

☆ XXXX ☆

小胶质细胞在痛觉敏化诱导及电针干预痛转化中的作用

徐雅双¹, 钟丽燕¹, 杜俊英^{1,2}, 周杰^{1,2}, 梁宜³, 方剑乔³, 房军帆^{1,2}

(¹浙江中医药大学第三临床医学院, 杭州 310053; ²浙江中医药大学附属第三医院, 杭州 310053; ³浙江中医药大学, 杭州 310053)

【摘要】 目的:探讨痛转化的机制,并评估电针对痛转化的干预效果。方法:雄性C57小鼠59只,分别用于四部分实验。第一部分实验分为空白组、假敏化组和敏化组,每组5只;第二部分实验分为假敏化组、敏化组和敏化+电针组。每组5只;第三部分实验分为敏化组和敏化+米诺环素组,每组7只;第四部分实验分为敏化组、敏化+电针+磷酸盐缓冲液组、敏化+电针+集落刺激因子组,每组5只。通过连续足底注射角叉菜胶和前列腺素建立痛转化小鼠模型。电针小鼠双侧“足三里”和“昆仑”穴,30 min/次,1次/日,共8 d。观察不同时间点小鼠机械缩足阈值(PWTs)的变化,评估痛转化的发生和发展及电针的干预作用。免疫荧光技术检测小胶质细胞(Iba1)和星形胶质细胞(GFAP)的活化状态。对痛转化小鼠进行鞘内注射米诺环素,检测其对Iba1活化及PWTs的影响。实验后进行骨架分析和Sholl分析,以评估Iba1的形态。进一步鞘内注射集落刺激因子(CSF-1),观察其对电针作用的影响。结果:痛转化模型小鼠不同时间点的PWTs显著下降($P<0.01$)。造模后Iba1活化($P<0.01$),而GFAP未活化。电针干预能提升痛转化小鼠的PWTs($P<0.01$),并抑制Iba1活化($P<0.01$)。鞘内注射米诺环素可抑制Iba1活化,降低脊髓背角中Iba1的表达($P<0.01$),并有效逆转PWTs的下降($P<0.01$)。进一步鞘内注射CSF-1可促进Iba1活化,并阻断电针对模型小鼠的镇痛作用($P<0.01$)。结论:Iba1活化在痛转化中起关键作用,电针可通过抑制Iba1活化,缓解痛转化小鼠的痛觉过敏状态。

【关键词】 痛觉敏化诱发;痛转化;脊髓背角;小胶质细胞;米诺环素;集落刺激因子;电针

The role of microglia in hyperalgesia priming and electroacupuncture intervention for pain transition

XU Ya-shuang¹, ZHONG Li-yan¹, DU Jun-ying^{1,2}, ZHOU Jie^{1,2}, LIANG Yi³, FANG Jian-qiao³, FANG Jun-fan^{1,2} (¹The Third Clinical Medical College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; ²The Third Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053; ³Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053)

【ABSTRACT】 Objective To explore the mechanism of hyperalgesia priming (HP) and evaluate the intervention effect of electroacupuncture (EA) on HP. **Methods** Fifty-nine male C57 mice were used for four separate experiments. In the first experiment, the mice were divided into a control group, a sham sensitization group, and a sensitization group, with 5 mice per group. In the second experiment, the mice were divided into a sham sensitization group, a sensitization group, and a sensitization + electroacupuncture group, with 5 mice per group. The third experiment consisted of a sensitization group and a sensitization + minocycline group, with 7 mice per group. In the fourth experiment, the mice were divided into a sensitization group, a sensitization + electroacupuncture + PBS group, and a sensitization + electroacupuncture + colony-stimulating factor group, with 5 mice per group. A HP mouse model was established via consecutive intraplantar injections of carrageenan and prostaglandin E2. EA was applied to bilateral

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20250697

引用格式:徐雅双,钟丽燕,杜俊英,等.小胶质细胞在痛觉敏化诱导及电针干预痛转化中的作用[J].针刺研究,XXXX,XX(X):1-11.

项目来源:国家自然科学基金项目(No. 82174490,82374561);浙江省自然科学基金项目(No. LY24H270003);国家重点研发计划(No. 2022YFC3500404);浙江省中医药管理局共建科技计划(No. GZY-ZJ-KJ-23072)

通信作者:房军帆,E-mail: fangjunfan0223@163.com

“Zusanli” (ST36) and “Kunlun” (BL60) for 30 min, once daily for 8 days. Mechanical paw withdrawal thresholds (PWTs) were measured at different time points to assess pain transition and the effect of EA. Immunofluorescence was used to detect the activation of microglia (Iba1) and astrocytes. Intrathecal injection of minocycline was also administered, and its impacts on Iba1 activation and PWTs were tested. After the experiment, skeleton and Sholl analyses were performed to analyze the morphology of Iba1. To further examine the role of CSF-1, the factor was administered intrathecally to assess its influence on the effects of electroacupuncture. **Results** In the pain transformation mouse model, the PWTs at various time points decreased significantly ($P<0.01$). After modeling, Iba1 were activated ($P<0.01$), but astrocytes were not. Electroacupuncture increased the PWTs in pain-transformed mice ($P<0.01$) and suppressed Iba1 activation ($P<0.01$). Intrathecal minocycline administration inhibited Iba1 activation, reduced Iba1 expression in the spinal cord dorsal horn ($P<0.01$), and effectively reversed the PWTs reduction ($P<0.01$). Subsequent intrathecal CSF-1 injection promoted Iba1 activation and blocked electroacupuncture's analgesic effect in the model mice ($P<0.01$). **Conclusion** Iba1 activation is critical in pain transition. EA can alleviate hyperalgesia in HP mice by inhibiting Iba1 activation.

【KEYWORDS】 Hyperalgesia priming; Pain transition; Spinal cord dorsal horn; Microglia; Minocycline; Colony-Stimulating Factor 1; Electroacupuncture

急性疼痛是受伤后的常见反应,可通过冰敷、非甾体抗炎药等方法有效缓解^[1]。但部分患者在损伤痊愈后仍有持续痛感,可能预示慢性疼痛的发生。慢性疼痛机制复杂,分子路径尚未完全明确,给治疗带来挑战。有研究表明,组织损伤会影响神经系统功能,致使传入神经末梢在后续刺激下变得更加敏感,从而引发急性痛向慢性痛的转变(痛转化)^[2],该类敏化现象被命名为痛觉敏化诱发(HP)^[3]。阻断痛转化被认为是治疗慢性痛的重要方向之一,但其机制的相对模糊限制了相关治疗方案的开发。

脊髓背角(SCDH)是疼痛信息整合并向高位中枢传递的关键部位^[4]。SCDH处小胶质细胞(Iba1)和星形胶质细胞(GFAP)在慢性痛的发生和维持中均起到关键作用^[5]。研究表明,外周伤害性刺激能促使Iba1活化并释放炎症反应介质和细胞因子,增强SCDH处痛觉传导神经元的兴奋性,并形成正反馈炎症反应^[6]。GFAP在慢性痛状态下亦被激活,并通过释放谷氨酸、脑源性神经营养因子(BDNF)等物质,敏化痛觉信号传递^[7]。但目前对于SCDH处何种胶质细胞主导痛觉敏化的早期启动过程,以及精准干预胶质细胞活化的时机与靶点选择仍存在争议。

电针在慢性痛治疗中展现出独特优势^[8-9]。近年来,已有部分研究表明电针具备干预痛转化的作用。但相关研究主要集中在外周机制,如对背根神经节神经元的调节、外周局部肥大细胞的调节等^[10]。电针干预痛转化是否具有中枢机制尚不清楚。现有研究明确,电针能通过影响脊髓内神经递质释放

和胶质细胞活化状态发挥镇痛作用^[11]。但相关机制是否适用在电针干预痛转化中尚未明确。本文将重点探讨电针对痛转化干预作用的脊髓机制,特别是其对SCDH处Iba1活化的抑制作用,以期电针治疗慢性痛提供新的理论依据和潜在靶点,推动电针疗法在慢性痛临床治疗中的应用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性C57小鼠59只,体质量20-25 g,由浙江中医药大学实验动物中心提供,购自上海斯莱克实验动物有限公司[动物生产许可证号:SCXK(沪)2022-0004]。在浙江中医药大学实验动物中心(清洁级)喂养,饲养环境:温度(25±2)℃,相对湿度(55±5)%,12 h/12 h昼夜节律交替,自由摄食和饮水。整个实验过程中对动物的各种处理均遵照中华人民共和国科技部2006年颁布的有关动物的使用及伦理学规定。所有实验程序均经浙江中医药大学动物护理与福利委员会批准(IACUC-20230501-18)。

1.2 主要试剂与仪器

角叉菜胶(Car, Sigma),前列腺素E2(PGE2, sigma),抗Iba1抗体(美国Abcam),抗-GFAP抗体(Atlas Antibodies),米诺环素(美国Sigma),集落刺激因子(CSF-1,美国MCE),戊巴比妥钠(德国Sigma-Aldrich),异氟烷(深圳RWD),驴血清(中国Solarbio),抗荧光淬灭封片液(含DAPI,中国Beyotime)。

一次性针灸针(0.16 mm×0.13 mm,中研太和),von-Frey丝套组(美国Stoelting),扫片机(德

国 Zeiss),冰冻切片机(美国 Thermo),荧光显微镜(德国蔡司),呼吸麻醉机(深圳瑞沃德),韩氏穴位神经刺激仪(南京济生医疗科技有限公司)。

1.3 造模及实验分组处理

参考本课题组以往造模方法^[12-13]。第1次注射:于小鼠左后足足底皮下注射 25 μ L 1% Car,在痛阈恢复至基础水平后第2次注射:于左后足足背注射浓度为 100 ng/25 μ L 的 PGE2。

造模成功后,依据不同干预措施及检测需求,将小鼠进行如下分组与相应处理。

分组一:小鼠随机分为空白组、假敏化组和敏化组,每组 5 只,用于行为学检测,其中每组 3 只用于免疫荧光检测。同时每组分为 Car 注射后 0、4、24、48、72 h 及 7 d 和 PGE2 注射后 1、4、24 h (Car 0 h、Car 4 h、Car 24 h、Car 48 h、Car 72 h、Car 7 d、PGE2 1 h、PGE2 4 h、PGE2 24 h) 9 个时间点。假敏化组第1次注射 25 μ L 0.9% 氯化钠溶液,第2次注射同等体积 PGE2;空白组两次均注射 25 μ L 0.9% 氯化钠溶液。

分组二:小鼠随机分为假敏化组、敏化组和敏化+电针组。每组 5 只,用于行为学检测,其中 3 只用于免疫荧光检测。敏化+电针组进行电针干预,假敏化组和敏化组于相同时间采用相同方法固定,但不进行电针干预。

分组三:小鼠随机分为敏化组和敏化+米诺环素组,每组 7 只,用于行为学检测,其中 3 只用于免疫荧光检测。敏化+米诺环素组通过鞘内给药方式注射盐酸米诺环素,注射时间为 PGE2 注射前 1 h。敏化组不进行给药注射。

分组四:小鼠随机分为敏化组、敏化+电针+磷酸盐缓冲液组、敏化+电针+集落刺激因子组,每组 5 只,用于行为学检测,其中 3 只用于免疫荧光检测。敏化+电针+集落刺激因子组采用鞘内给药 CSF-1,在 PGE2 注射后 4 h、24 h 进行注射,除敏化组外,其余两组均需在实施电针刺激前完成给药操作。

1.4 干预方法

电针干预方法:使用动物专用呼吸麻醉机,异氟烷(0.5%~1.5%)麻醉动物,并将其系在恒温台上以保持体温。选用 0.16 mm \times 7 mm 针灸针,直刺小鼠双侧“足三里”(膝关节后外侧,腓骨小头下 2 mm 处)和“昆仑”穴(后肢外踝与跟腱之间的凹陷中),穴位定位参照《实验针灸学》。同侧两穴位针柄分别连接 LH-200A 韩氏穴位神经刺激仪的输出端。

电针参数:疏密波 2 Hz/100 Hz,电流强度 0.5 mA,30 min/次,1次/日,直至最后一次行为学检测前。

鞘内注射:用异氟烷短暂麻醉小鼠,从髻后开始至腰椎第一阶段,剔除小鼠背部背毛,局部用 75% 乙醇对腰部区域进行消毒。用一块软布放在动物的头部和上半身以保证小鼠安静,用左手的拇指和食指通过骨盆带轻柔地固定小鼠的身体,使其后腿向外和向下张开。左手上抬将脊柱稍微变圆或弯曲以打开椎间隙,形成一个水平面,绷紧局部皮肤,将带有 30 号针头(BD)的微升注射器 20°~40° 斜刺入,缓慢向前滑动,针尖有落空感,小鼠出现甩尾或甩爪反应,然后注射药物。米诺环素浓度为 50 μ g/5 μ L,CSF-1 浓度为 20 ng/10 μ L。针头停留至少 10 s,缓慢拔出针头。剔除具有运动功能障碍迹象的小鼠。

1.5 观察指标及检测方法

行为学检测[机械缩足痛阈值(PWTs)检测]:各组小鼠分别于第1次注射 Car 及注射后 4、24、48、72 h 和 7 d 检测;在 7 d 检测后开始第2次注射 PGE2,在注射后的 1、4、24 h 再次检测机械痛阈。检测前,先将小鼠置于测痛架上的透明塑料盒内,合上盖板,让小鼠安静 30 min。采用 Chaplan 等^[14]建立的 up and down 法检测 PWTs。当小鼠停止整理毛发和探索走动时,提示安静完成。检测时,用不同力量的 von Frey hair(0.02、0.04、0.07、0.16、0.4、0.6、1、1.4、2 g)进行刺激。从 0.4 g 刺激强度开始,用 von Frey hair 垂直刺激小鼠左后肢足底中部,刺激时避开足垫,向小鼠足底施加压力至 von Frey hair 轻微弯曲并持续 5 s,接着持续进行刺激 5 s,若小鼠出现缩腿或者舔足反应则为阳性反应,记为“X”并给予相邻小一级的刺激,当该力度的 von Frey hair 刺激不能引起阳性反应时,则记为“O”并给予相邻大一级力度的纤维刺激,每次刺激间隔 30 s。由此可以得到一串以“O”或“X”组合的序列,以第一次出现“X”的前一次“O”作为起点,选择包括该起点的连续 6 次的刺激反应,作为推算 PWTs 的关键序列。 $PWTs(g) = (10^{-[Xf + \kappa\delta]})/10\ 000$ 。序列中最后 1 次纤维丝的对数值记为 Xf 值, κ 值由序列组合查表后获得,选取的各个纤维丝强度取对数后差值的平均值记为 δ ,此处为 0.244。若由公式推算 PWTs 大于 2 g 或小于 0.02 g 的值,仍以 2 g 或 0.02 g 作为最大或最小的 PWTs。

免疫荧光染色:所有行为学实验结束后,用 0.3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠,剂量为 50 mg/kg。动物麻醉后打开胸腔,经升主动脉快速灌注 4 $^{\circ}$ C 预

冷后的PBS溶液,随后灌注新鲜的4%多聚甲醛,等待小鼠肢体僵硬后,快速取出小鼠腰膨大处脊髓,并置于含有4%多聚甲醛的EP管中,静置过夜。随后依次使用15%、30%的蔗糖溶液脱水,液氮速冻,置于-80℃冰箱保存。使用冰冻切片机,SCDH切割为12 μm的切片,按顺序隔六取一于载玻片上,切片保存于-80℃冰箱。将切片从-80℃冰箱中拿出,采用小鼠抗Iba1抗体标记脊髓中的Iba1,小鼠抗GFAP抗体标记脊髓中的GFAP。实验步骤如下:37℃恒温水浴箱复温1h,PBST清洗6遍,37℃水浴箱内封闭液(10%驴血清、90% PBST、0.3% Triton X-100)封闭1h,加入一抗4℃孵育过夜,≥18h后于37℃水浴箱复温1h, TBST清洗6遍。避光条件下加入二抗,于37℃水浴箱孵育1h,PBST清洗6遍。切片干燥后,抗荧光淬灭封片液(含DAPI)封片。SCDH使用蔡司荧光显微镜10倍物镜拍摄图像。ba1采用Image J进行细胞计数,每组选择3只小鼠,每只小鼠选择5张图片进行阳性细胞数量统计。3名专家使用Image J对随机选取的15张图片进行训练,可获得3份15张MASK,结合原图训练共识模型,进行批量分析获取图片参数。详细信息参考相关文献^[15]。同时Iba1采用Image J (Fiji)^[16]进行形态学分析和Sholl分析,每组选择3只小鼠,每只小鼠随机选取30个单细胞进行形态学分析和Sholl分析^[17]。Sholl分析方法参照Ferreira等^[18]报道进行,所选原始图像的颜色转换为8-bit,调整阈值,消除背景噪声。然后,对图像进行二值化处理,并对细胞骨架进行描绘。最后以胞体中心为原点,以5 μm为步长画出一系列同心圆,并计算测量值,包括总终点数量、总骨架长度和每个同心圆与细胞骨架的交叉点数。总终点数量、总骨架长度和交叉点数分别代表细胞树突分枝复杂程度、延伸程度和分枝的密度。

1.6 统计学分析

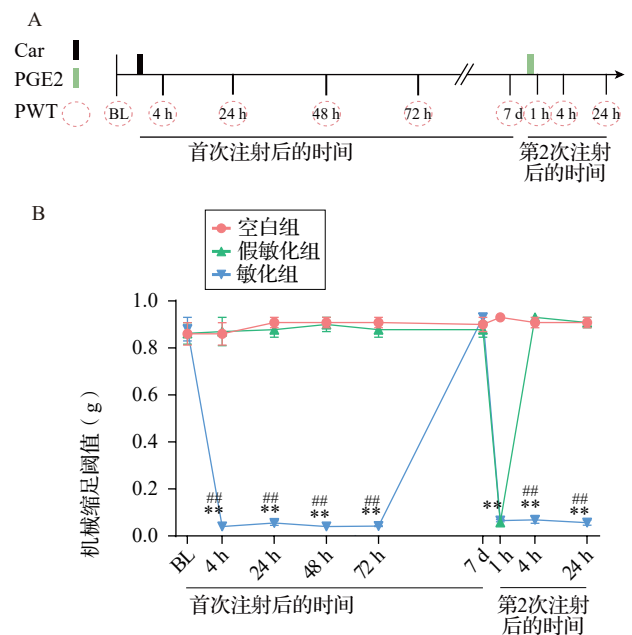
采用GraphPad Prism 9.5.1软件进行统计分析。数据符合正态分布,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较采用独立样本t检验;多组间比较使用单因素方差分析,进一步组间两两比较采用Bonferroni检验。以 $\bar{x}P < 0.05$ 为差异具有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 痛转化模型小鼠不同时间点的PWTs

本实验痛转化模型构建时间轴如图1A所示。

如图1B所示,三组小鼠基础(BL)机械缩足阈值PWTs差异无统计学意义。Car注射(第1次注射)后4h,与空白组相比,假敏化组小鼠造模足PWTs差异无统计学意义,而敏化组小鼠造模足PWTs显著降低($P < 0.01$),并持续至注射后72h($P < 0.01$);第1次注射后7d,3组小鼠造模足PWTs差异无统计学意义,提示敏化组小鼠PWTs恢复至基础水平。PGE₂注射(第2次注射)后1h,与空白组相比,假敏化组和敏化组小鼠造模足PWTs显著降低($P < 0.01$);与假敏化组相比,敏化组造模足PWTs差异无统计学意义。第2次注射后4、24h,与空白组相比,敏化组小鼠造模足PWTs持续低水平($P < 0.01$),而假敏化组小鼠造模足PWTs差异无统计学意义。此PWTs变化趋势与Aley等^[19]结果一致,痛转化模型成功建立。



注:Car为角叉菜胶,PGE₂为前列腺素E₂,PWT为机械缩足痛阈值,BL为基础。A为实验方案时间轴,B为各组小鼠PWTs变化情况。与空白组相比,** $P < 0.01$;与假敏化组相比,## $P < 0.01$ 。

图1 各组小鼠不同时间点的PWTs比较($\bar{x} \pm s$,5只鼠/组)
Fig. 1 PWTs of each group of mice at different time points ($\bar{x} \pm s$, 5 mice/group)

2.2 痛转化模型小鼠造模后SCDH处Iba1活化,而GFAP不活化

研究表明,SCDH处Iba1和GFAP均参与痛觉敏化的发生^[16]。为进一步探讨两者在痛转化中的作用,本研究观察了痛转化模型小鼠腰膨大段SCDH处Iba1与GFAP的活化情况。

SCDH处 Iba1 免疫荧光结果如图 2A 所示。与空白组比较,假敏化组小鼠造模侧腰(L)3~L5 SCDH中 Iba1 阳性细胞数量(图 2C)差异无统计学意义;敏化组造模侧 Iba1 阳性细胞数量显著升高($P < 0.01$)。而在造模对侧,与空白组比较,假敏化组、敏化组小鼠 L3~L5 SCDH中 Iba1 阳性细胞数量(图 2E)差异均无统计学意义。SCDH处 GFAP 免疫荧光结果如图 2B 所示。无论在造模侧还是对侧,与空白组比较,假敏化组、敏化组小鼠 L3~L5 SCDH中 GFAP 阳性细胞数量(图 2D和图 2F)差异均无统计学意义。以上结果提示,造模侧 SCDH中 Iba1 而非 GFAP 活化参与痛转化。

我们进一步分析了造模侧 SCDH中 Iba1 的形态变化,代表性图像和其骨架结构如图 2G 所示。与空白组相比,敏化组 Iba1 总骨架长度(图 2H)和总终点数量(图 2I)均显著下降($P < 0.05, P < 0.01$),假敏化组 Iba1 则无此变化($P > 0.05$)。以 $5 \mu\text{m}$ 为间距的 Sholl 分析(图 2J)显示,与空白组和假敏化组相比,敏化组 Iba1 的交叉点数量(图 2K)显著下降($P < 0.05, P < 0.01$)。骨架长度缩短、总终点数量和总交叉数量降低均为 Iba1 活化的典型形态学改变。相关结果进一步证实,模型组小鼠造模侧 SCDH处 Iba1 活化。

2.3 电针能提升痛转化小鼠痛阈,并抑制造模侧 SCDH处 Iba1 活化

本研究按图 3A 所示时间轴对痛转化小鼠进行电针干预。痛阈测量结果如图 3C 所示,各组小鼠造模足基础 PWTs 差异无统计学意义。Car 注射后 4 h,与假敏化组相比,敏化组和敏化+电针组小鼠造模足 PWTs 显著降低($P < 0.01$);且敏化组和敏化+电针组小鼠造模足 PWTs 差异无统计学意义。Car 注射后 24、48、72 h 分别介入电针干预,敏化+电针组小鼠造模足 PWTs 逐渐上升,高于同时点敏化组($P < 0.05, P < 0.01$),但仍低于同时点假敏化组($P < 0.01$)。Car 注射后 7 d,各组小鼠造模足 PWTs 差异无统计学意义。第 2 次注射后 1 h,各组小鼠造模足 PWTs 均降低,且 3 组间比较差异无统计学意义。第 2 次注射后 4 h,假敏化组小鼠造模足 PWTs 迅速恢复至基础水平,而敏化组和敏化+电针组小鼠 PWTs 仍处于较低水平,明显低于同时点假敏化组($P < 0.01$),但敏化+电针组 PWTs 高于敏化组($P < 0.01$)。第 2 次注射后 24 h,敏化+电针组小鼠 PWTs 继续上升,明显高于同期敏化组($P < 0.01$),但仍低于假敏化组($P < 0.01$)。SCDH中 Iba1 的免疫荧光结果如图 3D 所示。与假敏化组比较,敏化

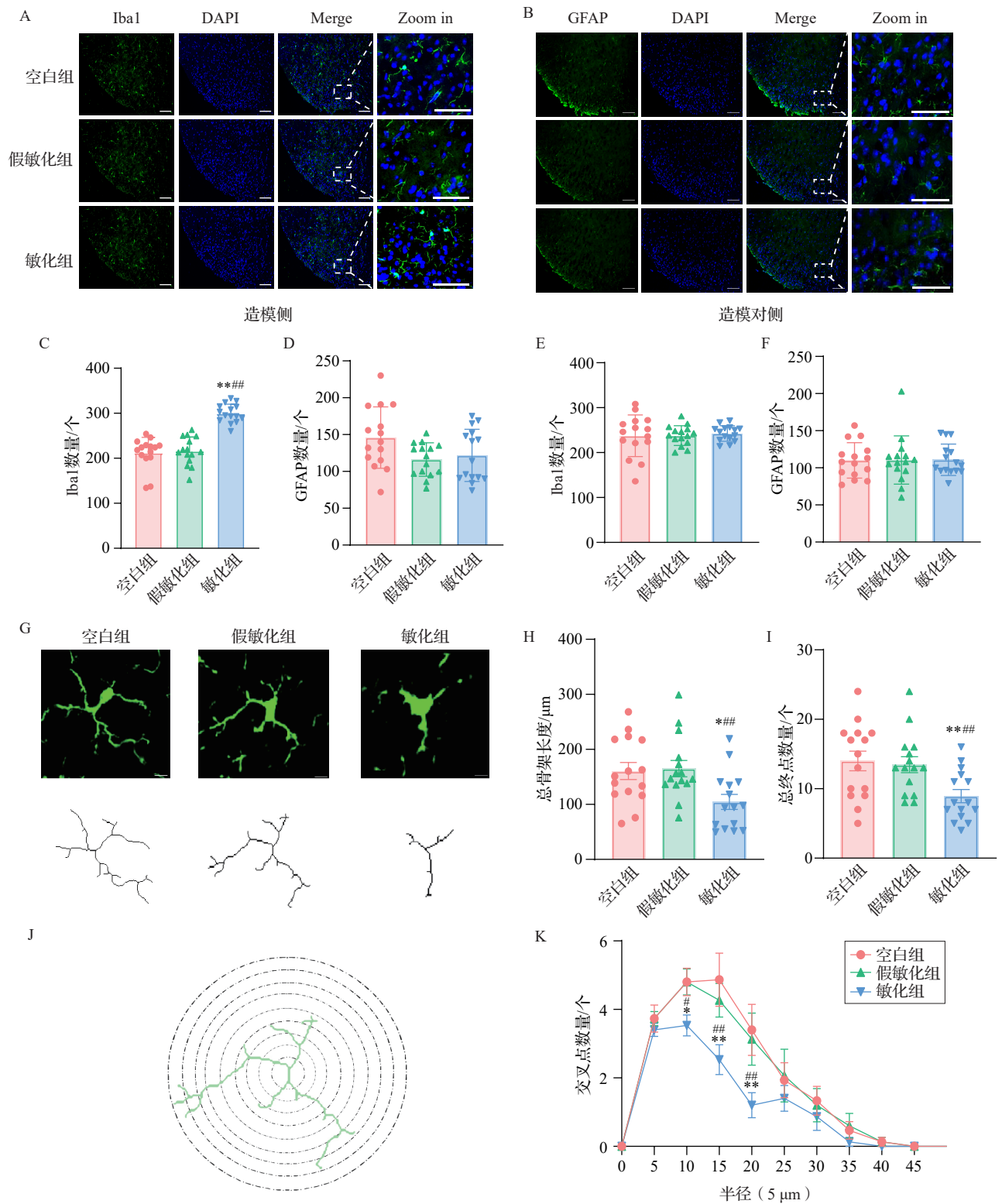
组小鼠造模侧 SCDH中 Iba1 阳性细胞数量显著上升($P < 0.01$);与敏化组比较,敏化+电针组小鼠造模侧 SCDH中 Iba1 阳性细胞数量(图 3E)显著下降($P < 0.01$)。以上结果提示,电针可能通过抑制 SCDH中的 Iba1 活化干预痛转化。

我们进一步分析了造模侧 SCDH中 Iba1 的形态变化,代表性图像和其骨架结构如图 3F 所示。与假敏化组和敏化+电针组相比,敏化组 Iba1 总骨架长度(图 3G)和总终点数量(图 3H)均显著下降($P < 0.01$);与敏化组相比,电针组 Iba1 总骨架长度和总终点数量均显著升高($P < 0.01$)。以 $5 \mu\text{m}$ 为间距的 Sholl 分析(图 3I)显示,与假敏化组和敏化+电针组相比,敏化组 Iba1 的交叉点数量(图 3J)显著下降($P < 0.01$)。骨架长度缩短、总终点数量和总交叉数量降低均为 Iba1 活化的典型形态学改变。相关结果进一步证实,电针可以抑制模型组小鼠造模侧 SCDH处 Iba1 活化。

2.4 鞘内注射米诺环素与电针效果相似

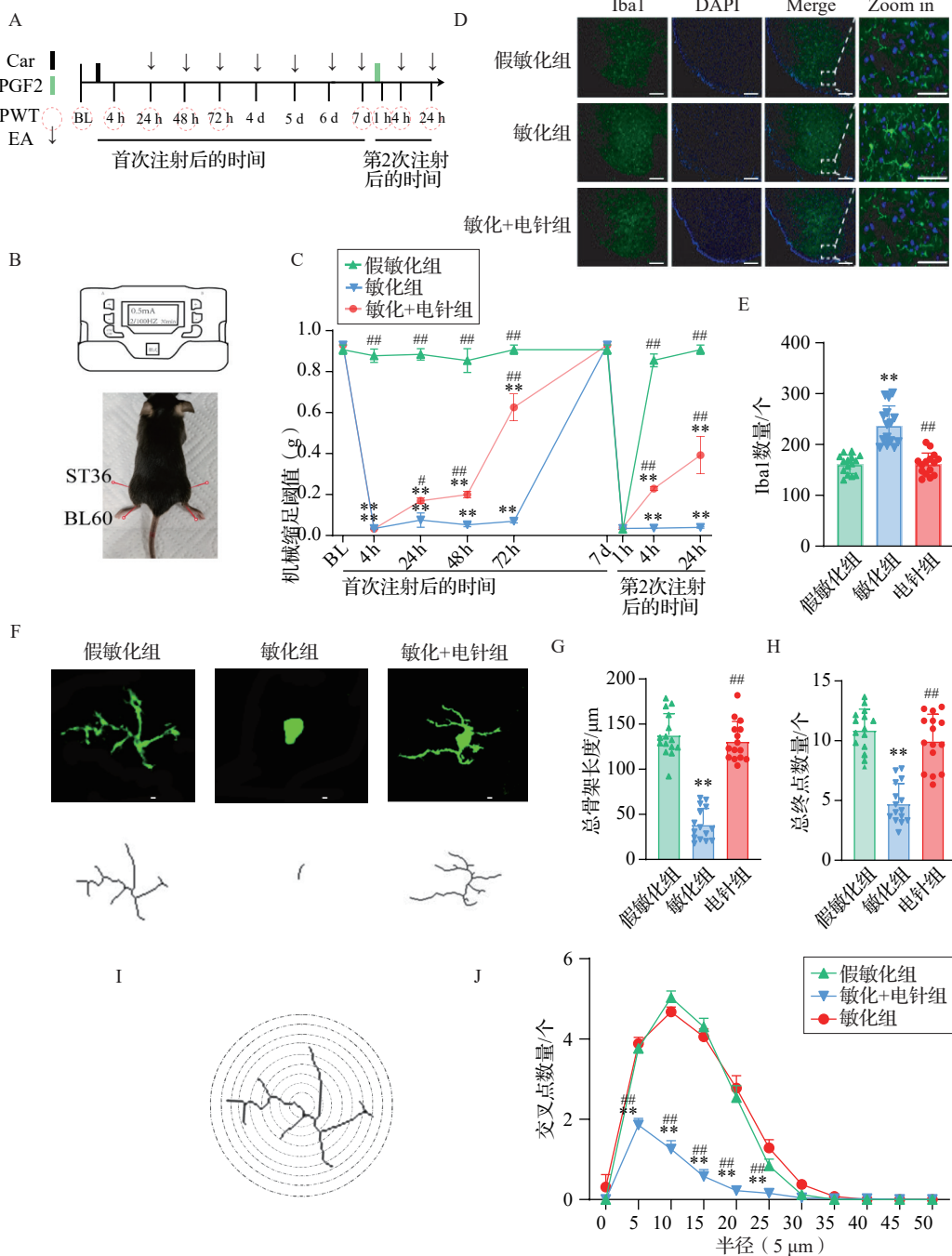
为进一步明确 SCDH中 Iba1 在电针干预痛转化中的作用,本研究按图 4A 所示时间点鞘内注射米诺环素抑制 Iba1 活化。米诺环素是一种非选择性 Iba1 抑制剂,已被证明可减轻神经性疼痛、炎症反应性疼痛和术后疼痛^[20]。结果如图 4B 所示,两组小鼠造模足基础 PWTs 差异无统计学意义。第 1 次 Car 注射后 4、24、48、72 h,两组小鼠造模足 PWTs 显著下降,但两组间相比差异无统计学意义。第 1 次 Car 注射后 7 d,两组小鼠造模足 PWTs 均恢复至基础水平,且差异无统计学意义。第 2 次 PGE2 注射前 1 h 鞘内注射米诺环素 $10 \mu\text{L}$,注射后 1 h,敏化+生理盐水组小鼠造模足 PWTs 显著下降,明显低于同期敏化+米诺环素组小鼠 PWTs($P < 0.01$)。第 2 次 PGE2 注射后 4、24 h,敏化+生理盐水组造模足 PWTs 均明显低于同期敏化+米诺环素组($P < 0.01$)。

进一步分析了两组小鼠 SCDH处 Iba1 的活化情况。Iba1 免疫荧光结果如图 4C 所示。与敏化+生理盐水组比较,敏化+米诺环素组小鼠造模侧 L3~L5 SCDH中 Iba1 阳性细胞数量(图 4D)显著降低($P < 0.01$)。两组小鼠 SCDH处 Iba1 代表性图像和其骨架如图 4E 所示。与敏化+生理盐水组相比,敏化+米诺环素组 Iba1 总骨架长度(图 4F)显著上升($P < 0.01$)。同时,与敏化+生理盐水组相比,敏化+米诺环素组 Iba1 的总终点数量(图 4G)显著上升($P < 0.01$)。 $5 \mu\text{m}$ 为间距的 Sholl 分析(图 4H)表



注:Iba1为小胶质细胞,GFAP为星形胶质细胞,SCDH为脊髓背角。A:各组小鼠造模侧腰(L)3~L5 SCDH中Iba1免疫荧光检测结果代表图(标尺:100 μm ;放大图标尺:50 μm)。B:各组小鼠造模侧L3~L5 SCDH中GFAP免疫荧光检测结果代表图(标尺:100 μm ;放大图标尺:50 μm)。C:各组造模侧Iba1免疫荧光阳性细胞数量统计。D:各组造模侧GFAP免疫荧光阳性细胞数量统计。E:各组造模对侧Iba1免疫荧光阳性细胞数量统计。F:各组造模对侧GFAP免疫荧光阳性细胞数量统计。G:Iba1的代表性图像,显示了空白组、假敏化组、敏化组Iba1的骨架(标尺:20 μm)。H:各组的总骨架长度统计。I:各组的总终点数量统计。J:5 μm 为间距的Sholl分析中投影交集数量的量化。K:各组的交叉点数量统计。与空白组相比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与假敏化组相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

图2 痛转化小鼠SCDH中Iba1,GFAP的表达及Iba1的骨架分析和Sholl分析($\bar{x} \pm s$,3只鼠/组,5张切片/只鼠)
 Fig. 2 Expression of Iba1 and GFAP in the spinal dorsal horn of pain-transformed mice and the skeleton and Sholl analyses of Iba1 ($\bar{x} \pm s$, 3 mice/group, 5 slices/mice)



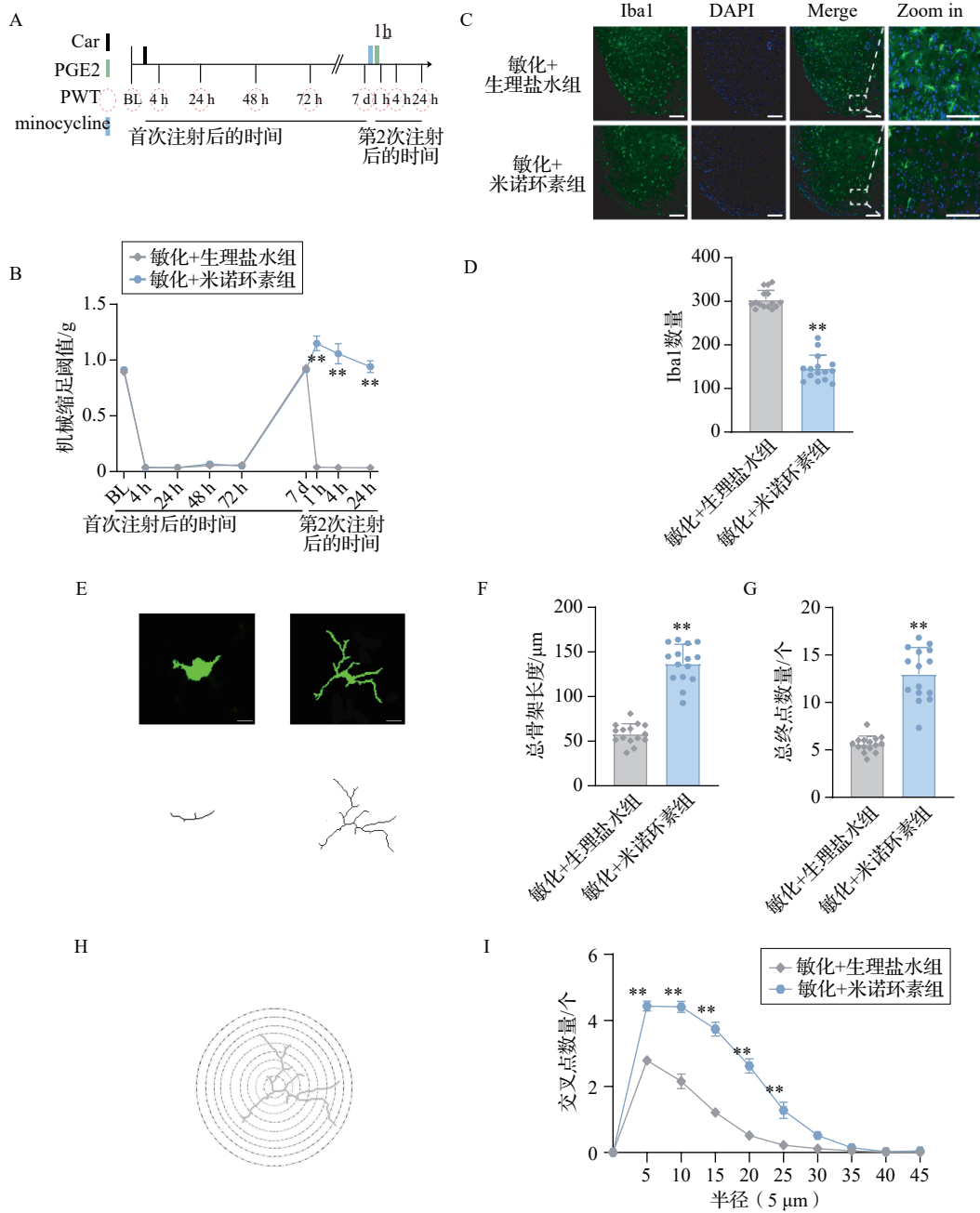
注:Car为角叉菜胶,PGE2为前列腺素E2,PWT为机械缩足痛阈值,BL为基础,EA为电针,ST36为“足三里”穴,BL60为“昆仑”穴,Iba1为小胶质细胞,SCDH为脊髓背角。A:电针实验方案时间轴。B:电针参数及示意图。C:各组小鼠PWTs变化情况。D:各组小鼠造模侧腰(L)3~L5 SCDH中Iba1免疫荧光代表图(标尺:200 μm;放大图标尺:50 μm)。E:各组小鼠造模侧L3~L5 SCDH中Iba1阳性细胞数量统计。F:Iba1的代表性图像,显示了假敏化组、敏化组、敏化+电针组Iba1的骨架(标尺:20 μm)。G:各组的总骨架长度统计。H:各组的总终点数量统计。I:5 μm为间距的Sholl分析中投影交集数量的量化。

J:各组的交叉点数量统计。与假敏化组相比,** $P < 0.01$

与敏化组相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。
图3 电针对痛转化小鼠痛阈(5只鼠/组)、SCDH中Iba1表达(3只鼠/组,5张切片/只鼠)的影响及骨架分析和Sholl分析($\bar{x} \pm s$)
Fig. 3 Effect of electroacupuncture on the pain threshold in pain-transformed mice (5 mice/group), the immunofluorescence expression of Iba1 in the SCDH (3 mice/group, 5 slices/mice), as well as skeleton and Sholl analyses ($\bar{x} \pm s$)

明,与敏化+生理盐水组相比,敏化+米诺环素组Iba1的交叉点数量(图4I、J)显著上升($P < 0.01$)。Iba1数量和形态学均表明,鞘内注射米诺环素显著

抑制了模型动物SCDH处Iba1活化。以上结果共同提示,阻断SCDH处Iba1活化能有效反转痛转化,电针通过抑制Iba1活化可能阻断痛转化。



注:Car为角叉菜胶,PGE2为前列腺素E2,PWT为机械缩足痛阈值,minocycline为米诺环素,BL为基础,Iba1为小胶质细胞,SCDH为脊髓背角。A:实验方案时间轴。B:两组小鼠不同时间点的PWTs。C:两组小鼠造模侧腰(L)3~L5 SCDH中Iba1免疫荧光代表图(标尺:200 µm;放大图标尺:100 µm)。D:各组小鼠造模侧L3~L5 SCDH中Iba1阳性细胞数量统计。E:Iba1的代表性图像,显示了敏化+生理盐水组、敏化+米诺环素组Iba1的骨架(标尺:20 µm)。F:各组的总骨架长度统计。G:各组的总终点数量统计。H:5 µm为间距的Sholl分析中投影交集数量的量化。I:各组的交叉点数量统计。与敏化+生理盐水组相比,** $P < 0.01$ 。

图4 鞘内注射米诺环素对痛转化小鼠痛阈(7只鼠/组)、SCDH中Iba1表达(3只鼠/组,5张切片/只鼠)的影响及骨架分析和Sholl分析($\bar{x} \pm s$)

Fig. 4 Effect of intrathecal injection of minocycline on the pain threshold in pain-transformed mice (7 mice/group), the immunofluorescence expression of Iba1 in the SCDH (3 mice/group,5 slices/mice), as well as skeleton and Sholl analyses($\bar{x} \pm s$)

2.5 鞘内注射CSF-1可抑制电针的效应,痛阈下降,并激活Iba1

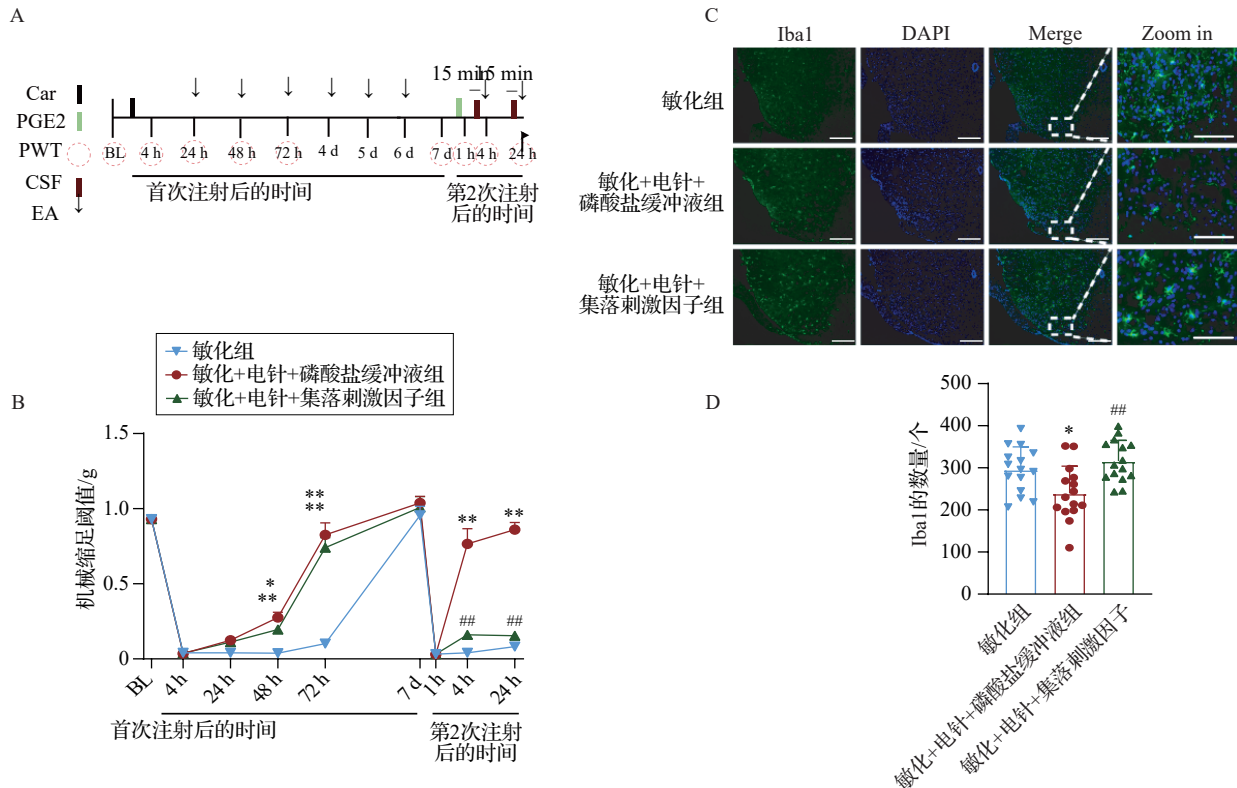
CSF-1是经典的Iba1激活剂。本研究按图5A所示时间点鞘内注射CSF-1刺激Iba1活化。结果

如图5B所示,3组小鼠造模足基础PWTs差异无统计学意义。第1次Car注射后48、72h,与敏化组相比,敏化+电针+磷酸盐缓冲液组和敏化+电针+集落刺激因子组小鼠造模足PWTs显著上升($P <$

0.05, $P < 0.01$), 表明电针干预有效。第1次Car注射后7 d, 3组小鼠造模足PWTs均恢复至基础水平, 且差异无统计学意义。第2次PGE2注射后, 每次电针干预前15 min均鞘内注射CSF-1。第2次PGE2注射后1 h, 3组小鼠造模足PWTs显著下降。第2次PGE2注射后4、24 h, 敏化+电针+集落刺激因子组和敏化组造模足PWTs均明显低于同期敏化+电针+磷酸盐缓冲液组 ($P < 0.01$), CSF-1注射

显著阻断了电针对模型动物的镇痛作用。

我们进一步分析了鞘内注射CSF-1后3组小鼠SCDH处Iba1的活化情况。实验结果显示, 与敏化组和敏化+电针+集落刺激因子组相比, 敏化+电针+磷酸盐缓冲液组L3~L5 SCDH中Iba1阳性细胞数量显著下降 ($P < 0.05, P < 0.01$), 表明鞘内注射CSF-1激活SCDH处的Iba1, 从而显著阻断了电针的镇痛作用。见图5C、D。



注: Car为角叉菜胶, PGE2为前列腺素E2, PWT为机械缩足痛阈值, CSF为集落刺激因子, EA为电针, BL为基础, Iba1为小胶质细胞, SCDH为脊髓背角。A: 实验方案时间轴。B: 3组小鼠不同时间点的PWTs。C: 3组小鼠造模侧腰(L)3~L5 SCDH中Iba1免疫荧光代表图(标尺: 200 μm; 放大图标尺: 100 μm)。D: 各组小鼠造模侧L3~L5 SCDH中Iba1阳性细胞数量统计。与敏化组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与敏化+电针+磷酸盐缓冲液组相比, ## $P < 0.01$ 。

图5 鞘内注射CSF对痛转化小鼠痛阈(5只鼠/组)和SCDH中Iba1表达(3只鼠/组, 5张切片/只鼠)的影响($\bar{x} \pm s$)
 Fig. 5 Effect of intrathecal injection of CSF on the pain threshold in pain-transformed mice (5 mice/group), the immunofluorescence expression of Iba1 in the SCDH (3 mice/group, 5 slices/mice) ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

痛转化是慢性痛产生和发展的前序环节, 阻断痛转化已被证明是电针干预慢性痛的重要机制之一^[21]。中枢神经系统中胶质细胞的活化长期被认为是慢性疼痛产生和维持的重要神经机制, 特别是SCDH处的Iba1和GFAP^[22]。已有大量研究表明, 抑制SCDH胶质细胞活化是电针干预多种慢性疼痛的关键机制^[23]。本研究在团队前期研究的基础

上, 以电针对Iba1活化的抑制作用为切入点, 重点探讨电针对痛转化干预作用的低位中枢机制。

SCDH处Iba1和GFAP活化在慢性痛维持和发展中发挥重要作用^[24]。部分研究将SCDH处Iba1和GFAP活化视为慢性痛产生的生物学标志^[25]。但现有研究并不清楚, 两种胶质细胞是否参与急性痛向慢性痛的转化。既有研究表明, Iba1和GFAP存在交互作用, Iba1的活化是GFAP活化的重要先决条件^[26]。有研究进一步提示, 痛转化与SCDH中

BDNF 的表达增高密切相关^[27],而活化的 Iba1 是 SCDH 处 BDNF 的主要分泌源之一^[28]。以上研究共同提示,SCDH 处的 Iba1 较 GFAP 更可能参与痛转化的发生。本研究观察到 Car 联合 PGE2 注射,诱导 SCDH 处的 Iba1 活化。活化的 Iba1 能通过诱导神经炎性反应和调节神经信号传递,加剧 SCDH 投射神经元的敏化状态,从而在痛转化过程中发挥重要作用^[29]。本研究相关时点并未观察到 SCDH 中 GFAP 的活化。以上结果共同提示,在痛转化的早期阶段,Iba1 是更为关键的参与者。对于早期活化的 Iba1 是否诱导 GFAP 活化从而维持慢性疼痛,仍有待进一步探索。

课题组研究表明,电针能阻断 HP 模型动物的痛转化,改善其疼痛症状^[30]。相关研究证明,电针能通过抑制背根神经节中蛋白激酶 C ϵ (PKC ϵ)活化干预痛转化。而 PKC ϵ 活化不仅在外周神经系统介导急性痛向慢性痛的转化,同时也是 SCDH 处构成 HP 状态的重要分子^[31]。已有大量研究表明,电针抑制 SCDH 处 Iba1 活化是电针镇痛的重要机制之一^[32]。且有部分研究提出,电针可能通过抑制 SCDH 中 BDNF-酪氨酸受体激酶 B 通路干预痛转化^[33]。同时,本研究表明 SCDH 处 Iba1 而非 GFAP 活化是早期痛转化发生的关键环节。由此,我们重点考察了电针是否能抑制痛转化小鼠 SCDH 处的 Iba1。相关研究结果表明,电针能显著降低痛转化小鼠 SCDH 处小胶质细胞标志物(Iba1)的表达水平,有效抑制由 Car 联合 PGE2 注射诱导产生的 Iba1 活化现象,从而在痛转化的早期阶段发挥关键的阻断作用。我们同时观察到,激活 SCDH 处的 Iba1 能显著阻断电针对痛转化小鼠痛阈的改善作用。相关结果表明电针通过抑制 SCDH 处 Iba1 的活化,进而阻断了痛觉信号的传递与放大过程,从而在痛转化的发生发展中发挥关键的调控作用。这不仅进一步证实了 Iba1 在电针镇痛中的重要作用,也为理解电针如何影响痛转化提供了新的分子层面的证据。然而,电针通过抑制 Iba1 活化来阻断痛转化的具体机制仍有待进一步探究。

前人研究表明,抑制 SCDH 处的 Iba1 能直接改善动物的肢体疼痛^[34]。我们在 PGE2 注射前利用鞘内注射米诺环素预防 Iba1 活化。PGE2 注射前鞘内给予米诺环素,不仅阻断了外周 PGE2 注射诱导的 SCDH 处 Iba1 活化,且有效逆转痛转化小鼠 PWTs 的下降,表明当 Iba1 活化被抑制后,急性痛将不再转为慢性痛。这一结果佐证了电针能通过抑制

SCDH 处的小胶质细胞活化干预痛转化。

课题组前期系统比较过三种不同的电针介入时间^[35]:自 Car 注射后开始持续至 PGE2 注射后的全程电针介入拥有最佳的镇痛效果;Car 注射后、PGE2 注射前介入电针对 PGE2 注射后疼痛的镇痛效应不明显;而 PGE2 注射后介入电针虽能镇痛但效应不如全段介入。为保证本研究的顺利开展,我们选择了全程电针介入。遗憾的是,在本研究中我们并未能阐明为什么在外周炎性反应刺激后,PGE2 注射能诱发 SCDH 处持续的 Iba1 活化。

综上所述,本研究深入探讨了痛转化早期阶段 SCDH 处 Iba1 活化的关键作用,并揭示了电针干预痛转化的脊髓中枢 Iba1 作用机制,为痛转化的临床治疗提供了实验依据和潜在的治疗策略。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] QASEEM A, MCLEAN R M, O' GUREK D, et al. Nonpharmacologic and pharmacologic management of acute pain from non-low back, musculoskeletal injuries in adults: a clinical guideline from the American college of physicians and American academy of family physicians[J]. *Ann Intern Med*, 2020, 173(9): 739-748.
- [2] 马震星. 慢性疼痛的药物治疗进展[J]. *临床医药文献电子杂志*, 2020, 7(81): 192-193.
MA Z X. Progress in drug treatment of chronic pain (in Chinese) [J]. *Journal of Clinical Medical Literature (ElectronicEdition)*, 2020, 7(81): 192-193.
- [3] JOSEPH E K, PARADA C A, LEVINE J D. Hyperalgesic priming in the rat demonstrates marked sexual dimorphism[J]. *Pain*, 2003, 105(1/2): 143-150.
- [4] BICAN O, MINAGAR A, PRUITT A A. The spinal cord: a review of functional neuroanatomy[J]. *Neurol Clin*, 2013, 31(1): 1-18.
- [5] LIU J L. Research on mechanisms of acupuncture analgesia - The most impressive field of acupuncture medicine [J]. *World J Acupunct Moxibustion*, 2023, 33(1): 3-5.
- [6] LI T, LIU T T, CHEN X H, et al. Microglia induce the transformation of A1/A2 reactive astrocytes via the CXCR7/PI3K/Akt pathway in chronic post-surgical pain [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 211.
- [7] HAN J S. Acupuncture and endorphins [J]. *Neurosci Lett*, 2004, 361(1/2/3): 258-261.
- [8] 刘盈君, 方剑乔, 方芳, 等. 电针对 CFA 慢性炎性痛大鼠患侧背根神经节 NR1 及其丝氨酸 890 位点磷酸化的影响[J]. *浙江中医药大学学报*, 2015, 39(4): 247-252.
LIU Y J, FANG J Q, FANG F, et al. Effect of electroacupuncture on NR1 and phosphorylation of NR1 at serine-890 site in ipsilateral dorsal root ganglion of rats with CFA chronic inflammatory pain (in Chinese) [J]. *Journal of*

- Zhejiang Chinese Medical University, 2015, 39(4): 247-252.
- [9] Zhao Z Q. Neural mechanism underlying acupuncture analgesia [J]. *Prog Neurobiol*, 2008, 85(4): 355-375.
- [10] Wei H, Liu B, Yin C, et al. Electroacupuncture improves gout arthritis pain via attenuating ROS-mediated NLRP3 inflammasome overactivation [J]. *Chin Med*, 2023, 18(1): 86.
- [11] ZHANG Q X, ZHOU M M, HUO M Z, et al. Mechanisms of acupuncture-electroacupuncture on inflammatory pain [J]. *Mol Pain*, 2023, 19: 17448069231202882.
- [12] WANG S S, DU J Y, XI D N, et al. Role of GABAAR in the transition from acute to chronic pain and the analgesic effect of electroacupuncture on hyperalgesic priming model rats [J]. *Front Neurosci*, 2021, 15: 691455.
- [13] WANG S S, SUN H J, DU J Y, et al. Effect of electroacupuncture on pain transition and content of protein kinase C ϵ in dorsal root ganglia in hyperalgesia rats [J]. *Acupunct Res*, 2018, 43(11): 677-681.
- [14] CHAPLAN S R, BACH F W, POGREL J W, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1): 55-63.
- [15] SCHULTE A, LOHNER H, DEGENBECK J, et al. Unbiased analysis of the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury: no neuronal loss, no gliosis, but satellite glial cell plasticity [J]. *Pain*, 2023, 164(4): 728-740.
- [16] SCHINDELIN J, ARGANDA-CARRERAS I, FRISE E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis [J]. *Nat Methods*, 2012, 9(7): 676-682.
- [17] YANG L, LU J S, GUO J P, et al. Ventrolateral periaqueductal gray astrocytes regulate nociceptive sensation and emotional motivation in diabetic neuropathic pain [J]. *J Neurosci*, 2022, 42(43): 8184-8199.
- [18] FERREIRA T A, BLACKMAN A V, OYRER J, et al. Neuronal morphometry directly from bitmap images [J]. *Nat Methods*, 2014, 11(10): 982-984.
- [19] ALEY K O, MESSING R O, MOCHLY-ROSEN D, et al. Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the Epsilon isozyme of protein kinase C [J]. *J Neurosci*, 2000, 20(12): 4680-4685.
- [20] LEE J Y, PARK C S, SEO K J, et al. IL-6/JAK2/STAT3 axis mediates neuropathic pain by regulating astrocyte and microglia activation after spinal cord injury [J]. *Exp Neurol*, 2023, 370: 114576.
- [21] ZHAO L P, LIU L, XU X B, et al. Electroacupuncture inhibits hyperalgesia by alleviating inflammatory factors in a rat model of migraine [J]. *J Pain Res*, 2020, 13: 75-86.
- [22] FÜLÖP B, HUNYADY Á, BENCZE N, et al. IL-1 mediates chronic stress-induced hyperalgesia accompanied by microglia and astroglia morphological changes in pain-related brain regions in mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(6): 5479.
- [23] SUN J, ZHANG C, WANG Y F, et al. Electroacupuncture alleviates hyperalgesia and anxiety-like behaviors in pain memory model rats through activation of GABAergic neurons and GABA receptor in the rostral anterior cingulate cortex [J]. *Mol Neurobiol*, 2024, 61(9): 6613-6627.
- [24] LIU Y N, CAI X T, SHI B W, et al. Mechanisms and therapeutic prospects of microglia-astrocyte interactions in neuropathic pain following spinal cord injury [J]. *Mol Neurobiol*, 2025, 62(4): 4654-4676.
- [25] MOU W Y, MA L L, ZHU A F, et al. Astrocyte-microglia interaction through C3/C3aR pathway modulates neuropathic pain in rats model of chronic constriction injury [J]. *Mol Pain*, 2022, 18: 17448069221140532.
- [26] NORDEN D M, TROJANOWSKI P J, VILLANUEVA E, et al. Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge [J]. *Glia*, 2016, 64(2): 300-316.
- [27] SHI M T, ZHOU J, HU R, et al. EA participates in pain transition through regulating KCC2 expression by BDNF-TrkB in the spinal cord dorsal horn of male rats [J]. *Neurobiol Pain*, 2023, 13: 100115.
- [28] DING H L, CHEN J L, SU M Z, et al. BDNF promotes activation of astrocytes and microglia contributing to neuroinflammation and mechanical allodynia in cyclophosphamide-induced cystitis [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 19.
- [29] YI M H, LIU Y U, LIU K, et al. Chemogenetic manipulation of microglia inhibits neuroinflammation and neuropathic pain in mice [J]. *Brain Behav Immun*, 2021, 92: 78-89.
- [30] LI Y, YANG M X, WU F, et al. Mechanism of electroacupuncture on inflammatory pain: neural-immune-endocrine interactions [J]. *J Tradit Chin Med*, 2019, 39(5): 740-749.
- [31] CHEN W H, CHANG Y T, CHEN Y C, et al. Spinal protein kinase C/extracellular signal-regulated kinase signal pathway mediates hyperalgesia priming [J]. *Pain*, 2018, 159(5): 907-918.
- [32] LIANG Y, DU J Y, QIU Y J, et al. Electroacupuncture attenuates spinal nerve ligation-induced microglial activation mediated by p38 mitogen-activated protein kinase [J]. *Chin J Integr Med*, 2016, 22(9): 704-713.
- [33] XUE M, SUN Y L, XIA Y Y, et al. Electroacupuncture modulates spinal BDNF/TrkB signaling pathway and ameliorates the sensitization of dorsal horn WDR neurons in spared nerve injury rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18): 6524.
- [34] ZHOU L J, PENG J Y, XU Y N, et al. Microglia are indispensable for synaptic plasticity in the spinal dorsal horn and chronic pain [J]. *Cell Rep*, 2019, 27(13): 3844-3859.e6.
- [35] WANG S S, DU J Y, SHAO F B, et al. Electroacupuncture regulates pain transition by inhibiting the mGluR5-PKC ϵ signaling pathway in the dorsal root ganglia [J]. *J Pain Res*, 2020, 13: 1471-1483.