

脉冲射频干预 LDH 致慢性后肢痛大鼠影响脊髓炎症因子差异表达

杨佳昊¹ 罗双¹ 刘璐莎¹ 罗海平² 李碧慧¹ 唐顺胜³ 王忠良¹

(1.长沙医学院 湖南长沙 410219; 2.邵阳市隆回县中医医院 湖南邵阳 422200;)

(3 广东黄埔卫生职业技术学校 广东广州 510720)

摘要:目的 研究脉冲射频干预 LDH 致慢性后肢痛大鼠的脊髓炎症因子差异表达。方法取健康成年 SD 大鼠 180 只,雌雄各半,体重 250-280g 进行造模。造模成功后根据低频电子脉冲电流刺激对椎间盘 NPCs 细胞干预情况分为刺激组和未刺激组,比较两组大鼠 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、PLA2、SP、PGE2 含量指标含量。结果刺激组大鼠促炎因子 IL-1 β (10.14 \pm 1.29)、TNF- α (84.49 \pm 7.22)、IL-6 (4.75 \pm 0.59) 含量显著低于未刺激组大鼠 (14.33 \pm 2.04)、(109.04 \pm 8.71)、(5.63 \pm 0.72), 刺激组大鼠 PLA2 活性 (261.74 \pm 18.15)、SP (391.24 \pm 26.89)、PGE2 (33.51 \pm 4.26) 含量显著低于未刺激组大鼠 (307.25 \pm 21.30)、(502.74 \pm 54.15)、(50.16 \pm 5.04), 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论脉冲射频干预能有效降低大鼠中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 炎症因子和 PLA2、PGE2、SP 疼痛介质含量,从而改善大鼠慢性炎性疼痛。

关键词: 腰椎间盘突出症; 微电流刺激; 脊髓炎症因子; 大鼠

腰椎间盘突出症 (Lumbar disc herniation, LDH) 是各类椎间盘退变 (Intervertebral disc degeneration, IVDD) 疾病中最常见的一种,其发病率居高不下且与劳作方式有关,是严重影响人群劳动能力的“社会疾病”^[1]。椎间盘细胞功能异常是 LDH 发生的主要病理机制,同时其细胞基质往往存在严重的代谢紊乱,这种代谢组学的特征性改变依然与部分信号通路异常激活有关。生物反馈功能性电刺激疗法广泛应用于临床退变性疾病的治疗,尤其适用于肌功能退变疾病,也被证实能显著改善 LDH 患者临床症状,因此微电流持续作用于椎间盘局部可能会影响椎间盘细胞的增殖或凋亡过程^[2]。本研究以 LDH 模型大鼠为例,施予生物反馈电刺激治疗,了解微电流施加前后对椎间盘细胞各效应指标表达的具体影响,从而为低频电子脉冲电流刺激等相关疗法用于腰椎间盘突出症治疗提供理论基础,并探究微电流影响信号通路,改变椎间盘细胞基质代谢,影响椎间盘细胞增殖或凋亡过程,最终引发 LDH 疾病的可能机制。

1 对象与方法

1.1 研究对象:由长沙医学院动物实验中心提供 (清洁级) 健康成年 SD 大鼠 180 只,雌雄各半,体重 250-280g。分笼饲养于湖南中医药大学动物中心实验室,饲养温度 24-26 $^{\circ}$ C,湿度 50.0-65.0%。

1.2 分组方法:造模方法参照陆志东等的造模方法,进行 LDH 大鼠模型设计,其制作方法具体如下:大鼠适应 3 天,称重大鼠,随之腹腔注射 1 mL/100g 体重的剂量戊巴比妥钠进行麻醉,麻醉成功后,将大鼠体位摆俯卧位,用剃毛机剃除大鼠背部以及鼠尾近根部毛发,碘伏仔细消毒手术区域并铺巾。以大鼠背部 L4-6 为中心,沿脊柱中线作 3.5cm 左右长度切口,切开皮肤,分离表面软组织与左侧腰部肌肉,暴露左侧 L5 和 L6 椎板,咬除部分椎板,暴露神经根。再取鼠尾近根处两节髓核组织移植到原先暴露的神经根处,止血后仔细缝合伤口 (L4-6 定位方法采用体表标志定位,大鼠髂棘连线与脊柱纵轴的交点为 L4-5 椎间隙平面)。①刺激组 (低频电子脉冲电流刺激):通过 BME-P500 脉冲电刺激仪对大鼠椎间盘 NPCs 细胞进行干预。②未刺激组 (常规培养):不对大鼠椎间盘 NPCs 细胞进行干预。

1.3 椎间盘 NPCs 细胞的提取和培养:①将造模成功的大鼠麻

醉后脱颈处死,使用剪刀从尾根部向尾尖部获得 6-8 个节段的尾椎骨。用手术刀切开椎间盘的纤维环以获得正常的大鼠髓核 (Nucleus pulposus, NP) 组织。将 NP 组织切成小块 (体积 1mm³),加入 4mL 的 I 型胶原酶 (0.2%),轻轻摇动组织并在 37 $^{\circ}$ C 条件下消化 1-2 h,然后经过滤器 (70 μ m) 过滤。②椎间盘 NPCs 细胞的培养:收集大鼠 NPCs 后,接种到培养瓶中,用培养液 (含 10%胎牛血清 HAMF-12) 冲洗 3 次,用 DMEMF12 培养基 (含 20%胎牛血清) 在特定环境 (5%CO₂、37 $^{\circ}$ C) 下培养。细胞融合为单层时用 0.25%胰蛋白酶消化传代。

1.4 数据收集:培养 48 h 后,以 ELISA 法检测髓核细胞中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、PLA2、SP、PGE2 含量。

1.5 统计分析:所得数据利用 SPSS20.0 统计学软件处理,对计量数据变量进行正态性和方差齐性检验,数据采用均数 \pm 标准差表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组大鼠背根神经节中促炎因子含量比较

两组大鼠背根神经节中促炎因子含量比较,刺激组大鼠 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 含量显著低于未刺激组大鼠 ($P < 0.05$)。具体见表 1。

表 1 两组大鼠背根神经节中促炎因子含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | IL-1 β (pg/mL) | TNF- α (ng/g) | IL-6 (ng/g) |
|-------------|----------------------|----------------------|-----------------|
| 刺激组 (n=90) | 10.14 \pm 1.29 | 84.49 \pm 7.22 | 4.75 \pm 0.59 |
| 未刺激组 (n=90) | 14.33 \pm 2.04 | 109.04 \pm 8.71 | 5.63 \pm 0.72 |
| F | 16.468 | 20.586 | 8.968 |
| P | <0.05 | <0.05 | <0.05 |

2.2 两组大鼠背根神经节中疼痛介质含量比较

两组大鼠背根神经节中疼痛介质含量比较,刺激组大鼠 PLA2 活性、SP、PGE2 含量显著低于未刺激组大鼠 ($P < 0.05$)。具体见表 2。

表 2 两组大鼠背根神经节中疼痛介质含量比较

| 组别 | PLA2 活性 | SP (ng/g) | PGE2 (ng/g) |
|-------------|--------------------|--------------------|------------------|
| 刺激组 (n=90) | 261.74 \pm 18.15 | 391.24 \pm 26.89 | 33.51 \pm 4.26 |
| 未刺激组 (n=90) | 307.25 \pm 21.30 | 502.74 \pm 54.15 | 50.16 \pm 5.04 |

| | | | |
|---|--------|--------|--------|
| F | 15.428 | 17.495 | 23.935 |
| P | <0.05 | <0.05 | <0.05 |

3 讨论

腰椎间盘突出症是椎间盘变性、纤维环破裂、髓核组织突出等因素导致神经根持续受压或刺激而引起的综合征,其临床症状显著且呈进行性发展而备受临床医师关注。LDH患者基数庞大、临床疗法多种多样,但其病因机制仍无定论。LDH高发与损伤因素、诱发因素、解剖因素、遗传因素均有不同程度的关联,如肥胖、职业类型、固定姿势持续劳动、腰椎负荷过载均是LDH的主要危险因素,而除不良工作姿势等职业因素,居住环境潮湿、辛辣食物嗜好、长期空调环境、睡床硬度软等生活行为方式也是影响LDH高发的因素。椎间盘是机体位于相邻两个椎体之间的最大无血管组织,其由3部分(髓核、终板软骨、纤维环)组成。髓核组织呈胶冻状,而细胞外基质中混杂着不规则的I型、II型胶原纤维,角化蛋白等其他成分偏少。健康的髓核是一种凝胶状、高度水合的组织,这些带负电荷的成分使髓核具有高亲水性和保水特性,为其传递脊柱负荷提供了生物学基础^[1]。髓核水合能力下降,水分的减少导致椎间盘内压力失衡,纤维环发生变形,甚至破裂、突出,可对神经产生压迫,并引发相应的临床症状^[2]。

LDH外周炎性损伤发生后,随着损伤的持续脊髓中炎性细胞因子产生中枢敏化,导致患者出现慢性炎性痛,脊髓神经免疫反应过程中,机体胶质细胞激活后会产生包括促炎性细胞因子等多种细胞因子,当机体中细胞因子表达失衡时,会促使中枢神经系统免疫应答紊乱,产生脊髓神经炎症,导致慢性炎性痛的形成,现有研究表明促炎因子在慢性炎性痛的形成和进展上有重大作用,其中以TNF- α 、IL-1 β 和IL-6对慢性炎性痛的影响最为广泛。白介素-1 β 是一种由巨噬细胞和有核细胞分泌的受体激动剂,能和IL-1R受体结合后参与机体炎症反应、免疫应答等活动。当机体神经受损后神经元细胞和脊髓的胶质细胞会大量分泌IL-1 β ,导致其表达量增加。还有研究表明IL-1 β 可通过与TRPV1、IL-1R受体结合来调节疼痛感受器,另一方面也可通过提高前列腺素合成间接刺激疼痛感受器降低疼痛阈值。本研究显示造模后大鼠IL-1 β 表达显著升高,刺激组大鼠IL-1 β 表达低于未刺激组大鼠,表明脉冲射频可降低IL-1 β 的,从而改善慢性炎性疼痛。肿瘤坏死因子- α 是一种由巨噬细胞分泌的肿瘤坏死因子,能参与机体细胞功能、炎症和免疫应答的调节,在神经组织受损时表达水平迅速增加。研究表明,TNF- α 能刺激机体P35表达增加,P35能通过与CDK5通路的TRPV1磷酸化,增加钙离子涌入伤害性神经元产生疼痛感。在受损神经节中TNF- α 与其受体结合能激活细胞核因子- κ B(NF- κ B),对其他炎性因子产生影响,本研究显示刺激组大鼠TNF- α 表达低于未刺激组大鼠,证明TNF- α 能调节慢性炎性疼痛,可以改善大鼠的痛敏效应。白介素-6广泛参与机体炎症反应和免疫反应,主要由TNF- α 、IL-1 β 、病毒感染等诱导正常细胞产生,IL-6在慢性炎性疼痛中起重要作用,IL-6与其受体sIL-6R通过Jak/PKC依赖性信号

通路作用于感觉神经元以增加其伤害性刺激的敏感性。诸多研究发现IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子能促使机体合成直接致痛因子和聚集炎症细胞,影响局部微循环,从而刺激机体产生疼痛症状^[4]。

PLA2能在将膜脂上糖磷脂的2位酯基水解成花生四烯酸的基础上进一步降解产生白三烯等具有致痛作用的花生酸代谢产物,在此反应过程中,PLA2作为一种限速酶具有强烈的致痛作用,LDH患者的核髓组织中PLA2活性水平和患者疼痛程度呈正相关,PGE2作为花生四烯酸代谢的产物,能刺激神经纤维使其异常放电从而导致坐骨神经痛,SP是一种由背根神经节合成释放的神经性多肽,广泛分布于神经纤维内且全程参与疼痛的产生,一方面可以增加血管的通透性促使炎症反应,另一方面能刺激相关细胞释放其他炎性因子,改变伤害感受器的敏感性,使机体疼痛感增加^[5]。本研究显示未刺激组大鼠PLA2、PGE2、SP含量均显著低于刺激组大鼠,说明PLA2、PGE2、SP参与了腰椎间盘突出过程,脉冲射频干预有效的降低该指标含量,从而改善大鼠慢性炎性疼痛。

本实验通过观察脉冲射频干预腰椎间盘突出大鼠后两组大鼠IL-1 β 、IL-6、TNF- α 炎症因子和PLA2、PGE2、SP疼痛介质的含量变化,表明脉冲射频干预能有效降低大鼠中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 炎症因子和PLA2、PGE2、SP疼痛介质含量,从而改善大鼠慢性炎性疼痛。

参考文献:

- [1]张佳铭,路文杰,陈金鑫等.颈椎间盘突出症中炎性因子及信号通路的研究进展[J].脊柱外科杂志,2022,20(1):63-68.
 - [2]韩玺铭,朱兵兵,刘凤霞等.腰椎间盘突出退变与血糖、血脂、白介素-6、降钙素原的相关性分析[J].医学信息,2022,35(2):90-93.
 - [3]廖雪英,杜娟,曾兴玲等.椎间孔镜手术治疗腰椎间盘突出症疗效及对患者炎性因子的影响[J].西部医学,2021,33(11):1679-1682.
 - [4]宋甲威,刘芝静.针刺联合运动疗法对腰椎间盘突出症患者镇痛作用、腰椎功能及炎性细胞因子的影响[J].上海针灸杂志,2020,39(8):1073-1077.
 - [5]聂克勤,张忠文,罗刚等.小针刀治疗腰椎间盘突出症及对血清炎性因子、疼痛介质水平的影响[J].颈腰痛杂志,2021,42(1):136-137.
- 作者简介:杨佳昊(2001年12月-),长沙医学院在校学生
 作者简介:罗双、刘璐莎、李碧慧,长沙医学院教师
 通讯作者:罗海平,就职于湖南省隆回县中医医院
 通讯作者:唐顺胜,男,就职于广东黄埔卫生职业技术学院
 通讯作者:王忠良,男,本科,讲师,就职于长沙医学院,主要从事病原生物学实验教学。
- 项目编号:
 1、长沙医学院大学生创新创业训练计划一般项目,长医教[2022]41号-116
 2、湖南省教育厅科学研究项目,湘教通[2021]352号)(编号21C0880、21C0902)