周游,汪雯,蔡杨乾,等. 电针对炎性痛大鼠背根神经节卫星胶质细胞活化和 P2X7 受体表达的干预 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 494-502.
Zhou Y, Wang W, Cai YQ, et al. Effect of electroacupuncture on activation of satellite glial cells and P2X7 receptor in the DRG of rats with chronic inflammatory pain[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 494-502.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.04.009

电针对炎性痛大鼠背根神经节卫星胶质细胞活化和 P2X7 受体表达的干预

周游[1],汪雯[1],蔡杨乾[1],杜俊英[1],邵晓梅[1],蒋永亮[1],刘伯一[1],高宏[2*],梁宜[1,2*],方剑乔[1,2]

(1. 浙江中医药大学第三临床医学院针灸神经生物学实验室 浙江省针灸神经病学重点实验室, 杭州 310053; 2. 浙江中医药大学附属第三医院针灸科, 杭州 310053)

【摘要】 目的 观察电针对慢性炎性痛大鼠患侧足跖机械痛阈(paw withdrawal thresholds,PWTs)以及背根神经节(dorsal root ganglia, DRG)内卫星胶质细胞及其 P2X7 受体活化的影响,探讨电针抗大鼠炎性痛的外周机制。**方法** 第一部分:将大鼠完全随机分为空白组(Con group,$n=12$)、炎性痛组(CFA group,$n=12$)、炎性痛+电针组(CFA + EA group,$n=12$)、炎性痛+假电针组(CFA + sEA group,$n=12$)。炎性痛大鼠于右后足掌侧正中皮下注射完全弗氏佐剂(complete freud's adjuvant,CFA)每只 0.1 mL 构建模型;电针处理取穴"足三里"、"昆仑",电针参数为疏密波,频率 2/100 Hz,强度 0.5-1-1.5 mA(每个强度治疗 10 min),每日 1 次,连续 7 d。检测造模前和造模后 1、3、7、8、10、12、14 d 各组大鼠机械痛阈,采用免疫印迹法检测造模后 14 d 各组大鼠患侧 DRG 中神经胶质酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein,GFAP)及 P2X7 受体活化情况。第二部分:将大鼠随机分为炎性痛+DMSO 组(CFA + DMSO group,$n=8$)、炎性痛+P2X7R 抑制剂 A740003 组(CFA + A740003 group,$n=10$)、炎性痛+电针+生理盐水组(CFA + EA + NS group,$n=8$)、炎性痛+电针+P2X7R 激动剂 BzATP 组(CFA + EA + BzATP group,$n=12$),分别鞘内注射相应药物。分别于手术前、造模前、造模后和给药后各时点检测大鼠 PWTs 变化。**结果** (1)CFA 致炎性模型大鼠痛阈显著下降($P<0.01$),电针治疗后其机械痛阈显著升高($P<0.01$)。CFA 足底注射 14 d 后,大鼠患侧 L4-6 DRG 中 GFAP、P2X7 蛋白表达显著增多($P<0.05$);电针显著抑制大鼠患侧 L4-6 DRG 中 GFAP、P2X7 蛋白表达($P<0.05$),而 CFA + sEA 组却无明显变化($P>0.05$)。(2)与 CFA + DMSO 组比较,鞘内注射 P2X7 抑制剂 A740003 显著提高 CFA 大鼠机械痛阈($P<0.01$);CFA + EA + BzATP 组大鼠 PWTs 明显低于 CFA + EA + NS 组($P<0.01$)。**结论** 抑制大鼠背根神经节卫星胶质细胞活化和 P2X7 受体表达参与电针抗慢性炎性痛,可能是电针镇痛外周机制之一。

【关键词】 慢性炎性痛;电针镇痛;背根神经节;卫星胶质细胞;P2X7 受体
【中图分类号】Q95-33 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1005-4847(2020) 04-0494-09

Effect of electroacupuncture on activation of satellite glial cells and P2X7 receptor in the DRG of rats with chronic inflammatory pain

ZHOU You[1], WANG Wen[1], CAI Yangqian[1], DU Junying[1], SHAO Xiaomei[1], JIANG Yongliang[1], LIU Boyi[1], GAO Hong[2*], LIANG Yi[1,2*], FANG Jianqiao[1,2]

[**基金项目**]国家自然科学基金(81674061),浙江省自然科学基金(LY19H270010)。
Funded by National Natural Science Foundation(81674061), Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY19H270010).
[**作者简介**]周游(1994—),女,在读硕士研究生,研究方向:针刺镇痛研究。Email:zhouyou0955@163.com
[**通信作者**]高宏(1970—),男,主任中医师,研究方向:针刺镇痛和功能调节研究。Email:qtgh@hotmail.com;
梁宜(1980—),女,博士,研究员、主任中医师,研究方向:针灸镇痛和免疫调节的基础和临床研究。Email: liangyiwww@zcmu.edu.cn。
*共同通信作者

(1. Department of Neurobiology and Acupuncture Research, the Third Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Key Laboratory of Acupuncture and Neurology of Zhejiang Province, Hangzhou 310053, China. 2. Department of Acupuncture and Moxibustion, the Third Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310005)
Corresponding author: CAO Hong. E-mail: qtgh@hotmail.com; LIANG Yi. E-mail: liangyiwww@zcmu.edu.cn

【**Abstract**】 **Objective** To observe the effects of electroacupuncture (EA) on ipsilateral paw withdrawal thresholds (PWTs), activation of satellite glial cells, and the P2X7 receptor in the dorsal root ganglia (DRG) of rats with chronic inflammatory pain, and further explore the peripheral mechanism of EA against chronic inflammatory pain. **Methods** Part 1: Rats were randomly divided into the control group (Con group; $n=12$), CFA-induced inflammatory pain group (CFA group; $n=12$), CFA model plus EA treatment group (CFA + EA group; $n=12$), and CFA model plus sham EA treatment group (CFA + sEA group; $n=12$). The CFA inflammatory pain model was established by injecting 0.1 mL CFA into the plantar of the rat right hind foot. EA at a 2/100 Hz alternative frequency and gradual intensity (0.5, 1, and 1.5 mA, 10 min each) was administered at acupoints "Zusanli" and "Kunlun" for 30 min per day for 7 days. PWTs were detected at 1, 3, 7, 8, 10, 12, and 14 days after CFA injection. Protein expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and P2X7 receptor in DRG at day 14 post-CFA was measured by western blotting. Part 2: CFA rats were randomly divided into the CFA plus DMSO group (CFA + DMSO group; $n=8$), CFA plus P2X7R agonist A740003 group (CFA + A740003 group; $n=10$), EA plus normal saline group (CFA + EA + NS group; $n=8$), and EA plus P2X7R agonist BzATP group (CFA + EA + BzATP group; $n=12$), which were intrathecally administrated with DMSO, A740003, normal saline, and BzATP respectively. PWTs were measured at pre-surgery, pre-CFA, post-CFA, and post-intrathecal injection. **Results** Part 1: PWTs of CFA rats were decreased significantly ($P<0.01$) and EA significantly increased PWTs ($P<0.01$). CFA injection significantly increased the expression of GFAP and P2X7 receptor in the ipsilateral L4-6 DRG of rats ($P<0.05$). EA significantly reduced the expression of GFAP and P2X7 receptor in the L4-6 DRG of rats ($P<0.05$), but sham EA had no obvious effect ($P>0.05$). Part 2: Compared with the CFA + DMSO group, intrathecal injection of P2X7 receptor antagonist A740003 significantly increased PWTs of CFA rats ($P<0.01$). PWTs in the CFA + EA + BzATP group were significantly lower than those in the CFA + EA + NS group ($P<0.01$). **Conclusions** Electroacupuncture alleviates chronic inflammatory pain in rats, which might be related to the reduction of satellite glial cell activation and decrease of P2X7 receptor activation in the rat DRG. Inhibition of satellite glial cell activation and a decrease of P2X7 receptor expression contribute to EA treating chronic inflammatory pain, which may be one of the peripheral mechanisms of EA analgesia.

【**Keywords**】 chronic inflammatory pain; Electroacupuncture's analgesia; dorsal root ganglia; satellite glial cells; P2X7 receptor
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

随着生活水平的不断提升,人们对生活质量的要求日益提高,而慢性疼痛是损害患者生活质量的重要因素之一。有报道显示:去年,发达国家中的慢性疼痛患者人数达到人口总数的 37.3%,而发展中国家则高达 41.1%[1]。最新报道显示美国慢性疼痛的发病率高达 4.8%[2],中国流行病学研究结果显示女性慢性疼痛发生率高于男性(女性:39.92%,男性:32.17%)[3]。慢性疼痛严重影响患者的生活质量,给个人和社会造成巨大负担。炎性疼痛是慢性疼痛的主要类型之一,目前主要采用非甾体类抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)进行治疗[4]。虽然 NSAIDs 抗炎镇痛疗效显著,但因胃肠道损伤、心血管损害等副作用而限制其临床应用。电针疗法作为新型针刺疗法,因其镇痛疗效确切被广泛应用于临床镇痛[5]。

嘌呤 P2X7 受体(purinergic P2X7 receptor, P2X7R)是三磷酸腺苷敏感的配体门控阳离子通道的受体,在外周选择性表达于卫星胶质细胞[6-7],新近研究表明 P2X7R 在疼痛信号传导中起重要作用[8-11]。课题组前期研究已证实电针有较好抗炎镇痛效应[12-14],电针抗炎性痛效应是否与抑制外周卫星胶质细胞活化及其 P2X7R 表达相关,暂未见相关报道。故本研究通过观察电针对炎性痛大鼠背根神经节卫星胶质细胞活化与 P2X7R 表达的干预,以期揭示电针抗炎性痛的部分外周调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 86 只,6 周龄,体重(180 ± 20) g,购自中国科学院上海实验动物中心【SCXK(沪)2018 - 0006】,由浙江中医药大学实验动物中心饲养【SYXK(浙)2018-0012】,本实验饲养期间给予啮齿类动物标准颗粒饲料(由浙江中医药大学实验动物中心提供)及自由饮水,12 h 循环灯光,恒定湿度,室温(23 ± 2)℃。本实验所有操作均符合浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会实验伦理学要求,伦理审批号: IACUC-20190715-03。

1.1.2 试剂与仪器

完全弗氏佐剂(F5881, 美国 Sigma),兔抗 P2X7R(APR-004,美国 Alomone),GAPDH(3683,美国 CST),兔抗 GFAP(ab7260,美国 Abcam),山羊抗兔 IgG H&L(ab6721,美国 Abcam),P2X7R 选择性抑制剂 A740003(3701,美国 Tocris),P2X7R 选择性激动剂 BzATP(B6396,美国 Sigma),BCA 试剂盒(P0010,中国碧云天),ECL 试剂盒(P0018,中国碧云天)。

纤毛机械刺激针(NC12775, 美国 Stoelting Co.);韩氏穴位神经刺激仪(HANS-200 A,中国联创科技公司);一次性无菌针灸针(0.25 × 13 mm,中国苏州医疗用品厂有限公司);恒温手术台(美国 Harvard);动物麻醉机(WMR,美国 MATRX);超声波粉碎机(中国宁波新芝生物科技有限公司);电泳-转印系统(美国 BioRad);台式高速冷冻离心机(Sorvall Biofuge Stratos,美国 Thermo Scientific);酶标仪(SpectraMax M4,美国 Molecular Devices);凝胶成像系统(Image Quant LAS4000,德国 GE)。

1.2 方法

1.2.1 动物造模

每只大鼠右后足掌面正中皮下注射完全弗氏佐剂(complete freud's adjuvant, CFA)0.1 mL,建立大鼠炎性痛模型;对照大鼠仅在相同位置注射相同剂量的 0.9%生理盐水溶液。

1.2.2 鞘内置管术

使实验第二部分大鼠适应环境 3 d 后,于模前 8 d进行鞘内置管术。具体方法如下:采用异氟烷(输出浓度为 2%)以 500 mL/min 氧气流量进行低流量吸入麻醉。将大鼠背部 L6-S1 区域常规去毛备皮。于大鼠 L6-S1 棘突中间纵向做切口,分离肌肉与棘间韧带,用咬骨钳去除 L6 部分棘突,形成“V”形切口,暴露椎间隙。用导引针头刺穿硬脊膜,随后将 PE-10 导管从穿刺部位斜向上缓慢插入,使其到达 L4-L5 间隙。经皮下隧道将导管另一端于颈部引出,前端保留 4 ~ 6 cm,热熔封闭管的外端口。置管术后肌肉注射青霉素并单笼饲养。术后待大鼠活动自如后,注入 10 μL 的 2%利多卡因及 25 μL 生理盐水。鞘内注射后 30 s 内大鼠出现双下肢麻痹,拖地、不能负重,钳夹或针刺不产生缩足反应,待药效消退后可完全恢复正常肢体活动能力,以此验证鞘内置管成功,否则为失败。

1.2.3 分组与处理

第一部分:48 只大鼠完全随机分为 4 组:空白组(Con 组,n=12)、炎性痛组(CFA 组,n=12)、炎性痛 + 电针组(CFA + EA 组,n=12)、炎性痛+假电针组(CFA + sEA 组,n=12)。除了 Con 组,余三组大鼠均接受造模和与 CFA + EA 组相同固定处理。CFA + EA 组于造模后第 8 天介入电针治疗,采用 0.25 mm × 13 mm 针灸针刺入大鼠双侧“足三里”、“昆仑”,连接 HANS-200 A 韩氏电针仪,刺激参数选用疏密波、频率 2/100 Hz、强度为 0.5-1-1.5 mA(每 10 min 步进 0.5 mA),每次治疗 30 min,每日 1 次,连续 7 d;CFA + sEA 组仅将针灸针刺入相同穴位皮下不予通电。

第二部分:鞘内置管术成功的 38 只大鼠随机分为炎性痛 + DMSO 组(CFA + DMSO 组,n=8)、炎性痛 + A740003 组(CFA + A740003 组,n=10)、炎性痛+电针+生理盐水组(CFA + EA + NS 组,n=8)和炎性痛+电针 + BzATP 组(CFA + EA + BzATP 组,n=12),于造模后第 12 ~ 14 天分别鞘内注射 10 μL 不同药物(0.1% DMSO 溶液、250 nmol/L A740003 溶液、灭菌生理盐水和 280 nmol/L BzATP 溶液),每日 1 次,连续 3 d。考虑到留置 PE 管体积,每次鞘内给药后给予 25 μL 灭菌生理盐水冲管后再行封管。CFA + EA + NS 组和 CFA + EA + BzATP 组鞘内给药前给予电针治疗,具体参数同第一部分,共治疗 7 次。

1.2.4 痛行为检测

采用缩腿阈(paw withdrawal threshold, PWT)作为大鼠痛行为观测指标,分别于 CFA 造模前后、电针治疗和鞘内给药前后不同时间点检测 PWT。正式测定前将大鼠置于铁丝网上的透明有机玻璃箱内(20 cm × 20 cm × 15 cm),使其适应环境 30 min。待大鼠停止梳理毛发和探索性活动,选用不同 Von Frey 丝(0.4、0.6、1、2、4、6、8、15、26 g)垂直刺激大鼠右后足底中部,向大鼠足垫施加压力至 Von Frey

丝轻微弯曲并持续 5 s。若大鼠出现缩腿或舔足反应则为阳性反应,记为“X”并给予相邻小一级力度的刺激。当该力度的 von Frey 纤维刺激不能引起阳性反应时,则记为“O”并给予相邻大一级力度的纤维刺激,每次刺激间隔 30 s。由此可得到一串以“O”或“X”组合的序列,并使用 Chaplan 等[15]描述的方法进行计算。若计算得出 50% PWTs > 26.0 g 或< 0.4 g,仍以 26.0 g 或 0.4 g 作为最大或最小值。

1.2.5　取材及样本处理

本实验于 CFA 模后 14 d 检测完 PWT 后,进行取材。用 3%戊巴比妥钠(0.15 mL/100 g)腹腔注射麻醉大鼠,暴露心脏,左心室、升主动脉用 4℃预冷的生理盐水快速灌注,快速取出患侧 L4-6 DRG,置入-80℃冰箱中保存。

1.2.6　免疫印迹法检测大鼠 DRG 中 GFAP、P2X7R 蛋白表达

将大鼠患侧 L4-6 背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)使用 RIPA 裂解液提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度后,进行蛋白变性。上样时采用 8%分离胶、5%浓缩胶制胶,电泳后转印致 PVDF 膜。使用 5% 脱脂奶粉封闭,分别用 TBST 稀释好的一抗:兔抗 P2X7R(1∶1000,Alomone),兔抗 GFAP(1∶2000, Abcam), GAPDH(1∶1000, CST),4℃孵育过夜。随后加入 TBST 稀释的二抗:山羊抗兔 IgG H&L(1∶10000,Abcam),室温搅动孵育 2 h。使用 ECL 发光试剂盒显色拍片。采用德国 GE 公司凝胶成像系统 ImageQuant LAS 4000 进行成像,拍片后使用 Image J 软件计算条带的平均灰度值。

1.3　统计学分析

实验数据以平均值 ± 标准误($\bar{x} \pm s\bar{x}$)表示,采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。两组组间采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,多组间不同时间点采用双因素重复测量方差分析。两两比较方差齐性时采用 LSD 检验、方差不齐时采用 Dunnett's T3 检验;均以 $P< 0.05$ 为差异有统计学意义。

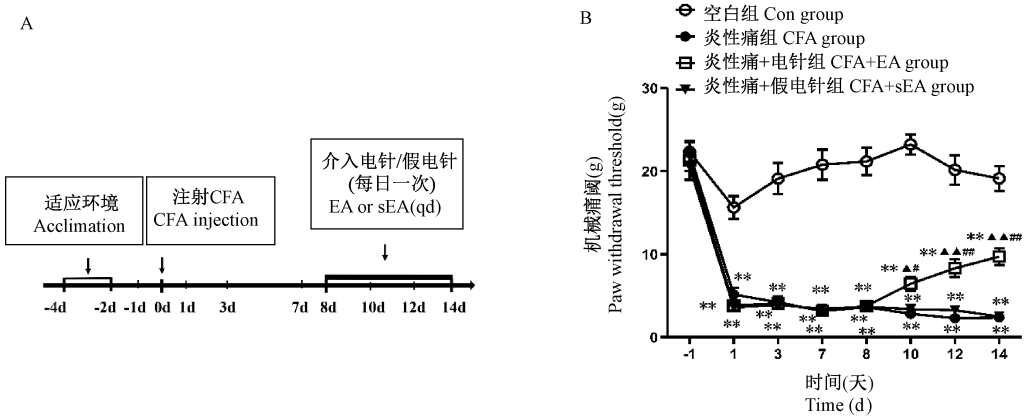
2　结果

2.1　各组大鼠 PWTs 变化

如图 1 所示,造模前各组大鼠患侧基础 PWTs 无差异($P> 0.05$)。与 Con 组比较,余三组大鼠造模后 1、3、7 d 时 PWTs 显著降低($P< 0.01$);模后第 8 天介入电针治疗,每次电针治疗后 30 min 内完成 PWTs 测量。单次电针治疗后,CFA + EA 组大鼠患侧 PWTs 并未出现显著变化($P> 0.05$)。电针治疗 3、5、7 次后,CFA + EA 组大鼠患侧 PWTs 逐渐递增,显著高于同期 CFA 和 CFA + sEA 组($P< 0.05$ 或 $P< 0.01$),但仍低于同期 Con 组($P< 0.01$)。结果提示重复电针治疗可有效缓解 CFA 诱发的慢性炎性痛。

2.2　各组大鼠 L4-6 DRG 中 GFAP 蛋白表达变化

如图 2 所示,造模后 14 d 时,CFA 大鼠患侧 L4-6 DRG 中 GFAP 蛋白表达显著高于同期 Con 组(P



注:A:实验流程图;B:与同期 Con 组比较,$^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$;与同期 CFA 组比较,$^{▲}P < 0.05$, $^{▲▲}P < 0.01$;与同期 CFA + sEA 组比较,$^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$。(下图同)

图 1　各组大鼠不同时间点 PWTs 变化

Note. A, Illustration of experimental design. B, Compared with Con group, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$. Compared with CFA group, $^{▲}P < 0.05$, $^{▲▲}P < 0.01$. Compared with CFA + sEA Group, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$. (The same in the following Figures)

Figure 1　Comparisons of PWTs among groups of rats at different timepoints

< 0.05)；CFA + EA 组大鼠患侧 L4－6 DRG 中 GFAP 蛋白表达显著低于同期 CFA 组和 CFA + sEA (P< 0.05)，与同期 Con 组无明显差异(P> 0.05)；而 CFA + sEA 组与同期 CFA 组比较无显著差异(P > 0.05)。结果表明电针可显著降低 CFA 大鼠患侧 DRG 中 GFAP 蛋白表达，提示电针可抑制外周卫星胶质细胞活化。

2.3 各组大鼠 L4－6 DRG 中 P2X7R 蛋白表达变化

如图 3 所示，于造模后 14 d，CFA 组大鼠患侧 L4-6 DRG 中 P2X7 蛋白表达显著高于同期 Con 组(P< 0.05)；与同期 CFA 组比较，CFA + sEA 组大鼠患侧 DRG 中 P2X7 蛋白表达无明显差异(P > 0.05)；CFA + EA 组大鼠患侧 DRG 中 P2X7 蛋白表达显著低于同期 CFA 和 CFA + sEA 组(均 P< 0.05)。结果表明电针可显著抑制 CFA 大鼠患侧 DRG 中 P2X7R 表达。

2.4 鞘内注射 P2X7R 选择性抑制剂 A740003 提高炎性痛大鼠机械痛阈

如图 4 所示，实验大鼠接受鞘内置管术后予以修复 1 周，分别于模前 8 d、模前 1 d 检测两组大鼠基础 PWTs 情况，两组间无明显差异(P> 0.05)。两组大鼠经由相同造模处理，模后两组痛阈均无差异(P> 0.05)。实验大鼠于造模后 12 ~ 14 d 分别鞘内注射 A740003 或等量 0.1% DMSO 溶液，CFA + A740003 组大鼠患侧 PWTs 显著高于同期 CFA + DMSO 组(均 P< 0.01)。结果提示鞘内给药 P2X7R 选择性抑制剂可拮抗 CFA 大鼠痛觉异常。

2.5 鞘内注射 P2X7R 激动剂 BzATP 翻转电针抗炎性痛效应

如图 5 所示，实验大鼠接受鞘内置管术后予以修复 1 周，分别于模前 8 d、模前 1 d 检测两组大鼠基础 PWTs 情况，两组间无明显差异(P> 0.05)。两组大鼠经由相同造模处理，模后两组痛阈均无差异(P> 0.05)。两组大鼠于造模后 8 ~ 11 d 均接收电针治疗，组间无差异(P> 0.05)；于造模后 12 ~ 14 d 各时点，CFA + EA + BzATP 组大鼠患侧足跖 PWTs 显著低于同期 CFA + EA + NS 组(均 P< 0.01)。结果提示鞘内注射 P2X7R 激动剂 BzATP 可翻转 EA 对 CFA 大鼠的镇痛效应。

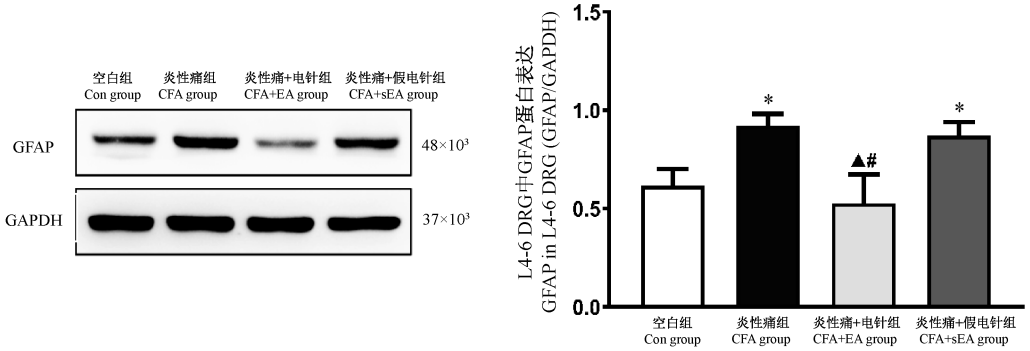


图 2 各组大鼠 L4-6 DRG 中 GFAP 蛋白表达变化

Figure 2 Changes of GFAP protein expression in L4-6 DRG among groups of rats

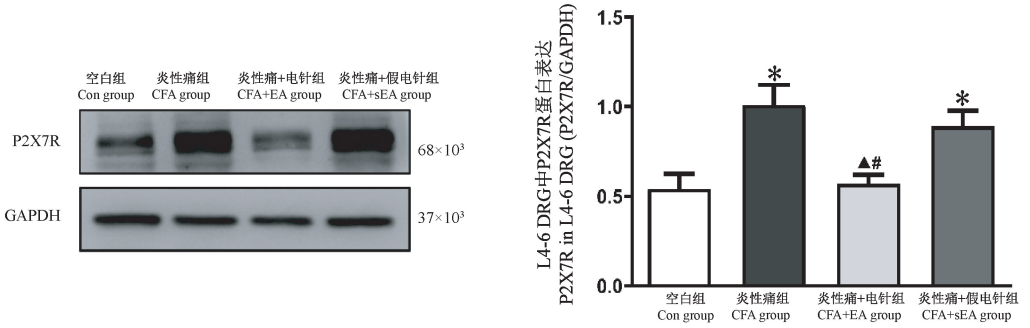
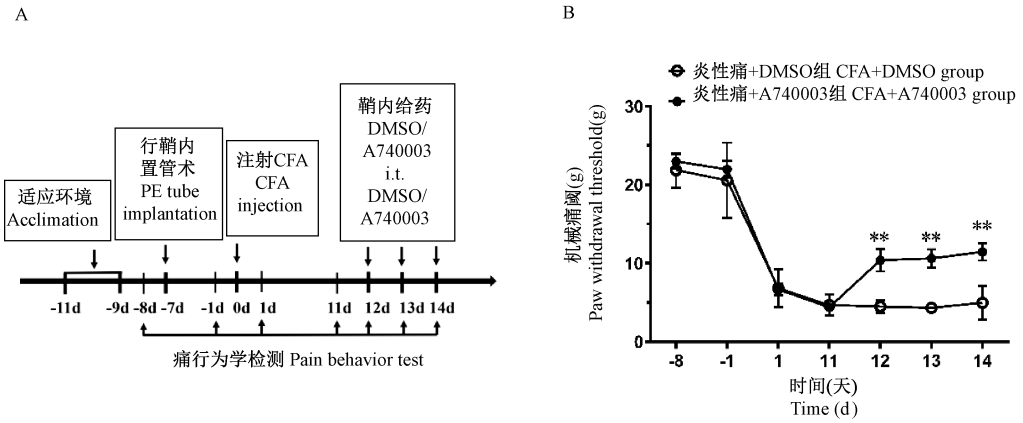


图 3 各组大鼠 L4-6 DRG 中 P2X7R 蛋白表达变化

Figure 3 Changes of P2X7R protein expression in L4-6 DRG among groups of rats

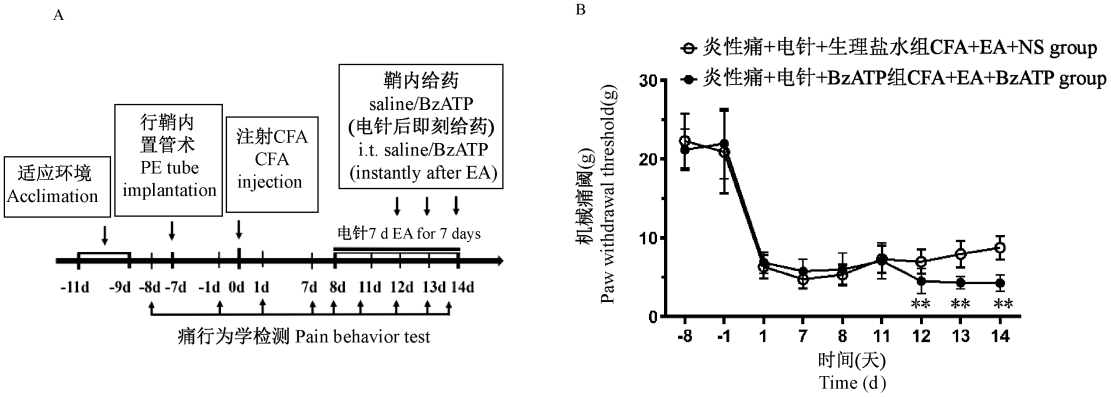


注：A：实验流程图；B：与 CFA+DMSO 组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

图 4　鞘内给药 P2X7R 抑制剂 A740003 提高 CFA 大鼠患侧 PWTs

Note. A, Illustration of experimental design. B, Compared with CFA + DMSO group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$.

Figure 4　Intrathecal injection of selective P2X7R inhibitor A740003 increased ipsilateral PWTs of CFA rats



注：A：本实验流程及 PWTs 测量时点示意图。B：与 CFA + EA + NS 组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

图 5　鞘内给药 P2X7R 激动剂 BzATP 翻转电针对 CFA 大鼠的镇痛效应

Note. A, Experiment process and timing of PWTs measurement. B, Compared with CFA + EA + NS group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$.

Figure 5　Intrathecal injection of selective P2X7R agonist BzATP reversed EA's analgesia on CFA rats

3　讨论

电针疗法是传统针刺疗法与微量电流刺激相结合的一种新型疗法。最早于二十世纪五十年代由朱玉龙医生首次提出，用于替代临床针灸医师繁琐的运针过程。现代研究表明，电针是临床镇痛的常用针灸方法，具有绿色、副作用小，临床上易于推广等优点，广泛用于治疗炎性痛、神经病理性疼痛等各类疼痛。有临床观察研究结果表明电针镇痛取穴双侧肢体较单侧（患侧）疗效显著[16]。课题组既往实验研究结果也表明，双侧电针穴位“昆仑”、“足三里”能有效缓解大鼠炎性痛[17]。既往研究表明，CFA 致炎性痛大鼠模型于造模后 4 ~ 24 h 处于急性期，1 ~ 3 d 处于亚急性期，3 d 后转向慢性痛[18]。本研究前期实验表明，CFA 致炎性痛模型于模后 1 d 出现患侧 PWTs 显著下降，并持续维持较低痛阈至模后 42 d。模后 28 d，对侧 PWTs 显著降低，出现“镜像痛”并维持至模后 42 d。同时，热痛（thermal withdrawal latency，TWL）在模后 1 d 显著下降并持续至 14 d。现有研究表明，通过在足底内注射 CFA100 μL 可引起大鼠双侧机械性异常性疼痛，及患侧热痛觉过敏。CFA 致炎性痛患侧 PWTs 在模后（< 1 h）迅速下降，在模后 7 d 到达最低峰值，并持续维持较低痛阈至造模后 28 d。约在模后 28 d，对侧足跖也出现 PWTs 降低的情况。同时，CFA 致炎性痛也可引起 TWL 迅速下降（< 1 h）。TWL 在

模后 6 h 达到峰值,于模后 14 ~ 28 d 可缓慢恢复致正常水平[18-19]。本研究中机械痛、热痛变化趋势与现有文献一致[18-19],说明造模成功。Gao 等[19]通过鞘内注射选择性 JNK 抑制剂,发现可降低 CFA 致慢性炎性痛维持阶段的机械痛,但对其引起的热痛没有影响。Lao 等[20]也指出,腹腔注射纳洛酮(20 mg/kg)可逆转单次电针对 CFA 致炎性痛产生的机械痛阈下降。以上结果提示两者(热痛与机械痛)机制有所差别,在慢性炎性痛的维持阶段,机械痛变化较之热痛更具变化特点。由于本研究处于慢性炎性痛维持期,因此侧重机械痛的变化情况作为行为学测定标准。据研究表明,电针对 CFA 致炎性痛大鼠患侧 PWTs、TWL 均具有升高作用[21-22],并且电针治疗在辣椒素、角叉菜胶及 CFA 等不同药物诱导的炎性痛模型均有效果[23]。这与实验室前期结果[24-25]相一致,提示电针治疗炎性痛效果确切。本研究中观察到连续 7 d 电针治疗可升高 CFA 致炎性痛大鼠患侧 PWTs 至模后 14 d,提示电针可以有效对抗炎性疼痛,与课题组以往研究结果相符[17,23-24]。但本研究并未观察到单次电针的镇痛效应,可能与炎性痛大鼠在足底注射 CFA 后 24 h 时足部肿胀严重,导致大鼠缩足反应性降低所致,提示重复电针可有效缓解慢性炎性痛,而在炎性痛急性期治疗并不占优势。

背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)是初级感觉神经元的聚集地,负责将外周感觉信号传输至中枢神经系统;外周损伤引起的 DRG 神经元胞体诱发出持续性的自发异位放电,常被认为传入脊髓后可增强外周信号和激发放大效应[25]。卫星胶质细胞(satellite glial cells, SGCs)分布在 DRG 神经元胞体周围,SGCs 活化可调控 DRG 神经元兴奋性参与外周痛觉敏化的调控。胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)被认为是中枢星型胶质细胞和外周卫星胶质细胞活化的特异性标志物。炎症、神经损伤等病理状态下 SGCs 可被激活,主要表现为 GFAP 表达增加[26-27]。本研究观察到 CFA 大鼠造模后 14 d 患侧L4-6 DRG 中 GFAP 表达显著增高。以往研究中在不同疼痛模型的不同时点也观察到与本研究类似结果。Liu 等[28]在脊神经结扎(SNL)致神经病理性疼痛模型中,观察到 SNL 大鼠于术后 4 h 便观察到 DRG 中 GFAP 表达增加,并持续高水平表达至术后 7 d。Nascimento 等[29]研究表明,在 CFA 致炎性痛模型中背根神经节 GFAP 表达显著升高,造模后 7 d 到达表达高峰并维持高水平至实验结束。课题组以往研究结果显示,电针可抑制 SNL 大鼠脊髓背角 GFAP 表达,提示电针镇痛与其抑制星形胶质细胞密切相关[13]。本研究中,我们观察到电针可显著抑制大鼠足底注射 CFA 引起的 DRG 中 GFAP 表达升高,提示背根神经节 SGCs 活化参与 CFA 诱发炎性痛,抑制 SGCs 活化介导电针抗大鼠炎性痛效应。

近来研究表明,P2X7 受体在疼痛的发展和维持中担当重要角色,在炎性痛、神经病理性疼痛等多种疼痛状态呈表达上调[8-11]。已有研究证实 SGCs 活化与 P2X7R 表达增加成正相关,GFAP 与 P2X7R 蛋白表达在 CCI 模型导致的神经病理性疼痛状态下均有升高趋势[30];Wu 等[31]发现在 gp120 诱导的神经病理性疼痛中大鼠 DRG 内 P2X7R 和 GFAP 的荧光共表达增加。在外周神经组织中,嘌呤 P2X7 受体特异性表达于 SGCs 中,背根神经元和 SGCs 可以通过 ATP 释放和 P2X7R 激活进行细胞间通信。以往有研究发现 CFA 大鼠 DRG 中 P2X7R 蛋白表达显著升高;敲除 P2X7R 基因可消除炎症诱发的痛觉过敏;于大鼠足跖局部注射 P2X7R 非特异性拮抗剂 oxidized ATP(ox ATP)或鞘内注射 A740003 可有效缓解不同造模方式导致的炎性疼痛[32-33]。本研究结果也观察到 CFA 大鼠患侧 DRG 中 P2X7R 蛋白表达显著升高,且鞘内注射 P2X7R 拮抗剂 A740003 可有效提高 CFA 大鼠缩腿阈进而缓解炎性疼痛,与以往研究结果较一致[32-33]。关于 EA 是否通过调控 P2X7R 表达发挥镇痛作用相关研究并不多见,主要集中于 EA 对中枢脊髓 P2X7R 表达的干预研究。以往研究表明,EA 可通过抑制脊髓 P2X7R 阳性小胶质细胞活化进而缓解神经损伤诱发的痛觉过敏[34];在颈部术后切口痛模型中,电针可通过抑制颈髓 P2X7R 介导 fractalkine/CX3CR1 信号通路活化发挥镇痛效应[35]。然而,抑制外周 P2X7R 表达是否参与电针镇痛的相关性研究,尚未见相关报道。本研究观察到电针可以显著抑制 CFA 大鼠患侧 DRG 中 P2X7R 蛋白表达,且鞘内注射 P2X7R 特异性激动剂 BzATP 可有效翻转电针镇痛效应,结果提示外周 P2X7R 参与电针抗炎性痛

效应。

综上所述,电针可有效缓解大鼠慢性炎性痛,抑制外周 SGCs 及其 P2X7R 活化可能是电针抗炎性痛的外周作用机制之一。

参 考 文 献(References)

[1] Van Hecke O, Torrance N, Smith BH. Chronic pain epidemiology and its clinical relevance[J]. Br J Anaesth, 2013, 111(1): 13-18.

[2] Pitcher MH, Von Korff M, Bushnell MC, et al. Prevalence and profile of high-impact chronic pain in the united states[J]. J Pain, 2019, 20(2): 146-160.

[3] Chen B, Li L, Donovan C, et al. Prevalence and characteristics of chronic body pain in china: A national study [J]. Springerplus, 2016, 5(1): 938.

[4] Zghoul N, Ross EL, Edwards RR, et al. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics: A randomized telephone survey among medical center patients in kuwait[J]. J Pain Res, 2017, 10: 679-687.

[5] 韩济生. 针刺镇痛频率特异性的进一步证明[J]. 针刺研究, 2001: 224-227.
Han JS. Further proof of frequency specificity of acupuncture analgesia [J]. Acupuncture Research, 2001,26(3):224-227.

[6] Chessell IP, Hatcher JP, Bountra C, et al. Disruption of the p2x7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain[J]. Pain, 2005, 114(3): 386-396.

[7] Chen Y, Wang CY, Li GW, et al. Activation of p2x7 receptors in glial satellite cells reduces pain through downregulation of p2x3 receptors in nociceptive neurons[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(43): 16773-16778.

[8] McGaraughty S, Chu KL, Namovic MT, et al. P2x7-related modulation of pathological nociception in rats[J]. Neuroscience, 2007, 146(4): 1817-1828.

[9] Liu S, Shi Q, Zhu Q, et al. P2x(7) receptor of rat dorsal root ganglia is involved in the effect of moxibustion on visceral hyperalgesia[J]. Purinergic Signal, 2015, 11(2): 161-169.

[10] Tang Y, Yin HY, Liu J, et al. P2x receptors and acupuncture analgesia[J]. Brain Res Bull, 2019, 151: 144-152.

[11] Fernandes NC, Sriram UG, et al. Methamphetamine alters microglial immune function through P2X7R signaling [J]. J Neuroinflammation, 2016, 13(1):91.

[12] Du JY, Fang JQ, Liang Y, et al. Electroacupuncture attenuates mechanical allodynia by suppressing the spinal jnk1/2 pathway in a rat model of inflammatory pain[J]. Brain Res Bull, 2014, 108: 27-36.

[13] Liang, Y, Du JY, Qiu YJ, et al. Electroacupuncture attenuates spinal nerve ligation-induced microglial activation mediated by p38 mitogen-activated protein kinase [J]. Chin J Integr Med, 2015, 22(9), 704-713.

[14] Liang Y, Fang JQ, Du JY, et al. Effect of electroacupuncture on activation of p38mapk in spinal dorsal horn in rats with complete freund's adjuvant-induced inflammatory pain[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012, 2012:568273.

[15] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw[J]. J Neurosci Methods, 1994, 53(1):55-63.

[16] 方剑乔, 刘元亮. 电针巨刺与患侧针刺镇痛的临床与实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1994, 14(10):579-582.
Fang JQ, Liu YL. Clinical and experimental study on giant needle electroacupuncture and acupuncture analgesia on the affected side[J]. Chin J Integr Trad West Med, 1994, 14 (10): 579-582.

[17] 项璇儿, 杜俊英, 方剑乔, 等. 电针对 CFA 致炎性痛大鼠热痛和机械痛优效频率观察及机制初探 [J]. 浙江中医药大学学报, 2016, 40(12):891-897,922.
Xiang X, Du JY, Fang JQ, et al. Observation of the frequency and effect of electroacupuncture on heat and mechanical pain in rats with CFA-induced inflammatory pain [J]. J Zhejiang Univ Trad Chin Med, 2016, 40(12):891-897,922.

[18] Nagakura Y, Okada M, Kohara A, et al. Allodynia and hyperalgesia in adjuvant-induced arthritic rats: time course of progression and efficacy of analgesics[J]. J PH-Armacol Exp Ther, 2003,306(2):490-497.

[19] Gao YJ, Xu ZZ, Ji RR, et al. The c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in spinal astrocytes is required for the maintenance of bilateral mechanical allodynia under a persistent inflammatory pain condition[J]. Pain, 2010,148(2):309-319.

[20] Lao L, Zhang RX, Zhang G, et al. A parametric study of electroacupuncture on persistent hyperalgesia and Fos protein expression in rats[J]. Brain Res, 2004,1020(1-2):18-29.

[21] Zhang Y, Li A, Xin J, et al. Involvement of spinal serotonin receptors in electroacupuncture anti-hyperalgesia in an inflammatory pain rat model[J]. Neurochem Res, 2011, 36 (10):1785-1792.

[22] Zhang R, Lao L, Ren K, et al. Mechanisms of acupuncture-electroacupuncture on persistent pain[J]. Anesthesiology, 2014; 120(2):482-503.

[23] Fang JQ, Du JY, Fang JF, et al. Parameter-specific analgesic effects of electroacupuncture mediated by degree of regulation TRPV1 and P2X3 in inflammatory pain in rats[J]. Life Sci, 2018, 200:69-80.

[24] Xiang X, Wang SS, Shao FB, et al. Electroacupuncture stimulation alleviates CFA-induced inflammatory pain via suppressing P2X3 expression [J]. Int J Mol Sci, 2019, 13 (20):3248.

[25] Warwick RA, Hanani M. The contribution of satellite glial cells

to chemotherapy-induced neuropathic pain[J]. Eur J Pain, 2013, 17(4): 571-580.

[26] Kasuya G, Yamaura T, Ma XB, et al. Structural insights into the competitive inhibition of the atp-gated p2x receptor channel[J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 876.

[27] Lemes JBP, de Campos Lima T, Santos DO, et al. Participation of satellite glial cells of the dorsal root ganglia in acute nociception[J]. Neurosci Lett, 2018, 676: 8-12.

[28] Liu FY, Sun YN, Wang FT, et al. Activation of satellite glial cells in lumbar dorsal root ganglia contributes to neuropathic pain after spinal nerve ligation[J]. Brain Res, 2012, 1427: 65-77.

[29] Nascimento DS, Castro-Lopes JM, Moreira Neto FL. Satellite glial cells surrounding primary afferent neurons are activated and proliferate during monoarthritis in rats: is there a role for ATF3?[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e108152.

[30] Xie JY, Liu SM, Wu B, et al. The protective effect of resveratrol in the transmission of neuropathic pain mediated by the P2X7 receptor in the dorsal root ganglia[J]. Neurochem Int, 2017, 103:24-35.

[31] Wu B, Ma YC, Yi ZH, et al. Resveratrol-decreased hyperalgesia mediated by the P2X7 receptor in gp120-treated rats[J]. Molecular Pain, 2017, 13:1-9.

[32] Chen Y, Zhang X, Wang C, et al. Activation of P2x7 receptors in glial satellite cells reduces pain through downregulation of P2x3 receptors in nociceptive neurons[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(43):16773-16778.

[33] Donnelly-Roberts DL, Namovic MT, Han P, et al. Mammalian p2x7 receptor pharmacology: Comparison of recombinant mouse, rat and human p2x7 receptors[J]. Br J Pharmacol, 2009, 157(7): 1203-1214.

[34] Xu J, Chen XM, Zheng BJ, et al. Electroacupuncture relieves nerve injury-induced pain hypersensitivity via the inhibition of spinal P2X7 receptor-positive microglia[J]. Anesth Analg, 2015, 122(3):882-892.

[35] Gao YH, Li CW, Wang JY, et al. Effect of electroacupuncture on the cervicospinal P2X7 receptor/fractalkine/CX3CR1 signaling pathway in a rat neck-incision pain model[J]. Purinergic Signal, 2017, 13(2):215-225.

[收稿日期] 2020-04-27