

☆ XXXX ☆

筛选穴位局部刺激关联神经环路的现代研究技术进展

狄文惠^{1, 2, 3}, 黄可妮^{1, 2, 3}, 易立琛^{1, 2, 3}, 龙浩曦^{1, 2, 3}, 许能贵^{1, 2, 3}, 姚露露^{1, 2, 3}(¹广州中医药大学针灸康复临床医学院, 广州 510006; ²广州中医药大学华南针灸研究中心, 广州 510006; ³广东省中医针灸重点实验室, 广州 510006)

【摘要】 穴位与神经系统存在密切联系, 针刺穴位调控神经系统从而发挥疗效的具体作用机制是目前针刺研究领域的热点和难点之一。针刺对神经系统的调控涉及多靶点、多环节的神经反馈, 如何找到这个过程中的效应神经元是研究者首要关心的问题。本文以穴位和神经系统的关联为切入点, 从如何研究与穴位具有结构联系的神经元和如何研究与穴位具有功能联系的神经元两个主要方面入手, 介绍筛选针刺刺激的效应神经元的现代研究思路和方法。

【关键词】 针刺; 穴位; 神经环路; 神经示踪

Advances in modern techniques for screening acupoint-localized stimulation-associated neural circuits

Di Wen-hui^{1, 2, 3}, Huang Ke-ni^{1, 2, 3}, Yi Li-chen^{1, 2, 3}, Long Hao-xi^{1, 2, 3}, Xu Neng-gui^{1, 2, 3}, Yao Lu-lu^{1, 2, 3} (¹Clinical School of Acupuncture and Rehabilitation, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006; ²South China Research Center for Acupuncture and Moxibustion, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006; ³Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Acupuncture and Moxibustion, Guangzhou 510006)

【ABSTRACT】 Acupoints exhibit intricate bidirectional interactions with the nervous system. The specific mechanism of acupuncture regulating the nervous system and exerting the therapeutic effect is one of the hottest and most difficult aspects in the field of acupuncture research. The regulation of acupuncture on the nervous system involves multi-target and multi-link neurofeedback, and how to find the critical effector neurons in this process is the primary concern. This review introduces the modern paradigms and methodologies for screening acupuncture-responsive effector neurons starting from elucidation of structural and functional connectivity between acupoints and neurons.

【KEYWORDS】 Acupuncture; Acupoint; Neural circuit; Neural tracing

针刺作为传统的非药物疗法, 在治疗神经系统疾病方面展现出独特优势^[1]。越来越多学者将针刺视为一种神经刺激疗法或脑功能调控疗法^[2]。值得关注的是, 2016年美国国立卫生研究院提出的“刺激外周神经缓解疾病症状(SPARC)”计划, 虽以开发外周神经刺激装置为核心目标, 但其研究的神经调控原理与针刺通过体表穴位刺激调控神经系统达到治疗目的的高度契合^[3]。从作用载体来看, 穴位的结构和功能特征是针刺疗效产生的物质基础^[4]。解剖学研究显示穴位局部组织具有显著的同质性并且富含神经结构: 除了血管、淋巴管、肌肉、筋膜

等, 通常包含密集的神神经末梢、神经束、周围神经丛^[4]。神经示踪结果进一步验证穴位与神经系统和各脏腑存在神经支配关系^[5-6]。在此背景下, 大量围绕针刺神经调控效应的多维度机制研究已经展开。

1 针刺的神经调控机制研究概述

总体来说, 目前的机制研究发现针刺穴位的神神经调控效应通过如下三个层级实现: 外周神经系统(如背根神经节)、中枢脊髓和中枢脑区, 各层级通过特定神经元及分子机制介导针刺的临床疗效, 包括对神经元的形态及功能活动、神经递质释放、受

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20250407 狄文惠 首发上传 筛选穴位局部刺激关联神经环路的现代研究技术进展 (1)

引用格式: 狄文惠, 黄可妮, 易立琛, 等. 筛选穴位局部刺激关联神经环路的现代研究技术进展[J]. 针刺研究, XXXX, XX(X): 1-8.

项目来源: 国家自然科学基金面上项目(No.82474623, 82374573); 国家自然科学基金重点项目(No.82430125)

通信作者: 姚露露, E-mail: yaolulu@gzucm.edu.cn

体表达及基因转录等多级水平产生动态调节等^[7-10]。

尽管人们已认识到穴位局部具有神经结构,相关研究也解析了不同层级神经元介导的针刺效应,但大多数实验未能明确所研究的神经元与穴位处神经结构的关联,包括结构和功能联系,现有的证据无法全面、充分地证实针刺外周穴位可以通过神经传导通路对神经系统不同层级神经元进行调节进而产生效应。针对这个不足,针刺研究者需要明确所研究的神经元与穴位的结构和功能关系。2021年马秋富团队协同复旦大学王彦青和中国中医科学院景向红团队的研究成果登上《Nature》杂志。他们的研究所报道的PROKR2阳性感觉神经元位于背根神经节并且直接支配“足三里”穴区的深层筋膜,该类神经元的功能活动以及其神经纤维在身体不同区域的分布模式对于低强度电针“足三里”激活迷走神经-肾上腺抗炎通路至关重要。该项研究正是在PROKR2阳性感觉神经元与穴位具有紧密结构联系的基础上,解析神经元功能对针刺穴位效应的影响。从中我们得到启发:找到与穴位具有结构联系和功能联系的效应神经元可能是回答针刺穴位如何发挥神经调控效应问题的关键切入点。因此,如何筛选关键的效应神经元是首先要解决的一个问题。针对这个问题,本文将从穴位与神经系统存在联系的角度出发,探讨如何利用现代研究技术从结构和功能两个方面筛选受穴位局部刺激影响的神经元集群,运用现代科学的话语解读针刺原理,助力未来“针灸大科学计划”的实施^[11]。

2 从结构联系入手筛选效应神经元

结构联系是针刺穴位产生调控效应的重要基础。20世纪80年代,研究者首次使用辣根过氧化物酶(HRP)进行穴位示踪^[12],开启了通过神经示踪技术研究穴位局部神经结构联系的实验先河。从结构联系入手不仅能明确与穴位具有结构关联的神经元,还可定位其在传导通路中的层级位置,更可进一步揭示其与神经环路上下游节点的连接关系。然而传统的神经示踪剂(如辣根过氧化物酶、生物素化葡聚糖胺等)存在信号不稳定、方向不特异、跨突触后信号衰减严重等缺点^[13-14],目前应用逐渐减少。如今应用较多的传统神经示踪剂是霍乱毒素亚单位B(CTB)、荧光金(FG),注射后仅能逆行标记神经元胞体,无法实现跨突触示踪,使得应用这类传统示踪剂的实验大多局限在研究穴位和脏腑的非跨突触投射关系和揭示支配穴位的神经纤维

投射,未能涉及由多类型、多脑区神经元通过突触连接形成的复杂神经网络,导致这类实验无法更完整更广泛地研究与穴位具有结构联系的神经元集群或效应脑区。

随着20世纪90年代神经病毒示踪技术逐渐发展,如今研究者可利用重组神经病毒代替传统示踪剂,实现长期、稳定的逆向或顺向甚至是跨多级神经元示踪,达到更广泛地筛选、研究与穴位具有结构联系的神经元集群的实验目的。因此,掌握神经病毒示踪技术对于现今的针刺研究者而言尤为重要。

2.1 神经病毒示踪技术的原理

通过注射重组神经病毒进入穴位中,选择性地感染穴位局部神经细胞,结合荧光蛋白标记,追踪神经元胞体及它们的轴突投射区域,利用部分病毒可在宿主体内复制、扩散的活动特点,实现跨神经元示踪,结合显微成像技术,可视化神经元的形态结构及神经元之间的连接网络,精细刻画穴位与外周、中枢神经元之间的解剖学路径。

2.2 应用神经病毒示踪技术研究针刺相关效应神经元及环路联系

研究者可以应用神经病毒研究针刺由穴位到外周和中枢神经系统的传入效应、针刺对神经系统的效应、针刺由神经系统到靶器官的传出效应^[15],具体需根据研究目的选择不同传播方向和跨突触能力的病毒。总体来说,病毒示踪剂按跨突触能力和传播方向可分为4类:非跨突触病毒(仅表达于受感染神经元)、跨突触病毒(可跨突触传播至下一级神经元)分别对应顺行与逆行方向,即顺行非跨突触、逆行非跨突触、顺行跨突触、逆行跨突触病毒(表1)。

2.2.1 非跨突触病毒示踪

非跨突触病毒示踪可应用于研究穴位与靶器官、穴位与神经系统的直接投射关系以及研究神经元间直接投射关系。应用非跨突触病毒可找到针刺信号由穴位向神经系统传入的第一级神经元以及由神经系统直接传出到靶器官的“输出端”神经元(如运动神经元)^[16]。

在进行非跨突触示踪时,最常使用重组腺相关病毒(AAV),其所引起的免疫反应较弱,可在体内的长期稳定表达。在选择AAV病毒进行神经示踪时应区分不同血清型,它们决定了病毒载体对特定细胞类型和组织的感染效率和转导特性,例如AAV2-retro或AAV9-retro具有非常高效的逆行标

表1 穴位神经病毒示踪常选用病毒
Table 1 Tracing viruses commonly used in acupoint studies

神经示踪 方向分类	可选用病毒	研究应用	注射策略、病毒表达时间	毒性
顺行或逆行 非跨突触	腺相关病毒(AAV)	穴位与神经元、神经元之间直接投射联系	直接注射,需表达21 d, 持续表达数月	极小
顺行跨多突触	单纯疱疹病毒 (HSV-H129)	穴位与神经元、神经元之间跨多突触投射联系	直接注射,数小时内启动 表达, 持续表达5~7 d	高
	水疱性口炎病毒(VSV)	神经元之间跨多突触 投射联系	直接注射,数小时内启动 表达, 持续表达数日	高
	腺相关病毒血清型1(AAV1)		上游注射 AAV1-Cre 病毒, 下游 注射 Dio 病毒,需表达21 d	小
顺行跨单突触	腺相关病毒结合麦胚凝集素 (mWGA)	神经元之间跨单突触 投射联系	直接注射,需表达21 d	小
	敲除胸苷激酶(TK)的 单纯疱疹病毒 (HSV- Δ TK)		注射辅助病毒14 d后注射 HSV- Δ TK,持续表达数日	较高
逆行跨多突触	伪狂犬病病毒(PRV)	穴位与神经元、神经元之间跨多突触投射联系	数小时内启动表达,持续 数日	高
逆行跨单突触	敲除糖蛋白G的 伪狂犬病病毒(RV- Δ G)	神经元之间跨单突触 投射联系	注射辅助病毒14 d后注射 RV- Δ G,持续表达数日	较高

记能力、AAV-PHP.eB可以跨越血脑屏障。Jaehong Park等人将AAV2-retro病毒注射进实验鼠喉部,在延髓部疑核中逆行不跨突触示踪出一簇可控制喉咙发声的神经元^[16]。

2.2.2 逆行跨突触病毒示踪

逆行跨突触病毒可分为逆行跨多突触和逆行跨单突触。将逆行跨多突触病毒注射在穴位局部,可逆行跨多突触找到对穴位具有传出投射的神经元。对于靠近病灶局部的穴位,应用该方法进行示踪或可为针刺穴位的局部效应提供与神经刺激作用关联的结构性证据,筛选到潜在效应神经元。对于逆行跨多突触示踪,常选用伪狂犬病毒(PRV),它能够严格逆向跨多突触标记神经网络。Yao等将PRV注射进外周小鼠“廉泉”中,于初级运动皮层(M1)第五层发现一簇受病毒标记的神经元,证明中枢M1到外周“廉泉”的神经联系^[17]。张帆等将携带不同荧光蛋白的PRV病毒分别注射入胃与“内关”,观察不同颜色病毒在脑内核团的共标情况,发现前庭内侧核细胞旁部分(MVePC)、巨细胞网状核(Gi)、下丘脑室旁核(PVN)、未定带下核(SubI)神

经元均被不同颜色的病毒标记,整合“内关”、胃与脑的神经联系^[18]。

为了实现精准控制病毒跨突触的级数范围,工程化的狂犬病毒(RV Δ G)应运而生。这种病毒保留逆行传播能力但丧失跨突触的能力,以禽病毒包膜蛋白(EnvA)替换天然包膜糖蛋白G(GP),只有在哺乳动物神经元中补充表达识别受体(TVA)和外源性G蛋白时,RV Δ G病毒才可以感染这些神经元并实现单突触逆行追踪^[19]。目前研究主要应用工程化狂犬病毒明确受针刺调控的中枢脑区神经元之间的单突触结构联系。Wang等在中脑导水管周围灰质(PAG)注射RV-EnvA- Δ G、AAV-mDlx-Cre及Cre依赖的辅助病毒AAV-DIO-TVA和AAV-DIO-RVG,在弓状核(ARC)可见病毒标记的神经元胞体,证明ARC神经元可跨突触投射到PAG的GABA能神经元(释放 γ -氨基丁酸的抑制性神经元)^[20]。

2.2.3 顺行跨突触病毒示踪

相应地,顺行跨突触病毒可分为顺行跨多突触和顺行跨单突触。应用顺行跨多突触病毒可顺向

跨多突触找到与针刺信号传入相关的潜在效应神经元,然而目前相关的应用较少,研究者较多用其明确中枢脑区神经元之间的结构联系。在进行顺行跨多突触示踪时,可选用单纯疱疹病毒(HSV)、水疱性口炎病毒(VSV)。目前 HSV-1 型病毒的 H129 株被广泛用于顺行跨突触示踪包括外周到中枢以及中枢神经环路示踪,而 VSV 主要用于中枢神经环路示踪。Yao 等将 VSV 注射进 M1 脑区,顺行跨多突触研究 M1 的下游脑区^[17]。

对于顺行跨单突触示踪,目前主要应用于明确神经元之间的单突触联系,可选用的示踪策略包括 HSV- Δ TK 结合辅助病毒,以及经基因工程改造的高滴度的 AAV1 型病毒^[21],同时还可利用携带经基因工程改造的麦胚凝集素(WGA)组件的 AAV 病毒^[22]。

2.2.4 应用神经病毒示踪技术注意事项

对于上述病毒示踪实验,需要注意的问题主要包括实验操作本身和病毒特性两方面。

在实验操作方面:(1)为了保持实验结果的一致性,注射同一个穴位时需统一注射参数,如注射深度、注射位点、注射量等,可分多个注射深度、注射量进行预实验摸索,实验后在注射原位点取材观察,保证注射位点的一致。同时为了实验结果的可靠性,应保证同一个注射参数的样本量大于等于 3。(2)若在外周穴位注射病毒,往往用量较大且需多点注射,大多在 1~3 μ L^[23]。对于肌肉组织分布较少或处于关节凹陷中的穴位,如头部的百会、前肢的合谷等,注射病毒的难度较大,因此在进行穴位示踪时可优先考虑肌肉丰厚处的穴位进行注射。

在病毒特性方面:(1)对于具有强神经毒性的病毒(如 HSV、VSV、PRV),中枢注射后实验动物一般仅能存活 3~5 d,外周注射存活时间略长,因此通常只用于结构示踪实验,不用于长期的神经元功能研究。病毒跨突触级数与注射时间呈正相关,以 PRV 病毒为例,中枢注射后 24~36 h 跨一级突触,36~48 h 跨两级突触,60~72 h 跨三级突触或更多,可分多个时间节点取材,辅助判断病毒跨越到第几级突触。为了避免动物提前死亡,病毒注射后,需随时查看动物状态,合理安排取样时间。此外,应在预实验阶段摸索出合适的病毒注射量,若病毒注射量过大会导致动物提前死亡,无法实现跨越多级神经元观察,若病毒注射量不足同样无法实现神经系统的观察。(2)若因病毒毒性太强无法实现穴位示踪,可考虑应用毒性较弱的 AAV 病毒或是传

统神经示踪剂(如 CTB、FG),从外周穴位逐级向神经系统示踪。(3)现行的示踪病毒并不能保证百分之百的顺行或是逆行效率,为了增强研究结果的可靠性,对于同一条环路最好使用两种及以上的不同病毒策略相互验证。Yao 等利用 CTB-555、高滴度 AAV1 型病毒、VSV 及逆行跨单突触 RV 病毒多重验证 M1-PBN-NTS 环路结构^[17]。

3 从功能联系入手筛选效应神经元

要筛选出与穴位局部刺激关联的效应神经元,除了应用神经病毒示踪技术明确神经元与穴位的结构性联系外,还要研究神经元与针刺效应的功能联系。本文接下来将重点阐述筛选与针刺效应具有功能性联系神经元的方法体系,具体包括:通过即刻早期基因(IEG)标记技术识别受针刺激活的候选神经元;在此基础上,进一步结合功能实验(如电生理记录、行为学验证等)对这些候选神经元进行功能验证,最终确认其与针刺效应的直接关联。

3.1 传统方法标记受针刺影响的神经元集群

针刺疗法对于机体而言是一种外部刺激。当针刺时,受到刺激的神经元会被激活,同时 IEG 会在受激活的神经元中快速转录,例如 c-Fos、Egr1/Zif268、Arc/Arg3.1 和 Homer1a。因此,IEG 可作为针刺后神经元激活的分子标记物,其中 c-Fos 是最广泛使用的 IEG 活动标记^[24-25]。利用这个特点,研究者可通过免疫染色(免疫荧光染色、免疫组织化学染色)或原位杂交的方法可视化 IEG 的蛋白产物来标记被针刺激活的神经元集群,从而将穴位刺激与神经元响应联系起来。Yuan 等通过免疫荧光染色的方法标记出了 M1、PVN、孤束核(NTS)、臂旁核(PBN)中对电针刺刺激“廉泉”有响应的神经元^[26]。除了通过免疫染色等方法识别被针刺激活的神经元,研究者通过基因工程手段构建了 FOS-GFP 转基因小鼠,这使得在全脑细胞尺度上成像 c-Fos 神经元变得更加简便高效^[27]。

3.2 在更高时间分辨率上标记受针刺影响的神经元集群

除了传统的标记方法,目前还开发了一系列 IEG 依赖标记工具,可实现在更精确的时间窗口内标记和调控激活的神经元。

3.2.1 基于他莫昔芬的诱导系统

Guo 等将 c-Fos 启动子下携带他莫昔芬依赖性重组酶 CreER 的 Fos-CreER 小鼠与表达 tdTomato 荧光蛋白的 Cre 报告 Ai9 小鼠杂交,得到 Fos-

CreER;Ai9 小鼠,随后给予他莫昔芬衍生物 4-羟基他莫昔芬(4-OHT)以允许 c-Fos 启动下游基因 tdTomato 的表达,在 c-Fos 表达的时间窗口内于小鼠“内关”处进行手针或假手针刺刺激,从而特异性地标记针刺激活的前脑神经元^[28]。

3.2.2 基于四环素的诱导系统

四环素标签(TetTag)条件性基因表达系统基于细菌对四环素(Tet)的耐药机制被改造而成。研究者将四环素调控基因表达系统改造为 Tet-on 和 Tet-off 两个系统,通过 c-Fos 启动子驱动四环素反式激活蛋白(rtTA)或四环素激活蛋白(tTA)的表达。在 Tet-on 系统中,通过加入外源性多西环素(Dox)使 rtTA 与四环素反应元件(TetO)结合,从而激活下游基因的表达。在 Tet-off 系统中,加入 Dox 后 tTA 从 TetO 上解离,抑制下游基因的表达^[29]。通过精确控制给予 TetTag 小鼠的 Dox,可以灵活调控目的基因表达的时间窗口,实现对特定时间区间内的活性神经元标记。

此外,还有激活神经元集群捕获(CANE)系统、加强版突触活动反应元件(E-SARE)系统^[30-31]等。正确认识和利用上述工具,有助于研究者精准地识别响应针刺的神经元集群^[32]。在以上实验操作中,如果实验目的是在全脑范围发现新脑区,那么进行标记后需要研究者利用成像工具对全脑的 IEG 表达分布进行扫描;如果已有预期目标脑区,则着重对于目标脑区是否带有荧光标记进行验证即可。

3.3 应用标记激活神经元技术的注意事项

尽管利用 IEG 标记激活神经元的研究方法已被广泛应用于解析针刺调控脑功能的神经环路研究,但它仍存在应用的局限性,在应用时需要注意以下几点:(1)首先,需要超过电活动阈值后才表达 IEG,检测结果可能仅揭示了积极响应针刺刺激的神经元子集;其次,某些脑区(例如感觉和运动皮层)的 IEG 基因基础水平较高,可能无法特异标记响应针刺刺激的神经元集群^[33]。针对上述情况,可结合多个 IEG 标记物进行组织染色(如双染 Arc 和 c-Fos 蛋白),还可利用在体双光子成像技术即时观察神经元的钙活动变化,反映神经元的激活情况。(2)IEG 的表达非常短暂,往往只能展现针刺的即时效应,因此在考察针刺的长期效应时并不适用。为了提高 IEG 标记的特异性,可通过设置对照组尽量排除干扰因素以及结合多种观测手段(如光纤钙记录、离体和在体电生理记录)和神经元操控技术(如光遗传、化学遗传)辅助验证 IEG 的标记结果。(3)

除了 IEG 依赖工具,还可应用非 IEG 依赖标记如光控钙离子依赖的新工具 Cal-Light 和 FLARE 系统^[34-35]。不同于 IEG 依赖工具需要药物诱导基因表达,光控钙离子依赖工具利用光刺激和神经元活动(钙内流)激活基因表达,避免了药物代谢导致标记窗口期较长的问题,提高了标记的时间精度。(4)无论是 IEG 依赖还是钙离子依赖标记方法均用于受激活的神经元,无法识别活性下降的神经元。已有研究者开发出神经元活性下降或关闭的标志物——磷酸化的丙酮酸脱氢酶(pPDH),可弥补 IEG 标记的不足^[36]。

3.4 进一步研究受针刺影响的神经元集群与针刺效应的因果联系

在神经系统的同一脑区内,兴奋性与抑制性神经元通过突触连接形成功能互补的局部网络,在不同脑区间,异质性神经元构成层级化的神经环路,它们共同支撑神经系统的功能调控。这些神经元的功能特异性是介导针刺效应产生的关键基础。为了识别细胞特异性,在利用 IEG 标记响应针刺的神经元集群后,可结合免疫染色初步识别神经元亚型,还可从更深层次角度运用单细胞转录组学分析神经元的分子特征。随后,结合目前主流的神经元活动观测手段,如离体膜片钳技术、在体电生理、在体光纤钙记录等观测针刺对神经元活动的直接影响。最后,需通过光遗传、化学遗传、药理学调控等手段对受针刺影响的神经元集群及其上游或下游神经元的活动进行操控,综合运用行为学检测,研究受调控神经元对于针刺疗效的必要性和充分性,建立神经元活动与针刺效应的因果联系,最终明确受针刺影响的神经元集群和环路的功能地位。

4 利用神经影像技术对针刺调节中枢脑区进行大尺度水平的研究

在大尺度的研究水平上,研究者通过各种神经成像技术如功能磁共振成像(fMRI)、功能超声成像(FUS)等研究大脑功能连接网络,结合复杂网络分析方法,研究大脑内部的工作机制。这种非侵入性的技术不仅在临床实践中发挥着重要作用,而且已广泛应用于针刺的基础实验研究中。Xu 等通过静息态功能磁共振成像(rsfMRI),评估电针对 5XFAD 小鼠大脑的功能连接影响,结果显示电针后 5XFAD 小鼠左侧海马 12 个感兴趣区的功能连接性显著增强^[37]。Yin 等通过 rsfMRI 观测到电针可调节疼痛抑郁共病模型小鼠杏仁核与其他大脑区域

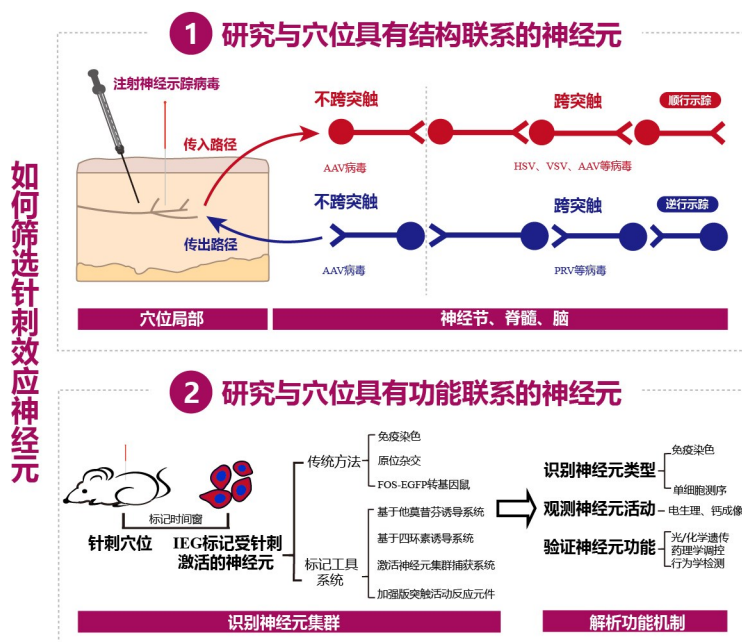
(包括尾状壳核、丘脑和部分大脑皮层)之间的功能性连接^[38]。神经影像技术在宏观层面检测大脑功能网络中发挥着重要的作用,为针刺的神经环路研究提供了从结构到功能的证据支撑。

5 总结与展望

目前越来越多的研究认为针刺疗法存在神经调控作用,本综述以穴位和神经系统的关联为切入点,从如何研究与穴位具有结构联系的神经元、如何探索与穴位具有功能联系的神经元两个主要方面入手,重点介绍筛选受针刺影响的效应神经元的现代研究思路和方法(图1)。总体而言,研究者可利用神经病毒示踪技术筛选与穴位具有结构联系的神经元,借助 IEG 标记与针刺激活具有功能性联系的神经元集群,利用神经影像技术从宏观角度活体观察针刺对大脑功能连接的影响,多技术结合筛选关键效应脑区及神经环路连接。后续的实验还需要识别神经元亚型,结合离体、在体电生理记录以及在体光纤记录或双光子钙成像等观测手段以揭示活性神经元集群的活动特性,再运用光遗传学和化学遗传学等调控手段,进一步解析关键效应神经元及其神经环路连接与针刺疗效的因果关系。熟练掌握上述思路和方法对于针刺研究者而言尤

为重要。

针刺实验性研究来源于临床,研究成果最终要服务于临床,然而目前的实验研究中仍存在许多不足,与中医理论和临床实践的联系仍有待加强。首先,基础实验对象与人体之间的跨物种差异影响基础研究成果的临床转化价值。目前针刺的实验研究对象主要为啮齿类动物,基于啮齿类动物与人体在解剖学、生理学、行为模式等方面的诸多差异,实验所得到的针刺参数(如针刺深度)、效应机制未必适用于人体。其次,针刺实验所应用的疾病模型较为简单(如脂多糖诱导的脓毒血症模型、不可预见刺激引起的抑郁模型、光化学栓塞法建立的中风模型等),其病理机制、行为表征无法完全模拟临床中复杂的系统性疾病,从实验动物身上得到的针刺调节机制外推到人上可能产生偏差。另外,现有实验研究多采用电针,而传统针刺理论强调通过针刺手法达到“得气”效应,统一参数的电针疗法可能难以模拟临床真实的针刺作用强度。未来需要摸索出一条更具有临床导向性的实验研究思路,如联合应用单细胞空间转录组、神经影像学、人工智能等技术于临床人体试验与基础动物实验^[39],加速揭示中医针刺疗法科学内涵的进程,推动针刺疗法走向现代化和国际化。



注:AAV为重组腺相关病毒,HSV为单纯疱疹病毒,VSV为水疱性口炎病毒,PRV为伪狂犬病毒,IEG为即刻早期基因。

图1 筛选受针刺影响的效应神经元的现代研究思路和方法总结图

Fig. 1 Summary schematic of the modern paradigms and methodologies for screening acupuncture-responsive effector neurons

利益冲突

参考文献

- [1] LU L M, ZHANG Y Q, TANG X R, et al. Evidence on acupuncture therapies is underused in clinical practice and health policy[J]. *BMJ*, 2022, 376: e067475.
- [2] 张震, 何腾, 王旭, 等. 基于“督脉入络脑”探讨针刺督脉穴位治疗脑病的神经传导机制[J]. *山东中医杂志*, 2024, 43(8): 795-803.
- ZHANG Z, HE T, WANG X, et al. Based on “Du meridian entering collateral brain”, this paper discusses the nerve conduction mechanism of acupuncture at Du Meridian Points in the treatment of encephalopathy (in Chinese)[J]. *Shandong Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2024, 43(8): 795-803.
- [3] 王晓宇, 于清泉, 何伟, 等. 从“分子药”到“电子药”: SPARC计划和针刺研究[J]. *针刺研究*, 2019, 44(3): 157-160, 175.
- WANG X Y, YU Q Q, HE W, et al. From “molecular medicine” to “electronic medicine”: SPARC project and acupuncture research (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2019, 44(3): 157-160, 175.
- [4] 余琛, 徐东升, 崔晶晶, 等. 腧穴结构研究的思考[J]. *针刺研究*, 2018, 43(5): 285-289.
- SHE C, XU D S, CUI J J, et al. Our considerations about studies on structure of acupuncture points (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2018, 43(5): 285-289.
- [5] 吴爽, 王佳, 徐东升, 等. 大鼠“承山”穴和坐骨神经之间的神经解剖学联系(英文)[J]. *World J Acupunct Moxibust*, 2021, 31(2): 129-135.
- [6] 张知云, 徐东升, 王慧, 等. 大鼠“肾俞”穴区与肾上腺神经支配的相关性研究[J]. *针刺研究*, 2018, 43(7): 414-418.
- ZHANG Z Y, XU D S, WANG H, et al. Correlation between “Shenshu” acupoint area and adrenal innervation in rats (in Chinese)[J]. *Acupuncture Research*, 2018, 43(7): 414-418.
- [7] CAI M D, PARK H R, YANG E J. Electroacupuncture modulates glutamate neurotransmission to alleviate PTSD-like behaviors in a PTSD animal model [J]. *Transl Psychiatry*, 2023, 13(1): 357.
- [8] TANG X R, SHI J H, LIN S M, et al. Pyramidal and parvalbumin neurons modulate the process of electroacupuncture stimulation for stroke rehabilitation [J]. *iScience*, 2024, 27(5): 109695.
- [9] XUE M, SUN Y L, XIA Y Y, et al. Electroacupuncture modulates spinal BDNF/TrkB signaling pathway and ameliorates the sensitization of dorsal horn WDR neurons in spared nerve injury rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18): 6524.
- [10] ZHENG X Y, LIN W J, JIANG Y M, et al. Electroacupuncture ameliorates beta-amyloid pathology and cognitive impairment in Alzheimer disease *via* a novel mechanism involving activation of TFEB (transcription factor EB)[J]. *Autophagy*, 2021, 17(11): 3833-3847.
- [11] 刘志远. 刘保延: 建议将针灸研究纳入国家大科学研究计划[J]. *科技导报*, 2019, 37(15): 6-8.
- LIU Z Y. Liu Baoyan: It is suggested that acupuncture research should be included in the national scientific research plan (in Chinese)[J]. *Science & Technology Review*, 2019, 37(15): 6-8.
- [12] 陶之理, 张祖萍, 王良培, 等. 足三里穴区感觉神经元的节段性分布(HRP法的研究)[J]. *针刺研究*, 1983, 8(2): 136-140, 158.
- TAO Z L, ZHANG Z P, WANG L P, et al. Segmental distribution of sensory neurons in Zusanli point area (study by HRP method) (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 1983, 8(2): 136-140, 158.
- [13] XU X M, HOLMES T C, LUO M H, et al. Viral vectors for neural circuit mapping and recent advances in trans-synaptic anterograde tracers[J]. *Neuron*, 2020, 107(6): 1029-1047.
- [14] 朱贺, 李丽, 赵磊, 等. 常用神经示踪剂及其示踪特点[J]. *四川生理科学杂志*, 2009, 31(3): 119-122.
- ZHU H, LI L, ZHAO L, et al. Common characteristics of the neural tracers (in Chinese) [J]. *Sichuan Journal of Physiological Sciences*, 2009, 31(3): 119-122.
- [15] 陈少宗. 现代针灸学视域下的腧穴-靶器官相关规律解析[J]. *针刺研究*, 2019, 44(8): 620-624.
- CHEN S Z. Analysis of the correlation between acupoints and target organs from the perspective of modern acupuncture (in Chinese)[J]. *Acupuncture Research*, 2019, 44(8): 620-624.
- [16] PARK J, CHOI S, TAKATO H, et al. Brainstem control of vocalization and its coordination with respiration [J]. *Science*, 2024, 383(6687): eadi8081.
- [17] YAO L L, YE Q P, LIU Y, et al. Electroacupuncture improves swallowing function in a post-stroke dysphagia mouse model by activating the motor cortex inputs to the nucleus tractus solitarius through the parabrachial nuclei[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 810.
- [18] 张帆, 吴立斌, 胡玲, 等. 基于病毒示踪技术探究内关穴和胃在脑的神经解剖学联系[C]//2022年中国针灸学会年会论文集. 济南, 2022: 420-426.
- [19] WICKERSHAM I R, LYON D C, BARNARD R J O, et al. Monosynaptic restriction of transsynaptic tracing from single, genetically targeted neurons [J]. *Neuron*, 2007, 53(5): 639-647.
- [20] WANG Q, LI Z H, NIE D Y, et al. Low-frequency electroacupuncture exerts antinociceptive effects through activation of POMC neural circuit induced endorphinergic input to the periaqueductal gray from the arcuate nucleus[J]. *Mol Pain*, 2024, 20: 17448069241254201.
- [21] ZINGG B, CHOU X L, ZHANG Z G, et al. AAV-mediated anterograde transsynaptic tagging: mapping corticocollicular input-defined neural pathways for defense behaviors [J]. *Neuron*, 2017, 93(1): 33-47.
- [22] TSAI N Y, WANG F, TOMA K, et al. Trans-Seq maps a

- selective mammalian retinotectal synapse instructed by Nephronectin[J]. *Nat Neurosci*, 2022, 25(5): 659-674.
- [23] MULLER P A, SCHNEEBERGER M, MATHEIS F, et al. Microbiota modulate sympathetic neurons *via* a gut-brain circuit[J]. *Nature*, 2020, 583(7816): 441-446.
- [24] HERDEGEN T, LEAH J D. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins[J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 1998, 28(3): 370-490.
- [25] CHUNG L. A brief introduction to the transduction of neural activity into fos signal[J]. *Dev Reprod*, 2015, 19(2): 61-67.
- [26] YUAN S, DENG B, YE Q P, et al. Excitatory neurons in paraventricular hypothalamus contributed to the mechanism underlying acupuncture regulating the swallowing function[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 5797.
- [27] BARTH A L, GERKIN R C, DEAN K L. Alteration of neuronal firing properties after *in vivo* experience in a FosGFP transgenic mouse[J]. *J Neurosci*, 2004, 24(29): 6466-6475.
- [28] GUO Z L, LIN X X, SAMANIEGO T, et al. Fos-CreER-based genetic mapping of forebrain regions activated by acupuncture[J]. *J Comp Neurol*, 2020, 528(6): 953-971.
- [29] ZHU Z, ZHENG T, LEE C G, et al. Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems: advances and application in transgenic animal modeling[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2002, 13(2): 121-128.
- [30] KAWASHIMA T, KITAMURA K, SUZUKI K, et al. Functional labeling of neurons and their projections using the synthetic activity - dependent promoter E-SARE [J]. *Nat Meth*, 2013, 10(9): 889-895.
- [31] SAKURAI K, ZHAO S L, TAKATOH J, et al. Capturing and manipulating activated neuronal ensembles with CANE delineates a hypothalamic social-fear circuit [J]. *Neuron*, 2016, 92(4): 739-753.
- [32] 王继华, 胡海岚. 神经元活动依赖工具开发应用的研究进展与展望[J]. *中国科学: 生命科学*, 2019, 49(3): 202-219.
- WANG J H, HU H L. Research progress and prospect of development and application of neuron activity dependence tools (in Chinese)[J]. *Scientia Sinica (Vita)*, 2019, 49(3): 202-219.
- [33] HE Q Y, WANG J H, HU H L. Illuminating the activated brain: emerging activity-dependent tools to capture and control functional neural circuits [J]. *Neurosci Bull*, 2019, 35(3): 369-377.
- [34] LEE D M, HYUN J H, JUNG K, et al. A calcium- and light-gated switch to induce gene expression in activated neurons [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(9): 858-863.
- [35] WANG W J, WILDES C P, PATTARABANJIRD T, et al. A light- and calcium-gated transcription factor for imaging and manipulating activated neurons [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(9): 864-871.
- [36] YANG D, WANG Y, QI T B, et al. Phosphorylation of pyruvate dehydrogenase inversely associates with neuronal activity[J]. *Neuron*, 2024, 112(6): 959-971.
- [37] XU M Z, LIN R, WEN H N, et al. Electroacupuncture enhances the functional connectivity of limbic system to neocortex in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Neuroscience*, 2024, 544: 28-38.
- [38] YIN X, ZENG X L, LIN J J, et al. Brain functional changes following electroacupuncture in a mouse model of comorbid pain and depression: a resting-state functional magnetic resonance imaging study [J]. *J Integr Med*, 2025, 23(2): 159-168.
- [39] 乔海法. 新技术是实现针灸现代研究突破的加速器[J]. *针刺研究*, 2025, 50(5): 526-530.
- QIAO H F. New technology is an accelerator to realize the breakthrough of modern acupuncture research (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2025, 50(5): 526-530.

收稿日期:XXXX-XX-XX 修回日期:XXXX-XX-XX