

• 实验研究 •

慢加速与快加速旋转手法对香草素受体 4/一氧化氮
通路抑制强度的比较韩雪¹ 张军^{1△} 韩磊¹ 耿进朝¹ 崔莹¹

[摘要] **目的:**比较慢加速与快加速旋转手法对大鼠腰椎背根节(DRG)损伤模型机械痛敏、TRPV4 通道蛋白和亚硝酸盐的影响,探讨不同加速度载荷旋转手法的消炎祛痛效果。**方法:**192 只雄性 SD 大鼠随机分为低速-零加速旋转手法组、低速-慢加速旋转手法组、低速-快加速旋转手法组、阳性药物灌胃对照组,每组各 48 只。所有大鼠均经 L_{5~6} 椎间孔外口先插入钢棒“致压”、后植入髓核“致炎”的方法建立 DRG 损伤疼痛模型,分别施行模拟 L_{5~6} 关节假手法、模拟 L_{5~6} 关节松动手法、模拟 L_{5~6} 关节调整手法、COX-2 抑制药 Etoricoxib 内服。每组各取 6 只大鼠于术前 1 d 及术后第 1,7,15,21 天行机械性撤足痛阈值(PWT)的测定;每组各取 24 只大鼠于术后第 9 天和第 21 天时取出手术同侧的 L₅ DRG,其中 18 只用于 TRPV4 通道蛋白表达的检测;6 只用于 NO 代谢产物亚硝酸盐含量的检测。**结果:**低速-快加速组 50%PWT 在术后第 7 天时开始高于低速-零加速组,差异有统计学意义($P<0.05$);第 15 天和第 21 天时更高,差异有统计学意义($P<0.01$)。低速-慢加速组 50%PWT 在术后第 1 天时高于低速-快加速组,差异有统计学意义($P<0.05$);但第 7,15,21 天时两者并无差别,差异无统计学意义($P>0.05$)。低速-慢加速组与 Etoricoxib 组相比较并无差别,差异无统计学意义($P>0.05$)。经腰椎旋转手法干预后,SNK 检验显示在术后第 9 天和第 21 天时低速-慢加速组、低速-快加速组、Etoricoxib 组的 TRPV4 蛋白平均灰度值、亚硝酸盐含量两两比较并无差异,但均明显低于低速-零加速组($P<0.01$)。**结论:**慢加速与快加速模拟手法对 TRPV4/NO 通路的抑制强度无差异,均与口服 Etoricoxib 的效果相当。在其他力学影响因素不变的情况下,不同的加速度载荷并不影响最终的消炎祛痛效果。

[关键词] 旋转手法;加速度;香草素受体 4/一氧化氮;疼痛

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2021)12-0022-04

Observation on the Efficacy of TRPV4/NO Expression in DRG by Slowly-Accelerating or Fastly-Accelerating Types of Spinal Manipulation on Acute Radiculopathy in Rat Model

HAN Xue¹ ZHANG Jun^{1△} HAN Lei¹ GENG Jinchao¹ CUI Ying¹

¹ Wangjing Hospital of Chinese Academy of Traditional Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China.

Abstract Objective: To compare the efficacies of fastly-accelerating and slowly-accelerating types of spinal manipulation on mechanical hyperalgesia, TRPV4 channel protein expression and nitrite content in rat dorsal root ganglion (DRG) injury model with acute radiculopathy and to explore the anti-inflammatory and analgesic efficacies of rotating manipulation under different acceleration loads. **Methods:** 192 male SD rats were randomly divided into low-speed and no-accelerating manipulation group, low-speed and fastly-accelerating manipulation group, low-speed and slowly-accelerating manipulation group and positive medicine gavage control group, with 48 rats in each group. In all rats, steel rods were inserted into the outer orifice of L_{5~6} intervertebral foramen to induce pressure, then nucleus pulposus were applied to induce inflammation, and finally DRG injury models were established. Four groups were performed Simulated L_{5~6} joint sham manipulation,

simulated L_{5~6} joint loosening manipulation, simulated L_{5~6} joint adjustment manipulation and oral administration of Etoricoxib, a COX-2 inhibitor. Six rats in each group were selected to measure the 50% mechanical paw withdrawal threshold (PWT) one day before modeling and 1, 7, 15, 21 d

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81373657)

国家自然科学基金青年项目(81503602)

¹ 中国中医科学院望京医院(北京, 100102)

△通信作者 E-mail: zhangjunmd@163.com

after modeling. The left L₅ DRG of 24 rats in each group were collected on days 9,21 respectively after surgery to detect the expression of TRPV4 with 18 rats and nitrite content with 6 rats in each group. **Results:** The 50% PWT in the low-speed and fastly-accelerating group was higher than that in the low-speed and no-accelerating manipulation group on the 7th day after operation ($P<0.05$) and was higher at the 15th and 21st day ($P<0.01$). The 50% PWT in the low-speed and slowly-accelerating manipulation group was higher than that in the low-speed and fastly-accelerating group on the 1st day after operation ($P<0.05$), but there was no difference between the two groups on the 7th, 15th and 21st days ($P>0.05$). There was no difference between the low-speed and slowly-accelerating manipulation group and positive drug gavage control group ($P>0.05$). SNK test showed that there was no difference in the TRPV4 protein gray value and nitrite content among low-speed and fastly-accelerating manipulation group, low-speed and slowly-accelerating manipulation group and positive drug gavage control group at 9 and 21 d after operation, but they were significantly lower than those in low-speed and no-accelerating manipulation group ($P<0.01$). **Conclusion:** There is no difference in the inhibition intensity of TRPV4/NO pathway between low-speed and slowly-accelerating and low-speed and fastly-accelerating manipulation, which are similar to Etoricoxib gavage. In the case of other mechanical factors unchanged, different accelerating load does not affect the final anti-inflammatory and analgesic efficacy.

Keywords: rotating manipulation; acceleration; transient receptor potential vanilloid 4/nitric oxide; pain

既往的动物模型证实背根节(Dorsal Root Ganglion, DRG)炎症反应是诱发和维持神经根痛觉敏感的原因^[1-3],有研究表明 DRG 神经元上的瞬时感受器电位离子通道香草素受体 4(Transient Receptor Potential Vanilloid 4, TRPV4)/一氧化氮(Nitric Oxide, NO)信号通路在痛敏状态调控中发挥着重要作用^[4-7]。鉴于此,笔者推测脊柱手法(Spinal Manipulation, SM)治疗根性痛和痛敏的起效机制可能与 TRPV4/NO 信号通路的活化状态有关。课题组前期研究发现,模拟腰椎旋转手法的抗炎祛痛效果可以通过抑制 TRPV4/NO 信号通路而实现,此通路在“力学效应-抗炎效应”之间起着桥梁作用^[8]。本研究进一步探讨模拟的低速-慢加速旋转手法和低速-快加速旋转手法对 TRPV4/NO 通路的抑制强度有无差异以及不同的加速度载荷是否影响最终的祛痛效果,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级雄性 SD 大鼠 192 只,体质量(150 ± 10)g,由斯贝福(北京)实验动物科技有限公司提供(实验动物生产许可证号为 SCXK(京)2019-0010),饲养在解放军总医院第四医学中心动物实验研究中心屏障环境实验室,温度 25℃,相对湿度为 50%~65%,光/暗周期为光照 12 h/黑暗 12 h。行为实验于 9:00 至 18:30 期间进行。

1.2 仪器与试剂

动物脊椎关节力学性能测试装置由北京工业大学制作,已获国家知识产权局发明专利(专利号为 ZL201310634617.4);纤毛机械刺激针(Von Frey Hairs, VFH)购于美国 Stoeling 公司;TRPV4 一抗购于英国 Abcam 公司(编号 ab219192);NO 检测试剂购

于江苏 Beyotime 公司(编号 S0023)。

1.3 造模与分组

参照课题组前期建立的经 L_{5~6} 椎间孔外口先插入钢棒“致压”、后植入髓核“致炎”的大鼠 DRG 损伤疼痛模型^[9],所有实验动物均按此所述进行造模。采用 SPSS19.0 软件产生随机数字的方法将模型大鼠随机分为:低速-零加速旋转手法组(48 例)、低速-慢加速旋转手法组(48 例)、低速-快加速旋转手法组(48 例)、阳性药物灌胃对照组(48 例),即分别施行模拟 L_{5~6} 关节假手法、模拟 L_{5~6} 关节松动手法、模拟 L_{5~6} 关节调整手法及 COX-2 抑制药 Etoricoxib 内服。

1.4 方法

1.4.1 模拟腰椎旋转手法操作^[10] 首先将模型大鼠均束缚固定在俯卧背伸 10°角体位,然后在动物脊椎关节力学性能测试装置上设定手法运行速度、持续时间、旋转角度等参数,从而完成以下 3 种 L_{5~6} 关节手法的模拟操作,见图 1。依据既往对临床手法应力曲线特点的分析,将关节手法的实验模拟操作依次分为 3 个时相:1)旋转相,由中立位开始,以 8.33°/s 匀速向术侧旋转;2)扳动相,继续零加速(1 倍速)、或慢加速(2 倍速)、或快加速(3 倍速)旋转;3)回位相,以 8.33°/s 匀速旋转恢复至中立位。本实验中 3 种 L_{5~6} 关节手法之间的差异主要体现在扳动相旋转加速度的变化上。于造模后第 1 天开始干预,隔日 1 次,共计 11 次,共 3 周。

1.4.2 COX-2 抑制药 Etoricoxib 灌胃内服,研究证实 NO 介导的炎症性痛敏与前列腺素 E(PGE)的释放有着密切关系,Etoricoxib 内服可以抑制 COX 的表达,减少 PGE 的产生,从而缓解 NO 介导的炎症性痛敏^[11-12]。因此,Etoricoxib 被选作阳性对照药。

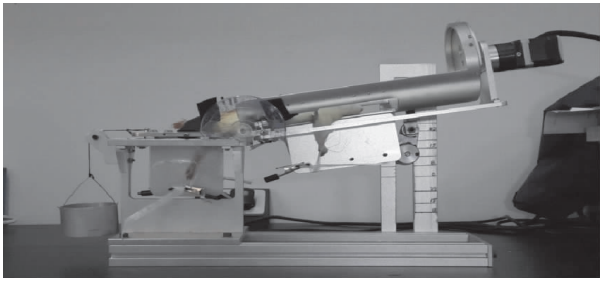


图1 不同加速度的同侧旋转模拟3种旋转手法的实验场景

使用 Etoricoxib 按 10 mg/(kg · d)灌胃,于造模后第 1 天开始施行,连续 21 d。

1.4.3 机械性撤足痛阈值的测试 每组各取 6 只大鼠于术前 1 d 及术后第 1,7,15,21 天行机械性撤足痛阈值(Paw Withdrawal Threshold,PWT)的测定:将大鼠放置于带底部网格的有机玻璃箱内,遵照Chaplan 等^[13]的“up and down”方法,运用不同强度的纤毛机械刺激针 VFH 刺激大鼠术侧足底,如果在刺激时间 6~8 s内出现缩足反应,即用 Dixon^[14]的方法推算出 50%PWT,评价实验大鼠术侧足底机械痛敏程度。

1.4.4 TRPV4 通道蛋白表达的检测 每组各取 18 只大鼠于术后第 9 天和第 21 天时,即 L_{5~6}手法治疗 5 次、11 次时,深麻醉后开胸,经主动脉快速灌注法,解剖取出手术同侧的 L₅ DRG。采用 Western Blot 印迹法检测,3 个 L₅ DRG 作为一个样本,提取组织总蛋白,使用 BCA 法进行蛋白定量后,经聚丙烯酰胺凝胶电泳,加入 TRPV4 一抗孵育过夜,冲洗后再加入辣根过氧化物酶标记的二抗 1.5 h,化学发光显色、显影、定影处理,获取目的条带,并与内参 β-actin 的光密度作比较。

1.4.5 NO 代谢产物亚硝酸盐(Ni-trite)含量的测量 每组各取 6 只大鼠于术后第 9 天和第 21 天时,同样方法解剖取出手术同侧的 L₅ DRG。采用 Griess Reagent法检测,按 50 μL/孔在 96 孔板中加入用 DMEM+10%缓冲液稀释的标本,向孔中再加入配制好的 Griess I 和 Griess II,于 37 ℃ 孵箱中反应 10 min,待反应液完全混匀后,于 540 nm 波长检测各孔 OD 值,拟合亚硝酸盐反应曲线,计算亚硝酸盐含量。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组大鼠 50%机械性撤足痛阈值 PWT 的比较

术前各组 50%PWT 在同一水平,差异无统计学意义($P>0.05$)。低速-快加速组 50%PWT 在术后第 7 天时开始高于低速-零加速组,差异有统计学意义($P<0.05$),第 15 天和第 21 天时更高,差异有统计学意义($P<0.01$)。低速-慢加速组 50%PWT 在术后第 1 天时高于低速-快加速组,差异有统计学意义($P<0.05$),但第 7,15,21 天时两者差异无统计学意义($P>0.05$)。低速-慢加速组与 Etoricoxib 组相比较差异无统计学意义($P>0.05$)。各组大鼠手术前后 50%PWT 见表 1。

2.2 各组大鼠 TRPV4 通道蛋白平均灰度值、NO 代谢产物亚硝酸盐含量的比较

经腰椎旋转手法干预后,SNK 检验显示在术后第

表 1 各组大鼠术前 1 d 和术后第 1,7,15,21 天 50%PWT 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	术前 1 d	术后第 1 天	术后第 7 天	术后第 15 天	术后第 21 天
Etoricoxib 组	23.7±1.7	11.9±1.3	6.7±0.6	11.7±1.3	18.8±1.8
低速-零加速组	23.5±1.6	11.1±1.2	5.5±0.5 ¹⁾	9.7±0.8 ²⁾	13.1±1.4 ²⁾
低速-慢加速组	23.6±1.7	12.2±1.2 ³⁾	7.9±0.7	12.5±1.5	19.3±1.7
低速-快加速组	23.4±1.5	10.3±1.1	7.1±0.6	11.8±1.4	20.5±1.9
F	0.032	3.009	15.150	5.851	22.955
P	0.992	0.054	<0.001	0.005	<0.001

注:与低速-零加速组比较,1) $P<0.05$,2) $P<0.01$;与低速-快加速组比较,3) $P<0.05$ 。

9 天及第 21 天时低速-慢加速组、低速-快加速组、Etori-
coxib 组的 TRPV4 蛋白平均灰度值、亚硝酸盐含量两两

比较无差异,但均明显低于低速-零加速组,差异有统计
学意义($P<0.01$),数据及组内前后比较见表 2。

表 2 各组大鼠术后第 9 天和第 21 天 TRPV4 蛋白平均灰度值及亚硝酸盐含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	TRPV4 蛋白平均灰度值		亚硝酸盐含量/(μg · mL ⁻¹)	
	术后第 9 天	术后第 21 天	术后第 9 天	术后第 21 天
Etoricoxib 组	3.74±0.91	1.70±0.55	9.57±0.35	5.11±0.18
低速-零加速组	4.50±1.15 ¹⁾	2.15±0.63 ¹⁾	13.96±0.47 ¹⁾	7.35±0.29 ¹⁾
低速-慢加速组	3.45±0.82	1.57±0.51	9.22±0.30	4.92±0.17
低速-快加速组	3.20±0.78	1.35±0.48	9.03±0.25	4.64±0.14
F	2.207	2.317	270.795	222.665
P	0.119	0.106	<0.001	<0.001

注:1)与低速-零加速组比较, $P<0.01$ 。

3 讨论

3.1 扳动加速度的瞬时变化是区分慢加速、快加速旋转手法的重要力学指标

腰椎旋转手法属于运动关节类手法之一,即先做关节被动的旋转、屈伸等,再施以有控制的关节瞬间扳动。此扳动力的量化测量多集中在时间、大小、方向、速度、加速度等参数^[15-17],其中瞬时加速度的增加是扳动发力环节的核心要素,代表着扳动操作的运动力学特征,在实时采集的力学操作轨迹中可记录为突然发生改变的曲线图形,是临床上将旋转手法归类于“柔性增力”或是“刚性增力”的判别指标之一。鉴于此,本实验设计了 3 种加速度的加载形式,分别为零加速、慢加速(2 倍速)、快加速(3 倍速),并通过动物脊椎关节力学性能测试装置对时间、方向、角度、速度等参数的设定模拟临床实施的安慰手法、松动手法、调整手法。该测试装置主要由屈伸支架、旋转托架、固定底盘等构成,依靠步进电机驱动旋转,自动回转步距角为 1.8° ,16 细分,步距角精度为 $\pm 5\%$,回转半径为 55 mm,最大扭矩为 1 nm,最高角速度为 $0.5\pi\text{rad/s}$,前期已证实被施加在大鼠模型上的模拟手法刺激量是可承受的、安全可控的。

3.2 常见的加速度载荷变化并不是决定脊柱手法祛痛效果的关键力学因素

椎间关节紊乱是目前手法医学所公认的主要病理改变之一,在现代称之为“椎体位移”或“椎体半脱位”,属于传统中医学“骨错缝”的范畴^[18-19],最近似乎达成一种共识,即椎间关节的力学问题可视为节段性、功能性的运动障碍^[20-21],脊柱关节手法可以直接矫正力学紊乱,恢复受累关节的可动性。既往经验同时发现,只有适度的手法施力才会产生既安全又高效的效果。手法施力过度或不及往往会增添损害或难以起效,这一点已经得到 Cao 等^[22]、Reed 等^[23]相关报道的证实。也即脊柱手法对关节施加的应力在适量时属于一种有益的非伤害性刺激,而在过量时也能够造成伤害性刺激^[24]。实验证实关节囊所受牵张力在 $44.2\% \pm 16.7\%$ 时,大多数(83%)非伤害性感受器表现出饱和反应;在 $47.2\% \pm 9.6\%$ 时将启动伤害性感受器反应产生疼痛感觉^[25]。那么,可以推断达到最佳效果时的牵张力也可能将要或已经产生进一步的损伤。

本实验所设定的加速度载荷并没有引发模型大鼠不良的损伤反应,推测也没有启动关节囊伤害感受器的反应,也可以确定均未达到最有益、最适量的手法刺激。通过模拟手法对 DRG 神经元上 TRPV4/NO 通路抑制强度的比较,结果显示慢加速与快加速模拟手法疗程结束后最终的消炎祛痛效应相近,均与口服

Etoricoxib 的效果相当。

综上所述,在其他力学影响因素不变的情况下,旋转扳动加速度的变化并不能引起手法最终祛痛效果出现明显的差异,提示临床上处理神经根性疼痛时选用手法并不必过度关注扳动手法的加速度。继续探索“适度而高效”的手法参数范围和使用原则,也许是提高脊柱手法临床疗效和安全的关键途径之一。

参考文献

- [1] KAWAKAMI M, TAMAKI T, WEINSTEIN J N, et al. Pathomechanism of pain-related behavior produced by allografts of intervertebral disc in the rat[J]. Spine (Phila Pa 1976), 1996, 21(18): 2101-2107.
- [2] 唐家广, 袁文, 王新伟, 等. 一个新的椎间盘源性坐骨神经疼痛动物模型的建立[J]. 脊柱外科杂志, 2008, 6(3): 144-147.
- [3] 魏明, 张劲军, 贺秋兰, 等. 新型腰椎间盘突出致坐骨神经痛大鼠模型及硬膜外腔置管方法的建立[J]. 中国疼痛医学杂志, 2011, 17(12): 744-748.
- [4] ALESSANDRI-HABER N, JOSEPH E, DINA O A, et al. TRPV4 mediates pain-related behavior induced by mild hypertonic stimuli in the presence of inflammatory mediator [J]. Pain, 2005, 118(12): 70-79.
- [5] 池俊莹, 李雨婷, 宁佳怡, 等. 神经系统中 TRPV4 的研究进展[J]. 海南医学, 2018, 29(20): 2929-2932.
- [6] 张晓, 曲玉娟, 贾磊, 等. 大鼠脊髓背角 TRPV4 在背根神经节持续受压致神经病理性疼痛中的作用[J]. 中国康复医学杂志, 2017, 32(2): 156-160.
- [7] 丁欣利, 张杨, 王永慧, 等. 瞬时感受器电位离子通道香草素受体 4 下游信号分子的确定及其对大鼠背根神经节慢性压迫后痛觉过敏的作用[J]. 中国康复医学杂志, 2011, 26(1): 39-44.
- [8] 韩磊, 李艺, 郭广进, 等. 模拟腰椎旋转手法抑制瞬时感受器电位离子通道香草素受体 4/一氧化氮镇痛转导通路的作用研究[J]. 安徽医药, 2020, 24(4): 677-680.
- [9] 韩磊, 李艺, 赵平. 腰椎关节手法对背根神经节伤害性疼痛大鼠疼痛行为学及一氧化氮含量的影响[J]. 北京中医药, 2019, 38(4): 340-343.
- [10] 韩磊, 李艺, 赵平. 模拟 2 种腰椎关节手法对大鼠腰神经节损伤模型机械痛敏的作用研究[J]. 空军医学杂志, 2019, 35(2): 117-119.
- [11] 牛晓方. 依托考昔研究进展[J]. 医药导报, 2010, 29(2): 221.
- [12] 孙喆, 李洁, 苗军. 依托考昔片联合甲钴胺注射液治疗腰椎间盘突出症的疗效观察[J]. 天津药学, 2012, 24(4): 40-42.
- [13] CHAPLAN S R, BACH F W, POGREL J W, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw[J]. J Neurosci Methods, 1994, 53(1): 55-63.