·基础研究·

A型肉毒毒素对膝骨性关节炎大鼠模型镇痛效果及机制的实验研究*

马文俊[1] 梁 英[2,3]

摘要

目的:评估A型肉毒毒素(BTX-A)在骨性关节炎模型中的镇痛效果及疼痛相关物质在脊神经节的变化,为其临床治疗骨性关节炎疼痛提供科学的理论依据。

方法:SD大鼠右膝关节腔内注射4%木瓜蛋白酶溶液0.3ml建立膝骨性关节炎(KOA)的动物模型。造模成功的大鼠于第2天随机分为2组:BTX-A组(n=10):关节腔内注射5μl BTX-A 0.1IU;WFI组(n=10):关节腔内注射5μl 注射用水;Sham组(n=10):非关节炎模型组。注射后第1、3、5天后检测疼痛行为学、热痛阈,免疫组织化学检测脊神经节钠离子通道1.8(Nav1.8)蛋白的表达。

结果:自发疼痛行为分析显示大鼠骨性关节炎引起步态异常,与WFI组相比,BTX-A组的大鼠异常步态改善明显,注射后5天与1、3天相比较,自发疼痛行为改善的愈明显;BTX-A组大鼠右足热痛阈升高($P<0.05$),脊神经节Nav1.8蛋白表达下调($P<0.05$)。

结论:关节腔内注射BTX-A可能通过下调脊神经节Nav1.8蛋白的表达,减少中枢致敏,减轻关节疼痛,提高痛阈,从而起到镇痛作用。

关键词 A型肉毒毒素;膝骨性关节炎;钠离子通道1.8;热痛阈;镇痛

中图分类号:R684 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2017)-06-0649-05

An experimental research on the analgesic effect and underlying mechanism of BTX-A for rat knee osteoarthritis/MA Wenjun,LIANG Ying//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2017, 32(6): 649—653

Abstract

Objective: To evaluate the analgesic effect of botulinum toxin type A (BTX-A) in osteoarthritis model and the changes of Nav1.8 protein expression in spinal ganglia changes.

Method: Animal model of knee osteoarthritis (KOA) was established by intra-articular injection of 4% papain solution 0.3ml into SD rat right knee. After the formation of arthritis,they were randomly divided into two groups at the 2nd day: BTX-A group (n=10): intra-articular injection of 5μl BTX-A 0.1IU; WFI group (n=10): intra-articular injection of 5μl water. No papain or BXT-A was given to the sham group (n=10). At the 1st, 3rd, 5th day after injection,we tested the pain behavior, thermal pain threshold, and sodium channel 1.8 (Nav1.8) protein expression in spinal ganglion by using immunohistochemistry.

Result: Analysis of spontaneous pain behavior showed abnormal gait caused by rat osteoarthritis. Comparing with the WFI group, abnormal gait caused by osteoarthritis improved significantly in BTX-A group. At day 5 it improved more significantly than day 1 and day 3. Thermal pain threshold of BTX-A group increased more than that of WFI group ($P<0.05$) at any time point. Abnormal high Nav1.8 protein in model rats decreased in spinal ganglia for BTX-A group.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2017.06.008

*基金项目:山西省课题基金(201301055)

1 山西医科大学附属第一临床医学院,山西太原,030001; 2 山西医学科学院,山西大医院; 3 通讯作者

作者简介:马文俊,男,硕士研究生,住院医师; 收稿日期:2015-04-06

Conclusion: The intra-articular injection of BTX-A may play the analgesic effect in the model of KOA by down-regulating of the expression of Nav1.8 protein in spinal ganglia and reduction in the central sensitization to pain stimulation.

Author's address Department of Rehabilitation Medicine,The First Clinical Hospital of Shanxi Medical University,Taiyuan,030001

Key word botulinum toxin type A;knee osteoarthritis;Nav1.8 sodium channel;paw withdrawal latency;analgesia

膝骨性关节炎(knee osteoarthritis,KOA)是以滑膜和关节软骨结构破坏为主要病理改变的慢性退行性的关节疾病[1],发病率高,临床表现为关节疼痛、活动受限,严重影响生存质量。目前治疗骨性关节炎的方法很多,如口服止痛剂、关节腔内注射皮质类固醇激素或玻璃酸钠、关节镜清创术及关节置换,存在药物不良反应[2]、效果持续时间不稳定,或高手术风险的代价[3],因此急需治疗关节炎的安全、有效的方法。

KOA伴随关节软骨的损害及膝关节炎性介质的释放增加,这些外周伤害性刺激的不断的输入将调控脊髓的痛觉传递神经元,通过痛觉过敏及中枢敏化机制,导致神经元突触的兴奋性增加和痛阈下降。脊神经节是疼痛信号传导的第一级神经元,且Nav 1.8特异性表达在脊神经节,激活其动作电位可使痛觉上传。KOA突出表现为关节疼痛,其疼痛的主要机制之一是脊髓中疼痛传导递质Nav 1.8的过度表达,使患者对疼痛的敏感度增高。研究表明,A型肉毒毒素(botulinum toxix type A, BTX-A)对神经病理性疼痛具有较好的止痛作用,但对膝骨性关节炎的镇痛效果和镇痛机制,尤其脊髓水平镇痛机制的研究尚缺乏相应的报道。目前已有临床研究观察到对老年慢性KOA患者关节腔内注射A型肉毒毒素有减轻疼痛的作用,延缓KOA的进展,但其镇痛机制尚不明确,缺乏理论支持,故临床应用受到制约。本研究拟在大鼠骨性关节炎模型中,通过关节腔注射A型肉毒毒素,观察其对大鼠膝骨性关节炎的镇痛效果,并观察脊髓背角中钠离子通道Nav 1.8的表达的变化,从中枢敏化角度部分阐明其镇痛机制,达到改善膝骨性关节炎疼痛及治疗其安全有效方法的目的。

1 材料与方法

1.1 材料

SD大鼠,均为雄性,清洁级,体质量(150±30)g,购自山西医科大学动物实验中心。木瓜蛋白酶,购自天津药业集团新郑股份有限公司,试剂号9001-73-4。注射用BTX-A,购自兰州生物制品研究所,批号20140609。兔抗大鼠Nav1.8、FITC标记山羊抗兔IgG均购自太原市贝倍科贸有限公司;电动跑步机购自北京东西仪科技有限公司;鼠爪热辐射刺激测痛仪购自北京智鼠多宝生物科技有限责任公司。

1.2 方法

参照Panicker等[4]的建模方法建立实验模型,固定大鼠使右膝关节屈曲90°,乙醇消毒并充分暴露,于膑韧带外侧0.2cm凹陷处进针,出现落空感,回抽无血液后注入4%木瓜蛋白酶溶液0.3ml,注射完毕后再次消毒且反复活动膝关节。于第1、4、7天分别进行注射。自注射之日起每日上、下午分别驱赶动物活动两次,每次10min,以使大鼠于规定时限内运动不停歇为标准,连续7日。

将SD大鼠随机分成3组,每组10只:其中两组是骨性关节炎组,分别给予BTX-A和WFI。BTX-A组:用30号针头穿刺2.5mm,膝关节内注射5μl的BTX-A 0.1 IU;WFI组:膝关节内注射5μl注射用水;Sham组为非关节炎大鼠。

1.3 检测指标

1.3.1 行为学测试:自发疼痛行为步态分析:肉眼步态分析观察大鼠在17cm/s的电动跑步机上行走20s。在0—4分之间半定量分析大鼠的步态。0分:大鼠拒绝在跑步机上行走;1分:大鼠行走了规定时间的30%,步态表现为严重的不协调;2分:大鼠行走了规定时间的60%,步态表现为中等的不协调;3分:大鼠行走了规定时间的90%,期间没有触碰间隔物、跳跃、张腿或拖后腿,步态表现为轻微的不协调;4分:大鼠行走完了规定时间,期间没有触碰间隔物、跳跃、张腿或拖后腿。

1.3.2 热刺激撤足阈值(paw withdrawal latency PWTL)的测定:利用鼠爪热辐射刺激测痛仪检测大鼠后肢足跟部皮肤对热刺激的反应。测试前将大鼠

放置于测痛仪的有机玻璃罩内自由活动约5min,测试时将热辐射光源通过透明玻璃板输出热刺激并聚焦于大鼠后肢足掌部。调整好仪器刺激强度(IR=72),按下操作开始键,热源启动并缓慢施加热刺激,在大鼠鼠爪撤足的瞬间手动记录大鼠反应时间,此时间即为大鼠足底部的热刺激撤足潜伏期(精确度达0.1s),即热痛阈。为避免长时间热刺激造成组织损伤不宜热刺激时间超过25s。以5min的间隔对双侧后足各测3次,3次撤足潜伏期的均值为所得数据。

1.3.3 免疫荧光组织化学检测:用10%水合氯醛(4ml/kg)麻醉大鼠后,行4%多聚甲醛经心脏灌流术固定,取出L5背根神经节,4%多聚甲醛浸泡固定24h(4℃)。组织经乙醇梯度脱水,石蜡包埋,厚4μm石蜡切片。切片晾干后,经二甲苯脱蜡,各级乙醇至水洗,PBS溶液冲洗,脊神经节滴加Nav1.8一抗后4℃过夜;次日用dH_2O、磷酸盐缓冲液(PBS)各洗5min,滴加羊抗兔FITC,室温过夜(注意避光),次日荧光显微镜观察,在激发光波长为490nm、滤色光波长为520nm条件下拍照。

1.4 统计学分析

全部数据应用SPSS 20.0统计软件进行处理,行为学测试结果采用非参数秩和检验进行分析。同一组大鼠不同测试时间点的数据用相关样本参数检验分析;采用均数±标准差表示计量资料,用t检验及方差分析对计数资料进行分析,$P<0.05$为有显著性意义。

2 结果

2.1 膝骨性关节炎模型

在大鼠右膝关节内注射4%木瓜蛋白酶溶液0.3ml,实验第5天80%大鼠已有不同程度出现关节肿胀及活动受限,7d达到高峰。取20只自发疼痛行为步态分析阳性(评分为1分)及关节肿胀的大鼠。

2.2 自发疼痛检测结果

自发疼痛检测阳性的20只大鼠分为两组,在右侧膝关节内分别注射BTX-A组(n=10):5μl的BTX-A0.1 IU,WFI组(n=10):5μl的注射用水,分别在注射后1天、3天及5天进行自发痛检测。与WFI组相比,BTX-A组的大鼠自发疼痛行为改善明显,差异有显著性意义($P=0.002<0.05$)。膝骨性关节炎大鼠在注射BTX-A后1天、3天及5天,分别进行自发疼痛步态分析的检测。注射BTX-A后时间不同,自发疼痛行为改善也不同,差异有显著性意义($P<0.05$)。注射BTX-A后1、3、5天,三组中两两相比较均有显著性差异($P<0.05$),且随着注射后时间延长(≤5天),自发疼痛步态改善越明显。

2.3 热痛阈检测结果

2.3.1 三组大鼠:Sham组、关节炎+WFI组、关节炎+BTX-A组分别在注射后第1、3、5天测试大鼠右足热痛阈值。在实验观察的时间内,关节炎+WFI组与Sham组比较,PWTL均有所降低($P<0.05$,见表1)。

2.3.2 热痛阈结果显示:模型组大鼠第1天给予BTX-A注射后24h大鼠的热痛阈值即明显上升($P<0.05$,见图1),且随时间的延长其缓解疼痛效果逐渐明显,一直可持续到注射后第5天($P<0.05$,见图1),与注射用水组比较,BTX-A组热痛阈明显高于对照组($P<0.05$,见表1)。实验结果表明注射BTX-A可缓解疼痛,增加热痛阈值。

2.4 脊神经节Nav1.8的表达

免疫荧光组织化学结果显示WFI组可上调DRG(背根神经节)神经元中Nav1.8蛋白表达水平(见图2),与假手术组比较,有显著性意义($P<0.05$,见表2)。BTX- A注射5 d后大鼠DRG神经元中Nav1.8蛋白表达上调现象被明显抑制(见图2),与注射用水组比较,具有显著性意义($P<0.05$,见表2)。结果提示BTX-A干预后可下调大鼠DRG神经元中原本表达增多的Nav1.8蛋白。

表1 非关节炎组、注射用水组及A型肉毒毒素组热痛阈的比较 ($\bar{x}\pm s$,n=10)

组别	第0天	第1天	第3天	第5天
假手术组	17.67±1.61	17.77±1.46	16.99±0.71	15.65±0.59
WFI组	7.22±0.23①	7.18±0.35①	7.20±0.72①	7.24±0.59①
BTX-A组	7.43±0.52①②	8.48±0.46①②	12.91±0.65①②	13.69±0.59①②

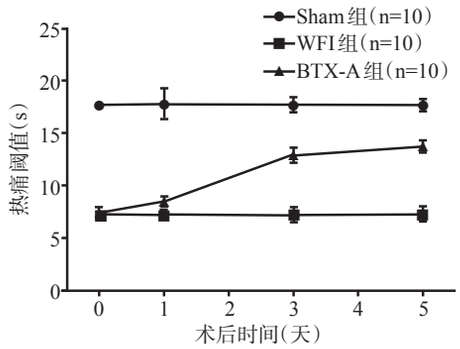
①与假手术组比较$P<0.05$;②与WFI组比较$P<0.05$

表2 非关节炎组、注射用水组及A型肉毒毒素组的大鼠Nav 1.8蛋白阳性百分比的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	第5天
假手术组	10	1.16±1.20
WFI组	10	45.25±1.99①
BTX-A组	10	21.40±0.72②

①与假手术组比较$P<0.05$,②与WFI组比较$P<0.05$

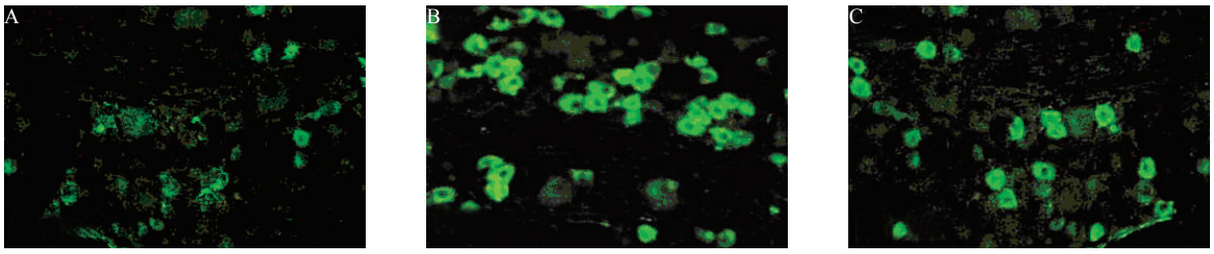
图1 不同组在不同天的热痛阈值



3 讨论

KOA是一种以关节软骨的变性、破坏、滑膜增生及骨质增生为特征的慢性全关节退行性疾病[1]。本病多在中年后发病，是引起中老年人关节疼痛的最常见的原因。临床主要表现为关节疼痛、肿胀、僵硬，且导致不同程度的活动受限，甚至严重影响日常生活。膝骨性关节炎临床治疗方法很多，口服止痛剂不能很好的达到缓解疼痛的目的，而且有不良反应和其他药物相互作用限制了其应用；关节腔内注射糖皮质激素和透明质酸可以缓解疼痛，能在短期内改善症状，但其疗效及持续时间尚不稳定；关节镜清创术后有出现关节腔内再次粘连及继发滑膜炎的可能；关节置换有很高的手术风险[3]。因此急需治疗慢性关节炎的安全、有效的方法。

图2 第5天非关节炎组、注射用水组和A型肉毒毒素组的脊神经后根上Nav1.8蛋白的表达 （免疫组化，×400）



非关节炎组　　注射用水组　　A型肉毒毒素组

BTX-A的药理机制是与神经肌肉接头处突触前膜的胆碱能神经末梢快速结合后，通过裂解相关蛋白[5]，抑制乙酰胆碱的释放，阻断神经肌肉间的传导，减少肌肉的痉挛和收缩，因此早期广泛用于治疗肌肉过度活动性疾病，以及用于美容除皱等外科领域[6]。近年，将BTX-A应用于偏头痛、带状疱疹后神经痛[7]、糖尿病周围神经病变[8]、腰背痛等临床研究中，均有明显的治疗效果。研究表明，BTX-A不仅可以使肌肉松弛，还能缓解由肌痉挛引起的疼痛，而且BTX-A的镇痛机制并不依赖对肌肉的松弛作用，当肌张力恢复正常后，它的镇痛作用仍然很明显[9]，可见BTX-A对由肌痉挛或非肌痉挛引起的疼痛均有效果。表明肉毒毒素的镇痛作用尚存在其他的机制。Weigand H[10—11]等在猫模型中用^{125}I标记的肉毒毒素行肌肉注射，注射后48h镇痛效果出现，且同时在猫背根神经节及脊髓中发现了标记的肉毒毒素。说明肉毒毒素的作用与背根神经节和脊髓密切相关，而背根神经节是疼痛信号传导的第一级神经元，钠离子通道Nav 1.8特异性表达在脊神经节，在炎症性和神经病理性疼痛形成中起到有重要作用[12]。本研究拟通过观察BTX-A是否能对骨性关节炎疼痛模型动物产生镇痛作用，并进一步探究BTX-A对疼痛行为学、热痛阈、背根脊神经神经元中Nav1.8蛋白表达的影响，以便了解BTX-A在实验研究中治疗疼痛的效果和作用机制。

在大鼠右膝关节腔内注射4%木瓜蛋白酶溶液后，其导致的炎症改变一般发生于5天左右，主要表现为关节肿痛及活动受限，行走拖后腿等不协调步态。模型成功后节腔内注射BTX-A及注射用水（WFI），从自发疼痛步态分析可见，与WFI组相比，BTX-A组的大鼠自发疼痛行为改善明显，随着注射后时间延长(≤5天)，自发疼痛步态改善越明显。从热痛阈测定结果可分析到，模型组大鼠第1天给予BTX-A注射后24h大鼠的热痛阈值即明显上升，且随时间的延长其缓解疼痛效果逐渐明显，一直可持续到注射后第5天且BTX-A组热痛阈明显高于WFI组。说明BTX-A的确对关节炎有镇痛作用。

研究显示注射BTX-A1天后即可缓解疼痛,表明其镇痛作用机制可能存在更多解释。研究显示当外周收到伤害感受后,初级感觉传入神经元可产生异常的自发电活动,这种异位冲动的产生可能在病理性疼痛形成中起至关重要的作用[13—14],而Matak等[15]研究发现外周足部应用少量的BTX-A后,可经坐骨神经传导至脊髓,因此推测BTX-A可能通过影响感觉传入的异常兴奋而产生镇痛作用。DRG神经元是感觉信号传导的第一级神经元,在痛觉感知和传导过程中起着重要的作用。电压门控钠离子通道Nav1.8和Nav1.9特异性表达在脊神经节,其中Nav1.8主要介导产生动作电位上升支的80%的内向电流,激活其动作电位使痛觉上传[16]。在本实验中,通过免疫组织化学法检测到BTX-A干预后脊神经节Navl.8蛋白表达量下降。因此推测,BTX-A可能通过影响Nav1.8蛋白的表达,减少神经递质的释放,减少外周敏化,间接地减少中枢致敏从而起到镇痛作用。本实验为BTX-A在关节炎的疼痛治疗提供了实验依据。

4 结论

①在右膝骨性关节炎模型中,予关节腔注射BTX-A,可改善其自发疼痛步态,在不同时间点(术后1天、3天、5天)均有类似的镇痛效果,且随着注射后时间延长(≤5天),自发疼痛步态改善愈明显。②给予BTX-A注射后,模型组大鼠24h后热痛阈值即明显上升,且随时间的延长其缓解疼痛效果逐渐明显,说明BTX-A可缓解疼痛,提高热痛阈值。③在大鼠骨性关节炎模型中,通过关节腔内注射BTX-A,可见脊神经节中钠离子通道Nav 1.8表达下降,可能通过抑制DRG神经元中原本表达上调的Nav 1.8蛋白,减少中枢致敏,减轻关节疼痛,提高痛阈,从而起到镇痛作用。

参考文献

[1] Scarpellini M , Lurati A, Vignati G, et al. Biomarkers, type II collagen,glucosamine and chondroitin sulfate in osteoarthritis follow-up:the "Magenta osteoarthritis study" [J]. J Orthop Traumatol,2008,9:81—87.

[2] 肖军,吴志宏,史占军,等.RE-1元件辅助抑制因子对骨关节炎软骨细胞分化的调控作用[J].中华实验外科杂志,2011,28:1375—1377.

[3] Studelska DR,Mandik-Navak L,Zhou X,et al.High affinity glyeo-saminogly can and autoantigen interaction explains joint specificity in a mouse model of rheumatoid arthritis[J]. Binl Chem,2009,284:2354—2362.

[4] Panicker S,Borgia J,Fhied C,et al.Oral glucosamine modulates the response of the liver and lymphocytes of the mesenteric lymph nodes in a papain-induced model of joint damage and repair[J].Osteoarthritis Caritlage,2009,17(8):1014—1021.

[5] Nitti VW.Botulinum toxin for the treatment of idiopathic and neurogenic over active bladder: state of the art[J].Reviews in urology,2006,8(4):198—208.

[6] 李荣春,项红兵,董航.氯胺酮对骨癌痛模型大鼠脊髓信号传导子与转录激活子STAT3表达的影响[J].中华实验外科杂志,2007,24:1581—1583.

[7] Shukla HD,Sharma SK.Clostfidium botulinum: a bug with beauty and weapon[J].Crit Rev Microbiol,2005,31:11—18.

[8] Liu HT,Tsai SK,Kao MC,et al.Botulinum toxin A relieved neuro-pathic pain in a ease of post-herpetic neuralgia[J].Pain Med,2006,7:89—91.

[9] Freund B, Schwartz M. Temporal relationship of muscle weakness and pain,reduction in subjects treated with botulinum toxin A[J].J Pain,2003,24 (3):159—165.

[10] Wiegand H,Erdmann G,Welhoner HH.^{125}I-labelled botulinum A neurotoxin: Pharmacokinetics in cats after intramuscular injection[J].Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol,1976,292:161—165.

[11] Wiegand H,Welhoner HH.The action of botulinum A on the inhibition by antidromic stimulation of the lumbar monosynaptic reflex[J].Naunyn Schmiedebergs Arch Phannacol,1977,298:235-—238.

[12] Leo S, D'Hooge R, Meert T.Exploring the role of nociceptor-specific sodium channels in pain transmission using Nav1.8 and Nav1.9 knockout mice[J].Behav Brain Res,2010,208(1):149—157.

[13] Scadding JW.Development of ongoing activity,mechanosensitivity,and adrenaline sensitivity in severed peripheral nerve axons[J].Exp Neurol, 1981, 73(2):345—364.

[14] Wall PD,Devor M.Sensory afferent impulses originate from dorsal root ganglia as well as from the periphery in normal and nerve injured rats [J].Pain,1983,17(4):321—339.

[15] Matak I, Riederer P, Lackovic Z.Botulinum toxin's axonal transport from periphery to the spinal cord[J].Neurochem Int, 2012, 61(2):236—239.

[16] Renganathan M, Cummins TR,Waxman SG.Contribution of Nav1.8 sodium channels to action potential electrogenesis in DRG neurons[J].J Neurop hysiol,2001,86(2):629—640.