

电针对慢性炎性疼痛与抑郁共病大鼠前扣带回皮层小胶质细胞极化和 $\alpha 7nAChR$ -TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路的影响

王甜¹, 羊璞², 张熙^{1,3}, 许慧¹, 黄文静¹, 李欣¹, 黄心雨¹, 郑广玫¹, 许智逸¹,
尹丽莉¹, 黄颖¹, 粟胜勇³

(¹广西中医药大学第一临床医学院, 南宁 530001; ²四川省医学科学院·四川省人民医院, 成都 610072; ³广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530023)

【摘要】 目的:观察电针对慢性炎性疼痛与抑郁共病(CIPDC)大鼠前扣带回皮层(ACC) $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7nAChR$)-Toll样受体4(TLR4)/核因子 κ B(NF- κ B)信号通路调控小胶质细胞极化的影响,探讨电针治疗CIPDC的中枢“镇痛-抗抑郁”机制。方法:将36只SPF级雄性SD大鼠随机分为空白组、模型组、电针组,每组12只。采用完全弗氏佐剂足底注射法建立CIPDC模型。造模后第14天,电针组大鼠予电针干预,每次20 min,每日1次,连续干预14 d。造模后第0天、14天、28天,通过机械缩足反应阈值(MWT)与热缩足反射潜伏期(TWL)评估大鼠的疼痛样行为;运用糖水偏好实验、强迫游泳实验、旷场实验对大鼠的抑郁样行为进行评价;HE染色观察ACC组织形态变化;ELISA法检测大鼠ACC组织中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、IL-4、IL-10含量;免疫荧光双染色法检测ACC组织M1型小胶质细胞标志物CD86与离子钙接头蛋白1(Iba-1)共表达、M2型小胶质细胞标志物CD206与Iba-1共表达;Western blot法检测大鼠ACC组织中 $\alpha 7nAChR$ 、TLR4、髓样分化因子88(MyD88)、NF- κ B p65、磷酸化(p)-NF- κ B p65的蛋白表达水平。结果:与空白组比较,模型组大鼠MWT、TWL、糖水偏好率、旷场实验运动总距离及中央停留时间降低($P < 0.05$),强迫游泳实验静止不动时间增加($P < 0.05$);ACC组织排列紊乱,大量神经元固缩、深染,组织间隙有空泡和神经纤维缠结出现;TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的表达水平显著升高($P < 0.05$),IL-4、IL-10的表达显著降低($P < 0.05$);M1型小胶质细胞CD86/Iba-1表达明显增加($P < 0.05$),M2型小胶质细胞CD206/Iba-1表达明显减少($P < 0.05$); $\alpha 7nAChR$ 蛋白表达明显降低($P < 0.05$),TLR4、MyD88、p-NF- κ B p65蛋白表达及p-NF- κ B p65/NF- κ B p65比值明显升高($P < 0.05$)。与模型组比较,电针组以上指标均逆转($P < 0.05$);ACC组织仅有少量神经元固缩、深染色,且神经元与组织间隙变小。结论:电针对CIPDC大鼠可发挥中枢“镇痛-抗抑郁”效应,其作用机制可能与ACC组织 $\alpha 7nAChR$ -TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路介导的小胶质细胞极化,从而缓解中枢炎症反应,减轻ACC组织神经元损伤相关。

【关键词】 电针;慢性炎性疼痛和抑郁共病; $\alpha 7nAChR$ -TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路;小胶质细胞极化;前扣带回皮层;炎症反应

Effect of electroacupuncture on microglial polarization and activity of $\alpha 7nAChR$ -TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway in the anterior cingulate cortex of rats with chronic inflammatory pain-depression comorbidity

WANG Tian¹, YANG Pu², ZHANG Xi^{1,3}, XU Hui¹, HUANG Wen-jing¹, LI Xin¹, HUANG Xin-yu¹, ZHENG Guang-mei¹, XU Zhi-yi¹, YIN Li-li¹, HUANG Ying¹, SU Sheng-yong³ (¹The First College of clinical Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China; ²Sichuan Academy of Medical Sciences, Sichuan Provincial People's

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20250285

引用格式:王甜,羊璞,张熙,等.电针对慢性炎性疼痛与抑郁共病大鼠前扣带回皮层小胶质细胞极化和 $\alpha 7nAChR$ -TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路的影响[J].针刺研究,2026,51(4):455-464.

项目来源:国家自然科学基金项目(No. 82160934)

通信作者:粟胜勇,E-mail:1037097555@qq.com

Hospital, Chengdu 610072; ³The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023)

【ABSTRACT】 Objective To observe the effect of electroacupuncture (EA) on the regulation of microglia polarization in anterior cingulate cortex (ACC) by $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ nAChR)-Toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor kappa B (NF- κ B) signaling pathway in chronic inflammatory pain-depression comorbidity (CIPDC) rats, so as to explore its central “analgesic-antidepressant” mechanism underlying improvement of CIPDC.

Methods Thirty-six adult male SD rats were randomly divided into blank, CIPDC model and EA groups, with 12 rats in each group. The CIPDC model was established by plantar injection of complete Freund’s adjuvant. On the 14th day after modeling, EA (1.5 Hz, 1 mA) was applied to bilateral “Hegu” (LI4) and “Taichong” (LR3) for 20 min, once a day for 14 consecutive days. The mechanical paw withdrawal threshold (MWT) and thermal paw withdrawal latency (TWL) were detected at the 0, 14th, and 28th day after modeling. The open field test (OFT), forced swim test (FST) and sucrose preference test were used to evaluate the rats’ depression-like behavior. Hematoxylin-eosin (H. E.) staining was used to observe the histopathological changes of ACC. The contents of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-4 and IL-10 in the ACC tissue were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Double immunofluorescence staining was used to detect the co-expression of M1 microglia marker CD86 and ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba-1), and M2 microglia marker CD206 and Iba-1 in the ACC tissue. The protein expression levels of $\alpha 7$ nAChR, TLR4, myeloid differentiation primary response protein 88 (MyD88), NF- κ B p65 and p-NF- κ B p65 in the ACC tissue were detected by Western blot. **Results** Compared with the blank group, the MWT, TWL, sucrose preference rate, total distance traveled and timespent in the center zone of OFT were significantly decreased ($P < 0.05$), and the immobility time of FST was obviously increased ($P < 0.05$) in the model group. In comparison with the model group, the MWT, TWL, sucrose preference rate, total distance traveled and time spent in the center zone of OFT were apparently increased ($P < 0.05$), while immobility time of FST was strikingly decreased ($P < 0.05$) in the EA group, suggesting an amelioration of pain and depression-like behavior after EA. The contents of TNF- α , IL-1 β and IL-6, immunofluorescence area of CD86/Iba-1 and the expression levels of TLR4, MyD88, p-NF- κ B p65, and the ratio of p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 were significantly higher ($P < 0.05$), and the contents of IL-4 and IL-10, CD206/Iba-1 immunofluorescence-positive area and the expression level of $\alpha 7$ nAChR were significantly lower ($P < 0.05$) in the model group than in the blank group. Following EA intervention, the increased levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6, CD86/Iba-1 immunofluorescence-positive area and the expression levels of TLR4, MyD88, p-NF- κ B p65, and the ratio of p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 and the decreased levels of IL-4 and IL-10, immunofluorescence area of CD206/Iba-1 and the expression level of $\alpha 7$ nAChR after modelling were all reversed ($P < 0.05$). H. E. staining showed disordered arrangement of tissues, neuronal cells shrinking, reduced number and deeply stained pyramidal cells, with vacuoles and nerve fiber tangles appeared in the interstitial spaces in the ACC of model group, which was relatively milder in the injury degree in the EA group, including a small number of neurons being deeply stained and smaller space between neurons and tissues. **Conclusion** EA can exert central “analgesic-antidepressant” effect in CIPDC rats, which may be related to its functions in alleviating central inflammatory response, reducing neuronal damage and promoting microglial polarization mediated by $\alpha 7$ nAChR-TLR4/MyD88/NF- κ B signaling in the ACC tissue.

【KEYWORDS】 Electroacupuncture; Chronic inflammatory pain and depression comorbidity; $\alpha 7$ nAChR-TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway; Polarization of microglia; Anterior cingulate cortex; Inflammatory reaction

慢性疼痛为持续3个月及以上的疼痛^[1]。慢性炎性疼痛是临床常见的慢性疼痛类型之一,其作为一种长期的应激源,可引起30%~60%的患者出现抑郁状态^[2]。临床上常用镇痛药联合抗抑郁药治疗慢性炎性疼痛和抑郁共病(chronic inflammatory pain and depression comorbidity, CIPDC)^[3],然而只有40%~60%的CIPDC患者的症状能够得到缓解^[4],这在一定程度上反映了对CIPDC发病机制及治疗方式探究的不足。研究^[5-6]表明,疼痛与情绪存

在交互作用,炎性反应是疼痛和抑郁发病的共同生物学途径及分子机制之一。胆碱能抗炎通路为重要的神经-免疫调节通路,其经迷走神经发出神经信号后,激活机体内 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor, $\alpha 7$ nAChR)下调Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)/髓样分化因子88(myeloid differentiation primary response protein 88, MyD88)/核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)信号通路的活性,抑制巨噬细胞释放促炎细胞因子^[7]。

$\alpha 7nAChR$ 的激活可抑制M1型小胶质细胞的转化,促进M2表型激活,有助于调控中枢神经系统疾病的神经炎性反应^[8]。其次,前扣带回皮层(anterior cingulate cortex, ACC)作为疼痛和抑郁整合的关键位点,在疼痛和抑郁共病中具有重要作用^[9]。因此,调控ACC组织内炎性反应可能成为治疗CIPDC的关键靶点。

临床研究^[10]表明,电针治疗CIPDC疗效显著,能明显提高患者疼痛阈值并缓解抑郁情绪。电针通过激活各种神经元底物产生镇痛和抗抑郁作用,已被广泛用于治疗神经系统疾病,包括神经痛、炎性疼痛和抑郁等^[11]。团队前期研究显示,电针可通过减少海马神经元凋亡途径,减轻CIPDC模型大鼠的疼痛及抑郁样行为^[12-13]。既往研究虽已经明确电针在海马脑区的作用机制,相较于海马(主司记忆巩固与情绪背景编码),ACC对疼痛与抑郁的即时情感反应和长期负性情绪维持具有更直接的调控作用^[14]。但现有研究对ACC在共病中机制的探索不足,电针是否通过ACC组织中 $\alpha 7nAChR$ -TLR4/MyD88/NF- κB 信号通路调控小胶质细胞极化,从而缓解CIPDC模型大鼠ACC的病理损伤,以及发挥中枢抗炎作用,还需进一步探讨。因此,本研究观察电针对CIPDC模型大鼠ACC组织中 $\alpha 7nAChR$ -TLR4/MyD88/NF- κB 信号通路表达的影响,探讨电针治疗CIPDC的中枢“镇痛-抗抑郁”作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

选用36只8周龄健康SPF级雄性SD大鼠,体重230~270 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,生产许可证号:SCXK(湘)2019-0014。依据随机数字表法,将大鼠分为空白组、模型组及电针组,每组12只。实验动物饲养于广西中医药大学第一附属医院医学分子生物学实验室动物房内,室温23~25℃,环境湿度60%~70%,12 h/12 h明暗交替模式,自由饮水与摄食。本动物实验方案均遵循《广西中医药大学实验动物基本管理条例》,且已通过广西中医药大学实验动物伦理委员会的审批(No. DW20240919-204)。

1.2 主要仪器和试剂

一次性无菌针灸针(0.25 mm×13 mm,苏州医疗用品厂),电针仪(青岛鑫升实业),Von Frey纤维丝测痛仪(上海玉研仪器),小动物专用麻醉机(美国Harvard),热板测痛仪(美国Life Science),旷场

实验视频分析系统、强迫游泳实验系统(上海欣软),糖水偏好自动检测仪(新加坡罗辑科学),光学显微镜、成像系统、荧光显微镜(日本OLYMPUS),石蜡切片机(德国莱卡),低温高速离心机(德国Eppendorf),干燥箱(日本三洋),研磨仪(武汉Servicebio),核酸蛋白定量仪(美国Denovix),超纯水仪(北京康铭泰克),电泳仪及转膜仪(北京六一),涡旋振荡仪、脱色摇床(海门其林贝尔),扫描仪(日本Epson),超声波细胞破碎仪(江苏天翎),电热恒温水箱(余姚东方电工),洗板机、酶标仪(美国BIO-TEK)。

完全弗氏佐剂(7009,美国Sigma),异氟醚(R510-22,深圳瑞沃德),苏木精染色液、伊红染色液(BA-4041、BA-4024,珠海贝索),荧光素标记山羊抗兔IgG二抗、荧光素标记山羊抗鼠IgG二抗、淬灭封片剂、ECL发光试剂、HRP标记山羊抗兔二抗、HRP标记山羊抗鼠二抗(ZF-0516、ZF-0512、ZLI-9556、sc-2048、ZB2301、ZB2305,北京中杉金桥),离子钙结合衔接蛋白1(ionized calcium binding adapter molecule 1, Iba-1)抗体、 $\alpha 7nAChR$ 抗体、NF- κB p65抗体、磷酸化(phosphorylated, p)-NF- κB p65抗体(ab283319、AB216485、AB16502、AB76302,美国Abcam),CD86抗体(13395-1-AP,武汉三鹰),DAPI染色液(AR1177,武汉博士德),RIPA裂解液(R0020,北京Solarbio),PVDF膜(IPVH00010,美国Millipore),CD206抗体、TLR4抗体、MyD88抗体、 β -actin抗体(DF4149、AF7017、AF5195、AF7018,英国Affinity),肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-4、IL-6、IL-10 ELISA检测试剂盒(EK382、EK301BHS、EK304HS、EK306、EK310HS,杭州联科生物)。

1.3 造模方法

适应性饲养1周后进行造模。大鼠造模前均禁食、禁水12 h。各组大鼠均用异氟醚诱导吸入麻醉约3 min(4%, 1 L/min),随后使用大鼠氧气面罩给予异氟醚持续麻醉(1%, 1 L/min),俯卧位固定。采用完全弗氏佐剂足底注射建立CIPDC模型^[15]。模型组、电针组大鼠均于左后爪足底注射100 μ L完全弗氏佐剂。空白组大鼠于左后爪足底注射等体积0.9%氯化钠溶液。造模后大鼠左后爪出现明显红肿现象且痛阈值明显下降,14 d后出现抑郁行为表现即为造模成功。本实验中CIPDC模型造模成功率为100%。

1.4 干预方法

注射完全弗氏佐剂 14 d 后开始干预。所有大鼠干预前均予异氟醚诱导吸入麻醉约 3 min (4%, 1 L/min), 随后使用大鼠氧气面罩给予异氟醚持续麻醉 (1%, 1 L/min), 麻醉后予俯卧位固定。电针组大鼠选取双侧“合谷”“太冲”^[16], 穴位处皮肤予碘伏消毒后, 选用 0.25 mm × 13 mm 一次性无菌针灸针直刺进针约 3 mm, 同侧穴位连接电针治疗仪的一对导线, 连续波, 频率 1.5 Hz, 强度 1 mA, 持续 20 min。空白组与模型组大鼠仅以和电针组相同的方式进行抓取与固定。各组大鼠干预时间均为每日 1 次, 连续干预 14 d。

1.5 检测指标和方法

大鼠机械缩足反应阈值 (mechanical paw withdrawal threshold, MWT) 检测^[17]: 分别于造模后第 0、14、28 天进行检测。使用 Von Frey 纤维丝的 Up-down 法对大鼠进行评估。将大鼠放置于测试笼中适应 15 min, 在大鼠安静状态下, 将 Von Frey 纤维丝垂直刺于左后肢足底中部, 并垂直施加压力使纤维丝呈“C”或“S”状, 每次刺激时间 ≤ 5 s, 刺激间隔时间 > 120 s。刺激时观察大鼠的反应, 当大鼠出现缩足或舔足行为时, 为阳性反应, 标记为“X”, 下一次刺激以较低强度纤维丝替代; 反之, 如果出现阴性反应 (无缩足或舔足行为), 则记为“O”, 下一次刺激以较高强度纤维丝替代。在出现“OX”或“XO”组合的情况下, 再进行另外 4 次测量。机械痛阈的计算和分析采用公式: $MWT(g) = (10[Xf + k\delta]) \div 10\,000$, Xf 为最后测试纤维丝编号, δ 为所取各根纤维丝取对数后的平均差值 (约为 0.224), k 为测试所得序列根据查表后获得的系数值。

大鼠热缩足反射潜伏期 (thermal paw withdrawal latency, TWL) 检测^[18]: 分别于造模后第 0、14、28 天进行检测。保持检测环境安静, 室温 20~25 °C, 将每只大鼠依次置入热板测痛仪测试箱中适应 3 min, 记录大鼠从开始照射至出现抬腿舔足行为的时长。为防止对大鼠造成烫伤, 设置保护时长为 30 s。对每只大鼠均测定 3 次, 每次测试间隔 5 min, 最终取这 3 次测量结果的平均值。

大鼠糖水偏好实验^[19]: 分别于造模后第 0、14、28 天进行检测。在开展糖水偏好实验前需先进行糖水训练, 具体步骤如下: 第 1 天, 在每个鼠笼中放置 2 瓶等量的 1% 蔗糖水; 第 2 天, 随机放置 1 瓶纯水与 1 瓶等量的 1% 蔗糖水, 每 12 h 将两瓶水的位置互换; 第 3 天, 对大鼠禁食禁水 24 h。随后正式开

始实验, 每笼每只大鼠给予等量纯水与 1% 蔗糖水, 1 h 后测定纯水与糖水剩余量。糖水偏好率 (%) = 糖水消耗量 ÷ (纯水消耗量 + 糖水消耗量) × 100%。

大鼠强迫游泳实验^[20]: 分别于造模后第 0、14、28 天进行检测。将大鼠放入有机玻璃测试圆桶中, 圆桶中水深约 30 cm, 水温 18~22 °C, 待大鼠适应环境后, 用视频分析软件记录 5 min 内大鼠静止不动时间。

大鼠旷场实验^[21]: 分别于造模后第 0、14、28 天进行检测。将每只大鼠单独放置在黑色敞箱的中心区域内适应环境 3 min 后开始实验, 通过旷场视频分析软件分析每只大鼠 5 min 内的运动轨迹, 依次记录每只大鼠的运动总距离和中央停留时间。

样本采集: 于造模后第 28 天, 完成所有干预及行为学检测后进行取材, 予 2% 异氟醚诱导吸入麻醉, 充分麻醉后切开大鼠胸腔暴露心脏, 通过心脏灌注 0.9% 氯化钠溶液, 于冰盘上将 ACC 组织迅速取出。取每组 3 只大鼠的 ACC 组织浸泡于 4% 多聚甲醛溶液中固定, 用于苏木精-伊红染色 (hematoxylin-eosin staining, HE 染色)、免疫荧光双染色; 其余 ACC 组织液氮速冻后置于 -80 °C 冰箱保存, 用于 Western blot、ELISA 检测。

HE 检测大鼠 ACC 组织形态变化: 取 ACC 组织, 流水冲洗组织样本, 依次采用梯度乙醇进行脱水处理, 随后进行常规石蜡包埋, 再进行切片 (厚度 3 μm), 65 °C 烤片 4.5 h, 进行脱蜡、水洗、返蓝、染色、封片, 采用光学显微镜观察, 选取目标区域进行拍照, 分析 ACC 的组织形态变化。

ELISA 法检测大鼠 ACC 组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-4、IL-10 含量: 取 ACC 组织 30 mg, 予预冷的 PBS 缓冲液冲洗, 称重后剪碎, 加入相应体积的 PBS (1:9), 匀浆, 以 4 °C, 5 000 × g 离心 10 min, 取上清液。按照 ELISA 试剂盒说明书操作检测大鼠 ACC 中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-4、IL-10 的含量。

免疫荧光双染色法检测大鼠 ACC 组织 CD86/Iba-1、CD206/Iba-1 阳性表达: 取大鼠 ACC 组织石蜡切片, 脱蜡、水合, 将切片置于 3% 柠檬酸修复液中, 进行高压修复。修复完成后, 用 PBS 冲洗切片, 随后滴加 3% 双氧水, 在室温下孵育 20 min。再次用 PBS 冲洗切片, 接着滴加牛血清白蛋白封闭液, 并在室温下孵育 20 min; 封闭后, 分别加入 Iba-1 (1:100) 与 CD86 (1:100) 一抗混合液、Iba-1 (1:100) 与 CD206 (1:100) 一抗混合液, 4 °C 孵育过夜, PBS 冲洗; 切片滴加荧光二抗 (1:150), 37 °C 避光 20 min,

PBS冲洗;使用DAPI染色液在室温且避光的条件下孵育20 min;充分水洗后滴加水溶性封片剂封片,采用荧光显微镜观察并采集图像。DAPI染的细胞核在紫外激发下为蓝光,CD86和CD206阳性表达为相应荧光素标记的红光,Iba-1阳性表达为相应荧光素标记的绿色。

Western blot法检测ACC组织中 $\alpha 7nAChR$ 、TLR4、MyD88、NF- κB p65、p-NF- κB p65蛋白表达水平:取ACC组织20 mg,加入RIPA组织裂解液并进行匀浆处理,随后在4℃环境下,以12 000 r/min的转速离心5 min,取上清液,采用BCA法测定蛋白浓度。蛋白上样量20 μg ,接着加入蛋白上样缓冲液,在100℃条件下变性10 min。之后依次进行蛋白电泳、转膜、封闭操作,完成后滴加一抗($\alpha 7nAChR$ 1:1 100, TLR4 1:1 200, MyD88 1:800, NF- κB p65 1:1 000, p-NF- κB p65 1:1 000, β -actin 1:8 000), 4℃孵育12 h,用PBST洗膜3次,接着滴加二抗,于37℃环境中孵育1 h。之后再次用PBST洗膜,通过ECL化学发光法进行显影,利用凝胶成像仪扫描获取图像。运用Image J软件对条带进行灰度值分析,并以 β -actin作为内参,以目的蛋白与内参蛋白条带灰度值的比值,计算 $\alpha 7nAChR$ 、TLR4、MyD88、NF- κB p65、p-NF- κB p65的相对表达量。

1.6 统计学分析

实验数据运用SPSS26.0软件进行统计分析。若数据符合正态分布且方差齐,计量资料以均数 \pm

标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用LSD法进行检验;若方差不齐,则采用Dunnett's *t*3检验;多时点测量数据采用两因素重复测量方差分析。以 $P\leq 0.05$ 为差异具有统计学意义的标准。

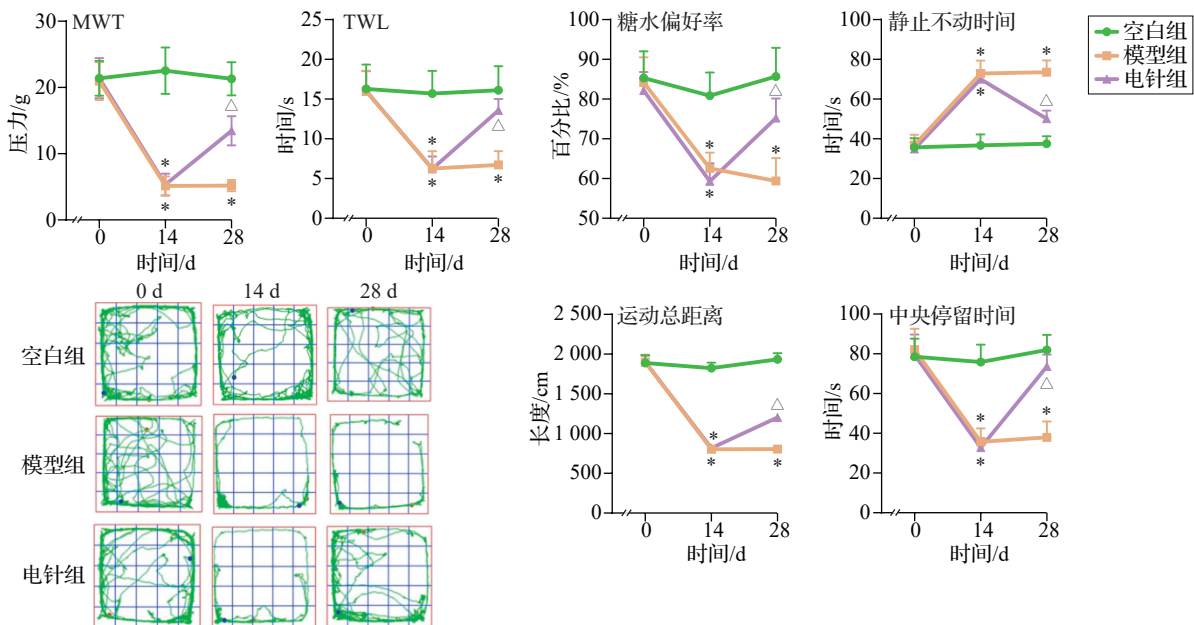
2 结果

2.1 电针改善CIPDC模型大鼠的疼痛及抑郁相关行为学表现

造模第0天,各组大鼠MWT、TWL、糖水偏好率、静止不动时间、旷场实验结果比较差异均无统计学意义。造模后第14、28天,与空白组比较,模型组MWT、TWL、糖水偏好率及旷场实验运动总距离、中央停留时间均明显降低($P<0.05$),强迫游泳实验静止不动时间明显增加($P<0.05$)。造模后第28天,与模型组比较,电针组MWT、TWL、糖水偏好率及旷场实验运动总距离、中央停留时间显著升高($P<0.05$),强迫游泳实验静止不动时间明显减少($P<0.05$)。见图1。

2.2 电针修复CIPDC模型大鼠ACC神经元损伤

空白组大鼠ACC组织形态正常,组织间无明显病理损伤,无空泡样现象出现,神经元结构清晰,锥体细胞数量较多、排列整齐;模型组大鼠ACC组织细胞排列紊乱,大量神经元固缩、深染,锥体细胞数量明显减少,组织间隙有空泡和神经纤维缠结出现;而电针组大鼠ACC仅有少量神经元固缩、深染色,且神经元与组织间隙变小,锥体细胞数量有所

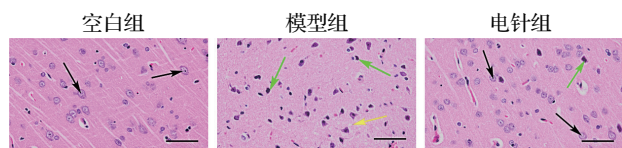


注:MWT为机械缩足反应阈值,TWL为热缩足反射潜伏期。与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$ 。

图1 各组大鼠行为学结果比较($\bar{x}\pm s$, 12只鼠/组)

Fig. 1 Comparison of behavioral tests results of rats in the 3 groups ($\bar{x}\pm s$, 12 rats/group)

增加。见图2。



注:ACC为前扣带回皮层。标尺=50 μm。黑色箭头示锥体细胞,绿色箭头示神经元固缩、深染,黄色箭头示组织间隙空泡和神经纤维缠结。

图2 各组大鼠ACC组织形态比较(HE染色)

Fig. 2 Comparison of ACC morphology of rats in the 3 groups (HE staining)

2.3 电针调控CIPDC模型大鼠ACC相关炎症因子含量

与空白组比较,模型组ACC组织的TNF-α、IL-1β、IL-6含量显著升高($P<0.05$),IL-4、IL-10含量显著降低($P<0.05$);与模型组比较,电针组ACC组织的TNF-α、IL-1β、IL-6含量显著降低($P<0.05$),IL-4、IL-10含量显著升高($P<0.05$)。见图3。

2.4 电针促进CIPDC模型大鼠的ACC小胶质细胞向M2型极化

与空白组比较,模型组M1型小胶质细胞CD86/Iba-1阳性表达明显增加($P<0.05$),M2型小胶质细胞CD206/Iba-1阳性表达显著减少($P<0.05$);与模型组比较,电针组CD86/Iba-1阳性表达明显减少($P<0.05$),CD206/Iba-1阳性表达明显增加($P<0.05$)。见图4。

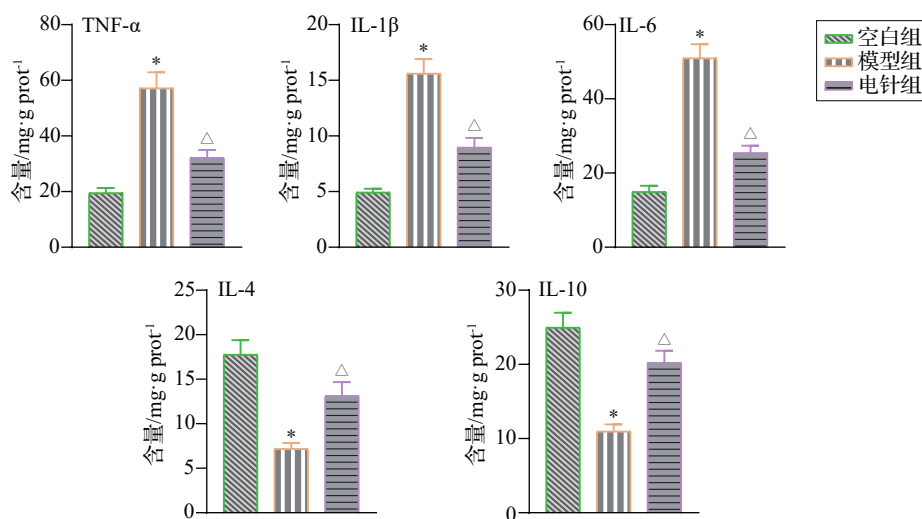
2.5 电针调控α7nAChR-TLR4/MyD88/NF-κB信

号通路表达水平

与空白组比较,模型组的α7nAChR蛋白表达显著降低($P<0.05$),TLR4、MyD88、p-NF-κB p65蛋白表达及p-NF-κB p65/NF-κB p65比值明显升高($P<0.05$),NF-κB p65蛋白表达差异无统计学意义;与模型组相比,电针组的α7nAChR蛋白表达显著升高($P<0.05$),TLR4、MyD88、p-NF-κB p65蛋白表达及p-NF-κB p65/NF-κB p65比值明显降低($P<0.05$),NF-κB p65蛋白表达差异无统计学意义。见图5。

3 讨论

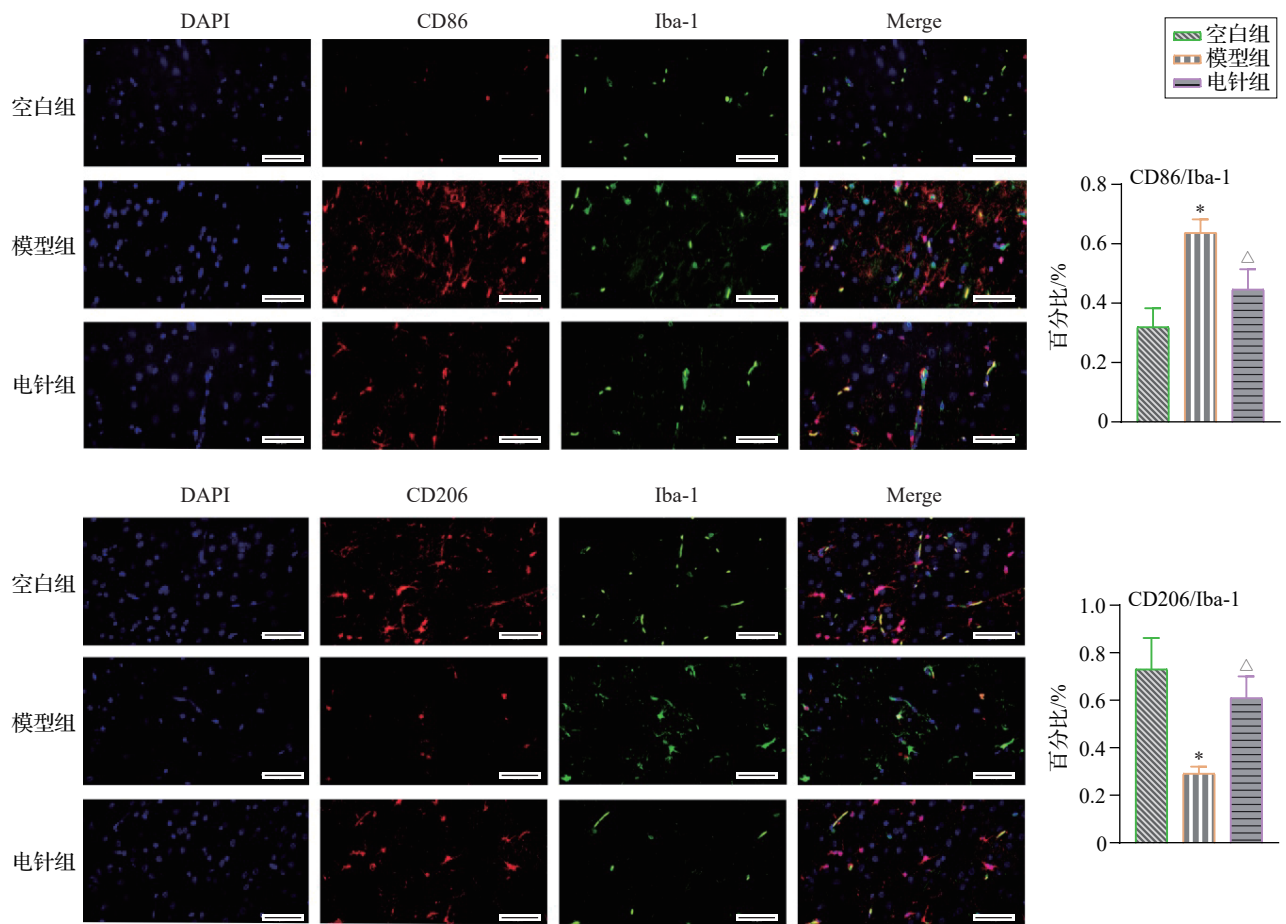
“气”是一切生命体的本源,对机体有着重要影响。慢性炎症疼痛与抑郁障碍二者均与气机运动相关,CIPDC的共病病因归咎于气机郁滞。《黄帝内经》提出“气伤痛”理论,其认为正常生理情况下,气的基本运行特点是周流全身、通行无阻,“气伤痛”是指气不能畅通运行、气机受阻而导致疼痛的发生。《灵枢·本神》曰“愁忧者,气闭塞而不行”,气机升降运动失常、气机郁滞,则进一步诱导抑郁障碍的产生,气机阻滞最终导致机体出现疼痛与抑郁障碍共病。因此,气机运行不畅是慢性疼痛及抑郁共病状态的共同决定性因素,而调畅气机是针对CIPDC治疗的关键。《针灸穴名解》云:“合谷、太冲各二穴,名为四关,以其能大开通也。”合谷、太冲即为“四关”,二穴配伍共用,具有调畅气机、止痛解郁之功效。本研究选取“合谷”“太冲”对穴施以电针



注:ACC为前扣带回皮层,TNF-α为肿瘤坏死因子α,IL为白细胞介素。与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[△] $P<0.05$ 。

图3 各组大鼠ACC组织TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-4、IL-10含量比较($\bar{x}\pm s$,3只鼠/组)

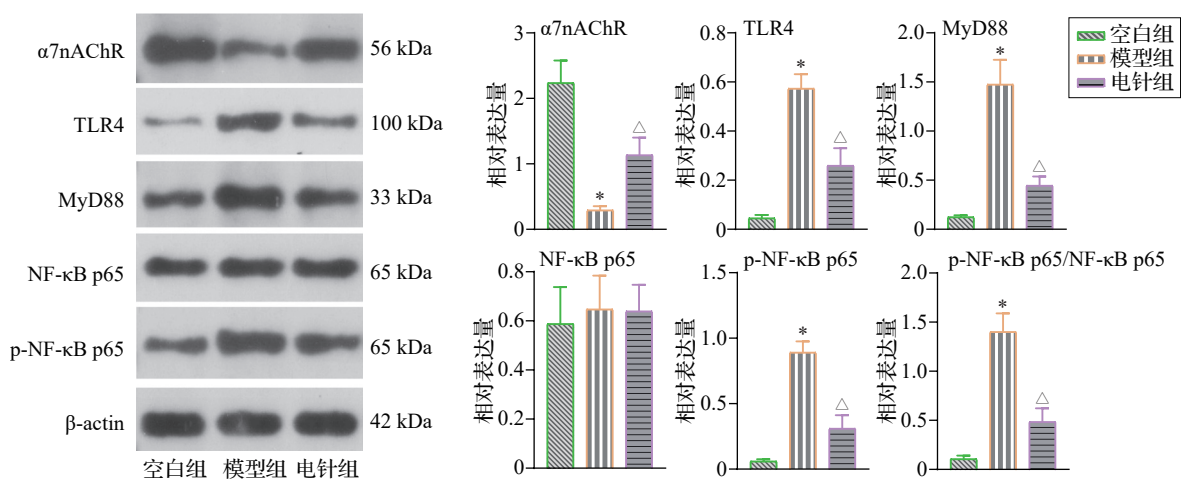
Fig. 3 Comparison of the contents of TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-4 and IL-10 in ACC tissue of rats in the 3 groups ($\bar{x}\pm s$, 3 rats/group)



注:ACC为前扣带回皮层,Iba-1为离子钙结合衔接蛋白1。标尺=50 μm。与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,Δ $P < 0.05$ 。

图4 各组大鼠ACC组织小胶质细胞CD86/Iba-1、CD206/Iba-1阳性表达比较
(免疫荧光双染色, $\bar{x} \pm s$, 3只鼠/组)

Fig. 4 Comparison of positive expressions of CD86/Iba-1 and CD206/Iba-1 in microglia of ACC tissue of rats in the 3 groups (double immunofluorescence staining, $\bar{x} \pm s$, 3 rats/group)



注:ACC为前扣带回皮层,α7nAChR为α7烟碱乙酰胆碱受体,TLR4为Toll样受体4,MyD88为髓样分化因子88,NF-κB为核因子κB。与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,Δ $P < 0.05$ 。

图5 各组大鼠ACC组织α7nAChR、TLR4、MyD88、NF-κB p65、p-NF-κB p65蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$, 3只鼠/组)

Fig. 5 Comparison of protein expression levels of α7nAChR, TLR4, MyD88, NF-κB p65 and p-NF-κB p65 in ACC tissue of rats in the 3 groups ($\bar{x} \pm s$, 3 rats/group)

刺激,旨在缓解疼痛及抑郁障碍。临床研究显示^[10],电针广泛应用于治疗疼痛与抑郁共病,能够明显减少患者疼痛症状,改善患者抑郁状态。相关动物实验结果显示^[22],电针能降低机体促炎细胞因子的释放,减轻炎症反应,从而改善大鼠疼痛抑郁共病症状。课题组前期研究提示,电针“合谷”“太冲”可通过激活磷脂酰肌醇3-激酶/青蒿琥酯信号通路,减少海马神经元凋亡,改善CIPDC模型大鼠的疼痛及抑郁样行为^[12-13]。基于此,本研究在课题组前期研究基础上,以中枢炎症反应为切入点,进一步探讨电针“合谷”“太冲”治疗CIPDC的中枢“镇痛-抗抑郁”机制。本实验结果显示,电针可通过调控ACC组织内 $\alpha 7nAChR$ -TLR4/MyD88/NF- κB 信号通路,促进小胶质细胞向M2型极化,从而发挥中枢抗炎作用,缓解ACC组织病理损伤,改善CIPDC的疼痛和抑郁样行为。

炎症反应介导了“疼痛-抑郁”信息的交互与传导。炎症因子是一类主要由免疫细胞产生的高活性、多功能小分子蛋白质。研究表明^[23],慢性疼痛发生后,机体IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等促炎因子的表达水平明显增加,造成神经炎症反应和神经元损伤,此过程被认为与抑郁发病相关。通过注射拮抗剂干扰炎症反应通路,可同时缓解疼痛模型的痛觉过敏及抑郁症状^[24]。因此,炎症反应在疼痛及诱导的抑郁症中发挥了重要作用,调控炎症反应细胞因子是治疗CIPDC的重要靶标^[25]。TLRs属于天然免疫系统里的一类保守型模式识别受体,在受到外界病原体刺激时,可激活下游炎症反应信号通路^[26]。TLR4作为TLRs家族的关键成员,与NF- κB 在信号通路中发挥着核心作用,而该通路信号中的MyD88是关键的下游分子。作为TLR4信号通路的下游效应因子,NF- κB 在正常生理状态下以无活性的形式存在,由NF- κB p65与抑制性蛋白相结合。在病理条件下,NF- κB p65转移至细胞核内,从而引发机体释放炎症因子并产生炎症反应^[27-28]。乙酰胆碱及其受体对机体炎症反应至关重要,研究表明^[29], $\alpha 7nAChR$ 激活后可对局部和全身炎症反应产生抑制作用。既往研究报道^[30], $\alpha 7nAChR$ 与TLR4/NF- κB 表达呈负相关, $\alpha 7nAChR$ 抑制剂可部分逆转对TLR4/NF- κB 的抑制作用,表明 $\alpha 7nAChR$ 介导的抗炎作用与TLR4/NF- κB 表达抑制有关。研究表明^[31], $\alpha 7nAChR$ 及TLR与小胶质细胞之间存在紧密联系。一方面,TLR4在小胶质细胞中高表达,被激活的小胶质细胞可分为两种表型,即促炎的M1

表型与抗炎的M2表型^[32]。在神经炎症动物模型中,小胶质细胞往往趋向于M1型的单一表达,而积极治疗干预可以减少M1型相关蛋白的水平,促使小胶质细胞向M2型极化,从而缓解神经炎症反应^[33]。有学者通过研究观察到,TLR4受到抑制能够触发小胶质细胞的M1/M2极化,且这种极化现象有助于缓解大脑的神经炎症反应^[34]。另一方面, $\alpha 7nAChR$ 的激活可抑制M1型小胶质细胞的转化,促进M2表型激活,有助于调控中枢神经系统疾病的神经炎症反应^[8]。因此,炎症反应诱导了“疼痛-抑郁”的发生。具体而言, $\alpha 7nAChR$ 可抑制TLR4/MyD88/NF- κB 信号通路的表达,该信号通路进一步对小胶质细胞的极化过程进行调控。小胶质细胞极化状态的改变促使机体产生炎症反应,而这种炎症反应又进一步推动了CIPDC的发生发展。

本研究结果显示,CIPDC模型大鼠ACC组织排列紊乱,大量神经元受损, $\alpha 7nAChR$ 蛋白表达明显降低,TLR4、MyD88、p-NF- κB p65蛋白表达明显升高,M1型小胶质细胞的表达量上升,M2型小胶质细胞的表达量下降,促炎因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的表达水平显著升高,抗炎因子IL-4、IL-10的表达显著降低,表明CIPDC诱发机体出现炎症反应,该机制发生途径与 $\alpha 7nAChR$ -TLR4/MyD88/NF- κB 介导的小胶质细胞极化相关。在采用电针干预后,CIPDC模型大鼠ACC组织中 $\alpha 7nAChR$ -TLR4/MyD88/NF- κB 信号通路表达被逆转,ACC中小胶质细胞向M2型极化,促炎因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的表达降低,而抑炎因子IL-4、IL-10的表达升高,ACC组织神经元损伤程度减轻,疼痛及抑郁样行为明显改善。

综上,电针能有效缓解CIPDC大鼠疼痛及抑郁行为,其机制可能与激活ACC中 $\alpha 7nAChR$ 以抑制TLR4/MyD88/NF- κB 信号通路,进而促进小胶质细胞向M2型极化,最终发挥中枢抗炎作用有关。本研究虽揭示了电针缓解CIPDC大鼠疼痛及抑郁行为的潜在机制,但仍存在一定的局限性:本实验仅对比了电针对CIPDC的治疗效应,未采用抑制剂阻断 $\alpha 7nAChR$ 或TLR4/MyD88/NF- κB 信号通路,导致结果的不确定性有所增加。基于此,未来研究中将使用抑制剂阻断 $\alpha 7nAChR$ 或TLR4/MyD88/NF- κB 信号通路,并对比使用抑制剂前后电针的治疗效果,进一步验证电针是否通过激活ACC中 $\alpha 7nAChR$ 抑制该信号通路发挥作用,为后续治疗靶点的精准选择提供更坚实的理论依据。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] BRAIN K, BURROWS T L, ROLLO M E, et al. A systematic review and meta-analysis of nutrition interventions for chronic noncancer pain[J]. *J Hum Nutr Diet*, 2019, 32(2): 198-225.
- [2] KREMER M, BECKER L J, BARROT M, et al. How to study anxiety and depression in rodent models of chronic pain? [J]. *Eur J Neurosci*, 2021, 53(1): 236-270.
- [3] OBATA H. Analgesic mechanisms of antidepressants for neuropathic pain[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(11): 2483.
- [4] MERCER LINDSAY N, CHEN C, GILAM G, et al. Brain circuits for pain and its treatment[J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(619): eabj7360.
- [5] 曾晓铃, 杨晓爱, 李珊珊, 等. 针刺治疗慢性疼痛-抑郁共病作用机制的研究现状[J]. *上海针灸杂志*, 2024, 43(11): 1284-1290.
- ZENG X L, YANG X A, LI S S, et al. Research status of mechanism of acupuncture in treating chronic pain-depression comorbidity (in Chinese) [J]. *Shanghai Journal of Acupuncture and Moxibustion*, 2024, 43(11): 1284-1290.
- [6] ZHU X, TANG H D, DONG W Y, et al. Distinct thalamocortical circuits underlie allodynia induced by tissue injury and by depression-like states[J]. *Nat Neurosci*, 2021, 24(4): 542-553.
- [7] 张悦. 海马 $\alpha 7nAChR/NF-\kappa B$ 信号通路介导耳甲电刺激干预抑郁模型大鼠的抗炎机制[D]. 北京: 中国中医科学院, 2021.
- ZHANG Y. The hippocampal $\alpha 7nAChR/NF-\kappa B$ signal pathway mediates the anti-inflammatory mechanism of auricular concha electrostimulation on depressive model rats (in Chinese) [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2021.
- [8] ZHANG Q C, LU Y, BIAN H M, et al. Activation of the $\alpha 7$ nicotinic receptor promotes lipopolysaccharide-induced conversion of M1 microglia to M2 [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(3): 971-985.
- [9] 张培根, 朱海丽, 高卉. 疼痛抑郁共病的研究进展[J]. *湖北科技学院学报(医学版)*, 2024, 38(3): 270-276.
- ZHANG P G, ZHU H L, GAO H. Research progress on comorbidity of pain and depression (in Chinese)[J]. *Journal of Hubei University of Science and Technology (Medical Sciences)*, 2024, 38(3): 270-276.
- [10] 王芸阁, 程笑菡, 张昕玥, 等. 针刺对膝关节炎患者疼痛及负性情绪的影响[J]. *上海针灸杂志*, 2025, 44(12): 1401-1408.
- WANG Y G, CHENG X H, ZHANG X Y, et al. Impact of acupuncture on pain and negative emotions in patients with knee osteoarthritis (in Chinese) [J]. *Shanghai Journal of Acupuncture and Moxibustion*, 2025, 44(12): 1401-1408.
- [11] 李佳诺, 曾祥新, 郭玉怀, 等. 电针治疗中枢神经系统疾病的免疫炎症机制研究进展[J]. *神经损伤与功能重建*, 2025, 20(5): 284-287, 306.
- LI J N, ZENG X X, GUO Y H, et al. Research progress on the immunoinflammatory mechanism of electroacupuncture in the treatment of central nervous system diseases (in Chinese) [J]. *Neural Injury and Functional Reconstruction*, 2025, 20(5): 284-287, 306.
- [12] 羊璞, 粟胜勇, 王甜. 电针对慢性疼痛抑郁共病大鼠海马组织 Cyt-C、Caspase-9 表达的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2024, 31(3): 85-91.
- YANG P, SU S Y, WANG T. Effects of electroacupuncture on Cyt-C and Caspase-9 expression in hippocampal tissue of rats with chronic pain and depression comorbidity (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine*, 2024, 31(3): 85-91.
- [13] YANG P, CHEN H Y, WANG T, et al. Electroacupuncture attenuates chronic inflammatory pain and depression comorbidity by inhibiting hippocampal neuronal apoptosis via the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Neurosci Lett*, 2023, 812: 137411.
- [14] SHACKMAN A J, SALOMONS T V, SLAGTER H A, et al. The integration of negative affect, pain and cognitive control in the cingulate cortex[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2011, 12(3): 154-167.
- [15] 羊璞, 粟胜勇, 王甜, 等. 足底注射完全弗氏佐剂致疼痛抑郁共病模型大鼠行为学及单胺类神经递质改变[J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(11): 1408-1414.
- YANG P, SU S Y, WANG T, et al. Plantar injection of complete Freund's adjuvant induces behavioral and monoamine neurotransmitter changes in comorbid pain and depression model rats (in Chinese) [J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2023, 31(11): 1408-1414.
- [16] 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位第2部分: 大鼠[J]. *针刺研究*, 2021, 46(4): 351-352.
- China Association of Acupuncture-Moxibustion. Nomenclature and location of acupoints commonly used in laboratory animals. Part 2: rat (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2021, 46(4): 351-352.
- [17] LUO C, ZHONG X L, ZHOU F H, et al. Peripheral brain derived neurotrophic factor precursor regulates pain as an inflammatory mediator[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 27171.
- [18] ZHAO L, TAO X S, WANG K P, et al. Astaxanthin alleviates fibromyalgia pain and depression via NLRP3 inflammasome inhibition [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 176: 116856.
- [19] WANG J Y, ZHANG Y, CHEN Y, et al. Mechanisms underlying antidepressant effect of transcutaneous auricular vagus nerve stimulation on CUMS model rats based on hippocampal $\alpha 7nAChR/NF-\kappa B$ signal pathway [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 291.
- [20] CHEN Y, ZHANG Y, WANG J Y, et al. Anti-neuroinflammation effects of transcutaneous auricular vagus nerve stimulation against depression-like behaviors via

- hypothalamic $\alpha 7nAChR/JAK2/STAT3/NF-\kappa B$ pathway in rats exposed to chronic unpredictable mild stress [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2023, 29(9): 2634-2644.
- [21] LI X J, XIAO Z, PU W Y, et al. Network pharmacology, molecular docking, and experimental validation to explore the potential mechanism of Long Mu Qing Xin mixture for the treatment of attention deficit hyperactivity disorder [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1144907.
- [22] 王永志, 王安娜, 高雪松, 等. 电针对疼痛抑郁共病大鼠行为学及外周血炎症因子的影响 [J]. *现代中医临床*, 2019, 26(4): 55-60.
- WANG Y Z, WANG A N, GAO X S, et al. Effect of electroacupuncture on behavior and peripheral blood inflammatory factors in rats with pain accompanied by depression (in Chinese) [J]. *Modern Chinese Clinical Medicine*, 2019, 26(4): 55-60.
- [23] SINGH A P, SINGH L, SINGH P, et al. Biological evaluation of Aegle marmelos fruit extract and isolated aegeline in alleviating pain-depression dyad: in silico analysis of aegeline on MAO-A and iNOS [J]. *ACS Omega*, 2021, 6(3): 2034-2044.
- [24] BURKE N N, KERR D M, MORIARTY O, et al. Minocycline modulates neuropathic pain behaviour and cortical M1-M2 microglial gene expression in a rat model of depression [J]. *Brain Behav Immun*, 2014, 42: 147-156.
- [25] FASICK V, SPENGLER R N, SAMANKAN S, et al. The hippocampus and TNF: common links between chronic pain and depression [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2015, 53: 139-159.
- [26] ZHANG Y S, LIANG X J, BAO X F, et al. Toll-like receptor 4 (TLR4) inhibitors: current research and prospective [J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 235: 114291.
- [27] ZHOU J Y, DENG Y Y, LI F, et al. Icariside II attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation through inhibiting TLR4/MyD88/NF- κB pathway in rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 111: 315-324.
- [28] FAN B Y, LI C, SZALAD A, et al. Mesenchymal stromal cell-derived exosomes ameliorate peripheral neuropathy in a mouse model of diabetes [J]. *Diabetologia*, 2020, 63(2): 431-443.
- [29] ZHANG Y W, MA R, WANG W C, et al. Activation of $\alpha 7nAChR$ by PNU282987 improves cognitive impairment through inhibiting oxidative stress and neuroinflammation in D-galactose induced aging via regulating $\alpha 7nAChR/Nrf2/HO-1$ signaling pathway [J]. *Exp Gerontol*, 2023, 175: 112139.
- [30] ZHAO M T, YANG M R, DU J Y, et al. *Monochasma savatieri* Franch. protects against acute lung injury via $\alpha 7nAChR-TLR4/NF-\kappa B$ p65 signaling pathway based on integrated pharmacology analysis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 321: 117487.
- [31] RAHIMIFARD M, MAQBOOL F, MOEINI-NODEH S, et al. Targeting the TLR4 signaling pathway by polyphenols: a novel therapeutic strategy for neuroinflammation [J]. *Ageing Res Rev*, 2017, 36: 11-19.
- [32] RIZZI C, TIBERI A, GIUSTIZIERI M, et al. NGF steers microglia toward a neuroprotective phenotype [J]. *Glia*, 2018, 66(7): 1395-1416.
- [33] 方茜, 吴文, 唐丹喆. 脊髓小胶质细胞的极化对神经病理性疼痛的影响 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2022, 28(4): 285-289.
- FANG Q, WU W, TANG D Z. Effect of polarization of spinal microglia on neuropathic pain (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Pain Medicine*, 2022, 28(4): 285-289.
- [34] CUI W G, SUN C L, MA Y Q, et al. Inhibition of TLR4 induces M2 microglial polarization and provides neuroprotection via the NLRP3 inflammasome in Alzheimer's disease [J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 444.

收稿日期:2025-03-18 修回日期:2025-04-30
网络首发:2025-12-18 编辑:李天娇