

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.07.013

推拿“委中”穴对坐骨神经慢性压迫损伤模型大鼠脊髓小胶质细胞活化相关蛋白及IL-10/ β -EP通路的影响

张天伟^{1,2}, 吕向前², 邢雅妮³, 朱柳陈², 朱清广^{1,4}, 孔令军⁵,
程艳彬^{1,4}, 严振¹, 孙武权¹, 房敏^{1,4,5}, 吴志伟^{1,4}✉

1. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, 上海市虹口区甘河路110号, 200437; 2. 上海中医药大学针灸推拿学院; 3. 上海中医药大学中药学院; 4. 上海市中医药研究院中医推拿研究所; 5. 上海中医药大学附属曙光医院

[摘要] **目的** 探讨推拿“委中”穴对坐骨神经慢性压迫损伤(CCI)模型大鼠神经病理性疼痛的缓解作用及可能的脊髓中枢机制。**方法** 32只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、推拿组和阻断组, 每组8只。模型组、推拿组和阻断组均采用羊肠线坐骨神经结扎制备CCI模型, 假手术组仅暴露坐骨神经不行结扎。推拿组及阻断组自术后第4至14天, 采用手套动态压力分布测量系统于“委中”穴行推拿按揉法, 压力5 N、频率2 Hz, 每次10 min, 每日1次; 阻断组与推拿时间同步按10 mg/kg予小胶质细胞阻断剂米诺环素腹腔注射, 每日1次; 假手术组与模型组行与推拿组相同的抓取与固定。观察各组大鼠造模前及造模第3、7、10、14天大鼠机械缩足阈值(MWT)和热缩足反射潜伏期(PWL); 采用透射电镜观察坐骨神经损伤修复情况, 测量轴突直径和有髓纤维总直径, 计算g-ratio值; 蛋白质印迹法检测术侧脊髓背角离子钙结合适配器分子1(Iba-1)、CD206、CD68、白细胞介素10(IL-10)和 β -内啡肽(β -EP)前体阿黑皮素原(POMC)蛋白水平。**结果** 与假手术组同时间比较, 模型组大鼠在造模第3、7、10、14天时MWT和PWL均降低($P<0.01$); 与模型组同时间比较, 推拿组和阻断组在造模第10、14天时MWT和PWL均升高($P<0.05$); 与推拿组同时间比较, 阻断组在造模第7、10、14天时MWT升高, 在造模第10天时PWL升高($P<0.05$)。坐骨神经病理形态学显示, 假手术组髓鞘结构完整、形态规则, 模型组可见髓鞘崩脱、扭曲及髓鞘球, 推拿组髓鞘部分形态不规则、偶见髓鞘崩脱, 阻断组髓鞘部分形态不规则、磷脂脱落。与假手术组比较, 模型组g-ratio值降低, 脊髓背角Iba-1、CD68蛋白水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与模型组比较, 推拿组和阻断组g-ratio值升高, 推拿组和阻断组大鼠Iba-1、CD68水平降低, 推拿组CD206、IL-10、POMC蛋白水平升高, 阻断组CD206蛋白水平降低($P<0.05$)。**结论** 推拿“委中”穴可缓解CCI模型大鼠的神经病理性疼痛, 其机制可能是通过调控脊髓小胶质细胞活化, 抑制其向M1型极化、促进其向M2型极化, 激活IL-10/ β -EP通路进而发挥镇痛效应。**[关键词]** 神经病理性疼痛; 推拿; 委中穴; 脊髓; 小胶质细胞; 白细胞介素10; β -内啡肽

国际疼痛研究学会将神经病理性疼痛(neuropathic pain, NPP)定义为由躯体感觉系统的损伤或疾病引起的疼痛^[1]。NPP通常由中枢或外周神经系统损伤或疾病、代谢紊乱、感染、药物或放射治疗的神经毒性或梗死(中风)引起^[2]。自发性疼痛、痛觉过敏和异常性疼痛是NPP的主要临床特征^[3]。患者描述的疼痛感觉体验通常表现为电击、

刺痛、灼热、麻木或悸动^[4]。由于其高发病率、疼痛持续时间长、身心危害大等因素, NPP成为近年的研究热点^[5]。

推拿是临床缓解NPP、提高患者生活能力的有效手段^[6]。基于中医学“腰背委中求”和“经脉所过、主治所及”理论, 委中穴成为临床推拿治疗腰部疼痛的代表性穴位之一^[7]。本团队前期研究证实, 推拿可通过调控脊髓背角小胶质细胞活化实现镇痛效应^[8]。神经损伤时, 小胶质细胞被激活并极

基金项目: 国家自然科学基金(82205302, 82030121, 82474672)

✉ 通讯作者: wuzhiwei8927@163.com

化为 M1 和 M2 两种表型,其中 M1 型通过释放细胞因子、炎性趋化因子和细胞毒性物质增强兴奋性突触传递,加重炎症反应和神经损伤;M2 型则通过释放白细胞介素 10 (IL-10) 等抑炎因子减轻免疫炎症反应并促进伤口愈合和组织修复^[9]。IL-10/ β -内啡肽 (β -EP) 通路被证实参与 M2 型小胶质细胞抑制 NPP 的病理进程^[10]。本研究以小胶质细胞极化为切入点,明确推拿干预 NPP 的镇痛效应,并基于 M2 型小胶质细胞下游 IL-10/ β -EP 通路探索推拿治疗 NPP 的起效分子机制,为推拿“委中”穴治疗 NPP 提供科学依据。本试验通过上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院伦理委员会批准,批件号:YYLAC-2024-257。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级雄性 SD 大鼠 32 只,6~8 周龄,体质量 180~200g,由上海吉辉实验动物有限公司提供,实验动物许可证号 SCXK (沪) 2022-0009。每笼 5 只饲养于上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院实验动物中心,饲养过程不限食水,饲养环境温度 (24 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 (55 ± 5)%、12 h/12 h 昼夜节律。

1.2 主要试剂与仪器

离子钙结合适配器分子 1 (Iba-1, 批号 YT5640)、CD206 (批号 YM4765)、IL-10 (批号 YT5138) 抗体,美国 ImmunoWay 公司; β -EP 前体阿黑皮素原 (POMC) 抗体 (批号 HY-P81874)、米诺环素 (批号 HY17412),美国 MCE 公司;CD68 抗体 (批号 ab283656),英国 Abcam 公司;RIPA 裂解液 (批号 WB0102)、BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 WB2123)、SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒 (批号 WB0130)、SDS 蛋白上样缓冲液 (批号 WB0133)、ECL 超敏发光试剂盒 (批号 WB0164)、一抗稀释液 (批号 WB0158)、二抗稀释液 (批号 WB0159)、封闭液 (批号 WB0161)、GAPDH 抗体 (批号 WB0197)、HRP 标记抗兔/抗小鼠二抗 (批号 WB0177/WB0176),上海威奥生物科技有限公司;电镜固定液 (批号 G1102),武汉塞维尔生物科技有限公司;钨酸 (批号 18456),北京博蕾德生物科技有限公司;丙酮 (批号 10000418)、无水乙醇 (批号 100092183)、柠檬酸三钠 (批号 10019408),国药集团化学试剂有限公司;醋酸铀 (批号 02624-AB),SPI 公司;硝酸铅 (批号 203580),Sigma 公司。

铬制羊肠线 (山东博达医疗用品股份有限公

司,型号 4-0);小型垂直电泳槽 (型号 165-8001)、小型转印槽 (型号 170-3930),Bio-Rad 公司;超声波细胞破碎仪 (宁波新芝生物科技有限公司,型号 JY88-II);台式高速冷冻离心机 (型号 JFresco21)、全波长酶标仪 (型号 MutiskanTM GO),Thermo 公司;免疫印迹成像系统 (Tanon 公司,型号 4600);电子机械测痛仪 (型号 ALMEMO 2450)、辐射热刺激装置 (型号 390),IITC/Life Science 公司;手套动态压力分布测量系统 (Novel 公司,型号 Plance-X 32 Expert);透射电子显微镜 (Hitachi 公司,型号 HT7800/HT7700)。

1.3 模型制备及评价

坐骨神经慢性压迫损伤模型 (CCI) 是公认的 NPP 模型之一^[11],本研究即采用该模型制备方法。大鼠称重后用 1% 戊巴比妥钠 3.5 ml/kg 腹腔注射麻醉,在股骨中部下方平行股骨剪开皮肤;将尖头止血钳经股二头肌间隙插入并撑开分离肌肉;使用撑开器撑开肌肉,并用玻璃分针分离坐骨神经与周围筋膜及肌肉组织,充分暴露坐骨神经干中部;使用浸泡充分的 4-0 铬制羊肠线在坐骨神经上间距 1 mm 处打 3 个方结,以结扎局部肌肉及右后肢轻微抽动、坐骨神经上血流通畅且羊肠线方结可在坐骨神经上滑动为宜;由内向外逐层缝合。以术后 3 天出现步态异常 (踝关节外翻、跛行),舔舐、悬空等后肢保护现象作为造模成功的判定标准^[11]。

1.4 分组及干预方法

采用随机数表法将大鼠分为假手术组、模型组、推拿组、阻断组,每组 8 只。假手术组仅暴露坐骨神经干中部,不行坐骨神经结扎,其余各组大鼠建立 CCI 模型。推拿组及阻断组在术后第 4 天开始抓取并采用自制固定器固定大鼠,采用手套动态压力分布测量系统于“委中”穴行推拿按揉法,压力 5 N、频率 2 Hz,每次 10 min,每日 1 次,连续治疗 10 天;阻断组与推拿时间同步按 10 mg/kg 予小胶质细胞阻断剂米诺环素腹腔注射,每日 1 次;假手术组与模型组行与推拿组相同的抓取与固定。

1.5 检测指标与方法

1.5.1 疼痛行为学测试 采用机械足反射阈值 (MWT) 和热缩足反射潜伏期 (PWL) 作为行为学测定指标。分别于造模前及造模后第 3、7、10、14 天各检测 1 次。MWT 测试时将大鼠置于金属网格上,并采用电子机械测痛仪进行刺激,记录大鼠抬足时刺激强度,每次间隔 15 s。PWL 测试时将大鼠置于辐射热刺激装置可加热双层玻璃板,并采用

钨丝热源焦点定位装置进行热刺激,记录大鼠抬足时刺激时长;设置光源强度为 65℃,20 s 自动切断,以防止组织灼伤。造模前进行两次测定并取平均值作为基线,测试之前连续 3 天将大鼠置于 20 cm×10 cm×20 cm 的有机玻璃笼中适应环境 2 h。每次正式测试前大鼠适应环境 30 min。术后每次测试均进行 5 次,排除最小值和最大值,以剩余 3 次测试的平均值作为结果。

1.5.2 透射电镜检测坐骨神经形态 最后一次推拿干预 2 h 后,每组采用随机数字表法选取 3 只大鼠,1%戊巴比妥钠 3.5 ml/kg 腹腔注射麻醉后,俯卧于冰中,快速取术侧坐骨神经损伤点上下 5 mm。先后经电镜液和 1%锇酸固定、乙醇梯度脱水、醋酸双氧铀染色、无水乙醇和丙酮脱水后包埋、60℃烤箱聚合。切片厚度 60~80 nm,2%醋酸铀饱和乙醇溶液避光染色 8 min;70%乙醇和超纯水清洗;2.6%枸橼酸铅溶液避二氧化碳染色 8 min;超纯水清洗。铜网切片,室温干燥过夜,透射电镜观察坐骨神经形态。应用 Image J 2.0 软件测量轴突直径和有髓纤维总直径,计算 g-ratio 值, g-ratio 值=轴突直径/有髓纤维总直径, g-ratio 值越大髓鞘越薄。

1.5.3 蛋白质印迹法检测脊髓背角 Iba-1、CD68、CD206、IL-10、POMC 蛋白表达 取出腰膨大部位术侧脊髓背角组织加入 RIPA 裂解液后研磨匀浆提取蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度;加入上样缓冲液,95℃高温变性;上样后依次电泳、转膜、封闭,加一抗 Iba-1 (1:1000)、CD68 (1:1000)、

CD206 (1:1000)、IL-10 (1:500)、POMC (1:1000)、GAPDH (1:2000),4℃过夜;1×TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;加二抗 (1:2000) 室温摇床孵育 1 h,洗膜 3 次,每次 10 min。显影、拍照。应用 Image J 2.0 软件分析条带灰度值。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 22.0 和 Graph prism 9.0 软件对数据进行分析 and 作图。计量资料均符合正态分布以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,方差齐者多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 LSD 法;方差不齐者多组间比较采用 Welch 近似 *F* 检验,两组间比较采用 Dunnett's *T*^a 法。*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时间 MWT 比较

表 1 示,造模前各组间 MWT 差异无统计学意义 (*P*>0.05)。与假手术组同时间比较,除阻断组造模第 14 天外,其余各组大鼠在造模第 3、7、10、14 天时 MWT 均降低 (*P*<0.05)。与模型组同时间比较,推拿组大鼠在造模第 10、14 天时 MWT 升高,阻断组在造模第 7、10、14 天时 MWT 亦升高 (*P*<0.05)。与推拿组同时间比较,阻断组在造模第 7、10、14 天时 MWT 升高 (*P*<0.05)。

2.2 各组大鼠不同时间 PWL 比较

表 2 示,造模前各组间 PWL 差异无统计学意义 (*P*>0.05)。与假手术组同时间比较,除阻断组造模第 10、14 天外,其余各组大鼠在造模第 3、7、

表 1 各组大鼠不同时间机械足反射阈值比较

Table 1 Comparison of mechanical paw withdrawal thresholds in rats at different time points across groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	造模前	造模第 3 天	造模第 7 天	造模第 10 天	造模第 14 天
假手术组	8	47.45±3.25	44.72±2.92	47.98±3.92	46.00±4.28	45.77±4.28
模型组	8	46.42±2.16	22.62±2.28 ^{a)}	22.34±2.69 ^{a)}	22.86±1.87 ^{a)}	25.44±2.90 ^{a)}
推拿组	8	44.66±2.81	22.40±1.92 ^{a)}	25.33±3.17 ^{a)}	29.59±3.47 ^{a) b)}	37.29±3.41 ^{a) b)}
阻断组	8	46.73±2.62	23.42±2.91 ^{a)}	33.75±3.21 ^{a) b) c)}	38.06±4.12 ^{a) b) c)}	45.52±4.21 ^{b) 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 各组大鼠不同时间热缩足反射潜伏期比较

Table 2 Comparison of thermal paw withdrawal latencies in rats at different time points across groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	造模前	造模第 3 天	造模第 7 天	造模第 10 天	造模第 14 天
假手术组	8	10.93±0.79	9.65±1.14	9.83±1.26	10.06±0.99	10.65±1.02
模型组	8	10.45±0.78	6.15±0.75 ^{a)}	6.03±0.48 ^{a)}	6.42±0.82 ^{a)}	6.18±0.74 ^{a)}
推拿组	8	11.03±0.95	6.29±1.16 ^{a)}	6.96±0.90 ^{a)}	7.68±0.87 ^{a) b)}	8.85±0.77 ^{a) b)}
阻断组	8	10.84±1.30	5.90±0.78 ^{a)}	7.53±0.95 ^{a) b)}	8.90±0.84 ^{a) b) c)}	9.67±0.85 ^{b) 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。

10、14 天时 PWL 均降低 ($P<0.05$)。与模型组同时时间比较, 推拿组大鼠在造模第 10、14 天时 PWL 升高, 阻断组在造模第 7、10、14 天时 PWL 亦升高 ($P<0.05$)。与推拿组同时时间比较, 阻断组在造模第 10 天时 PWL 升高 ($P<0.05$)。

2.3 各组大鼠坐骨神经透射电镜检测结果比较

表 3 示, 模型组 g-ratio 值低于假手术组 ($P<0.01$); 推拿组和阻断组 g-ratio 值高于模型组 ($P<0.05$); 推拿组和阻断组 g-ratio 值比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 3 各组大鼠坐骨神经 g-ratio 值比较

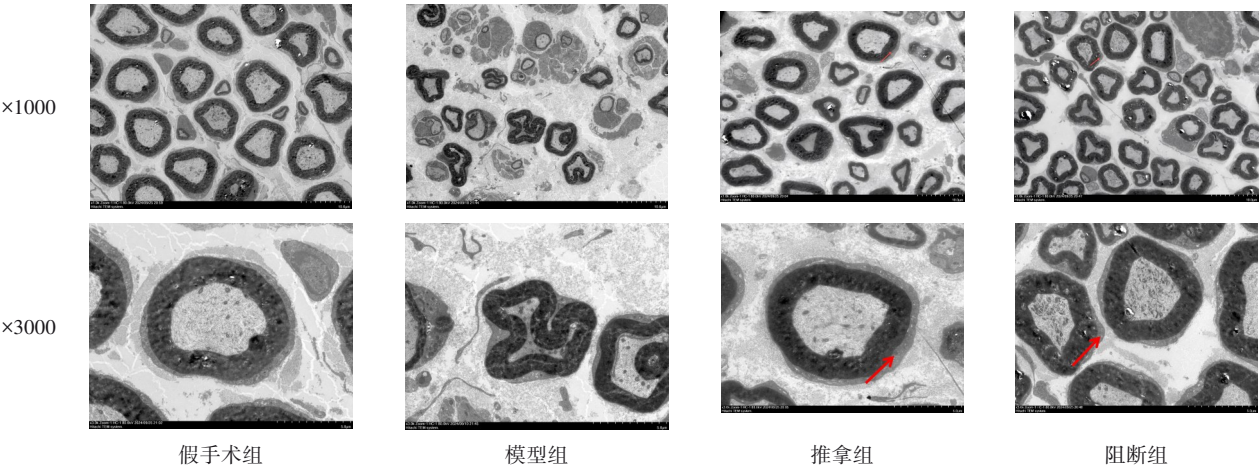
Table 3 Comparison of g-ratio values of sciatic nerve in rats across groups ($\bar{x}\pm s$)		
组别	鼠数	g-ratio
假手术组	3	0.66±0.06
模型组	3	0.38±0.14 ^{a)}
推拿组	3	0.54±0.11 ^{b)}
阻断组	3	0.58±0.11 ^{b)}

注: a) 与假手术组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$ 。

图 1 示, 假手术组髓鞘结构完整、形态规则并呈板层样整齐、致密、均匀排列; 模型组可见髓鞘崩脱、扭曲及髓鞘球, 板层间隙增大甚或板层分离; 推拿组髓鞘部分形态不规则、磷脂脱落, 板层欠致密、略有分离, 偶见髓鞘崩脱; 阻断组髓鞘部分形态不规则、磷脂脱落, 板层欠致密、略有分离。

2.4 各组大鼠术侧脊髓背角 Iba-1、CD68、CD206、IL-10、POMC 蛋白水平比较

表 4 示, 与假手术组比较, 模型组大鼠术侧脊髓背角 Iba-1、CD68 蛋白水平升高 ($P<0.05$), CD206、IL-10、POMC 蛋白水平差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与模型组比较, 推拿组和阻断组大鼠 Iba-1、CD68 水平降低, 推拿组 CD206、IL-10、POMC 蛋白水平升高, 阻断组 CD206 蛋白水平降低 ($P<0.05$); 与推拿组比较, 阻断组大鼠 Iba-1、CD68、CD206、IL-10、POMC 蛋白水平均降低 ($P<0.05$)。各组大鼠术侧脊髓背角中 Iba-1、CD68、CD206、IL-10、POMC 蛋白电泳图见图 2。



注: 图中红色箭头指示为坐骨神经脱髓鞘改变。

图 1 各组大鼠坐骨神经形态透射电镜检测结果

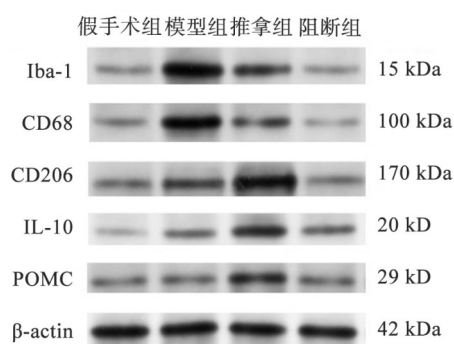
Figure 1 Transmission electron microscopy results of sciatic nerve morphology in rats across groups

表 4 各组大鼠术侧脊髓背角 Iba-1、CD68、CD206、IL-10、POMC 蛋白水平比较

Table 4 Comparison of Iba-1, CD68, CD206, IL-10, and β -EP protein levels in the dorsal horn of the spinal cord on the operated side in rats across groups ($/\beta$ -actin, $\bar{x}\pm s$)						
组别	鼠数	Iba-1	CD68	CD206	IL-10	POMC
假手术组	8	0.35±0.09	0.29±0.07	0.31±0.12	0.20±0.06	0.35±0.13
模型组	8	1.20±0.19 ^{a)}	1.35±0.16 ^{a)}	0.43±0.09	0.36±0.11	0.39±0.20
推拿组	8	0.69±0.13 ^{b)}	0.98±0.14 ^{b)}	0.96±0.14 ^{b)}	0.92±0.17 ^{b)}	0.95±0.23 ^{b)}
阻断组	8	0.32±0.08 ^{b) c)}	0.30±0.07 ^{b) c)}	0.27±0.06 ^{b) c)}	0.37±0.12 ^{c)}	0.35±0.12 ^{c)}

注: Iba-1, 离子钙结合适配器分子 1; IL-10, 白细胞介素 10; POMC, 阿黑皮素原。

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: Iba-1, 离子钙结合适配蛋白 1; IL-10, 白细胞介素 10; POMC, 阿黑皮素原。

图 2 各组大鼠术侧脊髓背角中 Iba-1、CD68、CD206、IL-10、POMC 蛋白电泳图

Figure 2 Western Blotting results of Iba-1, CD68, CD206, IL-10, and POMC protein levels in the dorsal horn of the spinal cord on the operated side in rats across groups

3 讨论

中医理论认为,疼痛的发生是由“不通”和“不荣”导致。《医宗金鉴·正骨心法要旨》中记载“因跌扑闪失,以至骨缝开错,气血郁滞,为肿为痛,宜用按摩法。按其经络,以通郁闭之气,摩其壅聚,以散痰结之肿,其患可愈”,指出了推拿按摩具有疏通气血、消肿散结的功效,对于跌扑损伤导致的“不通则痛”疗效显著。《素问·调经论篇》则指出“神不足者,视其虚络,按而致之……以通其经,神气乃平”,强调对于素体虚损、经络不荣导致的疼痛亦可以推拿治疗。清代医家吴师机在《理瀹骈文》中将此解释为“外治者,气血流通即是补”,指出了推拿“补虚治痛”的理论内涵。委中穴属足太阳膀胱经,是循经远端取穴的代表性穴位。《灵枢·经脉》载:“膀胱足太阳之脉,……其支者:从腰中,下挟脊,贯臀,入腠中。其支者:从腠内左右别下贯胛,挟脊内,过髀枢,循髀外后廉下合腠中”,其中所述“腠中”即委中穴,遵中医学“经脉所过,主治所及”原则,委中穴可用于治疗背、腰、臀、腿部疾患,亦是现代临床治疗坐骨神经痛的常用穴位。

本研究结果显示,推拿大鼠“委中”穴可显著升高由于 CCI 造模导致的 MWT 和 PWL 降低,提示推拿“委中”穴对于 NPP 的痛觉过敏和诱发痛具有显著疗效。本研究还观察到推拿组可改善 CCI 造模导致的脱髓鞘现象,显著升高 g-ratio 值,这与既往研究结果^[12]一致,为推拿改善神经损伤提供了形态学证据。

推拿镇痛机制复杂,有研究显示中枢敏化在 NPP 发生过程中发挥着重要的作用^[13]。神经损伤可致脊髓小胶质细胞活化,活化的小胶质细胞主要表现为数量急剧增多、胞体体积变大、特异性标记物染色加深、自身结构蛋白表达增多和炎症细胞因子释放增多^[14]。小胶质细胞直接参与对 NPP 脊髓中枢敏化的调控^[15]。活化的小胶质细胞有 M1 和 M2 两种表型,其中 M1 型致炎、M2 型抗炎。在神经损伤恢复过程中,小胶质细胞可通过升高细胞表面蛋白 CD206 的表达,极化为 M2 型^[16]。M2 型小胶质细胞通过释放 IL-10 和 TGF- β 等抗炎或神经保护因子减轻免疫炎症反应,并促进伤口愈合、组织修复和神经元稳态平衡,具有显著的神经保护和镇痛作用^[17]。本研究结果发现,CCI 造模可导致术侧脊髓背角小胶质细胞标志物 Iba-1 蛋白含量显著升高,而推拿可在一定程度上逆转此现象,提示推拿“委中”穴发挥镇痛效应与抑制脊髓小胶质细胞活化有关。同时模型组大鼠术侧脊髓背角 CD68 蛋白含量显著升高,而推拿可显著降低术侧脊髓背角 CD68 蛋白含量并升高 CD206 蛋白含量,提示推拿“委中”穴能有效调控小胶质细胞活化,抑制其向 M1 型极化、促进其向 M2 型极化,降低脊髓背角促炎因子释放进而发挥镇痛作用。

β -EP 是一种内源性阿片类药物,可通过与 μ -阿片受体特异性结合实现中枢和外周镇痛,还可通过激活导水管周围灰质区-中缝核群-脊髓背角的下行抑制系统阻滞背角的痛觉传入^[18]。鞘内注射 IL-10 可通过诱导小胶质细胞表达 β -EP 发挥镇痛作用,而鞘内注射 β -EP 中和抗体能够完全阻断 IL-10 的镇痛效应,证实脊髓层面 IL-10 的镇痛作用由 β -EP 介导,IL-10/ β -EP 通路是调控脊髓中枢镇痛的重要途径之一^[19]。既往研究^[20-21]证实,推拿可通过升高 NPP 模型大鼠血清、局部肌肉组织及下丘脑中 β -EP 含量和腰椎间盘突出症患者血清 IL-10 含量发挥镇痛作用。本研究结果显示,推拿“委中”穴可显著升高 CCI 大鼠术侧脊髓背角 IL-10 和 β -EP 前体 POMC 蛋白含量,提示推拿“委中”穴的镇痛效应与升高 IL-10 和 β -EP 蛋白含量有关。为了进一步证实推拿调控小胶质细胞活化与 IL-10、 β -EP 表达的关系,本研究采用米诺环素阻断小胶质细胞表达并予推拿干预,结果发现由 CCI 造模导致的神经病理性疼痛行为学被逆转。另外,研究还证实米诺环素阻断可导致脊髓 Iba-1、CD68 和 CD206 含量明显降低,说明米诺环素阻断逆转了推

拿对脊髓小胶质细胞活化相关蛋白的调控效应;研究还发现阻断组 IL-10 和 POMC 蛋白水平显著低于推拿组,证实推拿基于调控脊髓小胶质细胞活化促进 IL-10 和 β -EP 蛋白表达而发挥镇痛效应。

综上所述,推拿大鼠“委中”穴可显著缓解周围神经损伤导致的痛觉过敏、促进坐骨神经损伤修复,其机制可能与调控脊髓小胶质细胞活化,抑制其向 M1 型极化、促进其向 M2 型极化,激活小胶质细胞 IL-10/ β -EP 通路相关。本研究聚焦推拿镇痛的脊髓中枢机制,为推拿治疗 NPP 提供分子生物学和形态学证据,揭示推拿疗法“通则不痛”和“外治内应”现代科学内涵。然而本研究未对 IL-10/ β -EP 通路其他相关蛋白及基因进行研究,未来可进一步深入探索推拿调控 IL-10/ β -EP 通路的可能作用机制。

参考文献

- [1] FINNERUP NB, KUNER R, JENSEN TS. Neuropathic pain: from mechanisms to treatment [J]. *Physiol Rev*, 2021, 101(1):259-301.
- [2] COLLOCA L, LUDMAN T, BOUHASSIRA D, et al. Neuropathic pain[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3:17002. doi: 10.1038/nrdp.2017.2.
- [3] JENSEN TS, FINNERUP NB. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms [J]. *Lancet Neurol*, 2014, 13(9):924-935.
- [4] FINNERUP NB, HAROUTOUNIAN S, KAMERMAN P, et al. Neuropathic pain: an updated grading system for research and clinical practice [J]. *Pain*, 2016, 157(8):1599-1606.
- [5] BIELEWICZ J, KAMIENIAK M, SZYMONIUK M, et al. Diagnosis and management of neuropathic pain in spine diseases[J]. *J Clin Med*, 2023, 12(4):1380.
- [6] LIU ZF, WANG HR, YU TY, et al. A review on the mechanism of Tuina promoting the recovery of peripheral nerve injury[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021:6652099. doi: 10.1155/2021/6652099.
- [7] 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.
- [8] WU ZW, ZHU QG, KONG LJ, et al. Tuina alleviates neuropathic pain through regulate the activation of microglia and the secretion of inflammatory cytokine in spinal cord[J]. *J Tradit Chin Med*, 2024, 44(4):762-769.
- [9] XIE L, ZHANG N, ZHANG Q, et al. Inflammatory factors and amyloid β -induced microglial polarization promote inflammatory crosstalk with astrocytes [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(22):22538-22549.
- [10] 唐雪琪,卢金森,毛晓芳,等. 脊髓白细胞介素-10/ β -内啡肽通路抑制幼年大鼠神经病理性疼痛[J]. *中山大学学报(医学版)*, 2019, 197(3):351-357.
- [11] 吴志伟,宋朋飞,朱清广,等. 神经病理性疼痛动物模型研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(5):1083-1087.
- [12] 沈熠,莫岩君,于天源,等. “三法三穴”推拿手法对大鼠坐骨神经损伤后髓鞘厚度和神经调节蛋白 1-人类表皮生长因子受体 2 表达的影响[J]. *中国康复理论与实践*, 2020, 26(4):423-431.
- [13] ZHONG W, MA X, XING Y, et al. Blockade of peripheral nociceptive signal input relieves the formation of spinal central sensitization and retains morphine efficacy in a neuropathic pain rat model [J]. *Neurosci Lett*, 2020, 18:716. doi: 10.1016/j.neulet.2019.134643.
- [14] TSUDA M. Microglia in the spinal cord and neuropathic pain[J]. *J Diabet Invest*, 2016, 7(1):17-26.
- [15] 谈智,刘先国,武龙军,等. 小胶质细胞在脊髓背角突触可塑性和慢性疼痛中的重要作用[J]. *科学新闻*, 2020, 563(2):110.
- [16] TANG Y, LE W. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(2):1181-1194.
- [17] FRANCO R, FERNÁNDEZ-SUÁREZ D. Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system [J]. *Prog Neurobiol*, 2015, 131:65-86. doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.05.003.
- [18] HUANG Q, MAO XF, WU HY, et al. Cynandione a attenuates neuropathic pain through p38 β MAPK-mediated spinal microglial expression of β -endorphin [J]. *Brain Behav Immun*, 2017, 62:64-77. doi: 10.1016/j.bbi.2017.02.005.
- [19] WU HY, TANG XQ, MAO XF, et al. Autocrine interleukin-10 mediates glucagon-like peptide-1 receptor-induced spinal microglial β -endorphin expression [J]. *J Neurosci*, 2017, 37(48):11701-11714.
- [20] 周强,冯喜莲,李姝睿,等. 不同推拿手法对坐骨神经痛模型大鼠的镇痛作用及其镇痛机制研究[J]. *甘肃中医药大学学报*, 2020, 37(6):1-4.
- [21] 尚坤,伍颖慧,农云凤,等. 背部推拿疗法对机体不同组织免疫网络介质 β -内啡肽含量的影响[J]. *老年学杂志*, 2015, 35(23):6683-6684.

Effect of Tuina at "Weizhong (BL 40)" on Spinal Microglial Activation-related Proteins and the IL-10/ β -EP Pathway in a Rat Model of Chronic Sciatic Nerve Compression Injury

ZHANG Tianwei^{1,2}, LYU Xiangqian², XING Yani³, ZHU Liuchen², ZHU Qingguang^{1,4}, KONG Lingjun⁵, CHENG Yanbin^{1,4}, YAN Zhen¹, SUN Wuquan¹, FANG Min^{1,4,5}, WU Zhiwei^{1,4}

1. Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 200437; 2. School of Acupuncture-Moxibustion and Tuina, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine; 3. School of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine; 4. Institute of Tuina, Shanghai Academy of Traditional Chinese Medicine; 5. Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To investigate the analgesic effect of Tuina at the "Weizhong (BL 40)" on neuropathic pain in a rat model of chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve and its potential central spinal mechanisms. **Methods** Thirty-two Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups (8 rats in each group), sham-operated group, model group, Tuina group, and blockade group. The CCI model was established in the model group, Tuina group, and the blockade group by ligating the sciatic nerve with catgut, while the sham-operated group underwent only sciatic nerve exposure without ligation. From postoperative day 4 to day 14, rats in the Tuina group and the blockade group received Tuina manipulation at the "Weizhong (BL 40)" using a dynamic pressure distribution measurement system (5 N pressure, 2 Hz frequency, 10 min per session, once daily). The blockade group also received intraperitoneal injections of the microglial inhibitor minocycline (10 mg/kg) once daily. The sham-operated and the model group underwent the same handling and fixation as the Tuina group without actual Tuina. Mechanical withdrawal threshold (MWT) and paw withdrawal latency (PWL) were measured before surgery and on day 3, 7, 10, and 14 post-surgery. Transmission electron microscopy was used to evaluate sciatic nerve injury and repair, measuring axon diameter and total myelinated fiber diameter to calculate the g-ratio. Western Blotting was performed to detect the protein levels of ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba-1), CD206, CD68, interleukin-10 (IL-10), and β -endorphin (β -EP) precursor pro-opiomelanocortin (POMC) in the ipsilateral spinal dorsal horn. **Results**

Compared with the sham-operated group, the model group showed significantly reduced MWT and PWL on day 3, 7, 10, and 14 ($P < 0.01$). Compared with the model group, the Tuina group and the blockade group showed increased MWT and PWL on day 10 and 14 ($P < 0.05$). Compared with the Tuina group, the blockade group exhibited higher MWT on day 7, 10, and 14, and higher PWL on day 10 ($P < 0.05$). Sciatic nerve pathological morphology revealed intact and well-structured myelin in the sham-operated group, while the model group exhibited myelin collapse, distortion, and myelin ovoid formation. The Tuina group displayed partially irregular myelin with occasional myelin collapse, whereas the blockade group exhibited partial myelin irregularities and phospholipid shedding. Compared with the sham-operated group, the model group showed a decreased g-ratio and increased levels of Iba-1 and CD68 in the spinal dorsal horn ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, the Tuina group and the blockade group exhibited an increased g-ratio and reduced Iba-1 and CD68 levels. Additionally, the Tuina group showed elevated levels of CD206, IL-10, and POMC, whereas the blockade group had decreased CD206 levels ($P < 0.05$). **Conclusion** Tuina at "Weizhong (BL 40)" alleviates neuropathic pain in CCI rats, potentially by regulating microglial activation in the spinal cord, inhibiting M1 polarization while promoting M2 polarization, and activating the IL-10/ β -EP pathway to exert analgesic effects.

Keywords neuropathic pain; Tuina; Weizhong (BL 40); spinal cord; microglia; interleukin-10; β -endorphin

(收稿日期: 2024-12-17; 修回日期: 2025-02-03)

[编辑: 邓媛]