

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.10.014

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

苏嘉琪¹, 胡情¹, 楼金成¹, 张少巍¹, 苗鐸允¹, 翟春涛¹, 吕玉娥^{1,2}✉

1. 山西中医药大学, 山西省晋中市榆次区乌金山镇大学街 121 号, 030619; 2. 山西省针灸医院



[摘要] **目的** 探讨针刺对穴“后溪-环跳”治疗腰椎间盘突出症的可能作用机制。**方法** 32 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、普通针刺组、对穴组, 每组 8 只。除假手术组外, 其余各组采用大鼠自体髓核移植法建立腰椎间盘突出症模型。于造模 3 天后对普通针刺组大鼠进行针刺干预, 选穴“肾俞”“大肠俞”“委中”; 对穴组针刺“后溪”“环跳”, 毫针刺入 1~2 mm, 每 10 min 行针 1 次, 平补平泻, 留针 30 min。假手术组与模型组于相同时间内每日绑缚 30 min, 各组均干预 14 天。分别于造模前 1 天、造模术后 3 天、干预 14 天使用热痛刺激仪检测大鼠缩爪反应所需时间作为痛阈值; 治疗结束取双侧第五腰椎节段脊神经干行 HE 染色观察病理形态改变; 采用酶联免疫吸附 (ELISA) 法测定血清白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 6 (IL-6)、核因子 κ B (NF- κ B) 水平; 采用免疫荧光法检测脊神经干组织中高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1)、晚期糖基化终产物受体 (RAGE) 表达, 采用蛋白免疫印迹 (Western Blot) 法检测脊神经干组织中 HMGB1、RAGE 蛋白表达, 采用实时荧光定量 PCR 法检测脊神经干组织中 HMGB1、RAGE mRNA 表达。**结果** 与造模前 1 天比较, 造模术后 3 天模型组、普通针刺组、对穴组痛阈值均明显降低 ($P<0.05$)。干预 14 天, 与假手术组比较, 模型组痛阈值明显降低 ($P<0.05$), 而普通针刺组、对穴组痛阈值较模型组明显升高 ($P<0.05$)。HE 染色结果显示, 与假手术组比较, 模型组第五腰椎脊神经髓鞘部分消失形成空洞, 出现瓦勒氏变性; 普通针刺组神经纤维部分修复; 对穴组神经纤维排列较整齐, 空泡样改变明显减轻, 提示水肿明显减轻。与假手术组比较, 模型组血清 IL-1 β 、IL-6、NF- κ B 水平升高, 脊神经干组织 HMGB1、RAGE 荧光表达增多, HMGB1、RAGE 蛋白及 mRNA 表达明显升高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 对穴组 HMGB1、RAGE 荧光表达均减少, 血清 IL-1 β 、IL-6、NF- κ B 水平和 RAGE、HMGB1 蛋白及 mRNA 表达均降低 ($P<0.05$), 且与普通针刺组比较, 对穴组降低血清 IL-6 及 HMGB1、RAGE mRNA 表达方面更明显 ($P<0.05$)。**结论** 针刺对穴“后溪-环跳”能够明显改善腰椎间盘突出症模型大鼠脊神经干组织空泡样变性及其全身炎症反应, 其机制可能与抑制脊神经干组织 HMGB1/RAGE 通路有关。

[关键词] 腰椎间盘突出症; 后溪; 环跳; 高迁移率族蛋白 B1; 晚期糖基化终产物受体; 炎症因子; 痛阈

腰椎间盘突出症 (lumbar disc herniation, LDH) 是一种由腰椎间盘的退行性改变引起的疾病, 临床表现以腰痛、下肢麻木及坐骨神经痛为主, 严重者甚至出现下肢活动障碍。近年来, LDH 的发病率

在我国逐年升高, 且被认为是导致腰痛的主要原因^[1]。其发病主要为长期的压迫导致椎间盘膨出、破裂并释放自身免疫物质, 产生的炎症反应进一步刺激神经根引起疼痛^[2]。目前针刺治疗 LDH 疗效较好、副作用小、成本较低, 具有显著优势^[3]。国医大师吕景山教授临床发现, 对穴“后溪-环跳”伍用具有舒筋活络、通痹止痛之功, 对于腰背疼痛且痛引下肢者疗效佳^[4]。临床研究^[5]表明, 对穴后溪-环跳伍用, 能显著改善 LDH 患者症状, 提高

基金项目: 山西省自然科学基金 (201801D121349); 山西省软科学研究项目 (2016041033-3); 山西中医药大学创新团队项目 (2019TD-003, 2022TD1006); 山西省重点研发计划 (201803D31198); 山西省科技人才创新团队建设 (202204051002011); 山西省中医药管理局科研课题 (2023ZYYB047)

✉ 通讯作者: shanxitengtong1@126.com

临床疗效。实验研究^[6-7]证实,针刺对穴“后溪-环跳”后,能显著降低LDH模型大鼠血浆炎症因子水平。高迁移率族蛋白B1(HMGB1)作为炎症因子能够产生炎症放大效应,在多种疾病中发挥了重要作用,亦参与了LDH的发生发展^[8]。本研究从免疫炎症角度,观察针刺对穴“后溪-环跳”对LDH模型大鼠脊神经干组织HMGB1/RAGE通路的影响,以探讨其可能作用机制。本研究经山西中医药大学医学伦理委员会审批(审查编号:2018DW115)。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠32只,7~9周龄,体质量(200±20)g,由斯贝福生物技术有限公司提供,实验动物合格证编号SCXK(京)2019-0010。实验于山西中医药大学针灸针法实验室进行,温度20~25℃,相对湿度50%~70%,12 h/12 h明暗周期,自由饮食。经适应性饲养7天后进入实验。将大鼠按照Excel 2010软件随机数法分为假手术组、模型组、普通针刺组、对穴组各8只。

1.2 主要试剂与仪器

白细胞介素1 β (IL-1 β)、白细胞介素6(IL-6)、核因子 κ B(NF- κ B)酶联免疫分析试剂盒(货号分别为:S202485B、S202587A、S202810A),上海笛柏生物科技有限公司;HE染色液(货号:BA4025),珠海贝索生物技术有限公司;蛋白提取裂解液(货号:AR0105)、BCA蛋白定量试剂盒(货号:AR0146)、晚期糖基化终产物受体(RAGE)抗体(货号:PB9469)、HMGB1抗体(货号:A00066-1)、辣根过氧化物酶HRP-羊抗小鼠(货号:BA1050)、磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)抗体(货号:BM1623)、抗体稀释液(货号:AR1017)、浓缩型正常山羊血清(货号:AR1009)、ECL发光液(货号:AR1196)、荧光(Dylight 488)标记羊抗兔IgG(货号:BA1127)、EDTA抗原修复液(货号:AR0023)、DAPI染色液(货号:AR1176)、抗荧光淬灭封片剂(货号:AR1109),武汉博士德生物工程有限公司;总RNA提取试剂盒TRIzol® Reagent(货号:15596026)、DEPC-Treated Water(货号:4387937),美国英杰生命技术有限公司;中性树胶封片剂(货号:10004160)、三氯甲烷(货号:10006818)、异丙醇(货号:80109218),上海国药有限公司;利多卡因(货号:L832376),

上海麦克林生化科技有限公司;戊巴比妥钠(货号:MP0787),北京梦怡美生物科技有限公司;4%多聚甲醛(货号:MA0192),大连美仑生物技术有限公司;红霉素软膏(批准文号:H36020018),江西德成制药有限公司。

热痛刺激仪(型号:BME-410C),中国医学科学院生物医学工程研究所;电子天平(型号:CP214),上海奥豪斯仪器有限公司;华佗牌针灸针(规格:0.30 mm×25 mm),苏州医疗用品厂有限公司;酶标分析仪(型号:RT-6100),雷杜生命科学股份有限公司;电泳仪(型号:DYY-7C),北京六一生物科技有限公司;电泳槽(型号:VE-180),上海天能科技有限公司;高速离心机(型号:SH01D),上海知信实验仪器技术有限公司;低速离心机(型号:DT5-2),北京时代北利离心机有限公司;组织匀浆机(型号:SCIENTZ-24),宁波新芝生物科技股份有限公司;-80℃冷冻储存箱(型号:DW-HL388),中科美菱低温科技有限责任公司;荧光定量PCR仪(型号:LightCycler96),瑞士罗氏公司;恒温箱(型号:MIR-262),日本三洋公司;扫描仪(型号:APERIO VERSA8),德国徕卡公司。

1.3 模型的建立与评价

参照大鼠自体髓核移植方法^[9]进行腰椎间盘突出症造模。术前12 h禁食,使用1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)进行腹腔注射。待大鼠进入麻醉状态后进行备皮及消毒,从距尾根部1 cm处割下鼠尾,缝合伤口。除假手术组外,各组大鼠均从断尾中取出胶冻状髓核(50 mg)并与50 μ l生理盐水在低温冰盒中制成髓核混悬液,使用9号穿刺针将混悬液注射入大鼠第四、五腰椎棘突间隙硬脊膜外,随后注射40 μ l利多卡因,消毒并涂抹红霉素软膏0.1 g;假手术组进行断尾处理后在大鼠第四、五腰椎棘突间隙硬脊膜外注射50 μ l生理盐水、40 μ l利多卡因,消毒并涂抹红霉素软膏,术后对各组大鼠定期清洁伤口并更换纱布。若造模大鼠清醒后前肢活动自如、双后肢活动迟缓,且在30 min后恢复正常,证明穿刺成功。同时观察大鼠是否存在瘫痪等异常反应,若无异常则进行热痛刺激检测。若造模前与造模后痛阈差值造模大鼠比正常组大鼠大,则判断其痛觉敏感性增加,提示造模成功^[10],此次操作以痛阈差值大于1 s为造模成功。

1.4 干预方法

造模术后3天后对普通针刺组与对穴组进行针

刺干预。普通针刺组参考《针刺治疗学》^[11], 针刺双侧“肾俞”“大肠俞”“委中”; 对穴组针刺双侧“后溪”“环跳”。穴位定位参照《实验针灸学》^[12]以及相关文献^[13]确定, 毫针刺入 1~2 mm, 每 10 min 行针 1 次, 平补平泻, 留针 30 min。每日 1 次, 共干预 14 天。假手术组与模型组每日绑缚 30 min。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 痛阈检测 各组大鼠在造模前 1 天、造模术后 3 天、干预 14 天分别给予 1 次痛阈测定。将大鼠放入自制容器中稳定 30 min 后, 使用热痛刺激仪检测大鼠右后肢掌前端, 记录引起大鼠缩爪反应的所需时间, 连续检测两次间隔 1 min, 将其平均值作为痛阈值^[14]。

1.5.2 组织形态学变化检测 实验结束 3 天后对大鼠予 1% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉, 腹主动脉取血 6 ml, 于腹腔入路取双侧第五腰椎节段脊神经干, 一侧置于 4% 多聚甲醛固定, 另一侧锡纸包裹液氮速冻后置于 -80 °C 冷冻储存箱。取固定于 4% 多聚甲醛的脊神经干组织, 经脱水、包埋、烤干 (厚 4~5 μ m); 二甲苯透明、脱蜡、水洗后进行 HE 染色; 中性树胶封固, 镜下观察其组织形态学变化。

1.5.3 血清 IL-1 β 、IL-6、NF- κ B 水平检测 血液静置 20 min 后 4 °C、3000 r/min 离心 (半径 8 cm) 15 min, 取上清液, 按照 ELISA 说明书操作加样, 使用全自动酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 (A) 值, 绘制标准曲线, 得出 IL-1 β 、IL-6、NF- κ B 水平。

1.5.4 脊神经干组织 HMGB1、RAGE 免疫荧光检测 切片常规脱蜡至水后置 EDTA 抗原修复液中, 微波炉加热至沸腾, 室温冷却 8 min 后重复加热冷却; 滴加稀释的山羊血清封闭液, 37 °C 孵育 30 min; 滴加 RAGE (1:200)、HMGB1 (1:200) 4 °C 过夜, 37 °C 复温 30 min, PBS 洗 3 次; 滴加 Dylight 488 标记羊抗兔 IgG, 37 °C 孵育 45 min, PBS 洗 3 次; 滴加 DAPI 染色液, 室温孵育 3 min, 抗荧光淬灭封片剂封片。

1.5.5 脊神经干组织 HMGB1、RAGE 蛋白表达检测 取保存于 -80 °C 冰箱中的脊神经干组织, 加入蛋白提取裂解液, BCA 蛋白定量试剂盒进行定量; 沸水水浴 10 min 后放入 10% SDS-PAGE 凝胶, 进行电泳分离并转膜, 印迹膜采用封闭液室温封闭 2 h; 倒掉封闭液, 在 4 °C 条件下与一抗孵育过夜, RAGE (1:1000)、HMGB1 (1:1000)、GAPDH (1:2000); 采用 HRP 标记的二抗 HRP-羊抗小鼠 (1:

5000) 检测蛋白, 摇床室温摇动 2 h; 使用 Western Bright ECL 发光液按照说明书进行可视化操作。使用 Image J 1.8.0 软件分析蛋白条带灰度值进行定量分析。

1.5.6 脊神经干组织 HMGB1、RAGE mRNA 表达检测 采用实时荧光定量 PCR 法检测, 取保存于 -80 °C 冰箱中的脊神经干, 加入 Trizol 试剂消化; 加入 200 μ l 三氯甲烷, 4 °C、12 000 r/min 离心 (半径 8 cm) 10 min; 取上清液于另一 EP 管内, 加入异丙醇, 4 °C、12 000 r/min 离心 (半径 8 cm) 10 min; 弃上清, 加入 75% 乙醇, 4 °C、12 000 r/min 离心 (半径 8 cm) 5 min; 弃上清, 加入适量 DEPC 溶解 RNA 沉淀。将 β -actin 作为内参基因, 按照实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书进行加样、扩增, 采用实时荧光定量 PCR 仪检测, 数据采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行目的基因各组间的相对定量分析。引物合成由博士德生物有限公司完成, HMGB1: 上游 GAACAA-CACTGCTGCGGATG, 下游 TCCTCCTCGTCTCTT-CCTC, 产物长度 180 bp; RAGE: 上游 CCTTCCT-CGGCACAGACC, 下游 TTCCACCTTCAGGCTCAACC, 产物长度 104 bp; β -actin: 上游 CAAGGTCATG-CATGACAACCTTTG, 下游 GTCCACCACCCTGTTGC-TGTAG, 产物长度 496 bp。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 26.0 进行分析。计量资料均符合正态分布且方差齐, 采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 以 Shapiro-Wilk 检验确定数据的正态性, 并进行 F 检验以确定方差齐性, 组间比较采用方差分析, 多重比较采用 LSD 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时间痛阈值比较

表 1 示, 与本组造模前 1 天比较, 造模术后 3 天时模型组、普通针刺组、对穴组痛阈值均明显降低 ($P<0.05$)。干预 14 天, 与假手术组比较, 模型组痛阈值明显降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 普通针刺组、对穴组痛阈值明显升高 ($P<0.05$), 对穴组与普通针刺组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。干预 14 天对穴组痛阈值明显高于本组造模术后 3 天 ($P<0.05$), 普通针刺组与本组造模术后 3 天比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.2 各组大鼠脊神经干组织形态学比较

图 1 示, 假手术组脊神经干结构基本正常, 神

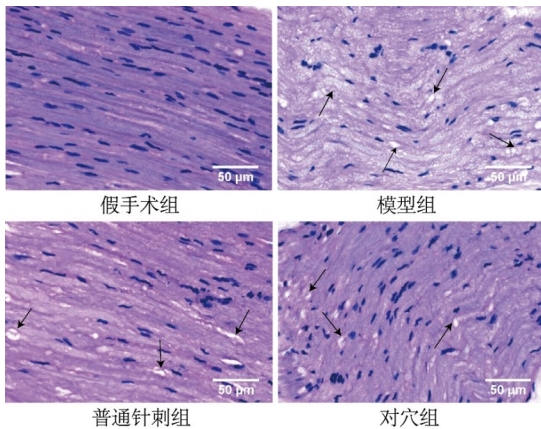
表 1 各组大鼠不同时间痛阈值比较

Table 1 Comparison of pain thresholds at different times of rats in each group (s, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	造模前 1 天	造模术后 3 天	干预 14 天
假手术组	8	9.84±1.21	9.97±1.31	9.97±0.94
模型组	8	9.95±1.33	8.87±1.00 ^{a)}	8.64±0.97 ^{a) b)}
普通针刺组	8	9.83±1.07	8.81±0.83 ^{a)}	9.67±1.09 ^{c)}
对穴组	8	9.94±1.05	8.81±0.48 ^{a)}	9.52±0.54 ^{c) d)}

注：a) 与本组造模前 1 天比较， $P<0.05$ ；b) 与假手术组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.05$ ；d) 与本组造模 3 天比较， $P<0.05$ 。

经纤维排列整齐，髓鞘结构致密、完整；模型组神经纤维结构松散，提示水肿明显，髓鞘部分消失形成空洞，神经纤维轴突节段性增粗、断裂，远端发生瓦勒氏变性；普通针刺组有少量空泡样变性，神经纤维部分修复；对穴组神经纤维排列较整齐，结构较完整，空泡样改变明显减轻，提示水肿明显减轻（彩图请扫描本文二维码获取）。



注：箭头所指为髓鞘消失形成的空泡样改变。

图 1 各组大鼠脊神经干组织病理学变化(HE,×200)

Figure 1 Histopathological changes of spinal nerve trunk of rats in each group observed by HE staining

2.3 各组大鼠血清炎症指标水平比较

表 2 示，与假手术组比较，模型组 IL-6、IL-1 β 、NF- κ B 水平明显升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，对穴组 IL-1 β 、IL-6、NF- κ B 水平明显降低，普通针刺组 IL-1 β 、NF- κ B 水平明显降低 ($P<0.05$)；与普通针刺组比较，对穴组 IL-6 水平明显降低 ($P<0.05$)，而 IL-1 β 、NF- κ B 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.4 各组大鼠脊神经干 HMGB1、RAGE 免疫荧光结果

采用免疫荧光技术对 HMGB1、RAGE 的分布以及表达水平进行测定。图 2 示，细胞核为 DAPI 蓝染，HMGB1、RAGE 为绿色荧光部分。与假手术

表 2 各组大鼠血清 IL-1 β 、IL-6、NF- κ B 水平比较

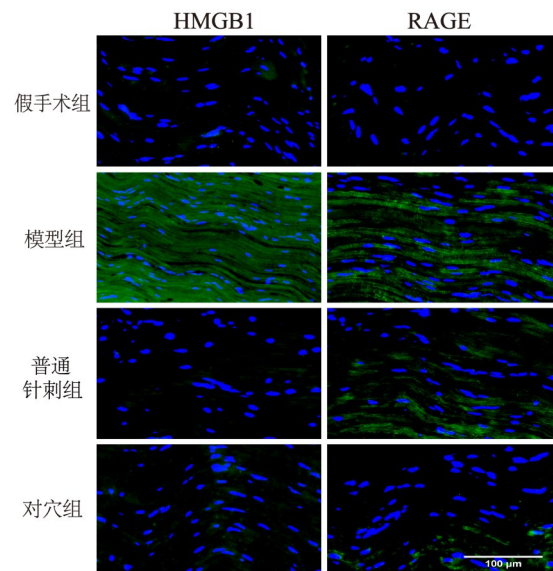
Table 2 Comparison of serum IL-1 β , IL-6, NF- κ B levels of rats in each group (ng/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	IL-1 β	IL-6	NF- κ B
假手术组	8	15.36±3.68	69.41±15.37	7.89±1.58
模型组	8	28.35±3.17 ^{a)}	118.15±34.95 ^{a)}	12.23±1.53 ^{a)}
普通针刺组	8	19.76±3.89 ^{b)}	111.44±14.38 ^{a)}	9.76±1.23 ^{a) b)}
对穴组	8	18.62±4.36 ^{b)}	82.11±15.56 ^{b) c)}	8.45±1.28 ^{b)}

注：IL-1 β ，白细胞介素 1 β ；IL-6，白细胞介素 6；NF- κ B：核因子 κ B。

a) 与假手术组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与普通针刺组比较， $P<0.05$ 。

组比较，模型组的 HMGB1 以及 RAGE 荧光表达明显升高；与模型组比较，普通针刺组、对穴组 HMGB1、RAGE 荧光表达均有所降低，且对穴组改善更为明显（彩图请扫描本文二维码获取）。



注：HMGB1，高迁移率族蛋白 B1；RAGE，晚期糖基化终产物受体。

图 2 各组大鼠脊神经干 HMGB1、RAGE 免疫荧光染色结果

Figure 2 Comparison of immunofluorescence staining results of spinal nerve trunk HMGB1 and RAGE in rats of each group

2.5 各组大鼠脊神经干组织 HMGB1、RAGE 蛋白表达结果检测

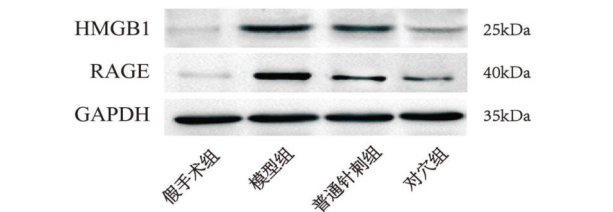
表 3 示，与假手术组比较，模型组 HMGB1、RAGE 蛋白表达明显升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，对穴组 HMGB1、RAGE 蛋白表达均明显降低 ($P<0.05$)；与普通针刺组比较，对穴组 HMGB1、RAGE 的蛋白表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。图 3 为各组大鼠脊神经干组织 HMGB1、RAGE 蛋白电泳图。

表3 各组大鼠脊神经干组织HMGB1、RAGE蛋白灰度值比较

Table 3 Comparison of gray value of HMGB1 and RAGE proteins in spinal nerve trunk tissues of rats in each group (/GAPDH, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	HMGB1	RAGE
假手术组	8	0.26±0.12	0.27±0.13
模型组	8	0.79±0.37 ^{a)}	0.74±0.18 ^{a)}
普通针刺组	8	0.56±0.12	0.58±0.17
对穴组	8	0.40±0.12 ^{b)}	0.42±0.14 ^{b)}

注：HMGB1，高迁移率族蛋白B1；RAGE，晚期糖基化终产物受体。
a) 与假手术组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ 。



注：HMGB1，高迁移率族蛋白B1；RAGE，晚期糖基化终产物受体。
图3 各组大鼠脊神经干组织HMGB1、RAGE蛋白电泳图

Figure 3 Protein electrophoresis of HMGB1 and RAGE in spinal nerve trunk tissue of rats in each group

2.6 各组大鼠脊神经干组织HMGB1、RAGE mRNA表达比较

表4示，与假手术组比较，模型组HMGB1、RAGE mRNA表达明显升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，对穴组和普通针刺组HMGB1、RAGE mRNA表达明显降低 ($P<0.05$)；与普通针刺组比较，对穴组HMGB1、RAGE mRNA表达明显降低 ($P<0.05$)。

表4 各组大鼠HMGB1、RAGE mRNA表达比较
Table 4 Comparison of HMGB1 and RAGE mRNA expression of rats in each group ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	HMGB1	RAGE
假手术组	8	1.00±0.02	0.79±0.23
模型组	8	3.78±0.56 ^{a)}	3.94±0.32 ^{a)}
普通针刺组	8	2.38±0.11 ^{b)}	2.69±0.04 ^{b)}
对穴组	8	1.44±0.09 ^{b) c)}	1.82±0.15 ^{b) c)}

注：HMGB1，高迁移率族蛋白B1；RAGE，晚期糖基化终产物受体。
a) 与假手术组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与普通针刺组比较， $P<0.05$ 。

3 讨论

现代研究认为，LDH为长期压迫、劳损而致

纤维环破裂，进而导致髓核突出、破裂引发自身免疫炎症物质逸出，刺激神经根产生疼痛，并引起周围组织的非特异性炎症反应的疾病，以腰部及下肢的放射痛为主要临床表现^[15]，其免疫炎症机制为现在LDH疾病的研究热点^[2]。HMGB1作为炎症因子，不仅可以从多种相关免疫细胞（激活的单核-巨噬细胞系）中积极分泌，也能通过坏死细胞被动释放而参与炎症反应，并且作为损伤相关分子模式（DAMPs）作用于关键模式识别受体RAGE，从而起到炎症放大效应^[16]。HMGB1/RAGE通路LDH的相关性可能表现为，髓核破裂释放出的HMGB1作用于细胞膜表面的RAGE受体，招募中性粒细胞向炎症组织中迁移，扩大炎症反应；并且HMGB1/RAGE通过激活多条胞内转导途径如丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）等，启动NF- κ B通路，促进中性粒细胞等白细胞分泌IL-1 β 、IL-6等炎症因子^[17]。有研究^[18-19]表明，分泌到胞外的炎症因子IL-1 β 又能通过与HMGB1结合形成HMGB1/IL-1 β 复合物作用于IL-1 β 受体（IL-1R）加强炎症反应，从而产生炎症放大效应，进一步刺激神经根导致疼痛加剧。

针刺临床治疗LDH主要以通络止痛为原则。对穴组的“后溪-环跳”伍用出自《百症赋》，云：“后溪、环跳，腿疼刺而即轻”^[20]。《拦江赋》记载了后溪穴治疗腰背痛，曰“后溪专治督脉病”^[21]。后溪之所以能够治疗腰背痛疾病，究其原因，其一为后溪通督脉能够疏调督脉之经气，其二为后溪能够疏调太阳膀胱气机，达通络止痛之功。环跳穴治疗腰痛在《针灸甲乙经》中就有记载：“腰胁相引痛急，髀筋痠，胫痛不可屈伸，痹不仁，环跳主之”^[22]。有研究者分析其原因有两点，其一：从经络来看，环跳穴为足少阳胆经与足太阳膀胱经之交会穴，能够疏通腰背部经络，其二：从解剖位置来看，环跳穴处分布有臀下神经、坐骨神经，对其进行刺激能够缓解LDH疼痛^[23]。吕景山教授在多年的临床应用中总结：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，二者相合，后溪以疏通太阳经气为主，环跳以疏通少阳经气为要，共行通络止痛之效^[4]。相关临床研究也证实了后溪、环跳治疗LDH的有效性。有研究者^[24]对LDH患者针刺穴位反应点进行了研究，发现后溪、环跳的压痛率与其他穴位相比具有统计学意义。

本研究采用自体髓核移植的方法模拟LDH疾病，具有创伤小、易操作等特点。本研究结果显

示,与造模前相比,造模术后3天模型组、对穴组、普通针刺组痛阈水平均有明显降低,且三者之间无显著差异,提示造模后大鼠出现痛觉敏感;而与造模术后3天相比,干预14天对穴组痛阈水平显著升高,而普通针刺组虽均值较高,但因标准差较大导致其差异缺乏显著性,提示针刺对穴能够显著缓解痛觉过敏且个体间差异较小,普通针刺虽能够一定程度上缓解痛觉过敏,但其个体间差异较大。与假手术组相比,模型组血清炎症因子IL-6、IL-1 β 、NF- κ B水平明显升高,提示造模后出现了血清中炎症因子表达增加;L5脊神经干中HMGB1、RAGE蛋白与mRNA的表达均有增加,提示L5局部出现炎症放大情况。与模型组相比,对穴组中血清IL-6、IL-1 β 、NF- κ B均显著降低,而普通针刺组IL-6降低不显著,提示针刺对穴对于炎症因子IL-6、IL-1 β 、NF- κ B均有抑制作用,且对于IL-6的抑制作用更优;与模型组相比,对穴组脊神经干中HMGB1、RAGE蛋白与mRNA表达均明显降低($P<0.05$);而普通针刺组虽然HMGB1、RAGE mRNA表达较模型组明显降低($P<0.05$),但仍显著高于对穴组($P<0.05$),且普通针刺组HMGB1、RAGE蛋白表达较模型组、对穴组差异均无统计学意义($P>0.05$),提示普通针刺组与对穴组可能存在转录后调控的差异作用,对穴组在降低IL-6以及HMGB1、RAGE mRNA的表达方面作用更显著,这与脊神经干组织中HMGB1、RAGE免疫荧光结果,以及脊神经干组织破坏情况一致。可见针刺对穴“后溪-环跳”与针刺“肾俞”“大肠俞”“委中”均能改善LDH模型大鼠免疫炎症反应,且对穴组的干预效果更优,其机制可能与影响脊神经干组织HMGB1/RAGE通路下调相关炎症因子表达有关。此外,本研究仅通过检测血清中的炎症因子观察全身炎症情况,缺乏对局部组织的炎症观察,以及对穴“后溪-环跳”间的协同作用仍需进一步探索。

参考文献

- [1]中国康复医学会脊柱脊髓专业委员会基础研究与转化学组. 腰椎间盘突出症诊治与康复管理指南[J]. 中华外科杂志, 2022, 60(5): 401-408.
- [2]DOWER A, DAVIES MA, GHAREMAN A. Pathologic basis of lumbar radicular pain[J]. World Neurosurg, 2019, 128: 114-121. doi: 10.1016/j.wneu. 2019. 04. 147.
- [3]ZHANG B, XU H, WANG J, et al. A narrative review of non-operative treatment, especially traditional Chinese medicine therapy, for lumbar intervertebral disc herniation [J]. Biosci Trends, 2017, 11(4): 406-417.
- [4]吕玉娥. 国医大师吕景山对穴[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2019: 321-322.
- [5]吕玉娥, 段永峰. 针刺吕景山对穴后溪-环跳对腰椎间盘突出症影响的临床观察[J]. 医药卫生, 2018, 1(1): 30-31.
- [6]吕玉娥, 段永峰. 吕景山对穴后溪-环跳对腰椎间盘突出症SD大鼠血浆白细胞介素-6、一氧化氮、前列腺素E₂的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2020, 15(4): 630-633.
- [7]张少巍, 楼金成, 苏嘉琪, 等. 针刺“后溪-环跳”对腰椎间盘突出症大鼠脊神经干高迁移率族蛋白1的影响[J/OL]. 针刺研究, (2022-11-14)[2023-01-20]. doi: 10.13702/j.1000-0607.20220149.
- [8]YANG H, LIU H, ZENG Q, et al. Inhibition of HMGB1/RAGE-mediated endocytosis by HMGB1 antagonist box A, anti-HMGB1 antibodies, and cholinergic agonists suppresses inflammation[J]. Mol Med, 2019, 25(1): 13.
- [9]陆志东, 金群华, 陈志荣. 大鼠非压迫性髓核突出模型的建立[J]. 中国矫形外科杂志, 2003, 19(Z2): 1361-1363.
- [10]KALLAKURI S, TAKEBAYASHI T, OZAKTAY AC, et al. The effects of epidural application of allografted nucleus pulposus in rats on cytokine expression, limb withdrawal and nerve root discharge[J]. Eur Spine J, 2005, 14(10): 956-964.
- [11]高树中, 杨骏. 针灸治疗学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 33-34.
- [12]郭义. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 221-225.
- [13]郑利岩, 张小卿, 王熙, 等. 实验大鼠常用经穴检测与定位[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(10): 2058-2060.
- [14]王树东, 张寒, 关红阳, 等. 电针对腰椎间盘突出症大鼠神经根形态及其NK1、NK2表达影响的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(12): 23-26, 281.
- [15]王洪伟, 李长青, 周跃. 腰椎间盘突出症疼痛发生机制的研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2011, 19(7): 568-571.
- [16]ANDERSSON U, YANG H, HARRIS H. Extracellular HMGB1 as a therapeutic target in inflammatory diseases [J]. Expert Opin Ther Targets, 2018, 22(3): 263-277.
- [17]HUDSON BI, LIPPMAN ME. Targeting RAGE signaling in inflammatory disease [J]. Annu Rev Med, 2018, 69: 349-364. doi: 10.1146/annurev-med-041316-085215.
- [18]WANG J, LI R, PENG Z, et al. HMGB1 participates in LPS induced acute lung injury by activating the AIM2 inflammasome in macrophages and inducing polarization of M1 macrophages via TLR2, TLR4, and RAGE/NF- κ B signaling pathways [J]. Int J Mol Med, 2020, 45(1): 61-80.

- [19]BIANCHI ME. HMGB1 loves company[J]. J Leukoc Biol, 2009, 86(3): 573-576.
- [20]杨继洲. 针灸大成[M]. 天津:天津科学技术出版社, 2017:43-44.
- [21]王森,赵晓梅,张兆发. 针灸歌赋集注[M]. 北京:中国医药科技出版社, 1989:260-261.
- [22]皇甫谧. 针灸甲乙经[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2018:378-379.
- [23]霍金,赵同琪. 温针结合电针齐刺环跳穴为主治疗干性坐骨神经痛临床观察[J]. 中国针灸, 2021, 41(3): 275-278.
- [24]黄洪尧,肖文鑫,吴国良,等. 腰椎间盘突出症患者穴位反应点分布规律研究及针刺该穴位反应点的疗效观察[J]. 深圳中西医结合杂志, 2017, 27(4): 34-36.

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

SU Jiaqi¹, HU Qing¹, LOU Jincheng¹, ZHANG Shaowei¹, MIAO Xinyun¹, ZHAI Chuntao¹, LYU Yu'e^{1,2}

1. Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong, 030619; 2. Shanxi Acupuncture Hospital

ABSTRACT **Objective** To explore the possible mechanism of acupuncture at the paired points “Houxi (SI 3) -Huantiao (GB 30)” on lumbar disc herniation (LDH). **Methods** Thirty-two SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, ordinary acupuncture group and paired acupoints group, with eight rats in each group. Except for the sham operation group, the rat model was established by autologous nucleus pulposus transplantation in the other groups. Three days after modeling, the rats in the ordinary acupuncture group were needled at the selected points including “Shenshu (BL 23)”, “Dachangshu (BL 25)” and “Weizhong (BL 40)” while those in the paired acupoints group were needled at “Houxi (SI 3)” and “Huantiao (GB 30)”, with insertion of 1-2mm by filiform needle, even supplementation and drainage once every 10 min, and with needle retention of 30 min. The sham operation group and the model group were bound for 30 minutes daily at the same time. Each group was intervened for 14 days. The thermal pain stimulator was used to detect the time required for the rat's foot-lifting reaction as the pain threshold at 1 day before and 3 days after model establishment, and after 14 days treatment. At the end of treatment, L5 spinal nerve stem was collected for HE staining to observe pathological changes. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect serum interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), and nuclear factor κ B (NF- κ B) levels. Immunofluorescence was used to detect the expression of high mobility group box B1 (HMGB1) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) in spinal nerve trunk tissues, while Western Blot was used to detect the protein expression of HMGB1 and RAGE; real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect mRNA expression of HMGB1 and RAGE in spinal nerve trunk tissues. **Results** Compared with the 1 day before modeling, the pain threshold in the model group, the ordinary acupuncture group and the paired points group all decreased significantly at 3 days after modelling ($P < 0.05$). After 14 days intervention, the pain threshold in the model group was significantly lower than in the sham operation group ($P < 0.05$), while that in the ordinary acupuncture and the paired points acupuncture group was significantly higher ($P < 0.05$). HE staining showed that compared to those in the sham operation group, the myelin sheath of L5 spinal nerve in the model group partially disappeared and formed a cavity, and Wallerian degeneration appeared; nerve fibers in the ordinary acupuncture group was partially repaired; the arrangement of nerve fibers in the paired points acupuncture group was relatively neat, and the vacuolar changes significantly decreased, suggesting that the edema was significantly reduced. Compared to those in the sham operation group, the serum IL-1 β , IL-6, NF- κ B levels increased, and spinal nerve trunk HMGB1, RAGE fluorescence expression, as well as HMGB1 and PAGE protein and mRNA expression significantly increased in the model group ($P < 0.05$). Compared to those in the model group, the fluorescence expression of HMGB1 and RAGE decreased in the paired points acupuncture group, as well as the serum levels of IL-1 β , IL-6, and NF- κ B, and the protein and mRNA expressions of RAGE and HMGB1 ($P < 0.05$); compared to the ordinary acupuncture group, the paired points acupuncture group was superior in reducing the serum IL-6 and the mRNA expressions of HMGB1 and RAGE ($P < 0.05$). **Conclusion** Acupuncture at the paired acupoints of “Houxi (SI 3)” - “Huantiao (GB 30)” can significantly improve the vacuolar degeneration and systematic inflammatory response in the spinal nerve trunk tissue in LDH model rats, and the mechanism may be related to the inhibition of HMGB1/RAGE pathway in spinal nerve trunk tissue.

Keywords lumbar disc herniation; Houxi (SI 3); Huantiao (GB 30); high-mobility group box protein B1; receptor for advanced glycation end products; inflammatory factors; pain threshold

(收稿日期: 2022-06-01; 修回日期: 2023-01-24)

[编辑: 焦 爽]