

·针灸推拿·

本文引用: 谢文彬, 谭若彤, 杨尚林, 谢玮琪, 任晋湘, 郭舟, 胡新颖, 李铁浪. 基于 p38 MAPK/PGC-1 α 信号通路探讨点按脾俞穴对慢性疲劳综合征大鼠骨骼肌重塑的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(11): 2106-2115.

基于 p38 MAPK/PGC-1 α 信号通路探讨点按脾俞穴对慢性疲劳综合征大鼠骨骼肌重塑的影响

谢文彬, 谭若彤, 杨尚林, 谢玮琪, 任晋湘, 郭舟, 胡新颖, 李铁浪*

湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

〔摘要〕 目的 观察点按脾俞穴对慢性疲劳综合征(CFS)大鼠骨骼肌纤维类型及 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)/过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1 α (PGC-1 α)信号表达的影响,探讨点按脾俞穴重塑 CFS 大鼠骨骼肌的作用机制。**方法** 将 32 只 SD 大鼠随机分为空白组 8 只、造模组 24 只。使用多因素复合刺激法建立 CFS 模型,造模周期为 21 d。造模结束后,再将造模组大鼠随机分为模型组、点按脾俞组和人参皂苷组,每组 8 只。空白组、模型组予以捆绑固定和生理盐水灌胃 1 mL/d;点按脾俞组予以捆绑固定、生理盐水灌胃 1 mL/d 和双侧脾俞穴点按;人参皂苷组大鼠给予捆绑固定及人参皂苷水溶液灌胃 1 mL/d。均 1 次/d,共干预 14 d。实验期间,进行实验大鼠一般情况半定量评分评估、体质量测量、力竭游泳实验、旷场实验;干预结束后,三磷酸腺苷(ATP)酶钙钴法染色检测大鼠竖脊肌中肌纤维类型,透射电镜观察竖脊肌超微结构,ELISA 检测竖脊肌中 ATP 含量,实时荧光定量 PCR 法检测竖脊肌中 PGC-1 α mRNA 表达,Western blot 检测竖脊肌中 p38 MAPK、PGC-1 α 蛋白表达水平。**结果** 干预结束后,与空白组比较,模型组大鼠一般情况半定量评分显著升高($P<0.01$),体质量、力竭游泳时间、旷场实验运动总路程和进入中央区次数显著降低($P<0.01$),竖脊肌肌原纤维排列紊乱,线粒体数量减少,I 型肌纤维比例减少,II 型肌纤维比例增加,ATP 含量、PGC-1 α mRNA 表达、p38 MAPK 和 PGC-1 α 蛋白相对表达量均显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,点按脾俞组和人参皂苷组大鼠一般情况半定量评分降低($P<0.05$),体质量、力竭游泳时间、旷场实验运动总路程和进入中央区次数升高($P<0.05$, $P<0.01$),竖脊肌肌原纤维排列更加整齐,线粒体数量增多,I 型肌纤维比例增加,II 型肌纤维比例减少,ATP 含量、PGC-1 α mRNA 表达、p38 MAPK 和 PGC-1 α 蛋白相对表达量均升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与人参皂苷组比较,点按脾俞组大鼠一般情况半定量评分、体质量、力竭游泳时间、旷场实验运动总路程和进入中央区次数差异无统计学意义($P>0.05$),竖脊肌电镜表现接近,I 型、II 型肌纤维比例接近,ATP 含量、p38 MAPK 和 PGC-1 α 蛋白相对表达量差异无统计学意义($P>0.05$),PGC-1 α mRNA 表达显著升高($P<0.01$)。**结论** 点按脾俞穴能有效改善 CFS 大鼠疲劳状态、运动能力以及焦虑状态,并促进骨骼肌肌纤维的重塑,其机制可能与激活 p38 MAPK/PGC-1 α 信号通路有关。

〔关键词〕 慢性疲劳综合征;点按法;脾俞穴;过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1 α ;骨骼肌重塑

〔中图分类号〕R245

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.11.011

Exploring the effect of acupressure at Pishu (BL20) on skeletal muscle remodeling in rats with chronic fatigue syndrome based on the p38 MAPK/PGC-1 α signaling pathway

XIE Wenbin, TAN Ruotong, YANG Shanglin, XIE Weiqi, REN Jinxiang, GUO Zhou,

HU Xinying, LI Tielang*

Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

〔收稿日期〕2025-07-05

〔基金项目〕湖南省自然科学基金项目(2023JJ30454);湖南中医药大学本科生科研创新基金项目(2023BKS090);湖南省大学生创新训练项目(S202410541038)。

〔通信作者〕* 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 acupressure at Pishu (BL20) on skeletal muscle fiber types and the expression of p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK)/ peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 α) signaling in rats with chronic fatigue syndrome (CFS), and to explore the mechanism by which acupressure at Pishu (BL20) remodels skeletal muscle in CFS rats. **Methods** Thirty-two SD rats were randomly divided into a blank group ($n=8$) and a modeling group ($n=24$). The CFS model was established in the modeling group using a multifactorial compound stimulation method for a modeling period of 21 days. After modeling, rats in the modeling group were further randomly divided into a model group, a Pishu (BL20) acupressure group, and a ginsenoside group, with 8 rats in each group. The blank group and model group received restraint fixation and intragastric administration of physiological saline at 1 mL/day. The Pishu (BL20) acupressure group received restraint fixation, intragastric administration of physiological saline at 1 mL/day, and bilateral acupressure at Pishu (BL20). The ginsenoside group received restraint fixation and intragastric administration of ginsenoside aqueous solution at 1 mL/day. All interventions were performed once daily for 14 days. During the experiment, semiquantitative scoring of general condition, body weight measurement, exhaustive swimming test, and open field test were conducted. After the intervention, calcium-cobalt adenosine triphosphatase (ATPase) staining was used to detect muscle fiber types in the erector spinae of rats. Transmission electron microscopy was employed to observe the ultrastructure of the erector spinae. ELISA was used to measure the ATP contents in the erector spinae. Real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) was applied to detect the messenger ribonucleic acid (mRNA) expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 α) in the erector spinae. Western blot analysis was performed to assess the protein expression levels of p38 MAPK and PGC-1 α in the erector spinae. **Results** Following the intervention, compared with the blank group, rats in the model group showed significantly higher semiquantitative scores of general condition ($P<0.01$), and significantly lower body weight, exhaustive swimming time, total distance traveled and number of entries into the central area in the open field test ($P<0.01$). In the model group, myofibrils in the erector spinae were disorganized, the number of mitochondria was reduced, the proportion of type I muscle fibers decreased while type II muscle fibers increased, and the ATP content, PGC-1 α mRNA expression, as well as the relative expression of p38 MAPK and PGC-1 α proteins were all significantly reduced ($P<0.01$). Compared with the model group, both the Pishu (BL20) acupressure group and the ginsenoside group showed decreased semiquantitative scores of general condition ($P<0.05$), and increased body weight, exhaustive swimming time, total distance traveled and number of entries into the central area ($P<0.05$, $P<0.01$). In these two groups, the arrangement of myofibrils in the erector spinae became more orderly, the number of mitochondria increased, the proportion of type I muscle fibers increased while type II decreased, and ATP content, PGC-1 α mRNA expression, and the relative expression of p38 MAPK and PGC-1 α proteins were elevated ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the ginsenoside group, there was no statistically significant difference in semiquantitative score of general condition, body weight, exhaustive swimming time, total distance in the open field test, number of entries into the central area, ultrastructural observation under electron microscopy, proportions of type I and II muscle fibers, ATP content, and relative protein expression levels of p38 MAPK and PGC-1 α between the Pishu (BL20) acupressure group and the ginsenoside group ($P>0.05$). However, the Pishu (BL20) acupressure group showed a significantly higher expression of PGC-1 α mRNA ($P<0.01$). **Conclusion** Acupressure at Pishu (BL20) can effectively ameliorate fatigue, exercise capacity, and anxiety in rats with CFS, and promote skeletal muscle fiber remodeling. The underlying mechanism may be related to the activation of the p38 MAPK/PGC-1 α signaling pathway.

[Keywords] chronic fatigue syndrome; acupressure; Pishu (BL20); peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; skeletal muscle remodeling

慢性疲劳综合征(chronic fatigue syndrome, CFS)是一种以持续或反复发作的严重疲劳为主要表现,常伴有劳累后不适、慢性疼痛、睡眠紊乱、认知障碍和抑郁等症状的慢性致残性疾病^[1]。CFS全球发病率为0.1%~2.2%^[2],该病导致患者生活质量显著降低,并对社会经济造成巨大负担^[3]。目前,CFS治疗尚缺

乏特效药物,主要依赖于对症支持治疗和认知行为疗法,但疗效有限且难以逆转核心病理进程^[4]。近年来,推拿在CFS治疗中展现出潜在临床价值。作为一种安全有效的中医外治法,推拿可改善CFS患者的疲劳、焦虑及睡眠障碍,提高CFS患者生活质量水平^[5],但其作用机制尚未完全阐明。

骨骼肌疲劳被认为是 CFS 的核心病理生理特征之一^[6],CFS 骨骼肌病理改变具体表现为 I 型慢肌纤维比例减少、II 型快肌纤维比例增加及线粒体功能障碍^[7]。孙莉莉等^[8]通过生物信息学筛选发现,过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-Alpha, PGC- 1α) 可能是调控骨骼肌疲劳的关键靶点。研究证实,PGC- 1α 表达可促进骨骼肌重塑,诱导 II 型快肌纤维向 I 型慢肌纤维转化,并增强线粒体生物合成和能量代谢^[9-10]。p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK) 是激活 PGC- 1α 表达及其功能的上游关键信号途径^[11-12]。课题组前期研究发现,推拿可提高 CFS 大鼠竖脊肌 PGC- 1α 含量,并改善骨骼肌的萎缩情况^[13]。基于以上理论,p38 MAPK/PGC- 1α 信号通路可能是推拿缓解 CFS 骨骼肌疲劳的潜在作用靶点。

本研究通过构建 CFS 大鼠模型,观察点按脾俞穴干预对大鼠运动行为学表现、竖脊肌 I 型与 II 型肌纤维比例、竖脊肌超微结构、三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 含量以及 p38 MAPK/PGC- 1α 基因和蛋白表达水平的影响,进而探究点按脾俞穴对 CFS 骨骼肌重塑的影响及其潜在分子作用机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级健康成年雄性 SD 大鼠 32 只,体质量 200~250 g,来源为湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物许可证为 SCXK(湘)2021-0002。将大鼠分笼饲养于湖南中医药大学动物中心 SPF 级实验室,置于温度 (24±2) °C、湿度 50%~60%、昼夜等长循环光照的环境,喂养普通饲料及蒸馏水,适应性饲养 7 d。

1.2 伦理审查

本研究经湖南中医药大学动物伦理委员会审查批准,批准编号:HNUCM21-2404-32,实验动物的护理和实验操作严格遵循实验动物福利伦理的相关规定。

1.3 药物

人参皂苷片,25 mg/片,沈阳东昂制药有限公司

生产(生产批号:Z20026640)。

1.4 试剂与仪器

异氟烷(深圳市瑞沃特生命科技有限公司,批号:R510-22);ATP 含量测试盒(南京建成生物工程研究所,货号:A095-1-1);p38 MAPK 抗体、GAPDH 抗体(上海埃必威生物技术有限公司,货号:CY5262、AB0037);PGC- 1α 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号:66368-1-I G);二抗(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号:G1213);RNA 提取试剂、qPCR 预混液、qPCR 扩增液(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,货号:R401-01、R223-01、Q712-02);GelRed 核酸染料(美国 Biotium 公司,货号:41003);ATP 酶染色试剂盒(武汉皮诺飞生物科技有限公司,货号:P0131)。

呼吸麻醉机(深圳市瑞沃特生命科技有限公司,型号:R500 通用型);按法刺激仪(自制,专利号:ZL 202210366733.1);酶标仪、荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司,型号:iMark、CFX Connect);石蜡包埋机(德国徕卡公司,型号:EG1150);高速组织研磨仪(武汉赛维尔生物科技有限公司,型号:KZ-II);冰冻切片机(美国 Thermo 公司,型号:HM525 NX);PCR 梯度基因扩增仪(美国 SCILOGEX 公司,型号:SCI1000-G)。

1.5 实验操作具体时间节点

实验操作具体时间节点:实验第 1 天起,进行为期 21 d 造模;实验第 22 天起,进行为期 14 d 的干预。实验共计 36 d,自实验第 1 天起,每隔 7 天进行实验大鼠一般情况半定量评分评估、体质量测量、力竭游泳实验、旷场实验。

2 方法

2.1 造模及分组

32 只大鼠按随机数字表法选定 8 只为空白组,不采取措施,剩下 24 只大鼠为造模组,以多因素复合应激刺激法^[14-15]建立 CFS 模型,造模周期为 21 d,具体方法如下。(1)强迫负重游泳:造模组大鼠采取力竭性训练,尾部捆绑自量 3% 的焊锡丝,于水温 (25±2) °C、水深超 45 cm 的水桶内游泳至力竭状态,大鼠浮在水面不动时,实验人员进行驱赶使其维持运动,至大鼠力竭。每天 1 次,持续 21 d。力竭标准:大鼠动作失调,无法继续游泳,沉入水下无法浮

出超过 10 s。将力竭大鼠捞起后迅速擦干毛发,置于饲养笼中休息。(2)慢性应激刺激:造模期间每天随机对造模组大鼠进行两种可承受范围内的应激刺激,应激刺激方式包含:12 h 禁食;12 h 禁水;通宵照明;夹尾 1 min;噪声干扰(持续 1 h 110 dB);足底电击(强度 1 mA,30 V,每次 30 s,间隔 1 min 再次刺激,共行 5 次)。每天 1 次,持续 21 d。

根据一般情况半定量评分观察表对大鼠精神状态、粪便性状、皮毛色泽及耳尾颜色进行评分,总评分 ≥ 4 分表明造模成功^[15-16]。造模结束后,按随机数字表法将造模成功的 24 只大鼠分为模型组、点按脾俞组和人参皂苷组,每组 8 只。

2.2 干预方法

空白组、模型组大鼠采取捆绑固定并给予生理盐水灌胃,1 mL/d,共 14 d。

人参皂苷组大鼠采取捆绑固定并给予人参皂苷水溶液灌胃^[17](按总皂苷含量计,浓度为 17.49 mg/mL),每次 1 mL,每天 1 次,连续 14 d。

点按脾俞组大鼠采取捆绑固定、生理盐水灌胃 1 mL/d 和点按脾俞穴。大鼠在动物气体麻醉机的协助下以 3% 浓度异氟烷吸入麻醉,俯卧位捆绑固定,采用按法刺激仪于背部双侧脾俞穴^[18-19]行按法操作,根据前期实验数据^[20]将按法刺激仪的力量参数设置为 0.14 kg,单侧刺激时间 7.5 min,双侧共计 15 min,每天 1 次,连续 14 d。

2.3 取材

行为学检测结束后,将 32 只大鼠用 3% 的戊巴比妥钠溶液根据体质量(25 mg/kg)腹腔注射方式处死,俯卧位固定,沿背部正中中线切开皮肤,剔除皮毛、筋膜,分离出脊柱周围肌肉,剥离双侧竖脊肌,4 ℃ 生理盐水洗净血液后,将肌肉组织修剪整齐后分装。根据检测指标,将大鼠竖脊肌一部分组织放入电镜固定液中固定,拟行透射电镜观察;另一部分组织装入 2 mL EP 管,液氮速冻后于 -80 ℃ 冰箱保存,拟行分子生物学及组织形态学检查。

2.4 观察指标

2.4.1 一般情况 一般情况包括大鼠一般情况半定量评分观察表评分和大鼠体质量,每隔 7 天记录 1 次。大鼠一般情况半定量评分观察表常用于评价 CFS 造模情况,总评分 ≥ 4 分表明造模成功^[15-16]。体质量下

降在一定程度上可反映大鼠的疲劳程度。

2.4.2 行为学检测 (1)力竭游泳实验^[21]:采用力竭游泳实验反映动物的运动耐力及疲劳程度。大鼠尾部捆绑自重 3% 的焊锡丝,于水温(25 $\pm$ 2) ℃、水深超 45 cm 水桶内强迫游泳至力竭状态。力竭标准:大鼠动作失调,无法继续游泳,口鼻部沉入水下无法浮起超过 10 s。记录大鼠自开始游泳至达到力竭标准的时长。

(2)旷场实验^[22]:采用旷场实验观察大鼠的自主活动能力和心理状态。将大鼠放入旷场实验箱底面的中央格内,观察 6 min 内大鼠的运动总路程和进入中央区次数。运动总路程反映大鼠主动运动能力,进入中央区次数反映大鼠的焦虑状态。

2.4.3 肌纤维类型检测 采用 ATP 酶钙钴法染色,取各组大鼠竖脊肌,冷冻切片,切片厚度 10 μ m,滴加酸性前孵育液染色 15 min,去除多余染液,在含 ATP 的底物液中孵育 30 min,去除多余染液后,在 1% 氯化钙溶液中孵育 10 min,冲洗后立即放入 1% 硝酸钴溶液孵育 5 min,冲洗后硫化铵溶液显色 5 min,再次冲洗去除多余染液,经梯度乙醇脱水和二甲苯透明后,显微镜下依据染色深浅区分肌纤维类型,Ⅰ型纤维深染呈现黑色或棕黑色,Ⅱ型纤维着色较浅。

2.4.4 竖脊肌超微结构观察 大鼠竖脊肌切割成 1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm 的组织块,以 0.1 mol 二甲胂酸钠缓冲液 4 ℃ 下冲洗,于 1% 锇酸和 2% 醋酸双氧铀中各固定 2 h,组织块固定后经梯度脱水、环氧树脂包埋,60 ℃ 孵育 48 h 后,制成厚度 70 nm 的超薄切片,以醋酸双氧铀、柠檬酸铅双染色。经透射电镜在 5 000~20 000 倍下观察竖脊肌的超微结构。

2.4.5 竖脊肌中 ATP 含量检测 取各组大鼠竖脊肌,按照 ELISA 试剂盒说明书操作,检测各组大鼠竖脊肌中的 ATP 含量。

2.4.6 竖脊肌中 PGC-1 α mRNA 表达检测 采用实时荧光定量 PCR 法,取大鼠竖脊肌约 100 mg,加入 1 mL Trizol 后充分匀浆,依次加入氯仿、异丙醇提取总 RNA,计算总 RNA 浓度及纯度。将 RNA 逆转录为 cDNA,逆转录条件为 50 ℃ 延伸 15 min,85 ℃ 失活 5 min,参考 SYBR Green 染料法进行循环扩增,扩增条件:95 ℃ 预变性 30 s,95 ℃ 变性 10 s,60 ℃ 退火 30 s,95 ℃ 延伸 15 s,共 40 个循环。以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达水

平。由擎科生物科技北京股份有限公司合成引物,引物序列详见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	正向:ACAGCAACAGGCTGGTGGAC	253
	反向:TTTGAGGGTGCAGCGAACTT	
PGC-1 α	正向:CCGCGAACATATTCGAGAAG	222
	反向:GCTTCTTAAGTAGAGACGGC	

2.4.7 竖脊肌中 p38 MAPK、PGC-1 α 蛋白表达水平检测 采用 Western blot 检测,取大鼠竖脊肌,加入适量的 RIPA 裂解液,充分匀浆后冰上提取蛋白质。采用 BCA 法测定蛋白浓度,配制蛋白上样液,100 $^{\circ}\text{C}$ 高温下加热变性。将变性蛋白上样液加入凝胶上样孔中进行电泳。电泳后转移蛋白至 PVDF 膜上,并在含 5% 脱脂牛奶的 TBST 溶液中封闭 1 h。TBST 洗膜后加入一抗 p38 MAPK(1:2 000 稀释)、PGC-1 α (1:50 000 稀释)、GAPDH(1:5 000 稀释)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 洗膜后加入二抗(1:15 000 稀释),在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后洗膜。加入 ECL 发光液,于化学发光凝胶成像仪上显影。以 GAPDH 为内参蛋白,用 Image Lab 3.0 软件测量灰度值,用 p38 MAPK 和 PGC-1 α 的灰度值与内参灰度值的比值进行半定量分析,以计算各组蛋白的相对表达量。

2.5 统计学方法

运用 SPSS 25.0 进行统计学分析。符合正态分布并且方差齐的计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较用 LSD 法;不符合正态分布时采用 Kruskal-Wallis H 检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠一般情况半定量评分比较

实验第 1 天(造模前),各组大鼠一般情况半定量评分均为 0 分。实验第 22 天(造模后),与空白组比较,模型组、点按脾俞组和人参皂苷组大鼠一般情况半定量评分显著升高($P<0.01$),评分均超过 4 分,提示 24 只大鼠均成功构建 CFS 模型,且模型组、点按脾俞组和人参皂苷组大鼠之间的一般情况半定量评分差异无统计学意义($P>0.05$)。实验第 36 天(干

预结束后),与空白组比较,模型组大鼠一般情况半定量评分显著升高($P<0.01$);与模型组比较,点按脾俞组和人参皂苷组大鼠的一般情况半定量评分降低($P<0.05$);点按脾俞组和人参皂苷组大鼠之间的一般情况半定量评分差异无统计学意义($P>0.05$)。详见图 1。

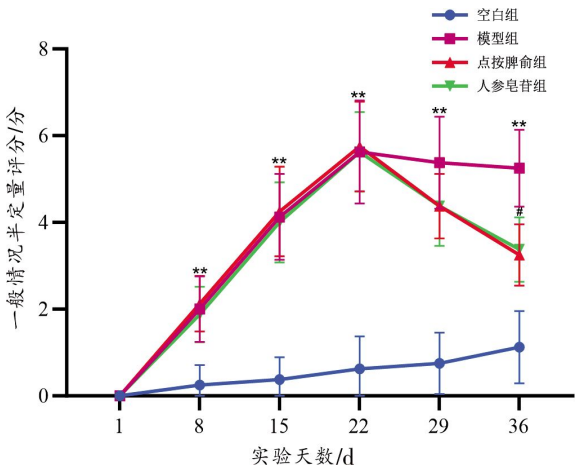


图 1 各组大鼠一般情况半定量评分比较($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Fig.1 Semi-quantitative comparison of the general condition among groups of rats ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

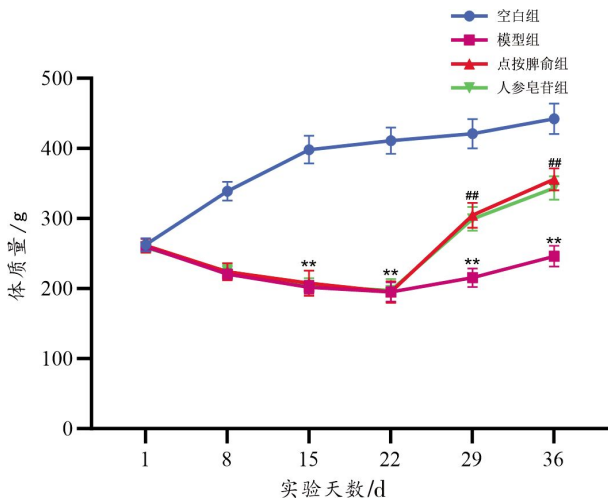
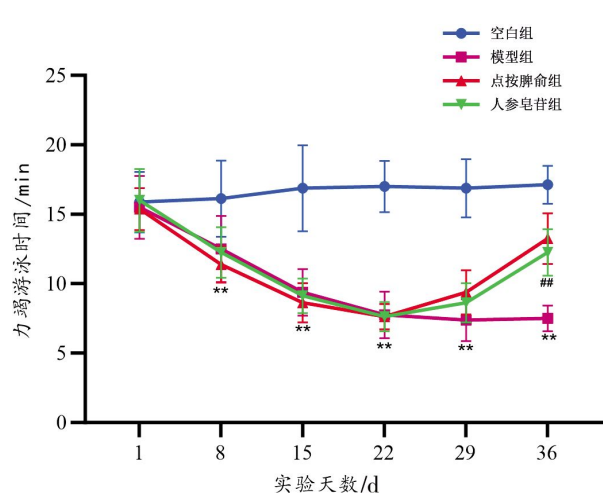
注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$ 。

3.2 各组大鼠体质量比较

实验第 1 天(造模前),与空白组比较,模型组、点按脾俞组和人参皂苷组体质量差异无统计学意义($P>0.05$)。实验第 22 天(造模后),与空白组比较,模型组、点按脾俞组和人参皂苷组大鼠体质量显著降低($P<0.01$);模型组、点按脾俞组和人参皂苷组大鼠之间的体质量差异无统计学意义($P>0.05$)。实验第 36 天(干预结束后),与空白组比较,模型组大鼠体质量显著降低($P<0.01$);与模型组比较,点按脾俞组和人参皂苷组大鼠体质量显著升高($P<0.01$);点按脾俞组与人参皂苷组大鼠之间的体质量差异无统计学意义($P>0.05$)。详见图 2。

3.3 各组大鼠力竭游泳时间比较

实验第 1 天(造模前),与空白组比较,模型组、点按脾俞组和人参皂苷组大鼠力竭游泳时间差异无统计学意义($P>0.05$)。实验第 22 天(造模后),与空白组比较,模型组、点按脾俞组和人参皂苷组大鼠力竭游泳时间显著降低($P<0.01$),且 3 组大鼠之间的力竭游泳时间差异无统计学意义($P>0.05$)。实验第

图2 各组大鼠体质量比较($\bar{x} \pm s, n=8$)Fig.2 Comparison of body weight among groups of rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.01$ 。图3 各组大鼠力竭游泳时间比较($\bar{x} \pm s, n=8$)Fig.3 Comparison of exhaustive swimming time among groups of rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.01$ 。

36 天(干预结束后),与空白组比较,模型组大鼠力竭游泳时间均显著下降($P<0.01$);与模型组比较,点按脾俞组与人参皂苷组大鼠力竭游泳时间均显著升高($P<0.01$);点按脾俞组和人参皂苷组大鼠之间的力竭游泳时间差异无统计学意义($P>0.05$)。详见图3。

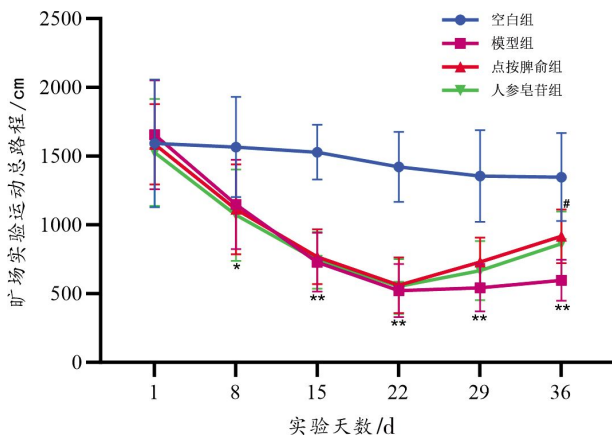
3.4 各组大鼠旷场实验运动总路程和进入中央区次数比较

实验第 1 天(造模前),与空白组比较,模型组、点按脾俞组和人参皂苷组大鼠旷场实验运动总路程和进入中央区次数差异无统计学意义($P>0.05$)。实验第 22 天(造模后),与空白组比较,模型组、点按脾

俞组和人参皂苷组大鼠旷场实验运动总路程和进入中央区次数显著降低($P<0.01$)。实验第 36 天(干预结束后),与空白组比较,模型组大鼠旷场实验运动总路程和进入中央区次数显著降低($P<0.01$);与模型组比较,点按脾俞组和人参皂苷组大鼠旷场实验运动总路程和进入中央区次数升高($P<0.05$);点按脾俞组和人参皂苷组大鼠之间的旷场实验运动总路程和进入中央区次数差异无统计学意义($P>0.05$)。详见图 4。

3.5 各组大鼠竖脊肌超微结构比较

电镜下,可见空白组大鼠竖脊肌肌节长短均一,肌原纤维排列整齐,肌节中明暗带交界清楚,规则交

图4 各组大鼠旷场实验运动总路程和进入中央区次数比较($\bar{x} \pm s, n=8$)Fig.4 Comparison of total distance traveled and number of entries into the central area in the open field test among groups of rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$ 。

替排列,Z 线和 M 线连续且清晰;线粒体为卵圆形,结构形态均正常。模型组大鼠竖脊肌可见肌原纤维排列紊乱,甚至出现部分肌纤维断裂,部分横纹模糊不清,肌节排列不规则,暗带紊乱,部分 M 线模糊或消失,Z 线扭曲断裂,有水纹样变出现;线粒体数量减少,结构出现异常,肿胀变圆、嵴结构减少,呈空泡状。与模型组比较,点按脾俞组和人参皂苷组大鼠竖脊肌肌原纤维排列趋于整齐,明暗带交界较清楚,M 线较明显,Z 线较整齐,部分出现错位,肌膜下可见线粒体聚集;线粒体数量增多,呈细长杆状和卵圆形,或呈融合形态,仅少数肿胀或嵴结构紊乱。点按脾俞组和人参皂苷组大鼠竖脊肌电镜表现接近。详见图 5。

3.6 各组大鼠竖脊肌 I 型和 II 型肌纤维比例比较

ATP 酶染色可见,空白组大鼠竖脊肌 I 型和 II 型肌纤维比例平衡。与空白组比较,模型组大鼠 I

型肌纤维比例减少,II 型肌纤维比例增加。与模型组比较,点按脾俞组和人参皂苷组大鼠竖脊肌 I 型肌纤维比例增加,II 型肌纤维比例减少。详见图 6。

3.7 各组大鼠竖脊肌中 ATP 含量、PGC-1 α mRNA 表达比较

与空白组比较,模型组竖脊肌中 ATP 含量及 PGC-1 α mRNA 表达显著降低($P<0.01$);与模型组比较,点按脾俞组和人参皂苷组大鼠竖脊肌中 ATP 含量及 PGC-1 α mRNA 表达升高($P<0.05$, $P<0.01$);与人参皂苷组比较,点按脾俞组大鼠竖脊肌中 ATP 含量差异无统计学意义($P>0.05$),PGC-1 α mRNA 表达显著升高($P<0.01$)。详见表 2。

3.8 各组大鼠竖脊肌中 p38 MAPK 和 PGC-1 α 蛋白相对表达量比较

与空白组比较,模型组竖脊肌中 p38 MAPK、PGC-1 α 蛋白相对表达量显著降低($P<0.01$);与模

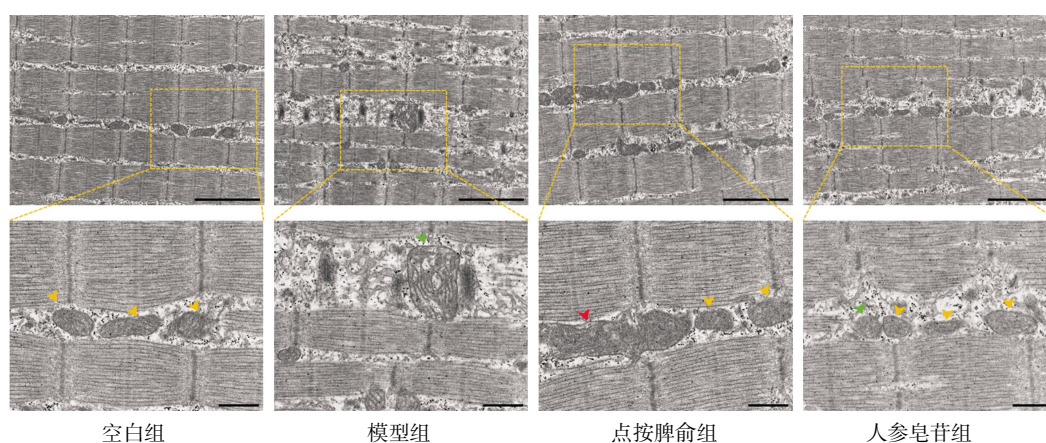


图 5 各组大鼠竖脊肌超微结构比较

Fig.5 Comparison of the ultrastructure of the erector spinae muscle among groups of rats

注:箭头所指为线粒体,黄色箭头所指为正常线粒体,绿色箭头所指为肿胀线粒体,红色箭头所指为融合形态线粒体;上图标尺=5 μm ,下图标尺=500 nm。

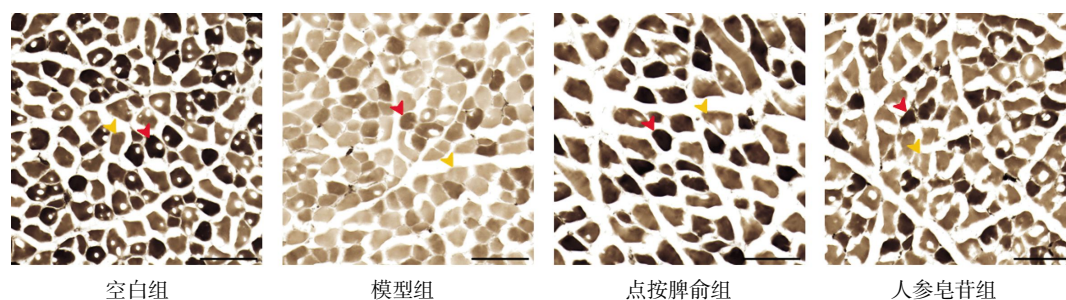


图 6 各组大鼠竖脊肌 I 型和 II 型肌纤维比例比较

Fig.6 Comparison of the proportions of type I and type II muscle fibers in the erector spinae muscle among groups of rats

注:红色箭头所指为 I 型纤维深染呈现黑色或棕黑色,黄色箭头所指为 II 型纤维浅染呈现浅灰色;标尺=200 μm 。

表 2 各组大鼠竖脊肌中 ATP 含量及 PGC-1 α mRNA 表达比较

Table 2 Comparison of ATP content and PGC-1 α mRNA expression in the erector spinae muscle among groups of rats

组别	<i>n</i>	ATP/(μ mol/g prot)	PGC-1 α mRNA
空白组	8	3 424.25 $\pm$ 1 106.80	5.48 $\pm$ 0.37
模型组	8	905.93 $\pm$ 281.66**	1.16 $\pm$ 0.14**
点按脾俞组	8	1 885.87 $\pm$ 413.23*	3.58 $\pm$ 0.30***
人参皂苷组	8	1 780.26 $\pm$ 632.04*	2.30 $\pm$ 0.18**
<i>F</i> 值		14.027	148.516
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注:与空白组比较,***P*<0.01;与模型组比较,**P*<0.05;与人参皂苷组比较,****P*<0.01。

型组比较,点按脾俞组和人参皂苷组大鼠竖脊肌中 p38 MAPK 和 PGC-1 α 蛋白相对表达量显著升高 (*P*<0.01);与人参皂苷组比较,点按脾俞组大鼠竖脊肌中 p38 MAPK 和 PGC-1 α 蛋白相对表达量差异无统计学意义 (*P*>0.05)。详见表 3,图 7。

表 3 各组大鼠竖脊肌中 p38 MAPK 和 PGC-1 α 蛋白相对表达量比较

Table 3 Comparison of relative expression levels of p38 MAPK and PGC-1 α proteins in the erector spinae muscle among groups of rats

组别	<i>n</i>	p38 MAPK/GAPDH	PGC-1 α /GAPDH
空白组	8	1.03 $\pm$ 0.21	0.90 $\pm$ 0.05
模型组	8	0.19 $\pm$ 0.09**	0.22 $\pm$ 0.04**
点按脾俞组	8	0.64 $\pm$ 0.04**	0.39 $\pm$ 0.02**
人参皂苷组	8	0.59 $\pm$ 0.05**	0.38 $\pm$ 0.07**
<i>F</i> 值		25.383	118.780
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

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

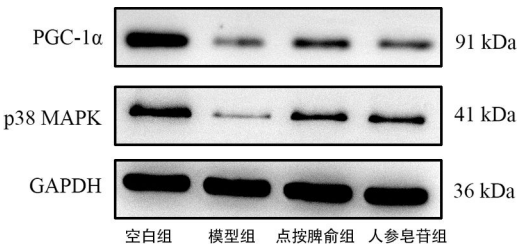


图 7 各组大鼠竖脊肌中 p38 MAPK 和 PGC-1 α 蛋白电泳条带图

Fig.7 Electrophoresis bands of p38 MAPK and PGC-1 α proteins in the erector spinae muscle among groups of rats

4 讨论

CFS 归属于中医学“虚劳”“五劳”范畴,病位多在脏腑,病机以脾虚为本,以肝郁肾亏为标^[23]。中医推拿治疗 CFS 重在补虚,通过调整脏腑功能平衡,通调营卫阴阳,在改善疲劳、调节机体功能方面具有独特的优势。《素问·痿论篇》中认为“脾主肌肉”,脾气亏虚则水谷精微输布失常,肌肉失于濡养而痿软乏力。脾俞穴作为脾脏精气在足太阳膀胱经的输注之所,是调节 CFS 的关键腧穴。多项基于文献分析法的研究进一步证实,中医治疗 CFS 的选穴归经以足太阳膀胱经为主,选穴集中于背部背俞穴,其中脾俞穴使用频率最高^[24-26]。课题组前期研究表明,按法可改善线粒体超微结构,促进线粒体修复^[27]。进一步研究发现,点按脾俞、胃俞穴可缓解 CFS 大鼠外周炎症,改善疲劳状态及运动水平^[28]。基于以上理论和 CFS 慢性虚弱证候的特点,本研究选取点按脾俞穴作为干预手段。

本研究通过一般情况半定量评分观察表得分和大鼠体质量评估 CFS 大鼠疲劳状态,以力竭游泳实验测试 CFS 大鼠被迫运动能力,采用旷场实验测试 CFS 大鼠主动运动能力和焦虑状态。研究结果表明,点按脾俞穴改善了 CFS 大鼠的疲劳程度、被迫运动能力、主动运动能力以及焦虑状态。ATP 酶染色和透射电镜结果显示,与空白组比较,模型组大鼠 I 型肌纤维比例减少,II 型肌纤维比例增加,肌纤维排列紊乱,线粒体数量减少,结构出现异常,肿胀变圆、线粒体嵴结构减少呈空泡状;而点按脾俞穴增加了 CFS 大鼠 I 型肌纤维的比例,减少了 II 型肌纤维的比例,使肌纤维排列更加整齐,并促进了线粒体数量增加和结构改善。此外,研究结果还显示,模型组大鼠竖脊肌中 ATP 含量显著低于空白组;而与模型组比较,点按脾俞组大鼠竖脊肌中 ATP 含量明显升高,这间接反映了点按脾俞穴促进了 II 型肌纤维向 I 型肌纤维的转化。上述结果表明,CFS 会导致骨骼肌 I 型肌纤维数量减少、II 型肌纤维数量增加以及线粒体功能和结构异常,而点按脾俞穴改善了上述病理变化,并促进了 CFS 患者疲劳程度、运动能力以及焦虑状态的恢复。

骨骼肌疲劳是 CFS 躯体疲劳的特征性病理改变,表现为 I 型肌纤维含量减少、II 型肌纤维含量增

加以以及线粒体结构和功能的改变^[29-30]。骨骼肌中的 ATP 在一定程度上反映肌纤维类型, I 型肌纤维主要通过有氧代谢途径产生大量 ATP, 而 II 型肌纤维依靠无氧糖酵解产生少量 ATP^[31]。已有研究证明, 激活 p38 MAPK/PGC-1 α 信号通路可诱导骨骼肌纤维从 I 型肌纤维转化为 II 型肌纤维, 并促进线粒体生物发生, 促进骨骼肌的纤维重塑^[12,32]。激活 p38 MAPK 信号通路增强了 PGC-1 α 表达^[11], PGC-1 α 是一种转录共激活因子, 通过与其他转录因子的结合, 从而增强靶基因的转录活性^[33-34]。PGC-1 α 的表达能够改变肌细胞增强因子 2 (myocyte enhancer factor 2, MEF2) 活性, 促进 II 型快肌纤维向 I 型慢肌纤维转化^[35-36]。此外, PGC-1 α 能够与下游目标基因核呼吸因子 (nuclear respiratory factor, NRF)-1、NRF-2 结合, 激活线粒体转录因子 A (mitochondrial transcription factor A, TFAM) 的表达, 从而促进线粒体 DNA 的复制和转录, 改善线粒体的生物合成^[37-39]。

基于以上结果, 本研究进一步探索了点按脾俞穴对 CFS 大鼠骨骼肌重塑的作用机制。结果发现, 相较于空白组, 模型组大鼠竖脊肌中 PGC-1 α mRNA 和蛋白表达水平均降低, p38 MAPK 蛋白表达水平降低; 而点按脾俞穴干预 CFS 模型大鼠后, 明显提高了 PGC-1 α mRNA 和蛋白表达水平以及 p38 MAPK 蛋白表达水平。这提示点按脾俞穴可能通过激活 p38 MAPK/PGC-1 α 信号通路促进骨骼肌重塑, 从而改善骨骼肌疲劳和 CFS 的疲劳状态。

人参皂苷是人参中提取的主要活性成分, 具有明确的抗疲劳作用^[40]。研究证实, 人参皂苷可通过提高机体有氧代谢合成 ATP 的能力, 增加肌肉供能及机体对底物糖的利用率, 从而缓解疲劳^[41-42]。故本研究阳性对照药物选用人参皂苷, 结果显示, 人参皂苷干预可促进 CFS 骨骼肌的重塑以及 p38 MAPK/PGC-1 α 信号通路的激活, 从而实现抗疲劳作用。而点按脾俞穴干预 CFS 显示出与人参皂苷相当或更显著的疗效。

综上所述, 点按脾俞穴可有效改善 CFS 大鼠的疲劳状态、运动能力以及焦虑状态, 并促进骨骼肌纤维重塑, 其机制可能是与激活 p38 MAPK/PGC-1 α 信号通路有关。然而, 本研究存在以下局限性: (1) 机制验证深度不足, 缺乏对目标信号通路的反向验证; (2) 下游信号未充分探索。后续将通过设置 p38 MAPK/

PGC-1 α 信号通路关键蛋白的抑制剂或激动剂展开进一步研究, 并通过免疫共沉淀探索 PGC-1 α 与其他转录因子 (如 MEF2、NRF-1、NRF-2) 的相互作用, 以进一步阐明骨骼肌重塑的分子调控机制。

参考文献

- [1] 方思瞳, 姚重界, 孔令军, 等. 慢性疲劳综合征评价量表选取及应用进展[J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(9): 4264-4270.
- [2] LUO L B, ZHANG Y T, HUANG T, et al. A description of the current status of chronic fatigue syndrome and associated factors among university students in Wuhan, China[J]. *Frontiers in Psychiatry*, 2023, 13: 1047014.
- [3] PHEBY D F H, FRIEDMAN K J, MUROVSKA M, et al. Turning a corner in ME/CFS research[J]. *Medicina*, 2021, 57(10): 1012.
- [4] KIM D Y, LEE J S, PARK S Y, et al. Systematic review of randomized controlled trials for chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis (CFS/ME)[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2020, 18(1): 7.
- [5] 赵云, 张苗苗, 金杰. 中医药治疗慢性疲劳综合征研究进展[J]. *中国现代应用药学*, 2023, 40(11): 1571-1577.
- [6] MAXMEN A. A reboot for chronic fatigue syndrome research[J]. *Nature*, 2018, 553(7686): 14-17.
- [7] BIZJAK D A, OHMAYER B, BUHL J L, et al. Functional and morphological differences of muscle mitochondria in chronic fatigue syndrome and post-COVID syndrome[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(3): 1675.
- [8] 孙莉莉, 彭丽娜, 李铮, 等. 大麻二酚对运动疲劳骨骼肌氧化应激作用靶点的生物信息学筛选[C]//第十三届全国体育科学大会论文摘要集——专题报告(运动医学分会). 天津, 2023: 12-14.
- [9] 陈娟. MEF2/PGC-1 α 信号通路在骨骼肌纤维类型转化中的作用[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2017.
- [10] MORTENSEN O H, FRANDSEN L, SCHJERLING P, et al. PGC-1 α and PGC-1 β have both similar and distinct effects on myofiber switching toward an oxidative phenotype[J]. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 2006, 291(4): E807-E816.
- [11] AKIMOTO T, POHNERT S C, LI P, et al. Exercise stimulates Pgc-1 α transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(20): 19587-19593.
- [12] SONG P K, ZHAO J M, LI F, et al. Vitamin A regulates mitochondrial biogenesis and function through p38 MAPK-PGC-1 α signaling pathway and alters the muscle fiber composition of sheep[J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2024, 15(1): 18.
- [13] 林巧婷, 钟叶蓓, 杨尚林, 等. 背部推拿对慢性疲劳综合征大

- 鼠运动行为、氧化应激和炎症反应的影响[J]. 中国运动医学杂志, 2024, 43(1): 39–46.
- [14] CHI A P, SHEN Z M, ZHU W F, et al. Characterization of a protein-bound polysaccharide from *Herba Epimedii* and its metabolic mechanism in chronic fatigue syndrome[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2017, 203: 241–251.
- [15] 冯楚文, 屈媛媛, 孙忠人, 等. 电针抑制 NF- κ 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.
- [16] 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.
- [17] 刘长征, 雷波, 张鹏. 针刺对慢性疲劳综合征大鼠认知功能及海马神经元的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2021, 36(8): 1009–1011.
- [18] 刘继生, 张泓, 尹秀婷, 等. 大鼠“脾俞”穴的取穴方法研究[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(4): 1793–1794.
- [19] 实验动物常用穴位名称与定位 第2部分: 大鼠[J]. 世界针灸杂志(英文版), 2025, 35(2): 163–169.
- [20] 蒋全睿. 不同参数和方式按压心俞穴对局部温度影响的实验研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2018.
- [21] 孔凡秀, 杨琪, 董佳萍, 等. 人参皂苷 Rg1 对疲劳小鼠骨骼肌中 TFAM 和 NRF-1 基因表达的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2022, 41(2): 67–72.
- [22] KRAEUTER A K, GUEST P C, SARNYAI Z. The open field test for measuring locomotor activity and anxiety-like behavior[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2019, 1916: 99–103.
- [23] 张思宁, 刘微微, 韩秀珍, 等. 基于“脾-线粒体”相关从脾论治慢性疲劳综合征[J]. 世界中医药, 2025, 20(6): 1004–1010.
- [24] 覃书颖. 基于文献分析法的针灸治疗慢性疲劳综合征临床疗效评价及其选穴规律研究[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2022.
- [25] 陈唯依, 肖鑫冉, 王丽莉, 等. 基于数据挖掘的慢性疲劳综合征灸疗法临床应用规律探析[J]. 针灸临床杂志, 2022, 38(4): 41–47.
- [26] 冯楚文, 屈媛媛, 范桢亮, 等. 基于集合可视化分析系统探索灸法治疗慢性疲劳综合征的选穴规律[J]. 针灸临床杂志, 2021, 37(10): 43–51.
- [27] 江玉婷, 李铁浪, 李江山, 等. 推拿按法对慢性激痛点模型大鼠骨骼肌超微结构的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(1): 85–90.
- [28] 林巧婷, 钟叶蓓, 杨尚林, 等. 基于 α 7nAChR/NF- κ 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.
- [29] PIETRANGELO T, CAGNIN S, BONDI D, et al. Myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome from current evidence to new diagnostic perspectives through skeletal muscle and metabolic disturbances[J]. *Acta Physiologica*, 2024, 240(4): e14122.
- [30] MISSAILIDIS D, ANNESLEY S J, FISHER P R. Pathological mechanisms underlying myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome[J]. *Diagnostics*, 2019, 9(3): 80.
- [31] HARGREAVES M, SPRIET L L. Skeletal muscle energy metabolism during exercise[J]. *Nature Metabolism*, 2020, 2(9): 817–828.
- [32] WANG T, SUN X H, ZHANG Y D, et al. Baicalin promotes skeletal muscle fiber remodeling by activating the p38MAPK/PGC-1 α signaling pathway[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2025, 73(11): 6878–6889.
- [33] COPPI L, LIGORIO S, MITRO N, et al. PGC1s and beyond: Disentangling the complex regulation of mitochondrial and cellular metabolism[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(13): 6913.
- [34] QIAN L, ZHU Y L, DENG C, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) family in physiological and pathophysiological process and diseases[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2024, 9(1): 50.
- [35] NOVAKOVA K, TÖRÖK M, PANAJATOVIĆ M, et al. PGC-1 α and MEF2 regulate the transcription of the carnitine transporter OCTN2 gene in C2C12 cells and in mouse skeletal muscle[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(20): 12304.
- [36] KIM M S, FIELITZ J, MCANALLY J, et al. Protein kinase D1 stimulates MEF2 activity in skeletal muscle and enhances muscle performance[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2008, 28(11): 3600–3609.
- [37] RIUS-PÉREZ S, TORRES-CUEVAS I, MILLÁN I, et al. PGC-1 α , inflammation, and oxidative stress: An integrative view in metabolism[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 2020: 1452696.
- [38] SCARPULLA R C. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function[J]. *Physiological Reviews*, 2008, 88(2): 611–638.
- [39] ALIZADEH PAHLAVANI H, LAHER I, KNECHTLE B, et al. Exercise and mitochondrial mechanisms in patients with sarcopenia[J]. *Frontiers in Physiology*, 2022, 13: 1040381.
- [40] LUO C H, XU X R, WEI X C, et al. Natural medicines for the treatment of fatigue: Bioactive components, pharmacology, and mechanisms[J]. *Pharmacological Research*, 2019, 148: 104409.
- [41] 郑怡菲, 李涛, 赵余庆. 人参有效成分抗疲劳作用机制的研究进展[J]. 药物评价研究, 2023, 46(11): 2496–2504.
- [42] 赵文莉, 张馨, 王伟, 等. 人参茎叶总皂甙抗疲劳作用的体内实验研究[J]. 卫生研究, 2009, 38(2): 184–187.