

• 科研简报 •

脉冲射频对髓核组织中磷脂酶 A2 活性的影响 *

刘 炎 刘 娜 宋永光 宫小文 吴大胜[△]
(吉林省人民医院疼痛科, 长春 130021)

椎间盘源性腰痛是在腰椎退变基础上椎间盘内疼痛感受器受炎症刺激所引起的腰痛^[1]。近年来, 脉冲射频治疗椎间盘源性腰痛取得了良好的临床疗效^[2,3]。但脉冲射频在治疗椎间盘源性腰痛时取得疗效的相关机制目前尚未完全清楚。本研究采用成年比格犬作为实验动物, 将其制作成腰椎退变动物模型, 以此作为反映局部组织中炎症程度高低的指标, 测量脉冲射频治疗前后椎间盘髓核组织中 PLA₂ (phospholipase A₂) 的活性进行统计学处理, 确定其对动物腰椎退变模型椎间盘髓核组织中 PLA₂ 活性的影响, 旨在为临床上脉冲射频治疗椎间盘源性腰痛提供确切的实验依据。

方 法

1. 实验动物

本实验通过动物伦理委员会审查和审批, 并严格遵守国家卫生和医学研究委员会对实验动物护理和管理的相关指南。选取 1~2 岁健康成年比格犬 20 只 (吉林大学动物实验中心提供), 体重 16.5~21.3 kg, 按照随机数字表法随机分为实验组与对照组, 每组 10 只。

2. 方法

(1) 动物模型的制作: 参考彭俊等^[4]研究造模方法, 用 2% (1 ml/kg) 戊巴比妥静脉注射麻醉两组实验犬。麻醉成功后取俯卧位, 固定四肢, 消毒铺巾, 在 L₅₋₆ 平面从棘突中线向右旁开 12 cm 为入针点, 用穿刺针 (16G) 在 C 形臂 X 线机透视引导下经皮穿刺 L₅₋₆ 椎间盘, 深度控制在透视下正侧位均提示穿过对侧纤维环, 时间持续 60 s。分别于造模前 1 天、造模后 7 天用戊巴比妥静脉麻醉后, 取俯卧位, 行腰椎 MRI 检查 (GE 公司磁共振扫描仪 1.5T)。

(2) 动物脉冲射频调节术: 动物模型制作成功

3 个月后, A 组实验犬行 L₅₋₆ 间盘脉冲射频调节术。C 形臂 X 线机下定位 L₅₋₆ 椎间盘位置, 克氏针定位在 L₅₋₆ 上关节突外侧缘为穿刺点。采用后外侧径路将射频治疗套管针穿刺进入椎间盘, 确认穿刺针尖的位置于椎间盘的中心或中后 1/3 交界处。确认针尖位置无误后, 退出针芯, 连接射频电极 (型号 PMK18-145, 加拿大 Baylis 公司) 及疼痛治疗发生器 (型号 PMG-230, 加拿大 Baylis 公司)。设定疼痛治疗发生器的治疗模式为自动脉冲模式, 进行 42℃、2 Hz、600 s 的标准脉冲射频治疗 2 次。B 组实验犬行 L₅₋₆ 椎间盘穿刺, 但不进行脉冲射频调节术。

(3) 椎间盘髓核组织采集和 PLA₂ 活性测定: 两组于造模前、术前 2 天及术后 7、14、28 天采用空气栓塞法分别处死 2 只动物, 取出动物的 L₅₋₆ 椎间盘髓核组织, 放入干燥、消毒容器内, -70℃ 保存。采用微量酸滴定法^[6]测定两组椎间盘髓核组织中 PLA₂ 的活性。椎间盘组织剪碎称重, 每克组织加 PLA₂ 稀释液 4 ml, 加入冰冻组织匀浆机中, 以 4000 rpm 速度匀浆 5 min 至细胞完全破碎为止。取上清液 4℃ 下保存。样本与底物缓冲液在 60℃ 水浴 30 min, 4℃ 下保存备用。对照管中各加入底物缓冲液 8 ml, 15 mmol/L EDTA 1.1 ml, 样本 0.4 ml, 0.5% 氯化钙 0.2 ml。测定管中各加入底物缓冲液 8 ml, 0.5% 氯化钙 0.2 ml, 样本 0.4 ml, 15 mmol/L EDTA 1.1 ml。用高灵敏度 pH 计分别测定两管的 pH 值, 用新标定的稀盐酸 (0.005 mol/L) 将对照管的 pH 值滴定到测试管的 pH 值, 以所消耗的盐酸量计算测定管中酶的活力。PLA₂ 活性 = $N \times V \times 10^8 \times 2.5 \div t$ (V、N 分别为所消耗的盐酸体积与浓度, t 为反应时间)。

3. 统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件对实验数据进行分析, 计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示, 两样本均数用 t 检验进行统计学分析, 计数资料采用 χ^2 检

* 基金项目: 吉林省卫生技术创新项目 (2017J018)

[△] 通讯作者 吴大胜 jlcwds@163.com

验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

1. MRI 检查椎间盘退变情况

经皮椎间盘穿刺造模后 7 天 L₅₋₆ 椎间盘髓核 MRI 图像对比见图 1。

2. 两组椎间盘组织不同时间点 PLA₂ 活性测定比较

造模前实验组与对照组椎间盘髓核组织中 PLA₂ 活性分别为 13.38 ± 0.43 nmol/(min·mg) 和 13.57 ± 0.78 nmol/(min·mg), 术前 2 天实验组与对照组椎间盘髓核组织中 PLA₂ 的活性分别为 81.73 ± 0.17 nmol/(min·mg) 和 86.25 ± 1.05 nmol/(min·mg), 实验组与对照组术前 2 天椎间盘髓核组织中 PLA₂ 的活性均显著高于两组造模前椎间盘髓核组织 ($P < 0.05$)。实验组术后 7、14 及 28 天 PLA₂ 活性值分别为 23.61 ± 1.06 nmol/(min·mg)、 21.72 ± 0.38 nmol/(min·mg) 和 27.33 ± 1.03 nmol/(min·mg), 对照组术后 7、14 及 28 天 PLA₂ 活性值分别为 91.37 ± 2.06 nmol/(min·mg)、 86.57 ± 0.87 nmol/(min·mg) 和 89.39 ± 1.17 nmol/(min·mg)。实验组术后 7、14、28 天椎间盘髓核组织中 PLA₂ 的活性明显低于术前 2 天椎间盘髓核组织 ($P < 0.05$); 对照组术后 7、14、28 天椎间盘髓核组织中 PLA₂ 的活性较术前 2 天椎间盘髓核组织无显著性差异 ($P > 0.05$); 实验组术后 7、14、28 天椎间盘髓核组织中 PLA₂ 的活性明显低于对照组椎间盘髓核组织 ($P < 0.05$, 见表 1)。

术前实验组与对照组 PLA₂ 的活性无显著性差

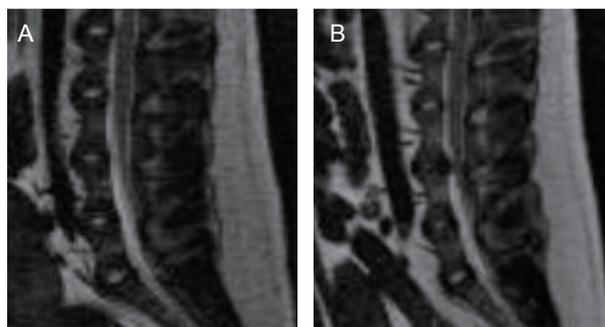


图 1 经皮椎间盘穿刺造模前后 L₅₋₆ 椎间盘 MRI 图像对比 (A) 造模前椎间盘图像; (B) 造模后 7 天椎间盘图像

异 ($P > 0.05$), 实验组与对照组 7、14、28 天 PLA₂ 的活性无显著性差异 ($P > 0.05$)。造模后实验组与对照组椎间盘髓核组织中 PLA₂ 的活性显著高于造模前椎间盘髓核组织 ($P < 0.05$), 术后实验组 7、14、28 天椎间盘髓核组织中 PLA₂ 的活性明显低于对照组 ($P < 0.05$)。

讨 论

腰椎间盘退行性变发生后, 与免疫系统相隔绝的髓核组织通过破裂的纤维环漏出产生化学炎症反应, 刺激神经末梢处于超敏状态可产生椎间盘源性腰痛^[5,6]。Lam 等^[7]发现在退变椎间盘的髓核中多种炎症因子如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 PLA₂ 活性异常升高, 这些促炎症介质接触纤维环外 1/3 部分神经末梢, 是腰痛产生的重要原因。其中的 PLA₂ 是局部组织炎症启动物质, 能引起强烈致炎和致病^[8]。因此, 灭活这些炎症介质和调节神经末梢是治疗椎间盘源性腰痛的根本。

近年来, 脉冲射频技术以其微创、安全、无不良反应及操作简单等优势已成为理想的椎间盘源性腰痛治疗手段。Shuijter 等^[9]研究发现 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等炎症介质在脉冲射频电场的作用下明显减少, 但脉冲射频能否抑制退变椎间盘髓核中重要的疼痛因子 PLA₂ 活性尚无报道, 本研究将 PLA₂ 作为主要检测指标也是基于以上原理。本研究结果显示, 术后实验组 7、14、28 天椎间盘髓核组织中 PLA₂ 的活性明显低于术前, 术后实验组 7、14、28 天椎间盘髓核组织中 PLA₂ 的活性明显低于对照组。

叶君健等^[8]通过采集腰椎间盘突出症病人术中标本进行冰冻切片, 应用 SP 法行免疫组织化学检测 PLA₂ 在髓核组织中的表达, 指出 PLA₂ 在腰椎间盘突出症诱发腰腿痛中发挥着重要的病理作用, 且其表达与退变髓核可能存在一定关系。张文煜等^[10]采用微量酸滴定法研究发现腰椎间盘突出症病人髓核组织中的 PLA₂ 活性显著高于正常腰椎间盘髓核组织, 得出 PLA₂ 化学性炎症机制在腰椎间盘突出症根性疼痛中发挥着可能比机械压迫更重要的作用的结论。腰椎间盘突出症是在腰椎退行性变基础上

表 1 两组椎间盘髓核组织不同时间点 PLA₂ 活性测定比较 [nmol/(min·mg), $\bar{x} \pm SD$]

组别	造模前	术前 2 天	术后 7 天	术后 14 天	术后 28 天
实验组 ($n = 10$)	13.38 ± 0.43	$81.73 \pm 0.17^{\#}$	$23.61 \pm 1.06^{\#*}$	$21.72 \pm 0.38^{\#*}$	$27.33 \pm 1.03^{\#*}$
对照组 ($n = 10$)	13.57 ± 0.78	$86.25 \pm 1.05^{\#}$	$91.37 \pm 2.06^{\#}$	$86.57 \pm 0.87^{\#}$	$89.39 \pm 1.17^{\#}$

[#] $P < 0.05$, 与造模前相比; ^b $P < 0.05$, 与术前 2 天相比; ^a $P > 0.05$, 与术前 2 天相比; ^{*} $P < 0.05$, 与对照组相比

发病的，所以腰椎间盘突出症髓核组织中 PLA₂ 活性的变化对本研究具有一定的参考价值。本研究结果显示，术前 2 天实验组与对照组椎间盘髓核组织中 PLA₂ 的活性显著高于造模前椎间盘髓核组织，证实腰椎间盘突出后髓核组织中 PLA₂ 表达量明显增高，这一结果与叶君健等^[8]及张文煜等^[10]的研究基本一致。

本实验动物模型严格遵照彭俊等^[4]在 X 线透视下经皮穿刺比格犬腰椎间隙建立腰椎间盘突出动物模型方法，具备简单有效、重复性好的优点。证实脉冲射频能够显著抑制犬腰椎退变模型椎间盘髓核组织中 PLA₂ 的活性。为疼痛科临床上治疗椎间盘突出源性腰痛提供确切的实验依据。然而本研究存在观察指标有限，且因缺少腰椎退变模型动物行为学方面检查经验参考，还需继续拓展思维、进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] 刘延青, 王应德, 丁晓宁, 等. 臭氧溶核术治疗椎间盘突出源性下腰痛的远期随访 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2011, 17(2):262-265.
 [2] Van Boxem K, van Bilsen J. Pulsed radiofrequency treatment adjacent to the lumbar dorsal root ganglion for the

management of lumbosacral radicular syndrome: A clinical audit[J]. Pain Med, 2019, 12:1322-1330.
 [3] 黄佑庆, 陈瑞霞, 等. 脉冲射频治疗椎间盘源性下腰痛的近期疗效 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2012, 18(8): 458-460.
 [4] 彭俊, 徐建广. 犬椎间盘经皮针刺退变模型的建立 [J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(24):4463-4466.
 [5] Cassinelli EH, Hall RA, Kang JD. Biochemistry of intervertebral disc degeneration and the potential for gene therapy applications[J]. Spine, 2018, 1(3):205-214.
 [6] Peng B, Wu W, Hou S, et al. The pathogenesis of discogenic low back pain[J]. J Bone Joint Surg, 2019, 87: 62-67.
 [7] Lam KS, Carlin D, Mulholland RC. Lumbar disc high-intensity zone: The value and significance of provocative discography in the determination of the discogenic pain source[J]. J Eur Spine, 2000, 9:36-41.
 [8] 叶君健, 宋继红, 姜小鹰, 等. 腰椎间盘突出症髓核组织磷脂酶 A2 表达的临床研究 [J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2006, 21(4):259-263.
 [9] Sluijter ME, Teixeira A, Serra V, et al. Intra-articular application of pulsed radiofrequency for arthrogenic pain: Report of six cases[J]. Pain Pract, 2008, 8(7):57-61.
 [10] 张文煜, 郑祖根, 高铁民, 等. 磷脂酶 A2 在腰椎间盘突出症髓核中的表达及相关临床研究 [J]. 颈腰痛杂志, 2003, 24(1):35-40.

· 消 息 ·

《中国疼痛医学杂志》继续入选 “中国科技核心期刊（中国科技论文统计源期刊）”

《中国疼痛医学杂志》2021 年继续入选“中国科技核心期刊（中国科技论文统计源期刊）”。中国科技核心期刊入选的期刊是由中国科学技术信息研究所通过统计核心总被引频次、核心影响因子、综合评价总分、学科扩散指标、学科影响指标、红点指标等主要指标，遴选出不同学科的期刊作为统计来源期刊，共有 2506 种期刊入选，其中自然科学领域期刊 2106 种。

《中国疼痛医学杂志》佳绩的取得，凝结着编委团队和审稿专家的支持与帮助，作者和读者的信任与厚爱，编辑人员的辛勤付出！再次入选中国科技核心期刊中国科技核心期刊（中国科技论文统计源期刊）代表业界对《中国疼痛医学杂志》学术水平的认可和对期刊办刊质量的肯定，同时也对期刊未来的发展提出了更高的要求。今后，《中国疼痛医学杂志》将以此为新的起点，随着中国疼痛医学的发展，不断开拓进取，向世界一流期刊看齐，不断实现期刊新突破、新发展。