

·针灸推拿·

本文引用: 林巧婷, 钟叶蓓, 杨尚林, 裴鑫, 杨小慧, 李铁浪, 李武. 基于 $\alpha 7nAChR/NF-\kappa B$ 通路研究点按脾俞、胃俞穴对缓解慢性疲劳综合征大鼠外周炎症的效应机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(6): 1027-1033.

## 基于 $\alpha 7nAChR/NF-\kappa B$ 通路研究点按脾俞、胃俞穴对缓解慢性疲劳综合征大鼠外周炎症的效应机制

林巧婷, 钟叶蓓, 杨尚林, 裴鑫, 杨小慧, 李铁浪\*, 李武\*

湖南中医药大学针灸推拿与康复学院, 湖南长沙 410208

**[摘要]** 目的 观察点按脾俞、胃俞穴对慢性疲劳综合征(chronic fatigue syndrome, CFS)模型大鼠疲劳状态、运动行为、外周炎症及 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体( $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor,  $\alpha 7nAChR$ )/核因子 $\kappa B$ (nuclear factor- $\kappa B$ ,  $NF-\kappa B$ )信号表达的影响,探讨点按脾俞、胃俞穴对缓解CFS大鼠外周炎症的效应机制。方法 先将32只SD大鼠随机分为空白组(8只)和造模组(24只)。造模组采用强迫负重游泳联合慢性应激刺激的方法建立CFS大鼠模型。造模成功后,将造模组大鼠随机分为模型组、点按组、 $\alpha 7nAChR$ 激动剂组,每组8只。空白组、模型组予腹腔注射等体积生理盐水;点按组以自制按法刺激仪点按双侧脾俞、胃俞穴,20 min/次,并予腹腔注射等体积生理盐水; $\alpha 7nAChR$ 激动剂组予腹腔注射 $\alpha 7nAChR$ 激动剂PNU-282987(每次2.4 mg/kg)。每组每日干预1次,连续14 d。记录各组大鼠一般情况半定量评分、力竭游泳时间和旷场实验运动距离;计算大鼠脾脏指数和胸腺指数;采用ELISA法检测大鼠血清中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ ,  $TNF-\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ ,  $IL-1\beta$ )、白细胞介素-6(interleukin-6,  $IL-6$ )的含量;Western blot检测大鼠脾脏组织 $\alpha 7nAChR$ 、 $NF-\kappa B$  p65、 $NF-\kappa B$  p-p65、 $TNF-\alpha$ 的蛋白表达水平;采用qPCR法检测 $\alpha 7nAChR$ 、 $NF-\kappa B$  p65、 $TNF-\alpha$ 的mRNA表达水平。结果 与空白组比较,模型组一般情况半定量评分,血清 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 含量,脾脏组织中 $NF-\kappa B$  p-p65、 $NF-\kappa B$  p65、 $TNF-\alpha$ 蛋白表达水平及 $NF-\kappa B$  p65、 $TNF-\alpha$  mRNA表达量均升高( $P<0.01$ );力竭游泳时间、旷场实验运动距离、脾脏指数、胸腺指数、脾脏组织中 $\alpha 7nAChR$ 蛋白表达水平及mRNA表达量均降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。与模型组比较,点按组与 $\alpha 7nAChR$ 激动剂组一般情况半定量评分,血清 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 含量,脾脏组织中 $NF-\kappa B$  p-p65、 $NF-\kappa B$  p65、 $TNF-\alpha$ 蛋白表达水平及 $NF-\kappa B$  p65、 $TNF-\alpha$  mRNA表达量均降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );力竭游泳时间、旷场实验运动距离、脾脏指数、胸腺指数、脾脏组织中 $\alpha 7nAChR$ 蛋白表达水平及mRNA表达量均升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。与点按组比较, $\alpha 7nAChR$ 激动剂组血清 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 含量,脾脏组织中 $NF-\kappa B$  p-p65、 $NF-\kappa B$  p65、 $TNF-\alpha$ 蛋白表达水平及 $NF-\kappa B$  p65、 $TNF-\alpha$  mRNA表达量均降低( $P<0.01$ ),脾脏组织中 $\alpha 7nAChR$ 蛋白表达水平及mRNA表达量均升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。结论 点按脾俞、胃俞穴可有效改善CFS大鼠的疲劳状态和运动行为,提高免疫水平并缓解外周炎症,这可能与激活 $\alpha 7nAChR$ 的表达,从而抑制 $NF-\kappa B$ 下游炎症通路的活性相关。

**[关键词]** 慢性疲劳综合征;点按法;脾俞;胃俞; $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体/核转录因子 $\kappa B$ 通路;外周炎症

[中图分类号]R245

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.06.013

## Mechanism of effects of pressing Pishu (BL20) and Weishu (BL21) on alleviating peripheral inflammation in rats with chronic fatigue syndrome based on the $\alpha 7nAChR/NF-\kappa B$ pathway

LIN Qiaoting, ZHONG Yebei, YANG Shanglin, PEI Xin, YANG Xiaohui, LI Tielang\*, LI Wu\*

School of Acupuncture-moxibustion, Tuina and Rehabilitation, Hunan University of Chinese Medicine,

Changsha, Hunan 410208, China

[收稿日期]2023-12-21

[基金项目]湖南省自然科学基金项目(2023JJ30454);湖南省教育厅科学研究重点项目(22A0273);湖南中医药大学研究生创新课题项目(2022CX107)。

[通信作者]\*李武,男,博士,副教授,硕士研究生导师,E-mail:272434694@qq.com;李铁浪,男,博士,教授,博士研究生导师,E-mail:litielang810@163.com。

**[Abstract] Objective** To observe the effects of pressing Pishu (BL20) and Weishu (BL21) on the fatigue state, locomotor behaviors, peripheral inflammation, and  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor ( $\alpha 7$ nAChR)/nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling expression of chronic fatigue syndrome (CFS) model rats, and to explore the mechanism of effect of this therapy on the alleviation of peripheral inflammation in CFS rats. **Methods** A total of 32 SD rats were randomized into blank group ( $n=8$ ) and modeling group ( $n=24$ ). In the modeling group, a CFS model was established by forced weight-bearing swimming combined with chronic stress stimulation. After successful modeling, the rats in the modeling group were randomly subdivided into model, acupoint-pressing, and  $\alpha 7$ nAChR agonist groups, with eight rats in each group. The blank and model groups were injected intraperitoneally with an equal volume of saline; the acupoint-pressing group was subjected to the bilateral press on Pishu (BL20) and Weishu (BL21) using a homemade pressing stimulator for 20 min each time as well as intraperitoneal injection of an equal volume of saline; the  $\alpha 7$ nAChR agonist group was injected intraperitoneally with the  $\alpha 7$ nAChR agonist PNU-282987 (2.4 mg/kg per time). Each group was intervened once daily for continuous 14 days. The semi-quantitative score of the general condition, swimming time to exhaustion, and exercise distance in the open-field test were recorded in each group; the spleen index and thymus index were calculated; the content of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), and interleukin-6 (IL-6) in rat serum were checked using ELISA; the protein expression levels of  $\alpha 7$ nAChR, NF- $\kappa$ B p65, NF- $\kappa$ B p-p65, and TNF- $\alpha$  in the rat spleen tissue were examined by Western blot; the mRNA expression levels of  $\alpha 7$ nAChR, NF- $\kappa$ B p65, and TNF- $\alpha$  were determined by qPCR. **Results** Compared with the blank group, the semi-quantitative score of the general condition, serum content of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6, as well as the protein expression levels of NF- $\kappa$ B p-p65, NF- $\kappa$ B p65, and TNF- $\alpha$  and the mRNA expression levels of NF- $\kappa$ B p65 and TNF- $\alpha$  in the spleen tissue increased in the model group ( $P<0.01$ ); the swimming time to exhaustion and exercise distance in the open-field test were shortened, and the spleen index, thymus index, and the  $\alpha 7$ nAChR protein and mRNA expression levels in the spleen tissue decreased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Compared with the model group, the semi-quantitative scores of the general condition, serum content of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6, as well as the protein expression levels of NF- $\kappa$ B p-p65, NF- $\kappa$ B p65, and TNF- $\alpha$  and the mRNA expression levels of NF- $\kappa$ B p65 and TNF- $\alpha$  in the spleen tissue were reduced in both acupoint-pressing and  $\alpha 7$ nAChR agonist groups ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); the swimming time to exhaustion and exercise distance in the open-field test were longer, and the spleen index, thymus index, and the  $\alpha 7$ nAChR protein and mRNA expression levels in the spleen tissue were higher ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Compared with the acupoint-pressing group, the serum content of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6, as well as the protein expression levels of NF- $\kappa$ B p-p65, NF- $\kappa$ B p65, and TNF- $\alpha$  and the mRNA expression levels of NF- $\kappa$ B p65 and TNF- $\alpha$  in the spleen tissue were lower in the  $\alpha 7$ nAChR agonist group ( $P<0.01$ ), while the  $\alpha 7$ nAChR protein and mRNA expression levels in the spleen tissue were elevated ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion** Pressing Pishu (BL20) and Weishu (BL21) can effectively relieve fatigue, improve locomotor behaviors, enhance immune level, and alleviate peripheral inflammation in CFS rats, which may be related to the activation of the expression of  $\alpha 7$ nAChR, thereby inhibiting the activity of the downstream inflammatory pathway of NF- $\kappa$ B.

**[Keywords]** chronic fatigue syndrome; pressing; Pishu (BL20); Weishu (BL21);  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor/nuclear factor- $\kappa$ B pathway; peripheral inflammation

慢性疲劳综合征(chronic fatigue syndrome, CFS)是一种复杂性多系统慢性疾病,其主要症状包括劳累后不适、因活动而加重的虚弱性疲劳、认知困难以及睡眠不解乏或睡眠障碍等<sup>[1]</sup>。研究认为,神经免疫系统反应失调可能是 CFS 发病的重要机制之一<sup>[2-3]</sup>。正常生理状态下,脾脏受迷走神经支配并依靠胆碱能抗炎通路发挥抗炎作用<sup>[4]</sup>。然而,受复杂应激因素长期刺激的 CFS 患者自主神经功能紊乱,表现为迷走神经活性减弱<sup>[5]</sup>。脾脏作为机体最大的免疫器官,抗炎作用受抑制时,导致过度产生的促炎因子在循环系统中堆积,在临床上表现为无法缓解的身体疲劳与精神疲劳<sup>[6]</sup>。

CFS 属于中医学“虚劳”范畴,病机关键为中焦脾胃升降失司,脏腑气血阴阳虚衰。从脾胃论治该病,固护脾胃后天之本,振奋中焦而充化气血,可达到平衡阴阳并治疗疾病的目的。本课题组及其他学者研究均证实,采用不同推拿手法刺激背俞穴,对 CFS 治疗有明显临床疗效<sup>[7-10]</sup>。脾俞、胃俞穴均为背俞穴,两者共奏健脾和胃降逆之功,体现从脾胃论治 CFS 的思想。此外,研究发现,刺激脾俞、胃俞穴能够改善机体免疫功能,调节炎症因子水平<sup>[11-13]</sup>。因此,本研究拟采用点按脾俞、胃俞穴干预 CFS 模型大鼠,探讨点按脾俞、胃俞穴对缓解 CFS 大鼠外周炎症的效应机制。

目前研究证实, $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体( $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor, $\alpha 7nAChR$ )/核因子 $\kappa B$ (nuclear factor- $\kappa B$ ,NF- $\kappa B$ )通路在脾脏胆碱能抗炎通路中发挥重要作用<sup>[14-15]</sup>。大量临床及基础研究表明,CFS患者或大鼠血清中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ ,TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ ,IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)含量及组织NF- $\kappa B$ 表达水平平均升高<sup>[16-18]</sup>。同时根据文献报道,研究者在CFS患者的B细胞和NK细胞中发现烟碱型乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptor,nAChR)基因存在改变并影响相关免疫细胞功能<sup>[19-20]</sup>。综合以上研究结果,课题组通过建立CFS模型大鼠,以点按脾俞、胃俞穴为干预手段,从运动行为能力、脾脏和胸腺指数、外周促炎因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6)和 $\alpha 7nAChR$ /NF- $\kappa B$ 信号通路等方面,进一步探讨其可能的作用机制,为临床应用推拿治疗CFS提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

健康成年SD大鼠32只,SPF级,雌雄各半,体重200~250 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物许可证:SCXK(湘)2019-0004。本实验在湖南中医药大学动物实验中心进行,实验开始前,所有大鼠先进行7 d的适应性饲养,提供足量无菌饲料及蒸馏水,饲养温度24~26℃,湿度50%~70%,换气次数为15~20次/h,压强梯度20~50 Pa,实验室定期消毒。实验方案与伦理由湖南中医药大学实验动物伦理委员会批准,审批号:LLBH-202211060005。

### 1.2 主要试剂与仪器

$\alpha 7nAChR$ 激动剂(美国Glpbio公司,规格100 mg/瓶,批号:GC12952);TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 ELISA试剂盒(厦门仑昌硕生物科技有限公司,批号:YD-31063、YD-30206、YD-30219); $\alpha 7nAChR$ 、NF- $\kappa B$  p-p65、NF- $\kappa B$  p65、TNF- $\alpha$ 抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司,批号:DF13247、AF2006、AF5006、AF7014);异氟烷(深圳瑞沃德生命科技有限公司,批号:R510-22);RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒、qPCR专用预混液(美国Thermo公司,批号:10296028CN、11752050、4472920)。

大鼠旷场视频分析系统[博睿唯思(香港)科技有限公司,型号:Tracking Master V3.0];呼吸麻醉机(深圳瑞沃德生命科技有限公司,型号:R500);酶标分析仪(瑞士TECAN公司,型号:Infinite F50);电

泳仪(北京百晶生物技术有限公司,型号:BG-sub-MIDI);荧光定量PCR仪(美国Applied biosystems公司,型号:StepOne Software);凝胶成像仪(美国Biorad公司,型号:2500R);按法刺激仪(自制)。

### 1.3 CFS模型建立与评价

以强迫负重游泳联合慢性应激刺激的方法建立CFS大鼠模型<sup>[18]</sup>。强迫负重游泳:在大鼠尾部增加自身体质量3%的焊锡丝,于水温(25±2)℃、水深超过40 cm(确保大鼠完全进入水中而不触碰水桶底部)的水桶内强迫游泳至力竭,力竭标准为大鼠游泳动作失调,口鼻部沉入水下不上浮超过10 s。力竭游泳结束后,迅速将大鼠捞起擦干毛发,并置于饲养笼中休息,每日1次,共21 d。慢性应激刺激:游泳结束后根据随机数字表法每天随机给予大鼠两种不可预知的应激刺激,刺激强度控制在大鼠可承受范围内,每日1次,共21 d。应激刺激方式包括:(1)12 h禁食;(2)12 h禁水;(3)通宵照明;(4)夹尾1 min;(5)110 dB噪声持续干扰1 h;(6)足底电击(强度为1 mA,30 V),30 s/次,每次间隔1 min,共5次。

根据一般情况半定量评分观察表<sup>[21]</sup>,对大鼠精神状态、粪便性状、皮毛色泽及耳尾颜色进行评价,总评分 $\geq 4$ 分表明造模成功<sup>[21]</sup>。具体评分细则如下。(1)精神状态:神态安静,活泼好动,眼睛有神(0分);易激怒好争斗,自主活动减少(1分);懒动倦怠,眼神黯淡无光,反应能力降低(2分);精神萎靡,缩肩拱背,攻击性、对抗性行为减少(3分)。(2)粪便形状:粪便干,成形(0分);粪便黏软有形(1分);粪便不成形,但不稀薄(2分);粪便溏状,黏腻恶臭(3分)。(3)皮毛色泽:皮肤与脂肪连接紧密,皮毛光洁整齐(0分);皮肤略松弛,毛发枯,黄无光泽(1分);皮肤松弛易抓取,毛发干枯或结穗打卷,无光泽(2分);皮肤松弛,皮肤无脂肪,抓之触骨,全身毛发枯槁,稀疏脱落(3分)。(4)耳尾颜色:红润光泽(0分);淡红少泽(1分);淡白少泽(2分);苍白或透青色(3分)。

### 1.4 分组及干预方法

将32只SD大鼠按随机数字表法分为空白组(8只)和造模组(24只),造模组参照“1.3”建立CFS大鼠模型。造模成功后,将造模组大鼠随机分为模型组、点按组、 $\alpha 7nAChR$ 激动剂组,每组8只。空白组、模型组予以等体积生理盐水腹腔注射。点按组点按双侧脾俞、胃俞穴后,予腹腔注射等体积生理盐水。穴位定位依据《实验动物常用穴位名称与定位第2部分:大鼠》<sup>[22]</sup>、《大鼠穴位图谱》及体表的骨性标志<sup>[23]</sup>,在大鼠清醒状态下,以两侧髂嵴最高点连线为标志,

配合反复上下提放鼠尾可精确定位第6腰椎棘突,向上顺摸至第12胸椎棘突下左右旁开6 mm处为脾俞穴;第13胸椎棘突下左右旁开约5 mm为胃俞穴。选用自制的中医按法刺激仪器进行点按法操作<sup>[24-25]</sup>。将实验大鼠用异氟烷吸入麻醉后,俯卧位放置,穴位局部备皮,将中医按法刺激仪器的按摩头对准脾俞、胃俞穴,垂直于皮肤按压,点按法刺激参数调节为:力量0.5 kg,频率8次/min。干预过程中由实验人员监督,防止出现意外事件,点按治疗20 min/次。 $\alpha 7nAChR$ 激动剂组予腹腔注射PNU-282987,每次2.4 mg/kg。以上干预每日1次,连续14 d。

### 1.5 标本采集及处理

用水合氯醛麻醉大鼠后,将大鼠仰卧位固定,打开腹腔及胸腔,暴露腹主动脉取血2 mL,静置1 h后,4 ℃以3 000 r/min离心15 min,取血清并保存在-80 ℃冰箱。摘取胸腺、脾脏,用生理盐水洗涤,滤纸吸干后称重。称重后,将脾脏组织冷藏于-80 ℃冰箱。

### 1.6 检测指标

1.6.1 一般情况半定量评分 干预结束后,参照“1.3”一般情况半定量评分观察表对各组大鼠进行评价并记录总分。

1.6.2 力竭游泳时间 具体操作参照“1.3”强迫负重游泳实验。干预结束后,记录各组大鼠力竭游泳时间。

1.6.3 旷场实验运动距离 干预结束后,将大鼠放置于规格为100 cm×100 cm×50 cm的旷场箱中央格,记录大鼠6 min内的运动距离。

1.6.4 脾脏指数与胸腺指数 称取大鼠脾脏与胸腺质量并按照下列公式计算胸腺与脾脏指数<sup>[26]</sup>:脏器指数(mg/g)=器官重量(mg)/体质量(g)。

1.6.5 血清中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6的含量 采用ELISA法检测血清中的TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6含量,严格按照ELISA试剂盒说明书操作。

1.6.6 脾脏组织 $\alpha 7nAChR$ 、NF- $\kappa B$  p-p65、NF- $\kappa B$  p65、TNF- $\alpha$ 蛋白表达水平 将脾脏组织进行蛋白提取与蛋白浓度测定,经SDS-PAGE电泳后,进行转膜、封闭。加入一抗 $\alpha 7nAChR$ (1:1 000)、NF- $\kappa B$  p-p65(1:1 000)、NF- $\kappa B$  p65(1:1 000)、TNF- $\alpha$ (1:1 000),4 ℃反应过夜。TBST漂洗3次,洗净未结合的一抗。加入二抗(1:5 000)溶液,室温孵育1 h。TBST漂洗3次。化学发光成像系统成像,以 $\beta$ -actin为内参计算各目的蛋白的相对表达量。

1.6.7 脾脏组织 $\alpha 7nAChR$ 、NF- $\kappa B$  p65、TNF- $\alpha$  mRNA

NA表达 运用Trizol法对样本总RNA进行提取与质量检测,使用逆转录试剂盒逆转录合成cDNA。选择 $\alpha 7nAChR$ 、NF- $\kappa B$  p65、TNF- $\alpha$ 对应的引物,以 $\beta$ -actin为内参,PCR反应条件:95 ℃预变性5 min;以95 ℃变性10 s,58 ℃退火20 s,72 ℃延伸20 s为1循环,进行40次循环。引物序列见表1。

表1 基因引物序列

基因	引物序列	长度/bp
$\beta$ -actin	正向:GACCCAGATCATGTTTCGAGACCT	145
	反向:CGGAGTCCATCAGCATGCCAG	
$\alpha 7nAChR$	正向:TCCCCAACACATGATGAGCACC	134
	反向:CAGATCACCTCACTCTCGTCTCT	
NF- $\kappa B$ p65	正向:ATGGCAGACGATGATCCCTAC	167
	反向:CGGAATCGAAATGCCCTCTGTT	
TNF- $\alpha$	正向:GTTCCATGCCCCAGACCCT	100
	反向:AGCTGCTCCTCCGCTTGCTG	

### 1.7 统计学分析

采用SPSS 26.0软件进行统计分析。计量资料服从正态分布,则用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。若数据满足正态分布且方差齐,采用单因素方差分析并用LSD检验多重比较;若数据满足正态分布但方差不齐,则采用Welch's ANOVA法分析并用Dunnnett T3法多重比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠一般情况半定量评分、力竭游泳时间及旷场实验运动距离比较

与空白组比较,模型组、点按组、 $\alpha 7nAChR$ 激动剂组一般情况半定量评分明显增加( $P < 0.01$ ),力竭游泳时间缩短( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );模型组旷场实验运动距离缩短( $P < 0.05$ )。与模型组比较,点按组、 $\alpha 7nAChR$ 激动剂组一般情况半定量评分明显降低( $P < 0.01$ ),力竭游泳时间和旷场实验运动距离增加( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。详见表2。

表2 各组大鼠一般情况半定量评分、力竭游泳时间、旷场实验运动距离比较( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

组别	一般情况半定量评分/分	力竭游泳时间/min	旷场实验运动距离/cm
空白组	1.13±0.83	15.75±3.33	1 462.76±219.06
模型组	4.13±0.83**	9.00±0.76**	1 179.24±270.34*
点按组	3.00±0.76***	10.75±1.04**	1 607.77±274.51**
$\alpha 7nAChR$ 激动剂组	2.25±0.71***	11.38±1.30***	1 461.75±282.67*

注:与空白组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ 。

## 2.2 各组大鼠脾脏指数与胸腺指数比较

与空白组比较,模型组脾脏指数、胸腺指数均明显降低( $P<0.01$ );与模型组比较,点按组、 $\alpha 7nAChR$ 激动剂组脾脏指数、胸腺指数明显升高( $P<0.01$ )。详见表3。

表3 各组大鼠脾脏指数与胸腺指数比较( $\bar{x}\pm s, n=8, \text{mg/g}$ )

组别	脾脏指数	胸腺指数
空白组	2.40±0.23	1.90±0.41
模型组	1.94±0.42**	1.15±0.16**
点按组	2.48±0.23 <sup>##</sup>	1.81±0.32 <sup>##</sup>
$\alpha 7nAChR$ 激动剂组	2.68±0.35 <sup>##</sup>	1.80±0.30 <sup>##</sup>

注:与空白组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>##</sup> $P<0.01$ 。

## 2.3 各组大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 含量比较

与空白组比较,其余各组血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 含量明显升高( $P<0.01$ );与模型组比较,点按组和  $\alpha 7nAChR$  激动剂组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 含量均明显降低( $P<0.01$ );与点按组比较, $\alpha 7nAChR$ 激动剂组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 含量均明显降低( $P<0.01$ )。详见表4。

## 2.4 各组大鼠脾脏组织 $\alpha 7nAChR$ 、NF- $\kappa B$ p-p65、NF- $\kappa B$ p65、TNF- $\alpha$ 蛋白表达水平比较

与空白组比较,其余各组  $\alpha 7nAChR$  蛋白表达水平明显降低( $P<0.01$ ),NF- $\kappa B$  p-p65、NF- $\kappa B$  p65、TNF- $\alpha$  蛋白表达水平明显升高( $P<0.01$ );与模型组比较,点按组和  $\alpha 7nAChR$  激动剂组  $\alpha 7nAChR$  蛋白表达水平明显升高( $P<0.01$ ),NF- $\kappa B$  p-p65、NF- $\kappa B$  p65、TNF- $\alpha$  蛋白表达水平降低( $P<0.05, P<0.01$ );与

点按组比较, $\alpha 7nAChR$  激动剂组  $\alpha 7nAChR$  蛋白表达水平升高( $P<0.05$ ),NF- $\kappa B$  p-p65、NF- $\kappa B$  p65、TNF- $\alpha$  蛋白表达水平明显降低( $P<0.01$ )。详见表5、图1。

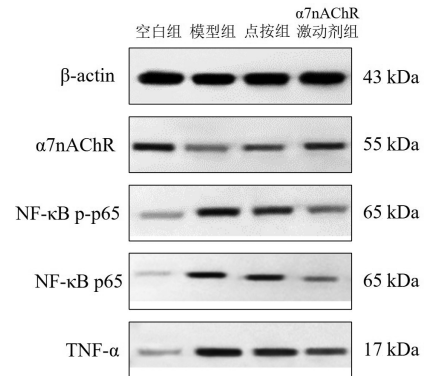


图1 各组大鼠脾脏组织  $\alpha 7nAChR$ 、NF- $\kappa B$  p-p65、NF- $\kappa B$  p65、TNF- $\alpha$  条带图

## 2.5 各组大鼠脾脏组织 $\alpha 7nAChR$ 、NF- $\kappa B$ p65、TNF- $\alpha$ mRNA 表达量比较

与空白组比较,模型组、点按组脾脏组织  $\alpha 7nAChR$  mRNA 表达量明显降低( $P<0.01$ ),NF- $\kappa B$  p65、TNF- $\alpha$  mRNA 表达量明显升高( $P<0.01$ ); $\alpha 7nAChR$  激动剂组脾脏组织 NF- $\kappa B$  p65 mRNA 表达量明显升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,点按组和  $\alpha 7nAChR$  激动剂组脾脏组织  $\alpha 7nAChR$  mRNA 表达量明显升高( $P<0.01$ ),NF- $\kappa B$  p65、TNF- $\alpha$  mRNA 表达量明显降低( $P<0.01$ )。与点按组比较, $\alpha 7nAChR$  激动剂组脾脏组织  $\alpha 7nAChR$  mRNA 表达量明显升高( $P<0.01$ ),NF- $\kappa B$  p65、TNF- $\alpha$  mRNA 表达量明显降低( $P<0.01$ )。详见表6。

表4 各组大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 含量比较( $\bar{x}\pm s, n=8, \text{pg/mL}$ )

组别	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6
空白组	151.76±42.22	283.50±55.24	27.75±3.09
模型组	453.55±30.42**	716.96±17.01**	65.67±2.81**
点按组	373.92±31.25 <sup>##</sup>	572.15±58.07 <sup>##</sup>	51.95±3.19 <sup>##</sup>
$\alpha 7nAChR$ 激动剂组	254.34±23.97 <sup>##</sup> $\Delta\Delta$	393.89±43.32 <sup>##</sup> $\Delta\Delta$	33.92±4.33 <sup>##</sup> $\Delta\Delta$

注:与空白组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>##</sup> $P<0.01$ ;与点按组比较, $\Delta\Delta$  $P<0.01$ 。

表5 各组大鼠脾脏组织  $\alpha 7nAChR$ 、NF- $\kappa B$  p-p65、NF- $\kappa B$  p65、TNF- $\alpha$  蛋白表达水平比较( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	$\alpha 7nAChR$	NF- $\kappa B$ p-p65	NF- $\kappa B$ p65	TNF- $\alpha$
空白组	0.52±0.02	0.20±0.04	0.16±0.02	0.17±0.04
模型组	0.23±0.06**	0.55±0.10**	0.47±0.04**	0.57±0.09**
点按组	0.34±0.05 <sup>##</sup>	0.42±0.06 <sup>##</sup>	0.38±0.04 <sup>##</sup>	0.42±0.07 <sup>##</sup>
$\alpha 7nAChR$ 激动剂组	0.43±0.05 <sup>##</sup> $\Delta\Delta$	0.31±0.04 <sup>##</sup> $\Delta\Delta$	0.25±0.01 <sup>##</sup> $\Delta\Delta$	0.28±0.08 <sup>##</sup> $\Delta\Delta$

注:与空白组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>##</sup> $P<0.05, P<0.01$ ;与点按组比较, $\Delta\Delta$  $P<0.05, \Delta\Delta$  $P<0.01$ 。

表6 各组大鼠脾脏组织  $\alpha 7nAChR$ 、NF- $\kappa$ B p65、TNF- $\alpha$  mRNA 表达量比较( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	$\alpha 7nAChR$ mRNA	NF- $\kappa$ B p65 mRNA	TNF- $\alpha$ mRNA
空白组	1.01±0.01	1.00±0.03	1.03±0.04
模型组	0.35±0.05**	4.05±0.25**	3.98±0.13**
点按组	0.63±0.06** <sup>##</sup>	3.01±0.15** <sup>##</sup>	2.98±0.10** <sup>##</sup>
$\alpha 7nAChR$ 激动剂组	1.02±0.02 <sup>##<math>\Delta\Delta</math></sup>	2.06±0.17** <sup>##<math>\Delta\Delta</math></sup>	1.04±0.05 <sup>##<math>\Delta\Delta</math></sup>

注:与空白组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>##</sup> $P<0.01$ ;与点按组比较, <sup>$\Delta\Delta$</sup>  $P<0.01$ 。

### 3 讨论

CFS属于中医学“虚劳”范畴,脾虚为基本病机<sup>[27-28]</sup>。《脾胃论·脾胃盛衰论》中提出“百病皆由脾胃衰而生”,脾胃之气的强弱是正气盛衰的关键,脾胃之气弱而正气衰,一则无法抵御邪气入体,二则无法将内邪驱逐,邪气留滞体内,故使CFS成为慢性发展性的长期疾病。推拿缓解CFS患者疲劳状态疗效显著,常选用脾俞、胃俞等穴位<sup>[7-10]</sup>。脾俞、胃俞穴均属于背俞穴,是调理脾胃的要穴。同时,两穴位具有脏腑互为表里的协同关系,对调理脾胃能产生叠加效应<sup>[29]</sup>。故而本研究选择脾俞与胃俞联用,共奏固护脾胃后天、振奋中焦气血化源、调和阴阳之功。

头晕、心悸、直立性低血压等自主神经系统功能紊乱症状在CFS患者中普遍多发,研究认为CFS患者自主神经功能障碍的主要原因为交感神经活动增加,迷走神经活动减少<sup>[30]</sup>。正常状态下,迷走神经对炎症反应有紧张性抑制作用,故在CFS患者迷走神经活动性减少的情况下,迷走神经的抗炎作用会受到影响<sup>[31]</sup>。脾脏是人体最大的免疫器官,受迷走神经的调节并依靠胆碱能抗炎通路发挥抗炎作用<sup>[4]</sup>。胆碱能抗炎通路经迷走神经发出神经信号后,脾脏T细胞在信号转导的过程中释放乙酰胆碱(acetylcholine, Ach), Ach与脾脏巨噬细胞上 $\alpha 7nAChR$ 结合后,下调细胞内NF- $\kappa$ B信号通路的活性,抑制巨噬细胞释放TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6等促炎细胞因子<sup>[6]</sup>。NF- $\kappa$ B p65作为关键转录调节因子,在NF- $\kappa$ B信号通路中发挥重要作用,其在蛋白磷酸化后可迅速入细胞核,促进下游细胞因子的表达<sup>[32]</sup>。因此,NF- $\kappa$ B p-p65水平也是衡量NF- $\kappa$ B信号通路活性的重要标志<sup>[32-33]</sup>。CFS患者迷走神经活性减弱<sup>[5,34-35]</sup>,可能会导致脾脏内胆碱能抗炎通路受抑制、 $\alpha 7nAChR$ 表达下降,NF- $\kappa$ B信号通路被激活,NF- $\kappa$ B p65和NF- $\kappa$ B p-p65水平升高,产生大量的促炎因子TNF- $\alpha$ 、

IL-1 $\beta$ 、IL-6,最终引起外周炎症的发生,增加患者疲劳感。

本研究通过一般情况半定量评分量表客观评估CFS大鼠疲劳程度,并采用力竭游泳实验与旷场实验分别测试CFS大鼠的被迫运动与主动运动能力<sup>[36]</sup>。结果发现,点按脾俞、胃俞穴能够改善CFS大鼠一般情况并提高运动行为能力,提示点按脾俞、胃俞穴位对CFS大鼠疲劳状态具有改善作用。此外,本研究发现,模型组大鼠脾脏指数与胸腺指数显著降低,血清中促炎因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6含量显著升高,脾脏组织 $\alpha 7nAChR$ 蛋白及mRNA表达量降低,而NF- $\kappa$ B p-p65、NF- $\kappa$ B p65、TNF- $\alpha$ 蛋白表达量与NF- $\kappa$ B p65、TNF- $\alpha$  mRNA表达水平均升高,提示大鼠免疫水平降低,脾脏胆碱能抗炎通路受抑制,外周炎症反应增强。点按脾俞、胃俞穴干预后,大鼠的脾脏指数与胸腺指数升高,血清中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6促炎因子的含量降低,脾脏组织 $\alpha 7nAChR$ 的蛋白表达量及mRNA表达水平均升高,NF- $\kappa$ B p-p65、NF- $\kappa$ B p65、TNF- $\alpha$ 蛋白表达量与NF- $\kappa$ B p65、TNF- $\alpha$  mRNA表达水平均降低,提示点按脾俞、胃俞穴提高了大鼠免疫水平,并可能通过激活脾脏组织中 $\alpha 7nAChR$ 的表达,抑制NF- $\kappa$ B信号通路,减少促炎因子的释放,以此缓解CFS大鼠的外周炎症。

综上所述,点按脾俞、胃俞穴可有效改善CFS大鼠疲劳状态、运动行为能力,提高免疫水平,缓解外周炎症,其机制可能是通过激活脾脏组织中 $\alpha 7nAChR$ 的表达,抑制NF- $\kappa$ B信号通路活性,减少下游促炎因子释放到外周循环中而发挥治疗作用。

### 参考文献

- [1] BASSI N, AMITAL D, AMITAL H, et al. Chronic fatigue syndrome: Characteristics and possible causes for its pathogenesis[J]. The Israel Medical Association Journal, 2008, 10(1): 79-82.
- [2] RYABKOVA V A, GAVRILOVA N Y, FEDOTKINA T V, et al. Myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome and post-COVID syndrome: A common neuroimmune ground?[J]. Diagnostics, 2022, 13(1): 66.
- [3] RENZ-POLSTER H, TREMBLAY M E, BIENZLE D, et al. The pathobiology of myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: The case for neuroglial failure[J]. Frontiers in Cellular Neuroscience, 2022, 16: 888232.
- [4] UDIT S, BLAKE K, CHIU I M. Somatosensory and autonomic neuronal regulation of the immune response[J]. Nature Reviews Neuroscience, 2022, 23(3): 157-171.

- [5] FLUGE Ø, TRONSTAD K J, MELLA O. Pathomechanisms and possible interventions in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS)[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2021, 131(14): e150377.
- [6] 胡建楠, 刘书畅, 马涛. 基于胆碱能抗炎通路探索脓毒症治疗的研究进展[J]. *中华危重病急救医学*, 2021, 33(1): 122-125.
- [7] 裴鑫, 李甜, 王聪聪, 等. 扶阳罐干预背俞功能带治疗慢性疲劳综合征 29 例[J]. *湖南中医杂志*, 2023, 39(8): 74-76.
- [8] 李甜, 朱晓晴, 张晨晨, 等. 扶阳罐干预背俞功能带对慢性疲劳综合征患者临床疗效及皮质醇影响[J]. *中医药导报*, 2023, 29(5): 94-98.
- [9] 徐玉欣. 背俞穴结合头部穴位推拿治疗慢性疲劳综合征[J]. *浙江中医药大学学报*, 2018, 42(6): 491-493.
- [10] 姚斐, 纪清, 赵毅, 等. 按压推拿治疗慢性疲劳综合征疗效观察[J]. *中国针灸*, 2007, 27(11): 819-820.
- [11] 张文静. 基于“健脾益气”法探讨针刺脾俞穴联合人参皂苷 Rg3 抗疲劳机制的实验研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2016.
- [12] 齐诗仪. 基于多元统计分析的急性胃黏膜损伤大鼠背部依文思蓝渗出点分布特征及其效应研究[D]. 福州: 福建中医药大学, 2021.
- [13] 周亚丹, 张华, 刘高仁. 针刺联合穴位贴敷治疗慢性萎缩性胃炎的疗效观察及对血清炎症因子和胃肠激素的影响[J]. *上海针灸杂志*, 2023, 42(7): 677-682.
- [14] 秦雨涵, 侯宏卫, 胡清源.  $\alpha 7$  烟碱型乙酰胆碱受体在胆碱能抗炎通路中的作用机制及应用现状[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2022, 38(10): 1304-1310.
- [15] HONE A J, MCINTOSH J M. Nicotinic acetylcholine receptors: Therapeutic targets for novel ligands to treat pain and inflammation[J]. *Pharmacological Research*, 2023, 190: 106715.
- [16] 熊杉, 张如祥, 刘良生. 针刺配合推拿膀胱经对慢性疲劳综合征患者血清细胞因子的影响[J]. *湖北中医药大学学报*, 2015, 17(2): 39-41.
- [17] YANG T S, YANG Y, WANG D L, et al. The clinical value of cytokines in chronic fatigue syndrome[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2019, 17(1): 213.
- [18] 冯楚文, 屈媛媛, 孙忠人, 等. 电针抑制 NF- $\kappa$ B 活性改善慢性疲劳综合征大鼠认知功能障碍的实验研究[J]. *针刺研究*, 2021, 46(9): 775-781.
- [19] MARSHALL-GRADISNIK S, JOHNSTON S, CHACKO A, et al. Single nucleotide polymorphisms and genotypes of transient receptor potential ion channel and acetylcholine receptor genes from isolated B lymphocytes in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome patients[J]. *The Journal of International Medical Research*, 2016, 44(6): 1381-1394.
- [20] MARSHALL-GRADISNIK S, HUTH T, CHACKO A, et al. Natural killer cells and single nucleotide polymorphisms of specific ion channels and receptor genes in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome[J]. *The Application of Clinical Genetics*, 2016, 9: 39-47.
- [21] 高怀林, 吴以岭, 朱慧明, 等. 慢性疲劳综合征动物模型的建立及对血管内皮功能的影响[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2009, 15(12): 904-906, 919.
- [22] 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位第 2 部分: 大鼠[J]. *针刺研究*, 2021, 46(4): 351-352.
- [23] 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.
- [24] 蒋全睿, 刘丹, 潘杰灵, 等. 不同部位按法对慢性疼痛激痛点大鼠模型的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2023, 46(7): 1008-1019.
- [25] 蒋全睿, 冯祥, 刘丹, 等. 不同力量推拿按法对大鼠筋膜疼痛触发点的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2024, 28(27): 4360-4366.
- [26] 钱梦, 朱巳昊, 史拓, 等. 一种脾虚肌萎证小鼠模型的复制与评价[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2022, 28(10): 1610-1615, 1652.
- [27] 陈佳, 黄运旋, 陈兴华. 慢性疲劳综合征免疫功能紊乱“脾虚”本质的探讨与思考[J]. *时珍国医国药*, 2021, 32(9): 2233-2235.
- [28] 李娜, 王洁晶, 陈晓敏, 等. 慢性疲劳综合征的中医研究进展[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2023, 21(9): 200-202.
- [29] 陈以国, 王庆林, 杜瑞卿, 等. 背俞穴的椎体间力学相关性研究[J]. *北京生物医学工程*, 2004, 23(2): 122-126.
- [30] CAMBRAS T, ZERÓN-RUGERIO M F, DÍEZ-NOGUERA A, et al. Skin temperature circadian rhythms and dysautonomia in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: The role of endothelin-1 in the vascular tone dysregulation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(5): 4835.
- [31] 郑志玉, 王悦, 张雨, 等. 迷走神经介导的针刺抗炎作用研究[J]. *针灸临床杂志*, 2023, 39(5): 11-16.
- [32] WILLIAMS L M, GILMORE T D. Looking down on NF- $\kappa$ B[J]. *Mol Cell Biol*, 2020, 40(15): e00104-e00120.
- [33] PRESCOTT J A, MITCHELL J P, COOK S J. Inhibitory feedback control of NF- $\kappa$ B signalling in health and disease[J]. *The Biochemical Journal*, 2021, 478(13): 2619-2664.
- [34] MURGA GANDASEGUI I, ARANBURU LAKA L, GARGIULO P Á, et al. Myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: A neurological entity?[J]. *Medicina*, 2021, 57(10): 1030.
- [35] CAMBRAS T, CASTRO-MARRERO J, ZARAGOZA M C, et al. Circadian rhythm abnormalities and autonomic dysfunction in patients with Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis[J]. *PLoS One*, 2018, 13(6): e0198106.
- [36] 孙秀萍, 王琼, 石哲, 等. 动物行为实验方法学研究的回顾与展望[J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(3): 1-7.