

doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2025.07.005

脊髓电刺激诱导小胶质细胞极化提高痛阈的 机制研究 *

董莎娜^{1#} 罗清甜^{2#} 周晓琴³ 李楠⁴ 张咏芳⁵ 季涵璞⁵ 熊东林⁴
肖礼祖⁴ 罗裕辉⁴ 樊碧发^{6△} 蒋昌宇^{1,4△}

(¹ 广东医科大学, 湛江 524023; ² 深圳市南山区人民医院消化科, 深圳 518052; ³ 东莞市中医院麻醉科, 东莞 523000; ⁴ 深圳市南山区人民医院疼痛科, 深圳 518052; ⁵ 深圳大学医学部, 深圳 518060; ⁶ 中日友好医院疼痛科, 北京 100029)

摘要 目的: 探讨脊髓电刺激 (spinal cord stimulation, SCS) 治疗慢性疼痛的神经免疫机制。**方法:** 在健康小鼠中植入电极, 进行连续 SCS, 观察机械痛阈值的改变和脊髓中小胶质细胞的极化状态。测定脊髓和脑脊液中转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 的表达水平, 以及抑制 TGF- β 功能后 SCS 对机械痛阈值改变的影响。**结果:** 电极植入术未改变小鼠的机械痛阈值和运动能力。连续 SCS 可显著提高小鼠的机械痛阈, 增加脊髓背角中小胶质细胞 M2 极化水平和 TGF- β 的表达, 鞘内注射 TGF- β 抗体减弱 SCS 对机械痛阈值的影响。**结论:** 连续的 SCS 通过激活脊髓小胶质细胞并使其进入 M2 极化状态, 释放 TGF- β , 进而上调疼痛阈值发挥镇痛作用。

关键词 脊髓电刺激; 机械痛阈; 小胶质细胞; M2 极化; 转化生长因子- β

A study on the mechanism of microglia polarization induced by spinal cord stimulation increasing mechanical threshold *

DONG Sha-na^{1#}, LUO Qing-tian^{2#}, ZHOU Xiao-qin³, LI Nan⁴, ZHANG Yong-fang⁵, JI Han-pu⁵, XIONG Dong-lin⁴, XIAO Li-zu⁴, LUO Yu-hui⁴, FAN Bi-fa^{6△}, JIANG Chang-yu^{1,4△}

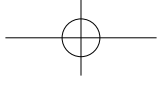
(¹ Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China; ² Department of Gastroenterology, Shenzhen Nanshan People's Hospital, Shenzhen 518052, China; ³ Department of Anesthesiology, Dongguan Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Dongguan 523000, China; ⁴ Department of Pain Medicine, Shenzhen Nanshan People's Hospital, Shenzhen 518052, China; ⁵ Shenzhen University Health Science, Shenzhen 518060, China; ⁶ Department of Pain Medicine, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To investigate the neuroimmune mechanism of spinal cord stimulation (SCS) in the treatment of chronic pain. **Methods:** Electrodes were implanted in healthy mice and continuous SCS was performed to observe the changes in mechanical pain threshold and the polarisation status of microglia in the spinal cord. The expression levels of transforming growth factor- β (TGF- β) in the spinal cord and cerebrospinal fluid were measured, and the effects of SCS on the alteration of mechanical pain threshold after inhibiting the function of TGF- β were determined. **Results:** Electrode implantation did not influence the mechanical pain threshold and locomotor ability of mice. Continuous SCS significantly increased the mechanical pain threshold, the M2 polarisation level and TGF- β expression in microglia in the dorsal horn of the spinal cord, and intrathecal injection of TGF- β antibody attenuated the effect of SCS on the mechanical pain threshold. **Conclusion:** Continuous

* 基金项目: 国家自然科学基金 (82171221); 广东省基础与应用基础研究基金 (2021A1515110799、2023A1515010144); 深圳市科技计划资助 (JCYJ20220530142000001); 深圳市科技创新委员会基础研究面上项目 (JCYJ20220818103206013); 深圳市科技创新委员会基础研究重点项目 (JCYJ20220818103206013); 深圳市南山区卫生健康系统科技重大项目 (NSZD2024015); 深圳市医疗卫生三名工程引进“中日友好医院樊碧发教授疼痛医学团队”项目 (SZSM202103018); 国家重点研发计划“主动健康和人口老龄化科技应对”重点专项 (2022YFC3602201)

共同第一作者

△ 通信作者 樊碧发 15010101616@yeah.net; 蒋昌宇 changyujiang@mail.edu.szu.cn



SCS exerts analgesic effects by activating spinal microglia into M2 polarised state and releasing TGF- β , and then up-regulates the pain threshold.

Keywords spinal cord stimulation; mechanical pain threshold; microglia; M2 polarisation; TGF- β

《中国疼痛医学发展报告(2020)》的数据显示,我国慢性疼痛病人超过3亿^[1]。慢性疼痛一旦形成往往难以治愈且给病人带来极大的身心折磨,已经成为一个严峻的健康问题。慢性疼痛以神经病理性疼痛(neuropathic pain, NP)最为常见。脊髓电刺激(spinal cord stimulation, SCS)作为一种慢性疼痛的非药物治疗方法,近年来已被广泛应用于神经病理性疼痛的临床治疗,取得了较理想的疗效^[2]。然而,遗憾的是,目前已知的SCS的镇痛机制无法完全解释SCS的疗效,且短时程SCS的远期镇痛效果仍尚不清楚,因此限制了其进一步的临床应用。

SCS是基于疼痛的“门控”理论所诞生的治疗方法,经过半个多世纪的发展,目前已经被广泛地运用于慢性疼痛的治疗。传统观念认为SCS的镇痛作用是通过刺激低阈值传入神经(A β 纤维),从而抑制脊髓中的疼痛信号传导^[3]。然而随着短时程SCS的普及,人们发现即使刺激终止后SCS诱导的镇痛效应仍可以持续。此外,SCS也被应用于其他疾病的治疗及临床试验,包括糖尿病足、重度抑郁症、高血压、意识水平下降以及与帕金森病相关的步态障碍等,说明SCS对人体机能的调节机制已经不能用“门控”理论这个单一学说来解释,其中可能存在其他机制介导了短时程SCS的镇痛作用。因此,为深入揭示SCS,尤其是短时程SCS的镇痛机制,本团队开展了进一步的研究。

小胶质细胞是中枢神经系统的常驻巨噬细胞,均匀分布在整个大脑和脊髓中,具有免疫防御和维持中枢神经系统稳态的功能。近年来的研究证实,当神经病理性疼痛发生后,脊髓中小胶质细胞会被激活并且对神经病理性疼痛的发生发展起着关键性的调节作用^[4]。随着研究技术手段的进步,研究人员对脊髓中小胶质细胞的认识更加深入。本团队曾采用单细胞测序技术发现脊髓小胶质细胞表型复杂,提示当神经病理性疼痛发生后,尽管脊髓中的小胶质细胞会发生活化,但可能发挥着不同的功能^[5]。Paolicelli等^[6]报道称,活化的小胶质细胞可分为两种相反的类型:经典型(M1)或替代型(M2)。经典激活小胶质细胞的M1样状态与促炎细胞因子,如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和IL-6的释放

有关,并且能够增强疼痛传递和加剧神经损伤^[7]。而小胶质细胞的M2样状态可介导神经修复、神经的形成以及对神经毒性的保护,并且与抗炎细胞因子,如转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、IL-10和IL-4的释放有关^[7]。其中TGF- β 被认为是一种经典的神经调节剂^[8]。研究表明TGF- β 可迅速抑制坐骨神经慢性压迫损伤(chronic constriction injury of the sciatic nerve, CCI)模型引起的脊髓突触可塑性变化和背根神经节神经元的过度兴奋^[9]。

近年来研究发现,电刺激可以调节神经胶质细胞的功能,如体外电刺激可以使星形胶质细胞内钙浓度增加并促进谷氨酸释放^[10];SCS可降低神经损伤大鼠脊髓中小胶质细胞的M1样变的标志物,如Fcgr3a(又称为Cd16)和Fcgr2a/Fcgr2b(又称为Cd32)的表达,提示小胶质细胞受到抑制^[11]。然而,与此相反,最新的全基因组芯片和RNA测序研究表明,SCS可能增加神经病理性疼痛大鼠脊髓的免疫应答并促进小胶质细胞活化^[12]。SCS对脊髓小胶质细胞活化的影响尚存争议。因此,本研究通过动物实验探究SCS对脊髓小胶质细胞的调节作用以及相关镇痛机制,旨在为SCS镇痛的中枢机制提供新的依据。

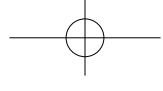
方 法

1. 实验动物

雄性C57BL/6小鼠(5~8周龄)购于广东省实验动物中心,许可证号(SCXK(粤)2022-0002)。小鼠以每笼5只的数量在标准饲养笼里饲养。饲养环境恒温恒湿,12/12 h的光/暗循环,自由饮水和进食。健康雄性小鼠78只,体重20~25 g,按体重随机区组设计分为对照组(空白组6只)、假SCS组(仅植入电极未予刺激组39只)和SCS组(植入电极并予电刺激组33只)。本研究所有实验程序均按照国际疼痛学会(The International Association for the Study of Pain, IASP)的指导方针进行,并通过深圳大学动物伦理委员会审核(伦理批号No:A202300939)。

2. 电极植入和电刺激

使用小动物麻醉机对假SCS组和SCS组小鼠进行麻醉,异氟醚吸入麻醉(4%异氟醚用于诱导,2%



用于维持)。完全麻醉后, 在小鼠的背部剔除毛发, 消毒皮肤, 在背部进行纵向切口并定位 T_{13} 椎体。钝性剥离暴露的肌肉组织, 暴露腰椎椎板, 将小鼠颈背皮肤切开, 通过皮下隧道经颈背区域将定制的无菌电极 (直径为 0.50 mm, 4 触点电极) 送至暴露的椎板附近, 并经第 4、5 腰椎间隙将电极植入小鼠蛛网膜下腔, 根据肋骨定位小心地将电极移动到 T_{13} 的水平, 对应于 L_{4-5} 脊髓节段。用组织粘合剂将电极固定在棘突上, 防止电极迁移。电极的连接器从颈部延伸出皮肤。

在 SCS 过程中, 将颈后伸出的电极连接器与外部刺激器相连接, 通过程序控制仪 (神经医疗科技有限公司, 杭州) 对刺激参数进行调整。每日刺激 30 min, 连续 7 天。刺激强度为 80% 运动阈值 (MoT), 脉冲宽度为 0.2 ms, 频率为 50 Hz。对照组小鼠仅电极植入, 不给予刺激。

3. 小鼠活体成像

待两组小鼠异氟醚吸入诱导麻醉后 (4% 异氟醚), 将小鼠转移至小动物活体成像仪 (IVIS Spectrum, PerkinElmer, 美国) 的观察室内, 并维持麻醉 (2% 异氟醚) 和拍照处理。

4. 行为学实验

痛觉实验: 利用 von Frey 实验方法评估两组小鼠的机械痛阈值: 在基线测试之前, 使小鼠习惯实验环境 3 天, 即将小鼠分别放置在一个有金属丝网板的塑料盒内。待小鼠安静后, 其后足用一系列具有对数增加刚度 (0.02~2.56 g, Stoelting) 的 von Frey 纤维丝刺激, 垂直于足底中央表面。50% 机械刺激缩足反射阈值 (50% mechanical withdrawal threshold, 50% MWT) 根据 “Dixon's up-down” 检测法确定^[13]。由于植入电极后电极偏向于椎管内的左侧, 故将左侧定义为同侧, 右侧定义为对侧。

旷场实验: 在隔音、安静的环境和适宜的温湿度条件下进行。小鼠被放置在记录盒底部的中间。观察 30 min 停止录像。根据计算机软件设定的观测参数, 记录运动距离。

转棒实验: 首先小鼠以最大转速 20 r/min 连续训练 2 天, 训练后选择能在棒上停留 90 s 以上的小鼠用于后续实验。检测过程中, 3 min 内将旋转器从每分钟 2 转提高到每分钟 20 转, 记录每只小鼠掉落的时间。每个测试进行 2 次, 记录平均值。

5. 免疫印迹

麻醉两组小鼠后取出脊髓并冷冻于液氮中。样品在含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂以及 1 mM PMSF 冰冷的 RIPA 裂解缓冲液 (北京索莱宝) 中匀浆。

在 4℃ 以 12,000 g 离心 15 min 后估算裂解物的蛋白质浓度, 并使用 BCA 蛋白质测定试剂盒 (北京索莱宝) 进行定量。每个泳道上等量的蛋白质 (15 μg) 经 10% SDS-PAGE 凝胶分离后转移 PVDF 膜 (EMD Millipore) 上。将膜在 3% BSA 中室温封闭 1 h 后与 TGF-β1 的抗体 (1:1000, Abcam, ab215715) 4℃ 孵育过夜。这些免疫印迹进一步与相对应的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG (1:5000, Abcam, ab97051) 4℃ 孵育 4 h。使用 ECL 试剂盒 (32106, Pierce, 美国) 将信号可视化, 并使用 ChemiDoc™ XRSC 成像系统 (Bio-Rad, 美国) 观察蛋白质条带。使用 ImageJ 软件对所有特定条带的灰度值进行半定量。

6. 组织免疫荧光

异氟烷麻醉两组小鼠后行心脏灌注 4% 多聚甲醛。灌注后取出脊髓, 置于同一固定剂中, 4℃ 固定过夜, 分别经 20%、30% 的蔗糖溶液 4℃ 过夜脱水后, OCT (美国 SAKURA) 包埋, 使用低温切片机 (Leica CM1520) 将脊髓切片 (15 μm), 经 0.3% 的 Triton X-100 室温破膜 1 h, 3% 的 BSA 室温封闭 1 h 后, 与 Iba-1 (1:1000, 日本和光纯药, 019-19741) 或 Arg1 (1:500, Santa Cruz, sc-18354) 的抗体 4℃ 孵育过夜。PBS 洗涤后, 将切片与二抗室温孵育 1 h。用奥林巴斯 FV3000 共聚焦显微镜 (奥林巴斯, 日本) 检查染色情况并拍摄。使用相同的采集参数设置获得所有的图像, 从每只小鼠中选择 4~5 个切片, 并且包括 3 或 4 只小鼠进行数据分析。

7. 脑脊液收集和 ELISA

TGF-β1 ELISA 试剂盒 (DB100C) 购自 R&D Systems 公司。从两组小鼠枕骨大池收集脑脊液 (cerebrospinal fluid, CSF), 并根据说明书进行 ELISA 流程操作。

8. 药物和鞘内注射

TGF-β1 中和抗体及对照 IgG 购自 R&D Systems 公司。两组小鼠用异氟烷吸入麻醉, 用微量注射器将针头插入 L_{5-6} 棘突间隙, 可观察到针头插入蛛网膜下腔时的甩尾运动。注射药物后, 注射器保持原位 20 s, 然后缓慢移动, 以防止药物流出。

9. 统计学分析

采用 Prism GraphPad 8.0 软件分析。计量资料符合方差齐性且服从正态分布采用均数 ± 标准误 ($\bar{x} \pm SEM$) 描述。行为数据的每个数据点对应于一个单独的小鼠。数据分析使用单因素方差分析或双因素方差分析, 用 Dunnett 事后检验来进行多组比较。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. 电极植入的安全性

如图 1A 所示, 电极植入后电极的连接器从颈部延伸出皮肤。图 1B 所示为电极植入部位和连接外部刺激电极的示意图。在麻醉状态下, 对假 SCS 组和 SCS 组小鼠进行小动物活体成像观察植入的刺激电极头所在位置 (见图 1C), 刺激电极在第 13 胸椎和第 1 腰椎水平, 且偏向左侧。在随后的叙述中将左侧定义为同侧, 右侧定义为对侧。

在此基础上, 继续观察电极植入术对小鼠的机械痛阈值和运动功能的影响。首先, 将小鼠随机分为对照组 (空白组) 和假 SCS 组 (电极植入组), 每组 6 只。图 2A, 2B 所示为电极植入示意图和本实验的操作流程示意图, 分别在电极植入前和植入后第 7 天, 通过 *von Frey* 检测两组小鼠双侧后足的机械痛阈值。结果显示, 电极植入术前后小鼠的机械痛阈值未发生改变 (见图 2C, 2D)。此外, 在相同时间点通过旷场实验和转棒实验对小鼠的运动功能进行观察, 结果显示 30 min 内小鼠在旷场中总的运动距离无明显差异, 小鼠从转棒上掉落的时间也未出现明显差异, 提示电极植入术未改变小鼠的运动功能 (见图 2E, 2F)。

2. 连续 SCS 对小鼠机械痛阈值的影响

在上述研究的基础上, 进一步观察连续 SCS 刺激是否能够改变小鼠的机械痛阈值。将小鼠随机分为假 SCS 组 (电极植入无刺激组) 和 SCS 组 (电极植入并刺激组), 每组 6 只。首先在电极植入后

第 7 天, 通过 *von Frey* 检测各组小鼠双侧后足的基础机械痛阈值, 随后连续 7 天 (每日 30 min) 给予麻醉状态下的小鼠电刺激, 刺激强度为 80% 运动阈值 (MoT), 脉冲宽度为 0.2 ms, 频率为 50 Hz, 并在结束 7 天刺激后的第 1、3、7、14 天通过 *von Frey* 检测各组小鼠双侧后足的基础机械痛阈值 (见图 3A, 3B)。结果显示, 假 SCS 组和 SCS 组同侧和对侧的基础机械痛阈值均无明显差异 ($P > 0.05$, 见图 3C, 3D)。但与假 SCS 组相比, 在连续刺激后的第 1 天 ($P = 0.002$)、第 3 天 ($P = 0.0120$) 和第 7 天 ($P = 0.0135$), SCS 组小鼠的左侧后足 (即同侧) 的机械痛阈值均显著上升 (见图 3C)。同时在连续刺激后的第 1 天 ($P = 0.0358$)、第 3 天 ($P = 0.0353$) 和第 7 天 (对侧 $P = 0.0099$), SCS 组小鼠右侧后足 (即对侧) 的机械痛阈值也显著上升 (见图 3D)。而在连续刺激后的第 14 天, 两组小鼠双侧后足的机械痛阈值无显著差异 (见图 3C, 3D)。上述结果提示, 连续 7 天刺激能够持续改变小鼠的机械痛阈值。

3. 连续 SCS 对脊髓小胶质细胞活化水平和极化状态的影响

为揭示连续 7 天 SCS 刺激改变疼痛阈值的潜在机制, 首先在刺激后第 1 天和第 7 天, 利用免疫荧光染色的方法观察小鼠脊髓背角浅层小胶质细胞的活化情况 (见图 4A)。与假 SCS 组相比, 在连续 SCS 后第 1 天 (同侧 $P = 0.0018$; 对侧 $P = 0.0111$) 和第 7 天 (同侧 $P = 0.0009$; 对侧 $P < 0.0001$), SCS 组小鼠的脊髓背角浅层中 Iba-1 的荧光强度均

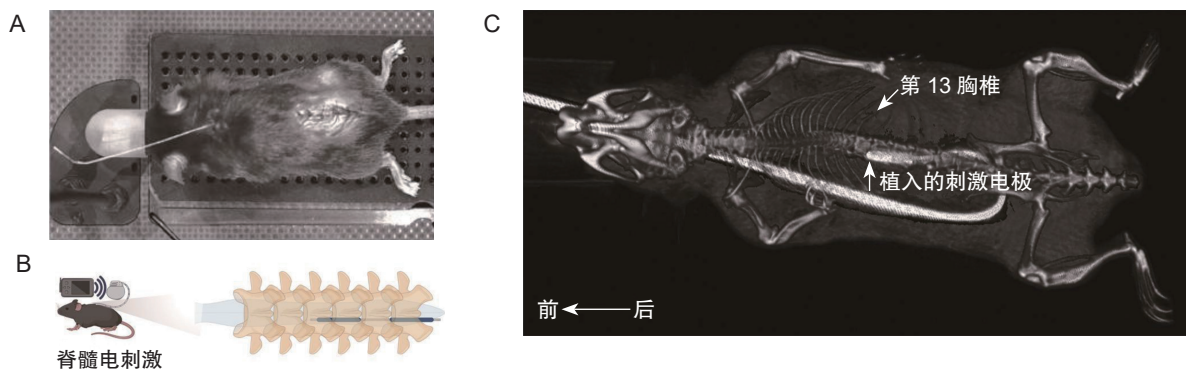


图 1 电极植入位置

(A) 电极的连接器从颈部延伸出皮肤; (B) 电极植入部位和连接外部刺激电极的示意图; (C) 小鼠活体成像确认刺激电极位置, 电极偏向左侧 (左侧定义为同侧), 解剖定位在第 13 胸椎和第 1 腰椎水平

Fig. 1 The site of electrode implantation

(A) The connector of the electrodes extends out of the skin from the neck; (B) Schematic diagram of the electrode implantation site and the connection to external stimulation electrode; (C) The electrode was anatomically positioned at the level of the 13th thoracic vertebra and the 1st lumbar vertebra; The position of the stimulating electrode was confirmed by in vivo imaging of the mouse, showing that the electrode is shifted towards the left side (Defined as ipsilateral).

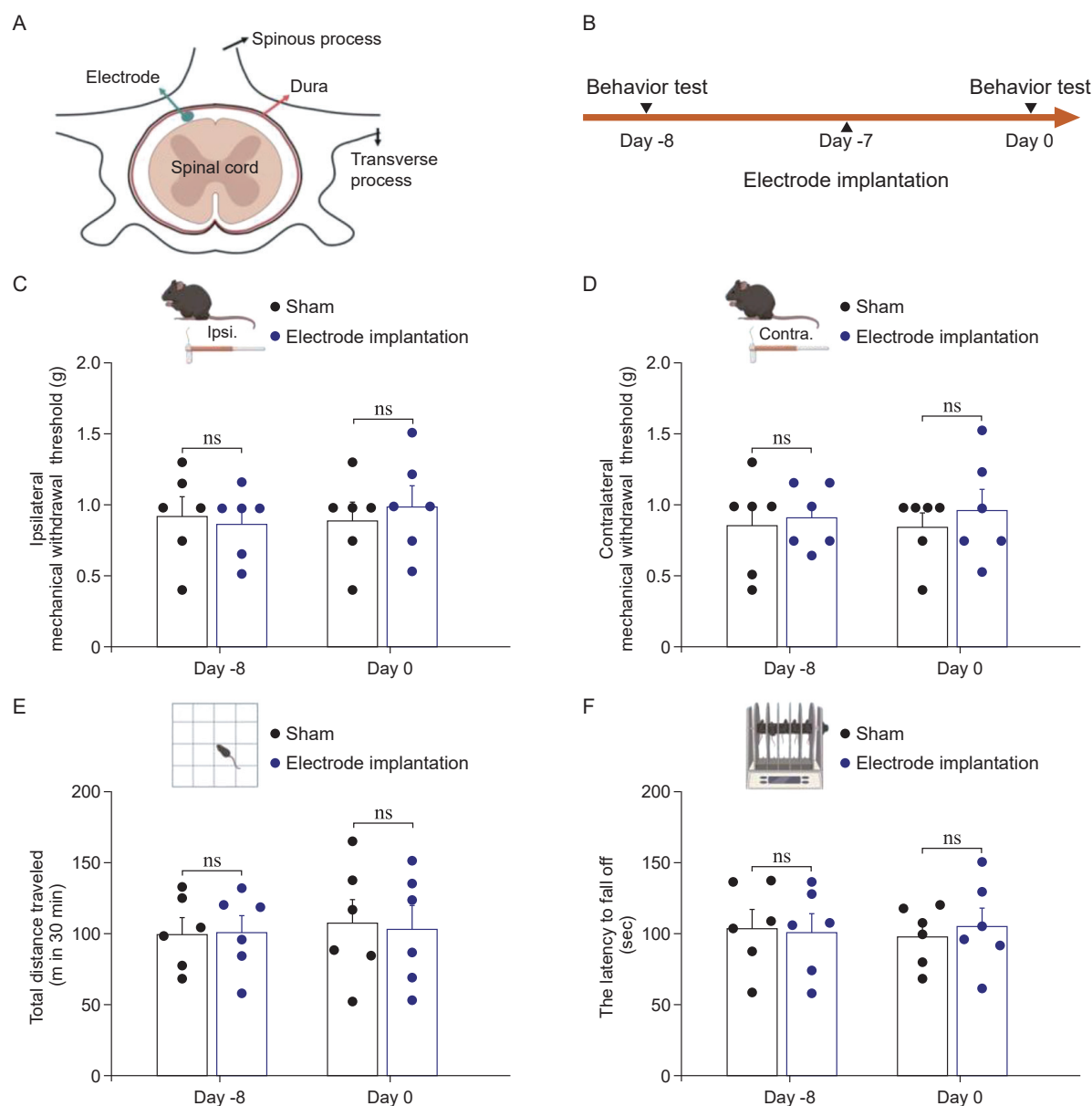


图 2 电极植入术对小鼠的基础痛阈值和运动功能的影响 ($n = 6$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A, B) 实验设计示意图; (C, D) 植入前后同侧和对侧后足机械痛阈值; (E) 植入前后在旷场测试 30 min 内总移动距离; (F) 植入前后从转棒掉落的时间

Fig. 2 Effects of electrode implantation on basal pain threshold and motor function in mice ($n = 6$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A, B) Schematic of the experimental design; (C, D) Before and after implantation, the mechanical withdrawal threshold of the ipsilateral and contralateral hindfoot; (E) Before and after implantation, the total distance of movement within 30 min measured by open field test; (F) Before and after implantation, the latency to fall from a rotating rod.

显著增加 (见图 4B, 4C)。

为进一步观察小胶质细胞的极化状态, 在连续 SCS 后第 7 天, 利用免疫荧光染色的实验方法观察脊髓背角 Arg1 和 Iba-1 的共染情况以判断小胶质细胞的极化状态 (见图 5A)。与假 SCS 组 (电极植入组) 相比, 在 SCS 组小鼠的脊髓背角中 Arg1 和 Iba-1 的比率显著升高 ($P < 0.0001$, 见图 5B-5D)。

4. 连续 SCS 对脊髓和脑脊液中 TGF- β 表达的影响

随后在连续 SCS 后第 7 天, 对假 SCS 组 (电极植入组) 和 SCS 组小鼠脊髓和脑脊液中的 TGF- β 表达进行检测 (见图 6A)。通过 ELISA 实验方法, 发现连续 SCS 能够显著增加小鼠脑脊液中 TGF- β 的表达水平 (见图 6B)。并且利用免疫印记的实验

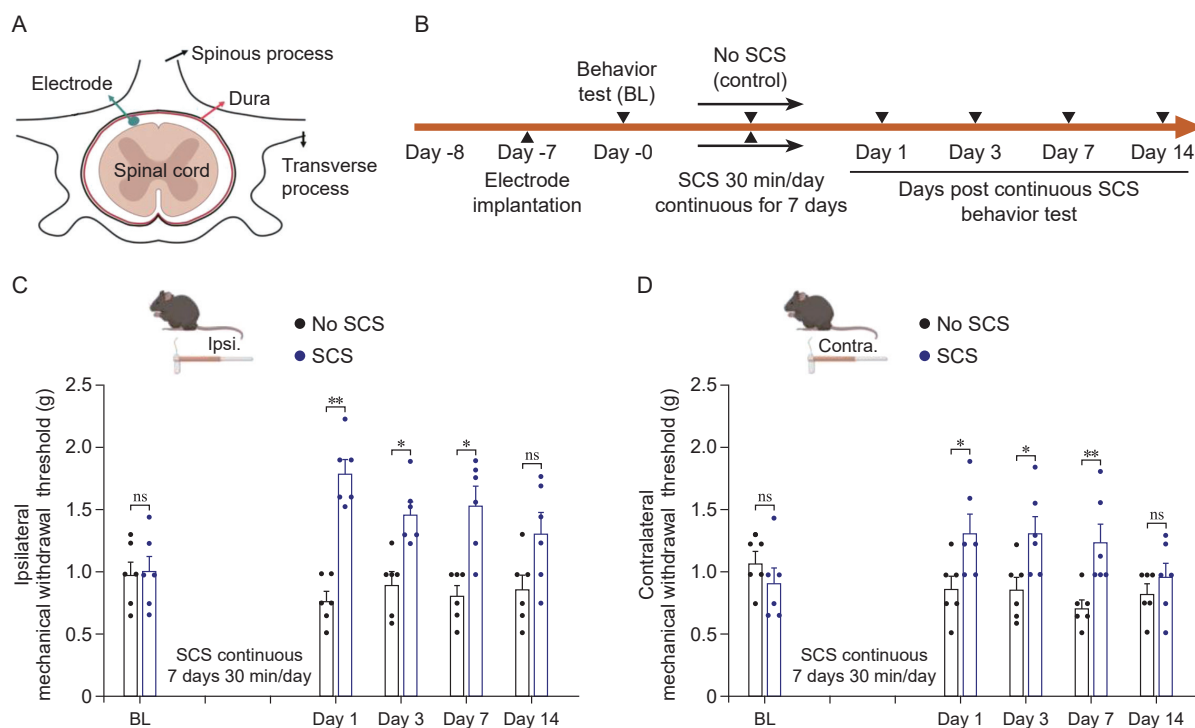


图3 脊髓电刺激对小鼠机械痛阈值的影响 ($n = 6$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A, B) 实验设计示意图; (C) 连续 SCS 后第 1 天 ($P = 0.002$)、第 3 天 ($P = 0.0120$)、第 7 天 ($P = 0.0135$) 和第 14 天 ($P > 0.05$) 同侧后足机械痛阈值; (D) 连续 SCS 后第 1 天 ($P = 0.0358$)、第 3 天 ($P = 0.0353$)、第 7 天 ($P = 0.0099$) 和第 14 天 ($P > 0.05$) 对侧后足机械痛阈值

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与假 SCS 组 (电极植入组) 相比

Fig. 3 Effects of spinal cord stimulation on the mechanical withdrawal threshold in mice ($n = 6$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A, B) Schematic of the experimental design; (C) The mechanical withdrawal threshold of the ipsilateral hindfoot before and on day 1 ($P = 0.002$), day 3 ($P = 0.0120$), day 7 ($P = 0.0135$), and day 14 ($P > 0.05$) after consecutive SCS; (D) The mechanical withdrawal threshold of the contralateral hindfoot before and on day 1 ($P = 0.0358$), day 3 ($P = 0.0353$), day 7 ($P = 0.0099$), and day 14 ($P > 0.05$) after consecutive spinal cord stimulation.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with sham SCS group (electrode implantation group).

方法, 发现在脊髓组织中 TGF- β 的表达明显高于假 SCS 组 (见图 6C)。

5. 抑制 TGF- β 的功能对 SCS 作用的影响

为判断 SCS 对机械痛阈值的影响是否通过 TGF- β 所介导, 在连续 SCS 后第 7 天检测机械痛阈值后, 鞘内注射 TGF- β 中和抗体或对照 IgG 并进行行为学观察 (见图 7A)。如图 7B 所示, 在 SCS 后第 7 天, 在鞘内注射 TGF- β 中和抗体或对照 IgG 前, 两组小鼠机械痛阈值无显著差异 ($P > 0.05$); 与对照 IgG 组相比, 鞘内注射 TGF- β 中和抗体 3 h 后, 小鼠机械痛阈值显著下降 ($P = 0.0056$)。提示 TGF- β 介导了 SCS 对机械痛阈值的影响。

讨论

近年来 SCS 已广泛应用于临床, 并且刺激模式

也呈现多样化趋势, 其中包括短时程脊髓电刺激^[14]。然而, 目前已知的镇痛机制难以完全解释包括短时程 SCS 在内的长效镇痛作用^[15]。最新的研究发现, SCS 有调节神经胶质细胞的功能, 但具体作用仍需深入探索。Shu 等^[16] 研究发现, SCS 能够增强大鼠脊髓中的小胶质细胞激活。而 Sun 等^[17] 研究却发现 SCS 通过减弱小胶质细胞的活化从而起到减轻由坐骨神经结扎诱导的动物疼痛行为。导致这些差异的原因复杂, 可能与所选择的刺激电极、刺激方式或观察的时间点不同有关。Shu 等^[16] 和 Sun 等^[17] 的报道均选用了外周神经损伤的模型对 SCS 的镇痛作用进行阐述, 但由于该模型本身就可激活脊髓小胶质细胞并改变其功能^[18], 对实验结果的观察及判断可能造成一定影响。因此, 为观察 SCS 自身对脊髓小胶质细胞的作用和相关疼痛行为学变化的机制, 本研究选择了非疼痛模型的小鼠开展研究。

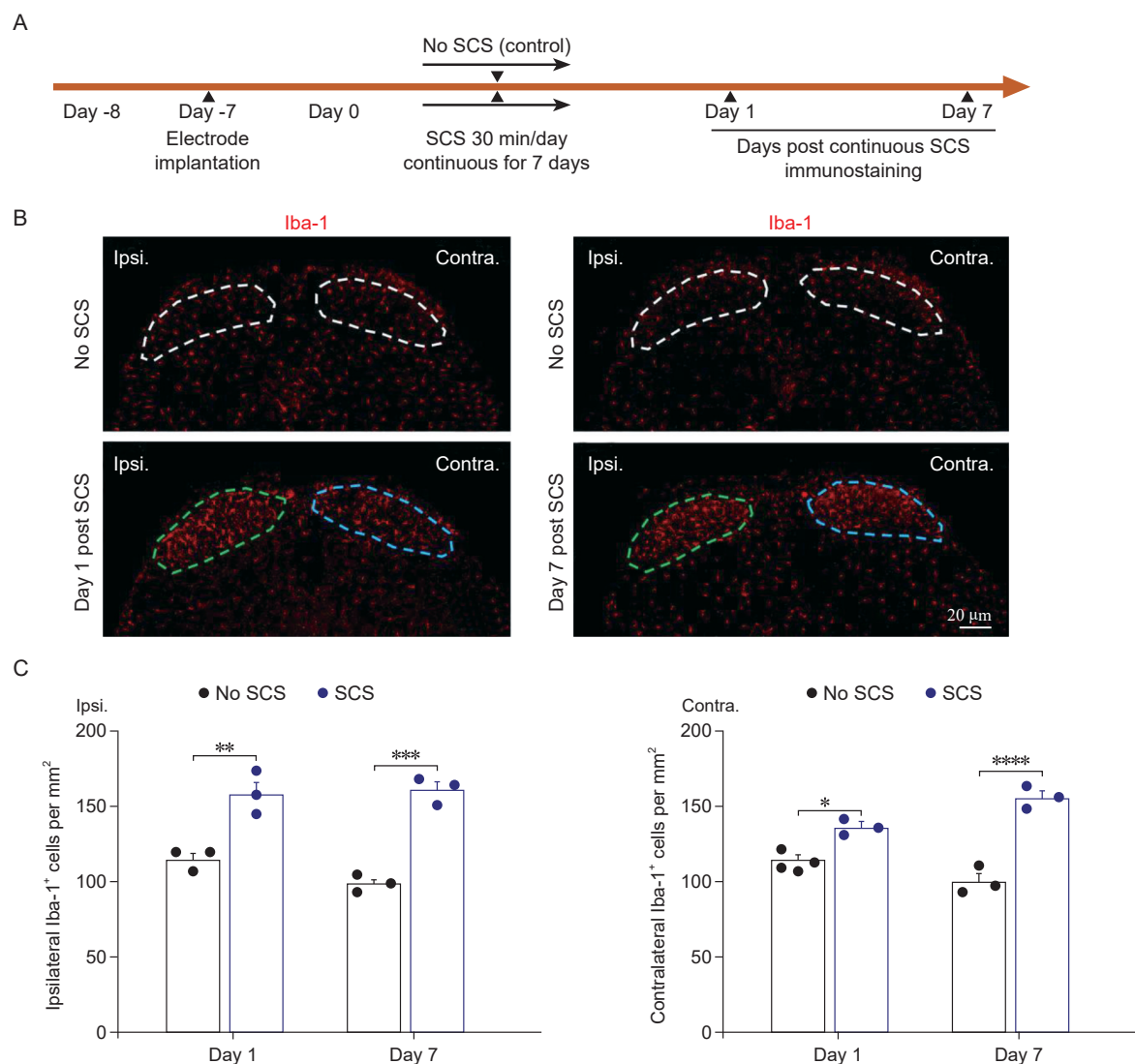


图 4 脊髓电刺激激活脊髓背角浅层内的小胶质细胞 ($n = 3$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) 实验设计示意图; (B) 具有代表性的免疫荧光显微镜图像显示 Iba-1 在无刺激或在连续 SCS 后第 1 天和第 7 天的小鼠脊髓背角浅层的表达; (C) 定量和统计分析显示在第 1 天 (同侧 $P = 0.0018$; 对侧 $P = 0.0111$) 和第 7 天 (同侧 $P = 0.0009$; 对侧 $P < 0.0001$) Iba-1⁺ 的数量情况

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, 与假 SCS 组 (电极植入组) 相比

Fig. 4 Spinal cord stimulation activated the microglia in the superficial dorsal horn ($n = 3$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) Schematic of the experimental design; (B) The representative immunofluorescence microscopy images show the expression of Iba-1 in the superficial dorsal horn of spinal cord in the mice without stimulation or on day 1 and day 7 after consecutive spinal cord stimulation; (C) Quantitative and statistical analysis shows the number of Iba-1⁺ cells/mm² in the bilateral superficial dorsal horn on day 1 (ipsilateral $P = 0.0018$; contralateral $P = 0.0111$) and day 7 (ipsilateral $P = 0.0009$; contralateral $P < 0.0001$).

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, compared with sham SCS group (electrode implantation group).

本研究利用小动物活体成像系统, 观察了电极植入后电极所对应的脊柱节段和其在椎管内的位置。明确了电极抵达第 13 胸椎和第 1 腰椎水平, 保证其覆盖对应坐骨神经的第 4 和第 5 腰髓节段; 如图 1 所示, 本研究中电极是偏向左侧。在随后测试刺激强度时, 当刺激强度达到一定程度, 小鼠的后足可出现明显的收缩或颤抖。这些证据均提示,

电极所植入的部位能覆盖支配后足的神经。接下来, 观察所植入电极和手术操作是否对小鼠感觉和运动功能产生影响, 在电极植入后 7 天分别利用了 von Frey、旷场实验和转棒实验进行检测, 结果均提示本研究所采取的手术操作和电极均未对小鼠的感觉和运动功能产生损伤。

在此基础上, 本研究给予小鼠连续 1 周的 SCS,

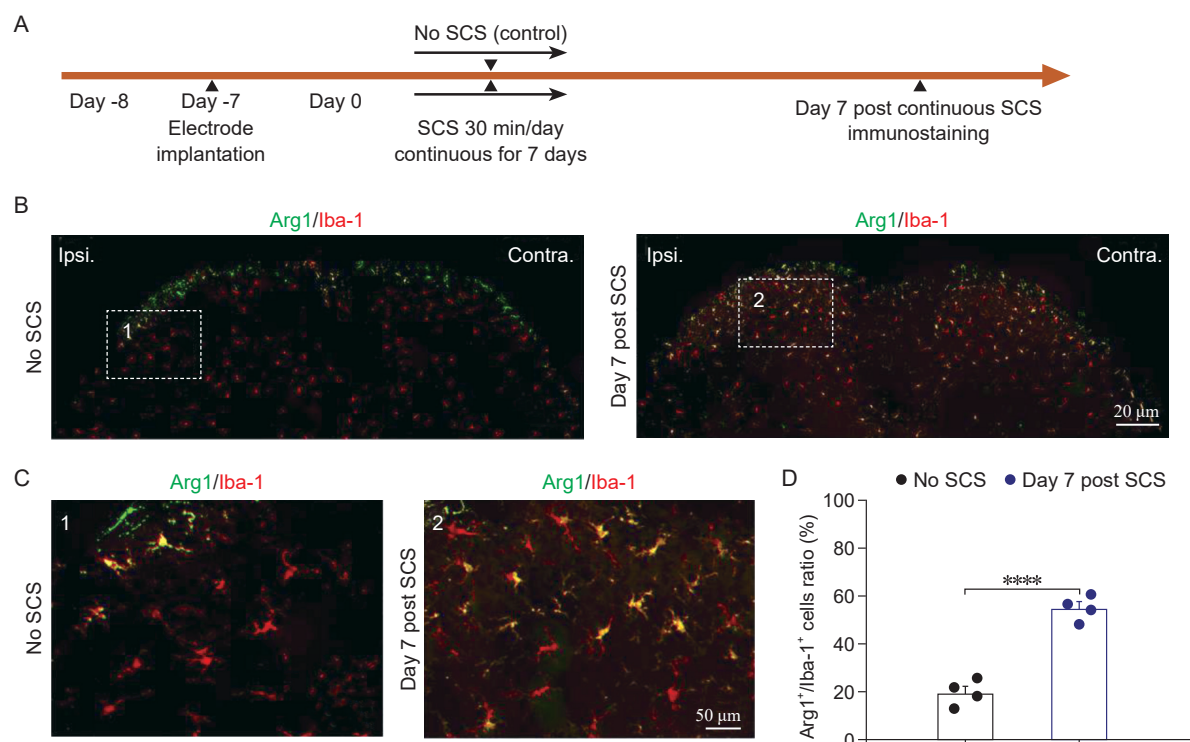


图 5 脊髓电刺激增加 Arg1 在脊髓背角浅层小胶质细胞中的表达 ($n = 4$, $\bar{x} \pm SEM$)
(A) 实验设计示意图; (B, C) 具有代表性的免疫荧光显微镜图像显示, 在无刺激或连续 SCS 后第 7 天, 小鼠脊髓背角浅层中 Arg1 和 Iba-1 的共表达; C 图为 B 图中截图区域的放大成像; (D) 统计学分析显示各组 Arg1 和 Iba-1 的比值 ($P < 0.0001$)

Fig. 5 Spinal cord stimulation increased the expression of Arg1 in the superficial dorsal horn ($n = 4$, $\bar{x} \pm SEM$)
(A) Schematic of the experimental design; (B, C) The representative immunofluorescence microscopy images show the co-expression of Arg1 and Iba-1 in the superficial dorsal horn of spinal cord in the mice without stimulation or on day 7 after consecutive spinal cord stimulation. The small box in B is magnified in C; (D) Statistical analysis shows the ratio of Arg1 and Iba-1 in each group ($P < 0.0001$).

刺激强度和频率均参考现行临床参数和 Yang 等^[19]的报道, 即刺激强度为 80% 运动阈值 (MoT), 脉冲宽度为 0.2 ms, 频率为 50 Hz。本研究发现连续 SCS 7 天后, 其对小鼠机械痛阈值的影响依然能够维持 7 天。故选择在刺激后第 7 天, 通过免疫荧光技术对小胶质细胞的激活情况和极化状态进行观察, Arg1/Iba-1 比值可反映小胶质细胞极化状态^[20]。结果显示, SCS 显著增强了双侧脊髓背角小胶质细胞标志物 Iba-1 和小胶质细胞 M2 标志物 Arg1 的表达以及 Arg1 与 Iba-1 的比值, 提示本研究的刺激方式会激活小胶质细胞并促进部分脊髓小胶质细胞进入 M2 极化状态。这一结果与 Shu 等^[16]的报道相似, 即该研究也发现 SCS 会促进脊髓中小胶质细胞的激活, 但也存在不一致处, 即他们发现 SCS 会导致小胶质细胞呈现出 M1 的极化状态, 而不是 M2 极化状态。导致这种差异的原因可能与所选用的刺激时程不同有关, 同时也不排除所用的动物种属和疼痛模型不同有关。

M2 小胶质细胞可产生抗炎细胞因子, 如 IL-10、

胰岛素样生长因子-1、成纤维细胞生长因子、神经生长因子以及 TGF- β ^[7]。多项研究表明, TGF- β 具有减轻疼痛的作用, 如鞘内注射 TGF- β 1 (0.01 ~ 10 ng) 显著减弱 CCI 诱导的神经病理性疼痛大鼠的热痛觉过敏, 并减轻了 CCI 诱导的脊髓炎症^[21]; 骨髓基质细胞通过分泌 TGF- β 抑制神经病理性疼痛^[9]。本研究发现, SCS 后 CSF 和脊髓组织中 TGF- β 的表达均显著增加, 这提示 SCS 诱导的小鼠机械痛阈值变化可能是由于脊髓小胶质细胞 M2 极化后释放 TGF- β 所致。研究证实, 在中枢神经系统中小胶质细胞是 TGF- β 的主要来源, 但也有研究表明卫星胶质细胞或神经元也具有分泌 TGF- β 的功能^[22]。虽然本研究尚不能明确 SCS 后引起脊髓内 TGF- β 增多的细胞来源, 但有研究针对脊髓中的小胶质细胞进行 qPCR 检测发现, 高频 SCS 能够刺激小胶质细胞表达 TGF- β 的 mRNA 增多^[12]。为确认 SCS 对疼痛阈值的改变是由 TGF- β 所介导的, 本研究在连续 SCS 后鞘内注射对照 IgG 或 TGF- β 抗体并检测机械痛阈

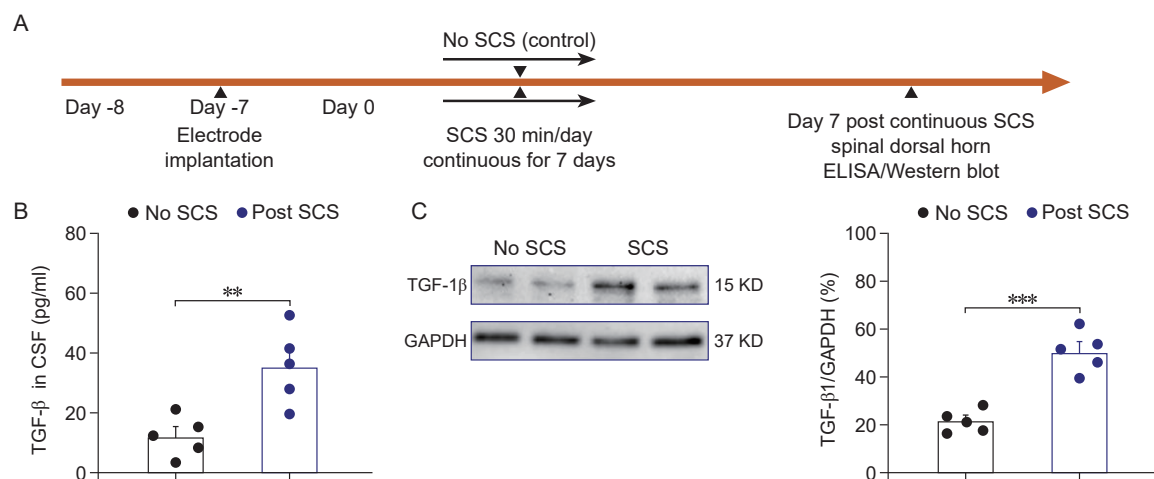


图6 脊髓电刺激增加 TGF-β 在脊髓和 CSF 中的表达 ($\bar{x} \pm SEM$)

(A) 实验设计示意图; (B) 在无刺激的小鼠或连续 SCS 后第 7 天 CSF 中 TGF-β 的表达 ($n = 4$, 不成对的 t 检验, $P = 0.0064$); (C) 左图为具有代表性的蛋白质印迹图像, 显示无刺激或在连续 SCS 后第 7 天 TGF-β1 在小鼠脊髓组织中的表达; 右图为统计学分析, 显示各组 TGF-β1 的表达 ($n = 5$, 不成对的 t 检验, $P = 0.0002$)

Fig. 6 Spinal cord stimulation increased the expression of TGF-β in the spinal cord and CSF ($\bar{x} \pm SEM$)

(A) Schematic of the experimental design; (B) The expression of TGF-β in the CSF in the mice without stimulation or on day 7 after consecutive spinal cord stimulation ($P = 0.0064$, unpaired t -test, $n = 4$ mice in each group); (C) Left: The representative western blot images show the expression of TGF-β1 in the spinal cord tissue in the mice without stimulation or on day 7 after consecutive spinal cord stimulation. Right: Statistical analysis shows the expression of TGF-β1 in each group ($P = 0.0002$, unpaired t -test, $n = 5$ mice in each group).

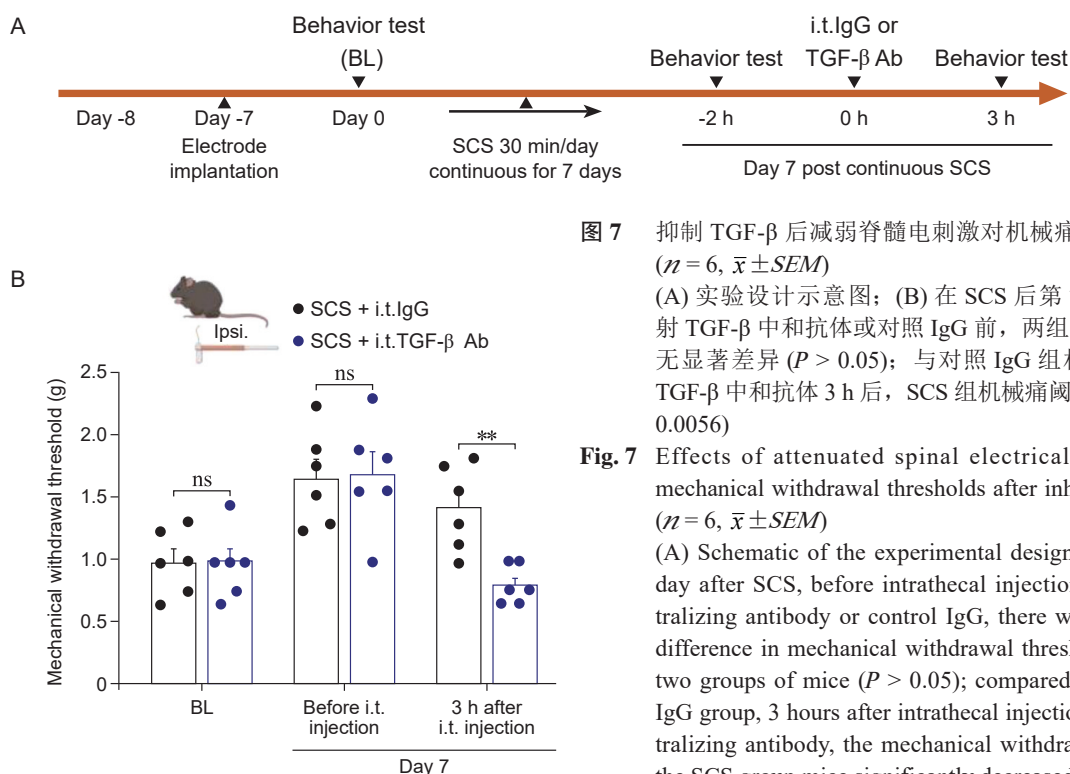


图7 抑制 TGF-β 后减弱脊髓电刺激对机械痛阈值的影响 ($n = 6$, $\bar{x} \pm SEM$)

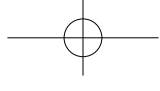
(A) 实验设计示意图; (B) 在 SCS 后第 7 天, 在鞘内注射 TGF-β 中和抗体或对照 IgG 前, 两组小鼠机械痛阈值无显著差异 ($P > 0.05$); 与对照 IgG 组相比, 鞘内注射 TGF-β 中和抗体 3 h 后, SCS 组机械痛阈值显著下降 ($P = 0.0056$)

Fig. 7 Effects of attenuated spinal electrical stimulation on mechanical withdrawal thresholds after inhibition of TGF-β ($n = 6$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) Schematic of the experimental design; (B) On the 7th day after SCS, before intrathecal injection of TGF-β neutralizing antibody or control IgG, there was no significant difference in mechanical withdrawal threshold between the two groups of mice ($P > 0.05$); compared with the control IgG group, 3 hours after intrathecal injection of TGF-β neutralizing antibody, the mechanical withdrawal threshold of the SCS group mice significantly decreased ($P = 0.0056$).

值的改变。结果表明, 鞘内注射 TGF-β 抗体可显著逆转 SCS 对机械阈值的影响, 这提示 TGF-β 释放增多可能是 SCS 发挥作用的关键环节。

本研究存在的局限性: 首先, 本实验是在正常小鼠上完成, 所得结论是否在神经病理性疼痛模型中适用还需进一步探索。其次, 关于 TGF-β 升高的



来源, 依然尚未明确, 该问题也待下一步的研究。

综上所述, 连续 SCS 可通过诱导部分脊髓小胶质细胞进入 M2 极化并增加 TGF- β 的表达介导 SCS 镇痛作用。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] 樊碧发. 中国疼痛医学发展报告 [M]. 中国疼痛医学发展报告, 2020.
- [2] Knotkva H, Hamani C, Sivnesan E, *et al.* Neuromodulation for chronic pain[J]. *Lancet (London, England)*, 2021, 397(10289):2111-2124.
- [3] Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms: a new theory[J]. *Science*, 1965, 150(3699):971-979.
- [4] Tansley S, Gu N, Guzmán AU, *et al.* Microglia-mediated degradation of perineuronal nets promotes pain[J]. *Science*, 2022, 377(6601):80-86.
- [5] Shan L, Xu K, Ji L, *et al.* Injured sensory neurons-derived galectin-3 contributes to neuropathic pain via programming microglia in the spinal dorsal horn[J]. *Brain Behav Immun*, 2024, 117:80-99.
- [6] Paolicelli C, Sierra A, Stevens B, *et al.* Microglia states and nomenclature: a field at its crossroads[J]. *Neuron*, 2022, 110(21):3458-3483.
- [7] Guo S, Wang H, Yin Y. Microglia polarization from M1 to M2 in neurodegenerative diseases[J]. *Front Aging Neurosci*, 2022, 14:815347.
- [8] Meyers EA, Kessler JA. TGF- β family signaling in neural and neuronal differentiation, development, and function[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2017, 9(8):a022244.
- [9] Chen G, Park C K, Xie RG, *et al.* Intrathecal bone marrow stromal cells inhibit neuropathic pain via TGF- β secretion[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(8):3226-3240.
- [10] Platt DC, Apuzzo CF, Jones MA, *et al.* Development of a C₆ glioma cell model system to assess effects of cathodic passively balanced electrical stimulation on responses to neurotransmitters: implications for modulation of intracellular nitric oxide, chloride, and calcium ions[J]. *Brain Sci*, 2022, 12(11):1504.
- [11] Smith WJ, Cedeño DL, Thomas SM, *et al.* Modulation of microglial activation states by spinal cord stimulation in an animal model of neuropathic pain: comparing high rate, low rate, and differential target multiplexed programming[J]. *Mol Pain*, 2021, 17:1744806921999013.
- [12] Yu J, Wong S, Lin Z, *et al.* High-frequency spinal stimulation suppresses microglial Kainate-P2X7 receptor axis-induced inflammation to alleviate neuropathic pain in rats[J]. *Ann Neurol*, 2024, 95(5):966-983.
- [13] Li L, Li P, Guo J, *et al.* Up-regulation of oxytocin receptors on peripheral sensory neurons mediates analgesia in chemotherapy-induced neuropathic pain[J]. *Br J Pharmacol*, 2023, 180(13):1730-1747.
- [14] 闫晗, 宋涛. 不同频率脊髓电刺激在治疗慢性疼痛中的应用及研究进展 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2022, 28(5):364-368.
- [15] Huang J, Yang S, Yang J, *et al.* Early treatment with temporary spinal cord stimulation effectively prevents development of postherpetic neuralgia[J]. *Pain Physician*, 2020, 23(2):E219-E230.
- [16] Shu B, He SQ, Guan Y. Spinal cord stimulation enhances microglial activation in the spinal cord of nerve-injured rats[J]. *Neurosci Bull*, 2020, 36(12):1441-1453.
- [17] Sun C, Tao X, Wan C, *et al.* Spinal cord stimulation alleviates neuropathic pain by attenuating microglial activation via reducing colony-stimulating factor 1 levels in the spinal cord in a rat model of chronic constriction injury[J]. *Anesth Analg*, 2022, 135(1):178-190.
- [18] Tsuda M, Inoue K, Salter MW. Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia[J]. *Trends Neurosci*, 2005, 28(2):101-107.
- [19] Yang F, Carteret AF, Wacnik PW, *et al.* Bipolar spinal cord stimulation attenuates mechanical hypersensitivity at an intensity that activates a small portion of A-fiber afferents in spinal nerve-injured rats[J]. *Neuroscience*, 2011, 199:470-480.
- [20] Radpour M, Khoshkroodian B, Asgari T, *et al.* Interleukin 4 reduces brain hyperexcitability after traumatic injury by downregulating TNF- α , upregulating IL-10/TGF- β , and potential directing macrophage/microglia to the M2 anti-inflammatory phenotype[J]. *Inflammation*, 2023, 46(5):1810-1831.
- [21] Chen NF, Huang SY, Chen WF, *et al.* TGF- β 1 attenuates spinal neuroinflammation and the excitatory amino acid system in rats with neuropathic pain[J]. *J Pain*, 2013, 14(12):1671-1685.
- [22] Spittau B, Dokalis N, Prinz M. The role of TGF β signaling in microglia maturation and activation[J]. *Trends Immunol*, 2020, 41(9):836-848.