

· 实验研究 ·

鞘内注射曲古菌素 A 对树脂脂毒素诱导的大鼠神经痛的影响

陈文佳 孟晓文 王丽娜 孙灿林

【摘要】 目的 评价曲古菌素 A(trichostatin A, TSA)在树脂脂毒素(resiniferatoxin, RTX)诱导的神经病理性疼痛模型(模拟 PHN)中的作用。**方法** 雄性健康 SD 大鼠 32 只, 体重 250~280 g, 采用随机数字表法分成四组: 溶剂对照组(C 组)、神经痛模型组(RTX 组)、二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide)治疗组(DMSO 组)和 TSA 治疗组(TSA 组)。C 组单次腹腔注射 RTX 溶剂 1 ml, RTX 组建立病理性神经痛模型, 建模方式为每只大鼠在异氟醚(2% O₂)麻醉下接受单次腹腔注射 RTX 210 μg/kg; DMSO 组建立病理性神经痛模型, 在建模前 60 min 和建模后每天鞘内注射 TSA 溶媒 5% DMSO 10 μl, 持续至建模后 7 天; TSA 组建立病理性神经痛模型, 在建模前 60 min 和建模后每天鞘内注射等容量溶于 DMSO 的 TSA 0.5 μg/kg, 持续到建模后 7 天。于建模前 60 min 和建模后第 1、3、5 和 7 天采用一系列校准的 von Frey 毛针测定四组大鼠机械痛阈值(MWT), 于第 7 天行为学测定结束后检测脊髓 IL-1β、TNF-α 和胶质纤维酸性蛋白(GFAP)等分子 mRNA 表达量。**结果** 与 C 组比较, 建模后第 3、5 和 7 天 RTX、DMSO 和 TSA 组 MWT 明显降低($P < 0.05$)。与 RTX 和 DMSO 组比较, 建模后第 3、5 和 7 天 TSA 组 MWT 明显升高($P < 0.05$)。RTX 和 DMSO 组不同时点 MWT 差异无统计学意义。与 C 组比较, RTX、DMSO 和 TSA 组 IL-1β mRNA, TNF-α mRNA 和 GFAP mRNA 表达量明显增多($P < 0.05$)。与 RTX 和 DMSO 组比较, TSA 组 IL-1β mRNA、TNF-α mRNA 表达量明显减少($P < 0.05$)。RTX 和 DMSO 组各指标差异无统计学意义。**结论** 鞘内注射 TSA 通过减缓脊髓炎症反应缓解 RTX 诱导的神经病理性痛。

【关键词】 曲古菌素 A; 树脂脂毒素; 神经病理性痛; 星形胶质细胞; 白细胞介素-1β, 肿瘤坏死因子-α

Effect of intrathecal injection trichostatin A in a rat model of resiniferatoxin induced neuropathic pain

CHEN Wenjia, MENG Xiaowen, WANG Lina, SUN Canlin. Department of Anesthesiology, Taizhou people's Hospital, Taizhou 225300, China

Corresponding author: WANG Lina, Email: Wangln@suda.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the effect of intrathecal injection trichostatin A (TSA) in a rat model of resiniferatoxin (RTX) induced neuropathic pain (a PHN mimic model). **Methods** Thirty-two male SD rats, weighing 250-280 g, were randomly divided into four groups ($n = 8$): sham group (group C); neuropathic pain group (group RTX); intrathecal injection DMSO in neuropathic pain rats (group DMSO); intrathecal injection TSA in neuropathic pain rats (group TSA). In group C, 1 ml of RTX solvent was injected intraperitoneally. The pathological neuralgia model was established in RTX group. Each rat was given a single intraperitoneal injection of RTX 210 μg/kg under isoflurane (2% O₂) anesthesia; a pathological neuralgia model was established in group DMSO via intrathecal injection of 10 μl of 5% DMSO for 60 min before modeling and 7 d after modeling. The TSA group established a pathological neuralgia model via injection intrathecal of TSA (0.5 μg/kg) for 60 minutes before modeling and 7 d after modeling. Mechanical withdrawal threshold (MWT) was quantified with von Frey filaments before and after modeling; the measurement time after the modeling was 2 h after intrathecal injection on the day of 1, 3, 5, 7 d. The expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), IL-1β, TNF-α mRNA in the spinal cord were measured by qRT-PCR 2 h after last TSA or DMSO injection. **Results** Compared with group C, MWT in groups RTX, DMSO and TSA decreased significantly 3, 5 and 7 d after modeling ($P < 0.05$). Compared with groups RTX and DMSO,

DOI:10.12089/jca.2018.06.014

基金项目:国家自然科学基金(81471136)

作者单位:225300 江苏省泰州市人民医院麻醉科(陈文佳、孙灿林);江苏省苏州大学附属第一医院麻醉科(孟晓文、王丽娜)

通信作者:王丽娜, Email: Wangln@suda.edu.cn

MWT increased significantly 3, 5 and 7 d after modeling ($P < 0.05$). There was no significant difference in MWT between group RTX and group DMSO at different time points. Compared with group C, the expressions of IL-1 β mRNA, TNF- α mRNA and GFAP mRNA in groups RTX, DMSO and TSA increased significantly ($P < 0.05$). Compared with groups RTX and DMSO, the expression of IL-1 β mRNA and TNF- α mRNA decreased significantly in group TSA ($P < 0.05$). There was no significant difference in the indexes between group RTX and group DMSO. **Conclusion** Intrathecal injection of TSA relieves RTX-induced neuralgia by slowing the inflammatory response of the myocardium.

【Key words】 Trichostatin A; Resiniferatoxin; Postherpetic neuralgia; Glial fibrillary acidic protein; IL-1 β ; TNF- α

带状疱疹后遗神经痛(postherpetic neuralgia, PHN)作为神经病理性痛疾病中一个重要类别,严重影响人类的健康。有分析指出,随着年龄的增加,PHN 的发病率呈上升趋势^[1]。因此,PHN 的预防和治疗正逐渐成为老龄化严重国家的重要课题。星形胶质细胞的激活和炎症因子的释放在一些神经病理性疼痛模型中得到验证^[2]。曲古霉素 A(trichostatin A, TSA)是一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitor, HDACI),研究显示对胶质细胞的激活引起的炎症反应具有调节作用^[3],因此本研究拟探讨鞘内注射 TSA 对树脂毒素(resiniferatoxin, RTX)诱导的神经病理性痛(模拟 PHN)的影响,以期 PHN 的治疗提供理论依据。

材料与方法

实验动物与分组 成年雌性 SD 大鼠 32 只,体重 250~280 g,许可证号:SCXK(苏)2013-0003。实验室光照时间 08:00—20:00,温度 18~22℃,湿度 40%~60%。单笼喂养,自由充分饮食。大鼠适应实验环境 1 周后,采用随机数字表法分成四组:溶媒对照组(C 组)、神经痛模型组(RTX 组)、二甲亚砜治疗组(DMSO 组)和 TSA 治疗组(TSA 组),每组 8 只。

实验方法 于造模前 1 周参照文献[4]对 DMSO 组和 TSA 组进行蛛网膜下腔置管,具体操作如下:大鼠俯卧位于操作台,背部皮肤备皮后消毒,大鼠 L₃₋₄ 间隙作一长度 2 cm 的竖直切口分离竖脊肌,充分暴露 L₃₋₄ 间隙。用 25 号穿刺针行腰椎穿刺,待有突破感,从椎间孔破口沿着穿刺针的径路插入 PE-10 导管,导管向大鼠头端置入约 2 cm,大鼠出现甩尾,且有清亮的脑脊液流出,说明导管已经置入蛛网膜下腔。将导管妥善固定,用碘伏消毒皮肤伤口,缝皮。于第 6 天用利多卡因验证是否置管成功,如出现肢体瘫痪、感染或导管脱出则剔除实验。在鞘内置管 1 周大鼠损伤恢复后建模。所需

药物 TSA 的溶剂为 5% 的 DMSO; RTX 的溶剂为 10% Tween 80、10% 乙醇与生理盐水组成的混合液;建模方式为在异氟醚(2% O₂)麻醉下, C 组单次腹腔注射 RTX 溶剂 1 ml, RTX 组建立神经病理性痛模型,麻醉状态下接受单次腹腔注射 RTX 210 μ g/kg^[5]; DMSO 组建立病理性神经痛模型,在建模前 60 min 和建模后每天鞘内注射 TSA 溶媒 5% DMSO 10 μ l,持续至建模后 7 d; TSA 组建立病理性神经痛模型,在建模前 60 min 和建模后每天鞘内注射等容量溶于 DMSO 的 TSA 0.5 μ g/kg,持续至建模后 7 d。

观察指标 四组大鼠鞘内置管后 1 周,建模前 60 min 和建模后第 1、3、5 和 7 天采用一系列校准的 von Frey 毛针测定机械痛阈值(mechanical withdrawal threshold, MWT),具体时间为鞘内给药后 2 h。连续测量 5 次取平均值记为大鼠 MWT。于第 7 天行为学测定结束后,取四组大鼠,腹腔注射 4% 水合氯醛 400 mg/kg 麻醉后,取 L₄₋₆ 脊髓组织,采用 Trizol reagent 提取总 RNA,应用 qRT-PCR 的方法检测脊髓 IL-1 β 、TNF- α 、胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)等分子的 mRNA 表达量,引物序列见表 1。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因的相对表达量。

表 1 引物序列

基因名称	基因序列
IL-1 β	正义: 5'-GCAAACAGGTCGGCGTCTT-3'
	反义: 5'-TGCGCAGCGCTAAAACCTTG-3'
TNF- α	正义: 5'-AAGGACCAAGACCATCCAAC-3'
	反义: 5'-ACCACAGTGAGGAATGTCCA-3'
GFAP	正义: 5'-TGGCCACCAGTAACATGCAA-3'
	反义: 5'-CAGTTGGCGGCGATAGTCAT-3'
β -actin	正义: 5'-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3'
	反义: 5'-CCCATACCCACCATCACACC-3'

统计分析 采用 SPSS 13.0 软件进行分析。

正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,重复测量设计的计量资料比较采用重复测量数据的方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

大鼠 MWT 与建模前 60 min 比较,建模后第 1、3、5 和 7 天 RTX、DMSO 和 TSA 组 MWT 明显降低($P < 0.05$)。C 组不同时间点 MWT 差异无统计学意义。与 C 组比较,建模后第 3、5 和 7 天 RTX、DMSO 和 TSA 组 MWT 明显降低($P < 0.05$),与 RTX 和 DMSO 组比较,建模后第 3、5 和 7 天 TSA 组 MWT 明显升高($P < 0.05$)。建模前 60 min 时四组 MWT 差异无统计学意义;建模后第 1 天 RTX、DMSO 和 TSA 组 MWT 差异无统计学意义。RTX 和 DMSO 组不同时间点 MWT 差异无统计学意义(表 2)。

大鼠 IL-1 β mRNA、TNF- α mRNA 和 GFAP mRNA 表达量与 C 组比较,RTX、DMSO 和 TSA 组 IL-1 β mRNA、TNF- α mRNA 和 GFAP mRNA 表达量明显增多($P < 0.05$)。与 RTX 和 DMSO 组比较,TSA 组 IL-1 β mRNA、TNF- α mRNA 表达量明显减少($P < 0.05$)。RTX 和 DMSO 组各指标差异无统计学意义,RTX 和 TSA 组 GFAP mRNA 表达量差异无统计学意义(表 3)。

讨 论

PHN 是带状疱疹病毒感染后最常见的并发症,发病机制复杂,给患者带来痛苦同时给临床治疗带来挑战。其发生率随年龄的增长而升高,多有痛觉过敏和痛觉异常,严重影响患者的生活质量。由于临床研究纳入标准不一致、缺乏严格的对照使其影响因素较多,研究结果差异很大。因此应用动物实验的基础研究对 PHN 发病机制进行深入探索,为寻找有效预防或治疗此种疾病的药物或方法的研究提供理论依据尤为重要。本实验应用的一种新型的 PHN 动物模型,即在腹腔单次注射超强的辣椒素受体激动剂 RTX,会导致大鼠机械痛觉超敏和热痛失敏,这两种痛行为的改变很好地模拟了 PHN 患者主要表现为机械痛觉超敏却没有热痛过敏的临床症状^[5],且模型构建简单,效果稳定,而其溶媒则不引起相关症状,为 PHN 的研究提供了较好的模型;DMSO 是 TSA 的有效溶剂,且 5% 的浓度不足以引起相关症状的改变。另外,基于探讨 TSA 对机械痛的作用,本实验未表述热痛相关指标的变化。

既往研究显示,脊髓背角是对痛信息进行加工、处理、整合的初级中枢,是研究痛与镇痛机制的突破口之一,是痛觉传导的一个关键部位。星形胶质细胞中含有很多由胶质纤维酸性蛋白(GFAP)构成的胶质纤维,这种纤维属中间丝具有特异性。目

表 2 四组大鼠不同时间点 MWT 的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	建模前 60 min	建模后第 1 天	建模后第 3 天	建模后第 5 天	建模后第 7 天
C 组	8	25.72±1.23	24.68±1.52	25.11±1.16	25.38±1.10	25.38±1.10
RTX 组	8	25.39±1.81	23.62±1.61 ^a	19.96±1.44 ^{abc}	16.29±1.71 ^{abc}	13.83±1.67 ^{abc}
DMSO 组	8	25.34±1.80	23.52±1.49 ^a	20.06±0.09 ^{abc}	16.28±1.48 ^{abc}	13.79±1.78 ^{abc}
TSA 组	8	25.50±1.34	23.62±0.61 ^a	22.40±1.35 ^{ab}	20.56±0.38 ^{ab}	17.97±0.27 ^{ab}

注:与建模前 60 min 比较,^a $P < 0.05$;与 C 组比较,^b $P < 0.05$;与 TSA 组比较,^c $P < 0.05$

表 3 四组大鼠鞘内注射 TSA 7 d 后 IL-1 β mRNA、TNF- α mRNA 和 GFAP mRNA 表达量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	IL-1 β mRNA	TNF- α mRNA	GFAP mRNA
C 组	8	1.02±0.05	1.00±0.12	1.01±0.11
RTX 组	8	5.86±1.16 ^a	3.45±0.98 ^a	3.51±0.09 ^a
DMSO 组	8	5.78±1.09 ^a	3.41±1.02 ^a	3.49±0.11 ^a
TSA 组	8	3.56±1.12 ^{abc}	2.56±1.12 ^{abc}	3.46±0.10 ^a

注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 RTX 组比较,^b $P < 0.05$;与 DMSO 组比较,^c $P < 0.05$

前认为 GFAP 的染色密度和/或表达水平与胶质细胞的激活程度呈正相关,可以用来直接反映胶质细胞的激活和功能的增强,且 GFAP 在疱疹病毒导致神经痛的模型中高表达已经得到证实^[6]。胶质细胞的爆发式激活释放大量促炎因子如 IL-1 β 、TNF- α 和 NO 等,引起氧化应激,导致神经退化性疾病和病理性痛^[7]。本实验结果显示,RTX 注射后星形胶质细胞和炎性因子 IL-1 β 和 TNF- α 的表达明显增高,提示星形胶质细胞的活化和炎性因子的释放是造成 RTX 诱导的神经病理性痛的原因之一,抑制星形胶质细胞的表达或炎性因子的释放可能成为治疗 PHN 的靶点。

TSA 作为一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂对多种炎症反应起到调节作用,研究显示不同的组蛋白去乙酰化酶通过不同的乙酰化模式调节不同的基因,最终实现对炎症等不良反应的调节^[3]。本实验结果显示,5%DMSO 作为 TSA 的有效溶剂,未对观察指标的调节产生影响,不能减轻大鼠的神经痛;鞘内注射 TSA 减轻了脊髓 IL-1 β 和 TNF- α 的表达,提示 TSA 通过抑制炎症反应减缓 RTX 诱导的神经病理性痛。虽然 TSA 在疼痛治疗中的研究较少,但 Bai 等^[8]研究结果表明 TSA 可以明显延迟 CFA 大鼠痛觉过敏。另一方面,在多发性硬化症所致中枢神经病理性痛研究显示,TSA 通过抑制甲基 CpG 结合蛋白 2 (methyl CpG binding protein 2, MeCP2)^[9],进而恢复细胞因子、趋化因子和神经营养因子 BDNF 的稳态平衡,从而达到神经修复与镇痛,而 BDNF 的增加减轻 PHN 患者疼痛也已得到证实^[10]。

本实验结果显示,TSA 的应用使得该疼痛模型大鼠中枢 IL-1 β 、TNF- α 在 mRNA 水平表达降低,从而减轻或者延迟疼痛的产生和发展。尽管也有研究指出 HDACI 可以减少星形胶质细胞的表达^[11],在本实验中并没有发现 GFAP 基因水平的降低,因此没有在蛋白水平进行验证,不同实验结果的产生可能与药物的种类及处理时间、处理方式有关,另外星形胶质细胞在 TSA 抑制炎症反应的过程中可能起着保护性而非损伤性的作用。另外本实验仅仅从抑制炎症反应的角度阐述了 TSA 的作用,而在表观遗传学中的作用未加以验证,这也是下一步研究的重点。

综上所述,腹腔内单次注射树脂毒素引起神经病理性痛,曲古霉素 A 可通过调节炎性因子的表达缓解疼痛,这种组蛋白去乙酰化酶抑制剂为治疗带状疱疹后遗神经痛提供新的研究思路。

参 考 文 献

- [1] 金文哲,任婷婷,李仁淑,等.背根神经节脉冲射频联合连续硬膜外镇痛治疗老年带状疱疹后遗神经痛的临床观察.临床麻醉学杂志,2014,30(5):507-508.
- [2] Machelska H, Celik MÖ. Recent advances in understanding neuropathic pain: glia, sex differences, and epigenetics. *Fl000Res*, 2016, 5: 2743.
- [3] Royce SG, Dang W, Yuan G, et al. Effects of the histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, in a chronic allergic airways disease model in mice. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2012, 60(4): 295-306.
- [4] Hou Y, Wang L, Gao J, et al. A modified procedure for lumbar intrathecal catheterization in rats. *Neurol Res*, 2016, 38(8): 725-732.
- [5] Pan HL, Khan GM, Alloway KD, et al. Resiniferatoxin induces paradoxical changes in thermal and mechanical sensitivities in rats: mechanism of action. *J Neurosci*, 2003, 23(7): 2911-2919.
- [6] Blackbeard J, Wallace VC, O'Dea KP, et al. The correlation between pain-related behaviour and spinal microgliosis in four distinct models of peripheral neuropathy. *Eur J Pain*, 2012, 16(10): 1357-1367.
- [7] 孙涛,宋文阁,姚尚龙,等.神经病理性疼痛大鼠脊髓星形胶质细胞增殖活化的变化.中华麻醉学杂志,2006,26(9): 842-845.
- [8] Bai G, Wei D, Zou S, et al. Inhibition of class II histone deacetylases in the spinal cord attenuates inflammatory hyperalgesia. *Mol Pain*, 2010, 6: 51.
- [9] Khorshid Ahmad T, Cortes C, et al. Transcriptional regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) by Methyl CpG binding protein 2 (MeCP2): a novel mechanism for remyelination and/or myelin repair involved in the treatment of multiple sclerosis (MS). *Mol Neurobiol*, 2016, 53(2): 1092-1107.
- [10] Zhao W, Wang Y, Fang Q, et al. Changes in neurotrophic and inflammatory factors in the cerebrospinal fluid of patients with postherpetic neuralgia. *Neurosci Lett*, 2017, 637: 108-113.
- [11] Suh HS, Choi S, Khattar P, et al. Histone deacetylase inhibitors suppress the expression of inflammatory and innate immune response genes in human microglia and astrocytes. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2010, 5(4): 521-532.

(收稿日期:2017-10-30)