

☆ 机制探讨 ☆

电针干预三叉神经痛的合谷-丘脑腹后核-三叉神经节应答机制研究

张昊达¹, 王东², 刘哲¹, 吴宗霖¹, 陈月蓉¹, 陈妮桑¹, 陈亮¹, 王展鹏¹, 方剑乔³, 吴媛媛¹⁽¹⁾浙江中医药大学附属第三医院, 杭州 310005; ⁽²⁾浙江绿城心血管病医院, 杭州 310013;⁽³⁾浙江中医药大学, 杭州 310053)

【摘要】目的:建立慢性压迫眶下神经(CION)诱导的三叉神经病理性疼痛小鼠模型,筛选电针干预三叉神经痛的优势频率,初步探讨其“合谷”-丘脑腹后核(VP)-三叉神经节(TG)的外周-中枢互作机制。**方法:**雄性C57BL/6J小鼠,采用CION法构建三叉神经病理性疼痛模型,分别于双侧“合谷”给予频率为2 Hz、100 Hz、2 Hz/100 Hz的电针刺激每次30 min,隔日1次,共12次。采用von Frey法检测触须垫机械反应阈值;高架十字迷宫(EPM)评估实验动物焦虑样行为;悬尾实验(TS)、糖水偏好实验(SP)评估抑郁样行为;采用免疫荧光法检测c-Fos蛋白表达,以评估中缝背核(DRN)、VP、尾侧亚核(Sp5C)等8个脑区的神经元活性。并进一步采用免疫荧光双标法检测DRN内5-羟色胺(5-HT)、谷氨酸(Glu)、 γ -氨基丁酸(GABA)和c-Fos的共表达情况,以评估不同类型神经元的激活状态。化学或病毒示踪技术明确“合谷”-背根神经节(DRG)-脊髓背角(DH)-VP及TG-Sp5C-VP的神经解剖联系。**结果:**治疗结束后,模型组小鼠机械反应阈值降低($P<0.0001$);2 Hz电针组、100 Hz电针组、2 Hz/100 Hz电针组机械反应阈值均提高($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$);且2 Hz/100 Hz电针组镇痛效果优于2 Hz和100 Hz电针组($P<0.05$, $P<0.01$)。在EPM实验中模型组小鼠进入开放臂的时间减少($P<0.0001$);100 Hz、2 Hz/100 Hz电针组进入开放臂的时间增加($P<0.01$, $P<0.0001$);且2 Hz/100 Hz电针组进入开放臂时间较2 Hz电针组增加($P<0.01$)。在TS实验中模型组动物的不动时间增加($P<0.0001$);而电针能逆转这一现象($P<0.0001$);且2 Hz/100 Hz电针组较2 Hz电针组和100 Hz电针组缓解抑郁样情绪更显著($P<0.05$)。在SP实验中,模型组小鼠的糖水偏好度降低($P<0.0001$);而电针能逆转这一现象($P<0.001$, $P<0.0001$);且2 Hz/100 Hz电针组较2 Hz电针组和100 Hz电针组缓解抑郁样情绪更显著($P<0.01$, $P<0.05$)。示踪结果表明,“合谷”注射化学示踪剂,在颈(C)6、C7节段DRG观察到示踪信号;VP注射逆行跨多级病毒,在DH、Sp5C和TG中观察到病毒表达。免疫荧光结果表明,模型组小鼠Sp5C、VP、丘脑腹后内侧核(VPM)、丘脑束旁核(PaF)和DRN脑区中神经元活性升高($P<0.01$, $P<0.0001$, $P<0.05$),且电针能逆转这一现象($P<0.0001$, $P<0.01$, $P<0.001$);模型组5-HT神经元活性降低($P<0.0001$),2 Hz/100 Hz电针后升高($P<0.001$);模型组Glu和GABA神经元活性均升高($P<0.0001$, $P<0.05$),2 Hz/100 Hz电针组Glu和GABA神经元活性均降低($P<0.0001$, $P<0.05$)。**结论:**2 Hz/100 Hz电针在改善CION模型小鼠机械痛敏及伴随负性情绪方面优于单一频率;CION状态下Sp5C、VP、VPM、PaF和DRN脑区异常激活,DRN内5-HT神经元活性下降,GABA和Glu神经元活性上升,2 Hz/100 Hz电针能逆转这一现象;存在合谷-DRG-DH-VP和TG-Sp5C-VP的神经解剖联系。上述结果为研究电针干预三叉神经痛的合谷-VP-TG应答机制提供客观依据。

【关键词】 三叉神经痛;电针;合谷;丘脑腹后核;三叉神经节;中缝背核

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20260550

引用格式:张昊达,王东,刘哲,等.电针干预三叉神经痛的合谷-丘脑腹后核-三叉神经节应答机制研究[J].针刺研究,2026,51(10):1-12.

项目来源:国家自然科学基金项目(No.82074541、82405546);浙江省自然科学基金项目(No.LY23H270009、LQ24H270009);浙江省医药卫生科技计划项目(No.2024KY1235);杭州市自然科学基金项目(No.2025SZRJ0464);浙江中医药大学附属医院科研专项项目(No.2025FSYYZZ04)

共同通信作者:方剑乔,E-mail:fangjianqiao7532@163.com

吴媛媛,E-mail:runnaway@126.com

Mechanism of electroacupuncture at “Hegu” (LI4) in regulating the VP-TG pathway for trigeminal neuralgia

Zhang Haoda¹, Wang Dong², Liu Zhe¹, Wu Zonglin¹, Chen Yuerong¹, Chen Nisang¹, Chen Liang¹, Wang Zhanpeng¹, Fang Jianqiao³, Wu Yuanyuan¹ (¹The Third Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310005, China; ²Zhejiang Greentown Cardiovascular Hospital, Hangzhou 310013; ³Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053)

【ABSTRACT】 Objective To establish a mouse model of trigeminal neuropathic pain induced by chronic constriction injury of the infraorbital nerve (CION), screen the optimal frequency of electroacupuncture (EA) for trigeminal neuralgia (TN), so as to explore the peripheral-central interaction mechanism of the “Hegu” (LI4)-ventral posterior nucleus (VP)-trigeminal ganglion (TG) pathway. **Methods** Male C57BL/6J mice were used to establish the TN model via the CION method. EA (2 Hz or 100 Hz or 2 Hz/100 Hz) was applied to bilateral LI4 for 30 min each time, once every other day, for a total of 12 times. Mechanical withdrawal thresholds (MWTs) of the vibrissal pad were measured using von Frey filaments. Anxiety-like behaviors were assessed by the elevated plus maze (EPM) test, and depression-like behaviors by the tail suspension (TS) test and sucrose preference (SP) test. Neuronal activities in 8 brain regions, including the dorsal raphe nucleus (DRN), VP, and spinal trigeminal nucleus caudalis (Sp5C), etc. were evaluated by c-Fos immunofluorescence. Double immunofluorescence labeling was used to detect co-expressions of c-Fos with 5-hydroxytryptamine (5-HT), glutamate (Glu), or γ -aminobutyric acid (GABA) in the DRN to identify activated neuron subtypes. Neural connectivities between “Hegu”-dorsal root ganglion (DRG)-spinal dorsal horn (DH)-VP and TG-Sp5C-VP were traced using chemical or viral tracers. **Results** After the treatment, compared with the sham group, the MWTs of mice were significantly decreased in the model group ($P < 0.0001$). The MWTs in the 2 Hz, 100 Hz, and 2 Hz/100 Hz EA groups were all increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$), and the analgesic effect of the 2 Hz/100 Hz EA was superior to those of the 2 Hz and 100 Hz EA groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In the EPM test, the time spent in the open arms was significantly decreased in the model group ($P < 0.0001$), while it was increased in the 100 Hz EA and 2 Hz/100 Hz EA groups ($P < 0.01$, $P < 0.0001$). Moreover, the time spent in the open arms was longer in the 2 Hz/100 Hz EA group than in the 2 Hz EA group ($P < 0.01$). In the TS test, the immobility time was increased in the model group ($P < 0.0001$), whereas EA reversed this change ($P < 0.0001$). The 2 Hz/100 Hz EA group showed a more significant improvement in depression-like behavior than the 2 Hz and 100 Hz EA groups ($P < 0.05$). In the SP test, the sucrose preference was decreased in the model group ($P < 0.0001$), whereas EA reversed this change ($P < 0.001$, $P < 0.0001$). The 2 Hz/100 Hz EA group showed a more significant improvement in depression-like behavior than the 2 Hz and 100 Hz EA groups ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Tracing results showed that after injection of a chemical tracer into LI4, tracer signals were observed in the C6 and C7 DRG. After injection of a retrograde trans-multisynaptic virus into the VP, viral expression was observed in the DH, Sp5C, and TG. Immunofluorescence results showed that neuronal activity in the Sp5C, VP, ventral posteromedial nucleus (VPM), parafascicular nucleus (PaF), and DRN was increased in the model group ($P < 0.01$, $P < 0.0001$, $P < 0.05$), while EA reversed these changes ($P < 0.0001$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). Compared with the sham group, the model group showed decreased 5-HT neuronal activity ($P < 0.0001$) and increased Glu and GABA neuronal activities ($P < 0.0001$, $P < 0.05$), all of which were reversed by 2 Hz/100 Hz EA ($P < 0.001$, $P < 0.0001$, $P < 0.05$). **Conclusion** The 2 Hz/100 Hz EA is superior to single-frequency stimulation in improving mechanical hypersensitivity and associated negative affective behaviors in CION model mice. Under CION conditions, abnormal activation was observed in the Sp5C, VP, VPM, PaF, and DRN, accompanied by decreased activity of 5-HT neurons and increased activities of GABA and Glu neurons in the DRN, and 2 Hz/100 Hz EA can reverse these phenomena. The tracing results indicated the existence of neuroanatomical connections of the LI4-DRG-DH-VP and TG-Sp5C-VP pathways. These findings provide objective evidence for investigating the LI4-VP-TG response mechanism underlying EA intervention in TN.

【KEYWORDS】 Trigeminal neuralgia; Electroacupuncture; Hegu (LI4); Ventral posterior nucleus; Trigeminal ganglion; Dorsal raphe nucleus

三叉神经痛是一种以面部三叉神经分布区域
内突发、剧烈、短暂的电击样、刀割样或撕裂样疼痛
为特征的神经系统疾病^[1-2]。其难治性和反复性导

致患者常伴有焦虑、抑郁及失眠,严重影响患者的
生活质量^[3]。电针作为重要的非药物干预已用于三
叉神经痛的临床治疗,并在随机对照试验中显示出

一定疗效和安全性^[4]。合谷为手阳明大肠经原穴,明代《针灸大成》的四总穴歌中记载有“面口合谷收”^[5]。“面口合谷收”的理论基础及临床应用已有相关论述^[6],但电针合谷治疗三叉神经痛的刺激参数及其生物学机制仍有待进一步研究^[7-8]。

疼痛信息由三叉神经传递至三叉神经节(TG),TG的神经元中枢突组成三叉神经感觉根止于尾侧亚核(Sp5C)。Sp5C作为口面部伤害性信息的重要中继核团,其部分投射神经元可进一步向丘脑腹后核(VP)上传痛觉信息^[9-11]。慢性疼痛不仅表现为伤害性信息的持续上传,还常伴随焦虑、抑郁等负性情绪,提示其病理机制涉及痛觉与情绪的共同异常。VP是躯体感觉及三叉神经痛觉信息上传的重要中继和整合节点,近年来研究显示,眶下神经损伤后丘脑腹后内侧核(VPM)神经元异常活动可参与三叉神经神经病理性疼痛的发生,提示VP/VPM相关丘脑网络可能是三叉神经痛觉信息中枢整合的重要部位^[12]。另一方面,慢性疼痛状态下下行疼痛调控系统也可发生异常,5-羟色胺(5-HT)系统被认为是调节脊髓及三叉神经伤害性信息传递的重要通路^[13]。中缝背核(DRN)是脑内5-HT神经元的重要聚集区,既参与下行疼痛调控,也与焦虑、抑郁等情绪行为密切相关。既往研究表明,DRN内5-HT参与电针对疼痛-抑郁共病的调节,提示DRN-5-HT系统可能是电针同时发挥镇痛和改善负性情绪作用的重要脑干节点^[14]。因此,电针合谷干预三叉神经痛的中枢机制可能不仅涉及合谷躯体感觉输入与三叉神经痛觉输入在VP水平的上行整合,还可能进一步募集DRN相关下行疼痛调控及情绪调节网络。本研究拟建立慢性压迫眶下神经(CION)诱导的三叉神经病理性疼痛小鼠模型,筛选电针干预三叉神经痛的优势频率,并初步探讨其合谷-VP-TG的外周-中枢互作机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

选用6周龄雄性C57BL/6J小鼠作为实验对象,体质量20~24 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,生产许可证号:SCXK(沪)2022-0004,由浙江中医药大学实验动物中心饲养,温度23~25℃,湿度50%~60%。12 h/12 h昼夜交替,小鼠可自由获得充足的食物和水。本研究获得浙江中医药大学动物管理与伦理委员会的伦理批准,批准号:IACUC-20251110-29。实验全程严格遵守中华人民共和国

科学技术部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

实验一:为明确合谷刺激信号进入中枢的神经解剖基础,采用逆行化学示踪和逆行跨突触病毒示踪相结合的方法,观察是否存在合谷-背根神经节(DRG)-脊髓背角(DH)-VP神经解剖联系。采用5只C57BL/6J小鼠,在小鼠“合谷”穴区注射逆行化学示踪剂,取材后观察颈(C)5~C8节段DRG内示踪信号表达情况。采用5只C57BL/6J小鼠,在VP脑区注射逆行跨突触病毒,取材后观察相应节段DH内病毒表达情况,以判断合谷传入信号是否可经DRG、DH与VP形成神经解剖联系。

实验二:为验证三叉神经痛觉传入相关结构与VP之间的神经解剖联系,采用5只C57BL/6J小鼠,在小鼠VP脑区注射逆行跨突触病毒,取材后观察Sp5C和TG中病毒表达情况,以明确是否存在TG-Sp5C-VP神经解剖联系。

实验三:为筛选电针干预三叉神经痛的优势频率,并观察不同频率电针对CION模型小鼠痛觉敏化及负性情绪行为的影响,将小鼠随机分为假手术组、模型组、2 Hz电针组、100 Hz电针组和2 Hz/100 Hz电针组,每组10只,其中假手术组实验过程中死亡1只,予以剔除,最终纳入假手术组实验的小鼠为9只。电针隔日1次,共干预12次。通过触须垫机械反应阈值检测痛觉敏化程度,并采用高架十字迷宫、悬尾实验和糖水偏好实验观察焦虑、抑郁样行为变化,以筛选干预三叉神经痛的优势电针频率。

选择假手术组、模型组及2 Hz/100 Hz电针组(优势电针频率组),每组各3只小鼠。根据三叉神经痛觉传导、丘脑痛觉整合及疼痛伴发负性情绪调控相关脑区,选取Sp5C、VP、丘脑中央中核(CM)、丘脑束旁核(PaF)、丘脑后核(Po)、丘脑腹内侧核(VM)、VPM和DRN这8个脑区作为观察对象。采用免疫荧光法检测上述脑区原癌基因c-Fos蛋白(c-Fos)蛋白表达,以评估不同脑区神经元活性变化,观察CION状态下相关脑区神经元异常激活及2 Hz/100 Hz电针对其的调节作用。为进一步明确DRN内不同类型神经元的活动状态,本研究采用免疫荧光双标法检测DRN内5-HT、谷氨酸(Glu)、 γ -氨基丁酸(GABA)与c-Fos的共表达情况,以评估CION状态下DRN内不同类型神经元的激活变化及2 Hz/100 Hz电针的调节作用。

1.2 主要试剂与仪器

c-Fos一抗、色氨酸羟化酶2(TPH2)一抗、Glu

一抗、GABA一抗、荧光素647标记的驴抗大鼠二抗、荧光素488标记的驴抗兔二抗、驴血清、DAPI封片剂(英国Abcam),CTB-555化学示踪剂、PRV-CAG-3GC(伪狂犬病毒,PRV)病毒示踪剂(深圳布林凯斯),冰冻切片包埋剂(美国SAKURA)。一次性针灸针(0.16 mm×7 mm,中研太和),von Frey丝套组、ANY-maze系统(美国Stoelting),高架十字迷宫、脑立体定位仪(深圳瑞沃德),冰冻切片机(美国Thermo),方氏经皮暨穴位治疗仪(杭州大力神),荧光显微镜(德国蔡司)。

1.3 病毒注射和化学示踪剂注射

病毒注射:小鼠通过腹腔注射0.3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)进行麻醉,用耳杆和鼻夹将小鼠固定于脑立体定位仪上,剃除颅顶毛发,使用碘伏消毒,沿中线切开皮肤约1~1.5 cm,暴露颅骨,根据小鼠脑立体定位图谱^[15],确定VP的立体定向坐标:AP-1.2 mm,ML±1.2 mm,DV-3.2 mm。在目标脑区上方颅骨表面钻孔后,以60 nL/min的速度向VP内注射80 nL的PRV-CAG-3GC病毒示踪剂,注射完成后静置8 min,以0.01 mm/s的速度缓慢出针,以避免病毒示踪剂外溢,见图1A、图1B。

化学示踪剂注射:小鼠通过腹腔注射0.3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)进行麻醉,充分暴露前肢第一、二掌骨之间区域。在小鼠前肢“合谷”(位于前爪背部第1、2掌骨之间,第2掌骨桡侧的中点处)进针,进针时以10~20°贴近皮肤进入,逐步由皮下推进至“合谷”对应解剖位置后停针固定,以60 nL/min的速度向“合谷”注射0.8 μL的CTB-555化学示踪剂。注射完成后静置8 min,以0.01 mm/s的速度缓慢出针,以避免化学示踪剂外溢,见图1E。

1.4 造模方法

小鼠通过腹腔注射0.3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉,麻醉后置于手术显微镜下进行操作。小鼠取仰卧位固定,术区常规消毒,充分暴露口腔操作视野。在口腔内侧颊缘折痕处、靠近上颌区域,于硬腭下方作一小切口,逐层分离以显露三叉神经上颌支的眶下神经分支,使用无菌线自眶下神经分支下方穿过以进行松结扎。手术完成后进行常规处理,实验动物置于恒温环境中恢复。假手术组不进行松结扎,其余操作与造模小鼠一致。造模后采用von Frey法检测小鼠术侧触须垫机械反应阈值。模型组小鼠机械反应阈值较造模前及假手术组明显降低,提示CION法可诱导稳定的三叉神经病理性疼痛,判定造模成功。

1.5 干预方法

电针干预方法:将小鼠置于前端有呼吸孔后端两侧有圆形开口的小鼠固定器上,小鼠双前肢暴露于固定器外,并用胶带固定,各组小鼠均采用相同方式固定30 min,以控制固定应激对实验结果的影响。选取双前肢“合谷”及“合谷”旁开2 mm处的非经非穴进行治疗,针尖朝腕关节方向斜刺,进针深度约1 mm,以针体稳定、不刺穿皮肤对侧为度。穴位定位参照《实验动物常用穴位名称与定位 第3部分:小鼠》^[16]。采用方氏经皮暨穴位治疗仪,刺激参数:频率筛选时分别使用疏波(2 Hz)、密波(100 Hz)和疏密波(2 Hz/100 Hz);分别于造模后第3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25天进行电针治疗,隔日1次共治疗12次,每次30 min,强度0.2 mA。该强度主要依据前期预实验、动物耐受性及既往小动物电针研究中以局部肌肉颤动阈值作为刺激强度参考的原则确定^[17]。预实验中,0.2 mA可诱发小鼠前肢“合谷”穴区局部轻微肌肉颤动,动物无明显挣扎、尖叫或逃避反应,针刺局部未见皮肤损伤,故选用0.2 mA作为本研究电针刺激强度。

1.6 观察指标与检测方法

触须垫机械反应阈值测定:各组小鼠分别于造模前后第0、3、7、13、19、25天进行检测。在机械痛阈检测前2 d,进行适应期测痛。在开始正式实验之前,确保周围环境安静后适应1 h开始正式实验。选取0.008、0.02、0.04、0.07、0.16、0.4、0.6、1.0 g的von Frey纤毛依次刺激小鼠的触须垫,纤毛弯曲并在触须垫停留2 s,小鼠若出现持续抓挠刺激区域则记为1次阳性反应。每个克数刺激5次,5次中有3次及以上出现阳性反应则将该克数记为实验小鼠的机械反应阈值^[18]。

高架十字迷宫实验:在造模后第26天评估小鼠焦虑样行为。迷宫包括两个封闭臂(尺寸为30 cm×6 cm×15 cm)、两个开放臂(尺寸为30 cm×6 cm)及一个中央平台(尺寸为6 cm×6 cm)。开放臂和封闭臂交错设置形成十字形,迷宫的底部距离地面35 cm。实验开始时,小鼠头部方向逆向于实验员放置于迷宫中央平台,适应30 s。随后使用ANY-maze软件记录小鼠5 min的活动情况。每只小鼠结束测试后用75%的乙醇和纯水擦拭高架十字迷宫,以避免遗留气味干扰,每只小鼠仅进行1次测试以防形成空间记忆。小鼠在开放臂的探索及停留时间减少则提示小鼠出现焦虑样行为。

悬尾实验:悬尾实验用于评价小鼠抑郁样行

为。实验时用胶带固定小鼠尾部远端约1/3处,将小鼠倒悬于距台面约20 cm的水平杆上。每只小鼠之间用黑色挡板隔开,以避免相互干扰。采用ANY-maze行为学分析系统记录小鼠倒悬后6 min内的活动情况,其中前1 min作为适应阶段,分析后5 min内的不动时间。当小鼠停止主动挣扎,四肢静止不动或仅出现由呼吸引起的轻微摆动时,判定为不动状态。不动时间越长,提示小鼠抑郁样行为越明显。

糖水偏好实验:将实验小鼠进行单笼饲养,维持笼内温度在24~26℃之间。准备足量的1%糖水和纯净水,以及适量饲料。关闭灯光12 h,实验动物自由饮食。12 h后交换每个笼内糖水和纯净水瓶位置,开灯12 h后撤走水瓶和饲料。于第3天打开灯光,准备2%糖水及纯净水,称重并做好记录,每笼放入1瓶2%糖水和1瓶纯净水,2 h后拿出水瓶,称重并记录每个水瓶剩余质量。糖水偏好系数(%)=糖水消耗量÷(糖水消耗量+纯净水消耗量)×100%。

免疫荧光染色:糖水偏好实验检测后当天腹腔注射0.3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉小鼠,先后用0.9%的氯化钠溶液和4%的多聚甲醛经心脏灌注,取双侧前肢“合谷”局部组织、C5~C8节段DRG、C5~C8节段脊髓、双侧TG及全脑组织。用4%多聚甲醛溶液固定,随后在15%和30%的蔗糖溶液中梯度脱水。将脱水后的大脑制备为厚度30 μm的冰冻切片,DRG、DH和TG制备为厚度10 μm的冰冻切片。并在37℃下复温1 h,根据三叉神经痛觉传导、丘脑痛觉整合及疼痛伴发负性情绪调控这几个方面,选取Sp5C、VP、CM、PaF、Po、VM、VPM、DRN这8个脑区进行c-Fos免疫荧光染色。用10%驴血清封闭液在37℃下封闭1 h,加入c-Fos一抗(1:800),4℃孵育16 h,37℃水浴1 h,并用TBST清洗6次,加入驴抗大鼠647二抗(1:300)。清洗后,使用DAPI封片。采用蔡司荧光显微镜采集图像。所有图像均在相同曝光参数和相同放大倍数下采集。采用QuPath软件进行阳性细胞计数,并在统一阈值条件下识别c-Fos阳性细胞。在相同脑区、相同层面及相同region of interest(ROI)范围内,c-Fos阳性细胞数量增加提示该脑区神经元激活状态增强,c-Fos阳性细胞数量减少提示该脑区神经元激活状态减弱。为进一步分析DRN内不同类型神经元的激活状态,采用免疫荧光双标法检测TPH2、Glu、GABA与c-Fos的

共表达,以评估DRN内不同类型神经元的激活状态。DRN中TPH2/c-Fos共表达染色时,用10%驴血清封闭液在37℃下封闭1 h,加入c-Fos一抗(1:800)、TPH2一抗(1:500),4℃孵育16 h,37℃水浴1 h,并用TBST清洗6次,加入驴抗大鼠647二抗(1:300)、驴抗兔488二抗(1:1 000)。DRN中Glu/c-Fos和GABA/c-Fos共表达染色时,分别加入Glu一抗(1:300)或GABA一抗(1:800)及c-Fos一抗(1:800),4℃孵育48 h,37℃水浴1 h, TBST清洗6次后加入相应荧光二抗,37℃孵育1.5 h。清洗后使用DAPI封片,采用蔡司荧光显微镜观察DRN中TPH2、Glu、GABA与c-Fos的共表达情况。采用QuPath软件在统一阈值条件下进行阳性细胞及双阳性细胞计数。共标神经元的百分比(%)=双阳性细胞数÷对应类型神经元阳性细胞数×100%。共标率升高表示该类型神经元激活状态增强,共标率降低表示该类型神经元激活状态减弱。对于化学示踪555和病毒示踪488的荧光观察,在TBST清洗切片后直接使用DAPI封片观察即可。TPH2为脑内5-HT合成的限速酶,常作为5-HT神经元的分子标记物^[19]。c-Fos是即刻早期基因产物,其表达常被用于反映神经元激活状态^[20]。

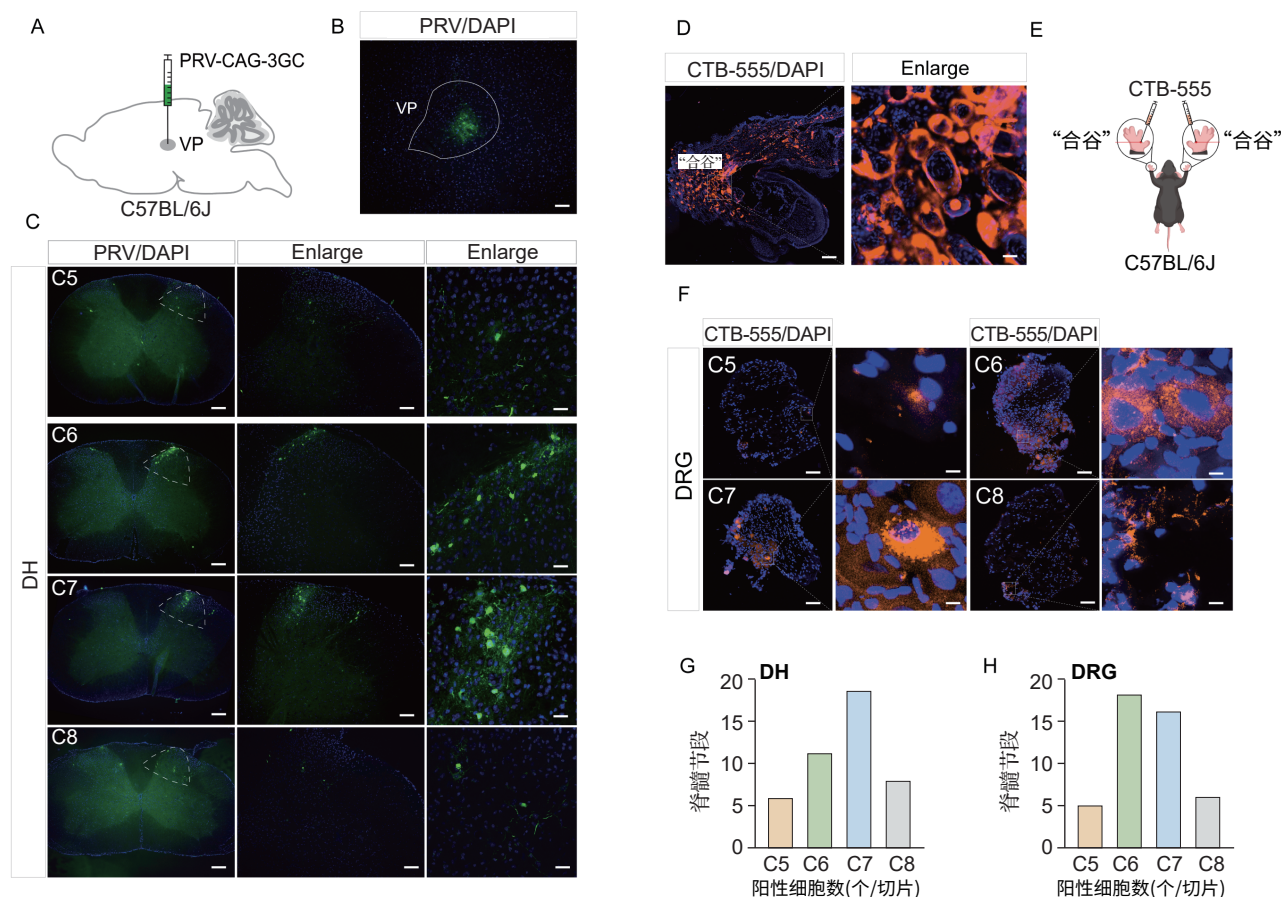
1.7 统计学分析

采用GraphPad Prism 9.5.1软件进行统计分析。计量数据符合正态分布,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较用单因素方差分析,进一步两两比较采用Tukey多重比较检验;涉及组别和时间两个因素的重复测量采用双因素方差分析,进一步组间两两比较采用Bonferroni检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 合谷-DRG-DH-VP的神经解剖联系

为观察合谷相关感觉传入结构与VP之间的神经解剖联系,本研究在VP脑区注射PRV逆行跨多级突触病毒示踪剂,5 d后于C5~C8节段DH观察示踪信号。结果显示,在所代表性切片中,C6和C7节段DH可见PRV阳性细胞(图1C、图1G)。此外,在“合谷”穴区注射CTB-555逆行化学示踪剂后,于C5~C8节段DRG观察示踪信号,在所代表性切片中,C6和C7节段DRG可见CTB-555阳性细胞(图1D、图1F、图1H)。上述结果提示存在合谷-DRG-DH-VP的神经解剖联系。见图1。



注:VP为丘脑腹后核,DH为脊髓背角,DRG为背根神经节,PPV为伪狂犬病毒。A为C57BL/6J小鼠VP脑区注射逆行跨多级突触病毒PRV-CAG-3GC示意图。B为VP脑区PRV-CAG-3GC病毒表达代表图,标尺=200 μm 。C为DH中PRV-CAG-3GC病毒表达代表图,中间和右侧为左侧图中虚线框部分的放大图,标尺(左)=200 μm ,标尺(中)=100 μm ,标尺(右)=20 μm 。D为“合谷”穴区逆行示踪剂CTB-555表达代表图,右图为左图方框部分的放大图,标尺(左)=200 μm ,标尺(右)=10 μm 。E为“合谷”注射逆行化学示踪剂示意图。F为DRG中逆行示踪剂CTB-555表达代表图,右图为左图方框部分的放大图,标尺(左)=100 μm ,标尺(右)=5 μm 。G为DH代表性切片中PRV阳性细胞计数。H为DRG代表性切片中CTB-555阳性细胞计数。G、H为代表性切片阳性细胞数量的描述性展示,不作节段间统计学比较。

图1 合谷-DRG-DH-VP的神经解剖联系

Fig. 1 The neuroanatomical connection of Hegu (LI4)-DRG-DH-VP

2.2 TG-Sp5C-VP的神经解剖学联系

为验证三叉神经痛觉传入相关结构与VP之间是否存在TG-Sp5C-VP神经解剖联系,我们在VP脑区注射PRV-CAG-3GC逆行病毒示踪剂(图2A、图2B),5 d后取材观察,结果显示,在Sp5C和TG可见较多示踪信号阳性细胞(图2C~图2F)。上述结果证明存在TG-Sp5C-VP的神经解剖学联系。

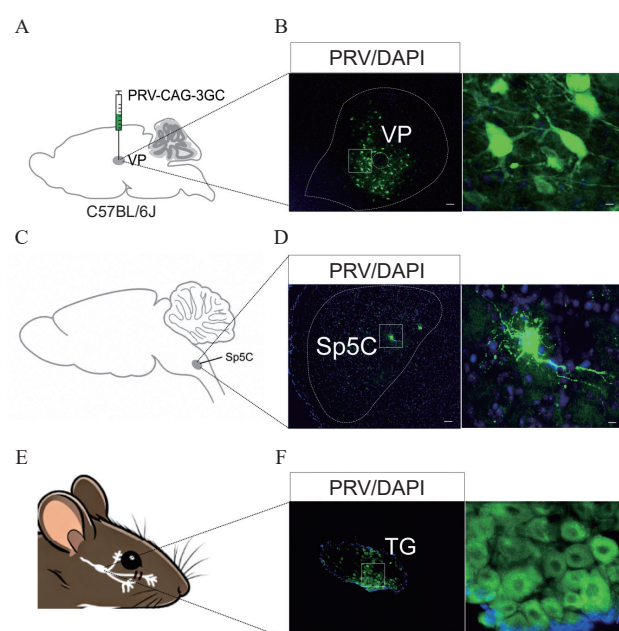
2.3 行为学结果提示2 Hz/100 Hz为本研究的优势电针频率

通过CION法成功建立三叉神经病理性疼痛模型(图3A),且模型至少维持25 d(图3C)。对模型动物给予不同频率电针“合谷”刺激(图3B),结果显示(图3D),与假手术相比,模型组小鼠触

须垫机械反应阈值降低($P<0.0001$)。与模型组相比,自第7天开始,2 Hz、100 Hz和2 Hz/100 Hz电针组模型动物的触须垫机械反应阈值升高($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$, $P<0.0001$);且自第13天开始,2 Hz/100 Hz电针组的机械反应阈值高于2 Hz电针组和100 Hz电针组($P<0.05$, $P<0.01$)。结果表明2 Hz/100 Hz对于缓解CION模型小鼠的机械反应阈值效果最为显著。

2.4 2 Hz/100 Hz电针可缓解CION模型小鼠的负性情绪

高架十字迷宫实验结果表明(图4A、图4B),与假手术组比较,模型组小鼠进入开放臂的时间减少($P<0.0001$);与模型组比较,100 Hz电针组和2 Hz/100 Hz电针组小鼠进入开放臂的时间增加



注:VP为中缝背核,Sp5C为尾侧亚核,TG为三叉神经节,PPV为伪狂犬病毒。A为C57BL/6J小鼠VP脑区注射逆行跨多级突触病毒PRV-CAG-3GC示意图。B为VP脑区PRV-CAG-3GC病毒表达代表图,右图为左图方框部分的放大图,标尺(左)=100 μm,标尺(右)=10 μm。C为C57BL/6J小鼠Sp5C示意图。D为Sp5C脑区PRV-CAG-3GC病毒表达代表图,右图为左图方框部分的放大图,标尺(左)=100 μm,标尺(右)=10 μm。E为C57BL/6J小鼠TG示意图。F为TG中PRV-CAG-3GC病毒表达代表图,右图为左图方框部分的放大图,标尺(左)=100 μm,标尺(右)=10 μm。

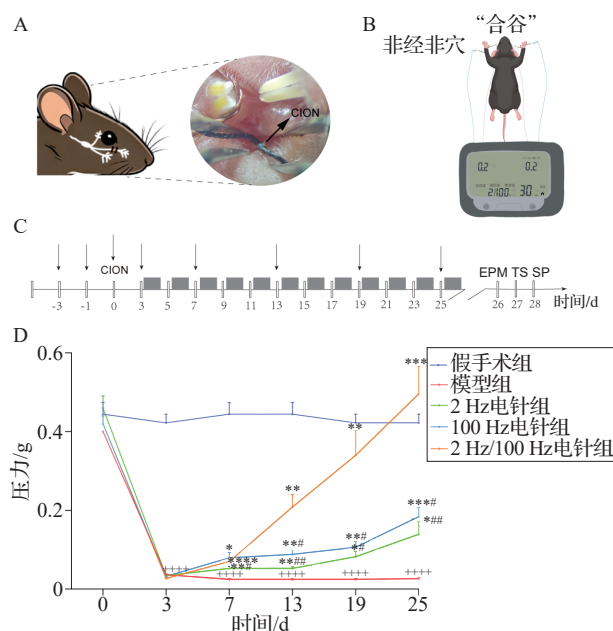
图2 TG-Sp5C-VP的神经解剖联系

Fig. 2 Neuroanatomical connection of TG-Sp5C-VP

($P < 0.01$, $P < 0.0001$); 2 Hz/100 Hz电针组进入开放臂时间较2 Hz电针组增加($P < 0.01$)。悬尾实验结果表明(图4C),与假手术组比较,模型组小鼠悬尾实验不动时间增加($P < 0.0001$);与模型组比较,2 Hz电针组、100 Hz电针组、2 Hz/100 Hz电针组的不动时间减少($P < 0.0001$);且2 Hz/100 Hz电针组较2 Hz电针组和100 Hz组不动时间减少($P < 0.05$)。糖水偏好实验结果表明(图4D),与假手术组比较,模型组小鼠糖水偏好系数降低($P < 0.0001$);2 Hz电针组、100 Hz电针组、2 Hz/100 Hz电针组糖水偏好系数均升高($P < 0.001$, $P < 0.0001$);且2 Hz/100 Hz组较2 Hz组和100 Hz组糖水偏好系数升高($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

2.5 电针可逆转CION模型小鼠Sp5C、VP、VPM、PaF和DRN神经元活性的异常升高

与假手术组比较,模型组小鼠Sp5C、VP、DRN、VPM和PaF脑区神经元活性明显增加($P <$



注:CION为慢性压迫眶下神经,EPM为高架十字迷宫,TS为悬尾实验,SP为糖水偏好实验。A为CION模型手术图。B为电针示意图。C为实验时间流程图,↓示触须垫机械反应阈值检测,■示电针干预。D为各组小鼠触须垫机械反应阈值统计图,与假手术组比较,++++ $P < 0.0001$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$;与2 Hz/100 Hz电针组比较,* $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

图3 CION模型建立和电针频率筛选

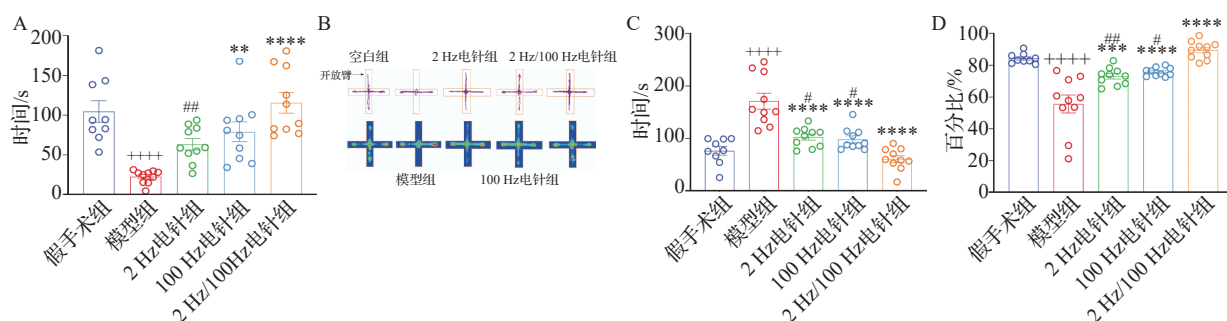
($\bar{x} \pm s$,假手术组9只小鼠,其余各组10只小鼠)

Fig. 3 Establishment of the CION model and screening of electroacupuncture frequency ($\bar{x} \pm s$, 9 mice in the sham group, 10 mice in all other groups)

0.01, $P < 0.0001$, $P < 0.05$);与模型组比较,电针能逆转这一现象($P < 0.0001$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。以上结果表明,Sp5C、VP、VPM、PaF和DRN可能是CION模型小鼠三叉神经痛发生及2 Hz/100 Hz电针干预过程中的主要相关脑区。见图5。

2.6 各组小鼠DRN脑区中不同类型神经元活性比较

上述研究表明,三叉神经痛状态下DRN整体神经元活性增强。DRN是由5-HT、Glu和GABA等多种神经元共同构成的复杂核团,为进一步明确DRN整体活性升高时不同类型神经元的活性变化,我们采用免疫荧光双标法观察DRN中5-HT、Glu、GABA神经元的活性情况。结果表明,与假手术组比较,模型组小鼠DRN中5-HT神经元活性(共标神经元百分比)降低($P < 0.0001$);与模型组比较,2 Hz/100 Hz电针组5-HT神经元活性升高($P < 0.001$,图6A、图6B)。而模型组DRN中Glu和



注: A 为高架十字迷宫实验进入开放臂时间。B 为高架十字迷宫实验运动轨迹代表图和热图。C 为悬尾实验不动时间。D 为糖水偏好系数。与假手术组比较, $++++P<0.0001$; 与模型组比较, $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$; 与 2 Hz/100 Hz 电针组比较, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$ 。

图4 各组小鼠行为学结果比较($\bar{x}\pm s$, 假手术组9只小鼠, 其余各组10只小鼠)

Fig. 4 Comparison of behavioral tests results of mice in the 5 groups
($\bar{x}\pm s$, 9 mice in the sham group, 10 mice in all other groups)

GABA 神经元活性均较假手术组升高($P<0.0001$, $P<0.05$), 电针能逆转这一现象($P<0.0001$, $P<0.05$, 图 6C~图 6F)。以上结果表明, 模型组小鼠 DRN 5-HT 神经元活性下降, 但 Glu 和 GABA 神经元活性升高, 结果提示 CION 状态下 DRN 内不同细胞群的激活状态发生差异性改变。

3 讨论

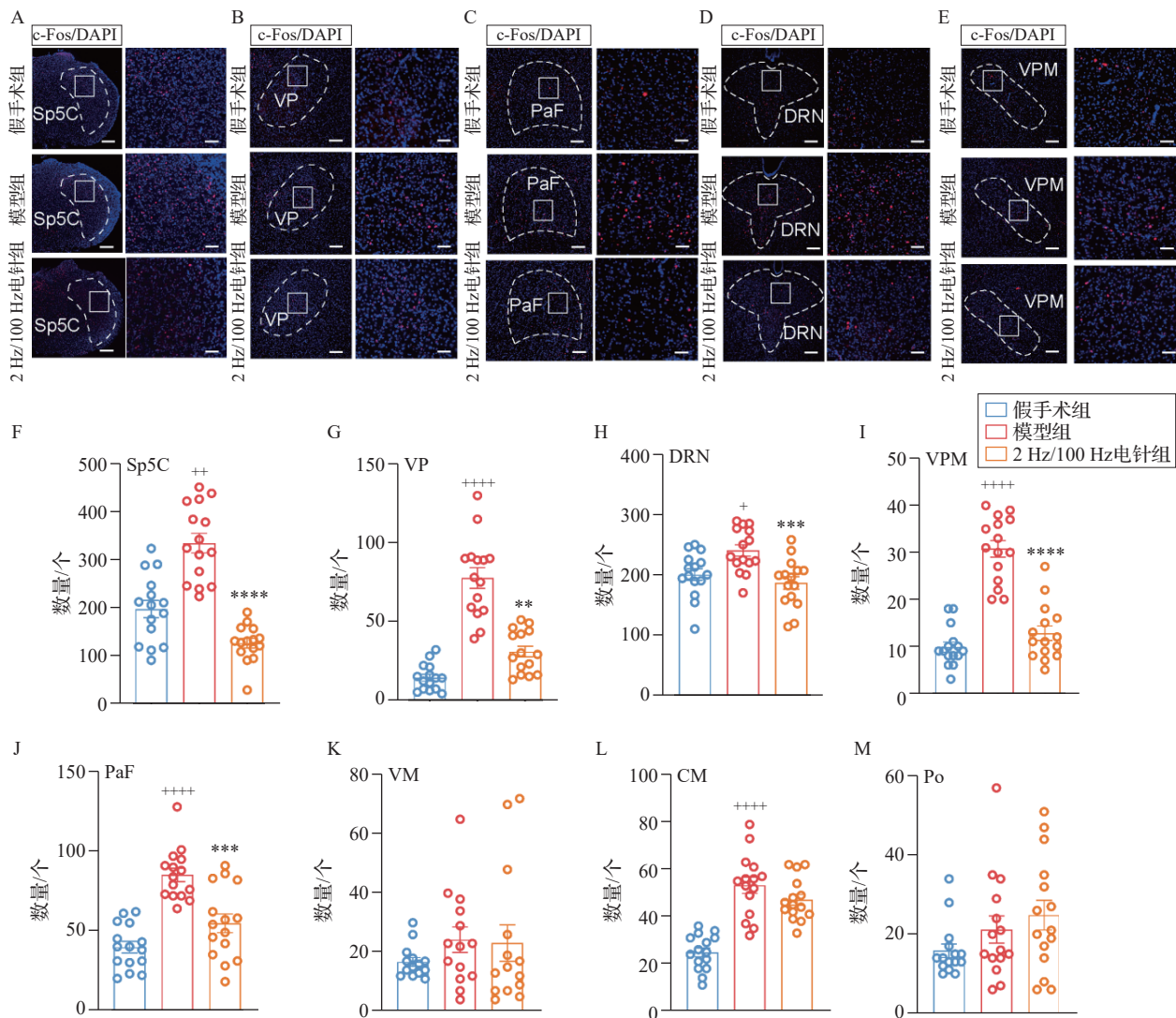
三叉神经痛属临床常见的头面部神经病理性疼痛, 常因反复发作诱发焦虑、抑郁等负性情绪, 形成疼痛与情绪异常相互促进的恶性循环。合谷为手阳明大肠经原穴, 历代针灸文献有“面口合谷收”之说, 提示其与头面部疾病具有密切联系。针刺效应的产生依赖于穴区外周传入与中枢神经系统的整合^[21]。为明确合谷刺激信号进入中枢的解剖基础, 本研究在“合谷”穴区注射 CTB-555 逆行示踪剂, 于 C6、C7 节段 DRG 观察到示踪信号; 进一步在 VP 注射 PRV 逆行跨突触病毒后, 于相应节段 DH 观察到病毒表达, 提示存在“合谷”-DRG-DH-VP 神经解剖联系。在 VP 注射 PRV 后, 于 TG 和 Sp5C 观察到病毒表达, 提示存在 TG-Sp5C-VP 解剖联系。由此推测, 二者可能在 VP 水平发生会聚或整合, VP 可能是电针“合谷”调节三叉神经痛的重要中枢节点。

在明确相关解剖联系后, 本研究以 CION 法建立三叉神经痛模型^[22], 结果显示模型小鼠触须垫机械反应阈值明显降低, 并出现开放臂停留时间减少、不动时间增加及糖水偏好系数降低等行为学改变, 提示 CION 模型可较好地模拟三叉神经痛。在此基础上, 本研究比较不同频率电针效应, 结果显

示 2 Hz、100 Hz 及 2 Hz/100 Hz 电针均可不同程度提高机械反应阈值, 其中 2 Hz/100 Hz 电针作用更为显著, 提示 2 Hz/100 Hz 可能是电针合谷干预三叉神经痛的优势频率。综合行为学结果, 2 Hz/100 Hz 电针在改善机械痛敏及伴随负性情绪方面表现出较好的综合效应, 因此本研究选择该频率开展后续中枢响应观察。

本研究进一步采用 c-Fos 免疫荧光染色检测相关脑区神经元激活状态, 以筛选三叉神经痛发生及电针干预过程中可能参与的关键脑区。本研究证明, CION 模型小鼠 Sp5C、VP、VPM、PaF 及 DRN 等脑区 c-Fos 表达均升高, 提示三叉神经病理性疼痛状态下不仅经典痛觉上行通路被激活, 丘脑整合网络、脑干下行调控系统及情绪相关核团亦可能参与其中。Sp5C 是三叉神经伤害性信息的重要初级中继结构, VP/VPM 则参与三叉神经痛觉信息的丘脑整合与上传。本研究显示 CION 状态下 VP 及 VPM 神经元激活状态增强, 而 2 Hz/100 Hz 电针后其异常激活降低, 提示 VP/VPM 相关丘脑网络可能参与三叉神经痛觉敏化及电针中枢整合作用。

DRN 的变化可能反映下行疼痛调控系统及情绪调节网络的异常。DRN 是脑内 5-HT 能神经元的重要来源, 其 5-HT 能神经元投射参与调节脊髓等部位的伤害性信息传递, 并与慢性疼痛的维持或缓解密切相关^[13]。同时, DRN-5-HT 系统与疼痛伴发的焦虑、抑郁样行为密切相关, 既往研究显示电针可通过调节 DRN 内 5-HT 水平改善疼痛-抑郁共病状态^[14]。本研究结果表明, CION 模型小鼠 DRN 内 5-HT 神经元 c-Fos 共表达比例降低, 而 Glu 及 GABA 神经元 c-Fos 共表达比例升高, 提示慢性三



注: CION为慢性压迫眶下神经, Sp5C为尾侧亚核, VP为丘脑腹后核, DRN为中缝背核, VPM为丘脑腹后内侧核, PaF为丘脑束旁核, VM为丘脑腹内侧核, CM为丘脑中央中核, Po为丘脑后核。A为小鼠Sp5C脑区c-Fos代表图, B为小鼠VP脑区c-Fos代表图, C为小鼠PaF脑区c-Fos代表图, D为小鼠DRN脑区c-Fos代表图, E为小鼠VPM脑区c-Fos代表图, 右图为左图方框部分的放大图, 标尺(左)=100 μ m, 标尺(右)=50 μ m。F~M分别为Sp5C、VP、DRN、VPM、PaF、VM、CM、Po脑区c-Fos阳性细胞数量统计图, 与假手术相比, + P <0.05, ++ P <0.01, +++ P <0.0001; 与模型组相比, ** P <0.01, *** P <0.001, **** P <0.0001。

图5 2 Hz/100 Hz电针对CION模型小鼠相关脑区神经元活动的影响($\bar{x} \pm s$, 3只/组, 每只小鼠选取5张脑片进行分析)

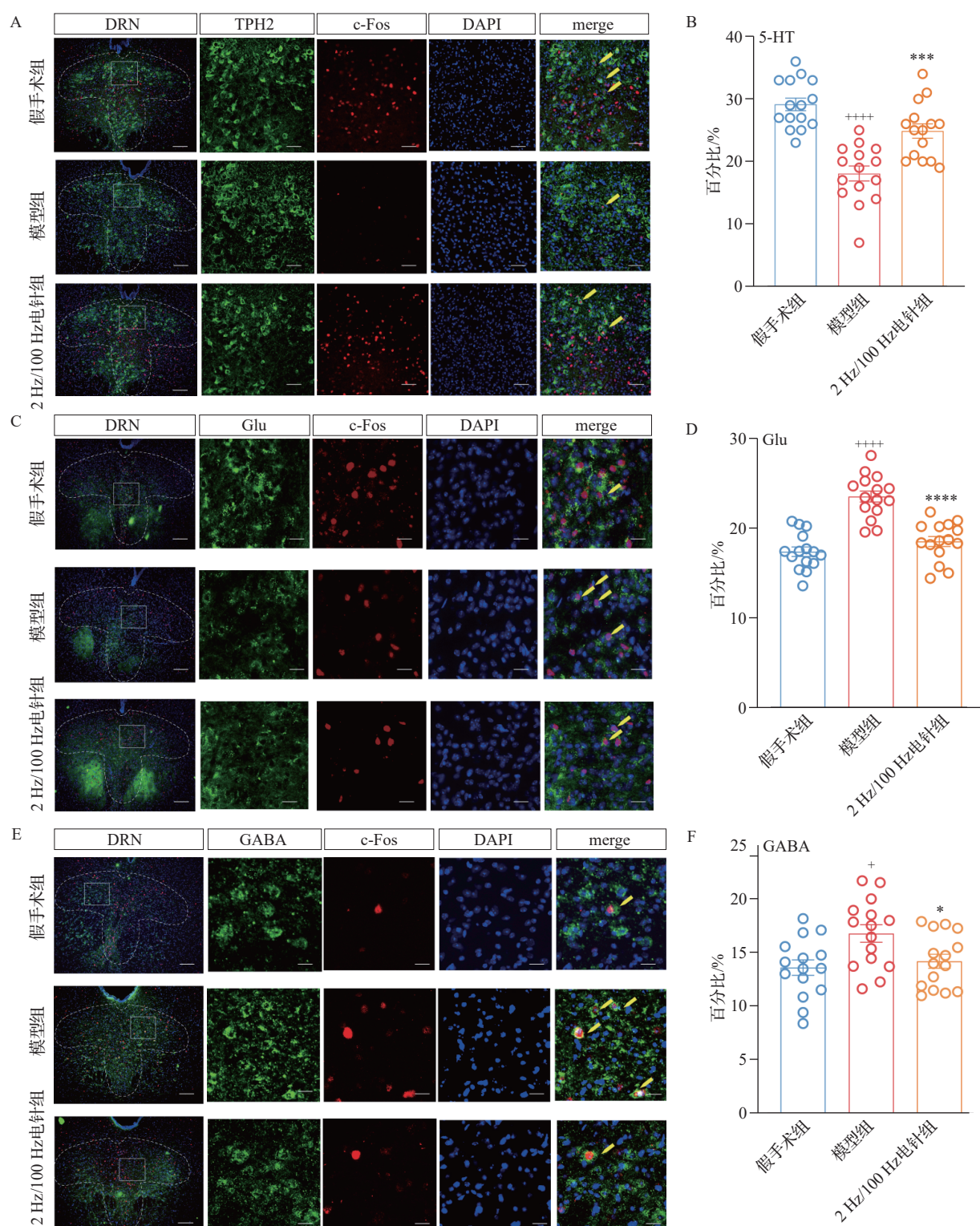
Fig. 5 Effects of 2 Hz/100 Hz electroacupuncture on neuronal activity in related brain regions of CION mice ($\bar{x} \pm s$, 3 mice/group, 5 brain sections were analyzed for each mice)

叉神经病理性疼痛状态下DRN内不同神经元亚群可能存在功能失衡。2 Hz/100 Hz电针可逆转上述变化, 表现为5-HT神经元激活状态恢复, 并降低Glu及GABA神经元异常激活, 该结果与行为学改善趋势一致, 提示DRN可能参与电针调节三叉神经痛及其伴随的负性情绪过程。

值得注意的是, PaF作为丘脑非特异性核团, 参与伤害性信息的情感维度及疼痛伴随负性情绪的调节^[23]。本研究结果表明PaF与DRN在CION状态下均出现c-Fos表达升高, 2 Hz/100 Hz电针后均

有所降低, 提示二者可能参与疼痛相关觉醒及情绪反应调节。既往研究表明, DRN-5-HT系统可影响丘脑及相关脑区神经活动, 从而参与疼痛调节过程^[24]。结合本研究结果推测, 电针“合谷”干预三叉神经痛的中枢机制可能不仅涉及合谷穴区躯体感觉输入与三叉神经痛觉输入在VP/VPM相关丘脑网络中的上行整合, 还可能进一步募集DRN相关下行疼痛调控及情绪调节网络。

在DRN神经元亚型分析中, 本研究显示, CION模型小鼠TPH2/c-Fos共标率降低, 而Glu和



注:DRN为中缝背核,TPH2为色氨酸羟化酶2,5-HT为5-羟色胺,Glu为谷氨酸,GABA为 γ -氨基丁酸。A为各组DRN中5-HT神经元(用TPH2标记)、c-Fos、DAPI及共标的免疫荧光染色图,C为各组小鼠DRN中Glu、c-Fos、DAPI及共标的免疫荧光染色图,E为各组小鼠DRN中GABA、c-Fos、DAPI及共标免疫荧光染色图,左图虚线框为DRN,标尺=100 μ m,右图为左图方框部分的共标染色图,标尺=10 μ m。B为各组5-HT与c-Fos双阳性细胞占5-HT阳性细胞的百分比;D为各组Glu与c-Fos双阳性细胞占Glu阳性细胞的百分比;F为各组GABA与c-Fos双阳性细胞占GABA阳性细胞的百分比;与假手术组相比, $^+P<0.05$, $^{+++}P<0.0001$;与模型组相比, $^*P<0.05$, $^{***}P<0.001$, $^{****}P<0.0001$ 。

图6 2 Hz/100 Hz电针对CION模型小鼠DRN中5-HT、Glu和GABA神经元活性的影响
($\bar{x}\pm s$,3只鼠/组,每只小鼠选取5张脑片分析)

Fig. 6 Effects of 2 Hz/100 Hz electroacupuncture on the activity of 5-HT, Glu and GABA neurons in the DRN of CION mice ($\bar{x}\pm s$, 3 mice/group, 5 brain sections were analyzed for each mice)

GABA的c-Fos共标率升高。既往研究表明,DRN内GABA能神经元可调节5-HT神经元活动并参与应激及负性情绪调控,DRN亦接受广泛的Glu能输入,参与疼痛和应激相关信息整合^[25-28]。鉴于DRN具有显著的细胞类型及投射异质性,不同GABA能和Glu能神经元亚群可参与不同的局部或远程环路^[29-31],因此二者活性同时升高可能反映不同神经元亚群的并行募集,而非同一局部环路中的直接拮抗。2 Hz/100 Hz电针可在一定程度上逆转上述变化,提示其可能通过调节DRN内不同细胞群的活动平衡,参与机械痛敏及伴随的负性情绪改善。

本研究结合神经示踪、行为学及c-Fos表达变化,初步揭示了电针“合谷”干预三叉神经病理性疼痛的相关中枢响应特征。行为学结果提示2 Hz/100 Hz电针具有较好的综合效应,并据此开展了后续中枢机制观察。上述结果为研究电针干预三叉神经痛的合谷-VP-TG应答机制提供了客观依据。未来可结合神经环路示踪、功能学调控及神经元活动记录等技术,进一步阐明VP相关丘脑网络与DRN-5-HT系统在电针镇痛及情绪调节中的协同作用,以及不同电针频率的中枢调控特征。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。作者方剑乔为本刊编委,但未参与本文的审理。

参考文献

- [1] Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS) The international classification of headache disorders, 3rd edition [J]. Cephalalgia, 2018, 38 (1): 1-211.
- [2] Lambru G, Zakrzewska J, Matharu M. Trigeminal neuralgia: a practical guide[J]. Pract Neurol, 2021, 21(5): 392-402.
- [3] Wu T H, Hu L Y, Lu T, et al. Risk of psychiatric disorders following trigeminal neuralgia: a nationwide population-based retrospective cohort study[J]. J Headache Pain, 2015, 16: 64.
- [4] Li R R, Sun J, Luo K T, et al. Electroacupuncture and carbamazepine for patients with trigeminal neuralgia: a randomized, controlled, 2×2 factorial trial [J]. J Neurol, 2024, 271(8): 5122-5136.
- [5] 杨继洲. 针灸大成[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006. Yang J Z. The great compendium of Acupuncture and Moxibustion (in Chinese) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2006.
- [6] 彭易雨, 彭瑛, 孟海婷, 等. 浅谈“面口合谷收”的理论基础与临床应用[J]. 针刺研究, 2021, 46(1): 84-86. Peng Y Y, Peng Y, Meng H T, et al. A brief discussion on theoretical basis and clinical application of “treatment of orofacial diseases by using Hegu (LI4)” (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2021, 46(1): 84-86.
- [7] 景向红, 宿杨帅, 高昕妍, 等. 推进针灸学科的高质量发展[J]. 针刺研究, 2024, 49(1): 1-5. Jing X H, Su Y S, Gao X Y, et al. Promoting high-quality development of acupuncture and moxibustion (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2024, 49(1): 1-5.
- [8] Zhou M M, Zhang Q X, Huo M Z, et al. The mechanistic basis for the effects of electroacupuncture on neuropathic pain within the central nervous system [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 161: 114516.
- [9] Patel N M, Jozsa F, Das J M. Neuroanatomy, spinal trigeminal nucleus [M]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024.
- [10] Kim H K, Chung K M, Xing J P, et al. The trigeminal sensory system and orofacial pain [J]. IJMS, 2024, 25(20): 11306.
- [11] Katagiri A, Kato T. Multi-dimensional role of the parabrachial nucleus in regulating pain-related affective disturbances in trigeminal neuropathic pain [J]. J Oral Sci, 2020, 62 (2): 160-164.
- [12] Du Y, Lin S D, Wu X Q, et al. Ventral posteromedial nucleus of the thalamus gates the spread of trigeminal neuropathic pain [J]. J Headache Pain, 2024, 25(1): 140.
- [13] Heijmans L, Mons M R, Joosten E A. A systematic review on descending serotonergic projections and modulation of spinal nociception in chronic neuropathic pain and after spinal cord stimulation [J]. Mol Pain, 2021, 17: 17448069211043965.
- [14] Wu Y Y, Jiang Y L, He X F, et al. 5-HT in the dorsal raphe nucleus is involved in the effects of 100-Hz electroacupuncture on the pain-depression dyad in rats [J]. Exp Ther Med, 2017, 14(1): 107-114.
- [15] Paxinos G, Franklin K B J. Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates [M]. 5th edition. Amsterdam: Academic Press, 2019.
- [16] 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. China Association of Acupuncture-Moxibustion. Nomenclature and location of acupoints commonly used in laboratory animals. Part 3: mice (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2021, 46(5): 445-446.
- [17] Jia Y Z, Li H T, Zhang G M, et al. Electroacupuncture alleviates orofacial allodynia and anxiety-like behaviors by regulating synaptic plasticity of the CA1 hippocampal region in a mouse model of trigeminal neuralgia [J]. Front Mol Neurosci, 2022, 15: 979483.
- [18] 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.
- [19] Carkaci-Salli N, Salli U, Kuntz-Melcavage K L, et al. TPH2 in the ventral tegmental area of the male rat brain [J]. Brain Res Bull, 2011, 84(6): 376-380.
- [20] Hoffman G E, Smith M S, Verbalis J G. C-fos and related immediate early gene products as markers of activity in

- neuroendocrine systems[J]. *Front Neuroendocrinol*, 1993, 14(3): 173-213.
- [21] Zhao Z Q. Neural mechanism underlying acupuncture analgesia [J]. *Prog Neurobiol*, 2008, 85(4): 355-375.
- [22] Deseure K, Hans G H. Chronic constriction injury of the rat's infraorbital nerve (IoN-CCI) to study trigeminal neuropathic pain[J]. *J Vis Exp*, 2015(103): 53167.
- [23] Zhu X, Zhou W J, Jin Y, et al. A central amygdala input to the parafascicular nucleus controls comorbid pain in depression [J]. *Cell Rep*, 2019, 29(12): 3847-3858.
- [24] Zhang H J, Li L, Zhang X J, et al. Role of the dorsal raphe nucleus in pain processing[J]. *Brain Sci*, 2024, 14(10): 982.
- [25] Gervasoni D, Peyron C, Rampon C, et al. Role and origin of the GABAergic innervation of dorsal raphe serotonergic neurons[J]. *J Neurosci*, 2000, 20(11): 4217-4225.
- [26] Challis C, Boulden J, Veerakumar A, et al. Raphe GABAergic neurons mediate the acquisition of avoidance after social defeat[J]. *J Neurosci*, 2013, 33(35): 13978-13988, 13988a.
- [27] Spoida K, Maseck O A, Deneris E S, et al. Gq/5-HT_{2c} receptor signals activate a local GABAergic inhibitory feedback circuit to modulate serotonergic firing and anxiety in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(17): 6479-6484.
- [28] Soiza-Reilly M, Commons K G. Glutamatergic drive of the dorsal raphe nucleus[J]. *J Chem Neuroanat*, 2011, 41(4): 247-255.
- [29] Weissbourd B, Ren J, DeLoach K E, et al. Presynaptic partners of dorsal raphe serotonergic and GABAergic neurons [J]. *Neuron*, 2014, 83(3): 645-662.
- [30] Xie L H, Wu H, Chen Q, et al. Divergent modulation of pain and anxiety by GABAergic neurons in the ventrolateral periaqueductal gray and dorsal raphe [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2023, 48(10): 1509-1519.
- [31] Wang X Y, Jia W B, Xu X, et al. A glutamatergic DRN-VTA pathway modulates neuropathic pain and comorbid anhedonia-like behavior in mice[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 5124.

收稿日期:2026-05-08 修回日期:2026-07-27