

推拿对神经病理性疼痛大鼠 miR-21-5P、ERK、STAT3 的影响*

吴婷婷¹, 肖易², 梁英业², 谢柳红¹, 丁瑶¹,
卢栋明², 陈晓红¹, 唐宏亮^{3**}

(1. 广西中医药大学 南宁 530000; 2. 广西中医药大学第一附属医院 南宁 530000;
3. 广西中医药大学附属防城港医院 防城港 538000)

摘要:目的 观察在神经病理性疼痛大鼠中 miR-21-5P、细胞外调节蛋白激酶(Extracellular signal-regulated kinases, ERK)和信号转导和转录活化因子3(Signal transducer and activator of transcription3, STAT3)的表达变化,探究推拿镇痛作用的机制。方法 40只SD雄性大鼠,按照随机分类的方法将其分为正常组、模型组、假手术组、推拿组和假推拿组5个组,每组8只。不给予正常组任何干预措施;模型组、推拿组及假推拿组建立L5脊神经结扎模型(SNL);只暴露假手术组的脊神经2-3 min;在造模后第1天使用按摩推拿手法模拟仪对推拿组的“环跳”、“阳陵泉”和“悬钟”穴进行推拿治疗,每天1次,每次治疗18 min(双侧),连续干预7天;假推拿组的大鼠则每天给予双后肢18 min的轻轻抚摸,连续干预7天。各组大鼠的机械痛阈值(Paw withdrawal mechanical threshold, PWMT)和热痛阈值(Hindpaw withdrawal thermal latency, PWTL)在造模前1天、造模后第3天和第7天进行测定。使用实时荧光定量PCR(Quantitative Real-time PCR, q-PCR)检测造模后第7天各组大鼠中 miR-21-5P 的表达水平;使用蛋白免疫印迹法(Western blot)测定各组大鼠中 ERK、STAT3 的蛋白表达水平,酶联免疫吸附法(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测各组大鼠中白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)的表达水平。结果 术后第3天和第7天,模型组大鼠的机械阈值与热痛阈值比正常组及假手术组的阈值下降($P<0.05$),推拿组大鼠的机械阈值与热痛阈值比模型组、假推拿组的阈值升高($P<0.05$)。术后第7天,q-PCR 检测结果显示,模型组大鼠的 miR-21-5P 水平较正常组及假手术组的 miR-21-5P 水平显著增加($P<0.01$),推拿组大鼠的 miR-21-5P 水平较模型组与假推拿组的 miR-21-5P 水平显著下降($P<0.01$);Western blot 检测结果显示,与正常组及假手术组比较,模型组大鼠的 ERK 与 STAT3 水平显著增加($P<0.01$),与模型组、假推拿组比较,推拿组能显著下调大鼠 ERK($P<0.05$)与 STAT3 水平($P<0.01$);ELISA 检测结果显示,模型组大鼠的 IL-1 β 水平较正常组及假手术组的表达增加($P<0.05$),推拿组大鼠的 IL-1 β 水平较模型组、假推拿组的表达下调($P<0.01$)。结论 推拿可以减轻 SNL 大鼠的疼痛反应,其机制可能与调控 miR-21-5P、ERK、STAT3、IL-1 β 的表达,从而抑制其介导的炎症反应有关。

关键词:推拿 神经病理性疼痛 miR-21-5P ERK STAT3 IL-1 β 镇痛

doi: 10.11842/wst.20211009003 中图分类号: R244.1 文献标识码: A

收稿日期:2021-10-09

修回日期:2022-02-28

* 国家自然科学基金委员会青年科学基金项目(8180151635):从LncBANCR介导ERK/mTOR调控自噬探讨推拿对SNL大鼠的镇痛效应机制,负责人:卢栋明;广西壮族自治区自然科学基金委员会面上项目(2018JJA140664):从miRNA-21的表达调控作用探讨推拿治疗慢性病理性疼痛的效应机制研究,负责人:肖易;广西壮族自治区研究生教育创新计划区级项目(YCSW2021229):从LNCRNAH19调控miR-342-3p/IER3探讨推拿对NPP的镇痛机制研究,负责人:吴婷婷。

** 通讯作者:唐宏亮,教授,副主任医师,硕士研究生导师,主要研究方向:针灸推拿治疗痛症的基础及临床研究。

神经病理性疼痛(Neuropathic pain, NPP)是由躯体感觉神经系统的病变或疾病引起的疼痛,流行病学研究的系统回顾报道神经病理性疼痛的患病率为6.9–10%^[1]。由于NPP拥有极其复杂的病理生理学,NPP也被认为是目前神经原性疼痛综合征临床治疗的主要挑战^[2]。尽管国内外在NPP的发病机制和治疗方面已经取得了巨大的进展,但目前治疗这一疾病的方法包括药物干预(三环类抗抑郁药、曲马多以及低剂量的阿片类药物等)、物理疗法和脊髓刺激等,其中药物干预容易诱导强迫性滥用,而物理疗法和脊髓刺激的效果有限且适用性不广。因此深入探索疼痛的发病机制,寻找疼痛治疗靶点,对提高疼痛治疗效果有着深远的意义。

MicroRNAs^[3]越来越被认为是免疫和神经元基因表达的调节因子,是NPP病理生理学的潜在主开关。且越来越多的证据强调,神经病理性疼痛的诱导和维持伴随着MicroRNAs表达的变化,而这些MicroRNAs表达的变化似乎与神经损伤、痛觉过敏和神经可塑性相关^[4]。最近的研究表明^[5]miR-21在神经病理性疼痛晚期损伤的背根神经节(Dorsal root ganglia, DRG)神经元增加,而阻断miR-21可以缓解神经病理性疼痛。与此同时研究显示^[6]miR-21-5P在DRG神经元中高表达,而鞘内注射miR-21-5P拮抗剂可以降低神经病理性疼痛的超敏反应和炎症巨噬细胞在DRG中的募集程度。但miR-21-5P在脊髓背角的表达尚不明确。本团队的前期研究已经反复印证了推拿的镇痛作用^[7-8],也从神经传递角度阐明了推拿的镇痛机制^[9-10]。但其机制尚未完全阐述清楚,还有待进一步研究。因此本实验从微小RNA角度出发阐明神经病理性疼痛在脊髓背角当中的发病机制以及推拿的镇痛机制,为完善推拿治疗NPP的效应研究提供研究依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

40只健康雄性SD大鼠,SPF级,体重210–240 g,月龄为6周。由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,许可证号:SCXK(湘)2019-0004。大鼠饲养在广西中医药防治医学分子生物实验室动物房中,湿度恒定,室温18–20℃,按时更换垫料以及给予饲料、饮水,适应性喂养7天。本实验研究过程符合广西中医药大学第一附属医院动物使用及伦理委员会审查。

1.2 主要试剂及仪器

microRNA反转录试剂盒(TaKaRa),TB Green PCR荧光试剂(TaKaRa),抗STAT3抗体(PTG),抗ERK抗体(PTG),蛋白定量试剂盒(BCA法)(碧云天),IL-1β ELISA试剂盒(赛默飞),Thermo Scientific Piko Real 96 PCR仪(赛默飞公司,美国),Bio-Rad Powerpac HC电泳仪及ChemiDoc MP Touch Hot图像扫描仪(Bio-Rad公司,美国),电子von Frey 2393及热板痛觉测试仪(IITC公司,美国),酶标仪(Thermo,美国)。

2 方法

2.1 动物分组

将40只SD雄性大鼠随机分为5组:正常组($n=8$)、假手术组($n=8$)、模型组($n=8$)、假推拿组($n=8$)、推拿组($n=8$)。

2.2 造模方法

参照课题组前期研究^[11],模型组、推拿组和假推拿组建立大鼠L5脊神经结扎(SNL)模型。按照3 mL·kg⁻¹的大鼠体重配置10%的水合氯醛进行腹腔麻醉后,定位每只大鼠的左侧后上棘,剃除该部位及周边的毛发备皮。常规消毒后于后上棘左侧与脊柱垂直切开,约2 cm长,与脊柱平行。分离左侧棘旁的筋膜和肌肉后,显露脊柱。用小咬钳去除L5横突,暴露L5脊神经,用5-0可吸收缝线将神经结扎,仅单侧结扎。假手术组仅暴露L5脊神经2–3 min,不结扎。最后用生理盐水清洗手术创口,并给予碘伏消毒,逐层关闭伤口。缝合伤口后将大鼠放入笼中观察,直至麻醉恢复,以免窒息导致死亡。造模成功的标准为术后大鼠患侧出现跛行、撤足、抬足。

2.3 干预方法

推拿组选择足少阳胆经上的“环跳”、“阳陵泉”和“悬钟”三个穴进行干预。干预时用布袋将大鼠束缚防止挣扎,然后使用按摩推拿手法模拟仪(中国人民共和国发明专利号:ZL 200710187403.1)从造模后第1天开始进行推拿治疗。按摩推拿手法模拟仪按摩头选用直径10 mm的圆形光滑接触面,刺激力量为4 N,手法模拟点法、揉法和拨法。每天1次,每次每穴每法1 min,每侧共9 min,每次治疗18 min(双侧),连续干预7天;假推拿组的大鼠同样用布袋束缚防止挣扎,每天给予双侧肢18 min的轻轻抚摸,连续干预7天。正常组、模型组以及假手术组只观察7天,不做任何干预处理。

2.4 观察指标

2.4.1 大鼠患侧机械痛阈值(PWMT)的测定

将大鼠提前放入铁笼中适应环境,当大鼠停止自我梳理和探索活动时选用4 g、6 g、8 g、10 g、15 g、26 g、60 g、100 g的von-Frey纤维丝依次从铁笼底部伸进去刺激大鼠的患侧足,当大鼠出现抬足或舔趾等阳性反应行为时,记录所对应的纤维丝的刺激强度。连续测3次,每次测量间隔15 s,取平均值即为机械痛阈值。于术前第1天及术后第3、7天进行PWMT测量。

2.4.2 大鼠患侧热痛阈值(PWTL)的测定

按Hargreaves^[12]法测定。当测试仪达到预设温度52.5℃时,将大鼠按组别依次放进测试仪的有机玻璃动物笼内,等大鼠停止自我梳理和探索活动时按下计时器,当大鼠患侧足出现舔足、回缩或跳跃时测试仪上显示的时间即为大鼠热痛阈值(PWTL)。在没有反应的情况下,在30 s时将大鼠从热板上取出,以避免组织损伤。每只大鼠测量3次,每次测量时间间隔5 min,取平均值作为热痛阈值。于术前第1天及术后第3、7天进行PWTL测量。

2.4.3 蛋白免疫印迹

使用蛋白免疫印迹法检测干预7天后的大鼠脊髓(L4-6)中ERK、STAT3的蛋白相对表达量。按照每100 mg组织加入1 mL蛋白裂解液的方法取L4-6段脊髓放入蛋白裂解液中进行低温匀浆,4℃ 12 000 rpm离心10 min,取上清液。各样本蛋白浓度使用BCA蛋白浓度试剂盒测定。用SDS-PAGE分离蛋白,转膜。5%脱脂奶粉封膜1 h,加入稀释后的抗体(STAT3一抗,1:1000;ERK一抗,1:1000),放置4℃冰箱孵育过夜。清洗后孵育二抗(1:5000)1 h。滴加ECL溶液,使用Bio-Rad ChemiDoc MP Touch Hot图像扫描仪采集图像。使用Image J软件分析图像结果。

2.4.4 酶联免疫吸附

使用酶联免疫吸附法检测干预7天后的大鼠血清中IL-1 β 含量,所有操作步骤按照试剂盒的操作说明进行。终止反应后,立即用酶标仪在450 nm波长测量各孔的光密度(OD值)。

2.4.5 荧光定量PCR

使用荧光定量PCR法检测干预7天后的大鼠脊髓(L4-6)中miR-21-5P mRNA表达。用Trizol试剂提取总RNA,然后按照PCR产品试剂盒的操作说明进行实验。miR-21-5P、 β -actin基因序列引物由TaKaRa公

表1 荧光定量PCR的引物序列

引物名称	引物序列
miR-21-5P单链	5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3'
β -actin上游	5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3'
β -actin下游	5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3'

司提供,引物序列见表1。反应条件:95℃ 30 s;95℃ 5 s,60℃ 30 s,45个循环;95℃ 5 s,60℃ 1 min,95℃;50℃ 30 s。将所得Ct值按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行数据处理。

2.5 统计学分析

数据采用SPSS 20.0统计软件进行统计分析,结果以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。数据符合正态分布,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较,方差齐者用LSD检验,方差不齐者用Tamhane's T2检验。不符合正态分布的数据采用秩和检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠的PWMT比较

术前各组大鼠的机械痛阈值无显著差异。术后第3天,机械痛阈值结果显示模型组、假手术组、假推拿组和推拿组较正常组相比均下降,模型组较假手术组下降($P<0.05$),且正常组及假手术组显著高于模型组,数据显示正常组为(54.00 \pm 5.07)、假手术组为(38.87 \pm 8.54)、模型组为(12.75 \pm 1.66);与模型组、假推拿组相比,推拿组的机械痛阈值升高($P<0.05$),且推拿组显著高于模型组为(39.37 \pm 8.07)、假推组为(22.37 \pm 5.04)。术后第7天,结果显示模型组与假推组的机械痛阈值较正常组降低,模型组的机械阈值较假手术组降低($P<0.05$),且发现大鼠模型组的机械痛阈值为(16.50 \pm 2.87),推拿组的机械痛阈值为(45.87 \pm 8.11),推拿组和模型组相比痛阈明显提高($P<0.05$),提示推拿有助于缓解SNL大鼠的疼痛,且能恢复SNL大鼠的痛阈。如表2,图1所示。

3.2 各组大鼠的PWTL比较

术前各组大鼠的热痛阈值无显著差异。术后第3天,热痛阈值结果显示模型组、假手术组、假推拿组和推拿组较正常组相比均下降,模型组较假手术组下降($P<0.05$),且正常组及假手术组显著高于模型组,数据显示正常组为(27.09 \pm 5.80)、假手术组为(21.64 \pm 1.54)、模型组为(12.20 \pm 1.36);与模型组、假推拿组相比,推拿组的热痛阈值升高($P<0.05$),且推拿组显著

表2 推拿对NPP大鼠机械痛阈值的影响
($\bar{x}\pm s, g, n=8$)

组别	术前1天	术后3天	术后7天
正常组	52.87±6.97	54.00±5.07	52.12±5.27
模型组	50.75±8.32	12.75±1.66 [#]	16.50±2.87 [#]
假手术组	51.00±7.32	38.87±8.54 [#]	44.25±6.11
推拿组	53.62±7.5	39.37±8.07 [#]	45.87±8.11 ⁺
假推组	50.37±5.62	22.37±5.04 [#]	26.00±4.34 [#]

注:与正常组比较,[#] $P<0.05$;与假手术组比较,[#] $P<0.05$;与模型组和假推拿组比较,⁺ $P<0.05$ 。

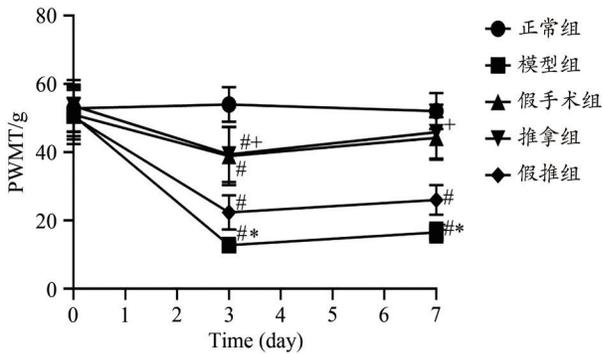


图1 推拿对NPP大鼠机械痛阈值的影响

注:与正常组比较,[#] $P<0.05$;与假手术组比较,[#] $P<0.05$;与模型组和假推拿组比较,⁺ $P<0.05$ 。

表3 推拿对NPP大鼠热痛阈值的影响($\bar{x}\pm s, g, n=8$)

组别	术前1天	术后3天	术后7天
正常组	29.06±1.29	27.09±5.80	27.26±7.48
模型组	30.50±1.78	12.20±1.36 [#]	16.43±1.27 [#]
假手术组	30.34±1.19	21.64±1.54 [#]	28.34±1.29
推拿组	30.44±1.67	23.01±0.98 ^{#△}	27.98±2.19 [△]
假推组	29.55±1.59	16.73±1.81 [#]	20.42±2.70 [#]

注:与正常组比较,[#] $P<0.05$;与假手术组比较,[#] $P<0.05$;与模型组和假推拿组比较,[△] $P<0.05$ 。

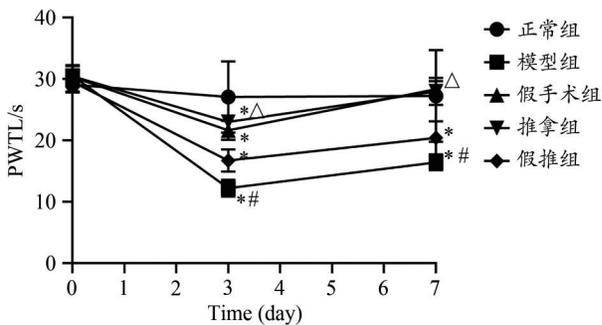


图2 推拿对NPP大鼠热痛阈值的影响

注:与正常组比较,[#] $P<0.05$;与假手术组比较,[#] $P<0.05$;与模型组和假推拿组比较,[△] $P<0.05$ 。

表4 推拿对NPP大鼠脊髓组织中miR-21-5P mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, 2^{-\Delta\Delta ct}, n=8$)

组别	miR-21-5P表达水平
正常组	1.00±0.00
模型组	6.53±1.12 [*]
假手术组	2.47±0.80
推拿组	1.10±0.41 ^{**}
假推组	1.83±0.57

注:与正常组及假手术组比较,^{*} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$ 。

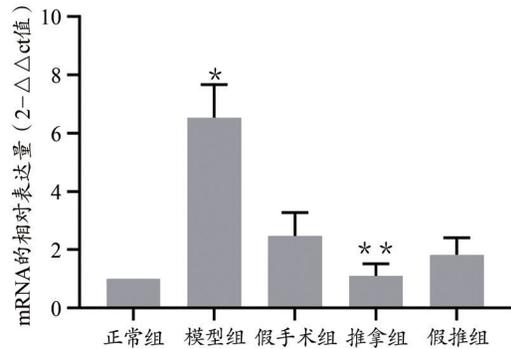


图3 推拿对NPP大鼠脊髓组织中miR-21-5P mRNA表达的影响

注:与正常组及假手术组比较,^{*} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$ 。

高于模型组为(23.01±0.98)、假推组为(16.73±1.81)。术后第7天,结果显示模型组与假推组的热痛阈值较正常组降低,模型组的机械阈值较假手术组降低($P<0.05$),且发现大鼠模型组的热痛阈值为(16.43±1.27),推拿组的热痛阈值为(27.98±2.19),推拿组与模型组相对热刺激的耐受明显提高($P<0.05$),提示推拿有助于缓解SNL大鼠的疼痛,且能提高大鼠对热刺激的阈值。如表3,图2所示。

3.3 各组大鼠脊髓背角中miR-21-5P mRNA表达的比较

术后第7天,模型组脊髓miR-21-5P mRNA的表达相较于正常组及假手术的表达升高($P<0.01$),且推拿组miR-21-5P mRNA的表达较模型组显著下降($P<0.01$)。如表4,图3所示。

3.4 各组大鼠脊髓背角中ERK、STAT3蛋白表达的比较

术后第7天,模型组脊髓背角ERK、STAT3的表达相较于正常组及假手术组的表达升高($P<0.01$)。经推拿干预后,推拿组的ERK表达下降,与模型组相比表达差异明显($P<0.05$),推拿组的STAT3表达同样下降,与模型组相比差异具有显著性($P<0.01$)。如图4所示。

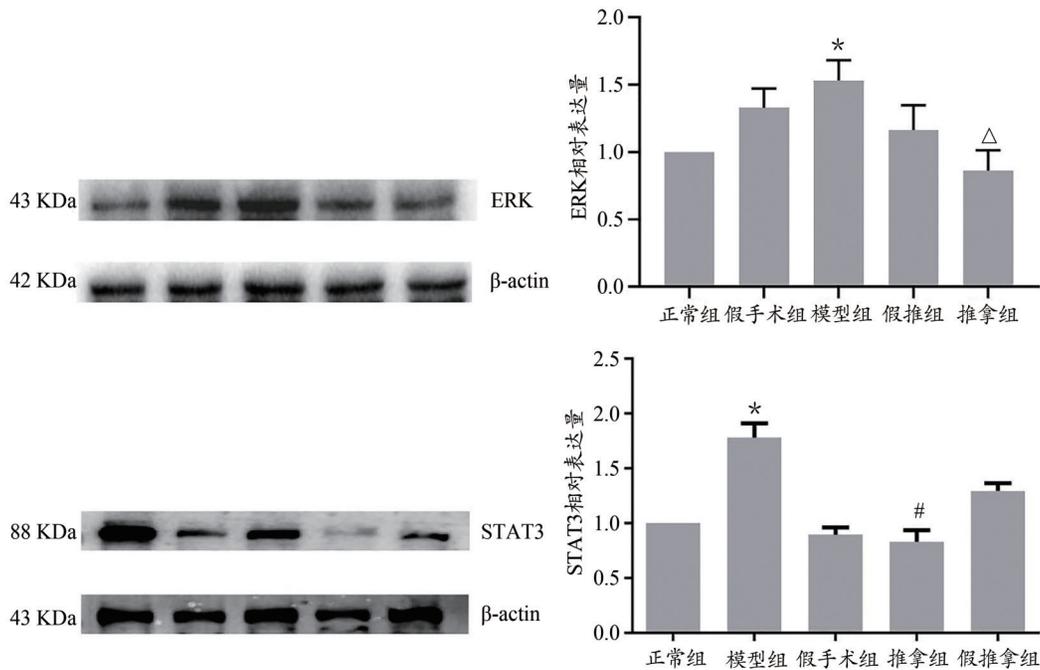


图4 推拿对NPP大鼠脊髓组织中ERK、STAT3蛋白表达的影响

注:与正常组、假手术组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$,# $P<0.01$ 。

表5 推拿对NPP大鼠血清中IL-1 β 表达的影响
($\bar{x}\pm s, \text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}, n=8$)

组别	IL-1 β 表达水平
正常组	0.09 \pm 0.33
假手术组	9.12 \pm 0.83
模型组	30.95 \pm 0.58 Δ
假推拿组	20.53 \pm 0.73
推拿组	18.01 \pm 0.93*

注:与正常组、假手术组比较, $\Delta P<0.05$;与模型组比较,* $P<0.05$ 。

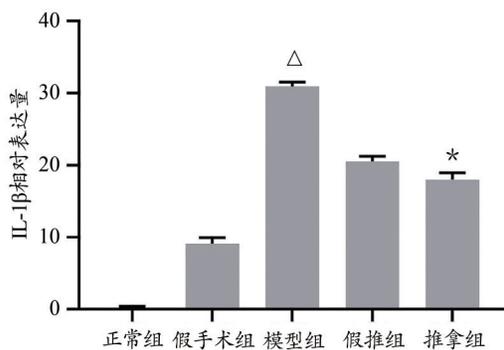


图5 推拿对NPP大鼠血清中IL-1 β 表达的影响

注:与正常组、假手术组比较, $\Delta P<0.05$;与模型组比较,* $P<0.05$ 。

3.5 各组大鼠血清中IL-1 β 表达的比较

术后第7天,模型组IL-1 β 的表达相较于正常组及假手术组的表达升高($P<0.05$)。经推拿干预后,推拿组的IL-1 β 表达降低,与模型组相比差异具有统计

学意义($P<0.05$)。如表5,图5所示。

4 讨论

4.1 推拿治疗疼痛的中医机制

中医学认为疼痛有虚实之分,即所谓“不通则痛”和“不荣则痛”。“不通则痛”多为“实痛”,多因外感六淫、痰浊凝滞、跌仆外伤,或食积虫扰等阻滞脏腑经脉,气血运行不畅所致;“不荣则痛”多为“虚痛”,多因阳气亏虚,精血不足,脏腑经络失养所致。而推拿手法作用于经络腧穴,可行气活血、疏经通络,从而达到治疗疼痛的效果。正如《素问·血气形志篇》曰:“形数惊恐,经络不通,病生于不仁,治之以按摩醪药^[13]。”另外,推拿手法通过对机体体表的温热刺激,产生热效应,从而加速气血的流动达到散寒止痛的功效,如《素问·举痛论》曰:“寒气客于背俞之脉则脉泣,脉泣则血虚,血虚则痛……按之则热气至,热气至则痛止矣^[14]。”筋骨关节受损的疾病通过推拿治疗能起到理筋整复、松解粘连与滑利关节的作用,正如《医宗金鉴·正骨心法要旨》曰:“因跌扑闪失,以至骨缝开错……宜用按摩法。按其经络,以通郁闭之气……其患可愈^[15]。”环跳穴为多气多血之经的足少阳胆经与足太阳膀胱经的交会穴,主腰胯疼痛、下肢痿痹等腰腿疾患。正如《针灸甲乙经·阴受病发痹》云:“腰胁相引痛急……胫

痛不可屈伸……环跳主之”，因此，推拿环跳穴可起到祛风化湿、疏通经络之效^[16]。阳陵泉为足少阳胆经的合穴，胆的下合穴，八会穴之筋会，是足少阳胆经气血汇聚之所。据《针灸大成》记载：“阳陵泉，主治下肢筋病症之要穴^[17]”，因此，推拿作用于阳陵泉穴可以促进局部的血液循环以及炎症介质的分解、稀释，从而缓解局部的疼痛症状。悬钟穴是足三阳之大络，为八会穴之髓会，是人体髓气汇聚的地方，古有记载，《针灸甲乙经》：“胫酸痛，按之不可，名曰附髓病，以镞针针绝骨出其血立已。”可见干预悬钟穴具有疏调肝胆气机、通经活络、祛风止痛、补髓壮骨之功效。因此推拿是缓解神经病理性疼痛的一种有效措施。

4.2 NPP与miR-21-5P及ERK、STAT3蛋白的关系

MicroRNA参与多种生物调控过程，包括细胞增殖、分化和凋亡以及炎症反应等，而在神经病理性疼痛动物模型中MicroRNA的调节异常，提示MicroRNA在神经病理性疼痛的发生发展中起着至关重要的作用。Chang等^[18]通过微阵列分析评估了大鼠DRG中差异MicroRNA的表达，与假手术组相比，SNL组在神经损伤后7d观察到83个差异MicroRNA。有文献报道miR-183在SNL大鼠模型中表达显著下调，而过表达miR-183可通过抑制miR-183的靶基因来缓解疼痛样行为^[19]。ERK是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族细胞外信号调节激酶的关键组成部分，通过调节代谢途径、细胞增殖、分化和凋亡来控制某些神经活动，ERK还影响神经弹性特性、神经生长以及脑损伤时的神经和认知过程^[20]。研究发现，在神经病理性疼痛的几种动物模型中，ERK在神经元、微胶质和星形细胞中被激活，且ERK的抑制剂可以在不同的时间点减轻疼痛^[21]。因此，ERK是神经性疼痛产生、痛觉信号传递等过程中的关键性因子^[22]。STAT3主要分布在神经系统中，可调节多种神经递质受体和离子通道蛋白的表达，其过度活化与大鼠神经病理性疼痛症状同步，抑制其活化可作为治疗神经病理性疼痛的新靶点^[23]。与此同时，在慢性疼痛的背景下，一些报道将p-STAT3的激活与炎症细胞因子或生长因子联系起来。例如在疼痛的实验模型中^[24]，p-STAT3或STAT3激活水平的增加与DRG神经元中通道的TNF- α 上调有关。Bernal等^[25]证实神经损伤时，DRG中的STAT3被激活，且存在于非轴突化神经元中。Dominguez等^[26]在脊髓结扎的大鼠模型发现脊髓背角的小胶质细胞会出现

IL-6和p-STAT3的高表达，并伴随着机械痛敏和热痛潜伏期的减小或缩短。IL-1 β 是主要由单核-巨噬细胞合成的促炎症细胞因子，参与多种炎症反应的发生，IL-1 β 促进炎症的发生，从而诱导轴突损伤和伤害性纤维的自发活动，导致非典型信号转导到DRG，因此，在神经损伤和炎症刺激后，IL-1 β 水平升高，所以，IL-1 β 在神经病理性疼痛中发挥重要作用^[27-28]。Mei等^[29]发现IL-1 β 在周围神经损伤小鼠体内的mRNA和蛋白水平均迅速上调，而与野生型同窝小鼠相比，缺乏IL-1 β 的小鼠损伤后的伤害感受敏感性降低，且在IL-1 β 敲除小鼠的坐骨神经损伤部位注射微量重组IL-1 β 可使机械痛阈恢复到损伤野生型小鼠的水平。与此同时，有研究表明抑制miR-21-5p可逆转PI3K/AKT和ERK通路的异常激活^[30]。而抑制了ERK的表达可以降低STAT3的激活，最终抑制肝癌的增殖^[31]。同时，抑制了STAT3的表达后又可以下调IL-1 β 的表达^[32]。以上实验皆证实了NPP与miR-21-5P及ERK、STAT3蛋白密切相关。因此，我们推测miR-21-5P、ERK、STAT3、IL-1 β 之间存在关联性，而推拿可能通过影响miR-21-5P、ERK、STAT3及IL-1 β 的表达，从而达到镇痛的目的。

5 结果分析

SNL大鼠模型是一个可靠的、可重复的诱导周围神经病变的啮齿动物模型，因此该模型在神经病理性疼痛的研究中被广泛应用。因SNL模型造模时伤口过深，为排除因手术造成的炎症损伤及疼痛，所以设置假手术组。同理，本研究设置假推拿组的目的是为了与推拿组对比，从而验证经络腧穴及推拿手法的治疗疗效。本研究观察到，SNL大鼠在造模后第3天有明显的跛行、抬足及啃咬术后一侧脚趾等疼痛行为表现，同时SNL大鼠的机械痛阈和热痛阈均有所降低，造模后第7天推拿组SNL大鼠的行为学表现较第3天有所好转，机械痛阈与热痛阈较第3天同样有所提高，这说明在推拿的干预下，SNL大鼠疼痛行为的发生下降，同时能够提高SNL大鼠的机械痛阈和热痛阈，推拿的镇痛效果显著。本实验通过qPCR观察到SNL大鼠损伤7天后，L4-6脊髓背角的miR-21-5P表达明显升高，经推拿干预后miR-21-5P的表达水平降低；通过WB观察到造模后SNL大鼠脊髓背角中ERK、STAT3表达升高，推拿干预后ERK、STAT3的表

达水平均有所降低;通过ELISA观察到SNL大鼠造模后IL-1 β 表达水平上升,经推拿干预后IL-1 β 的表达水平降低。这表明miR-21-5P、ERK、STAT3在SNL大鼠中被激活,然后诱导了炎症反应的发生,导致疼痛感。经过7天的推拿干预后,miR-21-5P、ERK、STAT3和IL-1 β 的表达均显著减少,这表明推拿可以通过降低miR-21-5P、ERK、STAT3的表达来抑制SNL大鼠的炎症反应,从而减轻SNL大鼠对疼痛的感知。

综上所述,推拿可缓解神经病理性疼痛,其机制可能与通过下调miR-21-5P、ERK、STAT3的表达,减少炎症因子IL-1 β 的表达相关。本研究在一定程度上为临床推拿治疗神经病理性疼痛提供了实验依据,但本实验还未证实miR-21-5P/ERK/STAT3的上下游关系,今后将用miR-21-5P抑制剂或基因敲除等方式进一步探究miR-21-5P与ERK、STAT3及推拿镇痛的关系。

参考文献

- 1 St John Smith E. Advances in understanding nociception and neuropathic pain. *J Neurol*, 2018, 265(2):231-238.
- 2 Brandenburger T, Castoldi M, Brendel M, et al. Expression of spinal cord microRNAs in a rat model of chronic neuropathic pain. *Neurosci Lett*, 2012, 506(2):281-286.
- 3 Karl F, Griebhammer A, Üçeyler N, et al. Differential impact of miR-21 on pain and associated affective and cognitive behavior after spared nerve injury in B7-H1 ko mouse. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10:219.
- 4 Brannan C I, Dees E C, Ingram R S, et al. The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol Cell Biol*, 1990, 10(1):28-36.
- 5 Sakai A, Suzuki H. Nerve injury-induced upregulation of miR-21 in the primary sensory neurons contributes to neuropathic pain in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 435(2):176-181.
- 6 Simeoli R, Montague K, Jones H R, et al. Exosomal cargo including microRNA regulates sensory neuron to macrophage communication after nerve trauma. *Nat Commun*, 2017, 8:1778.
- 7 唐宏亮, 庞军, 李建敏, 等. 中医推拿改善躯体疼痛性亚健康人群疼痛强度的床研究. *南京中医药大学学报*, 2012, 28(2):114-117.
- 8 唐宏亮, 林静, 金瑞勤, 等. 基于推拿治疗偏头痛随机对照试验的枢经特异性研究. *辽宁中医杂志*, 2016, 43(5):1059-1061.
- 9 韦斌丽, 唐宏亮, 王雄将, 等. 推拿对神经病理性疼痛大鼠脊髓磷酸化P38MAPK表达及炎性因子IL-1 β 的影响. *时珍国医国药*, 2018, 29(5):1245-1248.
- 10 Wang Q, Lin J, Yang P, et al. Effect of massage on the TLR4 signalling pathway in rats with neuropathic pain. *Pain Res Manag*, 2020, 2020: 8309745.
- 11 唐宏亮, 王雄将, 甘炜, 等. 基于中医推拿干预探讨慢性神经病理性疼痛的动物模型选择. *按摩与康复医学*, 2018, 9(13):36-38.
- 12 Hargreaves K, Dubner R, Brown F, et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, 1988, 32(1):77-88.
- 13 吕智桢, 孔令军, 姚重界, 等. 基于中医手法镇痛探讨大鼠腰痛模型的选择及应用进展. *南京中医药大学学报*, 2020, 36(6):921-925.
- 14 马兵. 扳腿压腰复位法治疗腰椎间盘突出症135例. *河南中医*, 2004, 24(2):64.
- 15 马大为. 屈膝屈髋摇按法结合常规手法治疗中央型腰间盘突出的临床疗效观察. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学硕士学位论文, 2020,(1): 1-44.
- 16 王雄将. 枢经推拿对慢性疼痛大鼠VGLUT2表达的影响及其机制研究. 南宁: 广西中医药大学硕士学位论文, 2018,(2):1-100.
- 17 梁英业. 基于MiRNA-146a调控TLR4信号通路探讨枢经推拿对神经病理性疼痛大鼠的镇痛机制. 南宁: 广西医科大学硕士学位论文, 2019,(8):1-88.
- 18 Chang H L, Wang H C, Chunag Y T, et al. miRNA expression change in dorsal root Ganglia after peripheral nerve injury. *J Mol Neurosci*, 2017, 61(2):169-177.
- 19 Lin C R, Chen K H, Yang C H, et al. Intrathecal miR-183 delivery suppresses mechanical allodynia in mononeuropathic rats. *Eur J Neurosci*, 2014, 39(10):1682-1689.
- 20 Yu W J, Fang H W, Zhang L, et al. Reversible changes in BDNF expression in MK-801-induced hippocampal astrocytes through NMDAR/PI3K/ERK signaling. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15:672136.
- 21 Ma W Y, Quirion R. The ERK/MAPK pathway, as a target for the treatment of neuropathic pain. *Expert Opin Ther Targets*, 2005, 9(4): 699-713.
- 22 何明伟, 庞金磊, 王成彬, 等. 电针深刺对三叉神经痛大鼠ERK蛋白表达及Kv3.4、Kv4.3基因表达的影响. *疑难病杂志*, 2021, 20(6): 608-612.
- 23 刘高丽, 刘静, 王江栓, 等. 草乌甲素通过JAK2/STAT3通路抑制Nav1.6表达减轻奥沙利铂诱发的神经病理性疼痛. *中国病理生理杂志*, 2021, 37(9):1628-1635.
- 24 Ding H H, Zhang S B, Lv Y Y, et al. TNF- α /STAT3 pathway epigenetically upregulates Nav1.6 expression in DRG and contributes to neuropathic pain induced by L5-VRT. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1):29.
- 25 Bernal L, Cisneros E, Roza C. Activation of the regeneration-associated gene *STAT3* and functional changes in intact nociceptors after peripheral nerve damage in mice. *Eur J Pain*, 2021, 25(4): 886-901.
- 26 Dominguez E, Mauborgne A, Mallet J, et al. SOCS₃-mediated blockade of JAK/STAT3 signaling pathway reveals its major contribution to spinal cord neuroinflammation and mechanical allodynia after

- peripheral nerve injury. *J Neurosci*, 2010, 30(16):5754–5766.
- 27 李秋月, 许海玉, 杨洪军. 促炎因子 TNF- α , IL-1 β , IL-6 在神经病理性疼痛中的研究进展. *中国中药杂志*, 2017, 42(19):3709–3712.
- 28 Khan J, Wang Q, Ren Y F, *et al.* Exercise induced hypoalgesia profile in rats is associated with IL-10 and IL-1 β levels and pain severity following nerve injury. *Cytokine*, 2021, 143:155540.
- 29 Mei X P, Sakuma Y, Xie C, *et al.* Depressing interleukin-1 β contributed to the synergistic effects of tramadol and minocycline on spinal nerve ligation-induced neuropathic pain. *Neurosignals*, 2014, 22(1):30–42.
- 30 Qiu F, Tong H J, Wang Y W, *et al.* Inhibition of miR-21-5p suppresses high glucose-induced proliferation and angiogenesis of human retinal microvascular endothelial cells by the regulation of AKT and ERK pathways via maspin. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2018, 82(8):1366–1376.
- 31 Lee G W, Hur W, Kim J H, *et al.* *Nardostachys jatamansi* root extract attenuates tumor progression in hepatocellular carcinoma *via* inhibition of ERK/STAT3 pathways. *Anticancer Res*, 2021, 41(4):1883–1893.
- 32 Yang Q Q, Li H N, Zhang S T, *et al.* Red nucleus IL-6 mediates the maintenance of neuropathic pain by inducing the productions of TNF- α and IL-1 β through the JAK2/STAT3 and ERK signaling pathways. *Neuropathology*, 2020, 40(4):347–357.

Effects of Massage on miR-21-5P, ERK and STAT3 in Rats with Neuropathic Pain

Wu Pingting¹, Xiao Yi², Liang Yingye², Xie Lihong¹, Ding Yao¹,
Lu Dongming², Chen Xiaohong¹, Tang Hongliang³

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, China ;2. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, China ;3. Fangchenggang Hospital affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Fangchenggang 538000, China)

Abstract: Objective To observe the expression changes of Mir-21-5p, ERK and STAT3 in neuropathic pain rats, and explore the analgesic mechanism of massage. Methods Forty male SD rats were randomly divided into 5 groups, including normal group, model group, sham operation group, massage group and sham massage group, with 8 rats in each group. The normal group was not given any intervention; L5 spinal nerve ligation model (SNL) was established in model group, massage group and false push group. Only spinal nerves of the sham group were exposed for 2–3 minutes; On the first day after modeling, massage manipulation simulator was used to massage the "Huantiao", "Yangling quan" and "Xuanzhong" points of the massage group, once a day, each treatment 18 min (bilateral), continuous intervention for 7 days; The rats in the sham massage group were gently stroked with both hind limbs for 18min every day for 7 consecutive days. PWMT and PWTL of rats in each group were determined 1 day before modeling, 3 and 7 days after modeling. The expression level of miR-21-5P in each group was detected by q-PCR on day 7 after modeling. The protein expression levels of ERK and STAT3 were determined by Western blot. The expression level of IL-1 β in each group was detected by ELISA. Results On the 3rd and 7th day after operation, the mechanical threshold and thermal pain threshold of rats in the model group were lower than those in the normal group and the sham group ($P < 0.05$), and the mechanical threshold and thermal pain threshold of rats in the massage group were higher than those in the model group and the sham group ($P < 0.05$). On the 7th day after surgery, q-PCR results showed that miR-21-5p level in model group was significantly increased compared with normal group and sham group ($P < 0.01$). The miR-21-5p level in massage group was significantly decreased compared with that in model group and sham massage group ($P < 0.01$). Western blot test results showed that compared with normal group and sham operation group, ERK and STAT3 levels in model group were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with model group and sham massage group, ERK and STAT3 levels in massage group were significantly down-regulated ($P < 0.05$). ELISA results showed that the expression of IL-1 β in model group was increased compared with normal group and sham operation group ($P < 0.05$), and the expression of IL-1 β in massage group was down-regulated compared with model group and sham massage group ($P < 0.05$). Conclusion

Massage can reduce pain response in SNL rats, and the mechanism may be related to regulating the expression of miR-21-5P, ERK, STAT3 and IL-1 β , and thus inhibiting the inflammatory response mediated by miR-21-5P.

Keywords: Massage, Neuropathic pain, miR-21-5P, ERK, STAT3, IL-1 β , Analgesia

(责任编辑: 李青, 审稿人: 王瑀、张志华)