

## · 基础研究 ·

## 大鼠椎骨错缝模型下丘脑及背根神经节 P 物质含量的实验研究

陈博<sup>1</sup>, 林勋<sup>1</sup>, 庞坚<sup>1</sup>, 孔令军<sup>2</sup>, 詹红生<sup>1</sup>, 程英武<sup>2</sup>, 石印玉<sup>1</sup>

(1. 上海中医药大学附属曙光医院石氏伤科医学中心, 上海市中医药研究院骨伤科研究所, 上海 201203; 2. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院推拿研究所, 上海 201203)

**【摘要】** 目的: 检测腰椎椎骨错缝对大鼠下丘脑及背根神经节中 P 物质含量的影响。方法: 选取 120 只体质量为 350~450 g 的 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为旋转固定组(RF 组)、单纯固定组(SF 组)和假手术组(Sham 组)。RF 组和 SF 组大鼠腰椎 L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub> 节段植入的椎体外部连接固定装置, RF 组大鼠使 L<sub>5</sub> 棘突向右侧旋转, 造成 L<sub>5</sub> 棘突与 L<sub>4</sub> 和 L<sub>6</sub> 棘突的不共线; SF 组大鼠单纯植入椎体外部连接固定装置不进行旋转。Sham 组大鼠不植入椎体外部连接固定装置, 只切开缝合。分别于手术后 1、4、8 和 12 周结束时, 检测各组大鼠下丘脑及背根神经节中 P 物质含量。结果: 手术 1、4、8 周后, RF 组和 SF 组大鼠下丘脑中 P 物质含量均低于 Sham 组大鼠 ( $P < 0.05$ ); 手术 1、4、8、12 周后, RF 组和 SF 组大鼠背根神经节中 P 物质含量均高于 Sham 组大鼠 ( $P < 0.05$ ); 固定 12 周后, RF 组和 SF 组大鼠下丘脑中 P 物质与 Sham 组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结论: 椎骨错缝可抑制下丘脑中 P 物质的镇痛作用, 促进背根神经节中 P 物质的合成和传递, 从而引起或加剧疼痛。

**【关键词】** 骨错缝; 下丘脑; 背根神经节; P 物质

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2015.01.019

**Experimental research on substance P content of hypothalamus and dorsal root ganglia in rats with lumbar vertebrae gucuofeng model** CHEN Bo, LIN Xun, PANG Jian, KONG Ling-jun, ZHAN Hong-sheng, CHENG Ying-wu, and SHI Yin-yu. Shi's Center of Orthopaedics and Traumatology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Institute of Orthopaedics and Traumatology, Shanghai Academy of TCM, Shanghai 201203, China

**ABSTRACT Objective:** To detect the effects of lumbar vertebrae *Gucuofeng* on the substance P content of hypothalamus and dorsal root ganglia in rat models. **Methods:** A hundred and twenty SPF level SD male rats with the weight of 350 to 450 g were randomly divided into rotary fixation group (RF group), simple fixation group (SF group) and sham-operation group (Sham group). The external link fixation system was implanted into the L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub> of rats in RF group and SF group; and in RF group, that the L<sub>5</sub> spinous process was rotated to the right resulted in L<sub>4</sub>, L<sub>5</sub>, L<sub>6</sub> spinous process not collinear; in SF group, the external link fixation system was simply implanted and not rotated. The rats of Sham group were not implanted the external link fixation system and only open and suture. The substance P content of hypothalamus and dorsal root ganglia were detected at 1, 4, 8, 12 weeks after operation. **Results:** Substance P content of hypothalamus in RF group and SF group was lower than Sham group at 1, 4, 8 weeks after operation ( $P < 0.05$ ). Substance P content of dorsal root ganglia was higher than Sham group at 1, 4, 8, 12 weeks after operation ( $P < 0.05$ ). There was no significant differences in the substance P content of hypothalamus among three groups at 12 weeks after operation ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** Lumbar vertebrae *Gucuofeng* can inhibit the analgesic activity of substance P in hypothalamus and promote the synthesis and transmission of substance P in dorsal root ganglia, so as to cause or aggravate the pain.

**KEYWORDS** *Gucuofeng*; Hypothalamus; Dorsal root ganglia; Substance P

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2015, 28(1): 75-77 www.zggszz.com

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(编号: 81202707); 高等学校博士学科点专项科研基金(新教师类)(编号: 20123107120006); 上海高校青年教师培养资助计划(编号: ZZszy13024); 海派中医流派传承研究基地(编号: ZYSNXD-CC-HPGC-JD-001); 上海市中医药事业发展 3 年行动计划项目(编号: ZYSNXD-CC-ZDYJ047)

Fund program: National Natural Science Foundation of China (Young Scholars Program) (No. 81202707)

通讯作者: 詹红生 E-mail: shgsyjs@139.com

Corresponding author: ZHAN Hong-sheng E-mail: shgsyjs@139.com

腰背部疼痛是脊柱慢性病损的主要临床症状, 其产生的中枢和外周机制一直是国内外疼痛研究的热点问题<sup>[1]</sup>。石氏伤科结合多年的临床实践发现, 腰背痛的出现与椎骨关节出现“骨错缝、筋出槽”密切相关<sup>[2]</sup>, 通过中医整复手法纠正后, 患者腰背部及下肢的放射性疼痛往往能得到一定程度的缓解。但“骨错缝、筋出槽”引起腰背痛的确切病理生理学机制鲜有报道。本实验以腰椎椎骨错缝模型大鼠为主要研

究对象,观察椎骨错缝后下丘脑与背根神经节中 P 物质(substance P, SP)含量的变化,研究“骨错缝、筋出槽”致痛的生理病理学机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 120 只,体重 350~450 g,上海中医药大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(沪)2008-0016。大鼠饲养室温度为 22~26 ℃,每只单笼饲养,自由进水,常规饲料。

#### 1.2 主要设备及试剂

椎体外部连接固定装置(上海浦卫医疗器械厂);JA10002 电子天平(上海精天电子仪器有限公司);FJ 200-S 数显高速分散均质机(上海标本模型厂);ELX800 酶标仪(美国 Thermo 公司);大鼠 SP 酶联免疫分析试剂盒(美国 R&D 公司);戊巴比妥钠(国药集团化学试剂有限公司);硫酸庆大霉素注射液(上海中西制药有限公司);复方对乙酰氨基酚片(商品名:散利痛,拜耳医药保健)。

#### 1.3 椎骨错缝模型分组及造模方法

将 120 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为旋转固定组(RF 组)、单纯固定组(SF 组)和假手术组(Sham 组),每组各 40 只。RF 组和 SF 组大鼠在其腰椎 L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub> 节段置入椎体外部连接固定装置,RF 组大鼠在连接钢板和棘突钢板之间放置金属垫片,以使 L<sub>5</sub> 棘突向右侧旋转,造成 L<sub>5</sub> 棘突与 L<sub>4</sub> 和 L<sub>6</sub> 棘突的不共线,以最大程度模拟“骨错缝、筋出槽”的生理病理学特征;SF 组大鼠腰椎 L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub> 节段置入的椎体外部连接固定装置不进行旋转,只进行单纯的椎体固定<sup>[3]</sup>。Sham 组大鼠不置入椎体外部连接固定装置,只切开缝合。术后 3 d 肌注庆大霉素控制感染,大鼠水瓶中加入复方对乙酰氨基酚片(散利痛)缓解手术疼痛。

各组大鼠分别在固定 1、4、8、12 周后进行麻醉取材,每次每组取 10 只。在每个时间节点分别快速

取下大鼠下丘脑和背根神经节放入液氮中保存。

#### 1.4 观察项目与方法

电子天平称取大鼠下丘脑及背根神经节组织 100 mg,加入 1 ml RIPA 和 10 μl PMSF。将 1.5 ml 离心管放入盛冰的锥形瓶中匀浆,避免起泡沫和发热。然后 4 ℃高速 13 000 r/min 离心 30 min,将上清转移到干净无菌离心管中。蛋白定量,用酶联免疫法测定大鼠下丘脑及背根神经节中 SP 含量,严格按照试剂盒说明书操作。

#### 1.5 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,计量数据采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较用方差分析,各组间的两两比较用 *q* 检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

### 2 结果

#### 2.1 各组大鼠下丘脑中的 SP 含量

单纯固定和旋转固定 1、4、8 周后,其下丘脑中 SP 含量均低于 Sham 组(*P*<0.05);手术 12 周后,各组大鼠下丘脑中 SP 含量比较差异无统计学意义(*P*>0.05)。见表 1。

#### 2.2 各组大鼠背根神经节中的 SP 含量

单纯固定和旋转固定 1、4、8、12 周后,其背根神经节中 SP 含量均高于切 Sham 组(*P*<0.05)。见表 1。

### 3 讨论

#### 3.1 “骨错缝、筋出槽”是脊柱病发病的关键病理环节之一

石氏伤科结合多年的临床实践发现中医整复手法治疗以颈椎病和腰背痛为代表的脊柱病的关键机制在于纠正脊椎的“骨错缝、筋出槽”问题<sup>[4]</sup>。在各种诱发因素的作用下,患者的脊椎关节出现“骨错缝、筋出槽”之后,骨离原位,筋离常道,构成脊椎关节的骨性结构相对解剖位置发生微细的位移改变,脊柱关节处于在某个位置被完全或部分限制活动的锁定状态<sup>[5]</sup>,伴随而来筋伤、血溢、气损,进一步导致了气

表 1 手术后不同时期各组大鼠下丘脑及背根神经节 SP 含量比较( $\bar{x} \pm s$ , ng/L)

Tab.1 Comparison of substance P content in hypothalamus and dorsal root ganglia among three groups in difference times ( $\bar{x} \pm s$ , ng/L)

组别	鼠数	下丘脑				背根神经节			
		术后 1 周	术后 4 周	术后 8 周	术后 12 周	术后 1 周	术后 4 周	术后 8 周	术后 12 周
SF 组	10	85.65±8.78 <sup>a1</sup>	90.83±9.25 <sup>a3</sup>	86.25±15.50 <sup>a5</sup>	106.06±14.12	122.78±12.73 <sup>b1</sup>	119.55±16.26 <sup>b3</sup>	119.78±12.75 <sup>b5</sup>	113.83±12.90 <sup>b7</sup>
RF 组	10	87.94±7.33 <sup>a2</sup>	91.49±8.81 <sup>a4</sup>	86.81±9.10 <sup>a6</sup>	105.32±10.16	120.91±10.54 <sup>b2</sup>	119.47±13.87 <sup>b4</sup>	119.82±15.73 <sup>b6</sup>	111.58±16.55 <sup>b8</sup>
Sham 组	10	113.36±8.97	112.27±14.16	105.62±13.99	102.51±15.63	97.90±10.04	95.08±12.35	85.12±25.06	85.27±12.62

注:与 Sham 组相比,<sup>a1</sup>*q*=6.17,<sup>a2</sup>*q*=5.67,<sup>a3</sup>*q*=3.64,<sup>a4</sup>*q*=3.53,<sup>a5</sup>*q*=2.68,<sup>a6</sup>*q*=3.00,<sup>b1</sup>*q*=4.17,<sup>b2</sup>*q*=3.85,<sup>b3</sup>*q*=3.21,<sup>b4</sup>*q*=3.20,<sup>b5</sup>*q*=3.49,<sup>b6</sup>*q*=3.49,<sup>b7</sup>*q*=3.78,<sup>b8</sup>*q*=3.48,*P*<0.05

Note: Compared with Sham group, <sup>a1</sup>*q*=6.17, <sup>a2</sup>*q*=5.67, <sup>a3</sup>*q*=3.64, <sup>a4</sup>*q*=3.53, <sup>a5</sup>*q*=2.68, <sup>a6</sup>*q*=3.00, <sup>b1</sup>*q*=4.17, <sup>b2</sup>*q*=3.85, <sup>b3</sup>*q*=3.21, <sup>b4</sup>*q*=3.20, <sup>b5</sup>*q*=3.49, <sup>b6</sup>*q*=3.49, <sup>b7</sup>*q*=3.78, <sup>b8</sup>*q*=3.48, *P*<0.05

血不通,加剧了筋骨失和,从而引起了一系列的肿胀、疼痛、关节活动受限等临床症状。临床研究表明<sup>[6-7]</sup>：“骨错缝、筋出槽”与脊柱病发病密切相关,在给予手法治疗干预后,使骨回原位,筋复常道,解除某个被完全或部分限制活动部位的锁定状态,从而使患者的临床症状得到改善。

### 3.2 “骨错缝、筋出槽”引发腰背痛的生理病理学机制

虽然临床上已证明“骨错缝、筋出槽”与颈椎病及腰背痛等脊柱病的发病密切相关,并运用矫正“骨错缝、筋出槽”技术治疗脊柱病也取得了良好的临床疗效<sup>[8]</sup>,但“骨错缝、筋出槽”引起腰背痛的病理生理学机制仍缺乏系统深入的研究,这也制约了手法治疗脊柱病的临床效果的提升。因此本研究建立大鼠“骨错缝、筋出槽”病理模型,检测其下丘脑及背根神经节中 SP 的含量,以进一步研究“骨错缝、筋出槽”致痛的生理病理学机制。

SP 是最早发现的一种神经肽,共有 11 个氨基酸组成,在中枢和周围神经系统内广泛存在。在痛觉的调制方面,SP 是第 1 级伤害性传入纤维末梢释放的兴奋性神经递质,对疼痛信息进行传递;但在中枢神经系统的较高级部位,它又具有明显的镇痛作用<sup>[9]</sup>。当外周受到伤害性刺激时,SP 能激活神经突触间动作电位的爆发,向大脑内传递疼痛信号,且 SP 自身可诱发炎症反应,在局部引起组织水肿,从而导致组胺等物质释放并引起局部氢离子浓度升高,升高的氢离子浓度可激活存在于伤害感受器表面的辣椒根素受体(VR1),使感受器细胞膜去极化而产生动作电位,形成疼痛信号向神经中枢传递,使机体感觉到疼痛<sup>[10]</sup>。而在中枢神经系统的较高级部位,又具有明显的镇痛作用。SP 除了参与痛觉信号的调制,有研究也证明在腰背慢性疼痛和术后瘢痕增生粘连时,局部组织、脊髓后角的 SP 表达增加。

本实验发现,模型大鼠(RF 组和 SF 组)下丘脑中 SP 的含量在椎骨错缝 1、4、8 周后低于 Sham 组大鼠,一方面说明 SP 在下丘脑中主要起镇痛作用;另一方面也说明椎骨错缝可抑制中枢 SP 的镇痛作用,从而引起或加剧疼痛。而经过 1、4、8、12 周的腰椎椎骨错缝后,大鼠背根神经节部位 SP 表达均高于 Sham 组,则在一定程度上说明腰椎的椎骨错缝可刺激外周神经 SP 的合成释放增加,促进周围伤害性刺激向中枢的传递,诱发疼痛的产生。这进一步验证了“椎骨错缝”引起脊柱病的可能病理机制为:“椎骨错缝”可抑制下丘脑中 SP 的镇痛作用,促进背根神经节中 SP 的合成和传递,引起或加剧疼痛。

另外需要注意的是,第 12 周时,各组大鼠下丘

脑中 SP 含量比较差异无统计学意义,但模型组大鼠的含量表达与术前相比呈上升趋势,是否说明中枢 SP 的镇痛作用会随时间而减弱?或伤害性刺激会随时间而增强从而削弱中枢 SP 的镇痛作用?这些问题需在未来的工作中进行更深一步的研究。

### 参考文献

- [1] Kidd BL, Urban LA. Mechanisms of inflammatory pain[J]. Br J Anaesth, 2001, 87(1): 3-11.
- [2] 元唯安, 张明才, 詹红生. 对“骨错缝、筋出槽”的认识及临床诊断[J]. 中国骨伤, 2013, 26(6): 502-504.  
Yuan WA, Zhang MC, Zhan HS. Understanding and diagnosis of "Gucuo feng and Jinchucao" [J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2013, 26(6): 502-504. Chinese with abstract in English.
- [3] 陈博, 詹红生, 石印玉, 等. “骨错缝、筋出槽”病机学说及其动物模型的建立[J]. 上海中医药大学学报, 2010, 24(5): 68-71.  
Chen B, Zhan HS, Shi YY, et al. Pathogenesis theory of "Gucuo feng and Jinchucao" and the establishment of animal model [J]. Shang Hai Zhong Yi Yao Da Xue Xue Bao, 2010, 24(5): 68-71. Chinese.
- [4] 张明才, 詹红生, 石印玉, 等. 基于“骨错缝、筋出槽”诊治椎间盘病症[J]. 中国骨伤, 2008, 21(6): 441-443.  
Zhang MC, Zhan HS, Shi YY, et al. Diagnosis and treatment of intervertebral disc disease based on the theory of "Gucuo feng and Jinchucao" [J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2008, 21(6): 441-443. Chinese with abstract in English.
- [5] Gillet H. The anatomy and physiology of spinal fixations [J]. Journal of National Chiropractic Association, 1963, 33(12): 63-66.
- [6] 张明才, 石印玉, 黄仕荣, 等. “骨错缝、筋出槽”与颈椎病发病关系的临床研究[J]. 中国骨伤, 2013, 26(7): 557-560.  
Zhang MC, Shi YY, Huang SR, et al. Study on the correlation between "Gucuo feng and Jinchucao" and cervical spondylosis [J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2013, 26(7): 557-560. Chinese with abstract in English.
- [7] 张明才, 石印玉, 陈东煜, 等. 矫正关节突关节“骨错缝”手法治疗神经根型颈椎病的有效性研究[J]. 上海中医药杂志, 2011, 45(12): 42-45.  
Zhang MC, Shi YY, Chen DY, et al. Effectiveness study on correction procedure for zygapophyseal joint in treating spondylotic radiculopathy [J]. Shang Hai Zhong Yi Yao Za Zhi, 2011, 45(12): 42-45. Chinese.
- [8] 孙青, 乔琼, 张晓燕, 等. 仰卧拔伸手法配合颈椎保健操治疗神经根型颈椎病疗效观察[J]. 上海中医药杂志, 2012, 46(11): 59-60.  
Sun Q, Qiao Q, Zhang XY, et al. Clinical observation of supine pilling manipulation and cervical rehabilitation exercise in treating cervical radiculopathy [J]. Shang Hai Zhong Yi Yao Za Zhi, 2012, 46(11): 59-60. Chinese.
- [9] Li YS, Wang JX, Jia MM, et al. Dragon's blood inhibits chronic inflammatory and neuropathic pain responses by blocking the synthesis and release of substance P in rats [J]. J Pharmacol Sci, 2012, 118(1): 43-54.
- [10] Tominaga M. Activation and regulation of nociceptive transient receptor potential (TRP) channels, TRPV1 and TRPA1 [J]. Yakugaku Zasshi, 2010, 130(3): 289-294.

(收稿日期: 2014-05-04 本文编辑: 李宜)