



• 论 著 •

电针通过 rACC 谷氨酸能神经元缓解炎性痛 伴发焦虑样行为 *

肖思琦 吴泽民 沈 醉 孙海桦 朱怡晨 吴梦薇 朱希潇 方剑乔 邵晓梅[△]
(浙江中医药大学附属第三医院 第三临床医学院 浙江省针灸神经病学研究重点实验室, 杭州 310053)

摘 要 **目的:** 探讨吻侧前扣带皮质 (rostral anterior cingulate cortex, rACC) 谷氨酸能神经元活性是否与慢性炎性痛伴发焦虑样行为相关, 明确电针是否通过调控 rACC 谷氨酸能神经元活性起到抗焦虑样行为作用。**方法:** 足底皮下注射完全弗氏佐剂 (complete Freund' s adjuvant, CFA) 0.1 ml 建立大鼠慢性炎性痛模型; 通过注射化学遗传病毒调控 rACC 谷氨酸能神经元活性, 并使用动态足底触觉仪和旷场实验 (open field test, OFT) 分别检测其机械缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT) 和焦虑样行为改变; 观察调控 rACC 谷氨酸能神经元是否对电针 (electroacupuncture, EA) 足三里、三阴交穴的抗焦虑样行为作用产生影响。**结果:** 特异性激活生理状态大鼠 rACC 谷氨酸能神经元可以诱发焦虑样行为; 特异性抑制 rACC 谷氨酸能神经元可缓解 CFA 模型大鼠的焦虑样行为; 电针缓解 CFA 大鼠焦虑样行为的作用被特异性激活 rACC 谷氨酸能神经元逆转。**结论:** 电针通过下调 rACC 谷氨酸能神经元活性缓解慢性炎性痛大鼠的焦虑样行为。

关键词 吻侧前扣带皮质; 谷氨酸能神经元; 慢性疼痛; 焦虑样行为; 电针

Electroacupuncture alleviates the inflammatory pain-induced anxiety-like behaviors by glutamatergic neurons in rostral anterior cingulate cortex *

XIAO Siqi, WU Zemin, SHEN Zui, SUN Haiju, ZHU Yichen, WU Mengwei, ZHU Xixiao, FANG Jianqiao, SHAO Xiaomei[△]

(Key Laboratory of Acupuncture and Neurology of Zhejiang province, the Third Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Abstract **Objective:** To explore the mechanism of glutamatergic neurons in the rostral anterior cingulate cortex (rACC) in regulating hyperalgesia and pain-induced anxiety-like behavior of chronic inflammatory pain model rats, and to investigate the effect of electroacupuncture intervention. **Methods:** The chronic inflammatory pain model was constructed by injecting 0.1 ml emulsified CFA into the left hind plantar. Neuronal activity was regulated by injection of adeno-associated virus. Mechanical withdrawal threshold (MWT) and anxiety-like behaviors were measured by dynamic plantar tactile instrument and OFT respectively. It was investigated that the activation of rACC glutamatergic neurons affects the electroacupuncture (EA) intervention on pain related anxiety-like behaviors by stimulating the acupoint of "Zusanli" (ST36) and "Sanyinjiao" (SP6). **Results:** Specific activation of glutaminergic neurons in the rACC induced anxiety-like behaviors in normal rats. The glutamatergic neurons in the rACC inhibited specifically could alleviated the pain-induced anxiety-like behaviors in CFA model rats. The antianxiotic effect of EA was reversed by specifically activating glutamatergic neurons in the rACC. **Conclusion:** Electroacupuncture alleviates the chronic inflammatory pain-induced anxiety-like behaviors by decreasing the activity of glutamatergic neurons in the rostral anterior cingulate cortex.

Keywords rostral anterior cingulate cortex; glutamatergic neurons; chronic pain; anxiety-like behaviors; electroacupuncture

* 基金项目: 国家自然科学基金 (82074518); 浙江省自然科学基金 (LY21H270010)

[△] 通信作者 邵晓梅 13185097375@163.com



2020 年国际疼痛学会将疼痛定义为“疼痛是一种与实际或潜在的组织损伤相关的不愉快的感觉和情绪情感体验, 或与此相似的经历”^[1]。流行病学调查指出, 慢性疼痛在发达和发展中国家发病率分别为 37% 和 41%^[2], 而慢性疼痛病人出现焦虑、抑郁等负性情绪的概率高达 50%^[3,4]。同时焦虑等负性情绪进一步导致疼痛持续时间延长, 强度变大^[5], 形成恶性循环, 最终导致慢性疼痛迁延难愈。因此治疗慢性疼痛伴发的焦虑障碍也是治疗慢性疼痛的重要方面, 不容忽视。深入了解慢性疼痛与焦虑共病的神经机制, 对于我们理解疼痛本质提供理论依据, 同时也为治疗慢性疼痛这一全球性公共卫生难题提供新的治疗方向。

既往研究发现吻侧前扣带皮质 (rostral anterior cingulate cortex, rACC) 在慢性疼痛的维持^[6]和痛相关情绪中均发挥重要作用^[7]。影像学研究表明, 病人慢性疼痛程度减轻与调控前扣带皮质 (anterior cingulate cortex, ACC) 激活有关^[8]; 慢性疼痛状态下出现焦虑等负性情绪时, ACC 中神经元自发性放电频率明显增加^[9]; 损毁 ACC 减轻疼痛伴发的厌恶等负性情绪^[10]。有文献证明, 完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA) 能诱发大鼠的焦虑样行为^[11]。而 rACC 谷氨酸能神经元活性变化对慢性炎性痛伴发焦虑样行为是否存在作用还未见报道。目前, 化学遗传学技术在疼痛相关神经机制研究中逐渐被应用^[12], 本次实验采用高度特异性的化学遗传病毒精准操控 rACC 谷氨酸能神经元, 以此揭示慢性炎性痛伴发焦虑样行为的中枢机制。

临床治疗慢性疼痛常采用镇痛药联合抗焦虑抑郁药等方案^[13]。虽然联合用药在一定程度上改善疼痛及相关负性情绪, 但具有剂量依赖性, 并伴有胃肠道不良反应、药物依赖等不良反应^[14]。而电针镇痛作用明确, 在治疗疼痛性疾病和情绪相关疾病均具有较好的临床效果^[15,16], 且长期应用无明显不良反应。但是电针是否通过 rACC 谷氨酸能神经元发挥缓解慢性疼痛伴发焦虑样行为的作用也尚未可知。

本研究通过特异性调控 rACC 谷氨酸能神经元, 观察其对生理状态及 CFA 诱发慢性炎性痛模型大鼠的机械痛阈和焦虑样行为的影响; 在此基础上, 进而观察了调控 rACC 谷氨酸能神经元对电针 (electroacupuncture, EA) 足三里、三阴交穴位的抗炎性痛和抗焦虑样行为作用的影响, 以阐述电针干预疼痛伴发焦虑样行为的中枢机制。本实验结果以期能为临床研发治疗慢性炎性痛高效特异药物提供新的方案和基础研究依据。

方 法

1. 实验动物与分组

实验动物选用清洁级健康雄性 SD 大鼠 67 只, 体重 (300±20) g, 由浙江中医药大学实验动物中心提供。实验过程中对动物的处置遵照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意见》, 并通过浙江中医药大学动物实验研究中心医学伦理委员会审核 (10745)。

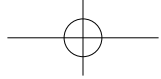
为使大鼠适应实验环境, 正式开始实验前进行适应性喂养 1 周 (室温 23~25℃, 湿度 40%~60%)。大鼠自由获取水和食物, 饲养环境有良好的通风和空气过滤系统, 12 小时明暗循环。采用区组随机法将大鼠分为 6 组: 空白对照组 (C + hM3Dq + Saline 组, $n = 11$)、空白 + rACC 激活组 (C + hM3Dq + CNO 组, $n = 11$)、模型对照组 (M + hM4Di + Saline 组, $n = 11$)、模型 + rACC 抑制组 (M + hM4Di + CNO 组, $n = 14$)、模型 + 电针组 (M + hM3Dq + Saline + EA 组, $n = 10$)、模型 + rACC 激活 + 电针组 (M + hM3Dq + CNO + EA 组, $n = 10$)。

2. 造模和处理方法

(1) 脑内病毒注射: 造模前 14 天, 进行脑内病毒注射。首先用 3% 戊巴比妥钠按照 60 mg/kg 剂量腹腔注射麻醉大鼠; 后将大鼠固定在脑立体定位仪 (RWD 公司) 上并进行调平, 充分暴露骨缝 (包括人字缝和十字缝)。测量 bregma 的 x、y 坐标位置, 根据 Paxinos and Watson 的大鼠大脑图谱 (第六版) 确定 rACC (图谱方位参数: + 3.00 mm anterior to bregma, ±0.8 mm mediolateral, -1.4 mm dorsoventral) 的位置。脑图谱中大鼠 AP = 9 mm, 将实际测量的 AP 值与图谱等比例换算, 得出该大鼠实际 rACC 坐标。位置确定后, 将 AAV2/9-CaMKII α -hM3Dq/hM4Di-mCherry (武汉枢密脑科学技术有限公司) 注射至 rACC 内, 剂量为每只 400 nl, 病毒滴度为 5.34E + 12 vg/ml。大鼠苏醒后放回饲养笼中, 后续进行行为学检测。

(2) 造模: 采用足底皮下注射 CFA 乳化液的方法复制慢性炎性痛模型^[17], 模型组各组大鼠于左足底注射 0.1 ml CFA (sigma 公司) 乳化液, 对照组大鼠左后足底注射 0.1 ml 0.9% 无菌生理盐水 (杭州民生药业有限公司)。

(3) 电针处理: 电针组大鼠在造模后 28 天进行一次电针干预。针刺穴位为双侧后肢“三阴交”穴和“足三里”穴 (穴位定位方法参照《实验动物穴位图谱》)。电针 (韩氏 HANS 200E 型电针仪,



北京华卫产业开发公司) 参数如下: 频率: 100 Hz, 强度: 初始强度 0.5 mA, 每隔 20 分钟增加 0.5 mA, 时间: 60 分钟。

(4) 调控 rACC 脑区谷氨酸能神经元活性: 通过定位后, 在大鼠 rACC 处微量注射化学遗传病毒 (AAV2/9-CaMKII α -hM3Dq-mCherry), 造模后 28 天 (旷场实验前 30 分钟) 腹腔注射氯氮平一氧化氮 (clozapine N-oxide, CNO, 浓度: 2 mg/kg) 以激活 rACC 谷氨酸能神经元; 通过定位后, 在大鼠 rACC 处微量注射化学遗传病毒 (AAV2/9-CaMKII α -hM4Di-mCherry), 造模后 28 天 (旷场实验前 30 分钟) 腹腔注射 CNO 以抑制 rACC 谷氨酸能神经元。对照大鼠腹腔注射等量 0.9% 无菌生理盐水。

3. 行为学检测

(1) 机械性痛阈检测: 采用动态足底触觉仪 (意大利 UGO Basile 公司) 进行机械缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT) 检测, 检测时间点为造模后第 27 和 28 天。首先将大鼠置于底面为铁丝网的透明有机玻璃盒中, 盖上透气盖子, 适应 20 分钟, 待安静后进行痛阈检测。将测痛仪上的不锈钢针 (直径 0.5 mm) 移动至大鼠左后足掌中央, 操作测痛仪以 0~50 g/20 s 的线性压力进行压力试验, 大鼠抬脚时的值为缩足阈值。连续进行 5 次测量, 每次间隔 30 s, 取后 4 次测量的平均值作为大鼠机械痛阈。测痛时保持周围环境安静, 室内温度为 23~25℃, 每次测痛时间为 9:00 am~12:00 am, 每次测痛前先进行测痛仪的校准。

(2) 焦虑样行为检测: 造模后 28 天进行旷场测试 (open field test, OFT), 检测时间为 8:00 am~12:00 am。室内环境保持湿度为 45%~55%、温度为 23~25℃, 噪音为 40 分贝以下, 室内用低亮度壁灯进行照明。测试前将大鼠放置于房间 1 小时适应环境。

旷场是 1 m×1 m×1 m 的正方形黑色无盖木质箱体, 将旷场底部平均分成 16 个正方形方格区域, 中间 4 个方格为中央区域, 周围 12 个方格为外围区域。测试时, 将大鼠放置在旷场中央, 适应 30 s 后, 使用 ANY-maze 动物行为视频跟踪系统 (美国 Stoelting 公司) 记录大鼠在旷场 5 min 的自发活动情况。每只大鼠结束后清洁旷场并使用 10% 酒精擦拭旷场底部和侧面, 防止残留痕迹和气味对后续大鼠行为造成影响。

4. 取材及后固定

行为学结束后 90 min 进行动物取材。3% 戊巴比妥钠按照 60 mg/kg 剂量麻醉大鼠, 充分暴露心脏, 灌注针头由心尖插入, 经左心室, 到达升主动脉, 止血钳固定灌注针头, 剪开右心耳, 快速灌注 PBS 溶液

200 ml (北京索莱宝科技有限公司), 直至大鼠四肢和肝脏变白, 随后缓慢推注 4% 多聚甲醛溶液 200 ml (上海展云化工有限公司)。灌注结束后取出全脑, 置于多聚甲醛溶液中 24 h, 并使用 15% 和 30% 的蔗糖 (无锡市展望化工试剂有限公司) 梯度脱水, 至大脑完全沉底后经液氮快速冷冻, 于 -80℃ 冰箱保存。

5. 免疫荧光染色

对取材后的脑组织使用冰冻切片机 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司) 进行切片, 厚度为 30 μ m。组织切片先用 10% 驴血清 (Solarbio) 封闭液在 37℃ 恒温水浴箱封闭 1 h。随后加入一抗于 4℃ 冰箱孵育 18 h: Anti-c-Fos (Rabbit, 1:500, ab190289, Abcam), 或 Anti-CaMKII (Mouse, 1:500, ab22609, Abcam), TBST 清洗后加入二抗: Donkey anti-rabbit 488 (1:800, Jackson ImmunoResearch), 或 Donkey anti-mouse488 (1:800, Jackson Immuno Research), 37℃ 恒温水浴箱孵育 1 h。最后使用抗荧光淬灭剂 (含 DAPI, ab104140, Abcam) 封片, 该实验全过程避光。采用 VS-120 数字病理切片 (荧光) 扫描仪 (Olympus 公司) 观察荧光信号, 并用 Sense Dimension 系统采集图片及后期处理工作。

6. 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计学分析, 以均数 $\pm$ 标准误 ($\bar{x} \pm SEM$) 表示。当数据符合正态分布和方差齐性时, 采用独立样本 *t* 检验; 当为非正态分布时, 采用秩和检验。 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

结 果

1. 特异性激活 rACC 谷氨酸能神经元诱发生理状态大鼠的焦虑样行为

首先在大鼠 rACC 处微量注射化学遗传病毒 (AAV2/9-CaMKII α -hM3Dq-mCherry) (见图 1A, B)。42 天后通过免疫荧光染色, 在 rACC 观察到增强的红色荧光 (mCherry) 信号 (见图 1C)。经统计显示, 病毒与谷氨酸能神经元标记物 (CaMKII α) 共表达率为 80% (见图 1D, E)。并且与对照组 (C + hM3Dq + Saline 组) 相比, rACC 谷氨酸能神经元激活组 (C + hM3Dq + CNO 组) 中 mCherry 和 c-Fos 的共表达明显增加 (*P* < 0.05, 见图 1F, G)。由此表明化学遗传方法能够发挥特异性激活 rACC 谷氨酸能神经元的作用。OFT 结果显示, 与对照组相比, 激活组大鼠在旷场的中央运动时间明显降低 (*P* < 0.05), 且这两组的运动总距离无明显差异 (见图 1H-J)。在机械性痛阈检测中, 与对照组相比, 激活组痛阈并无显著性差异 (见图 1K)。以上结果提示, 特

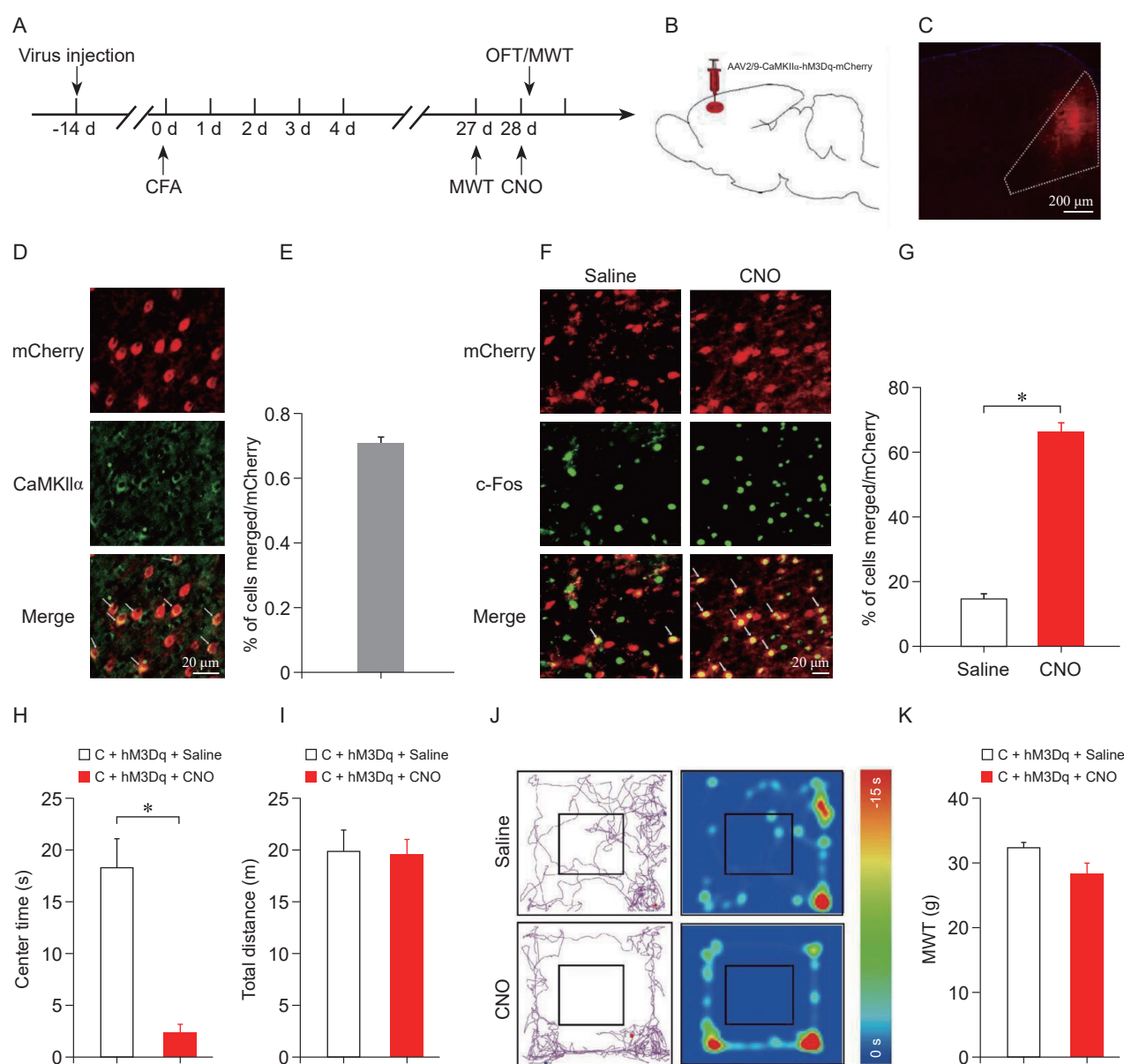


图 1 在生理状态大鼠中, 特异性激活 rACC 谷氨酸能神经元能够引起焦虑样行为 (A) 整个实验流程图; (B) 病毒 (AAV2/9-CaMKII α -hM3Dq-mCherry) 注射位置的大鼠矢状图; (C) 病毒注射后在 rACC 表达的代表图 (比例尺为 200 μ m); (D) 病毒 (红色) 和谷氨酸能神经元标记物 CaMKII α (绿色) 共表达的代表图 (比例尺为 20 μ m); (E) CaMKII α 阳性神经元和病毒共表达占病毒总数百分比 ($n = 3$); (F) 在 rACC 表达病毒的大鼠中, 病毒 (红色) 与 c-Fos (绿色) 共表达的代表图 (比例尺为 20 μ m); (G) 各组中病毒和 c-Fos 共表达占病毒总数百分比 ($n = 3$); (H) 各组大鼠在旷场试验中的中央运动时间 ($n = 11$); (I) 各组大鼠在旷场试验中的运动总距离 ($n = 11$); (J) 各组大鼠在旷场试验中运动轨迹图和热图代表图; (K) 各组大鼠痛阈值 ($n = 11$)

* $P < 0.05$, 与 C + hM3Dq + Saline 组相比

Fig. 1 Specific activation of glutamatergic neurons in the rACC induced anxiety-like behaviors in control rats (A) Schematic diagram of the experimental process; (B) Virus injection location in sagittal view of rats (AAV2/9-CaMKII α -hM3Dq-mCherry); (C) The representative image of virus expression in rACC after virus injection (Scale bar = 200 μ m); (D) The mCherry (red) and glutamatergic neuron marker-CaMKII α (green) were co-localized in the rACC (Scale bar = 20 μ m); (E) Percentage of mCherry and CaMKII α co-localization ($n = 3$); (F) Representative diagram of mCherry (red) merged with c-Fos (green) in rACC virus-expressing rats (Scale bar = 20 μ m); (G) The percentage of the co-expression of mCherry and c-FOS in each group ($n = 3$); (H) In the open field test, the center time of each group of rats ($n = 11$); (I) Total distance in each group of rats in the OFT ($n = 11$); (J) Representative animal trajectories and heat maps of rats with each group in the OFT; (K) The comparison of MWT in two groups ($n = 11$).

* $P < 0.05$, compared with group C + hM3Dq + Saline.

异性激活 rACC 谷氨酸能神经元能够诱发生理状态大鼠的焦虑样行为。

2. 特异性抑制 CFA 模型大鼠 rACC 谷氨酸能神经元缓解其焦虑样行为

基于以上研究,我们探讨 rACC 谷氨酸能神经元活性变化对 CFA 模型诱发焦虑样行为和机械性痛阈的影响。造模前 14 天,在大鼠 rACC 处微量注射化学遗传病毒 (AAV2/9-CaMKII α -hM4Di-mCherry) (见图 2A)。42 天后通过免疫荧光染色,在 rACC 脑区观察到增强的红色荧光 (mCherry) 信号 (见图 2B)。统计显示,与对照组 (M+hM4Di+Saline 组) 相比,rACC 谷氨酸能神经元抑制组 (M+hM4Di+CNO 组) 中 mCherry 和 c-Fos 的共表达明显减少

($P < 0.05$, 见图 2C, D), 由此说明化学遗传方法能够发挥特异性抑制 rACC 谷氨酸能神经元的作用。

OFT 结果显示,与对照组相比,抑制组在旷场试验中表现出更多的中央运动时间 ($P < 0.05$),且两组的运动总距离无明显差异 (见图 2E-G)。在机械性痛阈检测中,两组痛阈值无明显变化 (见图 2H)。以上结果提示,特异性抑制 rACC 谷氨酸能神经元能够缓解 CFA 模型大鼠的焦虑样行为。

3. 特异性激活 rACC 谷氨酸能神经元阻断电针对 CFA 大鼠焦虑样行为的治疗作用

上述结果证明抑制 rACC 谷氨酸能神经元能缓解慢性炎性痛模型大鼠焦虑样行为。既往研究表明,电针能够有效缓解焦虑症状^[18]。由此我们猜想电针

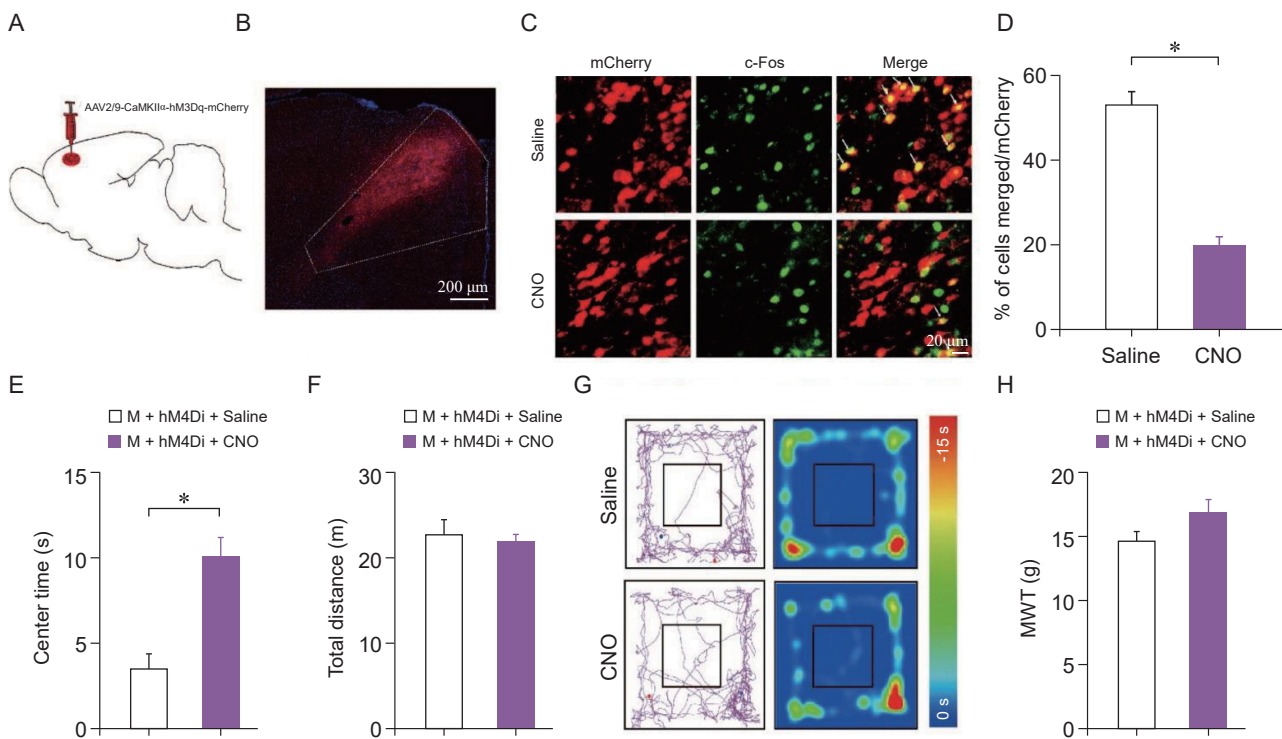


图 2 在 CFA 模型大鼠中,特异性抑制 rACC 的谷氨酸能神经元能够缓解焦虑样行为 (A) 病毒 (AAV2/9-CaMKII α -hM4Di-mCherry) 注射位置的大鼠矢状图; (B) rACC 病毒表达示意图 (比例尺为 200 μ m); (C) 在各组大鼠中, CaMKII α 阳性神经元 (红色) 与 c-Fos (绿色) 共表达的代表图 (比例尺为 20 μ m); (D) 各组中 CaMKII α 阳性神经元和 c-Fos 共表达占总 CaMKII α 阳性神经元百分比 ($n = 3$); (E) 不同组大鼠在旷场试验的中央运动时间 ($n = 11/14$); (F) 各组大鼠在旷场试验的运动总距离 ($n = 11/14$); (G) 不同组大鼠在旷场试验运动轨迹图和热图代表图; (H) 各组大鼠痛阈值比较 ($n = 11/14$)

* $P < 0.05$, 与 M+hM4Di+Saline 组相比

Fig. 2 Specific inhibition of glutamatergic neurons in rACC alleviated anxiety disorders in the CFA rat

(A) Virus (AAV2/9-CaMKII α -hM4Di-mCherry) injection location in sagittal view of rats; (B) The representative image of virus expression in rACC after virus injection (Scale bar = 200 μ m); (C) Representative diagram of CaMKII α -positive neurons (red) merged with c-Fos (green) in each group (Scale bar = 20 μ m); (D) The percentage of the co-expression of CaMKII α -positive neurons and c-FOS in each groups ($n = 3$ in each group); (E) In the OFT, the center time of rats in each group ($n = 11/14$); (F) Total distance of rats in the OFT ($n = 11/14$); (G) In the OFT, representative trajectories and heat maps of rats in different groups; (H) The comparison of MWT in each groups ($n = 11/14$).

* $P < 0.05$, compared with group M+hM4Di+Saline.

讨 论

可能是通过降低 rACC 谷氨酸能神经元活性发挥缓解焦虑样行为的作用。为了验证这一猜想,本实验在电针干预的同时将 rACC 谷氨酸能神经元激活,观察电针抗焦虑样行为的作用是否还存在。在造模前 14 天,首先于大鼠 rACC 处微量注射化学遗传病毒 (AAV2/9-CaMKII α -hM3Dq-mCherry) (见图 3A, B)。并在造模后 28 天,于大鼠双侧后肢“足三里”“三阴交”进行电针干预 (见图 3C)。OFT 结果显示,与对照+电针组 (M + hM3Dq + Saline + EA 组) 相比,激活+电针组 (M + hM3Dq + CNO + EA 组) 中央运动时间明显减少 ($P < 0.05$),且两组大鼠运动总距离无明显差异 (见图 3D-F)。在机械性痛阈检测中,对照+电针组与激活+电针组在电针治疗前后其痛阈均明显上升 ($P < 0.05$, 见图 3G)。以上结果提示,电针通过抑制 rACC 谷氨酸能神经元活性发挥缓解慢性炎性痛模型大鼠焦虑样行为的作用。

疼痛是一种多维度的主观体验,当疼痛持续存在、变为慢性疼痛时,将严重影响病人的生活质量^[19],导致病人出现焦虑、抑郁等负性情绪^[20,21],这种负性情绪被定义为痛情绪。痛情绪会进一步增加病人的疼痛感,从而形成疼痛-负性情绪-深度疼痛的恶性循环。与其他情感不同,痛情绪是基于个体接收伤害性刺激,并将这种疼痛信息传递至中枢、而后在相应脑区进行信息整合而形成的一种情感体验^[22]。研究表明,当疼痛长期发生成为慢性疼痛时,其大脑皮质就会发生突触可塑性变化,这些变化在慢性疼痛的疼痛感知和相关情绪障碍 (如焦虑、抑郁等) 等密切相关^[23]。临床上慢性疼痛包括神经病理性痛、慢性炎性痛、术后痛等,本研究此次以慢性炎性痛为主来探讨其对情绪的发生机制。红、肿、

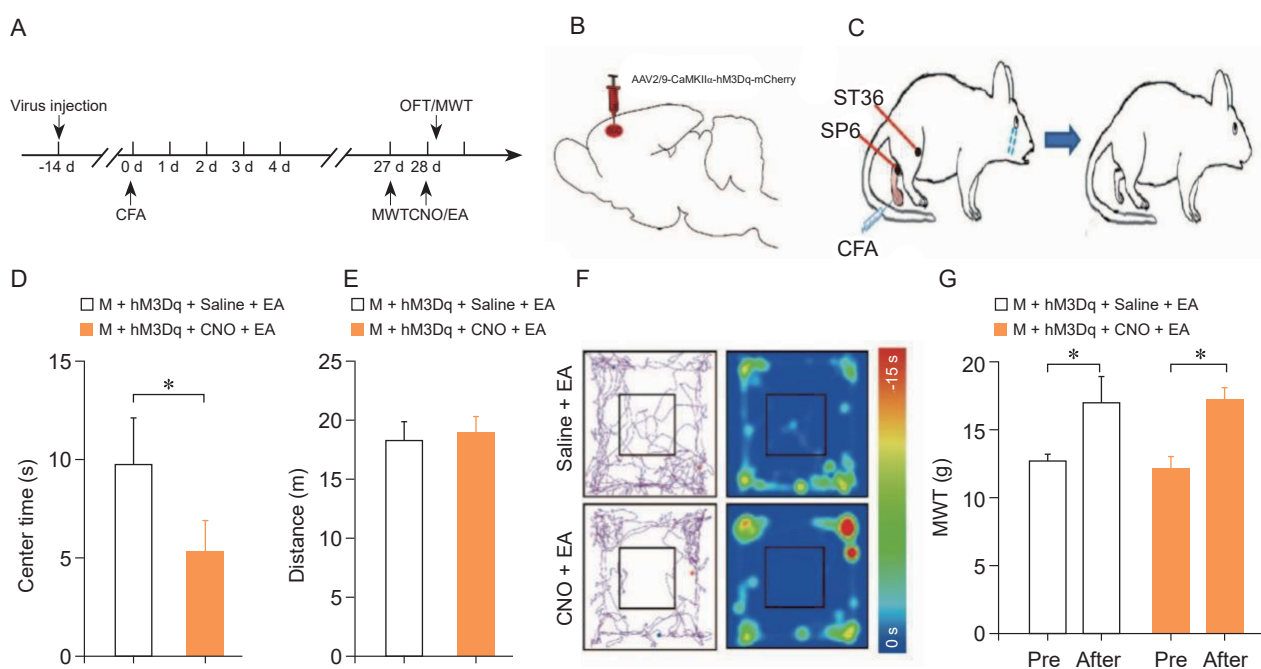


图 3 电针对痛相关焦虑样行为的作用可以被特异性激活 rACC 谷氨酸能神经元阻断 (A) 实验流程图; (B) 病毒 (AAV2/9-CaMKII α -hM3Dq-mCherry) 注射位置的大鼠矢状图; (C) 电针治疗的示意图 (足三里、三阴交); (D) 旷场试验中, 不同组别大鼠中央运动时间 ($n = 10$); (E) 各组大鼠在旷场试验中运动总距离比较 ($n = 10$); (F) 各组大鼠在旷场试验中运动轨迹图和热图代表图; (G) 不同组别电针前后痛阈值比较 ($n = 7$)

* $P < 0.05$, 与 M + hM3Dq + Saline + EA 组相比

Fig. 3 The effect of EA on pain-related anxiety behaviors could be blocked by specific activation of the glutamatergic neurons in rACC

(A) Schematic diagram of the experimental process; (B) Virus (AAV2/9-CaMKII α -hM3Dq-mCherry) injection location in sagittal view of rats; (C) Schematic diagram of EA treatment (ST36 and SP6); (D) Time in center of the OFT in different group rats ($n = 10$); (E) In the OFT, the total distance of the rats in each group ($n = 10$); (F) Representative trajectories and heat maps of rats in OFT; (G) In the OFT, representative trajectories and heat maps of rats in different groups; (G) The comparison of MWT before and after EA in each group's rats ($n = 7$).

* $P < 0.05$, compared with group M + hM3Dq + Saline + EA.



热、痛是临床上炎症的主要表现，而持续不愈的炎症会形成慢性炎性痛，对病人造成巨大的身心伤害。本实验采用 CFA 乳化液进行左足底注射以建立慢性炎性痛模型，来模拟临床常见的慢性炎性痛病例。并且从慢性疼痛模型伴发焦虑情绪的中枢机制来探讨痛情绪的发生发展，从而为慢性疼痛的治疗提供更为全面的方案。

ACC 是疼痛感知、慢性疼痛及痛相关负性情绪的重要皮质区域^[24]，分为 rACC 和尾侧前扣带皮质 (caudal anterior cingulate cortex, cACC)，其中 rACC 对疼痛伴发的厌恶情绪起着调节作用，但对疼痛本身没有影响^[25]。ACC 中分布大量的锥体神经元（以谷氨酸能神经元为主）和抑制性中间神经元（以 γ -氨基丁酸能神经元为主）。并且在 ACC 中抑制性神经元接受兴奋性谷氨酸能神经元支配，两者间兴奋/抑制 (excitatory/inhibitory, E/I) 协调平衡以维持 rACC 功能状态^[24]。有文献表明，ACC 谷氨酸能突触传递增强促进痛相关焦虑样行为产生^[24]。同时电生理结果证明，在神经病理性痛模型大鼠诱发焦虑样行为时，ACC 中锥体神经元（以谷氨酸能神经元为主）兴奋性突触后电流频率和振幅明显增加，而通过光遗传抑制 ACC 谷氨酸能神经元能够缓解痛相关焦虑样行为^[26]。但 rACC 谷氨酸能神经元活性变化对慢性炎性痛模型伴发焦虑样行为的影响却少有研究。本实验采用化学遗传方法，特异性调控 rACC 谷氨酸能神经元，并通过行为学检测其活性变化对于 CFA 模型大鼠疼痛和焦虑样行为改变情况。结果提示，激活 rACC 谷氨酸能神经元，能诱发生理状态大鼠的焦虑样行为；而抑制 rACC 谷氨酸能神经元，能缓解 CFA 模型大鼠的焦虑样行为。因此，通过调控 rACC 谷氨酸能神经元活性可能是治疗慢性疼痛伴发焦虑样行为的有效方法之一。

电针在临床上已被广泛应用于疼痛和情绪相关疾病的治疗，且疗效较好。在众多基础研究中证实了电针在治疗痛症和情绪疾病的作用。CFA 模型大鼠的红肿痛主要表现在左足底局部，因此本实验以局部选穴为主。在中医理论中，焦虑症等情绪病多由脏腑功能失调、气机失常所致，常涉及脾、心、肝、肾等多个脏腑。而“足三里”属于足阳明胃经合穴、胃之下合穴，能够发挥调理脾胃气血、补中益气、通调脏腑气机的作用。“三阴交”属于足太阴脾经穴位，为足三阴经交会穴，可以调理肝脾肾三脏，能疏肝解郁、补虚培元。故而“足三里”和“三阴交”也是临床上电针治疗情绪疾病的常用穴。Du 等^[27]的研究表明，电针特定穴位能缓解慢

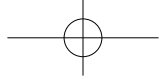
性炎性痛大鼠的疼痛及相关焦虑情绪。本课题组前期实验证明，100 Hz 电针刺激足三里、三阴交能缓解痛相关负性情绪^[28]。所以我们选择在病理状态下激活 rACC 谷氨酸能神经元活性并进行电针干预，且采用 100 Hz 电针刺激足三里、三阴交，来探讨电针的治疗效果。本研究在行为学前进行一次电针干预，发现激活 rACC 谷氨酸能神经元后会增强焦虑样行为，但并不影响电针镇痛效果。由此说明，激活 rACC 谷氨酸能神经元能反转电针对 CFA 模型大鼠焦虑样行为的缓解作用。本研究提示，电针对慢性炎性痛伴发焦虑样行为的治疗作用是通过抑制 rACC 谷氨酸能神经元活性实现的。

本研究通过探讨 rACC 谷氨酸能神经元活性变化对慢性炎性痛模型大鼠焦虑样行为的影响，进一步发现电针能够通过抑制 rACC 谷氨酸能神经元活性来缓解慢性炎性痛大鼠的焦虑样行为，研究成果为阐明电针镇痛科学内涵提供了理论依据，对慢性疼痛的治疗方案优化具有一定的指导价值。rACC 脑区内部存在多种神经元类别，本次实验仅研究了慢性炎性痛伴发焦虑样行为状态下 rACC 脑区中谷氨酸能神经元活性改变，而在该状态下 rACC 脑区内部其他神经元发生了何种改变以及与谷氨酸能神经元之间的联系在本实验中暂未进行，仍需后期进行深入研究。

利益冲突声明：作者声明本文无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] 宋学军, 樊碧发, 万有, 等. 国际疼痛学会新版疼痛定义修订简析 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2020, 26(9):641-644.
- [2] Tsang A, Von Korff M, Lee S, *et al.* Common chronic pain conditions in developed and developing countries: gender and age differences and comorbidity with depression-anxiety disorders[J]. J Pain, 2008, 9(10):883-891.
- [3] Bouhassira D. Neuropathic pain: definition, assessment and epidemiology[J]. Rev Neurol, 2019, 175(1-2):16-25.
- [4] Velly AM, Mohit S. Epidemiology of pain and relation to psychiatric disorders[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2018, 87(Pt B):159-167.
- [5] Zhuo M. Neural mechanisms underlying anxiety-chronic pain interactions[J]. Trends Neurosci, 2016, 39(3):136-145.
- [6] Gungor NZ, Johansen J. A chronic pain in the ACC[J]. Neuron, 2019, 102(5):903-905.
- [7] 付苏. 神经病理性疼痛引起焦虑抑郁样情绪的机



- 制——前扣带回 24a/24b 区的过度兴奋 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2018, 24(5):335.
- [8] Bushnell MC, Ceko M, Low LA. Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2013,14(7):502-511.
- [9] Yoshimura S, Okamoto Y, Onoda K, *et al.* Rostral anterior cingulate cortex activity mediates the relationship between the depressive symptoms and the medial prefrontal cortex activity[J]. *J Affect Disord*, 2010,122(1-2):76-85.
- [10] Shi Y, Yao S, Shen Z, *et al.* Effect of electroacupuncture on pain perception and pain-related affection: dissociation or interaction based on the anterior cingulate cortex and S1[J]. *Neural Plasticity*, 2020, 2020:8865096.
- [11] Shao F, Fang J, Qiu M, *et al.* Electroacupuncture ameliorates chronic inflammatory pain-related anxiety by activating PV interneurons in the anterior cingulate cortex[J]. *Front Neurosci*, 2021,15:691931.
- [12] 陈丹丹, 周瑜, 翟晓静, 等. 基于光遗传学与化学遗传学技术的疼痛脑环路研究进展 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2022, 28(1):7-20.
- [13] Hylands-White N, Duarte RV, Raphael JH. An overview of treatment approaches for chronic pain management[J]. *Rheumatol Int*, 2017, 37(1):29-42.
- [14] Rocchio RJ, Ward KE. Intranasal ketamine for acute pain[J]. *Clin J Pain*, 2021, 37(4):295-300.
- [15] Zhang R, Lao L, Ren K, *et al.* Mechanisms of acupuncture-electroacupuncture on persistent pain[J]. *Anesthesiology*, 2014, 120(2):482-503.
- [16] Mak AD, Chung VCH, Yuen SY, *et al.* Noneffectiveness of electroacupuncture for comorbid generalized anxiety disorder and irritable bowel syndrome[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2019, 34(10):1736-1742.
- [17] Matayoshi S, Jiang N, Katafuchi T, *et al.* Actions of brain-derived neurotrophic factor on spinal nociceptive transmission during inflammation in the rat[J]. *J Physiol*, 2005, 569(Pt 2):685-695.
- [18] Amorim D, Amado J, Brito I, *et al.* Acupuncture and electroacupuncture for anxiety disorders: a systematic review of the clinical research[J]. *Complement Ther Clin Pract*, 2018,31:31-37.
- [19] Kremer M, Becker LJ, Barrot M, *et al.* How to study anxiety and depression in rodent models of chronic pain? [J]. *Eur J Neurosci*, 2021, 53(1):236-270.
- [20] Gerrits M, Vogelzangs N, van Oppen P, *et al.* Impact of pain on the course of depressive and anxiety disorders[J]. *Pain*, 2012, 153(2):429-436.
- [21] Gerrits M, van Oppen P, van Marwijk HWJ, *et al.* Pain and the onset of depressive and anxiety disorders[J]. *Pain*, 2014, 155(1):53-59.
- [22] 卢波, 王瑞春, 王秋生, 等. 激活前扣带皮层腺苷酸活化蛋白激酶对大鼠痛情绪和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白活性的影响 [J]. 现代实用医学, 2021, 33(9): 1153-1154, 1262.
- [23] Zhuo M. Cortical LTP: a synaptic model for chronic pain[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1099:147-155.
- [24] Bliss TV, Collingridge GL, Kaang BK, *et al.* Synaptic plasticity in the anterior cingulate cortex in acute and chronic pain[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2016, 17(8):485-496.
- [25] Johansen JP, Fields HL, Manning BH. The affective component of pain in rodents: direct evidence for a contribution of the anterior cingulate cortex[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(14):8077-8082.
- [26] Sellmeijer J, Mathis V, Hugel S, *et al.* Hyperactivity of anterior cingulate cortex areas 24a/24b drives chronic pain-induced anxiodepressive-like consequences[J]. *J Neurosci*, 2018, 38(12):3102-3115.
- [27] Du J, Fang J, Xu Z, *et al.* Electroacupuncture suppresses the pain and pain-related anxiety of chronic inflammation in rats by increasing the expression of the NPS/NPSR system in the ACC[J]. *Brain Res*, 2020, 1733:146719.
- [28] Wu YY, Jiang YL, He XF, *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.