

文章编号: 1005-0957 (2022) 09-0923-07

· 动物实验 ·

# 电针对坐骨神经慢性压迫损伤大鼠脊髓 GRK2 及炎症因子表达的影响

吕瑛<sup>1,2,3</sup>, 吴耀持<sup>1,2</sup>, 孙懿君<sup>1,2</sup>, 张峻峰<sup>2</sup>, 郑明岳<sup>2</sup>, 康学智<sup>2</sup>

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 上海交通大学附属第六人民医院, 上海 200233; 3. 上海交通大学医学院附属同仁医院, 上海 200336)

**【摘要】** 目的 观察电针对坐骨神经慢性压迫损伤(CCI)大鼠模型脊髓 G 蛋白偶联受体激酶 2 (GRK2) 及炎症因子白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-10 (IL-10) 的影响, 探讨其缓解 CCI 疼痛的作用机制。**方法** 将 25 只大鼠随机分为对照组、模型 1 组、模型 2 组、导气电针组和电针组 5 组, 每组 5 只。造模后 3 d 对导气电针组和电针组大鼠干预, 共干预 14 次。干预 4 d 后处死模型 1 组, 末次治疗后处死其余 4 组。于造模前、治疗前、治疗 4 d、治疗 11 d 和末次治疗后测定各组大鼠机械缩足痛阈 (MWT), 采用 RT-PCR 法测定各组大鼠脊髓 GRK2 mRNA 表达, 采用 Western blot 法测定大鼠脊髓 GRK2 及 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-10 蛋白表达。**结果** 治疗 4 d 后, 与对照组比较, 模型 1 组、模型 2 组 MWT 显著下降 ( $P < 0.05$ ); 与模型 2 组比较, 导气电针组 MWT 显著上调 ( $P < 0.05$ )。治疗 11 d 后, 与模型 2 组比较, 导气电针组、电针组 MWT 显著提高 ( $P < 0.01$ )。末次治疗后, 与模型 2 组比较, 导气电针组、电针组 MWT 显著上调 ( $P < 0.01$ ); 与电针组比较, 导气电针组 MWT 显著上调 ( $P < 0.01$ )。与对照组比较, 模型 1 组和模型 2 组脊髓 GRK2 mRNA 和蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05$ ), 脊髓 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  蛋白表达显著上升 ( $P < 0.05$ ), 脊髓 IL-10 蛋白表达显著下降 ( $P < 0.05$ )。与模型 2 组比较, 导气电针组及电针组脊髓 GRK2 mRNA 和蛋白表达显著上升 ( $P < 0.05$ )。与模型 2 组比较, 导气电针组及电针组脊髓 TNF- $\alpha$  蛋白表达显著下降 ( $P < 0.01$ ); 与电针组比较, 导气电针组脊髓 TNF- $\alpha$  蛋白表达显著下降 ( $P < 0.01$ )。与模型 2 组比较, 导气电针组脊髓 IL-1 $\beta$  蛋白表达显著下降 ( $P < 0.01$ ); 与电针组比较, 导气电针组脊髓 IL-1 $\beta$  蛋白表达显著下降 ( $P < 0.05$ )。与模型 2 组比较, 导气电针组脊髓 IL-10 蛋白表达显著上升 ( $P < 0.01$ ); 与电针组比较, 导气电针组脊髓 IL-10 蛋白表达显著上调 ( $P < 0.05$ )。**结论** 电针治疗可以有效降低 CCI 大鼠的疼痛痛敏并缓解炎症持续趋势, 其机制可能与其调节脊髓 GRK2 蛋白及炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-10 水平有关。

**【关键词】** 电针; 导气针法; 坐骨神经痛; G 蛋白偶联受体 2; 大鼠**【中图分类号】** R2-03 **【文献标志码】** A

DOI: 10.13460/j.issn.1005-0957.2021.13.2015

**Impact of Electroacupuncture on GRK2 and Inflammatory Factors in the Spinal Cord of Rats with Chronic Constriction Injury of Sciatic Nerve** LÜ Ying<sup>1,2,3</sup>, WU Yaochi<sup>1,2</sup>, SUN Yijun<sup>1,2</sup>, ZHANG Junfeng<sup>2</sup>, ZHENG Mingyue<sup>2</sup>, KANG Xuezh<sup>2</sup>. 1.Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2.Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China; 3.Tongren Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200336, China

**[Abstract] Objective** To observe the impact of electroacupuncture (EA) on G protein-coupled receptor kinase2 (GRK2) and inflammatory factors interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and interleukin-10

**基金项目:** 上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划[Z Y (2018-2020)-FWTX-4020]; 上海市科学技术委员会科研计划项目(19401932900); 上海市长宁区“优质+均衡”科研人才专项子项目优质计划(CNYZ09)

**作者简介:** 吕瑛(1984—), 女, 2018 级博士生, 副主任医师, Email: ly1956@shtrhospital.com

**通信作者:** 吴耀持(1961—), 男, 主任医师, 博士生导师, Email: 18930177222@163.com

(IL-10) in the spinal cord of rats with chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve and discuss the mechanism of EA in releasing CCI-induced pain. **Method** Twenty-five rats were randomized into a control group, model group 1, model group 2, Qi-conduction EA group, and EA group, with 5 rats in each group. Rats in the Qi-conduction EA group and EA group received a total of 14 times of interventions after 3-day modeling. Rats in model group 1 were sacrificed after 4-day intervention, and rats in the other four groups were sacrificed after the last intervention. Before modeling, before treatment, and at 4-day, 11-day, and last treatments, the mechanical withdrawal threshold (MWT) was measured, the spinal cord GRK2 mRNA expression was determined using the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method. The protein expression levels of GRK2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-10 were detected using the Western blot method. **Result** After 4-day intervention, the MWT notably dropped in model groups 1 and 2 compared with the control group ( $P < 0.05$ ), and the MWT increased significantly in the Qi-conduction EA group compared with model group 2 ( $P < 0.05$ ). After 11-day treatment, the MWT went up significantly in the Qi-conduction EA and EA groups compared with model group 2 ( $P < 0.01$ ). After the last treatment, the MWT elevated markedly in the Qi-conduction EA and EA groups compared with model group 2 ( $P < 0.01$ ), and the MWT was significantly higher in the Qi-conduction EA group than in the EA group ( $P < 0.01$ ). The GRK2 mRNA and protein expression levels in the spinal cord decreased markedly, the protein expression level of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the spinal cord increased markedly, and the protein expression level of IL-10 in the spinal cord decreased markedly in model groups 1 and 2 compared with the control group ( $P < 0.05$ ). The GRK2 mRNA and protein expression levels in the spinal cord increased markedly in the Qi-conduction EA and EA groups compared with model group 2 ( $P < 0.05$ ). The protein expression level of TNF- $\alpha$  in the spinal cord declined considerably in the Qi-conduction EA and EA groups compared with model group 2 ( $P < 0.01$ ) and was significantly lower in the Qi-conduction EA group than in the EA group ( $P < 0.01$ ). The IL-1 $\beta$  protein expression level in the spinal cord decreased significantly in the Qi-conduction EA group compared with model group 2 ( $P < 0.01$ ) and was notably lower in the Qi-conduction EA group than in the EA group ( $P < 0.05$ ). Compared with model group 2, the IL-10 protein expression level in the spinal cord increased significantly in the Qi-conduction EA group ( $P < 0.01$ ) and was significantly higher in the Qi-conduction EA group than in the EA group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** EA can effectively reduce hyperalgesia in CCI rats and slow inflammatory development. The mechanism may be related to regulating the levels of GRK2 protein and inflammatory factors TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-10 in the spinal cord.

**[Key words]** Electroacupuncture; Qi-conduction needling method; Sciatica; G protein-coupled receptor kinase 2; Rats

坐骨神经痛是临床常见病、多发病,是由多种原因引起的坐骨神经炎症、水肿从而产生沿坐骨神经通路及其所分布区域疼痛的临床症状群,全球患病率1.6%~43.0%<sup>[1]</sup>。常用的药物缓解方法包括单独口服阿片类药物或非甾体抗炎药物,或两者合用,然而药物治疗可引发不可忽视的副作用<sup>[2]</sup>。此外,还可以对腰椎间盘突出患者实施椎间盘切除减压术,但在单次或多次术后,仍有超过10%的人受到慢性顽固性疼痛困扰<sup>[3]</sup>。坐骨神经痛漫长的治疗过程会加重个人及家庭的多重压力。因此,寻找毒副作用小且有效的治疗方法极为重要,不但可以提高患者的生活质量,帮助其更好地投入生产工作,还可以减轻家庭和社会的经济负担。

电针可以有效缓解坐骨神经痛,经过长期实践,已在临床中形成一套行之有效的治疗方案,结合导气手法则缓解疼痛效果更强<sup>[4]</sup>,但其作用机制尚待进一步明确。诸多与疼痛相关的递质都通过G蛋白偶联受体(G protein coupled receptors, GPCRs)发挥作用<sup>[5]</sup>。GPCRs的敏感性提高与痛觉超敏有密切关系<sup>[6]</sup>。G蛋白偶联受体激酶2(G protein coupled receptor kinase 2, GRK2)能够结合被激活的GPCRs,使GPCRs脱敏从而减少其介导的疼痛过程发生<sup>[7]</sup>。本动物实验研究采用坐骨神经慢性压迫损伤(chronic constriction injury, CCI)大鼠模型,通过检测各组大鼠不同时间点的机械缩足反射阈值(mechanic withdrawal

threshold, MWT) 及脊髓 GRK2 和炎症因子肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10) 的水平, 研究电针对 CCI 大鼠疼痛的影响及其相关作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与分组

健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 25 只, 1 月龄, 体质量 (220 $\pm$ 20) g, 购自上海市计划生育科学研究所实验动物经营部, 许可证号为 SCXK (沪) 2018-0006。大鼠饲养于上海市第六人民医院动物实验室, 室温 (22~24)  $^{\circ}$ C、相对湿度 50%~70%、12 h 循环照明, 正常供水喂食。开展动物实验研究的实验条件及操作技术符合实验动物福利、伦理规范, 伦理批件号为 DWSY2020-0102。所有大鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为对照组、模型 1 组、模型 2 组、电针组及导气电针组, 每组 5 只。

### 1.2 主要试剂及仪器

GRK2 抗体 (Abclonal 生物科技有限公司, A4443)、TNF- $\alpha$  抗体 (英国 Abcam 公司, Ab66579)、IL-10 抗体 (美国 SANTA CRUZ 生物科技, SC-365858)、IL-1 $\beta$  抗体 (Bioworld 生物科技有限公司, BS6067)、 $\beta$ -Actin (美国 ProteinTech 集团有限公司, 66009-1-Ig)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (碧云天生物工程有限公司, A0208)、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) (碧云天生物工程有限公司, A0216)、辣根过氧化物酶标记驴抗山羊 IgG (H+L) (碧云天生物工程有限公司, A0181)。Semmes-Weinstein vonFrey BW806 型机械刺痛测试包 (Stoelting 公司, 美国)、BW8061 型动物测试笼 (含支架和金属网) (Stoelting 公司, 美国)、G6805-1A 低频电子脉冲治疗仪 (上海华谊医用仪器有限公司, 中国)。

### 1.3 模型制备

除对照组外, 其余组大鼠均接受 CCI 模型制备<sup>[8]</sup>。采用 3% 的戊巴比妥钠溶液 [40 mg/(kg $\cdot$ bw)] 对大鼠行腹腔注射麻醉后取俯卧位捆绑。切开大鼠右后肢皮肤, 分离肌肉, 充分暴露右下肢坐骨神经主干, 采用 3 道结扎法<sup>[9]</sup>, 作 3 个间距 1 mm 的轻度结扎, 结扎强度以引起小腿肌肉轻度颤动为度, 注意避免损伤, 随后逐层缝合。对照组大鼠予以假手术, 仅切开右后肢皮肤, 分离肌肉, 在找到坐骨神经干后即逐层缝合。术后待大鼠苏醒即

放回笼中观察。术后连续 3 d 予腹腔注射青霉素, 每日 40 万单位/只, 防止伤口感染。

### 1.4 干预方法

造模后 3 d 导气电针组予以导气针刺法联合电针干预, 采用 0.25 mm $\times$ 40 mm 一次性无菌针灸针, 选择大鼠患侧 (右侧) L<sub>5</sub>~L<sub>6</sub> 夹脊穴 (平髂棘, L<sub>5</sub>~L<sub>6</sub> 间脊椎旁开 0.1 寸) 和环跳穴 (俯卧固定, 股骨大转子与尾骨、髂骨结合部连线上, 外 1/3 与内 2/3 的交点)<sup>[10-11]</sup> 进行治疗。进针后用拇、食指夹住针柄小幅度提插捻转, 而后中指侧压针身使针身弯曲成弓弩状, 将针体向上向前按压行导气针法 1 min。后两穴接 G6805-1A 低频电子脉冲治疗仪, 2 Hz, 连续波, 1 mA。出针前再行导气针法 1 min。行针与留针总时长为 20 min, 每日 1 次, 连续治疗 5 d 后休息 2 d, 共干预 14 次。电针组进针后不行针, 直接接电针留针 20 min, 电针参数及疗程同导气电针组。

### 1.5 样本采集

实验过程中无死亡大鼠, 样本按照每组 5 只采集分析。于干预 4 d 后处死模型 1 组, 末次干预后处死其余 4 组。取大鼠 L<sub>4</sub>~L<sub>6</sub> 段脊髓, 采用 PBS 缓冲液冲洗后, 纵切平均分为 2 份, 1 份用于抽提 RNA 开展 RT-PCR 实验, 1 份用于抽提蛋白进行 Western blot 实验, 均保存于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱。

### 1.6 观察指标

#### 1.6.1 MWT

采用 von Frey 细丝刺激大鼠后腿, 记录回缩时细丝的相应克数, 采用 up-and-down 法<sup>[12]</sup> 计算大鼠 MWT。检测时, 用 von Frey 细丝穿过网格鼠架由下向上刺激大鼠右足中间部位, 即 L<sub>5</sub> 神经根的足底支配区域, 避开感觉迟钝的足垫区域, 细丝弯曲略呈 “S” 状时维持时间 6~8 s, 使其提供相对恒定的机械力, 这个过程视为 1 次刺激。刺激过程中, 大鼠走动或一刺激就抬足被视为可疑阳性, 此次结果不算在正常结果内, 需等大鼠安静下来后再重新测量。相临两次刺激间隔时间  $\geq$  6 s 以避免前次刺激对本次痛阈测定结果产生影响。阳性结果记为 O, 阴性结果为记为 X。检测以 10.0 g 细丝为起始测量值, 大鼠若没有出现阳性反应, 则继续取相邻一级更高强度细丝进行刺激, 当在某一强度刺激过程中发生阳性反应时, 则继续取相邻低一级的强度进行刺激。以这种方式重复进行, 一直到第 1 次阳性、阴性反应交替出现时视为初始两次反应, 出现后再使用

相同强度重复测定 4 次。若检测力度大于 60 g 或小于 2 g, 该阈值则记为 60 g 或 2 g。按照阳性反应、阴性反应顺序根据机械缩足痛阈值计算公式为 50%缩足痛阈(paw withdrawal threshold, PWT) = (10Xf+kδ)/10 000 计算出阈值。以 PWT 评价大鼠 MWT。

### 1.6.2 脊髓 GRK2 mRNA 水平检测

采用 RT-PCR 检测脊髓 GRK2 mRNA 水平。取适量脊髓组织, 加入 1 mL Trizol 溶液进行匀浆, 冰上操作, 提取 RNA。按照 37 °C、60 min; 95 °C、5 min; 4 °C、60 min 的反转录程序得到 cDNA, 加入 80 μL 无酶水稀释备用, -20 °C 保存。PCR 扩增, 每个样品做 3 个重复对照, 最终结果使用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 相对定量法测定目的基因相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 各检测指标引物序列

引物名称	序列
β-Actin-F	ACACAGCCTGGATGGCTACG
β-Actin-R	GGAGAAGATTGGCACCACAC
GRK2-F	GCTTCGGTGAGGTCTATGGG
GRK2-R	AAGCATGATCCGCTCGTTCA

### 1.6.3 脊髓 GRK2 及 IL-1β、TNF-α、IL-10 蛋白表达水平

采用 Western blot 法检测脊髓 GRK2 及 IL-1β、TNF-α、IL-10 蛋白表达水平。取适量脊髓组织, 用冰 PBS 溶液洗涤 3 次。取适量 RIPA 裂解液, 在使用前数分钟内加入 PMSF 溶液, 比例为 1:100。将组织吹打混匀, 在 4 °C 冰箱放置 20 min 左右。充分裂解后, 11 000 rpm 4 °C 离心 10 min, 取上清液。进行蛋白质定量后, 首先在 80 V 恒定电压下电泳至染料接近分离胶顶端。然后 120 V 恒定电压电泳至溴酚蓝刚出胶底部。350 mA 转膜 2 h, 以进行免疫检测。封闭时, 将膜浸入到封闭

表 2 各组大鼠 MWT 比较

组别	n	造模前	治疗前	治疗4 d后	治疗11 d后	治疗后
对照组	5	106.78±16.02	100.50±18.84	104.79±33.97	92.54±27.16	103.37±31.53
模型1组	5	94.23±14.99	52.13±5.75 <sup>1)</sup>	43.49±10.84 <sup>2)</sup>	0	0
模型2组	5	98.03±18.65	55.50±6.82 <sup>1)</sup>	42.10±11.07 <sup>2)</sup>	29.43±6.70	27.84±5.52
导气电针组	5	105.01±22.29	55.39±5.71 <sup>1)</sup>	61.67±13.34 <sup>2)4)</sup>	60.40±11.01 <sup>3)</sup>	67.35±9.69 <sup>3)</sup>
电针组	5	96.89±18.15	56.89±12.79 <sup>1)</sup>	55.78±9.45 <sup>2)</sup>	54.36±11.14 <sup>3)</sup>	48.81±6.03 <sup>3)5)</sup>

注: 与对照组比较 <sup>1)</sup>P<0.01, <sup>2)</sup>P<0.05; 与模型 2 组比较 <sup>3)</sup>P<0.01, <sup>4)</sup>P<0.05; 与导气电针组比较 <sup>5)</sup>P<0.01

### 2.2 各组大鼠脊髓组织中 GRK2 mRNA 和蛋白表达水平比较

与对照组比较, 模型 1 组及模型 2 组脊髓

液中, 室温下振荡 1 h。加入稀释好的一抗抗体, GRK2 抗体、IL-1β 抗体、TNF-α 抗体、IL-10 抗体稀释比例均为 1:1 000, β-Actin 抗体稀释比例为 1:10 000, 4 °C 过夜。TBST 溶液洗膜 3 次。加入稀释好的二抗抗体, 1:1 000 稀释, 室温 1 min 振荡孵育。TBST 溶液洗膜 3 次后取出 ECL 发光试剂, 取发光试剂和过氧化物溶液按 1:1 混合成发光液。将膜放入荧光化学发光成像仪中, 滴加发光液进行曝光。

### 1.7 统计学分析

采用 SPSS23.0 软件对数据进行统计学处理。符合正态分布且方差齐的计量资料, 用均数±标准差表示。多组间比较采用 ANOVA 分析, 多时间点 MWT 采用重复测量方差分析。以 P<0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

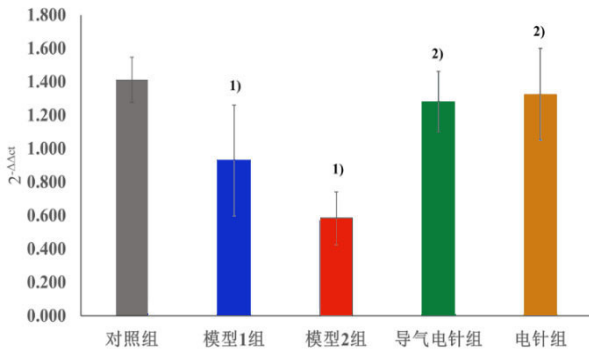
### 2.1 各组大鼠 MWT 比较

CCI 造模前, 各组间 MWT 比较差异无统计学意义 (P>0.05)。治疗前与对照组比较, 模型 1 组、模型 2 组、导气电针组及电针组 MWT 显著下降, 差异有统计学意义 (P<0.01)。治疗前和治疗 4 d 后, 模型 1 组与模型 2 组 MWT 比较差异无统计学意义 (P>0.05)。治疗 4 d 后与对照组比较, 模型 1 组、模型 2 组 MWT 显著下降, 差异有统计学意义 (P<0.05), 与模型 2 组比较, 导气电针组 MWT 显著上调, 差异有统计学意义 (P<0.05)。治疗 11 d 后, 与模型 2 组比较, 导气电针组、电针组 MWT 显著提高, 差异有统计学意义 (P<0.01)。末次治疗后, 与模型 2 组比较, 导气电针组、电针组 MWT 显著上调, 差异有统计学意义 (P<0.01), 与电针组比较, 导气电针组 MWT 显著上调, 差异有统计学意义 (P<0.01)。详见表 2。

( $\bar{x} \pm s, g$ )

GRK2 mRNA 和蛋白均显著降低, 差异有统计学意义 (P<0.05); 与模型 2 组比较, 导气电针组及电针组脊髓 GRK2 mRNA 和蛋白表达水平均显著上升, 差异有统计学

意义 ( $P < 0.05$ )。导气电针组与电针组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。详见图 1 至图 3。



注:与对照组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型2组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,  $n = 5$

图 1 各组大鼠脊髓组织中 GRK2 mRNA 水平比较

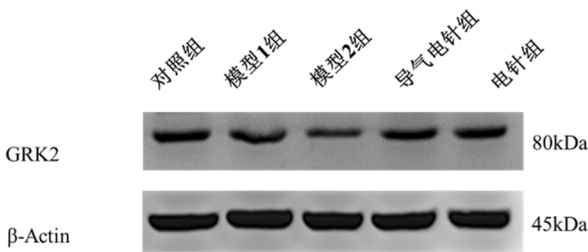
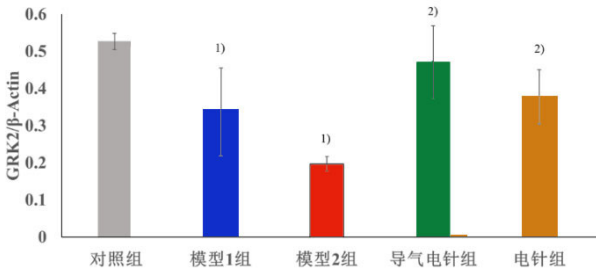


图 2 各组大鼠脊髓组织 GRK2 蛋白条带图



注:与对照组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型2组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,  $n = 5$

图 3 各组大鼠脊髓组织 GRK2 蛋白表达水平变化

### 2.3 各组大鼠脊髓组织 IL-1β、TNF-α、IL-10 蛋白表达量比较

末次治疗后与对照组比较,模型1组及模型2组脊髓 IL-1β、TNF-α蛋白表达显著上升 ( $P < 0.05$ );与模型2组比较,导气电针组及电针组脊髓 TNF-α蛋白表达显著下降 ( $P < 0.01$ );与导气电针组比较,电针组脊髓 TNF-α蛋白表达显著上升 ( $P < 0.01$ );与模型2组比较,导气电针组脊髓 IL-1β蛋白表达显著下降,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ );与导气电针组比较,电针组脊髓 IL-1β蛋白显著上升,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

与对照组比较,模型1组及模型2组脊髓 IL-10 蛋白表达显著下降,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );与模型2组比较,导气电针组脊髓 IL-10 蛋白显著上升,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ );与导气电针组比较,电针组脊髓 IL-10 蛋白表达显著降低,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。详见图 4 和图 5。

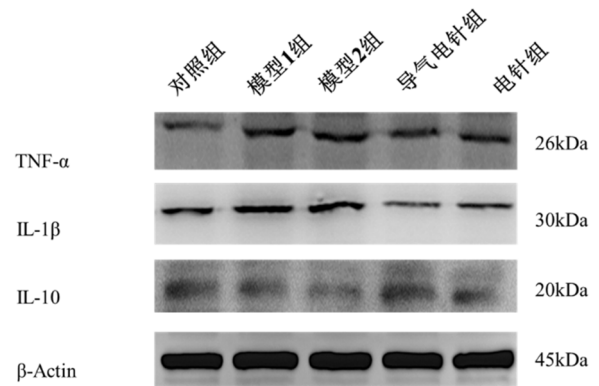
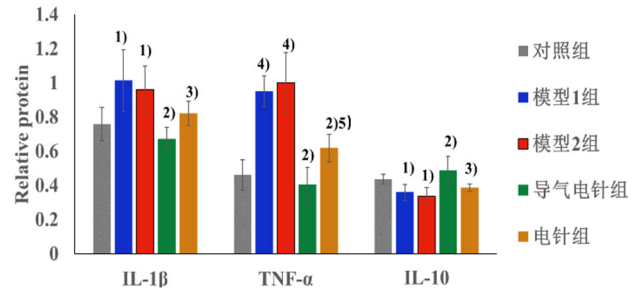


图 4 各组大鼠脊髓组织 TNF-α、IL-1β、IL-10 蛋白条带图



注:与对照组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup> $P < 0.01$ ;与模型2组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与导气电针组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>5)</sup> $P < 0.01$ ,  $n = 5$

图 5 各组大鼠脊髓 IL-1β、TNF-α、IL-10 蛋白表达量比较

### 3 讨论

有研究证实在经典 4 道结扎法制备 CCI 模型基础上改用 3 道结扎法,也可以制备出满意的 CCI 模型,与 4 道法无显著差异<sup>[13]</sup>,为了尽可能保证影响因素的单一性,本实验选择 3 道结扎法的 CCI 模型观察电针对坐骨神经痛的影响。CCI 大鼠坐骨神经长时间受压,病情类似梨状肌综合征一类神经受压致痛疾病,辨证为血瘀气滞证,治以疏经通络、活血化瘀。取大鼠患侧平髓棘 L<sub>5</sub>~L<sub>6</sub> 水平的夹脊穴和环跳穴治疗。L<sub>5</sub>~L<sub>6</sub> 夹脊穴位于腰部,用以缓解局部督脉和膀胱经气血不畅导致的疼痛症状,环跳穴可以疏风解痹、利腰脚痛,是治疗坐骨神经痛的要穴<sup>[14]</sup>。

导气针法是《内经》主要针法之一,《灵枢·五乱》中提及“徐入徐出,谓之导气”,其目的在于“同

精导气”，即分辨逆乱的清浊营卫之气，引其归位，传导气感，扩散疗效。阴阳气机调顺归位则阴阳协同作用，乱气可除病可获愈<sup>[15]</sup>。本实验采用导气手法以针向行气法为主，欲气上行则针尖向上刺，欲气下行针尖向下刺，然后适度捻转、提插以催气。导气针法以求更快更强烈地“气至病所”，以达到“气速至则病速愈”。以导气针法联合电针治疗腰椎间盘突出症能明显缓解疼痛、麻木、酸胀等临床症状，并且可以使病变部位肌张力得到显著缓解，还能改善腰突症术后患者顽固性腰痛<sup>[16-17]</sup>，对腰腿痛者徐徐导气有助于加快循经感传从而加速止痛<sup>[13]</sup>，石向东等<sup>[18]</sup>发现导气针法有效缓解了腰突症下肢疼痛，童青等<sup>[19]</sup>发现在督脉穴位上施以导气针法可以起到温阳益肾、祛风通络、散寒止痛的效果，导气针法对腰腿痛治疗效果明显优于电针治疗。本实验中，行导气针法时观察到大鼠出现强烈的舔舐、转身、尖叫等反应，电针组大鼠此类反应则明显弱化。

以往机制研究发现电针可以影响局部神经性一氧化氮合酶、环氧合酶 2、p38 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、JAK 激酶 2-信号传导及转录激活因子 3 (JAK kinase2-signal transduction and transcription active-tor 3, JAK2-STAT3) 信号通路<sup>[20-22]</sup>。上述部分炎症因子及信号通路受到上游 GRK2 调节，其机制是 GRK2 通过磷酸化胞内丝氨酸和苏氨酸残留致 G 蛋白偶联受体 (GPCR) 与其 G 蛋白失去偶联来调节一系列同源 GPCR 脱敏<sup>[23]</sup>，此过程促进 GPCR 与抑制素结合而后内化<sup>[24]</sup>，失去介导下游多条细胞因子释放通路，如 MAPK 信号通路、Jak-STAT 信号通路，从而起到保护细胞免受过度刺激的作用。通过对模型 1 组和模型 2 组变化趋势的观察，发现 CCI 大鼠造模后 3 周时间里 MWT、GRK2 mRNA 和蛋白表达水平、细胞因子 IL-10 水平均显著下降，而促炎因子 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 水平显著提高，提示炎症和痛敏状态持续，因此介入导气电针疗法是有意义的。TNF- $\alpha$ 和 IL-1 $\beta$ 是疼痛发生的机制之一<sup>[25-26]</sup>，调节因子 IL-10 也参与疼痛产生的过程，其功能与 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等拮抗，通过多种机制发挥减缓炎症、促进神经修复的作用<sup>[27]</sup>。实验结果显示，导气电针和电针治疗方法均可以显著上调大鼠脊髓组织 GRK2 蛋白表达水平；与电针法比较，导气电针法抑制炎症因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平和降低 MWT 的效果更好。电针法可以缓解 CCI 坐骨神经痛和炎症持续的趋势，其机制与电针调节脊髓组织

GRK2 蛋白表达水平并降低细胞因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平和提高 IL-10 水平有关。

PATIAL S 等<sup>[28]</sup>发现，在腹腔巨噬细胞 GRK2 减少 95% 的小鼠中，炎症细胞因子反应增强。电针可以治疗炎性疼痛，脊髓 GRK2 可能是一个关键的分子靶点<sup>[29]</sup>，靶向 GRK2 作为调节炎症性疼痛的策略可能是治疗临床疼痛的一种有前景的干预措施。导气电针组与电针组比较，GRK2 蛋白水平变化未见显著差异，而炎症因子 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 变化差异显著，提示导气针法还通过其他机制影响疼痛变化，有待进一步的研究。

### 参考文献

- [1] 王素珍, 武国印, 黄艺, 等. 中西医治疗坐骨神经痛概况[J]. 湖南中医杂志, 2014, 30(1):133-135.
- [2] ALICAN M F B, VER M R, RAMOS M R D, *et al.* Post-operative single-shot epidural fentanyl and bupivacaine for post-operative analgesia after lumbar decompression: a prospective, double-blind randomized study[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2020, 45(15):1017-1023.
- [3] ANDRADE P, HOOGLAND G, TEERNSTRA O P, *et al.* Elevated levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  and TNFR1 in recurrent herniated lumbar discs correlate with chronicity of postoperative sciatic pain[J]. *Spine J*, 2016, 16(2): 243-251.
- [4] 吕瑛, 吴耀持. 跟师陆氏针灸门诊治疗腰椎间盘突出症的学习体会[C]//中国针灸学会实验针灸分会、《上海针灸杂志》编辑部、Journal of Acupuncture and Tuina Science 编辑部. 第十八届针灸对机体功能的调节机制及针灸临床独特经验研讨会会议论文集. 2016:4.
- [5] 张蓉, 鲁显福. GPCR/TRPV1 介导神经病理性疼痛的研究进展[C]//中国中西医结合学会麻醉专业委员会 (CSIA). 中国中西医结合麻醉学会[CSIA]年会暨第二届全国中西医结合麻醉学术研讨会、江苏省中西医结合学会麻醉专业委员会成立大会论文汇编. 2015:772-776.
- [6] PAPON M A, LE FEUVRE Y, BARREDA-GÓMEZ G, *et al.* Spinal inhibition of GABAB receptors by the extracellular matrix protein fibulin-2 in neuropathic rats[J]. *Front Cell Neurosci*, 2020, 14:214.
- [7] RAMOS-RUIZ R, PENELA P, PENN R B, *et al.*

- Analysis of the human G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) gene promoter: regulation by signal transduction systems in aortic smooth muscle cells[J]. *Circulation*, 2000, 101(17):2083-2089.
- [8] BENNETT G J, XIE Y K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man[J]. *Pain*, 1988, 33(1):87-107.
- [9] 刘柏彤, 张薇, 蒋一璐, 等. 坐骨神经慢性压迫损伤动物模型的不同制备方法比较[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(2):477-481.
- [10] 郑利岩, 张小卿, 王熙, 等. 实验大鼠常用经穴检测与定位[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(10):2058-2060.
- [11] 曹学成. 大鼠坐骨神经的解剖学研究[J]. 中国实验动物学杂志, 2002, 12(4):22-23.
- [12] CHAPLAN S R, BACH F W, POGREL J W, *et al.* Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw[J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1):55-63.
- [13] 樊远志. 吴耀持运用导气针法结合隔物灸治疗痛证经验[J]. 上海中医药杂志, 2018, 52(3):25-28.
- [14] 孔昭遐, 屠佑生. 实用针灸学[M]. 合肥:安徽科学技术出版社, 1993:271.
- [15] 吕瑛, 吴耀持, 张俊峰, 等. 基于导气针法联合电针治疗腰椎间盘突出症的疗效观察[J]. 西部中医药, 2019, 32(1):105-108.
- [16] 吴耀持, 孙懿君, 张俊峰, 等. “督穴导气针法”联合电针治疗血瘀型轻中度腰椎间盘突出症临床研究[J]. 中国针灸, 2017, 37(5):467-472.
- [17] 竺永达, 张俊峰, 吴耀持. 导气针法配合电针治疗腰突术后顽固性腰痛疗效观察及红外热像变化[J]. 上海针灸杂志, 2016, 35(3):311-313.
- [18] 石向东, 朱鼎成, 卢新刚, 等. 导气针法结合朱氏一指禅推拿治疗腰椎间盘突出症疗效观察[J]. 按摩与康复医学, 2019, 10(14):20-22.
- [19] 童青, 张俊峰, 吴耀持. 督穴导气针法治疗腰椎间盘突出症临床研究[J]. 上海针灸杂志, 2018, 37(6):665-670.
- [20] 陈威, 吴耀持. 电针抑制 p38 MAPK 通路对脊髓损伤大鼠神经运动功能的影响[J]. 康复学报, 2018, 28(6):37-42.
- [21] 林元杰, 张峻峰, 康学智, 等. 电针对腰椎间盘突出症模型大鼠脊髓 JAK2-STAT3 信号通路的影响[J]. 上海针灸杂志, 2018, 37(10):1207-1211.
- [22] 张必萌, 吴耀持, 崔学军, 等. 电针对腰椎间盘突出症模型大鼠椎间盘组织环氧合酶 1 和环氧合酶 2 mRNA 表达水平的调控[J]. 中国临床康复, 2006, 10(39):51-54.
- [23] WILLEMEN H L D M, EIJKELKAMP N, WANG H, *et al.* Microglial/macrophage GRK2 determines duration of peripheral IL-1beta-induced hyperalgesia: contribution of spinal cord CX3CR1, p38 and IL-1 signaling[J]. *Pain*, 2010, 150(3):550-560.
- [24] 汪丹丹. CP-25 抑制 GRK2 转膜下调 CXCR4-Gβγ-PI3K/AKT 介导的类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞迁移[D]. 合肥:安徽医科大学, 2020.
- [25] MENDIOLA A S, CARDONA A E. The IL-1β phenomena in neuroinflammatory diseases[J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2018, 125(5):781-795.
- [26] CHANG L, YE F, LUO Q, *et al.* Increased hyperalgesia and proinflammatory cytokines in the spinal cord and dorsal root ganglion after surgery and/or fentanyl administration in rats[J]. *Anesth Analg*, 2018, 126(1):289-297.
- [27] MILLIGAN E D, LANGER S J, SLOANE E M, *et al.* Controlling pathological pain by adenovirally driven spinal production of the anti-inflammatory cytokine, interleukin-10[J]. *Eur J Neurosci*, 2005, 21(8):2136-2148.
- [28] PATIAL S, SAINI Y, PARVATANENI S, *et al.* Myeloid-specific GPCR kinase-2 negatively regulates NF-κB1p105-ERK pathway and limits endotoxemic shock in mice[J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(3):627-637.
- [29] LIU H, LIU S B, LI Q, *et al.* Downregulation of spinal g protein-coupled kinase 2 abolished the antiallodynic effect of electroacupuncture[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015:848603.