

· 实验研究 ·

脉冲射频治疗对带状疱疹后神经痛模型大鼠脊髓背角自噬的影响

王峰 蒋宗滨 张爱民 兰琪欣 陈婷婷

【摘要】 目的 观察脉冲射频(PRF)治疗对带状疱疹后神经痛(PHN)模型大鼠疼痛的影响,探讨脊髓背角自噬改变的可能作用。方法 雄性SD大鼠60只,体重200~240 g,随机分为五组:空白对照组(Blank组)、溶剂组(Solvent组)、PHN模型组(PHN组)、假治疗组(Sham组)和治疗组(PRF组),每组12只。PHN组、Sham组及PRF组腹腔注射树脂毒素(RTX)0.2 g/kg制备PHN模型。Blank组腹腔注射与PHN组相同体积的生理盐水。Solvent组腹腔注射相同体积的溶剂(10%吐温80、10%乙醇和80%生理盐水)。于制模前2 h、制模后1、4、7、10、14 d、PRF治疗后1、4、7、10、14、21、28、35和42 d测定大鼠机械缩足阈值(MWT)和热缩足潜伏期(TWL)。治疗后第42天处死大鼠,取L₄₋₆脊髓组织,采用Western blot法检测脊髓组织微管相关蛋白轻链Lc3 II和Lc3 I、Beclin-1和P62蛋白含量,计算Lc3 II和Lc3 I比值。RT-qPCR检测Lc3 mRNA和Beclin-1 mRNA的表达量。结果 与Blank组比较,PHN组、Sham组及PRF组RTX处理后大鼠MWT明显降低,TWL明显延长,脊髓组织Lc3 II/Lc3 I蛋白含量比值和Beclin-1蛋白含量明显升高,P62蛋白含量明显降低,Lc3 mRNA和Beclin-1 mRNA表达量明显增加(P 均 <0.05)。与PHN组比较,PRF组大鼠在治疗7 d后MWT明显升高,TWL明显缩短,Lc3 II/Lc3 I蛋白含量比值明显降低,Beclin-1蛋白含量明显降低,P62蛋白含量明显增加,Lc3 mRNA和Beclin-1 mRNA表达量明显降低(P 均 <0.05)。结论 脉冲射频可能通过抑制脊髓背角组织自噬活性,改善线粒体功能,从而对PHN模型大鼠产生镇痛作用。

【关键词】 脉冲射频;带状疱疹后神经痛;脊髓;自噬

Effect of pulsed radiofrequency on autophagy in rat spinal cord in postherpetic neuralgia model

WANG Feng, JIANG Zongbin, ZHANG Aimin, LAN Qixin, CHEN Tingting. Department of Pain Management, the Second Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530007, China

Corresponding author: JIANG Zongbin, Email: jiangzongbin@hotmail.com

【Abstract】 **Objective** To observe the analgesic effect of pulsed radiofrequency (PRF) on postherpetic neuralgia (PHN) model rats, and to explore the role of autophagy activity in spinal dorsal horn. **Methods** Sixty male SD rats were randomly divided into blank control group (group blank), solvent control group (group solvent), model control group (group PHN), sham treatment group (group sham) and treatment group (group PRF), with 12 rats in each group. PHN model was prepared by intraperitoneal injection of resinifratoin (RTX) 0.2 g/kg in groups PHN, sham and PRF. The mechanical withdrawal threshold (MWT) and thermal withdrawal latency (TWL) were measured at 2 hours before and 1, 4, 7, 10 and 14 days after modeling, and 1, 4, 7, 10, 14, 21, 28, 35 and 42 d days after PRF treatment. On the 42th day after treatment, five groups of rats were sacrificed and L₄₋₆ spinal cord tissues were taken. The expression of light chain Lc3 II and Lc3 I, Beclin-1 and P62 in spinal cord tissue was detected by Western blot, and the ratio of Lc3 II to Lc3 I was calculated. The expression of Lc3 mRNA, Beclin-1 mRNA was detected by RT-qPCR, and the ultrastructure of spinal dorsal horn tissue was observed under transmission electron microscopy. **Results** Compared with group blank, the MWT was decreased and the TWL was increased significantly, the ratio of Lc3 II/Lc3 I and the levels of Beclin-1 were increased, whereas the level of P62 protein was decreased significantly after RTX treatment in groups PHN, Sham and PRF (all $P < 0.05$). Meanwhile, the expressions of Lc3 mRNA and Beclin-1 mRNA were significantly higher in groups PHN, Sham and PRF than in group blank (all $P < 0.05$). Compared with group PHN, the MWT was increased and the TWL was decreased significantly, the ratio of Lc3 II/Lc3 I and the levels of Beclin-1 were

DOI: 10.12089/jca.2019.12.016

基金项目:广西自然科学基金(2017GXNSFAA10027)

作者单位:530007 南宁市,广西医科大学第二附属医院疼痛科(王峰、蒋宗滨、张爱民、兰琪欣);广西医科大学基础医学院人体解剖学教研室(陈婷婷)

通信作者:蒋宗滨,Email:jiangzongbin@hotmail.com

decreased, and the level of P62 protein was increased significantly 7 d later, whereas the expressions of Lc3 mRNA and Beclin-1 mRNA were decreased significantly in group PRF (all $P < 0.05$). **Conclusion** PRF can improve the function of mitochondria by inhibiting the autophagy activity of spinal dorsal horn tissue, thus exerting an analgesic effect on PHN model rats.

【Key words】 Pulsed radiofrequency; Postherpetic neuralgia; Spinal cord; Autophagy

带状疱疹后神经痛 (postherpetic neuralgia, PHN) 是水痘-带状疱疹病毒感染爆发后出现的一种神经病理性痛^[1], 通常持续超过 3 个月, 其产生机制较为复杂, 临床治疗效果欠佳。脉冲射频 (pulsed radiofrequency, PRF) 是近年来临床治疗 PHN 的常用方法。有研究表明^[2-3], PRF 可有效缓解神经病理性痛模型大鼠的异常性疼痛和痛觉过敏等症, 但其具体机制尚未明确。Zhang 等^[4] 研究表明, 细胞自噬活性改变可能参与神经病理性痛的发生。张爱民等^[5] 研究表明, PHN 的维持机制可能与脊髓自噬过度激活有关。因此, 调节细胞自噬活性可能成为治疗 PHN 的潜在靶点。但 PRF 在治疗 PHN 中是否通过调节细胞自噬活性发挥治疗功效尚不明确。本研究通过观察 PRF 治疗对 PHN 模型大鼠疼痛行为学的影响, 探讨脊髓背角自噬改变在其中的可能作用。

材料与方法

实验动物与分组 SPF 级健康成年雄性 SD 大鼠 60 只, 体重 200~240 g, 由广西医科大学动物实验中心提供。实验室温度 22~25 °C, 湿度 40%~60%, 周期光照 12 h, 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大鼠随机分为五组, 每组 12 只。

动物模型制备 Blank 组: 腹腔注射与 PHN 组相同体积生理盐水; Solvent 组: 新鲜配制由 10% 吐温 80、10% 乙醇和 80% 生理盐水组成的混合液, 按照 PHN 组相同体积腹腔注射; PHN 组、Sham 组、PRF 组: 参照文献^[6], 将 RTX 溶解于由 10% 吐温 80、10% 乙醇和 80% 生理盐水组成的新鲜混合液中, 浓度为 40 μg/ml, 腹腔注射树脂毒素 (RTX) 0.2 g/kg 构建 PHN 模型, 以出现大鼠机械缩足阈值 (MWT) 降低并热缩足潜伏期 (TWL) 延长为模型构建成功标准; Sham 组: 给予 RTX 腹腔注射后, 待大鼠 MWT 和 TWL 稳定后进行 PRF 穿刺定位, 但不实施 PRF 治疗; PRF 组: 给予 RTX 腹腔注射后, 待大鼠 MWT 和 TWL 稳定后进行 PRF 穿刺定位, 并给予 PRF 治疗; PHN 组: 给予 RTX 腹腔注射后不给予其他任何处理。

PRF 治疗方法^[7] 采用 4% 水合氯醛对大鼠进

行麻醉, 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 L₅₋₆ 间隙平齐髂结节上间隙, 正中或脊柱旁切开背部皮肤, 弯钳钳住棘突上提, 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背神经节内或其附近, 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: 单次, 频率 2 Hz, 脉冲时长 20 ms, 温度 42 °C, 持续时间 120 s, 治疗完成后将射频针移出, 之后妥善缝合。

MWT 和 TWL 的测定 在药物处理前 2 h、药物处理后 1、4、7、10、14 d 及 PRF 治疗后 1、4、7、10、14、21、28、35、42 d 分别使用电子测痛仪对大鼠进行 MWT 测定^[8]。每只大鼠重复测试 3 次, 每次间隔 5 min, 记录 3 次测量的平均值。同时使用热板刺激方法对大鼠进行 TWL 测定^[9]。每只大鼠重复测试 3 次, 每次间隔 10 min, 记录 3 次测量的平均值。

Lc3 II、Lc3 I、Beclin-1 和 P62 蛋白含量测定 在 PRF 治疗后第 42 天将大鼠麻醉处死, 迅速取出脊髓 L₄₋₆ 节段, 液氮速冻 30 min 后转移至 -80 °C 冰箱保存。取出冻存标本, 使用聚丙烯酰胺凝胶电泳法及 PVDF 转膜。在 Image Lab 系统下成像并计算目的条带灰度值, 以 β-actin 为内参, 以目的蛋白/β-actin 比值为目的蛋白相对含量。

基因表达量测定 在 PRF 治疗后第 42 天将大鼠麻醉处死, 取大鼠脊髓背角组织约 30 mg, 进行荧光定量 PCR 检测, β-actin 为内参照, 各引物序列见表 1。采用标准曲线法计算 mRNA 相对表达量, 各细胞因子与 β-actin mRNA 相对表达量的比值为其 mRNA 表达量校正值, 经 2^{-ΔΔCt} 法均一化处理后得其相对表达量。各样本均设 3 个复孔。

超微结构观察 在进行 PRF 治疗第 42 天取大鼠脊髓组织 L₄₋₆ 节段, 放入 2.5% 戊二酸中固定, 经过浸洗、脱水、染色、包埋和切片后, 将超薄切片于透射电镜下观察组织超微结构, 每张切片取 10 个视野, 观察自噬小体数量与线粒体形态。

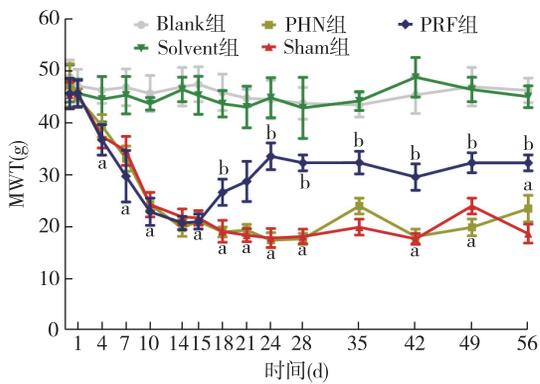
表 1 引物序列

基因	上游引物	下游引物
Lc3	5'-AGTGAAGATGT- CCGGCTCAT-3'	5'-GCTGCTTCTCAC- CCTTGATATCG-3'
Beclin-1	5'-AGCTCAGTACCA- GCCGGAGT-3'	5'-TGGAAGGTGGCA- TTGAAGAC-3'
β -actin	5'-CACGATGGAGGG- GCCGGACTCATC-3'	5'-TAAAGACCTCTA- TGCCAACACAGT-3'

统计分析 采用 SPSS 16.0 软件进行分析。正态分布计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组内比较采用重复测量的方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

MWT 与 Blank 组比较,RTX 处理 4 d 后 PHN 组、Sham 组和 PRF 组大鼠各时点 MWT 明显降低($P<0.05$);与 PHN 组比较,PRF 组大鼠 PRF 治疗 7 d 后 MWT 明显升高($P<0.05$)(图 1)。



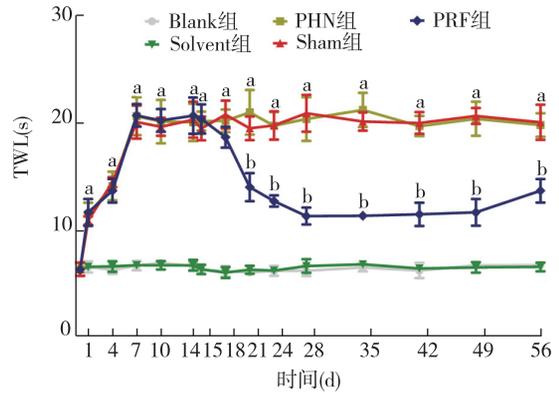
注:与 Blank 组比较,^a $P<0.05$;与 PHN 组比较,^b $P<0.05$

图 1 五组大鼠 MWT 的比较

TWL 与 Blank 组比较,RTX 处理后 PHN 组、Sham 组和 PRF 组大鼠各时点 TWL 明显延长($P<0.05$);与 PHN 组比较,PRF 组大鼠 PRF 治疗后各时点 TWL 明显缩短($P<0.05$)(图 2)。

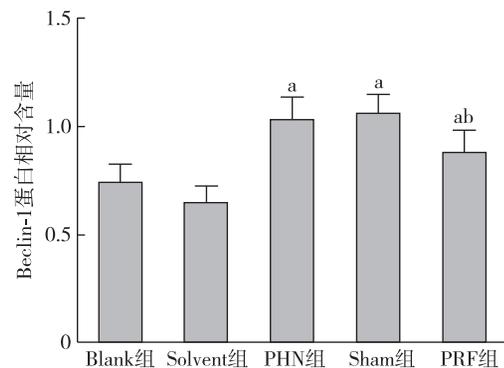
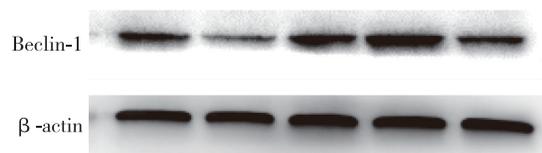
脊髓背角 Lc3 II、Lc3 I、Beclin-1 和 P62 蛋白含量 与 Blank 组比较,PHN 组、sham 组和 PRF 组大鼠脊髓背角 Lc3 II/Lc3 I 比值明显增加,Beclin-1 蛋白含量明显增加,P62 蛋白含量明显降低($P<0.05$);与 PHN 组比较,PRF 组大鼠脊髓背角 Lc3 II/Lc3 I 比值明显降低,Beclin-1 蛋白含量明显降低,P62 蛋白含量明显增加($P<0.05$)(图 3—5)。

脊髓背角 Lc3 mRNA 和 Beclin-1 mRNA 的表达



注:与 Blank 组比较,^a $P<0.05$;与 PHN 组比较,^b $P<0.05$

图 2 五组大鼠 TWL 的比较



注:与 Blank 组比较,^a $P<0.05$;与 PHN 组比较,^b $P<0.05$

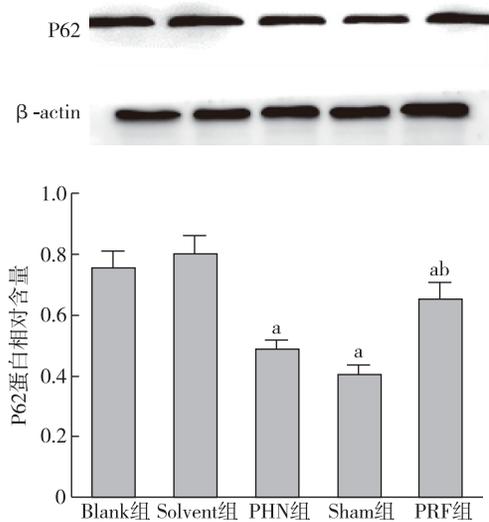
图 3 五组大鼠脊髓背角 Beclin-1 蛋白含量的比较

量 与 Blank 组比较,PHN 组、Sham 组和 PRF 组大鼠脊髓背角 Lc3 mRNA 和 Beclin-1 mRNA 表达量明显增加($P<0.05$);与 PHN 组比较,PRF 组大鼠脊髓背角 Lc3 mRNA 和 Beclin-1 mRNA 表达量明显降低($P<0.05$)(图 6—7)。

脊髓背角超微结构变化 Blank 组大鼠脊髓背角细胞结构完整,未见明显自噬小体,线粒体结构良好;PHN 组大鼠脊髓背角出现较多完整自噬小体双膜结构,线粒体肿胀、空泡变性和极消失等现象明显,少数出现与溶酶体融合;PRF 组大鼠脊髓背角少见自噬小体双膜结构,线粒体偶见轻微肿胀和空泡变性,未见极消失和与溶酶体融合。

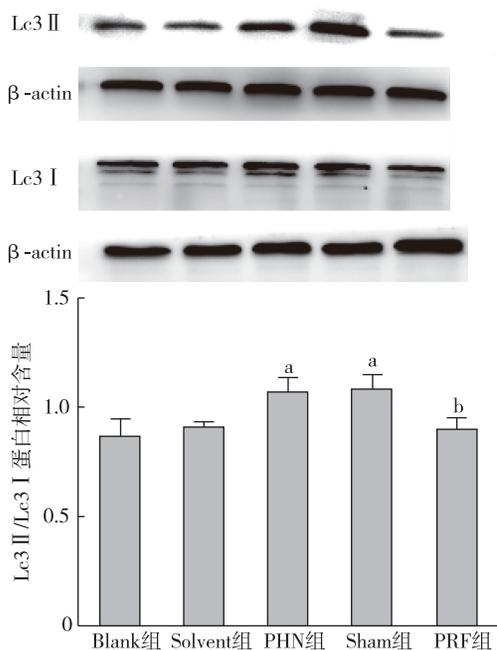
讨 论

RTX 是辣椒素 (capsaicin) 的超能类似物^[10]。



注:与 Blank 组比较,^a $P < 0.05$;与 PHN 组比较,^b $P < 0.05$

图 4 五组大鼠脊髓背角 P62 蛋白含量的比较

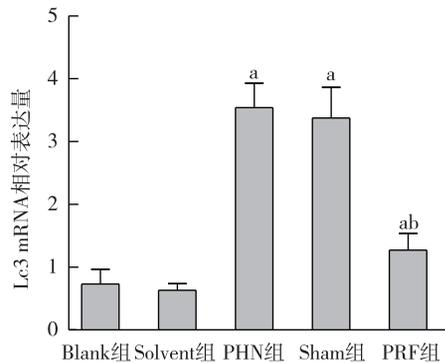


注:与 Blank 组比较,^a $P < 0.05$;与 PHN 组比较,^b $P < 0.05$

图 5 五组大鼠脊髓背角 Lc3 II/Lc3 I 蛋白含量的比较

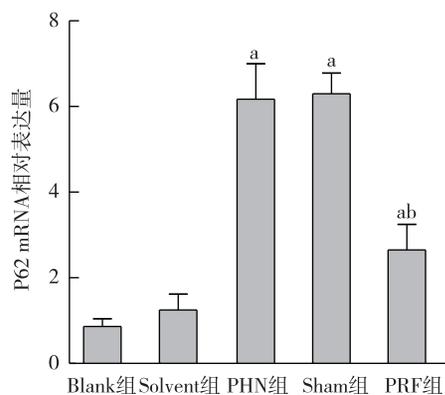
有研究表明^[11-12], RTX 处理成年大鼠将出现与 PHN 临床表现极为相似的症状(热痛阈升高,机械痛阈降低),其机制可能通过消耗无髓鞘传入神经元降低热痛敏感性,以及通过损伤有髓鞘传入纤维和促使有髓鞘传入纤维在脊髓背角椎板 II 层中的异常发育诱导触觉异常性疼痛,是研究 PHN 的一种较为理想的动物模型。

自噬可通过与溶酶体融合清除受损蛋白质和线粒体,促进细胞组份再利用和能量保存^[13]。水溶



注:与 Blank 组比较,^a $P < 0.05$;与 PHN 组比较,^b $P < 0.05$

图 6 五组大鼠脊髓背角 Lc3 mRNA 相对表达量的比较



注:与 Blank 组比较,^a $P < 0.05$;与 PHN 组比较,^b $P < 0.05$

图 7 五组大鼠脊髓背角 Beclin-1 mRNA 相对表达量的比较

性 Lc3 I 经脂化形成 Lc3 II,聚集于自噬体膜,从而参与自噬-溶酶体的形成^[14]。Lc3 II/Lc3 I 反映了自噬-溶酶体形成程度。Beclin-1 通过活化后参与自噬体膜形成,从而调节姿势水平^[15]。研究表明,细胞内 SQTAM1/P62 的表达与自噬流相关,可反映细胞内自噬活性^[16]。

疼痛行为学结果显示,PRF 后处理对 PHN 模型大鼠发挥镇痛作用,且 PRF 后处理可抑制 PHN 模型大鼠脊髓背角细胞自噬活性,同时对线粒体损伤具有改善作用。在本研究中,PRF 治疗后 PHN 模型大鼠脊髓背角自噬活性改变与大鼠疼痛行为学改变恰呈相反趋势,同时伴有线粒体数目和形态改变,由此可以认为,PRF 可能通过调控脊髓背角自噬活性,改善线粒体损伤,从而参与对 PHN 模型大鼠的镇痛作用机制。

细胞自噬活性改变参与神经病理性痛的产生与进展^[17]。自噬激活参与 PHN 的产生与维持。线粒体自噬作为细胞自噬的重要组成部分,目前研究已知多种途径参与其水平的调节^[18-20]。当细胞线

粒体受到氧化应激等因素刺激后,其膜电位发生去极化等改变,进而激活等信号转导通路,并使其特异性地转移到受损线粒体的外膜表面^[21],继而催化相关蛋白的泛素化,形成线粒体聚集体^[22],通过自噬-溶酶体的降解机制,使得受损线粒体选择性地得以清除^[23]。生理情况下,神经细胞通过线粒体自噬控制蛋白的质量,清除受损的线粒体,进而发挥保护神经细胞的作用^[24]。然而,过度的线粒体自噬将导致细胞线粒体缺陷,影响细胞的正常功能,甚至引起细胞的程序性死亡^[25]。本研究表明,PHN 模型大鼠脊髓背角自噬过度激活,可能通过诱导 GABA 能神经元自噬性凋亡,增加伤害性兴奋神经元的兴奋性,参与中枢敏化。但 PRF 是否通过影响 GABA 能神经元发挥对 PHN 的治疗作用尚未明确。

综上所述,在经过 PRF 治疗后,PHN 模型大鼠疼痛行为学明显改善,同时伴有脊髓背角自噬活性降低以及线粒体数目和形态恢复,自噬活性的降低可能是 PRF 对 PHN 模型大鼠发挥镇痛作用的机制之一。但 PRF 通过何种具体信号转导通路和调控方式调控 PHN 模型动物脊髓背角自噬活性,还有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Unezaki S, Sasaki A, Mabuchi T, et al. Involvement of Tyr1472 phosphorylation of NMDA receptor NR2B subunit in postherpetic neuralgia in model mice. *Mol Pain*, 2012, 8: 59.
- [2] Huang YH, Hou SY, Cheng JK, et al. Pulsed radiofrequency attenuates diabetic neuropathic pain and suppresses formalin-evoked spinal glutamate release in rats. *Int J Med Sci*, 2016, 13(12): 984-991.
- [3] Liu CK, Liao WT, Chu YC, et al. Pulsed radiofrequency attenuates complete Freund's adjuvant-induced epigenetic suppression of potassium chloride cotransporter 2 expression. *Pain Med*, 2017, 18(4): 807-813.
- [4] Zhang E, Yi MH, Ko Y, et al. Expression of LC3 and Beclin 1 in the spinal dorsal horn following spinal nerve ligation-induced neuropathic pain. *Brain Res*, 2013, 1519: 31-39.
- [5] 张爱民, 蒋宗滨, 陈云婷, 等. 脊髓自噬在小鼠带状疱疹后神经痛维持中的作用. *中华麻醉学杂志*, 2017, 37(12): 1477-1481.
- [6] Lei Y, Sun Y, Lu C, et al. Activated glia increased the level of proinflammatory cytokines in a resiniferatoxin-induced neuropathic pain rat model. *Reg Anesth Pain Med*, 2016, 41(6): 744-749.
- [7] 李燕尧. 脉冲射频对坐骨神经分支损伤模型大鼠机械痛阈的影响. *实用疼痛学杂志*, 2014, 10(5): 329-333.
- [8] 徐静, 鲁玉刚, 俞卫锋, 等. 慢性坐骨神经结扎大鼠前扣带皮层对脊髓痛觉信息传递的调节. *临床麻醉学杂志*, 2016, 32(4): 393-397.
- [9] Nakamoto K, Nishinaka T, Sato N, et al. Hypothalamic GPR40 signaling activated by free long chain fatty acids suppresses CFA-induced inflammatory chronic pain. *PLoS One*, 2013, 8(12): e81563.
- [10] Hsieh YL, Chiang H, Lue JH, et al. P2X3-mediated peripheral sensitization of neuropathic pain in resiniferatoxin-induced neuropathy. *Exp Neurol*, 2012, 235(1): 316-325.
- [11] Chen SR, Pan HL. Effect of systemic and intrathecal gabapentin on allodynia in a new rat model of postherpetic neuralgia. *Brain Res*, 2005, 1042(1): 108-113.
- [12] Pan HL, Khan GM, Alloway KD, et al. Resiniferatoxin induces paradoxical changes in thermal and mechanical sensitivities in rats: mechanism of action. *J Neurosci*, 2003, 23(7): 2911-2919.
- [13] Wei H, Wang C, Croce CM, et al. P62/SQSTM1 synergizes with autophagy for tumor growth in vivo. *Genes Dev*, 2014, 28(11): 1204-1206.
- [14] Mizushima N. The role of the Atg1, ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22(2): 132-139.
- [15] Tassa A, Roux MP, Attaix D, et al. Class III phosphoinositide 3-kinase-Beclin1 complex mediates the amino acid-dependent regulation of autophagy in C2C12 myotubes. *Biochem J*, 2003, 376(3): 577-586.
- [16] 赵远波, 洪杜北琦, 陈英玉. 基于 P62/SQSTM1-luciferase 的细胞自噬水平检测方法的建立及鉴定. *中国生物工程杂志*, 2016, 36(1): 55-62.
- [17] 刘永达, 赵平. 神经病理性疼痛中自噬的参与以及高压氧对其调节的展望. *中国疼痛医学杂志*, 2016, 22(8): 619-622.
- [18] Liu L, Feng D, Chen G, et al. Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(2): 177-185.
- [19] Orvedahl A, Sumpter R Jr, Xiao G, et al. Image-based genome-wide siRNA screen identifies selective autophagy factors. *Nature*, 2011, 480(7375): 113-117.
- [20] Li J, Qi W, Chen G, et al. Mitochondrial outer-membrane E3 ligase MUL1 ubiquitinates ULK1 and regulates selenite-induced mitophagy. *Autophagy*, 2015, 11(8): 1216-1229.
- [21] Sha D, Chin LS, Li L. Phosphorylation of parkin by Parkinson disease-linked kinase PINK1 activates parkin E3 ligase function and NF-kappaB signaling. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(2): 352-362.
- [22] Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y, et al. PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(1): 378-383.
- [23] Wild P, Dikic I. Mitochondria get a Parkin' ticket. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(2): 104-106.
- [24] 李明慧, 母得志. 线粒体自噬与神经系统疾病. *中国当代儿科杂志*, 2017, 19(6): 724-729.
- [25] Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, et al. Molecular definitions of cell death subroutines; recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*, 2012, 19(1): 107-120.

(收稿日期:2018-12-13)