



## • 学术动态 •

## 电针激活迷走神经-肾上腺轴的神经解剖学基础

**摘要** 电针刺激 (ES) 通过躯体感觉自主神经反射来调控机体的生理功能 (如抑制严重的炎症)。二十世纪七十年代有学者认为针刺反射具有身体区域特异性 (穴位特异性)。例如, 低强度 (0.5 mA, 10 Hz) ES 小鼠后肢穴位足三里 (ST36) 可激活迷走神经-肾上腺抗炎通路, 而 ES 腹部天枢穴 (ST25) 无效, 这种现象的神经解剖学基础尚不清楚。最近, 在一项新的研究中, 来自哈佛大学医学院、中国中医科学院和复旦大学的研究人员阐明了 ES 激活迷走神经-肾上腺轴抗炎通路的神经解剖学机制, 并发现了由 PROKR2<sup>Cre</sup> 标记的感觉神经元对激活迷走神经-肾上腺轴至关重要。特异性敲除小鼠表达 PROKR2<sup>Cre</sup> 标记的 DRG 神经元, 低强度电针 (0.5 mA) 刺激后肢 ST36 穴位不产生任何反应, 不能使肾上腺释放儿茶酚胺类神经递质, 也无法抑制细菌内毒素脂多糖 (LPS) 所诱发的全身炎症; 而高强度电针 (3.0 mA) 刺激后肢穴位 ST36 和腹部穴位 ST25 可激活交感神经抗炎通路。该研究还发现, 进一步运用交叉遗传的方法特异性诱导光敏感通道蛋白 CatCh 表达于 PROKR2<sup>Cre</sup> 标记的神经末梢, 可以激活迷走神经-肾上腺抗炎通路, 但不能激活交感神经-肾上腺抗炎通路。此外, PROKR2<sup>Cre</sup> 神经纤维的分布可以预测低强度 ES 产生抗炎作用的身体区域 (穴位特异性)。该研究为穴位选择和特异性激活自主神经通路提供了神经解剖学基础。尽管现代解剖学没有文献支持经络的物理存在, 但针灸确实可以通过躯体神经反射来达到治疗效果。这些反射始于背根神经节 (DRG) 和/或三叉神经节周围神经的激活, 然后从脊髓向大脑传递感觉信息, 进而激活外周自主神经通路, 最终对机体进行调控。该研究解读了为什么 ES 足三里 (ST36) 可激活迷走-肾上腺轴, 而刺激腹部天枢穴 (ST25) 无任何效果, ES 刺激 ST25 反而激活了脊髓交感神经通路。该研究认为迷走神经-肾上腺抗炎通道是由感觉神经介导, 是后肢特有的 PROKR2<sup>Cre</sup> 标记的 DRG 神经元 (一种 Cre 介导的重组标记神经元具有 PROKR2 持续或瞬时表达的作用) 激活的, 这些神经纤维密集分布在后肢深层筋膜组织。

1. PROKR2<sup>Cre</sup> 神经纤维分布在筋膜

该研究制作了 Prokr2<sup>Adv</sup>-tdTomato 小鼠, 共表达 PROKR2<sup>Cre</sup> 和 Advillin<sup>Flo</sup> 的 DRG 神经元 tdTomato 报告基因。在 DRG 神经元亚群中可检测到 PROKR2<sup>Adv</sup>-tdTomato<sup>+</sup> 细胞, 但在交感神经节、肾上腺或肠神经节中未检测到, 在结节状神经节中也很少见到。值得注意的是, PROKR2<sup>Adv</sup> 在肢体节段 DRG 神经元中比在胸段 DRG 具有更广泛地表达。TUBB3<sup>+</sup> 神经元中表达 tdTomato 的占 L<sub>4</sub>-L<sub>5</sub> 腰段 DRG 神经元的 (16.7±1.4)%, T<sub>8</sub>-T<sub>10</sub> 段 DRG 神经元中则有 (6.1±0.3)%。在腰段 DRG 中, PROKR2<sup>Adv</sup> 神经元与分布在皮肤表皮或表达小清蛋白的躯体感受器 IB4 结合的非肽能神经元没有重叠。tdTomato<sup>+</sup> 神经元中, (82.9±1.2)% 共表达神经生长因子受体 TRKA, (57.2±1.8)% 共表达神经丝蛋白 NEFH, (63.9±3.6)% 共表达降钙素基因相关肽 (CGRP), (50.7±3.9)% 共表达 NEFH 和 CGRP。此外, Nefh<sup>+</sup> tdTomato<sup>+</sup> 神经元可分为 Nefh<sup>high</sup> 亚群和 Nefh<sup>low</sup> 亚

群。Nefh<sup>high</sup> 亚群表示了 L<sub>4</sub>-L<sub>5</sub> DRG 中 (7.5±0.8)% 的 TUBB3<sup>+</sup> 神经元, 是 T<sub>8</sub>-T<sub>10</sub> DRG 中 TUBB3<sup>+</sup> 神经元数量 (2.0±0.1)% 的 3 倍多。相比之下, Nefh<sup>low</sup> 亚群在腰椎 DRG (2.7±0.3)% 和胸段 DRG (2.1±0.2)% 中无明显的表现差异。因此, Nefh<sup>high</sup>PROKR2<sup>Adv</sup> 神经元在四肢水平 DRG 中富集。

接下来进一步解析其神经分布模式。在中枢, PROKR2<sup>Adv</sup> 神经元主要位于脊髓背侧浅层。在外周, 无论是后肢还是腹部, tdTomato<sup>+</sup> 纤维都在毛囊周围形成环形末梢。这些末端高表达 CGRP, 但未表达 NEFH。几乎所有从皮肤逆行标记的 tdTomato<sup>+</sup> 神经元都共同表达 Bmpr1b 和低水平的 NEFH mRNA, 代表了 Aδ 痛觉感受器的 CGRP-ε 亚型。通过检查深层组织的神经分布, 发现了身体区域的差异。在后肢, tdTomato<sup>+</sup> 纤维密集分布于筋膜组织, 包括骨膜、关节韧带和胫骨与腓骨之间的骨间膜。tdTomato<sup>+</sup> 纤维在骨膜神经中, (63.5±4.1)% 共表达 NEFH 和 CGRP。NEFH<sup>+</sup> tdTomato<sup>+</sup> 纤维也大量分布于胫骨前



肌 (TA) 的内区域, 可能对应于筋膜包裹肌束的区域。PROKR2<sup>ADV</sup>-tdTomato<sup>+</sup> 神经元占 ST36 深层逆行标记神经元的 (38.7±1.3)%。其中, (75.6±1.3)% 共表达高水平的 Nefh mRNA, (10.6±1.0)% 共表达 Bmpr1b, (12.5±1.0)% 共表达低水平的 Nefh mRNA。这一表达图谱将它们与支配毛囊的 Bmpr1b<sup>+</sup>Nefh<sup>low</sup>PROKR2<sup>ADV</sup>-tdTomato<sup>+</sup> 神经元区分开。与后肢深筋膜致密的神经分布相比, 腹膜中未发现 tdTomato<sup>+</sup> 纤维, 而腹膜是腹部主要的深筋膜。值得注意的是, 与 ST36 内侧 TA 相比, 外侧 TA 或 ST25 腹壁肌肉的 tdTomato<sup>+</sup> 纤维密度仅为其十分之一, 这反映了两侧 TA 之间发育和功能的分离。因此, NEFH<sup>high</sup>tdTomato<sup>+</sup> 神经元对深筋膜组织的独特神经分布提供了一种区分后肢穴位足三里 (ST36) 区域和腹部天枢穴 (ST25) 区域的方法。

## 2. 激活迷走神经-肾上腺轴的必要性

为了研究 PROKR2<sup>ADV</sup> 神经元的功能, 制作了 Prokr2<sup>Adv</sup>-DTR 小鼠, 其中白喉毒素 (DTX) 受体 (DTR) 的表达仅限于 PROKR2<sup>ADV</sup> DRG 神经元。DTX 注射 4 周后, (98.0±0.5)% PROKR2<sup>Cre</sup> 标记的 DRG 神经元被消融, 导致骨膜中 TUBB3<sup>+</sup> 和 NEFH<sup>+</sup> 纤维密度分别降低 (44.5±7.0)% 和 (72.4±5.7)%。值得注意的是, 脊髓或大脑中没有观察到。这些小鼠被称为 PROKR2<sup>ADV</sup>-Abl。

为了确定 PROKR2<sup>ADV</sup> 神经元是否介导迷走神经-肾上腺轴, 对后肢 ST36 穴位进行电针刺激 (ES)。双侧电针插入 TA 肌, 针尖靠近腓神经。在对照组小鼠中, 低强度 (0.5 mA) ES 足以诱导以胆碱乙酰转移酶 (ChAT) 表达为标志的、位于迷走神经背侧运动核 (DMV) 的后脑迷走神经传出神经元中 Fos 的表达, Fos 是神经元激活的标志。PROKR2<sup>ADV</sup>-Abl 小鼠中这种 Fos 诱导被消除。ST36 穴位给予 0.5 mA ES 可引起依赖迷走神经的肾上腺嗜铬细胞释放去甲肾上腺素、肾上腺素和多巴胺。这种释放在 PROKR2<sup>ADV</sup>-Abl 小鼠中几乎被消除, 表明 PROKR2<sup>ADV</sup> 神经元在低强度 ES 激活迷走神经-肾上腺轴中发挥作用。

激活迷走神经-肾上腺轴可以抑制由细菌内毒素脂多糖 (LPS) 引起的全身炎症。不经 LPS 处理的动物, 在血清中几乎检测不到促炎细胞因子, 包括肿瘤坏死因子 (TNF) 和白细胞介素-6 (IL-6)。在 LPS 处理的对照组中, 与假 ES 相比, ST36 穴位 0.5 mA 的 ES 导致 TNF 和 IL-6 诱导降低 50%, 小鼠存活率提高 40%, 而这些效应在 PROKR2<sup>ADV</sup>-Abl 小鼠中消失。本文作者之前报道过腹部 ST25 穴位 0.5 mA 的 ES 不能激活迷走神经或交感神经反射, 也不能抑

制全身炎症, 而高强度 ES 可激活交感神经反射, 产生弱 (1.0 mA ES) 或强 (3.0 mA ES) 的抗炎作用, 不依赖于迷走神经传出信号。这些效应在 PROKR2<sup>ADV</sup>-Abl 小鼠中没有改变。后肢 ST36 穴位的高强度 (3.0 mA) ES 也可介导脊髓交感神经反射, 并产生抗炎作用, 而不依赖 PROKR2<sup>ADV</sup> 神经元。因此, PROKR2<sup>ADV</sup> 神经元是低强度 ES 从后肢 ST36 穴位激活迷走神经-肾上腺抗炎轴所必需的。

## 3. 激活肾上腺轴的充分性

接下来, 通过制作了 PROKR2<sup>ADV</sup>-CatCh 小鼠来进行功能获得研究, 其中钙转运通道视紫红质 (CatCh) 和增强的黄色荧光蛋白 (eYFP) 报告基因的表达仅限于 PROKR2<sup>ADV</sup> 神经元中。DRG 中可检测到 eYFP<sup>+</sup> 神经元, 骨膜中可见神经分布。电生理记录显示, 蓝光脉冲在 PROKR2<sup>ADV</sup>-CatCh 小鼠 DRG 神经元亚群中诱发动作电位放电, 但在对照组小鼠中没有。

然后进行光针灸, 通过 ST36 位点将光纤双侧插入 TA 内侧。蓝光刺激不能介导交感神经反射, 因此该研究将重点放在迷走神经反射上。既往研究显示, 延髓内的脊髓上升投射到孤束核 (NTS), 将输出信号发送到 DMV。光刺激 ST36 位点可使 NTS 逆行标记的 I 层脊髓神经元的 Fos 诱导率从对照组小鼠的 (3.3±0.9)% 增加到 PROKR2<sup>ADV</sup>-CatCh 小鼠的 (52.7±7.1)%。此外, DMV 内 ChAT<sup>+</sup> 迷走神经传出神经元的诱导率从对照组小鼠的 (10.8±1.4)% 增加到 PROKR2<sup>ADV</sup>-CatCh 小鼠的 (30.2±1.8)%。左颈迷走神经的电生理记录显示, ST36 位点的双侧光学刺激使放电率增加了 15 倍。与此同时, 与对照组相比, 蓝光刺激 ST36 穴位导致 PROKR2<sup>ADV</sup>-CatCh 小鼠血清中去甲肾上腺素、肾上腺素和多巴胺水平增加。膈下迷走神经切断术后则能阻断这种增加。由于血液中的肾上腺素和多巴胺主要来自肾上腺, 这些数据表明 PROKR2<sup>ADV</sup> 神经元的激活足以激活迷走神经-肾上腺轴。同样, ST36 穴位的蓝光刺激导致迷走神经传出神经元的 Fos 诱导增加, 从对照组的 (12.1±2.3)% 到 PROKR2<sup>ADV</sup>-CatCh 小鼠的 (47.7±3.7)%。此外, 与对照组小鼠相比, ST36 穴位的蓝光刺激使 LPS 处理的 PROKR2<sup>ADV</sup>-CatCh 小鼠的 TNF 和 IL-6 量降低 50%, 存活率增加 50%。这种抗炎作用在膈下迷走神经切断术后消失。因此, PROKR2<sup>ADV</sup> 纤维的光学激活本质上模仿了 ST36 的 0.5 mA ES, 并能充分激活迷走神经-肾上腺抗炎轴。

## 4. 后肢深筋膜神经参与

PROKR2<sup>ADV</sup> 神经纤维可分布在皮肤和深层组



织,  $\text{Nefh}^{\text{low}}\text{Bmpr1b}^+$  神经元亚群以区域独立的方式支配毛囊,  $\text{Nefh}^{\text{high}}$  神经纤维主要分布在后肢筋膜组织。为了达到身体区域特异性, 迷走神经反射可能由分布在深筋膜的腓总神经引起, 而不是由外侧皮肤的外侧皮神经引起。为了验证这一假设, 选择性切断腓总神经或外侧皮神经 (分别称为 CPX 和 CLX) 的小鼠, 以及进行假手术的对照组小鼠。在 CPX 小鼠中, 局部电刺激和针头插入到 3 mm 深度消除了 0.5 mA ES 在 ST36 位点诱导 TNF 和 IL-6 产生的抑制, 伴有骨膜和前侧深层肌肉神经支配的选择性丧失。即使通过弥漫性 ST36 ES 模式诱发的胫骨神经激活可以产生抗炎作用, 这种作用在腓骨和胫骨后面的胫骨神经横断小鼠中没有观察到。CPX 小鼠中, ST36 位点 0.5 mA ES 引起的 NTS 投射脊髓神经元中 Fos 诱导被消除。相比之下, 在选择性消除 ST36 位点皮神经支配的 CLX 小鼠中, 抗炎作用不受影响。与此相一致, ST36 穴位皮内 0.5 mA ES 不能产生抗炎作用。通过成津穴 (BL56) 插入电针, 针尖在腓肠神经两侧, 施加 0.5 mA ES 时, 没有引起抗炎作用。因此, 迷走神经-肾上腺抗炎轴可能是由分布在后肢深筋膜  $\text{PROKR2}^{\text{ADV}}$  感觉纤维介导的。

#### 5. 根据神经分布可预测 ES 效应

最后, 测试  $\text{PROKR2}^{\text{ADV}}$  感觉纤维的神经分布区域, 预测低强度 ES 产生抗炎作用的身体位置 (穴位)。  $\text{PROKR2}^{\text{ADV}}$  感觉纤维在 TA 内侧肌肉中有明显的神经分布, 在后侧肌肉中有稀疏的神经分

布, 包括小腿腓肠肌和大腿后侧的半腱肌。同样, 0.5 mA ES 在这些肌肉中不能抑制 TNF 和 IL-6 的产生。值得注意的是, 由于腓肠肌和半腱肌不包含传统的穴位, 经常被用作非穴位对照。因此, 该研究对足三里 (LI10) 穴位进行了双侧 0.5 mA ES, 针尖靠近桡骨神经深支, 含有支配桡骨骨膜的  $\text{tdTomato}^+$  纤维。这种刺激减少了依赖于  $\text{PROKR2}^{\text{ADV}}$  神经元和迷走神经的 TNF 和 IL-6 的产生。

#### 6. 讨论

该研究提供了穴位选择性 (如有效的 ST36 和 LI10 穴位相对于无效的 ST25 和 BL56 穴位) 和穴位特异性 (如 ST36 相对于无效的后肢肌肉传统非穴位) 介导特定的自主神经通路: 迷走神经-肾上腺轴。此外, 刺激强度、针头放置的深度和测量的结果指标都是影响穴位特异性的重要因素。例如, 对于低强度 ES, ST36 位点深层而非浅层的刺激对激活迷走-肾上腺轴至关重要, 这可能反映了电针尖需要靠近包含支配后肢深筋膜的  $\text{PROKR2}^{\text{ADV}}$  纤维的主要神经束。相比之下, 不依赖于  $\text{PROKR2}^{\text{ADV}}$  神经元的脊髓交感反射可以在 ST25 和 ST36 穴位通过高强度 ES 诱发。这些发现可能为优化生物电刺激参数来激活不同的自主神经通路以治疗特定疾病铺平道路。

(Liu SB, Wang ZF, Su YS, *et al.* A neuroanatomical basis for electroacupuncture to drive the vagal-adrenal axis. *Nature*, 2021, 598(7882):641-645. 复旦大学脑科学研究院, 陈紫悦 译, 韩清见 校)

《中国疼痛医学杂志》编辑部

地 址: 北京市海淀区学院路 38 号, 北京大学医学部

电 话: 010-82801712; 010-82801705

邮 箱: pain1712@126.com

投稿请登录: <http://casp.ijournals.cn> 在线投稿

微信公众平台号: 中国疼痛医学杂志 (cjp1712)

