

# 推拿对坐骨神经损伤模型大鼠疼痛、炎性介质及腓肠肌的影响\*

吴志伟<sup>1,2</sup>,周鑫<sup>3</sup>,宋朋飞<sup>3</sup>,程艳彬<sup>1,2</sup>,房敏<sup>1,2,3Δ</sup>

1 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院,上海 200437;

2 上海市中医药研究院推拿研究所,上海 200437; 3 上海中医药大学附属曙光医院,上海 201203

**[摘要]** 目的:探讨推拿对坐骨神经损伤(chronic constriction injury,CCI)模型大鼠疼痛行为学、血清炎性介质及腓肠肌的影响。方法:将32只雄性SD大鼠随机分为4组,模型组及推拿组通过羊肠线轻扎大鼠坐骨神经方法制备CCI模型。空白组不予任何手术操作;假手术组不予羊肠线结扎,其余流程同CCI造模。干预后观察4组大鼠术侧行为学[机械足反射阈值(paw withdrawal threshold,PWT)、热缩足反射潜伏期(paw withdrawal latency,PWL)]、腓肠肌湿重恢复率、肌细胞形态学及血清白细胞介素 $1\beta$ (interleukin- $1\beta$ ,IL- $1\beta$ )、IL-6、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ ,TNF- $\alpha$ )和5-羟色胺(5-hydroxytryptamine,5-HT)表达水平。结果:与空白组比较,模型组大鼠各时间点术侧PWT、PWL、腓肠肌湿重恢复率和肌细胞截面积均降低( $P<0.001$ ),血浆IL- $1\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 和5-HT均升高( $P<0.001$ );假手术组各指标与空白组相比均无统计学意义( $P>0.05$ );与模型组比较,推拿组大鼠术侧PWT、PWL、腓肠肌湿重恢复率和肌细胞截面积均升高( $P<0.05$ ),血浆IL- $1\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 和5-HT均降低( $P<0.05$ )。结论:推拿手法对CCI模型大鼠具有镇痛作用,其机制可能与抑制炎性介质IL- $1\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 和5-HT释放,减轻外周炎症反应有关。

**[关键词]** 坐骨神经损伤;疼痛;炎性介质;腓肠肌;推拿

**[中图分类号]** R255.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2096-9600(2025)06-0013-05

## Effects of Massage on Pain, Inflammatory Mediators and Gastrocnemius Muscle in Chronic Constriction Injury Rat Models

WU Zhiwei<sup>1,2</sup>, ZHOU Xin<sup>3</sup>, SONG Pengfei<sup>3</sup>, CHENG Yanbin<sup>1,2</sup>, FANG Min<sup>1,2,3Δ</sup>

1 Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China;

2 The Institute of Tui-Na, Shanghai Institute of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China;

3 Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China

**Abstract** Objective: To explore the effects of massage on pain behavior, plasma inflammatory mediators and gastrocnemius muscle in chronic constriction injury (CCI) rat models. Methods: A total of 32 male SD rats were randomized into four groups, the model group and the massage group were prepared into CCI models through the method of light puncture of rat sciatic nerve with catgut. The blank group didn't accept any surgical procedure, and sham operation group was not ligated with catgut, and the rest procedures were the same as CCI modeling. After the intervention, to observe surgical behavior including PWT and PWL, the recovery rate of gastrocnemius muscle wet weight, myocyte morphology, and the expressions of IL- $1\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  as well as 5-HT in the four groups. Results: Compared with the blank group, PWT and PWL, the recovery rate of gastrocnemius muscle wet weight, sectional area of myocytes in the model group were reduced at different time points ( $P<0.001$ ), the levels of plasma IL- $1\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  as well as 5-HT were increased ( $P<0.001$ ); The difference had no statistical meaning when the indexes of sham operation group were compared with these of the blank group ( $P>0.05$ ); compared with the model group, PWT and PWL, the recovery rate of gastrocnemius muscle wet weight, sectional area of myocytes were lifted in the massage group ( $P<0.05$ ), the levels of plasma IL- $1\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  as well as 5-HT were decreased ( $P<0.05$ ). Conclusion: Massage could relieve the pain in CCI rat models, and its mechanism might be related to restraining the release of inflammatory mediators including IL- $1\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ , 5-HT, and alleviating peripheral inflammatory response.

**Keywords** chronic constriction injury; pain; inflammatory mediators; gastrocnemius muscle; massage

周围神经损伤是指周围神经干或其分支损伤后引起受该神经支配的区域出现感觉、运动和营养障碍的一种疾病。其中,坐骨神经损伤(chronic

constriction injury,CCI)是最为常见的周围神经损伤疾病之一,CCI引起的疼痛属神经病理性疼痛(neuropathic pain,NPP)范畴,自发痛和痛

觉过敏是其主要病理特征<sup>[1]</sup>。NPP属于临床常见病、高发病<sup>[2]</sup>,其痛感强烈,且多伴运动功能障碍及负性情绪,严重影响患者身心健康<sup>[3-4]</sup>。推拿手法治疗周围神经损伤临床应用广泛且疗效显著,其可改善外周神经损伤患者疼痛、功能障碍和神经传导速度<sup>[5-6]</sup>,然而其起效机制目前尚未完全明确。本研究通过制备CCI模型大鼠,观察推拿手法对CCI模型大鼠疼痛行为学、血清炎性介质及腓肠肌的影响,以期对推拿手法治疗周围神经损伤提供一定理论证据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** SD大鼠32只,雄性,6~8周龄,体质量180~200 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,实验动物许可证号:SCXK(沪)2017-0005。将SD大鼠每笼4只饲养于上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院动物中心,自由饮食水,保证动物房温度与湿度恒定,通风良好,昼夜交替光照。本研究所有操作均严格遵守国际疼痛研究学会有关动物保护及使用规范的规定,且通过上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院伦理委员会审核批准(YYLAC-2019-020)。

**1.2 主要试剂与仪器** 白细胞介素 $1\beta$ (interleukin- $1\beta$ , IL- $1\beta$ )、IL-6、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )试剂盒均由Abcam公司提供,批号分别为ab255730、ab234570、ab236712;五羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)试剂盒由武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司提供,批号为E-EL-0033c;戊巴比妥钠(Epitomics,批号:150214);乌拉坦(国药集团化学试剂有限公司,批号:TH06181G);硫酸阿米卡星(宜昌福人药业有限公司,批号:06880,规格:2 mL/0.2 g)。手动型Von-Frey纤维丝刷毛(Stolting公司);Model 33型热痛测试仪(IITC Life Science公司);Grip系统无线触觉力测量指套(Finger TPS公司);CM-1900型恒冷切片机(Leica公司);CX-31型电子光镜(Olympus公司);Wellscan MK 3型酶标仪(Thermo公司);XW-80A型漩涡混合器(上海青浦沪西仪器厂);自制大鼠固定器(专利号:ZL201620226312.9)。

**1.3 造模与分组** 采用随机数字表法将32只SD大鼠随机分为空白组、假手术组、模型组及推拿组。本研究采用国际公认的CCI模型制备方法对大鼠行右后肢单侧造模,见图1。具体方法如下:1)采用4%戊巴比妥钠(0.2 mL/100 g)麻醉大鼠,剃毛、消毒后将大鼠股骨中部下方皮肤剪开1 cm,并用尖头止血钳钝性撑开肌肉组织,然后用撑开

器将分离的肌肉撑开,暴露坐骨神经干;2)玻璃分针钝性剥离坐骨神经周围筋膜及肌肉组织,用止血钳将浸泡12 h的羊肠线结扎在坐骨神经干上,共打3个方结(打结时要松紧适度,以局部肌肉及右后肢轻微抽动、坐骨神经血流通畅且方结可轻微滑动为度),结间距为1 mm;3)逐层缝合筋膜、肌肉、皮肤,腹腔注射硫酸阿米卡星防止伤口感染,电暖器照射至大鼠苏醒。空白组不予任何手术操作;假手术组不予羊肠线结扎,其余流程同CCI造模;模型组及推拿组大鼠行CCI造模。为保证模型制备均质性,所有手术操作由同一人完成。

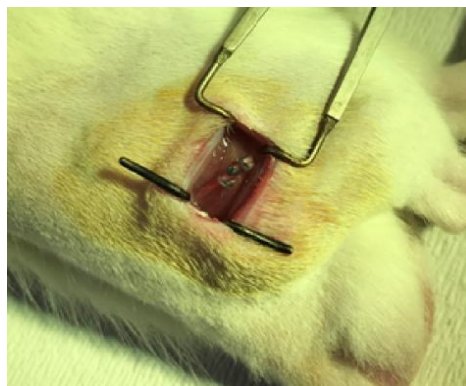


图1 CCI模型制备图

**1.4 干预方法** 推拿操作采用按揉法,从造模后第4天开始,采用自制固定器固定大鼠,充分暴露大鼠术侧后肢,用无线触觉力测量指套按揉术侧腓肠肌肌腹(承山穴),每天1次,持续干预10天。刺激参数:压力5 N,频率2 Hz,时长10 min。

## 1.5 观察指标

**1.5.1 大鼠行为学检测** 采用机械足反射阈值(paw withdrawal threshold, PWT)和热缩足反射潜伏期(paw withdrawal latency, PWL)评价大鼠疼痛行为,PWT值采用Von-Frey纤毛测定,PWL值采用Hargreaves方法测定。行为测试前大鼠适应环境3天,造模前分别测定各组大鼠PWT和PWL共2次并取平均值作为基线值。造模后第3、7、10、14天分别测定PWT和PWL值并记录。

**1.5.2 血清炎性介质水平检测<sup>[7]</sup>** 干预后,腹腔注射25%乌拉坦麻醉大鼠,用5 mL注射器刺入腹主动脉取血,静置30 min后低温离心取上清液,并储存于-80 °C冰箱内备用。采用酶联免疫吸附实验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测各组大鼠血清IL- $1\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 和5-HT表达水平。

**1.5.3 腓肠肌形态学检测<sup>[8]</sup>** 取血后处死大鼠,于冰上取大鼠术侧腓肠肌并称重记录,经PBS清

洗后,修剪保留肌腹最饱满部位并垂直放置于OCT底座上,充分冷冻后,修平组织并切片。将切好的腓肠肌组织贴在挂胶玻片上,经乙醇梯度脱水、苏木素染色、分色、水化、伊红染色、透明后20倍光镜下观察细胞形态。形态学采用腓肠肌湿重恢复率、肌细胞形态和肌细胞截面积评价。其中腓肠肌湿重恢复率(%)=右侧腓肠肌湿重/左侧腓肠肌湿重×100%;肌细胞截面积为高倍镜下50个肌细胞的平均面积,采用Image J软件统计分析。

**1.6 统计学方法** 采用SPSS 21.0软件分析数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行为学数据采用重复测量的方差分析,腓肠肌湿重恢复率及肌细胞截面积采用单因素方差分析,不符合正态分布时采用

非参数秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。  
**2 结果**

**2.1 大鼠疼痛行为学** 与空白组比较,假手术组大鼠各时间点PWT、PWL值变化不明显( $P > 0.05$ );模型组及推拿组大鼠各时间点PWT、PWL值均降低( $P < 0.05$ )。推拿组大鼠第10天及第14天PWT、PWL值高于模型组( $P < 0.05$ )。见表1。

**2.2 血清炎性介质表达水平** 与空白组比较,假手术组大鼠血清IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 和5-HT表达水平无明显变化( $P > 0.05$ );模型组大鼠血清IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 和5-HT表达水平均升高( $P < 0.001$ )。与模型组比较,推拿组大鼠血清IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 和5-HT表达水平均降低( $P < 0.05$ )。见表2。

表1 各组大鼠不同时间点术后足PWT、PWL值变化情况比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	基线值		第3天		第7天	
		PWT(g)	PWL(s)	PWT(g)	PWL(s)	PWT(g)	PWL(s)
空白组	8	24.63 ± 3.89	11.21 ± 0.47	23.25 ± 5.09	11.15 ± 0.81	21.88 ± 5.69	10.71 ± 0.73
假手术组	8	24.59 ± 3.90	11.48 ± 1.03	24.63 ± 3.90*	10.37 ± 1.00*	23.20 ± 5.09*	10.54 ± 0.77*
模型组	8	23.25 ± 5.01	11.32 ± 1.12	10.88 ± 3.48 <sup>#</sup>	8.50 ± 1.52 <sup>#</sup>	5.50 ± 0.93 <sup>#</sup>	5.94 ± 0.86 <sup>#</sup>
推拿组	8	22.95 ± 5.09	11.68 ± 1.26	11.38 ± 3.11 <sup>#</sup>	8.92 ± 1.08 <sup>#</sup>	7.25 ± 1.49 <sup>#</sup>	6.75 ± 0.71 <sup>#</sup>
组别	鼠数	第10天		第14天			
		PWT(g)	PWL(s)	PWT(g)	PWL(s)		
空白组	8	23.25 ± 5.10	10.45 ± 0.63	21.88 ± 5.71	10.94 ± 1.08		
假手术组	8	23.20 ± 5.08*	10.00 ± 1.04*	23.28 ± 5.13*	10.80 ± 1.17*		
模型组	8	4.75 ± 1.04 <sup>#</sup>	5.87 ± 0.57 <sup>#</sup>	4.85 ± 1.05 <sup>#</sup>	6.10 ± 0.47 <sup>#</sup>		
推拿组	8	10.13 ± 2.17**	7.26 ± 0.78**	12.50 ± 2.67**	8.15 ± 0.45**		

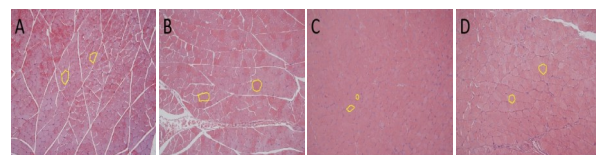
注:#表示与空白组比较, $P < 0.05$ ;\*表示与模型组比较, $P < 0.05$

表2 各组大鼠血清IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 和5-HT表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	IL-1 $\beta$ (pg/mL)	IL-6(pg/mL)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	5-HT(ng/mL)
空白组	8	36.15 ± 12.75	26.78 ± 10.28	74.57 ± 14.18	17.26 ± 8.03
假手术组	8	37.07 ± 14.49	27.17 ± 12.00	64.08 ± 21.73	21.18 ± 9.89
模型组	8	86.23 ± 12.41 <sup>###</sup>	63.81 ± 13.50 <sup>###</sup>	286.95 ± 51.54 <sup>###</sup>	54.98 ± 16.43 <sup>###</sup>
推拿组	8	61.40 ± 14.42 <sup>###</sup>	45.84 ± 15.46 <sup>**</sup>	219.17 ± 46.65 <sup>###</sup>	38.24 ± 12.53 <sup>**</sup>

注:与空白组比较,#表示 $P < 0.05$ ,##表示 $P < 0.01$ ,###表示 $P < 0.001$ ;与模型组比较,\*表示 $P < 0.05$ ,\*\*表示 $P < 0.01$

**2.3 腓肠肌细胞形态学变化** 空白组大鼠肌细胞肌束膜及肌内膜边界清晰,肌细胞核位于肌膜下方;肌纤维被肌内膜包绕,呈圆形、卵圆形或多边形,细胞形态规则、大小接近。假手术组大鼠肌细胞肌束膜及肌内膜边界较清晰,肌细胞核位于肌膜下方;肌纤维被肌内膜包绕,呈圆形、卵圆形或多边形,细胞形态规则,大小接近。模型组大鼠肌纤维被肌内膜包绕,呈圆形、卵圆形或多边形,细胞形态欠规则,肌细胞截面积较空白组缩小,肌细胞核相对聚集。推拿组大鼠肌纤维被肌内膜包绕,呈圆形、卵圆形或多边形,细胞形态欠规则,肌细胞截面积较模型组增大但仍小于空白组和假手术组。见图2。



注:A为空白组;B为假手术组;C为模型组;D为推拿组

图2 各组大鼠术侧腓肠肌形态学变化情况(HE, ×20)

**2.4 术侧腓肠肌湿重恢复率及细胞截面积** 与空白组比较,模型组大鼠术侧腓肠肌湿重恢复率及细胞截面积均降低( $P < 0.001$ );与模型组比较,推拿组大鼠术侧腓肠肌湿重恢复率及细胞截面积均升高( $P < 0.05$ )。见表3。

表3 各组大鼠术侧腓肠肌湿重恢复率及细胞截面积比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	恢复率(%)	截面积( $\mu\text{m}^2$ )
空白组	8	101.8 ± 5.84	1717.52 ± 444.03
假手术组	8	97.36 ± 5.20	1752.58 ± 408.45
模型组	8	38.56 ± 6.16 <sup>***</sup>	685.07 ± 193.41 <sup>***</sup>
推拿组	8	47.85 ± 6.21 <sup>***</sup>	1041.49 ± 225.94 <sup>***</sup>

注:与空白组比较,##表示 $P < 0.01$ ,###表示 $P < 0.001$ ;与模型组比较,\*表示 $P < 0.05$

### 3 讨论

周围神经损伤多属感觉神经和运动神经混合型损伤,临床多以疼痛伴发功能障碍为主要临床表现。中医学将其归于“痹证”范畴,中医认为疼痛主要分为“不通则痛”和“不荣则痛”。《医宗金鉴·正骨心法要旨》中“因跌扑闪失,以至骨缝开错,气血郁滞,为肿为痛,宜用按摩法”和《黄帝内经·太素》中“痛生筋脉皮肤之间,为痹不仁,故以按摩醪醴”分别描述了推拿治疗“不通”和“不荣”致痛的方法。本研究选用周围神经损伤致痛模型CCI,坐骨神经结扎可致局部淤血,属“血瘀”范畴,是为“不通”;结扎可致神经营养障碍,属“血虚”范畴,是为“不荣”。故CCI模型兼具“不通”和“不荣”双重特征,为中医镇痛研究的优选模型。本研究采用无线触觉力测试指套实现手法刺激的量化与标准化<sup>[9]</sup>。在治疗部位选择方面,研究结合中医“经脉所过、主治所及”经络理论及现代解剖“神经-肌肉支配”原则,选取承山穴进行刺激。承山穴属足太阳膀胱经,是临床治疗腰臀部病症常用穴,其位于腓肠肌肌腹交界处,归坐骨神经分支胫神经支配,选穴符合“神经-肌肉支配”原则。本研究结果显示,推拿镇痛效应自第7天开始凸显,并持续至干预结束,证实推拿镇痛具有累积效应。此外,本研究还发现CCI造模可导致腓肠肌湿重恢复率降低、肌细胞变形和细胞截面积缩小,这与既往研究结果一致<sup>[10-11]</sup>,而推拿手法可部分逆转此现象,证实推拿按揉刺激承山穴,可有效抑制腓肠肌萎缩,促进坐骨神经损伤运动功能恢复。

周围神经损伤可继发神经源性炎症反应并促使巨噬细胞、淋巴细胞和肥大细胞等免疫细胞渗出、交感神经兴奋以及血管扩张,进一步导致组胺、缓激肽、神经生长因子、IL、TNF等促炎细胞因子释放增多<sup>[12-13]</sup>。它们通过炎性介质(如蛋白激酶C)调控细胞膜表面离子通道活性,敏化伤害性感受器,导致痛觉过敏和异常性疼痛<sup>[14]</sup>。IL-1 $\beta$ 、IL-6和TNF- $\alpha$ 是经典的神经炎性细胞因子,由单核巨噬细胞分泌产生。周围神经损伤会导致IL-1 $\beta$ 、

IL-6和TNF- $\alpha$ 上调,刺激炎症细胞聚集和激活,促进炎症介质释放,诱发爆发式炎症反应进而导致伤害性感受器灵敏度增高<sup>[15]</sup>。在脊髓背角神经元敏化过程中,突触前膜谷氨酸释放增加以及N-甲基-D-天冬氨酸受体R活性和突触传递效能增强等改变均与TNF- $\alpha$ 密切相关<sup>[16]</sup>。5-HT是一种自体活性物质,在神经损伤过程中,5-HT可竞争性抑制儿茶酚氧位甲基转移酶活性,并通过 $\beta 2/\beta 3$ 肾上腺素受体增加交感神经末梢胺类和前列腺素的释放诱导痛敏<sup>[17-18]</sup>。另有研究表明,5-HT可诱导背根神经节中TNF释放及其受体表达;而TNF也可诱导5-HT<sub>2A</sub>受体表达,提示5-HT和TNF在疼痛外周调控机制中具有交互作用<sup>[19]</sup>。本研究结果表明,CCI造模可升高大鼠血清IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 和5-HT水平,而推拿组大鼠4种炎性介质蛋白表达降低,提示推拿可改善外周神经损伤导致的炎性微环境改变,从而减轻临床症状。

综上所述,推拿手法对CCI模型大鼠具有镇痛作用,其机制可能与抑制炎性介质IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 和5-HT释放,减轻外周炎性反应相关。推拿可减轻外周神经损伤导致的肌肉萎缩,但改善外周神经损伤微环境,促进损伤组织修复是一个复杂过程,推拿镇痛其他机制及推拿促进肌细胞修复的生物学基础值得进一步深入研究。

#### 参考文献

- [1] HE D, GRANT B, HOLDEN R R, et al. Methodology for self-report of rest pain(or spontaneous pain) vs evoked pain in chronic neuropathic conditions: a prospective observational pilot study[J]. Pain Rep, 2017,2(2):587.
- [2] VAN HECKE O, AUSTIN S K, KHAN R A, et al. Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies [J]. Pain, 2014, 155 (4) : 654-662.
- [3] MORIARTY O, RUANE N, O'GORMAN D, et al. Cognitive impairment in patients with chronic neuropathic or radicular pain: an interaction of pain and age[J]. Front Behav Neurosci, 2017, 11: 100.
- [4] SMITH B H, TORRANCE N. Epidemiology of neuropathic pain and its impact on quality of life [J]. Curr Pain Headache Rep, 2012, 16(3): 191-198.
- [5] METIN ZGOK, ARIKAN DONMEZ A, IZGU N, et al. Aromatherapy massage for neuropathic pain and quality of life in diabetic patients [J]. J Nurs Scholarsh, 2017, 49(4): 379-388.
- [6] 陈焕梅, 杨秀翠, 郑琼飞, 等. 电针联合推拿对腕管综合征患者正中神经传导速度及腕关节运动功能康复的影响 [J]. 环球中医药, 2021, 14(8): 1525-1528.
- [7] 冯涛, 张丽萍. 针刀松解对腰椎间盘突出症根性神经痛大鼠中枢与外周血CCK-8、5-HT的影响 [J]. 上海针灸杂志,