

背根神经节NF- κ B/p65激活介导的CX3CL1上调在大鼠膝关节骨性关节炎痛觉过敏中的作用*

刘翠翠¹ 徐灵军² 余少君¹ 张速博¹ 徐 婷^{3,4}

摘要

目的:研究背根神经节中核转录因子- κ B/p65(nuclear factor- κ B/p65, NF- κ B/p65)激活促进趋化因子CX3CL1(fractalkine)上调在膝关节骨性关节炎(knee osteoarthritis, KOA)诱导的痛觉过敏中的作用。

方法:采用体重为(220—250)g的成年雄性SD大鼠,随机地分为生理盐水对照组、KOA模型组、鞘内注射CX3CL1中和性抗体的KOA模型组和鞘内注射NF- κ B活化抑制剂吡咯烷二硫代氨基甲酸酯(pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC)的KOA模型组(n=12/组)。于造模前1天和造模后7、14、21、28天,采用Von Fray Hair检测大鼠术侧后爪的机械撤足阈值,采用Western Blot的方法检测各组大鼠背根神经节内的CX3CL1和磷酸化NF- κ B/p65(p-p65)的表达情况。

结果:KOA模型组大鼠背根神经节内CX3CL1和p-p65的表达量较对照组明显增加,且表达增加趋势与机械痛阈的变化趋势相一致;与KOA模型组相比,鞘内注射CX3CL1中和性抗体缓解KOA引起的机械痛敏;此外,与模型组相比,在大鼠鞘内注射PDTC能够阻断KOA诱导的背根神经节CX3CL1表达上调,并缓解KOA引起的机械痛敏。

结论:背根神经节NF- κ B/p65激活介导CX3CL1表达增加参与了KOA诱导的痛觉过敏。抑制背根神经节内NF- κ B/p65的激活阻断KOA引起的CX3CL1的上调,从而缓解OA大鼠的痛觉过敏。

关键词 膝关节骨性关节炎;背根神经节;NF- κ B/p65;CX3CL1;机械痛敏

中图分类号:R684,R441.1,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2021)-12-1481-06

NF- κ B/p65 activation induced upregulation of CX3CL1 in dorsal root ganglion contributes to mechanical allodynia in knee osteoarthritis/LIU Cuicui, XU Lingjun, YU Shaojun, et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2021, 36(12): 1481—1486

Abstract

Objective: To investigate the role of activated NF- κ B/p65 (nuclear factor- κ B/p65) mediated CX3CL1 (Fractalkine) upregulation in the development of KOA (Knee osteoarthritis)-induced allodynia.

Method: Male SD rats (220—250)g were randomly divided into four groups: normal saline group, KOA group, KOA+anti-CX3CL1 antibody group and KOA+PDTC (pyrrolidine dithiocarbamate) group (n=12/group). The mechanical withdrawal thresholds were assessed by Von Fray Hair one day prior to surgery and 7, 14, 21, 28 days after operation. The expression of CX3CL1 and phosphorylated NF- κ B/p65 (p-p65) in the dorsal root ganglion was detected by Western Blot at each time point.

Result: Compared with the control group, the expression of CX3CL1 and p-p65 in the KOA model of rats were increased, which were consistent with the decreased mechanical withdrawal threshold in the KOA group. Intrathecal injection of anti-CX3CL1 antibody alleviated mechanical allodynia of KOA rats. In addition, intrathecal injection of PDTC inhibited the upregulation of CX3CL1 in dorsal root ganglion of KOA rats and alleviated

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2021.12.001

*基金项目:广州市科技计划项目(201903010047);中山大学青年教师培育项目(19ykpy100)

1 中山大学孙逸仙纪念医院康复科,广东省广州市,510120; 2 暨南大学附属第一医院疼痛科; 3 中山大学中山医学院; 4 通讯作者
第一作者简介:刘翠翠,女,博士,主治医师; 收稿日期:2020-06-20

ed mechanical allodynia of KOA rats.

Conclusion: Upregulation of CX3CL1 expression mediated by activation of NF-kappa B/p65 in dorsal root ganglion contributes to KOA-induced mechanical allodynia in rats. Inhibition of NF-kappa B/p65 activation in dorsal root ganglion significantly prevents the up-regulation of CX3CL1 induced by KOA, thus alleviates the mechanical allodynia in KOA rats.

Author's address Sun Yat-sen Memorial Hospital, SunYat-sen University, Guangdong, Guangzhou, 510120

Key word knee osteoarthritis; dorsal root ganglion; NF-κB/p65; CX3CL1; mechanical allodynia

膝关节骨性关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是临床上最常见的慢性退行性疾病,主要以关节退行性变、功能损害和疼痛为特征,也是世界范围内导致疼痛和残疾的主要原因之一^[1-2],给家庭和社会造成了沉重的经济负担。由于KOA导致疼痛的机制尚不清楚,目前临床仍缺乏有效的预防和治疗方案。因此,更好地了解KOA疼痛的发生和维持机制,对于开发安全有效的疼痛治疗药物至关重要。

近期越来越多的证据表明:除了关节的滑膜炎促进退行性改变,影响整个关节导致外周敏感化和伤害性疼痛的发生^[3-4],关节神经支配的结构改变和神经损伤也参与了KOA疼痛的发生^[5]。临床上,大约30%的KOA患者有神经性疼痛^[6]。最新研究显示,疼痛相关神经系统的改变在KOA慢性疼痛发生和发展过程中发挥着更为重要的作用^[7]。

核因子κB(nuclear factor kappa-B, NF-κB)作为重要的核转录因子,是炎症相关的重要信号通路,中枢神经系统脊髓中NF-κB/p65的激活已被证实参与骨关节炎疼痛的过程中发挥了重要的作用^[8]。此外,NF-κB/p65能够调控多种炎症因子的产生,在神经病理性疼痛的外周敏化和中枢敏化过程中,NF-κB/p65能够调节疼痛相关趋化因子fractalkine(CX3C chemokine ligand 1, CX3CL1)基因的表达,进而导致痛觉相关神经元功能的改变^[9-11]。但是,KOA中外周神经系统中NF-κB的激活和趋化因子CX3CL1的表达模式,及其与KOA疼痛的关系尚无文献报道。因此,本研究旨在分析KOA模型外周神经系统背根神经节中NF-κB/p65激活情况和CX3CL1的表达,及其与KOA诱导慢性疼痛的关系。期待本研究能有助于阐明NF-κB调控趋化因子CX3CL1表达介导KOA疼痛的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

健康成年雄性SD大鼠(SPF级),体重为(220—250)g,购自中山大学动物实验中心。大鼠分笼饲养,自由饮食,室温(22±3)℃,湿度50%±10%,采用12h/12h白天和黑夜循环照明。后续实验均按照尽量减轻实验动物痛苦原则及有关实验动物使用原则进行操作。

采用随机数字分法,将大鼠随机分为生理盐水对照组(Con组)、膝关节骨性关节炎模型组(KOA组)、鞘内注射NF-κB激活抑制剂吡咯烷二硫代氨基甲酸酯OA模型组(KOA+PDTC组)和鞘内注射CX3CL1中和性抗体KOA模型组(KOA+anti-CX3CL1组),进行行为学检测的大鼠每组12只,进行Western Blot检测的大鼠每组每个时间点6只。

1.2 KOA模型的建立

参考Holly T等人的方法建立KOA模型^[12]。采用异氟醚(2%—4%异氟醚;100% 1L/min的氧气)对大鼠进行深度麻醉。后固定于手术台,暴露右侧膝关节,备皮、消毒、铺巾后,采用1ml的注射器沿胫骨平台上缘将50μl的碘乙酸钠(MIA 3mg+生理盐水)(MIA, Sigma公司,美国)注入关节腔内。对照组关节腔内给予50μl的无菌生理盐水。

1.3 鞘内置管手术及给药

参考Choi等人的方法^[13],实施鞘内置管手术。采用腹腔注射10%水合氯醛(300mg/kg)麻醉大鼠。后固定于手术台,暴露背部,备皮、消毒、铺巾后,于腰椎2—3水平沿脊柱纵行切开,剪掉腰椎2—3上下关节突,暴露椎间隙,采用无菌的PE—10管由硬膜下隙向头端插入约15mm,将大鼠垂直体位放置,观察导管内有脑脊液流出时,做皮下隧道,将PE—10管引至颈部皮下,后逐层缝合。大鼠苏醒后,剔除术后出现后肢瘫痪的大鼠;PE—10管内给

予2%利多卡因0.1—0.15ml,将双后肢出现麻痹的大鼠纳入实验。术后大鼠均单笼饲养,观察7天,无感染、运动障碍等则纳入后续实验。

参考相关文献,采用无菌生理盐水分别稀释PDTC至0.2mg/ml^[8],稀释抗——CX3CL1中和性抗体至4.17mg/ml^[14]。KOA大鼠关节腔内注射MIA当天开始,每天鞘内注射PDTC 12μl或抗-CX3CL1中和性抗体12μl直至实验结束。对照组及单纯KOA模型组则鞘内注射等体积的生理盐水。

1.4 行为学测试

参考Chaplan等人报道的方法检测大鼠机械撤足阈值^[15]。实验前3天,每天将大鼠放于透明的有机玻璃箱内20min,以适应环境、消除心理因素等对行为学测试结果的影响。KOA术前1天及术后7、14、21、28天,用Von Frey Hairs通过箱底的金属网孔,Von Frey Hair垂直于大鼠术侧足底的第二和三跖骨之间的皮肤,对其施加机械性刺激,微弯,停留6—8s。初始的刺激强度为2.041g。撤足反应为阴性时,再选刺激强度呈对数递增相邻的Von Frey Hair进行刺激。若撤足反应为阳性时,再选递减相邻的刺激强度进行刺激。最后采用“up-down”方法计算大鼠的机械撤足阈值15。

1.5 Western Blot检测

过量麻醉处死大鼠,冰上迅速取出膝关节腔注射术侧的L4—L6背根神经节。后将组织放入液氮中研成粉末并导入EP管,后称重并加入10倍体积的蛋白裂解液,低温下匀浆30s,再15000r/min离心30min,取出上清液。测定样本中的蛋白浓度后,采用十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium lauryl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS—PAGE)分离目的蛋白,然后经电转,将目的蛋白转至PVDF膜上。室温下,用5%脱脂奶粉封闭PVDF膜2h,后分别加入抗NF-κB/p65抗体(1:1000, Abcam公司,美国)、抗磷酸化NF-κB/p65抗体(1:2000, Abcam公司,美国)或抗

CX3CL1抗体(1:1000, Torrey Pines Biolabs公司,美国)或抗GAPDH抗体(1:2000, Cell Signaling Technology公司,美国),于4℃冰箱中孵育过夜。后洗膜,并加入对应的二抗(1:6000, Abcam公司,美国),于室温下进行孵育1h。洗膜结束后加入ECL发光液显影并曝光。Image J的软件测定条带灰度值后,进行相关的统计分析。

1.6 统计学分析

运用SPSS 20.0的统计学软件分析实验结果,行为学测试的结果以中位数和范围表示,Western Blot检测获得的数据以均数±标准差表示。行为学测试结果的组间比较采用非参数检验Mann-Whitney U秩和检验,Western Blot实验结果的组间比较,使用完全随机设计的单因素方差分析,并采用Bonferroni或Dunnett事后检验进行两两比较, $P<0.05$ 表示数据差异具有显著性意义。

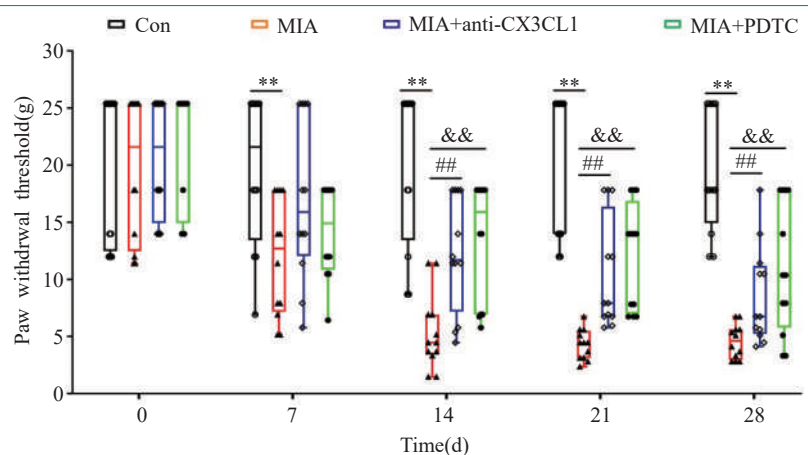
2 结果

2.1 膝关节骨性关节炎大鼠出现机械痛觉过敏

行为学检测结果显示,关节腔注射后7、14、21和28天,在注射MIA模型组,大鼠关节腔注射侧的机械痛阈较注射生理盐水对照组大鼠降低,且差异有显著性意义($P<0.01$),见图1。

2.2 大鼠背根神经节CX3CL1表达增加参与膝关

图1 关节腔注射MIA及鞘内应用抗CX3CL1中和性抗体或PDTC对大鼠机械痛阈的影响 (n=12)



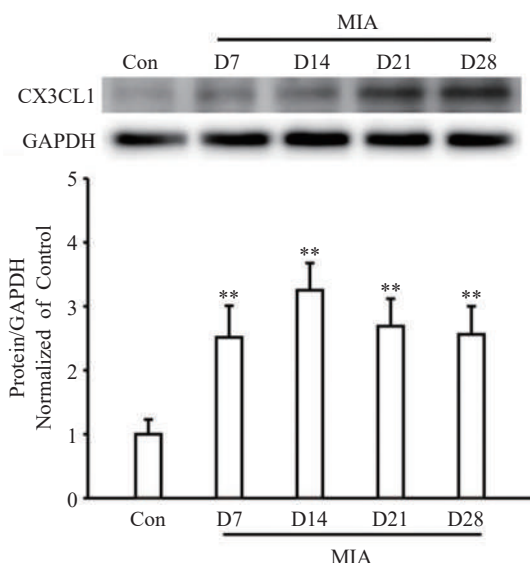
注:** $P<0.01$,与关节腔注射生理盐水溶剂对照组相比;## $P<0.01$ 和&& $P<0.01$,与只关节腔注射MIA组相比。

节骨性关节炎诱导的机械痛觉过敏

本研究结果显示:与关节腔注射生理盐水组相比,注射MIA的膝关节骨性关节炎模型组同侧L4—L6背根神经节的CX3CL1表达量在第7、14、21和28天显著增加($P<0.01$),并且与大鼠机械痛阈的变化相一致(图2),而第7、14、21、28天这些时间点之间相比较,差异并无显著性意义。

此外,鞘内给予抗-CX3CL1中和性抗体(anti-CX3CL1 antibody)的膝关节骨性关节炎大鼠的机械痛阈,在第7天与模型组之间未见明显的差异,然而从第14天起,抗-CX3CL1中和性抗体组大鼠的机械痛阈较模型组显著提高($P<0.01$),持续至第28天。

图2 CX3CL1在各组大鼠背根神经节内的表达情况
($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

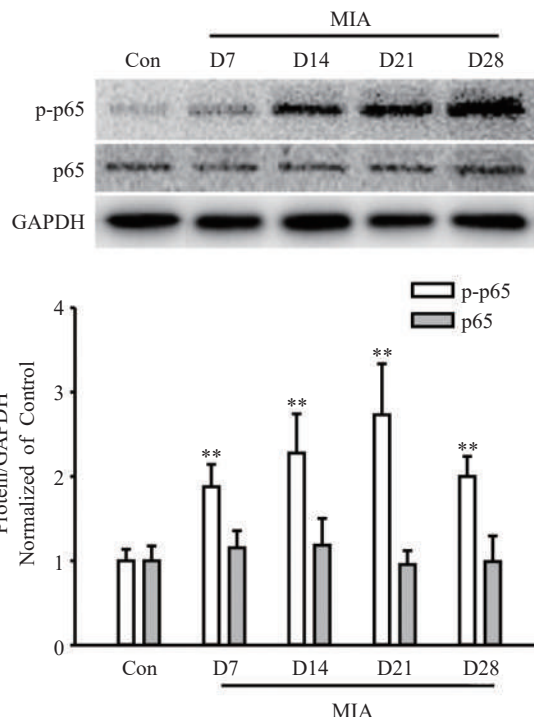


注:** $P<0.01$,与关节腔注射生理盐水溶剂对照组相比。

2.3 大鼠背根神经节NF- κ B激活介导膝关节骨性关节炎后期的机械痛觉过敏

本研究结果显示:与关节腔注射生理盐水组相比,注射MIA的膝关节骨性关节炎模型组同侧L4—L6背根神经节的磷酸化的NF- κ B/p65(p-p65)表达量在第7、14、21和28天显著增加($P<0.01$),并且与大鼠机械痛阈的变化相一致(见图3)。但是p65的表达在MIA注射后的以上各个时间点比较,差异并无显著性意义($P>0.05$)。通过检测鞘内给予PDTC的骨性关节炎大鼠的机械痛阈,发现:在骨性

图3 NF- κ B/p65及p-p65在各组大鼠背根神经节内的表达情况
($\bar{x}\pm s$, $n=6$)



注:** $P<0.01$,与关节腔注射生理盐水溶剂对照组相比。

关节炎的早期第7天大鼠的机械痛阈与模型组之间未见明显的差异,然而从第14天起PDTC组大鼠的机械痛阈较模型组显著提高($P<0.01$),并持续至第28天(图1)。

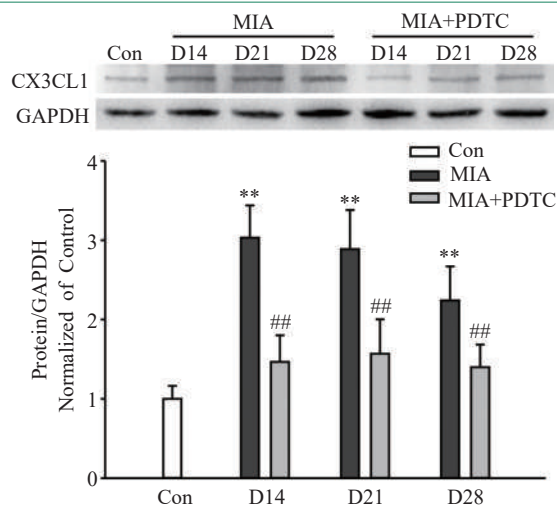
2.4 抑制NF- κ B的激活阻断膝关节骨性关节炎引起的大鼠背根神经节CX3CL1上调

本研究通过检测KOA造模同时鞘内给予PDTC的大鼠背根神经节内CX3CL1的表达,发现造模后第14、21、28天的表达量较模型组显著降低($P<0.01$),见图4。

3 讨论

许多病理过程,包括关节损伤、关节传入结构重组、低度炎症、神经可塑性和神经损伤,都是导致KOA疼痛的原因。骨性关节炎的疼痛一直被认为是包括关节内的伤害性感受器在内的外周神经末梢的敏化导致的一种伤害性疼痛^[16]。因此,明确外周神经系统的变化在KOA中的作用,对于寻找治疗KOA疼痛的潜在靶点具有重要的科学意义和临床

图4 鞘内注射PDTC抑制MIA诱导大鼠背根神经节中CX3CL1的上调 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)



注: ** $P<0.01$,与关节腔注射生理盐水溶剂对照组相比。## $P<0.01$,与MIA组关节腔注射MIA后的相同时间点相比。

价值。在本研究中,我们通过膝关节腔注射MIA建立KOA大鼠模型,探讨其疼痛产生的外周机制,发现大鼠外周神经系统背根神经节中NF- κ B p65激活介导的CX3CL1上调参与了KOA引起的机械痛觉过敏。

众所周知,炎症反应参与调控多种病理性疼痛的发生,趋化因子作为其中重要的细胞因子也发挥着至关重要的作用^[17]。我们既往的研究表明,背根神经节神经元趋化因子CX3CL1的增加可募集巨噬细胞浸润至外周神经系统背根神经节,激活的巨噬细胞通过诱导神经元发生凋亡介导化疗药物紫杉醇引起的病理性疼痛^[14]。本研究观察了MIA注射后大鼠的机械撤足阈值,发现关节腔注射3mg MIA能显著诱导机械痛觉过敏;此外,背根神经节神经元中CX3CL1的表达显著增加。这与同行的研究结果一致,研究人员还发现大鼠背根神经节中CX3CL1的上调与炎症性疼痛、椎间盘突出引起的病理性疼痛有关^[18-19]。而我们采用抗CX3CL1的中和性抗体中和CX3CL1的活性可缓解KOA诱导的疼痛,提示外周神经系统背根神经节中CX3CL1上调参与了KOA所致慢性疼痛的发生。

NF- κ B作为一种重要的转录调节因子,通过调节炎症和免疫反应参与多种疾病的发生,在神经炎症或损伤后急性和慢性疼痛的诱导和维持中发挥重

要作用^[20-21]。近年来有研究发现抑制中枢神经系统脊髓中NF- κ B的激活还可缓解KOA疼痛^[8]。研究显示NF- κ B不仅在神经病理性疼痛的中枢敏化中发挥作用外,在外周敏化过程中也发挥着举足轻重的作用^[9-10],例如背根神经节中NF- κ B的激活介导炎症反应诱导的慢性疼痛^[22]。这与我们的研究结果相一致,我们还发现NF- κ B/p65在KOA诱导的慢性疼痛大鼠背根神经节中被显著激活。此外,本研究还表明,通过PDTC抑制NF- κ B/p65的激活可改善KOA疼痛,证实了外周神经系统中NF- κ B/p65的激活在KOA疼痛过程中亦具有重要作用。

研究表明,NF- κ B/p65激活可介导细胞因子或趋化因子的表达,通过增强神经元的兴奋性,诱导慢性疼痛的产生^[11-22]。本研究中,我们观察到鞘内注射PDTC可显著抑制KOA诱导的背根神经节中CX3CL1的上调。与我们的研究结果一致,同行的研究还发现抑制背根神经节中NF- κ B/p65激活可通过阻断CX3CL1的表达缓解化疗药物诱导慢性疼痛的发生^[9]。有研究表明,p-p65直接与CX3CL1启动子区结合上调了背根神经节中CX3CL1的表达^[10]。因此,外周神经系统背根神经节中NF- κ B/p65的激活可能通过上调CX3CL1的表达,介导KOA疼痛的产生。

综上所述,KOA显著激活大鼠背根神经节内NF- κ B/p65,并上调CX3CL1的表达,阻断NF- κ B/p65激活能显著抑制背根神经节内CX3CL1的表达,从而改善大鼠KOA引起的机械痛敏。因此,NF- κ B/p65-CX3CL1通路有望成为防治KOA疼痛的新靶点。

参考文献

- [1] Chen D, Shen J, Zhao W, et al. Osteoarthritis: toward a comprehensive understanding of pathological mechanism[J]. Bone Res, 2017,5:16044.
- [2] McDougall JJ. Arthritis and pain. Neurogenic origin of joint pain[J]. Arthritis Res Ther, 2006, 8(6):220.
- [3] Krustev E, Rioux D, McDougall JJ. Mechanisms and mediators that drive arthritis pain[J]. Curr Osteoporos Rep, 2015, 13(4):216-224.
- [4] Schuelert N, McDougall JJ. Grading of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis reveals a concentration-dependent sensitization of nociceptors in the knee joint of the rat[J].

- Neurosci Lett, 2009, 465(2):184—188.
- [5] Syx D, Tran PB, Miller RE, et al. Peripheral mechanisms contributing to osteoarthritis pain[J]. Curr Rheumatol Rep, 2018, 20(2):9.
- [6] Schomberg D, Ahmed M, Miranpuri G, et al. Neuropathic pain: role of inflammation, immune response, and ion channel activity in central injury mechanisms[J]. Ann Neurosci, 2012, 19(3):125—132.
- [7] Bullock CM, Wookey P, Bennett A, et al. Peripheral calcitonin gene-related peptide receptor activation and mechanical sensitization of the joint in rat models of osteoarthritis pain [J]. Arthritis Rheumatol, 2014, 66(8):2188—1200.
- [8] 李云泽, 阎芳, 郭金婉, 等. 抑制脊髓内NF- κ B/p65对骨性关节炎后期产生的痛觉过敏的影响[J]. 中国疼痛医学杂志, 2017, 23(3):175—178.
- [9] Wang J, Zhang XS, Tao R, et al. Upregulation of CX3CL1 mediated by NF- κ B activation in dorsal root ganglion contributes to peripheral sensitization and chronic pain induced by oxaliplatin administration[J]. Mol Pain, 2017, 13:1744806917726256.
- [10] Li D, Huang ZZ, Ling YZ, et al. Up-regulation of CX3CL1 via nuclear factor- κ B-dependent histone acetylation is involved in paclitaxel-induced peripheral neuropathy [J]. Anesthesiology, 2015, 122(5):1142—1151.
- [11] Huang ZZ, Li D, Ou-Yang HD, et al. Cerebrospinal fluid Oxaliplatin contributes to the acute pain induced by systemic administration of Oxaliplatin[J]. Anesthesiology, 2016, 124(5):1109—1121.
- [12] Philpott HT, O'Brien M, McDougall JJ. Attenuation of early phase inflammation by cannabidiol prevents pain and nerve damage in rat osteoarthritis[J]. Pain, 2017, 158(12):2442—2451.
- [13] Choi SS, Kim YC, Lim YJ, et al. The neurological safety of epidural gabapentin in rats: a light microscopic examination[J]. Anesth Analg, 2005, 101(5): 1422—1426.
- [14] Huang ZZ, Li D, Liu CC, et al. CX3CL1-mediated macrophage activation contributed to paclitaxel-induced DRG neuronal apoptosis and painful peripheral neuropathy[J]. Brain Behav Immun, 2014, 40:155—165.
- [15] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw[J]. J Neurosci Methods, 1994, 53(1):55—63.
- [16] Miller RE, Kim YS, Tran PB, et al. Visualization of peripheral neuron sensitization in a surgical mouse model of osteoarthritis by in vivo calcium imaging[J]. Arthritis Rheumatol, 2018, 70(1):88—97.
- [17] Malcangio M. Role of the immune system in neuropathic pain[J]. Scand J Pain, 2019, 20(1):33—37.
- [18] Jacobsen DP, Moen A, Haugen F, et al. Hyperexcitability in spinal WDR neurons following experimental disc herniation is associated with upregulation of fractalkine and its receptor in nucleus pulposus and the dorsal root ganglion[J]. Int J Inflam, 2016, 2016:6519408.
- [19] Souza GR, Talbot J, Lotufo CM, et al. Fractalkine mediates inflammatory pain through activation of satellite glial cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(27): 11193—11198.
- [20] Xiang HC, Lin LX, Hu XF, et al. AMPK activation attenuates inflammatory pain through inhibiting NF- κ B activation and IL-1 β expression[J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1):34.
- [21] Lim H, Lee H, Noh K, et al. IKK/NF- κ B-dependent satellite glia activation induces spinal cord microglia activation and neuropathic pain after nerve injury[J]. Pain, 2017, 158(9):1666—1677.
- [22] Fu ES, Zhang YP, Sagen J, et al. Transgenic inhibition of glial NF- κ B reduces pain behavior and inflammation after peripheral nerve injury[J]. Pain, 2010, 148(3):509—518.