

针刺通过降低 TNF- α 表达缓解脂多糖诱导的炎性痛

杨玉琳¹,陶文剑^{2,3},唐宗湘^{2*},艾炳蔚^{4*}

(¹南京中医药大学第二临床医学院,江苏 南京 210023;²南京中医药大学基础医学院,江苏 南京 210046;³南京医科大学第一附属医院针灸科,江苏 南京 210029;⁴南京中医药大学附属医院针灸康复科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨针刺对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的慢性炎症疼痛行为的影响以及对慢性炎症的改善机制。方法:将 18 只 6~8 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠随机分为 3 组:对照组小鼠腹腔注射 4 mL/kg 生理盐水;模型组小鼠腹腔注射 LPS 3 mg/kg,制造慢性炎症小鼠模型;针刺组慢性炎症小鼠给予针刺双侧“足三里”穴。3 组小鼠不同处理后,分别采用 Von Frey 检测各组小鼠的机械缩足反射阈值(mechanical withdrawal threshold, MWT),采用酶联免疫法检测各组小鼠肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor, TNF- α)含量,采用杂交 Western blot 检测各组小鼠背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)神经元与热痛相关香草酸瞬时受体亚型 1 蛋白(transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1)表达的差异。结果:针刺组与模型组相比较,小鼠机械痛阈明显升高($P < 0.05$),血清 TNF- α 含量明显降低($P < 0.05$),DRG 神经元 TRPV1 蛋白表达降低($P < 0.05$)。结论:针刺治疗可以减少机体炎症因子的表达,同时也改变 DRG 神经元中 TRPV1 的表达,从而缓解和抑制慢性炎症所导致的疼痛。

[关键词] 针刺;LPS;慢性炎症;TRPV1;TNF- α

[中图分类号] R246

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)03-0303-04

doi:10.7655/NYDXBNS20170309

Acupuncture relieves lipopolysaccharide (LPS) induced inflammatory pain by deregulating of TNF- α

Yang Yulin¹, Tao Wenjian^{2,3}, Tang Zongxiang^{2*}, Ai Bingwei^{4*}

(¹The Second Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023; ²Basic Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046; ³Department of Acupuncture and Moxibustion, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ⁴Department Acupuncture and Rehabilitation, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of acupuncture on pain behavior and the mechanism of acupuncture on improving chronic inflammation. **Methods:** We randomly divided 18 C57BL/6J male mice aged 6 to 8 weeks into three groups. The model and the acupuncture groups were administered with 3 mg/kg lipopolysaccharide (LPS) by intraperitoneal injection to induce chronic inflammation, while the control was administered with 4 ml/kg saline by intraperitoneal injection. The acupuncture group was treated by acupuncture at bilateral zusanli points (ST 36). After different treatments, Von Frey fiber filament was performed to detect mechanical withdrawal threshold(MWT) of the mice in each group. The content of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in each group was detected by euzymelinked immunosorbent assay (ELISA). Bilateral dorsal root ganglion (DRG) neurons were performed to detect the heat pain related transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) expression differences by Western blot. **Results:** Compared with the model group, acupuncture increased the MWT significantly ($P < 0.05$), decreased the serum TNF- α content significantly ($P < 0.05$) and TRPV1 protein expression of DRG neurons ($P < 0.05$). **Conclusion:** Acupuncture treatment could reduce the expression of inflammatory cytokines, but also changed the expression of TRPV1 in DRG neurons, so as to suppress the pain caused by chronic inflammation.

[Key words] acupuncture; LPS; chronic inflammation; TRPV1; TNF- α

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 37(3): 303-306]

[基金项目] 国家自然科学基金(31271181);江苏省高校“青蓝工程”优秀科技创新团队项目;江苏省中西医结合优势学科项目;南京中医药大学江苏省中医药防治肿瘤协同创新中心项目

*通信作者(Corresponding author), E-mail: aibingwei@163.com; zongxiangtang1@163.com

慢性炎症是炎症因子持续存于机体内,同时伴有相关炎症组织损伤和疼痛的病理现象。各种组织的慢性炎症可由急性炎症转化而来,也可通过病原体(细菌、病毒、真菌、支原体等)对机体组织细胞的感染而缓慢发生;慢性炎症通常伴随病原体毒素的释放,导致细胞或组织的损伤,进而诱发疼痛。本研究拟通过观察针刺干预慢性炎症模型小鼠后的机械缩足反射阈值(mechanical withdrawal threshold, MWT)和背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)神经元热痛相关香草酸瞬时受体亚型 1 蛋白(transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1)表达的变化以及血清肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)的差异,探讨针刺治疗的抗炎作用和抑制慢性炎症疼痛的相关机制。

1 材料和方法

1.1 材料

6~8 周龄健康 C57BL/6J 雄性小鼠 18 只,平均体重(22 ± 5)g,由南京中医药大学实验动物中心提供。所有小鼠均在室温 22~24℃,相对湿度 50%~70%条件下分笼饲养,食水自由。光照 12 h、黑暗 12 h 模拟昼夜交替。小鼠适应性饲养 3 d 开始实验。小鼠清洁级饲料由南京市江宁区青龙山动物繁殖坊提供(执行标准:GB/T14924.9-2001)。

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(10 mg, Sigma 公司, 美国),华佗牌针灸针 0.22 mm \times 5 mm、5 \times SDS PAGE 蛋白上样缓冲液(南京凯基生物);兔抗鼠 TRPV1 抗体(Neuromics 公司, 美国), β -actin 抗体(20536-1-AP)、山羊抗兔二抗(SA00001-2)(Proteintech 公司, 美国);预染蛋白 Marker(00318120, Thermo Fisher 公司, 美国),小鼠 TNF- α ELISA 试剂盒、全蛋白提取试剂盒(南京凯基生物),ECL 发光试剂盒(Thermo Fisher 公司, 美国),酶标仪(240351, BioTek 公司, 美国),凝胶成像分析系统(BioRad 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 分组和造模方法

将 18 只 6~8 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠随机分为 3 组:对照组、模型组、针刺组,每组 6 只。模型组和针刺组于第 1 天和第 4 天分别腹腔注射 LPS 3 mg/kg(用生理盐水配制)制造慢性炎症小鼠模型,空白组腹腔注射 4 mL/kg 生理盐水。

1.2.2 治疗方法

模型组和针刺组于第 7 天上午再分别腹腔注

射 LPS 3 mg/kg, 针刺组于第 7 天下午针刺小鼠双侧“足三里”穴。针刺方法为在双侧“足三里”穴(小鼠膝关节下方腓骨小头下 0.3 cm 的肌沟中)邻近胫骨和腓骨处各给予针刺 2 针(皮内针,将 5 mm 针身掰弯垂直于针柄,垂直针刺),针刺深度为 3~4 mm,外用医用胶带缠绕 1 圈固定针柄;针刺时间为 4 d。“足三里”穴定位标准参照《实验针灸学》^[1]。

1.2.3 MWT 的测定

将小鼠置于特制的有机玻璃箱内,箱底为金属筛网,保持实验环境安静,使其适应 30 min 以上待探究活动基本消失后开始实验,选取 0.008~2.000 g 范围内的 Von Frey 纤维丝,用 Von Frey 纤维丝垂直刺激小鼠右足底部,使之稍弯曲,小鼠出现缩足或舔足行为视为阳性反应;无反应视为阴性反应。根据 Chaplan 等^[2]报道的“up and down”方法检测计算 MWT。

1.2.4 取材

第 11 天,各组小鼠禁食 6 h,眼底静脉丛采血后分离得到小鼠脊柱,置于冰上,打开椎管,在体视解剖显微镜下剪开椎管,去除脊髓等神经纤维,沿着腰椎(L1~L6)两侧从椎间孔中取出 DRG 神经元。

1.2.5 ELISA 检测 TNF- α 水平

小鼠眼眶静脉丛取血,室温静置 2 h,2 000 r/min 离心 15 min,吸取上清置于-20℃,取血清样本待测。实验方法严格按照 TNF- α 试剂盒说明书操作。标准品孔加入不同浓度的标准品 100 μ L,待测样品孔加入稀释好的样本 100 μ L,36℃孵育 90 min,洗板 5 次;加入生物素化抗体工作液 100 μ L,36℃孵育 60 min,洗板 5 次;加入酶结合物工作液 100 μ L,36℃孵育 30 min,洗板 5 次;加入显色底物 100 μ L,避光孵育 15 min;最后加入终止液 100 μ L,混匀后即刻在酶标仪上 450 nm 处测定吸光度值;根据制备的标准曲线,计算样本含量。

1.2.6 Western blot 检测 DRG 神经元 TRPV1 蛋白

样品采集与组织总蛋白提取:将取出的小鼠 DRG 加入有 1.5 mL 蛋白裂解液的 EP 管内,按照试剂盒说明,提取 DRG 组织中的总蛋白,12 000 r/min 离心 5 min 后分装。组织蛋白定量,测出样品浓度。SDS-PAGE 电泳:加入 10 μ L Marker 和 30 μ L 样品电泳,结束后取适当大小的胶和相同大小的 PVDF 膜在 100 V 电压下进行转膜,转膜结束后将膜置于 5%脱脂奶粉溶液中封闭,一抗孵育 4℃过夜,室温下二抗孵育 1 h,最后进行化学发光显色,用 Image J 软件分析。

1.3 统计学方法

采用 SPSS16.0 统计软件,MWT、TNF- α 和 TRPV1 蛋白表达均为定量资料,用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。其中 TNF- α 不服从正态分布,经过对数转化后服从正态分布。3 组数据在经过方差齐性检验和正态性检验后均符合单因素方差分析的应用条件。根据不同的比较要求,分别使用 SNK 法和 Duncan 法进行两两比较。检验水准定为 0.05。Graphpad Prism5 软件绘制统计分析图。

2 结果

2.1 各组 C57BL/6J 小鼠机械痛阈测定结果

3 组 MWT 存在差异($P<0.05$,表 1),针刺组和对照组右脚的痛阈均明显高于模型组($P<0.05$)。说明腹腔注射 LPS 能显著降低痛阈并导致痛觉过敏,而针刺能够消除降低的阈值,即产生“脱敏”作用,即针刺能够缓解慢性炎症性疼痛。

2.2 血清 TNF- α 含量的差异

3 组血清 TNF- α 含量存在差异($P<0.05$,表 1)。对照组的 TNF- α 含量与模型组比较存在显著性差异($P<0.01$),表明 LPS 具有致炎作用。针刺组 TNF- α 含量明显低于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$)。这说明针灸能显著降低 TNF- α 的含量。

表 1 各组 C57BL/6J 小鼠机械痛阈和血清 TNF- α

Table 1 Mechanical pain threshold and TNF- α in serum of C57BL/6J mice of each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	MWT(g)	TNF- α (pg/mL)
对照组(n=6)	1.30 \pm 0.27**	17.36 \pm 29.09**
模型组(n=6)	0.47 \pm 0.36	351.00 \pm 43.68#
针刺组(n=6)	0.99 \pm 0.39*	162.67 \pm 98.03**

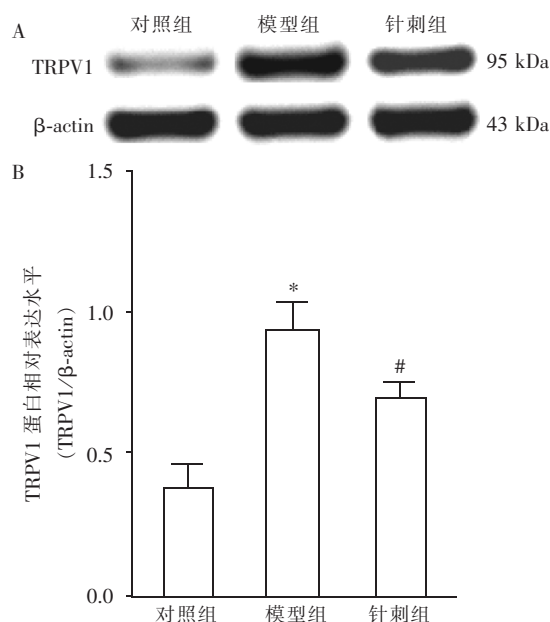
与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与对照组比较,# $P<0.05$ 。

2.3 Western blot 检测各组 DRG 神经元的 TRPV1 蛋白

3 组 TRPV1 蛋白表达存在差异($P<0.05$,图 1),对照组和针刺组 DRG 神经元的 TRPV1 蛋白表达均低于模型组(P 均 <0.05)。这说明腹腔注射 LPS 能够上调 DRG 神经元 TRPV1 蛋白表达,针刺能够下调 DRG 神经元 TRPV1 蛋白表达。

3 讨论

针灸是中医传统治疗方法,对关节炎等慢性炎症及引起的疼痛有疗效^[3]。足三里穴具有调理脾胃、疏风化湿、通经活络、补中益气、扶正祛邪、防病保健之功能。脾胃为后天之本,后天强健,则气血旺



A: Western blot 检测小鼠 DRG 中 TRPV1 的蛋白表达变化;B: 蛋白半定量分析。与对照组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$ 。

图 1 针刺对小鼠 DRG 神经元 TRPV1 蛋白表达的影响。
Figure 1 Effect of acupuncture on the expression of TRPV1 in mouse DRG neurons

盛,阴阳调和。《通玄指要赋》:“三里却五劳之羸瘦;痹肾败,取足阳明之上”;《灵枢·四时气》:“著痹不去,久寒不已,卒取其三里骨为干”。现代医学研究,针刺足三里可以对免疫功能产生影响^[4-6],此外,有文献显示针刺足三里有镇痛作用,可提高痛阈^[7-8]。本研究显示针刺足三里可以提高小鼠机械痛的阈值,起到缓解疼痛和镇痛的效果;针刺足三里降低 TNF- α 含量,从而起到减轻炎症的作用。

LPS 刺激单核/巨噬细胞产生 TNF- α ^[9]。在浓度较低(1×10^{-10} mol/L)时,TNF- α 主要作为白细胞和内皮细胞自分泌及旁分泌的调节物,参与抵抗细菌、病毒和寄生虫的感染,促进组织修复及调节炎症反应,引起肿瘤细胞凋亡等;在高浓度($\geq 1\times 10^{-8}$ mol/L)时,过量的 TNF- α 在体内大量产生和释放则会破坏机体的免疫平衡,与其他炎症因子一起产生多种病理损伤^[10]。本研究中由 LPS 所导致的 TNF- α 浓度约为 2×10^{-8} mol/L,诱发免疫炎症的瀑布反应^[11],使机体处于慢性炎症状态。

TRPV1 作为多种潜在伤害性信号的受体,在感受疼痛刺激及痛觉增敏病理过程中发挥重要作用^[12-16]。研究发现,TRPV1 的激活物质之间存在着相互作用,正常 pH7.4 条件下,热激活 TRPV1 的阈值是 43°C ;酸性条件时,激活阈值向低温方向移动;在足够低的 pH 条件下,室温就可促使 TRPV1 通道开

放,这可能是发生炎症反应时常伴有疼痛产生的主要原因^[17]。机体在炎症状态下,产生一系列化学介质,这些炎症介质可激活或敏化伤害性感受器^[18-23]。本研究证实在 LPS 引起的炎症反应中,DRG 神经元中 TRPV1 受体含量上升,使 TRPV1 受体处于“敏化”状态^[24-25]。针刺后,LPS 引起的 TRPV1 受体“敏化”状态趋于缓解,即处于“脱敏”状态^[26]。针刺后小鼠 MWT 值升高结果也证实针刺可以使小鼠对于机械刺激所致疼痛的“敏化”状态转变为“脱敏”状态。

该研究表明,针刺可以减少机体炎症因子 TNF- α 的表达,同时也降低 DRG 神经元中 TRPV1 的表达,从而缓解和抑制慢性炎症所导致的疼痛。

[参考文献]

- [1] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003:253-255
- [2] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw[J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1): 55-63
- [3] 石德光, 杜欣, 胡森. 针刺对慢性炎症疾病中炎症介质的影响[J]. *中国针灸*, 2003, 23(7): 429-431
- [4] 李丽娜, 焦志华, 宗蕾. 针灸调节免疫功能的研究进展[J]. *中国医药导刊*, 2014, 16(4): 633-634, 636
- [5] 王刚, 李彩霞, 王红. 针刺治疗化疗后白细胞减少症 41 例[J]. *陕西中医*, 2010, 31(11): 1514-1515
- [6] 赵喜新, 黄喜梅, 王和平, 等. 针灸对化疗后骨髓抑制及白细胞的影响[J]. *针灸推拿医学(英文版)*, 2011, 9(6): 331-335
- [7] 成词松, 诸毅晖, 袁权, 等. 电针改善慢性疲劳大鼠疲劳状态及痛阈的下丘脑 CRH 机制研究[J]. *成都中医药大学学报*, 2012, 35(3): 9-12, 18
- [8] 沈晓炜, 肖夏, 赵纪岚. 足三里针刺镇痛研究进展及理论探讨[J]. *黑龙江医学*, 2015, 39(10): 1115-1117
- [9] 杨雪梅, 吴刚. 苦参碱抑制 LPS 诱导巨噬细胞 IL-1 β 、TNF- α 分泌及机制研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2016, 32(6): 820-824, 837
- [10] Rummel C, Gerstberger R, Roth J, et al. Parthenolide attenuates LPS-induced fever, circulating cytokines and markers of brain inflammation in rats [J]. *Cytokine*, 2011, 56(3): 739-748
- [11] 龙海波. 特异性清除循环肿瘤坏死因子——异对内毒素休克时肝细胞氧化应激的影响[J]. *中国急救医学*, 2000, 20(1): 2
- [12] 任伟, 王秀丽. 香草酸瞬时受体亚型 1 在疼痛中的研究进展[J]. *河北医药*, 2013(19): 2984-2986
- [13] 施孟如, 南超, 徐丽艳, 等. TRPV1 激活对内毒素血症小鼠肺组织炎症损伤的影响及机制[J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(12): 2223-2228
- [14] 赵齐飞, 孙邈. TRPV1 通道介导疼痛的研究进展[J]. *中国保健营养*, 2013, 23(8): 4734-4735
- [15] Wu SY, Chen WH, Hsieh CL, et al. Abundant expression and functional participation of TRPV1 at Zusanli acupoint (ST36) in mice: mechanosensitive TRPV1 as an “acupuncture-responding channel” [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14(1): 96
- [16] Ho KW, Ward NJ, Calkins DJ. TRPV1: a stress response protein in the central nervous system [J]. *Am J Neurodegener Dis*, 2012, 1(1): 1-14
- [17] Planells-Cases R, García-Sanz N, Morenilla-Palao C, et al. Functional aspects and mechanisms of TRPV1 involvement in neurogenic inflammation that leads to thermal hyperalgesia [J]. *Pflugers Arch*, 2005, 451(1): 151-159
- [18] Okun A, Defelice M, Eyde N, et al. Transient inflammation-induced ongoing pain is driven by TRPV1 sensitive afferents [J]. *Mol Pain*, 2011, 7(1): 347-356
- [19] Zhao JF, Ching LC, Kou YR, et al. Activation of TRPV1 prevents OxLDL-induced lipid accumulation and TNF- α -induced inflammation in macrophages: role of liver X receptor α [J]. *Mediators Inflamm*, 2013, 2013: 925171
- [20] Lima CK, Silva RM, Lacerda RB, et al. LASSBio-1135: A dual TRPV1 antagonist and anti-TNF- α compound orally effective in models of inflammatory and neuropathic pain [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99510
- [21] Wang Y, Wang DH. TRPV1 ablation aggravates inflammatory responses and organ damage during endotoxic shock [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2013, 20(7): 1008-1015
- [22] Yoshida A, Furube E, Mannari T, et al. TRPV1 is crucial for proinflammatory STAT3 signaling and thermoregulation-associated pathways in the brain during inflammation [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 26088
- [23] Watanabe M, Ueda T, Shibata Y, et al. The role of TRPV1 channels in carrageenan-induced mechanical hyperalgesia in mice [J]. *Neuroreport*, 2015, 26(3): 173-178
- [24] Smith H, Brooks JR. Capsaicin-based therapies for pain control [J]. *Prog Drug Res*, 2014, 68(1): 129-146
- [25] Hutchinson MR, Buijs M, Tuke J, et al. Low-dose endotoxin potentiates capsaicin-induced pain in man: evidence for a pain neuroimmune connection [J]. *Brain Behav Immun*, 2013, 30(5): 3-11
- [26] Anand P, Bley K. Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch [J]. *Br J Anaesth*, 2011, 107(4): 490-502

[收稿日期] 2016-07-28