

髓核致炎性神经痛大鼠背根神经节 ASIC3 表达相关性研究

贺秋兰¹, 魏明¹, 张劲军¹, 孙来保^{1*}, 周利君², 邹学农³

(中山大学 1. 附属第一医院麻醉科, 2. 疼痛研究中心, 3. 附属第一医院脊柱外科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】观察髓核致炎后不同时期大鼠背根神经节(DRG) 3型酸敏感离子通道(ASIC3)的表达,及其与痛敏形成的关系。【方法】将SD大鼠尾部髓核0.4 mg移植于左侧腰5 DRG而建立炎性神经痛动物模型,或术毕DRG周围给予ASIC3抑制剂阿米洛利0.1 mg,用von-Fair细丝检测机械性痛敏阈值,观察DRG的ASIC3阳性细胞数,并检测不同时间点DRG的ASIC3蛋白表达。【结果】髓核移植后大鼠机械痛阈较术前持续降低($P < 0.001$),DRG上ASIC3阳性细胞数增多($P < 0.05$),术后第7天时表达至高峰($P < 0.05$);ASIC阻断剂阿米洛利可抑制模型鼠痛阈降低($P < 0.001$)。【结论】髓核移植使大鼠DRG ASIC3表达增加,抑制ASIC3表达可减轻机械性痛敏,ASIC3上调可能是椎间盘突出致炎性神经痛的重要促进因素。

关键词: 背根神经节; 酸敏感离子通道3(ASIC3); 痛觉过敏; 髓核; 大鼠

中图分类号: R61 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2010)06-0776-06

Expression of Acid-sensing Ion Channel 3 in Dorsal Root Ganglion Cells in Rats with Inflammatory Radicular Pain Following Application of Nucleus Pulposus

HE Qiu-lan¹, WEI Ming¹, ZHANG Jin-jun¹, SUN Lai-bao^{1*}, ZHOU Li-jun², ZOU Xue-nong³

(1. Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital, 2. Pain Research Center of Zhongshan Medical College, 3. Department of Surgery, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To Explore the expression of acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) in dorsal root ganglion (DRG) cells of rats after application of nucleus pulposus, and its impact on mechanical pain threshold. 【Methods】Inflammatory radicular pain of mature male rats was induced by application of nucleus pulposus about 0.4 mg on left lumbar 5 DRG. Mechanical pain threshold was tested with von Fair Hairs at different time points. Expression of ASIC3 protein was analyzed by immunofluorescent detection and Western blotting. 【Results】The mechanical pain threshold was slid down rapidly and persistently following nucleus pulposus autografting ($P < 0.001$), combined with augment of ASIC3 immunoreactive DRG cells ($P < 0.05$). The expression of ASIC3 protein reached peak on postoperative day 7 ($P < 0.05$). The change of mechanical pain threshold and ASIC3 immunoreactive DRG cells were significantly inhibited by amiloride ($P < 0.001$, $P < 0.01$). 【Conclusions】The expression of ASIC3 in DRG was enhanced in rats following application of nucleus pulposus. Inflammatory radicular pain was reduced by inhibitor of ASIC3. The up-regulation of ASIC3 may facilitate the chronic radicular pain induced by disc herniation.

Key words: dorsal root ganglion; acid-sensing ion channel 3; hyperalgesia; nucleus; rats

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(6): 776-780, 785]

椎间盘突出引起的慢性腰腿痛给患者、社会带来沉重负担, 它的发生除来自椎间盘的机械压

迫外, 神经根周围炎症刺激也是重要因素。炎症局部由于慢性的缺血缺氧, 大量酸性代谢产物聚集

收稿日期: 2010-03-08

基金项目: 国家自然科学基金广东联合资助重点项目(u0732001); 广东省自然科学基金(8161008901000194); 中山大学附属第一医院与生命科学院联合基金(162011)

作者简介: 贺秋兰, 硕士研究生, E-mail: evelyn0809@126.com; * 通信作者: 孙来保, 教授, 课题负责人, 研究方向: 急慢性疼痛诊疗, E-mail: sunlaibao88@hotmail.com

可导致神经元外 pH 下降,研究发现这与痛觉传导兴奋性异常有关^[1]。酸敏感离子通道(Acid-sensing ion channels,ASICs)是 pH 变化的主要感受器,其中 ASIC3 的激活电流爆发强度高、维持时间长,更易诱发局部电生理紊乱,且受多种炎性物质如花生四烯酸、一氧化氮、5 羟色胺、白细胞介素-1、缓激肽的调控^[2-3]。目前在多种炎症痛动物模型中已发现 ASIC3 的表达和功能异常^[4-5],但在模拟椎间盘突出症的髓核致炎性神经痛模型中,对于 ASIC3 与痛敏的关系尚缺乏研究证据。本研究旨在观察髓核致炎后不同时间大鼠背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)上 ASIC3 的表达改变,探讨 ASIC3 与神经根炎性疼痛的关系。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级 Sprague-Dawley(SD)成年雄性大鼠 62 只,体质量 240 ~ 280 g,由广东省实验动物中心提供。于 12 h 明/暗循环、室温(23 ± 1)℃、安静环境下单笼饲养,自由饮水摄食。所有动物随机分为空白组(Blank)、假手术组(Sham)、假手术 + 阿米洛利组(Sham + Ami)、假手术 + 生理盐水组(Sham + NS)、髓核组(NP)、髓核 + 阿米洛利组(NP + Ami)、髓核 + 生理盐水组(NP + NS)以及不同时间取材的髓核组(NPx)(表 1)。

表 1 实验动物分组及数量			
Table 1 Group Arrangement of rat			(n)
Group	Rats for IHC	Rats for WB	Eliminated Rats
Blank	4	3	
Sham	3	3	1
Sham + Ami	6		
Sham + NS	6		
NP	6		
NP + Ami	6		
NP + NS	5		1
NP 3		6	
NP 5		5	1
NPx NP 7		6	
NP 14		6	
NP 21		5	1

1.2 模型建立

大鼠在腹腔内注入 100 g/L 水合氯醛麻醉

下,以髂嵴最高点连线为中心做 25 ~ 30 mm 正中纵切口,切除 L₅ 下关节突、L₆ 上关节突和 L₅ 半椎板,暴露左侧 L₅ DRG 及部分脊髓硬膜囊。纵向切开鼠尾根部 15 mm,从 2 个椎间盘内取髓核组织共 0.4 mg,轻轻置于 L₅ DRG 上。Sham 组不放置髓核,余步骤同上。术毕前给 Sham + Ami 组和 NP + Ami 组大鼠的 L₅ DRG 周围滴入含 0.1 mg Amiloride(美国 sigma)的药液 1 mL;Sham + NS 组和 NP + NS 组滴入相同体积的 9 g/L NaCl。术毕以青霉素 30 000 U 术野内肌肉注射,逐层缝合肌肉、筋膜和皮肤。将术后 2 d 内出现下肢运动功能障碍、尾部瘫痪或腹胀的大鼠(共 4 只)从实验中剔除。

1.3 50%机械性撤足阈值(50%Paw withdrawal threshold,50%PWT)测定

术前 1 d 和术后 3、5、7、14、21 d,按“Up-Down”法用 von Frey 纤维测定大鼠左侧后足心的 50%机械性撤足阈值。实验前 3 d,每天将大鼠置于测试的有机玻璃箱内约 10 min,使其适应测试环境。行为学测试时间为每天 10:00 ~ 13:00。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)分别对大鼠后肢左右脚足心部进行机械性刺激,每次刺激持续时间为 6 ~ 8 s。以 2.04 g 刺激强度为初始刺激强度,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。如此反复,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。阈值计算公式:50%(g) threshold = [10(Xf + kδ)]/10 000。

1.4 免疫组织化学

术后 7 d 行为学测定结束后,以 200 g/L 乌拉坦腹腔注射深麻醉大鼠,行升主动脉插管,以预冷的生理盐水 400 mL 快速灌注后,40 g/L 多聚甲醛溶液灌注固定 40 min。在冰面上取大鼠左侧 L4-L6 DRG,依次以 100 g/L、200 g/L 和 300 g/L 蔗糖溶液脱水 3 d。-22℃下以 LEICA CM305DX 冰冻切片机做连续冠状切片,片厚 14 μm。经 TBS 液轻柔漂洗 10 min × 3 次,用 SABC 法行免疫荧光反应:3%羊血清/3 ml/L Triton X-100 液于室温下封闭 1.5 h,兔抗鼠 ASIC3(1:1 000,美国 INVITROGEN)一抗于 4℃反应 48 h,再依次以羊抗兔生物素化二抗(1:200,武汉博士得)和 FITC 三抗(1:200,

武汉博士得)孵育 2 h 和 30 min。从每组大鼠的切片中随机挑选 8 张,依次于荧光倒置显微镜的低倍镜、高倍镜下观察。采用 IBM50 软件采集拍摄图像,Image-Pro (r) Plus 6.0 软件进行 ASIC3 蛋白免疫反应阳性神经元计数,并计算阳性细胞率。

1.5 Western blotting

术后 3、5、7、14 和 21 d 行为学测试结束后,以 200 g/L 乌拉坦腹腔注射深麻醉大鼠,在冰面上迅速取出 L4 ~ L6 段脊柱,纵向剖开取出左侧 3 个 DRG,置于含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液中(50 mmol/L Tris HCl (pH 7.5)/5 mmol/L EDTA/150 mmol/L NaCl/10 mL/L Triton X-100),超声匀浆、水浴、高速离心后取上清。每次电泳前各组样品用 BCA 法测蛋白浓度,随机取一管上样 30 μ g,以 10% SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜后行免疫沉淀反应:将膜与 5%脱脂牛奶反应后,在 4 $^{\circ}$ C 条件下与 ASIC3 一抗(1:1 000, 英国 Abcam)或抗 β -actin (1:5 000, 美国 Sant Cruz)共孵育 48 h,再与二抗(1:5 000, 美国 Sant Cruz)室温下孵育 1 h。将膜与 ECL 试剂反应并压片、显影、定影,用 ImageJ6.0 软件采集胶片条带灰度值。实验重复 3 次,将每次实验中各样品目的蛋白(COX-2)灰度值除各样品的 β -actin 灰度值,得到每个样品 ASIC3 蛋白相对含量,进行组间比较。

1.6 统计学分析

实验结果用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。行免疫组化实验的大鼠,用重复测量设计的方差分析比较术后不同时间点的 50% PWT,差异有统计学意义时行 LSD 两两比较;行 WB 实验的大鼠术前和取材前的 50% PWT 行自身配对 t 检验。ASIC3 阳性细胞数和相对蛋白浓度的组间比较使用 one-way ANOVA 方差分析,两两比较用 LSD 法。分析通过 SPSS 16.0(SPSS Inc, USA)进行,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 行为学检测结果

各组大鼠术前 50% PWT 约在 19 g 左右。Sham 组术后各时间点 50% PWT 较术前差异不明显($P > 0.05$),暴露的 DRG 周围给予 ASIC3 抑制剂阿米洛利(0.1 mg)或生理盐水对 50% PWT 的影响无统计学意义($P > 0.05$)。移植髓核后的 1 ~

2 d,部分大鼠出现术侧后足外翻、足趾背屈,50% PWT 下降约 18 g($P < 0.001$),表明髓核移植使大鼠产生明显的机械性痛觉过敏。注射阿米洛利可使大鼠术后 3 d 至取材前的 50%PWT 较 NP 组升高($P < 0.01$),而生理盐水不影响大鼠 50% PWT 的改变($P > 0.05$,图 1)。术后 7 d 时 NP 大鼠的 50% PWT 降至最低,与 NP3 组、NP5 组比较差异有统计学意义($P < 0.01, P < 0.05$),至术后 21 d 时 50%PWT 仍较术前基础值降低($P < 0.01$,表 2)。

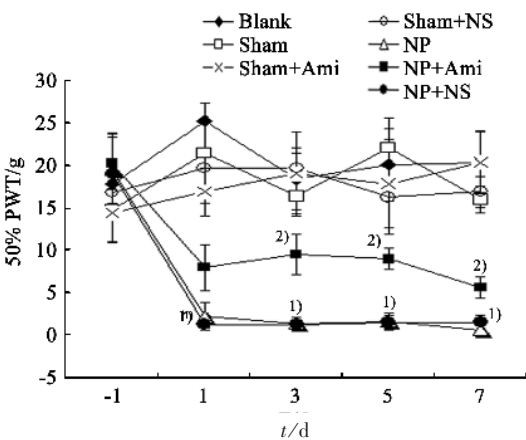


图 1 各组大鼠 50%机械撤足阈值的变化

Fig.1 Mechanical pain thresholds of different groups of rats

1) $P < 0.001$, Group NP on 1 d, 3 d, 5 d 7 d vs. Group Blank on corresponding day; 2) $P < 0.001$, Group Ami on 1 d, 3 d, 5 d vs. Group NP on corresponding day; $\bar{x} \pm s, n = 6$

表 2 术后不同时间点大鼠 50%机械痛敏阈值的变化

Table 2 50% Paw withdrawal threshold of rats at different time points before being sampled ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	Pre-operative 50%PWT/g	Pre-sampled 50%PWT/g	<i>t</i>	<i>P</i>
Blank	17.50 $\pm$ 8.21	22.50 $\pm$ 6.12	1.58	0.18
Sham	25.00 $\pm$ 0.01	21.58 $\pm$ 7.65	1.00	0.37
NP3	17.40 $\pm$ 8.83	5.69 $\pm$ 2.41 ¹⁾	7.11	0.01
NP5	20.33 $\pm$ 8.08	2.00 $\pm$ 0.36 ²⁾	7.08	0.02
NP7	20.90 $\pm$ 8.20	0.67 $\pm$ 0.20	4.85	0.02
NP14	21.25 $\pm$ 7.50	0.95 $\pm$ 1.64	4.23	0.02
NP21	20.00 $\pm$ 8.66	2.50 $\pm$ 1.65	2.94	0.01
<i>F</i>	0.59	22.13		
<i>P</i>	0.74	< 0.001		

LSD- t test after ANOVA: 1) $P < 0.01$, Group NP7 vs. NP3; 2) $P < 0.05$, Group NP7 vs. Group NP5.

2.2 大鼠 DRG ASIC3 阳性细胞的免疫组化结果

Blank 组大鼠 DRG 上有少量细胞呈 ASIC3 阳性反应。髓核致炎后,DRG 上 ASIC3 阳性细胞增多($P < 0.05$),以中小神经元为主,免疫阳性物质集中在胞浆,呈明亮绿色荧光,阴性细胞仅见细胞轮廓(图 2)。致炎后立即给予阿米洛利的大鼠术后 7 d DRG 上 ASIC3 阳性细胞与 Blank 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),表明阿米洛利确实抑制了 ASIC3 的上调。而生理盐水不能抑制致炎后 ASIC3 阳性细胞的增多($P < 0.01$,表 3)。

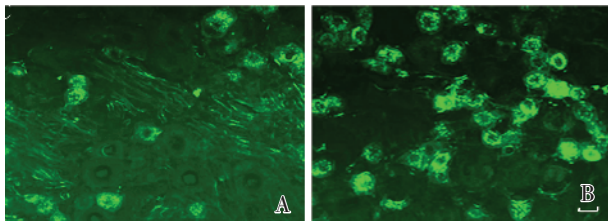


图 2 手术后 7 d ASIC3 阳性反应细胞的免疫荧光结果

Fig.2 Immunofluorescent detection of ASIC3 immunoreactive cells in DRG sampled on postoperative day 7

A: Group Blank; B: Group NP; Scale bar: 40 μm

表 3 大鼠 DRG ASIC3 阳性细胞数的变化

Table 3 Percentages of ASIC3 immunoreactive cells of DRGs in different groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Group	ASIC3 immuno-reactive cells	Percentage/%
Blank	12.88 ± 6.24	28.48 ± 7.69
Sham	17.00 ± 7.73	30.46 ± 4.95
NP	$45.75 \pm 9.82^{1)}$	83.32 ± 6.00
NP + Ami	$18.88 \pm 5.96^{2)}$	33.10 ± 7.65
NP + NS	$51.38 \pm 8.11^{3)}$	83.28 ± 6.60

The number of ASIC3 immunoreactive cells in DRG: 1) $P < 0.05$, Group NP vs. Group Blank; 2) $P < 0.01$, Group Ami vs. Group NP; 3) $P < 0.01$, Group NS vs. Group Ami.

2.3 大鼠 DRG ASIC3 蛋白表达的 Western blotting 结果

NP 组大鼠分别于术后 3、5、7、14 和 21 d 取材,各标本均使用 β -actin 作为内参,在 40 ku 处可见灰度近似的条带。经 ASIC3 蛋白印记反应后,各组标本在 59 ku 水平检测到清晰条带。与 Blank 组和 Sham 组比较,各时间点髓核致炎大鼠 DRG ASIC3 蛋白表达明显上调,并随着致炎时间的延

长,ASIC3 蛋白表达逐渐增加,术后 7 d 时达到高峰,较 5 d 时增加明显($P < 0.01$);随后 14 和 21 d 时的 ASIC3 表达较 7 d 时下降($P < 0.05$),但仍维持于高水平。以 β -actin 蛋白表达浓度为标准,各时间点 ASIC3 蛋白反应条带及相对含量的比较见图 3。

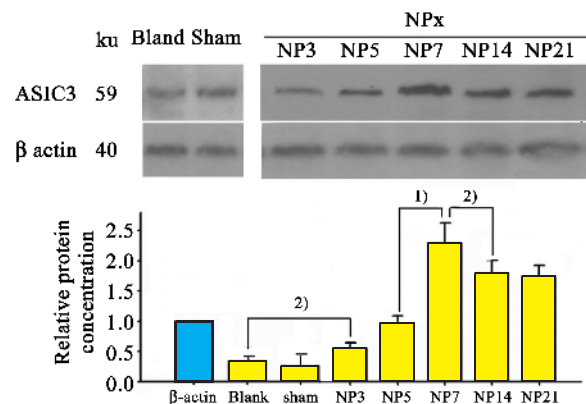


图 3 术后不同时间大鼠 DRG ASIC3 的反应条带和相对蛋白浓度

Fig.3 Expression and relative concentration of ASIC3 protein at postoperative different time points

Each bar expressed as the relative protein concentration to β -actin on the graph represents the $\bar{x} \pm s$. 1) $P < 0.01$; 2) $P < 0.05$

3 讨论

本研究发现将大鼠自体髓核移植至背根神经节后 3 d,相应 DRG 上的 ASIC3 蛋白表达开始增加,7 d 时达到峰值,并维持到术后至少 21 d,此过程伴随大鼠机械性痛阈下降。给予阻断剂阿米洛利可抑制 DRG 上 ASIC3 阳性细胞的增加,同时减轻大鼠髓核移植后的炎性神经痛。

3.1 髓核致炎性痛敏的形成与 ASIC3 上调有关

研究认为,神经受压水肿、炎性介质过度释放、DRG 血供障碍以及局部组织酸化等机制是椎间盘突出导致疼痛的基础^[6],疼痛演变为痛觉过敏则与伤害性感受器兴奋性改变、异常放电密切相关^[7]。炎症区域的 pH 降低能通过机体的酸感受器引起神经元兴奋性改变,如酸敏感离子通道家族 ASICs、开放-整流型 K⁺通道 TASK-1、瞬时感受器电位离子通道蛋白 V 亚组 1 和 G 蛋白偶联受体 OGR1,它们在疼痛的发生发展中起着重要促进作用^[8-9]。

ASIC3 作为酸敏感离子通道家族的重要亚

基,其构成的同/异聚体(四聚体)对胞外 pH 值高度敏感,并可在多种炎症环境中表达上调、活性增加。Ohtori 等^[5]通过将髓核放置于 L5DRG 并钳夹 DRG,发现在化学刺激和机械损伤共同作用下,大鼠 DRG ASIC3 阳性细胞增多;Omori 研究组^[4]使用酸液刺激外周神经复合 L5 脊神经根结扎的大鼠模型,发现结扎处 ASIC3 阳性细胞无变化,而相邻脊神经上其比例明显增加,提示 ASIC3 可能与化学刺激引起的痛敏更为相关。本研究在髓核化学刺激模型的相应 DRG 上也发现 ASIC3 过表达,并以痛敏相关的中型神经元(有髓 A δ 纤维传入神经元)表达为主,而致炎 DRG 周围给予 ASIC3 抑制剂可明显降低大鼠的炎性痛敏,这表明 ASIC3 很可能参与了椎间盘突出后炎性痛敏的产生机制。

3.2 髓核炎症刺激导致 ASIC3 上调

本实验中随着大鼠机械痛阈的迅速降低,ASIC3 并未出现爆发性上调,而是在 1 周左右缓慢达峰并维持高水平,我们推测 ASIC3 的上调可能来自于炎症环境中其他细胞因子或神经递质的介导。动物研究发现髓核组织暴露于神经根周围可引发自身免疫反应,导致神经根炎^[10];在慢性下腰痛患者的椎间盘标本也检测到大量炎症介质,如细胞白介素-1、花生四烯酸、一氧化氮、TNF- α 、5 羟色胺等^[11]。它们可促进 ASIC3 开放,使 ASIC3 样电流增强^[2-3]。ASIC3 表达的异常可能正是源于这些诱发性介质启动的瀑布样炎性反应。此外,ASIC3 的过表达还可能与高浓度的神经生长因子(nerve growth factor,NGF)和神经系统内含 PDZ 结构域的 Lin-7b 蛋白有关^[12]。

3.3 上调的 ASIC3 增加神经元的酸敏感性而促进痛敏

酸性液诱发的 ASIC3 样电流足以诱发神经元的动作电位^[1],而当 ASIC3 过表达,pH 降低就可能使神经元更容易且更持久地兴奋;另一方面,ASIC3 的异位表达和堆积可能使神经元上其他离子通道对 Na⁺、Ca²⁺等阳离子的通透性发生改变,形成异位放电,最终导致痛阈下降,这一机制尚待研究。此外,ASIC3 空间构象的改变可能是引发神经元兴奋性改变的另一因素,如缓激肽(Bradykinin, BK)通过 PKC- ε 通路诱发 ASIC3 构象变化后,可使神经细胞对热刺激和机械刺激产生高敏。

3.4 以 ASIC3 为靶点寻找炎性神经痛治疗药物

近年来,研究者开始关注以 ASIC3 为靶点,寻

找治疗椎间盘源性炎症痛的药物。阿米洛利是 ASICs 抑制剂的代表,能可逆性地抑制伤害性感受器中包括 ASICs ($IC_{50} = 10 \sim 50 \mu\text{mol/L}$)在内的钠通道,在 pH 5.8 ~ 7.4 环境中通过直接阻断 ASICs 而缓解酸化引起的疼痛。然而阿米洛利对 ASIC3 的选择性有限,对稳态电流几乎无抑制作用,这可能是本实验中阿米洛利并不能完全抑制机械痛敏的原因,也削弱了其临床开发价值。2004 年发现的 ASIC3 抑制剂 APETx2 是一种海葵毒素,能特异性的抑制感觉神经元上 ASIC3 的激活,但其提取工艺复杂、价格昂贵。最近 Uchiyama 等^[13]在退化椎间盘的髓核细胞中发现高浓度的转化生长因子 β (Transforming growth factor β , TGF β)可抑制 ASIC3 基因转录和蛋白表达,它可能成为疼痛治疗的一种内源性可利用因子。

综上,本研究表明大鼠 DRG 神经元的 ASIC3 表达上调在髓核致炎后 1 周达到高峰,可能促进了机械性痛觉过敏的产生,为证实 ASIC3 参与椎间盘源性炎症痛敏提供了新的科学依据,为临床上开发新的抗炎镇痛药物、缓解椎间盘突出患者的慢性神经痛提供了新的科学指导。

参考文献:

- [1] Deval E, Noël J, Lay N, et al. ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain [J]. *EMBO J*, 2008, 27(22): 3047-3055.
 - [2] Smith ES, Cadiou H, Naughton PA. Arachidonic acid potentiates acid-sensing ion channels in rat sensory neurons by a direct action [J]. *Neuroscience*, 2007, 145(2): 686-698.
 - [3] Cadiou H, Studer M, Jones NG, et al. Modulation of acid-sensing ion channel activity by nitric oxide [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(48): 13251-13260.
 - [4] Omori M, Yokoyama M, Matsuoka Y, et al. Effects of selective spinal nerve ligation on acetic acid-induced nociceptive responses and ASIC3 immunoreactivity in the rat dorsal root ganglion [J]. *Brain Res*, 2008, 1219: 26-31.
 - [5] Ohtori S, Inoue G, Koshi T, et al. Up-regulation of Acid-sensing ion channel 3 in dorsal root ganglion neurons following application of nucleus pulposus on nerve root in rats [J]. *Spine*, 2006, 31(18): 2048-2052.
 - [6] Nakamura T, Kodama N, Arai Y, et al. Inhibitory
- (下转第 785 页 to page 785)