

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.08.013

电针及电针后粪菌液灌肠对肥胖大鼠肠道菌群的影响

周钰点, 杨姝瑞, 卢威, 王雅媛, 梁凤霞[✉]

湖北中医药大学针灸骨伤学院, 湖北省武汉市武昌区昙华林188号, 430061

[摘要] **目的** 探究电针和电针后粪菌液灌肠对肥胖的影响及可能作用机制。**方法** 120只Wistar大鼠随机抽取8只作为正常组,其余大鼠采用高脂饲料诱导建立肥胖大鼠模型。造模成功的78只大鼠中选取40只随机分为模型组、电针组、非经非穴组、粪菌移植组、模型对照组,每组8只。1)正常组和模型组大鼠不进行干预,电针组造模同时进行电针“中脘”“关元”、双侧“足三里”和“丰隆”;非经非穴组大鼠取电针组穴位旁约5mm处皮下浅刺并连接电针夹,不予通电,两组均每次10min,每周3次,干预8周。2)另在剩余的38只造模成功的大鼠中随机选出5只作为粪菌采集组,采取和电针组大鼠相同的干预方式干预8周后,继续电针干预3周,并采集此3周每周最后一次干预后的新鲜粪便制备成粪菌液备用。模型对照组和粪菌移植组大鼠造模8周后进行灌肠,模型对照组大鼠用2ml生理盐水灌肠,粪菌移植组大鼠用粪菌采集组大鼠新鲜粪便制成的2ml粪菌液灌肠,每周1次,共3周,两组同时继续高脂饲料喂养。正常组、模型组、电针组和非经非穴组于干预8周后记录大鼠体重并计算Lee's指数,并取新鲜粪便分析肠道菌群丰度、多样性和代谢功能。模型对照组和粪菌移植组于灌肠3周后取材,检测指标和方法同前。**结果** 1)与正常组比较,模型组大鼠体重、Lee's指数升高,肠道拟杆菌属、罗氏菌属和普雷沃氏菌属等丰度降低,乳杆菌属、肠球菌丰度升高,肠道COG功能在一般功能预测、氨基酸转运与代谢、细胞修复、能量转化和脂代谢方面降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,电针组大鼠体重和Lee's指数降低,拟杆菌属、罗氏菌属丰度升高,乳杆菌属和肠球菌属丰度降低,肠道COG功能在一般功能预测、氨基酸转运与代谢、能量转化、脂代谢方面均升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);非经非穴组大鼠体重、Lee's指数、各菌属差异均无统计学意义($P>0.05$)。2)与模型对照组比较,粪菌移植组大鼠Lee's指数降低,肠道乳杆菌属和布劳氏菌属丰度升高,拟杆菌属、罗姆布茨菌属和柯林斯菌属丰度降低,肠道COG功能在碳水化合物运输和代谢、氨基酸转运与代谢、信号转导、能量转化、脂代谢方面明显升高,而胞膜形成和胞内运输功能降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 电针可降低肥胖大鼠体重,其机制可能与提高肠道优势菌有关,从而改善肠道菌群在能量转化与脂代谢方面的功能,并且通过电针后粪菌液灌肠的方式可继续发挥电针的良性效应。

[关键词] 肥胖;电针;粪菌移植;肠道菌群

肥胖是机体的热量摄入超过热量消耗而导致体内脂肪组织聚集过多、脂肪细胞体积增大的一种状态^[1]。肥胖伴随着胰岛素抵抗、糖尿病和心血管疾病等代谢紊乱风险的增加,已经成为影响人类健康的重要因素之一^[2]。流行病学研究^[3]显示,近1/3的人口被归为超重或肥胖。肠道微生物与机体代谢活动有密切的相关性,肠道微生物及其产生的某些

短链脂肪酸已被证实是肥胖产生的一个重要因素^[4]。肠道微生物群的变化可导致肠道屏障功能障碍,激活肠道及外周位点的炎症过程,从而促使胰岛素抵抗和肥胖的发生^[5]。同时,肠道微生物群基因组编码的调控蛋白是宿主维持新陈代谢正常稳态的重要因素,肥胖人群中肠道微生物群的物种丰度和代谢能力明显降低^[5-6]。因此,维持肠道微生物群的多样性和功能完整性对于人体健康至关重要。临床研究发现,电针中脘、天枢、足三里、三阴交等穴不仅有效降低肥胖患者体重,而且可以改善肠

基金项目:国家自然科学基金(81774420);湖北中医药大学2017年度“校级科研团队建设”资助项目(2017ZXZ004)

✉ 通讯作者:fxliang5@hotmail.com

道微生物群^[7], 是治疗肥胖和胰岛素抵抗的常用穴^[8]。课题组前期研究^[9-10]表明, 电针能够有效增加肥胖大鼠肠道屏障完整性, 调节与肥胖相关的特定菌群水平。本实验在此基础上, 将电针针刺后的菌群移植入肥胖模型大鼠, 观察电针后菌群移植对肥胖大鼠肠道菌群结构及代谢功能的影响, 探讨电针调节肠道菌群的可能作用机制。本研究通过湖北中医药大学动物伦理委员会审查, 批件号为: HUCMS 201904005。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 Wistar 大鼠 120 只, 8 周龄, 体质量为 (120±20) g, 购自湖北省实验动物中心, 实验动物许可证号: SYXK (鄂) 2015-0018, 饲养于湖北中医药大学实验动物中心 SPF 级动物房, 动物设施使用许可证号: SYXK (鄂) 2017-0067。每笼 5 只, 自由进食饮水, 设置 12h 明暗周期、温度为 (22±2)℃, 相对湿度 50%±10%。普通饲料总热量为 3.8 kcal/g (含 70% 碳水化合物, 20% 蛋白质, 10% 脂肪), 高脂饲料总热量为 5.4 kcal/g (含 38.5% 碳水化合物, 15% 蛋白质, 46.5% 脂肪), 均由武汉春玉红实验动物饲料有限公司生产, 批号: SCXK (鄂) 2017-001。

1.2 主要试剂与仪器

QIAamp Fast DNA Stool Mini 试剂盒 (货号: 51604, 德国 Qiagen 有限公司); Tru Seq TM DNA Sample Prep 试剂盒 (货号: FC-121-2001、FC-121-2002、FC-121-2003)、cBot Truseq PE Cluster Kit v3-c Bot-HS (货号: PE-401-3001)、Truseq SBS Kit v3-HS (货号: FC-401-3001), Illumina 公司。

0.30 mm×25 mm 针灸针 [批号: (10)20120921, 北京中研泰和医疗器械有限公司]; 电针治疗仪 (HANS LH202H 型, 北京华威科技有限公司); 防水电子秤 (JCS-1000C 型, 上海志荣电子科技有限公司); 不锈钢直尺 (6250 型, 得力集团有限公司); 台式冷冻离心机 (Microfuge 22R 型, 美国 Beckman Coulter 公司); 全自动生化分析仪 (Chemray240 型, 深圳雷杜生命科学股份有限公司); 高通量测序平台 (Illumina HiSeq2500 型, 中国香港基因有限公司)。

1.3 动物分组及造模

120 只大鼠适应性喂养 1 周后采用随机数字表法抽取 8 只作为正常组, 每日给予普通饲料喂养;

其余大鼠作为造模组, 给予高脂饲料喂养 8 周。造模结束后测定大鼠体重, 以高脂饲料喂养大鼠的体重比普通饲料喂养大鼠的平均体重超出 20% 即为实验性肥胖大鼠模型^[11]。共 78 只大鼠造模成功, 采用随机数字表法选取造模成功的大鼠 40 只, 再用随机数字表法分为模型组、电针组、非经非穴组、粪菌移植组和模型对照组, 每组 8 只。另在剩余造模成功的 38 只大鼠中采用随机数字表法选取 5 只大鼠作为粪菌采集组, 用于电针后新鲜粪便的采集, 采集结束即处死, 不纳入后续数据的分析。

1.4 干预方法

1.4.1 电针干预 正常组和模型组均不做任何干预。电针组采用高脂饲料喂养, 同时进行电针干预。电针干预前进行鼠衣固定和穴位定位。穴位定位参考《大鼠穴位图谱的研制》^[12], 选用 0.3 mm×25 mm 针灸针针刺双侧的“足三里”和“丰隆”, 直刺 3~5 mm, “关元”向剑突方向, “中脘”向耻骨联合方向斜刺 3~5 mm。将电针治疗仪的频率设定为 2 Hz, 强度为 1 mA, 波形选用连续波。同侧“足三里”和“丰隆”连接同一输出的两个电极, “关元”和“中脘”连接另一输出的两个电极。每次 10 min, 每周干预 3 次, 共 8 周。非经非穴组大鼠采用高脂饲料喂养, 在电针组所取穴位旁约 5 mm 处皮下浅刺并连接电针夹, 但不予通电。

1.4.2 粪菌液灌肠 粪菌采集组大鼠 5 只, 采取和电针组大鼠相同的干预方式, 在 8 周干预结束后, 继续电针干预 3 周并采集每周最后一次针刺后的新鲜粪便制备成粪菌液备用。新鲜粪菌液的制备: 烧杯消毒杀菌后称取 10 g 粪菌采集组大鼠的新鲜粪便, 取生理盐水 50 ml, 与新鲜粪便充分搅拌均匀, 进行初步粪便菌液的均质处理; 在另一无菌烧杯口放上两层无菌医用纱布, 将粪菌液缓慢倒入, 利用无菌纱布将粪菌液中未消化的食物残渣过滤干净。将过滤的粪菌液倒入灭菌的 EP 管中, 放入 -4℃、6 000 r/min (离心半径为 10 cm) 的离心机内离心 15 min; 弃上清, 将沉淀再次悬浮于 50 ml 生理盐水中, 此时得到无色粪菌液^[13]。

模型对照组和粪菌移植组大鼠与模型组大鼠同期进行 8 周的高脂饲料喂养, 不予其他干预措施。8 周后, 模型对照组大鼠用 2 ml 生理盐水灌肠, 粪菌移植组大鼠用粪菌采集组大鼠新鲜粪便制成的 2 ml 粪菌液灌肠, 模型对照组和粪菌移植组同时继续高脂饲料喂养, 两组均每周 1 次, 共灌肠 3 周。粪菌移植和生理盐水灌肠方法: 用针管分别抽取

2 ml 粪菌液和生理盐水, 拔掉针头, 换上长约 2 cm 的透明软管, 分别将粪菌液和生理盐水缓慢注入粪菌移植组和模型对照组大鼠的肛门中。灌肠后用手指压迫大鼠的肛门, 并且把大鼠头朝下颠倒 45°, 维持此状态 1 min, 以防止灌肠溶液流出^[13]。

1.5 观察指标及分析方法

1.5.1 体重、Lee's 指数 正常组、模型组、电针组和非经非穴组大鼠分别在干预前和干预 8 周后最后一天上午 8:30 检测大鼠体重, 称取两次, 计算平均值; 在大鼠平展状态下测量其肛鼻长, 计算 Lee's 指数, $\text{Lee's 指数} = (\text{体重} \times 1000)^{1/3} / \text{肛鼻长}$ ^[11]。模型对照组和粪菌移植组于灌肠 3 周后检测体重并计算 Lee's 指数, 方法同上。

1.5.2 肠道菌群结构分析 正常组、模型组、电针组和非经非穴组于干预 8 周后第一批取材, 模型对照组和粪菌移植组于灌肠 3 周后第二批取材。每只大鼠取材前先取新鲜粪便 3 g, 依据 QIAamp Fast DNA Stool Mini 试剂盒说明书提取新鲜粪便样本中的总 DNA, 选取未降解的样品 30 个 (用随机数字表法每组选取 5 个样本), 基于 Illumina HiSeq2500 测序平台, 利用双末端测序的方法, 构建小片段文库进行测序。根据不同的相似度水平, 对所有序列进行分类操作单元 (OTU) 划分, 基于 OTU 分析结果, 将 OTU 的代表序列与微生物参考数据库进行比对可得到每个 OTU 对应的物种分类信息, 进而各水平统计各样品群落组成, 利用 QIIME V2.2 软件生成不同分类水平上的物种丰度表, 以评价组间肠道微生物群结构的差异。

1.5.3 肠道菌群 Beta 多样性分析 使用 QIIME V2.2 软件进行 Beta 多样性分析, 比较不同样品在物种多样性方面存在的相似程度。采用 binary jaccard 算法计算样品间的距离从而获得样本间的 β 值。基于 Beta 多样性分析得到的四种距离矩阵, 通过 R 语言工具采用非加权配对平均法 (UPGMA) 对样品进行层次聚类, 得到样品层次聚类树图, 样品越靠近, 枝长越短, 说明两个样品的物种组成越相似。

1.5.4 肠道菌群功能基因预测分析 16S rDNA 是编码原核生物核糖体小亚基 rRNA (16S rRNA) 的 DNA 序列, 使用 PICRUSt 2.0 软件通过比对细菌基于 16S 区测序数据获得的物种组成信息, 推测样本中的功能基因组成, 从而分析不同样本或分组之间在功能上的差异。首先需要对生成的 OTU 数据进行标准化; 然后, 通过每个 OTU 对应的 greengene 数据库序列, 即可获得 OTU 对应的蛋白质直系同

源簇 (COG) 家族信息, 从而计算该 COG 的功能类别丰度。

1.6 统计学方法

使用 SPSS 23.0 软件进行统计学处理。计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 粪菌移植组与模型对照组两组计量资料的比较采用独立样本 t 检验, 多组的组间比较采用单因素方差分析, 若总体存在差异则进行 LSD 法两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠体重、Lee's 指数比较

表 1 示, 与正常组比较, 模型组大鼠体重和 Lee's 指数均升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 电针组大鼠体重和 Lee's 指数降低 ($P < 0.01$), 非经非穴组体重和 Lee's 指数差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与电针组比较, 非经非穴组体重升高 ($P < 0.01$), Lee's 指数差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。表 2 示, 与模型对照组比较, 粪菌移植组大鼠体重差异无统计学意义 ($P > 0.05$), Lee's 指数降低 ($P < 0.05$)。

表 1 正常组、模型组、电针组及非经非穴组大鼠干预 8 周后体重和 Lee's 指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	体重/g	Lee's 指数/ $\text{g}^{1/3} \cdot \text{cm}^{-1}$
正常组	8	514.13 $\pm$ 32.54	3.33 $\pm$ 0.06
模型组	8	636.25 $\pm$ 40.29 ^{a)}	3.52 $\pm$ 0.09 ^{a)}
电针组	8	544.25 $\pm$ 29.22 ^{b)}	3.36 $\pm$ 0.07 ^{b)}
非经非穴组	8	594.63 $\pm$ 37.10 ^{c)}	3.44 $\pm$ 0.13

注: a) 与正常组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.01$; c) 与电针组比较, $P < 0.01$ 。

表 2 模型对照组及粪菌移植组大鼠灌肠 3 周后体重和 Lee's 指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	体重/g	Lee's 指数/ $\text{g}^{1/3} \cdot \text{cm}^{-1}$
模型对照组	8	581.13 $\pm$ 39.38	3.44 $\pm$ 0.08
粪菌移植组	8	554.00 $\pm$ 26.84	3.34 $\pm$ 0.05 ^{a)}

注: a) 与模型对照组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 各组大鼠肠道菌群结构比较

表 3 示, 在属水平上, 与正常组比较, 模型组大鼠的拟杆菌属、罗氏菌属和普雷沃氏菌属丰度降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 乳杆菌属、肠球菌属的丰度升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 电针组大鼠的拟杆菌属、罗氏菌属丰度升高 ($P < 0.01$), 乳杆菌属和肠球菌属丰度降低 ($P < 0.05$); 非经非穴组各菌属差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与电针组比较, 非经非穴组各菌属差异无统计学意义

表3 正常组、模型组、电针组及非经非穴组大鼠肠道菌群属水平相对丰度比较 (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	拟杆菌属	毛螺菌科 NK4A136 组	罗氏菌属	肠球菌属
正常组	5	16.61±7.45	4.74±3.87	7.27±1.62	2.54±2.26
模型组	5	1.10±0.69 ^{a)}	10.43±4.99	2.25±1.49 ^{a)}	7.73±1.61 ^{a)}
电针组	5	10.21±3.70 ^{c)}	5.48±5.51	7.67±3.18 ^{c)}	3.83±2.56 ^{d)}
非经非穴组	5	8.57±4.44	6.06±7.06	4.52±3.66	5.95±2.36

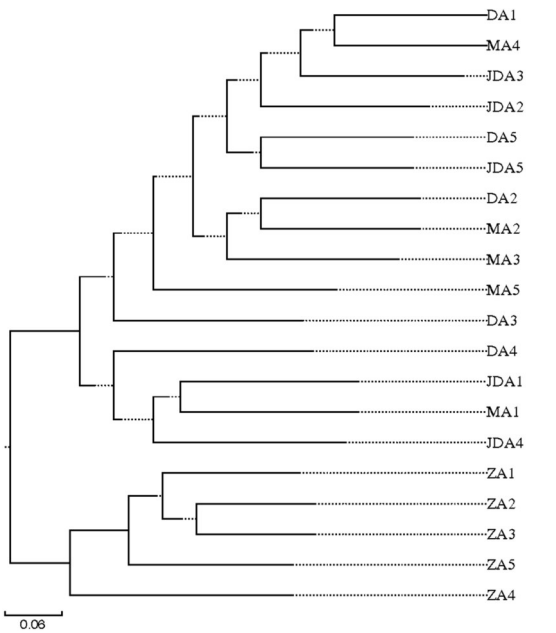
组别	鼠数	乳杆菌属	毛螺杆菌科未培养菌	普雷沃氏菌属	其他
正常组	5	1.13±1.36	3.15±1.50	3.77±2.20	33.76±3.42
模型组	5	9.42±5.58 ^{a)}	2.47±0.95	1.30±0.43 ^{b)}	32.37±8.64
电针组	5	2.75±2.05 ^{d)}	2.42±2.27	3.14±1.69	28.48±8.75
非经非穴组	5	5.07±6.67	1.73±1.28	1.32±0.77	30.68±3.81

注：a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与正常组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

($P>0.05$)。表4示，与模型对照组比较，粪菌移植组大鼠乳杆菌属和布劳特氏菌属丰度升高，拟杆菌属、罗姆布茨菌属和柯林斯菌属丰度降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

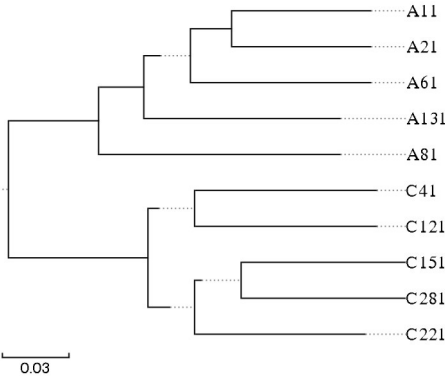
2.3 各组大鼠肠道菌群Beta多样性分析

图1、图2为聚类树图，表示各组样品间的聚



注：ZA，正常组；MA，模型组；DA，电针组；JDA，非经非穴组。图中组别后数字为样本编号。

图1 正常组、模型组、电针组及非经非穴组大鼠肠道菌群Beta多样性分析非加权配对平均法聚类树



注：A，粪菌移植组；C，模型对照组。图中组别后数字为样本编号。

图2 模型对照和粪菌移植组大鼠肠道菌群Beta多样性分析非加权配对平均法聚类树

集程度，聚类分析可见，正常组的5个样品为同一OUT，其余组样品为同一OUT，说明正常组与模型组、电针组、非经非穴组的样品组成差异较大；模型组与非经非穴组距离较近，枝长（OUT为始祖分出来的两支，OUT以下的实线分支为枝长）较短，表明两组样品组成差异较小；粪菌移植组和模型对照组分属于两个不同OUT，表明两组样品组成差异较大。

2.4 各组大鼠肠道菌群功能基因预测分析

将COG蛋白代谢功能划分为二十五类，表中只展示有统计学意义的通路。表5示，与正常组比

表4 模型对照组和粪菌移植组大鼠肠道菌群属水平相对丰度比较 (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	乳杆菌属	Muri 菌属	拟杆菌属	罗姆布茨菌属	普雷沃氏菌属
模型对照组	5	11.32±1.64	12.46±6.72	11.85±2.99	5.48±3.72	5.46±3.48
粪菌移植组	5	29.68±5.87 ^{a)}	11.51±5.51	3.45±2.25 ^{a)}	0.19±0.12 ^{b)}	4.05±2.99

组别	鼠数	普雷沃氏菌属	柯林斯菌属	布劳特氏菌属	毛螺菌科 NK4A136 组	其他
模型对照组	5	2.96±0.43	9.53±4.59	3.02±0.86	1.45±2.60	33.56±6.98
粪菌移植组	5	5.82±3.22	0.21±0.21 ^{a)}	4.89±0.95 ^{b)}	3.54±3.67	37.14±9.50

注：a) 与模型对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型对照组比较， $P<0.05$ 。

表 5 肠道菌群 COG 代谢通路在正常组、模型组、电针组和非经非穴组分布相对丰度比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

COG 代谢通路	正常组 (5 只)	模型组 (5 只)	电针组 (5 只)	非经非穴组 (5 只)
一般功能预测	11.36±0.08	11.09±0.09 ^{a)}	11.30±0.12 ^{c)}	11.16±0.18
氨基酸转运与代谢	7.66±0.17	7.37±0.17 ^{a)}	7.65±0.19 ^{c)}	7.38±0.19 ^{c)}
细胞修复	6.69±0.14	6.43±0.20 ^{a)}	6.51±0.21	6.47±0.16
能量转化	5.38±0.13	4.96±0.29 ^{a)}	5.38±0.30 ^{c)}	5.12±0.30
脂代谢	2.41±0.13	2.19±0.06 ^{b)}	2.37±0.07 ^{d)}	2.24±0.10 ^{e)}

注: a) 与正常组比较, $P < 0.05$; b) 与正常组比较, $P < 0.01$; c) 与模型组比较, $P < 0.05$; d) 与模型组比较, $P < 0.01$; e) 与电针组比较, $P < 0.05$ 。

较, 模型组大鼠的肠道 COG 功能在一般功能预测、氨基酸转运与代谢、细胞修复、能量转化和脂代谢方面明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 电针组的肠道 COG 功能在一般功能预测、氨基酸转运与代谢、能量转化、脂代谢方面均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与电针组比较, 非经非穴组的肠道 COG 功能在氨基酸转运与代谢、脂代谢方面明显降低 ($P < 0.05$)。表 6 示, 与模型对照组比较, 粪菌移植组的肠道 COG 功能在碳水化合物运输和代谢、氨基酸转运与代谢、信号转导、能量转化、脂代谢方面明显升高, 而胞膜形成和胞内运输功能降低 ($P < 0.05$)。

表 6 肠道菌群 COG 代谢通路在模型对照组和粪菌移植组分布相对丰度比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

COG 代谢通路	模型对照组 (5 只)	粪菌移植组 (5 只)
碳水化合物运输和代谢	8.40±0.26	9.47±0.77 ^{a)}
氨基酸转运与代谢	7.62±0.29	8.26±0.31 ^{a)}
胞膜形成	6.84±0.39	6.26±0.25 ^{a)}
信号转导	4.66±0.57	5.76±0.42 ^{a)}
能量转化	4.97±0.17	5.39±0.33 ^{a)}
脂代谢	2.29±0.15	2.58±0.21 ^{a)}
胞内运输	1.84±0.13	1.63±0.11 ^{a)}

注: a) 与模型对照组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

肠道菌群紊乱与多种代谢性疾病的发生相关^[14-16]。肥胖与非肥胖人群的微生物组成具有差异, 研究^[17]表明, 乳杆菌属能维护人体健康和调节免疫功能, 普雷沃氏菌属能够帮助降解食物中的碳水化合物和多糖, 有预防肥胖和胰岛素抵抗发生的作用^[18-19]。目前, 粪菌移植已被认为是重建肠道菌群的有效手段, 良性菌群在肠道内的定植能够改善肠道内环境, 恢复其稳态, 这种治疗方法可以避免服用减肥药物引起的副作用^[20]。

本实验经高脂饲料喂养成功诱导了肥胖大鼠模型, 电针干预后大鼠体重和 Lee's 指数降低, 提示

大鼠肥胖状态改善, 这与前期研究结果^[9-10]一致。此外, 本实验将电针后大鼠菌群移植入肥胖模型大鼠, 发现其 Lee's 指数下降, 表明肥胖程度仍有所改善。通过高通量测序技术检测大鼠肠道菌群发现, 模型组肠道内肠球菌属、乳杆菌属丰度增高, 拟杆菌属、罗氏菌属、普雷沃氏菌属丰度降低, 而电针组可是肠道内拟杆菌属、罗氏菌属丰度增高, 肠球菌属丰度降低。与模型对照组比较, 粪菌移植组可提高乳杆菌属、布劳特氏菌属丰度, 降低拟杆菌属、罗姆布茨菌属及柯林斯菌属丰度。以上结果提示肥胖状态的改善可能与肠道菌群结构的改变相关, 而电针和电针后粪菌移植亦可调节肠道菌群结构。

进一步通过肠道微生物 Beta 多样性分析得知, 正常组和其余组大鼠的肠道微生物多样性存在较大差异, 而模型组与非经非穴组的肠道微生物多样性差异较小, 粪菌移植组大鼠和模型对照组大鼠的微生物多样性同样存在差异。不同菌群有着不同的功能基因^[21], 肠道菌群结构和多样性之间的差异提示电针可能通过改善菌群的功能基因丰度而对肥胖产生影响。

通过 COG 功能预测发现, 模型组大鼠的肠道菌群丰度在一般功能预测、氨基酸转运与代谢、细胞修复、能量转化和脂代谢等方面均有较明显的降低, 而电针组和粪菌移植组大鼠的肠道菌群在能量转化与脂代谢功能丰度的改善上较为突出, 提示电针引起的菌群变化存在代谢功能的改善, 而通过粪菌移植依然能够使电针的这一良性作用继续发挥效应, 起到提高代谢功能, 缓解肥胖状态的效果。

综上所述, 电针改善肥胖状态的作用机制可能和菌群结构及其代谢功能的改善有关。电针能够重塑肥胖状态下肠菌的结构, 有针对性地提高乳杆菌和罗氏菌属等肠道优势菌的丰度, 并通过提高肠道微生物多样性和改善肠菌在能量转化与脂代谢方面

的功能,进而改善肥胖状态。粪菌移植作为有效手段,能够使改善后的菌群定植在肥胖大鼠的肠道内,纠正菌群失调状态,改善菌群的结构与功能。本实验不仅肯定了电针通过肠道菌群改善肥胖状态的有效机制,同时证明了能够通过电针后粪菌移植的方式继续发挥电针的良性效应。电针与粪菌移植相结合,作为补充替代疗法,弥补电针适应人群的不足。

本实验证实了电针改善菌群失调以及粪菌移植的有效性,然而电针是否通过调节特定菌群及其代谢来改善肥胖状态,菌群与代谢通路之间的相关性还有待进一步研究。考虑到饮食对肠道菌群也存在较大影响,课题组接下来可以将饮食纳入观察因素,并延长粪菌移植周期,观察电针和粪菌移植的远期影响。

参考文献

- [1]BELKAID Y, NAIK S. Compartmentalized and systemic control of tissue immunity by commensals[J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(7):646-653.
- [2]KHAN UALI, FALLAH M, SUNDQUIST K, et al. Risk of colorectal cancer in patients with diabetes mellitus: a Swedish nationwide cohort study[J]. *PLoS Med*, 2020, 17(11): e1003431.
- [3]CHOOI YC, DING C, MAGKOS F, et al. The epidemiology of obesity[J]. *Metabolism*, 2019, 92: 6-10. doi: 10.1016/j.metabol.2018.09.005.
- [4]TURNBAUGH PJ, LEY RE, MAHOWALD MA, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest[J]. *Nature*, 2006, 444(7122): 1027-1031.
- [5]DAVID LA, MAURICE CF, CARMODY RN, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome[J]. *Nature*, 2014, 505(7484):559-563.
- [6]TURNBAUGH PJ, HAMADY M, YATSUNENKO T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins[J]. *Nature*, 2009, 457(7228): 480-484.
- [7]XU ZT, LI RF, ZHU CL, et al. Effect of acupuncture treatment for weight loss on gut flora in patients with simple obesity[J]. *Acupunct Med*, 2013, 31(1):116-117.
- [8]LIANG F, KOYA D. Acupuncture: is it effective for treatment of insulin resistance? [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2010, 12(7):555-569.
- [9]宋爱群,张阳普,陈瑞,等. 电针对胰岛素抵抗肥胖大鼠肠道菌群的影响[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2020, 28(9):656-662.
- [10]武欢,陈丽,梁凤霞. 电针对胰岛素抵抗肥胖大鼠肠道菌群和肠道屏障的影响[J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(11):2808-2811.
- [11]汤锦花,严海东. 营养性肥胖大鼠模型的建立及评价[J]. *同济大学学报(医学版)*, 2010, 31(1):32-34.
- [12]华兴邦,周浩良. 大鼠穴位图谱的研制[J]. *实验动物与动物实验*, 1991(1): 1-5.
- [13]郭上齐. 粪菌移植对营养性肥胖大鼠血脂及肠道屏障的影响[D]. 太原:山西医科大学, 2016.
- [14]CAESAR R, TREMAROLI V, KOVATCHEVA-DATCHARY P, et al. Crosstalk between gut microbiota and dietary lipids aggravates WAT inflammation through TLR signaling[J]. *Cell Metab*, 2015, 22(4):658-668.
- [15]KIRALY DD. Gut microbes regulate neurons to help mice forget their fear[J]. *Nature*, 2019, 574 (7779): 488-489.
- [16]KAYE DM, SHIHATA WA, JAMA HA, et al. Deficiency of prebiotic fiber and insufficient signaling through gut metabolite-sensing receptors leads to cardiovascular disease[J]. *Circulation*, 2020, 141(17):1393-1403.
- [17]KUANG Z, WANG Y, LI Y, et al. The intestinal microbiota programs diurnal rhythms in host metabolism through histone deacetylase 3 [J]. *Science*, 2019, 365(6460):1428-1434.
- [18]SANNA S, ZUYDAM NRVAN, MAHAJAN A, et al. Causal relationships among the gut microbiome, short-chain fatty acids and metabolic diseases[J]. *Nat Genet*, 2019, 51(4):600-605.
- [19]肖润,郑旺,郑琳,等. 桑枝叶粉对云南云岭牛瘤胃微生物区系的影响[J]. *草业科学*, 2020, 37(10): 134-143.
- [20]葛晓龙,丁超. 粪菌移植改善肥胖和糖尿病病人的研究进展[J]. *肠外与肠内营养*, 2015, 22(6):370-373.
- [21]吴莉娟,刘铜华. 肠道菌群在肥胖发病中的地位与作用[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2017, 19(9): 1572-1579.

Effect of Electroacupuncture and Fecal Microbiota Enema after Electroacupuncture on the Intestinal Flora of Obese Rats

ZHOU Yudian, YANG Shurui, LU Wei, WANG Yayuan, LIANG Fengxia

School of Acupuncture and Orthopedics, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan, 430061

ABSTRACT Objective To explore the effect of electroacupuncture and fecal microflora transplantation after elec-

troacupuncture on obesity, as well as the possible mechanism. **Methods** Eight out of 120 Wistar rats were randomly selected as the normal group, and the remaining rats were fed with high-fat diet to establish the obesity rat model. Forty out of the 78 successfully modeled rats were randomly divided into model group, electroacupuncture (EA) group, sham EA group (acupuncture inserted not on the channels or the acupoints), fecal microbiota transplantation (FMT) group and model control group, with eight rats in each group. The rats in the normal group and the model group received no interventions. The rats in the EA group received EA inserted on “Zhongwan” (RN 12), “Guanyuan” (RN 4), bilateral “Zusanli” (ST 36), and bilateral “Fenglong” (ST 40), while those in sham EA group were administered with shallow needles on the points, 5 mm away from the acupoints used in EA group and with no electricity, both for 10 minutes each time, three times a week for eight weeks. In addition, five rats were randomly selected from the remaining 38 successfully modeled rats as the fecal microbiota collection group. The five rats were given the same 8-week intervention with the EA group for an additional three weeks, and the fresh feces were collected after the weekly last treatment to prepare the spare fecal microbiota liquid. Rats in model control group and FMT group were given 2 ml normal saline and 2 ml fecal microbiota liquid from the fecal microbiota collection group by enema, respectively, at eight weeks after modelling, once weekly for three weeks; simultaneously, both groups continued to be fed with high-fat diet. The changes of body weight and Lee’s index were assessed, and the abundance, diversity and metabolic function of intestinal flora were analyzed after eight-week intervention in the normal group, model group, EA group and sham EA group. The same outcomes were assessed in the model control group and FMT group at three weeks after enema. **Results** Compared to those in the normal group, the body weight and Lee’s index in the model group increased; the abundance of Enterobacteriaceae, Roche and Prevotella decreased, while the abundance of Lactobacillus and Enterococcus increased; the intestinal COG function was reduced in terms of general function prediction, amino acid transport and metabolism, cell repair, energy conversion and lipid metabolism ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to those in the model group, the body weight and Lee’s index decreased; the abundance of Bacteroides and Roche increased, while the abundance of Lactobacillus and Enterococcus decreased, and the intestinal COG function in terms of general function prediction, amino acid transport and metabolism, energy conversion and lipid metabolism increased in the EA group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). There were no significantly statistical differences between model group and sham EA group in body weight, Lee’s index, and the abundance of varied bacteria genus ($P > 0.05$). Compared to those in the model control group, the Lee’s index of rats in FMT group was reduced; the abundance of Lactobacillus enterica and Brucella increased, while the abundance of Bacteroides, Rhombus sp. and Collins were reduced; the intestinal COG function in carbohydrate transport and metabolism, amino acid transport and metabolism, energy conversion, and lipid metabolism increased, while membrane formation and intracellular transport function decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** EA can lower the body weight of obesity rats, which may be related to the increase of intestinal dominant bacteria, thereby improving the function of intestinal flora in energy conversion and lipid metabolism. Moreover, fecal microbiota enema after EA helps maintain the benign effect of EA.

Keywords obesity; electropuncture; fecal microbiota transplantation; intestinal flora

(收稿日期: 2021-08-06; 修回日期: 2022-01-26)

[编辑: 王利芬]