

p38 信号通路在三叉神经痛 ION-CCI 模型大鼠中的研究

刘雨¹, 崔曼曼¹, 张越¹, 施秀芳¹, 温泽惠¹, 王烈成², 王元银¹

摘要 目的 检测三叉神经痛(TN)模型大鼠三叉神经节(TG)内 p-p38 蛋白表达量的变化。方法 采用眶下神经缩窄术(ION-CCI)制备大鼠三叉神经痛模型,将雄性 SD 大鼠随机分为两组,即对照组(sham 组)和眶下神经缩窄术组(ION-CCI 组)。Frey 毛刷测定大鼠触须垫机械痛阈,Western blot 检测 p-p38 的表达量。结果 ION-CCI 组大鼠机械痛阈明显低于 sham 组($n=5$, $P<0.01$)。ION-CCI 组大鼠 TG 内 p-p38 的蛋白表达量均明显高于建模前正常大鼠($n=3$, $P<0.05$)。结论 p38 信号通路可能与 TN 的发生发展密切相关。

关键词 三叉神经痛; 三叉神经节; 眶下神经缩窄术

中图分类号 R 745.11

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)06-0894-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.06.014

三叉神经痛(trigeminal neuralgia, TN)是一种神经病理性疼痛,其特征是间歇性、周期性发作,刺痛或电击样疼痛局限于一侧面部,包括口腔^[1]。近年来许多学者针对 TN 进行大量的试验及临床研究,但其具体的生物学机制仍不清楚,目前关于其病因发生机制主要为中枢病变学说和周围病变学说,而两种学说都认为 TN 的主要病理变化为神经的脱髓鞘改变^[2]。引起脱髓鞘改变的原因有很多,主要包括免疫介导、病毒感染、营养障碍以及缺氧,一般临床上诊断为脱髓鞘疾病时多指由免疫介导的疾病,如多发性硬化症(multiple sclerosis, MS)等。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPK)家族中有一种分子量为 38 ku 的蛋白(pro-

tein 38, p38)即 p38 蛋白,其是一种具有控制炎症反应的蛋白激酶,多种方法可使其激活,包括炎症的刺激、生理性的应激以及脂多糖等。激活后的 p38 可发生核转位,并具有激活和磷酸化的作用^[3]。国外学者利用小鼠建立 MS 模型并对其神经纤维脱髓鞘的病理机制进行研究,证实 p38 信号通路参与了一些相关炎症和趋化因子的释放,从而导致小鼠中枢神经系统的脱髓鞘病变^[4]。近年来已经建立多种较成熟的 TN 动物模型,其中眶下神经缩窄术(chronic constriction injury of the infraorbital nerve, ION-CCI)是目前应用最广泛的 TN 动物模型^[5]。该实验将建立大鼠 TN 模型,观察其行为学改变以及检测三叉神经节(trigeminal ganglion, TG)中磷酸化的 p38 蛋白(phosphorylated signal protein 38, p-p38)的表达变化,为 TN 的治疗提供新的可能途径。

1 材料与方法

1.1 实验动物 采用安徽医科大学实验动物中心提供的成年雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,且体重在 200~220 g。常规分笼饲养,平均每笼控制在 5 只左右,饲养环境的温度约在 25℃ 左右,相对湿度约 50%,并按照明、暗的交替时间为 12 h/12 h,饲料饮水充分供应。在建模前 1 周,每日在固定时间点(8 pm)对所有大鼠进行适应性刺激训练,利用 VonFrey 毛刷针刺大鼠颜面部双侧触须垫并连续刺激 5 次,每次刺激间歇时间不低于 30 s,双侧交替进行观察大鼠反应并记录,训练结束后对刺激反应平静且毛发触须完整的健康大鼠则用于实验模型建立。实验中的所有操作均保护动物福利并以伦理学为原则。

1.2 实验建模 将符合实验标准的 40 只 SD 大鼠随机分成 2 组,即 sham 组 20 只,ION-CCI 组 20 只。两组大鼠分别称重,麻醉采用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉(剂量:0.35 ml/100 g)。待麻醉显效后,将大鼠固定 3% 碘伏消毒术区,进行手术。手术分两组,即 ION-CCI 模型组:在大鼠术侧(通常选择左侧)颧骨下缘距鼻背部约 0.5 cm 处剪开约 1 cm 长切口,组织剪钝性分离,显露扇形分布的眶下神经,

2018-03-14 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81271162);安徽省 2014 年科技攻关计划项目(编号:1401045013);合肥市自主创新政策“借转补”资金立项项目(编号:YW201608080001)

作者单位:安徽医科大学¹ 口腔医学院、² 基础医学院生理学教研室,合肥 230032

作者简介:刘雨,女,硕士研究生;

王烈成,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: wanglic-heng@ahmu.edu.cn;

王元银,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: wyy1970548@sohu.com

玻璃分针挑起,两根0号铬线分别结扎眶下神经,松紧适宜,上下间距约2 mm,置显微镜下,可见眶下神经直径变细,但并没有完全阻断神经的传导,缝合创口; sham组:手术过程与ION-CCI组相似,仅在同样位置做相同切口,暴露挑起眶下神经,但不结扎,缝合伤口。所有过程遵循无菌操作原则,为避免影响实验结果,手术前后均不使用抗生素,待大鼠完全清醒后,常规饲养,观察大鼠伤口愈合情况。

1.3 验证模型 选择刺激性训练相同的时间点(8 pm)分别对手术后1、2、3周的大鼠进行刺激,过程中保持环境安静。首先将两组大鼠置于鼠笼一段时间使其适应周围环境,随后用Von Frey毛刷刺激两组大鼠术侧触须垫,实验选取的毛刷强度应由小到大逐渐增加,方法同之前适应性训练。手术后ION-CCI模型组大鼠表现出躲避、攻击、连续搔抓面部行为。即当受刺激后出现迅速躲闪;抓咬刺激物;前爪不停搔抓受刺激部位。这些反应成为实验刺激阳性反应行为,标准为当出现阳性行为中任意1种或以上者均被视为刺激实验阳性。而使大鼠产生阳性反应的最小刺激强度即为大鼠术侧的机械阈值。本次实验分别在手术前(0周)和手术后的第1、2、3周分别对两组大鼠的触须垫机械痛阈进行测定,记录实验结果并进行统计学分析。

1.4 Western blot 检测 p-p38 蛋白含量 采用过量10%水合氯醛行腹腔注射麻醉,大鼠死亡后断头处理,迅速分离并取出术侧TG,再冷冻备用。将取出的TG置于匀浆器内剪碎,随后加入400 μ l RIPA蛋白裂解液(含PMSF)置冰上裂解30 min,收集裂解液,离心15 min(4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min),取上清液,采用BCA法测定蛋白浓度,加入蛋白上样缓冲液,混匀煮沸变性,-80 $^{\circ}$ C冰箱保存,备用。电泳分离样品,结束后将蛋白转移至PVDF膜上,5%脱脂奶粉摇床上室温封闭1 h,TBST洗3次,TBS洗1次,每次10 min。一抗(P38:1:1 000; P-P38:1:800; GAPDH:1:10 000)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,次日TBS洗膜充分后加入辣根酶标记的山羊抗兔IgG二抗(1:10 000)孵育2 h。采用ECL发光试剂盒检测蛋白条带,采用凝胶图像处理系统分析测定各条带的光密度值并计算出目的蛋白相对表达水平。

1.5 统计学处理 实验中全部数据通过SPSS 17.0软件进行数据分析,两组数据间采用独立样本 t 检验,且 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学实验结果 ION-CCI组大鼠在建模后1、2、3周触须垫的机械痛阈明显低于sham组大鼠,且差异有统计学意义。与sham组相比,从建模后1周开始,ION-CCI组大鼠机械痛阈明显降低(sham组:1.88 $\pm$ 0.268 g vs ION-CCI组:0.48 $\pm$ 0.110 g, $n = 5$, $t = 8.72$, $P < 0.01$),并在2周时痛阈达到最低(sham组:1.64 $\pm$ 0.329 g vs ION-CCI组:0.106 $\pm$ 0.049 g, $n = 5$, $t = 9.44$, $P < 0.01$),建模后3周两组大鼠的机械痛阈有所回升(sham组:1.76 $\pm$ 0.329 g vs ION-CCI组:0.432 $\pm$ 0.182 g, $n = 5$, $t = 8.27$, $P < 0.01$),见图1。

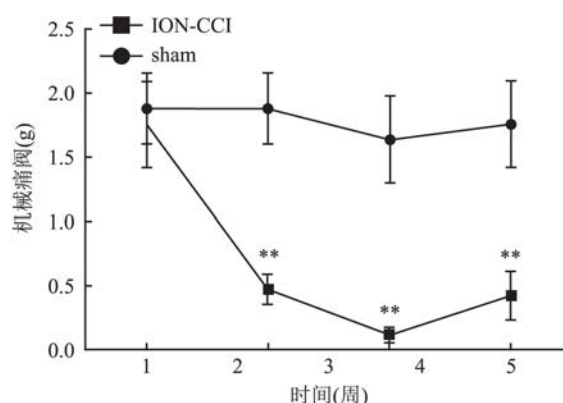


图1 ION-CCI组与sham组大鼠触须垫的机械痛阈在建模后不同时间点的变化
与sham组比较: ** $P < 0.01$

2.2 p-p38 蛋白在 TG 中的表达 Western blot结果显示分别与建模前的正常大鼠相比,在建模后1周ION-CCI组大鼠的TG中p-p38的蛋白表达量明显增高($n = 3$, $t = 3.60$, $P < 0.05$),并在第2周时表达量达到峰值,差异有统计学意义($n = 3$, $t = 8.82$, $P < 0.01$),在建模后第3周表达含量下降,但与建模前的正常大鼠相比仍增高,差异有统计学意义($n = 3$, $t = 3.00$, $P < 0.05$),见图2B,但p38的蛋白表达量分别与建模前的正常大鼠相比均无明显差异($n = 3$, $t = 1.27$, $P > 0.05$; $n = 3$, $t = 1.89$, $P > 0.05$; $n = 3$, $t = 2.04$, $P > 0.05$),见图2C。

3 讨论

由躯体感觉神经系统的损伤或疾病造成的疼痛称为神经性疼痛。神经性疼痛的病因有很多,全世界数百万患者受到影响,通常会影响到糖尿病患者、周围血管疾病和癌症患者^[6]。TN是临床上最常见的脑神经疾病,主要表现为一侧颜面部三叉神经分支

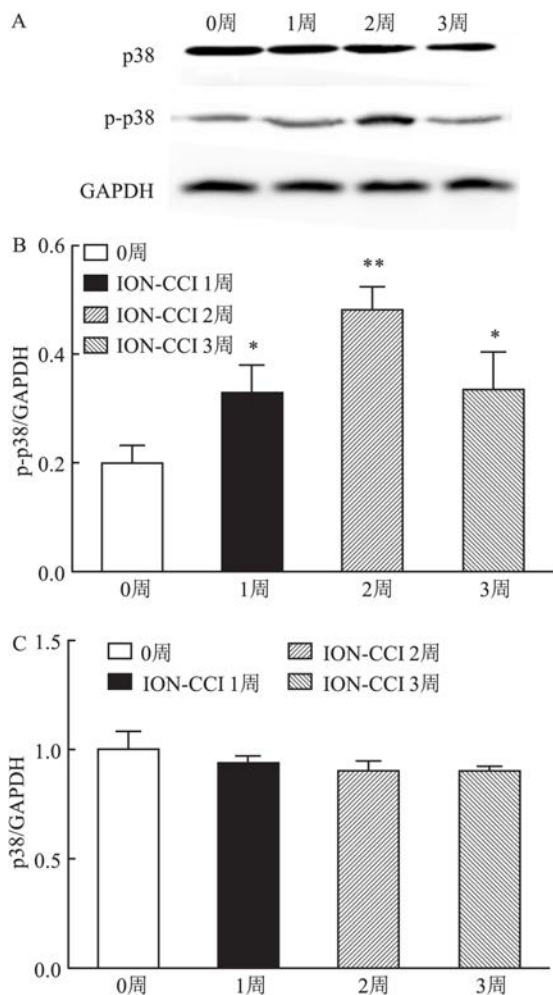


图2 建模前后不同时间点 p38 和 p-p38 蛋白在 TG 中的表达量

A: Western blot 检测结果例图; B: p-p38 的蛋白表达量的半定量分析; C: p38 的蛋白表达量的半定量分析; 与术前 0 w 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

所分布的区域内出现剧烈的、阵发性电击样剧烈疼痛。疼痛严重时,患者面部肌肉抽搐,表情愁苦,口角牵向一侧不敢拂面等症状并持续数秒至数分钟。

临床上将 TN 分为原发性和继发性两种,而原发性 TN 又可分为典型性和非典型性 TN,继发性 TN 是继发于其他疾病,如炎症、外伤、肿瘤以及 MS 等疾病侵犯三叉神经所致。对于原发性 TN 的病因和发病机制尚不完全明确,目前主要为中枢病变及周围病变等学说。其中中枢病变学说认为三叉神经脊束核内病变,破坏的胶质细胞使 T 细胞失去控制,导致活动增强,伤害性传入冲动很快达到“总和”而引起疼痛的发生^[7]。此外,中枢神经系统中的脱髓鞘病变也可出现 TN,如 MS,该病是一种以白质脱髓鞘为主的自身免疫性疾病,其坏保护神经纤维的

髓鞘,常在发展的早期出现 TN,该病发病具体涉及免疫炎症、氧化应激等多种机制^[8]。血管神经压迫学说是周围病变学说的重要因素之一,有研究^[9]表明,当神经受到血管等压迫会出现炎症损伤,从而导致神经脱髓鞘,信号传导过程中,脱髓鞘的神经纤维与周围正常神经纤维出现一种“短路”现象。目前大量研究^[10]表明,TN 表现的脱髓鞘是一种由细胞免疫介导的疾病,如 T 细胞、巨噬细胞、血管内皮细胞和肥大细胞等吞噬和破坏轴索,从而导致脱髓鞘病变的发生。

有丝分裂激活蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPK)为细胞内信号分子,属于丝/苏氨酸蛋白激酶,在调节基因表达和促进疾病发展方面起着关键作用。家庭主要分为四个成员,包括:细胞外信号调节激酶(extracellular regulated protein kinase 1/2, ERK 1/2),c-jun N 端激酶(c-jun N-terminal kinase, JNK),p38 基因激活蛋白激酶(p38 MAPK, p38)和 ERK5/BMK1(big mitogen-activated protein kinase 1, BMK1)^[11]。p38MAPK 的分子质量为 38 ku,由 4 个亚基组成,分别为 p38 α 、p38 β 、p38 γ 和 p38 δ 。p38 α 和 p38 β 主要涉及自身免疫、炎症和疼痛反应^[12]。p38 MAPK 诱导多种细胞内反应,与神经性疼痛和其他慢性疼痛相关,机体可因生理性应激、渗透性应激和脂多糖等刺激而激活。一些炎症因子包括:白细胞介素-1、脂多糖、肿瘤坏死因子等,可以诱导单核细胞、和中性粒细胞等内源性免疫细胞内的 p38 磷酸化而激活,激活后的 p38 表现 p-p38 MAPK。磷酸化的 p38 在中枢神经系统中造成的损伤主要为负性损伤,参与炎症反应,造成组织水肿和神经细胞的死亡^[13]。作为信号通路中的关键成员,四个 p38 同分异构体通过一系列磷酸化的方式将细胞外信号转化为细胞内的信号。因此,实验检测建模后大鼠 TG 中磷酸化 p38 蛋白表达变化,以期与疼痛相关。目前,市面上已有针对 p38 的抑制剂(SB203580, SB202190),其类似于 ATP 分子直接与 ATP 竞争结合位点^[14]。后期课题组将对 p38 抑制剂进行进一步的验证。

实验组多年来致力于 TN 的研究,通过建立 ION-CCI 模型并同时多次进行行为学验证,行为学观察至第 3 周,发现在建模后第 1 周开始,模型组大鼠痛阈与 sham 组相比明显降低,并在第 2 周达到最低,从第 3 周开始缓慢回升,但仍低于对照组,证明模型建立成功。本实验采用 Western blot 方法检测 p-p38 的蛋白表达量的变化,在建模后 1 周、2 周、3

周与正常大鼠相比表达均增高,并在第2周蛋白表达量达到峰值,即磷酸化的p38信号蛋白在ION-CCI大鼠的TG内表达增高,其蛋白表达含量结果与行为学实验结果相一致,但p38的蛋白表达量与正常大鼠相比均无明显差异,原因可能是p38信号蛋白在疼痛反应中主要是通过磷酸化的形式发挥作用,说明p38信号蛋白参与了ION-CCI模型大鼠的信号传导且主要是以其磷酸化的形式,提示p38信号通路可能与TN的发生发展密切相关。

参考文献

- [1] Prasad S, Galetta S. Trigeminal neuralgia: historical notes and current concepts [J]. *Neurologist* 2009, 15(2): 87-94.
- [2] 葛永红. 三叉神经痛病因及治疗现状 [J]. *武警医学院学报*, 2010, 19(1): 81-4.
- [3] Lu Y, Zhao L X, Cao D L, et al. Spinal injection of docosahexaenoic acid attenuates carrageenan-induced inflammatory pain through inhibition of microglia-mediated neuroinflammation in the spinal cord [J]. *Neuroscience* 2013, 241: 22-31.
- [4] Gaffen S L, McGeachy M. Integrating p38 α -MAPK immune signals in non-immunocytes [J]. *Sci Signal*, 2015, 8(366): fs5.
- [5] 孙晖, 李国超, 王元银, 等. 眶下神经慢性缩窄环三叉神经痛动物模型的研究进展 [J]. *医学综述*, 2013, 19(12): 2113-6.
- [6] Kersten C, Cameron M G, Laird B, et al. Epidermal growth factor receptor-inhibition (EGFR-4) in the treatment of neuropathic pain [J]. *Br J Anaesth*, 2015, 115(5): 761-7.
- [7] Devor M, Amir R, Rappaport Z H. Pathophysiology of trigeminal neuralgia: the ignition hypothesis [J]. *Clin J Pain*, 2002, 18(1): 4-13.
- [8] 全墨缘, 邓晓红, 刘会佳, 等. p38 MAPK在EAE小鼠免疫致炎机制中的研究进展 [J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2017, 24(2): 129-32.
- [9] 马腾飞, 王霁蕾, 黄姗姗, 等. 经眶下孔注射相关炎症因子制造大鼠三叉神经痛模型的实验研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(6): 753-6.
- [10] 叶廷军, 刘会敏, 陈泳莲. 巨噬细胞、肥大细胞免疫炎症反应和三叉神经脱髓鞘关系探讨 [J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 1999, 6(4): 281-2.
- [11] Johnson G L, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases [J]. *Science*, 2002, 298(5600): 1911-2.
- [12] Jirmanova L, Giardino Torchia M L, Sarma N D, et al. Lack of the T cell-specific alternative p38 activation pathway reduces autoimmunity and inflammation [J]. *Blood*, 2011, 118(12): 3280-9.
- [13] Liu W, Chen Y, Golan M A, et al. Intestinal epithelial vitamin D receptor signaling inhibits experimental colitis [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(9): 3983-96.
- [14] Séverin S, Ghevaert C, Mazharian A. The mitogen-activated protein kinase signaling pathways: role in megakaryocyte differentiation [J]. *J Thromb Haemost*, 2010, 8(1): 17-26.

Role of p38 signaling pathway in the trigeminal neuralgia of ION-CCI model in rats

Liu Yu, Cui Manman, Zhang Yue, et al

(Stomatological College of Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract **Objective** To detect the expression of p-p38 proteins in trigeminal ganglions (TG) of trigeminal neuralgia (TN) model in rats. **Methods** The TN model of rat was established by chronic constriction injury of the infraorbital nerve (ION-CCI). Male SD rats were randomly divided into 2 groups: control group (sham group) and ION-CCI group. The mechanical withdrawal thresholds of vibrissa pad in two groups of rats were measured by von Frey hairs. The proteins of p-p38 in TG were detected by Western blot test. **Results** The mechanical thresholds of ION-CCI group were obviously lower than that in sham group ($n=5$, $P<0.01$). The p-p38 proteins in TG of ION-CCI group were over-expressed obviously after operation, which was significantly different compared with that before operation ($n=3$, $P<0.05$). **Conclusion** p38 signaling pathway may be closely related to the development of TN.

Key words trigeminal neuralgia; trigeminal ganglion; chronic constriction injury of the infraorbital nerve