

# 大鼠脊髓小胶质细胞 p38 MAPK 介导 rrIL-1 $\beta$ 诱导的机械痛敏

魏绪红<sup>1</sup>, 杨涛<sup>2</sup>, 宫庆娟<sup>1</sup>, 信文君<sup>1</sup>, 周丽君<sup>1</sup>, 刘先国<sup>1\*</sup>  
(中山大学 1. 中山医学院生理学教研室//疼痛研究中心, 广东 广州 510089;  
2. 附属第二医院麻醉科, 广东 广州 510120)

**摘要:**【目的】观察大鼠脊髓背角丝裂原活化蛋白激酶家族中的 p38(p38 MAPK)在坐骨神经周围给予重组大鼠白细胞介素-1 $\beta$ (rrIL-1 $\beta$ )引起的病理性疼痛中的作用。【方法】通过检测大鼠 50%机械刺激撤足阈值的变化观察坐骨神经周围给予 rrIL-1 $\beta$  是否引起病理性疼痛, 免疫组织化学观察给予 rrIL-1 $\beta$  后 1,7 d 脊髓背角 p38 及小胶质细胞激活的情况。【结果】0.1 和 1  $\mu$ g/L rrIL-1 $\beta$  可引起大鼠双侧后爪机械刺激痛阈下降, 持续 50 d 左右。此外, 1  $\mu$ g/L rrIL-1 $\beta$  可引起给药同侧腰 5 脊髓背角 p38 MAPK 和小胶质细胞明显激活。磷酸化 p38 MAPK 与小胶质细胞标记物 III 型补体受体(OX-42)呈现明显共存。预先给予 p38 抑制剂可防止 rrIL-1 $\beta$  引起机械痛敏。【结论】大鼠脊髓背角小胶质细胞 p38 MAPK 信号途径的激活介导坐骨神经周围给予 rrIL-1 $\beta$  引起的机械痛敏。

**关键词:** 病理性疼痛; 白介素-1 $\beta$ ; p38; 脊髓; 坐骨神经; 大鼠

**中图分类号:** R338 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2010)03-0327-05

## p38 MAPK in Spinal Microglia Mediates Mechanical Allodynia Induced by rrIL-1 $\beta$

WEI Xu-hong<sup>1</sup>, YANG Tao<sup>2</sup>, GONG Qing-juan<sup>1</sup>, XIN Wen-jun<sup>1</sup>, ZHOU Li-jun<sup>1</sup>, LIU Xian-guo<sup>1\*</sup>  
(1. Department of Physiology//Pain research Center, Zhongshan Medical School, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510089, China; 2. Department of Anesthesiology, The Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

**Abstract:** 【Objective】 To observe the role of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) in pathological pain induced by peri-sciatic administration of recombinant rat IL-1 $\beta$  (rrIL-1 $\beta$ ). 【Methods】 To test whether peri-sciatic administration of rrIL-1 $\beta$  could induce neuropathic pain in rats, we detected the changes of 50% paw withdrawal threshold. By immunohistochemistry, we also observed the activation of p38 and microglia in spinal dorsal horn 1,7 d after administration of rrIL-1 $\beta$ . 【Results】 Peri-sciatic administration of rrIL-1 $\beta$  at the concentrations of 0.1 and 1  $\mu$ g/L induced mechanical allodynia in bilateral hindpaws, lasting for around 50 days. In addition, rrIL-1 $\beta$  at the concentrations of 1  $\mu$ g/L induced p38 and microglia activation in L5 ipsilateral spinal dorsal horn. P-p38 colocalized with microglia marker OX-42. Pretreatment with p38 inhibitor prevented the mechanical allodynia induced by rrIL-1 $\beta$ . 【Conclusion】 P38 MAPK in spinal microglia mediates mechanical allodynia induced by peri-sciatic administration of rrIL-1 $\beta$ .

**Key words:** neuropathic pain; interleukin-1 beta; p38; spinal cord; sciatic nerve; rats

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(3): 327-331]

最近的研究表明致炎细胞因子白细胞介素 1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 在病理性疼痛的产生和维持过程都发挥重要作用。大鼠脚掌皮肤<sup>[1]</sup>、坐骨神经内<sup>[2]</sup>、椎管内<sup>[3]</sup>以及在不同脑区注射 IL-1 $\beta$  都

可引起痛觉过敏。给予内源性的白细胞介素-1 受体拮抗剂 IL-1ra<sup>[4]</sup>或应用抗 IL-1 受体中和抗体可以使实验动物的神经病理性疼痛得到减轻。但在不损伤任何神经的情况下, 微量的外源性 IL-1 $\beta$

收稿日期: 2010-02-01

基金项目: 国家自然科学基金(30570599)

作者简介: 魏绪红, 博士, 讲师; \* 通信作者: 刘先国, 博士生导师, 教授, 研究方向: 痛觉的病理生理, E-mail: liuxg@mail.sysu.edu.cn

能否引起病理性疼痛还不清楚。因此本研究采用 Up-Down 方法,在坐骨神经周围施加不同剂量的外源性 IL-1 $\beta$ ,观察能否产生病理性疼痛。最近越来越多的证据表明,脊髓胶质细胞主要是小胶质细胞和星形胶质细胞在病理性疼痛的产生和维持中起重要作用<sup>[5]</sup>。在多种疼痛模型中均观察到脊髓小胶质细胞和星形胶质细胞的激活。脊髓胶质细胞激活和痛增强反应不是一个简单的共存现象,两者之间存在密切的因果关系。通过干扰脊髓胶质细胞激活可以阻断神经病理性疼痛的产生和发展,进一步说明脊髓胶质细胞激活在神经病理性疼痛的产生和维持阶段起关键作用。目前一般认为小胶质细胞在疼痛的产生阶段起作用,而星形胶质细胞在疼痛的维持阶段起作用。脊髓胶质细胞可能被初级传入末梢兴奋释放的物质(如 P 物质、EAAS、ATP 等)以及传导疼痛的二级神经元释放的物质(如 NO、PGs、fractakine)所激活,脊髓胶质细胞一旦被激活,便能释放多种神经活性物质,包括 TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、ATP、NGF、NO、ROS、PGs 等<sup>[6]</sup>。这些物质反过来可进一步引起初级传入末梢 P 物质及 EAAS(兴奋性氨基酸)的释放增加,导致脊髓水平痛觉信号的放大。致炎细胞因子 TNF $\alpha$  等的释放可进一步激活丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族中的 p38,而 p38 信号通路的激活又导致大量的致炎细胞因子的转录和翻译,由此形成的恶性循环在病理性疼痛的产生和维持中起重要作用<sup>[7]</sup>。本研究在大鼠坐骨神经周围施加 rrIL-1 $\beta$ ,在观察痛觉阈值变化基础上,进一步观察脊髓背角 p38 的激活在病理性疼痛产生中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

实验采用雄性 SD 大鼠,体质量 150 ~ 170 g,清洁级标准,由中山大学动物实验中心提供。动物分笼饲养,自由饮食。室温保持在 20 ~ 25  $^{\circ}\text{C}$ ,湿度 50% ~ 80%,12 ~ 12 h 白天-黑夜循环照明。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。行为学测试的大鼠分为 4 组(每组 5 只大鼠),前 2 组分别给予 0.1 mg/L 和 1  $\mu\text{g/L}$  rrIL-1 $\beta$ ,第 3 组为 1 mL/L BSA 对照组,第 4 组给予 1  $\mu\text{g/L}$  rrIL-1 $\beta$  前鞘内注射 p38 抑制剂

SB203580。免疫组化试验大鼠分为两组:一组给予 1  $\mu\text{g/L}$  rrIL-1 $\beta$  后 1 d 取腰段脊髓进行免疫组化,另外一组给予生理盐水做为对照,每组 6 只。

### 1.2 药物

重组大鼠 IL-1 $\beta$ (rrIL-1 $\beta$ )由 RD 公司提供,给药前用含有体积分数为 0.1%的牛血清白蛋白的生理盐水分别稀释为 0.1、1  $\mu\text{g/L}$ 。

实验大鼠用体积分数为 100 mL/L 的水合氯醛(3.5 mL/kg i.p.)麻醉,经备皮、体积分数 2%碘酒和 75%酒精消毒后,分离左侧坐骨神经,将浸满不同浓度药物或溶剂的快状明胶海绵包裹在上面。

p38 的抑制剂 SB203580 (Sigma),用生理盐水溶解至  $3 \times 10^{-2}$  mmol/L。大鼠消毒,暴露出 L6 棘突,用 1 mL 注射器针头在 L<sub>5</sub>/L<sub>6</sub> 椎间隙刺入蛛网膜下腔,可看到大鼠甩尾,同时左手将 PE-10 管子用眼科弯镊持住沿小口进入,向前 1 cm 即可,此时可看到清亮脑脊液出来,固定好 PE-10 管,缝皮,单笼饲养,等大鼠恢复一段时间后再通过 PE-10 管注入 10  $\mu\text{L}$  SB203580 或溶剂,10 min 后再在坐骨神经周围给予 rrIL-1 $\beta$ 。

### 1.3 50%机械刺激撤足阈值测定

测定 50%机械刺激撤足阈值以判定大鼠是否产生病理性疼痛,该阈值越低表明疼痛越明显。为了消除心理因素对测试结果的影响,在测试前,先将大鼠放置于测试装置内 20 min 以上(注:测试装置为透明有机玻璃箱,箱底由网格为 0.8 cm  $\times$  0.8 cm 的金属网制成,通过网孔用 von Frey hair 可以对大鼠足底部皮肤施加机械性刺激),直至大鼠洗脸、行走、搔抓、直立等活动停止,处于安静状态时开始测试。

测试时 Von Frey Hair 垂直,微弯,在大鼠足心部停留 6 ~ 8 s,此期间或撤离 Hair 的瞬间若出现快速撤足为阳性反应;若在刺激期间大鼠行走,为可疑反应,须待大鼠安静后重新检测。

### 1.4 免疫荧光组织化学染色

给予 rrIL-1 $\beta$  或溶剂后的大鼠,给药后 1 d,乌拉坦(1.5 g/kg, i.p.)深麻醉,首先经主动脉快速灌注 4  $^{\circ}\text{C}$ 肝素化的生理盐水,然后用质量体积浓度为 40 g/L 的多聚甲醛溶液灌注 30 min,解剖动物取出腰 5 脊髓,放入多聚甲醛溶液中后固定 3 h,随后转入 300 g/L 蔗糖溶液中放置 2 d。冰冻切片(LEICA CM1900,德国),切片厚度为 25  $\mu\text{m}$ 。收集的冰冻切片立即用 0.01 mol/L PBS 洗 3 次,每次 5 min,然后室温下封闭 1 h,加入磷酸化 p38(p-

p38)抗体(1:200; cell Signaling, #9211) 4 °C过夜, 吸去一抗,用 0.01 mol/L PBS 洗 3 次,加入标记 Cy3 的驴抗兔二抗(1:200; Jackson ImmunoResearch, 68152), 避光室温下作用 1 h, 再用 0.01 mol/L PBS 洗 3 次,随机挑选切片贴于载玻片上,荧光显微镜(Olympus IX71, Japan)下观察并拍照。

### 1.5 统计学分析

行为学测试结果采用非参数检验进行分析。同一组大鼠不同测试时间点的数据先用 Friedman ANOVA 检验差异,然后再用两组相关数据的秩和检验分析,  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 坐骨神经周围给予 rrIL-1 $\beta$ 引起大鼠双侧后爪机械刺激痛敏

采用包裹明胶海绵以将药物渗透至坐骨神

经的方法,我们发现,与给药前基础值相比,0.1 及 1 ng/L rrIL-1 $\beta$  可引起大鼠双侧后爪机械刺激痛阈下降,即痛觉过敏,显著性差异一直保持至给药后第 50 天( $P < 0.05$ ,  $n = 5$ , 图 1A、B),而 rrIL-1 $\beta$  的溶剂 1 mL/L BSA 对大鼠的 50%机械刺激撤足阈值无显著影响( $P > 0.05$ ,  $n = 5$ , 图 1C)。

### 2.2 坐骨神经周围给予 rrIL-1 $\beta$ 引起脊髓背角小胶质细胞内 p38 激活

与溶剂组(图 2A)相比,坐骨神经周围给予 1  $\mu\text{g/L}$  rrIL-1 $\beta$  后 1、7 d 给药同侧 L5 脊髓背角 p-p38 表达(图 2B、C)显著上调( $P < 0.05$ ,  $n = 6$ ),同时脊髓背角小胶质细胞呈现明显的激活(OX-42 标记,图 2E、F)。免疫荧光双染发现,给予 IL-1 $\beta$  后 1 d p-p38 与 OX-42 呈现明显共存,表明坐骨神经周围给予 IL-1 $\beta$  后小胶质细胞内 p38 会产生显著的激活。

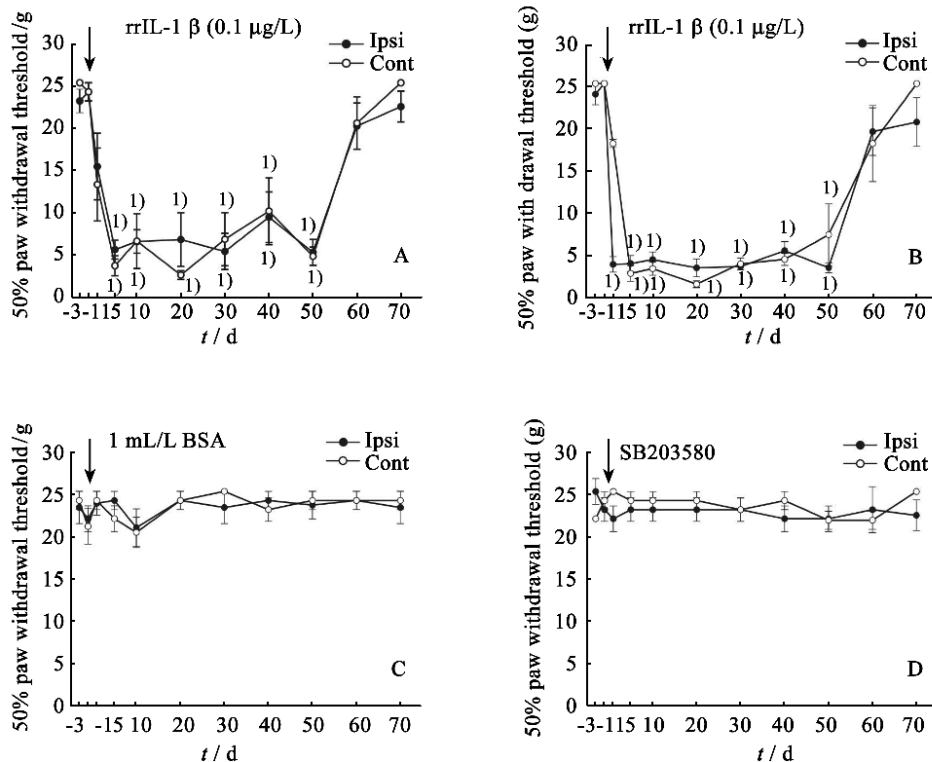


图 1 坐骨神经周围给予 rrIL-1 $\beta$  引起大鼠双侧后爪机械刺激痛觉过敏

Fig.1 rrIL-1 $\beta$  induced mechanical allodynia

rrIL-1 $\beta$  at the concentrations of 0.1 and 1  $\mu\text{g/L}$  induced mechanical allodynia compared with baseline, lasting for around 50 days. A significant decrease in 50% paw withdrawal threshold on the ipsilateral side was detected on day 5 when rrIL-1 $\beta$  at 0.1  $\mu\text{g/L}$  was applied (A) and on day 1 at 1  $\mu\text{g/L}$  (B). In the vehicle (1 mL/L BSA) treatment group, no change in paw withdrawal threshold was detected (C). Intrathecal injection of p38 inhibitor SB203580 started 10 min before IL-1 $\beta$  significantly suppressed the abnormal pain behaviors induced by rrIL-1 $\beta$ (D). Data are presented as means  $\pm$  standard error. 1)  $P < 0.05$ ,  $n = 5$ .

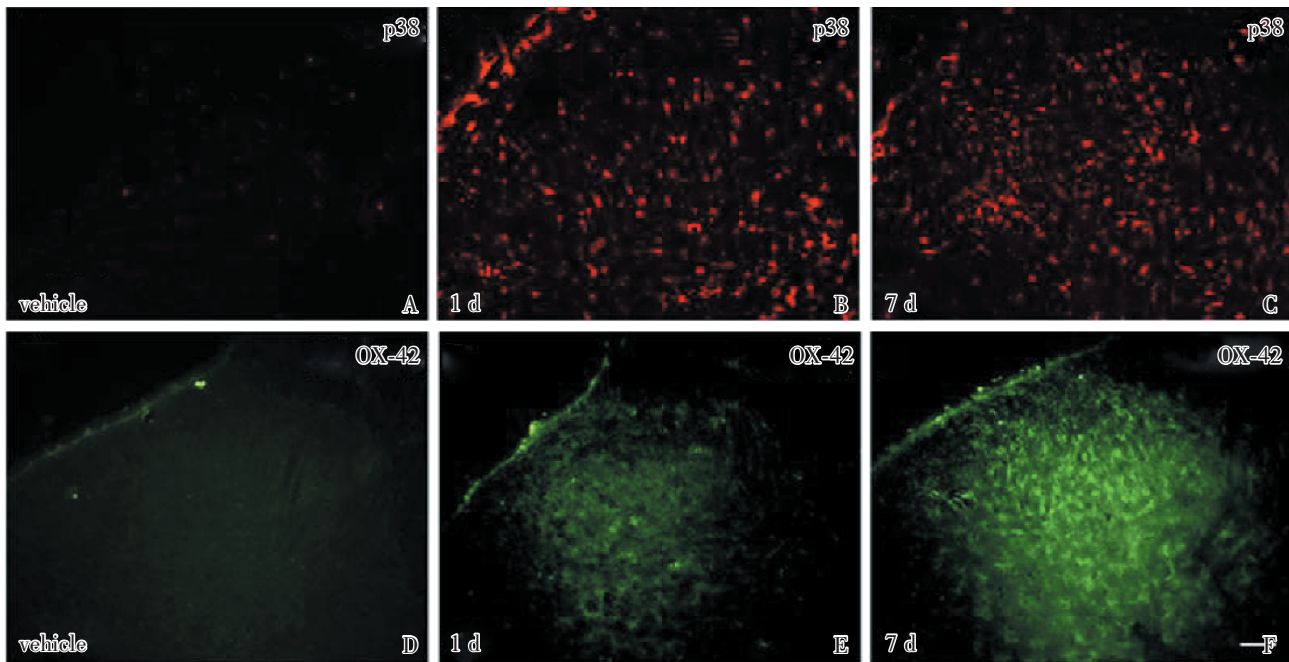


图 2 坐骨神经周围给予 rrIL-1β 引起给药同侧 L5 脊髓背角 p-p38 表达显著上调及小胶质细胞的显著激活

Fig.2 1 μg/L rrIL-1β induced p38 activation in L5 ipsilateral spinal dorsal horn

A, D: Representative experiments show the changes of p38 activation and OX-42 in L5 ipsilateral spinal dorsal horn following peri-sciatic administration of 1 mL/L BSA. B, C, E, F: Representative experiments show the changes of p38 activation and OX-42 in L5 ipsilateral spinal dorsal horn 1, 7 days following peri-sciatic administration of rrIL-1β. (n = 6/group, scale bar = 100 μm)

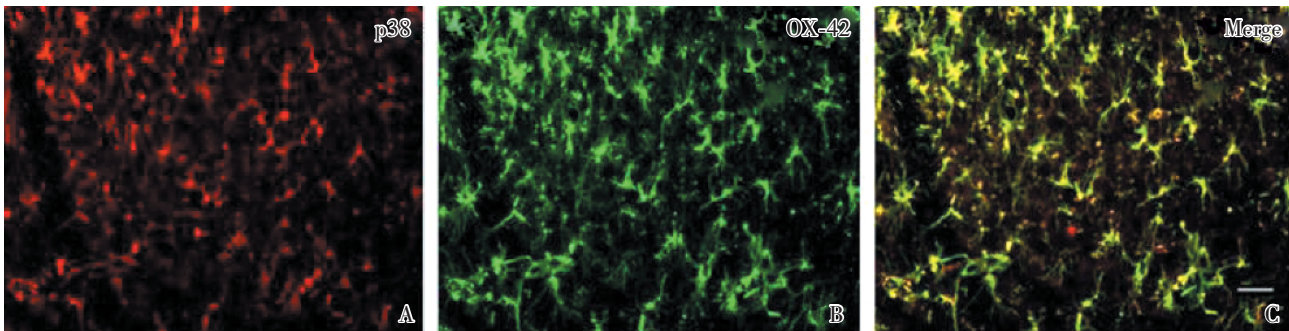


图 3 坐骨神经周围给予 IL-1β 后小胶质细胞内 p38 会产生显著的激活

Fig.3 Double immunofluorescence staining in L5 ipsilateral spinal dorsal horn

p-p38 (A) colocalized with OX-42 (B) 1 day after peri-sciatic administration of rrIL-1β. Scale bar = 50 μm.

### 2.3 预先给予 p38 抑制剂可防止坐骨神经周围给予 rrIL-1β 引起机械痛敏

坐骨神经周围给予 1 μg/L rrIL-1β 前 10 min 鞘内注射 p38 抑制剂 SB203580, 可完全防止大鼠机械痛敏的产生(P > 0.05, n = 5, 图 1D)。

## 3 讨论

IL-1β 属于致炎细胞因子中的一个非常重要的成员, 大量研究表明其在多种疾病包括病理性

疼痛的产生过程中起重要作用。本研究首次观察到微量的重组大鼠白介素-1β 施加到坐骨神经周围即可引起大鼠双侧后爪病理性疼痛, 持续约 50 d。这一实验结果提示即使在没有任何神经损伤的情况下, IL-1β 的增多也可以引起长时间的病理性疼痛。这或许可以解释临床有些病人并没有明显的神经受损伤的病史, 但却出现病理性疼痛。

大量的研究表明丝裂原激活的蛋白激酶家族中的 p38 在神经病理性疼痛的产生和维持中起关键作用。Ji 等<sup>[7]</sup>报道腰 5 脊神经结扎模型引起的

病理性疼痛模型上,脊髓背角 p38 的激活(磷酸化)仅局限于小胶质细胞,而在神经元和星形胶质细胞 p38 不被激活。我们<sup>[8]</sup>在腰 5 前根(运动神经)损伤引起的病理性疼痛模型上也观察到了完全相同的结果。与以上结果类似,本实验发现在不损伤任何神经的情况下,单纯坐骨神经周围给予 rrIL-1 $\beta$  即可引起 p38 在给药同侧腰 5 脊髓背角的激活,而且激活的 p38 与小胶质细胞呈现明显的共染。研究表明 p38 的激活又转录和翻译出导致大量的炎症因子,包括致炎细胞因子(TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  等)、前列腺素(PGE2)、一氧化氮(NO)、神经生长因子(NGF)等,这些炎症因子在病理性疼痛中的产生中起重要作用<sup>[7]</sup>。在实验中我们发现预先给予 p38 抑制剂能有效减轻 IL-1 $\beta$  引起的机械刺激痛觉过敏,进一步提示 p38 的激活在坐骨神经周围施加 IL-1 $\beta$  引起病理性疼痛的起始阶段发挥重要作用。病理性疼痛的产生,外周敏感化是起因,中枢敏感化是关键<sup>[9]</sup>。我们推测 rrIL-1 $\beta$  施加到坐骨神经后,可能通过轴浆运输到脊髓背角,进一步激活脊髓背角小胶质细胞内的 p38,引起中枢敏感化。

IL-1 $\beta$  引起病理性疼痛的机制可能是通过复杂的途径介导的<sup>[10]</sup>。IL-1 $\beta$  能通过作用于感觉神经元上的 IL-1R1 受体进而激活细胞内的 PKC 依赖的信号途径引起痛觉过敏<sup>[11]</sup>。一些实验还发现 IL-1 $\beta$  通过激活上述细胞内信号转导途径可进一步激活 NF- $\kappa$ B 并使其转位进入细胞核,启动基因转录而引起 COX-2、NO、TNF- $\alpha$ 、白介素-6 表达增加<sup>[12]</sup>。但是,也有实验发现大鼠神经周围注射 IL-1 $\beta$  能在 1 min 内引起皮肤的痛觉过敏<sup>[13]</sup>,向离体的皮肤神经直接给予 IL-1 $\beta$  可增强热刺激引起的降钙素基因相关肽的释放<sup>[14]</sup>,由于这一释放的潜伏期很短,而且离体的神经不含神经元胞体,所以 IL-1 $\beta$  的这一作用不是通过基因转录实现的,而是其直接作用。以上机制在坐骨神经周围给予 rrIL-1 $\beta$  引起的病理性疼痛的产生中可能也起一定的作用。

#### 参考文献:

- [1] Ferreira SH, Lorenzetti BB, Bristow AF, et al. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue [J]. *Nature*, 1988, 334(6184): 698-700.
- [2] Zelenka M, Schafers M, Sommer C. Intraneural injection of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain [J]. *Pain*, 2005, 116(3): 257-263.
- [3] Sung CS, Wen ZH, Chang WK, et al. Intrathecal interleukin-1beta administration induces thermal hyperalgesia by activating inducible nitric oxide synthase expression in the rat spinal cord [J]. *Brain Res*, 2004, 1015(1-2): 145-153.
- [4] 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.
- [5] Watkins LR, Milligan ED, Maier SF. Glial activation: a driving force for pathological pain [J]. *Trends Neurosci*, 2001, 24(8): 450-455.
- [6] Campbell JN, Meyer RA. Mechanisms of neuropathic pain [J]. *Neuron*, 2006(1), 52: 77-92.
- [7] Ji RR, Suter MR. p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain [J]. *Mol Pain*, 2007, 3: 33-35.
- [8] Xu JT, Xin WJ, Wei XH, et al. p38 activation in uninjured primary afferent neurons and in spinal microglia contributes to the development of neuropathic pain induced by selective motor fiber injury [J]. *Exp Neurol*, 2007, 204(1): 355-365.
- [9] Scholz J, Woolf CJ. Can we conquer pain? [J]. *Nat Neurosci*, 2002(5 Suppl): 1062-1067.
- [10] Basu A, Krady JK, Levison SW. Interleukin-1: a master regulator of neuroinflammation [J]. *J Neurosci Res*, 2004, 78(2): 151-156.
- [11] Ferreira J, Trichês KM, Medeiros R, et al. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice [J]. *Pain*, 2005, 117(1/2): 171-178.
- [12] Tegeder I, Niederberger E, Schmidt R, et al. Specific inhibition of IkappaB kinase reduces hyperalgesia in inflammatory and neuropathic pain models in rats [J]. *J Neurosci*, 2004, 24(7): 1637-1645.
- [13] Fukuoka H, Kawatani M, Hisamitsu T, et al. Cutaneous hyperalgesia induced by peripheral injection of interleukin-1 beta in the rat [J]. *Brain Res*, 1994, 657(1/2): 133-140.
- [14] Oprea A, Kress M. Involvement of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha, IL-1 beta, and IL-6 but not IL-8 in the development of heat hyperalgesia: effects on heat-evoked calcitonin gene-related peptide release from rat skin [J]. *J Neurosci*, 2000, 20(16): 6289-6293.

(编辑 刘清海)