

·基础研究·

带状疱疹后神经痛模型小鼠脊髓的自噬变化*

张爱民¹ 蒋宗滨^{1,3} 周增华¹ 陈云婷¹ 陈婷婷² 潘 剑²

摘要

目的:观察带状疱疹后神经痛(postherpetic neuralgia, PHN)模型小鼠脊髓自噬程度的变化。

方法:36只昆明小鼠随机分为生理盐水组(NS)、溶剂组(Solvent)与腹腔注射树脂毒素组(RTX),每组12只。RTX组0.2μg/g的剂量构建PHN模型,Solvent组、NS组分别注射等体积的溶剂和生理盐水。每天定时用von-frey纤维丝检测机械缩足阈值(PWMT),热板法检测缩足时间阈值(HPPT)至疼痛稳定。然后分别处死各组小鼠,取脊髓L4—L6节段使用实时荧光定量PCR、免疫组织化学染色及western Blot等方法检测LC3、beclin1的变化情况。

结果:使用0.2μg/g的RTX后PHN模型PWMT显著降低、HPPT显著增加($P < 0.05$),同时自噬相关蛋白LC3、beclin1的mRNA和蛋白相对表达量显著性增加($P < 0.05$)。

结论:0.2μg/g的RTX可以复制PHN小鼠模型;PHN小鼠模型脊髓自噬程度增加。

关键词 带状疱疹后神经痛;自噬;脊髓;小鼠

中图分类号:R752.1, R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2018)-03-0286-06

Changes of autophagy levels in spinal cord of mice with postherpetic neuralgia/ZHANG Aimin, JIANG Zongbin, ZHOU Zenghua, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2018, 33(3): 286—291

Abstract

Objective: To observe the changes of autophagy in the spinal cord of postherpetic neuralgia (PHN) mice.

Method: Thirty-six Kunming mice were randomly divided into group normal saline, group solvent and group PHN, 12 mice in each. They were treated with equal volume intraperitoneal injection of normal saline, solvent and 0.2μg/g resiniferotoxin solvent separately. Von-frey fiber was used to detect the paw mechanical thresholds. The hot plate method was used to detect the shrinkage time threshold at the same time every day for every mice. The expression of LC3 and beclin1 was detected by real-time fluorescence quantitative PCR, immunohistochemistry and Western-Blot in the spinal cord segment of L4—L6 after day 7.

Result: The PWMT value decreased and HPPT increased significantly ($P < 0.05$) in group PHN after intraperitoneal injection of 0.2μg/g resiniferotoxin, while the level of mRNA and protein, the relative expression of LC3, beclin1 significantly increased ($P < 0.05$).

Conclusion: Intraperitoneal injection of 0.2μg/g RTX can replicate PHN mice model. Levels of autophagy increased in PHN mice.

Author's address The Second Affiliated Hospital Guangxi Medical University, Nanjing, 530007

Key word postherpetic neuralgia; autophagy; spinal cord; mice

带状疱疹后神经痛(postherpetic neuralgia, PHN)是由水痘一带状疱疹病毒感染导致支配区域神经损伤后在皮损区出现的特殊、异常剧烈的疼痛,

为神经病理性疼痛(neuropathic pain, NeuP)的一种^[1]。临床上主要使用促进神经修复和功能调控的药物联合治疗,患者疼痛改善一般,治疗满意度仍欠

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2018.03.007

*基金项目:广西自然科学基金项目(2016GXNSFAA380172)

1 广西医科大学第二附属医院疼痛科,南宁市,530007; 2 广西医科大学基础医学院人体解剖学教研室; 3 通讯作者
作者简介:张爱民,男,硕士,住院医师; 收稿日期:2017-04-18

佳^[2]。导致其疗效不良的最重要的原因是PHN致病机制未明。新近研究表明,在NeuP中,脊髓自噬功能的过度激活参与小鼠糖尿病神经病理性疼痛的维持^[3];坐骨神经分支损伤疼痛模型的脊髓中自噬功能障碍参与了疼痛的持续状态^[4];在坐骨神经分支切断大鼠疼痛模型的脊髓背角中,微管相关蛋白1轻链3(microtubules associated protein 1 light chain 3, LC3)和beclin1蛋白表达明显升高^[5],而LC3和beclin1是发生自噬的特征性蛋白之一。综上所述可知,自噬可能是疼痛发生的重要机制之一,但在PHN中脊髓自噬是否激活尚未明确。因此,本研究拟通过建立PHN小鼠模型,观察其脊髓自噬水平改变情况。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验经广西医科大学动物学伦理委员会批准。实验选择的SPF级昆明小鼠由广西医科大学动物实验中心提供,合格证号:SCXK桂-2014-0002,均为6—8周鼠龄,体重约18—22g。实验开始前,小鼠在广西医科大学动物实验中心动物饲养室内适应3d后,每日自由作息与饮食,昼夜各半。

1.2 试剂与主要仪器

兔抗鼠LC3(ab204297),兔抗鼠beclin1(ab92389),兔抗鼠GAPDH(ab8245)由英国Abcam公司提供。辣根过氧化物酶标记鼠抗兔IgG、酶标鼠抗兔IgG、BCA蛋白浓度测定试剂盒RIPA裂解液、蛋白酶抑制剂、SDS-PAGE凝胶制备试剂盒、PVDF膜、考马斯亮兰R-250染液套装、TEMED等由中国碧云天公司提供。实时荧光定量PCR、免疫组化及Western Blot相关设备由广西医科大学基础医学院中心实验室提供。

1.3 动物模型制作与分组

将36只实验昆明小鼠进行数字编号。使用SPSS 19.0软件中的随机数字发生器进行随机化处理,将提取的号码对应小鼠分别进入生理盐水组(NS)、溶剂组(Solvent)与腹腔注射树脂毒素组(RTX),每组12只。将RTX溶解于新鲜配制的吐温80、乙醇和生理盐水混合液中,混合液中三者的比例依次为10%、10%、80%。制成后浓度为40μg/ml,按

0.2μg/g的RTX腹腔注射小鼠构建PHN模型;Solvent组则仅注射等体积不含有RTX的溶剂;生理盐水组则只注射等体积的生理盐水。

1.4 机械痛阈和热痛阈的测量

1.4.1 机械痛阈测量:实验选择的von-frey纤维丝测量范围为:0.07—15g各型号中,首先选择0.4g纤维丝垂直刺激小鼠术侧后爪内侧皮肤,缓慢有力至纤维丝弯曲成角,持续1.5s,结束刺激。连续刺激3次,每次间隔5min,每次刺激小鼠出现嘶吼、舔足、甩尾及弹腿任一行均记为该力度阳性,然后选择低于此力度的下一型号纤维丝继续刺激,直到小力度纤维丝刺激阴性为止,将最后一个小力度纤维丝的上一个值记为其痛阈值。若为阴性则选择大于该力度的纤维丝进行刺激,直到呈现阳性,且将此时的力度值记为其痛阈值。当小鼠的机械缩足阈值(paw withdrawal mechanical thresholds, PWMT)在0.07g时仍为阳性,则统一计数为0.07g。

1.4.2 热痛阈测量:将各组小鼠依次置于热痛阈检测盒中,待其安静后,打开辐射光源,依次在其足趾与足掌上选择三个照射点,每个间距0.2cm,每次照射间隔时间3min。当小鼠出现嘶吼、舔足、甩尾及弹腿任一行行为时即刻所需照射的时间,每次照射时间均不能大于30s,防止长时间照射导致热烫伤。连续监测7d后,使用10%的水合氯醛麻醉各组小鼠后处死,提取脊髓标本。

1.5 实时荧光定量PCR

冰上超声匀浆机研磨,参照TRizol法提取总RNA,测定RNA浓度与纯度。引物由NCBI引物在线系统设计,由Takara公司合成。参照反转录试剂盒说明,42℃反转录50min,95℃ 5min灭活反转录酶。使用ABI 7300实时PCR System进行Syber Green荧光定量PCR检测,记录ct值,以 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 统计分析。

1.6 免疫组化

组织切片后进行抗原修复,分别用LC3、beclin1抗体作为一抗4℃过夜,二抗和辣根过氧化物酶孵育后,DAB显色、苏木素染核,封片。用Olympus显微镜及显微摄影仪拍片后使用Image-pro Plus软件进行平均光密度测定。

1.7 Western Blot

脊髓组织加入RIPA裂解液后超声匀浆,提取总蛋白,采用BCA法检测其浓度。煮沸5min使其变性,十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS—PAGE)后转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上(LC3使用10%的SDS—PAGE, beclin1和P62使用12.5%的SDS—PAGE)。5%脱脂牛奶封闭1h,分别加入LC3、beclin1,稀释度分别为1:800、1:2000,4℃过夜后复温,30min。加入酶标二抗(中杉金桥提供,稀释度1:1000),ECL法显色,在Bio-Rad成像仪,获取蛋白显色后条带,并用该公司配套的Image Lab软件进行条带灰度值测量,目的蛋白条带与对应的内参GAPDH灰度值比值计算为蛋白相对表达量。

1.8 统计学分析

采用SPSS 19.0软件对数据进行分析处理,计量资料用均数±标准差表示,多组间相互比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验。

2 结果

2.1 痛阈值变化

连续7d监测痛阈变化,缩足时间阈值(pain threshold in hot-plate test, HPPT)统计结果发现:与d0时刻比较,NS组和Solvent组的HPPT在d1—d6时间区间内均无显著性改变($P>0.05$),RTX组的HPPT于d1时刻开始显著增加($P<0.05$);PWMT

统计结果发现:在d0时刻,三组相互比较,PWMT差异无显著性($P>0.05$)。与d0时刻比较,NS组在d1—d6时间段的PWMT无显著性改变($P>0.05$)。RTX组的PWMT在d1时刻开始显著降低($P<0.05$),在d2—d6时间段内阈值稳定($P>0.05$)。与NS组比较,Solvent组d1时刻阈值显著性升高($P<0.05$),d2—d6时间段二者比较无显著性差异($P>0.05$)。见表1—2。

2.2 实时荧光定量PCR检测结果

d6时刻测量痛阈值结束后,10%的水合氯醛麻醉后处死各组小鼠。采用荧光实时定量PCR测试三组小鼠脊髓组织LC3、beclin1 mRNA的改变情况,LC3 mRNA行单因素方差分析:经方差齐性检验认为五组样本总体方差相等($P=0.702$), $F=394.460$, $P=0.000$;beclin1 mRNA行单因素方差分析:经方差齐性检验认为五组样本总体方差相等($P=0.357$), $F=42.864$, $P=0.000$ 。结果提示:RTX组的LC3、beclin1的相对表达量显著高于NS组和Solvent组($P<0.05$),NS组和Solvent组之间比较,差异无显著性($P>0.05$)。见图1。

2.3 免疫组化染色结果

在痛阈值稳定后,于d6时刻麻醉后取小鼠L4—L6脊髓节段行免疫组化染色。LC3平均光密度值行单因素方差分析:经方差齐性检验认为五组样本

表1 各组小鼠不同时间点PWMT变化

($\bar{x}\pm s$)

组别	d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6
NS组	2.50±0.44	2.52±0.39	2.49±0.23	2.42±0.15	2.46±0.37	2.49±0.32	2.57±0.35
Solvent组	2.62±0.76 ^①	2.80±0.34 ^②	2.52±0.24 ^①	2.55±0.15 ^①	2.56±0.37 ^①	2.49±0.39 ^①	2.56±0.45 ^①
RTX组	2.73±0.69 ^{①③}	1.04±0.67 ^{②④}	0.88±0.26 ^{②④}	0.87±0.14 ^{②④}	0.76±0.29 ^{②④}	0.67±0.15 ^{②④}	0.68±0.20 ^{②④}
<i>F</i>	0.362	71.350	140.627	296.609	90.279	176.696	85.618
<i>P</i>	0.700	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:①机械痛阈值重复检测结果不满足球面分布($P=0.000$),采用Greenhouse-Geisser校正;②不同时间点间的机械痛阈值有差别($F_{\text{time}}=8.780$, $P=0.000$);③不同组的机械痛阈值检测结果在不同时间上的变化趋势有差别($F_{\text{time} \cdot \text{组间}}=12.075$, $P=0.000$);④不同组间的机械痛阈值结果有差别($F_{\text{组间}}=227.313$, $P=0.000$)。与NS组比较:① $P>0.05$;② $P<0.05$;与Solvent组比较:③ $P>0.05$;④ $P<0.05$

表2 各组小鼠不同时间点HPPT变化

($\bar{x}\pm s$)

组别	d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6
NS组	5.20±0.45	5.50±0.12	4.90±0.37	5.20±0.36	5.40±0.17	5.40±0.38	5.40±0.50
Solvent组	5.10±0.30 ^①	5.30±0.40 ^①	5.80±0.60 ^①	5.50±1.40 ^①	5.80±0.72 ^①	5.40±0.30 ^①	5.60±0.28 ^①
RTX组	5.40±0.63 ^{①③④}	12.50±1.20 ^②	15.70±2.50 ^{②④}	18.00±2.50 ^{②④}	18.40±4.10 ^{②④}	18.10±3.80 ^{②④}	18.00±3.50 ^②
<i>F</i>	1.520	325.413	262.732	188.857	53.026	548.686	142.463
<i>P</i>	0.237	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:①热痛阈值重复检测结果不满足球面分布($P=0.000$),采用Greenhouse-Geisser校正;②不同时间点间的热痛阈值有差别($F_{\text{time}}=35.476$, $P=0.000$);③不同组的热痛阈值检测结果在不同时间上的变化趋势有差别($F_{\text{time} \cdot \text{组间}}=30.766$, $P=0.000$);④不同组间的热痛阈值结果有差别($F_{\text{组间}}=667.643$, $P=0.000$)。与NS组比较:① $P>0.05$;② $P<0.05$;与Solvent组比较:③ $P>0.05$;④ $P<0.05$

总体方差相等($P=0.303$), $F=21.534$, $P=0.000$; beclin1 平均光密度值行单因素方差分析:经方差齐性检验认为五组样本总体方差相等($P=0.583$), $F=10.558$, $P=0.000$ 。平均光密度值分析结果提示:RTX 组的 LC3、beclin1 相对表达显著高于 NS 组和 Solvent 组($P<0.05$), NS 组和 Solvent 组之间比较,差异无显著性($P>0.05$)。各组 LC3、beclin1 染色结果见图 2—3, 各组 LC3、beclin1 平均光密度值统计结果见图 4。

2.4 Western Blot 检测结果

检测 d6 时刻的小鼠脊髓 LC3、beclin1 蛋白表达结果, LC3II/LCI 条带灰度值行单因素方差分析:经方差齐性检验认为五组样本总体方差相等($P=0.117$), $F=18.857$, $P=0.000$; beclin1/GAPDH 条带灰度值行单因素方差分析:经方差齐性检验认为五组样本总体方差相等($P=0.152$), $F=12.463$, $P=0.000$ 。与 NS 组比较, Solvent 组的 LC3II、beclin1 表达无显著性改变($P>0.05$), 而 RTX 组明显增加, 差异具有显著性意义($P<0.05$)。见图 5—6。

图1 各组小鼠脊髓中 LC3、beclin1 的 mRNA 相对量表达量比较

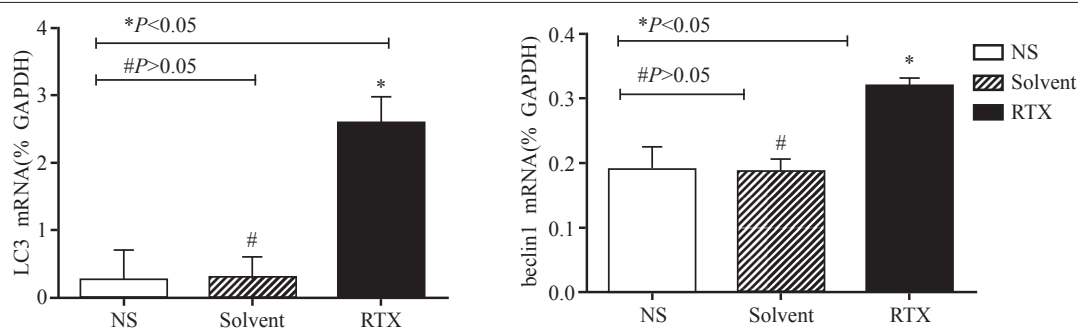
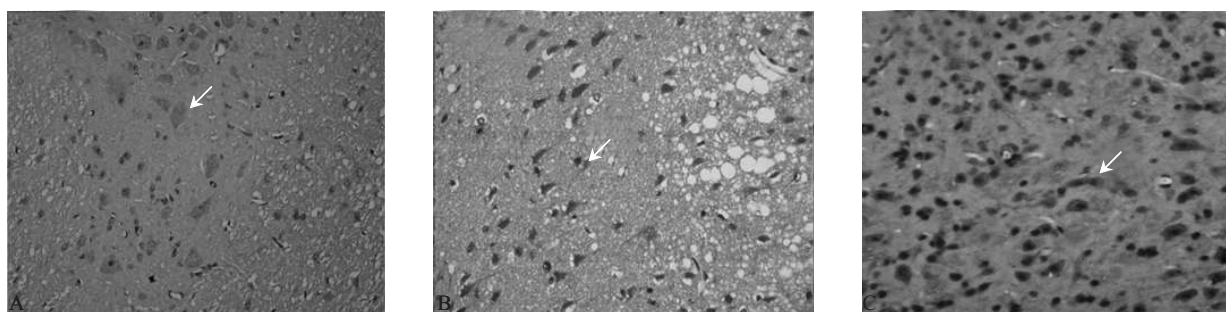


图2 光镜下三组脊髓 LC3 免疫组化染色

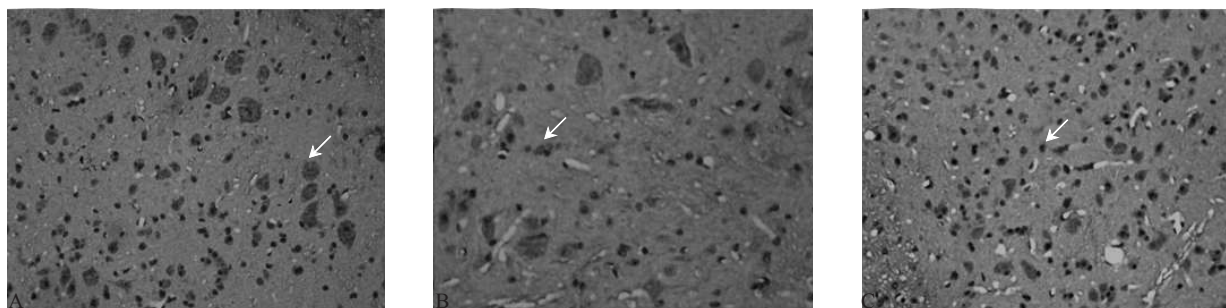
($\times 400$)



注: A: NS 组, B: Solvent 组, C: RTX 组。箭头为被 LC3 标记的阳性细胞

图3 光镜下三组脊髓 beclin1 免疫组化染色

($\times 400$)



注: A: NS 组, B: Solvent 组, C: RTX 组。箭头为被 beclin1 标记的阳性细胞

图4 各组脊髓LC3、beclin1阳性细胞的平均光密度值比较

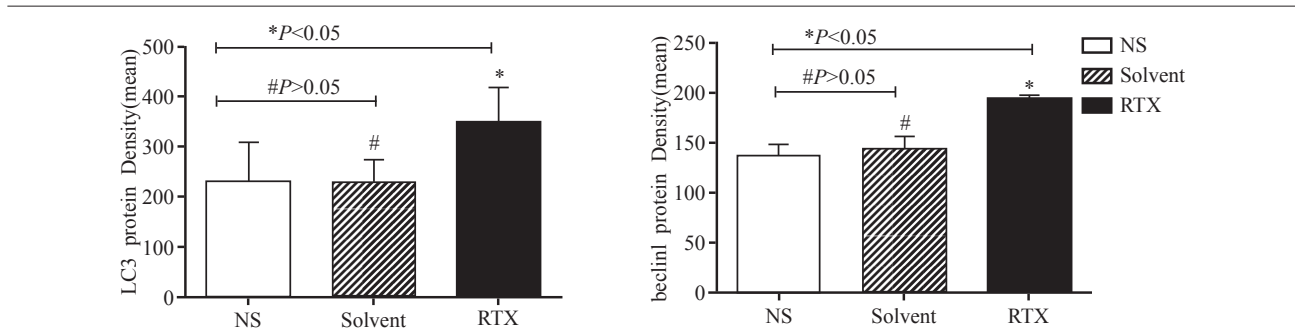


图5 在d6时刻各组小鼠脊髓LC3-II/LC3-I的相对表达量比较

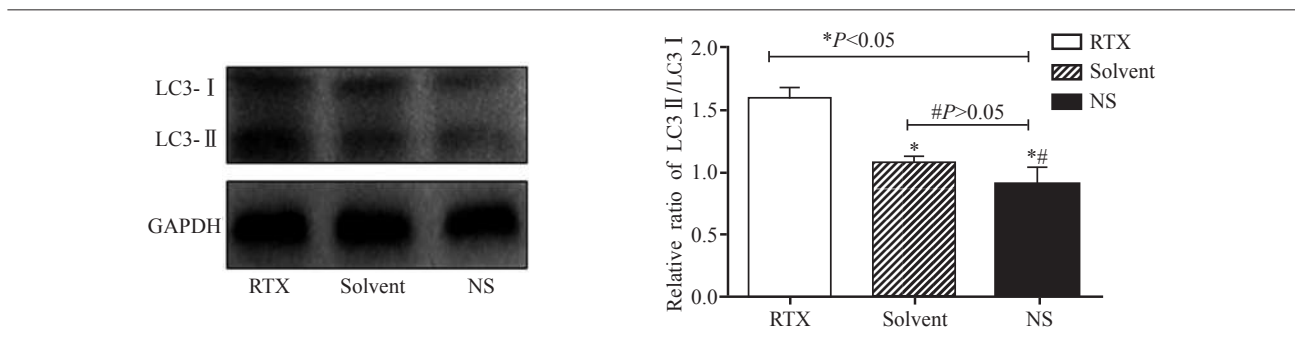
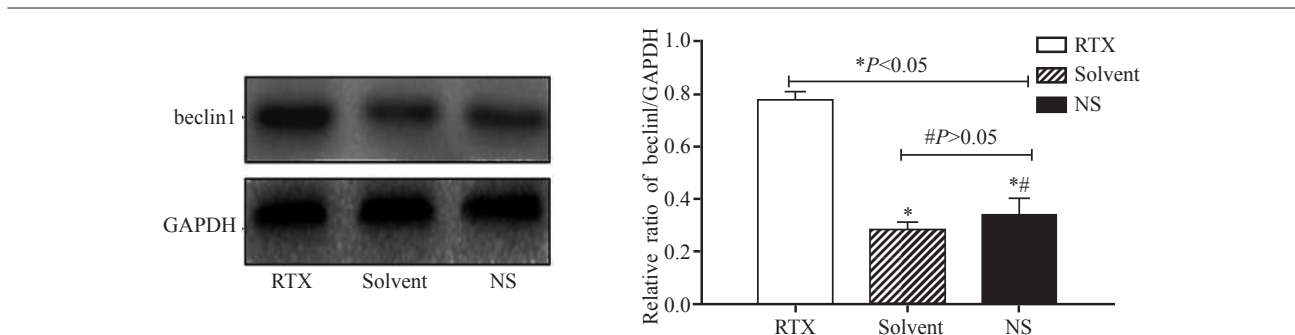


图6 在d6时刻各组小鼠脊髓beclin1的相对表达量比较



3 讨论

在本实验中,通过腹腔注射0.2μg/g的RTX后,热痛阈显著增加,而机械痛阈值显著下降($P<0.05$),符合临床PHN患者的疼痛特征。RTX复制的PHN小鼠模型脊髓LC3、beclin1在mRNA和蛋白相对表达量均显著性增加,提示自噬被激活。

PHN的发生与水痘一带状疱疹病毒的感染相关,而水痘一带状疱疹病毒是专一的人类嗜神经病毒,在人体免疫低下时可能会导致患者感染,且该病毒可在整个神经轴突的颅神经节、DRG和自主神经节中长期潜伏^[6]。当病毒再次大量复制时诱导PHN脊髓伤害性神经元疼痛易化,导致脊髓及脊髓上中

枢敏化^[7]。与其他神经病理性疼痛不同,PHN常表现为高度敏感的触痛,而热痛阈却反常性缺失,其机制可能与外周小神经A与C感觉纤维缺失有关^[8],其病理生理过程对研究PHN的动物模型制作带来了极大的难度。使用水痘一带状疱疹病毒^[9]、单纯疱疹病毒I型模型^[10]失败率较高。本研究参考Wu等^[11]的研究,给予小鼠腹腔注射0.2μg/g的RTX后,表现出机械痛阈显著降低而热痛阈值显著增加,热痛阈缺失的现象。此模型虽然未能反映PHN存在水痘一带状疱疹病毒潜伏并复制的病理过程,但较好地模拟了PHN的临床特点。

神经病理性疼痛与自噬关系密切^[3-5]。自噬是

细胞具有的一种关键分解代谢机制和大分子回收过程,通过细胞内双层膜包裹部分胞质和细胞器、蛋白质等成分形成自噬体,然后和溶酶体形成自噬溶酶体,完成分解与回收^[12]。本研究选择LC3和beclin1是判断模型小鼠脊髓自噬程度。在哺乳动物中,LC3被水解掉氨基端的22个氨基酸进而暴露出甘氨酸转化为LC3-I,LC3-I存在于细胞浆中。LC3-I经系列反应,与磷脂酰乙醇胺PE结合,成为膜结合形式LC3-II,LC3-II定位于自噬前体和自噬泡膜上^[13]。当自噬激活时,水溶性的LC3-I经脂化后成为LC3-II,随之聚集到自噬体膜上,参与自噬小体与溶酶体的结合^[14],同时在自噬末期又被溶酶体分解^[15],这种局限于细胞内,这与本研究观察到的LC3B定位一致。因LC3-II作为自噬体表的一个标记蛋白,观察自噬时常通过观察LC3-II/LC3-I的比值侧面反映自噬的激活程度^[16]。在细胞接受应激后,beclin1蛋白活化,与P13K3C结合为beclin1-P13K3C复合物^[17],诱导液泡膜蛋白1(vacuole membrane protein 1, VMP1)由内质网和高尔基体转位到自噬体膜上,参与形成自噬体膜^[18],而VMP1有助于LC3-I脂化后转位到自噬体膜(即LC3-II)^[19]。因此,LC3、beclin1的高表达较好地反应了PHN模型小鼠脊髓自噬激活的程度。

在其他疼痛模型中,Yang L等^[20]在观察脉冲射频治疗脊神经结扎模型小鼠的实验中,观察到该模型脊髓背角自噬激活,He J等^[3]在糖尿病神经痛模型大鼠中也发现脊髓自噬相关蛋白高表达,但本研究首次在RTX复制的PHN模型中发现其自噬被激活,表现为脊髓LC3与beclin1在mRNA与蛋白水平均显著性增加,且定位于细胞浆中,较好地反映了RTX复制的PHN小鼠模型脊髓自噬状态。但自噬的激活是对PHN脊髓神经细胞产生保护还是损伤还需继续探讨。

参考文献

- [1] Forbes HJ, Thomas SL, Smeeth L, et al. A systematic review and meta-analysis of risk factors for postherpetic neuralgia[J]. *Pain*, 2016, 157(1):30—54.
- [2] Kumar V, Krone K, Mathieu A. Neuraxial and sympathetic blocks in herpes zoster and postherpetic neuralgia: an appraisal of current evidence[J]. *Reg Anesth Pain Med*, 2004, 29(5):454—461.
- [3] He J, Wang H, Zhao W, et al. Activated autophagy in spinal cord contributes to maintaining diabetic neuropathic pain in rats model[J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2015, 95(14):1074—1077.
- [4] Berliocchi L, Russo R, Maiarù M, et al. Autophagy impairment in a mouse model of neuropathic pain[J]. *Mol Pain*, 2011, 7(1):83.
- [5] Shi G, Shi J, Liu K, et al. Increased miR-195 aggravates neuropathic pain by inhibiting autophagy following peripheral nerve injury[J]. *Glia*, 2013, 61(4):504—512.
- [6] Becerra J C L, Sieber R, Martinetti G, et al. Infection of the central nervous system caused by varicella zoster virus reactivation: a retrospective case series study[J]. *INT J INFECT DIS*, 2013, 17(7):E529—E534.
- [7] Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, et al. Cellular and molecular mechanisms of pain[J]. *Cell*, 2009, 139(2):267—284.
- [8] Franz M, Spohn D, Ritter A, et al. Laser heat stimulation of tiny skin areas adds valuable information to quantitative sensory testing in postherpetic neuralgia[J]. *Pain*, 2012, 153(8):1687—1694.
- [9] Zhang GH, Lv MM, Wang S, et al. Spinal astrocytic activation is involved in a virally-induced rat model of neuropathic pain[J]. *Plos One*, 2011, 6(9):e23059.
- [10] Dalziel RG, Bingham S, Sutton D, et al. Allodynia in rats infected with varicella zoster virus--a small animal model for post-herpetic neuralgia[J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 2004, 46(2):234—242.
- [11] Wu CH, Lv ZT, Zhao Y, et al. Electroacupuncture improves thermal and mechanical sensitivities in a rat model of postherpetic neuralgia[J]. *Mol Pain*, 2013, 9(1):18.
- [12] Wei H, Wang C, Croce CM, et al. p62/SQSTM1 synergizes with autophagy for tumor growth in vivo[J]. *Genes Dev*, 2014, 28(11):1204—1216.
- [13] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(12):2503—2518.
- [14] Mizushima N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22(2):132—139.
- [15] Tanida I, Minematsuikeguchi N, Ueno T, et al. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy[J]. *Autophagy*, 2005, 1(2):84—91.
- [16] Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting[J]. *Autophagy*, 2007, 3(6):542—545.
- [17] Tassa A, Roux MP, Attaix D, et al. Class III phosphoinositide 3-kinase-Beclin1 complex mediates the amino acid-dependent regulation of autophagy in C2C12 myotubes[J]. *Biochem J*, 2003, 376(Pt 3):577—586.
- [18] Molejon MI, Ropolo A, Re AL, et al. The VMP1-Beclin 1 interaction regulates autophagy induction[J]. *Faseb Journal*, 2013, 27(1Supplement): 832.4—832.4.
- [19] Koyama-Honda I, Itakura E, Fujiwara TK, et al. Temporal analysis of recruitment of mammalian ATG proteins to the autophagosome formation site[J]. *Autophagy*, 2013, 9(10):1491—1499.
- [20] Yang L, Guo L, Xu J, et al. Role of the autophagy in the treatment of neuropathic pain with pulsed radiofrequency [J]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2017, 42(5):511—516.