] 王 赛. 运动疲劳对大鼠纹状体神经元葡萄糖转运的影响及其机制研究[D]. 兰州: 西北师范大学, 2014.
- [22] 冯楚文, 屈媛媛, 孙忠人, 等. 针灸防治慢性疲劳综合征实验研究进展[J]. 神经损伤与功能重建, 2021, 16(12): 730-735, 739.
- [23] CRYAN J F, O'RIORDAN K J, COWAN C S M, et al. The microbiota-gut-brain axis[J]. *Physiological Reviews*, 2019, 99(4): 1877-2013.
- [24] OSTAPIUK A, URBANSKA E M. Kynurenic acid in neurodegenerative disorders -unique neuroprotection or double-edged sword?[J]. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2022, 28(1): 19-35.
- [25] DEHHAGHI M, PANAHI H K S, KAVYANI B, et al. The role of kynurenine pathway and NAD<sup>+</sup> metabolism in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome[J]. *Aging and Disease*, 2022, 13(3): 698-711.
- [26] KAVYANI B, LIDBURY B A, SCHLOEFFEL R, et al. Could the kynurenine pathway be the key missing piece of Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome (ME/CFS) complex puzzle?[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2022, 79(8): 412.
- [27] GROVEN N, REITAN S K, FORS E A, et al. Kynurenine metabolites and ratios differ between Chronic Fatigue Syndrome, Fibromyalgia, and healthy controls[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2021, 131: 105287.
- [28] GAO J, XU K, LIU H N, et al. Impact of the gut microbiota on intestinal immunity mediated by tryptophan metabolism[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018, 8: 13.

(本文编辑 匡静之)