

延髓头端腹外侧区 TH 阳性神经元介导电针改善功能性便秘小鼠肠动力障碍

王 单^{1,2,3}, 何昭璇^{1,2,3}, 于明凯^{1,2,3}, 武若晗^{1,2,3}, 邓 小^{1,2,3}, 罗予彩^{1,2,3}, 李艺帆^{1,2,3},

赖 鹏^{1,2,3}, 姚晓恒^{1,2,3}, 尹 涛^{1,2,3}, 曾 芳^{1,2,3}

(¹成都中医药大学针灸推拿学院, 成都 610075; ²成都中医药大学针灸防治老年疾病教育部重点实验室, 成都 610075; ³成都中医药大学针灸脑科学研究中心, 成都 610075)

【摘要】 目的:探究延髓头端腹外侧区(RVLM)的酪氨酸羟化酶(TH)阳性神经元在电针改善功能性便秘(FC)小鼠肠动力障碍中的作用。**方法:**首先,利用跨突触示踪病毒鉴定出支配近端结肠的投射脑区。其次,取 18 只 C57BL/6J 小鼠随机分为正常组、模型组、电针组,每组 6 只。采用盐酸洛哌丁胺灌胃构建 FC 模型。电针组给予电针“天枢”“上巨虚”,5 d/疗程,共 2 个疗程。观察各组小鼠排便情况并测定粪便含水率;记录首粒黑便排出时间;测定小肠推进率。ELISA 法测定血清和结肠中 TH 的含量。免疫荧光法检测 RVLM 中 TH/c-Fos 的共表达情况。随后将 12 只 C57BL/6J 小鼠随机分为空载病毒+氯氮平-N-氧化物(CNO)组、抑制病毒+CNO 组,将 18 只 C57BL/6J 小鼠随机分为空载病毒+CNO 组、电针组、激活病毒+CNO+电针组,均每组 6 只,分别于 RVLM 脑区注射相应病毒,病毒表达 21 d 后腹腔注射 CNO(1 mg/kg)。电针组和激活病毒+CNO+电针组于 CNO 注射 30 min 后予以电针干预,方法同上。对以上各组进行排便观察及肠动力检测,方法同上。最后,采用另外 18 只 C57BL/6J 小鼠于 RVLM 脑区注射 rAAV-hSyn-GCaMP6s 病毒,病毒转染 21 d 后,随机分为空白组、模型对照组、模型+电针组,每组 6 只,模型+电针组予以上述电针干预,采用多通道光纤记录系统记录 RVLM 脑区神经元钙信号变化。**结果:**逆行跨突触病毒示踪实验结果显示,RVLM 中神经元与近端结肠存在神经纤维突触连接。与正常组比较,模型组小鼠的首粒黑便排出时间延长、粪便总数减少、粪便含水率与小肠推进率均降低($P<0.001$, $P<0.01$),血清和结肠中 TH 含量均增加($P<0.01$),RVLM 中 TH 和 c-Fos 阳性神经元数量及 TH/c-Fos 共表达神经元数量均增加($P<0.001$);与模型组比较,电针组小鼠首粒黑便排出时间缩短、粪便总数增加、粪便含水率与小肠推进率均增加($P<0.001$, $P<0.01$),血清和结肠中 TH 含量均降低($P<0.01$),RVLM 中 TH、c-Fos 阳性神经元数量及 TH/c-Fos 共表达神经元数量均减少($P<0.001$)。与空载病毒+CNO 组比较,抑制病毒+CNO 组小鼠的首粒黑便排出时间缩短、粪便总数增多、粪便含水率与小肠推进率均增加($P<0.001$, $P<0.01$)。与空载病毒+CNO 组比较,电针组小鼠首粒黑便排出时间缩短、粪便总数增多、粪便含水率与小肠推进率均增加($P<0.001$, $P<0.01$);与电针组比较,激活病毒+CNO+电针组小鼠的首粒黑便排出时间延长、粪便总数减少、粪便含水率与小肠推进率均降低($P<0.001$, $P<0.01$)。与空白组比较,模型对照组小鼠 RVLM 脑区的 Ca^{2+} 信号活动显著增强($P<0.001$);与模型对照组比较,模型+电针组小鼠 RVLM 脑区的 Ca^{2+} 信号活动显著减弱($P<0.001$)。**结论:**电针大肠“天枢”“上巨虚”可能通过抑制 RVLM 脑区 TH 阳性神经元活性改善 FC 小鼠的肠动力障碍。

【关键词】 电针;延髓头端腹外侧区;酪氨酸羟化酶神经元;肠动力障碍

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20260528

引用格式:王单,何昭璇,于明凯,等.延髓头端腹外侧区 TH 阳性神经元介导电针改善功能性便秘小鼠肠动力障碍[J].针刺研究,2026,51(10):1-10.

项目来源:国家自然科学基金区域创新发展联合基金项目(No.U25A20160);四川省科技厅天府青城计划项目;国家自然科学基金青年科学基金项目(No.81804002)

通信作者:曾芳,E-mail: zengfang@cdutcm.edu.cn

TH-positive neurons in the rostral ventrolateral medulla mediating electroacupuncture improving intestinal motility dysfunction in functional constipated mice

Wang Dan^{1,2,3}, He Zhaoxuan^{1,2,3}, Yu Mingkai^{1,2,3}, Wu Ruohan^{1,2,3}, Deng Xiao^{1,2,3}, Luo Yucan^{1,2,3}, Li Yifan^{1,2,3}, Lai Peng^{1,2,3}, Yao Xiaoheng^{1,2,3}, Yin Tao^{1,2,3}, Zeng Fang^{1,2,3} (¹Acupuncture-moxibustion and Tuina School, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; ²Key Laboratory of Acupuncture for Senile Disease, Ministry of Education, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075; ³Acupuncture & Brain Research Center, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the role of tyrosine hydroxylase (TH)-positive neurons in the rostral ventrolateral medulla (RVLM) in the effects of electroacupuncture (EA) on intestinal dysmotility in mice with functional constipation (FC). **Methods** Firstly, Transsynaptic tracing virus was employed to identify brain regions projecting to the proximal colon. Secondly, eighteen C57BL/6J mice were randomly assigned to the normal, model, and EA groups, with 6 mice in each group. FC model was established by oral administration of loperamide hydrochloride. Mice in the EA group received EA at “Tianshu” (ST25) and “Shangjuxu” (ST37), 5 days per treatment course for 2 courses. After intervention, the defecation status of mice in each group was observed, and the fecal water content was determined, the time for the first black stool excretion was recorded, the small-intestinal propulsion rate was measured. Serum and colonic TH levels were determined by ELISA. TH/c-Fos co-expression in the RVLM was assessed by immunofluorescence staining. Subsequently, 12 C57BL/6J mice were randomly divided into the control virus+clozapine-N-oxide (CNO) group and inhibitory-virus+CNO group, with 6 mice per group. Another 18 C57BL/6J mice were randomly assigned to the control virus+CNO group, EA group, and excitatory-virus+CNO+EA group, with 6 mice per group. The corresponding viral vectors were injected into the RVLM, followed by intraperitoneal administration of CNO (1 mg/kg) 21 d after viral expression. Mice in the EA and excitatory-virus+CNO+EA groups received EA treatment as described above 30 min after the administration of CNO. Following completion of EA treatment, fecal parameters and intestinal motility were assessed as described above. Finally, rAAV-hSyn-GCaMP6s virus was injected into the RVLM of another 18 C57BL/6J mice. After 21 days of viral transduction, mice were randomly assigned to normal control, model control, and model+EA groups (6 mice per group). Mice in the model+EA group received EA treatment as described above. Post-EA intervention, multichannel fiber photometry was employed to record calcium signal dynamics in RVLM neurons. **Results** Neuronal fibers in the RVLM formed synaptic connections with the proximal colon. Compared with the normal group, the model group exhibited prolonged first black stool expulsion time, reduced total fecal pellet counts, decreased fecal water content and small intestinal transit rate ($P<0.001$, $P<0.01$), and elevated TH levels in serum and colon ($P<0.01$). TH and c-Fos, as well as TH/c-Fos co-expression positive cell counts in the RVLM, were all significantly increased ($P<0.001$). Compared with the model group, the EA group showed shortened first black stool expulsion time, increased total fecal pellet counts, elevated fecal water content and small intestinal transit rate ($P<0.001$, $P<0.01$), and reduced TH levels in serum and colon ($P<0.01$). TH and c-Fos expression, as well as TH/c-Fos positive cell counts in the RVLM, were all significantly decreased ($P<0.001$). Compared with the control virus+CNO group, the inhibitory-virus+CNO group exhibited shortened first black stool expulsion time, increased total fecal pellet counts, and elevated fecal water content and small intestinal transit rate ($P<0.001$, $P<0.01$). Compared with the control virus+CNO group, the EA group showed shortened first black stool expulsion time, increased total fecal pellet counts, elevated fecal water content and small intestinal transit rate ($P<0.001$, $P<0.01$). Compared with the EA group, the excitatory-virus+CNO+EA group showed prolonged first black stool expulsion time, reduced total fecal pellet counts, and decreased fecal water content and small intestinal transit rate ($P<0.001$, $P<0.01$). Compared with the normal control group, the model control group exhibited significantly increased Ca^{2+} activity in the RVLM ($P<0.001$), whereas EA significantly reduced RVLM Ca^{2+} activity compared with the model control group ($P<0.001$). **Conclusion** EA at ST25 and ST37 may improve intestinal dysmotility in FC mice by suppressing the activity of TH-positive neurons in the RVLM.

【KEYWORDS】 Electroacupuncture; Rostral ventrolateral medulla; Tyrosine hydroxylase neurons; Intestinal motility disorder

功能性便秘(FC)是一类以肠道动力障碍为主要特征的功能性胃肠疾病,临床表现为排便次数减

少、粪便干结及排便困难等。尽管FC不直接危及生命,但其病程迁延、易复发,对患者生活质量和心理状态造成持续影响。研究表明,FC的发生与脑-肠互作异常、肠道动力减弱及肠神经系统功能紊乱密切相关^[1-2]。近年来,大量临床研究及动物实验均表明,针刺治疗FC疗效确切^[3-6]。但目前针刺治疗FC的作用机制研究多聚焦单一靶器官的局部响应机制,针刺调节胃肠功能的中枢机制还有待深入探讨。

针刺可通过调节脑-肠轴从而影响自主神经系统功能来改善胃肠运动^[7]。延髓头端腹外侧区(RVLM)是中枢调控交感神经活动的重要枢纽,富含交感前运动神经元^[8-9],其中酪氨酸羟化酶(TH)阳性儿茶酚胺能神经元是RVLM内重要的交感前运动神经元群体,在调控交感神经输出及胃肠运动方面发挥关键作用^[10-11]。然而,针刺是否能够通过调控RVLM的TH阳性神经元活性参与FC肠动力障碍的改善,目前尚缺乏直接证据。基于上述背景,本研究聚焦RVLM与肠道之间的结构功能联系,结合光纤钙信号记录技术与化学遗传学方法,系统探讨电针调控RVLM中TH阳性神经元活性改善FC小鼠肠动力障碍的作用机制,以期部分阐释针刺的胃肠调节机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

雄性SPF级C57BL/6J小鼠,6~8周龄,体质量(22 ± 2) g,由成都达硕实验动物有限公司提供,动物生产许可证号:SCXK(川)2020-0030,饲养于成都中医药大学针灸推拿学院实验动物中心,湿度50%,温度23~25℃,明暗12 h/12 h交替,自由摄食和饮水。所有动物实验均遵循相关伦理准则^[12],并经成都中医药大学实验动物伦理委员会审批通过(伦理号:2025DL-022)。所有小鼠适应性饲养1周后进行实验。首先,随机挑选3只小鼠用于逆行跨突触病毒示踪实验,观察肠壁肌层病毒注射后RVLM中病毒表达及神经投射情况。其次,随机挑选18只小鼠随机分为正常组、模型组和电针组,每组6只,观察电针效应;随机挑选12只小鼠随机分为空载病毒+氯氮平-N-氧化物(CNO)组、抑制病毒+CNO组,每组6只;随机挑选18只小鼠随机分为空载病毒+CNO组、电针组、激活病毒+CNO+电针组,每组6只,观察化学遗传调控及电针干预后各组小鼠肠动力变化。最后,随机挑选18只小鼠随

机分为空白组、模型对照组和模型+电针组,每组6只,观察各组小鼠RVLM脑区钙信号变化。

1.2 主要试剂与仪器

盐酸洛哌丁胺(美国Sigma),活性炭粉末(上海麦克林),PRV-CAG-EGFP病毒、rAAV-hSyn-TH-EGFP-WPRE-hGH polyA、rAAV-hSyn-TH-hM4D(Gi)-EGFP-WPRE-hGH polyA、rAAV-hSyn-TH-hM3D(Gq)-EGFP-WPRE-hGH polyA和rAAV-hSyn-GCaMP6s病毒(武汉枢密),c-Fos抗体(英国Abcam),TH抗体(武汉三鹰),驴血清(美国Jackson),Alexa Fluor™ 488与Alexa Fluor™ 594标记的驴抗兔二抗(美国赛默飞),DAPI染料、抗荧光淬灭剂(上海碧云天),Super Fluor 750荧光显影剂(北京富百科),PBS缓冲液(武汉赛维尔),2.5%即用型三溴乙醇(南京爱贝),CNO(美国APEX BIO),4%多聚甲醛、异氟烷(深圳瑞沃德),TH ELISA试剂盒(南京晶美)。

华佗牌一次性无菌针灸针(0.25 mm×13 mm,苏州医疗用品厂),HANS-200A型韩氏电针仪(南京济生),脑立体定位仪、R821光纤记录仪(深圳瑞沃德),近红外二区小动物活体成像系统(上海恒光智影),冰冻切片机(德国徕卡),全自动数字切片扫描仪(武汉幂加),DM-48正置显微镜(日本奥林巴斯),激光共聚焦显微镜(日本尼康)。

1.3 造模方法

参照相关文献^[13],采用盐酸洛哌丁胺灌胃法建立FC小鼠模型(模型组、模型对照组、所有电针干预组和病毒注射组)。将盐酸洛哌丁胺溶于0.9%氯化钠溶液,配制成工作液,按 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量灌胃给药,每日2次,每次0.2 mL,连续14 d。以粪便排出量减少、粪便含水率下降及小肠推进率较正常组降低作为模型建立成功的判定标准。正常组同期给予等体积0.9%氯化钠溶液灌胃。

1.4 干预措施

肠壁肌层病毒注射:小鼠采用异氟烷持续吸入麻醉,腹部脱毛、常规消毒后,仰卧位固定于恒温加热垫上。在剑突下约1 cm处行约1 cm纵形切口,逐层钝性分离皮肤及肌层,充分暴露近端结肠。用无菌生理盐水湿润棉球覆盖肠管周围,保持局部湿润并减少出血。预先制备玻璃微电极及微量注射泵,吸取PRV-CAG-EGFP病毒。在近端结肠选择2个注射点(间距适当,避开血管),将玻璃电极以一定角度刺入肠壁肌层,深度约3~4 mm,每点注射800 nL。注射完成后留针10 min,再缓慢退出电极。

复位肠管,采用4-0缝合线逐层缝合肌层及皮肤,术区再次消毒。病毒表达5 d后,对小鼠进行麻醉和心脏灌流取材,依次进行固定、脱水、包埋、冰冻切片、DAPI染色和封片后,于荧光显微镜下观察RVLM脑区病毒表达及神经投射情况(EGFP绿色荧光信号)。

电针组:自第15 d开始,选取同侧“天枢”“上巨虚”,穴位定位参照《实验针灸学》^[14]和《实验动物常用穴位名称与定位》^[15]。固定小鼠,选用0.25 mm×13 mm毫针,垂直进针,深度约3 mm,分别连接电针仪正负极,电针参数设置为疏密波2 Hz/15 Hz,电流强度1 mA,以局部肌肉轻微收缩为度。留针20 min,每日1次。5次为1个疗程,疗程之间间隔2 d,共干预2个疗程(共10次)。

正常组和模型组:不予电针干预,仅进行相同时间和相同方式的抓取与固定处理。

空载病毒+CNO组:RVLM注射化学遗传空载病毒rAAV-hSyn-TH-EGFP-WPRE-hGH polyA,表达21 d后腹腔注射CNO(1 mg/kg)。

抑制病毒+CNO组:RVLM注射TH阳性神经元化学遗传抑制型病毒rAAV-hSyn-TH-hM4D(Gi)-EGFP-WPRE-hGH polyA,其余同空载病毒+CNO组。

激活病毒+CNO+电针组:RVLM注射TH阳性神经元化学遗传激活型病毒rAAV-hSyn-TH-hM3D(Gq)-EGFP-WPRE-hGH polyA,表达21 d后腹腔注射CNO(1 mg/kg),30 min后给予电针干预,电针方法同上。

空白组:RVLM脑区注射rAAV-hSyn-GCaMP6s病毒,其余同正常组。

模型对照组:RVLM脑区注射rAAV-hSyn-GCaMP6s病毒,表达7 d后开始建立FC模型,持续14 d。

模型对照+电针组:RVLM脑区注射rAAV-hSyn-GCaMP6s病毒,表达7 d后开始建立FC模型,持续14 d。造模结束后,给予电针干预(干预方式如前所述)。

RVLM脑区病毒注射方法:小鼠异氟烷持续吸入麻醉,头部脱毛后固定于脑立体定位仪,暴露颅骨并确定前囟点,调节头部使颅骨前后、左右保持水平。参照《小鼠脑图谱》(第2版)^[16]确定RVLM脑区定位(AP: -6.70 mm、ML: ±1.30 mm、DV: -5.30 mm)。采用微量注射泵以30 nL/min速度注射病毒,注射量为100 nL。注射结束后留针10 min,

缓慢退针。术后待病毒表达21 d,分别给予0.9%氯化钠溶液、CNO或电针干预,用于后续化学遗传调控及行为学实验。

1.5 观察指标及检测方法

观察排便情况并测定粪便含水率:分别收集各组小鼠4 h内排出的粪便,计数粪便颗数;立即称量湿重,随后置于恒温烘箱中干燥至恒重,称量干重。粪便含水率计算公式如下:粪便含水率(%)=(湿重-干重)÷湿重×100%。

首粒黑便排出时间:小鼠禁食12 h(自由饮水)后,灌胃给予活性炭混悬液100 μL。自灌胃时计时,记录排出首粒黑色粪便所需时间,用以评价全胃肠道传输功能。

小肠推进率测定:小鼠预先禁食12 h(自由饮水),待针刺干预结束后,经口灌胃给予活性炭混悬液(0.01 L/kg),20 min后处死小鼠,迅速开腹取出肠管,测量幽门至回盲部的小肠全长。近红外二区成像检测幽门至活性炭前沿的距离,作为活性炭推进距离。小肠推进率计算公式如下:小肠推进率(%)=活性炭推进距离÷小肠全长×100%。

ELISA法测定血清和结肠中TH的含量:分别采集各组小鼠全血,离心取血清,于-80℃保存。取近端结肠组织,预冷PBS充分漂洗后称重,加入预冷PBS匀浆,离心取上清,于-80℃保存。采用小鼠TH ELISA试剂盒检测血清及结肠组织TH含量,具体操作严格按照试剂盒说明书进行。于450 nm波长处测定吸光度值,根据标准品浓度及吸光度值绘制标准曲线,计算各样本TH含量。

免疫荧光染色检测TH⁺、c-Fos⁺细胞数量:各组小鼠末次干预后,经深度麻醉,采用PBS缓冲液和4%多聚甲醛依次进行心脏灌流。取脑组织(RVLM区域),经固定、脱水、包埋后制备冰冻切片(厚度40 μm)。切片经封闭处理后,分别孵育一抗(TH 1:200、c-Fos 1:300),4℃过夜;次日孵育相应荧光标记二抗(1:400),DAPI复染细胞核后封片。采用激光共聚焦显微镜观察并采集图像,分析RVLM脑区TH、c-Fos阳性神经元数量,以及RVLM中c-Fos与TH共表达水平。

光纤钙信号记录:采用在体多通道光纤记录技术检测各组小鼠RVLM神经元钙活动。采用脑立体定位仪固定小鼠头部,参照小鼠脑立体定位图谱定位RVLM,病毒注射完成后,在相应位置植入光纤陶瓷插芯,并采用牙科水泥固定。rAAV-hSyn-GCaMP6s病毒表达完成并建立FC模型后,于实验

前将小鼠置于昏暗、安静的行为学记录环境中适应不少于 40 min。记录过程中,小鼠保持清醒自由活动状态,将预先植入 RVLM 的光纤陶瓷插芯与光纤记录系统连接,避免对小鼠正常活动造成明显限制。末次电针干预结束 10 min 后对各组小鼠进行信号采集,每次记录时间不少于 20 min。记录参数设置如下:采样频率 60 Hz,曝光时间 15 ms,相机增益 1.0。通过 470 nm 激发光记录 Ca^{2+} 依赖性荧光信号,以反映神经元活动;同时采集 410 nm 激发的 Ca^{2+} 非依赖性信号作为参考,用于校正运动伪影及光漂白。对采集的荧光信号进行预处理,并根据基线荧光强度计算相对荧光变化值 $\Delta F/F$,计算公式为 $\Delta F/F = (F - F_0)/F_0$,其中 F 为实时荧光信号, F_0 为基线期平均荧光信号。以 $\Delta F/F$ 信号曲线作为计算指标,对预设时间窗口内的 $\Delta F/F$ 曲线进行积分,所得曲线下面积 (AUC) 用于评价相应时间窗口内 RVLM 神经元群体 Ca^{2+} 活动的总体水平。

1.6 统计学分析

采用 GraphPad Prism 软件进行统计分析。计量资料经 Shapiro-Wilk 检验评估正态性,正态分布数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较,若满足正态分布且方差齐,则采用单因素方差分析;方差不齐,则采用 Welch's ANOVA 及 Games-Howell 检验。非正态分布数据,采用 Kruskal-Wallis H 检验及 Dunnett's t 检验。两组间比较,若满足正态分布且方差齐时,采用独立样本 t 检验,方差不齐时,采用 Welch's t 检验;非正态分布时,采用 Mann-Whitney U 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义的标准。

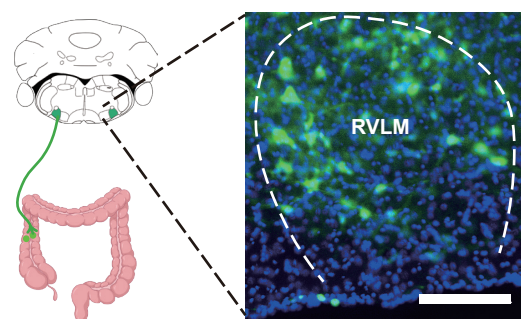
2 结果

2.1 肠壁肌层病毒注射后 RVLM 示踪结果

小鼠脑组织切片结果显示,RVLM 内可见大量 EGFP 标记的神经元胞体,提示 RVLM 与近端结肠之间存在直接或间接的神经纤维联系。见图 1。

2.2 各组小鼠肠动力相关指标及血清和结肠 TH 含量比较

与正常组比较,模型组小鼠首粒黑便排出时间显著延长 ($P < 0.001$),粪便总数明显减少 ($P < 0.001$),粪便含水率及小肠推进率均降低 ($P < 0.001, P < 0.01$),血清和结肠中 TH 含量明显增高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,电针组小鼠首粒黑便排出时间明显缩短 ($P < 0.001$),粪便总数显著增加 ($P < 0.001$),粪便含水率及小肠推进率均升高 ($P <$



注:标尺=200 μm 。RVLM 为延髓头端腹外侧区。
EGFP 阳性信号呈绿色荧光。

图 1 肠壁肌层病毒注射后 RVLM 示踪

Fig. 1 Tracing in RVLM after viral injection into intestinal muscularis

0.01),血清和结肠中 TH 含量明显降低 ($P < 0.01$)。见图 2。

2.3 各组小鼠 RVLM 中 c-Fos 与 TH 阳性神经元数量比较

与正常组比较,模型组小鼠 RVLM 中 c-Fos 阳性神经元及 TH 阳性神经元数量均显著增加 ($P < 0.001$),且二者共表达神经元数量明显增加 ($P < 0.001$)。与模型组比较,电针组小鼠 RVLM 中 c-Fos 及 TH 阳性神经元数量显著减少 ($P < 0.001$),c-Fos 与 TH 共表达神经元数量亦明显减少 ($P < 0.001$)。见图 3。

2.4 化学遗传抑制对小鼠肠动力的影响

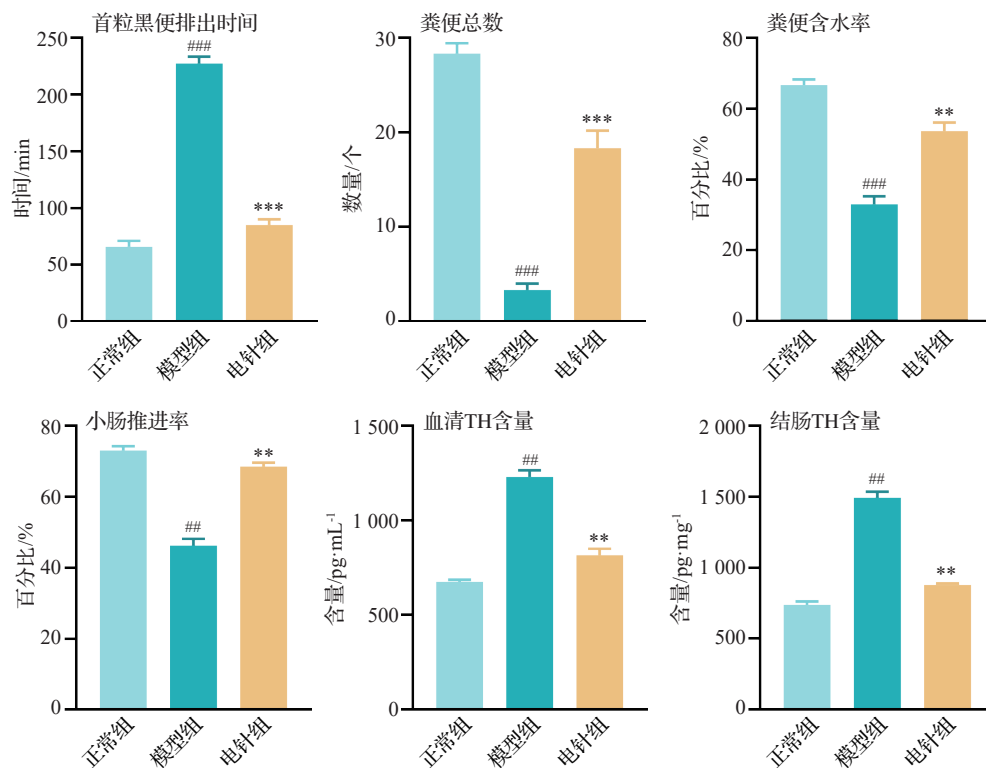
与空载病毒+CNO 组比较,抑制病毒+CNO 组小鼠首粒黑便排出时间显著缩短 ($P < 0.001$),粪便总数明显增加 ($P < 0.001$),粪便含水率及小肠推进率均显著升高 ($P < 0.01$)。见图 4。

2.5 化学遗传激活对电针改善 FC 小鼠肠动力效应的影响

与空载病毒+CNO 组比较,电针组小鼠首粒黑便排出时间显著缩短 ($P < 0.001$),粪便总数明显增加 ($P < 0.001$),粪便含水率及小肠推进率均显著升高 ($P < 0.01$)。与电针组比较,激活病毒+CNO+电针组小鼠首粒黑便排出时间显著延长 ($P < 0.001$),粪便总数减少 ($P < 0.001$),粪便含水率及小肠推进率均明显降低 ($P < 0.01$)。见图 5。

2.6 各组小鼠 RVLM 脑区钙信号变化

与空白组比较,模型对照组小鼠 RVLM 脑区 Ca^{2+} 信号活动显著增强 ($P < 0.001$)。与模型对照组比较,模型+电针组小鼠 RVLM 脑区 Ca^{2+} 信号活动明显减弱 ($P < 0.001$)。见图 6。



注: TH为酪氨酸羟化酶。与正常组比较, $^{##}P<0.01$, $^{###}P<0.001$; 与模型组比较, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ 。

图2 各组小鼠肠动力相关指标及血清和结肠TH含量比较($\bar{x}\pm s$, 6只鼠/组)

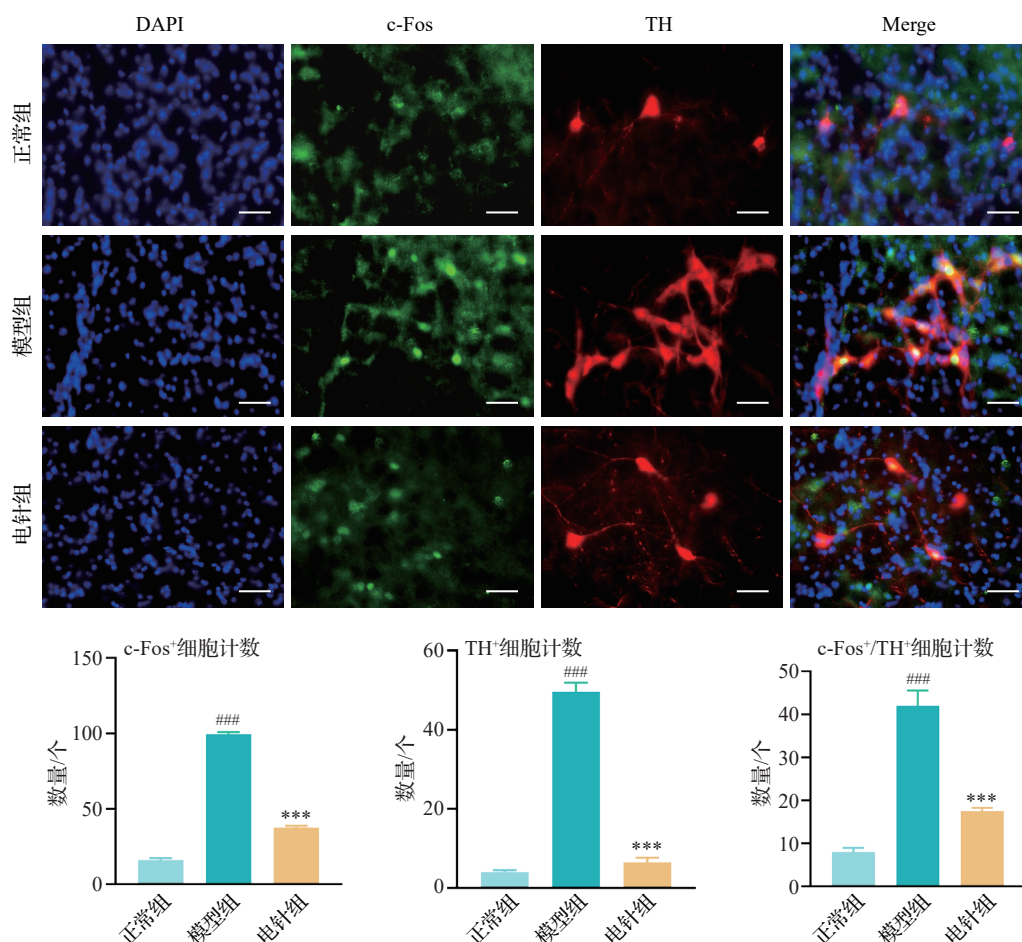
Fig. 2 Comparison of colon motility-related indicators as well as serum and colon TH levels of mice in the 3 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 mice/group)

3 讨论

传统中医理论认为FC主要责之于大肠“传导失司”,其病机与气机失调密切相关,涵盖气滞、气虚及肠燥津亏等病理因素,病位涉及脾、胃、肝、肾等脏腑,核心病理环节为肠道气机壅滞及浊阴不降。治疗当以通降大肠、调畅气机为要旨^[17]。由天枢(大肠募穴)和上巨虚(大肠下合穴)组成的合募配穴是治疗肠腑疾病的经典配伍方式,天枢为大肠之募穴,位于腹部,具有调理肠腑、通降腑气之功;上巨虚为大肠之下合穴,属足阳明胃经,主导腑气下行,两者上下相配,共同调节大肠传导功能^[18]。研究显示,在针灸治疗FC的高频选穴中,天枢-上巨虚组合出现频率最高,提示其在临床应用中的核心地位^[19]。动物实验^[20]证实,电针大肠合募配穴可显著改善FC小鼠的排便频率、粪便性状及肠道功能。本研究结果也表明,电针大肠合募配穴可显著缩短FC小鼠的首粒黑便排出时间,增加粪便粒数,提高粪便含水率及小肠推进率,提示电针能够有效促进胃肠蠕动,改善FC小鼠的肠动力障碍,促进肠道传输功能的恢复。

RVLM是维持交感神经张力及调控内脏功能

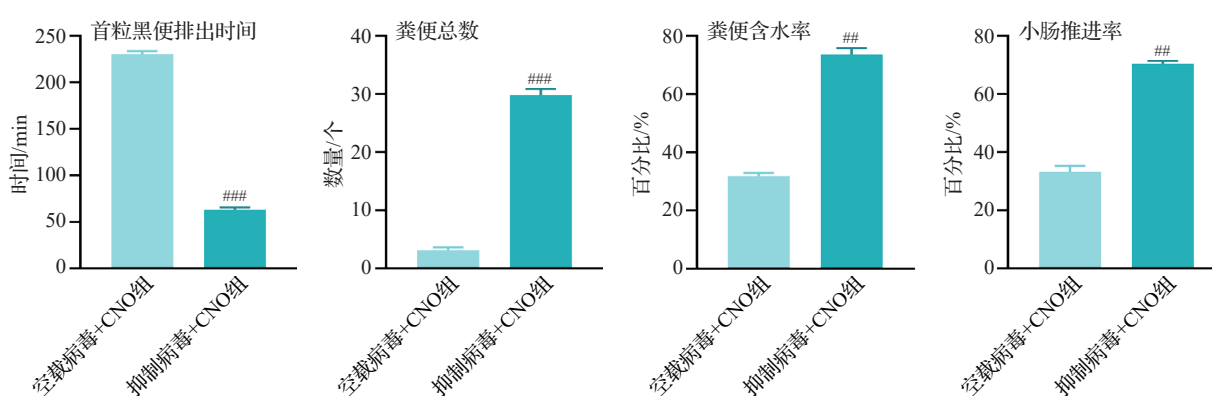
的关键脑区,其内富含表达TH的儿茶酚胺能神经元,在自主神经调控中发挥核心作用^[21-23]。近年研究表明,RVLM可参与胃肠道功能的中枢调控,例如应激可激活下丘脑-延髓通路,增强RVLM交感神经活动,导致应激性胃黏膜损伤、肠易激综合征样内脏高敏感及FC^[24-25]。而化学遗传激活RVLM可显著抑制胃窦收缩幅度和频率,该效应可被脊髓横断或交感神经节阻断所消除^[26-27]。本研究逆行示踪结果显示,近端结肠与RVLM之间存在明确神经投射,为脑-肠轴突触联系提供了形态学证据。此外,免疫荧光染色显示FC小鼠RVLM脑区c-Fos与TH阳性细胞数量显著上调,提示FC小鼠交感神经过度激活,这与既往研究报道的交感活性增强可抑制胃肠蠕动相一致^[26,28]。研究证实,针刺可通过抑制RVLM神经元活动,调节交感神经输出,从而参与心血管及内脏功能的调控^[29-30]。本研究结果表明,电针干预可显著降低RVLM脑区c-Fos、TH及其共表达阳性细胞数量,光纤钙信号记录技术进一步证实,FC小鼠RVLM脑区的钙信号活动增强,电针干预可降低RVLM神经元的钙信号活性。上述结果提示,电针大肠合募配穴能够抑制RVLM神经



注:RVLM为延髓头端腹外侧区,c-Fos为神经元标记物,TH为酪氨酸羟化酶。标尺=50 μ m。与正常组比较,^{###} $P<0.001$;与模型组比较,^{***} $P<0.001$ 。

图3 各组小鼠RVLM中c-Fos与TH阳性神经元数量比较(免疫荧光染色, $\bar{x}\pm s$,6只鼠/组)

Fig. 3 Comparison of the number of c-Fos and TH-positive neurons in the RVLM of mice in the 3 groups (immunofluorescence staining, $\bar{x}\pm s$, 6 mice/group)



注:CNO为氯氮平-N-氧化物。与空载病毒+CNO组比较,^{##} $P<0.01$,^{###} $P<0.001$ 。

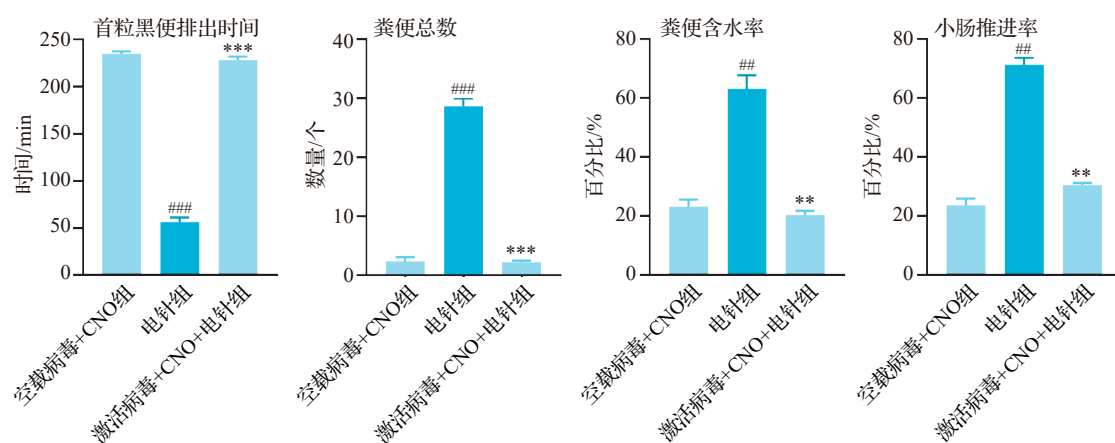
图4 化学遗传抑制病毒调控后两组小鼠肠动力相关指标比较($\bar{x}\pm s$,6只鼠/组)

Fig. 4 Comparison of colon motility-related indicators after chemogenetic viral inhibition of mice in the 2 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 mice/group)

元的过度兴奋,从而降低交感神经活动以改善肠动力障碍。

本研究化学遗传操控实验结果表明,特异性抑

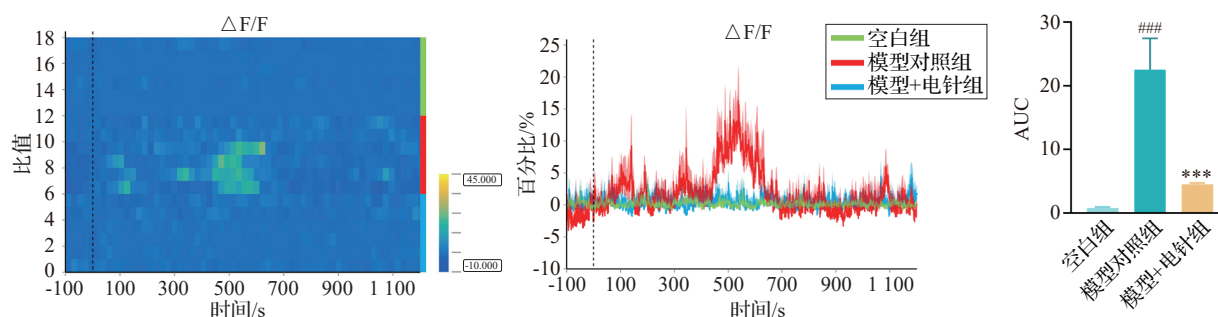
制RVLM中TH阳性神经元活性可显著改善FC小鼠的首粒黑便排出时间、粪便数量、粪便含水率及小肠推进率,其改善趋势与电针干预基本一致。结



注:CNO为氯氮平-N-氧化物。与空载病毒+CNO组比较,## $P<0.01$,### $P<0.001$;与电针组比较,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图5 化学遗传激活病毒调控后各组小鼠肠动力相关指标比较($\bar{x}\pm s$,6只鼠/组)

Fig. 5 Comparison of intestinal motility-related indicators of mice in the 3 groups after chemogenetic viral activation ($\bar{x}\pm s$, 6 mice/group)



注:左图为 $\Delta F/F$ 热图,中间为 $\Delta F/F$ 动态曲线图,右图 $\Delta F/F$ 信号AUC统计图。RVLM为延髓头端腹外侧区,AUC为曲线下面积。与正常组比较,### $P<0.001$;与模型组比较,*** $P<0.001$ 。

图6 各组小鼠RVLM脑区钙信号变化($\bar{x}\pm s$,6只鼠/组)

Fig. 6 The changes in calcium signals in the RVLM brain region of mice in the 3 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 mice/group)

果提示,RVLM中TH阳性神经元异常激活可能参与FC肠动力障碍的发生,而抑制其活性有助于恢复胃肠运动功能。相反,特异性激活RVLM中TH阳性神经元后,电针改善肠动力的作用明显减弱,提示RVLM中TH阳性神经元活性的变化与电针疗效密切相关。上述结果表明,RVLM可能是电针调节肠动力的重要中枢作用靶点。需要注意的是,本研究虽然通过光纤记录、化学遗传学方法验证了RVLM中TH阳性神经元与电针效应之间的功能联系,但尚未通过特异性损毁等手段验证其在电针调控过程中的必要性。因此,现阶段的证据更支持RVLM神经元参与了电针改善FC肠动力障碍的过程,而不能完全排除其他脑区或神经通路的协同作用。

综上所述,本研究结果表明,电针“天枢”“上巨虚”可以通过抑制RVLM中TH阳性神经元活性,调控支配近端结肠的交感神经活性。化学遗传激

活RVLM神经元活性可增强小鼠结肠区域交感兴奋,抑制肠道蠕动;相反,电针可通过抑制RVLM中TH阳性神经元活性降低FC小鼠交感神经的过度兴奋,改善肠动力障碍。因此,RVLM中TH阳性神经元参与电针大肠合募配穴改善FC小鼠肠动力障碍,其可能是电针发挥促胃肠动力作用的重要中枢机制。未来的研究可以借助单细胞测序或空间转录组学技术,结合光遗传学及多通道在体电生理等技术,解析RVLM中TH阳性神经元亚群的分子特征,以进一步剖析电针大肠合募配穴通过“RVLM-脊髓”神经环路改善肠动力的机制。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。作者曾芳为本刊编委,但未参与本文的审理。

参考文献

- [1] 靳琦,陈跃来,郑慧敏,等. 针灸治疗老年功能性便秘的临床疗效与作用机制研究概况[J]. 上海中医药大学学报, 2024, 38(2): 21-28.

- Jin Q, Chen Y L, Zheng H M, et al. Research survey on clinical efficacy and mechanism of acupuncture and moxibustion in treatment of functional constipation in elderly (in Chinese) [J]. *Acta Universitatis Traditionis Medicalis Sinensis Pharmacologiaeque Shanghai*, 2024, 38(2): 21-28.
- [2] 滕莉, 陈小朝. 中医药治疗功能性便秘的研究进展[J]. *现代临床医学*, 2026, 52(1): 78-80.
- Teng L, Chen X Z. Research progress of functional constipation treated by traditional Chinese medicine (in Chinese) [J]. *Journal of Modern Clinical Medicine*, 2026, 52(1): 78-80.
- [3] 陈丽. 针刺对功能性便秘患者边缘系统脑区低频振荡振幅的影响[D]. 成都: 成都中医药大学, 2020.
- Chen L. Influence of acupuncture on the amplitude of low frequency fluctuation of limbic system in patients with functional constipation (in Chinese) [D]. Chengdu: Chengdu University of TCM, 2020.
- [4] 马培宏. 针刺对功能性便秘患者海马-全脑功能连接网络的影响研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2021.
- Ma P H. Influence of acupuncture on functional brain connectivity network of hippocampus in functional constipation patients (in Chinese) [D]. Chengdu: Chengdu University of TCM, 2021.
- [5] 王路, 席梦含, 张微, 等. 基于机械敏感离子通道探讨电针改善功能性便秘小鼠胃肠动力的机制[J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(11): 5237-5243.
- Wang L, Xi M H, Zhang W, et al. Mechanism research of electroacupuncture improving gastrointestinal motility in functional constipation mice based on mechanosensitive ion channels (in Chinese) [J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2023, 38(11): 5237-5243.
- [6] Ong S S, Tang T, Xu L J, et al. Research on the mechanism of core acupoints in electroacupuncture for functional constipation based on data mining and network acupuncture [J]. *Front Med*, 2024, 11: 1482066.
- [7] 沙漫漫, 李崖雪. 基于脑-肠轴探讨针灸治疗脑卒中后便秘的研究进展[J]. *临床医学进展*, 2025, 15(7): 1296-1301.
- Sha M M, Li Y X. Research progress on acupuncture treatment for constipation after stroke based on the brain-gut axis theory (in Chinese) [J]. *Advances in Clinical Medicine*, 2025, 15(7): 1296-1301.
- [8] Chen W, Ma X, Fu Y M, et al. Electroacupuncture regulates sympathetic nerve through the NTS^{Glu}-RVLM circuit to relieve spontaneous pain in SNI rats [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2025, 31(3): e70327.
- [9] Rahman A, Nishiyama A. Inhibiting SGLTs diminishes sympathetic output by reducing rostral ventrolateral medulla (RVLM) neuron activity [J]. *Hypertens Res*, 2024, 47(2): 571-572.
- [10] Tovar S, Paeger L, Hess S, et al. K (ATP) -channel-dependent regulation of catecholaminergic neurons controls BAT sympathetic nerve activity and energy homeostasis [J]. *Cell Metab*, 2013, 18(3): 445-455.
- [11] Nam H, Kerman I A. Distribution of catecholaminergic presympathetic-premotor neurons in the rat lower brainstem [J]. *Neuroscience*, 2016, 324: 430-445.
- [12] 《针刺研究》编辑部. 《针刺研究》实验动物福利伦理审查清单 [J]. *针刺研究*, 2024, 49(2): 220.
- Editorial Board of Acupuncture Research. List of ethical reviews for experimental animal welfare in *Acupuncture Research* (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2024, 49(2): 220.
- [13] 鄢香芸, 李艳秋, 马沛涛, 等. 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 [J]. *针刺研究*, 2026, 51(3): 332-340.
- Yan X Y, Li Y Q, Ma P T, et al. Electroacupuncture improves intestinal motility and visceral sensitivity in mice with functional constipation via up-regulating Piezo1/2 channel activity (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2026, 51(3): 332-340.
- [14] 郭义, 方剑乔. 实验针灸学 [M]. 3版. 北京: 中国中医药出版社, 2012.
- Guo Y, Fang J Q. *Experimental acupuncturology* (in Chinese) [M]. 3rd edition. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2012.
- [15] 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): 445-446.
- China Association of Acupuncture-Moxibustion. Nomenclature and location of acupoints commonly used in laboratory animals. Part 3: mice (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2021, 46(5): 445-446.
- [16] Paxinos G, Franklin K B J. Paxinos and Franklin's The mouse brain in stereotaxic coordinates [M]. Amsterdam: Boston, Elsevier/Academic Press, 2013.
- [17] 胡露楠, 许燕城, 方文怡, 等. 《功能性便秘中西医结合诊疗专家共识(2025年)》解读 [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2025, 33(12): 1150-1155.
- Hu L N, Xu Y C, Fang W Y, et al. Interpretation of the expert consensus on integrated traditional Chinese and western medicine diagnosis and treatment of functional constipation (2025) (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Digestion*, 2025, 33(12): 1150-1155.
- [18] 杨婉卿. 基于合募配穴法针刺治疗功能性便秘的临床疗效观察及对血清 CGRP 的影响 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2023.
- Yang W Q. Observations on the clinical effectiveness of acupuncture for functional constipation and the effects on

- serum CGRP based on the method of back-Shu points and front-Mu points (in Chinese) [D]. Chengdu: Chengdu University of TCM, 2023.
- [19] 刘奕彤, 秦琪, 陈栋, 等. 基于数据挖掘的针刺治疗功能性便秘的选穴规律分析[J]. 实用临床医药杂志, 2025, 29(2): 75-79.
- Liu Y T, Qin Q, Chen D, et al. Analysis of acupoint selection rules for acupuncture treatment of functional constipation based on data mining (in Chinese) [J]. Journal of Clinical Medicine in Practice, 2025, 29(2): 75-79.
- [20] 席梦含, 王路, 张微, 等. 电针对功能性便秘小鼠肠道神经元自噬水平的影响[J]. 中国针灸, 2023, 43(11): 1279-1286.
- Xi M H, Wang L, Zhang W, et al. Effect of electroacupuncture on enteric neuronal autophagy in functional constipation mice (in Chinese) [J]. Chinese Acupuncture & Moxibustion, 2023, 43(11): 1279-1286.
- [21] Li W J, Zhu H Y, Zou X Y, et al. A brain-to-lung signal from GABAergic neurons to ADRB2⁺ interstitial macrophages promotes pulmonary inflammatory responses [J]. Immunity, 2025, 58(8): 2069-2085.
- [22] Mi Y, Yu H, Wang P, et al. Tyrosine hydroxylase-positive neurons in the rostral ventrolateral medulla mediate sympathetic activation in sepsis [J]. Life Sci, 2024, 358: 123118.
- [23] Kishi T. Clarification of hypertension mechanisms provided by the research of central circulatory regulation [J]. Hypertens Res, 2023, 46(8): 1908-1916.
- [24] Zaman A, Özcelik H, Yücel E, et al. Effect of sex on chronic stress induced alterations in hindbrain catecholaminergic system and autonomic dysfunction resulting in gastrointestinal dysmotility[J]. Brain Res, 2024, 1842: 149112.
- [25] Sartor D M, Shulkes A, Verberne A J. An enteric signal regulates putative gastrointestinal presympathetic vasomotor neurons in rats[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2006, 290(3): R625-R633.
- [26] Browning K N, Travagli R A. Central nervous system control of gastrointestinal motility and secretion and modulation of gastrointestinal functions [J]. Compr Physiol, 2014, 4(4): 1339-1368.
- [27] Greenwood-Van Meerveld B, Johnson A C, Grundy D. Gastrointestinal physiology and function [M]// Gastrointestinal Pharmacology. Cham: Springer, 2017: 1-16.
- [28] Wan Y W, Cao C R, Zeng W W. The sympathetic neurons in the gut: Perspectives on metabolic and immune health and diseases[J]. Curr Opin Neurobiol, 2025, 93: 103051.
- [29] Malik S, Samaniego T, Guo Z L. Adenosine receptor A_{2a}, but not A₁ in the rVLM participates along with opioids in acupuncture-mediated inhibition of excitatory cardiovascular reflexes[J]. Front Neurosci, 2019, 13: 1049.
- [30] 侯全亮, 李杨, 胡航, 等. 针灸治疗高血压的中枢调控机制研究进展[J]. 中医学, 2025, 14(11): 4722-4731.
- Hou Q L, Li Y, Hu H, et al. Research progress on central regulatory mechanisms of acupuncture in hypertension treatment (in Chinese) [J]. Traditional Chinese Medicine, 2025, 14(11): 4722-4731.

收稿日期:2026-04-30 修回日期:2026-06-27