

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2026.13.012

子午流注纳子法电针对慢性阻塞性肺疾病肺气虚证模型大鼠肺组织 BMAL1 蛋白及 NETs 标志物的影响

焦李长天¹, SHIO Nise Pantaleo¹, 蔡炼清¹, 蒋庆要¹,
唐丝雨¹, 万倩倩¹, 万梦晨¹, 叶宇琦¹, 朱洁^{1,2}✉



1. 安徽中医药大学中西医结合学院, 安徽省合肥市新站区龙子湖路 350 号, 230012; 2. 安徽中医药大学新安医学教育部重点实验室

[摘要] **目的** 从脑和肌肉芳香烃受体核转样蛋白 1 (BMAL1) 及中性粒细胞胞外陷阱 (NETs) 角度探讨子午流注纳子法电针治疗慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 肺气虚证的可能作用机制。**方法** 实验分两阶段进行。在疗效观察部分将 24 只大鼠随机分为对照 1 组、模型 1 组、子午电针 1 组、常规电针组, 每组 6 只。采用烟熏联合气管滴注脂多糖 (LPS) 法建立 COPD 肺气虚证大鼠模型。造模成功后, 子午电针 1 组大鼠于卯时 (5:00—7:00) 取“太渊”“肺俞”“足三里”行电针治疗, 每次 30 min, 隔日 1 次, 持续 14 天, 共 7 次; 常规电针组大鼠采用相同电针处理, 于白天随机工作时段 (8:00—18:00) 施治。检测肺功能指标 [包括第 0.3 秒用力呼气容积 (FEV_{0.3})、用力呼气肺活量 (FVC)、FEV_{0.3}/FVC], HE 染色观察肺组织病理, 检测大鼠血浆中炎症因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平, 检测肺组织活性氧 (ROS) 含量、BMAL1 蛋白水平及 NETs 标志物 [髓过氧化物酶 (MPO)、中性粒细胞弹性蛋白酶 (NE)、瓜氨酸化组蛋白 H3 (CitH3)] 表达。在机制验证部分将 36 只大鼠分为对照 2 组、模型 2 组、子午电针 2 组、过表达空载组、过表达组、过表达子午电针组, 每组 6 只。过表达组、过表达子午电针组大鼠于造模第 5 周向气管滴注 100 μ l 过表达 *Bmal1* 腺病毒载体悬液, 过表达空载组大鼠则于相同时间点向肺部注射等滴度、等体积的不包含 *Bmal1* 基因序列的空载病毒液。子午电针 2 组和过表达子午电针组电针干预方法同前。检测各组大鼠肺组织 MPO、NE、CitH3 水平。**结果** 与对照 1 组比较, 模型 1 组 FEV_{0.3}、FVC、FEV_{0.3}/FVC 降低, IL-1 β 、TNF- α 水平及 ROS 含量升高, BMAL1 蛋白表达水平下调, MPO、NE、CitH3 水平均升高 ($P<0.05$); 扫描电镜可观察到典型的 NETs 样结构, 纤维网络表面可见少量颗粒状物质; HE 染色显示肺泡结构破坏伴炎性浸润。与模型 1 组比较, 子午电针 1 组与常规电针组上述指标均显著改善, 且以子午电针 1 组改善最显著 ($P<0.05$)。子午电针 1 组的 NETs 样结构减少及肺组织病理改善亦较常规电针组显著。机制验证结果显示, 与模型 2 组比较, 子午电针 2 组、过表达组及过表达子午电针组 MPO 平均光密度值及 MPO、NE、CitH3 蛋白水平均显著降低 ($P<0.05$), 且过表达子午电针组低于子午电针 2 组 ($P<0.05$)。**结论** 子午流注纳子法电针可能通过上调肺组织生物钟蛋白 BMAL1 表达, 抑制 NETs 在肺组织的过度积累, 从而发挥对 COPD 肺部炎性的改善作用。

[关键词] 慢性阻塞性肺疾病; 电针; 子午流注纳子法; 生物钟基因; 中性粒细胞胞外陷阱

子午流注理论认为人体的气血按照一日十二时辰的阴阳消长而有规律地流注于经脉之中, 功能也随时间推移发生周期性变化, 故治疗当遵循因时制

宜原则^[1]。子午流注理论体系包含纳甲法、纳子法等, 其中纳子法通过融合十二经配十二支理论体系发展成熟, 并以“补母泻子”思想为纲^[2]。子午流注纳子法理论围绕“先辨病候、次定经脉、后择开穴时辰”的辨证展开, 实现了病机分析与时间医学的深度结合^[3], 在治疗病程演变与人体气血盛衰及季节、生物钟等时间因素密切相关的肺系疾病方面

基金项目: 国家自然科学基金 (82575021); 安徽省自然科学基金 (2408085MH230); 安徽高校杰出青年项目 (2022AH020044); 安徽省大学生创新创业计划训练项目 (S202410369050, S202410369115)

✉ 通讯作者: janezhutcm@foxmail.com

具有独特的中医治疗优势^[4]。

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是以气道异常 (如支气管炎、细支气管炎) 和肺泡异常 (如肺气肿) 导致持续且进行性的气流阻塞为特征的一种异质性肺部疾病^[5]。中医理论认为, 肺气虚证是肺系疾病的基础证候, 肺气虚证贯穿 COPD 整个病程^[6]。COPD 患者长期的咳、痰、喘等症状干扰日常生活, 可导致生物节律紊乱^[7], COPD 患者血清中生物钟基因水平显著低于健康对照组^[8]。现代研究^[9]发现, 作为核心生物钟基因, 脑和肌肉芳香烃受体核转运样蛋白 1 (BMAL1) 的表达降低是 COPD 患者疾病进展的关键驱动因素。当 *Bmal1* 基因表达下降或节律紊乱时, 细胞抗氧化能力减弱, 导致活性氧 (ROS) 过量累积, 而 ROS 暴发是触发中性粒细胞外诱捕网 (NETs) 形成的关键因素^[10]。NETs 作为先天免疫的一部分, 其标志物髓过氧化物酶 (MPO)、中性粒细胞弹性蛋白酶 (NE)、瓜氨酸化组蛋白 H3 (CitH3) 过度释放加剧了气道损伤和系统性炎症^[11]。因此, 本研究拟从 BMAL1 介导 ROS 影响 NETs 形成的角度, 探究子午流注纳子法对 COPD 肺气虚证大鼠肺部炎症的影响及可能作用机制, 为其临床运用提供依据。本试验通过安徽中医药大学实验动物伦理审查委员会批准 (批准号 AHUCM-rats-2024161)。

1 材料与方法

1.1 动物及病毒

SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只, 7~8 周龄, 体质量 (220±10) g, 购自斯克贝斯生物科技股份有限公司, 批号 No. 410000000000011166, 实验动物许可证编号 SCXK (豫) 2020-0005。动物实验前适应饲养 1 周, 温度 (23±3) °C, 相对湿度 (60±5) %, 实验期间动物自由摄食饮水。光照期从 08: 00 开始至 20: 00 结束^[12], 光暗比 12: 12。过表达 *Bmal1* 腺病毒载体由汉恒生物科技上海有限公司提供 (货号: HH20241214WY-ADP01, 批号: AP24121701), 病毒滴度为 4.5×10¹¹ PFU/ml。

1.2 主要试剂和仪器

雄狮牌香烟 (香烟焦油量 13 mg, 尼古丁含量 0.9 mg, 一氧化碳含量 14 mg), 中国浙江烟草实业有限公司; 苏木素 (批号: B005)、醇溶伊红染液 (批号: B006)、中性树胶 (批号: B018), 安徽欣乐生物技术有限公司; 肿瘤坏死因子-α (TNF-α)

ELISA 试剂盒 (批号: JYM0635Ra)、白细胞介素-1β (IL-1β) ELISA 试剂盒 (批号: JYMO419Ra), 武汉基因美生物科技有限公司; ROS 检测试剂盒 (批号: S0033S), 上海碧云天生物技术有限公司; 山羊抗小鼠 IgG (批号: ZB-2305)、山羊抗兔 IgG (批号: ZB-2301)、封闭用羊血清 (批号: ZLI-9056)、GAPDH 抗体 (批号: 鼠抗 TA-08), 北京中杉金桥生物技术有限公司; BMAL1 抗体 (批号: 兔抗 bsm-54102R), 北京博奥森生物技术有限公司; NE 抗体 (批号: 兔抗 AB310335)、CitH3 抗体 (批号: 兔抗 AB176916)、MPO 抗体 (批号: 兔抗 AB188211), 艾博抗 (上海) 贸易有限公司; ECL 超敏发光试剂盒 (批号: BL520A), 兰杰柯科技有限公司。

0.20 mm×25 mm 华佗牌针灸针, 苏州医疗用品厂有限公司; SDZ-V 型电针仪, 苏州医疗用品厂有限公司; VE-186 型电泳仪, 上海天能科技有限公司; JW-3021HR 型高速冷冻离心机, 安徽嘉文仪器装备有限公司; JS-1070P 型自动曝光仪, 上海培清科技有限公司; Ani-Res2005 型小动物呼吸功能检测仪, 北京贝兰博科技有限公司; CX41 型显微镜, 日本奥林巴斯株式会社; Panoramic MIDI 型数字切片扫描仪, 匈牙利斯瑞缔数字医疗有限公司; CytoFLEX 型流式细胞仪, 美国贝克曼库尔特有限公司; S-4800 型扫描电镜, 株式会社日立制作所; 0.24 mm×1.3 mm 洛亚山川牌一次性无菌撒针, 北京珞亚山川医疗器械有限公司。

1.3 COPD 肺气虚证大鼠模型建立

基于文献 [13] 和预实验, 采用烟熏联合气管滴注脂多糖 (LPS) 法建立 COPD 肺气虚证大鼠模型。每日上午将大鼠置于 1 m³ 自制的烟熏箱中进行烟熏, 每天 20 支, 分两次投入, 共烟熏 6 周; 并于第 1 天和第 14 天气管滴注 LPS (200 μl/只)。造模 6 周后, 若大鼠活动量减少, 拱背蜷卧, 呼吸急促, 撮毛, 行动迟缓, 肺功能检测第 0.3 秒用力呼气容积与用力肺活量的比值 (FEV_{0.3}/FVC) 低于 70%, 肺组织切片观察病理显示支气管壁及周围炎性细胞浸润、肺泡腔扩大及部分肺泡结构破坏, 则确认 COPD 肺气虚证大鼠模型构建成功^[14]。

1.4 动物分组及干预方法

实验分两阶段进行, 均采用随机数字表法进行动物分组。在疗效观察阶段将 24 只大鼠随机分为对照 1 组、模型 1 组、子午电针 1 组、常规电针组, 每组 6 只; 在机制验证阶段将 36 只大鼠分为对照 2 组、模型 2 组、子午电针 2 组、过表达空载组、过

表达组、过表达子午电针组, 每组 6 只。

除对照 1 组和对照 2 组外, 其余各组大鼠均建立 COPD 肺气虚证模型。过表达组、过表达子午电针组大鼠于造模第 5 周, 经 2%~3% 浓度异氟烷诱导麻醉后, 使用 1.5%~2% 浓度异氟烷维持麻醉并仰卧位固定, 消毒颈部皮肤并纵向切开 1.5 cm, 钝性分离肌肉暴露气管, 于第 3—4 软骨环间穿刺插入 22G 套管, 以 5~10 $\mu\text{l}/\text{min}$ 速度向气管滴注 100 μl 过表达 *Bmal1* 基因腺病毒载体悬液^[15], 剂量为 330 $\mu\text{l}/\text{kg}$, 留管 1~2 min 后拔除并缝合切口, 术后监测大鼠呼吸及活动状态。过表达空载组大鼠则于相同时间点, 以相同方法向肺部注射等滴度、等体积的不包含 *Bmal1* 基因序列的空载病毒液。

造模成功后, 子午电针 1 组、子午电针 2 组、过表达子午电针组大鼠在 2%~3% 浓度异氟烷诱导麻醉后, 使用 1.5%~2% 浓度异氟烷维持麻醉下行电针治疗。选取双侧“肺俞”“足三里”电针, 取“太渊”行揞针针刺, 穴位定位参考《实验动物常用穴位名称与定位第 2 部分: 大鼠》^[16]。于卯时(5:00—7:00)开展, 电针波形选取疏密波, 2 Hz/10 Hz, 持续 0.5 ms, 强度设为 1~2 mA, 每次 30 min, 隔日 1 次, 持续 14 天, 共 7 次。常规电针组大鼠采用相同穴位电针处理。将白天工作时段(08:00—18:00)按 30 min 为一个时间单元编号, 每日早 8 点前从中随机抽取一个单元作为当日治疗时段, 以模拟临床常规施治的随机性。对照 1 组、模型 1 组、对照 2 组、模型 2 组及过表达空载组大鼠在相同时间段接受同等等长的异氟烷吸入麻醉及固定处理, 但不予电针刺激。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 大鼠肺功能测定 治疗周期结束次日, 每组 6 只大鼠均以 2% 的戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠, 切开颈部皮肤进行气管插管, 采用动物肺功能分析系统 AniRes2005, 将大鼠仰卧位放置于肺功能测定仪的密闭体积描计器内, 测定并记录大鼠第 0.3 秒用力呼气容积($\text{FEV}_{0.3}$)、用力呼气肺活量(FVC)、 $\text{FEV}_{0.3}/\text{FVC}$ 。

1.5.2 ELISA 检测大鼠血浆中 IL-1 β 、TNF- α 水平 每组 6 只大鼠于肺功能检测后, 进行腹主动脉取血。收集的血液样本于 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h 后, 放入离心机按 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3000 r/min 离心(离心半径 12 cm)离心 10 min, 取上清血浆。采用 ELISA 法检测大鼠血浆 IL-1 β 、TNF- α 水平。

1.5.3 HE 染色检测大鼠肺组织病理变化 各组

6 只大鼠取右中肺组织, 使用生理盐水漂洗并用滤纸吸干表面水分, 置于 4% 多聚甲醛进行固定, 行常规脱水、透明、浸蜡、包埋, 连续 5~6 μm 厚切片; 再脱蜡和再水化后, HE 染色, 在光学显微镜下观察肺组织病理形态学变化, 并进行炎症评分^[17]。1) 支气管和血管周围的炎症评分: 无炎症反应计 0 分, 偶有炎性细胞脱落计 1 分, 大部分支气管和血管周围有薄层炎性细胞(1~5 层细胞厚度)计 2 分, 大部分支气管和血管周围有厚层炎性细胞(>5 层细胞厚度)计 3 分; 2) 肺泡炎症评分: 正常细胞计 0 分, 少量炎性细胞浸润计 1 分, 炎细胞环>1 层且<2 层细胞厚度计 2 分, 炎细胞环为 2~4 层细胞厚度计 3 分, 炎细胞环>4 层细胞厚度计 4 分。

1.5.4 扫描电镜观察大鼠肺组织 NETs 结构 各组大鼠的右中肺组织切取 1 mm³ 大小, 经 2.5% 戊二醛固定 4 h 后, 用 PBS 彻底漂洗 3 次以去除残留固定剂, 再分别经乙醇行梯度脱水, 每次 15 min, 随后用乙酸异戊酯置换乙醇 2 次(每次 20 min)将样品取出, 放入超临界干燥仪中干燥 12 h。干燥完成后固定于样品台上喷金 5~10 nm, 喷金完成后经扫描电镜观察 NETs 形成。

1.5.5 流式细胞术检测大鼠肺组织 ROS 水平 每组随机取 3 只大鼠新鲜右下肺组织, 称取 50 mg 置于预冷 PBS 中剪碎, 按照 ROS 检测试剂盒说明书步骤进行, 采用流式细胞仪检测, 结果以每毫克蛋白荧光强度表示。

1.5.6 免疫荧光法检测大鼠肺组织 MPO、CitH3 表达 各组随机取 3 只大鼠的右中肺组织石蜡包埋切片, 经二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水, 抗原修复并使用 3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育兔抗大鼠 MPO(1:100)和鼠抗大鼠 CitH3(1:500)一抗 60 min; 滴加混匀的免疫荧光二抗(1:500), 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h, 再通过 TSA 荧光染料信号放大 10 min 进行荧光标记, 并用 DAPI 复染细胞核。在荧光显微镜下观察及采集图像, Image J2.1.0 软件测定平均荧光强度。

1.5.7 蛋白质免疫印记法检测大鼠肺组织 BMAL1、MPO、NE、CitH3 蛋白水平 取大鼠右上肺组织, 各组随机抽取 3 个样本, 称重 30 mg 剪碎后, 在液氮中研磨成粉末, 置于离心管中, 加入 RIPA 裂解液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 裂解过夜。离心后取上清, 进行蛋白浓度测定。将蛋白样品与 SDS-PAGE 上样缓冲液混合, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min, 室温平衡后上样。以

50 V 电压电泳至分离胶的 2/3 处。采用半干转法, 250 mA 恒流转膜。室温封闭 2 h。分别加入 BMAL1 (1 : 1000)、MPO (1 : 1000)、NE (1 : 1000)、CitH3 (1 : 5000) 一抗, 4 ℃ 孵育过夜。次日加入二抗 (1 : 20 000) 室温孵育 1.2 h, PBST 洗涤 3 次 (每次 10 min)。洗涤后使用 ECL 发光试剂进行化学发光检测。扫描胶片, 用 Image J2. 1. 0 软件测定目标蛋白条带灰度值, 进行半定量分析。

1. 5. 8 免疫组化检测大鼠肺组织内 MPO 含量 取已包埋的机制验证阶段的大鼠右中肺组织进行切片, 使用免疫组化两步法观察大鼠组织内 MPO 表达改变, 按照试剂盒说明书步骤进行, 于光学显微镜下观察 MPO 棕褐色阳性信号。采用 Image J2. 1. 0 图像分析软件进行半定量分析, 每张切片随机选取 3 个互不重叠的高倍视野, 测定 MPO 阳性区域的平均光密度值。

1. 6 统计学方法

采用 SPSS 24. 0 统计软件进行处理, 计量资料均符合正态分布, 以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 方差齐的数据采用单因素方差分析, 多组间比较采用 SNK-*q* 法, 方差不齐者采用 Dunnett's *T*₃ 检验法。 *P*<0. 05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2. 1 疗效观察结果

2. 1. 1 各组大鼠肺功能指标比较 表 1 示, 与对照 1 组相比, 模型 1 组大鼠 FVC、FEV_{0.3}、FEV_{0.3}/FVC 肺功能参数均显著降低 (*P*<0. 05); 与模型 1 组相比, 子午电针 1 组与常规电针组大鼠的肺功能参数 FVC、FEV_{0.3}、FEV_{0.3}/FVC 显著升高 (*P*<0. 05); 与常规电针组相比, 子午电针 1 组大鼠的 FEV_{0.3} 及 FEV_{0.3}/FVC 显著提升 (*P*<0. 05)。

2. 1. 2 各组大鼠血浆 IL-1β、TNF-α 水平比较 表 2 示, 与对照 1 组比较, 模型 1 组大鼠血浆 IL-1β、TNF-α 含量显著升高 (*P*<0. 05); 与模型 1 组比

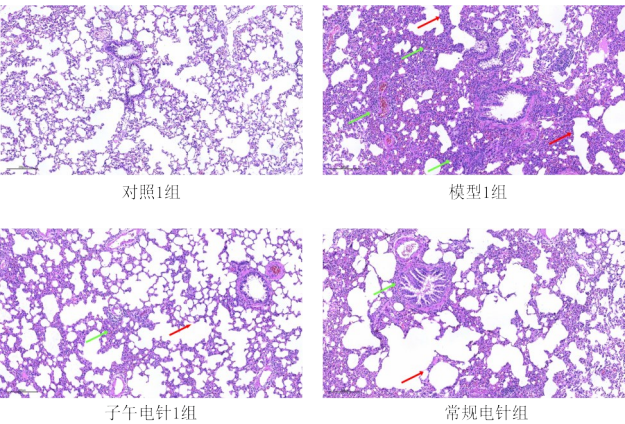
较, 子午电针 1 组和常规电针组血浆 IL-1β、TNF-α 含量降低 (*P*<0. 05); 与常规电针组比较, 子午电针 1 组血浆 IL-1β、TNF-α 含量进一步降低 (*P*<0. 05)。

表 2 各组大鼠血浆 IL-1β、TNF-α 水平比较
Table 2 Comparison of plasma IL-1β and TNF-α levels in rats across groups (pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	IL-1β	TNF-α
对照 1 组	6	33. 060±0. 260	155. 034±4. 940
模型 1 组	6	64. 813±0. 958 ^{a)}	238. 127±0. 623 ^{a)}
子午电针 1 组	6	35. 142±1. 130 ^{b) c)}	173. 583±1. 710 ^{b) c)}
常规电针组	6	41. 086±0. 385 ^{b)}	191. 082±0. 657 ^{b)}

注: IL-1β, 白细胞介素-1β; TNF-α, 肿瘤坏死因子-α。
a) 与对照 1 组比较, *P*<0. 05; b) 与模型 1 组比较, *P*<0. 05; c) 与常规电针组比较, *P*<0. 05。

2. 1. 3 各组大鼠肺组织病理变化 HE 染色 (图 1) 显示, 对照 1 组大鼠肺泡形态无明显异常改变, 肺泡壁无增厚、融合, 组织间隙无炎症反应; 模型 1 组大鼠肺泡壁增厚, 大部分支气管和血管附近炎性细胞浸润显著; 与模型 1 组比较, 子午电针 1 组与常规电针组大鼠肺组织肺泡轻度扩张, 肺组织炎性浸润均有所减轻, 其中子午电针 1 组的改善效果



注: 绿色箭头示炎症细胞浸润; 红色箭头示肺泡壁异常。
图 1 各组大鼠肺组织病理形态比较 (HE 染色, ×200)
Figure 1 Comparison of pathological morphology of lung tissues in rats of each group (HE staining, ×200)

表 1 各组大鼠肺功能指标比较
Table 1 Comparison of lung function indicators among groups of rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	FEV _{0.3} /ml	FVC/ml	FEV _{0.3} /FVC/%
对照 1 组	6	7. 961±0. 343	8. 759±0. 324	90. 933±3. 374
模型 1 组	6	3. 283±0. 234 ^{a)}	6. 298±0. 307 ^{a)}	52. 178±3. 749 ^{a)}
子午电针 1 组	6	5. 569±0. 167 ^{b) c)}	7. 617±0. 294 ^{b)}	73. 148±1. 492 ^{b) c)}
常规电针组	6	4. 826±0. 166 ^{b)}	7. 701±0. 262 ^{b)}	62. 697±2. 115 ^{b)}

注: FEV_{0.3}, 第 0. 3 秒用力呼气容积; FVC, 用力呼气肺活量; FEV_{0.3}/FVC, 第 0. 3 秒用力呼气容积占用力呼气肺活量百分率。
a) 与对照 1 组比较, *P*<0. 05; b) 与模型 1 组比较, *P*<0. 05; c) 与常规电针组比较, *P*<0. 05。

更明显。表 3 示, 与对照 1 组比较, 模型 1 组大鼠肺组织支气管和血管周围炎症评分及肺泡炎症评分均升高 ($P<0.05$); 与模型 1 组比较, 子午电针 1 组与常规电针组大鼠肺组织支气管和血管周围炎症评分及肺泡炎症评分均降低 ($P<0.05$), 且子午电针 1 组较常规电针组降低更显著 ($P<0.05$)。

表 3 各组大鼠肺组织病理评分比较

Table 3 Comparison of pathological scores of lung tissues in each group (分, $\bar{x}\pm s$)			
组别	鼠数	支气管和血管周围炎症评分	肺泡炎症评分
对照 1 组	6	0.167 $\pm$ 0.408	0.333 $\pm$ 0.516
模型 1 组	6	2.833 $\pm$ 0.408 ^{a)}	3.833 $\pm$ 0.408 ^{a)}
子午电针 1 组	6	1.833 $\pm$ 0.753 ^{b)}	2.333 $\pm$ 0.516 ^{b)}
常规电针组	6	2.000 $\pm$ 0.632 ^{b)}	2.500 $\pm$ 0.548 ^{b)}

注: a) 与对照 1 组比较, $P<0.05$; b) 与模型 1 组比较, $P<0.05$ 。

2.1.4 各组大鼠肺组织 ROS 水平及 MPO、CitH3 平均荧光强度比较 表 4 示, 与对照 1 组相比较, 模型 1 组大鼠肺组织 ROS 水平及 MPO、CitH3 平均荧光强度显著增高 ($P<0.05$); 与模型 1 组比较, 常规电针组和子午电针 1 组 ROS 水平及 MPO、CitH3 平均荧光强度均显著降低 ($P<0.05$)。与常规电针组比较, 子午电针 1 组 MPO、CitH3 平均荧光强度下降 ($P<0.01$)。各组大鼠肺组织 MPO、CitH3 免疫荧光图见附图 1 (请扫描本文二维码获取)。

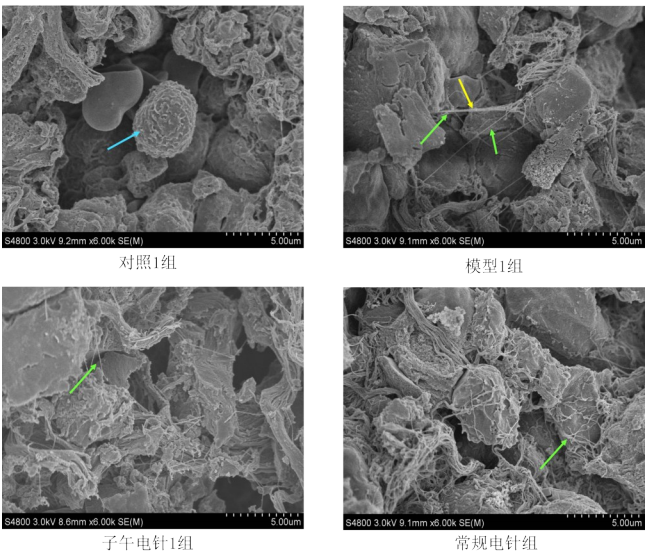
2.1.5 各组大鼠肺组织中中性粒细胞 NETs 结构比较 图 2 示, 对照 1 组可见正常中性粒细胞 (蓝色箭头), 细胞形态完整。模型 1 组观察到典型 NETs 样结构 (绿色箭头), 呈现为三维纤维网状架构, 纤维网络表面可见少量颗粒状物质 (黄色箭头)。常规电针组和子午电针 1 组与模型 1 组相比, 其 NETs 样结构均显著减少, 偶见少量纤维样物质, 且子午电针 1 组的 NETs 样结构更少。

表 4 各组大鼠肺组织 ROS 水平及 MPO、CitH3 平均荧光强度比较

Table 4 Comparison of pulmonary ROS content and mean fluorescence intensity of MPO and CitH3 in lung tissues of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)				
组别	鼠数	ROS 水平	MPO 平均荧光强度	CitH3 平均荧光强度
对照 1 组	3	2631.667 $\pm$ 520.581	0.217 $\pm$ 0.032	0.213 $\pm$ 0.034
模型 1 组	3	8700.000 $\pm$ 1020.331 ^{a)}	0.642 $\pm$ 0.042 ^{a)}	0.620 $\pm$ 0.023 ^{a)}
子午电针 1 组	3	4547.000 $\pm$ 222.169 ^{b) c)}	0.322 $\pm$ 0.020 ^{b) c)}	0.318 $\pm$ 0.022 ^{b) c)}
常规电针组	3	5195.000 $\pm$ 134.570 ^{b)}	0.420 $\pm$ 0.007 ^{b)}	0.419 $\pm$ 0.305 ^{b)}

注: ROS, 活性氧; MPO, 髓过氧化物酶; CitH3, 瓜氨酸化组蛋白 H3。

a) 与对照 1 组比较, $P<0.05$; b) 与模型 1 组比较, $P<0.05$; c) 与常规电针组比较, $P<0.01$ 。



注: NETs, 中性粒细胞胞外诱捕网; 蓝色箭头指示为正常中性粒细胞形态; 绿色箭头指示为典型 NETs 样超微结构; 黄色箭头指示为颗粒状物质。

图 2 各组大鼠肺组织中 NETs 结构 ($\times 6000$)

Figure 2 Structure of NETs in rat lung tissue ($\times 6000$)

2.1.6 各组大鼠肺组织 BMAL1、MPO、NE、CitH3 蛋白相对表达量比较 表 5 示, 与对照 1 组相比, 模型 1 组大鼠肺组织 BMAL1 蛋白相对表达量降低, MPO、NE、CitH3 蛋白相对表达量显著升高 ($P<0.05$); 与模型 1 组比较, 子午电针 1 组和常规电针组大鼠肺组织 BMAL1 蛋白相对表达量升高, MPO、NE、CitH3 蛋白相对表达量降低 ($P<0.05$); 与常规电针组比较, 子午电针 1 组大鼠肺组织 BMAL1 蛋白相对表达量升高, MPO、NE、CitH3 蛋白相对表达量降低 ($P<0.05$)。各组大鼠肺组织 BMAL1、MPO、NE、CitH3 蛋白印迹图见图 3。

2.2 机制验证结果

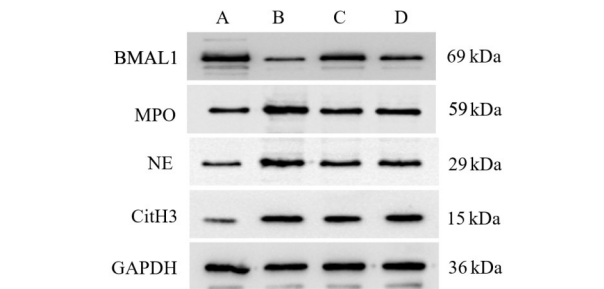
2.2.1 各组大鼠肺组织 MPO 含量比较 表 6 示, 与对照 2 组比较, 模型 2 组和过表达空载组 MPO 平均光密度值升高 ($P<0.05$); 与模型 2 组比较, 子

表5 各组大鼠肺组织BMAL1、MPO、NE、CitH3蛋白相对表达量比较

Table 5 Comparison of the relative expression levels of BMAL1, MPO, NE and CitH3 in lung tissues of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)					
组别	鼠数	BMAL1	MPO	NE	CitH3
对照1组	3	0.760±0.056	0.562±0.107	0.259±0.109	0.395±0.029
模型1组	3	0.311±0.039 ^{a)}	1.286±0.035 ^{a)}	1.320±0.098 ^{a)}	1.092±0.041 ^{a)}
子午电针1组	3	0.551±0.029 ^{b)} ^{c)}	0.858±0.097 ^{b)} ^{c)}	0.851±0.064 ^{b)} ^{c)}	0.639±0.033 ^{b)} ^{c)}
常规电针组	3	0.426±0.334 ^{b)}	1.061±0.084 ^{b)}	1.099±0.094 ^{b)}	0.927±0.031 ^{b)}

注：BMAL1，脑和肌肉芳香烃受体核转样蛋白1基因蛋白；MPO，髓过氧化物酶；NE，中性粒细胞弹性蛋白酶；CitH3，瓜氨酸化组蛋白H3。

a) 与对照1组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型1组比较， $P<0.05$ ；c) 与常规电针组比较， $P<0.05$ 。



注：A，对照1组；B，模型1组；C，子午电针1组；D，常规电针组；BMAL1，脑和肌肉芳香烃受体核转样蛋白1基因蛋白；MPO，髓过氧化物酶；NE，中性粒细胞弹性蛋白酶；CitH3，瓜氨酸化组蛋白H3；GAPDH，甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

图3 各组大鼠肺组织BMAL1、MPO、NE、CitH3蛋白电泳图

Figure 3 Electrophoresis images of BMAL1, MPO, NE, and CitH3 proteins in the lung tissues of rats in each group

午电针2组、过表达组及过表达子午电针组MPO平均光密度值均显著降低 ($P<0.05$)，且过表达子午电针组MPO平均光密度值显著低于子午电针2组 ($P<0.05$)。各组大鼠肺组织MPO免疫组化染色图见附图2 (请扫描本文二维码获取)。

2.2.2 各组大鼠肺组织MPO、NE、CitH3蛋白水平比较 表7示，与对照2组比较，模型2组和过表达空载组MPO、NE、CitH3蛋白水平均升高 ($P<0.05$)。与模型2组比较，子午电针2组、过表达组和过表达子午电针组MPO、NE、CitH3蛋白水平显著降低 ($P<0.05$)。与子午电针2组比较，过表达组MPO水平升高，而过表达子午电针组MPO、

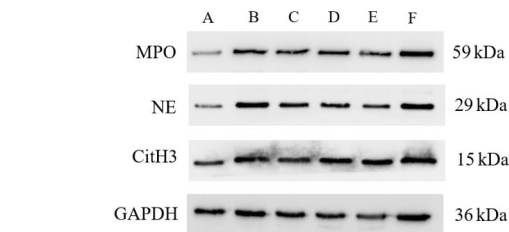
表6 各组大鼠肺组织MPO免疫组化检测结果比较

Table 6 Comparison of MPO immunohistochemical detection results in lung tissues of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)		
组别	鼠数	MPO 平均光密度值
对照2组	3	0.146±0.027
模型2组	3	0.502±0.164 ^{a)}
过表达空载组	3	0.506±0.281 ^{a)}
子午电针2组	3	0.363±0.033 ^{b)}
过表达组	3	0.398±0.017 ^{b)}
过表达子午电针组	3	0.246±0.034 ^{b)} ^{c)}

注：MPO，髓过氧化物酶。

a) 与对照2组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型2组比较， $P<0.05$ ；c) 与子午电针2组比较， $P<0.05$ 。

NE、CitH3蛋白水平显著降低 ($P<0.05$)。各组小鼠肺组织MPO、NE、CitH3蛋白印迹见图4。



注：A，对照2组；B，模型2组；C，子午电针2组；D，过表达组；E，过表达子午电针组；F，过表达空载组；MPO，髓过氧化物酶；NE，中性粒细胞弹性蛋白酶；CitH3，瓜氨酸化组蛋白H3；GAPDH，甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

图4 各组大鼠肺组织MPO、NE、CitH3蛋白印迹图

Figure 4 Western Blot images of MPO, NE and CitH3 proteins in lung tissues of rats from each group

表7 各组大鼠肺组织内MPO、NE、CitH3蛋白水平验证结果比较

Table 7 Comparison of validation results for MPO, NE, and CitH3 protein levels in the lung tissues of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)				
组别	鼠数	MPO	NE	CitH3
对照2组	3	0.466±0.034	0.229±0.020	0.447±0.015
模型2组	3	0.976±0.038 ^{a)}	1.093±0.027 ^{a)}	1.196±0.054 ^{a)}
过表达空载组	3	0.958±0.016 ^{a)}	1.082±0.039 ^{a)}	1.195±0.025 ^{a)}
子午电针2组	3	0.832±0.018 ^{b)}	0.785±0.031 ^{b)}	0.972±0.016 ^{b)}
过表达组	3	0.860±0.013 ^{b)} ^{c)}	0.923±0.011 ^{b)}	0.839±0.048 ^{b)}
过表达子午电针组	3	0.688±0.016 ^{b)} ^{c)}	0.595±0.021 ^{b)} ^{c)}	0.639±0.028 ^{b)} ^{c)}

注：MPO，髓过氧化物酶；NE，中性粒细胞弹性蛋白酶；CitH3，瓜氨酸化组蛋白H3。

a) 与对照2组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型2组比较， $P<0.05$ ；c) 与子午电针2组比较， $P<0.05$ 。

3 讨论

COPD 可归属于中医学“咳嗽”“喘病”“肺胀”范畴,属本虚标实之证,其中本虚以“肺气虚”贯穿疾病始终,标实则痰瘀互结为主^[18-19]。长期气道和肺实质炎症是 COPD 典型病理特征^[20]。COPD 患者在清晨时分常经历咳嗽、咳痰和呼吸困难等症状的加剧^[21],提示生物钟紊乱可能是构成疾病进展的重要环节。根据子午流注纳子法,寅时(3:00—5:00)为肺经气血流注旺盛时段,卯时则转注于相表里之大肠经,形成寅卯时段“肺气当令”的生理特性。实证当遵循“气之来迎而夺之”,用针刺泻法;虚证当遵循“气之去时随而济之”,用针刺补法^[22]。COPD 肺气虚证“虚则补其母”,宜于卯时针刺太渊穴(肺经的输穴、原穴)^[23],并配肺俞(背俞穴)、足三里,俞原配穴、培土生金,更利于调补肺之气血。既往研究显示^[24],肺俞、足三里、太渊是治疗 COPD 常用腧穴,对于肺气虚证 COPD 治疗有着良好效果。本研究结果显示, COPD 模型大鼠肺功能出现损伤, FVC、FEV_{0.3}、FEV_{0.3}/FVC 肺功能参数均显著降低,肺组织 HE 染色显示肺泡壁增厚、肺泡腔扩张融合,支气管及血管周围大量炎性细胞浸润,血清炎症因子升高,而扫描电镜进一步观察到肺组织内典型的 NETs 三维纤维网状结构,更提示了 NETs 过度形成参与了 COPD 肺组织炎性损伤和肺结构的破坏。而子午流注纳子法电针与常规电针治疗均对改善 COPD 模型大鼠肺功能、炎症有一定的疗效。同时,子午流注纳子法组在减轻肺组织病理损伤,下调 IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子水平方面展现了更有优势的治疗效果,提示重视 COPD 的节律变化,采取子午流注纳子法电针能显著提高疗效。

研究^[25]显示,在编码的 646 个肺部已知功能基因中, *Bmal1* 不仅在中枢神经系统呈现节律性表达,在肺脏组织中也表现出显著的昼夜波动特征。COPD 患者长期的咳、痰、喘等症状干扰日常休息与睡眠,导致生物钟紊乱,进而引起肺部 *Bmal1* 基因表达降低^[26];而降低的 *Bmal1* 表达又会通过加剧昼夜节律失调,引发炎症失控和组织损伤的恶性循环,推动疾病进展^[27-28]。*Bmal1* 作为核心生物钟基因,与免疫功能紊乱和炎症反应的加剧有着直接的联系^[29]。研究表明, *Bmal1* 可通过多种途径调控 ROS 代谢影响 NETs 的过度释放, *Bmal1* 表达的增高可显著抑制 ROS 释放^[30];而 *Bmal1* 沉默后,构

成抗氧化应激的正反馈环路遭到破坏, ROS 积累,进而导致中性粒细胞在肺部过度活化并释放大量的 NETs^[31]。在 COPD 长期肺部慢性炎症环境下, NETs 长期的过度积累会造成肺损伤,转而成为推动疾病进展的核心病理因素^[32-33]。临床研究表明,游离 DNA、MPO、NE、CitH3 等 NETs 关键成分在 COPD 患者痰液及血浆中高水平表达,其活性与肺中性粒细胞浸润数量呈正相关,并与 COPD 患者的气流受限严重程度及病情严重程度密切相关^[34]。本研究结果发现,与对照 1 组相比,模型 1 组大鼠肺组织中 BMAL1 蛋白水平显著下调, NETs 标志物 MPO、NE、CitH3 及上游触发因子 ROS 均显著升高,提示 COPD 状态下可能存在生物钟紊乱 $\rightarrow$ 氧化应激 $\rightarrow$ NETs 过度形成的级联反应。而常规电针和子午流注纳子法电针干预均可显著降低 NETs 标志物表达,升高 BMAL1 蛋白水平,且以子午流注纳子法电针效果更优。在机制验证中也发现,过表达组和子午电针 2 组、过表达子午电针组也同样具有降低 NETs 标志物水平作用,且以过表达子午电针组效果更好。

综上所述,子午流注纳子法电针能上调肺组织 BMAL1 蛋白表达、减少 ROS 积累并抑制 NETs 形成,从而降低炎症反应、减轻肺组织病理损伤,效果优于常规电针,体现了“因时制宜”理论在 COPD 治疗中的良好效果。然而,本研究尚存在一定局限:首先,电针干预周期为 14 天,仅能反映子午流注理论在 COPD 治疗中的短期效应,后续还应结合远期临床疗效观察及多时辰对比研究;其次,生物钟调控具有多层次性, *Bmal1* 是否介导其他相关生物钟基因值得进一步研究,以期子午流注纳子法的临床运用提供更多可借鉴的依据。

参考文献

- [1] 丁琳琳,张小娜,熊振芳,等. 子午流注理论下探讨昼夜节律紊乱与代谢功能的关系[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(10): 2470-2471.
- [2] 赵彩娇,范郁山. 子午流注纳子法经脉配地支的理论基础浅析[J]. 针灸临床杂志, 2007, 23(3): 3-4.
- [3] 张树剑. “子午流注”针法理论思想探析:兼论金元针灸理论之固化[J]. 针刺研究, 2015, 40(2): 161-165.
- [4] 杨爽,刘秉忠. 运用子午流注理论论治肺系疾病举隅[J]. 光明中医, 2021, 36(22): 3860-3862.
- [5] Venkatesan P. GOLD COPD report: 2026 update [J]. Lancet Respir Med, 2025, 26: S2213-2600(25)00432-1. DOI: 10.1016/S2213-2600(25)00432-1.

- [6]方程钰. 中医治疗肺气虚型慢性阻塞性肺疾病的研究进展[J]. 河北中医, 2025, 47(10): 1743-1746, 1750.
- [7]Sundar I K, Yao H, Sellix M T, et al. Circadian clock-coupled lung cellular and molecular functions in chronic airway diseases[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2015, 52(3): 285-290.
- [8]唐颖丽, 谢珊, 余清萍, 等. 子午流注法治疗慢性阻塞性肺疾病加重期痰浊阻肺证疗效研究[J]. 陕西中医, 2020, 41(9): 1311-1314, 1341.
- [9]Gaspar L S, Hesse J, Yalçın M, et al. Long-term continuous positive airway pressure treatment ameliorates biological clock disruptions in obstructive sleep apnea [J]. *EBioMedicine*, 2021, 65(6): 103248.
- [10]Zhang Z, Niu R, Zhao L, et al. Mechanisms of neutrophil extracellular trap formation and regulation in cancers [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(12): 10265.
- [11]Grabcanovic-Musija F, Obermayer A, Stoiber W, et al. Neutrophil extracellular trap (NET) formation characterizes stable and exacerbated COPD and correlates with airflow limitation[J]. *Respir Res*, 2015, 16(1): 1-12.
- [12]卞宏生. 昼夜节律对大鼠的睡眠模式和能量代谢的影响及褪黑素的干预作用研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2015.
- [13]李泽庚, 彭波, 张杰根, 等. 肺气虚证模型大鼠的建立[J]. 北京中医, 2005, 24(1): 53-55.
- [14]顾延会, 欧阳瑶. 烟熏联合脂多糖制备大鼠慢性阻塞性肺疾病动物模型[J]. 重庆医学, 2012, 41(13): 1295-1296.
- [15]Xu X, Yu T, Dong L, et al. Eosinophils promote pulmonary matrix destruction and emphysema via Cathepsin L [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 390.
- [16]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.
- [17]Ridzuan N, Zakaria N, Widera D, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles ameliorate airway inflammation in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 54.
- [18]中华中医药学会内科分会肺系病专业委员会. 慢性阻塞性肺疾病中医诊疗指南(2011 版)[J]. 中医杂志, 2012, 53(1): 80-84.
- [19]丁健, 陶慧, 程刚, 等. 韩明向分期分证治疗慢性阻塞性肺疾病经验[J]. 中医杂志, 2025, 66(8): 780-785.
- [20]吕明圣, 张沂, 张迪, 等. 中医药多靶点干预慢性阻塞性肺疾病机制研究概述[J]. 中医杂志, 2019, 60(19): 1697-1700.
- [21]Sundar I K, Yao H, Sellix M T, et al. Circadian molecular clock in lung pathophysiology[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 309(10): 1056-1075.
- [22]朱丹丹, 朱勇, 朱洁, 等. 中医因时制宜特色疗法在慢性阻塞性肺疾病中的应用探析[J]. 贵州中医药大学学报, 2024, 46(3): 1-7.
- [23]刘楠楠. 《针灸聚英发挥》的文献研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2021: 20-21.
- [24]张朝阳, 杨元祯, 骆雨, 等. 基于数据挖掘分析针药结合治疗慢性阻塞性肺疾病临床优势及选穴规律[J]. 针刺研究, 2025, 50(2): 232-242.
- [25]刘艳琴, 梁繁荣, 任玉兰, 等. 基于数据挖掘技术探讨针灸治疗慢性阻塞性肺疾病的经穴使用特点和规律[J]. 上海中医药杂志, 2018, 52(12): 18-22, 25.
- [26]Bando H, Nishio T, van der Horst G T, et al. Vagal regulation of respiratory clocks in mice [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(16): 4359-4365.
- [27]Yao H, Sundar I K, Huang Y, et al. Disruption of sir-tuin 1-mediated control of circadian molecular clock and inflammation in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2015, 53(6): 782-792.
- [28]Li L, Zhang M, Zhao C, et al. Circadian clock gene Clock-*Bmal1* regulates cellular senescence in Chronic obstructive pulmonary disease [J]. *BMC Pulm Med*, 2022, 22(1): 435.
- [29]李铮, 华玮, 居培红, 等. 生物钟基因 *Bmal1*、*Per2* 在 AECOPD 患者外周血单个核细胞中的表达及临床意义[J]. 江苏医药, 2021, 47(8): 815-818.
- [30]Zhu M, Tang H, Tang X, et al. *Bmal1* suppresses ROS-induced endothelial-to-mesenchymal transition and atherosclerosis plaque progression via BMP signaling [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(10): 3150-3161.
- [31]Vázquez-Reyes S, García-Culebras A, Di G, et al. Circadian control of neutrophils drives collateral perfusion and stroke outcome[J]. *Circ Res*, 2026, 138(2): e326438.
- [32]Zhang Z, Zhang C, Luo R, et al. Neutrophil-mimetic nanoscavengers target the inflammatory microenvironment to eliminate NETs/ROS and immunomodulate cGAS-STING signaling in septic AKI [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2026, 13(23): e21861.
- [33]Chen J, Wang T, Li X, et al. DNA of neutrophil extracellular traps promote NF- κ B-dependent autoimmunity via cGAS/TLR9 in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 163.
- [34]Katsoulis O, Toussaint M, Jackson M M, et al. Neutrophil extracellular traps promote immunopathogenesis of virus-induced COPD exacerbations [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 5766.

Effects of Electro-Acupuncture Based on the Midnight-Noon Ebb-Low Method with Hour-Prescription on BMAL1 Protein and NETs Markers in Lung Tissue of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Model Rats with Lung-*Qi* Deficiency Syndrome

JIAO-LI Changtian¹, SHIO Nise Pantaleo¹, CAI Lianqing¹, JIANG Qingyao¹, TANG Siyu¹, WAN Qianqian¹, WAN Mengchen¹, YE Yuqi¹, ZHU Jie^{1,2}

1. School of Integrative Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, 230012; 2. Key Laboratory of Ministry of Education in Xin'an Medicine, Anhui University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the potential mechanism underlying electroacupuncture therapy with the midnight-noon ebb-low method with hour-prescription for chronic obstructive pulmonary disease (COPD) with lung-*qi* deficiency syndrome from the perspective of brain and muscle basic helix-loop-helix ARNT-like 1 (BMAL1) as well as neutrophil extracellular traps (NETs). **Methods** The experiment was conducted in two phases. For the therapeutic effectiveness observation, 24 rats were randomly allocated into control group 1, model group 1, midnight-noon electro-acupuncture group 1 and conventional electro-acupuncture group, with 6 rats per group. Rat models of COPD with lung-*qi* deficiency syndrome were established via cigarette smoke exposure combined with intratracheal instillation of lipopolysaccharide (LPS). After successful modelling, rats in midnight-noon electro-acupuncture group 1 received electro-acupuncture at acupoints "Taiyuan (LU 9)", "Feishu (BL 13)" and "Zusanli (ST 36)" during 05:00—07:00, 30 minutes per treatment once every other day for 14 consecutive days (7 sessions in total). Rats in the conventional electro-acupuncture group received identical electroacupuncture manipulation at random daytime hours (08:00—18:00). Pulmonary function parameters including forced expiratory volume in 0.3 second ($FEV_{0.3}$), forced vital capacity (FVC) and $FEV_{0.3}/FVC$ ratio were detected. Pulmonary histopathological changes were observed via hematoxylin-eosin (HE) staining. Plasma levels of pro-inflammatory factors interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), as well as pulmonary reactive oxygen species (ROS) content, BMAL1 protein expression and the levels of neutrophil extracellular traps (NETs) biomarkers such as myeloperoxidase (MPO), neutrophil elastase (NE), and citrullinated histone H3 (CitH3) in lung tissue were determined. For the mechanistic verification phase, 36 rats were divided into control group 2, model group 2, midnight-noon electro-acupuncture group 2, overexpression empty group, overexpression BMAL1 group and overexpression with midnight-noon electro-acupuncture group, with 6 rats in each group. At the 5th week of model construction, rats in the overexpression BMAL1 group and overexpression with midnight-noon electro-acupuncture group received intratracheal instillation of 100 μ l adenoviral suspension carrying overexpressed *Bmal1* gene. Rats in the overexpression empty group were injected with an equal titer and equal volume of blank adenovirus without the *Bmal1* coding sequence into the lung at the identical time point. Midnight-noon electro-acupuncture group 2 and overexpression with midnight-noon electro-acupuncture group were consistent with the aforementioned protocol. Finally, pulmonary levels of MPO, NE and CitH3 were measured in all groups.

Results Compared with the control group 1, the model group 1 exhibited decreased $FEV_{0.3}$, FVC and $FEV_{0.3}/FVC$ ratio, elevated plasma IL-1 β , TNF- α and pulmonary ROS levels, downregulated lung BMAL1 protein expression, and increased contents of MPO, NE and CitH3 (all $P < 0.05$); typical NETs-like structures with sparse granular substances attached to fibrous networks were observed under scanning electron microscopy; HE staining revealed damaged alveolar architecture accompanied by inflammatory cell infiltration. Compared with model group 1, both the midnight-noon electro-acupuncture group 1 and conventional electro-acupuncture group achieved obvious improvements in all above indicators, with superior therapeutic effects in midnight-noon electro-acupuncture group 1 ($P < 0.05$). Consistently, midnight-noon electro-acupuncture group 1 showed more prominent alleviation of NETs-like structure formation and lung pathological injury compared to the conventional electro-acupuncture group. Mechanistic validation results demonstrated that compared with model group 2, the average optical density of MPO as well as the protein levels of MPO, NE and CitH3 were markedly reduced in midnight-noon electro-acupuncture group 2, overexpression BMAL1 group and overexpression with midnight-noon electro-acupuncture group ($P < 0.05$); furthermore, these parameters were significantly lower in the overexpression with midnight-noon electro-acupuncture group than in midnight-noon electro-acupuncture group 2 ($P < 0.05$). **Conclusion** Electro-acupuncture based on the midnight-noon ebb-low method with hour-prescription may alleviate pulmonary inflammation in COPD by upregulating the expression of clock protein BMAL1 and inhibiting excessive accumulation of NETs in lung tissue.

Keywords chronic obstructive pulmonary disease; electro-acupuncture; method of midnight-noon ebb-low with hour-prescription; circadian clock gene; neutrophil extracellular traps

(收稿日期: 2025-12-09; 录用日期: 2026-03-18; 修回日期: 2026-04-01)

[编辑: 邓媛]