



DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2019.04.006

<http://xbyxb.csu.edu.cn/xbwk/fileup/PDF/201904377.pdf>

脊髓哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路参与大鼠外周神经损伤诱发的痛觉过敏

杨文茜^{1,2}, 郭曲练¹, 程智刚¹, 王云姣¹, 白念岳¹, 贺正华¹

(1. 中南大学湘雅医院麻醉科, 长沙 410008; 2. 湖南省肿瘤医院, 中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院麻醉科, 长沙 410013)

[摘要] 目的: 探讨哺乳动物雷帕霉素(rapamycin, RAPA)靶蛋白(mammalian target of RAPA, mTOR)信号通路是否通过激活脊髓背角星形胶质细胞参与外周神经损伤诱发的大鼠痛觉过敏。方法: 取健康雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠30只, 随机分为6组($n=5$): 1 d组(D1组)、4 d组(D4组)、7 d组(D7组)、14 d组(D14组)、正常组、假手术组。其中D1, D4, D7, D14组建立坐骨神经慢性压榨损伤(chronic constriction injury, CCI)模型, Normal组不做处理, Sham组仅暴露坐骨神经。于CCI术后第1, 4, 7, 14天分别测定各组大鼠左后肢机械缩足阈值(paw withdrawal mechanical threshold, PWMT)和热缩足潜伏期(paw withdrawal thermal latency, PWTL)。D1, D4, D7, D14组分别于CCI术后第1, 4, 7, 14天, 假手术组和正常组于相应第14天采集腰段脊髓。采用免疫组织化学法观察mTOR在大鼠脊髓的分布, 采用real-time PCR和蛋白质印迹法检测CCI大鼠腰段脊髓mTOR mRNA和蛋白的表达。另取雄性SD大鼠30只, 完成鞘内置管后, 随机分为6组($n=5$): 空白组、CCI组、早给药组(CCI+early RAPA组)、早溶剂组[CCI+early二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)组]、晚给药组(CCI+later RAPA组)、晚溶剂组(CCI+later DMSO组)。空白组不建立CCI模型也不给药; CCI组建立左后肢CCI模型; CCI+early RAPA组于CCI术后4 h开始鞘内注射1% RAPA 10 μ L, 连续给药3 d; CCI+early DMSO组于CCI术后4 h开始鞘内注射同浓度等体积溶剂4% DMSO 10 μ L作为对照; CCI+later RAPA组于CCI术后第7天开始鞘内注射1% RAPA 10 μ L, 连续给药3 d; CCI+later DMSO组于CCI术后第7天开始鞘内注射同浓度等体积溶剂DMSO 10 μ L作为对照。各组于鞘内置管前后以及CCI术后隔天测定痛阈。于CCI术后第14天取腰段脊髓, 免疫组织化学检测脊髓背角胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)的表达。结果: mTOR免疫组织化学阳性颗粒广泛分布于正常脊髓神经元胞浆中; D14组大鼠术后第1, 4, 7, 14天的PWMT与其基础值比较明显降低, 术后第4, 7, 14天的PWTL与其基础值比较明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与正常组比较, CCI组(D1, D4, D7和D14组)大鼠腰段脊髓mTOR的mRNA和蛋白表达显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与CCI+early DMSO组相同时间点比较, CCI+early RAPA组CCI术后第4, 6, 8, 10, 12, 14天的PWMT和PWTL均升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与CCI+later DMSO组相同时间点比较, CCI+later RAPA组CCI术后第8, 10, 12, 14天的PWMT和PWTL均升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); CCI+early RAPA组与CCI+early DMSO组、CCI+later RAPA组与CCI+later DMSO组相比较, CCI大鼠术侧腰段脊髓背角GFAP免疫组织化学阳性面积与吸光度值均下降(均 $P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论: 脊髓mTOR信号通路可能通过脊髓背角星形胶质细胞活化参与外周神经损伤诱发的痛觉过敏。

[关键词] 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; 神经病理性疼痛; 慢性压迫性损伤; 雷帕霉素; 脊髓背角; 星形胶质细胞

收稿日期(Date of reception): 2019-02-12

第一作者(First author): 杨文茜, Email: yangwenqian@hnszlyy.com, ORCID: 0000-0003-0341-9299

通信作者(Corresponding author): 程智刚, Email: chengzg2004@hotmail.com, ORCID: 0000-0002-8726-3107

基金项目(Foundation item): 国家自然科学基金(30872427); 湖南省自然科学基金(14JJ2023)。This work was supported by the National Natural Science Foundation (30872427) and the Natural Science Foundation of Hunan Province (14JJ2023), China.

mTOR signaling pathway of spinal cord is involved in peripheral nerve injury-induced hyperalgesia in rats

YANG Wenqian^{1,2}, GUO Qulian¹, CHENG Zhigang¹, WANG Yunjiao¹, BAI Nianyue¹, HE Zhenghua¹

(1. Department of Anesthesiology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008; 2. Department of Anesthesiology, Human Cancer Hospital; Affiliated Cancer Hospital of Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410013, China)

ABSTRACT

Objective: To investigate whether mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway is involved in peripheral nerve injury-induced hyperalgesia through activation of spinal dorsal astrocytes in rats.

Methods: A total of 30 male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into 6 groups ($n=5$): the 1 day group (D1 group), the 4 days group (D4 group), the 7 days group (D7 group), the 14 days group (D14 group), the normal group and the sham group. The sciatic nerve chronic constriction injury (CCI) model was established in the D1, D4, D7 and D14 group. The normal group received no treatment while the sham group was only exposed the sciatic nerve. Paw withdrawal mechanical threshold (PWMT) and paw withdrawal thermal latency (PWTL) were measured at the 1st, 4th, 7th, and 14th day after CCI in the different groups. Lumbar spinal cord were harvested on the 1st, 4th, 7th and 14th day in the D1, D4, D7, D14 group correspondingly, which were harvested on the 14th day in the normal group and the sham group. Distribution of mTOR in rat spinal cord was assessed by immunohistochemistry. The expressions of mTOR mRNA and protein in the spinal cord in different groups were determined by real-time PCR and Western blotting, respectively. Another 30 male intrathecal catheterized SD rats were randomly divided into 6 groups ($n=5$): a blank group, a CCI group, a CCI+early rapamycin (RAPA) group, a CCI+early dimethylsulfoxide (DMSO) group, a CCI+ later RAPA group, and a CCI+later DMSO group. The blank group didn't received any treatment; The CCI group was carried out the treatment of CCI model in the left hind limbs. 10 μ L of 1% RAPA was given to the CCI+early RAPA group intrathecally at 4 hours after CCI for 3 days; the CCI+later RAPA group were treated with the same dose of RAPA on the 7th days after CCI for 3 days; the CCI+early DMSO group and the CCI+later DMSO group were injected with the same volume of 4% DMSO at the corresponding time as controls. The PWTL and PWMT were measured before and after intrathecal catheterization, and every other day after CCI. The lumbar spinal cords were selected and the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in spinal dorsal horn were examined by immunohistochemistry in the 14th day after CCI.

Results: The immunohistochemistry positive particles of mTOR were widely distributed in the cytoplasm of the normal spinal neurons. Compared with the base line, the PWMT in the D14 group on the 1st, 4th, 7th and 14th day after CCI were significantly lower, and the PWTL on the 4th, 7th and 14th day after CCI were also significantly lower ($P<0.05$ or $P<0.01$). The expressions of mTOR mRNA and protein in the CCI groups (D1, D4, D7 and D14 group) were significantly increased than those in the normal group ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with the CCI+early DMSO group, the PWMT and PWTL in the CCI+early RAPA group were obviously increased on 4th, 6th, 8th, 10th, 12th or 14th day after CCI ($P<0.05$ or $P<0.01$); compared with the CCI+later DMSO group, the PWMT and PWTL in the CCI+later RAPA group were also significantly increased at the 8th, 10th or 14th day after CCI ($P<0.01$ or $P<0.05$). The GFAP immunohistochemistry positive area and absorbance value in the dorsal horn of the lumbar spinal cord in the CCI rats were decreased in the CCI+early RAPA group compared with the CCI+early DMSO group ($P<0.05$ or $P<0.01$), and which were also decreased in the CCI+later RAPA group compared with the CCI+later DMSO group ($P<0.05$ or $P<0.01$).

Conclusion: mTOR signaling pathway may be involved in hyperalgesia induced by peripheral

nerve injury via spinal astrocyte activation in the dorsal horn of the spinal cord.

KEY WORDS

mammalian target of rapamycin; neuropathic pain; chronic constriction injury; rapamycin; spinal dorsal horn; astrocyte

神经病理性疼痛是由于躯体感觉系统的损伤或疾病所引起的疼痛^[1], 其机制复杂, 常用镇痛药物疗效不佳。神经病理性疼痛机制的研究热点集中在神经元可塑性、胶质细胞活化、神经免疫等方面^[2]。哺乳动物雷帕霉素(rapamycin, RAPA)靶蛋白(mammalian target of RAPA, mTOR)是进化上高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶分子。它在细胞生长增殖、营养代谢、蛋白质合成与转录方面起到中心作用。RAPA作为mTOR复合体1(mTORC1)途径的抑制剂, 广泛用作研究RAPA敏感通路的工具^[3]。mTOR调控的翻译机制在中枢神经系统中普遍表达, 不但涉及到非神经细胞的增殖, 还与神经元的发育和突触可塑性密切相关, 这一机制在学习和记忆的过程中起了重要的作用^[4]。mTOR参与周围神经损伤诱发神经病理性疼痛的具体机制尚需深入研究。本实验将在大鼠坐骨神经慢性压榨损伤(chronic constriction injury, CCI)模型中研究mTOR信号通路是否可激活脊髓背角星形胶质细胞而参与外周神经损伤诱发的大鼠痛觉过敏。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

动物热辐射痛阈测量仪(37370型)购自意大利Ugo Basile公司; 动物Von Frey机械痛阈测定套件购自美国Stoelting公司; ABI 7500型实时荧光定量PCR(real-time PCR)系统购自美国Applied Biosystems公司; 光学显微镜及Image advanced 3.0图像分析系统购自加拿大Motic North America公司; Polyurethane Microspinal导管(内径0.12 mm, 外径0.35 mm)购自美国Lewiston公司; 二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)购自美国Invitrogen公司; RAPA购于上海康城生物有限公司(将冻干粉溶解于DMSO配置成1%悬液); mTOR抗体购自英国Abcam公司; 胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体购自美国Chemicon公司; PCR引物由上海英骏生物技术有限公司设计并合成。

1.2 实验分组及标本采集

纯种清洁级雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠30只, 体重220~260 g, 由中南大学实验动物部提供。将上述大鼠随机分为6组($n=5$): CCI组[1 d组(D1组)、4 d组(D4组)、7 d组(D7组)、14 d组(D14组)]、假手术

组、正常组。D1, D4, D7, D14组均结扎左侧坐骨神经以建立CCI模型, 假手术组仅暴露而不结扎坐骨神经, 正常组不做任何处理。D1, D4, D7组分别于CCI术后第1天、第4天和第7天收集标本, D14组、假手术组、正常组于CCI第14天收集标本。

另取雄性SD大鼠30只, 完成鞘内置管后, 随机分为6组($n=5$): 空白组、CCI组(CCI组)、CCI+early RAPA组(CCI+Early RAPA组)、CCI+early DMSO组(CCI+Early DMSO组)、CCI+later RAPA组(CCI+Late RAPA组)、CCI+later DMSO组(CCI+Late DMSO组)。其中空白组既不建立CCI模型, 也不给药; CCI组建立左后肢CCI模型; CCI+early RAPA组于CCI术后4 h开始鞘内注射1% RAPA 10 μ L, 连续给药3 d; CCI+early DMSO组于CCI术后4 h开始鞘内注射同浓度等体积溶剂(4% DMSO 10 μ L)作为对照; CCI+later RAPA组于CCI术后第7天开始鞘内注射1% RAPA 10 μ L, 连续给药3 d; CCI+later DMSO组于CCI术后第7天开始鞘内注射同浓度等体积溶剂(4% DMSO 10 μ L)作为对照。各组于CCI术后第14天收集标本。

SD大鼠腹腔注射10%水合氯醛(300~350 mg/kg), 待大鼠麻醉后断头处死, 冰上迅速取脊髓节段L4~6(保留部分左侧传入神经以区分左右), 一部分新鲜组织用于蛋白质及RNA抽提; 剩余部分经固定, 脱水, 包埋, 切片后备用。

1.3 建立CCI模型和鞘内置管

采用Bennett等^[5]方法, 建立左后肢CCI模型。大鼠经腹腔注射10%水合氯醛(300~350 mg/kg)麻醉后, 剃毛消毒, 于左后肢上缘切开皮肤, 分离肌肉, 用玻璃分针钝性暴露中段坐骨神经主干, 用铬制4-0非可吸收线结扎4道, 间隔1 mm。假手术组仅暴露神经, 不进行结扎。

参照改良Yaksh法^[6]进行鞘内置管。大鼠经腹腔注射10%水合氯醛(300~350 mg/kg)麻醉, 俯卧固定, 枕部剃毛消毒, 逐层剪开皮肤, 刮开寰枢椎间的筋膜和韧带, 暴露出脊髓, 用18 G针尖挑破寰枕膜, 可见脑脊液涌出, 将Polyurethane Microspinal导管经破口处轻柔置入, 深度7.5~8.0 cm, 达腰膨大。固定导管, 缝合肌肉皮肤。大鼠清醒后, 剔除运动功能障碍者, 经导管注射2%利多卡因20 μ L, 注射后30 s出现后肢运动麻痹并于30 min内恢复者, 说明置管位置正

确, 可用于后续实验。

1.4 痛阈测定

第1次分组大鼠于CCI术前及术后第1, 4, 7和14天进行评估; 第2次分组大鼠于鞘内置管前后以及CCI术后第2, 4, 6, 8, 10, 12, 14天进行痛阈测定。每天上午9点, 由固定的实验人员使用动物热辐射痛阈测量仪(37370型)测试大鼠左后肢热缩足潜伏期(paw withdrawal thermal latency, PWTL), 使用Von Frey痛阈测定套件测量大鼠左后肢机械缩足阈值(paw withdrawal mechanical threshold, PWMT), 每只大鼠重复测量5次, 每次测量间隔5 min以上, 剔除最大值和最小值, 取平均值。

1.5 Real-time PCR

Real-time PCR检测脊髓mTOR mRNA表达。TRIzol法提取脊髓组织总RNA, 并进行DNA消化及RNA质检, 用反转录试剂盒将组织RNA反转录为cDNA, 在ABI7500型real-time PCR系统上进行分析。mTOR正向引物5'-TCCTGAAGAACATGTGCGAG-3', 反向引物5'-CCAAAGTACAAGCGAGAGGC-3'; β -actin正向引物5'-AAGAGCTATGAGCTGCCTGA-3', 反向引物5'-TACGGATGTCAACGTCACAC-3'。反应体系为20 μ L, 扩增步骤为预变性95 $^{\circ}$ C 30 s; 退火95 $^{\circ}$ C 15 s, 61 $^{\circ}$ C 45 s, 延伸72 $^{\circ}$ C 30 s, 重复40个循环。记录各组Ct值, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 比较法计算mRNA的相对表达量。

1.6 蛋白质印迹法

采用蛋白质印迹法检测脊髓mTOR蛋白表达。组织加细胞裂解液匀浆, 离心后取上清, 测蛋白浓度。取30 μ g样品加至凝胶孔, 常规电泳、转膜、封闭, 分别加入mTOR(1:500)和 β -actin抗体(1:2 000), 于4 $^{\circ}$ C孵育过夜。次日, 以室温孵育二抗1 h(1:40 000), 采用增强电化学发光显色, 曝光成像。用Gel Pro Analyzer凝胶定量分析软件(以 β -actin为内参)进行定量分析。

1.7 免疫组织化学检测及分析

脊髓组织切片脱蜡、水化, PBS漂洗后进行抗原修复, 滴加封闭液(5% BSA), 在湿盒中室温放置30 min。用滤纸擦去封闭液, 勿洗。加抗mTOR抗体(1:400)或抗GFAP抗体(1:400), 置湿盒中4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 再用PBS漂洗3次, 每次5 min, 洗去一抗, 用滤纸擦去标本外的PBS。滴加二抗(1:150), 室温下置于湿盒中孵育20 min, 用PBS漂洗3次, 每次5 min, 洗去二抗, 用滤纸擦去标本外的PBS。滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液, 室温下置于湿盒中孵

育20 min, 用PBS漂洗3次, 每次5 min, 用滤纸擦去标本外的PBS。DAB显色, 苏木精复染, 脱水, 透明, 中性树胶封片。在显微镜下观察mTOR的分布, 采用Motic病理图像分析系统检测脊髓背角GFAP免疫组织化学阳性区面积及吸光度值。

1.8 统计学处理

计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 采用SPSS13.0统计软件进行统计分析。组间比较采用单因素方差分析(ANOVA); 两两比较采用LSD及SNK-*q*检验; 组内不同时间点比较采用配对*t*检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脊髓mTOR免疫组织化学染色

mTOR广泛分布于正常SD大鼠脊髓神经元胞质中(图1)。

2.2 CCI大鼠脊髓mTOR的表达变化

第1次分组实验中, CCI大鼠术后第1天开始出现机械痛敏, 与CCI术前测定的基础值比较, PWMT显著下降; D1, D4, D7, D14组PWMT与假手术组相比明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$, 图2A); CCI大鼠术后第4天开始出现热痛敏。与基础值比较, PWTL显著下降; D4, D7, D14组PWTL与假手术组相比明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$, 图2B)。Real-time PCR结果显示: 与正常组比较, D1, D4, D7和D14组大鼠脊髓水平的mTOR mRNA表达随时间明显上调($P<0.01$, 图2C), 而正常组与假手术组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$); 蛋白质印迹法结果显示: 与正常组比较, D1, D4, D7和D14组大鼠脊髓水平的mTOR蛋白表达随时间明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$; 图2D, 2E), 而正常组与假手术组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 鞘内注射RAPA对CCI大鼠痛阈的影响

第2次分组实验中, 鞘内置管各组大鼠术侧PWMT和PWTL与鞘内置管前的基础值比较差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。与空白组比较, CCI组大鼠PWMT于第2, 4, 6, 8, 10, 12, 14天均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$, 图3A), 而PWTL于第4, 6, 8, 10, 12, 14天亦明显降低(均 $P<0.01$, 图3B); 与CCI+early DMSO组相比, CCI+early RAPA组PWMT于CCI第4, 6, 8, 10, 12, 14天明显上升($P<0.05$ 或 $P<0.01$, 图3C); CCI+early RAPA组PWTL也呈现同样的变化趋势($P<0.05$ 或 $P<0.01$, 图3D); 与CCI+later

DMSO组相比, CCI+later RAPA组PWMT于CCI第8, 10, 12, 14天明显上升($P<0.05$ 或 $P<0.01$, 图3E);

CCI+later RAPA组PWTL也呈现同样的变化趋势($P<0.05$ 或 $P<0.01$, 图3F)。

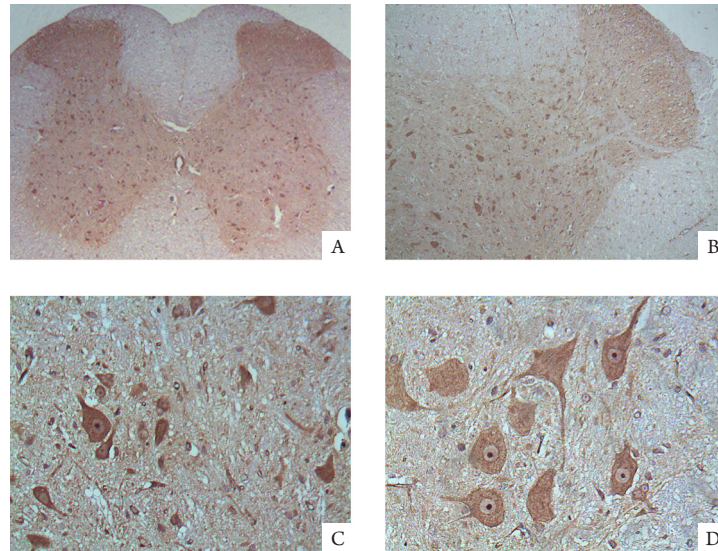


图1 mTOR在脊髓中的免疫组织化学染色

Figure 1 Immunohistochemical staining of mTOR in spinal cord

A: Lumbar segment of spinal cords ($\times 50$); B: Dorsal horn ($\times 100$); C: Positive neuron in dorsal horn ($\times 400$); D: Rich mTOR positive particles in cytoplasm of neurons ($\times 400$)

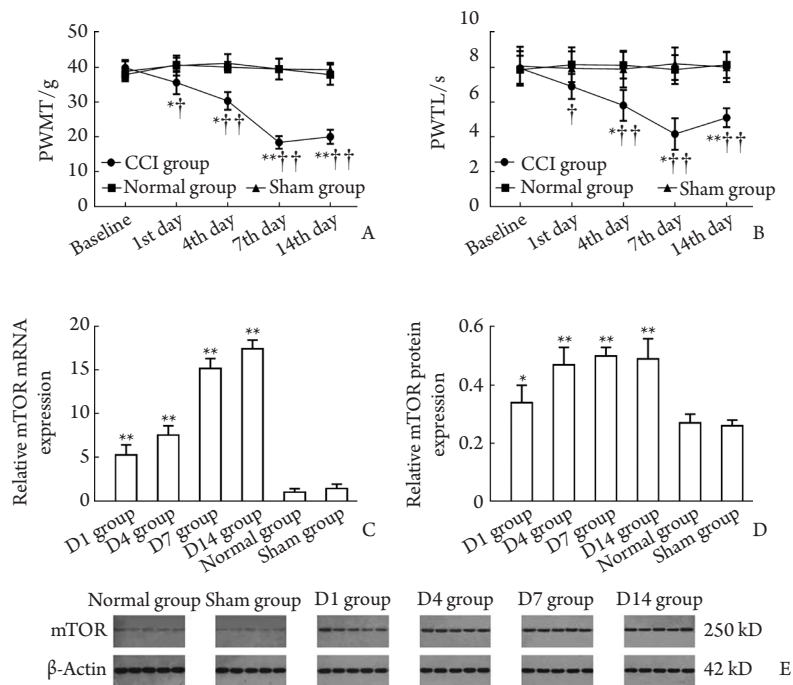


图2 CCI大鼠脊髓mTOR表达

Figure 2 Expression of mTOR in the rat spinal cord after CCI

A: Changes of PWMT of rats in the CCI groups, the normal group and the sham group. $*P<0.05$, $**P<0.01$ vs the baseline; $\dagger P<0.05$, $\dagger\dagger P<0.01$ vs the sham group. B: Changes of PWTL of rats in the CCI groups, the normal group and the sham group. $*P<0.05$, $**P<0.01$ vs the baseline; $\dagger P<0.05$, $\dagger\dagger P<0.01$ vs the sham group. C: Expressions of mTOR mRNA by real-time PCR in rats of each group. $**P<0.01$ vs the normal group. D: Expression of the relative protein levels of mTOR. $*P<0.05$, $**P<0.01$ vs the normal group. E: Electropherogram showing expression of mTOR protein detected by Western blotting

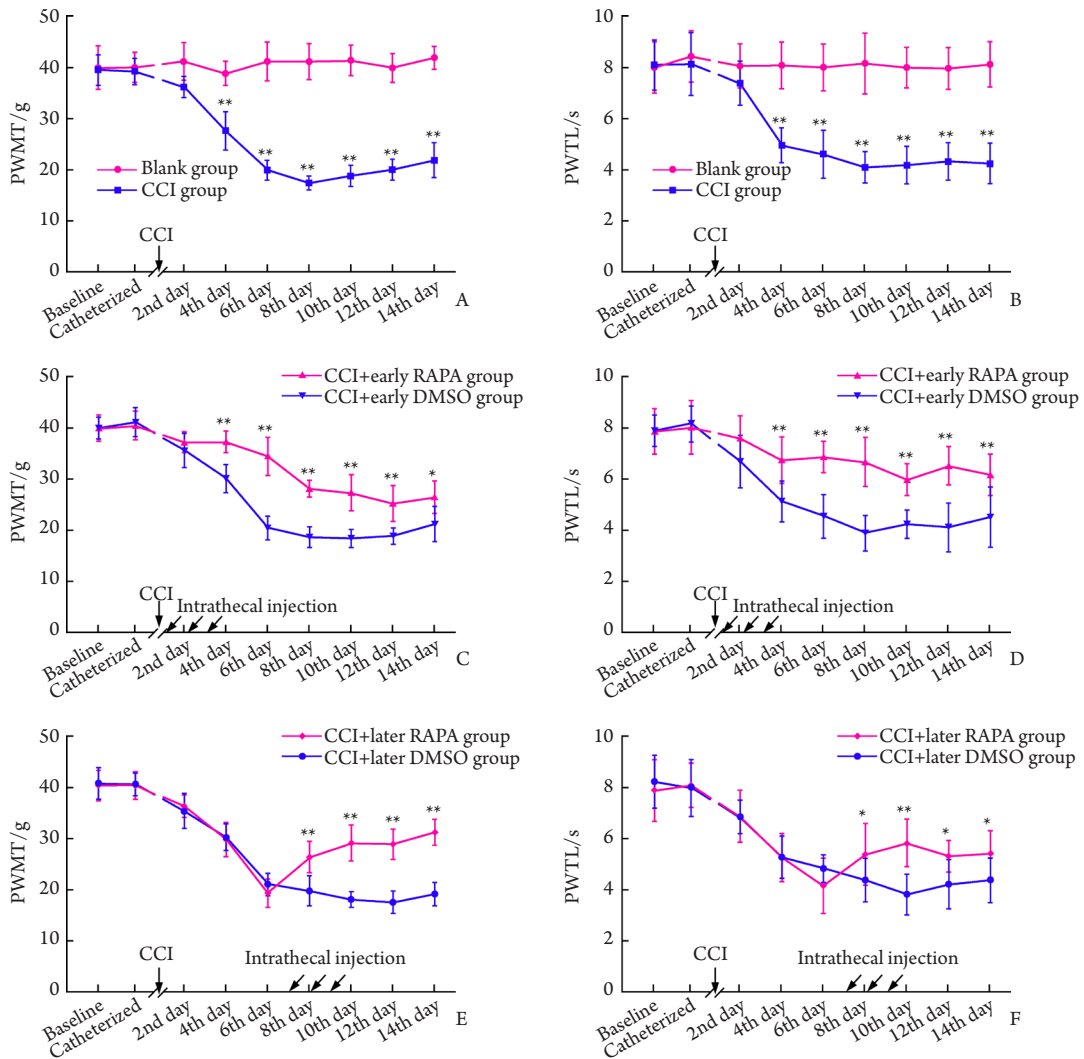


图3 鞘内注射RAPA对CCI大鼠PWMT和PWTL的影响

Figure 3 Effects of intrathecal treatment of RAPA on PWMT and PWTL in CCI rats

A: Comparison of PWMT between the blank group and CCI group. $**P < 0.01$ vs the blank group. B: Comparison of PWTL between the blank group and the CCI group. $**P < 0.01$ vs the blank group. C: Comparison of PWMT between the CCI+early RAPA group and the CCI+early DMSO group. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ vs the CCI+early DMSO group. D: Comparison of PWTL between the CCI+early RAPA group and the CCI+early DMSO group. $**P < 0.01$ vs the CCI+early DMSO group. E: Comparison of PWMT between the CCI+later RAPA group and the CCI+later DMSO group. $**P < 0.01$ vs the CCI+later DMSO group. F: Comparison of PWTL between the CCI+later RAPA group and the CCI+later DMSO group. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ vs the CCI+ later DMSO group

2.4 鞘内注射RAPA对CCI大鼠腰段脊髓背角GFAP表达的影响

CCI术后第14天, 观察损伤侧L₄₋₅脊髓背角的GFAP免疫组织化学染色。镜下可见活化的星形胶质细胞的胞体肥大, 突起增多分支增粗, GFAP表达增强(图4A~4F)。经病理图像分析系统检测分析, 与空白组比较, CCI组左侧背角GFAP阳性面积显著增加($P < 0.05$); 与CCI+early DMSO组比较, CCI+early RAPA组GFAP阳性面积显著减少($P < 0.05$); 与CCI+later DMSO组比较, CCI+later RAPA组GFAP阳性面积也

显著减少($P < 0.05$), CCI+early RAPA组与CCI+later RAPA组之间比较, CCI+later RAPA组GFAP阳性面积明显少于CCI+early RAPA组($P < 0.05$, 图4G)。与空白组比较, CCI组左侧背角GFAP吸光度值显著增加($P < 0.05$); 与CCI+early DMSO组比较, CCI+early RAPA组GFAP吸光度值显著减少($P < 0.05$); 与CCI+later DMSO组比较, CCI+later RAPA组GFAP吸光度值也显著减少($P < 0.05$), 但CCI+early RAPA组与CCI+later RAPA组比较, 两组间GFAP吸光度值比较差异无统计学意义($P > 0.05$, 图4H)。

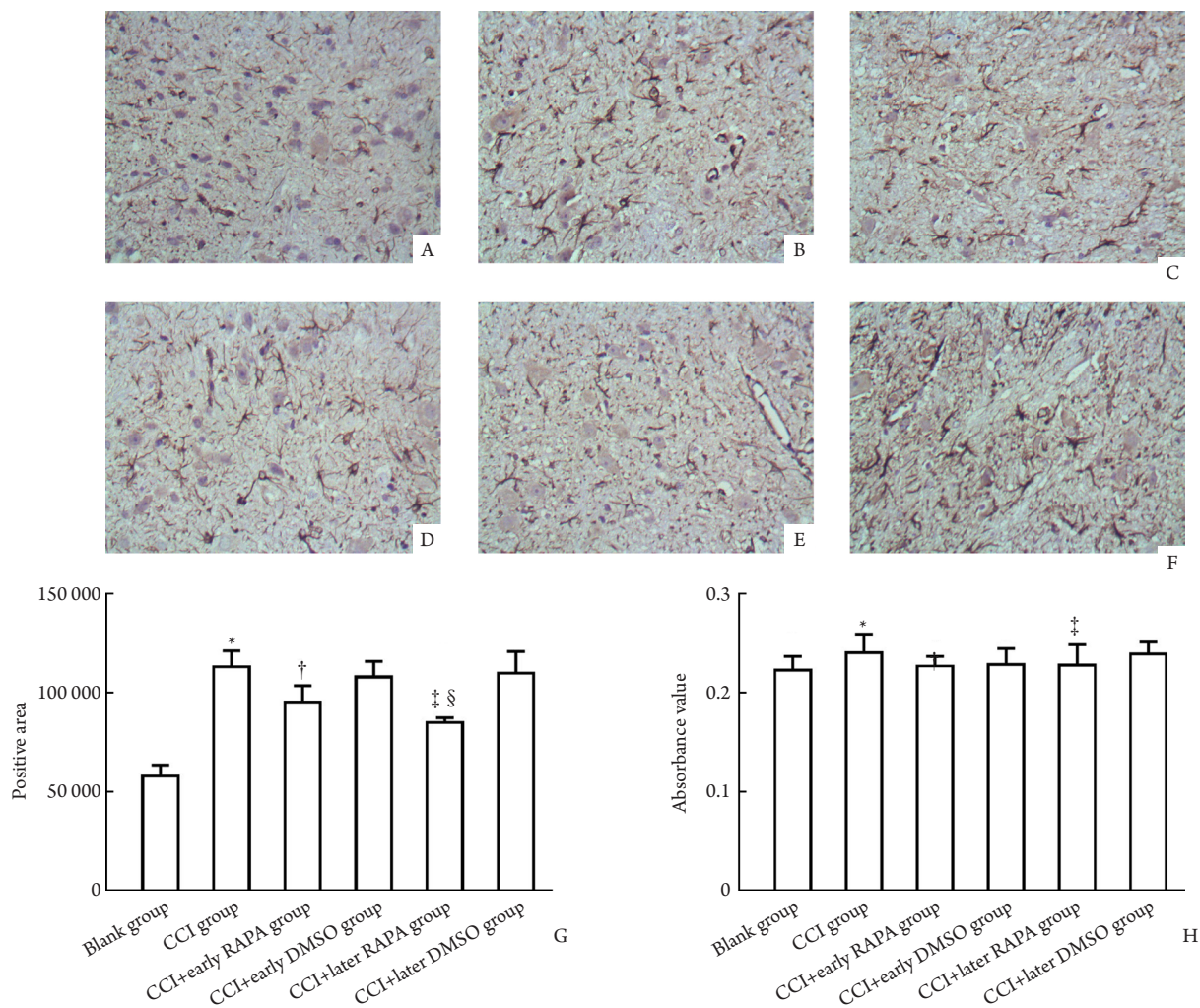


图4 免疫组织化学法观察鞘内注射RAPA对CCI大鼠腰段脊髓背角GFAP表达的影响

Figure 4 Effect of intrathecal treatment of RAPA on expressions of GFAP protein in lumbar dorsal horn of CCI rats by immunohistochemistry

A to F: Immunohistochemistry of GFAP in left dorsal horn of L4-6 spinal cord in different groups ($\times 400$). A: Blank group; B: CCI group; C: CCI+early RAPA group; D: CCI+early DMSO group; E: CCI+ later RAPA group; F: CCI+later DMSO group. G: Histogram of GFAP positive area in dorsal horn in each group; H: Histogram of absorbance value of the positive area in dorsal horn in each group. * $P < 0.05$ vs the blank group; † $P < 0.05$ vs the early DMSO group; ‡ $P < 0.05$ vs the later DMSO group; § $P < 0.05$ vs the early RAPA group

3 讨论

CCI模型由Bennett等^[5]在1988年建立, 良好地模拟了临床患者的病理状态和病理演变过程, 是广泛使用的神经病理性疼痛研究工具。本实验观察到CCI大鼠自发抬起患肢, 出现舔足、咬足或甩足, 避免患侧肢体负重, 表明已出现自发痛; 通过痛阈测定CCI大鼠术侧后肢出现明显热痛敏和机械痛敏。脊髓背角是疼痛信息的初级整合中枢^[2], 而病理性疼痛产生的脊髓机制复杂。通过微导管鞘内置管给药的途径, 药物可直接作用于脊髓, 为探索疼痛机制以及研究止痛药物提供了有力的工具^[6]。在第2次分组实验中, 所有动物均参照Yaksh等^[7]的方法进行鞘内置

管, 并且置管前后痛阈无差异, 排除了鞘内置管对实验结果的影响。

mTOR的激活触发下游效应物的磷酸化, 如核糖体70S亚基S6蛋白激酶(p70S6K)和真核细胞翻译起始因子4E结合蛋白1(4E-BP1), 调节mRNA翻译和蛋白质合成^[8]。mTOR有2种蛋白复合体mTORC1和mTORC2^[9], 雷帕霉素能与mTOR结合抑制mTORC1途径下游的效应^[10]。在神经系统中, mTOR介导的局部蛋白质合成在神经可塑性和学习与记忆过程中有重要作用^[11]。目前越来越多的证据^[12-13]支持mTOR信号通路与疼痛相关。RAPA可以减轻甲醛诱导的二相痛敏^[14]、辣椒素引起的二相机械痛敏^[15]、炎性疼痛模型的机械性痛敏^[16]。本实验发现mTOR免疫组织化学

染色阳性颗粒广泛分布于正常大鼠的腰段脊髓切片神经元的胞质轴浆中,提示脊髓mTOR可能参与了正常的痛觉的调制。坐骨神经结扎后大鼠脊髓mTOR的mRNA和蛋白水平均显著增高,并且脊髓mTOR表达的上调与CCI大鼠痛阈的变化趋势基本一致。在CCI损伤早期或在损伤1周后,鞘内应用RAPA均可减轻CCI大鼠的痛敏。以上结果提示脊髓水平mTOR信号通路上调,通过RAPA敏感的方式参与神经病理性疼痛的发生与维持。

神经胶质细胞能与神经细胞产生连接,分泌细胞因子,参与可塑性的调节,成为神经病理性疼痛研究的前沿热点之一。脊髓小胶质细胞和星形胶质细胞都参与了神经病理性疼痛的机制^[17]。星形胶质细胞表面可表达N-甲基-D-天冬氨酸受体,能被神经损伤后所释放的各种兴奋性氨基酸(excitatory amino acids, EAA)激活^[18]。活化的星形胶质细胞可通过释放前列腺素, EAA, 生长因子和其他促炎细胞因子等物质影响邻近的神经元和神经胶质细胞,以正反馈形式导致疼痛的放大和持续^[17]。神经胶质细胞的激活被认为是慢性疼痛产生并扩大的充分必要条件^[19]。激活的星形胶质细胞的胞体肥大、分支增多、突起增粗,特征性标志物GFAP表达增强^[20]。在本研究中,CCI第14天观察到明显的星形胶质细胞活化,在脊髓背角浅层星形胶质细胞数量增加,胞体明显增大,突起变粗变长,染色加深;与正常相比,CCI侧GFAP免疫组织化学染色明显增强。本实验发现:坐骨神经损伤后4 h与损伤后7 d开始向鞘内注射mTOR抑制剂RAPA,均可以显著减轻CCI大鼠的机械痛敏和热痛敏。免疫组织化学半定量分析显示,上述处理均能减少脊髓背角GFAP的表达。这些结果提示:RAPA可以抑制星形胶质细胞活化而减轻CCI所致的痛敏,mTOR参与CCI模型脊髓背角星形胶质细胞的活化。Cao等^[21]研究发现:星形胶质细胞的活化一般在CCI第3天,第7天活化程度达高峰,并且星形胶质细胞的活化可能与小胶质细胞活化后产生的细胞因子趋化因子有关。据此推测,早给药可能抑制了星形胶质细胞的激活过程;而晚给药也许抑制了星形胶质细胞活化的程度,表现出CCI痛敏的减轻和GFAP表达的减少,但其具体的机制尚需进一步探索。

利益冲突声明: 作者声称无任何利益冲突。

参考文献

[1] Murnion BP. Neuropathic pain: current definition and review of drug

treatment[J]. *Aust Prescr*, 2018, 41(3): 60-63.

- [2] Campbell JN, Meyer RA. Mechanisms of neuropathic pain[J]. *Neuron*, 2006, 52(1): 77-92.
- [3] Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease[J]. *Cell*, 2012, 149(2): 274-293.
- [4] Jaworski J, Sheng M. The growing role of mTOR in neuronal development and plasticity[J]. *Mol Neurobiol*, 2006, 34(3): 205-219.
- [5] 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.
- [6] Hou Y, Wang L, Gao J, et al. A modified procedure for lumbar intrathecal catheterization in rats[J]. *Neurol Res*, 2016, 38(8): 725-732.
- [7] Yaksh TL, Rudy TA. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space[J]. *Physiol Behav*, 1976, 17(6): 1031-1036.
- [8] Magnuson B, Ekim B, Fingar DC. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks[J]. *Biochem J*, 2012, 441(1): 1-21.
- [9] Loewith R, Jacinto E, Wullschlegel S, et al. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control[J]. *Mol Cell*, 2002, 10(3): 457-468.
- [10] Yip CK, Murata K, Walz T, et al. Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition[J]. *Mol Cell*, 2010, 38(5): 768-774.
- [11] Banko JL, Poulin F, Hou L, et al. The translation repressor 4E-BP2 is critical for eIF4F complex formation, synaptic plasticity, and memory in the hippocampus[J]. *J Neurosci*, 2005, 25(42): 9581-9590.
- [12] Melemedjian OK, Khoutorsky A. Translational control of chronic pain[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2015, 131: 185-213.
- [13] Duan Z, Li J, Pang X, et al. Blocking mammalian target of rapamycin (mTOR) alleviates neuropathic pain induced by chemotherapeutic bortezomib[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 48(1): 54-62.
- [14] Asante CO, Wallace VC, Dickenson AH. Formalin-induced behavioural hypersensitivity and neuronal hyperexcitability are mediated by rapid protein synthesis at the spinal level[J]. *Mol Pain*, 2009, 5(1): 27.
- [15] Géranton SM, Jiménez-Díaz L, Torsney C, et al. A rapamycin-sensitive signaling pathway is essential for the full expression of persistent pain states[J]. *J Neurosci*, 2009, 29(47): 15017-15027.
- [16] Obara I, Medrano MC, Signoret-Genest J, et al. Inhibition of the mammalian target of rapamycin complex 1 signaling pathway reduces itch behaviour in mice[J]. *Pain*, 2015, 156(8): 1519-1529.
- [17] Wieseler-Frank J, Maier SF, Watkins LR. Glial activation and pathological pain[J]. *Neurochem Int*, 2004, 45(2/3): 389-395.
- [18] Takuma K, Matsuda T, Hashimoto H, et al. Role of Na⁺-Ca²⁺ exchanger in agonist-induced Ca²⁺ signaling in cultured rat astrocytes[J]. *J Neurochem*, 1996, 67(5): 1840-1845.
- [19] Takeda K, Sawamura S, Tamai H, et al. Role for cyclooxygenase 2 in the development and maintenance of neuropathic pain and spinal

glial activation[J]. Anesthesiology, 2005, 103(4): 837-844.

[20] Dubový P, Klusáková I, Hradilová-Svíženská I, et al. Activation of astrocytes and microglial cells and CCL2/CCR2 upregulation in the dorsolateral and ventrolateral nuclei of periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla following different types of sciatic nerve injury[J]. Front Cell Neurosci, 2018, 12: 40.

[21] Cao H, Zhang YQ. Spinal glial activation contributes to pathological pain states[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2008, 32(5): 972-983.

(本文编辑 傅希文)

本文引用: 杨文茜, 郭曲练, 程智刚, 王云姣, 白念岳, 贺正华. 脊髓哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路参与外周神经损伤诱发的大鼠痛觉过敏[J]. 中南大学学报(医学版), 2019, 44(4): 377-385. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2019.04.006

Cite this article as: YANG Wenqian, GUO Qulian, CHENG Zhigang, WANG Yunjiao, BAI Nianyue, HE Zhenghua. mTOR signaling pathway of spinal cord is involved in peripheral nerve injury-induced hyperalgesia in rats[J]. Journal of Central South University. Medical Science, 2019, 44(4): 377-385. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2019.04.006

本刊常用词汇英文缩写表(按英文字母排序)

从2012年第1期开始, 本刊对大家较熟悉的以下常用词汇, 允许直接使用缩写, 即首次出现时可不标注中文。

ABC 法	抗生物素蛋白-生物素酶复合物法	FN	纤连蛋白	NF-κB	核因子-κB
ACh	乙酰胆碱	GFP	绿色荧光蛋白	NK 细胞	自然杀伤细胞
AIDS	获得性免疫缺陷综合征	GSH	谷胱甘肽	NO	一氧化氮
ALT	丙氨酸转氨酶	HAV	甲型肝炎病毒	NOS	一氧化氮合酶
AngII	血管紧张素 II	Hb	血红蛋白	NS	生理氯化钠溶液
APTT	活化部分凝血活酶时间	HBcAb	乙型肝炎病毒核心抗体	PaCO ₂	动脉血二氧化碳分压
AST	天冬氨酸氨基转移酶	HBcAg	乙型肝炎病毒核心抗原	PaO ₂	动脉血氧分压
ATP	三磷酸腺苷	HBeAb	乙型肝炎病毒 e 抗体	PBS	磷酸盐缓冲液
bFGF	碱性成纤维细胞转化生长因子	HBeAg	乙型肝炎病毒 e 抗原	PCR	聚合酶链反应
BMI	体重指数	HBsAb	乙型肝炎病毒表面抗体	PI3K	磷脂酰肌醇 3 激酶
BP	血压	HBsAg	乙型肝炎病毒表面抗原	PLT	血小板
BSA	牛血清白蛋白	HBV	乙型肝炎病毒	PT	凝血酶原时间
BUN	尿素氮	HCG	人绒毛膜促性腺激素	RBC	红细胞
BUN	血尿素氮	HCV	丙型肝炎病毒	RNA	核糖核酸
CCr	内生肌酐清除率	HDL-C	高密度脂蛋白胆固醇	ROS	活性氧
CCU	心脏监护病房	HE	苏木精-伊红染色	RT-PCR	反转录-聚合酶链反应
COX-2	环氧合酶-2	HGF	肝细胞生长因子	SABC 法	链霉抗生物素蛋白-生物素酶复合物法
Cr	肌酐	HIV	人类免疫缺陷病毒	SARS	严重急性呼吸综合征
CRP	C-反应蛋白	HRP	辣根过氧化物酶	SCr	血肌酐
CT	计算机 X 线断层照相技术	HSP	热休克蛋白	SO ₂	血氧饱和度
CV	变异系数	HPF	高倍视野	SOD	超氧化物歧化酶
ddH ₂ O	双蒸水	IC ₅₀	半数抑制浓度	SP 法	标记的链霉抗生物素蛋白-生物素法
DMEM	杜尔贝科改良伊格尔培养基	ICAM	细胞间黏附分子	SPF 动物	无特定病原体动物
DMSO	二甲基亚砜	ICU	重症监护病房	STAT3	信号转导和转录激活因子 3
DNA	脱氧核糖核酸	IFN	干扰素	Tbil	总胆红素
ECG	心电图	IL	白细胞介素	TC	总胆固醇
ECL	增强化学发光法	iNOS	诱导型一氧化氮合酶	TG	三酰甘油
ECM	细胞外基质	IPG	固相 pH 梯度	TGF	转化生长因子
EDTA	乙二胺四乙酸	JNK	氨基末端激酶	Th	辅助性 T 细胞
EEG	脑电图	LDL-C	低密度脂蛋白胆固醇	TLRs	Toll 样受体
EGF	表皮生长因子	LOH	杂合性缺失	TNF	肿瘤坏死因子
ELISA	酶联免疫吸附测定	LPS	内毒素/脂多糖	TT	凝血酶时间
eNOS	内皮型一氧化氮合酶	MAPK	丝裂原活化蛋白激酶	TUNEL	原位末端标记法
ERK	细胞外调节蛋白激酶	MDA	丙二醛	VEGF	血管内皮生长因子
ESR	红细胞沉降率	MMP	基质金属蛋白酶	VLDL-C	极低密度脂蛋白胆固醇
FBS	胎牛血清	MRI	磁共振成像	vWF	血管性血友病因子
FDA	美国食品药品监督管理局	MIT	四甲基偶氮唑盐微量酶反应	WBC	白细胞
FLTC	异硫氰酸荧光素	NADPH	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸	WHO	世界卫生组织