

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.004156

电针“夹脊”穴调控 PI3K/AKT/TNF- α 信号通路抑制小鼠脊髓损伤后 NF- κ B 诱导的 A1 型神经毒性星形胶质细胞的分化

邢珂吟, 黄思琴, 唐成林, 李明娇, 王嘉培, 邓钧元, 李思洁

(重庆医科大学中医药学院, 重庆 400016)

【摘要】目的:观察电针“夹脊”穴对磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, AKT)/肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)信号通路的影响,探讨电针抑制脊髓损伤后核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)诱导的神经毒性星形胶质细胞(neurotoxic A1 astrocytes, A1)分化的可能机制。**方法:**采用钳夹法对 48 只雌性 C57BL/6 小鼠建立脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)模型,并设假手术组 12 只。造模成功后再随机分为模型组、电针组、依那西普(TNF- α 抑制剂)组、LY294002(PI3K 抑制剂)组,每组 12 只。电针组小鼠接受双侧 T₁₂、L₂ 水平“夹脊”穴电针干预,每日 1 次,每次 15 min;依那西普组与 LY294002 组分别给予 SCI 模型小鼠腹腔注射抑制剂[1 mg/(kg·d)、1.5 mg/(kg·d)],连续 14 d。小鼠后肢运动评分(basso mouse scale, BMS)评估小鼠神经运动功能情况,苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色法观测脊髓组织形态学改变,酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)分析血清中白细胞介素 1 β (Interleukin-1 beta, IL-1 β)和 TNF- α 的含量。蛋白质印迹法(Western blotting, WB)检测脊髓组织 NF- κ B、PI3K、磷酸化磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphorylated PI3K, p-PI3K)、AKT、磷酸化蛋白激酶 B(phosphorylated AKT, p-AKT)、TNF- α 、补体成分 3(component 3, C3)、钙结合蛋白 A10(S100 calcium-binding Protein A10, S100A10)的相对表达量;免疫荧光法检测小鼠脊髓反应性星形胶质细胞标志物胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)中 C3 和 S100A10 的相对荧光强度。**结果:**与模型组比较,电针组与依那西普组的 BMS 评分在造模后第 7、14 天均明显高于模型组(均 $P < 0.001$)。减轻了神经元变性和炎症浸润,血清 IL-1 β 和 TNF- α 表达下降(均 $P < 0.01$);脊髓中 TNF- α 、NF- κ B、C3 蛋白相对表达量和 C3 相对表达降低(均 $P < 0.01$);S100A10 蛋白相对表达量和 S100A10 相对荧光强度升高(均 $P < 0.001$)。LY294002 组表现出与电针组相反的效果,BMS 评分进一步降低(均 $P < 0.001$),血清 IL-1 β 和 TNF- α 表达上升(均 $P < 0.05$),脊髓中 TNF- α 、C3 蛋白相对表达量和 C3 相对荧光强度增高(均 $P < 0.01$);PI3K 通路相关蛋白以及 S100A10 蛋白相对表达量和 S100A10 相对荧光强度降低(均 $P < 0.05$)。**结论:**电针“夹脊”可能通过调控 PI3K/AKT/TNF- α 信号通路,抑制脊髓损伤后 NF- κ B 诱导的 A1 型神经毒性星形胶质细胞的分化,增加神经保护性星形胶质细胞的分化,促进 SCI 小鼠神经功能的恢复。

【关键词】脊髓损伤;电针;夹脊;核因子 κ B;A1 型神经毒性星形胶质细胞**【中图分类号】**R651.2**【文献标志码】**AElectroacupuncture at Jiaji points inhibits nuclear factor- κ B-induced neurotoxic A1 astrocyte differentiation in mice after spinal cord injury by regulating the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/tumor necrosis factor- α signaling pathway

Xing Kehan, Huang Siqin, Tang Chenglin, Li Mingjiao, Wang Jiawei, Deng Junyuan, Li Sijie

(College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University)

作者介绍:邢珂吟, Email: 847601972@qq.com,

研究方向:脊髓损伤的电针疗法与机制。

通信作者:黄思琴, Email: huangsiqin@cqmu.edu.cn。**基金项目:**国家自然科学基金青年基金资助项目(编号:81403466);2021 年重庆市科技局资助项目(编号: cstc2021jcyj-msxmX0203);2020 年科卫联合中医药技术创新与应用发展资助项目(编号:2021ZY023890);2025 年重庆市璧山区科学技术局与重庆中医药学院中医药领航联合专项资助项目(编号:BSZY1016)。**优先出版:** <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20260708.1347.006>

(2026-07-09)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of electroacupuncture (EA) at Jiaji points on the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT)/tumor necrosis factor- α (TNF- α) signaling pathway, as well as the possible mechanism of EA in inhibiting nuclear factor- κ B (NF- κ B)-induced differentiation of neurotoxic A1 astrocytes (A1) after spinal cord injury (SCI). **Methods:** A total of 48 female C57BL/6 mice were used to establish a model of SCI using the clip compression method, and a sham-operation group with 12 mice was also established. After modeling,

the SCI mice were further randomly divided into model group, EA group, etanercept group (TNF- α inhibitor), and LY294002 group (PI3K inhibitor), with 12 mice in each group. The mice in the EA group were given EA treatment at bilateral T₁₂/L₂ Jiaji points for 15 minutes each time, once a day, and the etanercept group and LY294002 group received daily intraperitoneal injections of their respective inhibitors (1 mg/kg and 1.5 mg/kg) for 14 consecutive days after SCI. Basso mouse scale (BMS) was used to evaluate motor function; hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the histomorphological changes of spinal cord; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the serum levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α); Western blot (WB) was used to measure the relative protein expression levels of NF- κ B, PI3K pathway-related proteins (PI3K, phosphorylated PI3K [p-PI3K], AKT, and phosphorylated AKT [p-AKT]), complement component 3 (C3), and S100 calcium-binding protein A10 (S100A10); immunofluorescence assay was used to measure the relative positive intensity of C3 and S100A10 in glial fibrillary acidic protein (GFAP) as the marker for reactive astrocytes in spinal cord. **Results:** Compared with the model group, the EA group and the etanercept group had a significant increase in BMS score on days 7 and 14 after modeling (all $P < 0.001$), significant alleviation of neuronal degeneration and inflammatory infiltration, and significant reductions in the serum levels of IL-1 β and TNF- α ($P < 0.01$), as well as significant reductions in the relative protein expression levels of TNF- α , NF- κ B, and C3 in spinal cord and the relative fluorescence intensity of C3 (all $P < 0.01$) and significant increases in the relative protein expression level and relative fluorescence intensity of S100A10 ($P < 0.001$). The LY294002 group exhibited an opposite effect to the EA group, with a further reduction in BMS score ($P < 0.001$), significant increases in the serum levels of IL-1 β and TNF- α ($P < 0.05$), significant increases in the relative protein expression levels of TNF- α and C3 in spinal cord and the relative fluorescence intensity of C3 ($P < 0.01$), significant reductions in the relative protein expression levels of PI3K/AKT pathway-related proteins and S100A10, and a significant reduction in the relative fluorescence intensity of S100A10 (all $P < 0.05$). **Conclusion:** EA at Jiaji points can inhibit NF- κ B-induced differentiation of neurotoxic A1 astrocytes after SCI, promote the differentiation of neuroprotective A2 astrocytes (A2), and enhance the recovery of neurological function in SCI mice, possibly by regulating the PI3K/AKT/TNF- α signaling pathway.

【Key words】spinal cord injury; electroacupuncture; Jiaji; nuclear factor-kappa B; neurotoxic A1 astrocytes

脊髓损伤是中枢神经系统较为严重的创伤性疾病之一^[1],其病理过程呈现出典型的双阶段。初期的原发性损伤是机械外力直接导致脊髓组织的结构性破坏,包括神经纤维断裂、血管损伤以及细胞膜完整性丧失,引发局部出血、水肿等急性病理改变。后续的继发性损伤由复杂的分子级联反应驱动,涉及炎症反应、氧化应激和兴奋性毒性等多重病理机制的协同作用,最终导致进行性神经功能恶化。星形胶质细胞是中枢神经系统内数量最多的驻留细胞^[2],在继发性损伤发生后,会被诱导分化为反应性表型,包括神经毒性星形胶质细胞 (neurotoxic A1 astrocytes, A1) 和神经保护性星形胶质细胞 (neuroprotective A2 astrocytes, A2)^[3]。研究表明, A1 型星形胶质细胞导致髓鞘降解、突触吞噬及神经元凋亡,表现出明显的神经毒性作用, A2 型星形胶质细胞促进神经元存活、轴突再生及突触重塑,从而发挥神经保护作用^[4]。

前期研究表明,电针对脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 的治疗效果明显,可改善运动功能^[5],对

其造成的神经炎症反应有明显的抑制作用^[6]。炎症因子如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的释放,激活核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 使其表达升高^[7],而电针治疗可抑制这种病理性的 NF- κ B 上升^[8]。研究显示, A1 型星形胶质细胞标志物补体成分 3 (component 3, C3) 呈现 NF- κ B 依赖性上调^[9],这与损伤区 NF- κ B 蛋白水平的升高呈正相关,电针对磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT)/TNF- α 信号通路有明显的正向调控作用^[10]。目前对于电针调控 SCI 后星形胶质细胞的分化以及作用机制尚不清楚,因此,本研究拟建立 SCI 小鼠模型,分阶段探究电针是否可以通过调控 TNF- α 的表达,抑制 NF- κ B 诱导的 A1 型神经毒性星形胶质细胞分化,增加 A2 型神经保护星形胶质细胞的分化,再探究其机制是否为调控 PI3K/AKT/TNF- α 信号通路,实现对 NF- κ B 的抑制作用,为电针治疗 SCI 提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物造模分组及试剂仪器

1.1.1 动物准备 本研究使用 60 只 8 周龄、体质量 20~25 g 的雌性 C57BL/6 小鼠,所有动物均购自重庆医科大学实验动物中心[实验动物生产许可证号:SCXK(渝)2022-0003]。动物饲养环境参数控制为:室温 24~26 °C,相对湿度 40%~60%,12 h/12 h 明暗循环(光照时间 7:00 至 19:00)。

全部小鼠在试验前进行为期 1 周的适应性喂养和饮水,自由摄食。小鼠随机分为假手术组 12 只和 SCI 造模组 48 只,造模组采用钳夹法建立 SCI 模型。造模成功后再随机分为模型组、电针组、依那西普组和 LY294002 组,每组 12 只。假手术组、模型组、电针组与依那西普组用于验证电针对 TNF- α 、NF- κ B 通路及星形胶质细胞极化的影响;假手术组、模型组、电针组与 LY294002 组用于分析 PI3K/AKT/TNF- α 通路在电针调控 NF- κ B 活化过程中的作用。本研究所有动物实验操作遵循中国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》,并获重庆医科大学实验动物管理与使用委员会批准(批准编号:IACUC-CQMU-2025-0469)。

1.1.2 主要试剂和仪器 抗体:C3(Abcam,货号:ab200999),S100A10(Abcam,货号:ab76472),TNF- α (Abcam,货号:ab183218),PI3K(Cell Signaling Technology,货号:4292),p-PI3K(Cell Signaling Technology,货号:PSH01-38),AKT(Cell Signaling Technology,货号:4292),p-AKT(Cell Signaling Technology,货号:4060),NF- κ B(HUABIO,货号:SZ10-04),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)(Proteintech,货号:60004-1-IG),辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记山羊抗兔二抗(AiFang biological,货号:AFIHC003)、HRP 标记山羊抗鼠二抗(AiFang biological,货号:AFIHC002);抑制剂:依那西普(比利时 Pfizer Manufacturing Belgium NV),LY294002(美国 MCE),戊巴比妥钠(德国 Merck),青霉素、生理盐水(太极西南药业股份有限公司);检测试剂盒:酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒、苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒(湖南艾方生物科技有限公司),蛋白质印迹(Western blotting, WB)试剂盒(上海雅酶生物医药科技有限公司);主要仪器:针灸针(苏州医疗用品厂),电针仪(中国仙鹤股份有限公司),酶标检测系统(美国 BioTek),低温高速离心机(美国 Sigma),冷冻研磨仪(德国 Retsch),垂直电泳系统及转印仪(上海 Tanon),光学显微镜、成像系统(日本 Nikon),图像分析系统(美国 Licor)。

1.1.3 造模方法 钳夹法制备 SCI 小鼠模型^[11],小鼠经戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉后,取俯卧位固定于手术台。术区皮肤常规消毒,准确定位 T₁₂~L₂ 椎体节段。沿脊柱

后正中中线纵行切开皮肤,分离背部的组织和肌肉,充分展示棘突、椎板和横突。使用咬骨钳咬除 L₁ 椎板,充分暴露脊髓组织,通过血管夹垂直夹持脊髓组织 15 s,导致该节段脊髓受到不完全性损伤。术后用生理盐水清理伤口残留血液,进行逐层缝合处理,术区以聚维酮碘消毒。术后将小鼠置于 37 °C 恒温垫维持体温,待其自主活动恢复后,通过后肢运动功能丧失、尾部痉挛性摆动及尿潴留等典型神经症状判定建模成功。术后通过人工按压膀胱辅助小鼠排尿,每日 2 次,并进行抗感染处理。假手术组仅行椎板和棘突切除术,脊髓未受到损伤。

1.1.4 治疗方法 电针组:造模成功后第 2 天,将实验小鼠俯卧位固定,参照文献《实验大鼠和小鼠穴位定位的研究概况》附表中的标准化取穴方法^[12],于 T₁₂ 及 L₂ 水平(距脊柱正中线旁开 1 mm)定位“夹脊”穴,垂直进针约 3 mm。连接电针治疗仪,电极配置为:同侧 T₁₂ “夹脊”穴接正极, L₂ “夹脊”穴接负极。采用疏密波交替输出,参数设置为低频 1.5 Hz 与高频 7.5 Hz 以低频持续 5 s,高频持续 10 s,周期交替,电流强度以诱发小鼠后肢出现规律轻微震颤为宜(约 1.0 mA)。每日干预 1 次,每次 15 min,连续治疗 14 d^[13]。依那西普组:给予 SCI 小鼠腹腔注射 TNF- α 抑制剂依那西普(1 mg/kg)^[14],1 次/d,持续 14 d;LY294002 组:给予 SCI 小鼠腹腔注射 PI3K 抑制剂 LY294002(1.5 mg/kg)^[15],1 次/d,持续 14 d;假手术组和模型组:不采用治疗手段,只使用与治疗组一致的固定方法,每日固定小鼠 15 min,持续 14 d。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 小鼠运动功能评分(basso mouse scale, BMS) 造模前 1 d 和造模后第 7、14 天由 2 名非本课题组实验人员按照 BMS 评分表^[16],分别对小鼠进行运动神经功能评价,每只小鼠置于开阔场地自由运动,观察至少 5 min,取二者的评分平均值。评分系统采用 0~9 分制,评估指标包括踝关节协调性、足爪姿态、关节活动范围、躯干稳定性及尾部姿势 5 个维度,评分结果与运动功能障碍程度呈负相关。

1.2.2 HE 染色观察脊髓组织形态学变化 在治疗完成后,小鼠经腹腔注射戊巴比妥钠(0.08 mL/10 g)麻醉后,行心脏灌注固定(4%多聚甲醛)。以 L₁ 脊髓节段为中心取材,获取长度约 1 cm 的脊髓组织(范围涵盖损伤核心区及其头尾侧各约 0.5 cm),组织样本经 4% 多聚甲醛固定 12 h 后,梯度乙醇脱水,石蜡包埋。脱蜡水化后常规 HE 染色,使用光学显微镜进行形态学观察,并采用图像分析系统定量评估病理改变。

1.2.3 WB 检测小鼠损伤脊髓组织中 C3、S100A10、TNF- α 、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT 的蛋白相对表达量 治疗完成后每组取 4 只小鼠,麻醉后于冰盘上快速取下损伤中心上下各 0.5 cm 的脊髓组织,速冻 1 h 后将其存放于 -80 °C 冰箱。预冷含蛋白酶抑制剂的裂解液冰上裂解脊髓组织并机械匀浆制备匀浆液,离心后收集上清液,BCA 试剂盒统一蛋白浓

度后加 $5 \times$ 上样缓冲液, 100°C 变性 5 min 制备电泳样本。按分子量大小电泳分离蛋白组分, 将蛋白转移至甲醇活化后的聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜。置于快速封闭液中封闭 45 min 阻断非特异性结合位点。Tween-20 的 Tris 缓冲盐水 (Tris-buffered saline with Tween-20, TBST) 洗涤后加入稀释一抗: C3 (1:5 000)、S100A10 (1:5 000)、TNF- α (1:1 000)、NF- κ B (1:1 000)、PI3K (1:2 000)、p-PI3K (1:2 000)、AKT (1:2 000)、p-AKT (1:2 000) 及 GAPDH (1:5 000), 4°C 孵育 20 h。TBST 充分洗涤后加入 1:10 000 稀释对应种属二抗, 室温孵育 1 h。再次洗涤后使用增强发光底物进行蛋白条带显影, 并进行条带灰度值分析, 以目的蛋白与内参的灰度比值表示目的蛋白的相对表达水平。

1.2.4 免疫荧光双标染色技术检测小鼠脊髓损伤组织中星形胶质细胞的标志物胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 中, C3、S100A10 的相对荧光强度表达。切片经 60°C 烘烤后, 依次进行二甲苯脱蜡和梯度乙醇水化处理。将 GFAP、C3 及 S100A10 一抗 (1:100 稀释) 后加至切片表面, 再 4°C 湿盒孵育 15 h。磷酸盐缓冲盐水 (phosphate buffered saline, PBS) 充分洗涤后, 加入对应种属荧光二抗 (1:200 稀释), 37°C 避光孵育 1 h。酪酰胺 (tyramide signal amplification, TSA) 信号放大系统处理增强荧光信号强度, 染色 5 min 标记细胞核。封片剂封片处理后, 使用激光共聚焦显微镜观察, 多光谱成像系统采集各通道荧光图像数据。

1.2.5 ELISA 法检测小鼠血清中炎症因子白细胞介素 1β (Interleukin-1 beta, IL- 1β)、TNF- α 的含量。治疗完成后, 各组随机选取 4 只小鼠实施麻醉后, 经眼眶静脉丛采集血液样本。血样于室温环境静置 60 min 凝固后, 用预先降温至 4°C 的高速冷冻离心机, $3\,500\text{ r/min}$ 离心 10 min, 收集上层血清分装保存。同步取冻存脊髓组织样本, 经机械匀浆处理及离心澄清后获取组织上清液。采用商品化检测试剂盒, 严格遵循其标准操作流程, 对血清上清液中的 IL- 1β 和 TNF- α 进行定量分析测定。

1.3 统计学方法

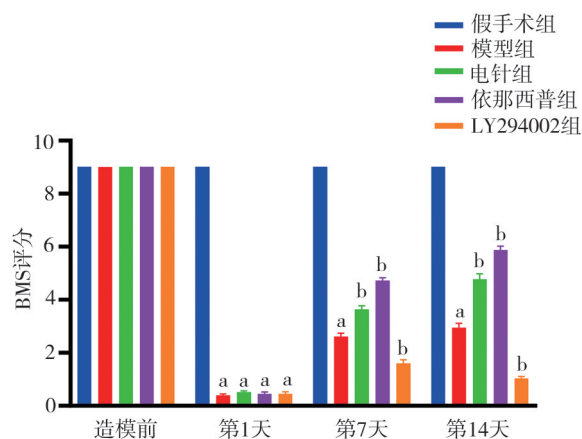
采用 GraphPad Prism 10.1.8 软件 (GraphPad Software, USA) 进行统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。数据经 Shapiro-Wilk 检验证实符合正态分布, 且经 Levene 检验确认方差齐性。多组间比较采用单因素方差分析。若总体比较差异有统计学意义, 则进一步采用 Dunnett's 检验进行实验组与对照组比较。所有检验均为双侧检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 小鼠 BMS 评分结果

术后第 1 天, 与假手术组对比, 各组小鼠的 BMS 评分明

显降低 ($F=1\,043.815$, $P<0.001$), 脊髓损伤模型建立成功。术后第 7、14 天, 与同期模型组比较, 电针组、依那西普组表现出显著的运动功能改善 ($F=104.440$ 、 54.380 , 均 $P<0.001$); LY294002 组运动功能进一步恶化 ($F=104.440$ 、 54.380 , 均 $P<0.001$), 见图 1。



注: a, 与同时时间段假手术组比较, $P<0.01$; b, 与同时时间段模型组比较, $P<0.01$

图1 各组小鼠造模前, 造模后 1、7、14 d BMS 评分比较 ($n=12$)

2.2 小鼠脊髓病理形态比较

假手术组小鼠脊髓组织结构保持正常, 神经元结构正常, 形态完整, 细胞分布均匀致密, 未出现病理性改变。模型组受损脊髓主要表现为组织松散, 神经元溶解, 且内部空泡数量增多, 同时伴随大量炎性细胞浸润。与模型组对比, 电针组和依那西普组小鼠损伤区域脊髓神经元的形态结构较模型组更完整, 坏死导致的空泡现象明显减少, 炎性细胞浸润减轻, 组织修复效果明显, 依那西普组各项修复效果略优于电针组; LY294002 组的神经元损伤程度较模型组进一步加剧, 神经元胞核固缩更为明显, 胞质溶解加剧, 形成的空泡数量增多且体积更大, 致使脊髓组织更为疏松、空洞化, 见图 2。

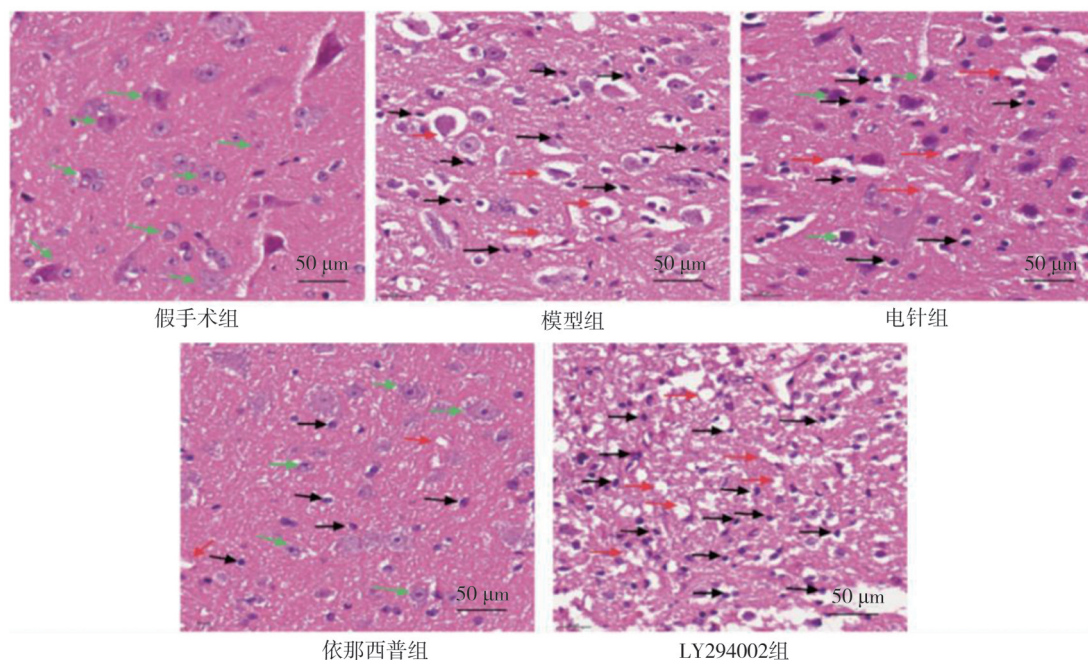
2.3 电针减少脊髓损伤后 TNF- α 表达抑制 NF- κ B 诱导的 A1 型神经毒性星形胶质细胞分化

2.3.1 假手术组、模型组、电针组、依那西普组小鼠脊髓组织中 TNF- α 、NF- κ B、C3、S100A10 蛋白相对表达量变化。与假手术组对比, 其余 3 组脊髓组织中 TNF- α 、NF- κ B、C3 蛋白相对表达量上升 ($F=48.536$ 、 132.253 、 152.760 , 均 $P<0.01$), S100A10 蛋白相对表达量降低 ($F=108.887$, $P<0.001$); 电针组和依那西普组 TNF- α 、NF- κ B、C3 蛋白相对表达量较模型组降低 ($F=48.536$ 、 132.253 、 152.760 , 均 $P<0.001$), S100A10 蛋白相对表达量较模型组明显升高 ($F=108.887$, $P<0.01$), 见图 3。

2.3.2 假手术组、模型组、电针组、依那西普组小鼠脊髓胶质 GFAP 中 C3、S100A10 的相对荧光强度。与假手术组对比, 其余 3 组 C3 的相对荧光强度升高 ($F=93.065$, $P<0.001$),

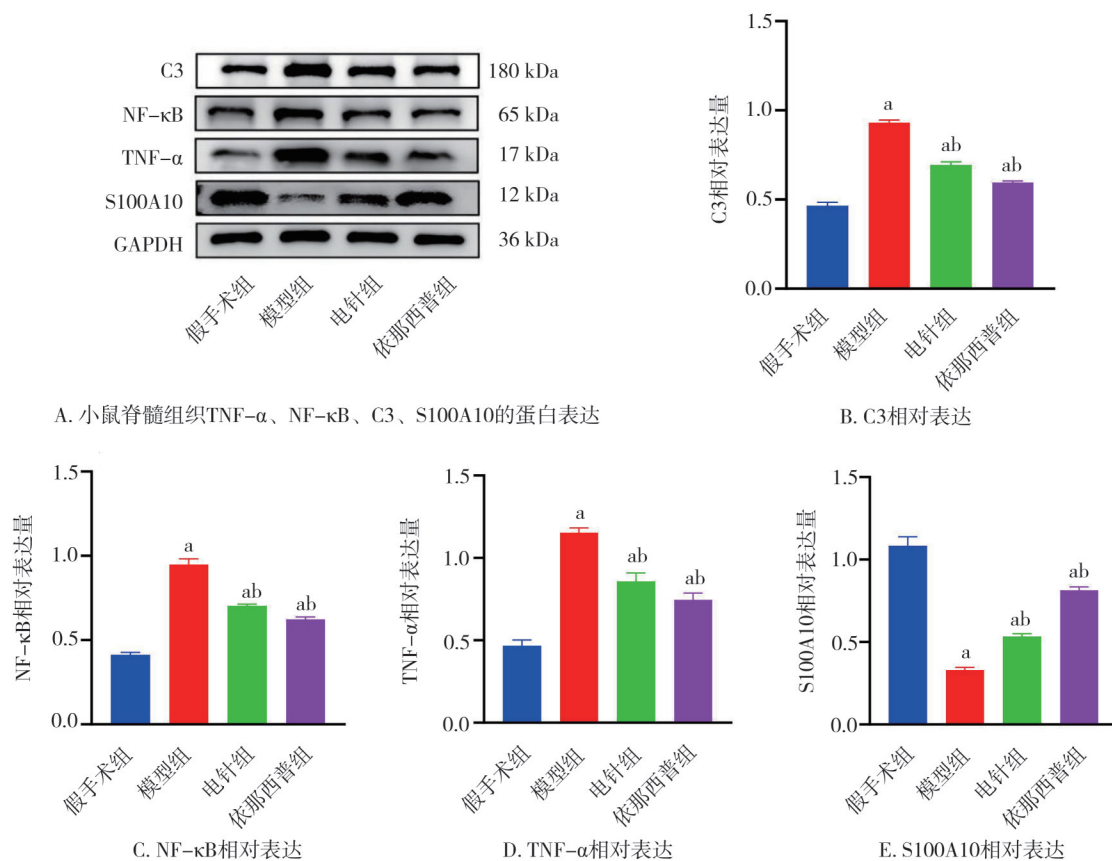
S100A10 的相对荧光强度明显下降 ($F=76.072, P<0.001$); 电针组、依那西普组 C3 的相对荧光强度较模型组明显下降

($F=93.065, P<0.01$), S100A10 的相对荧光强度较模型组升高 ($F=76.072, P<0.01$), 见图 4。



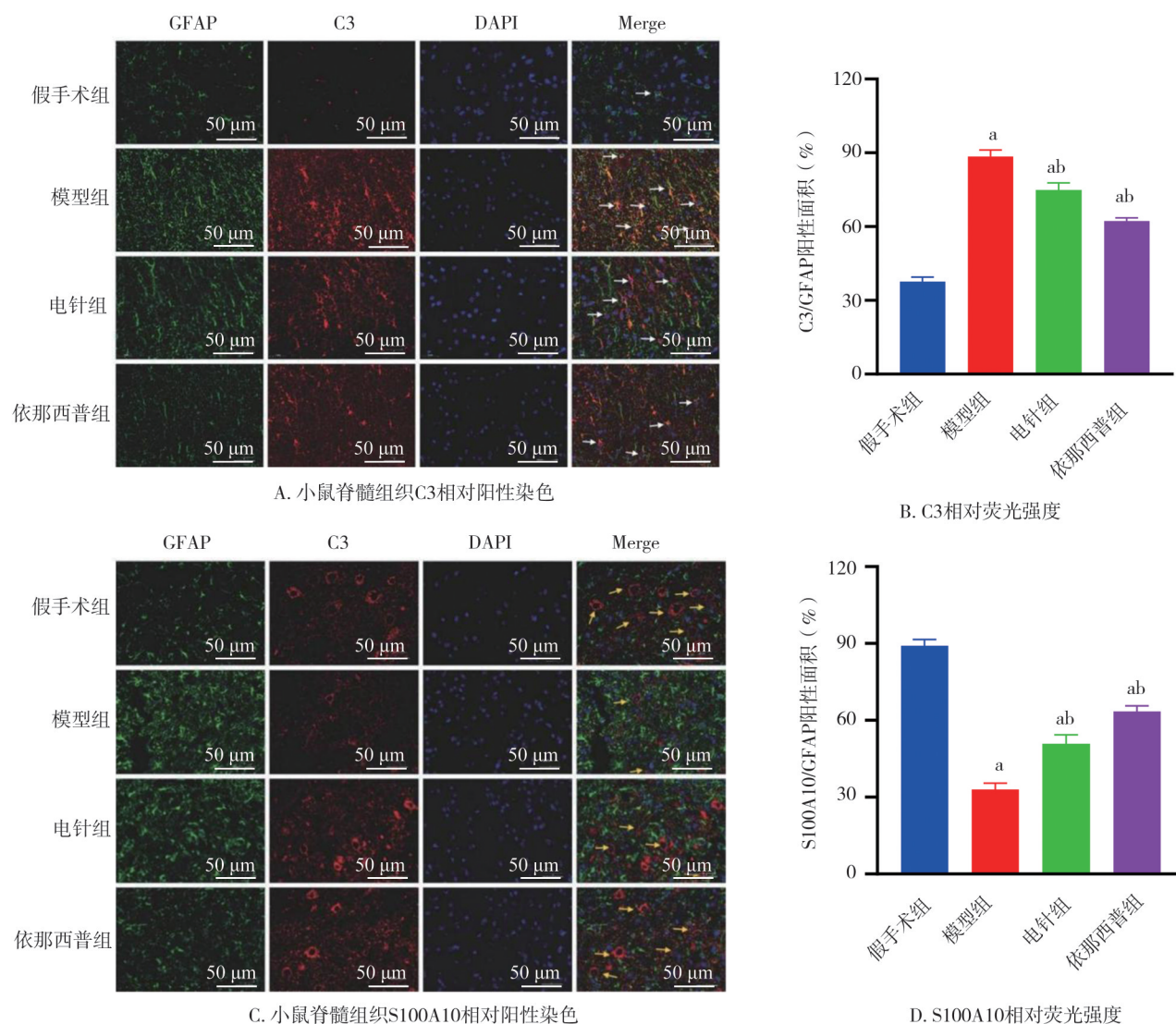
注: 绿色箭头指向正常神经元形态; 红色箭头指向空洞结构; 黑色箭头指向炎症细胞

图2 各组小鼠脊髓受损区域组织病理学变化



注: a, 与假手术组相比, $P<0.05$; b, 与模型组相比, $P<0.05$

图3 假手术组、模型组、电针组、依那西普组小鼠脊髓组织中TNF-α、NF-κB、C3、S100A10蛋白相对表达量($n=4$)



注:白色箭头指向C3阳性细胞;黄色箭头指向S100A10阳性细胞;a,与假手术组相比, $P<0.05$;b,与模型组相比, $P<0.05$

图4 假手术组、模型组、电针组、依那西普组小鼠脊髓组织GFAP中C3、S100A10相对荧光强度比较($n=4$)

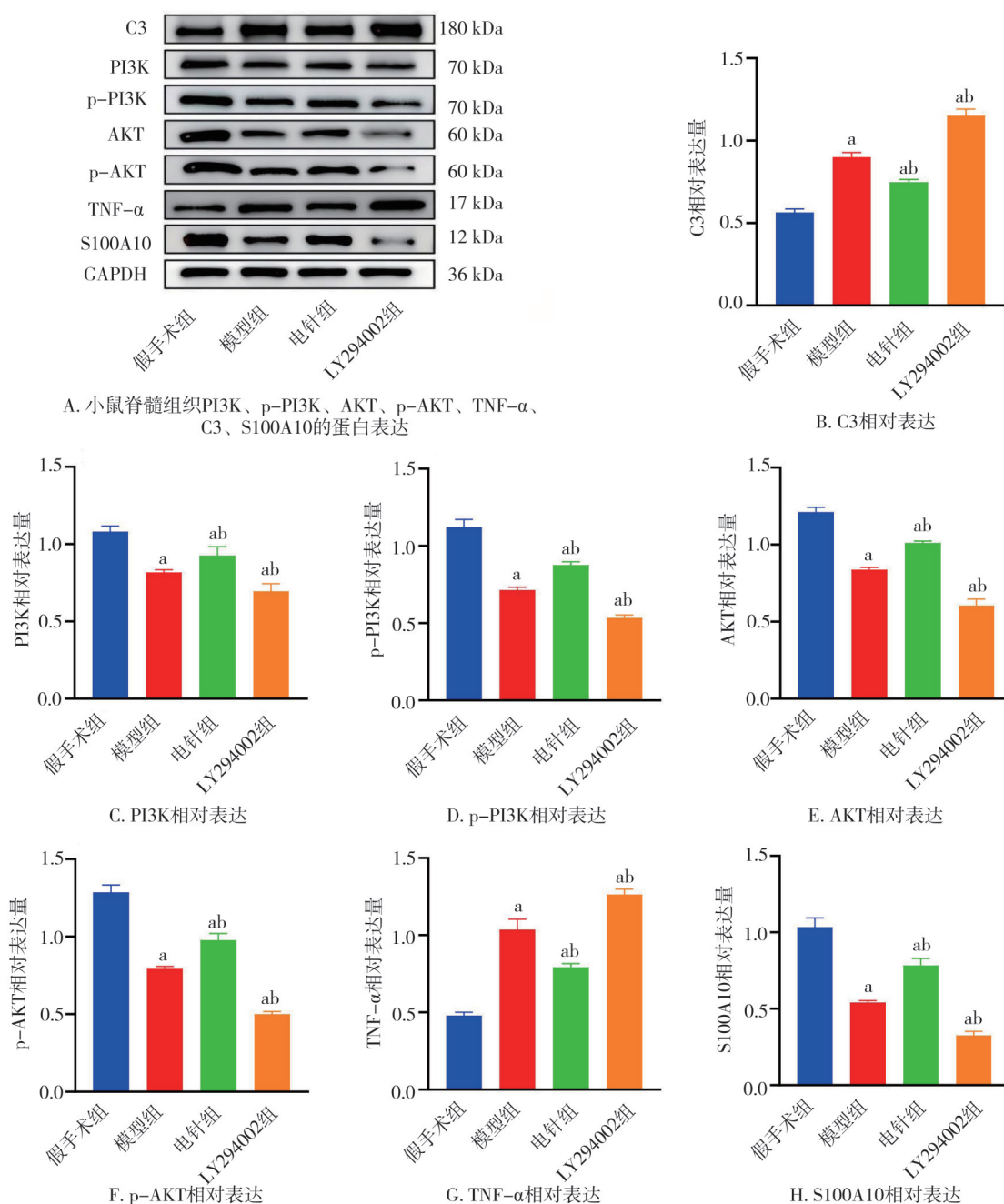
2.4 电针通过PI3K/AKT/TNF- α 信号通路对脊髓损伤小鼠脊髓组织反应性星形胶质细胞分化的影响

2.4.1 假手术组、模型组、电针组、LY294002组小鼠脊髓组织PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、TNF- α 、C3、S100A10蛋白相对表达量变化 与假手术组对比,其余3组的小鼠脊髓组织中TNF- α 、C3的蛋白相对表达量升高($F=67.250$ 、 72.141 ,均 $P<0.001$);PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、S100A10蛋白相对表达量降低($F=57.951$ 、 65.416 、 85.546 、 93.738 、 56.519 ,均 $P<0.01$);相较于模型组,电针组TNF- α 、C3蛋白相对表达量降低($F=67.250$ 、 72.141 ,均 $P<0.01$),而PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、S100A10蛋白相对表达量升高($F=57.951$ 、 65.416 、 85.546 、 93.738 、 56.519 ,均 $P<0.05$),LY294002组TNF- α 、C3蛋白相对表达量升高($F=67.250$ 、 72.141 ,均 $P<0.01$),PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、S100A10蛋白相对表达量降低($F=57.951$ 、 65.416 、 85.546 、 93.738 、 56.519 ,均 $P<0.01$),见图5。

2.4.2 假手术组、模型组、电针组、LY294002组小鼠脊髓GFAP中C3、S100A10的相对荧光强度 与假手术组对比,其余3组C3的相对荧光强度增加($F=81.722$, $P<0.001$),S100A10的相对荧光强度明显降低($F=185.769$, $P<0.001$);相较于模型组,电针组C3的相对荧光强度降低($F=81.722$, $P<0.01$),S100A10的相对荧光强度明显升高($F=185.769$, $P<0.01$),LY294002组C3的相对荧光强度升高($F=81.722$, $P<0.01$),S100A10的相对荧光强度明显降低($F=185.769$, $P<0.001$),见图6。

2.5 小鼠血清IL-1 β 和TNF- α 含量比较

与假手术组相比,其余4组小鼠血清中IL-1 β 和TNF- α 表达明显升高($F=63.191$ 、 221.070 ,均 $P<0.05$)。与模型组相比,电针组、依那西普组血清中IL-1 β 和TNF- α 表达降低($F=63.191$ 、 221.070 ,均 $P<0.01$),LY294002组血清中IL-1 β 和TNF- α 表达升高($F=63.191$ 、 221.070 ,均 $P<0.05$),见图7。



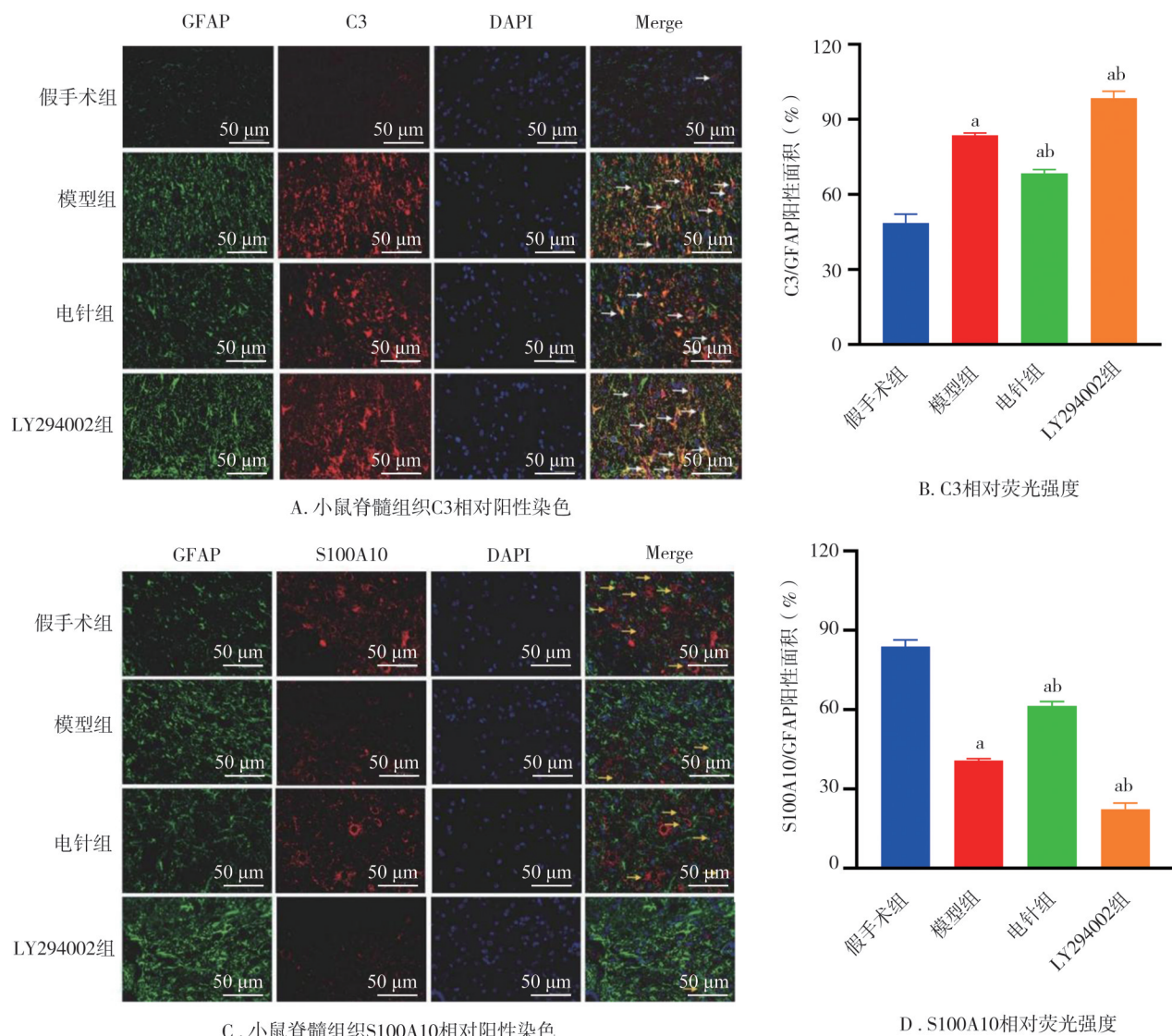
注:a,与假手术组相比, $P<0.05$;b,与模型组相比, $P<0.05$

图5 假手术组、模型组、电针组、LY294002组小鼠脊髓组织PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、TNF-α、C3、S100A10蛋白相对表达量($n=4$)

3 讨论

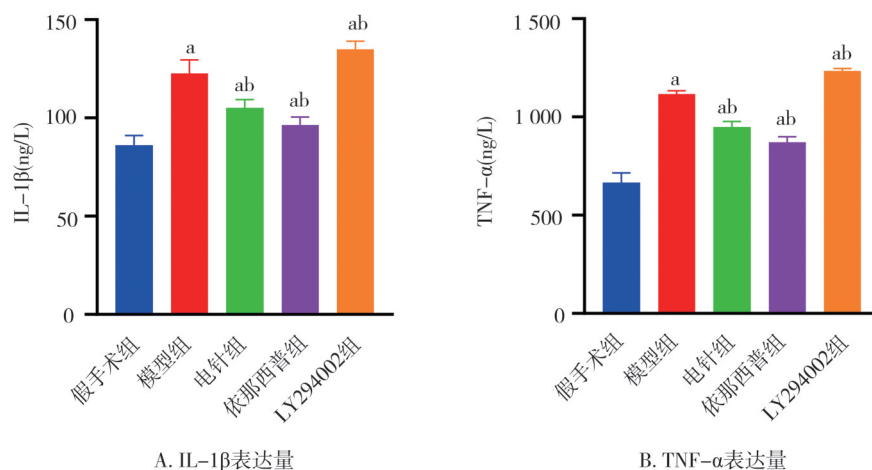
继发性损伤是SCI病理进程加剧及功能恶化的核心因素^[17]。传统中医将脊髓损伤所致截瘫归属于“痿证”的范畴^[18]。督脉的循行路径与脊柱重合,且作为“阳脉之海”具有调节阳经气血、反映脊髓与肾生理功能的作用^[19]。研究表明,脊神经后支分布于督脉夹脊穴深层^[20],电针“夹脊”穴不仅可缓解血流

动力学异常导致的血管壁痉挛,改善肌张力,增强脊神经细胞在缺血缺氧等压迫性恶劣环境中的耐受性^[21],还能改善损伤部位微循环,抑制局部过度炎症反应,减少神经胶质细胞凋亡和促进神经元存活^[22]。本实验通过切除L₁椎板并钳夹脊髓的方法构建SCI小鼠模型。实验结果表明,干预7 d和14 d后,与模型组相比,电针组小鼠的下肢运动神经功能有明显的恢复。病理学和免疫学检测结果表明,电针组的神经元损伤和炎性细胞浸润相较于模型



注:白色箭头指向C3阳性细胞;黄色箭头指向S100A10阳性细胞;a,与假手术组相比, $P<0.05$;b,与模型组相比, $P<0.05$

图6 假手术组、模型组、电针组、LY294002组小鼠脊髓组织GFAP中C3、S100A10相对荧光强度比较($n=4$)



注:a,与假手术组相比, $P<0.05$;b,与模型组相比, $P<0.05$

图7 小鼠血清中IL-1 β 和TNF- α 含量比较($n=4$)

组都有显著的减轻,这与运动功能的改善方向一致。研究结果表明,电针“夹脊”穴可帮助 SCI 小鼠恢复其运动功能。

既往研究发现脊髓损伤后,炎症因子如 TNF- α 的释放,激活调节 NF- κ B,使表达升高^[23]。星形胶质细胞有显著的 NF- κ B 活性,A1 型星形胶质细胞以 NF- κ B 依赖的形式增加。核因子 κ B 抑制蛋白 α (inhibitor of nuclear factor κ B α , I κ B α) 是 NF- κ B 的一个已知的下游靶点,在 TNF- α 过表达(50 倍)条件下,反应性星形胶质细胞中 I κ B α 的表达水平明显高于神经元,进一步说明小鼠中观察到的 C3 表达的升高源于脊髓损伤后 NF- κ B 对其的调控^[24]。本研究验证了这一经典炎症机制,同时发现了电针“夹脊”治疗 SCI 小鼠 14 d 后,明显抑制了 TNF- α 、NF- κ B 和 C3 的表达,同时上调 S100A10 的表达,效果与依那西普对小鼠的治疗作用一致。表明电针能够有效抑制 NF- κ B 介导的 A1 型神经毒性反应性星形胶质细胞的转化,并促进 A2 型神经保护反应性星形胶质细胞的转化。

PI3K 作为一类重要的脂质激酶,在维持细胞正常生理功能及参与多种病理过程中发挥着核心调控作用^[25]。SCI 后,髓鞘降解产物等损伤相关分子模式可特异性激活 Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)信号系统,启动级联炎症反应。在此过程中,PI3K 通路通过介导叉头框蛋白 O1 (forkhead box protein O1, FOXO1) 转录因子的磷酸化修饰,诱导其发生核质转位,从而抑制 FOXO1 依赖的 TLR4 基因表达及其下游 NF- κ B 信号转导,最终显著降低 TNF- α 、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)等促炎介质的分泌水平^[26]。实验结果显示,SCI 小鼠经过电针 14 d 的治疗, TNF- α 、C3 的表达降低,PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、S100A10 表达升高,该激活可被 LY294002 完全抑制并逆转电针的神经保护效应。该结果创新性地揭示了 PI3K/AKT/TNF- α 信号通路对于电针抑制 NF- κ B 的活化并正向调控反应性星形胶质细胞的转化的必要性。

本研究初步揭示了 PI3K/AKT/TNF- α 通路在电针治疗中的参与作用,然而其必要性尚需通过更深入的实验进一步验证。后续研究可结合谱系追踪、单细胞测序等技术进一步探索电针通过多靶点、多通路协同发挥作用的可能性。此外,未来研究可通过增设溶剂对照组,更有力地确认电针的特异性治

疗效应。这些工作将是未来研究的重点方向。

综上所述,本研究分阶段证实,电针可能通过调控 PI3K/AKT/TNF- α 信号通路,抑制了 NF- κ B 的活化,降低 A1 型神经毒性星形胶质细胞的分化,增加 A2 型神经保护星形胶质细胞分化,减少 SCI 后的炎症表达,从而促进脊髓损伤修复,为电针治疗脊髓损伤提供了新的理论依据。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 邢珂晗:研究方案设计、实验操作、数据分析、数据收集与整理,论文初稿撰写;黄思琴:实验技术指导;唐成林:提供实验设备;李明娇:研究方法指导、论文审定;王嘉培:实验方法指导;邓钧元:文献与资料调研;李思洁:文献与资料调研

参 考 文 献

- [1] Chen Z, Han FF, Du Y, et al. Hypoxic microenvironment in cancer: molecular mechanisms and therapeutic interventions[J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 70.
- [2] Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology[J]. Acta Neuropathol, 2010, 119(1): 7-35.
- [3] Hara M, Kobayakawa K, Ohkawa Y, et al. Interaction of reactive astrocytes with type I collagen induces astrocytic scar formation through the integrin-N-cadherin pathway after spinal cord injury[J]. Nat Med, 2017, 23(7): 818-828.
- [4] 孙懿晗, 赵嘉乐, 扈俊华, 等. 缺血性卒中后神经炎症动态演变与精准调控[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2026, 52(3): 173-180.
- [5] Sun YH, Zhao JL, Hu JH, et al. Temporal dynamics in the precision regulation of post-ischemic stroke neuroinflammation[J]. Chin J Nerv Ment Dis, 2026, 52(3): 173-180.
- [6] 赵鸿娣, 黄思琴, 唐成林, 等. 电针对脊髓损伤小鼠炎症因子高迁移率族蛋白 B1 及 Toll 样受体 4 表达的影响[J]. 针刺研究, 2021, 46(4): 259-265.
- [7] Zhao HD, Huang SQ, Tang CL, et al. Influence of electroacupuncture on locomotor function and expression of spinal HMGB1 and TLR4 in mice with spinal cord injury[J]. Acupunct Res, 2021, 46(4): 259-265.
- [8] 杨祝歆, 黄思琴, 唐成林, 等. 基于转录组测序技术探讨电针对脊髓损伤小鼠的抗炎作用及相关分子机制[J]. 针刺研究, 2023, 48(7): 672-680.
- [9] Yang ZX, Huang SQ, Tang CL, et al. The anti-inflammatory effect of electroacupuncture in mice with spinal cord injury and molecular mechanism based on transcriptome sequencing technology[J]. Acupunct Res, 2023, 48(7): 672-680.
- [10] Bracchi-Ricard V, Lambertsens KL, Ricard J, et al. Inhibition of astroglial NF- κ B enhances oligodendrogenesis following spinal cord injury[J]. J Neuroinflammation, 2013, 10: 92.
- [11] 周新宇, 崔 杨, 孙忠人, 等. “夹脊”电针调控 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路抑制脊髓损伤大鼠炎症反应的机制研究[J]. 针刺研究, 2024, 49(11): 1129-1137.

- Zhou XY, Cui Y, Sun ZR, et al. Electroacupuncture of “Jiaji” (EX-B2) inhibits inflammatory response by regulating HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway in rats with spinal cord injury[J]. *Acupunct Res*, 2024, 49(11):1129–1137.
- [9] Lian H, Yang L, Cole A, et al. NF- κ B-activated astroglial release of complement C3 compromises neuronal morphology and function associated with Alzheimer’s disease[J]. *Neuron*, 2015, 85(1):101–115.
- [10] 张安宁, 罗雪林, 黄思琴, 等. PI3K/Akt/mTOR 信号通路在大鼠急性骨骼肌钝挫伤修复中的作用[J]. *中国运动医学杂志*, 2018, 37(7):594–600.
- Zhang AN, Luo XL, Huang SQ, et al. Effect of PI3K/Akt/mTOR signaling pathways on the recovery of skeletal muscle contusion in rats[J]. *Chin J Phys Med*, 2018, 37(7):594–600.
- [11] Paterniti I, Esposito E, Cuzzocrea S. An *in vivo* compression model of spinal cord injury[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1727:379–384.
- [12] 程 颢, 张 雪, 史阳琳, 等. 实验大鼠和小鼠穴位定位的研究概况[J]. *上海针灸杂志*, 2021, 40(5):640–646.
- Cheng M, Zhang X, Shi YL, et al. A survey of acupoint location in experimental rats and mice[J]. *Shanghai J Acupunct Moxibustion*, 2021, 40(5):640–646.
- [13] 代 妮. 电针对小鼠脊髓损伤后炎症反应和氧化应激的作用及机制研究[D]. 重庆:重庆医科大学, 2020.
- Dai N. Effects and mechanisms of electroacupuncture on inflammatory response and oxidative stress in mice with spinal cord injury[D]. Chongqing:Chongqing Medical University, 2020.
- [14] 刘彩丽, 王颖璞. TNF- α /NF- κ B 信号通路在依那西普缓解大鼠类风湿性关节炎中的作用[J]. *中国应用生理学杂志*, 2017, 33(4):373–376.
- Liu CL, Wang YY. Effects of TNF- α /NF- κ B signaling pathway on etanercept alleviating rheumatoid arthritis[J]. *Chin J Appl Physiol*, 2017, 33(4):373–376.
- [15] Zhao JJ, Yan Y, Zhen SQ, et al. LY294002 alleviates bone cancer pain by reducing mitochondrial dysfunction and the inflammatory response[J]. *Int J Mol Med*, 2023, 51(5):201–210.
- [16] Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, et al. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains[J]. *J Neurotrauma*, 2006, 23(5):635–659.
- [17] 杨 婷. 凝血酶促进脊髓星形胶质细胞 MIF 产生的机制研究[D]. 南通:南通大学, 2022.
- Yang T. Mechanism by which thrombin induces proinflammatory MIF production in spinal cord astrocytes[D]. Nantong: Nantong University, 2022.
- [18] 释传根. 电针结合慈经音乐疗法治疗抑郁症的临床研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2010.
- Shi CG. Clinic research on metta-music electro-acupuncture treatment against depression[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2010.
- [19] 李晓宁, 迟 蕾. 夹脊配合督脉电针治疗脊髓损伤后功能障碍临床观察[J]. *上海针灸杂志*, 2015, 34(10):972–975.
- Li XN, Chi L. Clinical observations on electroacupuncture at Huatuo Jiaji points and du meridian points for spinal cord injury-induced dysfunction[J]. *Shanghai J Acupunct Moxibustion*, 2015, 34(10):972–975.
- [20] 胡华辉, 黄小龙, 刘 飞, 等. 电针夹脊穴治疗脊髓损伤机制的实验研究进展[J]. *上海针灸杂志*, 2016, 35(12):1480–1483.
- Hu HH, Huang XL, Liu F, et al. Advances in experimental studies on the mechanism of Huatuo Jiaji (ex-B2) point acupuncture treatment for spinal cord injury[J]. *Shanghai J Acupunct Moxibustion*, 2016, 35(12):1480–1483.
- [21] Zhao HD, Zong XQ, Li L, et al. Electroacupuncture inhibits neuroinflammation induced by astrocytic necroptosis through RIP1/MLKL/TLR4 pathway in a mouse model of spinal cord injury[J]. *Mol Neurobiol*, 2024, 61(6):3258–3271.
- [22] Vorobjeva NV, Chernyak BV. NETosis: Molecular mechanisms, role in physiology and pathology[J]. *Biochemistry*, 2020, 85(10):1178–1190.
- [23] Lafont E, Draber P, Rieser E, et al. TBK1 and IKK ϵ prevent TNF-induced cell death by RIPK1 phosphorylation[J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(12):1389–1399.
- [24] Fischer FA, Demarco B, Min FCH, et al. TBK1 and IKK ϵ prevent premature cell death by limiting the activity of both RIPK1 and NLRP3 death pathways[J]. *Sci Adv*, 2025, 11(10):eadq1047.
- [25] Davis WJ, Lehmann PZ, Li WM. Nuclear PI3K signaling in cell growth and tumorigenesis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2015, 3:24.
- [26] Horiuchi T, Mitoma H, Harashima SI, et al. Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents[J]. *Rheumatology*, 2010, 49(7):1215–1228.

(收稿:2025-09-30;修回:2025-11-16;录用:2025-11-18)

(责任编辑:周一青)

本文引用格式:

邢珂晗, 黄思琴, 唐成林, 等. 电针“夹脊”穴调控 PI3K/AKT/TNF- α 信号通路抑制小鼠脊髓损伤后 NF- κ B 诱导的 A1 型神经毒性星形胶质细胞的分化[J]. *重庆医科大学学报*, 2026, 51(9):1235–1244.