

谭甜,张梦,李彩琴,等.电针对对氯苯丙氨酸致失眠大鼠小胶质细胞及炎症因子的影响[J].中国比较医学杂志,2025,35(6):12-21.

Tan T, Zhang M, Li CQ, et al. Effects of electroacupuncture on microglia and inflammatory factors in PCPA-induced insomnia in rats [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(6): 12-21.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.06.002

电针对对氯苯丙氨酸致失眠大鼠小胶质细胞 及炎症因子的影响

谭甜,张梦,李彩琴,谭佳菲,何曦,贺丽娟,胡冰清,龚日玉,刘恋*

(湖南中医药大学第二附属医院,长沙 410005)

【摘要】 目的 观察电针对对氯苯丙氨酸(para-chlorophenylalanine, PCPA)致失眠大鼠小胶质细胞极化标记物和炎症因子白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素 4(interleukin-4, IL-4)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 10(interleukin-10, IL-10)含量的影响,探讨电针治疗失眠的作用机制。**方法** 取健康 SPF 级 SD 大鼠 50 只,雌雄各半,随机分成空白组 10 只和模型储备组 40 只,模型储备组以腹腔注射 500 mg/kg PCPA 混悬液建立失眠大鼠模型。30 只造模成功大鼠按随机数字表法分模型组、电针组和艾司唑仑组,每组 10 只。艾司唑仑组给予艾司唑仑 0.2 mg/(kg·d)灌胃;电针组给予电针“神门”“三阴交”,刺激“百会”“本神”穴位,每次 20 min,连续治疗 7 d,每天 1 次。治疗后采用 ELISA 法和 Western blot 检测大鼠血清、下丘脑 TNF- α 、IL-6、IL-4、IL-10 的含量;免疫荧光染色法检测大鼠下丘脑小胶质细胞 Iba-1 与 M1、M2 亚型细胞标记物 CD86、CD163 的共表达。**结果** 与空白组相比,模型组大鼠睡眠潜伏期(sleep latency, SL)延长($P<0.01$),睡眠持续时间(sleep duration, ST)缩短($P<0.05$),血清及下丘脑中 IL-6、TNF- α 含量和蛋白水平明显上升($P<0.01$),IL-4、IL-10 含量和蛋白水平下降($P<0.01$);与模型组比较,电针组、艾司唑仑组大鼠 SL 显著缩短($P<0.01$),ST 延长($P<0.01$),血清及下丘脑中 IL-6、TNF- α 含量和蛋白水平显著降低($P<0.01$);IL-4、IL-10 明显升高($P<0.01$);对比艾司唑仑组,电针组大鼠 IL-6 含量更低($P<0.05$)。与空白组比较,模型组 Iba-1/CD86(M1 型)共表达显著增强($P<0.01$),模型组 Iba-1/CD163(M2 型)共表达显著减弱($P<0.01$)。经电针、艾司唑仑干预后,Iba-1/CD86 共表达显著减弱($P<0.01$),Iba-1/CD163 共表达增强($P<0.05$)。**结论** 电针可有效改善大鼠睡眠障碍,其机制可能与调控小胶质细胞极化,下调促炎因子含量,上调抗炎因子含量,减轻神经炎症从而改善睡眠有关。

【关键词】 失眠;电针;小胶质细胞;炎症

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 06-0012-10

Effects of electroacupuncture on microglia and inflammatory factors in PCPA-induced insomnia in rats

【基金项目】 国家自然科学基金(82405588);湖南省自然科学基金(2023JJ40495);湖南中医药大学研究生科研创新项目(2023CX110);湖南中医药大学国家自然科学基金预研项目(Z2023YYJJ11)。

【作者简介】 谭甜(1999—),女,在读硕士研究生,研究方向:针灸的临床应用。E-mail:2219744325@qq.com

【通信作者】 刘恋(1988—),女,硕士,主治医师,研究方向:针灸的治病机理及应用。E-mail:455546557@qq.com

TAN Tian, ZHANG Meng, LI Caiqin, TAN Jiafei, HE Xi, HE Lijuan, HU Bingqing, GONG Riyu, LIU Lian*
(the Second Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410005, China)

【Abstract】 Objective To explore the effects and therapeutic mechanism of electroacupuncture on the levels of polarization markers and inflammatory factors interleukin (IL)-6, IL-4, tumor necrosis factor- α (TNF- α), and IL-10 in rats with para-chlorophenylalanine-induced insomnia (PCPA). **Methods** Fifty healthy specific-pathogen free grade Sprague-Dawley rats, half male and half female, were randomly divided into a blank group ($n=10$) and a model reserve group ($n=40$), in which insomnia was induced by intraperitoneal injection of a 500 mg/kg PCPA suspension. Using the random number table method, the 30 successfully modeled rats were divided into three treatment groups of 10 rats/group: model, electroacupuncture, and estazolam. The estazolam group was given estazolam 0.2 mg/(kg·d) by gavage; the electroacupuncture group was given once-daily electroacupuncture at the “Shenmen” and “Sanyinjiao” acupoints, and stimulation at the “Baihui” and “Benshen” acupoints, 20 minutes each time, for 7 consecutive days. Following treatment, serum and hypothalamic levels of TNF- α , IL-6, IL-4, and IL-10 were detected using ELISA and Western blot, while immunofluorescence staining was used to detect the presence of Iba-1 in hypothalamic microglia and the co-expression of CD86 and CD163, which are markers for the M1 and M2 subtypes of microglial cells, respectively. **Results** Compared with the blank group, the model group exhibited prolonged sleep latency (SL) ($P<0.01$), shortened sleep duration (ST) ($P<0.05$), significantly higher serum and hypothalamic protein levels of IL-6 and TNF- α ($P<0.01$), and significantly lower levels of IL-4 and IL-10 ($P<0.01$). Compared with the model group, the electroacupuncture and estazolam groups exhibited significantly shorter SL ($P<0.01$), prolonged ST ($P<0.01$), significantly lower serum and hypothalamic protein levels of IL-6 and TNF- α ($P<0.01$), and significantly higher IL-4 and IL-10 levels ($P<0.01$). IL-6 content was lower in the electroacupuncture group than in the estazolam group ($P<0.05$). Compared with the blank group, the model group exhibited significantly enhanced Iba-1/CD86 (M1 type) co-expression ($P<0.01$) alongside significantly weakened Iba-1/CD163 (M2 type) co-expression ($P<0.01$). Under electroacupuncture or estazolam intervention, Iba-1/CD86 co-expression was significantly weakened ($P<0.01$), and Iba-1/CD163 co-expression was significantly enhanced in the model group ($P<0.05$). **Conclusions** Electroacupuncture effectively improved sleep disturbances in rats, with an underlying mechanism that may involve regulation of microglial polarization, downregulation of pro-inflammatory cytokine levels, upregulation of anti-inflammatory cytokine levels, and alleviation of neuroinflammation, thereby ameliorating sleep.

【Keywords】 insomnia; electroacupuncture; microglia; inflammation

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

失眠主要表现为入睡困难和/或睡眠维持困难,常伴随记忆障碍、烦躁、疲劳等症。慢性失眠会引发机体慢性炎症反应,进而增加多个系统疾病的患病风险,有研究表明,睡眠障碍与阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、糖尿病、动脉粥样硬化等疾病的发生存在显著相关性,睡眠生理状态紊乱可多维度损害神经、内分泌、免疫调控功能^[1-2]。失眠病因错综复杂,发病机制仍不明确。研究发现炎症贯穿失眠发病全过程,表现为促炎因子水平增加、细胞炎症过程激活^[3]。炎症细胞因子可引起睡眠-觉醒周期改变,出现总睡眠时间和睡眠效率的下降,慢波睡眠(slow

wave sleep, SWS)持续时间增加及快速眼动睡眠(rapid eye movement, REM)持续时间减少。活化的小胶质细胞又会诱导血脑屏障破坏从而产生更多的炎症细胞因子,导致炎症加剧^[4-5]。

大量临床研究证实,电针可改善失眠患者的睡眠质量,而失眠又与炎性细胞因子关系密切;另有在电针干预其他疾病如脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)、AD等研究中发现电针能够影响小胶质细胞极化功能,促使小胶质细胞由促炎向抗炎方向转化,减少神经炎性因子释放,减缓神经炎性反应的进展^[6-7];电针改善睡眠的具体机制是否可能与调控小胶质细胞极化相关还有

待进一步研究。本研究通过观察电针对失眠大鼠下丘脑小胶质细胞极化与炎性细胞因子影响,探讨电针治疗失眠的可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

50 只 SPF 级健康 SD 大鼠,7 周龄,雌雄各半,体质量(170 ± 10) g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供[SCXK(湘)2021-0002],饲养于湖南中医药大学动物实验中心动物房[SYXK(湘)2024-0014],实验动物房配备独立通风系统,室温 $24 \sim 26$ °C,湿度 40%~60%,光照与黑暗各 12 h。动物可自由摄食、饮水,实验员定期更换垫料、饲料及饮用水。本实验经湖南中医药大学实验动物伦理委员会审批通过(SYLL-2022110809),符合 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

对氯苯丙氨酸(para-chlorophenylalanine, PCPA)(MCE 生物, HY-B1368);艾司唑仑片(每粒 1 mg, 华中药业, 20230702);戊巴比妥钠(美国西格玛奥德里奇公司, P3761);阿拉伯胶水溶液、 NaHCO_3 溶液(北京雷根生物技术有限公司, IH0262、CC0141);TNF- α 、IL-6、IL-4、IL-10 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(江苏菲亚生物科技有限公司, 2401R05、2401R03、2401R10、2401R16,);TNF- α 、IL-6、IL-4、IL-10 抗体(affinity, AF7014、DF6087、AF5142、DF6894);离子化钙结合适配分子 1(Iba-1)抗体(affinity, DF6442);CD86 抗体(affinity, DF6332);CD163 抗体(affinity, DF8235)。F-010S 超声机(深圳福洋科技有限公司);0.25 mm $\times$ 25 mm 针灸针(苏州针灸用品有限公司);SDZ-V 电针仪(苏州医疗用品厂有限公司);电泳系统(伯乐公司);成像系统(日本尼康);正置荧光显微镜(日本尼康)。

1.3 实验方法

1.3.1 造模、分组及干预

标准化适应性喂养 1 周后,将大鼠分为空白(blank)组 10 只、模型储备组 40 只。模型储备组采用腹腔注射 PCPA 制备失眠大鼠模型^[8]。在 0.9% NaCl 溶液中缓慢滴入 5% NaHCO_3 水溶液,用 pH 精密试纸调试至 pH = 7~8 之间,加入 PCPA,搅拌后加入 10%阿拉伯胶,用超声机超声

15 min 后,配制成弱碱性生理盐水,连续 2 d 腹腔注射(1 mL/100 g)造模。首次腹腔注射 36 h 后,空白组和模型储备组大鼠均以 50 mg/kg 用量,腹腔注射戊巴比妥钠溶液,进行戊巴比妥钠实验^[9],记录大鼠的睡眠潜伏期和睡眠持续时间,以此作为指标进行统计学分析,比较空白组和模型储备组的差异,若 $P < 0.05$,有统计学意义,提示模型复制成功。模型复制成功后从模型储备组中随机抽取 30 只,分为模型(model)组、电针(electroacupuncture)组、艾司唑仑(estazolam)组各 10 只。

分组后干预,电针组参照《实验针灸学》^[10]及华兴邦的大鼠穴位图谱取穴,将大鼠固定后,针刺“百会”、双侧“本神”、双侧“神门”、双侧“三阴交”,同侧“神门”“三阴交”连接电针治疗仪正负极,电针参数设置为 2 Hz、连续波,刺激强度以局部皮肤肌肉轻微颤动为宜,20 min/d,共 7 d。艾司唑仑组将艾司唑仑片研成细粉末,加生理盐水配成浓度为 0.1 mg/mL 的艾司唑仑溶液。予 0.2 mg/(kg $\cdot$ d)灌胃,共 7 d。同时模型组、电针组,比照艾司唑仑溶液每天灌服等量生理盐水 1 次,连续 7 d。空白组不干预,模型组、艾司唑仑组进行同期固定、不干预。

1.3.2 取材

干预结束后次日,采用 1%戊巴比妥钠(0.3 mL/100 g)溶液麻醉大鼠,腹主动脉采血后静置 10~20 min,以 3000 r/min 离心 10 min,收集上清液, -80 °C 保存备用。再脱颈处死大鼠,在冰盘上迅速取出大脑组织,随机取一部分下丘脑浸泡在 4%多聚甲醛固定液固定(4 °C、24 h),OCT 包埋,冰冻切片, -20 °C 冰箱保存备用。

1.3.3 动物行为学观察

观察并每天记录大鼠一般变化,包括昼夜节律变化、体质量、精神情况、活动能力、毛发光泽度等。

1.3.4 睡眠评价-翻正实验

实验各组均腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg),检测睡眠潜伏期(SL)和睡眠时间(ST),取大鼠仰卧,置于木制平面上,尾巴与平面垂直开始计时,计时 1 min 内大鼠不翻动视为翻正反射消失,由仰卧自动翻转身体且在 1 min 内不再翻过去为翻正反射恢复,给药到翻正反射消失计

为 SL, 持续计时至大鼠翻正反射恢复, 则为 ST^[11]。治疗结束后再次使用同样方法对实验各组进行睡眠实验, 评价各组大鼠睡眠情况。

1.3.5 血清炎症因子含量检测

按 ELISA 试剂盒说明书步骤操作, 检测血清中 IL-4、IL-6、TNF- α 、IL-10 的含量。

1.3.6 Western blot 检测下丘脑组织中 IL-4、IL-6、TNF- α 、IL-10 蛋白表达情况

每组随机选取 6 只大鼠, 断头取脑, 分离下丘脑组织, 经液氮速冻后转移至 -80℃ 冰箱冻存。取下丘脑组织研磨裂解破碎, 离心吸取上清, 测蛋白浓度, 制备凝胶, 上样, 电泳, 转膜后封闭, 加一抗 TNF- α 、IL-6、IL-4、IL-10 (1 : 1000) 4℃ 孵育过夜, 加入二抗 37℃ 孵育 1 h。避光条件下, 配制发光液, 进行发光。采用 Image J 1.53q 测定蛋白条带灰度值, 以 β -actin 为内参计算目标蛋白相较于内参蛋白的相对表达量。

1.3.7 免疫荧光染色

取冰冻切片, 依次进行抗原修复、阻断内源性酶血清封闭, 滴加 Iba-1、CD86、CD163 一抗 (1 : 300) 湿盒内 4℃ 孵育过夜, PBS 清洗 5 min $\times$ 3 次, 二抗孵育, PBS 清洗 5 min $\times$ 3 次, 细胞核用

DAPI 复染 10 min, 显微镜玻片扫描仪进行扫描, 每张切片随机选取 3 个不重复视野, 采用 Image J 1.53q 分析平均荧光强度。

1.4 统计学方法

数据分析使用 SPSS 26.0 软件, 计量资料以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 满足正态且方差齐时用 LSD 检验, 非正态性数据采用秩和检验, 方差不齐时选用 Dunnett T3 法。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模期大鼠 SL 与 ST

与空白组比较, 模型储备组大鼠的 SL 显著延长 ($P<0.01$), ST 明显缩短 ($P<0.05$), 见表 1。

2.2 大鼠一般行为学观察

如表 2 所示, 在进行造模前, 各组大鼠活动度、精神状态及饮水、进食情况无明显差异, 毛发光泽, 造模前各组大鼠体质量无显著差异 ($P>0.05$); 造模后, 除空白组之外, 其余大鼠白昼活动显著增多, 兴奋性与攻击性均有所增强, 对声、光、电刺激敏感, 易被激怒, 毛发干枯且缺少光

表 1 造模期大鼠 SL 与 ST 的比较 ($\bar{x}\pm s$, min)
Table 1 Comparison of SL and ST in rats during modeling period ($\bar{x}\pm s$, min)

组别 Groups	例数/ n Number of cases	SL	ST
空白组 Blank group	10	3.75 $\pm$ 0.21	244.70 $\pm$ 23.24
模型储备组 Model reserve group	40	5.80 $\pm$ 0.53 ^{##}	148.60 $\pm$ 18.89 [#]

注: 与空白组相比, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ 。
Note. Compared with the blank group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$.

表 2 大鼠体质量变化 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$, g)
Table 2 Changes of body weight in the rats ($\bar{x}\pm s$, $n=10$, g)

组别 Groups	造模前 Before modeling	造模后 After modeling	治疗后 Post-treatment
空白组 Blank group	220.90 $\pm$ 14.94	231.80 $\pm$ 20.92	277.40 $\pm$ 39.11
模型组 Model group	222.60 $\pm$ 14.12	205.00 $\pm$ 10.76 [#]	231.00 $\pm$ 12.13 [#]
电针组 Electroacupuncture group	215.90 $\pm$ 11.53	201.00 $\pm$ 14.17 [#]	248.80 $\pm$ 8.80 [*]
艾司唑仑组 Estazolam group	218.00 $\pm$ 12.88	205.70 $\pm$ 13.07 [#]	247.10 $\pm$ 9.91 [*]

注: 与空白组相比, [#] $P<0.05$; 与模型组相比, ^{*} $P<0.05$ 。
Note. Compared with the blank group, [#] $P<0.05$. Compared with the model group, ^{*} $P<0.05$.

泽;造模后,模型组、电针组、艾司唑仑组大鼠体质量增长均较空白组缓慢($P<0.05$);经治疗后,与模型组对比,电针组与艾司唑仑组大鼠躁动明显减轻,毛发光泽度增加;实验各组大鼠体质量均呈增长趋势,电针组与艾司唑仑组较模型组显著增加($P<0.05$),但两组间体质量差异无统计学意义($P>0.05$)。

干预后,与空白组对比,模型组大鼠 SL 显著延长($P<0.01$)、ST 缩短($P<0.01$);与模型组对比,电针组与艾司唑仑组 SL、ST 较模型组分别缩短($P<0.01$)和延长($P<0.01$),且两组间 SL、ST 差异无统计学意义($P>0.05$),治疗后各组大鼠 SL 和 ST 时间变化见表 3。

2.3 各组大鼠血清中 TNF-α、IL-6、IL-4、IL-10 含量

与空白组相比,模型组大鼠血清 TNF-α 和

IL-6 含量较空白组显著升高($P<0.01$),IL-4、IL-10 含量降低($P<0.01$);与模型组相比,电针组与艾司唑仑组 TNF-α、IL-6 含量均显著降低($P<0.01$),IL-4、IL-10 显著升高($P<0.01$);对比电针组,艾司唑仑组大鼠 IL-6 含量偏高($P<0.05$),见图 1。

2.4 各组大鼠下丘脑中 TNF-α、IL-6、IL-4、IL-10 蛋白表达

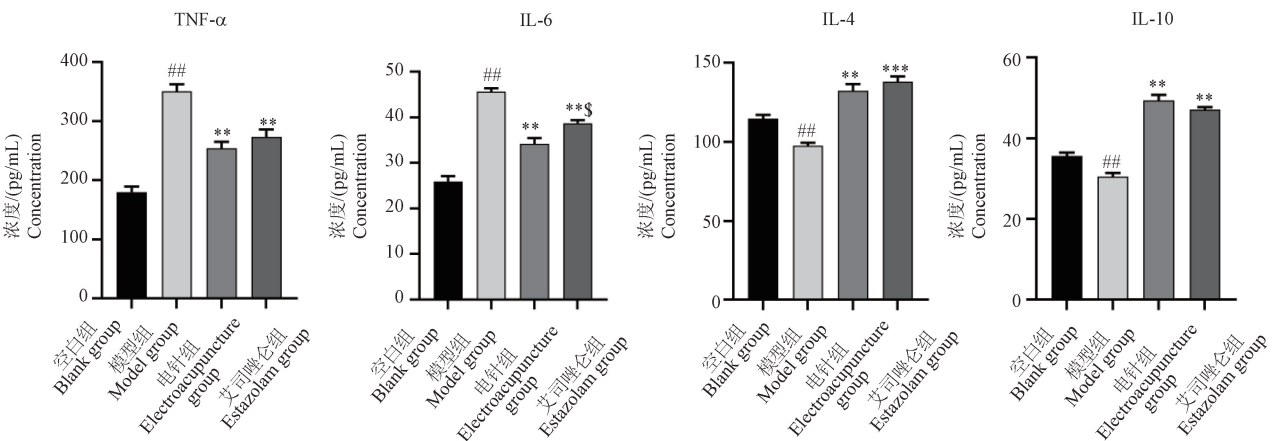
与空白组比较,在下丘脑区,模型组大鼠 IL-6、TNF-α 蛋白水平显著升高($P<0.01, P<0.05$),IL-4、IL-10 蛋白水平显著下降($P<0.01$);对比模型组,电针组、艾司唑仑组 IL-6、TNF-α 蛋白水平显著降低($P<0.01$);IL-4、IL-10 蛋白水平显著升高($P<0.05, P<0.01$);对比电针组,艾司唑仑组大鼠下丘脑中 IL-6 蛋白水平偏高($P<0.05$),见图 2 和表 4。

表 3 治疗后各组大鼠 SL 和 ST 的变化($\bar{x}\pm s, n=10, \text{min}$)

Table 3 Post-treatment changes in SL and ST across rat groups($\bar{x}\pm s, n=10, \text{min}$)

组别 Groups	SL	ST
空白组 Blank group	4.00±0.33	236.30±5.93
模型组 Model group	5.90±0.39 ^{##}	134.80±6.18 ^{##}
电针组 Electroacupuncture group	4.65±0.58 ^{**}	211.50±8.20 ^{**}
艾司唑仑组 Estazolam group	4.45±0.44 ^{**}	216.90±6.23 ^{**}

注:与空白组相比, ^{##} $P<0.01$;与模型组相比, ^{**} $P<0.01$ 。
Note. Compared with the blank group, ^{##} $P<0.01$. Compared with the model group, ^{**} $P<0.01$.



注:与空白组相比, ^{##} $P<0.01$;与模型组相比, ^{**} $P<0.01$;与电针组相比, ^{*} $P<0.05$ 。

图 1 各组大鼠血清 TNF-α、IL-6、IL-4、IL-10 含量

Note. Compared with the blank group, ^{##} $P<0.01$. Compared with the model group, ^{**} $P<0.01$. Compared with the electroacupuncture group, ^{*} $P<0.05$.

Figure 1 Serum TNF-α, IL-6, IL-4, and IL-10 levels in rats of each group

表 4 下丘脑组织中 TNF- α 、IL-6、IL-4、IL-10 蛋白水平比较($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 4 Comparison of TNF- α , IL-6, IL-4, and IL-10 protein levels in hypothalamic tissues($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别 Groups	TNF- α	IL-6	IL-4	IL-10
空白组 Blank group	0.75 $\pm$ 0.08	0.78 $\pm$ 0.06	1.00 $\pm$ 0.15	1.00 $\pm$ 0.08
模型组 Model group	1.84 $\pm$ 0.15 [#]	1.84 $\pm$ 0.12 ^{##}	0.62 $\pm$ 0.04 ^{##}	0.60 $\pm$ 0.09 ^{##}
电针组 Electroacupuncture group	0.99 $\pm$ 0.10 ^{**}	1.02 $\pm$ 0.09 ^{**}	1.05 $\pm$ 0.04 ^{**}	1.11 $\pm$ 0.07 ^{**}
艾司唑仑组 Estazolam group	1.07 $\pm$ 0.14 ^{**}	1.40 $\pm$ 0.05 ^{**§}	0.86 $\pm$ 0.13 [*]	1.02 $\pm$ 0.08 ^{**}

注:与空白组相比, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$;与模型组相比, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$;与电针组相比, [§] $P<0.05$ 。
Note. Compared with the blank group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$. Compared with the model group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$. Compared with the electroacupuncture group, [§] $P<0.05$.

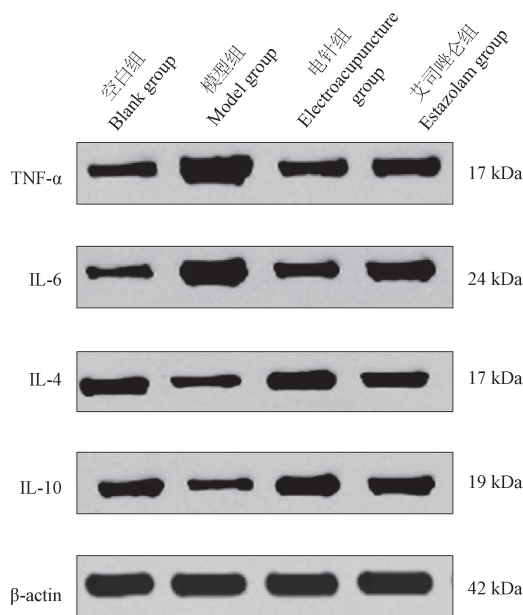


图 2 各组大鼠下丘脑中 TNF- α 、IL-6、IL-4、IL-10 蛋白表达

Figure 2 Protein expression of TNF- α , IL-6, IL-4, and IL-10 in the hypothalamus of rats of all groups

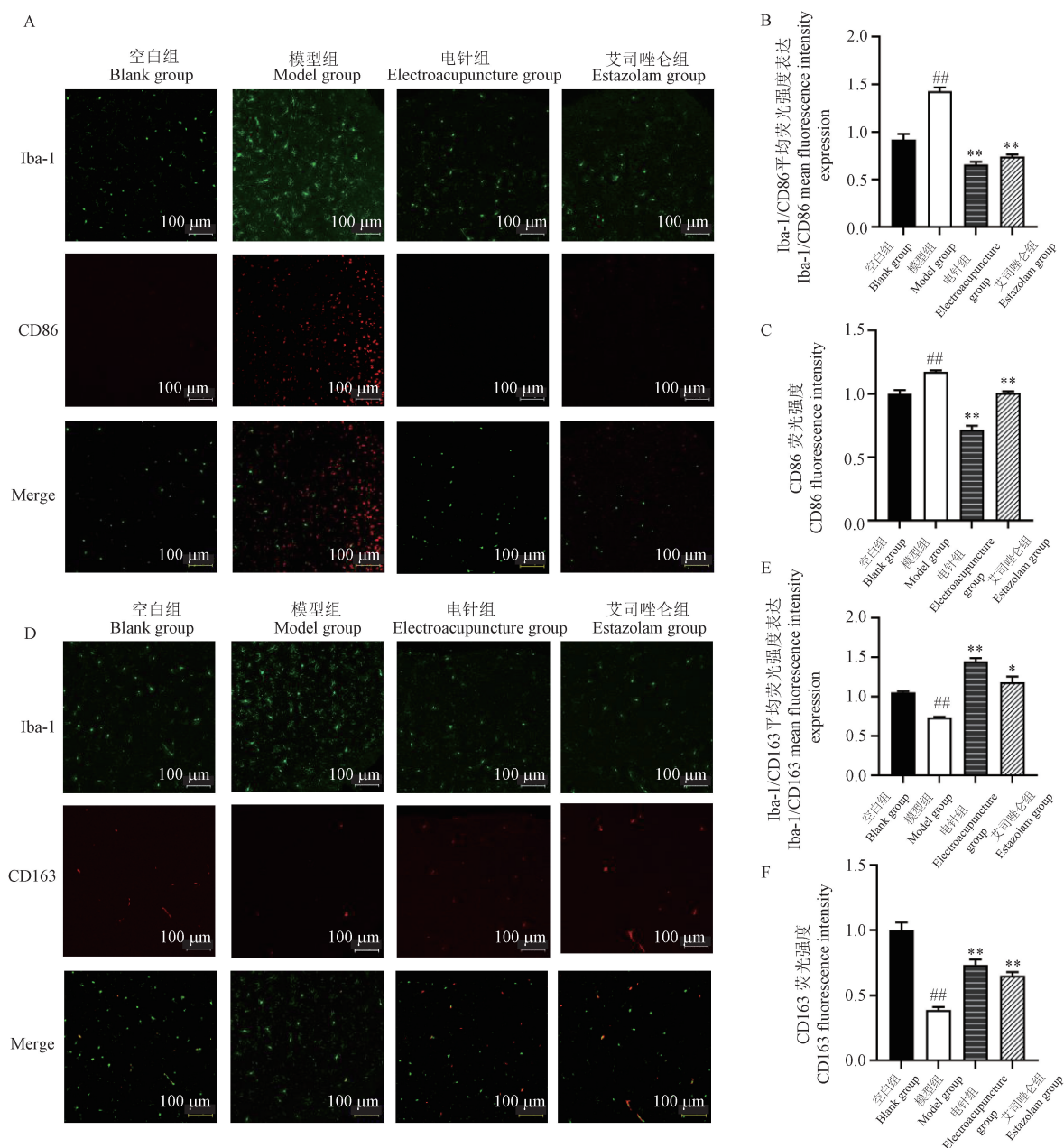
2.5 各组大鼠下丘脑 Iba-1 与 CD86、CD163 共表达情况

Iba-1 为小胶质细胞标志物,CD86 为 M1 型标记物,CD163 为 M2 型标记物。与空白组比较,模型组 CD86 荧光强度增强($P<0.01$)、Iba-1 和 CD86 共表达显著增强($P<0.01$),模型组 CD163 荧光强度减弱($P<0.01$)、Iba-1 和 CD163 共表达显著减弱($P<0.01$)。与模型组比较,电针组、艾司唑仑组 CD86 荧光强度减弱($P<0.01$)、Iba-1 和 CD86 共表达显著减弱($P<0.01$),电针组、艾司唑仑组 CD163 荧光强度增强($P<0.01$),电针组 Iba-

1 和 CD163 共表达增强($P<0.01$)、艾司唑仑组 Iba-1 和 CD163 共表达显著增强($P<0.05$),以上两组间差异无统计学意义,见图 3。

3 讨论

失眠属中医“不寐”的范畴,不寐的关键病机为“阴阳失交”,治当平衡阴阳,名医临证经验证实以调枢安神为切入点,通过针刺调节少阳、少阴之枢与神明之枢可枢转斡旋阴阳、安神助眠^[12]。已有研究表示电针神门-三阴交可显著改善失眠症状及睡眠质量,体现了穴位的协同增效优势^[13];此外,针对针灸治疗失眠的临床文献分析表明,“神门”与“三阴交”作为针灸治疗失眠的常用核心穴位组合,疗效显著^[14]。基于大量文献与中医理论的支持,本研究选取电针“神门”“三阴交”,辅以“百会”“本神”穴位治疗失眠大鼠,实验结果显示经电针治疗干预后,大鼠躁动与毛发情况得到明显改善,睡眠实验显示大鼠睡眠潜伏期缩短,睡眠持续时间得到延长,失眠得以缓解,这与既往临床检验结果相合,证实电针治疗失眠疗效显著;电针组与阳性对照艾司唑仑组对比治疗效果相当,差异无统计学意义,但电针较西药在临床上因其安全、无副作用等更具优势,应用范围更广,更值得临床推广应用。本实验未设立非经穴组对照,原因在于本次研究的重点是观察特定穴位(“神门”“三阴交”“百会”“本神”)对失眠大鼠的疗效机制,而非全面探讨穴位特异性;其次,已有大量文献证明电针“神门”“三阴交”对失眠的疗效,本实验基于此优先选择现有疗效确切的穴位进行研究,与临床契合度更高,更具实



注:A:各组下丘脑 Iba-1 与 CD86 荧光图;B: Iba-1/CD86 共表达比较;C: CD86 荧光强度;D: Iba-1 与 CD163 荧光图;E: Iba-1/CD163 共表达比较;F: CD163 荧光强度。与空白组相比, ^{##} $P<0.01$;与模型组相比, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ 。

图 3 各组大鼠下丘脑 Iba-1 与 CD86、CD163 共表达情况(平均荧光强度, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Note. A, Hypothalamic Iba-1 and CD86 fluorescence images across groups. B, Comparison of Iba-1/CD86 co-expression. C, CD86 fluorescence intensity. D, Hypothalamic Iba-1 and CD163 fluorescence images. E, Comparison of Iba-1/CD163 co-expression. F, CD163 fluorescence intensity. Compared with the blank group, ^{##} $P<0.01$. Compared with the model group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$.

Figure 3 Co-expression of Iba-1 with CD86 and CD163 in hypothalamus of rats in each group(mean fluorescence intensity, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

验研究转化意义;最后,考虑其中局限性,后续研究可设立非经穴组以研究穴位特异性,让实验结果证据链更充分。

失眠的病因主要包括社会环境、机体压力、

传染性压力等,其发病机制复杂,与过度觉醒、相关脑区及神经递质、内源性生物钟、神经-内分泌-免疫等多种机制相关,目前研究发现炎症贯穿失眠发病全过程,表现为促炎因子水平增加、细

胞炎症过程激活^[15]和血浆炎症因子水平升高,脑组织其他炎症反应标志物如小胶质细胞激活^[16]。炎症细胞因子通过影响睡眠觉醒和睡眠结构参与睡眠的调节,其中白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6 和 IL-10 被认为是与慢性失眠有关的最为关键的因子^[17], IL-1 β 可促进非快速眼动睡眠 (non-rapid eye movement, NREM) 的发生和维持,而 IL-6 可抑制 REM^[18];睡眠剥夺或不足可降低 IL-10 等抗炎性因子的水平,增加 IL-1 和 IL-6 等促炎性因子的水平,导致免疫功能紊乱和全身性低度炎症^[19],中枢神经系统 TNF- α 参与调节记忆巩固、睡眠周期等多种生理事件^[20]。临床研究证实慢性失眠患者血清 IL-1 β 水平与失眠严重程度正相关、血清 IL-10 与睡眠效率呈负相关^[21-22]。本研究结果显示,模型组大鼠血清内 IL-6、TNF- α 含量均明显升高,IL-4、IL-10 含量降低,说明失眠致体内促炎因子含量升高而抗炎因子下降,与既往文献论述结果相符^[17,19],进一步证实失眠与内环境炎症关系密切;张金媛等^[23]研究发现电针可通过调节相关炎症信号通路,使 IL-6、TNF- α 等致炎因子释放减少,从而缓解失眠的症状。本次研究结果中,经电针、艾司唑仑干预后 IL-6、TNF- α 含量得到下降;电针组、艾司唑仑组大鼠血清 IL-4、IL-10 含量明显升高,说明电针与西药可以通过调节某种炎症信号通路干预神经炎症,影响到炎症因子的释放,能够纠正内环境失稳状态,降低血清致炎因子的水平、上调抗炎因子水平以此对失眠起到治疗作用。其中,对比艾司唑仑组,电针组大鼠 IL-6 含量更低且差异具有统计学意义,原因可能在于 IL-6 在炎症反应中比 TNF- α 、IL-4、IL-10 更敏感,其次电针治疗失眠在降低 IL-6 水平上比西药更有优势,可能源于电针的多靶点调控能力,包括直接抑制炎症通路、调节下丘脑-垂体-肾上腺轴 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA)、改善氧化应激及肠道菌群等;而西药对 IL-6 的调控可能局限于单一作用机制或间接效应,这一结果也为电针治疗失眠相关的慢性炎症提供了实验依据,但需结合更多分子证据和临床研究支持论证。

小胶质细胞作为脑内主要的常驻免疫细胞类型,能够对炎症刺激做出快速反应,在形态和功能上转变为具有“阿米巴”形态的反应性吞噬

细胞,睡眠障碍可显著改变小胶质细胞形态特征,加剧小胶质细胞反应性^[24],其活化被认为是神经炎症的主要来源。研究发现,睡眠障碍可通过诱导小胶质细胞活化,影响细胞因子释放,促使海马、下丘脑及前额叶皮层等脑区产生 IL-6、TNF- α ,加剧炎症反应^[25]。本次实验中通过免疫荧光共定位观察到模型组 Iba-1 数量增加,说明小胶质细胞处于激活状态,小胶质细胞活化明显,过度活化的小胶质细胞参与炎症反应进展,炎症又可促进失眠的发生发展,如此恶性循环致使中枢内环境的平衡状态出现失调,多因子水平紊乱可经由多种路径诱导小胶质细胞活化,释放促炎性介质从而使炎症反应加剧,更进一步加重失眠。当机体处于炎症状态时,小胶质细胞响应微环境异常信号极化为 M1 和 M2 表型;M1 型可表达 CD86、CD16 和 CD32 等分子,并释放促炎性因子;相反,M2 型表达 CD206、CD163 等分子,产生保护性因子,如 IL-4、IL-10、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 等^[26]。本实验结果显示,下丘脑区 M1 型(促炎)小胶质细胞标记物 Iba-1 与 CD86 共表达显著增强,同时下丘脑组织促炎细胞因子 IL-6、TNF- α 蛋白水平明显升高,证实下丘脑区小胶质细胞反应性对炎症刺激发生响应,机体处于失眠状态时可诱导小胶质细胞向 M1 型极化,加重致炎因子的释放,M2 型(抗炎)小胶质细胞标记物 Iba-1 和 CD163 共表达显著减弱,同时抗炎细胞因子 IL-4、IL-10 蛋白水平显著下降,炎症反应加剧,失眠持续进展。经电针与艾司唑仑治疗后,大鼠下丘脑区 M1 型小胶质细胞标记物 Iba-1 与 CD86 共表达减弱,而 M2 型小胶质细胞标记物 Iba-1 和 CD163 共表达显著增强,抗炎细胞因子 IL-4、IL-10 含量上升,促炎细胞因子 IL-6、TNF- α 含量明显下降,说明经电针与艾司唑仑干预可调控小胶质细胞极化方向及内环境炎症性细胞因子,抑制失眠大鼠体内小胶质细胞向 M1 型极化,转而促进向 M2 型极化,从而减轻脑内神经炎症反应。

综上所述,经研究显示,电针能够明显改善失眠大鼠睡眠障碍,其机制可能与调控小胶质细胞极化方向有关,抑制 M1 型极化,促进其向 M2 型极化,下调 IL-6、TNF- α 促炎因子水平,上调抗炎因子 IL-4、IL-10 水平,减轻炎症,达到改善失眠的目的。

参考文献:

- [1] HUANG T, MARIANI S, REDLINE S. Sleep irregularity and risk of cardiovascular events: the multi-ethnic study of atherosclerosis [J]. J Am Coll Cardiol, 2020, 75(9): 991-999.
- [2] CAO Y, LI Q, LIU L, et al. Modafinil protects hippocampal neurons by suppressing excessive autophagy and apoptosis in mice with sleep deprivation [J]. Br J Pharmacol, 2019, 176(9): 1282-1297.
- [3] IRWIN M R. Sleep and inflammation: partners in sickness and in health [J]. Nat Rev Immunol, 2019, 19(11): 702-715.
- [4] 李曼. 基于免疫炎症学说探讨化痰解郁颗粒治疗失眠症的量效关系及作用机制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2023.
LI M. Study on the quantitative-effect relationship and mechanism of action of Hua Tan Jie Yu Granule in the treatment of insomnia based on the immune inflammation theory [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2023.
- [5] 刘明月, 张洋铭, 黄鑫, 等. 睡眠剥夺导致小鼠行为异常及海马小胶质细胞过度活化 [J]. 空军军医大学学报, 2022, 13(9): 946-951.
LIU M Y, ZHANG Y M, HUANG X, et al. Behavioral abnormalities and overactivation of hippocampal microglia in a mouse model of sleep deprivation [J]. J Air Force Med Univ, 2022, 13(9): 946-951.
- [6] 张香香, 陶倩云, 刘浩飞, 等. 电针预处理对大鼠脑缺血再灌注后小胶质细胞极化的影响 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2024, 26(2): 207-211.
ZHANG X X, TAO Q Y, LIU H F, et al. Effect of electroacupuncture preconditioning on microglia polarization after cerebral ischemia reperfusion injury in rats [J]. Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis, 2024, 26(2): 207-211.
- [7] 黄麟苻, 易丽贞, 黄慧源, 等. 电针调控小胶质细胞极化对脑卒中肢体痉挛大鼠的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2024, 31(4): 132-138.
HAUNG L X, YI L Z, HUANG H Y, et al. Effects of electroacupuncture regulating the polarization of microglia on post-stroke spasticity in rats [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2024, 31(4): 132-138.
- [8] 魏歆然, 郑雪娜, 裴芸, 等. 大鼠失眠模型造模中对氯苯丙氨酸混悬液改良法的探讨 [J]. 湖南中医药大学学报, 2018, 38(9): 986-989.
WEI X R, ZHENG X N, PEI Y, et al. An improved method for the preparation of para-chlorobenzalanine suspension in a rat model of insomnia [J]. J Hunan Univ Chin Med, 2018, 38(9): 986-989.
- [9] 刘臻, 谢晨, 赵娜, 等. 失眠动物模型的制作与评价 [J]. 中医学报, 2013, 28(12): 1846-1848.
LIU Z, XIE C, ZHAO N, et al. Preparation and evaluation of insomnia animal model [J]. Acta Chin Med, 2013, 28(12): 1846-1848.
- [10] 李忠仁. 实验针灸学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007.
LI Z R. Experimental acupuncture science [M]. Beijing: China Press of Chinese Medicine, 2007.
- [11] 乔丽娜, 高巧玲, 谭连红, 等. 电针单穴与腧穴配伍对失眠大鼠血清中白介素-1 β 、脑源性神经生长因子等睡眠-觉醒相关因子含量的影响 [J]. 针刺研究, 2018, 43(10): 651-656.
QIAO L N, GAO Q L, TAN L H, et al. Electroacupuncture of multiple acupoints is significantly superior to that of single acupoint in improving sleep by regulating serum sleep-promoting and awakening-promoting factors in insomnia rats [J]. Acupunct Res, 2018, 43(10): 651-656.
- [12] 鄢天涯, 朱墨豪, 韩文华, 等. 吴清明运用调枢安神法针刺治疗失眠症的经验 [J]. 中医药导报, 2023, 29(10): 197-199, 207.
YAN T Y, ZHU M H, HAN W H, et al. Wu Qingming's experience in using acupuncture with the Tiao Shu An Shen method to treat insomnia [J]. Guiding J Tradit Chin Med Pharm, 2023, 29(10): 197-199, 207.
- [13] 李仲文, 杨玲, 宋孝军, 等. 神门、三阴交配伍对失眠症睡眠质量和血清 GABA、5-HT 的影响 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(2): 860-866.
LI Z W, YANG L, SONG X J, et al. Effects of Shenmen (HT7) and Sanyinjiao (SP6) acupoint compatibility on sleep quality, serum GABA and 5-HT in insomnia [J]. Modern Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2022, 24(2): 860-866.
- [14] 于心同, 何天峰, 郇兴红, 等. 针灸治疗失眠临床用穴频次分析 [J]. 针灸临床杂志, 2012, 28(6): 72-74.
YU X T, HE T F, BING X H, et al. Acupoint selection frequency of acupuncture for treating insomnia [J]. J Clin Acupunct Moxibustion, 2012, 28(6): 72-74.
- [15] 黄楷棋, 汤永红. 白细胞介素因子与慢性失眠的相互作用研究进展 [J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2024, 31(1): 57-61.
HUANG K Q, TANG Y H. Interplay of interleukin factors and chronic insomnia [J]. Chin J Neuroimmunol Neurol, 2024, 31(1): 57-61.
- [16] 舒治钧, 张全怡, 徐义鹏, 等. 睡眠障碍后小胶质细胞活化相关信号通路的研究进展 [J]. 生理学报, 2023, 75(4): 569-574.
SHU Z J, ZHANG Q Y, XU Y P, et al. Research progress of signal pathways of microglia activation in sleep disorders

- [J]. *Acta Physiol Sin*, 2023, 75(4): 569–574.
- [17] STAHL S T, SMAGULA S F, RODAKOWSKI J, et al. Subjective sleep quality and trajectories of interleukin-6 in older adults [J]. *Am J Geriatr Psychiatry*, 2021, 29(2): 204–208.
- [18] IMERI L, OPP M R. How (and why) the immune system makes us sleep [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2009, 10(3): 199–210.
- [19] BESEDOVSKY L, LANGE T, HAACK M. The sleep-immune crosstalk in health and disease [J]. *Physiol Rev*, 2019, 99(3): 1325–1380.
- [20] 王芳, 瞿萍, 夏兰, 等. 慢性失眠障碍患者血清肿瘤坏死因子与记忆的相关性研究 [J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2017, 43(9): 530–534.
- WANG F, QU P, XIA L, et al. The study on the correlation of serum levels of tumor necrosis factor with memory in the patients with chronic insomnia disorder [J]. *Chin J Nerv Ment Dis*, 2017, 43(9): 530–534.
- [21] FREY D J, FLESHNER M, WRIGHT K P Jr. The effects of 40 hours of total sleep deprivation on inflammatory markers in healthy young adults [J]. *Brain Behav Immun*, 2007, 21(8): 1050–1057.
- [22] AGHELAN Z, KARIMA S, KHAZAIE H, et al. Interleukin-1 α and tumor necrosis factor α as an inducer for reactive-oxygen-species-mediated NOD-like receptor protein 1/NOD-like receptor protein 3 inflammasome activation in mononuclear blood cells from individuals with chronic insomnia disorder [J]. *Eur J Neurol*, 2022, 29(12): 3647–3657.
- [23] 张金媛, 顾银银, 葛玲玲, 等. 基于 TLR/NF- κ B 信号通路探讨电针治疗失眠症模型大鼠的作用及机制 [J]. *长春中医药大学学报*, 2022, 38(8): 862–866.
- ZHANG J Y, GU Y Y, GE L L, et al. Exploration of the effect and mechanism of electroacupuncture in the treatment of insomnia in rats based on the TLR/NF- κ B signaling pathway [J]. *J Changchun Univ Chin Med*, 2022, 38(8): 862–866.
- [24] BELLESI M, DE VIVO L, CHINI M, et al. Sleep loss promotes astrocytic phagocytosis and microglial activation in mouse cerebral cortex [J]. *J Neurosci*, 2017, 37(21): 5263–5273.
- [25] LIU H, HUANG X, LI Y, et al. TNF signaling pathway-mediated microglial activation in the PFC underlies acute paradoxical sleep deprivation-induced anxiety-like behaviors in mice [J]. *Brain Behav Immun*, 2022, 100: 254–266.
- [26] PAOLICELLI R C, SIERRA A, STEVENS B, et al. Microglia states and nomenclature: a field at its crossroads [J]. *Neuron*, 2022, 110(21): 3458–3483.

[收稿日期] 2025-01-06