

枢经热疗对神经病理性疼痛模型大鼠的镇痛作用及机制

<https://doi.org/10.12307/2022.824>

覃勤, 夏天, 李月发, 张铃铃, 秦海霞

投稿日期: 2021-09-30

采用日期: 2021-12-03

修回日期: 2022-01-11

在线日期: 2022-01-20

中图分类号:

R459.9; R318; R28

文章编号:

2095-4344(2022)26-04199-06

文献标识码: B

文章快速阅读:



动物模型:

(1) 采用 L₅ 脊神经结扎术制备神经病理性疼痛大鼠模型, 随机分组进行对比观察;

(2) 进行行为学检测和分子生物学检测, 观察镇痛作用, 探讨其作用机制。



枢经热疗:

(1) 热疗组使用 45 °C 盐水浸泡棉垫热敷大鼠双侧足少阳胆经循行部位;

(2) 中药热疗组使用 45 °C 中药液浸泡棉垫热敷大鼠双侧足少阳胆经循行部位。



研究结论:

(1) 枢经热疗可以显著提高大鼠机械缩足阈值和热缩足潜伏期, 从而发挥一定的镇痛作用;

(2) 其作用机制可能与调控 2 型囊泡膜谷氨酸转运体 / Toll 样受体 4 信号通路有关。

文题释义:

神经病理性疼痛: 是指由躯体感觉系统的损害或疾病导致的疼痛。根据感觉神经系统受损的部位, 神经病理性疼痛可分为周围神经病理性疼痛和中枢神经病理性疼痛。属于临床常见疼痛类型, 由神经系统的器质性损害或功能性异常引起, 常表现为慢性疼痛, 持续时间一般超过 3 个月, 且常见合并焦虑、抑郁、失眠等精神障碍。

枢经热疗: 是在中医枢经学说理论指导下的外治法, 认为少阳为阳经之枢、少阴为阴经之枢, 其循行经络均为气血阴阳活跃的部分, 用局部热敷的方法, 可达到舒筋活血、通络止痛作用。

摘要

背景: 枢经热疗是在中医枢经学说理论指导下的外治法, 已有研究证明其对神经病理性疼痛可能有较好疗效, 但具体疗效证据及作用机制尚不明确。

目的: 以神经病理性疼痛大鼠模型为观察对象, 根据行为学指标和分子生物学指标观察枢经热疗对大鼠的镇痛作用, 探讨其相关作用机制。

方法: 健康雄性 SD 大鼠 80 只, 随机分成空白对照组、模型对照组、热疗组、中药热疗组, 每组 20 只。后 3 组采用 L₅ 脊神经结扎术制备神经病理性疼痛大鼠模型, 热疗组使用 45 °C 盐水浸泡棉垫热敷大鼠双侧足少阳胆经循行部位; 中药热疗组使用 45 °C 中药液浸泡棉垫热敷大鼠双侧足少阳胆经循行部位。治疗 1 次/d, 每次热敷 15 min 后开始行为学检测, 分别测定机械缩足阈值和热缩足潜伏期; 连续治疗 14 d 后取材, 检测大鼠脊髓组织 2 型囊泡膜谷氨酸转运体和 Toll 样受体 4 蛋白表达水平。

结果与结论: ①行为学指标方面, 治疗第 7, 14 天后, 热疗组和中药热疗组的机械缩足阈值显著高于模型对照组, 热缩足潜伏期显著长于模型对照组 ($P < 0.05$), 其中中药热疗组疗效优于热疗组 ($P < 0.05$); ②信号通路相关蛋白表达水平方面, 热疗组和中药热疗组大鼠脊髓中的 2 型囊泡膜谷氨酸转运体和 Toll 样受体 4 表达水平均显著低于模型对照组 ($P < 0.05$), 其中热疗组和中药热疗组比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$); ③提示枢经热疗对于神经病理性疼痛大鼠具有明显的镇痛作用, 其作用机制可能与 2 型囊泡膜谷氨酸转运体/Toll 样受体 4 信号通路的抑制有关。

关键词: 神经病理性疼痛; 枢经热疗; 镇痛; 2 型囊泡膜谷氨酸转运体; Toll 样受体 4; 中药; 大鼠

缩略语: 2 型囊泡膜谷氨酸转运体: vesicular glutamate transporter 2, VGLUT2; Toll 样受体 4: toll-like receptor 4, TLR4

Analgesic effect and mechanism of pivot meridian hyperthermia in a rat model of neuropathological pain

Qin Qin, Xia Tian, Li Yuefa, Zhang Lingling, Qin Haixia

Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Qin Qin, Master, Associate chief nurse, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Corresponding author: Xia Tian, MD candidate, Associate professor, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Abstract

BACKGROUND: Pivot meridian hyperthermia is an external treatment method guided by the central meridian theory of traditional Chinese medicine (TCM). Studies have shown that it may have a better effect on neuropathic pain, but the specific efficacy evidence and mechanism of action are still unclear.

广西中医药大学, 广西壮族自治区南宁市 530023

第一作者: 覃勤, 女, 1980 年生, 广西壮族自治区南宁市人, 汉族, 2015 年广西中医药大学毕业, 硕士, 副主任护师, 主要从事中医方面的研究。

通讯作者: 夏天, 广西中医药大学在读博士, 副教授, 广西中医药大学, 广西壮族自治区南宁市 530023

<https://orcid.org/0000-0001-7941-5361> (覃勤)

基金资助: 广西壮族自治区科技厅课题青年科学基金项目 (QJ18003), 项目负责人: 夏天

引用本文: 覃勤, 夏天, 李月发, 张铃铃, 秦海霞. 枢经热疗对神经病理性疼痛模型大鼠的镇痛作用及机制 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(26):4199-4204.



OBJECTIVE: To investigate the analgesic effect of pivot meridian hyperthermia in a rat model of neuropathological pain and its mechanism based on behavior indicators and molecular biological indicators.

METHODS: Eighty male healthy Sprague-Dawley rats were randomly divided into a blank control group, a model control group, a hyperthermia group, and a TCM hyperthermia group, with 20 rats in each group. In the last three groups, the L₅ spinal nerve was ligated to prepare the rat model of neuropathic pain. In the hyperthermia group, cotton pads soaked in 45°C saline were used to heat the gall bladder meridian circulation parts of the rats' bilateral feet. In the TCM hyperthermia group, cotton pads soaked in 45°C Chinese medicinal solution were applied to heat the gall bladder meridian circulation parts of the rats' bilateral feet. Treatment in each group was performed once a day. Behavior testing was started after 15 minutes of each hot compress, to measure paw withdrawal mechanical threshold and paw withdrawal thermal latency. The expression levels of vesicular glutamate transporter 2 and Toll-like receptor 4 protein in rat spinal cord tissue were detected after 14 days of continuous treatment.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the model control group, paw withdrawal mechanical threshold was significantly higher and paw withdrawal thermal latency was significantly lower in the hyperthermia and TCM hyperthermia groups at 7 and 14 days of treatment ($P < 0.05$). Moreover, the TCM hyperthermia group showed better efficacy than the hyperthermia group ($P < 0.05$). Compared with the model control group, the expression levels of vesicular glutamate transporter 2 and Toll-like receptor 4 protein were significantly lower in the hyperthermia and TCM hyperthermia groups ($P < 0.05$). However, there was no significant difference between the hyperthermia and TCM hyperthermia groups ($P > 0.05$). To conclude, pivot meridian hyperthermia has a significant analgesic effect in neuropathological pain rats, and its mechanism may be related to inhibiting vesicular glutamate transporter 2/Toll-like receptor 4 signaling pathways.

Key words: neuropathological pain; pivot meridian hyperthermia; analgesia; vesicular glutamate transporter 2; Toll-like receptor 4 protein; traditional Chinese medicine; rat

Funding: the Youth Science Fund of Guangxi Zhuang Autonomous Region Science and Technology Department, No. QJJ18003 (to XT)

How to cite this article: QIN Q, XIA T, LI YF, ZHANG LL, QIN HX. Analgesic effect and mechanism of pivot meridian hyperthermia in a rat model of neuropathological pain. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(26):4199-4204.

0 引言 Introduction

神经病理性疼痛是一种临床常见疼痛类型，由神经系统的器质性损害或功能性异常引起，常表现为慢性疼痛，持续时间一般超过3个月^[1]，且常见合并焦虑、抑郁、失眠等精神障碍，在临床上属于难治性疼痛^[2]。中医药镇痛古已有之，通过长期发展，在多种疼痛性疾病的治疗上已形成系统的理论，并积累了丰富的经验。特别是针灸、推拿等中医外治法治疗疼痛的有效性已经通过多项随机对照临床研究得到验证^[3-4]，然而对于中医药治疗神经病理性疼痛的疗效机制研究并不深入，这在一定程度上限制了其临床运用和推广。

枢经热疗是在中医枢经学说理论指导下的外治法，认为少阳为阳经之枢、少阴为阴经之枢，其循行经络均为气血阴阳活跃的部分^[5]，用局部热敷的方法，较一般的热疗方法有更强的舒筋活血、通络止痛作用，可进一步改善局部的血液循环。由于神经病理性疼痛的疼痛部位与受损区域有对应关系，可以尝试运用枢经热疗达到缓解疼痛作用。谷氨酸是介导疼痛传导和痛觉信息调控最主要的神经递质之一，2型囊泡膜谷氨酸转运体 (vesicular glutamate transporter 2, VGLUT2) 位于脊髓神经元内，在介导谷氨酸的释放中发挥了重要作用^[6-7]。Toll样受体4 (toll-like receptor 4, TLR4) 是炎症反应和免疫反应的关键性受体，且特异性表达在小胶质细胞上，推断TLR4信号通路可能参与了神经病理性疼痛的发生和维持^[8-9]。因而，此次研究旨在探讨枢经热疗对神经病理性疼痛模型大鼠的镇痛作用，以期从VGLUT2/TLR4信号通路角度阐明枢经热疗镇痛的机制，为临床上枢经热疗治疗神经病理性疼痛提供一定的基础研究证据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照实验，组内数据采用独立样本t检验，组间数据比较中，蛋白检测结果采用单因素多元方差分析，行为学检测结果采用双因素多元方差分析。

1.2 时间及地点 实验于2020年8-12月在广西大学动物医学实验中心、广西中医药大学完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 80只健康、雄性SD大鼠，2月龄，体质量250-300g，购自北京华阜康，合格证号：SCXK(京)2020-0004。饲养于广西大学动物医学实验中心，饲养环境温度24-27℃，湿度50%，水食自由，12h交替光照。实验方案经广西中医药大学动物实验伦理委员会批准，批准号为GXZY20211986。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

1.3.2 主要实验试剂 中药饮片：桂枝100g、川芎100g、红花30g、白芷80g、续断80g、细辛20g、乳香30g、没药30g、田七30g，上述9味打碎后加高度米三花酒泡制1周取液，500mL，1mL中药液相当于2g中药材；大鼠VGLUT2、TLR4 ELISA检测试剂盒 (Siemens, 德国)；BCA蛋白定量试剂盒 (Thermo, 美国)；兔抗VGLUT2 IgG (Abcam, 英国)；兔抗TLR4 IgG (LSBio, 英国)；HRP、Rabbit Anti-Goat IgG (中杉金桥, 中国)。

1.3.3 主要实验仪器 相差倒置显微镜 (OLYMPUS, 日本)；低温高速离心机 (Thermo, 美国)；酶标仪 (Bio-rad, 美国)；热板刺痛仪 (IITC, 美国)；Von Frey 纤维丝测痛仪 (Stoelting, 美国)。

1.4 实验方法

1.4.1 实验动物分组 80只健康大鼠先饲养7d适应环境，随后按随机数字法分组：空白对照组20只继续正常饲养；其余60只随机分为模型对照组、热疗组和中药热疗组，每组20只，进行造模。

1.4.2 实验动物模型制备 采用脊神经结扎术制备神经病理性疼痛大鼠模型^[10]。大鼠应用3%的异氟烷吸入麻醉后，在左侧脊柱部位L₅脊神经行结扎剪断手术。术后封闭切口，待大鼠完全恢复正常活动后放回笼中。根据术后24h内大鼠的外形表现和行为学检测结果，判断神经病理性疼痛模型是否建立成功。

1.4.3 分组治疗方法 造模成功后，空白对照组、模型对照组使用45℃盐水浸泡棉垫热敷大鼠脊柱两侧背部皮肤；热

组织工程实验动物造模过程中的相关问题	
造模目的	使用动物体内实验模拟神经病理性疼痛发生发展过程
选择动物的条件	生理状态良好，月龄、体质量相近，均在同一范围内
模型与所研究疾病的关系	动物模型与神经病理性疼痛发病机制相同，均为神经损伤
动物来源及品系	人工培育 SD 大鼠，购自北京华阜康，合格证号：SCXK(京)2020-0004
造模技术描述	L ₅ 脊神经结扎，是采用手术暴露大鼠 L ₅ 脊神经后进行手术结扎的一种造模方法，常用于模拟神经病理性疼痛
动物数量及分组方法	健康 SD 大鼠共 80 只，先饲养 7 d 适应环境，随后以随机数字法进行分组 (n=20)。空白对照组继续正常饲养；其余 60 只大鼠随机分为模型对照组、热疗组和中药热疗组
造模成功评价指标	可以观察到大鼠侧下肢呈现自发性抬足，患肢悬空、跛行，行走时避免患肢着地等行为；结合大鼠的热痛阈和机械痛阈的降低，以及行走行为的改变，判断脊神经结扎模型是否建立成功
造模后观察指标	机械缩足阈值、热缩足潜伏期等
造模后动物处理	模型对照组使用 45 °C 盐水浸泡棉垫热敷大鼠脊柱两侧的背部皮肤；热疗组使用 45 °C 盐水浸泡棉垫热敷大鼠双侧足少阳胆经循行部位；中药热疗组使用 45 °C 中药液浸泡棉垫热敷大鼠双侧足少阳胆经循行部位。1 次/d，每次热敷 15 min 后进行行为学检测，连续 14 d 后取材
伦理委员会批准	实验方案经广西中医药大学伦理委员会审查同意

热疗组使用 45 °C 盐水浸泡棉垫热敷大鼠双侧足少阳胆经循行部位；中药热疗组使用 45 °C 中药液浸泡棉垫热敷大鼠双侧足少阳胆经循行部位。1 次/d，每次热敷 15 min 后开始进行行为学检测，连续 14 d 后取材。

1.5 主要观察指标

1.5.1 机械缩足阈值 将大鼠放入 Von Frey 纤维丝测痛仪中，适应环境 15 min，大鼠行为状态完全稳定后开始测量。使用不同弯折力的纤维丝刺激大鼠足掌中部皮肤，逐渐用力，直至大鼠出现反射性缩足，或抖足、跳跃等阳性行为后停止刺激。连续 2 次刺激时间间隔不少于 1 min，每次的刺激维持 5 s 左右。即时记录电脑所显示数据。连续测量 3 次，取平均值。

1.5.2 热缩足潜伏期 将大鼠置于室温 24–27 °C 环境的热板测痛仪中，20 min 适应环境，待大鼠行为状态完全平静后开始测量。打开热光源照射大鼠后肢足底皮肤，温度设定为 40 °C，记录大鼠首次出现反射性缩足、抖足、舔足或跳跃等阳性行为，即时记录测定时间。每次间隔 20 min，连续测量 3 次，取平均值。

1.5.3 信号通路相关蛋白表达水平检测 采用异氟烷吸入麻醉大鼠，迅速分离大鼠脊柱旁肌肉及组织，取 L₅ 段，分离脊柱取出脊髓。脊髓组织加入 RIPA 裂解 15 min，离心 3 min，收集离心管上清。采用 BCA 法测定提取蛋白的浓度，根据试剂盒说明书要求使用 ELISA 试剂盒检测各组样本 VGLUT2、TLR4 蛋白表达水平。

1.6 统计学分析 文章统计学方法已经广西中医药大学生物统计学专家审核。采用 SPSS 24.0 进行分析，所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组内数据采用独立样本 t 检验，组间数据比较中，

蛋白检测结果采用单因素多元方差分析，行为学检测结果采用双因素多元方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验共纳入 SD 大鼠 80 只，分为 4 组，全部进入结果分析，未发生脱失情况。

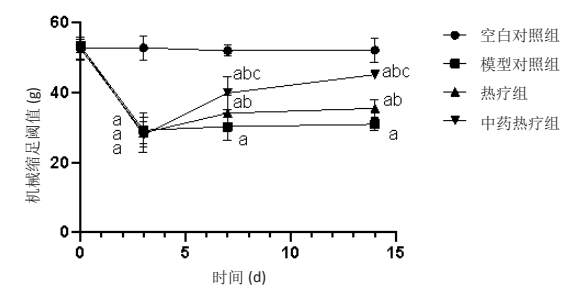
2.2 各组大鼠行为学情况

2.2.1 各组大鼠机械缩足阈值的比较 在每组大鼠造模之前，机械缩足阈值比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)，表明具有可比性。在造模后第 3, 7, 14 天，模型对照组、热疗组、中药热疗组与空白对照组大鼠机械缩足阈值比较差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)，表明造模导致模型对照组、热疗组、中药热疗组大鼠的机械缩足阈值降低，且低于空白对照组。在造模后的第 3 天，中药热疗组与模型对照组、热疗组大鼠机械缩足阈值比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。造模后第 7, 14 天，热疗组和中药热疗组与模型对照组大鼠机械缩足阈值比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$)，表明枢经热疗第 7, 14 天后中药热疗组大鼠机械缩足阈值明显高于模型对照组和热疗组。造模后 7 d 以上，中药热疗组与热疗组大鼠机械缩足阈值比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$)，表明在 7 d 以上的中药枢经热疗后，中药热疗组大鼠机械缩足阈值明显高于热疗组，结果见表 1 及图 1。

表 1 | 各组大鼠机械缩足阈值的比较 ($\bar{x} \pm s, n=20, g$)
Table 1 | Comparison of paw withdrawal mechanical threshold in rats

组别	造模前	造模后 3 d	造模后 7 d	造模后 14 d
空白对照组	52.74±3.12	52.84±3.47	51.96±1.55	52.13±3.50
模型对照组	53.29±1.86	29.25±4.87 ^a	30.25±4.01 ^a	30.98±1.74 ^a
热疗组	52.64±3.24	28.52±3.13 ^{ab}	34.10±5.28 ^{ab}	35.50±2.55 ^{ab}
中药热疗组	53.40±0.71	27.88±4.94 ^{abc}	39.85±4.79 ^{abc}	45.17±1.06 ^{abc}

表注：与空白对照组比较，^a $P < 0.05$ ；与模型对照组比较，^b $P < 0.05$ ；与热疗组比较，^c $P < 0.05$



图注：与空白对照组比较，^a $P < 0.05$ ；与模型对照组比较，^b $P < 0.05$ ；与热疗组比较，^c $P < 0.05$

图 1 | 各组大鼠机械缩足阈值变化

Figure 1 | Changes in paw withdrawal mechanical threshold of rats

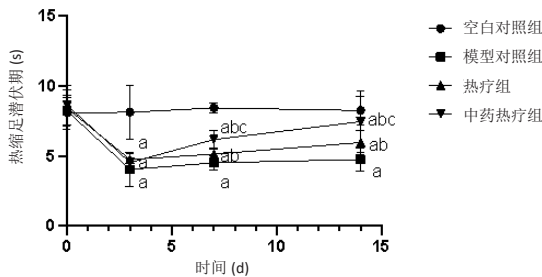
2.2.2 各组大鼠热缩足潜伏期的比较 在每组大鼠造模之前，热缩足潜伏期比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)，表明具有可比性。在造模后第 3, 7, 14 天，模型对照组、热疗组、中药热疗组分别与空白对照组大鼠热缩足潜伏期比较差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)，表明造模导致模型对照组、热疗组、中药热疗组大鼠的热缩足潜伏期缩短，且小于空白对照组。

在造模后的第3天, 中药热疗组与模型对照组、热疗组大鼠热缩足潜伏期比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。造模后第7, 14天, 热疗组和中药热疗组与模型对照组大鼠之间热缩足潜伏期比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 表明在7 d以上的中药枢经热疗后, 中药热疗组大鼠热缩足潜伏期明显长于模型对照组和热疗组。造模后第7, 14天, 中药热疗组与热疗组大鼠之间热缩足潜伏期比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 表明在7 d以上的中药枢经热疗后, 中药热疗组大鼠热缩足潜伏期明显长于热疗组, 结果见表2及图2。

表2 | 各组大鼠热缩足潜伏期的比较 ($\bar{x} \pm s, n=20, s$)
Table 2 | Comparison of paw withdrawal thermal latency in rats

组别	造模前	造模后 3 d	造模后 7 d	造模后 14 d
空白对照组	8.11±1.20	8.13±1.95	8.45±0.35	8.26±1.00
模型对照组	8.23±0.98	4.04±1.23 ^a	4.52±0.54 ^a	4.75±0.83 ^a
热疗组	8.42±1.28	4.75±0.11 ^a	5.14±0.34 ^{ab}	5.97±0.88 ^{ab}
中药热疗组	8.63±1.44	4.54±0.63 ^a	6.18±0.62 ^{abc}	7.45±2.23 ^{abc}

表注: 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型对照组比较, ^b $P < 0.05$; 与热疗组比较, ^c $P < 0.05$



图注: 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型对照组比较, ^b $P < 0.05$; 与热疗组比较, ^c $P < 0.05$

图2 | 各组大鼠热缩足潜伏期变化
Figure 2 | Changes in paw withdrawal thermal latency of rats

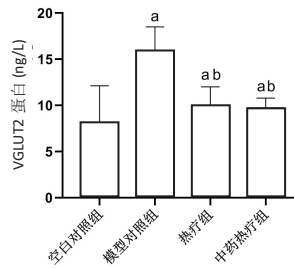
2.3 各组大鼠脊髓组织中 VGLUT2/TLR4 信号通路相关蛋白表达情况

2.3.1 各组大鼠脊髓组织中 VGLUT2 蛋白表达水平比较 造模后第14天, 模型对照组、热疗组、中药热疗组与空白对照组 VGLUT2 蛋白表达水平比较差异均有显著性意义 ($P < 0.05$), 表明造模后, 模型对照组、热疗组、中药热疗组的 VGLUT2 蛋白表达水平出现显著变化; 热疗组、中药热疗组与模型对照组 VGLUT2 蛋白表达水平比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 表明枢经热疗 14 d 后, 热疗组和中药热疗组的 VGLUT2 蛋白表达水平均显著低于模型对照组; 中药热疗组与热疗组比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 结果见表3及图3。

表3 | 造模后第14天各组大鼠脊髓组织中2型囊泡膜谷氨酸转运体(VGLUT2)蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=20, \text{ng/L}$)
Table 3 | Comparison of vesicular glutamate transporter 2 protein level in spinal cord tissue of rats at 14 days after modeling

组别	VGLUT2 蛋白
空白对照组	8.17±3.95
模型对照组	15.95±2.55 ^a
热疗组	10.04±1.96 ^{ab}
中药热疗组	9.79±1.00 ^{ab}

表注: 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 | 造模后第14天各组大鼠2型囊泡膜谷氨酸转运体(VGLUT2)蛋白表达水平比较

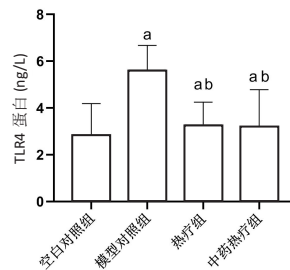
Figure 3 | Comparison of vesicular glutamate transporter 2 protein level of rats at 14 days after modeling

2.3.2 各组大鼠脊髓组织中 TLR4 蛋白表达水平比较 造模后第14天, 模型对照组、热疗组、中药热疗组分别与空白对照组 TLR4 蛋白表达水平比较差异均有显著性意义 ($P < 0.05$), 表明造模后, 模型对照组、热疗组、中药热疗组的 TLR4 蛋白表达水平出现显著变化; 热疗组、中药热疗组与模型对照组 TLR4 蛋白表达水平比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 表明枢经热疗 14 d 后, 热疗组和中药热疗组的 TLR4 蛋白表达水平均显著降低, 且低于模型对照组; 中药热疗组与热疗组比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 结果见表4及图4。

表4 | 造模后第14天各组大鼠脊髓组织中Toll样受体4(TLR4)蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=20, \text{ng/L}$)
Table 4 | Comparison of Toll-like receptor 4 protein level in spinal cord tissue of rats at 14 days after modeling

组别	TLR4 蛋白
空白对照组	2.86±1.33
模型对照组	5.63±1.05 ^a
热疗组	3.29±0.96 ^{ab}
中药热疗组	3.20±1.58 ^{ab}

表注: 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 | 造模后第14天各组大鼠Toll样受体4(TLR4)蛋白表达水平比较
Figure 4 | Comparison of Toll-like receptor 4 protein level of rats at 14 days after modeling

3 讨论 Discussion

神经病理性疼痛根据其临床症状和特征可归为中医的“痹症”“筋伤”范畴, 此次研究中制备大鼠神经病理性疼痛模型的脊神经结扎术, 对于大鼠背部肌肉、神经组织的损伤及其术后出现的舐足、跛行等行为表现可与之相对应, 其核心病机可以认为是气血不畅、瘀阻经络。枢经学说理论来源于《黄帝内经》, 如《素问·阴阳离合论》云: “……少阳为枢” “……少阴为枢”, 枢经开阖通畅, 气血才能正常运转^[11]。近年来, 在枢经学说理论指导下的针灸、推拿、热疗等临床应用和相关研究逐渐开展, 此次研究中使用的枢经热疗即为使用发热的敷料置于枢经循行位置, 通过促进局部毛细血管扩张、血液循环加速、局部肌肉松弛, 使得枢经循行部位的气行、血运更加通畅流利, 达到行气活血、通络止痛、驱除肌痹的效果, 最终减轻疼痛症状。此次研究在此基础上,

还加用了中药液浸泡敷料加强其临床疗效, 用药思路为: 桂枝、细辛辛香走窜, 可开腠理、温分肉, 红花、川芎温通经络、活血止痛, 白芷祛风湿、舒筋止痛, 乳香、没药消肿散瘀、止痛, 续断可补肝肾、续筋骨、行血脉, 田七止血止痛、兼有抗炎作用^[12]。中药枢经热疗可以通过升高局部皮肤温度促进药物浸润通道的开放, 并实现显著的透皮渗透, 使得药效成分更有效地到达疼痛部位, 实现协同增效^[13]。此次研究结果显示, 枢经热疗可以显著提高神经病理性疼痛大鼠的机械缩足阈值和热缩足潜伏期, 升高疼痛阈值达到镇痛作用, 其中加用中药液浸泡敷料的枢经热疗, 则疗效更为显著。

神经病理性疼痛是一种慢性疼痛, 由于复杂的潜在机制而难以明确其病理机制和治疗方法, 但已有研究表明其发生发展的病理基础是神经传导通路的可塑性变化, 涉及神经炎症反应、氧化应激反应、离子通道的改变等^[14-15]。其中, VGLUT2/TLR4 信号通路在神经病理性疼痛病理变化的复杂过程中有着非常重要的作用。VGLUTs 是一个谷氨酸转运蛋白家族, 控制脊髓背角突触前神经元释放谷氨酸。VGLUT1-3 均是兴奋性谷氨酸能神经元最常见的标志物, 在急性和慢性疼痛的发展过程中均有参与, 其中已有研究证明 VGLUT1 的缺失对神经病理性疼痛没有影响^[16]; VGLUT3 在调节神经病理性疼痛方面的作用仍然存在一定争议^[17], 有研究表明 VGLUT3^{-/-} 基因敲除的小鼠疼痛阈值与正常小鼠并无显著差异^[18]。多项研究表明, 躯体感觉痛觉信息的传递与表达过程中, VGLUT2 发挥关键作用^[19-20]。VGLUT2 在脊髓层 I - II 中的谷氨酸能神经元中选择性表达, 它位于轴突末端并介导谷氨酸储存、释放和再摄取到痛觉神经元的突触囊泡中^[21-23], 因此, VGLUT2 在维持细胞外谷氨酸浓度、谷氨酸受体激活、神经元可塑性和中枢敏化方面发挥着最终作用。在脊神经结扎诱导的神经性疼痛中, VGLUT2 表达水平升高, 谷氨酸释放增强, 导致机械性疼痛^[24]; 同样, VGLUT2 缺陷小鼠在周围神经损伤或炎症后表现出机械性疼痛减弱^[25-26]。此次研究采用 L₅ 脊神经结扎法制备神经病理性疼痛大鼠模型, 其原理为脊神经结扎诱导的神经损伤上调了 VGLUT2 的表达水平, 从而使谷氨酸能神经元的放电活动增加, 导致机械性疼痛, 而对大鼠的热痛觉影响相对较小, 可能的原因是周围神经损伤引起的机械和热超敏反应主要依赖于不同的 VGLUT2 初级传入通路^[27]。虽然越来越多的研究证明了以 VGLUT2 为代表的谷氨酸转运蛋白在痛觉信息传递过程中的重要性, 但在神经病理性疼痛的发生发展中, 与 VGLUT2 相关的信号通路失调是否为其作用机制仍有待进一步确定。

TLR4 是 Toll 样受体家族的成员, 主要由小胶质细胞表达, 其在病原体识别和先天免疫激活中起重要作用, 是激活先天免疫系统的关键调节剂, TLR4 的激活同时会释放许多可以增强神经元兴奋性的神经递质和调节剂^[28]。大量证据表明, TLR4 及其介导的信号通路在调控炎症反应和适应性免疫应答中起着关键作用, 并明确参与了神经病理性疼痛的加重和持续^[29]。有研究表明, 通过分子对接虚拟筛选出 39 种 TLR4 抑

制剂可有效治疗神经病理性疼痛^[30]。已有研究证实, TLR4 的表达随阿片类药物的摄入而变化, 反映吗啡和其他阿片类药物与 TLR4 的相互作用会抑制 TLR4 通路, 导致细胞因子的释放减少, 从而导致痛觉过敏状态抑制^[31-33], 其作用机制可能为阿片受体的激活, TLR4 mRNA 在巨噬细胞中的表达降低^[34-38]。因此, 深入探讨中西药对 TLR4 表达的影响可能会对药物镇痛机制的进一步明确有着重要意义。

此次研究结果显示, 枢经热疗可以显著下调神经病理性疼痛大鼠的 VGLUT2 和 TLR4 蛋白表达。作者推测, 一方面枢经热疗通过药物渗透作用和局部温热效应, 扩张皮下毛细血管、加速血液流动, 对神经损伤具有一定的修复作用, 从而减少了因机械损伤而释放的谷氨酸, 进而调控 VGLUT2 介导的信号通路; 另一方面, 中药热敷中使用的红花、田七等药效成分发挥抗炎、免疫调节作用, 可能与下调 TLR4 表达水平有关。因此, 枢经热疗所产生的镇痛作用可能与 VGLUT2/TLR4 信号通路抑制有关, 而具体机制还有待进一步研究。

致谢: 感谢广西中医药大学及广西壮族自治区科技厅课题的资助。

作者贡献: 夏天负责实验设计, 覃勤负责实验实施, 李月发、张铃、秦海霞负责指标测定, 文章写作修改由夏天完成。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名 - 非商业性使用 - 相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

出版规范: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》, 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重, 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合本刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] SADOSKY A, SCHAEFER C, MANN R, et al. Burden of illness associated with painful diabetic peripheral neuropathy among adults seeking treatment in the us: Results from a retrospective chart review and cross-sectional survey. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2013;6:79-92.
- [2] SCHAEFER C, MANN R, SADOSKY A, et al. Burden of illness associated with peripheral and central neuropathic pain among adults seeking treatment in the united states: A patient-centered evaluation. *Pain Med.* 2014;15(12):2105-2119.
- [3] ZHAO L, CHEN J, LI Y, et al. The long-term effect of acupuncture for migraine prophylaxis-A randomized clinical trial. *JAMA Intern Med.* 2017;177(4):508-515.
- [4] SHINY ES, SAFREENA I. Assess the effectiveness of foot and hand massage on caesarean pain among post-natal mothers. *J Obstetr Gynaecol Nursing.* 2021; 9(2):26-32.
- [5] 庞军, 杨鹏, 卢栋明, 等. 枢经推拿治疗腰椎间盘突出症的临床疗效及对患者病变区域红外热成像的影响 [J]. *广西医学*, 2021, 43(16): 1909-1912.
- [6] CHO YS, KO HG, HAN HM, et al. Vesicular glutamate transporter-immunopositive axons that coexpress neuropeptides in the rat and human dental pulp. *Int Endod J.* 2021;54(3):377-387.

- [7] ZENG X, NIU Y, QIN G, et al. Deficiency in the function of inhibitory interneurons contributes to glutamate-associated central sensitization through GABABR2-SynCAM1 signaling in chronic migraine rats. *FASEB J*. 2020;34(11): 14780-14798.
- [8] GAO YH, WANG JY, HAN YJ, et al. Spinal cord Toll like receptor 4 and its co-stimulatory molecule heat shock protein 90 may participate in electroacupuncture analgesia in rats with chronic neuropathic pain. *Zhen Ci Yan Jiu*. 2021;46(9):735-741.
- [9] DAI GG, WANG Y, LIAO SC, et al. Characteristics and Significance of Gene Expression Changes in Peripheral Blood of Lumbar Disc Extrusion Patients before and after Nonoperative Treatment. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2021;52(5):868-876.
- [10] KIM SH, CHUNG JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*. 1992; 50(3):355-363.
- [11] 庞军. 枢经学说的理论和应用研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2010.
- [12] 吴金玉, 黄仁发, 史伟, 黄雪霞, 覃祚莲. 田七注射液对 2-4 期慢性肾脏病患者微炎症状态及免疫功能的影响[J]. *广西医学*, 2012, 34(3): 260-263.
- [13] 罗翠萍, 孙钰, 耿猛. 分经辨治针刺结合中药热敷治疗神经根型颈椎病的疗效观察[J]. *中华针灸电子杂志*, 2019, 8(3): 92-95.
- [14] 宋学军. 疼痛信号外周神经转导的分子生物学机制[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2016, 22(1): 2-7.
- [15] OH JY, HWANG TY, JANG JH, et al. Muscovite nanoparticles mitigate neuropathic pain by modulating the inflammatory response and neuroglial activation in the spinal cord. *Neural Regen Res*. 2020;15(11): 2162-2168.
- [16] LEO S, MOECHARS D, CALLAERTS-VEGH Z, et al. Impairment of VGLUT2 but not VGLUT1 signaling reduces neuropathy-induced hypersensitivity. *Eur J Pain*. 2009; 13(10):1008-1017.
- [17] DRAXLER P, HONSEK SD, FORSTHUBER L, et al. VGLuT3(+) primary afferents play distinct roles in mechanical and cold hypersensitivity depending on pain etiology. *J Neurosci*. 2014; 34(36):12015-12028.
- [18] SEAL RP, WANG X, GUAN Y, et al. Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature*. 2009;462(7273):651-655.
- [19] LIU Y, ABDEL SO, ZHANG L. VGLUT2-dependent glutamate release from nociceptors is required to sense pain and suppress itch. *Neuron*. 2010; 68(3):543-556.
- [20] BRUMOVSKY P, WATANABE M, HOKFELT T. Expression of the vesicular glutamate transporters-1 and-2 in adult mouse dorsal root ganglia and spinal cord and their regulation by nerveinjury. *Neuroscience*. 2007; 147(2):469-490.
- [21] MOECHARS D, WESTON MC, LEO S, et al. Vesicular glutamate transporter VGLUT2 expression levels control quantal size and neuropathic pain. *J Neurosci*. 2006;26(46):12055-12066.
- [22] SANTOS MS, LI H, VOGLMAIER SM. Synaptic vesicle protein trafficking at the glutamate synapse. *Neuroscience*. 2009; 158(1):189-203.
- [23] ZHANG FX, GE SN, DONG YL, et al. Vesicular glutamate transporter isoforms: The essential players in the somatosensory systems. *Prog Neurobiol*. 2018;171:72-89.
- [24] GU P, PAN Z, WANG XM, et al. Histone deacetylase 5(HDAC5) regulates neuropathic pain through SRY-related HMG-box 10(SOX10)-dependent mechanism in mice. *Pain*. 2018;159(3):526-539.
- [25] MALET M, BRUMOVSKY PR. VGLUTs and glutamate synthesis-focus on DRG neurons and pain. *Biomolecules*. 2015;5(4):3416-3437.
- [26] WANG ZT, YU G, WANG HS, et al. Changes in VGLUT2 expression and function in pain-related supraspinal regions correlate with the pathogenesis of neuropathic pain in a mouse spared nerve injury model. *Brain Res*. 2015;1624:515-524.
- [27] SCHERRER G, LOW SA, WANG X, et al. VGLUT2 expression in primary afferent neurons is essential for normal acute pain and injury-induced heat hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(51): 22296-222301.
- [28] LI Q. Antagonists of toll like receptor 4 maybe a new strategy to counteract opioid-induced hyperalgesia and opioid tolerance. *Med Hypotheses*. 2012;79(6):754-756.
- [29] PLOCIENNIKOWSKA A, HROMADA-JUDYCKA A, BORZECKA K. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(3):557-581.
- [30] ZALI H, GOLCHIN A, FARAHANI M. FDA Approved Drugs Repurposing of Toll-Like Receptor4 (TLR4) Candidate for Neuropathy. *Iran J Pharm Res*. Summer. 2019;18(3):1639-1647.
- [31] 张姗姗, 刘漫, 刘冬妮, 等. TLR4-IN-C34 通过抑制 TLR4/MyD88/NF-κB/NLRP3 信号通路减轻脂多糖诱导的 BV2 小胶质细胞炎症反应[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2021, 35(10): 804.
- [32] WANG LT, WANG SJ, HSU SH. Functional characterization of mammalian Wntless homolog in mammalian system. *Kaohsiung J Med Sci*. 2012; 28(7):355-361.
- [33] WANG X, LORAM LC, RAMOS K, et al. Morphine activates neuroinflammation in a manner parallel to endotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(16):6325-6330.
- [34] FRANCHI S, MORETTI S, CASTELLI M, et al. Mu opioid receptor activation modulates Toll like receptor 4 in murine macrophages. *Brain Behav Immun*. 2012;26(3):480-488.
- [35] LEE JW, NAM H, KIM LE, et al. TLR4 (toll-like receptor 4) activation suppresses autophagy through inhibition of FOXO3 and impairs phagocytic capacity of microglia. *Autophagy*. 2019;15(5):753-770.
- [36] VICHAYA EG, FORD BG, QUAVE CB, et al. Toll-like receptor 4 mediates the development of fatigue in the murine Lewis Lung Carcinoma model independently of activation of macrophages and microglia. *Psychoneuroendocrinology*. 2020;122:104874.
- [37] JIN R, LIU L, ZHU W, et al. Iron oxide nanoparticles promote macrophage autophagy and inflammatory response through activation of toll-like Receptor-4 signaling. *Biomaterials*. 2019;203:23-30.
- [38] LIU Z, MA Y, CUI Q, et al. Toll-like receptor 4 plays a key role in advanced glycation end products-induced M1 macrophage polarization. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;531(4):602-608.

(责任编辑: GD, ZN, ZJP)