·基础研究·

低频电针对选择性神经损伤大鼠神经痛维持期脊髓背角 PKA-TRPV1 通路及痛敏递质的干预作用

叶佳瑜 蒋永亮 颜思思 何晓芬 杜俊英 赵文胜 陈晓军 陈利芳 方剑乔

【摘要】 **目的** 探讨低频电针干预神经病理痛维持期脊髓背角(SCDH)蛋白激酶 A(PKA)、辣椒素受体(TRPV1)通路的调控机制。**方法** 将大鼠随机分为空白对照组、假手术组、模型对照组、电针干预组 4 组。采用坐骨神经分支选择性神经损伤(SNI)方法建立神经病理痛模型。电针干预取术侧足三里、昆仑穴,频率 2 Hz,每日 1 次,连续干预 14 d。检测大鼠术侧后足缩足阈值(PWT)、SCDH PKA 和 TRPV1 以及降钙素基因相关肽(CGRP)和 P 物质(SP)水平。**结果** SNI 模型大鼠术侧 PWT 下降($P<0.01$),术侧SCDH PKA、TRPV1、CGRP、SP 水平均上调($P<0.05$);2 Hz 电针可提高 SNI 模型大鼠 PWT($P<0.01$),降低术侧 SCDH PKA、TRPV1、CGRP、SP 水平($P<0.05$)。**结论** 低频电针能改善神经病理痛,可能与其下调 SCDH PKA-TRPV1 通路以及 CGRP、SP 痛敏递质水平有关。

【关键词】 坐骨神经分支选择性损伤; 神经病理痛; 电针; 辣椒素受体; 蛋白激酶 A; 脊髓背角

基金项目:国家自然科学基金(81303038、81303039、81473772);浙江省自然科学基金(LQ17H270003、LY14H270002、LY14H270007、LY12H27015);浙江省重点科技创新团队计划资助(2013TD15)

The effects of low-frequency electroacupuncture on hyperalgesia PKA-TRPV1 signal pathway and neurotransmitters in the spinal cord of rats with neuropathic pain induced by spared nerve injury

*Ye Jiayu**, *Jiang Yongliang*, *Yan Sisi*, *He Xiaofen*, *Du Junying*, *Zhao Wensheng*, *Chen Xiaojun*, *Chen Lifang*, *Fang Jianqiao*. * *The Third Clinical Medical College*, *Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine*, *Hangzhou 310053*, *China* *Corresponding author*: *Fang Jianqiao*, *Email*: *fangjianqiao7532@163.com*

【**Abstract**】 **Objective** To explore the effect of low-frequency electroacupuncture (EA) on neuropathic pain induced by spinal nerve injury and its underlying mechanism. **Methods** Thirty-two male Sprague-Dawley rats were randomly divided into a normal group, a sham spared nerve injury (SNI) group, an SNI group and an SNI+EA group, each of 8. The rats in the SNI and SNI+EA groups were given SNI surgery, while those of the sham-SNI group only had the sciatic nerve and its branches exposed without any lesion. EA at 2 Hz was applied over the ipsilateral Zusanli and Kunlun acupoints daily for 14 days after the surgery. The ipsilateral paw withdrawal threshold (PWT) was measured, along with protein kinase A (PKA) levels in the dorsal horn of the spinal cord, calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P (SP) levels along with transient receptor potential V1 (TRPV1). **Results** Compared to the normal group, the SNI groups all showed significant decreases in their PWTs on the affected side and significant increases in PKA, TRPV1, CGRP and substance P on the affected side. Compared to SNI group, the average ipsilateral PWT in the SNI+EA group increased significantly after EA treatment, while PKA levels, TRPV1, CGRP levels and SP expression all decreased significantly. **Conclusion** Electroacupuncture at low frequency can effectively relieve neuropathic pain, perhaps through down-regulation of PKA in the spinal cord and by decreasing pain hypersensitivity related to CGRP and SP.

【**Key words**】 Spared nerve injury; Neuropathic pain; Electroacupuncture; Transient receptor potential V1; Protein kinase A; Spinal cord

Fund program: The National Natural Science Foundation of China (grants 81303038, 81303039 and 81473772); Zhejiang′s Provincial Natural Science Foundation (grants LQ17H270003, LY14H270002,

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2017.07.001

作者单位:310053 杭州,浙江中医药大学第三临床医学院针灸神经生物学实验室(叶佳瑜、蒋永亮、颜思思、何晓芬、杜俊英、方剑乔);浙江中医药大学附属第三医院(蒋永亮、何晓芬、杜俊英、陈晓军、陈利芳、方剑乔);浙江中医药大学附属浙江省中西医结合医院(赵文胜)

通信作者:方剑乔,Email:fangjianqiao7532@163.com

LY14H270007 and LY12H27015) and as a key subject of China's State Administration of Traditional Chinese Medicine (grant 2013TD15)

神经病理痛是一种由躯体感觉系统受损或病变直接导致的慢性疼痛,主要表现为自发性疼痛、痛觉过敏、痛觉超敏和感觉异常等特征,可起源于外周伤害感受器末梢到中枢大脑内皮质神经元的整条神经传导通路上的任一位点[1]。辣椒素受体(transient receptor potential vanilloid type 1,TRPV1)属于瞬时感受器电位离子通道蛋白家族成员之一[2],多分布于外周的背根神经节(dorsal root ganglion,DRG)、三叉神经节和中枢的下丘脑、导水管周围灰质等参与伤害性信息调节的部位[3-4],与疼痛的产生、维持密切相关,是近年来研究较多的疼痛因子之一。实验研究已表明,TRPV1 的活化能促进兴奋性神经递质降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide,CGRP)和 P 物质(substance P,SP)的释放[5]。蛋白激酶 A(protein kinase A,PKA)作为 TRPV1 的上游物质,能够直接活化或磷酸化 TRPV1[6-7]。PKA 作为神经信号传递的第二信使,能促进神经递质 CGRP、SP 的释放[8-9]。表明 PKA-TRPV1信号通路与 CGRP、SP 之间存在协调作用,共同参与各种伤害性信息的调控和痛觉过敏的形成,在神经病理痛中存在重要作用。

电针是目前公认的治疗疼痛的有效手段。研究表明,低频电针镇痛存在阿片机制,但其镇痛作用不能完全被吗啡受体拮抗剂纳洛酮所拮抗[10-12]。提示低频电针镇痛存在非阿片机制的可能性。本课题组前期研究也表明[13-15],2 Hz 电针可能通过干预 DRG PKA-TRPV1信号通路和 DRG CGRP、SP,发挥抗神经病理痛的作用。但目前对于低频电针能否通过干预中枢 PKA-TRPV1 信号通路及 CGRP、SP,进而治疗神经痛尚不明确。因此,本研究建立大鼠坐骨神经分支选择性神经损伤(spared nerve injury,SNI)模型,通过观察 SNI 模型大鼠神经病理痛 SCDH PKA、TRPV1 以及 CGRP、SP 水平的变化,及低频电针对其的干预作用,探讨在 SCDHPKA-TRPV1 信号通路基础上采用电针干预神经病理痛的中枢调控机制。

材料与方法

一、实验动物

选用无特定病原体(specific pathogen free,SPF)级健康雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠,体重(180±20)g,购自中国科学院上海实验动物中心,由浙江中医药大学实验动物中心饲养。饲养期间给予啮齿类动物标准颗粒饲料(由实验动物中心提供)及自由饮水,12 h 循环灯光。

二、主要实验仪器及试剂

动态足底测量仪(意大利 UGO BASILE 公司)、0.25 mm×13 mm 针灸针(中研太和医药有限公司)、LH-202H 韩氏穴位暨神经刺激仪(北京产)、凝胶成像仪(日本 Fujifilm 公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天公司)、RIPA 裂解液(碧云天公司)、蛋白酶抑制剂(碧云天公司)、预染蛋白 Maker(美国 Bio-Rad 公司)、兔抗大鼠 PKA 单克隆抗体(美国 Abcam 公司)、绵羊抗大鼠 TRPV1 多克隆抗体(美国 Abcam 公司)、兔抗大鼠 CGRP 单克隆抗体(美国 Epitomics 公司)、兔抗大鼠 SP 多克隆抗体(美国 Santa cruz 公司)、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)(美国 Cell Signaling 公司)、HRP 标记驴抗绵羊 IgG(美国 Abcam 公司)、HRP 标记山羊抗兔 IgG(美国 Abcam 公司)、超敏增强化学发光法(enhanced chemiluminescence,ECL)试剂盒(美国 Thermo 公司)。

三、模型制备

参照 Isabelle 等[16]的造模方法,将 SD 大鼠用 10%水合氯醛(0.35 ml/0.1 kg)腹腔注射麻醉后,俯卧位固定,充分暴露右侧臀区,剃毛消毒,在术侧股骨中点下约 0.5 cm 处平行坐骨神经方向切开皮肤,钝性分离臀部肌肉,充分暴露坐骨神经干,用玻璃分针分离周围粘连组织及坐骨神经的 3 个分支:胫神经、腓总神经和腓肠神经,用 5-0 丝线将胫神经和腓总神经紧紧结扎,在靠近结扎的远侧端且距离神经干远侧端大约 2~4 mm 处切断神经,同时保持腓肠神经完整,分层缝合肌肉和皮肤。假手术组仅暴露神经,不结扎切断。各造模组大鼠出现患足蜷曲、外翻等形态改变以及过度舔舐患足、患足承重能力下降等自发性疼痛行为,提示神经病理痛模型成功建立。

四、分组与电针干预

将大鼠随机分为空白对照组、假手术组、模型对照组、电针干预组,每组 8 只。造模后 1 d 开始对电针干预组大鼠进行电针干预。取术侧"足三里"、"昆仑"穴,进针后采用"LH-202H 韩氏穴位神经刺激仪"连接两穴,刺激参数:频率 2 Hz;强度 1 mA 10 min、2 mA 10 min、3 mA 10 min,共 30 min,每日干预 1 次,连续干预 14 d。空白对照组、假手术组、SNI 组大鼠不做治疗,仅给予相同固定。

五、PWT 测定

采用动态足底测量仪检测大鼠术侧后足缩足阈值

(paw withdrawal threshold, PWT),作为大鼠机械痛觉敏化的指标。分别于造模前 1 d、模后 1 d 电针干预前、模后电针干预 1 d、3 d、7 d、14 d 6 个时间点检测 PWT。将大鼠置于铁丝网上的透明塑料盒内适应环境,待大鼠停止探索活动和梳理毛发等活动后开始测痛。将金属丝正对大鼠术侧后足足跖外 1/3,启动机械泵,金属丝即以恒定速度自动上抬,对大鼠足底施加刺激,直至大鼠产生缩腿等逃避反应,大鼠逃避时电子记录器记录的刺激力量数值即为大鼠 PWT。设定最大刺激力量为 50 g,以免大鼠足爪受损。各时间点,每只大鼠重复测 3 次,取均值作为最终 PWT。

六、Western blot 检测 SCDH PKA、TRPV1、CGRP、SP 的表达水平

每组大鼠分别随机取 5 只用 Western blot 技术检测蛋白浓度。用 10%水合氯醛(0.35 ml/0.1 kg)腹腔注射麻醉后,开胸暴露心脏,经左心室、升主动脉用生理盐水(4 ℃预冷)快速灌注,直至流出液为澄清液体。参考杜俊英等[17]的方法,快速取出大鼠腰段脊髓,剥离脊髓两边的神经和硬脊膜后,取术侧脊髓背角,-80 ℃保存。RIPA 裂解组织后,超声粉碎抽提蛋白。总蛋白上样量为 20 μg,电泳浓缩胶电压为 80 V,30 min,分离胶电压为 120 v,90 min。将电泳后的蛋白转印至硝酸纤维素膜(0.45 μm)上,含 5%脱脂奶粉的洗涤液(tris buffered saline and tween, TBST)(pH7.5)室温封闭 1 h 后,分别加入兔抗大鼠 PKA 单克隆抗体(1∶1000)、绵羊抗大鼠 TRPV1 单克隆抗体(1∶1000)、兔抗大鼠 CGRP 单克隆抗体(1∶1000)、兔抗大鼠 SP 多克隆抗体(1∶1000)、兔抗大鼠GAPDH 单克隆抗体(1∶1000),4 ℃孵育过夜。TBST 摇洗 3 次后,TRPV1 加入 HRP 标记驴抗绵羊(1∶10000),PKA、CGRP、SP 加入 HRP 标记山羊抗兔 IgG(1∶10000),室温孵育 2 h,TBST 摇洗 3 次。用 ECL 超强发光试剂盒显影,Image Quant LAS 4000 拍摄,Image Quant TL7.0 分析蛋白条带灰度。

七、统计学方法

本研究所有实验数据采用($\bar{x}\pm s$)形式表示,多组间比较使用方差分析(analysis of variance, ANOVA),组间两两比较,方差齐性时采用最小显著差异法(least significant difference, LSD)检验,方差不齐时采用 Dunnett's T3 检验, $P<0.05$表示差异有统计学意义。

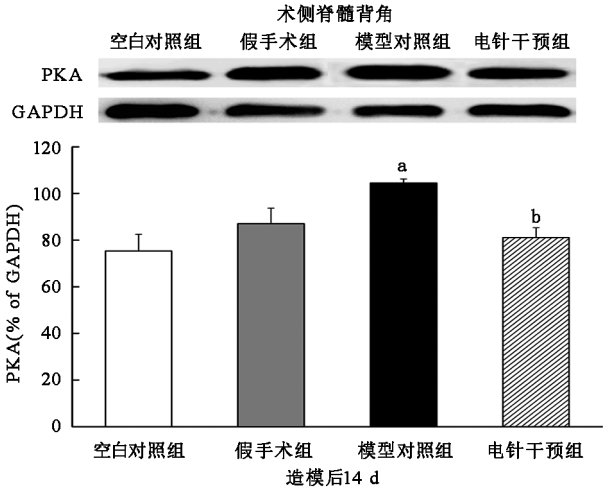
结　果

一、2 Hz 电针对 SNI 大鼠术侧 PWT 的影响

造模前,各组大鼠基础 PWT 比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。造模后 1 d,与空白对照组比较,假手术组 PWT 未见明显变化($P>0.05$);电针干预后,与模型对照组比较,电针干预组各个时间点的 PWT 提高,差异有统计学意义($P<0.01$)。

二、2 Hz 电针对 SNI 大鼠术侧 SCDH PKA 水平的影响

与空白对照组比较,假手术组术侧 SCDH PKA 水平未见显著变化($P>0.05$);模型对照组术侧 SCDH PKA 的水平上调($P<0.01$);与模型对照组比较,电针干预组术侧 SCDH PKA 的水平下降($P<0.05$)。详见图 1。



注:与空白对照组比较,[a]$P<0.05$;与模型对照组比较,[b]$P<0.05$

图 1　各组大鼠术侧 SCDH PKA 表达比较

三、2 Hz 电针对 SNI 大鼠术侧 SCDH TRPV1 水平的影响

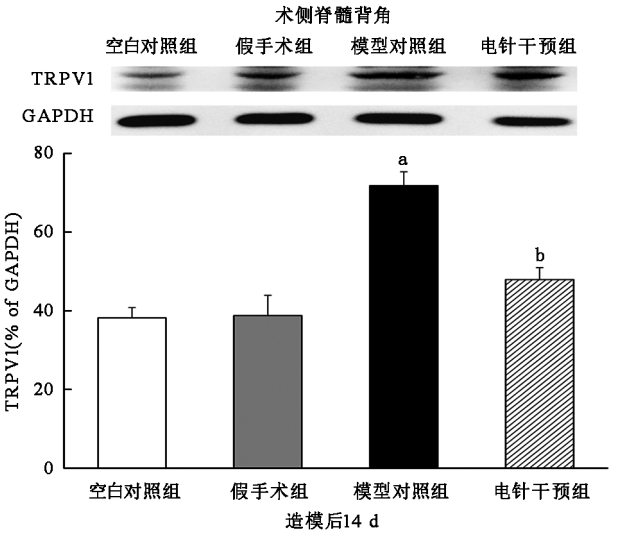
与空白对照组比较,假手术组术侧 SCDH TRPV1 水平未见显著改变($P>0.05$);模型对照组术侧 SCDH TRPV1 的水平上调($P<0.01$);与模型对照组比较,电针干预组术侧 SCDH TRPV1 的水平下降($P<0.01$)。详见图 2。

四、2 Hz 电针对 SNI 大鼠术侧 SCDH CGRP 水平的影响

与空白对照组比较,假手术组术侧 SCDH CGRP 的水平未见显著改变($P>0.05$);模型对照组术侧 SCDH CGRP 的水平上调($P<0.01$);与模型对照组比较,电针干预组术侧 SCDH CGRP 的水平下降($P<0.05$)。详见图 3。

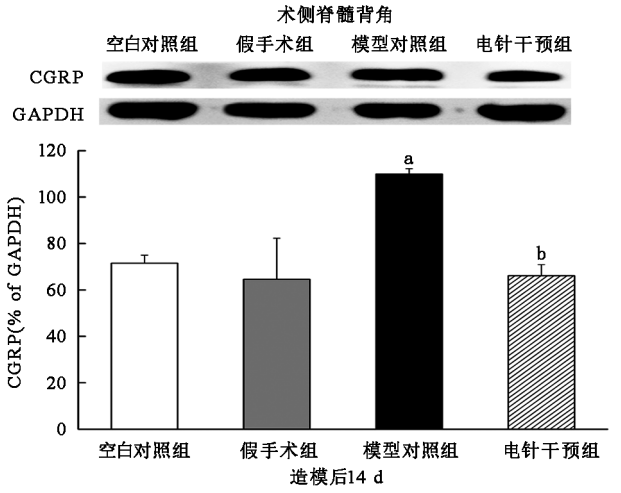
五、2 Hz 电针对 SNI 大鼠术侧 SCDH SP 水平的影响

与空白对照组比较,假手术组术侧 SCDH SP 的水平未见显著改变($P>0.05$);模型对照组术侧 SCDH SP 的水平上调($P<0.05$);与模型对照组比较,电针干预组术侧 SCDH SP 的水平下降($P<0.01$)。详见图 4。



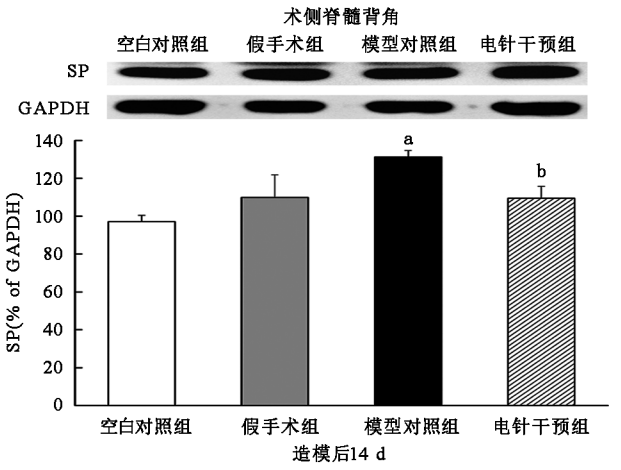
注：与空白对照组比较，[a]$P<0.05$；与模型对照组比较，[b]$P<0.05$

图 2　各组大鼠术侧 SCDHTRPV1 水平比较



注：与空白对照组比较，[a]$P<0.05$；与模型对照组比较，[b]$P<0.05$

图 3　各组大鼠术侧 SCDH CGRP 水平比较



注：与空白对照组比较，[a]$P<0.05$；与模型对照组比较，[b]$P<0.05$

图 4　各组大鼠术侧 SCDH SP 水平比较

讨　论

SNI 模型制作简单，机械痛敏感、持久，稳定性强，是近年来常用的神经病理痛模型[18-19]。本研究中，SNI 模型大鼠造模后1 d即出现机械痛敏化现象，以及跛行、舔足、足承重能力下降等行为学改变，并持续整个实验过程，表明 SNI 模型能成功诱导大鼠神经病理痛的产生、维持。

TRPV1 是 TRP 家族成员之一，在中枢的脊髓背角、导水管周围灰质、海马等部位都存在表达[4,20]。足底注射 TRPV1 激动剂能降低坐骨神经部分结扎模型小鼠的痛阈，同时能上调脊髓背角神经胶质细胞活化标志物 GFAP 和 Iba1 的表达水平[21]。提示 TRPV1 参与了神经病理痛的中枢敏化。在大鼠坐骨神经卡压模型中，同侧脊髓中 TRPV1 显著升高，而对侧脊髓中 TRPV1 表达变化不明显[22]，说明 TRPV1 表达的增强是 TRPV1 参与中枢痛觉调节的可能性机制。PKA 作为 G 蛋白耦联系统信号传递途径中的信使，在脊髓背角中也存在表达。研究观察到，PKA 能够直接磷酸化 TRPV1，进而达到减少 TRPV1 脱敏的目的[23]。同时，PKA 表达的上调能直接敏化 TRPV1[7]。表明 PKA 介导的 TRPV1 磷酸化和表达增强对 TRPV1 的活化具有重要作用。本课题组前期在对 TRPV1 外周机制的研究中观察到，2 Hz 电针能减轻 L_5 脊神经结扎（SNL）模型大鼠不同时期的 DRG TRPV1 活化，从而缓解 SNL 大鼠的机械痛敏，但该作用能被 PKA 激动剂 db-cAMP 拮抗[13-15]。验证了神经病理痛的外周机制中存在 PKA-TRPV1 信号通路，且低频电针能通过抑制该信号通路发挥镇痛作用。本研究显示，SNI 神经病理痛大鼠术侧 SCDH PKA、TRPV1 的表达水平均显著升高，提示 PKA-TRPV1 信号通路也可能参与了神经病理痛的中枢敏化。电针镇痛是治疗疼痛的新共识，既往研究发现，2 Hz 电针能上调中枢内啡肽等阿片类物质的表达，发挥镇痛作用[11]。本研究同样观察到，2 Hz 电针能显著提高 SNI 模型大鼠的机械痛阈，同时显著下调 SCDH PKA、TRPV1 水平，提示低频电针可能抑制中枢 PKA、TRPV1 的水平，从而干预中枢疼痛信号的传递。

CGRP、SP 属于肽类神经递质，分布在神经系统辣椒素敏感的感觉神经元中。已有研究表明，脊髓背角中的 CGRP、SP 与 PKA、TRPV1 在痛觉敏化过程中呈现协同作用，CGRP、SP 与 PKA、TRPV1 之间可相互促进，使疼痛阈值进一步降低，痛觉敏感性增高[5,24-25]。本研究同样观察到，神经损伤后，SNI 大鼠伴随术侧 SCDHPKA、TRPV1 表达水平的上调，CGRP 和 SP 的水平也显著升高。2 Hz 电针能一致下调 SCDH CGRP、

SP 的水平,这可能是电针干预神经病理痛的中枢机制之一。

综上所述,本研究结果表明,在 SNI 神经痛模型的维持期,脊髓背角 PKA-TRPV1 信号通路活化,痛敏神经递质 CGRP、SP 水平上升。低频电针能改善 SNI 模型引起的神经病理痛,可能与其下调脊髓背角 PKA-TRPV1 通路与 CGRP、SP 水平有关。

参 考 文 献

[1] Jensen TS, Baron R, Haanpää M, et al. A new definition of neuropathic pain[J]. Pain,2011,152(10):2204-2205.

[2] Ramsey IS, Delling M, Clapham DE. An introduction to TRP channels[J]. Annu Rev Physiol,2006,68(1):619-647.

[3] Ma QP. Expression of capsaicin receptor (VR1) by myelinated primary afferent neurons in rats[J]. Neurosci Lett, 2002,319(2):87-90.

[4] Palazzo E, Luongo L, de Novellis V, et al. Moving towards supraspinal TRPV1 receptors for chronic pain relief[J]. Mol Pain,2010,6:66.

[5] Kanai Y, Nakazato E, Fujiuchi A, et al. Involvement of an increased spinal TRPV1 sensitization through its up-regulation in mechanical allodynia of CCI rats[J]. Neuropharmacology,2005,49:977-984.

[6] Malek N, Pajak A, Kolosowska N, et al. The importance of TRPV1-sensitisation factors for the development of neuropathic pain[J]. Mol Cell Neurosci,2015,65:1-10.

[7] Bhave G, Zhu W, Wang H, et al. cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation[J]. Neuron,2002,35(4):721-731.

[8] Sun RQ, Tu YJ, Lawand NB, et al. calcitonin gene-related peptide receptor activation produces PKA- and PKC- dependent mechanical hyperalgesia and central sensitization[J]. J Neurophysiol, 2004, 5(92):2859-2866.

[9] He Y, Wang Z. Paclitaxel, at ultra low sub-apoptotic doses, induces substance P release via synchronized activation of PKA and PKC[J]. J Pain,2010,11(4 Suppl):S25.

[10] Cheng RS, Pomeranz B. Electroacupuncture analgesia could be mediated by at least two pain-relieving mechanisms; endorphin and non-endorphin systems[J]. Life Sci, 1979,25(23):1957-1962.

[11] 韩济生.能否通过外周电刺激引起中枢神经肽的释放[J].北京大学学报(医学版), 2002,34(5):408-413.

[12] 孙瑞卿, 王贺春, 景峥, 等. 2 Hz 电针减轻神经源性痛大鼠的痛觉超敏和冷诱发的持续性疼痛[J].中国疼痛医学杂志,2003,9(4):220-224.

[13] Jiang YL, Yin XH, Shen YF, et al. Low frequency electroacupuncture alleviated spinal nerve ligation induced mechanical allodynia by inhibiting TRPV1 upregulation in ipsilateral undamaged dorsal root ganglia in rats[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013:1-9.

[14] 蒋永亮,尹小虎,沈亚芳,等.低频电针对脊神经结扎大鼠痛敏化的干预作用[J].中国康复理论与实践,2014,20(3):211-214.

[15] 蒋永亮,尹小虎,沈亚芳,等.低频电针改善 SNL 模型大鼠早期神经痛背根神经节辣椒素受体的机制[J].上海针灸杂志,2014,33(5):476-479.

[16] Isabelle D, Clifford JW. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain[J]. Pain,2000,87(2):149-158.

[17] 杜俊英,方剑乔,梁宜,等.大鼠脊髓提取改良法[J].中华病理学杂志,2011,40(2):115-116.

[18] 林露, 陶国才, 易斌. 3 种神经病理性疼痛大鼠模型的评价[J].重庆医学,2011,40(1):3-6.

[19] Pertin M, Allchorne AJ, Beggah AT, et al. Delayed sympathetic dependence in the spared nerve injury (SNI) model of neuropathic pain[J]. Mol Pain,2007,3(21):1-10.

[20] Xia R, Dekermendjian K, Lullau E, et al. TRPV1: a therapy target that attracts the pharmaceutical interests[J]. Adv Exp Med Biol, 2011,704:637-665.

[21] Chen Y, Willcockson HH, Valtschanoff JG. Influence of the vanilloid receptor TRPV1 on the activation of spinal cord glia in mouse models of pain[J]. Exp Neurol, 2009,220(2):383-390.

[22] Facer, Paul C, Maria AS, et al. Differential expression of the capsaicin receptor TRPV1 and related novel receptors TRPV3, TRPV4 and TRPM8 in normal human tissues and changes in traumatic and diabetic neuropathy[J]. BMC Neurol,2007,7(1):11.

[23] Bhave G, Zhu W, Wang H, et al. cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation[J]. Neuron,2002,35(4):721-731.

[24] Spicarová D, Palecek J. The role of spinal cord vanilloid (TRPV1) receptors in pain modulation[J]. Physiol Res, 2008,57(3):69-77.

[25] Vetter I, Wyse BD, Monteith GR, et al. Opioid agonist morphine modulates potentiation of capsaicin-evoked TRPV1 responses through a cyclic AMP-dependent protein kinase A pathway[J]. Mol Pain, 2006,1(2):22.

(修回日期:2017-04-13)
(本文编辑:凌　琛)