电针调控 HMGB1/TLR4/NF-κB 信号通路影响小胶质细胞活化进而改善带状疱疹后遗神经痛*

辛　欢，　邹　璟，　乐　薇△

华中科技大学同济医学院附属武汉市中西医结合医院(武汉市第一医院)针灸科，武汉　430022

摘要：目的　探讨电针(electroacupuncture，EA)通过高迁移率族蛋白 B1(high mobility group Box 1，HMGB1)/Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4，TLR4)/核因子 κB(nuclear factor kappa-B，NF-κB)通路影响小胶质细胞活化进而改善带状疱疹后遗神经痛(postherpetic neuralgia，PHN)的机制。**方法**　将 50 只 SPF 级 SD 大鼠分为：对照组(Vehicle 组)、模型组(RTX 组)、假电针组(Sham-EA 组)、电针组(EA 组)、电针＋通路抑制剂组(EA＋Gly 组)。通过机械退缩阈值检测、热缩足反射潜伏期检测和斜板实验进行大鼠行为学检测。苏木精-伊红(HE)染色检测脊髓背角组织病理形态变化。TUNEL 实验检测脊髓背角组织细胞凋亡。ELISA 法检测疼痛敏感相关物质前列腺素 E2(PGE2)、P 物质(SP)、神经激肽 1(NK-1)水平，以及炎性因子白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子 α(TNF-α)水平。免疫荧光法检测 Iba1 表达。蛋白印迹法检测 HMGB1/TLR4/NF-κB 通路相关蛋白表达。**结果**　与 Vehicle 组相比，RTX 组大鼠机械退缩阈值降低，热缩足反射潜伏期缩短，在斜板保持平衡的角度减小；脊髓背角组织结构被破坏，神经纤维排列紊乱，出现炎性细胞浸润，细胞凋亡率上升，小胶质细胞活化增多，PGE2、SP、NK-1、IL-6、IL-1β、TNF-α 水平升高，HMGB1、TLR4、NF-κB p65 蛋白表达上调(均 $P<0.01$)。与 RTX 组相比，Sham-EA 组无显著差异(均 $P>0.05$)，EA 组大鼠机械退缩阈值升高，热缩足反射潜伏期延长，在斜板保持平衡的角度增大，脊髓背角组织中神经节细胞损伤得到缓解，排列较为整齐，炎性细胞浸润减少，细胞凋亡率降低，小胶质细胞活化减少，PGE2、SP、NK-1、IL-6、IL-1β、TNF-α 水平降低，HMGB1、TLR4、NF-κB p65 蛋白表达下调(均 $P<0.01$)。与 EA 组相比，EA＋Gly 组大鼠机械退缩阈值升高，热缩足反射潜伏期延长，在斜板保持平衡的角度增大，脊髓背角组织中神经细胞损伤和紊乱程度减轻，细胞凋亡率降低，小胶质细胞活化减少，PGE2、SP、NK-1、IL-6、IL-1β、TNF-α 水平降低，HMGB1、TLR4、NF-κB p65 蛋白表达下调(均 $P<0.05$)。**结论**　EA 通过抑制 HMGB1/TLR4/NF-κB 信号通路激活影响小胶质细胞活化，发挥对 PHN 的治疗作用。

关键词：高迁移率族蛋白 B1/Toll 样受体 4/核因子-κB；　电针；　小胶质细胞活化；　带状疱疹后遗神经痛

中图分类号：R246.7；R752.12　　**DOI：**10.3870/j.issn.1672-0741.24.10.007

Electroacupuncture Affects Microglial Activation and Subsequently Improves Postherpetic Neuralgia via HMGB1/TLR4/NF-κB Signaling Pathway

Xin Huan，Zou Jing，Le Wei△

Department of Acupuncture and Moxibustion，Wuhan Hospital of Traditional Chinese and Western Medicine (Wuhan No. 1 Hospital)，Tongji Medical College，Huazhong University of Science and Technology，Wuhan 430022，China

Abstract　Objective　To explore the mechanism by which electroacupuncture(EA) improves postherpetic neuralgia(PHN) by affecting the activation of microglia through the high mobility group box 1(HMGB1)/Toll-like receptor 4(TLR4)/nuclear factor kappa-B(NF-κB) signaling pathway. **Methods**　Fifty SPF-grade SD rats were divided into the following groups：control (Vehicle) group，model(RTX) group，sham electroacupuncture(Sham-EA) group，electroacupuncture(EA) group，and electroacupuncture＋pathway inhibitor(EA＋Gly) group. Behavioral tests in rats were conducted using mechanical withdrawal threshold testing，hot foot reflex latency testing，and tilt board testing. Hematoxylin-eosin(HE) staining was used to detect pathological morphological changes in the spinal dorsal horn tissue. TUNEL assay was used to detect cell apoptosis in the spinal dorsal horn tissue. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) was used to detect the levels of pain-sensitive substances：prostaglandin E2 (PGE2)，substance P(SP)，neurokinin 1(NK-1)，and inflammatory factors：interleukin-6(IL-6)，interleukin-1β(IL-1β)，tumor necrosis factor α(TNF-α). Immunofluorescence was used to detect the expression of Iba1. Western blot was used to detect the expression of proteins involved in the HMGB1/TLR4/NF-κB pathway. **Results**　Compared with Vehicle group，RTX group showed decreased mechanical withdrawal threshold，shortened hot foot reflex latency，reduced angle of balance on the tilt board，structural damage，disordered arrangement of nerve fibers，inflammatory cell infiltration，increased cell apoptosis rate，increased

* 国家自然科学基金资助项目(No. 82105008)

辛　欢，女，1984 年生，主管护师，E-mail：Xinhuanuh89@163.com

△通讯作者，Corresponding author，E-mail：57342375@qq.com

中国知网　https://www.cnki.net

activation of microglia, and increased levels of PGE2, SP, NK-1, IL-6, IL-1β, TNF-α in the spinal dorsal horn tissue, with upregulated expression of HMGB1, TLR4, NF-κB p65 proteins (all $P<0.01$). Compared with RTX group, no significant difference was observed in Sham-EA group ($P>0.05$), while EA group showed increased mechanical withdrawal threshold, prolonged hot foot reflex latency, increased angle of balance on the tilt board, relieved morphological damage of nerve cells, more orderly arrangement, reduced inflammatory cell infiltration, reduced cell apoptosis rate, reduced activation of microglia, and decreased levels of PGE2, SP, NK-1, IL-6, IL-1β, TNF-α in the spinal dorsal horn tissue, with downregulated expression of HMGB1, TLR4, NF-κB p65 proteins (all $P<0.01$). Compared with EA group, EA+Gly group showed increased mechanical withdrawal threshold, prolonged hot foot reflex latency, increased angle of balance on the tilt board, reduced degree of morphological damage and disorder of nerve cells, reduced cell apoptosis rate, reduced activation of microglia, and decreased levels of PGE2, SP, NK-1, IL-6, IL-1β, TNF-α in the spinal dorsal horn tissue, with downregulated expression of HMGB1, TLR4, NF-κB p65 proteins (all $P<0.05$). **Conclusion** EA exerts its therapeutic effect on PHN by inhibition of HMGB1/TLR4/NF-κB signaling pathway and activation of microglia.

Key words high mobility group box 1/Toll-like receptor 4/nuclear factor-κB; electroacupuncture; microglia activation; postherpetic neuralgia

后遗神经痛,特别是带状疱疹后遗神经痛(postherpetic neuralgia,PHN)是一种顽固且复杂的疼痛疾病,其典型特征包括异常性疼痛和痛觉过敏,这源于带状疱疹病毒对神经节的侵袭,引发炎症反应,进而影响周围神经的功能。患者常经历阵发性或持续性灼痛、刺痛,同时伴随着急躁易怒、皮肤瘙痒等症状,严重影响患者的健康[1]。随着现代医疗科技的发展,针对 PHN 的治疗方法和药物得到更加广泛的验证和探索。西药治疗主要以内服为主,但其临床疗效不佳,通常伴有恶心、呕吐、头痛等副作用,限制其广泛应用[2]。相比之下,针灸治疗在 PHN 领域展现出独特的优势,安全性高,几乎无副作用而且疗效明显,复发率低,对缓解疼痛具有积极作用。近年来,电针(electroacupuncture,EA)疗法在缓解 PHN 方面取得较好的成效,并且安全性与患者接受度较高[3]。然而,关于 EA 治疗 PHN 的具体机制目前仍缺乏深入研究与明确阐述。

高迁移率族蛋白 B1(high mobility group box 1,HMGB1)作为一种在哺乳动物中广泛分布的高度保守核蛋白,参与炎症、免疫、肿瘤、血管生成多个生物过程,因此靶向 HMGB1 可成为治疗炎症及相关疾病的一种潜在策略[4]。同时,Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4,TLR4)是 Toll 样受体家族中的重要成员,是一种能够识别病原体相关微生物模式或者损伤相关分子模式(DAMP)的跨膜蛋白,其在中枢神经系统中主要表达于小胶质细胞,其激活能够诱发神经炎症,促进小胶质细胞活化和增殖以及炎性因子释放[5]。研究显示,HMGB1 在外界刺激下被释放到细胞外,并与 TLR4、TLR2 等多种受体结合,从而激活核因子 κB(nuclear factor kappa-B,NF-κB)信号通路,加剧炎性因子释放[6]。但是关于 EA 是否能够通过调控 HMGB1/TLR4/NF-κB 信号通路来改善 PHN 的症状,目前仍缺乏充分的实验证据。基于上述背景,本研究通过建立 PHN 模型,探究 EA 治疗下 HMGB1/TLR4/NF-κB 信号通路相关蛋白表达变化,从而揭示 EA 对 PHN 的镇痛效应的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

50 只 6～8 周龄 SPF 级 Sprague-Dawley 雄性大鼠,体重 200～220 g,购自湖北省实验动物研究中心,实验动物生产许可证号:SCXK(鄂)2020-0018。

1.2 药物、试剂与器材

树脂毒素(Resiniferatoxin,RTX)(货号:BK-17691),购自上海贝万塔生物科技有限公司;甘草酸(Glycyrrhizin,Gly)(货号:54538ES50),购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司;二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide,DMSO)(货号:ml020808),购自上海酶联生物科技有限公司;大鼠前列腺素 E2(PGE2)酶联免疫分析(ELISA)试剂盒(货号:RA20013)、大鼠 P 物质(SP)ELISA 试剂盒(货号:RA20646)、大鼠白细胞介素 6(IL-6)ELISA 试剂盒(货号:RA20607)、大鼠白细胞介素 1β(IL-1β)ELISA 试剂盒(货号:RA20020)、大鼠肿瘤坏死因子 α(TNF-α)ELISA 试剂盒(货号:RA20035),购自武汉贝茵莱生物科技有限公司;大鼠神经激肽-1(NK-1)ELISA 试剂盒(货号:BY-ER339305),购自南京博研生物科技有限公司;HMBG1 抗体(货号:PA1-16926)、TLR4 抗体(货号:PA5-23124)、Iba1 抗体(货号:PA5-27436)、山羊抗鼠 IgG(货号:31430100),购自赛默飞世尔;NF-κB p65 抗体(货号:ab16502)购自英国 Abcam;TUNEL 试剂盒(货号:YT137)购自北京百奥莱博科技有限公司。

韩氏穴位神经刺激仪(LH202H,北京华卫产业开发公司);Primo Star 光学显微镜、Scope. A1 AXIO 正置荧光显微镜(德国 Carl Zeiss);MIKRO 220R 高速冷冻离心机(德国 Hettich);Infinite M200 Pro 多功能酶标仪(瑞士 Tecan);蛋白电泳、转印及凝胶成像系统(美国 Bio-Rad);Von Frey 电

中国知网 https://www.cnki.net

子测痛仪(美国 IITC)。

1.3　动物模型与分组

实验动物均可自由获得充足的食物和水，饲养条件：温度 20～24 ℃，湿度 30%～35%，光照周期 12 h∶12 h，饲养 7 d 后用于实验。本研究获得我院伦理委员会批准(批准号：2100010305)，且本研究严格遵循《中国实验动物护理与使用指南》。

PHN 模型的建立：RTX 溶于含 10% Tween80 和 10%乙醇的生理盐水混合物中，之后以 200 μg/kg 的剂量为 40 只大鼠腹腔注射以构建 PHN 大鼠模型[7]。建模前评估这 40 只大鼠的机械退缩阈值和热刺激缩足反射潜伏期，注射 RTX 3 d 后再次评估，如果前后两者数据差异显著则证明建模成功[8]。本研究造模成功率为 100%，取另外 10 只大鼠腹腔注射等体积的生理盐水混合液作为对照组(Vehicle 组)。将建模成功的 40 只大鼠分为：模型组(RTX 组)、假电针组(Sham-EA 组)、电针组(EA 组)、电针＋HMGB1 抑制剂组(EA＋Gly)。选取“阳陵泉”(GB34)和“环跳”(GB30)两个穴位作为刺激点，已有多项研究证实这两个穴位在多种疼痛模型中发挥镇痛作用[9-11]。GB34 位于小腿外侧，腓骨下缘；而 GB30 则位于连接大腿骨外侧最突出点与骶骨凹陷的连线，具体在连线外 1/3 与中 1/3 的交点处。为便于施针并让大鼠在治疗中保持活动自由，实验中使用了特制的塑料容器来固定大鼠。通过韩氏穴位神经刺激仪实施电针刺激，针刺深度控制在 6～7 mm，电流强度设定为 1 mA，频率为 2 Hz，每次治疗持续 30 min。治疗自 RTX 注射后第 8 天启动，隔日进行 1 次，连续进行 35 d[11]。Sham＋EA 组的治疗穴位与 EA 组相同，仅刺入，不接通电流；EA＋Gly 组在每天进行 EA 治疗的基础上每天腹腔注射 HMGB1 抑制剂 Gly 50 mg/kg[12-13]；Vehicle 和 RTX 组则每天注射同体积的生理盐水。

1.4　动物行为学检测

1.4.1　机械刺激缩足反射阈值测定　对各组大鼠进行 Von Frey 细丝刺激，首先将大鼠随机单独放入到网状悬挂板上，使其适应 30 min。然后用校准后的 Von Frey 电子测痛仪垂直相大鼠后爪掌面施加由弱到强的机械刺激，观察大鼠是否出现缩足反应。阳性反应包括快速退缩、嘶叫等，出现 3 次则记为阳性结果。出现阳性结果时测痛仪显示的最低值记为机械退缩阈值。每只大鼠测试 5 次，每次间隔 5 min[8]。

1.4.2　热刺激缩足反射潜伏期测定　将大鼠放入透明的有机玻璃箱中，并将其放在干预实验台 30 cm 处，让大鼠适应 30 min，将热源光束聚焦于大鼠足底，记录从开始照射到大鼠出现缩足反应的时间，记为热刺激缩足反射潜伏期，每只大鼠测量 5 次，每次间隔 5 min，取平均值[8]。

1.4.3　斜板实验　将大鼠放在具有纵向轴线的斜面上，确保斜面与大鼠身体轴线垂直，从 0°起，以 5°的增量缓慢调整斜面角度，同时观察大鼠是否可停留 5 s，以 5 s 不滑落为准，记录此刻角度，重复测量 5 次，每次间隔 5 min，取平均值[14]。

1.5　苏木精-伊红(HE)染色检测脊髓背角组织切片损伤情况

各组大鼠行为学检测结束后，麻醉大鼠并处死，在低温下解剖取出其 L4～L5 段脊髓背角，用 5%多聚甲醛固定，制作病理石蜡切片，切成 5 μm 左右的组织切片，脱蜡后进行乙醇脱水，用 HE 染色后再脱水渗透，用中性胶固定，置于显微镜下观察其病理变化。

1.6　TUNEL 染色检测脊髓背角组织细胞凋亡情况

将制作好的石蜡切片，在二甲苯中脱蜡，梯度乙醇洗涤后用蒸馏水洗净，抗原修复，用 3%过氧化氢溶液阻断过氧化物酶活性，盐酸盐缓冲液(PBS)洗涤后，二氨基联苯胺(DAB)显色后用苏木精复染，脱水，中性胶封片，于显微镜下观察，阳性显棕色，苏木精染色细胞核呈蓝色。使用 Image J 图像处理软件统计凋亡细胞数量。凋亡率(%)＝(凋亡细胞数/总细胞数)×100%。

1.7　免疫荧光染色检测 Iba1 阳性水平

将脊髓背角组织切片在 4℃用 PBS 洗涤、Triton 渗透，牛血清白蛋白封闭，加入 Iba1(1∶100)一抗在 4℃下孵育过夜，后加入二抗山羊抗鼠 IgG(1∶10000)，室温避光孵育 2 h，PBS 洗涤后在显微镜下观察，采用 Image J 软件对阳性细胞进行比较，平均荧光强度＝该区域总荧光强度/该区域面积。

1.8　ELISA 法检测痛觉敏感相关因子水平和炎性因子水平

取脊髓组织标本首先加入 0.01 mol/L pH7.4 的 PBS 进行匀浆，组织重量∶PBS 为 1∶9，收集匀浆液 4 ℃ 1000×g 离心 10 min，取上清。按照 ELISA 试剂盒说明书检测疼痛敏感相关物质前列腺素 E2(PGE2)、P 物质(SP)、神经激肽 1(SK-1)水平，以及炎性因子白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子 α(TNF-α)水平。

1.9　蛋白印迹法检测 HMGB1/TLR4/NF-κB 通路相关因子水平

取大鼠脊髓背角组织，加入 PIPA 裂解液，冰浴 30 min，离心 5 min，收集上清，酶标仪测定蛋白浓度。进行 SDS-PAGE 凝胶电泳，分离蛋白，加入 5%脱脂奶粉封闭，60 min 后加入一抗 HMGB1(1

中国知网　https://www.cnki.net

μg/mL)、TLR4(2 μg/mL)、NF-κB p65(3 μg/mL),封膜置于 4℃过夜,加入二抗 IgG(1∶10000),室温孵育 1 h 后用 TBST 洗涤 3 次,使用 ECL 发光液显色,曝光,使用 Image J 软件进行灰度分析,计算目的蛋白表达水平。目的蛋白相对表达水平=目的蛋白条带灰度值/β-actin 蛋白条带灰度值。

1.10　统计学方法

用 SPSS 软件进行统计分析。计量资料符合正态分布,用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间均数比较用 t 检验,多组间均数比较用单因素方差表示,组间两两比较采用 SNK-q 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

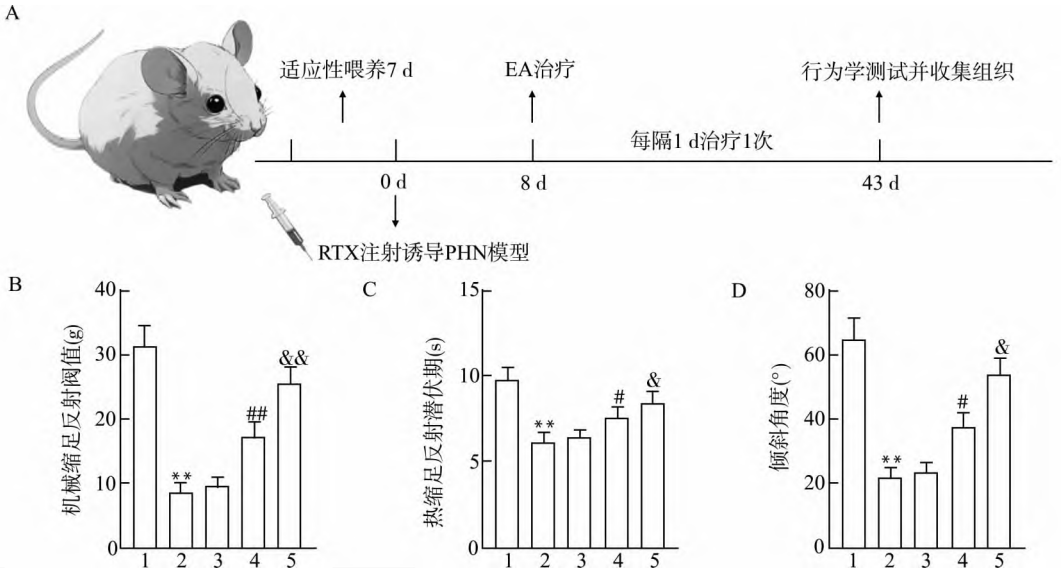
2　结果

2.1　EA 改善 PHN 大鼠的疼痛行为

本研究动物实验流程见图 1A。与 Vehicle 组相比,RTX 组大鼠机械退缩阈值降低,热缩足反射潜伏期缩短,在斜板保持平衡的角度减小(均 $P<0.01$);与 RXT 组相比,Sham-EA 组大鼠无显著差异(均 $P>0.05$),EA 组大鼠机械退缩阈值升高,热缩足反射潜伏期延长,在斜板保持平衡的角度增大(均 $P<0.05$);而与 EA 组相比,EA+Gly 组大鼠机械退缩阈值升高,热缩足反射潜伏期延长,在斜板保持平衡的角度增大(均 $P<0.05$)。表明 EA 改善 PHN 大鼠的疼痛行为,其改善作用在与 HMGB1/TLR4/NF-κB 通路抑制剂 Gly 联合作用下进一步增强。见图 1B~1D。

2.2　EA 改善 PHN 大鼠脊髓背角组织损伤并抑制细胞凋亡

HE 染色结果显示,Vehicle 组神经节细胞形态正常,神经纤维排列整齐;RTX 组脊髓背角组织出现破裂,结构被破坏,出现大面积组织空腔,神经纤维排列紊乱,神经元减少,炎性细胞浸润、水肿;Sham-EA 组与 RTX 组相比无显著变化;EA 组神经节细胞损伤得到缓解,结构紊乱改善,炎性浸润减少;而 EA+Gly 组与 EA 组相比,改善更加明显。TUNEL 检测脊髓背角组织细胞凋亡结果显示,与 Vehicle 组相比,RTX 组细胞凋亡率上升($P<0.01$);与 RTX 组相比,Sham-EA 组细胞凋亡率无显著差异($P>0.01$),EA 组细胞凋亡率下降($P<0.05$);与 EA 组相比,EA+Gly 组细胞凋亡率下降($P<0.05$)。表明 EA 改善 PHN 大鼠脊髓背角组织细胞损伤和凋亡,其保护作用在与 Gly 联合作用下得到加强。见图 2。



1:Vehicle 组;2:RTX 组;3:Sham-EA 组;4:EA 组;5:EA+Gly 组;A:动物实验流程图;B:各组大鼠缩足反射阈值检测结果;C:各组大鼠热缩足反射潜伏期检测结果;D:各组大鼠斜板保持平衡角度检测结果;与 Vehicle 组比较,** $P<0.01$;与 RTX 组比较,# $P<0.05$ ## $P<0.01$;与 EA 组比较,& $P<0.05$ && $P<0.01$

图 1　各组大鼠行为学测试结果

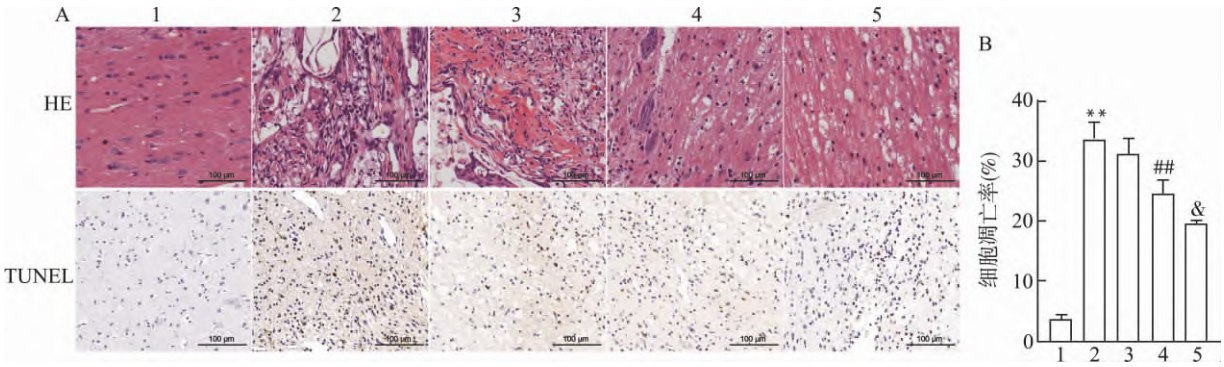
Fig. 1 Behavioral test results of rats in each group

2.3　EA 抑制 PHN 大鼠小胶质细胞活化

与 Vehicle 组相比,RTX 组大鼠脊髓背角组织中 Iba1 阳性表达增多($P<0.01$);与 RTX 组相比,Sham-EA 组大鼠脊髓背角组织中 Iba1 阳性表达无显著差异($P>0.05$),EA 组大鼠脊髓背角组织中 Iba1 阳性表达下降($P<0.01$);与 EA 组相比,EA+Gly 组大鼠脊髓背角组织中 Iba1 阳性表达下降($P<0.05$)。

表明 EA 能够抑制小胶质细胞活化,与 Gly 联合治疗则使其抑制作用进一步加强。见图 3。

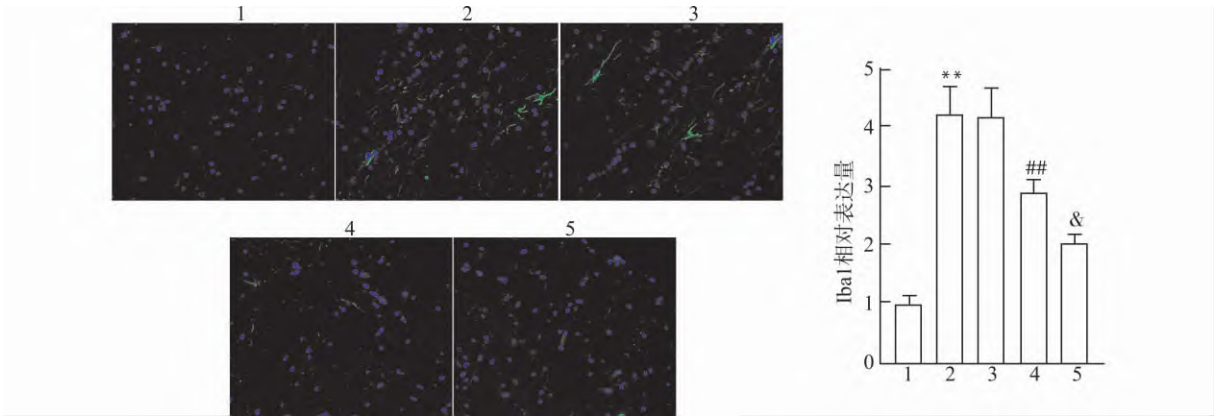
中国知网　https://www.cnki.net



1：Vehicle 组；2：RTX 组；3：Sham-EA 组；4：EA 组；5：EA＋Gly 组；A：HE 染色及 TUNEL 染色结果代表图；B：定量分析各组细胞凋亡率；与 Vehicle 组比较，** $P<0.01$；与 RTX 组比较，## $P<0.01$；与 EA 组比较，& $P<0.05$

图 2　各组大鼠脊髓背角组织细胞损伤和凋亡情况

Fig. 2 Injury and apoptosis of spinal dorsal horn tissue cells in each group of rats



1：Vehicle 组；2：RTX 组；3：Sham-EA 组；4：EA 组；5：EA＋Gly 组；与 Vehicle 组比较，** $P<0.01$；与 RTX 组比较，## $P<0.01$；与 EA 组比较，& $P<0.05$

图 3　各组大鼠小胶质细胞活化情况

Fig. 3 Activation of microglia in each group of rats

2.4　EA 抑制 PHN 大鼠脊髓背角组织中炎性因子释放

与 Vehicle 组相比，RTX 组大鼠脊髓背角组织中 IL-6、TNF-α 和 IL-1β 水平升高（均 $P<0.01$）；与 RTX 组相比，Sham-EA 组大鼠脊髓背角组织中 IL-6、TNF-α 和 IL-1β 水平无显著差异（均 $P>0.05$），EA 组大鼠脊髓背角组织中 IL-6、TNF-α 和 IL-1β 水平降低（均 $P<0.01$）；与 EA 组相比，EA＋Gly 组大鼠脊髓背角组织中 IL-6、TNF-α 和 IL-1β 水平降低（均 $P<0.05$）。

表明 EA 抑制 PHN 大鼠脊髓背角组织中的炎性反应，与 Gly 联合治疗则使其抑制作用加强。见表 1。

表 1　各组大鼠脊髓背角组织中炎性因子水平（$n=10$）

Table 1　Inflammatory factor levels in spinal dorsal horn tissue of rats in each group（$n=10$）

组别	IL-6(pg/mL)	IL-1β(pg/mL)	TNF-α(pg/mL)
Vehicle 组	124.14±13.45	54.12±6.11	145.78±15.69
RTX 组	441.63±45.11**	345.86±35.47**	511.23±56.14**
Sham-EA 组	445.81±46.12	338.94±34.12	513.29±54.23
EA 组	314.24±33.14##	198.78±21.11##	374.16±38.47##
EA＋Gly 组	215.41±22.52&	98.39±10.11&&	257.64±26.3&&

与 Vehicle 组比较，** $P<0.01$；与 RTX 组比较，## $P<0.01$；与 EA 组比较，& $P<0.05$　&& $P<0.01$

2.5　EA 降低 PHN 大鼠脊髓背角组织中疼痛相关因子水平

与 Vehicle 组相比，RTX 组大鼠脊髓背角组织中 PGE2、SP、NK-1 水平升高（均 $P<0.01$）；与 RTX 组相比，Sham-EA 组大鼠脊髓背角组织中 PGE2、SP、NK-1 水平无显著差异（均 $P>0.05$），EA 组大鼠脊髓背角组织中 PGE2、SP、NK-1 水平降低（均 $P<0.01$）；与 EA 组相比，EA＋Gly 组大鼠脊髓背角组织中 PGE2、SP、NK-1 水平降低（均 $P<0.05$）。表明 EA 降低 PHN 大鼠的痛觉敏感性，与 Gly 联合作用则更加降低 PHN 大鼠的痛觉敏感性。见表 2。

中国知网　https://www.cnki.net

表 2　各组大鼠脊髓背角组织中疼痛相关因子水平(n=10)

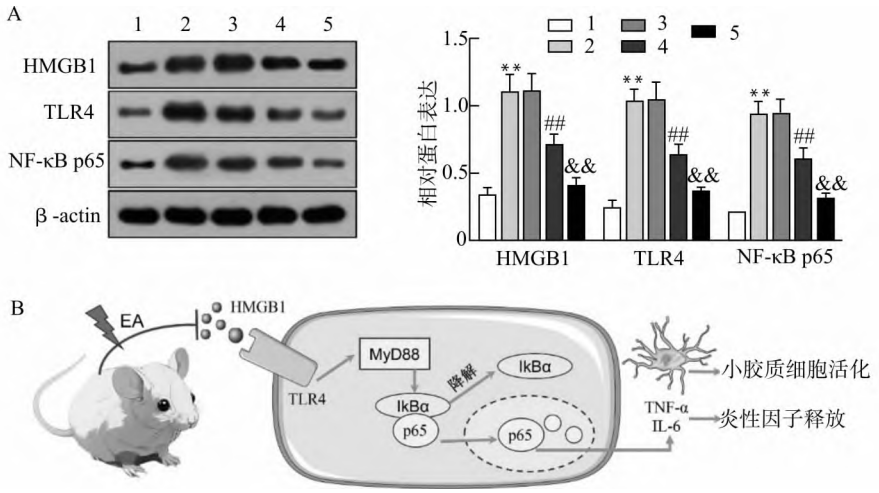
Table 2　Levels of pain related factors in spinal dorsal horn tissue of rats in each group(n=10)

组别	PGE2(pg/mL)	SP(pg/mL)	NK-1(ng/mL)
Vehicle 组	321.18±34.57	134.17±14.58	4.14±0.43
RTX 组	1124.56±123.12**	1647.15±168.74**	19.75±2.17**
Sham-EA 组	1024.14±105.81	1611.33±163.49	18.11±1.91
EA 组	687.24±69.73##	900.45±91.92##	11.54±1.28##
EA+Gly 组	424.19±45.48&&	514.34±52.56&&	7.11±0.76&&

与 Vehicle 组比较,** P<0.01;与 RTX 组比较,## P<0.01;与 EA 组比较,&& P<0.05

2.6　EA 抑制 HMGB1/TLR4/NF-κB 通路的激活

如图 4A 所示,与 Vehicle 组相比,RTX 组大鼠脊髓背角组织中 HMGB1、TLR4、NF-κB p65 蛋白表达上调(均 P<0.01);与 RTX 组相比,Sham-EA 组大鼠脊髓背角组织中 HMGB1、TLR4、NF-κB p65 蛋白表达无显著变化(均 P>0.05),EA 组大鼠脊髓背角组织中 HMGB1、TLR4、NF-κB p65 蛋白表达显著下调(均 P<0.01);与 EA 组相比,EA+Gly 组大鼠脊髓背角组织中 HMGB1、TLR4、NF-κB p65 蛋白表达下调(均 P<0.01)。表明 EA 抑制 HMGB1/TLR4/NF-κB 通路的激活。本研究机制解析见图 4B。



1:Vehicle 组;2:RTX 组;3:Sham-EA 组;4:EA 组;5:EA+Gly 组;A:各组大鼠脊髓组织中 HMGB1、TLR4、NF-κB p65 蛋白表达;B:本研究机制图;与 Vehicle 组相比,** P<0.01;与 RTX 组相比,## P<0.01;与 EA 组相比,&& P<0.01

图 4　各组大鼠脊髓背角组织中 HMGB1、TLR4、NF-κB p65 蛋白表达

Fig. 4 Expression of HMGB1, TLR4, NF-κB p65 proteins in spinal dorsal horn tissues of rats in each group

3　讨论

PHN 是带状疱疹发作后的一种常见并发症,表现出持续至少 1 个月的剧烈疼痛,患病率随着年龄的增长而上升,当前的治疗效果不理想[15]。在神经痛发展过程中,小胶质细胞作为中枢系统的免疫效应细胞,扮演者至关重要的角色,这些广泛分布于大脑和脊髓的“巨噬细胞”,一旦被激活,会释放多种促炎因子,如 IL-1β、IL-6、TNF-α 等,这些因子通过增强兴奋性突触传递并减少抑制性突触传递,形成神经病理性疼痛的正反馈机制[16]。有研究证实,调节小胶质细胞活化状态能够有效改善 PHN 症状,降低其发病风险[17],因此研究小胶质细胞活化可以作为治疗 PHN 的一个有效靶点。在中医理论中,PHN 的症状表现可归为“蛇串疮”范畴,其发病与湿热毒邪、气滞血瘀、气血亏虚等因素有着紧密联系。传统上,针灸被认为可以促进气的流动,针刺相关穴位能起到疏通经络、去除表浅病邪,缓解疼痛的作用。有研究证实,EA 作为针灸的一种治疗手段能够抑制 PHN 大鼠脊髓背角血管生长因子的表达,进而缓解机械痛觉超敏现象[18]。

RTX 被广泛应用于构建大鼠模型以模拟人类 PHN 的临床症状。RTX 作为一种超强效的瞬时受体电位阳离子通道亚家族 V 成员 1(transient receptor potential vanilloid 1,TRPV1)激动剂,其机制在于通过选择性消融表达 TRPV1 的感觉神经元,从而有效诱导出神经病理性疼痛状态[8]。本研究结果显示 EA 治疗显著改善 PHN 大鼠的疼痛症状,减轻脊髓背角组织细胞损伤,并且细胞凋亡减少,抑制小胶质细胞活化和炎性因子释放。

HMGB1 作为一种典型的 DAMP 分子,主要存在于细胞核内,参与基因转录调节。在细胞活化、损

中国知网　https://www.cnki.net

伤、死亡后被激活释放到细胞外，参与炎症发生，其在细胞外识别并结合受体 TLR4 后，进而激活 NF-κB，促进促炎因子 IL-6、TNF-α 等的释放[19-20]。有研究证实，抑制 HMGB1/TLR4/NF-κB 通路激活能够缓解未梢神经损伤（SNI）诱导的神经性疼痛[21]。本研究结果表明，RTX 组大鼠中 HMGB1、TLR4 和 NF-κB p65 的表达显著上调，而 EA 组与 RTX 组相比，各分子表达下调，则说明 EA 治疗能够通过抑制 HMGB1/TLR4/NF-κB 通路减轻 PHN 的进展。进一步验证 HMGB1/TLR4/NF-κB 信号通路的作用，结果显示 Gly＋EA 组大鼠相较于 EA 治疗组，在缓解 PHN 大鼠疼痛，抑制脊髓组织细胞损伤、凋亡以及小胶质细胞活化和炎性因子释放方面的效果更好，说明抑制 HMGB1/TLR4/NF-κB 信号通路能够起到改善 PHN 的作用。

综上，本文证实了 EA 治疗能够改善 PHN 症状，其具体作用机制与抑制 HMGB1/TLR4/NF-κB 通路有关。然而，本研究仍存在一定不足之处，尽管 RTX 诱导的大鼠 PHN 模型能够模拟人类 PHN 的部分症状，但动物模型与人类疾病之间仍存在差异；研究在统计方法和数据分析方面可能存在局限性。未来对于 PHN 的研究可以从多个方面进行改进和完善，以提高研究的科学性和实用性。

参　考　文　献

[1] Li Y，Jin J，Kang X，et al. Identifying and evaluating biological markers of postherpetic neuralgia：A comprehensive review[J]. Pain Ther，2024，13(5)：1095-1117.

[2] Zhao C，Zhang T，Zhu Q，et al. PROCESS trial：Effect of duloxetine premedication for postherpetic neuralgia within 72 hours of herpes zoster reactivation-a randomized controlled trial[J]. Clin Infect Dis，2024，78(4)：880-888.

[3] Sun R，Li S，Ren L，et al. Efficacy of electroacupuncture for the treatment of postherpetic neuralgia：Study protocol for a multicenter randomized controlled trial[J]. J Pain Res，2022，15：959-968.

[4] Xue J，Suarez J S，Minaai M，et al. HMGB1 as a therapeutic target in disease[J]. J Cell Physiol，2021，236(5)：3406-3419.

[5] Leitner G R，Wenzel T J，Marshall N，et al. Targeting Toll-like receptor 4 to modulate neuroinflammation in central nervous system disorders[J]. Expert Opin Ther Targets，2019，23(10)：865-882.

[6] Chu Y，Jing Y，Zhao X，et al. Modulation of the HMGB1/TLR4/NF-κB signaling pathway in the CNS by matrine in experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. J Neuroimmunol，2021，352：577480.

[7] Wei X，Wang L，Hua J，et al. Inhibiting BDNF/TrkB. T1 receptor improves resiniferatoxin-induced postherpetic neuralgia through decreasing ASIC3 signaling in dorsal root ganglia[J]. J Neuroinflammation，2021，18(1)：96.

[8] 龙兴震，余胜丽，马尊峰，等. 加巴喷丁有效缓解带状疱疹后神经痛大鼠痛敏并调控 CACNA2D1 的表达[J]. 中国药理学通报，2023，39(5)：903-909.
Long X Z，Yu S L，Ma Z F，et al. Gabapentin effectively alleviates hyperalgesia in rats with postherpetic neuralgia and regulates the expression of CACNA2SD1[J]. Chinese Pharmacological Bulletin，2023，39(5)：903-909.

[9] Xu Q，Niu C，Li J，et al. Electroacupuncture alleviates neuropathic pain caused by spared nerve injury by promoting AMPK/mTOR-mediated autophagy in dorsal root ganglion-macrophage[J]. Ann Transl Med，2022，10(24)：1341.

[10] Luo H，Zhang Y，Zhang J，et al. Glucocorticoid receptor contributes to electroacupuncture-induced analgesia by inhibiting Nav1.7 expression in rats with inflammatory pain induced by complete Freund's adjuvant[J]. Neuromodulation，2022，25(8)：1393-1402.

[11] Wu C H，Lv Z T，Zhao Y，et al. Electroacupuncture improves thermal and mechanical sensitivities in a rat model of postherpetic neuralgia[J]. Mol Pain，2013，9：18.

[12] Feldman P，Due M R，Ripsch M S，et al. The persistent release of HMGB1 contributes to tactile hyperalgesia in a rodent model of neuropathic pain[J]. J Neuroinflammation，2012，9：180.

[13] 王力，马莉，贾丽君，等. 高迁移率族蛋白 B1 抑制剂对白蛋白结合型紫杉醇致神经病理性疼痛的抑制作用及其机制[J]. 山西医科大学学报，2022，53(9)：1120-1126.
Wang L，Ma L，Jia L J，et al. Inhibitory effect and mechanism of high mobility group box 1 protein inhibitor on neuropathic pain induced by albumin-bound paclitaxel[J]. Journal of Shanxi Medical University，2022，53(9)：1120-1126.

[14] 肖林雨，段婷，夏勇生，等. 蒙花苷通过抑制 TLR4/NF-κB 通路抑制小鼠脊髓损伤后小胶质细胞活化介导的神经炎症和神经元凋亡[J]. 南方医科大学学报，2024，44(8)：1589-1598.
Xiao L Y，Duan T，Xia Y S，et al. Linarin inhibits microglial activation-mediated neuroinflammation and neuronal apoptosis after spinal cord injury in mice by suppressing the TLR4/NF-κB pathway[J]. Journal of Southern Medical University，2024，44(8)：1589-1598.

[15] Yang F，Yu S，Fan B，et al. The epidemiology of herpes zoster and postherpetic neuralgia in China：Results from a cross-sectional study[J]. Pain Ther，2019，8(2)：249-259.

[16] Malcangio M. Role of the immune system in neuropathic pain[J]. Scand J Pain，2019，20(1)：33-37.

[17] Lu C C，Lin C Y，Lu Y Y，et al. CDDO regulates central and peripheral sensitization to attenuate post-herpetic neuralgia by targeting TRPV1/PKC-δ/p-Akt signals[J]. J Cell Mol Med，2024，28(6)：e18131.

[18] 武彩花，毛红蓉，李洪萍，等. 电针对带状疱疹后遗神经痛大鼠脊髓背角血管内皮生长因子表达的影响[J]. 针刺研究，2018，43(4)：203-208.
Wu C H，Mao H R，Li H P，et al. Effects of electroacupuncture on the expression of vascular endothelial growth factor in the spinal dorsal horn of rats with postherpetic neuralgia[J]. Acupuncture Research，2018，43(4)：203-208.

[19] Andersson U，Yang H，Harris H. Extracellular HMGB1 as a therapeutic target in inflammatory diseases[J]. Expert Opin Ther Targets，2018，22(3)：263-277.

[20] Wang M，Gauthier A，Daley L，et al. The role of HMGB1，a nuclear damage-associated molecular pattern molecule，in the pathogenesis of lung diseases[J]. Antioxid Redox Signal，2019，31(13)：954-993.

[21] Wang X Y，Ma H J，Xue M，et al. Anti-nociceptive effects of *Sedum Lineare Thunb.* on spared nerve injury-induced neuropathic pain by inhibiting TLR4/NF-κB signaling in the spinal cord in rats[J]. Biomed Pharmacother，2021，135：111215.

（2024-10-11　收稿）

中国知网　https://www.cnki.net