

前扣带回内肿瘤坏死因子 α 过表达在神经病理性疼痛中的作用

王少坤, 陈少霞, 姚沛汶, 孙梓乘, 那晓东, 臧颖
(中山大学疼痛研究中心//中山医学院生理教研室, 广东广州 510080)

摘要:【目的】探讨坐骨神经部分损伤对前扣带回(ACC)内致炎细胞因子TNF- α 、IL-1 β 和抗炎细胞因子IL-10表达的影响,并分析它们在神经病理性疼痛中的可能作用。【方法】采用行为学、Western blot、免疫荧光组织化学方法,观察外周神经损伤后ACC内上述细胞因子表达的改变以及ACC内微量注射相应中和抗体对大鼠痛行为的影响。【结果】(1)坐骨神经部分损伤(SNI)诱导大鼠损伤侧触诱发痛并伴有ACC内致炎细胞因子TNF- α 和抗炎细胞因子IL-10蛋白水平显著升高,其中TNF- α 升高幅度更大,但对IL-1 β 的表达无影响;(2)免疫荧光双染结果表明SNI后ACC内上调的TNF- α 以及IL-10都表达于神经元而非胶质细胞内;(3)通过SNI术前及术后连续多次在ACC内微量注射TNF- α 中和抗体,显著缓解大鼠触诱发痛,但给予IL-1 β 中和抗体对大鼠痛行为无影响。【结论】以上结果表明坐骨神经损伤可能通过诱导ACC神经元内TNF- α 异常分泌易化脊髓背角痛信息传入。

关键词:肿瘤坏死因子- α ;前扣带回;神经病理性疼痛

中图分类号:R338.7

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2017)01-0008-07

Role of TNF- α in Anterior Cingulate Cortex in Neuropathic Pain Induced by Sciatic Nerve Injury

WANG Shao-kun, CHEN Shao-xia, YAO Pei-wen, SUN Zi-cheng, NA Xiao-dong, ZANG Ying
(Pain Research Center and Department of Physiology, Zhongshan Medical School of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Corresponding to: ZANG Ying, E-mail: yingzang@163.com

Abstract: 【Objective】 To discuss the effect of sciatic nerve injury on the expressions of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-10 (IL-10) in anterior cingulate cortex (ACC), and further to explain their roles resided in the development of neuropathic pain. 【Method】 With use of the methods of behavioral test, western blot and immunohistochemistry, we examine the effects of spared sciatic nerve injury (SNI) on the expressions of TNF- α , IL-1 β , and IL-10 in ACC, and observe the effect of the neutralizing antibody of TNF- α , IL-1 β on the rat mechanical allodynia. 【Result】 In present experiment, SNI increased the protein levels of TNF- α , IL-10, but not IL-1 β in ACC. Increased TNF- α -IR and IL-10-IR in ACC is located in neurons, but not astrocytes and microglia at 7 d following L5-VRT. Pre-treatment with anti-TNF α antibody but not anti-IL-1 β antibody into ACC significantly increased the rat paw withdrawal threshold to von Frey hairs. 【Conclusion】 These data suggested that the increased TNF- α in ACC neurons might be responsible for the development of neuropathic pain.

Key words: tumor necrosis factor-alpha; anterior cingulate cortex; neuropathic pain

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(1): 8-14]

收稿日期:2016-09-05

基金项目:国家自然科学基金(81371228);广东省科技计划项目(2012B031800254);广东省自然科学基金(S2013010016647);中央高校基本科研业务费专项资金(16ykjc02)

作者简介:王少坤,硕士;臧颖,通信作者, E-mail: yingzang@163.com

疼痛是一种复杂的经历,包含感觉分辨和情绪反应,二者相互独立又密切相关。以往,人们对病理性疼痛的研究大都围绕在脊髓及脊髓下位水平对痛感觉分辨的传递和调制,如初级感觉神经元的敏化和脊髓背角的突触可塑性改变是解释神经病理性疼痛的重要机制。然而,外周神经损伤后对脊髓上位脑结构功能的改变以及对痛情绪诱导的认知不足已严重阻碍了临床慢性痛的治疗,成为研发新的有效镇痛药和治疗方法的瓶颈。已知前扣带回(anterior cingulate cortex, ACC)在痛的感觉分辨、痛情绪反应等神经信息处理过程中扮演重要角色^[1-3]。正电子发射断层成像(positron emission tomography, PET)显示慢性痛增强了ACC的脑血流和糖代谢^[4-5]。电生理实验研究表明周围神经损伤或慢性炎性痛动物ACC区的兴奋性突触传递增强,依赖于AMPA和NMDA受体^[1-2],干扰NMDA受体NR2B亚单位的基因表达可阻断痛敏行为^[6]。以上研究主要集中于慢性痛动物ACC内神经元电活动和突触功能的改变,什么因素诱导ACC神经元过度兴奋尚不十分清楚。近年来,神经免疫反应在神经病理性疼痛发生和维持中的作用备受关注。我们的研究已证实,在外周和脊髓肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的过表达是运动神经损伤后外周敏感化和中枢敏感化的重要原因^[7-9]。由于坐骨神经部分损伤(spared sciatic nerve injury, SNI)和运动神经损伤(L5 ventral root transaction, L5-VRT)可诱导慢性痛动物脑脊液、海马以及伏隔核内TNF- α 显著升高^[10-12],TNF- α 又可直接调控电压门控钠通道的表达提高神经元兴奋性^[9-10],推测外周神经损伤后TNF- α 可能在ACC内异常表达并影响神经元的兴奋性参与痛过敏形成。本研究拟探讨SNI大鼠痛模型ACC内TNF- α 等细胞因子是否异常表达,选择性降低ACC内TNF- α 是否缓解大鼠痛过敏行为,从神经免疫学角度揭示ACC-脊髓下行投射神经元在痛调制中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验动物采用成年雄性SD大鼠,体质量150

~200 g,随机分为空白对照组($n=9$)、假手术组($n=9$)、SNI痛模型组($n=18$)、SNI溶剂对照组($n=13$)和SNI给药组($n=13$)。动物由中山大学北校区实验动物中心提供,分笼饲养,室温及室内相对湿度分别维持在 $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 和 $60\% \pm 10\%$,按照大鼠的生物节律将光照时间维持在每日的7:00 AM-7:00 PM。所有实验步骤均按照实验动物的相关使用原则操作。

1.2 坐骨神经部分损伤模型(SNI model)制作

10%水合氯醛(35 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,选取左后肢,切开皮肤逐层分离,暴露坐骨神经及其3个分支,游离腓总神经和胫神经用手术丝线扎紧,在结扎的远端切断部分神经,保留腓肠神经并避免过分牵拉,逐层缝合。

1.3 机械性触诱发痛行为学检测

将大鼠置于测试的透明有机玻璃箱(18 cm \times 25 cm \times 18 cm)内,箱底由金属网制成(网格0.8 cm \times 0.8 cm),待大鼠安静后,采用Up-Down方法^[13],选8根强度呈对数递增方式的von Frey hair(0.41、0.70、1.20、2.04、3.63、5.50、8.51、15.14 g)分别对大鼠后肢足心部进行刺激,每次刺激持续时间为6~8 s。以2.04 g刺激强度为初始强度,若撤足反应为阴性则选用强度呈对数递增的相邻von Frey hair继续刺激,若撤足反应为阳性,则选择相邻递减的强度给予刺激。如此反复,以第一个转折点的前一点为起点连续6次的刺激结果为最终撤足反应模式,再通过特定程序将撤足反应模式转换为撤足阈值。

1.4 Western blot

将大鼠铡刀断头,取脑。按照Paxinos & Watson图谱,冠状切取前囟前3.7 mm到前囟后1.4 mm范围的组织,左右旁开0.8 mm,深2.6 mm。取出后称重,放入离心管中,液氮冻存,在 -80°C 中储存。将组织置于15 mmol/L Tris缓冲液(250 mmol/L蔗糖,1 mmol/L MgCl_2 ,1 mmol/L DTT,2.5 mmol/L EDTA,1 mmol/L EGTA,50 mmol/L NaF,10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 亮抑酶肽,1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胃酶抑素,2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抑肽酶,2 mmol/L焦磷酸钠,0.1 mmol/L NaVO_4 ,0.5 mmol/L PMSF,蛋白酶抑制剂,pH = 7.6)中匀浆、超声,经紫外分光法测定蛋白浓度,进行电泳、转膜、免疫反应,在曝光机下进行曝光并分析目的蛋白的分子质量和净光密度值。

1.5 免疫荧光双染

大鼠经 200 g/L 乌拉坦(氨基甲酸乙酯, 1.5 g/kg)腹腔注射深麻醉, 先后用生理盐水和 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(phosphate buffer, PB)配制的 40 g/L 多聚甲醛液(pH 7.2-7.4, 4 °C)对动物进行主动脉灌注固定, 约 30 min。解剖动物取出大脑, 置于 40 g/L 多聚甲醛溶液后固定 1 h, 转入 300 g/L 蔗糖溶液脱水 3 d。标本经脱水后行冰冻切片, 切片为横切面, 厚度 25 μm , 收集于 24 孔板内的大脑冰冻切片用 0.01 mol/L PBS 洗 3 次, 每次 10 min, 室温下加入封闭液封闭非特异性结合位点。1 h 后吸去封闭液加入抗 IL-10(1:400)/TNF- α 抗体(1:200)和 GFAP(星形胶质细胞标记物, 1:200)/Iba1(小胶质细胞标记物, 1:400)/Neuron(神经元标记物, 1:500), 4 °C 过夜后弃上清, 用 0.01 mol/L PBS 洗 3 次, 每次 10 min, 加入标记 Cy3 的 IgG(1:300)和 FITC 的 IgG(1:200), 室温下避光作用 1 h, 再用 0.01 mol/L PBS 洗 3 次, 每次 10 min, 仔细挑选切片贴于载玻片上并加取封片液和盖玻片, 在荧光显微镜下观察并拍照。

1.6 ACC 置管和药物使用

手术前对大鼠称重, 腹腔注射 10% 水合氯醛(0.4 mL/100 g 体质量)麻醉, 将大鼠头部固定在脑立体定位仪上, 备皮, 碘酒和 75% 酒精消毒后, 在头顶部开一个直径约为 1.5 cm 的窗口, 用双氧水和盐水擦净骨膜以使其清晰暴露。按照图谱 Paxions & Watson 对 ACC 进行双侧定位(前卤前 2.7 mm, 旁开 0.6 mm, 深 2.5 mm)。用牙科钻将其上方的颅骨钻透, 在距离较远的颅骨前后各钻一个未穿透颅骨的浅洞, 用以固定两颗螺丝钉。往颅骨表面加注混合过的牙托水和牙托粉, 帽管通过螺丝钉和水泥固定在颅骨上。术后大约 1 周, 动物从手术创伤状态恢复后, 进行行为学实验训练和 ACC 内药物干预。出现行为异常或体质量明显下降的个体被排除。

IL-1 β /TNF- α 中和抗体的配制和使用: 将粉末状的抗体溶于无菌 PBS, 终浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每 2 天注射 1 次, 每只动物每次注射 10 μL 。

1.7 统计学分析

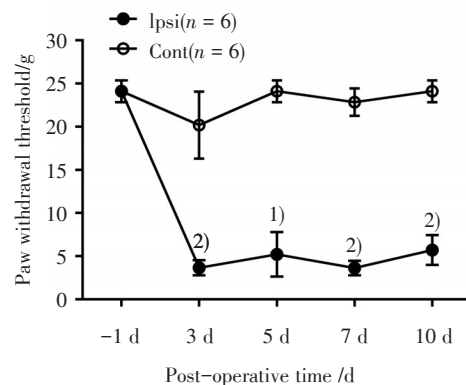
所有统计学分析均通过 SPSS 10.0 软件(SPSS Inc, USA)进行, 实验结果以均数 \pm 标准误(mean \pm

SE)表示。行为学测试数据: 50% 撤足阈值(g)使用配对秩和检验(Wilcoxon Signed Ranks Test)。Western blot 数据的处理首先用单因素方差分析(one-way ANOVA), 后用 Tukey 法(Tukey post hoc test)检测组间差异或使用 *t* 检验(Student's *t*-test)进行两组间差异比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SNI 病理性疼痛大鼠 ACC 内 TNF- α 蛋白表达升高

为明确外周神经损伤是否在引起神经病理性疼痛的同时诱导 ACC 内神经免疫反应的参与, 我们检测了经典的 SNI 慢性痛大鼠 ACC 内致炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 和抗炎细胞因子 IL-10 蛋白的表达改变, 并对异常表达的蛋白进行了细胞定位分析。如图 1 所示, SNI 诱导的神经病理性疼痛大鼠表现为神经损伤侧后肢机械性撤足阈值显著下降并持续至实验结束(术后 10 d, $P < 0.05$)。Western blot 结果表明, 与正常大鼠(Naive)相比, 假手术组大鼠(Sham)右侧 ACC 内 IL-1 β (图 2B)和 IL-10(图 2C)蛋白的表达都无明显改变, 尽管 Sham 大鼠 ACC 内 TNF- α (图 2A)表达强于 Naive 大鼠, 但差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 Naive 和 Sham 大鼠相比, 右侧 ACC 内 TNF- α (图 2A, $F = 23.73$, $P = 0.0014$)和 IL-10(图 2C, $F =$



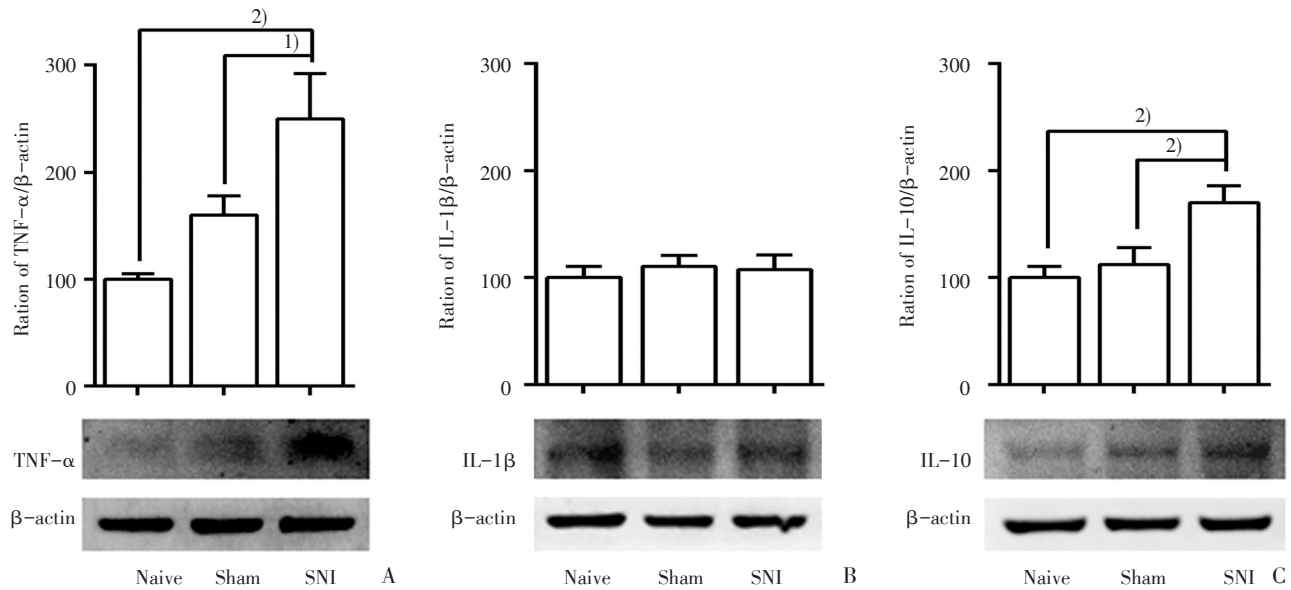
The ipsilateral paw withdrawal threshold in SNI rat is decreased significantly following nerve injury. 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ vs -1d.

图1 SNI 诱导大鼠损伤侧触诱发痛
Fig.1 SNI induces the mechanical allodynia in ipsilateral rat hindpaw

20.57, $P = 0.0021$)的蛋白水平在SNI术后7 d显著升高,其中TNF- α 升高的幅度($249\% \pm 24\%$)较IL-10($170\% \pm 9\%$)更为显著,但SNI后7 d ACC内IL-1 β 蛋白(图2B)的表达几乎无改变($F = 0.6474, P = 0.5564$)。免疫荧光双染结果(图3)显示,SNI后7 d ACC内增多的TNF- α 和IL-10表达于神经元内,而非星形胶质细胞和小胶质细胞。

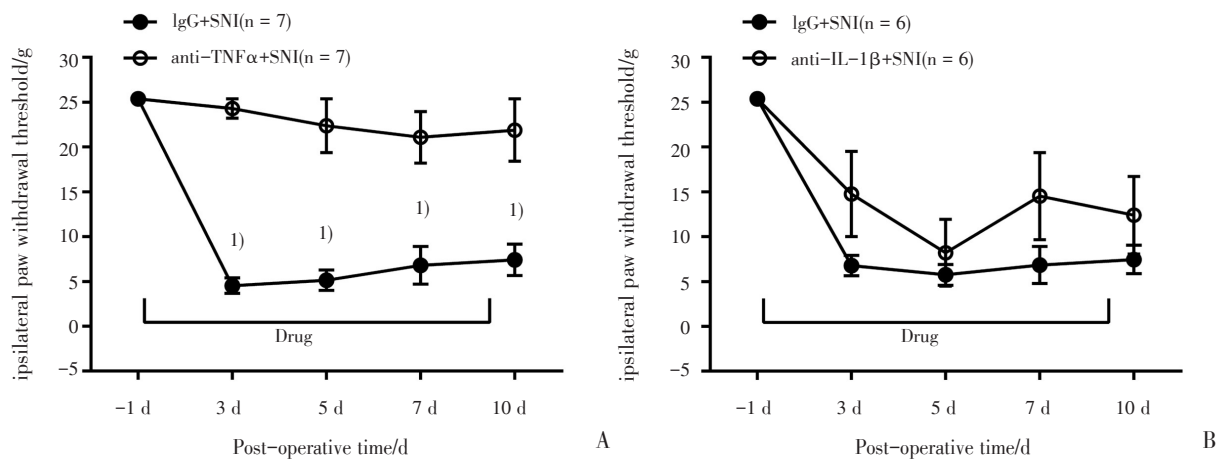
2.2 阻断ACC内TNF- α 蛋白的异常表达缓解大鼠痛过敏行为

为验证ACC内异常表达的TNF- α 在慢性痛中的作用,本研究在SNI术前1 d和术后1、3、5、7、9 d连续6次ACC内微量注射TNF- α 中和抗体(anti-TNF- $\alpha, 200 \mu\text{g/mL}, 10 \mu\text{L}$),用Up-down行为学检测方法观察降低ACC内TNF- α 的蛋白水



Protein levels of TNF- α (A), IL-1 β (B) and IL-10 (C) in the ipsilateral ACC from 7 d after SNI or from naive or sham rats are analyzed by western blot. β -actin is a loading control. $n = 3/\text{group}$, 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$.

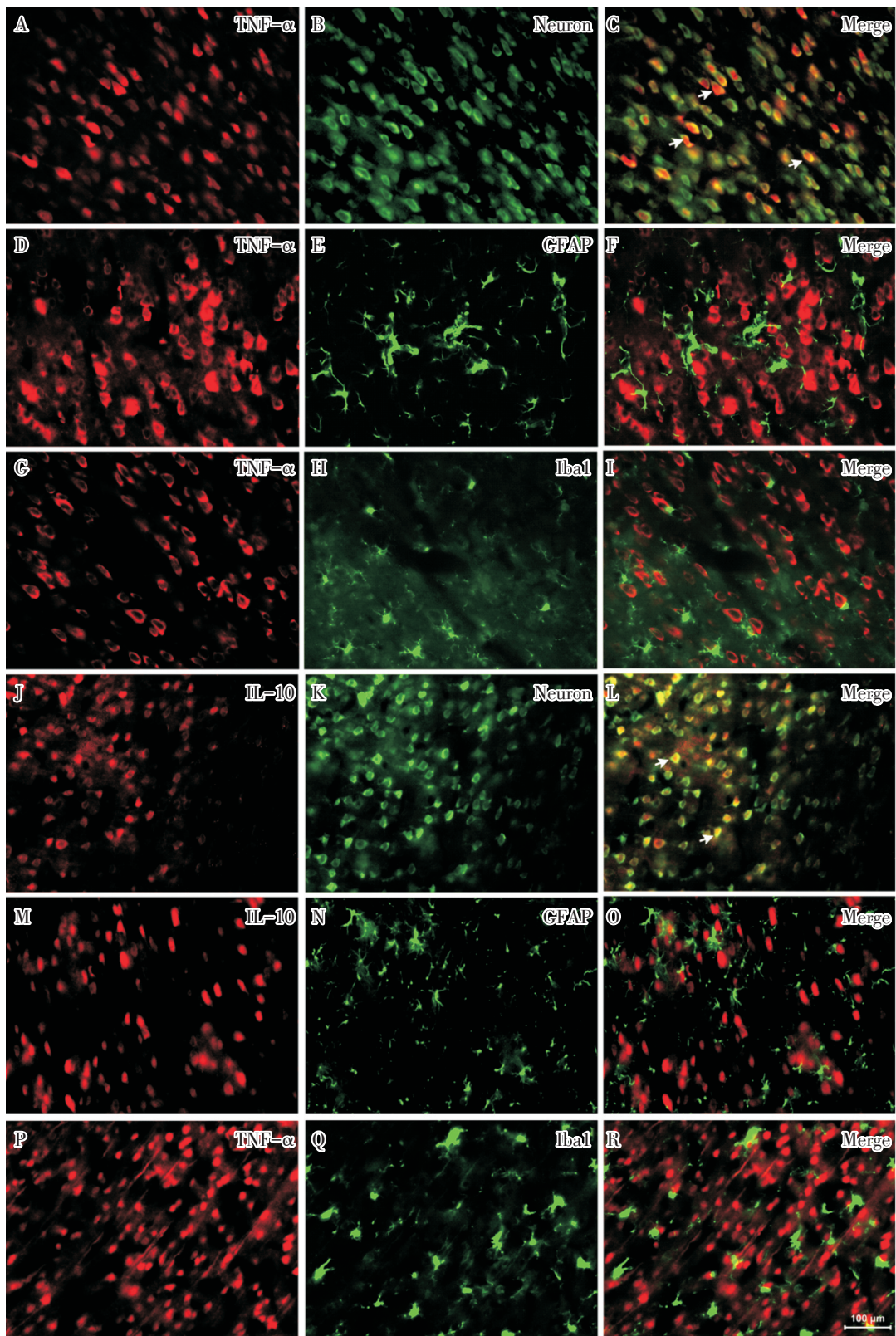
图2 SNI诱导ACC内致炎细胞因子TNF- α 和抗炎细胞因子IL-10蛋白水平的影响
Fig.2 SNI increases the protein levels of TNF- α and IL-10 but not IL-1 β in ACC



Compared with vehicle (normal control goat IgG, $200 \mu\text{g/mL}, 10 \mu\text{L}$) rats, continuous microinjection of the TNF- α (A) but not IL-1 β (B) neutralizing antibody ($200 \mu\text{g/mL}, 10 \mu\text{L}$) into ACC 1 day before and once every two days until post-operative day 9 significantly inhibited the decrease in ipsilateral paw withdrawal threshold by SNI. 1) $P < 0.05$ vs vehicle group.

图4 ACC内微量注射TNF- α 而非IL-1 β 中和抗体显著缓解SNI诱导的大鼠触诱发痛

Fig.4 Administration with anti-TNF- α but not anti-IL-1 β antibody inhibits the induction of mechanical allodynia in ipsilateral hindpaw after SNI



Double immunofluorescence staining in ACC show that both TNF- α (red) and IL-10 (red) are co-localized with NeuN (a neuronal marker, green; C and L), but not GFAP (an astrocyte marker, green; F and O) and Iba1 (a microglia marker, green; I and R). Scale bars: (A-R) = 100 μ m

图3 SNI后7 d ACC内增多的TNF- α 和IL-10表达于神经元内,而非星形胶质细胞和小胶质细胞

Fig.3 Increased TNF- α -IR and IL-10-IR in ACC is located in neurons, but not astrocytes and microglia at 7 d following L5-VRT

平对坐骨神经部分损伤诱导的大鼠触诱发痛行为的影响。如图4A所示,与溶剂(正常羊IgG, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 μL)对照组相比,ACC内给予TNF- α 中和抗体显著抑制SNI诱导的大鼠损伤侧后肢撤足阈值的下降($P < 0.05$)。提示外周神经损伤后ACC内异常表达的TNF- α 参与了痛信息的调制。此外,我们也检测了干预ACC内IL-1 β 的表达对痛行为的影响,发现用上述同样方法给予相同剂量IL-1 β 的中和抗体对SNI诱导的撤足阈值下降无明显影响,撤足阈值与溶剂对照组间无显著差异($P > 0.05$)。

3 讨论

本研究发现:坐骨神经部分损伤(SNI)诱导大鼠损伤侧触诱发痛并伴有ACC内致炎细胞因子TNF- α 和抗炎细胞因子IL-10蛋白水平显著升高,但对IL-1 β 的表达无影响;免疫荧光双染结果表明SNI后ACC内上调的TNF- α 以及IL-10都表达于神经元而非胶质细胞内;通过SNI术前及术后连续多次在ACC内微量注射TNF- α 中和抗体,显著缓解大鼠触诱发痛,但给予IL-1 β 中和抗体对大鼠痛行为无影响。以上结果表明坐骨神经部分损伤可能通过诱导ACC神经元内TNF- α 异常分泌易化ACC-脊髓投射通路,加强脊髓背角痛信息传入。

已知慢性痛可导致情绪紧张焦虑,后者又进一步加重持续性痛过敏。与痛情绪信息处理密切相关的脑区ACC不但可以直接接受丘脑内侧核群传入的伤害性信息,还可发出纤维直接投射到中脑导水管周围灰质、中脑被盖、蓝斑、黑质、伏核、海马等处,甚至直接投射到处理痛传入信息的初级中枢脊髓背角。当外周神经损伤后由ACC的II/III板层和V板层构成的兴奋性突触传递增强,这些源于ACC注入脊髓的下行易化被认为是ACC参与痛觉调制的解剖基础^[1]。由于激活阿片受体信号转导途径^[14]和阻断代谢性谷氨酸受体(mGluR1)^[15]都可缓解痛过敏行为,提示外周神经损伤后ACC可能通过削弱下行抑制和增强下行易化,使机体对伤害性刺激的敏感性增强,提高逃跑反应和生存能力。然而,何种因素促使神经损

伤后ACC内神经元兴奋性改变,诱导不良痛情绪并参与痛觉调制尚不十分清楚,解决这一问题可为临床缓解慢性痛提供新靶点。新近研究显示,在福尔马林诱导的条件性位置回避(formalin-induced conditioned place avoidance, F-CPA)炎性痛大鼠的ACC内致炎细胞因子TNF- α 和IL-1 β 的基因和蛋白水平均显著升高^[16];在用完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)诱导的炎性痛小鼠ACC内,上调的TNF- α 通过促使神经递质释放加强突触传递过程^[17]。也有文献报道,坐骨神经部分损伤后,脊髓背角内神经免疫状态由最初(婴幼儿期)较强的抗炎反应逐渐转换成致炎反应增强(青春期),是SNI后幼鼠(出生后10天)痛阈值被延迟降低的重要原因^[18],提示动物体内局部微环境致炎细胞因子与抗炎细胞因子的平衡状态可影响某些神经生理功能,进而干预行为。本研究发现,在SNI坐骨神经部分损伤后,ACC神经元内致炎细胞因子TNF- α 和抗炎细胞因子IL-10蛋白水平均显著升高(TNF- α 升高幅度大于IL-10),但对IL-1 β 的表达无影响。外周神经损伤后早期ACC内微量注射TNF- α 中和抗体可以显著缓解大鼠触诱发痛,但给予IL-1 β 中和抗体对大鼠痛行为无影响。以上结果提示,外周神经损伤后,大鼠ACC内抗炎细胞因子IL-10的升高可能是机体启动的一种自我保护机制,但其升高的幅度低于致炎细胞因子TNF- α 的过度表达,因此这种致炎与抗炎的失平衡可能最终导致ACC神经元过度兴奋,参与慢性痛行为的诱导。我们以往研究已证实TNF- α 可通过增强背根神经节内电压门控通道的表达提高神经元兴奋性^[9],因此调控ACC内TNF- α 的表达可能成为临床治疗慢性痛的新靶点。

参考文献

- [1] Chen T, Koga K, Descalzi G, et al. Postsynaptic potentiation of corticospinal projecting neurons in the anterior cingulate cortex after nerve injury [J]. *Mol Pain*, 2014, 10: 33.
- [2] Koga K, Descalzi G, Chen T, et al. Coexistence of two forms of LTP in ACC provides a synaptic mechanism for the interactions between anxiety and chronic pain [J]. *Neuron*, 2015, 85(2): 377-389.

- [3] Zhuo M. neural mechanisms underlying anxiety-chronic pain interactions [J]. *Trends Neurosci*, 2016, 39(3): 136-145.
- [4] Kishima H, Saitoh Y, Oshino S, et al. Modulation of neuronal activity after spinal cord stimulation for neuropathic pain; H (2) 15O PET study [J]. *Neuroimage*, 2010, 49(3): 2564-2569.
- [5] Shiraishi S, Kobayashi H, Nihashi T, et al. Cerebral glucose metabolism change in patients with complex regional pain syndrome: a PET study [J]. *Radiat Med*, 2006, 24(5): 335-344.
- [6] Guo SG, Lyu XH, Guan SH, et al. Silencing the NR2B gene in rat ACC neurons by lentivirus-delivered shRNA alleviates pain-related aversion [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(5): 6725-6734.
- [7] Xu JT, Xin WJ, Zang Y, et al. The role of tumor necrosis factor-alpha in the neuropathic pain induced by Lumbar 5 ventral root transection in rat [J]. *Pain*, 2006, 123(3): 306-321.
- [8] Liu YL, Zhou LJ, Hu NW, et al. Tumor necrosis factor-alpha induces long-term potentiation of C-fiber evoked field potentials in spinal dorsal horn in rats with nerve injury: the role of NF-kappa B, JNK and p38 MAPK [J]. *Neuropharmacology*, 2007, 52(3): 708-715.
- [9] He XH, Zang Y, Chen X, et al. TNF-alpha contributes to up-regulation of Nav1.3 and Nav1.8 in DRG neurons following motor fiber injury [J]. *Pain*, 2010, 151(2): 266-279.
- [10] Chen X, Pang RP, Shen KF, et al. TNF-alpha enhances the currents of voltage gated sodium channels in uninjured dorsal root ganglion neurons following motor nerve injury [J]. *Exp Neurol*, 2011, 227(2): 279-286.
- [11] Ren WJ, Liu Y, Zhou LJ, et al. Peripheral nerve injury leads to working memory deficits and dysfunction of the hippocampus by upregulation of TNF-alpha in rodents [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2011, 36(5): 979-992.
- [12] Wu Y, Na X, Zang Y, et al. Upregulation of tumor necrosis factor-alpha in nucleus accumbency attenuates morphine-induced rewarding in a neuropathic pain model [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 449(4): 502-507.
- [13] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1): 55-63.
- [14] Navratilova E, Atcherley CW, Porreca F. Brain circuits encoding reward from pain relief [J]. *Trends Neurosci*, 2015, 38(11): 741-750.
- [15] Gao SH, Wen HZ, Shen LL, et al. Activation of mGluR1 contributes to neuronal hyper excitability in the rat anterior cingulate cortex via inhibition of HCN channels [J]. *Neuropharmacology*, 2016, 105: 361-377.
- [16] Lu Y, Zhu L, Gao YJ. Pain-related aversion induces astrocytic reaction and proinflammatory cytokine expression in the anterior cingulate cortex in rats [J]. *Brain Res Bull*, 2011, 84(2): 178-182.
- [17] Jia D, Gao GD, Liu Y, et al. TNF-alpha involves in altered prefrontal synaptic transmission in mice with persistent inflammatory pain [J]. *Neurosci Lett*, 2007, 415(1): 1-5.
- [18] McKelvey R, Berta T, Old E, et al. Neuropathic pain is constitutively suppressed in early life by anti-inflammatory neuroimmune regulation [J]. *J Neurosci*, 2015, 35(2): 457-466.

(编辑 刘清海)