

☆ XXXX ☆

电针“上巨虚”激活骶副交感通路缓解结肠炎 机制初探

曲正阳, 宿杨帅, 刘筱羽, 骆 敏, 景向红

(中国中医科学院针灸研究所, 北京 100700)

【摘要】 目的:观察电针“上巨虚”缓解小鼠结肠炎的效应,并阐明骶副交感胆碱能神经免疫通路的介导机制。**方法:**第一部分实验将C57BL/6J小鼠随机分为正常组、模型组、电针组,每组15只。采用2.5%葡聚糖硫酸钠溶液自由饮用7天建立结肠炎模型,正常组饮水。电针组于造模第1、3、5、7天在异氟烷麻醉下行电针双侧“上巨虚”干预,每次30 min。测量各组小鼠体质量、结肠长度,计算体质量百分比;HE染色观察结肠组织病理变化;采用MSD多因子法检测结肠CXC基序趋化因子配体1(CXCL1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-6、干扰素- γ (IFN- γ)、IL-10水平;ELISA法检测结肠局部乙酰胆碱(Ach)、乙酰胆碱酯酶含量,实时荧光定量PCR法检测 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7$ nAChR)mRNA表达量。第二部分实验将C57BL/6J小鼠随机分为正常组、正常电针组,每组6只。正常电针组小鼠在第1、3、5、7天给予电针干预。采用免疫荧光染色法观察“上巨虚”电针对盆神经节乙酰胆碱转移酶(ChAT)阳性神经元的激活作用。第三部分实验使用4只ChAT-Ai14小鼠,采用免疫荧光染色法观察小鼠结肠局部ChAT阳性神经纤维与 $\alpha 7$ nAChR阳性细胞的解剖联系。第四部分实验取9只SD大鼠,采用神经电生理法观察针刺“上巨虚”对盆神经的放电影响。**结果:**与正常组相比,模型组小鼠体质量显著降低($P<0.05$, $P<0.01$),结肠长度明显缩短($P<0.01$),结肠组织病理评分升高($P<0.001$);结肠促炎因子CXCL1、TNF- α 、IL-6及IFN- γ 水平升高($P<0.01$, $P<0.05$);乙酰胆碱酯酶含量及 $\alpha 7$ nAChR mRNA表达显著降低($P<0.01$)。与模型组相比,电针组小鼠体质量下降幅度显著减缓($P<0.05$),结肠长度得以恢复($P<0.05$),结肠组织损伤明显减轻,病理评分降低($P<0.001$);结肠促炎因子CXCL1、TNF- α 、IL-6及IFN- γ 水平降低($P<0.05$, $P<0.01$),抗炎因子IL-10水平升高($P<0.01$);乙酰胆碱酯酶含量及 $\alpha 7$ nAChR mRNA表达显著升高($P<0.01$)。与正常组相比,“上巨虚”电针可激活结肠炎小鼠的盆神经节ChAT阳性神经元($P<0.01$)。ChAT-Ai14小鼠显示结肠局部ChAT阳性神经纤维与 $\alpha 7$ nAChR阳性细胞存在解剖毗邻。“上巨虚”针刺可使盆神经放电显著增加($P<0.001$)。**结论:**电针“上巨虚”通过激活骶副交感胆碱能神经免疫通路缓解小鼠结肠炎性反应,其机制可能与电针驱动盆神经节ChAT神经元-盆神经、进而调控结肠局部 $\alpha 7$ nAChR介导的抗炎效应有关。

【关键词】 电针;上巨虚;溃疡性结肠炎;神经免疫调控;骶副交感胆碱能通路

Electroacupuncture at “Shangjuxu” (ST37) activates the sacral parasympathetic pathway to alleviate colitis

Qu Zhengyang, Su Yangshuai, Liu Xiaoyu, Luo Min, Jing Xianghong (Institute of Acupuncture and Moxibustion, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

【ABSTRACT】 Objective To observe the therapeutic effect of electroacupuncture (EA) at “Shangjuxu” (ST37) on colitis in mice, and to elucidate the mediating mechanism of the sacral parasympathetic cholinergic neuroimmune pathway. **Methods** In the first experiment, C57BL/6J mice were randomly assigned to a normal group, a model group, and an EA group, with 15 mice in each group. The colitis model was established by ad libitum administration of 2.5% dextran sodium sulfate solution for 7 days, while the normal group received plain drinking water. Mice in the EA group were subjected to EA stimulation at bilateral ST37 for 30 min per session under isoflurane anesthesia on days 1,

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20251317

引用格式:曲正阳,宿杨帅,刘筱羽,等.电针“上巨虚”激活骶副交感通路缓解结肠炎机制初探[J].针刺研究,XXXX,XX(X):1-10.

项目来源:

通信作者:

3, 5 and 7 of model induction. The body weight and colon length of mice in each group were measured, and the percentage change in body weight was calculated. HE staining was used to observe pathological alterations in colonic tissues. The MSD multiplex assay was adopted to detect colonic levels of C-X-C motif chemokine ligand 1 (CXCL1), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-6, interferon- γ (IFN- γ), and IL-10. ELISA was used to measure the contents of acetylcholine (ACh) and acetylcholinesterase (AChE) in colonic tissues, and quantitative real-time PCR was performed to detect the mRNA expression of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ nAChR). In the second experiment, C57BL/6J mice were randomly divided into a normal group and a normal EA group, with 6 mice per group. Mice in the normal EA group received EA intervention on days 1, 3, 5 and 7. Immunofluorescence staining was applied to observe the activating effect of EA at ST37 on choline acetyltransferase (ChAT)-positive neurons in pelvic ganglia. In the third experiment, four ChAT-Ai14 reporter mice were used. Immunofluorescence staining was performed to observe the anatomical association between ChAT-positive nerve fibers and $\alpha 7$ nAChR-positive cells in the colon. In the fourth experiment, 9 SD rats were collected, and neuroelectrophysiology was used to observe the influence of acupuncture at ST37 on the discharge activity of pelvic nerves. **Results** Compared with the normal group, the model group exhibited significantly reduced body weight ($P < 0.05$, $P < 0.01$), markedly shortened colon length ($P < 0.01$), and elevated pathological scores of colonic tissues ($P < 0.001$). The levels of pro-inflammatory factors including CXCL1, TNF- α , IL-6 and IFN- γ were increased ($P < 0.01$, $P < 0.05$), whereas the content of AChE and the mRNA expression of $\alpha 7$ nAChR were significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the EA group showed a markedly alleviated loss of body weight ($P < 0.05$), recovered colon length ($P < 0.05$), attenuated colonic tissue injury and decreased pathological scores ($P < 0.001$). The colonic levels of pro-inflammatory factors CXCL1, TNF- α , IL-6 and IFN- γ were downregulated ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while the anti-inflammatory factor IL-10 was upregulated ($P < 0.01$). In addition, the AChE content and $\alpha 7$ nAChR mRNA expression were significantly elevated in the EA group ($P < 0.01$). EA at ST37 significantly activated ChAT-positive neurons in pelvic ganglia of colitic mice relative to the normal group ($P < 0.01$). Anatomical proximity was observed between ChAT-positive nerve fibers and $\alpha 7$ nAChR-positive cells in the colon of ChAT-Ai14 mice. Acupuncture at ST37 markedly increased the discharge frequency of pelvic nerves ($P < 0.001$). **Conclusion** EA at ST37 alleviates colonic inflammatory response in mice by activating the sacral parasympathetic cholinergic neuroimmune pathway. The underlying mechanism may be related to EA-evoked activation of ChAT neurons in pelvic ganglia and pelvic nerves, which further regulates the anti-inflammatory effects mediated by colonic $\alpha 7$ nAChR.

【KEYWORDS】 Electroacupuncture; Shangjuxu (ST37); Ulcerative colitis; Neuroimmune regulation; Sacral parasympathetic pathway

炎性肠病(IBD)是一种可累及结肠全节段的慢性炎性肠道疾病,包括溃疡性结肠炎和克罗恩病。该病发病机制复杂,免疫器官异常、神经反射紊乱可诱发免疫应答失衡,叠加肠道菌群失调、环境刺激与遗传易感因素,共同破坏肠黏膜免疫屏障。患者常以腹痛、腹泻、血便为典型临床表现,疾病会严重损害其劳动能力与生活质量^[1-2]。目前临床治疗IBD的方法主要包括糖皮质激素、促炎因子拮抗剂等药物,但外源性的激素和生物制剂存在不良反应较大、疗效不显著、易耐药及易复发等难以回避的问题^[3-4]。因此,探索并构建安全有效、机制明确的新型非药物干预方案,对IBD的综合管理具有深远意义。

近年来,多项基础研究揭示了自主神经系统与免疫系统之间存在密切的解剖学联系和生理功能联动,自主神经-免疫相互作用机制在机体多种生理和病理过程中发挥着至关重要的作用^[5-7]。其中,副

交感抗炎通路的激活成为IBD抗炎研究的焦点:迷走神经通过胆碱能抗炎通路发挥系统性抗炎效应,其传出纤维释放乙酰胆碱(ACh),作用于脾脏等免疫器官的 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7$ nAChR),从而减轻局部及全身的炎性反应^[6,8-9];此外,对IBD模型动物实施骶神经刺激后,其疾病活动度显著下降,肠道通透性改善、组织结构破坏程度减轻,同时系统性炎性反应也得到有效抑制,这一结果提示骶副交感神经同样参与了肠道炎性反应的调控^[10-11]。

溃疡性结肠炎作为IBD的重要组成部分,是针灸临床有效病种。文献研究表明:针灸治疗结肠炎常选用上巨虚,即大肠的“下合穴”^[12-13]。近年来国内外学者围绕针刺缓解结肠炎性反应的效应机制进行了一系列严谨可信的科学研究^[14]。针灸引发的“体表-自主神经”反射被认为是穴位调节内脏功能的神经生物学基础,其中自主神经除参与胃肠道感觉、运动、分泌和局部血流的调节以外,其在维持肠

道“炎症反应-免疫”稳态中的作用亦受到越来越多的关注^[7,15-16]。本课题组以往研究表明:电针下肢穴位可有效缓解结肠炎大鼠结肠炎性损伤,其机制可能与激活迷走胆碱能抗炎通路有关^[17];然而,电针改善结肠炎性反应的骶副交感神经介导的免疫机制尚不明确。本研究拟在验证电针“上巨虚”缓解结肠炎性反应有效性的基础上,观察电针对结肠炎模型小鼠盆神经节及盆神经的激活作用,以及结肠局部胆碱能神经-免疫调控的变化,进而探索骶副交感神经系统在电针缓解IBD中的神经免疫机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

实验过程遵循2006年科技部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》,并通过中国中医科学院针灸研究所伦理委员会批准(伦理号:Y2025-3-12-19)。C57BL/6J雄性小鼠(21~23 g)及SD雄性大鼠(110~130 g)由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供,生产许可证号:SCXK(京)2021-0006。Ai14及ChAT-Cre纯合子小鼠(23~27 g)由上海南方模式生物科技股份有限公司提供,生产许可证号:SCXK(沪)2024-0007。ChAT-Cre与Ai14小鼠杂交获得的ChAT-Ai14子代雄性小鼠(21~23 g)亦用于本研究。所有动物自由摄食、饮水,自然光照节律,适应性饲养1周。

第一部分实验:随机将C57BL/6J小鼠分为正常组、模型组、电针组,每组15只;其中每组9只用于评估小鼠体质量,其中7只(剔除每组体质量最大及最小的小鼠)用于评估结肠长度、结肠局部炎症因子含量、结肠局部ACh及乙酰胆碱酯酶含量、结肠局部 $\alpha 7$ AChR mRNA表达量;其余6只用于结肠HE病理切片染色等实验。

第二部分实验:取12只C57BL/6J小鼠随机分为正常组、正常电针组,每组6只,两组小鼠均自由饮水,正常电针组电针干预1次后即对两组小鼠进行灌流取材,取盆神经节进行乙酰胆碱转移酶(ChAT)和Fos原癌基因蛋白(c-Fos)的免疫荧光共染。

第三部分实验:使用4只ChAT-Ai14小鼠用于远端结肠节段ChAT阳性纤维与 $\alpha 7$ nAChR的免疫荧光染色。

第四部分实验:因小鼠盆神经过短、过细,钩挂电极困难且神经束极易断裂,本部分实验使用9只SD大鼠进行盆神经电生理记录。

1.2 主要试剂和仪器

异氟烷(青岛欧博方),c-Fos抗体、ChAT抗体(美国EMD Milipore Corp), $\alpha 7$ nAChR抗体、Alexa Flour 488标记山羊抗兔二抗、ACh ELISA试剂盒、乙酰胆碱酯酶ELISA试剂盒(英国Abcam),Alexa Flour 594标记驴抗兔二抗、Alexa Flour 488标记驴抗山羊二抗(美国Invitrogen),DAPI染色液(美国BD Pharmingen),驴血清(北京赛美斯特),多聚甲醛(北京永泰兴成),葡聚糖硫酸钠(DSS,美国APEX BIO),乌拉坦、Triton x-100、实时荧光定量PCR试剂盒(美国Sigma),无水磷酸二氢钠、十二水合磷酸氢二钠(上海阿拉丁),HE染色试剂盒(北京索莱宝),HiScript III第一链cDNA合成试剂盒(含gDNA wiper,南京万泽),MSD多因子检测试剂盒(美国Meso Scale Discovery)。

小动物吸入麻醉机(深圳瑞沃德),多通道刺激仪(美国Blackrock Microsystems),华佗牌针灸针(0.18 mm $\times$ 13 mm,苏州医疗用品厂),共聚焦显微镜(日本Nikon),神经电生理记录分析系统(美国AM Systems),MSD多因子检测仪(美国Meso Scale Discovery),全自动恒冷箱冰冻切片机(德国徕卡),全波长扫描式多功能酶标仪(美国Thermo),温度梯度PCR仪(美国Veriti 96 Well Thermal Cycler),0.01 g高精度电子秤(浙江永康友恒)。

1.3 小鼠结肠炎模型建立

采用浓度为2.5%的DSS溶液(25 g DSS粉末溶于纯水后,定容至1 L)供模型组、电针组小鼠自由饮用7 d,建立小鼠结肠炎模型^[18-19]。第8~9天恢复饮水。正常组及正常电针组小鼠全程正常饮水。小鼠出现明显稀便、便血,即造模成功^[19]。2.5%浓度DSS饮用7 d的小鼠造模成功率为100%^[20]。

1.4 干预方法

第一部分实验:电针组小鼠在造模流程的第1、3、5、7天给予电针干预,每日上午1次。小鼠电针干预方法:小鼠经气体麻醉后,双侧“上巨虚”各使用两支针灸针平行刺入,穴位位于小鼠膝关节后外侧、腓骨小头下方约4 mm,针刺深度2 mm。每个穴区的两针柄分别连接电针仪的输出端,给予强度1 mA、波宽0.5 ms、频率2~15 Hz的断续波电流刺激,留针30 min。正常组、模型组小鼠同步进行相同参数麻醉,但不进行电针干预。

第二部分实验:正常组及正常电针组小鼠皆不饮用DSS而饮水。正常电针组小鼠在第1、3、5、7天给予电针干预,每日上午1次,方法同上。正常组

小鼠给予相同条件的麻醉,不进行电针操作。

第三部分实验:ChAT-Ai14小鼠造模后给予单次电针干预,2 h后灌流取材。

第四部分实验:SD雄性大鼠暴露盆神经并使用双钩电极钩挂后,取双侧“上巨虚”行手针刺刺激60 s,记录盆神经在针刺前后的放电频率变化。大鼠手针干预方法:因大鼠“上巨虚”局部电针会引起下肢肌肉颤动,进而带动盆腔颤动,极大影响盆神经电生理记录的稳定性和数据可分析性,因此本部分实验观察手针刺刺激“上巨虚”对盆神经放电的影响。双侧“上巨虚”各使用1支针灸针刺入,取穴位置信息同上,针刺深度2 mm,针柄末端包绕圆柱状、带2个对称点状标记的海绵团。双手拇指、食指各捏住针柄,以海绵团标记为参考,进行180°往返捻转运动,频率约往返1次/s。

本实验动物采用1.5%异氟烷混合氧气实施气体吸入式全身麻醉。若需处死,则气体麻醉后通CO₂安乐死。

1.5 检测指标及方法

测量各组小鼠体重质量:比较各组小鼠造模后第1~9天每天的体重质量变化,结合稀便、便血情况评估模型建立程度。体重质量百分比(%)=(小鼠实时体重质量÷同一只小鼠第0天体重质量)×100%。

测量各组小鼠结肠长度:第9天以1.5%异氟烷混合氧气气体麻醉后,行CO₂安乐死并取材。剪取小鼠全结肠,无牵拉状态下测量结肠长度(cm)。

HE染色观察结肠组织病理变化:小鼠经左心室穿刺插管灌流,剪开右心耳,先以37℃0.9%氯化钠溶液以3 mL/min速率灌流至血液排净,再换用4℃的4%多聚甲醛溶液以3 mL/min速率灌流固定。取结肠组织(自脾曲至直肠),经常规固定、脱水、包埋后,切取3 μm厚度切片,行HE染色,在共聚焦显微镜下观察结肠组织结构及炎性细胞浸润等病理改变。病理评分标准:0分:无炎性反应;1分:轻度炎性反应,可见散在炎性细胞浸润;2分:中度炎性反应,炎性细胞多灶浸润;3分:重度炎性反应,伴明显黏膜增厚水肿及炎性细胞大面积浸润;4分:极重度炎性反应,伴弥漫性炎性细胞浸润及杯状细胞缺失。

采用MSD超敏电化学发光多因子法检测结肠炎性因子水平:各组小鼠处死后取结肠组织约50 mg,加入10倍质量的RIPA裂解液匀浆、离心后提取总蛋白。BCA蛋白定量后,将所有样本蛋白浓度调至一致。按MSD多因子检测试剂盒说明书进

行封闭、洗板后,加入结肠组织蛋白样品50 μL,于750 r/min摇床上室温孵育2 h;洗板后加入待检测因子抗体,包括CXC基序趋化因子配体1(CXCL1)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素(IL)-6、干扰素-γ(IFN-γ)、IL-10等,750 r/min室温孵育2 h;再次洗板后加入读板缓冲液,于MSD多因子检测仪上读取电化学发光信号。

ELISA法检测结肠局部Ach、乙酰胆碱酯酶含量:取结肠组织50 mg,加入10倍质量试剂盒专用Assay Buffer,冰上匀浆后离心取上清,BCA蛋白定量后,分别用于Ach及乙酰胆碱酯酶检测。Ach含量测定:取上清分别加入含或不含乙酰胆碱酯酶的Choline Reaction Mix,室温孵育30 min,使样本中的游离胆碱及乙酰胆碱水解产生的胆碱与Choline Probe反应显色,于酶标仪570 nm波长处读取吸光度值,通过标准曲线计算总胆碱与游离胆碱含量,二者差值即为Ach含量。乙酰胆碱酯酶活性测定:取结肠组织匀浆上清加入含DTNB及Acetylthiocholine的反应体系,室温孵育10~30 min,乙酰胆碱酯酶催化水解产生的Thiocholine与DTNB形成黄色复合物,于酶标仪410 nm波长处读取吸光度值;根据乙酰胆碱酯酶标准曲线计算酶活性。两项浓度结果均以BCA法测定的组织蛋白浓度进行归一化,最终单位以nmol/μg表示。

实时荧光定量PCR法检测α7nAChR mRNA水平:取结肠组织约50 mg,液氮速冻后于-80℃冰箱保存;使用Trizol试剂提取总RNA,经纯度及浓度检测后反转录合成cDNA,所得cDNA保存于-20℃冰箱备用。PCR扩增所用引物序列如下:α7nAChR上游引物5'-CAGTGAGTGGGAAGTTTGCG-3',下游引物5'-TTTGGGGCTGACATGAGGA-3',产物长度149 bp;内参基因β-actin上游引物5'-CCATCTACGAGGGCTATGCT-3',下游引物5'-CTTTGATGTCACGCACGATT-3',产物长度150 bp。按实时荧光定量PCR试剂盒说明书配置反应体系,并将其加载到96孔PCR板中。反应程序为:95℃30 s预变性;随后40个循环的95℃10 s、60℃30 s、72℃30 s扩增;最后进行熔解曲线分析。采用2^{-ΔΔCt}法计算基因相对表达量,并以β-actin为内参基因进行标准化校正。

免疫荧光染色检测:按照上述方法灌流,取C57BL/6J小鼠盆神经节进行ChAT、c-Fos免疫荧光共染,取ChAT-Ai14小鼠结肠组织进行α7AChR、DAPI免疫荧光共染。后固定、脱水、包埋

后切片,厚度为20 μm ,贴于载玻片上。用0.1 mol/L PB漂洗5 min,3次;5% 驴血清室温下孵育1 h;加入兔抗小鼠-c-Fos 一抗(1:1 000)、山羊抗小鼠-ChAT 一抗(1:200)孵育4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;PB漂洗5 min,3次;加入相应二抗(1:10 000)37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h;PB缓冲液漂洗10 min,3次;晾干;使用抗荧光淬灭封片剂进行封片,等待0.5 h后进行拍照。在共聚焦显微镜下进行观察、采集图像。应用Image J软件计阳性神经元个数。ChAT 阳性神经元激活百分比(%)=(视野内ChAT 神经元与c-Fos 共标个数 $\div$ 视野内ChAT 神经元总个数) $\times 100\%$ 。

盆神经电生理实验:将大鼠下腹部备皮后,沿脐下方、阴茎根部上方正中线向左侧腹股沟方向剪2 cm 切口,钝性分离肠管及腹网膜等周围组织,找到位于膀胱背侧、前列腺左侧的盆神经节。用玻璃分针小心分离自盆神经节发出、走行于前列腺后方的盆神经。于盆神经周围滴入37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的液体石蜡,使盆神经与周围组织隔离并保持活性,用双极铂丝钩状电极悬置神经,待信号稳定后记录。电极连接至电生理记录仪,信号经AM1800放大器放大后,由CED1401 数据采集系统进行滤波(30 Hz~20 kHz)并提取放电信号。使用Spike2 v8.06 软件实时显示并存储数据。放电信号记录分三个时段:1 min 盆神经放电基线期、双侧“上巨虚”针刺期1 min、针刺后恢复期1 min。

1.6 统计学分析

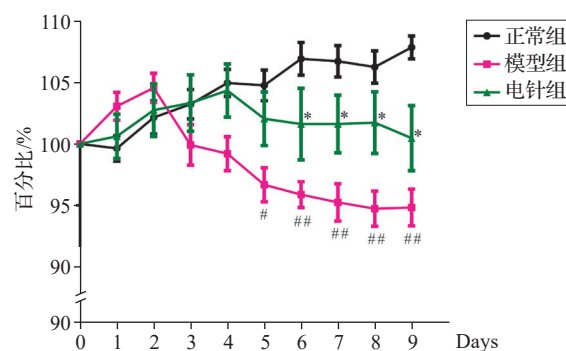
本研究采用SPSS Statistics 24.0 软件对数据进行统计分析。计量资料经Shapiro-Wilk 检验评估正态性,所有计量资料以均值 $\pm$ 标准误($\bar{x}\pm s_x$)的形式呈现。Levene 检验评估方差齐性,方差齐的数据组间比较采用独立样本 t 检验或单因素方差分析,采用LSD 法或Tukey 法进行组间两两比较;方差不齐的数据,采用Mann-Whitney U 检验。电生理数据

及体质量等时间序列资料采用单因素重复测量方差分析。以 $P\leq 0.05$ 为差异具有统计学意义的判定标准。

2 结果

2.1 电针“上巨虚”可一定程度缓解结肠炎模型小鼠的体质量流失

正常小鼠基线体质量约为22 g,造模期间体质量呈稳步增长态势,第9天时增至初始体质量的107.87%。模型组小鼠自第3天起体质量急剧下滑,第5天即显著低于初始水平($P<0.05$),至第9天降至初始体质量的94.82%($P<0.01$)。予以电针干预后,结肠炎模型小鼠体质量的跌落幅度明显趋缓($P<0.05$)。见图1。



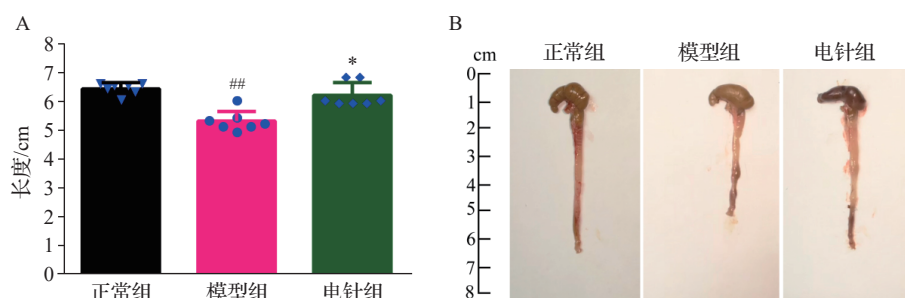
注:与正常组比较, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$;与模型组比较, $^{*}P<0.05$ 。

图1 各组小鼠体质量百分比变化情况比较($\bar{x}\pm s_x$, 9只/组)

Fig. 1 Comparison of the percentage changes in body weight of mice in the 3 groups ($\bar{x}\pm s_x$, 9 mice/group)

2.2 电针“上巨虚”可改善结肠炎模型小鼠结肠的缩短

在各组小鼠造模的第9天,模型组小鼠结肠长度较正常组明显缩短($P<0.01$);电针干预后,结肠长度得以恢复性延长($P<0.05$)。见图2。



注:A为各组小鼠结肠长度统计图;B为各组小鼠结肠实例图。与正常组比较, $^{##}P<0.01$;与模型组比较, $^{*}P<0.05$ 。

图2 各组小鼠结肠长度比较($\bar{x}\pm s_x$, 7只/组)

Fig. 2 Comparison of colon length of mice in the 3 groups ($\bar{x}\pm s_x$, 7 mice/group)

2.3 电针“上巨虚”可改善结肠炎模型小鼠结肠炎性反应损伤

与正常组相比,模型组结肠固有层结构破坏严重,病理评分升高($P<0.001$);电针组则组织结构趋于完整,黏膜下层水肿消退,炎性细胞浸润明显减少,病理评分降低($P<0.001$)。见图3。

2.4 电针“上巨虚”可降低结肠炎模型小鼠结肠异常升高的炎性因子

结肠局部促炎因子检测显示,模型组 CXCL1、TNF- α 、IL-6 及 IFN- γ 水平较正常组显著升高($P<0.01$, $P<0.05$),电针干预后上述因子水平降低($P<0.05$, $P<0.01$)。抗炎因子 IL-10 在模型组中较正常组无显著变化,电针“上巨虚”后则明显升高($P<0.01$)。见图4。

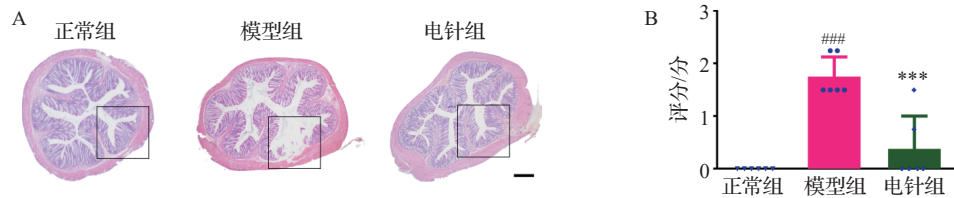
2.5 电针可激活结肠局部胆碱能抗炎系统

虽各组小鼠结肠局部 Ach 含量差异无统计学意

义,但鉴于 Ach 半衰期极短、易被乙酰胆碱酯酶水解灭活,且其效应靶点 $\alpha 7nAChR$ 的表达丰度直接决定胆碱能抗炎通路效能,故进一步检测了结肠局部乙酰胆碱酯酶含量及 $\alpha 7nAChR$ mRNA 表达。结果显示,模型组乙酰胆碱酯酶含量和 $\alpha 7nAChR$ mRNA 表达较正常组显著降低($P<0.01$);电针干预后,与模型组相比,乙酰胆碱酯酶含量和 $\alpha 7nAChR$ mRNA 表达回升至接近正常组水平($P<0.01$)。见图5。

2.6 电针“上巨虚”可激活小鼠盆神经节 ChAT 阳性神经元

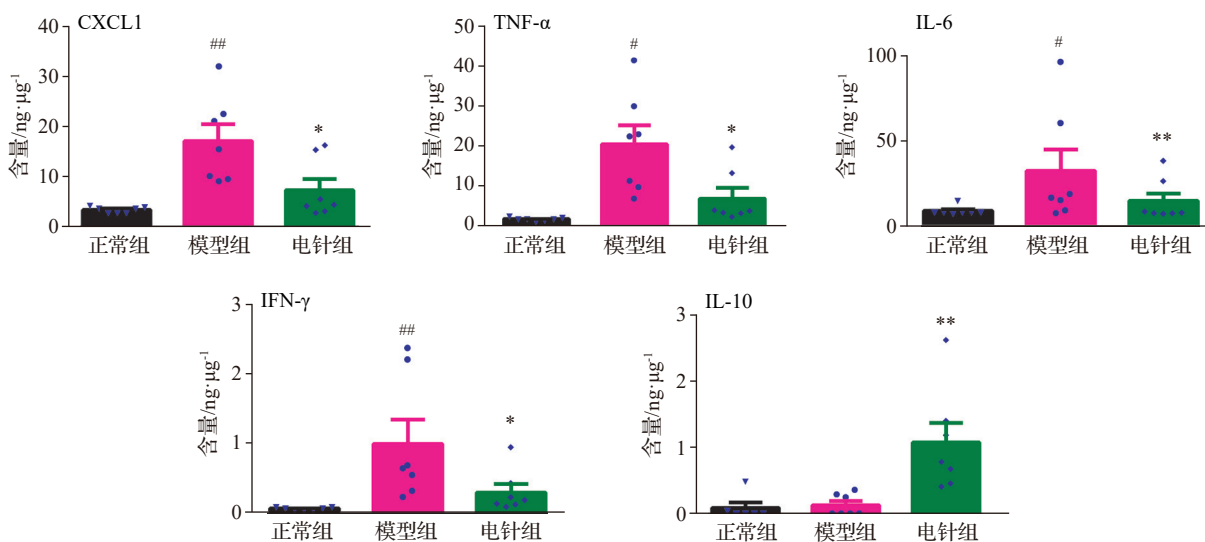
进一步观察电针“上巨虚”对骶副交感通路关键神经节-盆神经节中的 ChAT 阳性神经元的激活效应。免疫荧光染色结果显示,正常电针组盆神经节内 ChAT/c-Fos 双标神经元数量较正常组显著增多($P<0.01$)。见图6。



注:A为各组小鼠结肠组织HE染色图,所框区域为标志性病理变化区域,标尺=200 μ m;B为各组小鼠结肠病理评分统计图。与正常组比较,^{###} $P<0.001$;与模型组比较,^{***} $P<0.001$ 。

图3 各组小鼠结肠组织病理形态与病理评分比较(HE染色, $\bar{x} \pm s_x$, 6只/组)

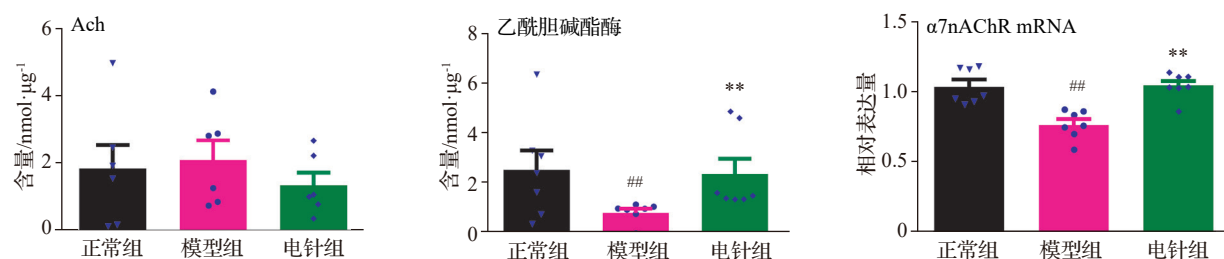
Fig. 3 Comparison of pathological morphology and pathological scores of colon tissue of mice in the 3 groups ($\bar{x} \pm s_x$, 6 mice/group)



注: CXCL1 为 CXC 基序趋化因子配体 1, TNF- α 为肿瘤坏死因子- α , IL-6 为白细胞介素-6, IFN- γ 为干扰素- γ , IL-10 为白细胞介素-10。与正常组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

图4 各组小鼠结肠局部炎症因子表达情况比较($\bar{x} \pm s_x$, 7只/组)

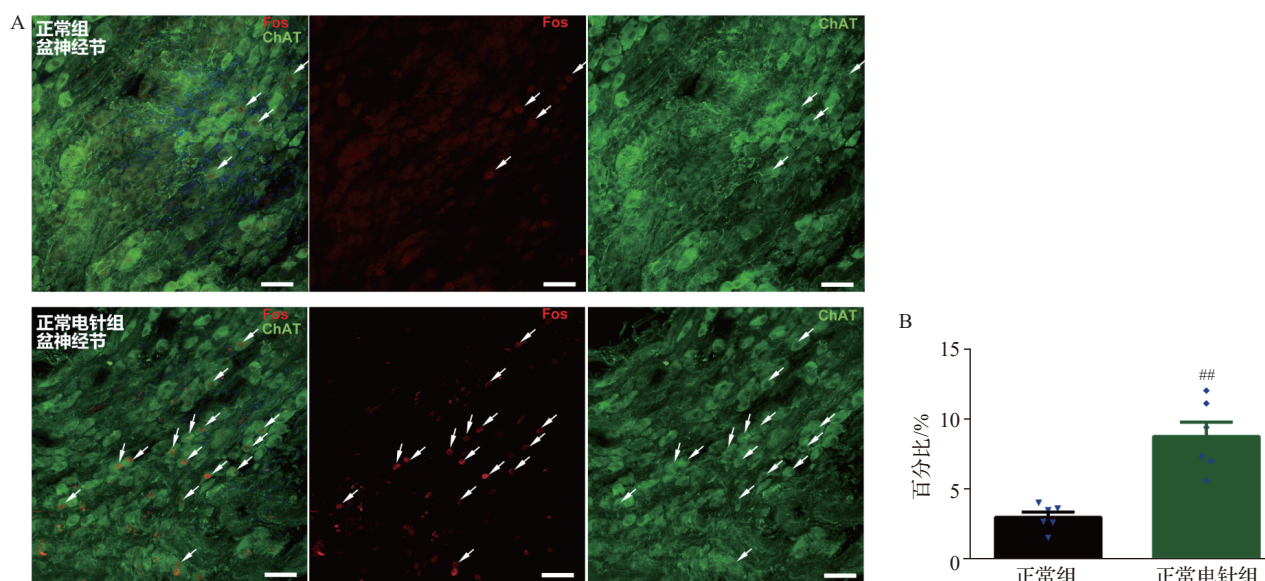
Fig. 4 Comparison of expression of local inflammatory factors in colon tissue of mice in the 3 groups ($\bar{x} \pm s_x$, 7 mice/group)



注: Ach为乙酰胆碱, α7nAChR为α7烟碱乙酰胆碱受体。;与正常组比较, ^{##} $P < 0.01$;与模型组比较, ^{**} $P < 0.01$ 。

图5 各组小鼠结肠Ach、乙酰胆碱酯酶及α7nAChR mRNA表达情况比较($\bar{x} \pm s_x$, 7只/组)

Fig. 5 Comparison of the expression of Ach, acetylcholinesterase, and α7nAChR mRNA in colon tissue of mice in the 3 groups ($\bar{x} \pm s_x$, 7 mice/group)



注: ChAT为乙酰胆碱转移酶, c-Fos为Fos原癌基因蛋白。A为各组小鼠盆神经节c-Fos/ChAT免疫荧光染色图,

标尺=50 μm; B为各组小鼠盆神经节ChAT阳性神经元激活百分比统计图。与正常组比较, ^{##} $P < 0.01$ 。

图6 各组小鼠盆神经节ChAT阳性神经元激活百分比比较($\bar{x} \pm s_x$, 6只/组)

Fig. 6 Comparison of the percentage of activated ChAT-positive neurons in pelvic ganglia of mice in the 2 groups ($\bar{x} \pm s_x$, 6 mice/group)

2.7 小鼠结肠局部α7nAChR阳性细胞与ChAT神经纤维具有解剖结构联系

梳理2.5-2.6的结果,可知电针“上巨虚”对副交感胆碱能系统及结肠局部胆碱能系统均具有激活效应。为明确结肠局部ChAT阳性神经纤维是否与α7nAChR阳性细胞形成神经支配,我们采用ChAT-Ai14工具小鼠进行观察。结果显示,单次电针“上巨虚”后结肠局部ChAT阳性神经纤维与α7nAChR阳性细胞存在紧密的解剖学毗邻关系。见图7。

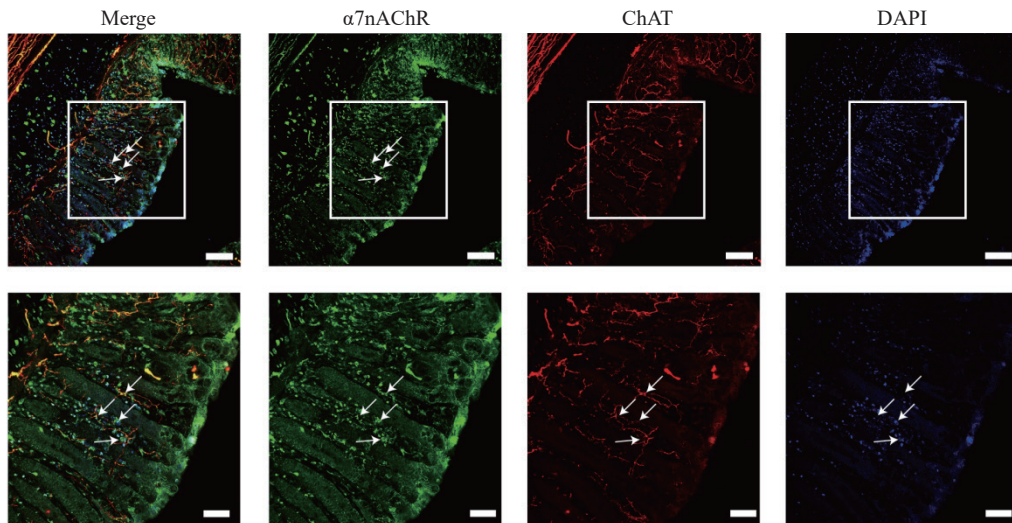
2.8 针刺“上巨虚”可激活盆神经

针刺“上巨虚”即刻引发盆神经放电,频率随刺激持续而逐步攀升,于第40 s左右达峰值,较基线水平显著跃升($P < 0.001$)。撤针后放电频率呈渐进式

回落($P < 0.001$),但仍可维持一段时间的低水平的刺激后放电。这说明针刺“上巨虚”可有效激活盆神经。见图8。

3 讨论

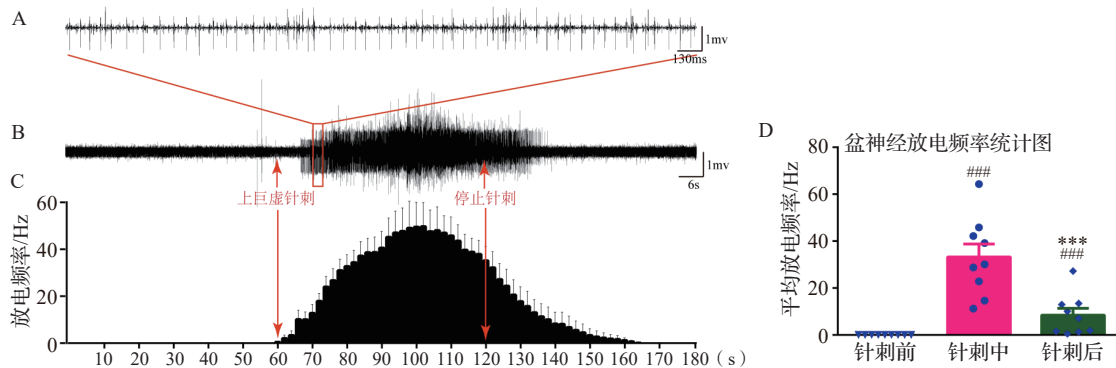
本研究聚焦体表刺激-骶副交感通路-结肠免疫调节这一神经免疫通路,从多维度阐明了电针“上巨虚”缓解结肠炎性反应的神经免疫调控机制。首先,电针“上巨虚”可改善结肠炎小鼠体征、结肠局部损伤及炎症反应;其次,电针“上巨虚”对骶副交感下游关键神经节-盆神经节具有激活效应,并进一步观察到盆神经节胆碱能神经元与结肠局部免疫细胞之间的神经支配联系;最后,针刺“上巨虚”可显著激活盆神经放电。



注:α7nAChR为α7烟碱乙酰胆碱受体,ChAT为乙酰胆碱转移酶。α7nAChR阳性染色呈绿色荧光,ChAT阳性染色呈红色荧光,DAPI呈蓝色荧光。下图为上图方框部分的放大图,上图标尺=100 μm,下图标尺=50 μm。

图7 ChAT-Ai14小鼠“上巨虚”电针后结肠ChAT纤维与α7nAChR共标(免疫荧光染色)

Fig. 7 Co-labeling of ChAT fibers and α7nAChR in the colon of ChAT-Ai14 mice after electroacupuncture at “Shangjuxu” (immunohistochemistry staining)



注:A、B为盆神经放电波形图;C为盆神经放电统计图,横坐标为记录时间,纵坐标为放电频率;D为“上巨虚”电针前、中、后盆神经平均放电频率统计图。与针刺前比较,### $P<0.001$;与针刺中比较,*** $P<0.001$ 。

图8 “上巨虚”针刺刺激下盆神经放电波形图、放电频率柱状图($\bar{x}\pm\text{SEM}$, 9只鼠)

Fig. 8 Waveform diagram of pelvic nerve discharge and bar graph of discharge frequency under acupuncture stimulation at Shangjuxu ($\bar{x}\pm\text{SEM}$, 9 rats)

在针灸临床实践中,“上巨虚”常被选用于治疗盆腔脏器疾病^[12-13],但这种体表选穴影响盆腔脏器的神经科学依据迄今尚未阐明。本团队注意到,经皮电刺激或超声刺激可激活外踝上方腓神经,进而改善多种盆腔疾病,且该效应可能与骶神经激活有关^[21-22]。鉴于外踝上方腓神经的解剖位置与“上巨虚”穴区基本重合,这为针刺治疗远端结肠炎性反应提供了重要研究思路:“上巨虚”穴区电针刺激可能通过调控骶副交感神经系统缓解结肠炎性反应。这一假说在本研究中得以初步验证,亦为电针调控自主神经理论体系提供了新的实验证据。

自主神经调控技术在炎症性疾病治疗中的应用

正经历重要技术革新。受骶副交感神经胆碱能抗炎通路的启发,美国 SPARC 计划资助的临床研究表明,骶神经电刺激可抑制盆腔脏器乃至全身性炎性反应,上述效应主要依赖于盆神经等副交感传出纤维的激活^[23-24]。骶副交感神经传出纤维的电刺激可通过增加结肠局部 Ach 水平并上调其受体表达,进而调控 TNF-α 及 IL-6 等促炎因子的释放,缓解结肠炎性反应^[23-24]。然而,该疗法涉及复杂的骶部外科手术,给患者带来安全性隐患及创伤风险,且骶副交感神经位于盆腔深处,手术操作难度大。此外,植入式电刺激器电池寿命有限,对慢性疾病的长期治疗持续性构成挑战。再者,自主神经纤维层

面的直接电刺激能否真实模拟副交感神经的生理性放电模式,亦有待验证。相较于侵入性神经调控,针刺干预等体表刺激技术展现出独特优势:体表刺激所诱发的自主神经激活,是一种更安全、便捷且更接近生理性副交感神经兴奋模式的干预手段。

近十年针刺研究在神经免疫调控领域取得突破性进展,其作用机制正被多维度揭示。文献计量分析显示,针刺调控自主神经通路的研究位居该领域热点之首,其中“抗炎作用”是最活跃的研究主题^[15-16]。相关实验研究主要聚焦于内脏炎症反应,胃肠道及心血管系统疾病是该领域最受关注的病种^[15-16]。针刺的调节效应可通过躯体感觉神经-自主神经反射来实现^[25-26]。针刺激活副交感神经免疫通路发挥抗炎作用的机制研究日趋成熟:对下肢足三里穴区的刺激已被证明可激活迷走传出信号,经腹腔神经节换元后,通过脾神经释放去甲肾上腺素(NE),进而作用于脾脏巨噬细胞释放抗炎因子^[27];另有研究表明,足三里穴区电针刺刺激可驱动迷走神经-肾上腺轴,进而抑制全身炎症反应^[28-31]。

但迷走神经主要承担食管至结肠脾曲段消化道的副交感神经支配;与此相对应,骶髓来源的副交感神经(脊髓S2~S4节段)则负责脾曲以远左半结肠、乙状结肠和直肠的神经调节^[32]。在IBD动物模型中,骶神经刺激可显著降低疾病活动指数,修复肠道屏障功能、恢复组织形态,并抑制全身炎症反应,这些发现提示骶副交感神经系统同样参与IBD调控^[10-11,23,33]。本团队既往研究亦表明,骶段副交感神经通路的激活与IBD炎症反应减轻之间存在明确关联^[34-35]。

虽然已知针刺“上巨虚”在维持远端结肠等盆腔脏器及全身免疫稳态中发挥重要作用,但其潜在神经环路调控机制及作用特征仍待深入阐释,这在一定程度上制约了针刺抗炎理论体系的完善及临床应用推广。本研究以结肠炎为切入点,揭示了电针“上巨虚”缓解IBD效应的新机制——通过激活骶副交感神经免疫通路实现抗炎作用。首先,本研究提示骶副交感神经系统在IBD调控中具有重要功能,拓展了针刺神经免疫调节的理论维度;其次,本研究揭示盆神经节中胆碱能神经元是该通路的关键中继节点,电针“上巨虚”可激活此类神经元,从而将体表刺激信号转化为自主神经免疫调控信号;最后,本研究初步探索了电针“上巨虚”对盆神经的激活效应,明确了“盆神经节-盆神经”轴在介导

电针“上巨虚”抗炎效应中的解剖-功能关联。

本研究尚存在以下不足:首先,电针“上巨虚”激活骶副交感神经通路的具体中枢核团机制尚待阐明;其次,盆神经节中被电针激活的胆碱能神经元亚型构成有待进一步解析;再次,电针“上巨虚”对结肠炎模型小鼠的盆神经的激活作用尚未涉及;最后,电针通过骶副交感通路调控的结肠局部免疫细胞类型及其抗炎分子机制,亦需后续研究深入探讨。

综上所述,本研究结论如下:电针“上巨虚”可通过激活骶副交感胆碱能神经免疫通路缓解结肠炎症反应。本研究为针刺抗炎提供了新的自主神经通路激活理论依据,亦为基于骶副交感神经激活原理的可穿戴体表神经调控装备的临床转化提供了新思路,有望继续推动针刺治疗IBD的临床应用。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] Wang R, Li Z Q, Liu S J, et al. Global, regional and national burden of inflammatory bowel disease in 204 countries and territories from 1990 to 2019: a systematic analysis based on the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. *BMJ Open*, 2023, 13(3): e065186.
- [2] Høivik M L, Moum B, Solberg I C, et al. Work disability in inflammatory bowel disease patients 10 years after disease onset: results from the IBSEN Study [J]. *Gut*, 2013, 62(3): 368-375.
- [3] 陈晓芬, 陈钰涵, 马娟. 炎症性肠病新型治疗方法的研究进展 [J]. *中国全科医学*, 2023, 26(27): 3349-3354.
Chen X F, Chen Y H, Ma J. Recent strides in novel treatments for inflammatory bowel disease (in Chinese) [J]. *Chinese General Practice*, 2023, 26(27): 3349-3354.
- [4] Ungaro R, Mehandru S, Allen P B, et al. Ulcerative colitis [J]. *Lancet*, 2017, 389(10080): 1756-1770.
- [5] Ma Q F. Somatotopic organization of autonomic reflexes by acupuncture [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2022, 76: 102602.
- [6] Huh J R, Veiga-Fernandes H. Neuroimmune circuits in inter-organ communication [J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20(4): 217-228.
- [7] Wang M, Liu W L, Ge J Y, et al. The immunomodulatory mechanisms for acupuncture practice [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1147718.
- [8] Carnevale D, Perrotta M, Pallante F, et al. A cholinergic-sympathetic pathway primes immunity in hypertension and mediates brain-to-spleen communication [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13035.
- [9] Goverse G, Stakenborg M, Matteoli G. The intestinal cholinergic anti-inflammatory pathway [J]. *J Physiol*, 2016, 594(20): 5771-5780.
- [10] Zhang S H, Zhang C, Yan H, et al. Sacral nerve stimulation alleviates intestinal inflammation through regulating the autophagy of macrophages and activating the inflammasome

- mediated by a cholinergic antiinflammatory pathway in colitis rats[J]. *Neuromodulation*, 2024, 27(2): 302-311.
- [11] Tu L, Gharibani P, Zhang N N, et al. Anti-inflammatory effects of sacral nerve stimulation: a novel spinal afferent and vagal efferent pathway[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2020, 318(4): G624-G634.
- [12] 金涵, 戴慧娟, 邹佳玲, 等. 基于数据挖掘与可视化分析探讨针灸治疗炎症性肠病选穴及配伍规律[J]. *亚太传统医药*, 2025, 21(8): 127-133.
- Jin H, Dai H J, Zou J L, et al. Exploring acupoint selection and compatibility rules in acupuncture treatment of inflammatory bowel disease based on data mining and visualization analysis (in Chinese) [J]. *Asia-Pacific Traditional Medicine*, 2025, 21(8): 127-133.
- [13] 邵中军, 赵海霞, 李瑞山, 等. 基于数据挖掘探讨近10年针灸治疗炎症性肠病的选穴规律[J]. *空军军医大学学报*, 2025, 46(4): 469-473.
- Shao Z J, Zhao H X, Li R S, et al. Exploring the rules of acupoint selection in acupuncture treatment of inflammatory bowel disease in the last 10 years based on data mining (in Chinese)[J]. *Journal of Air Force Medical University*, 2025, 46(4): 469-473.
- [14] Song G Q, Fiocchi C, Achkar J P. Acupuncture in inflammatory bowel disease[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2019, 25(7): 1129-1139.
- [15] Li Y Q, Yao J P, Yan X Y, et al. Advances in acupuncture regulation on the autonomic nervous system from 2013 to 2022: a bibliometric analysis *via* citespace[J]. *Complement Ther Med*, 2024, 80: 103009.
- [16] Xie J, Wang W J, Hou Y C, et al. Research progress on acupuncture and moxibustion for treatment of Crohn's disease based on the regulation of innate immunity 针灸调节固有免疫治疗克罗恩病的研究进展[J]. *World J Acupunct Moxibustion*, 2024, 34(2): 83-88.
- [17] 于清泉, 李桐, 张知云, 等. 电针敏化穴位激活迷走神经运动背核胆碱能神经元改善大鼠结肠炎性损伤[J]. *中国针灸*, 2021, 41(1): 45-51.
- Yu Q Q, Li T, Zhang Z Y, et al. Improvement in colonic inflammatory injury in rats *via* activating dorsal cholinergic neurons of vagus with electroacupuncture at sensitized acupoints (in Chinese) [J]. *Chinese Acupuncture & Moxibustion*, 2021, 41(1): 45-51.
- [18] Perše M, Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012: 718617.
- [19] Bramhall M, Flórez-Vargas O, Stevens R, et al. Quality of methods reporting in animal models of colitis [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2015, 21(6): 1248-1259.
- [20] Shen X H, Guan J, Lu D P, et al. *Peptostreptococcus Anaerobius* enhances dextran sulfate sodium-induced colitis by promoting nf- κ B-NLRP3-Dependent macrophage pyroptosis [J]. *Virulence*, 2024, 15(1): 2435391.
- [21] Krhut J, Peter L, Rejchrt M, et al. Peroneal electric transcutaneous NeuroModulation (eTNM®): a novel method for the treatment of the overactive bladder[J]. *J Healthc Eng*, 2021, 2021: 4016346.
- [22] Parodi S, Kendall H J, Terrone C, et al. What is in the pipeline on investigational neuromodulation techniques for lower urinary tract dysfunction: a narrative review [J]. *Neuromodulation*, 2024, 27(2): 267-272.
- [23] Tu L, Gharibani P, Yin J Y, et al. Sacral nerve stimulation ameliorates colonic barrier functions in a rodent model of colitis [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2020, 32(10): e13916.
- [24] Pasricha T S, Zhang H, Zhang N N, et al. Sacral nerve stimulation prompts vagally-mediated amelioration of rodent colitis[J]. *Physiol Rep*, 2020, 8(1): e14294.
- [25] Lim H D, Kim M H, Lee C Y, et al. Anti-inflammatory effects of acupuncture stimulation *via* the vagus nerve [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0151882.
- [26] Ulloa L. Electroacupuncture activates neurons to switch off inflammation[J]. *Nature*, 2021, 598(7882): 573-574.
- [27] Kim S K, Kim J, Woo H S, et al. Electroacupuncture induces Fos expression in the nucleus tractus solitarius *via* cholecystokinin A receptor signaling in rats[J]. *Neurol Res*, 2010, 32(Suppl 1): 116-119.
- [28] Torres-Rosas R, Yehia G, Peña G, et al. Dopamine mediates vagal modulation of the immune system by electroacupuncture [J]. *Nat Med*, 2014, 20(3): 291-295.
- [29] Ulloa L, Quiroz-Gonzalez S, Torres-Rosas R. Nerve stimulation: immunomodulation and control of inflammation [J]. *Trends Mol Med*, 2017, 23(12): 1103-1120.
- [30] Liu S B, Wang Z F, Su Y S, et al. Somatotopic organization and intensity dependence in driving distinct NPY-expressing sympathetic pathways by electroacupuncture [J]. *Neuron*, 2020, 108(3): 436-450.e7.
- [31] Liu S B, Wang Z F, Su Y S, et al. A neuroanatomical basis for electroacupuncture to drive the vagal-adrenal axis [J]. *Nature*, 2021, 598(7882): 641-645.
- [32] Ridolfi T J, Tong W D, Takahashi T, et al. Sympathetic and parasympathetic regulation of rectal motility in rats [J]. *J Gastrointest Surg*, 2009, 13(11): 2027-2033.
- [33] Guo J, Jin H F, Shi Z H, et al. Sacral nerve stimulation improves colonic inflammation mediated by autonomic-inflammatory cytokine mechanism in rats [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2019, 31(10): e13676.
- [34] 李桐, 刘筱羽, 万红叶, 等. 电针“天枢”改善小鼠结肠炎性反应的自主神经机制初探[J]. *针刺研究*, 2025, 50(5): 567-575.
- Li T, Liu X Y, Wan H Y, et al. Study on the underlying autonomic nervous mechanism of electroacupuncture in improving colonic inflammation in mice with chronic ulcerative colitis (in Chinese)[J]. *Acupuncture Research*, 2025, 50(5): 567-575.
- [35] 骆敏, 曲正阳, 李桐, 等. 电针“天枢”缓解小鼠结肠炎性反应的自主神经节后机制[J]. *针刺研究*, 2025, 50(8): 872-879.
- Luo M, Qu Z Y, Li T, et al. Electroacupuncture of “Tianshu” (ST25) alleviates ulcerative colitis by activating sacral parasympathetic postganglionic neurons of the pelvic ganglion in mice (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2025, 50(8): 872-879.

收稿日期:2025-12-03 修回日期:2026-01-07