

· 基础研究 ·

手法加载对慢性下腰痛模型大鼠降钙素基因相关肽和神经生长因子的影响

吕智桢^{1,2}, 朱清广^{1,2}, 孔令军^{1,2}, 程艳彬^{1,2}, 郭光昕³, 张帅攀^{1,2}, 周鑫^{1,2}, 房敏^{1,2,3}

(1.上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, 上海 200437; 2.上海市中医药研究院推拿研究所, 上海 200437; 3.上海中医药大学针灸推拿学院, 上海 201203)

【摘要】 目的:观察手法加载对慢性下腰痛(chronic low back pain, CLBP)模型大鼠的镇痛效应以及腰大肌组织相关炎症因子表达的影响,探索手法对局部炎症微环境状态的改善情况。方法:选取体质量为 340~360 g 的 SPF 级雄性 SD 大鼠 32 只,随机分为空白组、假手术组、慢性下腰痛模型组、治疗组,每组 8 只。模型组大鼠腰椎 L₄-L₆ 植入外部链接固定系统(external link fixation system, ELFS),假手术组不植入 ELFS,仅行切开缝合,空白组不作任何处理,治疗组植入 ELFS 后,在脊柱两侧用力量为 5 N,频率为 2 Hz 的刺激量进行手法干预,15 min/次,1 次/d,连续干预 14 d,分别在造模前、干预后第 1、3、7、10、14 天检测四组大鼠机械刺激反应阈值(paw with drawl threshold, PWT),热刺激反应阈值(paw withdrawal latency, PWL),治疗周期结束后,酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测腰大肌组织中降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)和神经生长因子(nerve growth factor, NGF)的浓度值。结果:空白组与假手术组的 PWT、PWL 在造模后均无显著差异($P>0.05$);模型成模后,CLBP 模型组和治疗组 PWT、PWL 明显降低($P<0.01$);手法加载后第 1、3 天,治疗组的 PWT 较 CLBP 模型组改善不明显($P>0.05$);手法加载后第 7 天,治疗组与 CLBP 模型大鼠相比,痛阈值呈现出升高的趋势,但二者相比无统计学意义($P=0.056>0.05$),至治疗第 10、14 天,治疗组大鼠的机械痛阈值开始上升,且与 CLBP 模型大鼠相比有统计学意义,分别为($P<0.05$, $P<0.01$);手法治疗第 1、3 天,治疗组的 PWL 较 CLBP 模型组改善同样不明显($P>0.05$);待第 7 天比较,治疗组与 CLBP 模型组的 PWL 有统计学意义($P=0.016<0.05$),手法加载对 CLBP 大鼠热痛觉过敏现象有了改善直到实验结束。CLBP 模型组腰大肌中 CGRP 和 NGF 含量均高于空白组和假手术组($P<0.01$),治疗后两者的含量均有明显下降($P<0.01$)。结论:局部按揉手法加载对 CLBP 大鼠有镇痛作用,同时可以抑制 CLBP 大鼠腰大肌组织 CGRP、NGF 的含量,改善局部炎症微环境状态。

【关键词】 手法; 慢性下腰痛; 降钙素基因相关肽; 神经生长因子; 炎症微环境

中图分类号:R274.9 R244.1

DOI:10.12200/j.issn.1003-0034.2021.03.018

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

**Effects of manual loading on calcitonin gene-related peptide and nerve growth factor in rats with chronic low back pain**

LYU Zhi-zhen, ZHU Qing-guang, KONG Ling-jun, CHENG Yan-bin, GUO Guang-xin, ZHOU Xin, ZHANG Shuai-pan, and FANG Min*. *Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China

ABSTRACT Objective: To observe the analgesic effect of manipulation loading on chronic low back pain (CLBP) model rats and the expression of inflammatory factors in psoas major muscle tissue, and to explore the improvement of manipulation on local inflammatory microenvironment. **Methods:** Thirty two SPF male SD rats weighing 340-360g were randomly divided into blank group, sham operation group, chronic low back pain model group and treatment group, with 8 rats in each group. In the model group, L₄-L₆ lumbar vertebrae were implanted with external link fixation system (ELFS). After implantation of ELFS, the treatment group received manual intervention with 5N force and 2Hz frequency on both sides of the spine, 15 min/time, once a day, for 14 consecutive days. Paw with drawl threshold (PWT) and paw withdrawal latency (PWL) was measured before modeling and on the 1st, 3rd, 7th, 10th and 14th day after intervention. At the end of the treatment cycle, the concentrations of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and nerve growth factor (NGF) in psoas muscle were detected by enzyme-linked im-

基金项目: 中华中医药学会青年托举人才项目(编号:QNRC2-A01); 上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划(编号:ZY(2018-2020)-CCCX-2004-02); 上海市卫生计生系统优秀青年医学人才(编号:2018YQ004)

Fund program: Chinese Traditional Medicine Association Young Talent Project (No. QNRC2-A01)

通讯作者: 房敏 E-mail: fm-tn0510@shutcm.edu.cn

Corresponding author: FANG Min E-mail: fm-tn0510@shutcm.edu.cn

munosorbent assay (ELISA). **Results:** There was no significant difference in PWT and PWL between the blank group and the sham operation group after modeling ($P>0.05$); after modeling, PWT and PWL in the CLBP model group and the treatment group were significantly decreased ($P<0.01$); PWT in the treatment group was not significantly improved than that in the CLBP model group on the 1st and 3rd day after manual loading ($P>0.05$); on the 7th day after manual loading, the pain threshold value in the treatment group was higher than that in the CLBP model group, but there was no significant difference. There was no significant difference between the two groups ($P=0.056>0.05$). On the 10th and 14th day of treatment, the mechanical pain threshold of the treatment group began to rise, and it was statistically significant compared with CLBP model rats ($P<0.05$, $P<0.01$); on the 1st and 3rd day after manual treatment, the PWL of the treatment group was not significantly improved compared with CLBP model group ($P>0.05$); on the 7th day, the PWL of the treatment group was significantly higher than that of CLBP model group, there was statistical significance ($P=0.016<0.05$). Manual loading improved thermal hyperalgesia in CLBP rats until the end of the experiment. The contents of CGRP and NGF in psoas major muscle of CLBP model group were higher than those of blank group and sham operation group ($P<0.01$). After treatment, the contents of CGRP and NGF decreased significantly ($P<0.01$). **Conclusion:** Local massage loading has analgesic effect on CLBP rats, at the same time, it can inhibit the content of CGRP and NGF in psoas muscle tissue of CLBP rats, and improve the local inflammatory microenvironment.

KEYWORDS Manipulation; Chronic low back pain; Calcitonin gene-related peptide; Nerve growth factor; Inflammatory microenvironment

慢性下腰痛 (chronic low back pain, CLBP) 是一种常见的肌肉骨关节疾病, 给社会带来了一定的经济负担, 也是导致世界范围内残疾和旷工的主要原因之一^[1]。CLBP 的发病机制尚不明确, 大多数腰痛患者没有基础疾病或明显诱因, 难以确定疼痛的来源^[2]。研究表明, 腰痛相关生物标记物可用于疾病的早期诊断、病情评估与疗效判断^[3]。慢性疼痛常伴随外周或中枢神经系统局部组织中炎性微环境改变, 影响神经系统疼痛的传导, 诱发疼痛。降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP) 是一种内源性扩血管物质, 能促进水肿的形成, 调节炎症反应^[4]。神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 属于神经营养因子家族, 存在于神经系统和全身其他组织, 在炎症、疼痛中发挥一定作用^[5]。两者均参与慢性疼痛与炎症的调节。本课题拟通过观察推拿手法对 CLBP 大鼠腰大肌中 CGRP 和 NGF 的影响, 以期对脊柱推拿临床相关机制研究提供科学支持。

1 材料和方法

1.1 实验仪器与试剂

IITC 足底热点测痛仪 model390 (上海玉研科学仪器有限公司), IITC 电子测痛仪 (上海玉研科学仪器有限公司), 外部连接固定系统 (上海浦卫医疗器械厂), 无线触觉力按摩指套 (日本 FingerTIPS), 降钙素基因相关肽 (CGRP) 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒, 大鼠神经生长因子 (NGF) 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (上海威奥生物科技有限公司), 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) 等。

1.2 实验动物与分组

健康成年 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠, 体质

量 (200 ± 20) g, 共 32 只, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。常规适应性饲养 4 周后, 待大鼠体重增长至 350 g 左右时, 采用随机数字表法随机分为空白组、假手术组、CLBP 模型组、治疗组 4 组, 每组各 8 只。

1.3 造模方法

模型组采用外部连接系统 (external link fixation system, ELFS) 的方法建立大鼠 CLBP 模型^[6], ELFS 由两部分棘突附着部件 (spinous attachment units, SAU) 和外部连接部件 (external link units, ELU), 分别由 3 对棘突钢板、2 块连接钢板及其相应的固定部件组成。模型具体制备方法: (1) 术前 12 h 禁食禁水。对大鼠腹腔注射 7% 戊巴比妥钠进行麻醉 (0.5 ml/100 g), 用钳夹夹持大鼠后足, 若无缩足反射, 则说明进入麻醉状态。手术区域备皮, 75% 医用酒精及碘伏消毒。(2) 铺巾, 手术台上铺好一次性手术铺巾, 保持术区清洁。(3) 定位大鼠髂嵴, 依次定位 L₄、L₅、L₆ 棘突, 之后切开皮肤及剥离清除浅层筋膜组织, 充分暴露各棘突。(4) 用 10 ml 注射器针头在 L₆ 棘突基底部正中上方约 2 mm 处钻孔, 之后用 SAU 固定 L₆ 棘突, 同样的方法安装 L₅ 和 L₄ 的棘突。(5) 肌肉组织缝合。(6) 安装 ELU 外部固件, 用 L₄-L₅ 连接钢板和 L₅-L₆ 连接钢板分别将 3 个棘突固件连接完毕。见图 1。(7) 皮肤缝合, 用碘伏清洁伤口。由于切开后固定棘突是外部侵入, 在造模后 3 d 内, 均需要肌注庆大霉素 (2 ml 加 0.9% 生理盐水 8 ml) 以防治感染。

1.4 分组与处理

空白组: 不做任何处理, 常规饲养, 与假手术组、CLBP 模型组、治疗组同步取材。假手术组: 只将皮肤和竖脊肌切开后缝合, 不安装固件链接。CLBP 模型

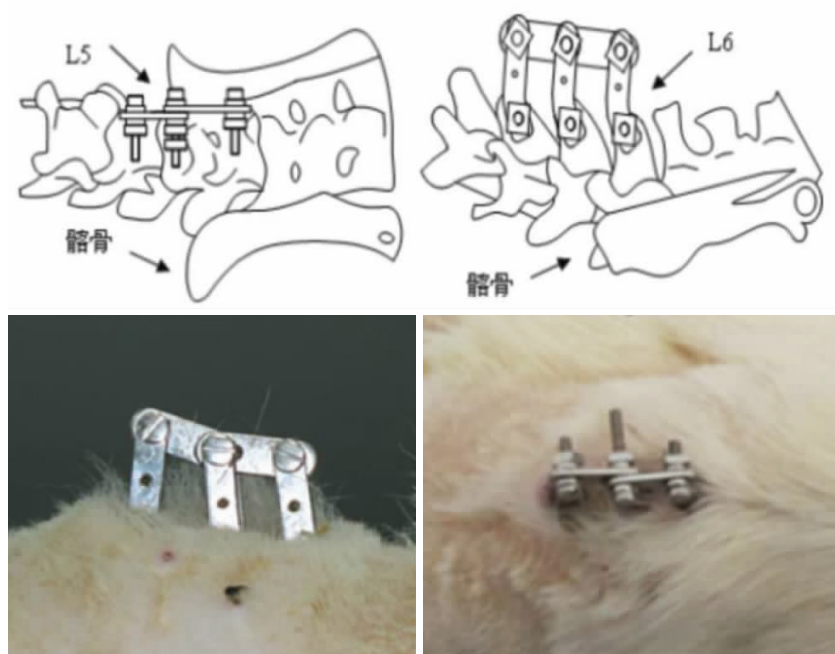


图1 慢性下腰痛模型示意图和外观图

Fig.1 Sketch and appearance of chronic low back pain model

组:与治疗组同步抓取与固定,但不予以推拿干预。治疗组:造模后第14天开始进行推拿手法治疗干预。手法采用按揉法操作,取穴为脊柱 L_1-S_1 两侧夹脊穴,穴位定位参照《实验针灸学》^[7]中大鼠标准穴位图谱定位。先将大鼠置于推拿固定器内15 min,适应环境,开始治疗时,操作者大拇指带上无线触觉力按摩指套(日本FingerTPS)进行手法操作,拇指罗纹面置于大鼠背部,通过手腕的摆动带动拇指屈伸进行有深透性的按揉。为保证手法标准化统一,手法刺激量设定在按揉力量5 N,频率为2 Hz,15 min/次,1次/d,连续干预14 d。

1.5 观察指标及检测方法

1.5.1 机械刺激反应阈值(paw withdrawal threshold, PWT)测定

分别在造模前、干预后第1、3、7、10、14天对4组大鼠左右后足PWT进行测量。正式测试前需适应环境2 d,每次测试前至少适应30 min。测试方法采用IITC电子测痛仪读数测试,测试前将探杆水平搁置在桌面上清零,调整主面板上的Max按钮,即可测量应用在生物体某部位的最大压力(疼痛阈值)。测量时,需将手持式压力探杆朝测量部位水平的缓慢的移动,轻轻用Tip头去触碰大鼠足心,直至大鼠有缩爪反应,如此完成一次测试,并记录该数值。每只大鼠测量3次,取平均值记为当日数据。

1.5.2 热刺激反应阈值(paw withdrawal latency, PWL)测定

分别在造模前、干预后第1、3、7、10、14天对4组大鼠左右后足PWT进行测量。正式测试前需

适应环境2 d,每次测试前至少适应30 min。热源的光照强度设定为55%,测试时将热光源对准大鼠足底中心,按动开关,待大鼠缩足则自动停止记录。如果单次测试热源持续超过20 s,机器自动停止,数据记录为20.00 s。每只大鼠测量3次,取平均值记为当日数据。

1.5.3 ELISA法测定CGRP、NGF蛋白浓度

行为学测试后,10%水合氯醛麻醉大鼠,待大鼠无意识反应时,断头处死大鼠,用剪刀分离背部,贴着 L_4-L_6 关节面下缘快速剪下椎旁两侧部位腰大肌,至于1.5 ml离心管中。腰大肌组织保存在 -80°C 冰箱中备用。常温下复融,按照ELISA试剂盒说明书进行操作,经酶标仪在450 nm光度值下测定其OD值,绘出标准线性方程,根据相应结果测出浓度。

1.6 统计学处理

采用SPSS 21.0统计软件进行分析处理,实验数据定量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),以LSD检验进行组间的两两比较;组内多时间点比较采用重复测量方差分析,若资料不服从正态分布时,则采用非参数检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠PWT的变化

各组大鼠在造模前的PWT测试结果显示,各组间PWT比较差异无统计学意义($P>0.05$),组间可比。空白组、假手术组大鼠在成模后第1~14天的过程中,其PWT值差异均无统计学意义($P>0.05$)。空白组大鼠PWT在整个实验观察周期内无明显改变,各时间点之间差异无统计学意义($P>0.05$);假手术组大鼠PWT在整个实验观察周期内无明显改变,各时间点之间差异无统计学意义($P>0.05$);CLBP模型组大鼠在整个观察周期内PWT持续降低,造模前后相比差异有统计学意义($P<0.01$);与空白组和假手术组比较,第1~14天内差异均有统计学意义($P<0.01$)。治疗组在成模后与空白组和假手术组比较,差异有统计学意义($P<0.01$),与CLBP模型组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。在手法治疗的第1~3天,治疗组大鼠的机械痛阈值并无明显改变趋势,与CLBP模型大鼠相比差异也无统计学意义($P>0.05$)。至治疗第7天,治疗组大鼠与CLBP模型大鼠相比,

痛阈值呈现出升高的趋势,但二者相比差异无统计学意义($P=0.056>0.05$)。至治疗第 10~14 天,治疗组大鼠的机械痛阈值开始上升,且与 CLBP 模型大鼠相比差异有统计学意义($P=0.013<0.05, P<0.01$)。见表 1。

2.2 大鼠 PWL 的变化

各组大鼠在造模前的 PWL 测试结果显示,各组间 PWL 差异无统计学意义($P>0.05$),组间可比。空白组、假手术组大鼠在成模后第 1~14 天的过程中,其 PWL 值差异均无统计学意义($P>0.05$)。空白组大鼠 PWL 在整个实验观察周期内无明显改变,各时间点之间差异无统计学意义($P>0.05$);假手术组大鼠 PWL 在整个实验观察周期内无明显改变,各时间点之间差异无统计学意义($P>0.05$);模型组各时间点

与空白组和假手术组比较,差异均有统计学意义($P<0.01$)。模型组大鼠成模后第 1 天 PWL 较基线明显降低,前后比较差异有统计学意义($P<0.01$);后模型组各时间点趋于平稳,约在成模后第 10 天到达最低值;治疗组大鼠在造模后 PWL 显著降低,出现了明显的热痛阈值降低。治疗组与模型组比较 1~3 d 差异并无统计学意义($P>0.05$),待 7 d 比较,治疗组与 CLBP 模型组的 PWL 差异有统计学意义($P=0.016<0.05$),手法加载对 CLBP 大鼠热痛觉过敏现象有了改善直到实验结束。见表 2。

2.3 ELISA 法大鼠腰大肌组织的 CGRP 和 NGF 蛋白浓度

分别按照 CGRP 和 NGF 的 ELISA 试剂盒说明书进行操作,经酶标仪在 450 nm 光度值下测定其

表 1 各组大鼠不同时间点 PWT 值($\bar{x}\pm s$)
Tab.1 PWT of rats in each group at different time points($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	造模前	第 1 天	第 3 天	第 7 天	第 10 天	第 14 天
空白组	8	56.61±6.36	54.91±4.86	57.10±7.37	55.19±5.71	56.74±4.03	57.65±2.89
假手术组	8	54.28±5.83 ^{a1}	55.84±6.05 ^{a2}	54.62±4.40 ^{a3}	57.67±5.62 ^{a4}	55.36±4.01 ^{a5}	55.72±2.75 ^{a6}
CLBP 模型组	8	55.72±5.95 ^{b1}	36.51±4.06 ^{b2}	34.54±3.68 ^{b3}	35.26±3.64 ^{b4}	35.50±2.83 ^{b5}	33.29±2.61 ^{b6}
治疗组	8	55.93±7.25 ^{c1}	37.32±4.46 ^{c2}	38.01±2.68 ^{c3}	40.02±3.72 ^{c4}	40.60±4.30 ^{c5}	43.48±3.02 ^{c6}
F 值		0.189	37.735	44.375	42.939	61.272	130.126
P 值		0.903	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与空白组比较,^{a1} $t=-0.73, P>0.05$,^{a2} $t=-0.07, P>0.05$,^{a3} $t=-1.02, P>0.05$,^{a4} $t=1.04, P>0.05$,^{a5} $t=-0.72, P>0.05$,^{a6} $t=-1.37, P>0.05$;与假手术组比较,^{b1} $t=0.45, P>0.05$,^{b2} $t=8.45, P<0.01$,^{b3} $t=-8.26, P<0.01$,^{b4} $t=-9.38, P<0.01$,^{b5} $t=-10.36, P<0.01$,^{b6} $t=-15.89, P<0.01$;与 CLBP 模型组比较,^{c1} $t=0.07, P>0.05$,^{c2} $t=0.35, P>0.05$,^{c3} $t=1.43, P>0.05$,^{c4} $t=1.99, P>0.05$,^{c5} $t=2.71, P<0.05$,^{c6} $t=7.22, P<0.01$

Note: Compared with the blank group, ^{a1} $t=-0.73, P>0.05$, ^{a2} $t=-0.07, P>0.05$, ^{a3} $t=-1.02, P>0.05$, ^{a4} $t=1.04, P>0.05$, ^{a5} $t=-0.72, P>0.05$, ^{a6} $t=-1.37, P>0.05$; compared with the sham operation group, ^{b1} $t=0.45, P>0.05$, ^{b2} $t=8.45, P<0.01$, ^{b3} $t=-8.26, P<0.01$, ^{b4} $t=-9.38, P<0.01$, ^{b5} $t=-10.36, P<0.01$, ^{b6} $t=-15.89, P<0.01$; compared with the CLBP model group, ^{c1} $t=0.07, P>0.05$, ^{c2} $t=0.35, P>0.05$, ^{c3} $t=1.43, P>0.05$, ^{c4} $t=1.99, P>0.05$, ^{c5} $t=2.71, P<0.05$, ^{c6} $t=7.22, P<0.01$

表 2 各组大鼠不同时间点 PWL 值($\bar{x}\pm s$)
Tab.2 PWL of rats in each group at different time points($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	造模前	第 1 天	第 3 天	第 7 天	第 10 天	第 14 天
空白组	8	13.23±1.05	12.91±0.97	13.04±0.81	12.56±0.66	12.62±0.37	12.61±0.51
假手术组	8	12.98±1.01 ^{a1}	12.85±1.09 ^{a2}	12.77±0.57 ^{a3}	12.74±0.50 ^{a4}	12.78±0.70 ^{a5}	12.57±0.47 ^{a6}
CLBP 模型组	8	13.18±0.77 ^{b1}	7.23±0.50 ^{b2}	6.91±0.40 ^{b3}	6.82±0.51 ^{b4}	6.39±0.55 ^{b5}	6.77±0.69 ^{b6}
治疗组	8	13.15±0.85 ^{c1}	6.89±0.41 ^{c2}	7.30±0.41 ^{c3}	7.51±0.43 ^{c4}	8.85±0.80 ^{c5}	8.97±0.71 ^{c6}
F 值		0.125	117.445	273.800	283.089	196.148	182.258
P 值		0.945	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与空白组比较,^{a1} $t=0.55, P>0.05$,^{a2} $t=-0.14, P>0.05$,^{a3} $t=-0.95, P>0.05$,^{a4} $t=0.66, P>0.05$,^{a5} $t=0.50, P>0.05$,^{a6} $t=-0.15, P>0.05$;与假手术组比较,^{b1} $t=0.44, P>0.05$,^{b2} $t=-14.07, P<0.01$,^{b3} $t=20.45, P<0.01$,^{b4} $t=22.14, P<0.01$,^{b5} $t=20.40, P<0.01$,^{b6} $t=-19.29, P<0.01$;与 CLBP 模型组比较,^{c1} $t=0.06, P>0.05$,^{c2} $t=-0.86, P>0.05$,^{c3} $t=1.37, P>0.05$,^{c4} $t=2.58, P<0.05$,^{c5} $t=7.87, P<0.01$,^{c6} $t=7.31, P<0.01$

Note: Compared with the blank group, ^{a1} $t=0.55, P>0.05$, ^{a2} $t=-0.14, P>0.05$, ^{a3} $t=-0.95, P>0.05$, ^{a4} $t=0.66, P>0.05$, ^{a5} $t=0.50, P>0.05$, ^{a6} $t=-0.15, P>0.05$; compared with the sham operation group, ^{b1} $t=0.44, P>0.05$, ^{b2} $t=-14.07, P<0.01$, ^{b3} $t=20.45, P<0.01$, ^{b4} $t=22.14, P<0.01$, ^{b5} $t=20.40, P<0.01$, ^{b6} $t=-19.29, P<0.01$; compared with the CLBP model group, ^{c1} $t=0.06, P>0.05$, ^{c2} $t=-0.86, P>0.05$, ^{c3} $t=1.37, P>0.05$, ^{c4} $t=2.58, P<0.05$, ^{c5} $t=7.87, P<0.01$, ^{c6} $t=7.31, P<0.01$

OD 值, 绘出标准线性方程, 根据相应结果测出 CGRP 和 NGF 的蛋白浓度。CLBP 模型组腰大肌中 CGRP 和 NGF 含量均高于空白组和假手术组 ($P < 0.01$), 治疗后, 两者的含量均有不同程度的下降, 见表 3。

表 3 各组大鼠腰大肌 CGRP 和 NGF 的蛋白含量值 ($\bar{x} \pm s$)
Tab.3 Contents of CGRP and NGF protein in the psoas major muscle of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CGRP(ng/ml)	NGF(pg/ml)
空白组	8	4.83±0.88	251.54±16.44
假手术组	8	5.12±0.62 ^{a1}	256.23±24.08 ^{a2}
CLBP 模型组	8	14.09±1.18 ^{b1}	406.78±23.44 ^{b2}
治疗组	8	10.05±0.79 ^{c1}	355.14±29.80 ^{c2}
F 值	-	197.066	81.559
P 值	-	0.000	0.000

注: 与空白组比较, ^{a1} $t=0.66$, ^{a1} $P>0.05$, ^{a2} $t=0.39$, ^{a2} $P>0.05$; 与假手术组比较, ^{b1} $t=20.15$, ^{b1} $P<0.01$, ^{b2} $t=12.59$, ^{b2} $P<0.01$; 与 CLBP 模型组比较, ^{c1} $t=9.07$, ^{c1} $P<0.01$, ^{c2} $t=-4.32$, ^{c2} $P<0.01$

Note: Compared with blank group, ^{a1} $t=0.66$, ^{a1} $P>0.05$, ^{a2} $t=0.39$, ^{a2} $P>0.05$; compared with sham operation group, ^{b1} $t=20.15$, ^{b1} $P<0.01$, ^{b2} $t=12.59$, ^{b2} $P<0.01$; compared with CLBP model group, ^{c1} $t=9.07$, ^{c1} $P<0.01$, ^{c2} $t=-4.32$, ^{c2} $P<0.01$

3 讨论

3.1 CLBP 模型建立以及手法对该模型大鼠的镇痛效应

慢性下腰痛困扰了庞大人群的工作与生活, 增添了社会经济负担。课题组前期建立了对应该疾病有效的动物模型, 能够较好的模拟临床上由于“筋出槽、骨错缝”“亚脱位”(subluxation)所引起的慢性腰背部疼痛, 并且发现随着固定的时间增加, 大鼠的椎体后缘所成的锐角 (posterior body angle, PBA) 呈下降趋势^[8]。换言之, 大鼠相应节段椎体的活动度较正常大鼠减弱, 更能反映脊柱节段被“锁死”的状态与脊柱活动度具有关联性。根据中医理论, “筋出槽、骨错缝”是脊柱病发病的重要机制之一, 脊柱关节紊乱通常是一种动态的生物力学损伤或一种关节内的变化, 这种动态的关节内的变化常会导致脊椎关节的失稳及损伤。长期伏案以及其他不正确姿势造成运动肌群疲劳, 累及脊柱小关节该模型也能较好的反应临床上脊柱功能障碍患者的临床表现。因此该模型采用外部连接固定的方法, 限制大鼠腰椎部分节段(L₄-L₆)的活动, 从而诱导合理的椎骨错缝状态下的 CLBP 动物模型。Charles 等^[6]研究表明当外部连接固定模型超过 4 周后将产生不可逆的退变。Henderson 等^[9]发现该模型诱导下, 大鼠对应节段的

脊柱刚度在固定 16 周后可增加 300%以上。这现象也对临床上患者脊柱关节活动度下降, 伴有强直固定感给出合理的解释。

脊柱推拿手法是治疗 CLBP 安全且有效的方法, 是临床上值得推荐的干预手段, 但其治疗机制的认识仍存在不足^[10]。目前相关研究表明, 推拿手法可通过改变初级感觉相关神经元内疼痛相关离子通道对慢性疼痛模型大鼠起到镇痛效应。林志刚等^[11]发现推拿手法治疗可以使腰椎间盘突出症大鼠 DRG 神经元内 P2X3 蛋白含量下调, 降低 Na⁺、K⁺、Ca²⁺通道开放性和 DRG 神经元兴奋性, 从而抑制中枢敏化起到镇痛效应。Song 等^[12]发现推拿手法对 CCD 模型大鼠具有镇痛效应, 可能是通过降低大鼠体内 Piezo2 受体活性引起的。本研究利用外部固件诱导临床上常见的 CLBP, 发现通过模拟手法加载局部软组织, 可以下调大鼠右后足的 PWL 和 PWT, 说明推拿手法对该模型大鼠具有较好的镇痛效应。

3.2 手法干预时间窗口选择与炎性微环境变化

ELFS 是一种在无菌条件下通过外部植入金属固件对大鼠的脊柱进行外固定的造模装置。在造模后的 5 天内, 肉眼可明显观察到大鼠的背部由于疼痛而具有不同程度的挛缩、隆起。由于手术时需要将背部皮肤切开 1.5~2 cm, 因此局部有水肿及炎性物质渗出。如果此时在对动物进行治疗时, 大鼠会由于急性期的疼痛而出现抗拒、躯体扭动摆脱等不配合状况。局部肿胀现象直到第 7~10 天逐渐消退, 因此本研究对造模组大鼠的手法介入选择在造模后两周进行。临床中, 患者出现红肿热痛等急性反应时, 应慎用推拿手法治疗。而在疾病向慢性疼痛中转归后, 配合手法镇痛, 促进局部瘀血消散、吸收, 以提升治疗获益率。

课题组前期研究^[13]观察了亚脱位固定后大鼠脊髓前角神经元尼氏小体(Nissl)的变化, 发现 Nissl 原有固定的虎斑状消失, 甚至部分溶解, 提示大鼠神经元发生了病理改变。这说明生物力学的变化到一定程度之后会引起相应的神经生物学改变。陈博等^[14]研究发现大鼠的长期椎骨错缝而导致的慢性筋骨病变会促进 DRG 中 P 物质合成与传递, 或是加剧疼痛的诱因。也符合“筋骨平衡功能态-生物学变化-炎性微环境-慢性疼痛”假说反应链。相关研究表明, 腰椎间盘突出症患者的慢性疼痛与 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等炎性细胞因子密切相关^[15], 且不同中医证型、退变程度的腰椎间盘突出症患者 TNF- α 等表达也存在明显差异性^[16]。

本研究观察的 CGRP 是一种神经肽, 含有 37 个氨基酸, 具有广泛而多样的生理作用, 广泛分布于哺

乳动物中枢及外周感觉神经 C-纤维末梢及相应组织器官中。Zhang 等^[17]发现在角叉菜胶诱导的关节炎模型大鼠中, CGRP 基因敲除的大鼠对伤害性刺激不表现出痛觉反应, 且脊髓背角和 DRG 内 CGRP 样免疫活性物质的表达均出现明显下调, 证明 CGRP 是痛感觉及痛觉过敏产生所必需的物质。NGF 属于神经营养因子家族, 主要作用为维持神经细胞的存活、增殖与分化, 在炎症、疼痛中发挥一定作用, 并且与下腰痛关系密切。NGF 可以上调如 P 物质、Nav1.8、BDNF 等痛觉神经元相关基因的表达来促进痛觉神经元敏化, 间接激活肥大细胞, 释放如前列腺素、缓激肽及组胺等疼痛介质, 刺激痛觉末梢, 增加痛感^[18]。本研究发现, 造模后诱导的 CLBP 模型大鼠会造成下肢机械痛觉和热痛觉过敏, 而手法加载椎旁软组织能够降低外部链接固定所引发的机械痛觉和热痛觉过敏。说明手法对 CLBP 模型大鼠有较好的镇痛作用。行为学测试后, 检测相应腰大肌中 CGRP 和 NGF 的蛋白含量, 发现模型组 CGRP 和 NGF 较空白组和假手术组明显增高。手法刺激可以使两者含量显著降低。可能是手法对局部软组织拮抗或者减弱了 CGRP 和 NGF 的活性, 改善了局部炎性微环境, 最终实现大鼠疼痛改善的结局。“筋骨功能态-炎性微环境-离子通道”是否有更进一步的应答联系, 以及手法干预与腰椎病疼痛相关神经元突触传递效能等机制还需后期实验继续探索。

参考文献

- [1] Hurwitz EL, Randhawa K, Yu H, et al. The global spine care initiative: a summary of the global burden of low back and neck pain studies[J]. *Eur Spine J*, 2018, 27(6): 796-801.
- [2] Yang Mingxiao, Feng Yue, Pei Hong, et al. Effectiveness of Chinese massage therapy (Tui Na) for chronic low back pain: study protocol for a randomized controlled trial[J]. *Trials*, 2014, 15: 418.
- [3] 郭美玉, 李忠海. 腰痛相关生物标记物的研究进展[J]. *中国骨与关节杂志*, 2018, 7(9): 716-719.
GUO MY, LI ZH. Research progress of related biomarkers for low back pain[J]. *Zhong Guo Gu Yu Guan Jie Za Zhi*, 2018, 7(9): 716-719. Chinese.
- [4] Sugawara S, Okada S, Katagiri A, et al. Interaction between calcitonin gene-related peptide-immunoreactive neurons and satellite cells via P2Y12 R in the trigeminal ganglion is involved in neuropathic tongue pain in rats[J]. *Eur J Oral Sci*, 2017, 125: 444-452.
- [5] Mizumura K, Murase S. Role of nerve growth factor in pain[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2015, 227(1): 5-77.
- [6] Charles NR, Henderson DC, Gregory D, et al. Introducing the external link model for studying spine fixation and misalignment: part 2, biomechanical features[J]. *Manipulative Physiol Ther*, 2007, 30(4): 279-294.
- [7] 郭义. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2008: 415.
GUO Y. Experimental acupuncture[M]. China Traditional Chinese Medicine Press, 2008: 415. Chinese.
- [8] 孔令军, 程英武, 詹红生, 等. 大鼠腰椎亚脱位模型节段活动范围减小的研究[J]. *中国骨伤*, 2012, 25(3): 241-245.
KONG LJ, CHENG YW, ZHAN HS, et al. Study on hypomobility of motion segment of rats with lumbar subluxation model[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2012, 25(3): 241-245. Chinese with abstract in English.
- [9] Henderson CN, DeVocht JW, Kirstukas SJ, et al. In vivo biomechanical assessment of a small animal model of the vertebral subluxation. *Bloomington: Proceedings of the International Conference on Spinal Manipulation*, 2000: 193-195.
- [10] 谭文莉, 王炜, 姜宏宁, 等. 推拿治疗慢性下腰痛的即时脑效应研究[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2019, 27(1): 11-16.
TAN WL, WANG W, JIANG HN, et al. Brain immediate analgesia mechanism of Tuina in low back pain[J]. *Zhongguo Zhong Yi Gu Shang Ke Za Zhi*, 2019, 27(1): 11-16. Chinese.
- [11] 林志刚, 蒋诗超, 程艳彬, 等. 推拿对腰椎间盘突出症大鼠 DRG 神经元 P2X3 受体影响的实验研究[J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(10): 2475-2479.
LIN ZG, JIANG SC, CHENG YB, et al. Experimental study of Tuina on DRG neurons P2X3 receptor of lumbar disc herniation rats[J]. *Zhonghua Zhong Yi Yao Xue Kan*, 2017, 35(10): 2475-2479. Chinese.
- [12] Song P, Lin Z, Zhu Q, et al. Possible mechanism underlying analgesic effect of Tuina in rats may involve piezo mechanosensitive channels within dorsal root ganglia axon[J]. *J Tradit Chin Med*, 2018, 38(6): 834-841.
- [13] 孔令军, 房敏, 詹红生, 等. 大鼠腰椎亚脱位模型刚度及其脊髓前角尼氏小体变化研究[J]. *中华中医药杂志*, 2012, 27(12): 3234-3237.
KONG LJ, FANG M, ZHAN HS, et al. Study of stiffness and Nissl of ventral horn of spinal cord of the rat lumbar subluxation model[J]. *Zhonghua Zhong Yi Yao Za Zhi*, 2012, 27(12): 3234-3237. Chinese.
- [14] 陈博, 林勋, 庞坚, 等. 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[J]. *中国骨伤*, 2015, 28(1): 75-77.
CHEN B, LIN X, PANG J, et al. Experimental research on substance P content of hypothalamus and dorsal root ganglia in rats with lumbar vertebrae gucuofeng model I[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2015, 28(1): 75-77. Chinese with abstract in English.
- [15] Hung AL, Lim M, Doshi TL. Targeting cytokines for treatment of neuropathic pain[J]. *Scand J Pain*, 2017, 17: 287-293.
- [16] 韦勇, 许建文, 谢筱晞, 等. 腰椎间盘突出症中医证型、影像学类型与外周血 TNF- α 表达水平的相关性研究[J]. *蛇志*, 2016, 28(2): 145-147.
WEI Y, XU JW, XIE XX, et al. The expression level study of the lumbar intervertebral disk protrusion disease TCM syndrome types, imaging type and the peripheral blood TNF- α [J]. *She Zhi*, 2016, 28(2): 145-147. Chinese.
- [17] Zhang L, Hoff AO, Wimalawansa SJ, et al. Arthritic calcitonin/alpha calcitonin gene-related peptide knockout mice have reduced nociceptive hypersensitivity[J]. *Pain*, 2001, 89(2-3): 265-273.
- [18] Mizumura K, Murase S. Role of nerve growth factor in pain[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2015, 227(1): 57-77.