

·针灸推拿·

本文引用: 巫继皇, 齐红梅, 陈辉, 王志明, 章伟, 郭建军. 赤凤迎源针刺法对面神经损伤模型大鼠 Ras/MEK/ERK 信号通路的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(7): 1277-1285.

赤凤迎源针刺法对面神经损伤模型大鼠 Ras/MEK/ERK 信号通路的影响

巫继皇¹, 齐红梅², 陈辉², 王志明², 章伟¹, 郭建军^{2*}

1. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208; 2. 湖南省中西医结合医院, 湖南长沙 410006

[摘要] **目的** 探讨赤凤迎源针刺法对面神经超微结构、丝裂原活化的细胞外信号调节激酶(mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase, MEK)、细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)及血清 KRas 蛋白表达的影响。**方法** 将 SD 大鼠随机分为空白对照组、模型组、常规针刺组、赤凤迎源针刺组, 每组 8 只。除空白对照组大鼠正常饲养外, 其他各组大鼠用面神经颊支压榨法诱导面神经损伤模型。造模成功后, 予以干预 2 周。干预结束后, 行电镜检查观察大鼠的面神经超微结构; 通过 HE 染色观察面神经组织形态组织学变化; ELISA 法检测血清 KRas 的表达水平; Western blot 检测面神经组织 MEK、ERK 蛋白的表达水平。**结果** 造模后, 与空白对照组比较, 另外 3 组大鼠动物行为学评分均明显升高($P<0.01$)。针刺 2 周后, 常规针刺组及赤凤迎源针刺组大鼠评分明显低于模型组($P<0.01$), 且赤凤迎源针刺组评分低于常规针刺组($P<0.01$)。针刺 2 周后, 与模型组对比, 常规针刺组及赤凤迎源针刺组面神经轴突纤维排列较紧密, 内质网较多, KRas 蛋白表达明显升高($P<0.05$), 面神经 MEK 蛋白、ERK 蛋白表达升高($P<0.05$), 且赤凤迎源针刺组均高于常规针刺组($P<0.05$)。**结论** 赤凤迎源针刺法可改善面神经损伤模型大鼠动物行为学, 上调 KRas、MEK 及 ERK 表达水平, 可能与激活 Ras/MEK/ERK 信号通路有关, 从而修复面神经损伤。

[关键词] 面神经损伤; 赤凤迎源; 大鼠; KRas 蛋白; MEK 蛋白; ERK 蛋白

[中图分类号] R245

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.07.019

Effects of Chifeng Yingyuan acupuncture method on Ras/MEK/ERK signaling pathway in a rat model of facial nerve injury

WU Jihuang¹, QI Hongmei², CHEN Hui², WANG Zhiming², ZHANG Wei¹, GUO Jianjun^{2*}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

2. Hunan Provincial Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Changsha, Hunan 410006, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of the Chifeng Yingyuan acupuncture method on the ultra microstructure of facial nerves, mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase (MEK), extracellular signal-regulated kinase (ERK), and serum KRas protein expressions. **Methods** SD rats were randomized into blank control, model, conventional acupuncture, and Chifeng Yingyuan acupuncture groups, with eight rats in each group. Except for the rats in the blank control group, which were raised normally, other groups of rats were induced with facial nerve injury models using the facial nerve buccal branch pressing method. After successful modeling, intervention was given for two weeks. After intervention, electron microscopy was performed to observe

[收稿日期] 2023-12-26

[基金项目] 湖南省中医药科研计划一般课题项目(D2022034); 湖南省中医药研究院院级课题项目(202122)。

[通信作者]* 郭建军, 男, 硕士, 副主任医师, 硕士研究生导师, E-mail: gjj1003@126.com。

the ultra microstructure of the facial nerve in rats; HE staining was employed to observe the morphological and histological changes of facial nerve tissues; ELISA was used to determine the expression level of serum KRas; Western blot was applied to examine the expression levels of MEK and ERK proteins in facial nerve tissues. **Results** After modeling, compared with the blank control group, the behavioral scores of the other three groups of rats significantly increased ($P<0.01$). After two weeks of acupuncture treatment, the scores of rats in the conventional acupuncture and the Chifeng Yingyuan acupuncture groups were significantly lower than those in the model group ($P<0.01$), and the scores in the Chifeng Yingyuan acupuncture group were lower than those in the conventional acupuncture group ($P<0.01$). After two weeks of acupuncture treatment, compared with the model group, the conventional acupuncture and the Chifeng Yingyuan acupuncture groups had a tighter arrangement of facial nerve axon fibers, more endoplasmic reticulum, and a significant increase in KRas protein expression ($P<0.05$). The expression of facial nerve MEK protein and ERK protein increased ($P<0.05$), and the expression levels of these three proteins (KRas, MEK, and ERK) in the Chifeng Yingyuan acupuncture group were higher than in the conventional acupuncture group ($P<0.05$). **Conclusion** The Chifeng Yingyuan acupuncture method can improve the behavioral outcomes of the rat model of facial nerve injury and upregulate the expression levels of KRas, MEK, and ERK, which may be related to the activation of the Ras/MEK/ERK signaling pathway, thereby repairing facial nerve injury.

[**Keywords**] facial nerve injury; Chifeng Yingyuan; rats; KRas protein; mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase protein; extracellular signal-regulated kinase protein

面神经损伤,亦称周围性面瘫,是指创伤、非特异性炎症、病毒感染、肿瘤、自身免疫疾病等各种原因损伤面神经,导致面神经功能障碍。其临床表现主要有抬眉困难、眼睑闭合不全、鼻唇沟变浅、口角歪斜等症状,当其损伤面神经颅内段时,可以合并出现味觉减退、腺体分泌障碍等症状^[1]。据流行病学调查,面神经损伤在中国的发病率高达4.25%^[2]。随着现代生活节奏加快,人们生活工作压力增大、劳逸失调、饮食结构不合理、体质逐渐下降,其发病率还在继续增长^[3]。目前,西医治疗本病尚无特效疗法,主要是激素、营养神经、抗病毒及手术治疗,以消除水肿、改善面部血运、降低面神经内压^[4]。面神经损伤后的修复仍旧是困扰医学界的一大难题。面神经损伤后,局部微环境改变,面神经元细胞胞质浓缩,形成凋亡小体,神经元细胞开始凋亡,轴突数目减少^[5]。面神经损伤后修复主要与神经元胞体的存活数目和轴突再生速度有关^[6]。因此,增加神经元胞体存活率,加快轴突重生速度是促进损伤面神经恢复的关键。

赤凤迎源针刺法,为古代针法飞经走气四法之一,是临床中常用的催气行气的针刺手法。赤凤迎源针刺法为“复式”操作手法,其将三才理论与提插捻转、飞法等手法相结合,因其行气、调气的效果而被历代医家所推崇。赤凤迎源针刺法选穴以具有行气、通络作用的穴位为主,适用于治疗痿证、气滞类证、

痹病等病证。但是其相关生物学机制研究尚不清楚,故而需要对其进行相关研究,为面神经损伤后修复提供理论支持。本研究通过观察MAPK信号通路中KRas、MEK、ERK蛋白的表达及面神经超微结构形态变化,探讨赤凤迎源针刺法治疗周围性面瘫的可能机制,现报道如下。

1 实验材料

1.1 实验动物

选取成年雄性SD大鼠32只,体质量(250±20)g,来自湖南斯莱克景达动物实验公司。大鼠自由摄食与饮水,饲养温度24~26℃,相对湿度50%~70%,适应性喂养1周。本研究实验动物及条件符合国家科学技术委员会的《实验动物管理条例》相关规定,由湖南省中医药研究院动物实验伦理审查委员会批准(审批号:SY2022-0028)。

1.2 主要试剂

GTP酶KRas ELISA试剂盒(伊爱博科技股份有限公司,批号:3C318U);广谱彩虹预染蛋白Marker(10~180 kDa)、三(羟甲基)氨基甲烷(Hydroxymethylaminomethane, Tris-HCl)缓冲液(1.5 mol/L, pH 8.8)、Tris-HCl缓冲液(1 mol/L, pH 6.8)、还原性蛋白上样缓冲液(5×)、10%过硫酸铵(ammonium persulphate solution, APS)溶液、10%十二烷基磺酸钠(sodium-

dodecyl sulfate, SDS)溶液、四甲基乙二胺(tetra methyl ethylene diamine, TEMED)(1×, pH 7.5)、丙烯酰胺:亚甲基双丙烯酰胺溶液(Acrylamide-Bisacrylamide, Acr-Bis)(30%, 29:1)、Tris-甘氨酸电泳缓冲液(1×)、Western 转膜缓冲液(10×)、丽春红 S 染色液(10×)、脱脂奶粉、RIPA 裂解液(强)、蛋白酶抑制剂混合液(100×PIC)、磷酸酶抑制剂(10×)、ECL Plus 超敏发光液、钨酸、戊二醛(艾碧维生物科技有限公司, 批号:AWB0236、AWB0055、AWB0073、AWB0074、AWB0093、AWT0047、AWB0068、AWI0130、AWB0020、AWB0083、AWB0211、AWB0225、AWB0004、AWB0136、AWH0645、AWH0650、AWB0005、AWI0136、AWI0097);显影液、定影液(中国上海佳信照相用品有限公司, 批号:BW-61、BW-62);环氧丙烷(上海迈瑞尔化学公司, 批号:M25514);磷酸盐缓冲液 PBS(北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号:ZLI-9062);Eponate 12 包埋树脂、DDSA、NMA、DMP30(美国Ted Pella Inc公司, 批号:18005、18022、18032、18042);醋酸双氧铀(中镜科仪生物技术有限公司, 批号:GZ02625)。

1.3 主要仪器

台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司, 型号:H1650R);全自动酶标洗板机、多功能酶标分析仪(深圳市汇松科技发展有限公司, 型号:PW-812、MB-530);电热恒温培养箱(北京市永光明医疗仪器有限公司, 型号:DHP-500);摇床(江苏其林贝尔仪器制造有限公司, 型号:TS-1);电泳仪、电泳槽、转膜仪(北京六一生物技术有限公司, 型号:DYY-6C、DYCZ-24DN、DYCZ-40D);旋涡混合器

(江苏其林贝尔仪器制造有限公司, 型号:GL-88B);磁力搅拌器、精密 PH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司, 型号:JB-13、PHS-3C);电子天平(美国双杰公司, 型号:JJ224BC);生物样品均质仪(中国杭州奥盛仪器有限公司, 型号:BioPrep-24);化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司, 型号:ChemiScope6100);莱卡切片刀(常州市飞勒斯仪器有限公司, 型号:M199);切片机(浙江金华益迪试验器材, 型号:YD-315);包埋机(常州中威电子仪器有限公司, 型号:BMJ-A);Motic 显微镜(合肥南达科学仪器有限公司, 型号:BA210T);透射电子显微镜(上海百贺仪器有限公司, 型号:JEM1400);EMSYS 数码相机(天津瑞利光电有限公司, 型号:GMBHmorada G3)。

2 实验方法

2.1 实验动物分组

SD 大鼠 32 只随机分为空白对照组、模型组、常规针刺组、赤凤迎源针刺组, 每组 8 只。

2.2 造模及造模成功评判

空白对照组不做任何处理。模型组、常规针刺组、赤凤迎源针刺组动物均制作右侧面神经颊支压榨性损伤的病理模型^[7], 详见图 1。大鼠称质量后, 采用腹腔注射 3%(0.2 mL/100 g)戊巴比妥钠溶液麻醉, 等待大鼠角膜反射消失后, 将大鼠侧卧位于手术台上, 进行常规备皮、局部消毒, 在右侧耳屏前与嘴角连线、瞳孔正下方约 1 cm 位置, 做一长约 2 cm“弧形”切口, 用止血钳钝性分离, 暴露长 1.0~2.0 cm 面神经颊支, 以止血钳夹持, 长度约 1 cm, 持续 30 s, 松开 30 s, 再夹持 30 s, 用长约 1 cm 缝合线绑在面

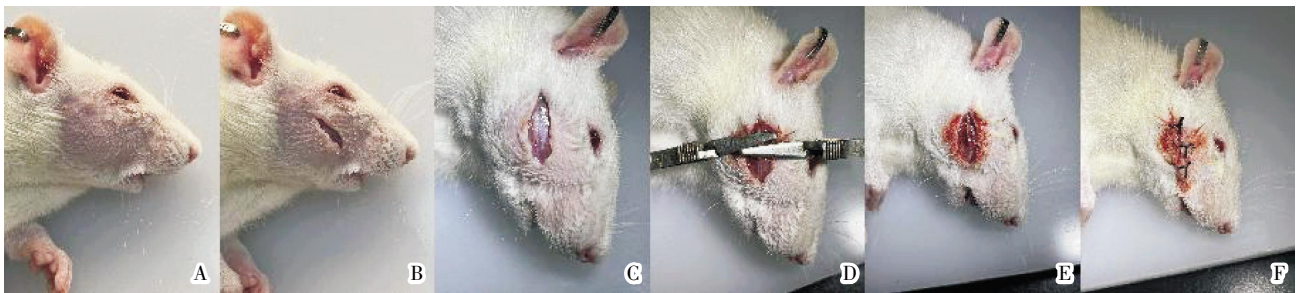


图 1 面神经损伤大鼠造模

Fig.1 Model of facial nerve injury in rats

注:A.大鼠备皮;B.消毒及切开皮肤;C.暴露面神经组织;D.止血夹夹持面神经;E.松开止血夹;F.缝合皮肤。

神经压榨部分作为标记,缝合皮下及皮肤层,3%碘酒伤口消毒后用青霉素软膏涂抹伤口,待麻醉清醒后放回原来的笼子饲养。术后禁食禁水4 h,术后3 d内将注射用青霉素钠放入食用水中。

造模后第2天,参照费静等^[8]方法通过观察造模大鼠动物行为学评估面神经功能,主要观察大鼠瞬目反射、触须运动、鼻尖位置,判断其造模是否成功。(1)瞬目反射。用5 mL注射器的针头对着大鼠眼睛吹气,引起大鼠眨眼反射,对比两侧眨眼反射,随后按照0~2的等级予以评分:若两侧无差距为0分;若与健侧相比,眨眼反射延迟为1分;若眨眼反射完全消失为2分。(2)触须运动。观察大鼠触须运动30 s,随后按照0~2的等级予以评分:若两侧无差距为0分;若与健侧相比,触须运动减弱为1分;若触须运动完全消失为2分。(3)鼻尖位置。观察大鼠鼻尖位置,随后按照0~1的等级予以评分:若鼻尖居中为0分;若鼻尖偏向健侧为1分。若总得分超过3分,认为存在面神经损伤,则造模成功。

2.3 干预方法

选用治疗面瘫常用的“地仓”“合谷”“颊车”“翳风”四穴,参照《实验针灸学》《基础医学实验动物操作基本技能》结合动物比较学方法定位^[9]。地仓:口角旁开,瞳孔直下;翳风:耳垂后方,乳突与下颌角之间凹陷中;合谷:前肢第1与第2掌骨之间;颊车:下颌角前上方约1 mm。

2.3.1 常规针刺组 将大鼠固定于自制鼠板上,按上述方法定位,常规消毒后,使用一次性无菌针灸针(贵州安迪药械有限公司,规格25 mm×0.30 mm)对右侧翳风、颊车、地仓、合谷行针刺。其中,地仓向颊车方向透刺约5 mm,翳风直刺约3 mm,合谷直刺约3 mm。留针30 min后取针,隔日1次,总共治疗7次。

2.3.2 赤凤迎源针刺组 将大鼠固定于自制鼠板上,按上述方法定位,常规消毒后,使用一次性无菌针灸针(贵州安迪药械有限公司,规格25 mm×0.30 mm)对翳风、颊车、地仓、合谷行赤凤迎源针刺法,翳风、合谷直刺进针,地仓向颊车方向进针。先将毫针刺入深层约5 mm,待针下紧滞,上提至浅层(皮下),自觉紧滞感,再将其插入中层约2.5 mm,用捻转手法及飞法,一捻一放,持续1 min。每10 min行针1次,

留针30 min后取针,隔日1次,总共治疗7次。

2.3.3 其他组 空白对照组不做任何处理;模型组只单独固定大鼠于自制鼠板30 min,不行针刺治疗,待其自愈。

2.4 观察指标

针刺治疗结束后第2天,各组大鼠再次评价动物行为学。完成之后进行腹腔注射1%戊巴比妥钠溶液过量麻醉处死大鼠后,分离腹主动脉采血,用肝素抗凝管采血,用以检测血清KRas;消毒备皮,切开大鼠右侧面颊部皮肤,暴露出大鼠面神经颊支,迅速切取面神经组织,分出一部分放入2.5%戊二醛中预固定,用于后期作透射电镜检测,其余部分立即放入液氮中冷冻储存,用于Western blot检测。

2.4.1 评估大鼠动物行为学 评分标准同上文造模后评分标准。若总得分超过3分,认为存在面神经损伤;若总分低于3分,认为恢复;总分为0分,认为恢复完全^[8]。

2.4.2 观察大鼠面神经纤维的超微结构 将面神经纤维组织固定到2.5%戊二醛6~12 h,然后将固定液弃掉,组织放入PBS缓冲液中1~6 h,再加入1%锇酸后固定1~2 h;脱水后予以环氧丙烷与环氧树脂1:1浸泡1~2 h,然后使用纯环氧树脂浸泡2~3 h浸透,再包埋切片,予以铅、铀染色,用透射电子显微镜观察,用数码相机记录图像。

2.4.3 HE染色观察大鼠面神经形态变化 先将面神经切片置于二甲苯中20 min,重复3次,然后按顺序在100%、95%、85%、75%乙醇中每级放置5 min。再用蒸馏水浸洗5 min;苏木素染1~10 min,蒸馏水冲洗,PBS返蓝;伊红染1~5 min,蒸馏水冲洗;予以梯度乙醇(95%~100%)脱水,每级5 min。取出后置于二甲苯10 min,重复2次,再用中性树胶封片、显微镜观察。

2.4.4 ELISA法检测血清KRas含量 分离腹主动脉,用肝素抗凝管采血。将室温血液自然凝固10~20 min,3 000 r/min、半径130 mm离心20 min,取上清液进行检测,然后依据试剂盒步骤检测血清KRas的表达量。

2.4.5 Western blot检测MEK、ERK表达 剪取0.025 g面神经纤维组织,用冰预冷PBS洗组织,配制10%

分离胶及4.8%的浓缩胶,取200 μL 蛋白上清进行凝胶电泳,然后将其转移至NC膜,用5%脱脂奶粉,加NC膜进一步封闭,将一抗按比例稀释后,将NC膜与一抗一起孵育,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,次日室温放置30 min,结束后予以PBST洗3次,每次15 min。用1 \times PBST稀释HRP标记的二抗山羊抗鼠二抗(1:5 000)、山羊抗兔二抗(1:5 000)孵育90 min,然后用TBST洗3次,每次15 min,使用ECL Plus超敏发光液与膜孵育1 min,用滤纸吸尽液体,用塑封膜将膜包裹杂交膜,凝胶成像系统成像。

2.5 统计学分析

采用SPSS 25.0统计学软件进行处理。计量资料用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,若数据符合正态分布和方差齐性,多组间比较采用单因素方差分析;若数据不符合正态分布和方差齐性,应用Kruskal-Wallis H检验。均以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组大鼠动物行为学评分

造模后,与空白对照组比较,另外3组大鼠行为学评分均明显升高($P<0.01$),表明造模成功。针刺2周后,常规针刺组及赤风迎源针刺组大鼠评分明显低于模型组($P<0.01$),且赤风迎源针刺组评分低于常规针刺组($P<0.01$)。详见表1。

3.2 各组大鼠面神经纤维的超微结构

空白对照组轴突纤维(髓鞘)排列紧密,内质网较多;模型组轴突纤维(髓鞘)排列疏松,内质网较少,表明面神经损伤;赤风迎源针刺组轴突纤维(髓鞘)排列较紧密,内质网较多;常规针刺组轴突纤维(髓鞘)排列及内质网数量介于模型组与赤风迎源针刺组之间。详见图2。

表1 各组大鼠面神经行为学评分比较($n=8, \bar{x}\pm s$,分)

Table 1 Comparison of facial nerve behavioral scores among different groups of rats ($n=8, \bar{x}\pm s$, points)

组别	造模后	治疗后
空白对照组	0 \pm 0	0 \pm 0
模型组	5.09 \pm 0.77 ^{▲▲}	4.25 \pm 0.46 ^{▲▲}
常规针刺组	5.06 \pm 0.92 ^{▲▲}	3.00 \pm 1.07 ^{▲▲△△}
赤风迎源针刺组	5.13 \pm 0.83 ^{▲▲}	2.13 \pm 0.35 ^{▲▲△△##}
F值	95.75	69.13
P值	$P<0.01$	$P<0.01$

注:与空白对照组比较,▲▲ $P<0.01$;与模型组比较,△△ $P<0.01$;与常规针刺组比较,## $P<0.01$ 。

3.3 各组大鼠面神经形态变化情况

空白对照组神经组织各层结构清晰,排列紧密,染色均匀;模型组神经组织细胞胞体肿大,胞质出现空泡变性,结构排列不规则;赤风迎源针刺组神经组织排列较紧密,染色较均匀;常规针刺组排列秩序介于模型组与赤风迎源针刺组之间。详见图3。

3.4 各组大鼠血清KRas蛋白表达情况

与模型组相比,常规针刺组、赤风迎源针刺组大鼠血清KRas蛋白表达明显升高($P<0.05$);与常规针刺组比较,赤风迎源针刺组大鼠血清KRas蛋白表达升高($P<0.05$)。详见表2。

表2 各组大鼠血清KRas蛋白表达比较($n=8, \bar{x}\pm s$,pg/mL)

Table 2 Comparison of serum KRas protein expression in different groups of rats ($n=8, \bar{x}\pm s$, pg/mL)

组别	KRas
空白对照组	65.34 \pm 5.04
模型组	71.85 \pm 1.56
常规针刺组	74.94 \pm 2.54 [△]
赤风迎源针刺组	81.05 \pm 6.01 ^{△▲}
F值	15.31
P值	$P<0.05$

注:与模型组比较,△ $P<0.05$;与常规针刺组比较,▲ $P<0.05$ 。

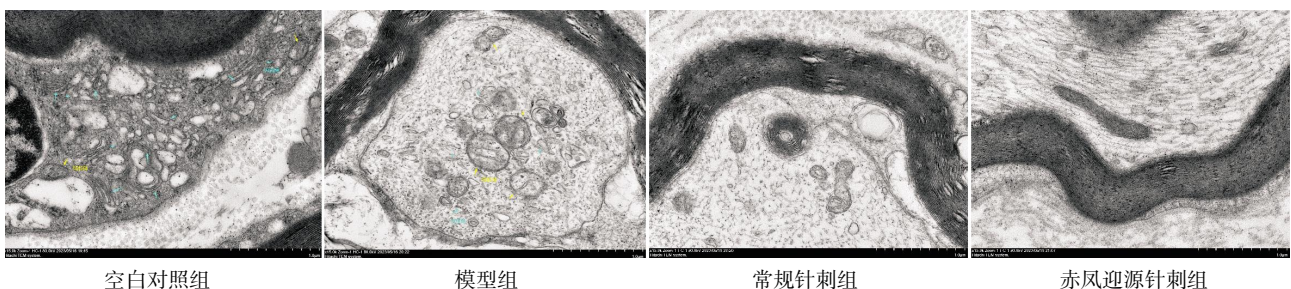


图2 各组大鼠面神经超微结构($\times 15\ 000$)

Fig.2 Ultrastructure of facial nerves in each group of rats ($\times 15\ 000$)

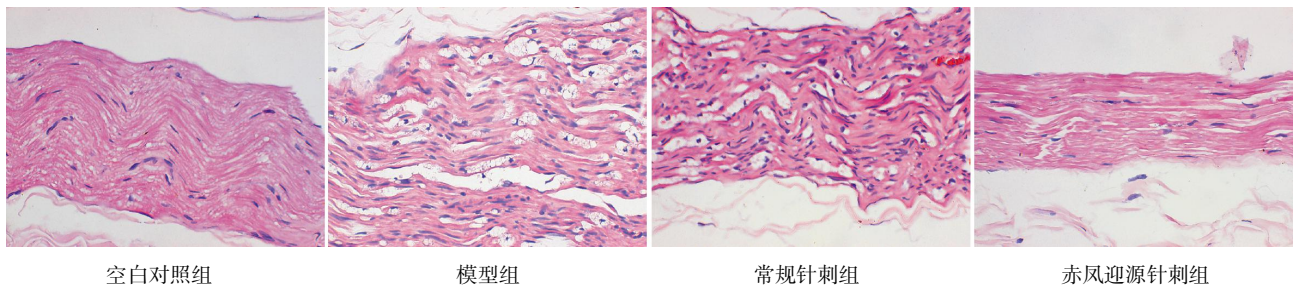


图3 各组大鼠面神经纤维 HE 染色结果($\times 400$)

Fig.3 HE staining results of facial nerve fibers in each group of rats ($\times 400$)

3.5 各组大鼠面神经 MEK、ERK 蛋白表达情况

与模型组相比,常规针刺组、赤风迎源针刺组大鼠面神经 MEK、ERK 蛋白表达升高($P < 0.05$);与常规针刺组比较,赤风迎源针刺组大鼠面神经 MEK、ERK 表达升高($P < 0.05$)。详见图 4、表 3。

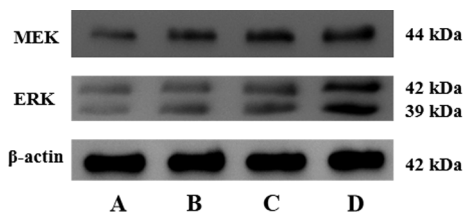


图4 各组大鼠面神经 ERK、MEK 蛋白表达条带图

Fig.4 Expression bands of ERK and MEK proteins in facial nerves of rats in each group

注:A.空白对照组;B.模型组;C.常规针刺组;D.赤风迎源针刺组。

表3 各组大鼠面神经 MEK、ERK 蛋白表达比较($n=8, \bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of MEK and ERK protein expression in facial nerves of rats in each group ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	MEK	ERK
空白对照组	0.12 \pm 0.03	0.10 \pm 0.03
模型组	0.19 \pm 0.02	0.17 \pm 0.02
常规针刺组	0.28 \pm 0.03 [△]	0.26 \pm 0.03 [△]
赤风迎源针刺组	0.39 \pm 0.04 ^{△▲}	0.36 \pm 0.06 ^{△▲}
F 值	34.55	24.41
P 值	$P < 0.05$	$P < 0.05$

注:与模型组比较;[△] $P < 0.05$,与常规针刺组比较,[▲] $P < 0.05$ 。

4 讨论

4.1 中医学对面神经损伤的认识

面神经损伤根据其“口眼喎斜”等症状,符合中医学“面瘫”“吊线风”“口僻”等范畴。关于其记载最

早见于《灵枢·经筋》:“足之阳明,手之太阳,筋急则口目皆僻。”关于本病病因病机,历代医家对其多有论述,认为本病位在头面部,因邪气侵袭面部经络,致气血痹阻、运行不畅、经络不通、经筋功能失调而引起。《灵枢·经筋》载“颊筋有寒,则急引颊移口;有热,则筋弛纵缓不胜收,故僻”,指出周围性面瘫因邪气侵袭导致经脉凝滞、气血不通、经筋不用,故而发为口角歪斜。喻嘉言《医门法律·中风门》亦云“口眼喎斜,面部之气不顺也”,认为气机不畅、经筋失用是导致口眼喎斜的关键。总之,中医学认为本病病位在头面部,因风寒、风热或风痰等邪气侵袭面部经络,致经络不通、经筋功能失调而引起^[10-12]。

4.2 选穴依据

依据循证针灸学原理,对针灸治疗本病的古今文献整理,总结出常用腧穴为地仓、颊车、合谷、翳风、太阳等穴位^[13-14]。吴敬欣^[15]通过数据挖掘分析针刺治疗周围性面瘫的穴位,梳理出使用频次超过 100 次的腧穴前三位为地仓、颊车、合谷。本研究结合周围性面瘫病因病机,循证针灸学原理、赤风迎源针刺法及数据挖掘规律,故而采用合谷、地仓、颊车、翳风四穴治疗周围性面瘫。

合谷为手阳明经大穴,为经脉气血汇聚之所,具有良好的调气行血功能。从穴位局部解剖中可以看出,穴位下具有丰富的肌肉、血管、神经,具有良好地改善微循环的作用。“面口合谷收”是合谷穴生理功能的高度概括,其一直指导临床实践^[16-17]。地仓和颊车都是足阳明胃经腧穴,且都分布在面部,在《扁鹊神应针灸玉龙经·一百二十穴玉龙歌·口眼斜篇》中记载到“中风口眼致喎斜,须疗地仓连颊车”。翳风位于耳垂后方,耳后乳突与下颌角之间的凹陷处。从穴位解剖看其深部正对面神经干出茎乳孔处,因

解剖结构的复杂性及其特殊的位置性为面瘫治疗的常用穴^[18]。

综上所述,周围性面瘫为经络不通、经筋失用所致,病位在面部,与少阳、阳明相关。故近部取穴取地仓、颊车、翳风,直达病所,疏调阳明、少阳经筋,循经远端取穴取合谷,取“面口合谷收”之意。

4.3 赤凤迎源针刺法的选择及其对大鼠动物行为学评分影响

飞经走气四法包括青龙摆尾、白虎摇头、苍龟探穴、赤凤迎源。“赤凤迎源”首见于《针灸大成·金针赋》:“赤凤迎源,展翅之仪,入针到地,提到天,候针处摇篮,复进其元(指人部、中层),上下左右,四围飞旋。”赤凤迎源针刺法为“复式”操作手法,其将三才理论与提插捻转、飞法等手法相结合,因其行气、调气的效果而被历代医家所推崇。面神经损伤病机为邪气侵袭面部经络,经络不通,导致经筋功能失调。适用手法有苍龟探穴及赤凤迎源手法,但临床上有“凤补龟泻”之谈。现代研究发现,赤凤迎源针刺法可以通过疏通经络之气,行气活血通络,加强面部经筋气血灌注,从而改善局部微循环,促进周围性面瘫恢复^[19-20]。综上所述,选择赤凤迎源针刺法作为面神经损伤的干预手段。

本实验通过对大鼠动物行为学观察,发现模型组、常规针刺组、赤凤迎源针刺组大鼠评分较之前均有改善,模型组评分较造模后改善,其原因可能与面神经损伤后自身有一定修复能力有关;与模型组大鼠相比,赤凤迎源针刺组和常规针刺组评分较低($P < 0.05$);且赤凤迎源针刺组低于常规针刺组($P < 0.05$)。上述结果说明,常规针刺法和赤凤迎源针刺法均可以改善大鼠行为学评分,且赤凤迎源针刺法疗效优于常规针刺法。

4.4 赤凤迎源针刺法对面神经损伤模型面神经超微结构的影响

施旺细胞具有营养神经元的功能,其参与神经损伤后修复及再生^[21]。神经损伤后,施旺细胞可髓鞘化并且为轴突的生长延长提供微环境,是神经再生修复的关键细胞^[22]。有研究发现,周围神经损伤后施旺细胞增殖并迁移到损伤部位,成为修复细胞,增殖的施旺细胞在基膜所围成的神经膜管内有序地

排成一条实心的细胞索,称 Bungner 带,为轴突的再生提供生长通道^[23-24]。施旺细胞具有高度可塑性,可以与巨噬细胞共同清理损伤后的细胞碎片^[25],并且可以通过分泌大量的神经再生所需的生长因子,从而为轴索损伤后再生提供微环境^[26]。HU 等^[27]发现,重复电刺激使外周血干细胞、骨髓间充质干细胞增殖并诱导其向施旺细胞分化,具体机制可能为调控 Ras/MEK/ERK 信息通路,从而促进施旺细胞的可塑性和髓鞘再生。

本实验通过电镜观察大鼠面神经超微结构发现:空白对照组大鼠面神经超微结构并未出现明显病理改变;模型组大鼠其神经纤维髓鞘排列疏松,施旺细胞细胞器减少,线粒体肿胀;赤凤迎源针刺组大鼠其神经纤维髓鞘排列紧密,脱髓鞘较轻,施旺细胞细胞器改变不明显;常规针刺组改变介于模型组和赤凤迎源针刺组之间。因此推测,赤凤迎源针刺法可以促进面神经功能恢复,从而改善面神经损伤,治疗周围性面瘫。

4.5 赤凤迎源对面神经损伤模型 Ras/MEK/ERK 信号通路的影响

Ras/MEK/ERK 信号通路是参与细胞增长、生殖、分化及凋亡等的一条经典信号通路。Ras/MEK/ERK 信号通路中除了含有 Ras 和 ERK 蛋白外,Ras 和 ERK 之间还存在着 2 个蛋白激酶,即 Raf、MEK,以此形成一条完整的 Ras/MEK/ERK 信号通路^[28-29]。

该通路可以被激素、生长因子等各种刺激因素所激活,各种刺激因素作为激活信号通路的配体,与细胞膜上受体结合,从而激活细胞内第二信使 Ras、Raf、MEK、ERK 等^[30],通过一系列的级联反应最后激活效应分子,调控细胞生长、增殖、分化及凋亡等程序。Ras/MEK/ERK 信号通路中各级信号分子及效应分子的表达,在调节该信号通路的活性中都发挥着至关重要的作用^[31]。

Ras 蛋白为信号传递蛋白,是信号通路的上游信号分子。Ras 一般情况下处于失活状态,当细胞受到外界刺激,配体与受体结合,随之产生一系列反应,Ras 则由原来的失活状态转换为激活状态^[32]。活化后的 Ras 能够进一步磷酸化 Raf 并使其激活,Raf 被激活后,和 MEK 相结合,磷酸化 MEK 激活 MEKs^[33-34]。

MEKs 是 MAPKK 家族的重要成员,MEK 可磷酸化下游靶蛋白 ERK,使 ERK 成为活性形式,活化的 ERK 可留在细胞质激活其他蛋白激酶,也可进入细胞核磷酸化一些转录因子,调控基因表达,最终参与细胞功能调节^[35]。总而言之,Ras/MEK/ERK 信号通路能促进神经元生长、分化,抗神经细胞凋亡,加速神经损伤的修复^[36]。

本实验结果显示,在面神经损伤模型大鼠经治疗后,与模型组相比,常规针刺组、赤凤迎源针刺组 KRas、MEK、ERK 的蛋白表达均升高($P<0.05$),且赤凤迎源针刺组高于常规针刺组($P<0.05$)。由此可知,赤凤迎源针刺法可以上调 KRas、MEK、ERK 蛋白表达,从而促进神经修复再生,其修复的机制可能与 Ras/MEK/ERK 信号通路有关。

4.6 结语

赤凤迎源针刺法具有行络通经、通关过节、疏调经筋等作用,导引经气、气至病所等特点优势,对面神经损伤的治疗疗效较常规针刺显著,值得临床推广。但赤凤迎源针刺法操作较为烦琐,较难掌握其要领,故应加强此针刺方法的学习,以便于赤凤迎源针刺法的推广。对于赤凤迎源针刺法治疗面神经损伤的生物学机制,目前研究并不深入,今后需进一步对其作用机制研究,以便于赤凤迎源针刺法在临床运用范围的扩大。本实验通过研究 Ras/MEK/ERK 信号通路,证明赤凤迎源针刺法与信号通路之间的相关性,但该通路涉及多个蛋白,因实验条件、技术等各种因素限制,故而对其通路的蛋白研究不够全面,需要进一步研究证明。

参考文献

[1] 中国针灸学会. 循证针灸临床实践指南: 贝尔面瘫[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2018: 79.

[2] 梁慧, 李卓荣, 林海波, 等. 弥可保离子导入结合平衡针治疗周围性面瘫疗效观察[J]. 中国针灸, 2018, 38(9): 955-960.

[3] 韦艳丽, 刘江, 黄霞. 中医治疗周围性面瘫研究近况[J]. 中医临床研究, 2018, 10(13): 135-138.

[4] 周森. 周围性面瘫急性期针灸治疗的临床探讨[J]. 临床医药文献电子杂志, 2018, 5(76): 25, 28.

[5] 惠莲, 刘凤啸, 袁婧, 等. FK506 对大鼠面神经损伤后面运动神经元凋亡及 bcl-2, bax 表达的影响[J]. 中国医科大学学报, 2013,

42(7): 608-611.

[6] 邓月, 陈兵. 面神经运动神经元凋亡相关蛋白表达的实验研究[J]. 中国眼耳鼻喉科杂志, 2008, 8(1): 12-14, 70.

[7] 郑红弟. 面神经压榨损伤后面神经功能及形态学恢复的研究[D]. 泸州: 西南医科大学, 2020.

[8] 费静, 陶美惠, 李雷激. 电针干预面神经压榨模型大鼠促进面神经的再生[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(11): 1728-1733.

[9] 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.

[10] 王冬冬, 李博, 查永梅, 等. 张庆萍教授针灸治疗周围性面瘫临床经验[J]. 中国针灸, 2021, 41(3): 313-315.

[11] 祝鹏宇, 孙明媚, 于天洋, 等. 孙申田教授针灸治疗周围性面瘫临床经验[J]. 中国针灸, 2021, 41(2): 189-191, 220.

[12] 李军, 焦琳, 肖源诣. 针灸治疗急性面神经麻痹研究进展[J]. 江西中医药, 2019, 50(9): 78-80.

[13] 梁繁荣, 吴曦. 循证针灸学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 158.

[14] 王妹. 基于文献研究探讨针刺治疗周围性面瘫的分期、证型、症状选穴规律[J]. 中国针灸, 2023, 43(12): 1457-1464.

[15] 吴敬欣. 基于数据挖掘的急性周围性面瘫中医用药及针刺选穴规律的探讨[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2021.

[16] 彭易雨, 彭璞, 孟海婷, 等. 浅谈“面口合谷收”的理论基础与临床应用[J]. 针刺研究, 2021, 46(1): 84-86.

[17] 许小燕, 曾根平, 陈婉妍, 等. “面口合谷收”在周围性面瘫中的应用与机制探讨[J]. 中国民族民间医药, 2023, 32(20): 66-70.

[18] 姜雪梅, 高彦平, 黄泳. 翳风穴的形态学特征及其临床意义[J]. 中国针灸, 2005, 25(11): 781-783.

[19] 石皓月, 尚菊菊, 刘红旭, 等. 基于“络脉-玄府气液”探讨心肌缺血再灌注治疗后冠状动脉微循环障碍[J]. 中医杂志, 2023, 64(18): 1862-1865.

[20] 闫思琪, 冯利民. 从络脉与微循环联系探讨原发性高血压[J]. 河北中医, 2023, 45(1): 129-132, 153.

[21] FEI J, GUAN X R, GAO L, et al. Establishment of a facial nerve trunk crush injury model and evaluation of facial nerve self-healing in rats[J]. Brain and Behavior, 2023, 13(9): e3156.

[22] 李大伟, 张析哲, 周琪. 雪旺细胞对周围神经损伤修复作用的研究进展[J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(5): 197-198.

[23] WANG X, LAW J, LUO M X, et al. Magnetic measurement and stimulation of cellular and intracellular structures[J]. ACS Nano, 2020, 14(4): 3805-3821.

[24] GOMEZ-SANCHEZ J A, PILCH K S, VAN DER LANS M, et al. After nerve injury, lineage tracing shows that myelin and remak schwann cells Elongate extensively and branch to form repair schwann cells, which shorten radically on remyelination[J]. The

- Journal of Neuroscience, 2017, 37(37): 9086–9099.
- [25] LI R, LI D H, WU C B, et al. Nerve growth factor activates autophagy in Schwann cells to enhance myelin debris clearance and to expedite nerve regeneration[J]. Theranostics, 2020, 10(4): 1649–1677.
- [26] MADDURI S, GANDER B. Schwann cell delivery of neurotrophic factors for peripheral nerve regeneration[J]. Journal of the Peripheral Nervous System, 2010, 15(2): 93–103.
- [27] HU X F, WANG X H, XU Y Z, et al. Electric conductivity on aligned nanofibers facilitates the transdifferentiation of mesenchymal stem cells into schwann cells and regeneration of injured peripheral nerve[J]. Advanced Healthcare Materials, 2020, 9(11): e1901570.
- [28] RAIMONDI V, IANNOZZI N T, BURROUGHS-GARCIA J, et al. A personalized molecular approach in multiple myeloma: The possible use of RAF/RAS/MEK/ERK and Bcl-2 inhibitors[J]. Exploration of Targeted Anti-Tumor Therapy, 2022, 3(4): 463–479.
- [29] RAZA A, PANDEY M S, JIN Q Y, et al. km23-1/DYNLRB1 regulation of MEK/ERK signaling and R-Ras in invasive human colorectal cancer cells[J]. Cell Biology International, 2020, 44(1): 155–165.
- [30] ZHAO Z W, ZHANG D K, WU F Z, et al. Sophoridine suppresses lenvatinib-resistant hepatocellular carcinoma growth by inhibiting RAS/MEK/ERK axis via decreasing VEGFR2 expression[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2021, 25(1): 549–560.
- [31] ZHANG Z X, YI P F, TU C C, et al. Curcumin inhibits ERK/c-Jun expressions and phosphorylation against endometrial carcinoma[J]. BioMed Research International, 2019, 2019: 8912961.
- [32] JI R R, GEREAU R W 4th, MALCANGIO M, et al. MAP kinase and pain[J]. Brain Research Reviews, 2009, 60(1): 135–148.
- [33] YIN Z J, ZHU W D, ZHANG X P, et al. Molecular characterization, expression and interaction of MAPK, MAPKK and MAPKKK genes in upland cotton[J]. Genomics, 2021, 113(1 Pt 2): 1071–1086.
- [34] GUO Y J, PAN W W, LIU S B, et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2020, 19(3): 1997–2007.
- [35] DEGIRMENCI U, WANG M, HU J C. Targeting aberrant RAS/RAF/MEK/ERK signaling for cancer therapy[J]. Cells, 2020, 9(1): 198.
- [36] HENDRIKSE C S E, THEELEN P M M, VAN DER PLOEG P, et al. The potential of RAS/RAF/MEK/ERK (MAPK) signaling pathway inhibitors in ovarian cancer: A systematic review and meta-analysis[J]. Gynecologic Oncology, 2023, 171: 83–94.

(本文编辑 匡静之)