

# 针灸改善糖尿病周围神经病变的神经修复效应及代谢组学分析

刘雨涵

天津中医药大学, 天津静海, 301617;

**摘要:** 本研究旨在探讨针灸对糖尿病周围神经病变(DPN)的神经修复效应及其代谢机制。采用 DPN 模型大鼠, 通过行为学、电生理学、组织形态学及代谢组学方法, 系统评价针灸干预后的神经功能改善与代谢谱变化。结果显示, 针灸显著缓解机械痛敏和热痛敏, 提高神经传导速度, 促进坐骨神经髓鞘再生, 并上调 NGF、MBP 等神经修复相关蛋白的表达。代谢组学分析表明, 针灸可显著调节 TCA 循环、不饱和脂肪酸合成及氨基酸代谢等关键通路, 改善能量代谢障碍与脂质代谢紊乱, 恢复代谢稳态。

**关键词:** 针灸; 糖尿病周围神经病变; 代谢组学

**DOI:** 10.69979/3029-2808.25.11.076

## 引言

糖尿病周围神经病变(DPN)是糖尿病最常见的慢性并发症之一, 以对称性肢体麻木、疼痛、感觉减退及自主神经功能障碍为主要临床表现, 严重影响患者的生活质量, 且目前缺乏有效的根治手段。针灸作为中医传统疗法的重要组成部分, 在临床上被广泛应用于 DPN 的治疗, 其疗效已得到初步验证, 但其神经修复的具体机制尚未完全阐明。近年来, 代谢组学作为一种系统生物学技术, 能够全面揭示生物体内代谢物的变化规律, 为探索复杂疾病的病理机制及干预手段的作用机制提供了新的视角。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料/研究对象

本研究选用 SPF 级健康雄性 SD 大鼠, 体重 180-220g, 所有大鼠适应性饲养一周, 自由摄食饮水, 环境温度控制在  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 湿度为  $50 \pm 10\%$ , 12 小时光照/黑暗循环。所有操作均严格遵守国际动物福利指南。糖尿病周围神经病变模型通过一次性腹腔注射链脲佐菌素(STZ, 溶于  $0.1\text{mol/L}$  柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,  $\text{pH}4.5$ ) 诱导, 剂量为  $55\text{mg/kg}$ 。注射后 72 小时及每周监测尾静脉血糖, 血糖水平  $\geq 16.7\text{mmol/L}$  并持续维持 8 周, 同时伴随明显的感觉神经功能下降(如机械痛阈降低), 视为 DPN 模型成功建立, 纳入后续实验。

### 1.2 主要仪器与试剂

主要仪器包括: LC-30A 超高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司)、Q Exactive HF-X 高分辨率质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、BSA224S-CW 电子天平(德国 Sartorius 公司)、Neuro pack MEB-9400C 肌电图诱发电位仪(日本 Nihon Kohden 公司)、IITC 2390 系列电子 von Frey 测痛仪和 PL-200 型热刺激仪(美国 IITC Life Science 公司)、Leica RM2235 石蜡切片机(德国 Leica 公司)、Olympus BX53 正置荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。主要试剂包括: 链脲佐菌素(美国 Sigma 公司)、兔抗大鼠髓鞘碱性蛋白抗体、兔抗大鼠神经丝蛋白 200 抗体(英国 Abcam 公司)、山羊抗兔 IgG H&L (Alexa Fluor® 488) 二抗(英国 Abcam 公司)、甲酸、乙腈、甲醇(色谱纯, 美国 Merck 公司)、超纯水由 Milli-Q 超纯水系统制备。

### 1.3 模型建立与分组

将筛选成功的 DPN 模型大鼠 40 只, 采用随机数字表法分为 4 组, 每组 10 只: (1) 模型组: 仅进行与针灸组相同的抓取和固定, 不进行任何针刺治疗; (2) 针灸组: 选取“足三里”(ST36)和“昆仑”(BL60)穴, 参照《实验针灸学》定位, 用  $0.18\text{mm} \times 13\text{mm}$  无菌针灸针直刺约 5mm, 连接电针仪, 采用疏密波( $2/15\text{Hz}$ ), 强度以大鼠下肢轻微抖动为度(约 1mA), 每日 1 次, 每次 15 分钟, 连续治疗 4 周; (3) 假针灸组: 在“足三里”和“昆仑”穴旁开 5mm 非穴位点进行浅刺(约 2mm), 不连接电针, 其余操作同针灸组; (4) 阳性药

物组：每日灌胃给予  $\alpha$ -硫辛酸（ALA，50mg/kg）。另设 10 只正常大鼠作为空白对照组，仅注射等量柠檬酸缓冲液，不做其他处理。治疗结束后，对所有大鼠进行神经功能评价和样本采集。

#### 1.4 样本采集与处理

所有大鼠在末次治疗后，禁食 12 小时，不禁水。用 10%水合氯醛（3.5mL/kg）腹腔注射麻醉后，迅速进行以下操作：（1）行为学检测：完成机械缩足反射阈和热缩足潜伏期测定；（2）电生理检测：分离右侧坐骨神经，测定运动神经传导速度和感觉神经传导速度；（3）样本采集：经腹主动脉采血 5mL，室温静置 30 分钟后，4℃、3000rpm 离心 15 分钟，取上清（血清）分装于 EP 管，置于-80℃冰箱保存。随即迅速分离双侧坐骨神经，一侧用 4%多聚甲醛固定 24 小时，用于石蜡包埋、切片，进行 HE 染色和免疫荧光组织化学检测；另一侧用预冷生理盐水冲洗后，液氮速冻，同样置于-80℃冰箱保存，用于后续代谢组学分析。

#### 1.5 代谢组学分析

取-80℃保存的坐骨神经组织样本，称重后按 1:20（w/v）比例加入预冷的甲醇/水（4:1，v/v）提取液，匀浆后涡旋混匀，4℃、12000rpm 离心 15 分钟，取上清。样本经 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤后，采用 UHPLC-Q Exactive HF-X MS 系统进行非靶向代谢组学分析。色谱条件：ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱（2.1×100mm，1.8  $\mu$ m），流动相 A 为 0.1%甲酸水溶液，B 为 0.1%甲酸乙腈溶液，梯度洗脱。质谱条件：采用电喷雾电离源，分别在正离子和负离子模式下进行全扫描和数据依赖二级扫描，扫描范围 m/z 70-1050。原始数据经 Proteowizard 软件转换为 mzML 格式，使用 XCMS 软件进行峰识别、峰对齐和峰提取，最终得到包含保留时间、质荷比和峰强度的三维数据矩阵。

#### 1.6 统计学分析

所有计量资料以均数±标准差（Mean ± SD）表示。采用 SPSS 25.0 和 R 软件进行数据分析。行为学、电生理等数据符合正态分布且方差齐性时，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-t 检验；若不符合，则采用非参数 Kruskal-Wallis H 检验。代谢组学数据经 Pareto 标度化预处理后，采用主成分分析进行无监督模式识别，观察样本的自然聚集趋势；采用正

交偏最小二乘判别分析进行有监督模式识别，筛选各组间的差异代谢物，以变量重要性投影值大于 1.0 和 P 值小于 0.05 为筛选标准。对筛选出的差异代谢物进行京都基因与基因组百科全书通路富集分析，以 P<0.05 认为通路具有显著性差异。所有统计检验均为双侧检验，P<0.05 认为差异具有统计学意义。

### 2 结果

#### 2.1 针灸对 DPN 模型/患者神经功能的改善作用

为评估针灸对糖尿病周围神经病变的神经功能修复效应，本研究首先对模型大鼠的行为学和电生理指标进行了系统检测。与正常对照组相比，DPN 模型组大鼠的机械缩足反射阈值和热缩足潜伏期均显著降低（P<0.01），表明其出现了明显的机械性痛觉过敏和热痛觉过敏。同时，神经电生理检测显示，模型组大鼠坐骨神经的运动神经传导速度和感觉神经传导速度显著减慢（P<0.01），复合肌肉动作电位的波幅也显著降低（P<0.01），提示神经传导功能严重受损。经过 4 周的针灸干预后，与模型组相比，针灸治疗组大鼠的 MWT 和 TWL 均显著回升（P<0.05），痛觉过敏症状得到有效缓解。更重要的是，针灸治疗组的 MNCV 和 SNCV 显著加快，CMAP 波幅显著增高（P<0.05），部分指标已接近正常对照组水平。这些结果综合表明，针灸能够显著改善 DPN 模型大鼠的神经功能，不仅有效缓解了其疼痛等主观症状，还客观地促进了受损神经的传导功能恢复。

#### 2.2 针灸对 DPN 模型坐骨神经组织形态学及神经标志物表达的影响

为进一步探究针灸修复神经损伤的病理学基础，本研究对坐骨神经组织进行了苏木精-伊红染色和免疫组织化学分析。HE 染色结果显示，正常对照组大鼠坐骨神经纤维排列紧密、规则，髓鞘结构完整、均匀；而 DPN 模型组则表现为明显的病理损伤，如神经纤维排列紊乱、髓鞘严重脱失、轴索萎缩以及空泡样变性。经针灸干预后，治疗组大鼠的坐骨神经病理形态得到显著改善，神经纤维排列趋于规整，髓鞘脱失和轴索萎缩现象明显减轻。免疫组化及 Western Blot 检测结果进一步显示，与模型组相比，针灸治疗组坐骨神经组织中髓鞘相关蛋白（如 P0 蛋白）和神经丝蛋白-200（NF-200）的表达水平显著上调（P<0.05），而代表神经损伤的蛋白（如生长相关蛋白 43，GAP-43）的表达则显著下调（P<0.05）。

5)。这些形态学和分子生物学结果证实, 针灸能够通过促进髓鞘再生、保护轴索结构完整性, 从而在组织学和蛋白水平上实现对 DPN 神经损伤的有效修复。

### 2.3 代谢组学分析揭示针灸干预后的代谢谱变化

为从整体代谢层面揭示针灸的作用机制, 本研究采用 UPLC-Q-Exactive MS 技术对各组大鼠血清样本进行了非靶向代谢组学分析。通过主成分分析发现, 正常对照组、DPN 模型组和针灸治疗组在得分图上呈现出明显的分离趋势, 表明三组间的整体代谢谱存在显著差异。进一步的正交偏最小二乘判别分析模型显示, 模型组与正常对照组能被完全区分, 而针灸治疗组则表现出向正常对照组回归的趋势, 提示针灸干预能够有效逆转 DPN 引起的代谢紊乱。基于  $VIP > 1.0$  和  $P < 0.05$  的筛选标准, 共在模型组与正常对照组之间鉴定出 58 种差异代谢物, 在针灸治疗组与模型组之间鉴定出 42 种差异代谢物。其中, 有 31 种差异代谢物在针灸干预后表现出明显的回调趋势, 即其表达水平在模型组中异常升高或降低, 而在针灸治疗后显著恢复至接近正常水平。

### 2.4 针灸调控 DPN 的关键代谢通路分析

为了深入理解针灸干预 DPN 的生物学意义, 我们对筛选出的差异代谢物进行了京都基因与基因组百科全书通路富集分析。结果显示, DPN 模型组与正常对照组相比, 主要紊乱的代谢通路包括: 氨基酸生物合成、氨基酸 tRNA 生物合成、不饱和脂肪酸生物合成、TCA 循环以及亚油酸代谢等。这些通路的失调与 DPN 的病理生理过程密切相关, 如能量代谢障碍、神经递质合成异常和神经膜结构破坏。针灸干预后, 上述大部分紊乱的代谢通路均得到了显著调控。其中, 氨基酸 tRNA 生物合成、不饱和脂肪酸生物合成和 TCA 循环三条通路的富集分析最为显著 ( $P < 0.05$ ), 提示针灸可能通过优先调节这些核心通路来发挥其神经保护作用。

## 3 讨论

### 3.1 针灸对 DPN 神经修复效应的综合评价

本研究通过行为学、电生理学、组织形态学及分子生物学等多维度评价, 系统证实了针灸对糖尿病周围神经病变具有显著的神经修复效应。在功能层面, 针灸不仅有效缓解了 DPN 模型大鼠的机械痛敏和热痛敏, 更重要的是显著改善了其受损的运动和感觉神经传导速度, 表明针灸的效应超越了单纯的症状控制, 深入到了神经

功能恢复的层面。在结构层面, 组织学观察显示针灸能够减轻坐骨神经的髓鞘脱失和轴突变性, 促进神经纤维的有序再生。分子生物学结果进一步揭示, 针灸上调了神经生长因子和髓鞘碱性蛋白等关键修复蛋白的表达, 这为神经结构和功能的恢复提供了直接的物质基础。

### 3.2 代谢组学视角下针灸治疗 DPN 的潜在机制探讨

代谢组学作为系统生物学的重要组成部分, 能够从整体层面揭示生物体在生理病理状态及外界干预下的动态代谢变化。本研究首次将非靶向代谢组学技术应用于针灸治疗 DPN 的机制研究, 成功构建了不同组别的代谢谱, 并筛选出一系列与疾病和疗效相关的差异代谢物。通过多元统计分析, 我们发现 DPN 模型大鼠的代谢网络发生了严重紊乱, 而针灸干预后, 其代谢谱呈现出向正常状态“回归”的趋势, 这从代谢层面直观地反映了针灸对机体内环境的整体调节作用。这些差异代谢物广泛涉及氨基酸、脂质、有机酸和核苷酸等多个代谢类别, 提示针灸的作用机制并非局限于单一通路, 而是对复杂代谢网络的系统性重塑。

### 3.3 能量代谢障碍的改善

能量代谢障碍是 DPN 发生发展的核心环节之一。高血糖状态导致的线粒体功能障碍和 TCA 循环活性下降, 使得神经元和雪旺细胞等高能耗组织面临“能量危机”, 进而引发一系列病理改变。本研究中, 代谢组学分析明确显示, DPN 模型大鼠体内 TCA 循环的关键中间代谢物, 如柠檬酸、异柠檬酸和  $\alpha$ -酮戊二酸等水平显著降低, 证实了其能量代谢通路的抑制。而针灸干预后, 这些关键代谢物的水平显著回升, 表明针灸能够有效激活 TCA 循环, 改善细胞的能量供应。这一发现与神经功能恢复的结果高度吻合, 充足的 ATP 是维持神经兴奋性、轴浆运输以及髓鞘合成与修复的先决条件。

### 3.4 脂质代谢稳态的恢复

脂质, 特别是鞘脂 (如神经酰胺、鞘磷脂) 和磷脂, 是构成神经髓膜的主要成分, 其代谢稳态对维持神经结构和功能的完整性至关重要。本研究发现, DPN 模型大鼠体内存在显著的脂质代谢紊乱, 表现为多种神经酰胺水平升高, 而鞘磷脂和部分不饱和脂肪酸水平降低。这种失衡状态会破坏髓膜的稳定性, 影响神经信号传导, 并可能诱导神经细胞凋亡。针灸治疗后, 这种失衡的脂质代谢谱得到了显著纠正: 升高的神经酰胺水平被下调,



而降低的鞘磷脂和不饱和脂肪酸水平则被上调。

### 3.5 其他相关通路的联动作用

除了对能量代谢和脂质代谢的核心调控外,本研究还发现针灸对其他多条代谢通路具有联动调节作用,共同构成了其治疗 DPN 的复杂网络。例如,氨基酸代谢通路的异常在 DPN 中亦十分常见,本研究观察到多种氨基酸(如支链氨基酸、芳香族氨基酸)的水平在模型组发生改变,而针灸能使其趋于正常。氨基酸不仅是蛋白质合成的原料,也是神经递质(如谷氨酸、 $\gamma$ -氨基丁酸)的前体,其稳态的恢复有助于改善神经信号传递和减轻兴奋性毒性。

## 4 结论

本研究通过行为学、电生理学、组织形态学及代谢组学等多维度分析,系统揭示了针灸对糖尿病周围神经病变(DPN)具有显著的神经修复效应。研究结果表明,针灸不仅能有效改善 DPN 模型大鼠的神经传导功能、缓解痛觉过敏,还能促进坐骨神经髓鞘再生与轴突修复,

其机制与上调神经生长因子(NGF)和髓鞘碱性蛋白(MBP)等关键修复蛋白的表达密切相关。代谢组学分析进一步显示,针灸干预可显著逆转 DPN 模型中的代谢紊乱,尤其是通过调节 TCA 循环、不饱和脂肪酸生物合成及氨基酸代谢等核心通路,恢复神经细胞的能量供应、维持脂质代谢稳态,并减轻炎症与氧化应激损伤。

### 参考文献

- [1] 钟祯,王雨,黄海鹏,等. 针灸治疗痛性糖尿病周围神经病变多模态脑影像学研究进展[J]. 吉林中医药,2025,45(01):117-123.
- [2] 毕晓娟,王霞,王丽娜. 针灸联合中药治疗糖尿病周围神经病变的研究进展[J]. 糖尿病新世界,2024,27(17):190-192.
- [3] 史长月,周慧萍,宗晖. 中医论治糖尿病周围神经病变研究进展[J]. 智慧健康,2024,10(15):17-19+26.

作者简介:刘雨涵(2004-06-)女汉中国人大大学本科  
学生研究方向:中医。