

·基础研究·

针刀用于腰椎间盘突出症根性神经痛大鼠中枢镇痛的机制研究*

崔成竣¹ 郭长青^{1,3} 付伟涛¹ 梁楚西¹ 黄怡然¹ 孙红梅²
许红² 郭健² 赵淑英² 张丽萍¹ 朴起范¹

摘要

目的:观察针刀疗法对腰椎间盘突出症根性神经痛大鼠下丘脑和脊髓中5-羟色胺、 β -内啡肽含量的影响,探讨针刀疗法对腰椎间盘突出症根性神经痛干预作用的可能机制。

方法:将40只雄性SD大鼠随机分为正常组、假模型组、模型组、针刀组,共4组,每组10只。用热痛测试仪检测各组大鼠造模前后的缩爪潜伏期;HE染色观察L5神经根的病理学变化;造模后第8天分别取各组大鼠下丘脑和脊髓,采用双抗夹心ELISA方法检测下丘脑和脊髓中5-羟色胺、 β -内啡肽的含量。

结果:模型组下丘脑和脊髓中5-羟色胺含量较正常组显著降低,差异有显著性意义($P < 0.05$),针刀组较模型组显著升高,差异有显著性意义($P < 0.05$);模型组 β -内啡肽含量较正常组显著升高,差异有显著性意义($P < 0.01$),针刀组较模型组显著降低,差异有显著性意义($P < 0.05$)。

结论:针刀治疗可调节中枢疼痛相关递质5-羟色胺和 β -内啡肽的合成和分泌,降低中枢痛觉传递和痛觉过敏,从而有效地发挥了镇痛作用。

关键词 针刀疗法;腰椎间盘突出症;根性神经痛;5-羟色胺; β -内啡肽

中图分类号:R681.5, R245 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2015)-04-0324-05

Effects of acupotomy on central analgesic mechanism of radicular pain of lumbar disc herniation in rats/
CUI Chengjun, GUO Changqing, FU Weitao, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2015, 30
(4): 324—328

Abstract

Objective: To observe effects of acupotomy on 5-hydroxytryptamine(5-HT) and β -endorphin(β -EP) in hypothalamus and spinal cord of rats with discogenic radiculalgia, so as to explore possible mechanism of acupotomy.

Method: Forty male SD rats were randomly divided into four groups: normal group, sham model group, model group and acupotomy group, 10 rats in each group. Samples were taken on the 8th d after modeling. The hypothalamus and spinal cord were taken to observe the changes of 5-HT and β -EP by ELISA.

Result: In model group, 5-HT in hypothalamus and spinal cord decreased significantly ($P < 0.05$) compared with normal group, in acupotomy group those increased compared with model group ($P < 0.05$); In model group, β -EP in hypothalamus and spinal cord increased significantly ($P < 0.05$) compared with normal group, in acupotomy group those decreased compared with model group ($P < 0.05$).

Conclusion: Acupotomy had benign effects on regulating 5-HT and β -EP in hypothalamus and spinal cord of rats with lumbar disc herniation and reducing central neurotransmission and hyperalgesia, so as to provide analgesic effect.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2015.04.003

*基金项目:北京中医药大学自主课题项目(53210100604209)

1 北京中医药大学针灸推拿学院,北京,100029; 2 北京中医药大学基础医学院; 3 通讯作者
作者简介:崔成竣,男,硕士研究生; 收稿日期:2014-06-13

Author's address College of Acupuncture and Moxibustion, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing, 100029

Key word acupotomy; lumbar disc herniation; radicular pain; 5-hydroxytryptamine; β -endorphin

腰椎间盘突出症(lumbar disc herniation, LDH),又称“腰椎纤维环破裂症”或“腰椎髓核脱出症”。整脊学概括为“由于外力作用引起腰椎骨关节旋转、倾斜、错位,导致椎间盘突出椎间孔或椎管,刺激到脊神经或下丘脑和脊髓;或因骨关节错位、椎间孔移位,导致神经根位移与椎间盘产生卡压,引起腰椎活动障碍、腰痛、下肢放射性疼痛,称腰椎间盘突出症”^[1]。大量的临床报道肯定了针刀治疗腰椎间盘突出症的疗效^[2-4],但其作用机制仍处于论证阶段。本实验通过观察腰椎间盘突出症根性神经痛大鼠下丘脑和脊髓中5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、 β -内啡肽(β -endorphins, β -EP)含量的变化,探讨针刀疗法的中枢镇痛机制。

1 材料与方

1.1 动物与分组

清洁级SD雄性健康大鼠40只,体重(250±20)g。由北京维通利华实验动物技术有限公司提供(动物生产许可批号SCXK(京)2001-0001),北京中医药大学针灸推拿学院针灸机制实验室动物室喂养。适应性饲养7天后,随机分为正常组、假模型组、模型组、针刀组,每组各10只。

1.2 主要仪器

汉章系列一次性使用针刀,规格0.4mm×40mm(汉章针刀,北京卓越华友医疗器械有限公司);骨科手术器械(手术刀、剪、镊、钳);9号腰椎穿刺针(扬州市江洲医疗器械有限公司);低温离心机(德国Eppendorf公司,5810R);MDF-U50A超低温冰箱(日本SANYO公司);AE-160电子天平(瑞士METTLER公司);匀浆器、96孔板、移液器、离心管、医用缝合针、4号缝皮丝线;Thermo Multiskan MK3酶标仪(产地:芬兰)。

1.3 主要试剂

75%酒精(北京海德润制药有限公司);碘伏消毒剂(武汉同济美迪生科技有限公司);0.9%氯化钠注射液(四川科伦药业股份有限公司);盐酸利多卡因注射液(浙江泰康药业集团有限公司);水合氯醛

(北京化学试剂厂);大鼠5-HT、 β -EP ELISA测定试剂盒(北京瑞格博科技有限公司)。

1.4 造模方法

运用陆志东^[5]非压迫性椎间盘髓核突出模型造模方法。本实验操作者首先进行了预实验,并且在操作方法熟练掌握的基础上进行了本实验的造模,具体操作如下。

自体髓核混悬液的制备:术前1天,大鼠背部用脱毛剂脱毛。10%水合氯醛0.35ml/100g腹腔麻醉,无菌条件下距尾部1cm处切下鼠尾并缝合伤口。切开尾部椎间盘,见髓核呈胶冻样约10mg,取5个髓核,按每1mg加入1 μ l生理盐水配比,充分搅拌稀释成混悬液备用。

模型组:将大鼠腰椎置于屈曲侧卧位,以L4—L5棘突间隙为穿刺点,用9号腰椎穿刺针行硬膜外穿刺,成功后注射20 μ l大鼠自体髓核混悬液,接着将2%利多卡因30 μ l注射到硬膜外腔。

假模型组:麻醉、断尾、硬膜外穿刺同实验组,不同的是将20 μ l生理盐水和2%利多卡因30 μ l注射到硬膜外腔。

针刀组:造模方法同模型组。

水合氯醛麻醉恢复后,大鼠四肢活动自如,说明硬膜外穿刺和注射失败。双前肢活动自如,双后肢运动、感觉丧失或减退,20—30min后完全恢复,说明硬膜外穿刺注射成功。此时,可继续进一步观察其双下肢有无瘫痪(步态不稳或足外翻)以判定造模过程中是否对脊髓有损伤。若无瘫痪,则对其两侧后足进行热刺激痛觉过敏的检测,若热痛反应出现痛觉过敏,则提示造模成功。

1.5 处理方法

正常组:正常饲养。假模型组:假造模后正常饲养。模型组:造模后正常饲养。针刀组:造模3天后给予针刀干预。施针刀时首先用自制袜套将大鼠固定于鼠板上,以使其不能强烈挣扎为度。在L4—L5棘间、L4—L5棘间旁开0.1cm处局部消毒,进行针刀操作,以大鼠下肢触电样抽动为度。每周治疗1次,共治疗1次。

1.6 取材

造模后第8天将各组大鼠分别固定于铡刀,在枕骨大孔水平断头处死各组大鼠,均采用断头后迅速倒置,离心管收集全血5ml,4℃下静置3h,置于离心机内离心(参数:4℃,3500r/min,10min),离心后取上清,放于-20℃冰箱中保存待测。

1.7 观察指标

1.7.1 一般情况:从造模第1天开始观察记录大鼠有无烦躁、撕咬肢体、频繁的摇动尾巴、后肢或足突然自发抬起、用嘴反复舔后爪、食欲降低等。并与造模前后分别检测大鼠的热痛阈。

1.7.2 后肢机械刺激缩爪阈值的变化:后肢机械刺激缩爪阈值检测均选择在下午(13:00—18:00),将各组大鼠放于PL-200型热痛测试仪的检测盒内,辐射热光源经底部玻璃板聚焦到一侧足底的后半部,光斑直径5mm。记录从开始照射到产生缩爪的时间。每次测试间隔至少5min,测量3次取平均值,两侧后足交替检测,根据平均值求出两后足热刺激缩爪潜伏期,按公式:“术前潜伏期-术后潜伏期”进行计算,差值大于正常大鼠组差值则表明潜伏期降低,对热痛反应存在痛觉过敏。

1.7.3 下丘脑和脊髓中细胞因子的检测:采用双夹心ELISA法检测下丘脑和脊髓中5-HT、 β -EP,操作步骤严格按试剂盒说明书进行。

1.7.4 切片HE染色,显微镜观察照相。

1.8 统计学分析

所得数据使用SPSS 17.0统计软件进行统计,结果以均数 \pm 标准差表示,对各数值变量进行方差齐性和正态性检验,多组间比较用单因素方差分析,组间比较用小显著性差异法检验。

2 结果

2.1 一般情况

大鼠造模后活动减少,精神萎靡,多蜷缩于笼中一角,饮食、饮水较正常减少。自由活动,行走速度变慢,步幅和频率减小,未出现撕咬肢体、频繁摇动尾巴、后肢或足突然自发抬起、用嘴反复舔后爪、食欲降低,而出现了易激惹、活动频繁的行为。

2.2 光镜观察

正常组有髓纤维的髓鞘完整、排列规则整齐,雪旺细胞大小均匀一致,数量较多,轴突表面规则完整,排列规则;假模型组有髓纤维的髓鞘完整、排列规则整齐,雪旺细胞大小均匀一致,数量较多,轴突表面规则完整,排列规则;模型组有髓纤维的髓鞘不完整,排列不规则,雪旺细胞数量减少,轴突边缘模糊,大小不规则,出现水肿变形,排列稀疏,胞质内出现明显的空泡;与模型组相比,针刀组出现新生的髓鞘,髓鞘整体排列规则,大小基本一致,轴突无水肿,排列整齐,雪旺细胞大小一致。见图1。

2.3 各组大鼠的热痛刺激缩爪阈值

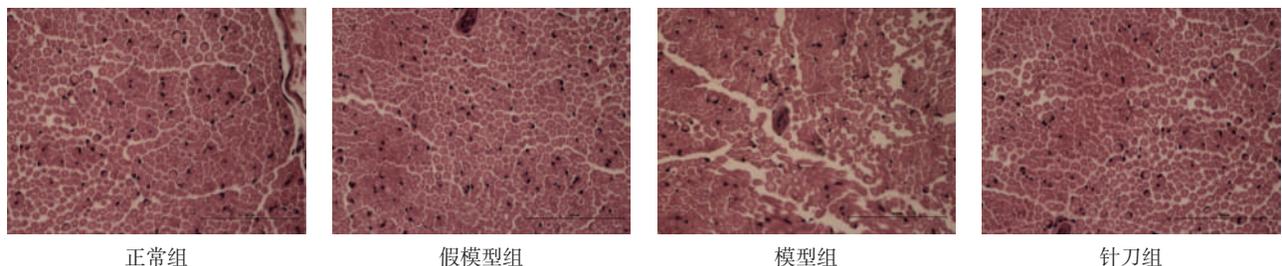
造模前后各组大鼠缩爪时间差值比较,采用单因素方差分析($F=22.631, P=0.000$),差异有显著性意义。模型组与其他各组比较,差异均有显著性意义($P<0.01$)。见表1。

2.4 针刀对腰突根性神经痛大鼠下丘脑和脊髓中5-HT含量的影响

治疗后各组大鼠下丘脑中5-HT含量比较,采用单因素方差分析($F=3.016, P=0.028$),差异有显著性意义。针刀组模型组比较,差异均有显著性意义($P<0.05$)。治疗后各组大鼠腰段脊髓中5-HT含量比较,采用单因素方差分析($F=9.810, P=0.000$)差异有显著性意义。针刀组模型组比较,差异均有显著

图1 治疗后各组大鼠L5神经根光镜观察结果

(HE染色, $\times 400$)



性意义($P < 0.01$)。见表2。

2.5 针刀对腰突根性神经痛大鼠下丘脑和脊髓中β-EP含量的影响

治疗后各组大鼠下丘脑中β-EP含量比较,采用单因素方差分析($F=4.377, P=0.004$),差异有显著性意义。针刀组模型组比较,差异均有显著性意义($P < 0.01$)。治疗后各组大鼠腰段脊髓中β-EP含量比较,采用单因素方差分析($F=4.551, P=0.004$),差异有显著性意义。针刀组模型组比较,差异均有显著性意义($P < 0.01$)。见表3。

表1 各组大鼠造模前后热痛刺激缩爪时间的差值的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	造模前后缩爪时间差值
正常组	10	0.63±0.35
假模型组	10	0.72±0.50
模型组	10	2.70±0.64 ^{①②④}
针刀组	10	0.92±0.69 ^③

与正常组相比:① $P < 0.01$;与假模型组相比:② $P < 0.01$;与模型组相比:③ $P < 0.01$;与针刀组相比:④ $P < 0.01$

表2 各组大鼠下丘脑和脊髓中5-HT含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	下丘脑	腰段脊髓
正常组	10	6.04±0.85	4.59±0.63
假模型组	10	5.36±0.78	4.28±0.26
模型组	10	4.90±0.86 ^{①⑤}	3.60±0.31 ^{①②⑥}
针刀组	10	5.85±0.86 ^③	4.49±0.36 ^④

与正常组相比:① $P < 0.01$;与假模型组相比:② $P < 0.01$;与模型组相比:③ $P < 0.05$;④ $P < 0.01$;与针刀组相比:⑤ $P < 0.05$;⑥ $P < 0.01$

表3 各组大鼠下丘脑和脊髓中β-EP含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	下丘脑	腰段脊髓
正常组	10	42.22±8.24	29.00±2.09
假模型组	10	50.03±7.87	32.51±3.19
模型组	10	56.66±11.00 ^{①③}	34.19±4.41 ^{①③}
针刀组	10	43.63±7.42 ^②	29.90±3.10 ^②

①与正常组相比 $P < 0.01$;②与模型组相比 $P < 0.01$;③与针刀组相比 $P < 0.01$

3 讨论

对于LDH的病因及发病机制,现阶段较为公认的原因是由于椎间盘突出引起的机械性压迫因素和(或)多种化学与免疫因素,包括多种化学性炎症介质、免疫性炎症介质及细胞因子(cytokine, CK)及神经源性炎症介质在该病的发生中起重要作用^[6],

突出的椎间盘组织压迫神经根或神经根被牵伸是引起坐骨神经痛的原因,但是也发现许多患者髓核和神经根之间的接触并没有机械压迫,也有明显的腰腿痛,本实验所建立的动物模型及实验亦证实了这一点:将大鼠自体髓核移植到硬膜外腔,未出现运动障碍,排除了机械压迫因素后,大鼠活动频繁,易激惹,模型组大鼠造模前后热刺激缩爪时间差值明显高于正常组和假模型组,后肢出现明显痛觉过敏反应,说明髓核本身也能引起坐骨神经痛。组织形态学结果显示有髓神经纤维的脱髓鞘改变,空泡样变性等病理改变,表明髓核本身的自身免疫炎症反应是引起根性神经痛的可能因素之一。

5-HT又叫下丘脑和脊髓素(serotonin),是色氨酸(Trp)的代谢产物,在人体中枢及外周组织中分布广泛。5-HT是中枢神经系统参与镇痛作用的主要神经活性物质。研究表明,5-HT通过与其受体结合并经不同途径作用于脊髓背角浅层(I层和II层)传递伤害性信息的神经元而发挥抑制作用^[7]。本研究结果显示,造模后模型组大鼠下丘脑和脊髓中5-HT的含量明显降低($P < 0.01$),表明造模后由于髓核的免疫炎症反应促使机体释放5-HT等物质,引起了机体的痛觉过敏和痛反应。针刀干预后,下丘脑和脊髓中5-HT含量均较模型组显著升高($P < 0.05$),说明针刀治疗腰椎间盘突出根性神经痛的中枢镇痛机制与激活5-HT上行和下行镇痛系统有关,这为临床治疗提供了实验依据。

从内源性阿片肽的分类来看,β-EP有明显的镇痛效应^[8]。其镇痛作用比吗啡强数十倍,维持1h以上,而脑啡肽的镇痛却远弱于吗啡,作用维持还不到10min^[9]。β-EP神经元胞体主要集中在下丘脑弓状核,在脊髓只分布于X层^[10]。β-EP主要通过μ和δ受体结合发挥镇痛作用。脑室或静脉注射β-EP,具有很强的镇痛作用,作用强且持续时间长^[11]。本实验结果显示,造模后模型组大鼠下丘脑和脊髓中β-EP的含量较正常组显著升高($P < 0.01$),针刀组干预后,下丘脑和脊髓中β-EP含量均较模型组显著降低($P < 0.05$),说明针刀干预后,针刀治疗可调节中枢疼痛相关递质的合成和分泌,降低模型大鼠的中枢痛觉传递和痛觉过敏,从而有效地发挥了中枢镇痛作用。

针刀治疗时,同针刺治疗一样,首先刺激神经感受器而引起生物电传导活动和内源性生化(MLF及其受体等)反应,特别是脊髓调控中心和中枢下行机制等整体神经系统活动的神经机制,所起的镇痛治疗作用。

脊髓是针刺信号和伤害信号的初级整合中枢。针刺信号进入脊髓后,一部分针刺信号使脊髓背角内发生节段性抑制,从而影响痛觉信号进一步向上传递,大部分针刺信号则沿着脊髓外侧索上行,如切断脊髓腹外侧索后,则针刺镇痛效应消失。

丘脑是痛冲动的主要接受中枢和整合部位,痛觉可能在丘脑水平就能产生。束旁核和中央中核的作用似乎尤为重要,刺激信号可以通过高位结构,如尾核、皮质或者低位结构,如中缝核对其产生抑制性影响。针刀疗法是将针刺疗法和手术松解法有机地结合为一体,在针的刺激下,调节下丘脑中 β -EP的含量,同时通过下行纤维调节5-HT的含量来调节脊髓中针刺信号;另一方面,通过“刀”的松解作用,可直接作用于局部炎症病灶,促进局部炎症介质消散和吸收,减轻局部的炎症反应,恢复软组织的生理功能。由于局部炎症病灶的消散和吸收,减轻了其对模型大鼠内源性痛觉调制系统刺激,故中枢各痛觉调制因子也就逐渐恢复正常,达到镇痛目的,这可能是针刀疗法治疗腰椎间盘突出症根性神经痛的中枢镇痛机制之一。

参考文献

- [1] 鲍铁周,宋永伟.腰椎间盘突出症诊疗指南编写报告[J].世界中医骨科杂志,2011,12(1):22—23.
- [2] 尹久.小关节间歇入路针刀脊神经触激术为主治疗腰椎间盘突出症48例[C].重庆:重庆市针灸学会2010年学术年会论文集.2010.123—124.
- [3] 李成,刘艳玲.小针刀疗法治疗腰椎间盘突出症800例[J].现代中医药,2010,30(6):45—46.
- [4] 李建运.小针刀治疗腰椎间盘突出症14例[J].中国中医急救,2008,17(11):1620—1621.
- [5] 陆志东,金群华,陈志荣.大鼠非压迫性髓核突出模型的建立[J].中国矫形外科杂志,2003,11(19):1361—1363.
- [6] Rannou F, Lee TS, Zhou RH, et al. Intervertebral disc degeneration: the role of the mitochondrial pathway in annulus fibrosus cell apoptosis induced by overload[J]. Am J Pathol, 2004, 164(3):915—924.
- [7] 李辉,李云庆.5-羟色胺在脊髓影响伤害性信息传递的机能学和形态学基础[J].神经解剖学杂志,2002,18(3):265—268.
- [8] Millan MJ. Descending control of pain[J]. Prog Neurobiol, 2002, 66(6):355—474.
- [9] 张安中,孙凤艳.内啡肽系统与针刺镇痛[J].上海第一医学院学报,1978,(1):67—78.
- [10] Yang J, Yang Y, Chu J, et al. Endogenous opiate peptides in the spinal cord are involved in the analgesia of hypothalamic paraventricular nucleus in the rat[J]. Peptides, 2009, 30(4):740—744.
- [11] 李辉,李云庆.内源性阿片肽参与痛信息调控的机制[J].神经解剖学杂志,2004,20(2):191—196.