

重复经颅直流电刺激治疗神经病理性疼痛的效果观察及机制初探

李冰冰^{1,2} 许涛¹ 王胜洁^{1,2} 蒋婷^{1,3} 刘璐^{1,4} 汪立梅^{1,2}

¹华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科,武汉 430030; ²湖北省中西医结合医院康复医学中心,武汉 430021; ³武汉大学中南医院康复医学科,武汉 430071; ⁴南方医科大学深圳医院康复医学科,深圳 518000

通信作者:许涛,Email: rehabcc@163.com

【摘要】 目的 观察重复经颅直流电刺激治疗大鼠神经病理性疼痛的效果并初步探索其作用机制。**方法** 成年雄性 SD 大鼠 40 只,随机选取 10 只大鼠纳入正常组($n=10$),10 只大鼠纳入假手术组($n=10$),其余 20 只大鼠行坐骨神经慢性压迫性损伤的模型制作,并按照随机数字表法分为假治疗组($n=10$)和治疗组($n=10$)。术后 14 d,治疗组进行连续 8 d 的经颅直流电刺激,假治疗组进行假刺激,正常组和假手术组不做任何干预。于术前 1 d、术后第 14 天和术后第 22 天(即治疗 8 d 后),分别利用 Von Frey 和 Hot-plate 测试大鼠痛阈变化,术后第 22 天行脊髓组织取材,利用 Western blot 技术检测各组大鼠的 NR2B-NMDA-R、GABA_a-R 和 GABA_b-R 的蛋白表达。**结果** ①术后第 14 天,与假手术组对比,假治疗组和治疗组大鼠的 50% MWT 和 WTL 值均明显下降($P<0.05$);②术后第 22 天,与假治疗组对比,治疗组 50% MWT 和 WTL 值均明显升高($P<0.05$),治疗组的 WTL 值与术前 1 d 对比,差异无统计学意义($P>0.05$);③术后第 22 天,与假手术组对比,假治疗组的 NR2B-NMDA-R 含量增高($P<0.05$),而 GABA_a-R 和 GABA_b-R 含量均下降($P<0.05$);术后第 22 天与假治疗组对比,治疗组的 NR2B-NMDA-R 含量下降($P<0.05$),GABA_a-R 含量增高($P<0.05$),但 GABA_b-R 含量与假治疗组对比,差异无统计学意义($P>0.05$);术后第 22 天,治疗组的 NR2B-NMDA-R 含量与假手术组间差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 重复经颅直流电刺激可改善神经病理性疼痛反应,并对痛觉过敏(热痛)的改善优于痛觉超敏(机械痛),其作用机制可能是下调脊髓 NR2B-NMDA-R 至正常水平,并部分上调 GABA_a-R。

【关键词】 神经病理性疼痛; 经颅直流电刺激; NMDA 受体; GABA 受体

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2022.04.005

Transcranial direct current stimulation for the relief of neuropathic pain in rats and the underlying mechanism

Li Bingbing^{1,2}, Xu Tao¹, Wang Shengjie^{1,2}, Jiang Ting^{1,3}, Liu Lu^{1,4}, Wang Limei^{1,2}

¹Department of Rehabilitation Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; ²Rehabilitation Medical Center, Hubei Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Wuhan 430021, China; ³Department of Rehabilitation Medicine, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China; ⁴Department of Rehabilitation Medicine, Shenzhen Hospital, Southern Medical University, Shenzhen 518000, China

Corresponding author: Xu Tao, Email: rehabcc@163.com

【Abstract】 Objective To observe any therapeutic effect of repeated transcranial direct current stimulation (tDCS) on rats modeling neuropathic pain and explore possible mechanisms. **Methods** Forty adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into a normal group ($n=10$), a sham operation group ($n=10$), a treatment group ($n=10$) and a sham treatment group ($n=10$). A model of chronic constriction injury of the sciatic nerve was established in the latter two groups. Fourteen days after the modeling, the treatment group was given tDCS for 8 consecutive days, while the sham treatment group received sham stimulation, and the other 2 groups did not receive any intervention. Von Frey and hotplate tests were used to test the rats' pain thresholds 1 day before, as well as 14 and 22 days after the surgery (i.e., 8 days after the end of the treatment). Spinal cord tissue samples were taken to detect the protein expressions of N-methyl-D-aspartic acid receptor 2B, gamma-aminobutyric acid receptor types A (GABA_a-R) and B (GABA_b-R) using western blotting. **Results** On the 14th day after the operation the average 50% MWT and WTL values of the sham treatment and treatment groups had decreased significantly compared with the sham operation

group. By the 22nd day the average 50% MWT and WTL values of the treatment group were significantly higher than those of the sham treatment group, but there was no significant change in the treatment group's average WTL between the 21st and 22nd days. On the 22nd day after the operation the average NR2B-NMDA-R level of the sham treatment group were significantly higher than that of the sham operation group, while the average GABA_a-R and GABA_b-R levels were significantly lower. At the same time point the treatment group's average NR2B-NMDA-R level had decreased significantly compared to the sham treatment group, while the average GABA_a-R level had increased significantly. There was no significant difference in average GABA_b-R level between the treatment group and the sham treatment group at that point. On the 22nd day there was also no significant difference in the average NR2B-NMDA-R level between the treatment group and the sham operation group. **Conclusions** Repeated tDCS can effectively relieve neuropathic pain. The relief of hyperalgesia is more significant than that of mechanical allodynia. A possible mechanism may be the down-regulation of spinal NR2B-NMDA-R to normal levels and modest up-regulation of GABA_a-R.

【Key words】 Neuropathic pain; Transcranial direct current stimulation; N-methyl-D-aspartate receptor; Gamma-aminobutyric acid receptor

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2022.04.005

神经病理性疼痛是一种慢性病理性疼痛状态,在损伤去除后可持续存在。国际疼痛学会将神经病理性疼痛定义为由躯体感觉神经系统的损伤或疾病直接造成的疼痛,其临床表现多种多样,包括自发性疼痛(如烧灼痛、麻刺痛、跳样痛、电击样痛等)、痛觉过敏及痛觉超敏等^[1]。这种慢性持续性的疼痛症状不仅对患者的健康和生活质量产生很不利的影响,还因医疗上的花费而加重家庭和社会负担。研究证实,神经病理性疼痛的病理生理学机制主要包括外周敏化、中枢敏化和神经胶质细胞的活化,中枢敏化主要发生在脊髓背角浅层(I、II层)^[2-3],感觉神经元 N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor, NMDA-R)的上调^[4-5]、中间抑制性神经元 γ -氨基丁酸受体(gamma aminobutyric acid receptor, GABA-R)的表达下降^[6],均在疼痛的起始和形成过程中发挥重要的调控作用。目前常用的治疗手段主要包括药物治疗、物理治疗、神经调控治疗、微创治疗、心理治疗等,但仍以药物治疗为主。然而,仅有 40% 的患者通过药物治疗获得了良好的效果,更重要的是,即使对减轻患者的疼痛有益处,许多药物的不良反应仍会导致治疗的终止^[7-8]。因此,找到一种经济有效且可被广泛应用的治疗方法是很有价值的。

经颅直流电刺激(transcranial direct current stimulation, tDCS)作为非侵入性经颅大脑刺激的一种,具有镇痛效果显著、作用持久、不良反应小、简便经济等优点,重复的刺激能获得更好的镇痛及持续效应^[9]。目前临床多应用 1.0~2.0 mA 的阳极电流兴奋大脑初级运动皮质(the primary motor cortex, M1),连续刺激 5~10 d,每日治疗 20 min^[10]。研究证实,tDCS 通过调节神经网络的各种活动而发挥镇痛作用,并在刺激时及刺激结束后的一段时间均可影响皮质兴奋性^[11],这可能与改变神经元静息膜电位变化^[12]、参与突触可塑

性调节^[13]及增加皮质内抑制^[14]相关。此外,tDCS 还对和刺激部位相关联的远端大脑区域产生影响^[15]。

目前,tDCS 的镇痛效应在脊髓水平的研究还很少,相关神经生理学机制仍不清楚。本研究采用经典坐骨神经慢性压迫性损伤(chronic constriction injury of the sciatic nerve, CCI)模型致大鼠发生创伤后疼痛性周围神经病变,给予大鼠连续 8 d 的 tDCS 刺激,观察其镇痛效果,并通过研究脊髓背角 NMDA-R 和 GABA-R 的表达,以初步探讨 tDCS 发挥镇痛作用的理论基础。

材料与方法

一、实验动物及分组

成年雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 40 只,体重 180~220 g,自华中科技大学同济医学院实验动物中心处购买。将大鼠置于安静、整洁的环境饲养 3 d 以上,明暗各 12 h,自由摄食、饮水。按随机数字表法选取 10 只大鼠纳入正常组($n=10$),10 只大鼠纳入假手术组($n=10$),其余 20 只大鼠行 CCI 的模型制作,并按照随机数字表法分为假治疗组($n=10$)和治疗组($n=10$)。

二、主要仪器及试剂

机械痛刺激仪、热痛刺激仪(意大利 Ugo Basile 公司)、1×1 的 tDCS 设备、4×1 的 HD-tDCS 适配器(美国 Soterix Medical 公司);GAPDH 抗体(杭州贤至生物有限公司)、NR2B-NMDA-R(abcam ab39610),GABA_a-R (Millipore MAB341)、GABA_b-R (Millipore AB2255)、HRP 标记羊抗小鼠二抗、HRP 标记羊抗兔二抗、HRP 标记兔抗羊二抗(武汉博士德生物工程有限公司)。

三、大鼠 CCI 模型制备

参照美国国立卫生研究院 Bennett 等^[16]1988 年研发的造模方法,通过结扎坐骨神经主干,对表浅的神经外膜血液循环起到阻碍作用,神经水肿、膨胀并在结

扎部位产生自缢,这种慢性压迫性损伤导致坐骨神经发生疼痛性周围神经病变。

CCI 模型制作:大鼠称重,按 3 ml/kg 剂量经大鼠腹腔注射 10% 的水合氯醛,剃除左侧大腿后外侧毛发,俯卧位固定于 37 °C 热毯上,将左大腿放置在与脊柱成 90° 的位置,用胶带固定左后足;消毒手术区域,平行于左股骨下 3~4 mm 处作一水平切口,长约 1.5 cm,钝性分离股二头肌和臀肌浅层肌肉,用拉钩拉开两肌肉之间的间隙,充分暴露其下的坐骨神经及其分支;使用弯曲的钝头钳和微型剪刀,轻轻地分离坐骨神经,从它起始于坐骨结节的近心端至远端腓窝的分叉处,约 10 mm;自坐骨神经主干近分叉处起,用 4-0 的普通丝线依次结扎 4 个双结,间隔 1 mm,当观察到手术暴露的肌肉出现微微颤动时立即停止结扎。假手术组仅分离坐骨神经,不结扎。充分止血后,用 3-0 丝线逐层缝合肌肉及皮肤切口。术毕,将大鼠置于电热毯上待其苏醒,醒后在安静、清洁的环境里饲养。

四、干预方法

CCI 造模后大鼠 5~7 d 开始出现痛反应,10~14 d 达高峰并稳定持续 2 个月^[13]。因此,本研究选择术后第 14 天作为 tDCS 干预的时间点。

1. 治疗组大鼠自术后第 14 天起,给予连续 8 d 的 tDCS 治疗,具体步骤:将大鼠固定于柔软型大鼠固定器上,剔除大鼠头颈部毛发,连接 tDCS 设备及 HD-tDCS 适配器,参考 Spezia Adachi 等^[14-15] 的研究,设定 tDCS 设备的刺激参数为刺激电流强度 0.5 mA、持续时间 20 min,将连接于 HD-tDCS 适配器的 2 个环形电极片(电极面积 1.3 cm²)置于大鼠头颈部,即阳极置于大鼠颈部两耳之间、阴极置于大鼠双眼外侧角中点;电极片下放置适宜大小的浸泡过生理盐水的棉球,用胶布固定电极片。

2. 假治疗组大鼠自术后第 14 天起,给予 tDCS 假治疗,持续 8 d,将 tDCS 设备调整至假刺激模式(即每次电流仅持续 30 s),余参数及步骤同治疗组。

3. 正常组和假手术组均不给予任何干预。

五、行为学观察及疼痛反应的测试

(一) 行为学观察

在对大鼠进行痛阈测定之前,将大鼠放在地板上观察 1~2 min,注意其站立、行走及休息的姿势,以及其左后爪、足趾的形态学变化。

(二) 疼痛反应的测试

坐骨神经末端分支支配的足底区域在 CCI 术后出现明显的疼痛反应,为主要的测试部位,即足垫后的中央足底表面,并且避开脚后跟和脚垫等部位。分别于术前 1 d、术后 14 d 及术后 22 d(即 tDCS 干预 8 d 后)

进行测试。

1. von Frey 试验:使用 Ugo Basile 公司生产的机械痛刺激仪,用 up-and-down 法,通过机械刺激诱发大鼠发生疼痛反应(缩足反射或舔足反应),记录大鼠缩足反应的阈值,即 50% 缩爪阈值(50% withdrawal threshold, 50% MWT),简称机械痛。

具体方法^[17]:将大鼠依次放入钢丝网格上的透明分隔笼中,使大鼠适应其周围环境(约 15 min),即大鼠在笼内的走动、洗脸、探索等行为结束后再对其进行测试;von Frey 丝的刺激力度依次为 0.4、0.6、1.0、1.4、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 和 15.0 g。首先,用 2.0 g 的 von Frey 丝垂直刺向大鼠左后足掌部,并且使细丝发生一定程度的弯曲并维持 8 s。如果刺激时大鼠的左后足在测试时间内或移开细丝的瞬间发生缩足反射或舔足反应,则记为阳性反应,以“X”表示,并降低一级刺激强度(即用 1.4 g)进行下一次测定;相反,如果没有引发大鼠上述反应,则记为阴性反应,即“O”,并用更高一级的刺激强度(即用 4 g)再次测试,以此类推。注意 2 次刺激之间应至少间隔 10 s,即动物恢复安静状态后再进行下一次刺激。当出现与前次不同的反应(即从“O”到“X”,或“X”到“O”)时开始记录,再按上述方法依次刺激 4 次,共刺激 6 次,按照记录的反应进行计算。如果刺激减至 0.4 g 大鼠反应一直记录为“X”或加至 15.0 g 均为“O”,则直接记录 50% MWT 为 0.25 g 或 15.0 g。

计算公式为:50% MWT = $10^{\log(x) + k\delta}$,式中 X 为最后刺激使用的力度,k 为不同刺激方式的系数, δ 指各刺激力度 log 值的方差。

2. 动物热板试验:使用 Ugo Basile 公司生产的热痛刺激仪,通过热刺激诱发大鼠发生疼痛反应(缩足反射或舔足反应),记录大鼠缩足反应潜伏期(paw withdrawal latency, WTL),简称热痛。

具体方法^[13]:测定前,调整红外热强度值(本研究为 90),使正常组大鼠的 WTL 平均值为 10 s 左右。设置热刺激的最长持续时间为 20 s,以避免对左后足的组织损伤;然后将大鼠分别置于玻璃板上的透明分隔笼中,适应环境约 15 min 后进行测试。将热痛刺激仪的红外热源放在大鼠左后足掌部正下方,按下启动键。仪器自动记录从热刺激开始到左后足发生缩足反应的持续时间,重复上述测量 3 次,每次间隔 5 min,计算其平均值,记作大鼠的 WTL 值。

六、标本采集

大鼠麻醉后,尽量去除脊柱两旁肌肉,暴露其骨性结构,在脊柱胸 8 水平将上段剪断,再沿骶 1 水平将脊柱下段剪断。用咬骨钳咬掉脊柱的椎骨,暴露出脊髓,用刀片快速取腰膨大组织并划断其周围的神经,用

4 ℃ 的生理盐水反复冲洗,去除组织周围的血液成分。上述步骤尽可能在冰上进行。

七、指标检测

将蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂分别按照 1:100 的比例加入 RIPA 裂解液中;按照每 100 mg 组织加入 1000 μl 裂解液的比例将腰膨大组织和裂解液加入到清洁消毒的玻璃匀浆器中,在冰上充分匀浆、裂解 30 min。吸取组织匀浆液至清洁的离心管中,在 4 ℃ 下 12 000 r/min 离心 5 min(离心半径 5 cm),取蛋白上清待测,用 BCA 试剂盒测量其蛋白浓度。将待检测蛋白与 5×蛋白上样缓冲液混合,沸水中煮 10 min 变性。取 50 μg 总蛋白上样,行 SDS-PAGE 凝胶电泳(浓缩 80 V 30 min,分离 120 V 90 min)。取出凝胶后根据 Marker 切下目的条带,剪与凝胶大小相同的聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜放入甲醇中浸泡,在电转缓冲液中,按照黑色板-纤维垫-滤纸-凝胶-PVDF 膜-滤纸-纤维垫-白色板的顺序依次放好,开始转膜(NR2B-NMDA-R, GABA_A-R: 200 mA 120 min; GABA_B-R: 200 mA 120 min 后 300 mA 25 min);以 5% BSA 封闭液浸泡 PVDF 膜,于室温下摇床封闭 2 h;用封闭液稀释一抗(NR2B-NMDA-R: 1:800; GABA_A-R 和 GABA_B-R: 1:500),将 PVDF 膜浸泡于稀释后的一抗工作液中,4 ℃ 孵育过夜。封闭液洗脱 PVDF 膜 5~6 次,5 min/次。将 PVDF 膜浸泡于封闭液稀释后 HRP 标记的二抗(1:5000 稀释),37 ℃ 摇床孵育 2 h。TBST 洗脱 PVDF 膜 5~6 次,5 min/次。采用 ECL 化学发光检测实验结果。晾干、扫描胶片,分析胶片灰度值。分析和比较各组大鼠的 NR2B-NMDA-R、GABA_A-R、GABA_B-R 蛋白与 GAPDH 的比值即相对表达量。

八、统计学方法

使用 SPSS 26.0 版统计软件对所得数据进行统计学分析处理,数据均呈正态分布,以($\bar{x} \pm s$)表示。多组间的比较采用单因素方差分析,组内对比采用配对样本 *t* 检验,术后 22 d 组间进行两两比较采用独立样本 *t* 检验。*P*<0.05 认为差异有统计学意义。

结 果

一、大鼠行为学观察

假治疗组及治疗组大鼠术后出现左后足畸形,表现为足趾内聚、腹屈,左足外翻;行走时出现明显跛行、垂足步态;站立时抬起患足、将其屈曲,放于大腿旁成保护性姿势;此外还可自发性舔左后足,无任何自残现象。假手术组大鼠术后无左足畸形、无跛行,各足趾可正常展开负重。

二、大鼠疼痛反应的测试值

1. 各组大鼠 50% MWT 值的变化:术前 1 d,4 组大

鼠的 50% MWT 值组间差异无统计学意义(*P*>0.05)。术后第 14 天,与术前 1 d 比较,假治疗组和治疗组的 50% MWT 值显著下降(*P*<0.001),但正常组和假手术组组内比较差异无统计学意义(*P*>0.05);术后第 14 天组间比较,假手术组与正常组同时间点比较,差异无统计学意义(*P*>0.05);假治疗组和治疗组的 50% MWT 值均显著下降,分别与假手术组同时间点比较,组间差异有统计学意义(*P*<0.001),而假治疗组与治疗组同时间点比较,差异无统计学意义(*P*>0.05)。术后第 22 天与术后第 14 天比较,假治疗组差异无统计学意义(*P*>0.05),治疗组 50% MWT 值明显上升(*P*<0.001);治疗组术后第 22 天的 50% MWT 值亦较假治疗组同时间点升高(*P*<0.05),详见表 1。

表 1 4 组大鼠不同时间点的 50% MWT 值比较($g, \bar{x} \pm s$)

组别	例数	术前 1 d	术后第 14 天	术后第 22 天
正常组	10	13.40±1.75	13.61±1.21	-
假手术组	10	13.82±1.19	13.64±1.19	-
假治疗组	10	13.00±1.93	1.97±1.03 ^{ab}	2.14±0.68
治疗组	10	13.07±1.95	1.48±0.82 ^{ab}	3.21±0.77 ^{cd}

注:-表示未检测;与术前 1 d 比较,^a*P*<0.001;与假手术组同时间点比较,^b*P*<0.001,^c*P*<0.05;与术后第 14 天比较,^d*P*<0.001

2. 各组大鼠 WTL 值的变化:术前 1 d,4 组大鼠的 WTL 值组间差异均无统计学意义(*P*>0.05)。术后第 14 天,与术前 1 d 比较,假治疗组和治疗组 WTL 值明显下降(*P*<0.001),但正常组和假手术组的 WTL 值组内比较差异无统计学意义(*P*>0.05);术后第 14 天,假手术组与正常组同时间点比较,差异无统计学意义(*P*>0.05);假治疗组和治疗组的 WTL 值均下降,分别与假手术组同时间点比较,组间差异有统计学意义(*P*<0.001),假治疗组与治疗组同时间点比较,差异无统计学意义(*P*>0.05)。术后第 22 天,治疗组的 WTL 值显著上升(*P*<0.001),且明显高于假治疗组(*P*<0.001),与术后第 14 天比较,治疗组组内差异有统计学意义(*P*<0.001),假治疗组的组内差异无统计学意义(*P*>0.05);而治疗组术后第 22 天的 WTL 值与术前 1 d 比较,组内差异无统计学意义(*P*>0.05)。详见表 2。

表 2 4 组大鼠不同时间点的 WTL 值比较($g, \bar{x} \pm s$)

组别	例数	术前 1 d	术后第 14 天	术后第 22 天
正常组	10	11.50±1.66	12.97±1.35	-
假手术组	10	11.87±1.68	13.25±1.41	-
假治疗组	10	12.13±2.42	7.17±1.35 ^{ab}	7.65±1.12
治疗组	10	11.96±2.18	6.77±1.37 ^{ab}	11.51±1.24 ^{cd}

注:-表示未检测;与术前 1 d 比较,^a*P*<0.001;与假手术组同时间点比较,^b*P*<0.001;与术后第 14 天比较,^c*P*<0.001;与假治疗组比较,^d*P*<0.001

三、Western blot 蛋白定量分析

术后 22 d,假手术组的 NR2B-NMDA-R、GABA_a-R、GABA_b-R 的蛋白相对表达量与正常组对比,组间差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。假治疗组的 NR2B-NMDA-R 蛋白相对表达量较假手术组明显上升 ($P<0.001$),治疗组则较假治疗组明显下降 ($P<0.001$),而治疗组与假手术组对比,组间差异无统计学意义 ($P>0.05$);假治疗组 GABA_a-R 和 GABA_b-R 蛋白的相对表达量均较假手术组明显下降 ($P<0.001$),而治疗组治疗后的 GABA_a-R 蛋白相对表达量明显高于假治疗组 ($P<0.001$),但其 GABA_b-R 的蛋白相对表达量与假治疗组比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。详见表 3 和图 1。

表 3 4 组大鼠的蛋白相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	NR2B-NMDA-R	GABA _a -R	GABA _b -R
正常组	10	0.424±0.018	0.838±0.025	0.279±0.030
假手术组	10	0.435±0.028	0.842±0.023	0.275±0.039
假治疗组	10	0.634±0.027 ^a	0.410±0.039 ^a	0.179±0.043 ^a
治疗组	10	0.482±0.092 ^b	0.634±0.023 ^b	0.198±0.056

注:与假手术组比较,^a $P<0.001$;与假治疗组比较,^b $P<0.001$

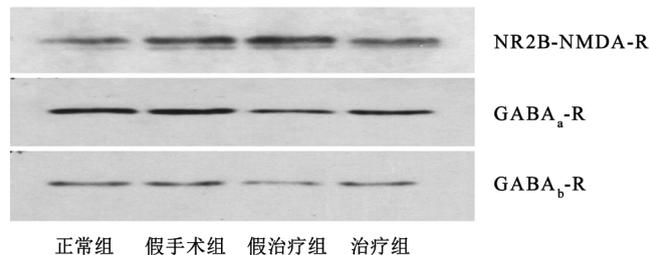


图 1 各组大鼠术后 22 d 疼痛相关蛋白表达的代表条带图

讨 论

本研究结果显示,CCI 术后第 14 天大鼠出现明显的疼痛反应,即 50% MWT 值和 WTL 值均显著下降,连续 8 d 的 tDCS 刺激可使 50% MWT 值和 WTL 值升高,提示重复的 tDCS 对机械痛和热痛均有改善作用;术后第 22 天,治疗组的 WTL 值可升高至术前 1 d 的水平,提示重复的 tDCS 可使热痛恢复至正常水平;然而,术后第 22 天,治疗组的 50% MWT 值虽然也出现上升,但幅度较小,与术前 1 d 有差距,提示重复的 tDCS 虽然也可改善机械痛,但作用有限。神经病理性疼痛的临床表现中,机体对热刺激等伤害性刺激的敏感性增加即为痛觉过敏,当机械刺激等非伤害性刺激也可诱发疼痛反应时,则表现为痛觉超敏^[1]。动物研究中常用热辐射产生的疼痛(如热痛)来反映痛觉过敏,用纤维丝刺激产生的疼痛(如机械痛)来反映痛觉超敏^[18]。本实验结果提示,重复的 tDCS 刺激对改善

神经病理性疼痛的痛觉过敏现象优于痛觉超敏。

神经病理性疼痛的体感传导通路涉及外周到中枢的多个区域,如外周伤害性感受器、感觉神经纤维、感觉背根神经节细胞、脊髓背角、丘脑及大脑皮质等。临床上选择大脑皮质的 M1 区作为 tDCS 的阳极刺激部位,通过 M1 区下行的投射纤维间接影响疼痛相关区域的神经网络来调控痛觉,如丘脑核团,后者可影响其他疼痛相关区域的活动,如扣带回前部、背外侧前额叶皮质、岛叶及脊髓,最终调节疼痛及其情感、认知部分,也抑制疼痛从脊髓的传入^[19-20],这种自上而下的调控机制可以解释 tDCS 作用于 M1 区的镇痛效应。刺激参数在 tDCS 的应用过程中也发挥重要作用,如电极片的位置及面积、电流的强度、刺激频率及持续时间等^[21],刺激参数组合方式的不同诱发 tDCS 发挥不同的治疗作用^[22]。本研究治疗参数的选择,参考了 Adachi 等^[23-24]的研究,模拟临床治疗方案,给予大鼠 0.5 mA,20 min/d,连续 8 d 的 tDCS 刺激,阳极位于大鼠顶叶皮质,阴极位于框上区,使 M1 区位于两电极之间,从而使 M1 区效应最大化^[25]。

神经病理性疼痛发生时,脊髓背角发生至关重要的中枢敏化现象,即神经元持续的过度兴奋状态,其中,NMDA-R 上调并介导突触传递发生可塑性变化^[1,4],而 GABA 能中间抑制性神经元占背角神经元的大多数,其抑制作用的减弱或去抑制,也可导致神经元网络兴奋性的增高,并激活在通常情况下由于抑制作用而沉默的感觉传导通路^[6],故本研究在脊髓水平选择了 NMDA-R 和 GABA-R 作为检测指标。NMDA 离子通道型受体是由 3 种亚基组成的四聚体 2NR1、NR2A 或 NR2B,其中 NR2B 主要分布于脊髓背角浅层、背角神经节传导痛觉的 A δ 类及 C 类纤维,也就是说,NR2B-NMDA-R 对脊髓伤害性感觉信号传递至关重要。研究证实,神经病理性疼痛时,脊髓背角神经元 NR2B 的表达增加,而抑制 NR2B 可以产生镇痛效应^[26]。本研究重点对脊髓 NR2B-NMDA-R 进行检测,并初步观察到,CCI 术后神经病理性疼痛大鼠的脊髓 NR2B-NMDA-R 表达是增高的,而重复的 tDCS 刺激后,受体在脊髓中的表达发生明显下调,而这种调节作用可使增高的受体恢复至正常水平状态。GABA 受体主要包含离子通道型 GABA_a-R 和代谢型 GABA_b-R 两种类型,两者集中分布在背角浅层^[6,27]。本研究通过检测脊髓 GABA_a-R 和 GABA_b-R 的表达,初步观察到神经病理性疼痛时,大鼠脊髓中 GABA_a-R 和 GABA_b-R 的表达均减少,重复 tDCS 刺激后仅观察到 GABA_a-R 在脊髓中的表达发生一定程度的上调,但未恢复至正常水平,然而本研究并未观察到 tDCS 对脊髓 GABA_b-R 具有明显的调节作用。

综上所述,重复 tDCS 可明显改善大鼠神经病理性疼痛反应,并对痛觉过敏(热痛)的改善优于痛觉超敏(机械痛),其机制可能是通过下调脊髓 NR2B-NMDA-R 而抑制突触可塑性变化;通过上调脊髓 GABA_a-R 的表达而部分恢复脊髓的去抑制现象。本研究将在后续的研究中进一步观察 tDCS 镇痛效应的维持时间及在其它疼痛相关部位(如丘脑等)对 NR2B-NMDA-R 和 GABA_a-R 的调控作用;还可增加神经电生理学指标(如坐骨神经传导速度的检查和针极肌电图等)来更全面地探索其作用机制。

参 考 文 献

- [1] Zhuo M. Neuronal mechanism for neuropathic pain[J]. *Mol Pain*, 2007, 3(14): 14. DOI: 10.1186/1744-8069-3-14.
- [2] Antal A, Kriener N, Lang N, et al. Cathodal transcranial direct current stimulation of the visual cortex in the prophylactic treatment of migraine[J]. *Cephalalgia*, 2011, 31(7): 820-828. DOI: 10.1177/0333102411399349.
- [3] Beydoun A, Backonjaand MM. Mechanistic stratification of antineuralgic agents[J]. *J Pain Symptom Manage*, 2003, 25(5): 18-30. DOI: 10.1016/s0885-3924(03)00066-6.
- [4] Vadivelu N, Mitra S, Narayan D. Recent advances in postoperative pain management[J]. *Yale J Biol Med*, 2010, 83(1): 11-25.
- [5] Zhuo M, Wu GX, Wu LJ. Neuronal and microglial mechanisms of neuropathic pain[J]. *Mol Brain*, 2011, 4(31): 31. DOI: 10.1186/1756-6606-4-31.
- [6] McCarron KE, Enna SJ. GABA pharmacology: the search for analgesics[J]. *Neurochem Res*, 2014, 39(10): 1948-1963. DOI: 10.1007/s11064-014-1254-x.
- [7] Attal N. Neuropathic pain: mechanisms, therapeutic approach, and interpretation of clinical trials[J]. *Continuum*, 2012, 18(1): 161-175. DOI: 10.1212/01.CON.0000411564.41709.2d.
- [8] Dworkin RH, O'Connor AB, Miroslov B, et al. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations[J]. *Pain*, 2007, 132(3): 237-251. DOI: 10.1016/j.pain.2007.08.033.
- [9] Rosen AC, Ramkumar M, Nguyen T, et al. Noninvasive transcranial brain stimulation and pain[J]. *Curr Pain Headache Rep*, 2009, 13(1): 12-17. DOI: 10.1007/s11916-009-0004-2.
- [10] Kuo MF, Paulus W, Nitsche MA. Therapeutic effects of non-invasive brain stimulation with direct currents (tDCS) in neuropsychiatric diseases[J]. *Neuroimage*, 2014, 85(3): 948-960. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2013.05.117.
- [11] Nitsche MA, Paulus W. Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation[J]. *J Physiol*, 2000, 527(3): 633-639. DOI: 10.1111/j.1469-7793.2000.t011-00633.x.
- [12] Gosselin RD, Suter MR, Ji RR, et al. Glial cells and chronic pain[J]. *Neuroscientist*, 2010, 16(5): 519-531. DOI: 10.1177/1073858409360822.
- [13] Nitsche MA, Fricke K, Henschke U, et al. Pharmacological modulation of cortical excitability shifts induced by transcranial direct current stimulation in humans[J]. *J Physiol*, 2003, 553(1): 293-301. DOI: 10.1113/jphysiol.2003.049916.
- [14] Portilla AS, Bravo GL, Miraval FK, et al. A feasibility study assessing cortical plasticity in chronic neuropathic pain following burn injury[J]. *J Burn Care Res*, 2013, 34(1): 48-52. DOI: 10.1097/BCR.0b013e3182700675.
- [15] Takano YJ, Yokawa T, Masuda A, et al. A rat model for measuring the effectiveness of transcranial direct current stimulation using fMRI[J]. *Neurosci Lett*, 2011, 491(1): 40-43. DOI: 10.1016/j.neulet.2011.01.004.
- [16] Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man[J]. *Pain*, 1988, 33(1): 87-107. DOI: 10.1016/0304-3959(88)90209-6.
- [17] 陈晔凌, 李世勇, 金小高, 等. 大鼠分级坐骨神经缩窄致神经病理性疼痛模型的行为学及病理学评估[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2013, 19(2): 98-101. DOI: 10.3969/j.issn.1006-9852.2013.02.010.
- [18] 李馨, 陈红. 干细胞治疗脊髓损伤后神经病理性疼痛的实验研究进展[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2017, 39(10): 790-792.
- [19] Li C, Jirachapitak S, Wrigley P, et al. Transcranial direct current stimulation for spinal cord injury-associated neuropathic pain[J]. *Korean J Pain*, 2021, 34(2): 156-164. DOI: 10.3344/kjp.2021.34.2.156.
- [20] Mori F, Codecù C, Kusayanagi H, et al. Effects of anodal transcranial direct current stimulation on chronic neuropathic pain in patients with multiple sclerosis[J]. *J Pain*, 2010, 11(5): 436-442. DOI: 10.1016/j.jpain.2009.08.011.
- [21] Ngernyam N, Jensen MP, Auvichayapat N, et al. Transcranial direct current stimulation in neuropathic pain[J]. *J Pain Relief*, 2013, (Suppl 3): 001. DOI: 10.4172/2167-0846.S3-001.
- [22] Brunoni AR, Nitsche MA, Bolognini N, et al. Clinical research with transcranial direct current stimulation (tDCS): challenges and future directions[J]. *Brain Stimul*, 2012, 5(3): 175-195. DOI: 10.1016/j.brs.2011.03.002.
- [23] Adachi LNS, Caumo W, Laste G, et al. Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model[J]. *Brain Res*, 2012, 1489: 17-26. DOI: 10.1016/j.brainres.2012.10.009.
- [24] Laste G, Caumo W, Adachi LNS, et al. After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation[J]. *Exp Brain Res*, 2012, 221(1): 75-83. DOI: 10.1007/s00221-012-3149-x.
- [25] Datta A, Bansal V, Diaz J, et al. Gyri-precise head model of transcranial direct current stimulation; improved spatial focality using a ring electrode versus conventional rectangular pad[J]. *Brain Stimul*, 2009, 2(4): 201-207. DOI: 10.1016/j.brs.2009.03.005.
- [26] Zhou Q, Sheng M. NMDA receptors in nervous system diseases[J]. *Neuropharmacology*, 2013, 74: 69-75. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2013.03.030.
- [27] Yang K, Ma WL, Fenget YP, et al. Origins of GABA(B) receptor-like immunoreactive terminals in the rat spinal dorsal horn[J]. *Brain Res Bull*, 2002, 58(5): 499-450. DOI: 10.1016/S0361-9230(02)00824-9.

(修回日期: 2022-01-25)

(本文编辑: 汪 玲)