

脊髓肿瘤坏死因子 α 的上调参与人类免疫缺陷病毒 相关病理性疼痛

白晓晖¹, 邝妙欢², 欧阳汉栋³, 曹铭辉^{1*}

(中山大学 1. 孙逸仙纪念医院麻醉科, 广东广州 510120; 2. 肿瘤防治中心//华南肿瘤学国家重点实验室 检验科,
3. 肿瘤防治中心//华南肿瘤学国家重点实验室 麻醉科, 广东广州 510060)

摘要:【目的】肿瘤坏死因子 α (TNF α) 是脊髓内重要的神经递质, 在慢性疼痛的发生发展过程中起着重要的作用, 本研究探讨脊髓内 TNF α 与人类免疫缺陷病毒 (HIV) 相关性病理性疼痛的关系及其可能的作用机制。【方法】大鼠左侧坐骨神经包裹 HIV 糖蛋白 gp120 建立 HIV 病理性疼痛模型, 采用行为学方法测定大鼠的异常疼痛域值; 大鼠建立疼痛模型 2 周后, 采用 Western-blot 测定脊髓背角区域 TNF α 浓度; 通过蛛网膜下腔导管注射水溶性 TNF α 受体和胶质细胞炎性因子抑制剂己酮可可碱进行干预处理, 用行为学评估其作用。【结果】大鼠左侧坐骨神经包裹 gp120 后形成神经病理性疼痛模型, 术后 3 d 大鼠左侧开始出现明显的异常疼痛现象, 14 d 左右异常疼痛达到峰值, 持续时间大于 1 个月。大鼠建立疼痛模型后 2 周, Western-blot 结果显示手术侧脊髓背角 TNF α 水平表达明显上调; 鞘内注射水溶性 TNF α 受体或胶质细胞炎性因子抑制剂己酮可可碱明显减轻异常疼痛的程度。【结论】HIV 相关性病理性疼痛发病过程中脊髓水平 TNF α 释放增加, 阻断 TNF α 的作用能够明显抑制疼痛, 提示 TNF α 可能参与 HIV 相关性病理性疼痛的发病机制, 其具体作用机制需要进一步研究。

关键词: 神经病理性疼痛; HIV 相关性疼痛; TNF- α ; gp120

中图分类号: R338

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2011)04-0458-05

Up-regulation of Spinal TNF α Is Involved in HIV-related Pathological Pain

BAI Xiao-hui¹, KUANG Miao-huan², OU-YANG Han-dong³, CAO Ming-hui^{1*}

(1. Department of Anesthesiology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China; 2. Department of Anesthesiology, 3. Department of Laboratory Medicine, State Key laboratory of Oncology on Southern China//Cancer Center of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objective】Tumor necrosis factor alpha (TNF α) is very important in spinal cord regulating the pain transmission process, especially the chronic pain. This study was designed to investigate the role of spinal cord TNF α on regulating the HIV-related pain. 【Methods】Male Sprague-Dawley rats were used for gp120 neuropathic pain model and intrathecal catheter were set up under anesthesia. Mechanical allodynia was determined by assessing paw withdrawal to Von Frey hairs of graded tensile strength. After gp120 neuropathic pain model was set up for two weeks, we detected the TNF α protein level on spinal cord by Western blot analysis. Intrathecal injection of soluble TNF α receptor and pentoxifylline, a non-specific glial cytokine inhibitor were used to determine the mechanism of TNF α in spinal cord. 【Results】Peripheral gp120 application into the rat sciatic nerve induced mechanical allodynia for more than 1 month. Peripheral gp120 upregulated the expression of TNF α in the protein level in spinal cord. Intrathecal administration of soluble TNF α receptor or glia inhibitor pentoxifylline reduced gp120 induced mechanical allodynia. 【Conclusion】Our results indicate that peripheral gp120 application induces TNF α release in spinal cord. Blockade of TNF α reverses neuropathic pain induced by HIV gp120.

Key words: neuropathic pain; HIV-related pain; TNF α ; gp120

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(4): 458-462]

收稿日期: 2011-05-13

基金项目: 国家自然科学基金(30972849); 广东省科技计划项目(2009B030801161)

作者简介: 白晓晖 硕士, 住院医师, E-mail: baixiaohuineu@163.com; * 通信作者: 曹铭辉, 副主任医师, E-mail: caofox5188@126.com

人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 相关性神经病理性疼痛的发病率越来越高, 大概 30% HIV 的患者具有不同程度的疼痛现象, 这种疼痛非常顽固, 治疗效果很有限^[1]。HIV 相关性神经病理性疼痛发病机制不明确, 目前认为炎性因子的过量分泌在神经病理性疼痛中起着重要的作用, 肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor α , TNF α) 是最重要的炎性因子^[2], HIV 的感染增加 TNF α 和 IL-1 等炎性因子的产生, 大部分艾滋病 (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) 患者脑脊液中 TNF α 含量也会增加, HIV 病毒感染的细胞 TNF α 的表达也上调。目前未见 HIV 相关性病理性疼痛与 TNF α 作用关系的研究。本研究采用大鼠坐骨神经包裹 HIV 膜糖蛋白 gp120 的方法^[3], 建立神经病理性疼痛的模型, 通过测定脊髓背角 TNF α 浓度, 并采用注射外源性 TNF α 、TNF α 受体和胶质细胞炎性因子抑制剂己酮可可碱的方法, 探讨 TNF α 在 HIV 相关病理性疼痛中的作用。

1 材料和方法

1.1 动物资料

雄性 SD 大鼠, 体质量 225 ~ 250 g, 实验期间大鼠在标准条件下 (每 12 h 明/暗循环, 室温 21 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C), 自由摄取水和食物, 随机分组, 按照 gp120 模型的不同分为大剂量 gp120 组 (400 ng) 和小剂量 gp120 组 (50 ng), 对大剂量组进行脊髓背角 TNF α 浓度的检测和鞘内注射 TNF α 受体或胶质细胞炎性因子抑制剂己酮可可碱的研究, 每组大鼠 5 ~ 7 只。

1.2 实验方法

1.2.1 gp120 模型 异氟醚吸入麻醉下, 切开大鼠左侧大腿皮肤, 暴露坐骨神经, 400 ng gp120 (大剂量 gp120 组) Immunodiagnosics, Bedford, MA.) 或 50 ng gp120 (小剂量 gp120 组) 分别溶于 250 μ L 0.1% 鼠血清白蛋白, 实验组采用 2 mm \times 6 mm 可吸收性止血纱浸于 gp120 溶液中, 对照组将止血纱浸于不含 gp120 的鼠血清白蛋白溶液中, 并将止血纱包绕于坐骨神经, 术后不得引起任何神经功能障碍, 有运动功能障碍的大鼠剔除该实验中。

1.2.2 蛛网膜下腔置管 按照 Ouyang^[4] 描述的方法, 大鼠异氟醚吸入麻醉下, 在枕骨大孔上方暴露寰枕膜, 用针尖挑破寰枕膜后将充满 9 g/L 的

NaCl 的 PE-10 导管向尾段置入 8.0 ~ 8.5 cm, 至脊髓腰骶段。大鼠清醒后用 2% 利多卡因 (10 μ L) 注入 PE 管来判断导管位置 (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), 每次注药后均用 10 μ L 9 g/L 的 NaCl 冲洗 PE 管。大鼠苏醒后 24 h 观察其活动情况, 剔除出现运动功能障碍的大鼠。术后大使用抗生素, 自然照明, 自由饮水和摄食。

1.2.3 机械异常疼痛阈值测定 采用经典的“Up-down”法检测大鼠的机械性撤足阈值^[5]。

1.2.4 Western-blot 大鼠麻醉后, 取出大鼠左侧脊髓背角部分, 均浆裂解离心后测定浓度, 取 30 g 蛋白 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 10% SDS-PAGE 胶分离, 转 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭, 室温下 1 抗孵育 1 h, 兔源多抗 TNF α (1:500, Chemicon, Temecula, CA), 鼠源单抗 β -actin (1:8 000)。结合相应的二抗, 采用化学发光法定量测定蛋白浓度, 并与内参 β -actin 比较。

1.2.5 鞘内给药 大鼠蛛网膜下腔置管后 1 周, 建立鞘内 gp120 疼痛模型后, 大剂量 gp120 组鞘内注射水溶性 TNF α 受体或胶质细胞炎性因子抑制剂己酮可可碱 (200 μ g/次, 8:00 AM, 6:00 PM 各 1 次, 共 4 次), 采用行为学评估给药前后的行为学改变。

1.3 统计学分析方法

数据采用均数 \pm 标准误 ($\bar{x} \pm s_x$) 来表示, Western-blot 比较采用 *t* 检验, 组间行为学测试的比较采用重复测量资料的方差分析。P < 0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学测试

21 只大鼠随机分成 3 组, 行为学检测结果显示, 大鼠的基础机械疼痛阈值为 (14 \pm 1.5) g, 实验组大鼠在坐骨神经包裹 gp120 400 ng, 3 d 后, 机械疼痛阈值开始下降, 在术后 2 周达到最低, 约 (2.1 \pm 1.7) g, 持续时间大于 4 周。大鼠在坐骨神经包裹 gp120 50 ng, 3 d 后, 机械疼痛阈值开始下降, 在术后 10 d 达到最低, 约 (4.3 \pm 1.1) g, 持续时间大于 4 周。对照组只包裹大鼠白蛋白, 大鼠的机械疼痛阈值没有明显的改变, 组间对比, P < 0.01 (图 1)。

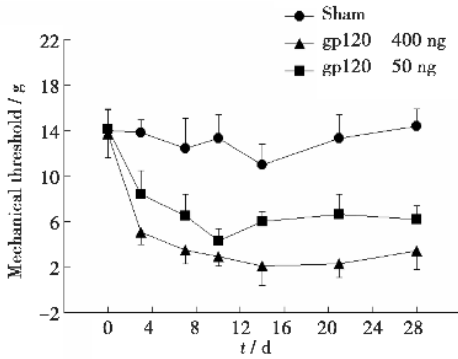


图 1 gp120(400 ng, 50 ng) 时间-疼痛曲线

Fig.1 The time course of the mechanical threshold in the model of peripheral gp120 400 ng and 50 ng

Rats exposed to perineural gp120 developed a persistent, mechanical allodynia of the ipsilateral hind paw compared to the sham group. gp120 400 ng vs sham $F = 20.126, P < 0.01, n = 6 \sim 7$; Gp120 50 ng vs sham, $F = 12.631, P < 0.01, n = 6 \sim 7$

2.2 TNF α 浓度

大剂量 gp120 组引起的异常疼痛峰值出现在术后 2 周, 选择术后 2 周这个时间点测试脊髓背角 TNF α 的浓度, Western-blot 结果显示, 实验组 TNF α 浓度的表达在蛋白水平明显高于对照组的表达, 组间比较统计有统计学意义 ($P < 0.05$; 图 2)。

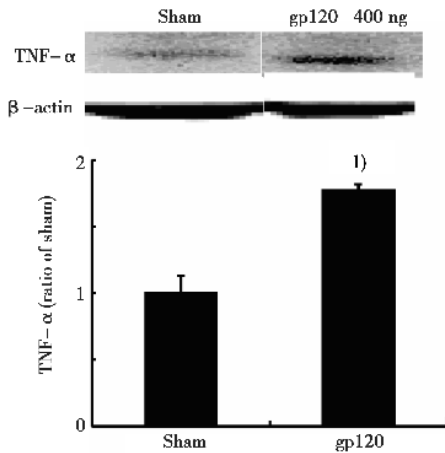


图 2 大剂量 gp120 组手术后 2 周手术侧 L3-5 脊髓背角 TNF α 表达的 Western blot 结果

Fig.2 Expression of TNF α by Western blot two weeks after gp120 400 ng application of left L3/5 spinal dorsal horns

Perineural gp120 400 ng application significantly induced the up-regulation of TNF α level in the spinal cord level. 1) $P < 0.05$ vs sham, t test, $n = 5$

2.3 鞘内药物干预结果

大剂量 gp120 组, 鞘内连续注射非选择性胶

质细胞炎性因子抑制剂己酮可可碱 (200 μ g/次, 8:00AM, 6:00 PM 各 1 次, 共 4 次) 或水溶性 TNF α 受体, 注射后大鼠机械异常疼痛阈值明显升高, 结果显示跟对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$; 图 3, 4)。

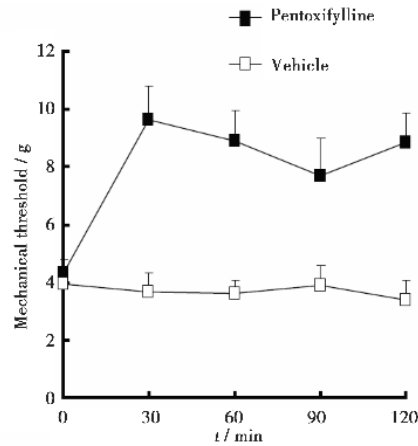


图 3 大剂量应用 gp120 后鞘内注射己酮可可碱的疼痛阈值

Fig.3 The antinociceptive effects of glial inhibitor pentoxifylline in rats treated with gp120

At 2 weeks after gp120 400 ng, intrathecal administration of pentoxifylline (four times injection, 200 μ g each time) significantly reversed the allodynia in the model, $F = 14.515, P < 0.01, n = 5$

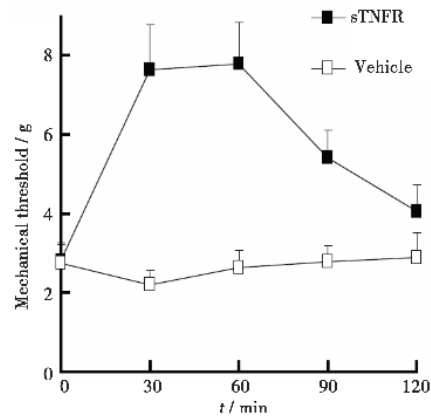


图 4 大剂量应用 gp120 后鞘内注射水溶性 TNF α 受体的疼痛阈值

Fig.4 The antinociceptive effects of recombinant soluble TNF α receptor in rats treated with gp120 400 ng

At 2 weeks after gp120, rats received intrathecal injection of recombinant soluble TNF α receptor or vehicle. Administration of recombinant soluble TNF α receptor, but not vehicle reversed the mechanical threshold, $F = 13.515, P < 0.01, n = 6 \sim 7$ (sTNFR, soluble TNF receptor)

3 讨论

神经病理性疼痛由于神经结构的破坏或改变而引起的,HIV病毒通过表面的糖蛋白gp120(一种病毒包膜糖蛋白)与CD4细胞表面的糖蛋白受体结合进入细胞内。在外周神经系统,gp120亚单位能直接侵入周围神经和背根神经节(DRG),引起神经变性,影响神经元的活性和存活。Wallace等^[6]将坐骨神经暴露于含有HIV gp120的血清中,发现受累神经出现可逆性机械痛觉敏感现象。本研究结果显示,大鼠坐骨神经局部使用gp120,刺激坐骨神经引起大鼠明显的机械性痛觉过敏现象,gp120的用量越大,痛觉过敏越明显,持续时间超过1个月。

外周直接注射gp120产生的痛觉过敏,跟直接刺激传入神经元有关^[7]。近年来发现神经的损伤可激活胶质细胞使其合成分泌炎症因子,参与病理性疼痛的发生与维持,在众多的炎症因子中,TNF α 起着核心作用,外周神经损伤后,脊髓胶质细胞来源的TNF α 释放增加^[8-9]。大部分AIDS患者脑脊液中TNF α 和IL-1含量也会增加,且两者出现协同作用^[10]。临床上TNF α 增高预示着HIV病人病情的加重,提示TNF α 与HIV感染预后的关系密切,因此抑制TNF α 的表达有重要的临床意义。动物行为学研究指出,肌肉、皮下、鞘内注射TNF α 可引起痛觉过敏,而阻断TNF α 受体可减轻神经病理性疼痛。外周神经损伤可能通过DRG内TNF α 的上调,促发Nav1.3异常表达,引起初级感觉传入神经元异常兴奋,导致病理性疼痛的持续存在^[11]。体外实验结果表明,gp120阳性神经元能够诱导细胞因子IL-1和TNF α 的表达^[7]。大鼠鞘内注射HIV病毒,可诱导出明显的疼痛过敏现象,HIV病毒可引起中枢神经元凋亡^[12]。大鼠脊神经结扎(SNL)模型中,鞘内注射水溶性TNF α 受体,能够减轻异常疼痛的程度^[13],抑制胶质细胞活性^[14]和细胞因子^[8-9]能够减轻疼痛的程度。

本研究结果也表明,采用400 ng或50 ng的gp120包裹坐骨神经,都引起了大鼠的异常疼痛现象,其异常疼痛的阈值随着剂量的增加而减低。本研究Western-blot结果显示,gp120引起脊髓背角TNF α 在蛋白水平的增加,采用外源性TNF α 受体结合TNF α 能够拮抗其作用,使用胶质细胞炎性

因子抑制剂己酮可可碱能够减轻gp120的痛觉过敏现象,提示脊髓内TNF α 的上调参与HIV相关性病理性疼痛的发病。己酮可可碱是黄嘌呤代谢产物,有扩张脑和周围血管的作用,可以改善脑和四肢的血液循环。近期研究发现,它还有抑制中枢胶质细胞激活和抑制TNF α 产生的作用,而产生抗神经病理性疼痛和减少吗啡的耐药性的作用^[15]。本研究者在试验过程中发现鞘内单次注射己酮可可碱200 μ g没有产生明显的抗神经病理性疼痛的作用,而每天早晚给药两次,每次200 μ g,连续4次鞘内注射己酮可可碱后即产生明显的抗异常疼痛作用(图4),这可能与其药物的半衰期和仅抑制TNF α 再合成需要一段时间有关。本研究的不足之处是没有深入研究gp120相关性TNF α 的释放来源和细胞内外的作用机制,有待进一步的探讨。

综上所述:HIV相关性病理疼痛可能与脊髓内TNF α 的产生有关,抑制脊髓TNF α 的产生或拮抗TNF α 的作用能够抑制疼痛的程度,本研究能为将来HIV相关性疼痛的治疗和药物开发提供理论依据。

参考文献:

- [1] Simpson DM, Kitch D, Evans SR, et al. HIV neuropathy natural history cohort study: assessment measures and risk factors [J]. *Neurology*, 2006, 66(11): 1679-1687.
- [2] Schafers M, Geis C, Svensson CI, et al. Selective increase of tumour necrosis factor- α in injured and spared myelinated primary afferents after chronic constrictive injury of rat sciatic nerve [J]. *Eur J Neurosci*, 2003, 17(4): 791-804.
- [3] Wallace VC, Blackbeard J, Segerdahl AR, et al. Characterization of rodent models of HIV-gp120 and anti-retroviral-associated neuropathic pain [J]. *Brain*, 2007, 130(Pt 10): 2688-2702.
- [4] Ouyang H, Li Q, Zeng W, et al. Mechanisms of antinociceptive effects of ouabain in combination with neostigmine in the rat [J]. *Neural Regener Res*, 2008, 3(7): 701-703.
- [5] 陈祥楠, 刑蔚, 曾维安, 等. 鞘内阿米洛利及混合可乐定治疗神经病理性疼痛的研究 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2008, 29(3): 274-277.
- [6] Wallace VC, Blackbeard J, Pheby T, et al. Pharmacological, behavioural and mechanistic analysis

- of HIV-1 gp120 induced painful neuropathy [J]. *Pain*, 2007, 133(1-3): 47-63.
- [7] Oh SB, Tran PB, Gillard SE, et al. Chemokines and glycoprotein120 produce pain hypersensitivity by directly exciting primary nociceptive neurons [J]. *J Neurosci*, 2001, 21(14): 5027-5035.
- [8] Schafers M, Svensson CI, Sommer C, et al. 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(7): 2517-2521.
- [9] Sweitzer S, Martin D, DeLeo JA. Intrathecal interleukin-1 receptor antagonist in combination with soluble tumor necrosis factor receptor exhibits an anti-allodynic action in a rat model of neuropathic pain [J]. *Neuroscience*, 2001, 103(2): 529-539.
- [10] Ilyin SE, Plata-Salaman CR. HIV-1 envelope glycoprotein 120 regulates brain IL-1beta system and TNF-alpha mRNAs in vivo [J]. *Brain Res Bull*, 1997, 44(1): 67-73.
- [11] 臧颖, 何昕华, 庞瑞萍, 等. 肿瘤坏死因子 α 对背根神经节电压门控性钠通道表达的影响 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2010, 31(5): 597-601.
- [12] Corasaniti MT, Nistico R, Costa A, et al. The HIV-1 envelope protein, gp120, causes neuronal apoptosis in the neocortex of the adult rat: a useful experimental model to study neuroaids [J]. *Funct Neurol*, 2001, 16(4 Suppl): 31-38.
- [13] Zou W, Kim BO, Zhou BY, et al. Protection against human immunodeficiency virus type 1 Tat neurotoxicity by Ginkgo biloba extract EGb 761 involving glial fibrillary acidic protein [J]. *Am J Pathol*, 2007, 171(6): 1923-1935.
- [14] Sweitzer SM, Schubert P, DeLeo JA. Propentofylline, a glial modulating agent, exhibits antiallodynic properties in a rat model of neuropathic pain [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 297(3): 1210-1217.
- [15] Mika J, Wawrzczak-Bargiela A, Osikowicz M, et al. Attenuation of morphine tolerance by minocycline and pentoxifylline in naive and neuropathic mice [J]. *Brain Behav Immun*, 2009, 23(1): 75-84.
- (编辑 刘清海)

(上接第 441 页 from page 441)

- serum pigment epithelium-derived factor is associated with microvascular complications, vascular stiffness and inflammation in Type 1 diabetes [J]. *Diabet Med*, 2007, 24(12): 1345-1351.
- [12] Jenkins A, Zhang SX, Gosmanova A, et al. Increased serum pigment epithelium derived factor levels in Type 2 diabetes patients [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2008, 82(1): e5-e7.
- [13] Nakamura K, Yamagishi S, Adachi H, et al. Serum levels of pigment epithelium-derived factor (PEDF) are positively associated with visceral adiposity in Japanese patients with type 2 diabetes [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2009, 25(1): 52-56.
- [14] Sabater M, Moreno-Navarrete JM. Circulating pigment epithelium-derived factor levels are associated with insulin resistance and decrease after weight loss [J]. 2010, 95(10): 4720-4728.
- [15] Crowe S, Wu LE, Economou C, et al. Pigment epithelium-derived factor contributes to insulin resistance in obesity [J]. *Cell Metab*, 2009, 10(1): 40-47.
- [16] Mesotten D, Delhanty PJ, Vanderhoydonc F, et al. Regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 during protracted critical illness [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(12): 5516-5523.
- [17] Schiekofe S, Galasso G, Andrassy M, et al. Glucose control with insulin results in reduction of NF-kappaB-binding activity in mononuclear blood cells of patients with recently manifested type 1 diabetes [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2006, 8(5): 473-482.
- [18] Dandona P, Aljada A, Mohanty P, et al. Insulin inhibits intranuclear nuclear factor kappaB and stimulates IkappaB in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(7): 3257-3265.
- [19] 朱本章, 马卫国, 南佳彦. 胰岛素抗炎作用的研究及应用进展 [J]. *中国实用内科杂志*, 2006, 26(17): 1309-1311.
- [20] Bi Y, Sun WP, Chen X, et al. Effect of early insulin therapy on nuclear factor kappaB and cytokine gene expressions in the liver and skeletal muscle of high-fat diet, streptozotocin-treated diabetic rats [J]. *Acta Diabetol*, 2008, 45(3): 167-178.
- (编辑 孙慧兰)