

拨法对 CCI 模型大鼠外周血清中 IL-1 β 以及脊髓中 5-HT_{2A} 表达的影响

陶艳红 姚斌彬 于天源 马驰 鲁梦倩 张林峰 吕桃桃 吴帅

【摘要】 目的 从行为学和形态学角度探索拨法对 CCI 模型大鼠感觉功能恢复的影响。**方法** 采用推拿手法模拟仪定性、定量模拟手法,对 CCI 模型大鼠进行干预。通过光热耐痛阈分析大鼠行为学改善情况,ELISA 法测定血清中 IL-1 β 含量的变化,Western blot 法检测脊髓中 5-HT_{2A} 受体的相对蛋白表达情况。**结果** 拨法治疗组造模后 7 天的光热耐痛阈数值与模型组无差异 ($P>0.05$),经过拨法治疗 20 次后(即造模后 28 天),二者之间有显著差异 ($P<0.05$),且拨法组逐渐接近正常组水平。ELISA 法检测血清中 IL-1 β 的含量:造模后 7 天,模型组和拨法组 IL-1 β 含量均显著高于正常组,经过拨法治疗 20 次后,拨法组 IL-1 β 与模型组相比显著性下降 ($P<0.05$)。Western blot 法测定脊髓中 5-HT_{2A} 的相对蛋白表达含量:拨法治疗 20 次后,拨法组脊髓中 5-HT_{2A} 相对蛋白表达含量明显上调,且已接近正常组水平 ($P>0.05$),高于模型组水平 ($P<0.05$)。**结论** 经过拨法治疗,可明显上调 CCI 模型大鼠的光热耐痛阈值,减轻其痛觉过敏状态;下调 CCI 模型大鼠外周血清中促炎性细胞因子 IL-1 β 的表达,达到“消炎镇痛”的作用;上调脊髓中 5-HT_{2A} 受体的表达,对中枢镇痛起到一定作用。

【关键词】 拨法; 神经病理性疼痛; 坐骨神经慢性压迫损伤模型; 白细胞介素 1 β ; 五羟色胺 2A 受体

【中图分类号】 R244 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.08.001

Effect of Bo'fa method on the expression of IL-1 β in peripheral serum and 5-HT_{2A} in spinal cord of CCI model rats TAO Yanhong, YAO Binbin, YU Tianyuan, et al. School of Acupuncture Moxibustion and Tuina, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Corresponding author: YU Tianyuan, E-mail: yutianyuan@sina.com

【Abstract】 Objective Explore the effects of Bo'fa method on the recovery of sensory function of the CCI model rats from the behavior and morphology. **Methods** The CCI model rats were intervened qualitatively and quantitatively by the massage simulation instrument. The variation of rats' behavior was analyzed through the solar-thermal pain threshold. The changes of the IL-1 β in the serum were measured by ELISA. And we detected the relative protein expression of 5-HT_{2A} receptor in the spinal cord by Western blot. **Results** There was no significant difference in the results of solar-thermal pain threshold between the Bo'fa method group and the model group at the 7th day after modeling ($P>0.05$). After twenty times of Bo'fa method treatment, the difference between the two groups became statistically significant ($P<0.05$), and the results were at or near the normal group level. At the 7th day after modeling, the levels of IL-1 β in serum measured by ELISA in the model group and the Bo'fa method group were significantly higher than

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(81403497); 国家自然科学基金(81373759)

作者单位: 100029 北京中医药大学针灸推拿学院[陶艳红(硕士研究生)、姚斌彬、于天源、马驰(硕士研究生)、鲁梦倩、张林峰(硕士研究生)、吕桃桃(硕士研究生)、吴帅(硕士研究生)]

作者简介: 陶艳红(1991-),女,2014 级在读硕士研究生。研究方向: 推拿治疗周围神经损伤的机理研究。E-mail: 635421798@qq.com

通信作者: 于天源(1965-),博士,教授,博士生导师。研究方向: 推拿治疗周围神经损伤的机理研究。E-mail: yutianyuan@sina.com

those in the normal group. After 20 times of Bo'fa method treatment, the levels of IL-1 β in the Bo'fa method group declined significantly compared with those in the model group ($P<0.05$). The relative protein expression of 5-HT_{2A} in the spinal cord was measured by the method of Western blot. The results of this experiment indicated that, after 20 times of Bo'fa method treatment, the relative protein expression of 5-HT_{2A} in the spinal cord in the Bo'fa method group increased significantly higher than that in the model group ($P<0.05$), and became close to that in the normal group ($P>0.05$). **Conclusion** Bo'fa method treatment can increase obviously the values of solar-thermal pain threshold of CCI model rats, ease the recovery of sensory function, decrease the expression of pro-inflammatory cytokine IL-1 β in peripheral serum of the CCI model rats to eliminate the inflammation of NPP. Moreover, Bo'fa method can increase the expression of 5-HT_{2A} receptor in the spinal cord, playing an important role in the analgesia of central nerves.

【Key words】 Bo'fa method; Neuropathic pain; CCI model; IL-1 β ; 5-HT_{2A}

周围神经损伤是临床中的常见病症,其可引起神经病理性疼痛^[1](neuropathic pain, NPP)已被证实,主要以痛觉过敏、自发性疼痛、异常疼痛等感觉功能障碍为主要表现。由于其发病的多样化,发病机制尚未阐明,故为科研课题中的难点之一。本团队前期实验研究表明,推拿干预治疗是一种安全性高、非侵袭性的非药物治疗方法,其能有效改善周围神经损伤大鼠的行为学指标,促进轴浆运输功能的恢复,促进轴突再生及神经营养因子的表达^[2],保护神经元,修复神经髓鞘^[3]等,然而关于推拿干预的效应机制尚不完全明确。本实验采用坐骨神经慢性压迫损伤(chronic constriction injury of the sciatic nerve, CCI)模型^[4]大鼠,通过观察其行为学的改变,应用 ELISA 法以及 Western blot 法,检测推拿干预后血清中促炎性细胞因子 IL-1 β ^[5]以及脊髓中 5-HT_{2A}受体^[6-7]蛋白的表达情况,定性定量地探讨拨法对周围神经操作功能恢复的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选取清洁级 SD 大鼠(由北京思贝福实验动物科技有限公司提供),实验动物许可证号:SCXK(北京)2011-0004,体重(160 \pm 10)g,雄性,48 只。购入后,适应性饲养 1 周。之后采用完全随机设计法,利用随机数字表将 48 只 SD 大鼠随机分为 4 组,即正常组 12 只、假手术组 12 只、模型组 12 只、拨法组 12 只。

1.2 造模方法

1.2.1 器械 手术剪、止血钳、镊子、小号持针器、棉签、烧杯、托盘、5 mL 注射器、一次性塑胶手套、口罩、医用缝合针及非吸收性外科缝线(上海医用缝合针厂)、薇乔抗菌缝线 4~0^[8]。

1.2.2 药品 水合氯醛(天津市福晨化学试剂厂)、碘伏消毒液(北京四环卫生药械厂有限公司出品)、甲醛溶液(广东汕头市西陇化工厂)、0.9% 氯化钠注射液。

1.2.3 造模 假手术组:分离暴露左侧坐骨神经中段、不结扎,逐层消毒后行常规缝合。模型组、拨法治疗组:按照 Bennett 和 Xie 的方法,建立 CCI 动物模型。(1)10% 水合氯醛 300~350 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠;(2)大鼠右侧俯卧位置于鼠板上,以右侧股骨中点为中心,2 cm 为直径,备皮、消毒;(3)从左侧大腿中部股骨外缘与股骨平行的方向切开皮肤;(4)肌间隙钝性分离肌间筋膜;(5)暴露坐骨神经主干;(6)在坐骨神经分叉前游离 6 mm 左右,(7)用 4~0 铬制羊肠线间隔 1 mm 环绕结扎 4 道,松紧程度以引起小腿肌肉轻微颤动且不影响神经外膜血运为宜。(8)术毕,生理盐水冲洗,逐层消毒,缝合皮肤。(9)术后将大鼠置于保温毯上,等待苏醒,禁食禁水 24 小时。

1.3 治疗方法

正常组:常规喂养。假手术组:行假手术,常规喂养。模型组:慢性坐骨神经压窄性损伤造模,不做任何处理,常规喂养。拨法治疗组:(1)治疗方法:于造模后第 7 天开始治疗。每天用按摩推拿手法模拟仪(专利号:200710187403.1)定性模拟拨法,依次刺激大鼠患侧股门、承山、阳陵泉穴。每穴各刺激 3 分钟,每只总计 9 分钟。按摩头为光滑的接触面,直径 10 mm。(2)治疗次数:每天 1 次,共 20 次。

1.4 指标检测

1.4.1 行为学检测 光热耐痛阈检测:评价大鼠温度觉和痛觉恢复情况。测试过程需保持安静,室温 20~25℃。测试前将大鼠置于检测盒内,待其适应

环境后,用辐射灯光源照射其足跖中后 1/3 处,按下开始按钮,待大鼠抬脚时计时自动停止,记录此时时间,作为大鼠热痛缩腿反应潜伏期。为防止大鼠组织热灼伤,设定光源自动切断时间为 20 秒。每侧下肢测定 2 次,取其平均值。

1.4.2 形态学坐骨神经 HE 染色 将展片 40℃ 恒温烤箱中烤片 12 小时,烤干备用;使用二甲苯脱蜡;梯度乙醇水化;水洗 3 分钟;苏木精染液染色 3 分钟,以染核;再水洗 3 分钟;盐酸乙醇分色 3~5 秒。带粉红色后立即取出;水洗 30 秒;在碳酸锂饱和液中提插 10 下,细胞核变为蓝色后水洗 1 分钟;伊红染液染色 1 分钟后水冲洗;梯度乙醇脱水;二甲苯透明;中性树胶封片。

1.4.3 ELISA 法检测 采集大鼠腹主动脉血 5 mL,室温静置约 1~2 小时后,用离心机以 3000 r/min 离心 15 分钟,即可分离出血清,移液枪取出血清,−20℃ 封存待用。采用 ELISA 试剂盒测定血清中 IL-1β 浓度。

1.4.4 Western blot 法检测 取大鼠 L3~L5 腰膨大脊髓背角,称量 50~100 mg 组织放在玻璃匀浆器中,加入 500~1000 μL RIPA 裂解液,裂解液中加 PMSF(1 mM),在冰上进行匀浆,直至匀浆充分无块状;提取蛋白,弃去沉淀,−80℃ 保存备用。进行蛋白质电泳、转膜封闭剂杂交,曝光鉴定,进行扫描胶片,用 Quantity One 图像分析软件分析目标条带的光密度值。

以上每项指标检测均每组随机选取 6 只大鼠进行。

1.5 统计学处理

用 SPSS 20.0 统计软件进行分析,率的比较用卡方检验,均数比较用方差分析,组间两两比较方差齐时用 Bonferroni 检验,方差不齐时用 Tamhane's T2 检验, $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠患肢光热耐痛阈的变化情况

各组大鼠光热耐痛阈结果(见表 1):造模后 7 天的拨法组、模型组与正常组相比,阈值明显下调,差异均有统计学意义($P<0.05$),说明坐骨神经慢性压迫性损伤后,大鼠出现热痛觉过敏现象,对感觉功能造成一定影响。假手术组与正常组相比,差异无统计学意义($P>0.05$),说明只切开肌肉,未结扎坐骨神经的大鼠一周左右的时间即可逐渐恢复。

拨法治疗 20 次(28 天)后,拨法组的光热耐痛阈虽然仍低于正常组,差异有统计学意义($P<0.05$),但其与模型组的光热耐痛阈相比,已有显著性升高($P<0.05$),说明拨法可以减轻 CCI 模型大鼠的痛觉过敏状态。

表 1 各组大鼠光热耐痛阈比较($\bar{x}\pm s$,秒)

组别	n	7 天	28 天
正常组	6	14.27±0.95	14.70±1.21
假手术组	6	12.70±1.44	14.32±0.67
拨法组	6	7.53±1.32 ^a	12.03±1.04 ^{ab}
模型组	6	6.47±1.21 ^a	8.25±0.85 ^a

注:与正常组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

2.2 光镜观察 HE 染色结果

造模后 7 天:正常组、假手术组可见完好无损的髓鞘及轴索;模型组轴索崩解。

拨法治疗 20 次:正常组、假手术组可见结构完整的神经纤维髓鞘及轴索;模型组轴索崩解,髓鞘破碎;拨法组镜下可见有序排列的神经纤维以及清晰完整的轴索。见图 1。

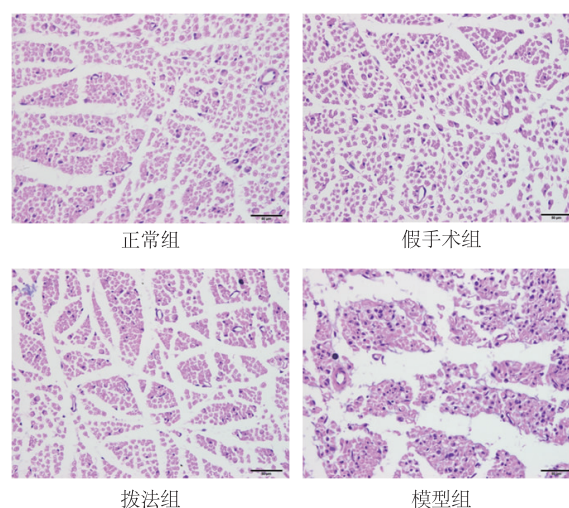


图 1 各组大鼠势拨法治疗 20 次后坐骨神经形态观察(×400)

2.3 血清 IL-1β 的含量

CCI 模型大鼠血清 IL-1β 的含量比较结果(见表 2):造模后 7 天的拨法组、模型组与正常组相比,血清中 IL-1β 表达上升,差异均有统计学意义($P<0.05$);假手术组与正常组相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。拨法治疗 20 次后,拨法组大鼠血清中 IL-1β 虽与正常组有一定差距($P<0.05$),但与模型组相比已有显著性下降($P<0.05$)。

表 2 各组大鼠血清 IL-1 β 的含量比较($\bar{x}\pm s$, ng/L)

组别	n	7 天	28 天
正常组	6	96.33 \pm 19.26	94.54 \pm 10.81
假手术组	6	125.83 \pm 30.46	106.88 \pm 18.93
拨法组	6	268.00 \pm 95.56 ^a	145.90 \pm 26.51 ^{ab}
模型组	6	237.17 \pm 40.03 ^a	194.37 \pm 50.00 ^a

注:与正常组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

2.4 脊髓中 5-HT_{2A} 的蛋白相对表达情况

CCI 模型大鼠脊髓中 5-HT_{2A} 蛋白相对表达量结果(见表 3、图 2);造模后 7 天,拨法组与模型组相比,CCI 模型大鼠脊髓中 5-HT_{2A} 受体蛋白的表达量无差异($P>0.05$);二者与正常组相比,蛋白表达明显下降($P<0.05$)。拨法治疗 20 次后,拨法组大鼠脊髓中 5-HT_{2A} 受体蛋白表达含量与正常组差异无统计学意义($P>0.05$),但拨法组与模型组相比,5-HT_{2A} 蛋白表达含量已明显上调($P<0.05$)。

表 3 各组大鼠脊髓中 5-HT_{2A} 蛋白
相对表达量的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	7 天	28 天
正常组	6	0.66 \pm 0.16	0.70 \pm 0.22
假手术组	6	0.58 \pm 0.06	0.66 \pm 0.06
拨法组	6	0.46 \pm 0.03 ^a	0.63 \pm 0.03 ^b
模型组	6	0.45 \pm 0.01 ^a	0.48 \pm 0.03 ^a

注:与正常组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

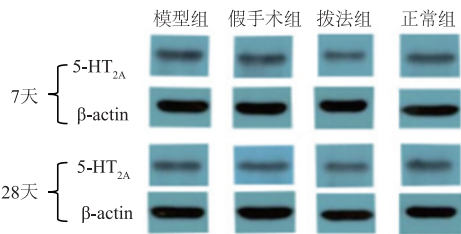


图 2 各组大鼠脊髓中 5-HT_{2A} 蛋白 Western Blot
条带分析结果图

3 讨论

随着推拿临床医技的发展,推拿所治疗的疾病范围逐渐拓宽,但临床中以颈椎病、腰椎间盘突出等伤科类疾病较为多见,这些疾病的发展或多或少都会累及周围神经的损伤。而周围神经损伤临床症状主要表现为感觉功能与运动功能障碍,周围神经损伤患者常因病灶局部或四肢远端的疼痛、麻木、无力等主诉就诊,运用推拿治疗,可针对病变部位及受累部位,进行“局部-整体”的结合治疗,能够缓解、治疗患者的疼痛,取得满意的疗效。同时因

其痛苦小、疗效好、无不良反应,已逐渐受到患者的认可,成为临床上伤科类疾病非手术疗法中最为常用的治疗手段。中医学认为疼痛多由经络循行受阻、气血瘀滞所致,即不通则痛。拨法是运用较广的外治法之一,对于缓解肌肉的痉挛作用性强,伤科疾病中应用十分广泛,当作用于神经干处,可以通过拨动神经干及周围肌肉韧带,达到治疗远端肢体的麻木或疼痛症状^[9]的作用。本次研究为推拿解决感觉功能障碍的机理研究,因此选用拨法,相对其他手法,能更加直接、有效地作用于治疗部位,针对性更强。

有相关研究表明,外周感受区的 NPP 常伴有炎症反应^[10],在相应的损伤部位可检测到炎性介质;另有研究证实抗炎症药物能够减轻慢性 NPP^[11],认为炎症因子在周围神经系统损伤引起的神经病理性痛中具有重要作用。近年来国内外研究发现,IL-1 β 是促炎性细胞中的代表性因子^[12],其作用与疼痛关系密切,尤其影响慢性疼痛的发生与发展过程。外周刺激可降低血清中 IL-1 β 的含量,从而起到消除炎症的作用。本实验研究结果显示,经过拨法治疗 20 次后,拨法组的 IL-1 β 与模型组相比有显著性下降,说明拨法干预可以下调促炎性细胞因子 IL-1 β 的表达,进而起到“消炎镇痛”的作用。

5-HT 是生物体内广泛分布的单胺类神经递质,与多种疾病的发生密切相关,如疼痛、焦虑、抑郁、偏头痛、高血压、呕吐等,其中 5-HT 与疼痛的关系备受关注。5-HT 受体可分为 7 种亚型,即 5-HT₁₋₇ 受体,其中 5-HT₂ 受体又可分为 5-HT_{2A} 受体、5-HT_{2B} 受体和 5-HT_{2C} 受体(5-HT_{2A} 受体参与疼痛的产生或调控已被证实)。大量疼痛模型的实验也表明 5-HT_{2A} 受体是伤害性信息向中枢传递的重要神经递质^[13],在大鼠的脊髓中,外周刺激如电针、火针等,可使 5-HT_{2A} 受体的表达增加,产生突触后抑制作用,继而产生镇痛作用^[14]。本实验研究结果显示,拨法治疗 20 次后,拨法组脊髓中 5-HT_{2A} 相对蛋白表达含量明显上调,且已接近正常组水平($P>0.05$),高于模型组水平($P<0.05$),说明作为外周刺激的一种方式,拨法可刺激 5-HT_{2A} 受体在脊髓中的表达,从而起到中枢镇痛作用。

本次实验结果揭示,经过拨法治疗,可明显减轻 CCI 模型大鼠的痛敏状态,修复受损的轴突;下调血清中促炎性细胞因子 IL-1 β 的表达,达到“消炎镇痛”的作用;上调脊髓中 5-HT_{2A} 受体的表达,对中

枢镇痛起到一定作用。虽然拨法通过 CCI 模型大鼠探究 NPP 相关疾病的治疗过程取得了一定成果,但仍需进一步全面深入地研究,以期更加清晰地阐明其作用机制,开拓更广泛的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 刘延青. 神经病理性疼痛治疗进展[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2010, 10(6): 611-614.
- [2] 张大鹏, 潘世奇, 侯明明, 等. 周围神经损伤后最佳修复时间时机的选择[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(20): 3726-3729.
- [3] 吴剑聪. 推拿通过影响 NT-3、TrkC 表达促进 SNI 大鼠恢复的机理研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [4] 俞立丰, 李家琦, 于天源, 等. CCI 模型在针灸推拿治疗神经性病理痛领域的研究进展[J]. 南京中医药大学学报, 2016, 32(4): 392-395.
- [5] 郭现辉, 王珂, 王鑫, 等. 电针对慢性坐骨神经结扎性损伤模型大鼠外周血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 表达的影响[J]. 上海中医药杂志, 2013, (9): 66-69.
- [6] 王江博, 杨清湖, 孙志宏, 等. 脊髓 5-HT_{2A} 受体在疼痛中的作用与机制[J]. 延安大学学报(自然科学版), 2015, 34

- (1): 37-39, 45.
- [7] 冀海明, 洪炎国. 5-羟色胺 2A 受体与疼痛[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2007, 27(5): 456-460.
- [8] 王维, 冯泽国, 马涛, 等. 铬制肠线与丝线制作 CCI 模型效果比较[J]. 军医进修学院学报, 2010, 31(5): 480-482.
- [9] 于天源, 林彩霞, 付国兵, 等. 按摩推拿学[M]. 3 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2012.
- [10] 高永静, 张志军, 曹德利. 趋化因子介导的神经炎症反应和神经病理性疼痛[J]. 中国细胞生物学学报, 2014, 22(3): 297-307.
- [11] 桂玉龙. 曲克芦丁对 CCI 模型所致神经性病理疼痛及脊髓腰膨大部炎症反应的影响[D]. 衡阳: 南华大学, 2015.
- [12] 张文华, 江剑平. 白介素-1 β 在炎性痛中的作用及其机制[J]. 生命科学, 2010, 22(3): 291-295.
- [13] 崔成竣, 郭长青, 付伟涛, 等. 针刀用于腰椎间盘突出症根性神经痛大鼠中枢镇痛的机制研究[J]. 中国康复医学杂志, 2015, 30(4): 324-328.
- [14] 谢虹. 曲马多与电针合用治疗慢性炎症痛的神经生物学机制研究[D]. 上海: 复旦大学, 2003.

(收稿日期: 2016-11-23)

(本文编辑: 董历华)