

☆ XXXX ☆

电针通过Piezo1蛋白调控NO/cGMP/PKG信号通路改善神经根型颈椎病大鼠疼痛的机制研究

黄文静¹, 粟胜勇^{2,3}, 王甜¹, 苏虹¹, 黄心雨¹, 李欣¹, 郑广玫¹, 尹丽莉¹, 许智逸¹,
黄颖¹, 韦冈良¹, 李晓明¹

(¹广西中医药大学, 南宁 530001; ²广西高校中医临床研究重点实验室, 南宁 530024;

³广西中医药大学第一附属医院针灸科, 南宁 530023)

【摘要】 目的:探究电针对神经根型颈椎病(CSR)大鼠Piezo1蛋白的调控作用及对一氧化氮(NO)/环磷酸鸟苷(cGMP)/蛋白激酶G(PKG)信号通路的影响,探讨电针治疗CSR的镇痛机制。方法:雄性SD大鼠随机分为假手术组、模型组、电针组、电针+Yoda1组,每组各10只。模型组、电针组、电针+Yoda1组采用椎管插线法制备CSR大鼠模型。电针组取双侧“合谷”“太冲”行电针治疗,20 min/次,连续7 d;电针+Yoda1组腹腔注射Piezo1激动剂Yoda1(1.5 mg/kg)后行电针治疗。电针干预前后对大鼠进行步态评分、机械缩足阈值及热缩足反应潜伏期测量;HE染色观察病变部位脊髓组织的病理变化;qPCR法检测大鼠脊髓组织Piezo1基因表达水平;免疫荧光双染法检测大鼠脊髓组织Piezo1、钙调蛋白(CaM)的表达;Western blot法检测脊髓组织CaM、神经元型一氧化氮合酶(nNOS)、可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)、PKG1蛋白表达情况;ELISA法检测脊髓组织cGMP的含量;亚硝酸盐显色法测定脊髓组织NO含量。结果:与假手术组相比,干预前模型组大鼠步态评分升高($P<0.01$),机械缩足阈值下降、热缩足潜伏期缩短($P<0.01$);模型组大鼠脊髓组织Piezo1 mRNA, Piezo1、CaM免疫荧光强度及其定位阳性表达, CaM、nNOS、sGC、PKG1蛋白相对表达量, cGMP、NO含量均显著升高($P<0.01$);HE染色显示,模型组大鼠脊髓组织可见神经元皱缩,细胞染色加深,胞核胞质分界不清,可见神经胶质细胞增生,细胞密度增加,微血管扩张出血。与模型组比较,电针组大鼠步态评分降低($P<0.01$),机械缩足阈值升高、热缩足潜伏期延长($P<0.01$);Piezo1 mRNA表达, Piezo1、CaM免疫荧光强度及其定位阳性表达, CaM、nNOS、sGC、PKG1蛋白相对表达量, cGMP、NO含量均降低($P<0.01$);HE染色显示,电针组大鼠脊髓组织可见个别神经元皱缩,微血管扩张及神经胶质细胞增生均较模型组减少。与电针组相比,电针+Yoda1组大鼠热缩足潜伏期缩短($P<0.01$);Piezo1 mRNA表达, Piezo1、CaM免疫荧光强度及其定位阳性表达, CaM、nNOS、sGC、PKG1蛋白相对表达量, cGMP、NO含量均升高($P<0.05, P<0.01$);HE染色显示,电针+Yoda1组大鼠脊髓组织可见神经元皱缩,神经胶质细胞数量增多,部分微血管扩张出血。结论:电针可有效缓解CSR大鼠的疼痛,其机制可能是通过抑制脊髓Piezo1蛋白的激活,抑制NO/cGMP/PKG信号通路,从而发挥镇痛作用。

【关键词】 神经根型颈椎病;电针;镇痛;Piezo1蛋白

Mechanism of electroacupuncture alleviating pain in rats with cervical spondylotic radiculopathy by regulating the NO/cGMP/PKG signaling pathway via Piezo1 protein

HUANG Wen-jing¹, SU Sheng-yong^{2,3}, WANG Tian¹, SU Hong¹, HUANG Xin-yu¹, LI Xin¹, ZHENG Guang-mei¹, YIN Li-li¹, XU Zhi-yi¹, HUANG Ying¹, WEI Gang-liang¹, LI Xiao-ming¹ (¹Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China; ²Key Laboratory of Chinese Medicine Clinical Research in Guangxi Universities, Nanning 530024; ³Department of Acupuncture and Moxibustion, The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine,

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20251085

引用格式:黄文静,粟胜勇,王甜,等.电针通过Piezo1蛋白调控NO/cGMP/PKG信号通路改善神经根型颈椎病大鼠疼痛的机制研究[J].针刺研究,XXXX,XX(XX):1-11.

项目来源:国家自然科学基金项目(No.82160934);广西中医药大学研究生教育创新计划项目(No.YCSY2025040);广西中医药大学桂林拔尖人才项目(No.2022C017)

通信作者:粟胜勇, E-mail: 1037097555@qq.com

Nanning 530023)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the regulatory effect of electroacupuncture on Piezo1 protein in rats with cervical spondylotic radiculopathy (CSR) and its impact on the nitric oxide (NO)/cyclic guanosine monophosphate (cGMP)/protein kinase G (PKG) signaling pathway, in order to explore the analgesic mechanism of electroacupuncture in treating CSR. **Methods** Male SD rats were randomly divided into sham-operation, model, electroacupuncture (EA), and EA+Yoda1 groups, with 10 rats in each group. The CSR model was established by a surgical procedure involving thread insertion into the vertebral canal. Rats in the EA group received electroacupuncture at bilateral “Hegu” (LI4) and “Taichong” (LR3) acupoints for 20 min per session, continuously for 7 days. Rats in the EA+Yoda1 group received an intraperitoneal injection of the Piezo1 agonist Yoda1 (1.5 mg/kg) before electroacupuncture treatment. Gait score, mechanical paw withdrawal threshold, and thermal paw withdrawal latency were measured before and after the electroacupuncture intervention. Pathological changes in the spinal cord tissue at the lesion site were observed using hematoxylin-eosin (HE) staining. The mRNA expression level of Piezo1 in the spinal cord was detected by qPCR. The expression of Piezo1 and calmodulin (CaM) in the spinal cord was detected by immunofluorescence double staining. The protein expression levels of CaM, neuronal nitric oxide synthase (nNOS), soluble guanylate cyclase (sGC), and PKG1 in the spinal cord were detected by Western blot. The content of cGMP in the spinal cord was measured by ELISA. The nitrite colorimetric method was used to determine the NO content in the spinal cord. **Results** Compared to the sham-operation group, the model group showed increased gait score ($P<0.01$), decreased mechanical withdrawal threshold, and shortened thermal withdrawal latency before intervention ($P<0.01$). After intervention, the model group exhibited significant increases in Piezo1 mRNA expression, Piezo1 and CaM immunofluorescence intensity and co-localization, protein expressions of CaM, nNOS, sGC and PKG1, as well as cGMP and NO contents in the spinal cord tissue ($P<0.01$). HE staining revealed shrunken neurons, deepened cytoplasmic staining, blurred nuclear-cytoplasmic boundaries, glial cell hyperplasia, increased cell density, and dilated microvessels with hemorrhage in the spinal cord of the model group. Compared to the model group, the electroacupuncture group showed decreased gait score ($P<0.01$), increased mechanical withdrawal threshold, and prolonged thermal withdrawal latency ($P<0.01$). Piezo1 mRNA expression, Piezo1 and CaM immunofluorescence intensity and co-localization, protein expressions of CaM, nNOS, sGC, PKG1, as well as cGMP and NO contents were all reduced ($P<0.01$). HE staining showed occasionally shrunken neurons in the electroacupuncture group, with reduced microvascular dilation and glial cell hyperplasia compared to the model group. Compared to the electroacupuncture group, the EA+Yoda1 group showed shortened thermal withdrawal latency ($P<0.01$), and increased Piezo1 mRNA expression, Piezo1 and CaM immunofluorescence intensity and co-localization, protein expressions of CaM, nNOS, sGC, PKG1, as well as cGMP and NO contents ($P<0.05$, $P<0.01$). HE staining revealed neuronal shrinkage, increased glial cell numbers, and some microvascular dilation with hemorrhage in the EA+Yoda1 group. **Conclusion** Electroacupuncture can effectively alleviate pain in CSR rats, potentially by inhibiting Piezo1 protein activation and suppressing the NO/cGMP/PKG signaling pathway in the spinal cord to exert analgesic effects.

【KEYWORDS】 Cervical radiculopathy; Electroacupuncture; Analgesia; Piezo1

神经根型颈椎病(CSR)是指由于颈椎间盘退变、骨质增生等因素,导致颈神经根受压、炎性刺激,从而引发颈部疼痛及相应神经支配区域疼痛、麻木、无力等症状的临床综合征^[1],属于神经病理性疼痛(NP)中的一种。随着生活习惯的改变,CSR的发病率逐年升高^[2]。临床运用针灸治疗CSR疗效确切,但机制尚未明确。

CSR的核心为机械压迫所致的脊神经根损害,因此机体对机械力刺激的感受与转导机制是启动疼痛信号级联反应的首要环节。Piezo1为机械敏感阳离子蛋白,可在背根神经节神经元、脊髓神经元

与巨噬细胞等表达。在神经元上表达,可直接引起钙内流,导致神经元去极化和兴奋性增高,介导外周敏化;在免疫细胞上表达,可调控巨噬细胞极化、炎性反应相关通路,对NP的调控具有重要的作用^[3-6]。Piezo1被激活后可诱导Ca²⁺内流,其作为第二信使,通过与钙调蛋白(CaM)结合,可进一步激活一氧化氮(NO)/环磷酸鸟苷(cGMP)/蛋白激酶G(PKG)通路,这是参与外周及中枢疼痛调控的关键^[7-8],其通过参与背根神经节及脊髓背角的神经元可塑性的调节,在痛觉敏化的形成与维持中起着重要的作用^[9],且已有研究证实抑制NO/cGMP通路

对坐骨神经损伤导致的NP具有治疗作用^[10]。

电针治疗CSR已在临床及基础研究中得到验证,本课题组前期研究观察到,电针“合谷”“太冲”可以通过调控神经炎症反应^[11]、调节突触超微结构^[12]、调控自噬凋亡^[13]等缓解CSR大鼠疼痛。细胞机械力敏感相关受体Piezo1蛋白是近年来研究的热点,而针刺是否可以通过Piezo1蛋白调控NO/cGMP/PKG信号通路从而产生镇痛作用,目前尚不清楚。因此,本实验以CSR大鼠为模型,观察电针通过Piezo1蛋白对NO/cGMP/PKG信号通路的影响,从而探讨电针改善CSR疼痛的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

48只成年雄性SD大鼠(SPF级),体质量230~270g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,饲养于广西中医药大学第一附属医院分子生物学实验室动物房,室温(22±1)℃、相对湿度(55±5)%、12h光暗循环,大鼠可自由饮食。本研究获广西中医药大学动物伦理与福利委员会批准(DW20220430-075),所有实验操作严格遵守3R原则。大鼠适应性喂养1周后,随机选取10只作为假手术组,剩余38只进行CSR造模。造模期间有5只大鼠死亡,3只大鼠步态评分为1分,成功造模30只大鼠,成功率为79%。将30只造模成功的大鼠随机分为模型组、电针组、电针+Yoda1组,每组10只。

1.2 主要试剂和仪器

Piezo1抗体(江苏亲科),神经元型一氧化氮合酶(nNOS)抗体(武汉塞维尔),可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)抗体(北京博奥森),PKG1抗体(上海赛信通),CaM抗体(武汉三鹰生物),GAPDH一抗(北京兰杰柯),HRP标记的山羊抗兔IgG二抗、Cy3标记的山羊抗兔IgG二抗(武汉塞维尔),NO亚硝酸盐显色法试剂盒(南京建成),cGMP ELISA试剂盒(武汉贝茵莱),Yoda1(美国Selleck),gDNA去除反转录预混液(上海新贝)、SYBR qPCR预混液(上海新贝),Triquick总RNA提取试剂(北京索莱宝),苏木精染液、伊红染液(珠海贝索)。

华佗牌无菌针灸针(0.18 mm×13 mm,苏州医疗用品厂),G-6805型电针治疗仪(江苏英迪),von Frey 纤维丝(上海玉研),热板痛觉测试仪(江苏卡尔文),光学显微镜、成像系统(日本OLYMPUS),高速低温组织研磨仪(武汉塞维尔),低温高速离心机(美国Eppendorf),多功能酶标仪(瑞士

TECAN),荧光定量PCR仪(美国ABI),电泳仪、蛋白转印模块(美国Bio-Rad),凝胶成像系统(上海天能),包埋机(武汉俊杰),病理切片机(上海徕卡),扫描仪(匈牙利3DHISTECH),微量天平(德国Sartorius),正置荧光显微镜(广州明美)。

1.3 造模方法及模型评估

造模方法:按照课题组既往的造模方法,采用尼龙鱼线压迫颈神经根的方法制备CSR模型^[14]。所有大鼠在造模前12h禁食禁水,称重记录,予2%戊巴比妥钠溶液(0.2 mL/100 g)腹腔注射麻醉,剔除大鼠颈部及上胸段的毛,采取俯卧位固定,头朝上,消毒,由胸(T)2向上沿着背部正中线做长约3 cm切口,沿着皮下组织、肌肉、韧带,逐层钝性分离,直到充分暴露颈(C)6~T2左侧椎弓,用手术剪在C7左侧椎弓剪开约0.2 cm,将消毒的尼龙鱼线(长约1.5 cm,直径约0.8 mm)沿着脊髓纵轴放置于左侧C6~T1的神经根腋下,确保鱼线压迫神经,然后将肌肉层及皮层分层缝合。假手术组操作同上,仅不进行鱼线椎管插入。

模型评价:从术后第1天开始,于每日上午8:00将大鼠置于观察箱内,适应30 min后观察大鼠一般活动状态及进行步态评分^[11]。评分标准为:1分:步态正常,无畸形;2分:左前肢出现蜷缩畸形,跛行,不能持重;3分:左前肢出现严重的足内收蜷缩畸形、抬起,走路时不着台面。评分为2~3分的模型大鼠为造模成功。

1.4 干预方法

电针:电针组及电针+Yoda1组行电针治疗,电针治疗在造模后第7天开始,穴位选择双侧“合谷”“太冲”,20 min/次,连续干预7 d。穴位定位参照《实验针灸学实验指导》,“合谷”位于前肢第1、第2掌骨之间,“太冲”位于后肢足背第1、第2跖骨间凹陷处。在开始针刺之前,用2.5%异氟烷诱导麻醉大鼠,后选择1.5%浓度维持麻醉。直刺进针,针刺深度为3~5 mm,轻捻转后,以同侧穴位为一组连接电针仪的一对电极,选择连续波,频率1.5 Hz,强度以大鼠四肢轻度抖动为度。假手术组和模型组仅进行抓取及与上述相同的麻醉操作,不做其他处理。

药物注射:电针+Yoda1组在电针干预前1h进行腹腔注射Piezo1激动剂Yoda1(1.5 mg/kg)^[15],配置方式为Yoda1溶于5%二甲基亚砷+95%玉米油中,连续注射7 d,而电针组仅给予5%二甲基亚砷+95%玉米油混合溶液。

1.5 观测指标及检测方法

大鼠步态评分:在干预前1 d及干预完成后1 d对大鼠进行步态评分,评分标准同前。

大鼠机械缩足阈值检测:在干预前1 d及干预完成后1 d分别测定大鼠的机械缩足阈值。将大鼠置于透明树脂箱(底部为金属网格)中适应环境15 min,采用改良 up-down 法,使用一系列 von Frey 纤维丝(0.4、0.6、1.4、2.0、4.0、6.0、8.0、15.0 g)垂直刺激大鼠左前肢足底中部皮肤。当纤维丝弯曲呈“C”或“S”形并维持6~8 s,大鼠出现抬足、舔足或躲避反应,则判定为阳性。同一大鼠的连续两次刺激需间隔至少10 min。机械缩足阈值计算公式为:阈值 = $[10(Xf + k\delta)]/10\ 000$ 。式中,Xf表示最后一次使用的纤维丝压力值(g),k为根据阳性反应模式查表所得系数, δ 代表所用刺激间的平均差值(固定为0.224 g)。

热缩足反应潜伏期检测:在干预前1 d及干预完成后1 d分别测定大鼠的热缩足反应潜伏期。实验前将大鼠置于带挡板的有机玻璃箱中适应15 min;设置热板温度为50℃,待温度稳定后,使大鼠左前肢足底接触热板表面并启动计时,以出现舔足或抬腿反应为终点,同一大鼠每次刺激间隔10 min,连续测量3次取平均值。

样本采集:完成行为学测试后取材,用2%戊巴比妥钠溶液(0.2 mL/100 g)腹腔注射麻醉大鼠,确定充分麻醉后,每组取3只大鼠进行灌流固定。切开大鼠胸腔,暴露心脏,剪开右心耳以排出血液,将输液针从心尖刺入左心室,灌注0.9%氯化钠溶液,直至肝脏、四肢末端变白,后于冰盘上取出C6~T1节段脊髓,浸泡于4%多聚甲醛溶液中固定,用于HE及免疫荧光染色。其余脊髓组织不经过灌注,直接取材后用液氮速冻,后置于-80℃冰箱保存,用于Western blot、qPCR、ELISA、生化检测。

HE染色法观察大鼠脊髓组织病理形态变化:取上述每组3只大鼠脊髓组织,将固定后的脊髓组织经流水冲洗,依次进行梯度乙醇脱水、石蜡包埋,切片(厚度3~5 μ m)后65℃烤片。脱蜡水化,苏木精染色5 min,盐酸乙醇分化,流水冲洗返蓝,伊红染色5 min。经无水乙醇脱水、二甲苯透明,中性树脂胶封片。光镜下观察并采集目标区域图像。

免疫荧光染色法观察脊髓组织中Piezo1、CaM表达情况:取上述每组3只大鼠脊髓组织,固定完成后石蜡包埋,5 μ m厚度切片,环保型脱蜡液脱蜡共30 min,梯度乙醇中脱水15 min,在乙二胺四乙酸抗

原修复缓冲液中进行2次热修复,每次8 min,自然冷却后PBS洗涤,滴加牛血清白蛋白孵育30 min,PBS清洗后,加入稀释的一抗Piezo1、CaM(1:100),4℃过夜,次日PBS清洗后,加入稀释的荧光标记二抗(1:200),室温孵育50 min,滴加DAPI染液,染色5 min,PBS清洗后封片,荧光显微镜下观察,计算Piezo1和CaM的平均荧光强度。

qPCR法检测大鼠脊髓组织Piezo1基因表达水平:取上述每组3只大鼠脊髓组织,剪取约20 mg的组织样本,采用低温研磨 TriQuick Reagent 法提取组织总RNA,RNA纯度经酶标仪检测;将总RNA进行gDNA的去除,使用gDNA去除反转录预混液反转录为cDNA;qPCR采用SYBR Green法:反应体系含SYBR qPCR预混液、正反引物、cDNA模板,95℃30 s预变性,95℃10 s变性,60℃30 s退火及延伸,共40循环,并采集熔解曲线,以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的mRNA的相对表达量。Piezo1、GAPDH引物序列见表1。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因名称	序列(5'→3')	产物长度/bp
Piezo1	上游:ATTGCCCTAATCCGAGTCC	126
	下游:GTGAGCCGGAGACTTTGGTC	
GAPDH	上游:TCTCTGCTCCTCCCTGTTCT	95
	下游:ATCCGTTACACCGACCTTC	

Western blot法检测大鼠脊髓组织中CaM、nNOS、sGC、PKG1蛋白表达水平:从-80℃冰箱中取上述每组3只大鼠的脊髓组织,每个样本剪取约20 mg,加入研磨珠和250 μ L蛋白裂解液(RIPA),用高速低温组织研磨仪匀浆,4℃、13 500×g离心5 min,取上清液,采用BCA蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白浓度测定,用酶标仪测定A562 nm处吸光度值,根据标准曲线计算出蛋白浓度,根据蛋白定量结果,加入PBS统一蛋白浓度至2 mg/mL,按照1:3的比例加入蛋白上样缓冲液,100℃变性10 min。所得变性后的蛋白置于-20℃保存待用。制胶后进行SDS-PAGE(浓缩胶80 V,分离胶120 V),电泳结束后,以300 mA恒定电流转膜90 min,将蛋白转移到PVDF膜上,采用5%脱脂奶粉(TBST配置)常温封闭2 h,以1×TBST洗涤5 min×3次;分别加入CaM、nNOS、sGC、PKG1一抗(均为1:1 000)

和GAPDH一抗(1:2 000)4℃孵育过夜,1×TBST洗涤5 min×3次;加入二抗(1:5 000)室温孵育1 h,1×TBST洗涤5 min×3次。ECL化学发光成像系统曝光成像,以GAPDH为内参,用Image J软件计算目标蛋白的相对表达量(目标蛋白条带灰度值/GAPDH条带灰度值)。

ELISA法检测脊髓组织cGMP含量:取-80℃保存的每组6只大鼠脊髓组织,用预冷的0.01 mol/L PBS(pH7.4)冲洗,称重后剪碎。按照组织质量(g)与PBS体积(mL)比例为1:9的比例加入预冷PBS,冰上研磨,4℃1 150×g离心10 min,收集上清液。参照大鼠cGMP ELISA试剂盒说明书操作,于450 nm波长测定吸光度值,检测脊髓组织cGMP含量。

亚硝酸盐显色法测定脊髓组织NO含量:取-80℃保存的每组6只大鼠脊髓组织,准确称重。按质量(g)与0.9%氯化钠溶液体积(mL)比1:9加入预冷0.9%氯化钠溶液,冰浴机械匀浆,4℃1 150×g离心10 min,取上清液即10%匀浆上清300 μL,然后按照NO测定试剂盒操作步骤进行,用酶标仪测定波长550 nm处各孔吸光度值,计算样本中NO的含量。

1.6 统计学方法

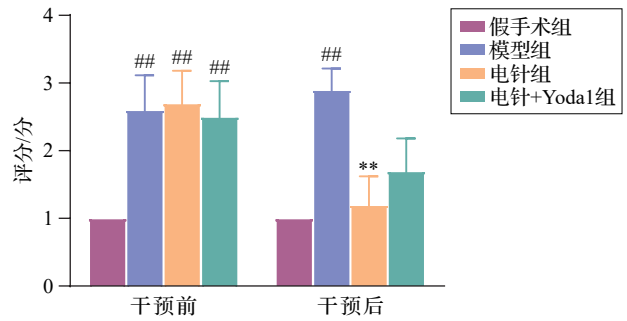
采用SPSS27.0软件进行统计学分析。计量资料均采用均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。先对数据进行正态性检验,当数据符合正态分布,采用单因素方差分析,两两比较时,方差齐用LSD检验,方差不齐用Dunnett' *t*3检验;当不符合正态分布时,采用Kruskal-Wallis秩和检验。以 $P\leq 0.05$ 为差异具有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 各组大鼠步态评分、机械缩足阈值及热缩足反应潜伏期比较

干预前,与假手术组比较,模型组、电针组、电针+Yodal组均出现步态改变,步态评分均升高($P<0.01$),且模型组、电针组、电针+Yodal组之间的差异无统计学意义,说明造模成功。干预后,与模型组相比,电针组步态评分显著降低($P<0.01$);与电针组相比,电针+Yodal组步态评分有升高趋势,但差异无统计学意义。见图1。

干预前,与假手术组比较,模型组、电针组、电针+Yodal组机械缩足阈值均降低($P<0.01$),且模型组、电针组、电针+Yodal组之间的差异无统计学意义。干预后,与模型组相比,电针组机械缩足阈



注:与同时点假手术组比较,^{##} $P<0.01$;与同时点模型组比较,^{**} $P<0.01$ 。

图1 各组大鼠干预前后步态评分比较($\bar{x}\pm s$, 10只鼠/组)

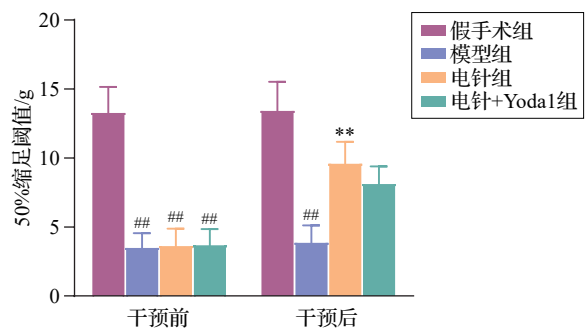
Fig. 1 Comparison of gait scores before and after intervention in rats of the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 10 rats/group)

值显著增高($P<0.01$);与电针组相比,电针+Yodal组机械缩足阈值有降低趋势,但差异无统计学意义。见图2。

干预前,与假手术组比较,模型组、电针组、电针+Yodal组热缩足反应潜伏期明显缩短($P<0.01$)。干预后,与模型组相比,电针组热缩足反应潜伏期明显延长($P<0.01$);与电针组相比,电针+Yodal组热缩足反应潜伏期缩短($P<0.01$)。见图3。

2.2 各组大鼠脊髓组织病理形态学比较

对大鼠脊髓背角进行HE染色分析,结果显示假手术组大鼠脊髓组织染色均匀,神经元形态结构正常、胞核胞质分界清晰、核仁明显,极少量神经元皱缩,未见明显的炎性细胞浸润,微血管数量较少。模型组大鼠脊髓组织可见神经元皱缩,细胞染色加深,胞核胞质分界不清,可见神经胶质细胞增生,细

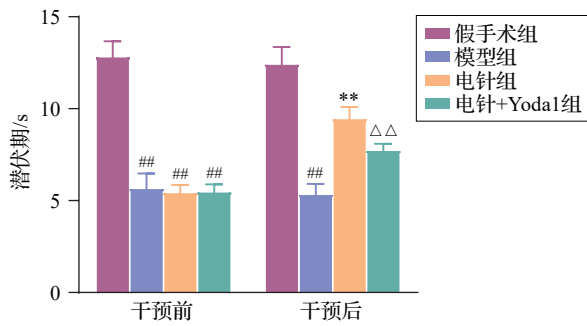


注:与同时点假手术组比较,^{##} $P<0.01$;与同时点模型组比较,^{**} $P<0.01$ 。

图2 各组大鼠干预前后机械缩足阈值比较

($\bar{x}\pm s$, 10只鼠/组)

Fig. 2 Comparison of mechanical paw withdrawal thresholds before and after intervention of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 10 rats/group)



注:与同时点假手术组比较,^{##} $P<0.01$;与同时点模型组比较,^{**} $P<0.01$;与电针组比较,^{△△} $P<0.01$ 。

图3 各组大鼠干预前后热缩足阈值比较($\bar{x}\pm s$, 10只鼠/组)
Fig. 3 Comparison of thermal paw withdrawal latency before and after intervention of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 10 rats/group)

胞密度增加,微血管扩张出血。电针组大鼠脊髓组织可见个别神经元皱缩、细胞染色加深、胞核胞质分界不清,微血管扩张及神经胶质细胞增生均较模型组减少。电针+Yoda1组大鼠脊髓组织可见神经元皱缩,神经胶质细胞数量增多,部分微血管扩张出血。见图4。

2.3 各组大鼠脊髓组织 Piezo1 mRNA 表达的比较

与假手术组相比,模型组大鼠脊髓组织 Piezo1 mRNA 表达显著升高($P<0.01$);与模型组相比,电针组 Piezo1 mRNA 相对表达显著降低($P<0.01$);与电针组相比,电针+Yoda1组 Piezo1 mRNA 表达升高($P<0.05$)。见图5。

2.4 各组大鼠 Piezo1、CaM 免疫荧光共定位分析

免疫荧光分析显示,与假手术组相比,模型组

脊髓组织 Piezo1、CaM 荧光强度及共定位阳性表达显著升高($P<0.01$);与模型组相比,电针组 Piezo1、CaM 荧光强度及共定位阳性表达降低($P<0.01$);与电针组相比,电针+Yoda1组 Piezo1、CaM 荧光强度及共定位阳性表达升高($P<0.05$)。见图6。

2.5 各组大鼠脊髓组织 CaM、nNOS、sGC、PKG1 蛋白表达水平的比较

与假手术组相比,模型组大鼠脊髓组织中的 CaM、nNOS、sGC、PKG1 蛋白表达均升高($P<0.01$);与模型组相比,电针组大鼠脊髓组织 CaM、nNOS、sGC、PKG1 蛋白表达均降低($P<0.01$);与电针组相比,电针+Yoda1组大鼠脊髓组织 CaM、nNOS、sGC、PKG1 蛋白表达升高($P<0.05$, $P<0.01$)。见图7。

2.6 各组大鼠脊髓组织 cGMP 含量比较

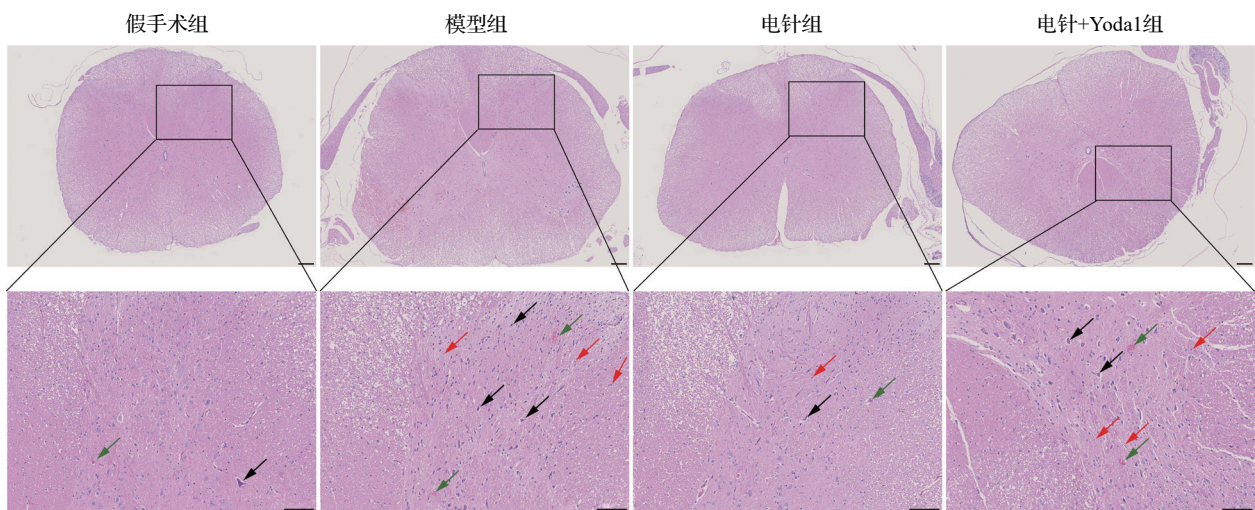
与假手术组相比,模型组大鼠脊髓组织 cGMP 含量显著升高($P<0.01$);与模型组相比,电针组大鼠脊髓组织 cGMP 含量降低($P<0.01$);与电针组相比,电针+Yoda1组大鼠脊髓组织 cGMP 含量升高($P<0.01$)。见图8。

2.7 各组大鼠脊髓组织 NO 含量的比较

与假手术组相比,模型组大鼠脊髓组织的 NO 含量显著升高($P<0.01$);与模型组相比,电针组 NO 含量显著降低($P<0.01$);与电针组相比,电针+Yoda1组 NO 含量升高($P<0.01$)。见图9。

3 讨论

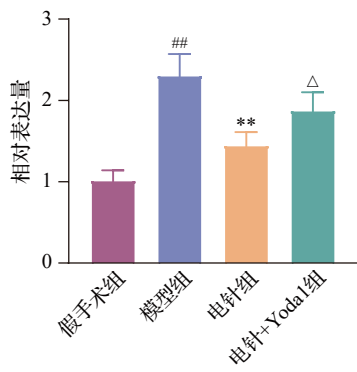
CSR 归属于中医“颈肩痛”“痹证”等病的范畴。《素问·阴阳应象大论》云“气伤痛,形伤肿”,“气伤



注:上排标尺=200 μm,下排标尺=100 μm,黑色箭头示神经元皱缩,红色箭头示神经胶质细胞,绿色箭头示微血管。

图4 各组大鼠脊髓组织病理形态比较(HE染色)

Fig. 4 Comparison of the pathological morphology of spinal cord tissue of rats in the 4 groups(HE staining)

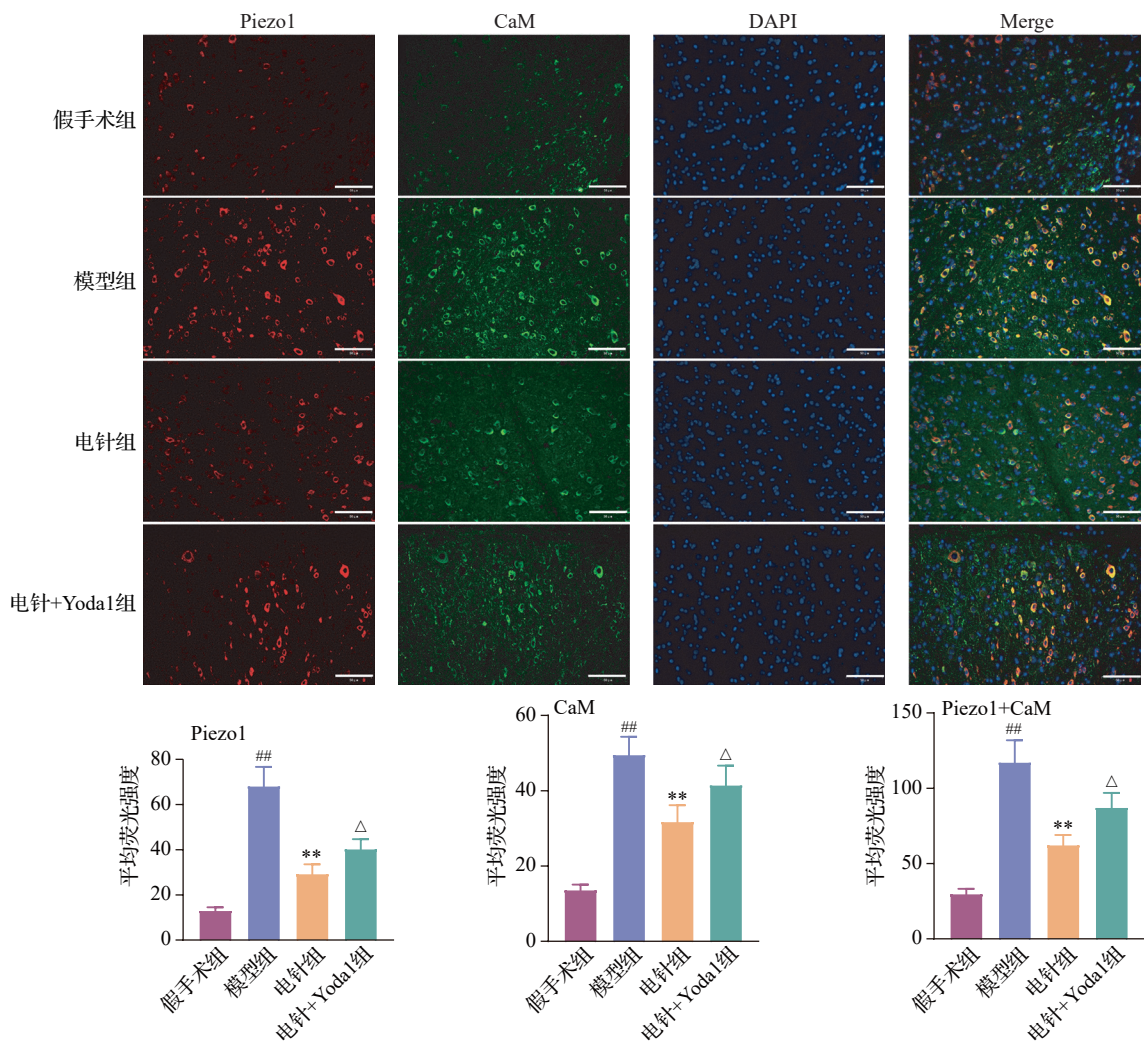


注:与假手术组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.01$;与电针组比较,△ $P<0.05$ 。

图5 各组大鼠脊髓组织 Piezo1 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$, 3 只鼠/组)

Fig. 5 Comparison of Piezo1 mRNA expression levels in spinal cord tissue of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 3 rats/group)

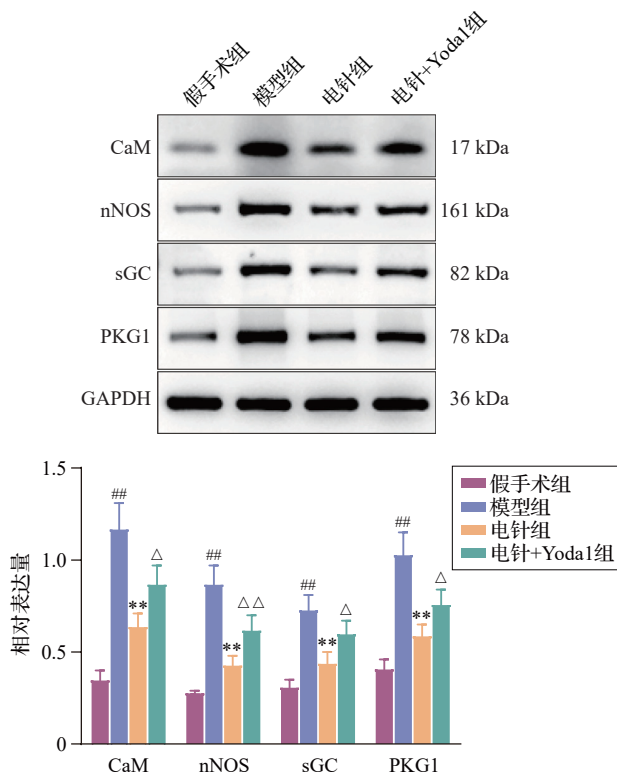
痛”指气的运行不能畅通,经络痹阻,最终导致疼痛的发生。课题组以“气伤痛”为 CSR 的基本病机,以调畅气机、行气止痛为基本治疗原则,以电针“合谷”“太冲”调气止痛。《针灸穴名解》有:“合谷、太冲各二穴,名曰四关,以其能大开通也。”《标幽赋》载“寒热痹痛,开四关而已之”。合谷属阳、主气,太冲属阴、主血,一气一血,一升一降,可见四关具有调畅全身气机、通络止痛功效。课题组前期动物实验证实,电针“合谷”“太冲”具有良好的镇痛效应,可用于治疗 CSR^[16-17]。合谷、太冲虽非临床上治疗 CSR 的常用穴位,但其配合局部腧穴治疗可加强镇痛效应^[18]。吴倩扉等^[19]研究结果提示,在常规针刺的基础上配合“四关穴”,可明显降低颈椎病患者血清肿瘤坏死因子- α 、C 反应蛋白及 P 物质,可有效减轻患者的疼痛。在辨证论治理论指导下,两穴是治



注: CaM 为钙调蛋白。标尺 = 50 μm 。与假手术组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.01$;与电针组比较,△ $P<0.05$ 。

图6 各组大鼠脊髓组织 Piezo1、CaM 及其共定位阳性表达比较(免疫荧光染色, $\bar{x}\pm s$, 3 只鼠/组)

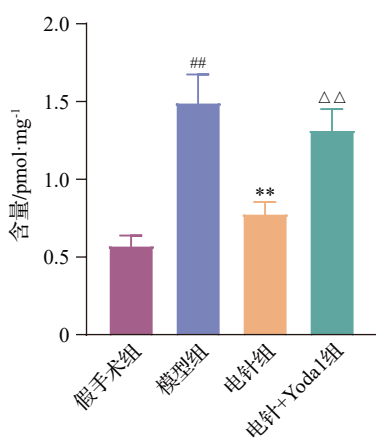
Fig. 6 Comparison of the Piezo1 and CaM immunofluorescence intensity and co-localization in the spinal cord tissue of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 3 rats/group)



注:CaM为钙调蛋白,nNOS为神经元型一氧化氮合酶,sGC为可溶性鸟苷酸环化酶,PKG1为蛋白激酶G1。与假手术组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.01$;与电针组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

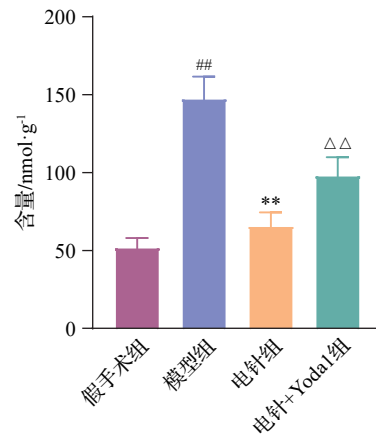
图7 各组大鼠脊髓组织CaM、nNOS、sGC、PKG1蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$,3只鼠/组)

Fig. 7 Comparison of the protein expression levels of CaM, nNOS, sGC, and PKG1 in the spinal cord tissue of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 3 rats/group)



注:cGMP为环磷酸鸟苷。与假手术组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.01$;与电针组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

图8 各组大鼠脊髓组织cGMP含量比较($\bar{x}\pm s$,6只鼠/组)
Fig. 8 Comparison of the contents of cGMP in the spinal cord tissue of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 rats/group)



注:NO为一氧化氮。与假手术组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.01$;与电针组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

图9 各组大鼠脊髓组织NO含量比较($\bar{x}\pm s$,6只鼠/组)
Fig. 9 Comparison of the contents of NO in the spinal cord tissue of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 rats/group)

疗神经根型颈椎病气滞血瘀证型的配合用穴^[20]。因此本研究选取“合谷”“太冲”进行电针干预,进一步研究电针的镇痛的机制。

Piezo1可感知针样刺激、剪切力、拉伸和内源性膜张力等多种机械刺激^[21],Piezo1为“三叶草”螺旋结构,在受机械力刺激时叶片区域变形,驱动中心孔开放,中心孔位于结构中央,是离子运行的通道,其开放后可使阳离子内流,引起细胞去极化,由此将机械刺激产生的物理信号转化为电信号和化学信号,参与调控神经炎症反应、神经发育等各种生理及病理过程^[22-23]。研究发现,Piezo1机械敏感膜张力及膜电压调节。Piezo1具有电压依赖性失活特性,其在静息时活性受抑制,而去极化则显著降低其机械激活阈值;另一方面,静息膜张力可调节Piezo1的整体敏感性,但持续或过强的机械刺激则导致其进入失活状态^[24]。CSR的本质为颈神经根受压,持续性机械力可能通过直接激活Piezo1蛋白,从而进行信号转换,而CSR产生的痛觉过敏,则可能是持续的机械力压迫导致的膜张力及膜电压在一定范围内的升高所致,但仍有待进一步的细胞电生理学验证。已有研究^[25]显示,在坐骨神经损伤模型中,Piezo1在前扣带皮质层中表达升高,介导神经炎症反应,促进脊髓疼痛信号的传递。另有研究^[26]显示,Piezo1可在大鼠背根神经节中60%的初级感觉神经元中检测到,当周围神经损伤时,大鼠背根神经节及脊髓的Piezo1表达升高,痛阈值降低,注射Piezo1激动剂Yoda1可进一步诱发机械异常性疼痛及痛觉过敏,Piezo1抑制剂GsMTx4可逆

转 Yoda1 诱导的超敏反应,也进一步验证了 Piezo1 的表达可诱发 NP,对于 NP 的调控具有重要的作用。

NO/cGMP/PKG 信号通路在调节疼痛方面具有重要的作用。当细胞内 Ca^{2+} 浓度升高,可诱导 CaM 募集并形成偶联,激活 nNOS, nNOS 可作用于 L-精氨酸产生 NO 和瓜氨酸,NO 可与胞质的 sGC 结合,促进 cGMP 的形成,从而进一步激活 cGMP 依赖的 PKG,最终促进疼痛介质的释放,兴奋脊髓伤害性感受神经元,将信息传向更高级中枢,导致疼痛^[27]。这条通路中,NO 在增强神经兴奋性的同时,又可抑制神经元的下行抑制,对 NP 的产生和维持起到重要作用^[28-29]。研究显示,持续激活的 cGMP/PKG 信号通路是导致持续性痛觉过敏的关键^[30]。坐骨神经结扎大鼠的 nNOS、cGMP、sGC β 、PKG1 蛋白表达上调,而抑制 Ca^{2+} 内流可降低上述蛋白表达,从而达到镇痛效应^[31],抑制该通路中的任意分子也均可达到镇痛效应^[32]。Piezo1 激活后可诱导 Ca^{2+} 内流,其可能是调控 NO/cGMP/PKG 信号通路的关键。既往的研究表明, Piezo1 可通过 cGMP 信号通路调节神经功能^[33]。

本研究采用椎管插线法成功诱导 CSR 大鼠模型。造模后,大鼠表现为热痛阈值降低、步态评分升高;HE 染色进一步显示脊髓组织出现神经元皱缩、染色加深、胞核胞质分界不清,伴神经胶质细胞增生、细胞密度增加及微血管扩张出血等病理改变。本研究重点关注 Piezo1 及其下游信号通路的变化。实验结果显示,模型大鼠脊髓中 Piezo1 的 mRNA 及蛋白表达水平均显著升高。经电针干预后,大鼠疼痛行为明显改善,同时 Piezo1 的表达被显著抑制。为进一步验证电针作用是否经由 Piezo1 介导,本研究增设电针+Yoda1 组,结果显示 Piezo1 激动剂 Yoda1 可部分逆转电针的镇痛效应及对 Piezo1 表达的抑制作用,表明电针确实通过调控 Piezo1 发挥治疗作用。进一步对 NO/cGMP/PKG 通路相关指标进行检测,免疫荧光双标显示,模型组脊髓组织 Piezo1 与 CaM 共表达增强,同时 CaM、nNOS、sGC、PKG1 蛋白表达及 NO、cGMP 含量均升高,提示 Piezo1 激活可启动 NO/cGMP/PKG 通路。电针干预有效逆转了上述分子的异常高表达,而 Yoda1 则可阻断电针对该通路的抑制作用,进一步证实了电针可通过脊髓组织中 Piezo1 参与 NO/cGMP/PKG 信号通路的调控,最终改善 CSR 疼痛。

综上,电针能改善 CSR 大鼠行为学,提高大鼠

的热痛阈值,其机制可能与电针通过抑制脊髓 Piezo1 蛋白,调控 NO/cGMP/PKG 信号通路,抑制中枢神经元的兴奋有关,从而启动镇痛效应,缓解痛觉过敏症状。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] JAJEH H, LEE A, CHARLS R, et al. A clinical review of hand manifestations of cervical myelopathy, cervical radiculopathy, radial, ulnar, and median nerve neuropathies [J]. *J Spine Surg*, 2024, 10(1): 120-134.
- [2] ALMASI A, JAFARI S, SOLOUKI L, et al. The best surgical treatment for cervical radiculopathy: a systematic review and network meta-analysis [J]. *Adv Biomed Res*, 2023, 12: 191.
- [3] 黄文静, 粟胜勇, 王甜. Piezo 机械敏感阳离子蛋白在神经病理性疼痛的调控作用[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2025, 31(9): 696-702.
HUANG W J, SU S Y, WANG T. The regulatory role of Piezo mechanosensitive cation channels in neuropathic pain (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Pain Medicine*, 2025, 31(9): 696-702.
- [4] WAN Y T, ZHOU J S, LI H. The role of mechanosensitive piezo channels in chronic pain [J]. *J Pain Res*, 2024, 17: 4199-4212.
- [5] XU Y, WANG Y H, MEI S C, et al. The mechanism and potential therapeutic target of piezo channels in pain [J]. *Front Pain Res*, 2024, 5: 1452389.
- [6] D'ARCO M, GINIATULLIN R, SIMONETTI M, et al. Neutralization of nerve growth factor induces plasticity of ATP-sensitive P2X3 receptors of nociceptive trigeminal ganglion neurons [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(31): 8190-8201.
- [7] 杨震杰, 萨出拉, 于天源, 等. 经 TRPV1/TRPA1-cGMP 信号通路探究推拿对 minor CCI 模型大鼠背根神经节镇痛启动机制 [J]. *中国比较医学杂志*, 2024, 34(7): 1-9.
YANG Z J, SA C L, YU T Y, et al. Exploring the analgesic initiation mechanism of Tuina on the dorsal root ganglion in minor chronic constriction injury model rats via the TRPV1/TRPA1-cGMP signaling pathway (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2024, 34(7): 1-9.
- [8] 杨震杰, 萨出拉, 于天源, 等. 基于 NMDAR1/cGMP 通路探究“三法三穴”对轻度慢性压迫性神经损伤大鼠脊髓背角的镇痛启动机制 [J]. *北京中医药大学学报*, 2024, 47(7): 1017-1024.
YANG Z J, SA C L, YU T Y, et al. Exploring the analgesic initiation mechanism of “three-manipulations and three-acupoints” on the spinal dorsal horn of rats with minor chronic constriction injury based on the NMDAR1/cGMP pathway (in Chinese) [J]. *Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine*, 2024, 47(7): 1017-1024.
- [9] WANG T Z, WANG F, TIAN Z C, et al. Cingulate cGMP-dependent protein kinase I facilitates chronic pain and pain-

- related anxiety and depression [J]. *Pain*, 2023, 164 (11) : 2447-2462.
- [10] 闫丽萍, 侯保权, 李守栋, 等. 电针对坐骨神经分支选择性损伤大鼠脊髓L-Arg/NO/cGMP通路的影响[J]. *针刺研究*, 2019, 44(12): 893-897, 905.
YAN L P, HOU B Q, LI S D, et al. Electroacupuncture relieved neuropathic pain by suppressing L-Arg/NO/cGMP pathway in the lumbar spinal cord in rats with spared nerve injury (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2019, 44 (12): 893-897, 905.
- [11] 郭彦君, 栗胜勇, 苏虹, 等. 基于星形胶质细胞活化与HMGB1/TLR4/MyD88信号通路探讨电针对神经根型颈椎病大鼠的镇痛机制[J]. *针刺研究*, 2024, 49(9): 909-916.
GUO Y J, SU S Y, SU H, et al. Mechanism of analgesic effect of electroacupuncture on rats with cervical spondylosis radiculopathy based on activation of astrocytes and HMGB1/TLR4/MyD88 signaling pathway (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2024, 49(9): 909-916.
- [12] 羊璞, 栗胜勇, 王甜, 等. 电针对神经根型颈椎病大鼠脊髓组织突触相关蛋白及超微结构的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2023, 30(12): 122-128.
YANG P, SU S Y, WANG T, et al. Effects of electroacupuncture on spinal synaptic-related protein and ultrastructure in rats with cervical spondylotic radiculopathy (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine*, 2023, 30(12): 122-128.
- [13] 黄小珍, 栗胜勇, 覃忠亮, 等. 电针对CSR大鼠神经细胞自噬相关因子Beclin1 mRNA、LC3 mRNA表达的影响[J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(4): 1012-1014.
HUANG X Z, SU S Y, QIN Z L, et al. Effect of electroacupuncture on the expression of autophagy-related factors Beclin1 mRNA and LC3 mRNA in CSR rats (in Chinese) [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2019, 30(4): 1012-1014.
- [14] SU H, CHEN H Y, ZHANG X, et al. Electroacupuncture ameliorates pain in cervical spondylotic radiculopathy rat by inhibiting the CaMKII/CREB/BDNF signaling pathway and regulating spinal synaptic plasticity[J]. *Brain Behav*, 2023, 13 (10): e3177.
- [15] HU J, CHEN Q, ZHU H R, et al. Microglial Piezo1 senses A β fibril stiffness to restrict Alzheimer's disease[J]. *Neuron*, 2023, 111(1): 15-29.e8.
- [16] 黄霞, 栗胜勇, 黄小珍, 等. “调气”电针远端腧穴对神经根型颈椎病大鼠PGE2含量、COX-2蛋白及其mRNA表达的影响[J]. *辽宁中医杂志*, 2018, 45(6): 1293-1296.
HUANG X, SU S Y, HUANG X Z, et al. Influence of regulating qi electroacupuncture at distal acupoints on content of PGE2 and expressions of COX-2 protein and its mRNA in rats with cervical spondylotic radiculopathy (in Chinese) [J]. *Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2018, 45 (6): 1293-1296.
- [17] 陈霞, 栗胜勇, 黄云龙, 等. 基于JAK-STAT/SOCS信号通路交互作用探讨“调气”电针对神经根型颈椎病大鼠的镇痛作用机制[J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(3): 733-736.
CHEN X, SU S Y, HUANG Y L, et al. Exploring the analgesic mechanism of “regulating qi” electroacupuncture on cervical spondylosis of nerve root type rats based on the interaction of JAK-STAT/SOCS signaling pathway (in Chinese) [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2018, 29(3): 733-736.
- [18] 蒋成艳. 基于“气伤痛”理论探讨针灸疗法对颈椎病颈痛症状及SF-36生活质量量表的影响[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2016.
JIANG C Y. Exploring the impact of acupuncture and moxibustion therapy on cervical spondylosis-related neck pain symptoms and the SF-36 quality of life scale based on the theory of “qi deficiency causing pain” (in Chinese) [D]. Nanning: Guangxi University of Chinese Medicine, 2016.
- [19] 吴倩扉, 张宇, 龚惠娣, 等. “气伤痛”理论指导下针刺合谷穴、太冲穴治疗颈椎病临床观察[J]. *河南中医*, 2023, 43 (4): 607-611.
WU Q F, ZHANG Y, GONG H D, et al. Clinical observation of the treatment of cervical spondylosis with acupuncture at Hegu and Taichong points under the guidance of the theory of “damage of qi causing pain” (in Chinese) [J]. *Henan Traditional Chinese Medicine*, 2023, 43(4): 607-611.
- [20] 魏林, 赵海华, 刘卫. 辨证分型治疗神经根型颈椎病118例观察[J]. *中医临床研究*, 2016, 8(22): 86-87.
WEI L, ZHAO H H, LIU W. Observation on treating 118 cases of cervical spondylotic radiculopathy based on syndrome differentiation (in Chinese) [J]. *Clinical Journal of Chinese Medicine*, 2016, 8(22): 86-87.
- [21] COSTE B, MATHUR J, SCHMIDT M, et al. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels [J]. *Science*, 2010, 330 (6000) : 55-60.
- [22] BRYNIARSKA-KUBIAK N, KUBIAK A, BASTA-KAIM A. Mechanotransductive receptor Piezo1 as a promising target in the treatment of neurological diseases [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2023, 21(10): 2030-2035.
- [23] XIAO B L. Mechanisms of mechanotransduction and physiological roles of PIEZO channels [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2024, 25(11): 886-903.
- [24] LEWIS A H, GRANDL J. Mechanical sensitivity of Piezo1 ion channels can be tuned by cellular membrane tension [J]. *eLife*, 2015, 4: e12088.
- [25] LI Q Y, DUAN Y W, ZHOU Y H, et al. NLRP3-mediated Piezo1 upregulation in ACC inhibitory parvalbumin-expressing interneurons is involved in pain processing after peripheral nerve injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21): 13035.
- [26] SHIN S M, ITSON-ZOSKE B, FAN F, et al. Peripheral sensory neurons and non-neuronal cells express functional Piezo1 channels [J]. *Mol Pain*, 2023, 19: 17448069231174315.
- [27] 陈扬林, 陈小卫, 张文华. NO在脊髓痛觉传递过程中的作用[J]. *生命的化学*, 2011, 31(2): 233-237.

- CHEN Y L, CHEN X W, ZHANG W H. Role of nitric oxide in spinal nociception transmission (in Chinese) [J]. *Chemistry of Life*, 2011, 31(2): 233-237.
- [28] 肖志刚, 杨世忠, 谢国水, 等. 一氧化氮在疼痛中的作用 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2013, 19(6): 362-365.
- XIAO Z G, YANG S Z, XIE G S, et al. The role of nitric oxide in pain (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Pain Medicine*, 2013, 19(6): 362-365.
- [29] LI D Y, GAO S J, SUN J, et al. Targeting the nitric oxide/cGMP signaling pathway to treat chronic pain [J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(5): 996-1003.
- [30] HUANG Z J, LI H C, LIU S, et al. Activation of cGMP-PKG signaling pathway contributes to neuronal hyperexcitability and hyperalgesia after in vivo prolonged compression or in vitro acute dissociation of dorsal root ganglion in rats [J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2012, 64(5): 563-576.
- [31] YANG Z J, SA C L, YU T Y, et al. Exploring the analgesic initiation mechanism of Tuina in the dorsal root ganglion of minor CCI rats via the TRPV1/TRPA1-cGMP pathway [J]. *Pain Res Manag*, 2024, 2024: 2437396.
- [32] DING Y Y, YAO P, HONG T, et al. The NO-cGMP-PKG signal transduction pathway is involved in the analgesic effect of early hyperbaric oxygen treatment of neuropathic pain [J]. *J Headache Pain*, 2017, 18(1): 51.
- [33] SONG Y Q, LI D, FARRELLY O, et al. The mechanosensitive ion channel piezo inhibits axon regeneration [J]. *Neuron*, 2019, 102(2): 373-389.e6.

收稿日期:2025-10-10 修回日期:2025-10-30