

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00883

• 研究快报 •

鞘内注射 p38 MAPK 抑制剂对神经病理性疼痛大鼠脊髓背角脑源性神经营养因子表达的影响

严晓娣, 陈前波, 周双琼, 袁红斌*

第二军医大学长征医院麻醉科, 上海 200003

[摘要] **目的** 观察鞘内注射 p38 MAPK 抑制剂 SB203580 对坐骨神经压缩性损伤(CCI)神经病理性疼痛大鼠的镇痛效果及脊髓背角 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)、脑源性神经营养因子(BDNF)的表达,探讨大鼠神经病理性疼痛可能的发生机制。**方法** 30 只 SD 雄性大鼠随机分为 3 组($n=10$):假手术组、对照组(CCI 组)、SB203580 组(CCI 术前 30 min 及术后第 1~3 天内鞘内注射 SB203580,剂量为 0.1 ml/kg)。于 CCI 术前 2 h 以及术后第 4~14 天测定大鼠右足机械痛阈值;术后第 14 天取损伤侧腰段脊髓,采用免疫组化方法观察脊髓背角 p38 MAPK 及 BDNF 的表达。**结果** 与术前相比,假手术组术后机械痛阈值差异无统计学意义,对照组、SB203580 组在 CCI 术后机械痛阈值明显降低($P<0.05$);与假手术组相比,CCI 术后,对照组、SB203580 组机械痛阈值明显降低($P<0.05$);与对照组相比,CCI 术后第 4~14 天 SB203580 组机械痛阈值明显升高($P<0.05$)。与假手术组相比,对照组、SB203580 组脊髓背角 p38 MAPK 表达及 BDNF 释放明显增加($P<0.05$);与对照组相比,SB203580 组损伤侧脊髓背角 p38 MAPK 表达及 BDNF 释放明显降低($P<0.05$)。**结论** 鞘内注射 p38 MAPK 抑制剂可能通过降低损伤侧脊髓背角 p38 MAPK 表达,抑制 BDNF 释放,从而缓解 CCI 大鼠慢性神经病理性疼痛。

[关键词] 神经病理性疼痛;SB203580;p38 丝裂原活化蛋白激酶类;脑源性神经营养因子

[中图分类号] R 444.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)08-0883-04

Influence of intrathecal injection of p38 MAPK inhibitor on BDNF expression in dorsal horn of spinal cord of rats with neuropathic pain

YAN Xiao-di, CHEN Qian-bo, ZHOU Shuang-qiong, YUAN Hong-bin*

Department of Anesthesiology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To observe the effect of intrathecal p38 MAPK inhibitor (SB203580) treatment on neuropathic pain and the expression of p38 MAPK and BDNF in dorsal horn of spinal cord in rats with chronic constriction injury (CCI), So as to investigate the possible mechanisms of neuropathic pain. **Methods** Totally 30 SD rats were evenly randomized into 3 groups ($n=10$): sham group receiving intrathecal injection of sodium chloride, control group receiving intrathecal injection of sodium chloride and CCI surgery, and SB203580 group receiving intrathecal injection of SB203580 and CCI surgery. SB203580 (0.1 ml/kg) was administered 0.5 h before and 1-14 d after CCI surgery. The mechanical thresholds were tested 24 h before and 4-14 d after CCI surgery. p38 MAPK expression and BDNF release in the dorsal horn were determined using immunohistochemistry method 14 d after CCI surgery. **Results** The mechanical thresholds in the control and SB203580 groups were significantly lower after CCI surgery compared with that before CCI surgery ($P<0.05$), but there was no significant change in the control group ($P>0.05$). Compared with the sham operation group, the mechanical thresholds were significantly lower in the other two groups after CCI surgery ($P<0.05$). The mechanical threshold of SB203580 group was significantly higher than that of the control group after CCI surgery ($P<0.05$). The p38 MAPK expression and BDNF release were significantly higher in the control and SB203580 groups compared with those in the sham operation group ($P<0.05$), and those in the SB203580 group were significantly lower than those in the control group ($P<0.05$). **Conclusion** Intrathecal injection of p38 MAPK inhibitor SB203580 can attenuate hyperalgesia in CCI rats through decreasing p38 MAPK expression and BDNF release.

[Key words] neuropathic pain; SB203580; p38 mitogen-activated protein kinases; brain-derived neurotrophic factor

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(8):883-886]

[收稿日期] 2010-03-12 **[接受日期]** 2010-05-12

[基金项目] 上海市自然科学基金(08ZR14050000). Supported by Natural Science Foundation of Shanghai(08ZR14050000).

[作者简介] 严晓娣, 硕士生, 讲师、主治医师. E-mail: yanxiaodi0721@126.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81885822, E-mail: yuan_hongb@126.com

神经病理性疼痛(neuropathic pain)是指由中枢或外周神经系统损伤或病变所引起的一种疼痛综合征,以自发性疼痛、痛觉过敏和痛觉超敏为主要表现^[1-2],目前发病机制不明,对其预防和治疗措施有限,是镇痛相关研究的热点。p38 MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase)是有丝分裂原激活蛋白激酶家族的成员之一,神经病理性疼痛大鼠脊髓小胶质细胞存在 p38 MAPK 的表达及活性明显增高^[3-5],提示 p38 MAPK 通路可能与神经病理性疼痛密切相关。最近研究还发现脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)释放增加可能在神经病理性疼痛的发生过程也发挥关键作用^[6-8]。BDNF 是否通过 p38 MAPK 发挥致神经病理性疼痛作用目前仍存有争议。因此,本研究以坐骨神经压迫性损伤(CCI)大鼠作为神经病理性疼痛模型,对其鞘内注射 p38 MAPK 特异性抑制剂 SB203580,观察大鼠腰椎脊髓 p38 MAPK、BDNF 的表达,探讨大鼠神经病理性疼痛可能的发生机制和潜在的作用靶点。

1 材料和方法

1.1 动物来源、分组及处理

雄性 SD 大鼠,体质量 200~250 g,由第二军医大学实验动物中心提供。30 只雄性 SD 大鼠随机分为 3 组($n=10$):(1)假手术组,鞘内置管成功 3 d 后,暴露右侧后肢坐骨神经主干,但不予以结扎,术后予以鞘内注射生理盐水。(2)对照组,鞘内置管成功 3 d 后,暴露右侧后肢坐骨神经主干并结扎,术后予以鞘内注射生理盐水。(3)SB203580 治疗组,鞘内置管成功 3 d 后,暴露右侧后肢坐骨神经主干并结扎,术后予以鞘内注射 SB203580。各组在 CCI 结扎前 30 min 及结扎后第 1~14 天,采用 50 μ l 微量注射器通过 PE 导管缓慢向鞘内注射药物,剂量为 0.1 ml/kg。实验期间大鼠在标准条件下(每 12 h 明/暗循环,20~24 $^{\circ}$ C)饲养,自由摄取水和食物。大鼠饲养 1 周后开始实验,实验前 6 h 禁食水。行为学实验在光线明亮的条件下进行。

1.2 CCI 动物模型的制备

大鼠按腰椎入路法^[9]进行鞘内置管:腹腔注射 10%水合氯醛(300 mg/kg)麻醉后,定位(L₆)剪毛,消毒,切约 1 cm 切口,分离筋膜,暴露出棘突,在棘突旁(紧贴棘突)用小剪刀前端垂直下去,钝性分离旁边肌肉,用眼科弯镊在切口处可以感受到椎板,向前有一个小凹陷,用 1 ml 注射器针头(剪去尖端,磨平),弯曲 3 mm 成 90 $^{\circ}$,沿椎板向前在凹陷处刺入,可看到大鼠甩尾,同时左手将 PE-10 导管,用眼科弯镊持住沿小口进入,向前 1 cm 即可见到清亮脑脊液流出,将导管与肌肉固定牢

靠,并建立皮下隧道,导管另一端从枕部正中穿出,固定于皮肤,管端密封。消毒,缝合皮肤切口,再消毒,肌内注射青霉素 4 万单位预防感染,放回单笼饲养清醒。术后第 2 天给正常进食、饮水的大鼠鞘内注射 2%利多卡因 10 μ l,若 30 s 后出现双下肢麻痹等腰麻症状,并在 30 min 内恢复证明置管成功。

30 只大鼠全部置管成功,随机分为 3 组,每组 10 只,鞘内置管 3 d 后,参考 Bennett 等^[10]的方法建立右后肢 CCI 模型。大鼠称质量后,腹腔注射 10%水合氯醛(300 mg/kg)麻醉,俯卧位固定于手术台上,暴露出坐骨神经主干,用 4-0 铬制肠线环绕神经干分别做 4 个轻度结扎环,间距 1 mm,结扎强度以引起小腿肌肉轻度颤动反应但不影响神经血运为宜。局部敷以青霉素粉,缝合肌筋膜及各层组织后缝合皮肤。假手术组只暴露坐骨神经,不做神经结扎。术毕将大鼠放入底部铺有软锯屑垫料的塑料盒中,于安静、温暖、避强光环境自由喂养。

1.3 行为学测定

3 组大鼠分别于术前 2 h 和术后第 4~14 天测定大鼠右足机械痛阈值。参照 Dixon^[11]的测试方法:将大鼠放置 10.0 cm \times 10.0 cm \times 20.0 cm 底部为金属网的有色有机玻璃箱内,盖顶避光,在实验开始前让其适应环境至少 30 min。采用 Von-Frey 触丝垂直刺激大鼠右后肢足底 5 s,刺激力量以触丝弯曲为准。采用 up-down 法进行疼痛测试,选择 8 根 Von-Frey 触丝,标度为 0.6、1、2、4、6、8、10、15 g,大鼠出现抬足或舔足行为视为阳性反应,否则为阴性反应。测定首先从 2 g 开始,当该力度的刺激不能引起阳性反应,则给予相邻大一级力度的刺激;如出现阳性反应则给予相邻小一级力度的刺激,如此连续进行,直至出现第一次阳性和阴性反应的骑跨,再连续测定 4 次,取平均值为阈值。最大力度为 15 g,大于此值时记为 15 g;最小力度为 0.6 g,小于此值时记为 0.6 g。每次刺激间隔 30 s。

1.4 免疫组织化学染色

术后第 14 天每组各随机抽取 5 只大鼠,检测右侧脊髓组织 p38 MAPK 及 BDNF 水平。所有大鼠腹腔注射 10%水合氯醛(300 mg/kg)麻醉后开胸,插管至升主动脉,生理盐水 200 ml 快速冲洗,继之以 4 $^{\circ}$ C 4%多聚甲醛溶液(内含 0.1 mol/L PBS, pH 7.4)500 ml 灌注固定,取 L₃₋₄脊髓,在 4 $^{\circ}$ C 4%多聚甲醛溶液中固定 8 h,然后石蜡包埋,每个标本于石蜡切片机上切取 5 张(同一部位),片厚 5 μ m。免疫组织化学染色采用 ABC 法,切片浸入兔抗 p38 MAPK 多克隆一抗(1:500)4 $^{\circ}$ C 过夜,抗兔 IgG (1:200)室温 30 min,ABC 复合物(1:200)室温 30 min,最后用 DAB/H₂O₂溶液进行呈色反应。用 0.01 mol/L PBS 代替一抗作为阴性

对照。每只大鼠取 5 张脊髓切片染色(其中一张用于阴性对照染色),在脊髓背角浅层先于 40×10 倍光镜下观察,然后用 Motic B5 显微摄像系统(MoticChina,北京)进行图片采集,用 CMIAS 医学图像分析系统(北航公司),以产物染色灰度进行半定量分析,以免疫组化指数(阳性面积 $\times D$ 值)来表示阳性反应产物的数量。

1.5 统计学处理 计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 统计软件进行处理。各组术前机械痛阈值的比较采用单因素方差分析;术后各组机械痛阈值的比较采用重复测量资料方差分析;各组大鼠在 CCI 手术前后机械痛的比较采用单因素方差分析;各组 p38 MAPK 和 BDNF 免疫组化结果比较采用单因素方差分析。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 行为学指标 结果(图 1)表明:术前各组大鼠机械痛阈无统计学差异。与术前相比,假手术组在手术前后机械痛阈没有统计学差异;与假手术组相比,CCI 术后对照组、SB203580 治疗组机械痛阈显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与对照组相比,CCI 术后 4~14 d SB203580 治疗组机械痛阈明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果提示在 CCI 模型

中,鞘内注射 p38 MAPK 抑制剂 SB203580 治疗可明显提高 CCI 大鼠术后 4~14d 机械痛阈。

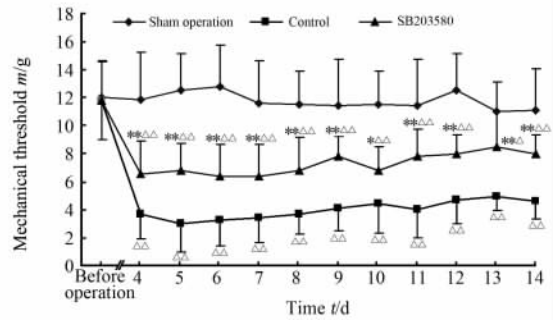


图 1 各组大鼠在各测试时间点的机械痛阈值
Fig 1 Mechanical thresholds of rats in each group at different time points

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; $\triangle P < 0.05$, $\triangle\triangle P < 0.01$ vs sham operation group. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$

2.2 损伤侧脊髓背角 p38 MAPK、BDNF 表达的变化 免疫组化染色结果(图 2、3)发现:对照组在 CCI 术后第 14 天损伤侧脊髓背角 p38 MAPK 表达及 BDNF 的释放均较假手术组明显上升($P < 0.05$);与对照组相比,SB203580 治疗组 p38 MAPK 表达及 BDNF 的释放明显降低($P < 0.05$)。

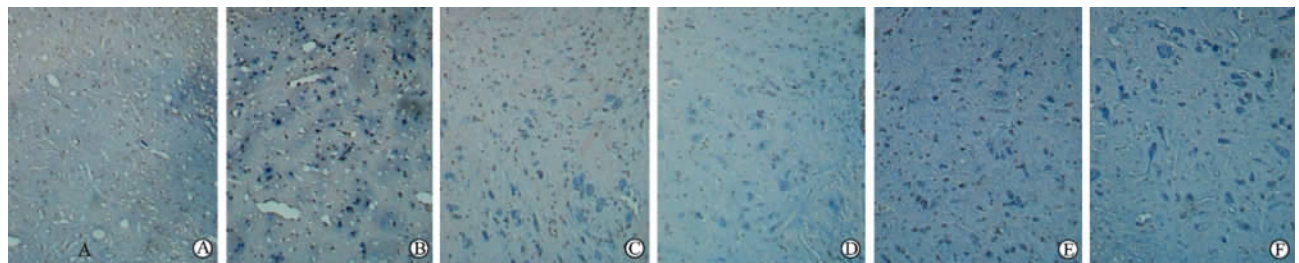


图 2 各组大鼠 p38 MAPK(A~C)、BDNF(D~F)免疫组化染色结果

Fig 2 Immunohistochemistry results of p38 MAPK (A, B, C) and BDNF (D, E, F) in each group (ABC staining)

A, D: Sham operation group; B, E: Control group; C, F: SB203580 group. Original magnification: $\times 200$

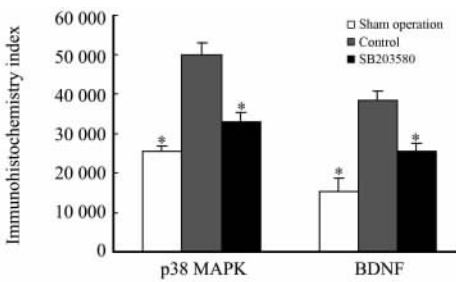


图 3 CCI 术后第 14 天损伤侧脊髓背角 p38 MAPK 和 BDNF 免疫组化指数的比较

Fig 3 Immunohistochemistry index of p38 MAPK and BDNF in ipsilateral dorsal horn of spinal cord 14 days after CCI surgery

* $P < 0.05$ vs control group. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

p38 MAPK 在神经病理性疼痛中起着非常重要的作用。外周神经损伤后可引起脊髓背角小胶质细胞的激活, $P2X_4$ 受体表达上调, 同时神经损伤引起初级感觉神经元释放的 ATP 与小胶质细胞表面的 $P2X_4$ 受体结合, 激活 $P2X_4$ 受体; $P2X_4$ 受体激活后, 产生内向电流, 引起 Na^+ 、 Ca^{2+} 内流增加, 小胶质细胞内 p38 MAPK 分泌增加并激活^[1-3]。给予小胶质细胞抑制剂 minocycline 抑制小胶质细胞激活后, 在阻止或者延缓神经病理性疼痛出现的同时 p38 MAPK 的表达也明显降低^[12-13], 给予 p38 MAPK 抑

制剂后同样可明显提高机械痛阈值。这些结果提示 p38 MAPK 的激活对于维持痛觉过敏也是必要的。本研究结果提示 CCI 术后第 14 天损伤侧脊髓背角 p38 MAPK 的表达明显增加,给予鞘内注射 SB203580 可明显提高 CCI 模型大鼠机械痛阈值,与以往研究^[14]结果类似。

外周及中枢神经损伤后 BDNF 在脊髓小胶质细胞中的释放明显增加^[15],并参与伤害性刺激的痛觉过敏的发生机制^[8],外周神经损伤后激活的小胶质细胞上 P2X₄ 受体导致痛觉异常很可能是通过释放 BDNF 产生的^[16-17]。当外周神经损伤后引起脊髓的小胶质细胞激活,P2X₄ 受体表达上调,导致小胶质细胞 Ca²⁺ 内流,从而导致细胞内的级联反应,释放 BDNF,引起脊髓神经细胞的 Cl⁻ 内流,机体对无伤害刺激产生痛觉异常和痛觉过敏;可以被 BDNF 的拮抗剂 TrkB 缓解^[18]。Kerr 等^[19]认为 BDNF 与中枢敏化有关,并且发现外源性 BDNF 明显增强 NMDA 受体介导的中枢神经敏化。

Obata 等^[18]研究发现 p38 MAPK 可以调节 BDNF 的表达,外周神经受损诱导脊髓 ATP 生成增加,作用于小胶质细胞上的特异性受体 P2X₄,不仅激活 P2X₄ 而且诱导 P2X₄ 蛋白表达增加,ATP 和 P2X₄ 的结合可激活 p38 MAPK,该激酶再通过激活下游特定的转录因子而使 BDNF 在小胶质细胞中的表达增加,使用特异的抑制剂使 P2X₄、p38 MAPK 或 BDNF 的活性下降可阻断 ATP 的信号传递。Trang 等^[20]的研究进一步提出外周神经损伤后脊髓的小胶质细胞被激活,P2X₄ 受体表达上调后,可能通过 p38 MAPK 和小胶质细胞内 Ca²⁺ 内流的作用,使小胶质细胞 BDNF 释放增加。

综上所述,鞘内注射 p38 MAPK 抑制剂 SB203580 可有效改善 CCI 模型大鼠术后病理性疼痛,并降低损伤侧脊髓背角 p38 MAPK 的表达及 BDNF 的释放,可见 p38 MAPK 信号通路参与了 P2X₄ 受体激活导致 BDNF 的释放这个慢性神经病理性疼痛机制。

【参考文献】

[1] Nakai K, Nakae A, Oba S, Mashimo T, Ueda K. P2X₄ receptor expression in a rat model of trigeminal neuropathic pain[J]. *Neuroreport*, 2010, 21: 559-563.

[2] 孙玉明, 吴飞翔, 缪雪蓉, 吕欣, 徐学武, 杨立群, 等. 坐骨神经结扎大鼠脊髓组织 Toll 样受体 4 及下游细胞因子表达的变化[J]. *第二军医大学学报*, 2008, 29: 949-953.

Sun Y M, Wu F X, Miao X R, Lü X, Xu X W, Yang L Q, et al. Changes of Toll-like receptor 4 and its downstream cytokines in spinal cord of rat model of neuropathic pain[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2008, 29: 949-953.

[3] Tsuda M, Mizokoshi A, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Inoue K. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal hyperactive microglia contributes to pain hypersensitivity following peripheral nerve injury[J]. *Glia*, 2004, 45: 89-95.

[4] Jin S X, Zhuang Z Y, Woolf C J, Ji R R. p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain[J]. *J Neurosci*, 2003, 23: 4017-4022.

[5] Schäfers M, Svensson C I, Sommer C, Sorkin L S. Tumor necrosis factor-alpha induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 MAPK in primary sensory neurons[J]. *J Neurosci*, 2003, 23: 2517-2521.

[6] Torsney C, MacDermott A B. Neuroscience: a painful factor[J]. *Nature*, 2005, 438: 923-925.

[7] Marcol W, Kotulska K, Larysz-Brysz M, Kowalik J L. BDNF contributes to animal model neuropathic pain after peripheral nerve transection[J]. *Neurosurg Rev*, 2007, 30: 235-243.

[8] Coull J A, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain[J]. *Nature*, 2005, 438: 1017-1021.

[9] Milligan E D, Hinde J L, Mehmert K K, Maier S F, Watkins L R. 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: 81-86.

[10] 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: 87-107.

[11] Dixon W J. Efficient analysis of experimental observations[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1980, 20: 441-462.

[12] Ledebner A, Sloane E M, Milligan E D, Frank M G, Mahony J H, Maier S F, et al. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation[J]. *Pain*, 2005, 115(1-2): 71-83.

[13] Hains B C, Waxman S G. Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury[J]. *J Neurosci*, 2006, 26: 4308-4317.

[14] 张飞娥, 张励才, 贾晋太, 徐美蓉, 曹君利, 宋学军, 等. 神经病理性疼痛大鼠鞘内注射 SB203580 的镇痛作用[J]. *中华麻醉学杂志*, 2006, 26: 356-359.

[15] Ha S O, Kim J K, Hong H S, Kim D S, Cho H J. Expression of brain-derived neurotrophic factor in rat dorsal root ganglia, spinal cord and gracile nuclei in experimental models of neuropathic pain[J]. *Neuroscience*, 2001, 107: 301-309.

[16] Inoue K, Tsuda M, Koizumi S. ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system; chronic pain and microglia: involvement of the ATP receptor P2X₄[J]. *J Pharmacol Sci*, 2004, 94: 112-114.

[17] Inoue K. Involvement of microglia in neuropathic pain signalling[J]. *Brain Nerve*, 2007, 59: 739-746.

[18] Obata K, Noguchi K. BDNF in sensory neurons and chronic pain[J]. *Neurosci Res*, 2006, 55: 1-10.

[19] Kerr B J, Bradbury E J, Bennett D L, Trivedi P M, Dassin P, French J, et al. Brain-derived neurotrophic factor modulates nociceptive sensory inputs and NMDA-evoked responses in the rat spinal cord[J]. *J Neurosci*, 1999, 19: 5138-5148.

[20] Trang T, Beggs S, Wan X, Salter M W. P2X₄-receptor-mediated synthesis and release of brain-derived neurotrophic factor in microglia is dependent on calcium and p38-mitogen-activated protein kinase activation[J]. *J Neurosci*, 2009, 29: 3518-3528.