

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.24.007  
文章编号: 1005-8982 (2023) 24-0036-07

实验研究·论著

## 腺苷 A3 受体对浅筋膜成纤维细胞 cAMP/Epac 信号通路及炎症因子表达的影响\*

崔艳茹, 许经萍, 可红, 席超, 徐尚呈, 杜红, 屈飞

(江西中医药大学, 江西 南昌 330004)

**摘要:** **目的** 探讨沉默腺苷 A3 受体对浅筋膜成纤维细胞 cAMP/Epac 信号通路及炎症因子表达的影响。**方法** 选取 SD 大鼠浅筋膜组织, 通过组织块培养法提取成纤维细胞, 细胞免疫荧光实验检测 Vimentin、CD45、FVIII、AKA 表达, 腺苷预处理细胞并分为 Control 组、10 nmol/L 组、100 nmol/L 组、10  $\mu$ mol/L 组和 100  $\mu$ mol/L 组, 均培养 48 h。腺苷 siRNA 干扰实验将细胞分为对照组、腺苷组、A3R 干扰组、空载组。对照组不予任何处理, 腺苷组用 10  $\mu$ mol/L 腺苷培养 48 h, 其余两组用 2  $\mu$ L Lipofectamine 2000 转染 A3R siRNA, 在培养箱孵育 6 h 后换上维持液继续培养 48 h。Western blotting 检测细胞腺苷 A3 受体蛋白的表达, 实时荧光定量聚合酶链反应检测 cAMP、Epac mRNA 表达, Western blotting 检测 cAMP、Epac 蛋白表达, 酶联免疫吸附试验检测白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 水平, 免疫荧光检测细胞间黏附分子-1 表达。**结果** Control 组、10 nmol/L 组、100 nmol/L 组、10  $\mu$ mol/L 组和 100  $\mu$ mol/L 组 A3R 蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 腺苷预处理可剂量依赖性地上调 A3R 蛋白表达。对照组、腺苷组、A3R 干扰组、空载组 A3R 蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 腺苷 siRNA 干扰可下调 A3R 蛋白表达, 而空载组并无明显影响。A3R 干扰组 cAMP、Epac mRNA 相对表达量高于对照组 ( $P < 0.05$ )。A3R 干扰组 cAMP、Epac 蛋白相对表达量高于对照组 ( $P < 0.05$ )。A3R 干扰组 IL-6、TNF- $\alpha$  相对表达量高于对照组 ( $P < 0.05$ )。**结论** 在浅筋膜成纤维细胞中, 腺苷 A3 受体通过下调 cAMP/Epac 信号通路减少炎症因子的表达。

**关键词:** 腺苷 A3 受体; 针刺镇痛; 浅筋膜; 成纤维细胞; cAMP/Epac 通路

**中图分类号:** R686.3; R245.3

**文献标识码:** A

## Role of adenosine A3 receptor in regulating cAMP/Epac signaling pathway and expression of inflammatory molecules in superficial fascia fibroblasts\*

Cui Yan-ru, Xu Jing-ping, Ke Hong, Xi Chao, Xu Shang-cheng, Du Hong, Qu Fei

(Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang, Jiangxi 330004, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of silencing the adenosine A3 receptor on the cAMP/Epac signaling pathway and the expression of inflammatory molecules in superficial fascia fibroblasts. **Methods** The fibroblasts were extracted from the superficial fascia of SD rats by tissue block culture. The expressions of vimentin, CD45, FVIII and AKA were detected by the immunofluorescence assay on cultured cells. Cells pretreated with adenosine were divided into control group, 10 nmol/L group, 100 nmol/L group, 10  $\mu$ mol/L group and 100  $\mu$ mol/L group and cultured for 48 hours. To explore the effects of RNA interference of adenosine, cells were divided into the control group, adenosine group, A3R interference group, and empty vector group. The control

收稿日期: 2023-04-07

\* 基金项目: 江西省自然科学基金(No:20212BAB206014);江西中医药大学校级科技创新团队发展计划(No:CXTD22007)

[通信作者] 屈飞, E-mail: quf0917@163.com

group was left untreated, and the adenosine group was treated with 10  $\mu\text{mol/L}$  of adenosine and cultured for 48 hours. Cells in the other two groups were transfected with A3R siRNA via 2  $\mu\text{L}$  of Lipofectamine 2000, incubated in the incubator for 6 h, and cultured for another 48 h after replacement with the maintenance solution. The protein level of the adenosine A3 receptor in the cells was detected by Western blotting. The mRNA expressions of cAMP and Epac were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction, while the protein expressions of cAMP and Epac were detected by Western blotting. The levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay, and the expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) was determined by immunofluorescence. **Results** The relative protein expression of the adenosine A3 receptor was different among the control group, 10 nmol/L group, 100 nmol/L group, 10  $\mu\text{mol/L}$  group and 100  $\mu\text{mol/L}$  group ( $P < 0.05$ ). Pretreatment with adenosine upregulated the protein expression of the adenosine A3 receptor in a dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ). There were differences in the relative protein expression of the adenosine A3 receptor among the control group, adenosine group, A3R interference group and empty vector group ( $P < 0.05$ ). The interference with the adenosine siRNA but not the empty vector downregulated the protein expression of the adenosine A3 receptor. The relative mRNA expressions of cAMP and Epac in the A3R interference group were higher than those in the control group ( $P < 0.05$ ), and the relative protein expressions of cAMP and Epac in the A3R interference group were also higher than those in the control group ( $P < 0.05$ ). The relative expressions of IL-6 and TNF- $\alpha$  in the A3R interference group were higher than those in the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** In superficial fascia fibroblasts, the adenosine A3 receptor reduces the expressions of inflammatory molecules by downregulating the cAMP/Epac signaling pathway.

**Keywords:** adenosine A3 receptor; acupuncture analgesia; superficial fascia; fibroblast; cAMP/Epac signaling pathway

中医经络系统作为针灸治疗的理论基础,具有运行气血、连接全身脏腑表里的功能,现有医学技术和解剖学研究并不能完全阐述经络的实质。筋膜从表到里依次为真皮层、浅筋膜、深筋膜、内脏筋膜<sup>[1]</sup>,是一个全身连续的网络,贯穿并包围所有器官、肌肉、骨骼和神经纤维,被认为是单一的器官,统一的整体,与人类生理学的各个方面都有联系<sup>[2]</sup>。白宇等<sup>[3]</sup>通过发现,经络的实质是全身非特异性结缔组织所构成的筋膜支架,筋膜作为支撑、营养和储备系统遍布全身,其位置和走形与经络相似,穴位则为筋膜上能够被刺激产生生物信息的位置。

浅筋膜分布着大量的穴位,成纤维细胞作为浅筋膜中最主要的细胞,具有较强的增殖能力,参与组织修复的过程,是经络腧穴主要的感受性细胞和效应性细胞,在针刺力的信号传导中具有重要意义<sup>[4]</sup>。

针刺镇痛主要和调控炎症有关,cAMP、Epac在炎症反应中扮演了重要角色<sup>[5]</sup>。研究发现,针刺可通过降低 ERK1/ERK2 下游转录因子 cAMP 反应元件结合蛋白的 DNA 结合活性,减轻炎症反应和缓解疼痛,治疗炎症性疼痛大鼠<sup>[6]</sup>。针刺可通过降低 cAMP 激活的交换蛋白 Epac1 和 Piezo2 的表达减轻炎症后肠易激综合征的机体的超敏反应<sup>[7]</sup>。针刺可通过抑制白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 和单核细胞趋化蛋白-1 的

表达,治疗胶原诱导的关节炎大鼠模型<sup>[8]</sup>。

文献报道,针刺可引起穴位区腺苷释放<sup>[9]</sup>,腺苷可作为一种工具药,作用于穴位区,起到类似针刺的作用<sup>[10]</sup>,其作用机制尚不明确。本课题组致力于研究浅筋膜中腺苷 A3 受体 (adenosine A3 receptor, A3R) 途径在针刺镇痛中作用机制,前期研究发现 A3R 在痛觉传导通路中的脊髓、脑干、丘脑、大脑皮层均有广泛表达,在足三里浅筋膜、腹股沟中点处、腹膜浅筋膜亦有分布;针刺足三里浅筋膜可以激活 A3R 参与针刺镇痛,其针刺镇痛效应可能与上调 Ras/MAPK 途径、下调 cAMP/Epac 途径有关<sup>[11-12]</sup>。成纤维细胞是浅筋膜中最主要的细胞,本文设计腺苷干预成纤维细胞,观察成纤维细胞中 A3R 表达,以期明确腺苷镇痛是否与成纤维细胞中 A3R 表达有关。前期主要从体内实验说明 A3R 与针刺镇痛的关系,笔者发现腺苷 A3 受体可介导针刺镇痛,影响 cAMP/Epac 信号通路。本研究从体外实验出发,探讨 siRNA 转染浅筋膜中的成纤维细胞通过沉默 A3R 对 cAMP/Epac 信号通路和炎症因子的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 10 只,体

重( $200 \pm 20$ )g,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,实验动物使用许可证号:SYXK(赣)2017-0004]。

**1.1.2 主要试剂** Lipofectamine 2000(型号:11668-027)购自美国 Invitrogen 公司, Vimentin(货号:ab92547)、AKA(货号:ab134923)、CD45(货号:ab10558)、cAMP(货号:ab76238)、Epac(货号:ab109415)均购自美国 Abcam 公司, FⅧ(货号:NB100-91761)购自美国 Novusbio 公司, YBR Green PCR 试剂盒(货号:KM4101)购自美国 Novusbio 公司, 逆转录试剂盒(货号:639505)购自日本 TaKaRa 株式会社,引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。IL-6(货号:AD3249Ra)和 TNF- $\alpha$ (货号:AD3238Ra)购自美国 Andygene 公司。

**1.1.3 主要仪器** 二氧化碳恒温培养箱(型号 311)购自美国 Thermo 公司, 荧光倒置显微镜(型号 IX53)购自日本 Olympus 株式会社, 离心机(Centrifuge 5424R 型)购自德国 Eppend 公司, 荧光定量 PCR 仪、水平电泳设备(型号 DYC-31D)、凝胶成像系统(型号 Universal Hood II 型)和电泳仪(型号 mini protean 3 cell)购自美国 BIO-RAD 公司, 酶标仪(型号 MK3)购自芬兰雷勃公司, 全自动化学发光分析仪(型号 Tanon-5200)购自上海天能科技有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 大鼠浅筋膜成纤维细胞的原代分离** 在无菌的条件下获取大鼠浅筋膜组织,并去除腹膜上的脂肪组织和血管,将组织切为  $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$  的小方块置于 DMEM 培养液中,置于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴摇床消化,将收集的细胞以  $1\ 500\text{ r/min}$  离心  $5\text{ min}$ ,弃上清液,用完全培养基( $1\%$  三抗 +  $10\%$  胎牛血清 +  $89\%$  DMEM)重悬细胞,置于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%$  二氧化碳细胞培养箱内静置培养,  $48\text{ h}$  换液,每隔  $2 \sim 3\text{ d}$  换 1 次液。待细胞长至  $85\%$  左右时,开始进行传代( $1:3$  传代),显微镜下观察细胞状态。

**1.2.2 实验分组** 腺苷预处理细胞并分为 Control 组、 $10\text{ nmol/L}$  组、 $100\text{ nmol/L}$  组、 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$  组和  $100\text{ }\mu\text{mol/L}$  组,均培养  $48\text{ h}$ 。腺苷 siRNA 干扰实验将细胞分为对照组、腺苷组、A3R 干扰组、空载组。转染前  $1\text{ d}$  将  $0.5 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^5$  个/孔细胞接种于 24 孔板, A3R 干扰组添加  $2\text{ }\mu\text{L}$  siRNA-A3R ( $20\text{ }\mu\text{mol/L}$ )、空载组添加  $2\text{ }\mu\text{L}$  siRNA-NC ( $20\text{ }\mu\text{mol/L}$ )用来转染,细胞在培

养箱孵育  $6\text{ h}$  后换上维持液,培养  $48\text{ h}$ 。对照组不予任何处理,腺苷组用  $10\text{ }\mu\text{mol/L}$  腺苷浓度,培养  $48\text{ h}$ 。

**1.2.3 免疫荧光检测浅筋膜成纤维细胞 Vimentin、CD45、FⅧ、AKA、ICAM-1 表达** 将细胞用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗 2 次,加入  $4\%$  多聚甲醛室温固定  $30\text{ min}$ ,再将细胞置于  $0.5\%$  Triton X-100 室温通透  $20\text{ min}$ ,用  $5\%$  胎牛血清蛋白  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  封闭  $1\text{ h}$ ,封闭完成后,加入一抗,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。用 PBS 洗涤一抗 3 次,再加入二抗,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育  $1\text{ h}$ ,用 PBS 洗涤 3 次,洗去多余的二抗。再加少量抗荧光淬灭封片液[含  $4'$ ,  $6$ -二脒基- $2$ -苯基吲哚( $4'$ ,  $6$ -diamidino- $2$ -phenylindole, DAPI)],覆盖住样品,置于荧光显微镜下观察,将同一位置的 2 张荧光图片重叠为 Merge 图。

**1.2.4 siRNA 转染** 转染前  $1\text{ d}$  将细胞以  $0.5 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^5$  个/孔密度接种于 24 孔中,保证转染时细胞汇合达  $90\% \sim 95\%$ 。准备 2 种复合物,第 1 种是将  $0.8\text{ }\mu\text{g}$  DNA 稀释于  $50\text{ }\mu\text{L}$  Opti-MEM 中形成的复合物;第 1 种将  $2\text{ }\mu\text{L}$  Lipofectamine 2000 稀释于  $50\text{ }\mu\text{L}$  Opti-MEM 形成的复合物,室温孵育  $5\text{ min}$ ,再将第 2 种复合物缓慢加入第 1 种中,继续室温孵育  $20\text{ min}$ ,加入培养孔中,置于二氧化碳培养箱中孵育  $6\text{ h}$ ,  $48\text{ h}$  后检测细胞转入基因表达。

**1.2.5 实时荧光定量聚合酶链反应检测 cAMP、Epac mRNA 表达** 用 TRIzol 提取总 RNA,再将 RNA 逆转录为 cDNA,逆转录样本置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱冷冻保存,将制备好的 cDNA 进行 PCR 扩增,反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性  $3\text{ min}$ ,  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性  $5\text{ s}$ ,  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火  $10\text{ s}$ ,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  拉伸  $25\text{ s}$ ,  $39$  个循环后  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  拉伸  $5\text{ s}$ ,  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  再变性  $50\text{ s}$ 。采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算 cAMP、Epac mRNA 相对表达量。见表 1。

表 1 PCR 引物序列

基因	引物序列	长度/bp
cAMP	正向: 5'-CTGGACCTGGATTCTGA-3'	157
	反向: 5'-TCCCCATACACTGCTTC-3'	
Epac	正向: 5'-CTCCTGTCATCCCTTTCAT-3'	111
	反向: 5'-CCATCATTCGCATCTTCTC-3'	
GAPDH	正向: 5'-CAAGTTCAACGGCAG-3'	138
	反向: 5'-CCAGTAGACTCCACGACAT-3'	

**1.2.6 Western blotting 检测 A3R、cAMP、Epac 蛋白表达** 将细胞从培养箱中取出,吸出培养液,用预冷的 PBS 洗 3 次,加入裂解液,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  充分裂解细胞,将细胞刮入  $1.5\text{ mL}$  EP 管中,  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  以上加热  $10\text{ min}$ ,以

12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, BCA 法测定蛋白浓度, 制备 8%、12% 的分离胶, 每孔上样量为 10  $\mu$ g, 电泳 1.5 h、转膜 50 min、将膜置于 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 分别加入 A3R、cAMP、Epac 抗体, 一抗 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, 再用 TBST 洗涤 3 次, 再将膜置于 1:10 000 稀释 HRP 标记的二抗中, 室温孵育 1 h, 再用 TBST 洗涤 3 次, 电化学发光法化学显色, 用 TANON GIS 软件分析条带的灰度值。

**1.2.7 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测上清液 IL-6、TNF- $\alpha$  水平** 将细胞以  $0.5 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^5$  个/孔接种于 24 孔板, 进行 siRNA 转染。在 37  $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳培养箱中培养 48 h 后, 收集上述各孔培养上清液, 采用 ELISA 检测上清液 IL-6、TNF- $\alpha$  水平, 按照试剂盒说明书进行操作, 用酶标仪测定 570 nm 波长处吸光度值, 计算 IL-6、TNF- $\alpha$  相对表达量。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件。计量资料

以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较用单因素方差分析, 进一步两两比较用 LSD-*t* 检验。 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 浅筋膜成纤维细胞的分离鉴定

镜下成纤维细胞呈梭形 (见图 1)。Vimentin 为 III 型中间丝蛋白, 主要表达于中胚层起源的间充质细胞中, 在成纤维细胞中大量分布, 可作为成纤维细胞的标志。免疫荧光结果显示, Vimentin 阳性, F VIII, CD45、AKA 阴性 (见图 2)。

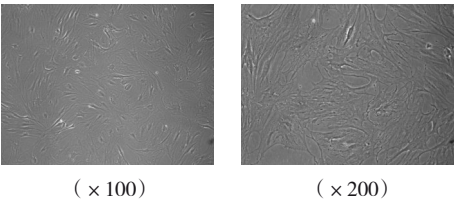


图 1 浅筋膜成纤维细胞

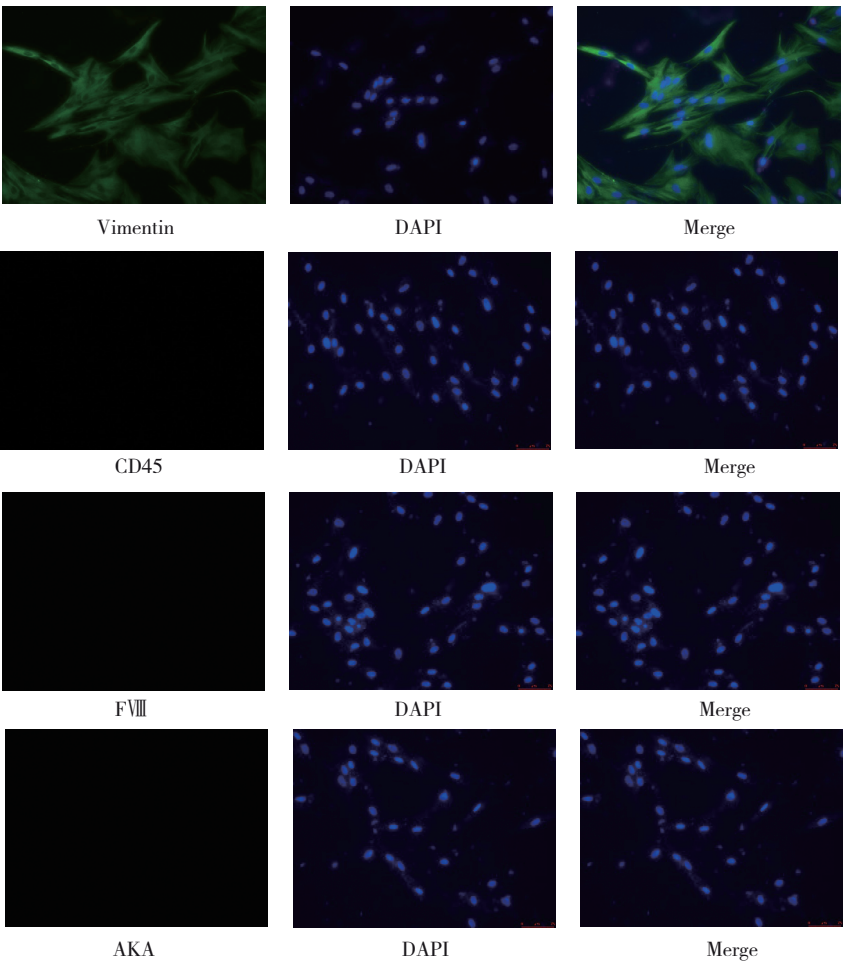


图 2 浅筋膜成纤维细胞 Vimentin、CD45、FVIII、AKA 表达 (免疫荧光染色)

2.2 各组 A3R 蛋白相对表达量比较

Control 组、10 nmol/L 组、100 nmol/L 组、10 μmol/L 组和 100 μmol/L 组 A3R 蛋白相对表达量分别为 (0.24 ± 0.01)、(0.29 ± 0.02)、(0.36 ± 0.02)、(0.41 ± 0.02) 和 (0.45 ± 0.02), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=166.700, P=0.000$ ); 进一步组间两两比较, 100 μmol/L 组高于其他 4 组 ( $P<0.05$ ), 10 μmol/L 组高于 Control 组、10 nmol/L 组、100 nmol/L 组 ( $P<0.05$ ), 100 nmol/L 组高于 Control 组、10 nmol/L 组 ( $P<0.05$ ), 10 nmol/L 组高于 Control 组 ( $P<0.05$ ), 表明腺苷预处理可剂量依赖性地上调 A3R 蛋白表达。见图 3。

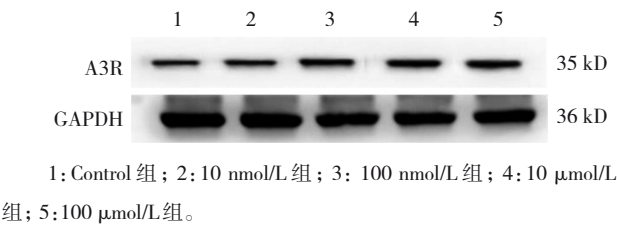


图 3 各组 A3R 蛋白条带图

对照组、腺苷组、A3R 干扰组、空载组 A3R 蛋白相对表达量分别为 (0.37 ± 0.05)、(0.65 ± 0.07)、(0.15 ± 0.03) 和 (0.64 ± 0.05), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=64.270, P=0.000$ ); 进一步组间两两比较, 腺苷组高于对照组 ( $P<0.05$ ), A3R 干扰组低于腺苷组 ( $P<0.05$ ), 但空载组与腺苷组比较, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 表明腺苷 siRNA 干扰可下调 A3R 蛋白表达, 而空载组并无明显影响。见图 4。

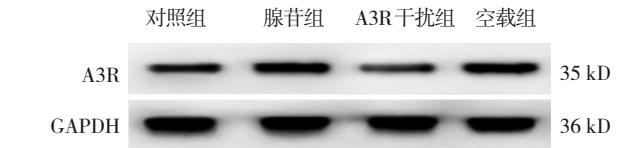


图 4 各组 A3R 蛋白条带图

2.3 各组 cAMP、Epac mRNA 相对表达量比较

对照组、A3R 干扰组、空载组 cAMP、Epac mRNA 相对表达量比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 进一步组间两两比较, A3R 干扰组均高于对照组 ( $P<0.05$ )。见表 3。

2.4 各组 cAMP、Epac 蛋白相对表达量比较

对照组、A3R 干扰组、空载组 cAMP、Epac 蛋白

表 3 各组 cAMP、Epac mRNA 相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	cAMP mRNA	Epac mRNA
对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
A3R 干扰组	2.87 ± 0.04	6.51 ± 0.72
空载组	0.78 ± 0.09	1.03 ± 0.16
F 值	71.810	165.900
P 值	0.000	0.000

相对表达量比较, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 进一步组间两两比较经 LSD- $t$  检验, A3R 干扰组高于对照组 ( $P<0.05$ )。见表 4 和图 5。

表 4 各组 cAMP、Epac 蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	cAMP 蛋白	Epac 蛋白
对照组	0.35 ± 0.04	0.41 ± 0.04
A3R 干扰组	0.52 ± 0.04	0.57 ± 0.04
空载组	0.32 ± 0.04	0.41 ± 0.03
F 值	24.930	18.820
P 值	0.001	0.003

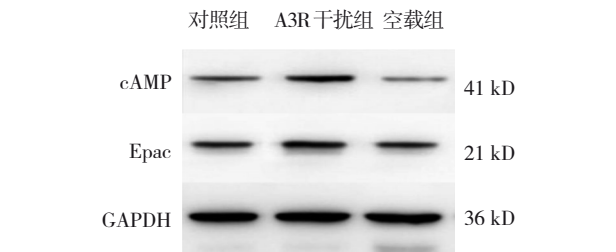


图 5 各组 cAMP、Epac 蛋白条带图

2.5 各组 IL-6、TNF-α 相对表达量比较

对照组、A3R 干扰组、空载组 IL-6、TNF-α 水平比较, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 进一步组间两两比较经 LSD- $t$  检验, A3R 干扰组高于对照组 ( $P<0.05$ )。见表 5 和图 6。

表 5 各组 IL-6、TNF-α 水平比较 (pg/mL,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	IL-6	TNF-α
对照组	39.32 ± 6.61	73.49 ± 1.31
A3R 干扰组	136.64 ± 13.48	198.66 ± 1.66
空载组	37.40 ± 4.70	98.22 ± 42.97
F 值	117.100	21.370
P 值	0.000	0.002

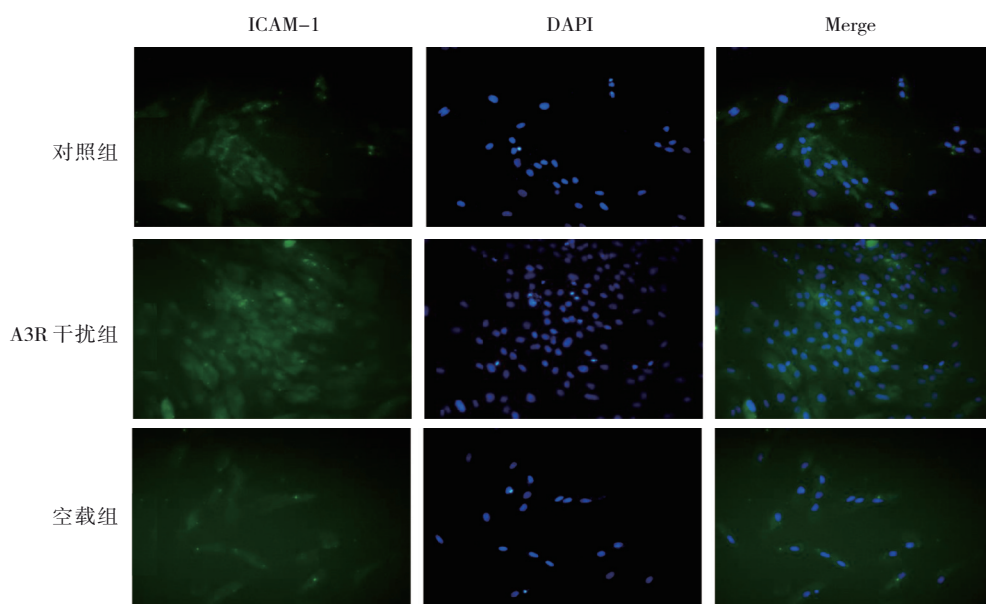


图6 siRNA 干扰 A3R 表达对 ICAM-1 表达的影响

### 3 讨论

针刺镇痛机制具有多样性,复杂性,矛盾性等特点,大多研究主要是从神经机制主导来阐述,如中枢神经传导、中枢神经递质、免疫学炎症因子参与针刺镇痛<sup>[13-14]</sup>。在慢性压迫性损伤疼痛模型中,电针可以通过增强脊髓中强啡肽的表达,提高脊髓小胶质细胞上 $\kappa$ 阿片受体 mRNA 表达,来抑制 Toll 样受体 4 的疼痛信号传导<sup>[15]</sup>。也有一部分学者认为,筋膜结缔组织和局部的生化改变也可介导针刺镇痛机制。筋膜作为一种胶原纤维结缔组织,具有支持和储备功能,其在形态学和功能学与中医经络相似,而且结缔组织平面与经络、穴位和针刺镇痛机制密切相关<sup>[16]</sup>,陈德成等<sup>[17]</sup>提出可以找到肌筋膜激痛点,针刺至皮下浅筋膜处留针,通过主动运动来进行针灸治疗。

成纤维细胞作为穴位感受器,能对刺激产生较强的生化信号。针刺作为一种伤害性机械性刺激,通过提插捻转等手法形成力学信号,引起筋膜结缔组织发生形变,作用到对刺激敏感的成纤维细胞,激活细胞,引起细胞发生变异,如突起、周长和横截面积的改变,通过换能将细胞表面的信号转化为胞内生化信号途径,最终将生化信号转化为针刺效应<sup>[4]</sup>。陈波等<sup>[18]</sup>发现在体外实验中,给予筋膜中成纤维细胞压力刺激,能使细胞回缩、间隙增大和形态缩小。本课题组前期研究发现,体外压力刺激可以上调 A3R,激活 MAPK 信号通路,诱导成

纤维细胞腺苷的表达增加,促进成纤维细胞增殖<sup>[19]</sup>。压力刺激可能会激发和提高穴位处的筋膜成纤维细胞的活力<sup>[20]</sup>。由此可见,筋膜中的成纤维细胞可能介导力学传导,影响针刺效应。本研究结果显示,腺苷 siRNA 干扰可下调 A3R 表达,提示筋膜中的成纤维细胞的 A3R 可能参与针刺镇痛的过程。本实验培养浅筋膜成纤维细胞,应用不同浓度腺苷干预,结果显示,腺苷可剂量依赖性地上调成纤维细胞 A3R 表达,提示腺苷可能通过 A3R 发挥作用,那么成纤维细胞 A3R 表达增加的意义值得探讨。

钟欢等<sup>[21]</sup>提出针刺可以治疗大鼠慢性萎缩性胃炎,下调 COX-2、IL-6、IL-8 水平。郑倩华等<sup>[22]</sup>发现在膝骨性关节炎模型中,针刺可以降低 IL-6、Chemerin 表达,提示针刺可能具有抗炎作用。有研究发现,Epacs 在炎症的产生增强中起着至关重要的作用<sup>[23]</sup>。炎症损伤引起感觉细胞中 Epac 表达大幅升高。在炎症性损伤后,PGE2 通过激活 PKA 和 Epac-PKC 产生增强的痛觉过敏,cAMP/Epac 可以增强炎症后 PGE2 介导的痛觉过敏,对炎症疼痛有着关键作用。在由皮肤肌肉切开牵拉诱导的 CPSP 大鼠模型中,鞘内注射 Epac1 抑制剂 CE3F4 可明显抑制皮肤肌肉切开牵拉诱导的机械性异常和脊髓中星形胶质细胞的活化,表明脊柱 Epac1 介导的星形胶质细胞活化可能有助于缓解慢性术后疼痛,抑制 Epac1 可以有效预防 CPSP,提示 cAMP/Epac 可能参与炎症的调节<sup>[24]</sup>。本课题组前期研究发现,A3R 途径的激活可以下调

cAMP/Epac 通路,在针刺前注射 A3R 激动剂 IB-MECA 可进一步下调 cAMP、Epac 表达, A3R 拮抗剂 Reversine 可逆转这一效应。本研究结果发现, siRNA 干扰下调 A3R 表达后, cAMP、Epac 表达上调,与前期实验结果一致。在前期实验发现, A3R 途径激活可能有利于改善炎症疼痛,本实验结果发现, siRNA 干扰 A3R 表达后, IL-6、TNF- $\alpha$  表达上调,提示沉默的 A3R 途径可能不利于炎症疼痛,与上调浅筋膜成纤维细胞的 cAMP/Epac 信号通路有关;针刺可能通过调节炎症来发挥镇痛效应,这可能与针刺激活 A3R,下调 cAMP/Epac 通路,降低炎症因子表达有关。

综上所述,结合前期的体内实验和本实验发现,针刺可能通过激活 A3R 途径,下调 cAMP/Epac 通路,降低 IL-6、TNF- $\alpha$  表达,起到抗炎镇痛作用。

#### 参 考 文 献 :

- [1] 王春雷,吴金鹏,王军,等.筋膜学说解读中医经络实质及针灸作用机制[J].中国中医基础医学杂志,2008,(4):312-314.
- [2] YANG C, DU Y K, WU J B, et al. Fascia and Primo Vascular System [J]. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM, 2015, 2015: 303769.
- [3] 白宇,原林,黄泳,等.经络的解剖学发现——筋膜学新理论[J].世界科学技术(中医药现代化),2010,12(1):20-24.
- [4] 张小红,蔡定均,王宇,等.针刺作用及机械力刺激对成纤维细胞的影响[J].中国中医基础医学杂志,2017,23(03):380-383.
- [5] ZHANG R, LAO L, REN K, et al. Mechanisms of acupuncture-electroacupuncture on persistent pain[J]. Anesthesiology, 2014, 120(2):482-503.
- [6] FANG J Q, FANG J F, LIANG Y, et al. Electroacupuncture mediates extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathways in the spinal cord of rats with inflammatory pain[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2014, 14: 285.
- [7] GUO J, CHEN L, WANG Y H, et al. Electroacupuncture attenuates post-inflammatory ibs-associated visceral and somatic hypersensitivity and correlates with the regulatory mechanism of epac1-piezo2 axis [J]. Frontiers in Endocrinology, 2022, 13: 918652.
- [8] DONG W, WANG B, ZHANG R, et al. Therapeutic effects of acupuncture in rheumatoid arthritis are associated with centromere protein f expression [J]. Allergologia et Immunopathologia, 2022, 50(3): 47-54.
- [9] WANG X, HUANG M, YANG H, et al. Mast Cell Degranulation and Adenosine Release: Acupoint Specificity for Effect of Electroacupuncture on Pituitrin-Induced Acute Heart Bradycardia in Rabbits[J].2020,2020:1348914.
- [10] HUANG M, WANG X, XING B, et al. Critical roles of TRPV2 channels, histamine H1 and adenosine A1 receptors in the initiation of acupoint signals for acupuncture analgesia[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 6523.
- [11] 屈飞,邱沙英,崔艳茹,等.腺苷 A3 受体在中枢神经系统痛觉传导通路及浅筋膜的表达分布[J].中华中医药学刊,2019,37(4):803-806.
- [12] 屈飞,张明月,崔艳茹,等.基于腺苷 A3 受体途径针刺对足三里浅筋膜 cAMP/Epac 及 Ras/MAPK 途径的调节作用研究[J].中华中医药杂志,2021,36(6):3541-3544.
- [13] 范刚启,钱俐俐,赵杨,等.针刺镇痛机制的多样性及问题分析[J].中国针灸,2013,33(1):92-96.
- [14] 王倩,包永欣.针刺镇痛原理探析[J].中华中医药杂志,2019,34(10):4911-4913.
- [15] 高永辉,王俊英,韩焱晶,等.脊髓小胶质细胞 Toll 样受体 4 和  $\kappa$  阿片受体的相互作用参与针刺镇痛的机制研究[J].针刺研究,2022,47(2):95-100.
- [16] LANGEVIN H M, YANDOW J A. Relationship of acupuncture points and meridians to connective tissue planes[J]. The Anatomical record, 2002, 269(6): 257-265.
- [17] 陈德成,杨观虎,王富春,等."动筋针法"的靶点治疗[J].中国针灸,2016,36(11):1177-1180.
- [18] 陈波,王兴桂,李小明,等.体外压力刺激对大鼠筋膜组织成纤维细胞形态和 MMP-1、MMP-3 合成释放影响的研究[J].辽宁中医杂志,2011,38(4):770-772.
- [19] QU F, CUI Y, ZENG J, et al. Acupuncture induces adenosine in fibroblasts through energy metabolism and promotes proliferation by activating MAPK signaling pathway via adenosine(3) receptor [J]. Journal of Cellular Physiology, 2020, 235(3): 2441-2451.
- [20] CHEN B, JIA Y, XIONG J, et al. Effect of Pressure Stresses on Cell Viability and Protein Expression of Fascial Fibroblast [J]. Iranian journal of biotechnology, 2019, 17(1): e1863.
- [21] 钟欢,黎铭玉,舒文娜,等.针刺与艾灸对慢性萎缩性胃炎大鼠环氧化酶-2 和炎症相关因子的影响差异研究[J].中华中医药杂志,2022,37(4):2246-2250.
- [22] 郑倩华,吴强,蒋一璐,等.针刺不同敏化状态穴位对 KOA 模型大鼠的关节软骨形态和关节腔液炎症因子的作用[J].时珍国医国药,2020,31(04):982-985.
- [23] HUANG L Y, GU Y. Epac and Nociceptor Sensitization [J]. Molecular pain, 2017, 13: 1744806917716234.
- [24] SHE Q, CHEN J, ZHONG C, et al. Exchange proteins directly activated by cyclic adenosine monophosphate inhibitor reverses mechanical allodynia via the modification of astrocytes activity in the spinal cord [J]. Annals of translational medicine, 2021, 9(22): 1656.

(李科 编辑)

**本文引用格式:** 崔艳茹,许经萍,可红,等.腺苷 A3 受体对浅筋膜成纤维细胞 cAMP/Epac 信号通路及炎症因子表达的影响[J].中国现代医学杂志,2023,33(24):36-42.

**Cite this article as:** CUI Y R, XU J P, KE H, et al. Role of adenosine A3 receptor in regulating cAMP/Epac signaling pathway and expression of inflammatory molecules in superficial fascia fibroblasts[J]. China Journal of Modern Medicine, 2023, 33(24): 36-42.