

## · 基础研究 ·

# 针刀松解法对膝骨关节炎大鼠中枢不同部位亮氨酸-脑啡肽的影响

郭长青, 嵇波, 陈幼楠, 钟鼎文, 金燕, 刘清国, 郭孟玮, 张义, 刘乃刚, 陈占禄  
(北京中医药大学针灸推拿学院, 北京 100029)

**【摘要】目的:**通过观察针刀松解法干预后膝骨关节炎(KOA)大鼠中枢不同部位亮氨酸-脑啡肽(L-ENK)的变化并与电针干预相比较,探讨针刀松解法在脊髓及脊髓以上水平的镇痛机制。**方法:**将 60 只健康 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、电针组和针刀组。将 4%木瓜蛋白酶溶液与 0.3 mol/L 半胱氨酸溶液按 1:1 混合静置 0.5 h 后分别于造模第 1、4、7 天注射于后 3 组大鼠左膝关节腔,每次 20  $\mu$ l。造模第 36 天开始,相应给予针刀松解治疗或电针治疗,治疗 3 周后取大鼠腰膨大处脊髓及脑组织,分别测定脊髓、延髓、中脑、丘脑、海马的 L-ENK 含量。**结果:**造模后,模型组大鼠 L-ENK 含量在脊髓、中脑、海马较空白组差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),延髓和丘脑 L-ENK 含量与空白组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。针刀和电针干预后,针刀组海马中 L-ENK 含量较模型组升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );针刀组中脑 L-ENK 含量较模型组降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );海马中 L-ENK 含量针刀组较电针组高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );其余部位差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论:**针刀松解法对 KOA 大鼠中枢各水平的 L-ENK 有一定调节作用,其镇痛作用的发挥可能与其对中枢 L-ENK 的调节有关。

**【关键词】** 骨关节炎,膝; 电针; 脑啡肽,亮氨酸; 动物实验

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2011.08.010

**Affection of acupotomy lysis on Leu-Enkephalin (L-ENK) content in different parts of centrum of rats with knee osteoarthritis** GUO Chang-qing, JI Bo, CHEN You-nan, ZHONG Ding-wen, JIN Yan, LIU Qing-guo, GUO Meng-wei, ZHANG Yi, LIU Nai-gang, CHEN Zhan-lu. College of Acupuncture and Moxibustion, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

**ABSTRACT Objective:** To study the analgesia mechanism of needle-knife lysis in spinal cord and other parts of central nervous system by comparing the changes of Leu-Enkephalin (L-ENK) content in different parts of centrum of rats undergone needle-knife lysis and electro-acupuncture respectively. **Methods:** Sixty healthy SD rats were randomly divided into normal control group, model group, needle-knife lysis (NKL) group and electro-acupuncture (EA) group. 4% papain solution mixed with 0.3 mol/L cysteine solution in the ratio of 1:1, paused for 0.5 h, injected the mixture, 20  $\mu$ l each time, into the left knee joint cavities of rats in model, NKL, EA groups at the 1st, 4th, 7th day. After 4 weeks in NKL group and EA group were treated with needle-knife lysis and electro-acupuncture, respectively. Three weeks after treatment, samples of spinal cord of the swollen part of rat waists and rat brains were taken from and the content of L-ENK of medulla oblongata, midbrain, pituitary gland, and hippocampus were measured. **Results:** L-ENK content of model group increased higher than that of normal control group in spinal cord, hippocampus and midbrain ( $P < 0.01$ ); there were no significant difference between normal control group and model group on L-ENK in medulla oblongata and thalamus ( $P > 0.05$ ). After intervening of NKL or EA, L-ENK content of NKL group increased higher in hippocampus than that of model group and EC group ( $P < 0.05$ ); but L-ENK content of NKL group in midbrain was lower than that of model group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Needle-knife lysis has characteristic of regulation for the L-ENK content in different parts of central nervous system of rats with knee osteoarthritis, and analgesic effect of needle-knife was possibly related with regulation of center L-ENK.

**KEYWORDS** Osteoarthritis, knee; Electroacupuncture; Enkephalin, leucine; Animal experimentation

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2011, 24(8):656-658 www.zggszz.com

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(编号: 2006CB504508)

Foud programs: The National Basic Research Program of China (973 Program)(No.2006CB504508)

通讯作者: 郭长青 Tel: 010-64286687 E-mail: guochangqing66@163.com

近年来针刀松解法被广泛运用于膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)的治疗,并在缓解疼痛方面收到了较好的疗效。内源性阿片肽(endogenous opioid peptides, EOP)是哺乳动物脑内合成的具有阿片样活性的肽类物质,是一类重要的内源性镇痛物

质,广泛分布于脑和脊髓,具有镇痛、调节内分泌、应激反应、精神活动等作用。脑啡肽(enkephalin, ENK)是最早被发现的 EOP,包括甲硫氨酸-脑啡肽(met-enkephalin, M-ENK)和亮氨酸-脑啡肽(leu-enkephalin, L-ENK),两者结构相似。ENK 在外周及中枢的镇痛作用已被许多实验所证实,且可被电针刺刺激增强<sup>[1]</sup>。以往的动物实验表明针刀松解法在提高实验动物耐痛阈及促进镇痛物质释放方面具有与电针相似的效果<sup>[2]</sup>。本实验以木瓜蛋白酶诱导的 KOA 大鼠为模型,系统观察针刀松解法干预后中枢不同部位 L-ENK 的变化并与电针干预相比较,旨在进一步研究针刀松解法在脊髓及脊髓以上水平的镇痛作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 动物及分组** 清洁级 3 月龄健康 SD 大鼠共 60 只,雌雄各半,体重 200~230 g,由北京维通利华实验动物中心提供(合格证号:SCXK 京 2008-0002)。将实验动物按随机数字表分为空白组和模型组,空白组 15 只,模型组 45 只。

**1.2 仪器与试剂** 针刀(I 型 4 号,0.60 mm×40 mm,北京华夏针刀医疗器械厂);毫针(0.25 mm×25 mm,苏州针灸用品有限公司);穴位神经刺激仪(韩氏 HANS LH202H,北京华卫产业开发公司);20%乌拉坦(天津药业焦作有限公司生产,批号:06051121);低温离心机(5810R,德国 Eppendorf 公司);超低温冰箱(MDF-U50A,日本 SANYO 公司);电子天平(AE-160,瑞士 METTLER 公司);L-ENK 放免试剂盒(北京华英生物技术研究所提供)。

**1.3 模型制备** 模型组 45 只大鼠均按改良的 Murrat 等<sup>[3]</sup>法制备膝骨关节炎模型。具体方法为 4%木瓜蛋白酶溶液与 0.3 mol/L 半胱氨酸溶液 1:1 混置 0.5 h,同时大鼠用 20%乌拉坦按 0.4 ml/kg 腹腔麻醉后仰卧位固定于操作台,用剃须刀片剃除大鼠左膝及其周围绒毛,湿纱布擦洗洗净后用碘伏消毒。术者左手使大鼠左膝微屈,右手持 1 ml 注射器由髌骨内侧下方斜向上刺入关节腔,注入混合液 20 μl。造模第 1、4、7 天分别配制新鲜混合液并进行注射。第 7 天注射后圈养大鼠 4 周。造模过程中,若出现足底溃烂、感染、上呼吸道感染、骨折等,均予以排除。造模过程中,因足底肿胀、颅内高压、意外死亡的原因排除模型大鼠 3 只。造模过程中用于判断模型成功与否 9 只。将其余造模成功 33 只大鼠,按随机数字表分为模型组 11 只,针刀组 11 只,电针组 11 只。

**1.4 干预措施** 空白组同期正常饲养。模型组造模成功后正常饲养,无治疗。电针组造模第 36 天开始治疗,采用比较解剖学的方法,选取内外膝眼穴,用

毫针进行针刺,与膝关节纵轴呈 45°向上斜刺 2~3 mm,连接刺激仪,采用频率 2 Hz/100 Hz,电流强度 2 mA 进行电针治疗,每次 10 min,隔日治疗 1 次,每周 3 次,共治疗 3 周。针刀组造模第 36 天开始治疗,对患膝进行触诊,于关节周围特别是髌骨周围找到条索状物并用甲紫定点,每次选 1~2 个点,常规备皮、消毒,针刀到达病变点后,行纵向疏通及横向剥离,出针后以消毒棉签按压针眼片刻,胶布贴封针眼。在手法放松膝关节周围软组织基础上予以关节拔伸和被动屈伸活动,每周 1 次,共 3 次。

## 1.5 观测指标与方法

**1.5.1 大体情况观察** 从造模开始观察大鼠的饮食、活动、关节肿胀度及毛色变化。

**1.5.2 中枢 L-ENK 含量检测** 采用放免测定法测定大鼠脊髓、延髓、中脑、丘脑、海马的 L-ENK 含量。造模后第 57 天进行实验取材,断头法处死动物,迅速从枕骨大孔处开颅取出大鼠脑组织,分离出延髓、中脑、丘脑、海马,剪开脊椎椎弓,取出腰膨大处脊髓。各部位脑组织及脊髓于冰皿上编号,样品称重后置于-70℃保存待测。检测时严格按放免试剂盒操作说明进行,依次加样后混合均匀,4℃孵育 24 h,然后加入分离剂,混匀后于 4℃静置 30 min,3 600 r/min 离心 20 min,去上清,测定沉淀的 cpm 值。以 N/T、B/T 计算 NSB 及 S<sub>0</sub> 结合百分率,以 B/B<sub>0</sub> 计算标准及待测样品结合百分率,在半对数坐标纸上绘制标准曲线,计算结果。

**1.6 统计方法** 应用 SPSS 11.5 统计软件包进行统计学处理,各组数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,空白组与模型组之间比较采用成组资料 *t* 检验,模型组与电针组、针刀组之间比较采用单因素方差分析。

## 2 结果

**2.1 大体情况观察** 造模后 1~3 d,模型组、针刀组、电针组大鼠关节局部肿胀,大鼠活动量减少,个别大鼠跛行明显,出现健侧承重现象,实验后期肿胀逐渐消失,肉眼观察与健侧区别不明显。整个实验过程中动物饮食基本正常,毛色未见明显改变。

**2.2 大鼠中枢不同部位 L-ENK 含量变化** 造模后,模型组大鼠 L-ENK 含量在脊髓、中脑、海马较空白组高,在延髓和丘脑与空白组含量差异无统计学意义。见表 1。

针刀和电针干预后,针刀组海马中 L-ENK 含量较模型组升高,中脑 L-ENK 含量较模型组降低。海马中 L-ENK 含量针刀组较电针组高,其余部位差异均无统计学意义,见表 2。

## 3 讨论

针刀治疗 KOA 有较好疗效,有学者<sup>[4]</sup>认为本法

表 1 模型组与空白组大鼠中枢不同部位的 L-ENK 含量变化( $\bar{x}\pm s$ , pg/mg)

Tab.1 Changes of L-ENK contents in different CNS parts between model group and normal group rats ( $\bar{x}\pm s$ , pg/mg)

组别	鼠数(只)	脊髓	延髓	中脑	丘脑	海马
空白组	15	3.18±0.47	3.69±0.70	3.64±0.53	1.69±0.51	3.94±0.72
模型组	11	4.58±1.03	3.99±0.72	4.71±1.04	2.12±0.60	4.77±0.64
t 值	-	-4.21	-1.08	-3.12	-1.96	-3.05
P 值	-	0.001 0	0.292 8	0.007 7	0.062 2	0.005 5

表 2 电针组、针刀组与模型组大鼠中枢不同部位的 L-ENK 含量变化( $\bar{x}\pm s$ , pg/mg)

Tab.2 Change of L-ENK contents in different CNS parts among modle, EA and NKL groups( $\bar{x}\pm s$ , pg/mg)

组别	鼠数(只)	脊髓	延髓	中脑	丘脑	海马
模型组	11	4.58±1.03	3.99±0.72	4.71±1.04	2.12±0.60	4.77±0.64
电针组	11	4.96±0.89	4.02±0.66	4.10±0.67	1.98±0.66	4.79±0.59
针刀组	11	4.76±1.06	4.46±0.74	3.76±0.54	2.10±0.37	5.53±0.98
F 值	-	0.40	1.56	4.20	0.21	3.65
P 值	-	0.671 8	0.227 6	0.024 6	0.810 2	0.038 1

改变了局部组织结构,有利于解除引起疼痛的刺激源,特别是机械性刺激如组织粘连、挛缩等,这种改变可减轻炎症对末梢神经的刺激,起到减轻疼痛的作用。

EOP 作为一类重要的内源性镇痛物质,其镇痛作用一直备受关注。其中对 ENK 的研究较为清楚的是其分布在脑内各级水平及脊髓内并不均匀,其中下丘脑、中脑导水管周围灰质、脊髓背角浅层分布较多。ENK 神经元大部分是短轴突的中间神经元,能形成局部环路,也有些较长的 ENK 能投射通路,如从中缝核到脊髓背角的通路。

在脊髓水平 EOP 可通过作用于初级传入终末的受体使兴奋性神经递质的释放减少,从而抑制兴奋性突触传递。在本实验中,模型组较空白组含量升高,而针刀组和电针组较模型组未出现显著改变。脑干的网状结构汇集了不同来源和不同性质的各种感觉及运动信息,在镇痛过程中起到了承上启下的作用。本实验结果显示,在延髓,模型组与空白组以及模型组与针刀组、电针组的差异性并不明显,这可能与延髓中缝核群主要为 5-HT 神经元汇集处有关。中脑导水管周围灰质是由不同类型细胞组成的核团,不但接受来自皮层、下丘脑、网状核、蓝斑的传入,也接受来自脊髓的信息传入,多数高级中枢的镇痛效应都可能经过中脑导水管周围灰质的介导。本实验中在中脑,模型组 L-ENK 含量较正常组升高,针刀组较模型组含量降低,而在丘脑各组均未出现显著差异,针刀组中脑 L-ENK 含量的可能与镇痛物质的下行释放有关。海马是脑啡肽及其受体表达丰富的脑区之一<sup>[5]</sup>。本实验中,模型组含量较正常组显著升高,针刀组较模型组和电针组含量高,提示针刀松解法可促进海马 L-ENK 的生成,增强端脑水平的

镇痛作用。

本实验的结果显示针刀松解法可调节 KOA 大鼠 L-ENK 在脊髓及脊髓以上水平的释放,显示针刀松解法镇痛作用的发挥可能与其对中枢 L-ENK 的调节有关。

参考文献

[1] 王一菱,吴景兰,金辉.电针对疼痛患者血浆及小鼠脊髓甲硫氨酸脑啡肽、强啡肽及痛阈的影响[J].河南医科大学学报,2001,36(4):245-246.  
Wang YL,Wu JL,Jin H. Effects of electroacupuncture on met-enkephalin,dynorphin in patient plasma and mouse spinal cord and analgesia[J]. He Nan Yi Ke Da Xue Xue Bai,2001,36(4):245-246. Chinese.

[2] 孙红梅,胡波,李晓泓,等.针刀松解法对第 3 腰椎横突综合征模型大鼠耐痛阈及脊髓与下丘脑 ENK、β-EP 的影响[J].北京中医药大学学报,2008,31(3):176-179.  
Sun HM,Hu B,Li XH,et al. Effect of acupotomy dissolution on pain threshold and ENK and β-EP in spinal cord and hypothalamus in rats with transverse syndrome of the third lumbar vertebrae[J]. Bei Jing Zhong Yi Yao Da Xue Xue Bao,2008,31(3):176-179. Chinese.

[3] Murat N,Karadam B,Ozkal S,et al. Quantification of papain-induced rat osteoarthritis in relation to time with the Mankin score[J]. Acta Orthop Traumatol Turc,2007,41(3):233-237.

[4] 刘公望,胡明海,王秀云,等.论针刺止痛的四种机制[J].针刺研究,1998,23(4):313.  
Liu GW,Hu MH,Wang XY,et al. Four kinds of mechanism of acupuncture analgesia[J]. Zhen Ci Yan Jiu,1998,23(4):313. Chinese.

[5] 彭书峻,李玉娟,万朝权,等.慢性炎性疼痛对新生大鼠学习记忆功能发育及海马前脑啡肽 mRNA 表达的影响[J].中华麻醉学杂志,2005,25(8):601-603.  
Peng SJ,Li YJ,Wan CQ,et al. Effects of chronic inflammatory pain on development of learning and memory and proenkephalin mRNA expression in hippocampus of neonatal rats[J]. Zhonghua Ma Zui Xue Za Zhi,2005,25(8):601-603. Chinese.

(收稿日期:2010-09-03 本文编辑:连智华)