

☆ XXXX ☆

# 针刺对穴“后溪”“环跳”调节PI3K/AKT/mTOR 信号通路对腰椎间盘突出退变模型大鼠髓核细胞 自噬的影响机制

胡志祥<sup>1</sup>, 吴 涵<sup>1</sup>, 吕 恒<sup>1</sup>, 张 浩<sup>1</sup>, 翟春涛<sup>1</sup>, 李圣云<sup>1,2</sup>, 王正浩<sup>1,2</sup>, 吕玉娥<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>山西中医药大学第二临床学院, 山西晋中 030024; <sup>2</sup>山西省针灸医院, 太原 030006)

**【摘要】** 目的:观察针刺“后溪”“环跳”对穴对腰椎间盘突出退变(IDD)模型大鼠磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路及髓核细胞自噬的影响,探讨其延缓IDD的潜在机制。方法:选取36只SD大鼠,随机分为假手术组、模型组与对穴组,每组12只。模型组与对穴组大鼠均采用纤维环穿刺法构建IDD模型。造模成功后,对穴组大鼠给予“后溪”“环跳”针刺治疗,每次20 min,每日1次,持续14 d。在造模前后及干预后第7、14天,采用VonFery纤维丝测定各组大鼠右足的机械性缩足反射阈值,同时使用热痛刺激仪检测大鼠右足对热刺激产生缩足反射的潜伏期;HE染色法观察椎间盘组织的形态学特征;ELISA法检测各组大鼠髓核组织中聚集蛋白聚糖(Aggregan)、II型胶原蛋白(Collagen II)、转录因子性别决定区Y框蛋白9(SOX9)、基质金属蛋白酶3(MMP3)、基质金属蛋白酶13(MMP13)含量;实时荧光定量PCR法检测各组大鼠髓核组织中SOX9、MMP13 mRNA表达水平;免疫荧光染色法检测髓核组织中LC3阳性表达;Western blot法检测各组大鼠髓核组织中PI3K/AKT/mTOR信号通路相关蛋白及微管相关蛋白1轻链3-II(LC3-II)、苜蓿素1(Beclin1)、整合体1(p62)表达水平。结果:与假手术组相比,模型组大鼠第7、14天的机械性缩足反射阈值、热刺激缩足反射潜伏期降低( $P<0.001$ ),髓核组织内的Aggregan、Collagen II、SOX9含量及SOX9 mRNA表达降低( $P<0.001$ ,  $P<0.01$ ),MMP3、MMP13含量及MMP13 mRNA表达水平,LC3阳性表达,以及Beclin1、LC3-II蛋白表达水平平均升高( $P<0.001$ ),p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR比值及p62蛋白表达水平降低( $P<0.001$ )。与模型组相比,对穴组大鼠机械性缩足反射阈值、热刺激缩足反射潜伏期升高( $P<0.001$ ),髓核组织内的Aggregan、Collagen II、SOX9含量及SOX9 mRNA表达水平上升( $P<0.001$ ),MMP3、MMP13含量及MMP13 mRNA表达水平,LC3阳性表达,以及Beclin1、LC3-II蛋白表达水平平均降低( $P<0.001$ ,  $P<0.01$ ,  $P<0.05$ );p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR比值及p62蛋白表达水平平均升高( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ,  $P<0.001$ )。HE结果显示,模型组髓核细胞数量较少且形态紊乱,可见大量空泡;而对穴组髓核细胞排列更规则且形态正常,空泡数量减少。结论:针刺“后溪”“环跳”对穴能够通过调控腰椎间盘突出退变模型大鼠髓核细胞的自噬过程,减少细胞外基质的降解程度,进而延缓IDD进程,其潜在机制可能与针刺对穴激活PI3K/Akt/mTOR信号通路密切相关。

**【关键词】** 针刺;后溪;环跳;腰椎间盘突出退变;PI3K/AKT/mTOR信号通路;自噬

## Mechanism of acupuncture of “Houxi” (SI3) and “Huantiao” (GB30) in delaying intervertebral disc degeneration by regulating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and autophagy of nucleus pulposus cells in rats with lumbar intervertebral disc degeneration

HU Zhi-xiang<sup>1</sup>, WU Han<sup>1</sup>, LÜ Heng<sup>1</sup>, ZHANG Hao<sup>1</sup>, ZHAI Chun-tao<sup>1</sup>, LI Sheng-yun<sup>1,2</sup>, WANG Zheng-hao<sup>1,2</sup>, LÜ Yu-e<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Second Clinical College of Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030024, Shanxi Province, China; <sup>2</sup>Shanxi

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20251108

引用格式:胡志祥,吴涵,吕恒,等.针刺对穴“后溪”“环跳”调节PI3K/AKT/mTOR信号通路对腰椎间盘突出退变模型大鼠髓核细胞自噬的影响机制[J].针刺研究,XXXX,XX(X):1-10.

项目来源:山西省科技人才创新团队建设(No.202204051002011);山西省中医药管理局中医药创新团队项目(No.zyytd2024013);中国中医科学院科技创新工程项目(No.CI2022E010XB);山西中医药大学创新团队项目(No.2022TD1006);吕景山国医大师“对法”传承省技术创新中心项目(No.2022D100089052823242891545041)

通信作者:翟春涛,E-mail:709966203@qq.com;吕玉娥,E-mail:shanxitengtong1@126.com

Provincial Acupuncture Hospital, Taiyuan 030006)

**【ABSTRACT】 Objective** To observe the effect of acupuncture at the acupoint pair “Houxi”(SI3) and “Huantiao”(GB30) on the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway and autophagy of nucleus pulposus cells in a rat model of intervertebral disc degeneration (IDD), so as to explore its underlying mechanism in delaying IDD. **Methods** A total of 36 male SD rats were randomly assigned to sham operation, model and acupoint pair groups, with 12 rats in each group. The IDD model was established by annulus fibrosus puncture. After modeling, rats of the acupoint pair group received acupuncture stimulation of bilateral SI3 and GB30, with the acupuncture needles retained for 20 min, once daily for 14 consecutive days. Before and after modeling and after the intervention, the mechanical withdrawal reflex threshold (mechanic pain threshold) of the right foot was measured using VonFrey filaments, and the thermal pain threshold measured by using a thermal pain tester. The morphological characteristics of the intervertebral disc tissue were observed by H.E. staining. The contents of type II collagen (Collagen II), Aggrecan, matrix metalloproteinase 3 (MMP3), matrix metalloproteinase 13 (MMP13), and transcription factor sex-determining region Y-box protein 9 (SOX9) in the nucleus pulposus tissue were detected by ELISA. The mRNAs relative expression levels of SOX9 and MMP13 in the nucleus pulposus tissue were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The expression of light chain 3 (LC3) in the nucleus pulposus tissue was detected by immunofluorescence staining. The expression levels of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway-related proteins and microtubule-associated protein 1 light chain 3- II (LC3- II), Beclin1, and chaperone 1 (p62) in the nucleus pulposus tissue were detected by Western blot. **Results** After modeling, in contrast to the sham operation group, the model group showed a striking decrease in the mechanical and thermal pain thresholds on day 7 and 14, contents of Aggrecan, collagen II and SOX9, and the expression levels of SOX9 mRNA and p62 protein, ratios of p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT, and p-mTOR/mTOR in the nucleus pulposus tissue ( $P<0.001$ ,  $P<0.01$ ), and a notable increase in the contents of MMP3 and MMP13, and MMP13 mRNA expression level, LC3 immunofluorescence intensity, and protein expressions of LC3- II and Beclin 1 ( $P<0.001$ ). Under light microscope, the nucleus pulposus cells in the model group was relatively small in the number and discorded in the distribution, with a large number of vacuoles and chaotic matrix arrangement, and the lumbar intervertebral discs showed obvious degeneration, and decrease in the height. In comparison with the model group, both the decrease and increase of the indexes mentioned above were all reversed in the acupoint pair group ( $P<0.001$ ,  $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ). The results of H.E. stain displayed that in the acupoint pair group, the arrangement of the nucleus pulposus cells was more regular, and the number of vacuoles was reduced. **Conclusion** Acupuncture of acupoint pair SI3 and GB30 can mitigate pain and regulate the autophagy process of lumbar intervertebral disc nucleus cells, reduce the degree of degradation of cytoplasmic matrix, and thereby delay the progression of IDD in DDI rats, which may be associated with its function in activating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway.

**【KEYWORDS】** Acupuncture; Houxi(SI3); Huantiao(GB30); intervertebral disc degeneration; PI3K/AKT/mTOR signaling pathway; Autophagy

腰椎间盘突出退变(IDD)属于肌肉骨骼系统常见的退行性病变,其主要病理特征包括髓核细胞衰老与自噬失衡、细胞外基质(ECM)合成与降解失常,以及纤维环破裂和炎症反应<sup>[1-2]</sup>。保守治疗作为IDD的前期治疗首选方案,可使大部分患者症状得到缓解<sup>[3]</sup>。针灸作为其中一种有效治疗手段,不仅能够缓解疼痛、维持脊柱稳定,还可通过调节机体炎症免疫反应及局部微循环,对IDD的病理进程产生干预作用<sup>[4]</sup>。近年来,有研究已证实,自噬可发生在椎间盘髓核细胞的代谢活动中。适度的自噬能维持髓核细胞稳态,促进细胞外基质的合成,并抑制基质金属蛋白酶的表达,从而对退变椎间盘发挥保护

效应<sup>[5-6]</sup>。磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路是细胞自噬的主要通路,通过干预该通路来调节细胞自噬可能成为治疗IDD的潜在方法<sup>[7]</sup>。国医大师吕景山教授通过临床实践发现,将后溪与环跳作为对穴联合运用,治疗腰腿痛疗效显著<sup>[8]</sup>。本课题组前期研究表明,针刺“后溪”“环跳”可缓解模型大鼠腰椎间盘突出退变及疼痛<sup>[9]</sup>。然而,针刺对穴是否能够通过调控PI3K/AKT/mTOR信号通路影响髓核细胞自噬,进而发挥治疗作用,目前尚不明确。因此,本研究通过针刺IDD模型大鼠“后溪”“环跳”,观察该疗法对PI3K/AKT/mTOR通路活性、自噬

相关蛋白表达及髓核细胞的影响,揭示其治疗IDD的作用机制,为其临床应用提供现代科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

本研究选用36只SPF级健康雄性SD大鼠,周龄6~8周,体质量为(200±20)g。大鼠均购自北京西山昌扬养殖场,生产许可证编号为SCXK(京)2024-0001,饲养在山西中医药大学屏障设施动物房。饲养采用分笼方式,环境温度控制在(23±3)℃,湿度维持在(53±5)%,并设置12h光照与12h黑暗的交替周期,动物可自由摄食饮水。所有大鼠经7d适应性饲养后开始实验。本项动物实验已通过山西中医药大学伦理委员会审批,批号为AWE202209144,且实验操作全程严格遵循《实验动物保护与使用指南》的相关规定。采用随机数字表法将大鼠分为假手术组、模型组与对穴组,每组12只。模型组、对穴组各有2只大鼠因死亡被剔除,最终假手术组12只、模型组10只、对穴组10只。

### 1.2 主要仪器和试剂

小动物气体麻醉机(深圳瑞沃德),BME-410C型热痛刺激仪(成都泰盟),VonFery纤维丝(山东佳鼎),华佗牌针灸针(苏州医疗用品厂),FA1004型电子天平(上海浦春),KZ-II型研磨仪(武汉赛维尔),neofuge 15R型冷冻离心机(上海力康),DYY-6D型电泳仪(北京六一),HB-980型曝光仪(美国ProteinSimple),荧光定量PCR仪(美国Thermo),SCI 1000-G型反转录仪(美国SCILOGEX),超微量分光光度计(瑞典Cytiva),酶标仪(瑞士帝肯sunrise),SHANDONFINESSE325型石蜡切片机(美国赛默飞),CX-31型显微镜(日本奥林巴斯),7.0T核磁共振仪(德国Bruker)

异氟烷(河北金达福),氨苄西林钠(大连美仑),性别决定区Y框蛋白9(SOX9)、II型胶原蛋白(Collagen II)、聚集蛋白聚糖(Aggregan)、基质金属蛋白酶3(MMP3)、基质金属蛋白酶13(MMP13)ELISA试剂盒(江苏酶免),荧光素及HRP标记的羊抗兔二抗(美国Jackson),HRP标记的羊抗鼠二抗、PI3K、AKT、mTOR、磷酸化(p)-PI3K、p-AKT、p-mTOR、苜蓿素1(Beclin1)、螯合体1(p62)、微管相关蛋白1轻链3(LC3)抗体(武汉三鹰), $\beta$ -actin抗体(武汉爱博泰克),苏木精染液-伊红染色试剂盒(湖北百奥斯),RNA提取、反转录及PCR试剂盒(北京全式金)。

### 1.3 造模方法

模型组与对穴组采用纤维环穿刺法<sup>[10-11]</sup>构建IDD大鼠模型,通过吸入2%异氟烷的氧气混合气体诱导麻醉,待大鼠呼吸频率平稳后,调整为俯卧位,并使其持续吸入1%异氟烷以维持麻醉。剃除背部毛发,以两侧髂嵴最高点连线[对应腰(L)5~L6间隙]为体表标志,定位目标椎间盘(L4~L5),用碘伏对局部皮肤消毒后,依次切开皮肤及筋膜,钝性分离脊柱旁肌肉,暴露L4和L5的横突及椎板。以横突为骨性标志,定位其间的L4~L5椎间盘;用9号穿刺针对准L4~L5椎间盘进行穿刺,穿刺方向斜向内下方,角度约15°,穿刺深度达到椎间盘2mm处,并在此深度维持5s。穿刺操作完成后,先用可吸收缝合线缝合深部肌肉组织,再使用非吸收缝合线缝合皮肤创口,最后用碘伏对切口周围区域皮肤进行消毒处理。假手术组仅进行手术区域剃毛、消毒、逐层解剖暴露至椎间盘外侧缘(不穿刺),直接缝合组织。术后连续3d肌内注射氨苄西林钠,每天1次,并观察大鼠进食及步态、有无伤口感染及尿潴留等情况。造模后第3天,用磁共振成像(MRI)评估造模效果,若造模节段椎间盘出现信号降低,则提示造模成功。

### 1.4 干预方法

模型构建完成3d后,对穴组大鼠开始给予针刺干预。穴位的定位标准参照《实验动物常用穴位名称与定位 第2部分:大鼠》<sup>[12]</sup>,对穴组大鼠需接受双侧“后溪”与“环跳”针刺干预。将大鼠以俯卧位放置在固定平台上,用柔软的棉绳以适当的松紧度依次固定其四肢腕、踝关节于平台固定点,使动物身体伸展体位,充分暴露背部区域,使用规格为0.30mm×25mm的一次性无菌针灸针,双侧“环跳”直刺进针7mm,双侧“后溪”直刺进针2.5mm,由同一操作者进行针刺,使用计时器,从进针完毕开始计时,总留针时长为20min。留针期间,每间隔10min行针1次,行针手法采用平补平泻法,均匀捻转针柄,捻转幅度为180°,持续时间30s,留针期间密切观察大鼠呼吸、活动及应激状态,操作结束后快速剪断棉绳解除束缚。每日干预1次,连续干预14d。假手术组与模型组大鼠每日给予相同时长的俯卧位固定,但不进行针刺干预。

### 1.5 检测指标及方法

MRI检测:造模后3d,从假手术组、对穴组及模型组中分别随机挑选2只大鼠进行MRI检测。以2%异氟烷氧气混合气体对各组大鼠进行麻醉、

固定,使用核磁共振仪行L4~L5腰椎间盘MRI平扫,使用自旋回波序列获得覆盖整个椎间盘区域的矢状面的T2加权图,观察腰部椎间盘的信号强度和高度,以判断模型成功与否。

Vonfery 纤维丝测定大鼠机械性缩足反射阈值(PWMT):分别于造模前、造模后和干预后第7、14天分别测定各组大鼠的机械痛阈值<sup>[13]</sup>。将大鼠置于底部为网格的特制有机玻璃箱内适应20 min左右,待大鼠动作缓和后开始测定,通过上下法采用由6.0 g起始不同规格的VonFrey纤维丝刺激大鼠右脚掌中部皮肤,纤维丝弯曲至“C”或“S”并维持6~8 s,每种力度均重复3次,若大鼠出现2次及以上缩足、舔足,记为阳性反应,反之,为阴性反应。观察缩足反应并记录,每次测试间隔5 min,避免组织敏化或损伤。每只大鼠重复检测3次,计算平均值作为其最终的PWMT值。

热痛刺激仪测定大鼠对热刺激产生缩足反射的潜伏期(PWTL):分别于造模前、造模后和干预后第7、14天测定各组大鼠的热痛觉阈值<sup>[14]</sup>。将大鼠置于室温下正方形的格子中,每个格子之间由挡板阻隔,让大鼠在隔间中适应1 min左右,设定热源照射强度为50%。将热辐射探头精确对准并紧贴有机玻璃底板下的大鼠右后足掌心。当大鼠出现快速缩足反应时,自动停止计时并记录下对应时间。每次测试后需间隔5 min再进行下一次测定,避免足部组织烫伤。每只大鼠重复检测3次,计算平均值作为其最终PWTL值。

取材:在治疗周期结束后,麻醉后处死各组大鼠,剥离腰椎L1~L6节段周围的肌肉,取腰段椎体,在0.9%氯化钠溶液中清洗,用滤纸吸收表面的液体后,分离出L4~L5椎体的椎间盘,一部分椎间盘置于4%多聚甲醛固定液,用于HE染色和免疫荧光染色;另一部分保存在-80℃冰箱中,用于Western blot、ELISA和实时荧光定量PCR检测。

HE染色法观察大鼠椎间盘组织病理形态改变:每组取3个椎间盘组织置于4%多聚甲醛固定液中充分固定,然后置于10%EDTA脱钙液中脱钙处理;脱钙结束后,采用无水乙醇脱水,随后依次进行浸蜡、包埋与切片(厚度为5 μm),于显微镜下观察椎间盘组织的病理学变化情况。

ELISA法检测大鼠椎间盘组织中Collagen II、Aggrecan、MMP3、MMP13、SOX9含量:取每组8只大鼠冻存的髓核组织约80 mg,加入适量0.9%氯化钠溶液后充分捣碎、匀浆。随后离心10 min,收集上

清液备用。按照所购试剂盒规定的步骤,向96孔板中依次添加倍比稀释的上清液样本、不同浓度梯度的标准品及HRP标记的检测抗体,将其置于37℃水浴锅中温育60 min,温育结束后进行彻底洗涤。洗涤完成后加入TMB底物溶液,在避光条件下进行显色反应,待显色完成后加入终止液以终止反应。立即于450 nm波长下测定各孔吸光度值,根据标准曲线计算椎间盘中Collagen II、Aggrecan、MMP3、MMP13、SOX9含量。

实时荧光定量PCR法检测大鼠椎间盘组织SOX9、MMP13 mRNA表达水平:取每组3只大鼠冻存的髓核组织约30 mg,加入RNA提取试剂,使用研磨珠进行匀浆。充分振荡混匀,室温静置后离心,提取总RNA,进行反转录,得到cDNA,扩增目的基因。反应条件:94℃预变性2 min;94℃变性5 s,60℃退火、延伸30 s,共45个循环。以β-actin为内参,采用2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算目的mRNA的相对表达量。引物由武汉博尔夫设计,引物序列见表1。

表1 引物序列  
Table1 Primer sequences

基因	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
SOX9	上游 GAAGATCAAGATCATTGCTCC	86
	下游 TACTCCTGCTTGCTGATCCA	
MMP13	上游 ACCATCCTGTGACTCTTGCG	170
	下游 TTCACCCACATCAGGCACTC	
β-actin	上游 GAAGATCAAGATCATTGCTCC	111
	下游 TACTCCTGCTTGCTGATCCA	

注:SOX9为性别决定区Y框蛋白9,MMP13为基质金属蛋白酶13。

免疫荧光染色法检测大鼠椎间盘髓核LC3阳性表达:取各组3个椎间盘石蜡切片,经脱蜡、水化及抗原修复后。将LC3一抗(1:200)分别加入组织切片,4℃孵育过夜。然后滴加50~100 μL荧光素标记的抗兔二抗(1:200)室温孵育,DAPI溶液37℃下染色10 min,PBS冲洗,用缓冲甘油密封。在荧光显微镜下观察并采集图像,选取每个视野的髓核区域,用Image J软件进行分析,计算平均荧光强度。

Western blot法检测大鼠椎间盘髓核组织中PI3K/AKT/mTOR通路蛋白及Beclin1、p62、LC3-II蛋白表达水平:每组取3只大鼠髓核组织约30 mg,加入组织裂解液,使用研磨仪碾磨组织,研磨完成

后取出静置 10 min, 涡旋仪充分震荡, 重复 3 次, 4 ℃ 下 12 000 r/min (离心半径为 4 cm) 离心 10 min, 取上清, 用 BCA 法测定蛋白浓度。取适量蛋白溶液与 5× 还原型蛋白上样缓冲液按 4:1 体积比例混合, 沸水浴变性 10 min, 冷却至室温, 放置 -20 ℃ 冰箱保存备用。取等量蛋白样品进行凝胶电泳。电泳结束后, 在 300 mA 恒定电流下转膜 30 min。随后, 用 5% 脱脂牛奶封闭 PVDF 膜 1 h, 加入相应的一抗 PI3K (1:2 000)、AKT (1:5 000)、mTOR (1:5 000)、p-PI3K (1:1 000)、p-AKT (1:1 000)、p-mTOR (1:2 000)、Beclin1 (1:1 000)、p62 (1:1 000) 和 LC3 (1:1 000), 4 ℃ 孵育过夜后, 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入相应的 HRP 标记的二抗溶液 (兔二抗 1:5 000, 鼠二抗 1:5 000), 室温孵育 1 h, 缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min, 然后在膜内加入显色试剂, 显影、曝光。以  $\beta$ -actin 作为内参, 使用 Image J 软件分析各蛋白条带的灰度值, 以目的蛋白与内参蛋白  $\beta$ -actin 的灰度值比值作为目的蛋白的相对表达量。

### 1.6 统计学方法

所有实验数据采用 SPSS27.0 进行统计分析, 使用 GraphPad Prism 9.0 软件绘图。计量资料均符合正态分布且方差齐, 以均数±标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示。组间比较, PWMT、PWTL 采用重复测量方差分析, 其他数据采用单因素方差分析, 进一步两两比较用 LSD 检验。以  $P\leq 0.05$  为差异有统计学意义的标准。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠椎间盘 MRI 检测结果比较

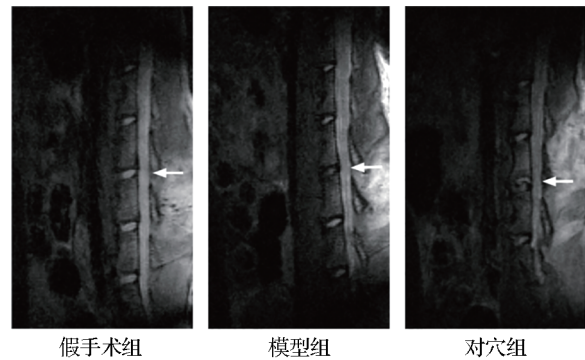
造模后, 模型组和对穴组中 L4~L5 节段椎间盘的髓核信号强度降低, 结构不均匀, 出现灰色水平带。而假手术组大鼠 L4~L5 节段椎间盘的髓核信号强度较高, 结构分布均匀且呈亮白色。见图 1。

### 2.2 各组大鼠 PWMT 比较

造模后, 与假手术组相比, 模型组和对穴组大鼠 PWMT 均降低 ( $P<0.001$ )。针刺干预后第 7、14 天, 与假手术组相比, 模型组大鼠 PWMT 仍降低 ( $P<0.001$ ); 与模型组相比, 对穴组大鼠 PWMT 升高 ( $P<0.001$ )。见图 2。

### 2.3 各组大鼠 PWTL 比较

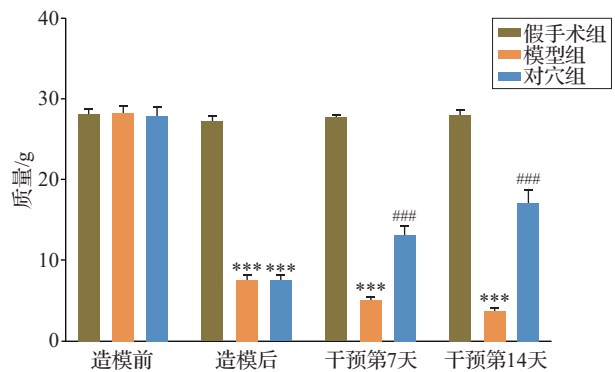
造模后, 与假手术组相比, 模型组和对穴组的 PWTL 均降低 ( $P<0.001$ )。在针刺干预后第 7、14 天, 与假手术组相比, 模型组大鼠 PWTL 降低



注: 白色箭头示造模节段。

图 1 各组大鼠椎间盘核磁共振成像比较

Fig. 1 Comparison of magnetic resonance imaging of intervertebral discs of rats in rats of the 3 group

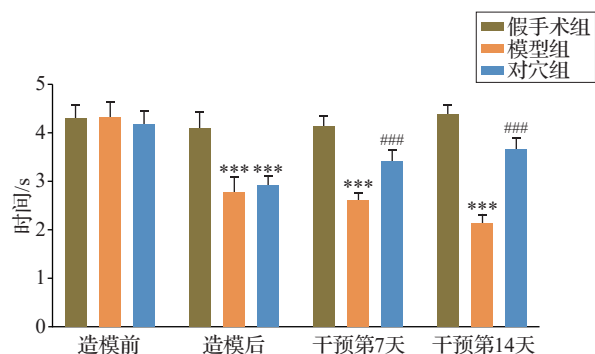


注: 与假手术组相比, \*\*\* $P<0.001$ ; 与模型组相比, ### $P<0.001$ 。

图 2 各组大鼠不同时间机械性缩足反射阈值比较 ( $\bar{x}\pm s$ , 8 只鼠/组)

Fig. 2 Comparison of paw withdrawal mechanical threshold at different times of rats in the 3 groups ( $\bar{x}\pm s$ , 8 rats/group)

( $P<0.001$ ); 与模型组相比, 对穴组大鼠 PWTL 升高 ( $P<0.001$ )。见图 3。



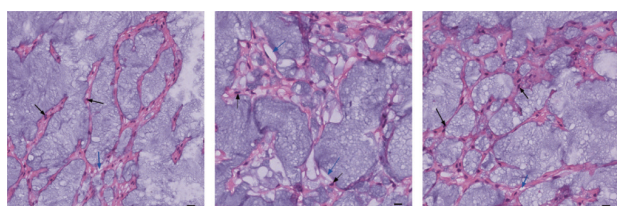
注: 与假手术组相比, \*\*\* $P<0.001$ ; 与模型组相比, ### $P<0.001$ 。

图 3 各组大鼠热刺激缩足反射潜伏期比较 ( $\bar{x}\pm s$ , 8 只鼠/组)

Fig. 3 Comparison of the paw withdrawal thermal latency under thermal stimulation of rats in the 3 groups ( $\bar{x}\pm s$ , 8 rats/group)

#### 2.4 各组大鼠椎间盘髓核细胞形态比较

假手术组髓核细胞数量较多且基质分布均匀,仅见少量空泡;模型组髓核细胞数量较少且形态紊乱,基质排列杂乱,组织内可见大量空泡;对穴组髓核细胞形态较模型组改善,细胞排列更规则,空泡数量减少。见图4。



注:标尺=25  $\mu\text{m}$ 。黑色箭头示髓核细胞,蓝色箭头示空泡。

图4 各组大鼠椎间盘髓核的病理形态比较(HE染色)

Fig. 4 Comparison of pathological morphology of intervertebral disc nucleus pulposus of rats in the 3 groups (HE staining)

#### 2.5 各组大鼠椎间盘髓核组织中 Aggrecan、Collagen II、SOX9、MMP3、MMP13 含量比较

与假手术组相比,模型组椎间盘髓核组织的 Aggrecan、Collagen II、SOX9 含量均下降 ( $P < 0.001$ ),MMP3、MMP13 含量上升 ( $P < 0.001$ ),提示该组椎间盘髓核组织 ECM 降解;与模型组相比,对穴组椎间盘髓核组织的 Aggrecan、Collagen II、

SOX9 含量上升 ( $P < 0.001$ ),MMP3、MMP13 含量下降 ( $P < 0.001$ )。见图5。

#### 2.6 各组大鼠椎间盘髓核组织 SOX9、MMP13 mRNA 表达水平比较

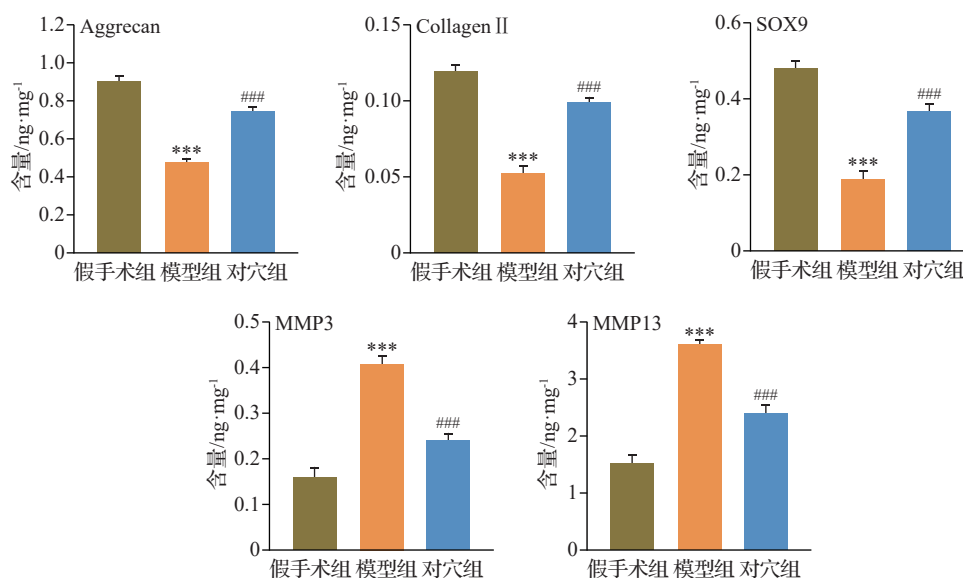
与假手术组相比,模型组椎间盘髓核组织的 SOX9 mRNA 表达水平下降 ( $P < 0.01$ ),而 MMP13 mRNA 表达水平上升 ( $P < 0.001$ ),进一步提示该组椎间盘髓核组织 ECM 降解;与模型组相比,对穴组椎间盘髓核组织 SOX9 mRNA 表达水平上升 ( $P < 0.001$ ),MMP13 mRNA 表达水平下降 ( $P < 0.001$ )。见图6。

#### 2.7 各组大鼠椎间盘髓核 LC3 阳性表达比较

与假手术组相比,模型组椎间盘髓核组织中 LC3 阳性表达的平均荧光强度升高 ( $P < 0.001$ );与模型组相比,对穴组大鼠椎间盘髓核组织中 LC3 阳性表达的平均荧光强度降低 ( $P < 0.01$ )。见图7。

#### 2.8 各组大鼠椎间盘髓核组织中 PI3K/AKT/mTOR 通路蛋白及 Beclin1、p62、LC3-II 自噬相关蛋白表达水平比较

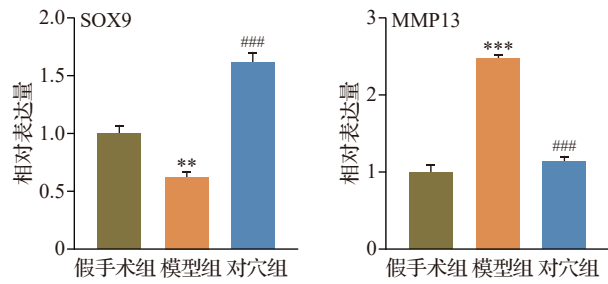
与假手术组比较,模型组大鼠椎间盘髓核组织中 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 比值及 p62 蛋白表达水平均降低 ( $P < 0.001$ ),而 LC3-II 和 Beclin1 表达水平上升 ( $P < 0.001$ )。与模型组比较,对穴组大鼠髓核组织中 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 比值及 p62



注:Aggrecan为聚集蛋白聚糖,MMP3为基质金属蛋白酶3,Collagen II为II型胶原蛋白,SOX9为性别决定区Y框蛋白9,MMP13为基质金属蛋白酶13。与假手术组比较,\*\*\* $P < 0.001$ ;与模型组比较,### $P < 0.001$ 。

图5 各组大鼠椎间盘髓核组织各成分含量比较( $\bar{x} \pm s$ , 8只鼠/组)

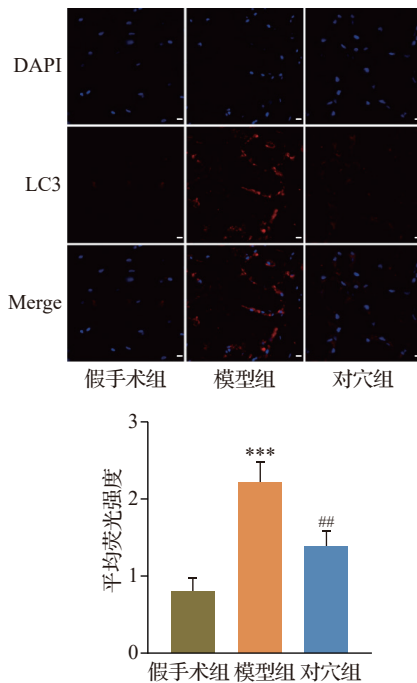
Fig. 5 Comparison of the composition content of intervertebral disc nucleus pulposus tissue of rats in the 3 groups ( $\bar{x} \pm s$ , 8 rats/group)



注:SOX9为性别决定区Y框蛋白9,MMP13为基质金属蛋白酶13。与假手术组比较,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ ;与模型组比较,### $P<0.001$ 。

图6 各组大鼠椎间盘髓核组织SOX9、MMP13 mRNA表达水平比较( $\bar{x}\pm s$ ,3只鼠/组)

Fig. 6 Comparison of SOX9 and MMP13 mRNA expression levels in the intervertebral disc nucleus pulposus tissue of rats in the 3 groups ( $\bar{x}\pm s$ ,3 rats/group)



注:LC3为微管相关蛋白1轻链3。蓝色荧光为细胞核,红色荧光为LC3阳性表达。标尺=25  $\mu\text{m}$ 。与假手术组比较,\*\*\* $P<0.001$ ;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

图7 各组大鼠L4-L5椎间盘髓核组织中LC3阳性表达比较(免疫荧光染色法, $\bar{x}\pm s$ ,3只鼠/组)

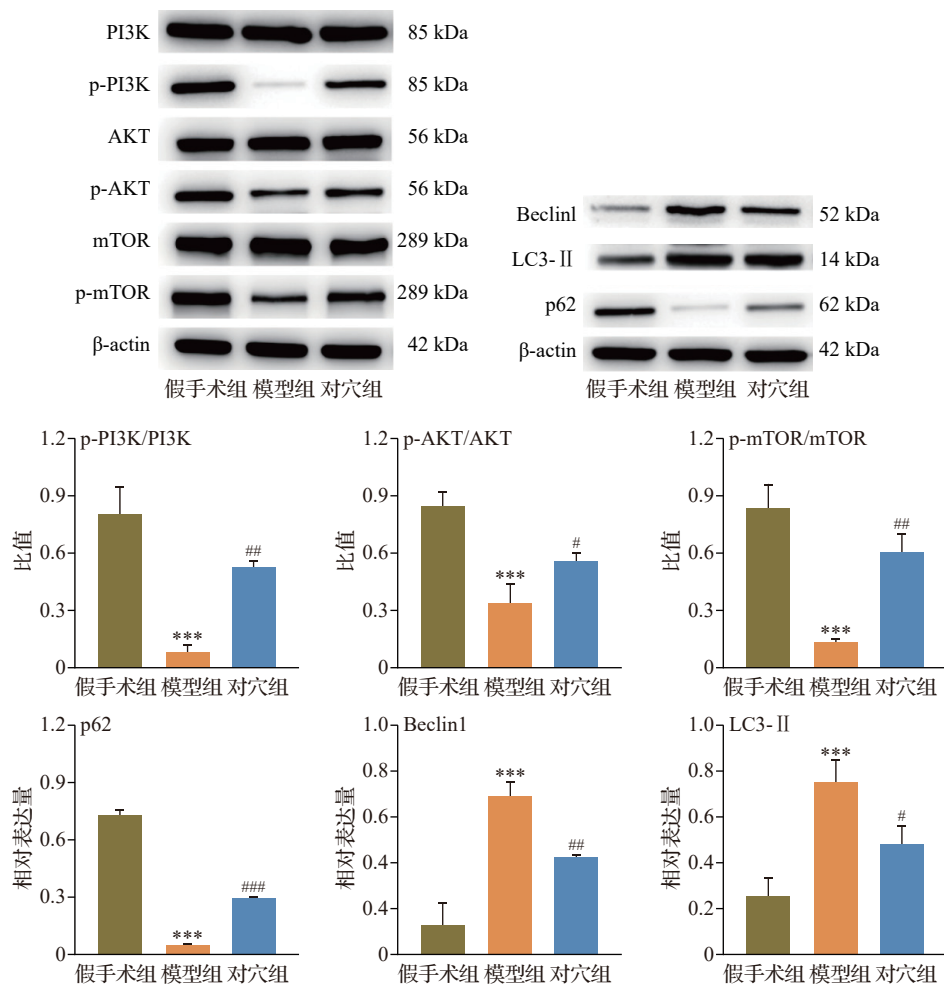
Fig. 7 Comparison of the positive expression of LC3 in the nucleus pulposus tissue of L4-L5 intervertebral discs of rats in the 3 groups (immunofluorescence staining,  $\bar{x}\pm s$ , 3 rats/group)

蛋白表达水平升高( $P<0.01$ , $P<0.05$ , $P<0.001$ ),LC3-II和Beclin1表达水平降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。见图8。

### 3 讨论

IDD归属于“腰痛”“痹症”的范畴,同时还与“腰椎痛”“腰背痛”“肾着”等传统中医病证存在一定的关联。临床表现为腰部肌肉张力明显升高,持续僵硬疼痛、活动受限,常伴有下肢疼痛麻木等不适症状,而后溪为手太阳小肠经之输穴,八脉交会穴之一,通于督脉,故针刺后溪可传输阳气,治疗腿部、腰背疼痛<sup>[15-16]</sup>。环跳属足少阳胆经,为足少阳、太阳二脉之会,《针灸甲乙经·阴受病发痹》中载“腰胁相引痛急,髀筋癭,胫痛不可屈伸,痹不仁,环跳主之”,以上两穴是IDD临床治疗中的常用腧穴<sup>[17]</sup>。后溪与环跳伍用出自《百症赋》,其中载有“后溪、环跳,腿茎刺而即轻”<sup>[18]</sup>。国医大师吕景山教授总结多年的临床应用,认为后溪为手太阳小肠经脉气所注,又与督脉阳跷脉相通;环跳为足少阳胆经所发,二穴伍用,可通调少阳、太阳二经,宣发疏通太阳和少阳经气,通经活络而止痛<sup>[8]</sup>。针对IDD患者针刺治疗中选用穴位的分析显示,后溪与环跳的选用频率相对较高<sup>[19]</sup>。本研究采用纤维环穿刺法成功构建了大鼠IDD模型,结果表明,针刺“后溪”“环跳”对穴可有效抑制椎间盘ECM的异常降解,维持髓核细胞稳态,并显著提高模型大鼠的疼痛阈值,对IDD有明显的治疗作用。

椎间盘退变的核心病理特征是ECM的合成与降解稳态失衡,进而导致其进行性异常降解。ECM主要由髓核细胞合成及分泌的Collagen II与Aggrecan构成,不仅为髓核组织提供结构支撑,更在脊柱活动中发挥着缓冲与传递轴向应力的关键力学作用。同时,纤维环也通过合成此类成分维持结构的完整与弹性,共同保障脊柱的稳定性<sup>[20-21]</sup>。在生理状态下,转录因子SOX9通过结合Collagen II与Aggrecan,是维持ECM合成代谢的关键促进因子<sup>[22]</sup>。然而,在退变进程中,MMP3与MMP13等基质降解酶的表达上升,会直接分解Collagen II、Aggrecan及其他ECM组分,进一步加速椎间盘结构和功能的丧失<sup>[23-24]</sup>。ECM的代谢平衡主要依赖于健康的髓核细胞,而自噬在维持细胞稳态中扮演着关键角色<sup>[25]</sup>。在疾病状态下,ECM的合成缺陷或降解产物累积会破坏自噬功能,而自噬的功能失调又会进一步加剧ECM的病理改变,最终导致椎间盘退变的发生与发展<sup>[26]</sup>。本研究结果显示,穿刺后椎间盘的髓核细胞数量减少,ECM分布不均,髓核组织中MMP3、MMP13含量及MMP13 mRNA表达水平增加,Collagen II、Aggrecan、SOX9含量降



注:PI3K为磷脂酰肌醇-3激酶,AKT为蛋白激酶B,mTOR为哺乳动物雷帕霉素靶蛋白,Beclin1为苜氯素1,p62为整合体1,LC3-II为微管相关蛋白1轻链3-II型。与假手术组比较,\*\*\* $P<0.001$ ;与模型组比较,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$ ,### $P<0.001$ 。

图8 各组大鼠椎间盘髓核PI3K/AKT/mTOR通路蛋白及自噬相关表达水平比较( $\bar{x}\pm s$ ,3只鼠/组)

Fig. 8 Comparison of the expression levels of PI3K/AKT/mTOR pathway proteins and autophagy-related proteins in the intervertebral disc nucleus pulposus of rats in the 3 groups ( $\bar{x}\pm s$ ,3 rats/group)

低,提示ECM降解过度;针刺干预后,髓核组织中MMP3、MMP13含量及MMP13 mRNA表达水平降低, Collagen II、Aggrecan、SOX9含量增加,提示针刺可恢复髓核细胞稳态。

自噬是一个动态过程,涉及在不同生理或病理条件下对细胞内蛋白质的降解与合成,受激素、信号通路等方面影响,是维持细胞稳态以应对饥饿、缺氧、感染等应激刺激的重要功能<sup>[27]</sup>。在自噬过程中,自噬体与溶酶体相互融合形成自噬溶酶体,而当椎间盘的自噬通量受到抑制时,会进一步引发椎间盘出现退行性改变<sup>[28]</sup>。PI3K/AKT/mTOR信号通路是细胞内一条重要的自噬调控通路,对维持细胞稳态至关重要<sup>[29]</sup>。该通路的经典激活过程始于PI3K,其能被多种信号激活,并催化磷脂酰肌醇-二磷酸转化为磷脂酰肌醇-三磷酸,进而招募并激活

AKT;活化的AKT通过磷酸化并激活其关键下游靶点mTOR,从而抑制自噬的起始与进程<sup>[30-31]</sup>。现有研究已明确,当该信号通路被激活时,mTOR活性随之增强,进而加强对自噬过程的抑制,最终导致自噬水平下降<sup>[29]</sup>。mTOR对Beclin1、p62和LC3-II自噬蛋白均有调控作用<sup>[32]</sup>。自噬过程的实现需要多种蛋白质参与,Beclin1作为自噬起始阶段的核心调控蛋白,可与其他蛋白质相互配合,并通过与PI3K形成复合体调控自噬前体膜的成核,是推动自噬体膜形成过程的自噬起始标志性正性调节因子<sup>[33-34]</sup>。p62作为选择性自噬受体,在结合泛素化底物后,会随自噬体被溶酶体降解,过量积累会抑制其他自噬受体的功能,对自噬产生调节,避免自噬过度激活<sup>[35-36]</sup>。LC3-II作为自噬过程中的核心功能分子,参与自噬体双层膜的形成与延伸过程,与自

噬适配器蛋白结合,将泛素化标记的胞内垃圾靶向包裹到自噬体中<sup>[37]</sup>。正常生理状态下,髓核细胞自噬活性较低,但在退变条件下,自噬作为一种应激反应被激活<sup>[38]</sup>。因此,PI3K/AKT/mTOR信号通路的功能正常,是维持适度自噬水平、防止椎间盘退变的关键。本研究结果显示,与假手术组相比,模型组大鼠髓核组织中p-PI3K、p-AKT、p-mTOR的表达水平均显著降低;Beclin1与LC3-II的表达水平显著升高,而p62的表达水平则明显下降,提示在椎间盘退变状态下,髓核细胞自噬过程被激活,PI3K/AKT/mTOR信号通路的活性受到抑制;而针刺对穴干预后,p-PI3K、p-AKT、p-mTOR的表达水平均显著升高,髓核细胞中Beclin1和LC3-II的水平降低,p62的表达升高,提示针刺对穴或许能通过激活PI3K/AKT/mTOR信号通路,对髓核细胞的过度自噬产生抑制作用。

综上所述,针刺对穴“后溪”“环跳”可通过调节PI3K/AKT/mTOR信号通路,抑制IDD大鼠髓核细胞自噬,维持细胞的稳态,减少ECM的异常降解,促进其修复。本研究主要聚焦于椎间盘局部组织自噬水平的调控,但未对其周围神经功能的影响进行研究,未来有待进一步研究。

**利益冲突** 所有作者声明不存在利益冲突。

## 参考文献

- [1] WANG Y D, CHENG H G, WANG T, et al. Oxidative stress in intervertebral disc degeneration: molecular mechanisms, pathogenesis and treatment [J]. *Cell Prolif*, 2023, 56(9): e13448.
- [2] XIN J G, WANG Y J, ZHENG Z, et al. Treatment of intervertebral disc degeneration [J]. *Orthop Surg*, 2022, 14(7): 1271-1280.
- [3] EL MELHAT A M, YOUSSEF A S A, ZEBDAWI M R, et al. Non-surgical approaches to the management of lumbar disc herniation associated with radiculopathy: a narrative review [J]. *J Clin Med*, 2024, 13(4): 974.
- [4] DI X S, CHEN J, WANG X R, et al. Progress of researches on mechanisms of acupuncture therapy in the treatment of lumbar disc herniation [J]. *Acupunct Res*, 2024, 49(5): 526-533.
- [5] XU K, CHEN W J, WANG X F, et al. Autophagy attenuates the catabolic effect during inflammatory conditions in nucleus pulposus cells, as sustained by NF- $\kappa$ B and JNK inhibition [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(3): 661-668.
- [6] LIAO Y, ZHANG P, YUAN B, et al. Pravastatin protects against avascular necrosis of femoral head via autophagy [J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 307.
- [7] YURUBE T, TAKEOKA Y, KANDA Y, et al. Intervertebral disc cell fate during aging and degeneration: apoptosis, senescence, and autophagy [J]. *N Am Spine Soc J*, 2023, 14: 100210.
- [8] 吕玉娥. 国医大师吕景山对穴 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2019: 255.  
LÜ Y E. Acupuncture point pairs (Dui Xue) by Guoyi master Lü Jingshan (in Chinese) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2019: 255.
- [9] 胡情, 张天生, 苏嘉琪, 等. 针刺对穴“后溪-环跳”对腰椎间盘突出症大鼠HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路的影响 [J]. *针灸临床杂志*, 2023, 39(8): 64-70.  
HU Q, ZHANG T S, SU J Q, et al. Effect of needling paired points 'SI3-GB30' on HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway in LDH rats (in Chinese) [J]. *Journal of Clinical Acupuncture and Moxibustion*, 2023, 39(8): 64-70.
- [10] 尹浩, 吉美奇, 胡志祥, 等. 三种腰椎间盘突出症大鼠模型制备方法的比较与评价 [J]. *中国组织工程研究*, 2025, 29(14): 2930-2936.  
YIN H, JI M Q, HU Z X, et al. Comparison and evaluation of three different methods for preparing rat models of lumbar disc herniation (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2025, 29(14): 2930-2936.
- [11] 吕权, 高金金, 杨玉林, 等. 姿势性应力诱导椎间盘退变动物模型的实验研究 [J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2024, 32(12): 10-14, 19.  
LÜ Q, GAO J J, YANG Y L, et al. Experimental study on animal model of spontaneous intervertebral disc degeneration induced by postural stress (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Traditional Medical Traumatology & Orthopedics*, 2024, 32(12): 10-14, 19.
- [12] 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.  
China Association of Acupuncture-Moxibustion. Nomenclature and location of acupoints commonly used in laboratory animals. Part 2: rats (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2021, 46(4): 351-352.
- [13] BONIN R P, BORIES C, DE KONINCK Y. A simplified up-down method (SUDO) for measuring mechanical nociception in rodents using von Frey filaments [J]. *Mol Pain*, 2014, 10: 26.
- [14] HARGREAVES K, DUBNER R, BROWN F, et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia [J]. *Pain*, 1988, 32(1): 77-88.
- [15] 谢博多, 张志强, 刘晓华, 等. 针刺后溪穴结合中药热雾疗法治疗腰部训练伤的临床研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2015, 33(9): 2082-2085.  
XIE B D, ZHANG Z Q, LIU X H, et al. Clinical research of acupuncture at Houxi (SI3) combined with traditional Chinese medicine thermal fog therapy in treatment of waist training injury (in Chinese) [J]. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*, 2015, 33(9): 2082-2085.
- [16] 郁宗俊, 马鹤鸣. 《针灸大成》中后溪穴的应用探讨 [J]. *中国民间疗法*, 2025, 33(9): 26-28.

- YU Z J, MA H M. Discussion on the application of Houxi point(SI3) in Compendium of Acupuncture (in Chinese)[J]. *China's Naturopathy*, 2025, 33(9): 26-28.
- [17] 韦成玉. 基于现代文献分析的腰椎间盘突出症针灸疗法运用规律研究[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2022.
- WEI C Y. Research on the application rules of acupuncture and moxibustion therapy for lumbar disc herniation based on the analysis of modern literature (in Chinese)[D]. Nanning: Guangxi University of Chinese Medicine, 2022.
- [18] 杨继洲. 针灸大成[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 2017: 43-44.
- YANG J Z. Compendium of acupuncture (in Chinese)[M]. Tianjin: Tianjin Scientific & Technical Publishers, 2017: 43-44.
- [19] 姜伟, 陈少宗, 王喆, 等. 基于数据挖掘技术探讨温针灸治疗腰椎间盘突出症选穴规律与作用机制研究[J]. *世界中医药*, 2024, 19(2): 230-235.
- JIANG W, CHEN S Z, WANG Z, et al. Discussion on the rule of acupoint selection and mechanism of needle warming moxibustion in the treatment of lumbar disc herniation based on data mining (in Chinese)[J]. *World Chinese Medicine*, 2024, 19(2): 230-235.
- [20] KOS N, GRADISNIK L, VELNAR T. A brief review of the degenerative intervertebral disc disease[J]. *Med Arch*, 2019, 73(6): 421-424.
- [21] LIU L, HE J Y, LIU C, et al. Cartilage intermediate layer protein affects the progression of intervertebral disc degeneration by regulating the extracellular microenvironment (Review)[J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(2): 475-484.
- [22] SONG H, PARK K H. Regulation and function of SOX9 during cartilage development and regeneration [J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 67: 12-23.
- [23] QIN R Q, DAI S Q, ZHANG X, et al. Danshen attenuates intervertebral disc degeneration *via* antioxidation in SD rats [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 6660429.
- [24] 苏嘉琪, 胡情, 楼金成, 等. 针刺对穴“后溪-环跳”对腰椎间盘突出症模型大鼠脊神经干组织HMGB1/RAGE通路的影响[J]. *中医杂志*, 2023, 64(10): 1051-1057.
- SU J Q, HU Q, LOU J C, et al. Effects of acupuncture at paired points of “Houxi (SI 3)” - “Huantiao (GB 30)” on HMGB1/RAGE pathway in spinal nerve trunk tissue of lumbar disc herniation model rats (in Chinese)[J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2023, 64(10): 1051-1057.
- [25] ZHANG Y, GUO R, WANG S S, et al. Autophagy-related proteins in genome stability: autophagy-dependent and independent actions[J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(14): 5329-5344.
- [26] MADHU V, GUNTUR A R, RISBUD M V. Role of autophagy in intervertebral disc and cartilage function: implications in health and disease[J]. *Matrix Biol*, 2021, 100/101: 207-220.
- [27] WANG J, ZHANG Y, CAO J, et al. The role of autophagy in bone metabolism and clinical significance[J]. *Autophagy*, 2023, 19(9): 2409-2427.
- [28] HU S L, CHEN L, AL MAMUN A, et al. The therapeutic effect of TBK1 in intervertebral disc degeneration via coordinating selective autophagy and autophagic functions[J]. *J Adv Res*, 2021, 30: 1-13.
- [29] LIU C L, ZHANG J Q, YE Z Y, et al. Research on the role and mechanism of the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway in osteoporosis[J]. *Front Endocrinol*, 2025, 16: 1541714.
- [30] LIU G Y, SABATINI D M. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(4): 183-203.
- [31] 张博文, 李美, 张晋宁, 等. 汉防己甲素诱导自噬抑制破骨细胞的分化[J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(28): 4473-4479.
- ZHANG B W, LI M, ZHANG J N, et al. Tetrandrine inhibits osteoclast differentiation by inducing autophagy (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2023, 27(28): 4473-4479.
- [32] XIE A N, ZHANG S Z, ZHANG Y, et al. Chlorogenic acid mitigates glucocorticoid-induced osteoporosis via modulation of HER2/AKT/mTOR signaling pathway[J]. *J Integr Med*, 2025, 23(6): 670-682.
- [33] LI X, ZHU Y R, LIN X Q, et al. Beclin1- and Atg13-dependent autophagy activation and morroniside have synergistic effect on osteoblastogenesis [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2022, 247(19): 1764-1775.
- [34] TRAN S, FAIRLIE W D, LEE E F. BECLIN1: protein structure, function and regulation [J]. *Cells*, 2021, 10(6): 1522.
- [35] GONG C Y, ZHANG H H. Autophagy as a potential therapeutic target in intervertebral disc degeneration[J]. *Life Sci*, 2021, 273: 119266.
- [36] HUANG X, ZHANG J P, YAO J, et al. Phase separation of p62: roles and regulations in autophagy[J]. *Trends Cell Biol*, 2025, 35(10): 854-865.
- [37] PEÑA-MARTINEZ C, RICKMAN A D, HECKMANN B L. Beyond autophagy: LC3-associated phagocytosis and endocytosis[J]. *Sci Adv*, 2022, 8(43): eabn1702.
- [38] WU Z L, LIU Y, SONG W, et al. Role of mitophagy in intervertebral disc degeneration: a narrative review [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2025, 33(1): 27-41.

收稿日期:2025-10-14 修回日期:2026-02-04