

· 基础研究 ·

电针对慢性压迫性损伤大鼠脊髓 N-甲基-D-天门冬氨酸受体 NR2B 表达的影响 *

高永辉¹ 陈淑萍¹ 王俊英¹ 乔丽娜¹ 徐秋玲¹ 刘俊岭^{1,2}

摘要

目的:观察电针对慢性压迫性损伤(CCI)大鼠脊髓 N-甲基-D-天门冬氨酸受体 NR2B 表达的影响,分析电针(EA)累积性镇痛效应可能的作用机制。

方法:将 50 只 Wistar 大鼠随机分为正常对照组、CCI 模型组、EA3 次组、EA5 次组、EA10 次组,每组 10 只。对照组大鼠行假手术,其余 4 组结扎坐骨神经造成 CCI 疼痛模型。手术后一周开始测定大鼠双侧缩腿的潜伏期(PWL)。EA3 次组于 CCI 术后第 14 天电针双侧“足三里”-“阳陵泉”连续 3d,EA5 次组于 CCI 术后第 12 天电针双侧“足三里”-“阳陵泉”连续 5d,EA10 次组于 CCI 术后第 7 天电针双侧“足三里”-“阳陵泉”连续 10d,每天 1 次。电针结束后用 RT-PCR 和 Western blot 法检测脊髓 NMDA 受体 NR2B 表达的情况。

结果:与对照组比较,CCI 后各组动物出现明显的痛觉过敏($P<0.01$)。EA5 次后动物的痛觉过敏有明显减轻。EA10 次后动物的痛觉过敏进一步减轻。CCI 后第 18 天大鼠脊髓 NMDA 受体 NR2B 亚基 mRNA 和蛋白表达水平明显增加,与 CCI 组,EA5 次组和 EA10 次组比较 NMDA 受体 NR2B 亚基 mRNA 和蛋白表达水平明显下降($P<0.05$)。

结论:NR2B 表达上调可能是神经损伤后出现慢性疼痛的发病机制之一,电针有可能通过抑制其表达从而发挥一定程度镇痛作用。

关键词 N-甲基-D-天门冬氨酸受体 NR2B;脊髓;电针;慢性压迫性损伤;疼痛

中图分类号:R245 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2010)-11-1026-04

Effect of repeated electroacupuncture on the expression of NR2B subunit of N-methyl-D-aspartate receptor in the spinal cord of rats with chronic constrictive injury/GAO Yonghui, CHEN Shuping, WANG Junying, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 25(11): 1026—1029

Abstract

Objective: To observe the effect of repeated electroacupuncture (EA) on the expression of NR2B subunit of NMDA receptor in the lumbar spinal cord in rats with chronic constrictive injury (CCI) pain, so as to analyze the analgesic mechanism of repeated acupuncture.

Method: A total of 50 Wistar rats were randomized into control, CCI model, EA 3 times, EA 5 times and EA 10 times groups, with 10 cases in each group. CCI pain model was established by loosely ligating the sciatic nerve near the proximal and of the bifid site. The animals' paw withdrawal latency (PWL) of radiant heat irradiation was recorded before EA everyday. The difference values between the affected limb and the healthy limb were used to judge the changes of pain threshold. EA(2/15Hz, 1mA) was respectively applied to bilateral "Zusanli"(ST36)-"Yanlingquan"(GB34) for 30 min, once daily for EA 3 times, EA 5 times and EA 10 times groups respectively. The spinal cord tissues of the L2—6 segments were removed for detecting the expressions of NR2B mRNA and protein of NR2B receptor with reversed transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting techniques

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2010.11.002

* 基金项目:国家自然科学基金重大项目(90709031),中国中医科学院自主选题研究项目(Z02012)

1 中国中医科学院针灸研究所,北京,100700; 2 通讯作者

作者简介:高永辉,女,硕士,主管技师;收稿日期:2009-11-11



separately.

Result: In comparison with control group, PWL difference value of CCI, EA 3 times, EA 5 times, EA 10 times groups increased significantly ($P<0.01$), suggesting a marked decrease of pain threshold. Compared with CCI group, PWLs of EA 5 times and EA10 times decreased significantly ($P<0.01$), showing a better cumulative analgesic effect. At the same time, the NR2B mRNA and protein levels decreased with the increasing times of EA.

Conclusion: The levels of NR2B subunit in spinal cord of rats with neuropathic pain were higher, which may be one of the causes of neuropathic pain and NR2B subunit involved in the accumulative effect of EA in the rat with CCI.

Author's address Institute of Acupuncture and Moxibustion, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100700, China

Key words N-methyl-D-aspartate receptor 2B subunit; spinal cord; electroacupuncture; chronic constrictive injury; pain

临床与动物实验均已证实,电针能明显提高坐骨神经慢性压迫性损伤所致神经痛的痛阈,其疗效随着治疗次数的增加而明显增强^[1-3],但其效应的中枢机制尚不明确。已有研究证明 N-甲基-D-天门冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)受体对诱发和维持疼痛状态中的中枢敏感性具有重要作用,其亚基可决定 NMDA 受体的功能特性,其中 NR2B 亚基对伤害感受尤为重要^[4-5]。为了探讨 NMDA 受体 NR2B 亚基在电针镇痛中的作用,本研究采用结扎大鼠坐骨神经造成慢性压迫性损伤(chronic constrictive injury, CCI)疼痛模型,观察电针不同时间对动物行为学反应及脊髓腰段 NMDA 受体 NR2B 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

健康雌性 Wistar 大鼠 50 只,体重 240—310g,购自协和医科大学实验动物中心。随机分为对照组、CCI 模型组、电针(electroacupuncture, EA)3 次组,EA5 次组,EA10 次组,每组 10 只。对照组大鼠行假手术,其余 4 组结扎坐骨神经造成 CCI 疼痛模型。手术后 1 周用 37370 爪痛觉测试仪开始测定大鼠双侧缩腿的潜伏期(paw withdrawal latency, PWL)。动物自由饮水和常规喂养。

1.2 CCI 模型制备

于 Wistar 大鼠右侧臀部分离坐骨神经后,在该神经分叉的近心端松松做 4 个结扎,造成 CCI 疼痛模型。手术后 1 周开始测定大鼠双侧 PWL,用患-健

侧 PWL 的差值作为疼痛反应的变化值,每只动物重复测量 3 次,每次间隔 5min。每日测痛后电针双侧“足三里”-“阳陵泉”。

1.3 电针

EA3 次组于 CCI 术后第 14 天电针双侧“足三里”-“阳陵泉”连续 3d, EA5 次组于 CCI 术后第 12 天电针双侧“足三里”-“阳陵泉”连续 5d, EA10 次组于 CCI 术后第 7 天电针双侧“足三里”-“阳陵泉”连续 10d, 每天 1 次。每侧穴位各刺一个半寸针灸针(苏州针厂产品),连接 HANS 针灸仪(LH 202 型)的输出端。电针参数为:2/100Hz, 1mA, 2/15Hz, 30min。

1.4 NMDA 受体 NR2B 亚基 mRNA 表达水平测定

电针结束后 5 组动物深度麻醉后断头处死,取脊髓腰 L2-L6 段,用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 NMDA 受体 NR2B 表达的情况。引物如下:

P1 5'TGGACGATGGCGACTCTA3',
P2 5'CTCTTGGGCTCAGGGATG3'.
β-actin: P1 5'CAACACCCAGCCATGTA3',
P2 5'ATACCCAGGAAGGAAGGC3'.

PCR 反应条件: 94℃ 预变性 5min, 94℃ 1min, 53℃ 1min, 72℃ 45s, 30 个循环, 72℃ 延伸 10min 后结束。琼脂糖电泳后,用图像分析系统进行图像分析,以目的条带的吸光度值/内参的吸光度值表示基因表达的相对水平。

1.5 NMDA 受体 NR2B 亚基蛋白表达水平测定

NR2B 多克隆抗体购于博士德生物工程有限公司,辣根过氧化物酶标记兔抗羊抗体购于中山公司。大鼠断头处死后,迅速取脊髓 L2-L6 段,冰

浴中匀浆、离心,Lowry 法测蛋白浓度。50 μ g/孔等量蛋白样品经 SDS-PAGE 分离后,半干法转印,15V 恒压 40min,将凝胶中的蛋白质转移至 PVDF 膜上。PVDF 膜以 BSA 室温封闭 2h, NR2B 抗体工作浓度为 1:400,室温反应过夜,用 TBST 摇动洗膜 3 次(10min/次),去除残留的一抗。辣根过氧化物酶标记的兔抗羊 IgG 工作浓度为 1:1000,室温反应 2h。二抗孵育结束后,用 TBST 摇动洗膜 3 次(10min/次),去除残留的二抗。化学发光法显色,凝胶扫描系统分析蛋白条带的吸光度,以目的条带的吸光度值/内参的吸光度值表示蛋白表达的相对水平。

1.6 统计学分析

所有数据以均数 $\pm$ 标准差表示。组间差异分析用单因素方差分析,各组间均数的两两比较采用 LSD 检验, $P<0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 电针对 CCI 大鼠行为学的影响

结扎坐骨神经建立慢性痛模型前,各组动物 PWL 的差值差异没有显著性意义($P>0.05$),说明各组动物基础痛阈的值无明显区别。表 1 的结果表明与结扎前比较,结扎坐骨神经后动物痛阈明显降低($P<0.01$),4 组动物无明显差异。与 CCI 后比较,电针 5 次后大鼠痛域有所恢复($P<0.05$);与电针 5 次后比较,电针 10 次后大鼠痛域进一步恢复($P<0.05$)。

2.2 电针对脊髓 NMDA 受体 NR2B 亚基 mRNA 及蛋白表达的影响

见图 1—2。从表 2 中我们可以看出,CCI 后第 18 天脊髓 NMDA 受体 NR2B 亚基 mRNA 和蛋白表达水平明显增加,与 CCI 组相比,EA5 次组和 EA10 次组 NMDA 受体 NR2B 亚基 mRNA 及蛋白表达水平明显下降($P<0.05$),其中 EA10 次组 NMDA 受体 NR2B mRNA 表达水平接近正常组($P>0.05$)。

表 1 电针对 CCI 大鼠双侧 PWL 差值的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	造模前	CCI 后 8 天	CCI 后 18 天
正常对照组	10	0.34 $\pm$ 0.25	0.41 $\pm$ 0.21	0.16 $\pm$ 0.26
CCI 模型组	10	0.18 $\pm$ 0.15	8.05 $\pm$ 0.82 ^①	5.79 $\pm$ 0.39 ^①
EA3 次组	10	0.38 $\pm$ 0.16	7.68 $\pm$ 0.38 ^①	5.47 $\pm$ 0.41 ^①
EA5 次组	10	0.36 $\pm$ 0.19	7.68 $\pm$ 0.45 ^①	3.94 $\pm$ 0.50 ^{①②③}
EA10 次组	10	0.27 $\pm$ 0.24	8.11 $\pm$ 0.52 ^①	2.81 $\pm$ 0.40 ^{①②③④}

①与正常对照组相比 $P<0.05$; ②与 CCI 模型组相比 $P<0.05$; ③与 EA3 次组相比 $P<0.05$; ④与 EA5 次组相比 $P<0.05$ 。

表 2 各组脊髓 L2-L6 段 NMDA 受体 NR2B

亚基 mRNA 及蛋白表达吸光度值比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	NR2B mRNA	NR2B 蛋白
正常对照组	10	0.47 $\pm$ 0.09	0.39 $\pm$ 0.12
CCI 模型组	10	1.44 $\pm$ 0.33 ^①	0.93 $\pm$ 0.34 ^①
EA3 次组	10	1.23 $\pm$ 0.36 ^①	0.91 $\pm$ 0.24 ^①
EA5 次组	10	0.72 $\pm$ 0.28 ^{①②③}	0.70 $\pm$ 0.16 ^{①②③}
EA10 次组	10	0.66 $\pm$ 0.15 ^{②③}	0.60 $\pm$ 0.12 ^{①②③}

①与正常对照组相比 $P<0.05$; ②与 CCI 模型组相比 $P<0.05$; ③与 EA3 次组相比 $P<0.05$

图 1 RT-PCR 法检测 EA 对 NMDA 受体 NR2B mRNA 表达的影响

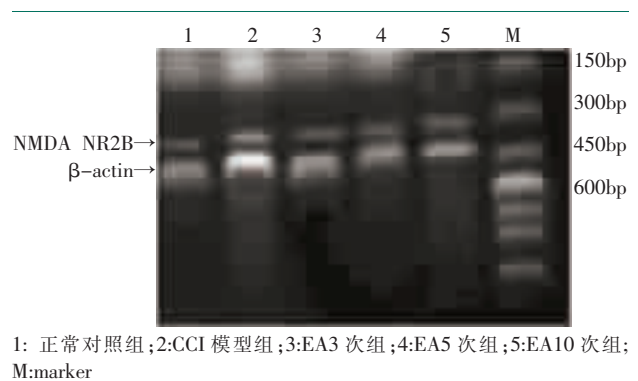
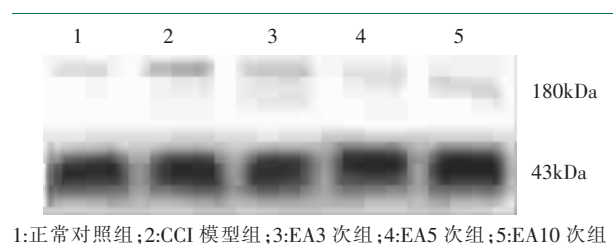


图 2 Western-blot 法检测 EA 对 NMDA 受体 NR2B 蛋白表达的影响



1:正常对照组;2:CCI 模型组;3:EA3 次组;4:EA5 次组;5:EA10 次组

3 讨论

针刺镇痛源于中国古代针灸实践,优点为经济、安全、简单、易行,临床和动物实验还表明:多次重复针刺具有累积效应,多个疗程的针刺治疗可明显改善坐骨神经痛等患者的临床症状,其疗效随着治疗次数的增加而明显增强^[6-8]。本实验中,我们按照 Bennett 等^[9]的方法成功建立了大鼠坐骨神经 CCI 动物模型,CCI 术后第 3 天起大鼠即开始出现患足屈曲、后伸、足趾肿胀发亮,足掌不能平伸着地,术后第 7 天后这些外在症状有所好转,但测其辐射热痛域却表现出非常明显的痛觉过敏,此时的表现与人类坐骨神经损伤后神经病理性疼痛的临床表现非常相似。

神经病理性疼痛的发生机制一直是神经生物学领域内的重大课题。脊髓背角是痛觉信息传入的中继站,是疼痛刺激调节的关键部位。电针在脊髓水平的调制作用主要体现在影响脊髓内分子水平的变化,包括影响多种参与痛觉调制的递质、受体、细胞因子的表达。谷氨酸为脑和脊髓内主要的兴奋性神经递质,NMDA受体为兴奋性氨基酸受体的一种,大鼠NMDA受体是一个异聚体复合物,形成配基门控离子通道,由NR1、NR2A-D和NR3组成,其中NR2B受体亚单位是受体复合物的重要调节亚单位,已有证据证明NMDA受体对诱发和维持疼痛状态中的中枢敏感性具有重要作用^[10],其亚基可决定NMDA受体的功能特性,其中NR2B亚基对伤害感受尤为重要,它主要分布于与疼痛传导密切相关的前脑和脊髓背角的I层和II层,选择性阻断NR2B亚基的药物可缓解疼痛,因此推测NR2B可能是介导疼痛的关键亚基^[11]。本实验结果表明CCI后第19天NMDA 2B亚基 mRNA及蛋白表达水平明显增高,与文献报道一致^[10],说明NMDA 2B参与CCI后的痛觉调制。

电针对疼痛有明显的调制作用,这已被众多的行为学实验所证实。电针能显著抑制福尔马林导致的大鼠缩腿、舔爪等自发痛行为反应^[13-14]。在本研究中我们发现电针3次后,动物的热痛域变化不大,脊髓相应阶段中NMDA受体NR2B亚基 mRNA及蛋白表达水平变化也不大。电针5次后,电针效果表现出明显的累积效应,这与佟帅等对CCI及电针后对运动终板的观察结果一致^[15],而此时脊髓相应阶段中NMDA受体NR2B亚基 mRNA及蛋白表达水平明显下降,此后随着电针次数的增加,动物的痛觉过敏明显减轻,脊髓相应阶段中NMDA受体NR2B亚基 mRNA及蛋白表达水平也明显下降,至电针10次时NR2B亚基 mRNA表达已接近正常,但此时痛觉过敏和蛋白表达仍高于正常,提示:①NMDA 2B亚基参与调控电针镇痛信息;②在电针治疗过程中,NR2B亚基 mRNA和蛋白出现非同步表达,说明可能存在转录后修饰调控机制;③在电针治疗过程中,NR2B亚基 mRNA表达和痛域变化出现非同步现

象,说明除了NMDA 2B亚基参与调控电针镇痛信息外,还有可能存在其他的调控分子。

参考文献

- [1] 刘俊岭,陈淑萍,高永辉,等.不同强度、不同频度电针对慢性痛大鼠镇痛作用的比较[J].针刺研究,2006,31(5):280.
- [2] Hwang BG, Min BI, Kim JH, et al. Effects of electroacupuncture on the mechanical allodynia in the rat model of neuropathic pain[J].Neurosci Lett, 2002,320(1-2):49.
- [3] 邵水金,单宝枝.电针对大鼠坐骨神经损伤后的修复作用[J].中国康复医学杂志,1997,12(4):184.
- [4] 杨向红,王彦青,高秀,等.电针对大鼠神经痛敏分数的影响[J].针刺研究,2002,27(1):60.
- [5] 罗非.反复电针对慢性痛的累加治疗作用及其机制研究[J].生理科学进展,1996,27(3):241.
- [6] Loftis JM, Janowsky A. The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications[J]. Pharmacol Ther,2003,97(1):55-85.
- [7] 董国兴,杨日芳,李锦,等.选择性N-甲基-D-天门冬氨酸受体NR2B亚型阻滞剂的研究进展 [J]. 中国新药杂志,2006,15(23):2013.
- [8] 徐秋玲,陈淑萍,高永辉,等.累加电针对坐骨神经痛大鼠海马及下丘脑突触素表达的影响[J].中国康复医学杂志,2009,24(6):498.
- [9] Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man[J]. Pain,1988,33(1):87.
- [10] 王景阳.疼痛与N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体[J].实用疼痛学杂志,2005,1(2):111.
- [11] Taniguchi K, Shinjo K, Mizutani M, et al. Antinociceptive activity of CP-101,606, an NMDA receptor NR2B subunit antagonist[J]. Br J Pharmacol,1997,122(5):809.
- [12] 虞雪融,黄宇光,许力.神经病理性疼痛大鼠脊髓NMDA受体NR2B亚基的表达[J].临床麻醉学杂志,2007,23(3):215.
- [13] Choi BT, Kang J, Jo UB. Effects of electroacupuncture with different frequencies on spinal ionotropic glutamate receptor expression in complete Freund's adjuvant-injected rat[J]. Acta Histochem,2005,107(1):67.
- [14] Wang L, Zhang Y, Dai J, et al. Electroacupuncture (EA) modulates the expression of NMDA receptors in primary sensory neurons in relation to hyperalgesia in rats [J]. Brain Res, 2006,1120(1):46.
- [15] 佟帅,王胜,孙忠人,等.针刺疗法对大鼠坐骨神经损伤后运动终板的影响[J].中国康复医学杂志,2007,22(6):533.