

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.15.013

推拿“委中”穴对坐骨神经慢性压迫性损伤模型大鼠海马CA3区突触可塑性的影响

黄红叶, 陈水金, 陈乐春, 张幻真, 蒋晶晶, 江煜, 陈进城, 林志刚✉

福建中医药大学附属康复医院, 福建省福州市鼓楼区湖东支路13号, 350003



[摘要] **目的** 从海马突触可塑性角度探讨推拿委中穴缓解坐骨神经痛的可能作用机制。**方法** 60只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、推拿组、MK-801组、MK-801+推拿组, 每组12只。所有大鼠侧脑室置管术后, 除假手术组外其余各组大鼠制备右侧坐骨神经慢性压迫性损伤模型。造模后第4天, 推拿组大鼠开始推拿“委中”穴干预, 每日1次持续10 min, 共干预14天; MK-801组大鼠开始侧脑室注射0.25 μg/μl的N-甲基-D天冬氨酸受体2B(NR2B)阻断剂地佐环平(MK-801)0.5 μl, 每日1次, 共14天。MK-801+推拿组大鼠在侧脑室注射MK-801 30 min后进行推拿干预, 时间方法同上; 模型组和假手术组大鼠不进行任何干预。大鼠造模前1天(基础值)及造模第4、10、14、18天进行自发痛行为评分和机械足反射阈值(PWTs)检测, 第19天各组大鼠脑组织取材后, 使用尼氏染色观察海马CA3区尼氏阳性细胞数量与形态, 透射电镜观察海马CA3区突触数目、突触间隙、突触后致密物厚度、活性带长度与突触界面曲率, 免疫荧光染色和免疫印迹法检测海马CA3区突触相关蛋白NR2B、突触后致密物95(PSD95)的表达。**结果** 与假手术组同时间比较, 模型组造模后第4、10、14、18天时自发性疼痛评分显著增加, PWTs降低($P<0.05$); 与模型组比较, 推拿组大鼠在造模第10、14、18天自发性疼痛评分显著下降, 在造模第14、18天PWTs显著升高($P<0.05$); 与推拿组比较, MK-801+推拿组自发性疼痛评分在造模第10、14、18天升高, 在造模第14、18天PWTs降低($P<0.05$)。与假手术组比较, 模型组大鼠海马CA3区神经元排列紊乱, 尼氏阳性细胞数量、突触数目、突触后致密物厚度、活性带长度、突触界面曲率减小, 突触间隙变宽, 海马CA3区NR2B、PSD95免疫荧光阳性表达及免疫印迹蛋白表达减少($P<0.05$)。与模型组比较, 推拿组大鼠海马CA3区神经细胞排列密集, 尼氏阳性细胞数量、突触数目、突触后致密物厚度、活性带长度均增加, 突触间隙明显变窄, 海马CA3区NR2B、PSD95免疫荧光阳性表达及免疫印迹蛋白表达较模型组增加($P<0.05$)。与推拿组比较, MK-801+推拿组海马CA3区神经元形态破坏严重, 尼氏阳性细胞数量、突触数目、突触后致密物厚度、活性带长度、突触界面曲率减小, 突触间隙变宽, NR2B、PSD95免疫荧光阳性表达和免疫印迹蛋白表达降低($P<0.05$)。**结论** 推拿“委中”穴具有显著的镇痛作用, 显著增加海马CA3区NR2B和PSD95蛋白表达水平从而调控海马突触可塑性是其发挥镇痛作用的可能作用机制之一。

[关键词] 坐骨神经痛; 推拿; 委中穴; 海马; 突触可塑性; N-甲基-D天冬氨酸受体2B

坐骨神经痛是临床常见的慢性神经病理性疼痛, 多继发于腰椎间盘突出, 表现为坐骨神经分布区域出现放射性疼痛、麻木及灼烧感^[1]。目前坐骨神经痛患者日益增多, 且有年轻化趋势。推拿作为

传统的中医外治手段, 广泛应用于神经病理性疼痛的治疗^[2-3]。临床研究证实, 推拿对于坐骨神经痛有良好的镇痛效果^[4-5]。委中穴为足太阳膀胱经之合穴, 具有舒筋活络之功效, 是临床治疗腰腿痛的常用穴位, 针刺委中穴治疗坐骨神经痛也具有良好的镇痛效应^[6]。突触是神经元细胞相互接触的部分, 具有可塑性, 其中海马突触可塑性与坐骨神经痛的形成与维持密切相关, 并可能影响生物体对疼

基金项目:国家自然科学基金(82174523, 82105039, 82205303); 福建省杰出青年基金(2023J06037); 福建省自然科学基金(2020J01760); 福建省卫生健康中青年领军人才研修培养项目

✉ 通讯作者: drlzg2014@126.com

痛的感知能力,或导致痛觉过敏^[7-8]。本研究从海马突触可塑性角度探讨推拿委中穴对坐骨神经痛的可能镇痛机制。本研究通过福建中医药大学伦理委员会批准(伦理批号:FJTCM IACUC 2021049)。

1 材料和方法

1.1 动物

SPF级雄性SD大鼠60只,体质量180~200g,2月龄,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,实验动物生产许可证:SCXK(沪)2017-0005。全程饲养于福建中医药大学动物中心,大鼠自由进食饮水,保持12h交替昼夜节律,室温22~26℃,湿度45%~50%。

1.2 主要试剂及仪器

3%异氟烷(批号:R510-22-10),深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司;红霉素软膏(批号:H44023920),广东恒健制药有限公司;N-甲基-D天冬氨酸受体2B(NR2B)一抗(货号:21920-1-AP)、二抗(货号:SA00001-2)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗(货号:10494-1-AP),武汉三鹰生物技术有限公司;突触后密度蛋白95(PSD95)一抗(货号:ab238135),英国Abcam公司;NR2B阻断剂地佐环平(MK-801,货号:M107),美国Sigma公司;尼氏染色液(货号:G1436),北京索莱宝科技有限公司;4%多聚甲醛(货号:BL539A),Biosharp公司;RIPA裂解液(货号:P0013B),上海碧云天生物技术有限公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒(货号:AR0146),武汉博士德生物工程有限公司。

Von-Frey纤毛(型号:Aesthesio)、脑立体定位仪(型号:68528),深圳瑞沃德生命科技股份有限公司;尼康生物显微镜(日本Nikon公司,型号:ECLIPSE);徕卡荧光显微镜(德国Leica公司,型号:DMi8);透射电子显微镜(日本Hitachi公司,型号:HT-7700);化学发光成像系统(美国Bio-Rad公司,型号:ChemiDoc XRS+)。

1.3 分组及造模方法

60只大鼠采用随机数字表法分为假手术组、模型组、推拿组、MK-801组和MK-801+推拿组,每组12只。所有大鼠经3%异氟烷麻醉后,根据大鼠脑立体图谱定位左侧脑室,将大鼠头骨钻开一小孔,植入导管(深度3.5mm)后灌注义齿基托树胶固定。侧脑室置管术后,除假手术组外其余各组大鼠参照文献[9]方法制备右侧坐骨神经慢性压

迫性损伤大鼠模型:暴露大鼠右侧坐骨神经,采用4条羊肠线穿过坐骨神经,每条间隔1.0~1.5mm,由近端向远端依次完成4道结扎,结扎程度以大鼠右后肢肌肉出现轻微抽动为宜。术后逐层缝合肌肉与皮肤,并在伤口处涂抹红霉素软膏以抗感染。大鼠在造模1天后,右后足可出现明显跖屈与外翻畸形,并出现舔舐、悬空等后肢保护现象,则认为模型成功^[9]。假手术组大鼠行侧脑室置管术后,仅暴露坐骨神经后缝合,不结扎。

1.4 干预方法

推拿组在造模后第4天开始推拿干预,推拿手法操作参照《推拿学》^[10]中记载的按揉法相关要点,干预时操作者利用右手拇指在大鼠右后肢腓窝“委中”穴处进行按揉法操作,同时佩戴自制推拿按摩指套(专利号:ZL201821318407.9)以精确控制按揉手法变量,频率为120次/min,力量约(5±1)N,持续10min,每日1次,共干预14天,期间均为同一人操作(请扫描本文二维码观看操作视频)。MK-801组大鼠在造模后第4天开始侧脑室注射0.25μg/μl,注射量为0.5μl^[11],每日给药1次,共持续14天。MK-801+推拿组大鼠在侧脑室注射MK-80130min后进行推拿干预,推拿时间、手法及注射剂量同上。模型组和假手术组大鼠不进行任何干预。

1.5 观察指标及方法

本实验每组12只大鼠采用随机数字表法选取8只进行自发痛和机械痛检测;所有大鼠取材脑组织后每组采用随机数字表法选取4只大鼠用于尼氏染色与免疫荧光检测,4只用于透射电镜检测,4只用于蛋白免疫印迹法检测。

1.5.1 自发痛行为评分 分别在大鼠造模前1天(基础值)及造模第4、10、14、18天各评价1次。提前将大鼠放入测试箱中适应30min,待大鼠安静后,每只大鼠观察5min。参照文献[12]评分标准进行评分,0分:大鼠无右后足畸形,可整个脚掌着地;1分:右后足轻微跖屈畸形,右后足可稍着地;2分:右后足明显跖屈畸形,只有右后足内缘可着地;3分:右后足存在明显畸形,如跖屈与外翻,同时只有右后足跟可着地;4分:大鼠右后足明显畸形并伴随整个右后足悬空,不敢触地;5分:在4分基础上,大鼠还存在啃咬右后足等自残行为。

1.5.2 机械痛检测 分别在大鼠造模前1天(基础值)及造模第4、10、14、18天自发痛行为观察结束后,开始进行机械痛检测。使用Von-Frey纤毛刺

激大鼠右后爪足心表面,逐渐加压使纤毛弯曲,维持 5 s。每个等级共测量 5 次,致使大鼠出现 3 次抬脚的纤维等级即为大鼠的机械足反射阈值(PWTs)。

1.5.3 尼氏染色观察海马 CA3 区神经元 干预完成后第二天,大鼠经 4% 多聚甲醛固定后取脑,经石蜡包埋后行海马组织 CA3 区切片,切片经脱蜡复水,置于尼氏染色液(甲苯胺蓝法)中,在 57℃ 烘箱中染色 20 min,经纯水洗涤、95% 无水乙醇分化后封片,置于光学显微镜(400 倍)下观察海马 CA3 区,计算每张切片尼氏阳性细胞数量。

1.5.4 透射电镜海马 CA3 区突触情况 取左侧海马 CA3 区组织,将其修剪为 1 mm³ 的小块,放入电镜固定液,经切片、经醋酸铀与柠檬酸铅染色后行透射电镜观察与拍摄,记录每张切片的神元突触结构参数,包括突触数目、突触界面曲率、突触间隙、突触后致密物厚度与活性带长度。突触界面曲率为突触后膜弧长与弦长的比值,突触间隙测定采用多点平均法进行^[13],突触后致密物厚度与活性带长度测量参考文献^[14]方法。

1.5.5 免疫荧光染色观察海马 CA3 区 NR2B、PSD95 表达 海马组织切片经脱蜡复水、EDTA 修复、封闭后滴加 NR2B 抗体(1:200)与 PSD95 抗体(1:200),置于 4℃ 冰箱静置孵育过夜,次日滴加驴抗兔绿色荧光二抗,于 37℃ 烘箱孵育 1 h,使用含 DAPI 的抗荧光淬灭封片液封片,以大鼠左侧海马 CA3 区为目标区域,200 倍荧光显微镜下观察拍

片,使用 Image J 软件(版本:2.3.0)进行图像统计分析。

1.5.6 免疫印迹法检测海马 CA3 区 NR2B、PSD95 蛋白表达 取大鼠左侧海马 CA3 区置于离心管中,经组织裂解、超声粉碎、匀浆,4℃、12 000 r/min 离心 20 min,取上清,利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒定量。通 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离所得的蛋白质,并转至 PVDF 膜上。经 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加一抗 4℃ 孵育过夜。一抗稀释比例:NR2B(1:200),PSD95(1:200),GAPDH(1:1000)。次日经洗膜、二抗孵育、化学发光成像系统成像,使用 Image Lab 软件(版本:6.1)进行数据统计与分析。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析,计量资料均符合正态分布以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析进行组间差异比较,方差齐用 LSD 法,方差不齐用 Games-Howell 法;行为学数据使用重复测量方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时间自发痛评分及 PWTs 比较

表 1、表 2 示,与假手术组同时间比较,模型组造模后第 4、10、14、18 天时自发性疼痛评分显著增加,PWTs 降低($P<0.05$)。与模型组比较,推拿组大鼠在造模第 10、14、18 天自发性疼痛评分显著下降,在造模第 14、18 天 PWTs 显著升高

表 1 各组大鼠不同时间自发痛评分比较

Table 1 Comparison of spontaneous pain scores at different times in different groups of rats (分, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	基础值	第 4 天	第 10 天	第 14 天	第 18 天
假手术组	8	0	0.75±0.25	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	8	0	3.25±0.71 ^{a)}	2.63±0.52 ^{a)}	2.38±0.74 ^{a)}	2.13±0.64 ^{a)}
推拿组	8	0	3.13±0.64	1.63±0.74 ^{b)}	1.63±0.26 ^{b)}	1.38±0.18 ^{b)}
MK-801 组	8	0	3.50±0.53	3.50±0.76	3.50±0.76	3.25±1.04
MK-801+推拿组	8	0	3.38±0.74	3.25±0.71 ^{c)}	2.75±0.25 ^{c)}	2.38±0.52 ^{c)}

注: a) 与假手术组同时间比较, $P<0.05$; b) 与模型组同时间比较, $P<0.05$; c) 与推拿组同时间比较, $P<0.05$ 。

表 2 各组大鼠不同时间机械足反射阈值(PWTs)比较

Table 2 Comparison of paw withdraw thresholds (PWTs) at different times in different groups of rats (g, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	基础值	第 4 天	第 10 天	第 14 天	第 18 天
假手术组	8	13.75±2.31	8.00±5.53	9.13±3.76	9.50±1.41	11.00±2.56
模型组	8	14.25±5.55	4.00±2.62 ^{a)}	3.50±1.78 ^{a)}	3.75±2.25 ^{a)}	2.75±1.49 ^{a)}
推拿组	8	12.13±6.01	3.25±1.83	5.75±1.28	7.75±1.98 ^{b)}	8.00±2.39 ^{b)}
MK-801 组	8	11.25±2.31	3.50±2.33	3.25±2.12	2.25±0.71	2.25±0.25
MK-801+推拿组	8	11.88±2.59	3.50±1.78	3.50±1.77	4.25±2.25 ^{c)}	4.75±1.49 ^{c)}

注: a) 与假手术组同时间比较, $P<0.05$; b) 与模型组同时间比较, $P<0.05$; c) 与推拿组同时间比较, $P<0.05$ 。

($P<0.05$)；MK-801 组自发性疼痛评分和 PWTs 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与推拿组比较, MK-801+推拿组自发性疼痛评分在造模第 10、14、18 天升高, 在造模第 14、18 天 PWTs 降低 ($P<0.05$)。

2.2 各组大鼠海马 CA3 区神经元尼氏染色结果

图 1、表 3 示, 假手术组神经元排列均匀整齐, 形态结构完整, 尼氏阳性细胞数量丰富。与假手术组相比, 模型组神经元排列紊乱, 尼氏阳性细胞数量减少 ($P<0.05$)。与模型组比较, 推拿组大鼠海马神经细胞排列密集、尼氏阳性细胞数量较多 ($P<0.05$)。MK-801 组与模型组相比神经元排列紊乱、形状不规则, 细胞不清晰并出现细胞核固缩现象, 但尼氏阳性细胞数量并未出现明显减少 ($P>0.05$)。MK-801+推拿组神经元形态破坏严重, 排列杂乱无序, 尼氏阳性细胞数量明显少于推拿组 ($P<0.05$)。

表 3 各组大鼠海马 CA3 区尼氏阳性细胞数量比较
Table 3 Comparison of the number of Nysted-positive cells in hippocampal CA3 region of rats in each group (个, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	尼氏阳性细胞数
假手术组	4	34.50±4.65
模型组	4	15.00±4.69 ^{a)}
推拿组	4	26.75±1.71 ^{b)}
MK-801 组	4	14.50±3.42
MK-801+推拿组	4	14.25±1.50 ^{c)}

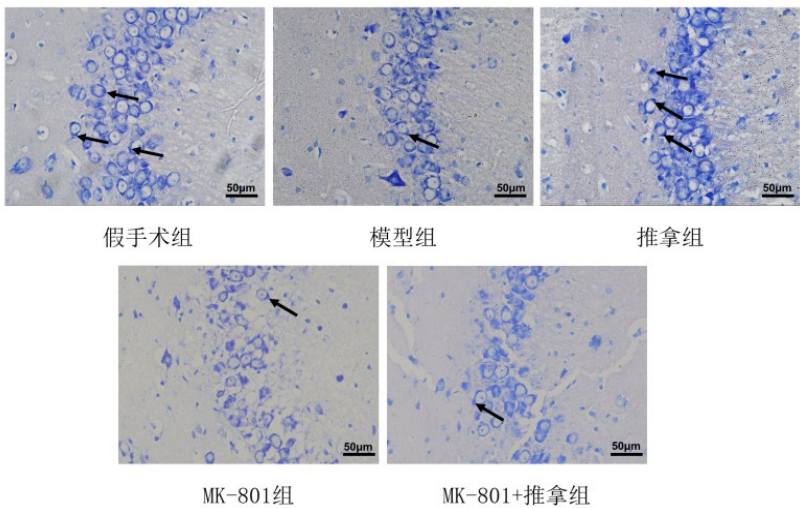
注：a) 与假手术组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与推拿组比较, $P<0.05$ 。

2.3 各组大鼠海马 CA3 区突触数目、突触间隙、突触后致密物厚度、活性带长度与突触界面曲率比较

表 4 示, 与假手术组比较, 模型组大鼠突触数目减少, 突触间隙变宽, 突触后致密物厚度、活性带长度、突触界面曲率减小 ($P<0.05$)。与模型组比较, 推拿组突触数目增多, 突触间隙明显变窄, 突触后致密物厚度、活性带长度均增加 ($P<0.05$)。与模型组相比, MK-801 组突触数目和突触后致密物厚度差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与推拿组比较, MK-801+推拿组突触数目减少, 突触间隙变宽, 突触后致密物厚度、活性带长度、突触界面曲率减小 ($P<0.05$)。各组大鼠海马神经元的超微结构见图 2。

2.4 各组大鼠海马 CA3 区 NR2B、PSD95 免疫荧光阳性表达和免疫印迹蛋白表达比较

表 5 示, 与假手术组比较, 模型组大鼠海马中 NR2B、PSD95 免疫荧光阳性表达及免疫印迹蛋白表达均明显减少 ($P<0.05$)。与模型组比较, 推拿组海马中 NR2B、PSD95 免疫荧光阳性表达及免疫印迹蛋白表达均显著增加 ($P<0.05$)。而 MK-801 组表达均减少 ($P<0.05$)。MK-801+推拿组大鼠海马 NR2B、PSD95 免疫荧光阳性表达和免疫印迹蛋白表达较推拿组均显著降低 ($P<0.05$)。各组大鼠海马 CA3 区 NR2B、PSD95 免疫荧光图见图 3, 免疫印迹蛋白电泳图见图 4。



注：黑色箭头指示为尼氏阳性细胞。

图 1 各组大鼠脑组织海马 CA3 区尼氏阳性细胞形态 (尼氏染色, ×400)

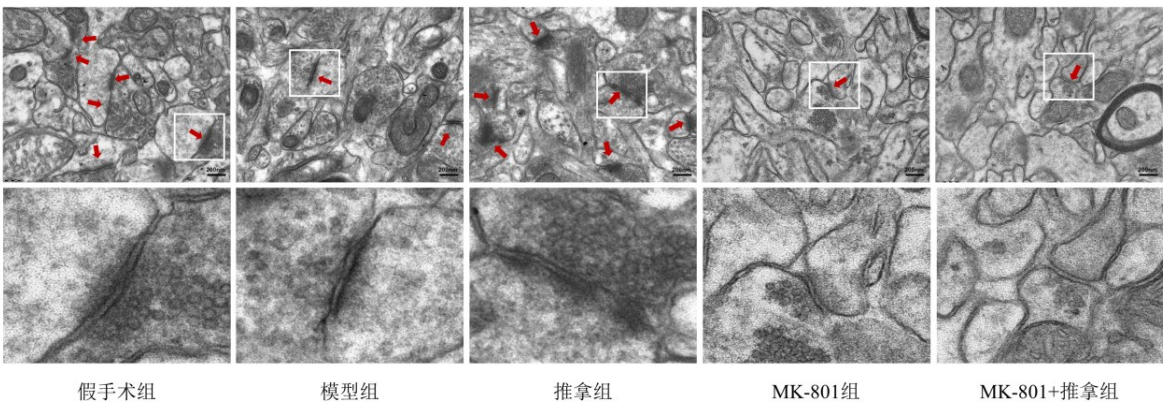
Figure 1 Morphology of Nysted-positive cells in hippocampal CA3 region of rat brain tissue in each group (Nysted staining, ×400)

表 4 各组大鼠海马 CA3 区神经元突触结构参数比较

Table 4 Comparison of synaptic structural parameters of neurons in hippocampal CA3 region of rat in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	突触数目/个	突触间隙/nm	突触后致密物厚度/nm	活性带长度/nm	突触界面曲率
假手术组	4	5.25±1.39	23.82±3.26	48.72±8.01	374.49±80.05	1.21±0.11
模型组	4	2.13±0.83 ^{a)}	27.62±3.87 ^{a)}	26.51±4.54 ^{a)}	316.42±59.92 ^{a)}	1.08±0.05 ^{a)}
推拿组	4	5.00±1.07 ^{b)}	22.33±3.65 ^{b)}	42.37±10.90 ^{b)}	374.56±47.38 ^{b)}	1.14±0.12
MK-801 组	4	1.63±0.52	31.39±2.93 ^{b)}	25.17±2.86	207.55±21.83 ^{b)}	1.06±0.04
MK-801+推拿组	4	1.62±1.00 ^{c)}	27.95±2.93 ^{c)}	23.52±7.27 ^{c)}	256.05±26.72 ^{c)}	1.05±0.04 ^{c)}

注：a) 与假手术组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与推拿组比较， $P<0.05$ 。



注：红色箭头指示为突触，第二行图片为第一行白色方框中突触的放大视图。

图 2 各组大鼠海马 CA3 区神经元突触超微结构 (×50 000)

Figure 2 Synaptic ultrastructure of neurons in hippocampal CA3 region of rat in each group (×50 000)

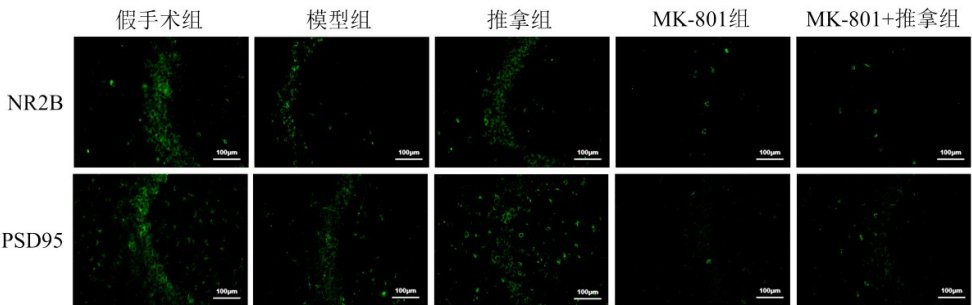
表 5 各组大鼠海马 CA3 区 NR2B 与 PSD95 免疫荧光阳性表达及免疫印迹蛋白表达比较

Table 5 Comparison of immunofluorescence positive expression of NR2B and PSD95 and expression of immunoblotting proteins in hippocampal CA3 region of rat in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	NR2B		PSD95	
		免疫荧光阳性表达	免疫印迹蛋白表达	免疫荧光阳性表达	免疫印迹蛋白表达
假手术组	4	4.57±1.03	1.06±0.07	4.18±1.03	1.09±0.11
模型组	4	1.51±0.54 ^{a)}	0.72±0.08 ^{a)}	1.31±0.35 ^{a)}	0.60±0.14 ^{a)}
推拿组	4	3.49±1.24 ^{b)}	0.96±0.12 ^{b)}	3.27±0.64 ^{b)}	0.86±0.17 ^{b)}
MK-801 组	4	0.22±0.03 ^{b)}	0.52±0.08 ^{b)}	0.36±0.11 ^{b)}	0.36±0.19 ^{b)}
MK-801+推拿组	4	0.39±0.13 ^{c)}	0.57±0.08 ^{c)}	0.46±0.10 ^{c)}	0.46±0.15 ^{c)}

注：NR2B，N-甲基-D 天冬氨酸受体 2B；PSD95，突触后密度蛋白 95。

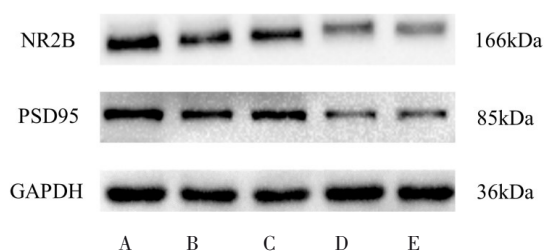
a) 与假手术组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与推拿组比较， $P<0.05$ 。



注：绿色荧光为 NR2B 与 PSD95 阳性表达。NR2B，N-甲基-D 天冬氨酸受体 2B；PSD95，突触后密度蛋白 95。

图 3 各组大鼠海马 NR2B、PSD95 免疫荧光图 (×200)

Figure 3 Immunofluorescence map of NR2B and PSD95 of rat in each group (×200)



注: NR2B, N-甲基-D天冬氨酸受体2B; PSD95, 突触后密度蛋白95; A, 假手术组; B, 模型组; C, 推拿组; D, MK-801组; E, MK-801+推拿组。

图4 各组大鼠海马CA3区NR2B、PSD95蛋白免疫印迹电泳图

Figure 4 Immunoblot electrophoresis of NR2B and PSD95 proteins in hippocampal CA3 region of rat in each group

3 讨论

坐骨神经痛为推拿科常见病与多发病, 根据其相关症状可归属于中医学“痹证”“筋痹”等范畴。《灵枢·经脉》曰:“脊痛, 腰似折, 髀不可以曲, 腠如结, 膈如裂”, 《素问·长刺节论篇》云:“病在筋, 筋挛节痛, 不可以行, 名曰筋痹”, 与坐骨神经痛患者出现痛觉超敏、跛行等症状临床表现^[15]相吻合。坐骨神经痛因风、寒、湿等邪气入侵人体, 致周身气机、血液运行不畅, 瘀滞痹阻经脉, 不通则痛; 或是机体阴阳失衡, 脏腑、经络失于温煦、濡润, 不荣则痛。推拿对坐骨神经痛有着显著的镇痛效果^[16], 通过对施术部位的点拨、按揉, 可发挥疏通经络、行气活血、理筋整复功效, 从而达到“通则不痛”“荣则不痛”的镇痛作用。同时, 选择合适的腧穴对坐骨神经痛的治疗至关重要。委中穴位于腠横纹的中点, 为足太阳膀胱经之合穴, 具有舒筋活络之功效, 是临床治疗腰腿痛的常用穴位^[17]。现代研究也发现, 按揉委中穴可兴奋脑内愉悦回路内的相关核团, 产生愉悦效应, 缓解疼痛^[18]; 三棱针点刺“委中”穴后可增加家兔坐骨神经传导速度, 具有镇痛作用^[19]。因此, 本研究选择委中穴作为干预穴位。

海马是大脑边缘系统的重要组成部分之一, 主要包括CA1区、CA3区和齿状回结构, 是负责调节情绪、传递伤害性疼痛信息和处理疼痛刺激的关键结构^[20]。伤害性刺激经外周感受器传入脊髓, 疼痛信息在脊髓背角被加工处理后, 经脊髓丘脑束与臂旁核上行。海马与臂旁核、丘脑等之间存在复杂的神经网络连接, 疼痛信息可从内嗅皮层通过穿支通路进入海马CA3区, 也可从齿状回通过苔藓纤维间接进入海马CA3区, 海马CA3区能够接收疼痛相关信息的传入, 并对疼痛相关信息进行处理, 从

而参与疼痛的感知与调制^[21-22]。

突触作为神经元相互接触的地方, 也是神经元之间的信息加工、传递与整合的场所。突触具有可塑性, 即神经元间的连接强度可调节, 导致突触可发生形态和功能较为持久的改变, 这是中枢神经系统发育过程中的重要特征^[23]。研究^[24]发现, 坐骨神经痛大鼠海马中出现突触可塑性降低的表现, 这个变化或与坐骨神经痛的发生和维持密切相关。因此, 针对海马突触可塑性的调节可能是坐骨神经痛治疗的策略之一。

本研究结果显示, 坐骨神经慢性压迫性损伤模型大鼠出现自发性疼痛, 机械痛阈降低, 并致大鼠海马CA3区神经元形态紊乱、尼氏阳性细胞数减少; 透射电镜结果显示大鼠海马CA3区突触结构特异改变, 表现为突触数量减少、突触间隙增加、突触后致密物厚度减少等, 上述结果均与既往研究^[25]一致。推拿“委中”穴对模型大鼠有明显镇痛作用, 并改善了海马CA3区神经元形态, 恢复突触异常结构。

本团队前期研究^[26]发现, 推拿可通过NR2B、PSD95蛋白调节脊髓背角突触可塑性, 从而发挥镇痛作用。因此, 本研究观察了模型大鼠海马CA3区NR2B、PSD95蛋白的变化。NR2B、PSD95蛋白是存在于突触前后膜上, 可对突触可塑性起着调节作用的信号分子。NR2B广泛参与了中枢神经系统中各种生理与病理过程, 其可通过开放阳离子通道, 导致细胞膜外Ca²⁺内流, 升高细胞内Ca²⁺浓度, 激活一系列级联效应, 从而参与神经系统突触可塑性及树突和轴突结构发育等生理病理过程, 并在痛觉信息的传递、学习、记忆与神经损伤的病理过程中发挥重要作用^[27-28]。PSD95是兴奋性谷氨酸能突触中最具特征的细胞支架蛋白, 被发现在大脑皮质及海马区的神经元细胞内大量表达^[29]。在神经元突触水平, PSD95可通过锚定NR2B形成定位于突触后膜致密物的NR2B/PSD95复合物, 从而激活下游信号分子, 产生级联反应, 参与维持突触结构连接状态与调节长时程增强, 在调控突触可塑性中发挥关键作用^[30]。本研究结果表明, 模型组大鼠海马CA3区NR2B、PSD95蛋白较假手术组表达减少, 提示海马突触功能受损, 推拿干预则增加了海马CA3区NR2B、PSD95蛋白表达, 说明推拿可改善海马突触功能。结合本课题组前期研究结果^[26], 我们推测增加NR2B与PSD95蛋白表达可能是推拿改善大鼠海马CA3区突触可塑性的分子基础。

为了验证这一推测,我们使用 NR2B 抑制剂 MK-801 观察其对推拿镇痛作用的影响。结果表明, MK-801 的使用抑制了推拿的镇痛作用、神经元保护与突触可塑性改善作用。同样抑制了推拿对 NR2B、PSD95 蛋白的调节作用,提示推拿能够通过增加坐骨神经慢性压迫性损伤模型大鼠海马 CA3 区 NR2B、PSD95 蛋白的表达水平,调控海马突触可塑性,从而发挥镇痛作用,但这一过程的具体机制仍需进一步深入探索。

本研究仍存在局限性:第一,本研究没有探讨疼痛引起的情绪、认知与记忆等行为变化,因此今后可尝试从情绪与认知等方面探索推拿镇痛起效机制;第二,本研究检测技术相对单一,只检测了蛋白质水平的变化,未进行基因层面的观察,今后可使用不同的技术手段进行研究;第三,突触可分为前成分与后成分,本研究主要针对突触后成分进行研究观察,故今后可针对突触前成分深入探索,以完善研究。

参考文献

- [1] LEWIS RA, WILLIAMS NH, SUTTON AJ, et al. Comparative clinical effectiveness of management strategies for sciatica: systematic review and network meta-analyses[J]. Spine J, 2015, 15(6): 1461-1477.
- [2] LIU ZF, WANG HR, YU TY, et al. Tuina for peripherally-induced neuropathic pain: a review of analgesic mechanism[J]. Front Neurosci, 2022, 16: 1096734. doi: 10.3389/fnins. 2022. 1096734.
- [3] MO ZM, LI DL, ZHANG RW, et al. Comparisons of the effectiveness and safety of Tuina, acupuncture, traction, and Chinese herbs for lumbar disc herniation: a systematic review and network meta-analysis [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019: 6821310. doi: 10.1155/2019/6821310.
- [4] 李峰. 理筋减压推拿术治疗坐骨神经痛 50 例临床观察[J]. 中国继续医学教育, 2016, 8(20): 169-170.
- [5] 张秀锦, 于晓芳. 推拿治疗坐骨神经痛 40 例[J]. 中国民间疗法, 2014, 22(8): 26.
- [6] 赵红义, 焦蕾. 单刺委中穴治疗坐骨神经痛瘀血型 28 例[J]. 实用中医药杂志, 2023, 39(10): 2036-2037.
- [7] TYRTYSHNAIA AA, MANZHULO IV, KONOVALOVA SP, et al. Neuropathic pain causes a decrease in the dendritic tree complexity of hippocampal CA3 pyramidal neurons[J]. Cells Tissues Organs, 2019, 208(3-4): 89-100.
- [8] DU JY, DENG YF, QIU ZL, et al. Curcumin alleviates chronic pain and improves cognitive impairment via enhancing hippocampal neurogenesis in sciatic nerve constriction rats[J]. J Pain Res, 2021, 14: 1061-1070. doi: 10.2147/JPR. S299604.
- [9] 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.
- [10] 房敏, 宋柏林. 推拿学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 113-114.
- [11] 马煦, 杨春晓. 谷氨酸对大鼠海马 CA3 区痛反应神经元电活动的影响[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2016, 50(4): 301-305.
- [12] NING L, MA LQ, WANG ZR, et al. Chronic constriction injury induced long-term changes in spontaneous membrane-potential oscillations in anterior cingulate cortical neurons in vivo[J]. Pain Physician, 2013, 16(5): E577-E589.
- [13] JONES DG, DEVON RM. An ultrastructural study into the effects of pentobarbitone on synaptic organization[J]. Brain Res, 1978, 147(1): 47-63.
- [14] GÜLDNER FH, INGHAM CA. Increase in postsynaptic density material in optic target neurons of the rat supra-chiasmatic nucleus after bilateral enucleation[J]. Neurosci Lett, 1980, 17(1-2): 27-31.
- [15] 崔艳红, 张赛, 陈旭义, 等. 坐骨神经痛的研究进展[J]. 中国医药, 2019, 14(7): 1114-1117.
- [16] 张静. 中医外治法联合应用治疗坐骨神经痛研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2019, 28(18): 65-68.
- [17] 高俊虎, 王博仑, 刘巍, 等. 基于“腰背委中求”理论浅谈对委中穴治疗腰痛病的认识[J]. 针灸临床杂志, 2020, 36(8): 91-94.
- [18] 李征宇, 孙兮文, 张效初, 等. 按揉委中穴对脑愉悦回路的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2008, 22(4): 51-53.
- [19] 常小荣, 封迎帅, 易受乡, 等. 点刺“委中”放血对实验性腰椎间盘突出症坐骨神经传导速度和髓核组织白细胞介素-1 α 的影响[J]. 针刺研究, 2007, 32(5): 319-322.
- [20] 田润利, 郭朝晖, 李永男. 神经病理性疼痛对海马影响的研究进展[J]. 疑难病杂志, 2017, 16(11): 1166-1170.
- [21] CHERUBINI E, MILES RM. The CA3 region of the hippocampus: how is it? What is it for? How does it do it? [J]. Front Cell Neurosci, 2015, 9: 19. doi: 10.3389/fncel. 2015. 00019.
- [22] LIU MG, CHEN J. Roles of the hippocampal formation in pain information processing[J]. Neurosci Bull, 2009, 25(5): 237-266.
- [23] 张小飞, 刘菊英. 基于突触可塑性的疼痛研究及临床转化[J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2019, 40(2): 160-164.

- [24]XU QL, LIU T, CHEN SP, et al. The cumulative analgesic effect of repeated electroacupuncture involves synaptic remodeling in the hippocampal CA3 region [J]. *Neural Regen Res*, 2012, 7(18): 1378–1385.
- [25]吴愚. 海马 MiR-181c 通过 TRIM2-NF-L-NR1 通路缓解 CCI 大鼠疼痛和痛相关行为学研究[D]. 遵义: 遵义医科大学, 2021.
- [26]HUANG HY, WANG BQ, CHEN SJ, et al. Chinese Tuina remodels the synaptic structure in neuropathic pain rats by downregulating the expression of N-methyl D-aspartate receptor subtype 2B and postsynaptic density protein-95 in the spinal cord dorsal horn [J]. *J Tradit Chin Med*, 2023, 43(4): 715–724.
- [27]LI S, CAO J, YANG X, et al. NR2B phosphorylation at tyrosine 1472 in spinal dorsal horn contributed to N-methyl-D-aspartate-induced pain hypersensitivity in mice [J]. *J Neurosci Res*, 2011, 89(11): 1869–1876.
- [28]FRANCE G, FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ D, BURNELL ES, et al. Multiple roles of GluN2B-containing NMDA receptors in synaptic plasticity in juvenile hippocampus [J]. *Neuropharmacology*, 2017, 112(7): 76–83.
- [29]STATHAKIS DG, UDAR N, SANDGREN O, et al. Genomic organization of human DLG4, the gene encoding postsynaptic density 95 [J]. *J Neurochem*, 1999, 73(6): 2250–2265.
- [30]翁启芳, 龙儒桃, 张策. NMDA 受体 NR2B 亚单位结构和功能的研究进展 [J]. *现代预防医学*, 2013, 40(16): 3132–3134, 3140.

Effects of Tuina at "Weizhong" (BL 40) on Synaptic Plasticity in the Hippocampal CA3 Region in Chronic Sciatic Nerve Compression Injury Model Rats

HUANG Hongye, CHEN Shuijin, CHEN Lechun, ZHANG Huanzhen, JIANG Jingjing, JIANG Yu, CHEN Jincheng, LIN Zhigang

Rehabilitation Hospital affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, 350003

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of Tuina at Weizhong (BL 40) for relieving sciatica from the perspective of hippocampal synaptic plasticity. **Methods** Sixty SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, Tuina group, MK-801 group, MK-801 plus Tuina group, 12 rats in each group. After lateral ventricular cannulation, rats model with chronic compression injury of the right sciatic nerve were prepared in all groups except the sham operation group. On day 4 after modelling, rats in the Tuina group start Tuina at Weizhong (BL 40) for 10 mins once a day for a total of 14 days; rats in the MK-801 group started injecting with 0.25 μg/μl of the N-methyl-D-aspartate receptor 2B (NR2B) blocker, dizocycline (MK-801), 0.5 μl of which was administered daily in the lateral ventricle for 14 days. Rats in the MK-801 plus Tuina group underwent Tuina after 30 mins when completing MK-801 injection in the lateral ventricle, in the same way as above; rats in the model group and the sham operation group did not undergo any intervention. Spontaneous pain behaviour scores and paw withdraw thresholds (PWTs) were examined on day 1 (base value) before modelling and on day 4, 10, 14 and 18 after modelling; and on day 19, the brain tissues of the rats in each group were sampled and the number and morphology of the Nysted-positive cells in the hippocampal CA3 region were observed using Nysted staining; and the number of synapses, the thickness of post-synaptic dense material, the length of active band and the curvature of synaptic interface in hippocampal CA3 region were observed by transmission electron microscopy; and the expression of synapse-associated proteins NR2B and postsynaptic density protein-95 (PSD95) in hippocampal CA3 was detected by immunofluorescence staining and immunoblotting. **Results** Compared with the same time in the sham operation group, spontaneous pain scores significantly increased and PWTs decreased on day 4, 10, 14, and 18 after modelling in the model group ($P < 0.05$); compared with the model group, spontaneous pain scores in Tuina group of rats significantly decreased on day 10, 14, and 18 after modelling, and PWTs significantly increased on day 14 and 18 after modelling ($P < 0.05$). Compared with Tuina group, spontaneous pain scores increased on day 10, 14, and 18 of modelling, and PWTs decreased at days 14 and 18 of modelling in the MK-801 plus Tuina group had higher spontaneous pain scores on days 10, 14, and 18 after modelling and lower PWTs on days 14 and 18 after modelling ($P < 0.05$). Compared with the sham operation group, the neuronal arrangement in the hippocampal CA3 region of the rats in the model group was disordered, with decreased number of Nysted-positive cells and synapses, reduced thickness of postsynaptic densities, length of active

bands, and curvature of synaptic interfaces, wider synaptic gaps, and decreased immunofluorescent positive expression of NR2B and PSD95 as well as the expression of immunoblotting proteins in hippocampal CA3 region ($P < 0.05$). Compared with the model group, more dense arranged nerve cells, the number of Nysted-positive cells, the number of synapses, the thickness of postsynaptic dense material, the length of active bands increased, the synaptic gap became significantly narrower, and the positive expression of immunofluorescence and immunoblotting protein expression of NR2B, PSD95 increased in the rat hippocampal CA3 region of Tuina group ($P < 0.05$). Compared with Tuina group, the neuronal morphology of the hippocampal CA3 region in MK-801 plus Tuina group was severely damaged, and the number of Nystrom's-positive cells, the number of synapses, the thickness of post-synaptic densities, the length of active bands, and the curvature of synaptic interfaces reduced, the synaptic gaps became wider, and the immunofluorescent positive expression of NR2B, PSD95, and the expression of immunostained proteins decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Tuina at "Weizhong" (BL 40) showed significant analgesic effect, and one of the possible mechanisms concluded as significantly increasing the levels of NR2B and PSD95 protein expression in hippocampal CA3 region and thus modulating the synaptic plasticity of the hippocampus.

Keywords sciatica; Tuina; Weizhong (BL 40); hippocampus; synaptic plasticity; N-methyl-D-aspartate receptor 2B

(收稿日期: 2024-02-25; 修回日期: 2024-03-26)

[编辑: 邓 媛]

珍贵文献 临床科研必备《中医杂志》光盘合订本

广告

《中医杂志》光盘检索系统收录了 1951—2013 年出版发行的《中医杂志》所有期刊(繁体字已转为简体字)。您可借助计算机阅读收录的任意一篇文章,而且可对光盘进行任意词或多组合条件检索,检索结果可以打印或下载保存。您可以在几秒钟内就能检索到某种疾病、某种疗法或某种药的相关文章,本光盘可按自然年、期排序,方便阅读与保存。1951—1986 年光盘还收录了扫描的原文版面图像。

邮购地址:北京东直门内南小街 16 号中医杂志社,邮政编码:100700

电话:(010) 64035632 联系人:杨秋雷(请在汇款单附言栏写明购买者的电话)

1951—1986 年光盘合订本每套(4 张光盘)480 元

1987—1994 年光盘合订本每套(1 张光盘)260 元

1995—2004 年光盘合订本每套(1 张光盘)280 元

2005—2013 年光盘合订本每套(1 张光盘)300 元



欢迎关注《中医杂志》公众号

科技精品光盘全文检索管理系统 3.5-《中医杂志》(1987-1994)

工系统工具 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 年代 检索 二次检索 全选

期刊目录

1. 泄泻证治

2. 厥脱与中风的关系

3. 脉法三论

4. 针灸保健益寿浅探

5. 清热解毒法治疫气中

6. 余无言医方治法选介

7. 中医治疗高热症 21 例

8. 丁仲山外科医案三则

9. 闭经溢乳综合征证治当议

10. 医话二则

11. 甘露消毒丹新用

12. 中药粘胶剂治疗皮肤切

13. 失眠从气论治 2 例

14. 男性不育症从肝肾论治

15. 东垣升阳泻火法在针灸

16. 升穴的变通应用法则

17. 萎缩性胃炎 436 例中医

18. 中药重泻治清霍乱腹

19. 三种不同治法治疗急

20. 桑椹对老年便秘及睡眠

21. 利胆合剂治疗小儿肝

22. 中药治疗小儿过敏性血

23. 慢性胃炎辨证论治和血

24. 八种验中中药效的对

【第 1 页】泄泻证治

【第 2 页】泄泻证治

【第 3 页】泄泻证治

【第 4 页】泄泻证治

【第 5 页】泄泻证治

【第 6 页】泄泻证治

【第 7 页】泄泻证治

【第 8 页】泄泻证治

【第 9 页】泄泻证治

【第 10 页】泄泻证治

【第 11 页】泄泻证治

【第 12 页】泄泻证治

【第 13 页】泄泻证治

【第 14 页】泄泻证治

【第 15 页】泄泻证治

【第 16 页】泄泻证治

【第 17 页】泄泻证治

【第 18 页】泄泻证治

【第 19 页】泄泻证治

【第 20 页】泄泻证治

