

白细胞介素6参与介导大鼠运动神经损伤所致的病理性疼痛

廖广界^{1,2}, 臧颖³, 魏绪红³, 李永勇³, 那晓东^{1,2*}

(中山大学 1.疼痛研究中心 2.中山医学院病理生理教研室, 3.中山医学院生理教研室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】检测选择性切断腰5脊神经前根(L5-VRT)术后脊髓背角内IL-6的异常表达并评价其对运动神经损伤所致机械性痛觉过敏的影响。【方法】在不损伤感觉传入的情况下, L5-VRT制备大鼠机械性痛过敏模型, 采用Western blot和免疫荧光组织化学方法检测IL-6在脊髓背角的表达水平并进行细胞定位, 通过痛行为学测试观察蛛网膜下腔内注射IL-6中和抗体对L5-VRT大鼠机械性痛过敏的影响。分组: sham组、L5-VRT组, $n=5$; vehicle+L5-VRT、IL-6 neutralization +L5-VRT组, $n=6$ 。【结果】L5-VRT术后7d较假手术组同侧DRG IL-6蛋白表达显著上调($P<0.001$), IL-6蛋白表达的细胞类型为神经元细胞, L5-VRT术前应用IL-6中和抗体可抑制大鼠L5-VRT术后所致双侧机械性痛过敏的形成($P<0.05$)。【结论】IL-6参与介导L5-VRT所致的大鼠后肢机械性痛过敏。

关键词: 背根神经节; 运动神经损伤; 痛超敏; 白细胞介素-6

中图分类号: R338.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2012)06-0723-05

Involvement of IL-6 in Neuropathic Pain Rats Following Motor Nerve Injury

LIAO Guang-jie^{1,2}, ZANG Ying³, WEI Xu-hong³, LI Yong-yong³, NA Xiao-dong^{1,2*}

(1.Pain Research Center, 2.Department of Pathophysiology, 3.Department of Physiology of Zhongshan Medical School, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To test the expression of IL-6 in spinal dorsal horn and evaluate its effects on the development of neuropathic pain induced by L5 ventral root transection (L5-VRT). 【Method】 Rats mechanical allodynia model was prepared by L5-VRT. The expression and cellular localization of IL-6 in spinal dorsal horn was detected by Western blot and immunofluorescence staining. The behavioral test was used to observe the affection of the neutralizing antibody of IL-6 on the mechanical allodynia induced by L5 VRT. 【Result】 The expression of IL-6 in neurons was upregulated in ipsilateral DRGs on day 7 after surgery ($P<0.001$). Intrathecal injection of the neutralizing antibody of IL-6 administered 30 min before L5-VRT effectively attenuated bilateral mechanical allodynia induced by L5 VRT ($P<0.05$). 【Conclusion】 IL-6 participates in regulation of the rat mechanical allodynia induced by motor nerve injury.

Key words: dorsal root ganglion; motor nerve injury; allodynia; interleukin-6

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(6):723-727]

早期的研究认为病理性疼痛是感觉神经受损所致的异位放电引起的, 经典的神经病理性疼痛模型亦大多为感觉传入的损伤模型; 但近期的研究发现提示引起病理性疼痛的原因并非如此简单, 例如外周神经损伤后邻近未损伤神经元上亦有异位放电的产生^[1]; 此外, 在不损伤初级感觉传入情况下, 选择性切断大鼠腰5脊神经前根(lumbar 5 ventral root transection, L5-VRT)引起运

动神经损伤也可引起大鼠双侧后肢的热痛过敏和机械性痛过敏^[2], 因此, 目前认为邻近损伤的传入神经所产生的异位冲动亦可能在病理性疼痛中起重要作用。大量研究结果提示继发于外周神经损伤的免疫反应可能对邻近未损伤神经元的异位放电起调控作用, 其中促炎细胞因子的作用备受关注, 研究发现肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)是神经损伤后最先表达的炎

收稿日期: 2012-08-19

基金项目: 国家自然科学基金(30900436)

作者简介: 廖广界, 硕士, E-mail: liaojack@foxmail.com; * 通信作者, 那晓东, 博士, 副教授, 硕士生导师, E-mail: naxd@mail.sysu.edu.cn

症因子^[3],它可启动其他细胞因子和炎症因子的级联反应。已有文献报道 TNF- α 能够诱导白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)的分泌^[4],坐骨神经损伤后 TNF- α 可通过上调 IL-6 参与病理性疼痛的产生,但未损伤的感觉传入神经元细胞是否存在 IL-6 的异常表达并参与调控神经病理性疼痛形成目前尚未明确。分析未损伤感觉传入神经元细胞 IL-6 的异常表达并探讨其与神经病理性疼痛形成之间的相互关系对于深入理解病理性疼痛机制,寻求其有效治疗方法具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验动物采用成年雄性 SD 大鼠,体质量 150 ~ 200 g,随机分组,分笼饲养。动物由中山大学北校区实验动物中心提供,室温及室内相对湿度分别维持在 $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ 和 $(65 \pm 5)\%$,按照大鼠的生物节律将光照时间维持在每日的 7:00 AM-7:00 PM。为尽量减轻动物在实验中的痛苦,所有实验步骤均按照实验动物的相关使用原则操作执行。

1.2 主要试剂

兔抗鼠 β -actin 抗体 (Abmart),兔抗鼠 IL-6 抗体 (R&Dsystem),羊抗兔 Ig-HRP (Immunology Consultants Labogatory, Inc),中分子蛋白标准 MARKER (Fermentas) 和 ECL 化学发光底物检测试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 腰 5 前根切除模型(L5-VRT)的制备 大鼠经腹腔注射 4 g/L 戊巴比妥钠 (40 mg/kg)麻醉实施腰 5 前根切除术。沿左侧脊柱旁肌约 L4-S1 脊髓节段处做一纵行切口,在 L4-L5 椎间行半椎板切除术,暴露 L5 根鞘,用细针挑开 L5 根鞘表面的硬脊膜,显微镜下鉴别 L5 背根和前根。将 L5 前根小心拉出并形成环状,在 L5 DRG 近脊髓侧 3 ~ 4 mm 处切断并移去 2 mm 左右的前根,同时分离 L5 前根残端,避免发生神经纤维的再生。用 3-0 医用缝合线分层缝合肌肉和皮肤,术后常规条件下喂养。假手术组大鼠(Sham 组)只分离 L5 前根,不做前根切断术。

1.3.2 微创性鞘内给药方法 大鼠麻醉消毒后, L4-S2 脊髓节段处沿中线做纵行切口,将无菌的 PE-10 管(8 cm)从 L5-L6 椎间隙的硬膜下隙向头

端小心插入,使导管尖端置于脊髓腰膨大处,将大鼠置垂直位若导管内有脑脊液流出说明导管尖端位于椎管内,导管固定于周围肌肉组织,用 3-0 医用缝合线逐层缝合,暴露于切口外导管埋置于皮毛中,用烧热的镊子封闭导管末端。给药前剪开封闭末端,对部分 L5-VRT 大鼠分别于术前 30 min 或术后连续两天给予 IL-6 中和抗体或对照溶剂,微量加样器的给药量不超过 40 μL ,10 μL 盐水冲管,给药结束后重新封闭管口。

1.3.3 50%机械性撤足阈值的测定 大鼠置于透明有机玻璃测试箱(18 cm $\times$ 25 cm $\times$ 18 cm)内,金属网格箱底(网格尺寸 0.8 cm $\times$ 0.8 cm),待大鼠安静后,采用 Up-Down 方法,选 8 根强度呈对数递增方式的 von Frey hair (0.41、0.70、1.20、2.04、3.63、5.50、8.51、15.14 g) 分别对大鼠左右后肢足心部位进行机械性刺激,每次持续 6 ~ 8 s。以 2.04 g 为初始刺激强度,若撤足反应为阴性则选用刺激强度呈对数递增的相邻 von Frey hair 继续刺激,若撤足反应为阳性,则选择相邻递减的刺激强度给予刺激。以第一个转折点的前一点为起点连续 6 次的刺激结果为最终的撤足反应模式,再经特定程序将撤足反应模式转换为相应的撤足阈值。

1.3.4 免疫组织化学 大鼠经 200 g/L 乌拉坦(氨基甲酸乙酯,1.5 g/kg)腹腔注射深麻醉,先后用生理盐水和 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(phosphate buffer, PB)配制的 40 g/L 多聚甲醛液(pH 7.2-7.4, 4 $^\circ\text{C}$)对动物进行主动脉灌流固定,约 30 min。解剖动物取出同侧 L4、L5 DRG,置于 40 g/L 多聚甲醛溶液后固定 3 h,转入 300 g/L 蔗糖溶液脱水 3 d。标本经脱水后行冰冻切片,切片为横切面,厚度 16 μm ,收集于 24 孔板内的 DRG 冰冻切片用 0.01 mol/L PBS 洗 3 次,每次 5 min,室温下加入封闭液封闭非特异性结合位点。1 h 后吸去封闭液加入 IL-6 抗体 (1:100)。4 $^\circ\text{C}$ 过两夜后弃上清,用 0.01 mol/L PBS 洗 3 次,每次 5 min,加入标记 Cy3 的 IgG (1:300),室温下避光作用 1 h,再用 0.01 mol/L PBS 洗 3 次,每次 5 min,随机挑选切片贴于载玻片上,立即于荧光显微镜下观察并拍照。定量分析是通过计数每张切片上的免疫阳性细胞获得的。对每只实验大鼠随机挑取 4 张 L5 DRG 切片,镜下计数每张切片上 IL-6 免疫活性为阳性细胞的百分比,从而得到每只大鼠 IL-6 阳性细胞百分

比的均数。每个实验组共计数5~6只大鼠,最后计算出每组大鼠IL-6阳性细胞百分比的均数±标准误。

1.3.5 蛋白提取与 western blot 实验 术后7 d处死各组大鼠分离同侧L4-L5脊髓和DRG,将组织置于15 mmol/L Tris 缓冲液(250 mmol/L 蔗糖,1 mmol/L $MgCl_2$,1 mmol/L DTT, 2.5 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 50 mmol/L NaF, 10 $\mu g/mL$ 亮抑酶肽,1.25 $\mu g/mL$ 胃酶抑素,2.5 $\mu g/mL$ 抑肽酶,2 mmol/L 焦磷酸钠,0.1 mmol/L $NaVO_4$, 0.5 mmol/L PMSF, 蛋白酶抑制剂,pH =7.6)中匀浆获取全细胞裂解液,提取蛋白经紫外分光法测定蛋白浓度,进行电泳、转膜、免疫反应、化学发光反应、显影和定影,最后将胶片进行扫描或拍照,用凝胶图像处理系统分析目的蛋白的分子质量和净光密度值。

1.4 统计学分析

所有统计学分析均通过 SPSS 10.0 软件(SPSS Inc, USA)进行,实验结果以均数 ± 标准误(mean ± SE)表示。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)。免疫荧光组织化学染色数据的处理首先用单因素方差分析(one-way ANOVA),后用 Tukey 法(Tukey post hoc test)检测组间差异或使用 *t* 检验(Student's *t*-test)进行两组间差异比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 L5-VRT 对 L4、L5 同侧 DRG IL-6 蛋白表达的影响

L5-VRT 及 Sham 组大鼠术后 7 d Western blot

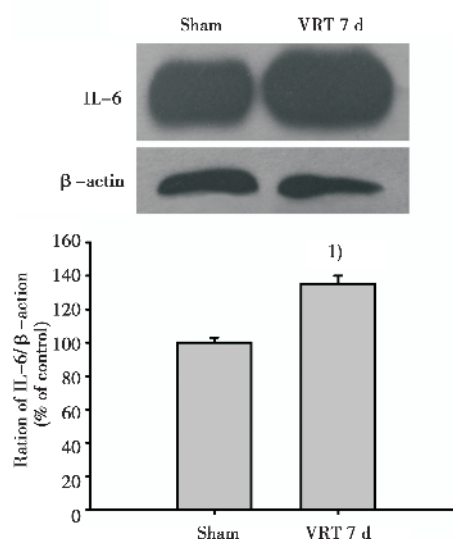


图1 L5-VRT 对 L4、L5 同侧 DRGs IL-6 蛋白表达的影响

Fig.1 L5-VRT up-regulates the expression of IL-6 in both L4 and L5 ipsilateral DRGs 7 days after operation

1) $P < 0.001$ versus sham.

的压片结果如图1所示,IL-6的分子质量是23 ku,β-actin的分子质量是42 ku。通过凝胶图像处理系统分析,与假手术组(Sham组, $n = 5$)相比,L5-VRT大鼠($n = 5$)在术后7 d手术同侧的L4、L5 DRG内IL-6表达显著增强($P < 0.001$)。

2.2 L5-VRT 对同侧 DRG 神经元 IL-6 表达的影响

如图2所示,假手术组大鼠(Sham组, $n = 5$)的L5 DRG内可检测到IL-6基础水平的表达;与假手术组相比,L5-VRT大鼠在术后3 d和7 d手术同侧的L4、L5 DRG内IL-6表达显著增强($P < 0.001$)。

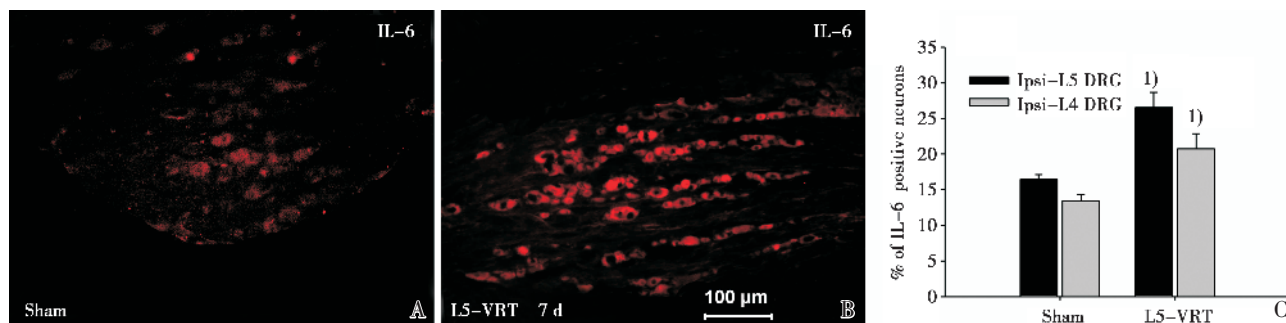


图2 L5-VRT 对 L4、L5 同侧 DRGs 神经元 IL-6 表达的影响

Fig.2 L5-VRT up-regulates the percentage of IL-6 positive neurons in both L4 and L5 ipsilateral DRGs 7 days after operation

Scale bars: (A-B) = 100 μm . 1) $P < 0.001$ versus sham.

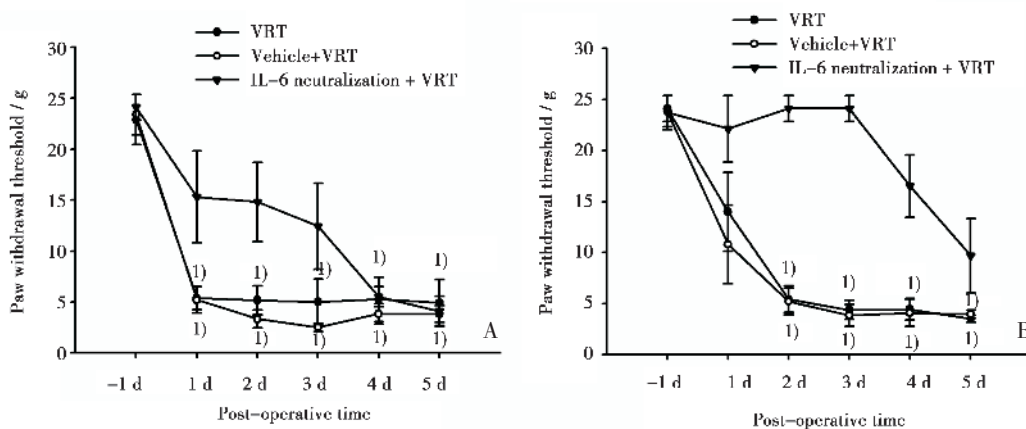


图 3 鞘内注射 IL-6 中和抗体对 L5-VRT 所致双侧机械性痛过敏的影响

Fig.3 Intrathecal administration with anti-IL-6 antibody attenuates the mechanical allodynia produced by L5 ventral root transection (L5-VRT)

A: Ipsilateral ($n = 6/\text{group}$); B: Contralateral ($n = 6/\text{group}$). 1) $P < 0.05$ versus post-operative day -1.

2.3 IL-6 中和抗体对 L5-VRT 所致神经病理性疼痛的影响

如图 3A 和 B 所示, L5-VRT 引起大鼠双侧后肢 50% 撤足阈值显著下降 ($P < 0.05$), 表现出机械性痛过敏, 持续时间长达 5 周。于 L5-VRT 术前 30 min、术后 1 d、2 d 鞘内注射 IL-6 中和抗体 ($0.002 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, $10 \mu\text{L}$) 连续 3 次给药可显著缓解由损伤运动神经引起的大鼠双侧后肢机械性痛过敏的形成, 抑制效应可维持至给药结束后的 2 ~ 3 d, 术前给予等量 IL-6 中和抗体的溶剂对 L5-VRT 诱导的机械性痛过敏无显著影响。

3 讨论

近年来, 未损伤的感觉传入在病理性疼痛产生中的作用受到越来越多的关注。在没有损伤感觉传入的情况下, 由 L5-VRT 引起的运动神经损伤可显著诱导大鼠双侧机械性和热痛过敏出现^[2]。腓肠神经是坐骨神经的一个分支, 以支配皮肤的感觉传入为主。临床数据表明, 大多数神经移植患者在切断腓肠神经后并没有出现术后供区疼痛的现象。同样, 切断腓肠神经的大鼠也没有表现出神经病理性疼痛的症状, 但是切断即支配皮肤又支配肌肉的腓肠肌-比目鱼肌神经或胫神经可引起长时程的机械性和热痛过敏^[5]。以上研究说明损伤运动神经引起的邻近未受损 DRG 上某些分子的改变可能在病理性疼痛形成中更为重要, 越来越

多的研究发现神经炎症反应在慢性疼痛中发挥了重要作用。细胞因子是神经炎症级联反应中的主要参与者, 其中促炎细胞因子的作用备受关注, $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-6 为主要的促炎因子, 两者均在神经损伤后迅速释放并可提高中枢神经系统的敏感性。

我们近期研究已经发现大鼠 L5-VRT 后 DRG 上 $\text{TNF-}\alpha$ 的上调可以通过引起电压门控钠通道 Nav1.3 和 Nav1.8 的异常表达参与痛过敏的形成^[6]。继发于外周神经损伤的免疫反应可能在邻近未损伤神经元产生异位放电中发挥调控作用, 研究发现 $\text{TNF-}\alpha$ 是神经损伤后最先表达的炎症因子^[3], 它可启动其他细胞因子和炎症因子的级联反应, 已有文献报道 $\text{TNF-}\alpha$ 能够诱导 IL-6 的分泌^[4]。IL-6 作为一种具有多种生物学功能的细胞因子, 主要参与机体细胞免疫、炎症反应及造血调控等, 目前认为 IL-6 是一种与中枢神经系统创伤、缺血相关的重要炎症反应分子。神经损伤、恶性肿瘤、烧伤、自身免疫性疾病和慢性炎症等病人或动物模型的血清中, IL-6 的水平均显著升高^[7-8]。足底、侧脑室或鞘内注射外源性 IL-6 可诱导出大鼠的痛觉过敏症状^[9-10]。相反, IL-6 基因敲除的大鼠, 由周围神经损伤诱导的痛觉过敏症状减轻^[11]; 鞘内给予 IL-6 的中和抗体也可显著抑制 L5 脊神经结扎诱导的痛觉过敏^[12]。以上研究结果表明, IL-6 确实参与了神经病理性疼痛的形成, 但机制尚不十分明了。

目前关于 IL-6 调控神经病理性疼痛的研究都是基于传入神经损伤的动物模型展开的, IL-6 是否参与运动神经损伤所致的机械痛敏目前尚未明确。坐骨神经损伤后 TNF- α 可通过上调 IL-6 参与病理性疼痛的产生, 但尚不清楚未损伤的感觉传入神经元细胞是否存在 IL-6 的异常表达并参与调控神经病理性疼痛形成, 在本研究中, 我们证实 L5-VRT 可引起同侧 L4、L5 背根神经节神经元细胞及双侧脊髓 IL-6 的表达上调, 鞘内注射 IL-6 中和抗体可明显抑制 L5-VRT 所致双侧后爪的机械痛敏反应。本项目研究发现 L5-VRT 还可诱导未受损的 DRG 上 IL-6 表达升高, 至少持续至术后 7 d; 术前 10 min、术后 1 d、2 d 鞘内注射 IL-6 中和抗体连续 3 次给药可显著缓解由损伤运动神经引起的大鼠双侧后肢机械性痛过敏的形成, 抑制效应可维持至给药结束后的 2 ~ 3 d, L5-VRT 后 DRG 上 TNF- α 的持续高表达可能是 IL-6 上调的原因, 停止给予 IL-6 中和抗体后, 我们推测 L5-VRT 后 DRG 上 TNF- α 的持续高表达可能是 IL-6 上调的原因, 停止给予 IL-6 中和抗体后, TNF- α 促使 IL-6 再次上调诱发痛过敏的产生。因此, 有效抑制 IL-6 的表达可能成为临床治疗神经病理性疼痛的新靶点。

参考文献:

- [1] Michaelis M, Liu X, Janig W. Axotomized and intact muscle afferents but no skin afferents develop ongoing discharges of dorsal root ganglion origin after peripheral nerve lesion[J]. *J Neurosci*, 2000, 20(7): 2742-2748.
- [2] Xu JT, Xin WJ, Zang Y, et al. The role of tumor necrosis factor- α in the neuropathic pain induced by Lumbar 5 ventral root transection in rat[J]. *Pain*, 2006, 123(3): 306-321.
- [3] Whitehead KJ, Smith CG, Delaney SA, et al. Dynamic regulation of spinal pro-inflammatory cytokine release in the rat in vivo following peripheral nerve injury [J]. *Brain Behav Immun*, 2010, 24(4): 569-576.
- [4] Yamaguchi S, Tanabe K, Takai S, et al. Involvement of Rho-kinase in tumor necrosis factor- α -induced interleukin-6 release from C6 glioma cells [J]. *Neurochem Int*, 2009, 55(6): 438-445.
- [5] Zhou LJ, Ren WJ, Zhong Y, et al. Limited BDNF contributes to the failure of injury to skin afferents to produce a neuropathic pain condition[J]. *Pain*, 2010, 148(1): 148-157.
- [6] 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.
- [7] Kawasaki Y, Zhang L, Cheng J K, et al. Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord[J]. *J Neurosci*, 2008, 28(20): 5189-5194.
- [8] Lee KM, Jeon SM, Cho HJ. Tumor necrosis factor receptor 1 induces interleukin-6 upregulation through NF- κ B in a rat neuropathic pain model [J]. *Eur J Pain*, 2009, 13(8): 794-806.
- [9] Vissers KC, De Jongh RF, Hoffmann VL, et al. Exogenous interleukin-6 increases cold allodynia in rats with a mononeuropathy[J]. *Cytokine*, 2005, 30(4): 154-159.
- [10] Anderson LC, Rao RD. Interleukin-6 and nerve growth factor levels in peripheral nerve and brainstem after trigeminal nerve injury in the rat [J]. *Arch Oral Biol*, 2001, 46(7): 633-640.
- [11] Ramer MS, Murphy PG, Richardson PM, et al. Spinal nerve lesion-induced mechanoallodynia and adrenergic sprouting in sensory ganglia are attenuated in interleukin-6 knockout mice[J]. *Pain*, 1998, 78(2): 115-121.
- [12] Arruda JL, Sweitzer S, Rutkowski MD, et al. Intrathecal anti-IL-6 antibody and IgG attenuates peripheral nerve injury-induced mechanical allodynia in the rat: possible immune modulation in neuropathic pain [J]. *Brain Res*, 2000, 879(1-2): 216-225.

(编辑 孙慧兰)