

· 基础研究 ·

小针刀对肌张力增高大鼠脊髓和背根神经节内 P 物质影响的研究

王金荣¹, 王永志¹, 董福慧², 钟红刚², 王德龙², 王萱²

(1. 中国中医科学院眼科医院骨科, 北京 100040; 2. 中国中医科学院望京医院骨伤科研究所)

【摘要】目的:探讨骨骼肌受压后初级感觉神经元兴奋性递质(substance P, SP)在背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)内的合成、脊髓中枢末端梢的释放机制, 观察小针刀针刺的影响。**方法:**采用大鼠股薄肌 70 kPa 受压模型。24 只大鼠随机均分为 3 组, 分别为空白组、压迫组、针刀组。除空白组 6 只外, 其余 18 只大鼠左侧设为压迫组, 右侧设为针刀组, 组内分 1、2、3 d 不同组, 每组 6 只。两组同时进行 70 kPa 压强压迫, 每天压迫 1 次, 每次 2 h。同时于造模后对针刀组股薄肌进行小针刀针刺。用免疫组织化学方法结合图像分析技术检测各组大鼠股薄肌受压后及针刺后背根神经节和相应脊髓节段内 P 物质的表达变化。**结果:**在 DRG 中, 空白组针刀侧阳性反应明显强于对侧, $P < 0.01$; 针刀 1、2 d 组 SP 表达整合光密度(integrated optical density, IOD)较压迫组低, $P < 0.05$ 。在脊髓中, 与压迫组比较, 针刀 1、3 d 组 SP 阳性表达 area 和 IOD 数值较高, $P < 0.01$; 2 d 组两指标则低于对侧。**结论:**小针刀针刺可明显减低骨骼肌受压后 DRG 内疼痛物质 SP 的合成, SP 在中枢末梢的释放在短期内(3 d)未见明显变化。

【关键词】 P 物质; 神经节; 脊髓; 疼痛; 小针刀

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2010.09.016

Effects of small needle knife on the substance P in the dorsal root ganglion and spinal cord of rats WANG Jin-rong, WANG Yong-zhi*, DONG Fu-hui, ZHONG Hong-gang, WANG De-long, WANG Xuan. *Department of Orthopaedics, Eye Hospital of China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100040, China

ABSTRACT Objective: To study the mechanism of synthesis of substance P (SP) in the dorsal root ganglion (DRG) and the release of it in the dorsal horn of the spinal cord of rats after compression of skeletal muscle, and to observe the influence of small needle knife. **Methods:** Sustained pressure of 70 kPa was applied to rats, muscular tissues for 2 hours. The rats were divided into three groups: normal, control and experiment group respectively. In all rats except the six normal ones, the lower legs were compressed once one day. The left leg was considered as the control group, the right left was experiment group, which were divided into the 1st day, the 2nd day and the 3rd day within the two groups. Experiment group was treated with small needle knife after the muscular tissue was compressed. After completing the stimulation, the DRG related to the muscle and part of spinal cord were removed for the qualification of SP-like immunoreactivity using immunohistochemistry. The dark brown stains on the DRG and on the REXed laminae I and II in the dorsal horn of the spinal cord were counted by Image-Pro Plus software. **Results:** SP-like immunoreactivity in the side treated by the small needle knife was enhanced comparing with the counterpart in DRG in normal group ($P < 0.01$). The integrated optical density of SP like immunoreactivity of the DRG in the experiment group were significantly reduced compared with the control group ($P < 0.05$). However, the release of SP from spinal cord in experiment group was lower than that in the control group at the 1st day and the 3rd day ($P < 0.01$), with the opposite result of the 2nd day. **Conclusion:** Based on the fact that SP is a nociceptive neurotransmitter, the present study suggests that tension relaxation by small needle knife reduces expression of SP in the DRG, and shows no effects on the release of SP from the spinal cord in short term (3 days).

KEYWORDS Substance P; Ganglia; Spinal cord; Pain; Small needle knife

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2010, 23(9): 692-695 www.zggszz.com

大量临床研究显示各种肌筋膜疼痛有着不同程度的软组织张力增高现象, 软组织张力增高在慢性劳损性疾病所产生的疼痛中已经成为主要的病因之

一^[1]。但在临床检查中, 此类疼痛患者的神经并没有明显地受到损害, 完整的神经纤维在患病局部对压力及张力更敏感^[2]。在中枢神经元胞体发生的一系列生物学变化^[3]与此类疾病密切相关。神经元的功能活动主要表现在电位的改变和各种神经递质的变化, 尤其是各种神经肽的变化。近年来, 随着对经络

实质研究的不断深入,越来越多的资料证明初级感觉神经元兴奋性递质 P 物质(substance P, SP)在经神经信息传递中具有重要作用。为此,本实验以适当压强压迫大鼠股薄肌的方法建立软组织张力增高模型,通过免疫组化并结合专业图像分析等方法定量研究了在背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)及脊髓后角感觉传入系统具有重要作用的 P 物质的变化。

1 材料与与方法

1.1 材料与试剂 大鼠股薄肌软组织夹由中国中医科学院骨伤科研究所生物力学实验室提供。免疫组织化学试剂盒由武汉博士德生物有限公司提供。

1.2 实验动物模型的制备与分组方法 采用 Linder-Ganz 等^[4]的方法,使用标准为 70 kPa 的组织夹对大鼠股薄肌实施压迫,每日 1 次,每次 2 h。实验动物选用由中国中医科学院针灸研究所动物中心提供的成年 SD 大鼠 24 只,雌雄各半,体重(200±10) g。实验前喂养 3 d 以适应环境,其间给予标准动物饮食。所有的动物饲养、处理均遵守中国中医科学院实验动物指导方针。18 只大鼠进行双侧股薄肌 70 kPa 压迫,其中左侧股薄肌为压迫组,右侧于压迫后设为针刀组,分别于第 1、2、3 天行针刀术。为了观察压迫与时间及针刀术的影响,两组分别于第 1、2、3 天进行观察,以上每组各 6 只。6 只大鼠设为空白组作为对照,未进行压迫,右侧行小针刀针刺。

1.3 观测指标与方法

1.3.1 组织制备 动物存活到相应时间(6 h 内)后,戊巴比妥钠深麻下打开胸腔,经左心室向升主动脉插管快速灌注生理盐水 100~150 ml 冲洗血液,然后快速灌注 4%多聚甲醛磷酸缓冲液 150 ml,缓慢滴注 150 ml 持续 20 min。取双侧 L₂、L₃、L₄ 节段 DRG 以及相应脊髓节段,置入上述相同固定液后固定 3 h,浸入 30%蔗糖 4 °C 至标本沉底。连续恒冷冰冻切片(脊髓片厚 20 μm, DRG 片厚 15 μm),每隔 5 张切片取 1 张,裱贴在预先经 0.5%铬钒明胶处理的载玻片上,自然干燥后置-20 °C 冰箱内备用。

1.3.2 免疫组织化学方法检测大鼠脊髓和背根神经节内 P 物质表达量 步骤如下:切片以 0.01 mol/L PBS 振荡漂洗 10 min×2 次,入 3% H₂O₂ 室温孵育 5~10 min,以消除内源性过氧化物酶的活性。蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5 min。5%~10%正常山羊血清(PBS 稀释)封闭,室温孵育 10 min。倾去血清,未洗,滴加多克隆兔抗 SP(1:500, 武汉博士德)一抗工作液,4 °C 过夜。PBS 冲洗,5 min×3 次。滴加适当比例稀释的生物素标记二抗(1%BSA-PBS 稀释),37 °C 孵育 10~30 min。PBS 冲洗,5 min×3 次。滴加适当比例稀释的

辣根酶标记链霉卵白素(PBS 稀释),37 °C 孵育 10~30 min。PBS 冲洗,5 min×3 次。DAB 显色剂显色。切片自然晾干,梯度乙醇脱水,二甲苯透明后,中性树脂封片。阴性对照用 0.01 mol/L PBS 代替一抗,采用上述同样操作,结果为阴性。

1.3.3 图像分析 每个标本随机取 5 张 DRG 和脊髓免疫组化染色切片,用尼康显微镜(Nikon, E600; DXM1200 CCD)观察并照相,操作时所有照片在完全同样的显微镜条件下拍摄,在更换样品时,除了调整焦距和视野外,显微镜上的其他部件未有移动。每批次所有样品一次拍摄完成。以 Image-Pro Plus 6.0(Media Cybernetics)专业图像分析软件对脊髓后角、DRG 切片内 SP 的表达量进行测量。选取整合光密度(integrated optical density, IOD)值、阳性总面积进行半定量分析^[5-6], IOD 值越大表明染色越强,总面积越大表明染色阳性神经元越多。

1.4 统计学处理 数据以均数±标准差表示,采用 SPSS 12.0 软件包,采用一般线性模型重复测量设计单变量方差分析对组间数据差异进行比较。

2 结果

2.1 SP 在 DRG 内的表达 低倍镜下,整个 DRG 呈梨形,其外膜的结缔组织伸入节内,把节内细胞分成多群;在高倍光镜下,节内细胞多数呈圆形,体积较大。镜下 SP 免疫阳性反应面积较大,染色浅,以周边为主。空白组针刀侧阳性反应明显强于对侧;针刀 1、2 d 组 SP 表达 IOD 值较压迫组低(见图 1),表明针刀术可明显降低压迫后痛物质 SP 的表达量;3 d 组则无差异,可能与压迫时间或压强相关(表 1)。

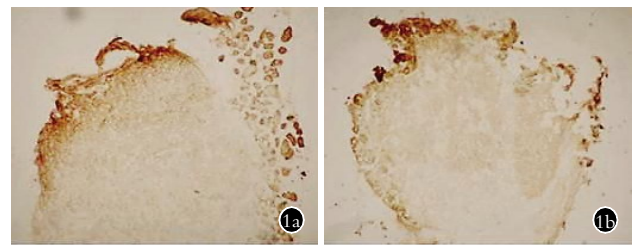


图 1 SP 在大鼠 DRG 内表达及聚集部位(2 d),两组均有阳性反应,深色颗粒是 SP 在 DRG 内的聚集部位 1a. 压迫组 DRG 周围染色明显加深 1b. 针刀组 DRG 染色情况(免疫组化, ×400)

Fig. 1 There were SP-like immunoreactivity in both groups 1a. The IOD in experimental group was darker than that of control group 1b. Immunoreactivity in control group (immunohistochemistry, ×400)

2.2 SP 在脊髓的表达 镜下可见 SP 免疫阳性反应密集分布于脊髓背角 I 层和 II 层,尤以 II 层腹侧部为甚,脊髓背角其他层未见此特异染色。空白组,阳性产物量少,其中针刀侧染色略强,面积稍小,两者比较无意义。与压迫组比较,针刀 1、3 d 组 SP 阳性表达 area 和 IOD 数值较高, $P < 0.01$; 2 d 组两指标

表 1 各组大鼠股薄肌 DRG 内 SP 表达 area 和 IOD 比较
Tab.1 Comparison of SP levels of the DRG with area and IOD

分组	鼠数 (只)	1 d		2 d		3 d	
		area	IOD	area	IOD	area	IOD
压迫组	6	2 026.38±355.24	712.18±222.04	2 211.78±172.78	781.18±212.31	2 066.5±248.91	764.58±164.64
针刀组	6	1 983.97±400.76	392.53±65.68	2 089.75±230.75	381.28±93.44	1 980.95±468.82	547.53±143.26

注:与压迫组比较, $F=826.24, P<0.05$; 两组组内前后比较, 针刀组 IOD 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 其多重比较中, 3 d 组 SP 染色稍强
Note: Compared with control group, $F=826.24, P<0.05$; There were significant differences between the two groups ($P<0.05$). At the 3rd day, immunoreactivity was darker others

表 2 各组大鼠股薄肌脊髓后角内 SP 表达 area 和 IOD 比较
Tab.2 Comparison of SP levels of the spine with area and IOD

分组	鼠数 (只)	1 d		2 d		3 d	
		area	IOD	area	IOD	area	IOD
压迫组	6	293.95±59.05	27.53±5.01	441.63±28.26	55.37±4.31	1 543.82±112.52	127.79±17.11
针刀组	6	85.38±21.11**	6.18±2.47**	725.80±99.87**	99.81±16.94**	491.28±30.15**	46.98±6.14**

注:与压迫组比较, $F=159.23, P<0.01$ 。两组组内前后比较, 差异均有统计学意义, ** $P<0.001$
Note: Compared with control group, $F=159.23, P<0.01$. There were significant differences within both of groups, ** $P<0.001$

则低于对侧 (图 2-4)。压迫组和针刀组组内前后 ANOVA 比较, area 和 IOD 差异均有统计学意义 (表 2), 表明每次压迫及针刺前后 P 物质在脊髓中枢的表达差异比较大, 在本次短期急性实验中未见明显规律性变化。

3 讨论

3.1 软组织张力与神经纤维的关系 在临床上, 当身体处于静态姿势时, 不同的组织在支持层和骨性突起之间受到挤压而变形。骨骼肌长时间慢性集中受牵拉、挤压, 肌组织的超微结构同时发生病理上的改变。长时间的受压导致骨骼肌的生理性质变化的同时, 其间的神经、血管也受到不同程度的影响, 皮下组织同时也受损、坏死, 甚至皮肤也可以受累坏死, 而神经的受损程度及各种神经递质的变化与临床各种疼痛的发生有着密切的联系。

完整的神经纤维在患病局部对压力及张力敏感, 但对患处轴索进行研究时并未发现其明显受损。电生理研究发现, 这些临床症状多与神经周围的结缔组织直接相关, 而不是神经纤维本身的形态学改变^[6]。临床各种软组织疾病中, 诸如神经卡压症、肌筋膜痛、纤维肌痛、纤维织炎、腱鞘炎, 神经受压周围局部软组织张力多呈明显增高现象^[7], 由此我们推测是神经周围软组织张力增高压迫感觉神经末梢导致慢性疼痛。经筋病候之筋急者, 多表现为十二经筋的痹证。临床观察到某一部位的经筋痹痛与该处的软组织张力存在着密切关系^[8]。

3.2 P 物质与传统医学 P 物质是广泛分布于神经纤维内的一种神经肽。当神经受刺激后, P 物质可在中枢端和外周末端梢释放, 与 NK1 受体结合发挥生理作用。SP 在背根节内合成后随 C 或 A δ 纤维转

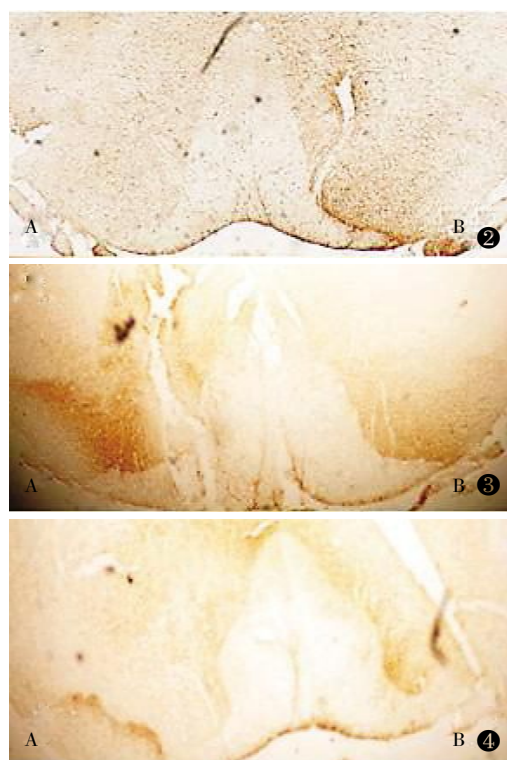


图 2,3,4 SP 在大鼠脊髓后角的定位及表达, 分别为第 1、2、3 天情况, 其中图 A 为压迫侧 (压迫组), 图 B 为针刀侧 (针刀组), 两组均有阳性反应, 深色颗粒是 SP 在脊髓中枢的聚集部位, 主要位于后角 I、II 板层 (免疫组化, $\times 200$)

Figure.2,3,4 Qualification of SP-like immunoreactivity at the dorsal horn of the spinal cord using immunohistochemistry ($\times 200$). Note: There were SP-like immunoreactivity within both of groups. It expressed in the dark areas, most on the REXed laminae I and II (1,2,3: different times. A: control group. B: experimental group)

运至脊髓背角释放, 激活神经激肽 1 受体参与疼痛信息的传递^[9]。各种刺激致外周末端梢释放 P 物质, 引起该神经支配区血管扩张, 通透性增加, 血浆蛋白

外渗等神经源性炎症反应^[10]。在中枢末端梢释放的 P 物质与痛觉传递有关。P 物质能直接或间接通过促进谷氨酸等的释放参与痛觉传递,其镇痛作用是通过促进脑啡肽的释放引起。近年来,随着对经络实质研究的不断深入,越来越多的资料证明 P 物质在经脉信息传递中具有重要作用^[11]。

史文春等^[12]和赵委等^[13]发现外周传入神经末梢之间存在的跨节段的信息传递可能是循经感传的基础,循经针刺时,可激发同经络线上的 P 物质或组胺的释放,抑制酪氨酸神经肽,这种激发和抑制作用具有明显的循经特征,认为 P 物质和组胺可能是经脉线上传递信息的重要化学物质。一些肉眼可见的经络现象本质可能就是 P 物质参与的神经源性炎症反应,推断出 P 物质在经脉信息的传递中可能具有的重要作用。在治疗方法的选择上,《灵枢·经筋》在论述十二“痹”的治疗时,反复提出“治在燔针劫刺,以知为数,以痛为腧”。“以痛为腧”就是指治疗经筋病应以疼痛之处作为针刺的腧穴。

本实验通过 Ganz 的肌张力增高造模方法,模拟肌硬度增高后神经纤维受影响情况,以免疫组织化学方法对 P 物质在 DRG、脊髓的表达情况进行深入的研究;同时,对针刀术治疗肌张力增高后疼痛减轻的机制进行探讨。在实验中,我们发现对软组织进行单独压迫(压迫组)或针刺(空白组)均可导致大鼠 DRG 内的 SP 合成增多,但对压迫后的股薄肌再进行针刺(针刀组)时,1、2 d 组的 SP 的合成明显下降,说明此时的针刺可能抑制了 DRG 内痛物质的合成机制,或是使过多的 SP 从周围末梢释放出来,在这一点上,本次实验结果与以往类似研究相一致^[14]。而在脊髓背角内 SP 的表达则同 DRG 的合成情况不相符,没有明显规律可循。在大鼠完全弗氏佐剂炎症反应研究中,Galeazza 等^[15]用放射免疫法测定了位于脊髓内的 SP 含量的变化,发现致炎后 6 h SP 量已下降了 47%,之后的 4 d 内呈线性减少,直到第 8 天完全消失。对于 DRG 内编码 SP 的 mRNA Northern Blot 分析发现,与正常组相比,mRNA 的表达在 2 d 之内显著上调,而 8 d 之后其量仍高于正常组,说明 DRG 内 SP 的合成量的增高变化先于脊髓 SP 传递量的变化,且不同步。在这一点上,本实验结果与其保持了一致性。究其原因,很可能与受损后局部神经纤维的结构破坏有关,而其他方面的不同可能与本实验急性压迫时间的长短有关系,或是与神经递质传导机制密切相关^[16],各种对症疗法或针刀术的应用在一定程度上促进了 SP 在周围末梢的释放,从而达到减轻疼痛的目的。对肌组织中周围神经末梢形态及痛物质的研究则由于 SP 主要分布于动脉区域

而使得应用免疫组织化学方法略显粗糙^[17]。这种情况下,如果以本实验结合神经纤维束路追踪或分子生物学等其他方法进一步深入研究则值得期待。这样,对于我国传统经络学说,在方法学上能为其经筋的研究提供支持,拓宽经络学说的研究模式和应用领域。

参考文献

- [1] 董福慧. 皮神经卡压综合征的病因病机[J]. 中国骨伤, 2003, 16(2): 117-119.
- [2] Benoliel R, Eliav E, Tal M. Strain-dependent modification of neuropathic pain behaviour in the rat hindpaw by a priming painful trigeminal nerve injury[J]. Pain, 2002, 97(3): 203-212.
- [3] De Stefano R, Selvi E, Villanova M, et al. Image analysis quantification of substance P immunoreactivity in the trapezius muscle of patients with fibromyalgia and myofascial pain syndrome[J]. J Rheumatol, 2000, 27(12): 2906-2910.
- [4] Linder-Ganz E, Gefen A. Mechanical compression-induced pressure sores in rat hindlimb: muscle stiffness, histology, and computational models[J]. J Appl Physiol, 2004, 96(6): 2034-2049.
- [5] 杨建茹. 平均光密度在医学图像分析中的定量[J]. 中国医学影像技术, 1999, 15(4): 322-323.
- [6] 吕宏升, 朱庆生, 王军, 等. 全自动显微镜及图像分析系统处理免疫组化图像[J]. 中国体视学与图像分析, 2004, 9(1): 37-40.
- [7] 王兆星, 董福慧. 正常人的软组织张力测定[J]. 中国骨伤, 2004, 17(1): 13-15.
- [8] 董福慧. 皮神经卡压综合征的临床表现[J]. 中国骨伤, 2003, 16(3): 183-186.
- [9] Yaksh TL. Spinal systems and pain processing; development of novel analgesic drugs with mechanistically defined models[J]. Trends Pharmacol Sci, 1999, 20(8): 329-337.
- [10] Basbaum AI. Spinal mechanisms of acute and persistent pain[J]. Reg Anesth Pain Med, 1999, 24(1): 59-67.
- [11] 牛汉璋, 江赛男. 经络实质探秘[J]. 西安医科大学学报, 1997, 18(3): 409.
- [12] 史文春, 赵委, 张保真. P 物质和组胺在经络信息传递中的作用[J]. 中国针灸, 1995, 15(4): 33.
- [13] 赵委, 史文春, 王会生, 等. 大鼠感觉神经末梢之间的跨节段信息传递[J]. 西安医科大学学报, 1996, 17(2): 140.
- [14] Rokugo T, Takeuchi T, Ito H. A histochemical study of substance P in the rat spinal cord; effect of transcutaneous electrical nerve stimulation[J]. J Nippon Med Sch, 2002, 69(5): 428-433.
- [15] Galeazza MT, Garry MG, Yost HJ, et al. Plasticity in the synthesis and storage of substance P and calcitonin gene-related peptide in primary afferent neurons during peripheral inflammation[J]. Neuroscience, 1995, 66(2): 443-458.
- [16] Calzà L, Pozza M, Zanni M, et al. Peptide plasticity in primary sensory neurons and spinal cord during adjuvant-induced arthritis in the rat: an immunocytochemical and in situ hybridization study[J]. Neuroscience, 1998, 82(2): 575-589.
- [17] Reinert A, Mense S. Inflammatory influence on the density of GCRP-immunoreactive and SP-immunoreactive nerve endings in rat skeletal muscle[J]. Neuropeptides, 1993, 24: 204-205.

(收稿日期: 2010-05-25 本文编辑: 连智华)