

● 实验研究 ●

杵针对 DPN 大鼠血清炎症因子及坐骨神经病理形态影响的实验研究*

王小艳¹, 黄亚玲², 王芳^{1,3,△}, 翁夕媚⁴, 林洋⁵, 王寒⁶

(1. 广安市中医医院, 四川 广安 638099; 2. 汕头大学医学院第一附属医院, 广东 汕头 515063; 3. 成都中医药大学附属医院, 四川 成都 610072; 4. 绵阳市中医医院, 四川 绵阳 621053; 5. 广安市人民医院, 四川 广安 638000; 6. 达州市中心医院, 四川 达州 635000)

摘要: 目的: 建立糖尿病周围神经病变 (DPN) 的大鼠实验动物模型, 研究杵针对 DPN 大鼠血清炎症因子水平和坐骨神经病理形态的影响, 从炎症的角度探讨杵针对 DPN 的神经保护机制。方法: 将 38 只 SD 雄性大鼠随机分为正常组 11 只和模型组 27 只。造模成功后通过计算机随机分组法, 将模型组剩余 24 只分为模型对照组 (8 只)、甲钴胺组 (8 只)、杵针组 (8 只), 正常组剩余 8 只大鼠为正常对照组。正常对照组和模型对照组分别给予正常饲料和高脂高糖饲料喂养, 不做任何干预措施; 甲钴胺组在模型对照组的基础上, 每日以甲钴胺片 0.25mg/kg 剂量溶于蒸馏水灌胃 1 次, 持续 4w; 杵针组在模型对照组的基础上, 持杵针奎星笔依次点叩至阳八阵、命门八阵, 持七曜混元杵以分理手法运行河车路命门至长强段, 每日一次, 每次共 30min, 连续干预 4w。实验期间观察并记录各组大鼠的一般状况; 干预期间每周测量大鼠体重、血糖; 实验前后测定大鼠足底热痛觉反应阈值 (PWT); 实验后取大鼠坐骨神经观察形态结构和取血标本检测各组大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1 含量。结果: 干预后, 杵针组、甲钴胺组与模型对照组比较, 大鼠 PWT 均显著降低 ($P<0.05$)、大鼠坐骨神经损害均明显减轻、大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1 水平均显著下降 ($P<0.05$)。结论: 杵针能明显改善坐骨神经病理形态结构, 降低血清炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1 水平, 表明杵针治疗 DPN 的有效性及抗炎效应。

关键词: 杵针; 糖尿病周围神经病变; 炎症因子; 病理形态学**中图分类号:** R 245.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3649 (2024) 12-0046-05

Experimental study of the effects of pestle on serum inflammatory factors and sciatic neuropathologic morphology in DPN rats/WANG Xiaoyan¹, HUANG Yaling², WANG Fang^{1,3}, et al// (1. Guang'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guang'an Sichuan 638300, China; 2. The First Affiliated Hospital of Shantou University School of Medicine, Shantou Guangdong 515000, China; 3. Hospital of Chengdu University of Tardtional Chinese Medicine, Chengdu Sichuan 610072, China)

Abstract: Objective: The experimental rats model of diabetic peripheral neuropathy (DPN) was established to study the effects of pestle treatment on serum inflammatory factors and sciatic neuropathologic morphology of DPN rats, and to explore the neuroprotective mechanism of pestle treatment on DPN from the perspective of inflammation. Methods: Thirty-eight SD male rats were randomly divided into the normal group ($n=11$) and the model group ($n=27$). After successful modeling, the remaining 24rats in the model group were randomly divided into model control group ($n=8$), mecobalamin group ($n=8$) and clubbing group ($n=8$). The remaining 8rats in the normal group were normal control group. Normal control group and model control group were given normal diet and high-fat and high-sugar diet, respectively, without any intervention measures. On the basis of the model control group, the mecobalamin group was gavaged with mecobalamin tablets (0.25mg/kg) dissolved in distilled water daily for 4weeks. In the pestle group, on the basis of the intervention in the model control group, the Kuixing pen of pestle was used to tap Zhiyang eight array and Mingmen eight array in turn, and the Qiya Huanyuan Chu was used to run the Heche Road of Mingmen to Changqiang section, once a day, for 30min each time. The intervention lasted for 4weeks. During the experiment to observe and record each rat's general condition, body weight and blood glucose were measured weekly during the intervention period. PWT was measured before and after the experiment. After the experiment, the morphological structure of sciatic nerve was observed and the serum levels of TNF- α , IL-1 β and MCP-1were detected. Results: After intervention, the PWT of the pestle group and the mecobalamin group was significantly lower than that of the model control group ($P<0.05$), sciatic nerve damage was significantly reduced, and the serum levels of TNF- α , IL-1 β and MCP-1were significantly decreased ($P<0.05$). Conclusion: The pestle therapy can obviously improve the pathological morphology of sciatic nerve, and significantly reduce the levels of serum inflammatory factors TNF- α , IL-1 β and MCP-1. The results indicate that pestle therapy is effective in treating DPN and has anti-inflammatory effect.

Keywords: Pestle needle; Diabetic peripheral neuropathy; Inflammatory factors; Pathomorphology

糖尿病周围神经病变 (Diabetic Peripheral Neuropathy, DPN) 是糖尿病 (Diabetes Mellitus, DM) 最常见的慢性并发症之一, 其患病率占比高达 47%~90%, 可发生于各个年龄组^[1-2]。DPN 起病隐匿, 其临床表现复杂, 典型表现为四肢手套或袜套样的异常感觉, 在疾病后期甚至发生感觉消失, 还可

产生焦虑、抑郁等负性情绪, 严重降低患者的生活质量^[3-4]。本课题组前期临床研究^[5-6]已初步证实, 杵针治疗可通过增强机体抗氧化能力, 增加神经传导速度, 从而改善 DPN 患者肢体凉、麻、痛等症状。但目前 DPN 的发生机制尚不完全明确, 其中炎症机制贯穿始终, 也是 DPN 重要的发病机制之一^[7]。研究

* 基金项目: 四川省中医药管理局科学技术研究专项课题 (编号: 2023MS502、2023MS466)。第一作者: 王小艳, 女, 本科, 副主任护师, 研究方向: 中西医结合临床护理, E-mail: 1146808862@qq.com。△通讯作者: 王芳, 女, 学士, 硕士研究生导师, 主任护师, 研究方向: 中西医结合临床护理, E-mail: 1697070757@qq.com。

表明, DPN 患者血液循环中的细胞因子、趋化因子、黏附因子等炎性标志物水平明显升高, 导致其周围神经和血管缺血缺氧、功能受损, 从而减慢神经传导速度和发生异常感觉^[8-9]。以往研究^[10-11]表明杵针疗法对急性哮喘、急性乳腺炎患者具有一定的抗炎作用, 但尚无文献报道杵针治疗对 DPN 炎症反应的影响。因此, 为进一步探索杵针治疗 DPN 的炎症效应作用机制以及对 DPN 周围神经结构的影响, 本研究拟采用适合代谢性疾病研究的 SD (Sprague-Dawley, SD) 大鼠作为载体, 建立 DPN 大鼠模型, 通过观测大鼠的神经生理指标、炎症因子水平及坐骨神经病理结构, 探究杵针对 DPN 大鼠的疗效、对坐骨神经的实质改变及可能的炎症作用机制, 为临床推广应用杵针治疗 DPN 提供科学的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 38 只 3~8w 龄无特定病原体 (Specific Pathogen Free, SPF) 级雄性 SD 大鼠, 体重 150g~170g, 购于成都达硕动物实验有限公司 (许可证号: SCXK (川) 2019~028)。所有大鼠饲养于 SPF 级实验动物中心, 环境温度 18℃~22℃, 湿度 50%~60%, 实验室内分笼饲养, 每日更换垫料、饲料及饮水。按照抽签法, 将 38 只 SD 大鼠分为正常组 11 只和模型组 27 只。每组各随机取 3 只用于检验造模是否成功。造模成功后, 利用计算机随机分组法, 将模型组剩余的 24 只大鼠分入模型对照组、甲钴胺组、杵针组, 每组 8 只大鼠; 正常组剩余的 8 只大鼠进入正常对照组。在实验干预过程中, 由于灌胃操作不当, 甲钴胺组一只大鼠死亡, 最终共 31 只 SD 大鼠完成实验。本实验获成都中医药大学附属广安医院伦理委员会审批通过 (编号: 2022KL-09)。

1.2 主要试剂与仪器 甲钴胺片, 卫材药业有限公司; 链脲佐菌素 (Streptozotocin, STZ), 北京邦定泰克生物制药有限公司; 10% 中性甲醛固定液, 南昌雨露实验器材有限公司; 10% 水合氯醛, 福建飞净生物科技有限公司。杵针, 成都市诚信康医疗器械有限公司; 血糖仪及配套试纸, 广州百济新特药业连锁有限公司; 智能热板测痛仪, 南京卡尔文生物科技有限公司; 酶标仪, 美谷分子仪器有限公司; 转轮式切片机, 德国莱卡; 数字切片扫描仪 (Pannoramic 250, 3DHISTECH (Hungary)); 普通光学显微镜, 重庆光电仪器有限公司; 大鼠白介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、单核细胞趋化因子蛋白-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1, MCP-1)、肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α) 酶联免疫吸附法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 试剂盒, 上海苗彩生物科技有限公司。

1.3 DPN 大鼠模型制备 采用饮食诱导结合 STZ 腹腔注射法制备 DPN 大鼠模型。首先予以普通饲料、自由进食和饮水适应性喂养 38 只 SD 雄性大鼠。1 周后, 将大鼠分为正常组和模型组, 分别予普通饲料和高脂高糖饲料继续饲喂。4w 后, 所有大鼠禁食不禁水 12 小时, 模型组大鼠以 32mg/kg 剂量于左下腹腹腔内单次注射 1% STZ 溶液 (由 PH4.5 的 0.1mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制) 诱导 DM 发生, 正常组的大鼠于左下腹腹腔内单次注射相同剂量的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液进行对照。48 小时后测定所有大鼠尾尖随机血糖, 血糖数值大于 16.7mmol/L^[12] 者为 DM 大鼠造模成功, 如未达标, 再给予小剂量 STZ 溶液腹腔注射。血糖达标者继续上述喂养 8 周待神经病变发生, 8 周后测量所有大鼠的 PWT, 而后在正常组和模型组中利用抽签法各随机抽取 3 只大鼠, 取坐骨神经进行苏木精-伊红 (Hematoxylin-Eosin, HE) 染色, 结合实验数据验证模型是否建立成功。模型制备过程中无大鼠死亡。

1.4 干预方法 (1) 正常对照组: 普通饲料喂养, 自由饮水及进食, 不给予任何干预措施; (2) 模型对照组: 高脂高糖饲料喂养, 自由饮水及进食, 不给予任何干预措施; (3) 甲钴胺组: 在模型对照组的基础上, 每日以甲钴胺片 0.25mg/kg 的剂量 (相当于成人剂量 10 倍, 成人体重按 60kg 体重计) 溶于蒸馏水灌胃 1 次, 药液现配现用, 持续给药 4 周; (4) 杵针组:

在模型对照组的基础上, 持杵针奎星笔, 用钝锥头以一定的力量依次点叩至阳八阵、命门八阵, 持七曜混元杵针以分理手法运行河车命强段 (命门穴至长强穴)。具体操作: 穴位定位后用马克笔标记位置; 使大鼠头朝前, 身体呈自然匍匐状态, 施杵者一手以食指和中指轻夹住大鼠的脖颈, 手掌轻扶固定大鼠身体, 另一手持杵针在背部施杵。施杵顺序依次为: 点叩至阳八阵-点叩命门八阵-分理河车路, 每个部位施杵 10min。要求针尖力度达肌肉层组织, 点叩时针尖垂直于皮肤表面, 力度适中、匀速进行, 频率约为 80~100 次/min, 作分理手法时针尖与皮肤呈约 45°~60°角度, 适当控制力度, 频率约为 60~80 次/min, 以大鼠不出现剧烈挣扎、皮肤潮红温热为宜。每日施杵一次, 每次共 30min, 连续干预 4 周。

1.5 实验指标 (1) 一般情况、体重、血糖: 每周观察并记录大鼠的毛发、摄食量、饮水量、尿量、精神状态及日常活动情况; 注射 STZ 之前、注射 STZ 4 周后、注射 STZ 8 周后和干预期间每周称取每只大鼠的体重; 干预期间每周五上午 9:00 采尾尖静脉血测量血糖, 测取干预期间 0~4 周大鼠血糖。(2) 足底热痛觉反应阈值 (PWT): 在干预前与干预结束后, 利用智能恒温热板仪测取各组大鼠 PWT: 将热板加热至恒温 55℃, 让大鼠的足底接触热板, 开始计时, 密切观察大鼠行为, 当出现明显的抬后足和舔舐后足动作, 立即踩下踏板暂停计时, 并快速使大鼠离开热板, 随后记录时间 t, 若 t 超过 25s 大鼠仍没有抬足表现, 要及时终止热刺激以免造成大鼠足部组织损伤。每只大鼠重复测量 3 次, 每次至少间隔 20min, 取 3 次的平均值作为大鼠的 PWT。(3) 坐骨神经组织病理形态 (Paw Withdrawal Threshold, PWT): 干预结束后, 取各组大鼠坐骨神经固定于 10% 中性甲醛溶液, 进行脱水、石蜡包埋、切片, 随后将切片脱蜡至水, 经过苏木精染色、自来水冲洗、盐酸酒精分化、返蓝、伊红染色、梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树胶封固, 完成 HE 染色过程, 于数字切片扫描仪下观察坐骨神经组织形态并进行图像采集。(4) 血清 TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1 水平: 干预结束后, 采用 ELISA 测定各组大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 和 MCP-1 含量, 具体操作如下: 血液离心后取上层清液, 在空白孔、标准品孔和待测样品孔分别加入相应样品, 盖上封板膜, 轻轻振荡混匀, 37℃ 温育 60min, 而后弃去液体, 甩干, 重复洗涤 5 次, 再依次加入底物液显色 15min, 最后终止反应。在 15min 内, 450nm 波长依序测量各孔的吸光度, 通过计算得出样品的实际浓度。

1.6 统计学方法 本研究采用 IBM SPSS Statistics 26.0 软件进行统计分析。计量资料采用表示, 两组比较采用独立样本 t 检验, 多组比较采用单因素方差分析, 资料满足方差齐性采用最小显著性差异法 (Least Significant Difference, LSD) 分析, 若不满足方差齐性, 采用 Tamhane's T2 检验, 统计结果以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 大鼠一般状况的比较 注射 STZ 之后, 模型组大鼠精神状态变差, 易激惹, 出现严重的多饮、多食、多尿现象, 排便次数增加、大便秘结改变, 毛色暗黄无光泽、脱落严重, 行动迟缓, 活动量减少; 干预期间, 杵针组大鼠较模型对照组大鼠进食饮水量、尿量有所减少, 精神状态逐渐恢复良好, 活动量增加, 情绪稳定, 不易激惹, 毛发有光泽, 脱落减少, 大便形态恢复正常, 甲钴胺组一般状态不及杵针组大鼠, 但优于模型对照组大鼠。

2.2 大鼠体重水平的比较 注射 STZ 之前, 模型组大鼠体重显著高于正常组大鼠体重 ($P < 0.01$); 注射 STZ 4 周之后, 模型组与正常组大鼠体重无明显差异 ($P > 0.05$); 注射 STZ 8 周后, 模型组大鼠体重显著低于正常组大鼠体重 ($P < 0.01$); 干预前, 模型对照组、甲钴胺组、杵针组较正常对照组大鼠体重明显降低 ($P < 0.01$); 干预 3 周后、干预 4 周后, 杵针组较模型对照组大鼠体重显著增加 ($P < 0.05$)。

表 1 干预期间体重变化情况(g, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	干预前	干预 1 周后	干预 2 周后	干预 3 周后	干预 4 周后
正常对照组	8	555.19±27.39	557.06±45.10	566.38±42.91	574.44±40.13	585.81±41.50
模型对照组	8	407.25±38.16**	402.00±42.84**	395.69±44.68**	381.00±35.44**	375.18±37.33**
甲钴胺组	7	405.13±50.93**	404.13±67.65**	412.07±71.20**	415.00±71.50**	420.14±71.70**
杵针组	8	417.25±42.38**	418.81±52.18**	431.81±44.55**	433.81±47.26** [#]	439.56±42.16** [#]

注：与正常对照组相比，** $P<0.01$ 。与模型对照组相比，[#] $P<0.05$

2.3 大鼠血糖水平的比较 干预前，模型对照组、甲钴胺组、杵针组较正常对照组大鼠血糖水平明显升高（ $P<0.01$ ）；干预

期间，杵针组大鼠血糖水平较模型对照组有降低的趋势，但不存在统计学意义（ $P>0.05$ ）。

表 2 干预期间血糖变化情况(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	干预前	干预 1 周后	干预 2 周后	干预 3 周后	干预 4 周后
正常对照组	8	6.28±0.58	6.21±0.45	5.93±0.31	5.94±0.52	6.05±0.59
模型对照组	8	28.90±4.67**	27.49±4.01**	29.43±2.28**	30.34±1.74**	30.45±2.64**
甲钴胺组	7	28.48±3.17**	28.65±3.85**	27.57±4.80**	27.67±3.00**	28.10±4.11**
杵针组	8	29.01±2.34**	27.81±3.68**	26.99±4.26**	25.38±4.53**	25.19±4.58**

注：与正常对照组相比，** $P<0.01$

2.4 PWT 的比较 在实验干预之前，模型对照组、甲钴胺组以及杵针组大鼠的 PWT 水平均显著高于正常对照组大鼠（ $P<0.01$ ），而三组间无明显差异。实验干预 4 周以后，杵针组与甲钴胺组大鼠 PWT 显著低于模型对照组大鼠 PWT（ $P<0.05$ ）。

表 3 各组大鼠 PWT 比较(s, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	干预前	干预后
正常对照组	8	7.43±1.27	6.69±1.14
模型对照组	8	12.83±3.58**	15.49±4.25**
甲钴胺组	7	12.69±2.24**	9.37±2.79 [#]
杵针组	8	11.41±1.82**	9.20±3.70 [#]

注：与正常对照组相比，** $P<0.01$ 。与模型对照组相比，[#] $P<0.05$

2.5 大鼠坐骨神经病理形态学的比较 由病理切片 HE 染色可见，正常对照组（图 1）坐骨神经纤维排列密集、均匀、有序、成束排列，各轴突表面神经内膜轮廓清晰，轴突染色较浅，周围髓鞘呈空网状，部分区域藕样结构的郎飞结明显，雪旺细胞及纤维细胞轮廓清晰；与正常对照组相比，模型对照组（图 2）大鼠坐骨神经形态有明显损害改变，坐骨神经结构疏松，神经纤维排列杂乱不均匀，部分神经纤维脱髓鞘，局部神经纤维变性坏死，见神经纤维溶解，神经纤维结构完全消失，轴突不同程度断裂，轴索肿胀明显，雪旺细胞减少；甲钴胺组（图 3）、杵针组（图 4）与模型对照组相比，大鼠坐骨神经损害明显减轻，神经纤维排列较为紧凑规则，神经纤维坏死减少，肿胀减轻。

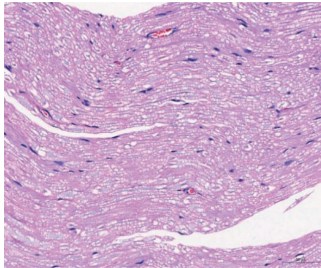


图 1 正常对照组 HE×400

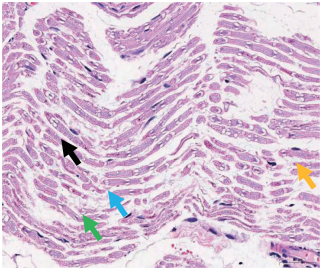


图 2 模型对照组 HE×400
(神经肿胀↑ 坏死↑ 轴突断裂↑ 雪旺细胞减少↑)

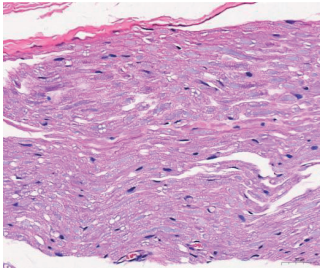


图 3 甲钴胺组 HE×400

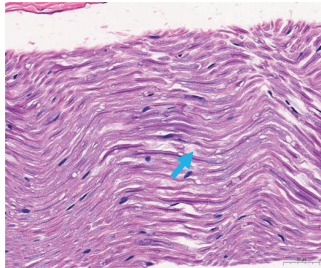


图 4 杵针组 HE×400
(轴突断裂↑)

2.6 大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1 水平的比较 经过 4 周的干预，模型对照组、甲钴胺组、杵针组与正常对照组比较，大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1 含量有不同程度的升高，其中以模型对照组最为显著（ $P<0.01$ ），甲钴胺组与杵针组较模型对照组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1 水平均显著下降（ $P<0.05$ ）。

表 4 各组大鼠血清炎症因子水平比较(pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF- α	IL-1 β	MCP-1
正常对照组	8	39.03±7.49	1.93±0.54	17.90±4.62
模型对照组	8	55.28±7.63**	3.26±0.50**	25.11±5.80**
甲钴胺组	7	45.90±8.48 [#]	2.58±0.40 [#]	19.45±5.42 [#]
杵针组	8	46.85±5.24 [#]	2.54±0.73 [#]	19.42±4.62 [#]

注：与正常对照组相比，* $P<0.05$ ；与正常对照组相比，** $P<0.01$ 。

与模型对照组相比，[#] $P<0.05$

3 讨论

目前多数医家认为 DPN 是在消渴病的基础上发展而来，主要归属于“痹证”、“痿证”等范畴。杵针疗法结合了易经和中医学内涵，以“经脉所过，主治所及”、“腧穴所在，主治所在”等原则，作用于体表皮肤、筋肉，可以达到疏理气机、调和脏腑、通痹止痛、调节全身气血阴阳的作用^[13]。本研究针对 DPN 的病因病机，选取位于“阳脉之海”督脉之上的至阳穴、命门穴、长强穴，作用于至阳八阵、命门八阵、河车命强段，可以提升周身阳气，温煦经脉，活血化瘀，调畅脏腑气机，推动气血顺行。在实验干预之前，各模型组大鼠的血糖值较正常对照组显著增高且无自然改善的情况，说明 32mg/kg 的 STZ 剂量适合 DPN 大鼠模型的建立，也满足实验进行的条件。大鼠经注射 STZ 8 周后，与正常对照组相比，其余 3 组大鼠体重水平、血糖水平、PWT 均显著升高，结合坐骨神经 HE 染色观察到明显的神经损伤，说明在持续高血糖 8 周后 DPN 大鼠造模成功。在干预后，杵针组大鼠进食量、饮水量以及尿量相较于模型对

照组有所减少,毛色较白有一定光泽,精神状态由于干预前的低落逐渐恢复生机,活动量增加,整体状况较甲钴胺组和模型对照组更好,说明杵针治疗能够改善 DPN 大鼠的一般状态和糖尿病相关症状;且研究结果表明,杵针治疗能有效改善 DPN 大鼠体重减轻的状态,以及其具有一定的降血糖作用。

3.1 杵针疗法可降低 DPN 大鼠 PWT,并改善坐骨形态结构 本实验经过 4 周干预后,杵针组和甲钴胺组大鼠的 PWT 较模型对照组大鼠 PWT 显著降低 ($P<0.05$),而与正常对照组无显著差异 ($P>0.05$),表明杵针治疗同甲钴胺药物治疗均能够有效改善大鼠热痛感觉迟钝的现象,增强大鼠对疼痛的反应能力,提升了神经的感觉功能,但两者作用机制可能不尽相同。甲钴胺降低 DPN 大鼠的 PWT 可能与其营养修复神经作用有关^[14]。杵针疗法降低 PWT 的原理可能与降低机体炎症因子水平有关,此前有研究证实了炎症因子的升高与 DM 前期患者早期电生理功能障碍相关^[15]。且也有动物实验^[16-17]表明, TNF- α 、IL 等炎症因子的降低,常常伴随有 DPN 大鼠感觉神经和运动神经传导速度的提升,这与本研究结果高度一致。此外,也有临床研究^[18]表明,杵针联合微波治疗较单独微波治疗能够显著降低腰椎间盘突出症患者的血清去甲肾上腺素、多巴胺、5-羟色胺、P 物质等疼痛介质水平。因此,杵针治疗能够降低 DPN 大鼠 PWT 的原因也可能与血清疼痛介质的减少有关,有待今后深入探究。另一方面,经过 4 周的干预治疗后,杵针组与甲钴胺组大鼠坐骨神经纤维总体损伤状况较模型对照组更好,说明杵针治疗可以明显改善 DPN 大鼠坐骨神经形态结构。本研究证明了干预前 DPN 模型大鼠血清炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1 水平显著升高,表明炎症因子在 DPN 的神经损害中发挥着重要作用,与以往研究^[19]结果一致。经干预后杵针组大鼠血清中各炎症因子水平显著降低,由于炎症与神经损害之间关系密切,由此本研究推测杵针可能是通过降低炎症反应,从而改善大鼠坐骨神经病理结构,发挥了神经保护作用。

3.2 杵针治疗 DPN 可能的抗炎机制探讨 本研究结果显示,杵针治疗能够显著降低 DPN 大鼠血清炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 MCP-1 水平 ($P<0.05$),发挥了抗炎效应。TNF- α 是免疫细胞激活后分泌的一种炎症因子,在 DPN 患者中被激活并保持高水平状态^[20]; IL-1 β 是参与 DM 炎症反应的关键促炎细胞因子,与神经性疼痛也密切相关^[21]; MCP-1 是重要的炎症趋化刺激因子,其水平的上调被认为是 DPN 疼痛早期诊断的潜在生物标志物^[22]。降低上述炎症因子水平可以明显改善 DPN 相关症状,减轻神经纤维损伤。杵针疗法能起到抗炎的作用,这与以往的一些研究^[11,23]结果相似,但其抗炎的具体机制尚未深入探究。杵针兼有针刺与按摩的功效,或许可以从这二者的抗炎机制中窥见杵针的抗炎作用机制。研究^[24]表明,针刺在治疗 DPN 过程中,可以通过抑制核因子- κ B (NF- κ B)、p38MAPK、细胞外信号调节激酶 (ERK)、c-Jun 氨基端激酶和胆碱能等抗炎通路降低炎症因子水平,从而减轻神经损害。推拿按摩手法同样能起到降低炎症因子水平、减轻炎症浸润、缓解疼痛的作用,可降低肌肉组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和 NF- κ B 的含量,从而减轻炎症反应^[25]。推拿按摩在 DPN 炎症方面的探究尚不足,但有动物研究^[26]表明按摩可以提升 DPN 大鼠坐骨神经中超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD) 含量、降低丙二醛表达,发挥出抗氧化应激作用。追溯炎症信号通路,近年来研究^[27]发现,多种非编码 RNA 参与到 DPN 炎症通路的表达中,例如 miR-146a、miR-155、miR-221、miR-590~3p-agomir、miR-133a-3p、lncRNA BC168687 等基因,通过利用这些非编码 RNA 的类似物和抑制剂可以有效抑制 DPN 的发生发展,为 DPN 的早期诊断和治疗提供新的策略。因此,可基于以上相关机制深入探究杵针治疗 DPN 的具体抗炎途径,更好地阐释杵针疗法的科学性,推动国家非物质文化遗产的弘扬与发展,为更多的患者提供一种促进健康的新技术。

综上所述,杵针疗法能通过降低机体炎症反应起到治疗 DPN 的作用,这一发现可为临床推广实施杵针治疗 DPN 提供有

力的科学依据。但是基于实验时间以及实验条件不足等原因,本次实验存在一些问题,需要在以后的研究中进一步改善,如通过中医临床证型特点探索 DPN 动物分型的造模方法优化造模方案、延长干预时间以更好的体现杵针的长期治疗效果等,未来研究可通过关注炎症信号通路上下游炎症介质进行纵向研究设计,探究杵针治疗 DPN 的具体抗炎作用机制。

参考文献

- [1] Furukawa S, Sakai T, Niiya T, *et al.* Diabetic peripheral neuropathy and prevalence of erectile dysfunction in Japanese patients aged < 65years with type 2diabetes mellitus: The Dogo Study [J]. International Journal of Impotence Research, 2017, 29 (1): 30-34.
- [2] Tesfaye S, Selvarajah D. Advances in the epidemiology, pathogenesis and management of diabetic peripheral neuropathy [J]. Diabetes/Metabolism Research and Reviews, 2012, 28Suppl 1: 8-14.
- [3] 甘兆义,李春妮,韦雄丽,等. 糖尿病周围神经病变的早期诊断及治疗进展 [J]. 中国卫生标准管理, 2023, 14 (11): 194-198.
- [4] 魏凯善. 2 型糖尿病性周围神经病变共病焦虑、抑郁状态及其中医证型、体质的相关研究 [D]. 成都中医药大学, 2020.
- [5] 王宇. 杵针干预糖尿病高危足周围神经病变的临床效果研究 [D]. 成都中医药大学, 2019.
- [6] 王芳,杨慧,廖顺琪,等. 杵针对糖尿病周围神经病变 Keap1/Nrf2/ARE 通路及氧化应激的影响研究 [J]. 海南医学院学报, 2022, 28 (06): 425-429.
- [7] 程凯倩,朱钊,吴敏. 痛性糖尿病周围神经病变的研究进展 [J]. 神经损伤与功能重建, 2023, 18 (09): 539-542.
- [8] 张桐毓,杨传慧,徐宁. 糖尿病周围神经病变炎症因子变化及与神经传导速度相关性 [J]. 河北医科大学学报, 2023, 44 (05): 517-520+571.
- [9] 魏薇,赵湜,吕晓玉,等. 糖尿病周围神经病变与炎症因子的相关性分析 [J]. 中国糖尿病杂志, 2020, 28 (05): 326-330.
- [10] 徐志微,金红露,李彬彬,等. 杵针疗法治疗哮喘急性期寒哮证 47 例观察 [J]. 浙江中医杂志, 2020, 55 (04): 290-291.
- [11] 陈府芳,张方璐. 杵针联合手法通乳在哺乳期急性乳腺炎中的应用效果分析 [J]. 中国妇幼保健, 2022, 37 (15): 2905-2908.
- [12] Shi X, Chen Y, Nadeem L, *et al.* Beneficial effect of TNF- α inhibition on diabetic peripheral neuropathy [J]. Journal of Neuroinflammation, 2013, 10: 69.
- [13] 申治富,余思奕,胡幼平. 杵针疗法的理论及临床运用 [J]. 上海针灸杂志, 2015, 34 (06): 575-578.
- [14] 赵超群. 甲钴胺联合 α -硫辛酸治疗糖尿病周围神经病变对神经电生理的影响与相关机制研究 [J]. 中国现代药物应用, 2023, 17 (09): 131-134.
- [15] Tiftikcioglu B I, Duksal T, Bilgin S, *et al.* Association between the Levels of IL-6, sE-Selectin and Distal Sensory Nerve Conduction Studies in Patients with Prediabetes [J]. European Neurology, 2016, 75 (3~4): 124-131.
- [16] 吴丽娜,范晓萌,武爽,等. 人参皂苷 Rg1 调节氧化应激和炎症因子表达改善糖尿病大鼠周围神经损伤 [J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37 (04): 486-491.
- [17] 白惠中,秦灵灵,张亚奇,等. 糖痹康颗粒调控 AMPK/NF- κ B 通路改善糖尿病大鼠坐骨神经炎症反应 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29 (09): 91-98.
- [18] 仇贵龙,张正松,樊效鸿. 杵针联合微波治疗对腰椎间盘突出症血清疼痛介质的影响 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19 (78): 142-143.
- [19] 王喆. 糖尿病周围神经病变与炎症因子的关系研究 [J]. 实用糖尿病杂志, 2020, 16 (6): 89-90.
- [20] González-Clemente J M, Mauricio D, Richart C, *et al.* Diabetic neuropathy is associated with activation of the TNF- α system in subjects with type 1diabetes mellitus [J]. Clinical Endocrinology, 2005, 63 (5): 525-529.
- [21] Zelenka M, Schäfers M, Sommer C. Intraneural injection of interleukin-1beta and tumor necrosis factor- α into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain [J]. Pain, 2005, 116 (3): 257-263.

基于“从肝论治”研究电针肝经腧穴对 DOR
模型大鼠卵巢储备功能机制*黄丽, 杨孝芳, 陈兰县, 陈可欣, 陈皖倩, 杨志虹[△], 刘佳敏

(贵州中医药大学针灸推拿学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 目的: 观察电针肝经腧穴对卵巢储备功能下降 (diminished ovarian reserve, DOR) 模型大鼠性激素水平的影响, 探讨电针肝经腧穴通过调控 Smad2、smad3 蛋白表达水平影响 TGF- β 1 分泌治疗 DOR 的作用与机制。方法: 将 32 只清洁级 SD 雌性大鼠随机分为空白组、模型组、肝经组、非经非穴组, 每组 8 只。采用腹腔注射环磷酰胺 (CTX) 建立 DOR 大鼠模型。肝经组取“曲泉穴”、“太冲穴”、“急脉穴”、“蠡沟穴”电针治疗, 非经非穴组取四个非经非穴点电针治疗, 隔日 1 次, 每周 3 次, 共治疗 3 周。治疗结束后, 观察大鼠一般情况; HE 染色观察大鼠动情周期变化; 酶联免疫吸附剂测定法 (ELISA 法) 检测血清中雌二醇 (E2)、促卵泡生成素 (FSH)、促黄体生成素 (LH)、抗缪勒激素 (AMH) 水平; 蛋白质印迹 (Western Blot) 检测大鼠卵巢组织 TGF- β 1、Smad2、smad3 蛋白表达。结果: 与空白组相比, 模型组大鼠体重减少, 行为习惯异常, 动情周期不同程度延长及紊乱, E2、AMH 水平明显降低 ($P < 0.01$), FSH、LH 水平升高 ($P < 0.01$), TGF- β 1、Smad2、smad3 蛋白表达水平显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 肝经组大鼠体重、活动恢复, 动情周期规律, 血清 E2、AMH 水平升高 ($P < 0.01$), FSH、LH 水平下降 ($P < 0.01$), TGF- β 1、Smad2、smad3 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$), 非经非穴组大鼠异常表现均减轻, 动情周期紊乱率降低, E2、AMH 水平升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), FSH、LH 含量下降 ($P < 0.05$); 与非经非穴组相比, 肝经组大鼠动情周期规律, E2、AMH 水平升高 ($P < 0.05$), FSH、LH 水平下降 ($P < 0.05$), TGF- β 1、Smad2、smad3 蛋白表达水平强表达且显著升高 ($P < 0.01$)。结论: 电针肝经腧穴能够改善 DOR 大鼠卵巢储备功能, 其机制可能与调控 TGF- β 1 及 Smad2、3 蛋白的表达有关。

关键词: 电针; 肝经; 卵巢储备功能下降; TGF- β 1; smad2、3

中图分类号: R 245.9⁺7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3649 (2024) 12-0050-04

Study on the mechanism of ovarian reserve function of electroacupuncture at acupoints of liver meridian in DOR model rats based on “treatment from the liver” /HUANG Li, YANG Xiaofang, CHEN Lanxian, et al// (Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang Guizhou 550025, China)

Abstract: Objective: To observe the effect of electroacupuncture at acupoints of liver meridian on the level of sex hormones in rats with decreased ovarian reserve function (diminished ovarian reserve, DOR), and to explore the effect and mechanism of electroacupuncture at acupoints of liver meridian on the secretion of TGF- β 1 in the treatment of DOR by regulating the expression of Smad2 and Smad3 protein. Methods: 32 clean female SD rats were randomly divided into blank group ($n=8$), model group ($n=8$), liver meridian group ($n=8$) and non-acupoint group ($n=8$). The rat model of DOR was established by intraperitoneal injection of cyclophosphamide (CTX). The liver meridian group was treated with electroacupuncture at “Ququan acupoint”, “Taichong acupoint”, “Jimai acupoint” and “Ligou acupoint”, and the non-meridian non-acupoint group was treated with electroacupuncture at non-meridian and non-acupoints, once every other day, 3 times a week for 3 weeks. After treatment, the general condition of rats was observed, the estrous cycle of rats was observed by HE staining, the levels of estradiol (E2), follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH) and anti-Müllerian hormone (AMH) in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the protein expressions of TGF- β 1, Smad2 and Smad3 in rat ovary were detected by western blot. Results: Compared with the blank group, the body weight of the model group was decreased, the behavior habit was abnormal, the estrous cycle was prolonged and disordered in varying degrees, the levels of E2 and AMH were significantly decreased, the levels of FSH and LH were increased, and the protein expression levels of TGF- β 1, Smad2 and Smad3 were significantly decreased in the model group. Compared with the model group, the body weight, activity, estrous cycle regularity, serum E2 and AMH levels increased, FSH and LH levels decreased, TGF- β 1, Smad2 and Smad3 protein expression increased significantly in the liver meridian group. The abnormal performance, estrous cycle disorder rate and estrous cycle disorder rate were alleviated in the non-acupoint group ($P < 0.01$). The contents of FSH and LH decreased. Compared with the non-acupoint group, the estrous cycle of rats in the liver meridian group was regular, the levels of E2 and AMH were increased, the levels of FSH and LH were decreased, and the protein expressions of TGF- β 1, Smad2 and Smad3 were strongly ex-

* 基金项目: 国家重点研发项目 (编号: 2019YFC1709104), 贵州中医药大学学术新苗 (贵科合学术新苗 [2023] -44 号), 贵州中医药大学大学生创新创业训练计划项目 (贵中医大创合字 (2021) 62 号)。第一作者: 黄丽, 硕士研究生在读, 研究方向: 针灸治疗心脑血管疾病及盆底病临床及机制研究, E-mail: 3509576386@qq.com。[△] 通讯作者: 杨志虹, 硕士, 硕士生导师, 高级实验师, 研究方向: 针灸治疗心脑血管疾病及盆底病临床及机制研究, E-mail: yangmiss1115@163.com。

- [22] Chatterjee P, Srivastava A K, Kumar D A, et al. Effect of deep tissue laser therapy treatment on peripheral neuropathic pain in older adults with type 2 diabetes: a pilot randomized clinical trial [J]. BMC Geriatrics, 2019, 19 (1): 218.
- [23] 孙剑峰, 邓建伟, 张迪, 等. 通络活血酊联合杵针治疗血瘀气滞型腰椎间盘突出症的疗效 [J]. 实用医学杂志, 2022, 38 (9): 1147-1151.
- [24] 舒文, 张倩, 冉津川, 等. 针灸调节炎症介质对糖尿病周围神经病变影响的研究进展 [J]. 中国中医药科技, 2020, 27 (02): 331-334.
- [25] 薛惠天, 王兰兰, 孙梦龙, 等. 推拿手法对骨骼肌损伤修复炎症因子的影响综述 [J]. 亚太传统医药, 2023, 19 (4): 247-251.
- [26] 尚坤, 刘明军, 陈飞腾, 等. 传统推拿“束挽疗法”对糖尿病周围神经病变大鼠坐骨神经传导速度、超氧化物歧化酶、丙二醛表达的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2018, 38 (6): 1451-1453.
- [27] 刘涛, 何志军, 李金鹏, 等. 糖尿病神经病变过程中非编码 RNA 的作用及机制 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28 (07): 1124-1129.

(收稿日期 2024-03-04)