

“调神健脾”针法对便秘型肠易激综合征大鼠肠道通透性及肠道菌群的影响*

张楚穹¹, 耿婷婷¹, 封宇¹, 孙建华², 刘永涛^{1,△}

(1. 南京中医药大学附属淮安中医院针灸科, 江苏 淮安 213000; 2. 南京中医药大学附属医院针灸康复科, 江苏 南京 210029)

摘要: 目的: 观察“调神健脾”针法对便秘型肠易激综合征 (IBS-C) 模型大鼠肠道通透性及肠道菌群的影响。方法: 针刺 IBS-C 大鼠“百会”“印堂”“天枢”“足三里”, 分析粪便颗粒数、含水量及肠道推进率, 采用 Western blot 检测肠粘膜内 Zonulin 蛋白表达, 采用 16S rRNA 测序观察肠道菌群的变化。结果: 经治疗, 与模型组相比, 电针组大鼠粪便含水率显著升高 ($P<0.05$), 肠道推进率显著升高 ($P<0.01$), Zonulin 的蛋白表达明显下调 ($P<0.05$), 肠道中厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、真杆菌 (Eubacterium) 等显著富集 ($P<0.05$)。结论: “调神健脾”针法通过下调 IBS-C 模型大鼠肠上皮粘膜的 Zonulin 蛋白抑制其肠道通透性, 同时调节可能影响肠道通透性的肠道菌群的结构与丰度, 达到改善 IBS-C 大鼠便秘症状的目的。

关键词: 肠易激综合征; 便秘; 肠道通透性; 肠道菌群

中图分类号: R 245 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3649 (2025) 01-0020-05

Effect of Tiaoshen Jianpi acupuncture therapy on intestinal permeability and microflora in constipation-type irritable bowel syndrome rats/ZHANG Chuqiong¹, GENG Tingting¹, FENG Yu¹, et al// (1. Department of acupuncture and moxibustion, Huai'an TCM Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu, Huai'an 223000, China)

Abstract: Objective: To observe the effects of Tiaoshen Jianpi on the intestinal permeability and intestinal flora of rats with constipation-type irritable bowel syndrome (IBS-C) model. Methods: Acupuncture was applied to the “Baihui”, “Yintang”, “Tianshu” and “Zusanli” of IBS-C rats, and the number of faecal pellets and water content were analysed. The number of fecal pellets, water content and intestinal propulsion rate were analysed, the expression of Zonulin protein in the intestinal mucosa was detected by western blot, and the changes of intestinal flora were observed by 16S rRNA sequencing. Results: After treatment, compared with the model group, rats in the electroacupuncture group showed significantly higher faecal water content ($P<0.05$), significantly higher intestinal propulsion rate ($P<0.01$), significantly down-regulated protein expression of Zonulin ($P<0.05$), and significantly enriched intestinal flora in the intestinal tract of thick-walled bacteria (Firmicutes), Bacteroidetes, and Eubacterium were significantly enriched ($P<0.05$). Conclusion: The Tiaoshen Jianpi acupuncture method inhibits intestinal permeability by down-regulating the Zonulin protein in the intestinal epithelial mucosa of IBS-C rats, and at the same time, regulates the structure and abundance of intestinal flora that may affect intestinal permeability, so as to achieve the improvement of constipation symptoms in IBS-C rats.

Keywords: Irritable bowel syndrome; Constipation; Intestinal permeability; Intestinal flora

肠易激综合征 (Irritable bowel syndrome, IBS) 是一组持续或间歇发作, 以腹痛、腹胀、排便习惯和 (或) 大便性状改变为临床表现, 而缺乏胃肠道结构和生化异常的肠道功能紊乱性疾病。根据粪便性状将 IBS 分为 4 个主要亚型: IBS 便秘型 (IBS-C)、IBS 腹泻型 (IBS-D)、IBS 混合型 (IBS-M) 和 IBS 不定型 (IBS-U)。IBS 在全球约每 10 人中就有 1 人受到影响^[1], 中国成人人群中 IBS 的患病率约为 5%~10%^[2]。

“调神健脾”针法将十余年基础理论与临床经验相结合, 对 IBS 的治疗效果显著^[3-5], 本次研究在前期研究的基础上^[6-7], 从肠道通透性及肠道菌群的角度, 进一步探讨“调神健脾”针法对便秘型肠易激综合征的机制调节作用,

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 选取 6 周龄 SPF 级 Wistar 雄性大鼠只, 体质量 (200~220) g。购于北京斯贝福生物技术有限公司 [SPF 级许可证号: SCXK (京)

* 基金项目: 江苏省中医药科技发展计划项目 (编号: MS2021068); 国家中医药管理局中医药古籍文献和特色技术传承专项 (编号: GZY-KJS-2020~077)。第一作者: 张楚穹, 博士, 主治医师, 研究方向: 针灸防治代谢性疾病, E-mail: zcq8954@163.com。△ 通讯作者: 刘永涛, 主任医师, 研究方向: 针灸治疗神经相关类疾病, E-mail: 13952326701@126.com。

2019~0010]。环境温度 (23 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ ，湿度 (55 ± 5)%，24h 自由摄食、饮水，适应性饲养 1 周后，随机分为空白组 (BL)、模型组 (WG) 和电针组 (IWG_EA)，每组 11 只。造模期间及治疗阶段大鼠食水自由。本研究通过了南京中医药大学附属淮安中医院伦理学会认证和许可 (许可批号 K2021~15)，实验全过程严格遵循 2006 年 9 月发布的《关于善待实验动物的指导性意见》的相关规定。

1.2 主要试剂与仪器 试剂：Trizol (北京佳兰生物科技有限公司 5012)，DNA Marker 预混合 MIX (北京天根生化科技有限公司)，组织蛋白提取试剂盒 (康为世纪 CW0891)，Zonulin 抗体 (美国 Proteintech 公司 16665~1)。仪器：华佗牌一次性无菌针灸针 (苏州医疗用品厂有限公司 0.30mm $\times$ 13mm)，韩氏电针仪 (南京济生医疗科技有限公司 HANS-200A)，低温冷冻离心机 (德国 Eppendorf 5424R)。

1.3 IBS-C 模型大鼠的建立 随机选取 11 只作为 BL 组，正常饲养，不灌胃；其余 22 只采用冰水灌胃造模方法造模^[8]，每天上午 8:30 予 ($0 \sim 4$) $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水灌胃，3mL/只，每日 1 次，共 14d。每日于灌胃前称取大鼠体质量，24h 后捡取大鼠粪便，称取粪便质量，记录粪便粒数，观察粪便形态。若见大鼠粪便质硬、形状变小、含水量减少，鼠性易激惹，可判断造模成功。将 22 只 IBS-C 模型大鼠，采用随机数字表法分为模型组 ($n=11$)、电针组 ($n=11$)。

1.4 电针治疗方法 电针组：采用“调神健脾”针法治疗。取穴：百会、印堂、天枢、足三里。取穴标准参照常用实验动物针灸穴位^[9]。针刺方法：电针组大鼠采用特殊框架固定，常规消毒后，将针灸针平刺 15° 入百会、印堂穴，垂直刺入双侧天枢穴及足三里穴，针身插入深度约 3mm。将百会和印堂、双侧天枢和足三里穴位的针尾连接到韩氏电针治疗仪器上，电流强度 0.5mA，疏密波 2/15 Hz，每天一次，每次 15min，持续 10d。

BL 组和 IWG 组大鼠均不做电针干预。

1.5 检测指标及方法 观察指标：24h 粪便粒数及粪便含水量：造模后，将大鼠分别放入代谢笼里，收集每组大鼠 24h 粪便并计数，然后用电子天平分别称其重量为湿粪质量，后置于 60°C 温箱中干燥 12h 后称其重量为干粪质量，依据此公式计算：粪便含水量 = (湿粪质量 - 干粪质量) / 湿粪质量 $\times 100\%$ 。肠道推进率 = (L_2/L_1) $\times 100\%$ 。每组随机选择三只大鼠，禁水及禁食 24h 后，用 10mL/kg 活性炭悬浮液灌胃，浓度为 10%，待 30min 后用 2% 戊巴比妥钠腹腔麻醉后处死，开腹腔后分离肠系膜，上端切至幽门，下端切至回盲部所有肠管，轻轻地拉成一条

直线，静置 30 秒。测量肠管的总长度为 L_1 ，从幽门到最终碳前部的距离为 L_2 。Western blot 检测：取小肠粘膜组织 (取样方法同上)，在小肠粘膜组织中加入 400 μL 裂解液，充分裂解后 4°C 离心， -80°C 保存备检。将纯化的蛋白样品在 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳，浓缩胶 80V 30min，分离胶 100V 90min；电泳后转 PVDF 膜。封闭 4°C 过夜；加入抗体 (1:400) 后 4°C 过夜；洗膜后加入 1:5000 稀释的 HRP 二抗，室温孵育 2h；洗膜后曝光显影。以 Zonulin 与内参的比值为相对表达量。肠道菌群检测：将收集的新鲜大鼠粪便液氮速冻 15min 后置于 -80°C 冰箱保存，使用 NovaSeq 6000 (Illumina, San Diego, USA) 进行上机测序，采用 CTAB 方法对样本的基因组 DNA 进行提取，根据 Barcode 序列和 PCR 扩增引物序列从下机数据中拆分出各样本数据，正向引物为 515F 引物 341F (5' CCTAYGGGRBGCASCAG3') 和 806R (5' GGACTACNNGGTATCTAAT3') 进行 PCR 扩增，扩增微生物 16S rDNA 基因的 V4 区域，对样本进行检测测序。

1.6 统计分析 采用 SPSS 26.0 进行统计处理，结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。24h 粪便粒数、粪便含水量及肠道推进率，符合正态分布且方差齐，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用 LSD 法，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 各组大鼠 24h 粪便粒数比较 造模后，与空白组比较，模型组、电针组粪便粒数显著减少 ($P < 0.01$)；治疗后，与空白组比较，模型组粪便粒数显著减少 ($P < 0.05$)，电针组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；与模型组比较，电针组粪便粒数显著增加 ($P < 0.05$)。见图 1。

说明造模成功后，经过“调神健脾”针法干预，IBS-C 模型大鼠的排便量显著增加。

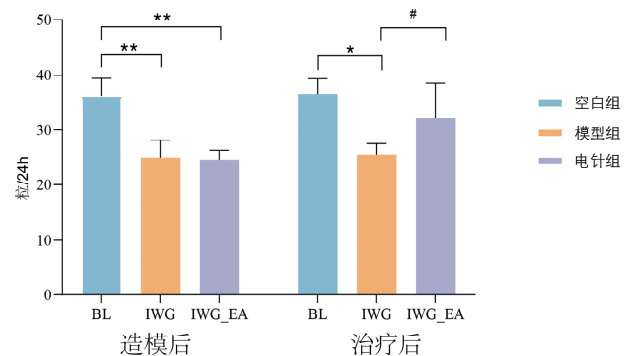


图 1 各组大鼠粪便粒数的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=11$ /组)

注：与 BL 组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，与 IWG 组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

2.2 各组大鼠粪便含水量对比 造模后，与空白组

比较, 模型组、电针组粪便含水率显著降低 ($P < 0.01$); 治疗后, 与空白组比较, 模型组粪便含水率显著降低 ($P < 0.05$), 与模型组比较, 电针组粪便含水率显著升高 ($P < 0.05$)。见图 2。说明造模成功后, 经过“调神健脾”针法干预, IBS-C 模型大鼠的粪便质地明显变软。

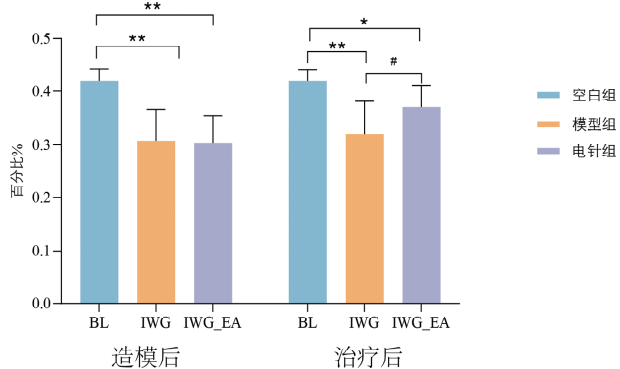


图 2 各组大鼠粪便含水量的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 11$ /组)

注: 与 BL 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与 IWG 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

2.3 各组大鼠粪便肠道推进率对比 与空白组比较, 模型组、电针组肠道推进率显著降低 ($P < 0.01$), 电针干预后, 与模型组比较, 电针组肠道推进率显著升高 ($P < 0.01$), 见图 3。说明经过“调神健脾”针法干预, IBS-C 大鼠的肠道运动功能明显恢复。

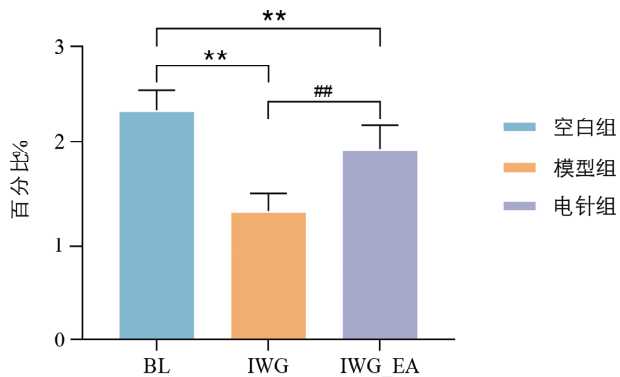


图 3 各组大鼠肠道推进率的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$ /组)

注: 与 BL 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与 IWG 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

2.4 “调神健脾”针法对 Zonulin 的蛋白表达的影响 与空白组相比, 模型组 Zonulin 蛋白表达量升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 电针组 Zonulin 表达量降低 ($P < 0.01$), 说明“调神健脾”针法可下调 IBS-C 大鼠的 Zonulin 蛋白表达。见图 4。

2.5 “调神健脾”针法对 IBS-C 大鼠肠道菌群的影响

2.5.1 “调神健脾”针法可以改变 IBS-C 模型大鼠

肠道微生物群结构 通过 16S rRNA 基因测序分析评估肠道微生物群。平均每个样本获得 64072 个 reads, 降噪后获得 1652 个 ASVs。基于 ASVs 计算 chao1 指数和 ACE 指数以评估组间物种多样性。

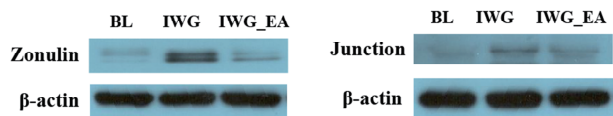
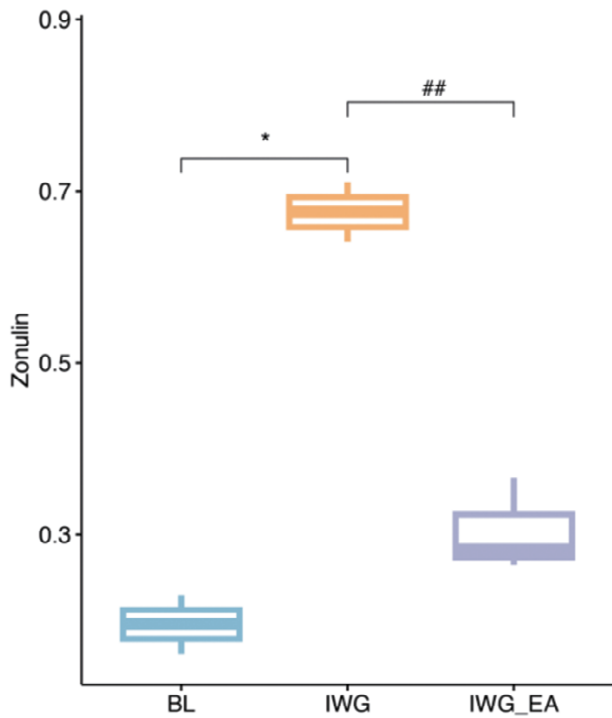


图 4 各组大鼠 Zonulin 的蛋白表达比较
($\bar{x} \pm s$, $n = 11$ /组)

注: 与 BL 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与 IWG 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。β-actin 为内参蛋白表达。

三组间的微生物群落结构存在差异。门水平上, 厚壁菌门 (*Firmicutes*) 和拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 占比显著 ($P < 0.05$)。与空白组比较, 模型组、电针组的厚壁菌门和拟杆菌门在肠道菌群结构中占比升高 ($P < 0.05$)。见图 5-a。属水平上, 与空白组比较, 模型组假单胞菌属 (*pseudomonas*)、黏液真杆菌属 (*Blautia*) 占比显著降低 ($P < 0.05$), 乳酸菌属 (*Lacobacilus*)、*muribaculaceae* 占比显著升高 ($P < 0.05$), 与模型组比较, 乳酸菌属、拟杆菌属占比显著降低 ($P < 0.05$), 电针组 *muribaculaceae*、黏液真杆菌属占比显著升高 ($P < 0.05$)。见图 5-b。

2.5.2 “调神健脾”针法可以改变 IBS-C 模型大鼠肠道微生物群组成 为确定“调神健脾”针法参与调节的 IBS-C 模型大鼠相关特定细菌类群, 使用

MetaStat 分析和线性判别分析效应大小 (LEfSe) 比较肠道微生物类群的组成。属水平上的 MetaStat 分析表明,与空白组相比,模型组在肠杆菌 (*Enterobacter*) 的丰度上有显著富集 ($P<0.05$),电针组的真杆菌 (*Eubacterium*)、戈尔多尼巴氏菌 (*Gordonibacter*)、

安德克氏菌属 (*Adlercreutzia*) 显著富集 ($P<0.05$);与模型组相比,电针组的真杆菌戈尔多尼巴氏菌显著富集 ($P<0.05$),普雷沃氏菌 (*Prevotellaceae*)、肠杆菌属等相对丰度较低 ($P>0.05$)。见图 6。

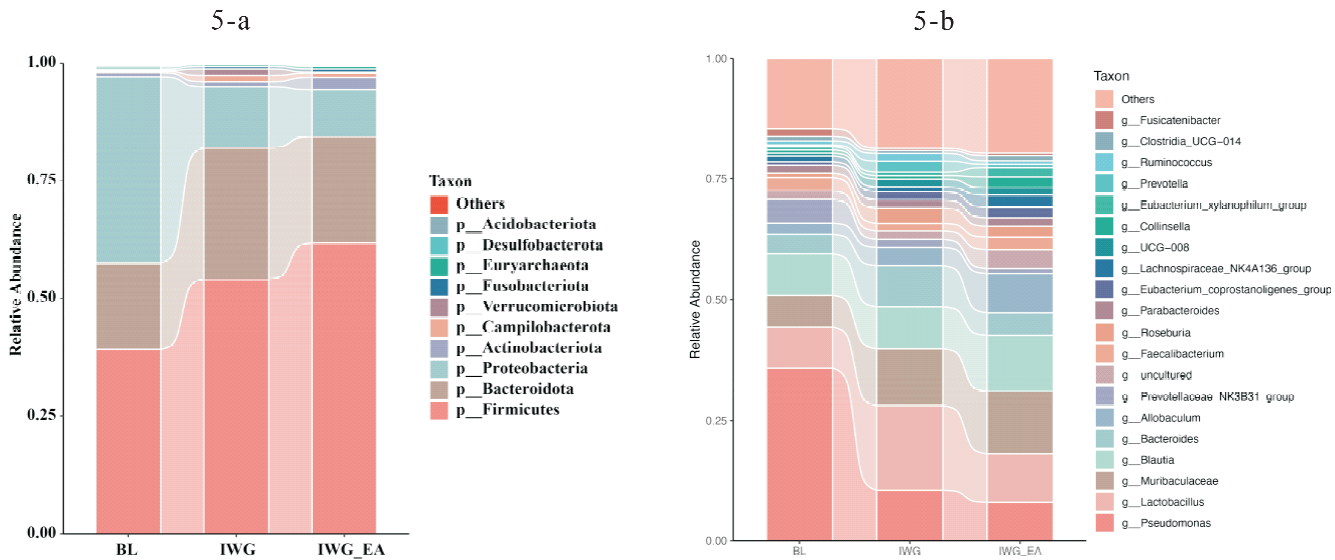


图 5 各组大鼠在不同水平上的结构差异对比

注:图 5-a,各类群微生物群落在门水平上的相对丰度;图 5-b,各类群微生物群落在属水平上的相对丰度。

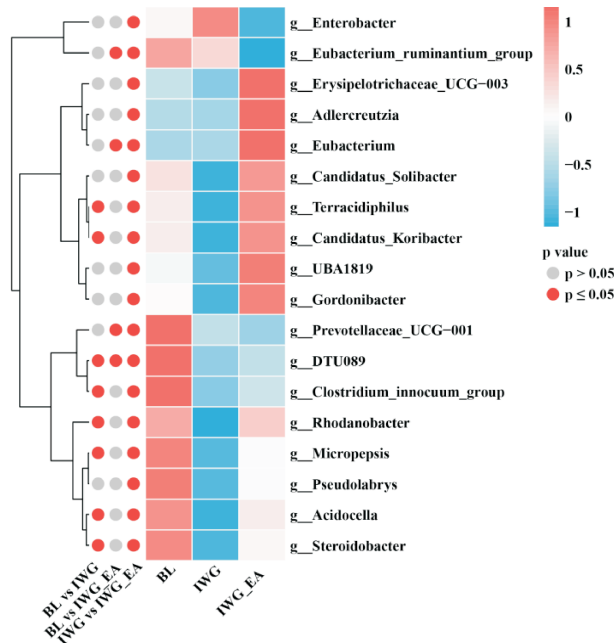


图 6 各组大鼠肠道微生物类群的组成差异检验热图

3 讨论

IBS 的病理生理机制仍有待清晰阐明,近年来学者们提出的 IBS 发病机制除了胃肠动力障碍、肠道感染、脑-肠轴功能异常等,肠道通透性增高也是 IBS 的重要病理生理机制^[10]。肠道屏障系统依赖于几种屏障成分之间的相互作用,包括免疫球蛋白 A、抗菌

肽和细胞间质紧密连接等^[11]。在这些成分中,紧密连接蛋白 (Tight Junction, TJ) 构成肠道物理屏障的主要决定成分。Zonulin 蛋白是主要的功能蛋白,它是目前已知的唯一一种肠道通透性生理性调节蛋白,研究表明 Zonulin 是内皮和上皮紧密连接的主调节因子^[12],它释放入肠腔与 Zonulin 受体结合,可快速调节肠道紧密连接,改变肠道通透性,对肠道黏膜屏障的功能具有重要作用^[13]。IBS 正是因为肠道通透性遭到一定程度的破坏,各种病原体及毒素通过肠黏膜进入体内甚至是全身,从而出现一系列消化系统症状^[14]。肠道通透性的调节,是维持 IBS 黏膜内稳态的生理机制的一部分。Zonulin 的分泌是通过其自身从紧密连接复合体中分解后以增加肠道通透性。因此,抑制肠上皮 Zonulin 蛋白等紧密连接蛋白上调,降低肠道通透性,保护肠道屏障完整性,对 IBS 有着重要的意义。

本次研究表明,经“调神健脾”针法干预后,抑制了 IBS-C 模型大鼠的肠上皮 Zonulin 的蛋白表达的异常上调,降低了肠道通透性。肠道微生物群与 IBS 之间的相关性已被证实。在正常情况下,肠道微生物群可以代谢化合物,刺激免疫系统,产生微量营养素和神经调节剂,以维持宿主生态系统的生理功能^[15]。IBS 患者和健康对照组之间肠道微生物群的

多样性、丰富度和构成存在显著差异^[16]。诸多研究发现^[17]肠道菌群可影响 Zonulin 蛋白分泌,从而改变肠道通透性。正常肠道菌群通过抑制肠黏膜的通透性,对维持肠黏膜屏障的完整性具有积极意义^[18]。本次实验结果中,电针组从属于厚壁菌门的真杆菌属显著增加。研究表明^[19-20]真杆菌属肠道内的富集程度与 IBS-C 呈负相关,患有 IBS-C 的患者经含有真杆菌属等益生菌的粪便移植后,IBS-C 症状有显著缓解。

IBS-C 患者的临床表现为粪质干结、排便困难、大便次数减少,属于中医“便秘”范畴。《灵枢·本神》曰:“凡刺之法,必先本于神”,脑为元神之府,百会为督脉重要穴位,印堂属督脉所过;又“……脾藏营,营舍意……”,人的意念活动依附于营气,脾胃为气血生化之源,调节脾胃功能可滋养营气,《灵枢·四时气》“肠中不便,取三里”,足三里是足阳明胃经下合穴,天枢乃手阳明大肠之募穴,“调神健脾”针法通过针刺此四穴,共奏调神健脾理肠之作用。

综上,“调神健脾”针法通过下调 IBS-C 模型大鼠肠上皮粘膜的 Zonulin 蛋白,抑制了 IBS-C 模型大鼠的肠道通透性,同时参与调节了可能影响肠道通透性的肠道菌群如真杆菌属等,达到改善 IBS-C 大鼠的便秘症状的目的。

参考文献

- [1] Black C J, Ford A C. Global burden of irritable bowel syndrome: trends, predictions and risk factors [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17 (8): 473-486.
- [2] Liu Y L, Liu J S. Irritable bowel syndrome in China: a review on the epidemiology, diagnosis, and management [J]. *Chin Med J*, 2021, 134 (12): 1396-1401.
- [3] 郭静,孙建华,陈璐,等. 针刺双向调节效应——“调神健脾”法针刺治疗肠易激综合征多中心随机对照试验亚组分析 [J]. *中国针灸*, 2021, 41 (08): 845-850.
- [4] 陈璐,徐万里,裴丽霞,等. “调神健脾”针法对腹泻型肠易激综合征患者肠道菌群及粪便短链脂肪酸含量的影响 [J]. *中国针灸*, 2021, 41 (02): 137-141.
- [5] 李静,陆瑾,孙建华,等. “调神健脾”配穴针刺改善腹泻型肠易激综合征症状和睡眠质量: 随机对照试验 [J]. *中国针灸*, 2017, 37 (1): 9-13.
- [6] 耿昊,翁晟捷,赵婷婷,等. 基于种子点相关分析探讨调神健脾针法治疗腹泻型肠易激综合征的中枢调节机制 [J]. *针刺研*

- 究, 2021, 46 (04): 318-325.
- [7] 唐满,孙建华. “调神健脾”针法治疗肠易激综合征的理论探析 [J]. *世界中医药*, 2023, 18 (03): 370-373.
- [8] Eshraghian A. Interstitial cells of cajal: a novel hypothesis for the pathophysiology of irritable bowel syndrome [J]. *Can J Gastroenterol*, 2011, 25 (5): 277-279.
- [9] 李忠仁. 实验针灸学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 325-326.
- [10] Inczei O, Bacsur P, Resail T, *et al*. The Influence of Nutrition on Intestinal Permeability and the Microbiome in Health and Disease [J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 718710.
- [11] Suzuiki T. Regulation of the intestinal barrier by nutrients: the role of tight junctions [J]. *Anim Sci J*, 2020, 91 (1): e13357.
- [12] Sturgeon C, Fasano A. Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases [J]. *Tissue Barriers*, 2016, 4 (4): e1251384.
- [13] Fasano A. Intestinal permeability and its regulation by zonulin: diagnostic and therapeutic implications [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2012, 10 (10): 1096-1100.
- [14] Thomas K E, Sapone A, Fasano A, *et al*. Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: role of the innate immune response in Celiac disease [J]. *J Immunol*, 2006, 176 (4): 2512-2521.
- [15] Lynch S V, Pedersen O. The human intestinal microbiome in health and disease [J]. *N Engl J Med*, 2016, 375 (24): 2369-2379.
- [16] Mahaeshak N, Ringel Y, Katibian D, *et al*. Fecal and mucosa-associated intestinal microbiota in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. *Dig Dis Sci*, 2018, 63: 1890-1899.
- [17] 杜维霞,沈名扬,艾青,等. Zonulin 介导的肠道微生物对肠上皮细胞屏障功能的调节 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2014, 36 (10): 1362-1367.
- [18] Distrutti I, Monaldi L, Ricci P, *et al*. Gut microbiota role in irritable bowel syndrome: New therapeutic strategies [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22 (7): 2219-2241.
- [19] El-sailhy M, Krisoffersen A B, Valeur J, *et al*. Gilja in patients with irritable bowel syndrome [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2021, 34: e14200.
- [20] El-sailhy M. Intestinal bacteria associated with irritable bowel syndrome and chronic fatigue [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2023, 35 (9): e14621.

(收稿日期 2024-03-15)