

# 富血小板血浆凝胶缓解 CCI 模型大鼠周围神经痛及其改善 中枢海马组织炎症机制研究

靳永强<sup>1</sup>, 赵年章<sup>1</sup>, 宗银东<sup>1</sup>, 谢金发<sup>2</sup>

1. 广州医科大学附属第五医院麻醉科, 广东高校生物靶向诊治与康复重点实验, 广东 广州 510700;

2. 中国贵航集团三〇二医院麻醉科, 贵州 安顺 561000

**【摘要】** 目的 建立大鼠坐骨神经慢性压迫损伤(CCI)模型, 观察富血小板血浆凝胶(PRP)对 CCI 大鼠坐骨神经病理性疼痛进展期痛域的影响, 并探讨其对中枢海马组织的抗炎作用机制。方法 选择 SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只, 其中 10 只用于制备 PRP, 其余 40 只采用随机数表法分为空白对照组、假手术组、CCI 组和 CCI+PRP 组, 每组 10 只。比较各组大鼠在术前 1 d、术后 6 h、1 d、3 d、7 d 足底机械性缩足反射阈值(MWT)和热辐射缩足潜伏期(TWL)变化; 比较术后 7 d 时各组大鼠海马区肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )和高迁移率组蛋白 1 (HMGB1)及其下游 Toll 样受体-4 (TLR4)、糖基化终产物受体(RAGE)mRNA 表达水平。结果 空白组与假手术组各时间点大鼠 MMT 和 TWL 比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ ); CCI 组和 CCI+PRP 组大鼠术后 MMT 和 TWL 值与术前比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ ); CCI 组和 CCI+PRP 组大鼠术后各时间点 MWT 和 TWL 比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。术后 7 d 时, 对照组和假手术组大鼠海马组织的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、HMGB1 含量以及 HMGB1、TLR4 和 RAGE mRNA 表达水平比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ ), 而 CCI 组和 CCI+PRP 组与对照组或假手术组比较差异均具有统计学意义( $P<0.05$ ); 术后 7 d 时, CCI+PRP 组与 CCI 组大鼠海马组织的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、HMGB1 含量以及 HMGB1、TLR4 和 RAGE mRNA 表达水平比较, 差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 富血小板血浆可有效延缓 CCI 大鼠神经病理性疼痛进展期痛域, 抑制中枢海马组织炎症反应, 其机制可能与富血小板血浆通过 HMGB1-TLR4/RAGE 信号通路抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  表达水平有关。

**【关键词】** 雄性 SD 大鼠; 坐骨神经慢性压迫损伤; 富血小板血浆; 高迁移率组蛋白 1; 糖基化终产物受体; 中枢海马组织; 炎症反应; 机制

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2024)03-0305-05

**Platelet-rich plasma gel alleviates peripheral neuralgia and improves the inflammatory mechanism of central hippocampus in rat models of chronic constriction injury.** JIN Yong-qiang<sup>1</sup>, ZHAO Nian-zhang<sup>1</sup>, ZONG Yin-dong<sup>1</sup>, XIE Jin-fa<sup>2</sup>. 1. Department of Anesthesiology, Key Laboratory of Biological Targeting Diagnosis, Therapy, and Rehabilitation of Guangdong Higher Education Institutes, the Fifth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510700, Guangdong, CHINA; 2. Department of Anesthesiology, No. 302 Hospital of China Guihang Group, Anshun 561000, Guizhou, CHINA

**【Abstract】 Objective** To establish the rat model of chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve, observe the effect of platelet-rich plasma gel (PRP) on the pain domain of sciatic neuropathic pain in progressive stage in CCI rats, and to explore the anti-inflammatory mechanism of PRP in the central hippocampus. **Methods** Fifty male SD rats with SPF grade were selected, 10 of which were used for PRP preparation and the remaining 40 were randomly divided into 4 groups (blank control group, sham group, CCI group, and CCI+PRP group), with 10 rats in each group. mechanical withdrawal threshold (MWT) and thermal withdrawal latency (TWL) were observed and compared at 1 d before surgery, and 6 h, 1 d, 3 d, and 7 d after surgery. The expression levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , high mobility group box-1 protein (HMGB1), and the mRNA of Toll-like receptor 4 (TLR4), receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in hippocampus of all groups were compared at 7 d after surgery. **Results** There was no significant difference in MMT and TWL between blank group and sham group at different time points ( $P>0.05$ ). MMT and TWL after surgery in CCI group and CCI+PRP group showed significant difference with those before surgery ( $P<0.05$ ); MMT and TWL had statistically significant differences between CCI group and CCI+PRP group at various time points after surgery ( $P<0.05$ ). At 7 d after operation, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , HMGB1, HMGB1 mRNA, TLR4 mRNA, RAGE mRNA showed no significant difference between control group and sham group in hippocampus of rats ( $P>0.05$ ), but significant difference was found between CCI group, CCI+PRP group and control group/sham group ( $P<0.05$ ), and also between CCI+PRP group and CCI

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金(编号: B2022145)。

第一作者: 靳永强(1983—), 男, 主治医师, 主要研究方向为临床麻醉与器官保护和神经病理性疼痛。

通讯作者: 赵年章(1974—), 男, 副主任医师, 主要研究方向为临床麻醉药理和神经病理性疼痛, E-mail: suiguoa422622@163.com。

group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Platelet-rich plasma can effectively delay the pain domain of sciatic neuropathic pain in progressive stage in CCI rats, inhibit the inflammatory response in the central hippocampus, which may be related to the inhibitory effect of platelet-rich plasma on  $\text{TNF-}\alpha$  and  $\text{IL-1}\beta$  expression through HMG1-TLR4/RAGE signaling pathway.

**【Key words】** Male SD rats; Chronic constriction injury of the sciatic nerve; Platelet-rich plasma; HMGB1; RAGE; Central hippocampus; Inflammatory response; Mechanism

周围神经慢性压迫性损伤常导致神经病理性疼痛(neuropathic pain, NP)发生,往往在压迫解除后痛敏仍然存在<sup>[1-2]</sup>。NP 痛敏机制与现已阐明的细胞和分子机制有着显著差异,神经炎症在 NP 发生和维持中起着至关重要的作用<sup>[3]</sup>。临床治疗 NP 尚无行之有效的方法,但早期有效干预可一定程度上缓解 NP 的进展。近年来,富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)在周围神经慢性损伤修复领域中的研究渐热。PRP 中含有大量的生长因子,如转化生长因子 $\beta$  ( $\text{TGF-}\beta$ )、血小板源性生长因子(PDGF)、胰岛素样生长因子 1 (IGF-1),表皮生长因子(EGF),血管内皮生长因子(VEGF)等。研究表明这些生长因子可能有利于外周损伤神经的修复<sup>[4-5]</sup>,但 PRP 在中枢抗炎作用机制方面的研究文献报道较少。本实验构建了大鼠坐骨神经慢性压迫损伤模型(chronic constriction injury of the sciatic nerve, CCI),观察 PRP 早期干预对模型大鼠周围神经病理性疼痛进展期痛域的影响,并检测大鼠海马组织炎症因子、HMGB1 蛋白及其下游 TLR4 和 RAGE mRNA 表达水平,以探讨可能的中枢抗炎机制,为临床治疗周围神经慢性压迫性损伤提供理论依据。

## 1 材料与方 法

1.1 主要实验试剂与仪器 戊巴比妥钠(上海化学试剂供应站分装厂,批号:190146);HMGB1 一抗(博士德生物技术有限公司,批号:A00066-1)、羊抗兔二抗(博士德生物技术有限公司,批号:BA1011);肿瘤坏死因子( $\text{TNF-}\alpha$ )、白细胞介素  $1\beta$  ( $\text{IL-1}\beta$ )酶联免疫吸附(ELISA 法)实验试剂盒(伊莱瑞特生物科技股份有限公司),RNase inhibitor,RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo 公司)、PerfectStart Green qPCR SuperMix (全式金公司),低温高速离心机(德国 Thermo 公司),4-0 铬制羊肠线(上海浦东金环医疗用品有限公司)。

1.2 实验动物 SPF 级雌性 SD 大鼠 50 只,购自广东省医学实验动物中心[动物合格证:SCXK(粤)2022-0002],体质量为(200 $\pm$ 10) g,在安静、通风、恒温恒湿的环境下饲养在广州医科大学实验动物中心,12 h 光暗交替。随机分组,独笼饲养,进水自由,专用饲料饲养,保持垫料干净卫生。本实验经广州医科大学实验动物伦理委员会审核、批准(SQ2022-034)。

1.3 实验分组和 各 组 干 预 处 理 措 施 (1)分 组 方 法:大鼠适应性饲养 1 周后,随机选取 10 只实验大鼠作为 PRP 凝胶制作组,剩余 40 只按随机数表法分为空白对照组、假手术组、CCI 组和 CCI+PRP 组,每组

10 只。(2)各 组 干 预 和 处 理 措 施:对 照 组 大 鼠 不 予 任 何 处 理,仅 作 为 对 照 比 较。其 余 三 组 大 鼠 腹 腔 注 射 40 mg/mg 戊 巴 比 妥 钠 麻 醉 后:假 手 术 组 大 鼠 在 无 菌 原 则 下 切 开 右 下 肢 股 部,显 露 坐 骨 神 经 后 轻 柔 分 离 完 全 暴 露 坐 骨 神 经,在 坐 骨 神 经 分 支 前 约 1 cm 主 干 处 用 4-0 羊 肠 线 环 绕 4 道(间 隔 1 mm 左 右),不 扎 紧 不 结 扎。CCI 组 大 鼠 同 样 手 术 操 作 下 在 坐 骨 神 经 干 相 同 部 位 用 4-0 羊 肠 线 环 绕 且 结 扎,结 扎 线 的 松 紧 以 保 证 坐 骨 神 经 环 周 均 受 压,可 见 右 侧 小 腿 肌 肉 轻 度 颤 抖,但 不 影 响 血 供 为 宜。CCI+PRP 组 大 鼠 在 完 成 坐 骨 神 经 结 扎 手 术 后,在 结 扎 部 位 均 匀 环 形 包 绕 涂 抹 配 置 好 的 PRP 凝 胶 1 mL。术 毕 逐 层 缝 合,对 侧 下 肢 肌 注 庆 大 霉 素 2 万 U 预 防 感 染,放 回 饲 养 笼 内,直 至 大 鼠 逐 渐 复 苏,正 常 饲 养。

1.4 富血小板血浆凝胶制备 随机选取 SD 大鼠 10 只,腹腔注射 40 mg/mg 戊巴比妥钠麻醉后,无菌操作下腹主动脉取血 10 mL。PRP 制备采用两次离心法:在 4 $^{\circ}\text{C}$  条件下,第一次以 200 $\times$ g 离心 15 min 后,取全部上清液及交界层以下 3 mm 移至另一离心管,摇匀;第二次以 500 $\times$ g 离心 10 min,弃上层约 3/4 的贫血小板血浆,取剩下 1/4 层约 1 mL 混合物为实验用 PRP。按体积 9:1 的比例加入凝血酶激活剂(1 000 U/mL),室温下 5~6 s 成凝胶状态,备用。

## 1.5 观察指标与检测方法

1.5.1 右侧足底机械痛域(MWT)和热痛域(TWL)的测定方法 各组大鼠分别在术前 1 d、术后 6 h、1 d、3 d 和 7 d 相同时间段(8:00~13:00)安静环境下进行 MWT 和 TWL 测定。(1)机械痛域测定:将大鼠放在金属丝网眼垫上,用透明塑料鼠笼约束大鼠,待大鼠的梳理机探究活动基本消失,足底伸展适中后,采用 von-Frey 纤维丝以 up-down 法推算 50% 缩足阈值:用 von-Frey 纤维丝从 2 g 的力度开始,垂直刺激大鼠后肢足底中部裸露皮肤,持续时间 $\leq$ 4 s,若大鼠出现规避行为(舔足或抬足)认定为阳性反应,反之为阴性反应。当刺激不能引起阳性反应时,则给予相邻大一级力度的刺激;相反则给予相邻小一级力度刺激。如此连续进行直至出现第一次阳性/阴性反应骑跨,再连续测定 4 次。若刺激力度超过 15 g,实验记录为 15 g。每次刺激间隔 30 s。(2)热平板热痛域测定:试验将平板预热到 52 $^{\circ}\text{C}$ ,将大鼠置于平板表面,计时器开始计时,大鼠受热刺激缩足或舔舐时,计时器自动停止,记录时间。

1.5.2 大鼠海马组织相关指标检测方法 在模型构建后的第 7 天,最后一次 MWT 和 TWL 测定完成后,向大鼠腹腔注射 40 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉,脱颈椎处死后,剪开大鼠的头皮,暴露出头骨,打开大鼠脑壳,用直镊小心将大脑皮层拨开,海马组织位于大脑皮层底部,暴露海马组织,小心分离海马体后包裹于洁净的锡纸内,用液氮速冻后转移至 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存待测。(1)大鼠海马组织 HMGB1 蛋白相对表达量测定:采用 Western blot 蛋白印迹法。海马组织均浆后,各组样品中统一精取 20  $\mu\text{L}$  上样测定,采用 12% 浓度聚丙烯酰胺凝胶电泳和 PVDF 转膜。转膜完成后,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入 HMGB1 一抗孵育 15 min, PBS 液清洗 3 次,再加入二抗(羊抗兔 IgG)再次孵育 15 min 后曝光显影。(2)大鼠海马组织炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  表达水平测定:根据实验试剂盒说明书,通过 ELISA 法测定大鼠海马区 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的表达水平。(3)大鼠海马组织 HMGB1 mRNA 及其下游 Toll 样受体 4 (TLR4) mRNA、糖基化终产物受体(RAGE) mRNA 表达水平测定:采用 qRT-PCR 法检测。首先,加入 Trizol 提取大鼠海马组织的总 RNA,按照试剂盒说明书进行反转录反应,以待检测基因的引物为模板,进行荧光定量 PCR 检测,以  $\beta$ -actin 作为内参进行相对定量分析,按照  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法处理实验数据。大鼠海马组织 HMGB1、TLR4、RAGE mRNA 引物序列由上海生工生物技术合成提供。HMGB1:上游 5'-ATGGGCAAAGGAGATCCTA-3',下游 5'-ATTCTCATCATCTCTTCT-3'; TLR4:上游 5'-CAAGAAGCAACAACCTTTGACCTG-3',下游 5'-CCTGTGAGGTCGTTGAGGTTAG-3'; RAGE:上游 5'-GCCCTCCAGTCTACTCTCG-3',下游 5'-TGTGTGGCCACCC-ATCCAG-3';  $\beta$ -actin:上游 5'-GCCATGTACGTAGCC-ATCCA-3',下游 5'-GAACCGCTCATTGCCGATAG-3'。

1.6 统计学方法 应用 SPSS22.0 统计软件分析实验数据。计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用独立样本  $t$  检验,模型组不同时间点测定比较采用重复测量方差分析。以  $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组大鼠术后不同时间的右侧 MWT 和 TWL 比较 各组大鼠术前 1 d 的基线值比较差异无统计学意义( $P>0.05$ );空白对照组和假手术组术后各时间点比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。与对照组或假手术组比较,模型组(CCI 组和 CCI+PRP 组)大鼠在术后各时间点 MWT 和 TWL 值均明显降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );而 CCI+PRP 组和 CCI 组术后 6 h、1 d、3 d、7 d 时的 MWT 和 TWL 测值比较,CCI+PRP 组各时间点测值明显高于 CCI 组,差异均有统计

学意义( $P<0.05$ ),见表 1 和表 2。

表 1 各组大鼠术后不同时间的右侧 MWT 比较( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 1 Comparison of the right MWT at different time points after surgery in rats among different groups ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	术前 1 d	术后 6 h	术后 1 d	术后 3 d	术后 7 d
空白对照组	14.3 $\pm$ 1.5	14.3 $\pm$ 1.4	14.4 $\pm$ 1.4	14.2 $\pm$ 1.2	14.3 $\pm$ 1.5
假手术组	14.4 $\pm$ 1.6	14.2 $\pm$ 1.5	12.8 $\pm$ 2.2	13.2 $\pm$ 1.1	14.2 $\pm$ 1.4
CCI 组	14.5 $\pm$ 1.4	9.7 $\pm$ 1.4 <sup>ab</sup>	6.2 $\pm$ 1.6 <sup>ab</sup>	3.6 $\pm$ 1.8 <sup>ab</sup>	2.2 $\pm$ 0.5 <sup>ab</sup>
CCI+PRP 组	14.4 $\pm$ 1.5	11.0 $\pm$ 1.2 <sup>abc</sup>	8.4 $\pm$ 2.6 <sup>abc</sup>	5.8 $\pm$ 1.9 <sup>abc</sup>	3.3 $\pm$ 0.6 <sup>abc</sup>
F 值	0.030	28.138	35.242	117.782	367.524
P 值	0.993	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与术前 1 d 比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与空白对照组和假手术组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与 CCI 组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ 。

Note: Compared with 1 d before surgery, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; Compared with blank control group and sham operation group, <sup>b</sup> $P<0.05$ ; Compared with CCI group, <sup>c</sup> $P<0.05$ .

表 2 各组大鼠术后不同时间的右侧 TWL 比较( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 2 Comparison of the right TWL at different time points after surgery in rats among different groups ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	术前 1 d	术后 6 h	术后 1 d	术后 3 d	术后 7 d
空白对照组	19.3 $\pm$ 4.0	19.4 $\pm$ 4.3	18.7 $\pm$ 4.2	19.4 $\pm$ 4.3	19.2 $\pm$ 4.2
假手术组	18.9 $\pm$ 3.8	18.9 $\pm$ 4.1	18.6 $\pm$ 4.1	18.8 $\pm$ 4.2	18.9 $\pm$ 4.3
CCI 组	19.0 $\pm$ 3.6	11.8 $\pm$ 3.1 <sup>ab</sup>	10.8 $\pm$ 3.2 <sup>ab</sup>	8.2 $\pm$ 3.1 <sup>ab</sup>	6.2 $\pm$ 2.3 <sup>ab</sup>
CCI+PRP 组	19.3 $\pm$ 3.6	15.1 $\pm$ 3.8 <sup>abc</sup>	14.0 $\pm$ 3.5 <sup>abc</sup>	11.2 $\pm$ 3.2 <sup>abc</sup>	8.5 $\pm$ 2.4 <sup>abc</sup>
F 值	0.040	8.550	10.347	22.160	39.446
P 值	0.989	0.001	0.001	0.001	0.001

注:与术前 1 d 比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与空白对照组和假手术组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与 CCI 组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ 。

Note: Compared with 1 d before surgery, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; Compared with blank control group and sham operation group, <sup>b</sup> $P<0.05$ ; Compared with CCI group, <sup>c</sup> $P<0.05$ .

2.2 7 d 时各组大鼠海马组织的 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  表达量比较 7 d 时,空白对照组和假手术组大鼠海马组织的 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  表达量比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),而模型组(CCI 组和 CCI+PRP 组)和假手术组大鼠海马组织的 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  表达量比较,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );CCI+PRP 组大鼠海马组织的 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  表达量明显低于 CCI 组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 3。

表 3 7 d 时各组大鼠海马组织的 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  表达量比较( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 3 Comparison of the expression levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in hippocampal tissues of rats among different groups at 7 d after surgery ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	TNF- $\alpha$ (pg/mg)	IL-1 $\beta$ (pg/mg)
空白对照组	49.28 $\pm$ 2.62	50.44 $\pm$ 2.06
假手术组	54.64 $\pm$ 3.68	52.68 $\pm$ 3.56
CCI 组	202.68 $\pm$ 18.24 <sup>a</sup>	134.44 $\pm$ 9.52 <sup>a</sup>
CCI+PRP 组	156.74 $\pm$ 24.75 <sup>ab</sup>	122.48 $\pm$ 8.52 <sup>ab</sup>
F 值	240.106	443.189
P 值	0.001	0.001

注:与空白对照组和假手术组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与 CCI 组比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ 。

Note: Compared with blank control group and sham operation group, <sup>a</sup> $P<0.01$ ; Compared with CCI group, <sup>b</sup> $P<0.01$ .

2.3 7 d 时各组大鼠海马组织 HMGB1 蛋白表达量和 HMGB1 mRNA、TLR4 mRNA 和 RAGE mRNA 相对表达水平比较 7 d 时提取各组大鼠海马组织均浆液, WB 法测定 HMGB1 蛋白表达量, 对照组和假手术组比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 模型组 (CCI 组和 CCI+PRP 组) 和对照组或假手术组的 HMGB1 蛋白表达量比较, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ); CCI 组的 HMGB1 蛋白表达量明显高于 CCI+PRP 组, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。空白组和假手术组大鼠海马组织的 HMGB1 mRNA、TLR4 mRNA 和 RAGE mRNA 相对表达水平比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 模型组 (CCI 组和 CCI+PRP 组) 和对照组或假手术组的 HMGB1 mRNA、TLR4 mRNA 和 RAGE mRNA 表达比较, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ); CCI 组的 HMGB1 mRNA、TLR4 mRNA 和 RAGE mRNA 表达量明显高于 CCI+PRP 组, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 见图 1 和表 4。

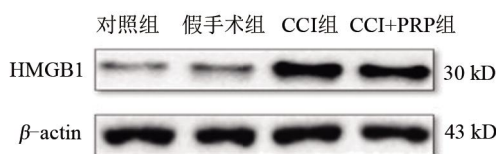


Figure 1 Comparison of HMGB1 protein expression in hippocampal tissues of rats in each group at 7 d after surgery

表 4 各组大鼠海马区 HMGB1 及其下游 TLR4 和 RAGE mRNA 相对表达水平比较 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 4 Comparison of mRNA of HMGB1, TLR4, and RAGE in hippocampus of rats among different groups ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	HMGB1 mRNA	TLR4 mRNA	RAGE mRNA
空白对照组	1.24±0.16	1.33±0.26	1.24±0.28
假手术组	1.28±0.26	1.26±0.24	1.20±0.16
CCI 组	5.12±1.34 <sup>a</sup>	2.74±0.46 <sup>a</sup>	2.32±0.38 <sup>a</sup>
CCI+PRP 组	3.62±1.68 <sup>ab</sup>	2.14±0.39 <sup>ab</sup>	2.02±0.21 <sup>ab</sup>
F 值	30.560	40.730	43.227
P 值	0.001	0.001	0.001

注: 与空白对照组和假手术组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; 与 CCI 组比较, <sup>b</sup> $P<0.05$ 。

Note: Compared with that in blank control group and sham operation group, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; Compared with that in CCI group, <sup>b</sup> $P<0.05$ .

### 3 讨论

周围神经慢性压迫性损伤发生后, 病理变化包括轴浆运输受损、轴突变性、施万细胞损伤、节段性脱髓鞘和完全瓦勒氏变性等<sup>[6]</sup>。在坐骨神经慢性压迫性损伤初期, 神经干外层的基底膜可能仍保持部分完整性, 损伤呈现的是渐进的过程。研究表明, 在疾病进展期, 对损伤部位微环境进行及时有效的干预不仅有利于缓解神经损伤症状, 也助于在解除压迫后神经功能恢复<sup>[7]</sup>。

周围神经损伤(peripheral nerve injury, PNI)修复过

程复杂, 在大鼠坐骨神经结扎术后早期, 受损神经通过轴浆逆向运输营养因子和活性物质能力骤减。Bennett 等<sup>[8]</sup>研究发现, 在坐骨神经 4 道结扎手术后 7 d 内, 大鼠行为学发生明显变化; 结扎后第 2 天开始, 结扎侧的后爪机械痛阈明显降低。本实验中模型组大鼠在坐骨神经结扎术后同样出现了行走时笨拙、跛行、足外翻或蜷缩等行为学异常表现; 模型组在术后 6 h 即出现了 MWT 和 TWL 测定值明显下降, 且在术后 7 d 观察阶段 MWT 和 TWL 持续恶化。这说明 CCI 大鼠出现了典型的 PNI, 发生了 NP, 造模成功。Bastami 等<sup>[9]</sup>研究发现 PRP 对周围神经损伤愈合有促进作用。本研究也发现 CCI+PRP 组大鼠术后 MWT 和 TWL 明显要高于 CCI 组, 这也说明 PRP 缓解了坐骨神经的损伤程度。PRP 中含有大量的生长因子 (PDGF、TGF- $\beta$ 、IGF-1、EGF、VEGF 等), 研究发现这些生长因子可能通过加速神经元细胞轴突生长、刺激细胞增殖减少凋亡等方式, 改善创伤微环境, 缓解损伤促进愈合<sup>[10]</sup>。

高迁移率组蛋白 1 (HMGB1) 及其受体 TLR4, 在慢性神经损伤发生后中枢炎性疼痛信息处理中发挥着重要作用<sup>[11]</sup>。在生理条件下, HMGB1 与核内组蛋白结合维持 DNA 转录稳定性<sup>[12]</sup>; 病理条件下, HMGB1 通过 TLR4/RAGE-NF- $\kappa$ B 信号通路诱导 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 等多种炎性因子的表达, 而这些炎性介质又反过来激活 NF- $\kappa$ B, 形成的细胞外正反馈调节, 放大炎症效应<sup>[13-14]</sup>。中枢海马组织承担着大脑记忆存储、学习、构建空间、定位及情绪反应等功能, 越来越多证据表明海马组织参与了 NP 的形成与维持<sup>[15]</sup>。周围性 NP 发生后, 中枢痛记忆加强、学习能力下降以及负性情绪改变等症状, 是否与海马组织暴发神经炎症机制有关? 本实验中, 在术后 7 d 提取各组大鼠海马区组织, 通过均浆后提取组织液检测发现模型组 (CCI 组和 CCI+PRP 组) 大鼠炎性因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  表达量和 HMGB1 蛋白及其下游 TLR4 和 RAGE mRNA 表达水平均高于空白组和假手术组, 推测外周神经疼痛刺激可能激活了大脑海马组织的级联炎性反应。而在模型组中, CCI+PRP 组各组数值明显低于 CCI 组, 据此推断 PRP 凝胶局部干预可能改善了中枢海马组织的级联炎性水平, 这可能与 HMGB1 依赖的 TLR4/RAGE-NF- $\kappa$ B 信号通路有关。

综上所述, PRP 凝胶早期干预可以有效减缓坐骨神经 CCI 模型大鼠的神经病理性疼痛进程, 促进修复; 同时亦可减轻中枢海马组织炎性反应, 这可能与抑制 HMGB1 依赖的 TLR4/RAGE-NF- $\kappa$ B 信号通路有关。但本实验也存在不足之处, 尚不能对 PRP 缓解中枢海马组织神经炎症反应提供直接证据, 这还需要通过海马神经元体外培养进一步验证。目前在周围神经损

伤治疗中应用 PRP 凝胶依然处于实验研究阶段,在 PRP 制作中浓度、白细胞含量以及生长因子活性等因素均可能影响实验结果。随着生物工程技术的进步,PRP 凝胶治疗周围神经损伤面临的诸多问题将逐步得到解决,这将会使 PRP 凝胶在神经损伤科研方面产生更有利的影响,同时为周围神经损伤患者及其家庭带来希望。

#### 参考文献

- [1] Du T, Hu YS, Lu G, et al. Chronic neuropathic pain [J]. Chinese Journal of Pain Medicine, 2021, 27(7): 5.  
杜涛, 胡永生, 卢光, 等. 慢性神经病理性疼痛[J]. 中国疼痛医学杂志, 2021, 27(7): 5.
- [2] Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, et al. Neuropathic pain [J]. Chinese Journal of Contemporary Neurology & Neurosurgery, 2008, (2): 1630-1635.
- [3] Singh G, Taliyan R, Sharma PL. Pathophysiology of neuropathic pain: a systemic review [J]. Int J Pharm Sci Res, 2012, 3(10): 3530-3542.
- [4] Zhang XA, Wu SJ, Lu HB, et al. Autologous platelet-rich plasma for repairing facial nerve injury [J]. Chinese Tissue Engineering, 2013, 17(28): 5145-5150.  
张兴安, 吴蜀江, 卢海彬, 等. 自体富血小板血浆修复面神经损伤[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(28): 5145-5150.
- [5] Amable PR, Carias RB, Teixeira MV, et al. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors [J]. Stem Cell Res Ther, 2013, 4(3): 67.
- [6] Wang ML, Rivlin M, Graham JG, et al. Peripheral nerve injury, scarring, and recovery [J]. Connect Tissue Res, 2019, 60(1): 3-9.
- [7] Zigmund RE, Echevarria FD. Macrophage biology in the peripheral nervous system after injury [J]. Prog Neurobiol, 2019, 173: 102-121.
- [8] 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.
- [9] Bastami F, Vares P, Khojasteh A. Healing effects of platelet-rich plasma on peripheral nerve injuries [J]. J Craniofac Surg, 2017, 28(1): e49-e57.
- [10] Su H, Tan GQ, Xu YQ. Research progress on the therapeutic mechanism of platelet-rich plasma in the microenvironment of nerve regeneration in spinal cord injury [J]. Hebei Medicine, 2021, 27(9): 1578-1581.  
苏辉, 谭国庆, 徐展望. 富血小板血浆在脊髓损伤神经再生微环境治疗机制研究进展[J]. 河北医学, 2021, 27(9): 1578-1581.
- [11] Lv JL, Hu JT, Chai L, et al. Effects of inhibiting high mobility group histone 1 on inflammatory response after acute spinal cord injury in rats [J]. Zhejiang Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2020, 30(1): 19-23.  
吕建兰, 胡劲涛, 柴乐, 等. 抑制高迁移率组蛋白 1 对大鼠急性脊髓损伤后炎症反应的影响[J]. 浙江中西医结合杂志, 2020, 30(1): 19-23.
- [12] Zhang XM, Zhao WP, Liu XF, et al. Spinal HMGB1/NF- $\kappa$ B is involved in the analgesic effect of celastrol on chronic inflammatory pain in rats [J]. Chinese Journal of Pain Medicine, 2018, 24(12): 891-896.  
张秀梅, 赵文平, 刘星芳, 等. 脊髓 HMGB1/NF- $\kappa$ B 参与雷公藤红素对慢性炎症痛大鼠的镇痛作用[J]. 中国疼痛医学杂志, 2018, 24(12): 891-896.
- [13] Yuan C, Cao H. Research progress on the relationship between HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B signal transduction and diabetic neuropathic pain [J]. Chinese Journal of Diabetes, 2014, 22(8): 3.  
袁超, 曹红. HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B 信号转导与糖尿病神经病理性疼痛关系的研究进展[J]. 中国糖尿病杂志, 2014, 22(8): 3.
- [14] Kuang X. The effect of HMGB1/TLR4 signal transduction pathway on neuropathic pain and its mechanism [D]. Changsha: Central South University, 2012.  
旷昕. HMGB1/TLR4 信号传导途径对神经病理性疼痛的影响及其机制探讨[D]. 长沙: 中南大学, 2012.
- [15] Tian RL, GUO ZH, LI YN. Research progress on the effect of neuropathic pain on hippocampus [J]. Chinese Journal of Difficult and Complicated Cases, 2017, 16(11): 1166-1170.  
田润利, 郭朝晖, 李永男. 神经病理性疼痛对海马影响的研究进展[J]. 疑难病杂志, 2017, 16(11): 1166-1170.

(收稿日期:2023-07-14)