

针 灸 推 拿

电针夹脊穴对佐剂性关节炎大鼠脊髓背角内磷酸化
ERK、NK-1 信号转导通路的影响王春雷¹ 王升旭¹ 许幸仪²

摘要 目的:观察电针夹脊穴对佐剂性关节炎大鼠脊髓背角内磷酸化细胞外信号调节激酶(ERK)、神经激肽-1(NK-1)表达的影响,从信号转导的角度研究电针镇痛可能的作用机理。方法:80只Wistar成年雄性大鼠随机分为正常对照组、单纯电针组、模型30分钟组、模型24小时组、模型48小时组及电针治疗30分钟组、电针治疗24小时组、电针治疗48小时组,每组10只。以完全弗氏佐剂注入大鼠左后足垫皮肤内制作炎性痛模型,电针大鼠双侧L₃~L₅夹脊穴,采用免疫组化技术,分别检测各组大鼠痛阈及脊髓背角内磷酸化ERK与NK-1表达。结果:与正常对照组及单纯电针组比较,模型各组大鼠痛阈明显下降(均 $P<0.01$),同时同侧脊髓背角内磷酸化ERK明显增多($P<0.01$);电针治疗各组大鼠痛阈亦下降,但与同时段模型组比较痛阈明显提高,同侧脊髓背角内ERK磷酸化水平亦较同时段模型组明显降低(均 $P<0.01$)。与正常对照组及单纯电针组比较,模型24小时组与电针治疗24小时组大鼠同侧脊髓背角内NK-1受体表达均明显增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:电针夹脊穴可明显缓解佐剂性关节炎大鼠炎性痛,提高痛阈,而ERK可能作为电针镇痛中一个重要的信号转导分子,通过脊髓背角的磷酸化激活及其对NK-1表达的调控在炎症痛敏形成及电针镇痛过程中起重要作用。

主题词 关节炎/针灸疗法 电针 穴,夹脊

Effects of Electroacupuncture at Jiaji (EX-B₂) on Phosphorylated ERK and NK-1 Signal Conduction Pathway in Dorsal Horn in Complete Freund's Adjuvant Arthritis Rats

Wang Chunlei¹, Wang Shengxu¹, Xu Xingyi²

(1. Southern Medical University, Guangzhou 510515; 2. Guangzhou City Hospital of TCM)

Objective: To observe effects of electroacupuncture at Jiaji (EX-B₂) on phosphorylated extracellular signal regulated kinase (ERK) and neurokinin-1 (NK-1) in dorsal horn of the complete Freund's adjuvant arthritis rat, so as to study possible mechanism of electroacupuncture analgesia from the point of view of signal conduction. **Methods:** Eighty Wistar adult male rats were randomly divided into normal control group, simple electroacupuncture (EA) group, model 30 min group, model 24h group, model 48 h group, EA 30min group, EA 24h group, and EA 48h group, 10 rats in each group. Inflammatory pain rat model was established by injection of complete Freund's adjuvant into left hindpaw. EA was given at bilateral L₃~L₅ Jiaji (EX-B₂). The pain threshold was determined and phosphorylated ERK and NK-1 expressions in the spinal cord were detected by immunohistochemical technique. **Results:** The pain threshold significantly decreased (all $P<0.01$) and phosphorylated ERK in the homolateral spinal cord significantly increased (all $P<0.01$) in the various model groups as compared with those in normal control group and simple EA group. After the treatment, pain threshold decreased in all the EA groups, but it significantly increased as compared with the same time point model group, and the phosphorylated ERK level in the homolateral spinal cord significantly decreased as compared with that of the same time point model groups ($P<0.01$). The NK-1 receptor expression in the homolateral spinal cord in the model 24h group and the EA 24h group significant increased as compared with those in the normal control group and in the simple EA group ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion:** EA at Jiaji (EX-B₂) can significantly alleviate inflammatory pain and increase pain threshold in the adjuvant arthritis rat, and ERK is possibly an important signal conduction molecular in EA analgesia, which can play an important role in inflammatory pain sensitivity formation and EA analgesia through activation of phosphorylation and regulation on NK-1 expression.

Key Words Arthritis/acup-mox therapy; Electroacupuncture; Point, Jiaji (EX-B₂)

细胞外信号调节激酶(ERK)为丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)的一个亚族,是生物体内重要的信号转

导分子之一,能被多种炎性刺激所激活,并对炎症的发生、发展起重要调控作用^[1]。P物质及其受体神经激肽-1(NK-1)则在炎性痛敏形成与维持中发挥重要作用。我们以往的研究表明,电针夹脊穴可以通过调节MAPK的另一个亚族——p38MAPK磷酸化水平

1 南方医科大学中医系针灸教研室,广东省广州市广州大道北

1838号(510615) 1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 广州市中医院

收稿日期:2005-04-19;修回日期:2005-12-24

而达到镇痛效果^[4]。为了进一步研究针刺镇痛的相关信号转导机制,我们采用炎症痛大鼠模型,检测大鼠脊髓背角内磷酸化ERK 及NK-1 表达水平,观察电针夹脊穴对炎症痛大鼠脊髓背角内磷酸化ERK、NK-1 信号转导通路的影响,现报告如下。

1 材料

1.1 动物:清洁级成年雄性Wistar 大鼠 80 只,6~7 周龄,体重 280~320g,由南方医科大学试验动物中心提供。

1.2 试剂:完全弗氏佐剂(CFA),Sigma 公司产品;一抗兔抗p-ERK、一抗兔抗NK-1,武汉博士德生物工程有限公司产品;即用型SABC 免疫组化染色试剂盒,武汉博士德生物工程有限公司产品,包含 5%BSA 封闭液、二抗(山羊抗兔)IgG、SABC、复合消化液、抗原修复液、DAB 显色剂试剂盒,武汉博士德生物工程有限公司产品,包含显色剂A、显色剂B、显色剂C;粘片剂APES,武汉博士德生物工程有限公司产品。配制试剂均由南方医科大学组织胚胎学重点实验室提供。其他试剂均为市售分析纯级。

1.3 仪器:G-6805 Ⅱ型电针仪、28 号 3 寸华佗牌不锈钢毫针、XZC-A 型压痛仪(山东省医学科学院设备供应维修站)、Leica 轮转式切片机等。

2 方法

2.1 动物造模:用 1%戊巴比妥钠(40mg/kg 体重)腹腔麻醉后,于大鼠左足后垫皮肤注射 CFA 100 μ l。

2.2 动物分组:试验前分笼饲养适应环境 1 周后用 XZC-A 型压痛仪对大鼠进行痛阈筛选,痛阈以每 20g 为一个单位表示,痛阈测定小于 4 $\times$ 20g 或者大于 20 $\times$ 20g 者表示动物反应过敏或者迟钝,不纳入试验对象。纳入的 80 只大鼠随机分为正常对照组 10 只、单纯电针组 10 只、模型组 30 只、电针治疗组 30 只。模型组和电针治疗组按造模后和电针后 30 分钟、24 小时、48 小时各分为 3 组,每组 10 只。

2.3 痛阈测定:在特制布套束缚限制运动的条件下用 XZC-A 型压痛仪测量大鼠左后足痛阈,以每 20g 为单位,每隔 5 分钟测量并记录 1 次,连续 3 次取平均值。测试时间均为上午 8~12 时。

2.4 选穴与针刺方法:大鼠被固定在特制的鼠笼内,头尾稍可活动,但身体不能转动,参照华兴邦等制定的大鼠穴位图谱^[5],电针治疗组与单纯电针组针刺双侧 L₃~L₅ 夹脊穴,用 28 号 3 寸华佗牌不锈钢毫针在大鼠第 3 腰椎棘突下旁开约 0.3cm 直刺进针,抵达椎板时针尖转向尾侧,沿棘突旁平行透刺至第 5 腰椎夹脊穴,接 G-6805 Ⅱ型电针治疗仪,连续波型,频率 15Hz,通电

20 分钟,强度以大鼠胡须抖动但不出现挣扎为基准。单纯电针组只针刺 1 次。电针治疗各组均在造模后即开始针刺,其中电针治疗 24 小时、48 小时组每隔 24 小时分别重复针刺 1 次及 2 次。针刺完毕后进行痛阈测定并灌注取材。

2.5 取材与切片:正常对照组及单纯电针组均在进行痛阈检测完毕后即刻予以灌注取材,进行 ERK 及 NK-1 免疫组化检测。模型各组 and 电针治疗各组分别在各个时段造模及电针治疗,试验处理结束后以 10%水合氯醛(400mg/kg 体重)腹腔麻醉,开胸,经左心室向升主动脉插管,于右心耳处剪开右心房,快速灌注 4 $^{\circ}$ C 预冷的生理盐水 100~200ml,随后灌注 4 $^{\circ}$ C 预冷的 4%多聚甲醛 200~250ml,先快后慢,持续灌注固定 1~2 小时。然后将大鼠固定在实验台上,用手术剪刀在大鼠背部正中线剪开皮肤,分离脊柱两侧肌肉,暴露出胸、腰、骶段脊柱,先游离坐骨神经至椎管处,再剪开椎板暴露脊髓,用玻璃分离针挑开脊膜,最后迅速将脊髓剪下,截取脊髓腰膨大部。放入 4%多聚甲醛中固定 1~2 小时。常规脱水,透明,石蜡包埋,在 Leica 轮转式切片机上,石蜡切片,厚度 4 μ m。载玻片经 APES 防脱片处理,捞片后置烤箱中,60 $^{\circ}$ C 烘片 60 分钟。

2.6 免疫组化染色:石蜡切片常规脱蜡至水,30% H₂O₂ 1 份加蒸馏水 10 份混合,室温孵育 10 分钟,以灭活内源性酶。蒸馏水冲洗 5 分钟 $\times$ 3 次,置于 0.01mmol/L、pH6.0 的枸橼酸盐缓冲液中进行抗原微波热修复后,PBS(pH7.2~7.6)洗 5 分钟 $\times$ 2 次,切片滴加抗原修复液 I 室温 5 分钟以暴露核内抗原,PBS(pH7.2~7.6)洗 2~3 次,5%BSA 室温封闭 20 分钟,甩去多余液体,不洗,滴加 1:100 一抗 50 μ l(根据染色指标的不同选择相对应的 p-ERK 一抗、NK-1 一抗,每组各取 1 张以 PBS 代替一抗作为阴性对照),湿盒内孵育 4 $^{\circ}$ C 过夜,再室温孵育 30 分钟。PBS 洗 2 分钟 $\times$ 3 次。滴加生物素化山羊抗兔 IgG 二抗,25 $^{\circ}$ C 孵育 20 分钟,PBS(pH7.2~7.6)漂洗 2 分钟 $\times$ 3 次,滴加 SABC,25 $^{\circ}$ C 孵育 20 分钟,PBS 冲洗 5 分钟 $\times$ 4 次,DAB 室温显色 5~15 分钟,蒸馏水冲洗,苏木素轻度复染,常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,于目镜测微尺下观察免疫阳性细胞计数。

2.7 统计学方法:应用 SPSS 10.0 软件(由南方医科大学统计学教研室提供)处理实验数据,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用随机设计方差分析(One-way ANOVA)方法。

3 结果

3.1 各组大鼠痛阈变化比较:表 1 示,与正常对照组

比较,单纯电针组大鼠痛阈无明显变化($P>0.05$);模型组大鼠痛阈则明显降低(均 $P<0.01$);电针治疗30分钟、48小时组与同时段模型组大鼠痛阈相比明显升高(均 $P<0.01$),而与正常对照组比较,电针治疗48小时组大鼠痛阈差异无显著性($P>0.05$)。模型组与电针治疗组大鼠造模侧足痛阈均在24小时左右达到最低峰。

3.2 电针夹脊穴对大鼠脊髓背角内p-ERK表达的影响:表1示,与正常对照组大鼠比较,单纯电针组大鼠脊髓背角内p-ERK的表达无明显变化($P>0.05$);模型30分钟、24小时、48小时组以及电针治疗30分钟、24小时组大鼠同侧脊髓背角内p-ERK阳性细胞百分数均明显增加(均 $P<0.01$),而电针治疗48小时组与正常对照组比较差异无显著性($P>0.05$);与同时段模型组比较,电针治疗各组大鼠同侧脊髓背角内p-ERK含量明显降低(均 $P<0.01$)。模型组与电针治疗组对侧脊髓背角p-ERK阳性细胞表达造模前后均未见明显变化。

3.3 电针夹脊穴对大鼠脊髓背角内NK-1表达的影响:表2示,与正常对照组比较,单纯电针组大鼠脊髓背角内NK-1的表达无明显变化($P>0.05$);模型24小时组大鼠同侧脊髓背角内NK-1阳性细胞百分数明显增加,差异有显著性($P<0.01$);电针治疗24小时组与正常对照组比较,差异有显著性($P<0.05$),而与模型组比较,电针治疗组24小时组大鼠同侧脊髓背角

内NK-1含量有所降低,但差异无显著性。模型组与电针治疗组对侧脊髓背角NK-1阳性细胞造模前后均未见明显变化。

4 讨论

针刺作为治疗各种疼痛特别是慢性痛的有效手段,在疼痛的临床治疗中被普遍采用,疗效得到广泛认可,但其针刺镇痛的机理特别是其相关的信号转导机制尚未完全阐明。

我们前期的研究表明,电针夹脊穴可以有效提高佐剂性关节炎大鼠的痛阈,使之对伤害性热刺激和机械性刺激的痛敏下降^[6],并从信号转导角度探讨了电针夹脊穴镇痛的可能机制,提出背根神经节(DRG)内磷酸化p38MAPK可能是针刺镇痛过程中的重要信号分子之一,电针可能通过调节p38MAPK磷酸化水平而达到镇痛效果^[4]。然而针刺镇痛是通过多层次、多靶点发挥镇痛效果的。Ji RR等^[7]的研究工作证实,炎性痛过程中,神经生长因子(NGF)激活p38MAPK导致辣椒素受体(VR1)蛋白表达增加是维持炎性热痛觉过敏的一条重要通道。同时,ERK的激活导致前强啡肽原mRNA和NK-1表达增加,从而增加佐剂性关节炎大鼠对热伤害刺激和机械伤害刺激的痛敏亦是炎性痛敏形成的另一重要通路^[8]。p38MAPK蛋白激酶和ERK共同参与调控炎性痛的信号转导过程。因此,进一步深入研究电针夹脊穴镇痛与磷酸化ERK表达的关系,对于全面阐明针刺镇痛的相关信号转导机制显得十分重要。

参照以往的实验研究,CFA致炎性痛大鼠造模后24~48小时脊髓背角内NK-1表达达到最高峰并维持在相对稳定水平^[8],故我们只选取了具有代表性的CFA造模后24小时组作为切入点截取脊髓背角标本检测NK-1变化并进行组间比较。本试验结果表明,15Hz单纯连续波电针刺激在正常大鼠并未引起同侧、对侧脊髓背角内NK-1受体明显变化,这说明电针作为治疗信号的同时,又是一种机械性伤害刺激信号,可能对脊髓背角内NK-1受体具有双重影响而相互抵消。而在CFA致大鼠炎性痛模型中,NK-1受体表达则明显上调,从而参与炎性痛敏的形成和维持。本研究显示,电针夹脊穴能够下调NK-1受体在佐剂性关节炎大鼠脊髓背角浅层内的表达,从而减轻痛敏。但电针究竟通过什么途径发挥对NK-1受体表达的影响,尚需进一步探讨。

本试验结果表明,电针夹脊穴可以提高CFA致炎性痛大鼠模型的足底痛阈,与此同时,免疫组化结果显示,其可下调同侧脊髓背角内ERK磷酸化水平及NK-

表1 各组大鼠痛阈及同侧脊髓背角内磷酸化ERK阳性细胞百分数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	痛阈值($\times 20g$)	p-ERK(%)
正常对照组	10	15.20 $\pm$ 0.57	1.78 $\pm$ 0.36
单纯电针组	10	15.26 $\pm$ 0.65	1.85 $\pm$ 0.33
模型30分钟组	10	7.89 $\pm$ 1.00**	12.54 $\pm$ 0.95**
模型24小时组	10	6.82 $\pm$ 0.54**	8.44 $\pm$ 0.79**
模型48小时组	10	9.88 $\pm$ 1.49**	5.71 $\pm$ 0.59**
电针治疗30分钟组	10	11.64 $\pm$ 1.28** Δ	7.25 $\pm$ 0.69** Δ
电针治疗24小时组	10	8.25 $\pm$ 2.21**	4.51 $\pm$ 0.76** Δ
电针治疗48小时组	10	15.06 $\pm$ 2.03 Δ	1.96 $\pm$ 0.66 Δ

与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与同时段模型组比较, $\Delta P<0.01$;下表同

表2 各组大鼠同侧脊髓背角内NK-1阳性细胞百分数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	NK-1(%)
正常对照组	10	4.32 $\pm$ 0.83
单纯电针组	10	4.47 $\pm$ 0.94
模型24小时组	10	7.16 $\pm$ 1.27**
电针治疗24小时组	10	5.82 $\pm$ 1.80*

1 阳性表达水平。结合以前的研究结果,我们可以得出以下推论:在 CFA 致炎性痛大鼠模型中,其机械痛阈明显降低,同侧脊髓背角内 p-ERK 及 NK-1 受体蛋白表达明显增加,经过电针夹脊穴治疗后,治疗组大鼠与模型组大鼠相比痛阈明显提高,同时脊髓背角内 p-ERK 与 NK-1 表达明显减少,表明 ERK、NK-1 信号通路在疼痛发生以及电针夹脊穴镇痛过程中起着重要作用。电针可能通过调节佐剂性关节炎大鼠脊髓背角内 p-ERK 表达水平,从而调低 NK-1 在同侧脊髓背角浅层的表达,最终发挥镇痛作用。

参考文献

1 姜勇,龚小卫·MAPK 信号转导通路对炎症反应的调控.生理学报,2000,52(4):267~271.
2 Pernow B·Substance P·Pharmacol Rev,1983,35(2):85~141.

3 Kuraishi Y,Hirota N,Sato Y,et al·Evidence that substance P and somatostatin transmit separate information related to pain in the spinal dorsal horn·Brain Res,1985,325(1~2):294~298.
4 龚伟,王升旭·电针夹脊穴在佐剂性关节炎大鼠镇痛过程中磷酸 p38 丝裂原活化蛋白激酶的影响·中国临床康复,2004,8(8):1514~1515.
5 华兴邦,李辞蓉,周浩良,等·大鼠穴位图谱的研制·实验动物与动物试验,1991,1(1):1~3.
6 王升旭,赖新生,杨哲·华佗夹脊穴镇痛的临床及机理研究进展·广州中医药大学学报,1998,15(12):70~74.
7 Ji RR,Samad TA,Jin SX,et al·p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia·Neuron,2002,36(1):57~68.
8 Ji RR,Befort K,Brenner GJ,et al·ERK MAP kinase activation in superficial spinal cord neurons induces prodynorphin and NK-1 up-regulation and contributes to persistent inflammatory pain hypersensitivity·J Neurosci,2002,22(2):478~485.

全国中医药研究与临床经验学术交流会

通 知

为了探讨我国中医药学领域所面临的一系列热点和难点问题,在国家中医药管理局鼎力支持和指导下,中华中医药学会和中医杂志社共同邀请两岸四地中医药界的学者、管理专家共同与会,就当前及未来中医药医疗、科研、教育、管理和相关方面的政策、法规等进行研讨。旨在展示中医药科研、教育、医疗、管理的最新成果和经验,促进中医药在新世纪更好地发展,让中医药为人类的健康发挥更大的作用。

- 1.会议形式:专题演讲、大会交流、分组交流、产品展示等。
- 2.会议将对以下内容进行研讨与交流:(1) 中医药传统研究的思路和方法;(2) 中医、中西医结合临床研究和治疗经验、成果与体会;(3) 中医基础研究和理论研究探讨;(4) 临床应用经方、成方、验方治疗体会;(5) 中药理论研究及现代应用;(6) 中医各科临床经验;(7) 中医药疗效评价及安全性研究;(8) 非药物疗法在临床中的应用研究与总结;(9) 中药及复方制剂的开发与研究;(10) 老中医临床经验总结与继承;(11) 中医食疗及药膳方法介绍及理论研究;(12) 中医养生方法及理论研究;(13) 中医临床各科经验介绍及研究进展;(14) 中药、方剂理论及现代应用综述、分析;(15) 单味药临床应用体会;(16) 针灸临床应用经验;(17) 临床应用推拿、按摩及其它理疗方法的经验;(18) 非药物康复疗法经验总结;(19) 常见病、多发病进行生活方式干预的成果报告;(20) 医院的发展趋势及社会资本多元化开办医院的思路;(21) 中医药现代研究的新思路、新方法。
- 3.主办单位:中华中医药学会 中医杂志社
- 4.承办单位:中医杂志社东方岐黄科技服务中心
- 5.会议地点:四川省成都飞天饭店(成都军区空军第一招待所),地址:成都市新南路103号,电话:(028) 85399400,85432063。
- 6.会议日程:2006年6月24日报到,6月25日开幕式及大会演讲,6月26日大会交流、专家报告等,6月27日参观。
- 7.交通:(1) 飞机:会务组将于6月24日全天在成都双流机场设有接待处,(2) 火车:成都火车站(北站)乘55路汽车至磨子桥站。
- 8.住宿标准:内地代表:45~60元/床/天(按报到先后顺序安排住房)。
- 9.注册费用:内地代表:880元人民币/每人(包括会议费、餐费、会议资料、论文证书含Ⅰ类继续教育6学分、会议合影照片等)。
- 10.会务组地址:北京市东直门内南小街16号中医杂志社内,邮政编码:100700,电话:(010) 64035632,64013162,64013164,传真:(010) 64050201, <http://www.jtcm.net.cn>, E-mail:64013162@163.com, 联系人:午易。

全国中医药研究与临床经验学术交流会回执

(参加会议者寄此回执,此表可复制)

姓名		性别		年龄		职称		职务		电话	
工作单位及地址										邮编	
备注	(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net										

此回执请于2006年6月5日前邮寄或传真或发电子邮件至会务组,传真:(010) 64050201, E-mail:64013162@163.com