

doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2022.12.004

• 论 著 •

高电压脉冲射频背根神经节对 SNI 大鼠脊髓背角内
TNF- α 和 IL-10 表达的影响 *施小妹¹ 余幼芬¹ 陈艳琴² 徐雪汝¹ 刘荣国¹ Δ (¹福建省立医院疼痛科, 福建医科大学省立临床医学院, 福州 350001; ²厦门大学附属妇女儿童医院麻醉科, 厦门 361003)

摘 要 目的: 比较不同电压脉冲射频 (pulsed radiofrequency, PRF) 背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 对坐骨神经分支选择性损伤 (spared nerve injury, SNI) 模型大鼠神经病理性疼痛的疗效和脊髓背角内肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 和白介素-10 (interleukin-10, IL-10) 表达的影响。**方法:** 雄性 SD 大鼠 140 只按随机数字表法分成 7 组: Sham 组、SNI 组、SPRF 组、45VPRF 组、65VPRF 组、85VPRF 组和 100VPRF 组, 每组 20 只。除 Sham 组外, 其余 6 组制作 SNI 模型。各 PRF 组在 SNI 后第 7 d 于左 L₅ DRG 分别实施相应电压的 PRF。观察大鼠 SNI 前, SNI 后 1 d、3 d、5 d、7 d、8 d、10 d、12 d、14 d、21 d 机械刺激缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT) 变化, SNI 后第 14 d、21 d 采用免疫荧光、Western blot 检测脊髓背角 TNF- α 和 IL-10 表达。**结果:** SNI 后, 与 Sham 组比较, 其余 6 组大鼠 MWT 降低、TNF- α 表达增强、IL-10 表达减弱 ($P < 0.05$); 与 SNI 组比较, PRF 后各 PRF 组 MWT 均上升、TNF- α 表达减弱、IL-10 表达增强 ($P < 0.05$); 其中 85VPRF 组疼痛改善、TNF- α 表达减弱、IL-10 表达增强较其他组更为显著 ($P < 0.05$)。**结论:** 不同电压 PRF 大鼠 DRG 可抑制 SNI 大鼠脊髓背角内 TNF- α 的表达, 上调 IL-10 的表达而改善神经病理性疼痛, 其中 85 V 的 PRF 效果最佳。**关键词** 神经病理性疼痛; 脉冲射频; 背根神经节; 肿瘤坏死因子 α ; 白介素-10

Effects of high voltage pulsed radiofrequency of dorsal root ganglion on the expression of TNF- α and IL-10 in spinal dorsal horn of sciatic nerve injury rats *SHI Xiaomei¹, YU Youfen¹, CHEN Yanqin², XU Xueru¹, LIU Rongguo¹ Δ (¹Department of Pain Management, Fujian Provincial Hospital, Provincial Clinical College of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China; ²Department of Anesthesiology, Women's and Children's Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China)

Abstract Objective: To compare the effects of different voltage pulsed radiofrequency (PRF) of the dorsal root ganglion (DRG) on neuropathic pain and the expression of tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10) of spinal cord in rats with sciatic nerve injury (SNI). **Methods:** One hundred and forty adult male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly assigned into 7 groups as follows ($n = 20$ for each group): Sham, SNI, SPRF, 45VPRF, 65VPRF, 85VPRF and 100VPRF. The rats in 45VPRF, 65VPRF, 85VPRF and 100VPRF groups received the corresponding voltage PRF on the left L₅ DRG on 7th day after SNI, respectively. The mechanical withdrawal thresholds (MWT) were measured before SNI and on 1 d, 3 d, 5 d, 7 d, 8 d, 10 d, 12 d, 14 d, 21 d after SNI. The expression levels of TNF- α and IL-10 in the spinal dorsal horn were measured by immunofluorescence and Western blot on the 14th and 21st day after SNI. **Results:** Compared with Sham group, the MWT and IL-10 expression levels at all time points were significantly decreased after SNI in other 6 groups ($P < 0.05$), whereas the expressions of TNF- α were significantly increased in other 6 groups ($P < 0.05$). After

* 基金项目: 福建省卫生创新基金 (2018-CX-6); 福建医科大学启航基金 (2018QH1161)

 Δ 通信作者 刘荣国 lrgfw88@sina.com

PRF treatment, the MWT and IL-10 expression levels were up-regulated and the expression levels of TNF- α were down-regulated significantly in the four PRF groups, compared with those in SNI group, respectively ($P < 0.05$). The rising of MWT after PRF in 85VPRF group were superior to those in other three PRF groups ($P < 0.05$), the changes of descending TNF- α and ascending IL-10 levels were more remarkable in 85VPRF group compared to the other three PRF groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** Different voltage PRF of DRG can alleviate pain through inhibiting the expression levels of TNF- α and up-regulating the expression levels of IL-10 in the dorsal horn of the spinal cord in SNI rats, of which, the PRF of 85V has the best effect.

Keywords neuropathic pain; pulsed radiofrequency; dorsal root ganglion; TNF- α ; IL-10

神经病理性疼痛 (neuropathic pain, NP) 是源于躯体感觉神经系统的损害或疾病所导致的疼痛, 疼痛可持续存在或反复发作^[1], 是亟待解决的重大医学难题。目前认为, NP 发生发展的重要机制与外周和中枢神经系统敏化有关。外周神经损伤后, 伤害性感受信息经背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 整合后传入脊髓背角, 激活脊髓背角小胶质细胞产生多种生物活性物质, 诱发中枢敏化, 促进 NP 的发生、发展, 而抑制脊髓小胶质细胞下游活性介质的形成、释放则能明显减轻 NP^[2]。这些活性介质主要包括细胞因子、趋化因子和脂质介质等^[3], 根据功能可分为致炎及抗炎因子, 致炎因子常见为肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、IL-1 β 和干扰素等, 抗炎因子常见为白介素-10 (interleukin-10, IL-10)、IL-4 及肿瘤坏死因子结合蛋白等^[4,5]。鉴于脊髓背角内的免疫炎症反应在促发中枢敏化中发挥重要作用, 且研究已证实 TNF- α 可诱导其他炎症因子发生级联反应, 参与 NP 的形成与维持, 而 IL-10 可逆转其作用, 两者交互作用以平衡神经炎症^[6]。因此, 本研究以脊髓背角内的炎症反应为切入点, 探讨抑制脊髓背角内的炎症反应而改善 NP, 具有重要的研究意义。

脉冲射频 (pulsed radiofrequency, PRF) 是目前临床治疗 NP 的一种非损伤或微损伤的神经调控介入技术, 可通过抑制胶质细胞活化、突触传递和炎症因子的改变来实现治疗目的^[7]。虽然标准 PRF 具有操作简单, 并发症少, 创伤小且即时治疗效果突出等优点, 但是标准 PRF 的远期疗效不稳定, 常需多次治疗。近年来, 许多学者针对更加有效的 PRF 模式进行探索, 发现高电压模式可提高 PRF 的治疗效果^[8,9]。然而, PRF 的输出电压与疗效之间的量效关系, 尚缺乏随机、对照的基础试验研究, 高电压 PRF 镇痛机制的相关基础实验鲜见。本实验拟复制坐骨神经分支选择性损伤 (spared nerve injury, SNI) 大鼠模型, 采用不同电压 PRF 大鼠 DRG, 通过观察大鼠疼痛行为学改变和脊髓背角内 TNF- α 和 IL-10

的表达变化, 研究不同电压 PRF 干预 DRG 治疗 NP 是否存在差异及其与 TNF- α 和 IL-10 的相关关系, 为未来临床推广应用高电压 PRF 治疗 NP 提供实验依据。

方 法

1. 实验动物和分组

清洁级成年雄性 SD 大鼠 140 只, 体重 250~300 g, 由福建医科大学实验动物中心提供 [许可证号: SCXK (闽) 2016-0002], 采用随机数字表法分为 7 组, 每组 20 只: ①假手术组 (Sham 组): 仅暴露左后肢坐骨神经后游离其分支胫神经和腓总神经近分叉段; ②坐骨神经损伤组 (SNI 组): 暴露左后肢坐骨神经, 在分支处近端结扎胫神经和腓总神经, 远端剪断, 保留并避免损伤腓肠神经; ③ SNI + 假 PRF 组 (SPRF 组): 建立 SNI 后 7 d 仅于左 L₅ DRG 放置 PRF 电极, 不实施 PRF 治疗; ④ SNI + 45VPRF 组 (45VPRF 组)、SNI + 65V PRF 组 (65VPRF 组)、SNI + 85V PRF 组 (85VPRF 组)、SNI + 100V PRF 组 (100VPRF 组): 各组 SNI 后 7 d 于左 L₅ DRG 分别实施相应 45 V、65 V、85 V 和 100 V 电压的 PRF 治疗。实验操作人员持有福建省实验动物从业人员资格证书 [编号 (闽实动会字) 第 2021-0285], 所有动物实验操作均严格遵守福建医科大学生物医学伦理委员会相关规定。

2. 模型制备

(1) 按照 Decosterd 等^[10]的方法制备大鼠 SNI 模型: 大鼠全身麻醉后暴露左坐骨神经主干分支, 于分支处近端结扎其分支胫神经、腓总神经, 远端剪断, 保留并避免损伤腓肠神经, 逐层缝合肌肉和皮肤。Sham 组仅暴露左后肢坐骨神经后游离其分支胫神经和腓总神经近分叉段。

(2) 大鼠 DRG 的 PRF 治疗, 于神经损伤后第 7 d 进行。大鼠全身麻醉后暴露左 L₅ DRG 后, 将射频仪 (COSMAN RF-G4, 美国) 的负极板贴于

大鼠足底, 射频治疗套管针(长度 10 cm, 裸露端 5 mm)置于 DRG 上, 取出针芯, 插入电极(见图 1)。设定治疗模式: 温度 42℃, 脉率 2 Hz, 脉宽 20 ms, 持续时间 2 min × 3 循环, 电压分别为 45 V、65 V、85 V、100 V。SPRF 组: 制模后第 7 d, 仅在左 L₅ DRG 放置射频电极, 无 PRF 治疗。

3. 疼痛行为学观察和测量

在制模前测量各组大鼠基础阈值, 制模后 1 d、3 d、5 d、7 d, PRF 后 1 d、3 d、5 d、7 d、14 d 实行为学测定和机械刺激缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT) 测量。所有测定均在固定时间 (8:00~12:00, am) 和安静环境下进行。

运动功能: 观察所有 SD 大鼠自然状态下随意行走的步态, 采用记分制: 1 分: 正常步态、足无畸形; 2 分: 正常步态伴明显足畸形; 3 分: 轻度步态障碍伴足下垂; 4 分: 严重步态障碍伴肌无力。将评分 4 分的大鼠剔除。

MWT 测量: 以 Dixon 等^[1] up and down 法测定 MWT, 将有机玻璃箱置于金属筛网上, 大鼠适应 10 min 后, 以 von Frey 针丝 (Stoeling 公司, 美国) 垂直刺激大鼠术侧后足掌部, 避开爪垫, 持续时间 ≤ 4 s, 大鼠出现抬足或舔足行为视为阳性反应, 否则为阴性反应。测定从 2 g 开始, 当该力度刺激不能引起阳性反应, 则给予相邻大一级力度刺激; 如出现阳性反应则给予相邻小一级力度刺激, 如此连续进行, 直至出现第 1 次阳性和阴性反应, 再连续测定 4 次, 取平均值为阈值。最大力度为 15 g, 大于此值时记为 15 g。每次刺激间隔 30 s, 每次测量时使尼龙丝弯曲到相同的弧度, 以确保每次施加的刺激相同。

4. 脊髓背角内 TNF-α 和 IL-10 的表达

制模后第 14 d、21 d 每组处死大鼠各 5 只, 采用免疫荧光和 Western blot 检测脊髓背角内 TNF-α 和 IL-10 表达水平。

(1) 免疫荧光法: 大鼠腹腔麻醉, 开胸经心脏灌注 4% 多聚甲醛。分离脊髓并取出 L_{4/6} 脊髓背角, 并用刀片在非手术侧划一缺口作为标记, 固定 12 h 后, 样本置于石蜡中包埋, 切片, 片厚 5 μm。采用等距随机抽样法, 抽取 5 张用于免疫荧光染色。脱蜡, EDTA 抗原修复缓冲液 (pH 8.0) 微波修复 15 min, 冷却至室温, 依次加入 3% 血清工作液封闭 30 min 后, 甩掉封闭液, 直接加入一抗: 兔抗鼠 IL-10 抗体 (ab9969, abcam, 英国), 兔抗鼠 TNF-α 抗体 (ab6671, abcam, 英国), 4℃ 孵育过夜, 滴加羊抗兔二抗 IgG (武汉赛维尔生物科技有限公司, 中

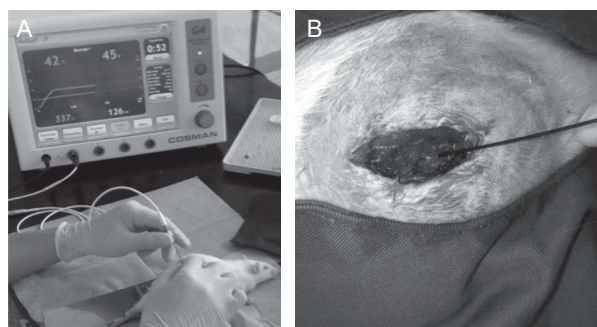


图 1 SNI 大鼠 DRG 的 PRF 治疗

(A) SNI 大鼠的 PRF 治疗; (B) SNI 大鼠左 L₅ DRG 放置射频电极

Fig. 1 Pulsed radiofrequency of dorsal root ganglion of SNI rats

(A) Pulsed radiofrequency of SNI rats; (B) PRF on the left L₅ DRG of SNI rats.

国), 覆盖组织, 避光室温孵育 50 min, 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 冲洗 3 次, 滴加 DAPI 染液, 避光室温孵育 10 min, 加入自发荧光淬灭剂 5 min, 流水冲洗 10 min, 抗荧光淬灭封片剂封片, 光学显微镜 (Nikon, 日本) 观察。使用 Image J 软件 (National Institutes of Health 公司, 美国) 分析免疫荧光强度。

(2) 蛋白质免疫印迹法: 大鼠腹腔麻醉后, 迅速取 L_{4/6} 节段脊髓背角, 置于液氮中保存待测。测试时, 取出脊髓组织放入匀浆器, 加入 RIPA 蛋白裂解液 1.0 ml, 冰上机械匀浆裂解 30 min 后 4℃、12,000 rpm 离心 10 min, 小心吸取上清, 采用 BCA 法测定蛋白样品浓度, 上样缓冲液稀释蛋白样品后沸水浴变性 15 min, 等量蛋白样品经 10% SDS PAGE 凝胶电泳分离后, 蛋白以湿转法电转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, IL-10 抗体 (ab9969, abcam, 英国)、β-actin 抗体 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 中国)、TNF-α 抗体 (ab6671, abcam, 英国) 孵育, 4℃ 轻摇过夜, 加入辣根氧化物酶标记物的羊抗兔 IgG (1:3000, 武汉赛维尔生物科技有限公司, 中国), 室温孵育 30 min, 按照发光试剂盒 (Thermo 公司, 美国) 的说明进行放射自显影, 使用 Image J 软件 (National Institutes of Health 公司, 美国) 分析条带光密度值, 以目的蛋白条带光密度值与相应 β-actin 条带光密度值的比值反映蛋白表达水平。

5. 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行分析, 符合正态计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示, MWT 采用双因素重复测量方差分析 (two-way repeated measures ANOVA), 并进行组间各时间点的比较。

TNF- α 和 IL-10 的表达量采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 组间两两比较采用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1. 疼痛行为学观察

(1) 一般行为学观察: 除 Sham 组外, 其余 6 组大鼠在 SNI 后术侧足趾并拢轻度外翻, 下肢行走无力, 评分均为 2 分。术侧后爪偶然接触笼面会发生明显的缩足反应。术前各组大鼠之间体重无明显差异, 术后各组大鼠体重正常增长, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 见图 2)。

(2) MWT: 除了 Sham 组, 其余 6 组大鼠于 SNI 后第 1 d 即出现 MWT 下降, 与 Sham 组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。SNI 组与 SPRF 组各时间点 MWT 比较, 差异无统计学意义。与 SNI 组比较, 4 个 PRF 组在 PRF 后各时间点的 MWT 均升高 ($P < 0.05$), 但仍低于 Sham 组 ($P < 0.05$)。45VPRF 组与 100VPRF 组比较, MWT 差异无统计学意义。与 45VPRF 组比较, 65VPRF 组在 SNI 第 8 d 后各时间点的 MWT 升高 ($P < 0.05$), 但显著低于 85VPRF 组 ($P < 0.05$, 见图 3)。

2. 免疫荧光法检测脊髓背角内 TNF- α 和 IL-10 的表达

与 Sham 组比较, 其余 6 组大鼠在 SNI 后 14 d 和 21 d TNF- α 的表达均明显增强, 而 IL-10 的表达均明显减弱 ($P < 0.05$)。SNI 组与 SPRF 组的 TNF- α 、

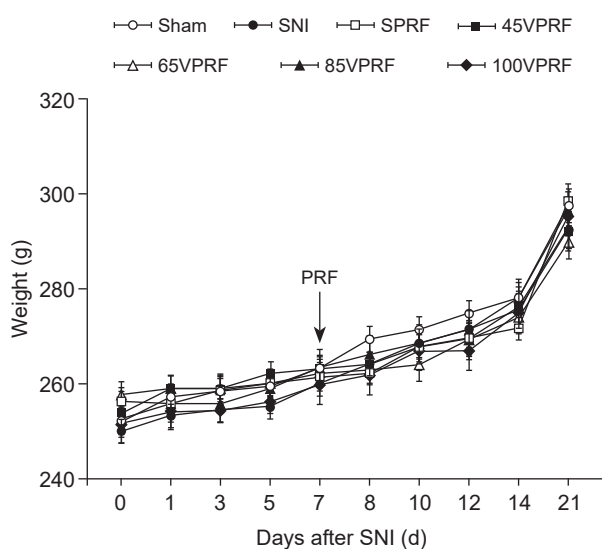


图 2 各组 SNI 大鼠 PRF 前后的体重变化 ($n = 20$, $\bar{x} \pm SD$)
Fig. 2 Weight changes of SNI rats before and after PRF ($n = 20$, $\bar{x} \pm SD$)

IL-10 表达水平在 SNI 后 14 d、21 d (即 PRF 后第 7 d、14 d) 差异均无统计学意义。在 SNI 后 14 d、21 d, 与 SNI 组比较, 4 个 PRF 组 TNF- α 表达均明显减弱 ($P < 0.05$), 而 IL-10 的表达均明显增强 ($P < 0.05$)。在 SNI 后 14 d、21 d, 45VPRF 组与 100VPRF 组 TNF- α 、IL-10 的表达比较, 差异无统计学意义。在 SNI 后 14 d、21 d, 与 45VPRF 组比较, 65VPRF 组 TNF- α 的表达减弱, 而 IL-10 的表达增强 ($P < 0.05$)。85VPRF 组和 65VPRF 组在 SNI 后 14 d IL-10 的表达比较, 差异无统计学意义。在 SNI 后 14 d、21 d, 与另外 3 个 PRF 组比较, 85VPRF 组 TNF- α 的表达最弱, 在 SNI 后 21 d, 85VPRF 的 IL-10 的表达增强最显著 ($P < 0.05$, 见图 4、5)。

3. 蛋白质免疫印迹法测定脊髓背角内 TNF- α 和 IL-10 的表达

与 Sham 组比较, 其余 6 组大鼠在 SNI 后第 14 d 和 21 d TNF- α 的表达均明显增高, IL-10 的表达均明显减弱 ($P < 0.05$)。SNI 组与 SPRF 组的 TNF- α 、IL-10 表达水平差异均无统计学意义。与 SNI 组比较, 4 个 PRF 组在 SNI 后 14 d、21 d TNF- α 表达均明显减弱, IL-10 的表达均明显增强 ($P < 0.05$)。

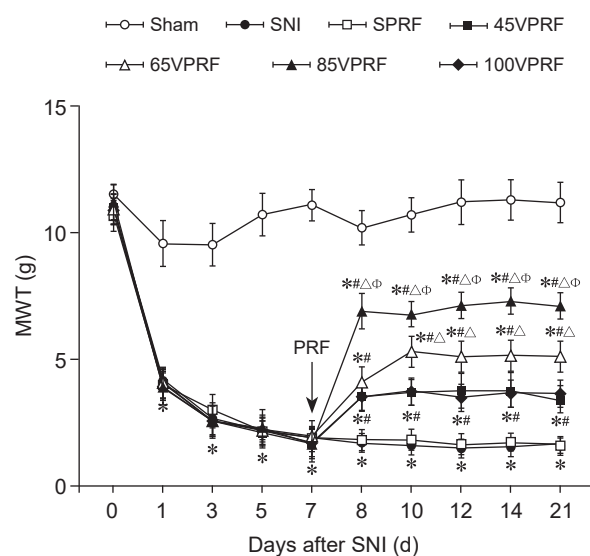


图 3 不同电压 PRF 大鼠 SNI 模型 DRG 对术侧 MWT 的影响 ($n = 20$, $\bar{x} \pm SD$)
* $P < 0.05$, 与 Sham 组相比; # $P < 0.05$, 与 SNI 组相比; $\Delta P < 0.05$, 与 45VPRF 组相比; $\Phi P < 0.05$, 与 65VPRF 组相比

Fig. 3 Effects of different voltage PRF of DRG on the MWT of left foot in rats with SNI ($n = 20$, $\bar{x} \pm SD$)
* $P < 0.05$, compared with group Sham; # $P < 0.05$, compared with group SNI; $\Delta P < 0.05$, compared with group 45VPRF; $\Phi P < 0.05$, compared with group 65VPRF.

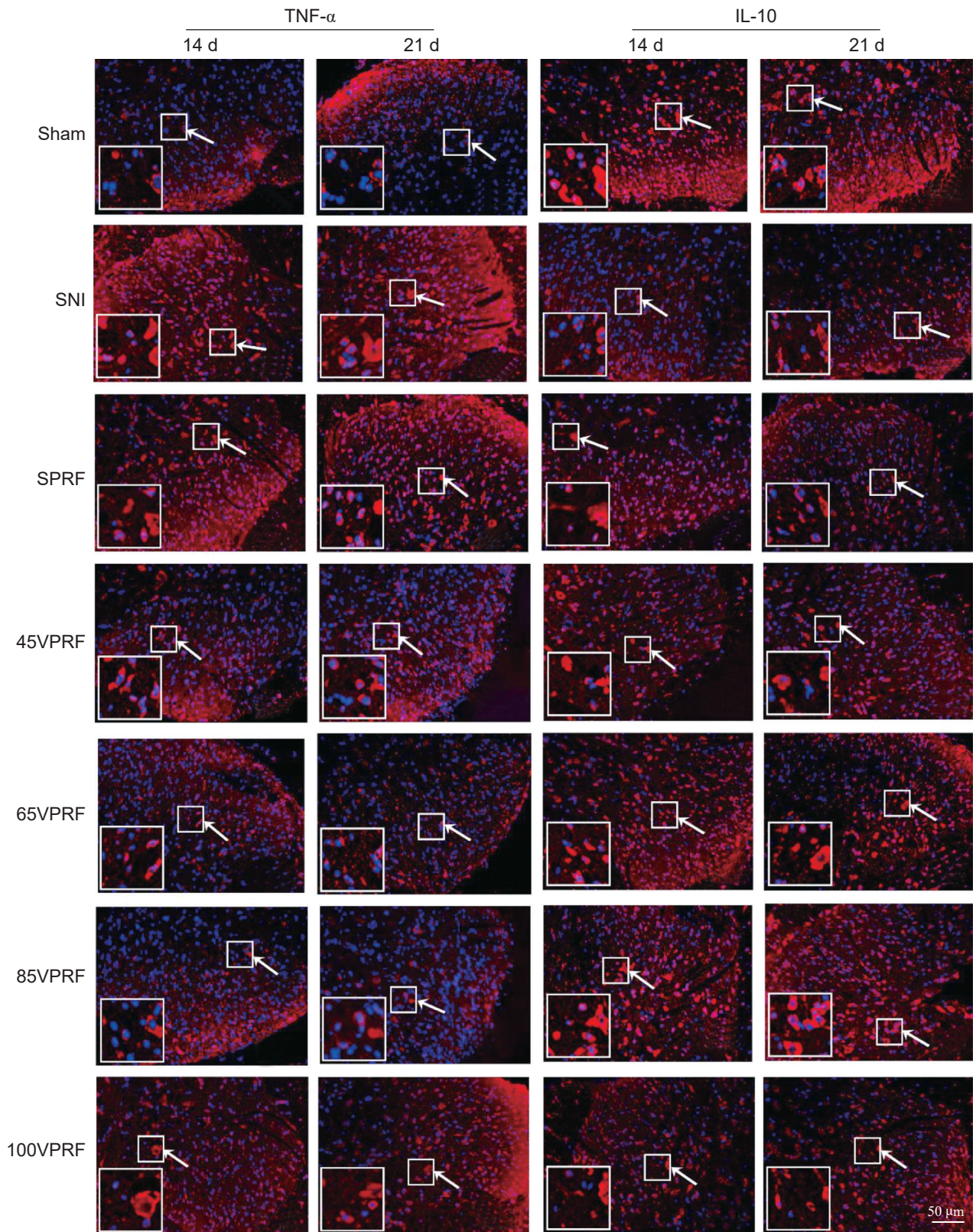


图4 免疫荧光法检测各组大鼠脊髓背角中 TNF- α 和 IL-10 的表达
白色箭头所指为 TNF- α 和 IL-10, 蓝色荧光显示为细胞核。标尺 = 50 μ m; 放大倍数 $\times$ 200

Fig. 4 Expression levels of the TNF- α and the IL-10 in spinal cord horn among different groups by immunofluorescence analysis
The white arrows indicated TNF- α and IL-10, while the blue fluorescence indicated nucleus. Scale bar = 50 μ m; magnification $\times$ 200.

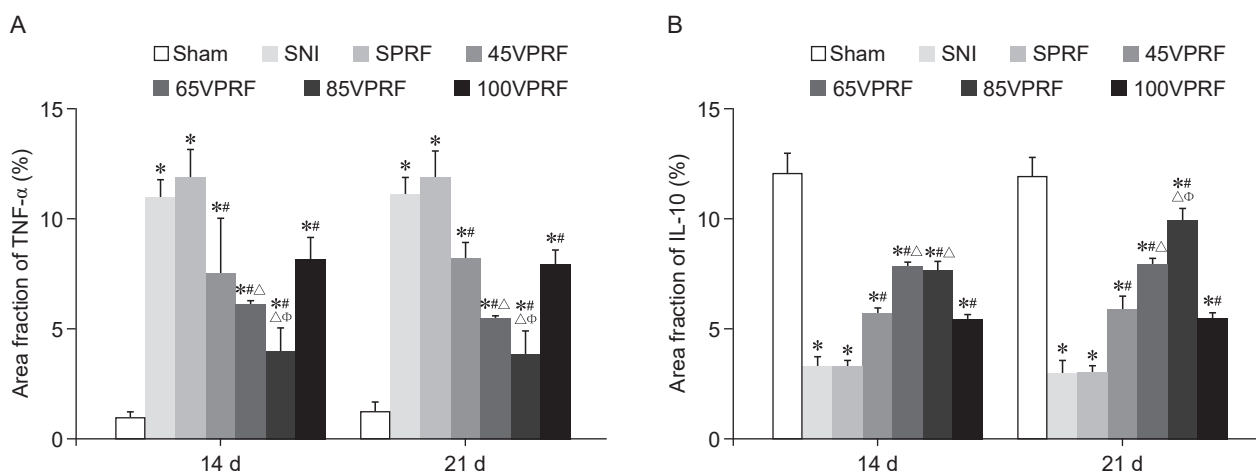


图5 不同电压 PRF 大鼠第 14 d 和 21 d 的脊髓背角内 TNF- α 和 IL-10 的表达比较 ($n = 5$, $\bar{x} \pm SD$)

(A) SNI 后 14 d 和 21 d 各组大鼠脊髓背角内 TNF- α 的表达; (B) SNI 后 14 d 和 21 d 各组大鼠脊髓背角内 IL-10 的表达

* $P < 0.05$, 与 Sham 组相比; # $P < 0.05$, 与 SNI 组相比; $\Delta P < 0.05$, 与 45VPRF 组相比; $\Phi P < 0.05$, 与 65VPRF 组相比

Fig. 5 Expression levels of TNF- α and IL-10 in the spinal dorsal horn of rats in different groups on day 14 and day 21 after SNI ($n = 5$, $\bar{x} \pm SD$)

(A) Expression of TNF- α in the spinal dorsal horn of rats on day 14 and day 21 after SNI; (B) Expression of IL-10 in the spinal dorsal horn of rats on day 14 and day 21 after SNI.

* $P < 0.05$, compared with group Sham; # $P < 0.05$, compared with group SNI; $\Delta P < 0.05$, compared with group 45VPRF; $\Phi P < 0.05$, compared with group 65VPRF.

在 SNI 后 14 d、21 d, 45VPRF 组与 100VPRF 组的 TNF- α 和 IL-10 的表达比较, 差异无统计学意义。在术后 21 d, 与 45VPRF 组比较, 65VPRF 组 TNF- α 的表达减弱, IL-10 的表达增强 ($P < 0.05$)。在 SNI 后 14 d, 85VPRF 组和 65VPRF 组 IL-10 的表达比较, 差异无统计学意义。在 SNI 后 14 d、21 d, 与另外 3 个 PRF 组比较, 85VPRF 组 TNF- α 的表达均最弱; 在 SNI 后 21 d, 85VPRF 组的 IL-10 的表达最显著 ($P < 0.05$, 见图 6)。

讨 论

本研究复制大鼠 SNI 模型, 发现以 DRG 为靶点实施不同电压 PRF 均能有效改善 SNI 大鼠的 MWT, 下调脊髓背角内 TNF- α 和上调 IL-10 的表达。与 45VPRF 组和 100VPRF 组比较, 65VPRF 组和 85VPRF 组的 MWT 改善、TNF- α 表达下调和 IL-10 表达上调更为显著, 其中 85VPRF 组最为显著。本研究是首次报道有关高电压 PRF 大鼠 DRG 通过调控脊髓背角内 TNF- α 和 IL-10 的表达这一抗炎途径发挥镇痛作用, 丰富了高电压 PRF 模式产生良好镇痛疗效的相关机制研究。

本研究选用的是 SD 大鼠 SNI 模型, SNI 组

坐骨神经损伤后 5~7 d 疼痛反应达高峰并在随后观察时间内维持稳定, 这与 Hu 等^[12]的研究结果一致。大鼠 SNI 后第 7 d 于 DRG 实施 PRF 治疗, PRF 后第 1 天即开始出现 MWT 的回升, 至治疗后 14 d 内仍保持稳定, 且接受不同电压 PRF 的 4 组在 SNI 第 8 d 后各时间点的 MWT 均有明显上升, 表明 PRF 对 NP 治疗有效。45VPRF 组与 100VPRF 组 MWT 均有明显上升, 但两组差异无统计学意义。与 45VPRF 组和 100VPRF 组比较, 65VPRF 组、85VPRF 组的 MWT 上升程度更为显著, 其中 85VPRF 组的 MWT 上升最为显著, 说明高电压 65 V、85 V 的 PRF 应用于 DRG 治疗 NP 的效果优于 45 V (标准电压), 高电压 PRF 能进一步提升疗效。而继续提高电压至 100 V 时, 对 NP 的改善程度并没有进一步扩大, 相关机制需要进一步研究确认。

NP 发生发展的重要机制是外周敏化和中枢敏化^[13]。DRG 在外周敏化过程中起重要作用, 被认为是 NP 的一个重要靶点^[14,15]。PRF 干预 DRG 能够有效治愈 NP 已经被大量临床及基础实验证实, 故本研究的 PRF 靶点选择为 DRG。脊髓是疼痛信息传递和整合的初级中枢, 在中枢敏化中发挥重要作用, 脊髓背角接受 DRG 神经冲动传入, 并将信息传递至上位中枢, 现已证实当外周神经损伤后, 脊

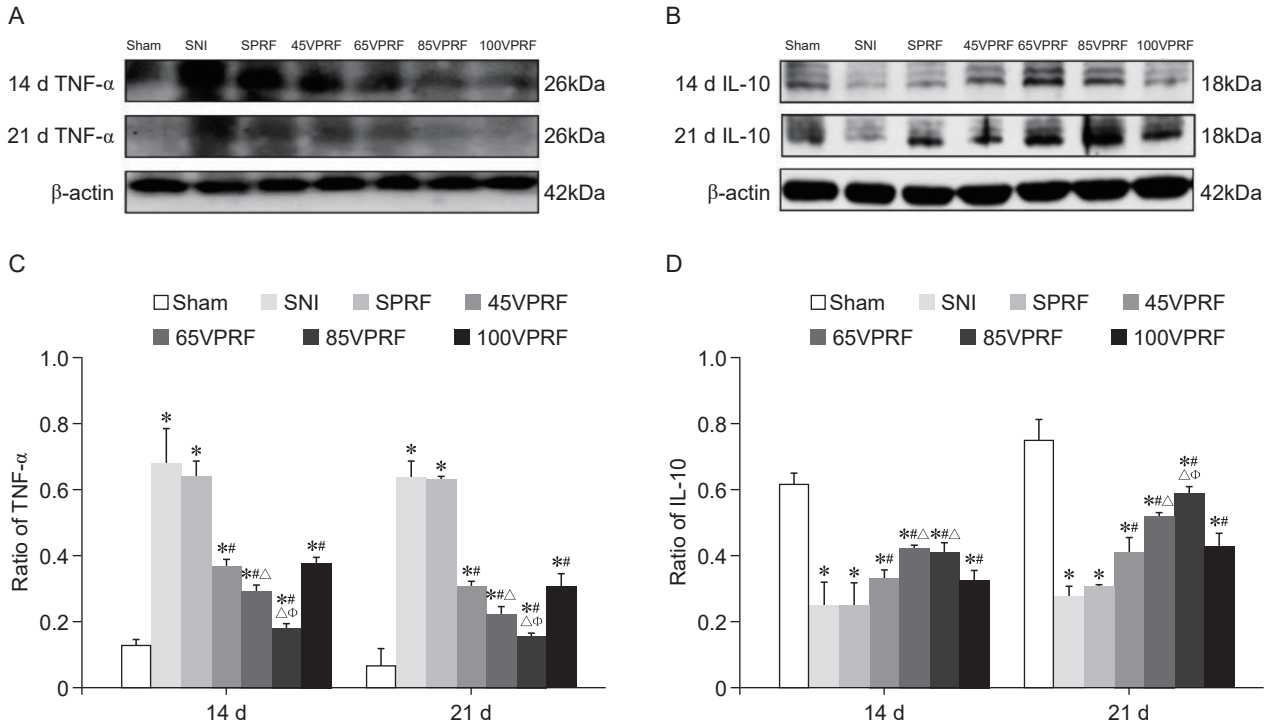


图6 Western blot 法检测各组大鼠脊髓背角内 TNF- α 和 IL-10 蛋白表达 ($n=5$, $\bar{x} \pm SD$)

(A, B) SNI 后 14 d 和 21 d 各组 TNF- α (A) 和 IL-10 (B) 的表达; (C, D) 目的蛋白条带光密度值与相应 β -actin 条带光密度值的比值反映蛋白表达水平

* $P < 0.05$, 与 Sham 组相比; # $P < 0.05$, 与 SNI 组相比; $\Delta P < 0.05$, 与 45VPRF 组相比; $\Phi P < 0.05$, 与 65VPRF 组相比

Fig. 6 Expression levels of the TNF- α and the IL-10 in spinal dorsal horn among different groups by Western blot ($n=5$, $\bar{x} \pm SD$)

(A, B) The expression levels of TNF- α and IL-10 in the spinal dorsal horn among different groups on day 14 and day 21 after SNI; (C, D) The ratio of the optical density value of the TNF- α and IL-10 protein band to that of the corresponding β -actin band.

* $P < 0.05$, compared with group Sham; # $P < 0.05$, compared with group SNI; $\Delta P < 0.05$, compared with group 45VPRF; $\Phi P < 0.05$, compared with group 65VPRF.

髓背角接收异常兴奋的初级感觉神经元信号,引起脊髓中小胶质细胞活化进而释放免疫炎症物质,诱导形成 NP^[1,15],即脊髓背角内的免疫炎症反应在促发中枢敏化中发挥重要作用,因此本研究重点选择观察脊髓背角内的炎症反应。

TNF- α 作为重要致炎因子,通过调控上下游各通道、细胞因子等参与 NP 的产生与维持^[16]。本研究表明,不同高电压的 PRF 均能起到缓解 NP 的效果,但不同高电压 PRF 抑制 SNI 大鼠的 TNF- α 表达的程度各不相同,其中以 85VPRF 组抑制 TNF- α 表达最优,结合其 MWT 的变化发现, TNF- α 表达下调越明显,其 MWT 上升越显著,这与他人的研究结果一致^[7],证明了脊髓背角内 TNF- α 参与了 NP 的形成和发展,高电压 PRF 可能通过不同程度下调 TNF- α 表达而减轻 NP。

新近研究提示,脊髓背角内 TNF- α 和 IL-10 在

内的关键抑炎细胞因子共同调节神经炎症, IL-10 可能是通过抑制促炎因子合成和释放从而有效减轻 NP^[5,17]。本研究中,随着 NP 的发展, IL-10 表达逐渐下调,而接受 PRF 干预后,4 个不同电压 PRF 组的 IL-10 表达均上调并伴随着 MWT 的回升,其中以 85VPRF 组的 IL-10 上调最为明显,因此,高电压 PRF 可能通过不同程度上调 IL-10 表达而减轻 NP。值得注意的是,在 SNI 后第 14 d,对 65VPRF 组和 85VPRF 组脊髓背角内 IL-10 表达进行比较并未观察到统计学差异,可能 IL-10 是炎症晚期细胞因子,其对炎症以及高电压 PRF 治疗的效果可能存在部分延迟,后期才表达增强并保持稳定。

本研究仍存在不足,首先仅在 SNI 后第 14 d 和第 21 d 测定脊髓背角内 TNF- α 和 IL-10 的表达,虽然发现两者的表达与 NP 密切相关,但没有增加时间点以动态观察脊髓背角内 TNF- α 和 IL-10 表达

的整体变化趋势,且未进行更长时间的观察,故无法判断高电压 PRF 相比标准 PRF 远期的疗效如何。其次,本研究设置最高电压为 100 V,结果显示,85VPRF 组是缓解 NP 最佳电压,当电压增加到 100 V 时,对 NP 的改善并没有得到进一步的缓解,其具体机制尚不明确,未来我们将进一步探讨研究不同电压 PRF 是否能不同程度改善 DRG 的超微结构、促进神经修复而产生不同疗效,以及针对其内在的其他机制进行更深入的研究。

综上所述,高电压 PRF 大鼠 SNI 模型 DRG 可下调脊髓背角内 TNF- α 表达,上调 IL-10 表达,从而减轻 NP,而 85 V 的 PRF 镇痛疗效优于其他电压,这为临床选择高电压 PRF 治疗 NP 提供了实验支持依据。

利益冲突声明:作者声明本文无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] 袁文茜,宋学军,刘小立,等.慢性神经病理性疼痛[J].中国疼痛医学杂志,2021,27(7):481-485.
- [2] Yamamoto Y, Terayama R, Kishimoto N, *et al.* Activated microglia contribute to convergent nociceptive inputs to spinal dorsal horn neurons and the development of neuropathic pain[J]. *Neurochem Res*, 2015, 40(5): 1000-1012.
- [3] Ellis A, Bennett DL. Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain[J]. *Br J Anaesth*, 2013, 111(1):26-37.
- [4] Chen SX, Wang SK, Yao PW, *et al.* Early CALP2 expression and microglial activation are potential inducers of spinal IL-6 up-regulation and bilateral pain following motor nerve injury[J]. *J Neurochem*, 2018, 145(2): 154-169.
- [5] 吕秋兰,黄安,刘双梅,等.促炎因子和抗炎因子在神经病理痛中的作用[J].神经解剖学杂志,2015,31(14):533-538.
- [6] 周利君,桂文珊,刘先国.奇正镇痛贴抑制完全弗氏佐剂引起的炎性痛和神经炎症[J].中国疼痛医学杂志,2016,22(4):250-258.
- [7] Sam J, Catapano M, Sahni S, *et al.* Pulsed radiofrequency in interventional pain management: cellular and molecular mechanisms of action-an update and review[J]. *Pain Physician*, 2021, 24(8):525-532.
- [8] Dai ZS, Xu XR, Chen YQ, *et al.* Effects of high-voltage pulsed radiofrequency on the ultrastructure and Na_v1.7 level of the dorsal root ganglion in rats with spared nerve injury[J]. *Neuromodulation*, 2021, 25(7):980-988.
- [9] Wang B, Du ZJ, Xia JR, *et al.* Efficacy of high-voltage pulsed radiofrequency for the treatment of elderly patients with acute herpes zoster neuralgia[J]. *Rev Assoc Med Bras (1992)*, 2021, 67(4):585-589.
- [10] Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain[J]. *Pain*, 2000, 87(2):149-158.
- [11] Dixon WJ. Efficient analysis of experimental observations[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1980, 20:441-462.
- [12] Hu R, Zhang J, Liu X, *et al.* Low-dose interleukin-2 and regulatory T cell treatments attenuate punctate and dynamic mechanical allodynia in a mouse model of sciatic nerve injury[J]. *J Pain Res*, 2021, 14:893-906.
- [13] Ma L, Peng S, Wei J, *et al.* Spinal microglial β -endorphin signaling mediates IL-10 and exenatide-induced inhibition of synaptic plasticity in neuropathic pain[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2021, 27(10):1157-1172.
- [14] Liem L, Van Dongen E, Huygen FJ, *et al.* The dorsal root ganglion as a therapeutic target for chronic pain[J]. *Reg Anesth Pain Med*, 2016, 41(4):511-519.
- [15] GRuber-Schoffnegger D, Drdla-Schutting R, Honigsperger C, *et al.* Induction of thermal hyperalgesia and synaptic long-term potentiation in the spinal cord lamina I by TNF- α and IL-1 β is mediated by glial cells[J]. *J Neurosci*, 2013, 33(15):6540-6551.
- [16] 汪小芳,何苏月,马卓琳,等.大鼠 DRG 内 CIC-3 敲减导致的 TNF- α /IL-10 失衡对电压门控性钠通道表达和机械痛敏的影响[J].中国病理生理杂志,2020,36(7):1153-1160.
- [17] Ding H, Kiguchi N, Kishioka S, *et al.* Differential mRNA expression of neuroinflammatory modulators in the spinal cord and thalamus of type 2 diabetic monkeys[J]. *J Diabetes*, 2018, 10(11):886-895.