

☆ XXXX ☆

电针累积镇痛效应的机制:基于 AMPK 信号通路的靶向调控研究

武彩花¹, 蓝渝叶², 詹慕欧洋¹, 林立雪¹, 王 琼¹, 景向红³, 李 熲², 毛红蓉¹

(¹武汉市第一医院针灸科, 武汉 430035; ²华中科技大学同济医学院神经生物学系, 武汉 430030; ³中国中医科学院针灸研究所, 北京 100700)

【摘要】 目的:探讨多次电针干预通过靶向调控腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)信号通路产生累积镇痛效应的分子机制。方法:将小鼠随机分为对照组、模型组、单次电针组、多次电针组、假电针组;对照组、模型组、溶媒+电针组、抑制剂+电针组,每组8只。建立完全弗氏佐剂(CFA)诱导的小鼠炎性疼痛模型。对多次电针组、溶媒+电针组、抑制剂+电针组小鼠施加多次电针干预,选取小鼠左侧“足三里”和“上巨虚”,频率 2 Hz、电流 1 mA、每次干预 30 min,每日 1 次,共 6 d;单次电针组仅于造模次日行单次电针处理;假电针组仅浅刺皮下,不接入电针仪器。抑制剂+电针组每日电针开始前 30 min 按 20 mg/kg 剂量腹腔注射 Compound C。检测机械痛阈和热痛阈评价疼痛行为学,Western blot 法检测脊髓背角磷酸化(p)-AMPK 和 AMPK、c-Fos 蛋白的表达,免疫荧光染色技术检测脊髓背角 c-Fos 的表达数量。结果:与对照组相比,模型组小鼠机械痛阈和热痛潜伏期均显著降低($P<0.05$),与模型组相比,单次电针组小鼠电针后 1、2、4 h 的机械痛阈和热痛潜伏期显著升高($P<0.05$),多次电针组电针后 2~7 d 的机械痛阈和热痛潜伏期显著升高($P<0.05$)。与对照组和模型组相比,多次电针后腰段脊髓背角 p-AMPK/AMPK 蛋白表达比值和 c-Fos 表达显著升高($P<0.05$);假电针组的 p-AMPK/AMPK 蛋白表达比值和 c-Fos 表达相较于多次电针组明显降低($P<0.05$)。与模型组相比,溶媒+电针组小鼠在造模第 3~7 天的机械痛阈和热痛阈潜伏期均显著升高($P<0.05$)。与溶媒+电针组相比,抑制剂+电针组小鼠造模后第 3~7 天机械痛阈和热痛阈均显著降低($P<0.05$)。与对照组相比,模型组 c-Fos 表达和 c-Fos 阳性神经元数量显著增加($P<0.05$)。与模型组相比,溶媒+电针组腰段脊髓背角 c-Fos 表达和 c-Fos 阳性神经元数量显著降低($P<0.05$)。与溶媒+电针组相比,抑制剂+电针组腰段脊髓背角 c-Fos 表达和 c-Fos 阳性神经元数量显著增加($P<0.05$)。结论:多次电针显著改善了 CFA 小鼠疼痛,该累积镇痛效应可能是通过持续激活腰段脊髓背角中 AMPK 介导的。

【关键词】 电针;镇痛;脊髓背角;累积效应;腺苷酸活化蛋白激酶信号通路

Mechanism of cumulative analgesic effect of electroacupuncture: targeted regulation based on AMPK signaling pathway

WU Cai-hua¹, LAN Yu-ye², ZHAN Mu-ouyang¹, LIN Li-xue¹, WANG Qiong¹, JING Xiang-hong³, LI Man², MAO Hong-rong¹ (¹Department of Acupuncture and Moxibustion, Wuhan First Hospital, Wuhan 430035, China; ²Department of Neurobiology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030; ³Institute of Acupuncture and Moxibustion, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700)

【ABSTRACT】 Objective To explore the molecular mechanism of cumulative analgesic effect induced by repeated electroacupuncture (EA) intervention via targeted regulation of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway. **Methods** Mice were randomly divided into control group, model group, single EA group, repeated EA group and sham EA group; as well as vehicle + EA group and inhibitor + EA group, with 8 mice in

[DOI] 10.13702/j.1000-0607.20260118

引用格式:武彩花,蓝渝叶,詹慕欧洋,等.电针累积镇痛效应的机制:基于 AMPK 信号通路的靶向调控研究[J].针刺研究,XXXX,XX (XX):1-10.

项目来源:国家自然科学基金重点项目(No.82130122);国家自然科学基金面上项目(No.81973949);湖北省时珍人才项目

共同通信作者:李熲,E-mail:liman73@mails.tjmu.edu.cn

毛红蓉,E-mail:1838269751@qq.com

each group. A mouse inflammatory pain model was established by complete Freund's adjuvant (CFA) injection. Repeated EA stimulation was applied to mice in repeated EA group, vehicle + EA group and inhibitor + EA group at left "Zusanli" (ST36) and "Shangjuxu" (ST37). The parameters were set as frequency 2 Hz, current 1 mA, 30 minutes per intervention, once a day for 6 consecutive days. The single EA group only received a single EA treatment on the second day after modeling. The sham EA group only received superficial subcutaneous puncture without electrical stimulation. Mice in inhibitor + EA group were intraperitoneally injected with Compound C at a dose of 20 mg/kg 30 minutes before daily EA. Mechanical pain threshold and thermal pain latency were detected to evaluate pain behaviors. Western blot was used to determine the protein expression levels of p-AMPK, AMPK and c-Fos in the spinal dorsal horn. Immunofluorescence staining was adopted to detect the number of c-Fos positive cells. **Results** Compared with the control group, mechanical pain threshold and thermal pain latency were markedly decreased in the model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, single EA significantly elevated mechanical pain threshold and thermal pain latency at 1, 2 and 4 h after treatment ($P < 0.05$); repeated EA increased pain thresholds from day 2 to day 7 after intervention ($P < 0.05$). The ratio of p-AMPK/AMPK and c-Fos expression in lumbar spinal dorsal horn were significantly higher in repeated EA group than those in control and model groups ($P < 0.05$), while these indicators were obviously lower in sham EA group than those in the EA group ($P < 0.05$). Pain thresholds from day 3 to day 7 were higher in vehicle + EA group relative to the model group ($P < 0.05$), and notably declined in inhibitor + EA group compared with vehicle + EA group ($P < 0.05$). The expression level and positive neuron number of c-Fos were increased in the model group versus the control group ($P < 0.05$), and reduced in vehicle + EA group ($P < 0.05$). Such changes were reversed after Compound C intervention ($P < 0.05$). **Conclusion** Repeated EA can effectively alleviate CFA-induced pain in mice. The cumulative analgesic effect may be mediated by persistent activation of AMPK in the lumbar spinal dorsal horn.

【KEYWORDS】 Electroacupuncture; Analgesia; Spinal dorsal horn; Cumulative effect; AMPK signaling pathway

疼痛,特别是慢性疼痛,作为一种复杂的病理生理状态,不仅严重损害患者的生活质量,还带来了沉重的社会经济负担^[1]。传统镇痛药物常伴随成瘾性、耐受性及器官毒性等不良反应,因此,包括传统医学电针在内的非药物镇痛疗法日益受到关注。电针结合了传统针刺与现代电刺激技术,通过特定频率的电流刺激穴位,发挥神经调节和组织修复作用^[2]。临床观察表明,电针的镇痛效果随治疗次数增加而逐渐增强,呈现明显的累积效应特性,但其内在的分子机制尚未完全阐明^[3-4]。

腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)作为细胞能量代谢的核心调控因子,其广泛参与疼痛的调控过程。AMPK在结构和功能上高度保守,是由 α 催化亚基和 β 、 γ 调节亚基组成的异三聚体蛋白,其激活依赖于激酶结构域通过磷酸化激活ST环中的保守苏氨酸(Thr172),而这一过程受到上游肝激酶B1、钙/钙调素依赖性蛋白激酶激酶 β 和转化生长因子- β 活化激酶1的精密调控^[5]。研究表明,AMPK可通过抑制炎症介质表达、调节初级传入神经元离子通道兴奋性以及调控脊髓胶质细胞活性等多重途径发挥镇痛作用^[6]。在神经病理性疼痛模型中,AMPK激动剂能显著缓解痛觉超敏,而AMPK基因敲除小鼠则表现出疼痛持续时间延长和程度加

重^[7],另外,可通过改善脊髓AMPK/核因子 κ B信号通路紊乱,抑制慢性束缚应激诱导的神经炎症反应和胶质细胞活化,从而缓解痛觉过敏^[8]。其次,在偏头痛模型中,外源性激活AMPK可显著减轻痛觉过敏和疼痛样行为,提示AMPK激活可通过调节神经炎症反应和能量代谢发挥镇痛作用^[9]。这进一步凸显了AMPK在疼痛调控中的关键作用。

作为一种物理刺激疗法,电针已被证实可在炎性疼痛模型中通过激活大麻素CB2受体依赖的AMPK通路,上调 β -内啡肽表达,从而缓解炎性疼痛^[10];另外,电针可通过外周循环中的脂联素作用于脊髓内的脂联素受体2,进而激活AMPK通路,产生镇痛效应^[11]。然而,多次电针刺刺激是否通过AMPK通路介导其累积镇痛效应,以及该过程中涉及的关键分子事件的变化规律,目前尚缺乏系统研究。

基于以上研究背景,本研究提出以下科学假说:多次电针干预能够通过持续激活脊髓AMPK信号通路,产生累积性镇痛效果。为验证这一假说,我们建立了炎性疼痛小鼠模型,系统观察不同频次电针干预对疼痛行为学及脊髓背角AMPK通路关键分子表达的影响,并采用药理学手段AMPK抑制剂Compound C进一步明确AMPK在电针累积镇

痛效应中的核心作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性C57 BL/6J小鼠,8周龄,体质量20~22 g,北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2021-0006。实验过程对动物的处理遵守中华人民共和国科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》相关规定,华中科技大学同济医学院实验动物伦理委员会批准了本研究所涉及的动物实验方案(伦理批号:伦理字S2681号)。

1.2 主要仪器与试剂

0.20 mm×13 mm毫针(吴江云龙),LH202型韩氏穴位神经刺激仪(南京济生),von Frey丝(美国Stoelting),APW-M500电泳仪(武汉赛维尔),LS780显微镜(德国蔡司),CM1950切片机(德国Leica),ChemiDoc MP扫描仪(美国伯乐)。完全弗氏佐剂(CFA,美国Sigma F5881),BCA试剂盒(上海碧云天),AMPK抑制剂Compound C(英国Abcam, #ab120843),Triton X-100(美国Sigma-Aldrich, #T9284),c-Fos抗体(德国Synaptic Systems GmbH, #226008),磷酸化(p)-AMPK抗体(Thr172, #2353T)、AMPK抗体(#2532S)均购自美国Cell Signaling Technology, β -actin抗体(美国Santa Cruz Biotechnology, #sc-47778),抗兔HRP、抗鼠HRP二抗(武汉科瑞)。

1.3 造模方法和分组

根据文献[12]和课题组已发表的报道^[10, 13],用CFA法制备炎性痛模型。采用25号皮下注射针头,对照组在同样部位注射25 μ L 0.9%氯化钠注射液,模型组在左后足背皮下注射25 μ L CFA,共注射1次,注射操作均在乙醚吸入轻度麻醉下进行。患侧足出现明显红肿,检测机械痛阈值显著下降表明造模成功。

根据实验目的需要,将小鼠随机分为对照组、模型组、单次电针组、多次电针组、假电针组;对照组、模型组、溶媒+电针组、抑制剂+电针组,每组8只。

1.4 干预方法

电针干预:多次电针组、溶媒+电针组、抑制剂+电针组造模第2天开始给予小鼠左侧“足三里”和“上巨虚”电针干预。小鼠穴位定位参考《实验动物常用穴位名称与定位》^[14],并结合解剖学进行穴位

定位。“足三里”:膝关节后外侧,在腓骨小头下约2 mm的凹陷处。“上巨虚”：“足三里”直下5 mm。在CFA造模后第2天,将电针处理组小鼠放置于用牛仔布自制的鼠衣内,暴露小鼠的左下肢并固定。取小鼠“足三里”“上巨虚”,选用0.20 mm×13 mm毫针直刺2~3 mm。针柄接韩氏穴位神经刺激仪,选择连续波、频率2 Hz、强度1 mA的电流刺激。每日1次,每次30 min,连续6 d。单次电针组操作参数与多次电针组相同,仅于造模次日行单次电针处理;假电针组仅浅刺皮下,不接入电针仪器。对照组小鼠和模型组小鼠在电针组小鼠电针处理期间,以相同方法放置于牛仔布中固定,但不进行任何处理。

抑制剂和溶媒注射:溶媒+电针组、抑制剂+电针组每日电针开始前30 min,抑制剂+电针组按20 mg/kg剂量腹腔注射Compound C,溶媒组同期注射等量对应溶剂。

1.5 观察指标和检测方法

机械痛阈值的测定:采用von Frey丝以“up and down”方法^[15]测定小鼠机械痛阈。在室温25~27 °C的安静环境中,采用双盲实验方法,将小鼠置于底为5 mm×5 mm的金属丝网眼垫的透明有机玻璃箱中,适应30 min,等其安静后测定机械痛阈。将校准的von Frey丝垂直地作用于小鼠左后肢足底,稍用力,直至其弯曲成S形,每次持续时间最长不超过6 s,小鼠出现足掌快速撤退或缩爪等行为可判断为阳性反应。每次测试重复2次,计算平均值。造模前所有小鼠连续测定3 d基础痛阈,造模后连续测6 d。

热痛阈值的测定:采用热板法,在室温为25~27 °C的安静环境中,将小鼠置于53 °C热板,观察爪部反应并计时。小鼠抬爪或甩爪时,停止计时,该时间段为热痛潜伏期。为避免组织损伤,热板测试仅持续20 s^[16]。每只小鼠的热痛潜伏期取3次热痛阈值实验的平均值,每次实验间隔5 min。

Western blot法检测脊髓背角AMPK、p-AMPK蛋白表达:最后一次电针结束后,小鼠使用1%戊巴比妥钠,按小鼠体质量以50 mg/kg腹腔注射,小鼠在麻醉状态下取各组小鼠腰段和胸段脊髓背角组织,经称量、按比例加混合裂解液,剪碎研磨、冰浴裂解及离心取上清以提取蛋白;接着用BCA试剂盒检测蛋白浓度,随后制备SDS-PAGE凝胶,将蛋白样品加缓冲液变性后上样,经电泳分离;再激活PVDF膜,配制转膜液,按特定步骤转膜;之后用1×TBST配制封闭液封闭膜,再依次孵育特异性一

抗[p-AMPK (Thr172) 1:1 000, AMPK 1:1 000, β -actin 1:1 000, c-Fos 1:2 000], 4 °C 过夜, TBST 清洗膜;再孵育相应种属的 HRP 标记二抗(1:20 000), 室温下 1 h, TBST 清洗膜。在暗室用 ECL 化学发光显色液显色 5 min, 压胶片, 取出胶片并依次放入显影液、定影液中显影。将胶片洗净晾干后扫描并分析。用 Image J 软件分析条带灰度值, 将目的蛋白与内参蛋白条带灰度值的比值作为量化指标。

免疫荧光染色检测脊髓背角 c-Fos 表达: 最后一次电针结束后, 用 1% 戊巴比妥钠麻醉小鼠, 经心脏灌流(先灌 0.9% 的氯化钠溶液至液清, 再灌冰冷多聚甲醛溶液), 取相应组别的腰段或者胸段脊髓固定、PBS 漂洗, 经 20%、30% 蔗糖梯度脱水后, 用 OCT 包埋并速冻, 切 20 μ m 切片贴于载玻片, 晾干后 -20 °C 保存; 染色时, 切片复温后 PBS 洗涤, 用含 0.3% Triton X-100 的驴血清封闭 1 h, 随后 4 °C 孵育稀释的 c-Fos 一抗(1:2 000) 过夜, 次日 PBS 洗涤后, 37 °C 孵育稀释的荧光二抗 anti-rabbit Dylight 594 (1:600) 1 h, 接着避光用 DAPI 染核 5 min, PBS 洗涤后封片, 最后用荧光显微镜在 1 h 内或 4 °C 下 4 h 内拍照。每组取 3 只动物, 每只动物取 2 个切片分析阳性表达细胞数。

1.6 统计学方法

数据分析和处理通过 GraphPad Prism 8.2 软件完成。绘图用 Adobe Illustrator CC 2020 软件。所有数据以均数 \pm 标准误($\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$)表示。行为学采用双因素重复测量方差分析检验组别 \times 时间对机械痛阈值及热痛潜伏期的影响, 事后两两比较采用 Bonferroni 校正。文中 Western blot 和免疫荧光染色的 $n=3$ 为生物学重复(来自 3 只独立动物/3 次独立实验)。因样本量较小, 不满足参数检验的前提假设, 故采用非参数检验。多组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验, 差异有统计学意义时采用 Dunnett's 事后检验。两组间比较采用 Mann-Whitney U 检验。以 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 单次与多次电针对炎性痛的镇痛效应

疼痛行为学结果显示, CFA 诱导的炎性痛模型成功建立, 表现为与对照组相比, 模型组小鼠机械痛阈值和热痛潜伏期均显著降低($P<0.05$), 且各组基线痛敏程度一致。单次电针干预在造模后当天即显示出显著的镇痛效果, 与模型组相比, 单次电

针组小鼠电针后 1、2、4 h 的机械痛阈值和热痛潜伏期显著升高($P<0.05$); 与单次电针组相比, 假电针组机械痛阈值和热痛潜伏期阈值差异无统计学意义。多次电针干预在造模后第 7 天表现出更强的镇痛作用, 与模型组相比, 多次电针组电针后 2~7 d 的机械痛阈值和热痛潜伏期显著升高($P<0.05$); 与多次电针组相比, 假电针组机械痛阈值和热痛潜伏期阈值差异无统计学意义。见图 1。

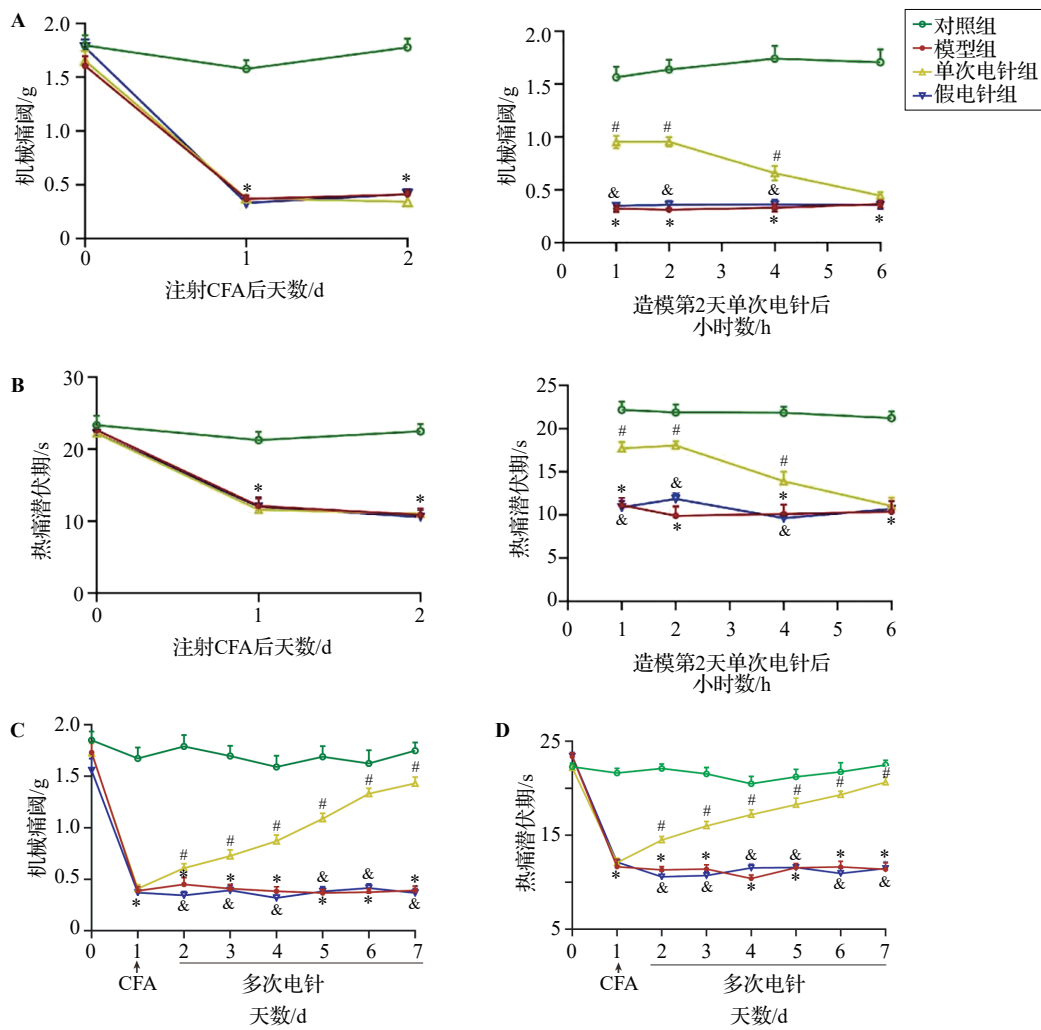
2.2 单次与多次电针对脊髓背角 AMPK 活化的作用

为了探究 AMPK 信号通路在电针镇痛效应中的作用机制, 我们检测了脊髓背角 AMPK 的活化水平。Western blot 结果显示, 在单次电针干预后, 各组的腰段脊髓背角 p-AMPK/AMPK 蛋白表达比值差异无统计学意义。在多次电针干预后, 与对照组相比, 模型组腰段脊髓背角 p-AMPK/AMPK 蛋白表达比值差异无统计学意义; 与模型组相比, 多次电针组腰段脊髓背角 p-AMPK/AMPK 蛋白表达比值显著升高($P<0.05$); 与多次电针组相比, 假电针组腰段脊髓背角 p-AMPK/AMPK 蛋白表达比值明显降低($P<0.05$)。各组小鼠胸段脊髓背角 p-AMPK/AMPK 蛋白表达比值差异无统计学意义。各组小鼠胸段和腰段脊髓背角 AMPK 蛋白表达差异均无统计学意义。见图 2。

2.3 AMPK 抑制剂对电针累积镇痛及 AMPK 活化的影响

疼痛行为学检测显示, 造模后第 1 天, 模型组小鼠的机械痛阈和热痛阈均显著低于对照组($P<0.05$), 证实模型成功建立。在造模第 3~7 天, 与模型组相比, 溶媒+电针组(多次)小鼠的机械痛阈和热痛阈均显著升高($P<0.05$), 而抑制剂+电针组(多次)小鼠的机械痛阈和热痛阈差异无统计学意义。与溶媒+电针组(多次)相比, 造模后第 3~7 天, 抑制剂+电针组(多次)小鼠的机械痛阈和热痛阈均显著降低($P<0.05$)。见图 3。

进一步通过 Western blot 检测造模第 7 天腰段脊髓背角 AMPK 活化状态。结果显示, 与对照组相比, 模型组小鼠腰段脊髓背角 p-AMPK/AMPK 蛋白表达比值差异无统计学意义。与模型组相比, 溶媒+电针组(多次)小鼠 p-AMPK/AMPK 蛋白表达比值显著升高($P<0.05$); 抑制剂+电针组(多次)小鼠 p-AMPK/AMPK 蛋白表达比值差异无统计学意义。与溶媒+电针组(多次)相比, 抑制剂+电针组(多次)的 p-AMPK/AMPK 蛋白表达比值明显降低



注:CFA为完全弗氏佐剂。A、B分别为单次电针治疗后的机械痛阈值和热痛潜伏期;C、D分别为多次电针治疗期间的机械痛阈值和热痛潜伏期。与对照组相比,* $P < 0.05$;与模型组相比,# $P < 0.05$;与电针组相比,& $P < 0.05$ 。

图1 单次电针和多次电针对小鼠疼痛行为学的影响($\bar{x} \pm s_x$, 8只鼠/组)

Fig. 1 Effects of single and repeated electroacupuncture on pain behaviors in mice ($\bar{x} \pm s_x$, 8 mice/group)

($P < 0.05$)。各组间 AMPK 蛋白表达差异无统计学意义。见图 3。

2.4 多次电针抑制腰段脊髓背角 c-Fos 表达依赖 AMPK 活化

Western blot 结果显示,与对照组相比,模型组小鼠患侧腰段脊髓背角 c-Fos 表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。多次电针干预则显著抑制了这种升高,与模型组相比,电针组(多次)c-Fos 表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。与电针组(多次)相比,假电针组 c-Fos 表达显著升高 ($P < 0.05$)。

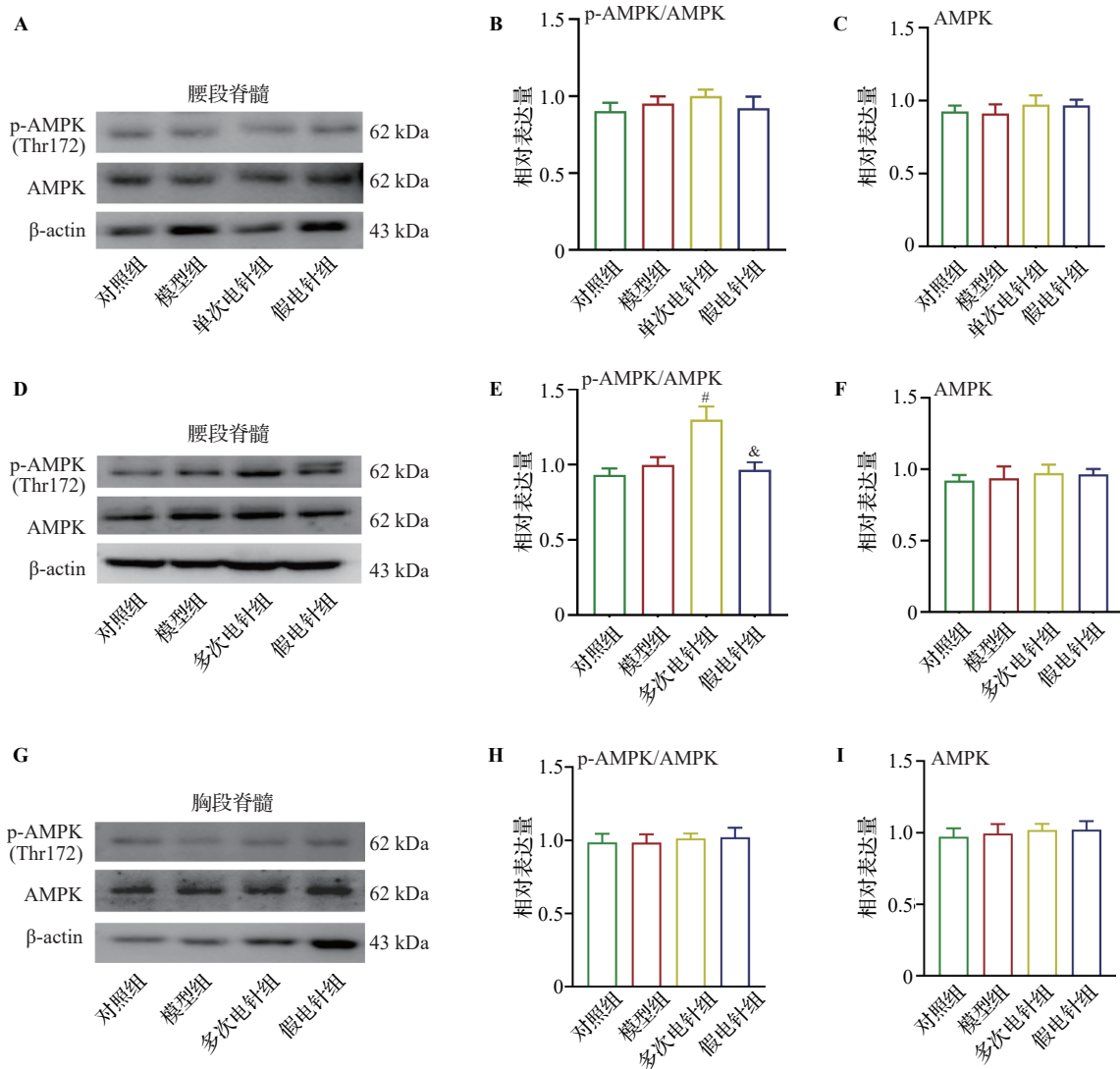
为了阐明 AMPK 在此抑制效应中的作用,我们观察了 AMPK 抑制剂对多次电针效应的影响。与对照组相比,模型组小鼠患侧腰段脊髓背角 c-Fos 表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比,溶媒+电针组腰段脊髓背角 c-Fos 表达显著降低 ($P <$

0.05)。而 AMPK 抑制剂联合多次电针则完全阻断了电针的抑制作用,与溶媒+电针组(多次)比较,抑制剂+电针组(多次)c-Fos 表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。见图 4。

进一步采用免疫荧光染色技术在患侧腰段脊髓背角浅层(I-II板层)的细胞水平验证上述结果。与对照组相比,模型组 c-Fos 阳性神经元数量显著增加 ($P < 0.05$)。与模型组相比,溶媒+电针组(多次)腰段脊髓背角 c-Fos 阳性神经元数量显著减少 ($P < 0.05$)。与溶媒+电针组(多次)相比,抑制剂+电针组腰段脊髓背角 c-Fos 阳性神经元数量显著增加 ($P < 0.05$)。见图 5。

3 讨论

本研究综合运用疼痛行为学、Western blot 及免



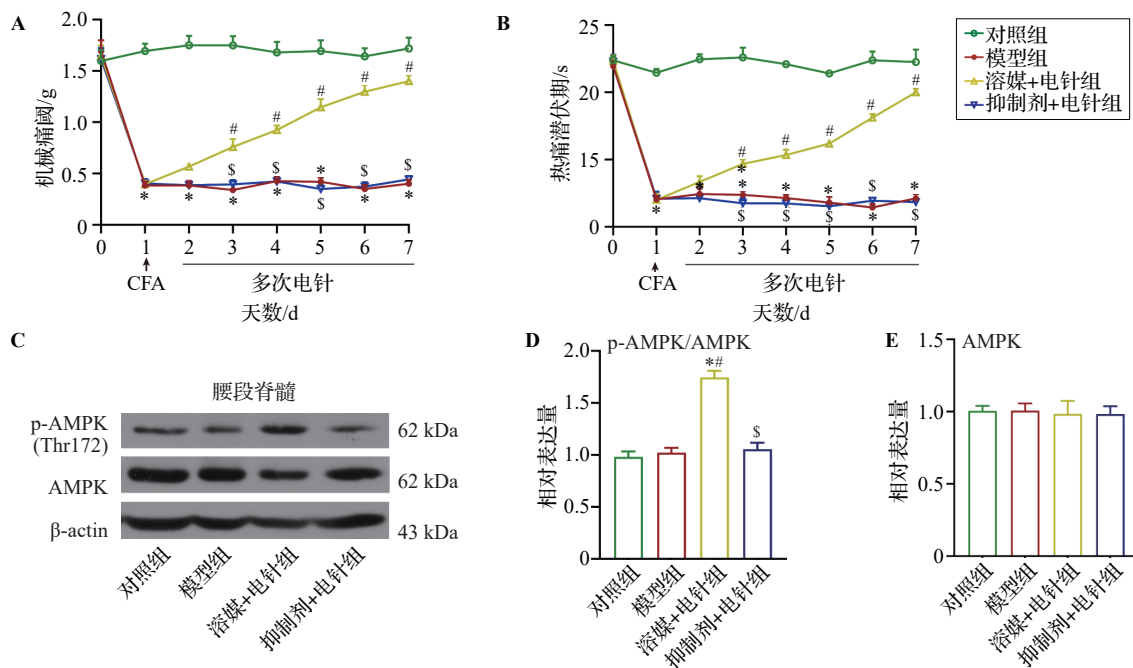
注:AMPK为腺苷酸活化蛋白激酶,p-AMPK为磷酸化的腺苷酸活化蛋白激酶。A、B、C分别为单次电针后各组腰段脊髓背角p-AMPK、AMPK蛋白表达条带图和统计直方图,D、E、F分别为多次电针后腰段脊髓背角p-AMPK、AMPK蛋白表达条带图和统计直方图,G、H、I分别为多次电针后胸段脊髓背角p-AMPK、AMPK蛋白表达的条带图和统计直方图。与对照组相比,^{*} $P<0.05$;与模型组相比,[#] $P<0.05$;与多次电针组相比,[&] $P<0.05$ 。

图2 单次和多次电针对小鼠胸段和腰段脊髓背角AMPK活化水平的影响($\bar{x}\pm s_x$, 3只鼠/组)

Fig. 2 Effects of single and repeated electroacupuncture on AMPK activation level in thoracic and lumbar segment spinal dorsal horn ($\bar{x}\pm s_x$, 3 mice/group)

疫荧光染色等方法,系统探讨了电针干预炎性痛的镇痛效应及其分子机制。疼痛行为学结果显示,CFA诱导的炎性痛模型成功建立,表现为模型组小鼠机械痛阈值和热痛潜伏期均显著降低。单次电针干预在造模后当天即显示出显著的镇痛效果,与模型组相比,其显著升高了小鼠的机械痛阈值和热痛潜伏期,表明单次电针能够产生镇痛即时效应。更为重要的是,连续6 d的多次电针干预在造模后第7天表现出更强的镇痛作用,与模型组相比,其同样显著升高了小鼠的机械痛阈值和热痛潜伏期,提示多次电针能够产生镇痛累积效应。这一结果与

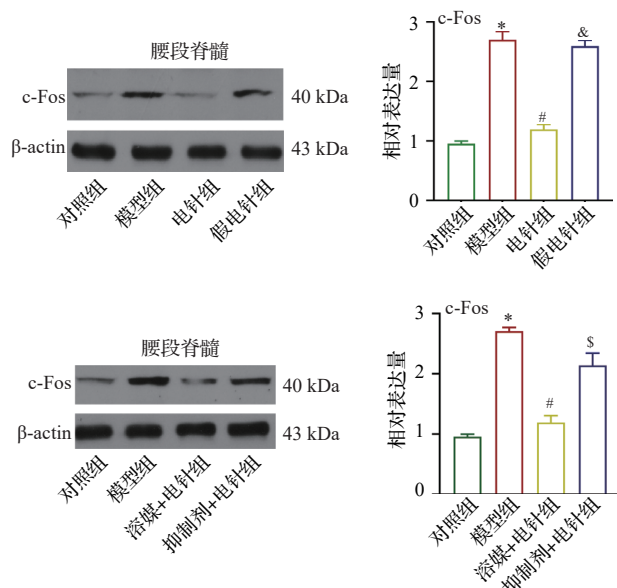
既往临床和基础研究中观察到的“电针镇痛效果随治疗次数增加而增强”的现象高度一致^[17-18]。前期研究表明,单次电针治疗CFA诱导炎性痛的即时效应仅持续4 h^[19],多次电针对炎性痛的镇痛效应可持续24 h,表现出累积效应^[20-21]。从临床转化角度看,这一时效特性具有重要指导价值。单次电针的即时效应适用于快速缓解急性疼痛发作;而多次电针产生的累积效应,则为慢性炎性痛的长期、有效管理提供了极具前景的非药物策略,因此临床中对于针灸治疗的频率(频次)也是针灸疗效的一个关键变量^[22]。临床实践中,针对慢性疼痛患者,可据此设



注:AMPK为腺苷酸活化蛋白激酶,p-AMPK为磷酸化的腺苷酸活化蛋白激酶。A、B分别为患侧机械痛阈和热痛潜伏期(8只鼠/组),C~E为各组小鼠腰段脊髓背角p-AMPK、AMPK蛋白表达条带图和统计直方图(3只鼠/组)。与对照组相比,^{*} $P < 0.05$;与模型组相比,[#] $P < 0.05$;与溶媒+电针组相比,^S $P < 0.05$ 。

图3 AMPK抑制剂可翻转电针镇痛和激活腰段脊髓背角AMPK的作用($\bar{x} \pm s_x$)

Fig. 3 The AMPK inhibitor can reverse the analgesic effect of electroacupuncture and the activation of AMPK in the lumbar spinal dorsal horn ($\bar{x} \pm s_x$)



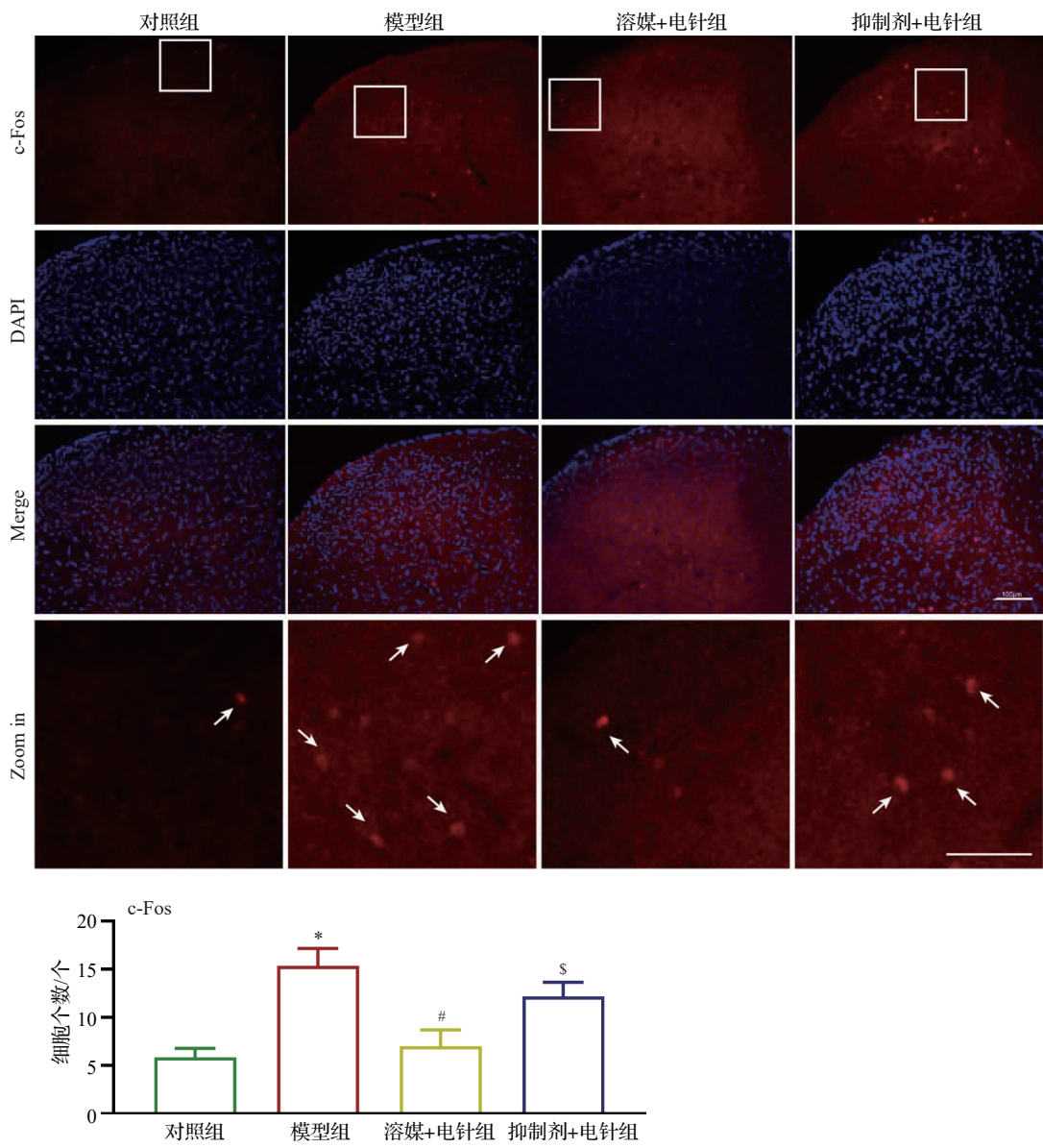
注:c-Fos为细胞Fos原癌基因。与对照组相比,^{*} $P < 0.05$;与模型组相比,[#] $P < 0.05$;与溶媒+电针组相比,^S $P < 0.05$ 。

图4 各组小鼠腰段脊髓背角c-Fos表达比较($\bar{x} \pm s_x$, 3只鼠/组)

Fig. 4 Comparison of c-Fos expression in the lumbar spinal dorsal horn of mice in the 4 groups ($\bar{x} \pm s_x$, 3 mice/group)

计规律的多疗程电针方案,以维持稳定、持久的镇痛效果。

AMPK作为细胞能量稳态的核心调控因子(“主开关”),在神经系统中广泛表达,并参与调控多种与疼痛发生发展密切相关的病理生理过程。近年来研究日益关注其在疼痛调控中的角色,提示AMPK可能通过调节初级传入神经元或脊髓神经元的兴奋性等多种途径参与疼痛缓解^[23-25]。本课题组前期研究结果表明:单次电针后1~4h虽然能发挥即时镇痛效应,但不能激活皮肤水平的AMPK,而多次电针可通过激活AMPK,发挥镇痛作用^[10],这和以往的研究结果相一致^[26-28]。为探究AMPK信号通路在电针镇痛效应中的作用机制,本研究采用Western blot法检测脊髓背角AMPK的活化水平。结果显示,单次电针干预后,各组小鼠的腰段脊髓背角AMPK活化水平均未发生显著变化,表明单次电针产生的即时镇痛效应并不依赖于脊髓背角AMPK的激活。然而,多次电针治疗后炎性痛模型小鼠腰段脊髓背角的AMPK活化水平显著升高,且抑制AMPK后电针的作用被削弱,而健侧胸段(病灶异节段)脊髓背角的AMPK未见激活。这些结果共同表明,多次电针在发挥镇痛累积效应的过程



注:c-Fos为细胞Fos原癌基因。上3排标尺为50 μm,最下排为框选处放大图,标尺=10 μm。箭头示阳性表达。与对照组相比,* $P < 0.05$;与模型组相比,# $P < 0.05$;与溶媒+电针组相比,§ $P < 0.05$ 。

图5 各组小鼠腰段脊髓背角c-Fos表达比较(免疫荧光染色, $\bar{x} \pm s_x$, 3只鼠/组)

Fig. 5 Comparison of c-Fos expression in lumbar spinal dorsal horn of mice in the 4 groups (immunofluorescence staining, $\bar{x} \pm s_x$, 3 mice/group)

中,特异性地激活了同节段(腰段)脊髓背角的AMPK信号通路,而不能激活异节段(即胸段)脊髓的AMPK。

c-Fos作为神经元活动高度敏感的分子标记,其表达水平是反映神经元群体兴奋状态的可靠指标^[29-30]。本研究进一步观察了多次电针对腰段脊髓背角c-Fos表达的影响。Western blot结果显示,慢性炎性痛模型小鼠腰段脊髓背角c-Fos表达显著升高,提示痛觉传导通路中神经元的过度激活。多次电针干预显著抑制了腰段脊髓背角c-Fos表达水平

的升高,这表明多次电针能够有效抑制同节段脊髓背角神经元的兴奋性。在使用AMPK抑制剂Compound C后,电针对c-Fos的抑制作用完全被阻断,提示电针抑制脊髓背角c-Fos表达的作用依赖AMPK的活化。进一步采用免疫荧光染色在患侧腰段脊髓背角浅层(I-II板层)细胞水平验证上述结果,免疫荧光结果在细胞水平进一步证实了Western blot的结果,即多次电针显著抑制脊髓背角浅层神经元的激活(c-Fos表达减少),且该效应可被AMPK抑制剂Compound C所逆转。需要指出的

是,Compound C虽然被广泛用作 AMPK 抑制剂,但其特异性存在局限性。既往研究表明,高浓度(通常 $>10 \mu\text{mol/L}$)下,Compound C 可显著脱靶抑制多种激酶,包括 Yes 相关蛋白(YAP)的磷酸化过程^[31]、骨形成蛋白信号通路^[32]及线粒体复合物^[33]等,从而可能以非 AMPK 依赖的方式影响细胞代谢、自噬及存活。既往多数研究将 Compound C 作为工具药验证 AMPK 通路功能,如阻断秋葵果胶分离纯化提取物 OP-1 的抗脂毒性^[34]、逆转电针镇痛效应^[10]、抑制 gastrodin 肝保护作用^[35]等。为了尽可能规避脱靶效应带来的假阳性结果,本研究参考上述文献,控制实验中使用的 Compound C 剂量为 20 mg/kg,浓度 $5 \mu\text{mol/L}$ 。因此,尽管 Compound C 存在固有的脱靶风险,本研究的主要结论——多次电针显著抑制脊髓背角浅层神经元的激活(c-Fos 表达减少),且该效应可被 Compound C 所逆转,仍是可靠的,其并非单纯由 Compound C 的非特异性效应所致。

基于上述结果,我们提出“AMPK-c-Fos 信号轴”是介导电针累积镇痛效应的核心通路:多次电针刺刺激通过特异性激活同节段脊髓背角的 AMPK,进而抑制该区域痛觉相关神经元的过度兴奋(表现为 c-Fos 表达降低),最终削弱痛觉信号向高级中枢的传递,产生累积镇痛效果。本研究揭示了靶向脊髓背角 AMPK 通路的多次电针干预策略在调控慢性疼痛中的核心机制。其独特的累积效应特性,不仅为深入理解传统医学疗法的现代生物学基础提供了重要依据,也为开发更高效、持久且避免药物不良反应的非药物疼痛管理方案开辟了新思路。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。作者景向红、李嫒为本刊编委,但未参与本文的审理。

参考文献

- [1] TREEDE R D, RIEF W, BARKE A, et al. Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11) [J]. *Pain*, 2019, 160(1): 19-27.
- [2] LIU S B, WANG Z F, SU Y S, et al. A neuroanatomical basis for electroacupuncture to drive the vagal-adrenal axis[J]. *Nature*, 2021, 598(7882): 641-645.
- [3] XU Q L, LIU T, CHEN S P, et al. The cumulative analgesic effect of repeated electroacupuncture involves synaptic remodeling in the hippocampal CA3 region [J]. *Neural Regen Res*, 2012, 7(18): 1378-1385.
- [4] ZHANG R X, LAO L X, REN K, et al. Mechanisms of acupuncture-electroacupuncture on persistent pain [J]. *Anesthesiology*, 2014, 120(2): 482-503.
- [5] 张可,李元亨,王随曦,等. AMPK 参与调控疼痛机制的研究进展[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2023, 29(1): 6-11.
- [6] ZHANG K, LI Y H, WANG S X, et al. Research progress of AMPK in regulating pain mechanism (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Pain Medicine*, 2023, 29(1): 6-11.
- [7] YE G Y, LIN C Y, ZHANG Y, et al. Quercetin alleviates neuropathic pain in the rat CCI model by mediating AMPK/MAPK pathway[J]. *J Pain Res*, 2021, 14: 1289-1301.
- [8] MAIXNER D W, YAN X S, GAO M, et al. Adenosine monophosphate-activated protein kinase regulates interleukin-1 β expression and glial glutamate transporter function in rodents with neuropathic pain[J]. *Anesthesiology*, 2015, 122(6): 1401-1413.
- [9] TAN X, WANG D N, LU P, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells alleviate stress-induced hyperalgesia via restoring gut microbiota and inhibiting neuroinflammation in the spinal cord by targeting the AMPK/NF- κ B signaling pathway[J]. *Life Sci*, 2023, 314: 121318.
- [10] LU G S, XIAO S B, MENG F C, et al. AMPK activation attenuates central sensitization in a recurrent nitroglycerin-induced chronic migraine mouse model by promoting microglial M2-type polarization [J]. *J Headache Pain*, 2024, 25(1): 29.
- [11] LAN Y Y, JING X H, ZHOU Z Y, et al. Electroacupuncture ameliorates inflammatory pain through CB2 receptor-dependent activation of the AMPK signaling pathway [J]. *Chin Med*, 2024, 19(1): 176.
- [12] NING Z P, GU P, ZHANG J L, et al. Adiponectin regulates electroacupuncture-produced analgesic effects in association with a crosstalk between the peripheral circulation and the spinal cord[J]. *Brain Behav Immun*, 2022, 99: 43-52.
- [13] MLOST J, BRYK M, STAROWICZ K. Cannabidiol for pain treatment: focus on pharmacology and mechanism of action[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(22): 8870.
- [14] XIANG H C, LIN L X, HU X F, et al. AMPK activation attenuates inflammatory pain through inhibiting NF- κ B activation and IL-1 β expression [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 34.
- [15] 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位第3部分: 小鼠[J]. *针刺研究*, 2021, 46(5): 445-446.
- [16] China Association of Acupuncture and Moxibustion. Nomenclature and location of commonly used acupoints in experimental animals. Part 3: mice (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2021, 46(4): 445-446.
- [17] CHAPLAN S R, BACH F W, POGREL J W, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. *J Neurosci Meth*, 1994, 53(1): 55-63.
- [18] MECCA C M, CHAO D M, YU G L, et al. Dynamic change of endocannabinoid signaling in the medial prefrontal cortex controls the development of depression after neuropathic pain[J]. *J Neurosci*, 2021, 41(35): 7492-7508.
- [19] LI R R, SUN J, LUO K T, et al. Electroacupuncture and carbamazepine for patients with trigeminal neuralgia: a randomized, controlled, 2 \times 2 factorial trial [J]. *J Neurol*,

- 2024, 271(8): 5122-5136.
- [18] XIANG X E, WANG S S, SHAO F B, et al. Electroacupuncture stimulation alleviates CFA-induced inflammatory pain *via* suppressing P2X3 expression[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(13): 3248.
- [19] 闫娅霞, 冯秀梅, 王俊英, 等. 电针对慢性痛大鼠痛感觉和情绪成分相关杏仁核内 μ -阿片受体等蛋白表达的影响[J]. *针刺研究*, 2016, 41(1): 3-10.
- YAN Y X, FENG X M, WANG J Y, et al. Effect of electroacupuncture intervention on expression of pain sensory and affective processing-related μ -opioid receptor, etc. in the amygdala in chronic neuropathy pain rats (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2016, 41(1): 3-10.
- [20] GAO F, XIANG H C, LI H P, et al. Electroacupuncture inhibits NLRP3 inflammasome activation through CB2 receptors in inflammatory pain [J]. *Brain Behav Immun*, 2018, 67: 91-100.
- [21] MA Q F, ZHOU Y H, CHEN L, et al. Electroacupuncture activates CB1 receptors to inhibit GABAergic neurons in the RVM and alleviate inflammatory pain [J]. *Nat Neurosci*, 2021, 24(7): 1001-1012.
- [22] 针灸科学研究联盟. 针灸科学研究行动计划[J]. *针刺研究*, 2025, 50(1): 1-2.
- Acupuncture Scientific Research Alliance. A plan for acupuncture-moxibustion scientific research (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2025, 50(1): 1-2.
- [23] SUN J, SONG F H, WU J Y, et al. Sestrin2 overexpression attenuates osteoarthritis pain *via* induction of AMPK/PGC-1 α -mediated mitochondrial biogenesis and suppression of neuroinflammation [J]. *Brain Behav Immun*, 2022, 102: 53-70.
- [24] LI F, LI D S, LIU J G, et al. Activation of protease-activated receptor-1 causes chronic pain in lupus-prone mice *via* suppressing spinal glial glutamate transporter function and enhancing glutamatergic synaptic activity[J]. *J Pain*, 2023, 24(7): 1163-1180.
- [25] ZHANG Y, TAO G J, HU L, et al. Lidocaine alleviates morphine tolerance *via* AMPK-SOCS3-dependent neuroinflammation suppression in the spinal cord [J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1): 211.
- [26] HOU Y, GUO X C, RAN J H, et al. Conductive polyphenol microneedles coupled with electroacupuncture to accelerate wound healing and alleviate depressive-like behaviors in diabetes[J]. *Bioact Mater*, 2025, 44: 516-530.
- [27] CHEN Z H, YAO K F, WANG X R, et al. Acupuncture promotes muscle cells ATP metabolism in ST36 acupoint local exerting effect by activating TRPV1/CaMKII/AMPK/PGC1 α signaling pathway[J]. *Chin Med*, 2025, 20(1): 112.
- [28] ZHANG Y, WANG X Y, ZHOU J, et al. Electroacupuncture attenuates CFA-induced inflammatory pain *via* P2X3 receptor-mediated purinergic signaling [J]. *Inflamm Res*, 2023, 72(5): 1023-1037.
- [29] ZHAO P, WAXMAN S G, HAINS B C. Modulation of thalamic nociceptive processing after spinal cord injury through remote activation of thalamic microglia by cysteine cysteine chemokine ligand 21 [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(33): 8893-8902.
- [30] CAMPEAU S, FALLS W A, CULLINAN W E, et al. Elicitation and reduction of fear: behavioural and neuroendocrine indices and brain induction of the immediate-early gene *c-fos* [J]. *Neuroscience*, 1997, 78(4): 1087-1104.
- [31] PARK H, CHOI S, LEE H, et al. Compound C exerts a therapeutic effect on Graves' orbitopathy *via* AMPK-independent pathways[J]. *Int J Mol Med*, 2025, 55(5): 1-13.
- [32] MANOKAWINCHOKE J, WATCHARAWIPAS T, EKMETIPUNTH K, et al. Dorsomorphin attenuates Jagged1-induced mineralization in human dental pulp cells[J]. *Int Endod J*, 2021, 54(12): 2229-2242.
- [33] CAO S T, XIAO H, LI X, et al. AMPK-PINK1/Parkin mediated mitophagy is necessary for alleviating oxidative stress-induced intestinal epithelial barrier damage and mitochondrial energy metabolism dysfunction in IPEC-J2[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(12): 2010.
- [34] LIAO Z Z, LI Y H, LIAO L H, et al. Structural characterization and anti-lipototoxicity effects of a pectin from okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 238: 124111.
- [35] WAN J, ZHANG Y Y, YANG D Q, et al. Gastrodin improves nonalcoholic fatty liver disease through activation of the adenosine monophosphate-activated protein kinase signaling pathway[J]. *Hepatology*, 2021, 74(6): 3074-3090.

收稿日期:2026-01-29 修回日期:2026-04-11