

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.14.008

文章编号: 1005-8982(2017)14-0040-04

脊髓 CXCR2 在 CCI 大鼠神经病理性疼痛中的作用研究*

潘冰冰,肖丹,黄晓玲,魏来,唐轶珣,孔高茵
(湖南省人民医院 麻醉科,湖南 长沙 410005)

摘要:目的 探讨脊髓趋化因子受体 2(CXCR2)在坐骨神经慢性压迫(CCI)模型大鼠神经病理性疼痛(NPP)中的作用。**方法** 18 只成年 Sprague-Dawley 雄性大鼠,随机分为 3 组,每组 6 只。对照组:大鼠不做任何处理;模型组:复制 CCI 大鼠模型;实验组:复制 CCI 大鼠模型后第 3 天腹腔注射漆树酸 5 mg/kg。于复制大鼠 CCI 模型前 1 天,以及第 1、3、5 和 7 天分别测定大鼠后足热痛阈及机械痛阈,并应用 Western blot 测定腰段脊髓 CXCR2 的蛋白表达。**结果** CCI 大鼠术后第 3 天开始术侧下肢热痛阈值降低,模型组、实验组术侧下肢热痛阈值与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);实验组大鼠第 5 和 7 天术侧热痛阈值与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。机械痛阈变化趋势与热痛阈一致。模型组、实验组大鼠脊髓 CXCR2 表达与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);实验组 CXCR2 表达与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 脊髓 CXCR2 表达的异常上调,可导致 NPP 产生和维持。腹腔注射漆树酸能够部分抑制 CCI 大鼠脊髓腰段 CXCR2 的表达上调,并缓解 CCI 大鼠的疼痛行为。

关键词: 神经病理性疼痛;趋化因子受体 2;组蛋白乙酰化;表观遗传学

中图分类号: R741

文献标识码: A

Role of spinal CXCR2 in neuropathic pain of rats suffered from chronic constriction injury*

Bing-bing Pan, Dan Xiao, Xiao-ling Huang, Lai Wei, Yi-xun Tang, Gao-yin Kong
(Department of Anesthesiology, Hunan Provincial People's Hospital,
Changsha, Hunan 410005, China)

Abstract: Objective To explore the role of chemokine receptor 2 (CXCR2) of spinal cord in neuropathic pain of rats following sciatic nerve chronic constriction injury (CCI). **Methods** Eighteen adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups (6 in each), i.e. N group (without any treatment), C group (CCI model) and T group (rats received intraperitoneal injection of 5 mg/kg Anacardic acid 3 d after CCI model establishment). Paw mechanical withdrawal threshold (PMWT) and paw thermal withdrawal latency (PTWL) were measured in the 3 groups 1 d before model establishment and on the 1st, 3rd, 5th and 7th d after CCI surgery. All lumbar spinal cords were dissected to examine the CXCR2 expression by Western blot. **Results** The PTWL of the CCI rats reduced from the 3rd d after surgery. Compared with the N group, the PTWL in the C and T groups were obviously reduced ($P < 0.05$). Compared with the C group, the PTWL of the T group increased on the 5th and 7th d ($P < 0.05$). The variation tendency of PMWT was similar to that of PTWL. Compared with the N group, the CXCR2 expression in the C and T groups increased ($P < 0.05$). Compared with the C group, the CXCR2 expressions in the T group decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** Up-regulation of CXCR2 in the spinal cord may play an important role in the pathogenesis of neuropathic pain.

收稿日期:2016-10-24

* 基金项目:湖南省自然科学基金青年基金(No:2017JJ3178);湖南省长沙市科技计划(No:K1401007-31);湖南省人民医院 2015 年仁术基金
[通信作者] 孔高茵, E-mail: konggaoyin@sina.com

Intraperitoneal injection of Anacardic acid could partly reduce the expression of CXCR2 in the lumbar spinal cord in CCI rats and relieve pain.

Keywords: neuropathic pain; chemokine receptor 2; histone acetylation; epigenetics

神经病理性疼痛(neuropathic pain, NPP)是一种由神经系统原发性损害和功能障碍所激发的机制复杂的疼痛类型。外周神经损伤后,外周感觉神经元自发放电,导致外周背根神经节及中枢脊髓背角神经元敏化,上行性传导通路发生可塑性改变,从而出现痛觉过敏、痛觉超敏及痛觉异常等症状。表观遗传学机制、神经免疫调控等在该病发病过程中有重要作用^[1]。表观遗传机制在神经受损后可调控离子通道、G 蛋白偶联受体及神经递质的信号传导,来发挥生物学效应。神经胶质细胞包括小胶质细胞、星形胶质细胞及少突胶质细胞等,也协同参与神经性炎症的发生和维持^[2]。趋化因子及其受体可能通过星形胶质细胞与神经元间的相互作用,参与多种疼痛的维持和中枢敏化^[3]。NPP 发生机制尚不明确,临床上治疗困难且效果欠佳,因此针对其发病机制来明确有效的治疗靶点非常必要。本研究拟应用坐骨神经慢性压迫(chronic constriction injury of the sciatic nerve, CCI)模型,探索基于表观遗传学机制的 NPP 治疗靶点及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

10%水合氯醛(中南大学湘雅医院),聚氰基丙烯酸正丁酯(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量检测试剂盒(武汉谷歌生物技术公司,型号 G2026),漆树酸(美国 Sigma 公司, A7236),兔抗趋化因子受体 2(C-X-C motif chemokine receptor 2, CXCR2)多克隆抗体(美国 Abcam 公司, ab14935),兔抗 β -actin 抗体(武汉谷歌生物技术公司, GB13001-1),辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)羊抗兔免疫球蛋白 G(Immunoglobulin G, IgG)(武汉谷歌生物技术公司, GB23303)。

1.2 仪器与设备

大鼠热机械痛阈仪(意大利 UGO 公司, 37370 型), Von Frey 机械痛阈测定套件(美国 Stoelting 公司), 紫外分光光度计(上海现科生物技术公司), Western blot 电泳及转印装置(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 方法

1.3.1 实验动物及分组 18 只 SPF 级别成年 SD 雄

性大鼠,购自湖南省斯莱克景达实验动物股份有限公司,体重 220 ~ 250 g,随机分为 3 组,每组 6 只。对照组:大鼠不做任何处理,正常观察;模型组:复制 CCI 大鼠模型;实验组:复制 CCI 大鼠模型后第 3 天腹腔注射漆树酸 5mg/kg。

1.3.2 CCI 模型的复制 经手术复制模型,腹腔注射 10%水合氯醛麻醉,剂量 300 ~ 350 mg/kg^[4]。取俯卧位,左后肢大腿外侧备皮消毒,切皮后用玻璃分针钝性分离大腿筋膜、肌肉,可见坐骨神经干。向神经干分叉前游离 5 ~ 6 mm,用铬制 4 号非可吸收线结扎坐骨神经 4 次,间隔 1 mm 左右,其松紧程度以不影响神经外膜血运为宜,且可引起小腿肌肉轻度颤动反应,逐层缝合。术毕肌内注射青霉素 3 ~ 4 万 u 以防止伤口感染。

1.3.3 一般行为学变化 CCI 手术后每天 8 : 00 和 16 : 00 分 2 次观察大鼠的一般状况,主要包括是否进食及饮水、自主活动情况、皮肤伤口愈合进度等,评估有无瘫痪、步态异常等运动功能改变。

1.3.4 大鼠痛阈测量 使用 37370 型热痛仪,分别于 CCI 前 1 天,以及第 1、3、5 和 7 天,测试大鼠两侧后肢足底皮肤热痛阈,即热刺激缩足反射潜伏期(paw withdraw thermal latency, PWTL),重复测量 3 次,间隔 5 ~ 10 min/次,取平均值。使用 Von Frey 痛阈测定套件,分别于 CCI 前 1 天,以及第 1、3、5 和 7 天,测试大鼠两侧后肢机械痛阈,即机械缩足反射阈(paw withdraw mechanical threshold, PWMT),重复测量 3 次,间隔 5 ~ 10 min/次,取平均值。

1.3.5 标本的采集与处理 大鼠 CCI 第 7 天行痛阈测量后,深麻醉行断头术处死,冰上快速取出 L₄₋₆ 脊髓节段,剥膜后迅速放入冻存管置于液氮罐冷冻,并尽快转运至 -80℃ 冰箱冷冻保存备用。

1.3.6 Western blot 检测 取大鼠腰段脊髓,加裂解液,进行组织匀浆,提取总蛋白,采用 BCA 蛋白定量检测试剂盒测定蛋白浓度。取 30 μ l 蛋白行聚丙烯酰胺凝胶电泳,常规方法转膜,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,分别加入兔抗脊髓 CXCR2 抗体(1 : 1 000 稀释),兔抗 β -actin 抗体(1 : 1 000 稀释),4℃ 孵育过夜,1 \times 磷酸盐缓冲溶液加 Tween-20(phosphate buffer saline and tween-2, PBST)漂洗 3 次,加入 HRP

羊抗兔 IgG(1 : 3 000 稀释),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 β -actin 为内参进行定量分析。

1.4 统计学方法

数据分析采用 Graph Pad Prism 软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用单因素方差分析或重复测量设计的方差分析,两两比较用 Bonferroni 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

3 组大鼠术后一般情况良好,未见体重下降,所有大鼠自主进食量无明显减少。CCI 手术大鼠伤口未见感染,有跛行现象,术侧后足有轻微的外翻。

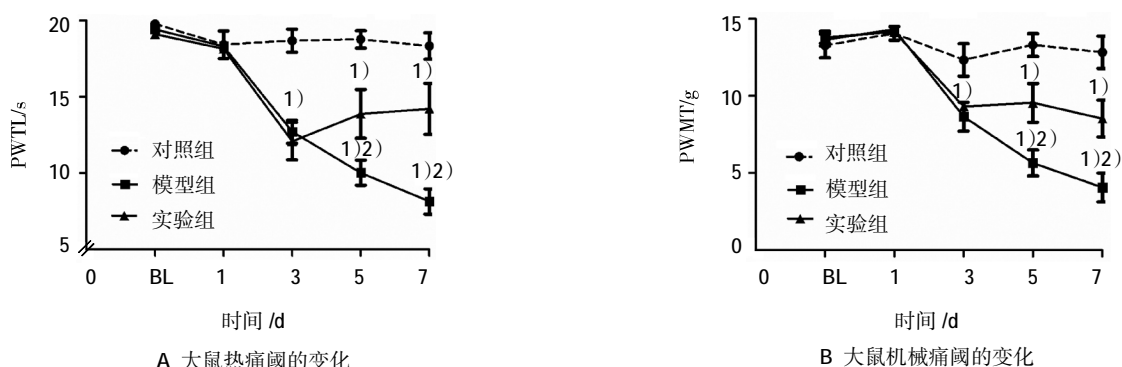
2.2 大鼠痛阈比较

3 组大鼠静息状态下痛阈比较采用双因素重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间的痛阈(PWTL 和 PWMT)有差异($F=37.140$ 和 42.250 ,均 $P=0.000$);②3 组大鼠组间痛阈(PWTL 和 PWMT)有

差异,PWTL($F=18.330$ 和 18.110 ,均 $P=0.000$);③3 组大鼠痛阈(PWTL 和 PWMT)的变化趋势有差异,PWTL($F=19.720$ 和 18.760 ,均 $P=0.000$)。进一步采用 Bonferroni 法比较不同时间大鼠痛阈,结果:①对照组与模型组术前基础值及术后第 1 天痛阈比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);术后 3~5 天痛阈比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),模型组大鼠痛阈降低,说明 CCI 模型复制成功。②实验组与对照组痛阈术前基础值及术后第 1 天痛阈比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);术后 3~5 天痛阈比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),实验组大鼠痛阈降低。③模型组与实验组腹腔给药前痛阈比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);腹腔给药后实验组大鼠痛阈高于模型组($P < 0.05$)。见图 1。

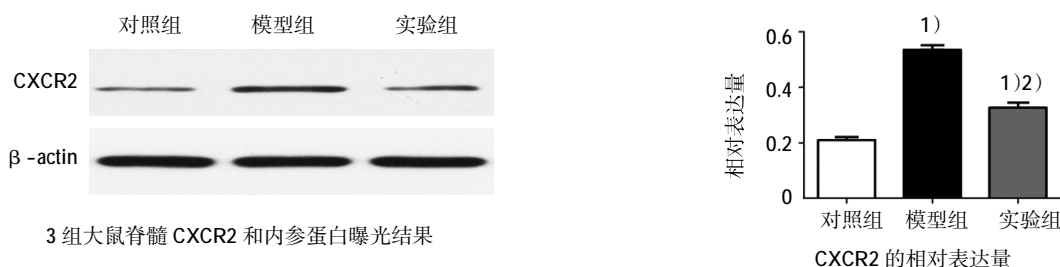
2.3 3 组大鼠腰段脊髓 CXCR2 表达变化

CCI 术后第 7 天,3 组大鼠脊髓 CXCR2 蛋白表达量比较,经单因素方差分析,差异有统计学意义($F=117.900$, $P=0.000$),模型组表达量较对照组升高,实验组较模型组降低。见图 2。



1)与对照组比较, $P < 0.05$;2)与模型组比较, $P < 0.05$

图 1 大鼠手术侧后足痛阈的变化



3 组大鼠脊髓 CXCR2 和内参蛋白曝光结果

1)与对照组比较, $P < 0.05$;2)与模型组比较, $P < 0.05$

图 2 3 组大鼠腰段脊髓 CXCR2 蛋白的表达

3 讨论

临床上根据神经损伤部位将 NPP 分为外周性和中枢性 2 种。外周性常见于多发性神经病变,包括

糖尿病、慢性酒精滥用、炎症、化疗及淀粉样病变等,其他的原因有三叉神经痛、带状疱疹及复杂性区域疼痛综合征;中枢性神经痛发生率较低,主要见于脊

髓损伤、多发性硬化及中风后疼痛等^[6]。由于该病发病率高,患者生活质量严重下降,已受到越来越多的重视。本研究选择的 CCI 大鼠模型,是目前常用的 NPP 模型之一^[6]。在手术后第 3 天,大鼠手术侧后爪出现触痛、自发痛及痛觉过敏等表现,机械痛阈和热痛阈较对照组降低,并一直持续到实验结束,说明 CCI 模型复制成功。

趋化因子是一类功能相关的小分子分泌蛋白,主要通过细胞膜上的特异性受体发挥其生物学功能。趋化因子主要在炎症反应中发挥调节作用,其受体在很多组织中都有表达。多项研究显示,脊髓和背根神经节中的趋化因子及其受体参与多种急、慢性疼痛的信号传导。XU 等^[7]研究指出,趋化因子 12 在化疗引起的 NPP 中表达上调。YANG 等^[8]研究发现,瑞芬太尼导致的痛觉过敏有可能与脊髓 N-甲基-D-天冬氨酸受体表达和磷酸化介导的 CXCL1/CXCR2 上调有关。本实验中,CCI 大鼠模型复制成功 7 d 后,腰段脊髓中 CXCR2 水平较对照组升高,其可能的机制是来自神经元分泌的 CXCR2 上调,并在 CCI 疼痛神经性炎症反应中发挥趋化调节作用。正常情况下,CXCR2 表达于动物的脊髓背角;病理条件下,CXCR2 与其配体可能通过神经元与神经胶质细胞间的相互作用来参与 NPP 的维持和中枢敏化^[9]。

表观遗传学是指基于非基因序列改变所致基因表达水平变化,主要涉及乙酰化、甲基化、泛素化、磷酸化等。疼痛的产生和维持与多种疼痛基因的转录和表达水平有关,而表观遗传学调控可激活或沉默基因的表达,这可能在疼痛的形成和维持中发挥关键作用。王英等^[10]研究发现,鞘内注射 5-氮杂胞苷可抑制 DNA 甲基转移酶上调,从而缓解 NPP,提示 DNA 甲基化可能参与 NPP 的发生。KAMI 等^[3]发现,小胶质细胞中组蛋白乙酰化水平导致 NPP 小鼠模型的运动性痛觉过敏,在脊髓注射组蛋白去乙酰化酶抑制剂可以缓解疼痛,并且组蛋白乙酰化后能产生白介素 10 等某些止痛因子。另有报道指出,神经损伤后钾离子通道的组蛋白 -3-赖氨酸 -9 二甲基化增加,G9a 抑制剂或基因敲除使 K 离子通道恢复表达,并且缓解疼痛,这可能在神经可塑性中发挥重要的作用^[11]。本研究发现,实验组大鼠腹腔注射漆树酸后,能缓解病理性疼痛,大鼠患侧痛阈上调,且脊

髓水平 CXCR2 较 CCI 组下调,提示某些基于表观遗传学调控机制的催化酶能调控疼痛相关基因的表达,从而达到缓解疼痛和治疗的目的,因此该靶点有可能成为疼痛药物治疗的新方向之一。

综上所述,CXCR2 表达的异常可能参与 CCI NPP 的产生和维持,腹腔注射组蛋白乙酰转移酶抑制剂漆树酸可以部分抑制 CCI 大鼠脊髓腰段 CXCR2 的表达上调,且能在一定程度上缓解 CCI 大鼠疼痛,其表观遗传学机制及神经信号传导通路还需要进一步研究。

参 考 文 献:

- [1] MACHELSKA H, CELIK M Ö. Recent advances in understanding neuropathic pain: glia, sex differences, and epigenetics[J]. *F1000 Research*, 2016, 5: 2743.
- [2] JI R, CHAMESSIAN A, ZHANG Y. Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation[J]. *Science*, 2016, 354 (6312): 572-577.
- [3] KAMI K, TAGUCHI S, TAJIMA F, et al. Histone acetylation in microglia contributes to exercise-induced hypoalgesia in neuropathic pain model mice[J]. *J Pain*, 2016, 17(5): 588-599.
- [4] 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.
- [5] NASCIMENTO O J, PESSOA B L, ORSINI M, et al. Neuropathic pain treatment: still a challenge[J]. *Neurol Int*, 2016, 8(2): 6322.
- [6] 潘冰冰,程智刚,孔高茵,等.慢病毒介导的 DREAM 沉默治疗在坐骨神经慢性压迫模型大鼠疼痛中的作用及其对 GALR1 的表达调控[J]. *中国现代医学杂志*, 2013, 23(32): 7-12.
- [7] XU T, ZHANG X L, OU-YANG H D, et al. Epigenetic upregulation of CXCL12 expression mediates antitubulin chemotherapeutics-induced neuropathic pain[J]. *Pain*, 2017, 158(4): 637-648.
- [8] YANG L, XU G, WANG Y. Up-regulation of CXCL1 and CXCR2 contributes to remifentanyl-induced hypernociception via modulating spinal NMDA receptor expression and phosphorylation in rats[J]. *Neuroscience Letters*, 2016, 626: 135-141.
- [9] 高永静,张志军,曹德利.趋化因子介导的神经炎症反应和神经病理性疼痛[J]. *中国细胞生物学学报*, 2014, 36(3): 297-307.
- [10] 王英,郭曲练,鄢建勤,等. DNA 甲基转移酶类在大鼠神经病理性疼痛发病机制中的作用[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2016, 41(6): 578-585.
- [11] LAUMET G, GARRIGA J, CHEN S, et al. G9a is essential for epigenetic silencing of K⁺ channel genes in acute-to-chronic pain transition[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 68(8): 836-845.

(童颖丹 编辑)