

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.12.004

缝隙连接蛋白 pannexin1 在神经病理性疼痛大鼠脊髓背角的表达变化

周功锐,包晓航,毛庆祥,龙宗泓,景 胜,黄 静,杨天德[△]

(第三军医大学新桥医院麻醉科,重庆 400037)

[摘要] 目的 观察缝隙连接蛋白 pannexin1(PX1)在坐骨神经分支选择结扎模型大鼠脊髓背角上的表达变化。方法 健康 SD 雄性大鼠 50 只,分为对照组(WT 组, $n=10$)、假手术组(sham 组, $n=10$)和坐骨神经分支选择性损伤组(SNI 组, $n=30$)。SNI 组 20 只大鼠于术后 3、5、7、14 d($n=5$),WT、sham 组于术后 14 d($n=5$)取脊髓腰段用 Western blot 法检测 PX1 表达变化,另 20 只大鼠于术后 7 d 取脊髓腰段进行免疫组化染色,检测脊髓背角内胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的表达水平。SNI 组中 10 只于建模前进行鞘内置管,术后 7 d 分别向鞘内注射生理盐水 20 μ L(SNI+NS 组)或甘珀酸(CBX)20 μ L(SNI+CBX 组),再进行免疫组化染色。结果 SNI 组脊髓背角内 PX1 表达增多,并随时间增强,明显高于 WT、sham 组($P<0.05$);7 d 后 SNI 组脊髓背角内 GFAP 表达较 WT、sham 组明显增强($P<0.05$);SNI+CBX 组 GFAP 表达较 SNI+NS 组明显下调($P<0.05$)。WT、sham 组脊髓背角的 PX1 蛋白和 GFAP 表达差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 缝隙连接蛋白 PX1 可能参与了星形胶质细胞的激活,提示其在因外周神经损伤引起的神经病理性痛中起重要作用。

[关键词] 神经病理性疼痛;缝隙连接类;Pannexin1;星形胶质细胞;甘珀酸;胶质纤维酸性蛋白

[中图分类号] R441.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)12-1596-03

Change of pannexin1 expression in dorsal horn of spinal cord in rats with neuropathic pain

Zhou Gongrui, Bao Xiaohang, Mao Qingxiang, Long Zonghong, Jing Sheng, Huang Jing, Yang Tiande[△]

(Department of Anesthesiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[Abstract] **Objective** To observe the expression of pannexin1(PX1) in the dorsal horn of spinal cord in model rats with neuropathic pain after selective ligation of sciatic nerve branches. **Methods** 50 male SD rats were randomly divided into 3 groups, including the control group(WT group, $n=10$), sham operation group(sham group, $n=10$) and sciatic nerve branch selective injury group(SNI group, $n=30$). 30 rats were killed on postoperative 3, 5, 7, 14 d and the lumbar segment of the spinal cord was taken for detecting the expression of PX1 by using Western blot. Other 20 rats were killed on 7 d after SNI and the expression of glial fibrillary acidic protein(GFAP) in the spinal cord was detected with immunohistology. Among them, 10 rats in the SNI group were treated with intrathecal intubation before operation and administrated with saline 20 μ L or carbenoxolone(CBX) 20 μ L by intrathecal injection on postoperative 7 d for determining the expression of GFAP by the immunohistology. **Results** The expression of PX1 in the SNI group was increased and enhanced with time, which was significantly higher than that in the WT group and the sham group ($P<0.05$); the GFAP expression on 7 d in the SNI group was obviously increased compared with the WT group and the sham group ($P<0.05$); after intrathecal injection of CBX, the expression of GFAP was significantly decreased compared with that in the normal saline group ($P<0.05$). No statistically significant differences in the expression of PX1 and GFAP were found in the WT group and the sham group. **Conclusion** PX1 may be involved in the activation of astrocytes, prompting that PX1 plays an important role in the neuropathic pain caused by the peripheral nerve injury.

[Key words] neuropathic pain; gap junction; Pannexin1; astrocyte; carbenoxolone; glial fibrillary acidic protein

神经病理性疼痛(neuropathic pain, NP)是感觉神经系统损伤引起的一种慢性疼痛综合征,临床上以自发痛、诱发痛、痛觉过敏、痛觉超敏以及疼痛异常为特征。由于其发病机制复杂,尚无特别有效的治疗手段,近年来越来越成为疼痛领域研究的热点。而星形胶质细胞被认为是 NP 激活的重要靶点,探索其分子机制有可能为临床疼痛治疗提供新的思路。pannexin(PX)通道蛋白是一类缝隙连接蛋白(gap junction, GJ),目前发现存在 3 种亚型, PX1、PX2、PX3,以 PX1 表达最多,广泛存在于全身大部分组织,尤其在神经系统中大量表达。它能连接两个相邻细胞,也能形成半通道与细胞外液想通,能够实现离子及小分子物质在细胞和组织液间的快速交换。有研究发现,

星形胶质细胞上 PX 半通道能够通过控制 ATP 的释放和调节钙离子的内流,影响星形胶质细胞的激活状态^[1]。本研究旨在通过建立坐骨神经分支选择性结扎模型(spared nerve injury, SNI),观察大鼠脊髓上 PX1 蛋白的表达变化以及通过鞘内注射 GJ 阻断剂甘珀酸(carbenoxolone, CBX),分析其与星形胶质细胞的关系。

1 材料与方法

1.1 材料 主要试剂和仪器:PX1 兔多克隆抗体(美国, Sigma);胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)兔多克隆抗体(北京,中杉金桥);生物素抗兔二抗(美国, Vector);辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗(北京,中杉金桥);

作者简介:周功锐(1984—),医师,硕士研究生,主要从事临床麻醉和疼痛方面的研究,现工作于成都军区总医院麻醉科(邮编 610083)。

[△] **通讯作者,** Tel: (023)68755634; E-mail: 31011@sina.com。

CM1900 冰冻切片机及激光扫描显微镜 (德国, Leica); 组织蛋白裂解试剂盒 (上海, 贝博); 化学发光试剂盒 (武汉, 博士德); 3,3-二氨基联苯胺 (DAB) 显色液试剂盒 (北京, 中杉金桥); CBX 试剂 (美国, Sigma)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及模型制备 健康 SD 雄性大鼠 50 只, 体质量 180~200 g, 由新桥医院动物实验中心提供。将 50 只大鼠分为 3 组: 对照组 (WT 组, $n=10$)、假手术组 (sham 组, $n=10$)、SNI 组 ($n=30$)。SNI 组: 按 Decosterd 等^[2]的方法建立动物模型。大鼠麻醉 (2% 戊巴比妥钠 50 mg/kg, 腹腔注射) 后取俯卧位, 备皮, 消毒后切开大鼠右侧大腿后外侧, 暴露坐骨神经及其分支, 远端结扎并剪断腓总神经和胫神经, 保留腓肠神经, 最后逐层缝合肌肉和皮肤。sham 组: 大鼠行假手术, 在暴露分离坐骨神经后, 不作任何处理, 直接缝合肌肉和皮肤。WT 组: 大鼠不作任何处理。整个手术过程注意动作轻柔, 避免牵拉和损伤腓肠神经, 术后均肌内注射青霉素预防感染。术后于动物房室温, 单笼饲养。

1.2.2 Western blot 法测定脊髓 PX1 蛋白表达 SNI 组 20 只大鼠, 分别于术后 3、5、7、14 d (5 只/每个时段) 麻醉后处死, 分别取其 L₄₋₆ 段脊髓组织; sham、WT 组各 5 只大鼠于术后 14 d 麻醉后处死, 分别取其 L₄₋₆ 段脊髓组织, 加入裂解液冰上匀浆, 10 000 r/min 离心 5 min 后取上清液, 核酸浓度仪 (Thermo 公司) 测定蛋白浓度, 调定浓度为 4 μ g/ μ L, 加入 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液煮沸 5 min。等量蛋白样品经过电泳、转膜、脱脂奶粉封闭后, PX1 一抗 (1:1 000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 隔日加入 HRP 标记的二抗 (1:5 000) 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, ECL 化学发光系统显色。Quantity One 软件分析结果。

1.2.3 大鼠鞘内模型制备 选取 SNI 组 10 只大鼠于建立 SNI 模型前进行鞘内模型制备, 方法参照文献^[3]。大鼠麻醉 (2% 戊巴比妥钠 50 mg/kg, 腹腔注射) 后取俯卧位, L₄₋₆ 处切开皮肤, 钝性分离脊柱两侧肌肉, 暴露 L₄₋₅ 椎板, 剪去部分 L₅ 棘突, 用 5 mL 注射器针头刺破黄韧带同时见清亮液体流出, 遂将拉细的硬膜外导管沿相同路径置入, 见大鼠甩尾即置管成功。固定导管, 逐层缝合伤口, 封闭导管外口。术后第 3 天导

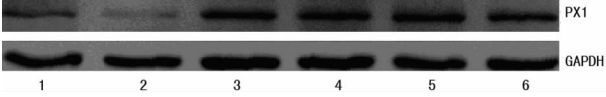
管注入 1% 利多卡因 10 μ L, 有下肢麻痹症状的大鼠再按前述方法制备 SNI 模型。10 只大鼠在 SNI 术后 7 d 分成两组, 5 只鞘内注射 20 μ L 生理盐水 (SNI+NS 组), 另外 5 只注射 20 μ L 0.5 g/L CBX 溶液 (SNI+CBX 组)^[4]。

1.2.4 GFAP 免疫组织化学染色 术后 7 d 取 WT ($n=5$)、sham ($n=5$)、SNI+NS ($n=5$)、SNI+CBX ($n=5$) 4 组大鼠, 麻醉 (2% 戊巴比妥钠 60 mg/kg, 腹腔注射) 后剪开胸腔, 暴露心脏, 从心尖插入灌注针并固定, 同时剪开右心耳。首先用 0.01 mol PBS 液灌注约 200 mL 至肝脏变白后再用 4 $^{\circ}$ C 的 4% 多聚甲醛灌注约 300 mL。小心取出大鼠脊髓组织 L₄₋₆ 段, 放置 4% 多聚甲醛中 4 $^{\circ}$ C 过夜, 再放于 30% 蔗糖溶液中脱水至组织沉底。取出标本, 用冰冻切片包埋剂 (北京, 中山金桥) 包埋, 制作冰冻冠状切片 (厚度 40 μ m), 各标本分别取 5 张切片染色。切片经 3% H₂O₂ 洗脱、Triton X-100 打孔, 牛血清封闭后, 加 GFAP 多克隆抗体 (1:100) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 隔日 0.01 mol PBS 漂洗后, 加入生物素二抗 (1:200) 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 再加入链霉亲和素-生物素复合物 (SABC) 三抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 最后滴加 DAB 液经化学反应后显色, 封片剂封片。每张切片在显微镜下观察, 计算每张切片伤侧脊髓背角每平方毫米 GFAP 表达数目, 取平均值进行统计分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行分析, 计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组内各指标比较用配对 t 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠脊髓 PX1 蛋白表达 与 WT、sham 组比较, SNI 组术后 3 d PX1 蛋白表达开始升高, 术后 5、7 d 一直持续高表达, 至 14 d 趋于稳定, 仍高于 WT、sham 组 ($P<0.05$)。SNI 组术后 3、5、7、14 d 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。WT、sham 组表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 1。



1: sham 组; 2: WT 组; 3~6: SNI 组术后 3、5、7、14 d。

图 1 各组大鼠脊髓 PX1 蛋白表达

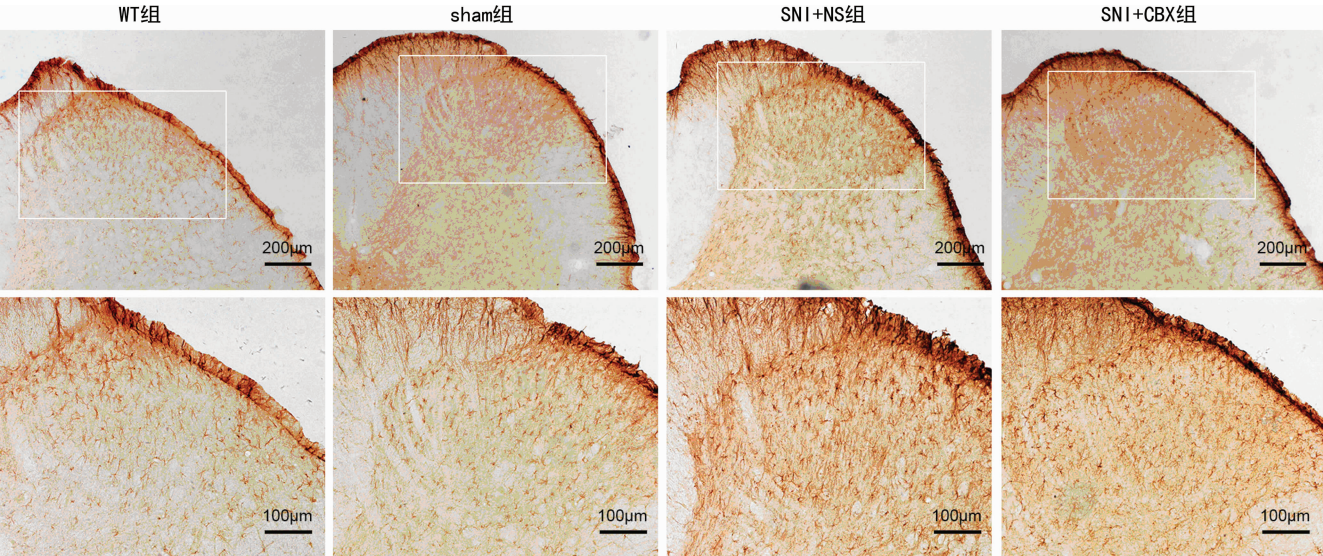
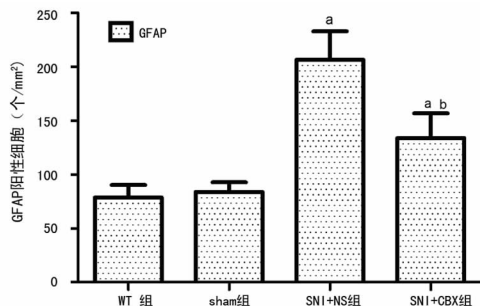


图 2 术后 7 d 各组大鼠脊髓背角 GFAP 免疫组化图像

2.2 各组大鼠脊髓背角 GFAP 表达 术后 7 d SNI 组大鼠脊髓背角 GFAP 表达较 WT、sham 组明显增强($P<0.05$), SNI+CBX 组较 SNI+NS 组的脊髓背角 GFAP 表达下调($P<0.05$),但仍高于 WT、sham 组($P<0.05$)。sham、WT 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 2、3。



^a: $P<0.05$, 与 WT、sham 组比较; ^b: $P<0.05$, 与 SNI+NS 组比较。

图 3 术后 7 d 各组大鼠脊髓背角 GFAP 表达比较

3 讨论

近年来,随着对疼痛研究的不断深入,研究者发现脊髓内的胶质细胞在病理性疼痛的产生和维持中起着重要的作用。在坐骨神经慢性压迫型模型(CCI)、部分坐骨神经结扎伤模型(PSNL)、L₅ 脊神经冷冻模型中均观察到脊髓星形胶质细胞和小胶质细胞激活的反应。多种疼痛相关物质可以引起胶质细胞的活化。缩胆囊素和缓激肽可以与星形胶质细胞上的受体结合,激活胞内由 Ca^{2+} 介导的信号转导通路^[5]。活化的胶质细胞可以通过释放多种神经活性物质 ROS、NO、EAA、ATP 等,直接影响神经元的可塑性,使病理性疼痛进一步发展和持续^[6]。作为神经免疫细胞,又可以通过合成和释放多种炎性细胞介质如白细胞介素、TNF- α 产生致痛作用^[5]。而阻断脊髓胶质细胞活化则可以抑制或减轻痛敏反应^[7]。越来越多的研究表明,调控星形胶质细胞已经成为疼痛研究的一个重要方向。

GJ 是连接两个相邻细胞的大通道,能够实现离子及小分子物质在细胞间的快速交换,尤其在神经系统中大量表达。之前的研究表明这些细胞间的缝隙连接通道均由缝隙连接蛋白 Connexin(CX)构成,不同于 CX 蛋白形成细胞间连接,新发现的 PX 作为 GJ 中的一类新蛋白,主要是以半通道单体的形式存在,调节 ATP、 Ca^{2+} 等分子直接与细胞外液间的交换^[8-9]。其作为细胞信息与外界交换的一种补充,极大地丰富了神经细胞间信息的交换和整合。本研究通过分支选择性结扎坐骨神经建立 NP 模型,研究 PX1 在脊髓中的表达变化。通过 Western blot 检测,发现术后 3、5、7、14 d 大鼠脊髓 PX1 表达量较 WT、sham 组明显上调($P<0.05$)。在术后 5~7 d,其表达量达到一个峰值,随后逐渐下降,在 14 d 时趋于平稳。SNI 组表达量的明显增高,提示 PX1 可能参与了疼痛的激活和调控。CBX 作为目前惟一相对特异非选择性的 GJ 阻断剂,有研究已经证实其可以阻断缝隙连接通道,导致离子或其他分子交换减少甚至停止。GFAP 作为星形胶质细胞的特异性标志物,已经得到大量研究证实。本研究免疫组化中发现,SNI 组与其他两组比较,脊髓背角中 GFAP 阳性细胞个数明显增多($P<0.05$)。在术后 7 d 进行鞘内注射 CBX 后,GFAP 阳性细胞个

数较未注射的 SNI 组有明显的下降($P<0.05$)。由此,可以推测 PX1 这类 GJ 可能与星形胶质细胞的表达激活有关。

以前的研究大量集中在 CX 上,但是近年来,自从其同源蛋白 PX 在 2004 年被克隆出来后,又成为研究的热点。PX1 蛋白参与了很多重要的病理生理过程。PX1 参与了机体免疫应答及炎症反应,巨噬细胞可能由 PX1 通道介导 IL-1 β 释放^[10-11];红细胞膜上 PX1 半通道可介导 ATP 释放从而对局部血流进行调节^[12];PX1 还能够抑制胶质瘤细胞的正常增殖^[13]。由于 PX 不同于 CX 组成的六聚体细胞间通道,只能形成三聚体的半通道。它的功能和 CX 相比较类似但又不完全一样,而这二者谁在疼痛信号的传递上起着更为重要的作用,需进一步探究^[14]。由于 CBX 是非选择性的 GJ 阻断剂,在二者的功能研究上很难以进行区分和鉴别。寻找更好、更特异的 GJ 阻断剂,能分别阻断两种同源蛋白通道,将为下一步研究提供更好的帮助,同时为疼痛药物的研发提供方向。

综上所述,缝隙连接蛋白 PX1 确实在 NP 的发生、发展中起着重要作用。至于 PX1 半通道如何调控星形胶质细胞,如何进一步整合和传递胶质细胞间的信息,还有待进一步的研究。

参考文献

- [1] Bennett MV, Garre JM, Orellana JA, et al. Connexin and pannexin hemichannels in inflammatory responses of glia and neurons[J]. Brain Res, 2012(1487): 3-15.
- [2] Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain[J]. Pain, 2000, 87(2): 149-158.
- [3] Mata M, Shuang LH. Applications of Gene Therapy to the Treatment of Chronic Pain[J]. Curr Gene Ther, 2008, 8(1): 42-48.
- [4] Yoon SY, Robinson CR, Zhang H, et al. Spinal astrocyte gap junctions contribute to oxaliplatin-induced mechanical hypersensitivity[J]. J Pain, 2013, 14(2): 205-214.
- [5] Ji RR, Berta T, Nedergaard M. Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? [J]. Pain, 2013, 154 Suppl 1: 10-28.
- [6] Mika J, Zychowska M, Popielek-Barczyk K, et al. Importance of glial activation in neuropathic pain[J]. Eur J Pharmacol, 2013, 716(1/2/3): 106-119.
- [7] Obata H, Sakurazawa S, Kimura M, et al. Activation of astrocytes in the spinal cord contributes to the development of bilateral allodynia after peripheral nerve injury in rats[J]. Brain Res, 2010(1363): 72-80.
- [8] Garre JM, Retamal MA, Cassina P, et al. FGF-1 induces ATP release from spinal astrocytes in culture and opens pannexin and connexin hemichannels[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(52): 22659-22664.
- [9] Houtao L, Abduqodir HT. Maxi-anion channel as a candidate pathway for osmosensitive ATP release from mouse astrocytes in primary culture[J]. Cell Res, 2008, 18(3): 558-565.
- [10] Kanneganti TD, Lamkanfi M, Kim YG, et al. Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules(下转第 1602 页)

综上所述,本研究认为单侧椎弓根螺钉固定的方式在椎间融合后可以取得和双侧固定同样的效果,理论上并不会显著增加内植物失效的发生率,其远期临床疗效是可以保证的。本研究结果为单侧椎弓根螺钉固定方法的临床应用提供了理论支持。当然,单侧椎弓根螺钉并不适合每种腰椎退行性病变的 TLIF 手术固定,比如术前存在腰椎不稳的病例,以及腰椎滑脱症和双侧关节突切除减压的病例,选择合适的患者进行单侧固定可以减少患者的经济负担和手术创伤,并且达到和双侧固定一样的融合效果。

参考文献

[1] Chastain CA, Eck JC, Hodges SD, et al. Transforaminal lumbar interbody fusion: a retrospective study of long-term pain relief and fusion outcomes[J]. Orthopedics, 2007,30(5):389-392.

[2] Rosenberg WS, Mummaneni PV. Transforaminal lumbar interbody fusion: technique, complications, and early results[J]. Neurosurgery, 2001,48(3):569-574.

[3] Sim HB, Murovic JA, Cho BY, et al. Biomechanical comparison of single-level posterior versus transforaminal lumbar interbody fusions with bilateral pedicle screw fixation: segmental stability and the effects on adjacent motion segments[J]. J Neurosurg Spine, 2010,12(6):700-708.

[4] Park P, Garton HJ, Gala VC, et al. Adjacent segment disease after lumbar or lumbosacral fusion: review of the literature[J]. Spine, 2004,29(17):1938-1944.

[5] Xue H, Tu Y, Cai M, et al. Comparison of unilateral versus bilateral instrumented transforaminal lumbar interbody fusion in degenerative lumbar diseases[J]. Spine J, 2012,12(3):209-215.

[6] Hu XQ, Wu XL, Xu C, et al. A systematic review and meta-analysis of unilateral versus bilateral pedicle screw fixation in transforaminal lumbar interbody fusion[J]. PLoS One, 2014,9(1):e87501.

[7] Yang XM, Wang H, Zhao QL, et al. A comparison of uni-

lateral and bilateral pedicle screw fixation combined with transforaminal lumbar interbody fusion for lumbar degenerative diseases[J]. Chin Med J, 2014,127(20):3592-3596.

[8] Schleicher P, Beth P, Ottenbacher A, et al. Biomechanical evaluation of different asymmetrical posterior stabilization methods for minimally invasive transforaminal lumbar interbody fusion[J]. J Neurosurg Spine, 2008,9(4):363-371.

[9] Chen HH, Cheung HH, Wang WK, et al. Biomechanical analysis of unilateral fixation with interbody cages[J]. Spine, 2005,30(4):E92-96.

[10] Yucesoy K, Yuksel KZ, Baek S, et al. Biomechanics of unilateral compared with bilateral lumbar pedicle screw fixation for stabilization of unilateral vertebral disease[J]. J Neurosurg Spine, 2008,8(1):44-51.

[11] Kim TY, Kang KT, Yoon DH, et al. Effects of lumbar arthrodesis on adjacent segments: differences between surgical techniques[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2012,37(17):1456-1462.

[12] Denoziere G, Ku DN. Biomechanical comparison between fusion of two vertebrae and implantation of an artificial intervertebral disc[J]. J Biomech, 2006,39(4):766-775.

[13] 王建华, 万磊, 夏虹, 等. 单枚融合器与单钉棒系统微创术式的有限元研究[J]. 临床骨科杂志, 2010,13(6):700-703.

[14] 敖俊, 万磊, 廖文波, 等. 腰椎间融合后路非对称与对称固定螺钉应力的有限元比较[J]. 中国组织工程研究, 2013,17(9):1555-1562.

[15] Renner SM, Natarajan RN, Patwardhan AG, et al. Novel model to analyze the effect of a large compressive follower pre-load on range of motions in a lumbar spine[J]. J Biomech, 2007,40(6):1326-1332.

(收稿日期:2014-11-04 修回日期:2015-01-27)

(上接第 1598 页)

activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling[J]. Immunity, 2007,26(4):433-443.

[11] Eugenin EA. Role of connexin/pannexin containing channels in infectious diseases[J]. FEBS Lett, 2014,588(8):1389-1395.

[12] Locovei S, Bao L, Dahl G. Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006,103(20):7655-7659.

[13] Lai CP, Bechberger JF, Thompson RJ, et al. Tumor-suppressive effects of pannexin 1 in C6 glioma cells[J]. Cancer Res, 2007,67(4):1545-1554.

[14] Iglesias R, Dahl G, Qiu F, et al. Pannexin 1: the molecular substrate of astrocyte “hemichannels”[J]. J Neurosci, 2009,29(21):7092-7097.

(收稿日期:2014-08-28 修回日期:2015-01-03)