

DOI: 10.13703/j.0255-2930.20221125-k0002

中图分类号: R 245.9<sup>7</sup> 文献标志码: A

# 电针“四关”穴对卒中后抑郁大鼠结肠 5-羟色胺、粪便短链脂肪酸的影响\*

许 慧<sup>1</sup>, 李恋秋<sup>1</sup>, 康 贞<sup>1</sup>, 陈壮志<sup>1</sup>, 林佩怡<sup>1</sup>, 方灵蓂<sup>2</sup>, 张 鹏<sup>1</sup>, 叶海敏<sup>2</sup>✉(湖南中医药大学第二附属医院<sup>1</sup>针灸推拿康复科,<sup>2</sup>神经内科,长沙 410005)

**【摘要】** 目的: 观察电针“四关”穴对卒中后抑郁(PSD)大鼠行为学、结肠 5-羟色胺(5-HT)、粪便短链脂肪酸(SCFAs)的影响,探讨电针四关穴治疗 PSD 的作用机制。方法: 将 50 只 SD 大鼠随机分为假手术组、卒中组、PSD 组、药物组和电针组,每组 10 只。除假手术组外,其余各组采用大脑中动脉栓塞(MCAO)法制备卒中模型;除假手术组和卒中组外,其余组大鼠采用 MCAO 结合孤养和慢性不可预知性温和应激(CUMS)法制备 PSD 模型。电针组予电针“合谷”“太冲”干预,疏密波,频率 2 Hz/10 Hz,每次 30 min,每日 1 次,持续 21 d,同时予蒸馏水(0.01 L·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)灌胃;药物组予氟西汀溶液(2.33 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)灌胃,每日 1 次,持续 21 d;假手术组、卒中组、PSD 组予同等固定束缚、蒸馏水灌胃。分别于卒中造模前、PSD 造模后、干预 21 d 后观察大鼠糖水消耗量及敞箱实验水平运动得分、垂直运动得分;干预 21 d 后,采用免疫组化法检测结肠 5-HT 水平,气相色谱法测定粪便短链脂肪酸含量。结果: PSD 造模后,与卒中组比较,PSD 组、药物组、电针组大鼠糖水消耗量及敞箱实验水平运动得分、垂直运动得分均降低( $P<0.05$ )。干预 21 d 后,与 PSD 组比较,药物组、电针组糖水消耗量及敞箱实验水平运动得分、垂直运动得分均升高( $P<0.05$ );电针组水平运动得分低于药物组( $P<0.05$ )。与假手术组比较,卒中组粪便总短链脂肪酸及乙酸含量均降低( $P<0.05$ ),PSD 组结肠 5-HT 水平及粪便总短链脂肪酸、乙酸、丙酸、丁酸含量均降低( $P<0.05$ );与 PSD 组比较,药物组和电针组结肠 5-HT 水平及粪便总短链脂肪酸、乙酸、丙酸含量均升高( $P<0.05$ );电针组结肠 5-HT 水平低于药物组( $P<0.05$ )。结肠 5-HT 水平与粪便总短链脂肪酸、丙酸含量存在正相关关系( $r=0.424, P=0.005; r=0.427, P=0.004$ )。结论: 电针“四关”穴可改善 PSD 大鼠抑郁样行为,可能与调控粪便短链脂肪酸含量,从而影响结肠 5-HT 释放有关。

**【关键词】** 卒中后抑郁;电针;针刺;四关穴;5-羟色胺;短链脂肪酸

## Effects of electroacupuncture at "Siguan" points on the expression of colonic 5-hydroxytryptamine and fecal short-chain fatty acids in rats with post-stroke depression

XU Hui<sup>1</sup>, LI Lian-qiu<sup>1</sup>, KANG Zhen<sup>1</sup>, CHEN Zhuang-zhi<sup>1</sup>, LIN Pei-yi<sup>1</sup>, FANG Ling-lang<sup>2</sup>, ZHANG Peng<sup>1</sup>, YE Hai-min<sup>2</sup>✉

(1Department of Acupuncture-Moxibustion, Tuina and Rehabilitation, 2 Neurological Department, Second Affiliated Hospital of Hunan University of CM, Changsha 410005, China)

**ABSTRACT Objective** To observe the effects of electroacupuncture at "Siguan" points on behavior, colonic 5-hydroxytryptamine (5-HT) and fecal short-chain fatty acids (SCFAs) in rats with post-stroke depression (PSD), and explore the effect mechanism of electroacupuncture at "Siguan" points on PSD. **Methods** Fifty SD rats were randomly divided into a sham-operation group, a stroke group, a PSD group, a drug group and an electroacupuncture group, with 10 rats in each one. The stroke model was established by middle cerebral artery occlusion (MCAO) method in the stroke group; except for the sham-operation group, the rats in the other groups were intervened with MCAO combined with solitary and chronic unpredictable mild stress (CUMS) to establish PSD model. In the electroacupuncture group, electroacupuncture was delivered at "Hegu" (LI 4) and "Taichong" (LR 3), with disperse-dense wave, 2 Hz/10 Hz in frequency, for 30 min in each intervention, once daily, for consecutive 21 days. Simultaneously, distilled water (0.01 L·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) was administrated intragastrically. Fluoxetine solution (2.33 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) was given by gavage, once a day and for 21 days in the drug group. The same procedure of fixation and gavage with distilled water were adopted in the sham-operation group, the stroke group and the PSD

\*湖南省自然科学基金面上项目: 2021JJ30519; 湖南中医药大学校级科研基金项目: 2020XJJ056

✉通信作者: 叶海敏, 副主任医师。E-mail: 56842028@qq.com

group. Separately, before stroke modeling, after PSD modeling and after 21-day intervention, the consumption of sugar water and the scores of horizontal movement and vertical movement in open-field test were observed. After 21-day intervention, the content of colonic 5-HT was detected by immunohistochemical method, and that of fecal SCFAs was determined by gas chromatography mass spectrometry. **Results** After PSD modeling, compared with the stroke group, the sugar water consumption, the horizontal movement scores and vertical movement scores of the open-field test were all reduced in the PSD group, the drug group and the electroacupuncture group ( $P < 0.05$ ). After 21-day intervention, the sugar water consumption and the scores of horizontal movement and vertical movement of the open-field test were increased in the drug group and the electroacupuncture group ( $P < 0.05$ ) when compared with the PSD group; and the horizontal movement score in the electroacupuncture group was lower than that of the drug group ( $P < 0.05$ ). Compared with the sham-operation group, the contents of total fecal SCFAs and acetic acid were lower in the stroke group ( $P < 0.05$ ), and the contents of colonic 5-HT and total fecal SCFAs, acetic acid, propionic acid and butyric acid were reduced in the PSD group ( $P < 0.05$ ). In comparison with the PSD group, the contents of colonic 5-HT and total fecal SCFAs, acetic acid and propionic acid were increased in the drug group and the electroacupuncture group ( $P < 0.05$ ); and the content of colonic 5-HT in the electroacupuncture group was lower than that of the drug group ( $P < 0.05$ ). The level of colonic 5-HT was positively correlated with the contents of total fecal SCFAs and propionic acid ( $r=0.424$ ,  $P=0.005$ ;  $r=0.427$ ,  $P=0.004$ ). **Conclusion** Electroacupuncture at "Siguan" points can relieve the depression-like behavior of PSD rats, and its underlying mechanism may be related to the regulation of fecal SCFAs, which affects the release of colonic 5-HT.

**KEYWORDS** post-stroke depression; electroacupuncture; acupuncture; Siguan points; 5-hydroxytryptamine; short chain fatty acids

卒中后抑郁 (post-stroke depression, PSD) 是指脑卒中后表现出除卒中症状以外的闷闷不乐、兴趣及愉快感减退或丧失等一系列症状的情感障碍综合征, 其发生率为 31%<sup>[1-2]</sup>。研究<sup>[3-7]</sup>表明针刺可能通过上调 5-羟色胺 (5-HT) 等单胺类神经递质含量、调节神经营养因子表达、调控下丘脑-垂体-肾上腺 (HPA) 轴或调节促炎性细胞因子和抗炎性细胞因子含量缓解 PSD 抑郁症状、改善神经功能缺损。有研究发现微生物-肠-脑轴的失衡可以影响大脑的发育和功能<sup>[8]</sup>, 肠道菌群与卒中和抑郁症均存在相关性<sup>[9-10]</sup>。针灸可改善肠道菌群的多样性及调节代谢产物<sup>[11-13]</sup>。短链脂肪酸 (SCFAs) 以乙酸、丙酸、丁酸、戊酸为主, 是肠道菌群代谢的重要终末产物之一, 其在卒中及抑郁症患者中均会发生不同程度的改变<sup>[14-15]</sup>, 其含量改变亦会引起结肠 5-HT 水平变化<sup>[16]</sup>。故本研究观察电针“四关”穴对 PSD 模型大鼠结肠 5-HT 水平及粪便 SCFAs 含量的影响, 探讨电针四关穴治疗 PSD 的作用机制, 现报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与分组

50 只 3 月龄 SPF 级健康雄性 SD 大鼠, 体质量 240 ~ 280 g, 购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司 [生产许可证号: SCXK (湘) 2019-0004]。饲养于湖南中医药大学动物实验中心, 饲养温度 20 ~ 25 °C, 湿度 50% ~ 70%, 12 h/12 h 明暗交替, 适应

性喂养 1 周, 将大鼠随机分为假手术组、卒中组、PSD 组、药物组和电针组, 每组 10 只。本研究经湖南中医药大学动物实验伦理审查委员会批准 (批件号: LL2022022302), 实验过程中对动物的处置严格遵照中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》相关规定。

### 1.2 主要试剂和仪器

试剂: 戊巴比妥钠 (096956-001, 北京寰宇化工有限公司)、盐酸氟西汀片 (常州四药制药有限公司, 国药准字 H19980139, 10 mg)、注射用青霉素钠 (华北制药股份有限公司, 国药准字 H13020657, 80 万 U)、EDTA (pH 8.0) 抗原修复液 (B2001, 武汉安隆科讯技术有限公司)、EDTA (pH 9.0) 抗原修复液 (B2002, 武汉安隆科讯技术有限公司)、柠檬酸 (pH 6.0) 抗原修复液 (B2010, 武汉安隆科讯技术有限公司)、5-HT 抗体 (bs-1126R, 上海爱必信生物科技有限公司)、HRP 标记山羊抗兔二抗 (5220-0336, 美国 SeraCare)、戊酸 (75054, 美国 Sigma)、丁酸 (19215, 美国 Sigma)、丙酸 (94425, 美国 Sigma)、乙酸 (320099, 美国 Sigma)。

仪器: 敞箱 [100 cm × 100 cm × 50 cm, 博睿唯思 (香港) 科技有限公司]、一次性针灸针 (0.25 mm × 13 mm, 苏州医疗用品厂有限公司)、电针治疗仪 (SDZ-V 型, 苏州医疗用品厂有限公司)、气相色谱-氢火焰检测器 (GC-FID, 美国 Agilent)、Universal Hood

II 化学发光成像系统 (美国 Bio-Rad)、Transblot SD Cell 转膜仪 (美国 Bio-Rad)、正置光学显微镜 (ECLIPSE Ci, 日本尼康)。

### 1.3 模型制备

卒中组大鼠制备卒中模型; PSD 组、药物组、电针组大鼠制备 PSD 模型; 假手术组大鼠仅分离右侧颈部肌肉, 暴露动脉后不结扎, 直接缝合切口。

(1) 卒中模型: 采用改良 Koizumi J 线栓法<sup>[17]</sup>制备大脑中动脉栓塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型。室温条件下, 采用 1%戊巴比妥钠 (4 mL/kg) 腹腔注射麻醉大鼠, 仰卧位固定并颈部备皮, 常规消毒后于颈部正中稍靠右做 2~3 cm 切口, 钝性分离颈部肌肉, 暴露右侧颈总动脉 (CCA)、颈外动脉 (ECA)、颈内动脉 (ICA), 分离 ICA 和 ECA 分叉处的迷走神经。分别结扎 CCA 主干和 ECA 近心端, 在 CCA 主干远端和 ICA 根部穿线备用。使用微动脉夹暂时夹闭 ICA 远端, 在距 CCA 分叉部 3 mm 处剪一小口, 将线栓插入 ICA 并轻推, 若有明显阻力则可能插到了翼腭动脉 (PPA), 这时可缓慢地拉出线栓, 调整方向重新插入, 插入长度为 1.8~2.0 cm (从 CCA 分叉处计算), 线栓到达大脑中动脉起始段, 用手术线结扎 CCA 主干远端及 ICA 根部, 松开 ICA 的微动脉夹, 逐层缝合并消毒。腹腔注射青霉素钠 4 万 U/d 预防感染, 连用 3 d。Longa 5 得分为 2~3 分、水平木棒实验阳性为模型制备成功<sup>[18]</sup>。

(2) PSD 模型: 卒中模型制备成功大鼠采用孤养和慢性不可预知性温和应激 (CUMS) 法制备 PSD 模型。假手术组与卒中组为 3 只/笼, 其余组大鼠单笼内孤养 1 周后, 结合 CUMS 法, 每天随机使用 1 种方法对大鼠进行刺激, 分别为禁食 12 h、禁水 12 h、倾斜鼠笼 (45°) 12 h、持续光照 12 h (18:00 至次日 6:00)、湿笼 12 h、4 °C 游泳 10 min、噪声 10 min、水平振荡 5 min、行为限制 10 min、夹尾 10 min, 连续进行 18 d。糖水消耗量及敞箱实验水平运动得分、垂直运动得分低于假手术组、卒中组为模型制备成功<sup>[19]</sup>。

### 1.4 干预方法

电针组: 于 PSD 造模成功后的第 1 天开始予电针干预。取穴: “合谷”“太冲”, 穴位定位参照《实验针灸学》<sup>[20]</sup>。操作: 将大鼠仰卧位固定, 选用 0.25 mm × 13 mm 一次性针灸针, “合谷”直刺约 3 mm, “太冲”呈 45° 角向上斜刺约 3 mm。同侧穴位连接 SDZ-V 型电针治疗仪, 予疏密波, 频率 2 Hz/10 Hz, 强度

以大鼠肢体轻微颤动为度, 每次 30 min, 同时予蒸馏水 (0.01 L · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>) 灌胃, 每日 1 次, 持续 21 d。

药物组: 于 PSD 造模成功后的第 1 天开始施以电针组同等固定束缚, 同时以 2.33 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> 剂量给予浓度为 0.233 g/L 的氟西汀溶液灌胃, 每天 1 次, 持续 21 d。

假手术组、卒中组、PSD 组常规饲养, 在其他组进行干预时予以同等固定束缚、蒸馏水灌胃。

### 1.5 观察指标及检测方法

(1) 糖水消耗量: 首先训练大鼠饮用蔗糖水, 即在前 48 h 内用 10 g/L 蔗糖水取代日常饮用水, 再予以禁水禁食 20 h。然后再给予 10 g/L 蔗糖水饮用, 24 h 后称重饮水瓶, 计算出大鼠 24 h 的饮水量, 计为糖水消耗量。分别于卒中造模前、PSD 造模后、干预 21 d 后进行测量。

(2) 敞箱实验: 将大鼠单独放入敞箱中央, 观察 5 min 内大鼠的活动情况。水平运动得分, 即穿行格子数, 记录大鼠穿行方格次数, 以至少 3 只爪跨入邻格为 1 次, 计 1 分; 垂直运动得分, 即两前肢离地 1 cm 以上的次数, 1 次计 1 分。分别于卒中造模前、PSD 造模后、干预 21 d 后进行评定。

(3) 免疫组化法检测结肠 5-HT 水平: 干预 21 d 后处死大鼠, 剖腹取结肠。以盲肠为标志, 盲肠以下 3 cm 取结肠, 长约 3 cm, 用 PBS 将结肠冲洗干净。制备石蜡切片 (厚度为 3 μm), 石蜡切片脱蜡、水化。EDTA 抗原修复缓冲液进行抗原修复, 将玻片置于 PBS (pH 7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。切片放入 3%过氧化氢溶液, 室温避光孵育 25 min, 洗涤 3 次, 每次 5 min。滴加 3% BSA 室温孵育 30 min。滴加一抗 (5-HT 1:200), 放于湿盒内 4 °C 孵育过夜。洗涤 3 次, 每次 5 min。滴加二抗 (HRP 标记山羊抗兔二抗 1:200), 避光室温孵育 50 min。DAB 显色, 复染细胞核, 脱水封片, 显微镜镜检, 应用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行图像采集分析。棕黄色为阳性, 每只大鼠做 1 张切片, 每张切片随机挑选 3 个 200 倍视野进行拍照, 计算平均吸光度值 (OD 值)。

(4) 气相色谱法检测粪便 SCFAs 含量: 干预 21 d 后处死大鼠, 取新鲜粪便使用 EP 管收集, 密封, 迅速放入 -80 °C 冰箱保存。称取粪便样品 50 mg, 加入 500 μL 超纯水, 涡旋 1 min, 冰水浴超声 15 min; 4 °C、13 000 r/min 离心 (离心半径: 5 cm) 5 min, 取上清液; 1.5 mL 离心管中称取约 0.1 g 氯化钠, 加



入 200  $\mu\text{L}$  液体样本, 8  $\mu\text{L}$  内标, 涡旋 10 s, 再加入 20  $\mu\text{L}$  50% 浓硫酸, 200  $\mu\text{L}$  无水乙醚, 涡旋 1 min; 上下振摇 1 min; 4  $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 r/min 离心 (离心半径: 5 cm) 5 min, 取 80  $\mu\text{L}$  上清液上机检测。

## 1.6 统计学处理

采用 SPSS27.0 软件进行统计分析, Graphpad Prism 9.0 生成统计图。计量资料进行正态性和方差齐性检验, 符合正态分布以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 方差齐者, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法; 不符合正态分布以中位数 (上下四分位数) [ $M(P_{25}, P_{75})$ ] 表示, 采用多样本秩和检验。相关性分析符合正态分布采用 Pearson 相关系数, 不符合正态分布采用 Spearman 相关系数。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

实验过程中共有 6 只大鼠死亡, 1 只未造模成功 (电针组)。其中卒中模型制备过程中共有 3 只大鼠死亡 (卒中组 1 只, 电针组 1 只, 药物组 1 只), PSD 模型制备过程中共有 3 只死亡 (药物组 1 只, PSD 组 2 只), 最终假手术组 10 只、卒中组 9 只、PSD 组 8 只、药物组 8 只、电针组 8 只大鼠纳入观察。

### 2.1 各组大鼠糖水消耗量比较

卒中造模前, 各组大鼠糖水消耗量比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。PSD 造模后, 卒中组、PSD 组、药物组、电针组大鼠糖水消耗量较假手术组下降 ( $P < 0.05$ ); PSD 组、药物组、电针组大鼠糖水消耗量较卒中组下降 ( $P < 0.05$ )。干预 21 d 后, 与 PSD 组比较, 药物组、电针组大鼠糖水消耗量均升高 ( $P < 0.05$ ); 药物组和电针组大鼠糖水消耗量比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 1。

### 2.2 各组大鼠敞箱实验比较

卒中造模前, 各组大鼠水平运动得分比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。PSD 造模后, 与假手术组比较, 卒中组、PSD 组、药物组、电针组大鼠水平运动得分均下降 ( $P < 0.05$ ); 与卒中组比较, PSD 组、药物组、电针组大鼠水平运动得分下降 ( $P < 0.05$ )。干预 21 d 后, 与 PSD 组比较, 药物组、电针组大鼠水平运动得分均升高 ( $P < 0.05$ ); 电针组水平运动得分低于药物组 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

卒中造模前, 各组大鼠垂直运动得分比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。PSD 造模后, 与假手术组比

较, 卒中组、PSD 组、药物组、电针组大鼠垂直运动得分均下降 ( $P < 0.05$ ); 与卒中组比较, PSD 组、药物组、电针组大鼠垂直运动得分下降 ( $P < 0.05$ ), 结合糖水消耗量和水平运动得分, 提示造模成功。干预 21 d 后, 与 PSD 组比较, 电针组、药物组大鼠垂直运动得分均升高 ( $P < 0.05$ ); 药物组和电针组大鼠垂直运动得分比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 3。

表 1 各组大鼠造模前后各时间点糖水消耗量比较 ( $\text{mL}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数/只	卒中造模前	PSD 造模后	干预 21 d 后
假手术组	10	96.90 $\pm$ 15.04	107.60 $\pm$ 11.69	119.00 $\pm$ 13.82
卒中组	9	103.22 $\pm$ 11.18	80.11 $\pm$ 5.51 <sup>1)</sup>	67.67 $\pm$ 5.34
PSD 组	8	97.75 $\pm$ 19.17	47.75 $\pm$ 14.22 <sup>1)2)</sup>	37.38 $\pm$ 7.58
药物组	8	102.38 $\pm$ 20.90	46.38 $\pm$ 7.85 <sup>1)2)</sup>	87.13 $\pm$ 6.71 <sup>3)</sup>
电针组	8	105.75 $\pm$ 16.30	45.50 $\pm$ 12.33 <sup>1)2)</sup>	75.63 $\pm$ 12.18 <sup>3)</sup>

注: 与假手术组同时时间点比较, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与卒中组同时时间点比较, <sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ; 与 PSD 组同时时间点比较, <sup>3)</sup>  $P < 0.05$ 。

表 2 各组大鼠造模前后各时间点敞箱实验水平运动得分比较 (分,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数/只	卒中造模前	PSD 造模后	干预 21 d 后
假手术组	10	87.70 $\pm$ 29.78	87.10 $\pm$ 18.07	108.60 $\pm$ 18.42
卒中组	9	107.44 $\pm$ 23.64	55.22 $\pm$ 10.71 <sup>1)</sup>	41.33 $\pm$ 11.62
PSD 组	8	86.25 $\pm$ 21.00	25.13 $\pm$ 21.28 <sup>1)2)</sup>	9.00 $\pm$ 6.72
药物组	8	85.75 $\pm$ 26.98	27.13 $\pm$ 18.66 <sup>1)2)</sup>	82.50 $\pm$ 21.57 <sup>3)</sup>
电针组	8	98.25 $\pm$ 34.88	27.75 $\pm$ 21.84 <sup>1)2)</sup>	65.63 $\pm$ 12.13 <sup>3)4)</sup>

注: 与假手术组同时时间点比较, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与卒中组同时时间点比较, <sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ; 与 PSD 组同时时间点比较, <sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ; 与药物组同时时间点比较, <sup>4)</sup>  $P < 0.05$ 。

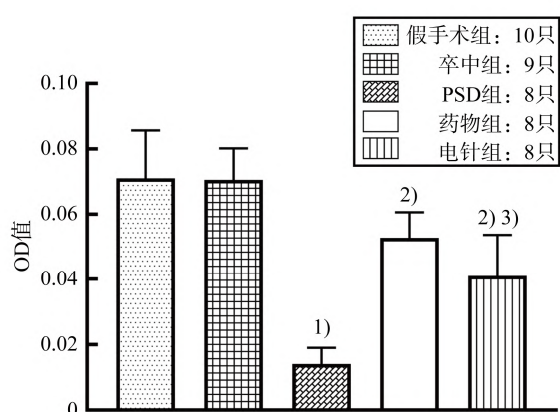
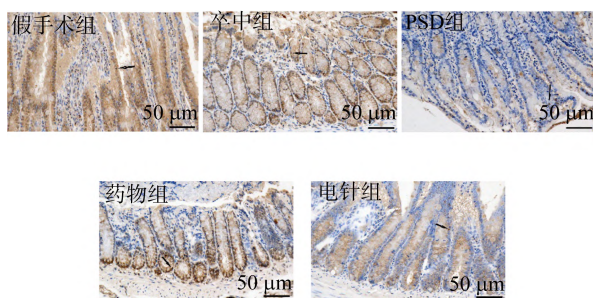
表 3 各组大鼠造模前后各时间点敞箱实验垂直运动得分比较 (分,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数/只	卒中造模前	PSD 造模后	干预 21 d 后
假手术组	10	10.40 $\pm$ 4.40	8.60 $\pm$ 3.20	12.70 $\pm$ 3.06
卒中组	9	10.56 $\pm$ 2.65	6.22 $\pm$ 2.17 <sup>1)</sup>	4.00 $\pm$ 2.00
PSD 组	8	9.88 $\pm$ 2.90	3.13 $\pm$ 1.89 <sup>1)2)</sup>	1.50 $\pm$ 1.31
药物组	8	9.88 $\pm$ 5.08	3.00 $\pm$ 2.45 <sup>1)2)</sup>	7.88 $\pm$ 1.73 <sup>3)</sup>
电针组	8	12.00 $\pm$ 4.24	2.88 $\pm$ 1.81 <sup>1)2)</sup>	7.75 $\pm$ 1.67 <sup>3)</sup>

注: 与假手术组同时时间点比较, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与卒中组同时时间点比较, <sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ; 与 PSD 组同时时间点比较, <sup>3)</sup>  $P < 0.05$ 。

### 2.3 各组大鼠结肠 5-HT 水平比较

与假手术组比较, 卒中组大鼠结肠 5-HT 水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), PSD 组大鼠结肠 5-HT 水平降低 ( $P < 0.05$ ); 与 PSD 组比较, 药物组和电针组大鼠结肠 5-HT 水平均升高 ( $P < 0.05$ ); 电针组大鼠结肠 5-HT 水平低于药物组 ( $P < 0.05$ )。见图 1。



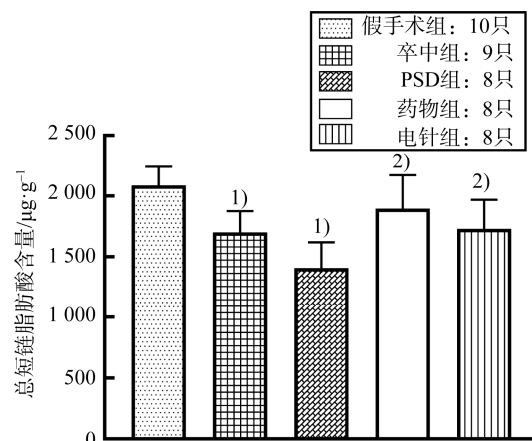
注: 免疫组化法, 箭头示阳性表达。与假手术组比较, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与 PSD 组比较, <sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ; 与药物组比较, <sup>3)</sup>  $P < 0.05$ 。

图 1 各组大鼠结肠 5-HT 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

### 2.4 各组大鼠粪便 SCFAs 含量比较

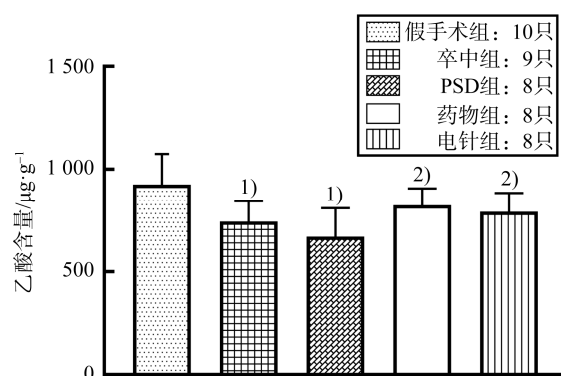
(1) 总短链脂肪酸含量: 与假手术组比较, 卒中组和 PSD 组大鼠总短链脂肪酸含量均降低 ( $P < 0.05$ ); 与 PSD 组比较, 药物组和电针组大鼠总短链脂肪酸含量均升高 ( $P < 0.05$ ); 药物组与电针组大鼠总短链脂肪酸含量比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 2。

(2) 乙酸含量: 与假手术组比较, 卒中组和 PSD 组大鼠乙酸含量均降低 ( $P < 0.05$ ); 与 PSD 组比较, 药物组和电针组大鼠乙酸含量均升高 ( $P < 0.05$ ); 药物组与电针组大鼠乙酸含量比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 3。



注: 与假手术组比较, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与 PSD 组比较, <sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。

图 2 各组大鼠粪便总短链脂肪酸含量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )



注: 与假手术组比较, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与 PSD 组比较, <sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。

图 3 各组大鼠粪便乙酸含量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

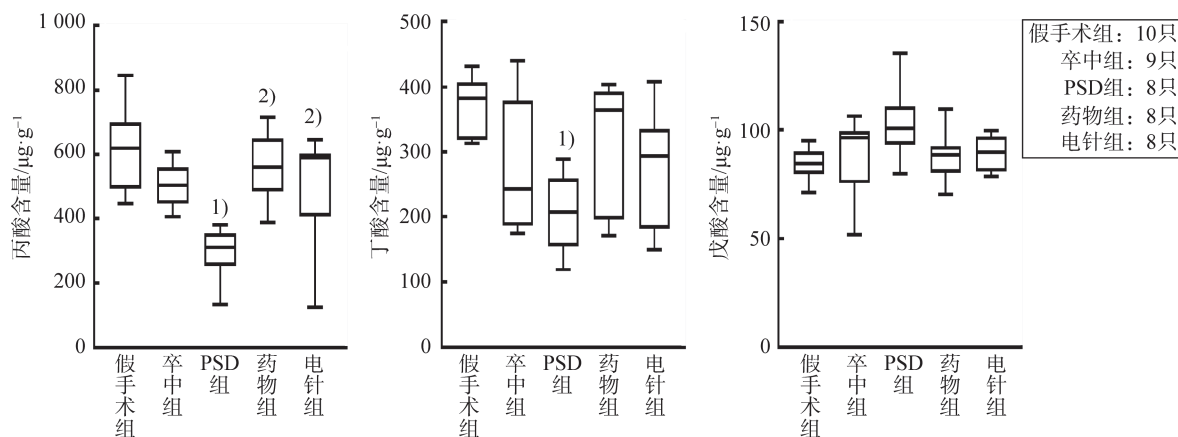
(3) 丙酸含量: 与假手术组比较, 卒中组丙酸含量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), PSD 组大鼠丙酸含量降低 ( $P < 0.05$ ); 与 PSD 组比较, 药物组和电针组大鼠丙酸含量均升高 ( $P < 0.05$ ); 药物组与电针组大鼠丙酸含量比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 4。

(4) 丁酸含量: 与假手术组比较, 卒中组丁酸含量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), PSD 组大鼠丁酸含量降低 ( $P < 0.05$ ); 药物组和电针组大鼠丁酸含量与 PSD 组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 药物组与电针组大鼠丁酸含量比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 4。

(5) 戊酸含量: 各组间戊酸含量比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见图 4。

### 2.5 结肠 5-HT 水平与粪便 SCFAs 含量相关性分析

结肠 5-HT 水平与粪便总短链脂肪酸、丙酸含量存在相关性 ( $r=0.424$ ,  $P=0.005$ ;  $r=0.427$ ,  $P=0.004$ ), 结肠 5-HT 水平与其余粪便短链脂肪酸含量无相关性 ( $P > 0.05$ ), 见图 5。



注: 与假手术组比较, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与 PSD 组比较, <sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。

图 4 各组大鼠粪便丙酸、丁酸、戊酸含量比较 [ $M(P_{25}, P_{75})$ ]

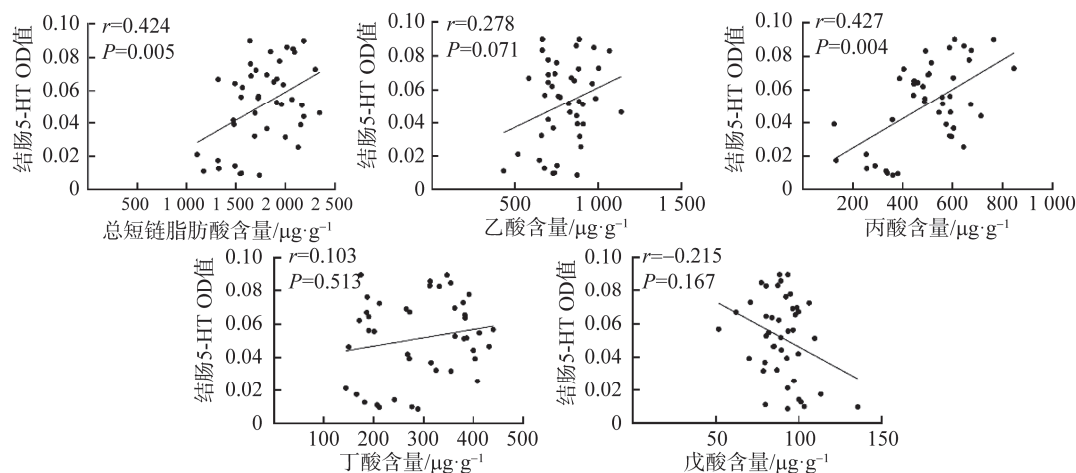


图 5 大鼠结肠 5-HT 水平和粪便 SCFAs 含量相关性分析

### 3 讨论

卒中后抑郁 (PSD) 属中医“郁证”范畴, 中风后脑络受损, 神明失养, 加之七情内伤, 肝郁气结, 气血逆乱, 气机升降失调而致郁。卒中后抑郁临床一线用药为盐酸氟西汀片等<sup>[21]</sup>, 本研究设此药物为阳性对照。杨继洲《针灸大成》载:“四关者, 五脏有六腑, 六腑有十二原, 出于四关, 太冲、合谷是也”, 明确了四关穴是合谷、太冲<sup>[22]</sup>。合谷具有调和气血、通经活络、行气开窍、镇静安神之功, 太冲有调和气血、疏肝理气、平肝熄风之效。二者合用可调和气血, 调节气机, 疏肝解郁。针刺四关穴与盐酸氟西汀片抗抑郁疗效相似, 且能降低不良反应的发生<sup>[23-24]</sup>, 其作用机制与调节 5-HT 等单胺类神经递质含量密切相关<sup>[25-27]</sup>。本研究结果显示, 卒中造模后及 PSD 造模后大鼠糖水消耗量及敞箱实验水平运动得分、垂直运动得分降低, 提示脑卒中及卒中后抑郁会使大鼠出现不同程度快感消失、自由活动程度和对新奇环境的好奇程度降低; 而电针组大鼠糖水消耗量及敞箱实验水平运动得分、垂直运动得分较 PSD 组升高, 提示电针“四关”穴能明显改善 PSD 大鼠快感消失、对幸福事件反应能力、自由活动程度以及增强探究行为。

大脑与肠道菌群之间存在双向交流机制, 主要通过胃肠道、肠神经系统以及中枢神经系统建立双向沟通, 称之为肠-脑轴, 肠道菌群可通过迷走神经、免疫通路、神经内分泌以及微生物代谢产物等对肠-脑轴进行调控<sup>[28]</sup>。SCFAs 是结肠内微生物发酵未消化的碳水化合物产生的主要代谢产物, 它不仅可以作为能量来源, 还能通过微生物-肠-脑轴发挥其神经活性<sup>[29]</sup>。组蛋白去乙酰化酶 (HDACs) 与大脑发育及一系列神经精神疾病有关<sup>[30]</sup>, 而 SCFAs 抑制 HDACs 的活性, 促进组蛋白的过度乙酰化<sup>[31]</sup>。SCFAs 水平升高, 不仅可以缓解神经炎症反应, 还可以通过抑制海马神经元凋亡改善认知衰退和抑郁样行为<sup>[14]</sup>。研究<sup>[32-33]</sup>显示, 抑郁小鼠结肠 5-HT 含量降低, 给予 5-羟基色氨酸缓释物既能升高中枢神经系统 5-HT 含量又能升高肠道 5-HT 含量, 并可改善抑郁症状。含有 5-HT 的黏膜型肥大细胞可通过相关受体感知 SCFAs<sup>[34]</sup>, 而 SCFAs 可使大鼠结肠 5-HT 含量升高<sup>[35]</sup>。研究<sup>[16]</sup>证明丙酸是抑郁大鼠和正常大鼠的差异化代谢物, 直肠内给药丙酸钠可起抗抑郁样作用; 研究<sup>[36]</sup>表明, 丙酸可促使肠色素细胞释放 5-HT, 进而影响肠道传导。本研究结果显示, 卒中造模后大鼠粪便总短链脂肪酸及乙酸含量降低, 与既往研究<sup>[37]</sup>结果一致; 而 PSD 造模后



大鼠结肠 5-HT 及总短链脂肪酸、乙酸、丙酸、丁酸均降低;电针“四关”穴可升高结肠 5-HT 及粪便总短链脂肪酸、乙酸、丙酸含量。同时结肠 5-HT 水平与粪便总短链脂肪酸、丙酸含量存在相关性。由此,可推断电针“四关”穴可能通过调控粪便 SCFAs 的合成和分解调节结肠 5-HT 的释放,从而改善卒中后抑郁。受实际条件、样本量、治疗观察时间等多方面影响,不排除实验结果与电针“四关”实际疗效存在差异。今后可进一步探究短链脂肪酸与 5-HT 及相关受体关系,以及与卒中后抑郁的神经炎症反应、神经营养因子方面的联系,探究 PSD 发生的相关机制。

## 参考文献

- [1] Hackett ML, Pickles K. Part I: frequency of depression after stroke: an updated systematic review and meta-analysis of observational studies[J]. *Int J Stroke*, 2014, 9(8): 1017-1025.
- [2] 王少石,周新雨,朱春燕.卒中后抑郁临床实践的中国专家共识[J]. *中国卒中杂志*, 2016, 11(8): 685-693.
- [3] 肖夏,魏京金,李维靖,等.针灸调控下丘脑-垂体-肾上腺轴抗抑郁的机理分析[J]. *上海针灸杂志*, 2016, 35(6): 758-760.
- [4] 孙培养,蔡荣林,李佩芳,等.“通督调神”针刺对脑卒中后抑郁大鼠海马神经元保护作用及单胺类神经递质的影响[J]. *中国针灸*, 2019, 39(7): 741-747.
- [5] 王波,王天磊,谭春风,等.醒神启闭针刺法对脑卒中后抑郁的疗效及 5-HT、NGF、IL-23 的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(12): 84-86.
- [6] Kang Z, Ye HM, Chen T, et al. Correction to: effect of electroacupuncture at Siguan acupoints on expression of BDNF and TrkB proteins in the hippocampus of post-stroke depression rats[J]. *J Mol Neurosci*, 2021, 71(10): 2172.
- [7] 汪洋,王玉娟,武九龙,等.电针对 PSD 大鼠行为学及神经营养因子和炎症因子的影响[J]. *南京中医药大学学报*, 2021, 37(2): 263-269.
- [8] 高佩,慕春龙,朱伟云.微生物-肠-脑轴的研究进展[J]. *微生物学报*, 2019, 59(9): 1737-1746.
- [9] Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, et al. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders[J]. *Cell*, 2013, 155(7): 1451-1463.
- [10] Singh V, Roth S, Llovera G, et al. Microbiota dysbiosis controls the neuroinflammatory response after stroke[J]. *J Neurosci*, 2016, 36(28): 7428-7440.
- [11] 覃佩兰,成泽东.基于脑肠轴学说探讨针灸对肠道菌群调节的思考[J]. *时珍国医国药*, 2015, 26(11): 2712-2714.
- [12] 马继红,彭拥军,孙建华,等.基于“肠道菌群-免疫反应”探讨针灸治疗缺血性脑卒中的作用机制[J]. *针刺研究*, 2019, 44(7): 538-542.
- [13] 王文炎,梁凤霞,宋爱群,等.针灸调节肠道微生物群现状与思考[J]. *针刺研究*, 2019, 44(1): 71-74.
- [14] Xiao WP, Su JB, Gao XJ, et al. The microbiota-gut-brain axis participates in chronic cerebral hypoperfusion by disrupting the metabolism of short-chain fatty acids[J]. *Microbiome*, 2022, 10(1): 62.
- [15] Fang ZW, Chen MR, Qian JF, et al. The bridge between ischemic stroke and gut microbes: short-chain fatty acids[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2023, 43(2): 543-559.
- [16] Li JG, Hou LW, Wang C, et al. Short term intrarectal administration of sodium propionate induces antidepressant-like effects in rats exposed to chronic unpredictable mild stress[J]. *Front Psychiatry*, 2018, 9: 454.
- [17] Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, et al. Experimental studies of ischemia brain edema: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area[J]. *Stroke*, 1986, 8(1): 1-8.
- [18] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. *Stroke*, 1986, 17(3): 472-476.
- [19] 陶希,王佳,刘楚娟,等.缺血性卒中后抑郁动物模型构建及核心症状评定研究进展[J]. *中国康复医学杂志*, 2020, 35(10): 1264-1269.
- [20] 余曙光,郭义.实验针灸学[M].上海:上海科学技术出版社, 2009.
- [21] 赵建国.脑梗死[M].2版.北京:人民卫生出版社, 2012.
- [22] 杨继洲.针灸大成[M].天津:天津科学技术出版社, 2017.
- [23] 李厥宝,叶祥明,程瑞动,等.电针对脑卒中后抑郁患者脑血流量的影响[J]. *中国康复理论与实践*, 2015, 21(2): 192-195.
- [24] 吴加勇,刘呈艳,黄桂榕,等.针刺百会、四关穴治疗脑卒中后抑郁临床观察[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2019, 17(18): 90-92.
- [25] 覃佐爱,薛海兵,吴清明,等.电针“四关”组穴及其相应单穴对卒中后抑郁模型大鼠行为学及脑单胺神经递质含量影响[J]. *环球中医药*, 2014, 7(12): 915-921.
- [26] 张鹏,叶海敏,吴清明,等.电针“四关”穴及相应单穴对 PSD 大鼠海马 5-HT、NE 的影响[J]. *中医药导报*, 2016, 22(8): 40-42, 45.
- [27] 叶海敏,张鹏,林旭明,等.针刺“四关”穴治疗脑卒中后抑郁的临床研究[J]. *中医药导报*, 2016, 22(7): 60-62.
- [28] 沈馨,孙志宏.微生物-肠-脑轴与神经系统疾病的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(11): 3781-3788.
- [29] 赵敏,王韵,马雅军,等.短链脂肪酸及其在微生物肠脑轴中作用研究进展[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2022, 24(10): 1116-1117.
- [30] Schmauss C. The roles of class I histone deacetylases (HDACs) in memory, learning, and executive cognitive functions: a review[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2017, 83: 63-71.
- [31] Dalile B, Van Oudenhove L, Vervliet B, et al. The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(8): 461-478.
- [32] Deng YY, Zhou MF, Wang JF, et al. Involvement of the microbiota-gut-brain axis in chronic restraint stress: disturbances of the kynurenine metabolic pathway in both the gut and brain[J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1-16.
- [33] Israelyan N, Del Colle A, Li ZS, et al. Effects of serotonin and slow-release 5-hydroxytryptophan on gastrointestinal motility in a mouse model of depression[J]. *Gastroenterology*, 2019, 157(2): 507-521.e4.
- [34] Karaki S, Mitsui R, Hayashi H, et al. Short-chain fatty acid receptor, GPR43, is expressed by enteroendocrine cells and mucosal mast cells in rat intestine[J]. *Cell Tissue Res*, 2006, 324(3): 353-360.
- [35] Fukumoto S, Tatewaki M, Yamada T, et al. Short-chain fatty acids stimulate colonic transit via intraluminal 5-HT release in rats[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003, 284(5): R1269-R1276.
- [36] Mitsui R, Ono S, Karaki S, et al. Neural and non-neural mediation of propionate-induced contractile responses in the rat distal colon[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2005, 17(4): 585-594.
- [37] Zhao Z, Ning JW, Bao XQ, et al. Fecal microbiota transplantation protects rotenone-induced Parkinson's disease mice via suppressing inflammation mediated by the lipopolysaccharide-TLR4 signaling pathway through the microbiota-gut-brain axis[J]. *Microbiome*, 2021, 9(1): 226.

(收稿日期: 2022-11-25, 网络首发日期: 2023-02-23, 编辑: 陈秀云)