

·基础研究·

A型肉毒毒素调控钠离子通道 Nav1.8 缓解神经病理性疼痛的作用

陈曦^{1*}, 郑淑慧², 胡昔权¹, 刘先国³

(中山大学 1.附属第三医院康复医学科,广东 广州 510630;2. 附属第一医院转化医学研究中心,3. 疼痛研究中心,广东 广州 510080)

摘要:【目的】研究 A 型肉毒毒素(BoNT/A)对腰 5 脊神经前根切断(L5 VRT)介导的神经病理性疼痛的影响,并进一步探讨其可能的内在作用机制。【方法】利用行为学测试方法观察 BoNT/A 足底注射后对 L5 VRT 大鼠机械刺激撤足阈值的影响,采用 Western blot 方法分析 BoNT/A 对 L5 VRT 术后背根神经节(DRG)神经元中钠离子通道(Nav1.8)蛋白表达的影响,并进一步应用全细胞膜片钳技术观察 BoNT/A 对 DRG 神经元中功能性 Nav1.8 电流密度的影响。【结果】一侧足底注射 7、15 U/kg 的 BoNT/A 1 d 后可显著缓解 L5 VRT 介导的机械触诱发痛症状,且作用时间至少持续至给药后 14 d;BoNT/A 可显著下调 L5 VRT 术后 DRG 神经元中 Nav1.8 蛋白表达水平,并可明显降低功能性 Nav1.8 电流密度。【结论】BoNT/A 可能通过下调 DRG 神经元中 Nav1.8 蛋白表达,降低功能性 Nav1.8 电流,发挥缓解神经病理性疼痛的作用。

关键词: A 型肉毒毒素;钠离子通道 1.8;神经病理性疼痛;腰 5 脊神经前根切断

中图分类号: R338.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2014)06-0801-06

Analgesic Effect of Botulinum Neurotoxin Type A on Neuropathic Pain by Regulating Nav1.8 Sodium Channel

CHEN Xi^{1*}, ZHENG Shu-hui², HU Xi-quan¹, LIU Xian-guo³

(1. Department of Rehabilitation Medicine, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China;
2. Research Center of Translational Medicine, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China;
3. Pain Research Center, Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the analgesic effect of Botulinum Neurotoxin Type A (BoNT/A) on neuropathic pain induced by Lumbar 5 ventral root transection(L5 VRT) and further to explain the underlying mechanism. 【Methods】 With use of the method of behavioral test, the effect of BoNT/A on the paw withdrawal threshold of L5 VRT rats was investigated, the effect of BoNT/A on Nav1.8 protein expression in Dorsal Root Ganglion (DRG) neurons of L5 VRT rats was observed by Western blot, the functional Nav1.8 current density in DRG neurons was recorded with whole-cell patch clamp technique as well. 【Results】 Subplantar injection of BoNT/A at 7 U/kg and 15 U/kg in the ipsilateral hindpaw reversed L5VRT induced mechanical allodynia, started 1 day after injection and persisted for at least 14 days. Further experiments found that administration of BoNT/A down-regulated the Nav1.8 expression and decreased the Nav1.8 current density in DRG neurons significantly. 【Conclusion】 The reduction of activity on the expression and function of Nav1.8 sodium channel may contribute to the long-lasting analgesic effect of BoNT/A.

Key words: botulinum neurotoxin type A; Nav1.8 sodium channel; neuropathic pain; L5 VRT

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(6): 801-806]

肉毒毒素(botulinum neurotoxin)是肉毒杆菌产生的一种神经毒素,分为 A~G 7 型,为结构类

似的蛋白酶,其中毒力最强的是 A 型肉毒毒素(botulinum neurotoxin type A, BoNT/A),其作用机

收稿日期:2014-07-28

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金(12ykpy45);广东省医学科研基金(B2013123, B2013113)

作者简介:陈曦,* 通信作者,博士,研究方向:痛觉病理生理, E-mail: ninjacs@foxmail.com

制是通过裂解胆碱能神经末梢突触相关蛋白-25,阻止乙酰胆碱的释放,减少肌肉的收缩和痉挛,因此早期临床上主要用于治疗各种肌张力障碍疾病。近年来大量临床研究证实,A型肉毒毒素对各种疼痛也有较好疗效,局部应用BoNT/A对偏头痛、紧张性头痛、丛集性头痛、疱疹后神经痛、糖尿病性神经病变、肌筋膜炎、腰背痛等有明显的治疗效果^[1],但其镇痛作用机制尚不明确。最新的研究表明,BoNT/A的镇痛机制不依赖于其对肌肉的放松作用,BoNT/A对由肌痉挛和非肌痉挛引起的疼痛均有效,当肌肉张力恢复正常后,其镇痛作用依然显著^[2],表明BoNT/A的止痛作用可能尚存在其他的机制。外周神经损伤后背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)神经元中电压门控钠离子通道的异常表达对病理性疼痛的发生发展有重要意义。钠离子通道亚型1.8(Nav1.8)分布在与感受伤害性刺激相关的中小神经元上,在神经病理性疼痛和炎症性疼痛的形成中具有重要作用^[3]。我们前期研究发现,选择性腰5脊神经前根切断(切断运动神经,lumbar 5 ventral root transaction, L5VRT)的病理性疼痛大鼠,DRG神经元中Nav1.8的转录和表达上调^[4],功能性Nav1.8钠通道电流增大,神经元的兴奋性增高^[5]。BoNT/A能否在L5VRT所致神经病理性疼痛模型动物上发挥镇痛作用目前还不十分清楚,其临床缓解疼痛的作用机制是否与影响钠通道的表达和功能有关,目前还未见报道。本研究拟通过观察BoNT/A是否能对L5VRT病理性疼痛模型动物产生镇痛作用,并进一步探究BoNT/A对DRG神经元中Nav1.8蛋白表达和功能性电流的影响,以期了解BoNT/A临床治疗疼痛的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

成年雄性Sprague-Dawley (SD)大鼠(体质量150~250 g)由中山大学实验动物中心提供。动物分笼饲养,室温保持在(24±1)℃和50%~60%的湿度,12 h-12 h白天-黑夜循环照明。实验动物随机分为假手术组(Sham)、VRT模型+生理盐水(Saline)组、VRT模型+BoNT/A组。所有实验步骤都尽量减轻动物的痛苦并按照有关实验动物的使用原则操作。胰酶、胶原酶及膜片钳实验所用化合

物购自美国Sigma公司;河豚毒素(TTX)购自江苏泰州康特生物科技有限公司;A型肉毒毒素由兰州生物制品研究所生产。

1.2 腰5前根切断模型(L5VRT)的制备及评价

用100 g/L水合氯醛麻醉(3.5 mL/kg,腹腔注射)大鼠后,按照Li等^[6]描述的方法对大鼠行腰5前根切断手术。首先在左侧第4至5腰椎间行半椎板切除术,暴露左半部脊髓后,用一锋利的细针轻轻划破外侧脊膜。直视下看到位于背根下方、外侧的脊神经前根后,用一特制的玻璃分针轻轻从背根下方拉出并提起前根,用眼科剪剪去约2~3 mm的前根,注意避免损伤背根神经节和背根。生理盐水冲洗切口后,分层缝合肌肉和皮肤。一切手术器具都经严格消毒,手术过程尽量减少出血和避免不必要的组织损伤。假手术组动物(Sham组)只分离出L5前根,不做前根切断术。实验结束后,所有L5VRT大鼠都通过解剖以确认前根被切除而且在L5的位置,不符合标准的动物将被从实验中排除。

行为学测试采用Chaplan等^[7]描述的“up-down”方法,选用8根强度呈对数递增的von Frey hair检测大鼠50%的机械刺激撤足阈值(paw withdrawal threshold)。测试时Hair垂直,微弯,在大鼠足心部保持4~5 s,出现快速撤足为阳性反应。表现明显撤足阈值下降并稳定的动物视为造模成功并进行下一步实验。

1.3 Western blot 实验

大鼠相应节段DRG在冰上取出后,修剪干净后剪碎称重并按10 μL/mg加入SDS裂解液,再按1:100比例加入蛋白酶/磷酸酶抑制剂Cocktail(博士德,武汉),置冰上用细胞破碎仪处理3 min。4℃离心(21 255 ×g),15 min,取上清液分装于-80℃。取等量蛋白样品加入上样缓冲液和二巯叔糖醇(DTT)沸水中10 min。用SDS-PAGE凝胶电泳分离至目的蛋白到合适位置,取下凝胶湿法电转至PVDF膜。膜经过含50 g/L脱脂奶粉TBST溶液室温封闭1 h后,用抗Nav1.8抗体(Alomone Labs,1:200)孵育4℃环境过夜。次日PVDF膜经TBST溶液冲洗后用相应的HRP标记的二抗室温孵育1 h。TBST溶液再次冲洗,加入ECL发光液(普利莱,北京),暗室内在胶片上显影后,对灰度值做定量分析。以β-actin作内参。

1.4 急性分离和培养DRG神经元

使用酶消化法分离DRG神经元^[5]。实验动物

在冰袋上小心取出椎间孔中腰4、5背根神经节,分离剪碎后转移到5 mL含有胰酶(0.4 mg/mL)和胶原酶(IA, 0.6 mg/mL)的DMEM/F12培养基中,35℃振荡消化30 min,离心(21 255 $\times g$),5 min,吸去上清,加入5 mL含100 mL/L胎牛血清的DMEM/F12培养基以终止消化,然后种在包被多聚赖氨酸的玻璃片上,放置于温箱内(体积分数为5% CO₂, 37℃)。

1.5 电生理记录

将种有DRG神经元细胞的玻片放入置于倒置显微镜上的灌流槽内,持续灌流。实验在室温下进行,选用中、小直径的神经元(20~35 μm),调节微操纵仪使电极贴附细胞后给予负压吸引,待细胞达到稳定吉欧封接后,进行快电容补偿,轻轻给予负压或电击破膜并补偿慢电容,形成全细胞记录模式。使用HEKA EPC10放大器(德国)和配套PULSE程序采集和分析数据。玻璃微电极用Sutter P87(美国)拉制仪制作,电极电阻1~3 m Ω 。电流采集的采样频率为5 kHz,滤过频率为2 kHz。串联电阻和漏电流均给予补偿以减少实验误差。电极内、外液及钠电流记录方法参见文献^[5]。

1.6 统计学分析

统计学分析通过SPSS 10.0软件(SPSS Inc., USA)进行,实验结果均以均数 \pm 标准误(mean \pm SE)表示。多组间的数据比较用单因素方差分析(one-way ANOVA)处理;行为学测试数据;50%撤足阈值(g)使用配对秩和检验(Wilcoxon Signed Ranks Test)。P<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BoNT/A可缓解L5VRT介导的神经病理性疼痛

为观察BoNT/A是否可有效减轻神经病理性疼痛,我们对L5VRT大鼠足底注射一定剂量的BoNT/A后测量其机械触痛阈的变化情况。由于过小剂量(<3.5 U/kg)短时间内无明显作用,过大剂量(>30 U/kg)可能会产生松弛肌肉的作用,本实验将动物随机分为Sham组、VRT+BoNT/A(7 U/kg)注射组、VRT+BoNT/A(15 U/kg)注射组及VRT+生理盐水(Saline)注射组,在L5VRT造模成功后第5天采用一侧足底注射给药方式,分别在给药后第1、3、5、7、14天测试大鼠50%机械刺激

撤足阈值。行为学测试结果显示,L5VRT术后第5天给予BoNT/A(7 U/kg)注射后24 h大鼠50%机械刺激撤足阈值即明显上升(P<0.05),且随着时间的延长其缓解疼痛效果逐渐明显,一直可持续到注射后第14天(P<0.01~P<0.001,与生理盐水注射组比较,n=8/组,图1A);15 U/kg BoNT/A注射组与7 U/kg BoNT/A作用效果类似但更为明显,注射后24 h可显著升高痛阈(P<0.05),持续到第14天升高痛阈效果仍十分明显(P<0.01~0.001,与生理盐水注射组比较,n=8/组,图1B)。实验结果表明足底注射BoNT/A可显著减轻L5VRT介导的神经病理性疼痛症状。

2.2 BoNT/A对L5VRT大鼠DRG神经元中Nav1.8蛋白表达的下调作用

我们前期的研究表明,L5VRT术后表达上调的Nav1.8对病理性疼痛有重要意义^[4]。鉴于第一部分实验结果提示7 U/kg BoNT/A即可改善大鼠神经病理性疼痛症状,且在给药后第7天镇痛效果最为显著,一直可持续到给药后第14天,本部分实验我们进一步在L5VRT大鼠模型上观察BoNT/A(7 U/kg)给药后7、14 d DRG神经元中Nav1.8蛋白表达的变化情况。Western Blot实验结果显示,L5VRT可显著上调DRG神经元中Nav1.8蛋白表达水平(P<0.01,与假手术组比较,n=5/组);BoNT/A(7 U/kg)注射7 d后L5VRT大鼠DRG神经元中Nav1.8蛋白表达上调现象被明显抑制,这种下调作用一直到BoNT/A注射后第14天仍十分明显(P<0.05,与生理盐水注射组比较,n=5/组,图2)。结果提示BoNT/A干预后可下调L5VRT大鼠DRG神经元中原本表达增多的Nav1.8蛋白。

2.3 BoNT/A对L5VRT大鼠DRG神经元中Nav1.8电流的抑制作用

为探究BoNT/A对Nav1.8蛋白介导的功能性钠电流是否有影响,我们在上一部分实验基础上进一步应用电生理膜片钳技术观察了BoNT/A(7 U/kg)作用7 d后对各实验组大鼠DRG神经元中Nav1.8电流密度(pA/pF)的影响。结果显示,Nav1.8峰电流的膜电位约在-20 mV;L5VRT术后大鼠DRG神经元中Nav1.8电流密度明显增大(P<0.01,与假手术组相比较,n=12/组,图3A);BoNT/A干预组与盐水对照组相比较,DRG神经元中Nav1.8电流密度在膜电位为-25 mV至-15

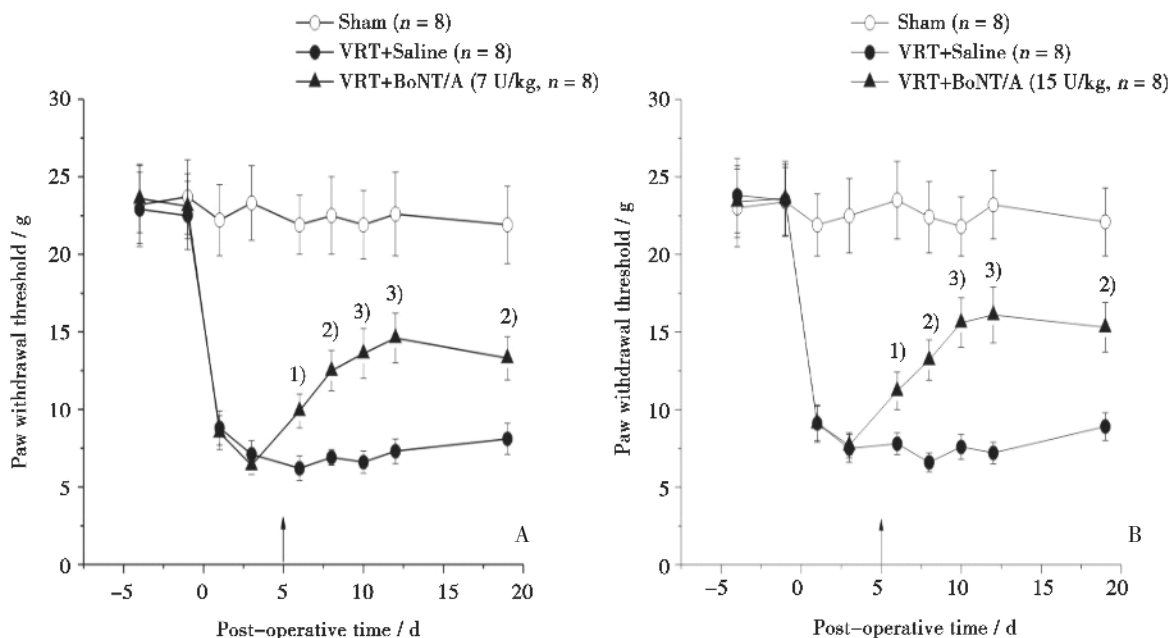


图 1 BoNT/A 缓解 L5 VRT 介导的神经病理性疼痛

Fig.1 Analgesic Effect of BoNT/A on Neuropathic Pain induced by L5 VRT

The time course of mechanical allodynia on hind paws of L5 VRT rats after injection of BoNT/A at 7 U/kg (A) and 15 U/kg (B). Subplantar injection of BoNT/A (applied at day 5 after L5 VRT) attenuated mechanical allodynia, started 1 day after the injection and persisted for at least 14 days. (n = 8/group, 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$, 3) $P < 0.001$ vs saline group)

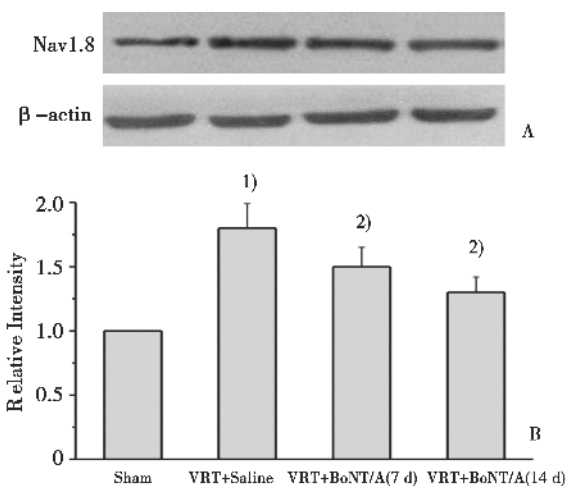


图 2 BoNT/A 下调 L5 VRT 大鼠 DRG 神经元中 Nav1.8 蛋白

Fig.2 BoNT/A down-regulates the expression of Nav1.8 in DRG neurons of L5 VRT rats

A: Representative Western Blots for Nav1.8 expression in DRGs of each group are shown. B: Densitometric analysis shows a significant increase in Nav1.8 protein expression following L5 VRT, while administration of BoNT/A down-regulates the expression of Nav1.8 in L5 VRT rats at day 7 and day 14. 1) $P < 0.01$ vs sham group, 2) $P < 0.05$ vs saline group, n = 5/group).

mV时明显减小(图 3B),其中膜电位为 -20 mV 时电流密度降低最为明显 [$P < 0.05$, VRT+BoNT/A 组: (126 ± 14) pA/pF 对 VRT+Saline 组: (143 ± 15) pA/pF, n = 12/组,图 3C], I-V 曲线发生上移,表明 BoNT/A 干预后对 L5 VRT 介导的 Nav1.8 电流增大有明显的抑制作用。

3 讨论

近期很多研究发现,BoNT/A 对临床各种病理性疼痛均有显著疗效,在大鼠糖尿病病理性疼痛模型的实验也发现,足底皮下给予 BoNT/A 可显著减轻大鼠的机械、热刺激痛觉过敏症状^[8],但 BoNT/A 缓解疼痛的作用机制尚不十分清楚。本实验观察了 BoNT/A 对 L5 VRT 介导的神经病理性疼痛的影响,并进一步探究其可能的内在作用机制。

L5 VRT 是经典的神经病理性疼痛模型,可迅速出现(术后 24 h)足底对机械刺激和热刺激痛觉过敏的神经病理性疼痛症状,且持续时间较长(56 d 左右)^[6]。我们在这种模型上的实验发现,一侧足

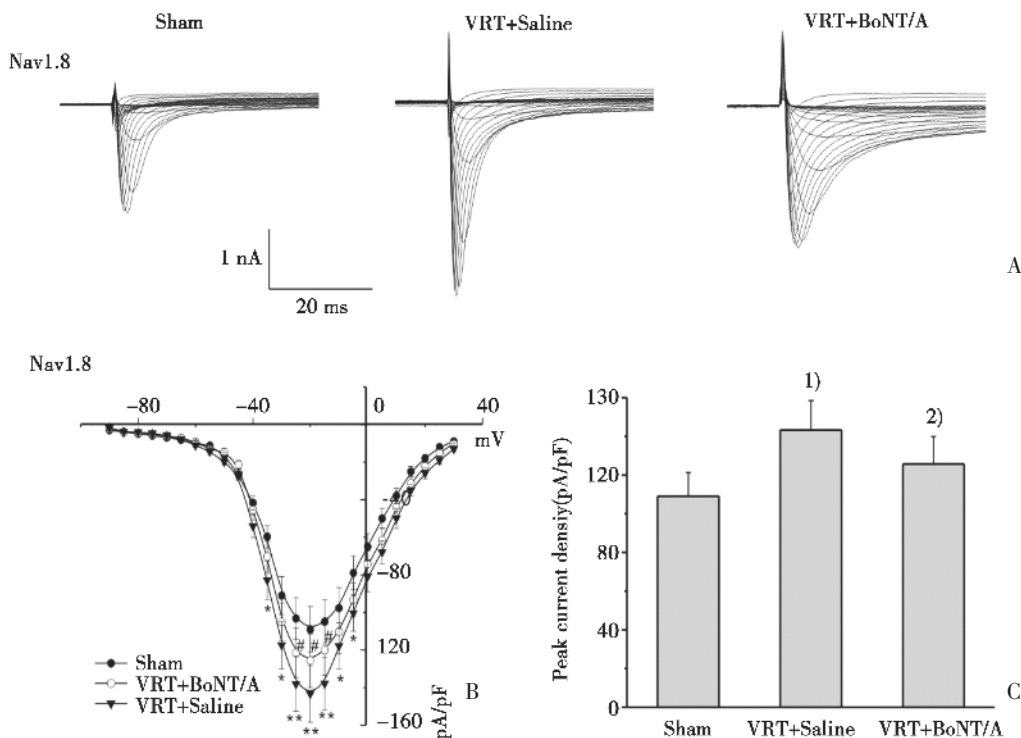


图 3 BoNT/A 减小 L5 VRT 大鼠 DRG 神经元中 Nav1.8 电流密度

Fig.3 BoNT/A decreases current densities (pA/pF) of Nav1.8 channels in DRG neurons of L5 VRT rats

A: The presentative currents of Nav1.8 recorded in Sham, VRT+Saline and VRT+BoNT/A (7 U/kg) groups are shown. BoNT/A notably reduces Nav1.8 current in DRG neurons that is supposed to increase following L5 VRT. B: I-V curves of Nav1.8 currents in different groups. The current densities of Nav1.8 in BoNT/A group are significantly decreased at -25 mV to -15 mV (1) $P < 0.05$, (2) $P < 0.01$ vs sham group, 2) $P < 0.05$ vs saline group). C: Comparison of maximal current densities of Nav1.8 in each group at -20 mV (1) $P < 0.01$ vs sham group, (2) $P < 0.05$ vs saline group, $n = 12$ /group)

底注射 7、15 U/kg 的 BoNT/A, 在未发现引起实验动物肢体瘫痪或运动异常的基础上, 可迅速减轻神经病理性疼痛症状, 且维持时间长 (至注射后 14 d), 这与近期一项随机、双盲、安慰剂对照实验结果相一致: 对慢性神经病理性疼痛病人一次皮下给予 BoNT/A 可明显缓解自发性疼痛症状, 最长可持续 14 周^[9]; 此外我们的研究发现 BoNT/A 注射后 1 天即可显著缓解疼痛, 表明其镇痛作用机制可能存在更多解释。研究表明, 当外周神经损伤后, 初级感觉传入神经元可产生异常的自发电活动, 这种传入神经产生的异位冲动可能在病理性疼痛形成中起关键作用^[10-11]; 而 Matak 等^[12]研究发现外周足部应用少量的 BoNT/A 可经坐骨神经转运至脊髓, 因此推测 BoNT/A 可能通过影响感觉传入的异常兴奋而产生镇痛作用。

DRG 神经元是感觉传入的第一级神经元, 在

痛觉感知、调节和传导过程中起着重要的作用。很多证据表明外周神经损伤后 DRG 神经元中电压门控钠离子通道的异常表达及其功能性的改变对病理性疼痛的发生发展有重要意义。在与伤害感受相关的中小直径 DRG 神经元中主要存在 Nav1.8 和 Nav1.9 两个钠通道亚型, 均属于 TTX 不敏感型 (TTX-Resistant, TTX-R) 钠通道。其中 Nav1.8 主要介导产生动作电位上升支的 80% 的内向电流, 对于 DRG 神经元中动作电位的产生有重要意义^[13]; 应用 Nav1.8 特异性阻断剂或者反义寡核苷酸 Knock-down Nav1.8 可以减轻或反转病理性疼痛^[14-15], 提示了 Nav1.8 在神经病理性疼痛中的重要作用。我们前期的研究发现, L5VRT 后未损伤的感觉神经元中 Nav1.8 的转录和表达上调, 功能性钠电流增大, 神经元的兴奋性增高^[4-5]; 在本实验中我们发现 BoNT/A (7 U/kg) 干预后可明显

下调 L5 VRT 大鼠 DRG 神经元中 Nav1.8 蛋白表达水平,即抑制了 L5 VRT 介导的 Nav1.8 表达上调,因此推测 Nav1.8 在 BoNT/A 缓解神经病理性疼痛的作用机制中具有重要意义。为了检测 BoNT/A 下调 Nav1.8 蛋白表达是否产生功能性影响,我们进一步应用全细胞膜片钳技术观察了 BoNT/A 对 L5 VRT 术后 DRG 神经元中 Nav1.8 的峰电流密度的影响。实验结果发现 BoNT/A(7 U/kg)干预后可显著减少功能性 Nav1.8 钠电流,所以 BoNT/A 可能通过影响 Nav1.8 的表达和功能发挥缓解神经病理性疼痛的作用。

综上所述,我们的研究发现 BoNT/A 足底注射后可显著缓解 L5 VRT 介导的大鼠神经病理性疼痛症状,BoNT/A 可下调 L5 VRT 大鼠 DRG 神经元中原本表达上调的 Nav1.8 蛋白,同时降低功能性 Nav1.8 电流水平。这些结果提示,BoNT/A 影响 DRG 神经元中 Nav1.8 的表达和功能,可能是其产生镇痛作用的重要机制。

参考文献:

- [1] Argoff CE. A focused review on the use of botulinum toxins for neuropathic pain[J]. *Clin J Pain*, 2002, 18(6 Suppl): 177-181.
- [2] Freund B, Schwartz M. Temporal relationship of muscle weakness and pain reduction in subjects treated with botulinum toxin A[J]. *J Pain*, 2003, 4(3): 159-165.
- [3] Leo S, D'Hooge R, Meert T. Exploring the role of nociceptor-specific sodium channels in pain transmission using Nav1.8 and Nav1.9 knockout mice [J]. *Behav Brain Res*, 2010, 208(1): 149-157.
- [4] He XH, Zang Y, Chen X, et al. TNF- α contributes to up-regulation of Nav1.3 and Nav1.8 in DRG neurons following motor fiber injury[J]. *Pain*, 2010, 151(2): 266-279.
- [5] Chen X, Pang RP, Shen KF, et al. TNF- α enhances the currents of voltage gated sodium channels in uninjured dorsal root ganglion neurons following motor nerve injury[J]. *Exp Neurol*, 2011, 227(2): 279-286.
- [6] Li L, Xian CJ, Zhong JH, et al. Effect of lumbar 5 ventral root transection on pain behaviors: a novel rat model for neuropathic pain without axotomy of primary sensory neurons[J]. *Exp Neurol*, 2002, 175(1): 23-34.
- [7] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1): 55-63.
- [8] Bach RL, Salkovic PM, Lackovic Z. Botulinum toxin type A reduces pain supersensitivity in experimental diabetic neuropathy: bilateral effect after unilateral injection[J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 633(1-3): 10-14.
- [9] Ranoux D, Attal N, Morain F, et al. Botulinum toxin type A induces direct analgesic effects in chronic neuropathic pain[J]. *Ann Neurol*, 2008, 64(3): 274-283.
- [10] Scadding JW. Development of ongoing activity, mechanosensitivity, and adrenaline sensitivity in severed peripheral nerve axons[J]. *Exp Neurol*, 1981, 73(2): 345-364.
- [11] Wall PD, Devor M. Sensory afferent impulses originate from dorsal root ganglia as well as from the periphery in normal and nerve injured rats[J]. *Pain*, 1983, 17(4): 321-339.
- [12] Matak I, Riederer P, Lackovic Z. Botulinum toxin's axonal transport from periphery to the spinal cord [J]. *Neurochem Int*, 2012, 61(2): 236-239.
- [13] Renganathan M, Cummins TR, Waxman SG. Contribution of Na (v)1.8 sodium channels to action potential electrogenesis in DRG neurons[J]. *J Neurophysiol*, 2001, 86(2): 629-640.
- [14] Dong XW, Goregoaker S, Engler H, et al. Small interfering RNA-mediated selective knockdown of Na (V)1.8 tetrodotoxin-resistant sodium channel reverses mechanical allodynia in neuropathic rats[J]. *Neuroscience*, 2007, 146(2): 812-821.
- [15] Jarvis MF, Honore P, Shieh CC, et al. A-803467, a potent and selective Nav1.8 sodium channel blocker, attenuates neuropathic and inflammatory pain in the rat [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(20): 8520-8525.

(编辑 徐杰)