

背根神经节微量注射 7-硝基吡唑抑制炎症性疼痛

孙伟翔,徐海兵,朱东亚*

(南京医科大学药学院药理教研室,江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**观察完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)诱导炎症性疼痛的现象,并探究背根神经节(DRG)部位注射神经元型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)抑制剂 7-硝基吡唑(7-nitroindazole, 7-NI)对于炎症性疼痛是否有镇痛作用并简要探讨其镇痛机制。**方法:**小鼠足底注射 10 μ l CFA 诱导炎症性疼痛动物模型,使用 von Frey 纤维丝采用 up-and-down 的方法测定小鼠的 50%足底回缩阈值(50% paw withdrawal threshold, 50%PWT)作为痛觉行为学的评价指标。在小鼠的背根神经节部位微量注射 10 μ g 7-NI 观察 50%PWT 的变化情况。用免疫印迹的方法观察炎症相关的降钙素基因相关肽(calcitonin gene related peptide, CGRP)在 CFA 诱导模型后、造模后给予 7-NI 和 nNOS 基因敲除小鼠造模后的表达情况。**结果:**与 DMSO 组相比,7-NI 组造模后 2~12 h 50%PWT 显著升高。观察到 CGRP 的表达量在 CFA 诱导后增加,而在给予 7-NI 和 nNOS 基因敲除组内 CGRP 的表达增加可以被逆转。**结论:**小鼠 DRG 部位注射 7-NI 对炎症性疼痛具有镇痛作用,且炎症性疼痛中 CGRP 表达量的增加可能是一氧化氮(nitric oxide, NO)在 DRG 内起疼痛敏感性作用的下游机制。

[关键词] 神经元型一氧化氮合酶;7-硝基吡唑;炎症性疼痛;降钙素基因相关肽

[中图分类号] R962

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)03-359-05

Suppression of inflammatory pain by microinjecting 7-nitroindazole into dorsal root ganglion

SUN Wei-xiang, XU Hai-bing, ZHU Dong-ya*

(Department of Pharmacology, School of Pharmacy, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the phenomenon of complete Freund's adjuvant (CFA)-induced inflammatory pain and explore the analgesic effect of 7-nitroindazole (7-NI) on dorsal root ganglion (DRG), and briefly discuss its analgesic mechanism. **Methods:** Ten microliters of CFA were injected into the plantar surface of the hind paw of the mice to produce inflammatory pain models, von Frey filaments were used to determine 50% paw withdrawal threshold (PWT) adopting by up-and-down method which can be regarded as an evaluation criteria for the pain behavior test. The changes of 50% PWT were tested by microinjecting 10 μ g 7-NI into DRG of the mice. Detect the expression of calcitonin gene related peptide (CGRP) in CFA-induced, 7-NI treated and neuronal nitric oxide synthase (nNOS) knock-out models by Western blot. **Results:** Compared with DMSO group, 50% PWT significantly increased in 7-NI group during 2~12 h after CFA inducing. The expression of CGRP increased after CFA injection, this effect could be reversed by 7-NI administration or nNOS knock-out. **Conclusion:** Microinjection of 7-NI into DRG could produce analgesia in inflammatory pain mice. Increased expression of CGRP might be the downstream mechanism resulted from NO mediated nociceptive effect in dorsal root ganglion.

[Key words] nNOS; 7-NI; inflammatory pain; CGRP

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(3): 359-363]

国际疼痛协会(International Association for the Study of Pain, IASP)认为“疼痛是与实际或潜在的组织损伤相关联的不愉快的感觉和情感体验,或用组织损伤这类词汇所描述的主诉症状”。已有实验证

明,非选择性一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)抑制剂 L-N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)能够显著性地抑制慢性炎症性疼痛的痛觉增敏作用^[1]。同时,外周神经损伤引发的疼痛可以导致背根神经节(DRG)神经元中 nNOS 表达升高^[2]。DRG 中含有大量的躯体感觉一级传入神经元的胞体,在痛觉的外周和中枢传导机制中起着十分重要

[基金项目] 江苏省自然科学基金重点研究专项(BK2011029)

*通讯作者, E-mail: dyzhu@njmu.edu.cn

的作用。本研究的主要目的在于探究在炎症性疼痛的发生发展的过程中,DRG 部位微量注射 nNOS 抑制剂 7-硝基吡唑(7-nitroindazole,7-NI)能否改善炎症性疼痛。

1 材料与方 法

1.1 材 料

成年 ICR 雄性小鼠,体重 18~25 g,购自南京医科大学实验动物中心,雄性 nNOS 敲除(nNOS^{-/-})小鼠购自南京大学动物模式中心。所有实验动物在开始实验前,均在清洁动物饲养系统中进行 1 周的适应性饲养,实验室光照时间 06:00~18:00,温度控制在 18℃~22℃。

完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA)、7-NI、DMSO 购于美国 Sigma 公司;兔抗降钙素基因相关肽(CGRP)多克隆抗体购自美国 AbbiotecTM 公司,辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗购于南京联科生物技术有限公司;ECL 发光液试剂(Super Signal West Pico Trial Kit,美国 Bio-Rad 公司);其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 炎症性疼痛动物模型的复制

按 Jarvis 等^[3]方法,用 75%酒精将右侧后足底周围皮肤消毒,皮下注射 CFA 10 μl 诱导足底炎性疼痛模型。拔针后用干棉球轻压片刻,避免药液沿针孔外溢。

1.2.2 机械性痛觉阈值测定方法

测定机械缩足阈值 (paw withdrawal threshold, PWT) 时,用 von Frey 纤维丝推算 50%PWT。50% PWT 的测定是指多次机械刺激能够引起 50%缩足反应的机械力度,本实验使用接触刺激(Touch-testTM sensory evaluator test, 美国 North Coast Medical 公司)采取 up-and-down 的方法测定小鼠 50%PWT。依次使用 0.02、0.04、0.07、0.16、0.40、0.60、1.00、1.40 和 2.00 g 的力度刺激后肢。将有机玻璃箱 (20 cm × 20 cm × 20 cm)置于金属筛网上,待小鼠在箱中适应 30 min 后,用 von Frey 纤维丝垂直刺激小鼠后肢足底中部,持续时间 ≤ 4 s,小鼠出现抬足或舔足行为视为阳性反应,反之为阴性反应。开始使用 0.40 g 的力度刺激,若没有阳性反应,则选择其上的 1 个力度 0.60 g 刺激后足;若有阳性反应,则选择其下的 1 个力度 0.16 g 刺激后足,以此类推,在出现 1 次与前次不同的反应(由阳性反应至阴性反应或阴性反应至阳性反应)时,继续依序刺激 4 次,共 6 次,

即完成 50%PWT 的测定。若需要使用的力度超过 2.00 g 或低于 0.02 g,该侧阈值则直接记为 2.00 g 或 0.02 g,每次刺激间隔 30 s。在实验中尽量保持一致的测量手法,如力方向、加力速度、纤维丝弯曲程度和力的撤除速度等,保持力的稳定性。另外,对小鼠的反应判断标准尽量一致。50%PWT 的计算使用公式:50%PWT=10^{log(X)+κδ}(X 为最后刺激使用的力度;κ 为不同刺激方式的系数,在系数表中查找;δ 是指各刺激力度相邻间距的平均数,此处 δ=0.224)^[4-5]。

1.2.3 背根神经节微量注射

将小鼠分为 2 组,每组 10 只,腹腔注射 2%水合氯醛(0.2 ml/10 g),翻正反射消失后,固定小鼠于俯卧位。切开小鼠第 5 腰椎(L₅)至右侧髋关节之间的皮肤,钝性分离右侧椎骨旁肌肉,移除结缔组织,用小号咬骨钳去除 L₅ 横突(图 1)。在椎骨边缘处找到 L₅ 神经节,神经节注射在直视下进行^[6]。一组 DRG 内微量注射 20%DMSO 3 μl 作为溶剂组(CFA+DMSO),另一组 DRG 内微量注射 7-NI 10 μg 溶于 20%DMSO 3 μl 作为给药组(CFA+7-NI),待小鼠完全恢复后,右侧后肢足底皮下给予 CFA 10 μl,观察造模后 2、4、6、8、12、24 h 机械性痛阈的变化情况。



图 1 L₅ 背根神经节的解剖部位

Figure 1 Anatomical position of L₅ dorsal root ganglion (DRG)

1.2.4 蛋白免疫印迹分析

小鼠断头取出脊柱,沿棘突剪开椎骨,去除脊髓,暴露并取出右侧 L₅ 水平 DRG,5 只小鼠的 DRG 为 1 个样品,每组 4 个样品,加入预冷的组织蛋白裂解液,充分匀浆(始终在冰浴中进行)。12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,加入 1/5 体积的 6 × 蛋白加样缓冲液煮沸 10 min,10% SDS-PAGE 凝胶恒压 100 V 电泳,转至硝酸纤维素膜(NC 膜),5%脱脂奶粉封闭 1 h,TBST 洗膜,CGRP 一抗(1:100)孵育过夜,TBST 洗膜 15 min × 4 次,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1:1 000)孵育 2 h,TBST 洗膜 15 min × 4 次,末次洗膜后,ECL 曝光,Kodak 凝胶成像系统显影、拍照、分析。

1.3 统计学方法

所有数据均运用 STATA10.0 统计软件进行检验。所有定量数据均表示为均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$), 方差分析联合 Scheffe 法比较组间差异的显著性, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

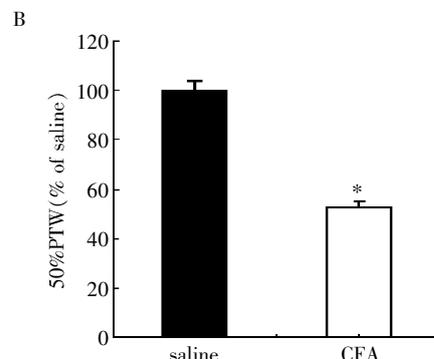
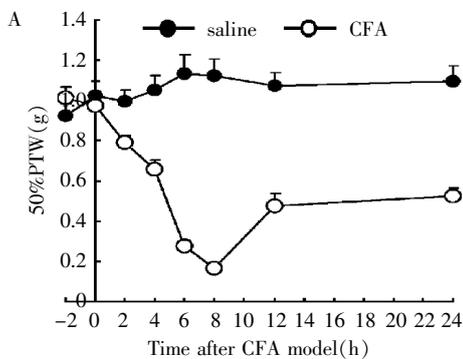
2.1 小鼠炎症性疼痛引发的机械性阈值的变化

小鼠右侧后足皮下注射 CFA 10 μ l 后, 右侧后足立刻出现红肿现象, 同时部分小鼠伴有后足自发性悬空抬起、舔舐右侧后足等自发性疼痛行为。使用 von Frey 纤维丝测定小鼠 CFA 注射后机械痛

阈, 结果显示 CFA 造模 2 h 后小鼠疼痛阈值显著下降, 8 h 达到最低值, 12 h 后阈值逐渐升高(图 2A)。以足底皮下注射生理盐水(saline)作为对照组, 统计结果显示, CFA 造模后的平均 50%PWT 明显小于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.01$, 图 2B)。

2.2 DRG 给予 nNOS 抑制剂 7-NI 对小鼠炎症性疼痛的抑制作用

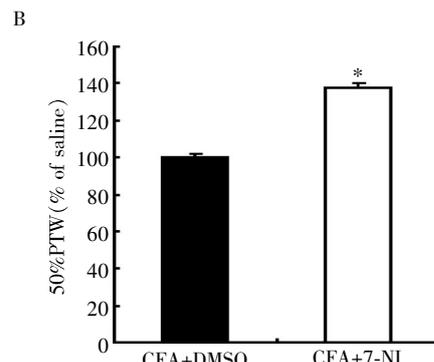
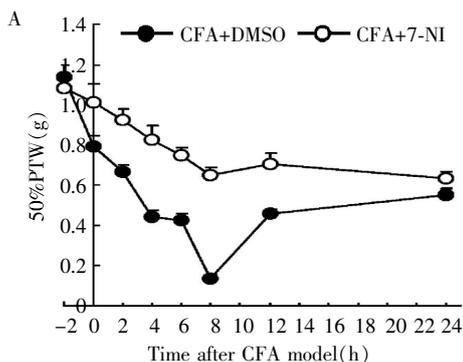
由实验结果得知, 给药组的痛觉阈值在 2~12 h 内明显高于溶剂组, 说明 7-NI 能够显著抑制炎症性疼痛造成的痛觉增敏效应(图 3A)。统计结果显示, 7-NI 组的平均 50%PWT 明显高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.001$, 图 3B)。



A: saline 组和 CFA 组的 50%PWT 的时程变化结果; B: saline 组和 CFA 组造模后 24 h 内各时间点 50%PWT 总和与 saline 组之比。与 saline 组比较, * $P < 0.001$ ($n = 10$)。

图 2 CFA 模型足底机械性阈值变化时程

Figure 2 Time course of paw withdrawal changes in CFA models



A: 溶剂组与 7-NI 组的 50%PWT 的时程变化结果; B: 溶剂组与 7-NI 组造模后 24 h 内各时间点 50%PWT 的总和与溶剂组之比。与溶剂组比较, * $P < 0.001$ ($n = 10$)。

图 3 CFA 模型 DRG 微量注射 7-NI 的镇痛作用

Figure 3 Analgesic effect by microinjecting of 7-NI into DRG in CFA models

2.3 nNOS 对 CFA 诱发的背根神经节 CGRP 表达的影响

2.3.1 7-NI 对 CFA 诱发的背根神经节 CGRP 表达的影响

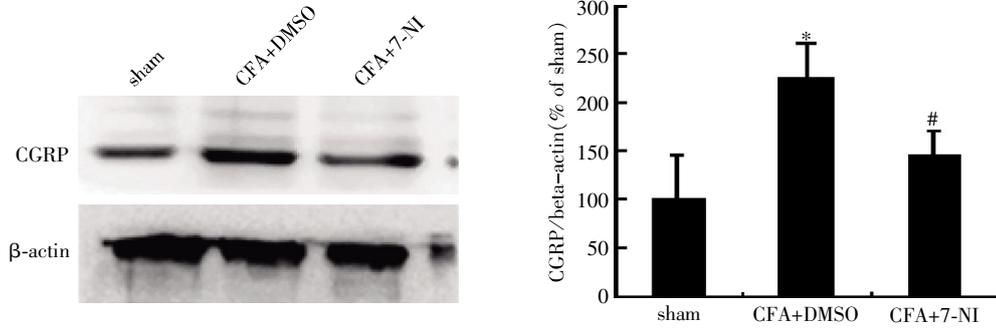
采用免疫印迹法观察 DRG 内微量注射 7-NI (10 μ g) 后是否对 CFA 诱发的 CGRP 表达有影响。

实验结果得知, 相比假手术(sham)组, CFA 造模后 DRG 内 CGRP 的表达量明显增加; 相比溶剂(CFA+DMSO)组, 给药(CFA+7-NI)组 CGRP 的表达量明显降低, 具有统计学意义($P < 0.05$, 图 4)。

2.3.2 nNOS 基因敲除对 CFA 诱发的背根神经节 CGRP 表达的影响

由实验得知,在野生(WT)组 CFA 诱导 CGRP 的表达量增加,具有统计学意义($P < 0.05$);而在 nNOS 基因敲除 (nNOS KO) 组 CGRP 的表达量在

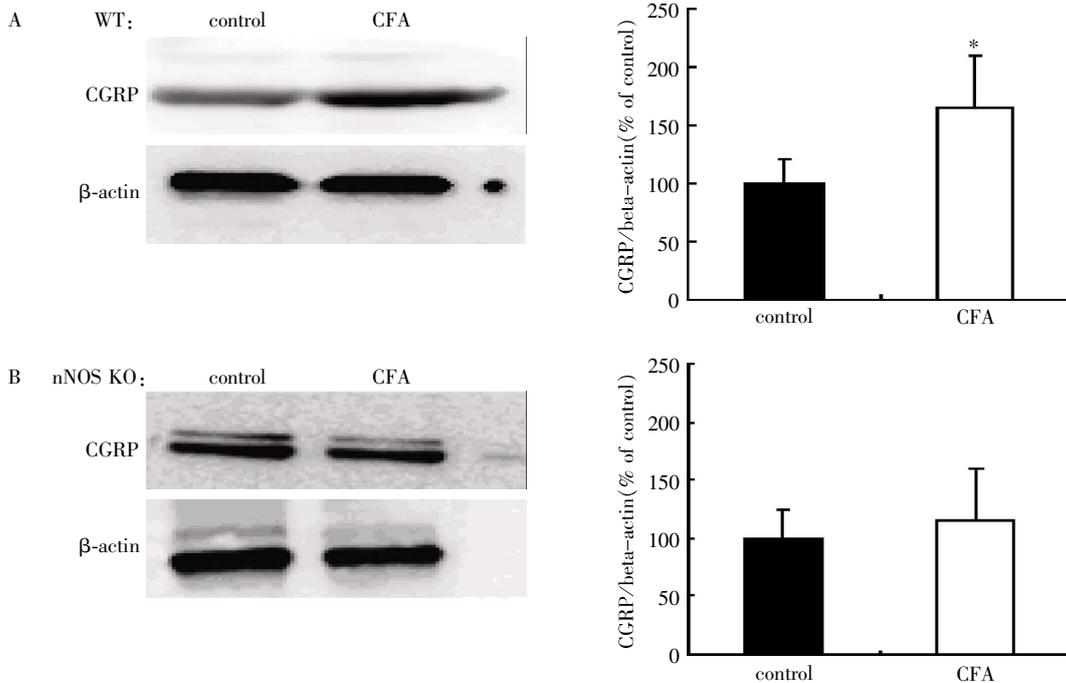
CFA 诱导模型与对照组没有统计学差异。结果表明,nNOS 在 DRG 内神经元起痛觉敏感性的作用,这一作用可能是通过激活 CGRP 发挥的(图 5)。



与 sham 组比较, * $P < 0.05$; 与 CFA+DMSO 组比较, # $P < 0.05$ ($n = 4$)。

图 4 CFA 诱导炎症性疼痛后 DMSO 组和 7-NI 组 DRG 神经元中 CGRP 的表达情况

Figure 4 Expression of CGRP in DRG neurons of DMSO and 7-NI group after CFA-induced inflammatory pain



A: 在 WT 组, CFA 造模组与 control 组比较, * $P < 0.05$ ($n = 4$); B: 在 nNOS KO 组, CFA 造模组与 control 组比较, 无统计学差异 ($n = 4$)。

图 5 WT 组和 nNOS KO 组 CFA 诱导后 DRG 神经元中 CGRP 的表达

Figure 5 Expression of CGRP in DRG neurons of CFA-induced WT and nNOS-KO group

3 讨论

NO 作为小分子气体信号, 参与了机体神经系统、心血管系统以及免疫系统的多项生理活动^[7-9]。其作用机制之一是提高靶细胞的环磷酸鸟苷 (cGMP) 的水平, 即 NO-cGMP 途径^[10]。有研究表明, 在给动物注射炎症物质之后, NO 从周围组织的内皮细胞、白细胞中释放, 扩张微动脉血管, 提高微动脉血管的渗透性。NO 还能够促进细胞因子、

游离氧自由基以及前列腺素的释放, 产生红肿热痛的炎症现象。因此, NO 被认为是参与炎症性疼痛的重要组成部分。最近一段时间的研究成果表明^[11]: nNOS 是作为诱导和维持神经病理性疼痛和炎性疼痛的最为重要的 NO 合成酶。诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 仅仅只是维持了炎症性疼痛的病理过程, 而内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 对于疼痛的发生发展并没有任何作用。同时有文献报道表

明:在 nNOS 或者 iNOS 敲除的小鼠疼痛模型中,不同类型 NOS 的上调呈现一种代偿的形式,这种机制就可以解释在某种类型 NOS 敲除小鼠上给予 NOS 抑制剂之后,疼痛阈值的变化并不明显或者不存在的原因。

本研究给予小鼠 DRG 中注射溶剂 DMSO 和 7-NI,待小鼠状态恢复后同时测定其疼痛阈值,结果显示 7-NI 组的 50%PWT 显著高于 DMSO 组,从而可以说明用水合氯醛麻醉的方法并没有干扰对 7-NI 药效的判定。此外,因为 DRG 部位含有 nNOS 阳性神经元^[12-15],所以本实验试图采用 DRG 部位定向给予 nNOS 抑制剂 7-NI 的方法来提高炎症性疼痛的痛敏阈值,结果显示 7-NI 能够抑制造模后 2~12 h 的痛敏作用。据文献报道^[16],CGRP 与伤害性刺激信号传递的关系极为密切。本课题证明了 DRG 神经元可能通过激活 nNOS 使得内源性 CGRP 大量释放,从而介导炎症性疼痛的病理过程。同时证明了与野生炎症性疼痛模型鼠相比较,nNOS 敲除鼠 CFA 诱导炎症疼痛后 DRG 中 CGRP 的表达没有变化,从而可以证明降低 DRG 部位 nNOS 表达水平能够抑制炎症性疼痛的增敏作用。与此同时,已有文献表明,采用钝性分离组织和咬开横突暴露 DRG 的方法进行神经内微量注射,结果显示术后 2 周内并没有造成动物疼痛相关的行为学变化^[17],该方法治疗的范围小且作用部位明确,能够避免全身给药带来的对于神经系统的不良反应。这一给药方法也为本课题后续研究在 DRG 部位 NO 介导炎症性疼痛的机制以及筛选新型抑制 NO 生成的镇痛药物奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Chen Y,Boettger MK,Reif A,et al. Nitric oxide synthase modulates CFA-induced thermal hyperalgesia through cytokine regulation in mice[J]. *Mol Pain*,2010,6:13
- [2] Martucci C,Travato AE,Costa B,et al. The purinergic antagonist PPADS reduces pain related behaviours and interleukin-1b,interleukin-6,iNOS and nNOS overproduction in central and peripheral nervous system after peripheral neuropathy in mice[J]. *Pain*,2008,137(1):81-95
- [3] Jarvis MF,Honore P,Shieh CC,et al. A-803467,a potent and selective Nav1.8 sodium channel blocker,attenuates neuropathic and inflammatory pain in the rat [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2007,104(20):8520-8525
- [4] 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
- [5] Mestre C,Pelissier T,Fialip J,et al. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*,1994,32(4):197-200
- [6] Puljak L,Kojundzic SL,Hogan QH,et al. Targeted delivery of pharmacological agents into rat dorsal root ganglion [J]. *J Neurosci Methods*,2009,177(2):397-402
- [7] Zhou L,Zhu DY. Neuronal nitric oxide synthase:Structure,subcellular localization,regulation,and clinical implications[J]. *Nitric Oxide*,2009,20(4):223-230
- [8] Choi BS,Kim KW,Lee YJ,et al. Exhaled nitric oxide is associated with allergic inflammation in children [J]. *J Korean Med Sci*,2011,26(10):1265-1269
- [9] Shiekh GA,Ayub T,Khan SN,et al. Reduced nitrate level in individuals with hypertension and diabetes [J]. *J Cardiovasc Dis Res*,2011,2(3):172-176
- [10] SchmidtkoA,Gao W,Konig P,et al. cGMP produced by NO-sensitive guanylyl cyclase essentially contributes to inflammatory and neuropathic pain by using targets different from cGMP-dependent protein kinase I [J]. *J Neurosci*,2008,28(34):8568-8576
- [11] Boettger MK,Uceyler N,Zelenka M,et al. Differences in inflammatory pain in nNOS-,iNOS- and eNOS-deficient mice[J]. *Eur J Pain*,2007,11(7):810-818
- [12] Bradman MJ,Arora DK,Morris R,et al. How do the satellite glia cells of the dorsal root ganglia respond to stressed neurons? -- nitric oxide saga from embryonic development to axonal injury in adulthood[J]. *Neuron Glia Biol*,2010,6(1):11-17
- [13] Sardella TC,Polgúr E,Watanabe M A,et al. A quantitative study of neuronal nitric oxide synthase expression in laminae I-III of the rat spinal dorsal horn [J]. *Neuroscience*,2011,192:708-720
- [14] Kim KH,Kim JI,Han JA,et al. Upregulation of neuronal nitric oxide synthase in the periphery promotes pain hypersensitivity after peripheral nerve injury [J]. *Neuroscience*,2011,190:367-378
- [15] Ruscheweyh R,Goralczyk A,Wunderbaldinger G,et al. Possible sources and sites of action of the nitric oxide involved in synaptic plasticity at spinal lamina I projection neurons[J]. *Neuroscience*,2006,141(2):977-988
- [16] Benemei S,Nicoletti P,Capone JG,et al. CGRP receptors in the control of pain and inflammation [J]. *Curr Opin Pharmacol*,2009,9(1):9-14
- [17] Kosta V,Kojundzic SL,Sapunar LC,et al. The extent of laminectomy affects pain-related behavior in a rat model of neuropathic pain [J]. *Eur J Pain*,2009,13 (3):243-248