

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.08.015

“标本配穴”针刺法对腹泻型肠易激综合征焦虑模型大鼠焦虑样行为及肠道菌群的影响

吴帆¹, 李佳¹, 吴松¹, 唐丽娜², 周绪柳¹, 赵嘉伟¹, 陈茜³, 王华^{1✉}

1. 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, 430060; 2. 湖北中医药大学检验学院; 3. 武汉市第三医院

[摘要] 目的 探讨“标本配穴”针刺法治疗腹泻型肠易激综合征(IBS-D) 伴焦虑的可能作用机制。方法 从60只SD大鼠中随机抽取10只作空白组, 剩余50只大鼠制备IBS-D焦虑模型, 将造模成功的30只大鼠随机分为模型组、常规取穴组、标本配穴组, 每组10只。模型组不干预, 常规取穴组予“天枢”“足三里”“上巨虚”针刺干预, 标本配穴组予“内关”“足三里”“关元”针刺干预, 两组均每次针刺20 min, 每天1次, 共干预14天。各组大鼠进行Bristol粪便性状量表评分及腹壁撤退反射实验, 并进行糖水偏好实验、旷场实验、高架十字迷宫实验评价其焦虑状态, 绝对荧光定量PCR法检测肠道大肠杆菌、肠球菌、拟杆菌、乳酸杆菌、双歧杆菌、消化链球菌、芽孢杆菌7种目的菌的含量。结果 与空白组比较, 模型组大鼠Bristol粪便性状量表评分升高, 糖水偏好率降低, 大鼠在扩张压力为40、60、80 mmHg时腹壁撤退反射评分均升高, 内脏疼痛阈值降低, 旷场试验大鼠运动距离、直立次数、中央区域停留时间均减少, 高架十字迷宫实验大鼠开放臂停留时间、进入开放臂次数、总路程均显著减少($P<0.05$)。与模型组比较, 常规取穴组和标本配穴组上述各指标均显著改善($P<0.05$), 且标本配穴组在改善糖水偏好率、内脏疼痛阈值及旷场试验、高架十字迷宫实验指标方面优于常规取穴组($P<0.05$)。肠道菌群方面, 常规取穴组、标本配穴组均可降低大肠杆菌、肠球菌、拟杆菌、消化链球菌的含量, 升高乳酸杆菌、双歧杆菌、芽孢杆菌的含量, 且以标本配穴组效果更明显($P<0.05$)。结论 标本配穴针刺法能显著改善IBS-D焦虑模型大鼠粪便性状和焦虑样负性情绪, 其机制可能与调控肠道有益菌和致病菌菌群含量有关。

[关键词] 腹泻型肠易激综合征; 焦虑; 标本配穴; 针刺疗法; 肠道菌群; 身心同调

腹泻型肠易激综合征(irritable bowel syndrome with predominant diarrhea, IBS-D)是以腹痛、腹胀, 伴反复腹泻、大便性状为糊状便或水样便为主要临床特征的功能性胃肠疾病。《肠易激综合征中医诊疗专家共识意见(2017)》指出IBS-D患者存在烦躁、焦虑、抑郁等精神心理障碍^[1]。其发病机制与焦虑抑郁精神心理障碍、肠道菌群失调、内脏高敏感性增加等密切相关^[2], 它们不仅是诱发肠易激综合征的重要因素, 同时精神心理障碍与肠道病理因素会合并加重患者的身心症状^[3]。从中医学角

度, 我们认为IBS-D发病关键是心神失调、肠腑失司, 治疗应身心同调。目前, 有研究已经证实针灸可通过调节肠道菌群、降低内脏高敏感性、缓解内脏痛、改善胃肠动力, 改善IBS-D患者身心症状^[4]。另有研究采用数据挖掘技术分析针灸治疗IBS-D的常用腧穴, 结果显示使用频次排名前三位的腧穴为天枢、足三里、上巨虚^[5], 治疗多从肠腑论治。但若正气不足, 肠腑难以抵御情志因素的影响, 加重心神失调而造成肠腑通降不利。因此, 本课题组提出IBS-D治疗应固护正气, 兼顾调节心神和健运肠腑, 从腧穴配伍角度提出了“标本配穴”^[6]。前期研究证实, “标本配穴”能稳固IBS-D大鼠肠黏膜机械屏障, 优于常规选穴^[7]。本实验拟进一步观察“标本配穴”对IBS-D焦虑模型大鼠焦虑样行为和

基金项目: 国家自然科学基金(81973931); 国家中医药管理局中医药传承与创新“百千万”人才工程(岐黄工程岐黄学者)(国中医药人教函[2018]284号); 武汉市医学科研项目(WZ20Z02)

✉ 通讯作者: hwang.tcm@china.com

肠道菌群的影响, 探讨其防治 IBS-D 的可能机制。本实验经湖北中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号: HUCMS202205006)。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 SPF 级 SD 雌性大鼠 60 只, 体质量 300 ~ 350 g, 购自湖北贝恩特生物科技有限公司, 实验动物合格证号: 422023100000839, 实验动物生产许可证号: SCXK(鄂) 2021-0027。饲养于湖北中医药大学动物实验中心 SPF 级动物室, 室温 20 ~ 25 °C, 湿度 55% ~ 65%, 普通饲料适应性喂养 1 周后开始实验。

1.2 主要试剂及仪器

异氟烷(瑞沃德生命科技有限公司, 批号 20091801); 总 RNA 提取试剂盒(批号 EP013)、组织基因组提取试剂盒(批号 EP007)、EnTurbo™ 荧光定量 PCR 试剂盒(批号 EQ001)、EntiLink™ PCR 反应混合物(批号 EQ004), 科鹿生物科技有限公司; DL2000 DNA Marker(日本 TaKaRa 公司, 批号 A1701A)。

TC-XP 型 PCR 仪(杭州博日科技有限公司); StepOne™ 型实时荧光定量 PCR 仪(赛默飞世尔科技公司); SW-CJ-1FD 型超净工作台(苏净安泰空气技术有限公司); YH-OF-M/R 型旷场实验敞箱(武汉一鸿科技有限公司); XR-XG201 型高架十字迷宫(上海欣软信息科技有限公司); 0.18 mm×25 mm 一次性无菌针灸针(北京中研太和医疗器械有限公司)。

1.3 IBS-D 焦虑大鼠模型制备

以急性与慢性应激结合方法^[8]制备 IBS-D 焦虑大鼠模型。将大鼠暴露于 7 种不同的压力源: 1) 缺水 24 h; 2) 缺食 24 h; 3) 夹尾巴 1 min; 4) 43 °C 热水游泳 5 min; 5) 4 °C 冰水游泳 3 min; 6) 昼夜(12 h/12 h) 倒置; 7) 水平振动(120 r/min) 45 min。所有应激方案每天采用随机抽签法应用 2 种, 持续 4 周, 其中每连续 2 天都无重复特定的压力源。在第 28 天进行急性束缚应激, 包裹肩部、上肢前肢和胸廓 1 h。参照文献^[8]拟定模型成功标准: 以大鼠 Bristol 粪便性状评分、腹壁撤退反射评分增高, 内脏疼痛阈值、糖水偏好率降低, 旷场实验直立运动次数明显减少, 高架十字迷宫进入开放臂次数、总距离减少, 且以上指标与正常大鼠比较差异均有统计学意义视为模型制备成功。

1.4 实验分组及干预方法

采用随机数字表法从 60 只大鼠中选取 10 只作为空白组, 其余 50 只大鼠进行 IBS-D 焦虑模型制备。结果 13 只大鼠腹泻情况不明显, 7 只大鼠未有焦虑样行为改变, 剔除后用随机数字表法将造模成功的 30 只大鼠分为模型组、常规取穴组、标本配穴组, 每组各 10 只。空白组和模型组大鼠普通喂养不进行干预; 常规取穴组针刺大鼠“天枢”“足三里”“上巨虚”, 标本配穴组针刺“内关”“足三里”“关元”。针刺使用 0.18 mm×25 mm 毫针直刺, 平补平泻, 留针 20 min。每日 1 次, 共 14 天。腧穴定位参照《实验动物常用穴位名称与定位第 2 部分: 大鼠》^[9]。“足三里”: 膝关节后外侧, 腓骨小头下约 3 mm 处; “上巨虚”: 大鼠后肢“足三里”向下约 5 mm 处; “关元”: 大鼠肚脐下约 25 mm 处; “天枢”: 以胸锁联合和耻骨联合连线下 1/4 与上 3/4 交点为大鼠肚脐, 脐中旁开 5 mm; “内关”: 大鼠前肢内侧、距离腕关节 3 mm 桡尺骨缝间。

1.5 观察指标及检测方法

1.5.1 糖水偏好实验 最后 1 次针刺后当天, 每笼大鼠给予 200 ml 2% 蔗糖水溶液和纯化水各 1 瓶, 12 h 后对换一次两个瓶子位置, 24 h 后(最后一次针刺后次日)测量瓶内液体的消耗, 糖水偏好率(%) = 糖水摄入(ml) / (糖水摄入 + 纯水摄入)(ml) × 100%, 以此评价大鼠快感缺乏样行为^[10]。

1.5.2 Bristol 粪便性状量表评分 最后一次针刺后次日按照 Bristol 粪便性状 7 级评分标准^[11], 收集每组大鼠的粪便, 并进行性状评分。随后依次进行腹壁撤退反射试验、旷场实验、高架十字迷宫实验。

1.5.3 腹壁撤退反射试验 自制气囊导管插入大鼠肛门并固定在尾巴根部, 用改良血压计向气囊内缓慢加压, 依次给予 20、40、60、80 mmHg 的压力刺激^[12], 依据腹壁撤退反射评分标准^[13], 观察各组大鼠在不同压力下的行为表现并评分, 当大鼠腹部抬离操作台面或背部拱起所对应的压力值即为疼痛阈值。以上操作每次测量间隔 2 min, 重复 3 次, 取平均值。

1.5.4 旷场实验 将大鼠放入旷场箱的正中格内, 观察 5 min 内大鼠自主活动情况, 采用 SuperMaze 动物行为分析软件 3.3.0.0 分析运动距离、直立次数、中央格停留时间, 以此评价大鼠的探索行为和紧张焦虑状态^[15]。

1.5.5 高架十字迷宫实验 将大鼠从中央区面向闭合臂放入迷宫, 记录大鼠自由探索 5 min 内活动

轨迹，采用 SuperMaze 动物行为分析软件 3.3.0.0 分析大鼠开放臂内停留时间、进入开放臂次数和总路程距离以评估焦虑程度^[15]。

1.5.6 绝对荧光定量 PCR 法检测肠道目标菌含量 各组大鼠上述检测结束后，吸入浓度为 1.5% 异氟烷麻醉，打开腹腔，取回肠末端 2 cm 的肠段，放 PBS 缓冲液中清洗干净，使用试剂盒完成 DNA 提取。以回肠组织 DNA 为模板，用试剂盒进行 qPCR 检测，将得到的 Ct 值代入绘制好的标准曲线，计算对应样本目的菌（包括大肠杆菌、肠球菌、拟杆菌、乳酸杆菌、双歧杆菌、消化链球菌、芽孢杆菌 7 种）的含量。扩增引物由武汉恒意赛生物科技有限公司合成，序列详见表 1。qPCR 反应条件：95℃ 3min，95℃ 10s→58℃ 30s→72℃ 30s，循环 40 次。

表 1 大鼠 7 类肠道微生物菌引物序列表
Table 1 List of primers and sequences of 7 intestinal microbial bacteria

引物名称	碱基序列 (5'-3')	产物 长度/bp
大肠杆菌	上游 GTTAATACCTTTGCTCATTTG	340
	下游 ACCAGGTATCTAATCCTGTT	
肠球菌	上游 CCCTTATTGTTAGTTGCCATCAT	144
	下游 ACTCGTTGTAATTCCTATTTG	
拟杆菌	上游 CTGAACCAGCCAAGTAGCG	227
	下游 CCGCAAACCTTCACAAGTACTTA	
乳酸杆菌	上游 GCAGTAGGGAATCTTCC	341
	下游 CACCGCTACACATGGA	
双歧杆菌	上游 TCGCGTCCGGTGTGAAAG	242
	下游 CACATCCAGCATCCAC	
消化链球菌	上游 AACTCCGGTGGTATCAGATG	269
	下游 GGGGCTTCTGACTCAGGTA	
芽孢杆菌	上游 CGTGGGTAACCTGCCTGTAAG	233
	下游 GTAGGAGTCTGGGCCGTGTCT	

1.6 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行数据统计分析，本研

究数据均符合正态分布，用均值±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示，用单因素方差分析进行多组间比较，两两比较用 LSD 检验。以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义，用 GraphPad Prism 9.0 软件绘制统计图。

2 结果

2.1 各组大鼠 Bristol 粪便性状量表评分及糖水偏好率比较

表 2 示，与空白组比较，其余各组大鼠 Bristol 粪便性状量表评分升高，糖水偏好率降低 ($P<0.05$)。与模型组比较，常规取穴组和标本配穴组 Bristol 粪便性状量表评分均降低，糖水偏好率升高 ($P<0.05$)。常规取穴组与标本配穴组比较，Bristol 粪便性状量表评分差异无统计学意义 ($P>0.05$)，标本配穴组糖水偏好率高于常规取穴组 ($P<0.05$)。

表 2 各组大鼠 Bristol 粪便性状评分及糖水偏好率比较
Table 2 Comparison of bristol stool form scale score and sucrose preference percentage in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Bristol 粪便性状 量表评分/分	糖水偏好率/%
空白组	10	4.20±0.63	89.81±2.21
模型组	10	6.40±0.52 ^{a)}	45.30±7.79 ^{a)}
常规取穴组	10	5.30±0.68 ^{a) b)}	66.68±5.95 ^{a) b)}
标本配穴组	10	4.90±0.74 ^{a) b)}	78.17±3.95 ^{a) b) c)}

注：a) 与空白组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与常规取穴组比较， $P<0.05$ 。

2.2 各组大鼠腹壁撤退反射试验结果比较

表 3 示，在扩张压力为 20 mmHg 时，各组大鼠之间腹壁撤退反射评分差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与空白组比较，其余各组大鼠在扩张压力为 40、60、80 mmHg 时腹壁撤退反射评分均升高，内脏疼痛阈值降低 ($P<0.05$)。与模型组比较，常规取穴组和标本配穴组大鼠在扩张压力为 40、60、80 mmHg 时腹壁撤退反射评分均降低，内脏疼痛阈值升高 ($P<0.05$)。与常规取穴组比较，标本配穴组在扩张压力为 40 mmHg 时腹壁撤退反射

表 3 各组大鼠腹壁撤退反射评分及内脏疼痛阈值比较

Table 3 Comparison of abdominal withdrawal reflex score and visceral pain threshold in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	腹壁撤退反射评分/分				内脏疼痛阈值/mmHg
		20 mmHg	40 mmHg	60 mmHg	80 mmHg	
空白组	10	0.60±0.26	1.07±0.31	1.43±0.42	1.93±0.41	102.60±4.99
模型组	10	1.20±0.55	3.07±0.63 ^{a)}	3.60±0.41 ^{a)}	3.93±0.14 ^{a)}	44.80±4.64 ^{a)}
常规取穴组	10	0.93±0.54	2.13±0.59 ^{a) b)}	2.77±0.50 ^{a) b)}	3.30±0.25 ^{a) b)}	68.40±9.03 ^{a) b)}
标本配穴组	10	0.83±0.48	1.70±0.48 ^{a) b)}	2.20±0.50 ^{a) b) c)}	2.57±0.65 ^{a) b) c)}	82.80±4.83 ^{a) b) c)}

注：a) 与空白组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与常规取穴组比较， $P<0.05$ 。

评分差异无统计学意义 ($P>0.05$), 在扩张压力为 60 和 80 mmHg 时腹壁撤退反射评分均降低, 内脏疼痛阈值升高 ($P<0.05$)。

2.3 各组大鼠旷场实验结果比较

图 1 示, 空白组大鼠的运动轨迹自由且总路程长, 模型组大鼠的运动轨迹多在外围且总路程短; 常规取穴组、标本配穴组大鼠较模型组运动轨迹范围更广且总路程增加, 标本配穴组比常规取穴组大鼠更活跃, 运动轨迹更多。表 4 示, 与空白组比较, 其余各组大鼠运动距离、直立次数、中央区域停留时间均减少 ($P<0.05$)。与模型组比较, 常规取穴组、标本配穴组大鼠的运动距离、直立次数和中央区域停留时间均增加 ($P<0.05$)。与常规取穴组比较, 标本配穴组大鼠的运动距离、直立次数和中央区域停留时间增加 ($P<0.05$)。

2.4 各组大鼠高架十字迷宫结果比较

图 2 示, 空白组大鼠进入开放臂和封闭臂次数

多, 状态活跃且总运动路程长; 模型组大鼠只在封闭臂停留徘徊, 总运动路程短; 常规取穴组、标本配穴组大鼠较模型组大鼠进入开放臂停留时间与次数增多、总路程增加, 且标本配穴组大鼠活动更明显。表 5 示, 与空白组比较, 其余各组大鼠开放臂停留时间、进入开放臂次数、总路程显著减少 ($P<0.05$)。与模型组比较, 常规取穴组、标本配穴组开放臂停留时间、进入开放臂次数、总路程明显增加 ($P<0.05$)。与常规取穴组比较, 标本配穴组开放臂停留时间、进入开放臂次数、总路程增加 ($P<0.05$)。

2.5 各组大鼠肠道目的菌含量变化比较

图 3 示, 大肠杆菌、肠球菌、拟杆菌、乳酸杆菌、双歧杆菌、消化链球菌、芽孢杆菌引物扩增产物在琼脂糖凝胶电泳后得到的凝胶成像, 可以看出, 此引物条带的引物特异性好, 扩增产物单一且与理论值相符。图 4、表 6 示, 与空白组比较, 模

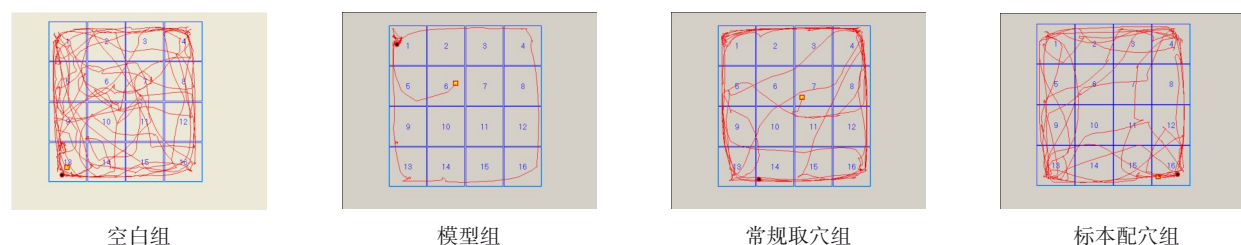


图 1 各组大鼠旷场实验代表性运动轨迹

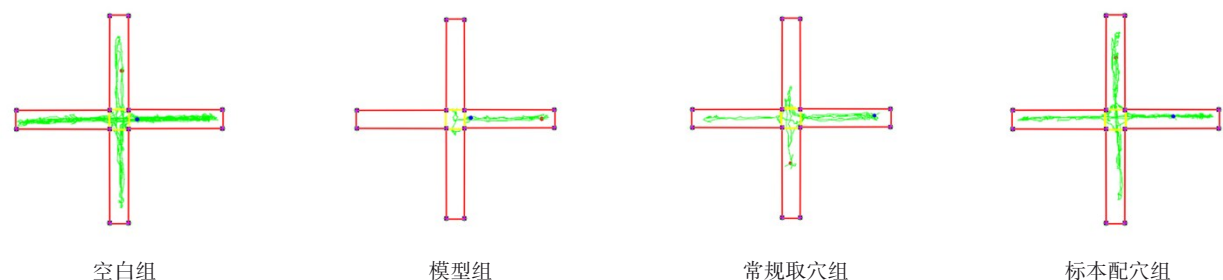
Figure 1 Representative tracksheets of open field test in each group

表 4 各组大鼠旷场实验中运动距离、直立次数和中央区域停留时间比较

Table 4 Comparison of the distance of locomotion, number of uprights, and dwell time in the central area in the open field test in each group

组别	鼠数	运动距离/cm	直立次数/次	中央区域停留时间/s
空白组	10	2563.40±173.89	31.30±2.31	32.67±1.39
模型组	10	1310.90±142.13 ^{a)}	11.30±1.49 ^{a)}	7.47±1.11 ^{a)}
常规取穴组	10	1745.10±140.01 ^{a) b)}	19.50±1.08 ^{a) b)}	16.78±1.21 ^{a) b)}
标本配穴组	10	2035.20±124.29 ^{a) b) c)}	24.40±1.43 ^{a) b) c)}	24.15±1.21 ^{a) b) c)}

注: a) 与空白组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与常规取穴组比较, $P<0.05$ 。



注: 横向为封闭臂, 纵向为开放臂。

图 2 各组大鼠高架十字迷宫代表性运动轨迹

Figure 2 Representative tracksheets of elevated plus maze test in each group

表5 各组大鼠高架十字迷宫中开放臂停留时间、进入开放臂次数、总路程比较

Table 5 Comparison of the dwell time in the open arm, number of times into the open arm, and total distance in the elevated plus maze in each group ($\bar{x}\pm s$)				
组别	鼠数	开放臂停留时间/s	进入开放臂次数/次	总路程/cm
空白组	10	51.42±13.87	5.70±1.89	8809.39±488.96
模型组	10	3.58±3.40 ^{a)}	0.90±0.57 ^{a)}	1215.35±103.17 ^{a)}
常规取穴组	10	16.35±2.52 ^{a) b)}	2.30±0.67 ^{a) b)}	3451.45±250.97 ^{a) b)}
标本配穴组	10	28.21±4.11 ^{a) b) c)}	3.90±1.37 ^{a) b) c)}	6451.74±483.06 ^{a) b) c)}

注：a) 与空白组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与常规取穴组比较， $P<0.05$ 。

型组大鼠大肠杆菌、肠球菌、拟杆菌、消化链球菌的含量增加，乳酸杆菌、双歧杆菌、芽孢杆菌的含量减少 ($P<0.05$)。与模型组比较，常规取穴组、标本配穴组大鼠大肠杆菌、肠球菌、拟杆菌、消化链球菌的含量减少，乳酸杆菌、双歧杆菌、芽孢杆菌的含量增多 ($P<0.05$)。与常规取穴组比较，标本配穴组大鼠大肠杆菌、肠球菌、拟杆菌、消化链球菌的含量减少，乳酸杆菌、双歧杆菌、芽孢杆菌的含量增多 ($P<0.05$)。

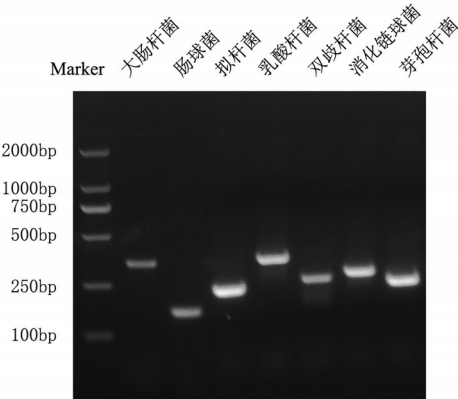
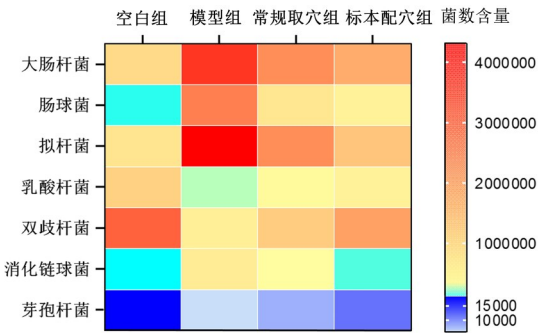


图3 大鼠7种肠道菌群PCR扩增产物凝胶电泳图

Figure 3 Gel electrophoresis of PCR amplification products of 7 target intestinal bacteria



注：不同菌的含量对应不同的颜色区间，红色代表菌数含量高，蓝色代表菌数含量低。

图4 各组大鼠肠道7种目的菌含量分布比较

Figure 4 Comparison of the content distribution of 7 target intestinal bacteria in each group

3 讨论

IBS-D 是一种以精神心理障碍为主的功能性胃肠病，属中医学“肠郁”^[16]范畴。常规取穴治疗多以疏导肠腑为主，虽能改善腹痛、腹胀及排便异常等症状，但在如何进行腧穴配伍以整体改善患者焦虑抑郁等精神心理异常方面存在一定的欠缺。我们依据针灸“治病求本”思想和标本理论，在临床中采用“标本配穴”针法从身心论治该病取得一定效果^[6]。选取祛除邪气的腧穴为“标穴”，疏导经气

表6 各组大鼠肠道7种目的菌含量比较

Table 6 Comparison of the contents of 7 target intestinal bacteria in each group					(copies·μl ⁻¹ , $\bar{x}\pm s$)								
组别	鼠数	大肠杆菌			肠球菌			拟杆菌			乳酸杆菌		
空白组	10	845	117.84±103	973.71	122	869.41±29	843.57	685	688.52±104	305.38	987	736.24±59	720.67
模型组	10	3 282	113.11±384	632.17 ^{a)}	2 613	846.67±287	095.33 ^{a)}	4 621	483.01±569	085.49 ^{a)}	167	480.68±65	231.59 ^{a)}
常规取穴组	10	2 168	101.74±83	329.40 ^{a) b)}	1 379	549.13±238	350.06 ^{a) b)}	2 642	294.00±91	649.50 ^{a) b)}	316	199.19±49	630.51 ^{a) b)}
标本配穴组	10	1 562	397.57±162	661.74 ^{a) b) c)}	642	989.90±11	398.34 ^{a) b) c)}	1 648	331.49±19	008.95 ^{a) b) c)}	475	581.52±37	369.72 ^{a) b) c)}
组别	鼠数	双歧杆菌			消化链球菌			芽孢杆菌					
空白组	10	2 887	704.71±584	635.19	70	611.90±584	6.81	22	597.80±139	5.07			
模型组	10	330	414.94±36	674.89 ^{a)}	527	117.19±67	145.31 ^{a)}	4035	04±513	0.01 ^{a)}			
常规取穴组	10	1 113	637.61±46	618.15 ^{a) b)}	287	599.28±40	382.75 ^{a) b)}	9493	35±996	6.62 ^{a) b)}			
标本配穴组	10	1 948	636.46±83	303.94 ^{a) b) c)}	177	184.73±10	825.00 ^{a) b) c)}	14 986	30±3355	5.52 ^{a) b) c)}			

注：a) 与空白组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与常规取穴组比较， $P<0.05$ 。

以利导邪气排除;选取固护先天之气(元气)和后天之气(胃气)的“本穴”,调动机体正气以增强抗邪能力^[17]。本研究中,标穴即内关穴,以调节心神为主,疏导经气调理肠腑功能为辅。本穴即足三里和关元。关元为小肠募穴,擅治腹泻,同时扶助先天之本;足三里是胃经之合穴与胃腑之下合穴,主治腹泻等胃肠疾患,同时固护后天之本。三穴配伍标本兼治,共奏调心神、固肠腑之效。

糖水偏好实验、旷场实验、高架十字迷宫实验是已被广泛用于研究动物精神领域衡量焦虑障碍及其相关情绪变化的有效行为学测试方法。本研究表明,模型组大鼠 Bristol 粪便性状评分升高,内脏疼痛阈值和糖水偏好率降低,旷场实验中运动距离、直立次数、中央区域停留时间均减少,高架十字迷宫实验中开放臂停留时间、进入开放臂次数、总路程显著减少,说明大鼠不仅有腹泻、腹痛、腹胀等症及内脏高敏感性,还存在快感缺失、焦虑样行为改变。运用常规取穴和标本配穴针刺方法治疗均能改善模型大鼠腹泻、腹痛症状及降低内脏高敏感性,但标本配穴能更好地减轻焦虑样负性情绪,改善腹痛、腹泻症状,整体防治 IBS-D 效果优于常规取穴。

肠道微生物的改变与 IBS-D 患者心理焦虑具有高度相关性,IBS-D 患者常出现精神紧张、焦虑甚至抑郁,使自身肠道抵御能力下降,故致病菌与有害菌更易入侵或加剧繁殖,有益菌减少,菌群失调,进一步加重病情^[18]。研究证实,IBS-D 患者普遍存在肠道菌群失调,表现为致病菌数量(如大肠杆菌、肠球菌等)增加,优势菌群(如双歧杆菌、乳酸杆菌)等减少,菌群多样性降低,引起肠道免疫力降低^[19]。同时,拟杆菌、消化链球菌作为条件致病菌,大量增多会加速肠内过度发酵,增加肠道产气,与 IBS-D 患者的腹痛、腹部不适和腹胀的严重程度密切相关^[20-21]。芽孢杆菌可拮抗肠道内有害菌,增强机体免疫力,增强肠道屏障功能^[22]。因此,本研究检测了 IBS-D 患者肠道微生物群落中的 7 类菌:大肠杆菌、肠球菌、拟杆菌、乳酸杆菌、双歧杆菌、消化链球菌、芽孢杆菌。本实验观察到 IBS-D 焦虑模型大鼠存在肠道菌群失衡;常规取穴组和标本配穴组都能减少大肠杆菌、肠球菌、拟杆菌、消化链球菌的含量,增加乳酸杆菌、双歧杆菌、芽孢杆菌的含量,且以标本配穴组效果更佳。推测标本配穴可能通过缓解 IBS-D 大鼠的焦虑状态,更好地调节肠道有益菌和致病菌的表达。

综上,标本配穴针刺法较常规取穴治疗 IBS-D

疗效更好,可能与其能更好地调节负面情绪、改善焦虑样行为、维护肠道菌群的平衡有关。但本实验只从行为学与肠道菌群的角度探讨了部分机制,今后将结合代谢组学和蛋白质组学进一步阐明标本配穴针刺法的作用机制,以提供更强有力的实验证据。

参考文献

- [1] 中华中医药学会脾胃病分会,首都医科大学附属北京中医医院消化中心,中国中医科学院望京医院. 肠易激综合征中医诊疗专家共识意见(2017)[J]. 中医杂志, 2017,58(18):1614-1620.
- [2] 中华医学会消化病学分会胃肠功能性疾病协作组,中华医学会消化病学分会胃肠动力学组. 2020 年中国肠易激综合征专家共识意见[J]. 中华消化杂志, 2020,40(12):803-818.
- [3] LIN H, GUO Q, WEN Z, et al. The multiple effects of fecal microbiota transplantation on diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (IBS-D) patients with anxiety and depression behaviors [J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20(1):233.
- [4] 孙慧,毕宇峰,纪昌春,等. 腹泻型肠易激综合征脑-肠互动及针灸干预[J]. 辽宁中医药大学学报, 2022, 24(8):49-52.
- [5] 张艳洁,杨丹,陈祥林,等. 基于数据挖掘的针灸治疗腹泻型肠易激综合征的取穴规律研究[J]. 时珍国医国药, 2020,31(4):990-993.
- [6] 吴帆,王华,吴松,等. 王华教授运用“标本配穴”针灸法治疗肠腑病证经验[J]. 时珍国医国药, 2021,32(3):729-731.
- [7] 吴帆,唐丽娜,王华,等. 标本配穴针灸对 IBS-D 大鼠肠黏膜机械屏障的影响[J]. 时珍国医国药, 2022,33(3):756-760.
- [8] SHAN L, FEI G, FANG X, et al. Changes in enteric neurons of small intestine in a rat model of irritable bowel syndrome with diarrhea [J]. J Neurogastroenterol Motil, 2016, 22(2):310-320.
- [9] 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位第 2 部分:大鼠[J]. 针刺研究, 2021,46(4):351-352.
- [10] LIU MY, YIN CY, ZHU LJ, et al. Sucrose preference test for measurement of stress induced anhedonia in mice [J]. Nature Protocols, 2018,13(7):1686-1698.
- [11] LEWIS SJ, HEATON KW. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time [J]. Scand J Gastroenterol, 1997,32(9):920-924.
- [12] 陈颖,赵妍,罗丹妮,等. 腹壁撤退反射实验测量方法概述[J]. 中国比较医学杂志, 2017,27(8):89-93.
- [13] AL-CHAER ED, KAWASAKI M, PASRICHA PJ. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult

- rats induced by colon irritation during postnatal development[J]. *Gastroenterology*, 2000, 119(5): 1276-1285.
- [14] KUNISHI H, ICHISAKA S, YAMAMOTO M, et al. Early deprivation increases high-leaning behavior, a novel anxiety-like behavior, in the open field test in rats[J]. *Neurosci Res*, 2017, 123(10): 27-35.
- [15] 赵丹, 王少贤, 梁文杰, 等. 慢性应激模型大鼠体重、摄食变化与粪便代谢物的相关性研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(7): 1302-1309.
- [16] 国家技术监督局. 中国临床诊疗术语: 疾病部分[S]. 北京: 中国标准出版社, 1997: 12.
- [17] 陈茜, 梁凤霞, 吴松, 等. 标本配穴的理论探讨与临床应用[J]. *中国针灸*, 2018, 38(5): 505-509.
- [18] LIU T, GU X, LI LX, et al. Microbial and metabolomic profiles in correlation with depression and anxiety comorbidities in diarrhoea-predominant IBS patients [J]. *BMC Microbiol*, 2020, 20(1): 168.
- [19] CANAKIS A, HAROON M, WEBER HC. Irritable bowel syndrome and gut microbiota [J]. *Curr Opin Innodorinol Diabetes Obes*, 2020, 27(1): 28-35.
- [20] ZHU X, HONG G, LI Y, et al. Understanding of the site-specific microbial patterns towards accurate identification for patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. *Microbiol Spectr*, 2021, 9(3): e0125521.
- [21] HONG G, LI Y, YANG M, et al. Baseline gut microbial profiles are associated with the efficacy of *Bacillus subtilis* and *Enterococcus faecium* in IBS-D [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2022; 1-10. doi: 10.1080/00365521.2022. 2136013.
- [22] RHAYAT L, MARESCA M, NICOLETTI C, et al. Effect of *Bacillus subtilis* strains on intestinal barrier function and inflammatory response[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 564. doi: 10.3389/fimmu.2019.00564.

Effect of Biaoben (标本) Acupoints Combination Needling on Anxiety-like behavior and Gut flora in Model Rats of Irritable Bowel Syndrome with Predominant Diarrhea and Anxiety

WU Fan¹, LI Jia¹, WU Song¹, TANG Lina², ZHOU Xuli¹, ZHAO Jiawei¹, CHEN Qian³, WANG Hua¹

1. College of Acupuncture and Orthopedics, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan, 430060; 2. School of Laboratory Medicine, Hubei University of Chinese Medicine; 3. Wuhan Third Hospital

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of Biaoben (标本) acupoints combination needling in the treatment of irritable bowel syndrome with predominant diarrhea (IBS-D) with anxiety. **Methods** Ten rats were randomly selected from 60 SD rats as blank group and the remaining rats were prepared with the IBS-D and anxiety model. The successful modeling rats were randomly divided into model group, routine acupoints needling group and Biaoben acupoints combination needling group, with 10 rats in each group. The model group was left untreated. In the routine acupoints needling group, “Tianshu (ST25)”, “Zusanli (ST36)” and “Shangjuxu (ST37)” were selected, while in the Biaoben acupoints combination needling group, “Neiguan (PC6)”, “Zusanli (ST36)”, and “Guanyuan (CV4)” were used. Both groups received acupuncture for 20 minutes each time, once a day for 14 days. Bristol stool form scale (BSFS) and abdominal withdrawal reflex were assessed. Anxiety was evaluated by sucrose preference test, open field test, and elevated plus maze test. The absolute fluorescence quantitative PCR method was used to detect *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*, and *Bacillus* contents. **Results** Compared to those in the blank group, the model group had higher BSFS score, lower sucrose preference percentage, increased abdominal withdrawal reflex score at the diastolic pressure of 40, 60, and 80 mmHg, decreased visceral pain threshold, reduced distance of locomotion, number of uprights, and dwell time in the central area in the open field test, as well as the dwell time in the open arm, number of times into the open arm, and total distance in the elevated plus maze ($P < 0.05$). Compared to those in the model group, the above-mentioned outcomes were significantly improved in both needling groups ($P < 0.05$), and more improvements were found in the Biaoben acupoints combination needling group in terms of the sucrose preference percentage, visceral pain threshold, open field test and elevated plus maze indicators ($P < 0.05$). Regarding the gut flora, both needling groups could decrease the content of *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, and *Peptostreptococcus*, and increase the content of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Bacillus*, with more improvements in the Biaoben acupoints combination needling group ($P < 0.05$). **Conclusion** The Biaoben acupoints combination needling is effective in improving the stool properties and relieving the anxiety-like negative emotions of IBS-D rats with anxiety, and the mechanism may be related to the regulation of the number of intestinal beneficial and pathogenic bacteria.

Keywords irritable bowel syndrome with predominant diarrhea; anxiety; Biaoben (标本) acupoints combination; acupuncture; gut flora; regulate the body and the mind simultaneously

(收稿日期: 2022-08-29; 修回日期: 2022-11-24)

[编辑: 邓媛]