

瞿思颖,王涵芝,胡群祺,等. 电针对糖尿病神经痛模型大鼠痛觉敏化及脊髓小胶质细胞 BDNF 表达的影响[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(3): 307-313.

Qu SY, Wang HZ, Hu QQ, et al. Effects of electroacupuncture on pain sensitization and BDNF expression in spinal microglia in rats with diabetic neuropathic pain [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(3): 307-313.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.03.003

电针对糖尿病神经痛模型大鼠痛觉敏化及脊髓小胶质细胞 BDNF 表达的影响

瞿思颖¹, 王涵芝¹, 胡群祺¹, 邵昭霞^{1,2,3}, 费雪瑜^{1,2,3}, 蒋永亮^{1,2,3,4},
方剑乔^{1,2,3,4*}, 何晓芬^{1,2,3,4*}

(1. 浙江中医药大学第三临床医学院康复医学院, 杭州 310053; 2. 浙江中医药大学针灸研究所, 杭州 310053;
3. 浙江省针灸神经病学研究重点实验室, 杭州 310053; 4. 浙江中医药大学附属第三医院, 杭州 310005)

【摘要】 目的 观察糖尿病神经痛(diabetic neuropathic pain,DNP)大鼠 L₄-L₆ 脊髓背角中小胶质细胞和脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)表达的变化及电针对其干预作用,探讨小胶质细胞和 BDNF 是否参与电针镇痛。**方法** SD 大鼠分为正常组(N组),模型组(M组),电针组(EA组),每组 10 只。EA 组于第 6 周开始电针双侧足三里和昆仑穴,每次 30 min,隔日 1 次,干预 7 次。分别检测各组大鼠的基础(base)、4 周(4 weeks)、6 周(6 weeks)、8 周(8 weeks)空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、热痛阈(thermal paw withdrawal latency, PWL)和机械痛阈(paw withdrawal thresholds, PWT)变化;于 8 weeks 应用免疫荧光法检测大鼠 L₄-L₆ 脊髓背角小胶质细胞和 BDNF 蛋白的表达。**结果** (1)6 weeks、8 weeks 时,M 组和 EA 组 FBG 较 N 组显著升高,EA 组 FBG 较 M 组无明显变化;(2)6 weeks、8 weeks 时,M 组 PWL 和 PWT 较 N 组显著下降;8 weeks 时,EA 组 PWL 和 PWT 较 M 组显著升高;6 weeks 时,EA 组 PWL 和 PWT 与 M 组无明显差异;(3)M 组大鼠 L₄-L₆ 脊髓背角 CD11b(小胶质细胞标记物)和 BDNF 平均光密度值较 N 组显著升高,EA 组大鼠 L₄-L₆ 脊髓背角 CD11b(小胶质细胞标记物)和 BDNF 平均光密度值较 M 组显著下降。**结论** 脊髓背角小胶质细胞和 BDNF 可能参与了大鼠糖尿病神经痛的产生与维持,电针可能通过减少 DNP 大鼠脊髓背角小胶质细胞表达和 BDNF 的表达产生镇痛作用。

【关键词】 糖尿病神经痛;电针;免疫荧光;小胶质细胞;脑源性神经营养因子

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)03-0307-07

Effects of electroacupuncture on pain sensitization and BDNF expression in spinal microglia in rats with diabetic neuropathic pain

QU Siying¹, WANG Hanzhi¹, HU Qunqi¹, TAI Zhaoxia^{1,2,3}, FEI Xueyu^{1,2,3}, JIANG Yongliang^{1,2,3,4},
FANG Jianqiao^{1,2,3,4*}, HE Xiaofen^{1,2,3,4*}

(1. Third Clinical Medical College and Rehabilitation Medical College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China.
2. Institute of Acupuncture and Moxibustion, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053.
3. Key Laboratory of Acupuncture and Neurology of Zhejiang Province, Hangzhou 310053.

【基金项目】 国家自然科学基金(81804181, 81774389),浙江省自然科学基金(LQ17H270003),国家级大学生创新创业训练计划项目(201910344054),浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划项目(2019R410017)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81804181, 81774389), Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (LQ17H270003), National Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program(201910344054), Science and Technology Innovation Program for College Students in Zhejiang Province (New Miao Talents Program)(2019R410017).

【作者简介】 瞿思颖(1997—),女,在读本科生,研究方向:主要从事针刺镇痛研究。Email:673394504@qq.com

【通信作者】 何晓芬(1986—),女,硕士,实验师,研究方向:主要从事针刺镇痛研究。Email:zhxf1986@163.com;

方剑乔(1961—),男,教授,博士生导师,研究方向:主要从事针刺镇痛及免疫相关性疾病的研究。Email:fangjianqiao7532@163.com。

* 共同通信作者

4. the Third Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310005)

Corresponding author: HE Xiaofen. E-mail: zjhx1986@163.com; FANG Jianqiao. E-mail: fangjianqiao7532@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the underlying mechanisms of the analgesic effect of electroacupuncture (EA), we assessed the effect of EA on microglial activation and the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the L₄-L₆ spinal cord in rats with diabetic neuropathic pain (DNP). **Methods** SD rats were divided into a normal group (N group), a model group (M group), and an EA group (EA group). The rats in the EA group were treated with EA at “Zusanli” (ST36) and “Kunlun” (BL60) starting on week 6, with 30 min per session, once every other day for 7 sessions. Fasting blood glucose (FBG), thermal paw withdrawal latency (PWL), and paw withdrawal thresholds (PWT) were measured at baseline, 4 weeks, 6 weeks, and 8 weeks. Immunofluorescence was used to measure the expression of microglia (CD11b) and BDNF in samples from the L₄-L₆ spinal cord. **Results** 1) Compared with that in the N group, FBG was significantly increased in the M group and the EA group, and there was no significant difference in FBG between the M group and the EA group at 6 weeks and 8 weeks. (2) Compared with that in the N group, the PWL and PWT were significantly decreased in the M group at 6 weeks and 8 weeks. After EA treatment, compared with that in the M group, the PWL and PWT in the EA group were significantly increased at 8 weeks. there was no significant difference in PWL and PWT between the M group and the EA group at 6 weeks. (3) Compared with that in the N group, the expression of microglia (CD11b) and BDNF in the M group were increased significantly, and compared with that in the M group, the expression of microglia (CD11b) and BDNF were significantly decreased in the EA group. **Conclusions** The result suggest that microglia and BDNF in the spinal cord might be involved in the development of DNP. The analgesic effect of EA might be achieved by inhibition of the expression of microglia and BDNF.

【Keywords】 diabetic neuropathic pain; electroacupuncture; immunofluorescence; microglia; brain-derived neurotrophic factor

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

糖尿病患病人数日益增多,糖尿病引起的并发症^[1]已成为影响患者生存质量的主要因素^[2]。糖尿病神经痛(diabetic neuropathic pain,DNP)一种常见的糖尿病并发症,主要表现为轻度刺激引起的自发性痛觉过敏和轻微触觉等无害刺激引起的异常性疼痛^[3],有研究表明小胶质细胞在糖尿病神经痛的产生与维持中发挥重要作用,已成为治疗 DNP 的重要靶点^[4],DNP 大鼠腰段脊髓背角小胶质细胞激活以及数量增加^[5-6],鞘内注射小胶质细胞抑制剂米诺环素抑制 DNP 大鼠痛觉过敏^[7]。脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor,BDNF)在疼痛、炎症和继发性损伤中发挥重要的作用,初步研究发现小胶质细胞释放脑源性神经营养因子参与 DNP 的产生维持^[8-9]。针刺是目前控制神经病理疼痛的主要手段之一^[10],有实验研究结果表明在大鼠足三里、昆仑穴进行低频电针干预能有效减轻 DNP 大鼠热痛过敏反应^[11]。有报道电针可通过抑制脊髓小胶质细胞的活化,减轻坐骨神经压迫性损伤引起的神经痛敏化反应^[12];也有报道电针可通过干预脑缺血大鼠皮质 BDNF 的合成和分泌改善大脑缺血再灌注损伤^[13],但电针能否通过减少 DNP 大鼠脊髓背角小胶质细胞和 BDNF 的表达产生镇痛

作用尚有待明确。

本实验旨在通过建立糖尿病神经痛大鼠模型,观察大鼠 L4-L6 脊髓背角中 CD11b(小胶质细胞活化标记物)和 BDNF 表达的变化,探讨脊髓背角小胶质细胞和 BDNF 是否参与电针镇痛。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

30 只 5 周龄清洁级健康雄性 SD 大鼠,体重约 150 g,购于中国科学院上海实验动物中心【SCXK(沪)2018-0006】,饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心【SYXK(浙)2018-0012】。饲养期间各组大鼠自由饮水,正常组大鼠饲喂啮齿类动物标准颗粒饲料,模型组大鼠饲喂高脂高糖饲料,具体饲料配方参考寿^[14]。饲养环境:昼夜明暗各半循环照明,湿度恒定,温度维持在 22 ~ 26℃。所有动物实验操作均严格遵守实验动物伦理管理条例,并经过浙江中医药大学实验动物伦理委员会许可(伦理审批号为:IACUC-20180319-13)。

1.1.2 实验试剂与仪器

链脲佐菌素,STZ(Sigma,美国,S0130);小鼠抗

CD11b 抗体 (BIO-red, 美国, MCA275GA); 兔抗 BDNF 多克隆抗体 (Alomone, 以色列, ANT-010); 驴抗兔 Alexa Fluor488 IgG (H+L) 二抗 (Jackson, 美国, 批号 711-545-152); 驴抗小鼠 Alexa Fluor647 IgG (H+L) 二抗 (Jackson, 美国, 批号 715-605-150); 驴血清 (Solarbio, 中国, SL034)。

韩氏穴位神经刺激仪 (北京华卫产业开发公司, HANS 200E, 中国); 动态足底触觉仪 (Ugo Basile 公司, 37450, 意大利); 足底热辐射测痛仪 (Ugo Basile 公司, 37360, 意大利); 冰冻切片机 (Thermo Fisher Scientific 公司, CryoStar NX50, 美国); 激光共聚焦显微镜 (Nikon 公司, A1R, 日本); 罗氏卓越型血糖仪 (Roche Diagnostics GmbH 公司, 德国)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组及实验干预

大鼠随机分为正常组 (N group): 饲喂啮齿类动物标准颗粒饲料饲养, 仅予以腹腔注射 1 mL 的柠檬酸缓冲液; 模型组 (M group): 予以高脂高糖饲料饲养 4 周后, 禁食 16 h, 予以腹腔注射 35 mg/kg 链脲佐菌素; 电针组 (EA group): 予以高脂高糖饲料饲养。喂 4 周后, 禁食 16 h, 予以腹腔注射 35 mg/kg 链脲佐菌素, 并于链脲佐菌素注射 2 周后 (即 6 周) 予以电针治疗, 隔天 1 次, 持续 2 周, 共治疗 7 次。方法: 首先对大鼠予以固定, 选用双侧“足三里”“昆仑”穴, 采用 0.25 mm×13 mm 的毫针, 进针后连接韩氏穴位神经刺激仪, 设置电针参数如下: 频率 2 Hz, 强度 1 ~ 2 mA, 共干预 30 min。每组 10 只。

1.2.2 空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG) 检测

分别在基础 (base)、4 周 (4 weeks)、6 周 (6 weeks)、8 周 (8 weeks) 这 4 个时间点, 对大鼠均禁食不禁水 8 h 后检测大鼠的空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG)。剪尾尖用尾静脉采血, 用血糖仪对各组大鼠的空腹血糖进行检测。

1.2.3 热痛阈 (thermal paw withdrawal latency, PWL) 检测

采用足底热辐射测痛仪检测各组大鼠的热痛阈 (thermal paw withdrawal latency, PWL)。将大鼠放在透明的有机玻璃格子内, 适应约 30 min, 待其安静后, 将足底热辐射测痛仪的测试仪上的, “十”字形标记置于大鼠的足底跖部无毛区, 避开足垫, 从热源开始照射大鼠, 至大鼠出现抬足、舔脚反应时的时间为热痛阈。以 20 s 作为最高痛阈, 以免足爪受损。痛阈测定时每组循环测定 5 次, 每次间隔 5

min, 去除极大值和极小值后计算 3 次平均值作为大鼠 PWL。

1.2.4 机械痛阈 (paw withdrawal thresholds, PWT) 检测

机械痛阈 (Paw withdrawal thresholds, PWT) 检测方法: 取单侧平均值作为大鼠机械痛觉异常的指标。于正式测量前, 将大鼠置于透明的塑料盒内适应环境约 30 min, 直至大鼠停止梳理毛发和探索性活动并安静后开始测量。避开足垫, 将类 Von Frey 丝的金属丝置于大鼠后足中央, 启动与金属丝相连的机械泵, 金属丝即以恒定速度自动上抬, 刺激力量从 0 g 开始以 2.5 g/s 递增, 对大鼠足底施加持续的机械刺激, 直至大鼠产生缩腿反应。最大刺激力量设定为 50 g, 以免损伤大鼠足爪。每次检测间隔 5 min, 总共测 5 次, 去极大值和极小值后计算 3 次平均值作为最终检测值。

1.2.5 免疫荧光法检测大鼠脊髓背角 CD11b 和 BDNF 荧光强度的表达

8 周时检测好各组大鼠痛阈后, 每组取 3 只大鼠, 用戊巴比妥 (40 mg/kg, BW) 予以麻醉, 用 4℃ 预冷的生理盐水经左心室、升主动脉快速灌注至大鼠肝脏变白, 再先快后慢推注 4% 多聚甲醛。快速冲出腰段脊髓, 将脊髓放于 4% 多聚甲醛后固定 6 h, 然后置于 15% 和 30% 的蔗糖溶液梯度脱水, 经液氮快速冷冻后, 放于 -80℃ 冰箱保存。

大鼠腰段脊髓节段行厚度为 30 μm 的冰冻切片。用 TBST 漂洗脊髓切片 10 min×3 次, 10% 驴血清 37℃ 孵育 1 h。孵育完成后, 将切片转移至含 10% 驴血清的 TBST 稀释的兔抗 BDNF 抗体 (稀释比例 1:400) 和小鼠抗 CD11b 抗体 (稀释比例 1:600) 中 4℃ 孵育过夜, 次日将切片 37℃ 复温 1 h, TBST 漂洗 10 min×6 次, 然后将切片置于含 10% 驴血清的 TBST 稀释的驴抗兔 Alexa Fluor488 IgG (H+L) 二抗 (稀释比例: 1:600) 和驴抗小鼠 Alexa Fluor647 IgG (H+L) 二抗 (稀释比例: 1:800) 中予以 37℃ 孵育 1 h, TBST 漂洗 10 min×6 次。将切片转移至黏附载玻片, 风干, 滴加抗荧光淬灭液后, 缓慢盖上载玻片完成封片。在激光共聚焦显微镜下观察脊髓切片并拍片。每组大鼠 3 只大鼠, 每只大鼠选取 3 ~ 5 张脊髓切片, 激光共聚焦显微镜扫描所得图像用计算机辅助图像分析软件系统 (Image J 软件) 对图片进行分析, 计算免疫阳性反应的平均光密度值, 把正常组的相对表达量作为 1 的倍数, 其他

相对正常组的比值(增加倍数)则作为该组平均光密度值的结果^[15]。

1.3 统计学分析

所有数据均用 SPSS 22.0 处理,结果用平均值 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm s\bar{x}$)表示,多组间比较使用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 大鼠空腹血糖(FBG)变化

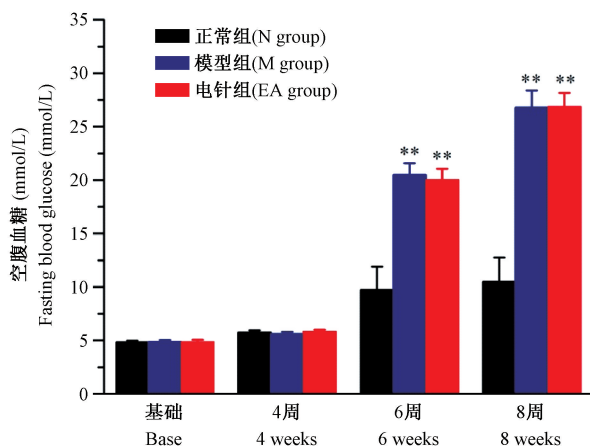
各组大鼠不同时间点 FBG 结果如图 1 所示,各组大鼠基础(base)血糖及 4 周(4 weeks)时的血糖差异无显著性;在 6 周(6 weeks)和 8 周(8 weeks)时,模型组(M group)及电针组(EA group)大鼠 FBG 明显上升($P < 0.01$; $P < 0.01$)。

2.2 大鼠热痛阈(PWL)变化

各组大鼠不同时间点热痛阈(PWL)结果如图 2 所示。各组大鼠基础(base) PWL 及 4 周(4 weeks)时的 PWL 差异无显著性;6 周(6 weeks)时,模型组(M group)及电针组(EA group)大鼠 PWL 明显下降($P < 0.01$; $P < 0.01$);8 周(8 weeks)时,电针组(EA group)大鼠 PWL 明显上升($P < 0.01$)。

2.3 大鼠机械痛阈(PWT)变化

各组大鼠不同时间点机械痛阈(PWT)结果如图 3 所示。各组大鼠基础(base) PWT 及 4 周(4 weeks)时的 PWT 差异无显著性;6 周(6 weeks)时,模型组(M group)及电针组(EA group)大鼠 PWT 明显下降($P < 0.01$; $P < 0.01$);8 周(8 weeks)时,电针组(EA group)大鼠 PWT 明显上升($P < 0.01$)。

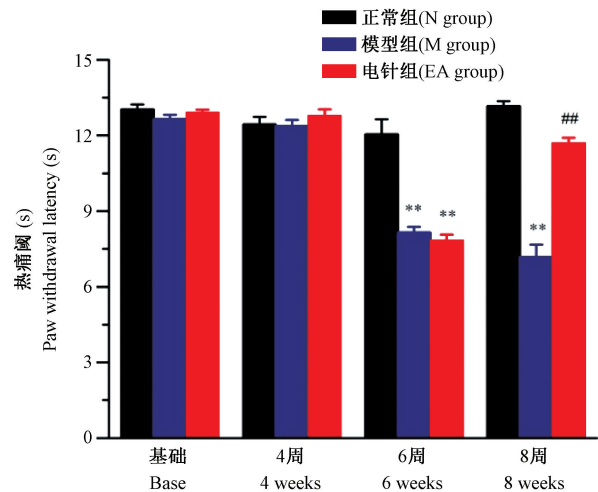


注:与正常组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 1 大鼠血糖变化

Note. Compared with the N group, ** $P < 0.01$.

Figure 1 Changes of fasting blood glucose in rats



注:与正常组比较, ** $P < 0.01$ 。与模型组比较, ## $P < 0.01$ 。(下同)

图 2 各组大鼠热痛阈变化情况

Note. Compared with the N group, ** $P < 0.01$. Compared with the M group, ## $P < 0.01$. (The same in the following Figures)

Figure 2 Changes of paw withdrawal latency in rats

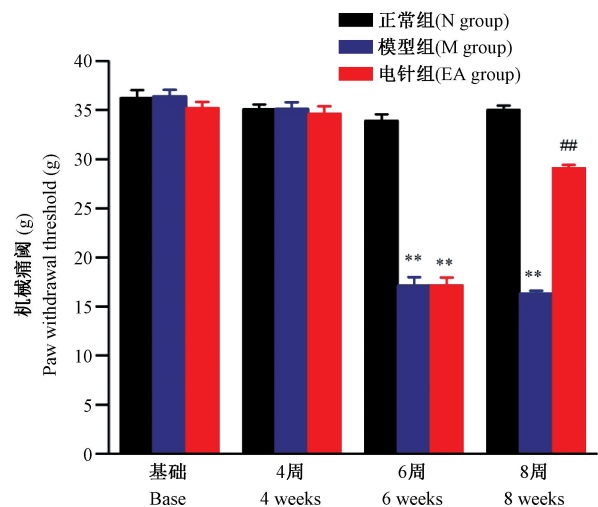


图 3 各组大鼠机械痛阈变化情况

Figure 3 Changes of paw withdrawal threshold in rats

2.4 大鼠脊髓背角小胶质细胞 CD11b 的表达

采用免疫荧光法观察各组大鼠脊髓背角小胶质细胞 CD11b 的表达。各组大鼠脊髓背角 I-II 层上 CD11b 荧光染色代表图(图 4A)和各组大鼠在脊髓背角 I-II 层上 CD11b 平均光密度值统计结果(图 4B)。与 N group 比较, M group 大鼠脊髓背角 I-II 层上 CD11 平均光密度显著升高($P < 0.01$);与 M group 比较, EA group 大鼠脊髓背角 I-II 层上 CD11 平均光密度显著降低($P < 0.01$)。

2.5 大鼠脊髓背角 BDNF 的表达

采用免疫荧光法检测大鼠脊髓背角 BDNF 的表达。与 N 组比较, M 组大鼠脊髓背角 I -II 层上 BDNF 荧光强度显著升高 ($P < 0.01$); 与 M 组比较, EA 组大鼠脊髓背角 I -II 层上 BDNF 荧光强度显著降低 ($P < 0.01$)。各组大鼠脊髓背角 I -II 层上 BDNF 阳性细胞代表图(图 5A)和各组大鼠在脊髓

背角 I -II 层上 BDNF 荧光强度(图 5B)。

2.6 BDNF 在脊髓背角小胶质细胞表达

免疫荧光双标实验结果如图 6 所示。BDNF 阳性细胞表达显示为绿色, 小胶质细胞 (CD11b) 阳性细胞表达显示为红色, BDNF 和 CD11b 免疫荧光双标的阳性细胞呈黄绿色, 表明糖尿病神经痛诱导大鼠脊髓背角小胶质细胞产生 BDNF。

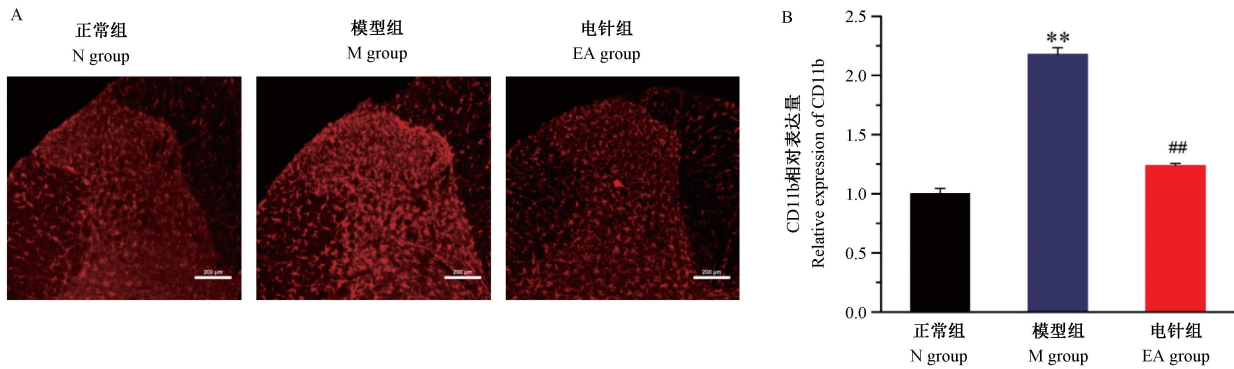


图 4 大鼠脊髓背角 CD11b 相对表达量(免疫荧光染色, 标尺=200 μm)

Figure 4 Relative expression of CD11b in spinal cord of rats (Immunofluorescence staining, Bar=200 μm)

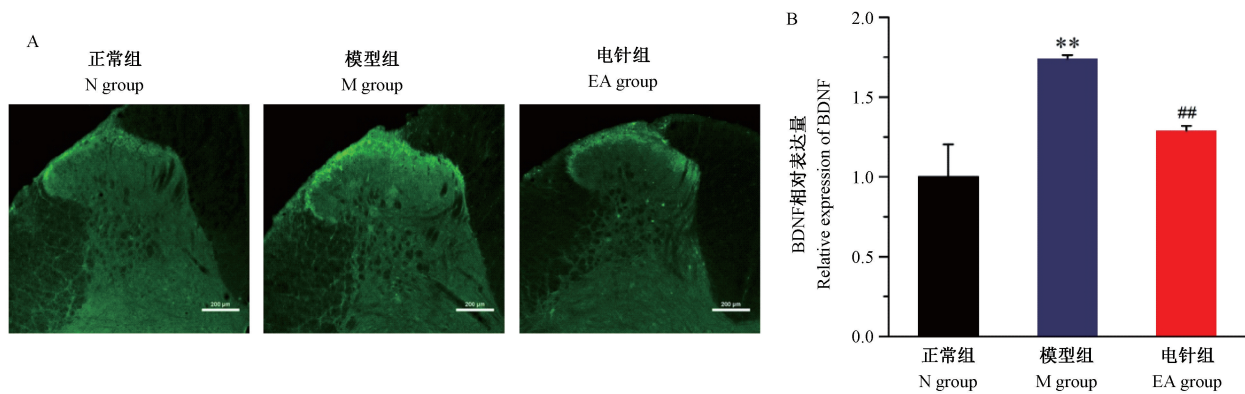


图 5 大鼠脊髓背角 BDNF 相对表达量(免疫荧光染色, 标尺=200 μm)

Figure 5 Relative expression of BDNF in spinal cord of rats (Immunofluorescence staining, Bar=200 μm)

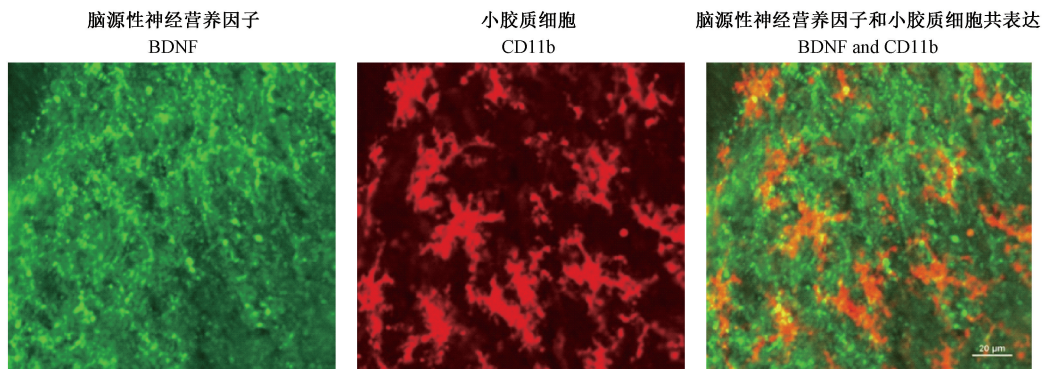


图 6 BDNF 和小胶质细胞共表达(免疫荧光染色, 标尺=20 μm)

Figure 6 Co-expression of BDNF and microglia in spinal cord (Immunofluorescence staining, Bar=20 μm)

3 讨论

糖尿病神经痛的定义为糖尿病患者外周体感觉系统异常直接引起的疼痛^[16]。糖尿病神经疼痛的发病机制尚未有公认,目前针对性的药物治疗旨在通过给予抗抑郁药和抗惊厥药等来缓解症状,但药物的使用受到副作用和耐受性的限制。临床研究表明,电针是治疗糖尿病神经病理痛的有效非药物疗法之一,且 2 Hz 的低频电针比 100 Hz 更能有效抑制糖尿病神经痛敏化反应^[11]。

小胶质细胞在正常条件下处于静止状态,周围炎症、高血糖症和由此产生的活性氧物质可影响脊髓中的局部微环境^[4]使小胶质细胞被迅速激活。利用链脲佐菌素引起的糖尿病神经痛模型中小胶质细胞的活化表现为细胞体肥大、细胞数量增加和小胶质细胞标记物染色水平增加^[17],如本文中使用的分化簇 11b(CD11b)就是小胶质细胞特异性标记物之一^[18]。本实验研究结果显示 M 组大鼠 L₄-L₆ 脊髓背角 CD11b 平均光密度值较正常组显著升高,电针干预后 CD11b 平均光密度明显下降。这表明脊髓小胶质细胞参与糖尿病神经痛产生与维持,脊髓小胶质细胞可能参与电针镇痛。

脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 可促进神经系统中神经元的增殖营养存活,并可介导突触形成和轴突可塑性^[19]。近年来一系列的研究发现脑源性神经营养因子与神经病理痛密切相关,在神经病理痛的发生发展中发挥着极其关键的作用^[20]。坐骨神经痛大鼠^[21]与糖尿病神经痛大鼠^[22]中小胶质细胞源性 BDNF 表达比正常组高,向糖尿病神经痛大鼠鞘内注射 BDNF 可减轻机械痛与热痛觉过敏^[23]。本实验研究发现模型组大鼠脊髓背角 BDNF 平均光密度较正常组显著升高,电针干预后 BDNF 平均光密度显著下降。有研究报道脑源性神经营养因子被 ATP 刺激后从小胶质细胞中释放出来,是小胶质细胞和神经元之间的关键信号分子,可以阻断脊髓中异常的伤害性过程^[24]。同时 BDNF 的释放反过来可以诱导激活小胶质细胞并促进小胶质细胞迁移,BDNF 还可调节小胶质细胞的增殖存活和细胞动力学^[25]。有研究发现 BDNF 通过激活脊髓小胶质细胞可促进脊髓神经元的增强和机械超敏反应,从而在神经元再生过程中影响周围的环境^[26-27]。本实验免疫荧光双标实验结果显示 BDNF 与小胶质细胞

(CD11) 存在共表达。

本实验结果表明,低频电针对糖尿病神经痛大鼠血糖无明显作用,可提高糖尿病神经痛大鼠的热痛阈和机械痛阈,免疫荧光结果显示 M 组大鼠脊髓背角小胶质细胞表面标记物 CD11b 以及 BDNF 表达明显增多;电针可明显抑制 M 组大鼠脊髓背角小胶质细胞和 BDNF 的表达。综上所述,脊髓背角小胶质细胞 BDNF 参与糖尿病神经痛的产生与维持;低频电针可显著改善糖尿病神经痛,其可能的机制是抑制脊髓背角小胶质细胞 BDNF 的表达。本研究结果部分阐明了低频电针治疗糖尿病神经痛的作用机制。

参 考 文 献 (References)

- [1] Naranjo C, Del RL, Moratalla G, et al. Anxiety, depression and sleep disorders in patients with diabetic neuropathic pain: a systematic review [J]. *Expert Rev Neurother*, 2019, 8(14): 1-9.
- [2] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2017 年版) [J]. *中国实用内科杂志*, 2018, 38(4): 292-344. Chinese Diabetes Society. Guidelines for the prevention and treatment of type 2 diabetes in China (2017) [J]. *Chin J Pract IntMed*, 2018, 38(4): 292-344.
- [3] Sun Q, Zhang BY, Zhang PA, et al. Downregulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase contributes to diabetic neuropathic pain through upregulation of toll-like receptor 4 in rats [J]. *Mol Pain*, 2019, 15:1-12.
- [4] Wang D, Couture R, Hong Y. Activated microglia in the spinal cord underlies diabetic neuropathic pain [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 728(1): 59-66.
- [5] Cheng KI, Wang HC, Chuang YT, et al. Persistent mechanical allodynia positively correlates with an increase in activated microglia and increased P-p38 mitogen-activated protein kinase activation in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Eur J Pain*, 2014, 18(2): 162-173.
- [6] Wodarski R, Clark AK, Grist J, et al. Gabapentin reverses microglial activation in the spinal cord of streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Eur J Pain*, 2009, 13(8): 807-811.
- [7] Morgado C, Pereira-Terra P, Cruz CD, et al. Minocycline completely reverses mechanical hyperalgesia in diabetic rats through microglia-induced changes in the expression of the potassium chloride co-transporter 2 (KCC2) at the spinal cord [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2011, 13(2): 150-159.
- [8] Rachel W, Anna KC. Gabapentin reverses microglial activation in the spinal cord of streptozotocin induced diabetic rats [J]. *Eur J Pain*, 2009, 13(8): 807-811.
- [9] Makoto T, Hidetoshi TS, Kazuhide I. Purinergic system, microglia and neuropathic pain [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2012, 12(1): 74-79.
- [10] Sun KK, Hak JM, Jung HP, et al. The maintenance of

- individual differences in the sensitivity of acute and neuropathic pain behaviors to electroacupuncture in rats [J]. *Brain Res Bull*, 2007, 74(5): 357-360.
- [11] He XF, Wei JJ, Shou SY, et al. Effects of electroacupuncture at 2 and 100 Hz on rat type 2 diabetic neuropathic pain and hyperalgesia-related protein expression in the dorsal root ganglion [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2017, 18(3): 239-248.
- [12] 李思思, 谷鹏鹏, 屠文展, 等. 电针对神经病理性疼痛大鼠脊髓小胶质细胞活化的影响 [J]. *中国针灸*, 2017, 37(4): 411-416.
- Li SS, Gu PP, Tu WZ, et al. Effects of electroacupuncture on activation of microglia cells in spinal cord in rats with neuropathic pain [J]. *Chin Acupunct Moxib*, 2017, 37(4): 411-416.
- [13] 赵嘉培, 黄丹霞, 黄赛娥, 等. 电针“曲池”和“足三里”对脑缺血大鼠皮质突触素、脑源性神经营养因子表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(11): 1099-1106.
- Zhao JP, Huang DX, Huang SE, et al. Effect of electroacupuncture at Quchi and Zusanli acupoint on the expressions of cortical synaptophysin and brain-derived neurotrophic factor in cerebral ischemia rats [J]. *Chin J Arterioscl*, 2017, 25(11): 1099-1106.
- [14] 寿升芸, 魏骏骏, 何晓芬, 等. 低频电针对 2 型糖尿病神经痛大鼠 DRG P2X3 受体的抑制作用 [J]. *中国实验动物学报*, 2017, 25(1): 54-59.
- Shou SY, Wei JJ, He XF, et al. Inhibitory effect of low frequency electroacupuncture on the P2X3 receptor in dorsal root ganglion of rats suffering from type II diabetic neuropathic pain [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2017, 25(1): 54-59.
- [15] Xiang XE, Wang SS, Shao FB, et al. Electroacupuncture stimulation alleviates CFA-induced inflammatory pain via suppressing P2X3 expression [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(13): 3248-3265.
- [16] Ochoa JL. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes [J]. *Neurology*, 2009, 72(14): 1630-1635.
- [17] Makoto T. Microglia in the spinal cord and neuropathic pain [J]. *J Diabetes Investig*, 2016, 7(1): 17-26.
- [18] Garcia MY, Jay TR, Checkley MA, et al. Immortalization of primary microglia: a new platform to study HIV regulation in the central nervous system [J]. *J Neurovirol*, 2017, 23(1): 47-66.
- [19] Shin MK, Kim HG, Kim KL. A novel trimeric peptide, Neuropep-1-stimulating brain-derived neurotrophic factor expression in rat brain improves spatial learning and memory as measured by the Y-maze and Morris water maze [J]. *J Neurochem*, 2011, 116(2): 205-216.
- [20] 廖斐斐, 耿山景, 刘小旦, 等. 脊神经结扎诱导神经病理痛大鼠脊髓背角 BDNF 的含量和表达上调 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2009, 15(3): 162-165.
- Liao PP, Geng SJ, Liu XD, et al. Upregulation of the Brain-derived Neurotrophic factor in the Spinal Dorsal horn of Neuropathic rats induced by spinal Nerve Ligation [J]. *Chin J Pain Med*, 2009, 15(3): 162-165.
- [21] Aline CG, Fabio MS, Joyce TS, et al. Neural mobilization treatment decreases glial cells and brain-derived neurotrophic factor expression in the central nervous system in rats with neuropathic pain induced by CCI in rats [J]. *Pain Res Manage*, 2017, 2017: 1-9.
- [22] 赵仲柏, 薛庆生, 于布为. 脑源性神经营养因子-B 型酪氨酸激酶受体-钾氯共转运体 2 信号通路在大鼠糖尿病周围神经痛机制中的作用 [J]. *上海医学*, 2012, 35(10): 873-877.
- Zhao ZB, Xue QS, Yu BW. Role of brain derived neurotrophic factor-tyrosinekinase receptor B-potassium-chloride cotransporter pathway in mechanisms of painful diabetic neuropathy in rats [J]. *Shanghai Med J*, 2012, 35(10): 873-877.
- [23] Li L, Yu T, Yu L, et al. Exogenous brain-derived neurotrophic factor relieves pain symptoms of diabetic rats by reducing excitability of dorsal root ganglion neurons [J]. *Int J Neurosci*, 2016, 126(8): 749-758.
- [24] Coull JA, Beggs S, Boudreau D, et al. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain [J]. *Nature*, 2005, 438(7070): 1017-1021.
- [25] Zhang J, Geula C, Lu C, et al. Neurotrophins regulate proliferation and survival of two microglial cell lines in vitro [J]. *Exp Neurol*, 2003, 183(2): 469-481.
- [26] Zhou LJ, Yang T, Wei X, et al. Brain-derived neurotrophic factor contributes to spinal long-term potentiation and mechanical hypersensitivity by activation of spinal microglia in rat [J]. *Brain Behav Immun*, 2010, 25(2): 322-334.
- [27] Zhang X, Zeng L, Yu T, et al. Positive feedback loop of autocrine BDNF from microglia causes prolonged microglia activation [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34(11): 715-723.

[收稿日期] 2019-10-18