

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.03.012

电针“风池”“外关”“阳陵泉”对慢性偏头痛模型大鼠痛觉敏化和三叉神经节PKC/TRPV1通路的影响

曾翼翔, 涂润泽, 赵书聪, 杨阳, 文皓佳, 贺卓众, 周胜利, 谭磊, 何可, 付磊✉

湖南中医药大学第二附属医院, 湖南省长沙市开福区蔡锷北路233号, 410005

[摘要] **目的** 从痛觉敏化角度探讨电针风池、外关、阳陵泉治疗慢性偏头痛的可能作用机制。**方法** 将40只SPF级SD大鼠随机分为空白组、模型组、电针组、电针+激动剂组、抑制剂组, 每组8只。除空白组外, 其余各组大鼠采用腹腔注射硝酸甘油建立慢性偏头痛大鼠模型。大鼠造模成功后, 电针组予电针双侧“风池”“外关”“阳陵泉”, 每次30 min; 电针+激动剂组在电针组的基础上经眶下孔注射蛋白激酶C (PKC) 激动剂 Phorbol 12-myristate 13-acetate Abcam (1.0 ng/ μ l) 25 μ l; 抑制剂组经眶下孔注射PKC抑制剂 Chelerythrine Chloride (1.0 ng/ μ l) 10 μ l; 空白组、模型组、抑制剂组均予捆绑束缚30 min, 不做其他干预。各组均连续干预5天。干预结束后对大鼠进行眶周、后足机械痛阈值及后足热痛阈值测定; 分别运用Western Blot法、实时荧光定量PCR法、免疫荧光法检测三叉神经节组织中瞬时受体电位香草酸亚型1 (TRPV1)、磷酸化瞬时受体电位香草酸亚型1 (p-TRPV1)、PKC蛋白水平, *Trpv1*、*Pkc* mRNA表达以及TRPV1、PKC平均荧光强度。**结果** 与空白组比较, 模型组大鼠眶周、后足机械痛阈值及后足热痛阈值均降低, 三叉神经节组织中TRPV1、PKC、p-TRPV1蛋白水平, *Trpv1*、*Pkc* mRNA表达以及TRPV1、PKC平均荧光强度均升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 电针组大鼠眶周、后足机械痛阈值及后足热痛阈值均升高, 三叉神经节组织中TRPV1、PKC、p-TRPV1蛋白水平, *Trpv1*、*Pkc* mRNA表达以及TRPV1平均荧光强度均降低; 电针+激动剂组大鼠三叉神经节组织中TRPV1平均荧光强度降低; 抑制剂组大鼠眶周机械痛阈值和后足热痛阈值升高, 三叉神经节组织中TRPV1、PKC、p-TRPV1蛋白水平以及TRPV1、PKC平均荧光强度均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与电针组比较, 电针+激动剂组大鼠三叉神经节组织中TRPV1、PKC、p-TRPV1蛋白水平以及*Trpv1* mRNA表达均升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 电针“风池”“外关”“阳陵泉”可提高慢性偏头痛大鼠机械痛阈值及热痛阈值, 减弱痛觉敏化, 其机制可能与抑制PKC/TRPV1通路有关。

[关键词] 慢性偏头痛; 痛觉敏化; 电针; 瞬时受体电位香草酸亚型1; 蛋白激酶C; 风池; 外关; 阳陵泉

慢性偏头痛 (chronic migraine, CM) 是指频繁发作 (>15 次/月), 持续3个月以上的偏头痛^[1]。据统计, CM影响全球1.7%~4.0%的人口, 且每年约有2.5%的发作性偏头痛进展为CM, 严重降低了患者的生活质量^[2]。电针作为CM非药物治疗方法之一, 具有安全性高、疗效显著等治疗优势^[3]。

偏头痛属于少阳经头痛, 风池、阳陵泉、外关作为少阳经特定穴, 针刺三者治疗偏头痛临床疗效肯定^[4], 且能减少CM患者神经源性炎症^[5]。

在神经病理性疼痛疾病的发展过程中, 患者会形成痛觉敏化状态, 包括中枢敏化和外周敏化^[6]。CM患者中枢敏化常表现为恶心、呕吐、认知功能下降等, 外周敏化常表现为扳机点、声音、光线、嗅觉超敏等与三叉神经相关的局部症状^[1]。伤害性感受器可塑性变化是痛觉敏化形成的关键因素之一^[7]。瞬时受体电位香草酸亚型1 (TRPV1) 作为一种伤害性感受器, 高表达于三叉神经节、背根神经节、迷走神经节等中小型神经元中, 其在慢性疼

基金项目: 湖南省医学学科青年骨干人才项目(20240304123); 湖南省自然科学基金区域联合基金(2023JJ60337); 湖南省卫生健康委员会科研重点指导项目(C202303079147); 长沙市科学技术局一般项目(kq2208198); 长沙市科学技术局指导性科技计划项目(kzd22053); 湖南中医药大学研究生创新项目(2023CX54, 2024CX059, 2024CX060, 2024CX064)

✉ 通讯作者: fulei@126.com

痛患者的神经组织中有不同程度的改变,可介导疼痛发生^[8]。研究^[9]证明,CM患者头皮血管动脉壁神经纤维中的TRPV1表达更高,而蛋白激酶C(PKC)的活化能引起TRPV1受体的磷酸化,调节TRPV1敏感性,降低其对机械和热刺激的反应阈值,从而参与炎症和痛觉敏化的形成^[10]。本研究通过建立CM大鼠模型,从痛觉敏化及外周PKC-TRPV1通路角度探讨电针风池、外关、阳陵泉治疗CM的可能作用机制,为其临床应用提供实验依据。本研究已通过湖南中医药大学实验动物伦理委员会审批,批件号:LL2023053110。

1 材料与方法

1.1 动物

选取SPF级SD大鼠40只,体质量200~250 g,雌雄各半,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(湘)2019-0004。于湖南中医药大学动物实验中心饲养,温度20~25℃,湿度50%~70%,12 h光/暗循环控制,自由进食和饮水,雌雄分笼。

1.2 主要试剂和仪器

硝酸甘油注射液(1 ml:5 mg,货号:H11020289),北京益民药业有限公司;PBS缓冲液(货号:HY-K3005)、二甲基亚砜(货号:HY-Y0320)、多聚甲醛(货号:HY-Y0333)、DAPI染液(货号:HY-D0814)、抗荧光淬灭封片剂(货号:HY-K1042)、PKC激动剂Phorbol 12-myristate 13-acetate Abcam(PMA,货号:HY-13956)、PKC抑制剂Chelerythrine Chloride(CC,货号:HY-12048),MedChemExpress公司;戊巴比妥钠(货号:H31020240),上海上药新亚药业有限公司;TRPV1抗体(货号:DF10320)、磷酸化瞬时受体电位香草酸亚型1(p-TRPV1)抗体(货号:AF8520)、PKC抗体(货号:AF6197),Affinity Biosciences公司;GAPDH单克隆抗体(货号:YM3029)、HRP羊抗兔(货号:RS0002)、HRP羊抗鼠(货号:RS0001)、即用型鼠兔通用二抗(货号:RS0011)、远红外荧光二抗(货号:RS23910),美国Immunoway公司;Trizol溶液(货号:15596026),美国Ambion公司;快速qPCR试剂盒(货号:KM4101),KAPA Biosystems公司;反转录引物Oligo(dT)18 Primer(货号:3806)、反转录酶(货号:2690A)、重组型RNA酶抑制剂(货号:2313A),TAKARA公司;脱氧核苷三磷酸底物(货号:PC2200)、裂解液(货号:

R0010),Solarbio公司;超敏ECL化学发光试剂盒(货号:P10200),苏州新赛美生物科技有限公司。

华佗牌一次性针灸针(0.18 mm×13 mm)、电子针疗仪(型号:SDZ-II),苏州医疗用品有限公司;纤毛机械刺激针(型号:Von Frey),深圳瑞沃德生命科技有限公司;足底测痛仪(型号:UGO),Ugo Basile公司;PCR仪(型号:GE48527),杭州柏恒科技有限公司;超微量分光光度计(型号:Nano-300),杭州奥盛仪器有限公司;荧光成像(型号:Odyssey),美国LICOR公司;酶标仪(型号:SpectraMax M5E),美国Molecular Devices公司;石蜡病理切片机(型号:RM2016),上海徕卡仪器有限公司;组织摊片机(型号:KD-P),浙江省金华市科迪仪器设备有限公司;正置荧光显微镜、成像系统(型号:NIKON DS-U3),日本尼康公司。

1.3 动物分组及造模方法

大鼠适应性喂养1周后,按随机数字表法分为空白组、模型组、电针组、电针+激动剂组、抑制剂组,每组8只。除空白组外,其余各组大鼠予腹腔注射10 mg/kg硝酸甘油注射液隔日1次,共注射5次,建立CM大鼠模型^[11]。造模结束后大鼠热、痛阈值较空白组大鼠显著降低,差异有统计学意义,说明引起急性痛觉过敏,证明造模成功^[12]。

1.4 干预方法

所有大鼠均造模成功,电针+激动剂组大鼠经眶下孔注射PKC激动剂PMA(1.0 ng/μl)25 μl,抑制剂组大鼠经眶下孔注射PKC抑制剂CC(1.0 ng/μl)10 μl。经眶下孔注射给药方法^[13]:腹腔注射1%戊巴比妥钠40 mg/kg麻醉大鼠,后用碘伏对大鼠双侧触须垫进行消毒,在面部体表仔细扪及大鼠颧骨及鼻骨交界处的凹陷(位于大鼠鼻翼旁约1 cm),以确定进针点;持微量注射器自进针点刺入后,探查并刺入眶下孔,注射药物。注射药物结束30 min后,电针组、电针+激动剂组大鼠捆绑束缚并予电针干预30 min。选取大鼠双侧“风池”“外关”“阳陵泉”,取穴定位参照《大鼠穴位图谱的研制》^[14]。将大鼠捆绑束缚在固定台上,采用0.18 mm×13 mm一次性华佗牌针灸针进行针刺干预,根据穴位特点进针3~6 mm,应用平补平泻的捻转手法,捻转角度约180°,频率约120次/min,持续捻转约1 min。行针结束后,选取同侧的“外关”和“阳陵泉”穴位连接华佗牌电子针疗仪的正负极进行电针治疗,波形选用疏密波(10 Hz/50 Hz),刺激强度以大鼠双上肢出现规律性抖动为判断标准,每次电针刺激时

长为 30 min。空白组、模型组、抑制剂组予相同方法捆绑束缚固定 30 min，不做其他干预。以上各组干预均每日 1 次，连续 5 日。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 机械痛阈值测定 最后一次干预 2 h 后，按照“up-down”法^[15]进行眶周机械痛阈值、后足机械痛阈值测定。1) 眶周机械痛阈值测定：使用 Von Frey 纤维丝按照“上上下下”的方法测量大鼠左侧眶周机械痛阈值。统一选取 2 g 的 Von Frey 纤维丝作为起始测量力度作用于大鼠左侧眶上部，若刺激过程中大鼠出现快速缩头、挠头或拨开纤维丝等反应时为阳性反应，记为“X”，否则为阴性反应记为“O”；若刺激过程中大鼠走动或者一刺激就挠头为可疑阳性反应，需等大鼠安静后再行测量。连续两次眶上部刺激后，变更为两次眶下部刺激，循环交替，相邻刺激间隔至少 7 s，采取阳性降阶、阴性升阶的测量方法，直到第一次出现“X”“O”交叉时，再测量 4 次，最后一次测量的 Von Frey 纤维丝克数的对数记为 Xf。根据公式^[15]计算痛阈值，即 50% 机械痛阈值 = $(10[Xf + k\delta]) / 10000$ ， $\delta = 0.224$ ，k 值来源于文献^[15]后附录。2) 后足机械痛阈值测定：根据大鼠体型分别放入自制铁丝网笼中（以允许头和前后爪自由活动为度）静置 30 min 后，统一选取 10 g 的 Von Frey 纤维丝作为起始测量力度作用于大鼠左侧掌跖部无毛处，使 Von Frey 纤维丝垂直刺激呈“S”型，作用时间 6~8 s；若刺激过程中大鼠抬足或舔舐被刺激侧则为阳性反应，记为“X”，否则为阴性反应记为“O”；若刺激过程中大鼠走动或者一刺激就抬足为可疑阳性反应，需等大鼠安静后再行测量。相邻刺激间隔至少 7 s，采取阳性降阶、阴性升阶的测量方法，直到第一次出现“X”“O”交叉时，再测量 4 次，最后一次测量的 Von Frey 纤维丝克数的对数则为 Xf，根据公式^[15]计算痛阈值。

1.5.2 后足热痛阈值测定 按照文献^[16]报道方法测定：将大鼠放在 UGO 足底测痛仪的透明分隔中 30 min 进行适应，待大鼠安静后开始后足热痛阈值测定。将测痛仪灯芯对准大鼠左后足足底中心部位，打开热源开关（热刺激强度 48%，保护时间为 20 s），当大鼠出现快速抬起被测后足、舔舐被测后足等行为时立即关闭热源开关，并记录大鼠后足的热痛反应时间。若大鼠出现走动、小幅度挪动等可疑阳性反应，则 5 min 后再次测量，每只大鼠重复测量 4 次，相邻测量间隔 5 min，4 次测量的平

均值即该大鼠的后足热痛阈值。

1.5.3 实时荧光定量 PCR 法检测大鼠三叉神经节组织中 *Trpv1*、*Pkc* mRNA 表达 机械痛阈值和热痛阈值测量结束后，腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉大鼠，脱颈处死，迅速断头，从枕骨大孔沿正中线剪开颅顶部骨面并掀起，暴露并剥离脑组织，用钝性分离和锐性分离法将三叉神经节分离后切断并用镊子取出，一部分于冻存管内 -80 °C 冻存备用，另一部分于 4% 多聚甲醛中固定后 4 °C 保存备用。

取冻存的大鼠三叉神经节组织，使用 Trizol 溶液提取总 RNA，通过分光光度计检测其浓度和纯度，选取 OD 值在 1.8~2.0 范围内的样本留用。随后，取 20 μ l 的反应混合物置于 42 °C 环境下孵育 60 min，再加热至 70 °C 孵育 15 min，将总 RNA 反转录为稳定的 cDNA。利用荧光定量 PCR 仪进行 PCR 反应。*Pkc* 引物：上游 GAAAGGCAGTTTTGG-GAAGG，下游 GGTGGAATGAAGTTGTGTGAG，长度 196 bp；*Trpv1* 引物：上游 CGAGTGCCGACACCTATC，下游 TTCAAGGGTTCCACGAGA，长度 177 bp；*Gapdh* 引物：上游 CAAGTTCAACGGCACAG，下游 CCAGTAGA-CTCCACGACAT，长度 138 bp。引物由 TAKARA 公司合成，反应条件为 56 °C、10 s，95 °C、5 s，72 °C、25 s，共 40 个循环。内参基因为 *Gapdh*，通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法分析基因相对表达量。

1.5.4 Western Blot 法检测三叉神经节组织中 TRPV1、p-TRPV1、PKC 蛋白水平 取冻存的大鼠三叉神经节组织，加入 200 μ l 裂解液裂解，使用高速冷冻离心机在 4 °C、12 000 r/min（离心半径 10 cm）离心 5 min，取上清液，存于 -20 °C 冰箱。利用 BCA 法测定蛋白浓度，将提取的蛋白与 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液混合（比例 4 : 1），沸水热浴 10 min 后冷却至室温。制备电泳胶进行电泳分离，使用 PVDF 膜进行转膜，条件为 200 mA、90 min。膜转后用含 1% BSA 的 TBST 缓冲液室温封闭 1 h，随后加入一抗（TRPV1、p-TRPV1、PKC 稀释比例均为 1 : 1000），再加入二抗（稀释比例为 1 : 10 000），使用 ECL 化学发光试剂发光，并通过 X 光胶片曝光显影。利用 Image J 1.54f 软件分析胶片灰度值，以 β -actin 作为内参对照，以目的蛋白与内参灰度值的比值表示目的蛋白水平。

1.5.5 免疫荧光法检测三叉神经节组织中 TRPV1、PKC 平均荧光强度 取固定于 4% 多聚甲醛中的三叉神经节组织，常规石蜡包埋，将各组样本石蜡切片（厚度 5 μ m）洗净，经高压抗原修复后，滴加

山羊血清封闭液，37℃培养箱孵育 30 min。然后滴加一抗（TRPV1、PKC 稀释比例均为 1：200），加盖置于 37℃培养箱孵育 60 min，PBS-T 溶液冲洗 3 次后，滴加免疫荧光二抗（山羊抗兔 IgG、山羊抗小鼠 IgG 稀释比例均为 1：400），加盖置于 37℃培养箱避光孵育 50 min，PBS-T 溶液冲洗 3 次后，用抗荧光淬灭封片剂封片。采用数字切片扫描仪扫描荧光切片，每张随机选取 3 个视野检测 TRPV1、PKC 平均荧光强度。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。计量资料均符合正态分布，以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较方差齐者采用 LSD 检验，方差不齐者采用 Tamhane T^e 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠机械痛阈值及热痛阈值比较

表 1 示，与空白组比较，模型组大鼠眶周机械痛阈值、后足机械痛阈值及后足热痛阈值均降低 ($P<0.01$)。与模型组比较，电针组上述各痛阈值均升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；抑制剂组眶周机械痛阈值、后足热痛阈值升高 ($P<0.05$)，但后足机械痛阈值差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 1 各组大鼠机械痛阈值及热痛阈值比较

Table 1 Comparison of mechanical pain threshold and thermal pain threshold among different groups of rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	眶周机械痛 阈值/g	后足机械痛 阈值/g	后足热痛阈 值/s
空白组	8	0.46±0.12	4.37±1.33	10.82±1.12
模型组	8	0.05±0.04 ^{a)}	0.90±0.42 ^{a)}	7.26±1.33 ^{a)}
电针组	8	0.35±0.14 ^{b)}	2.68±0.49 ^{b)}	8.92±1.67 ^{c)}
电针+激动剂组	8	0.17±0.09	1.45±0.40	7.94±1.78
抑制剂组	8	0.31±0.13 ^{c)}	1.33±0.41	8.76±1.28 ^{c)}

注：a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

2.2 各组大鼠三叉神经节组织中 *Trpv1*、*Pkc* mRNA 表达比较

表 2 示，与空白组比较，模型组大鼠三叉神经节组织中 *Trpv1*、*Pkc* mRNA 表达均升高 ($P<0.01$)。与模型组比较，电针组三叉神经节组织中 *Trpv1*、*Pkc* mRNA 表达均降低 ($P<0.01$)。与电针组比较，电针+激动剂组三叉神经节组织中 *Trpv1* mRNA 表达升高 ($P<0.05$)，但 *Pkc* mRNA 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 2 各组大鼠三叉神经节组织中 *Trpv1*、*Pkc* mRNA 表达比较

Table 2 Comparison of *Trpv1* and *Pkc* mRNA expression in the trigeminal ganglion tissue among different groups of rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	<i>Trpv1</i>	<i>Pkc</i>
空白组	8	1.01±0.16	1.01±0.16
模型组	8	6.67±0.93 ^{a)}	6.57±0.75 ^{a)}
电针组	8	3.45±0.12 ^{b)}	1.73±0.14 ^{b)}
电针+激动剂组	8	6.07±0.62 ^{c)}	5.10±0.26
抑制剂组	8	5.50±0.37	2.47±0.16

注：*Trpv1*，瞬时受体电位香草酸亚型 1；*Pkc*，蛋白激酶 C。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与电针组比较， $P<0.05$ 。

2.3 各组大鼠三叉神经节组织中 TRPV1、PKC、p-TRPV1 蛋白水平比较

表 3 示，与空白组比较，模型组大鼠三叉神经节组织中 TRPV1、PKC、p-TRPV1 蛋白水平均升高 ($P<0.01$)。与模型组比较，电针组和抑制剂组三叉神经节组织中 TRPV1、PKC、p-TRPV1 蛋白水平均降低 ($P<0.01$)。与电针组比较，电针+激动剂组三叉神经节组织中 TRPV1、PKC、p-TRPV1 蛋白水平均升高 ($P<0.01$)。各组大鼠三叉神经节组织中 TRPV1、PKC、p-TRPV1 蛋白电泳图见图 1。

表 3 各组大鼠三叉神经节组织中 TRPV1、PKC、p-TRPV1 蛋白水平比较

Table 3 Comparison of TRPV1, PKC, and p-TRPV1 protein levels in the trigeminal ganglion tissue among different groups of rats (β -actin, $\bar{x}\pm s$)

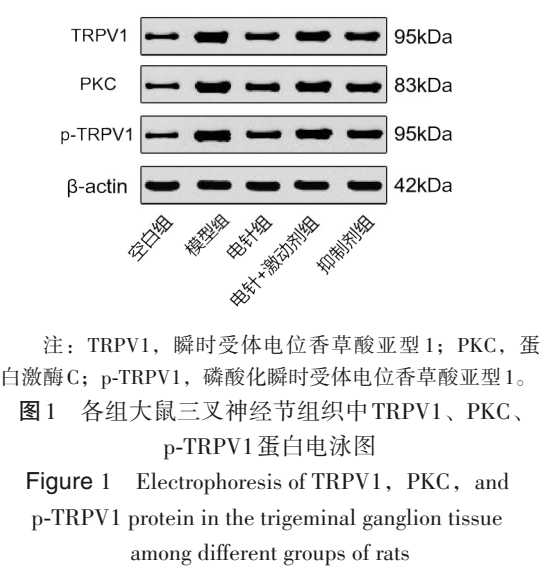
组别	鼠数	TRPV1	PKC	p-TRPV1
空白组	8	0.71±0.10	0.71±0.12	0.66±0.07
模型组	8	1.47±0.20 ^{a)}	1.57±0.21 ^{a)}	1.45±0.06 ^{a)}
电针组	8	0.99±0.10 ^{b)}	1.08±0.18 ^{b)}	0.97±0.08 ^{b)}
电针+激动剂组	8	1.40±0.17 ^{c)}	1.42±0.18 ^{c)}	1.35±0.06 ^{c)}
抑制剂组	8	1.17±0.14 ^{b)}	1.14±0.19 ^{b)}	1.12±0.06 ^{b)}

注：TRPV1，瞬时受体电位香草酸亚型 1；PKC，蛋白激酶 C；p-TRPV1，磷酸化瞬时受体电位香草酸亚型 1。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与电针组比较， $P<0.01$ 。

2.4 各组大鼠三叉神经节组织中 TRPV1、PKC 平均荧光强度比较

表 4 示，与空白组比较，模型组大鼠三叉神经节组织中 TRPV1 和 PKC 平均荧光强度均升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较，电针组、电针+激动剂组、抑制剂组三叉神经节组织中 TRPV1 平均荧光强度降低，抑制剂组 PKC 平均荧光强度降

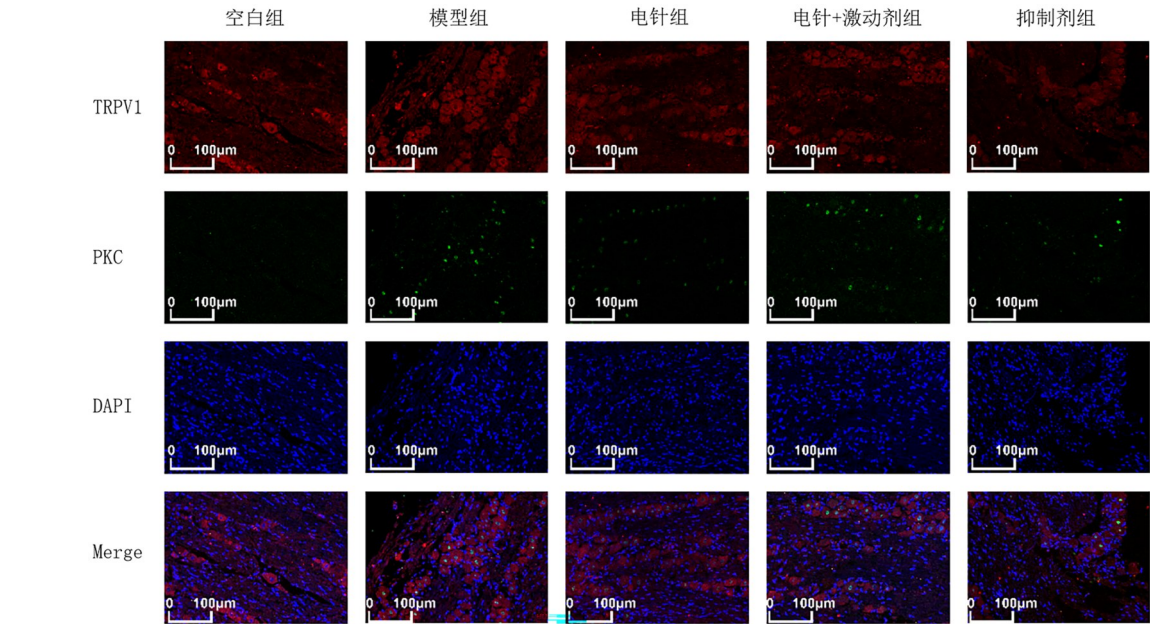


低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组大鼠三叉神经节组织中 TRPV1、PKC 免疫荧光图见图 2。

表 4 各组大鼠三叉神经节组织中 TRPV1、PKC 平均荧光强度比较

Table 4 Comparison of the average fluorescence intensity of TRPV1 and PKC in the trigeminal ganglion tissue among different groups of rats ($\bar{x}\pm s$)			
组别	鼠数	TRPV1	PKC
空白组	8	1.00±0.07	1.00±0.24
模型组	8	1.16±0.14 ^{a)}	1.44±0.29 ^{b)}
电针组	8	1.04±0.11 ^{c)}	1.19±0.42
电针+激动剂组	8	1.08±0.06 ^{d)}	1.32±0.21
抑制剂组	8	1.01±0.08 ^{c)}	1.10±0.13 ^{d)}

注：TRPV1，瞬时受体电位香草酸亚型 1；PKC，蛋白激酶 C。
a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与空白组比较， $P<0.05$ ；
c) 与模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与模型组比较， $P<0.05$ 。



3 讨论

从经络辨证的角度出发，侧头部属于少阳经循行范围，故针刺治疗偏头痛多选取少阳经腧穴以疏通少阳^[17]。既往研究表明，风池、阳陵泉、外关是治疗急性偏头痛的高频穴位^[18-19]。风池、阳陵泉属于足少阳胆经穴位，外关属于手少阳三焦经穴位，我们认为该三穴为“少阳经特定穴”，三穴共用有疏泄少阳、通络止痛之功，临床常以该三穴治疗急性或慢性偏头痛。有研究^[20-21]表明，电针少阳经特定穴可显著改善偏头痛模型大鼠的疼痛程

度。因此，本研究选取电针“风池”“外关”“阳陵泉”三穴，探讨其对 CM 模型大鼠痛觉敏化和相关通路的影响，以期临床电针治疗 CM、降低痛觉敏化并改善 CM 伴随症状的作用机理提供一定参考。

本研究通过测定眶周机械痛阈值、后足机械痛阈值及后足热痛阈值来测量痛觉敏化的状态，但三者侧重点有所不同：后足机械痛阈值及后足热痛阈值偏向于中枢敏化，而眶周机械痛阈值偏向于外周敏化。TRPV1 作为伤害性刺激分子整合器，高表达于三叉神经元中，其可被多种理化因素如辣椒

素、 H^+ ($pH < 6.0$)、机械刺激及热刺激等激活,引起神经末梢去极化产生动作电位,诱导疼痛产生^[22]。TRPV1 通道是非选择性阳离子通道,当 TRPV1 活化后,其通道开放能力进一步增强,促进神经元产生并释放多种神经肽类物质,介导血管舒张,增加血流量,引起神经源性炎症,参与痛觉敏化形成^[23],进一步加重偏头痛。PKC 是细胞内重要的信号转导分子,在伤害性刺激的传导中发挥重要作用^[24]。当炎症刺激神经末梢伤害性感受器时,炎症因子与细胞膜上 G 蛋白偶联受体结合,会激活 PKC 通路^[25]。PKC 通路的激活能促使底物活化,引起 TRPV1 受体的磷酸化,即激活 PKC/TRPV1 通路,升高 TRPV1 蛋白水平,进而参与炎症和痛觉敏化过程,是炎症反应和痛觉敏化形成的重要环节^[26]。本研究设立 PKC 相关的抑制剂组和电针+激动剂组,进一步验证电针对 PKC 的影响。

本研究结果显示,与空白组比较,模型组大鼠三叉神经节组织中 PKC、TRPV1、p-TRPV1 蛋白水平及 *Pkc*、*Trpv1* mRNA 表达均升高,免疫荧光检测结果趋势亦与其一致,而机械痛阈值及热痛阈值均降低,提示 CM 模型大鼠处于痛觉敏化状态,此现象可能与三叉神经节组织中 PKC/TRPV1 通路被激活,导致 TRPV1 水平升高有关。与模型组比较,抑制剂组 PKC、TRPV1、p-TRPV1 蛋白水平及 TRPV1、PKC 平均荧光强度均降低,眶周机械痛阈值及后足热痛阈值升高,可以推测 PKC 抑制剂减弱大鼠痛觉敏化与抑制 PKC-TRPV1 通路而降低 TRPV1 水平有关。经电针干预后,大鼠三叉神经节组织中上述 PKC、TRPV1 的蛋白水平、mRNA 表达及平均荧光强度均降低,机械痛阈值及热痛阈值均升高,提示电针“风池”“外关”“阳陵泉”能减弱 CM 模型大鼠痛觉敏化状态,其机制可能与抑制 PKC-TRPV1 通路,降低 TRPV1 水平而抑制痛觉敏化有关。电针+激动剂组机械痛阈值及热痛阈值较模型组差异无统计学意义,仅 TRPV1 平均荧光强度较模型组降低,且 TRPV1、PKC、p-TRPV1 蛋白水平及 *Trpv1* mRNA 表达较电针组均升高,提示电针+激动剂组大鼠仍处于痛觉敏化状态,其电针效应的减弱可能与 PKC 激活导致 PKC-TRPV1 通路的活化有关。

综上所述,电针“风池”“外关”“阳陵泉”能提高 CM 模型大鼠的疼痛阈值,减弱痛觉敏化,其机制可能与抑制 PKC-TRPV1 通路有关。然而,本研究未进一步探索电针对 CM 模型大鼠脑干及丘脑中 PKC-TRPV1 通路的影响,后续有待进一步研究。

参考文献

- [1] Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS). The international classification of headache disorders, 3rd edition [J]. *Cephalalgia*, 2018, 38(1):1-211.
- [2] AGOSTONI EC, BARBANTI P, CALABRESI P, et al. Current and emerging evidence-based treatment options in chronic migraine: a narrative review [J]. *J Headache Pain*, 2019, 20(1):92.
- [3] 李静钰,程岩岩. 针灸疗法治疗偏头痛研究进展 [J]. *中医药信息*, 2023, 40(10):82-86.
- [4] 姚金,唐雨兰. 针刺少阳经特定穴治疗偏头痛的临床疗效观察 [J]. *针灸临床杂志*, 2017, 33(10):19-22.
- [5] 李学智,刘旭光,宋文忠,等. 针刺少阳经穴对慢性偏头痛患者脑内葡萄糖代谢的影响 [J]. *中国针灸*, 2008, 28(11):854-859.
- [6] 傅青雯,尤浩军,雷静. 神经病理性疼痛发生机制的研究进展 [J]. *生命科学研究*, 2023, 27(2):139-146.
- [7] 侯娜,张力,蒙臣,等. 伤害性感受器可塑性在慢性疼痛中的研究进展 [J]. *医学综述*, 2020, 26(5):950-954.
- [8] 吴一箫,童志前,万有. 温度感受器 TRPV1 调节疼痛 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2021, 48(12):1392-1397.
- [9] DEL FIACCO M, QUARTU M, BOI M, et al. TRPV1, CGRP and SP in scalp arteries of patients suffering from chronic migraine [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2015, 86(4):393-397.
- [10] MALEK N, PAJAK A, KOLOSOWSKA N, et al. The importance of TRPV1-sensitisation factors for the development of neuropathic pain [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2015, 65:1-10. doi: 10.1016/j.mcn.2015.02.001.
- [11] PRADHAN AA, SMITH ML, MCGUIRE B, et al. Characterization of a novel model of chronic migraine [J]. *Pain*, 2014, 155(2):269-274.
- [12] TIPTON AF, TARASH I, MCGUIRE B, et al. The effects of acute and preventive migraine therapies in a mouse model of chronic migraine [J]. *Cephalalgia*, 2016, 36(11):1048-1056.
- [13] 马腾飞. 经眶下孔注射相关炎症因子制造大鼠三叉神经痛模型的实验研究 [D]. 合肥:安徽医科大学, 2015.
- [14] 华兴邦,周浩良. 大鼠穴位图谱的研制 [J]. *实验动物与动物实验*, 1991(1):1-5.
- [15] CHAPLAN SR, BACH FW, POGREL JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1):55-63.
- [16] MONTAGNE-CLAVEL J, OLIVERAS JL. The "plantar test" apparatus (Ugo Basile Biological Apparatus), a controlled infrared noxious radiant heat stimulus for precise withdrawal latency measurement in the rat, as a tool

- for humans? [J]. *Somatosens Mot Res*, 1996, 13 (3/4): 215-223.
- [17] 陈仲杰, 胡静, 霍金, 等. 古籍文献中偏头痛针灸治疗特色探析[J]. *中医杂志*, 2024, 65(10): 1063-1067, 1081.
- [18] 文亚, 王丹, 范刚启. 针刺治疗急性期偏头痛的穴位选择[J]. *中国针灸*, 2018, 38(11): 1183-1188.
- [19] 寇任重, 陶腊梅, 刘岚青, 等. 针刺治疗偏头痛急性期优选研究的现状及思考[J]. *中医杂志*, 2018, 59(4): 348-351, 357.
- [20] 王乾娜, 刘秋佳, 叶意红, 等. 不同时期电针少阳经特定穴对偏头痛大鼠血清中 5-HT 及 SP 含量的影响[J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(11): 2795-2798.
- [21] 王乾娜, 刘秋佳, 叶意红, 等. 电针少阳经特定穴与非经非穴对偏头痛大鼠血清中相关神经递质及 50% 缩足阈
- 值的影响[J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(11): 2802-2804.
- [22] LI F, WANG F. TRPV1 in pain and itch [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2021, 1349: 249-273. doi: 10. 1007/978-981-16-4254-8_12.
- [23] 赵秀圆, 徐小林. 降钙素基因相关肽与偏头痛[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2019, 46(1): 109-113.
- [24] 易小清, 崔小娇, 陈祝君, 等. 蛋白激酶 C 在疼痛及镇痛药物作用中的研究进展[J]. *医药导报*, 2021, 40 (12): 1699-1703.
- [25] 王竞鹏. G 蛋白、G 蛋白偶联受体及信号传导途径研究进展[J]. *医学研究杂志*, 2006, 35(8): 92-94.
- [26] 张华. 伤害性感受器 NK-1 受体的激活增强 TRPV1 和 TTX 不敏感钠通道活动的机制研究[D]. 上海: 复旦大学, 2006.

Effects of Electroacupuncture at "Fengchi" (GB 20), "Waiguan" (TE 5), and "Yanglingquan" (GB 34) on Nociceptive Sensitization and PKC/TRPV1 Pathway in the Trigeminal Ganglion of Chronic Migraine Model Rats ZENG Yixiang, TU Runze, ZHAO Shucong, YANG Yang, WEN Haojia, HE Zhuozhong, ZHOU Shengli, TAN Lei, HE Ke, FU Lei

The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410005

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanisms of electroacupuncture at Fengchi (GB 20), Waiguan (TE 5), and Yanglingquan (GB 34) in treating chronic migraine from the perspective of nociceptive sensitization. **Methods** Forty SPF-grade SD rats were randomly divided into blank group, model group, electroacupuncture group, electroacupuncture + agonist group, and inhibitor group, with 8 rats in each group. Except for the blank group, rats were injected intraperitoneally with nitroglycerin to establish a chronic migraine rat model. After successful modeling, the electroacupuncture group received electroacupuncture at bilateral "Fengchi" (GB 20), "Waiguan" (TE 5), and "Yanglingquan" (GB 34) for 30 minutes each session. The electroacupuncture + agonist group received the same electroacupuncture treatment and additional injection of protein kinase C (PKC) agonist Phorbol 12-myristate 13-acetate (1.0 ng/ μ l, 25 μ l) via the infraorbital foramen. The inhibitor group received PKC inhibitor Chelerythrine Chloride (1.0 ng/ μ l, 10 μ l) via the infraorbital foramen. The blank group, model group, and inhibitor group underwent restraint for 30 minutes without other interventions. All groups were continuously intervened for 5 days. After the intervention, the nociceptive thresholds (mechanical and thermal pain) of the periorbital area and hind paw were measured. The expression levels of transient receptor potential vanilloid acid subtype 1 (TRPV1), phosphorylated TRPV1 (p-TRPV1), PKC proteins, *Trpv1*, *Pkc* mRNA, and the average fluorescence intensity of transient receptor potential vanilloid acid subtype 1 (TRPV1) and PKC in the trigeminal ganglion were detected using Western Blot, real-time fluorescence quantitative PCR, and immunofluorescence methods. **Results** Compared with the blank group, the mechanical and thermal pain thresholds of the periorbital area and hind paw were reduced in the model group, and the protein levels of TRPV1, PKC, p-TRPV1, as well as the mRNA expression of *Trpv1* and *Pkc*, and the average fluorescence intensity of TRPV1 and PKC in the trigeminal ganglion significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, the electroacupuncture group exhibited increased mechanical and thermal pain thresholds in the periorbital and hind paw areas, and decreased protein levels of TRPV1, PKC, p-TRPV1, mRNA expression of *Trpv1* and *Pkc*, and average fluorescence intensity of TRPV1. In the electroacupuncture + agonist group, the average fluorescence intensity of TRPV1 in the trigeminal ganglion decreased. The inhibitor group exhibited increased mechanical pain thresholds in the periorbital area and thermal pain thresholds in the hind paw, along with decreased protein levels of TRPV1, PKC, p-TRPV1, and the average fluorescence intensity of TRPV1 and PKC ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the electroacupuncture group, the electroacupuncture + agonist group showed an increase in the protein levels of TRPV1, PKC, p-TRPV1, and the mRNA expression of *Trpv1* ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Electroacupuncture at the "Fengchi" (GB 20), "Waiguan" (TE 5), and "Yanglingquan" (GB 34) acupoints can increase the mechanical and thermal pain thresholds in chronic migraine rats and alleviate nociceptive sensitization. The mechanism may be related to the inhibition of PKC/TRPV1 pathway.

Keywords chronic migraine; nociceptive sensitization; electroacupuncture; transient receptor potential vanilloid acid subtype 1; protein kinase C; Fengchi (GB 20); Waiguan (TE 5); Yanglingquan (GB 34)

(收稿日期: 2024-09-22; 修回日期: 2024-11-25)

[编辑: 邓 媛]