

☆ XXXX ☆

“调气”电针通过激活 AKT/GSK-3 β /Nrf2 通路抑制氧化应激及铁死亡缓解神经根型颈椎病大鼠的神经性疼痛

黄心雨¹, 粟胜勇^{2,3}, 黄文静¹, 郑广玫¹, 李欣¹⁽¹⁾广西中医药大学, 南宁 530001; ⁽²⁾广西中医药防治医学分子生物重点实验室, 南宁 530023;⁽³⁾广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530023)

【摘要】目的:基于蛋白激酶B(AKT)/糖原合成酶激酶3 β (GSK-3 β)/核因子相关因子2(Nrf2)信号通路探讨“调气”电针对神经根型颈椎病(CSR)的影响,探讨其可能的作用机制。**方法:**雄性SD大鼠随机分为空白组、模型组和电针组,每组10只。采用颈椎椎管插线法建立CSR大鼠模型。造模成功后第7天电针组予大鼠双侧“合谷”“太冲”电针20 min,1次/d,连续7 d。观察干预前后各组大鼠的步态评分、热刺激缩足反应潜伏期,VonFrey测痛仪测量各组大鼠的痛阈值;HE染色法观察大鼠脊髓组织病理形态变化;ELISA法检测大鼠脊髓组织中白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、超氧化物歧化酶(SOD)含量;微量法检测大鼠脊髓组织中丙二醛(MDA)、亚铁离子(Fe²⁺)含量;用DCFH-DA探针检测大鼠脊髓组织中活性氧(ROS)相对强度;Western blot法检测大鼠脊髓中磷酸化(p)-AKT/AKT、p-GSK-3 β /GSK-3 β 蛋白表达比值及Nrf2、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX4)、铁蛋白重链(FTH1)蛋白表达水平。**结果:**与空白组比较,模型组大鼠机械痛阈值降低,热刺激缩足反应潜伏期缩短,步态评分升高($P<0.01$),脊髓组织中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、MDA、Fe²⁺含量和ROS相对强度均升高($P<0.01$),脊髓组织中SOD含量、p-AKT/AKT、p-GSK-3 β /GSK-3 β 比值及Nrf2、FTH1、GPX4蛋白表达水平降低($P<0.01$)。与模型组比较,电针组大鼠上述指标均逆转($P<0.01$, $P<0.05$)。**结论:**“调气”电针可能通过调节神经根型颈椎病大鼠脊髓组织内AKT/GSK-3 β /Nrf2信号通路,减轻氧化应激损伤,抑制铁死亡,减轻受损神经组织炎症反应,从而达到缓解神经根型颈椎病疼痛的作用。

【关键词】 神经根型颈椎病;电针;氧化应激;铁死亡;炎症细胞因子;蛋白激酶B/糖原合成酶激酶3 β /核因子相关因子2信号通路

Effect of “*qi*-regulating” electroacupuncture on neuropathic pain in rats with cervical spondylotic radiculopathy by inhibiting oxidative stress and ferroptosis via activating AKT/GSK-3 β /Nrf2 pathway

Huang Xinyu¹, Su Shengyong^{2,3}, Huang Wenjing¹, Zheng Guangmei¹, Li Xin¹ (¹Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China; ²Guangxi Key Laboratory of Molecular Biology for Preventive and Therapeutic Medicine of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530023; ³The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023)

【ABSTRACT】 Objective To explore the effect of “*qi*-regulating” electroacupuncture on rats with cervical spondylotic radiculopathy (CSR) based on the protein kinase B (AKT)/glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β)/nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) signaling pathway, and to clarify its potential mechanism. **Methods** Male SD

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20251166

引用格式:黄心雨,粟胜勇,黄文静,等.“调气”电针通过激活 AKT/GSK-3 β /Nrf2 通路抑制氧化应激及铁死亡缓解神经根型颈椎病大鼠的神经性疼痛[J].针刺研究,XXXX,XX(X):1-9.

项目来源:国家自然科学基金(No.82160934);国家中医药管理局高水平重点学科建设项目(No.zyyzdxk-2023167);广西中医药大学桂派杏林拔尖人才项目(No.2022C017);广西中医药大学全国名中医黄鼎坚学术思想与临床诊疗传承发展推广中心项目(No.2022V005)

通信作者:粟胜勇,E-mail:1037097555@qq.com

rats were randomly divided into blank group, model group and electroacupuncture group, with 10 rats in each group. The CSR rat model was established by intraspinal catheter insertion into cervical vertebral canal. Starting on the 7th day after successful model establishment, rats in the electroacupuncture group received electroacupuncture at bilateral “Hegu” (LI4) and “Taichong” (LR3) for 20 min once a day for 7 consecutive days. Gait score, thermal withdrawal latency and mechanical pain threshold measured by Von Frey anesthesiometer were observed before and after intervention. HE staining was adopted to observe the pathological morphological changes of spinal cord tissue. ELISA was used to detect the contents of interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and superoxide dismutase (SOD) in spinal cord tissue. Microassay method was used to detect the contents of malondialdehyde (MDA) and ferrous ion (Fe²⁺). DCFH-DA fluorescent probe was applied to detect the level of reactive oxygen species (ROS) in spinal cord tissue. Western blot was used to detect the ratios of phosphorylated (p)-AKT/AKT and p-GSK-3 β /GSK-3 β protein expression as well as the protein expression levels of Nrf2, glutathione peroxidase 4 (GPX4) and ferritin heavy chain 1 (FTH1) in spinal cord tissue. **Results** Compared with the blank group, the model group showed decreased mechanical pain threshold, shortened thermal withdrawal latency and elevated gait score ($P<0.01$). The contents of TNF- α , IL-1 β , IL-6, MDA, Fe²⁺ and ROS level in spinal cord tissue were significantly increased ($P<0.01$), while the content of SOD, the ratios of p-AKT/AKT and p-GSK-3 β /GSK-3 β , as well as the protein expression levels of Nrf2, FTH1 and GPX4 were remarkably decreased ($P<0.01$). All above indexes were reversed in the electroacupuncture group compared with the model group ($P<0.01$, $P<0.05$). **Conclusion** “qi-regulating” electroacupuncture can alleviate pain in rats with cervical spondylotic radiculopathy, which may be realized by regulating the AKT/GSK-3 β /Nrf2 signaling pathway in spinal cord tissue, reducing oxidative stress injury, suppressing ferroptosis and relieving inflammatory response in damaged nerve tissue.

[KEYWORDS] Cervical spondylotic radiculopathy; Electroacupuncture; Oxidative stress; Ferroptosis; Inflammatory cytokines; AKT/GSK-3 β /Nrf2 signaling pathway

神经根型颈椎病(CSR)是颈椎病最常见的类型,其病理基础主要是椎间盘突出、钩椎关节增生、椎间孔狭窄等因素,致使神经根受压并引起的以颈、肩、上肢等颈神经支配区域出现放射性疼痛、麻木等症状^[1-3]。本病所致的根性疼痛属于神经病理性疼痛范畴,疼痛的发生与炎性反应、外周敏化及中枢敏化有关^[4-5]。氧化应激和铁死亡与神经病理性疼痛的发生发展密切相关^[6-8]。脊髓神经根受压后大量促炎因子释放,不仅可以间接诱发中枢敏化,还能直接引发氧化应激,进一步诱导细胞内铁离子异常积累,破坏抗氧化防御系统致使脂质过氧化物大量积聚,加速铁死亡进程,加剧神经炎性反应,维持痛敏状态^[9]。蛋白激酶B(AKT)/糖原合成酶激酶3 β (GSK-3 β)/核因子相关因子2(Nrf2)作为重要的抗氧化、抗铁死亡信号通路,常态下可通过稳定细胞氧化还原状态和抑制脂质过氧化,有效维持神经元的存活和功能^[10-11],但无菌性炎性环境可通过抑制AKT信号通路活化,进而解除对GSK-3 β 的抑制作用,过度活化的GSK-3 β 又促进Nrf2的泛素化降解,最终触发氧化应激-铁死亡的恶性循环,加剧炎性反应,增强神经元兴奋性,加强疼痛信号传导,促使痛觉敏化^[12-13]。

课题组前期研究^[14-16]结果表明,电针可通过抑

制神经炎性反应、中枢敏化,调节神经细胞自噬、神经元突触超微结构等显著改善大鼠神经病理性疼痛症状,电针镇痛效应显著。然而,电针能否通过调控AKT/GSK-3 β /Nrf2信号通路抑制氧化应激与铁死亡从而治疗CSR,目前研究尚少。因此,本研究观察电针对CSR大鼠行为学变化、氧化应激相关指标、铁死亡标志物及相关信号通路激活的影响,探讨电针对CSR的镇痛机制,为本疗法的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

2~3月龄SPF级成年雄性SD大鼠30只,体重(250 $\pm$ 20)g,购自长沙市天勤生物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(湘)2019-0014,实验动物使用许可证编号:SYXK(桂)2024-0004。大鼠饲养于广西中医药大学第一附属医院动物房(清洁级),温度、湿度控制在(22 $\pm$ 2)℃、(54 $\pm$ 2)%,自然光照明,不限制饮水、摄食。大鼠按照随机数字表法均分为空白组、模型组、电针组,每组10只。实验的各项处理均根据《实验动物管理条例》执行,遵守实验动物管理及伦理委员会相关规定。本实验经过广西中医药大学伦理委员会审核,批准编号:

DW20220430-075。

1.2 主要试剂及仪器

苏木精染液、伊红染色液(南昌雨露),超氧化物歧化酶(SOD)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)ELISA试剂盒(武汉贝茵莱),RIPA裂解液、BCA蛋白定量试剂盒、丙二醛(MDA)及亚铁离子(Fe²⁺)含量检测试剂盒(北京索莱宝),组织活性氧(ROS)检测试剂盒(上海贝博),AKT、磷酸化(p)-AKT、Nrf2、GPX4抗体及山羊抗兔二抗(武汉Servicebio),GSK-3 β 抗体、p-GSK-3 β 抗体(美国Affinity),铁蛋白重链(FTH1)抗体(武汉贝茵莱),ECL发光液、GAPDH抗体(北京Biosharp)。

华佗牌无菌针灸针(0.25 mm $\times$ 13 mm,苏州医疗用品厂),电针仪(青岛鑫升),VonFrey测痛仪(北京众实迪创),热板装置(美国ITC Life Science),酶标分析仪(南京德铁),高速低温组织研磨仪(武汉Servicebio),低温离心机(德国Eppendorf),荧光酶标仪(美国Perkin Elmer),电泳仪、转膜仪(美国Bio-Rad),成像系统(上海天能),切片机(上海徠卡),显微镜(日本奥林巴斯)。

1.3 造模方法及造模评估

造模方法参考文献[17],大鼠禁食不禁水12 h后麻醉,取俯卧位固定,剃毛备皮充分暴露颈部,常规消毒后,手触颈部最高棘突为胸(T)2,由此向上于背部正中做3 cm纵向切口,钝性分离皮下组织、颈后部肌群,充分暴露颈(C)6~T2左侧椎弓,刮净其表面组织,用显微镊轻挑开C₇和T₁,C₆和C₇椎间隙的黄韧带和结缔组织,用尖嘴蚊式钳轻轻钳开C₇左侧椎弓,暴露脊髓,再用显微外科镊将乙醇浸泡后的尼龙渔线(约1.5 cm长,直径0.5 mm)轻轻沿脊髓纵轴放至C6~C7、T1神经根下。逐层缝合伤口,局部涂抹青霉素溶液抗感染。造模后第2天上午观察大鼠有无舔咬、嘶叫等行为,结合Kawakami法^[18]评估大鼠肢体疼痛挛缩引起的步态障碍。1分:左侧前足无畸形,步态正常;2分:左侧前足内收蜷缩畸形,轻微持重或不能持重、行走时跛行;3分:显著的左侧前足内收蜷缩畸形,抬起、走动时不着台面。步态评分2~3分为造模成功。

1.4 干预方法

空白组正常饲养,不做任何处理。模型组仅行抓取固定20 min,不做针刺干预。电针组于造模成功后第7天开始电针干预,参照《实验动物常用穴位名称与定位 第2部分:大鼠》^[19]选取穴位。大鼠经异氟烷吸入诱导麻醉后,俯卧位固定,经面罩持续吸

入异氟烷持续麻醉,全程监护麻醉深度与体温,用0.25 mm $\times$ 13 mm不锈钢毫针分别刺入大鼠双侧“合谷”“太冲”,同侧两个穴位连接电针仪的一对电极,给予强度约1 mA的连续波电刺激,频率1.5 Hz,以大鼠四肢轻度抖动为度,每次20 min,1次/d,连续治疗7 d。

1.5 观察指标及检测方法

步态评分:参考Kawakami法^[18],分别于大鼠造模后第7天及干预结束后,评估各组大鼠因疼痛挛缩引起的步态障碍。

机械痛阈值测定:参考文献[20]方法,分别于大鼠造模后第7天、干预结束后测定各组大鼠机械痛阈值。将大鼠放置于底部为网格的特制有机玻璃隔箱内适应20 min左右,使大鼠适应环境,不出现四肢频繁活动。取一系列Von Frey纤维丝,从2.0 g力度开始按照“Up and Down”法对大鼠左侧前肢足底中部皮肤进行刺激,纤维丝需弯曲至“C”或“S”形并维持6~8 s,观察缩足反应;阴性反应为“○”,阳性反应为“×”;参照动物50%缩足阈值公式计算机机械痛阈值,50%机械痛阈值=10log(x)+k δ ,式中x为最后刺激使用的力度,k为不同刺激方式的系数, δ 指各刺激力度log值的方差。

热刺激缩足反应潜伏期的测定:参考文献[21]的方法,分别于大鼠造模后第7天、干预结束后采用热板装置进行测定。将热板温度设置为50℃,如果大鼠展现出快速缩足、扬足或舔足的反应,则应立即停止测试,并记录测试的持续时间。每隔5 min测量1次,重复测量3次,取3次的平均值。

取材:各组大鼠于最后1次行为学测定后进行取材,予2%戊巴比妥钠溶液(0.2 mL/100 g)腹腔注射充分麻醉后切开胸腔暴露心脏,通过心脏灌注0.9%氯化钠溶液后于冰盘上将C6~T1段脊髓组织迅速取出。取每组3只大鼠的脊髓组织浸泡于4%多聚甲醛溶液中固定,用于HE染色;其余大鼠脊髓组织液氮速冻后置于-80℃冰箱保存,用于其余检测。

HE染色法观察大鼠脊髓组织病理形态变化:取固定好的脊髓组织用流水冲洗,依次进行乙醇梯度脱水,石蜡包埋,切片(厚度3 μ m),65℃烤片;脱蜡水化后苏木精染液染色5 min,盐酸乙醇分化,流水冲洗后返蓝,伊红染液染色1~2 min,无水乙醇、透明液透明,中性树胶封片;光学显微镜下观察,选取目标区域采集图像。

ELISA法检测各组大鼠脊髓组织TNF- α 、IL-

IL-6的含量:取每组3只大鼠冻存的脊髓组织,解冻后使用预冷的PBS(0.01 mol/L, pH=7.4)冲洗组织,去除残留血液,称重后将组织剪碎。将剪碎的组织与对应体积的PBS(按1:9的质量体积比)加入玻璃匀浆器中研磨,再于4℃下离心5~10 min,取上清液。按照ELISA试剂盒说明书操作,用酶标仪测定波长450 nm处各孔的吸光度值,绘制标准品曲线后得到回归方程,计算出样本中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的含量。

试剂盒检测大鼠脊髓组织中MDA、ROS、SOD和Fe²⁺水平:取每组3只大鼠脊髓组织匀浆后离心,取上清,严格按照试剂盒说明书步骤,使用微量法检测Fe²⁺、MDA含量。按照ROS测定试剂盒说明书,用DCFH-DA探针检测细胞ROS,并计算相对强度。按照ELISA试剂盒说明书操作,用酶标仪测定波长450 nm处各孔的吸光度值,计算SOD含量。

Western blot法检测大鼠脊髓中p-AKT/AKT、p-GSK-3 β /GSK-3 β 的蛋白表达比值及Nrf2/GPX4、FTH1蛋白表达水平:取每组3只大鼠的脊髓组织100 mg,剪碎后每20 mg样本加入250 μ L裂解液,高速低温下匀浆,离心后取上清,BCA试剂盒测蛋白浓度后配平待测。配胶、上样(每孔上样量蛋白20 μ L)、电泳、转膜,一抗均按1:1 000稀释,GAPDH按1:2 000稀释,4℃摇转过夜,二抗按1:5 000稀释,37℃摇床孵育90 min,电化学发光(ECL)显影,图片采用Image J软件进行图片处理分

析,以GAPDH作为内参。以目的蛋白条带灰度值与内参条带灰度值的比值为目的蛋白的相对表达量。

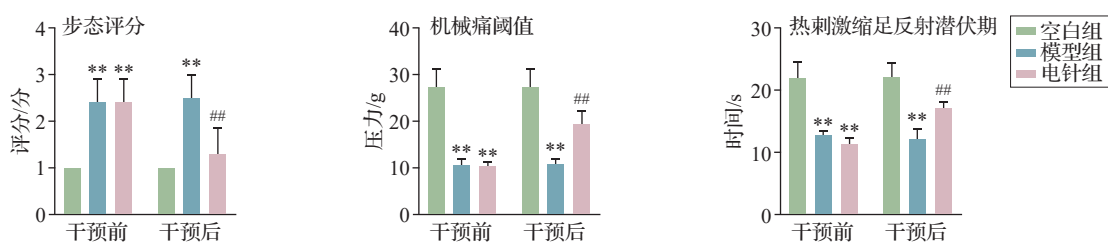
1.6 统计学分析

采用SPSS26.0软件进行数据统计分析,绘图使用Graph Pad Prism 10.1.2软件。数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较,方差齐用LSD检验,方差不齐则用Dunnett's *t*3检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 各组大鼠步态评分、机械痛阈值、热刺激缩足反应潜伏期时间比较

干预前,与空白组比较,模型组、电针组大鼠左前肢出现足内收蜷缩、畸形、持重困难、悬空、跛行和舔舐等保护现象,步态评分升高($P < 0.01$),提示造模成功。干预后,模型组上述症状无明显变化,步态评分高于空白组($P < 0.01$);与模型组相比,电针组大鼠足内收蜷缩、持重困难、跛行和舔舐等左前肢保护现象较前明显改善,步态评分降低($P < 0.01$)。干预前,与空白组相比,模型组、电针组大鼠的机械痛阈值、热刺激缩足反应潜伏期均降低($P < 0.01$)。干预后,模型组机械痛阈值、热刺激缩足反应潜伏期较空白组降低($P < 0.01$);与模型组相比,电针组机械痛阈值、热刺激缩足反应潜伏期显著升高($P < 0.01$)。见图1。



注:与同时点空白组相比,** $P < 0.01$;与同时点模型组相比,## $P < 0.01$ 。

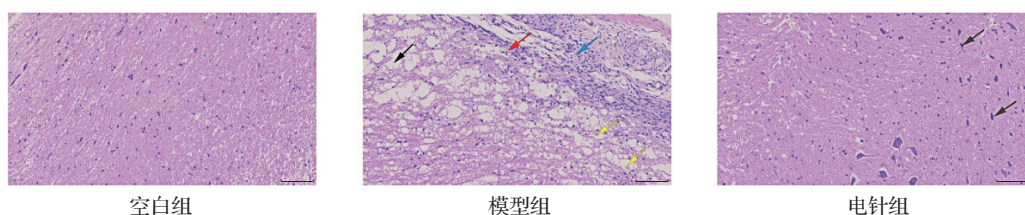
图1 各组大鼠干预前后步态评分、机械痛阈值、热刺激缩足反应潜伏期比较($\bar{x} \pm s$, 10只鼠/组)

Fig. 1 Comparison of gait score, mechanical pain threshold and thermal stimulation paw withdrawal latency before and after intervention in 3 groups of rats ($\bar{x} \pm s$, 10 rats/group)

2.2 各组大鼠干预后脊髓组织病理形态比较(HE染色)

空白组大鼠脊髓组织形态结构完整,神经元分布均匀,数量丰富,形态规则、饱满,胞核大,核仁清晰;未见明显胶质细胞增生和炎性细胞浸润。模型组大鼠脊髓组织整体形态损伤严重,神经元数量减少、坏死;大量神经纤维肿胀,可见大量不规则空

泡;组织边缘可见少量长梭形细胞增生;可见少量胶质细胞增生。电针组大鼠脊髓组织坏死、皱缩神经元数量较模型组显著减少,仍可见少量神经元皱缩;未见明显胶质细胞增生和炎性细胞浸润。说明脊髓整体损伤程度较模型组有所减轻,但未恢复至空白组水平。见图2。



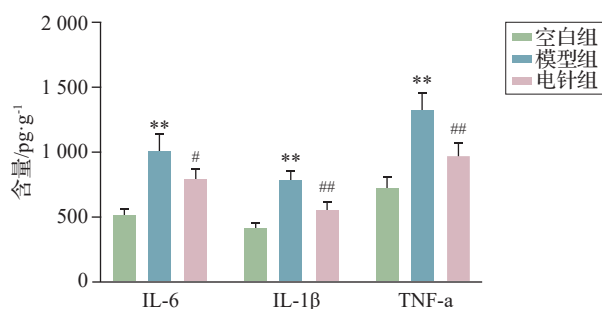
注:标尺=100 μm 。黄色箭头示坏死神经元,红色箭头示胶质细胞,蓝色箭头示长梭形细胞,黑色箭头示不规则空泡,棕色箭头示皱缩神经元。

图2 各组大鼠脊髓组织病理形态比较(HE染色)

Fig. 2 Comparison of pathological morphology of spinal cord tissue of rats in the 3 groups(HE staining)

2.3 各组大鼠脊髓组织 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 含量比较

与空白组相比,模型组大鼠脊髓组织 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 含量均升高($P<0.01$);与模型组相比,电针组大鼠脊髓组织 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 含量均显著降低($P<0.05$, $P<0.01$)。见图3。



注:IL-6为白细胞介素6,IL-1 β 为白细胞介素1 β ,TNF- α 为肿瘤坏死因子 α 。与空白组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,## $P<0.01$ 。

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

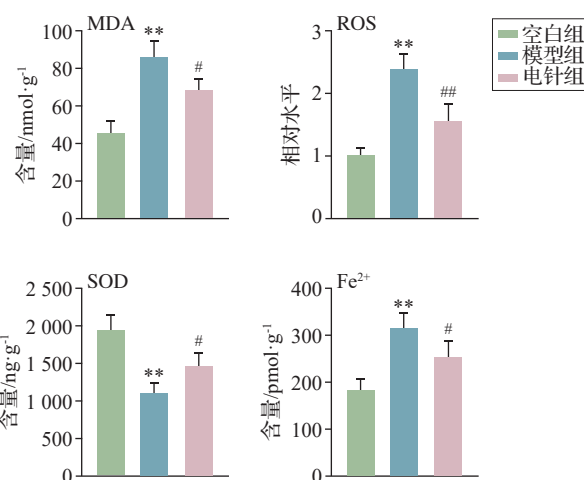
Fig. 3 Comparison of the contents of IL-6、IL-1 β and TNF- α in spinal cord of rats in the 3 groups ($\bar{x}\pm s$,3 rats/group)

2.4 各组大鼠脊髓组织 MDA、SOD、Fe²⁺ 含量和 ROS 相对强度比较

与空白组相比,模型组大鼠脊髓组织 MDA、Fe²⁺ 含量和 ROS 相对强度升高($P<0.01$),SOD 含量降低($P<0.01$);与模型组相比,电针组大鼠脊髓组织的 MDA、Fe²⁺ 含量和 ROS 相对强度降低($P<0.05$, $P<0.01$),SOD 含量升高($P<0.05$)。见图4。

2.5 各组大鼠脊髓组织 p-AKT/AKT、p-GSK-3 β /GSK-3 β 蛋白表达比值和 Nrf2 蛋白表达水平比较

与空白组相比,模型组大鼠脊髓组织 p-AKT/AKT、p-GSK-3 β /GSK-3 β 蛋白表达比值和 Nrf2 蛋



注:MDA为丙二醛,ROS为活性氧,SOD为超氧化物歧化酶,Fe²⁺为亚铁离子。与空白组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

图4 各组大鼠脊髓组织中 MDA、ROS、SOD 和 Fe²⁺ 含量比较 ($\bar{x}\pm s$,3只鼠/组)

Fig. 4 Comparison of the contents of MDA、ROS、SOD and Fe²⁺ in spinal cord of rats in the 3 groups ($\bar{x}\pm s$,3 rats/group)

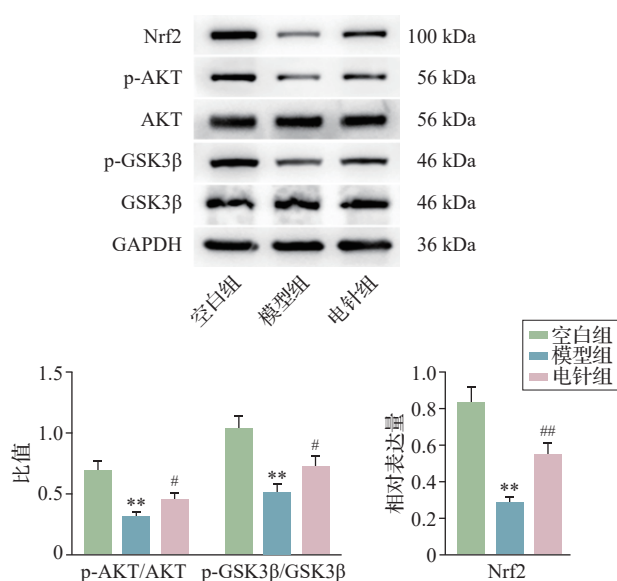
白表达水平降低($P<0.01$)。与模型组相比,电针组大鼠脊髓组织 p-AKT/AKT、p-GSK-3 β /GSK-3 β 蛋白表达比值和 Nrf2 蛋白表达水平升高($P<0.05$, $P<0.01$)。见图5。

2.6 各组大鼠脊髓组织 GPX4、FTH1 蛋白表达水平比较

与空白组相比,模型组大鼠脊髓组织 GPX4、FTH1 蛋白表达水平降低($P<0.01$)。与模型组相比,电针组大鼠脊髓组织 GPX4、FTH1 蛋白表达水平升高($P<0.05$)。见图6。

3 讨论

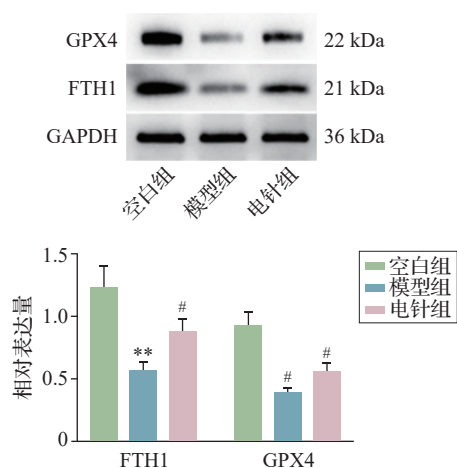
神经根型颈椎病归属于“颈肩痛”“项痹”“痹症”等范畴,中医认为“痹者,闭也”,外感邪气侵袭,经络气血闭阻,气机失畅则生痹痛。《素问·阴阳应



注: AKT为蛋白激酶B, p-AKT为磷酸化蛋白激酶B, GSK-3β为糖原合成酶激酶3β, p-GSK-3β为磷酸化糖原合成酶激酶3β, Nrf2为核因子相关因子2。与空白组相比, ** $P < 0.01$; 与模型组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图5 各组大鼠脊髓组织中p-AKT/AKT、p-GSK3β/GSK3β蛋白表达比值和Nrf2蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$, 3只鼠/组)

Fig. 5 Comparison of protein expression ratios of p-AKT/AKT, p-GSK-3β/GSK-3β and Nrf2 protein expression level in spinal cord of rats in the 3 groups ($\bar{x} \pm s$, 3 rats/group)



注: FTH1为铁蛋白重链, GPX4为谷胱甘肽过氧化物酶。与空白组相比, ** $P < 0.01$, 与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图6 各组大鼠脊髓组织中GPX4、FTH1蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$, 3只鼠/组)

Fig. 6 Comparison of protein expression levels of GPX4 and FTH1 in spinal cord of rats in the 3 groups ($\bar{x} \pm s$, 3 rats/group)

象大论篇》曰“气伤痛”,认为气机不畅是疼痛产生的主要病机^[22]。“气畅则康,气郁则病”,治疗上宜“通”,即恢复气机的通畅。《针灸穴名解》曰“合谷、

太冲各二穴,名为四关,以其能大开通也”,合谷为手阳明大肠经原穴,属阳,主气,太冲为足厥阴肝经原穴,属阴,主血,两穴一阴一阳,一升一降,一气一血,一脏一腑,上疏下导,升降相因,善调气机升降^[23]。因此,本研究选用“合谷”“太冲”进行电针干预,以调气活血、舒筋通络止痛。

既往研究^[24-25]表明,CSR中神经病理性疼痛发生和维持的核心病理生理机制与炎症反应、氧化应激和铁死亡之间的相互作用有关。炎症反应是疼痛发生和维持的关键因素,脊髓神经根受压迫后释放大促炎因子,这些因子可通过直接敏化伤害性感受器,增加神经元的敏感性和疼痛信号的传递,引起外周敏化导致疼痛,另一方面还可促进脊髓背角神经元兴奋、激活胶质细胞并启动相关信号通路,从而诱发中枢敏化^[26]。郭彦君等^[27]研究显示,CSR大鼠脊髓组织中星形胶质细胞活化并激活相关炎症信号通路,针刺可抑制其活化,降低炎症反应缓解中枢敏化,减轻疼痛。生理状态下,机体的氧化与抗氧化能力保持平衡,从而维持正常生理功能。当缺血缺氧等应激源诱发时,抗氧化防御系统失衡,ROS生成增多,引发剧烈的炎症反应,形成“氧化应激-炎症”轴,参与疼痛^[28]。SOD反映机体清除氧自由基的能力,MDA作为脂质过氧化的终产物,其水平的增高与机体氧化应激程度呈正相关,两者是评价氧化应激反应的常见指标。既往研究^[29]证实,针刺可打破“氧化应激-神经炎症反应”恶性循环,减少相关炎症因子表达,抑制氧化应激状态,缓解颈神经根受压引起的神经病理性疼痛。进一步证明氧化应激在CSR发病机制中的重要作用。近年来,铁死亡这一新型细胞死亡方式在神经系统损伤所致神经性疼痛中的作用日益凸显,被认为扮演着潜在的关键角色^[7]。细胞内铁代谢、脂质过氧化失衡是导致铁死亡的核心生化事件^[30]。GPX4作为内源性抗氧化因子,能将有害脂质过氧化物转化为无害脂质醇,从而抑制脂质过氧化,抑制细胞铁死亡^[31]。FTH1是主要的铁储存因子,通过调控铁离子浓度维持细胞内铁稳态,其具备的亚铁氧化酶活性可有效抑制芬顿反应,减轻铁介导的氧化损伤^[32]。Xue等^[33]研究结果显示,坐骨神经压迫大鼠脊髓中GPX4、FTH1和SOD显著下调,铁离子异常蓄积,电针干预可逆转上述氧化应激介导的脊髓铁死亡表型,降低MDA水平和铁过载,从而抑制神经元铁死亡,缓解大鼠疼痛。综上,“炎症反应-氧化应激-铁死亡”三者构成复杂的病理级联恶性循环网,神

经根受压引发无菌性炎症反应,炎症因子释放并激活免疫细胞产生大量ROS,直接诱发氧化应激诱导中枢敏化;另外,氧化应激引起 Fe^{2+} 异常蓄积,引发脂质过氧化并削弱GPX4抗氧化防御,触发铁死亡,加剧神经根损伤与痛觉过敏。

AKT/GSK-3 β /Nrf2作为重要的抗氧化、抗铁死亡信号通路,在中枢神经系统疾病的病理改变中具有关键作用^[10-11,34]。研究证实,AKT/GSK-3 β /Nrf2信号通路的激活在神经损伤后的神经元存活和疼痛中起重要作用^[35]。生理状态下,生长因子等信号激活PI3K,进而磷酸化并激活AKT。活化的AKT通过磷酸化GSK3 β 的Ser9位点抑制其激酶活性。被抑制的GSK-3 β 无法磷酸化降解Nrf2,从而使Nrf2得以稳定入核,启动一系列细胞保护基因的转录,维持氧化还原稳态。当神经受压后这一平衡被打破,大量释放的促炎介质抑制AKT活性,导致对GSK-3 β 的抑制作用减弱,这使得GSK-3 β 过度活化,过度活化的GSK-3 β 进而促使Nrf2失活,加剧神经元损伤和疼痛^[36]。GSK-3 β 属于GSK蛋白质家族中的一种蛋白激酶,参与炎症反应、氧化应激等过程^[37],可通过多种途径介导炎症反应,进而调控胶质细胞激活和炎症通路介导神经元敏化^[38]。在离体实验和动物研究中均发现抑制GSK-3 β 通路活性可直接影响胶质细胞活化及炎症介质表达,减少氧化应激,缓解组织损伤^[39-40]。因此抑制GSK-3 β 活性成为潜在的病理性疼痛的潜在治疗靶点。Nrf2是AKT/GSK-3 β 通路重要的下游因子,作为关键的抗氧化转录因子广泛参与炎症反应、氧化应激反应和铁死亡过程^[41]。过度活化的GSK-3 β 磷酸化Nrf2的Neh6结构域,泛素化降解Nrf2从而阻止Nrf2入核活化,Nrf2抗氧化基因下调,氧化应激爆发,大量的ROS不仅可以反作用于GSK-3 β 进一步激活核因子 κB 等炎症通路加剧神经炎症反应^[42],还能与脂质膜的多不饱和脂肪酸(PUFAs)发生反应,诱导脂质过氧化,下调抗铁死亡基因表达,触发铁死亡,最终加剧神经炎症和诱导中枢敏化^[43]。抑制Gsk-3 β 激活,可增加Nrf2介导的抗氧化反应,抑制脊髓氧化损伤和炎症反应,减轻神经性疼痛^[44]。本研究结果显示,CSR大鼠神经根受损后,“炎症反应-氧化应激-铁死亡”恶性循环被激活,促炎因子大量释放进一步激活氧化应激,诱导铁死亡发生,造成神经元损伤加剧神经炎症反应,诱导疼痛的发生。此外,本研究还观察到CSR大鼠脊髓组织中p-AKT/AKT、p-GSK-3 β /GSK-3 β 磷酸化水平及Nrf2蛋白水平降

低,推测该通路被抑,活性丧失。经“调气”电针干预后,大鼠步态评分降低,机械痛阈值升高,热刺激缩足反应潜伏期时间延长,受损脊髓中坏死、皱缩神经元数量均减少;未见明显胶质细胞增生和炎症细胞浸润;脊髓组织中AKT、GSK-3 β 的磷酸化水平及Nrf2和FTH1、GPX4蛋白水平平均升高,SOD含量增加,TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、MDA、ROS、 Fe^{2+} 含量显著降低。

综上,激活AKT/GSK-3 β /Nrf2信号通路可能是“调气法”电针发挥镇痛作用的重要机制。该机制通过协同调控氧化应激、神经炎症反应及铁死亡,最终缓解疼痛。需要指出的是,本研究存在一定局限性,虽证实其镇痛效应但未使用该通路的特异性抑制剂进行反向验证,今后将继续深入研究,进一步确认其在电针镇痛中的必要性和核心地位。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] 廖少君,詹吉恒,侯宇,等.神经根型颈椎病临床实践指南和专家共识方法学与报告质量评价[J].中国中西医结合杂志,2024,44(10):1197-1205.
Liao S J, Zhan J H, Hou Y, et al. Methodological and reporting quality evaluation of clinical practice guidelines and expert consensus for cervical spondylotic radiculopathy (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2024, 44(10): 1197-1205.
- [2] Huo L Y, Yang X X, Feng T X, et al. Management of cervical spondylotic radiculopathy: a systematic review [J]. Global Spine J, 2022, 12(8): 1912-1924.
- [3] Yang F, Li W X, Liu Z, et al. Balance chiropractic therapy for cervical spondylotic radiculopathy: study protocol for a randomized controlled trial [J]. Trials, 2016, 17(1): 513.
- [4] Jensen T S, Baron R, Haanpää M, et al. A new definition of neuropathic pain [J]. Pain, 2011, 152(10): 2204-2205.
- [5] 周围神经病理性疼痛中国专家共识编委会.周围神经病理性疼痛诊疗中国专家共识[J].中国疼痛医学杂志,2020,26(5):321-328.
Chinese Expert Consensus Committee on Peripheral Neuropathic Pain. China expert consensus on diagnosis and treatment of peripheral neuropathic pain (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Pain Medicine, 2020, 26(5): 321-328.
- [6] Yu H C, Zhang Z, Wei F H, et al. Hydroxytyrosol ameliorates intervertebral disc degeneration and neuropathic pain by reducing oxidative stress and inflammation [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022(1): 2240894.
- [7] Li L, Guo L L, Gao R, et al. Ferroptosis: a new regulatory mechanism in neuropathic pain [J]. Front Aging Neurosci, 2023, 15: 1206851.
- [8] Galaris D, Barbouti A, Pantopoulos K. Iron homeostasis and oxidative stress: an intimate relationship [J]. Biochim Biophys

- Acta BBA Mol Cell Res, 2019, 1866(12): 118535.
- [9] 杨旭霞, 娄宏君, 王文韬, 等. 基于Nrf2/ARE信号通路探讨夹脊电针对神经根型颈椎病模型大鼠的作用机制[J]. 针灸临床杂志, 2024, 40(2): 63-68.
Yang X X, Lou H J, Wang W T, et al. Action mechanism of Jiaji EA in treatment of CSR based on Nrf2/ARE signaling pathway in model rats (in Chinese) [J]. Journal of Clinical Acupuncture and Moxibustion, 2024, 40(2): 63-68.
- [10] Shi Y P, Yan D D, Nan C R, et al. Salvianolic acid A inhibits ferroptosis and protects against intracerebral hemorrhage [J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 12427.
- [11] Huo K, Ma K G, Guo Q Y, et al. Perilipin 5 protects against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-elicited neuronal damage by inhibiting oxidative stress and inflammatory injury via the Akt-GSK-3 β -Nrf2 pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2022, 108: 108718.
- [12] Yang W, Liu Y, Xu Q Q, et al. Sulforaphene ameliorates neuroinflammation and hyperphosphorylated tau protein via regulating the PI3K/Akt/GSK-3 β pathway in experimental models of Alzheimer's disease [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 4754195.
- [13] Guo C L, Yue Y F, Wang B J, et al. Anemoside B4 alleviates arthritis pain via suppressing ferroptosis-mediated inflammation [J]. J Cell Mol Med, 2024, 28(4): e18136.
- [14] 陈舒, 栗胜勇, 黄霞, 等. 电针颈夹脊穴对神经根型颈椎病大鼠局部脊髓组织自噬相关因子LC3和Beclin-1的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(11): 2429-2431, 2463.
Chen S, Su S Y, Huang X, et al. Effect of electroacupuncture at cervical Jiaji points on autophagy related factors LC3 and beclin-1 in spinal cord tissue of CSR rats (in Chinese) [J]. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine, 2019, 46(11): 2429-2431, 2463.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 窦夏睿, 孙建宁, 王威, 等. 急性期神经根型颈椎病模型的建立[J]. 北京中医药大学学报, 2006, 29(5): 332-334, 343, 361.
Dou X R, Sun J N, Wang W, et al. Establishment of model of acute cervical spondylotic radiculopathy (in Chinese) [J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2006, 29(5): 332-334, 343, 361.
- [18] Kawakami M, Weinstein J N, Spratt K F, et al. Experimental lumbar radiculopathy. Immunohistochemical and quantitative demonstrations of pain induced by lumbar nerve root irritation of the rat [J]. Spine, 1994, 19(16): 1780-1794.
- [19] 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.
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: rats (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2021, 46(4): 351-352.
- [20] 李建国, 高春雨, 王宝剑, 等. 基于“阳化气, 阴成形”理论探讨退行性腰椎管狭窄症的中医论治[J]. 中医药导报, 2021, 27(10): 174-177.
Li J G, Gao C Y, Wang B J, et al. Discussion on TCM treatment of degenerative lumbar spinal stenosis based on the theory of “Yang turning into qi, Yin turning into formation” (in Chinese) [J]. Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2021, 27(10): 174-177.
- [21] Patel R, Gonçalves L, Leveridge M, et al. Anti-hyperalgesic effects of a novel TRPM8 agonist in neuropathic rats: a comparison with topical menthol [J]. Pain, 2014, 155(10): 2097-2107.
- [22] 谢瑞, 于杰, 尹逊路, 等. 神经根型颈椎病的现代中医治疗研究进展[J]. 海南医学院学报, 2019, 25(17): 1356-1360.
Xie R, Yu J, Yin X L, et al. Advances in modern Chinese medicine treatment of cervical spondylotic radiculopathy (in Chinese) [J]. Journal of Hainan Medical University, 2019, 25(17): 1356-1360.
- [23] 周绪柳, 王华, 吴松, 等. 四关穴探析[J]. 针灸临床杂志, 2023, 39(4): 95-98.
Zhou X L, Wang H, Wu S, et al. Exploration of siguan points (in Chinese) [J]. Journal of Clinical Acupuncture and Moxibustion, 2023, 39(4): 95-98.
- [24] Kartha S, Weissshaar C L, Philips B H, et al. Pre-treatment with meloxicam prevents the spinal inflammation and oxidative stress in DRG neurons that accompany painful cervical radiculopathy [J]. Neuroscience, 2018, 388: 393-404.
- [25] Wang H X, Huo X D, Han C Y, et al. Ferroptosis is involved in the development of neuropathic pain and allodynia [J]. Mol Cell Biochem, 2021, 476(8): 3149-3161.
- [26] 黄远西, 陈晓强, 石义丹, 等. 电针治疗神经病理性疼痛机制研究进展[J]. 山东中医杂志, 2023, 42(2): 199-202, 208.
Huang Y X, Chen X Q, Shi Y D, et al. Advances in study on mechanism of electroacupuncture in treatment of neuropathic pain (in Chinese) [J]. Shandong Journal of Traditional Chinese Medicine, 2023, 42(2): 199-202, 208.
- [27] 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.
- [28] Clower L, Fleshman T, Geldenhuys W J, et al. Targeting oxidative stress involved in endometriosis and its pain [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(8): 1055.
- [29] 宋海瑞, 孙刚, 布尔古德, 等. 针灸治疗对神经根型颈椎病患者的疗效及炎症因子、氧化应激及血液流变学的影响[J]. *湖南师范大学学报(医学版)*, 2020, 17(6): 188-191.
- Song H R, Sun G, Bu E, et al. Curative effect of acupuncture and moxibustion on cervical spondylotic radiculopathy patients and its influence to inflammatory cytokine, oxidative stress and hemorheology (in Chinese) [J]. *Journal of Hunan Normal University (Medical Science)*, 2020, 17(6): 188-191.
- [30] Rochette L, Dogon G, Rigal E, et al. Lipid peroxidation and iron metabolism: two corner stones in the homeostasis control of ferroptosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 24(1): 449.
- [31] Zhang W, Liu Y, Liao Y, et al. GPX4, ferroptosis, and diseases [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 174: 116512.
- [32] Mi Y, Wei C Q, Sun L Y, et al. Melatonin inhibits ferroptosis and delays age-related cataract by regulating SIRT6/p-Nrf2/GPX4 and SIRT6/NCOA4/FTH1 pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 157: 114048.
- [33] Xue C C, Kui W Y, Huang A P, et al. Electroacupuncture suppresses neuronal ferroptosis to relieve chronic neuropathic pain [J]. *J Cell Mol Med*, 2024, 28(7): e18240.
- [34] Duan M, Yu N, Liu J, et al. Remimazolam suppresses oxidative stress and apoptosis in cerebral ischemia/reperfusion injury by regulating AKT/GSK-3 β /NRF2 pathway [J]. *DDDT*, 2025, 19: 111-128.
- [35] Han R, Yu Y, Zhao K H, et al. Lignans from *Eucommia ulmoides* Oliver leaves exhibit neuroprotective effects *via* activation of the PI3K/Akt/GSK-3 β /Nrf2 signaling pathways in H₂O₂-treated PC-12 cells [J]. *Phytomedicine*, 2022, 101: 154124.
- [36] Yuan L L, Liu C H, Wan Y C, et al. Effect of HDAC2/Inpp5f on neuropathic pain and cognitive function through regulating PI3K/Akt/GSK-3 β signal pathway in rats with neuropathic pain [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(1): 678-684.
- [37] Dong X, Hong H X, Cui Z M. Function of GSK-3 signaling in spinal cord injury (Review) [J]. *Exp Ther Med*, 2023, 26(5): 541.
- [38] 胡胜, 田绍文, 游咏. 糖原合酶激酶-3 β : 神经炎症的潜在重要调节靶点 [J]. *临床与病理杂志*, 2021, 41(4): 879-884.
- Hu S, Tian S W, You Y. Glycogen synthase kinase-3 β : a potentially important regulatory target for neuroinflammation (in Chinese) [J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2021, 41(4): 879-884.
- [39] Yang H Y, Sun X, Zhen S Q, et al. GSK-3 β inhibition alleviates arthritis pain *via* reducing spinal mitochondrial reactive oxygen species level and inflammation [J]. *PLoS One*, 2023, 18(4): e0284332.
- [40] 李丹, 左淑萍, 张守军, 等. 虫草素改善糖尿病心肌病大鼠心肌组织及氧化应激作用的机制研究 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2025, 27(4): 504-509.
- Li D, Zuo S P, Zhang S J, et al. Mechanism of cordycepin improving myocardial tissue and oxidative stress in diabetic cardiomyopathy rats (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Geriatric Heart Brain and Vessel Diseases*, 2025, 27(4): 504-509.
- [41] Li H Y, Weng Q Q, Gong S, et al. Kaempferol prevents acetaminophen-induced liver injury by suppressing hepatocyte ferroptosis *via* Nrf2 pathway activation [J]. *Food Funct*, 2023, 14(4): 1884-1896.
- [42] 张玲玉, 何长宏, 赵忠正, 等. 青藤碱调节 GSK3 β /Nrf2/HO-1 及 NF- κ B 信号通路对帕金森小鼠的神经保护作用 [J]. *中药新药与临床药理*, 2024, 35(5): 607-614.
- Zhang L Y, He C H, Zhao Z Z, et al. Neuroprotective effect of sinomenine on Parkinson's disease mice by regulating GSK3 β /Nrf2/HO-1 and NF- κ B signaling pathways (in Chinese) [J]. *Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology*, 2024, 35(5): 607-614.
- [43] Gao X, Hu W, Qian D L, et al. The mechanisms of ferroptosis under hypoxia [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2023, 43(7): 3329-3341.
- [44] Zhang M W, Sun X, Xu Y W, et al. Curcumin relieves oxaliplatin-induced neuropathic pain *via* reducing inflammation and activating antioxidant response [J]. *Cell Biol Int*, 2024, 48(6): 872-882.

收稿日期: 2025-10-28 修回日期: 2025-12-18