

· 基础研究 ·

脊髓背角中强啡肽 A 表达的上调对福尔马林引起的大鼠炎性水肿的影响

祁文秀¹ 卢崇让²

摘要 目的:利用鞘内注射前强啡肽 mRNA 的反义寡聚核苷酸,观察由福尔马林引起的大鼠后脚掌炎性水肿程度的变化,来证明脊髓背角中强啡肽(dynorphin, Dyn A)的量可能影响外周炎症反应的大小。方法:在 3 组成年 Wistar 大鼠(每组 5 只)预先在鞘内分别注入对抗前强啡肽 mRNA 的反义寡聚核苷酸(AS-ODN)、生理盐水(NS)、和反序的反义寡聚核苷酸(RS-ODN);4h 后,再给各组动物一侧后脚掌皮下注射福尔马林(0.5%, 100 μ l),并分别在注射后的 1h、2h、3h 三个时间点,各以 5 只动物先检查后脚掌直径,以福尔马林注射前的直径为对照,算出直径增加的百分数,作为炎性水肿变化的指标,并在脚掌检测后立即处死动物作免疫组化检测,确定各时间点大鼠两侧脊髓背角浅层中 Dyn A(1—8)免疫反应样物质的光密度值。结果:①3 组动物在福尔马林注射后的 3 个时间点,注射侧后脚掌的炎性水肿均呈进行性的加重,但在鞘内注入 AS-ODN 的实验组,各个时间点的水肿程度均明显地小于注射了生理盐水和 RS-ODN 的两个对照组;而在两个对照组相应的各时间点之间无显著性差异。②在免疫组化检测中,可看到三组动物注射侧脊髓背角中都出现 Dyn A(1—8)的光密度值随测定值时间推后而增加,实验组各时间点的测定值均明显地小于两个对照组相应时间点的测定值,但后两组的各相应时间点的测定值之间无显著性差异。结论:鞘内注射反义核苷酸后福尔马林引起的脊髓中强啡肽 A 的表达上调被阻止,并且平行地出现了局部炎性水肿发展的被阻止。

关键词 前强啡肽;反义寡聚核苷酸;强啡肽 A;炎性水肿;脊髓背角;大鼠

中图分类号:R49,R441.1 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2006)-06-0510-04

Up-expression of dynorphin A aggravates inflammatory edema induced by formalin test in rats/QI Wenxiu, LU Chongrang//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21(6):510—513

Abstract Objective: We utilized intrathecal (i.t.) application antisense oligodeoxynucleotide (AS-ODN) to induce prodynorphin (Pro-Dyn) mRNA and observed the degree of inflammatory edema after the formalin injection in rats to prove whether the quantity of dynorphin A in nerve centre could effect the degree of periphery inflammation. **Method:** The rats were pretreated with i.t. application of AS-ODN, normal saline (NS) or the reverse ODN (RS-ODN) separately. The rat's paw was injected with formalin and observed the incremental percentages of diameter difference(%) combined with the immunocytochemical evidences that intensified expression of dynorphin A(1—8)(Dyn A)(OD units) in spinal dorsal horn after the formalin injection in 1h, 2h and 3h time slices. **Result:** ①All the injected paws showed inflammatory edema with a progressive aggravation in three inspect times after the formalin injection, at the same time interval. The formalin induced incremental percentages of diameter differences of injected paws in i.t. AS-ODN group were smaller than that in i.t. NS or i.t. RS-ODN group but there were no differences in i.t. NS group and in i.t. RS-ODN group. ②The up-expression of Dyn A in ipsilateral dorsal horn to the formalin injection increased gradually follow the formalin injection in all groups of all inspect times, and there were markedly reducer in i.t. AS-ODN group than that in i.t. NS or i.t. RS-ODN group but there were no differences in i.t. NS group and i.t. RS-ODN group in all inspect times. **Conclusion:** Application of AS-ODN induced prodynorphin mRNA could suppress the increase expression of Dyn A in the spinal dorsal horn along with prevention on the local inflammatory edema.

Author's address Dept. of Physiology, Fenyang College, Fenyang, 032200

Key words prodynorphin; antisense oligodeoxynucleotide; dynorphin A; inflammatory edema; spinal dorsal horn; rat

许多资料显示,在大鼠外周炎症引致的痛觉过敏中,伴有脊髓背角浅层中强啡肽 A 表达明显增加^[1-2]。本实验室以往的实验也表明^[3-4],在大鼠后肢脚掌皮下注射弗氏佐剂或福尔马林所致的痛模型中,脊髓背角中强啡肽 A(dynorphin, Dyn A)的表达

明显增加,此增加与该侧后肢对伤害性温热刺激的

1 山西医科大学汾阳学院生理教研室,汾阳, 032200

2 山西省太原市中心医院麻醉科

作者简介:祁文秀,女,教授

收稿日期:2005-07-04

痛过敏或第二相行为痛反应呈正相关, 因而推测脊髓痛感受的可塑性, 即痛过敏的产生机制与背角中 Dyn A 的上调有关。这一结论同最近认为“Dyn A 在痛行为和中枢痛过敏出现的过程中可能作为一种致痛因子起作用”的观点相一致^[5-6]。

但我们在实验过程中也注意到, 在皮下注射慢性致炎物质(如福尔马林或弗氏佐剂)后, 局部炎症反应的大小似乎也与脊髓背角中 Dyn A 的表达高低有关。这通常认为是局部炎症的大小决定了背角中 Dyn A 的表达^[2-3], 但是否中枢 Dyn A 的量也可能影响外周炎症反应的大小, 也不能完全除外。本实验在大鼠预先鞘内注入前强啡肽(prodynorphin, Pro-Dyn)mRNA 的反义寡聚核苷酸, 观察了大鼠在后肢脚掌皮下注射福尔马林后 1h、2h、3h 注射部位炎性水肿程度的改变, 同时用免疫细胞化学技术检测脊髓背角中 Dyn A 表达的改变。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

Wistar 大鼠, 体重 100—120g, 雌雄不拘; 动物随机分成 3 组, 每组 15 只。实验组: 鞘内注射 Pro-Dyn mRNA 的反义寡聚核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide, AS-ODN)。两个对照组(NS 组和 RS-ODN 组): 鞘内注射生理盐水或反序的反义寡聚核苷酸(reverse oligodeoxynucleotide, RS-ODN)。3 组大鼠在鞘内注射结束后 4h, 全部在一侧后脚掌皮下注射福尔马林(5%, 100 μ l), 各组在注射后 1h、2h、和 3h 的时间点, 分别各对 5 只大鼠进行注射侧脚掌直径的测量, 作为炎性水肿程度的指标, 并立即处死大鼠进行脊髓背角中 Dyn A 的免疫组化测定。则 9 组分别为: NS-1h, NS-2h, NS-3h; RS-ODN-1h, RS-ODN-2h, RS-ODN-3h; AS-ODN-1h, AS-ODN-2h, AS-ODN-3h。

1.2 动物准备

大鼠首先行戊巴比妥钠麻醉(3%, 3ml/kg, i.p.), 经寰枕膜处切口, 将一长约 5.5—6.0cm 的 PE-10 硅胶管插入脊髓腰膨大(约 L3—L5)部位^[7], 固定缝合, 动物清醒后自由饮水、饮食, 约 14—16h, 行为反应良好, 开始实验。

1.3 测量左侧后肢脚掌皮肤的直径(cm), 算出福尔马林注射后直径较注射前直径变化的百分数^[2]。

1.4 鞘内注射

经鞘内置管分别注入 NS(5 μ l), RS-ODN(50 μ g/5 μ l), AS-ODN(50 μ g/5 μ l), 然后补 10 μ l NS 冲洗硅胶管。所有寡聚核苷酸片段均由上海生工公司合成,

AS-ODN 片段为 5'-GCC CAT CCT GCG TCC TCA-3', RS-ODN 片段为 5'-ACT CCT GCG TCC TAC CCG-3', 二者均为全磷硫化修饰^[8]。

1.5 炎性水肿程度检测及免疫组化检测

分别将动物在注射福尔马林后 1h、2h 及 3h 测定脚掌直径后, 立即进行深麻醉处死; 4℃, 4%多聚甲醛加 0.25%戊二醛 1000ml, 然后用 20%蔗糖 200ml 进行心内灌流; 取脊髓腰膨大约 1cm, 放 4℃冰箱, 30%蔗糖过夜, 以上液体均用磷酸缓冲液(PB, pH7.4) 配制; -20℃冰冻切片, 磷酸盐缓冲液(PBS, 0.01M, pH7.4)漂洗; ABC 法染色: ①入一抗: 抗 Dyn A(1—8)(1:2000)IgG, 室温孵育过夜。②入二抗: 生物素化羊抗兔 IgG, 室温孵育 2h。③入三抗: AB 混合液, 室温孵育 2h; DAB 显色, Dyn A 为单纯成色, 显示棕黄色的细胞胞体及突起; 酒精梯度脱水; DPX 封片^[9]。

1.6 Dyn A 表达的结果分析

用图像分析仪(MIAS300)检测脊髓背角浅层(I, II 层)Dyn A(1—8)免疫阳性(Dyn A-like immunoreactive, Dyn A-LI)物质的光密度值(OD), 并选择具有代表的脊髓片做显微照像。

1.7 统计学分析

以上结果均用平均值 $\pm$ 标准差表示, 方差分析进行统计学处理, 以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 炎性水肿检测结果

表 1 显示了两个对照组和一个实验组在各自的三个时间点所测得的注射福尔马林后脚掌直径增大的百分数, 表明 3 个组的水肿程度在注射以后都随时间而呈进行性增大, 但在预先鞘内注射 AS-ODN 的实验组, 三个时间点的测定值, 均较两个对照组相应时间点的测定值为小, 比较差异有显著性意义($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。这说明了在鞘内注射了能阻断 Dyn A 表达的 AS-ODN 后, 炎性水肿仍在 3h 内有所增加, 但较两个对照组明显减弱。

2.2 Dyn A-LI 检测结果

表 2 显示了 3 组在注射福尔马林后 1h、2h、3h 注射侧和对侧脊髓背角浅层 Dyn A-LI 的光密度测定值, 图 1 则是 3 组不同时间点的代表性脊髓切片图。可以看出, 在 NS 组及 RS-ODN 组, 注射侧 Dyn A-LI 的 OD 值或颜色均较对侧明显增加或加深, 并且注射侧的测定值都随时间而进一步加大(3h 测定值均较 1h 和 2h 差异显著); 而在 AS-ODN 组三个时间点注射侧的 OD 值虽也随时间增大(分别为 $P <$

0.05 及 $P<0.01$), 但三个时间点与两个对照组的相应时间点相比, OD 值均明显减小, 比较差异有显著性意义 ($P<0.01$ 及 $P<0.05$)。这说明, 鞘内注射 AS-ODN 后 Dyn A 的生成被明显地阻断了。

3 讨论

Dyn A 在炎性和神经病理性损伤所导致的痛

表 1 3 组在三个时间点大鼠后脚掌注射前、后直径差值与注射前直径的百分比的比较 ($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	动物数	1h	2h	3h
NS 组	5	41.2 $\pm$ 4.5	48.3 $\pm$ 3.1	69.8 $\pm$ 6.3 ^④
RS-ODN 组	5	45.6 $\pm$ 3.4	52.8 $\pm$ 4.2	74.5 $\pm$ 5.3 ^④
AS-ODN 组	5	22.7 $\pm$ 3.9 ^②	32.3 $\pm$ 5.6 ^①	49.5 $\pm$ 4.8 ^{①③}

在同一时间点与对照组 NS 组 或 RS-ODN 组比较: ① $P<0.05$; ② $P<0.01$; 组内与 1h 或 2h 时比较: ③ $P<0.05$; ④ $P<0.01$

表 2 3 组在三个时间点注射福尔马林同侧及对侧脊髓背角 Dyn A-LI 的 OD 值的比较 (25 个切片) ($\bar{x}\pm s$)

组别	1h		2h		3h	
	注射侧	对照侧	注射侧	对照侧	注射侧	对照侧
NS 组	207.2 $\pm$ 1.2	191.7 $\pm$ 2.3	208.75 $\pm$ 3.4	9192.8 $\pm$ 3.1	221.67 $\pm$ 2.67 ^④	194.6 $\pm$ 4.3
RS-ODN 组	209.1 $\pm$ 4.6	182.9 $\pm$ 2.0	220.60 $\pm$ 4.3	6184.5 $\pm$ 2.4	226.67 $\pm$ 1.53 ^③	190.5 $\pm$ 3.8
AS-ODN 组	189.5 $\pm$ 0.6 ^②	180.4 $\pm$ 3.1	190.93 $\pm$ 2.40 ^①	181.2 $\pm$ 2.2	204.40 $\pm$ 1.6 ^{①③}	184.5 $\pm$ 2.4

在同一时间点与对照组 NS 组 或 RS-ODN 组比较: ① $P<0.05$; ② $P<0.01$; 组内与 1h 或 2h 时比较: ③ $P<0.05$; ④ $P<0.01$

Dyn A(1-17), Dyn A(1-8), α -及 β -新内啡肽, 以及 Dyn B(1-13)等具有活性的内源性阿片肽, 但根据 Weber 等^[12]报道 Dyn A(1-8)是大鼠脑内前强啡肽分解生成的主要活性片段, 因而我们的 Dyn A(1-8)的表达量代表了前强啡肽的主要分解产物。

我们在实验中发现, 在鞘内注射了 NS 或 RS-ODN 的两个对照组, 脚掌注射福尔马林引起的炎性水肿随时间延长而加重, 到 3h 末达到最大 (本实验未作进一步观

图 1 3 组动物在三个时间点注射福尔马林的同侧及对侧脊髓背角 Dyn A-LI 表达的代
表性脊髓片的显微照相结果

三列分别为: a 列为 NS 组, b 列为 RS-ODN 组, c 列为 AS-ODN 组; 三行分别为: 福尔马林注射后 1h、2h 和 3h 的检测时间点。标尺为 250 μ m

觉过敏中的作用, 近年来有多种观点及看法。以往的许多资料认为 Dyn A 具有抗炎及抗伤害性痛的作用^[10], 而近年来的研究表明, Dyn A 可能具有促进痛行为及痛性感觉异常或痛觉过敏的作用, 在外周炎症或神经病理性损伤时, 可发现脊髓背角中 Dyn A 生成明显增加, 而且具有时间依赖性, 在中枢性痛或过敏中起关键作用^[11]。

本研究的主要目的是检验一种可能性, 即尽管外周持续的伤害性输入, 亦即局部慢性炎症反应的强烈程度是导致脊髓背角中 Dyn A 表达增加的诱发因素^[3,11], 是否背角中 Dyn A 表达的上调也可影响外周炎症反应的发展, 在实验中我们用大鼠后脚掌注射福尔马林作为诱发脊髓中 Dyn A 上调的因素, 而以预先鞘内注入前强啡肽的 AS-ODN 作为阻止背角 Dyn A 生成的手段, 同时观察注射侧脚掌水肿程度的变化情况, 以免疫组化技术测定背角中 Dyn A(1-8)生成量的改变。前强啡肽在体内可降解生成

察), 脚掌直径分别增大到正常时 69.8% $\pm$ 6.3% 和 74.5% $\pm$ 5.3%, 而在注射了 AS-ODN 的动物, 福尔马林注射也引起脚掌水肿的不断加大, 但程度明显减弱, 到 3h 末只达到正常时的 49.5% $\pm$ 4.8%, 而且在 1h 和 2h 的测定值也分别小于两个对照组相应时间的测定值, 有显著性差异。和免疫组化对背角中 Dyn A 的检测值相对照, 发现各 Dyn A 的变化情况与各该组水肿程度的变化呈正相关。事实是, 当 AS-ODN 的注射阻止了背角中 Dyn A 的上调程度时, 水肿增加的程度也出现相对应的减慢, 说明背角中 Dyn A 的量决定着脚掌炎症水肿的程度。

这个结果多少有些出乎我们的意料。因为过去的实验只注意到 Dyn A 的生成和生成受阻对痛行为反应的影响, 推测 Dyn A 的上调是中枢痛过敏状态形成和维持的重要因素, 但本实验观察到的却是背角中 Dyn A 的量影响外周组织对致炎物质引发炎性水肿程度的影响。局部炎性刺激是诱发脊髓中

Dyn A 上调的起始因素,而 Dyn A 上调的被阻止是通过怎样的途径减缓了外周组织炎性水肿程度的发展(事实上 Dyn A 上调未被阻止前它还在加重水肿程度的发展!),有待于进一步探讨。

参考文献

- [1] Shimoyama M, Tatsuoka H, Ohtori S, et al. Change of dorsal horn neurochemistry in a mouse model of neuropathic cancer pain [J]. Pain, 2005, 114(1—2): 221—230.
- [2] Zhang RX, Liu B, Lao L, et al. Spinal preprodynorphin mRNA expression in neonatal rats following peripheral inflammation[J]. Brain Res, 2005, 1038(2): 238—242.
- [3] 张瑞新,陈晋原,Ruda MA,等.大鼠外周组织炎症、温热性痛觉过敏和脊髓强啡肽基因表达增强的相关关系——行为和 mRNA 的研究[J]. 神经解剖学杂志,1999, 15: 19—26.
- [4] 祁文秀,张宇,祁金顺,等. 大鼠鞘内注入前强啡肽原的反义寡聚核苷酸减弱福尔马林引起的脊髓背角中强啡肽 A 的合成和行为痛反应:细胞免疫学和行为化学的联合观察[J]. 神经解剖学杂志,2003, 19(4): 351—358.
- [5] Gardell LR, Ibrahim M, Wang R, et al. Mouse strains that lack spinal dynorphin upregulation after peripheral nerve injury do not develop neuropathic pain [J]. Neuroscience, 2004,123(1): 43—52.
- [6] Wu HE,Schwasinger ET, Hong JS, et al. Pretreatment with antiserum against dynorphin, substance P, or cholecystokinin enhances the morphine-produced anti-allodynia in the sciatic nerve ligated mice[J].Neurosci Lett,2005,386(1):46—51.
- [7] Yaksh TL,Rudy TA. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space[J]. Physiol. Behav,1996,17: 1031—1036.
- [8] Broberger C, Nylander I, Geijer T, et al. Differential effects of intrastrially infused fully and endcap phosphorothioate antisense oligonucleotides on morphology, histochemistry and prodynorphin expression in rat brain [J]. Mol Brain Res, 2000, 75: 25—45.
- [9] Shu S, Ju J, Fan L. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system [J]. Neurosci Lett, 1998, 85: 167—171.
- [10] Kitamura K, Akahori K, Yano H,et al. Effects of peptides inhibitors on anti-nociceptive action of dynorphin-(1-8) in rats [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol,2000,36:273—278.
- [11] Toshiya T, Kenji M, Tetsuo F, et al. Dynorphin mRNA expression in dorsal horn neurons after traumatic spinal cord injury: temporal and spinal analysis using in situ hybridization [J]. J. Neurotraum, 1998, 15: 485—494.
- [12] Weber E, Evans CJ, Barchas JD. Predominance of the amino-terminal octapeptide fragment of dynorphin in rat brain regions[J]. Nature, 1982, 299 (2): 77—79.

“骨关节病的康复治疗新技术”学习班通知

由东南大学附属中大医院康复医学科举办的 2006 年省级继续医学教育项目“骨关节病的康复治疗新技术”(项目编号 2006-27-16-00 001)学习班定于 2006 年 8 月在南京举办。授课专家由国内骨关节康复界资深专家组成。

主要内容:骨关节疾病的影像学诊断进展;手功能的解剖和功能;手外伤的康复评定和治疗进展;髋、膝关节置换术后的康复治疗进展;疼痛的评定和注射治疗;颈腰椎疾病的解剖基础与临床;颈椎病、颈肩综合征、腰腿痛的诊断和治疗进展;血清阴性脊柱关节病的诊断与治疗;四肢和脊柱的关节松动技术;周围神经损伤的康复治疗进展;肌电生物反馈训练应用进展;平衡检测和训练系统;等速肌力评定和训练系统;表面肌电分析和训练系统;新型物理因子的治疗原理和临床应用;矫形器的使用;科研论文的写作与投稿。

招生对象:各级医院从事或拟开展骨关节疾病康复的医、护、技人员,如康复医学科、骨科、理疗科、全科(综合科)、中医科、针灸科等。

时间安排:2006 年 8 月 22—26 日,22 日全天报到,23—25 日授课,26 日离开。学费及学分:学费 500 元,6 月 30 日前提前注册交费者,学费 350 元。如同时参加国家级继续医学教育项目“脑血管病的康复治疗新技术”(项目编号 2006-16-00-014)学习班者,学费 1000 元,6 月 30 日前提前注册交费者,学费 700 元。食宿统一安排,费用回原单位报销。凡参加学习者均可获得 I 类学分 10 分。

联系地址:南京市丁家桥 87 号 东南大学附属中大医院康复医学科,邮编:210009;联系人:科教科 王慧萍;联系电话:025-83272065;传真:025-83272011; 康复医学科 王蓓蓓;联系电话:025-83272176;电子邮件:zdkf2176@163.com;网站:www.zdkf.com。提前汇款请寄:210009 南京市丁家桥 87 号 东南大学附属中大医院康复医学科 王蓓蓓 收。