

· 临床论著 ·

针刺调节主观认知功能下降患者肠道菌群
及认知功能随机对照试验谭春霞^{1, 2} 刘存志^{1, 2} 李玲孺³ 石广霞^{1, 4} 杨娜娜^{1, 2} 汪 露^{1, 2}
闫超群² 齐翎羽^{1, 2} 杨静雯^{1, 2} 张宇沁^{1, 2}

摘要 **目的** 观察针刺对主观认知功能下降 (SCD) 患者的临床疗效以及针刺前后 SCD 患者肠道菌群的变化。**方法** 筛查 196 例 SCD 患者, 纳入 72 例患者随机分为针刺组和假针组, 每组各 36 例, 针刺组采用“调和气血, 补心益智”针刺法, 百会与神庭连接 1 对电极 (2/100 Hz, 1~5 mA), 其余穴位手针治疗, 20 min/次, 每周治疗 2 次, 连续治疗 12 周; 假针组采用非穴位的非穿透性治疗, 治疗时间和疗程同针刺组。采用综合 Z 分数、蒙特利尔认知评估量表 (MOCA)、主观认知下降量表、简易精神状态量表、老年抑郁量表、匹兹堡睡眠量表和功能活动问卷评价 SCD 患者的认知功能。采用 16S 核糖体 RNA 基因测序法进行肠道菌群分析。**结果** 最终每组完成 26 例患者资料纳入分析。与假针组比较, 治疗 12 周后, 针刺组的综合 Z 分数和 MOCA 评分显著提高 ($P=0.045$, $P=0.007$)。针刺治疗后变形菌门 (大肠埃希氏菌-志贺氏菌和克雷伯氏菌) 丰度降低 ($P<0.05$), 拟杆菌门 (拟杆菌) 和厚壁菌门 (瘤胃球菌科 UCG-014) 丰度增加 ($P<0.05$)。相关性分析发现罗氏菌属与综合 Z 分数和 MOCA 评分成正相关 ($P<0.05$)。**结论** 针刺可有效缓解 SCD 患者的认知障碍, 并平衡 SCD 患者体内肠道菌群生态。(ClinicalTrials.gov 注册, No.NCT03444896)

关键词 针刺; 肠道菌群; 主观认知功能下降; 16S rRNA 基因测序; 随机对照试验

Acupuncture Modulates Gut Microbiota and Improves Cognition in Patients with Subjective Cognitive Decline: A Randomized Controlled Trial TAN Chun-xia^{1, 2}, LIU Cun-zhi^{1, 2}, LI Ling-ru³, SHI Guang-xia^{1, 4}, YANG Na-na^{1, 2}, WANG Lu^{1, 2}, YAN Chao-qun², QI Ling-yu^{1, 2}, YANG Jing-wen^{1, 2}, and ZHANG Yu-qin^{1, 2}
1 School of Acupuncture-Moxibustion and Tuina, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100029); 2 International Acupuncture and Moxibustion Innovation Institute, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100029); 3 National Institute of Traditional Chinese Medicine Constitution and Preventive Treatment of Diseases, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100029); 4 Department of Acupuncture and Moxibustion, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Capital Medical University, Beijing (100069)

ABSTRACT Objective To investigate the therapeutic efficacy of acupuncture on cognitive function and explore the characteristics of gut microbiota in subjective cognitive declines (SCD) patients before and after acupuncture treatment. **Methods** A total of 196 patients with SCD were screened and 72 cases were randomly assigned to an acupuncture group and a sham acupuncture group, with 36 patients in each group. In the acupuncture group, the acupuncture method of "harmonizing qi and blood, invigorating heart and intelligence" was adopted. Baihui (DU20) and Shenting (DU24) were connected with a pair of electrodes (2/100 Hz, 1-5 mA), and the other acupoints were treated with hand acupuncture to retained for 20 min, receiving twice-weekly treatment for 12 weeks. The sham acupuncture group was treated with non-penetrating

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.81674055, No.82105017)

作者单位: 1. 北京中医药大学针灸推拿学院 (北京 100029); 2. 北京中医药大学国际针灸创新研究院 (北京 100029); 3. 北京中医药大学国家中医体质与治未病研究院 (北京 100029); 4. 首都医科大学附属北京中医院针灸中心 (100069)

通讯作者: 张宇沁, Tel: 010-52176905 E-mail: yuqin_zhang@bucm.edu.cn

DOI: 10.7661/j.cjim.20230814.029

treatment at non-acupoints, and the duration and course of treatment were the same as those of acupuncture group. Comprehensive Z-scores, Montreal Cognitive Assessment (MOCA), Subjective Cognitive Decline Questionnaire (SCDQ), Mini-Mental State Examination (MMSE), Geriatric Depression Scale (GDS), Pittsburgh Sleep Quality Index scale (PSQI), and Functional Activities Questionnaire (FAQ) were used to evaluate cognitive function in patients with SCD. 16S ribosomal RNA gene sequencing was used for gut microbiota analysis. **Results** Finally, 26 patients in each group were included in the analysis due to case withdrawal and shedding. After 12 weeks of treatment, the comprehensive Z scores ($P=0.045$) and MOCA scores ($P=0.007$) in the acupuncture group were higher than those in the SA group. The abundance of pathogenic bacteria *Proteobacteria* (*Escherichia-Shigella* and *Klebsiella*) decreased dramatically, and the abundance of beneficial bacteria, such as *Bacteroidetes* (*Bacteroides*) and *Firmicutes* (*Ruminococcaceae*_UCG-014) increased ($P<0.05$). Correlation analysis showed that the *Roseburia* was positively correlated with Z-score and MOCA score ($P<0.05$). **Conclusion** Acupuncture treatment effectively alleviates cognitive impairment and balances gut microbiota ecology in patients with SCD. (ClinicalTrials.gov Registry, No.NCT03444896)

KEYWORDS acupuncture; gut microbiota; subjective cognitive decline; 16S rRNA gene sequencing; randomized controlled trial

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是以进行性认知功能障碍为特征的中枢神经系统退行性病变^[1]。主观认知功能下降 (subjective cognitive decline, SCD) 是指个人主观认知功能减退, 但并不存在神经心理学测验或者日常功能能力检测相关认知障碍的客观表现^[2]。SCD 与痴呆风险密切相关^[3], 患有持续性 SCD 患者在 10 年内发生为轻度认知功能障碍 (mild cognitive impairment, MCI) 或痴呆的可能性 >75%^[4]。因此, 提早对 SCD 患者进行治疗干预可降低 AD 的发病率。

SCD 的发病机制与肠道菌群的破坏密切相关^[5-7]。肠道菌群紊乱可导致体内内毒素排泄增加, 肠道通透性增加, 可能引起认知功能障碍发生^[8], 靶向治疗肠道菌群可通过驱动肠-脑轴, 刺激免疫-神经通路, 改善脑功能^[9]。在一项以 AD 模型小鼠为研究对象的基础研究中发现, 口服给药 GV-971 能改善肠道生态失调, 控制神经炎症并改善认知功能^[10]。此外, 益生元、益生菌和合生元也可通过肠-脑轴改善肥胖患者胰岛素抵抗并改善患者认知功能^[11], 提示调节肠道菌群平衡可改善患者认知功能。

针灸作为一种安全便捷的干预措施^[12], 可有效改善认知功能^[13]。随着微生物组学的飞速发展, 一些研究发现, 针刺通过平衡肠道菌群生态, 提高模型鼠的学习和记忆功能^[14, 15]。课题组前期研究表明, 针刺可减轻 SCD 患者的认知功能障碍, 但针刺对患者肠道菌群的影响机制尚不明确^[16]。本研究探究针刺治疗前后 SCD 患者肠道菌群的变化, 以及肠道菌

群变化与针刺治疗 SCD 患者临床指标之间的相关性, 现将结果报道如下。

资料与方法

1 诊断标准 SCD 尚未有明确统一的诊断标准, 本研究基于 Jessen F 等^[17]对 SCD 的定义制定诊断标准。

2 纳入、排除、剔除和脱落标准

2.1 纳入标准 (1) 55~75 岁, 不限性别, 母语为汉语, 小学及以上文化程度; (2) 主诉是抱怨认知下降, 或知情者报告其认知下降; (3) 认知功能正常: 蒙特利尔认知评估量表中文版 (Montreal Cognitive Assessment, MOCA)^[18]评分: 小学及以下 >19 分, 中学 >22 分, 大学 >24 分; 简易精神状态量表 (Mini-Mental State Examination, MMSE)^[19]评分: 小学 >20 分, 中学及以上 >24 分; (4) 无视力、听力、智力或语言障碍, 能成功回答并填写问卷的患者; (5) 治疗前及治疗过程中未服用认知功能障碍相关的精神药物患者; (6) 签署书面知情同意。

2.2 排除标准 (1) 除疑似的早期 AD 外, 可导致认知功能下降的神经系统疾病, 如血管性痴呆、亨廷顿氏病、帕金森病、正压性脑积水、脑瘤、进行性核上性麻痹、癫痫、硬膜下血肿、多发性硬化或造成神经损伤的外伤性脑损伤, 以及其他脑结构异常疾病; (2) 其他可引起认知功能减退的全身性疾病, 如桥本氏脑病、代谢性脑病、麻痹性痴呆、贫血、肝性脑病、肾性脑病等; (3) 核磁共振成像显示脑区重要

记忆区域的梗塞、感染或其他局部性病变或多腔或管腔梗塞;(4)严重抑郁、双相情感障碍和精神分裂症等精神障碍病史(《精神障碍诊断和统计手册》,第五版,DSM-V 诊断标准)^[20];(5)过去两年酗酒或吸毒/成瘾史;(6)任何其他系统性疾病或不确定状况导致不能完成该项目;(7)近 1 个月接受过针刺治疗。

2.3 剔除标准 治疗过程中因出现如胃炎、肠炎、腹泻、腹痛等脾胃症状或其他影响试验评价的病症;试验期间发生了重要偏差,难以评价针灸疗效的患者。

2.4 脱落标准 自行退出的患者;不宜继续治疗的患者以及未完成本试验的患者。脱落人群不采用意向分析。

3 样本量估算、随机分配及盲法实施

3.1 样本量估算 本研究为初次探索电针对 SCD 患者肠道菌群的影响,参考菌群相关研究的样本量^[21, 22],估计每组样本量采集 36 例左右。

3.2 随机方法 采用随机对照的试验设计方法,由 SAS 9.3 软件产生随机号,区组长度为 6,将 SCD 患者以 1:1 的比例随机分入针刺组和假针组。

3.3 盲法 对 SCD 患者、数据收集者和结局评价者设盲,使其无法得知每位患者的针刺方法和组别。针刺组和假针组均在穴位处或非穴位处贴无菌海绵垫,针刺组使用针灸针透过海绵垫刺入皮肤,假针组使用平头针刺入海绵垫上,不穿透皮肤。两组患者在治疗过程中均连接电针,假针治疗组连接特制电源线(中间电线剪断,外表如常,电针仪显示接通状态,实际未通电)。

4 一般资料 本研究从 2018 年 4 月 25 日—10 月 20 日于北京的东城区、丰台区和顺义区三家社区卫生服务中心招募 196 例患者,排除 124 例,最终纳入 72 例患者随机分配至针刺组和假针组,针刺组 36 例,假针组 36 例。由于患者出现影响菌群的胃肠症状,最终两组纳入分析各 26 例。两组基线资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性,见表 1。本研究符合《赫尔辛基宣言》,研究已获得首都医科大学附属北京中医院伦理委员会(No.2017BL-061-03)的批准,研究方案已在临床试验中心官网 ClinicalTrials.gov 进行注册(No. NCT03444896)^[23]。负责记录和评估人员不参与研究的设计和具体临床实施。

5 治疗方法 医者手部及患者针刺穴位局部常规消毒,除百会外所有穴位贴上无菌海绵垫后进行针刺操作。各中心配有一名具有 3 年以上临床经验的针灸医师完成,以控制试验干预的质量。

表 1 两组主观认知功能下降患者人口学和神经心理学评估结果

项目	假针组 (26 例)	针刺组 (26 例)	P 值
年龄 ($\bar{x} \pm s$)	65.4 ± 5.1	64.4 ± 5.1	0.5
性别 (女) [例 (%)]	21 (80.8)	21 (80.8)	1.0
教育年限 (年, $\bar{x} \pm s$)	10.1 ± 3.8	9.8 ± 2.6	0.7
体重指数 (kg/m^2 , $\bar{x} \pm s$)	24.4 ± 3.0	25.7 ± 3.2	0.1
高血压 [例 (%)]	8 (30.8)	6 (23.1)	0.5
高血脂 [例 (%)]	7 (27.0)	9 (34.6)	0.6
糖尿病 [例 (%)]	5 (19.2)	6 (23.1)	0.7
冠心病 [例 (%)]	1 (3.9)	0 (0.0)	0.3
饮酒 [例 (%)]	2 (7.7)	1 (3.9)	0.6
抽烟 [例 (%)]	1 (3.9)	1 (3.5)	1.0
神经心理学 (分, $\bar{x} \pm s$)			
GDS	1.6 ± 1.3	1.6 ± 1.2	1.0
PSQI	6.5 ± 4.7	6.0 ± 5.1	0.7
FAQ	0.3 ± 0.6	0.2 ± 0.6	0.5
认知障碍评分 (分, $\bar{x} \pm s$)			
SCDQ	6.9 ± 1.2	6.6 ± 1.3	0.3
MOCA	20.8 ± 3.0	21.3 ± 3.0	0.5
MMSE	27.5 ± 1.9	27.5 ± 2.0	1.0
AVLT-S	5.5 ± 2.6	5.8 ± 1.9	0.6
AVLT-L	4.8 ± 2.6	5.5 ± 1.8	0.3
AFT	17.4 ± 5.2	17.7 ± 4.1	0.8
BNT	24.0 ± 3.0	24.4 ± 2.6	0.6
TMT-A	70.5 ± 20.7	67.7 ± 17.4	0.6
TMT-B	194.6 ± 55.8	189.9 ± 64.3	0.8
SCWT-C	84.9 ± 24.8	80.2 ± 20.4	0.5
DSST	29.1 ± 8.3	30.7 ± 7.1	0.5
DST	11.8 ± 1.7	12.0 ± 1.9	0.7
CDT	23.4 ± 5.1	21.1 ± 6.5	0.2

注: GDS 为老年抑郁量表; PSQI 为匹兹堡睡眠质量表; FAQ 为功能活动问卷; SCDQ 为主观认知下降量表; AVLT-S 为听觉词汇学习短期延迟回忆测试; AVLT-L 为听觉词汇学习长期延迟回忆测试; AFT 为动物词语流畅性测试; BNT 为波士顿命名测试; TMT-A 为形状连线测试 A, TMT-B 为形状连线测试 B; SCWT-C 为色词测试卡片 C; DSST 为符号数字转换测试; DST 为数字广度测试; CDT 为画钟测试; 表 3 同

5.1 针刺组 选取膻中、中脘、气海、百会、风府、神庭、风池 (双侧)、心俞 (双侧)、谿謐 (双侧)、内关 (双侧)、通里 (双侧)、血海 (双侧)、足三里 (双侧) 和照海 (双侧)。操作: 采用华佗牌 0.35 × 25 mm 和 0.35 × 40 mm 两种规格的一次性针灸针和华佗牌 SDZ-V 针灸治疗仪, 根据腧穴的位置, 将针灸针通过无菌海绵垫刺入皮肤 5~20 mm, 得气后, 留针 20 min。百会和神庭穴连接华佗牌 SDZ-V 针灸治疗仪, 疏密波, 频率 2/100 Hz, 电流强度 1~5 mA (以患者耐受为度)。风府、心俞和谿謐手针得

气不留针。余下穴位手针得气留针即可。患者接受为期 12 周, 每周 2 次, 共 24 次的针灸治疗。

5.2 假针组 假穴位旁开位置, 如表 2 所示。除假穴位 1 外所有穴位贴上无菌海绵垫后操作, 选用华佗牌 0.35 × 25 mm 规格的安慰针, 进行非穿透性针刺。针灸师将安慰针插在无菌海绵垫上, 不穿透皮肤, 不进行针刺操作, 留针 20 min。双侧假穴位 2 连接 SDZ-V 型针灸治疗仪, 但无电流输出。假穴位 11 和假穴位 12 不留针。治疗时间和疗程同针刺组。

表 2 假针组使用假穴位的位置

假穴位	位置
假穴位 1	率谷穴和头维穴的中点
假穴位 2	头维穴和阳白穴的中点
假穴位 3	天膺穴和天容穴的中点
假穴位 4	脐上 4 寸, 中线向右旁开 1 寸
假穴位 5	脐下 2 寸, 中线向右旁开 1 寸
假穴位 6	少海穴与神门穴中点外侧 1 寸
假穴位 7	少海穴与通里穴中点外侧 1 寸
假穴位 8	髌骨上缘上 6 寸
假穴位 9	阳陵泉穴下 3 寸, 在足少阳胆经和足太阳膀胱经的中间
假穴位 10	内踝尖
假穴位 11	第五胸椎棘突下旁开 2 寸
假穴位 12	第六胸椎棘突下旁开 2 寸

6 观察指标及检测方法

6.1 主要结局指标 综合 Z 分数为主要临床结局指标^[23]。综合 Z 分数是通过多域神经心理测试的平均分值来计算, 该测试包括八个测试: 听觉词汇学习测试 (auditory verbal learning test, AVLT)^[24]、形状连线测试 A 和 B (trail making test parts A and B, TMT A and TMT B)^[25]、动物词语流畅性测试 (animal fluency test, AFT)^[26]、色词测试卡片 C (stroop color word test C, SCWT-C)^[27]、符号数字转换测试 (digit symbol substitution test, DSST)^[28]、数字广度测试 (digital span test, DST)^[29]、波士顿命名测试 (boston naming test, BNT)^[30] 和画钟测试 (clock drawing test, CDT)^[31]。

6.2 次要结局指标 采用主观认知下降量表 (Subjective Cognitive Decline Questionnaire, SCDQ)^[32]、老年抑郁量表 (Geriatric Depression Scale, GDS)^[33]、匹兹堡睡眠量表 (Pittsburgh Sleep Quality Index scale, PSQI)^[33] 和功能活动问卷 (Functional Activities Questionnaire, FAQ)^[34] 为次要结局指标进行评分。

6.3 肠道菌群测定 (1) 粪便样本采集: 采集 SCD 患者治疗前后的早晨空腹新鲜粪便样本, 每例

约 2 g, 置于 50 mL 无菌粪便干燥盒内, 立即密封并贴上标签, 于 3 h 内将其放入 -80 ℃ 的冰箱保存, 待标本采集完毕后统一送至上海美吉生物医药科技有限公司检测; (2) 16S rRNA 测序: 取 200~300 mg 组织标本, 采用改良 TIANAMP 粪便 DNA 试剂盒法提取粪菌总基因组 DNA。用 NanoDrop2000 测定 DNA 的浓度和纯度, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的提取质量。选择细菌 16 S 核糖体 RNA (rRNA) 基因的 V3~V4 区进行扩增。通用引物 (338 F 和 806 R) 与指数和测序适配器连接。正向引物 (5'-3') 为 ACTCCTACGAGGCAGCAG (338 F), 反向引物 (5'-3') 为 GGACTACVGGGTATCTAATC (806 R)。PCR 反应按以下程序进行: 95 ℃ 变性 3 min, 95 ℃ 30 s 27 次, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 伸长 30 s, 10 min 后扩增 (ABI GeneAmp 9700)。使用 Illumina 的 MiseqPE300 平台对扩增产物进行测序; (3) 微生物信息学分析: 使用 UPARSE 软件 (Version 7.1 <http://drive5.com/uparse/>), 根据 97% 的相似度对序列进行 OTU 聚类, 并在聚类的过程中去除单序列和嵌合体, 未分类的 OTUs 从后续分析中删除。对 OTU 原始数据进行过滤和处理, 对处理后的数据进行拼接和过滤, 获得有效数据。然后根据有效数据进行 OTU 聚类 / 去噪和物种分类分析, 形成 OTUs 和其他物种分类等级的物种丰度谱。采用 RDP Classifier 算法 (<http://rdp.cme.msu.edu/>) 对 Silva (SSU128) 16S rRNA 数据库进行分类, 置信阈值为 70%。最后, 将原始数据上传到 NCBI 数据库。

7 统计学方法 数据采用 SPSS 23.0 统计程序处理, 所有的统计检验均采用双侧检验。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 或 95% 可信区间 (95% CI) 表示, 计数资料采用 % 表示。基线时两组的人口统计学和神经心理学评估使用独立样本 *t* 检验进行。Z 分数计算方法是减去基线值, 除以基线值的 *s*, 然后将所有测试的标准 Z 分数取平均值^[35]。在肠道菌群的分析中, 数据使用在线 Majorbio 云平台 (www.Majorbio.Com)^[36] 分析。在 OTU 水平上, 采用 α 多样性 (Sobs、Chao 指数) 和 β 多样性 (主坐标分析, PCoA) 测定菌群多样性^[36, 37]。为了解 SCD 患者肠道微生物组成, 采用 R 语言 (3.3.1 版 Vegan package) (<https://cloud.majorbio.com/page/tools/>) 进行热图分析^[37, 38]。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 病例完成情况 (图 1) 2018 年 4 月 25 日—

10 月 20 日于北京的东城区、丰台区和顺义区三家社区卫生服务中心门诊招募邀请 196 例患者参加本研究的基线访问，最终 164 例患者进行了基线访问。排除不符合纳入标准的 92 例，纳入 72 例患者随机分配至针刺组和假针组，各 36 例。因出现未完成治疗、脾胃症状等不能评价针刺疗效及菌群变化的情况致针

刺组和假针组各剔除 10 例，最终每组各 26 例患者资料纳入分析。

2 两组认知功能指标比较（表 3） 治疗 12 周后，针刺组综合 Z 分数明显高于假针组（ $P=0.045$ ）。针刺组 MOCA 评分经 Bonferroni 校正后差异有统计学意义（ $P=0.007$ ）。针刺组 AVLT-S 评分差异有

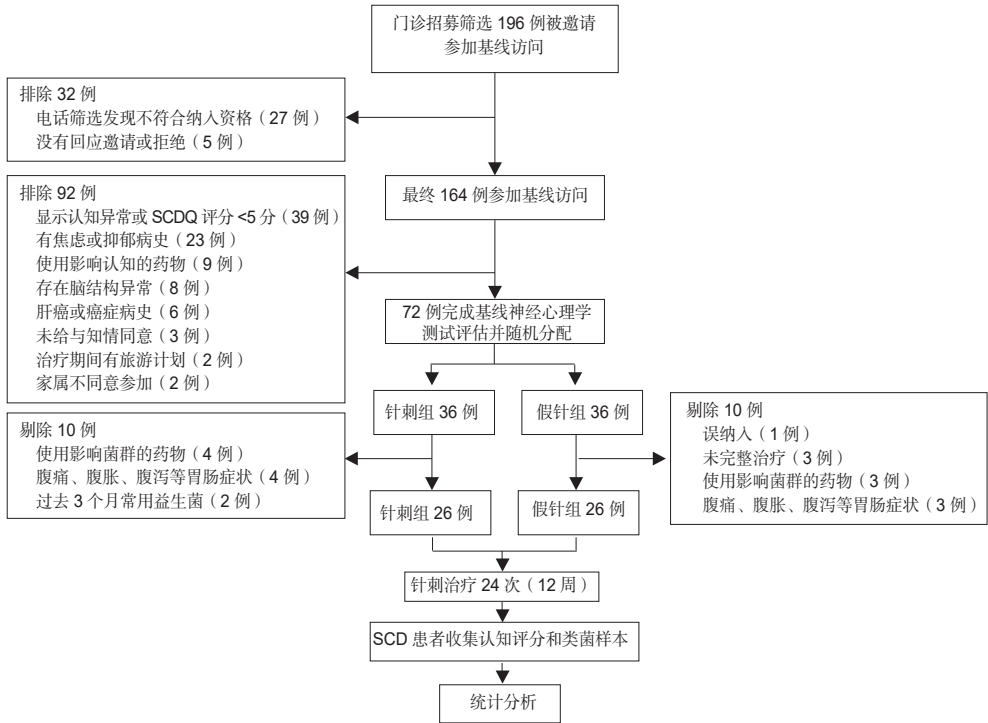


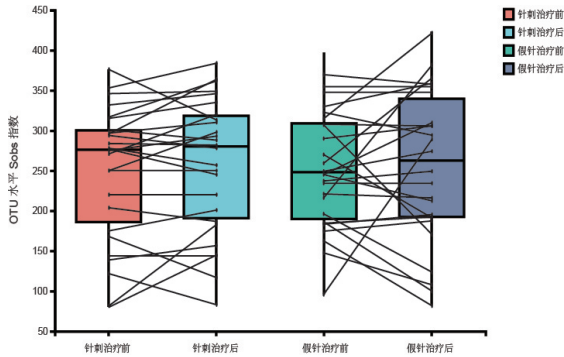
图 1 研究流程图

表 3 两组认知功能指标比较

指标	假针组 (26 例)	针刺组 (26 例)	P	效应量		
	[治疗前 - 治疗后, (95% CI)]	[治疗前 - 治疗后, (95% CI)]		平均差值	偏平方值	95%CI
主要结局指标						
综合 Z 分数	0.126 (-0.002~0.254)	0.313 (0.194~0.433)	0.045	-0.042	0.083	0.001~0.221
次要结局指标						
AVLT-S	0.500 (-0.444~1.444)	1.615 (0.999~2.231)	0.033	0.346	0.093	0.004~0.234
AVLT-L	1.038 (0.143~1.934)	1.769 (1.017~2.521)	0.168	0.654	0.040	0.000~0.160
AFT	0.731 (-0.850~2.312)	-0.346 (-1.966~1.273)	0.289	0.385	0.024	0.000~0.131
BNT	0.231 (-0.831~1.292)	1.115 (0.427~1.804)	0.186	0.385	0.037	0.000~0.155
TMT-A	-3.885 (-13.193~5.424)	-3.308 (-11.885~5.269)	0.874	-2.769	0.001	0.000~0.022
TMT-B	2.038 (-19.530~23.607)	0.077 (-18.794~18.947)	0.894	-4.769	0.000	0.000~0.016
SCWT-C	-4.846 (-11.059~1.367)	-8.962 (-13.642~-4.281)	0.296	-4.692	0.023	0.000~0.130
DSST	1.038 (-1.913~3.990)	0.308 (-1.613~2.229)	0.773	1.615	0.002	0.000~0.060
DST	0.423 (-0.273~1.120)	0.808 (0.336~1.279)	0.461	0.192	0.012	0.000~0.104
CDT	-0.808 (-2.567~0.951)	1.885 (-0.673~4.443)	0.098	-2.212	0.057	0.000~0.186
SCDQ	-0.885 (-1.721~-0.048)	-1.538 (-2.276~-0.800)	0.146	-0.327	0.044	0.000~0.167
MOCA	0.000 (-1.481~1.481)	2.269 (1.310~3.229)	0.007	0.500	0.143	0.023~0.293
MMSE	0.615 (-0.232~1.463)	0.846 (0.136~1.557)	0.475	0.000	0.011	0.000~0.102
GDS	-0.308 (-1.000~0.385)	-0.115 (-0.841~0.610)	0.788	0.000	0.002	0.000~0.057
PSQI	-0.077 (-1.672~1.518)	-0.192 (-1.891~1.506)	0.740	-0.500	0.002	0.000~0.065
FAQ	0.038 (-0.252~0.329)	0.192 (-0.204~0.588)	0.503	-0.115	0.010	0.000~0.098

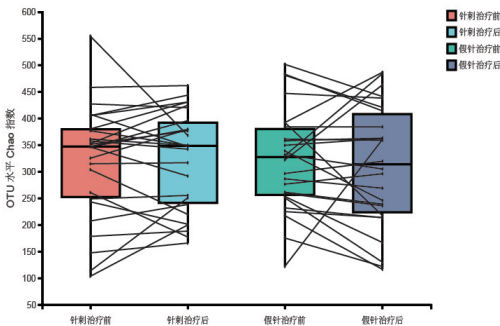
统计学意义 ($P=0.033$)。用于评估患者主观症状的 SCDQ 评分和评估生活质量的 PSQI 和 GDS 评分均未发生显著变化 ($P>0.05$)。

3 两组肠道菌群多样性指标比较 (图 2~4) 在 OTU 水平上, Sob 和 Chao 指数分别表示物种丰富度和均匀度, 四组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。



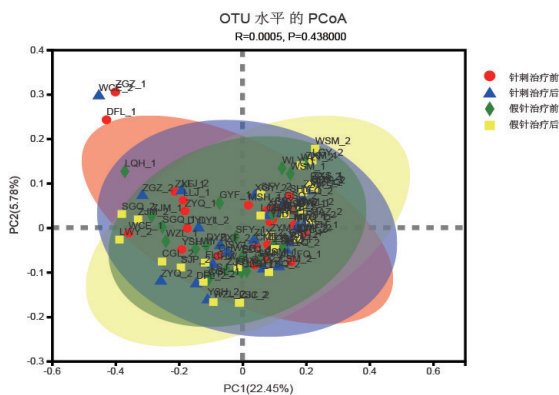
注: 图中一个点代表一个样本, 两点一线代表该样本治疗前到治疗后变化; $n=26$

图 2 两组肠道菌群 α 多样性 Sobs 指数比较



注: 图中一个点代表一个样本, 两点一线代表该样本治疗前到治疗后变化; $n=26$

图 3 两组肠道菌群 α 多样性 Chao 指数比较



注: 图中红色小圆点、蓝色小三角、绿色小菱形和黄色小正方形代表不同样本, 样本名字以首字母表示; 1 表示治疗前, 2 表示治疗后; 不同颜色的大圆代表不同分组, 橘色代表针刺治疗前, 紫色代表针刺治疗后, 绿色代表假针刺治疗前、黄色代表假针刺治疗后; $n=26$

图 4 两组肠道菌群多样性 β 多样性 PCoA 比较

OTU 水平主坐标分析 (PCoA) 显示, 四组间 β 多样性差异无统计学意义 ($P>0.05$), 横坐标代表第一主成分 (贡献率: 22.45%), 纵坐标代表第二主成分 (贡献率: 5.78%)。

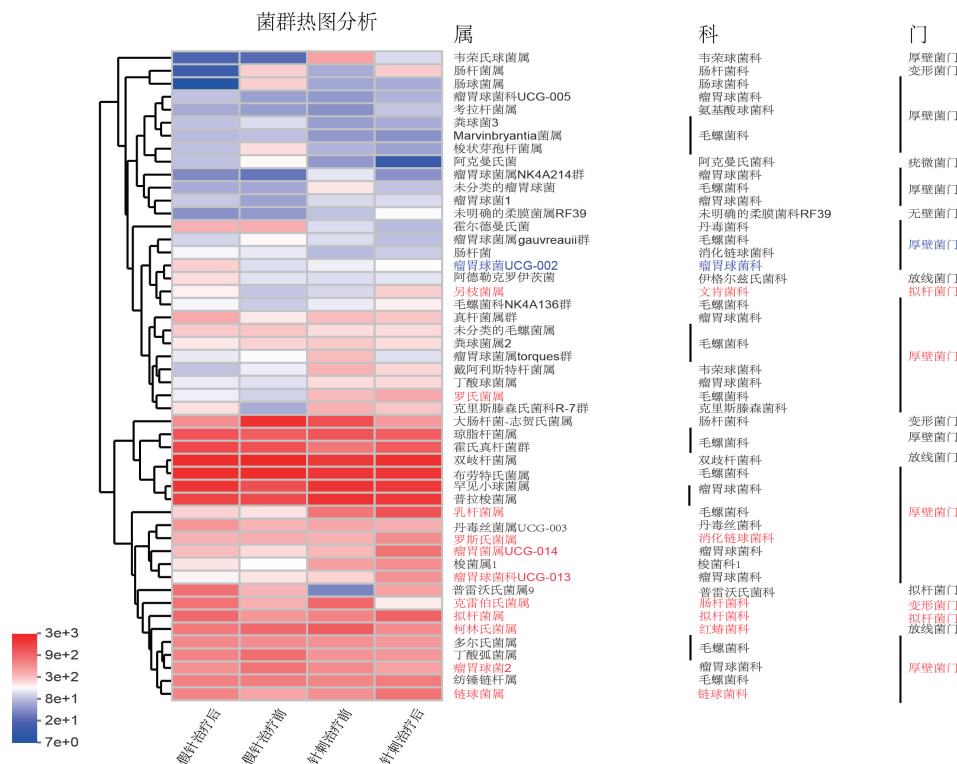
4 两组肠道菌群组成指标比较 (图 5) 在门的水平上, 5 个细菌类群 (厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门、放线菌门和疣微菌门) 在针刺组和假针刺组治疗前后各组之间具有相对丰度的变化。在属的水平上, 大肠埃希氏菌 - 志贺氏菌和克雷伯氏菌在 SCD 患者中富集, 然而, 针灸治疗后两种致病菌的丰度下降。针刺治疗可增加 SCD 患者体内某些有益细菌的丰度, 如罗氏菌属、瘤胃球菌属 UCG-014、瘤胃球菌属 UCG-013 和拟杆菌属。

5 针刺调节的肠道菌群与认知障碍评估量表之间相关性分析 (图 6) 根据 SCD 患者的评分, 罗氏菌属, 瘤胃球菌属_2 和另枝菌属与 MOCA 评分呈正相关 ($P<0.05$)。罗氏菌属与 FAQ 评分呈负相关 ($P<0.05$)。瘤胃球菌属_2 与 Z 评分呈正相关 ($P<0.05$), 罗姆布茨菌属与 SCDQ 评分呈正相关 ($P<0.05$)。乳酸杆菌属与 PSQI 评分呈正相关, 但拟杆菌属与 PSQI 评分呈负相关 ($P<0.05$)。针刺主要改善 SCD 患者的综合 Z 分数以及 MOCA 评分, 相关性分析提示针刺可能通过提高罗氏菌属和瘤胃球菌属_2 的丰度发挥改善认知的作用。

讨 论

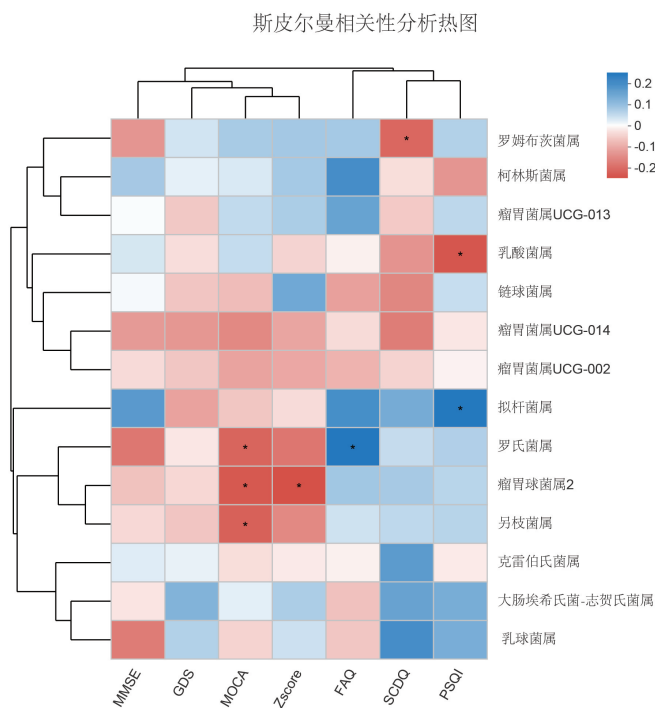
本研究以 SCD 患者肠道菌群为切入点, 以假针刺组做为对照, 运用多个评估认知障碍的神经心理学量表, 观察“调和气血, 补心益智”针刺法治疗前后 SCD 患者的认知功能及肠道菌群的变化。研究发现, 与假针刺组相比, 针刺可显著提高 SCD 患者的综合 Z 分数和 MOCA 评分, 提示针刺治疗可明显减轻 SCD 患者的认知障碍。其次, 与假针刺组相比, 针刺治疗能更好地调节 SCD 患者微生物组成, 增加有益菌丰度, 如罗氏菌属、瘤胃球菌属 UCG-014、瘤胃球菌属 UCG-013 和拟杆菌属, 并减少致病菌丰度, 如大肠埃希氏菌 - 志贺氏菌和克雷伯氏菌。与此同时, 相关性分析发现, 罗氏菌属和瘤胃球菌属_2 的丰度与综合 Z 分数和 MOCA 评分成正相关, 提示针刺可能通过增加罗氏菌属和瘤胃球菌属_2 的丰度发挥改善认知的作用。

中医学认为 SCD 病位在脑, 是本虚标实之证, 以气血阴精不足为主, 亦有因气滞血瘀, 痰浊上扰而成者, 属于中医学“健忘”的范畴, 多发生在老年人



注：左图为四组中针刺治疗影响的前 50 个 OTUs 丰度热图，右图为细菌分类信息（门、科、属）所代表的差异分析；颜色显示 OTU 丰度的平均值；标记为红色的细菌表示主要是受针刺治疗后丰度变化明显的细菌；标记为蓝色的细菌主要是假针干预后丰度变化明显的细菌

图 5 两组肠道菌群组成指标比较



注：Zscore：综合 Z 分数，X 轴和 Y 轴分别为临床指标和针刺调节的关键菌属，通过计算获得 R 值和 P 值；R 值在图中以不同颜色展示，* $P < 0.05$ ，右侧图例是不同 R 值的颜色区间； $n = 26$

图 6 针刺调节的关键菌属其相对丰度与临床认知相关量表相关性热图

群，常表现为记忆力减退、遇事善忘等症状。研究发现针刺能明显减轻老年人认知障碍^[39]，本课题结合国医大师贺普仁教授的学术思想，创立“调和气血，补心益智”针刺法，侧重调节 SCD 患者全身气血，达到益智通窍，心脑血管同治的效果。百会主一身之阳，能补益人体全身阳气，配合神庭、风府、风池诸穴可疏通经络、醒脑开窍、调和阴阳；膻中、中脘、气海分别调节上中下三焦气化，畅达全身气机、培元补虚、温阳益气；内关、通里、血海、足三里和照海合用同调气血；心俞、谿谿两穴合用可宁心安神。诸穴合用，气血双补，心脑血管并治，以达平衡阴阳，醒脑开窍之功。

本研究发现针刺治疗减少了 SCD 患者中致病菌的丰度。研究发现大肠埃希氏菌 - 志贺氏菌与注意域、方向域和延迟回忆域密切相关^[40]。在认知障碍的脑淀粉样变患者中发现，大肠埃希氏菌 - 志贺氏菌丰度高于健康对照组和非脑淀粉样变患者^[41]；克雷伯氏菌是一种革兰氏阴性菌，是目前最重要的肠道致病菌^[42]，在精神分裂症患者中克雷伯氏菌明显多于健康对照组^[43]；表明大肠埃希氏菌 - 志贺氏菌和克雷伯氏菌与认知障碍成正相关。本研究发现，针刺治疗可改变肠道菌群的结构成分，降低 SCD 患者肠道菌群中促炎性致病菌大肠埃希氏菌 - 志贺氏菌和克雷伯氏

菌的丰度。

本研究发现针刺治疗除了减少 SCD 患者中致病菌的丰度以外,同时也增加了有益菌拟杆菌属的丰度。多项研究表明与改善认知功能有关的拟杆菌属具有抗炎特性^[6, 44]。与健康对照组相比,AD 和 MCI 患者的拟杆菌属的含量较低,且拟杆菌属的含量往往与 MMSE 和 MOCA 评分呈正相关^[45, 46]。有研究表明针刺可通过调节大肠杆菌、肠球菌等肠道菌群,增加人体免疫功能^[47]。本研究还发现,针刺治疗增加了部分产短链脂肪酸的毛螺菌科和瘤胃球菌科的丰度。瘤胃球菌可产生乙酸、甲酸和微量乳酸,在针刺干预后 SCD 患者中瘤胃球菌显著增加^[48]。先前的一项研究表明,短链脂肪酸通过肠-脑轴调节能量摄入,在调节机体平衡方面发挥关键作用^[48]。因此,针灸可能通过调节产生短链脂肪酸的微生物对机体发挥有利的作用。以上表明促炎细菌和抗炎细菌之间的不平衡可能在 SCD 发展中起重要作用,针刺对肠道菌群有双向调节作用。正如廖冬梅等^[49]发现电针百会、大肠俞、足三里干预认知障碍模型小鼠,对肠道菌群有良性双向调节作用,能明显提高小鼠的认知能力。

综上所述,针刺治疗可有效改善 SCD 患者的认知功能障碍,其机制可能是通过肠-脑轴调节 SCD 患者致病菌与益生菌的丰度,平衡肠道菌群的紊乱,发挥缓解认知功能障碍的作用^[50]。本文是首次探究针刺对 SCD 患者肠道菌群的影响,但由于初步探索,试验设计时未采集健康人的数据作对照,无法通过与健康对照组对比筛选 SCD 的菌群标志物,也没有深入探究针刺调节核心菌与疾病的联系。今后将进一步研究针刺干预的核心细菌与疾病之间的具体联系,为针刺改善认知功能障碍性疾病提供更多的依据。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Nagpal R, Neth BJ, Wang S, et al. Modified Mediterranean-ketogenic diet modulates gut microbiome and short-chain fatty acids in association with Alzheimer's disease markers in subjects with mild cognitive impairment[J]. EBioMedicine, 2019, 47: 529-542.
- [2] Howard R. Subjective cognitive decline: what is it good for? [J]. Lancet Neurol, 2020, 19 (3): 203-204.
- [3] Cheng YW, Chen TF, Chiu MJ. From mild cognitive impairment to subjective cognitive decline: conceptual and methodological evolution[J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2017, 13: 491-498.
- [4] Liew TM. Trajectories of subjective cognitive decline, and the risk of mild cognitive impairment and dementia[J]. Alzheimers Res Ther, 2020, 12 (1): 135.
- [5] Cryan JF, O'Riordan KJ, Sandhu K, et al. The gut microbiome in neurological disorders[J]. Lancet Neurol, 2020, 19 (2): 179-194.
- [6] Liu P, Wu L, Peng G, et al. Altered microbiomes distinguish Alzheimer's disease from amnesic mild cognitive impairment and health in a Chinese cohort[J]. Brain Behav Immun, 2019, 80: 633-643.
- [7] Sampson TR, Debelius JW, Thron T, et al. Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of Parkinson's disease[J]. Cell, 2016, 167 (6): 1469-1480.
- [8] Kaliannan K, Wang B, Li XY, et al. A host-microbiome interaction mediates the opposing effects of omega-6 and omega-3 fatty acids on metabolic endotoxemia[J]. Sci Rep, 2015, 5: 11276.
- [9] Dinan TG, Cryan JF. The microbiome-gut-brain axis in health and disease[J]. Gastroenterol Clin North Am, 2017, 46 (1): 77-89.
- [10] Wang X, Sun G, Feng T, et al. Sodium oligomannate therapeutically remodels gut microbiota and suppresses gut bacterial amino acids-shaped neuroinflammation to inhibit Alzheimer's disease progression[J]. Cell Res, 2019, 29 (10): 787-803.
- [11] Chunchai T, Thunapong W, Yasom S, et al. Decreased microglial activation through gut-brain axis by prebiotics, probiotics, or synbiotics effectively restored cognitive function in obese-insulin resistant rats[J]. J Neuroinflammation, 2018, 15 (1): 11.
- [12] Fernandez Rojas R, Liao M, Romero J, et al. Cortical network response to acupuncture and the effect of the hegu point: An fNIRS study[J]. Sensors (Basel), 2019, 19 (2): 394.
- [13] Li W, Wang Q, Du S, et al. Acupuncture for mild cognitive impairment in elderly people: Systematic

- review and meta-analyses[J]. *Medicine*(Baltimore), 2020, 99 (39): e22365.
- [14] Jiang J, Liu H, Wang Z, et al. Electroacupuncture could balance the gut microbiota and improve the learning and memory abilities of Alzheimer's disease animal model[J]. *PLoS One*, 2021, 16 (11): e0259530.
- [15] He C, Huang ZS, Yu CC, et al. Preventive electroacupuncture ameliorates D-galactose-induced Alzheimer's disease-like inflammation and memory deficits, probably via modulating the microbiota-gut-brain axis[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2021, 24 (3): 341–348.
- [16] 周平, 闫超群, 胡尚卿, 等. 针刺对主观认知下降人群认知功能的调节作用[J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2019, 18 (3): 169–173.
- [17] Jessen F, Amariglio RE, van Boxtel M, et al. A conceptual framework for research on subjective cognitive decline in preclinical Alzheimer's disease[J]. *Alzheimers Dement*, 2014, 10 (6): 844–852.
- [18] 姚燕, 杨芳, 王丽娟, 等. 蒙特利尔认知评估量表在轻度认知功能障碍诊断中的应用[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2012, 38 (4): 730–735.
- [19] 唐娟娟, 肖军. 蒙特利尔认知评估量表与简易精神状态量表在认知功能障碍筛查中的应用与比较[J]. *实用医院临床杂志*, 2011, 8 (2): 193–195.
- [20] Balsis S, Segal DL, Donahue C. Revising the personality disorder diagnostic criteria for the diagnostic and statistical manual of mental disorders-fifth edition (DSM- V): consider the later life context[J]. *Am J Orthopsychiatry*, 2009, 79 (4): 452–460.
- [21] Halkjær SI, Christensen AH, Lo BZS, et al. Faecal microbiota transplantation alters gut microbiota in patients with irritable bowel syndrome: results from a randomised, double-blind placebo-controlled study[J]. *Gut*, 2018, 67 (12): 2107–2115.
- [22] Craven L, Rahman A, Nair Parvathy S, et al. Allogenic fecal microbiota transplantation in patients with nonalcoholic fatty liver disease improves abnormal small intestinal permeability: A randomized control trial[J]. *Am J Gastroenterol*, 2020, 115 (7): 1055–1065.
- [23] Yan CQ, Zhou P, Wang X, et al. Efficacy and neural mechanism of acupuncture treatment in older adults with subjective cognitive decline: study protocol for a randomised controlled clinical trial[J]. *BMJ Open*, 2019, 9 (10): e028317.
- [24] Moradi E, Hallikainen I, Hänninen T, et al. Alzheimer's disease neuroimaging initiative. Rey's Auditory Verbal Learning Test scores can be predicted from whole brain MRI in Alzheimer's disease[J]. *Neuroimage Clin*, 2016, 13: 415–427.
- [25] Bowie CR, Harvey PD. Administration and interpretation of the Trail Making Test[J]. *Nat Protoc*, 2006, 1 (5): 2277–2281.
- [26] Yang L, Koyanagi A, Smith L, et al. Hand grip strength and cognitive function among elderly cancer survivors[J]. *PLoS One*, 2018, 13 (6): e0197909.
- [27] Rivera D, Perrin PB, Stevens LF, et al. Stroop color-word interference test: Normative data for the Latin American Spanish speaking adult population[J]. *NeuroRehabilitation*, 2015, 37 (4): 591–624.
- [28] Chen SP, Bhattacharya J, Pershing S. Association of vision loss with cognition in older adults[J]. *JAMA Ophthalmol*, 2017, 135 (9): 963–970.
- [29] Liu D, Duan S, Zhang J, et al. Aberrant brain regional homogeneity and functional connectivity in middle-aged T2DM patients: A resting-state functional mri study[J]. *Front Hum Neurosci*, 2016, 10: 490.
- [30] Leite KS, Miotto EC, Nitrini R, et al. Boston Naming Test (BNT) original, Brazilian adapted version and short forms: normative data for illiterate and low-educated older adults[J]. *Int Psychogeriatr*, 2017, 29 (5): 825–833.
- [31] Terwindt PW, Hubers AA, Giltay EJ et al. Screening for cognitive dysfunction in Huntington's disease with the clock drawing test[J]. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2016, 31 (9): 1013–1020.
- [32] Rami L, Mollica MA, García-Sánchez C, et al. The subjective cognitive decline questionnaire (SCD-Q): a validation study[J]. *J Alzheimers Dis*, 2014, 41 (2): 453–466.
- [33] Buysse DJ, Germain A, Moul DE, et al. Efficacy

- of brief behavioral treatment for chronic insomnia in older adults[J]. *Arch Intern Med*, 2011, 171 (10): 887–895.
- [34] Torosyan N, Mason K, Dahlbom M, et al. Value of FDG-PET scans of non-demented patients in predicting rates of future cognitive and functional decline[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2017, 44 (8): 1355–1363.
- [35] Barnes DE, Santos-Modesitt W, Poelke G, et al. The mental activity and exercise (MAX) trial: a randomized controlled trial to enhance cognitive function in older adults[J]. *JAMA Intern Med*, 2013, 173 (9): 797–804.
- [36] Ma L, Yang Y, Liu W, et al. Sodium butyrate supplementation impacts the gastrointestinal bacteria of dairy calves before weaning[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2023, 107 (10): 3291–3304.
- [37] Wang TQ, Li LR, Tan CX, et al. Effect of electroacupuncture on gut microbiota in participants with knee osteoarthritis[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 597431.
- [38] Sun WL, Li XY, Dou HY, et al. Myricetin supplementation decreases hepatic lipid synthesis and inflammation by modulating gut microbiota[J]. *Cell Rep*, 2021, 36 (9): 109641.
- [39] 李俊峰, 高兆虹, 陈英华. 血管性痴呆针刺实验研究进展 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2022, 42 (6): 764–768.
- [40] Qu L, Dong Z, Ma S, et al. Gut microbiome signatures are predictive of cognitive impairment in hypertension patients-a cohort study[J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 841614.
- [41] Cattaneo A, Cattane N, Galluzzi S, et al. Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly[J]. *Neurobiol Aging*, 2017, 49: 60–68.
- [42] Sahly H, Podschun R, Ullmann U. Klebsiella infections in the immunocompromised host[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2000, 479: 237–249.
- [43] Shen Y, Xu J, Li Z, et al. Analysis of gut microbiota diversity and auxiliary diagnosis as a biomarker in patients with schizophrenia: A cross-sectional study[J]. *Schizophr Res*, 2018, 197: 470–477.
- [44] Zhao Y, Lukiw WJ. Bacteroidetes neurotoxins and inflammatory neurodegeneration[J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55 (12): 9100–9107.
- [45] Guo M, Peng J, Huang X, et al. Gut microbiome features of chinese patients newly diagnosed with Alzheimer's disease or mild cognitive impairment[J]. *J Alzheimers Dis*, 2021, 80 (1): 299–310.
- [46] Zhuang ZQ, Shen LL, Li WW, et al. Gut microbiota is altered in patients with Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 63 (4): 1337–1346.
- [47] 孙晖, 张波, 钱海华, 等. 结直肠癌根治术后温针灸干预对患者免疫功能和肠道菌群的影响 [J]. *针刺研究*, 2021, 46 (7): 592–597.
- [48] Han Z, Li A, Pei L, et al. Milk replacer supplementation ameliorates growth performance and rumen microbiota of early-weaning yimeng black goats[J]. *Front Vet Sci*, 2020, 7: 572064.
- [49] 廖冬梅, 庞芳, 杨云昊, 等. 基于肠道菌群探讨电针对 APP/PS1 小鼠认知能力的改善机制 [J]. *中国病理生理杂志*, 2021, 37 (10): 1774–1783.
- [50] 聂玉婷, 高利. 基于肠道菌群失调探讨脑系疾病从脾胃论治 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39 (11): 1390–1394.
- (收稿: 2023-04-25 在线: 2023-09-28)
责任编辑: 赵芳芳