

· 基础研究 ·

神经病理性疼痛大鼠脊髓背角中核转录因子- κ B 蛋白表达的变化

罗剑刚 余恩念 孙涛 张丽 傅志俭

【摘要】目的 观察大鼠脊髓背角中核转录因子- κ B (NF- κ B) 在慢性坐骨神经挤压性损伤 (CCI) 疼痛模型中表达的变化规律。**方法** 雄性 SD 大鼠 48 只, 分为手术组和假手术组, 每组 24 只, 于 CCI 前 1 天、CCI 后第 1, 4, 7, 14, 21 天各时间点测定机械痛阈及热痛阈后立即处死大鼠, 每个时间点 4 只, 取腰髓, 采用 Western blot 方法测定 NF- κ B 的蛋白表达变化。**结果** 手术组大鼠术侧机械痛阈及热痛阈明显降低, 脊髓背角中 NF- κ B 水平表达增加, 明显高于对侧和假手术组; NF- κ B 蛋白水平于 CCI 后第 1 天开始增加, 第 7 天达到高峰 ($P < 0.01$), 于 CCI 后第 21 天仍维持于较高水平 ($P < 0.05$)。**结论** CCI 致大鼠脊髓背角 NF- κ B 活化, 参与神经病理性疼痛的调控过程。

【关键词】 神经病理性疼痛; 慢性压迫性损伤; 核转录因子- κ B

Expression of nuclear factor kappa B and neuropathic pain LUO Jian-gang, YU En-nian, SUN Tao, ZHANG Li, FU Zhi-jian. Department of Pain Management, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Ji'nan 250021, China

Corresponding author: SUN Tao, Email: suntao@medmail.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the expression of nuclear factor kappa B (NF- κ B) in the lumbar spinal cord in chronic constrictive injury (CCI) of the sciatic nerve. **Methods** Forty-eight male Sprague-Dawley rats were divided into 2 groups ($n = 24$ in each). The operation group received CCI of the sciatic nerve and the sham-operation group received a sham operation as a control. Their mechanical and thermal nociceptive thresholds were assessed with paw withdrawal latency (PWL) using von Frey filaments and radiant heating. Four rats were sacrificed at each time point and segments of their lumbar spinal cords were examined using Western blotting. **Results** Mechanical and thermal stimulation thresholds were reduced significantly after the operation. Expression of NF- κ B protein increased significantly in the ipsilateral dorsal horn of the spine compared with the contralateral side and compared with the sham-operation group. NF- κ B protein expression began to increase on the 1st day after the operation, reached a peak at the 7th day, and stayed high throughout the experiment. **Conclusion** NF- κ B in the dorsal horn of the spine may be involved in neuropathic pain after CCI.

【Key words】 Neuropathic pain; Chronic constrictive injury; Nuclear factor κ B

神经病理性疼痛是与多种周围神经障碍相关联的一组共同表现的症状, 包括与神经损伤、糖尿病、尿毒症、病毒感染、营养缺乏、放化疗药物相关的神经障碍。国际疼痛研究会 (International Association for The Study of Pain, IASP) 将这种由于外周或中枢神经系统的直接损伤或功能紊乱引起的疼痛称为神经病理性疼痛^[1]。神经病理性疼痛常常伴有一系列感觉和运动功能异常, 表现为自发性疼痛、痛觉过敏和触诱发痛, 严重影响患者的生活质量。有研究发现, 外周神经损伤导致的神经病理性疼痛与外周和中枢神经系统中一系列复

杂的分子机制有关^[2], 核转录因子- κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 是一个关键的转录因子, 调节中枢神经系统炎症反应中多种促炎性因子的表达^[3,4]。本研究旨在通过观察神经病理性疼痛大鼠脊髓中 NF- κ B 蛋白表达的变化, 探讨 NF- κ B 信号转导通路在神经病理性疼痛中的作用。

材料与方法

一、实验动物及分组

健康雄性 SD 大鼠 48 只, 体重 200 ~ 250 g, 由山东大学医学院实验动物中心提供, 分为假手术组和手术组, 每组 24 只。分别于慢性坐骨神经挤压性损伤 (chronic constrictive injury, CCI) 前 1 天、CCI 后第 1, 4, 7, 14, 21 天测定机械痛阈和热痛阈后处死, 每个时间点为 4 只, 取腰髓, 将标本迅速入液氮保存备 Western

DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0254-1424. 2011. 03. 002

基金项目: 国家自然科学基金 (30801072), 山东省自然科学基金 (Q2007C14)

作者单位: 250021 济南, 山东大学附属省立医院疼痛科

通信作者: 孙涛, Email: suntao@medmail.com.cn

blot 用。

二、CCI 模型的建立

参照 Bennett 和 Xie^[5] 于 1988 年创建的方法,用 10% 水合氯醛(300 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉,常规消毒右下肢,于股骨外侧纵行切开皮肤,钝性分离肌肉,暴露坐骨神经,在接近分叉前游离出约 7 mm 的神经,在显微镜下用 4-0 铬制肠线松扎 4 处(以不影响神经外膜的血运为度),间隔为 1 mm,结扎时可见肢体轻微抽动,然后逐层缝合,术后肌注青霉素 8 万 U, 2 次/d。假手术组仅暴露坐骨神经干,不予结扎。

三、机械痛阈测定

用 von Frey 丝(Stoelting 公司,美国)以 up-down 法推算 50% 缩足反射阈值^[6]:将大鼠置于一有机玻璃罩内(底为金属筛网),安静 15 min,用不同压力的纤维丝(由小到大)垂直刺激大鼠双侧足底中部,持续时间 6~8 s,大鼠出现抬足或舔足行为视为阳性反应,记录引起 50% 阳性反应的压力作为机械痛阈。每次间隔时间为 30 s。

四、热痛阈测定

用 BME-410A 热痛刺激仪(中国科学院生物医学工程公司)测定大鼠足底部的热缩足反射潜伏期表示热痛阈^[7]。将大鼠置于底为 3 mm 厚玻璃板的有机玻璃箱中,使其适应 30 min 后,用热痛刺激仪照射大鼠足底,记录从照射开始至大鼠出现抬腿回避时间即为热缩足反射潜伏期。照射时间不超过 30 s,间隔 5 min。连续测定 3 次,取其平均值。

五、Western blot 检测 NF-κB 蛋白的表达

称取约 0.1 g 于液氮保存的 L₄₋₆ 处的脊髓,用预冷的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)漂洗 3 次,加入 1 ml 预冷的组织细胞裂解液,匀浆,然后转入 EP 管中进行超声,4 ℃ 12 000 转/min 离心 10 min,收集上清。以二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BSA)作为标准蛋白,采用 BCA 法测定方法进行蛋白定量。在样品处理液中加入上样缓冲液,于 100℃ 水浴锅中加热 5 min 使蛋白变性。50 μg 总蛋白经 10% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium lauryl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离,用半干转移电泳仪将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上;5% 脱脂奶粉的 TBST(tris buffered saline with tween, TBST)溶液室温封闭 1 h,滴加兔抗鼠 NF-κB 一抗(CST 公司,美国)(1:1000)4 ℃ 孵育过夜;TBST 洗膜,每次 10 min,洗 3 次;然后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:200),室温下孵育 1 h;再用化学发光底物孵育,硝酸纤维素膜于暗室中用感光胶片感光,冲洗。所得结果经扫描后用 Quantity One V4.62 软件计算灰度值,并以术前 1 d 组的平均值作为正常值,计算相对灰

度值,反映 NF-κB 蛋白表达水平。

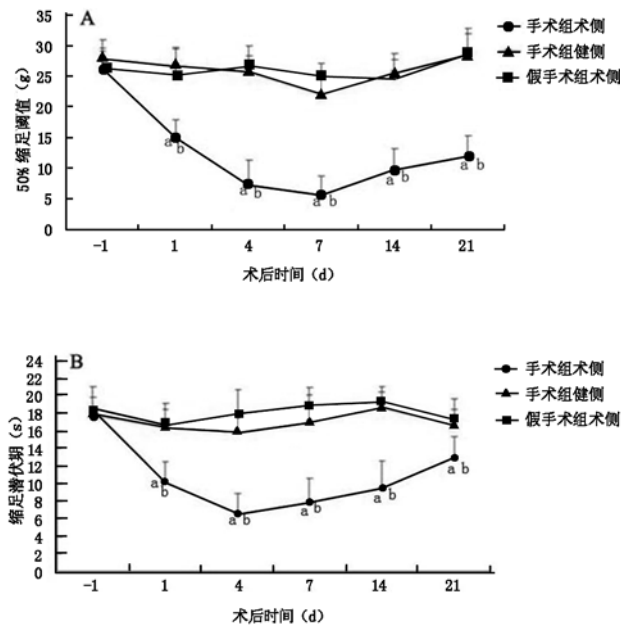
六、统计学分析

采用 SPSS 13.0 版统计软件进行分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组内比较采用配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、机械痛阈和热痛阈的变化

手术组大鼠术侧出现明显的触诱发痛和痛觉过敏现象:术侧着地时间较健侧明显缩短,且右足蜷曲,跛行,有时出现舔舐、悬空等后肢保护(缩足)现象,而手术组健侧及假手术组均未出现缩足现象。与 CCI 前比较,手术组术侧机械性痛阈和热痛阈在术后第 1 天开始下降($P < 0.05$),手术组术侧、手术组健侧和假手术组的 50% 缩足阈值分别为(16.02 ± 2.63)g、(26.71 ± 1.05)g 和 (26.10 ± 2.76)g,缩足潜伏期分别为(10.35 ± 2.14)s、(16.30 ± 1.87)s 和 (16.38 ± 2.52)s,术后第 7 天机械痛阈下降达到最低($P < 0.01$),术后第 4 天热痛阈下降达到最低($P < 0.01$),至第 21 天仍处于较低水平($P < 0.05$);与假手术组比较,手术组术侧术后机械痛阈和热痛阈下降($P < 0.05$);手术组健侧和假手术组术侧机械痛阈和热痛阈差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1。



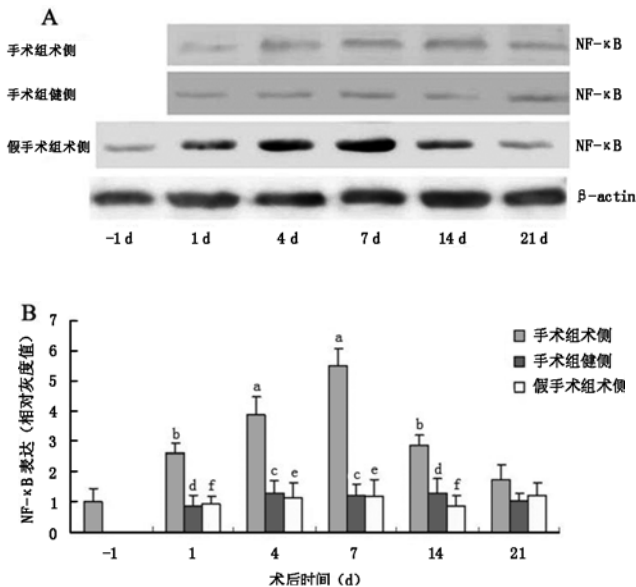
注:A. CCI 大鼠机械痛阈的变化(g); B. CCI 大鼠热痛阈的变化(s);与术前相比,^a $P < 0.05$;与假手术组术侧相比,^b $P < 0.05$

图 1 CCI 大鼠痛阈的变化

二、NF-κB 蛋白表达的变化

手术组大鼠术侧脊髓背角中 NF-κB 表达的水平增加,明显高于对侧和假手术组,与大鼠行为学的变化

相一致。NF- κ B 蛋白的水平于 CCI 后第 1 天开始增加,第 7 天达到高峰($P < 0.01$),于 CCI 后第 21 天仍维持于较高水平($P < 0.05$),表明 CCI 明显上调术侧脊髓中 NF- κ B 的表达。见图 2。



注:与术前相比,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$;与手术组健侧相比,^c $P < 0.01$,^d $P < 0.05$;与假手术组术侧相比,^e $P < 0.01$,^f $P < 0.05$

图 2 各组大鼠脊髓 NF- κ B 蛋白表达的变化(Western blot)

讨 论

神经病理性疼痛的主要行为学特征是自发性疼痛、痛觉过敏和异常疼痛。构建神经病理性疼痛动物模型的方法很多,各有优缺点。本研究采用的是 CCI 神经病理性疼痛动物模型,其致病机制是大鼠对铬制肠线特异性的免疫反应,引起神经干肿胀,进而出现神经压迫和神经干部分切断,从而导致神经病理性疼痛的表现。与其他疼痛模型比较,该模型大鼠出现伤肢自噬现象较少,且手术制作简单,创伤比较小,并发症少,易于掌握。在本实验中所有大鼠术后无一例出现感染和自残现象。大鼠在术后出现痛觉异常现象,实验中大鼠表现为自发抬起患肢,着地时间较健侧明显缩短,且有足内收、跛行、舔足等行为学表现。手术组术侧机械性疼痛阈和热痛阈显著下降,分别提示出现机械痛敏现象和热痛敏现象。表明适度的坐骨神经结扎选择性损伤了有髓鞘的粗纤维,保留了大部分传递痛觉的 C 纤维,标志 CCI 模型成功建立。本研究结果显示,CCI 后第 1 天术侧脊髓中 NF- κ B 开始增加,第 7 天达到高峰,并且在整个研究阶段一直处于较高水平,这也与本研究中大鼠的痛阈变化基本相符合,表明外周神经损伤时,NF- κ B 信号转导通路的活性明显增强。

NF- κ B 是一类关键性的核转录因子,对细胞内许

多基因尤其涉及炎症和免疫反应的基因表达起着关键性的调控作用。神经系统中,NF- κ B 作为一种“应激感受器”,可通过其活性形式进入细胞核结合与 DNA 上相应位点快速对外界刺激作出反应。在静息状态下,NF- κ B 以同源或异源二聚体形式存在于胞浆中,并与抑制性蛋白 I κ B 结合在一起而无活性^[8]。当外源性刺激,如促炎性细胞因子(肿瘤坏死因子- α 、白介素-1 β 、白介素-6)、细菌、病毒、氧化剂和放射线等存在时,通过不同的信号转导激活 I κ B 激酶(I κ K)复合体,活化的 I κ K 导致 I κ B 磷酸化降解,NF- κ B 游离进入细胞核,与目的基因的启动子或增强子上特定的 κ B 位点特异性结合,从而启动和调控基因的转录。活化的 NF- κ B 进入细胞核,可以诱导和激活多种相关基因的转录^[9-10],包括:细胞因子、炎症介质、免疫受体等。近年来 NF- κ B 在慢性疼痛调控机制中的作用逐渐引起重视。

NF- κ B 作为关键的转录调节因子,在细胞存活、凋亡、突触塑性变化等过程中发挥重要作用^[11-12]。近年来,多种实验模型如坐骨神经部分或完全结扎、坐骨神经横断、脊髓压迫损伤等均研究了外周神经损伤所导致的 NF- κ B 表达变化^[13-15]。研究发现,脊髓和背根神经节中 NF- κ B 的激活与伤害性信息的传递过程有关。部分坐骨神经结扎损伤能够导致大鼠背根神经节中 NF- κ B 激活且表达上调^[16]。腰 4,5 脊神经结扎术后术侧脊髓背角 NF- κ B 的表达显著升高^[17]。鞘内注射 gp120 产生的神经病理性疼痛大鼠模型中也可以观察到脊髓 NF- κ B 的激活^[18]。而在损伤部位注射 NF- κ B 的圈套寡核苷酸可以明显减轻触诱发痛,提示 NF- κ B 参与神经病理性疼痛的发生与发展过程。本研究发现,NF- κ B 于 CCI 术后第 1 天开始增高,于术后第 4 ~ 7 天维持在较高水平,而大鼠的行为学机械痛阈于术后第 7 天降至最低,热痛阈于术后第 4 天降至最低,NF- κ B 的表达与大鼠的痛阈变化基本一致,表明 NF- κ B 的激活与大鼠痛觉过敏和触诱发痛有关。

综上所述,大鼠坐骨神经慢性压迫性损伤导致脊髓中 NF- κ B 激活,参与神经病理性疼痛的启动和发展过程,NF- κ B 信号转导通路可能会成为疼痛调控的新靶点。

参 考 文 献

- [1] Merskey H, Bogduk N. Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. 2nd. Seattle: IASP Press, 1994: 394.
- [2] Zhang X, Xiao HS. Gene array analysis to determine the components of neuropathic pain signaling. Curr Opin Mol Ther, 2005, 7:532-537.
- [3] Papa S, Bubici C, Zazzeroni F, et al. The NF-kappa B-mediated

- control of the JNK cascade in the antagonism of programmed cell death in health and disease. *Cell Death Differ*, 2006, 13:712-729.
- [4] Albenis BC, Mattson MP. Evidence for the involvement of TNF and NF-kappa B in hippocampal synaptic plasticity. *Synapse*, 2000, 35: 151-159.
- [5] Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 1988, 33:87-107.
- [6] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*, 1994, 53:55-63.
- [7] Hargreaves K, Dubner R, Brown F, et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, 1988, 32:77-81.
- [8] Whiteside ST, Israe IA. I kappa B proteins: structure, function and regulation. *Semin Cancer Biol*, 1997, 8:75-82.
- [9] Murase T, Kume N, Hase T, et al. Gallates inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF-kappa B and expression of leukocyte adhesion molecules in vascular endothelial cells. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol*, 1999, 19:1412-1420.
- [10] Liu SF, Ye X, Malik AB. Inhibition of NF-kappa B activation by pyroglutamate prevents in vivo expression of proinflammatory genes. *Circulation*, 1999, 100:1330-1337.
- [11] Ciucci A, Gianferretti P, Piva R, et al. Induction of apoptosis in estrogen receptor-negative breast cancer cells by natural and synthetic cyclopentenones: role of the I kappa B kinase/nuclear factor-kappa B pathway. *Mol Pharmacol*, 2006, 70:1812-1821.
- [12] Albenis BC, Mattson MP. Evidence for the involvement of TNF and NF-kappa B in hippocampal synaptic plasticity. *Synapse*, 2000, 35: 151-159.
- [13] Sakaue G, Shimaoka M, Fukuoka T, et al. NF-kappa B decoy suppresses cytokine expression and thermal hyperalgesia in a rat neuropathic pain model. *Neuroreport*, 2001, 12:2079-2084.
- [14] Pollock G, Pennypacker KR, Mémet S, et al. Activation of NF-kappa B in the mouse spinal cord following sciatic nerve transection. *Exp Brain Res*, 2005, 165:470-477.
- [15] Bethea JR, Castro M, Keane RW, et al. Traumatic spinal cord injury induces nuclear factor-kappa B activation. *J Neurosci*, 1998, 18: 3251-3260.
- [16] Ma W, Bisby MA. Increased activation of nuclear factor kappa B in rat lumbar dorsal root ganglion neurons following partial sciatic nerve injuries. *Brain Res*, 1998, 797: 243-254.
- [17] O'Rielly DD, Loomis CW. Spinal nerve ligation-induced activation of nuclear factor kappa B is facilitated by prostaglandins in the affected spinal cord and is a critical step in the development of mechanical allodynia. *Neuroscience*, 2008, 155:9.
- [18] Ledebner A, Gamanos M, Lai W, et al. Involvement of spinal cord nuclear factor kappa B activation in rat models of proinflammatory cytokine-mediated pain facilitation. *Eur J Neurosci*, 2005, 22: 1977-1986.

(修回日期:2010-10-25)

(本文编辑:松 明)

· 消息 ·

第三届国际骨科康复学术会议通知

由上海交通大学医学院附属第九人民医院、广东省康复医学会、上海交通大学康复医学工程研究所共同主办,上海市康复医学工程研究会、上海市康复医学会、中山市中医药学会、中国康复医学会康复治疗专业委员会物理治疗学组、广东省医学会物理医学与康复学会康复治疗学组共同合办,广东省中山市中医院承办的第三届国际骨科康复学术会议将于 2011 年 5 月 21 至 23 日在广东省中山市中医院召开。

本届会议将聚焦“肩关节康复”,特邀美国、香港、台湾和大陆的专家专题开展指导讲座,力图从生物力学、手术、康复治疗、康复工程等多方位阐述肩关节常见伤病与功能障碍的基础理论与康复技术进展。在此基础上,还将安排肩关节康复治疗实训(workshop)课程(限额 60 人),邀请多位来自台湾、香港和美国的资深物理治疗师及手法名家针对肩关节物理检查、关节松动术、稳定性训练等进行现场教学与实训。参会者将授予国家级继续教育 I 类学分 10 分。会议注册方式:网上注册 800 元/人(若参加 workshop 1200 元/人);现场注册 1000 元/人(若参加 workshop 1500 元/人)。

会议网址:<http://www.orpt.org/2011kf>;会议报到时间:5 月 20 日;联系方式:上海交通大学医学院附属第九人民医院骨科(上海制造局路 639 号,邮编 200011);联系人:殷宁、水文;电话/传真:021-63139920;电子邮箱:shrehab@163.com

上海交通大学医学院附属第九人民医院