

◆方药研究◆

不同参数组合电针对炎性痛模型大鼠镇痛效果及炎症因子的影响

周杰¹, 陈贞羽², 龚杰³, 庄晟坚⁴, 邵晓梅⁵, 方剑乔⁵

1. 浙江中医药大学附属第三医院, 浙江 杭州 310005
2. 杭州市下城区人民医院, 浙江 杭州 310000
3. 杭州市萧山区中医院, 浙江 杭州 311201
4. 温州市中西医结合医院, 浙江 温州 325000
5. 浙江中医药大学第三临床医学院, 浙江 杭州 310053

[摘要] 目的: 评价不同参数组合电针的抗炎镇痛效应, 筛选出电针治疗炎性痛的最佳参数组合。方法: 30只SD雄性大鼠, 随机分为空白组(N组)、模型组(M组)、2 Hz组、100 Hz组和2/100 Hz组, 每组6只。于SD大鼠右后足跖内注射完全弗氏佐剂(CFA)建立大鼠炎性痛模型。用电针干预大鼠患侧“足三里”和“昆仑”穴, 于造模前, 造模后24 h, 治疗第1、3、5、7、10天检测大鼠右后足机械缩足阈值(PWTs)。采用酶联免疫吸附试验检测大鼠右后足跖炎症因子白细胞介素-1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的含量。结果: 造模后24 h, 除N组外, 其余各组大鼠PWTs均显著下降($P < 0.01$), 提示造模成功。与M组比较, 电针刺激干预后, 电针组各时间点PWTs明显上升($P < 0.01$)。在干预后第1、3、5天三个时间点检测PWTs后发现, 电针组之间无统计学差异($P > 0.05$); 在电针干预后第7天, 2/100 Hz组大鼠PWTs高于2 Hz组和100 Hz组($P < 0.01$); 干预后第9天, 2/100 Hz组和100 Hz组大鼠PWTs高于2 Hz组($P < 0.05$, $P < 0.01$); 干预后第10天, 2/100 Hz组大鼠PWTs高于2 Hz组($P < 0.01$)。与N组比较, M组大鼠足跖炎症因子IL-1β、TNF-α含量显著升高($P < 0.01$)。与M组比较, 2 Hz组、100 Hz组和2/100 Hz组大鼠足跖炎症因子IL-1β含量显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$); 100 Hz组和2/100 Hz组大鼠足跖炎症因子TNF-α含量显著降低($P < 0.01$)。与2 Hz组比较, 100 Hz组和2/100 Hz组大鼠足跖炎症因子TNF-α含量显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: 不同参数组合电针均具有抗炎镇痛作用, 但不同参数组合电针镇痛效果有所不同, 电针干预炎性疼痛时, 以2(50 μs)/100 Hz(200 μs)最佳。

[关键词] 炎性痛; 电针; 频率; 镇痛; 参数; 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R332 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415(2018)02-0001-05

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.02.001

Electroacupuncture with Different Parameter Combinations Has Analgesic Effect on Model Rats with Inflammatory Pain

ZHOU Jie, CHEN Zhenyu, GONG Jie, ZHUANG Shengjian, SHAO Xiaomei, FANG Jianqiao

Abstract: Objective: To evaluate the anti-inflammatory and analgesic effect of electroacupuncture with different parameter combinations, and to select the optimal parameter combination of electroacupuncture in the treatment of inflammatory pain. Methods: Divided 30 male SD rats into blank control group(group N), the model group(group M), 2 Hz group, 100 Hz group and 2/100 Hz group, 6 rats in each group. Injected complete Freund's adjuvant(CFA) into plantars of right hind legs of SD rats to establish the rat model of inflammatory pain. Intervened Zusani and Kunlun on affected sides in rats with electroacupuncture. Before and 24 h after the establishment of model and 1st, 3rd, 5th, 7th, and 10th days of treatment, detected paw withdrawal thresholds(PWTs) of right hind legs of rats. Adopted enzyme linked immunosorbent assay to detect

[收稿日期] 2017-06-13

[基金项目] 浙江省重点科技创新团队项目(2013TD15); 浙江省中医药科研基金项目(2016ZA109)

[作者简介] 周杰(1985-), 男, 主治中医师, 研究方向: 电针镇痛的免疫机制研究。

[通信作者] 方剑乔, E-mail: fangjianqiao7532@163.com.

the content of inflammatory factors such as interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α). **Results:** At 24 h after the establishment of model, except group N, PWTs of rats in other groups were significantly decreased ($P < 0.01$), indicating the success of model establishment. Comparing with those in group M, after intervention with electroacupuncture stimulation, PWTs of electroacupuncture groups at each time point were evidently increased ($P < 0.01$). At the three time points of the 1st, 3rd and 5th day after intervention, detected PWTs of electroacupuncture groups, there being no significance in differences ($P > 0.05$). On the 7th day after intervention, PWTs in 2/100 Hz group were higher than those in 2 Hz group and 100 Hz group ($P < 0.01$). On the 9th day after intervention, PWTs in 2/100 Hz group and 100 Hz group were higher than those in 2 Hz group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). On the 10th day after intervention, PWTs in 2/100 Hz group were higher than those in 2 Hz group ($P < 0.01$). Comparing with that in group N, the content of IL-1 β and TNF- α in group M was significantly increased ($P < 0.01$). Comparing with that in group M, IL-1 β content was evidently decreased in 2 Hz group, 100 Hz group and 2/100 Hz group ($P < 0.05$, $P < 0.01$); TNF- α content in 100 Hz group and 2/100 Hz group was significantly decreased ($P < 0.01$). Comparing with that in 2 Hz group, TNF- α content in 100 Hz group and 2/100 Hz group was significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Electroacupuncture with different parameter combinations all have anti-inflammatory and analgesic effect but the analgesic effect can be different. Electroacupuncture with parameter of 2(50 μ s)/100 Hz (200 μ s) is optimal for the intervention of inflammatory pain.

Keywords: Inflammatory pain; Electroacupuncture; Frequency; Analgesia; Parameter; Animal experiment; Rats

炎性痛是临幊上最常见疼痛类型，如常见的骨关节炎、肩周炎、类风湿性关节炎等均属于炎性痛，可以说“有炎症，就有炎性疼痛”，也是世界医学难题之一。现代医学的主要治疗手段是应用非甾体抗炎药消炎镇痛，然而长期使用会导致胃肠道黏连、溃疡、出血，甚至穿孔等危及生命的副作用^[1~2]。电针镇痛早已是不争的事实，电刺激参数是电针镇痛起效的关键，但有一份调查显示 78.4 % 的中医师不清楚应用哪种刺激参数达到最佳的镇痛效果^[3]。文献表明，研究人员应用不同频率电针对疼痛模型动物均有明显的镇痛作用^[4~5]，这让临幊医生无所适从。课题组前期发现电针治疗慢性疼痛应选用频率为 2 Hz、100 Hz 的电针，不推荐使用频率为 15 Hz、50 Hz 的电针^[6]。课题组在前期研究过程中发现不同频率与波宽组合，其镇痛效应有所差别，即频率为 2 Hz 时，波宽选用 50 μ s 镇痛效果最好，而频率为 100 Hz 时，波宽选用 200 μ s 镇痛效果最好。本研究选用弗氏完全佐剂致大鼠炎性痛模型^[7]，应用 Master-9 电脉冲刺激器，模拟电针仪输出波形、波宽、频率、电流等刺激参数组合，通过对炎性痛大鼠行为学观察和相关炎症因子检测，客观评价不同电刺激参数组合的镇痛效应，筛选出治疗炎性痛的最优电针参数，使其更好地应用于临幊，也对电针仪研发人员有一定参考意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选用清洁级健康雄性 SD 大鼠 30

只，体质量(180 ± 20)g，购自中国科学院上海实验动物中心，合格证号为 SCXK(沪)2014-0016。饲养期间给予啮齿类动物标准颗粒饲料(由浙江中医药大学实验动物中心提供)及自由摄食与饮水，温度(25 ± 2)℃，湿度 30 % ~ 40 %，12 h 循环灯光。实验在浙江中医药大学实验动物中心完成。

1.2 仪器和试剂 脉冲刺激器(以色列 AMPI 公司，型号 Master-9)；电刺激隔离器(以色列 AMPI 公司，型号 ISO-Flex)；Digital Von Frey 测痛仪(法国 Bioseb 公司，型号 BIO-EVF3)。弗氏完全佐剂(美国 Sigma 公司)；水合氯醛(上海化学试剂采购供应五联化工厂)；IL- β ELISA kit(美国 Abcam 公司)；TNF- α ELISA kit(美国 Abcam 公司)。华佗牌无菌针灸针(苏州医疗用品厂有限公司，规格 0.25 mm × 13 mm)。

1.3 分组与模型的制备 将 SD 大鼠适应性喂养 1 周后，采用 SPSS17.0 软件随机分为空白组(N 组)、模型组(M 组)、2 Hz 组、100 Hz 组、2/100 Hz 组，每组 6 只。大鼠俯卧位，于右后足垫底部碘伏消毒，75 % 酒精脱碘，取 1 mL 注射器抽取适量完全弗氏佐剂(Complete Freund's Adjuvant, CFA)，除 N 组外，其余组别大鼠均在右后足跖皮下按照 0.1 mL/ 只缓慢注射，注射完成后用干棉球按压以防止出血和 CFA 的渗出。N 组大鼠于右后足跖皮下注射等量的生理盐水即可。

1.4 电刺激器参数设置 (1)2Hz 组波形：双向对称

矩形波；频率：2 Hz；波宽：50 μ s；刺激强度和时间：1 mA 15 min，再2 mA 15 min，共30 min。(2)100 Hz组波形：双向对称矩形波；频率：100 Hz；波宽：200 μ s；刺激强度和时间：1 mA 15 min，再2 mA 15 min，共30 min。(3)2/100 Hz组波形：双向对称矩形波；频率：2 Hz持续3 s，然后100 Hz持续3 s，两者自动切换；波宽：2 Hz时，波宽为50 μ s，100 Hz时，波宽为200 μ s；刺激强度和时间：1 mA 15 min，再2 mA 15 min，共30 min。

1.5 处理与治疗 N组不做任何处理，自由活动。M组用特制的布套固定，不行针灸干预；其余各电针干预组大鼠均选取右侧的足三里穴(膝关节后外侧，在腓骨小头下约5 mm处)和昆仑穴(后肢外踝与跟腱之间的凹陷中)穴(参照华兴邦大鼠穴位图谱)，并用特制的布套固定，选用0.25 mm×13 mm针灸针刺激，导线分别连接Master-9针灸针和脉冲刺激器，刺激器参数如上所述。每天干预1次，连续10天。

1.6 痛阈测试 本实验使用EvF(Electronic von Frey)测量仪检测大鼠右后机械缩足阈值(Paw Withdrawal Thresholds, PWTs)，分别于造模前(Base)，造模后24 h(After CFA)，干预第1、3、5、7、10天，共7个时间点检测，每次测量时间不少于5 s，间隔时间不少于10 s，每只大鼠共测量3次，取其平均值作为该只大鼠的机械缩足阈值。

1.7 取材 大鼠干预第10天结束后统一处死，用眼科剪剪取大鼠患侧即右后足跖炎症组织，立即称重后放入事先预冷的10 mL离心管中，于-80 °C的超低温冰箱中冻存待用。

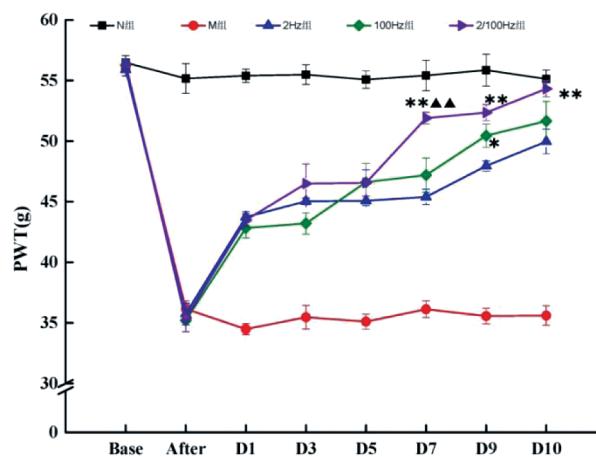
1.8 指标检测 酶联免疫吸附法(ELISA)检测足跖炎症组织白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)。将事先冻存的足跖炎症组织样本于冰浴下解冻，将预配制的PBS溶液，按照样本重量以1:9的比例加入离心管中，随后在冰浴环境下，使用组织匀浆机将足跖炎症组织充分匀浆，然后置于落地高效冷冻离心机中离心，设置参数为：4 °C，3 000 rpm，离心10 min，离心后取上清液1 mL于离心管中，-80 °C冻存待测。ELISA样本检测在浙江中医药大学动物实验中心完成。

1.9 统计学方法 采用SPSS17.0软件进行统计分析，计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示，组间比较用单因素方差分析(ANOVA)；组间两两比较，方差齐性时采用LSD

(Least-Significant-Difference)检验，方差不齐时采用Dunnett's T3检验。

2 结果

2.1 各组大鼠痛阈检测结果比较 见图1。造模后24 h，除N组外，其余各组大鼠PWTs均显著下降($P < 0.01$)，提示造模成功。与M组比较，电针干预后，电针组各时间点PWTs明显上升($P < 0.01$)。在干预后第1、3、5天3个时间点检测痛阈后发现，电针组之间无统计学差异($P > 0.05$)；在电针干预后第7天，2/100 Hz组大鼠痛阈高于2 Hz组和100 Hz组($P < 0.01$)；干预后第9天，2/100 Hz组和100 Hz组大鼠痛阈高于2 Hz组($P < 0.05$ ， $P < 0.01$)；干预后第10天，2/100 Hz组大鼠痛阈高于2 Hz组($P < 0.01$)。



与2 Hz组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与100 Hz组比较，▲▲ $P < 0.01$

图1 各组大鼠痛阈检测结果比较

2.2 各组大鼠足跖炎症因子IL-1 β 含量比较 见表1。与N组比较，M组大鼠足跖炎症因子IL-1 β 含量显著升高，差异有统计学意义($P < 0.01$)。与M组比较，2 Hz组、100 Hz组和2/100 Hz组大鼠足跖炎症因子IL-1 β 含量显著降低，差异均有统计学意义($P < 0.05$ ， $P < 0.01$)。

2.3 各组大鼠足跖炎症因子TNF- α 含量比较 见表2。与N组比较，M组大鼠足跖炎症因子TNF- α 含量显著升高，差异有统计学意义($P < 0.01$)。与M组比较，100 Hz组和2/100 Hz组大鼠足跖炎症因子TNF- α 含量显著降低，差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与2 Hz组比较，100 Hz组和2/100 Hz组大鼠足跖炎症因子TNF- α 含量显著降低，差异均有统计

学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表1 各组大鼠足跖炎症因子 IL-1 β 含量比较($\bar{x} \pm s$) pg/mL

组别	n	IL-1 β
N组	6	790.08±51.51
M组	6	1244.99±68.11 ^①
2 Hz组	6	915.14±35.73 ^②
100 Hz组	6	833.71±99.27 ^③
2/100 Hz组	6	836.80±149.80 ^③

与N组比较, ① $P < 0.05$; 与M组比较, ② $P < 0.05$, ③ $P < 0.01$

表2 各组大鼠足跖炎症因子 TNF- α 含量比较($\bar{x} \pm s$) pg/mL

组别	n	TNF- α
N组	6	78.87±10.06
M组	6	160.45±32.99 ^①
2 Hz组	6	164.55±12.98
100 Hz组	6	95.14±7.79 ^{②③}
2/100 Hz组	6	91.22±6.65 ^{②④}

与N组比较, ① $P < 0.01$; 与M组比较, ② $P < 0.01$; 与2 Hz组比较, ③ $P < 0.05$, ④ $P < 0.01$

3 讨论

炎性痛是指由创伤、感染以及手术等引起的外周组织损伤并导致炎症时所产生的疼痛, 是临床最常见的病理性疼痛类型, 其主要表现为持续性的痛觉过敏。本研究选用的CFA模型能很好地模拟临床炎性痛过程, 是国内外公认的研究炎性痛的典型模型^[8]。本研究过程中发现大鼠在造模后第1天痛阈明显下降, 直至实验结束; 与此同时, 大鼠足跖炎症因子明显高于正常组, 说明造模成功。

电针广泛应用于各类疼痛性疾病, 其镇痛机制在于电针刺激信号与疼痛信号在神经系统相互整合, 鉴于目前对疼痛发生机制尚不完全清楚, 因此用疼痛行为学作为主要评价指标来研究针刺镇痛更为合适。本实验通过检测CFA大鼠患侧足PWTs来反映电针镇痛效果, 研究结果表明3种参数组合(2 Hz/50 μs, 100 Hz/200 μs及2/100 Hz)电针均有明显镇痛效果, 且从电针治疗起始终优于模型组。在电针干预1周之内, 无论是低频、高频还是疏密波电刺激, 均能提高模型大鼠的痛阈, 3组之间无差异; 而电针干预1周以后, 发现2/100 Hz组大鼠痛阈不同程度优于2 Hz组和100 Hz组。由于疼痛的发生与维持是由不同传导通路介导的, 因此, 笔者认为这种差异可能源于不

同电刺激信号可以特异性地激活不同传导通路, 特异地作用于疼痛的发生阶段或维持阶段。可见病程在1周以内选这3个频率(2 Hz, 100 Hz, 2/100 Hz)不影响疗效, 而治疗后期应该选2/100 Hz, 这提示在临床治疗中, 炎性痛病程较长者应选用疏密波来治疗。

IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子在介导炎症反应过程中起重要作用。本研究采用ELISA法检测大鼠足跖炎症组织中IL-1 β 、TNF- α 含量, 除2Hz组炎症因子TNF- α 含量与模型组无差异, 其余各组均能明显降低IL-1 β 、TNF- α 含量, 这与课题组前期结果一致^[9-10]。研究结果提示3种参数组合电针均可降低大鼠足跖炎症组织因子IL-1 β 含量, 且3组间无差异。100 Hz组和2/100 Hz组大鼠足跖炎症因子TNF- α 的含量低于模型组和2 Hz组, 表明100 Hz和2/100 Hz电针较2 Hz电针治疗具有更好的抗炎作用。因此, 笔者认为100 Hz和2/100 Hz电针镇痛效果优于2 Hz电针可能与前者可以同时抑制两种炎症因子有关。

考虑到疏密波可以降低实验对象或患者对电针的耐受性, 且疏密波可以让4种阿片肽全部释放^[11], 结合本研究结果看, 建议电针治疗炎性痛时选用2/100 Hz电针, 不推荐使用连续波电针治疗。

[参考文献]

- Jones P, Dalziel SR, Lamdin R, et al. Oral non-steroidal anti-inflammatory drugs versus other oral analgesic agents for acute soft tissue injury[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2015(7): CD007789.
- 王海华, 王海珍, 曾瑾, 等. 水溶性蜂胶联合阿司匹林对大鼠炎性痛作用[J]. 中成药, 2015, 37(6): 1157-1164.
- 林蓓茵. 电针仪设计技术及其参数的相关因素研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2010.
- Zhang S, Tang H, Zhou J, et al. Electroacupuncture attenuates neuropathic pain after brachial plexus injury[J]. Neural Regen Res, 2014, 9(14): 1365-1370.
- 魏骏骏, 蒋永亮, 寿升芸, 等. 低频电针对2型糖尿病神经痛大鼠背根神经节CGRP的干预研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2016, 40(4): 227-231.
- 周杰, 庄最坚, 龚杰, 等. 不同频率电针对神经病理痛模型大鼠镇痛效应观察[J]. 浙江中医药大学学报, 2016, 40(12): 887-890.
- Malekzadeh G, Dashti-Rahmatabadi MH, Zanbagh S, et al. Mumijo attenuates chemically induced inflammatory pain in mice[J]. Altern Ther Health Med, 2015, 21(2): 42-47.

- [8] Beyer A, Schäfer M, Stein C. Antinociceptive effects of dynorphin peptides in a model of inflammatory pain[J]. Pain, 1997, 70(2-3): 141-147.
- [9] 方剑乔, 刘芳, 邵晓梅, 等. 电针对角叉菜胶致炎大鼠的抗炎效应及对白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子- α 的影响[J]. 针刺研究, 2007, 32(4): 224-228.
- [10] 陈益丹, 邱华平, 金肖青, 等. 不同针灸方法对膝骨关节炎模型细胞因子及基质金属蛋白酶影响的比较研究[J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(1): 42-45.
- [11] 韩济生. 针刺镇痛频率特异性的进一步证明[J]. 针刺研究, 2001, 26(3): 224-225.

(责任编辑: 冯天保, 郑峰玲)

补阳还五汤对 ApoE 基因缺陷小鼠血脂及动脉粥样硬化斑块炎症反应的影响

李土明, 吴滢, 徐丽英, 钟萍

上海中医药大学附属上海市中西医结合医院, 上海 200082

[摘要] 目的: 观察补阳还五汤对 ApoE 基因缺陷 ($ApoE^{-/-}$) 小鼠血脂及动脉粥样硬化斑块炎症因子脂蛋白相关磷脂酶 A2 (Lipoprotein-associated phospholipase A2, Lp-PLA2) 及基质金属蛋白酶-9 (Matrix Metalloproteinase-9, MMP-9) 的影响。方法: 34 只 $ApoE^{-/-}$ 小鼠高脂饮食 12 周, 随机取 4 只确定造模成功后, 余 30 只按随机数字表随机分成模型组、补阳还五汤组、阿托伐他汀组, 每组 10 只。补阳还五汤组给予补阳还五汤 20 g/(kg·d) 灌胃; 阿托伐他汀组给予阿托伐他汀 5 mg/(kg·d) 灌胃; 模型组给予等量生理盐水。给药 4 周后, 测定血脂水平, 并采用 ELISA 法测定血清 Lp-PLA2 及 MMP-9 水平。结果: 与模型组比较, 补阳还五汤组、阿托伐他汀组小鼠总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG) 及低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平均下降, 高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 水平升高, 血清 Lp-PLA2 和 MMP-9 水平明显降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。补阳还五汤组小鼠 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 水平、血清 Lp-PLA2 和 MMP-9 水平与阿托伐他汀组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论: 补阳还五汤具有抗动脉粥样硬化作用, 下调血脂水平和降低炎症反应可能是其作用机制之一。

[关键词] 补阳还五汤; 动脉粥样硬化; 炎症反应; 脂质代谢; 动物实验; 小鼠

[中图分类号] R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2018) 02-0005-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.02.002

Buyang Huanwu Tang Has Effect on Blood Lipid and Inflammatory Reaction of Atherosclerosis Plaque in ApoE Gene-Deficient Mice

LI Tuming, WU Ying, XU Liying, ZHONG Ping

Abstract: Objective: To observe the effect of Buyang Huanwu tang on blood lipid and inflammatory factors of atherosclerosis plaque such as lipoprotein-associated phospholipase A2(Lp-PLA2) and matrix metalloproteinase-9(MMP-9) in apoE gene-deficient($ApoE^{-/-}$) mice. Methods: Thirty-four $ApoE^{-/-}$ mice were fed with high-fat diet for 12 weeks. Randomly selected 4 of them to determine success of the models. After establishing successful models, divided the rest 30 mice into the model group, Buyang Huanwu tang group, and atorvastatin group randomly according to random number table, 10 mice in each group. Buyang Huanwu tang group was given 20 g/(kg·d) of Buyang Huanwu tang by gavageand, atorvastatin group was given 5 mg/(kg·d) of atorvastatin by gavage. The model group was given equivalent amount of saline. After 4 weeks of medication, measured the blood lipid level, and detected levels of Lp-PLA2 and MMP-9 in serum with ELISA method. Results: Compared with those in the model group, in Buyang Huanwu tang group and atorvastatin group, levels of total

[收稿日期] 2017-07-07

[基金项目] 上海中医药大学预算内项目 (2015YSN61); 上海市虹口区卫生局课题 (虹卫 1503-04)

[作者简介] 李土明 (1981-), 男, 主治医师, 研究方向: 中西医结合治疗脑血管病。

[通信作者] 钟萍, E-mail: zphgl@163.com.