

电针治疗对神经病理性疼痛中嘌呤能受体的影响及其作用机制研究

程瑞动 叶祥明 杨婷 李琦 闻万顺 朱根应 李厥宝

浙江省人民医院、杭州医学院附属人民医院康复医学科,杭州 310014

通信作者:李厥宝,Email:lijuebao@126.com

【摘要】 目的 观察电针对 CCI 大鼠脊髓背角小胶质细胞激活和 P2X4 受体表达的影响,并进一步探讨同时干预 CCPA 特异性作用受体 A1 受体与 P2X4 受体是否在电针镇痛调节中存在强化镇痛效应。方法 选取成年清洁级健康 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠 40 只,体重 150~180 g。按随机数字表法分为假模组、CCI 模型组、电针组、腺苷 A1 受体激动剂 2-氯环戊腺苷 (CCPA) 组和电针 CCPA 组,每组大鼠 8 只。CCI 模型组、电针组、CCPA 组和电针 CCPA 组均建立大鼠 CCI 模型,假模组仅暴露坐骨神经。造模成功后,CCPA 组和电针 CCPA 组均行足三里和阳陵泉两穴位注射 CCPA 20 μ l, 0.1 mm/L; 电针组和电针 CCPA 组(穴位注射后)则接受电针治疗;假模组和 CCI 模型组不做 CCPA 和电针干预。于造模前和造模成功 20 d 后,对 5 组大鼠进行痛阈测定,包括机械缩足反射阈值 (MWT) 和热缩足反射潜伏期 (TWL)。于痛阈测定结束后,即刻处死大鼠,取出 L₄~L₆ 脊髓段,采用双标免疫组织化学染色法分析 5 组大鼠每个 P2X4R、OX42 阳性细胞的平均荧光强度。OX42 和 P2X4 受体的荧光密度与痛阈差值的相关性采用 Spearman 秩相关系数进行分析。结果 造模成功 20 d 后,CCI 模型组大鼠的 MWT 值和 TWL 值均显著低于假模组、电针组、CCPA 组和电针 CCPA 组,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。造模成功 20 d 后,CCI 模型组大鼠脊髓组织中 P2X4 和 OX42 的表达显著高于假模组、CCPA 组、电针组和电针 CCPA 组,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。通过分析 OX42 和 P2X4 受体的荧光密度与痛阈差值的相关性,确定 OX42 和 P2X4 受体的荧光密度与痛阈差值呈明显的正相关,相关系数分别为 0.907、0.717,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 CCI 后大鼠痛觉过敏与脊髓背角 P2X4 受体表达和小胶质细胞的活化相关,CCPA 和电针治疗均可降低 P2X4 受体的表达,抑制小胶质细胞的活化,同时干预 CCPA 作用受体 A1 受体和 P2X4 受体可增强电针的镇痛效应。

【关键词】 电针; 神经病理性疼痛; 嘌呤能受体; 镇痛

基金项目:国家自然科学基金青年基金 (81601965); 浙江省中医药科技计划 (2014ZB009); 浙江省自然科学基金 (LY15H170002); 浙江省医药卫生科技计划 (2016KYB014)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2019.01.003

Interactions of purinergic receptors in treating neuropathic pain using electroacupuncture

Cheng Ruidong, Ye Xiangming, Yang Ting, Li Qi, Wen Wanshun, Zhu Genying, Li Juebao

Department of Rehabilitation, Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, China

Corresponding author: Li Juebao, Email: lijuebao@126.com

【Abstract】 Objective To elucidate the mechanism underlying electroacupuncture's (EA's) amply-documented analgesic effect. To observe its effect on the pain threshold and on the expression of P2X4 receptor and microglia activation in the spinal cords of rats with neuropathic pain. To demonstrate whether or not interfering with A1 receptors and P2X4 receptors at the same time could enhance the analgesic effect. **Methods** A total of 40 Sprague-Dawley rats weighing 150 to 180 g were randomly divided into a sham group, a CCI group, an EA group, a 2-chloro-N(6)-cyclopentyladenosine (CCPA) group and a CCPA+EA group, each of 8. Chronic constriction injury (CCI) was induced successfully in the rats of all groups except the sham group. Five days later, EA and 20 μ L injections of 0.1 mm/L CCPA were applied to the rat analogues of the Zusanli (ST36) and Yanglingquan (GB34) acupoints once a day for 15 days for the rats in the appropriate groups. The mechanical withdrawal threshold (MWT) and the thermal withdrawal latency (TWL) were measured before the CCI operation and 20 days afterward. L₄-L₆ spinal cord tissue was then resected and the fluorescence intensity of P2X4 and OX42 receptors was detected using double label immunohistochemical staining. The correlation between the mean fluorescence intensity and the pain threshold gap was analyzed. **Results** The average MWT and TWL of the CCI group were significantly lower than in the other four groups. The expression of P2X4 receptor and OX42 in the spinal cord increased significantly in the CCI group compared to the other four groups. There was significant correlation between the mean fluorescence intensity of P2X4 and OX42 recep-

tors and the gap in pain threshold, with correlation coefficients of 0.907 and 0.717 respectively. **Conclusion** P2X4 receptor and microglia activation might be involved in the development of neuropathic pain. CCPA and EA can inhibit the activation of microglia and reduce the activity of P2X4 receptors. The interaction between A1 receptors and P2X4 receptors can strengthen the analgesic effect of EA.

【Key words】 Electroacupuncture; Neuropathic pain; Purinergic receptors; Analgesia

Fund program: National Natural Science Foundation of China (grant 81601965); Zhejiang Scientific Research Program in Traditional Chinese Medical Technology (grant 2014ZB009); Natural Science Foundation of Zhejiang Province (grant LY15H170002); Zhejiang Scientific Research in Medical Technology (2016KYB014)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2019.01.003

神经病理性疼痛是周围神经损伤后引起的顽固性疼痛,严重危害人类身心健康。临床中电针治疗神经病理性痛有显著疗效,已被广泛应用于临床^[1]。以往研究表明,脊髓小胶质细胞的激活和嘌呤能受体在神经病理性痛中起重要作用,即腺苷 A1 受体与 P2X4 受体参与了痛觉信息的传递^[2-3],而目前鲜见通过检测 OX42 来观察电针是否介导脊髓小胶质细胞的激活,以及 A1 受体与 P2X4 受体是否参与电针痛觉调制机制的相关研究。本课题在对嘌呤能受体参与电针镇痛机制的研究基础之上,采用坐骨神经慢性压迫性损伤模型(chronic constrictive injury, CCI),应用动物行为学、形态学以及分子生物学等方法研究电针对 CCI 大鼠脊髓背角小胶质细胞 OX42 和 P2X4 受体表达的影响,并进一步探讨同时干预 2-氯环戊腺苷(2-chloro-N(6)-cyclopentyladenosine, CCPA) 特异性作用受体 A1 受体与 P2X4 受体是否在电针痛觉调制中存在强化镇痛效应,以此阐明电针镇痛效应中的部分中枢机制,为临床优化电针应用和治疗方案提供依据。

材料与方法

一、实验动物及分组

选取成年清洁级健康 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠 40 只,体重 150~180 g。按随机数字表法分为假模组、CCI 模型组、电针组、CCPA 组和电针 CCPA 组,每组 8 只大鼠。

二、模型制备

CCI 模型组、电针组、CCPA 组和电针 CCPA 组均建立大鼠 CCI 模型,5%水合氯醛(0.6 ml/100 g 体重)腹腔注射麻醉;固定后大鼠右侧后肢去毛备皮,常规消毒,沿右股骨切开皮肤,钝性分离肌肉;暴露坐骨神经,用 4-0 号铬制羊肠线在坐骨神经分叉前以 1 mm 间隔打 4 次松结,使神经外膜稍稍受压,松紧度以大腿肌肉或足指轻微抽动,不影响神经外膜的血液循环为度,不可过紧,模型制备后大鼠出现跛行,足呈轻度外翻状,且有时出现舔舐、悬空等后肢保护现象,表明 CCI 制备成功^[4],假模组仅暴露坐骨神经 2~3 min,不做后续松结和受压处理。造模成功后所有大鼠均常规饲养,采

用国家标准固体混合饲料,自由饮食,室温 21~25 ℃,相对湿度 50%~70%,实验室保持昼夜 12 h 变化。

三、CCPA 和电针干预

造模成功后,CCPA 组和电针 CCPA 组均于足三里-阳陵泉两穴位注射 CCPA 20 μl,0.1 mm/L。将电针组和电针 CCPA 组(穴位注射后)大鼠固定于柔性大鼠针刺固定器上,相应部位剪毛备皮,安静后用 3 mm 皮内针针刺足三里和阳陵泉,垂直进针 2~3 mm。采用韩氏电针仪(HANS-200 A 型,南京产)、频率 2 Hz/100 Hz 疏密波,电刺激强度 2 mA,以腿部肌肉轻微抽动为度,每日 1 次,每次持续 30 min,连续干预 14 d。假模组和 CCI 模型组不做 CCPA 和电针干预。

四、痛阈监测

于造模前和造模成功 20 d 后,对 5 组大鼠进行痛阈测定,包括机械缩足反射阈值(mechanical withdrawal threshold, MWT)和热缩足反射潜伏期(thermal withdrawal latency, TWL)。MWT 采用 von Frey 痛觉测试仪(美国 IITC Life Science 公司)测定,大鼠安静状态下,对右后足底加压至逃避性抬腿或右后肢抽动,记录抬腿时施加于大鼠足底的最大力度(g),重复 3 次,间隔 5 min,取平均值。TWL 采用中国医学科学院生物医学工程研究所生产的 BME-410c 型热痛刺激仪测定,大鼠先适应环境 20 min,然后仪器会发射光照射大鼠右后爪足底中部皮肤,大鼠逃避性抬腿时,仪器会自动感应并切断热源,记录开始照射至出现缩足逃避反射时间(s),重复 3 次,间隔 10 min,取平均值(为防止大鼠脚底热辐射烫伤,将 TWL 的上限值定为 30 s)。

五、组织取材

于痛阈测定结束后,即刻采用 10%水合氯醛(0.4 ml/100 g 体重)腹腔注射深度麻醉后处死大鼠,迅速开胸经左心室至升主动脉插管,先以 100 ml 生理盐水洗去血液,随后用冷的(4 ℃)含 4%多聚甲醛的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)(pH7.4)先快后慢灌注固定 2 h,然后完整取出 L₄~L₆ 脊髓段。

六、双标免疫组织化学染色法

切片做抗 P2X4/OX42 的免疫荧光双标记显色,先将 L₄~L₆ 脊髓段不连续切片,将切片置于

0.01 mol/L PBS 中漂洗,放入含 0.3% 聚乙二醇辛基苯基醚的 0.01 mol/L PBS 中浸泡 30 min(室温),然后进行免疫荧光染色:①混有兔抗 P2X4 的抗体稀释液(1:400,美国 Chemicon 公司),P2X4 和小鼠抗 CD11b/c 单克隆抗体的抗体稀释液(1:400),孵育 24 h(室温),然后采用 0.01 mol/L PBS 液充分漂洗 3 次,每次 10 min;②混有异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的羊抗兔 IgG(1:500,美国 Sigma 公司)和 Texas red 标记的驴抗鼠 IgG(1:500,美国 Molecular Probes)荧光二抗避光放置 2~4 h(室温),然后采用 0.01 mol/L PBS 液充分漂洗 3 次,每次 10 min。切片经漂洗后裱片、晾干、封固后在荧光显微镜下观察并采集图象,并分析 5 组大鼠每个 P2X4R、OX42 阳性细胞的平均荧光强度。

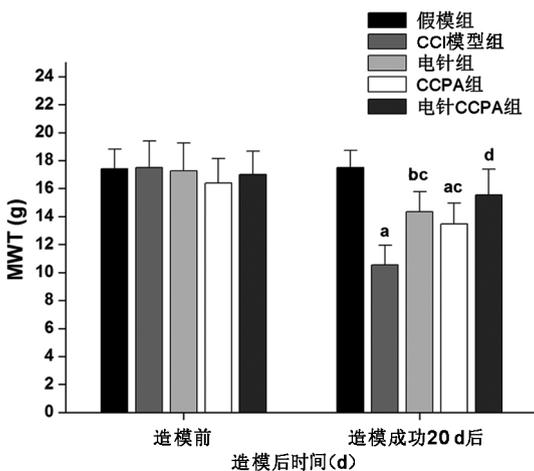
七、图像和统计学分析

图像分析采用 Image J v1.36 版和 Image Pro Plus v5.0 版软件。所得数据采用 SPSS 16.0 版软件进行分析统计,结果以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,后进行最小显著性差异法(least-significant difference, LSD)检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。OX42 和 P2X4 受体的荧光密度与痛阈差值的相关性采用 Spearman 秩相关系数进行分析,相关性系数 $r > 0.80$ 为优等,0.60~0.80 为良好。

结 果

一、5 组大鼠痛阈检测结果

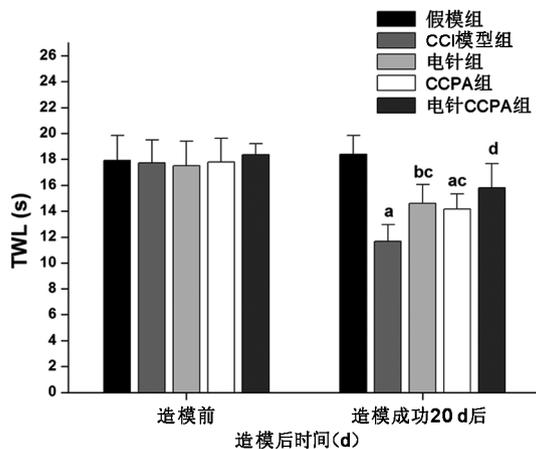
1. 5 组大鼠患侧 MWT 检测:图 1 可见,造模成功 20 d 后,CCI 模型组大鼠的 MWT 值显著低于假模组,差异有统计学意义($P < 0.01$);且电针组、CCPA 组和电针 CCPA 组大鼠的 MWT 值亦显著高于 CCI 模型组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。



注:与假模组比较,^a $P < 0.01$ 、^b $P < 0.05$;与 CCI 模型组比较,^c $P < 0.05$ 、^d $P < 0.01$

图 1 5 组大鼠 MWT 变化图

2. 5 组大鼠患侧 TWL 检测:图 2 可见,造模成功 20 d 后,CCI 模型组大鼠的 TWL 值显著低于假模组,差异有统计学意义($P < 0.01$);且电针组、CCPA 组和电针 CCPA 组大鼠的 TWL 值亦显著高于 CCI 模型组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。



注:与假模组比较,^a $P < 0.01$ 、^b $P < 0.05$;与 CCI 模型组比较,^c $P < 0.05$ 、^d $P < 0.01$

图 2 5 组大鼠 TWL 变化图

二、5 组大鼠 P2X4 和 OX42 的表达

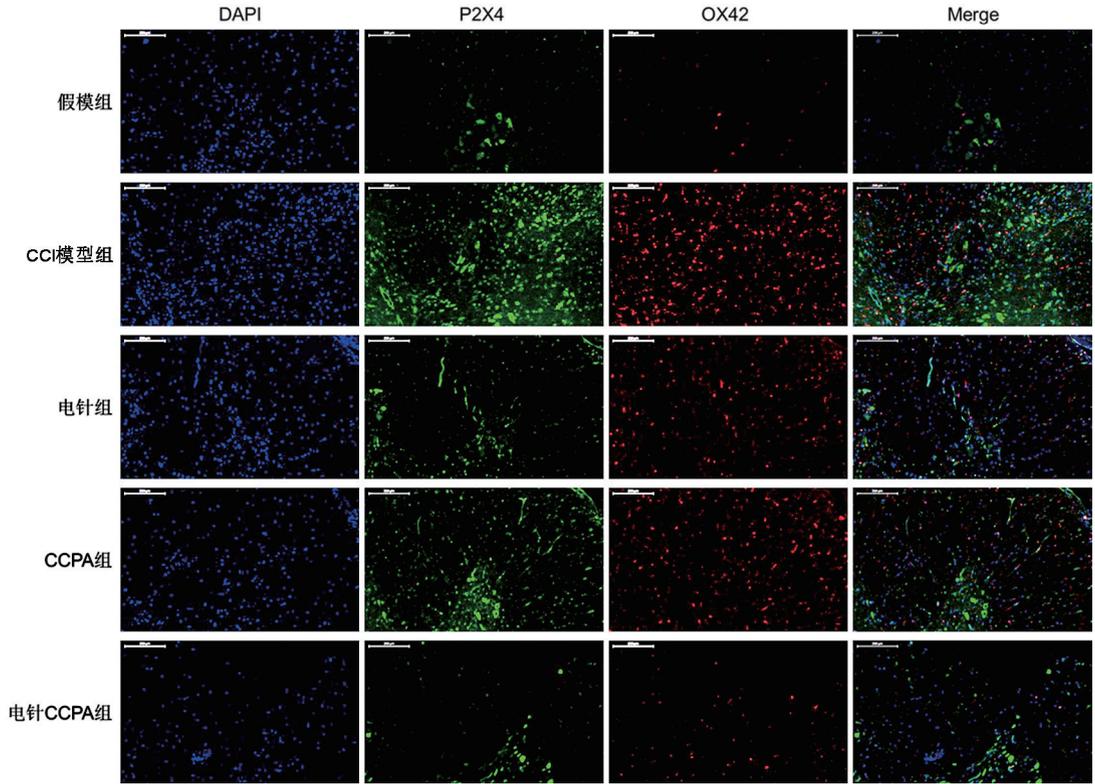
图 3 和图 4 中可见,造模成功 20 d 后,CCI 模型组大鼠脊髓组织中 P2X4 和 OX42 的表达显著高于假模组,差异均有统计学意义($P < 0.01$);且 CCPA 组、电针组和电针 CCPA 组大鼠脊髓组织中 P2X4 和 OX42 的表达亦显著低于 CCI 模型组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。图 3 和图 4 表明,CCI 后,大鼠脊髓背角 P2X4 受体及小胶质细胞活化增多,CCPA 和电针治疗均可降低 P2X4 受体表达,抑制小胶质细胞活化,其中以电针结合 CCPA 的效果最佳。

三、OX42 及 P2X4 的荧光密度与痛阈差值相关性分析

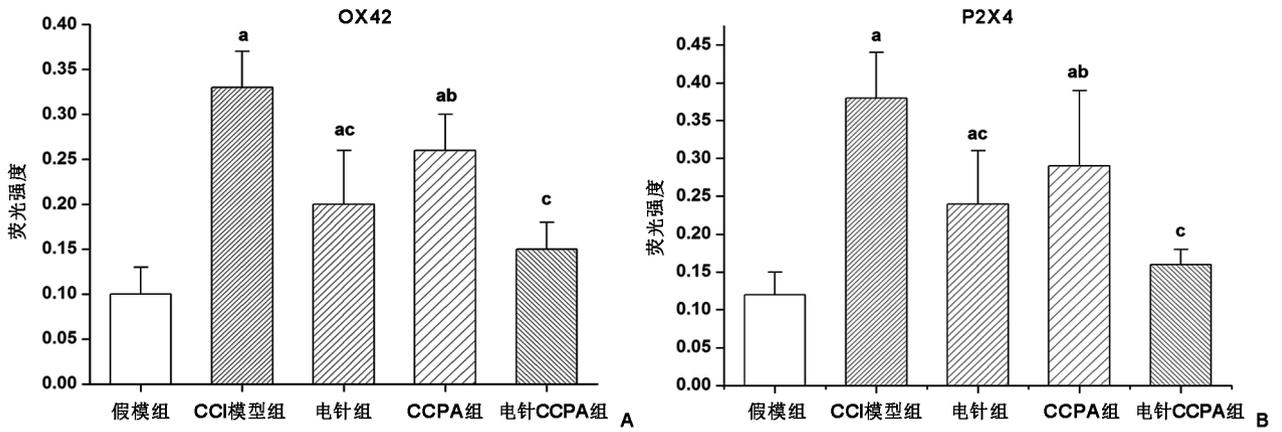
通过分析 OX42 和 P2X4 受体的荧光密度与痛阈差值的相关性,得出 OX42 和 P2X4 受体的荧光密度与痛阈差值呈明显的正相关,相关系数分别为 0.907、0.717,差异均有统计学意义($P < 0.01$),详见图 5。该结果提示,CCI 后痛觉过敏与 P2X4 受体和小胶质细胞的活化相关。

讨 论

本研究结果显示,CCI 后大鼠脊髓背角 P2X4 受体和小胶质细胞的活化增多,而 CCPA 和电针治疗均可降低 P2X4 受体的表达,抑制小胶质细胞的活化,其中以 CCPA 联合电针协同治疗的效果最佳,而大鼠痛觉过敏与脊髓背角 P2X4 受体和小胶质细胞的活化相关。



注:绿色标记 P2X4,红色标记 OX42;标尺=200 μm
图 3 5 组大鼠脊髓组织免疫荧光检测图(×100)



注:与假模组比较,^a $P < 0.01$;与 CCI 模型组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$

图 4 5 组大鼠脊髓组织中 P2X4 与 OX42 荧光强度变化

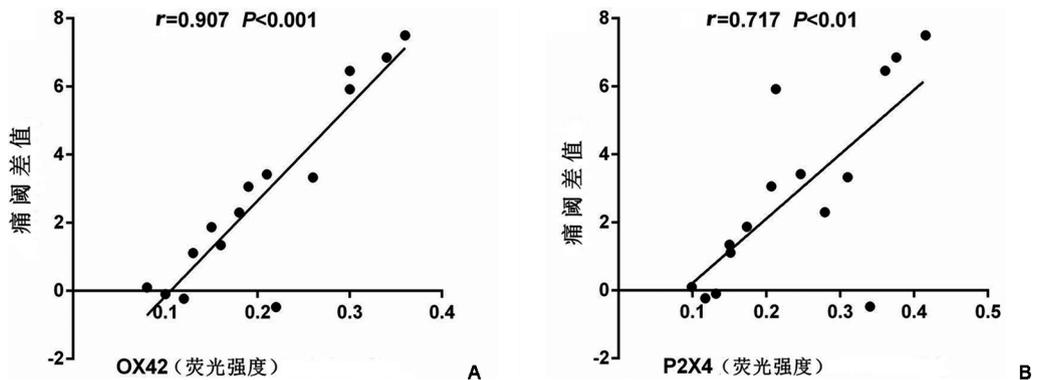


图 5 OX42 和 P2X 的荧光密度与痛阈差值的相关性

目前,电针已被广泛运用于临床治疗中,特别是因为其镇痛效果较好而常用于疼痛性疾病的治疗^[1]。国内外对电针镇痛原理的神经、神经化学及分子机制进行了大量研究,其中嘌呤类物质及其受体在电针镇痛效应中的作用引起广泛关注,且对嘌呤类物质在神经系统信号转导及其作用受体的研究也取得了较大的进展。神经病理性疼痛是由中枢或外周神经系统的损伤和功能紊乱引起的慢性疼痛,不仅对机体有害,而且持续时间长,常导致患者生活质量降低^[5]。研究证实,腺苷三磷酸和腺苷介导的信号传递在疼痛的传递和调控中具有重要作用,其可通过改变机体的功能来影响痛觉信息在脊髓背角的整合、传递和调控^[6]。近年来研究发现,小胶质细胞在神经病理性痛的发动和维持中起着重要的作用,小胶质细胞在神经损伤后出现形态学的变化,由“静止态”变为“激活态”^[7-10],激活后的脊髓背角的小胶质细胞伴随 P2X4 受体的表达上调,这在神经病理性疼痛痛觉过敏中起重要作用,而应用 P2X4 受体拮抗剂后脊髓背角激活的小胶质细胞数量明显减少,P2X4 受体的表达下调,痛觉过敏症状明显减轻甚至逆转^[11-12]。本研究结果也显示,OX42 和 P2X4 受体的荧光密度与痛阈差值呈较明显的正相关,表明 CCI 后痛觉过敏与 P2X4 受体和小胶质细胞活化相关。腺苷在参与疼痛的调节过程中,其镇痛作用主要由 A1 受体介导,有研究发现,缺少 A1 受体的神经病理性疼痛模型大鼠对疼痛刺激变得更为敏感,其主要在脊髓水平调节疼痛信息的传递^[13-14],给予 A1 受体特异性激动剂 CCPA 能减轻疼痛性伤害,在 A1 受体介导针刺镇痛的研究中发现针刺镇痛效应需要腺苷 A1 受体的参与^[15-16]。在本实验中,CCPA 干预可明显降低 CCI 大鼠的痛觉过敏症状,再次验证了该实验结果,同时本研究还发现,CCPA 可降低 P2X4 受体的表达,提示 CCPA 作用受体与 P2X4 受体在神经病理性疼痛的发生发展中存在相关性。

综上所述,CCI 大鼠痛觉过敏与脊髓背角 P2X4 受体及小胶质细胞活化相关,CCI 后,大鼠脊髓背角 P2X4 受体和小胶质细胞活化增强,CCPA 和电针治疗可降低 P2X4 受体的表达,抑制小胶质细胞的活化,且以 CCPA 联合电针治疗的效果最佳,同时干预 A1 受体和 P2X4 受体在电针镇痛调制中可强化电针的镇痛效应,本研究结果较好的阐明了电针治疗神经病理性疼痛发生、发展的机制和规律,为发现更具有针对性的疼痛治疗的靶点提供了依据。

参 考 文 献

[1] Yin C, Buchheit TE, Park JJ. Acupuncture for chronic pain: an update and critical overview[J]. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2017, 30(5):

583-592. DOI: 10.1097/ACO.0000000000000501.

- [2] 程瑞动,屠文展,蒋松鹤.电针镇痛效应中嘌呤类物质及其受体的作用研究进展[J].*中国疼痛医学杂志*, 2012, 18(1): 53-56. DOI: 10.3969/j.issn.1006-9852.2012.01.019.
- [3] Tu WZ, Cheng RD, Cheng B, et al. Analgesic effect of electroacupuncture on chronic neuropathic pain mediated by P2X3 receptors in rat dorsal root ganglion neurons[J]. *Neurochem Int*, 2012, 60(4): 379-386. DOI: 10.1016/j.neuint.2012.01.006.
- [4] Fox A, Kesingland A, Gentry C, et al. The role of central and peripheral Cannabinoid1 receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain[J]. *Pain*, 2001, 92(1-2): 91-100.
- [5] Zhao ZQ. Neural mechanism underlying acupuncture analgesia[J]. *Prog Neurobiol*, 2008, 85(4): 355-375. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2008.05.004.
- [6] Cheng RD, Tu WZ, Wang WS, et al. Effect of electroacupuncture on the pathomorphology of the sciatic nerve and the sensitization of P2X(3) receptors in the dorsal root ganglion in rats with chronic constrictive injury[J]. *Chin J Integr Med*, 2013, 19(5): 374-379. DOI: 10.1007/s11655-013-1447-1.
- [7] Nell PG, Albrecht-Küpper B. The adenosine A1 receptor and its ligands[J]. *Prog Med Chem*, 2009, 47: 163-201. DOI: 10.1016/S0079-6468(08)00204-X.
- [8] Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K. Purinergic system, microglia and neuropathic pain[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2012, 12(1): 74-79. DOI: 10.1016/j.coph.2011.10.014.
- [9] Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K. Pain and purinergic signaling[J]. *Brain Res Rev*, 2010, 63(1-2): 222-32. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2009.11.003.
- [10] Trang T, Beggs S, Salter MW. ATP receptors gate microglia signaling in neuropathic pain[J]. *Exp Neurol*, 2012, 234(2): 354-361. DOI: 10.1016/j.expneurol.2011.11.012.
- [11] Trang T, Salter MW. P2X4 purinoreceptor signaling in chronic pain[J]. *Purinergic Signal*, 2012, 8(3): 621-628. DOI: 10.1007/s11302-012-9306-7.
- [12] Beggs S, Trang T, Salter MW. P2X4R+ microglia drive neuropathic pain[J]. *Nat Neurosci*, 2012, 15(8): 1068-1073. DOI: 10.1038/nn.3155.
- [13] Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, et al. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury[J]. *Nature*, 2003, 424(6950): 778-783. DOI: 10.1038/nature01786.
- [14] Luongo L, Petrelli R, Gatta L, et al. 5'-Chloro-5'-deoxy-(±)-ENBA, a potent and selective adenosine A(1) receptor agonist, alleviates neuropathic pain in mice through functional glial and microglial changes without affecting motor or cardiovascular functions[J]. *Molecules*, 2012, 17(12): 13712-13726. DOI: 10.3390/molecules171213712.
- [15] Yamaguchi D, Terayama R, Omura S, et al. Effect of adenosine A1 receptor agonist on the enhanced excitability of spinal dorsal horn neurons after peripheral nerve injury[J]. *Int J Neurosci*, 2014, 124(3): 213-222. DOI: 10.3109/00207454.2013.842566.
- [16] Goldman N, Chen M, Fujita T, et al. Adenosine A1 receptors mediate local anti-nociceptive effects of acupuncture[J]. *Nat Neurosci*, 2010, 13(7): 883-888. DOI: 10.1038/nn.2562.

(修回日期:2018-10-30)

(本文编辑:阮仕衡)