

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230657

• 短篇论著 •

电针通过抑制小胶质细胞激活拮抗吗啡镇痛耐受及相关机制

赵 昱¹, 高 菲¹, 李 岱¹, 吴冬梅², 徐礼鲜^{3*}

1. 广西壮族自治区南溪山医院麻醉科, 桂林 541002

2. 广西壮族自治区南溪山医院放射治疗科, 桂林 541002

3. 空军军医大学口腔医院麻醉科, 西安 710032

[摘要] **目的** 观察电针对吗啡诱导的小胶质细胞激活和镇痛耐受的影响, 探索电针治疗吗啡镇痛耐受的可能机制。**方法** 将 60 只清洁级 SD 大鼠随机分为对照组、吗啡组、吗啡+电针组和吗啡+电针+集落刺激因子 1 (CSF1) 组, 每组 15 只。吗啡组、吗啡+电针组和吗啡+电针+CSF1 组大鼠连续 7 d 鞘内注射吗啡, 制备吗啡镇痛耐受模型; 吗啡+电针组和吗啡+电针+CSF1 组同时实施电针干预, 选择疏密波, 频率为 2/100 Hz, 以 0.5、1.0 和 1.5 mA 的刺激强度各刺激 10 min, 刺激“足三里”和“三阴交”穴, 每天 1 次, 连续 7 d; 吗啡+电针+CSF1 组同时鞘内注射重组 CSF1 蛋白, 连续 7 d。采用机械缩足反射阈值 (MWT) 法观察电针对大鼠吗啡镇痛耐受的影响。7 d 后处死大鼠, 分离 L₄₋₆ 脊髓背角及背根神经节组织, 采用蛋白质印迹法和 qPCR 法检测大鼠背根神经节及脊髓背角 CSF1 蛋白和 mRNA 表达, 免疫荧光法检测脊髓背角小胶质细胞标志物离子化钙结合适配分子 1 (IBA-1) 的表达, ELISA 法检测脊髓 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 表达。**结果** 鞘内注射吗啡后, 吗啡组大鼠最大镇痛效应百分率 (%MPE) 进行性降低, 表明吗啡镇痛耐受模型构建成功; 与吗啡组比较, 吗啡+电针组大鼠在鞘内注射 3、5 和 7 d 时 %MPE 均增高 (均 $P<0.05$); 与吗啡+电针组比较, 吗啡+电针+CSF1 组大鼠在鞘内注射 3、5 和 7 d 时 %MPE 均降低 (均 $P<0.05$)。与对照组比较, 吗啡组大鼠背根神经节 CSF1 蛋白及 mRNA 表达、脊髓背角 CSF1 蛋白表达均增高 (均 $P<0.05$); 与吗啡组比较, 吗啡+电针组大鼠背根神经节 CSF1 蛋白及 mRNA 表达、脊髓背角 CSF1 蛋白表达均降低 (均 $P<0.05$); 各组大鼠脊髓背角 CSF1 mRNA 表达差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$)。与对照组比较, 吗啡组大鼠脊髓背角 IBA-1 表达增高 ($P<0.05$); 与吗啡组比较, 吗啡+电针组大鼠脊髓背角 IBA-1 表达降低 ($P<0.05$); 与吗啡+电针组比较, 吗啡+电针+CSF1 组大鼠脊髓背角 IBA-1 表达增高 ($P<0.05$)。**结论** 电针能够抑制大鼠脊髓背角小胶质细胞激活、改善大鼠吗啡镇痛耐受, 其机制可能与减少脊髓背角 CSF1 蛋白表达有关。

[关键词] 电针; 吗啡镇痛耐受; 小胶质细胞; 集落刺激因子 1; 脊髓; 背根神经节

[引用本文] 赵昱, 高菲, 李岱, 等. 电针通过抑制小胶质细胞激活拮抗吗啡镇痛耐受及相关机制[J]. 海军军医大学学报, 2025, 46(3): 411-417. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230657.

Electroacupuncture antagonizes morphine analgesic tolerance by inhibiting microglia activation and related mechanisms

ZHAO Yu¹, GAO Fei¹, LI Dai¹, WU Dongmei², XU Lixian^{3*}

1. Department of Anesthesiology, Nanxishan Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Guilin 541002, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

2. Department of Radiotherapy, Nanxishan Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Guilin 541002, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

3. Department of Anesthesiology, School of Stomatology, Air Force Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China

[Abstract] **Objective** To observe the effects of electroacupuncture (EA) on morphine-induced microglia activation and analgesic tolerance, and explore the potential mechanism of EA in the treatment of morphine analgesic tolerance.

[收稿日期] 2023-11-23

[接受日期] 2025-01-17

[基金项目] 国家自然科学基金 (81471265), 广西医疗卫生适宜技术开发与推广应用项目 (S2024074), 桂林市技术应用与推广计划项目 (20212E422580). Supported by National Natural Science Foundation of China (81471265), Medical Health Technology Development and Promotion Project of Guangxi (S2024074) and Guilin Technology Application and Promotion Project (20212E422580).

[作者简介] 赵 昱, 博士, 副主任医师. E-mail: zhaoyu0066@sina.com

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 029-84776115, E-mail: 38690708@qq.com

Methods A total of 60 clean-grade SD rats were randomly assigned to control group, morphine group, morphine+EA group, and morphine+EA+colony-stimulating factor 1 (CSF1) group, with 15 rats in each group. Morphine analgesic tolerance model was established by continuous 7-d intrathecal injection of morphine in the morphine, morphine+EA and morphine+EA+CSF1 groups. EA was given in the rats of morphine+EA and morphine+EA+CSF1 groups at “Zusanli” and “Sanyinjiao” acupoints, with dilatational wave, frequency of 2/100 Hz, stimulation intensities of 0.5, 1.0, and 1.5 mA (10 min per intensity), once a day, for 7 consecutive days. Rats in morphine+EA+CSF1 group were given intrathecal injection with recombinant CSF1 protein for 7 consecutive days. The effect of EA on morphine analgesic tolerance in rats was observed by mechanical withdrawal threshold (MWT). After 7 d, the rats were sacrificed, and the L₄₋₆ spinal dorsal horn and dorsal root ganglion tissues were isolated. The expression of CSF1 protein and mRNA in the dorsal root ganglia and spinal dorsal horn was detected by Western blotting and quantitative polymerase chain reaction. The expression of ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA-1), a marker of microglia in the spinal dorsal horn, was detected by immunofluorescence method, and the expression of interleukin (IL)-1 β , IL-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α in the spinal cord was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results After intrathecal injection of morphine, the percentage of maximal possible potential effect (%MPE) in the morphine group was decreased progressively, indicating that the morphine analgesic tolerance model was successfully constructed. Compared with the morphine group, the %MPE in the morphine+EA group was increased after intrathecal injection at 3, 5 and 7 d (all $P<0.05$). Compared with the morphine+EA group, the %MPE in the morphine+EA+CSF1 group was all decreased after intrathecal injection at 3, 5 and 7 d (all $P<0.05$). Compared with the control group, the expression of CSF1 protein and mRNA in dorsal root ganglion and the expression of CSF1 protein in spinal dorsal horn in the morphine group were increased (all $P<0.05$). Compared with the morphine group, the expression levels of CSF1 protein and mRNA in dorsal root ganglion and CSF1 protein in spinal dorsal horn in the morphine+EA group were decreased (all $P<0.05$). There was no significant difference in the expression of CSF1 mRNA in the spinal dorsal horn among those groups (all $P>0.05$). Compared with the control group, the expression of IBA-1 in the spinal dorsal horn of the morphine group was increased ($P<0.05$). Compared with the morphine group, the expression of IBA-1 in the spinal dorsal horn of the morphine+EA group was decreased ($P<0.05$). Compared with the morphine+EA group, the expression of IBA-1 in the spinal dorsal horn of the morphine+EA+CSF1 group was increased ($P<0.05$).

Conclusion EA can inhibit the activation of microglia in the spinal dorsal horn of rats and improve morphine analgesic tolerance in rats. The mechanism may be related to the reduction of CSF1 protein expression in the spinal dorsal horn.

[**Key words**] electroacupuncture; morphine analgesic tolerance; microglia; colony-stimulating factor 1; spinal cord; dorsal root ganglia

[**Citation**] ZHAO Y, GAO F, LI D, et al. Electroacupuncture antagonizes morphine analgesic tolerance by inhibiting microglia activation and related mechanisms[J]. Acad J Naval Med Univ, 2025, 46(3): 411-417. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230657.

吗啡是临床上缓解重度疼痛及治疗癌性疼痛最常用的镇痛药物,但长期应用会出现镇痛效能显著下降的镇痛耐受现象,吗啡引起的神经炎性反应及胶质细胞激活在吗啡镇痛耐受的形过程中发挥重要作用^[1]。研究发现,脊髓中受损的神经元可以分泌巨噬细胞集落刺激因子1(colony-stimulating factor 1, CSF1),集落刺激因子1受体(colony-stimulating factor 1 receptor, CSF1R)仅表达于小胶质细胞表面,而鞘内注射CSF1可以显著增加脊髓小胶质细胞标志物离子化钙结合适配分子1(ionized calcium-binding adapter molecule 1, IBA-1)表达,表明脊髓中受损的神经元可以分泌CSF1直接激活小胶质细胞^[2]。本团队前期研究发现,吗啡可以显著增加脊髓CSF1表达,而鞘内

注射CSF1R抑制剂PLX3397可以抑制吗啡诱导的小胶质细胞激活,并拮抗吗啡镇痛耐受,证实脊髓CSF1介导了吗啡镇痛耐受的形^[3]。

研究表明,电针刺激“足三里”和“昆仑”穴能够延长炎性痛大鼠吗啡耐受形时间,降低鞘内给予吗啡所诱导的炎性痛大鼠的痛阈^[4]。电针可以抑制脊髓小胶质细胞激活,改善炎性痛大鼠的脊髓炎性环境^[5]。Sun等^[6]研究结果显示,脊髓电刺激通过降低脊髓中CSF1的水平减弱小胶质细胞的激活,从而减轻神经性疼痛,提示电针可能通过调控脊髓CSF1的表达及小胶质细胞激活拮抗吗啡镇痛耐受。本研究采用大鼠模型观察电针对吗啡引起的脊髓水平小胶质细胞激活及其对吗啡镇痛耐受的影响,并探讨其分子机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器 盐酸吗啡(生产批号为120909,沈阳第一制药厂);重组CSF1蛋白(中国台湾Abnova公司);CSF1小鼠单克隆抗体(1:1 000,美国Millipore公司);IBA-1兔多克隆抗体(1:400,日本Wako公司);荧光素标记的羊抗兔二抗(1:1 000,美国Millipore公司);IL-1 β 、IL-6和TNF- α ELISA检测试剂盒(武汉博士德生物科技有限公司)。电针刺激仪(北京韩氏电针仪器厂);显微成像系统(日本Olympus公司);实时荧光定量PCR仪(美国Bio-Rad公司);冰冻切片机(德国Leica公司)。

1.2 实验动物分组与干预 清洁级雄性SD大鼠60只,体重210~230 g,购于浙江维通利华实验动物技术有限公司[实验动物生产许可证号:SCXK(浙)2019-0001]。饲养环境:光照周期为12 h,温度为22~24 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度为40%~60%,单笼饲养,自由进食水。依据国家卫生机构制定的实验室动物使用指南进行所有操作和动物处理。鞘内置管成功后,按随机数字表法将大鼠分为对照组、吗啡组、吗啡+电针组和吗啡+电针+CSF1组,每组15只。吗啡组、吗啡+电针组和吗啡+电针+CSF1组连续7 d鞘内给予15 μg 吗啡(20 μL),对照组连续7 d鞘内给予等体积生理盐水。吗啡+电针组和吗啡+电针+CSF1组连续7 d于鞘内注射吗啡后即刻给予电针治疗。吗啡+电针+CSF1组连续7 d鞘内给予重组CSF1蛋白15 ng/ μL (10 μL)。

1.2.1 大鼠鞘内置管术 利多卡因局部麻醉后切开L₅水平背部皮肤,分离椎旁肌后暴露第5腰椎间隙,与脊柱成30 $^{\circ}$ 角将8号针头插入椎间隙,待大鼠尾部或后肢突然抽动时表明针头已进入蛛网膜下腔。退出针头,将PE-10导管插入椎间隙,向头端方向插入导管2~2.5 cm,导管腔中有清亮液体流出再次证明导管进入蛛网膜下腔。封闭导管外口后将导管外口固定于颈部皮肤。出现术后运动功能障碍的动物认定为鞘内置管失败。实验结束取材时观察确定导管末端位置。导管位置不正确的大鼠所得数据排除。

1.2.2 电针干预方法 于鞘内注射吗啡后即刻给予电针干预,参照《实验动物针灸穴位图谱》中大鼠穴位^[7],使用0.25 mm $\times$ 13 mm针灸针,选择双侧“足

三里”(ST36)和“三阴交”(SP6)穴进针,连接穴位神经刺激仪,选择疏密波,频率为2/100 Hz,以0.5、1.0及1.5 mA的刺激强度各刺激10 min,每天1次,连续7 d。

1.3 疼痛行为学测试 于鞘内注射第1、3、5、7天时进行行为学测量。应用von Frey纤维丝及up-down法对大鼠后足进行机械刺激,采用机械缩足反射阈值(mechanical withdrawal threshold, MWT)法计算最大镇痛效应百分率(percentage of maximal possible potential effect, %MPE)^[8]。具体方法如下:将金属筛网放置于22 cm $\times$ 12 cm $\times$ 22 cm大小有机玻璃箱下面,将大鼠放入有机玻璃箱中,用von Frey纤维丝垂直穿过金属筛网刺激大鼠后肢足底中部,阳性反应为大鼠出现抬足或舔足行为。刺激力度从2 g开始,当不能引起阳性反应时,将刺激力度调大,出现阳性反应后将刺激力度调小,出现第1次阳性和阴性反应的骑跨时停止。连续测定4次,刺激持续时间短于4 s,每次刺激间隔大于30 s,最大刺激力度小于15 g。分别测定吗啡注射前基础MWT及注射后30 min实验MWT, %MPE=(实验MWT-基础MWT)/基础MWT $\times$ 100%。

1.4 脊髓背角小胶质细胞激活的检测 疼痛行为学测定结束后,每组各取7只大鼠,用预冷的生理盐水100 mL和4%多聚甲醛溶液400 mL经左心室灌注进行预固定。将L_{4~6}脊髓取出,用4%多聚甲醛溶液固定2 h后置入梯度浓度的蔗糖溶液中脱水,然后进行冰冻切片(厚度为12 μm)。加入IBA-1兔多克隆抗体4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,用荧光素标记的羊抗兔二抗在37 $^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育1 h,各步骤间用PBS冲洗3次,每次5 min。用50%甘油封片后在荧光显微镜下观察,应用Image pro-Plus 6.0软件进行数据分析。

1.5 脊髓背角及背根神经节组织中CSF1检测 每组各取4只大鼠,于鞘内注射结束后次日采用颈椎脱臼法处死,分离L_{4~6}脊髓背角及背根神经节组织。L_{4~6}脊髓背角及背根神经节组织经充分匀浆、裂解后,采用蛋白质印迹法检测CSF1蛋白的表达。以 β -肌动蛋白(β -actin)为内参照,计算CSF1蛋白条带与 β -actin条带灰度值的比值,即为CSF1蛋白的相对表达量。采用TRIzol[®]试剂(美国Invitrogen公司)提取大鼠L_{4~6}脊髓背角及背根神经节总RNA,反转录为cDNA,采用

qPCR 检测 *CSF1* mRNA, 以 β -actin 为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析待测基因的相对表达水平。引物由日本 TaKaRa 公司设计、合成。 β -actin 正义引物序列为 5'-CGTTGACATCCGTAAAGACCTC-3', 反义引物序列为 5'-TAGGAGCCAGGGCAGTAATCT-3'; *CSF1* 正义引物序列为 5'-TGCTAAGTGCTCTAGC-CGAG-3', 反义引物序列为 5'-CCCCAACAGTC-AGCAAGAC-3'。PCR 条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s、54 °C 30 s、72 °C 20 s, 共 45 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

1.6 脊髓炎症因子的检测 每组各取 4 只大鼠, 于鞘内注射结束后次日采用颈椎脱臼法处死, 分离 L_{4~6} 脊髓, 冰上充分匀浆后离心提取上清液, 采用 ELISA 试剂盒检测 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平, 严格按照试剂盒说明书操作。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 应用 GraphPad Prism 8.0 软件制图。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用最小显著性差异法。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 电针对大鼠吗啡镇痛耐受的影响 吗啡组、吗啡+电针组和吗啡+电针+CSF1 组大鼠在鞘内注射吗啡 1 d 时均产生了最大镇痛作用, 3 组间 %MPE 的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。吗啡组大鼠在鞘内注射吗啡 3 d 时开始出现镇痛耐受现象, 鞘内注射吗啡 7 d 时形成明显耐受, %MPE 进

行性降低。与吗啡组比较, 吗啡+电针组大鼠鞘内注射吗啡 3、5 和 7 d 时仍可以产生显著的镇痛作用, 两组 %MPE 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。吗啡+电针+CSF1 组大鼠 %MPE 进行性降低, 鞘内注射吗啡 3、5 和 7 d 时与吗啡+电针组比较差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。见图 1。

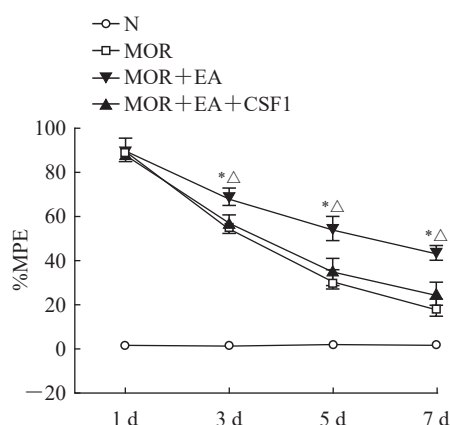


图1 各组大鼠最大镇痛效应百分率 (%MPE) 变化情况 %MPE 采用机械缩足反射阈值法计算。* $P < 0.05$ 与 MOR 组比较; $\Delta P < 0.05$ 与 MOR+EA+CSF1 组比较。n=15, $\bar{x} \pm s$ 。CSF1: 集落刺激因子 1; N: 对照组; MOR: 吗啡组; MOR+EA: 吗啡+电针组; MOR+EA+CSF1: 吗啡+电针+CSF1 组。

2.2 电针对大鼠脊髓背角小胶质细胞激活的影响 在鞘内注射吗啡 7 d 后, 与对照组比较, 吗啡组大鼠腰段脊髓背角小胶质细胞标志物 IBA-1 表达增高 ($P < 0.05$) ; 与吗啡组比较, 吗啡+电针组大鼠腰段脊髓背角 IBA-1 表达降低 ($P < 0.05$) ; 与吗啡+电针组比较, 吗啡+电针+CSF1 组大鼠腰段脊髓背角 IBA-1 表达增高 ($P < 0.05$)。见图 2。

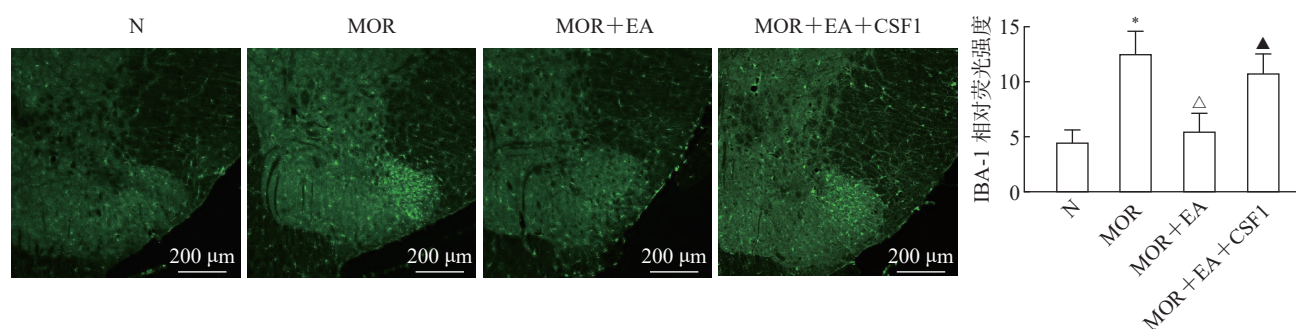


图2 各组大鼠腰段脊髓背角 IBA-1 表达情况 (免疫荧光法)

* $P < 0.05$ 与 N 组比较; $\Delta P < 0.05$ 与 MOR 组比较; $\blacktriangle P < 0.05$ 与 MOR+EA 组比较。n=7, $\bar{x} \pm s$ 。IBA-1: 离子化钙结合适配分子 1; CSF1: 集落刺激因子 1; N: 对照组; MOR: 吗啡组; MOR+EA: 吗啡+电针组; MOR+EA+CSF1: 吗啡+电针+CSF1 组。

2.3 电针对大鼠背根神经节和脊髓背角组织中 CSF1 表达的影响 在鞘内注射吗啡 7 d 后, 与对照组比较, 吗啡组大鼠腰段背根神经节 CSF1 蛋白

及 mRNA 表达均增高 (均 $P < 0.05$) ; 与吗啡组比较, 吗啡+电针组和吗啡+电针+CSF1 组大鼠腰段背根神经节 CSF1 蛋白及 mRNA 表达均降低

(均 $P < 0.05$) ; 吗啡+电针组与吗啡+电针+CSF1组大鼠腰段背根神经节CSF1蛋白及mRNA表达差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。见图3。在鞘内注射吗啡7 d后,与对照组比较,吗啡组大鼠腰段脊髓背角CSF1蛋白表达增高($P < 0.05$) ; 与吗啡组比较,吗啡+电针组大鼠腰段脊髓背角CSF1蛋白表达降低($P < 0.05$) ; 与吗啡+电针组比较,吗啡+电针+CSF1组大鼠腰段脊髓背角CSF1蛋白表达增高($P < 0.05$) ; 各组大鼠腰段脊髓背角CSF1 mRNA表达差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。见图4。

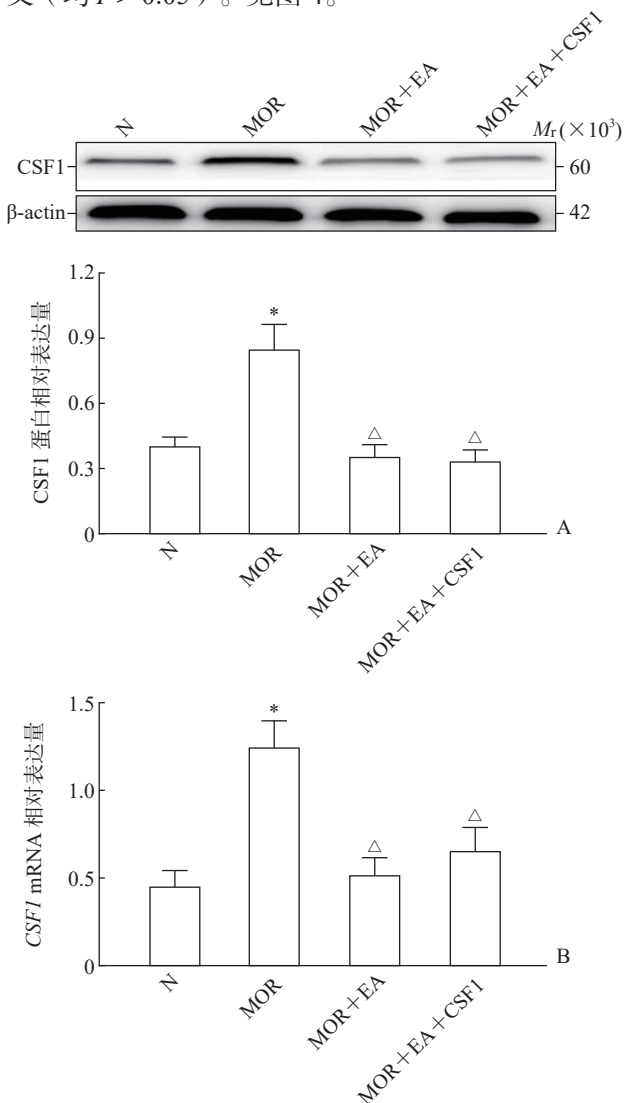


图3 各组大鼠腰段背根神经节CSF1蛋白及mRNA表达情况

A: 蛋白质印迹法检测CSF1蛋白的表达; B: qPCR法检测CSF1 mRNA的表达. * $P < 0.05$ 与N组比较; $\Delta P < 0.05$ 与MOR组比较. $n=4$, $\bar{x} \pm s$. CSF1: 集落刺激因子1; β -actin: β -肌动蛋白; qPCR: 定量聚合酶链反应; N: 对照组; MOR: 吗啡组; MOR+EA: 吗啡+电针组; MOR+EA+CSF1: 吗啡+电针+CSF1组。

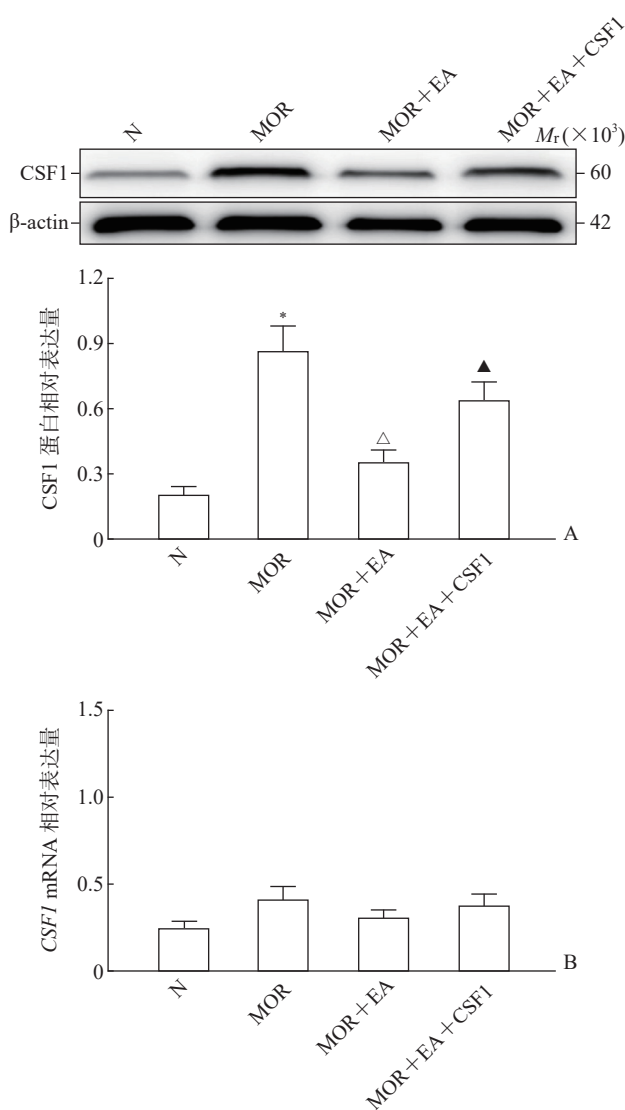


图4 各组大鼠腰段脊髓背角CSF1蛋白及mRNA表达情况

A: 蛋白质印迹法检测CSF1蛋白的表达; B: qPCR法检测CSF1 mRNA的表达. * $P < 0.05$ 与N组比较; $\Delta P < 0.05$ 与MOR组比较; $\blacktriangle P < 0.05$ 与MOR+EA组比较. $n=4$, $\bar{x} \pm s$. CSF1: 集落刺激因子1; β -actin: β -肌动蛋白; qPCR: 定量聚合酶链反应; N: 对照组; MOR: 吗啡组; MOR+EA: 吗啡+电针组; MOR+EA+CSF1: 吗啡+电针+CSF1组。

2.4 电针对大鼠脊髓炎症因子水平的影响 与对照组比较, 吗啡组大鼠腰段脊髓IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平均升高(均 $P < 0.05$)。与吗啡组比较, 吗啡+电针组大鼠腰段脊髓IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平均降低(均 $P < 0.05$)。与吗啡+电针组比较, 吗啡+电针+CSF1组大鼠腰段脊髓IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平均升高(均 $P < 0.05$)。见图5。

3 讨论

目前针灸治疗已逐渐受到国际认可与关注,

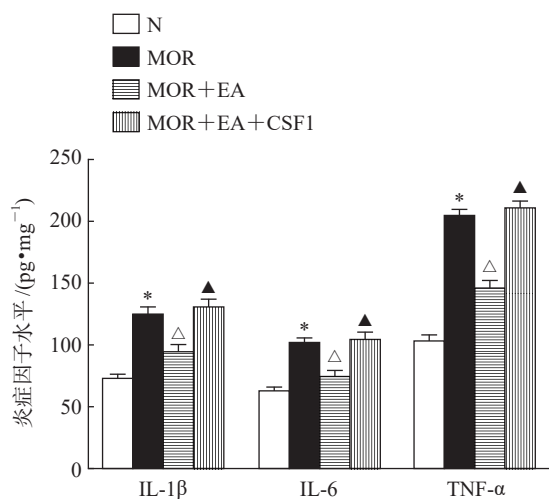


图5 各组大鼠腰段脊髓 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 表达情况
* $P < 0.05$ 与 N 组比较; $\Delta P < 0.05$ 与 MOR 组比较; $\Delta P < 0.05$ 与 MOR+EA 组比较。 $n=4$, $\bar{x} \pm s$ 。IL: 白细胞介素; TNF- α : 肿瘤坏死因子 α ; CSF1: 集落刺激因子 1; N: 对照组; MOR: 吗啡组; MOR+EA: 吗啡+电针组; MOR+EA+CSF1: 吗啡+电针+CSF1 组。

已有大量研究证实针灸可以治疗神经病理痛^[9-10]。电针将电刺激与针刺相结合,将脉冲电流通过针灸针作用于穴位从而治疗疾病。既往研究发现,电针抑制疼痛的作用机制可能在于其能促进中枢神经系统内阿片肽和去甲肾上腺素等神经递质的释放,进而调控疼痛相关信号通路^[11]。针灸治疗还可以抑制神经损伤后小胶质细胞激活及大鼠脊髓炎症反应,延缓痛觉过敏的出现^[12]。神经病理痛与吗啡镇痛耐受存在许多相近的神经生物学机制。研究表明骨边刺电针刺激“足三里”穴具有减缓吗啡镇痛耐受形成的作用^[13]。电针刺激“阳陵泉”和“足三里”穴能够延长炎性痛大鼠吗啡耐受形成时间,抑制鞘内给予吗啡所导致的炎性痛大鼠背根神经节辣椒素受体的表达^[5]。吗啡在产生镇痛作用的同时还会引发神经炎症反应^[14],这可能与吗啡镇痛耐受性及依赖性的形成直接相关^[15]。脊髓内小胶质细胞和星形胶质细胞的激活在吗啡镇痛耐受的形成和维持中发挥重要作用,而抑制胶质细胞激活可以减少吗啡耐受现象的发生^[16]。脊髓小胶质细胞的激活只参与吗啡镇痛耐受形成,但对吗啡镇痛耐受维持没有影响,而脊髓星形胶质细胞的激活只参与吗啡镇痛耐受的维持^[17]。本研究结果显示,电针干预能改善大鼠吗啡镇痛耐受,抑制大鼠腰段脊髓背角小胶质细胞激活,并下调腰段脊髓 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平,

与上述研究结果一致。这些结果提示,抑制脊髓小胶质细胞的激活并减轻其介导的炎症反应可能是电针治疗吗啡镇痛耐受的重要机制之一。

CSF1 可以调控巨噬细胞和破骨细胞的生长^[18]。本研究结果表明,鞘内注射重组 CSF1 蛋白可以反转电针对大鼠腰段脊髓小胶质细胞激活和炎症反应的抑制,并抵消电针抑制吗啡镇痛耐受形成的作用。本研究还发现,与对照组比较,吗啡组大鼠腰段脊髓背角 CSF1 蛋白表达明显上调,而 CSF1 mRNA 表达差异无统计学意义,这可能有以下两点原因:(1) CSF1 原发产生部位并非在脊髓,可能存在其他部位 CSF1 蛋白向脊髓转运。有研究发现,背根神经节中受伤的感觉神经元 CSF1 表达增加,并通过轴突运送到脊髓背角,与小胶质细胞 CSF1R 结合后,导致小胶质细胞的激活^[2]。而特异性敲除感觉神经元 CSF1 表达可以完全阻止神经损伤诱导的机械性超敏反应,减少小胶质细胞的激活和增殖^[19]。未来可以通过背根神经节切断模型观察吗啡镇痛耐受过程中是否存在 CSF1 自背根神经节向脊髓背角的转运。(2) 脊髓背角 CSF1 的转录后调控发生了改变。有研究发现, N1-甲基腺苷 (N1-methyladenosine, m1A) 修饰参与了 CSF1 mRNA 的衰减, m1A 去甲基化可以稳定并延长 CSF1 mRNA 的半衰期,增加 CSF1 表达^[20]。下一步可以利用 RNA 甲基化免疫共沉淀 qPCR 实验检测吗啡镇痛耐受过程中背根神经节及脊髓背角中 m1A 的甲基化修饰水平,验证吗啡是否通过 m1A 甲基化修饰途径上调 CSF1 表达。

综上所述,本实验结果表明,慢性吗啡处理导致大鼠腰段脊髓背角 CSF1 的表达增加,而应用电针治疗可以明显抑制 CSF1 的表达及脊髓背角小胶质细胞的激活,从而阻止吗啡镇痛耐受的形成。本研究未设立单纯电针刺激组来观察电针对正常大鼠痛阈以及脊髓背角和背根神经节 CSF1 表达的影响。电针本身具有镇痛作用,在和吗啡联合使用时,其镇痛作用与拮抗吗啡镇痛耐受作用可能存在混淆,需要进一步研究加以区分。电针通过何种机制来降低脊髓背角 CSF1 的表达从而减轻吗啡镇痛耐受,将是下一步研究的方向。

[参 考 文 献]

- [1] BADSHAH I, ANWAR M, MURTAZA B, et al.

- Molecular mechanisms of morphine tolerance and dependence; novel insights and future perspectives[J]. *Mol Cell Biochem*, 2024, 479(6): 1457-1485. DOI: 10.1007/s11010-023-04810-3.
- [2] GUAN Z, KUHN J A, WANG X, et al. Injured sensory neuron-derived CSF1 induces microglial proliferation and DAP12-dependent pain[J]. *Nat Neurosci*, 2016, 19(1): 94-101. DOI: 10.1038/nn.4189.
- [3] 赵昱,吴军,安扬,等. 脊髓集落刺激因子1在大鼠吗啡镇痛耐受中的作用[J]. 蚌埠医学院学报, 2021, 46(5): 570-573, 578. DOI: 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2021.05.003.
- [4] 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. DOI: 10.16466/j.issn1005-5509.2016.12.006.
- [5] TU W Z, LI S S, JIANG X, et al. Effect of electroacupuncture on the BDNF-TrkB pathway in the spinal cord of CCI rats[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(6): 3307-3315. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3563.
- [6] SUN C, TAO X, WAN C, et al. Spinal cord stimulation alleviates neuropathic pain by attenuating microglial activation via reducing colony-stimulating factor 1 levels in the spinal cord in a rat model of chronic constriction injury[J]. *Anesth Analg*, 2022, 135(1): 178-190. DOI: 10.1213/ANE.0000000000006016.
- [7] 徐东升,赵硕,崔晶晶,等. 绘制实验大鼠腧穴图谱的新尝试[J]. 针刺研究, 2019, 44(1): 62-65, 79. DOI: 10.13702/j.1000-0607.180396.
- [8] 肖勇,陈渔,陆巍. 鞣花酸对吗啡镇痛耐受的影响及机制[J]. 贵州医科大学学报, 2024, 49(6): 826-835. DOI: 10.19367/j.2096-8388.2024.06.006.
- [9] ROBINSON C L, BERGER A, SOTTOSANTI E, et al. Acupuncture as part of multimodal analgesia for chronic pain[J]. *Orthop Rev (Pavia)*, 2022, 14(3): 38321. DOI: 10.52965/001c.38321.
- [10] WEI X Y, WANG X, SHI G X, et al. Acupuncture modulation of chronic neuropathic pain and its association with brain functional properties[J]. *J Pain*, 2024, 25(11): 104645. DOI: 10.1016/j.jpain.2024.104645.
- [11] LV Q, WU F, GAN X, et al. The involvement of descending pain inhibitory system in electroacupuncture-induced analgesia[J]. *Front Integr Neurosci*, 2019, 13: 38. DOI: 10.3389/fnint.2019.00038.
- [12] MA X, CHEN W, YANG N N, et al. Potential mechanisms of acupuncture for neuropathic pain based on somatosensory system[J]. *Front Neurosci*, 2022, 16: 940343. DOI: 10.3389/fnins.2022.940343.
- [13] 杜俊英,陈峰,江彬,等. 骨边刺电针干预对骨癌痛吗啡耐受大鼠蓝斑核的影响[J]. 针刺研究, 2020, 45(2): 87-92. DOI: 10.13702/j.1000-0607.190003.
- [14] GUAN S, JIN T, HAN S, et al. Dihydroartemisinin alleviates morphine-induced neuroinflammation in BV-2 cells[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(2): 9401-9410. DOI: 10.1080/21655979.2021.1982311.
- [15] MORCUENDE A, NAVARRETE F, NIETO E, et al. Inflammatory biomarkers in addictive disorders[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(12): 1824. DOI: 10.3390/biom11121824.
- [16] HAHM S C, LEE J S, YOON Y W, et al. Analgesic tolerance development during repetitive electric stimulations is associated with changes in the expression of activated microglia in rats with osteoarthritis[J]. *Biomedicines*, 2020, 8(12): 575. DOI: 10.3390/biomedicines8120575.
- [17] LEDUC-PESSAH H, WEILINGER N L, FAN C Y, et al. Site-specific regulation of P2X7 receptor function in microglia gates morphine analgesic tolerance[J]. *J Neurosci*, 2017, 37(42): 10154-10172. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0852-17.2017.
- [18] LEE S, SHI X Q, FAN A, et al. Targeting macrophage and microglia activation with colony stimulating factor 1 receptor inhibitor is an effective strategy to treat injury-triggered neuropathic pain[J]. *Mol Pain*, 2018, 14: 1744806918764979. DOI: 10.1177/1744806918764979.
- [19] OKUBO M, YAMANAKA H, KOBAYASHI K, et al. Macrophage-colony stimulating factor derived from injured primary afferent induces proliferation of spinal microglia and neuropathic pain in rats[J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0153375. DOI: 10.1371/journal.pone.0153375.
- [20] WOO H H, CHAMBERS S K. Human ALKBH3-induced m1A demethylation increases the CSF-1 mRNA stability in breast and ovarian cancer cells[J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2019, 1862(1): 35-46. DOI: 10.1016/j.bbagr.2018.10.008.

[本文编辑] 孙岩