

☆ 机制探讨 ☆

不同强度电针与手针“上巨虚”干预急性炎性内脏痛大鼠的效应及与 $\alpha 7nAChR/PI3K/AKT$ 通路的关系陈采益¹, 简远全¹, 王张颖¹, 何玲玲¹, 王 暄²(¹福建中医药大学针灸推拿学院, 福州 350122; ²福建中医药大学成人教育学院, 福州 350122)

【摘要】 目的:对比不同刺激强度电针与手针治疗急性炎性内脏痛的效应差异;观察手针与(等效)电针通过 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7nAChR$)/磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(AKT)通路治疗急性炎性内脏痛的机制差异。方法:将SD大鼠随机分为正常组、模型组、电针1 mA组、电针2 mA组、电针3 mA组、电针4 mA组、电针6 mA组、手针组,每组12只。用2%乙酸灌肠制作急性炎性内脏痛大鼠模型。电针组分别采用对应电流强度电针(2 Hz)刺激“上巨虚”,手针组针刺“上巨虚”,刺激频率为2次/s,均持续干预2 min。HE染色法检测结肠黏膜组织病理形态变化,腹部撤回反射(AWR)评分和腹外斜肌放电幅值测定大鼠内脏痛,对比手针与不同强度电针的效应差异。选取与手针组等效的电针2 mA组,以及应用甲基乌头碱(MLA, $\alpha 7nAChR$ 阻断剂,4 mg/kg)的手针+MLA组和电针2 mA+MLA组,对比加用阻断剂后电针和手针镇痛效应的变化,ELISA法检测大鼠血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)含量,Western blot法检测大鼠结肠 $\alpha 7nAChR$ 、PI3K、AKT蛋白表达。结果:与正常组比较,模型组大鼠AWR评分和腹外斜肌放电幅值升高($P<0.05$);与模型组比较,1、2 mA电针组及与电针各组相同频率相同刺激时间的手针组大鼠AWR评分和腹外斜肌放电幅值降低($P<0.05$),结肠黏膜炎性浸润及形态异常均有所改善。与正常组比较,模型组大鼠血清TNF- α 、IL-1 β 含量,结肠PI3K、AKT蛋白表达升高($P<0.05$),结肠 $\alpha 7nAChR$ 蛋白表达降低($P<0.05$);与模型组比较,与2 mA等效的手针组和电针2 mA组大鼠血清TNF- α 、IL-1 β 含量,结肠PI3K、AKT蛋白的表达降低($P<0.05$),结肠 $\alpha 7nAChR$ 蛋白表达升高($P<0.05$),且手针和2 mA电针降低AWR评分,血清TNF- α 、IL-1 β 含量,结肠PI3K、AKT蛋白表达及升高结肠 $\alpha 7nAChR$ 蛋白表达的效应均能被 $\alpha 7nAChR$ 的阻断剂MLA抑制($P<0.05$)。结论:1 mA、2 mA强度电针及与其相同频率(2 Hz)相同刺激时间(2 min)的手针具有类似的急性炎性内脏痛镇痛效应,此效应优于较高强度(3、4、6 mA)的电针;手针与电针“上巨虚”缓解急性炎性内脏痛的作用机制,可能与 $\alpha 7nAChR/PI3K/AKT$ 信号通路密切相关。

【关键词】 手针;电针;急性炎性内脏痛; $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体/磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B信号通路;上巨虚

Effects of different intensities of electroacupuncture and manual acupuncture at “Shangjuxu” (ST37) on acute inflammatory visceral pain and their relationship with $\alpha 7nAChR/PI3K/AKT$ signaling pathway

CHEN Cai-yi¹, LIN Yuan-quan¹, WANG Zhang-ying¹, HE Ling-ling¹, WANG Xuan² (¹College of Acupuncture and Moxibustion, Fujian University of Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; ²College of Adult Education, Fujian University of Chinese Medicine, Fuzhou 350122)

【ABSTRACT】 Objective To compare the effects of electroacupuncture (EA) and manual acupuncture (MA) at different stimulation intensities on acute inflammatory visceral pain, and to analyze their mechanisms underlying relief of inflammatory visceral pain mediated by $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7nAChR$)/phosphatidylinositol 3-kinase

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20250327

引用格式:陈采益,简远全,王张颖,等.不同强度电针与手针“上巨虚”干预急性炎性内脏痛大鼠的效应及与 $\alpha 7nAChR/PI3K/AKT$ 通路的关系[J].针刺研究,2025,50(12):1365-1375.

项目来源:福建省自然科学基金项目(No.2020J01741,2024J01134);福建中医药大学校管课题(No.X2023017);福建中医药大学针灸学科开放课题(No.XZJ2022002)

通信作者:王暄,E-mail:674700301@qq.com

(PI3K)/protein kinase B (AKT) signaling pathway. **Methods** Male SD rats were randomly divided into normal control, visceral pain model, EA 1 mA, EA 2 mA, EA 3 mA, EA 4 mA, EA 6 mA, and MA groups (with the same frequency as EA, 2 times/s, for 2 min), with 12 rats in each group. The acute inflammatory visceral pain model was established by intracolonic instillation of 2% acetic acid. EA (2 Hz, 1, 2, 3, 4, 6 mA) or MA (120 twirlings/min, with the needle rotated at a magnitude of about 90°—180°) was applied to the right “Shangjuxu” (ST37) for 2 min. The abdominal withdrawal reflex (AWR) score and external oblique muscle electromyogram amplitude were used to assess the visceral pain reaction. Histopathological changes of the colonic mucosal tissue were detected by H.E. staining. For observing the involvement of colonic $\alpha 7nAChR$ in visceral pain relief of both EA and MA, intraperitoneal injection of methylnaconitine (MLA, $\alpha 7nAChR$ blocker, 4 mg/kg) was given to rats of MA+MLA and EA 2 mA+MLA groups (with 6 rats in each group) before each intervention. The contents of serum tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression levels of $\alpha 7nAChR$, PI3K and AKT in the colon tissue were detected by Western blot. **Results** In comparison with the normal control group, both the AWR scores and the amplitude of EMG at colorectal dilation (CRD) pressure of 20, 40, 60 and 80 mmHg were significantly increased in the model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, both the AWR scores and the amplitude of EMG at CRD pressure of 20, 40, 60 and 80 mmHg were significantly decreased in the EA 1 mA, EA 2 mA and MA groups ($P < 0.05$), rather than in the EA 3 mA, EA 4 mA and EA 6 mA groups, suggesting that the higher stimulation intensity of EA had no analgesic effect. H.E. staining showed slightly hyperemic and edematous injury of the colonic mucosa tissue, with obvious inflammatory infiltration and abnormal morphological changes in the model group, which was obviously milder in the injury in the MA and EA 1 mA, EA 2 mA groups, rather than in the EA 3 mA, 4 mA and 6 mA groups. In comparison with the normal control group, the contents of serum TNF- α and IL-1 β , and expression levels of PI3K and AKT proteins in colon were significantly increased ($P < 0.05$), and the expression of $\alpha 7nAChR$ protein was remarkably down-regulated ($P < 0.05$) in the model group. Compared with the model group, the contents of serum TNF- α and IL-1 β , and the expression levels of PI3K and AKT proteins were strikingly down-regulated ($P < 0.05$), and the expression of $\alpha 7nAChR$ was considerably up-regulated ($P < 0.05$) in both EA 2 mA and MA groups. Moreover, the effects of reducing the corresponding AWR scores at various CRD pressure levels, serum TNF- α and IL-1 β contents, and the protein expressions of PI3K and AKT in colon, as well as increasing the protein expression of $\alpha 7nAChR$ in colon in rats of MA and EA 2 mA groups can be inhibited by MLA ($P < 0.05$), a blocker of $\alpha 7nAChR$. **Conclusion** Both MA and 2 mA EA (not 3, 4, 6 mA EA) stimulation of ST37 have a similar analgesic effect in acute inflammatory visceral pain rats, which may be related to their function in suppressing the activities of $\alpha 7nAChR$ /PI3K/AKT signaling pathway.

【KEYWORDS】 Manual acupuncture; Electroacupuncture; Acute inflammatory visceral pain; $\alpha 7nAChR$ /PI3K/AKT signaling pathway; Shangjuxu(ST37)

《灵枢·九针十二原》言“刺之要，气至而有效”，强调针刺时达到一定的刺激使之“气至”是取效的关键。《针灸大成》言“刺有大小”，强调了针刺的大小（补泻）应根据病情的不同来区别刺激量的轻重^[1]。现代对于针灸刺激量的量化研究也逐渐受到重视，有学者^[2-3]证实针刺特别是在抗炎和镇痛方面的效应可能与刺激强度存在相关性。电针刺刺激量达 0.4 V 时治疗败血症小鼠可见微效，而刺激量增大 10 倍达 4 V 时疗效显著^[4]。也有研究显示，1 mA-1 mA-2 mA (30 min, 每个强度 10 min) 而不是高强度 (2 mA-3 mA-4 mA) 的经皮电刺激能有效缓解关节炎大鼠的局部炎症反应^[5]。在手针量-效关系研究方面，有研究者用毫针强刺激结合深刺、施行特殊补泻手法治疗原发性痛经，其效果优于弱刺激

结合浅刺、施行平补平泻法的治疗^[6-7]。石学敏院士提出了“针刺手法量学”理论，对针刺手法量学的要素进行了规范^[8]。因此，刺激量大小可影响针刺治疗各种疾病的效应。

而在针灸刺激方式上，电针和手针是临床实践中最常用的针刺技术，两者因其刺激方式、操作方法等的不同，导致传入途径和作用机制也可能不同。电针对疼痛及神经损伤的治疗有着独特的优势，而手针则在调控免疫分子方面存在一定优势^[9]。电针及手针的作用机制亦存在差异，电针主要调节神经胶质可塑性，而手针主要调节神经递质，电针和手针在整合素家族中具有共同的治疗靶点^[10]。上述文献提示，电针和手针可经由不同组织、传导途径及刺激信号起效，但二者治疗靶点常重叠。刺激

量也会影响手针与电针两种不同刺激方式的作用,如采用不同的刺激时间、不同刺激频率也会产生不同的针刺效应,而非电针和手针两种刺激方式的单一差异影响^[9]。但目前关于手针及电针等效性的量化研究尚不多,即相同的持续时间和频率的情况下手针与多大强度(如多少mA电流)的电针是等效的?因此本研究拟以急性炎性内脏痛大鼠模型为切入点,观察与电针相同的持续时间和频率的手针与不同强度电针间的效应差异,并探讨手针与电针对急性炎性内脏痛的治疗机制,为阐明手针与电针不同刺激方式间的量效关系及作用机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物来源

雄性SPF级SD大鼠共108只,由福建中医药大学实验动物中心提供,体质量为200~250g,使用许可证编号为SYXK(闽)2019-0007。大鼠饲养于实验动物中心SPF级动物饲养室。大鼠自由摄取食物,光照12h昼夜轮换,室温保持在(21±3)℃,湿度控制在(60±10)%。实验过程中对动物的处置遵照福建中医药大学动物伦理委员会和科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》的相关规定进行。伦理批准文号:2021081。

1.2 主要试剂与仪器

乙酸(上海泰坦),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及白细胞介素-1 β (IL-1 β)ELISA试剂盒、增强型RIPA裂解液、蛋白酶抑制剂、BCA蛋白定量试剂盒、Western blot专用一抗二抗稀释液(武汉博士德),甲基乌头碱(MLA,美国MCE),异氟烷(深圳瑞沃德),苏木精、DAB显色试剂盒(北京索莱宝), α 7烟碱乙酰胆碱受体(α 7nAChR)抗体(新竹Arigo),磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)、蛋白激酶B(AKT)、GAPDH抗体、二抗(美国ProteinTech)。

多通道生理信号采集处理系统(成都仪器厂),石蜡切片机、DMIL/DFC295倒置显微镜、显微图像采集系统(德国Leica),电泳仪(北京六一),ChemiDoc XRS+化学发光成像分析系统(美国BioRad),5417R高速冷冻离心机(德国Eppendorf),ND-100c分光光度计(杭州米欧),酶标仪(上海帝肯),韩氏电针仪(HANS-100A,南京济生),0.30mm×13mm无菌针灸针(苏州华佗)。

1.3 造模方法

急性炎性内脏痛大鼠模型参照文献^[11]的方法制作。大鼠在实验前12h禁食不禁水,用4%异氟

烷(流量:0.7L/min)麻醉2min后,将大鼠放置于手术台上,调整异氟烷(流量:0.7L/min,2%)进行持续麻醉,再将甘油润滑的PE-60聚乙烯套管经肛门轻轻插入远端结肠约6cm深的肠腔内,提起鼠尾倒立后将1.5mL 2%乙酸缓慢注入大鼠的结肠,并保持2min,以避免乙酸药液流出,使大鼠产生急性结肠局部炎性反应和痛觉敏化。以造模大鼠腹部撤回反射(AWR)评分明显高于正常组为造模成功标准。

1.4 干预方法

正常组:结肠注入1.5mL 0.9%氯化钠溶液后1h,模拟手针组进行固定但不进行针刺干预。

模型组:结肠注入1.5mL 2%乙酸后1h,模拟手针组进行固定但不进行针刺干预。

手针组:结肠注入1.5mL 2%乙酸后1h,将大鼠进行固定并用异氟烷(流量:0.7L/min,0.7%)进行浅麻醉,取位于大鼠后肢胫骨前结节外侧5mm、膝关节下方15mm的“上巨虚”^[12],右侧取穴,针刺深度5mm,以90°~180°的幅度及约120次/min(2Hz)的频率进行手法操作,使用节拍器(设定为2次/s)引导手法的频率,刺激2min,然后起针。

电针1mA组:结肠注入1.5mL 2%乙酸后1h干预,固定、麻醉方法和取穴同手针组,应用双极联体针^[13](制作方法:使用两根针灸针,针柄分别套上直径1mm、长度为10~15mm的PE50聚乙烯管使两针之间绝缘,针柄末端露出8~10mm便于连接电针仪,两针套管部分用透明胶带固定,两针针身全部露出,相隔约1~1.5mm),针刺深度5mm,两针柄接电针仪,连续波2Hz,1mA,电针刺激2min,然后起针。

电针2、3、4、6mA组:电针强度分别为2、3、4、6mA,余同电针1mA组。

以上每组各12只大鼠在干预结束后30min,每组各6只大鼠立刻进行AWR评分,剩余每组各6只大鼠进行腹外斜肌放电幅值的测定。在以上研究得出结果的基础上,选手针组和等效的电针2mA组,另增加手针+MLA组和电针2mA+MLA组进行对比研究。

手针组+MLA组:在针刺前10min腹腔注射 α 7nAChR拮抗剂MLA(4mg/kg)^[14],余操作同手针组。

电针2mA+MLA组:在电针前10min腹腔注射 α 7nAChR拮抗剂MLA 4mg/kg,余操作同电针2mA组。

以上2组各6只大鼠在干预结束后30min立刻进行AWR评分。

1.5 观察指标及检测方法

结直肠扩张(CRD)刺激检测 AWR 评分:实验之前禁止大鼠进食 12 h,同时允许饮水,以此来降低大鼠排便量。大鼠置于麻醉诱导装置中,以 4% 异氟烷(流速:0.7~1 L/min)进行麻醉处理。随后,将大鼠移至手术台上,继续施加 2% 异氟烷(流速:0.7~1 L/min)以维持麻醉状态。自肛门内置入 CRD 扩张球囊(CRD 扩张球囊用安全套头端捆绑在外径 0.2 cm 的 PE 管上,使用时球囊外侧开口端接三通管,分别与 10 mL 注射器和 XJ11D 台式血压计相连),深度为 6 cm,并将扩张球囊导管用胶布轻缚在大鼠尾端以防止其滑出。置大鼠于平台上,并限制其于 20 cm×5 cm×8 cm 的透明盒内,然后进行 CRD 刺激和 AWR 评分。开始正式实验前,以上操作重复 3 次,以最大限度地减少应激因素对实验结果的影响。AWR 评分是观察动物在清醒状态下,对不同级别的 CRD 所产生的反应进行半定量评分。扩张压力的监控通过医用三通管连接扩张球囊和台式血压计而实现。CRD 分为 20、40、60、80 mmHg (1 mmHg≈0.133 kPa)4 个等级。AWR 评分标准参照 Al-Chaer^[15]的方法。每次 CRD 刺激持续 20 s,间隔 5 min 后给下一次刺激;每个刺激强度重复 3 次,取平均值作为最后的评分值。

腹外斜肌放电幅值测量:维持上述麻醉状态下,在大鼠腹股沟韧带上方,距离腹中线 1.5 cm 的位置,将银丝双极电极插入一侧腹外斜肌。设置压力梯度分别为 20、40、60、80 mmHg,对大鼠结直肠施加压力(CRD 方法同前),每次 CRD 刺激持续 10 s,间隔时间为 4 min,然后再执行下一轮刺激;每种刺激的强度重复进行 3 次。运用 RM6240 多通道生理信号采集处理系统,记录在不同 CRD 压力水平下大鼠腹外斜肌放电情况(参数配置:高频滤波 3 kHz,时间常数 0.001,采样频率 40 Hz,灵敏度 200 μV,走纸速度 200 ms/div)^[16]。为了消除不同大鼠基础放电(刺激前的肌肉自发放电)幅值对实验结果的影响,在不同 CRD 压力下,腹外斜肌放电幅值相对于基础放电幅值的增加百分比为最终结果:腹外斜肌放电幅值(%)=(腹外斜肌放电幅值-基础放电幅值)÷基础放电幅值×100%,用以代表不同 CRD 压力下腹外斜肌放电幅值的变化。

取材:经 AWR 评分和腹外斜肌放电幅值测定后,即在距造模时灌注 2% 乙酸 4 h 后进行取材。20% 乌拉坦(6 mL/kg)腹腔注射麻醉大鼠,待完全麻醉后,剪开腹部,暴露腹腔,取腹主动脉血以备

ELISA 检测。处死大鼠后再取距肛门 6 cm 处的结肠 2 cm,其中 1 cm 置于 4% 多聚甲醛固定,以备用于 HE 染色,1 cm 放入液氮,然后转入 -80 °C 冰箱,以备 Western blot 检测。

HE 染色观察大鼠结肠组织病理形态学变化:大鼠结肠组织在 4% 多聚甲醛中固定约 24 h 之后,经流水冲洗,随后进行组织脱水、透明及浸蜡、包埋、切片(5 μm)、水化、HE 染色等步骤,显微镜下观察。

ELISA 法检测大鼠血清 TNF-α、IL-1β 含量:从液氮中取出大鼠血清,预先包装好的 96 孔板恢复至室温,各加入 100 μL 稀释后的标准品和样本,37 °C 孵育 90 min,加入 100 μL 1:100 比例稀释的生物素标记抗体,37 °C 下孵育 60 min,洗涤缓冲液清洗 3 次,加入过氧化物酶标记的亲合素 37 °C 下孵育 30 min,清洗标板,加入底物避光处理 20 min 后终止反应,酶标仪 450 nm 波长处读取吸光度值,按照标准曲线计算样品含量。

Western blot 法检测大鼠结肠组织 α7nAChR、PI3K、AKT 蛋白表达水平:从液氮中取出标本,称取大鼠结肠组织(75±25)mg,加入适量的 RIPA 裂解液和 PMSF 溶液,并放入研磨机内进行研磨、裂解。4 °C 离心 15 min,取上清液,得到总蛋白溶液,测定总蛋白浓度。电泳,400 mA 恒流转膜。TBST 中快速洗涤,转移至封闭液内进行封闭处理,在 4 °C 条件下过夜。加入经抗体稀释液稀释的 α7nAChR (1:1 000)、PI3K (1:1 000)、AKT (1:10 000)、GAPDH (1:50 000)一抗,在室温下使用摇床孵育 2~3 h,转移至 TBST 内洗涤,10 min×3 次。用 HRP 标记的二抗(1:10 000)孵育 90 min,重复 TBST 洗涤过程。最后将膜放入化学发光成像仪内进行显影。将得到的条带用 Image J 分析软件进行灰度值测定。以 GAPDH 为内参蛋白,目的蛋白与 GAPDH 条带灰度值的比值为目的蛋白的相对表达量。

1.6 统计学分析

采用 SPSS23.0 软件进行统计分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用单因素方差分析比较组间差异,并做多组间的两两比较,方差齐用 LSD 检验,方差不齐用 Games-Howell 检验。以 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 手针与不同强度电针对急性炎性内脏痛模型大鼠 AWR 评分的影响

与正常组比较,模型组大鼠 20、40、60、80 mmHg

4个等级相应的AWR评分显著升高($P<0.05$),说明模型制作成功。与模型组比较,手针组、电针1 mA组、电针2 mA组的AWR评分显著降低($P<0.05$),但电针3 mA组、电针4 mA组、电针6 mA组差异无统计学意义。见图1。

2.2 手针与不同强度电针对急性炎性内脏痛模型大鼠腹外斜肌放电幅值的影响

与正常组比较,模型组大鼠在20、40、60、80 mmHg 4个等级相应的腹外斜肌放电幅值升高($P<0.05$)。与模型组比较,手针组、电针1 mA组、电针2 mA组大鼠腹外斜肌放电幅值显著降低($P<0.05$),而电针3 mA组、电针4 mA组、电针6 mA组腹外斜肌放电幅值差异无统计学意义。见图2。

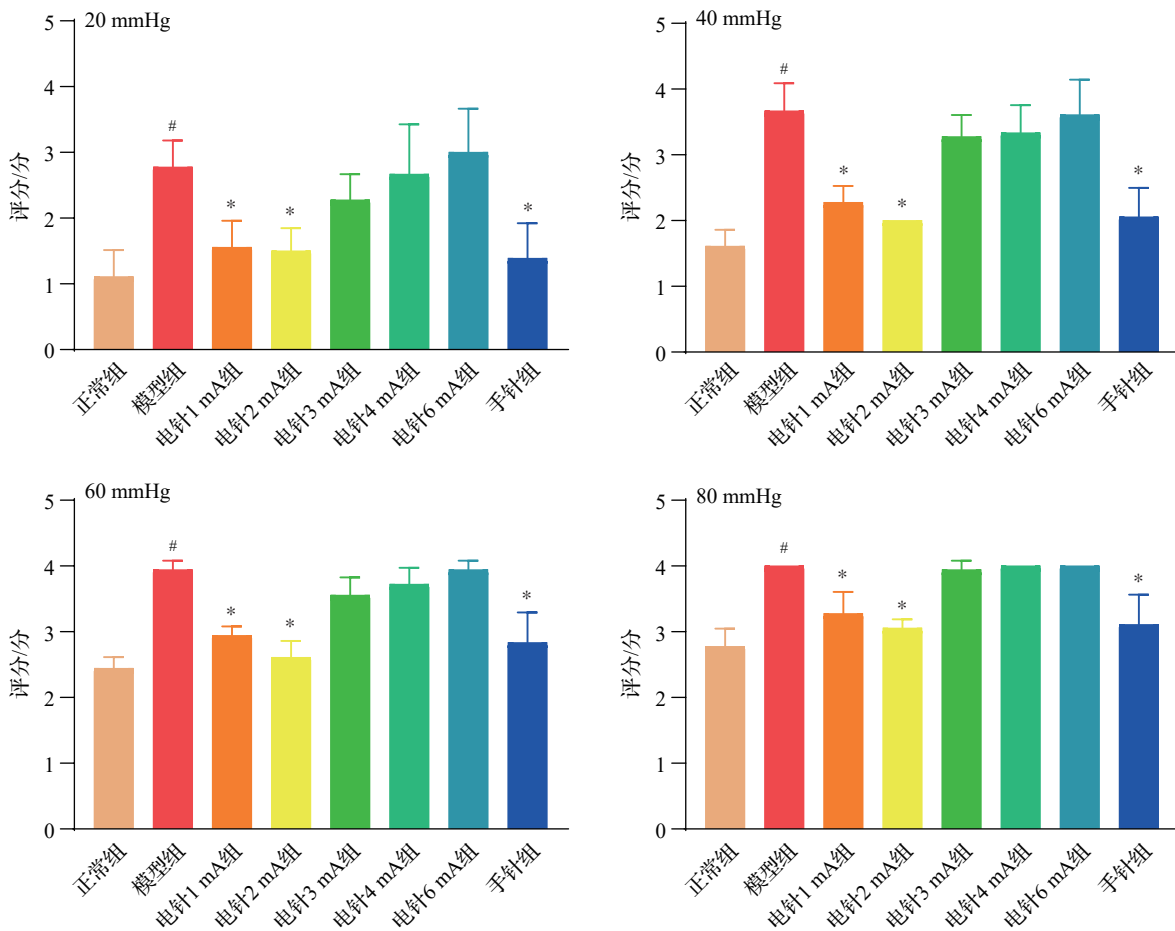
以上两部分结果说明相同频率的手针与1、2 mA电针干预“上巨虚”皆可降低急性炎性内脏痛模型大鼠的内脏痛敏,而较高的电针刺激强度(3、4、6 mA)则无明显的镇痛作用。

2.3 手针与不同强度电针对急性炎性内脏痛模型大鼠结肠组织形态学的影响

与正常组比较,模型组大鼠结肠黏膜轻度充血、水肿,可见明显的炎性浸润及形态异常改变。与模型组比较,手针组、电针1 mA组、电针2 mA组结肠黏膜炎性浸润及异常形态较少,但电针3 mA组、电针4 mA组、电针6 mA组无明显变化。见图3。提示相同频率的手针与1、2 mA电针干预“上巨虚”皆可改善急性炎性内脏痛模型大鼠肠黏膜炎性浸润等病理形态改变,而较高的电针刺激强度(3、4、6 mA)则无明显的作用。

2.4 抑制 $\alpha 7nAChR$ 对手针与电针干预急性炎性内脏痛模型大鼠镇痛效应的影响

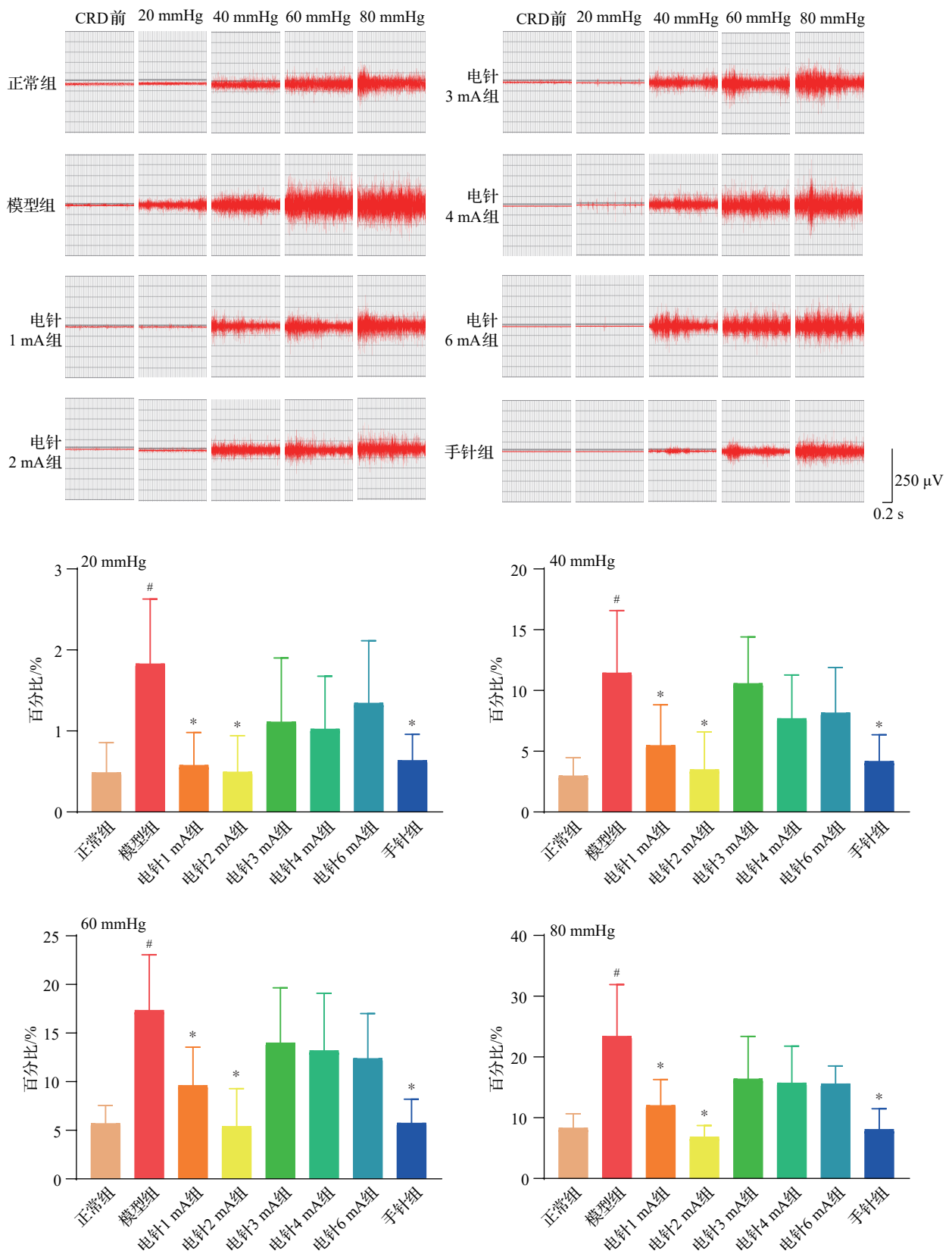
在干预前10 min予以大鼠腹腔注射 $\alpha 7nAChR$ 的阻断剂MLA后检测各组大鼠AWR,结果显示,与手针组比较,手针+MLA组20、40、60、80 mmHg 4个等级相应的AWR评分显著升高($P<0.05$);与



注:AWR为腹部撤回反射。1 mmHg \approx 0.133 kPa,下同。与正常组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$ 。

图1 手针与不同强度电针干预后各组大鼠AWR评分比较($\bar{x}\pm s$, 6只鼠/组)

Fig. 1 Comparison of AWR scores among rats of the 8 groups after manual acupuncture and electroacupuncture interventions with different intensities($\bar{x}\pm s$, 6 rats/group)



注:CRD为结直肠扩张刺激。上图为各组相应的例图,下图为各组进行CRD诱发的腹外斜肌放电幅值直方图。

与正常组比较,[#] $P < 0.05$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$ 。

图2 手针与不同强度电针干预后各组大鼠腹外斜肌放电幅值比较($\bar{x} \pm s$, 6只/组)

Fig. 2 Comparison of external oblique muscle electromyography amplitude among rats of the 8 groups after manual acupuncture and electroacupuncture interventions with different intensities ($\bar{x} \pm s$, 6 rats/group)

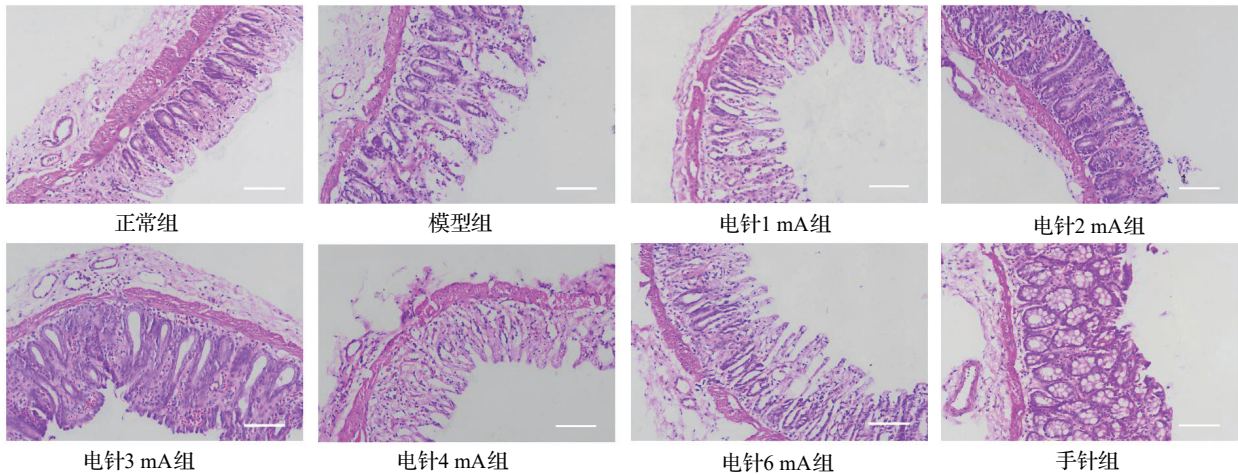


图3 手针与不同强度电针后各组大鼠结肠病理形态学比较(HE染色,标尺=100 μm)

Fig. 3 Comparison of colonic pathological morphology among rats of the 8 groups after manual acupuncture and electroacupuncture interventions with different intensities (HE staining, scale bar=100 μm)

电针 2 mA 组比较,电针 2 mA +MLA 组各 CRD 压力等级相应的 AWR 评分显著升高 ($P < 0.05$)。表明注射 $\alpha 7nAChR$ 的阻断剂 MLA 抑制了手针和 2 mA 电针的镇痛效应。见图 4。

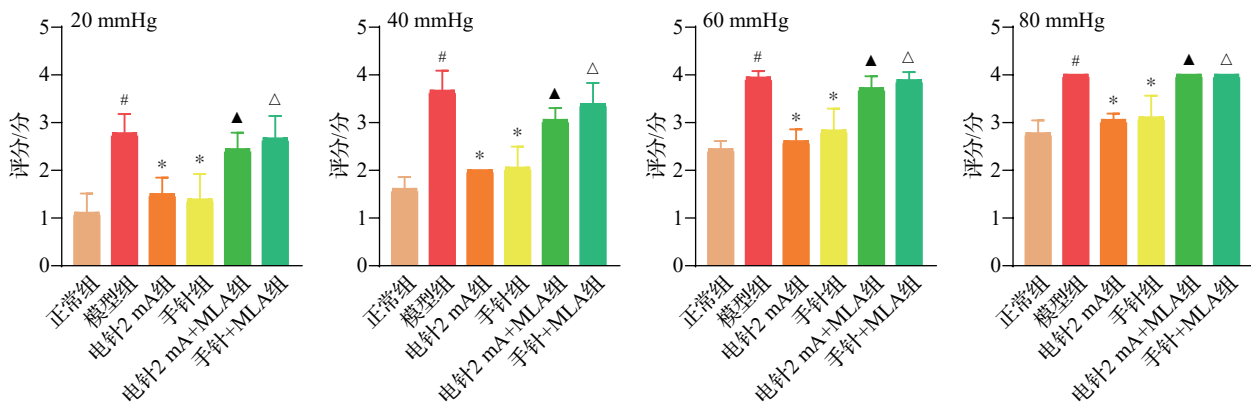
2.5 手针与电针对急性炎性内脏痛模型大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 含量的影响及抑制 $\alpha 7nAChR$ 后的作用

与正常组比较,模型组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 含量升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,手针组和电针 2 mA 组血清 TNF- α 、IL-1 β 含量降低 ($P < 0.05$)。表明手针和 2 mA 电针对急性炎性内脏痛模型大鼠均具有抗炎作用。为了验证手针与电针的作用是否与 $\alpha 7nAChR$ /PI3K 信号通路相关,在干预前 10 min 予以大鼠腹腔注射 $\alpha 7nAChR$ 的阻断剂

MLA,结果显示,与手针组比较,手针+MLA 组 TNF- α 、IL-1 β 含量显著升高 ($P < 0.05$);与电针 2 mA 组比较,电针 2 mA+MLA 组 TNF- α 、IL-1 β 含量显著升高 ($P < 0.05$)。表明注射 $\alpha 7nAChR$ 的阻断剂 MLA 后,手针组和电针 2 mA 组的抗炎效应均被抑制。见图 5。

2.6 手针与电针对急性炎性内脏痛模型大鼠结肠 $\alpha 7nAChR$ 、PI3K、AKT 蛋白表达的影响及抑制 $\alpha 7nAChR$ 后的作用

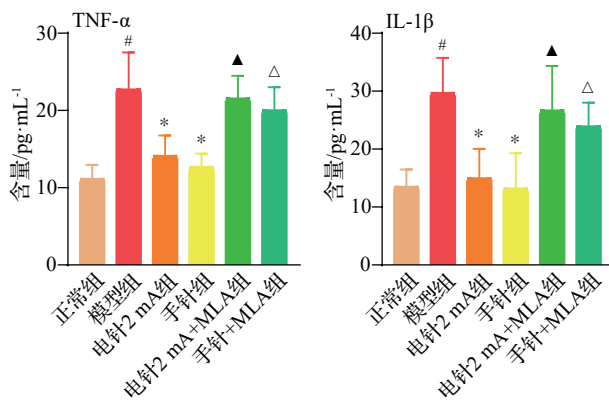
与正常组比较,模型组大鼠结肠 PI3K、AKT 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), $\alpha 7nAChR$ 蛋白表达降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,手针组和电针 2 mA 组结肠 PI3K、AKT 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), $\alpha 7nAChR$ 蛋白表达升高 ($P < 0.05$);与手针组比



注:AWR为腹部撤回反射。与正常组比较, # $P < 0.05$;与模型组比较, * $P < 0.05$;与电针 2 mA 组比较, ^ $P < 0.05$;与手针组比较, Δ $P < 0.05$ 。

图4 抑制 $\alpha 7nAChR$ 对手针与电针后大鼠 AWR 评分的影响($\bar{x} \pm s$, 6 只鼠/组)

Fig. 4 The effects of inhibiting $\alpha 7nAChR$ on AWR scores in rats following manual acupuncture and electroacupuncture ($\bar{x} \pm s$, 6 rats/group)



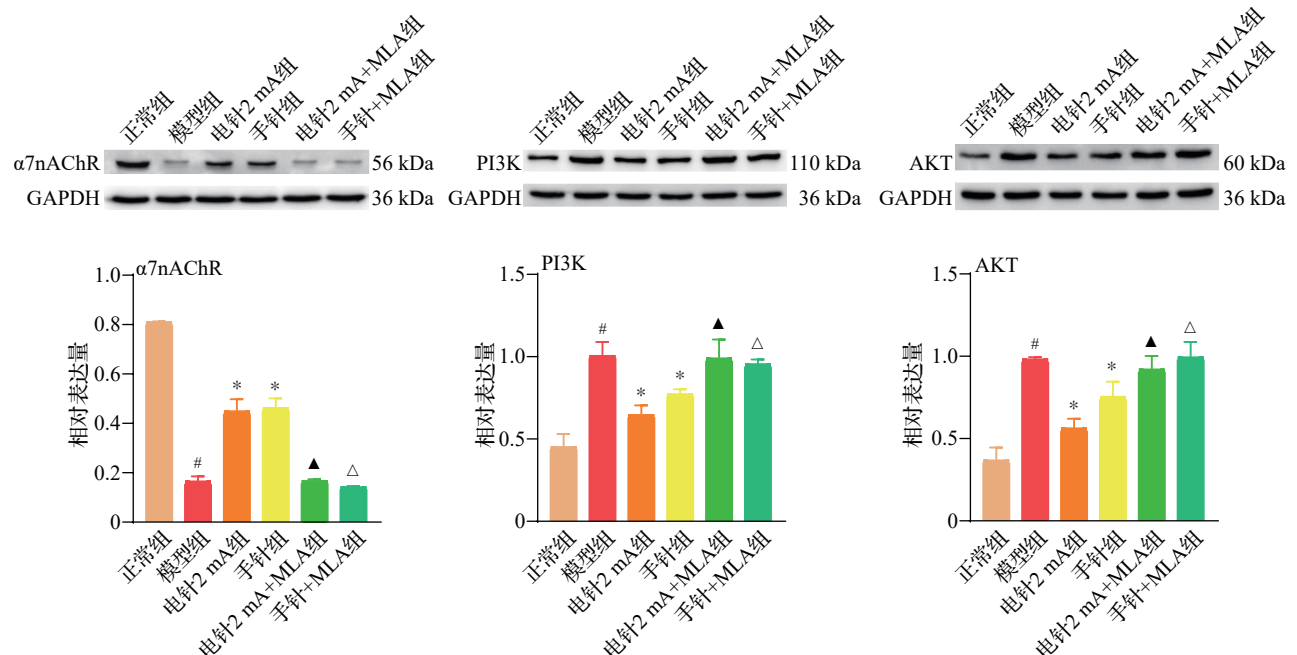
注:TNF- α 为肿瘤坏死因子- α ,IL-1 β 为白细胞介素-1 β 。
与正常组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与电针2 mA组比较,[▲] $P<0.05$;与手针组比较,[△] $P<0.05$ 。
图5 各组大鼠血清TNF- α 、IL-1 β 含量比较($\bar{x}\pm s$,6只鼠/组)
Fig. 5 Comparison of serum TNF- α and IL-1 β contents of rats in the 6 groups ($\bar{x}\pm s$,6 rats/group)

较,手针+MLA组结肠PI3K、AKT蛋白表达升高($P<0.05$), $\alpha 7nAChR$ 蛋白表达降低($P<0.05$);与电针2 mA组比较,电针2 mA+MLA组结肠PI3K、AKT蛋白表达升高($P<0.05$), $\alpha 7nAChR$ 蛋白表达降低($P<0.05$)。见图6。因此,我们推测手针和2 mA电针“上巨虚”缓解急性内脏炎性痛的作用机制,可能与激活 $\alpha 7nAChR$ 抑制PI3K信号

通路密切相关。

3 讨论

针灸已在缓解疼痛方面显示出良好的疗效,其中也包括内脏痛^[2]。然而,目前对于手针与电针在相同刺激频率和时间条件下的量效差异研究仍较为有限。一般比较电针和手针的研究都是在一定的时间内干预刺激,手针组是间歇行针的,而电针组却是持续刺激的,导致手针刺激的持续时间远低于电针,即使在治疗过程中手针每间隔一段时间实施一次手法刺激,其总体有效持续时间仍然低于电针^[9]。要解决这个问题,电针和手针需要在相同的持续时间和频率下操作。手针主要通过医师的手法操作来施加机械刺激,而电针则通过不同强度、频率和波形的电流实现刺激。朱兵团队^[17]观察到在引发脊髓背角放电时,当电针强度在1~7 mA的范围内,电针效应与电针刺激强度呈现出一定的量效关系,但是当电针刺激强度达到7~10 mA时,这种效应基本呈现平台趋势。因此本研究设置6 mA及以下的电流强度。为了使手针和电针频率基本相同,我们在操作手针时用节拍器做引导,确保每分钟120次(即与电针频率2 Hz一致)。为了避免手针/电针、捆绑等刺激造成大鼠应激,在干预时用



注: $\alpha 7nAChR$ 为 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体,PI3K为磷脂酰肌醇3-激酶,AKT为蛋白激酶B。与正常组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与电针2 mA组比较,[▲] $P<0.05$;与手针组比较,[△] $P<0.05$ 。

图6 各组大鼠结肠 $\alpha 7nAChR$ 、PI3K、AKT蛋白表达的比较($\bar{x}\pm s$,3只鼠/组)
Fig. 6 Comparison of the expression of colonic $\alpha 7nAChR$, PI3K, and AKT proteins of rats in the 6 groups ($\bar{x}\pm s$,3 rats/group)

0.7%异氟烷进行浅麻醉,以减少其他因素带来的干扰。

本实验参考 Qi 等^[11]的研究制作急性内脏炎性痛大鼠模型,在急性内脏炎性痛大鼠模型的“上巨虚”进行手针(2次/s频率的手法)与频率 2 Hz 不同刺激强度(1、2、3、4、6 mA)电针刺激 2 min。在实验观察效应时,先设置了电针 2 mA 组、4 mA 组、6 mA 组,统计 AWR 评分数据显示电针 4 mA 组、6 mA 组无明显的镇痛效应,从动物伦理的角度不加设 5 mA 组。与模型组比较,手针组、电针 1 mA 组、电针 2 mA 组的 AWR 评分均显著降低,但电针 3 mA 组、电针 4 mA 组、电针 6 mA 组差异均无统计学意义。可见针灸刺激要达到一定强度才能起效,但是针灸刺激强度并不是越大越好。有研究观察到低强度 1 mA 电针治疗腓肠肌炎性痛时可显著缓解肌肉炎性痛,高强度 3 mA 肌肉层电针则无明显镇痛作用^[18];同节段低强度 1 mA 电针对慢性疼痛的缓解作用明显优于高强度 5 mA 电针^[19];低强度电针而不是高强度电针能够缓解关节炎大鼠的局部炎性反应^[5]。Liu 等^[20]观察到低强度 0.5 mA 电针“足三里”可以导致依赖于迷走神经的肾上腺嗜铬细胞释放去甲肾上腺素、肾上腺素和多巴胺,足以诱导位于迷走神经背侧运动核的迷走神经传出神经元中 Fos 的表达。本研究的结果也提示,较低强度的 1、2 mA 电针对急性炎性内脏痛的镇痛效应优于 3 mA 以上的电针,为了探究电针效应是否与电针通过迷走抗炎机制治疗急性炎性内脏痛有关,本研究选取镇痛效应相近的手针组和电针 2 mA 组进行进一步研究。

胆碱能神经通路(CAP)是抗炎信号通过迷走神经传出纤维释放的乙酰胆碱与巨噬细胞等免疫细胞上的 $\alpha 7nAChR$ 结合,抑制促炎细胞因子释放而起到抗炎的作用。Borovikova 等^[21]提出了这一生理机制后,越来越多的学者开始研究 CAP。Du 等^[22]观察到电针“足三里”可通过激活胆碱能抗炎机制减轻全身性炎性反应,保护了肠屏障完整性,改善失血性休克后的器官功能和存活率。电针可以上调结肠与十二指肠的 $\alpha 7nAChR$ 蛋白表达,改善结肠溃疡与十二指肠溃疡大鼠的炎性反应,达到相应的抗炎作用^[23]。但手针是否也有类似的作用,尚不清楚。Lim 等^[24]研究显示电针与手针小鼠“足三里”皆能诱导背迷走神经复合体 c-Fos 的表达,但手针在减少脾脏 TNF- α 产生方面有效,迷走神经和脾神经的去除显著抵消了手针刺刺激介导的抗炎作用,表明手

针的治疗作用可能是通过迷走神经调节内脏炎性反应而介导的。

$\alpha 7nAChR$ 通过激活下游信号传导通路而参与调控胆碱能反应达到抗炎作用。PI3K/AKT 是 $\alpha 7nAChR$ 下游的一条重要信号通路^[25-26],AKT 是一种丝/苏氨酸蛋白激酶,作为 PI3K 的主要效应物,是 PI3K/AKT 信号级联的重要组成部分,在小鼠溃疡性结肠炎中,AKT 信号通路可以激活巨噬细胞,从而影响炎性反应的强度和持续时间,巨噬细胞中 AKT/PI3K 通路的异常激活会导致过度的肠道炎性反应和组织损伤,可通过抑制该通路降低炎性细胞因子的表达^[27]。有研究^[28]表明 $\alpha 7nAChR$ 的激活通过其下游多种途径抑制促炎细胞因子、促进抑炎细胞因子的释放达到抗炎作用,其中可通过调控 PI3K/AKT 信号传导通路,抑制 Toll 样受体 4 的表达,从而导致炎性细胞因子的减少。在针灸抗炎镇痛的研究中,有学者观察到电针能够使慢性结肠炎大鼠结肠组织中的 PI3K、AKT、mTOR mRNA 与蛋白表达明显降低,并降低血清中促炎因子水平,提高抗炎因子表达水平,“上巨虚”总体效应优于“天枢”“大肠俞”“足三里”^[29]。课题组前期也证实手针“上巨虚”降低促炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达,是通过抑制 PI3K/AKT 通路对瞬时受体电位香草酸受体 1 的调节实现的,在手针介导的急性炎性内脏痛的改善作用中起重要作用^[12]。本实验观察到对“上巨虚”干预的手针组和电针 2 mA 组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 的含量均降低,并进一步观察了造模后 PI3K/AKT 上游分子 $\alpha 7nAChR$ 的表达情况,实验结果显示急性内脏炎性痛模型大鼠结肠 PI3K、AKT 蛋白表达高于正常组, $\alpha 7nAChR$ 蛋白表达低于正常组,手针和 2 mA 电针都能降低 PI3K、AKT 蛋白的表达,并提高 $\alpha 7nAChR$ 蛋白的表达。为了验证手针与电针作用机制与 $\alpha 7nAChR$ /PI3K 信号通路的关系,在干预前 10 min 予以大鼠腹腔注射 $\alpha 7nAChR$ 阻断剂 MLA,结果显示阻断 $\alpha 7nAChR$ 后手针和 2 mA 电针的抗炎效应都被抑制了。同样,手针和 2 mA 电针对大鼠结肠 PI3K、AKT 和 $\alpha 7nAChR$ 蛋白表达的作用也被 $\alpha 7nAChR$ 阻断剂 MLA 逆转,因此,我们推测手针和电针“上巨虚”缓解急性内脏炎性痛的作用机制,可能与激活 $\alpha 7nAChR$ 抑制 PI3K/AKT 信号通路活化密切相关。

但本研究为了保证手针作用的稳定性只比较了电针与手针 2 min 的效应关系,如果刺激时间更短或者更长,是否也是相同的结果,还有待进一步

研究;也未对比不同部位的穴位如四肢的“足三里”与腹部的“天枢”是否存在调控内脏痛的差异,手针与电针对不同穴区的激活特征是否不同;两种不同刺激方式是否存在其他起效和抗炎途径及差异,尚有待今后进一步研究。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] 盛燮荪. 杨继洲刺有大小论探析[J]. 浙江中医杂志, 2000, 35(7): 277-278.
SHENG X S. On Yang Jizhou's theory of the size of acupuncture needles (in Chinese) [J]. Zhejiang Journal of Traditional Chinese Medicine, 2000, 35(7): 277-278.
- [2] ZHANG Q X, ZHOU M M, HUO M Z, et al. Mechanisms of acupuncture-electroacupuncture on inflammatory pain [J]. Mol Pain, 2023, 19: 17448069231202882.
- [3] 潘卫星. 针灸的神经生物学机理[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(10): 4281-4297.
PAN W X. Neurobiological mechanisms of acupuncture (in Chinese) [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2018, 33(10): 4281-4297.
- [4] TORRES-ROSAS R, YEHIA G, PEÑA G, et al. Dopamine mediates vagal modulation of the immune system by electroacupuncture[J]. Nat Med, 2014, 20(3): 291-295.
- [5] LIU H X, TIAN J B, LUO F, et al. Repeated 100 Hz TENS for the treatment of chronic inflammatory hyperalgesia and suppression of spinal release of substance P in monoarthritic rats[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2007, 4(1): 65-75.
- [6] 谢海梅, 柳依江, 王培, 等. 针刺强度对类痛经模型大鼠镇痛效应、前列腺素及缩宫素含量的影响[J]. 中医杂志, 2022, 63(5): 475-480.
XIE H M, LIU Y J, WANG P, et al. Effect of different stimulation strength of acupuncture on pain and the content of prostaglandin and oxytocin in dysmenorrhea-like model rats (in Chinese) [J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2022, 63(5): 475-480.
- [7] 孙俊俊, 王亚峰, 张壮, 等. 毫针刺手法对原发性痛经效应影响的系统评价[J]. 中国针灸, 2017, 37(8): 887-892.
SUN J J, WANG Y F, ZHANG Z, et al. Efficacy of filiform needle manipulation on primary dysmenorrhea: a systematic review (in Chinese) [J]. Chinese Acupuncture & Moxibustion, 2017, 37(8): 887-892.
- [8] 卞金玲, 张春红. 石学敏院士针刺手法量学的概念及核心[J]. 中国针灸, 2003, 23(5): 287-289.
BIAN J L, ZHANG C H. Conception and core of academician Shi Xuemin's acupuncture manipulation quantitative arts (in Chinese) [J]. Chinese Acupuncture & Moxibustion, 2003, 23(5): 287-289.
- [9] LANGEVIN H M, SCHNYER R, MACPHERSON H, et al. Manual and electrical needle stimulation in acupuncture research: pitfalls and challenges of heterogeneity [J]. J Altern Complement Med, 2015, 21(3): 113-128.
- [10] WANG Y, WANG Y C, CHEN Y N, et al. Distinct mechanisms of electroacupuncture and manual acupuncture in modulating hypothalamic GnRH-tanycyte unit function of polycystic ovary syndrome [J]. Chin Med, 2025, 20(1): 18.
- [11] QI D B, ZHANG S H, ZHANG Y H, et al. A rat model for studying electroacupuncture analgesia on acute visceral hyperalgesia [J]. Exp Anim, 2018, 67(1): 51-61.
- [12] CHEN C Y, YU Z, LIN D, et al. Manual acupuncture at ST37 modulates TRPV1 in rats with acute visceral hyperalgesia via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 5561999.
- [13] 陈采益, 徐斌, 喻晓春, 等. 电针经穴与相应非经穴对大鼠心动过缓调节效应差异的研究[J]. 上海针灸杂志, 2010, 29(12): 747-751.
CHEN C Y, XU B, YU X C, et al. Study of the difference in the regulating effect on rat bradycardia between electroacupuncture at meridian points and corresponding non-meridian points (in Chinese) [J]. Shanghai Journal of Acupuncture and Moxibustion, 2010, 29(12): 747-751.
- [14] WEI P H, LYU W Y, XU L, et al. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor may be a pharmacological target for perioperative neurocognitive disorders [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 907713.
- [15] AL-CHAER E D, KAWASAKI M, PASRICHA P J. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development [J]. Gastroenterology, 2000, 119(5): 1276-1285.
- [16] 郭丽霞. PKM ζ 在肠易激综合征模型大鼠慢性内脏痛脊髓中枢敏化中的作用[D]. 福州: 福建医科大学, 2014.
GUO L X. The role of PKM ζ in spinal central sensitization of chronic visceral pain in a rat model of irritable bowel syndrome (in Chinese) [D]. Fuzhou: Fujian Medical University, 2014.
- [17] 李亮, 荣培晶, 罗曼, 等. 内脏伤害性传入易化体表穴区功能的中枢机制[J]. 中国针灸, 2015, 35(11): 1187-1191.
LI L, RONG P J, LUO M, et al. The central mechanisms underlying the phenomenon of acupoint sensitization evoked by visceral nociceptive afferent (in Chinese) [J]. Chinese Acupuncture & Moxibustion, 2015, 35(11): 1187-1191.
- [18] 陈李圳. 深刺“承山穴”缓解大鼠肌肉炎性痛的外周神经机制[D]. 北京: 中国中医科学院, 2019.
CHEN L Z. Peripheral nerve mechanism of deep needling “Chengshan point” to relieve muscle inflammatory pain in rats (in Chinese) [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2019.

- [19] 刘俊岭, 陈淑萍, 高永辉, 等. 不同强度、不同频度电针对慢性痛大鼠镇痛作用的比较[J]. 针刺研究, 2006, 31(5): 280-285.
LIU J L, CHEN S P, GAO Y H, et al. Comparison of analgesic effects of electroacupuncture at different stimulating intensities and different treatment intervals (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2006, 31(5): 280-285.
- [20] LIU S B, WANG Z F, SU Y S, et al. A neuroanatomical basis for electroacupuncture to drive the vagal-adrenal axis[J]. Nature, 2021, 598(7882): 641-645.
- [21] BOROVIKOVA L V, IVANOVA S, ZHANG M, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin [J]. Nature, 2000, 405 (6785) : 458-462.
- [22] DU M H, LUO H M, HU S, et al. Electroacupuncture improves gut barrier dysfunction in prolonged hemorrhagic shock rats through vagus anti-inflammatory mechanism [J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(36): 5988-5999.
- [23] 凌希, 张泓, 易细芹, 等. 电针胃肠胆腑下合穴对十二指肠溃疡大鼠血清肿瘤坏死因子- α 及组织烟碱型乙酰胆碱受体 $\alpha 7$ 等的影响[J]. 针刺研究, 2016, 41(2): 108-112.
LING X, ZHANG H, YI X Q, et al. Effects of electroacupuncture stimulation of "Xiajuxu" (ST39), etc. on duodenal mucosal injury, serum pro-inflammatory factors levels and duodenal nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ expression in duodenal ulcer rats (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2016, 41(2): 108-112.
- [24] LIM H D, KIM M H, LEE C Y, et al. Anti-inflammatory effects of acupuncture stimulation *via* the vagus nerve [J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0151882.
- [25] 万亚会, 吕梦嶝, 李征, 等. $\alpha 7$ -nAChR/PI3K/AKT/GSK-3 β 通路在慢性睡眠剥夺后的保护作用及其机制研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2021, 38(5): 392-398.
WAN Y H, LÜ M D, LI Z, et al. The role of $\alpha 7$ -nAChR/PI3K/AKT/GSK-3 pathway in chronic sleep deprivation and its mechanism (in Chinese) [J]. Journal of Apoplexy and Nervous Diseases, 2021, 38(5): 392-398.
- [26] KALKMAN H O, FEUERBACH D. Modulatory effects of $\alpha 7$ nAChRs on the immune system and its relevance for CNS disorders[J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73(13): 2511-2530.
- [27] ZHOU T T, YE Y J, CHEN W J, et al. Glucocalyxin A alleviates ulcerative colitis by inhibiting PI3K/AKT/mTOR signaling[J]. Sci Rep, 2025, 15(1): 6556.
- [28] REN C, TONG Y L, LI J C, et al. The protective effect of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor activation on critical illness and its mechanism [J]. Int J Biol Sci, 2017, 13(1) : 46-56.
- [29] 唐坤鹏, 吕嘉琪, 文坛, 等. 基于PI3K/AKT/mTOR信号通路对电针干预慢性结肠炎大鼠的腧穴特异性及机制研究[J]. 海南医学院学报, 2023, 29(9): 674-680.
TANG K P, LÜ J Q, WEN T, et al. A study of acupoint specificity and mechanism of electroacupuncture intervention on chronic colitis in rats based on PI3K/AKT/mTOR signaling pathway (in Chinese) [J]. Journal of Hainan Medical University, 2023, 29(9): 674-680.

收稿日期:2025-03-30 修回日期:2025-05-11

网络首发:2025-08-27 编辑:秦田雨