



针刺研究
Acupuncture Research
ISSN 1000-0607, CN 11-2274/R

《针刺研究》网络首发论文

题目： 针刺对腹泻型肠易激综合征大鼠脑肠肽及相关炎性因子表达的影响
作者： 朱洲，杨孝芳，喻华梅，陈盼碧，金灵敏，李娅，韩丹，尚雪梅
DOI： 10.13702/j.1000-0607.20221401
网络首发日期： 2023-09-21
引用格式： 朱洲，杨孝芳，喻华梅，陈盼碧，金灵敏，李娅，韩丹，尚雪梅. 针刺对腹泻型肠易激综合征大鼠脑肠肽及相关炎性因子表达的影响[J/OL]. 针刺研究. <https://doi.org/10.13702/j.1000-0607.20221401>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

针刺对腹泻型肠易激综合征大鼠脑肠肽及相关炎性因子表达的影响

朱洲, 杨孝芳, 喻华梅, 陈盼碧, 金灵敏, 李娅, 韩丹, 尚雪梅
(贵州中医药大学针灸推拿学院, 贵阳 550025)

【摘要】目的：观察针刺对腹泻型肠易激综合征（IBS-D）大鼠脑肠肽及相关炎性因子表达的影响，探讨针刺治疗 IBS-D 的作用机制。**方法：**雄性 Wistar 大鼠随机分为空白组、模型组、药物组和针刺组，每组 8 只。除正常组外，其余各组采用“冰醋酸灌肠+束缚应激”方式建立 IBS-D 大鼠模型，共 14 d。造模成功后药物组予匹维溴铵（15 mg/kg）灌胃，1 次/d；针刺组予针刺“百会”及双侧“天枢”“上巨虚”“足三里”“太冲”，20 min/d，两组均连续治疗 14 d。观察各组大鼠一般状态，测定大鼠体质量，旷场实验测定大鼠横向运动行走距离、纵向运动直立次数和粪便粒数，甲苯胺蓝染色法观察大鼠结肠组织肥大细胞（MC）并计数，ELISA 法检测血清肿瘤坏死因子- α （TNF- α ）、白细胞介素（IL）-10 含量，实时荧光定量 PCR 法检测下丘脑、结肠组织降钙素基因相关肽（CGRP）mRNA 表达；Western blot 法检测下丘脑、结肠组织促肾上腺皮质激素释放因子（CRF）蛋白表达。**结果：**与空白组比较，IBS-D 模型组大鼠体质量，旷场实验行走距离及直立次数，血清 IL-10 含量均显著降低（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），粪便粒数显著增加（ $P<0.05$ ），结肠组织 MC 数量，血清 TNF- α 含量，下丘脑、结肠组织 CGRP mRNA、CRF 蛋白表达显著升高（ $P<0.01$ ）。与模型组比较，药物组、针刺组大鼠体质量，旷场实验行走距离及直立次数，血清 IL-10 含量显著升高（ $P<0.01$ ， $P<0.05$ ）、粪便粒数显著减少（ $P<0.05$ ），结肠组织 MC 数量，血清 TNF- α 含量，下丘脑、结肠组织中 CGRP mRNA 表达水平显著降低（ $P<0.01$ ）；同时针刺组下丘脑、结肠组织 CRF 蛋白表达水平显著降低（ $P<0.01$ ， $P<0.05$ ）。以上指标药物组和针刺组两组间比较差异无统计学意义。**结论：**针刺可改善 IBS-D 大鼠一般状态及情绪状态、炎性反应及相关脑肠肽表达，减轻 IBS-D 症状，其机制可能与通过调控脑肠肽进而影响炎性因子水平有关。

【关键词】腹泻型肠易激综合征；针刺；脑肠肽；炎性反应；肥大细胞

【中图分类号】R246.1 【文献标志码】A 【DOI】10.13702/j.1000-0607.20221401

Effect of acupuncture on the expression of neuropeptides and related inflammatory factors in rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome

ZHU Zhou, YANG Xiao-fang, YU Hua-mei, CHEN Pan-bi, JIN Ling-min, LI Ya, HAN Dan, SHANG Xue-mei
(Acupuncture-moxibustion and Tuina College, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

【Abstract】 Objective To observe the effect of acupuncture on the expression of neuropeptides and related inflammatory factors in rats with diarrhea-predominant

项目来源：贵阳医学院 2017 年度学术新苗培养及创新探索专项项目（No.黔科合平台人才[2017]5735 号-35）

第一作者：朱洲，研究生在读，研究方向：针灸治疗心脑血管系统疾病。

通讯作者：尚雪梅，讲师，研究方向：针灸治疗老年性疾病。

irritable bowel syndrome(IBS-D), so as to explore the mechanism of acupuncture in the treatment for IBS-D.

Methods Male Wistar rats were randomly divided into blank group, model group, medication group, and acupuncture group, with 8 rats in each group. Except for the normal group, the other groups were subjected to 14-day "acetic acid enema + restraint stress" to establish the IBS-D rat model. After the successful modeling, the medication group received a gavage of pinaverium bromide(15 mg/kg) once a day, and the acupuncture group received acupuncture at "Baihui"(GV20) and bilateral "Tianshu"(ST25) "Shangjuxu"(ST37) "Zusanli"(ST36) and "Taichong"(LR3) for 20 min every day, both groups were treated continuously for 14 days. The general state of the rats in each group was observed, and the body weight of the rats was measured. The open-field experiment was conducted to measure the horizontal and vertical movements, and the number of fecal pellets of rats. Toluidine blue staining was used to observe and count the mast cells(MCs) in the colon tissue of rats. ELISA was used to detect the serum contents of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin(IL)-10. Real-time fluorescence quantitative PCR was performed to detect the mRNA expression of calcitonin gene-related peptide(CGRP) in the hypothalamus and colon tissue. Western blot was used to detect the protein expression of corticotropin-releasing factor(CRF) in the hypothalamus and colon tissue.

Results Compared with the blank group, the model group showed significantly decreased body weight, decreased walking distance and upright times in open field experiment, decreased serum IL-10 contents($P<0.05$, $P<0.01$), increased fecal pellet count($P<0.05$), increased MC count in the colon tissue, serum TNF- α contents, and CGRP mRNA expression and CRF protein expression in the hypothalamus and colon tissue($P<0.01$). Compared with the model group, the medication and acupuncture groups showed significantly increased body weight, walking distance and upright times in the open-field experiment, and serum IL-10 contents($P<0.01$, $P<0.05$), significantly decreased fecal pellet count($P<0.05$), significantly decreased MC count in the colon tissue, serum TNF- α contents, and CGRP mRNA expression in the hypothalamus and colon tissues($P<0.01$); at the same time, the acupuncture group showed significantly decreased CRF protein expression in the hypothalamus and colon tissue($P<0.01$, $P<0.05$). There was no significant difference in the above indicators between the medication group and the acupuncture group.

Conclusion Acupuncture can improve the general and emotional state, inflammatory response, and neuropeptide expression in rats with IBS-D, alleviate the symptoms of IBS-D, and its mechanism may be related to the regulation of neuropeptides and inflammatory factor levels.

【Keywords】 Diarrhea-predominant irritable bowel syndrome; Acupuncture; Neuropeptide; Inflammatory response; Mast cell

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种慢性胃肠道疾病,以肠道习惯改变及腹痛、腹胀等为特征^[1-2]。流行病学调查^[3-4]显示,IBS全球患病率约为9%~20%,在我

国 IBS 发病率约占 7%~11%，其中临床以腹泻型肠易激综合征（IBS-D）最为常见，占全部 IBS 的 74%。目前，IBS-D 发病机制暂不明确，多认为与脑-肠轴、肠道低度炎性反应、内脏高敏感、肠道菌群及胃肠动力异常等有关^[5]，其中脑-肠轴在 IBS-D 发生发展中具有重要作用。脑肠肽是存在于脑-肠轴中具有神经递质和胃肠激素双重作用的小分子多肽，介导脑-肠轴功能的发挥^[6]。促肾上腺皮质激素释放因子（corticotropin releasing factor, CRF）作为一种关键脑肠肽，在 IBS-D 中具有重要作用。研究证实，应激反应能促进大鼠下丘脑神经元释放 CRF，从而刺激肥大细胞（mast cell, MC）活化^[7]，导致大量促炎因子释放，进一步加剧肠道症状致使疾病迁延难愈^[8]。针刺作为中医学中一种特色疗法，因其疗效好、不良反应少等优势，在 IBS-D 的治疗中被广泛应用^[9]。本实验通过观察针刺对 IBS-D 大鼠下丘脑、结肠组织中脑肠肽表达及血清相关炎性因子的影响，探讨其治疗 IBS-D 作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

SPF 级健康 Wistar 雄性大鼠 30 只，体质量（300±50）g，购自长沙市天勤生物技术有限公司[生产许可证号：SCXK（湘）2019-0013]。饲养于贵州中医药大学中心动物实验室，饲养温度（20±2）℃，湿度（60±5）%，光/暗周期为 12 h/12 h，定期更换垫料，保持环境干燥通风，自由饮水和摄食。大鼠适应性喂养 7 d 后，根据随机数字表抽取 6 只大鼠为空白组，其余 24 只进行造模。实验过程中，模型复制失败（1 只）和死亡大鼠（4 只）不纳入实验，剩余大鼠取 18 只随机分为模型组、药物组及针刺组，每组 6 只。对动物的处理符合科技部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》相关规定并通过了贵州中医药大学动物实验伦理审查（批号：20220068）。

1.2 主要试剂与仪器

冰醋酸（20220402，成都金山），匹维溴铵（法国苏威），苏木精染液（CR2109146）、伊红染液（CR2011064），甲苯胺蓝（CR2104004）均购自武汉赛维尔，肿瘤坏死因子-α（TNF-α）ELISA 试剂盒（ZC-37624）、白细胞介素（IL）-10 ELISA 试剂盒（ZC-36379）均购自上海茁彩，RNA Trizol Reagent（BM1144，合肥博美），RIPA 裂解液（G2002-100ML，塞尔维亚 Servicebio），BCA 蛋白浓度测定试剂盒（P0009，上海碧云天），ECL 化学发光试剂盒（17046，美国 Zen-bio），PAGE 凝胶快速制备试剂盒（PG112，上海雅酶），兔抗大鼠 CRF 抗体（A1122，武汉 Abclonal），PCR 引物（上海生工）。

0.25 mm×0.25 mm 毫针（苏州医疗用品厂有限公司），旷场实验箱（XR-XZ301，上海欣软），电子天平（PPT-A+100，美国康州 HZ），徕卡-2016 转轮式切片机（德国徕卡），RS36 型全自动染色机（常州派斯杰），Pannoramic250 数字切片扫描仪（匈牙利 3DHISTECH），C2500 低温离心机（湖南湘仪），SpectraMAX Plus384 酶标仪（上海美谷），KZ-III-F 高速低温组织研磨仪（武汉赛维尔），QuantStudio TM3 实时荧光定量 PCR 仪（美国 ThermoFisher），JY200C 电泳仪（北京君意东方），TY-80A 水平脱色摇床（江苏科析），5200 化学发光凝胶成像仪（上海天能），Image J 软件（美国 NIH）。

1.3 造模方法

参照章海凤等^[10]的方法进行“冰醋酸+束缚应激”IBS-D 模型动物制备：首日将 4%的冰醋酸溶液按 0.2 mL 体积灌肠，每隔 2 d 增加 0.1 mL，直至剂量为 0.5 mL 不再增加。每日灌肠后，立即进行束缚刺激，每天一次，每次 2 h，持续 14 d。以大鼠出现静卧少动、肛周污秽等一般症状，以及体质量，旷场实验中横向运动行走距离、纵向运动直立次数较空白组降低，粪便粒数较空白组增加为造模成功^[11-12]的标准。

1.4 干预方法

空白组、模型组：予固定但不进行干预。

药物组：根据人与动物体表面积计算，将浓度为 1.5 mg/mL 的匹维溴铵以 15 mg/kg 的

剂量灌胃给药^[13]，1次/d，连续治疗14d。

针刺组：予针刺“百会”及双侧“天枢”“上巨虚”“足三里”及“太冲”，取穴定位参照《实验动物常用穴位名称与定位 第2部分：大鼠》^[14]。在实验第15天时，将大鼠固定于自制固定器上，穴位常规消毒，除“百会”平刺进针外，其余穴位均直刺进针，进针深度为3~5mm，1次/d，每次20min，连续治疗14d。

1.5 观察指标及检测方法

取材：末次干预结束后，将大鼠禁食不禁水24h后，予20%乌拉坦麻醉大鼠，腹主动脉取血，静置后4℃ 3000 r/min离心，离心半径为10cm，取血清放入-80℃冰箱冻存。沿远端结肠系膜分离出整段结肠，取距肛门约8cm处的结肠组织，一部分使用4%多聚甲醛固定，用于HE及甲苯胺蓝染色；另一部分液氮速冻后，于-80℃冻存。将大鼠大脑放置于冰台上分离出大鼠下丘脑，一部分使用4%多聚甲醛固定，另一部分液氮速冻后于-80℃冻存。

观察大鼠一般状态：每日观察大鼠的食量、饮水量，精神状态，皮毛色泽，活动度，粪便性状，肛周污秽程度及有无其他异常症状等情况，同时记录大鼠体质量。

旷场实验检测大鼠行为学：分别于造模前、造模及干预后进行大鼠行为学评定。实验开始前将大鼠放置于50cm×50cm×50cm的旷场箱实验环境中适应30min后开始实验，每次将一只大鼠放置旷场实验箱中心位置，利用摄像机记录大鼠行为，运用ANY-MAZE软件分析5min内大鼠横向运动行走距离、纵向运动直立次数及粪便粒数。每只大鼠实验后，用75%乙醇溶液擦拭旷场实验箱，避免大鼠残留气味影响实验结果。

苏木精-伊红（HE）染色法观察大鼠下丘脑及结肠组织病理形态：取固定的大鼠结肠和下丘脑组织经乙醇梯度脱水，二甲苯透明，石蜡包埋，切片（厚度5μm）；脱蜡至水，苏木精染色，盐酸乙醇分化，流水冲洗，中性树胶封固；使用Pannoramic250数字切片扫描仪扫描切片观察并采集图像。

甲苯胺蓝染色法观察大鼠结肠组织中MC的表达：取上述切片，脱蜡至水后放入1%甲苯胺蓝溶液中；95%乙醇分化，无水乙醇脱水，二甲苯透明，中性树胶封固；使用Pannoramic250数字切片扫描仪每张切片采集3个视野，进行肥大细胞计数。

ELISA法检测大鼠血清TNF-α、IL-10的含量：取冻存的大鼠血清，按照ELISA试剂盒说明书进行操作。酶标仪450nm波长下测定各孔吸光度，根据标准品吸光度值绘制标准曲线，计算样本中TNF-α、IL-10的含量。

实时荧光定量PCR法检测大鼠下丘脑及结肠组织中降钙素基因相关肽（CGRP）mRNA表达：取部分上述冻存的大鼠结肠、下丘脑组织转移至装有1mL Trizol的无酶EP管内提取总RNA，反转录试剂盒将其反转录为cDNA，将得到的cDNA通过PCR反应体系进行扩增。PCR反应体系：2×Real PCR Easy™ Mix-SYBR混合液10μL，对应基因上下游引物各0.8μL，cDNA2μL，ddH₂O6.4μL。PCR反应条件：95℃ 30s；95℃ 5s，55℃ 30s，72℃ 30s，共45个循环。最终得到检测样本相应CT值，以β-actin为内参，通过2^{-ΔΔCt}计算样本中目的基因的相对表达量。引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer Sequences

基因	引物序列（5' → 3'）	产物长度/bp
CGRP	上游 CTCAGTGAAGAAGAAGCTCGCCTAC	76
	下游 CCTCAGCCTCCTGTTCCTCCTC	
β-actin	上游 GGGAAATCGTGCGTGACATT	100

Western blot 法检测大鼠下丘脑及结肠组织中 CRF 蛋白的表达：提取下丘脑、结肠组织蛋白，根据 BCA 蛋白定量试剂盒说明书要求测定蛋白浓度。其后进行蛋白变性、电泳、转膜、封闭、CRF 一抗孵育（1:2 000 稀释）、二抗孵育（1:5 000 稀释）。使用 ECL 发光液按 1:1 混合后，滴加到 PVDF 膜上反应 1 min，将膜置于化学发光凝胶成像仪暗室中，使用 GIS 机箱控制软件 V2.0 进行曝光扫描，Image J 软件读取条带灰度值，以目的蛋白与内参蛋白 β -actin 条带灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.6 统计学处理

用 SPSS26.0 统计软件进行统计分析。数据符合正态分布，以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示，多组间比较采用 One-Way ANOVA 检验，进一步两两比较方差齐采用 LSD 检验，方差不齐则采用 Tamhane's T2 检验，以 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

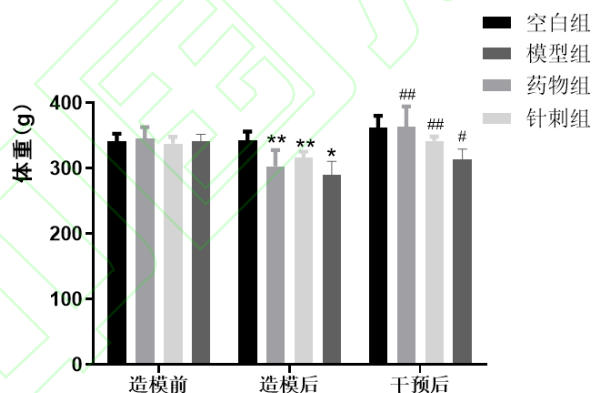
2 结果

2.1 各组大鼠一般状态比较

造模结束后，空白组大鼠毛色光滑，动作敏捷、活泼好动，精神可，肛周干净，粪便呈颗粒状；其余 3 组大鼠毛色暗淡，精神萎靡、喜静恶动、行动迟缓、对外界刺激的反应迟钝，扭体反应增多，肛周污迹且伴有粪便稀薄。干预结束后，药物组和针刺组大鼠精神状态、毛色、活动、肛周污迹及粪便性状均得到改善。

2.2 各组大鼠体质量比较

造模前，各组大鼠体质量差异无统计学意义；造模后，与空白组比较，各组大鼠体质量显著降低 ($P<0.01$, $P<0.05$)；干预后，与模型组比较，药物组、针刺组体质量显著升高 ($P<0.01$, $P<0.05$)，但两组间比较差异无统计学意义。见图 1。



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

图 1 各组大鼠体质量比较 ($\bar{x}\pm s$, 6 只鼠/组)

Fig. 1 Comparison of body weight of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 rats/group)

2.3 各组大鼠旷场实验结果比较

造模前，各组大鼠旷场试验行走距离、直立次数、粪便粒数差异无统计学意义；造模后，与空白组比较，3 组造模大鼠行走距离及直立次数均显著减少 ($P<0.01$, $P<0.05$)，粪便粒数显著增加 ($P<0.05$)，提示造模成功。干预后，与模型组比较，药物组及针刺组大鼠行走距离及直立次数均显著增加 ($P<0.01$)，粪便粒数显著减少 ($P<0.05$)，但两组间比较差异无统计学意义。见图 2。

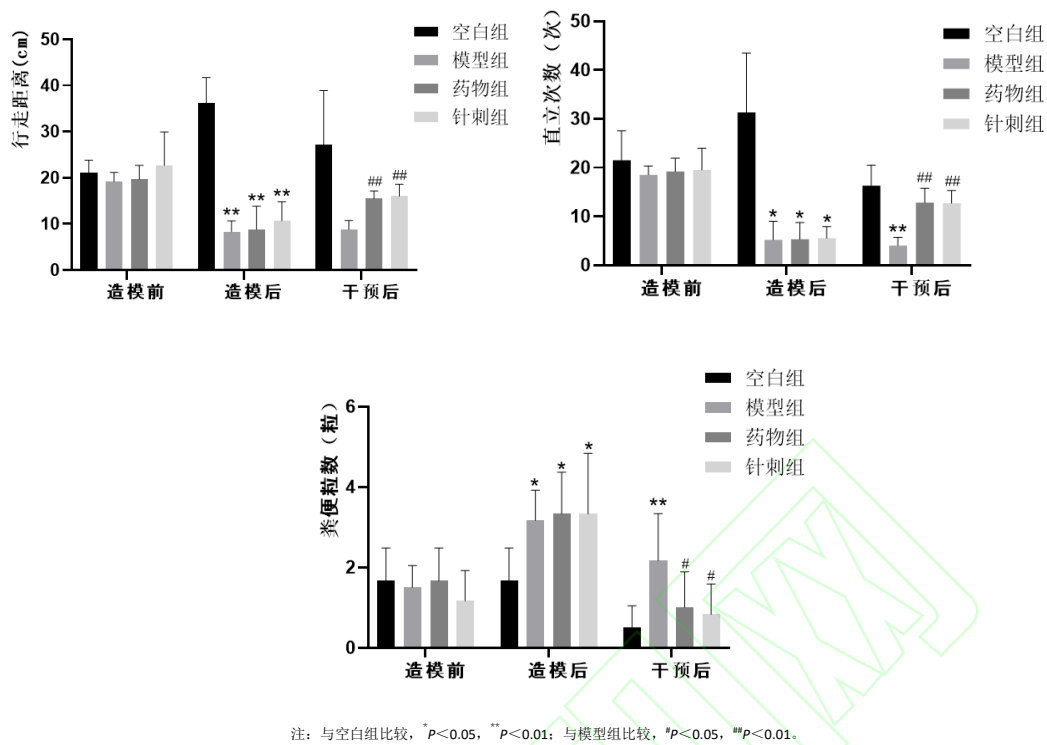


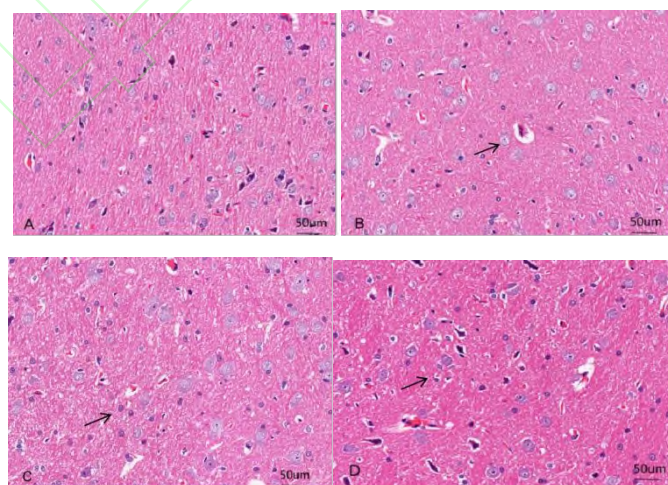
图2 各组大鼠旷场实验行走距离、直立次数及粪便粒数比较 ($\bar{x} \pm s$, 6只鼠/组)

Fig. 2 Comparison of walking distance, upright times in open field experiment, and fecal particle number of rats in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 6 rats/group)

2.4 各组大鼠下丘脑、结肠组织病理形态比较

各组大鼠下丘脑未见明显病理变化，各神经元形态完整，轮廓清晰，胶质细胞无噬神经现象及卫星现象，间质血管无充血、出血等现象。见图3。

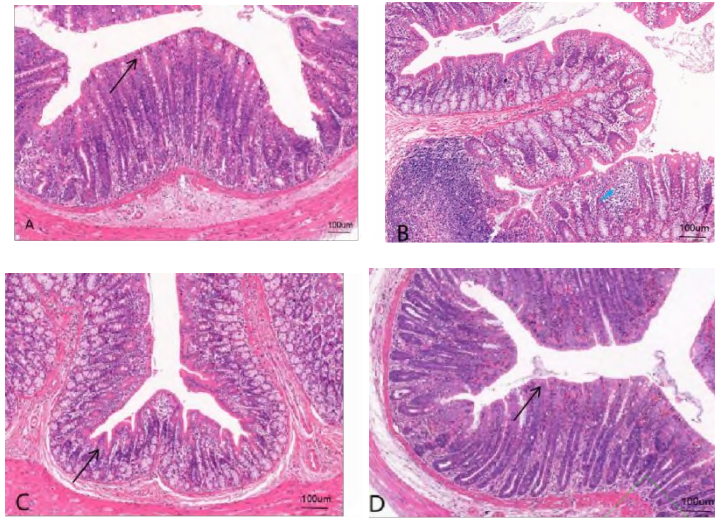
模型组大鼠结肠固有层有少量炎性细胞浸润，以淋巴细胞为主；其余各组大鼠结肠黏膜结构清晰完整，分层明显，上皮细胞排列整齐，固有层腺体排列较规则，固有层和黏膜下有不同程度的中性粒细胞或淋巴细胞浸润。见图4。



注：箭头示下丘脑神经元；标尺=50 μm 。

图3 各组大鼠下丘脑组织病理形态比较 (HE 染色)

Fig. 3 Comparison of hypothalamic histopathologic morphology of rats in the 4 groups (HE staining)



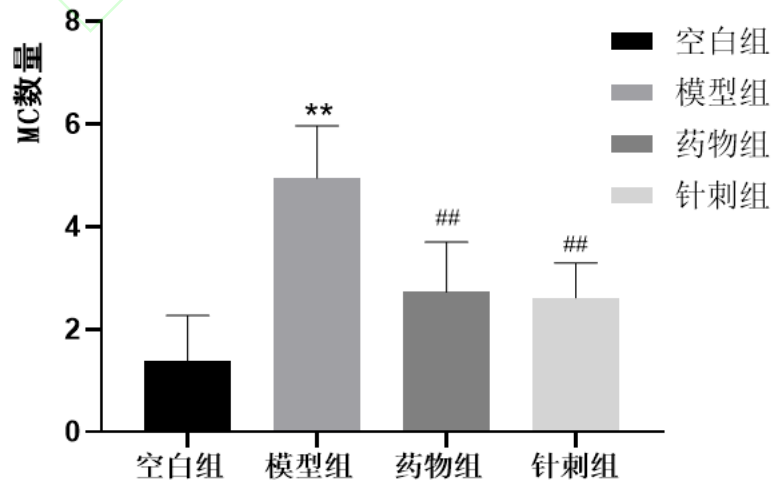
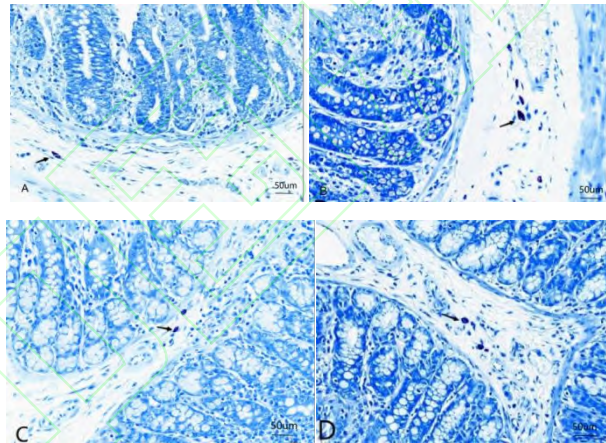
注：蓝色箭头示淋巴细胞，黑色箭头示结肠层；标尺=100 μm。

图4 各组大鼠结肠组织病理形态比较（HE染色）

Fig. 4 Comparison of colonic histopathologic morphology of rats in the 4 groups(HE staining)

2.5 各组大鼠结肠组织中 MC 数量比较

与空白组比较，模型组大鼠结肠组织中 MC 数量显著增加 ($P < 0.01$)；与模型组比较，药物组、针刺组大鼠结肠组织中 MC 数量显著减少 ($P < 0.01$)，但两组间比较差异无统计学意义。见图 5。



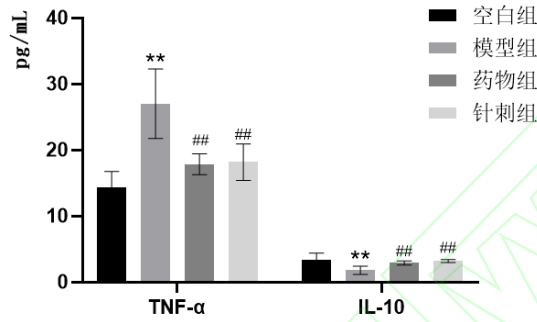
注: 标尺=50 μm ; 与空白组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, ## $P<0.01$ 。

图5 各组大鼠结肠组织 MC 数量比较 (甲苯胺蓝染色, $\bar{x}\pm s$, 6 只鼠/组)

Fig. 5 Comparison of colonic MC number of rats in the 4 groups (toluidine blue staining, $\bar{x}\pm s$, 6 rats/group)

2.6 各组大鼠血清 TNF- α 、IL-10 含量比较

与空白组比较, 模型组大鼠血清 TNF- α 含量显著升高 ($P<0.01$), IL-10 含量显著降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 药物组、针刺组大鼠血清 TNF- α 含量显著降低 ($P<0.01$), IL-10 含量显著升高 ($P<0.01$), 但两组间比较差异无统计学意义。见图 6。



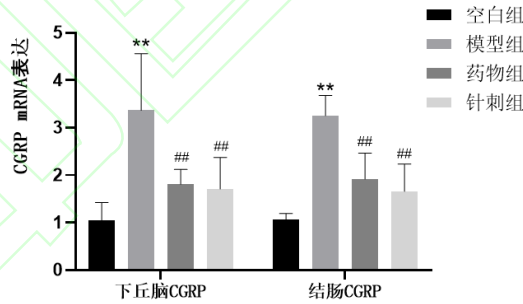
注: 与空白组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, ## $P<0.01$ 。

图6 各组大鼠血清 TNF- α 、IL-10 含量比较 ($\bar{x}\pm s$, 6 只鼠/组)

Fig. 6 Comparison of serum TNF- α and IL-10 contents of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 rats/group)

2.7 各组大鼠下丘脑、结肠组织中 CGRP mRNA 表达水平比较

与空白组比较, 模型组大鼠下丘脑、结肠组织中 CGRP mRNA 表达均显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 药物组与针刺组大鼠下丘脑、结肠组织中 CGRP mRNA 表达均显著降低 ($P<0.01$)。见图 7。



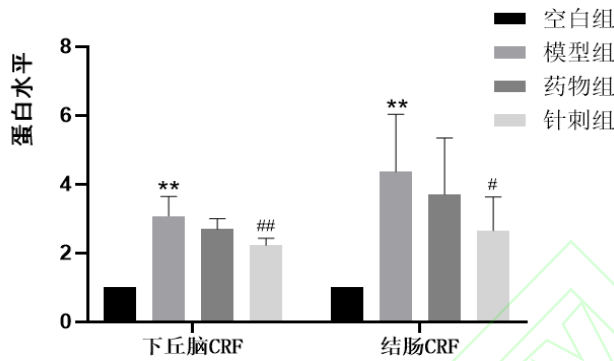
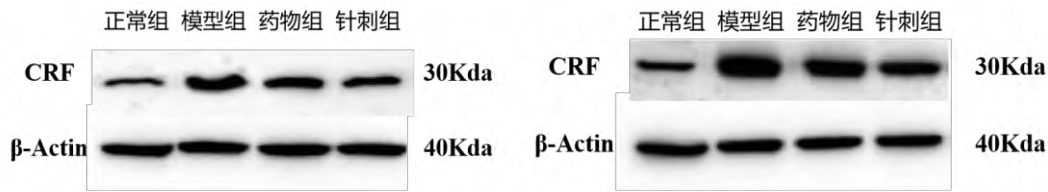
注: 与空白组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, ## $P<0.01$ 。

图7 各组大鼠下丘脑、结肠组织中 CGRP mRNA 表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$, 6 只鼠/组)

Fig. 7 Comparison of hypothalamic and colonic CGRP mRNA expressions of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 rats/group)

2.8 各组大鼠下丘脑、结肠组织 CRF 蛋白表达水平比较

与空白组比较, 模型组大鼠下丘脑、结肠组织 CRF 蛋白表达水平均显著升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 针刺组大鼠下丘脑、结肠组织 CRF 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01, P<0.05$); 药物组大鼠下丘脑、结肠组织 CRF 蛋白表达水平差异无统计学意义。见图 8。



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

图8 各组大鼠下丘脑、结肠组织中CRF蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, 5只鼠/组)

Fig. 8 Comparison of hypothalamic and colonic CRF protein expressions of rats in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 5 rats/group)

3 讨论

IBS-D 是以肠道症状和粪便性状改变为主要临床表现的一类慢性胃肠道疾病，该病迁延难愈，反复发作，易导致患者出现抑郁、焦虑等精神情绪症状。其归属于中医学“腹痛”“泄泻”等范畴，《肠易激综合征中医诊疗专家共识意见（2017）》^[15]指出肝郁脾虚是导致本病进一步发展的重要环节。天枢属大肠经募穴，可调理脾胃、缓急止痛；足三里为胃经合穴，可健脾养胃、补益气血，通治本腑一系列病症；上巨虚是大肠下合穴，可调理肠腑，现代研究^[16]表明三穴合用具有促进胃肠蠕动、降低炎性水平、调节胃肠激素的功效。百会是督脉与足阳明胃经、足太阳膀胱经交会穴，通于脑府，镇静安神；太冲为肝经原穴，具有疏肝理气、平肝潜阳的功效，两穴合用可发挥疏肝调神之功。以上五穴联用体现了疏肝健脾、调神止泻的治疗原则，是辨证论治下针刺治疗 IBS-D 的常规选穴。本实验研究结果显示，针刺此五穴能显著改善 IBS-D 大鼠腹痛、腹泻及相关症状。

匹维溴铵作为临床常用解痉药，是治疗 IBS-D 的首选药物^[17]，研究显示，匹维溴铵在改善 IBS-D 腹痛、腹泻方面具有一定的效果，因而本研究选取匹维溴铵为阳性对照药物。结果提示匹维溴铵能改善 IBS-D 模型大鼠的症状和炎性水平，但 CRF 蛋白表达下调差异无统计学意义，可能不能兼顾所有发病机制。

研究^[18]表明，IBS-D 患者受刺激时中央后回、杏仁核等脑区功能连接会出现相应改变，从而导致患者出现焦虑等情绪症状，而针刺可改善相关脑区之间的功能连接，缓解 IBS-D 患者相关情绪症状。大鼠旷场实验是观察大鼠行为情绪的常用实验方法，其中大鼠横向运动行走距离与纵向运动直立次数反映大鼠兴奋性和探索能力，是观察大鼠行为情绪的常用指标。本研究结果显示，IBS-D 大鼠横向运动行走距离和纵向运动直立次数较正常组均降低。针刺干预结束后，与模型组比较，针刺组大鼠横向运动行走距离和纵向运动直立次数均升高，提示针刺可改善大鼠焦虑、抑郁样精神状态。此外，本研究结果显示，正常组大鼠在造模和干预前后横向运动行走距离和纵向运动直立次数出现一定改变，相关研究^[19-20]表明这可能与大鼠环境适应能力、实验时间、实验环境和温度等有关。

脑肠肽在脑-肠轴调节中发挥重要作用，可作为脑-肠轴功能紊乱的重要标志，其表达失

衡可能会引起结肠黏膜 MC 异常激活及中枢神经系统、肠神经系统的异常变化^[21-22]。已知的脑肠肽有 CGRP、CRF 等^[23]，CRF 是一种能调控脑-肠轴的关键脑肠肽，主要分布于神经系统中应激相关区域，其表达上升可活化 MC，促使 MC 脱颗粒释放促炎因子，从而引起免疫炎症反应；MC 活化后肠道应激信号通过脑-肠轴传递至中枢神经系统，促进中枢神经系统分泌 5-羟色胺（5-HT）、CGRP 等脑肠肽，调节肠道症状^[24-27]。此外，CRF 可促进 5-HT 与受体结合，进而释放 CGRP、P 物质及乙酰胆碱等神经介质^[28]，从而影响中枢神经系统和胃肠道功能。本研究结果显示，IBS-D 大鼠下丘脑、结肠组织中 CRF 蛋白表达升高，导致结肠 MC 数量增加，CGRP mRNA 表达升高，与相关研究^[5, 29]结果一致。针刺干预后，IBS-D 大鼠下丘脑、结肠组织中 CRF 蛋白表达降低，结肠 MC 数量减少，CGRP mRNA 表达降低，提示针刺干预可能影响脑肠肽表达，调节脑-肠轴，从而对机体免疫炎症反应发挥调控作用。

肠道免疫炎症反应同时还依赖于促炎、抑炎因子之间的动态平衡，当平衡被打破时，将引起肠道免疫炎症反应^[30]。当 MC 被异常激活后，脱颗粒释放促炎因子 TNF- α ，导致抑炎因子 IL-10 表达下调，介导肠道炎症反应。研究^[31]表明，IBS 患者存在 TNF- α 、IL-10 表达失衡。本研究结果显示，IBS-D 大鼠血清 TNF- α 含量升高，IL-10 含量下降，提示 IBS-D 大鼠存在炎症反应；针刺干预后，IBS-D 大鼠血清 TNF- α 含量降低，IL-10 含量升高，提示针刺干预可以改善 IBS-D 大鼠免疫炎症反应，调节炎症因子平衡。

综上所述，针刺可通过调节大鼠炎症相关脑肠肽及炎症因子水平，调控脑-肠轴、降低肠道炎症反应，从而改善大鼠 IBS-D 相关的一般状态及抑郁、焦虑样精神症状，治疗 IBS-D。但针刺治疗 IBS-D 中脑-肠轴与炎症反应之间的关系仍需进一步研究。

参考文献

- [1] NISTICÒ V, ROSSI R E, D'ARRIGO A M, et al. Functional neuroimaging in irritable bowel syndrome: a systematic review highlights common brain alterations with functional movement disorders[J]. *J Neurogastroenterol Motil*, 2022, 28(2): 185-203.
- [2] CHONG R I H, YAOW C Y L, LOH C Y L, et al. Vitamin D supplementation for irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2022, 37(6): 993-1003.
- [3] OKA P, PARR H, BARBERIO B, et al. Global prevalence of irritable bowel syndrome according to Rome III or IV criteria: a systematic review and meta-analysis[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2020, 5(10): 908-917.
- [4] 杨芳, 严晶, 刘丽娜, 等. 肠易激综合征病因及发病机制研究的新进展[J]. *河北医科大学学报*, 2020, 41(8): 987-992.
- [5] YANG F, YAN J, LIU L N, et al. New progress in the study of etiology and pathogenesis of irritable bowel syndrome (in Chinese)[J]. *Journal of Hebei Medical University*, 2020, 41(8): 987-992.
- [5] 邓多喜, 谭洁, 张泓, 等. 针刺合募配穴对肠易激综合征大鼠结肠内脏高敏相关因子的影响[J]. *针刺研究*, 2018, 43(8): 485-491.
- [6] DENG D X, TAN J, ZHANG H, et al. Electroacupuncture relieves visceral hypersensitivity by down-regulating mast cell number, PAR-2/TRPV 1 signaling, etc. in colonic tissue of rats with irritable bowel syndrome (in Chinese)[J]. *Acupuncture Research*, 2018, 43(8): 485-491.
- [6] AGIRMAN G, YU K B, HSIAO E Y. Signaling inflammation across the gut-brain axis[J]. *Science*, 2021, 374(6571): 1087-1092.
- [7] TACHE Y, LARAUCHE M, YUAN P Q, et al. Brain and gut CRF signaling: biological actions and role in the gastrointestinal tract[J]. *Curr Mol Pharmacol*, 2018, 11(1): 51-71.
- [8] 姚俊鹏, 赵妍, 陈颖, 等. 电针对腹泻型肠易激综合征大鼠肠上皮黏膜屏障功能的影响[J]. *针刺研究*, 2020, 45(5): 357-362.
- [9] YAO J P, ZHAO Y, CHEN Y, et al. Effect of electroacupuncture on intestinal epithelial mucosal barrier function in

- rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (in Chinese)[J]. *Acupuncture Research*, 2020, 45(5): 357-362.
- [9] 邓多喜, 郭奎奎, 谭洁, 等. 针刺治疗腹泻型肠易激综合征临床研究的 Meta 分析[J]. *中国针灸*, 2017, 37(8): 907-912.
- DENG D X, GUO K K, TAN J, et al. Acupuncture for diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: a meta-analysis (in Chinese)[J]. *Chinese Acupuncture & Moxibustion*, 2017, 37(8): 907-912.
- [10] 章海凤, 曾婷, 曹乾安, 等. 肝郁脾虚型肠易激综合征中医病证结合模型的研究进展[J]. *辽宁中医杂志*, 2022, 49(5): 208-212.
- ZHANG H F, ZENG T, CAO Q A, et al. Research progress on model of combination of disease and syndrome of diarrhea irritable bowel syndrome with liver stagnation and spleen deficiency (in Chinese)[J]. *Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2022, 49(5): 208-212.
- [11] 司原成, 任晨晨, 李青青, 等. 针刺对腹泻型肠易激综合征脑肠神经肽 NPY 及 PAR4 的影响[J]. *时珍国医国药*, 2020, 31(7): 1782-1785.
- SI Y C, REN C C, LI Q Q, et al. Effect on NPY and PAR4 in brain-cerebral neuropeptide of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (D-IBS) by acupuncture (in Chinese)[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2020, 31(7): 1782-1785.
- [12] 王宁, 纪昌春, 万鹏, 等. 病证结合模式下腹泻型肠易激综合征实验动物模型的研究进展[J]. *天津中医药大学学报*, 2021, 40(4): 533-538.
- WANG N, JI C C, WAN P, et al. Research progress on experimental animal model of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome combining disease and syndrome (in Chinese)[J]. *Journal of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, 2021, 40(4): 533-538.
- [13] 刘敏, 薛红, 胡运莲. 四神丸对腹泻型肠易激综合征模型大鼠及离体结肠的实验研究[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2021, 23(1): 75-80.
- LIU M, XUE H, HU Y L. Experimental study of Sishen pill on diarrhea-predominant irritable bowel syndrome model rats and isolated colon (in Chinese)[J]. *Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology*, 2021, 23(1): 75-80.
- [14] 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.
- China Institute of Acupuncture and Moxibustion. [Names and location of commonly used acupoints in experimental animals. Part 2: rats](#) (in Chinese)[J]. *Acupuncture Research*, 2021, 46(4): 351-352.
- [15] 张声生, 魏玮, 杨俭勤. 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.
- ZHANG S S, WEI W, YANG J Q. Consensus opinion of Chinese medicine diagnosis and treatment experts on irritable bowel syndrome (2017) (in Chinese)[J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2017, 58(18): 1614-1620.
- [16] 张建斌. 针灸在功能性便秘治疗中的价值[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2019, 28(4): 371-377.
- ZHANG J B. The value of acupuncture and moxibustion in the treatment of functional constipation (in Chinese)[J]. *Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2019, 28(4): 371-377.
- [17] 李贻弘, 苏青, 刘劲松, 等. 匹维溴铵与雷贝拉唑治疗腹泻型肠易激综合征与功能性消化不良重叠患者的随机对照研究[J]. *临床消化病杂志*, 2021, 33(6): 423-427.
- LI Y H, SU Q, LIU J S, et al. A randomized controlled study of the treatment effect of Pinavide, Rebaprazole on the patients with overlapping diarrhoeal irritable bowel syndrome and functional dyspepsia (in Chinese)[J]. *Chinese Journal of Clinical Gastroenterology*, 2021, 33(6): 423-427.
- [18] 张伟晓, 刘永康, 姚刚, 等. 针刺治疗对腹泻型肠易激综合征病人 rs-fMRI 脑功能连接的影响[J]. *国际医学放射学杂志*, 2022, 45(6): 621-625.

- ZHANG W X, LIU Y K, YAO G, et al. Effect of acupuncture on brain functional connectivity of resting-state fMRI in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (in Chinese)[J]. International Journal of Medical Radiology, 2022, 45(6): 621-625.
- [19] 张鹏横, 阮璐薇, 卓泽伟, 等. 情绪异常大鼠模型的旷场行为实验在中医药领域的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(9): 100-103.
- ZHANG P H, RUAN L W, ZHUO Z W, et al. A review of experimental studies on the behavior of rat models with abnormal emotion in Traditional Chinese Medicine (in Chinese)[J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2018, 28(9): 100-103.
- [20] 蔡思琪, 李沅衡, 黎嘉, 等. 鼠类行为学实验方法研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(5): 916-920.
- CAI S Q, LI Y H, LI J, et al. Research progress of behavior experimental methods in rats (in Chinese)[J]. Medical Recapitulate, 2018, 24(5): 916-920.
- [21] 杨敏, 邹燃, 邓薇, 等. 针灸联合药物治疗对肠易激综合征大鼠脑-肠轴失衡的作用研究[J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(12): 2251-2257.
- YANG M, ZOU R, DENG W, et al. Effect of acupuncture combined with medicine on imbalance of brain-gut axis in rats with irritable bowel syndrome (in Chinese)[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2021, 37(12): 2251-2257.
- [22] 杜娟, 郭哲阳, 杨文亚, 等. 敦煌固本方对脾虚型肠易激综合征大鼠结肠黏膜肥大细胞、类胰蛋白酶以及 5-羟色胺的影响[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(6): 2693-2696.
- DU J, GUO Z Y, YANG W Y, et al. Effects of Dunhuang Guben Formula on colonic mast cells, trypsin and 5-HT in rats with spleen deficiency irritable bowel syndrome (in Chinese)[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2019, 34(6): 2693-2696.
- [23] 彭飞燕, 陈国忠, 吴瑕, 等. 从脑肠轴学说探讨肠易激综合征的治疗[J]. 吉林中医药, 2020, 40(3): 309-311.
- PENG F Y, CHEN G Z, WU X, et al. To discuss the treatment of irritable bowel syndrome from the theory of brain intestinal axis (in Chinese)[J]. Jilin Journal of Chinese Medicine, 2020, 40(3): 309-311.
- [24] 臧希, 窦志芳. 脑肠肽与肠易激综合征相关性研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(12): 110-115.
- ZANG X, DOU Z F. Research progress of brain gut peptide and irritable bowel syndrome (in Chinese)[J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2019, 21(12): 110-115.
- [25] 曹楠, 陈桂婷, 周婷婷, 等. 肥大细胞来源的外泌体在类风湿性关节炎中的免疫调节作用[J]. 生命的化学, 2021, 41(4): 788-792.
- CAO N, CHEN G T, ZHOU T T, et al. Immunomodulatory effects of mast cell-derived exosomes in rheumatoid arthritis (in Chinese)[J]. Chemistry of Life, 2021, 41(4): 788-792.
- [26] 厉越, 韩昌鹏, 高凌卉. 炎症性肠病和脑: 肠轴的相互作用机制研究进展[J]. 结直肠肛门外科, 2020, 26(3): 388-392.
- LI Y, HAN C P, GAO L H. Research progress on the interaction mechanism between inflammatory bowel disease and brain-gut axis (in Chinese)[J]. Journal of Colorectal & Anal Surgery, 2020, 26(3): 388-392.
- [27] 徐心田, 徐丹华, 陆为民. 神经-内分泌-免疫系统调控异常与肠易激综合征相关性的研究进展[J]. 中国全科医学, 2020, 23(26): 3369-3374.
- XU X T, XU D H, LU W M. Relationship between irritable bowel syndrome and regulatory abnormalities of neuro-endocrine-immune network (in Chinese)[J]. Chinese General Practice, 2020, 23(26): 3369-3374.
- [28] 章海凤, 谢芳深, 龚红斌, 等. 热敏灸对肠易激综合征模型大鼠下丘脑 CRH、CRF 及肾上腺 GR 的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(5): 1076-1079.
- ZHANG H F, XIE F S, GONG H B, et al. Effect of heat-sensitive moxibustion on CRH and CRF in hypothalamus

- and GR in adrenal gland of IBS rats (in Chinese)[J]. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine, 2018, 45(5): 1076-1079.
- [29] 徐万里, 周帅, 周静珠, 等. 低频耳针电刺激降低内脏敏感性的机制探讨[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2021, 41(2): 181-186.
- XU W L, ZHOU S, ZHOU J Z, et al. Study on the mechanism of low-frequency auricular electric stimulation to reduce visceral hypersensitivity (in Chinese)[J]. Journal of Nanjing Medical University(Natural Sciences), 2021, 41(2): 181-186.
- [30] 李奎武, 储浩然, 阮静茹, 等. 基于 SCF/c-kit 信号通路探讨艾灸干预对腹泻型肠易激综合征大鼠免疫功能稳态的影响[J]. 中国针灸, 2023, 43(2): 177-185.
- LI K W, CHU H R, RUAN J R, et al. Effect of moxibustion on immune function homeostasis in rats with diarrhea irritable bowel syndrome based on SCF/c-kit signaling pathway (in Chinese)[J]. Chinese Acupuncture & Moxibustion, 2023, 43(2): 177-185.
- [31] CHOUGHAKHORI R, ABBASNEZHAD A, HASANVAND A, et al. Inflammatory cytokines and oxidative stress biomarkers in irritable bowel syndrome: association with digestive symptoms and quality of life[J]. Cytokine, 2017, 93: 34-43.