

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2018.05.0488

· 论 著 ·

## 脊髓背角基质细胞衍生因子 1 对皮肤肌肉切口牵拉术致持续性疼痛大鼠中枢敏化及痛觉过敏的影响

李秀娟<sup>△</sup>, 李 黛<sup>△</sup>, 陈 辉, 熊源长\*

海军军医大学(第二军医大学)长海医院麻醉学部疼痛中心, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 观察脊髓背角基质细胞衍生因子 1 (SDF-1) 对皮肤肌肉切口牵拉术 (SMIR) 致持续性疼痛大鼠中枢敏化及痛觉过敏的影响, 为探讨术后慢性疼痛的发生机制和治疗靶点提供依据。**方法** 采用 SMIR 后持续性疼痛大鼠模型。将 36 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组 (仅切开皮肤) 和 SMIR 后 1、5、10、20 d 组以及 SMIR+鞘内注射 SDF-1 中和性抗体组, 每组 6 只大鼠。用 up-down 法测定术后大鼠痛行为学, 用蛋白质印迹法检测各组大鼠脊髓组织中 SDF-1 的表达。再取 18 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、SMIR 组和 SMIR+脊髓表面给予 SDF-1 中和性抗体组 (每组 6 只大鼠), 检测 3 组大鼠脊髓背角 C 纤维诱发场电位长时程增强 (LTP) 的变化。**结果** 与假手术组大鼠相比, SMIR 后第 5、10、20 天大鼠脊髓组织 SDF-1 表达均增加 ( $P$  均 $<0.05$ ), 且 SMIR 后大鼠痛阈降低 ( $P<0.01$ ), 鞘内注射 SDF-1 中和性抗体可部分逆转 SMIR 引起的痛阈下降 ( $P<0.05$ )。SMIR 后 1 h 脊髓背角 LTP 升高 ( $P<0.01$ ), 脊髓表面给予 SDF-1 中和性抗体可抑制 SMIR 导致的 LTP 升高 ( $P<0.01$ )。**结论** 脊髓背角 SDF-1 参与了 SMIR 致持续性疼痛大鼠中枢敏化及痛觉过敏, 但具体机制有待进一步研究。

**[关键词]** 手术后疼痛; 基质细胞衍生因子 1; 中和性抗体; 痛觉过敏**[中图分类号]** R 441.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2018)05-0488-05

### Effects of stromal cell-derived factor 1 of spinal dorsal horn on central sensitivity and allodynia in rats with persistent pain evoked by skin/muscle incision and retraction

LI Xiu-juan<sup>△</sup>, LI Dai<sup>△</sup>, CHEN Hui, XIONG Yuan-chang\*

Pain Center, Department of Anesthesiology, Changhai Hospital, Navy Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the effects of stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) on central sensitivity and allodynia in rats with skin/muscle incision and retraction (SMIR)-induced persistent pain, so as to provide reference for elucidating the potential mechanisms and therapeutic targets of postoperative chronic pain. **Methods** A postoperative chronic pain rat model was induced by SMIR. Thirty-six male SD rats were randomized into sham group, 1, 5, 10, and 20 d after SMIR groups and SMIR+intrathecal injection of SDF-1 neutralizing antibody group, with six rats in each group. The mechanical allodynia was determined with up-down method, and the expressions of SDF-1 were detected by Western blotting after surgery. Furthermore, 18 male SD rats were randomly divided into sham group ( $n=6$ ), SMIR group ( $n=6$ ) and SMIR+anti-SDF-1 group (SDF-1 neutralizing antibody was given on the surface of the spinal cord,  $n=6$ ). The long-term potentiation (LTP) of C-fiber-evoked potentials in the rat spinal dorsal horn was detected in the three groups. **Results** The SDF-1 expressions were significantly increased on the 5, 10 and 20 days after SMIR versus the sham group (all  $P<0.05$ ). The pain threshold of rats was significantly reduced after SMIR versus the sham group ( $P<0.01$ ). Compared with the sham group, intrathecal injection of SDF-1 neutralizing antibody significantly suppressed the mechanical allodynia induced by SMIR ( $P<0.05$ ). The LTP was significantly increased one hour after SMIR ( $P<0.01$ ), and SDF-1 neutralizing antibody given on the surface of the spinal cord significantly inhibited the increased LTP induced by SMIR ( $P<0.01$ ). **Conclusion** SDF-1 of the spinal dorsal horn is involved in SMIR-induced central sensitivity and allodynia in rats, but the specific mechanism is still unclear.

**[收稿日期]** 2017-11-29 **[接受日期]** 2018-03-28**[作者简介]** 李秀娟, 硕士, 主治医师. E-mail: angellee518@163.com; 李 黛, 博士, 住院医师. E-mail: lidaichosp@163.com<sup>△</sup>共同第一作者(Co-first authors).

\*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31162522, E-mail: ychxiong@sina.com

**[Key words]** postoperative pain; stromal cell-derived factor 1; neutralizing antibody; hyperalgesia

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(5): 488-492]

腹股沟疝修补术、开胸手术等多种常规临床手术常可诱发术后慢性疼痛综合征 (chronic postsurgical pain syndrome, CPPS), 主要表现为手术及其邻近部位持续数月乃至数年的痛觉过敏<sup>[1-2]</sup>。由于发病机制尚不清楚, 且常规的非甾体类镇痛药和阿片类药物均疗效不佳<sup>[3]</sup>, CPPS 严重影响了患者的生命质量和机能恢复。因此, 阐明手术诱导痛觉过敏的机制从而寻找到合适的防治手段有重要的临床意义和巨大的社会效益。研究显示, 趋化因子家族成员基质细胞衍生因子 (stromal cell-derived factor 1, SDF-1) 参与了包括病理性疼痛在内的多种神经系统生理、病理过程<sup>[4]</sup>。但其是否也参与术后慢性疼痛的发生、发展还不清楚, 故本研究通过建立大鼠持续性疼痛动物模型探讨 SDF-1 对皮肤肌肉切口牵拉术 (skin/muscle incision and retraction, SMIR) 所致痛觉敏化的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 动物、试剂与仪器** 选用 8~10 周龄、体质量 210~220 g、无特定病原体级的健康雄性 SD 大鼠 [海军军医大学 (第二军医大学) 实验动物中心, 动物生产许可证号: SCXK (沪) 2012-0003, 使用许可证号: SYXK (沪) 2012-0003], 实验前适应性饲养 1 周。设动物饲养室温度为 20~25 °C, 湿度为 20%~30%, 每天的光暗周期比为 1:1。全部实验步骤均按照实验动物护理与应用指南实施。

SDF-1 中和性抗体 (AMD3100; Torrey Pines Biolabs, 美国), SDF-1 兔多克隆抗体 (ab9797; Abcam, 英国)。实验动物行为学测定采用 7370 Von Frey Hair (UgoBasile, 美国)。MK3 型酶标仪 [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司], 电泳电转系统 (Bio-Rad, 美国), 5200 型全自动化学发光图像分析系统 (Tanon, 中国), 解剖显微镜 (Olympus, 日本), 微电极操纵器 (Narishige, 日本), DAM 60 放大器 (World Precision Instruments, 美国), DT2821-F-16SE 数模转换器 (BrainWave System Corporation, 美国), 示波器

(Hitachi Denshi, 日本), 刺激器 (Nihon Kohden, 日本), 隔离器 (Nihon Kohden, 日本), 钨丝微电极 (World Precision Instruments, 美国)。

**1.2 实验模型建立与分组** 构建大鼠 SMIR 后持续性疼痛动物模型<sup>[5]</sup>。具体操作步骤如下: 用戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 麻醉大鼠, 在距离隐静脉 4 mm 的股内侧切开皮肤, 暴露股薄肌并切开浅表肌肉, 钝性分离至约 8 mm。插入微型解剖牵开器, 牵拉皮肤、肌肉 1 h; 牵拉结束后逐层缝合肌肉及皮肤。

根据 SMIR 后测定大鼠痛阈和脊髓 SDF-1 表达的时间, 将 24 只雄性 SD 大鼠随机分为 4 组: SMIR 后 1、5、10 和 20 d 组 (每组 6 只), 分别于术后第 1、5、10、20 天测定痛阈, 获得撤足反射阈值 1 h 后取脊髓组织检测 SDF-1 的表达。另取 12 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组和 SMIR+鞘内注射 SDF-1 中和性抗体组 (SMIR+anti-SDF-1 组), 每组 6 只。假手术组仅切开皮肤, 不执行 SMIR, 并分别在术后第 1、5、10、20 天测定痛阈, 在第 20 天获得撤足反射阈值 1 h 后取脊髓组织检测 SDF-1 的表达; SMIR+anti-SDF-1 组预先鞘内注射 1 g/L 的 SDF-1 中和性抗体 (注射剂量为 10 μL), 2 h 后行 SMIR, 并分别于术后第 1、5、10、20 天测定痛阈。电生理实验中再另取 18 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、SMIR 组和 SMIR+脊髓表面给予 SDF-1 中和性抗体组 (SMIR+anti-SDF-1 组), 每组 6 只, 具体干预方法见 1.5 项。

**1.3 蛋白质印迹法检测大鼠脊髓组织中 SDF-1 表达** 用戊巴比妥钠麻醉大鼠, 迅速取脊髓组织并立即将其浸入预先充有饱和混合氧 (95% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>) 的 1~3 °C Krebs 液中。然后将脊髓组织固定于琼脂块上, 置于切片机载物台上, 覆以冷 Krebs 液, 切取层厚为 500 μm 的脊髓切片。用 punch 法取脊髓背角组织, 添加 Tris 裂解缓冲液 (pH 7.6), 在低温条件下匀浆, 并实施超声波破碎, 12 000 r/min (离心半径为 0.1 m) 低温离心, 取上清。用 BCA 法检测蛋白质浓度, 取 50 μg 添加上样缓冲液 6 μL, 混合均匀后, 沸水煮沸 10 min。进行

SDS-PAGE (200 V、45 min) 后转移至 PVDF 膜 (100 V、1 h), 用 5% 脱脂奶粉 TBST 封闭液室温下封闭 1 h。4 °C 过夜孵育 SDF-1 一抗 (稀释比例为 1 : 1 000), 第 2 天用 TBST 洗膜 3 次, 共 30 min。用辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1 h, 洗 3 次后进行 ECL 显色, 暗室曝光拍照。

1.4 痛行为学测定 用 up-down 法检测撤足反射阈值, 观察大鼠痛阈变化及时程。将大鼠置于透明的有机玻璃箱内, 箱底为金属网 (网格大小为 0.8 cm × 0.8 cm)。通过网孔用 Von Frey hair (0.97、2、3.87、5.9、8.3、10.1、14.4、27.5 g) 刺激大鼠后爪底部皮肤。每次刺激持续 2~3 s, 每两次刺激间隔时间为 5 min, 每个强度应用 10 次。大鼠出现快速抬起后爪或舔舐后爪行为表示为阳性反应。计算 50% 阳性反应阈值为大鼠的撤足反射阈值, 50% 阳性反应阈值 (g) = [10 (Xf+kδ)] / 10 000, 其中 Xf 为初次测试 Von Frey hair 的对数值, k 值可根据撤足反应模式查表得出, δ 为 8 根 Von Fery hairs 间对数差值的平均值。预实验结果显示, SMIR 后 10 d 时痛阈最低, 且至少维持到 20 d, 因此本实验确定取样时间为术前 1 d 和术后 1、5、10、20 d。

1.5 在体记录脊髓背角 C 纤维诱发场电位 检测 SMIR 对大鼠脊髓背角 C 纤维诱发场电位长时程增强 (long-term potentiation, LTP) 的影响。方法简述如下: 在 20% 乌拉坦 5 mL/kg 麻醉下行椎板切除术, 暴露脊髓腰膨大部, 同时行 SMIR。手术暴露一侧坐骨神经, 安装一对刺激电极。电刺激 (20 V、0.5 ms, 每分钟 1 次) 坐骨神经的同时, 用微电极记录同侧脊髓背角 C 纤维诱发场电位 LTP。观察并记录脊髓表面局部给予 SDF-1 中和性抗体 50 μg 和未给药时 SMIR 对 C 纤维诱发场电位 LTP 的影响。

1.6 统计学处理 用 SPSS 17.0 和 GraphPad Prism 5.01 软件进行数据分析。先用 SPSS 17.0 软件实施正态性与方差齐性检验, 服从正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 然后用 GraphPad Prism 5.01 软件进行 t 检验。检验水准 (α) 为 0.05。

## 2 结果

2.1 SMIR 后大鼠脊髓 SDF-1 表达水平 如图 1 所示, SMIR 后第 5、10、20 天大鼠脊髓 SDF-1 的表达水平均高于假手术组 (P 均 < 0.05)。

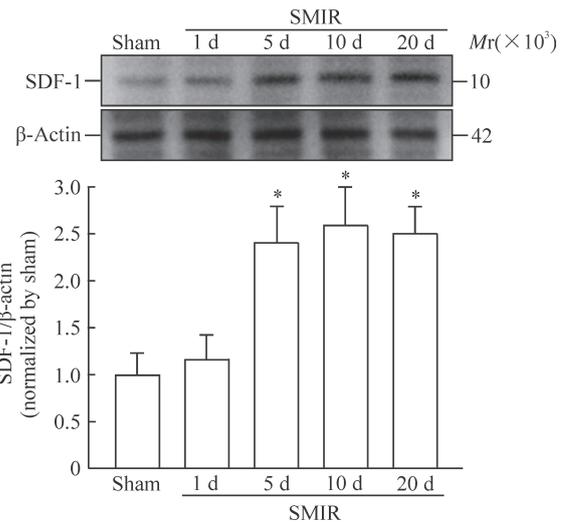


图 1 SMIR 后不同时间大鼠脊髓组织 SDF-1 的表达  
Fig 1 Expression of SDF-1 in spinal cord at different phases after SMIR

SMIR: Skin/muscle incision and retraction; SDF-1: Stromal cell-derived factor 1. \*P < 0.05 vs sham group. n = 6,  $\bar{x} \pm s$

2.2 鞘内注射 SDF-1 中和性抗体后 SMIR 模型大鼠机械性痛阈的变化 用 up-down 法检测 SMIR 后不同时间点大鼠机械性撤足反射阈值, 结果 (图 2) 显示, 与假手术组相比, SMIR 后第 5 天开始大鼠机械性撤足反射阈值降低, 并持续至术后第 20 天 (P < 0.01); 鞘内注射 SDF-1 中和性抗体可缓解大鼠痛阈的降低 (P < 0.05), 提示 SDF-1 参与 SMIR 诱导的痛觉过敏。

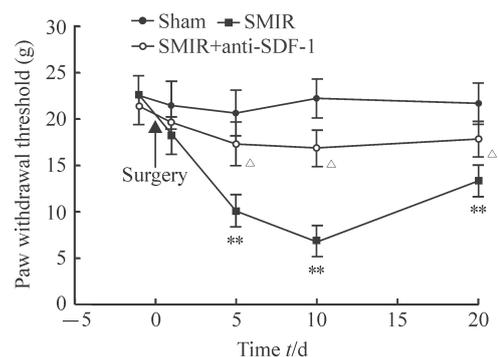


图 2 鞘内注射 SDF-1 中和性抗体 (10 μg) 缓解 SMIR 致大鼠机械性痛觉过敏

Fig 2 Intrathecal injection of SDF-1 neutralizing antibody (10 μg) attenuating rat mechanical allodynia induced by SMIR

SMIR: Skin/muscle incision and retraction; SDF-1: Stromal cell-derived factor 1. \*\*P < 0.01 vs sham group; <sup>△</sup>P < 0.05 vs SMIR group. n = 6,  $\bar{x} \pm s$

2.3 SDF-1 中和性抗体干预后 SMIR 模型大鼠脊髓背角 C 纤维诱发场电位 LTP 的变化 图 3A 为电生理变化的原始图, 图 3B 是数据分析比较图。由图 3B 可见, SMIR 后 60 min 大鼠脊髓背角 C

纤维诱发场电位 LTP 开始升高, 约 300 min 时达高峰 ( $P < 0.01$ ), 脊髓表面局部给予 SDF-1 中和性抗体干预后 SMIR 所致的 LTP 升高被逆转 ( $P < 0.01$ )。

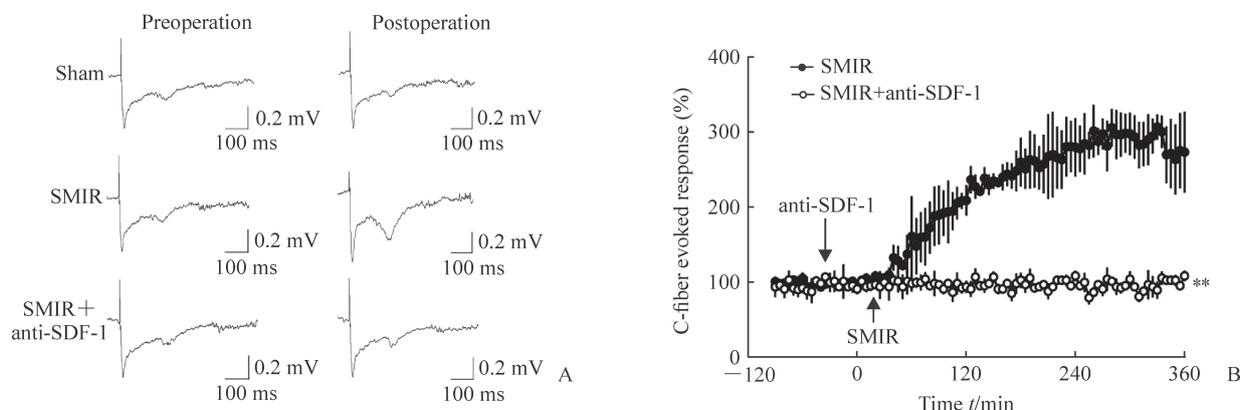


图 3 脊髓表面局部给予 SDF-1 中和性抗体 (50  $\mu$ g) 后 SMIR 所致的 LTP 升高被逆转

Fig 3 Local application of SDF-1 neutralizing antibody (50  $\mu$ g) on rat spinal cord surface preventing SMIR-induced LTP

A: Original graph of electrophysiology; B: Chart of data analysis. SMIR: Skin/muscle incision and retraction; SDF-1: Stromal cell-derived factor 1; LTP: Long-term potentiation. \*\* $P < 0.01$  vs SMIR group.  $n = 6, \bar{x} \pm s$

### 3 讨论

Flatters<sup>[5]</sup>在 2008 年首次提出大鼠 SMIR 动物模型, 该模型可模仿术中切口牵拉外科行为, 同时不损伤外周神经, 能够形成大约 4 周的持续性痛觉过敏, 现已被广泛应用并作为研究术后慢性疼痛的可靠模型, 因此本研究也选择了 SMIR 模型复制术后慢性疼痛。预实验观察了大鼠的痛阈变化和时程, 结果显示 SMIR 后大鼠痛行为学发生改变, 验证了本研究成功建模。紧接着在模型稳定的基础上连续监测大鼠的机械痛阈, 结果显示第 5 天开始降低, 至第 10 天痛阈最低, 且至少维持到第 20 天, 因此本研究确定取样时间为术后第 1、5、10、20 天。

SDF-1 是趋化因子家族中的重要成员, 既往一直在肿瘤免疫炎症反应中被广泛研究, 近年来发现其同样存在于中枢神经系统且可以介导多种原因诱导的痛觉过敏。有研究显示 SDF-1 介导了神经损伤、炎症等多种原因诱导的痛觉过敏<sup>[6-7]</sup>。例如, 在脊髓损伤、蜂毒注射诱导痛觉过敏模型中均观察到 SDF-1 显著上调<sup>[8-9]</sup>。可能原因是炎症、损伤等伤害性刺激激活脊髓背角小胶质细胞从而使 SDF-1 分泌增多<sup>[10-11]</sup>。但 SDF-1 是否也参与了术后慢性疼痛尚不清楚, 也未见相关报道。

本实验通过 up-down 法检测大鼠 SMIR 后不同时间点的机械性撤足反射阈值, 建模成功后大鼠痛阈降低, 鞘内注射 SDF-1 中和性抗体后痛阈升高。表明 SDF-1 可以干预 SMIR 所致的痛觉过敏, 结合 SMIR 后大鼠脊髓 SDF-1 表达水平上调的结果, 可以认为 SDF-1 参与了 SMIR 所致的术后痛觉过敏。然后本研究通过电生理学实验对这一假设进行验证。LTP 对疼痛感知很重要, 其异常升高是中枢神经系统慢性疼痛的关键特征之一<sup>[12]</sup>。本实验结果显示, SMIR 后大鼠脊髓背角 C 纤维诱发场电位 LTP 升高, 脊髓表面局部给予 SDF-1 中和性抗体干预后这种升高被逆转, 进一步表明 SDF-1 可以干扰 SMIR 所致的术后痛觉过敏。

综上所述, SDF-1 参与了 SMIR 所致的大鼠痛觉过敏, 这一结论为探讨术后慢性疼痛的发生机制提供了新的思路, 为防治术后慢性疼痛提供了新的干预靶点。但 SDF-1 通过何种机制、何种信号通路介导和调节 SMIR 诱导的痛觉过敏仍有待深入研究。

### [参考文献]

- [1] REDDI D, CURRAN N. Chronic pain after surgery: pathophysiology, risk factors and prevention[J]. Postgrad Med J, 2014, 90: 222-227; quiz 226.
- [2] VAN RIJCKEVORSEL D C, DE VRIES M,

- SCHREUDER L T, WILDER-SMITH O H, VAN GOOR H. Risk factors for chronic postsurgical abdominal and pelvic pain[J]. *Pain Manag*, 2015, 5: 107-116.
- [3] CHAPARRO L E, SMITH S A, MOORE R A, WIFFEN P J, GILRON I. Pharmacotherapy for the prevention of chronic pain after surgery in adults[J/CD]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2013(7): CD008307. doi: 10.1002/14651858.
- [4] LUO X, WANG X, XIA Z, CHUNG S K, CHEUNG C W. CXCL12/CXCR4 axis: an emerging neuromodulator in pathological pain[J]. *Rev Neurosci*, 2016, 27: 83-92.
- [5] FLATTERS S J. Characterization of a model of persistent postoperative pain evoked by skin/muscle incision and retraction (SMIR)[J]. *Pain*, 2008, 135: 119-130.
- [6] REAUX-LE GOAZIGO A, RIVAT C, KITABGI P, POHL M, MELIK PARSADANIANTZ S. Cellular and subcellular localization of CXCL12 and CXCR4 in rat nociceptive structures: physiological relevance[J]. *Eur J Neurosci*, 2012, 36: 2619-2631.
- [7] GOSSELIN R D, DANSEREAU M A, POHL M, KITABGI P, BEAUDET N, SARRET P, et al. Chemokine network in the nervous system: a new target for pain relief[J]. *Curr Med Chem*, 2008, 15: 2866-2875.
- [8] YANG F, SUN W, YANG Y, WANG Y, LI C L, FU H, et al. SDF1-CXCR4 signaling contributes to persistent pain and hypersensitivity via regulating excitability of primary nociceptive neurons: involvement of ERK-dependent Nav1.8 up-regulation[J/OL]. *J Neuroinflammation*, 2015, 12: 219. doi: 10.1186/s12974-015-0441-2.
- [9] KNERLICH-LUKOSCHUS F, VON DER ROPP-BRENNER B, LUCIUS R, MEHDORN H M, HELDFEINDT J. Spatiotemporal CCR1, CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CXCR4, CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ ) expression patterns in a rat spinal cord injury model of posttraumatic neuropathic pain[J]. *J Neurosurg Spine*, 2011, 14: 583-597.
- [10] YANG F, LUO W J, SUN W, WANG Y, WANG J L, YANG F, et al. SDF1-CXCR4 signaling maintains central post-stroke pain through mediation of glial-neuronal interactions[J/OL]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10: 226. doi: 10.3389/fnmol.2017.00226.
- [11] BAI L, WANG X, LI Z, KONG C, ZHAO Y, QIAN J L, et al. Upregulation of chemokine CXCL12 in the dorsal root ganglia and spinal cord contributes to the development and maintenance of neuropathic pain following spared nerve injury in rats[J]. *Neurosci Bull*, 2016, 32: 27-40.
- [12] ZHUO M. Long-term potentiation in the anterior cingulate cortex and chronic pain[J/OL]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2013, 369: 20130146. doi: 10.1098/rstb.2013.0146.

[本文编辑] 杨亚红