

针刺外关穴对甲醛致炎性疼痛模型大鼠痛阈 及海马 Bcl-2 表达的影响*

何玲玲, 林栋, 陈采益, 游世晶, 林道延

(福建中医药大学针灸学院, 福建 福州 350122)

摘要: **目的** 探讨针刺对甲醛致炎性疼痛大鼠痛阈及海马 Bcl-2 表达的影响。**方法** 将炎性疼痛模型大鼠随机分为模型组、外关 30min 组、非经穴 30min 组、外关 60min 组及非经穴 60min 组, 每组 6 只。模型组: 造模成功后予模拟抓取动作, 余不做任何处理, 置鼠笼 60min 后取材。外关 30min 组、非经穴 30min 组予相应的针刺干预后, 置鼠笼中 30min 后取材; 外关 60min 组、非经穴 60min 组在干预后置鼠笼中 60min 后取材。采用鼠尾测痛仪检测鼠尾潜伏期, 采用免疫组化检测海马 Bcl-2 蛋白表达水平。**结果** 外关 30min 组、外关 60min 组的鼠尾潜伏期比干预前提高, 经配对 *t* 检验, 干预后两组鼠尾潜伏期时间评分与干预前比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。各组干预后, 经单因素方差分析, 外关 30min 组、外关 60min 组与模型组比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。海马 Bcl-2 蛋白经免疫组化检测结果经 LSD(L) 分析, 结果显示外关 30min 组与模型组比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。**结论** 针刺炎性疼痛大鼠外关穴后 30min 或 60min 均可明显提高大鼠痛阈。外关 30min 组与外关 60min 组、非经穴 30min 组、非经穴 60min 组相比无显著性差异 ($P > 0.05$)。同时, 针刺外关 30min 后可上调海马区 Bcl-2 表达, 初步表明针刺干预可能通过 Bcl-2 介导的凋亡传导通路发挥抗细胞凋亡作用。

关键词: 针刺; 炎性疼痛; 痛阈; 海马; Bcl-2

中图分类号: R245

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2017)03-0019-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.03.005

针刺治疗炎性疼痛是临床常见的有效安全的非药物治疗方法, 大量临床实践和实验研究表明均表明其能有效改善各类炎性疼痛, 但对其中枢作用机制尚有待深入阐述。本实验通过针刺外关穴探讨其对炎性痛症大鼠痛阈及海马 Bcl-2 表达的影响, 为探索穴-脑相关的神经生物学机制及经穴的临床应用提供理论基础及实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选用清洁级健康雄性 SD 大鼠 30 只, 体质量 (250 ± 30)g, 由福建中医药大学动物实验中心提供(合格证号: SYXK(闽)2014-0005)。饲养温度 (24 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 40%~60%。适应性喂养 1 月后, 按随机数字表将大鼠分为模型组、外关 30min 组、非经穴 30min 组、外关 60min 组及非经穴 60min 组, 每组 6 只。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠炎性痛模型制作

实验开始前 60min, 采用大鼠钻笼法固定大鼠, 用黑布蒙住大鼠头部控制其不安状态, 助手用微量进样器于大鼠右前肢外侧肘节穴(定位参照《实验针灸学》三版教材中的大鼠的穴位图谱: 肘突与臂骨外上髁间的凹陷中, 相当于人体手少阳经天井穴)快速进针, 并循经注入相当于“清冷渊”穴区注射 5% 甲醛 50 μL 后, 观察动物疼痛行为 10min, 动物注射后出现患肢红肿、抖动、缩肢等形态学、行为学改变, 示造模成功。后采用鼠尾测痛仪测出疼痛阈值并记录。

1.2.2 穴位的选择和定位及针具的选择

外关穴取穴参照大鼠的穴位图谱: 位于腕关节上 3mm(近心端), 尺、桡骨间, 在指总伸肌与指侧伸肌之间取穴。针具选用华佗牌 1 寸针灸针 (0.25mm $\times$

* 基金项目: 福建省卫生厅科研课题(2013-2-54); 福建中医药大学校管科研课题(X2014087); 福建省教育厅课题(JA15239)

收稿日期: 2017-04-28

作者简介: 何玲玲(1985-), 女, 福建福州人, 讲师, 主治医师, 研究方向: 针灸的作用机制研究。E-mail: woshilingy@sina.cn

25mm, 苏州医疗用品厂生产), 用单手进针法直刺, 深度 2~3mm, 留针 20min, 留针期间每 5min 行平补平泻捻转手法, 捻转幅度在 90°~180°之间, 捻转频率 60~90 次/min。外关非经穴定位及针刺方法: 外关非经穴位参考影响学研究于外关穴水平, 手少阳三焦经与手太阳小肠经连线的中点。针具、手法同上。模型组: 造模成功后予模拟抓取动作, 余不做任何处理, 置鼠笼 60min 后予疼痛阈值测定, 随后麻醉取材。外关 30min 组、非经穴 30min 组在相应的干预后, 置鼠笼中 30min 后予疼痛阈值测定, 随后麻醉取材; 外关 60min 组、非经穴 60min 组在干预后置鼠笼中 60min 后予疼痛阈值测定, 麻醉取材。

1.2.3 取材及处理

各组实验干预后, 腹腔注射 20%乌拉坦 (1g/kg) 麻醉大鼠, 经大鼠主动脉插管进行心脏灌注, 先用注射 0.9%生理盐水约 200mL, 至肠系膜苍白、流出液清晰。后用 4%多聚甲醛 100mL 进行固定, 至大鼠身体僵直后断头, 取脑组织固定于 4℃的 4%多聚甲醛的广口瓶, 24h 后常规石蜡包埋, 连续矢状切片, 厚约 4μm。

海马定位: 参照《大鼠脑立体定位图谱》(2005 年 7 月人民卫生出版社 诸葛启钊主译) 的描述。本研究采用定位为: 大鼠取脑后, 按脑正中中线往左侧 3mm 处, 作矢状位切面。

1.3 指标检测

1.3.1 鼠尾潜伏期测定

大鼠鼠尾潜伏期测定: 造模后各组大鼠分别在针刺前及针刺后 (腹腔麻醉前) 用鼠尾光照测痛仪进行疼痛阈值测定。光照射可产生热辐射, 持续照射于鼠尾可产生热痛觉, 当热痛觉达到大鼠的热痛阈后, 可引发大鼠甩尾反射, 从照射开始至甩尾反应即为甩尾反应潜伏期 (TFL)。

将 ZH-LUO/B 鼠尾测痛仪 (安徽省淮北正华生物仪器设备有限公司) 连接电源, 设置温度值 (50℃) 及时钟参数, 将大鼠置于仪器面上, 调整位置, 将距尾根部 2~3cm 的位置摆放在光源中。记录光源点亮至大鼠甩尾时间数据, 即为大鼠甩尾潜伏期。每只大鼠测 2 次取平均值, 即为热痛阈值。

1.3.2 免疫组化染色检测

石蜡切片按常规操作脱蜡至水; 经枸橼酸高温修复, 滴加 3%内源性过氧化物酶, 室温孵育 10min; 滴加非特异染色阻断剂, 室温孵育 40min; 倾去后滴加

一抗, 于 4℃冰箱中孵育过夜, 37℃温箱复温 1h; 滴加生物素化二抗, 室温孵育 20min; 滴加链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶, 室温孵育 10min。以后各步骤间均用 PBS 漂洗 5min, 反复 3 次。滴加 DAB 显色液显色, 后蒸馏水漂洗、苏木素复染、酒精脱水、封片。对照实验用 PBS 替换一抗, 余步骤同上, 显微镜下观察, 拍照、分析。

1.4 统计方法分析

数据描述以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS22.0 统计软件分析处理, $P < 0.05$ 差异有统计学意义, $P > 0.05$ 差异无统计学意义, 干预前后鼠尾测痛实验采用配对 t 检验, 免疫组化实验组间对比采用单因素方差分析, 其中方差齐采用 LSD(L) 分析, 方差不齐采用 Games-Howell 分析。

2 结果

2.1 针刺对炎性疼痛大鼠鼠尾潜伏期的影响

如表 1 所示, 经方差分析, 各实验组大鼠干预前鼠尾潜伏期时间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。外关 30min 组、外关 60min 组的鼠尾潜伏期比干预前提高, 经配对 t 检验, 干预后两组鼠尾潜伏期时间评分与干预前比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。干预后, 经单因素方差分析, 外关 30min 组、外关 60min 组与模型组比较有显著性差异 ($P < 0.05$), 表明针刺外关穴可提高前肢炎性疼痛大鼠痛阈。而外关 30min 组与外关 60min 组、非经穴 30min 组、非经穴 60min 组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 干预前、后各组平均鼠尾潜伏期时间 ($\bar{x} \pm s$, min)

组别	干预前平均潜伏时间	干预后平均潜伏时间
模型组	5.08±0.42	5.05±0.34
外关 30min	5.10±0.72	5.78±0.26 [△]
非经穴 30min	5.28±0.51	5.40±0.46
外关 60min	4.80±0.57	5.62±0.34 [△]
非经穴 60min	4.85±0.55	5.45±0.45

注: 与干预前比较, $^*P < 0.05$; 与无干预组比较, $^{\Delta}P < 0.05$

2.2 针刺对炎性疼痛大鼠海马 Bcl-2 的影响

如图 1 所示, 外关 30min 组大鼠海马 Bcl-2 蛋白表达明显增多, 细胞膜内及核膜等区域可见大量褐色颗粒。经方差齐性检验后, 采用 LSD(L) 分析, 结果表明外关 30min 组与模型组比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。

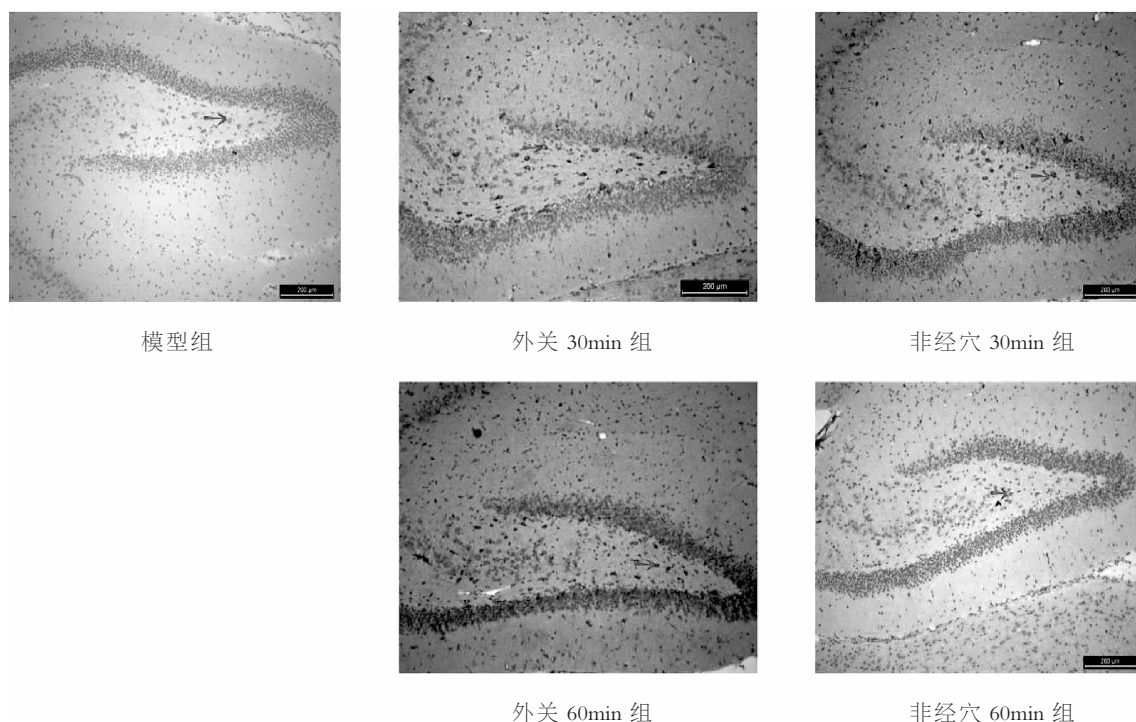


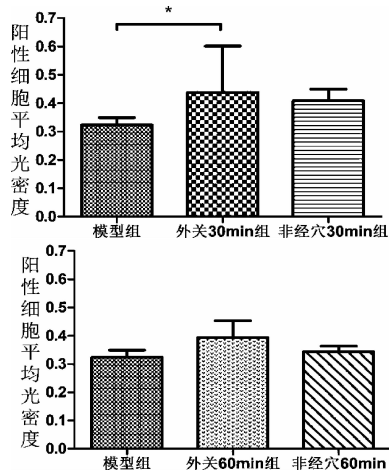
图1 各组大鼠海马 Bcl-2 蛋白表达(免疫组化染色)

余组之间比较无统计学意义($P>0.05$)。见表2、图2。

表2 干预后各组大鼠海马 Bcl-2 蛋白阳性细胞平均光密度($\bar{x} \pm s$)

组别	海马
模型组	0.32 ± 0.03
外关 30min	$0.44 \pm 0.16^*$
非经穴 30min	0.41 ± 0.04
外关 60min	0.39 ± 0.06
非经穴 60min	0.34 ± 0.02

注:与模型组比较, $^*P<0.05$



注:与模型组比较, $^*P<0.05$

图2 干预后各组大鼠海马 Bcl-2 蛋白阳性细胞平均光密度比较

3 讨论

疼痛性疾病是针灸的优势病种之一,在世界卫生组织推荐的64种针灸适应症中,与疼痛有关高达32种,如神经痛、内脏痛、关节痛、癌痛等^[1]。目前,甲醛致痛模型已广泛应用在疼痛研究领域,具有易行、可靠、经济、稳定等特点。本研究参考李氏炎症痛症造模^[2]于大鼠右前肢外侧肘关节穴进针,注射5%甲醛50 μ L造成前肢炎性痛症模型,并按临床常规取穴选用手少阳经穴外关治疗大鼠前肢痛症。造模成功后,大鼠在前5min内处于急性伤害反应期,主要因甲醛直接刺激局部伤害性感受器所致。后10~60min则为继发炎症刺激期,是外周炎症引发中枢敏化的结果^[3-4]。已有研究表明针刺镇痛是针刺与疼痛双重信号传入在中枢神经系统各级层面相互作用及整合的结果^[5-6]。本研究结果显示:针刺炎性疼痛大鼠外关穴后30min或60min均可明显提高大鼠痛阈,且与模型组比较有统计学意义。而外关30min组与外关60min组二者比较无统计学意义,表明针刺外关穴30min后可延长大鼠对痛刺激的耐受时间,其针刺镇痛效应在60min后无显著性改变,这表明针刺镇痛效应至少能维持到针刺后30min。外关30min、60min组与非经穴30min、60min组组间比较均无统计学差异,

尚不能说明经穴在炎性疼痛动物模型中的针刺镇痛效应与非经穴针刺镇痛效应存在统计学差异。

海马作为边缘系统重要结构之一,参与高级神经活动,如学习、情感、记忆等。而痛觉与心理、情绪等密切相关,且海马中富含调节伤害性敏感神经元和疼痛的神经传递素(如突触前 α_2 肾上腺素受体、IL-6 受体等)^[7-9]。因此,海马与疼痛的产生密切相关^[10-12]。已有研究表明外周伤害性刺激产生后可通过传入纤维至脊髓,经脑干网状结构中继后,上传至海马。同时,外周伤害性刺激达到皮层后下行至海马,进而影响海马内相关凋亡分子表达^[13-14]。另有研究表明甲醛致炎可引起大鼠海马中 θ 节律增高,与动物的痛行为相平行^[15]。同时,炎性疼痛发生时,海马雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路可被激活,进而调控突触可塑性,参与炎性痛进程^[16]。课题组前期研究表明针刺外关穴能特异性激活参与炎性疼痛应答的相关信号传导通路,进而参与细胞的发育和凋亡的调控^[17]。在凋亡分子机制研究中,Bcl-2 家族蛋白是细胞凋亡的关键调节分子,其中 Bcl-2 是细胞凋亡过程中的主要靶分子,它主要分布在线粒体外膜,通过调节膜通透性,具有促进细胞生存及抗凋亡作用。本研究结果显示:针刺炎性疼痛大鼠外关穴 30min 组海马区 Bcl-2 阳性表达明显增多,与模型组比较有统计学意义。说明针刺外关 30min 后可上调海马区 Bcl-2 表达,初步证明针刺干预可能通过 Bcl-2 介导的凋亡传导通路发挥抗细胞凋亡作用,进而保护细胞免于各类伤害性刺激而诱发凋亡。由于研究条件所限,本研究只观察针刺后 30min 与针刺后 60min 两个时间截点,结果显示外关穴 60min 组与模型组比较无统计学意义。初步表明针刺外关穴对海马 Bcl-2 蛋白表达的影响随时间延长呈现减弱趋势。而非经穴则未能体现出经穴所具有的针刺效应的时效性。

参考文献:

- [1] 汪德瑾,王军,刘存志. 针刺镇痛临床评价指标的选择[J]. 中华中医药杂志,2008,23(12):1053-1056.
- [2] 李熳,施静,刘晓春,等. 电针对大鼠针刺穴位、穴旁和炎性痛病灶皮下肥大细胞数量的影响[J]. 中国针灸,2003,23(10):597-601.
- [3] Chen J, Koyama N. Differential activation of spinal dorsal horn units by subcutaneous formalin injection in the cat: an electrophysiological study[J]. Exp Brain Res, 1998, 118(1):14-18.
- [4] Abbott FV, Franklin KB, Westbrook RF. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats[J]. Pain, 1995, 60(1):91-102.
- [5] 黎春元,朱丽霞,吉长福,等. 针刺对初级传入 C 纤维末梢兴奋性的影响[J]. 针刺研究,1990(4):256-263.
- [6] Hui KK, Liu J, Marina O, et al. The integrated response of the human cerebro-cerebellar and limbic systems to acupuncture stimulation at ST 36 as evidenced by fMRI[J]. Neuroimage, 2005, 27(3):479-496.
- [7] 司海超. 己酮可可碱对大鼠神经病理性疼痛及海马 TNF- α 、IL-6 的影响[D]. 福州:福建医科大学,2010.
- [8] 韩济生. 神经科学纲要[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1993. 282-285,383-398.
- [9] 王倩,张娟,周一,等. CFA 注射致炎性疼痛过程中海马内 BDNF 的表达及作用研究[J]. 现代生物医学进展,2014,14(36):7001-7006.
- [10] 胡玉燕,李清君,李文斌,等. 甲醛炎性痛诱导大鼠海马神经元凋亡[J]. 中国应用生理学杂志,2009,25(2):190-194.
- [11] 李花,曹文字,徐杨,等. 炎性疼痛致大鼠海马 CREB 结合蛋白的表达变化[J]. 中国临床解剖学杂志,2011,29(5):546-549.
- [12] 杨丽平,李清君. 炎性痛诱导海马神经元形态学变化及 PKC 的表达上调[J]. 神经科学通报,2005,21(2):129-134.
- [13] Zhang F, Kaide JI, Rodriguez-Mulero F, et al. Vasoregulatory function of the heme-heme oxygenase carbon monoxide system[J]. Am J Hypertens, 2001, 14(6Pt2):62S-67S.
- [14] 武斌. 伤害性信息传入诱导海马神经元血红素氧化酶-1 表达增加[D]. 石家庄:河北医科大学,2008.
- [15] Ceccarelli I, Scaramuzzino A, Aloisi AM. Effects of formalin pain on hippocampal c-Fos expression in male and female rats[J]. Pharmacol Biochem Behav, 1999, 64(4):797-802.
- [16] 吕丹,王准,杨艳梅,等. 海马 mTOR 信号通路在大鼠炎性痛中的作用[J]. 中华麻醉学杂志,2015,35(4):463-465.
- [17] 林栋,赖新生,张宏,等. 基于多元统计分析的针刺效应对不同脑区 CREB/p-CREB 表达时空分布特征分析[J]. 中华中医药杂志,2014,29(10):3286-3291.

(编辑:徐建平)

Effect of Needling at Waiguan(SJ5) on Pain Threshold and the Expression of Bcl-2 in Hippocampus of Rats with Inflammatory Pain Induced by Formaldehyde

HE Lingling, LIN Dong, CHEN Caiyi, YOU Shijing, LIN Daoyan

(College of Acupuncture, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

ABSTRACT: **Objective** To investigate the effect of acupuncture on Pain threshold and the expression of Bcl-2 in hippocampus of rats with inflammatory pain Induced by formaldehyde. **Methods** The rats with inflammatory pain were randomly divided into model group (group A), 30 min group needled at Waiguan (SJ5)(group B), 30 min group needled at non-acupoint (group C), 60 min group needled at Waiguan(group D) and 60 min group needled at non-acupoint(group E), 6 rats in each group. The rats with inflammatory pain for 30 min groups were retained 30 mins after intervention, and then sacrificed for sampling. And the rats with inflammatory pain for 60 min groups were retained 60 mins after intervention, and then sacrificed for sampling. The model group had no acupuncture treatment. Tail-flick latency was determined with Tail Flick Analgesia Meter. And the expression of Bcl-2 in hippocampus was detected by immunohistochemical techniques. **Results** After paired t-test, differences were significant before and after intervention in group B and group D. ($P < 0.05$). After intervention, comparisons between the five groups were tested by One-Way ANOVA analysis, both group B and group D were obviously better than model group ($P < 0.05$). then we used LSD test for the comparisons of the expression of Bcl-2 in hippocampus in these groups. It showed that group B was obviously better than group A ($P < 0.05$). **Conclusion** After needling at Waiguan (SJ5), Pain threshold of the inflammatory pain rats retained 30 min or 60 min was significantly improved. And there was no significant difference among group B、group C、group D and group E ($P > 0.05$). Meanwhile, after needling Waiguan (SJ5), the expression of Bcl-2 in the inflammatory pain rats' hippocampus retained 30 min was increased. It is primary proved that effect of acupuncture on antiapoptosis may through the role of Bcl-2 anti-apoptotic signal pathway.

KEY WORDS: acupuncture; inflammatory pain; pain threshold; hippocampus; Bcl-2

《云南中医学院学报》欢迎网上投稿

网址:<http://www.xb.ynutcm.edu.cn>