

· 基础研究 ·

温针灸对骨关节炎大鼠软骨组织 Clock、Bmal1 蛋白的影响

蔡国伟¹ 李柏村¹ 李 佳² 李 静¹

摘要 目的 探讨温针灸对骨关节炎(OA)大鼠软骨组织 Clock、Bmal1 蛋白表达的影响。**方法** 60 只 3 月龄 SPF 级雄性 SD 大鼠,按随机数字表法分为对照组、模型组、针刺组、温针灸组,每组 15 只。以手术方法制备 OA 大鼠,温针灸组于造模第 1 天取足三里、犊鼻和内膝眼穴温针灸治疗,采用手针及悬灸法,15 min/次,1 次/天,共 21 天。针刺组采用针刺方法同温针灸组,不用艾灸。对照组大鼠自由饮水,正常饲养。所有大鼠于相应处理结束后,采用排水法测大鼠膝关节部体积,HE 染色观察软骨组织病理结构,Western Blot 检测软骨组织 Clock、Bmal1 蛋白表达。**结果** 与对照组比较,模型组大鼠右膝关节肿胀明显($P < 0.01$);模型组大鼠软骨组织 Clock、Bmal1 蛋白表达明显降低($P < 0.01$);与模型组比较,针刺和温针灸均能显著改善大鼠右膝关节肿胀程度($P < 0.05$),提高 OA 大鼠软骨组织中 Clock、Bmal1 蛋白表达水平($P < 0.05$),温针灸组较针刺组改善更为明显($P < 0.05$)。**结论** 相对于针刺,温针灸更能有效调节 OA 大鼠关节炎性损伤状况,促进 OA 大鼠软骨组织中 Clock、Bmal1 蛋白表达,从而调节软骨细胞生物钟,抑制了软骨细胞骨架破坏的进程,减缓膝关节的关节退变。

关键词 温针灸;足三里;骨关节炎;Clock 蛋白;Bmal1 蛋白

Effects of Warming Acupuncture on Cartilage Tissue Protein Expressions of Clock and Bmal1 in Osteoarthritis Rats CAI Guo-wei¹, LI Bo-cun¹, LI Jia², and LI Jing¹ 1 Department of Acupuncture, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan (430022); 2 College of Acupuncture and Orthopedics, Hubei University of Chinese Medicine/Hubei Provincial Collaborative Innovation Center of Preventive Treatment by Acupuncture and Moxibustion, Wuhan (430061)

ABSTRACT Objective To observe the effects of warming acupuncture on protein expressions of Clock and Bmal1 in cartilage tissue of rats with osteoarthritis (OA). **Methods** Sixty 3-month-old male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into four groups by random number table, i.e., the control group, the model group, the acupuncture group, and the warming acupuncture group, 15 in each group. OA rat model were prepared by surgery. Rats in warming acupuncture group were needled at Zusanli (ST36), Dubei (ST35), Neixiyan (EX-LE4) on day 1 of modeling, 15 min per time, once a day and totally for 21 days. Rats in acupuncture group were treated with the same acupuncture method as the warming acupuncture group without moxibustion. Rats in the control group were fed normally and free access to normal water. The volume of knee joints was detected using drainage. The pathological structures of cartilage tissue were observed by HE staining. The expressions of Clock and Bmal1 protein in cartilage tissue were detected by Western Blot. **Results** Compared with the control group, the right knee joint was obviously swollen ($P < 0.01$), the expressions of Clock and Bmal1 protein in cartilage tissue significantly decreased in the model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the swollen right knee joint was obviously melio-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81774410);湖北省卫健委项目(No. ZY2019M041)

作者单位:1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院针灸科(武汉 430022); 2. 湖北中医药大学针灸骨伤学院/针灸治未病湖北省协同创新中心(武汉 430061)

通讯作者:李 静, Tel: 027-85726156, E-mail: 461688459@qq.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20190819.272

rated ($P < 0.05$), the expressions of Clock and Bmal1 protein in cartilage tissue significantly elevated in the acupuncture group and the warming acupuncture groups ($P < 0.05$). Better effects were obtained in the warming acupuncture group ($P < 0.05$). Conclusion Compared with acupuncture, warming acupuncture regulated inflammatory injury of OA rats more effectively, promoted expressions of Clock and Bmal1 proteins in cartilage tissue of OA rats, thus regulating the circadian clock of chondrocytes, inhibiting the process of cartilage cytoskeleton destruction, and relieving the deterioration of knee OA.

KEYWORDS warming acupuncture; Zusanli (ST36); osteoarthritis; Clock protein; Bmal1 protein

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 的病理特点是关节软骨和软骨下骨的退行性变,常伴有疼痛、肿胀和僵硬,并导致关节功能障碍^[1]。基因、生活方式和关节不稳定等因素导致 OA 的发生和发展,严重影响人们的生活质量^[2]。目前,西医多用非甾体类抗炎药以缓解 OA 的症状,不良反应较大,不推荐长期使用,而针灸治疗 OA 不良反应小、疗效显著,有着独特的优势^[3],有临床研究表明,多种针灸治疗方法如针刺、火针、温针灸、蜂针、电针、穴位敷贴等均能有效改善 OA 所引起的局部肿胀和疼痛^[4]。许多研究发现针灸能够改善局部微循环^[5]、调节疼痛中枢^[6]、降低炎症因子的含量^[7],从而发挥对关节软骨、滑膜组织的保护作用。然而,针灸对 OA 病理过程中软骨细胞的调节作用、以及抑制炎症反应的机制究竟如何,仍不甚明了。

软骨功能的失调和软骨骨架结构的破坏在 OA 病理进程中非常关键,对于维持软骨的正常功能极其重要^[8]。研究表明,昼夜节律核心蛋白 Clock、Bmal1 对维持软骨的稳态和结构的完整性具有重要的作用,其失调会导致软骨内稳态的紊乱并促进 OA 的发生发展^[9]。但是,针灸能否影响 OA 机体软骨组织 Clock、Bmal1 的蛋白表达,尚缺乏证据。因此,本实验通过检测 OA 大鼠膝关节软骨组织中 Clock、Bmal1 的蛋白表达水平,探讨温针灸对 OA 软骨的保护作用。

材料与方 法

1 动物 3 月龄雄性 SPF 级 SD 大鼠 60 只,体重 (200 ± 10) g,由湖北省医学科学研究院实验动物中心提供[动物合格证号: SCXK (鄂) 2015 - 0018 号]。适应性喂养 1 周后,按随机数字表法分为 4 组,每组 15 只,分别为对照组、模型组、针刺组和温针灸组。本实验严格遵守科技部[2006]398 号文件《关于善待实验动物的指导性意见》要求。

2 主要试剂及仪器 Bmal1 (B-1) 抗体 (批号: 00005347): sc-365645, Clock (C-8) 抗体 (批号: 3257622 - 4): sc-271603,均为 Santa Cruz 公司; Bio-Rad 化学发光成像系统 (Universal Hood II,

USA: Bio-Rad)、Bio-Rad 电泳仪 (Power Pac TM-HC, USA: Bio-Rad)、转膜仪 (Transblot SD Cell, USA: Bio-Rad)、电针治疗仪 (G6805 - 2A 型;上海华谊医用仪器有限公司);特制香烟型纯艾条 (直径 1 cm, 南阳市卧龙汉医艾绒厂);华佗牌毫针 (0.30 mm × 13 mm, 中国苏州医疗用品有限公司)。

3 方法

3.1 模型制备 参照参考文献[10],以手术结合术后跑台运动诱导 OA 动物模型。具体步骤:大鼠腹腔注射戊巴比妥钠 (100 g/0.3 mL) 麻醉下,右后肢膝关节行前交叉韧带切断联合内侧半月板切除术,术后第 7 天将大鼠放置于大鼠跑步装置运动 30 min,每天跑步路程为 200 m,持续 3 周以诱导 OA 模型。根据关节炎指数 (arthritis index, AI) 评分进行模型成功评判^[11]。0 分:无红斑或肿胀;1 分:轻微的红斑和 1 个趾关节肿胀;2 分:红斑和 2 个或以上的趾关节肿胀;3 分:红斑和踝部或腕部肿胀;4 分:全部红斑以及脚趾和踝部或手指和腕部肿胀,踝或腕不能弯曲;四肢评分之和 (最高分为 16 分) 为 AI,分数越高表明关节炎程度越严重。AI 评分 ≥ 4 分视为造模成功。本次造模成模率为 100%。

3.2 干预方法 针刺组和温针灸组用自制鼠衣固定大鼠,参照中国针灸学会实验针灸研究会制定的“实验动物针灸穴位图谱”^[12],取足三里、犊鼻、内膝眼。温针灸组先采用华佗牌毫针实行针刺,针刺深度约 5 mm,强度以大鼠耐受为度;艾灸用特制香烟型纯艾条离穴位 2 cm 处悬灸,1 次/天,15 min/次。治疗从大鼠跑步运动开始 (即术后第 7 天) 至第 28 天结束,共 21 次。针刺组针刺方法同温针灸组,但不使用艾灸治疗。对照组大鼠自由饮水,正常饲养。

3.3 检测指标及检测方法

3.3.1 关节肿胀度 采用排水法^[13]测大鼠肿胀膝关节部体积。将大鼠固定,将足部插入灌满水的特制量筒,水面持平膝关节上 2 cm,将另一个烧杯置于量筒下收集从量筒排出的水,排出水的体积即为所测大鼠足跖部的体积。从手术后第 7 天开始,分别于

上午 9:00 测量干预时间段的第 0、3、6、9、12、15、18、21 天排水体积, 每只大鼠每次分别测量 3 次, 取其平均值, 每隔 2 天测量 1 次, 每只大鼠每次分别测量 3 次取其平均值。

3.3.2 软骨组织 HE 染色结果 处死大鼠后取出膝关节, 用中性 4% 多聚甲醛固定, 10% EDTA 脱钙, 石蜡包埋, 切片, 脱蜡, 制作 4 μm 厚软骨石蜡切片, 苏木素、伊红染色后梯度乙醇脱水、二甲苯透明后封片, 光学显微镜下观察软骨组织。

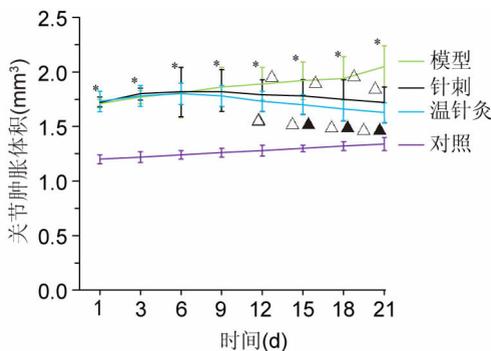
3.3.3 软骨组织中 Clock、Bmal1 蛋白水平检测 采用 Western Blot 法检测。提取软骨组织蛋白并测定浓度后, 行聚丙烯酰胺凝胶电泳。结果行计算机扫描, 用图像分析系统, 测定目的条带 Clock、Bmal1 与内参 β-actin 的光密度值 (optical density, OD), 并取两者的比值作半定量分析。

3.4 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。所有资料先进行正态性、方差齐性检验, 符合正态分布且方差齐时采用方差分析进行组间比较, 两两比较采用 LSD 检验进行, 不符合正态分布时采用秩和检验, 方差不齐采用 Dunnett's T3 检验, 计数数据采用率表示, 采用 χ^2 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 一般情况 模型制备过程中, 各组大鼠饮食无明显变化。造模组经手术制备模型后, 大鼠表现出活动量减少, 右膝关节肿胀, 出现跳步、跛行。而对照组上述表现无明显变化。

2 各组大鼠右膝关节肿胀体积比较 (图 1) 模型组从第 3 天开始, 其关节肿胀程度显著高于对照组, 肿胀程度减轻, 与模型组比较, 差异有统计学意义 (P < 0.01); 从第 12 天开始, 温针灸组和针刺组关节



注: 与对照组比较, *P < 0.01; 与模型组比较, ΔP < 0.05; 与针刺组比较, ▲P < 0.05; 每组 n 为 15

图 1 各组大鼠右膝关节肿胀体积比较

(P < 0.05), 其中温针灸组减轻程度最为明显, 从第 15 天开始, 与针刺组比较, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。

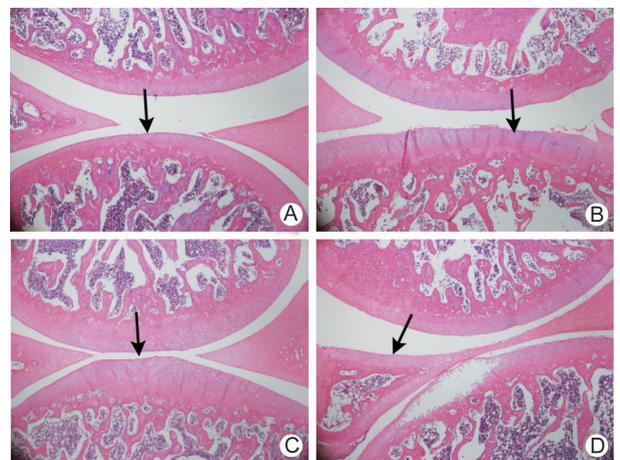
3 各组大鼠右膝关节胫骨平台软骨 Markin 评分比较 (表 1) 与对照组比较, 模型组 Markin 评分升高更明显 (P < 0.05); 温针灸组、针刺组 Markin 评分均低于模型组 (P < 0.05), 且温针灸组较针刺组评分更低 (P < 0.05)。

表 1 各组大鼠右膝关节胫骨平台软骨 Mankin 评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	Markin 评分
对照	15	0.100 0 ± 0.094 7
模型	15	7.430 0 ± 1.064 5*
针刺	15	4.690 0 ± 1.152 6 ^Δ
温针灸	15	3.550 0 ± 1.043 7 ^{Δ▲}

注: 与对照组比较, *P < 0.05; 与模型组比较, ΔP < 0.05; 与温针灸组比较, ▲P < 0.05

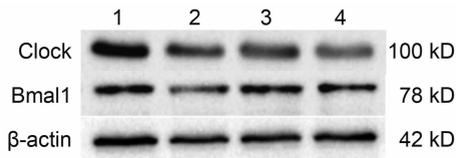
4 各组大鼠关节软骨 HE 染色结果 (图 2) 对照组关节软骨表面光滑, 浅表层、移行层、辐射层和钙化层结构清晰。模型组关节软骨表层破损, 细胞增生明显, 黏合线不明显。温针灸组和针刺组软骨表面较平滑, 表层细胞呈梭形, 近似水平排列, 其中温针灸组改善最为显著, 细胞凋亡最少。



注: A 为对照组; B 为模型组; C 为针刺组; D 为温针灸组; 图中箭头表示软骨层

图 2 各组大鼠关节软骨 HE 染色结果 (×40)

5 各组大鼠膝关节软骨组织 Clock、Bmal1 蛋白表达比较 (图 3, 表 2) Western Blot 检测显示, 模型组大鼠膝关节软骨组织中 Clock、Bmal1 蛋白含量较对照组明显减少 (P < 0.05), 温针灸组和针刺组均能升高大鼠膝关节软骨组织中 Clock、Bmal1 蛋白含量 (P < 0.05), 且温针灸组 Clock、Bmal1 蛋白表达水平较针刺组升高更为明显 (P < 0.05)。



注:1 为对照组;2 为模型组;3 为针刺组;4 为温针灸组

图 3 各组大鼠右膝关节软骨组织 Clock、Bmal1 蛋白表达电泳图

表 2 各组大鼠右膝关节软骨组织 Clock、Bmal1 蛋白含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Clock	Bmal1
对照	15	100.0 ± 15.3	100.0 ± 12.6
模型	15	53.0 ± 12.4*	50.0 ± 11.5*
针刺	15	72.0 ± 14.2 [△]	68.0 ± 15.6 [△]
温针灸	15	82.0 ± 15.3 ^{△▲}	85.0 ± 13.8 ^{△▲}

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$;与针刺组比较,[▲] $P < 0.05$

讨 论

OA 是一种软骨退行性变和继发骨质增生为主的慢性骨关节病,其发病机制十分复杂,通常认为与遗传因素、内分泌紊乱、细胞因子、金属蛋白酶和骨内高压有关^[14]。软骨病变是 OA 的主要特征。《素问·痹论》曰:“风、寒、湿三气杂至,合而为痹。”认为 OA 是由于风寒邪气侵入机体,日久损伤肝肾,故本病发病基础为肝肾不足,致病因素为风寒湿邪留恋、经脉闭阻。OA 分为气滞血瘀、寒湿痹阻、肝肾亏虚、气血虚弱 4 型,针对这 4 种证型分别以活血化瘀、通络止痛;温经散寒、养血通脉;滋补肝肾;补气养血法进行治疗^[15]。针灸治疗 OA 多为从筋论治,局部选穴为主,本实验选取犊鼻、内膝眼配以补益后天、扶助正气的足三里,体现“以痛为腧”、“以筋为先”的治则^[16]。温针灸同时具有针刺和艾灸的特点,灸增针温通之效,针助灸直抵经络以温经通脉,扶正祛邪,二者相辅相成,故有“温针之理最为宜”的说法。姚志芳等^[17]在一项临床研究发现温针灸治疗膝 OA 效果优于温针灸,也肯定了温针灸的良好疗效。

近年研究发现,软骨细胞中存在的生物钟基因表达的生物钟蛋白能够调节“软骨损伤”和“软骨修复”之间的平衡,该基因受到昼夜节律的影响。哺乳动物的生物钟由下丘脑视交叉上核中的中央时钟控制^[18]。生物钟的另一个组成部分是存在于几乎所有组织器官中的外周时钟系统,因而软骨组织同样也表达生物钟基因。Clock、Bmal1 蛋白是核心时钟蛋白,它们能够形成异二聚体复合物,该复合物结合 PER、CRY 基因上游的 E-box 增强子元件,激活这些基因的转录,下游转录产

物又能反向抑制 Bmal1/Clock 复合物的转录,使得 Bmal1、Clock 蛋白表达降低,对 PER 和 CRY 基因的激活随之减少,Bmal1、Clock 基因的抑制作用变弱,Clock、Bmal1 基因表达又增强,如此形成一个 24 h 循环调控机体的昼夜节律。Clock、Bmal1 是炎症反应的重要调节因子,Bmal1 可以通过调节氧化应激途径以限制促炎细胞因子 IL-1 β 的产生^[19],也可以通过下调 Clock 依赖性 NF- κ B 活化^[20]、调节 TGF- β 信号通路降低炎症反应^[21]。小鼠 Clock 基因突变后软骨组织中关键促炎介质 IL-1 β 、IL-6 和 MCP-1 的表达显著增强并明显促进 NF- κ B 核转位导致严重的软骨组织损伤^[22]。同时时钟基因被证实与衰老有关,昼夜节律的稳健性随着年龄的增长而下降,敲除 Bmal1 基因的小鼠表现出寿命的显著减少和明显的如肌肉减少症,白内障,皮下脂肪减少,器官缩小等早衰症状^[23,24]。由此可见生物钟可以从多个层面发挥对 OA 的调控作用。

针灸可以调节生物钟,有研究发现,针刺可以通过调节下丘脑腹外侧视前区组织生物钟基因 Clock、Bmal1、Period1、Period2 的表达,调控生物钟蛋白水平改善失眠模型大鼠的睡眠功能^[25,26];针刺还可以通过调节结肠生物钟蛋白的表达水平,控制神经型一氧化氮合成酶基因的周期性转录-翻译从而调节 NO 的合成发挥调节结肠节律性收缩的作用^[27]。但目前对针灸能否调控 OA 软骨时钟蛋白的研究还缺乏。本实验以针灸对 OA 软骨组织外周时钟的作用为切入点展开研究,发现实验性 OA 软骨组织生物钟蛋白 Clock、Bmal1 的含量处于较低水平,但在针灸的干预下软骨组织 Clock、Bmal1 蛋白含量提高,促进软骨向生理状态恢复。并且温针灸效果比单纯的针刺和艾灸效果更佳,温针灸足三里、内膝眼和外膝眼穴提高 Clock、Bmal1 蛋白的表达,这可能是其抗膝 OA 的新机制,但通过怎样的途径来抑制该信号通路目前尚不清楚,须待进一步研究。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Aicher WK, Rolauffs B. The spatial organisation of joint surface chondrocytes: review of its potential roles in tissue functioning, disease and early, preclinical diagnosis of osteoarthritis [J]. Ann Rheum Dis, 2014, 73(4): 645-653.
- [2] Johnson VL, Hunter DJ. The epidemiology of osteoarthritis [J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2014, 28(1): 5-15.
- [3] 官昌, 杨容. “全息针刺”疗法治疗膝骨关节炎 30 例

- [J]. 江西中医药, 2018, 49(12): 55-57.
- [4] Hou PW, Fu PK, Hsu HC, et al. Traditional Chinese medicine in patients with osteoarthritis of the knee [J]. *Tradit Complement Med*, 2015, 5(4): 182-196.
- [5] 冯斌. 针刺临床作用及机制浅析 [J]. *中医药学刊*, 2003, 9: 1565-1566, 1568.
- [6] Ahsin S, Saleem S, Bhatti AM, et al. Clinical and endocrinological changes after electro-acupuncture treatment in patients with osteoarthritis of the knee [J]. *Pain*, 2009, 147(1-3): 60-66.
- [7] 黄剑, 卓廉士, 彭支莲, 等. 电针对家兔膝关节炎模型关节液中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的影响 [J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2007, 15(3): 17-18, 21.
- [8] Blain EJ. Involvement of the cytoskeletal elements in articular cartilage homeostasis and pathology [J]. *Int J Exp Pathol*, 2009, 90(1): 1-15.
- [9] Dudek M, Gossan N, Yang N, et al. The chondrocyte clock gene Bmal1 controls cartilage homeostasis and integrity [J]. *J Clin Invest*, 2016, 26(1): 365-376.
- [10] Zhou Y, Tao H, Li Y, et al. Berberine promotes proliferation of sodium nitroprusside-stimulated rat chondrocytes and osteoarthritic rat cartilage via Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 789: 109-118.
- [11] 王洁, 王亚南, 陆妍, 等. 藤莓汤对胶原诱导性关节炎大鼠滑膜 PPAR γ /NF- κ B 信号途径信号途径的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2017, 37(4): 458-463.
- [12] 王玲玲, 白学颖, 吕梅, 等. 中国针灸穴位图谱 (汉英对照) [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 2006: 35-37.
- [13] He TF, Yang WJ, Zhang SH, et al. Electroacupuncture inhibits inflammation reaction by upregulating vasoactive intestinal peptide in rats with adjuvant-induced arthritis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011: 290489.
- [14] 高仰贤, 江蓉星. 骨性关节炎发病机制的国内研究进展 [J]. *中医正骨*, 2005, 17(4): 55-57.
- [15] 陈卫衡, 刘献祥, 童培建, 等. 膝关节炎中医诊疗专家共识 (2015 年版) [J]. *中医正骨*, 2015, 27(7): 4-5.
- [16] 艾健, 房敏, 孙武权, 等. “筋骨失衡, 以筋为先”理论在膝关节病中的应用探讨 [J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(8): 2404-2406.
- [17] 姚志芳, 黄晓卿, 张炜. 温针灸与单纯针刺对膝关节骨性关节炎疗效比较观察 [J]. *针灸临床杂志*, 2003, 19(7): 34-35.
- [18] Lee C, Etchegaray JP, Cagampang FR, et al. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock [J]. *Cell*, 2001, 107(7): 855-867.
- [19] Early JO, Menon D, Wyse CA, et al. Circadian clock protein BMAL1 regulates IL-1 β in macrophages via NRF2 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(36): E8460-E8468.
- [20] Spengler ML, Kuropatwinski KK, Comas M, et al. Core circadian protein CLOCK is a positive regulator of NF- κ B-mediated transcription [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(37): E2457-2465.
- [21] Akagi R, Akatsu Y, Fisch KM, et al. Dysregulated circadian rhythm pathway in human osteoarthritis: NR1D1 and BMAL1 suppression alters TGF- β signaling in chondrocytes [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2017, 25(6): 943-951.
- [22] Yuan G, Xu L, Cai T, et al. Clock mutant promotes osteoarthritis by inhibiting the acetylation of NF- κ B [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2019, 21(6): 922-931.
- [23] Bunger MK, Wilsbacher LD, Moran SM, et al. Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals [J]. *Cell*, 2000, 103(7): 1009-1017.
- [24] Kondratov RV, Kondratova AA, Gorbacheva VY, et al. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock [J]. *Genes Dev*, 2006, 20(14): 1868-1873.
- [25] 魏歆然, 魏高文, 郑雪娜, 等. 不同经穴组合针刺对失眠大鼠下丘脑生物钟基因 Clock 和 Bmal 1 表达的影响 [J]. *针刺研究*, 2017, 42(5): 429-433.
- [26] 郭保君, 余思奕, 申治富, 等. 针刺跷脉对失眠大鼠视交叉上核内生物钟基因 Period 1 及 Period 2 的影响 [J]. *针刺研究*, 2017, 42(6): 507-509.
- [27] 朱毅, 李凝. 针刺干预脊髓损伤肠道功能障碍生物钟基因研究进展 [J]. *中国康复理论与实践*, 2013, 19(10): 939-941.

(收稿: 2019-03-19 在线: 2019-09-29)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶