

doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2023.01.004

• 论 著 •

电针对多囊卵巢综合征小鼠机械痛阈及 TRPV1 和 CGRP 表达的影响 *

徐晨曦¹ 胡瑞斌¹ 高昕妍^{1,4} 乔海法^{1,2,3 Δ} 袁 伟^{1,2,3 Δ}(¹ 陕西中医药大学针灸推拿学院, 咸阳 712046; ² 陕西省针药结合重点实验室, 咸阳 712046; ³ 咸阳市神经生物学(针灸)重点实验室, 咸阳 712046; ⁴ 中国中医科学院针灸研究所, 北京 100700)

摘 要 **目的:** 观察电针关元及敏化点对多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 小鼠关元穴、敏化点机械痛阈值及 T₁₃-L₂ 节段脊髓、背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 中瞬时受体电位香草酸亚型 1 (transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1)、降钙素基因相关肽 (calcitonin gene related peptide, CGRP) 表达的影响, 探讨 PCOS 小鼠模型体表敏化的部分机制。**方法:** 32 只雌性 ICR 小鼠, 随机分为对照组、模型组、电针关元组、电针敏化点组, 每组 8 只。采用双酚 A 灌胃的方式制备 PCOS 模型, 对照组用玉米油灌胃; 电针关元及敏化点, 每日 20 min, 连续 5 天, 共 4 周。电针结束后第 3 天, 用 von Frey 测量小鼠体表敏化点及关元穴机械痛阈值; HE 染色法观察卵巢组织病理形态; 蛋白印迹法、免疫荧光法检测脊髓、DRG 中 TRPV1 及 CGRP 表达水平。**结果:** 与对照组比较, 模型组卵巢组织囊性扩张、闭锁卵泡增加, 关元穴、敏化点痛阈值下降, 脊髓及 DRG 中 TRPV1、CGRP 蛋白表达上升, 脊髓中 TRPV1/CGRP 共表达光密度升高、DRG 中 TRPV1/CGRP 共表达细胞增加; 与模型组比较, 电针关元组及电针敏化点组卵泡及黄体发育良好, 关元穴及敏化点痛阈值升高, 脊髓、DRG 中 TRPV1 及 CGRP 蛋白表达降低、脊髓中 TRPV1/CGRP 共表达光密度降低、DRG 中 TRPV1/CGRP 共表达细胞减少。**结论:** 电针敏化点与关元可提高 PCOS 小鼠关元穴及敏化点机械痛阈值, 调节 PCOS 小鼠体表敏化现象, 其作用机制可能与下调 TRPV1、CGRP 的异常高表达有关。

关键词 多囊卵巢综合征; 穴位敏化; 机械痛阈; 瞬时受体电位香草酸亚型 1; 降钙素基因相关肽

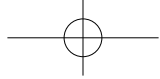
Effects of electroacupuncture on mechanical pain threshold and expression of TRPV1 and CGRP in mice with polycystic ovary syndrome *

XU Chenxi¹, HU Ruibin¹, GAO Xinyan^{1,4}, QIAO Haifa^{1,2,3 Δ}, YUAN Wei^{1,2,3 Δ}(¹ College of Acupuncture & Tuina, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China; ² Shaanxi Key Laboratory of Acupuncture & Medicine, Xianyang 712046, China; ³ Xianyang Key Laboratory of Neurobiology (Acupuncture), Xianyang 712046, China; ⁴ Institute of Acupuncture and Moxibustion, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract **Objective:** To observe the effects of electroacupuncture (EA) at Guan Yuan (CV4) and sensitization point on the mechanical pain threshold of CV4 acupoint and sensitization point and the expression of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and calcitonin gene related peptide (CGRP) in T₁₃-L₂ segment spinal cord and dorsal root ganglion (DRG) in mice with polycystic ovary syndrome (PCOS), and to explore partial mechanisms of PCOS mice model body surface sensitization. **Methods:** Thirty-two female ICR mice were randomly divided into control group, model group, electroacupuncture (EA) Guan yuan (CV4) group and EA-sensitization group, with 8 mice in each group. PCOS mice models were intragastrically administered with bisphenol A, and the control group was intragastrically administered with corn oil. EA-CV4 and EA-sensitiza-

* 基金项目: 陕西中医药大学经脉-脏腑相关研究创新团队 (No.YL-09); 陕西中医药大学博士科研启动金项目 (No.303-17102031914); 陕西中医药大学校级科研课题 (No. 2021GP35)

Δ 通信作者 袁伟 yuanwei@sntcm.edu.cn; 乔海法 1805355963@qq.com



tion point, 20 min a day, for 5 consecutive days, a total of 4 weeks. On the third day after the EA, the mechanical pain threshold of the sensitized point on the body surface and CV4 were measured by *von Frey*. HE staining was used to observe the pathological morphology of mice ovarian tissue. The expression levels of TRPV1 and CGRP in spinal cord and DRG tissues were detected by Western blot and Immunofluorescence. **Results:** Compared with the control group, the cystic dilatation and atresia of ovarian tissue were increased in the model group, and the mechanical pain threshold of CV4 acupoint and sensitized point were decreased, the protein expressions of TRPV1 and CGRP in the spinal cord and DRG tissue were increased, the optical density of TRPV1/CGRP co-expression in spinal cord was increased, and the number of TRPV1/CGRP co-expressing cells in the DRG was increased. Compared with model group, the follicles and luteum of the EA-CV4 group and the EA-sensitization group were well developed, the mechanical pain threshold of CV4 acupoint and sensitized point increased, the protein expression of TRPV1 and CGRP in spinal cord and DRG tissues were decreased, the optical density of TRPV1/CGRP co-expression in the spinal cord were decreased, the TRPV1/CGRP co-expression cells in the DRG were decreased. **Conclusion:** EA-sensitization point and EA-CV4 can increase the mechanical pain threshold of CV4 acupoint and sensitization point of PCOS mice, and regulate the body surface sensitization of PCOS mice. The mechanism may be related to the down-regulation of the abnormally high expression of TRPV1 and CGRP.

Keywords polycystic ovary syndrome; acupoint sensitization; mechanical pain threshold; transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1); calcitonin gene related peptide (CGRP)

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是育龄期女性中常见的内分泌疾病, 临床主要特征为月经不调、持续无排卵、高雄激素, 易引发不孕、心血管疾病、肥胖等多种并发症, 对病人的生活质量有极大影响^[1]。PCOS 发病机制尚不确定, 通常多认为与炎症、代谢异常、遗传等多种因素有关^[2]。

穴位选择是针刺干预的核心部分, 穴位被认为是一个动态的功能区域, 当机体遭受损伤或疾病时, 相应穴位以压敏、痛敏、热敏、感受野扩大等表现形式被激活, 随着健康状况而动态改变^[3]。瞬时受体电位香草酸亚型 1 (transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1), 是非选择性阳离子通道之一, 通常被机械痛、热刺激、辣椒素等伤害性刺激所激活, 在伤害性感受感觉的传递和调节中起重要作用^[4]。降钙素基因相关肽 (calcitonin gene related peptide, CGRP), 是一种感觉神经肽, 由 37 个氨基酸组成, 主要存在于外周和中枢感觉神经系统中, CGRP 能够激活其效应细胞受体、增强伤害感受器敏感性^[5]。CGRP 在 TRPV1 激活后释放, 机体受损时 TRPV1、CGRP 在脊髓、背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 中高度表达^[6,7]。穴位敏化是一个动态而复杂的过程, TRPV1、CGRP 在穴位致敏中起着至关重要的作用^[8]。

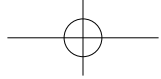
我国早已在针灸临床中认识到“以痛为输”选穴理论, 干预敏化腧穴具有更好的疗效。机械痛阈降低是体表敏化的重要表现形式之一^[9], 脊髓、

DRG 组织中的 CGRP 等痛敏递质释放, 是参与伤害性感受信息调控与传递的重要环节^[10,11]。本研究借助课题组前期研究, PCOS 小鼠尾静脉注射伊文思蓝 (evans blue, EB) 后, 选择神经源性渗出点重叠最多处作为针刺部位^[12], 与临床妇科常用任脉经穴关元比较针刺效应差异, 对针刺治疗该疾病的选穴有积极作用, 具有一定的临床意义。针刺穴位选择区别于传统单一定位, 更有助于解释穴位的本态研究, 但其作用机制尚不明确。基于此, 本研究继续通过双酚 A (bisphenol A, BPA) 灌胃复制 PCOS 动物模型, 探讨 PCOS 小鼠模型体表敏化的可能机制, 为临床 PCOS 针刺选穴提供参考及科学依据。

方 法

1. 动物与分组

32 只 SPF 级 7 周龄雌性 ICR 小鼠, 体质量 (29±2) g, 购自西安交通大学动物中心, 生产许可证号: SCXK (陕) 2018-001, 饲养于陕西省针药结合重点实验室, 饲养温度 (22±2)℃, 相对湿度 (50±10)%, 12 h 昼夜交替循环照明, 自由饮水、摄食。小鼠随机分为对照组 (Con 组)、模型组 (PCOS 组)、电针关元组 (EA-CV4 组)、电针敏化点组 (EA-sensitization 组), 每组 8 只。实验过程严格按照 2006 年科技部颁发的《关于善待



实验动物的指导性意见》及陕西省针药结合重点实验室动物相关管理规定（伦理审批号：SVCMDL20210901003）。

2. 主要仪器和试剂

小动物麻醉机（深圳瑞沃德生命科技有限公司），韩氏电针仪（南京济生医疗科技有限公司），华佗牌针灸针（规格 10 mm×0.19 mm，苏州医疗用品厂有限公司），von Frey 测痛仪（美国 IITC Life Science），酶标仪（美国 Biotek），超声波细胞粉碎机（宁波新艺超声设备有限公司），冰冻切片机、台式高速冷冻离心机（美国 Thermo Fisher），荧光显微镜（德国 Leica），电泳仪、化学发光成像系统（美国 Bio-Rad）。

BPA（西安灏洋生物有限公司），TRPV1 抗体（美国 abcam），CGRP 抗体（美国 cell signaling）， β -actin 抗体（武汉博士德生物工程有限公司），正常驴血清、Alexa Fluor 488 驴抗小鼠荧光二抗、Alexa Fluor 647 驴抗兔荧光二抗（上海翊圣生物科技有限公司），BCA 蛋白定量试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司），HRP 标记山羊抗鼠/兔二抗（笛医生物科技有限公司）。

3. 造模方法

采用 BPA 灌胃的方式制备 PCOS 小鼠模型^[12]，除对照组外，各组小鼠按 0.1 ml/10 g 剂量灌胃玉米油配置的 BPA 溶液，每日 1 次，连续 5 天，共干预 4 周，对照组以同等条件进行玉米油灌胃。HE 染色中小鼠卵巢组织具有囊性扩张、闭锁卵泡为模型制备成功的标准^[13]。

4. 干预方法

电针关元组根据《实验针灸学》选取关元穴，电针敏化组根据前期研究^[12]，选取小鼠腹部脐下约 8 mm，前正中线旁开约 3 mm 两侧敏化点。用韩氏电针仪给予电针刺激，强度 2.0 mA，频率 2 Hz。每次 20 min，每日 1 次，连续 5 天，共治疗 4 周。对照组、模型组以同等条件进行抓取固定。

5. 观察指标及检测方法

（1）电子 von Frey 测定小鼠体表关元穴及腹部敏化点机械痛阈值：电针结束后第 3 天，用探针缓慢刺激小鼠腹部针刺敏化点选取部位及关元穴，当小鼠出现甩尾、肢体抖动等躲避行为时，显示屏数值即为痛阈值，间隔 3 min 重复测量 3 次，取平均值。

（2）HE 染色法观察小鼠卵巢病理形态：每组取 4 只小鼠卵巢组织，多聚甲醛固定后蔗糖梯度脱水，OCT 冷冻包埋，冰冻切片机切片（厚度 16 μ m），HE 染色、中性树胶封片，显微镜下观察小鼠的卵

巢组织形态。

（3）Western blot 法检测小鼠脊髓及 DRG 组织中 TRPV1、CGRP 蛋白表达：每组取 4 只小鼠胸椎 (T)₁₃-腰椎 (L)₂ 节段脊髓及 DRG 组织，RIPA 裂解液中静置 20 min，超声破碎 3 次×6 s，4℃离心提取总蛋白，BCA 法检测蛋白浓度，将样品定量至 5 μ g/ml。用 5% 浓缩胶、15% 分离胶进行 SDS-PAGE 电泳，电泳结束后将蛋白转至 PVDF 膜后室温封闭 2 h，TRPV1 抗体 (1:2000)、CGRP 抗体 (1:1000)，4℃孵育过夜，HRP 二抗 (1:10 000) 室温孵育 2 h，TBST 洗膜 10 min×3 次，滴加 ECL 发光液，化学发光成像仪上检测。Image Pro-Plus 6.0 分析各条带的灰度值，TRPV1、CGRP 灰度值与 β -actin 的比值作为 TRPV1、CGRP 相对表达量，每组数据以对照组作归一化处理。

（4）免疫荧光染色法检测小鼠脊髓及 DRG 组织中 TRPV1/CGRP 阳性共表达：每组取 4 只小鼠 T₁₃-L₂ 节段脊髓及 DRG 组织，多聚甲醛固定后蔗糖梯度脱水，OCT 冷冻包埋，冰冻切片机切片 (16 μ m)。用含 3% TritonX 100 的驴血清封闭 2 h，TRPV1 (1:500)、CGRP 抗体 (1:500) 一抗 4℃孵育过夜，荧光二抗 (Alexa Fluor 488 驴抗小鼠，1:400；Alexa Fluor 647 驴抗兔，1:400) 避光孵育 2 h，DAPI 染核 5 min，PBS 洗 10 min×3 次后封片，荧光显微镜阅片，Image Pro-Plus 6.0 统计共表达 TRPV1/CGRP 细胞个数。

6. 统计学分析

SPSS 25.0 进行数据统计，计量资料采用均数 ± 标准误 ($\bar{x} \pm SEM$) 表示。多组间比较选用单因素方差分析，方差齐时，两两比较选用 LSD 检验，方差不齐时，采用 Tamhane's T2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 各组小鼠卵巢组织形态学比较

对照组小鼠卵巢组织具有不同阶段发育良好的卵泡；模型组小鼠卵泡内颗粒细胞层减少，囊性扩张、闭锁卵泡增加；电针关元组及电针敏化组小鼠对比模型组小鼠卵巢颗粒细胞层数增多，卵泡及黄体发育良好（见图 1）。

2. 各组小鼠机械痛阈值比较

与对照组比较，模型组关元穴、敏化点痛阈值显著下降 ($P < 0.01$)；与模型组比较，电针关元组关元穴及敏化点痛阈值显著升高 ($P < 0.05$)、电针敏化

组关元穴及敏化点痛阈值显著升高 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)；电针关元组和电针敏化组比较差异无统计学意义 (见图 2)。

3. 各组小鼠 T_{13} - L_2 节段脊髓、DRG 组织中 TRPV1 及 CGRP 蛋白表达比较

与对照组比较, 模型组脊髓组织中 TRPV1 及 CGRP 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)、DRG 组织中 TRPV1 及 CGRP 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)；与模型组相比, 电针关元组和电针敏化组脊髓、DRG 组织中 TRPV1 及 CGRP 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)；电针关元组与电针敏化组比较差异无统计学意义 (见图 3、4)。

4. 各组小鼠 T_{13} - L_2 节段脊髓、DRG 组织中 TRPV1/CGRP 阳性共表达比较

与对照组比较, 模型组脊髓、DRG 组织中

TRPV1/CGRP 阳性共表达显著升高 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$)；与模型组比较, 电针关元组及电针敏化组脊髓、DRG 组织中 TRPV1/CGRP 阳性共表达显著降低 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$)；电针关元组和电针敏化组比较差异无统计学意义 (见图 5、6)。

讨 论

PCOS 是一种常见的女性生殖系统疾病, 占排卵障碍病人的 70%~80%, 在不孕症的病因学中起重要作用^[14]。无排卵、多囊样卵巢是 PCOS 的典型特征, PCOS 小鼠多表现为囊性卵泡数量显著增加、黄体减少^[15]。本研究通过对小鼠卵巢组织进行 HE 染色, 发现模型组小鼠卵巢组织囊性扩张、闭锁卵泡明显增加, 电针关元组及电针敏化组小鼠卵巢组

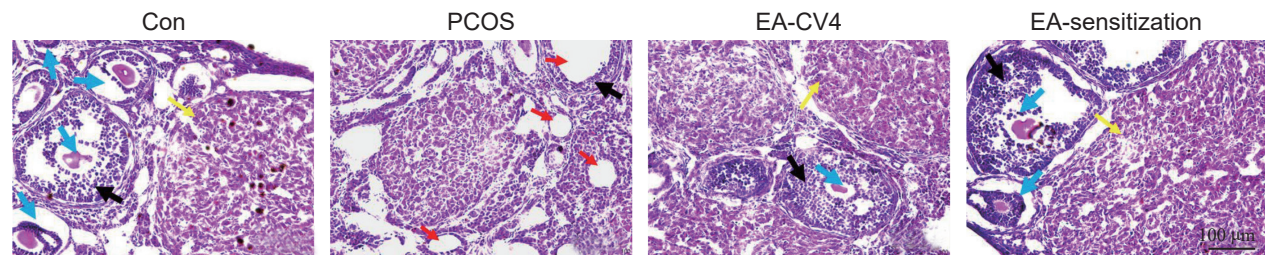


图 1 小鼠卵巢组织形态比较

小鼠卵巢组织 HE 染色图, 蓝色箭头所示为正常卵泡, 黄色箭头所示为黄体, 红色箭头所示为闭锁卵泡, 黑色箭头所示为颗粒细胞层, 标尺 = 100 μ m

Fig. 1 Comparison of histological morphology of mouse ovarian tissue

HE staining of mouse ovarian tissue, blue arrows indicate normal follicles, yellow arrows indicate corpus luteum, red arrows indicate atresia follicles, and black arrows indicate the granulosa cell layer. Scale bar = 100 μ m

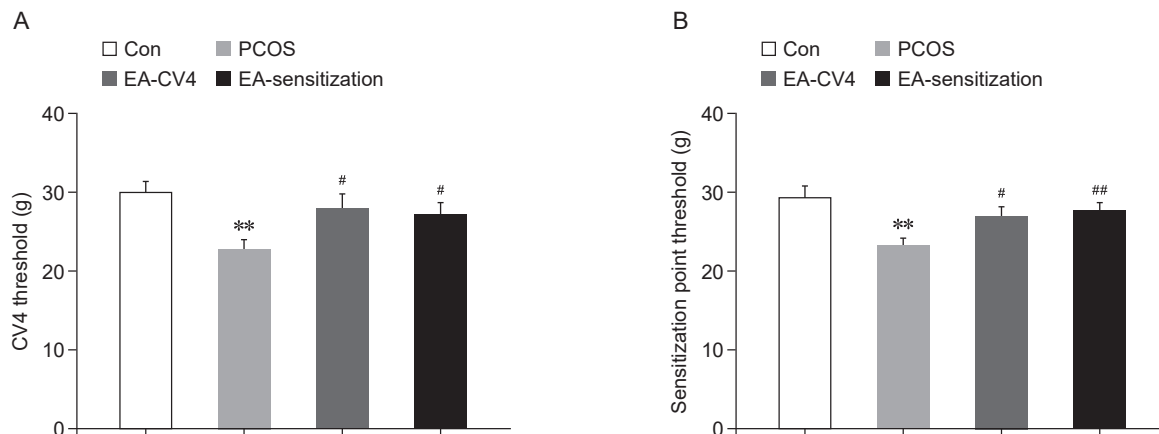


图 2 小鼠机械痛阈值比较 ($n = 8$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) 各组小鼠关元穴痛阈值比较; (B) 各组小鼠敏化点痛阈值比较
** $P < 0.01$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与模型组相比

Fig. 2 Comparison of mechanical pain threshold in mice ($n = 8$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) Comparison of pain threshold at CV4 acupoint in each group; (B) Comparison of pain threshold at sensitization point in each group.

** $P < 0.01$, compared with group control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with group model.

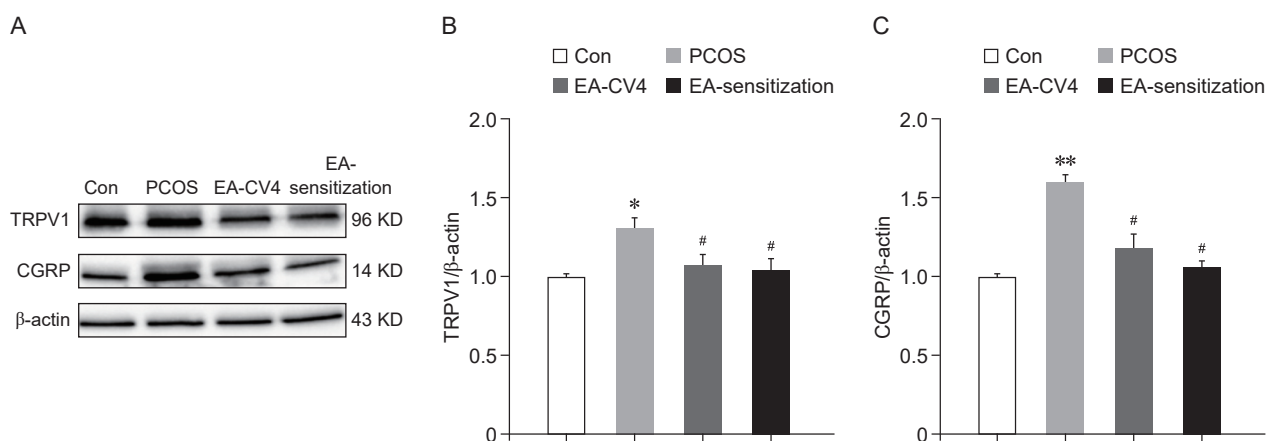


图 3 小鼠脊髓组织中 TRPV1 及 CGRP 蛋白表达比较 ($n = 4$, $\bar{x} \pm SEM$)
(A) TRPV1、CGRP 和 β -actin Western blot 条带例图; (B) 各组小鼠脊髓组织中 TRPV1 蛋白表达比较; (C) 各组小鼠脊髓组织中 CGRP 蛋白表达比较

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与模型组相比

Fig. 3 Comparison of TRPV1 and CGRP protein expression in mice spinal cord tissue ($n = 4$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) Representative bands of TRPV1, CGRP and β -actin in Western blot; (B) Comparison of TRPV1 protein expression in spinal cord tissue of mice in each group; (C) Comparison of CGRP protein expression in spinal cord tissue of mice in each group.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with group control; # $P < 0.05$, compared with group model.

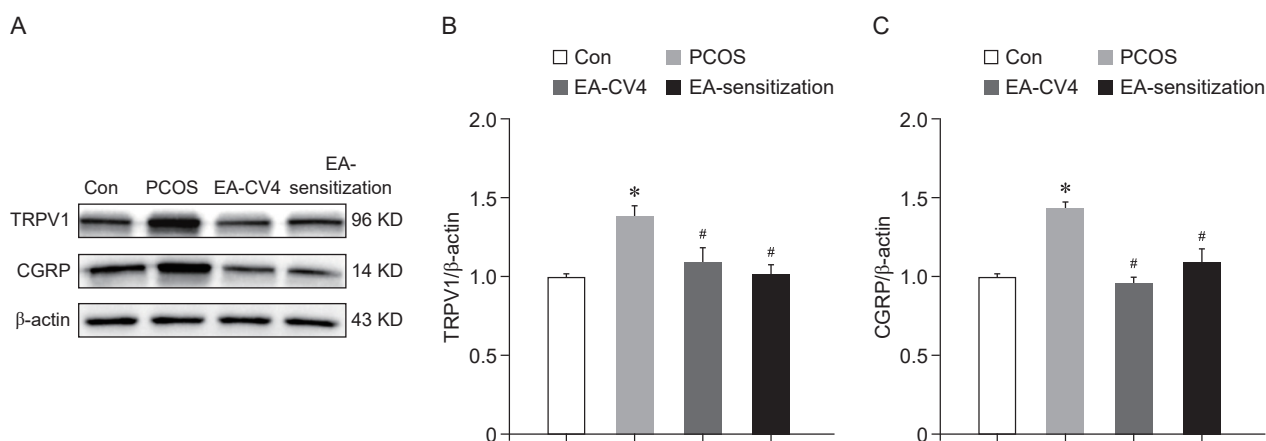


图 4 小鼠 DRG 组织中 TRPV1 及 CGRP 蛋白表达比较 ($n = 4$, $\bar{x} \pm SEM$)
(A) TRPV1、CGRP 和 β -actin Western blot 条带例图; (B) 各组小鼠 DRG 组织中 TRPV1 蛋白表达比较; (C) 各组小鼠 DRG 组织中 CGRP 蛋白表达比较

* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与模型组相比

Fig. 4 Comparison of TRPV1 and CGRP protein expression in mice DRG tissue ($n = 4$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) Representative bands of TRPV1, CGRP and β -actin in Western blot; (B) Comparison of TRPV1 protein expression in DRG tissues of mice in each group; (C) Comparison of CGRP protein expression in DRG tissues of mice in each group.

* $P < 0.05$, compared with group control; # $P < 0.05$, compared with group model.

织颗粒细胞层数增多, 卵泡及黄体发育良好。提示成功建立 PCOS 小鼠模型, 且电针能够改善 PCOS 小鼠卵巢组织病理形态。

中医认为, 腧穴既是针刺治疗疾病的刺激部位, 也是疾病的反应部位, 具有“按而痛止”“按之快然”的特点。《备急千金要方·灸例》记载: “有阿

是之法, 言人有病痛, 即令捏其上, 若理当其处, 不问孔穴……灸刺皆验”, 表明针刺痛敏点可以明显的缓解病痛。临床研究表明, 机体病理状态下, 与疾病相关的体表反射区存在痛觉敏化现象, 按压这些特殊区域具有疼痛、酸胀等感觉, 且压痛点多位于与脏腑相关的体表经络、穴位, 具有相对特

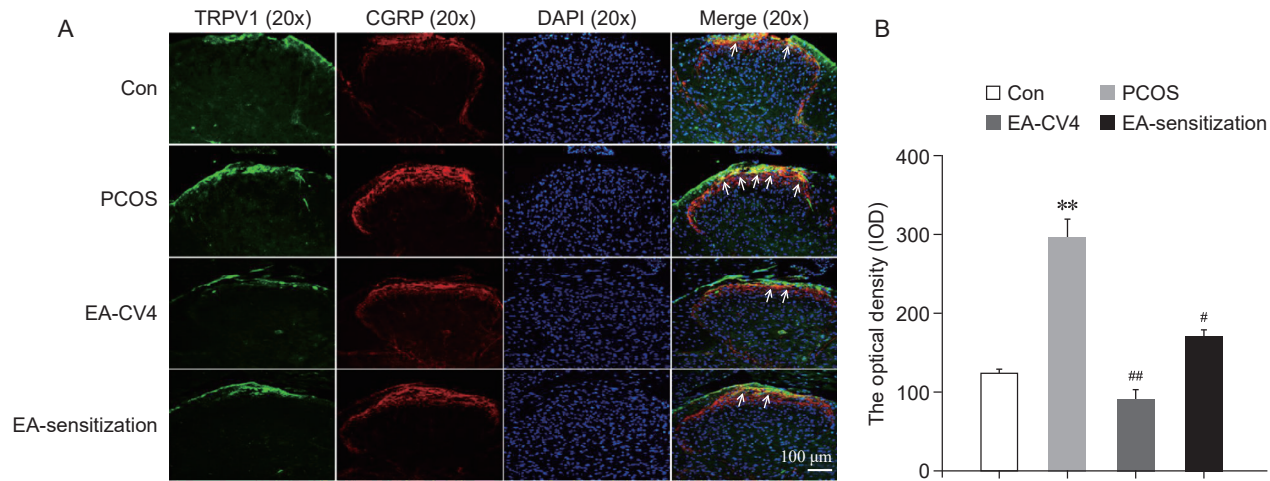


图 5 小鼠脊髓组织中 TRPV1/CGRP 共表达光密度比较 ($n = 4$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) 小鼠脊髓组织中 TRPV1 及 CGRP 阳性表达图 (免疫荧光染色法), 标尺 = 100 μm , 绿色标记 TRPV1, 红色标记 CGRP, 细胞核用蓝色标记, 白色箭头示为 TRPV1/CGRP 阳性共表达; (B) 各组小鼠 TRPV1/CGRP 共表达光密度比较

** $P < 0.01$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与模型组相比

Fig. 5 Comparison of the optical density of TRPV1/CGRP co-expression in mice spinal cord tissue ($n = 4$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) Positive expression of TRPV1 and CGRP in mice spinal cord tissue (immunofluorescence staining method), Scale bar = 100 μm , TRPV1 is marked in green, and CGRP is denoted in red, the nuclei are marked with blue, and white arrows indicate the positive co-expression of TRPV1/CGRP; (B) Optical density comparison of TRPV1/CGRP co-expression in each group of mice.

** $P < 0.01$, compared with group control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with group model.

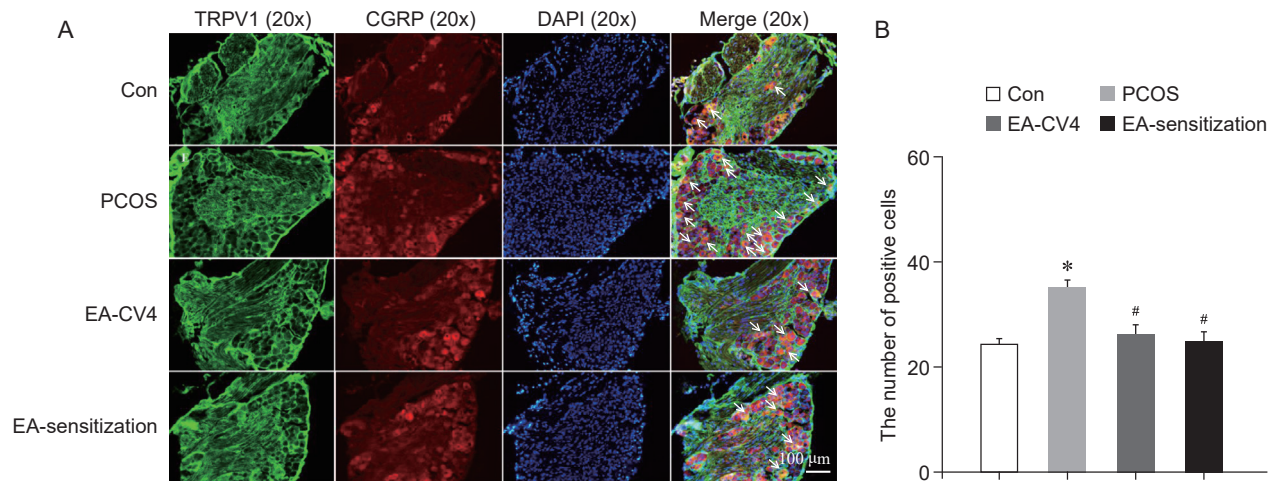


图 6 小鼠 DRG 组织中 TRPV1/CGRP 共表达细胞个数比较 ($n = 4$, $\bar{x} \pm SEM$)

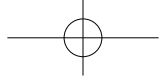
(A) 小鼠 DRG 组织中 TRPV1 及 CGRP 阳性表达图 (免疫荧光染色法), 标尺 = 100 μm , 绿色标记 TRPV1, 红色标记 CGRP, 细胞核用蓝色标记, 白色箭头示为 TRPV1/CGRP 共表达细胞; (B) 各组小鼠 TRPV1/CGRP 共表达细胞数量比较

* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与模型组相比

Fig. 6 Comparison of the number of cells co-expressing TRPV1/CGRP in mice DRG tissues ($n = 4$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) Positive expression of TRPV1 and CGRP in mice DRG tissue (immunofluorescence staining method), Scale bar = 100 μm , TRPV1 is marked in green, CGRP is marked in red, nuclei are marked in blue, and white arrows indicate cells that co-express TRPV1/CGRP; (B) Comparison of the number of co-expressing TRPV1/CGRP cells in each group of mice.

* $P < 0.05$, compared with group control; # $P < 0.05$, compared with group model.



定联系^[16,17]。在动物实验中同样可以观察到内脏疾病引发的痛觉敏化现象^[18]。吴强等^[19]采用触诊法对 143 名卵巢相关疾病病人体表进行按压探查压痛点,发现压痛区域主要分布在下腹部、腰骶、下肢内侧等,与经穴、经脉存在高度相关性。以上研究表明,体表压痛是穴位敏化的主要表现形式之一,疾病状态下腧穴痛阈降低。我们的前期研究^[12]发现 PCOS 小鼠尾静脉注射 EB 后,双下肢内侧、下腹部、腰骶部体表可见蓝色的 EB 渗出点,电针 EB 点重合最多处与同一脊髓节段体表区域的关元穴具有相似效应。为进一步验证穴位敏化现象,本研究对 PCOS 小鼠关元穴及敏化点进行痛阈测定,发现机械痛阈值显著低于对照组,PCOS 小鼠关元穴及敏化点具有痛觉敏化。电针能够显著提高其机械痛阈值,进一步验证了穴位的开/合功能是“活的”,并伴随内脏病理生理变化而动态改变。

机体病变时,相应体表多出现神经源性炎症病理改变,特殊部位从“静息态”到“激活态”动态转变,TRPV1、CGRP 等受体在敏化点的高表达可能是体表敏化的物质基础^[20]。TRPV1、CGRP 在神经性疼痛中起关键作用,不仅参与痛觉过敏,还可调控疼痛^[21]。TRPV1 在机体遭受有害刺激后激活,同时释放 CGRP、P 物质等伤害性神经肽,引发神经源性炎症导致外周敏化^[22]。CGRP 是对伤害性传递至关重要的一种神经肽,与神经源性炎症的发展密切相关^[23]。TRPV1 介导的 CGRP 释放可加强 TRPV1 在疼痛感觉中的作用,TRPV1 和 CGRP 之间存在相互作用关系^[24]。研究表明 PCOS 能显著增加血浆 CGRP 及卵巢中 CGRP 阳性神经纤维的表达^[25],CGRP 的过量释放可通过感觉神经末梢引起穴位致敏,针灸能够减少 CGRP、肿瘤坏死因子 α 、白介素 6 的释放进而降低 TRPV1 敏感性及其表达水平^[26],通过调节 TRPV1 离子通道降低 PCOS 病人中性粒细胞的氧化应激和 Ca^{2+} 浓度,从而改善 PCOS 病人炎症症状^[27]。以上研究提示 CGRP、TRPV1 参与了 PCOS 的病理生理过程。PCOS 小鼠 EB 点主要集中于 $\text{T}_{13}\text{-L}_2$ 脊髓节段支配的体表区域,具有神经源性炎症反应^[12]。内脏伤害性信息经 DRG 传入脊髓背角,经背根反射传至外周引发 EB 渗出,TRPV1、CGRP 阳性细胞在敏化穴区高度表达^[28]。神经源性炎症反应中最易产生敏化现象,脊髓背角的伤害感受神经元随着机体病理变化而动态改变,外周伤害性刺激的传入可引发可塑性变化^[29]。在炎症疼痛大鼠模型中,DRG 组织中 CGRP 阳性神经元与 TRPV1 部分重叠,TRPV1 激活参与 CGRP

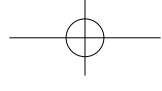
表达的上调^[30]。在本研究中,与对照组比较,模型组 $\text{T}_{13}\text{-L}_2$ 节段脊髓、DRG 组织中 TRPV1、CGRP 表达水平及 TRPV1/CGRP 共表达光密度均显著升高,表明 TRPV1 通道激活、CGRP 释放增加,引起体表机械痛阈降低,穴位敏化反应。电针可显著降低脊髓、DRG 组织中 TRPV1、CGRP 表达水平及 TRPV1/CGRP 阳性共表达,表明 TRPV1、CGRP 参与 PCOS 小鼠的穴位敏化部分机制,关元穴及敏化点压痛敏化可能与 $\text{T}_{13}\text{-L}_2$ 节段脊髓、DRG 中 TRPV1、CGRP 表达显著升高有关;随着电针改善 PCOS 小鼠卵巢组织病理形态,关元穴及敏化点痛阈值显著升高, $\text{T}_{13}\text{-L}_2$ 节段脊髓、DRG 组织中 TRPV1、CGRP 表达显著下降,进一步说明穴位敏化和内脏功能有关,电针可通过下调脊髓、DRG 组织中 TRPV1、CGRP 的异常高表达,调节 PCOS 小鼠体表敏化现象。电针 EB 点重合最多处与同一脊髓节段体表区域的关元穴具有相似效应,穴位不是一个简单的反应点,而是一块动态功能区域。

综上所述,电针敏化点与关元可改善 PCOS 小鼠卵巢组织病理形态,降低 PCOS 小鼠 $\text{T}_{13}\text{-L}_2$ 节段脊髓、DRG 组织中 TRPV1、CGRP 的异常高表达,进而提高关元穴及敏化点的机械痛阈值,调节穴位痛觉敏化反应,说明 TRPV1、CGRP 参与 PCOS 小鼠模型的穴位敏化部分机制。

利益冲突声明:作者声明本文无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Chen H, Zhang Y, Li S, *et al.* The association between genetically predicted systemic inflammatory regulators and polycystic ovary syndrome: a mendelian randomization study[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12:731569.
- [2] Rondanelli M, Riva A, Petrangolini G, *et al.* Berberine phospholipid is an effective insulin sensitizer and improves metabolic and hormonal disorders in women with polycystic ovary syndrome: a one-group pretest-post-test explanatory study[J]. *Nutrients*, 2021, 13(10): 3665.
- [3] Tan HJ, Tumilty S, Chapple C, *et al.* Understanding acupoint sensitization: a narrative review on phenomena, potential mechanism, and clinical application[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019:6064358.
- [4] Liao H, Lin Y. Electroacupuncture reduces cold stress-induced pain through microglial inactivation and transient receptor potential V1 in mice[J]. *Chinese Medicine*, 2021, 16(1):43.
- [5] Kim YJ, Granstein RD. Roles of calcitonin gene-



- related peptide in the skin, and other physiological and pathophysiological functions[J]. *Brain Behav Immun Health*, 2021, 18:100361.
- [6] Priestley JV, Michael GJ, Averill S, *et al*. Regulation of nociceptive neurons by nerve growth factor and glial cell line derived neurotrophic factor[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2002, 80(5):495-505.
- [7] Quartu M, Carozzi VA, Dorsey SG, *et al*. Bortezomib treatment produces nocifensive behavior and changes in the expression of TRPV1, CGRP, and substance P in the rat DRG, spinal cord, and sciatic nerve[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014:180428.
- [8] Kim D, Ryu Y, Hahm DH, *et al*. Acupuncture points can be identified as cutaneous neurogenic inflammatory spots[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):15214.
- [9] Sun M, Tao S, Geng G, *et al*. Identification of the optimal points for the acupuncture treatment of neck pain in China: protocol for a multicenter, matched, case-control study[J]. *BMJ Open*, 2019, 9(8):e29194.
- [10] 高星扬, 王懿春. 鞘内单次注射吗啡对神经病理痛大鼠脊髓背角 CGRP 表达的影响 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2009, 15(3):166-170.
- [11] 吴茗慧, 甄思佳, 徐婷, 等. 背根神经节 P2X3R 和 TRPV1 介导 CFA 致炎性痛大鼠不同时期痛行为 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2022, 28(5):331-339.
- [12] 徐晨曦, 袁伟, 陈欣怡, 等. 电针敏化点对双酚 A 暴露所致多卵巢综合征小鼠情绪及雌激素受体 α 的影响 [J]. *针刺研究*, 2022, 47(5):377-385.
- [13] Li S, Song Z, Song M, *et al*. Impaired receptivity and decidualization in DHEA-induced PCOS mice[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:38134.
- [14] Wang L, Fan H, Zou Y, *et al*. Aberrant expression of long non-coding RNAs in exosomes in follicle fluid from PCOS patients[J]. *Front Genet*, 2021, 11:608178.
- [15] Yu Y, Cao Y, Huang W, *et al*. β -sitosterol ameliorates endometrium receptivity in PCOS-like mice: the mediation of gut microbiota[J]. *Front Nutr*, 2021, 8:667130.
- [16] Jia P, Liu J, Li L, *et al*. Acupuncture for knee osteoarthritis with sensitized acupoints: results from a pilot, feasibility randomized controlled trial[J]. *Pilot Feasibility Stud*, 2020, 6(1):144.
- [17] Sun M, Tao S, Geng G, *et al*. Identification of the optimal points for the acupuncture treatment of neck pain in China: protocol for a multicenter, matched, case-control study[J]. *BMJ Open*, 2019, 9(8):e29194.
- [18] 朱小香, 许金森, 萨喆燕, 等. 基于致痛物质探讨胃溃疡大鼠督脉背段穴位敏化的物质基础 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(6):3613-3616.
- [19] 吴强, 章薇, 施静, 等. 妇科相关疾病牵涉痛与穴位敏化的关系 [J]. *中医杂志*, 2019, 60(23):2001-2005.
- [20] 朱兵. 穴位敏化现象及其生物学意义 [J]. *中国针灸*, 2019, 39(2):115-121.
- [21] Yang J, Hsieh C, Lin Y. Role of transient receptor potential vanilloid 1 in electroacupuncture analgesia on chronic inflammatory pain in mice[J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017:5068347.
- [22] Dou B, Li Y, Ma J, *et al*. Role of neuroimmune cross-talk in mediating the anti-inflammatory and analgesic effects of acupuncture on inflammatory pain[J]. *Front Neurosci*, 2021, 15:695670.
- [23] Fan Y, Kim D, Ryu Y, *et al*. Neuropeptides SP and CGRP underlie the electrical properties of acupoints[J]. *Front Neurosci*, 2018, 12:907.
- [24] Jiang Y, Yin X, Shen Y, *et al*. Low frequency electroacupuncture alleviated spinal nerve ligation induced mechanical allodynia by inhibiting TRPV1 upregulation in ipsilateral undamaged dorsal root ganglia in rats[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013:170910.
- [25] Zhang Z, Gong F, Lu G. Plasma level of calcitonin gene-related peptide in patients with polycystic ovary syndrome and its relationship to hormonal and metabolic parameters[J]. *Peptides*, 2012, 34(2):343-348.
- [26] McDonald JL, Cripps AW, Smith PK, *et al*. The anti-inflammatory effects of acupuncture and their relevance to allergic rhinitis: a narrative review and proposed Model[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013:591796.
- [27] Kose SA, Naziroglu M. Selenium reduces oxidative stress and calcium entry through TRPV1 channels in the neutrophils of patients with polycystic ovary syndrome[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2014, 158(2):136-142.
- [28] 朱兵. 系统针灸学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015.
- [29] 朱兵. 穴位可塑性: 穴位本态的重要特征 [J]. *中国针灸*, 2015, 35(11):1203-1208.
- [30] Nakanishi M, Hata K, Tomotaka N, *et al*. Acid activation of TRPV1 leads to an up-regulation of calcitonin gene-related peptide expression in dorsal root ganglion neurons via the camk-creb cascade: a potential mechanism of inflammatory pain[J]. *Mol Biol Cell*, 2010, 21(15):2568-2577.