

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.04.010

◇临床医学◇

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4/一氧化氮疼痛转导通路的作用研究

韩磊, 李艺, 郭广进, 赵平

作者单位: 中国人民解放军空军特色医学中心正骨治疗科, 北京 100142

通信作者: 赵平, 男, 主任医师, 研究方向为脊柱手法的临床与基础, E-mail: kzzp@sina.com

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(81503602)

摘要: **目的** 观察模拟腰椎旋转手法对腰神经根疼痛模型大鼠背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)内瞬时感受器电位离子通道香草素受体4(transient receptor potential vanilloid 4, TRPV4)表达、一氧化氮(Nitric Oxide, NO)含量变化的影响, 探讨手法抑制TRPV4/NO疼痛转导通路的作用。**方法** 2017年3月至2018年10月, 将144只雄性SD大鼠随机分为假手术组、模型组、模型+钆红组, 每组各48只。其中假手术组只在相应椎节(L_{5/6})左侧做局部软组织切开, 未建模; 模型组通过手术在特定椎节(L_{5/6})左侧建立L₅神经根疼痛模型; 模型+钆红组在建模后向L₅背根节注射TRPV4抑制剂钆红0.1 nmol。所有组别均施行统一量化的模拟腰椎旋转手法, 频率1次/隔日, 治疗期为3周。每组各取24只大鼠于术后第9、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** 经蛋白质印迹法条带比较, 发现模型组TRPV4为高表达, 模型+钆红组TRPV4表达比模型组减弱, 但仍强于假手术组。经腰椎旋转手法干预后, 在术后第9、21天时模型组亚硝酸盐含量均值(9.17 nm/mL, 5.31 nm/mL)均明显低于模型+钆红组(14.36 nm/mL, 9.45 nm/mL), 均明显高于假手术组(6.23 nm/mL, 3.84 nm/mL)(均 $P < 0.001$)。**结论** TRPV4/NO通路是调控神经根疼痛敏感状态的重要信号转导通路之一。腰椎旋转手法可能是通过调控DRG神经元上的TRPV4/NO通路, 来达到迅速缓解DRG神经痛敏的作用。

关键词: 推拿; 脊柱; 神经根病; 腰椎旋转手法; 香草素受体4; 一氧化氮; 钆红; 大鼠, Sprague-Dawley

Experimental study on inhibiting transient receptor potential vanilloid 4/nitric oxide pain signal pathway by lumbar rotatory manipulation on rats model with lumbar radicular pain

HAN Lei, LI Yi, GUO Guangjin, ZHAO Ping

Author Affiliation: Department of Orthopedic Therapy, Medical Center of Air Force of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100142, China

Abstract: Objective To observe the changes of lumbar rotatory manipulation on the expression of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) and nitric oxide(NO) content in dorsal root ganglion(DRG) of rats with lumbar radicular pain model, and to explore the effect of manipulation on TRPV4/NO pain signal pathway. **Methods** One hundred and forty-four male Sprague-Dawley rats were randomly assigned into three groups: sham surgery group, radicular pain model group, model+ ruthenium red (RR) group, with 48 rats in each group. The sham surgery group performed local soft tissue incision on the left side of the corresponding vertebral segment (L5-6) without modeling; the model group established the L5 nerve root pain model on the left side of the specific vertebral segment (L5-6) through surgery; the model+ ruthenium red (RR) group with TRPV4 inhibitor 0.1 nmol into the L₅ dorsal root ganglion after modeling. All groups were subjected to a unified and quantified simulated lumbar rotatory manipulation, with a frequency of 1 time per 2 days, and the treatment period was 3 weeks. The left L₅ dorsal root ganglion (DRG) of 24 rats in each group were collected on days 9, 21 respectively after surgery for detecting the expression of TRPV4 with 18 rats and nitrite content with 6 rats in each group. **Results** Western blot results showed that the TRPV4 expression in the model+RR group was weaker than that in the model group, but it was still stronger than that in the sham operation group. After lumbar rotatory manipulation treating, the nitrite content in the model group on the 9th and 21st day after operation was 9.17 and 5.31, which was lower than 14.36 and 9.45 of the model+RR group and was higher than 6.23 and 3.84 of the sham operation group (all $P < 0.001$). **Conclusion** The TRPV4/NO pathway is one of the important signal transduction pathways that regulate the sensitive state of nerve root pain. Lumbar rotatory manipulation can rapidly alleviate radicular pain, which may be achieved by regulating the TRPV4/NO pathway on DRG.

neurons.

Key words: Manipulation, spinal; Radiculopathy; Lumbar rotatory manipulation; Transient receptor potential vanilloid 4; Nitriteoxide; Ruthenium red; Rats, sprague-dawley

前期研究^[1]发现,模拟腰椎旋转手法能促使急性神经根疼痛模型大鼠痛阈短期内出现快升变化,以及背根节一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)表达下调,提示手法能快速改善炎性环境和异常痛敏。另有研究^[2]发现,瞬时感受器电位离子通道香草素受体4(transient receptor potential vanilloid 4, TRPV4)可被机械力刺激激活,称作一种“瞬时力传感器”;那么旋转手法实施过程中扳动加速度瞬间增快时的旋转力就有可能影响TRPV4的表达。现已证实一氧化氮(nitric oxide, NO)是TRPV4调控的下游信号分子^[3],手法促使NOS表达下调就会导致NO合成减少,因此我们推测腰椎手法有可能抑制了TRPV4/NO此通路的活化程度,从而发挥着减轻根性疼痛的作用。本研究利用建立的由腰椎间孔外口先插入钢棒、后植入髓核诱导的大鼠神经根疼痛模型,通过研制出的模拟临床腰椎旋转手法的大鼠测试仪,旨在探讨旋转手法对背根节神经元上TRPV4/NO通路的调控作用。

1 材料与方法

1.1 动物与分组 清洁级雄性SD大鼠144只,体重(150±10)g,由斯贝福实验动物科技有限公司提供(批号15183),本研究中对于大鼠的处理符合动物伦理学标准。采用SPSS 19.0软件产生随机数字表的方法随机分为假手术组($n=48$)、模型组($n=48$)、模型+钉红组($n=48$)。假手术组只在相应椎节(L_{5/6})左侧做局部软组织切开,未建模,作为空白对照;模型组通过手术在特定椎节(L_{5/6})左侧建立L₅神经根疼痛模型;模型+钉红组在建模后向L₅背根节注射TRPV4抑制剂钉红(Ruthenium Red, RR) 0.1 nmol。后两组通过抑制TRPV4与否来观察其在神经根性疼痛反应中的调控作用。

1.2 仪器与试剂 脊柱关节手法模拟装置(国家知识产权局发明专利,专利号:ZL201310634617.4);纤毛机械刺激针 Von Frey Hairs, VFH(美国 Stoeling 公司);TRPV4一抗(英国 Abcam 公司);NO检测试剂(江苏 Beyotime 公司);TRPV4拮抗剂钉红(美国 Sigma 公司)。

1.3 模型制备 参照 Song 等^[4]的大鼠背根神经节压迫模型和课题组前期研究的神经根炎症模型^[5],建立了在L_{5/6}椎间孔外口先插入钢棒“致压”、后植入髓核“致炎”的大鼠神经根疼痛模型。

1.4 干预方式 以上三组均施行统一量化的模拟腰椎旋转手法:将大鼠束缚固定在脊柱关节手法模拟装置上,体位设为俯卧背伸10°,施行低速-慢加速旋转运动。首先由中立位0°以起始速度(8.33 %/s)向术侧匀速旋转25°,之后再以2倍速度(16.67 %/s)继续加速旋转至30°结束,最后再以起始速度(8.33 %/s)恢复至中立位0°,从而完成腰椎旋转手法的整个模拟过程。于造模后第1天开始干预,频率1次/隔日,共计完成11次,治疗期为3周。

1.5 检测指标 每组各取24只大鼠于术后第9、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背根神经节(dorsal root ganglion, DRG),其中18只用于TRPV4检测;6只用于NO检测。

TRPV4通道蛋白的表达:采用蛋白质印迹法检测,3个L₅ DRG作为一个样本,提取组织总蛋白,使用BCA蛋白质定量法进行蛋白定量后,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的光密度做比较。

NO代谢产物亚硝酸盐含量:采用 Griess Reagent 法检测,按50微升/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。

1.6 统计学方法 采用SPSS 19.0统计软件进行分析。所有数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK- q 检验,组内前后两两比较采用配对 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 三组间TRPV4通道蛋白表达比较 经蛋白质印迹法条带(内参为 β -Actin)比较,发现模型组TRPV4为高表达,模型+钉红组TRPV4表达比模型组减弱,但仍强于假手术组。以术后第9天为例,见图1。经腰椎旋转手法干预后,SNK检验显示三组间TRPV4蛋白平均灰度值完全不相等,而且两两比较均差异有统计学意义(均 $P<0.001$)。见表1。

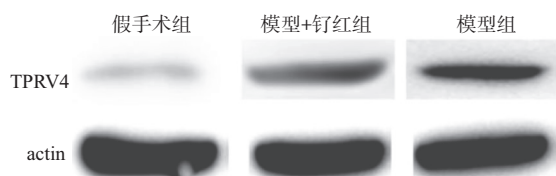


图1 三组瞬时感受器电位离子通道香草素受体4(TRPV4)蛋白质印迹法条带比较

2.2 三组间NO代谢产物 经腰椎旋转手法干预后,SNK-*q*检验显示三组间亚硝酸盐含量均值完全不相等,而且两两比较均差异有统计学意义(均 $P < 0.001$)。因此,在术后第9、21天时模型组亚硝酸盐含量均明显低于模型+钉红组,但均明显高于假手术组。见表1。

表1 不同处理组术后第9和21天瞬时感受器电位离子通道香草素受体4(TRPV4)蛋白平均灰度值和亚硝酸盐含量比较/(nm/mL, $\bar{x} \pm s$)

分组	样本数	TRPV4蛋白平均灰度值		亚硝酸盐含量	
		术后9 d	术后21 d	术后9 d	术后21 d
假手术组	6	1.14±0.37	0.60±0.13	6.23±0.15	3.84±0.08
模型组	6	3.53±0.93 ^a	1.59±0.48 ^a	9.17±0.24 ^a	5.31±0.19 ^a
模型+钉红组	6	2.41±0.75 ^{ab}	1.05±0.24 ^{ab}	11.36±0.33 ^{ab}	9.45±0.27 ^{ab}
<i>F</i> 值		18.20	16.62	2 669.98	6 045.89
<i>P</i> 值		0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0

注:与假手术组比较,^a $P < 0.001$;与模型组比较,^b $P < 0.001$

3 讨论

3.1 TRPV4/NO通路是调控神经根疼痛敏感状态的重要信号转导通路之一 研究表明,疼痛敏感状态多是由于DRG受损细胞的兴奋性增高和异位电活动引起的,而多种离子通道被认为与DRG炎症损伤后的高兴奋性有关^[6-8],如电压门控性钠离子通道和钾离子通道、超极化激活性阳离子通道、机械敏感性离子通道等。其中,瞬时感受器电位离子通道家族中的香草素受体TRPV家族越发获得当前的广泛关注。TRPV家族包括TRPV1-6,其基因和拓扑结构都较相近。其中TRPV4是大鼠DRG上的一种多觉型感受器,可被机械刺激、低渗、低PH值、佛波醇酯等激活,同时参与介导机械性痛敏和炎症性痛敏^[9-12]。因此,当TRPV4出现高表达就意味着DRG神经痛敏状态的存在。TRPV4受体的激活可以引起DRG神经元细胞内大量钙离子内流,导致具有钙离子依赖性的一氧化氮合成酶促进L-精氨酸合成NO。NO是参与介导伤害性疼痛信号传递中的重要介质,它既能通过cGMP-PKG通路促进兴奋性神经递质-谷氨酸(Glu)的释放,又能通过此通路减缓抑制性神经递质-氨基丁酸(GABA)电流;同时又能增

加降钙素基因相关肽(CGRP)的表达量^[13-15]。综上所述,DRG损伤模型大鼠伤害性疼痛信号的传递途径可能是:DRG持续压迫和炎症刺激能够增加TRPV4的表达和功能,导致细胞内钙离子内流增多,增加钙离子依赖性NOS表达,催化L-精氨酸合成NO,进一步调节下游的cGMP-PKG级联反应,并调节突触联系,促进Glu等兴奋性神经递质和CGRP等神经肽类物质的释放,从而调节伤害性疼痛信号的传递,这就是TRPV4/NO信号通路增高DRG细胞损伤后的电兴奋,参与介导炎症性痛敏的全过程。因此,TRPV4介导其下游信号分子NO合成,继而促进痛敏信号的传递;TRPV4/NO信号通路与痛敏状态密切相关,活化TRPV4/NO信号通路对痛敏状态有调控作用。

3.2 腰椎旋转手法可能通过抑制TRPV4/NO信号通路而缓解根性疼痛和痛觉敏感 近年来有学者指出,腰椎旋转手法之所以产生疗效并一直沿用至今,其所谓“筋归槽”“骨合缝”机制的关键环节很可能与其力学效应触发了自身神经-内分泌网络系统反馈调节的生物学效应——“抗炎镇痛作用”有关^[16-18]。腰椎旋转手法的治疗干预呈现的是一种物理形式的机械力在肌骨组织应力点上的传达,在某种特定的椎间关节相对运动中可以通过减缓反应性关节炎高张力,而对神经根及其周围组织的缺血状态产生影响。通过微环境的血运改善,细胞缺氧状态逐渐缓解,以及细胞膜张力发生变化,机械敏感性离子通道亦随之呈现相应变化,细胞膜上的机械张力信号向细胞内传导就转换成电信号或生化信号,进而促使炎症性痛敏信号的减弱。这种机械-电信号/化学信号转换过程可能提示了:其可能是旋转手法“生物应力效应”转换为“生物抗炎效应”的关键所在。

鉴于TRPV4/NO信号通路在DRG神经痛敏中的传递途径和调控作用,它可能在“力学效应-抗炎效应”两者之间起着重要的“桥梁”作用。TRPV4由于自身对机械刺激敏感特性,可作为“瞬时力传感器”对旋转手法产生的牵张力学刺激产生反应。本研究证实,在适度手法干预后可以使得模型组NO的生成减少;然而通过钉红阻断TRPV4感受力学信号的作用,旋转手法减少NO含量的效果就会明显降低,其抗炎镇痛效应就被削弱。也就是说,TRPV4/NO通路被抑制与腰椎旋转手法快速抗炎镇痛效果有密切关系,腰椎旋转手法迅速缓解DRG神经痛敏的作用很可能与调控DRG神经元上的TRPV4/NO通路有关。

此外,本研究模拟了一种腰椎关节松动手法,其运动力学特征是低速度、慢加速、低幅度的旋转运动^[19-20],也就是说通过一个增力轻柔但稳定的扭转力作用到病变节段的关节囊及DRG,即可活化TRPV4/NO通路达到快速镇痛的效果,为临床如何适度控制手法力度、发挥手法效应和减少副损伤提供了重要的参考依据。模拟不同力学形式的手法进行抗炎镇痛效应的相互比较将是下一步研究的重点。

参考文献

- [1] 韩磊,郭伟,卫杰,等.脊柱松动手法减轻急性腰神经根炎大鼠根性疼痛作用研究[J].北京中医药,2015,34(8):612-616.
- [2] NELL RG, HELLER S. The mechanosensitive nature of TRPV channels[J]. Pflugers Arch, 2005, 451(1): 193-203.
- [3] 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.
- [4] SONG XJ, HU SJ, GREENQUIST KW, et al. Mechanical and thermal hyperalgesia and ectopic neuronal discharge after chronic compression of dorsal root ganglia[J]. J Neurophysiol, 1999, 82(6):3347-3358.
- [5] 韩磊,赵平,郭伟,等.腰椎间孔外口植入髓核致坐骨神经痛大鼠模型的建立[J].北京中医药,2015,34(3):245-248.
- [6] TAN ZY, DONNELLY DF, LAMOTTE RH. Effects of a chronic compression of the dorsal root ganglion on voltage-gated Na⁺ and K⁺ currents in cutaneous afferent neurons[J]. J Neurophysiol, 2006, 95(2):1115-1123.
- [7] CHO H, SHIN J, SHIN CY, et al. Mechanosensitive ion channels in cultured sensory neurons of neonatal rats[J]. J Neurosci, 2002, 22(4):1238-1247.
- [8] 黄云,张广钦.神经病理性疼痛小鼠背根神经节河豚毒素敏感型钠电流的变化特征[J].安徽医药,2016,20(2):232-235.
- [9] ALESSANDRI-HABER N, DINA OA, YEH JJ, et al. Transient receptor potential vanilloid 4 is essential in chemotherapy-induced neuropathic pain in the rat[J]. J Neurosci, 2004, 24(18):4444-4452.
- [10] ALESSANDRI-HABER N, JOSEPH E, DINA OA, 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.
- [11] 池俊莹,李雨婷,宁佳怡.神经系统中TRPV4的研究进展[J].海南医学,2018,29(20):2929-2932.
- [12] 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.
- [13] ZHOU L, ZHU DY. Neuronal nitric oxide synthase: structure, sub-cellular localization, regulation, and clinical implication[J]. Nitric Oxide, 2009, 20(4):223-230.
- [14] CHIO BS, KIM KW, LEE YJ, et al. Exhaled nitric oxide is associated with allergic inflammation in children[J]. J Korean Med Sci, 2011, 26(10):1265-1269.
- [15] SCHMIDTKO A, GAO W, KÖNIG P, et al. cGMP produced by NO-sensitive guanylyl cyclase essentially contributes to inflammatory and neuropathic pain by using targets different from cGMP-dependent protein kinase I[J]. J Neurosci, 2008, 28(34):8568-8576.
- [16] WALKER BF, HEBERT JJ, STOMSKI NJ, et al. Short-term usual chiropractic care for spinal pain: a randomized controlled trial[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2013, 38(24):2071-2078.
- [17] MELZACK R, WALL PD. Pain mechanisms: a new theory[J]. Science, 1965, 150(699):971-979.
- [18] TEODORCZYK-INJEYAN JA, INJEYAN HS, RUEGG R. Spinal manipulative therapy reduces inflammatory cytokines but not substance P production in normal subjects[J]. J Manipulative Physiol Ther, 2006, 29(1):14-21.
- [19] 王飞.两种腰椎手法对椎间盘和关节突关节应力应变的作用比较[D].北京:中国中医科学院,2016:37.
- [20] 郭伟,韩磊,闵亚青,等.腰椎手法关节和椎间盘压力的力学研究[J].颈腰痛杂志,2016,37(4):263-267.

(收稿日期:2019-01-09,修回日期:2019-02-25)

◇ 编读往来 ◇

校对诀要

为保证作者文稿刊出准确无误,责编会将编辑的文稿发回作者,要做好这份刊前稿样的核校,作者的操作诀要是:(1)必须回答编者提出的问题(将有批注或文字提问)。详核文题、作者姓名和单位名称(邮编)、科室。(2)对正文(包括外文拼写)、标点符号、数据、图表、计量单位、参考文献等认真细致逐一校对。无原则问题,尽量不改动。(3)务请核查文内角码是否与文末参考文献序号相对应。参考文献缺项的内容,按本刊规定格式补充(如前3位作者全部著录,卷、期要同时写明,作者名刊宜缩写)。(4)认真核查法定计量单位及药物剂量;认真核校文内、表和图中的数字有无计算错误;认真复核统计学处理,写出统计量的具体值(如 χ^2 值、t值、P值的大小)。(5)若改动,必须将编辑编审的电子稿(编辑发回的刊前稿样)下载后用“修订格式”直接修改发回即可——切勿删去修改痕迹。切勿另行启用其它稿样修改。(6)校毕应于3d内发回修改稿,可附以修改说明。

(郝希春)