

## 髓核源性坐骨神经痛大鼠背根神经节磷酸化 p38MAPK 表达的变化

张劲军<sup>1</sup>, 肖颖<sup>1</sup>, 钟觉明<sup>2</sup>, 陈坚伟<sup>1</sup>, 廖威明<sup>3\*</sup>  
(中山大学附属第一医院 1. 麻醉科, 2. 病理科, 3. 骨科, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】观察髓核源性坐骨神经痛大鼠模型中背根神经节磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p-p38MAPK)表达的变化及其与炎性反应和机械痛敏的关系,以探讨腰椎间盘突出症的病理机制。【方法】选择成年 SD 雄性大鼠 66 只随机分为空白组(12 只)、假手术组(18 只)和模型组(36 只)。模型组在左腰 5 神经背根神经节(L5DRG)自体髓核移植以建立大鼠非压迫性腰椎间盘突出模型,假手术组自体肌肉移植。空白组不进行手术。测量各组大鼠术前至术后 21 d 的左后肢 50%机械性撤足阈值(50%PWT)以测定机械痛敏的变化,空白组、假手术组术后 7 d 及模型组术后 7、14、21 d 各 12 只大鼠取左腰 5DRG 用免疫组化法测定环氧合酶-2(COX-2)与 p-p38MAPK 的阳性细胞比率。【结果】假手术组 50%PWT 术后无明显变化,模型组术后 7 d 出现明显的 50%PWT 下降损伤,术后 14 d 达最低值,术后 21 d 部分恢复;空白组、假手术组术后 7 d DRG 的 COX-2 和 p-p38MAPK 微弱表达,模型组术后 7 d DRG 的 COX-2 和 p-p38MAPK 高表达,模型组术后 14 d DRG 的 COX-2 和 p-p38MAPK 表达更高,模型组术后 21 d DRG 的 COX-2 和 p-p38MAPK 表达减弱。【结论】背根神经节的 p-p38MAPK 的表达与非压迫性髓核所致炎性反应和坐骨神经病理性神经痛的变化密切相关。

**关键词:** 髓核; 磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶; 背根神经节; 环氧合酶-2; 坐骨神经痛

**中图分类号:** R6      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1672-3554(2009)06-0652-05

### Expression of Phosphorylated p38MAPK in Sorsal Root Ganglion in Rats with Sciatica Caused by Nucleus Pulposus

ZHANG Jin-jun<sup>1</sup>, XIAO Ying<sup>1</sup>, ZHONG Jue-ming<sup>2</sup>, CHEN Jian-wei<sup>1</sup>, LIAO Wei-ming<sup>3\*</sup>

(1. Department of Anesthesiology, 2. Department of Pathology, 3. Department of Orthopaedics, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 To observe the relationship of the expression of phosphorylated p38 mitogen activated protein kinase (p-p38MAPK) and the inflammatory reaction of dorsal root ganglion as well as sciatica caused by nucleus pulposus in rats. 【Method】 Sixty-six pathogen-free adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups: naive group ( $n=12$ ) and sham group ( $n=18$ ) and model group ( $n=36$ ). Model group received left L5 hemilaminectomy and L5 dorsal root ganglion (DRG) epineuriumetomy as well as caudal vertebrae nucleus pulposus autograft, which establish an improved rat model of non-compressed lumbar intervertebral disc herniation. Sham groups received operation similar to model group except with muscles autograft. Naive group received no operation. 50% paw withdraw threshold (50%PWT) of left hind limb was measured 1 day before the surgery and on the 1<sup>st</sup>, 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> day after surgery in each group by "Up-Down" method to detect the change of the mechanical hyperalgesia. Twelve left L5 dorsal root ganglions were collected from naive group and sham group on the 7<sup>th</sup> day after operation and model group on the 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, and 21<sup>st</sup> day after operation. Then the proportion of Cyclooxygenase-2 (COX-2) and p-p38MAPK positive expression cell were detected by immunohistochemistry method. 【Results】 The 50% PWT showed no change after operation in sham group. The 50% PWT in the model group decreased significantly from the first day to the 21<sup>st</sup> day post-operation, The 50% PWT reached the lowest on the 14<sup>th</sup> day and partially recovered on the 21<sup>st</sup> day. The expression of COX-2 and p-p38MAPK in sham group and naive group were weak. In the 7<sup>th</sup> day, the expression of COX-2 and p-p38MAPK was significantly

收稿日期: 2009-08-05

基金项目: 广东省医学科研基金(B2008034)

作者简介: 张劲军, 博士, 主治医师, E-mail: zhangjingjun1991@163.com; \* 通信作者, 廖威明, 教授, 博士生导师

higher in model group. In the 14<sup>th</sup> day, the expression of COX-2 and p-p38MAPK continuously increased. In the 21<sup>th</sup> day model group, the expression of COX-2 and p-p38MAPK significantly decreased. 【Conclusion】 p-p38MAPK expression in DRG correlated closely with the sciatica and the inflammatory reaction caused by nucleus pulposus.

**Key word:** nucleus pulposus; phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase (p-p38MAPK); dorsal root ganglion (DRG); cyclooxygenase-2(COX-2); sciatica

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(6): 652-756]

非压迫性腰椎间盘突出髓核可引起坐骨神经的炎性损伤并导致病理性神经痛<sup>[1]</sup>, 具体机制尚未完全明了。抗炎治疗是目前髓核源性坐骨神经痛保守治疗的主要方法<sup>[2]</sup>。最近研究表明, p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK) 信号通路的激活(磷酸化)与炎症反应和外周神经损伤引起的病理性神经痛关系密切<sup>[3]</sup>。背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)是感觉传入的第一级换能神经元的集中地位置, 也是腰椎间盘突出髓核容易接触的位置, 与腰椎间盘突出症的坐骨神经痛关系密切<sup>[4]</sup>。目前尚无关于 p38MAPK 信号通路在 DRG 激活与其炎症反应和坐骨神经痛关系的研究, 我们对此进行研究, 以深入了解腰椎间盘突出症的病理机制, 并为寻找髓核源性坐骨神经痛治疗的新靶点提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与分组

选择成年 Sprague-Dawley (SD) 清洁级雄性大鼠 66 只(中山大学动物实验中心提供) 体质量 180 ~ 250 g, 随机分为空白组(12 只)、假手术组(18 只)和模型组(36 只)。动物分笼饲养, 室温保持在(23 ± 2)°C 和 50% ~ 60% 的湿度, 12 h: 12 h 白天-黑夜循环照明。

### 1.2 模型建立

按笔者的方法<sup>[5]</sup>建立改良非压迫性腰椎间盘突出髓核突出模型。同时设假手术组和空白组。模型组: 大鼠术前 1 d 禁食不禁饮。次日 100 mL/L 的水合氯醛(3.0 mL/kg)腹腔注射麻醉。以 L4-L6 棘突为中心取背部正中纵行切口, 显露双侧 L4、L5 椎板, 咬除 L5 棘突、左侧椎板、下关节突和左 L6 上关节突, 暴露左 L5 背根节, 用一号针头将背根节远端束膜仔细挑破一个小口, 然后用锋利的玻璃分针纵行分离背根节的束膜约 2 ~ 3 mm, 注意动作轻柔, 勿挤压损伤背根节, 充分止血后, 生理盐水局部冲洗。在鼠尾显露 2 个椎间盘, 针刺挤压

法取出尾椎间盘髓核, 取固定量(约 5 mg)髓核覆盖在 L5 背根节上, 由于髓核组织是柔软的胶冻样物质, 具有很强的黏性, 无须特别固定。逐层缝合切口。假手术组: 操作同模型组, 但左 L5 背根节只覆盖等量的脊旁肌肉组织, 髓核弃之不用。手术操作严格无菌技术。术后大鼠平卧, 待复苏后, 送动物房单笼喂养。术后 3 d 内, 各组大鼠均肌肉注射青霉素钠 8 万单位, 每天 1 次, 以预防感染。空白组不进行任何手术操作。

### 1.3 行为学测试

参照 up-down 法<sup>[6]</sup>测定大鼠术前 1 d, 术后 1、3、7、10、14、21 d 的左后肢 50% 机械性撤足阈值(paw withdrawal threshold, PWT): 将一有机玻璃箱(22 cm × 12 cm × 22 cm)置于金属筛网上, 待大鼠在有机玻璃箱中适应 15 min 后, 用 von Frey 纤维丝垂直刺激大鼠左后肢足底中部, 持续时间 ≤ 4 s, 大鼠出现抬足或舔足行为视为阳性反应, 否则为阴性反应。术后 50%PWT 较术前明显降低为出现机械痛敏。

### 1.4 环氧化酶-2 的表达

假手术组术后 7 d 及模型组术后 7、14、21 d 和空白组各 6 只, 行为学测试后, 乌拉坦麻醉动物, 经升主动脉多聚甲醛灌注后取出左腰 5DRG 固定后送病理室行作常规石蜡包埋, 石蜡横断切片后各取 5 张横断切片, 用免疫组化 SABC 法检测(浓缩型 SABC 试剂盒, 兔 IgG, 武汉博士德生物工程有限公司) 环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)在 DRG 的表达。随机选切片各 4 张, 在同等光学显微镜条件下拍照。照片于 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件中进行图像处理, 设定阳性细胞光密度基础值, 计算阳性细胞数百分比。

### 1.5 磷酸化丝裂原活化蛋白激酶的测定

各组 6 只同上述时间点同样方法取左腰 5DRG, 30% 蔗糖脱水至 DRG 沉底后行冰冻纵切片, 片厚 16 μm, 收集于含有 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)的 24 孔板内, 按照 Ji 等<sup>[7]</sup>报道的方法操作, 进行免疫荧光组织化学染色: 0.01 mol/L

PBS洗3次,每次5 min;加入驴血清封闭液摇匀1 h;吸去封闭液并加入兔抗-大鼠的抗-磷酸化 p38 抗体(美国,Cell Signaling 公司,#9211,稀释度为1:300);4 ℃过夜后,吸去一抗,用0.01 mol/L PBS洗3次;加入标记 Cy3 的驴抗兔二抗(美国,Jackson ImmunoResearch,68152,稀释度为1:200),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,立即于荧光显微镜(日本 Olypus IX71)下观察并拍照。

DRG 组织切片免疫染色结果的定量:每个 DRG 切片随机挑取5张,在荧光显微镜下同等曝光条件下拍片,照片于 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件中进行图像处理,设定阳性细胞光密度基础值,计算磷酸化丝裂原活化蛋白激酶(phosphorylated p38MAPK, p-p38MAPK)阳性细胞数,每张切片的细胞总数按照 Jin 等<sup>[3]</sup>的方法获

得,进而计算出 p-P38MAPK 阳性细胞百分比。

### 1.6 统计学处理

实验结果用均数 ± 标准误(mean ± SE)表示,先用单因素方差分析(one-way ANOVA)处理数据,然后用 Tukey 法(Tukey post hoc test)检测组间差异。所有统计学分析均通过 SPSS 10 软件(SPSS Inc, USA)进行,  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 行为学测试

假手术组大鼠术后的左后肢 50%PWT 无下降,与术前组比较,无统计学差异;模型组术后3 d 出现明显的 50%PWT 下降,14 d 降到最低值,21 d 部分恢复,与术前比较及同一时点与假手术组比较均有统计学差异( $P < 0.05$ ,表1)。

表 1 两组动物左后肢 50% 撤足阈值的变化

Table 1 The changes of 50% paw withdrawal threshold in left hind paws in the two groups ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ , g)

Group	Before operation	1 d after operation	3 d after operation	7 d after operation	10 d after operation	14 d after operation	21 d after operation
Model	21.4 ± 5.5	10.3 ± 3.2 <sup>1),2)</sup>	5.2 ± 1.5 <sup>1),2)</sup>	4.6 ± 1.8 <sup>1),2)</sup>	3.4 ± 1.6 <sup>1),2)</sup>	2.5 ± 1.2 <sup>1),2)</sup>	5.9 ± 1.7 <sup>1),2)</sup>
Sham	19.6 ± 5.2	18.8 ± 5.0	20.2 ± 4.8	21.2 ± 5.1	19.6 ± 4.8	19.8 ± 4.9	20.3 ± 5.0

Each group,  $n = 6$ ; 1) compared with before operation,  $P < 0.05$ ; 2) compared with the sham group,  $P < 0.05$

### 2.2 COX-2 和 p-p38MAPK 的表达

空白组、假手术7 d 组的 COX-2 和 p-p38MAPK 均微弱表达,两组间比较均无统计学差异( $P > 0.05$ ;图 1A-B,2A-B),模型组两者在7、14、21 d 均强表达(图 1C-E,2C-E),两者阳性细胞比率与假手术组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。模型

14 d 组两者阳性细胞比率最高,模型7 d 组次之,与模型14 d 组比较,两者差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),模型21 d 组两者阳性细胞比率最低,与14 d 组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),与7 d 组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,表2)。COX-2 和 p-p38MAPK 表达两者变化趋势相近。

表 2 COX-2 和 p-p38MAPK 阳性细胞比率的变化

Table 2 Proportion of the COX-2 and p-p38MAPK positive cells in each groups ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ , %)

	Naive group	Sham group	Model 7 <sup>th</sup> day	Model 14 <sup>th</sup> day	Model 21 <sup>th</sup> day
COX-2	3.5 ± 1.5 <sup>2)</sup>	4.8 ± 3.6 <sup>2)</sup>	56.4 ± 8.3 <sup>1)</sup>	65.5 ± 7.2 <sup>1)</sup>	46.7 ± 9.6 <sup>1),2)</sup>
p-p38MAPK	4.8 ± 2.2 <sup>2)</sup>	6.2 ± 4.6 <sup>2)</sup>	40.6 ± 9.4 <sup>1)</sup>	59.5 ± 16.5 <sup>1)</sup>	25.2 ± 10.6 <sup>1),2)</sup>

1) Compared with the sham group,  $P < 0.05$ ; 2) Compared with model 14<sup>th</sup> day group,  $P < 0.05$

## 3 讨 论

近年来大量的研究提示:椎间盘髓核的化学性致炎特性是椎间盘源性坐骨神经痛的重要机制之一<sup>[8]</sup>,但目前对髓核的致炎特性如何诱发坐骨

神经痛具体机制仍未清楚。

椎间盘髓核具有很强的致炎性<sup>[9]</sup>,退变或突出的髓核含有许多非特异性致炎物质,如氢离子、一氧化氮(NO)、前列腺素 E2 (PGE2)、炎症细胞因子等<sup>[10]</sup>,这些化学致炎物质一方面可直接刺激 DRG 或神经根使其出现异常放电导致自发性疼

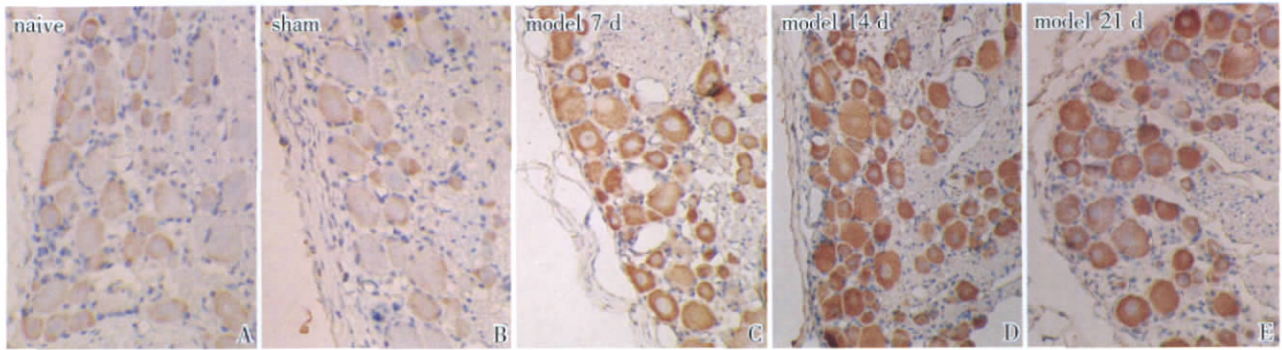


图 1 COX-2 的表达

Fig.1 The expression of COX-2 in each group

A-B: Weak expression in naive and sham group; C: High expression in the model 7<sup>th</sup> day group; D: Higher expression in the model 14<sup>th</sup> day group; E: The expression decreased in the model 21<sup>th</sup> day group;  $\times 100$

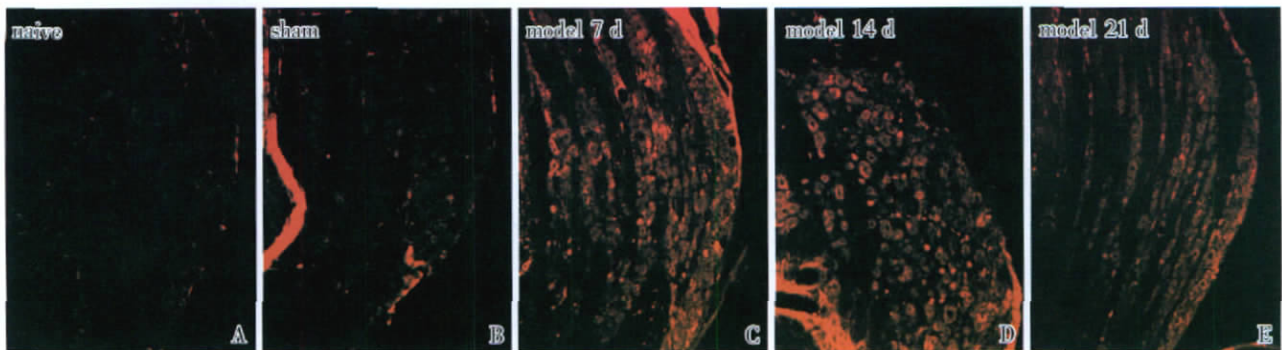


图 2 p-p38MAPK 的表达

Fig.2 The expression of p-p38MAPK in each group

A-B: Weak expression in sham group; C: High expression in the model 7<sup>th</sup> day group; D: Higher expression in the model 14<sup>th</sup> day group; E: The expression decreased in the model 21<sup>th</sup> day group;  $\times 50$

痛,另一方面可诱发 DRG 内部炎症的瀑布级联反应,使 DRG 出现更严重和更长时间的炎症反应。PGE<sub>2</sub> 被认为是最主要和最具代表性的致痛物质<sup>[11]</sup>,环氧化酶(cyclooxygenase,COX)是花生四烯酸转化为 PGE<sub>2</sub> 代谢途径的限速酶。COX 有 COX-1 和 COX-2 两种异构酶。COX-1 是一种结构酶,产生具有生理作用的 PGs,COX-2 是一种诱导酶,正常情况下不被多数正常细胞表达,但在炎症反应中可显著上调 COX-2 表达参与病理过程。因此,COX-2 是局部炎症反应的标志性介质<sup>[12]</sup>。本实验结果显示,髓核移植后,DRG 的 COX-2 高表达,第 14 天最强,第 21 天开始减弱。同时行为学测试也表明,髓核左腰 5DRG 移植后第 1 天就开始出现左后肢表现为机械撤足阈值降低的病理性坐骨神经痛,第 7 天明显,第 14 天最严重,第 21 天开始出现减轻。DRG 的炎症反应程度与病理性坐骨神经痛的严重程度在时间点相符。

p38MAPK 是 MAPK(丝裂原激活的蛋白激酶)

家族中重要成员。p38MAPK 广泛存在于哺乳动物细胞内,将细胞外刺激信号转导至胞浆和细胞核中,引起细胞生物学反应,主参与细胞应激和炎症反应。多种因素可以激活 p38MAPK,包括:炎症细胞因子(如 IL-1、TNF- $\alpha$ )及细胞应激(如紫外线、细胞外高渗、热休克等)。其激活形式表现为磷酸化 p38MAPK(p-p38),激活的 p38 信号通路可增强多种转录因子的基因表达活性,如激活作用转录因子、核因子- $\kappa$ B、热休克转录因子等<sup>[13]</sup>,使效应细胞表达、合成和释放更多的 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 等炎症细胞因子及花生四烯酸产物,导致组织的炎症瀑布级联放大反应。研究表明<sup>[14]</sup>,p38 MAPK 可在转录水平上调节 COX-2 的表达从而影响炎症过程,使用 p38 MAPK 的抑制剂可减少 COX-2 的表达而减轻炎症反应。

近年来,人们发现 p38MAPK 的激活在神经病理性疼痛模型中发挥重要作用。Tsuda 等<sup>[15]</sup>发现外周神经损伤后脊髓的胶质细胞的 p38MAPK 被激

活, Kim 等<sup>[16]</sup>使用坐骨神经慢性压迫模型(chronic constriction injury model, CCI)发现坐骨神经损伤后, DRG 中磷酸化 p38MAPK 免疫组化阳性细胞显著增加。Schäfers 等<sup>[17]</sup>也观察到大鼠神经结扎模型(SNL)后, DRG 神经元 p38MAPK 磷酸化增加, 使用抑制 p38MAPK 剂可减轻 SNL 后的神经痛敏。

本实验结果也显示, 自体髓核移植后, DRG 中的磷酸化 p38MAPK 保持高水平的表达, 而且 p-p38MAPK 表达变化与 COX-2 的表达和大鼠表现的痛过敏行为在时相上的变化一致, 这表明 DRG 中 p38MAPK 的激活与髓核所致的炎症反应和坐骨神经痛的密切相关。DRG 中 p38MAPK 的激活是髓核导致的 DRG 炎症反应和神经痛的必需的过程, 是椎间盘突出症出现坐骨神经痛的机制之一, 这与 Ito 等<sup>[18]</sup>的研究中发现大鼠自体髓核移植后脊髓背角的 p38MAPK 的表达增高的结果相符合。

实验结果提示对 DRG 中 p38MAPK 信号通路进行干预, 有可能减轻髓核导致的 DRG 炎症反应程度和病理性神经痛, 针对 p38MAPK 信号通路的调控有可能成为椎间盘突出症新的靶点。

#### 参考文献:

- [1] 张劲军, 魏明, 赖英荣, 等. 非压迫性髓核导致大鼠背根神经节病理变化 [J]. 中国神经精神疾病杂志, 2009, 35(5): 280-284.
- [2] 张劲军, 孙来保, 徐康清, 等. 侧隐窝注射治疗椎间盘源性坐骨神经痛的临床观察 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2008, 29(4s): 65-66.
- [3] Jin SX, Zhuang ZY, Woolf CJ, et al. p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain [J]. J Neurosci, 2003, 23(10): 4017-4022.
- [4] Weinstein J, Pope M, Schmidt R, et al. Neuropharmacologic effects of vibration on the dorsal root ganglion. An animal model [J]. Spine, 1988, 13(5): 521-525.
- [5] 张劲军, 徐康清, 孙来保, 等. 改良非压迫性腰椎间盘突出大鼠模型的建立 [J]. 中华实验外科杂志, 2008, 25(10): 1495
- [6] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. J Neurosci Methods, 1994, 53(7): 55-63.
- [7] Ji RR, Samad TA, Jin SX, et al. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia [J]. Neuron, 2002, 36(1): 57-68.
- [8] Mulleman D, Mammou S, Griffoul I, et al. Pathophysiology of disk-related sciatica. I: Evidence supporting a chemical component [J]. Joint Bone Spine, 2006, 73(2): 151-158.
- [9] Olmarker K, Blomquist J, Strömberg J, et al. Inflammatory properties of nucleus pulposus [J]. Spine, 1995, 20(6): 665-669.
- [10] Kang JD, Georgescu HI, McIntyre-Larkin L, et al. Herniated lumbar intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6, and prostaglandin E2 [J]. Spine, 1996, 21(3): 271-277.
- [11] Zeilhofer HU. Prostanoids in nociception and pain [J]. Biochem Pharmacol, 2007, 73(2): 165-174.
- [12] Miyamoto H, Saura R, Doita M, et al. The role of cyclooxygenase-2 in lumbar disc herniation [J]. Spine, 2002, 27(22): 2477-2483.
- [13] Obata T, Brown GE, Yaffe MB. MAP kinase pathways activated by stress: the p38MAPK pathway [J]. Crit Care Med, 2000, 28(4): 67-77.
- [14] Chen BC, Chen YH, Lin WW, et al. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-induced iNOS and COX2 expression in J774 macrophages [J]. Immunology, 1999, 97(1): 124-129.
- [15] Tsuda M, Mizokoshi A, Shigemoto-Mogami Y, et al. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal hyperactive microglia contributes to pain hypersensitivity following peripheral nerve injury [J]. Glia, 2004, 45(1): 89-95.
- [16] Kim SY, Bae JC, Kim JY, et al. Activation of p38 MAP kinase in the rat dorsal root ganglia and spinal cord following peripheral inflammation and nerve injury [J]. Neuroreport, 2002, 13(18): 2483-2486.
- [17] Schäfers M, Svensson CI, Sommer C, et al. Tumor necrosis factor-alpha induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of P38MAPK in primary sensory neurons [J]. J Neurosci, 2003, 23(7): 2517-2521.
- [18] Ito T, Ohtori S, Inoue G, et al. Glial phosphorylated p38MAP kinase mediates pain in a rat model of lumbar disc herniation and induces motor dysfunction in a rat model of lumbar spinal canal stenosis [J]. Spine, 2007, 32(2): 159-167.

(编辑 刘清海)