

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.17.016

文献研究

针刺动物实验中假针刺对照设置的现状分析

余超超, 沈峰, 孔立红*, 王雪松, 姜韬

(湖北中医药大学针灸骨伤学院, 湖北省武汉市武昌区昙华林 188 号, 430061)

摘要 目的 分析国内外针刺动物实验研究中假针刺对照设置的现状及问题, 为优化针刺基础研究实验设计提供参考。方法 检索 2013 年 1 月 1 日至 2018 年 12 月 31 日期间 PubMed、中国生物医学文献数据库 (SinoMed) 中收录的针刺相关基础动物实验研究文献, 对文献中假针刺对照的方式进行归纳总结和分析。结果 共纳入文献 235 篇, 涉及假针刺对照的设置方式主要为非经非穴对照 (125 篇)、假电针真穴常规刺对照 (69 篇)、假电针真穴浅刺对照 (30 篇) 和真穴透皮浅刺对照 (11 篇)。其中, 真穴附近、胁下髂嵴上、尾部为非经非穴对照的主要选取部位。结论 当前针刺动物实验中假针刺对照的设置方式尚无统一、规范的标准。规范化的非经非穴选取方法及其针刺操作标准是针刺实验研究领域亟待解决的问题。

关键词 针刺; 动物实验; 假针刺; 假针刺对照

近年来, 国内外相继开展了一系列大型临床随机对照试验以验证针灸在辅助生殖技术、偏头痛、功能性消化不良、多囊卵巢综合征、慢性女性压力性尿失禁、膝骨性关节炎等中的疗效及安全性, 这些临床试验的结果引起的争议之一是来自于试验设计中“假针刺 (sham acupuncture, shamelectroacupuncture)”或“安慰针刺 (placebo acupuncture)”对照的设置^[1]。有学者曾对国内外针刺临床试验中假针刺的设置方法进行总结, 主要包括非传统中医穴位邻近假穴针刺法、真穴假刺法、假穴浅刺法、非病症相关穴位法、假电针法及假穴假刺法等^[2]。但由于针刺的操作特点, 目前仍无法确定最合适的对照方法。另外, 在针刺机制研究的动物实验中, 假针刺对照设置也存在争议。针刺动物实验中是否需要设置假针刺对照、如何设置的问题尚未达成行业内的共识, 使得针刺效应机制的基础研究成果在国际主流学术界的认可度较低。鉴于此, 本文对针刺动物实验中假针刺对照设置的现状进行归纳总结, 并对其科学性及其可行性进行分析, 以期对改进针刺动物研究方法设计、揭示针刺效应的作用机制提供参考。

1 资料与方法

检索 PubMed 数据库、中国生物医学文献数据库 (SinoMed 数据库) 自 2013 年 1 月 1 日至 2018 年 12 月 31 日收录的针刺相关动物研究文献, 对文献中的假针刺对照设置方式进行分类、归纳。

1.1 检索策略

1) PubMed 数据库: 以 “sham acupuncture” “sham electroacupuncture” “placebo acupuncture” “acupuncture nonacupoint” 为关键词, “publication date” 的限定条件为 “20130101 to 20181231”, “species” 的限定条件为 “other animals”。2) SinoMed 数据库: 以 “假针刺” “假电针” “非经非穴” “非穴” “安慰针刺” 为关键词, 发表日期限定为 “20130101 - 20181231”, “对象” 限定为 “动物”。依据上述检索策略检索出的文献, 根据其标题和摘要进行初筛, 并同时下载获取全文。

1.2 文献纳入标准

1) 针刺相关的基础实验研究, 研究对象为动物; 2) 实验设置假针刺对照组, 且设置方法阐述明确。

1.3 文献排除标准

1) 理论类、综述类、述评类、系统评价和 Meta 分析类文献; 2) 以经皮电刺激电极、激光针

基金项目: 国家自然科学基金 (81373741)

* 通讯作者: xiyu1618@sina.com

灸、艾灸、穴位埋线、穴位注射、穴位贴敷为干预手段的文献。

1.4 数据资料信息提取

文献筛选过程由团队中两位成员独立完成,再进行双方核对。对存在争议的文献,共同讨论、判断其是否纳入。对筛选出的文献根据假针刺对照设置方式进行分类、归纳整理,统计各型假针刺文献的数量,记录各种假针刺的设置方式。

2 结果

本研究共纳入 235 篇文献。通过对假针刺设置方式分类,共归纳总结出 4 种针刺动物实验中假针刺的设置类型。根据文献数量从高到低的顺序排列依次为非经非穴针刺对照 125 篇、假电针真穴常规刺对照 69 篇、假电针真穴浅刺对照 30 篇和真穴透皮浅刺对照 11 篇,见图 1。

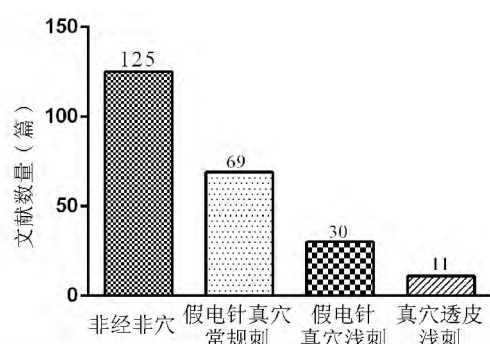


图 1 常见针刺动物实验中假针刺的设置类型

对大鼠、小鼠主要的非经非穴的选取方法进行归纳汇总,见表 1。非经非穴针刺对照是说明针刺经穴的特异性效应的一种常用的假针刺对照方法。但目前尚无关于非经非穴选取方法的统一标准。通过检索、回顾文献分析发现,非经非穴针刺对照有常规针刺和浅刺之分。非经非穴的选择亦有距“真穴”远近之别,有在穴位附近选取,如“取关元、中脘、足三里和丰隆经穴旁 1 ~ 2 mm 处、穴位所在经络线外的 4 个非穴区”^[3]、穴位“旁开 3 mm 处”^[4]、穴位“旁开 5 mm 处”^[5-6];有在两经脉连线的中点定非穴,如“天枢穴与神阙穴连线中点”的非经非穴(“真穴”为列缺、内关)^[7];有在肋下髂嵴上区定非穴,如有“真穴”远端的“肋下髂嵴上 20 ~ 25 mm,后正中线上旁开 20 mm 处”的非经非穴^[8],有“肋下髂嵴上 10 mm 处”的非经非穴^[9-10];有大鼠“臀部外上方”的非经非穴^[11];有在尾根附近选取,如“近躯干端尾根处”的非经非穴^[12]、“尾根上方 2 cm 处”的非经非穴^[13]、“尾尖”的非经非穴^[14]。

表 1 针刺动物实验文献中主要的非经非穴的选取方式

非经非穴选取区	文献数量 (篇)	具体的选取方式
穴位附近	72	穴位旁开 5 mm、3 mm、1 ~ 2 mm 处
肋下区、肋下髂嵴上区	22	肋下髂嵴上 3 mm、10 mm、20 ~ 25 mm 处;肋下处
尾部区	16	近躯干端尾根处、距近躯干端尾根 1 ~ 2 cm、尾尖、尾部中 1/3 段等
髋关节区	6	髋关节处
臀区	4	臀大肌外上方区
其他	5	足背侧第 3、第 4 跖骨间隙凹陷处、耳垂区、两经脉之间

目前,动物实验中假电针对照是电针干预的常见对照设置方式,其取穴等各操作要求均与电针组相同,分假电针真穴浅刺和假电针真穴常规刺两种,都是在针刺入穴位后接上电针仪导线后不通电流^[15-19]。真穴表浅刺的实质即为“穴位浅刺对照”,故假电针真穴浅刺对照与真穴透皮浅刺对照可统称为穴位浅刺对照,其与“真针刺”治疗组选用相同的穴位进行针刺干预,除进针深度表浅外,其余干预措施均与“真针刺”治疗组相同。此“浅刺”方法不一,有“只刺入皮下不及肌肉,不留针”者^[20-21],也有“只刺浅表,留针而不行手法或不通电流”者^[22-23]。

3 讨论

在临床研究设计中,理想的安慰针刺对照应满足以下几点:安慰针刺没有或几乎没有特定疗效;针刺没有治疗效应的部位;受试者不能感知、察觉假针刺与真针刺的差别^[24]。我们认为,将针刺临床试验的安慰针刺对照设置方式套用在针刺动物实验的意义和可行性有待重新思考。

针刺效应包括针刺的特异性效应(真实的治疗效应)和非特异性效应(安慰剂效应)^[25]。影响针刺特异性效应的因素主要包括机体的机能状态、腧穴的特异性、针灸刺激参数和时间因素等^[26]。而影响针刺非特异性效应的因素主要包括“语境治疗效应”即医患互动效应^[27],受试者自身精神心理效应等^[30-31]。从针刺动物实验的实践操作中可知,实验动物对针刺干预的“认知反应”主要体现在恐惧、主动逃避反应、留针期间嘶叫等抵触反应,与临床试验中受试者的主观克服、治疗期望认知并不同。当然,实验动物对于针刺干预的这种应激反应不可避免,虽然此应激状态的机体状态亦一直受到国际主流学术界的质疑,但应激反应本身可能就是针刺效应的组成部分^[32],空白对照

设置的意义亦在于此。而动物实验中真假针刺引起的应激反应的效应及其程度尚难以评估和区分,实验动物的“非经非穴”亦争议不断。因此,另设置不同形式的“假针刺”对照并不能符合和体现临床试验中“安慰对照”的初衷和意义。且不同形式的假针刺的实际操作的借鉴重复性较低,使得真假针刺效应的对比受到质疑。

本研究结果发现,当前针灸动物实验中假针刺对照设置的方式可以归纳为穴位浅刺对照、非经非穴针刺对照及假电针刺对照,每种假针刺对照方法均有一定的局限性。

非经非穴针刺对照,选取距“真穴”远端的非经非穴主要是为了避免其与“真穴”在同一神经节段分布区。首先,大鼠、小鼠“真穴”水平旁开“1~2 mm”“3 mm”或“5 mm”的“非经非穴”的神经、肌肉、血管等组织分布与“真穴”差异不明,“真穴”邻近部位并不能确定其“非经”抑或“非穴”的属性。目前,国内外针灸动物实验的取穴标准多参照中国针灸学会实验针灸学会制定的《常用实验动物穴位定位图谱》^[3],此图谱中小鼠的穴位定位标准尚欠完整。在进行以小鼠为对象的针刺操作时,实验者或参照大鼠穴位定位“测量后折算确定小鼠穴位定位”^[4],或结合解剖相似性依据人体穴位定位标准进行定位^[5]。在进行大鼠、小鼠针刺操作时,因大鼠、小鼠的穴区肌肉、骨骼解剖标志并不明显,这样所取得的穴区本身就存在争议,在此基础上选取邻近“1~2 mm”“3 mm”或“5 mm”的“对照点”作为非经非穴点实欠严谨和稳妥。其次,据经络腧穴理论,皮部和络脉遍布全身,与“真穴”相邻近的部位不能排除经与络之间的相关性。再次,在电针操作标准的描述中,实验者多要求针刺局部“轻度抖动为宜”。研究指出,电针引起的局部肌肉抽动可调控针刺点区域的能量代谢^[6],电针引起的真穴附近“3 mm”或“5 mm”的非经非穴区的肌肉抽动及感觉传导范围与电针真穴区是否会有重叠?因此,此“非经非穴”定取方法的可行性有待商榷。“腋下髂嵴上”区域的“非经非穴”在实践操作时是否能避开足太阳膀胱经、足少阳胆经和足太阴脾经的经脉循行尚无定论。鼠尾部组织结构与经穴结构差异较大,于尾根或尾尖附近处选取“非经非穴”进行假针刺,能较好地避开经脉及经穴,且其操作性、重复性强,但尾部组织结构与“真穴”相比差异较大,穴位的解剖特异性和生物

物理特性是针刺发挥疗效的基础^[6-3]。但是,经穴穴位处从表皮、真皮和皮下组织等各层次中以神经、血管、淋巴管、筋膜、肌肉、肌腱和肥大细胞等已知结构为主,是一个由多种组织构成的立体构筑,具有电学、热学、光学、磁学、同位素迁移等生物物理特性^[6],近年来众多基础研究与临床疗效验证试验已肯定穴位的特异性^[3]。而以针刺尾区“非经非穴点”作为“真针刺”效应的对照,恐有为了“对照”而“对照”之嫌。

穴位浅刺作为一种对照方法,其本身具有一定的治疗效应。《灵枢·官针》曰“毛刺者,刺浮痹皮肤也”,“半刺者,浅内针而疾发,无针伤肉,如拔毛状,以取皮气……”,《针灸甲乙经》中也记载数十穴位有“刺入一分”“刺入2分”的刺法要求,“病有在毫毛腠理者,有在皮肤者……刺毫毛腠理无伤皮……刺皮无伤肉……”。可知,浅刺本身就是一种刺法。另外,我们在对大鼠、小鼠进行备皮后针刺时发现,大鼠、小鼠的头部、四肢部表皮及肌肉浅薄,项背区表皮粗糙质韧。仅针刺浅表1~2 mm导致大鼠、小鼠疼痛应激反应强烈,实际操作可控性不强。另外,“只刺浅表,不及肌肉”的针刺操作使得针灸针处于垂挂欲坠状态,留针期间大鼠、小鼠的扭体、挣扎逃避反应易致针灸针脱落,需反复再行针刺,从而反复引起大鼠、小鼠的逃避应激反应,影响实验结果。故把浅刺作为没有疗效的针刺对照,其可行性和严谨性有待重新思考。

针灸基础研究中多以电针而非普通针刺为干预手段,可能是出于手针操作难以达到基础研究中“统一、定量、均质性干预”的原因,通过设置电针刺激参数以控制、量化针刺刺激量以避免之,保证实验干预的均质性。故真穴常规刺不接电的对照方式实际仅突出、强调普通针刺和电针刺的差异,此对照设置方法可能更适用于比较电针和普通针刺效应差异的研究,相关临床研究和实验研究亦提示电针效应与普通针刺效应不同^[6]。若以此作为“假的针刺效应”与“真针刺”电针干预进行对照,并不能体现其对照意义。

4 结语

我们通过归纳分析近6年针刺基础研究中假针刺对照的设置类型,对其局限性和存在的问题进行了讨论,认为在研究针刺疗效和疗效机制的基础研究中引入假针刺对照设置的必要性和合理性有待重

新思考。然而,在研究经穴特异性的基础研究中,从实验设计的严谨性出发,非经非穴针刺方式的对照是重要的对照设置方法,但是关于非经非穴的界定及其针刺操作要求目前尚无统一、规范的标准。在借鉴西医学基础研究方法时应结合针灸学的学科特点,根据针刺动物实验中实际操作的特点和局限性,合理、科学地设计实验研究方法,以提高针刺基础研究的质量。

参考文献

- [1] 王永洲. 对临床研究中真假针灸的质疑及反思 [J]. 中国针灸, 2012, 32(8): 731-735.
- [2] 黄梅芳, 俞昌德. 介绍国外针灸临床研究中几种安慰对照方法 [J]. 中国针灸, 2003, 23(10): 25-27.
- [3] 李强, 徐芬, 梁凤霞, 等. “标本配穴”电针对胰岛素抵抗大鼠股四头肌线粒体超微结构和生物合成功能的影响 [J]. 中国针灸, 2014, 34(6): 578-582.
- [4] YANG J, WU D, TANG Y, et al. Photoacoustic microscopy of electronic acupuncture (EA) effect in small animals [J]. J Biophotonics, 2017, 10(2): 217-223.
- [5] LAI X, REN J, LU Y, et al. Effects of acupuncture at HT7 on glucose metabolism in a rat model of Alzheimer's disease: an 18F-FDG-PET study [J]. Acupunct Med, 2016, 34(3): 215-222.
- [6] LIU H, SHEN X, TANG H, et al. Using microPET imaging in quantitative verification of the acupuncture effect in ischemia stroke treatment [J]. Sci Rep, 2013, 3: 1070. doi: 10.1038/srep01070.
- [7] 成泽东, 陈以国, 李晓梅, 等. 电针“内关”穴对急性心肌缺血小鼠心肌组织氯离子通道蛋白表达的影响 [J]. 针刺研究, 2016, 41(5): 423-428.
- [8] 范怀玲, 纪峰, 林莺, 等. 电针“关元”穴对绝经后骨质疏松症大鼠 Wnt 信号通路的影响 [J]. 针刺研究, 2015, 40(2): 87-93.
- [9] LIU W, WU J, HUANG J, et al. Electroacupuncture Regulates Hippocampal Synaptic Plasticity via miR-134-Mediated LIMK1 Function in Rats with Ischemic Stroke [J]. Neural Plast, 2017, 2017: 9545646. doi: 10.1155/2017/9545646.
- [10] YE Y, LI H, YANG JW, et al. Acupuncture attenuated vascular dementia-induced hippocampal long-term potentiation impairments via activation of D1/D5 receptors [J]. Stroke, 2017, 48(4): 1044-1051.
- [11] SEO SY, MOON JY, KANG SY, et al. An estradiol-independent BDNF-NPY cascade is involved in the antidepressant effect of mechanical acupuncture instruments in ovariectomized rats [J]. Sci Rep-UK, 2018, 8(1): 5849. doi: 10.1038/s41598-018-23824-2.
- [12] HUANG Y, LU S F, HU C J, et al. Electro-acupuncture at Neiguan pretreatment alters genome-wide gene expressions and protects rat myocardium against ischemia-reperfusion [J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2014, 19(10): 16158-16178.
- [13] ESHKEVARI L, MULRONEY SE, EGAN R, et al. Effects of acupuncture, RU-486 on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in chronically stressed adult male rats [J]. Endocrinology, 2015, 156(10): 3649-3660.
- [14] CAO B, LI R, TIAN H, et al. Effect on glycemia in rats with type 2 diabetes induced by streptozotocin: low-frequency electro-pulse needling stimulated Weiwanxiashu (EX-B 3) and Zusanli (ST 36) [J]. J Tradit Complement Med, 2016, 36(6): 768-778.
- [15] 金滋润, 柳博珩, 蔡捷, 等. 电针治疗大鼠弱精子症的实验研究 [J]. 针刺研究, 2017, 42(2): 114-118.
- [16] 王宏法, 夏洪莲, 秦金玲, 等. 腺苷脱氨酶介导电针百会穴对脑缺血再灌注损伤大鼠脑保护效应的研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(2): 235-239.
- [17] 王颖, 孔立红, 李威, 等. 不同频率电针对阿尔茨海默病大鼠学习记忆能力效应及部分作用机制探讨 [J]. 中国针灸, 2017, 37(6): 629-636.
- [18] GAO F, XIANG HC, LI HP, et al. Electroacupuncture inhibits NLRP3 inflammasome activation through CB2 receptors in inflammatory pain [J]. Brain Behav Immun, 2018, 67: 91-100. doi: 10.1016/j.bbi.2017.08.004.
- [19] QI D, WU S, ZHANG Y, et al. Electroacupuncture analgesia with different frequencies is mediated via different opioid pathways in acute visceral hyperalgesia rats [J]. Life Sci, 2016, 160: 64-71. doi: 10.1016/j.lfs.2016.06.025.
- [20] 虞跃跃, 崔建美, 李双, 等. 针刺对支气管哮喘大鼠肺组织 c-fos 蛋白表达的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(9): 1124-1127.
- [21] 李佳, 刘娇萍. 针刺“神门”穴对睡眠剥夺大鼠脑电波及其认知能力的影响 [J]. 针刺研究, 2017, 42(6): 502-506.
- [22] HAN X, WU H, YIN P, et al. Electroacupuncture restores hippocampal synaptic plasticity via modulation of 5-HT receptors in a rat model of depression [J]. Brain Res Bull, 2018, 139: 256-262. doi: 10.1016/j.brainresbull.2018.03.004.
- [23] 辛娟娟, 高俊虹, 刘军, 等. 电针“内关穴”对原发性高血压大鼠心肌肥厚的影响及其作用机制 [J]. 中医杂志, 2016, 57(16): 1406-1410.
- [24] 付桃芳, 王玲玲, 杜俊英, 等. 电针对骨痛痛-吗啡耐受大鼠蓝斑核 μ 阿片受体表达的干预 [J]. 中国针灸, 2017, 37(5): 513-520.

- [5] 胡海宇, 丁家威, 吴叶琪, 等. 电针对痛觉敏化大鼠背根神经节蛋白酶激活受体 2 的影响 [J]. 针刺研究, 2018, 43(1): 14-19.
- [6] 张宏伟, 唐金陵. 针灸临床试验中安慰针的设计与选用 [J]. 中国中西医结合杂志, 2003, 23(4): 247-250.
- [7] 吕君玲, 李佰承, 冷俊艳, 等. 针刺镇痛与安慰剂效应的关系概述 [J]. 中医杂志, 2015, 56(14): 1257-1260.
- [8] 石广霞, 汪德瑾, 刘存志, 等. 影响针刺效应因素的分析 [J]. 中医杂志, 2009, 50(10): 942-944.
- [9] MILLER FG, KAPTCHUK TJ. The power of context: re-conceptualizing the placebo effect [J]. J R Soc Med, 2008, 101(5): 222-225.
- [10] HROBJARTSSON A. What are the main methodological problems in the estimation of placebo effects? [J]. J Clinical Epidemiol, 2002, 55(5): 430-435.
- [11] KAPTCHUK TJ. Powerful placebo: the dark side of the randomised controlled trial [J]. Lancet, 1998, 351(9117): 1722-1725.
- [12] 成词松, 诸毅晖, 魏琴, 等. 试论针刺与应激 [J]. 中国针灸, 2015, 35(04): 397-399.
- [13] 郭义. 实验针灸学实验指导 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 76-80.
- [14] YUAN XC, ZHU B, JING XH, et al. Electroacupuncture Potentiates Cannabinoid Receptor-Mediated Descending Inhibitory Control in a Mouse Model of Knee Osteoarthritis [J]. Front Mol Neurosci, 2018, 11: 112. doi: 10.3389/fnmol.2018.00112.
- [15] LIANG F, CHEN R, NAKAGAWA A, et al. Low-Frequency Electroacupuncture Improves Insulin Sensitivity in Obese Diabetic Mice through Activation of SIRT1/PGC-1alpha in Skeletal Muscle [J]. Ecam, 2011, 2011: 735297. doi: 10.1155/2011/735297.
- [16] 郭义. 实验针灸学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 40-59.
- [17] 姜劲峰, 徐旺芳, 俞兴根, 等. 基于血管生物学的神阙穴特异性解析 [J]. 中国针灸, 2017, 37(12): 1304-1308.
- [18] XING JJ, ZENG BY, LI J, et al. Acupuncture point specificity [J]. Int Rev Neurobiol, 2013, 111: 49-65. doi: 10.1016/B978-0-12-411545-3.00003-1.
- [19] LIN D, ZHANG J, ZHUANG W, et al. The Effect of Electroacupuncture versus Manual Acupuncture through the Expression of TrkB/NF-kappaB in the Subgranular Zone of the Dentate Gyrus of Telomerase-Deficient Mice [J]. Ecam, 2018, 2018: 1013978. doi: 10.1155/2018/1013978.

Analysis of the Current Situation of Sham Acupuncture Control in Acupuncture Animal Experiment

YU Chaochao, SHEN Feng, KONG Lihong, WANG Xuesong, JIANG Tao

(College of Acupuncture and Orthopedics, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061)

ABSTRACT Objective To analyze the current situation and problems of the control setting of sham acupuncture in experimental research of acupuncture animal at home and abroad, and to provides reference for the optimization of experimental design of acupuncture basic research. **Methods** The literatures on basic animal experiments about acupuncture in PubMed and Chinese Biomedical Literature Database (SinoMed database) from January 1, 2013 to December 31, 2018 were searched, and the methods of sham acupuncture control in the literature were summarized and analyzed. **Results** A total of 235 papers were included. The setting methods related to sham acupuncture control were mainly non-meridian non-acupoint control (125 papers), sham electroacupuncture acupoint normal control (69 papers), and sham electroacupuncture acupoint shallow insertion (30 papers) and acupoint transdermal shallow insertion (11 papers). Among them, the acupoints nearby, below the costal region and posterior superior spine, and the tail were the main selected parts of the non-meridian and non-acupoint. **Conclusion** There is no uniform and standardized method for the setting of sham acupuncture control in acupuncture animal experiments. The standardized non-meridian and non-acupoint selection method and its acupuncture operation standard are urgent problems to be solved in the field of acupuncture experimental research.

Keywords acupuncture; animal study; sham acupuncture; sham acupuncture control

(收稿日期: 2019-03-17; 修回日期: 2019-04-23)

编辑: 金超