

☆ XXXX ☆

5-羟色胺7型受体介导下电针“上巨虚”调控神经生长因子表达改善大鼠IBS内脏痛敏的机制

陈采益¹, 陈欣¹, 王暄², 王张颖¹, 林栋¹(¹福建中医药大学针灸推拿学院, 福州 350122; ²福建中医药大学成人教育学院, 福州 350122)

【摘要】 目的:探讨电针“上巨虚”调控肠易激综合征(IBS)内脏痛敏的干预机制,明确5-羟色胺7型受体(5-HT₇)依赖的神经生长因子(NGF)在其干预效应中的作用机制。方法:SD大鼠随机分为正常组、模型组、上巨虚组,每组6只。以2,4,6-三硝基苯磺酸灌肠4周后诱导大鼠IBS慢性内脏痛敏模型。上巨虚组电针“上巨虚”,每次30 min,每日1次,持续10 d。治疗结束后次日进行腹部撤回反射(AWR)评分与腹外斜肌肌电(EMG)检测;采用HE染色法观察大鼠结肠的病理形态,比色法检测大鼠结肠髓过氧化物酶(MPO)活性,采用免疫荧光法检测大鼠结肠5-HT₇、NGF分别与泛总神经标志物(PGP9.5)共表达,采用Western blot法检测结肠肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素-10(IL-10)和5-HT₇、NGF、原肌球蛋白受体激酶A(TrkA)蛋白表达。结果:与正常组比较,模型组大鼠AWR评分、EMG、结肠MPO活性升高($P<0.05$),TNF- α 蛋白表达水平上调($P<0.05$),IL-10蛋白表达水平下调($P<0.05$);结肠组织5-HT₇与PGP9.5共定位、NGF与PGP9.5共定位的阳性细胞率升高($P<0.05$),5-HT₇、NGF、TrkA的蛋白表达水平上调($P<0.05$);大鼠结肠黏膜上皮细胞结构排列紊乱,间质出现水肿现象,黏膜下层亦有炎性细胞浸润。电针“上巨虚”后上述指标均逆转($P<0.05$)。结论:电针“上巨虚”可缓解IBS内脏痛大鼠的内脏痛敏、调节结肠低度炎症反应水平,可能是通过抑制5-HT₇的过度激活下调了NGF的表达而影响结肠神经支配,从而达到治疗IBS内脏痛敏的作用。

【关键词】 肠易激综合征;电针;内脏痛敏;5-羟色胺7型受体;神经生长因子

Study on the mechanism of electroacupuncture at “Shangjuxu” (ST37) in regulating the expression of NGF mediated by 5-HT₇ receptor and relieving visceral hypersensitivity in IBS rats

CHEN Cai-yi¹, CHEN Xin¹, WANG Xuan¹, WANG Zhang-ying², LIN Dong¹ (¹College of Acupuncture-moxibustion and Tuina, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; ²College of Adult Education, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122)

【ABSTRACT】 Objective To observe the effect of electroacupuncture (EA) of “Shangjuxu” (ST37) on the visceral hypersensitivity, and expression of colonic 5-hydroxytryptamine 7 receptor (5-HT₇) and nerve growth factor (NGF) in rats with irritable bowel syndrome (IBS), so as to explore its mechanisms underlying the improvement of visceral hypersensitivity of IBS. **Methods** A total of 18 male SD rats were randomly divided into normal control, IBS model and EA groups, with 6 rats in each group. The IBS model was established by intracolonic administration of 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid (0.8 mL, 80 mg/kg, in 50% ethanol) for 4 weeks. EA (2 Hz, 1.0 mA) was applied to bilateral ST37 for 30 min, once daily for 10 days. The visceral hypersensitivity was assessed by visceromotor responses (abdominal withdrawal reflex [AWR] to 20, 40, 60, and 80 mmHg colorectal distension pressure [CRD], simultaneously. Changes of the electromyography (EMG) activities of the obliquus externus abdominis were synchronously recorded after CRD. Histopathological changes of the colonic tissue were observed after H&E staining. The activity of myeloperoxidase (MPO, an inflammatory marker) in the colon tissue was detected by colorimetry. The

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20250706

引用格式:陈采益,陈欣,王暄,等.5-羟色胺7型受体介导下电针“上巨虚”调控神经生长因子表达改善大鼠IBS内脏痛敏的机制[J].针刺研究,XXXX,XX(X):1-10.

项目来源:福建省自然科学基金项目(No.2024J01134);福建中医药大学校管课题项目(No.X2023017);福建中医药大学针灸学科开放课题项目(No.XZJ2022002)

通信作者:林栋,E-mail:bluelike1@sina.com

co-expression of 5-HT₇, NGF and pan-neural marker (PGP9.5) in the colon tissue was detected by immunofluorescence staining. The protein expression levels of colonic tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-10 (IL-10), 5-HT₇, NGF and tropomyosin receptor kinase A (TrkA) were detected by Western blot. **Results** In comparison with the normal control group, the model group showed a striking increase in the AWR scores and EMG activities in response to 20, 40, 60, and 80 mmHg CRD ($P < 0.05$), suggesting a visceral hypersensitivity after CRD. In addition, the activity of MPO, expression levels of TNF- α , 5-HT₇, TrkA and NGF proteins, and the positive cell rates of 5-HT₇/NGP9.5 dual staining, and NGF/NGP9.5 dual staining in the colon tissue were significantly increased ($P < 0.05$), while the expression of colonic IL-10 protein was obviously down-regulated in the model group than in the control group ($P < 0.05$). After EA intervention, both the AWR scores and EMG activity were considerably down-regulated ($P < 0.05$), suggesting an apparent reduction of the visceral pain. Correspondingly, both the increase of the activity of MPO, expression levels of TNF- α , 5-HT₇, TrkA and NGF proteins, and the positive cell rates of 5-HT₇/NGP9.5 and NGF/NGP9.5 dual staining, and the decrease of IL-10 protein expression were reversed by EA ($P < 0.05$). H. E. staining displayed disordered arrangement of the epithelial cells of the colon mucosa, interstitial edema, and inflammatory cell infiltration in the submucosa in the model group. While in the EA group, the epithelial cells were comparatively closely arranged, the muscular layer structure was relatively complete, and the inflammatory cell infiltration was reduced. **Conclusion** EA at ST37 can alleviate visceral hypersensitivity and regulate low-grade inflammation in the colon tissue of IBS rats, which may be related to its functions in inhibiting the overactivation of 5-HT₇ to down-regulate NGF expression, affecting the colonic nerve activities.

【KEYWORDS】 Irritable bowel syndrome; Electroacupuncture; Visceral hypersensitivity; 5-HT₇ receptor; NGF

肠易激综合征(IBS)是在心理应激、肠道感染和炎症反应史^[1-2]等多种复杂因素介导下,出现与排便习惯改变相关的复发性腹痛。尽管排便模式可能因腹泻和便秘而异,但所有IBS患者的肠扩张痛阈均较低,即内脏痛敏^[3-4],Mertz等^[5]提出内脏感知阈值降低是IBS的生物学标志。IBS患者的结肠镜活检中观察到黏膜神经纤维密度增加^[6-9],且5-羟色胺(5-HT)能神经参与了肠痛觉过敏的发病机制^[10-12]。新近研究^[13]初步诠释了5-HT作为神经递质发挥经典作用外的机制,5-羟色胺7型受体(5-HT₇)的激活上调了IBS结肠神经生长因子(NGF)的表达,促进黏膜神经生长并导致肠痛觉过敏,抑制5-HT₇激活在中枢及外周水平平均介导内脏痛觉过敏小鼠的镇痛作用,可见5-HT₇依赖性肠黏膜神经轴突生长是IBS内脏痛敏的病理改变之一。针刺作为治疗IBS的常用替代疗法之一,能够减轻IBS腹痛、改善大便性状,对IBS症状严重程度(IBS-SSS)等改善效果可持续至18周^[14],Meta分析表明针刺治疗IBS疗效确切^[15-16],但机制尚不明晰。本研究旨在从5-HT₇影响NGF表达而改变肠黏膜神经支配的角度,探讨电针治疗IBS内脏痛敏的作用机制,为临床治疗IBS提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选用雄性SPF级SD大鼠18只,体质量200~

250 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,生产许可证编号:SCXK(沪)2022-0004,由福建中医药大学实验动物中心饲养,使用许可证编号:SYXK(闽)2019-0007,其中12只大鼠用于造模,6只大鼠分为正常组。自由饮食,饲养环境为12 h/12 h昼夜节律变换,室温控制在18~24℃,湿度控制在50%~70%。实验过程中对动物的处置遵照科技部《关于善待实验动物的指导性意见》规定,并通过福建中医药大学伦理审核(批准文号:FJTCMIACUC2023072)。

1.2 主要试剂与仪器

GAPDH鼠单克隆抗体(美国Proteintech),5-HT₇兔单克隆抗体、原肌球蛋白受体激酶A(TrkA)兔单克隆抗体(美国Abcam),NGF兔单克隆抗体(杭州华安),泛总神经标志物(PGP9.5)兔单克隆抗体、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)鼠单克隆抗体、白细胞介素-10(IL-10)兔单克隆抗体、羊抗鼠IgG二抗、羊抗兔IgG二抗(美国Immunoway),2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)、PMSF蛋白酶抑制剂(大连美仑生物),苏木精、伊红染色试剂盒(北京索莱宝),PAGE凝胶快速制备试剂盒(上海雅酶),BCA蛋白含量测定试剂盒、RIPA裂解液(上海碧云天),髓过氧化物酶(MPO)比色法测试盒(武汉Elabscience),快速转膜液(苏州新赛美),双色预染蛋白Marker(美国赛默飞),TSA试剂盒、Polymer-HRP羊抗兔二抗(湖南艾方)。

多通道生理信号采集处理系统(成都仪器厂),石蜡包埋机(孝感亚光),正置荧光显微镜(日本尼康),多通道荧光扫描仪(宁波江丰),石蜡切片机、DMIL/DFC295倒置式系统显微镜、DM4000B显微图像采集系统(德国Leica),电泳仪(北京六一),ChemiDoc XRS+化学发光成像分析系统(美国Bio-Rad),高速冷冻离心机(德国艾本德),ND-100c分光光度计(杭州米欧),韩氏穴位刺激仪(南京济生),0.30 mm×13 mm无菌针灸针(苏州华佗)。

1.3 造模方法

通过TNBS灌肠诱导的炎性反应消退后内脏痛敏方法建立IBS大鼠模型^[17-18]。造模大鼠禁食24 h后,通过0.8%异氟烷呼吸麻醉大鼠,将一根导管(直径约1.0 mm)从肛门插入肠道,深度为8.0 cm,注射0.8 mL TNBS 50%乙醇混合物(5 mg TNBS溶于50%乙醇)。正常组大鼠注射0.8 mL 0.9%氯化钠溶液。所有造模大鼠头部向下放置3 min,以确保注射溶质扩散并从肛门溢出,以上操作进行1次。造模4周后,所有造模大鼠进行结肠扩张刺激(CRD)及腹部撤回反射(AWR)评分以评价模型,AWR评分比正常组大鼠显著升高出现内脏痛敏为造模成功。用随机数字表法将造模成功大鼠分为模型组、上巨虚组,每组6只。

1.4 干预方法

上巨虚组造模成功次日开始治疗,取穴方法根据文献^[18-19]并类比人体腧穴骨度分寸法量取。上巨虚位于大鼠后肢胫骨前结节外侧5 mm,膝关节下方15 mm^[20],双侧取穴,应用双极联体针^[21](使用两根针灸针,针柄分别套上直径1 mm长度为10~15 mm PE50聚乙烯管使两针之间绝缘,针柄末端露出8~10 mm便于连接电针仪,两根针套管部分用透明胶带固定,两针针身全部露出,相隔约1~1.5 mm)进行针刺,针刺深度5 mm,以2 Hz的连续波、1.0 mA的电流强度电针30 min,每日1次,持续10 d。与上巨虚组相同方法抓握、固定模型组和正常组大鼠,但不进行针刺操作。

1.5 观察指标及检测方法

最后1次治疗结束后次日进行AWR评分与腹外斜肌放电幅值(EMG)测量,评估电针对IBS大鼠的治疗作用。完成评估后次日,处死大鼠后取离肛门6 cm处的结肠2 cm,其中1 cm置于4%多聚甲醛中固定,用于HE染色,1 cm放入液氮,然后转入-80℃冰箱备用。

AWR评分检测:在进行实验之前,大鼠需要禁

食不禁水12 h,以此来降低大鼠排便量。大鼠置于麻醉诱导装置中,以4%异氟烷(流速:0.7~1 L/min)进行麻醉。将大鼠移至手术台上,继续以2%异氟烷(流速:0.7~1 L/min)维持麻醉。自肛门内置入CRD扩张球囊(CRD扩张球囊用安全套头端捆绑在外径0.2 cm的PE管上,使用时球囊外侧开口端接三通管,分别与10 mL注射器和XJ11D台式血压计相连),深度为6 cm,并将扩张球囊导管用胶布轻缚在大鼠尾端以防止其滑出。将大鼠放在20 cm×5 cm×8 cm的透明盒内,然后进行CRD刺激和AWR评分。开始正式实验前,以上操作重复3次,以最大限度地减少应激因素对实验结果的影响。AWR评分是观察动物在清醒状态下,对不同级别的CRD所产生的反应进行半定量评分。扩张压力的监控通过医用三通管连接扩张球囊和台式血压计而实现。CRD分为20、40、60、80 mmHg(1 mmHg≈0.133 kPa)4个等级,相应的AWR评分标准参照文献^[22]的方法:对CRD刺激无行为反应,评为0分;给予刺激大鼠有动作停顿后并见短暂的头部运动行为,评为1分;刺激期间,见有腹部肌肉的收缩,评为2分;如有腹部抬起行为,评为3分;身体拱起,并抬起盆腔和阴囊者,评为4分。每次CRD刺激持续20 s,间隔5 min后给予下1次刺激;每个刺激强度重复3次,取平均值作为最后的评分值。

腹外斜肌EMG测量:在大鼠腹股沟韧带上方,距离腹中线1.5 cm的位置,将银丝双极电极插入一侧腹外斜肌。通过对大鼠直肠(CRD方法同前)施加压力,设置压力梯度分别为20、40、60、80 mmHg,每次CRD刺激持续10 s,间隔时间为4 min,再执行下1轮刺激;每种刺激的强度重复进行3次。运用RM6240多通道生理信号采集处理系统,记录在不同CRD压力水平下大鼠腹外斜肌放电行为(参数配置:高频滤波3 kHz,时间常数0.001,采样频率40 Hz,灵敏度250 μV,走纸速度200 ms/div)^[23-24]。为了消除不同大鼠基础放电(刺激前的肌肉自发放电)幅值对实验结果的影响,计算在各种CRD压力下,腹外斜肌放电幅值相对于基础放电幅值的百分比,EMG(%)=腹外斜肌EMG÷基础EMG×100%,用以代表不同CRD压力下腹外斜肌EMG的变化。

HE染色检测结肠病理形态变化:结肠组织在4%多聚甲醛中固定24 h,流水冲洗后进行组织脱水、透明、浸蜡、包埋、切片(5 μm)、水化、苏木精-伊

红染色等步骤,完成后再次脱水并封片。在光学显微镜下观察结肠组织的形态学特征。

比色法测定结肠 MPO 活性:严格按照试剂盒说明书进行操作。将结肠组织称重后匀浆,加入相应的试剂,离心取上清液于酶标板中,酶标仪 460 nm 处测定各孔吸光度值,绘制标准品标准曲线后得到回归方程,并根据回归方程计算大鼠结肠 MPO 活性。

免疫荧光法检测结肠组织 PGP9.5 与 5-HT₇、PGP9.5 与 NGF 共表达水平:取每组 3 只大鼠固定后结肠组织,经流水冲洗后进行组织脱水、透明、浸蜡、包埋、切片(5 μm)、脱蜡、水化、抗原修复、封闭,甩去封闭液,滴加 5-HT₇(1:1 000)、NGF(1:500)、PGP9.5(1:1 000)一抗。4℃孵育过夜后 PBS 清洗 3 次,每次 5 min。加入 Polymer-HRP 羊抗兔二抗试剂覆盖组织,室温孵育 30 min, PBS 清洗 3 次,每次 5 min。滴加浓缩型荧光染料与 TSA buffer 按照 1:200 的比例混合均匀,均匀覆盖切片组织室温反应 5 min,后 PBS 清洗 3 次,每次 5 min。换用另外一种颜色的 TSA 荧光染料反应液,进行第 2 轮标记,操作同上。切片甩干后,滴一滴抗荧光淬灭封片剂(含 DAPI)于样本上,轻轻盖上盖玻片,尽量避免气泡,待 5 min 后于多通道荧光扫描仪下观察并采集图像。采用 Visiopharm 软件统计阳性细胞数量,阳性细胞率(%)=双标细胞数÷总细胞数×100%。

Western blot 法检测结肠 5-HT₇、NGF、TrkA、IL-10、TNF-α 蛋白表达水平:取每组 3 只大鼠结肠组织 20 mg,按照组织质量与裂解液与蛋白酶抑制剂的体积 1:100:1 加入 2.0 mL EP 管,放入研磨机研磨 30 s,后置于冰上静置 30 min,4℃离心 10 min 取上清。用 BCA 试剂盒测定总蛋白含量,随后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,按照以下步骤操作:先以 20 V 的电压运行 10 min,随后将电压调至 80 V 运行 30 min,最后以 120 V 的电压运行 60 min。电泳结束后,开始凝胶转膜,将尺寸与凝胶相适应的转膜滤纸、凝胶及 PVDF 膜依次放入转膜夹中,后置于冰浴的转膜槽中开始转膜,转膜后加入快速封闭液封闭 30 min,后用 1×TBST 清洗 3 次,每次 5 min。一抗 5-HT₇(1:5 000)、NGF(1:2 000)、TrkA(1:1 000)、TNF-α(1:1 000)、IL-10(1:1 000)4℃孵育过夜后 1×TBST 清洗 3 次,每次 5 min。加入 IgG 二抗(1:5 000),室温孵育 60 min 后 1×TBST 清洗 3 次,每次 5 min。采集图像,现配显色液(1:1),均匀滴加

至膜表面,置于全能型成像系统进行曝光拍照与结果观察,采用 Image J 软件进行灰度值测定,以 GAPDH 为内参蛋白,目的蛋白与 GAPDH 条带灰度值的比值为目的蛋白的相对表达量。

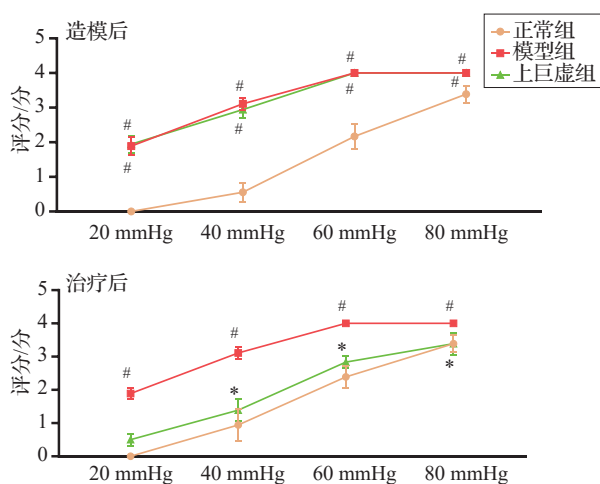
1.6 统计学分析

用 SPSS23.0 统计软件进行数据统计分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用单因素方差分析比较组间差异,多组间的两两比较,方差齐性用 LSD 检验,方差不齐用 Tamhane's *t*2 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 AWR 评分比较

造模后对各组大鼠进行 20、40、60、80 mmHg 4 个递增等级压力的刺激,记录相应的 AWR 评分。与正常组相比,模型组、上巨虚组大鼠 AWR 评分均升高($P<0.05$),表明成功诱导大鼠出现内脏痛敏。治疗后,上巨虚组在 40、60、80 mmHg 的 AWR 评分均低于模型组($P<0.05$),在 20 mmHg 差异无统计学意义,表明电针“上巨虚”能够降低 IBS 内脏痛敏模型大鼠的内脏痛敏反应。见图 1。



注:1 mmHg \approx 0.133 kPa。AWR为腹部撤回反射评分。与正常组比较,# $P<0.05$;与模型组比较,* $P<0.05$ 。

图 1 各组大鼠 AWR 评分比较($\bar{x}\pm s$, 6 只鼠/组)

Fig. 1 Comparison of AWR scores of rats in the 3 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 rats/group)

2.2 各组大鼠 EMG 比较

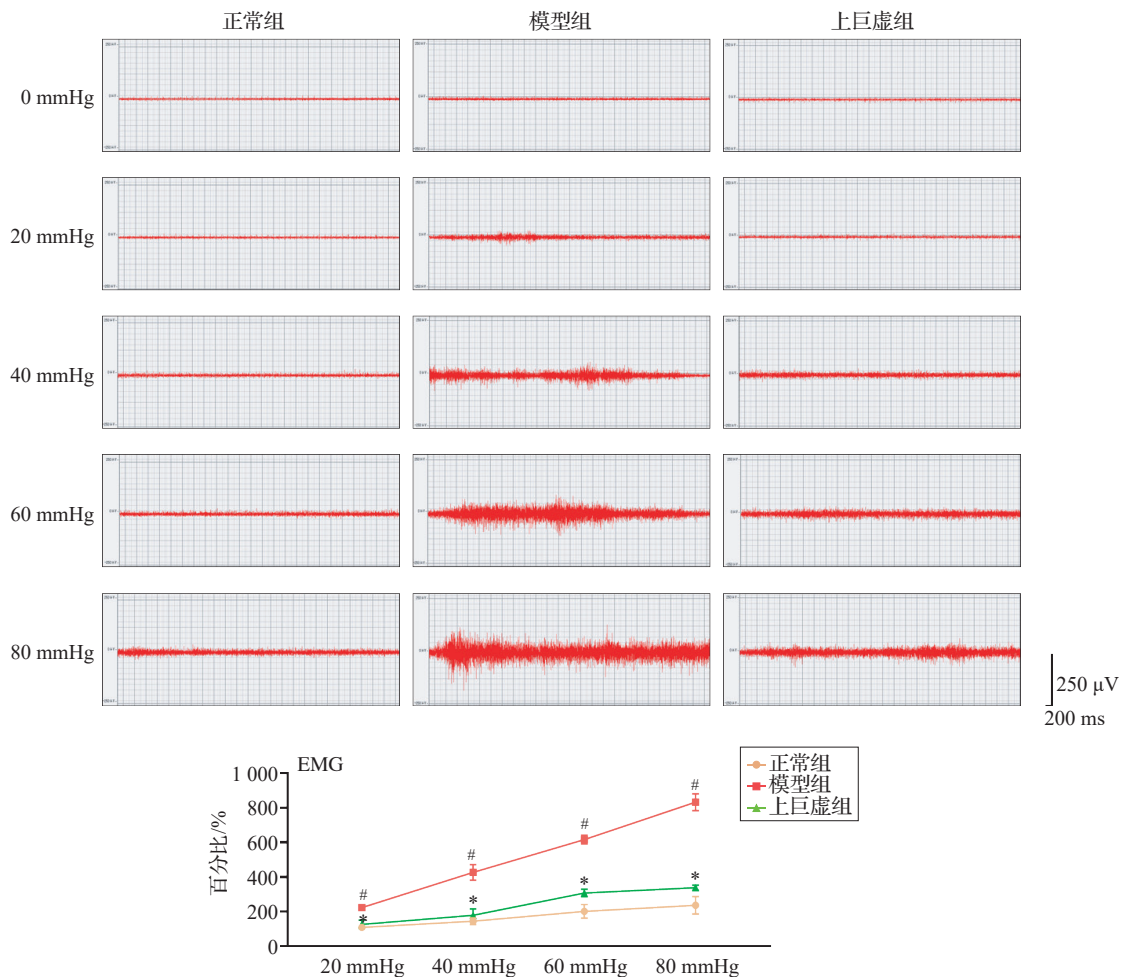
在 20、40、60、80 mmHg 4 个递增等级压力下,模型组 EMG 均高于正常组($P<0.05$)。上巨虚组 EMG 均低于模型组($P<0.05$)。见图 2。

2.3 各组大鼠结肠组织形态比较

正常组大鼠结肠黏膜上皮细胞呈单层柱状排

列,结构紧密且完整。固有层内可见黏膜肌层,其外侧为疏松的黏膜上层,再外侧为肌层,由内环行和外纵行两层平滑肌构成。两层平滑肌之间存在肌间神经丛。模型组大鼠的结肠黏膜上皮细胞结构明显疏松,细胞排列紊乱,可见少量中性粒细胞

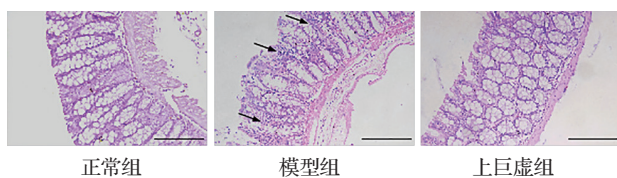
浸润,间质出现水肿现象,黏膜下层亦有炎性细胞浸润。上巨虚组大鼠的结肠黏膜形态较模型组有一定程度改善,上皮细胞排列紧密,肌层结构较为完整,黏膜下层的炎性细胞浸润现象减少,整体黏膜结构趋于正常化。见图3。



注:EMG为腹外斜肌放电幅值。与正常组比较,# $P<0.05$;与模型组比较,* $P<0.05$ 。

图2 各组大鼠EMG比较($\bar{x}\pm s$,6只鼠/组)

Fig. 2 Comparison of EMG after electroacupuncture intervention of rats in the 3 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 rats/group)



注:黑色箭头示炎性浸润,标尺=50 μm 。

图3 各组大鼠结肠组织病理形态比较(HE染色)

Fig. 3 Comparison of the pathological morphology of the colon tissues of rats in the 3 groups(HE staining)

2.4 各组大鼠结肠MPO活性和TNF- α 、IL-10蛋白表达的比较

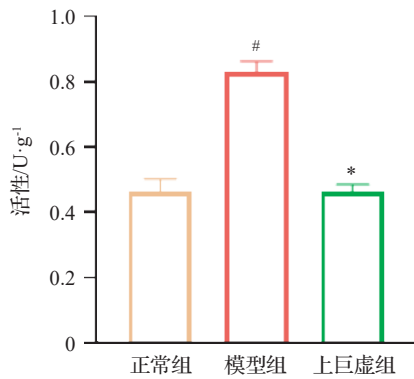
模型组大鼠结肠MPO活性和TNF- α 蛋白表达高于正常组($P<0.05$),IL-10蛋白表达低于正常组

($P<0.05$)。上巨虚组大鼠结肠MPO活性和TNF- α 蛋白表达较模型组降低($P<0.05$),IL-10蛋白表达水平升高($P<0.05$)。见图4、图5。

2.5 各组大鼠结肠5-HT₇、与PGP9.5 NGF与PGP9.5的共表达比较

与正常组相比,模型组大鼠结肠中PGP9.5分别与5-HT₇、NGF共定位的阳性细胞率明显增多($P<0.05$);与模型组相比,上巨虚组PGP9.5分别与5-HT₇、NGF共定位的阳性细胞率明显减少($P<0.05$)。见图6。

2.6 各组大鼠结肠5-HT₇、NGF、TrkA蛋白表达的比较
与正常组相比,模型组大鼠结肠中5-HT₇、



注: MPO为髓过氧化物酶。与正常组比较, [#] $P < 0.05$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$ 。

图4 各组大鼠结肠MPO活性的比较($\bar{x} \pm s$, 6只鼠/组)

Fig. 4 Comparison of MPO activity in the colon of rats in the 3 groups ($\bar{x} \pm s$, 6 rats/group)

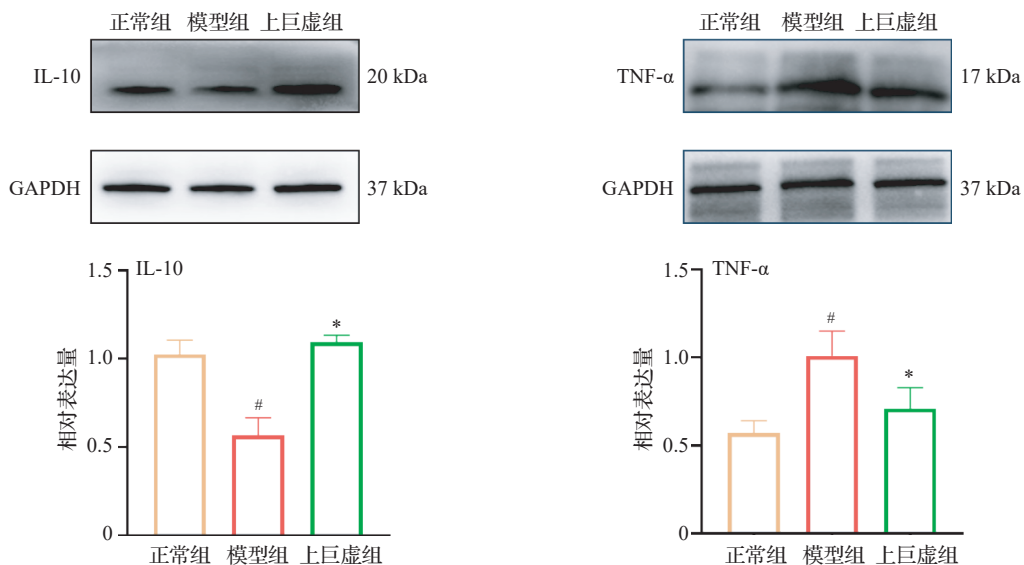
NGF、TrkA蛋白表达水平升高($P < 0.05$)。与模型组相比,上巨虚组5-HT₇、NGF、TrkA的蛋白表达水平显著下调($P < 0.05$)。见图7。

3 讨论

IBS全球总患病率为11.2%^[25],是一种常见的以内脏痛为主要表现的疾病。针刺作为治疗IBS的替代疗法之一疗效确切,且在调节IBS内脏痛敏方面疗效显著^[26-27]。研究^[28]显示电针“足三里”“上巨虚”能够缓解TNBS诱导的IBS小鼠模型的内脏及躯体高敏感性,这一效应与Epac1-Piezo2信号通路的调控密切相关。艾灸“天枢”“上巨虚”的作用可能与降低IBS大鼠肠上皮细胞自噬水平,保护肠黏

膜屏障有关^[29]。侯雨君等^[30]研究显示,电针显著缓解IBS大鼠内脏高敏等症状的机制可能与下调肥大细胞活化相关物质,上调肠道屏障紧密连接蛋白有关。电针可降低IBS模型大鼠结肠痛敏阈值^[31],对自主神经平衡性也有调整作用^[32]。“治脏者治其俞,治腑者治其合”“大肠有热,肠鸣腹满,挟脐痛,食不化,喘不能久立,巨虚上廉主之”均明确了上巨虚对大肠腑病的治疗作用,研究^[33]也显示上巨虚以治疗肠腑的病症为多。本研究电针“上巨虚”干预后,递增等级压力下的AWR评分及EMG均下降,表明电针“上巨虚”对IBS内脏痛具有改善作用。

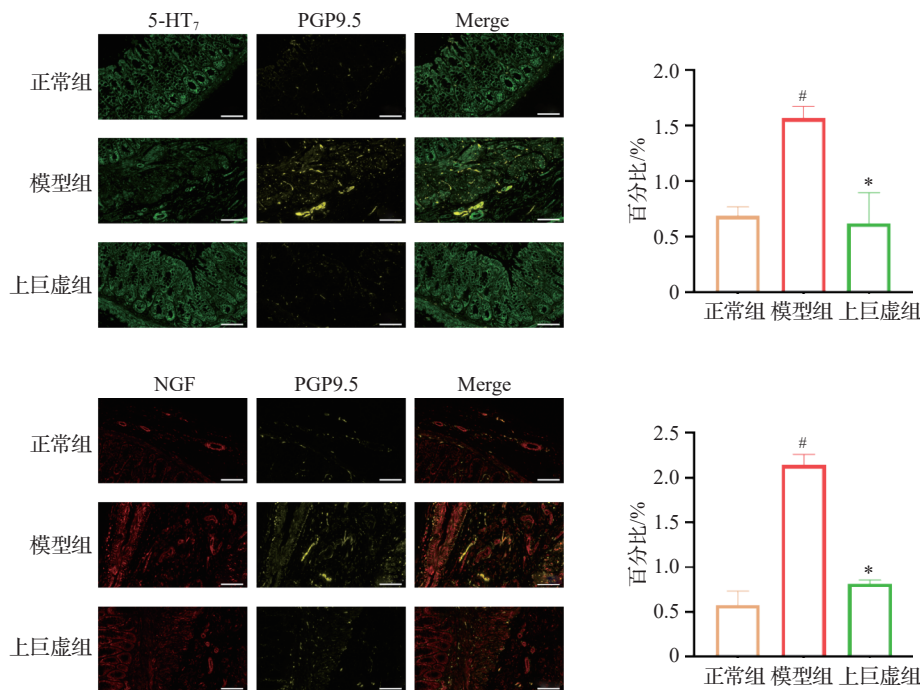
尽管IBS在临床上被视为一种无明确器质性改变的疾病,但近年来的研究表明,IBS患者存在肠道低度炎性反应现象^[34]。持续的低级别免疫激活,在维持IBS内脏痛敏反应中起着至关重要的作用^[35]。有研究表明,与健康对照组相比,IBS患者降结肠中肠神经附近脱颗粒肥大细胞的数量显著增加,炎症肠病患者在缓解期出现IBS样症状的比例高于预期^[36]。MPO是一种主要存在于中性粒细胞中的酶,常被用作炎性反应的重要标志物^[37]。本实验结果显示,经电针“上巨虚”治疗后,大鼠的结肠黏膜形态较模型组改善;模型组升高的MPO水平在电针“上巨虚”后显著降低,并且电针干预能够降低模型大鼠结肠促炎因子TNF- α 的表达,同时增加抗炎因子IL-10的表达,表明电针“上巨虚”可通过抑制炎症因子的表达,减少肠道的炎性反应,减轻内脏痛敏症状。



注: IL-10为白细胞介素-10, TNF- α 为肿瘤坏死因子 α 。与正常组比较, [#] $P < 0.05$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$ 。

图5 各组大鼠结肠TNF- α 、IL-10蛋白表达的比较($\bar{x} \pm s$, 3只鼠/组)

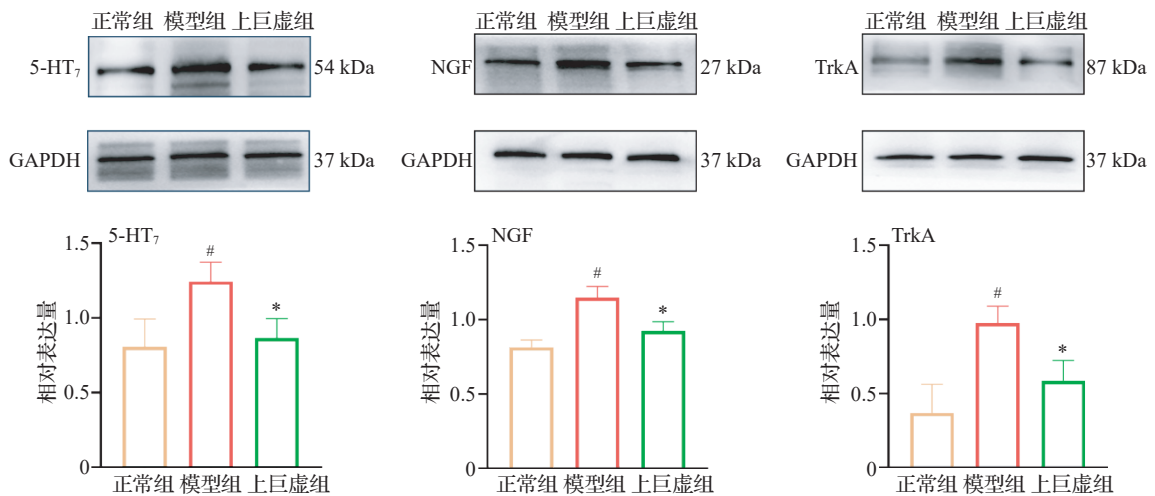
Fig. 5 Comparison of TNF- α and IL-10 protein expressions in the colons of rats in the 3 groups ($\bar{x} \pm s$, 3 rats/group)



注:5-HT₇为5-羟色胺7型受体,NGF为神经生长因子,PGP9.5为泛总神经标志物。绿色为5-HT₇阳性表达,黄色为PGP9.5阳性表达,红色为NGF阳性表达,标尺=100 μm。与正常组比较,[#]*P*<0.05;与模型组比较,^{*}*P*<0.05。

图6 各组大鼠结肠PGP9.5与5-HT₇、NGF共表达的比较(免疫荧光染色, $\bar{x} \pm s$, 3只鼠/组)

Fig. 6 Comparison of the co-expression of PGP9.5, 5-HT₇, and NGF in the colons of rats in the 3 groups (immunofluorescence staining, $\bar{x} \pm s$, 3 rats/group)



注:5-HT₇为5-羟色胺7型受体,NGF为神经生长因子,TrkA为原肌球蛋白受体激酶A。与正常组比较,[#]*P*<0.05;与模型组比较,^{*}*P*<0.05。

图7 各组大鼠结肠5-HT₇、NGF、TrkA蛋白表达的比较($\bar{x} \pm s$, 3只鼠/组)

Fig. 7 Comparison of the protein expressions of 5-HT₇, NGF and TrkA in the colons of rats in the 3 groups ($\bar{x} \pm s$, 3 rats/group)

持续的低级别炎性反应可引起肥大细胞介质、细胞因子等的释放,改变传入神经末梢上的受体和离子通道的性能,已被确定为内脏痛敏的主要机制^[38]。促炎因子TNF-α与抗炎因子IL-10等可在肠道中发挥作用,不仅促进肠道免疫细胞的激活,还

能直接作用于肠道神经元,改变其兴奋性和突触传递,从而提高内脏痛觉敏感性^[39-40]。有研究表明,在与IBS患者腹痛评分相关的黏膜活检标本中观察到神经纤维密度增加和NGF等神经营养因子水平升高^[7,9]。神经营养因子主要由神经元和胶质细胞产

生,对神经元存活、修复和神经纤维延长至关重要。NGF是最早被发现的神经生长因子之一,与其特异性受体 TrkA 的结合将诱导内脏痛敏的出现,而 TrkA 抑制剂或抗 NGF 抗体可阻断 NGF-TrkA 信号从而缓解疼痛^[41-42]。在以新生大鼠与母体分离诱导的内脏痛敏模型中,NGF 介导的神经元可塑性被证实是痛敏发生的关键因素^[43]。本团队的前期研究也表明针刺“上巨虚”治疗 IBS 慢性内脏痛敏的效应,与调控 NGF 介导的伤害性感受器上瞬时受体电位香草醛 1 的表达有关^[44]。

在啮齿动物模型中,5-HT₇受体的激活导致结肠直肠组织中 NGF 的转录水平上升,这与 IBS 患者中 NGF 水平增高的现象一致^[45]。5-HT 的受体共有 7 种亚型,其中 5-HT₇在肠道及其神经系统中的分布和功能尤为显著。5-HT₇是 5-HT 的 7 种亚型受体之一,是一种 G 蛋白偶联受体,在肠道神经元、平滑肌和结肠树突状细胞中被识别^[46]。痛觉过敏模型大鼠 5-HT₇的表达水平上调,且其受体的激活能够增强外周神经的反应性^[47]。调节外周 5-HT₇受体的活性可有效改善结肠炎小鼠的痛敏现象,来缓解肠道炎性反应^[47]。因此,抑制 5-HT₇受体的活性可能成为治疗 IBS 的有效策略。有研究显示 5-HT₇受体抑制剂 SB-269970 的抗痛觉过敏作用可能是由于阻断了内源性 5-HT 激活的 5-HT₇受体,由于鞘内注射 SB-269970 不能再现全身注射该抑制剂的抗伤害性作用,因此有研究者提出,这种作用是由于阻断了初级传入纤维上的 5-HT₇受体^[46]。抑制 5-HT₇受体可能减轻内脏疼痛及黏膜神经支配的异常,其机制在于 5-HT₇受体在神经系统中具有兴奋性作用,通过抑制相关信号通路,能够显著缓解痛觉过敏^[48]。

在 IBS 患者的活检组织中,PGP9.5 的免疫反应增多,而 5-HT₇的点状染色局限于 IBS 标本中的黏膜神经纤维(与 PGP9.5 共标),表明 5-HT₇受体阳性神经纤维在肠黏膜神经支配和肠痛觉过敏中起重要作用,而其他 5-HT 受体亚型(如 5-HT₃和 5-HT₄)则与健康受试者无明显差异^[13];且动物实验验证了 5-HT₇的激活上调了 IBS 模型结肠 NGF 的表达,增强黏膜神经生长并促进肠痛觉过敏。值得注意的是,抑制 5-HT₃或 5-HT₄对 NGF 等神经营养因子介导的轴突生长没有影响,这表明这种正反馈回路是 5-HT₇亚型特有的^[13]。本研究结果显示,与正常组相比,IBS 内脏痛敏模型大鼠结肠中 NGF 或 5-HT₇与 PGP9.5 共定位的阳性细胞率都明显增多,表明 IBS 模型的 5-HT₇受体阳性神经纤维密度升高,神

经纤维 NGF 的表达上调,产生肠痛觉过敏,经过电针“上巨虚”后则均降低,表明电针“上巨虚”可能通过抑制 IBS 大鼠结肠神经纤维中 NGF、5-HT₇的过度表达而起到改善内脏痛敏作用。与此同时,模型组大鼠结肠组织中 5-HT₇、NGF 和 TrkA 的蛋白表达也显著增加,电针“上巨虚”可显著降低这些蛋白表达水平,这一结果提示电针可能通过调节 5-HT₇介导的 NGF-TrkA 信号通路,发挥对 IBS 内脏痛敏的治疗作用。

因此,本研究结果表明电针“上巨虚”可缓解 IBS 内脏痛大鼠的内脏痛敏、调节结肠低度炎性水平,其作用机制可能是通过抑制 5-HT₇的过度激活下调了 NGF 的表达而影响结肠神经支配,从而达到治疗 IBS 内脏痛敏的作用。尽管团队目标主要聚焦于 5-HT₇和 NGF 这一信号通路,但 IBS 内脏痛的神经调节和炎性反应涉及众多复杂的信号通路。例如,5-HT 其他多种受体亚型之间可能存在广泛的相互作用,同时除了结肠低度炎性水平的变化,IBS 内脏痛还可能涉及肠道黏膜屏障的完整性改变、肠道菌群与宿主免疫系统的相互作用等复杂的机制。显然,电针对 IBS 内脏痛痛敏的研究有着复杂的网络调控效应,本研究仅从 5-HT₇介导下的 NGF 信号通路初步探讨了电针“上巨虚”对结肠痛敏的调控机制,后期研究团队拟进一步分析针刺局部的免疫相关信号调控途径,并深入探索不同电针参数组合对 IBS 内脏痛敏和结肠炎性反应的调节效果,以优化电针治疗方案。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] CIBERT-GOTON V, LAM C, LINGAYA M, et al. Pain severity correlates with biopsy-mediated colonic afferent activation but not psychological scores in patients with IBS-D [J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2021, 12(2): e00313.
- [2] CARD T, ENCK P, BARBARA G, et al. Post-infectious IBS: defining its clinical features and prognosis using an Internet-based survey [J]. *United European Gastroenterol J*, 2018, 6(8): 1245-1253.
- [3] AWAD R A, CAMACHO S. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of polyethylene glycol effects on fasting and postprandial rectal sensitivity and symptoms in hypersensitive constipation-predominant irritable bowel syndrome [J]. *Colorectal Dis*, 2010, 12(11): 1131-1138.
- [4] LANGILLE M G I, ZANEVELD J, CAPORASO J G, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 814-821.

- [5] MERTZ H, NALIBOFF B, MUNAKATA J, et al. Altered rectal perception is a biological marker of patients with irritable bowel syndrome[J]. *Gastroenterology*, 1995, 109(1): 40-52.
- [6] YU Y B, ZUO X L, ZHAO Q J, et al. Brain-derived neurotrophic factor contributes to abdominal pain in irritable bowel syndrome[J]. *Gut*, 2012, 61(5): 685-694.
- [7] DOTHEL G, BARBARO M R, BOUDIN H, et al. Nerve fiber outgrowth is increased in the intestinal mucosa of patients with irritable bowel syndrome [J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(5): 1002-1011.
- [8] AKBAR A, YIANGOU Y, FACER P, et al. Increased capsaicin receptor TRPV1-expressing sensory fibres in irritable bowel syndrome and their correlation with abdominal pain[J]. *Gut*, 2008, 57(7): 923-929.
- [9] ZHANG Y, QIN G, LIU D R, et al. Increased expression of brain-derived neurotrophic factor is correlated with visceral hypersensitivity in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(2): 269-281.
- [10] CENAC N, ALTIER C, MOTTA J P, et al. Potentiation of TRPV4 signalling by histamine and serotonin: an important mechanism for visceral hypersensitivity [J]. *Gut*, 2010, 59(4): 481-488.
- [11] LU C L, HSIEH J C, DUN N J, et al. Estrogen rapidly modulates 5-hydroxytryptophan-induced visceral hypersensitivity via GPR30 in rats [J]. *Gastroenterology*, 2009, 137(3): 1040-1050.
- [12] ZHANG L Y, DONG X, LIU Z L, et al. Luminal serotonin time-dependently modulates vagal afferent driven antinociception in response to colorectal distention in rats[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2011, 23(1): 62-69.
- [13] CHANG W Y, YANG Y T, SHE M P, et al. 5-HT (7) receptor-dependent intestinal neurite outgrowth contributes to visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome [J]. *Lab Invest*, 2022, 102(9): 1023-1037.
- [14] YANG J W, QI L Y, YAN S Y, et al. Efficacy of acupuncture in irritable bowel syndrome (ACTION): a multicenter randomized controlled trial[J]. *Gastroenterology*, 2025, 169(5): 958-969.
- [15] MA Y Y, HAO Z, CHEN Z Y, et al. Acupuncture and moxibustion for irritable bowel syndrome: an umbrella systematic review[J]. *J Integr Med*, 2024, 22(1): 22-31.
- [16] JIANG X X, GUO X T, ZHOU J H, et al. Acupuncture and moxibustion in the treatment of adult diarrhea irritable bowel syndrome: a network meta-analysis [J]. *Comput Math Methods Med*, 2022, 2022: 9919839.
- [17] SHAH M K, WAN J, JANYARO H, et al. Visceral hypersensitivity is provoked by 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced ileitis in rats [J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7: 214.
- [18] 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 Association of Acupuncture-Moxibustion. Nomenclature and location of acupoints commonly used in laboratory animals. Part 2: rats (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2021, 46(4): 351-352.
- [19] SONG Y F, PEI L X, CHEN L, et al. Electroacupuncture relieves irritable bowel syndrome by regulating IL-18 and gut microbial dysbiosis in a trinitrobenzene sulfonic acid-induced post-inflammatory animal model [J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48(1): 77-90.
- [20] CHEN C Y, YU Z, LIN D, et al. Manual acupuncture at ST37 modulates TRPV1 in rats with acute visceral hyperalgesia via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 5561999.
- [21] 陈采益, 蒯远全, 王张颖, 等. 不同强度电针与手针“上巨虚”干预急性炎性内脏痛大鼠的效应及与 $\alpha 7nAChR/PI3K/AKT$ 通路的关系[J]. 针刺研究, 2025, 50(12): 1365-1375.
CHEN C Y, LIN Y Q, WANG Z Y, et al. Effects of different intensities of electroacupuncture and manual acupuncture at “Shangjuxu” (ST37) on acute inflammatory visceral pain and their relationship with $\alpha 7nAChR/PI3K/AKT$ signaling pathway (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2025, 50(12): 1365-1375.
- [22] AL-CHAER E D, KAWASAKI M, PASRICHA P J. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development [J]. *Gastroenterology*, 2000, 119(5): 1276-1285.
- [23] 郭丽霞. PKM ζ 在肠易激综合征模型大鼠慢性内脏痛脊髓中枢敏化中的作用[D]. 福州: 福建医科大学, 2014.
GUO L X. Roles of PKM ζ in spinal central sensitization of chronic visceral pain in rats with irritable bowel syndrome (in Chinese) [D]. Fuzhou: Fujian Medical University, 2014.
- [24] 黄扬, 陈倩倩, 龚进, 等. SB203580对慢性功能性内脏痛大鼠痛觉敏感性的抑制作用[J]. 神经解剖学杂志, 2018, 34(3): 341-346.
HUANG Y, CHEN Q Q, GONG J, et al. Effect of SB203580 on visceral hypersensitivity in the irritable bowel syndrome rats (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Neuroanatomy*, 2018, 34(3): 341-346.
- [25] CAMILLERI M. Diagnosis and treatment of irritable bowel syndrome: a review [J]. *JAMA*, 2021, 325(9): 865-877.
- [26] SHEN J H, YE Y M, ZHU K X, et al. Acupuncture for diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: a randomized control study [J]. *World J Acupunct Moxibust*, 2022, 32(2): 123-130.
- [27] PEI L X, GENG H, GUO J, et al. Effect of acupuncture in patients with irritable bowel syndrome: a randomized controlled trial [J]. *Mayo Clin Proc*, 2020, 95(8): 1671-1683.
- [28] GUO J, CHEN L, WANG Y H, et al. Electroacupuncture attenuates post-inflammatory IBS-associated visceral and somatic hypersensitivity and correlates with the regulatory mechanism of Epac1-Piezo2 axis [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 918652.
- [29] 王婷, 宋小鸽, 阮静茹, 等. 基于PI3K/AKT/mTOR信号通路探讨艾灸改善腹泻型肠易激综合征大鼠肠上皮细胞自噬

- 的机制[J]. 针刺研究, 2025, 50(8): 936-945.
- WANG T, SONG X G, RUAN J R, et al. Study on the mechanism of moxibustion in improving autophagy of intestinal epithelial cells in rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome based on PI3K/AKT/mTOR signaling pathway (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2025, 50(8): 936-945.
- [30] 侯雨君, 王楷, 蒋慧灵, 等. 电针调节肥大细胞活化修复腹泻型肠易激综合征大鼠肠道屏障的机制研究[J]. 针刺研究, 2023, 48(3): 281-286.
- HOU Y J, WANG K, JIANG H L, et al. Study on the mechanism of electroacupuncture repairing intestinal barrier via regulating mast cell in rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2023, 48(3): 281-286.
- [31] 刘婷婷, 陈少宗, 赵香顺, 等. 电针天枢、上巨虚对肠易激综合征大鼠模型结肠功能的影响[J]. 针灸临床杂志, 2023, 39(11): 61-65.
- LIU T T, CHEN S Z, ZHAO X S, et al. Effect of electroacupuncture at Tianshu and Shangjuxu on colon function in rat model of irritable bowel syndrome (in Chinese) [J]. *Journal of Clinical Acupuncture and Moxibustion*, 2023, 39(11): 61-65.
- [32] 王正文, 陈碧玮, 陈少宗, 等. 电针“足三里”配伍“天枢”对肠易激综合征大鼠结肠功能及自主神经平衡性的影响[J]. 针刺研究, 2023, 48(2): 165-171.
- WANG Z W, CHEN B W, CHEN S Z, et al. Effect of electroacupuncture at “Zusanli” (ST36) and “Tianshu” (ST25) on intestinal function and autonomic nerve balance in rats with irritable bowel syndrome (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2023, 48(2): 165-171.
- [33] 范鸿颖, 张子忆, 徐伟晨, 等. 基于文献计量学探讨上巨虚的临床应用[J]. 亚太传统医药, 2020, 16(5): 142-145.
- FAN H Y, ZHANG Z Y, XU W C, et al. Discussing of modern clinical application of Shangjuxu (ST37) meridians based on bibliometric method (in Chinese) [J]. *Asia-Pacific Traditional Medicine*, 2020, 16(5): 142-145.
- [34] SCHMULSON M, CHEY W D. Abnormal immune regulation and low-grade inflammation in IBS: does one size fit all [J]. *Am J Gastroenterol*, 2012, 107(2): 273-275.
- [35] CASTRO TEJERA V, ÖHMAN L, AABAKKEN L, et al. Randomised clinical trial and meta-analysis: mesalazine treatment in irritable bowel syndrome-effects on gastrointestinal symptoms and rectal biomarkers of immune activity[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2022, 56(6): 968-979.
- [36] JONEFJÄLL B, ÖHMAN L, SIMRÉN M, et al. IBS-like symptoms in patients with ulcerative colitis in deep remission are associated with increased levels of serum cytokines and poor psychological well-being[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2016, 22(11): 2630-2640.
- [37] SANTONI A, MERCADANTE S, ARCURI E. Chronic cancer and non-cancer pain and opioid-induced hyperalgesia share common mechanisms: neuroinflammation and central sensitization[J]. *Minerva Anestesiol*, 2021, 87(2): 210-222.
- [38] BOECKXSTAENS G E, WOUTERS M M. Neuroimmune factors in functional gastrointestinal disorders: a focus on irritable bowel syndrome [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2017, 29(6). DOI:10.1111/nmo.13007.
- [39] YANG Z, ZHANG X R, ZHAO Q, et al. Knockdown of TNF- α alleviates acute lung injury in rats with intestinal ischemia and reperfusion injury by upregulating IL-10 expression[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(2): 926-934.
- [40] ROJAS O L, PRÖBSTEL A K, PORFILIO E A, et al. Recirculating intestinal IgA-producing cells regulate neuroinflammation via IL-10 [J]. *Cell*, 2019, 176(3): 610-624.
- [41] HEFTI F F, ROSENTHAL A, WALICKE P A, et al. Novel class of pain drugs based on antagonism of NGF [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2006, 27(2): 85-91.
- [42] ZAHN P K, SUBIETA A, PARK S S, et al. Effect of blockade of nerve growth factor and tumor necrosis factor on pain behaviors after plantar incision [J]. *J Pain*, 2004, 5(3): 157-163.
- [43] TSANG S W, ZHAO M, WU J, et al. Nerve growth factor-mediated neuronal plasticity in spinal cord contributes to neonatal maternal separation-induced visceral hypersensitivity in rats [J]. *Eur J Pain*, 2012, 16(4): 463-472.
- [44] 陈采益, 余芝, 纪峰, 等. NGF/PI3K/TRPV1通路介导针刺“上巨虚”调节肠易激综合征慢性内脏痛敏模型大鼠内脏痛 [J]. 针刺研究, 2023, 48(10): 1017-1024.
- CHEN C Y, YU Z, JI F, et al. NGF/PI3K/TRPV1 pathway mediates the regulation of visceral pain by acupuncture at “Shangjuxu” (ST37) in irritable bowel syndrome rats with chronic visceral hyperalgesia (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2023, 48(10): 1017-1024.
- [45] ZOU B C, DONG L, WANG Y, et al. Expression and role of 5-HT₇ receptor in brain and intestine in rats with irritable bowel syndrome [J]. *Chin Med J*, 2007, 120(23): 2069-2074.
- [46] FORD A C, BRANDT L J, YOUNG C, et al. Efficacy of 5-HT₃ antagonists and 5-HT₄ agonists in irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis [J]. *Am J Gastroenterol*, 2009, 104(7): 1831-1843.
- [47] SMITH T K, KOH S D. A model of the enteric neural circuitry underlying the generation of rhythmic motor patterns in the colon: the role of serotonin [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2017, 312(1): G1-G14.
- [48] VIGUIER F, MICHOT B, HAMON M, et al. Multiple roles of serotonin in pain control mechanisms: implications of 5-HT₇ and other 5-HT receptor types [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 716(1/2/3): 8-16.

收稿日期: 2025-07-02 修回日期: 2025-09-19