

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.003153

针药结合对抑郁症大鼠脑-肠轴功能的影响

王叶欣, 庞 芳, 唐成林

(重庆医科大学中医药学院, 重庆 400016)

【摘要】目的:观察针药结合治疗对抑郁症大鼠行为学、肠道菌群及 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、5-羟色氨酸(5-hydroxytryptophan, 5-HTP)分子表达的影响,探讨针药结合治疗抑郁症的可能机制。**方法:**将 35 只雄性 SD 大鼠随机分成空白组、模型组、电针组、氟西汀组和针药结合组,每组 7 只。经慢性不可预知温和刺激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)制备抑郁症大鼠模型。电针组和针药结合组大鼠选取“腰阳关”及双侧“天枢”“足三里”“大肠俞”穴电针干预,每次 30 min,1 次/d,连续 21 d。氟西汀组、针药结合组用 0.2% 氟西汀按 10 mg/kg 灌胃治疗,1 次/d,连续 21 d。蔗糖偏好实验(sucrose preference test, SPT)、旷场实验(open field test, OFT)和强迫游泳实验(forced swimming test, FST)分析大鼠行为学变化,16S rDNA 高通量测序法检测肠道菌群结构多样性,ELISA 法检测海马、结肠和血清中 5-HT、结肠和血清中 5-HTP 含量。**结果:**与空白组相比,模型组大鼠 SPT 糖水消耗量和 OFT 总距离减少,FST 不动时间增加,海马中 5-HT 以及结肠组织和血清中 5-HT、5-HTP 含量减少($P<0.01$),肠道有益菌群种类和相对丰度减少;与模型组相比,各干预组大鼠的 SPT 糖水消耗量增加,OFT 总距离增加,FST 不动时间减少,海马中 5-HT 及血清中 5-HT 和 5-HTP 含量增加($P<0.01$, $P<0.05$),肠道有益菌群种类和相对丰度增加;与氟西汀组比较,针药结合组 FST 不动时间减少,大鼠海马、血清组织中 5-HT 含量增加($P<0.05$),有益菌群升高趋势更明显,有害菌群降低趋势更明显。**结论:**针药结合治疗能明显改善 CUMS 大鼠抑郁样行为,其作用机制可能与提高肠道有益菌群的种类和相对丰度,上调脑-肠轴 5-HT、5-HTP 等相关分子表达有关。

【关键词】抑郁症;针药结合;肠道菌群;脑-肠轴**【中图分类号】**R245.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2021-12-21

Effect of acupuncture plus medication on the brain-gut axis function in depressed rats

Wang Yexin, Pang Fang, Tang Chenglin

(College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To observe the effects of acupuncture plus medication therapy on behavior, intestinal flora, and the expression of 5-hydroxytryptamine (5-HT) and 5-hydroxytryptophan (5-HTP) in depressed rats, and to explore the possible mechanism of acupuncture plus medication in the treatment of depression. **Methods:** Thirty-five male SD rats were randomly divided into a blank group, a model group, an electroacupuncture (EA) group, a fluoxetine group, and an acupuncture plus medication group, with 7 rats in each group. The depressed rat model was prepared by exposing to chronic unpredictable mild stress (CUMS). In the EA group and the acupuncture plus medication group, the rats were intervened by EA at “Yaoyangguan”, bilateral “Tianshu”, “Zusanli”, and “Changshu”, 30 minutes each time, once a day for 21 days. In the fluoxetine group and the acupuncture plus medication group, the rats received intragastric administration with 0.2% fluoxetine at 10 mg/kg, once a day for 21 days. The sucrose preference test (SPT), open field test (OFT), and forced swimming test (FST) were performed to analyze the behavioral changes of rats. The diversity of intestinal flora was detected by 16S rDNA high-throughput sequencing. The levels of 5-HT in hippocampus, colon, and serum, and 5-HTP in colon and serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** Compared with the blank group, in the model group, the sugar water consumption of SPT and the total distance of OPT were significantly decreased, the immobility time of FST was significantly increased, the levels of 5-HT in hippocampus, 5-HT and 5-HTP in colon tissue and serum were significantly decreased ($P<0.01$), and the species and relative abundance of intestinal beneficial flora were decreased. Compared with the model group, in

each intervention groups, the sugar water consumption of SPT and the total distance of OPT were significantly increased, the immobility time of FST was significantly decreased, the levels of 5-HT in hippocampus, 5-HT and 5-HTP in colon tissue and serum were increased ($P<0.01$, $P<0.05$), and the species and relative abundance of intestinal beneficial flora were

作者介绍: 王叶欣, Email: 735196228@qq.com,

研究方向: 针灸推拿方向。

通信作者: 唐成林, Email: cytel996@163.com。

基金项目: 重庆市渝中区基金资助项目 (编号: 20200116)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20230109.1100.006.html>

(2023-01-10)

increased. Compared with the fluoxetine group, in the acupuncture plus medication, the immobility time of FST was decreased, the levels of 5-HT in hippocampus and serum were increased ($P < 0.05$), and the increasing trend of beneficial flora and the decreasing trend of harmful flora was more obvious. **Conclusion:** Acupuncture plus fluoxetine therapy could significantly alleviate the depression-like behavior in CUMS rats. And its mechanism may be related to the increasing the species and relative abundance of intestinal beneficial flora and up-regulating the expression of brain-gut axis 5-HT, 5-HTP and other related molecules.

[Key words] depression; acupuncture plus medication; intestinal flora; brain-gut axis

抑郁症是常见的精神障碍性疾病^[1]。药物治疗是抑郁症的主要治疗方式^[2-5]。但是,现有药物存在不良反应风险高、患者耐受性差、用药依从性低等缺陷^[6]。中医电针安全性高、疗效佳,在治疗抑郁症上具有一定优势^[7]。

脑-肠轴是胃肠道与大脑之间的双向信号调节系统,通过传递神经递质或激素等发挥调节作用。通过脑-肠轴调控肠道菌群是治疗抑郁症的有效手段^[8]。研究表明,氟西汀改善抑郁状态可能与上调脑-肠轴中的关键神经递质 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、5-羟色氨酸(5-hydroxytryptophan, 5-HTP)表达水平^[9]及改善肠道菌群^[10]相关。前期研究发现,针刺可有效改善抑郁症患者抑郁行为及血清 5-HT 水平^[11],但其作用机制是否与脑-肠轴功能相关目前尚不清楚,需做进一步研究。本实验拟以慢性不可预知温和刺激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)抑郁模型 SD 大鼠为研究对象,采用电针干预“腰阳关”“天枢”“足三里”“大肠俞”穴位和氟西汀的针药联合治疗手段,通过行为学分析[(蔗糖偏好实验(sucrose preference test, SPT)、旷场实验(open field test, OFT)和强迫游泳实验(forced swimming test, FST)]、分子生物学检测(ELISA 测定海马中 5-HT、结肠及血清中 5-HT 和 5-HTP 含量)及肠道菌群检测(16S rDNA 高通量测序法),探讨针药结合方式对抑郁症大鼠的治疗机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

雄性 SD 大鼠 35 只,清洁级,7 周龄,体质量(200 ± 20) g,由重庆医科大学实验动物中心提供,动物生产许可证:SCXK(渝)2018-0003,饲养于重庆医科大学实验动物中心,环境温度 22~25℃,湿度 50%~65%,明暗 12 h 交替,自由进食和饮水。所有大鼠均适应性饲养 1 周后,按体质量分层随机分为空白组、模型组、电针组、氟西汀组和针药结合组共 5 组,每组 7 只。实验严格遵照《关于善待实验动物的指导性意见》。

1.2 主要试剂与仪器

中研太和牌针灸针(0.30 mm × 25 mm,北京中研太和医疗器械有限公司),盐酸氟西汀(批号 H20093454, 20 mg/粒,苏州俞氏药业有限公司),电针仪(Hwato SDZ-II 型,苏州医疗用品厂有限公司),离心机(TG16-WS,湖南湘仪公司),大鼠 5-HT ELISA 试剂盒(JM-01849R1,江苏晶美生物公司),大鼠 5-HTP ELISA 试剂盒(JM-01849R1,江苏晶美生物公司),微型离心机(1795 型,北京天根公司),96 well PCR 仪(9902 型,美国应用生物系统公司),24 孔离心机(5424EQ766751 型,德国艾本德公司)。

1.3 模型制备方法

参考并改进 CUMS 加单笼饲养方法制备抑郁症大鼠模型^[12]。空白组大鼠每笼 4 只,不给予任何刺激,正常饲养;其余 4 组大鼠单笼孤养,并且每天不定时随机给予以下一种温和刺激:禁食 24 h、禁水 24 h、昼夜颠倒 24 h、4℃冰水游泳 5 min、夹尾 2 min、潮湿垫料 24 h 等。连续 2 d 刺激不重复,总刺激时间 21 d。

1.4 干预方法

造模第 1 周后开始干预,每天干预时间为造模后 1 h^[13],电针组、针药结合组采用自制固定器^[14]俯卧固定,用 0.30 mm × 25 mm 针灸针针刺,电针组和针药结合组大鼠每日针刺“腰阳关”和双侧交替针刺“天枢”“足三里”和“大肠俞”(取穴标准参照华兴邦和周浩良^[15]编著的《大鼠穴位图谱的研制》),电针仪参数设置:疏密波、频率 2 Hz,强度 0.5~1.5 mA,以穴位局部皮肤肌肉出现轻微抖动为宜,持续 30 min,1 次/d,连续干预 21 d。氟西汀组和针药结合组用 0.2% 氟西汀按 10 mg/kg 灌胃(每 20 mg 氟西汀用蒸馏水配成 10 mL 溶液),1 次/d,连续干预 21 d。实验过程中空白组、氟西汀组、针药结合组各死亡 1 只,干预结束后模型组、电针组每组 7 只,空白组、氟西汀组、针药结合组每组 6 只。

1.5 观察指标与检测方法

1.5.1 行为学检测 干预 21 d 结束后,立即收集每只大鼠粪便,随后进行行为学检测。①SPT^[16]:大鼠禁食禁水 24 h 后测定:以 1 h 内糖水偏好率(蔗糖水消耗量/(蔗糖水消耗量+纯净水消耗量) × 100%)作为评价指标。实验时大鼠单独放置于饲养笼中,每个饲养笼放置 2 个水瓶(分别为 1% 的蔗糖水和纯净水)。②OFT^[17]:OFT 在独立安静的房间内进行。实验装置为 100 cm × 100 cm × 40 cm 测试箱。用动物行为学分析软件自动记录大鼠在箱内 5 min 的运动距离、运动时间和运动轨迹图(取后 3 min 结果分析)。单次实验结束后,清洁旷场箱,

并用 75% 的乙醇清除残留气味,再进行下次实验。③FST^[18]: 游泳水箱设置:20 cm × 40 cm,25℃,注入清水 30 cm。单只放入大鼠,游泳时长 6 min (取后 4 min 不动时间结果分析)。不动时间定义:不再挣扎;直立漂浮的姿势;偶尔四肢移动以使其头部保持在水面之上。

1.5.2 ELISA 法检测海马 5-HT 以及结肠和血清 5-HT、5-HTP 水平 行为学检测完成 12 h 后,2% 苯巴比妥腹腔注射麻醉大鼠,眼眶取静脉血,静脉血自然凝固 10~20 min,离心 20 min (2 500 r/min) 后留取上清液。灌注,处死大鼠,在冰上取海马,依据解剖学取结肠并刮取肠道内容物,分别放置于 2 mL EP 管中,立即放入 -80℃ 冰箱中保存备用。将冷冻的标本融化后,加入一定量的 PBS (2~8℃),迅速匀浆,离心 20 min (2 500 r/min),取上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书测定各孔吸光度值,计算 5-HT 和 5-HTP 含量。

1.5.3 16S rDNA 测序法检测肠道菌群结构多样性 干预 21 d 结束后,立即将经过紫外线杀菌的清洁用纸铺于鼠盒,让大鼠自然排便。收集 3~5 粒粪便置于无菌 EP 管中,迅速投入液氮,随后转入 -80℃ 冰箱保存。检测主要流程如下:①微生物 DNA 提取:使用 DNA 强力提取试剂盒 (the Power Soil DNA Isolation Kit, MO BIO Laboratories) 进行提取样本基因组 DNA。②扩增引物:测序区域:16S rRNA (V3+V4),使用带 Barcode 的特异引物:上游引物:5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3';下游引物:5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'。采用 Takara EX Taq 高保真酶进行 PCR 扩增。③微生物多样性建库:目标区域 PCR 纯化后 Solexa PCR。根据电泳结果用 Image J 软件定量。定量后,按照质量比 1:1 进行混样。1.8% 的琼脂糖凝胶,120 V 40 min 电泳后,切目的片段并回收。对原始数据进行拼接,将拼接得到的序列进行质量过滤 (Trimomatic, version 0.33),并去除嵌合体得到高质量的 Tags 序列,用于 OUT 分析。基于 OUT 的分析结果,α 多样性可反映微生物群落的丰度和多样性,反映肠道菌群的组成,通过 ACE、Chao1 计算菌群丰度,Shannon、Simpson 计算菌群多样性。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计软件分析。所有数据均符合正态分布,用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间比较采用单因素方差分析,方差齐时两两比较采用 LSD (L) 法,方差不齐时两两比较采用 Tamhane's T2 (M) 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组大鼠行为学比较

与空白组相比,模型组大鼠的 SPT 糖水消耗和 OFT 总距离明显减少,FST 不动时间明显增多 ($P=0.000, P=0.002, P=0.000$),提示造模成功。与模型组比较,电针组 SPT 糖水消耗和 OFT 总距离均明显增多,FST 不动时间明显减少 ($P=0.001, P=0.026, P=0.000$);针药结合组 SPT 糖水消耗和 OFT 总距离均明显增多,FST 不动时间明显减少 ($P=0.000, P=0.004, P=0.000$);氟西汀组 SPT 糖水消耗明显增多,FST 不动时间明显减少 ($P=0.000, P=0.000$)。与氟西汀组比较,针药结合组 FST 不动时间减少 ($P=0.016$)。见表 1。

2.2 各组大鼠 5-HT、5-HTP 含量比较

海马组织中,与空白组相比,模型组大鼠的海马中 5-HT 含量明显减少 ($P=0.000$)。与模型组比较,电针组、针药结合组及氟西汀组大鼠海马中 5-HT 含量明显增加 ($P=0.000, P=0.000, P=0.010$)。与氟西汀组比较,针药结合组大鼠海马中 5-HT 含量增加 ($P=0.021$)。见表 2。结肠组织中,与空白组相比,模型组大鼠结肠组织中 5-HT、5-HTP 含量明显减少 ($P=0.000, P=0.001$)。与模型组比较,电针组大鼠结肠组织中 5-HT、5-HTP 含量明显增加 ($P=0.001, P=0.000$);针药结合组大鼠结肠组织中 5-HT、5-HTP 含量明显增加 ($P=0.001, P=0.002$)。见表 2。血清中,与空白组相比,模型组大鼠血清中 5-HT、5-HTP 含量明显减少 ($P=0.003, P=0.004$)。与模型组比较,电针组大鼠血清中 5-HT、5-HTP 含量明显增加 ($P=0.002, P=0.001$);针药结合组大鼠血清中 5-HT、5-HTP 含量明显增加 ($P=0.000, P=0.001$);氟西汀组大鼠血清中 5-HT、5-HTP 含量明显增加 ($P=0.029, P=0.037$)。与氟西汀组比较,针药结合组大鼠血清组织中 5-HT 含量增加 ($P=0.025$)。见表 2。

2.3 各组大鼠肠道菌群结构多样性比较

与空白组比较,模型组大鼠肠道菌群 ACE、Chao1、Shannon 指数明显下降 ($P=0.000, P=0.000, P=0.003$);与模型组相比,电针组 ACE、Chao1、Shannon 指数升高 ($P=0.003, P=0.004, P=0.002$);氟西汀组 ACE、Chao1、Shannon 指数升高 ($P=0.015, P=0.007, P=0.010$);针药结合组 ACE、Chao1、Shannon 指数升高 ($P=0.000, P=0.000, P=0.002$)。见表 3。

表 1 各组大鼠干预 21 d 结束后行为学比较结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	SPT 中糖水偏好率/%	OFT 中运动总距离/cm	FST 中不动时间/s
空白组 (n=6)	71.349 ± 9.933	81.688 ± 11.653	119.522 ± 29.755
模型组 (n=7)	42.002 ± 6.406 ^a	40.457 ± 27.586 ^a	236.231 ± 5.719 ^a
电针组 (n=7)	61.906 ± 8.474 ^b	68.310 ± 21.475 ^c	137.867 ± 12.256 ^b
氟西汀组 (n=6)	66.780 ± 11.438 ^b	54.282 ± 29.529	159.795 ± 47.031 ^b
针药结合组 (n=6)	70.330 ± 13.305 ^b	79.252 ± 12.735 ^b	113.532 ± 43.716 ^{bd}
F 值	9.656	4.019	17.107
P 值	0.000	0.011	0.000

注:a,与空白组比较, $P<0.01$;b,与模型组相比, $P<0.01$;c,与模型组相比, $P<0.05$;d,与氟西汀组相比, $P<0.05$ 。 $F_{\text{海马}5\text{-HT}}=9.337, P_{\text{海马}5\text{-HT}}=0.000; F_{\text{结肠}5\text{-HT}}=6.015, P_{\text{结肠}5\text{-HT}}=0.001; F_{\text{血清}5\text{-HT}}=6.369, P_{\text{血清}5\text{-HT}}=0.001; F_{\text{结肠}5\text{-HTP}}=6.143, P_{\text{结肠}5\text{-HTP}}=0.001; F_{\text{血清}5\text{-HTP}}=4.591, P_{\text{血清}5\text{-HTP}}=0.006$

表 2 各组 CUMS 抑郁大鼠干预后 5-HT、5-HTP 含量的影响 (pg/mL; $\bar{x} \pm s$)

组别	5-HT含量			5-HTP含量	
	海马	结肠	血清	结肠	血清
空白组(n=6)	0.288 ± 0.032	0.288 ± 0.026	0.368 ± 0.033	0.230 ± 0.026	0.320 ± 0.024
模型组(n=7)	0.217 ± 0.031 ^a	0.219 ± 0.028 ^a	0.304 ± 0.029 ^a	0.164 ± 0.031 ^a	0.257 ± 0.036 ^a
电针组(n=7)	0.286 ± 0.035 ^b	0.279 ± 0.030 ^b	0.367 ± 0.043 ^b	0.236 ± 0.046 ^b	0.325 ± 0.042 ^b
氟西汀组(n=6)	0.260 ± 0.035 ^b	0.248 ± 0.037	0.348 ± 0.040 ^c	0.194 ± 0.026	0.301 ± 0.042 ^c
针药结合组(n=6)	0.300 ± 0.037 ^{bd}	0.284 ± 0.033 ^b	0.395 ± 0.020 ^{bd}	0.227 ± 0.021 ^b	0.329 ± 0.032 ^b
F 值	9.337	6.015	6.369	6.143	4.591
P 值	0.000	0.001	0.001	0.001	0.006

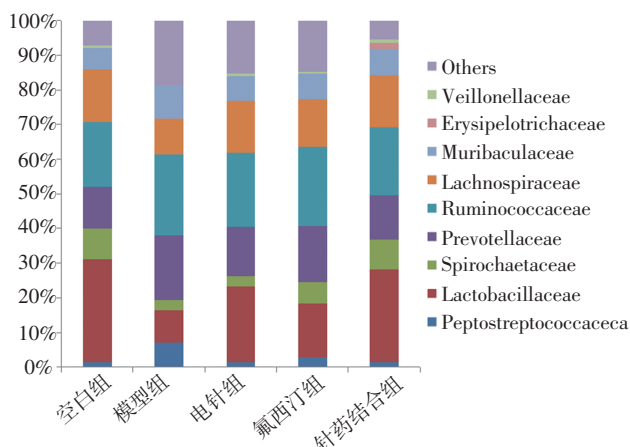
注: a, 与空白组比较, $P < 0.01$; b, 与模型组相比, $P < 0.01$; c, 与模型组相比, $P < 0.05$; d, 与氟西汀组相比, $P < 0.05$ 。 $F_{\text{海马 5-HT}}=9.337$, $P_{\text{海马 5-HT}}=0.000$; $F_{\text{结肠 5-HT}}=6.015$, $P_{\text{结肠 5-HT}}=0.001$; $F_{\text{血清 5-HT}}=6.369$, $P_{\text{血清 5-HT}}=0.001$; $F_{\text{结肠 5-HTP}}=6.143$, $P_{\text{结肠 5-HTP}}=0.001$; $F_{\text{血清 5-HTP}}=4.591$, $P_{\text{血清 5-HTP}}=0.006$

表 3 各组大鼠肠道菌群 α 多样性指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	ACE	Chao1	Shannon	Simpson
空白组(n=6)	570.460 ± 22.067	580.567 ± 16.688	4.437 ± 0.404	0.960 ± 0.023
模型组(n=7)	500.625 ± 32.444 ^a	503.560 ± 31.791 ^a	3.569 ± 0.669 ^a	0.913 ± 0.063
电针组(n=7)	547.567 ± 27.384 ^b	549.720 ± 28.024 ^b	4.430 ± 0.480 ^b	0.956 ± 0.048
氟西汀组(n=6)	539.803 ± 21.230 ^c	547.538 ± 31.826 ^b	4.293 ± 0.408 ^c	0.930 ± 0.050
针药结合组(n=6)	566.377 ± 28.978 ^b	577.238 ± 24.066 ^b	4.478 ± 0.243 ^b	0.960 ± 0.014
F 值	7.046	7.046	4.483	1.522
P 值	0.001	0.001	0.007	0.224

注: a, 与空白组比较, $P < 0.01$; b, 与模型组相比, $P < 0.01$; c, 与模型组相比, $P < 0.05$ 。 $F_{\text{ACE}}=7.046$, $P_{\text{ACE}}=0.001$; $F_{\text{Chao1}}=7.046$, $P_{\text{Chao1}}=0.001$; $F_{\text{Shannon}}=4.483$, $P_{\text{Shannon}}=0.007$; $F_{\text{Simpson}}=1.522$, $P_{\text{Simpson}}=0.224$ 。 Simpson 指数指数越大, 群落丰富度和多样性越高

与空白组相比, 模型组大鼠消化链球菌科(Streptococcaceae)、普雷沃菌科(Prevotellaceae)、瘤胃球菌科(Ruminococcaceae)、Muribaculaceae 等菌群比例有升高趋势; 乳酸杆菌科(Lactobacillaceae)、螺旋杆菌科(Spirochaetaceae)、毛螺旋菌科(Lachnospiraceae)、韦荣球菌科(Veillonellaceae)等菌群比例降低。与模型组相比, 电针组、针药结合组和氟西汀组大鼠消化链球菌科、普雷沃菌科、瘤胃球菌科、Muribaculaceae 比例有降低趋势, 针药结合组降低趋势比氟西汀组更明显; 乳酸杆菌科、螺旋杆菌科、毛螺旋菌科、韦荣球菌科比例有升高趋势, 针药结合组升高趋势比氟西汀组更明显。见图 1。



注: 空白组、氟西汀组、针药结合组 $n=6$; 模型组、电针组 $n=7$

图 1 各组大鼠肠道菌群水平丰度分析比较

3 讨论

抑郁症属于传统医学“郁病”的范畴。郁病是由于情志不舒、气机郁滞所致, 以心情抑郁、情绪不宁、胸部满闷、斜肋胀痛, 或易怒喜哭, 或咽中如有异物梗塞等症为主要临床表现的一类病证。病因为七情所伤、思虑劳倦、脏气素虚、体制偏颇等。病机为气机失常、脏腑阴阳气血失调。治疗基本原则为理气开郁、调畅气机。中医脏腑理论认为, 脾虚是抑郁症的关键病机^[19-21]。脾是后天之本, 气血生化之源, 使清阳之气上走空窍, 入脑。脑与肠关联的功能基础是气机的升降出入; 途径则通过经络^[22]。足阳明胃经、手阳明大肠经和手太阳小肠经皆有走行经过头部。前期实验多采用“百会”“印堂”等调神穴位^[7,23]。本实验从调脾胃的角度, 选用足三里穴(胃的下合穴、胃经合穴)、天枢穴(大肠经的募穴)、大肠俞穴(大肠的下合穴)、腰阳关穴观察针刺对抑郁症的作用。

药物治疗抑郁症是目前最常用的治疗方法。氟西汀是指南推荐的一线用药, 但长期服用会产生口干、便秘等一系列副作用^[24]。电针治疗抑郁症的疗效

与氟西汀、阿米替林基本相同^[25],且可以改善氟西汀的副作用^[26]和延迟效应^[27]。Meta 分析结果显示,与单纯药物治疗相比,针药结合能更明显地提高治疗有效率,改善汉密尔顿抑郁评定量表评定的抑郁相应症状^[28]。抑郁症机制复杂,脑-肠轴功能正常是调控抑郁状态的重要机制之一^[29]。尽管诸多研究证明,针药结合治疗能明显改善患者临床症状,但机制尚不明确,较少涉及脑-肠轴机制。本研究通过观察针药结合干预 21 d 后 CUMS 大鼠行为学、肠道菌群及 5-HT、5-HTP 分子表达的变化,发现针药结合治疗能明显改善 CUMS 大鼠抑郁样行为,提高肠道有益菌群的种类和相对丰度,上调脑-肠轴的 5-HT、5-HTP 等相关分子表达,其抑郁症改善作用可能与改善脑-肠轴功能相关。

CUMS 动物模型表现出快感缺乏、活动能力和探索能力降低、绝望状态等行为学改变,分别可用 SPT、OFT、FST 来评价^[30]。多项动物试验表明,电针、氟西汀、针药结合治疗均可明显改善抑郁模型大鼠的 SPT、OFT、FST 结果,并且针药结合优于单独使用电针或氟西汀治疗^[23,31]。本实验结果表明,与空白组相比,模型组大鼠的 SPT 糖水消耗量、OFT 总距离明显减少,FST 不动时间明显增加;与模型组相比,治疗组(电针组、氟西汀组、针药结合组)SPT 糖水消耗和 OFT 总距离明显增多,FST 不动时间明显减少。治疗组中,针药结合组 FST 改善优于氟西汀组,提示针药结合治疗在行为学改善上优于氟西汀单药治疗。

抑郁症的单胺类神经递质病理假说认为机体内单胺类神经递质(如 5-HT、5-HTP)含量减少是抑郁症的发病机制之一^[32]。5-HTP 是合成 5-HT 的前体物质,其合成增加有利于提高 5-HT 浓度^[33]。氟西汀是选择性 5-HT 再摄取抑制剂,通过抑制神经突触细胞对 5-HT 的再吸收从而提高 5-HT 水平。研究表明,电针能上调抑郁模型大鼠血清、海马 5-HT 水平^[34-35];并促使异常表达的结肠 5-HT 恢复正常^[36]。本实验中,与空白组相比,模型组大鼠海马中 5-HT、结肠组织和血清中 5-HT、5-HTP 含量明显减少。与模型组相比,电针组、针药结合组的 5-HT、5-HTP 均上调,氟西汀组海马 5-HT、血清中 5-HT、5-HTP 含量上调。与氟西汀组比较,针药结合组大鼠海马、血清组织中 5-HT 含量增加。上述结果提示,针药结合的干预方式在改善 5-HT、5-HTP 等单胺类神经递

质表达的作用上优于氟西汀单药治疗。

脑-肠轴是双向(大脑和胃肠道)信号调节系统,由中枢神经、周围神经、肠神经、内分泌及其交叉系统和肠道菌群组成^[37]。双重分布在大脑和胃肠道的脑肠肽(如 5-HT)在脑-肠轴的双向调节中发挥主要作用^[38]。肠道菌群可以通过直接或间接调节 5-HT 等物质调控大脑功能^[39]。研究证明,针刺干预能调控多种肠道菌群^[40-41]。肠道菌群能通过直接或间接作用影响体内 5-HT 分子水平,如产芽孢菌形成的代谢物可以刺激肠嗜铬细胞产生 5-HT^[42],口咽婴儿双歧杆菌可以增加大鼠血浆中色氨酸(5-HT 前体)水平^[43],念珠菌、链球菌、大肠杆菌和肠球菌能够产生 5-HT^[44]等。本实验中,与空白组相比,模型组 α 多样性指数降低;在肠道菌群科水平上,有益菌群(Lactobacillaceae、Spirochaetaceae、Lachnospiraceae、Veillonellaceae)比例有降低趋势,有害菌群(Peptostreptococcaceae、Prevotellaceae、Muribaculaceae、Ruminococcaceae)比例有升高趋势。与模型组相比,电针组、氟西汀组、针药结合组 α 多样性指数升高;在肠道菌群科水平上,有益菌群(Lactobacillaceae、Spirochaetaceae、Lachnospiraceae、Veillonellaceae)比例有升高趋势,有害菌群(Peptostreptococcaceae、Prevotellaceae、Muribaculaceae、Ruminococcaceae)比例有降低趋势,与既往研究结果类似^[45]。 α 多样性指数降低,微生物群落丰度下降,多样性减少,易导致肠道菌群微生态紊乱(有益菌群比例降低、有害菌群比例升高),继而导致色氨酸的代谢异常,影响 5-HT 的生成。

综上所述,针药结合治疗可能通过上调脑-肠轴的 5-HT、5-HTP 等相关分子的表达,提高肠道有益菌群的种类和相对丰度,改善脑-肠轴功能,进而改善 CUMS 大鼠抑郁样行为。后续将进一步观察针药联合对脑-肠轴相关通路其他分子表达的影响,探讨治疗抑郁症更深层的作用机制。

参 考 文 献

- [1] Malhi GS, Mann JJ. Depression [J]. Lancet, 2018, 392 (10161): 2299-2312.
- [2] 陶伟伟,董宇,刘立,等. 基于“脑-肠”轴的肠道菌群影响抑郁研究进展[J]. 南京中医药大学学报, 2019, 35(2): 234-240.
- Tao WW, Dong Y, Liu L, et al. Research progress on the effect of intestinal flora on depression based on “brain-gut” axis [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2019, 35(2): 234-240.

- [3] 漆靖,蔡溢,肖剑英,等. 抑郁症患者肠道菌群研究[J]. 中国微生态学杂志,2018,30(9):1057-1060.
- [4] Qi J,Cai Y,Xiao JY,et al. Intestinal microbial community in patients with depression[J]. Chin J Microecol,2018,30(9):1057-1060.
- [5] Healy D. Serotonin and depression[J]. BMJ,2015,350(apr21 7):h1771.
- [6] Kim DY,Camilleri M. Serotonin;a mediator of the brain-gut connection[J]. Am J Gastroenterol,2000,95(10):2698-2709.
- [7] 吴宁,卢关伊,杨磊,等. 阿片受体作用系统与抑郁症发病及干预研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2020,34(9):641-655.
- [8] Wu N,Lu GY,Yang L,et al. Progresses in relationship between opioid receptor system and depression and intervention strategies[J]. Chin J Pharmacol Toxicol,2020,34(9):641-655.
- [9] 张海华,许能贵,李知行,等. 针刺配合五行音乐治疗女性抑郁症的临床观察[J]. 中国针灸,2018,38(12):1293-1297.
- [10] Zhang HH,Xu NG,Li ZX,et al. Effects on female depression treated with the combined therapy of acupuncture and the five-element music therapy[J]. Chin Acupunct Moxibustion,2018,38(12):1293-1297.
- [11] Higgins GA,Hong S,Wiley JW. The role of epigenomic regulatory pathways in the gut-brain axis and visceral hyperalgesia[J]. Cell Mol Neurobiol,2022,42(2):361-376.
- [12] Wang GL,He ZM,Zhu HY,et al. Involvement of serotonergic, noradrenergic and dopaminergic systems in the antidepressant-like effect of ginsenoside Rb1,a major active ingredient of Panax ginseng C. A. Meyer[J]. J Ethnopharmacol,2017,204:118-124.
- [13] Sun LJ,Zhang HH,Cao Y,et al. Fluoxetine ameliorates dysbiosis in a depression model induced by chronic unpredicted mild stress in mice[J]. Int J Med Sci,2019,16(9):1260-1270.
- [14] 蔡慧倩,栗胜勇,代琪,等. 针刺结合麦粒灸治疗大学生抑郁症的临床观察及对血清 5-羟色胺的影响[J]. 针刺研究,2021,46(4):330-334.
- [15] Cai HQ,Su SY,Dai Q,et al. Clinical observation of acupuncture combined with moxibustion on college students with depression[J]. Acupunct Res,2021,46(4):330-334.
- [16] 黄艳妮,何小华,郑晓霞,等. 慢性不可预计温和刺激抑郁模型的研究进展[J]. 医学综述,2020,26(1):54-58.
- [17] Huang YN,He XH,Zheng XX,et al. Research progress in chronic unpredictable mild stress depression model[J]. Med Recapit,2020,26(1):54-58.
- [18] 张景正,陈娟,鲍真真,等. 氧化苦参碱对 CUMS 抑郁模型小鼠抑郁样行为的改善作用研究[J]. 河北医药,2020,42(7):970-974.
- [19] Zhang JZ,Chen X,Bao ZZ,et al. The improvement effects of oxymatrine on depressive-like behavior in CUMS depressive model mice[J]. Hebei Med J,2020,42(7):970-974.
- [20] 李洋洋,蔺耐荣,黄银兰,等. 新型大鼠针刺固定器的制作和使用方法[J]. 针刺研究,2016,41(5):466-468.
- [21] Li YY,Lin NR,Huang YL,et al. A newly-made rat holder for convenient acupuncture needle insertion[J]. Acupunct Res,2016,41(5):466-468.
- [22] 华兴邦,周浩良. 大鼠穴位图谱的研制[J]. 实验动物与动物实验,1991(1):1-5.
- [23] Hua XB,Zhou HL. Development of acupoint atlas of rats[J]. Exp Animal Animal Exp,1991(1):1-5.
- [24] 龚锡平. 逍遥散对 CUMS 模型大鼠胃肠功能的影响及 5-HT 系统调控机制研究[D]. 成都:成都中医药大学,2014.
- [25] Gong XP. Study on the gastrointestinal function and 5-HT regulatory mechanisms of Xiaoyao Powder in rats of CUMS model[D]. Chengdu: Chengdu University of TCM,2014.
- [26] 林晓春,李云鹏,卞艳芳,等. 大鼠旷场实验指标检测及参考值的探讨[J]. 毒理学杂志,2010,24(3):224-225.
- [27] Lin XC,Li YP,Bian YF,et al. Detection of open-field experimental indexes in rats and discussion on reference values[J]. J Toxicol,2010,24(3):224-225.
- [28] 杨福中,施慎逊. 强迫游泳实验研究应用及进展[J]. 上海精神医学,2009,21(3):188-190.
- [29] Yang FZ,Shi SX. Application and progress of forced swimming experiment research[J]. Shanghai Arch Psychiatry,2009,21(3):188-190.
- [30] 牛晓曼,李海昌,邵铁娟. 从肠道菌群失调探讨抑郁症从脾论治的机理[J]. 江西中医药大学学报,2016,28(1):1-3.
- [31] Niu XM,Li HC,Shao TJ. Exploration on the mechanism of treatment of depression by dealing with spleen from the point of alteration of intestinal flora[J]. J Jiangxi Univ Tradit Chin Med,2016,28(1):1-3.
- [32] 于姚,李阳,刘姝含,等. 从脾论治抑郁症的理论基础与现代研究依据[J]. 山东中医杂志,2020,39(5):445-448.
- [33] Yu Y,Li Y,Liu SH,et al. Theoretical and modern research basis for treating depression from spleen[J]. Shandong J Tradit Chin Med,2020,39(5):445-448.
- [34] 苏芮,郭蓉娟,韩振蕴. 从中焦论治抑郁症[J]. 中医学报,2020,35(1):43-45.
- [35] Su R,Guo RJ,Han ZY. On the treatment of depression from middle Jiao[J]. Acta Chin Med,2020,35(1):43-45.
- [36] 王威,李博,刘金玲,等. 经络与脑肠相关[C]//中国针灸学会针灸文献专业委员会 2014 年学术研讨会论文集. 厦门,2014:84-87.
- [37] Wang W,Li B,Liu JL,et al. The channels and collaterals are related to the brain and intestines[C]// Proceedings of 2014 academic Symposium of Acupuncture and moxibustion Literature Committee of Chinese Acupuncture and moxibustion Association. Xiamen,2014:81-84.
- [38] 覃双来,赵宾宾,关江锋,等. 电针联合氟西汀片对骨癌痛大鼠抑郁样行为改善作用的研究[J]. 中医药信息,2019,36(4):1-4.
- [39] Qin SL,Zhao BB,Guan JF,et al. Effect of electro-acupuncture combined with fluoxetine tablet on improving depression-like behavior in rats with bone cancer pain[J]. Inf Tradit Chin Med,2019,36(4):1-4.
- [40] 李惠春,谭庆荣,司天梅,等. 氟西汀治疗抑郁症的疗效综述[J]. 中国心理卫生杂志,2017,31(S2):7-15.
- [41] Li HC,Tan QR,Si TM,et al. A summary of the efficacy of fluoxetine in the treatment of depression[J]. Chin Ment Health J,2017,31(S2):7-15.
- [42] 罗和春,Ureil Halbrich,沈渔邨,等. 电针与氟西汀治疗抑郁症疗效的对照研究[J]. 中华精神科杂志,2003,36(4):215-219.

- Luo HC, Halbriech U, Shen YC, et al. Comparative study of electroacupuncture and fluoxetine for treatment of depression[J]. Chin J Psychiatry, 2003, 36(4): 215-219.
- [26] 刘兰英, 陆倩, 王玲玲. 电针对抑郁症患者氟西汀副作用的影响[J]. 浙江中医药大学学报, 2007, 31(4): 484-485.
- Liu LY, Lu Q, Wang LL. Combination of electroacupuncture and fluoxetine treat depression and influence side effect[J]. J Zhejiang Univ Tradit Chin Med, 2007, 31(4): 484-485.
- [27] 俞裕天, 荣培晶, 唐纯志. 针药结合改善 SSRIs 类抗抑郁药起效延迟效应的探索[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(3): 1165-1168.
- Yu YT, Rong PJ, Tang CZ. Research of acupuncture combined with western medicine in the improvement of therapeutic delay of SSRIs[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2017, 32(3): 1165-1168.
- [28] 孟英, 蒋钰, 陈昊, 等. 针药结合治疗抑郁症效应特征的 Meta 分析[J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(7): 41-51.
- Meng Y, Jiang Y, Chen H, et al. Effectiveness of combined electroacupuncture and SSRIs for depression: a systematic review and Meta-analysis[J]. Chin J Ethnomedicine Ethnopharmacy, 2020, 29(7): 41-51.
- [29] 郭椿, 贺平. 脑-肠轴及其研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(95): 89-91.
- Guo C, He P. Intestinal axis and its research progress[J]. World Latest Med Inf, 2017, 17(95): 89-91.
- [30] Wang SH, Zhang ZJ, Guo YJ, et al. Involvement of serotonin neurotransmission in hippocampal neurogenesis and behavioral responses in a rat model of post-stroke depression[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2010, 95(1): 129-137.
- [31] 孙达亮, 李雪, 刘庆贺. 电针结合氟西汀对抑郁模型大鼠行为学及 HPA 轴的影响[J]. 精神医学杂志, 2016, 29(1): 4-8.
- Sun DL, Li X, Liu QH. The influence of electroacupuncture combined with fluoxetine for behavioristics and hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats with depressive model[J]. J Psychiatry, 2016, 29(1): 4-8.
- [32] 周胖, 钱海华, 张丹, 等. 基于肠道菌群与脑-肠轴的相互作用机理探讨中医脑肠学说[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(3): 119-122.
- Zhou X, Qian HH, Zhang D, et al. Study on brain-intestinal theory of traditional Chinese medicine based on mechanism of interaction between gut microbiota and brain-gut axis[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2020, 38(3): 119-122.
- [33] 王刚, 田培郡, 赵建新, 等. 短双歧杆菌 CCFM1025 可缓解由轻度慢性不可预知压力引起的抑郁症状和相关肠道菌群失调[C]//第十五届益生菌与健康国际研讨会摘要集. 南京, 2020: 118-119.
- Wang G, Tian PJ, Zhao JX, et al. Bifidobacterium brevis CCFM1025 can relieve depressive symptoms and related intestinal flora disorders caused by mild chronic unpredictable stress[C]// Summary of the 15th International Symposium on probiotics and Health. Nanjing: 2020: 2.
- [34] 包伍叶, 宋英周, 卢峻, 等. 电针对慢性强迫游泳应激模型大鼠抑郁样行为及血清 5-HT 的影响[J]. 中医药信息, 2014, 31(2): 44-47.
- Bao WY, Song YZ, Lu J, et al. Effects of electroacupuncture on depressive-like behavior and serum 5-HT in the chronic forced swim stress model rats[J]. Inf Tradit Chin Med, 2014, 31(2): 44-47.
- [35] 樊凌, 吕爱平, 符文彬, 等. 针刺对抑郁症大鼠海马 5-HT、NE、BDNF 水平和神经元细胞凋亡相关基因表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(8): 3204-3207.
- Fan L, Lü AP, Fu WB, et al. Effects of acupuncture on the levels of 5-HT, NE, BDNF and expression of neuronal apoptosis related genes in hippocampus of the depression rats[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2016, 31(8): 3204-3207.
- [36] 杨玲, 施征, 王晓梅, 等. 电针对便秘型肠易激综合征大鼠结肠组织 5-HT、5-HT₄ 受体的调节作用[J]. 上海针灸杂志, 2014, 33(3): 266-269.
- Yang L, Shi Z, Wang XM, et al. Regulating effect of electroacupuncture on colonic 5-HT and 5-HT₄ receptors in rats with irritable bowel syndrome of constipation type[J]. Shanghai J Acupunct Moxibustion, 2014, 33(3): 266-269.
- [37] Bienenstock J, Collins S. 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: psycho-neuroimmunology and the intestinal microbiota: clinical observations and basic mechanisms[J]. Clin Exp Immunol, 2010, 160(1): 85-91.
- [38] Evrensel A, Ceylan ME. The gut-brain axis: the missing link in depression[J]. Clin Psychopharmacol Neurosci, 2015, 13(3): 239-244.
- [39] 黄艳, 高凌. 肠道微生物在脑-肠轴及相关疾病中的作用[J]. 世界华人消化杂志, 2017, 25(34): 3032-3037.
- Huang Y, Gao L. Role of intestinal microorganisms in brain-gut axis and related diseases[J]. World Chin J Dig, 2017, 25(34): 3032-3037.
- [40] 岳灵. 基于 16S rDNA 测序研究电针大肠俞募穴调整功能性腹泻大鼠肠道菌群紊乱的作用机制[D]. 成都: 成都中医药大学, 2019.
- Yue L. Study on the mechanism of electroacupuncture at back-Shu and front-mu points to adjust the intestinal flora disorder in rats with functional diarrhea based on 16S rDNA sequencing[D]. Chengdu: Chengdu University of TCM, 2019.
- [41] 侯天舒, 韩晓霞, 杨阳, 等. 电针对溃疡性结肠炎大鼠肠道微生态的保护作用[J]. 针刺研究, 2014, 39(1): 27-34.
- Hou TS, Han XX, Yang Y, et al. Effect of electroacupuncture intervention on enteric microecology in ulcerative colitis rats[J]. Acupunct Res, 2014, 39(1): 27-34.
- [42] Yano JM, Yu K, Donaldson GP, et al. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis[J]. Cell, 2015, 161(2): 264-276.
- [43] Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, et al. The probiotic Bifidobacterium infantis: an assessment of potential antidepressant properties in the rat[J]. J Psychiatr Res, 2008, 43(2): 164-174.
- [44] Lyte M. Probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds: Microbial endocrinology in the design and use of probiotics[J]. BioEssays, 2011, 33(8): 574-581.
- [45] Yang ZL, Li JJ, Gui XH, et al. Updated review of research on the gut microbiota and their relation to depression in animals and human beings[J]. Mol Psychiatry, 2020, 25(11): 2759-2772.