

缪刺电针足三里穴、阳陵泉穴对 CCI 大鼠背根神经节 P2X₃ 受体表达的影响

操 芬 屠文展 程瑞动 程 博 蒋松鹤

摘 要 **目的** 观察缪刺电针和患侧电针足三里穴、阳陵泉穴对坐骨神经慢性缩窄性损伤 (CCI) 模型大鼠痛阈和背根神经节 P2X₃ 受体表达的影响。**方法** 通过机械刺激法和热辐射法测定大鼠机械缩足反射阈值 (MWT) 和热缩足反射潜伏期 (TWL), 采用 Western blotting 法观察大鼠造模侧 L4 - L6 DRG 上 P2X₃ 受体蛋白的表达。**结果** ①与假模组比较, CCI 术后各组大鼠在各时间点 MWT 和 TWL 明显降低 (P 均 < 0.001); 电针 7 天后, 与模型对照组相比, 缪刺电针组和患侧电针组 MWT 和 TWL 升高 (P 均 < 0.05); 缪刺电针组和患侧电针组 MWT 和 TWL 差异无统计学意义 (P 均 > 0.05); ②CCI 术后第 14 天, 与假模组相比, 各组大鼠 P2X₃ 受体蛋白表达上调 (P 均 < 0.05), 与模型对照组相比, 电针能够明显减少 P2X₃ 受体蛋白的表达 (P 均 < 0.001), 缪刺电针组与患侧电针组相比, 差异没有显著性 ($P > 0.05$)。**结论** 缪刺电针和患侧电针足三里穴、阳陵泉穴, 均可下调 CCI 大鼠 DRG 神经元中 P2X₃ 受体蛋白的表达, 减轻 CCI 大鼠机械性痛觉过敏和热痛觉过敏。

关键词 足三里穴、阳陵泉穴 DRG 慢性坐骨神经压迫性损伤 P2X₃ 受体 镇痛

Effect of Contralateral and Ipsilateral Electroacupuncture Zusanli, Yanglingquan Acupoint on the Expression of P2X₃ Receptor in the L4 - L6 Segments of DRG of Rats with Chronic Constrictive Injury. Cao Fen, Tu Wenzhan, Cheng Ruidong, Cheng Bo, Jiang Songhe. Rehabilitation Center of Affiliated Second Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325027, China

Abstract Objective To observe the change of P2X₃ receptor protein expression located in the L4 to L6 segments of dorsal root ganglion (DRG) by electroacupuncture (EA) Zusanli acupoint (ST36) and Yanglingquan acupoint (GB34) on rats with chronic constrictive injury (CCI) of the right sciatic. **Methods** The mechanical withdrawal threshold (MWT) and thermal withdrawal latency (TWL) were measured by mechanical stimulation method and thermal radiation electronic. The expression of the P2X₃ receptor protein was detected by Western blotting. **Results** ①After CCI operation, the MWT and TWL of each group rat were significantly decreased ($P < 0.001$) as compared to the sham group on every post-operative day. In the contralateral EA group and ipsilateral EA group, MWT and TWL were increased ($P < 0.05$) compared with the model control group after EA treatment 7 days. There was no significant difference between the contralateral EA group and ipsilateral EA group ($P > 0.05$). ②After CCI operation 14 days, there was increased expression of P2X₃ receptor protein in each group compared with the sham group ($P < 0.05$). After electroacupuncture treatment 7 days, the P2X₃ receptor protein expression was decreased at a different degree in the contralateral EA group and ipsilateral EA group, and the changes were significant differences compared with the model control group ($P < 0.001$). But there was no significant difference between the contralateral EA group and ipsilateral EA group ($P > 0.05$). **Conclusion** Electroacupuncture contralateral and ipsilateral Zusanli acupoint and Yanglingquan acupoint can down-regulate the protein expression of P2X₃ receptor in the L4 - L6 DRG at operation side, and can alleviate mechanical hyperalgesia and thermal hyperalgesia induced by CCI.

Key words Zusanli acupoint (ST36); Yanglingquan acupoint (GB34); DRG; Chronic constrictive injury; P2X₃ receptor; Analgesia

三磷酸腺苷 (adenosine 5' - triphosphate, ATP) 已经被证实具有神经递质或调质作用, P2X₃ 受体是

ATP 受体的一种亚型, 属配体门控型离子通道, 可表达于初级传入神经元的胞体、中枢端和外周端, 参与初级感觉神经元的痛觉及伤害性信息传递^[1-3]。神经病理痛和炎性痛刺激时, P2X₃ 受体蛋白和 mRNA 表达增加, 感觉神经元 P2X₃ 受体介导 ATP 激活的门控通道电流明显增强^[4]。

缪刺为左病取右, 右病取左的针刺方法, 始见于

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30901924)

作者单位: 325027 温州医学院附属二院康复中心 (操芬、屠文展、程瑞动、程博、蒋松鹤); 325035 温州医学院 (操芬、程瑞动、蒋松鹤)

通讯作者: 蒋松鹤, 教授, 电子信箱: jshwz@126.com

《黄帝内经》,多用于中风偏瘫、软组织损伤及诸多疼痛症。临床上,缪刺足三里穴、阳陵泉穴常用于治疗腰腿痛,疗效显著,在动物实验研究也发现针刺大鼠足三里穴、阳陵泉穴具有累积镇痛效应^[5,6]。针刺的镇痛机制复杂,Goldman 等^[7]研究发现针刺大鼠足三里穴后,穴位周围 ATP 及其代谢产物腺苷等浓度明显增高。因此嘌呤类物质及其受体和针刺镇痛之间的联系引起了学者们的关注。Xiao 等^[8]研究证明电针坐骨神经慢性缩窄性损伤(chronic constriction injury of the sciatic nerve,CCI)大鼠造模侧足三里穴可引起 CCI 大鼠机械痛阈和热痛阈升高及中脑导水管周围灰质外侧部 P2X₃ 受体表达升高。然而缪刺电针足三里穴、阳陵泉穴对大鼠背根神经节(dorsal root ganglion, DRG) P2X₃ 受体表达的影响尚未见报道。本实验采用 CCI 模型大鼠,通过缪刺电针和患侧电针足三里穴、阳陵泉穴,观察大鼠造模侧机械缩足反射阈值(mechanical withdrawal threshold, MWT)和热缩足反射潜伏期(thermal withdrawal latency, TWL)的变化及 P2X₃ 受体蛋白在 L4 ~ L6DRG 神经元上的表达变化,旨在探讨 P2X₃ 受体在缪刺电针抗慢性神经病理性疼痛中的作用。

材料与方法

1. 主要试剂和仪器:兔抗大鼠 P2X₃ 多克隆一抗(美国 Millipore 公司 AB5895),HRP 标记山羊抗兔 IgG(H + L)(上海碧云天公司 A0208)。336 爪/尾刺激痛觉测试计以及 2390 Electrovonfrey 测痛计购自美国 ITC 公司。

2. 动物分组及 CCI 模型制备:清洁级健康成年雄性 SD 大鼠 32 只,由温州医学院实验动物中心提供,体重 170 ~ 200g,随机分为 4 组:假模组(只暴露坐骨神经,不结扎不电针)、模型对照组(右侧后肢造模不电针)、缪刺电针组(右侧后肢造模后电针左侧足三里穴、阳陵泉穴)、患侧电针组(右侧后肢造模后电针右侧足三里穴、阳陵泉穴),每组 8 只。

除假模组外,其余 3 组按 Bennett 等^[9]模型制备方法建立大鼠 CCI 模型,5% 水合氯醛(0.6ml/100g 体重)腹腔注射麻醉,大鼠右侧后肢股去毛备皮,常规消毒,沿右股骨下缘切开皮肤,钝性分离肌肉,暴露坐骨神经,用 4-0 可吸收铬制羊肠线在坐骨神经分叉前打 4 个间隔 1mm 的松结,使神经外膜稍稍受压,松紧度以股肌肉或足指轻微抽动为度。假模组大鼠仅暴露坐骨神经 2 ~ 3min,不打结,其余手术操作相同。CCI 模型制备后大鼠出现跛行,足呈轻度外翻状,且有时出现舔舐、悬空等后肢保护现象,表明坐骨神经慢性挤压伤模型制备成功。造完模后,各组大鼠分笼饲养,自由饮食,室温 22 ± 2℃,相对湿度 50% ~ 70%。

3. 电针方法:CCI 术后第 8 天,将大鼠固定于自制改良的大鼠针刺固定器,暴露针刺侧肢体,相应部位去毛备皮,安静

后用 3mm 皮内针,针刺足三里穴、阳陵泉穴(取穴标准按郭义主编的《实验针灸学》^[10]:足三里穴在膝关节下腓骨小头下方约 5mm 处;阳陵泉穴在膝关节下方,腓骨小头前下方凹陷处),垂直进针 3mm,用胶布局部固定,防止脱出。采用韩氏治疗仪,2/100Hz 交替脉冲连续刺激,每种波形持续 2.5s,电流强度 1mA(以腿部肌肉轻微抽动为度),持续 30min,每日同一时段连续电针 7 天。假模组和模型对照组不予电针处理。

4. 行为学测定:(1)机械缩足反射阈值(MWT):将大鼠置于透明的有机玻璃箱中,底为 1cm × 1cm 的铁丝网,待大鼠安静后,用 2390 Electrovonfrey 测痛计的电子压力传感器探头由下向上刺激大鼠右侧后肢足底中部皮肤,垂直向上均匀缓慢增加力度至大鼠右后肢抽动或抬足逃避,记录此时电子显示器上的数值(单位 g)。测定时间为术前 1 天及术后 3、5、7、10、12、14 天,每次测定重复 5 次,间隔 5min,取 5 次平均值。(2)热缩足反射潜伏期(TWL):将大鼠置于底为 3mm 厚玻璃板的有机玻璃箱中,待大鼠在安静后,用 336 爪/尾刺激痛觉测试计的灯光照射大鼠右后肢足底中部皮肤。热辐射刺激仪参数设定:加热头空闲时激光发射强度为 20%,加热头测试工作时激光发射强度为 60%,切断时间 25s 以防测试时间过长对动物造成损伤,触发温度 30℃。待大鼠右后肢抬起逃避时,切断热源,记录此时的照射时间(s)。测定时间为术前 1 天及术后 3、5、7、10、12、14 天,每次测定重复 5 次,间隔 10min,取 5 次平均值。

5. Western blotting 法检测 P2X₃ 受体蛋白表达:术后第 14 天,腹腔注射 10% 水合氯醛(0.4ml/100g)麻醉后,冰上取 L4 ~ L6 DRG 用于 P2X₃ 受体蛋白检测。在冰上将 L4 ~ L6 DRG 加组织裂解液(用 Western 及 IP 裂解液和 PMSF 配制,比例为 99:1)研碎,充分裂解,4℃,12000r/min × 5min 离心取上清,用 BCA 法测定蛋白浓度。各样本按 60μg/15μl 蛋白上样,70V 和 120V 电泳后 300mA 湿转 40min,5% 脱脂奶粉室温封闭 2h,TBST 漂洗 3 × 5min,P2X₃ 一抗(1:1000)4℃孵育 18h,TBST 漂洗 3 × 10min 后室温下 HRP 标记山羊抗兔二抗(1:1000)孵育 1h,TBST 漂洗 3 × 10min,滴加 ECL 显色,DNR Micro Chemi 化学发光凝胶成像系统成像。

6. 图像分析及数据处理、统计学方法:Alpha Ease FC(Fluorchem FC 2)软件对 Western blotting 实验结果进行半定量分析,结果以 P2X₃ 受体蛋白和内参 Actin 平均光密度值的比值表示该蛋白的相对表达水平,所得数据均用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 16.0 统计软件分析,痛阈数据用重复测量的两因素方差分析处理,平均光密度值的比值采用单因素方差分析后进行 LSD 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1. CCI 模型大鼠行为学观察:CCI 术后第 1 天大鼠出现行走时患肢拖动,不能抬离地面,跛行,安静时足呈轻度外翻状,足趾不能承重或以膝关节承重,且有时出现舔舐、悬空等后肢保护现象,日常活动及梳

理皮毛动作明显较假模组减少。

假模组大鼠术前与术后比较, MWT 和 TWL 无明显差异。与假模组相比, CCI 术后各组大鼠在各时间点 MWT 和 TWL 明显降低 (P 均 < 0.001), 其中模型对照组大鼠的 MWT 和 TWL 缓慢下降至术后第 14 天。电针治疗后, 缪刺电针组和患侧电针组大鼠 MWT 和 TWL 均有不同程度的持续升高, 与模型对照组相比差异显著 (P 均 < 0.05)。术后第 14 天, 缪刺电针组和患侧电针组相比无明显差异 ($P > 0.05$ 、图 1、图 2)。

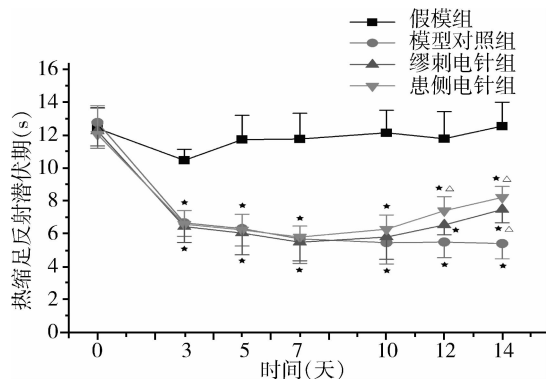


图 1 CCI 术后大鼠热缩足反射潜伏期 (TWL) 变化曲线
同一时间窗, 与假模组比较, $*P < 0.001$; 与模型对照组比较, $\Delta P < 0.01$

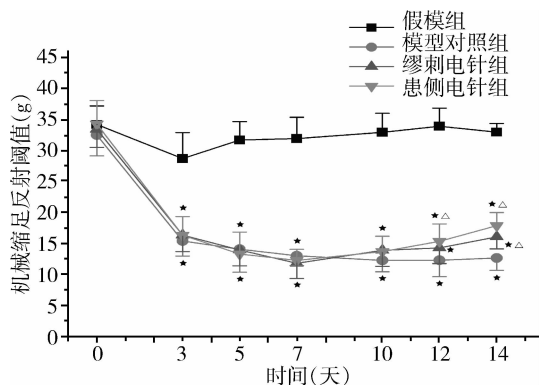


图 2 CCI 术后大鼠机械缩足反射阈值 (MWT) 变化曲线
同一时间窗, 与假模组比较, $*P < 0.001$; 与模型对照组比较, $\Delta P < 0.05$

2. 大鼠 CCI 术后 L4 ~ L6 DRG 神经元上 $P2X_3$ 受体蛋白表达变化: Western blotting 分析结果提示, 在 4 个实验组中均观察到在分子质量 48kDa 处有免疫阳性条带, 与已知的 $P2X_3$ 受体蛋白分子质量符合。以 Actin 作为内参蛋白, 采用相对光密度值定量检测结果。CCI 术后第 14 天, 与假模组比较, 3 组大鼠造模侧 L4 ~ L6 DRG 神经元上 $P2X_3$ 受体蛋白表达上调

(P 均 < 0.05)。经电针干预 7 天后, 缪刺电针组和患侧电针组大鼠造模侧 L4 ~ L6 DRG 神经元中 $P2X_3$ 受体蛋白表达均减少, 与模型对照组比较, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.001)。缪刺电针组与患侧电针组相比, L4 ~ L6 DRG 神经元中 $P2X_3$ 受体蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 3、图 4)。

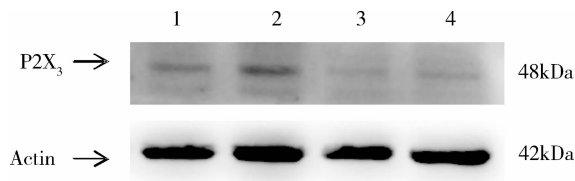


图 3 Western blotting 检测大鼠造模侧 L4 ~ L6 DRG 神经元上 $P2X_3$ 受体蛋白表达

1. 假模组; 2. 模型对照组; 3. 缪刺电针组; 4. 患侧电针组

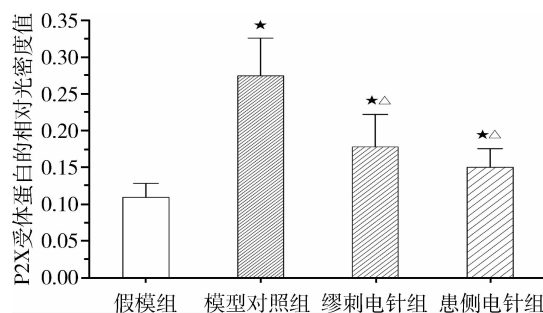


图 4 DRG 神经元 $P2X_3$ 受体蛋白相对光密度值

与假模组比较, $*P < 0.05$; 与模型对照组比较, $\Delta P < 0.001$

讨 论

1. 足三里穴、阳陵泉穴的解剖及信号传导: 足三里属足阳明胃经, 阳陵泉属足少阳胆经, 二者解剖部位临近, 均在腓骨小头附近, 是临床上治疗坐骨神经痛常用的两个穴位。《针灸学》^[11]中记载: 足三里在外膝眼下 3 寸, 胫骨前嵴外一横指处, 穴深层为腓深神经; 阳陵泉在腓骨小头前下方凹陷中, 为足少阳胆经合穴, 局部解剖正当腓总神经分为腓浅神经和腓深神经处, 这些神经正是坐骨神经的分支。楼新法等^[12,13]研究发现, 足三里穴有一个神经小分支和小血管密集区, 位于胫骨前肌与骨间膜之间的疏松结缔组织内, 并认为针刺足三里穴区能通过腓深神经和胫前动脉壁上的神经丛上传针刺信号, 直刺阳陵泉略向下即可刺中腓总神经分支其附近。在临床研究中, 赵敏生等^[14]采用辣根过氧化物酶 (CT-HRP) 追踪到大鼠左侧足三里穴投射到脊髓的 T12 ~ S2 节段, 以 L5 ~ S2 的标记最多, 本实验的取材正是 L4 ~ L6 DRG, 与足三里穴的投射区相吻合。

2. 缪刺:缪刺是临床常用的交叉取穴针刺方法,《黄帝内经》中记载:“夫邪客大络者,左注右,右注左,上下左右,与经相干,而布于四末,其气无常处,不入于经俞,命曰缪刺”。可见,缪刺是一种左病治右,右病治左的取穴方法。目前,学者们对缪刺取穴的作用机制已进行了探索,临床上,肖叶玉等^[15]通过磁共振功能成像研究表明直刺右侧足三里可引起脑双侧多个功能区的激活。周诚等进行了针刺阳陵泉穴 fMRI 脑功能成像的研究,结果显示针刺阳陵泉穴,同侧枕叶视皮质有明显兴奋区,双侧枕叶视皮质都有明显兴奋区。动物实验研究也发现缪刺法对佐剂性关节炎大鼠有较好的镇痛效应。

本实验研究发现缪刺电针组和患侧电针组造模侧 L4 ~ L6 DRG 神经元上 P2X₃ 受体的表达均降低,与模型对照组相比均有显著差异 ($P < 0.001$),而缪刺电针组与患侧电针组比较 P2X₃ 受体表达无明显差异 ($P > 0.05$),且电针 7 天后大鼠 MWT 和 TWL 均有不同程度的持续升高,缪刺电针组和患侧电针组相比无明显差异。这一结果提示缪刺电针和患侧电针均能下调 CCI 大鼠造模侧 L4 ~ L6 DRG 上 P2X₃ 受体表达,减轻 CCI 大鼠机械性痛觉过敏和热痛觉过敏,考虑此结果的可能机制为缪刺电针和患侧电针的针刺信号均能通过 DRG 传导至脊髓,再上行至脊髓上中枢,如下丘脑、中脑导水管周围灰质、大脑皮质等,引起脑内双侧多个功能区的激活,从而对伤害性刺激引起的反应进行调制,降低造模侧 L4 ~ L6 DRG 上 P2X₃ 受体表达,从而起到镇痛作用。

3. DRG 神经元中 P2X₃ 受体和疼痛传导的关系:DRG 作为痛觉传入的第一级神经元,在痛觉的外周机制中起着极为重要的作用。疼痛信号由 DRG 初步加工后传入脊髓,再经多条传导束向高级中枢传递,最后到达大脑皮质。DRG 神经元中不仅含有传递伤害性感觉的神经递质和调质,如速激肽、兴奋性氨基酸等,也含有起突触前调制作用的受体,如 γ 氨基丁酸 (GABA)、阿片、嘌呤等受体,以及一些离子通道。这些物质在疼痛的发生机制中起重要作用。刘晓红等研究表明坐骨神经缩窄性损伤致神经痛后同侧对应节段的背根节神经元 P2X₃ 受体表达明显增加,ATP 快反应电流明显增强。本实验研究结果发现,模型对照组造模侧 L4 ~ L6 DRG 神经元上 P2X₃ 受体蛋

白表达量与假模组相比显著升高,与以往研究报道相一致。

本实验的研究结果提示缪刺电针和患侧电针刺激大鼠“足三里、阳陵泉”穴均可下调 CCI 大鼠造模侧 L4 ~ L6 DRG 神经元上 P2X₃ 受体表达,为针刺镇痛机制的进一步研究和针刺镇痛的临床运用提供了参考。

参考文献

- Honore P, Kage K. Analgesic profile of intrathecal P2X₃ antisense oligonucleotide treatment in chronic inflammatory and neuropathic pain states in rats[J]. *Pain*, 2002, 99(1-2): 11-19
- Gourine AV, Wood JD, Burnstock G. Purinergic signalling in autonomic control[J]. *Trends Neurosci*, 2009, 32:241-248
- Wirkner K, Sperlagh B, Illes P. P2X₃ receptor involvement in pain states[J]. *Mol Neurobiol*, 2007, 36: 165-183
- Jarvis MF, Burgard EC, McGaughy S, et al. A-317491, a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X₃ and P2X_{2/3} receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat[J]. *PNAS*, 2002, 99(26): 17179-17184
- 刘俊岭,陈淑萍,高永辉,等.不同强度、不同频度电针对慢性痛大鼠镇痛作用的比较[J]. *针刺研究*, 2006, 31(5): 280-285
- 高永辉,陈淑萍,王俊英,等.电针对慢性压迫性损伤大鼠脊髓 N-甲基-D-天门冬氨酸受体 NR2B 表达的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2010, 25(11): 1026-1029
- Goldman N, Chen M, Chen JF, et al. Adenosine A1 receptors mediate local anti-nociceptive effects of acupuncture[J]. *Nat Neurosci*, 2010, 13(7): 883-888
- Xiao Z, Ou S, He WJ, et al. Role of midbrain periaqueductal gray P2X₃ receptors in electroacupuncture-mediated endogenous pain modulatory systems[J]. *Brain Research*, 2010, 1330:31-44
- Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man[J]. *Pain*, 1988, 33(1): 87-107
- 郭义. 实验针灸学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2008:415-417
- 石学敏. 针灸学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2002:46-97
- 楼新法,杨新东,蒋松鹤,等.足三里穴进针角度和深度的研究[J]. *中国针灸*, 2006, 26(7): 483-486
- 楼新法,杨新东,蒋松鹤,等.腓总神经的分支与阳陵泉的关系[J]. *针灸临床杂志*, 1998, 14(8): 4-5
- 赵敏生,余安胜,李西林.辣椒过氧化物酶追踪足三里穴的脊髓投射研究[J]. *中国针灸*, 1999(9): 551-553
- 肖叶玉,杜丽,洪璧楷,等.手法针灸足三里穴脑内效应磁共振功能成像研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2008, 2:122-125

(收稿:2011-11-12)

(修回:2011-11-28)