

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.33.002

文章编号: 1005-8982 (2018) 33-0007-06

背根神经节巨噬细胞迁移抑制因子参与 调控神经病理性疼痛的机制研究*

龙迎曦, 唐轶珣, 黄晓玲, 潘冰冰, 刘永平, 魏来, 孔高茵

[湖南省人民医院(湖南师范大学附属第一医院)麻醉科(湖南省围术期
加速康复麻醉临床医学研究中心), 湖南 长沙 410005]

摘要: 目的 探讨脊髓背根神经节(DRG)巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)对神经病理性疼痛的作用及可能的调控机制。**方法** 成年雄性SD大鼠随机分为3组($n=8$):假手术组(Sham组)、坐骨神经结扎(CCI)模型对照组(以下简称CCI组)、ISO-1组(CCI+鞘内注射ISO-1)。鞘内置管5d后予以左侧坐骨神经结扎。CCI组和ISO-1组连续14d鞘内注射10% DMSO 10 μ l或含ISO-1 30 μ g的DMSO 10 μ l,每天1次。在术前1天,术后第1、3、5、7、10及14天(给药2h后)测定机械痛阈值;在第7和14天取大鼠DRG, ELISA检测肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素1 β (IL-1 β)的表达变化, Western blot检测MIF表达变化,并于第14天记录受压坐骨神经传导速度(CV)。**结果** 与Sham组比较,术后CCI组机械痛阈值均降低($P<0.05$);与CCI组比较,ISO-1组术后第10和14天机械缩足反射阈值均升高($P<0.05$)。与Sham组比较,CCI组第7和14天背根神经节MIF、TNF- α 、IL-1 β 表达上调($P<0.05$);与CCI组比较,ISO-1组第7和14天MIF、TNF- α 、IL-1 β 表达下调($P<0.05$)。神经电生理的结果显示,与Sham组比较,CCI大鼠坐骨神经的CV降低,差异有统计学意义($P<0.05$);ISO-1组与CCI组大鼠坐骨神经的CV比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 鞘内注射MIF拮抗剂ISO-1可以减轻大鼠机械痛敏,下调DRG MIF、TNF- α 和IL-1 β 表达,但不能修复受损坐骨神经。MIF拮抗剂ISO-1可能通过抑制脊髓背根神经节炎症反应,减轻大鼠神经病理性疼痛。

关键词: 神经病理性疼痛 / 神经痛; 巨噬细胞迁移抑制因子; ISO-1; 促炎细胞因子

中图分类号: R614

文献标识码: A

Role of migration inhibitory factor in rat model of dorsal root ganglion mediated neuropathic pain*

Ying-xi Long, Yi-xun Tang, Xiao-ling Huang, Bing-bing Pan, Yong-ping Liu, Lai Wei, Gao-yin Kong
[Department of Anesthesiology (Clinical Research Center for Anesthesiology of ERAS in Hunan Province), Hunan Provincial People's Hospital, Changsha, Hunan 410005, China]

Abstract: Objective To investigate the role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in dorsal root ganglion (DRG) mediated neuropathic pain. **Methods** Animals in all groups were intrathecally catheterized 5 days before surgery. SD rats were randomized into three groups ($n=8$): sham group in which rats received all surgical procedure except nerve ligation, CCI group in which rats received CCI and intrathecal injection of 10% DMSO (10 μ l per day for 2 weeks), and ISO-1 group in which rates received CCI and intrathecal injection of ISO-1 (30 μ g/ μ l per day for 2 weeks). Mechanical allodynia of the plantar surface of the left hind-paw was tested on 1st d before surgery, 1st d, 3rd d, 5th d, 7th d, 10th d, and 14th d after surgery in all rats (2h after intrathecal injection). The expressions of

收稿日期: 2018-05-07

* 基金项目: 湖南省卫生计生委科研基金 (No: B2016017)

[通信作者] 孔高茵, E-mail: konggaoyin@sina.com

MIF, TNF- α and IL-1 β in DRG were examined by western blot or ELISA on the 7th and 14th day after surgery. The Conduction Velocity (CV) of sciatic nerve was tested on the 14th day after surgery. **Results** Paw mechanical withdrawal threshold (PMWT) in CCI group was significantly lowered compared with sham group ($P < 0.05$), which was abolished by treatment of ISO-1 on 5th d, 7th d, 10th d, and 14th d after surgery ($P < 0.05$). Western-blot and ELISA showed that the expression of MIF, TNF- α , and IL-1 β in CCI group was markedly increased in the ipsilateral DRG on the 7th and 14th day after nerve injury when compared with sham group ($P < 0.05$), which was significantly suppressed by ISO-1 admission ($P < 0.01$). Electrophysiology test showed that CV was decreased greatly in the CCI group compared with that in sham group while no difference was observed between CCI and ISO-1 groups. **Conclusions** MIF antagonist ISO-1 attenuates tactile allodynia without obvious physical recovery of sciatic nerve through attenuating local inflammation, suggesting that blockage of MIF might be a therapeutic strategy for treating neuropathic pain.

Keywords: neuropathic pain; macrophage migration inhibitory factor (MIF); ISO-1; proinflammatory cytokine

神经病理性疼痛困扰全世界约 1.0 ~ 5.6 亿人, 其病因复杂, 疼痛程度严重, 给患者带来极大的痛苦^[1-2]。因此, 为深入研究神经病理性疼痛产生的机制, 学者们建立许多重复性好、临床模拟度高的动物模型, 其中最经典的是慢性坐骨神经压迫 (chronic constriction injury, CCI) 模型。基于动物模型和临床层面的研究提示, 炎症反应、神经受损后的异常放电、胶质细胞的活化和中枢及外周的敏化是神经病理性疼痛的主要机制^[3-4]。其中, 炎症反应是导致神经病理性疼痛形成的重要机制^[5]。当外周神经受损时, 背根神经节上的炎症反应激活胶质细胞, 导致神经细胞的敏化^[5]。因此, 以神经受损后产生的炎症反应为靶向目标, 给神经病理性疼痛的治疗带来广阔的前景。

巨噬细胞迁移抑制因子 (macrophage migration inhibitory factor, MIF) 是第一个被发现在免疫性炎症中发挥多效炎症介质功能的细胞因子, 可由免疫细胞如巨噬细胞、B 细胞以及非免疫细胞如内皮细胞等合成, 它主要通过抑制巨噬细胞游走, 增强巨噬细胞的吞噬、内杀伤等作用促进炎症反应^[6]。本研究复制 CCI 模型, 通过观察鞘内注射 MIF 拮抗剂 ISO-1 对 CCI 大鼠机械痛阈、脊髓背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) MIF、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 表达变化、坐骨神经电生理的影响, 探讨 DRG 中 MIF 参与调控神经病理性疼痛的机制, 从炎症机制的角度为开发特异性高、镇痛效果良好的新型药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

10% 水合氯醛 (购自湖南省人民医院), MIF 拮抗

剂 ISO-1 (MIF 拮抗剂) 购自德国 Calbiochem 公司, TNF- α 及 IL-1 β ELISA 试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司), 小鼠单克隆 Anti-MIF 抗体和大鼠单克隆 Anti-GAPDH 抗体购自 Santa Cruz 公司, 电子 von Frey 测痛仪 (型号 2390) 购自美国 IITC。

1.2 动物及分组

24 只无特定病原体 (SPF) 级雄性 SD 大鼠, 由湖南省人民医院动物实验中心代购, 体重 220 ~ 250 g, 饲养于 24 $^{\circ}$ C 室温条件下, 相对湿度 50% ~ 60%, 自由摄食和饮水。随机分为 3 组, 每组 8 只: 假手术组 (Sham 组); CCI 组 (CCI 术后, 鞘内连续注射溶剂——10% DMSO 10 μ l 14 d); ISO-1 组 (CCI 术后, 鞘内连续注射含 ISO-1 30 μ g 的 10% DMSO 10 μ l 14 d)。该实验所有与动物饲养和操作都遵循国际动物保护协会和国际疼痛研究学会的相关规定, 并经湖南省人民医院 / 湖南师范大学附属第一医院伦理委员会批准 (伦理批号: 2016 年 009 号)。

1.3 鞘内置管

腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉 (剂量 350 mg/kg)。刺激大鼠无体动后, 置大鼠于俯卧位, 通过髂棘定位于 L₃ ~ L₄ 间隙, 去毛, 使用络合碘消毒, 作长 2 ~ 3 cm 的纵切口, 分离 L₄ 棘突两侧肌肉, 切除 L₄ 棘突和邻近椎板, 定位 L₃ 与 L₄ 棘突间隙, 置入 25 G 针, 穿破黄韧带及硬脊膜后, 可见脑脊液溢出。经破口处插入 PE-10 导管 2 cm, 18 G 硬膜外穿刺针在大鼠皮下穿一隧道, 导管的另一端送至颈背部, 外露 2 ~ 3 cm 固定, 外口封闭, 防止脑脊液外溢。排除置管时瘫痪的大鼠 (可能为脊髓受损所致, 出现概率约为 20%)。术后于伤口处涂抹金霉素软膏, 并于术后 3 d 肌内注射青霉素 1 万 IU/d 抗感染。置管后第 3 天, 导管内注射 2% 利多卡因 20 μ l。若出现下肢瘫痪, 且 30 ~ 40 min 左右恢

复, 即提示鞘内置管成功。每次注药时, 使用微量注射器 (规格 50 μ l) 给药 10 μ l, 注射时间为 20 s, 再用 10 μ l 生理盐水冲管, 确保药液完全进入鞘内。

1.4 CCI 模型的复制

按照 BENNET 等人的方法制备大鼠左后肢 CCI 模型^[7], 方法如下: 大鼠鞘内置管 5 d 后, 腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉 (剂量 350 mg/kg)。刺激大鼠无体动后, 置大鼠于俯卧位, 在左股骨外侧切开皮肤, 钝性分离肌肉, 暴露坐骨神经, 用 4-0 铬制羊肠线松结扎坐骨神经干 4 道, 每道间距为 1 mm。小腿肌肉轻度颤动且不影响神经外膜血运的结扎强度为最佳。术毕使用金霉素眼膏涂抹伤口, 并使用青霉素肌内注射 1 万 IU/d, 抗感染 3 d。术后单笼饲养, 加强营养。Sham 组大鼠仅暴露坐骨神经不进行结扎。

1.5 机械痛阈测定

在术前 1 天, 术后第 1、3、5、7、10 及 14 天 (鞘内置管 2 h 后) 测定各组大鼠机械痛阈 (术前 1 天, 术后第 1、3、5 及 7 天测 8 只大鼠机械痛阈; 由于第 7 天每组处死 4 只大鼠取组织, 因此术后第 10 和 14 天测余下 4 只大鼠机械痛阈): 将大鼠放置于距实验台高 30 cm 的铁丝网架上, 大鼠适应且处于安静状态后, 用电子 von Frey 痛阈测定仪探头接触小鼠患侧肢体足底中央, 缓慢增加压力直至肢体抬起。此时仪器的读数为小鼠机械性缩足阈值。每只动物测 5 次, 取平均值。

1.6 ELISA 检测脊髓背根神经节炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 的浓度

于术后第 7 和 14 天, 腹腔注射 10% 水合氯醛 350 mg/kg 麻醉后, 采用颈椎脱臼法, 每组各处死大鼠 4 只, 沿棘突切开皮肤, 剪除棘突和椎板, 快速取出各组大鼠左侧 L₄₋₆ 脊髓 DRG, 置于 EP 管中, 置入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻保存。

检测前将脊髓 DRG 取出, 称质量, 标本放入 4 $^{\circ}$ C、pH=7.4 的磷酸盐缓冲液中, 制成匀浆液, 4 $^{\circ}$ C 下 20 000 r/min 离心 30 min, 取上清液 (主要含有非膜结合 TNF- α), 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存; 再用 pH=7.4 的 PBS 悬浮上述离心后的沉淀, 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 然后 4 $^{\circ}$ C 下 20 000 r/min 离心 20 min, 取上清液 (主要含膜结合的 TNF- α)。两上清液之和即为各组织中的总 TNF- α 含量, 混匀待测。采用 ELISA 试剂盒检测 TNF- α 浓度, Bio-Rad 酶标仪测定 450 nm 波长处吸光度 (A) 值, 根据标准曲线计算 TNF- α 相对浓度, 结果以 pg/mg

表示。

检测前将脊髓 DRG 取出, 称重量, 然后将其置于 4 $^{\circ}$ C、pH=7.4 的磷酸盐缓冲液中, 制成匀浆液。使用玻璃匀浆器在 4 $^{\circ}$ C 下匀浆, 4 $^{\circ}$ C 下 20 000 r/min 离心 30 min, 取上清液。按照 ELISA 试剂盒提供的标准步骤测定 IL-1 β 浓度, Bio-Rad 酶标仪测定 450 nm 波长处吸光度 (A) 值, 根据标准曲线计算 IL-1 β 相对浓度, 结果以 pg/mg 表示。

1.7 Western blot 检测患肢侧背根神经节 MIF 的表达

于术后第 7 和 14 天, 腹腔注射 10% 水合氯醛 350 mg/kg 麻醉后, 采用颈椎脱臼法处死大鼠, 沿棘突切开皮肤除棘突和椎板, 快速取出各组大鼠左侧 L₄₋₆ 脊髓 DRG, 取出已收集的脊髓 DRG, 加入组织裂解液, 提取总蛋白, 采用 BCA 蛋白定量检测试剂盒测定蛋白浓度。取 50 μ l 蛋白行 SDS-PAGE 电泳, 转膜, 室温下 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加入 MIF 抗体 (1 : 1 000 稀释) 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。重复清洗 3 次后, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗工作液 (羊抗兔 1 : 2 000), 室温下孵育 1 h, 增强化学发光显色, 采用 Alpha Innotech 光密度分析软件, 以 GAPDH 为内参进行定量分析, 每组重复检测 3 次。图像分析软件定量分析靶蛋白及内参 GAPDH 条带含量, 计算 MIF/GAPDH 比值, 进行统计分析。

1.8 大鼠坐骨神经传导速度测定

于术后第 14 天测定大鼠坐骨神经的传导速度 (conduction velocity, CV) ($n=4$)。采用 BL-420E 生物机能实验系统软件 (成都泰盟公司) 肌肉神经实验中神经干兴奋传导速度测定模块, 刺激并记录动作电位。腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉 (350 mg/kg)。刺激大鼠无体动后, 置大鼠于俯卧位固定, 切开皮肤, 分离肌肉, 充分暴露结扎段坐骨神经。游离出坐骨神经干, 用两绝缘电极分别勾于结扎坐骨神经处的近端和远端 (两绝缘电极距离为 2 cm), 其中刺激电极位于记录电极的远端。接地线连接的钳夹夹住皮肤。确认接触良好后, 施加电刺激, 找出诱发稳定动作电位的最大刺激, 记录到稳定的动作电位后, 记录潜伏期 (两电极之间的距离刺激伪迹出现至动作电位的起始部)。并计算出 (CV)。

1.9 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较采用 t 检验, 配对

t 检验, 单因素方差分析或重复测量设计的方差分析, 方差分析的两两比较用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ISO-1 对 CCI 大鼠机械痛敏的影响

3 组大鼠在术前 1 天的机械痛阈值差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。3 组大鼠术后第 1、3、5 及 7 天的机械痛阈值, 采用重复测量设计的方差分析, 结果:

表 1 各组大鼠各时间点机械痛阈值比较 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	术前 1 天	术后第 1 天	术后第 3 天	术后第 5 天	术后第 7 天
Sham 组	13.65 ± 1.66	13.26 ± 1.39	12.81 ± 1.54	14.13 ± 1.92	13.60 ± 1.87
CCI 组	13.00 ± 1.49	5.12 ± 0.90	4.10 ± 0.68	4.56 ± 0.84	4.23 ± 0.78
ISO-1 组	13.16 ± 1.08	4.99 ± 1.08	4.20 ± 1.22	4.99 ± 1.08	4.20 ± 1.22

表 2 各组大鼠术后第 7 和 14 天的机械痛阈值比较 ($n=4, \bar{x} \pm s$)

组别	术后第 7 天	术后第 14 天
Sham 组	13.26 ± 1.39	12.81 ± 1.54
CCI 组	5.12 ± 0.90	4.1 ± 0.68
ISO-1 组	10.85 ± 1.33	10.45 ± 1.24
F 值	139.399	246.908
P 值	0.000	0.000

2.2 ISO-1 对 CCI 大鼠脊髓背根神经节炎症细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 表达的影响

第 7 和 14 天, 3 组大鼠 IL-1 β 表达水平, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 Sham 组比较, 在术后第 7 和 14 天, CCI 组大鼠 DRG 中 IL-1 β 表达均升高 ($P < 0.05$); 与 CCI 组比较, 术后第 7 和 14 天, ISO-1 组大鼠 DRG 中 IL-1 β 表达均下调 ($P < 0.05$); 与 Sham 组比较, 术后第 7 天, ISO-1 组大鼠 DRG 处 IL-1 β 表达增加 ($P < 0.05$), 术后第 14 天, ISO-1 组大鼠 DRG 中 IL-1 β 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

第 7 和 14 天, 3 组大鼠 TNF- α 表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 Sham 组比较, 在术后第 7 和 14 天, CCI 组大鼠 DRG 中 TNF- α 表达升高 ($P < 0.05$); 与 CCI 组比较, 术后第 7 和 14 天, ISO-1 组大鼠 DRG 中 TNF- α 表达下调 ($P < 0.05$)。与 Sham 组比较, 术后第 7 和 14 天, ISO-1 组大鼠 DRG 中 TNF- α 表达增加 ($P < 0.05$)。见表 4。

①不同时间点的机械痛阈值有差异 ($F = 22.843, P = 0.000$); ②3 组大鼠机械痛阈值有差异 ($F = 58.170, P = 0.000$); ③3 组大鼠的机械痛阈值变化趋势有差异 ($F = 37.413, P = 0.000$)。见表 1。3 组大鼠术后第 10 和 14 天的机械痛阈值有差异 (第 7 天: $F = 139.399, P = 0.000$; 第 14 天: $F = 246.908, P = 0.000$); 与 Sham 组比较, CCI 组大鼠机械痛阈值均降低 ($P < 0.05$); 与 CCI 组比较, ISO-1 组大鼠机械痛阈值均升高 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 3 各组大鼠术后第 7 和 14 天的 IL-1 β 表达 ($n=4, \bar{x} \pm s$)

组别	术后第 7 天	术后第 14 天
Sham 组	6.28 ± 0.72	6.18 ± 0.97
CCI 组	17.42 ± 0.78 ¹⁾	15.62 ± 0.65 ¹⁾
ISO-1 组	9.0 ± 0.58 ¹⁾²⁾	6.96 ± 0.98 ²⁾
F 值	345.619	177.345
P 值	0.000	0.000

注: 1) 与 Sham 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 CCI 组比较, $P < 0.05$

2.3 ISO-1 对 CCI 大鼠脊髓背根神经节 MIF 表达的影响

术后第 7 和 14 天, 3 组大鼠 MIF 表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 Sham 组比较, 术后第 7 和 14 天 CCI 组大鼠 DRG 中 MIF 表达均升高 ($P < 0.05$)。与 CCI 组比较, ISO-1 组大鼠术后第 7 和 14 天 DRG 中 MIF 表达均下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 Sham 组比较, ISO-1 组大鼠术后第 7 天 DRG 中 MIF 表达无变化 ($P > 0.05$), 第 14 天表达增加 ($P < 0.05$)。见表 5 和图 1。

2.4 ISO-1 对 CCI 大鼠坐骨神经 CV 的影响

3 组大鼠坐骨神经 CV 的比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 7481.400, P = 0.000$); 与 Sham 组比较, CCI 大鼠坐骨神经 CV 降低 ($P < 0.05$), 与 CCI 组比较, ISO-1 组大鼠坐骨神经 CV 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 2。

表 4 各组大鼠术后第 7、14 天的 TNF- α 表达
($n=4, \bar{x} \pm s$)

组别	术后第 7 天	术后第 14 天
Sham 组	2.34 \pm 0.73	2.50 \pm 0.61
CCI 组	8.08 \pm 0.74 ¹⁾	7.1 \pm 0.72 ¹⁾
ISO-1 组	4.14 \pm 0.55 ¹⁾²⁾	3.98 \pm 0.59 ¹⁾²⁾
F 值	93.140	70.505
P 值	0.000	0.000

注: 1) 与 Sham 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 CCI 组比较, $P < 0.05$

表 5 各组大鼠术后第 7 和 14 天的 MIF 表达
($n=4, \bar{x} \pm s$)

组别	术后第 7 天	术后第 14 天
Sham 组	0.14 \pm 0.006	0.13 \pm 0.02
CCI 组	0.80 \pm 0.01 ¹⁾	0.87 \pm 0.04 ¹⁾
ISO-1 组	0.13 \pm 0.005 ²⁾	0.29 \pm 0.05 ¹⁾²⁾
F 值	7 481.400	320.773
P 值	0.000	0.000

注: 1) 与 Sham 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 CCI 组比较, $P < 0.05$

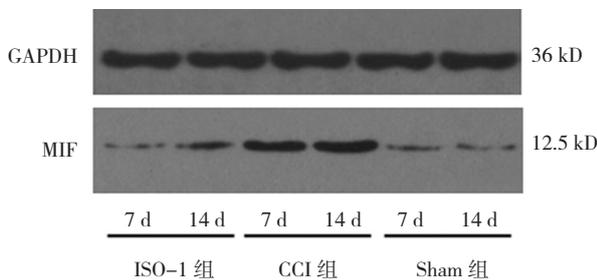


图 1 各组大鼠 DRG 中 MIF 的表达

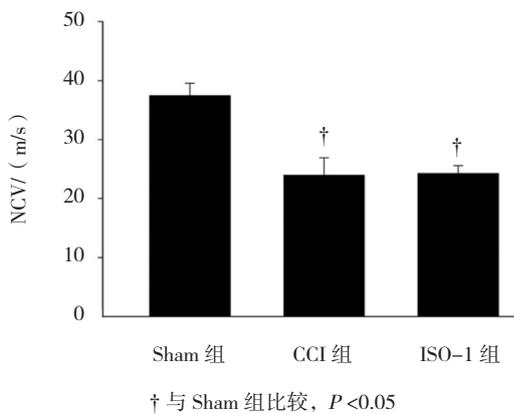


图 2 各组大鼠坐骨神经 CV 比较

3 讨论

本研究显示, 坐骨神经损伤后, 受损部位的动作

电位的传导速度减慢, 患肢表现出机械痛觉过敏, 同时相应 DRG 中 MIF 及炎症细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 表达上调。鞘内注射 ISO-1 能减轻 CCI 大鼠患肢的机械痛觉过敏, 下调患肢相应的 DRG 中 MIF、IL-1 β 及 TNF- α 的表达, 但不能改善受损神经的传导速度。本结果揭示 MIF 通过上调 DRG 中炎症反应参与调控神经病理性疼痛的形成。

MIF 是一种多功能的促炎因子之一, 与多种疾病相关^[8]。神经受损后中枢和外周神经系统中的 MIF 表达改变提示其参与神经元的变性和再生的调节^[9]。DRG 是外周痛觉信息传入的第一级神经元, 组织损伤后, 神经胶质细胞和施旺细胞被激活并释放一系列炎症细胞因子, 导致炎症的发生; 该细胞的激活也导致疼痛介质的产生, 降低动作电位的阈值, 使胶质细胞敏化, 导致外周和中枢敏化, 从而导致慢性神经病理神经痛形成^[10]。笔者通过结扎大鼠左侧的坐骨神经复制 CCI 模型, 行为学结果显示, CCI 术后, 大鼠有稳定的机械痛阈降低。蛋白印迹检测证明同侧 DRG 中 MIF 表达上调与 CCI 诱导的疼痛密切相关, 且表现出时间依赖性。既往研究证实, 在神经病理性疼痛中, 脊髓背角 MIF 表达也升高^[11]。上述结果提示, MIF 在脊髓背角和 DRG 2 个层面都与神经病理性疼痛的形成相关。既往研究证实, ISO-1 30 μ g 能抑制炎性痛^[12], 在笔者的前期实验中, 发现该剂量也能抑制 CCI 大鼠的机械痛敏。鞘内注射 ISO-1 后, 术后第 1 和 3 天实验动物的机械痛阈并未增加, 提示此剂量的 ISO-1 的镇痛效应出现在观察期的中晚期。既往研究证实, 在炎症或神经病理性疼痛模型中, 脊髓背角小神经胶质细胞和神经元可能是炎性和神经病性情况下 MIF 表达上调的主要来源^[11]。然而, 在背根神经节中, 是否存在者不同细胞的表达差异, 有待进一步探究。

炎症细胞因子导致的神经炎症在神经病理性疼痛的发生、发展中越来越受到关注。其中在背根神经节层面, 促炎因子 IL-1 β 和 TNF- α 与神经病理性疼痛关系的研究较多。IL-1 β 可通过作用于辣椒素受体和 IL-1R 受体作用于 p38 MAPK 通路诱发疼痛^[13]; TNF- α 通过激活 p38 MAPK 通路促进 Na⁺ 内流, 降低兴奋性阈值, 还可与受体结合后激活细胞 NF- κ B, 引起炎症级联反应, 促进疼痛的产生^[14]。而作为重要的促炎因子, MIF 可通过 cPLA2-COX2 通路调节小胶质细胞中其他炎症介质 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的表达^[14]。本实验中, 鞘内注射 ISO-1 可抑制 DRG 中 TNF- α 、

IL-1 β 的表达。因此, MIF 可能是促使疼痛形成的神经炎症级联反应中的上游介质。

神经电生理指标是评估神经受损、功能状态最客观的指标。其中, 神经 CV 是神经冲动传导的直接表现。在本实验中, 使用神经电生理技术测量实验动物受损坐骨神经的动作电位传导速度, 结果显示, 与 CCI 组比较, ISO-1 组的坐骨神经 CV 并未改善。笔者推测, 鞘内注射 ISO-1 通过抑制脊髓和 DRG 中 MIF 的促炎作用, 从而减轻 CCI 模型大鼠的机械痛敏, 但并不能修复受损的坐骨神经。但在受损神经局部使用 ISO-1 处理是否能改善坐骨神经的功能, 将在进一步的实验中探索。

本研究存在以下不足: 首先, DRG 中不同细胞对神经病理性疼痛的贡献不一, 该研究并未从细胞层面去探究相关细胞的活化状态与 MIF 的表达关系。其次, 在该研究中, 鞘内注射 ISO-1 并未完全缓解 CCI 大鼠的疼痛, 有可能与 ISO-1 的剂量相关, 也可能与存在其他的机制参与 CCI 大鼠的痛觉形成有关。因此, 在下一阶段的研究中, 笔者将从上述的不足着手, 对背根神经节 MIF 参与调控神经病理性疼痛的机制进行更進一步的研究。

综上所述, MIF 可能通过上调炎症细胞因子的表达参与神经病理性疼痛的形成。因此, 从炎症角度, 针对 MIF 拮抗剂的研究将为神经病理性疼痛的治疗提供新视角。

参 考 文 献:

- [1] BOUHASSIRA D, ATTAL N. Translational neuropathic pain research: A clinical perspective[J]. *Neuroscience*, 2016, 338(3): 27-35.
- [2] FINNERUP N B, ATTAL N, HAROUTOUNIAN S, et al. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: A systematic review and meta-analysis[J]. *Lancet Neurol*, 2015, 14(2): 162-173.
- [3] ALLES S R A, SMITH P A. Etiology and pharmacology of neuropathic pain[J]. *Pharmacol Rev*, 2018, 70(2): 315-347.
- [4] INOUE K, TSUDA M. Microglial neuropathic pain: cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2018, 19(3): 138-152.
- [5] SOMMER C, LEINDERS M, ÜÇEYLER N. Inflammation in the pathophysiology of neuropathic pain[J]. *Pain*, 2018, 159(3): 595-602.
- [6] CALANDRA T, BERNHAGEN J, METZ C N, et al. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production[J]. *Nature*, 1995, 377(6544): 68-71.
- [7] BENNETT G J, XIE Y K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man[J]. *Pain*, 1988, 33(1): 87-107.
- [8] BLOOM J, SUN S, AL-ABED Y. MIF, a controversial cytokine: are view of structural features, challenges, and opportunities for drug development[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2016, 20(12): 1463-1475.
- [9] LERCH J K, PUGA D A, BLOOM O, et al. Glucocorticoids and macrophage migration inhibitory factor (MIF) are neuroendocrine modulators of inflammation and neuropathic pain after spinal cord injury[J]. *Semin Immunol*, 2014, 26(5): 409-414.
- [10] ELLIOT S, KRAMESES. The role of the dorsal root Ganglion in the development of neuropathic pain[J]. *Pain Medicine*, 2015, 15(10): 1669-1685.
- [11] ALEXANDER JK, COX G M, TIAN J B. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is essential for inflammatory and neuropathic pain and enhances pain in response to stress[J]. *Exp Neurol*, 2012, 236(2): 351-362.
- [12] WANG F, SHEN X, GUO X, et al. Spinal macrophage migration inhibitory factor contributes to the pathogenesis of inflammatory hyperalgesia in rats[J]. *Pain*, 2010, 148(2): 275-283.
- [13] BINSHTOK A M, WANG H, ZIMMERMANN K, et al. Nociceptors are interleukin-1 beta sensors[J]. *J Neurosci*, 2008, 24, 28(52): 14062-14073.
- [14] RAMESH G, MACLEANA G, PHILIPP M T. Cytokines and chemokines at the cross roads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain[J]. *Mediators Inflamm*, 2013, 2013(9): 480739.

(王荣兵 编辑)