

基于Piezo1/2通道探讨电针改善功能性便秘小鼠肠道动力及内脏敏感性的作用机制

鄢香芸¹, 李艳秋¹, 马沛涛¹, 曾伟健¹, 王 雯¹, 侯雨君¹, 陈科多¹, 郑倩华¹, 姚俊鹏^{1,2},
李 瑛¹

(¹成都中医药大学针灸推拿学院, 成都 610075; ²针灸防治老年病教育部重点实验室, 成都 610075)

【摘要】 目的:探讨电针对功能性便秘(FC)小鼠肠道动力及敏感性障碍的改善作用,及其对肠嗜铬(EC)细胞Piezo通道的调控机制。方法:30只C57雄性小鼠随机分为正常组、模型组和电针组,每组8只。采用盐酸洛哌丁胺灌胃构建FC模型。电针组针刺天枢和上巨虚穴(1 mA, 2/15 Hz, 20 min/次, 1次/d),左右侧交替刺激,干预5 d后休息2 d,共10 d。检测各组小鼠的排便情况、肠道动力和结肠敏感性;以透射电镜观察结肠EC细胞超微结构;免疫荧光染色法、Western blot法和实时荧光定量PCR法检测结肠和EC细胞中Piezo1/2表达;ELISA法检测血清和结肠5-HT、Ca²⁺含量。结果:与正常组相比,模型组粪便颗粒数、性状评分和含水率均降低($P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.05$),首粒蓝便排出时间和疼痛阈值增加($P < 0.01$),小肠推进率和腹壁撤退反射(AWR)评分降低($P < 0.01$, $P < 0.05$);EC细胞线粒体肿胀,分泌颗粒数量减少;结肠和血清中5-HT及结肠中Ca²⁺含量均减少($P < 0.01$, $P < 0.001$);结肠和EC细胞中Piezo1、Piezo2蛋白及其mRNA表达水平均下调($P < 0.001$),Piezo1、Piezo2蛋白和EC细胞的阳性面积占比,以及Piezo1/EC、Piezo2/EC的共定位系数均降低($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.001$)。与模型组相比,电针组粪便颗粒数、性状评分和含水率均增加($P < 0.05$, $P < 0.001$, $P < 0.01$),首粒蓝便排出时间和疼痛阈值下降($P < 0.01$, $P < 0.05$),小肠推进率和AWR评分升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);电镜结果显示模型组EC细胞中线粒体肿胀,分泌颗粒减少;EC细胞线粒体结构部分恢复,分泌颗粒数量增加;结肠和血清中5-HT及结肠中Ca²⁺含量增加($P < 0.05$);结肠和EC细胞中Piezo1、Piezo2蛋白及其mRNA表达水平均上调($P < 0.001$),Piezo1、Piezo2蛋白和EC细胞的阳性面积,以及Piezo1/EC、Piezo2/EC的共定位系数占比均上升($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结论:电针可能通过上调EC细胞Piezo1/2通道表达,促进Ca²⁺内流及5-HT分泌,改善FC小鼠的肠道动力及敏感性障碍,从而改善功能性便秘。

【关键词】 功能性便秘;电针;肠嗜铬细胞;Piezo;肠道动力

Electroacupuncture improves intestinal motility and visceral sensitivity in mice with functional constipation via upregulating Piezo1/2 channel activity of enterochromaffin cells

YAN Xiangyun¹, LI Yanqiu¹, MA Peitao¹, ZENG Weijian¹, WANG Wen¹, HOU Yujun¹, CHEN Keduo¹, ZHENG Qianhua¹, YAO Junpeng^{1,2}, LI Ying¹ (¹School of Acupuncture and Tuina, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; ²Key Laboratory of Acupuncture and Moxibustion for the Prevention and Treatment of Geriatric Diseases (Ministry of Education), Chengdu 610075, China)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the effect of electroacupuncture (EA) on intestinal motility and visceral sensitivity in functional constipation (FC) mice and its regulatory mechanism on Piezo1/2 channels in enterochromaffin (EC) cells. **Methods** Thirty male C57BL/6 mice were randomly divided into normal control, model, and EA groups (n=

项目来源:国家自然科学基金(No. 82274652;82074554)

通信作者:李瑛, E-mail: liying@cdutcm.edu.cn

10 in each group). The FC model was established by gavage of loperamide hydrochloride. EA (1 mA, 2/15 Hz) was applied to unilateral Tianshu (ST25) and Shangjuxu (ST37) for 20min per session, once daily for 5 consecutive days per week, two weeks altogether. Fecal parameters (number of stool particles in 6h, characters, and fecal water content), intestinal motility (the time of the first blue stool excretion after gavage of Evans blue solution), and visceral sensitivity (assessed by abdominal withdrawal reflex, AWR in responding to colorectal dilation) were observed. A transmission electron microscopy (TEM) was used to observe EC cells' ultrastructure. Triple immunofluorescence, Western blot and RT-qPCR were used to detect the expression of Piezo1/2 in the EC cells, and ELISA was employed to detect the levels of serum and colonic 5-HT and CaCa⁺⁺. **Results** Compared with the normal group, the model group showed a significant reduction in the number of stool particles, fecal character score, and fecal water content, small intestinal transit rate, AWR scores at 0.25mL and 0.65mL, contents of serum and colonic 5-HT and Ca⁺⁺, expression levels of colonic Piezo1 and Piezo2 proteins and mRNAs, and the positive areas of Piezo1, Piezo1/EC and Piezo2/EC ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$), and an evident increase in the time of the first blue stool particle excretion (decrease of intestinal propulsion) and AWR 3-points threshold ($P<0.01$). Following EA treatment, both the decrease and increase of the indexes mentioned above were reversed completely ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$). TEM showed mitochondrial swelling and a reduction in the secretory granules of EC cells in the model group, which was partially restored following EA treatment. **Conclusion** EA of ST25-ST37 can alleviate FC-related intestinal dysmotility and visceral hypersensitivity in FC mice, which may be associated with its functions in upregulating Piezo1/2 channels of EC cells, promoting Ca⁺⁺ flux and 5-HT secretion.

【KEYWORDS】 Functional constipation; Electroacupuncture; Enterochromaffin cell; Piezo; Intestinal motility

功能性便秘 (Functional Constipation, FC) 是一种常见的多因素非器质性疾病, 主要表现为排便次数减少、排便困难或排便不完全^[1]。疾病的反复发展、迁延难愈不仅严重危害患者健康, 同时还因反复就诊增加医疗费用, 降低社会生产力^[2]。在 FC 的关键病理机制中, 肠道动力减慢和结肠敏感性下降是主要表现。针刺在改善 FC 方面具有优势^[3], 可通过调节肠神经-平滑肌系统、改善胃肠激素分泌及重塑肠道菌群等多方面发挥作用^[4-6]。然而, 作为一种机械刺激干预方式, 针刺在改善结肠低敏和调控肠道动力中的具体机制尚未完全阐明。电针通过机械刺激与电刺激结合, 在功能性便秘的治疗中显示出显著的疗效, 但其具体的作用靶点和分子机制有待进一步研究。

机械敏感离子通道 Piezo1 和 Piezo2 在感知和响应外部机械刺激中发挥关键作用^[7]。Piezo1 和 Piezo2 通过将机械信号转化为细胞内的生物化学信号, 维持细胞和组织的功能, 并调控包括肠道动力在内的多种生理过程^[8-9]。研究表明, 肠嗜铬 (Enterochromaffin, EC) 细胞肠道内分泌系统的主要组成部分, 能够分泌多种神经递质, 对机械信号敏感, 其功能受 Piezo2 通道调控; 5-HT 在调节胃肠动力和感觉功能中具有重要作用, 与 FC 的发生发展密切相关, 而肠道中 95% 的 5-HT 均来源于 EC 细胞^[10-11]。本研究基于机械敏感性离子通道的功能特点, 旨在探讨电针通过调控 EC 细胞 Piezo1 和

Piezo2 通道改善功能性便秘小鼠肠道动力及感觉障碍的机制。

1 材料及方法

1.1 动物及分组

SPF 级雄性 C57BL/6j 小鼠 30 只, 6~8 周龄, 体重 (20±2)g, 购自成都达硕实验动物有限公司, 许可证号: SCXK(川)2020-0030。小鼠饲养温度 (20±2)°C、湿度 (50±5)%、明暗周期 12 h/12 h。适应性饲养 7 d 后, 采用随机数字法将小鼠分为正常组、模型组和电针组, 每组 8 只。所有动物实验均按照伦理准则进行, 并经成都中医药大学动物实验伦理委员会批准 (批准号为 2022012)。

1.2 试剂与仪器

盐酸洛哌丁胺 (美国 Sigma), 伊文斯蓝溶液 (北京索莱宝), Piezo1 抗体 (江苏亲科生物), Piezo2 抗体 (美国 Novusbio), Chromogranin A 抗体 (武汉三鹰), GAPDH 抗体 (美国 Abcam) DAPI 核染剂 (北京中杉金桥), 5-HT ELISA 试剂盒 (上海苗彩), 钙测定离子试剂盒 (南京建成)。

华佗牌一次性无菌针灸针 (规格: 0.25 mm×13 mm)、SDZ-V 型华佗牌电子针疗仪 (苏州医疗用品厂有限公司), H2050R 型台式高速冷冻离心机 (湘仪集团), RM2016 型石蜡切片机 (德国徕卡), VS200 型数字切片扫描仪 (日本 OLYMPUS), PW-600 型电泳电源 (武汉赛维尔), JY-SCZ4+ 型垂直

电泳槽(北京君意东方电泳设备), Quant Studio TM3型实时荧光定量PCR仪(美国 Thermo Fisher) JEM-1400FLASH型透射电子显微镜(日本电子株式会社), Image J软件(美国 NIH)。

1.3 造模方法

采用盐酸洛哌丁胺灌胃法复制 FC 小鼠模型^[12]。将盐酸洛哌丁胺粉末溶解于 0.9% 氯化钠溶液中, 配置成浓度为 1 mg/mL 的混悬液。模型组和电针组根据体质量以 10 mg/kg 的剂量进行灌胃, 2 次/d, 持续 14 d, 正常组予以 0.9% 氯化钠溶液灌胃。灌胃伊文斯蓝溶液后首粒蓝便排出时间大于正常组小鼠均数的判断为造模成功, 予以纳入。

1.4 干预措施

穴位定位参照《实验动物常用穴位名称与定位》^[13]。“上巨虚”为小鼠后肢足三里偏下方约 5 mm; “天枢”为小鼠脐中旁开 5 mm。电针操作: 固定小鼠后, 选用规格为 0.25×13 mm 的毫针, 每日交替选择左侧或右侧的同侧天枢与上巨虚, 垂直进针, 深度约 3~5 mm, 不施行提插捻转手法。将一组电针仪导线分别连接同侧天枢与上巨虚, 频率为 3 Hz/15 Hz, 电流强度 1 mA 左右, 以小鼠四肢颤动为度。留针 30 min, 1 次/d, 5 d 为 1 个疗程, 疗程结束后休息 2 d, 共治疗 2 个疗程。干预期间, 正常组继续予以 0.9% 氯化钠溶液灌胃, 模型组和电针组继续以盐酸洛哌丁胺溶液灌胃。灌胃 30 min 后正常组和模型组仅固定, 固定时间周期同电针组。

1.5 观察指标及检测方法

粪便颗粒数、性状和含水率观察: 造模后和针刺治疗后, 小鼠正常进食饮水情况下, 分别记录各组小鼠 6 h 内排便粪粒数、性状。收集 2 h 内粪便, 记录湿重, 置于烘箱内烘干 20 min, 温度为 200℃, 记录干重, 计算粪便含水率。粪便含水量(%)=[(湿重-干重)÷湿重]×100%。

首粒蓝便排出时间检测: 造模后和针刺治疗后, 各组小鼠灌胃伊文斯蓝溶液, 记录首粒蓝便的排出时间(即胃肠通过时间), 以反映全胃肠道传输功能。

结肠敏感性评估: 采用腹壁撤退反射(Abdominal withdrawal reflex, AWR)实验评估小鼠结肠敏感性。针刺治疗后, 小鼠禁食不禁水 12 h, 将蘸有液体石蜡的自制气囊导管插入小鼠肛门内 1.5 cm 处, 用 1 mL 注射器向气囊内缓慢加压, 记录小鼠腹部抬离地面时对应的压力阈值, 以及注入 0.25 mL、0.35 mL、0.5 mL 和 0.65 mL 气体时小鼠的腹壁

撤退反射评分^[14]。反复测量 3 次取平均值, 每次间隔 5 min。

取材方法: 针刺干预 10 d 后, 所有小鼠禁食过夜, 经 2% 异氟烷吸入 2~3 min 麻醉充分后, 摘除眼球取血 0.5~1 mL, 3 000r/min 离心 15 min, 取上清, 存放于 -80℃ 冰箱。取血后, 行颈椎脱臼法处死小鼠。处死后暴露腹腔, 迅速取出小鼠的小肠, 完成小肠推进率检测。剪取适当长度的结肠组织, 在 0.9% 氯化钠溶液中清洗干净, 分成 3 段, 一段放入 2.5% 戊二醛固定液, 4℃ 保存, 一段放入 4% 多聚甲醛溶液固定, 4℃ 保存, 一段放入冻存管中, 液氮速冻, 存放于 -80℃ 冰箱中。

小肠推进率检测: 针刺治疗后, 小鼠禁食不禁水 12 h。灌胃伊文斯蓝 20 min 后, 处死小鼠并剪取小肠, 测小肠总长度(幽门至回盲部)。小肠推进率=蓝染肠管长度÷小肠全长×100%。

透射电镜观察 EC 细胞超微结构: 随机选取每组 6 只小鼠经戊二醛固定的结肠组织, 用 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液清洗 3 次, 每次 10 min, 再用 1% 四氧化锇后固定 1~2 h。经乙醇梯度脱水后, 采用环氧树脂包埋, 制备 50~70 nm 超薄切片。切片经醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色后, 置于透射电子显微镜下观察 EC 细胞的超微结构。EC 细胞为肠道内分泌细胞, 呈不规则形, 染色分布均匀, 异染色质聚集于核膜周边, 以多形性、电子密集分泌颗粒为特征。

ELISA 法检测结肠和血清 5-HT、结肠 Ca²⁺含量: 取液氮保存的小鼠结肠组织约 100 mg, 加入预冷 PBS 冰浴超声匀浆, 离心 15 min 取上清。将收集好的上清液, 使用倍比稀释法制备标准品工作液和血清, 每样本设 3 复孔, 每孔加入 50 μL 样本后, 于 37℃ 孵育 45 min, 洗涤后加入 HRP 二抗, TMB 显色 10 min 终止反应, 使用 BioTek 酶标仪在 450 nm 波长下测各孔 OD 值, 绘制标准曲线图, 并依据标准曲线计算结肠组织和血清中 5-HT、结肠组织中 Ca²⁺含量。

Western blot 法检测结肠 Piezo1、Piezo2 蛋白表达: 随机选取每组 6 只小鼠液氮保存的结肠样本(每样本称取约 100 mg), 加入 RIPA 裂解液, 离心 15 min 取上清液。采用 BCA 法测定蛋白浓度, 取 20 μg 蛋白经 10% SDS-PAGE(浓缩胶 80V 30 min, 分离胶 120V 90 min)电泳分离后转移至 PVDF 膜。在室温下用 5% 脱脂奶粉-TBST 封闭 30 min。加入一抗(Piezo1 抗体 1:1 000、Piezo2 抗体 1:1 000、GAPDH 抗体 1:2 500), 4℃ 下孵育过夜。次日用

TBST洗膜3次,每次5 min。随后加入HRP偶联的二抗(1:5 000),室温下孵育2 h。再次用TBST洗涤3次后,使用增强化学发光(ECL)底物显影,并通过UVP成像系统进行拍照和记录。采用Image J软件分析条带的灰度值,以目标蛋白与内参GAPDH条带灰度值的比值计算相对表达量,并以正常组为标准进行归一化处理。

荧光定量PCR法检测结肠Piezo1、Piezo2 mRNA表达:随机取每组6只小鼠液氮保存的结肠样本(每样本称取约50 mg),使用RNA提取试剂盒提取组织或细胞的总RNA, RNA定量仪测定RNA

浓度及纯度。采用反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA。配制荧光定量PCR反应体系(2×qPCR MasterMix 10.0 μL, 7.5 μM基因引物 mix 1.2 μL, 反转录产物 2.0 μL, ddH₂O 6.8 μL, 总体系 20.0 μL)。在PCR仪上进行扩增:95℃预变性10 min;95℃变性10 s, 60℃退火延伸30 s, 共40个循环。融解曲线分析:60℃升至95℃, 每15 s升温0.3℃。以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算Piezo1、Piezo2 mRNA的相对表达量。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成,序列见表1。

表1 引物序列

基因	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
Piezo1	上游:CCTGTTACGCTTCAATGCTCT	178
	下游:GTGTAGGCATATCTGAAAGGCAA	
Piezo2	上游:ATTGGACAGCGAATGGACTTCTACG	123
	下游:GCAAGCCAGGAAGCAGCAGTAC	
GAPDH	上游:GGTTGTCTCCTGCGACTTCA	183
	下游:TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC	

免疫荧光染色法检测结肠Piezo1、Piezo2在EC细胞的定位和表达:随机取每组3只小鼠多聚甲醛固定的结肠样本,经脱水、石蜡包埋后制备石蜡切片,厚度为5 μm。切片脱蜡至水后,使用PBS洗涤3次,每次5 min;5%牛血清蛋白室温封闭30 min,分别滴加Piezo1一抗(1:100)、Piezo2一抗(1:200)及ChromograninA一抗(1:200),4℃孵育过夜。次日PBS洗涤3次,每次5 min,晾干后分别加入对应的荧光二抗(1:100)室温避光孵育50 min, PBS洗涤3次,每次5 min。DAPI染色10 min, PBS洗涤3次,用抗荧光衰减封片剂封片。用Olyvia软件扫描并采集荧光图像,用Image J软件进行分析,计算Piezo1和Piezo2的阳性面积占比,使用Image J软件中的Coloc2插件,分别计算Piezo1与EC细胞以及Piezo2与EC细胞之间的Pearson相关系数,以评估蛋白间的荧光信号共定位程度。Pearson系数用于量化双通道荧光信号的线性相关性,值越接近1表示共定位程度越高。

1.6 统计学分析

统计分析采用GraphPad Prism 9软件,首先通过Shapiro-Wilk检验评估数据的正态性,再采用Levene's检验评估方差齐性。计量资料符合正态分布,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单

因素方差分析,方差齐,进一步两两比较使用LSD检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

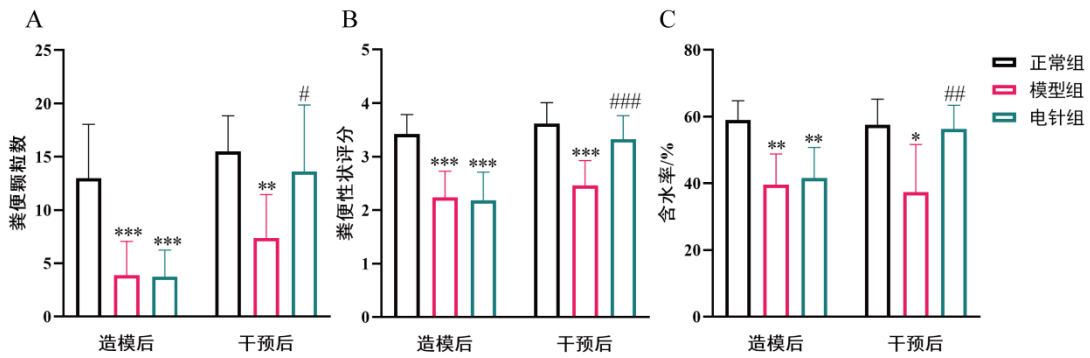
2 结果

2.1 各组小鼠粪便颗粒数、性状和含水率比较

见图1。造模后,与正常组相比,模型组和电针组小鼠的粪便颗粒数减少($P < 0.001$),粪便性状评分和含水率均降低($P < 0.001, P < 0.01$)。干预后,与正常组相比,模型组小鼠的粪便颗粒数仍减少($P < 0.01$),粪便性状评分和含水率降低($P < 0.001, P < 0.05$)。与模型组相比,电针组小鼠的粪便颗粒数、粪便性状评分和含水率均增加($P < 0.05, P < 0.001, P < 0.01$)。以上结果表明,电针能够有效改善FC小鼠的排便状况和粪便质量。

2.2 各组小鼠首粒蓝便排出时间和小肠推进率比较

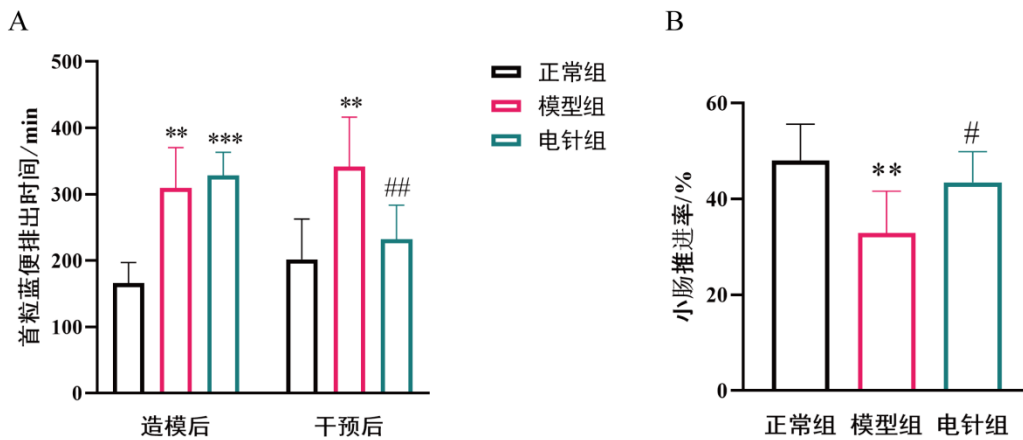
见图2。造模后,与正常组相比,模型组和电针组小鼠的首粒蓝便时间延长($P < 0.01, P < 0.001$)。干预后,与正常组相比,模型组小鼠首粒蓝便时间仍延长($P < 0.01$),小肠推进率降低($P < 0.01$);与模型组相比,电针组小鼠首粒蓝便排出时间减少($P < 0.01$),小肠推进率增加($P < 0.05$)。以上结果表明,电针能改善FC小鼠的肠道动力障碍。



注:与正常组相比,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;与模型组相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$ 。

图1 各组小鼠粪便颗粒数、性状和含水率比较($\bar{x} \pm s$, 8只鼠/组)

Fig. 1 Comparison of fecal pellet number, consistency, and water content rate of mice in the 3 groups ($\bar{x} \pm s$, 8 mice/group)



注:与正常组相比,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;与模型组相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

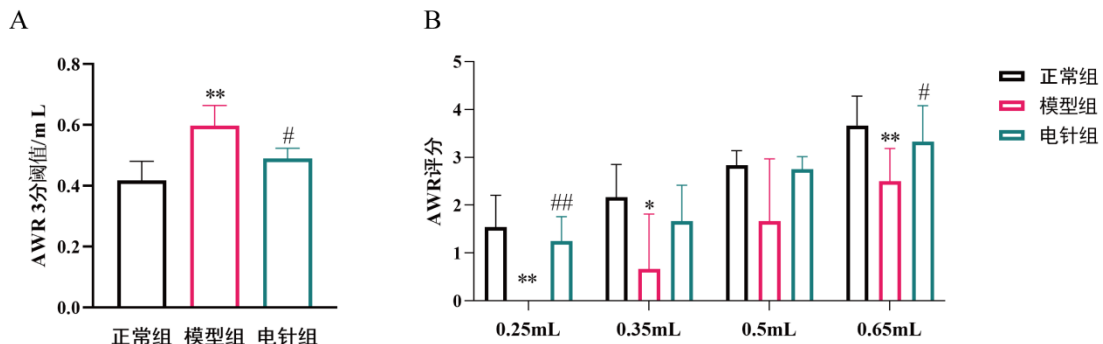
图2 各组小鼠首粒蓝便排出时间和小肠推进率比较($\bar{x} \pm s$, 8只鼠/组)

Fig. 2 Comparison of first evans blue-stained fecal pellet expulsion time and small intestinal transit rate of mice in the 3 groups ($\bar{x} \pm s$, 8 mice/group)

2.3 各组小鼠结肠敏感性评分比较

见图3。与正常组相比,模型组小鼠达到AWR评分3分阈值所需的气囊体积增加($P < 0.01$),且在结肠气囊充气至0.25 mL、0.35 mL和0.65 mL时,AWR评分降低($P < 0.01, P < 0.05$),提示FC模型

小鼠结肠敏感性明显下降。与模型组相比,电针组小鼠达到AWR评分3分阈值所需的气囊体积减少($P < 0.05$),并且在结肠气囊充气至0.25 mL和0.65 mL时,AWR评分升高($P < 0.01, P < 0.05$),表明电针治疗能够有效改善FC小鼠的结肠敏感性。



注:与正常组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

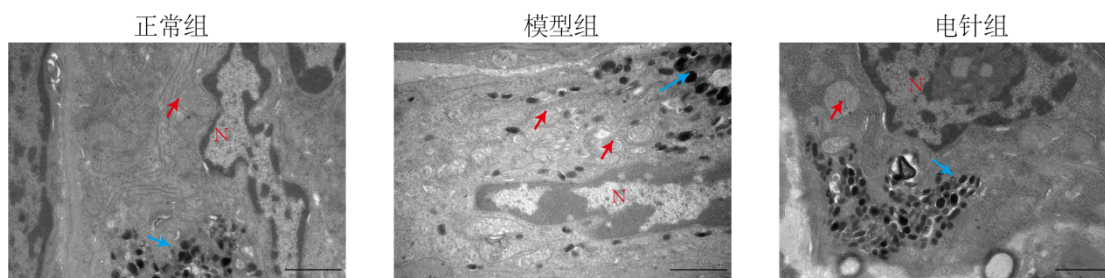
图3 各组小鼠结肠敏感性评分比较($\bar{x} \pm s$, 8只鼠/组)

Fig. 3 Comparison of colonic sensitivity scores of mice in the 3 groups ($\bar{x} \pm s$, 8 mice/group)

2.4 各组小鼠EC细胞电镜结构比较

见图4。正常组小鼠结肠EC细胞的细胞核、线粒体、分泌颗粒等形态结构正常。模型组小鼠结肠EC细胞线粒体肿胀,嵴溶解、断裂,基质丢失,分泌

颗粒数量减少。电针组小鼠结肠EC细胞的胞质内部分线粒体轻度肿胀,嵴少量断裂,基质部分丢失,分泌颗粒数量较模型组增加。以上结果提示,电针干预能够有效缓解FC小鼠EC细胞的病理损伤。



注:标尺=1 μm。N为细胞核,红色箭头为线粒体,蓝色箭头为分泌颗粒。

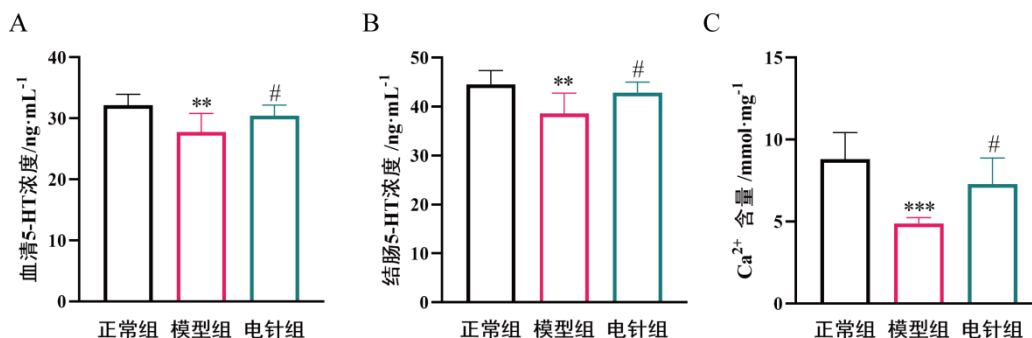
图4 各组小鼠肠嗜铬细胞电镜结构比较(3只鼠/组)

Fig. 4 Comparison of ultrastructural features of enterochromaffin cells with electron microscopy of mice in the 3 groups (3 mice/group)

2.5 各组小鼠结肠、血清5-HT和结肠Ca²⁺含量比较

见图7。与正常组相比,模型组小鼠血清、结肠

5-HT浓度和Ca²⁺含量均降低($P<0.01$, $P<0.001$);与模型组相比,电针组小鼠血清、结肠5-HT浓度和结肠Ca²⁺含量均增加($P<0.05$)。



注:与正常组相比,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与模型组相比,# $P<0.05$ 。

图7 各组小鼠结肠、血清5-HT和结肠Ca²⁺含量比较($\bar{x}\pm s$,6-8只鼠/组)

Fig. 7 Comparison of colonic and serum 5-HT levels, and colonic Ca²⁺ content of mice in the 3 groups ($\bar{x}\pm s$, 6—8 mice/group)

2.6 各组小鼠结肠Piezo1和Piezo2蛋白和基因表达比较

见图5。与正常组相比,模型组小鼠结肠的Piezo1、Piezo2蛋白及mRNA表达量均降低($P<0.001$);与模型组相比,电针组小鼠结肠Piezo1、Piezo2蛋白及mRNA表达量均增加($P<0.001$)。

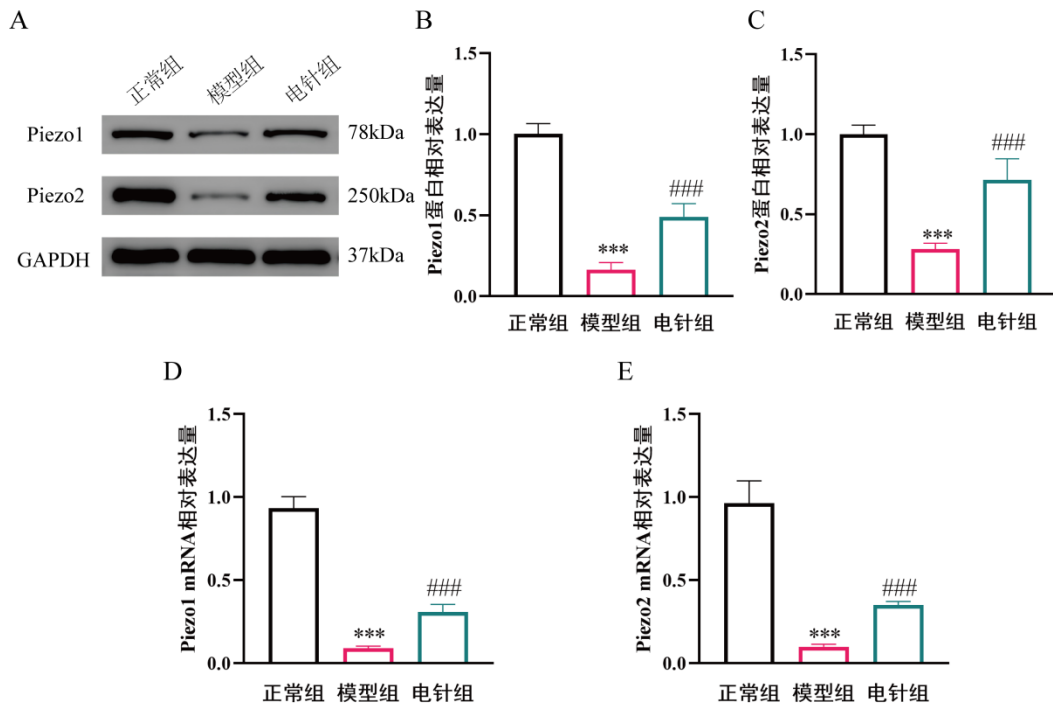
2.7 各组小鼠Piezo1、Piezo2在EC细胞中的免疫荧光定位及表达比较

见图6。Piezo1、Piezo2蛋白和EC细胞在结肠的黏膜层和肌层均有分布。与正常组小鼠相比,模型组结肠Piezo1、Piezo2蛋白和EC细胞的阳性面积占比均降低($P<0.01$),Piezo1/EC和Piezo2/EC的

共定位系数均降低($P<0.05$, $P<0.001$)。与模型组相比,电针组结肠Piezo1、Piezo2蛋白和EC细胞的阳性面积占比增加($P<0.01$, $P<0.05$),Piezo1/EC、Piezo2/EC的共定位系数增加($P<0.05$, $P<0.01$)。

3 讨论

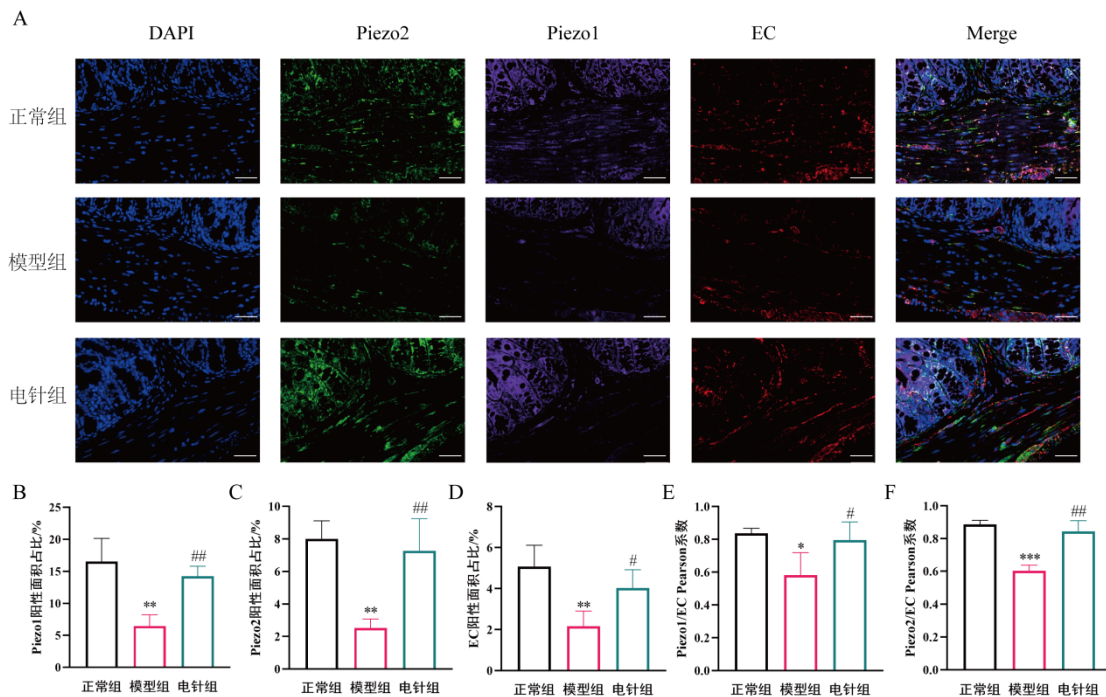
肠道动力障碍是FC的关键病理环节。本研究显示FC模型小鼠排便功能障碍,表现为粪便颗粒数减少、性状评分下降、含水率降低以及小肠推进率降低,这与FC患者的临床表现相符,验证了盐酸洛哌丁胺灌胃构建的FC模型的有效性。电针可通



注:与正常组相比,*** $P < 0.001$;与模型组相比,### $P < 0.001$ 。

图5 各组小鼠结肠 Piezo1 和 Piezo2 蛋白和基因表达比较 ($\bar{x} \pm s$, 6 只鼠/组)

Fig. 5 Comparison of Piezo1 and Piezo2 protein and gene expression in the colon of mice in the 3 groups ($\bar{x} \pm s$, 6 mice/group)



注:标尺=50 μm ,与正常组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;与模型组相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

图6 各组小鼠肠嗜铬细胞 Piezo1 和 Piezo2 阳性表达比较 ($\bar{x} \pm s$, 免疫荧光染色法, 3 只鼠/组)

Fig. 6 Comparison of positive expressions of Piezo1 and Piezo2 in enterochromaffin cells of mice in the 3 groups (immunofluorescence staining, $\bar{x} \pm s$, 3 mice/group)

过改善肠道的推进性运动,促进肠道运动功能恢复。既往研究证实,针刺能够通过调控胆碱能神经

信号通路,保护肠道神经元,有效增强远端结肠的收缩和运动能力^[15-16]。结直肠感觉异常同样是FC

的重要病理特征,FC患者常因结肠机械敏感性下降而出现“无便意”现象^[17-18]。本研究中,FC模型组小鼠AWR评分显著下降,表明结肠敏感性降低。电针治疗后,AWR评分显著增加,提示电针可能通过增强结肠对机械刺激的感知能力改善结直肠感觉异常。既往研究AWR评分多用于评估高敏状态(如肠易激综合征),但近年来也被用于评估结直肠低敏^[19],并被认为能反映肠道感觉功能的变化。未来可结合神经电生理或直肠压力测定等方法,以更全面地评估电针对结直肠感觉功能的调节作用。

EC细胞是肠道内分泌系统的主要组成部分,能够分泌多种神经递质,尤其是5-HT。5-HT通过其在平滑肌上的受体作用,不仅调节肠道的神经传导和运动功能,还与排便反射和肠道的机械感知密切相关^[20]。在FC模型中,EC细胞表现出显著的病理改变,包括线粒体肿胀、分泌颗粒减少等,导致5-HT分泌水平降低,进而引发肠道动力障碍和敏感性下降。与已有文献一致^[21],本研究结果显示电针治疗能够有效恢复EC细胞的形态,修复其线粒体功能,并增加分泌颗粒的数量,进而提升5-HT的分泌水平,调节肠道的运动和感觉。

Piezo1和Piezo2作为两种主要的机械敏感离子通道,广泛分布于肠道内的机械感知细胞中,参与肠道的张力感知、平滑肌收缩及神经反射^[7]。最近研究显示,Piezo2在EC细胞子集靠近5-HT囊泡的膜中表达,受机械刺激后引起Ca²⁺内流,促进5-HT的生成。本研究证实,电针治疗能够显著上调FC小鼠EC细胞Piezo1和Piezo2的表达水平,进而提升5-HT及Ca²⁺的含量^[22]。这表明电针可能通过调节这些机械敏感离子通道,增强EC细胞对机械刺激的感知能力,进而促进5-HT的合成和分泌,改善肠道运动功能并提高结肠敏感性。

电针可能通过多种途径调控Piezo受体,进而影响EC细胞的机械感知能力和5-HT释放。首先,作为一种机械刺激,电针可能直接激活Piezo1/2,使通道开放并介导Ca²⁺内流,从而促进5-HT分泌^[23]。其次,电针可能通过激活脊髓背根神经节,调控神经肽的释放,增强Piezo1/2的敏感性^[24-25]。此外,电针还能改善胆碱能神经功能,降低炎症反应水平,从而优化局部微环境,使Piezo1/2介导的机械敏感性进一步增强^[26]。这些作用机制仍需进一步实验验证,以明确电针对Piezo受体的具体调控方式及其在EC细胞功能调节中的作用。

Piezo通道的激活通过介导Ca²⁺流动,激活下游

信号通路,影响肠道平滑肌的收缩及神经反射^[27]。Ca²⁺作为重要的信号分子,能够增强5-HT的释放,并促进肠道的正常运动^[28]。此外,Ca²⁺通过激活细胞内的多种酶和受体,能直接参与调节平滑肌的张力和蠕动反射^[29]。因此,Ca²⁺是反映结肠机械离子通道信号和平滑肌收缩的重要指标。本研究结果显示,电针治疗能显著增加FC小鼠结肠中的Ca²⁺含量,提示其可能通过激活Piezo通道及其相关的Ca²⁺通道,增强肠道的敏感性并调节5-HT的分泌,从而恢复平滑肌正常功能以改善肠道动力。

综上所述,本研究表明,电针可能通过上调EC细胞Piezo1/2通道的表达,促进Ca²⁺内流及5-HT分泌,从而改善FC小鼠的肠道动力和结肠敏感性异常,为电针治疗功能性便秘提供了实验依据。然而,本研究仍存在一些局限性,例如缺乏对Piezo1或Piezo2通道的功能验证,未来需要引入基因干预手段深入探讨Piezo通道在电针治疗FC中的作用机制。

利益冲突

参考文献

- [1] BLACK C J, DROSSMAN D A, TALLEY N J, et al. Functional gastrointestinal disorders: advances in understanding and management [J]. *Lancet*, 2020, 396 (10263): 1664-1674.
- [2] TREICHEL A J, FINHOLM I, KNUTSON K R, et al. Specialized mechanosensory epithelial cells in mouse gut intrinsic tactile sensitivity [J]. *Gastroenterology*, 2022, 162 (2): 535-547.
- [3] YIN P, GAO N Y, DONG B, et al. Efficacy and safety of acupuncture on the treatment of functional constipation: Study protocol for a randomized controlled trial [J]. *World J Acupunct Moxibust*, 2019, 29(2): 145-152.
- [4] LIANG C, WANG K, XU B, et al. Electroacupuncture at acupoint ST 37 (Shangjuxu) improves function of the enteric nervous system in a novel mouse constipation model [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16(1): 392.
- [5] 李艳秋,姚俊鹏,鄢香芸,等.针刺治疗功能性便秘的机制研究进展[J].*针刺研究*, 2024, 49(1): 79-87.
LI Y Q, YAO J P, YAN X Y, et al. Research progress on mechanism of acupuncture in treating functional constipation [J]. *Acupuncture Research*, 2024, 49(1): 79-87.
- [6] 许明敏.基于肠道菌群探讨针刺改善FC小鼠胃肠传输功能的效应机制研究[D].四川:成都中医药大学, 2020.
XU M M. From intestinal flora to explore the effect mechanism of acupuncture treatment on improving gastrointestinal transit function in a mice FC model [D]. Sichuan: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2020.

- [7] XIAO B L. Mechanisms of mechanotransduction and physiological roles of PIEZO channels[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2024, 25(11): 886-903.
- [8] 王司琦, 鄢香芸, 李艳秋, 等. 机械敏感性离子通道Piezo在消化系统疾病中的作用[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2024, 51(08): 1883-1894.
WANG S Q, YAN X Y, LI Y Q, et al. The Role of Mechanical Sensitive Ion Channel Piezo in Digestive System Diseases[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2024, 51(08): 1883-1894.
- [9] HE J, XIE X T, XIAO Z L, et al. Piezo1 in Digestive System Function and Dysfunction[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(16): 12953.
- [10] ISRAELYAN N, DEL COLLE A, LI Z S, et al. Effects of Serotonin and Slow-Release 5-Hydroxytryptophan on Gastrointestinal Motility in a Mouse Model of Depression[J]. *Gastroenterology*, 2019, 157(2): 507-521.
- [11] CUI C, SHI Y, HONG H, et al. 5-HT₄ Receptor is Protective for MPTP-induced Parkinson's Disease Mice Via Altering Gastrointestinal Motility or Gut Microbiota [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2023, 18(4): 610-627.
- [12] HUANG J Q, Lin B, Zhang Y, et al. Bamboo shavings derived O-acetylated xylan alleviates loperamide-induced constipation in mice [J]. *Carbohydr Polym*, 2022, 276: 118761.
- [13] 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位第3部分:小鼠[J]. *针刺研究*, 2021, 46(5): 3445-446.
China Association of Acupuncture-Moxibustion. Name and positioning of common acupoints in experimental animals-Part 3: mice (in Chinese)[J]. *Acupuncture Research*, 2021, 46(5): 445-446.
- [14] 刘玮. 结肠粘膜低度炎症诱发小鼠结肠PAR-2活化和内脏感觉过敏[D]. 福建:福建医科大学, 2009.
LIU W. Low grade mucosal inflammation activated the colonic PAR-2 and visceral hypersensitivity in mice [D]. Fujian: Fujian Medical University, 2009.
- [15] ZHANG C, CHEN T, FAN M W, et al. Electroacupuncture improves gastrointestinal motility through a central-cholinergic pathway-mediated GDNF releasing from intestinal glial cells to protect intestinal neurons in Parkinson's disease rats [J]. *Neurotherapeutics*, 2024, 21(4): e00369.
- [16] YU Z. Neuromechanism of acupuncture regulating gastrointestinal motility[J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26(23): 3182-3200.
- [17] 张灵, 丁雨, 林琳. 直肠敏感性异常在功能性排便障碍中的重要性[J]. *胃肠病学*, 2019, 24(7): 440-443.
ZHANG L, DING Y, LIN L. Importance of rectal sensitivity abnormalities in functional defecation disorders [J]. *Chinese Journal of Gastroenterology*, 2019, 24(7): 440-443.
- [18] 李娟, 林宏城, 任东林. Piezos机械敏感性离子通道在直肠中的表达[J]. *广东医学*, 2015, 36(21): 3359-3361.
LI J, LIN H C, REN D L. Expression of Piezos mechanosensitive ion channels in the rectum [J]. *Guangdong Medical Journal*, 2015, 36(21): 3359-3361.
- [19] 赵军梅. 功能性便秘患儿肠道菌群对大鼠酸敏感离子通道3表达的影响及酸敏感离子通道3在肠道动力中的作用[D]. 安徽:安徽医科大学, 2020.
ZHAO J M. Effect of intestinal flora on expression of acid-sensitive ion channel 3 in rats and its regulation in intestinal motility in children with functional constipation [D]. Anhui: Anhui Medical University, 2020.
- [20] SPENCER N J, HU H. Enteric nervous system: sensory transduction, neural circuits and gastrointestinal motility [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(6): 338-351.
- [21] CHENG J, LI W M, WANG Y, et al. Electroacupuncture modulates the intestinal microecology to improve intestinal motility in spinal cord injury rats [J]. *Microb Biotechnol*, 2022, 15(3): 862-873.
- [22] ALCAINO C, KNUTSON K R, TREICHEL A J, et al. A population of gut epithelial enterochromaffin cells is mechanosensitive and requires Piezo2 to convert force into serotonin release [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(32): E7632-E7641.
- [23] Liu S J, Yang X Z, Chen X D, et al. An intermediate open structure reveals the gating transition of the mechanically activated PIEZO1 channel [J]. *Neuron*, 2025, 113(4): 590-604.
- [24] Servin-Vences M R, Lam R M, Koolen A, et al. PIEZO2 in somatosensory neurons controls gastrointestinal transit [J]. *Cell*, 2023, 186(16): 3386-3399.
- [25] Hu T, Lu M N, Chen B, et al. Electro-acupuncture-induced neuroprotection is associated with activation of the IGF-1/PI3K/Akt pathway following adjacent dorsal root ganglionectomies in rats [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(2): 807-820.
- [26] Du M H, Luo H M, Hu S, et al. Electroacupuncture improves gut barrier dysfunction in prolonged hemorrhagic shock rats through vagus anti-inflammatory mechanism [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(36): 5988-5999.
- [27] YANG H Y, HOU C F, XIAO W D, et al. The role of mechanosensitive ion channels in the gastrointestinal tract [J]. *Front Physiol*, 2022, 13: 904203.
- [28] KNUTSON K R, WHITEMAN S T, ALCAINO C, et al. Intestinal enteroendocrine cells rely on ryanodine and IP3 calcium store receptors for mechanotransduction [J]. *J Physiol*, 2023, 601(2): 287-305.
- [29] SANDERS K M, DRUMM B T, COBINE C A, et al. Ca²⁺ dynamics in interstitial cells: foundational mechanisms for the motor patterns in the gastrointestinal tract [J]. *Physiol Rev*, 2024, 104(1): 329-398.