

“足三里”和“三阴交”单穴与组穴电针刺激对肠易激综合征小鼠干预效应的比较研究

钱 申¹, 张 灵^{1,2}, 张佳佳¹, 崔光富¹, 黄天文^{1,2}

(¹中国科学院深圳先进技术研究院, 广东深圳 518055; ²中国科学院大学, 北京 101408)

【摘 要】 目的:比较电针“足三里”“三阴交”单穴和组穴(“足三里”+“三阴交”)3种刺激方式对肠易激综合征(IBS)模型小鼠行为学、组织学的干预效应差异及不同刺激方式下外周、中枢神经系统的神经元响应差异,为探究穴位组合干预IBS的神经机制提供实验依据。**方法:**通过向雄性C57BL/6J小鼠直肠灌注酵母聚糖构建IBS动物模型,随机分为空白组、模型组、足三里组、三阴交组和穴位组合组(除模型组为18只外均为20只)。连续7 d电针刺激(2 Hz/100 Hz, 1 mA, 每次15 min, 每日1次)后, von Frey 纤维丝检测各组小鼠腹部机械痛敏(牵涉痛), 转棒实验检测运动能力, 基于人工智能的3D无监督动物自发精细行为学分析方法评估3D自发精细行为特征, HE染色观察结肠组织结构和炎症水平, Western blot法检测结肠组织炎症因子表达, 评估单穴和组穴刺激改善IBS症状的效果差异。利用标记工具病毒对支配C57BL/6J小鼠“足三里”和“三阴交”的背根神经节(DRG)神经元进行环路示踪, 以在体双光子钙成像记录Thy1-GCaMP6s小鼠响应不同电针(1 mA, 1 min)刺激方式的DRG神经元, 采用活动依赖的神经元标记技术解析转基因TRAP2; Ai14小鼠电针(2 Hz/100 Hz, 1 mA, 每次15 min)激活的中枢神经元, 探究单穴和组穴刺激的外周-中枢神经元响应差异。**结果:**与空白组比较, 模型组小鼠腹部机械痛敏回撤次数及曲线下面积增加($P<0.001$, $P<0.05$), 运动能力(跌落潜伏期和跌落时的转棒速度)下降($P<0.01$), 结肠组织损伤和炎症反应加重($P<0.001$), 白细胞介素 1β (IL- 1β)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的表达量升高($P<0.001$), 自发行为方式发生变化($P<0.001$, $P<0.01$, $P<0.05$); 3种电针刺激方式均能显著缓解IBS模型小鼠的腹壁机械痛敏反应($P<0.001$, $P<0.05$, $P<0.01$), 并且组穴刺激的有效干预区间大于单穴。组穴刺激相比单穴还能够更加有效地恢复IBS造成的结肠组织损伤、降低TNF- α 的表达水平($P<0.05$), 以及缩短自发弓背动作的单次持续时间和不同自发行为动作的转换方式($P<0.01$, $P<0.05$)。DRG神经元对3种刺激方式的响应存在高度异质性, 基于被记录的神经元活动特点, 可分为3大类7小类。此外, 组穴刺激较单穴可激活更多的DRG神经元($P<0.05$), 且神经元钙信号强度也高于单穴刺激($P<0.05$)。最后, 不同脑区神经元对于3种刺激方式在响应数量上存在显著的差异, “足三里”及“三阴交”两种单穴刺激与组穴刺激所激活的神经元在下丘脑室旁核(PVN)都存在最大程度的重合, 而在岛叶皮层(IC)的重合度均最低, 提示IC神经元的激活需要组穴的协同效应。**结论:**“足三里”与“三阴交”的组穴刺激较单穴能够更好地改善IBS模型小鼠的腹部机械痛敏、结肠组织结构损伤和炎症状态, 以及内脏痛引起的自发行为变化, 其优势可能来自外周及中枢神经元对不同刺激方式电针信号进行的协同整合。

【关键词】 穴位组合; 电针; 肠易激综合征; 足三里; 三阴交

Comparative study on intervention effects of electroacupuncture at single point “Zusanli” (ST36), “Sanyinjiao” (SP6) and combined points on irritable bowel syndrome mice

Qian Shen¹, Zhang Ling^{1,2}, Zhang Jiajia¹, Cui Guangfu¹, Huang Tianwen^{1,2} (¹Shenzhen Institutes of Advanced Technology,

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20260558

引用格式: 钱申, 张灵, 张佳佳, 等. “足三里”和“三阴交”单穴与组穴电针刺激对肠易激综合征小鼠干预效应的比较研究[J]. 针刺研究, 2026, 51(10): 1-15.

项目来源: 国家自然科学基金面上项目(No.82274358); 国家自然科学基金青年项目(No.82305050); 广东省重点领域研发计划项目(No.2023B0303040004); 深圳市基础研究重点项目(No.JCYJ20220818100615033)

共同通信作者: 崔光富, E-mail: gf.cui@siat.ac.cn;

黄天文, E-mail: tw.huang@siat.ac.cn

Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, Guangdong Province, China; ²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101408)

【ABSTRACT】 Objective To compare the differences in interventional effects among three stimulation modalities: electroacupuncture (EA) at single acupoint “Zusanli” (ST36), single acupoint “Sanyinjiao” (SP6), and their combination (ST36 + SP6), on behavioral and histological outcomes in a mouse model of irritable bowel syndrome (IBS), and to examine the differential neuronal responses in the peripheral and central nervous systems under these modalities, so as to provide experimental evidence for exploring the neural mechanisms underlying acupoint combination stimulation in IBS treatment. **Methods** An IBS model was established in male C57BL/6J mice by intrarectal instillation of Zymosan. The mice were randomly divided into blank control group, model group, ST36 group, SP6 group, and acupoint combination group ($n=20$ per group except $n=18$ for the model group). After 7 consecutive days of EA stimulation (2 Hz/100 Hz, 1 mA, 15 min per session, once daily), abdominal mechanical hyperalgesia (referred pain) was assessed using von Frey filaments, motor function by rotarod test, and 3D spontaneous fine behavioral characteristics by an AI-based unsupervised 3D behavioral analysis system. Colon tissue structure and inflammatory levels were observed by HE staining, and colonic inflammatory cytokines expressions were detected by Western blot, to evaluate the symptom-relieving effects of single versus combined acupoint stimulation. For neural tracing, retrograde viral tracers were injected into ST36 and SP6 to label dorsal root ganglion (DRG) neurons innervating these acupoints in C57BL/6J mice. *In vivo* two-photon calcium imaging was performed to record DRG neuronal responses to different EA modalities (1 mA, 1 min) in Thy1-GCaMP6s mice, and activity-dependent neuronal labeling was applied using transgenic TRAP2;Ai14 mice to identify central neurons activated by EA (2 Hz/100 Hz, 1 mA, 15 min per session), aiming to reveal peripheral–central neuronal response differences between single and combined acupoint stimulation. **Results** Compared with the blank control group, the model group showed increased abdominal mechanical withdrawal frequency and area under the curve ($P<0.001$, $P<0.05$), decreased motor function (latency to fall and rotarod speed at fall, $P<0.01$), aggravated colonic tissue damage and inflammatory responses ($P<0.001$), elevated expressions of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor α (TNF- α) ($P<0.001$), and altered spontaneous behavioral patterns ($P<0.001$, $P<0.01$, $P<0.05$). All three EA modalities significantly alleviated abdominal mechanical hyperalgesia in IBS mice ($P<0.001$, $P<0.05$, $P<0.01$), with the combined stimulation showing a larger effective interventional window than either single acupoint. Compared with single-acupoint stimulation, combined stimulation also more effectively restored colonic tissue damage, reduced TNF- α expression ($P<0.05$), and shortened the duration of spontaneous arching episodes and altered the transition patterns among different spontaneous behavioral actions ($P<0.01$, $P<0.05$). DRG neurons exhibited highly heterogeneous responses to the three stimulation modalities, which could be classified into 3 major categories and 7 subcategories based on their firing characteristics. Furthermore, combined stimulation activated a greater number of DRG neurons than single acupoint stimulation ($P<0.05$), and the neuronal calcium signal intensity was also higher ($P<0.05$). Finally, significant differences were observed in the number of responsive neurons across different brain regions under the three modalities. The activated neuronal populations evoked by ST36, SP6, and combined stimulation showed maximal overlap in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN), whereas the overlap was minimal in the insular cortex (IC), suggesting that IC neuronal activation requires the synergistic effect of combined acupoint stimulation. **Conclusion** Combined stimulation at ST36 and SP6 produces superior therapeutic effects over single acupoint stimulation in ameliorating abdominal mechanical hyperalgesia, colonic structural damage, inflammatory status, and spontaneous behavioral changes induced by visceral pain in IBS model mice, and this advantage may arise from the synergistic integration of peripheral and central neuronal responses to different EA signals.

【KEYWORDS】 Acupoint combination; Electroacupuncture; Irritable bowel syndrome; Zusanli (ST36); Sanyinjiao (SP6)

肠易激综合征(IBS)是目前人群发病率较高的一种功能性胃肠疾病^[1-3],致病因素复杂多样,以腹痛、腹胀或腹部不适为主要症状。除肠道症状外,IBS患者常伴发焦虑、抑郁等情绪障碍^[4],药物治疗

存在不良反应多、停药后易复发等因素导致患者依从性差。针刺在改善机体炎性反应、胃肠功能紊乱、疼痛及情绪障碍等方面具有显著效果^[5]。随机对照临床试验显示,针刺治疗IBS多采用天枢、中

腕、关元、足三里、上巨虚搭配太冲与三阴交单穴或双穴^[6]。《消化系统常见病肠易激综合征中医诊疗指南》等^[7-8]推荐足三里和三阴交配伍治疗IBS,并且二者组合刺激的镇痛时长显著优于单一穴位^[9]。

本研究通过结肠灌注酵母聚糖(Zymosan)构建IBS小鼠模型,利用多种行为学方法评估IBS模型小鼠的腹部机械痛敏(牵涉痛)、运动能力和自发行方式;从行为、组织和炎症因子水平多维度比较分析电针足三里、三阴交单穴及组穴刺激缓解IBS的效果差异;利用在体双光子钙成像技术分析背根神经节(DRG)神经元对单穴及组穴刺激的响应特性;运用活动依赖神经元标记技术分析单穴及组穴刺激激活的中枢神经元分布差异,探究组穴刺激干预效应优于单穴的潜在神经机制,将有助于回答临床针刺组穴效应的神经基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

所有手术和实验过程均由中国科学院深圳先进技术研究院动物伦理委员会批准,批准号:SIAT-IACUC-20230215-NS-NENJSYS-CGF-A1816-03。本研究所使用的野生型雄性C57BL/6J小鼠购买于广州维通利华实验动物技术有限公司(7~10周龄),生产许可证编号:SCXK(粤)2022-0063。Thy1-GCaMP6s(JAX024275)、TRAP2(JAX030323)和Ai14(JAX007914)小鼠购买于美国Jackson实验室。所有小鼠在饲养过程中进行分笼饲养,每笼不超过5只。所有实验小鼠饲养温度为20~26℃,湿度为40%~70%,12h的明/暗循环(8:00~20:00),提供实验小鼠标准饲料和饮用水。在所有行为实验之前,将小鼠随机分组。实验后给予1%戊巴比妥钠进行麻醉取材或二氧化碳安乐死,尽一切努力减少实验动物的使用数量和痛苦。实验小鼠随机分为5组,空白组(直肠灌注0.9%氯化钠溶液)、模型组(直肠灌注Zymosan)、三阴交组、足三里组和穴位组合组。共计使用114只小鼠,其中野生型C57BL/6J小鼠100只、Thy1-GCaMP6s小鼠8只、TRAP2;Ai14小鼠6只。野生型小鼠分别用于空白组(20只)、模型组(18只)、三阴交组(20只)、足三里组(20只)、穴位组合组(20只)和神经示踪(2只)。

1.2 主要仪器和试剂

不锈钢毫针(0.25 mm×13 mm,南京华佗),电刺激器(3800和3820,美国A-M system),3D无监督自发行行为分析仪(广州一湾),玻片扫描仪(Olympus

VS200,日本奥林巴斯),冰冻切片机、石蜡切片机和包埋机(德国徕卡),电泳仪和转膜仪(美国BIO-RAD),多功能酶标仪(美国Molecular Devices),转棒仪(美国Panlab),微型双光子显微镜(南京超维景),四足称重动态测试仪(美国Harvard Apparatus),von Frey纤维丝(意大利Ugo Basile)。

4-羟基他莫昔芬(4-OHT, Sigma #H6278)、Zymosan(Sigma #Z4250,美国Sigma),HE染色试剂盒(北京索莱宝),逆向跨突触示踪病毒PRV-CAG-EGFP(BC-PRV-531)、PRV-CAG-mRFP(BC-PRV-724,深圳布林凯斯),白细胞介素1 β (IL-1 β)抗体(CST #12242,美国CST),c-Fos抗体(Abcam #ab209794)、rabbit anti- β -actin(Abcam #ab179467)、rabbit anti-肿瘤坏死因子 α (TNF- α)抗体(Abcam #ab6671)、goat anti-rabbit-HRP二抗(Abcam #ab97051,英国Abcam),HyperFluor™ 488 goat anti-rabbit 二抗(APExBio #K1214)、HyperFluor™ 488 goat anti-mouse 二抗(APExBio #K1204,美国APExBio)。

1.3 模型制备方法

小鼠适应性饲养1周后直肠灌注Zymosan构建IBS动物模型。0.9%氯化钠溶液溶解Zymosan配制成悬浮液(30 mg/mL),使用前摇匀。小鼠经1%异氟烷麻醉,使用8号灌胃针伸进直肠2 cm给予0.1 mL Zymosan悬浊液,连续3 d。空白组小鼠采取相同操作直肠灌注0.1 mL 0.9%氯化钠溶液。在造模后第1、7、14天进行转棒实验、腹壁机械痛敏测试,以运动能力下降以及产生显著的腹壁机械痛敏作为造模成功依据^[1,7]。

1.4 电针干预方法

根据参考文献[10]确定“三阴交”位于小鼠后肢内踝尖直上约5 mm,“足三里”位于膝关节后外侧,在腓骨小头下约2 mm处。将两根直径为0.25 mm的不锈钢针灸针间隔1 mm分别垂直刺入小鼠左腿的“三阴交”“足三里”,或“足三里”+“三阴交”双穴位,深度约2 mm(“三阴交”)和3 mm(“足三里”)。通过电刺激器给小鼠穴位电针刺激,刺激频率为2 Hz/100 Hz,疏密波,强度为1 mA,时间为15 min,从造模结束后第1天开始,连续干预7 d。干预过程中小鼠处于清醒、固定状态。固定方法:将小鼠放入50 mL离心管,离心管前端及对应小鼠四肢的位置均有开孔,用医用胶带将离心管固定在一个底座上(尺寸大小为25 cm×2.5 cm×5 cm)。小鼠在造模期间同时进行固定适应,为期3 d,每天15 min。

1.5 观察指标及检测方法

腹部机械敏感性测试:将小鼠放置在开放金属网格(孔径大小为6 mm×6 mm)上,单只放进亚克力盒(尺寸大小为10 cm×10 cm×5 cm)中连续适应3 d,每天30 min。在测试前1 d使用剃毛剪剃去小鼠腹部毛发。正式测试开始时,小鼠在亚克力盒中适应30 min,使用0.008、0.02、0.04、0.07、0.16、0.4 g和0.6 g强度 von Frey 纤维丝检测动物腹部皮肤机械敏感度,以小鼠做出舔舐腹部或者全身躲避定义为阳性反应^[11]。每个刺激强度重复10次,每次间隔为10 s,每个刺激强度间隔2 min,统计每只小鼠对于每一次刺激强度的阳性反应(回撤)次数,并计算曲线下面积。

转棒实验:转棒测试前3 d,每天将小鼠置于转棒仪旋转杆上以4 r/min的转速训练30 min。第4天开始测试时,以4 r/min为起始速度进行加速运动,上限为40 r/min,记录小鼠跌落下来的时间(跌落潜伏期)和速度,每只小鼠重复测试3次。

基于人工智能的3D无监督动物自发精细行为

学分析^[12]:实验开始前将小鼠放置于亚克力圆筒(直径50 cm,高30 cm)中适应30 min,实验开始后将小鼠放置于自发行为记录箱中,记录小鼠30 min的自发行为。每次视频录制后,用20%的乙醇擦拭行为学箱体。在视频录制之后,将定标文件和视频导入Behavior Atlas Analyzer 和 Behavior Atlas Explorer 分析软件中,重建小鼠3D骨架,提取小鼠行为学参数。利用Python对行为学参数进行聚类分析,计算各组姿态参数差异和4种动作的序列、时间占比、发生频次、平均维持时间及动作间转换概率。

结肠组织HE染色:小鼠经4%多聚甲醛心脏灌流后收集结肠组织,固定、脱水、石蜡包埋、切片、脱蜡,进行HE染色,脱水、透明、封片,玻片扫描仪采集切片图像。选择结肠的横截面图片,对隐窝结构、隐窝基底部厚度、隐窝脓肿、杯状细胞丢失及炎性细胞浸润程度进行定量评分,评分标准见表1。计算样品在每个单项的平均值,组织学损伤评分为每个单项评分的总和。

表1 HE染色组织学评分标准
Table 1 Histological scoring criteria of hematoxylin-eosin staining

结构	形态学变化	组织评分
隐窝结构	是否丢失	0分:正常 3分:隐窝严重变形甚至整个隐窝丢失
隐窝基底部	厚度是否增加	0分:隐窝底部位于黏膜肌层 3分:有明显的肌肉增厚
隐窝脓肿	是否存在	0分:无 1分:存在
杯状细胞	是否丢失	0分:正常 3分:丢失
炎性细胞	浸润程度是否增加	0分:正常 3分:出现致密炎性浸润物

Western blot检测结肠组织炎性因子表达:每组选择3只小鼠经预冷PBS心脏灌流,取约2 cm远端结肠组织,液氮冷冻研磨、裂解取上清,用BCA法检测蛋白含量,配胶电泳、转膜、封闭。一抗(TNF- α , 1:1 000; IL-1 β , 1:1 000; β -actin, 1:1 000)4℃过夜, TBST清洗后,二抗(1:1 000)室温孵育2 h。TBST再次清洗后,配置化学发光底物(A:B=1:1)后滴加到膜表面,将膜放置在化学发光凝胶成像系统中进行显影,选择合适的曝光模式并保存图片。在Image Lab软件中导出显影后的图片,并利用

ImageJ软件分析目标蛋白条带的灰度值,以目标蛋白条带灰度值与内参 β -actin条带灰度值的比值计算目标蛋白相对表达水平。

病毒示踪:本研究使用的标记工具病毒PRV-CAG-EGFP和PRV-CAG-mRFP滴度均为 1.00×10^9 PFU/mL。使用1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉野生型小鼠,并脱去小鼠腿部毛发,依据上述定位方法确定“足三里”和“三阴交”位置,先用针灸针在穴位皮肤上打孔(深度2 mm,确保穿透皮肤方便玻璃电极进入进行病毒注射),再在体视

镜下使用 10 μL 微量注射器在“足三里”(PRV-CAG-EGFP)和“三阴交”(PRV-CAG-mRFP)分别注射 1 μL 示踪病毒,深度为皮肤表面之下 2 mm。注射完毕后,0.9% 氯化钠溶液清洗周围组织,减少病毒对皮肤等其他区域的感染,使用 3M 生物胶黏合小鼠皮肤。在病毒注射 5 d 后,对小鼠进行灌流取材。依次取出腰(L)1~骶(S)1 节段的 DRG,切片和图像采集,利用 Adobe Photoshop 软件进行荧光阳性细胞计数。

在体双光子成像:用 1% 戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉 Thy1-GCaMP6s 小鼠,剃去背部毛发并清洁皮肤。手术刀沿脊柱正中皮肤做约 2 cm 的纵形切口,清理脊柱两侧肌肉及椎板暴露 L4 DRG。将小鼠固定于特制的脊椎夹持器上,以减少因呼吸和心跳引起的运动伪影。利用 4-0 手术缝线牵拉皮肤和肌肉,为双光子物镜探头进入创造空间。使用纱布、棉签和温热的 0.9% 氯化钠溶液控制出血。将小鼠 L4 DRG 放置在双光子镜头下,依次在小鼠“足三里”“三阴交”单穴及双穴给予 1 mA 电针刺激,记录视野下电针刺激(1 min)下 DRG 神经元的钙信号。本研究记录了 8 只 Thy1-GCaMP6s 小鼠,每只小鼠记录 2 个视野,一共 78 个神经元。使用 ImageJ 完成初步的图像分析。计算归一化荧光强度 $\Delta F/F_0 = (F - F_0)/F_0$,其中 F 为实时瞬时荧光强度, F_0 为基线荧光强度。

标记穴位电针激活的中枢神经元:采用活动依赖神经环路标记技术^[13-14],将活动依赖表达 Cre 酶的 TRAP2 转基因小鼠与报告基因小鼠(Ai14)进行杂交获得双转基因后代。转基因动物(TRAP2;Ai14)随机分为三阴交组和足三里组,连续适应固定器 3 d 后,在第 4 天腹腔注射 4-OHT(40 mg/kg),并分别给予相应穴位电针刺激(2 Hz/100 Hz,1 mA,15 min),随后单笼饲养过夜,第 2 天再合笼饲养。一周后两组动物再给予相同参数的双穴位组合电针刺激,90 min 后将小鼠灌流取脑。脑组织切片后进行 c-Fos 染色,先在一抗(1:2 000)中 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,PBS 漂洗后,再在二抗(1:4 000)中室温孵育 2 h。利用玻片扫描仪采集图像,并对不同脑区的标记神经元进行区分和统计。

1.6 统计学方法

本研究所有的原始数据均先录入 Excel2021 中,随后使用 GraphPad Prism 9.0、SPSS Statistics 26 软件进行数据分析。在进行统计分析之前,分别使用 Shapiro-Wilk(S-W 检验)和 Levene 检验对数据

进行正态分布和方差齐性检验。数据以均数 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm s_x$)表示。当数据符合正态分布及方差齐性检验时,单时间点数据使用单因素方差分析,多时间点数据采用双因素方差分析,并进行 Bonferroni 多重比较检验;两组间比较采用独立样本 t 检验。当样本数据不满足正态分布或方差齐性检验时,对数据进行 Kruskal-Wallis 检验或 Mann-Whitney U 检验。其中统计学显著性设定为 $P \leq 0.05$ 。图像由 Olympus VS200、Adobe Photoshop 2018、ImageJ 软件及 BioRender 网站进行处理绘制。

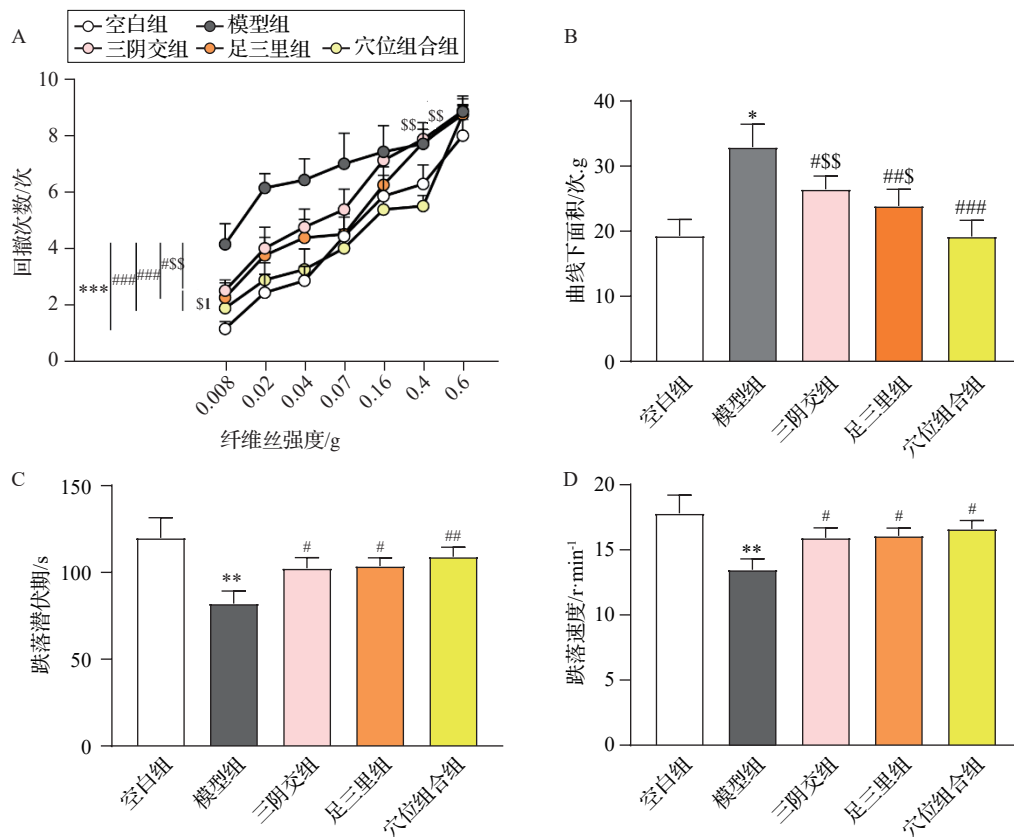
2 结果

2.1 “足三里”和“三阴交”穴位组合刺激改善 IBS 模型小鼠表型

在 IBS 模型构建完成后第 1、7、14 天,对小鼠进行行为学检测。与空白组比较,模型组小鼠腹部机械痛敏显著增加,运动能力显著减弱,且在第 7 天表型最明显($P < 0.001$, $P < 0.05$, $P < 0.01$),因此后续的电针干预均选择在第 7 天进行(附图 1)。单穴与组穴刺激均能显著改善模型小鼠的腹部机械痛敏回撤次数,其中电针“三阴交”“足三里”单穴及组穴刺激分别对 0.04 g 及以下、0.07 g 及以下、0.4 g 及以下的刺激强度引发的机械痛敏有显著干预效应,尤其在 0.4 g 刺激强度下组穴刺激对比两种单穴刺激均有显著性差异($P < 0.01$,图 1A)。进一步比较,模型组 0.008 g 至 0.4 g 区间各组腹壁回撤次数的曲线下面积显著大于空白组($P < 0.05$);与模型组相比,只有穴位组合组的曲线下面积显著减小($P < 0.05$),三阴交组和足三里组虽有下降趋势,但差异无统计学意义(图 1B)。上述结果表明,组穴刺激相比单一针刺“三阴交”和“足三里”,能够在更大的机械刺激强度区间内显著改善 IBS 模型小鼠的腹部机械痛敏。

在运动能力方面,与空白组相比,模型组小鼠的跌落潜伏期和跌落时的转棒速度均显著下降($P < 0.01$)。与模型组相比,三阴交组、足三里组、穴位组合组小鼠的跌落潜伏期和跌落时的转棒速度均显著高于模型组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。无论是单一穴位还是穴位组合刺激对 IBS 小鼠的运动能力均有显著改善作用,但单一穴位和穴位组合刺激之间差异无统计学意义(图 1C、图 1D)。

在结肠组织结构方面,空白组结肠隐窝结构正常,杯状细胞排列规则;模型组隐窝基底部出现明



注:A、B分别为各组小鼠腹部机械痛敏阳性反应回缩次数及曲线下面积;C、D分别为各组小鼠的转棒跌落潜伏期、跌落时的转棒速度。与空白组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与模型组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$,### $P<0.001$;与穴位组合组相比,\$ $P<0.05$,\$\$ $P<0.01$ 。

图1 电针对肠易激综合征模型小鼠腹部机械痛敏和运动能力的干预效应($\bar{x}\pm s_x$, 7~8只鼠/组)

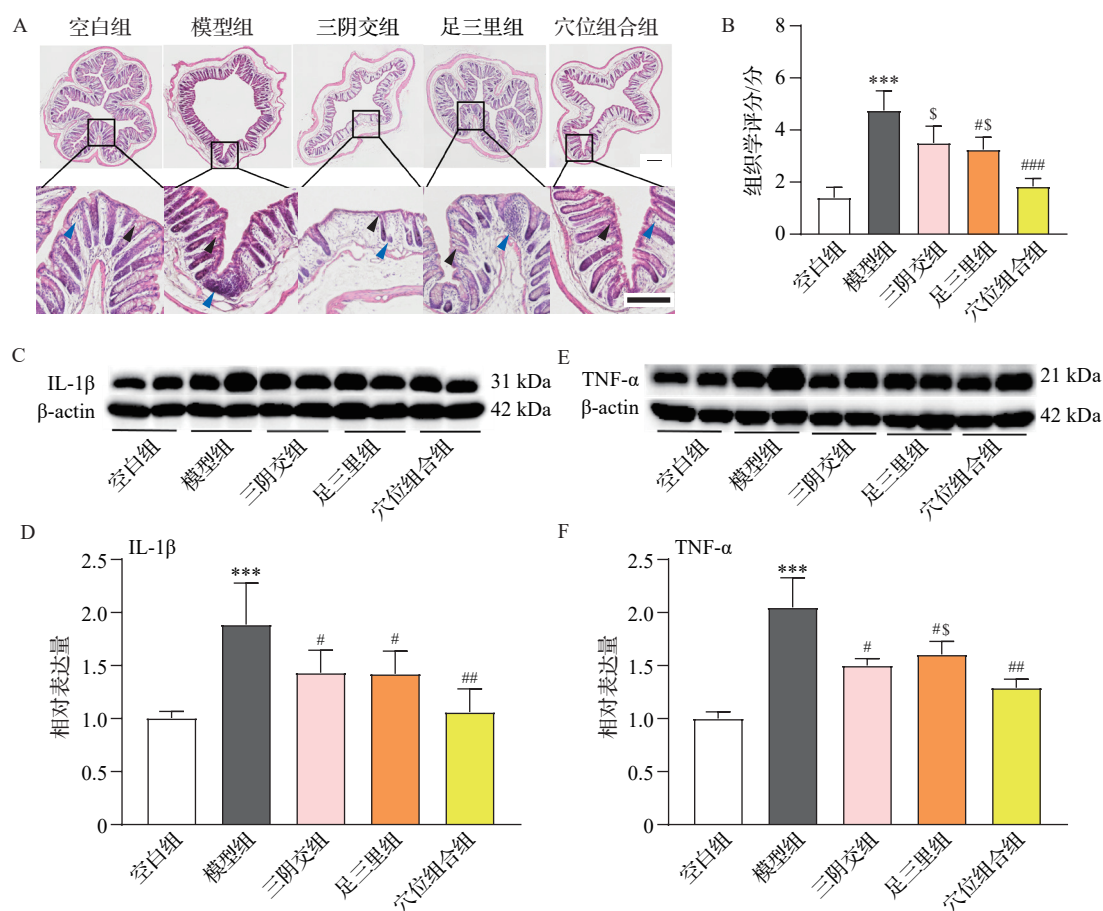
Fig. 1 Intervention effects of electroacupuncture on abdominal mechanical allodynia and motor performance in mice with irritable bowel syndrome ($\bar{x}\pm s_x$, 7~8 mice/group)

显的炎症细胞浸润,隐窝基底部增厚,杯状细胞减少;穴位组合组小鼠结肠组织隐窝结构正常,杯状细胞排列规则(图2A,如箭头所示)。对结肠结构进行组织学评分,与空白组相比,模型组结肠组织学评分显著升高($P<0.001$),表明结肠组织受损。电针干预之后,与模型组相比,足三里组($P<0.05$)和穴位组合组($P<0.001$)的结肠组织学评分均显著降低,并且穴位组合组较三阴交组($P<0.05$)和足三里组($P<0.05$)均更低,表明组穴刺激相比单穴能够更好地促进结肠组织的恢复(图2B)。

在结肠组织炎症因子表达水平方面,与空白组比较,模型组小鼠的IL-1 β 和TNF- α 的表达量均显著升高($P<0.001$);电针干预后,与模型组相比,三阴交组、足三里组和穴位组合组的IL-1 β 和TNF- α 表达水平均显著降低($P<0.05$, $P<0.01$),且组穴刺激相比“足三里”单穴能够更有效地降低TNF- α 表达水平($P<0.05$,图2C~图2F)。

2.2 针刺改善IBS模型小鼠自发行方式

传统宏观行为学检测手段难以刻画内脏痛介导的精细躯体姿态与行为时序动力学变化。本研究采用多视角无监督三维动作捕捉人工智能分析平台,连续采集各组小鼠30 min自发活动视频,完成躯体关键点三维骨架重建、行为自动分割、高维特征降维聚类,明确IBS模型小鼠固有行为特征,并对比电针“三阴交”“足三里”单穴与组穴的矫正效应(图3A)。重建各组小鼠三维骨架并叠加可视化构建骨架侧视X-Z平面投影,对比分析模型组和空白组小鼠身体动作姿态识别指标,结果显示,模型组小鼠出现特征性弓背蜷缩,躯体轴线长度范围狭窄(图3B、图3C)。模型组小鼠共有36项体态姿势、运动相关参数显著下调,2项显著上调,异常指标覆盖身体姿势角度、全身运动能量、肢体运动速度、行为片段持续时间等精细特征(图3D、附图2A)。上述结果说明IBS模型小鼠存在广泛、多维度的行为表型紊乱。



注:IL-1 β 为白细胞介素1 β ,TNF- α 为肿瘤坏死因子 α 。A为各组小鼠结肠组织的HE染色图,黑色和蓝色箭头分别指向杯状细胞和炎性细胞,标尺=200 μ m;B为各组小鼠结肠组织学评分;C~F分别为各组小鼠结肠组织中IL-1 β 、TNF- α 的Western blot条带图和定量分析。与空白组相比,*** $P<0.001$;与模型组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$,### $P<0.001$;与穴位组合组相比,S $P<0.05$ 。

图2 电针刺激对肠易激综合征模型小鼠结肠组织炎症反应的干预效应($\bar{x}\pm s_x$,4只鼠/组)

Fig. 2 Intervention effects of electroacupuncture stimulation on colonic inflammatory response in mice with irritable bowel syndrome ($\bar{x}\pm s_x$, 4 mice/group)

我们接下来以模型组为参考,定量比较“足三里”“三阴交”单穴及组穴刺激的行为矫正特征。穴位组合组可显著矫正的动作姿态指标总数为3组最高,足三里组最低,三阴交组介于二者之间(图3E)。3种干预方式均能显著矫正身体姿势角度变化量和姿态模式取向值,电针“三阴交”对于身体姿势角度的矫正能力有强于“足三里”和组穴刺激的趋势;“足三里”对于身体姿态模式的同向矫正率有高于“三阴交”和穴位组合刺激的趋势;组穴对身体姿态模式的矫正率介于“三阴交”和“足三里”之间,但对身体姿势角度的矫正能力却是3种干预方式中最差的,提示“三阴交”和“足三里”可能在矫正不同指标过程中产生协同或者拮抗作用(图3F)。

我们将小鼠的自发行为划分为3种动作:嗅探、水平运动(行走、跑动)以及站立(仅后肢着地,附图2B)。与空白组相比,模型组的嗅探时间占比没有

显著变化,水平运动时间占比显著减少($P<0.001$),站立时间占比显著增加($P<0.01$)。电针干预后,与模型组相比,不论是单穴位还是组穴刺激,都不显著改变小鼠的原地嗅探;而只有组穴刺激显著提升了水平运动时间占比($P<0.05$);在站立时间占比方面,三阴交组、足三里组和穴位组合组都体现为显著降低($P<0.01$),且3种针刺方式之间差异无统计学意义(附图2B)。

啮齿类动物存在主动探索新环境的天性^[15],尤其是在刚进入新环境后,小鼠的主动探索可能会部分掩盖IBS造模对自发行为的影响。我们进一步分析了各组小鼠在进入行为记录舱的前15 min和后15 min 3种动作的时间占比变化。对于嗅探,不论是前15 min还是后15 min,各组小鼠差异均无统计学意义;对于水平运动,与空白组比较,在前15 min和后15 min,模型组的占比都分别显著降低($P<$

0.05, $P < 0.001$), 而与模型组比较, 只有组穴刺激在后 15 min 显著提高其占比 ($P < 0.05$); 对于站立, 模型组其占比仅在后 15 min 较空白组显著提高 ($P < 0.05$), 而 3 种电针刺激也仅在后 15 min 较模型组显著降低其占比 ($P < 0.05$)。因此电针干预可以显著改善 IBS 模型小鼠的站立动作时间占比并接近空白组水平, 主要体现在进入行为记录舱的后 15 min 内 (附图 2C、附图 2D)。

以上结果提示水平运动的减少和站立的增加可能反映了 IBS 造模后引起的内脏痛状态。根据小鼠站立姿势的不同, 我们进一步将站立分解为攀爬 (上肢贴在舱壁、下肢直立) 和弓背 (背部呈弓形、上肢不贴近舱壁、仅下肢着地) 两个动作, 提取进入记录舱后 15 min 小鼠三维骨架颈、背、尾根 3 个脊柱特征点构建平均脊柱骨架, 对嗅探、攀爬、水平运动、弓背 4 种典型动作的脊柱弯曲角度进行定量解析 (图 3G)。结果显示, 弓背状态下, 与空白组相比, 模型组小鼠脊柱平均角度显著减小 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 三阴交组、足三里组、穴位组合组的脊柱平均角度均显著增加 ($P < 0.001$); 但在嗅探、水平运动、攀爬状态下, 各组间小鼠脊柱平均角度差异均无统计学意义 (图 3H)。以上结果说明电针“三阴交”“足三里”单穴及组穴干预均可有效缓解弓背状态下 IBS 模型小鼠脊柱的病理性屈曲。

绘制各组小鼠在进入记录舱后 15 min 内的行为序列图谱 (图 3I), 分析各组 4 种动作的时间占比结果显示, 各组之间的攀爬时间和嗅探时间占比差异无统计学意义。模型组的弓背时间占比显著低于空白组 ($P < 0.001$), 水平运动时间占比显著高于空白组 ($P < 0.001$); 电针干预后, 与模型组相比, 3 种电针刺激均能显著降低弓背时间占比 ($P < 0.05$); 仅穴位组合组可显著回升水平运动的时间占比 ($P < 0.05$, 图 3J)。在动作发生频次方面, 模型组水平运动发生频次较空白组显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 各干预组弓背发生频次呈下降趋势, 但未达到统计学显著性差异; 嗅探、攀爬动作发生频次各组间差异均无统计学意义 (图 3K)。进一步针对内脏痛核心表现弓背行为的平均单次持续时长开展分析, 与空白组相比, 模型组弓背动作平均持续时间显著延长 ($P < 0.001$); 与模型组相比, 只有组穴刺激可显著缩短弓背动作平均持续时间 ($P < 0.01$, 图 3L)。上述结果表明, 组穴刺激不仅能够减少弓背行为总时长, 还可缩短单次弓背动作的持续时间, 对内脏痛相关弓背表型具有更全面的改善

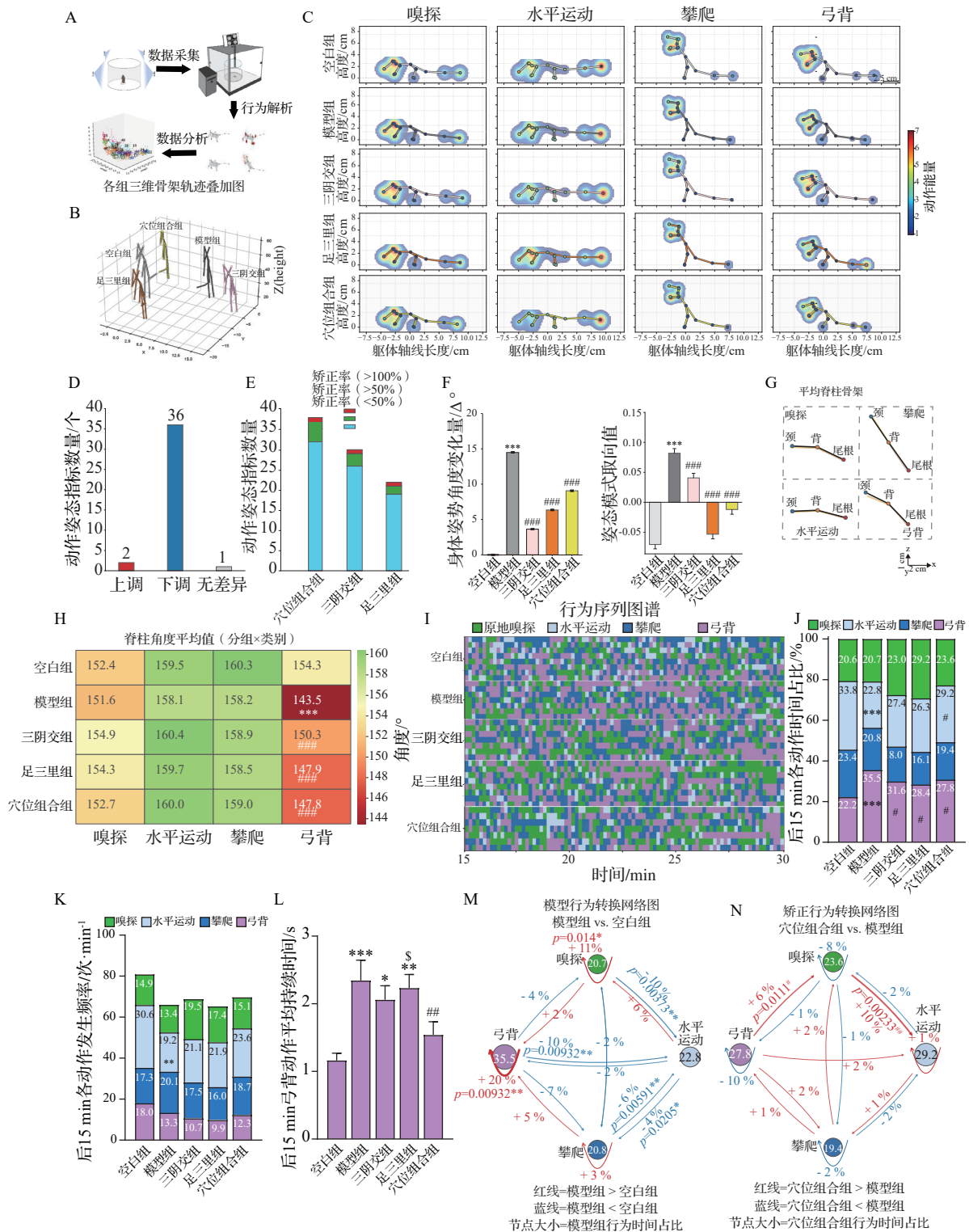
效果。

小鼠的自发行行为方式不仅包括各种不同的行为动作, 还体现在各种动作之间的转换方式上^[16]。我们构建行为状态转移网络图解析模型小鼠动作切换模式的病理性重构及不同针刺方案对动作转换的调控作用。与空白组相比, 模型组弓背动作自转换概率显著升高 20%, 同时弓背向水平运动的转换概率显著下降 10%, 而且向嗅探和攀爬动作的转换概率也降低, 提示模型小鼠更倾向于停留在弓背状态。此外, 模型组的嗅探自转换概率显著上升 11%, 嗅探向水平运动、攀爬向水平运动, 以及水平运动向攀爬的转换概率均显著下降 (图 3M)。上述结果提示 IBS 模型小鼠陷入弓背状态难以脱离, 与探索相关行为之间的状态切换受阻, 行为模式趋于固化。3 种干预中, 组穴刺激可产生更为广泛的行为状态转换网络矫正效应: 弓背自转换概率下降 10%, 弓背向嗅探的转换概率显著升高 6%, 有效打破弓背状态的自我维持; 同时嗅探向水平运动的转换概率显著回升 10%, 嗅探自转换概率下降 8%, 提示组穴干预不仅降低弓背的持续滞留, 还能够恢复嗅探向水平运动的正常流转 (图 3N)。而“三阴交”“足三里”单穴刺激对弓背动作自转换也有小幅度的改善作用, 但对多数动作状态转换差异未见统计学意义 (附图 2E、附图 2F)。因此, 与“三阴交”“足三里”单穴相比, 组穴刺激对弓背自维持、嗅探-水平运动均产生显著的矫正作用, 对行为状态转换网络的矫正效果更加全面。

2.3 DRG 神经元对不同电针刺激模式的响应特性

为探究初级感觉神经元对单穴和组穴电针刺激的响应特性, 我们首先分别标记支配“足三里”“三阴交”的 DRG 神经元, 进行节段分布分析 (图 4A)。结果显示, 支配“足三里”的 DRG 神经元集中在腰 (L) 1 和 L3~L4 节段, 支配“三阴交”的 DRG 神经元集中在 L1 和 L3~L5 节段 (图 4B), 共同支配“足三里”和“三阴交”的 DRG 神经元数量较少, 且主要集中在 L3~L4 节段 (图 4C、图 4D)。

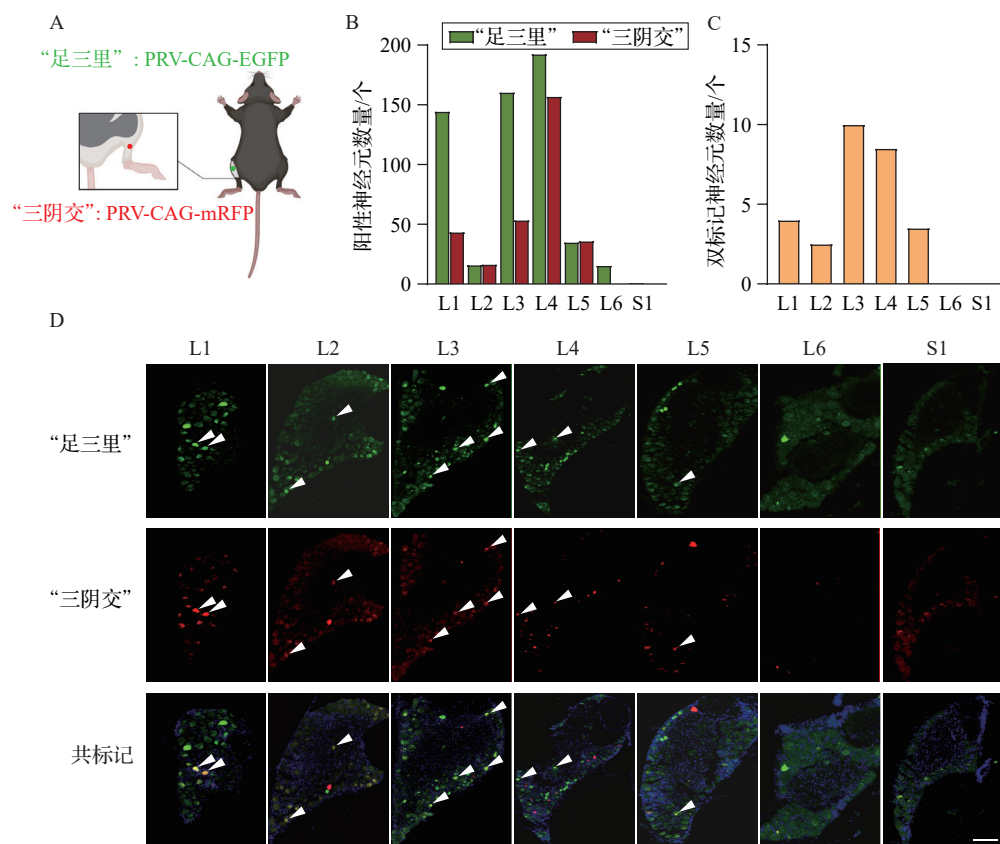
我们进一步用在体双光子钙成像技术记录 L4 DRG 神经元在“三阴交”单穴、“足三里”单穴以及组穴 (“三阴交”+“足三里”) 3 种电针刺激方式下的钙信号变化。在典型视野下, 电针刺激“三阴交”可以激活 1、2、4、5 号神经元, 刺激“足三里”可以激活 2、3、4 号神经元; 同时刺激“三阴交”和“足三里”时, 5 个神经元都有明显的钙信号发放 (图 5A、图 5B), 提示 DRG 神经元对不同刺激方式的响应具有异质



注: A为三维动作捕捉与行为定量分析技术流程图; B为各组小鼠三维躯体骨骼叠加可视化图; C为小鼠骨架侧视各节点动作能量在高度和躯体轴线长度方向的投影图; D为模型组较空白组动作姿态指标变化的数量; E为各干预组较模型组差异具有统计学意义的行为指标堆叠柱状图; F为各干预组身体姿势角度变化量和姿态模式取向值; G、H分别为小鼠4种动作的脊柱骨架构型、脊柱平均角度统计; I为后15 min 各组小鼠动作时序图谱; J、K和L分别为后15 min 4类行为时长占比、动作发生频率、弓背动作平均持续时间; M为模型组较空白组各动作转换网络; N为穴位组合组较模型组各动作转换网络。与空白组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; 与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$; 与穴位组合组相比, § $P<0.05$ 。

图3 电针刺激改善肠易激综合征模型小鼠的自发行为方式($\bar{x}\pm s$, 7~8只鼠/组)

Fig. 3 Electroacupuncture improves spontaneous behavioral patterns in mice with irritable bowel syndrome ($\bar{x}\pm s$, 7—8 mice/group)



注:L为腰段,S为骶段,DRG为背根神经节。A为“足三里”(绿色)、“三阴交”(红色)穴位逆向病毒示踪示意图;B为各节段DRG中所标记的阳性神经元计数;C为各节段DRG中“足三里”和“三阴交”共同标记的神经元计数;D为各节段逆向示踪标记的DRG神经元典型图,白色箭头所示为共同支配“足三里”和“三阴交”的神经元,标尺=200 μm 。共使用2只小鼠。

图4 标记支配“足三里”和“三阴交”的DRG神经元

Fig. 4 Labeling of DRG neurons innervating “Zusanli” (ST36) and “Sanyinjiao” (SP6)

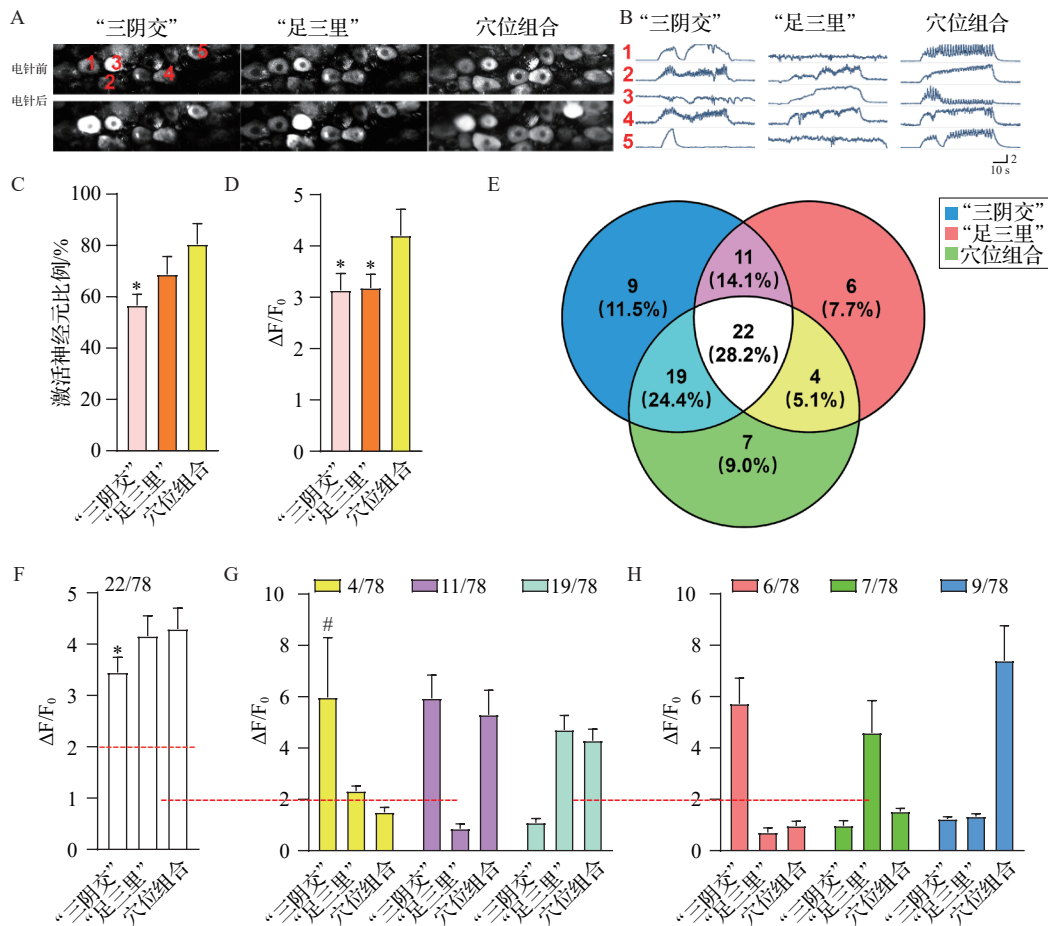
性。本研究在8只动物中用3种电针刺激方式一共记录了78个被激活的DRG神经元,结果显示响应组穴刺激的神经元比例显著高于单穴刺激“三阴交”($P < 0.05$,图5C),并且响应组穴刺激的神经元钙信号强度显著高于两种单穴刺激($P < 0.05$,图5D)。对这78个神经元在3种刺激方式下的响应特性进行深入分析,可以将它们分为3大类7小类(图5E)。第1大类,对3种刺激方式均有响应(22/78),它们在组穴刺激过程中的钙信号强度变化较单一刺激“三阴交”更显著($P < 0.05$,图5F)。第2大类,对任意两种刺激方式均有响应但不响应第3种刺激方式($\Delta F/F_0 \geq 2$ 作为本研究判定神经元是否响应的阈值),根据刺激方式排列组合可进一步分为3小类:响应单穴刺激“三阴交”和“足三里”但不响应组穴刺激(4/78),它们在“三阴交”刺激过程中的钙信号强度变化显著强于“足三里”($P < 0.05$,图5G);响应单穴刺激“三阴交”和组穴刺激但不响应“足三里”刺激(11/78),它们在单穴刺激“三阴交”或组穴刺激过程中的钙信号强度变化没有显著差异;响应

单穴刺激“足三里”和组穴刺激但不响应“三阴交”刺激(19/78),它们在单穴刺激“足三里”或组穴刺激过程中的钙信号强度变化没有显著差异。第3大类,仅响应某一种刺激方式,它们数量较少,分为3小类:只响应单穴刺激“三阴交”(6/78)、只响应单穴刺激“足三里”(7/78)和只响应组穴刺激(9/78)。上述结果提示DRG神经元对于单穴和组穴电针刺激方式的响应不是简单叠加,而具有差异化的信号整合功能。

2.4 标记响应不同穴位刺激方式的中枢神经元

利用活动依赖神经元标记技术^[13-14]用红色荧光报告基因tdTomato标记电针刺激“足三里”或“三阴交”所激活的神经元(单穴刺激响应神经元,“足三里”-TRAP及“三阴交”-TRAP),用免疫荧光染色(绿色)通过c-Fos蛋白标记组穴刺激响应神经元(“足三里”+“三阴交”),两者共标记的黄色神经元代表在组穴刺激过程中被再次激活的“足三里”或“三阴交”单穴刺激响应神经元(图6A、图6B)。

对比“足三里”-TRAP和“三阴交”-TRAP两组



注:DRG为背根神经节。A、B分别为在体双光子钙成像记录DRG神经元在“三阴交”“足三里”单穴和组穴(“足三里”+“三阴交”)刺激过程中响应状态的典型视野、钙信号强度曲线;C、D、E分别为3种刺激模式下激活的DRG神经元比例、钙信号强度、分类;F、G、H分别为各类DRG神经元在3种刺激模式下的钙信号强度。与穴位组合刺激相比,* $P<0.05$;与“足三里”刺激相比,# $P<0.05$ 。

图5 响应不同穴位电针刺激方式的DRG神经元钙信号分析($\bar{x} \pm s_x$, 8只鼠)

Fig. 5 Analysis of calcium signals in DRG neurons responding to different electroacupuncture stimulation protocols at acupoints ($\bar{x} \pm s_x$, 8 mice)

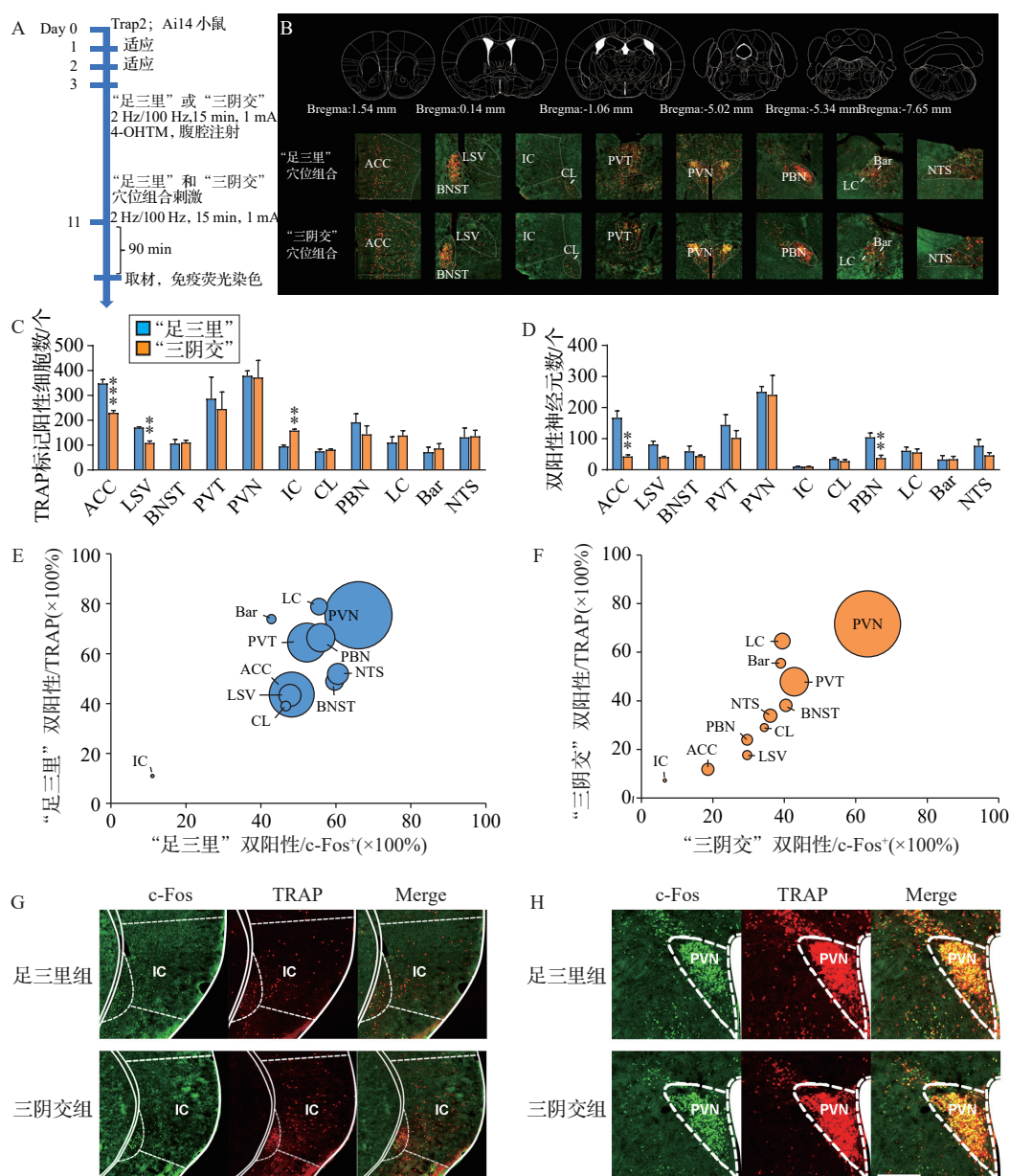
神经元数量,结果显示单穴刺激“足三里”在前扣带回(ACC)和腹外侧隔核(LSV)比刺激“三阴交”激活更多神经元($P<0.001$, $P<0.01$),而单穴刺激“三阴交”在岛叶皮层(IC)比刺激“足三里”激活更多神经元($P<0.01$,图6C);而在组穴刺激中被再次激活的“足三里”单穴刺激响应神经元数量在ACC和臂旁核(PBN)均显著高于“三阴交”单穴刺激响应神经元($P<0.01$,图6D)。

我们以共标神经元在组穴刺激响应神经元(c-Fos⁺)中的占比作为X轴,以其在各自对应的单穴刺激响应神经元中的占比作为Y轴,以共标神经元数量作为气泡面积制作二维气泡图,综合分析单穴和组穴刺激对各脑区神经元的激活规律。结果显示不论是数量还是比例,共标神经元均在下丘脑室旁核(PVN)占比最高,而在IC最低,这提示“足

三里”或“三阴交”单穴和组穴刺激在PVN激活的神经元存在大量重合,而在IC,组穴刺激很可能激活了一群在两种单穴刺激下都很难被激活的神经元(图6E、图6H)。以上结果表明,与外周初级感觉神经元类似,单穴刺激“足三里”或“三阴交”差异化地激活了不同脑区的中枢神经元,而组穴刺激所激活的中枢神经元也不是单穴的简单叠加。因此,在IBS模型中,组穴刺激在多个评价指标上优于单穴,很可能源自组穴刺激协同效应下被激活的新的神经元集群。

3 讨论

本研究通过在小鼠结肠灌注 Zymosan 构建 IBS 模型,观察到模型小鼠出现显著的腹部皮肤机械痛敏(牵涉痛)、运动能力下降、结肠组织损伤及炎症



注: ACC为前扣带回, LSV为腹侧外侧隔核, BNST为纹状体核, PVT为丘脑室旁核, PVN为下丘脑室旁核, IC为岛叶皮层, CL为屏状核, PBN为臂旁核, LC为蓝斑核, Bar为巴林顿核, NTS为孤束核, 4-OHT为4-羟基他莫昔芬。A为实验流程图; B为“足三里”“三阴交”单穴和组穴刺激激活的中枢神经元; C为“足三里”(蓝色)或“三阴交”(橙色)单穴刺激在各脑区激活的神经元数量分布; D为共标神经元数量分布; E为共标神经元在“足三里”单穴和组穴刺激响应神经元中的比例; F为共标神经元在“三阴交”单穴和组穴刺激响应神经元中的比例; G、H分别为单穴和组穴刺激激活IC、PVN神经元的典型图, 标尺=200 μ m。

与足三里组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图6 单穴和组穴刺激激活的中枢神经元分布 ($\bar{x} \pm s_x$, 3只鼠/组)

Fig. 6 Distribution of central neurons activated by single-acupoint and combined-acupoint stimulation ($\bar{x} \pm s_x$, 3 mice/group)

因子上调, 并且通过基于人工智能的3D行为分析技术, 创新性地展示了IBS模型小鼠的精细行为转化方式变化。通过系统比较电针“足三里”“三阴交”单穴及组穴刺激对IBS模型的干预效果, 结果显示组穴刺激较单穴在改善腹部机械痛敏、恢复结肠组织结构及改善自发行为方面更有优势。我们进

一步利用在体双光子钙成像技术揭示了DRG神经元在不同刺激条件下的响应异质性, 组穴刺激比单穴可以激活更多的DRG神经元, 激活的钙信号强度也高于单穴刺激; 而在中枢神经系统, 我们观察到各脑区神经元对不同的单穴和组穴刺激的响应程度存在差异, 特别是组穴刺激的协同效应可以激活

单穴刺激难以激活的IC神经元。

穴位配伍是临床针刺治疗IBS的重要方式,文献调研显示足三里是治疗IBS的常用穴位^[17],并且常与三阴交组合使用,其穴位配伍关联度达51.205%^[18]。在抗炎镇痛方面,电针刺激双侧“足三里”和“三阴交”能降低神经病理性痛小鼠脊髓背角中的环氧化酶-2(COX-2)表达,镇痛时间也长于塞来昔布^[19],并且“足三里”和“三阴交”组穴刺激较“三阴交”或“足三里”单穴刺激的镇痛时间更长^[20]。本研究中,相较“足三里”和“三阴交”单穴刺激,组穴刺激能够更加有效地缓解IBS模型小鼠的内脏痛敏行为,其有效作用区间优于单穴。此外,组穴刺激相比“足三里”单穴能够更大程度降低结肠组织中的TNF- α 表达水平,体现了组穴刺激在系统性抗炎方面的优势。

持续的内脏高敏感是IBS的主要临床特征,内脏痛定位模糊而弥散,并常伴有牵扯痛、身体机能受损和情绪障碍等症状^[21-22]。本研究结果显示IBS模型出现腹部机械痛敏、运动能力下降和自发行为方式改变,病程变化与前期报告相符^[23]。有研究将小鼠在旷场中自发的舔腹部行为(下肢着地站立,头伸向腹部)、贴地行为以及腹部收缩呈拱形姿势作为内脏痛的表征^[24],并且IBS小鼠表现出自发疼痛行为次数的增加^[25],在旷场中水平运动的减少^[26]。我们利用3D精细自发行为检测系统^[12]捕捉IBS小鼠在三维空间中的行为动作,对小鼠的自发行为进行高度精细客观评估。小鼠在内脏痛状态下会更多表现出弓背行为^[27],本研究观察到在行为测试的后15 min内,3种电针刺激方式均显著降低了IBS模型小鼠的弓背时间占比。进一步比较行为序列转换后观察到IBS模型小鼠一方面水平运动的发生减少、与内脏不适相关的弓背延长,另一方面弓背与嗅探的自转换概率增加了,整体反映出IBS诱导躯体不适所出现的行为紊乱特征。而组穴刺激不仅能够显著抑制上述动作转换模式,还能促进弓背向原地嗅探的转换,这体现了3D精细行为分析系统相比传统行为学检测手段能够更加客观精确地刻画模型动物的细微行为差异,这也为评估内脏痛动物模型以及针刺或药物的疗效提供了新的研究范式。

外周感觉信号通过DRG神经元传递到中枢神经系统^[28]。为探究穴位组合刺激优势效应的潜在神经机制,我们对支配穴位的感觉传入神经进行了示踪,结果显示“足三里”和“三阴交”受不同节段的

DRG神经元支配,共同支配两个穴位的神经元数量较少,并且集中在L3和L4节段DRG。在体双光子钙成像记录的结果表明DRG神经元对于不同电针刺激方式的响应存在高度的异质性,通过对3大类7小类DRG神经元的电针响应特性进行分析,我们推测组穴刺激可能一方面通过激活更多的DRG神经元,另一方面通过调节DRG单穴响应神经元的活性来整合编码电针刺激信号,并向中枢传递。

近年来围绕IBS等内脏痛动物模型的研究也观察到CL-ACC^[29]、PVN-LSV、PVT-IC^[30]、BNST-PVN^[31]、PBN-中央杏仁核(CeA)^[32]、ACC-基底外侧杏仁核(BLA)^[33]等多条神经通路参与改善内脏痛^[34]。其中PVN不仅是识别躯体疼痛和内脏疼痛的“分拣中心”^[35],也是穴位针刺信息整合的关键节点^[36]。针刺通过调节PVN中的特定神经元[如促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)神经元]或调节PVN相关的神经环路和激素释放(如催产素、精氨酸加压素)发挥作用^[37-38]。本研究提示PVN核团可能是介导单穴和组穴刺激效应的共同节点。PVN神经元在不同穴位刺激过程中的活动性变化也不一样^[39],说明针刺信号可能通过不同的上行通路最终汇聚于PVN进行整合,但针刺频率、强度、穴位配伍等因素如何差异化地影响PVN各神经元亚型的具体机制仍有待阐明。还有研究表明电针刺激“足三里”通过调节ACC-IC神经环路缓解IBS引起的机械痛敏^[40],此外,PVT-IC神经环路也对IBS及其引起的结肠扩张内脏痛具有调节作用^[30],提示IC也是干预IBS的重要核团。我们发现在IC中,“足三里”及“三阴交”单穴刺激响应神经元与组穴刺激响应神经元存在很少的重合,这表明组穴刺激很可能在IC激活了一个新的神经元集群,组穴刺激对IBS的干预效果优于单穴很可能部分源自这部分神经元,它们在针刺干预IBS中的功能及其上下游环路还有待深入研究。

临床针刺依据系统性和整体性原则,以维持和修复机体稳态平衡为最终治疗目的。穴位组合针刺是基于长期临床实践的经验总结,旨在利用多穴位协同作用增强疗效,但在基础研究中为了尽可能减少变量,选穴往往简化,也少有研究系统性对比单一穴位与穴位组合刺激的干预效果差异。此外,目前对于单一穴位与穴位组合针刺信号在外周及中枢神经系统的编码模式及整合规律研究还不够深入,本研究为研究穴位配伍治疗IBS的神经机制提供了新的切入点。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] Ford A C, Sperber A D, Corsetti M, et al. Irritable bowel syndrome[J]. *Lancet*, 2020, 396(10263): 1675-1688.
- [2] Talley N J. Functional gastrointestinal disorders as a public health problem [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2008, 20 (Suppl 1): 121-129.
- [3] 中华医学会消化病学分会胃肠功能性疾病协作组, 中华医学会消化病学分会胃肠动力学分组. 2020年中国肠易激综合征专家共识意见[J]. *中华消化杂志*, 2020, 40(12): 803-818. Cooperative Group of Functional Gastrointestinal Diseases, Gastroenterology Branch of Chinese Medical Association, Gastrointestinal Motility Group, Gastroenterology Branch of Chinese Medical Association. Chinese expert consensus of irritable bowel syndrome in 2020 (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Digestion*, 2020, 40(12): 803-818.
- [4] Staudacher H M, Black C J, Teasdale S B, et al. Irritable bowel syndrome and mental health comorbidity - approach to multidisciplinary management [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2023, 20(9): 582-596.
- [5] Dou Z Q, Su N, Zhou Z Y, et al. Modulation of visceral pain by brain nuclei and brain circuits and the role of acupuncture: a narrative review[J]. *Front Neurosci*, 2023, 17: 1243232.
- [6] Qi L Y, Yang J W, Yan S Y, et al. Acupuncture for the treatment of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: a pilot randomized clinical trial[J]. *JAMA Netw Open*, 2022, 5 (12): e2248817.
- [7] 温艳东, 李保双, 王彦刚, 等. 消化系统常见病肠易激综合征中医诊疗指南(基层医生版)[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(7): 3518-3523. Wen Y D, Li B S, Wang Y G, et al. Clinical practice guideline of TCM for common digestive system diseases: Irritable bowel syndrome (edition for primary physician) (in Chinese) [J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2020, 35(7): 3518-3523.
- [8] 陈碧玮, 陈少宗. 治疗肠易激综合征穴位干预常用方法及取穴组方规律研究[J]. *针灸临床杂志*, 2021, 37(8): 48-53. Chen B W, Chen S Z. Study on acupoints intervention methods and the rules of acupoints selection and prescriptions for the treatment of IBS (in Chinese) [J]. *Journal of Clinical Acupuncture and Moxibustion*, 2021, 37(8): 48-53.
- [9] Jiang Z H, Li Y H, Wang Q, et al. Combined-acupoint electroacupuncture induces better analgesia via activating the endocannabinoid system in the spinal cord [J]. *Neural Plast*, 2022, 2022: 7670629.
- [10] 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 and Moxibustion. Nomenclature and location of commonly used acupoints in experimental animals. Part 3: mice (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2021, 46(5): 445-446.
- [11] Michalski C W, Laukert T, Sauliunaite D, et al. Cannabinoids ameliorate pain and reduce disease pathology in cerulein-induced acute pancreatitis [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(5): 1968-1978.
- [12] Huang K, Han Y N, Chen K, et al. A hierarchical 3D-motion learning framework for animal spontaneous behavior mapping [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2784.
- [13] DeNardo L A, Liu C D, Allen W E, et al. Temporal evolution of cortical ensembles promoting remote memory retrieval[J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22(3): 460-469.
- [14] Guenther C J, Miyamichi K, Yang H H, et al. Permanent genetic access to transiently active neurons via TRAP: targeted recombination in active populations [J]. *Neuron*, 2013, 78(5): 773-784.
- [15] Liu J J, Ye J L, Ji C Y, et al. Mapping the behavioral signatures of Shank3b mice in both sexes [J]. *Neurosci Bull*, 2024, 40(9): 1299-1314.
- [16] Ye J L, Xu Y, Huang K, et al. Hierarchical behavioral analysis framework as a platform for standardized quantitative identification of behaviors [J]. *Cell Rep*, 2025, 44 (6) : 115803.
- [17] 陈少宗, 方剑乔, 景向红. 针灸治疗肠易激综合征取穴规律与组方规律研究[J]. *北京中医药大学学报*, 2023, 46(3): 301-305. Chen S Z, Fang J Q, Jing X H. Study on rules of acupoint selection and combine prescription for acupuncture and moxibustion treatment of irritable bowel syndrome (in Chinese) [J]. *Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine*, 2023, 46(3): 301-305.
- [18] Cheng W L, Zhang L L, Chen B W, et al. A study on the regularity of acupoint match based on association rules with SP6 as the main acupoint and its clinical application [J]. *Int J Gen Med*, 2023, 16: 5675-5693.
- [19] Lau W K, Lau Y M, Zhang H Q, et al. Electroacupuncture versus celecoxib for neuropathic pain in rat SNL model [J]. *Neuroscience*, 2010, 170(2): 655-661.
- [20] Cidral-Filho F J, da Silva M D, Moré A O, et al. Manual acupuncture inhibits mechanical hypersensitivity induced by spinal nerve ligation in rats [J]. *Neuroscience*, 2011, 193: 370-376.
- [21] Grundy L, Erickson A, Brierley S M. Visceral pain [J]. *Annu Rev Physiol*, 2019, 81: 261-284.
- [22] Markman S. Referred pain [J]. *J N J Dent Assoc*, 2014, 85 (2): 26-29.
- [23] Chun E, Yoon S, Parveen A, et al. Alleviation of irritable bowel syndrome-like symptoms and control of gut and brain responses with oral administration of Dolichos lablab L. in a mouse model [J]. *Nutrients*, 2018, 10(10): 1475.
- [24] Laird J M A, Martinez-Caro L, Garcia-Nicas E, et al. A new model of visceral pain and referred hyperalgesia in the mouse [J]. *Pain*, 2001, 92(3): 335-342.
- [25] Park B K, Chun E, Choi J J, et al. Administration of wasabia koreana ameliorates irritable bowel syndrome-like symptoms

- in a zymosan-induced mouse model[J]. *J Med Food*, 2017, 20(5): 474-484.
- [26] Zhang M M, Liu S B, Chen T, et al. Effects of NB001 and gabapentin on irritable bowel syndrome-induced behavioral anxiety and spontaneous pain[J]. *Mol Brain*, 2014, 7(1): 47
- [27] Klibaite U, Kislin M, Verpeut J L, et al. Deep phenotyping reveals movement phenotypes in mouse neurodevelopmental models[J]. *Mol Autism*, 2022, 13(1): 12.
- [28] Winston J H, Xu G Y, Sarna S K. Adrenergic stimulation mediates visceral hypersensitivity to colorectal distension following heterotypic chronic stress [J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(1): 294-304.
- [29] Xu Q Y, Zhang H L, Du H, et al. Identification of a glutamatergic claustrum-anterior cingulate cortex circuit for visceral pain processing[J]. *J Neurosci*, 2022, 42(43): 8154-8168.
- [30] Zhang F C, Wei Y X, Weng R X, et al. Paraventricular thalamus-insular cortex circuit mediates colorectal visceral pain induced by neonatal colonic inflammation in mice [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2024, 30(4): e14534.
- [31] Huang S T, Song Z J, Liu Y, et al. BNST_{AV}^{GABA}-PVN^{CRF} circuit regulates visceral hypersensitivity induced by maternal separation in vgat-cre mice[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 615202.
- [32] Palmiter R D. The parabrachial nucleus: CGRP neurons function as a general alarm [J]. *Trends Neurosci*, 2018, 41(5): 280-293.
- [33] Hasan M, Lei Z G, Akter M, et al. Chemogenetic activation of astrocytes promotes remyelination and restores cognitive deficits in visceral hypersensitive rats[J]. *iScience*, 2023, 26(1): 105840.
- [34] Huang S T, Ji N N, Wang Y, et al. Environmental enrichment reverses ELS-induced visceral pain and depression through a prefrontal-limbic circuit involving CB1Rs [J]. *Commun Biol*, 2026, 9: 871.
- [35] Li Y C, Wang Q, Li M G, et al. A paraventricular hypothalamic nucleus input to ventral of lateral septal nucleus controls chronic visceral pain [J]. *Pain*, 2023, 164(3): 625-637.
- [36] 白子优, 张超然, 饶奔清, 等. 下丘脑室旁核参与针灸治疗疾病的机制[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2025, 56(1): 26-34.
Bai Z Y, Zhang C R, Rao Y Q, et al. Mechanisms by which paraventricular hypothalamic nucleus participates in the acupuncture treatment of diseases (in Chinese)[J]. *Journal of Sichuan University (Medical Sciences)*, 2025, 56(1): 26-34.
- [37] Yang J, Liu W Y, Song C Y, et al. Through central arginine vasopressin, not oxytocin and endogenous opiate peptides, glutamate sodium induces hypothalamic paraventricular nucleus enhancing acupuncture analgesia in the rat [J]. *Neurosci Res*, 2006, 54(1): 49-56.
- [38] Zhu R X, Yu L L, Li M. Modulation of functional gastrointestinal disorders by paraventricular nucleus and the effect of acupuncture[J]. *HSET*, 2025, 144: 325-332.
- [39] 张娇娇, 王少军, 谭连红, 等. 针刺激活下丘脑室旁核促肾上腺皮质激素释放激素相关神经元特异性研究[J]. *中国中医药信息杂志*, 2013, 20(4): 34-36.
Zhang J J, Wang S J, Tan L H, et al. Study on specificity of acupoints in acupuncture activated corticotrophin releasing hormone relative neurons in paraventricular area of hypothalamus (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine*, 2013, 20(4): 34-36.
- [40] Wang D, Guo Y X, Wu Z C, et al. Electroacupuncture at ST36 alleviates visceral hypersensitivity and anxiety via ACC-AIC circuit modulation in IBS rats[J]. *NDT*, 2025, 21: 1761-1781.

收稿日期:2026-05-09 修回日期:2026-08-05