

☆ XXXX ☆

电针联合抗生素靶向迷走神经背核激活迷走神经-肾上腺轴减轻脓毒症小鼠炎症反应及降低死亡率的机制

刘嘉宝¹, 任红霞², 林琪顺², 赵 帅², 李 彤², 简红伟², 孙 红², 余玲玲³, 景向红⁴,
李 熲², 张红星¹

(¹湖北中医药大学针灸骨伤学院, 武汉 430061; ²华中科技大学同济医学院基础医学院, 教育部
和湖北省神经系统重大疾病重点实验室, 武汉 430030; ³华中科技大学同济医学院附属同济医
院, 武汉 430030; ⁴中国中医科学院针灸研究所, 北京 100700)

【摘要】 目的:探讨电针联合抗生素通过迷走神经背核(DMV)调控迷走神经-肾上腺轴促进儿茶酚胺分泌、减轻炎症风暴,提高脓毒症小鼠生存率的机制。**方法:**实验1:将50只C57BL/6小鼠分为假手术组、模型组、抗生素组、电针组、电针+抗生素组,每组10只。采用盲肠结扎穿孔术(CLP)建立脓毒症模型。电针组给予双侧“足三里”电针15 min,每日1次,连续3 d;抗生素组腹腔注射亚胺培南西司他丁钠(30 mg/kg),每12 h注射1次,连续3 d。观察各组3 d生存率及体质量变化;ELISA检测血清白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量;HE染色观察盲肠组织病理及炎性细胞数量;全脑光透明检测DMV脑区、原癌基因c-Fos蛋白(c-Fos)表达。实验2:将50只Chat-Cre小鼠随机分为假手术+空载病毒组、模型+空载病毒组、针药联合+抑制病毒组、针药联合+空载病毒组、抗生素+激活病毒组,每组10只。造模前3周向DMV注射相应病毒,3周后行CLP,术后每日注射氯氮平N-氧化物(CNO, 3 mg/kg),并予抗生素或电针(具体操作和参数同实验1)。ELISA法检测血清IL-6、TNF- α 含量;HE染色观察盲肠炎性反应;超高效液相色谱串联质谱技术检测血清儿茶酚胺多巴胺(DA)、肾上腺素(E)、去甲肾上腺素(NE)及其代谢产物3-甲氧基酪胺(3-MT)、3-甲氧基去甲肾上腺素(NMN)、3-甲氧基肾上腺素(MN);免疫荧光检测盲肠组织程序性死亡受体-1(PD-1)⁺、叉头框蛋白P3(FOXP3)⁺/表面抗原分化簇4(CD4)⁺细胞数量。**结果:**实验1:与假手术组相比,模型组3 d生存率、体质量显著降低($P<0.0001$),血清IL-6、TNF- α 含量升高($P<0.0001$),DA、E、NE及代谢物3-MT、NMN、MN水平降低($P<0.01$, $P<0.0001$),盲肠炎性细胞浸润数量增加($P<0.0001$)。与模型组相比,电针+抗生素组生存率提高($P<0.05$),体质量下降减缓($P<0.0001$),血清IL-6、TNF- α 含量降低($P<0.0001$),炎性细胞浸润数量减少($P<0.0001$),DMV脑区c-Fos密度升高($P<0.0001$),且上述指标不同程度优于单独电针或抗生素组。实验2:与假手术+空载病毒组相比,模型+空载病毒组血清炎性因子含量、盲肠组织炎性细胞数量升高($P<0.0001$),儿茶酚胺及代谢物水平、盲肠PD-1⁺、FOXP3⁺/CD4⁺细胞数量降低($P<0.0001$);与模型+空载病毒组相比,针药联合+空载病毒组、针药联合+抑制病毒组和抗生素+激活病毒组血清炎性因子含量、盲肠组织炎性细胞数量降低($P<0.0001$, $P<0.01$, $P<0.05$),儿茶酚胺及代谢物水平、盲肠PD-1⁺、FOXP3⁺/CD4⁺细胞数量升高($P<0.001$, $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.0001$);与针药联合+空载病毒组相比,针药联合+抑制组上述指标均逆转($P<0.01$, $P<0.001$, $P<0.05$)。**结论:**电针“足三里”联合抗生素对CLP小鼠疗效最佳,其机制可能是通过激活DMV胆碱能神经元、调控迷走神经-肾上腺轴促进儿茶酚胺分泌、抑制炎症反应进而提高生存率。

【关键词】 脓毒症;电针;足三里;迷走神经-肾上腺轴;炎症反应;免疫调节

【DOI】 10.13702/j.1000-0607.20260402

引用格式:刘嘉宝,任红霞,林琪顺,等.电针联合抗生素靶向迷走神经背核激活迷走神经-肾上腺轴减轻脓毒症小鼠炎症反应及降低死亡率的机制[J].针刺研究,XXXX,XX(X):1-13.

项目来源:国家重点研发计划项目(No.2022YFC3500704)

通信作者:李熲, E-mail: liman73@mails.tjmu.edu.cn;张红星, E-mail: zhxzj99@aliyun.com

Mechanism of electroacupuncture combined with antibiotics targeting dorsal motor nucleus of vagus nerve to activate vagus-adrenal axis, alleviate inflammatory response and reduce mortality in septic mice

Liu Jiabao¹, Ren Hongxia², Lin Qishun², Zhao Shuai², Li Tong², Jian Hongwei², Sun Hong², Yu Lingling³, Jing Xianghong⁴, Li Man², Zhang Hongxing¹ (¹School of Acupuncture and Orthopedics, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061; ²School of Basic Medicine, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Key Laboratory of Major Neurological Diseases of the Ministry of Education and Hubei Province, Wuhan 430030; ³Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030; ⁴Institute of Acupuncture and Moxibustion, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the mechanism by which electroacupuncture (EA) combined with antibiotics regulates the vagus-adrenal axis via the dorsal motor nucleus of vagus (DMV), promotes catecholamine secretion, attenuates inflammatory storm, and improves survival rate in septic mice. **Methods** Experiment 1: Fifty C57BL/6 mice were randomly divided into sham operation group, model group, antibiotic group, EA group, and EA + antibiotic group, with 10 mice in each group. Cecal ligation and puncture (CLP) was performed to establish the sepsis model. Mice in the EA group received 15-min EA at bilateral “Zusanli” (ST36), once daily for 3 consecutive days. Mice in the antibiotic group were intraperitoneally injected with imipenem-cilastatin sodium (30 mg/kg) every 12 h for 3 consecutive days. The 3-day survival rate and body weight changes of mice in each group were recorded. ELISA was adopted to detect serum levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α). HE staining was used to observe pathological changes and the number of inflammatory cells in cecal tissues. Whole-brain optical clearing was performed to detect the expression of proto-oncogene c-Fos protein in the DMV region. Experiment 2: Fifty Chat-Cre mice were randomly assigned to sham operation + empty virus group, model + empty virus group, EA-antibiotic combination + inhibitory virus group, EA-antibiotic combination + empty virus group, and antibiotic + activating virus group, with 10 mice per group. Corresponding viruses were injected into the DMV 3 weeks before model establishment. CLP operation was conducted 3 weeks after virus injection, followed by daily intraperitoneal injection of clozapine N-oxide (CNO, 3 mg/kg), combined with antibiotics or EA treatment (the same interventions and parameters as Experiment 1. Serum IL-6 and TNF- α concentrations were measured by ELISA; cecal inflammatory infiltration was evaluated via HE staining. Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was applied to detect serum catecholamines including dopamine (DA), epinephrine (E), norepinephrine (NE), as well as their metabolites 3-methoxytyramine (3-MT), normetanephrine (NMN), and metanephrine (MN) levels. Immunofluorescence staining was used to quantify the counts of programmed death receptor-1 positive (PD-1⁺) cells and forkhead box protein P3 positive / cluster of differentiation 4 positive (FOXP3⁺/CD4⁺) cells in cecal tissues. **Results** Experiment 1: Compared with the sham operation group, the model group exhibited markedly decreased 3-day survival rate and body weight ($P < 0.0001$), elevated serum IL-6 and TNF- α levels ($P < 0.0001$), reduced concentrations of DA, E, NE and their metabolites 3-MT, NMN, MN ($P < 0.01$, $P < 0.0001$), and increased inflammatory cell infiltration in cecum ($P < 0.0001$). Compared with the model group, the EA + antibiotic group showed improved survival rate ($P < 0.05$), alleviated body weight loss ($P < 0.0001$), decreased serum IL-6 and TNF- α levels ($P < 0.0001$), reduced inflammatory cell infiltration ($P < 0.0001$), and elevated c-Fos density in DMV ($P < 0.0001$). Moreover, all above indicators were superior to those in the single EA or single antibiotic group to varying degrees. Experiment 2: In comparison with the sham operation + empty virus group, the model + empty virus group had higher serum inflammatory factor levels and more cecal inflammatory infiltrates ($P < 0.0001$), and lower levels of catecholamines and their metabolites, as well as fewer PD-1⁺ and FOXP3⁺/CD4⁺ cells in cecal tissues ($P < 0.0001$). Compared with the model + empty virus group, the EA-antibiotic combination + empty virus group, EA-antibiotic combination + inhibitory virus group, and antibiotic + activating virus group displayed reduced serum inflammatory factors and relieved cecal inflammatory infiltration ($P < 0.0001$, $P < 0.01$, $P < 0.05$), accompanied by increased levels of catecholamines and metabolites, and more PD-1⁺ and FOXP3⁺/CD4⁺ cells in cecum ($P < 0.001$, $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.0001$). Relative to the EA-antibiotic combination + empty virus group, all the above indicators were reversed in the EA-antibiotic combination + inhibitory virus group ($P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.05$). **Conclusion** EA at ST36 combined with antibiotics exerts optimal therapeutic effects on CLP-induced septic mice. The underlying mechanism may involve activating cholinergic neurons in DMV, regulating the vagus-adrenal axis to facilitate

catecholamine secretion, suppressing excessive inflammatory response, and consequently elevating survival rate.

【KEYWORDS】 Sepsis; Electroacupuncture; Zusanli (ST36); Vagus-adrenal axis; Inflammatory response; Immune regulation

脓毒症是一种对感染反应失调而导致的危及生命的急性器官功能障碍综合征。据统计,在全球范围内每年约有4 890万例新发脓毒症,相关死亡病例约1 100万^[1]。一项包含7个国家27项数据的META分析^[2]显示,在高收入国家脓毒症病例估计达3 150万例,其中重症脓毒症病例约1 940万例,每年可能造成530万人死亡,死亡率高达17%左右,其中重症脓毒症死亡率约26%,因此脓毒症是一个重大的全球性健康问题。脓毒症的主要治疗策略是全程控制感染和恢复灌注,治疗包括早期抗生素使用、器官功能支持和重症监护,患者住院时间长,治疗费用高昂^[3]。

电针治疗脓毒症是当前神经免疫调控领域的研究热点。一项系统综述分析表明电针“足三里”可以调节迷走神经活动和炎性免疫反应,缓解脓毒症引起的多器官衰竭,降低死亡率,提高生存质量^[4]。2021年发布的国际脓毒症和脓毒性休克管理指南指出,对于脓症患者,应尽快启用抗生素疗法^[5]。电针有明确抗炎和调节免疫的效果,尽管动物实验已经证实,电针能降低脓毒症小鼠的死亡率^[6-8],但是临床上,电针更多是用于脓毒症的辅助治疗^[9-10],因此,针药结合的治疗方案极具潜力。

经盲肠结扎穿刺(CLP)诱导的多微生物源性脓毒症模型相较于早期的造模方法能够高度模拟脓毒症或脓毒性休克的疾病模式,符合人类脓毒症的动态演变进程与临床特征被公认为“金标准”^[11-12]。为此,本研究运用CLP构建的脓毒症小鼠模型评估电针“足三里”联合抗生素治疗在整体动物水平上的疗效,血清学变化及靶器官的组织形态学变化。运用化学遗传学技术特异性激活或抑制迷走神经背核(DMV)神经元,模拟或阻断电针诱导的神经活动变化,分析血清中儿茶酚胺类物质的动态变化,分析验证电针“足三里”通过DMV调控迷走神经-肾上腺轴在抗生素治疗脓毒症中的协同抗炎的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

购入健康雄性C57BL/6小鼠50只[8周龄,体质量20~25 g,品系编号213,来自北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号SCXK(鄂)

2022-0030]和Chat-Cre小鼠50只[8周龄,体质量20~25 g,品系编号006410,来自北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号SCXK(鄂)2021-0025]。小鼠均饲养于华中科技大学SPF级实验动物中心,温度(22±2)℃,湿度(60±10)%,12 h光照/黑暗周期,可自由获取标准实验室饲料和水,适应性喂养1周后开始实验。所有实验操作严格遵循《实验动物护理和使用指南》中的原则,已获得华中科技大学机构动物护理和使用委员会的批准(批准编号:[2024]IACUC4489)。

将C57BL/6小鼠随机分为假手术组、模型组、抗生素组、电针组、抗生素+电针组,每组各10只。将Chat-Cre小鼠随机分为假手术+空载病毒组、模型+空载病毒组、针药联合+空载病毒组、针药联合+抑制组、抗生素+激活组,每组各10只。

1.2 主要仪器和试剂

精密电子秤(上海志荣),无菌针灸针(吴江云龙),HANS-200 A电针仪(南京济生),Thermo离心机(LABOFUGE 400 R)、Thermo切片机(MICROM HM 430)均购自美国赛默飞世尔,Olympus电子荧光显微镜(MIS 2000,日本奥林巴斯),LIT光片显微镜(LiTone XL,深圳Light Innovation Technology),

酶标仪(352型,芬兰LabsystemsMultiskan MS)超高效液相色谱(UPLC I-Class)、串联四极杆质谱系统(XEVO TQ-XS)均购自美国Waters,双臂数显脑立体定位仪(深圳瑞沃德)。

亚胺培南西司他丁钠(H20074008,淮南国药),白细胞介素(IL)-6检测试剂盒(1210602)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)检测试剂盒(1217202)均购自深圳达科为,原癌基因c-Fos蛋白(c-Fos)抗体(A103400)、HE染色试剂盒、FDISCO离体组织透明试剂盒(JA11012)均购自武汉佳维斯,胆碱乙酰转移酶(ChAT)抗体(A25311,武汉爱博泰克),程序性死亡受体-1(PD-1)抗体(66220-1-IG,武汉三鹰)、叉头框蛋白P3(FOXP3)抗体(GB112325,武汉赛维尔),表面抗原分化簇4(CD4)抗体(Ab183685,英国Abcam),DAPI染液(RC0086-34RM,上海茹创),Triton X-100(T8200,北京索莱宝),抗荧光淬灭封片剂(0100-01,美国SouthernBiotech),氯氮平

N-氧化物(CNO)粉末(HY-17366,美国MCE),4%多聚甲醛固定液(BL539A,北京兰杰柯),rAAV-DIO-mCherry-WPRE-pA、rAAV-DIO-hM3D(Gq)-mCherry-WPRE-pA和rAAV-DIO-hM4D(Gi)-mCherry-WPRE-pA病毒(武汉枢密)。

1.3 脓毒症小鼠模型的建立

称取每只小鼠体质量以确定所需麻醉剂用量,常规无菌操作,小鼠术前禁食12 h,腹腔注射0.3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)进行麻醉,充分麻醉后剃除腹部下部的毛发,碘伏消毒,用医用胶带将小鼠四肢固定。用手术刀沿皮肤中线作纵向切口,避免穿透腹膜腔。使用小剪刀延长切口以进入腹腔(1.5~2 cm),暴露盲肠。使用钝性解剖钳定位盲肠并将其分离外置,保留小肠和大肠残余部分于腹腔内,避免损伤肠系膜血管。用3号丝线在盲肠远端3/4处结扎,在结肠系膜侧与反系膜侧方向上,于结肠系膜结扎点与末端之间的中点位置,采用21G针头贯穿,操作时特别注意避免穿破血管。取出穿刺针后,从系膜侧和反系膜侧穿刺孔各挤出少量粪便(液滴状),以确保通道通畅。确保挤出的盲肠内容物有限且所有小鼠挤出量保持一致。将盲肠重新定位至腹腔内,避免盲肠内容物扩散至腹壁伤口边缘,采用简单连续缝合法缝合好腹膜、筋膜及腹肌组织,采用简单间断缝合皮肤,碘伏消毒。皮下注射预热的0.9%氯化钠溶液(37℃,0.05 mL/g),将小鼠置于恒温加热垫维持体温(37±0.5)℃。将苏醒后的小鼠放回笼中,每6 h监测1次。假手术组和假手术+空载病毒组仅打开腹腔随后立即缝合,不进行盲肠结扎穿孔操作,其余各组都进行CLP造模。

1.4 干预方法

实验1:探究针灸与药物联合疗法对CLP小鼠的治疗效果。完成假手术及CLP手术操作操作后,假手术组、模型组每隔12 h皮下注射预热无菌0.9%氯化钠溶液(37℃,0.05 mL/g),抗生素组间隔12 h腹腔注射亚胺培南西司他丁钠(30 mg/kg),电针组进行电针干预,其余处理同假手术组;抗生素+电针组予抗生素处理(同抗生素组),电针处理同电针组。

实验2:探究联合疗法背后的神经回路机制。所有小鼠均在洁净安静环境中隔离饲养,将病毒分别通过脑立体定位注射入小鼠双侧DMV脑区,假手术+空载病毒组、模型+空载病毒组、针药联合+空载病毒组注射rAAV-DIO-mCherry-WPRE-

pA 150 nL,针药联合+抑制组注射rAAV-DIO-hM4D(Gi)-mCherry-WPRE-pA 150 nL,抗生素+激活组注射rAAV-DIO-hM3D(Gq)-mCherry-WPRE-pA 150 nL。

以上所有组别小鼠在病毒注射完成3周后,再进行假手术或CLP造模。造模后,各组小鼠每天腹腔注射CNO(3 mg/kg)溶液,针药联合+空载病毒组和针药联合+抑制组在注射40 min后再进行电针干预,假手术+空载病毒组和模型+空载病毒组每间隔12 h皮下注射预热无菌0.9%氯化钠溶液(37℃,0.05 mL/g),针药联合+空载病毒组、针药联合+抑制组和抗生素+激活组腹腔注射亚胺培南西司他丁钠(30 mg/kg),直至实验结束或小鼠死亡。

电针方法:根据《实验动物常用穴位名称与定位 第3部分:小鼠》^[13]进行穴位定位,取双侧“足三里”(后肢膝关节下方,位于腓骨小头前下方约3 mm处的凹陷中)。采用云龙牌0.18 mm×10 mm针灸针直刺双侧“足三里”,深度约2~3 mm。连接韩氏穴位刺激仪电极,刺激参数为连续波,频率10 Hz,脉宽50 μs,强度0.5 mA,每次治疗时间15 min,每日治疗1次,连续治疗3 d。

1.5 观察指标及检测方法

小鼠生存率:记录各组小鼠术后24、48、72 h的生存情况。

小鼠体质量比较:记录小鼠术前、术后24、48、72 h的体质量。将小鼠放入自制体质量称量盒中称取体质量。每只小鼠称重5次,取平均值记录。体质量差值(g)=干预前体质量(g)-干预后体质量(g)。

取材:所有实验完成后,称取小鼠体质量,按30 mg/kg剂量腹腔注射3%戊巴比妥钠麻醉。麻醉后采用眼球取血法取血收集血液。血样静置2 h后,4℃下3 000 r/min(离心半径10 cm,约1 000×g)离心10 min,取上层血清于-80℃保存,用于ELISA和超高效液相色谱串联质谱技术(UPLC-MS/MS)检测。采血后,小鼠仰卧固定于鼠板,暴露胸腹部,依次剪开皮肤、肌肉及筋膜,打开胸腔。将灌注针头从心尖刺入左心室并固定,剪开右心耳,以100 mL/min流速灌注0.9%氯化钠溶液,待肝脏转白且尾巴抽搐后,换用4%多聚甲醛以50 mL/min继续灌注。5 min后,待四肢冰冷僵直、器官呈灰白色即停止,断颈取脑,剥离头骨取出全脑,置于固定液保存,用于免疫荧光染色验证注射

位点。另剪取盲肠,于4%多聚甲醛中固定12~24 h,用于HE染色。

全脑光透明技术检测小鼠DMV脑区c-Fos的表达水平:将脑组织从固定液中取出,用PBS室温漂洗3次后,依次以梯度甲醇水溶液促渗5 d、过氧化氢溶液脱色、0.2% TritonX-100 PBS溶液促渗3 d;随后以10%驴血清PBST封闭3 d,再用含5%驴血清及一抗的PTwH溶液(0.2% Tween-20 PBS)孵育7 d。PBS-Tween漂洗2 d后,以含5%驴血清及二抗的PTwH溶液避光室温振荡孵育7 d,再漂洗2 d。采用FDISCO试剂盒对染色组织进行透明处理。成像使用配备4×物镜($NA=0.28$, $WD=20\text{ mm}$)的光片显微镜,薄光片四侧照射并保存合并图像;样品固定于支架适配器后浸入成像试剂,以不同波长激光激发。原始tif图像经LitScan拼接转换后,用Imaris进行三维观看及视频录制。定量分析时,先将原始荧光图像(分辨率 $2.9\text{ }\mu\text{m}\times 2.9\text{ }\mu\text{m}\times 6\text{ }\mu\text{m}$)通过ImageJ下采样至CCFv3参考图谱的 $10\text{ }\mu\text{m}$ 分辨率,统一灰度、厚度及方向后,以ClearMap方法配准获取形变场并作用于图谱标签;随后将形变标签与原始荧光图像匹配,以Imaris“Surface”功能分割脑区,并以“Spot”功能统计各脑区表达c-Fos的细胞数量。

免疫荧光染色检测脑组织的病毒注射位点:取4%多聚甲醛固定的脑组织,经20%、30%蔗糖梯度沉糖后,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以OCT包埋冷冻切片。免疫组织化学笔画圈后,PBS洗涤3次 $\times 5\text{ min}$ 去除OCT;0.2% TritonX-100 PBS浸泡5 min促渗,PBS洗3次 $\times 5\text{ min}$ 。以与二抗同源血清 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 封闭1 h,滴加一抗(ChAT,1:1 000)湿盒 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;恢复室温后PBS洗3次 $\times 5\text{ min}$,加荧光二抗室温孵育1 h,PBS洗3次 $\times 5\text{ min}$ 。避光PBS洗3次 $\times 10\text{ min}$,吸液后滴加含DAPI的抗荧光淬灭封片剂,盖玻片并以指甲油固定封片,荧光显微镜下观察拍照。

ELISA法检测小鼠血清IL-6和TNF- α 水平:从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出冻存的血清样本,严格按照试剂盒说明书进行检测操作。在450 nm波长下,用酶标仪依序测定各孔的吸光度。最后,根据标准品浓度与对应吸光度值绘制标准曲线,计算出血清中IL-6和TNF- α 的含量。

HE染色观察盲肠组织的组织形态学:盲肠组织经4%甲醛固定后,依次行梯度乙醇脱水、透明剂透明及石蜡浸蜡;包埋时组织定向埋入石蜡,冷冻凝固。切片厚度 $4\text{ }\mu\text{m}$,经温水展片后贴于玻片,

$60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烤片20~30 min。常规HE染色:切片依次经透明、梯度乙醇水化后,苏木精染核15 min,盐酸乙醇分化,返蓝液蓝化,伊红染胞质2 min,再经梯度乙醇脱水、二甲苯透明。封片后于显微镜下观察盲肠组织中的炎性细胞形态和分布,并拍照采集图片,采用ImageJ软件定量分析每视野下的炎性细胞数量,所有切片由两名研究人员双盲独立评估。

UPLC-MS/MS检测小鼠血清儿茶酚胺及其代谢产物的水平[多巴胺(DA)、去甲肾上腺素(NE)、肾上腺素(E)、3-甲氧基酪胺(3-MT)、3-甲氧基去甲肾上腺素(NMN)、3-甲氧基肾上腺素(MN)];各取200 μL 血清样本与标准品,分别加入200 μL 内标溶液,涡旋10 s;按Oasis WCX $\mu\text{Elution}$ SPE流程提取后,于96孔板震荡1 min,进行UPLC-MS/MS分析。色谱条件:Waters UPLC HSS PFP柱($2.1\text{ mm}\times 100\text{ mm}$, $1.8\text{ }\mu\text{m}$);流动相A为0.1%甲酸水,B为乙腈,流速0.4 mL/min,进样量5.0 μL ,柱温 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$;梯度洗脱(0~3.5 min 100%A $\rightarrow$ 50%A,随后快速置换与平衡)。质谱条件:XEVO TQ-XS系统,离子源电压3.0 kV、温度 $150\text{ }^{\circ}\text{C}$,去溶剂化温度 $400\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、气流800 L/h,锥孔气流150 L/h。靶向数据峰面积计算采用TargetLynx定量软件,保留时间允许误差15 s。浓度计算采用标准曲线法获取定量结果。

免疫荧光染色检测盲肠组织中PD-1、叉头框蛋白P3(FOXP3)、表面抗原分化簇4(CD4)的共表达:石蜡切片脱蜡至水,EDTA(pH9.0)微波抗原修复,3%过氧化氢阻断,3% BSA封闭。PD-1染色:一抗(1:2 000) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜,二抗(1:2 000)1 h,TSA-520(1:200)10 min,PBS漂洗;pH6.0柠檬酸缓冲液 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 min热洗脱。FOXP3染色:3%过氧化氢阻断、10%山羊血清封闭,一抗(1:1 000) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜,二抗1 h,TSA-570(1:200),PBS中洗3次每次洗5 min。CD4染色:同前法使用山羊血清封闭,一抗(1:200) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜,二抗1 h,TSA-690(1:200),PBS中洗3次,每次5 min。DAPI染核10 min,PBS漂洗,抗荧光淬灭封片剂封片, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存。于共聚焦显微镜下观察,使用Zens软件采集图像,TSA-520呈绿色,TSA-570呈红色,TSA-690呈黄色。在每只小鼠盲肠中随机选取6个图像。使用ImageJ软件定量分析阳性表达细胞数量。

1.6 统计学分析

除生存指标外所有数据均用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,并使用Graphpad Prism软件(version 10.1.2)进行分析。多组数据之间的差异通过One-

way ANOVA 进行统计分析,进一步两两比较使用 Tukey 进行分析检验;数据不符合方差齐性或正态性分布时则使用 Brown-Forsythe 方差分析检验和 Kruskal-Wallis 检验。采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,Log-rank(Mantel-Cox)检验用于比较各组生存曲线差异。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义的标准。

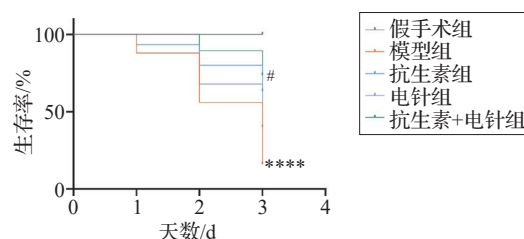
2 结果

2.1 针药联合治疗对 CLP 小鼠生存率的影响

假手术组小鼠的生存率为 100%,其余各组小鼠的生存率随着天数增加均呈现下降趋势,其中模型组小鼠的生存率最低。与假手术组相比,模型组小鼠的生存率显著下降($P < 0.0001$)。与模型组相比,抗生素+电针组小鼠的生存率明显升高($P < 0.05$),抗生素组和电针组差异无统计学意义。表明针药联合能显著提高脓毒症小鼠的生存率。见图 1。

2.2 针药联合治疗对 CLP 小鼠体质量的影响

各组小鼠术后的体质量随着天数的增加逐渐减轻,总体呈下降趋势。假手术组在第 2 天和第 3 天的体质量下降幅度明显较第 1 天放缓,表明假手术组小鼠的预后良好。与模型组相比,电针组和抗

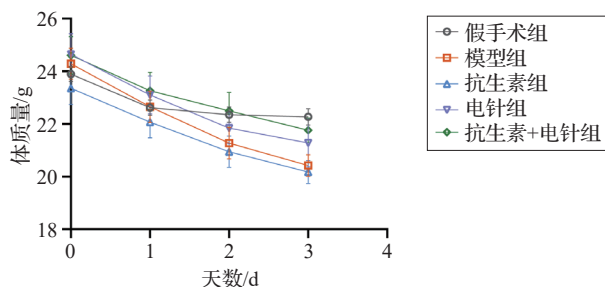


注:与假手术组相比,**** $P < 0.0001$;与模型组相比,# $P < 0.05$ 。

图 1 各组小鼠术后 24、48、72 h 的生存率比较 (10 只鼠/组)

Fig. 1 Comparison of survival rate of mice in the 3 groups 24, 48, 72 h after operation (10 mice/group)

生素+电针组小鼠的体质量下降幅度减缓,其中抗生素+电针组效果更优;抗生素组小鼠的体质量下降幅度有减缓的趋势,但差异无统计学意义。提示电针“足三里”、电针“足三里”联合抗生素的治疗均有助于减缓脓毒症小鼠的体质量下降,有利于后续恢复。与假手术组相比,模型组小鼠的体质量显著升高($P < 0.0001$);与模型组相比,抗生素组和抗生素+电针组小鼠的体质量差明显降低($P < 0.01$, $P < 0.0001$);电针组小鼠的体质量差则差异无统计学意义。表明脓毒症小鼠体质量会在短期内大幅度减轻,而抗生素、电针“足三里”联合抗生素等治疗方案都能放缓脓毒症小鼠的体质量减轻进程。见图 2。



注:与假手术组相比,**** $P < 0.0001$;与模型组相比,## $P < 0.01$,#### $P < 0.0001$ 。

图 2 各组小鼠体质量比较 ($\bar{x} \pm s$, 10 只鼠/组)

Fig. 2 Comparison of body weight of mice in the 5 groups ($\bar{x} \pm s$, 10 mice/group)

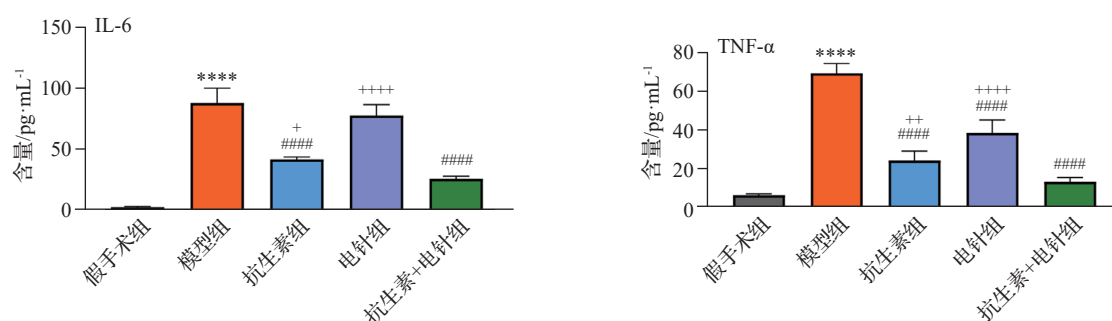
2.3 针药联合治疗对小鼠血清 IL-6、TNF- α 含量的影响

与假手术组相比,模型组小鼠血清炎性因子 IL-6 及 TNF- α 含量显著升高($P < 0.0001$)。与模型组相比,抗生素组、电针组及抗生素+电针组的血清炎性 TNF- α 含量及抗生素组、抗生素+电针组 IL-6 含量均显著降低($P < 0.0001$)。且抗生素+电针组降低炎性因子 IL-6 及 TNF- α 含量的效果优于

抗生素组和电针组($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.0001$)。表明相较单纯抗生素治疗,抗生素联合电针治疗能进一步降低脓毒症小鼠的炎症反应。见图 3。

2.4 针药联合治疗对小鼠盲肠组织形态学和炎症反应的影响

假手术组小鼠肠黏膜结构完整,绒毛排列整齐,未见明显炎性细胞浸润。模型组小鼠肠黏膜损伤严重,部分绒毛缩短、脱落,炎性细胞显著增加,



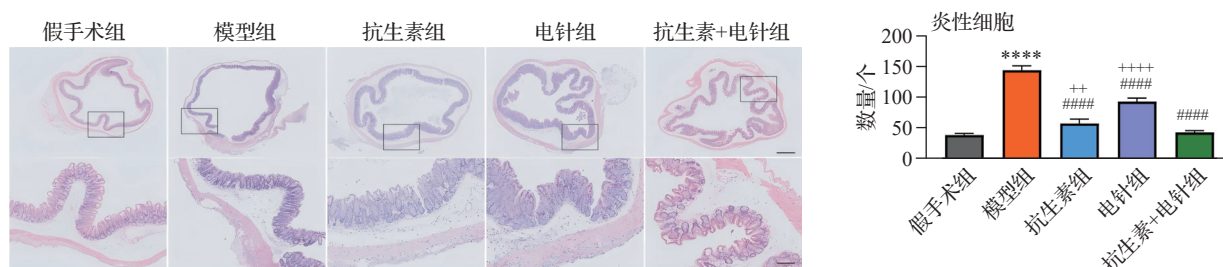
注:IL-6为白细胞介素-6,TNF- α 为肿瘤坏死因子- α 。与假手术组相比,**** $P<0.0001$;与模型组相比,#### $P<0.0001$;与抗生素+电针组相比,+ $P<0.05$,++ $P<0.01$,+++ $P<0.0001$ 。

图3 各组小鼠血清IL-6、TNF- α 的含量的比较($\bar{x}\pm s$,10只鼠/组)

Fig. 3 Comparison of serum IL-6 and TNF- α contents of mice in the 5 groups ($\bar{x}\pm s$,10 mice/group)

浸润肠壁全层,部分区域可见溃疡形成。抗生素组、电针组、抗生素+电针组小鼠肠黏膜损伤程度较模型组明显减轻,绒毛结构相对完整,炎性细胞浸润减少。与假手术组相比,模型组小鼠盲肠组织的炎性细胞计数数值显著升高($P<0.0001$),提示

模型构建后小鼠肠道组织出现明显炎症反应。抗生素组、电针组及抗生素+电针组的肠道炎性细胞计数数值均较模型组显著降低($P<0.0001$);其中抗生素+电针组的炎性细胞计数数值低于单独抗生素组与电针组($P<0.01$, $P<0.0001$)。见图4。



注:上标尺=200 μm ,下标尺=50 μm 。与假手术组相比,**** $P<0.0001$;与模型组相比,#### $P<0.0001$;与抗生素+电针组相比,++ $P<0.01$,+++ $P<0.0001$ 。

图4 各组小鼠盲肠组织形态和炎性细胞数量比较($\bar{x}\pm s$,10只鼠/组)

Fig. 4 Comparison of histological morphology and inflammatory cell counts in colon tissue of mice in the 5 groups ($\bar{x}\pm s$,10 mice/group)

2.5 针药结合对小鼠DMV中c-Fos表达的影响

假手术组、模型组、抗生素组、电针组和抗生素+电针组的DMV脑区体积两两比较均差异无统计学意义。与假手术组相比,模型组和抗生素组的c-Fos阳性细胞密度均无显著差异,而电针组和抗生素+电针组的c-Fos阳性细胞密度显著升高($P<0.001$, $P<0.0001$)。与模型组相比,电针组和抗生素+电针组的c-Fos阳性细胞密度明显升高($P<0.001$, $P<0.0001$)。与抗生素组相比,电针组和抗生素+电针组的c-Fos阳性细胞密度显著升高($P<0.001$, $P<0.0001$)。电针组和抗生素+电针组的c-Fos阳性细胞密度差异无统计学意义。提示假手术、CLP操作及不同治疗方案对CLP小鼠DMV脑区的结构无明显影响,说明脓毒症主要影响DMV

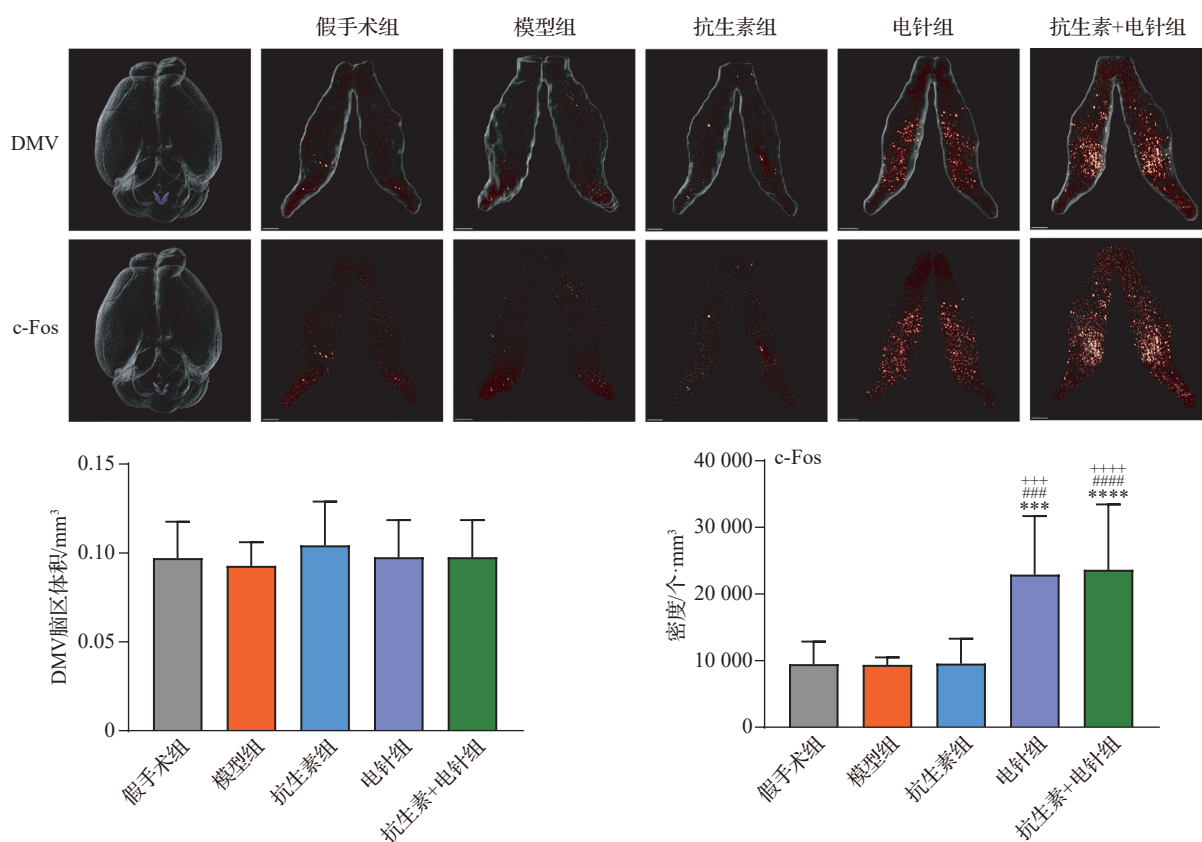
脑区的功能活动,而非造成脑区结构的器质性损伤;电针能够显著激活DMV脑区的神经元活动,逆转脓毒症对DMV脑区的功能抑制。见图5。

2.6 DMV的病毒注射位点验证

病毒注射坐标:距离前囟点(Bregma)-7.32 mm,距离耳间点(Interaural)-3.52 mm。病毒注射位点经免疫荧光染色验证显示,mCherry表达严格局限于双侧DMV(10N)解剖边界内,与内源性胆碱能神经元标记(ACh)高度共定位,未见向邻近孤束核(NTS)或延髓网状结构的弥散,证实立体定位注射的精确性。见图6。

2.7 干预DMV活动对小鼠血清IL-6、TNF- α 含量的影响

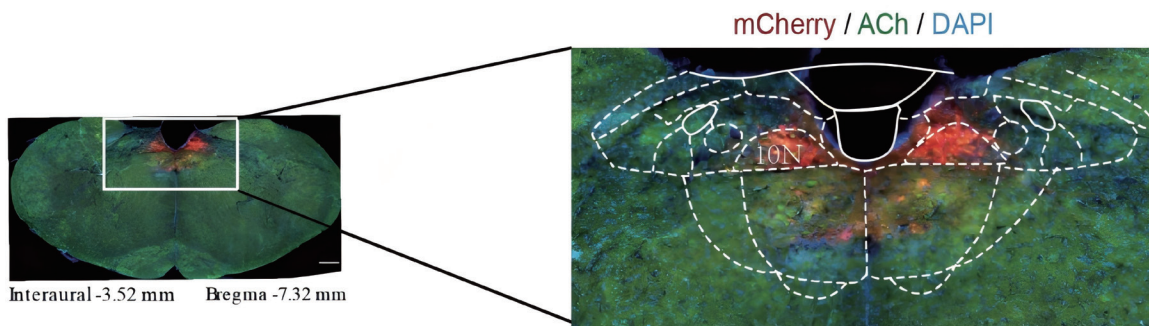
与假手术+空载病毒组相比较,模型+空载病



注:DMV为迷走神经背核,c-Fos为原癌基因c-Fos蛋白。标尺=150 μ m。与假手术组相比,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$;与模型组相比,### $P<0.001$,#### $P<0.0001$;与抗生素组相比,+++ $P<0.001$,++++ $P<0.0001$ 。

图5 各组小鼠DMV脑区体积及c-Fos密度比较($\bar{x}\pm s$,10只鼠/组)

Fig. 5 Comparison of volume of the DMV brain region and c-Fos density of mice in the 5 groups ($\bar{x}\pm s$,10 mice/group)



注:ACh为乙酰胆碱,DMV为迷走神经背核。红色(mCherry)示病毒表达神经元,绿色(ACh)示胆碱能神经元,蓝色(DAPI)示细胞核,10N示DMV,虚线轮廓标示DMV边界。标尺=100 μ m。

图6 小鼠背侧迷走神经复合体(DMV)双侧病毒注射位点及表达分布

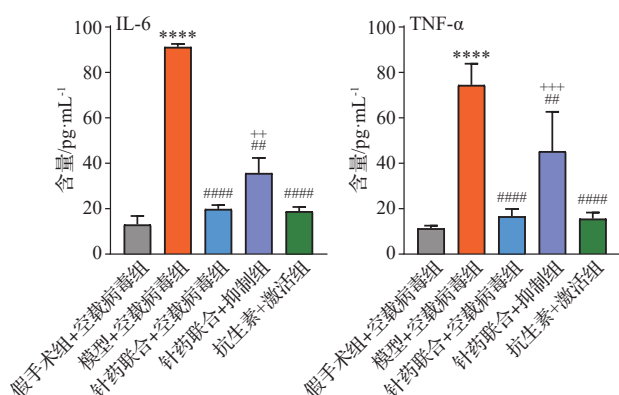
Fig. 6 Bilateral viral injection sites and expression distribution in the dorsal motor nucleus of the vagus (DMV) of mice

毒组小鼠血清的IL-6、TNF- α 含量显著升高($P<0.0001$);与模型+空载病毒组相比,针药联合+空载病毒组、针药联合+抑制组和抗生素+激活组小鼠血清的IL-6、TNF- α 含量显著降低($P<0.0001$, $P<0.01$);与针药联合+空载病毒组相比,针药联合+抑制组小鼠血清的IL-6、TNF- α 含量显著升高($P<0.01$),而抗生素+激活组小鼠则差异无统计学

意义。见图7。

2.8 干预DMV活动后各组小鼠盲肠组织形态及炎性浸润情况

HE染色显示,假手术+空载病毒组小鼠盲肠黏膜损伤最轻,炎性细胞浸润最少。模型+空载病毒组小鼠盲肠黏膜损伤最重,炎性细胞浸润最多。与针药联合+空载病毒组比较,针药联合+抑制组



注:IL-6为白细胞介素6,TNF- α 为肿瘤坏死因子 α 。与假手术+空载病毒组相比,**** $P<0.0001$;与模型+空载病毒组相比,## $P<0.01$,#### $P<0.0001$;与针药联合+空载病毒组相比,++ $P<0.01$,+++ $P<0.001$ 。

图7 各组小鼠血清IL-6、TNF- α 含量比较($\bar{x}\pm s$,10只鼠/组)
Fig. 7 Comparison of serum IL-6 and TNF- α contents of mice in the 5 groups ($\bar{x}\pm s$,10 mice/group)

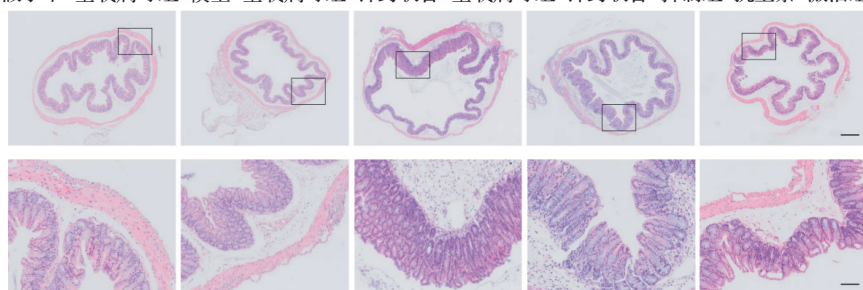
盲肠黏膜损伤加重,炎性细胞浸润增加;抗生素+激活组小鼠盲肠黏膜损伤无明显加重。炎性细胞

计数显示,与假手术+空载病毒组相比较,模型+空载病毒组小鼠盲肠组织的炎性细胞计数数值显著升高($P<0.0001$);与模型+空载病毒组相比,针药联合+空载病毒组、针药联合+抑制组和抗生素+激活组小鼠盲肠组织的炎性细胞计数明显降低($P<0.01$, $P<0.05$);与针药联合+空载病毒组相比,针药联合+抑制组小鼠盲肠组织的细胞计数数值显著升高($P<0.05$)。见图8。

2.9 干预DMV活动后对小鼠血清儿茶酚胺及其代谢产物水平的影响

与假手术+空载病毒组相比,模型+空载病毒组小鼠的血清DA、E、NE、3-MT、MN、NMN水平均显著降低($P<0.0001$);与模型+空载病毒组相比,针药联合+空载病毒组、针药联合+抑制组和抗生素+激活组小鼠的血清DA、E、NE、3-MT、MN、NMN水平均明显升高($P<0.01$, $P<0.05$, $P<0.001$);与针药联合+空载病毒组相比,针药联合+抑制组小鼠的血清DA、E、NE、MN、NMN水平显著降低($P<0.05$)。见图9。

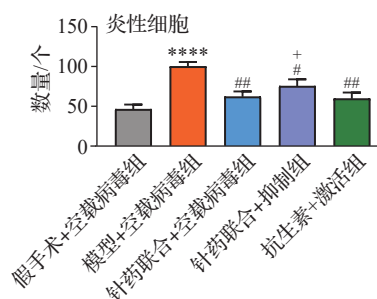
假手术+空载病毒组 模型+空载病毒组 针药联合+空载病毒组 针药联合+抑制组 抗生素+激活组



注:上标尺=200 μm ,下标尺=50 μm 。与假手术+空载病毒组相比,**** $P<0.0001$;与模型+空载病毒组相比,## $P<0.05$,### $P<0.01$;与针药联合+空载病毒组相比,+ $P<0.05$ 。

图8 各组小鼠盲肠组织形态和炎症浸润情况比较($\bar{x}\pm s$,10只鼠/组)

Fig. 8 Histological morphology and inflammatory infiltration in the cecum and colon tissues of mice in the 5 groups ($\bar{x}\pm s$,10 mice/group)



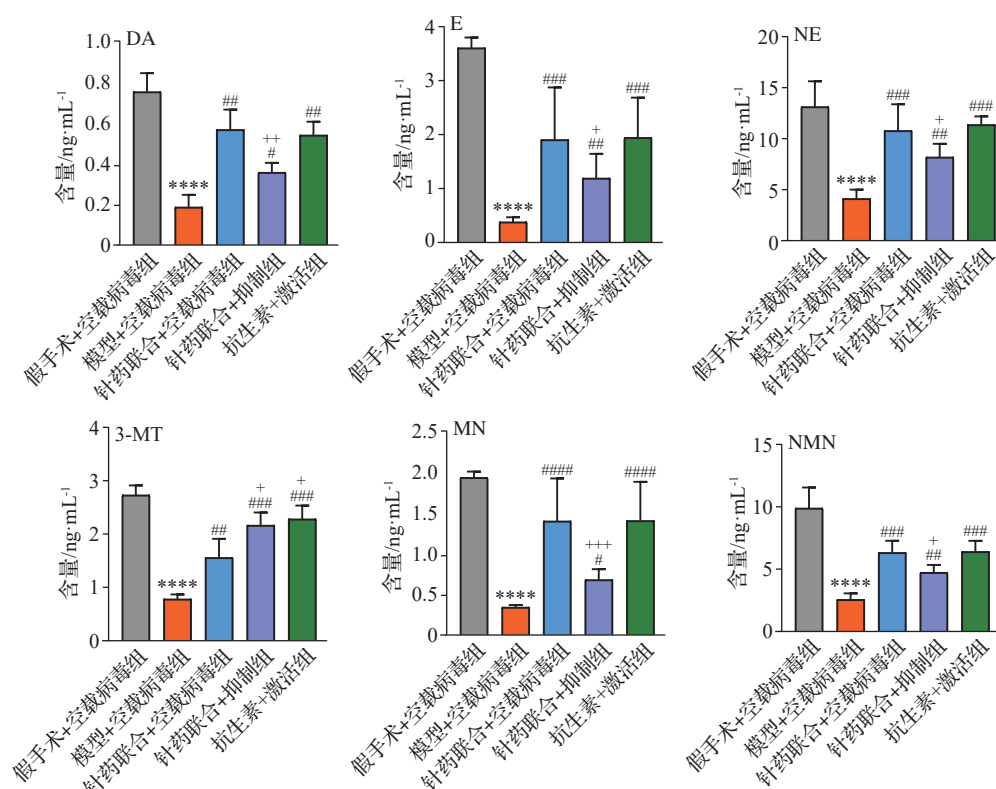
2.10 干预DMV活动后对小鼠盲肠组织的PD-1、FOXP3/CD4表达的影响

与假手术+空载病毒组相比,模型+空载病毒组小鼠的PD-1⁺、FOXP3⁺/CD4⁺细胞数量显著减少($P<0.0001$);与模型+空载病毒组相比,针药联合+空载病毒组、针药联合+抑制组、抗生素+激活组小鼠的PD-1⁺、FOXP3⁺/CD4⁺的细胞数量均增多($P<0.001$, $P<0.05$, $P<0.0001$);与针药联合+空载病毒组相比,针药联合+抑制组小鼠的PD-1⁺、FOXP3⁺/CD4⁺的细胞数量显著减少($P<0.01$, $P<0.001$)。见图10。

3 讨论

脓毒症发生过程中,严重的病原体入侵可能会导致过度的炎症反应,释放大量的促炎细胞因子,如TNF- α 、IL-1和IL-6等^[14]。促炎细胞因子可从感染部位大量释放进入循环系统,并诱导更多的炎症介质产生,形成“细胞因子风暴”,导致心脏、肠道等多器官损伤,最终导致心血管衰竭和多器官功能障碍,这是脓毒症患者死亡的主要原因^[15-16]。抗生素是治疗脓毒症的经典治疗手段,但是经治疗后脓毒症的死亡率仍较高。

针灸与药物结合的治疗方法,在中医领域早已



注:DA为多巴胺,E为肾上腺素,NE为去甲肾上腺素,3-MT为3-甲氧基酪胺,MN为3-甲氧基肾上腺素,NMN为3-甲氧基去甲肾上腺素。与假手术+空载病毒组相比,*** $P<0.0001$;与模型+空载病毒组相比,† $P<0.05$,‡ $P<0.01$,§ $P<0.001$,§§§ $P<0.0001$;与针药联合+空载病毒组相比,† $P<0.05$,†† $P<0.01$,††† $P<0.001$ 。

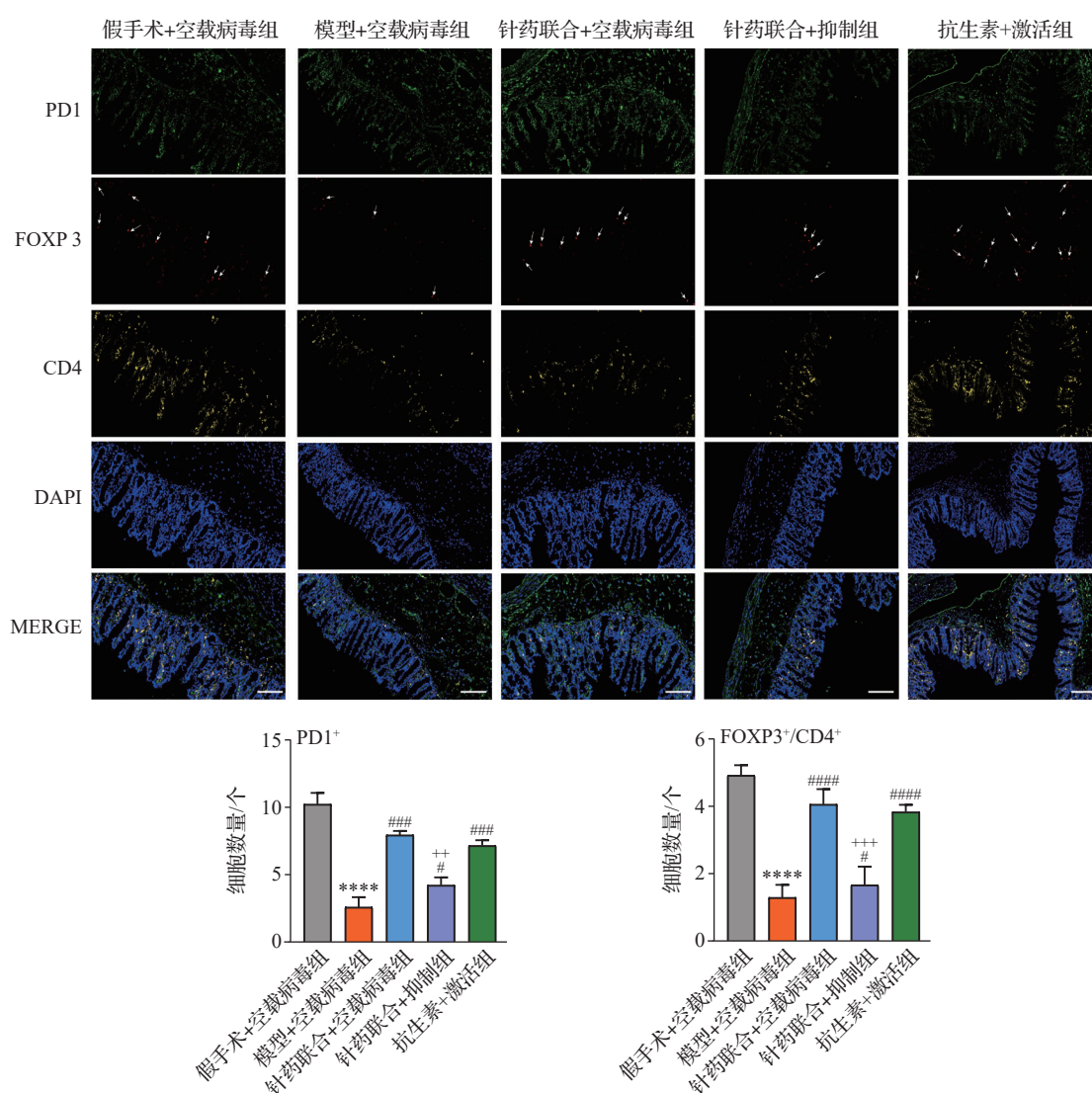
图9 各组小鼠血清儿茶酚胺及其代谢产物的比较($\bar{x}\pm s$,10只鼠/组)

Fig. 9 Comparison of serum catecholamines and their metabolites of mice in the 5 groups ($\bar{x}\pm s$,10 mice/group)

得到广泛应用。这种综合疗法源于传统中医经典理论,《黄帝内经·素问》载“毒药治其内,针石治其外”,强调药物疗法与针灸在恢复人体系统平衡方面具有互补作用。最近一项荟萃分析还显示,与单纯药物治疗相比,针灸与药物结合能显著降低脓毒症患者28 d死亡率,并改善临床严重程度评分^[17]。本研究显示,电针“足三里”联合抗生素治疗能延缓脓毒症小鼠的体质量减轻进程,提高脓毒症小鼠的生存率,血清学检测电针组炎症因子IL-6和TNF- α 含量显著降低,小鼠盲肠组织炎症反应较模型组与单纯抗生素组明显缓解,证实了电针“足三里”在抗生素治疗脓毒症中发挥了明显协同增效作用。

2002年, Kevin J. Tracey在《Nature》杂志上发表了一篇综述阐述了炎症反射在抑制炎症反应中的作用机制,认为交感神经系统和副交感神经系统在炎症调控中通过神经与体液机制协同限制局部炎症反应,防止其失控发展为全身性反应^[18]。并且, Kevin J. Tracey在该文章中指出针灸可通过调节迷走神经活动,减轻实验性炎症反应,并合理推测通过电刺激对迷走神经活动进行精确调节,或可为治

疗炎症性疾病提供新途径,为电针治疗炎症反应的机制研究奠定了一定理论基础。马秋富团队的研究^[19]显示,低强度(0.5 mA)电针刺激“足三里”可以通过激活PROKR2-Cre标记的感觉神经元,并通过DMV激活迷走神经-肾上腺轴,即迷走神经可投射至肾上腺髓质并释放乙酰胆碱,激活肾上腺髓质嗜铬细胞,释放儿茶酚胺降低脓毒症小鼠的炎症反应。DMV是调控迷走神经-肾上腺轴的重要中枢^[20]。其胆碱能神经元通过投射至肾上腺髓质,促进儿茶酚胺类递质的合成与释放^[21]。本研究显示,对假手术组、抗生素组、抗生素+电针组3组小鼠进行DMV的c-Fos免疫荧光标记观察到针药联合组DMV的c-Fos表达远高于其他两组,推测电针是通过调控DMV发挥了协同抗炎作用。我们通过Chat-Cre小鼠结合化学遗传学技术进一步研究,结果显示激活DMV胆碱能神经元可模拟电针在抗生素基础上的抗炎效应,即降低血清IL-6和TNF- α 水平,减少肠道炎症浸润,而抑制DMV神经元则可拮抗电针联合抗生素的疗效;电针刺激“足三里”可激活DMV胆碱能神经元,促进儿茶酚胺及其代谢产



注:PD-1为程序性死亡受体-1,FOXP3为叉头框蛋白P3,CD4为表面抗原分化簇4。标尺=100 μ m。与假手术+空载病毒组相比,**** $P<0.0001$;与模型+空载病毒组相比, * $P<0.05$, ### $P<0.001$, #### $P<0.0001$;与针药联合+空载病毒组相比, ++ $P<0.01$, +++ $P<0.001$ 。

图10 各组小鼠盲肠组织中PD-1⁺、FOXP3⁺/CD4⁺细胞数量比较($\bar{x}\pm s$,10只鼠/组)

Fig. 10 Comparison of PD-1⁺ and FOXP3⁺/CD4⁺ cells in cecal tissues of mice in the 5 groups ($\bar{x}\pm s$,10 mice/group)

物的合成与释放,间接反映电针“足三里”脓毒症小鼠协同抗炎作用机制可能与激活迷走神经-肾上腺轴、促使肾上腺髓质释放儿茶酚胺类物质(如DA、NE和E),从而抑制促炎因子风暴有关,这与目前多项研究的结论一致^[19, 22]。

在脓毒症中后期,过度的炎症反应还经常伴随免疫功能的深度抑制,表现为免疫细胞表面PD-1及其配体PD-L1表达上调,导致免疫细胞耗竭与凋亡,机体无法对新感染作出有效应答,面临严重的继发性感染风险,这也是脓毒症高死亡率的重要原因^[15-16]。有研究表明,电针诱导的儿茶酚胺释放可通过作用于免疫细胞表面的 β 2-肾上腺素能受体(β

2-AR),调控髓源性抑制细胞(MDSC)的PD-L1表达及T细胞功能^[23-24]。同时, β 2-AR信号可促进初始CD4⁺T细胞向FOXP3⁺调节性T细胞(Treg)分化并增强其抑制功能^[25],而Treg自身也具备合成儿茶酚胺的能力,可能形成局部调控环路^[26]。本研究显示,针药联合+空载病毒组、针药联合+抑制组和抗生素+激活组较模型+空载病毒组小鼠盲肠组织PD-1⁺及FOXP3⁺/CD4⁺Treg数量均明显增加,表明电针、抗生素和针药联合都能上调肠道PD-1⁺T细胞和FOXP3⁺Treg数量,缓解免疫抑制状态,重建部分调节功能。其中针药联合+空载病毒组与抗生素+激活组小鼠盲肠组织PD-1⁺细胞及

FOXP3⁺/CD4⁺ Treg 数量接近,而针药联合+抑制组相较针药联合+空载病毒组小鼠盲肠组织PD-1⁺细胞及FOXP3⁺/CD4⁺ Treg 数量减少,提示激活DMV胆碱能神经元活动和电针对免疫耗竭的改善效果相近,而抑制DMV活动则能阻断针药联合的免疫调节效应,提示DMV是针药联合改善脓毒症免疫抑制的关键神经-免疫通路。本研究观察到电针的PD-1⁺细胞和FOXP3⁺ Treg 调控作用,为其调节脓毒症免疫平衡、降低后期感染风险提供了全新分子靶点。结合其他研究^[23-24]和本研究结果推测,儿茶酚胺可能通过作用于T细胞表面的β2-AR,促进FOXP3的乙酰化修饰与PD-1的表达上调,这一分子机制有待后续实验进一步验证。

综上所述,电针“足三里”可通过迷走神经-肾上腺轴-免疫调节在脓毒症抗炎治疗中发挥有效的协同增效作用。抗生素控感染+电针激活DMV抗炎通路的针药结合治疗方式可提升脓毒症小鼠生存率,显著优于单独治疗。未来将进一步开展分子机制研究和临床研究,验证电针联合抗生素治疗脓毒症的有效性,并探索最优电针参数。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。作者李嫚、景向红为本刊编委,但未参与本文的审理。

参考文献

- [1] Meyer N J, Prescott H C. Sepsis and septic shock[J]. *N Engl J Med*, 2024, 391(22): 2133-2146.
- [2] Fleischmann C, Scherag A, Adhikari N K, et al. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. current estimates and limitations[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2016, 193(3): 259-272.
- [3] Rudd K E, Johnson S C, Agesa K M, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study[J]. *Lancet*, 2020, 395(10219): 200-211.
- [4] Zeng L, Yan J T. Acupuncture at Zusanli (ST36) for the benefits of sepsis-laboratory evidence for “preventive treatment of disease” and “holistic concept” in the protective effects of acupuncture: a literature review of rodent studies[J]. *Front Neurol*, 2025, 16: 1645906.
- [5] Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021[J]. *Intensive Care Med*, 2021, 47(11): 1181-1247.
- [6] Lv Z Y, Shi Y L, Bassi G S, et al. Electroacupuncture at ST36 (*Zusanli*) prevents T-cell lymphopenia and improves survival in septic mice[J]. *J Inflamm Res*, 2022, 15: 2819-2833.
- [7] Liu A P, Xiao L, He Q W, et al. EA mitigates sepsis-induced liver injury by inhibiting the proinflammatory pathways IkBα/NF-κB and NLRP3-mediated pyroptosis[J]. *Microb Pathogen*, 2026, 212: 108309.
- [8] Zhang J Y, Wang M J, Hu X Y, et al. Electroacupuncture-driven endogenous circulating serum exosomes as a potential therapeutic strategy for sepsis[J]. *Chin Med*, 2023, 18(1): 106.
- [9] 林浩嘉, 林海龙. 电针联合隔药灸脐辅治脓毒症胃肠功能障碍的临床观察[J]. *中国中医急症*, 2022, 31(4): 666-669.
- [9] Lin H J, Lin H L. Clinical observation on electroacupuncture combined with medicinal partitioned moxibustion at navel in adjuvant treatment of gastrointestinal dysfunction in sepsis (in Chinese)[J]. *Journal of Emergency in Traditional Chinese Medicine*, 2022, 31(4): 666-669.
- [10] Yang G, Zheng B J, Yu Y, et al. Electroacupuncture at Zusanli (ST36), Guanyuan (CV4), and Qihai (CV6) acupoints regulates immune function in patients with sepsis via the PD-1 pathway[J]. *Biomed Res Int*, 2022, 2022: 7037497.
- [11] Alverdy J C, Keskey R, Thewissen R. Can the cecal ligation and puncture model be repurposed to better inform therapy in human sepsis?[J]. *Infect Immun*, 2020, 88(9): e00942-19.
- [12] 李超, 石炳毅, 柏宏伟, 等. 脂多糖注射及盲肠结扎穿刺诱导脓毒症肾损伤模型的对比研究[J]. *西北国防医学杂志*, 2021, 42(4): 215-220.
- [12] Li C, Shi B Y, Bai H W, et al. Comparative study of animal models of sepsis associated acute kidney injury induced by CLP and LPS injection (in Chinese)[J]. *Medical Journal of National Defending Forces in Northwest China*, 2021, 42(4): 215-220.
- [13] China Association of Acupuncture, Moxibustion. Nomenclature and location of acupuncture points for laboratory animals Part 3: Mouse[J]. *World Journal of Acupuncture-Moxibustion*, 2025, 35(2): 160-166.
- [14] Iskander K N, Osuchowski M F, Stearns-Kurosawa D J, et al. Sepsis: multiple abnormalities, heterogeneous responses, and evolving understanding[J]. *Physiol Rev*, 2013, 93(3): 1247-1288.
- [15] LaRosa S P, Opal S M. Tissue factor pathway inhibitor and antithrombin trial results[J]. *Crit Care Clin*, 2005, 21(3): 433-448.
- [16] Wilson J X, Young G B. Progress in clinical neurosciences: sepsis-associated encephalopathy: evolving concepts[J]. *Can J Neurol Sci*, 2003, 30(2): 98-105.
- [17] Xian J, Wang L, Zhang C Y, et al. Efficacy and safety of acupuncture as a complementary therapy for sepsis: a systematic review and meta-analysis[J]. *Acupunct Med*, 2023, 41(1): 3-15.
- [18] Tracey K J. The inflammatory reflex[J]. *Nature*, 2002, 420(6917): 853-859.
- [19] 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.
- [20] Zhang G Y, Lian Y N, Li Q G, et al. Vagal pathway activation links chronic stress to decline in intestinal stem cell

- function[J]. *Cell Stem Cell*, 2025, 32(5): 778-794.e10.
- [21] Rosas-Ballina M, Olofsson P S, Ochani M, et al. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit[J]. *Science*, 2011, 334(6052): 98-101.
- [22] 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.
- [23] Cao L L, Liu H R, Ji Y J, et al. Research progress of vagal nerve regulation mechanism in acupuncture treatment of atrial fibrillation[J]. *Chin J Integr Med*, 2025, 31(3): 281-288.
- [24] 秦尔奇, 梁繁荣, 李钰, 等. 针刺治疗呼吸困难的神经内分泌机制研究进展[J]. *针刺研究*, 2022, 47(6): 559-564.
- Qin E Q, Liang F R, Li Y, et al. Research progress of neuroendocrine mechanism of acupuncture for dyspnea (in Chinese)[J]. *Acupuncture Research*, 2022, 47(6): 559-564.
- [25] 王文炎, 梁凤霞, 陈瑞. 针灸调节胃肠动力机制的研究进展与思考[J]. *针刺研究*, 2020, 45(9): 771-775.
- Wang W Y, Liang F X, Chen R. Research advances in the mechanism of acupuncture and moxibustion in regulating gastrointestinal motility and related thinking (in Chinese)[J]. *Acupuncture Research*, 2020, 45(9): 771-775.
- [26] 陈碧玮, 陈少宗, 方剑乔, 等. 针灸治疗肠易激综合征的神经生物学机制研究进展及问题[J]. *针刺研究*, 2021, 46(10): 885-892.
- Chen B W, Chen S Z, Fang J Q, et al. Research progress and problems of neurobiological mechanisms of acupuncture underlying improvement of irritable bowel syndrome (in Chinese)[J]. *Acupuncture Research*, 2021, 46(10): 885-892.

收稿日期:2026-04-07 修回日期:2026-06-01