

[文章编号] 1000-4718(2009)07-1435-03

鞘内注射 BN50730 抑制 SNI 大鼠痛敏和脊髓 TNF- α 的表达*

马国平^{1,2}, 杨京利², 田玉科¹, 刘菊英²[¹ 华中科技大学同济医院麻醉科,湖北 武汉 430030;² 郟阳医学院附属太和医院麻醉科,湖北 十堰 442000]

[摘要] 目的:观察鞘内注射血小板活化因子受体拮抗剂 BN50730 对坐骨神经分支选择损伤(SNI)神经病理痛大鼠痛阈及脊髓肿瘤坏死因子 α (TNF- α)表达的影响,探讨脊髓血小板活化因子(PAF)及其受体参与痛觉信号调节的可能机制。方法:鞘内置管的 Sprague-Dawley 大鼠 24 只随机等分为 4 组:假手术组, SNI 组, SNI + DMSO 对照组和 SNI + BN50730 组,建立 SNI 疼痛模型,手术后 1、3、5、7、10 和 14 d 鞘内给药并测痛阈,第 14 d 取腰段脊髓免疫组化法和 ELISA 法检测脊髓 TNF- α 的表达。结果: SNI 神经损伤大鼠机械缩爪阈值明显降低($P < 0.05$),同侧脊髓背角 TNF- α 表达增强,ELISA 检测脊髓 TNF- α 含量升高($P < 0.05$);鞘内应用 BN50730 降低脊髓 TNF- α 的表达,同时伴有大鼠痛行为的改善。各组大鼠辐射热缩爪潜伏期无明显差异。结论: BN50730 对 SNI 神经病理性疼痛有治疗作用, TNF- α 的表达下调可能与其镇痛机制有关。

[关键词] 血小板活化因子; BN50730; 神经病理性疼痛; 肿瘤坏死因子

[KEY WORDS] Platelet activating factor; BN50730; Neuropathic pain; Tumor necrosis factor

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)是免疫细胞和炎症细胞产生的一种重要的炎症介质。PAF 及其受体广泛存在于神经组织中,参与神经中枢的一系列病理生理过程^[1]。近来有研究表明, PAF 及其受体参与慢性疼痛的中枢敏化机制^[2]。BN50730 是一种人工合成的 PAF 受体拮抗剂,选择性作用于 PAF 受体细胞内结合位点^[3]。本研究通过观察鞘内注射 BN50730 对坐骨神经分支选择损伤(spared nerve injury, SNI)大鼠痛阈及脊髓肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor, TNF- α)表达的影响,探讨内源性 PAF 及其受体在神经病理性疼痛中枢敏化机制中的作用,为 BN50730 用于疼痛治疗提供理论依据。

材 料 和 方 法

1 动物及试剂

雄性 Sprague-Dawley 大鼠,体重 200-250 g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供; BN50730 购于 RBI; 兔抗 TNF- α 抗体购于北京中山生物技术公司; ELISA 试剂盒购自 Diaclone。

2 鞘内置管

大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛(300mg/kg)麻醉后,参考 Milligan 等^[4]的方法,去掉 L₆ 椎板暴露硬脊膜,用针尖挑破脊膜,将一端封闭的充满生理盐水的 PE-10 导管向头端插入 3 cm,固定导管并逐层缝合切口,导管外端经皮下隧道至后颈部出皮肤后固定,热熔封口,术后分笼饲养,室温维持 20-25 °C,自然照明,自由饮水和摄食。大鼠清醒 24 h 后经导

管注射 2% 利多卡因 10 μ L 判断导管位置,如注射后 30 s 内大鼠出现双后肢麻痹现象说明导管位置正确。

3 神经痛模型的建立及分组

取导管位置正确且无运动功能障碍的大鼠 24 只纳入实验,随机等分为 4 组,假手术组(sham 组), SNI 组, DMSO(二甲基亚砜)对照组和 BN50730(100 μ g/5 μ L)治疗组。鞘内置管 3 d 后,参照 Decosterd 等^[5]的方法建立 SNI 疼痛模型, 10% 水合氯醛(300 mg/kg)麻醉后,于大鼠右侧大腿中部切开,暴露游离坐骨神经分支,分别切断并结扎胫神经和腓总神经,保留腓肠神经;假手术组仅暴露游离坐骨神经分支,不做切断和结扎。

4 痛阈测定

建立模型手术的前 1d 测基础痛阈,手术后 1、3、5、7、10 和 14 d 鞘内给药 1 次,30 min 后测痛阈。参照 Obata 等^[6]的方法,采用电子自动爪触觉测试仪(Ugo basile, Comerio),测机械缩爪阈值(paw withdrawal mechanical threshold, PWMT); 参照 Hargreaves 等^[7]的方法,采用辐射热测痛仪(BME-410A 型,中国医学科学院生物医学工程研究所),测辐射热缩爪潜伏期(paw withdrawal thermal latency, PWTL)。

5 免疫组织化学

第 14d 测定痛阈后,大鼠在腹腔注射 10% 水合氯醛(300 mg/kg)麻醉下开胸,经心尖部穿刺行主动脉内插管灌注,生理盐水 200 mL 快速冲洗,继之以预冷的 4% 多聚甲醛溶液(内含 0.1 mol/L PBS, pH7.4) 500 mL 灌注固定。取脊髓 L₄-L₆ 节段,置于相同固定液中再固定 24 h,将标本置于

[收稿日期] 2008-06-11 [修回日期] 2008-12-10

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30672027)

E-mail: gpmshian@163.com

25%蔗糖液4℃冰箱保存过夜。次日,取脊髓冰冻切片,切片厚度25 μm。切片收集入0.01 mol/L PBS液中漂洗后,入0.25% Triton X-100 孵育30 min,3%过氧化氢(H₂O₂)室温20 min,30%正常羊血清中37℃封闭40 min后,加入1:300倍稀释的兔抗TNF-α I抗,37℃孵育1 h,4℃冰箱过夜;次日PBS清洗后,加入1:100倍稀释的生物素化羊抗兔IgG II抗,37℃湿盒中孵育30 min;PBS清洗后,加入1:100倍稀释的ABC复合物37℃孵育45 min;PBS清洗后,DAB显色5 min,流水冲洗,终止反应;爬片、晾干,梯度乙醇逐级脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。每只大鼠随机选取5张切片,用高清晰度彩色病理图像报告分析系统(Leica Q500IW)检测脊髓背角浅层TNF-α免疫阳性反应物的吸光度(A)值进行半定量分析。

6 ELISA 法检测脊髓 TNF-α 含量

脊髓组织称重后置于匀浆缓冲液中匀浆,样本在4℃20 000 ×g离心30 min,取上清液待用。按照试剂盒说明进行ELISA法检测TNF-α含量,计算脊髓组织中TNF-α的浓度,以ng/g表示。

7 统计学处理

数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS 11.0统计软件包进行单因素方差分析,继之以Fisher's PLSD多重比较法。

结 果

1 鞘内注射 BN50730 对大鼠 SNI 所致痛敏的影响

假手术组大鼠术前与术后PWMT未见明显变化,SNI组和DMSO组大鼠于神经损伤后1 d出现机械异常痛敏(mechanical allodynia),至7 d时达到高峰并在观察时间内维持稳定,鞘内注射BN50730明显减轻SNI所致的机械性异常痛敏,见图1;各组大鼠辐射热缩爪潜伏期PWTL无明显差异,见图2。

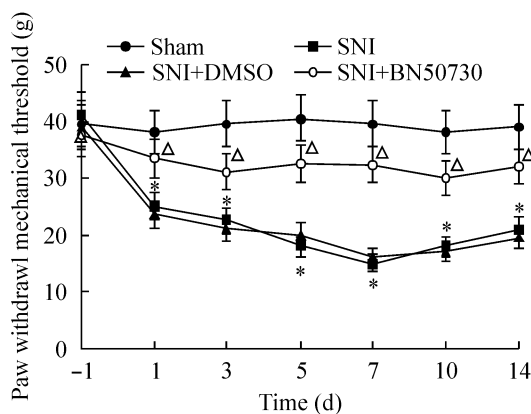


Fig 1 Effects of intrathecal administration of BN50730 and spared nerve injury (SNI) on paw withdrawal mechanical threshold in rats. BN50730 and vehicle were administered, respectively. Mechanical allodynia was assessed with a dynamic plantar aesthesiometer (Ugo Basile, Comerio, Italy), which is an automated von Frey-type system. $\bar{x} \pm s$. $n = 6$. * $P < 0.05$ vs sham group; $\Delta P < 0.05$ vs SNI and SNI + DMSO group.

图1 鞘内注射 BN50730 对 SNI 大鼠机械缩爪阈值的影响

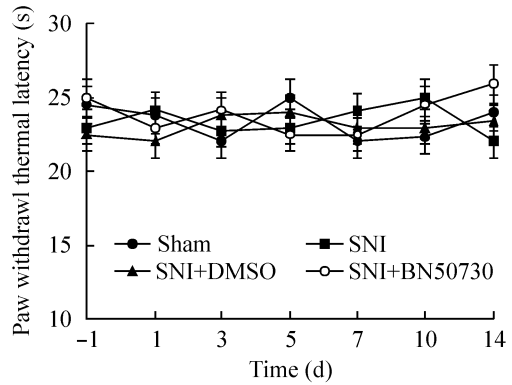


Fig 2 The time-course of paw withdrawal thermal latency in rats. Thermal hyperalgesia was assessed with a radiant heat stimulator. There were no differences among four groups in each time point.

图2 鞘内注射 BN50730 对 SNI 大鼠热缩爪潜伏期的影响

2 鞘内注射 BN50730 对 SNI 引起的脊髓 TNF-α 表达的影响

免疫组化图像分析,SNI引起同侧脊髓背角内TNF-α的表达增强,对侧背角内仅有少量TNF-α阳性表达,鞘内应用BN50730后大鼠脊髓背角内TNF-α表达水平与SNI组及DMSO组相比明显降低($P < 0.05$),见图3。ELISA法检测,BN50730明显抑制SNI引起的脊髓TNF-α含量升高(图4)。

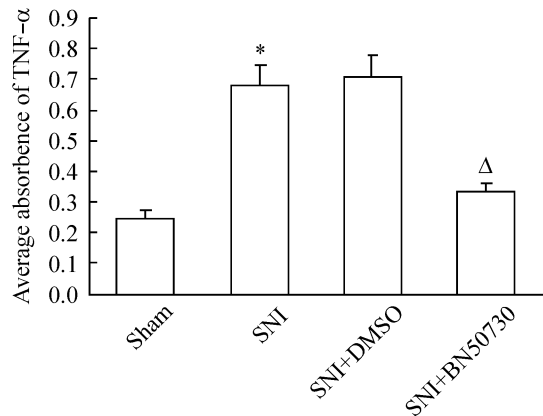


Fig 3 Changes of TNF-α in lumbar spinal cord. Absorbance of TNF-α in immunohistochemical photograph was analyzed with a colour picture analysis system (Leica Q500IW). $\bar{x} \pm s$. $n = 6$. * $P < 0.05$ vs sham group; $\Delta P < 0.05$ vs SNI and SNI + DMSO group.

图3 SNI 大鼠脊髓 TNF-α 变化

讨 论

SNI模型是一种新型神经病理痛动物模型,具有手术创伤小、操作简单及模型稳定可靠的优点,是研究慢性神经痛的理想动物模型。本研究成功地建立了SNI模型,模型成功率高,产生疼痛过敏和异常的时间早,手术后1 d同侧后爪即出现机械异常痛敏,术后7 d达到高峰,随后趋于稳定;研究结果显示,SNI模型的神经损伤对大鼠辐射热缩爪潜伏期没有明显影响,符合该模型的特点。

传统观点认为胶质细胞仅对神经元起支持和营养作用,

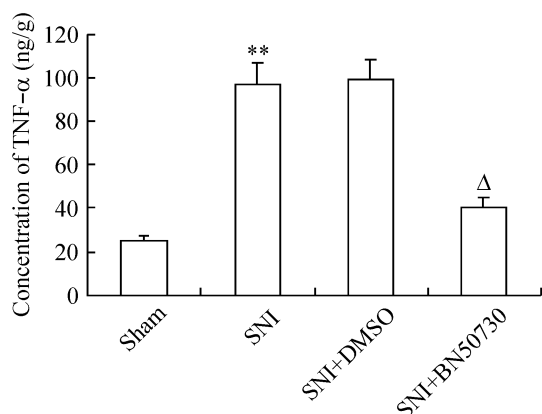


Fig 4 TNF- α level in lumbar spinal cord. Quantitative determination of TNF- α protein was performed by ELISA. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. ** $P < 0.01$ vs sham group; $\Delta P < 0.05$ vs SNI and SNI + DMSO group.

图4 SNI大鼠脊髓TNF- α 表达水平

近年来的研究表明,胶质细胞及其产生的促炎性细胞因子在神经病理性疼痛机制中发挥重要作用。TNF- α 是胶质细胞表达的重要促炎性细胞因子,TNF- α 拮抗剂可阻断和逆转神经损伤引起的痛敏^[8];促炎性细胞因子中TNF- α 最早从胶质细胞释放,释放后诱导其它促炎性细胞因子(如IL-1 β 、IL-6)的表达和释放,并且促炎性细胞因子间有强大的协同作用,以上研究均表明,脊髓TNF- α 参与神经病理性疼痛中枢敏化机制。本研究结果表明,SNI神经损伤诱导脊髓TNF- α 的表达增强,提示TNF- α 可能参与SNI神经病理性疼痛中枢机制。

PAF是一种具有广泛生物学活性的内源性磷脂类炎症介质,参与中枢神经系统内多种生理和病理过程^[1,9]。PAF与其受体结合产生细胞效应,其作用机制复杂,目前的研究认为存在3个PAF结合位点,即1个突触膜表面位点和2个细胞内位点^[4]。PAF细胞膜表面受体是一类G蛋白偶联受体,激活后调节多个细胞内信号转导级联反应,包括细胞内钙离子浓度、环磷酸腺苷(cAMP)、二酰甘油(DAG)和三磷酸肌醇(IP₃)水平^[11]。PAF还是一种细胞内调质,通过与微粒体位点结合诱导神经元和胶质细胞内某些基因的表达。研究表明,PAF增加星形胶质细胞PGE₂的释放^[10],诱导共培养的神经元和胶质细胞COX-2和TNF- α 的表达上调^[11],PAF参与诱导脊髓损伤后促炎性细胞因子IL-1 β 和IL-6的表达^[12]。BN50730是一种人工合成的PAF受体拮抗剂,选择性作用于细胞内结合位点。研究表明,BN50730能有效减轻甲醛诱发的炎性疼痛反应^[13]。脊髓是调节痛觉信号转导的重要中枢,脊髓水平内源性PAF及其受体在神经病理性疼痛中的作用尚无相关的研究。本研究鞘内注射BN50730明显减轻SNI大鼠机械性异常痛敏,同时伴有脊髓TNF- α 表达下调,其镇痛机制可能是作用于PAF细胞内结合位点而抑制PAF的活性,抑制其对细胞内疼痛相关基因表达的诱导作用,在脊髓水平调节痛觉信号的转导。BN50730对大鼠辐射热缩爪潜伏期无明显影响,可能与SNI模型只存在机械性异常痛敏,而没有热痛敏的特点有关。

综上所述,SNI引起大鼠机械性异常痛敏和脊髓TNF- α 的表达增强,鞘内注射BN50730降低TNF- α 的表达,并且与

大鼠痛行为改善相一致。研究结果提示,BN50730对SNI神经病理性疼痛有治疗作用,TNF- α 的表达下调可能与其镇痛机制有关。

[参 考 文 献]

- [1] Ishii S, Shimizu T. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice[J]. *Prog Lipid Res*, 2000, 39(1): 41-82.
- [2] Morita K, Morioka N, Abidin J, et al. Development of tactile allodynia and thermal hyperalgesia by intrathecally administered platelet-activating factor in mice[J]. *Pain*, 2004, 111(3): 351-359.
- [3] Marcheselli VL, Rossowska, MJ. Domingo MT, et al. Distinct platelet-activating factor binding sites in synaptic endings and in intracellular membranes of rat cerebral cortex[J]. *J Biol Chem*, 1990, 265(16): 9140-9145.
- [4] Milligan ED, Hinde JL, Mehmert KK, et al. A method for increasing the viability of the external portion of lumbar catheters placed in the spinal subarachnoid space of rats[J]. *J Neurosci Methods*, 1999, 90(1): 81-86.
- [5] Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain[J]. *Pain*, 2000, 87(2): 149-158.
- [6] Obata K, Yamanaka H, Kobayashi K, et al. Role of mitogen-activated protein kinase activation in injured and intact primary afferent neurons for mechanical and heat hypersensitivity after spinal nerve ligation[J]. *J Neurosci*, 2004, 24(45): 10211-10222.
- [7] Hargreaves K, Dubner R, Brown F, et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia[J]. *Pain*, 1988, 32(1): 77-88.
- [8] Wieseler-Frank J, Maier SF, Watkins LR. Central proinflammatory cytokines and pain enhancement[J]. *Neurosignals*, 2005, 14(4): 166-174.
- [9] 孟强,李树清. PAF拮抗剂对光化学反应后脑缺血中心区及半暗区单胺类递质的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 1999, 15(9): 829-831.
- [10] Teather LA, Lee RK, Wurtman RJ. Platelet-activating factor increases prostaglandin E(2) release from astrocyte-enriched cortical cell cultures[J]. *Brain Res*, 2002, 946(1): 87-95.
- [11] Boetkjaer A, Boedker M, Cui JG, et al. Synergism in the repression of COX-2- and TNF alpha-induction in platelet activating factor-stressed human neural cells[J]. *Neurosci Lett*, 2007, 426(1): 59-63.
- [12] Hostettler ME, Carlson SL. PAF antagonist treatment reduces pro-inflammatory cytokine mRNA after spinal cord injury[J]. *Neuroreport*, 2002, 13(1): 21-24.
- [13] Teather LA, Magnusson JE, Wurtman RJ. Platelet-activating factor antagonists decrease the inflammatory nociceptive response in rats[J]. *Psychopharmacology*, 2002, 163(3-4): 430-433.