背部推法通过调节色氨酸－犬尿氨酸代谢途径改善大鼠慢性疲劳综合征认知障碍*

钟叶蓓，林巧婷，杨尚林，杨小慧，裴鑫，李铁浪

湖南中医药大学针灸推拿与康复学院，湖南 长沙 410208

摘要：目的：探讨背部推法通过调节色氨酸－犬尿氨酸代谢途径（kynurenine pathway，KP）改善慢性疲劳综合征（chronic fatigue syndrome，CFS）大鼠认知障碍的作用机制。方法：从 32 只 SD 大鼠中随机选取 8 只作为空白组，其余大鼠采用多因素复合应激刺激法建立 CFS 模型，并分为模型组、推法组及 1－甲基 L－色氨酸（1－methyl－L－tryptophan，1－MT）组，每组 8 只。造模 21 d 后，1－MT 组予以 1－MT 溶液灌胃，推法组在大鼠背部操作推法，每日 1 次，连续 14 d。采用旷场实验检测大鼠的运动功能，新物体识别实验检测大鼠的认知功能。采用 ELISA 法检测大鼠海马中白细胞介素（interleukin，IL）－1β、IL－6、肿瘤坏死因子－α（tumor necrosis factor－α，TNF－α）、犬尿喹啉酸（kynurenic acid，KYNA）、犬尿氨酸－3－单加氧酶（kynurenine－3－monooxygenase，KMO）、3－羟基犬尿氨酸（3－hydroxy－kynurenine，3－HK）、喹啉酸（quinolinic acid，QUIN）含量。采用 Western blot 法检测大鼠海马 N－甲基－D－天冬氨酸受体（N－methyl－D－aspartate receptor，NMDAR）蛋白表达水平，免疫荧光法检测海马离子钙结合衔接分子－1（ionized calcium binding adapter molecule－1，Iba－1）阳性百分比。结果：旷场实验显示，与空白组比较，模型组大鼠的总路程、中心区路程、中心区时间、中心区进入次数及跨格数均减少（$P<0.05$）；与模型组比较，推法组和 1－MT 组大鼠的总路程、中心区路程、中心区时间、中心区进入次数及跨格数均增加（$P<0.05$）。新物体识别实验显示，与空白组比较，模型组大鼠的新物体识别指数与识别概率降低（$P<0.01$）；与模型组比较，推法组和 1－MT 组大鼠的新物体识别指数与识别概率升高（$P<0.01$）。与空白组比较，模型组大鼠海马 IL－1β、IL－6、TNF－α、KMO、3－HK、QUIN 含量升高，KYNA 含量降低（$P<0.01$）；与模型组比较，推法组与 1－MT 组大鼠海马 IL－1β、IL－6、TNF－α、KMO、3－HK、QUIN 含量降低，KYNA 含量升高（$P<0.05$）。与空白组比较，模型组大鼠海马 NMDAR1、NMDAR2A、NMDAR2B 蛋白表达水平升高（$P<0.01$）；与模型组比较，推法组和 1－MT 组大鼠海马 NMDAR1、NMDAR2A、NMDAR2B 蛋白表达水平降低（$P<0.01$）。与空白组比较，模型组大鼠海马 CA1 区 Iba－1 阳性百分比升高（$P<0.01$）；与模型组比较，推法组和 1－MT 组大鼠海马 CA1 区 Iba－1 阳性百分比降低（$P<0.01$）。结论：背部推法可能通过调节 KP 途径，抑制神经毒性，从而改善 CFS 大鼠的认知障碍。

关键词：慢性疲劳综合征认知障碍；背部推法；色氨酸－犬尿氨酸代谢途径；神经毒性；神经炎症
DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2025.06.213
中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999（2025）06－1325－08

Tuina Manipulating on Back Improving Cognitive Impairment in Chronic Fatigue Syndrome in Rats by Regulating the Tryptophan－Kynurenine Metabolism Pathway

ZHONG Yebei，LIN Qiaoting，YANG Shanglin，YANG Xiaohui，PEI Xin，LI Tielang

College of Acupuncture，Massage and Rehabilitation，Hunan University of Chinese Medicine，Changsha Hunan China 410208

Abstract：Objective：To investigate the mechanism of Tuina manipulating on back in improving cognitive impairment in rats with chronic

* **基金项目**：湖南省自然科学基金面上项目（2023JJ30454）；湖南省教育厅科学研究重点项目（22A0273）；国家级大学生创新创业训练计划项目（202210541035）；湖南中医药大学研究生创新项目（2023CX77）

fatigue syndrome (CFS) by regulating the tryptophan – kynurenine pathway (KP). Methods: 8 SD rats were randomly selected as the blank group, and the rest of the rats were divided into model group, push group and 1 – methyl – L – tryptophan (1 – MT) group, with 8 rats in each group. After 21 days of modeling, the 1 – MT group was given 1 – MT solution by gavage, and the Tuina group operated the push – up method on the back of the rats once a day for 14 consecutive days. The open field experiment was used to detect the motor function of rats, and the new object recognition experiment was used to detect the cognitive function of rats. ELISA was used to detect interleukin (IL) – 1β, IL – 6, tumor necrosis factor – α (TNF – α), kynurenic acid (KYNA), kynurenine – 3 – monooxygenase (KMO), 3 – 3 – hydroxy – kynurenine (3 – HK) and quinolinic acid (QUIN) content. Western blot was used to detect the protein expression level of N – methyl – D – aspartate receptor (NMDAR) in the hippocampus, and the positive percentage of ionized calcium binding adapter molecule – 1 (Iba – 1) in the hippocampus was detected by immunofluorescence. Results: Compared with the blank group, the total distance travel, distance in the center area, time in the center area, number of entries in the center area and number of cross – grids in the model group were reduced ($P < 0.05$). Compared with the model group, the total distance, distance in the central area, time in the central area, number of entries in the central area and the number of spans in the 1 – MT group were increased ($P < 0.05$). The new object recognition experiment showed that compared with the blank group, the recognition index and recognition probability of the rats in the model group were reduced ($P < 0.01$). Compared with the model group, the recognition index and recognition probability of the rats in the push – method group and the 1 – MT group were increased ($P < 0.01$). Compared with the blank group, the levels of IL – 1β, IL – 6, TNF – α, KMO, 3 – HK, and QUIN in the hippocampus of the model group rats increased, while the level of KYNA decreased ($P < 0.01$); Compared with the model group, the levels of IL – 1β, IL – 6, TNF – α, KMO, 3 – HK, and QUIN in the hippocampus of rats in the Tuina group and 1 – MT group decreased, while the level of KYNA increased ($P < 0.05$). Compared with the blank group, the protein expression levels of NMDAR1, NMDAR2A, and NMDAR2B in the hippocampus of the model group rats increased ($P < 0.01$); Compared with the model group, the expression levels of NMDAR1, NMDAR2A, and NMDAR2B proteins in the hippocampus of rats in Tuina group and 1 – MT group were reduced ($P < 0.01$). Compared with the blank group, the positive percentage of Iba – 1 in the hippocampal CA1 region of the model group rats increased ($P < 0.01$); Compared with the model group, the percentage of Iba – 1 positivity in the hippocampal CA1 region of rats in Tuina group and 1 – MT group decreased ($P < 0.01$). Conclusion: Tuina manipulating on back method may improve cognitive impairment in CFS rats by regulating the KP pathway and inhibiting neurotoxicity.

Key words: cognitive impairment in chronic fatigue syndrome; Tuina manipulating on back; tryptophan – kynurenine metabolic pathway; neurotoxicity; neuroinflammation

慢性疲劳综合征(chronic fatigue syndrome, CFS)是一种连续 3 个月及以上同时出现活动后加剧的虚弱性疲劳、劳累后不适、认知困难及睡眠不解乏或睡眠障碍的复杂性多系统慢性疾病[1]。CFS 的病理生理机制可能与病毒感染、免疫功能异常、氧化应激等因素有关。研究发现,色氨酸 – 犬尿氨酸代谢途径(kynurenine pathway, KP)异常可能是 CFS 发病的机制之一[2]。大部分色氨酸通过吲哚胺 – 2, 3 – 双加氧酶(indoleamine 2, 3 – dioxygenasel, IDO)催化为犬尿氨酸(kynurenine, KYN),小胶质细胞介导的神经炎症导致外周 KP 途径产生的神经毒性物质进入大脑,并刺激脑内 KP 途径产生过量神经毒性物质。研究表明,CFS 患者的神经炎症程度与疼痛、抑郁和认知障碍等症状的严重程度存在相关性[3]。在 KP 代谢物中,喹啉酸(quinolinic acid, QUIN)已被证明具有显著的神经毒性特性[4]。

人体背部区域包含膀胱经、督脉、背俞穴及夹脊穴等,这些穴位具有调节脏腑的作用。杨松堤等[5]认为,扩大对背俞穴的空间刺激可对疾病进行整体治疗,抑制复杂病变中的恶性循环。推法是常用的推拿手法之一,可调畅表里阴阳及脏腑之气,发挥行气活血、疏通经络的功效。研究显示,推拿对 CFS 的疗效优于单一针刺、中药内服及西药治疗,其可极大刺激背部区域,缓解 CFS 的疲劳症状[6]。前期研究发现,刺激背部区域可有效改善患者健康状况,可能通过提高皮质醇(cortisol, CORT)含量,调节下丘脑 – 垂体 – 肾上腺轴(hypothalamic – pituitary – adrenal axis, HPA)轴功能,进而改善疲劳症状[7-8],但其具体机制尚未完全阐明。因此,本研究以 IDO 抑制剂 1 – 甲基 L – 色氨酸(1 – methyl – L – tryptophan, 1 – MT)作为对照,观察背部推法对 CFS 大鼠疲劳症状的影响,以及通过调节 KP 途径改善 CFS 大鼠认知障碍的作用机制。

1　材料

1.1　动物　SPF 级健康成年 SD 大鼠 32 只,雌雄各

半，体质量 160 ~ 180 g，由湖南中医药大学动物实验中心提供。大鼠在湖南中医药大学动物中心实验室进行分笼饲养，温度 24 ~ 26 ℃，湿度 50% ~ 70%。本研究经湖南中医药大学伦理委员会审核批准，伦理编号：LLBH - 202209170001。

1.2　试剂　1 - MT（美国 Glpbio）；白细胞介素（interleukin，IL）- 1β、IL - 6、肿瘤坏死因子 - α（tumor necrosis factor - α，TNF - α）、犬尿喹啉酸（kynurenic acid，KYNA）、QUIN、IDO 酶联免疫吸附测定试剂盒（厦门仑昌硕生物科技有限公司）；犬尿氨酸 - 3 - 单加氧酶（kynurenine - 3 - monooxygenase，KMO）、3 - 羟基犬尿氨酸（3 - hydroxy - kynurenine，3 - HK）酶联免疫吸附测定试剂盒（江苏晶美生物科技有限公司）；N - 甲基 - D - 天冬氨酸受体 1（N - methyl - D - aspartate receptor 1，NMDAR1）、NMDAR2A、NMDAR2B（Affinity Biosciences）；异氟烷（深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司）。

1.3　仪器　酶标分析仪（深圳雷杜生命科学股份有限公司）；通用冷冻离心机（ThermoFisher Scientific 公司）；大鼠旷场视频分析系统［博锐唯思（香港）科技有限公司］；微量加样器（Gilson 公司）；电热恒温水浴槽（上海一恒科学仪器有限公司）；脱色摇床（海门其林贝尔仪器制造公司）；电泳仪（北京百晶生物技术有限公司）；SDS - PAGE 电泳系统、Chemi-Doc MP 化学发光成像系统（美国 Bio - Rad 公司）；凝胶成像系统（美国 UVP）。

2　方法

2.1　分组及造模　从 32 只 SD 大鼠中随机选取 8 只作为空白组，其余大鼠采用多因素复合应激刺激法建立 CFS 模型[9 - 11]。将造模成功的大鼠随机分为模型组、推法组及 1 - MT 组，每组 8 只。造模方法如下：（1）强迫负重游泳：大鼠进行力竭性训练，尾部增加自身体质量 3% 的焊锡丝，于水温（25 ± 2）℃、水深超过 40 cm（确保大鼠完全进入水中而不触碰水桶底部）的水桶内强迫游泳至力竭，每日 1 次，持续 21 d；力竭标准：大鼠四肢失调，无法继续游泳，身体完全沉入水下超过 10 s，无法浮起。（2）慢性应激刺激：每日随机抽取 2 种刺激，刺激强度以大鼠可承受为宜，刺激方法包括：禁食 12 h、禁水 12 h、夜间照明 12 h、夹尾 60 s、噪声干扰 1 h（110 dB）、足底电击 5 次（强度 1 mA、30 V，每次 30 s，间隔 60 s），每日 1 次，持续 21 d。造模结束后，观察大鼠的精神状态、粪便性状、皮毛色泽及耳尾颜色，并进行评分，综合评分 > 4 分即为模型制备成功[11 - 12]。空白组大鼠不予造模，正常饲养。

表 1　实验大鼠一般情况评分表

指标	0 分	1 分	2 分	3 分
精神状态	神态安静，活泼好动，眼睛有神	易激怒好争斗，自主活动减少	懒动倦怠，眼神暗淡无光，反应能力降低	精神萎靡，缩肩拱背，攻击性、对抗性行为减少
粪便性状	粪便干，成形	粪便黏软有形	粪便不成形，但不稀薄	便溏，黏腻恶臭
皮毛色泽	皮肤与脂肪连接紧密，皮毛光洁整齐	皮肤略松弛，毛发枯黄无光泽	皮肤松弛易抓取，毛发干枯或结穗打卷，无光泽	皮肤松弛无脂肪，抓之触骨，全身毛发枯槁，稀疏脱落
耳尾颜色	红润光泽	淡红少泽	淡白少泽	苍白或透青色

2.2　治疗方法　造模结束后，1 - MT 组大鼠予 1 - MT 溶液灌胃（1 g · L^{-1}），每次 1 mL，每日 1 次，连续 14 d。推法组大鼠吸入异氟烷麻醉后，以俯卧位固定在操作台上，用气麻机维持麻醉。随后，使用团队自制的推法刺激器从大鼠颈部向尾部（第一胸椎棘突到第四骶椎棘突下缘）单方向操作推法，参数设定为时间 20 min，频率 15 次 · min^{-1}，力度 0.5 kg。推动距离以大鼠实际的背部长度为准[13 - 14]，每日 1 次，连续 14 d。

2.3　行为学检测

2.3.1　旷场实验　将大鼠放置于旷场箱（100 cm × 100 cm × 50 cm）的中央，让其自由探索 6 min，由自动视频信息采集系统记录大鼠在箱子内的活动情况。运动总路程代表大鼠的活动度及运动能力，大鼠进入中央格次数越少、时间与距离越短，提示其焦虑程度越高[15]。每只大鼠实验结束后，用 75% 酒精擦拭箱底和侧壁，清除其遗留的气味信息。

2.3.2　新物体识别实验　第一阶段为适应期，大鼠在新物体识别箱中自由探索 10 min 以适应周围环境。间隔 2 h 后进行第二阶段的物体识别训练[16]：在箱子对角线上放置 2 个完全相同的物体（A、B），且与箱体边缘距离相等，在两物体中间放入大鼠，任其自由探索 10 min。24 h 后，将物体 B 替换为大小相似、形状颜色不同的新物体 C，位置距离不变，再

将大鼠放置于两物体之间，让其自由探索 10 min，记录大鼠的探索时间与探索次数[17]，并计算新物体识别指数、新物体识别概率。大鼠对物体的探索活动定义为：当大鼠鼻子距离物体 2 ~ 3 cm 时，指向或用口鼻部嗅、舔物体。

新物体识别指数 = 探索 C 物体时间/（探索 C 物体时间 + 探索 A 物体时间）×100%

新物体识别概率 = 新物体探索次数/总探索次数 ×100%

2.4　ELISA 法检测大鼠海马 IL - 1β、IL - 6、TNF - α、KYNA、KMO、3 - HK、QUIN 含量　行为学检测结束后，用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠，取大鼠脑组织，立即冰上分离海马，放入液氮进行快速冷冻，存入 - 80 ℃冰箱。采用酶联免疫吸附测定（ELISA）法检测各组大鼠海马 IL - 1β、IL - 6、TNF - α、KYNA、KMO、3 - HK 及 QUIN 含量，严格按照试剂盒说明书进行操作。

2.5　Western blot 法检测大鼠海马 NMDAR 蛋白表达水平　每组取 3 只大鼠的海马组织，分别放置于预冷的研钵中充分研磨，使用裂解液完全裂解后离心，取上清液，测定蛋白浓度。经过电泳、转膜、TBST 漂洗及封闭后，加入一抗 actin（1 ∶ 1 000）、NMDAR1（1 ∶ 1 000）、NMDAR2A（1 ∶ 1 000）、NMDAR2B（1 ∶ 1 000），4 ℃孵育过夜。TBST 洗膜，加入二抗（1 ∶ 5 000）室温孵育 1 h，TBST 洗膜。在凝胶成像系统中显影，采用 Image J 软件分析蛋白条带的灰度值。

2.6　免疫荧光染色法检测大鼠海马小胶质细胞情况　每组取 3 只大鼠的海马组织石蜡切片，脱蜡抗原修复，10% 山羊血清封闭，37 ℃孵育 30 min。PBS 缓冲液冲洗 3 次，每次 5 min。滴入 Iba - 1 一抗（1 ∶ 200），4 ℃下孵育过夜。PBS 冲洗，滴入免疫荧光二抗（1 ∶ 400），37 ℃避光孵育 1 h。PBS 冲洗后，滴加 DAPI 染液染色 5 min，PBS 冲洗，滴入抗荧光淬灭封片剂后封片，显微镜下观察并拍片。使用 Image J 软件分析并计算大鼠海马 CA1 区 Iba - 1 阳性百分比。

Iba - 1 阳性百分比（%）= Iba - 1 阳性表达面积/当前视野测定总面积 ×100%

2.7　统计学方法　采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析，Graphpad Prism 8.0 软件进行绘图，计量资料用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。若数据不符合正态分布，采用非参数检验；若数据符合正态分布，多组间比较采用单因素方差分析，方差齐者两两比较采用 *LSD* 检验，方差不齐者采用 *Dunnett′ T3* 检验。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3　结果

3.1　背部推法对 CFS 大鼠运动功能的影响　旷场实验显示，与空白组比较，模型组大鼠的总路程、中心区路程、中心区时间、中心区进入次数及跨格数均减少（$P < 0.05$）；与模型组比较，推法组和 1 - MT 组大鼠的总路程、中心区路程、中心区时间、中心区进入次数及跨格数均增加（$P < 0.05$），见表 2。

表 2　各组大鼠旷场实验指标比较　（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	总路程（l/cm）	中心区路程（l/cm）	中心区时间（t/s）	中心区进入次数/次	跨格数/个
空白组	8	1 968.36 ± 451.56	186.39 ± 102.72	12.00 ± 7.48	12.00 ± 7.48	52.50 ± 14.56
模型组	8	828.95 ± 367.06△△	26.20 ± 23.38△	1.69 ± 1.52△	1.69 ± 1.52△△	16.38 ± 11.13△△
推法组	8	1 390.60 ± 383.28▲	85.76 ± 24.88▲	6.10 ± 2.62▲▲	6.10 ± 2.62▲	36.75 ± 19.32▲
1 - MT 组	8	1 632.40 ± 524.82▲▲	95.73 ± 39.49▲	6.58 ± 2.22▲▲	6.58 ± 2.22▲	44.00 ± 19.41▲▲

注：与空白组比较，△$P < 0.05$，△△$P < 0.01$；与模型组比较，▲$P < 0.05$，▲▲$P < 0.01$。

3.2　背部推法对 CFS 大鼠认知功能的影响　新物体识别实验显示，与空白组比较，模型组大鼠的新物体识别指数与识别概率降低（$P < 0.01$）；与模型组比较，推法组和 1 - MT 组大鼠的新物体识别指数与识别概率升高（$P < 0.01$），见表 3。

3.3　背部推法对 CFS 大鼠海马炎症因子的影响　与空白组比较，模型组大鼠海马 IL - 1β、IL - 6、TNF - α 含量升高（$P < 0.01$）；与模型组比较，推法组与 1 - MT 组大鼠海马 IL - 1β、IL - 6、TNF - α 含量降低（$P < 0.01$）；与 1 - MT 组比较，推法组大鼠海马 IL - 1β、IL - 6、TNF - α 含量升高（$P < 0.01$），见表 4。

表 3　各组大鼠新物体识别实验指标比较　（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	新物体识别指数/%	新物体识别概率/%
空白组	8	0.65 ± 0.14	0.60 ± 0.16
模型组	8	0.24 ± 0.05△△	0.35 ± 0.11△△
推法组	8	0.52 ± 0.08▲▲	0.57 ± 0.07▲▲
1 - MT 组	8	0.57 ± 0.13▲▲	0.62 ± 0.11▲▲

注：与空白组比较，△△$P < 0.01$；与模型组比较，▲▲$P < 0.01$。

表 4　各组大鼠海马 IL－1β、IL－6、TNF－α 含量比较　（$\bar{x} \pm s$，ng·L^{-1}）

组别	n	IL－1β	IL－6	TNF－α
空白组	8	283.50±55.24	27.75±3.09	151.76±42.22
模型组	8	705.91±22.57△△	64.70±3.33△△	449.08±35.08△△
推法组	8	477.61±50.07▲▲##	47.22±3.99▲▲##	299.57±31.73▲▲##
1－MT 组	8	393.61±35.82▲▲	35.67±3.97▲▲	224.00±32.75▲▲

注：与空白组比较，△△P<0.01；与模型组比较，▲▲P<0.01；与 1－MT 组比较，##P<0.01。

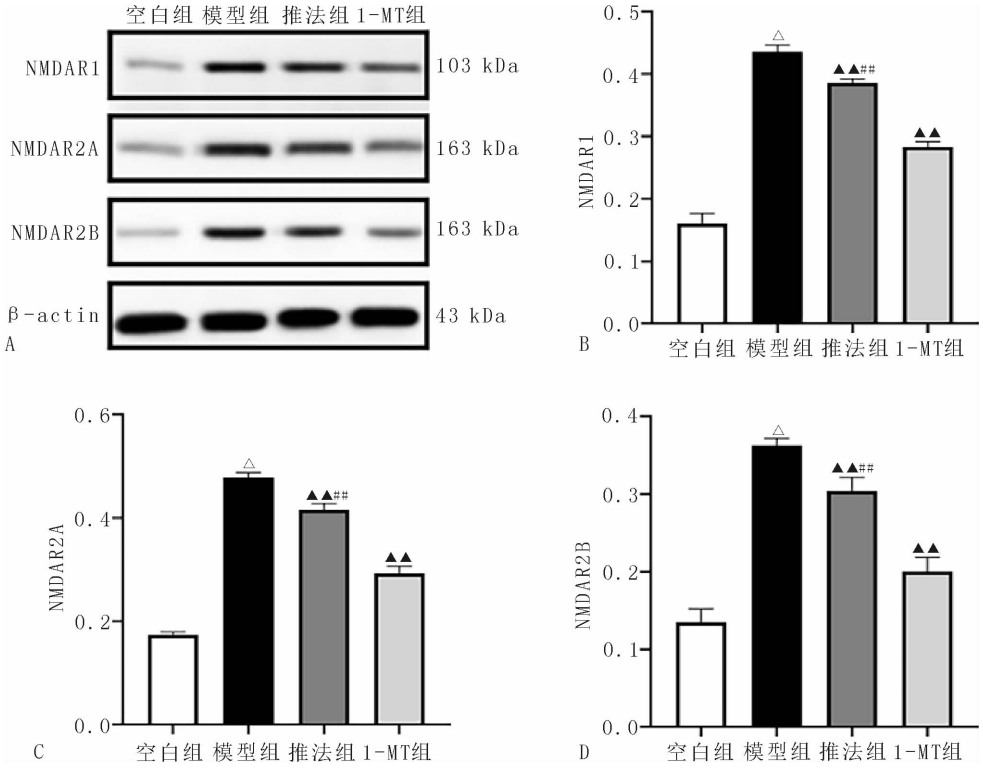
3.4　背部推法对 CFS 大鼠海马 KP 途径相关代谢物的影响　与空白组比较，模型组大鼠海马 KMO、3－HK、QUIN 含量升高，KYNA 含量降低（P<0.01）；与模型组比较，推法组和 1－MT 组大鼠海马 KMO、3－HK、QUIN 含量降低，KYNA 含量升高（P<0.05）；与 1－MT 组比较，推法组大鼠海马 KMO、3－HK 含量升高，KYNA 含量降低（P<0.01），见表 5。

表 5　各组大鼠海马 KYNA、KMO、QUIN 含量比较　（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	KYNA（ρ/ng·L^{-1}）	KMO（ρ/μg·L^{-1}）	3－HK（ρ/ng·L^{-1}）	QUIN（c/nmol·L^{-1}）
空白组	8	585.25±32.48	9.48±0.99	62.12±2.97	532.82±101.07
模型组	8	270.99±15.32△△	20.45±0.83△△	121.57±4.24△△	759.36±72.34△△
推法组	8	366.20±26.27▲▲##	14.39±1.09▲▲##	88.64±5.74▲▲##	608.08±99.25▲
1－MT 组	8	455.61±22.01▲▲	12.14±0.88▲▲	73.00±3.64▲▲	596.64±109.31▲▲

注：与空白组比较，△△P<0.01；与模型组比较，▲P<0.05，▲▲P<0.01；与 1－MT 组比较，##P<0.01。

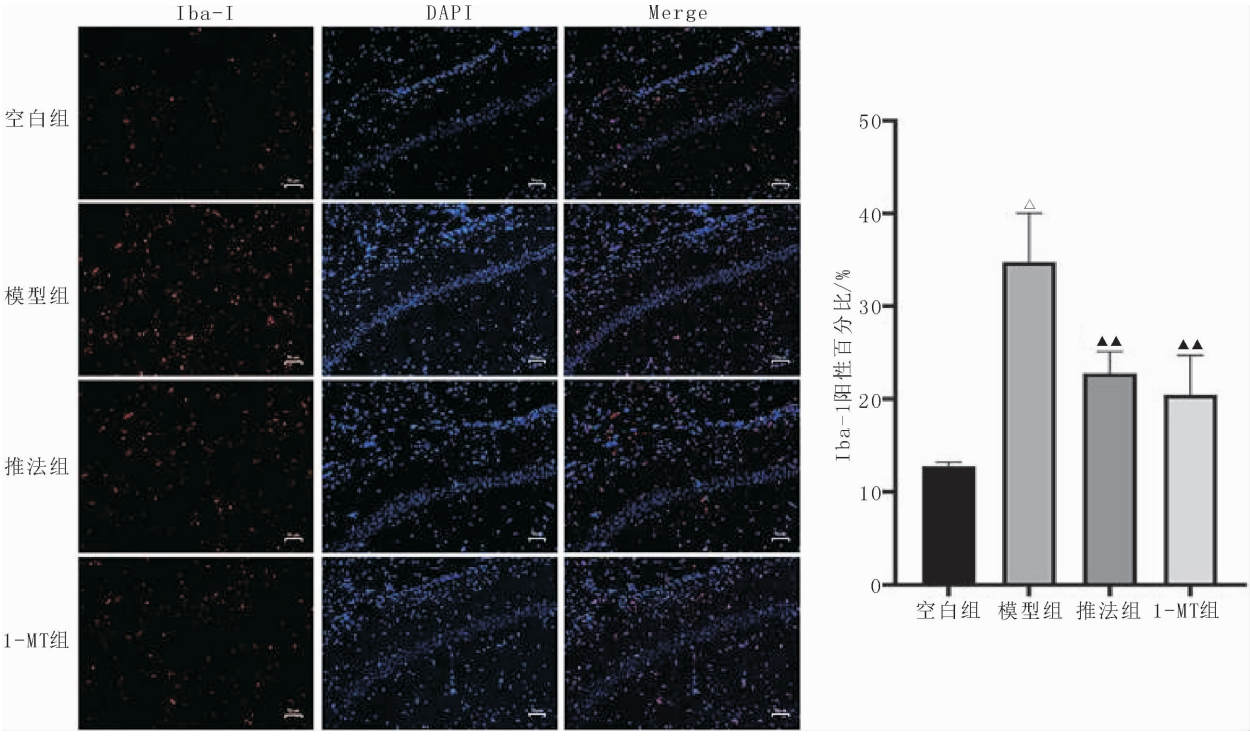
3.5　背部推法对 CFS 大鼠海马 NMDAR 受体的影响　Western blot 显示，与空白组比较，模型组大鼠海马 NMDAR1、NMDAR2A、NMDAR2B 蛋白表达水平升高（P<0.01）；与模型组比较，推法组和 1－MT 组大鼠海马 NMDAR1、NMDAR2A、NMDAR2B 蛋白表达水平降低（P<0.01）；与 1－MT 组比较，推法组大鼠海马 NMDAR1、NMDAR2A、NMDAR2B 蛋白表达水平升高（P<0.01），见图 1。



注：A：NMDAR1、NMDAR2A、NMDAR2B 蛋白条带图；B：NMDAR1 蛋白表达量；C：NMDAR2A 蛋白表达量；D：NMDAR2B 蛋白表达量；与空白组比较，△P<0.05；与模型组比较，▲▲P<0.01；与 1－MT 组比较，##P<0.01。

图 1　各组大鼠海马 NMDAR1、NMDAR2A、NMDAR2B 蛋白表达量比较

3.6　背部推法对海马小胶质细胞的影响　免疫荧光显示，与空白组比较，模型组大鼠海马 CA1 区 Iba－1 阳性百分比升高（P<0.01）；与模型组比较，推法组和 1－MT 组大鼠海马 CA1 区 Iba－1 阳性百分比降低（P<0.01），见图 2。



注：与空白组比较，△$P<0.05$；与模型组比较，▲▲$P<0.01$。

图 2　各组大鼠海马 CA1 区 Iba－1 免疫荧光染色图（×200）

4　讨论

CFS 属于中医“虚劳”“郁证”范畴，由多种病因引起脏腑功能失调及气血阴阳亏损，日久不复而成，且出现情志不舒、认知能力下降等症状。《素问·六微旨大论》曰：“出入废则神机化灭，升降息则气立孤危。”当阴阳气机升降出入正常时，才能达到阴平阳秘、气血调和的状态；若气机不畅，其气或郁或陷，则肝气郁结，情志不舒，即出现焦虑、抑郁、认知障碍等 CFS 症状[18]。CFS 发病机制复杂，目前认为可能与氧化应激和代谢异常、免疫功能失调、炎症反应及内分泌失衡相关[19]。有研究发现，CFS 患者神经炎症水平明显高于健康者，炎症反应破坏神经功能可能诱发认知障碍和严重疲劳感[20]，且海马的炎症水平与 CFS 患者的认知障碍评分和疲劳感呈正相关[3]。

研究表明，推法刺激背部膀胱经和督脉，可通达阳气，向外疏通经络，向内改善脏腑功能，调和营卫，达到阴阳平衡状态，从而缓解 CFS 症状。督脉为阳脉之海，其功能是中枢神经调控机体的外在表现[21-22]。督脉又主神志病，参与调节精神、意识、思维活动以及肢体活动[23]。背部推法可将脏腑精气输于脑，奉养元神，以奏宣阳开郁之功。督脉与足太阳膀胱经并行，通过络脉深入脊柱两旁夹脊处相互贯通，膀胱经阳气受督脉调控，两者有直接或间接联系[21]。足太阳膀胱经为六经之长、诸阳之属，其循行从巅入络脑，与脑有着密切联系。因此，推法刺激膀胱经可温通阳气、调养元神，有助于改善疲劳、焦虑、抑郁及认知障碍等症状[24]。推法对神经－内分泌－免疫系统有积极的调节作用，背部有丰富的脊神经和交感神经带，推拿手法可刺激局部神经末梢，从而调控神经胶质细胞活性[25]。有研究发现，背部循经推拿手法可调节大鼠海马神经元相关蛋白表达，从而发挥神经保护作用[26-27]。

研究表明，大鼠认知能力在慢性应激下会受到影响，不可预测应激刺激（1 个月或 40 d）、束缚（7 d、21 d）可损伤大鼠的学习记忆能力[28]。新物体识别实验是一种评价啮齿动物识别记忆能力的方法[29]。本研究中，模型组大鼠出现明显的认知功能下降；经过背部推法治疗后，大鼠的运动和认知功能增强。海马在记忆、执行处理及奖励处理等认知功能和情绪调节中发挥重要作用。有研究发现，89% 的 CFS 患者出现记忆力和注意力减退。CFS 患者与健康受试者在多个海马亚区的体积存在显著差异，证实海马与 CFS 患者的认知障碍和情绪相关[30-31]。海马神经炎症可能是影响认知和情绪的关键因素，其典型特征是小胶质细胞活化和促炎细胞因子增加[32]。本研究发现，模型组大鼠海马

Iba－1 阳性百分比和炎症因子含量显著增加，说明 CFS 大鼠海马中存在大量活化的小胶质细胞，并加速促炎细胞因子产生；而背部推法可抑制小胶质细胞活化和神经炎症。

色氨酸是人体必需氨基酸，在大脑中由 IDO1 和 IDO2 催化产生 KYN，进而生成 QUIN、烟酸及烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD^+）[33]。有研究发现，使用 1－MT 抑制 IDO 及 TDO 后，可影响 KP 代谢途径[34]。KP 途径有 2 条分支，其一是在犬尿氨酸氨基转移酶（kynurenine aminotransferase，KAT）的催化下生成具有神经保护作用的 KYNA，该过程主要存在于星形胶质细胞，可以减轻神经炎症；其二是通过 KMO 的作用代谢成 QUIN，该过程主要存在于小胶质细胞[35]。QUIN 是 NMDA 受体激动剂，通过与 NMDA 受体相互作用，QUIN 具有强烈的神经毒性[36]。NMDAR 是离子型谷氨酸受体，对突触可塑性、记忆和认知功能具有重要的调节作用。NMDAR 包括 7 个亚基，即 NMDAR1、NMDAR2（A、B、C、D）和 NMDAR3（A、B）。QUIN 诱发的神经元受损主要与 NMDAR2A 和 NMDAR2B 的过度刺激有关。NMDAR 与 Ca^{2+} 通道偶联形成受体离子通道复合物，从而介导细胞间信号传导[37]。当出现小胶质细胞炎症反应，激活的 KP 途径产生过量 QUIN，使 NMDA 过度兴奋，引发 Ca^{2+} 内流，神经元内高水平 Ca^{2+} 激活凋亡通路导致细胞死亡，从而出现认知障碍[38]。本研究中，推法组大鼠海马 KMO、3－HK 和 QUIN 含量降低，KYNA 含量升高，可抑制 NMDAR 的激活。由此提示，背部推法可调节 KP 途径的代谢物，通过刺激背部神经末梢并经感受器传导信息至脑内，阻断其向神经毒性产物转化，从而改善认知功能及疲劳症状。

综上，背部推法可能通过调节 KP 途径，抑制神经毒性，从而改善 CFS 大鼠的认知障碍及缓解疲劳状态。

参考文献：

[1]张力，张强，刘凯利，等. 中医辨证分型治疗慢性疲劳综合征的临床研究进展[J]. 现代中西医结合杂志，2022，31(18)：2623－2628.

[2]KONIG R S，ALBRICH W C，KAHLERT C R，et al. The gut microbiome in myalgic encephalomyelitis（ME）/chronic fatigue syndrome（CFS）[J]. Front Immunol，2021，12：628741.

[3]NAKATOMI Y，MIZUNO K，ISHII A，et al. Neuroinflammation in patients with chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis：an 11C－（R）－PK11195 PET study[J]. J Nucl Med，2014，55(6)：945－950.

[4]KAVYANI B，LIDBURY B A，SCHLOEFFEL R，et al. Could the kynurenine pathway be the key missing piece of Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome（ME/CFS）complex puzzle？[J]. Cell Mol Life Sci，2022，79(8)：412.

[5]杨松堤，聂卉，孟凤仙. 背俞穴临床应用与中医整体观[J]. 中医药学报，2000，28(6)：47.

[6]REN J，HE T X，ZHOU X，et al. The effects of traditional Chinese manual therapy（Tuina）for chronic fatigue syndrome：a protocol for systematic review and meta－analysis[J]. Medicine（Baltimore），2021，100(44)：e27700.

[7]李甜，朱晓晴，张晨晨，等. 扶阳罐干预背俞功能带对慢性疲劳综合征患者临床疗效及皮质醇影响[J]. 中医药导报，2023，29(5)：94－98.

[8]裴鑫，李甜，王聪聪，等. 扶阳罐干预背俞功能带治疗慢性疲劳综合征 29 例[J]. 湖南中医杂志，2023，39(8)：74－76.

[9]杨添淞，许骏，于国强，等. 电针对 CFS 模型大鼠海马与下丘脑中 Smad4 蛋白表达的影响[J]. 中医药学报，2016，44(2)：49－51.

[10]CHI A P，SHEN Z M，ZHU W F，et al. Characterization of a protein－bound polysaccharide from Herba Epimedii and its metabolic mechanism in chronic fatigue syndrome[J]. J Ethnopharmacol，2017，203：241－251.

[11]冯楚文，屈媛媛，孙忠人，等. 电针抑制 NF－κB 活性改善慢性疲劳综合征大鼠认知功能障碍的实验研究[J]. 针刺研究，2021，46(9)：775－781.

[12]高怀林，吴以岭，朱慧明，等. 慢性疲劳综合征动物模型的建立及对血管内皮功能的影响[J]. 中国中医基础医学杂志，2009，15(12)：904－906，919.

[13]JIANG Q R，LI J S，CHEN S H，et al. Orthogonal test on local temperature influenced by different parameters and manipulation types of An－pressing Xinshu（BL 15）[J]. J Acupunct Tuina Sci，2019，17(3)：147－154.

[14]蒋全睿，刘丹，潘杰灵，等. 不同部位按法对慢性疼痛激痛点大鼠模型的影响[J]. 北京中医药大学学报，2023，46(7)：1008－1019.

[15]李威，周鑫，谢志艳，等. 自主跑轮运动通过促进海马神经发生改善甲醛所致小鼠的负性情绪[J]. 解剖学报，2021，52(5)：686－691.

[16]凌梦钰，杨一卓，刘帅，等. 运动训练对脑缺血再灌注大鼠认知功能及前额皮层神经元核抗原和突触素 1 表达的效果[J]. 中国康复理论与实践，2021，27(11)：1272－1281.

[17]MCCLEAN P L，HOLSCHER C. Lixisenatide，a drug developed to treat type 2 diabetes，shows neuroprotective effects in a mouse model of Alzheimer′s disease[J]. Neuropha-

macology,2014,86:241 – 258.
[18]张丽美,户方芳,张霖,等. 从“罢极之本”探析慢性疲劳综合征的治疗[J]. 中国中医基础医学杂志,2023,29(10):1752 – 1755.
[19]刘欣怡,刘占东. 慢性疲劳综合征相关焦虑及抑郁的研究进展[J]. 中国全科医学,2023,26(35):4477 – 4482.
[20]MORRIS G,MAES M. A neuro – immune model of Myalgic Encephalomyelitis/Chronic fatigue syndrome[J]. Metab Brain Dis,2013,28(4):523 – 540.
[21]李君,何水辉,唐莫玲,等. 从手足三阳经浅谈督脉的“阳脉之海”理论与神经分布及相关疾病的关系[J]. 广西医学,2019,41(4):489 – 491.
[22]陶吉明,尹露,张宏,等. 脑卒中后抑郁“通督塑神”推拿诊疗方案优化研究[J]. 世界科学技术:中医药现代化,2023,25(7):2266 – 2273.
[23]杨帆,罗开涛,杨喜兵,等. 百会长留针治疗气虚血瘀型中风后认知功能障碍临床观察[J]. 中国针灸,2018,38(11):1151 – 1156.
[24]姚斐,赵毅,蒋诗超,等. 从足太阳膀胱经论治慢性疲劳综合征的理论依据[J]. 中国针灸,2015,35(3):295 – 298.
[25]崔承斌,王京京,吴中朝. 从背俞穴与夹脊穴的关系论背俞功能带[J]. 中国针灸,2005,25(7):483 – 486.
[26]张海英,雷龙鸣,邱石源,等. 背部循经推拿手法对亚健康模型大鼠海马神经元凋亡相关基因 Bcl – 2、Bax 及 Casepase – 3 表达的影响[J]. 中华中医药学刊,2019,37(3):579 – 582,770.
[27]雷龙鸣,唐农,唐宏亮,等. 背部循经推拿对亚健康模型大鼠海马脑源性神经营养因子基因和蛋白表达的影响[J]. 辽宁中医杂志,2017,44(1):187 – 189.
[28]李卫,边艳青. 外周炎症及慢性应激对认知功能的影响及影响机制[J]. 免疫学杂志,2014,30(7):650 – 653.
[29]宋广青,高莉,孙秀萍,等. 大鼠物体识别实验装置的研制[J]. 中国比较医学杂志,2013,23(8):80 – 86.
[30]THAPALIYA K,STAINES D,MARSHALL – GRADISNIK S,et al. Volumetric differences in hippocampal subfields and associations with clinical measures in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome[J]. J Neurosci Res,2022,100(7):1476 – 1486.
[31]ROBINSON L J,GALLAGHER P,WATSON S,et al. Impairments in cognitive performance in chronic fatigue syndrome are common,not related to co – morbid depression but do associate with autonomic dysfunction[J]. PLoS One,2019,14(2):e0210394.
[32]KODALI M,MISHRA V,HATTIANGADY B,et al. Moderate,intermittent voluntary exercise in a model of Gulf War Illness improves cognitive and mood function with alleviation of activated microglia and astrocytes,and enhanced neurogenesis in the hippocampus[J]. Brain Behav Immun,2021,97:135 – 149.
[33]ROTH W,ZADEH K,VEKARIYA R,et al. Tryptophan metabolism and gut – brain homeostasis[J]. Int J Mol Sci,2021,22(6):2973.
[34]吕炜. 吲哚胺 2,3 – 双加氧酶抑制剂对慢性脑低灌注大鼠的认知功能影响及机制研究[D]. 太原:山西医科大学,2020.
[35]HEISLER J M,O′CONNOR J C. Indoleamine 2,3 – dioxygenase – dependent neurotoxic kynurenine metabolism mediates inflammation – induced deficit in recognition memory[J]. Brain Behav Immun,2015,50:115 – 124.
[36]HESTAD K,ALEXANDER J,ROOTWELT H,et al. The role of tryptophan dysmetabolism and quinolinic acid in depressive and neurodegenerative diseases[J]. Biomolecules,2022,12(7):998.
[37]SHEEDY J R,WETTENHALL R E H,SCANLON D,et al. Increased d – lactic acid intestinal bacteria in patients with chronic fatigue syndrome[J]. In Vivo,2009,23(4):621 – 628.
[38]ZHOU Q,SHENG M. NMDA receptors in nervous system diseases[J]. Neuropharmacology,2013,74:69 – 75.

收稿日期:2025 – 01 – 06
作者简介:钟叶蓓(1999 –),女,江西新余人,硕士研究生,研究方向:推拿治病机理。
通信作者:李铁浪(1969 –),男,医学博士,教授,博士研究生导师,研究方向:推拿治病机理。E – mail:litielang810@163.com

编辑:刘凯歌