

·基础研究·

脉冲射频对坐骨神经分支损伤模型大鼠脊髓神经元凋亡的影响*

张爱民¹ 周增华² 蒋宗滨^{2,3}

摘要

目的:探讨脉冲射频(pulsed radiofrequency, PRF)对坐骨神经分支损伤(spared nerve injury, SNI)模型大鼠脊髓神经元凋亡的影响。

方法:将32只雄性SD大鼠随机分为4组(n=8):空白对照组(C组)、模型组(SNI组)、假治疗组(Sham组)和治疗组(PRF组)。于制模前0天,制模后1、4、7、10天,PRF治疗后6、12、24、36、48天分别测定4组大鼠机械缩足阈值(pain mechanical withdrawal threshold, PMWT);在PRF治疗前0天、治疗48天后分别处死每组大鼠4只,提取L4—L6节段脊髓,采用蛋白印记(Western Blot)技术检测bcl-2、caspase-3表达情况,TUNEL法检测脊髓组织凋亡细胞数。

结果:①坐骨神经分支损伤术后,SNI组、Sham组和PRF组大鼠的PMWT较C组显著降低($P<0.01$);②经PRF治疗后,PRF组大鼠的PMWT可显著提高($P<0.05$);③随着PMWT提高,PRF组bcl-2蛋白表达量显著增加,caspase-3蛋白表达量显著降低($P<0.05$),而脊髓组织细胞凋亡数量显著下降($P<0.05$)。

结论:PRF可能通过抑制脊髓神经细胞凋亡对SNI模型大鼠产生良好的镇痛作用。

关键词 脉冲射频;SNI模型;脊髓;凋亡

中图分类号:R651.2,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2018)-10-1156-07

Effects of pulsed radiofrequency on apoptosis of spinal cord neurons in rats with spared nerve injury/
ZHANG Aimin, ZHOU Zenghua, JIANG Zongbin, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,
2018, 33(10): 1156—1161

Abstract

Objective: To explore the effect of pulsed radiofrequency (PRF) for spinal cord neuron apoptosis in rat with spared nerve injury (SNI).

Method: Thirty-two male SD rats were randomly divided into four groups, ①control group (CON), ②SNI model group (SNI), ③sham treatment group (sham), ④PRF treatment group (PRF). Pain mechanical withdrawal threshold (PMWT) was assessed before establishment of SNI model, 1,4,7 and 10d after establishment of SNI model, and 6,12,24,36,48d after PRF treatment. Four rats in each group were euthanized before PRF treatment and 48 days after treatment to collect L4—L6 spinal cord. Western blotting was conducted to assess the expression of bcl-2 and caspase-3 protein, and TUNEL method was used for apoptosis rate of spinal cord.

Result: ①The PMWT of SNI, Sham and PRF group were significantly decreased compared with CON group after spared nerve injury ($P<0.01$). ②The PMWT of PRF group was obviously enhanced after PRF treatment ($P<0.05$). ③The expression of bcl-2 was significantly up-regulated with the increase of PMWT while the expression of caspase-3 protein decreased ($P<0.05$), and the apoptosis rate was simultaneous decreased ($P<0.05$).

Conclusion: PRF may produce good analgesic effect on SNI model rats by inhibiting the apoptosis of spinal

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2018.10.005

*基金项目:广西自然科学基金项目(2013GXNSFAA019137;2016GXNSFAA380172)

1 广西医科大学第二附属医院疼痛科,广西医科大学疼痛医学中心,南宁市大学东路,530007; 2 广西医科大学第二附属医院; 3 通讯作者
作者简介:张爱民,男,住院医师; 收稿日期:2016-12-26

cord neurons.

Author's address Department of Pain, the Second Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Center for Pain Medicine of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530007

Key word pulsed radiofrequency; SNI model; spinal cord; apoptosis

神经病理性疼痛(neuropathic pain, NeuP)因躯体感觉神经系统受到外界损伤或疾病侵袭而导致,诱导脊髓及脊髓上中枢敏化,与MAPK等通路介导脊髓神经元凋亡水平增加的有关^[1]。外源性促红素及N-乙酰半胱氨酸等通过抑制脊髓细胞凋亡率可使NeuP机械痛得以改善^[2],提示神经元凋亡是NeuP产生和维持的重要机制之一。脉冲射频(pulsed radiofrequency, PRF)是近年逐渐兴起的疼痛治疗新技术之一,实验证实PRF对神经损伤诱导的痛觉过敏具有缓解作用^[3],可显著提高坐骨神经分支损伤(spared nerve injury, SNI)模型大鼠的痛阈^[4]。既往研究认为,脉冲射频作用于侧背根神经节时,并不会促进侧背根神经节的细胞凋亡^[5],但是否影响脊髓神经组织凋亡仍未知。既往研究表明^[6], bcl-2蛋白是线粒体凋亡的中心调节因子,通过抑制细胞色素c从线粒体释放到细胞质,减少线粒体内钙离子从而抑制了细胞凋亡。caspase-3则是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶,可导致核酸内切酶的活性异常表达增加,介导DNA裂解损伤,启动凋亡。bcl-2/caspase-3表达平衡失调决定细胞的存活与凋亡结局^[7]。因此,本研究基于观察PRF治疗SNI模型大鼠的脊髓bcl-2与caspase-3的蛋白相对表达量以及凋亡细胞数量变化,进一步探讨PRF治疗NeuP是否与调控脊髓组织凋亡有关。

1 材料与方法

1.1 模型制作与分组

本实验通过广西医科大学动物伦理委员会审核(NO.伦理-2013-KY-广基-055)。选择清洁级SD雄性大鼠32只,体重220—250g,4—6月龄,由广西医科大学动物实验中心提供,动物合格证号:SYKX桂2015-003。空调控制动物房(SPF级)温度在22℃左右,保证其正常的昼夜节律,避免强光和噪音的刺激,大鼠自由饮水和进食。采用随机数字表法,将32只SD大鼠随机分为4组,每组8只,C组:不做任何处理;SNI组:仅接受SNI手术;Sham组:在制作SNI手术基

础上,待机械痛阈值(pain mechanical withdrawal threshold, PMWT)稳定后,解剖暴露背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)进行脉冲射频神经刺激定位,确定射频针刺刺激定位于L4-5神经支配区域,但不实施脉冲射频治疗;PRF组:是在模型大鼠接受SNI手术PMWT稳定后,解剖暴露DRG,进行脉冲射频定位L4-5神经支配区域,并给予脉冲射频治疗。

1.2 实验试剂与仪器

bcl-2、caspase-3单克隆抗体(英国Abcam公司)、TRIzol(日本Takara公司)、反转录试剂盒(日本Takara公司)、PCR试剂盒与引物(日本Takara公司)、GADPH多克隆抗体(美国Cell Signaling Technology公司)和辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG(美国Proteintech Group公司);VATION-50N神经射频治疗仪(四川锦江电子科技有限公司)、MK3型酶标仪(赛默飞仪器有限公司)、德国Effendorf 5810R离心机、Von Frey纤维丝测痛仪(上海玉研科学仪器有限公司)等。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型制作:根据参考文献[3—4]制作SNI大鼠模型:10%水合氯醛400mg/kg腹腔注射麻醉,术侧剪毛消毒,以大鼠右后肢背侧为切开入路,钝性分离肌肉,暴露坐骨神经主干及其各分支包括:胫神经、腓总神经和腓肠神经,用5.0号丝线轻度结扎胫神经和腓总神经,结扎强度以引起小腿肌肉轻度颤动为宜,并在距结扎处远端2—4mm的位置将神经剪断,术中避免接触或牵拉腓肠神经,保持其完整,同时避免损伤腓肠神经伴行的动脉,结扎完成后依次缝合筋膜和皮肤,术后按照术前的饲养方法处理。

1.3.2 机械痛阈测定:根据参考文献[4],制模前0天(D0),制模后1(D1)、4(D2)、7(D3)、10天(T0),PRF治疗前0天(制模后第10天,T0)、治疗后6(T1)、12(T2)、24(T3)、36(T4)、48(T5)天分别测定四组大鼠PMWT。本部分操作由2人组成,分别为检测的操作人员和疼痛刺激的评价与记录人员。选用Von Frey各型号丝,垂直刺激大鼠术侧后爪内侧

皮肤,用力轻柔,待针弯曲成角,持续1.5s,结束刺激。选择(0.4、0.6、1.0、1.4、2.0、4.0、6.0、8.0、10、15)g的力度刺激,最初用2.0g的力度刺激,若没有缩足反应,则选择其上的一个力度4.0g刺激;若有缩足反应,则选择其下的一个力度1.4g刺激。依此类推若需要使用的力度超过15g或低于0.4g,该阈值则直接记为15g或0.4g。每一个力度测5次,在出现有缩足反应3次及以上,取此过程中的最大力值读数记为机械痛阈值。重复测量3次,记录刺激的机械力度,取平均值。每次测试至少间隔5min。

1.3.3 PRF治疗:根据参考文献[4],将大鼠麻醉后对其背部和腹部除毛,然后碘伏消毒,消毒液自然干燥后,在腹部贴上电极片。再将大鼠俯卧固定,腹下置入热水袋垫高腹部并保持体温恒定,定位在背侧脊柱下段探及髂结节,大鼠的L6节段与之平齐,大鼠L5-L6间隙平齐髂结节上间隙,正中或脊柱旁切开背部皮肤,弯钳夹住棘突上提以便操作,钝性分离术侧脊柱周围肌肉,暴露关节突,关节突后下方即椎间孔,将射频针探入椎间孔内,以出现神经刺激症状,如肌颤、蹬腿或甩尾为指征,固定射频针后施放PRF,(治疗参数为频率2Hz,脉冲时长20ms,温度42℃,持续时间120s)之后妥善缝合。而假PRF组同样将大鼠麻醉后固定,按前面的方法将射频针置入椎间孔后,不实施PRF治疗,持续时间120s,之后妥善缝合。

1.3.4 TUNEL法分析:参照文献[8],腹腔注射10%的水合氯醛350mg/kg麻醉大鼠,经心脏快速灌入含4%多聚甲醛,待大鼠身体及尾变硬后灌注结束将脊髓取出。然后参照试剂盒说明书染色,棕褐色为凋亡神经细胞。应用全自动图像分析系统进行分析,每张切片随机选取5个高倍视野,记录并统计镜下凋亡细胞数量。

1.3.5 Western Blot分析:在PRF治疗前0天,治疗后48天分别随机取出4只大鼠麻醉处死,迅速分离脊髓L4-L6节段,液氮速冻30min后转移至-80℃冰箱保存。取出冻存标本,使用组织裂解液后置于冰盒后进行超声匀浆,12000r/min离心后取上清液,使用BCA标准蛋白测定法测定并记录各组总蛋白浓度。加上样缓冲液后沸水浴5min,使用聚丙烯酰胺凝胶电泳法PVDF转膜,5%的脱脂奶粉封闭2h,TBST漂洗后加入一抗,4℃摇床过夜,二抗37℃2h。在Im-

age Lab系统下成像并计算目的条带灰度值,以GAPDH为上样量的内参,计算目的蛋白/GAPDH比值为目的蛋白相对表达量。

1.4 统计学分析

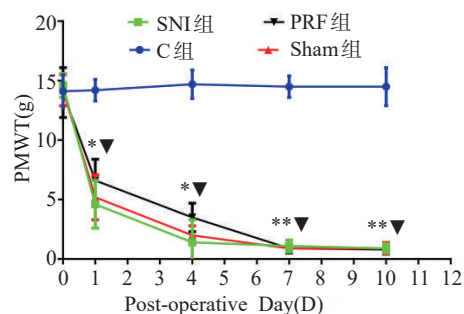
采用SPSS13.0统计软件对数据进行处理,计量资料以均数±标准差表示,两组间不同时间组间比较采用重复测量方差分析,如数据不满足球形假设,则采用Greenhouse-Geisser法进行校正,两两比较采用LSD-*t*检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 机械痛阈检测结果

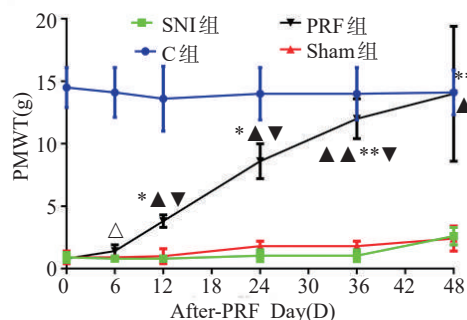
接受坐骨神经分支损伤手术对受试大鼠的痛觉影响见图1—2。第一天开始,与C组比较,SNI组、Sham组与PRF组PMWT出现显著性阈值降低($P < 0.05$),表现为痛觉敏化,在第7—10天阈值趋于稳定;PRF治疗对受试大鼠的痛觉影响见图2。与SNI组与Sham组比较,PRF治疗后第12天开始阈值逐渐显著性增加($P < 0.05$)。

图1 SNI模型手术后每组受试大鼠机械痛阈值变化



与C组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,与前一时刻比较,▼ $P < 0.05$

图2 PRF治疗后各组大鼠机械痛阈值变化



与Sham组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,△ $P > 0.05$;与SNI组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$,△ $P > 0.05$,与前一时间点比较,▼ $P < 0.05$

2.2 TUNEL法凋亡检测结果

各组大鼠脊髓细胞凋亡染色与细胞计数统计结果见图3—6。坐骨神经分支手术后第10天(T0时刻),未进行手术干预的健康对照组有少量凋亡细胞。与C组比较,经过手术处理的SNI组、Sham组及PRF组脊髓细胞均可看见大量的凋亡细胞,差异有显著性($P < 0.01$);在PRF治疗48天后(T5时刻),C组凋亡细胞数量显著低于SNI组、Sham组及PRF组($P < 0.01$),PRF组凋亡细胞数量则显著低于SNI组和Sham组($P < 0.05$)。SNI组和Sham组比较,凋亡细胞数量无显著性差异($P > 0.05$)。

2.3 脊髓bcl-2与caspase-3表达结果

蛋白检测结果见图7—10。坐骨神经分支损伤手术后第10天(T0时刻),C组表达少量的bcl-2,与C组比较,SNI组、Sham组及PRF组的脊髓bcl-2显著性增加($P < 0.01$)。C组仅表达少量的caspase-3,与C组比较,SNI组、Sham组及PRF组脊髓caspase-3表达显著性增加($P < 0.01$);T5时刻,经过PRF治疗处理的PRF组脊髓bcl-2表达量较SNI组增加,差异具有显著性意义($P < 0.01$)。同时,经过PRF治疗处理的PRF组脊髓caspase-3表达量较SNI组降低,差异具有显著性意义($P < 0.01$)。

图3 TUNEL法检测术后T0时刻各组大鼠脊髓细胞凋亡情况

($\times 400$)

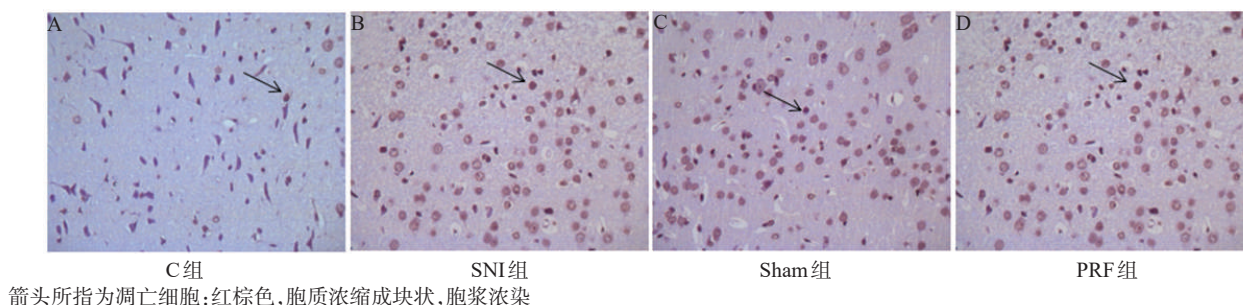


图4 TUNEL法检测PRF治疗后T5时刻各组大鼠脊髓细胞凋亡情况

($\times 400$)

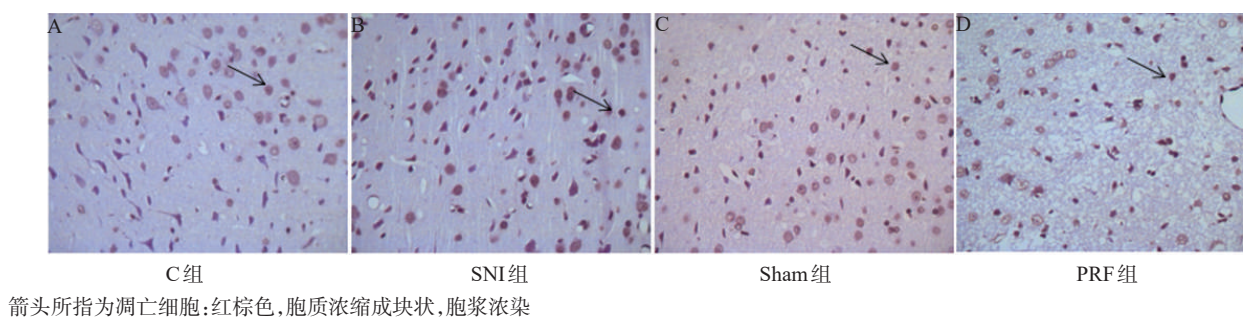
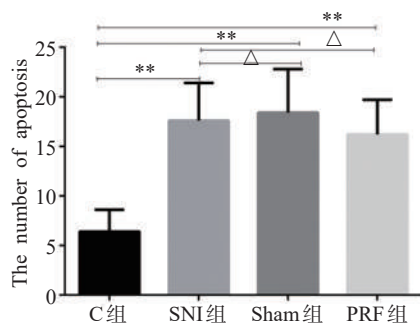
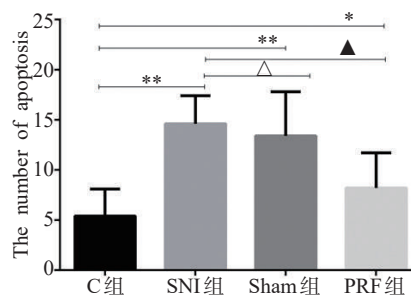


图5 SNI模型手术后T0时刻每组受试大鼠脊髓细胞凋亡比较



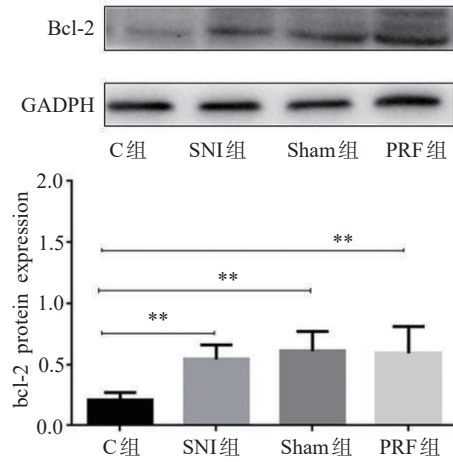
与C组比较, ** $P < 0.01$; 与SNI组比较, $\Delta P > 0.05$

图6 PRF治疗后T5时刻各组受试大鼠脊髓细胞凋亡比较



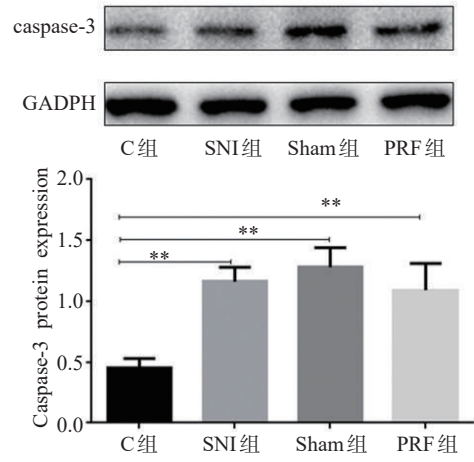
与C组比较, ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$, 与SNI组比较, $\Delta P > 0.05$; $\blacktriangle P < 0.05$

图7 T0时刻,bcl-2的Western Blot示意图及bcl2/GAPDH结果分析图



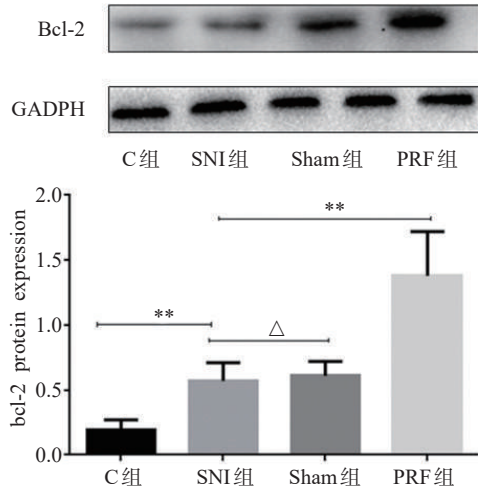
与C组比较, ** $P < 0.01$

图8 T0时刻,caspase-3的Western Blot示意图及caspase-3/GAPDH结果分析图



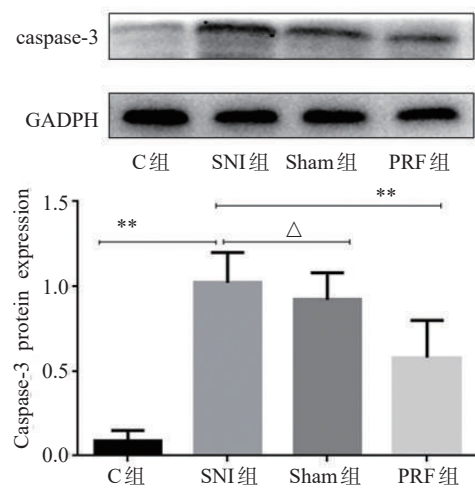
与C组比较, ** $P < 0.01$

图9 T5时刻,bcl-2的Western Blot示意图及bcl2/GAPDH结果分析图



与SNI组比较, ** $P < 0.01$, $\Delta P > 0.05$

图10 T5时刻,caspase-3的Western Blot示意图及caspase-3/GAPDH结果分析图



与SNI组比较, ** $P < 0.01$, $\Delta P > 0.05$

3 讨论

本研究 TUNEL 实验表明,使用坐骨神经分支损伤手术可以诱导模型大鼠脊髓细胞凋亡,而 PRF 可显著降低因疼痛导致的脊髓神经细胞凋亡。机械痛阈值检测表明,PRF 通过作用于 DRG 能显著性降低 SNI 痛觉过敏,在治疗后 48 天左右接近正常痛阈值范围。而 Western Blot 结果提示,PRF 可能是通过诱导抗凋亡蛋白 bcl-2、抑制促凋亡蛋白 caspase-3 的表达而改善疼痛状态。

SNI 模型是一类能较好模拟临床神经病理性疼痛的动物模型^[9]。脊髓作为疼痛信号的中枢,参与伤害性感觉的初级整合^[10]。当疼痛刺激信号传入脊髓中枢,伤害性信号刺激神经细胞内级联反应,激活多条信号通路将信息传导至细胞核,细胞核内 cAMP 与 ERK(细胞外信号调节激酶)调控 cAMP 效应元件^[11],激活 MAPK 信号通路^[12],其中 p38MAPK 可诱导抗凋亡蛋白 bcl-2 磷酸化后失活,线粒体内细胞色素 C 释放,激活 caspase-3^[13],诱导脊髓细胞凋

亡。表现为脊髓背角抑制性中间能神经元数量减少,GABA-谷氨酸盐-谷氨酰胺循环平衡被打破,细胞膜上钾离子电流调节失衡,静息电位将不能维持,伤害性神经元的兴奋性随之增加,诱导痛觉敏化^[14]。反之,强烈的伤害性刺激会导致脊髓背角伤害性神经元的凋亡增加。因此,阻断细胞凋亡路径是保护脊髓神经元、减少痛觉中枢敏化的重要方式。脉冲射频是近年来疼痛治疗兴起的新技术。研究证实,临床治疗参数(42℃、2Hz、120s)下,治疗侧DRG神经元的凋亡细胞数量并没有较未治疗侧增加^[15],但急性期对有髓神经纤维存在髓鞘的破坏^[16],显微镜下线粒体的膜破损,形态学改变,微管微丝解体^[17],同时伴有新髓鞘形成^[18],提示这是一个可逆性病变。PRF治疗过程并不直接作用于脊髓组织,但可下调脊髓背角细胞JNK基因^[19]。JNK信号转导通路是MAPK通路的一重要分支,参与细胞的生殖、凋亡等。在本研究中,治疗前的SNI模型大鼠表现为抗凋亡基因bcl-2与促凋亡基因caspase-3均显著性增加,但凋亡程度与促凋亡基因增强程度趋势一致。经PRF治疗后,诱导脊髓bcl-2高表达、抑制caspase-3,这可能与PRF抑制凋亡信号上游通路JNK基因相关。

综上,慢性疼痛可以诱导脊髓组织细胞凋亡,在我们观察的48天内,经过PRF治疗后可以较好的改善大鼠疼痛程度,有效地抑制了促凋亡基因caspase-3、诱导了抗凋亡基因bcl-2的表达。因此,我们认为,PRF可能通过抑制脊髓神经细胞凋亡对SNI模型大鼠产生良好的镇痛作用。但参与脊髓信号处理的神经细胞种类繁多,而PRF影响的具体神经细胞类型仍需要我们进一步探究。

参考文献

- [1] Polgar E, Hughes DI, Arham AZ, et al. Loss of neurons from laminae I-III of the spinal dorsal horn is not required for development of tactile allodynia in the spared nerve injury model of neuropathic pain[J]. *J Neurosci*, 2005,25(28):6658—6666.
- [2] 吴飞翔,葛彦虎,缪雪蓉,等. N-乙酰半胱氨酸对大鼠神经元凋亡及神经病理性疼痛的影响[J]. *上海医学*, 2009,(6):494—497.
- [3] 吕时甲, 窦智, 蒋宗滨, 等. 脉冲射频对坐骨神经分支损伤模型大鼠机械痛阈的影响[J]. *实用疼痛学杂志*, 2014,10(5):329—333.
- [4] 李燕尧,张爱民,蒋宗滨,等. 脉冲射频对保留性神经损伤大鼠Nav1.8 mRNA表达的影响[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2015,12:903—907.
- [5] Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain[J]. *Pain*, 2000,87(2):149—158.
- [6] Lewis A, Hayashi T, Su TP, et al. Bcl-2 family in inter-organellar modulation of calcium signaling; roles in bioenergetics and cell survival[J]. *Journal of Bioenergetics & Biomembranes*, 2014, 46(1):1.
- [7] Fujita T, Yoshimoto T, Matsuda S, et al. Interleukin-8 induces DNA synthesis, migration and down-regulation of cleaved caspase-3 in cultured human gingival epithelial cells[J]. *Journal of Periodontal Research*, 2015, 50(4):479—485.
- [8] Chen SR, Pan HL. Effect of systemic and intrathecal gabapentin on allodynia in a new rat model of postherpetic neuralgia[J]. *Brain Research*, 2005,1042(1):108—113.
- [9] 金小高,罗爱林,张广雄. 三种大鼠神经病理性疼痛模型的制备和效果比较[J]. *临床麻醉学杂志*, 2005,05:338—340.
- [10] Wu SX, Wang W, Li H, et al. The synaptic connectivity that underlies the noxious transmission and modulation within the superficial dorsal horn of the spinal cord[J]. *Progress in Neurobiology*, 2010,91(1):38—54.
- [11] Garrido-Suarez BB, Garrido G, Delgado R, et al. A *Mangifera indica* L. extract could be used to treat neuropathic pain and implication of mangiferin[J]. *Molecules*, 2010,15(12):9035—9045.
- [12] Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, et al. Cellular and molecular mechanisms of pain[J]. *Cell*, 2009,139(2):267—284.
- [13] Chen NF, Chen WF, Sung CS, et al. Contributions of p38 and ERK to the antinociceptive effects of TGF- β 1 in chronic constriction injury-induced neuropathic rats[J]. *J Headache Pain*, 2016,17(1):72.
- [14] Moore KA, Kohno T, Karchewski LA, et al. Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2002,22(15):6724—6731.
- [15] Arons M, Pilmane M, Vasilevskis E, et al. Morphological changes in the lumbar dorsal root ganglion of the domestic porcine after pulsed radiofrequency stimulation[J]. *Anestezilogia I Reanimatologija*, 2013,(4):26—30.
- [16] Protasoni M, Reguzzoni M, Sangiorgi S, et al. Pulsed radiofrequency effects on the lumbar ganglion of the rat dorsal root: a morphological light and transmission electron microscopy study at acute stage[J]. *European Spine Journal*, 2009,18(4):473—478.
- [17] Erdine S, Bilir A, Cosman ER, et al. Ultrastructural changes in axons following exposure to pulsed radiofrequency fields[J]. *Pain Practice*, 2009,9(6):407—417.
- [18] Park CH, Lee YW, Kim YC, et al. Treatment experience of pulsed radiofrequency under ultrasound guided to the trapezius muscle at myofascial pain syndrome - a case report[J]. *The Korean Journal of Pain*, 2012,25(1):52—54.
- [19] Chen KH, Yang CH, Juang SE, et al. Pulsed radiofrequency reduced complete Freund's adjuvant-induced mechanical hyperalgesia via the spinal c-Jun N-terminal kinase pathway[J]. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2014,34(2):195—203.