

蠕虫来源的 LNFP III 对周围性神经病理性疼痛的病理发生和脊髓胶质细胞活化的影响*

丁有权, 任弘毅, 肖霞, 李轩漾, 齐建国[△]

四川大学华西基础医学与法医学院 组织胚胎学与神经生物学教研室(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨蠕虫来源的免疫调控性糖分子乳-N-岩藻五糖 III (lacto-N-fucopentaose III, LNFP III) 对成年大鼠神经永久性横断伤(即改良型备用性神经损伤, modified spared nerve injury, mSNI)后神经病理性疼痛的病理发生的影响, 以及它对此时脊髓胶质细胞活化的影响。方法 成年雄性 SD 大鼠随机分为 4 组, 即假手术组($n=6$)、mSNI 手术组($n=6$)、mSNI 手术+牛血清白蛋白(BSA)组($n=12$)和 mSNI 手术+LNFP III 组($n=12$)。各组动物行右侧 mSNI 手术或者相应的假手术, 根据实验分组腹腔注射 BSA 或 LNFP III 与 BSA 的结合物。每组取 6 只大鼠进行足底试验、von Frey 纤维试验、针刺试验和丙酮试验, 测试手术前、后手术同侧和对侧大鼠后爪足底面腓肠神经和隐神经皮肤区域特异性的疼痛反应。制备 mSNI 手术+BSA 组和 mSNI 手术+LNFP III 组手术后 7 d 和 14 d(各组每个时间点 3 只动物)的第 3~4 腰椎(L3~4)脊髓节段冰冻切片, 进行小胶质/巨噬细胞标志物分化抗原簇分子 11b(cluster of differentiation molecule 11b, CD11b)和星形胶质细胞标志物胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)的免疫荧光染色。结果 成年大鼠 mSNI 后, 早期系统性给予 LNFP III 可显著缓解手术后急性诱导期(4/5 d)和慢性转化期(7/8 d 和 14/15 d)中手术侧后爪足底面腓肠神经和隐神经皮肤区域特异性的机械和温度刺激诱发的病理性疼痛。同时, 早期系统性给予 LNFP III 抑制 mSNI 大鼠手术侧脊髓背角中术后 7 d 小胶质/巨噬细胞以及术后 7 d 和 14 d 星形胶质细胞的活化。结论 早期系统性给予 LNFP III 能抑制成年大鼠 mSNI 后神经病理性疼痛的病理发生(包括急性诱发起和慢性转化)以及该过程中脊髓胶质细胞的活化。

【关键词】 周围神经 神经胶质细胞 神经病理性疼痛 LNFP III

Helminth-derived Immunomodulatory Glycan LNFP III Impairs Pathogenesis of Peripheral Neuropathic Pain and Spinal Glial Activation DING You-quan, REN Hong-yi, XIAO Xia, LI Xuan-yang, QI Jian-guo[△]. Department of Histology, Embryology and Neurobiology, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: jgqi@scu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect of helminth-derived immunomodulatory glycan lacto-N-fucopentaose III (LNFP III) on the pathogenesis of neuropathic pain and spinal glial activation in the corresponding time windows after adult rat tibial nerve permanent transection (modified spared nerve injury, mSNI). **Methods** Ten weeks old male adult Sprague-Dawley (SD) rats weighing 250-300 g were randomly grouped into four groups: sham-operated group ($n=6$), mSNI group ($n=6$), mSNI plus bovine serum albumin (BSA) group ($n=12$) and mSNI plus LNFP III group ($n=12$). Rats were subjected to surgical operation or sham operation on the right tibial nerves and were intraperitoneal injected BSA or LNFP III-BSA conjugates by the group design. Animals from each group ($n=6$ per group) were subjected to the plantar test, von Frey hairs test, pinprick test and acetone test for critical evaluation of region-specific pain responses on the plantar sural and saphenous skin territories of ipsilateral and contralateral hindpaws after injuries. Transverse frozen sections of L3-4 spinal cords from the remaining animals of mSNI plus BSA group and mSNI plus LNFP III group 7 and 14 d after injury ($n=3$ for each time point per group) were prepared and subjected to immunofluorescent staining of microglia/macrophage marker [cluster of differentiation molecule 11b (CD11b)] and astrocyte marker [glial fibrillary acidic protein (GFAP)], for analysis of spinal glial activation. **Results** After adult rat mSNI, early systematic administration of LNFP III significantly but not completely attenuated region-specific pathological pain evoked by mechanical and thermal stimuli on the sural and

* 国家自然科学基金(No. 31571240)资助

[△] 通信作者, E-mail: jgqi@scu.edu.cn

saphenous skin territories of rat hindpaw plantar surfaces in acute (4/5 d after injuries) and subacute (7/8 d and 14/15 d after injuries) phases. Meanwhile, in the ipsilateral spinal cord dorsal horns, this early systematic treatment inhibited microglia/macrophage activation 7 d after injury and astrocyte activation 7 and 14 d after injury. **Conclusion** Early systematic administration of LNFP III impairs the pathogenesis (acute induction and chronic transition) of neuropathic pain and spinal glial activation in the corresponding time windows after adult rat mSNI.

【Key words】 Peripheral nerves Neuroglial cells Neuropathic pain LNFP III

目前,由周围神经系统的损害、疾病或功能紊乱引起的周围性神经病理性慢性疼痛临床治疗困难,严重影响患者健康^[1-3]。最新研究表明,周围神经损伤后外周免疫器官中的炎症和免疫反应参与对应脊髓节段背角小胶质/巨噬细胞和星形胶质细胞的活化^[3]。周围神经损伤后,外周血单核细胞浸润脊髓背角,与局部小胶质细胞共同增殖并分化成活化的小胶质/巨噬细胞^[4]。这些活化的小胶质/巨噬细胞释放脑源性神经营养因子、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α 等炎症因子,导致病理性疼痛的急性诱发^[2,4-5]。同时,外周免疫器官中一些炎症性 T 细胞(Th1 和 Th17 细胞)特异性浸润脊髓背角,导致星形胶质细胞持续增殖和活化^[3,6-7]。这些活化的星形胶质细胞持续释放单核细胞趋化因子蛋白-1 和 IL-1 β 等炎症因子,导致病理性疼痛的慢性转化^[3,8-9]。因此,调控周围神经损伤引起的外周炎症和免疫反应,进而抑制脊髓胶质细胞的活化,可能是周围性神经病理性疼痛治疗的新型潜在措施。

最近研究表明,曼氏血吸虫虫卵可溶性抗原中含有 Lewis X 抗原表位的五糖分子乳-N-岩藻五糖 III (lacto-N-fucopentaose III, LNFP III)^[10-11],通过糖结合物而非单体的形式,强烈抑制巨噬细胞和 CD4⁺ T 细胞的炎症分化,有效控制银屑病、实验性脑脊膜炎、饮食性肥胖和心脏移植等炎症和自身免疫性疾病的发生和发展^[10-13]。因此,蠕虫来源的免疫调控性糖分子 LNFP III 也可能调控周围神经损伤后的外周炎症和免疫反应,进而抑制脊髓背角胶质细胞的活化和神经病理性疼痛的病理发生。基于该假说,本研究检测了早期系统性给予 LNFP III 对成年大鼠胫神经永久性横断伤(即改良型备用性神经损伤,modified spared nerve injury, mSNI)后神经病理性疼痛的病理发生以及此时脊髓胶质细胞活化的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

10 周龄成年雄性 SD 大鼠体重 250~300 g,

购自四川大学实验动物中心。饲养于(22 $\pm$ 1)℃的室温、12 h/12 h 明/暗的光照循环的空间中,能够自由获取水和粮食。所有的动物实验均严格按照四川大学动物保护和伦理委员会的要求和美国国立卫生研究院实验动物保护和使用指南(出版号 85-23, 1985 修订版)执行。

大鼠随机分为 4 组,即假手术组($n=6$)、mSNI 手术组($n=6$)、mSNI 手术+牛血清白蛋白(BSA)组($n=12$)和 mSNI 手术+LNFP III 组($n=12$)。各组动物行右侧 mSNI 手术或者相应的假手术,腹腔注射 BSA 或 LNFP III 与 BSA 的结构合物。首先,4 组动物各取 6 只,进行足底实验、von Frey 纤维实验、针刺实验和丙酮实验,测试手术后大鼠手术同侧和对侧后爪足底面腓肠神经和隐神经皮肤区域特异性的疼痛反应。同时, mSNI 手术+BSA 组和 mSNI 手术+LNFP III 组各自的另外 6 只动物,分别于手术后 7 d 和 14 d(每组每个时间点各 3 只)灌注固定,获取大鼠隐神经和坐骨神经对应的脊髓节段第 3~第 4 腰椎(L3~4),冰冻切片,进行小胶质/巨噬细胞标志物分化抗原簇分子 11b(cluster of differentiation molecule 11b, CD11b)(术后 7 d)和星形胶质细胞标志物胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)(术后 7 d 和 14 d)的免疫荧光染色,分析脊髓胶质细胞活化。

1.2 动物手术及药物注射

成年大鼠 mSNI 手术按照文献^[14-15]报道进行。暴露大鼠右侧坐骨神经及其胫、腓总和腓肠神经分支,确定胫神经分支并小心游离其周围的结缔组织。在紧邻坐骨神经分叉处的远侧段处,利用 5-0 丝线牢固地结扎胫神经,于结扎处远侧利用显微剪刀切除 5 mm 长度的胫神经,同时确保腓总和腓肠神经不受任何损伤。逐层缝合肌肉和皮肤后,将大鼠置于 37℃热板上等待苏醒。实验过程中所有的动物均独立饲养以便术后护理。

LNFP III 的免疫调控功能需要以糖结合物的形式给予;单体无法激活免疫调控功能,却能够阻断 LNFP III 糖结合物的免疫调控作用^[12]。因此,本实

验中使用 LNFPⅢ与 BSA 的结合物,在 mSNI 手术后立即和术后 5 d,给予 mSNI 手术+LNFPⅢ组各只大鼠腹腔注射 LNFPⅢ结合的 BSA(单次注射剂量为 50 μg ; Dextra, # NGP0502, 英国雷丁), mSNI 手术+BSA 组各只大鼠于相应时间点腹腔注射同等剂量的 BSA 作为对照。根据生产商提供的质谱数据,一个 LNFPⅢ结合的 BSA 结合物分子(相对分子质量为 84.87×10^3)平均拥有 20 个 LNFPⅢ分子(每个 LNFPⅢ分子的相对分子质量为 853.77)。因此,一个 LNFPⅢ结合的 BSA 结合物分子中 LNFPⅢ的质量仅占该结合物分子质量的 20%。也就是说,在单次腹腔注射的 50 μg LNFPⅢ结合的 BSA 结合物中 LNFPⅢ分子本身的实际剂量仅为 10 μg 。

1.3 疼痛行为学测试

手术同侧大鼠后爪足底面的内侧和外侧部均进行足底实验(热痛过敏)、von Frey 纤维实验(机械性疼痛异常)、针刺实验(机械性疼痛过敏)和丙酮实验(冷痛异常),用于分析隐神经和腓肠神经支配皮肤的区域特异性疼痛反应。手术对侧后爪足底面的对应部位也进行相应的行为学测试。测试时间点为手术前、术后 4/5 d、术后 7/8 d 以及术后 14/15 d。对于某个确定的时间点(每个时间点包含连续两天),4 种行为学测试的时间顺序为:足底实验在该时间点的第 1 d 进行,丙酮实验、von Frey 纤维实验和针刺实验在该时间点的第 2 d 进行。手术前 1 周,所有的行为学测试动物均需要适应实验环境,并适应测量疼痛反应基础值的实验操作。所有的行为学测试基于单盲法,均由能够正确执行各种测试的同一人员进行。

进行足底实验过程中,利用足底测试仪(Ugo Basile, 意大利科米里奥)中发光直径为 6 mm 的红外热光源以 40 mW/cm^2 的低功率辐射强度($1^\circ\text{C}/\text{s}$ 的加热速度)刺激大鼠后爪掌面的内侧或外侧部,然后按照文献^[16-17]报道测量爪缩潜伏期的时程长度。丙酮实验按照文献^[17]中改良后的方法进行:利用微量注射器钝头针头的针尖轻轻滴加 10 μL 丙酮于大鼠后爪掌面的内侧或外侧部,同时确保针尖未接触皮肤,然后测量爪缩时程长度。进行 von Frey 纤维实验时,利用触丝痛觉测试套装(DanMic Global, 美国加州)中的 von Frey 纤维,按照 up-down 方法垂直刺激大鼠后爪掌面的内侧或外侧部,然后按照文献^[16-17]报道测量和计算 50% 爪缩阈值。进行针刺实验时,利用大头针刺激大鼠后爪掌面的内侧或

外侧部,同时确保大头针不刺破皮肤,然后按照文献^[16-17]报道测量爪缩时程长度。

1.4 脊髓冰冻切片免疫荧光染色与成像^[17]

大鼠胫神经横断后 7 d 和 14 d,通过体积分数为 4% 的多聚甲醛(PFA)经心脏灌注固定后获取大鼠的 L3~4 脊髓节段。经过适当的后固定和梯度蔗糖溶液冷冻保护处理后,脊髓样本通过液氮预冷的异戊烷速冻将其包埋于聚乙二醇和聚乙烯醇的水溶性混合物(OCT)中,继之在冰冻切片机上做脊髓横行冷冻切片,片厚 5 μm ,并贴片于多聚赖氨酸(PLL)包被的载玻片上。

取出冻存的脊髓切片,复温后利用 PBST [0.05% Tween 20,溶解于 0.01 mol/L 磷酸缓冲盐溶液(PBS)]漂洗 3 次,然后进行 CD11b 和 GFAP 的免疫荧光染色。室温 30 min 穿透(0.3% TritonX-100,溶解于 0.01 mol/L PBS)和室温 1 h 封闭(2% BSA、 5% 山羊血清、 0.05% Tween 20、 0.01% 叠氮钠,溶解于 0.01 mol/L PBS)后,脊髓切片被抗 CD11b 小鼠单克隆抗体($1:100$; Abcam, 英国剑桥)或抗 GFAP 小鼠单克隆抗体($1:1000$; Abcam, 英国剑桥)浸润, 4°C 孵育 12 h。经过 3 次 PBST 漂洗(每次 5 min)后,加入 Alexa Fluor 568 标记的山羊抗小鼠 IgG 荧光二抗(CD11b 为 $1:500$; GFAP 为 $1:1000$; Molecular Probes, 美国尤金),室温孵育 1 h。经过 5 次 PBST 漂洗(每次 5 min)后,利用抗荧光淬灭剂进行封片。

使用奥林巴斯 IX83 显微镜和 DP80 双芯片电荷耦合元件(CCD)摄像头,在 cellSens Dimension 软件控制下,利用 10 倍($\text{NA}=0.40$) UPLSAPO 物镜对所有切片的手术同侧和对侧脊髓灰质背角区进行观察和荧光成像。

1.5 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用重复测量的多因素方差分析和 Dunn 检验,分析同一皮肤区域不同组别动物不同时间点的疼痛反应的差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠神经病理性疼痛的病理发生

结果见图 1。相对于假手术组动物而言, mSNI 手术组动物手术侧后爪足底面隐神经和腓肠神经皮肤区域机械和冷热刺激激发的手术后的疼痛反应与手术前的疼痛反应基础值比较出现了快速而明显的长时间变化,包括足底测试中热刺激导致缩爪的潜

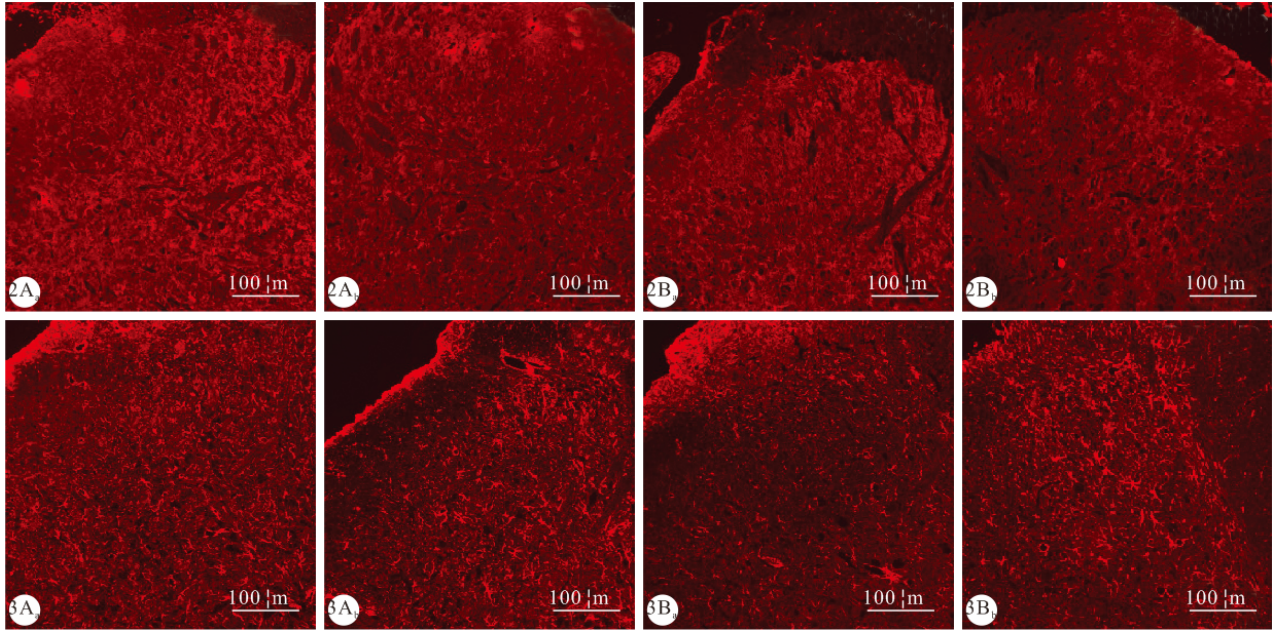
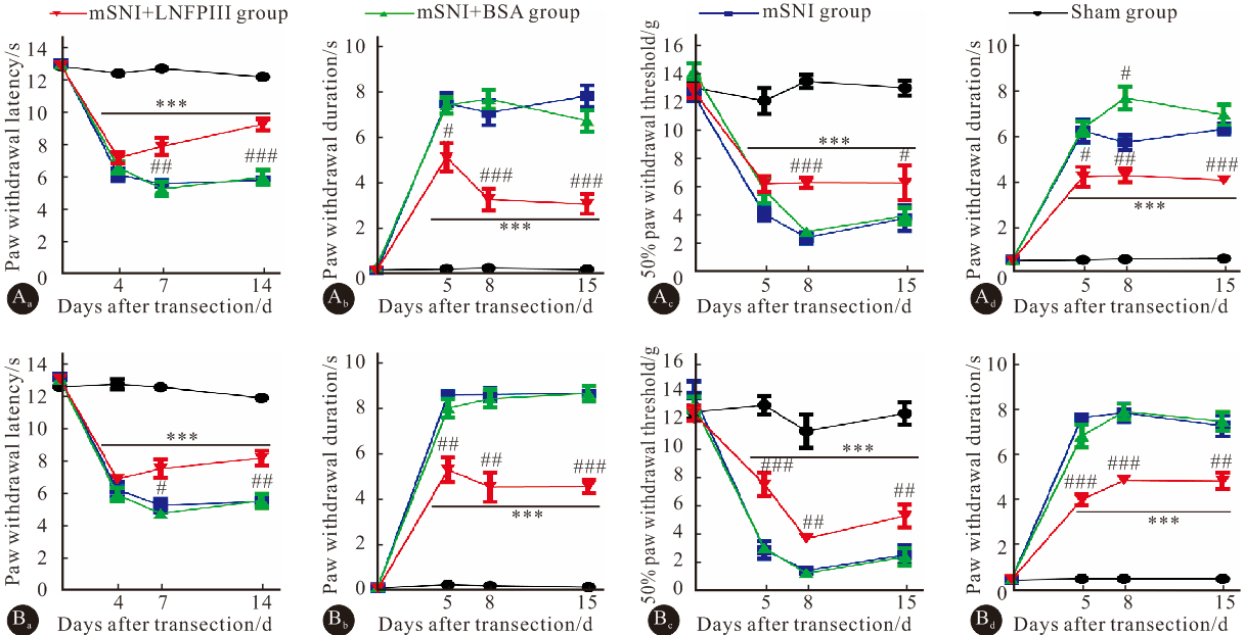


图 1 各组大鼠右侧 mSNI 后神经病理性疼痛的病理发生 图 2 大鼠右侧 mSNI 后神经病理性疼痛急性诱发过程中脊髓灰质背角 CD11b 的表达。免疫荧光染色 图 3 大鼠右侧 mSNI 后神经病理性疼痛慢性转化过程中脊髓灰质背角 GFAP 的表达。免疫荧光染色

Fig 1 The pathogenesis of neuropathic pain after right tibial mSNI in adult rats Fig 2 Expression of CD11b in spinal cord dorsal horns during acute induction of neuropathic pain after right tibial mSNI in rats (a; Ipsilateral; b: Contralateral). Immunofluorescent staining Fig 3 Expression of GFAP in spinal cord dorsal horns during chronic transition of neuropathic pain after right tibial mSNI in rats (a; 7 d after mSNI; b; 14 d after mSNI). Immunofluorescent staining

Fig 1: A: Saphenous; B: Sural; a: Plantar test; b: Acetone test; c: Von Frey hairs test; d: Pinprick test; Fig 2, Fig 3: A: mSNI + BSA group; B: mSNI + LNFP III group; * * * $P < 0.001$, vs. 0 d in the same group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, vs. mSNI group

伏期明显缩短(热痛过敏)、丙酮测试中阈下冷刺激导致的缩爪时间的延长(冷痛异常)、von Frey 纤维实验中缩爪阈值的降低(机械性疼痛异常)和针刺实

验中阈上机械刺激导致的缩爪时间的延长(机械性疼痛过敏),说明成年大鼠 mSNI 后其手术侧出现迅速、明显和持续的病理性疼痛反应。

mSNI 手术+BSA 组动物,其手术侧(损伤同侧)后爪足底面隐神经和腓肠神经皮肤区域的疼痛反应的变化特征与单纯 mSNI 手术组动物对应皮肤区域疼痛反应的变化特征基本一致。然而,相对于 mSNI 手术+BSA 组而言,mSNI 手术+LNFPⅢ组动物的手术侧后爪足底面隐神经和腓肠神经皮肤区域的病理性疼痛反应得到了迅速、明显和持续的不完全缓解。

mSNI 手术+LNFPⅢ组大鼠手术后 7 d,其损伤同侧后爪足底面隐神经和腓肠神经皮肤区域的热痛过敏均出现大约 35% 的缓解;手术后 14 d 隐神经和腓肠神经皮肤区域的热痛过敏均出现进一步的缓解。mSNI 手术+LNFPⅢ组大鼠其损伤同侧后爪足底面隐神经和腓肠神经皮肤区域的冷痛异常手术后 5 d 即出现明显的缓解(隐神经区域约 30%;腓肠神经区域约 38%);冷痛异常的缓解在手术后 8 d 得到进一步强化(隐神经区域约 60%;腓肠神经区域约 45%),并持续至手术后 15 d。mSNI 手术+LNFPⅢ组大鼠,其损伤同侧后爪足底面隐神经皮肤区域的机械性疼痛异常手术后 8 d 才出现明显的缓解(约 30%),并持续至手术后 15 d;但手术侧腓肠神经皮肤区域的机械性疼痛异常在手术后 5 d 即出现明显的缓解(约 50%),并持续至手术后 15 d。值得注意的是,机械性疼痛异常的缓解随着时间的延长有所减弱。机械性疼痛过敏的明显缓解对于手术侧后爪足底面隐神经和腓肠神经皮肤区域而言均在手术后 5 d 即出现,并稳定地持续至手术后 15 d。

对所有组别大鼠的手术对侧后爪足底面隐神经和腓肠神经皮肤区域而言,手术或者药物处理后所有时间点的疼痛反应与对应的手术前疼痛反应没有明显的差别($P>0.05$)。由于大鼠后爪足底面隐神经和腓肠神经皮肤区域疼痛反应的基础值无明显差别,所以手术对侧后爪足底面仅给出腓肠神经皮肤区域的疼痛反应数据。

2.2 各组神经病理性疼痛急性诱发过程中小胶质细胞的活化

术后 7 d,相比于手术对侧脊髓灰质背角中极少的 CD11b 免疫荧光染色阳性信号而言,mSNI 手术+BSA 组大鼠的手术同侧脊髓灰质背角出现明显增强的 CD11b 免疫荧光染色阳性信号,出现小胶质细胞的大量活化(图 2A_a、2A_b)。相比于 mSNI 手术+BSA 组大鼠的手术同侧脊髓灰质背角,mSNI 手术+LNFPⅢ组大鼠的手术同侧脊髓灰质背角中 CD11b 免疫荧光染色阳性信号和活化的小胶质细

胞的数量明显降低(图 2B_a、2B_b)。

2.3 各组神经病理性疼痛慢性转化过程中星形胶质细胞的活化

相比于手术对侧脊髓灰质背角中极少的 GFAP 免疫荧光染色阳性信号(图片未给出)而言,mSNI 手术+BSA 组大鼠在手术后 7 d 和 14 d 时其手术同侧脊髓灰质背角出现明显增强的 GFAP 免疫荧光染色阳性信号,出现星形胶质细胞的大量活化(图 3A_a、3A_b)。相比于手术后 7 d 而言,mSNI 手术+BSA 组大鼠手术同侧脊髓灰质背角中 GFAP 免疫荧光染色阳性信号和活化的星形胶质细胞的数量在手术后 14 d 明显增多(图 3A_a、3A_b)。相比于 mSNI 手术+BSA 组大鼠手术同侧脊髓灰质背角,mSNI 手术+LNFPⅢ组大鼠在手术后 7 d 和 14 d 时其手术同侧脊髓灰质背角中 GFAP 免疫荧光染色阳性信号和活化的星形胶质细胞的数量明显降低(图 3B_a、3B_b)。相比于手术后 7 d 而言,mSNI 手术+LNFPⅢ组大鼠手术同侧脊髓灰质背角中 GFAP 免疫荧光染色阳性信号和活化的星形胶质细胞的数量在手术后 14 d 明显增多(图 3B_a、3B_b)。

3 讨论

本研究首次发现早期系统性给予 LNFPⅢ会强烈抑制成年大鼠 mSNI 后神经病理性疼痛的病理发生和相应时间窗口内胶质细胞的活化。由于所有组别的实验动物其手术对侧的疼痛反应在实验过程中没有发生明显的变化,因此我们观察到的各实验组动物手术侧疼痛反应的变化不可能是实验过程中动物自身某些改变引起的。另外,mSNI 手术组与假手术组大鼠手术同侧疼痛反应变化的明显差别以及 mSNI 手术+BSA 组大鼠手术同侧和对侧脊髓胶质细胞活化的强烈反差提示,mSNI 手术组大鼠手术同侧疼痛反应的病理性改变是神经损伤本身导致的特异性反应。再者,早期系统性给予 LNFPⅢ并不导致 mSNI 大鼠手术对侧疼痛反应基础值的变化。这些数据提示早期系统性给予 LNFPⅢ导致的动物手术侧病理性疼痛反应的缓解是一种特异性反应。虽然本研究没有分析 LNFPⅢ镇痛作用的剂量效应,但实验数据仍明确地说明早期系统性给予 LNFPⅢ会强烈抑制成年大鼠 mSNI 后神经病理性疼痛的病理发生。

周围性神经病理性疼痛的病理发生分为急性诱发期(术后 5 d 以内)和慢性转化期(术后 5~10 d)^[3-4,7-8]。本研究结果表明,早期系统性给予

LNFPⅢ能够明显缓解术后 4/5 d 以及 7/8 d 的手术侧后爪足底面隐神经和腓肠神经皮肤区域的不同刺激类型的病理性疼痛反应。最新研究表明,小胶质/巨噬细胞而非星形胶质细胞的活化直接参与病理性疼痛的急性诱发而非慢性转化^[3]。因此,我们在急性诱发期刚刚结束的术后 7 d 检测了早期系统性给予 LNFPⅢ对 mSNI 术后病理性疼痛急性诱发期小胶质/巨噬细胞活化的影响的时间终点累积效应。数据表明,早期系统性给予 LNFPⅢ能够明显抑制 mSNI 术后 7 d 手术侧脊髓灰质背角中小胶质细胞的活化。虽然目前我们缺乏急性诱发期内(术后 5 d 以内)更详细的行为学时间变化特征和脊髓灰质背角中小胶质细胞活化实时动态变化的数据,但是本研究的数据已能初步说明早期系统性给予 LNFPⅢ能够明显缓解 mSNI 术后病理性疼痛的急性诱发,同时明显抑制病理性疼痛急性诱发过程中小胶质细胞的活化。这可能是由于 LNFPⅢ能够直接刺激血源性单核细胞并使之进行 M2 样抗炎性分化^[13, 18]。而这些 M2 样抗炎性分化的单核细胞浸润相应的脊髓背角,可能抑制小胶质/巨噬细胞的增殖与活化,进而干扰病理性疼痛的急性诱发。

特别值得注意的是,本研究结果表明,早期系统性给予 LNFPⅢ能够明显缓解术后 14/15 d 的大鼠手术侧后爪足底面隐神经和腓肠神经皮肤区域的不同刺激类型的病理性疼痛反应。鉴于星形胶质细胞的活化直接参与病理性疼痛的慢性转化^[3],因此,我们在术后 7 d 和 14 d 检测了早期系统性给予 LNFPⅢ对 mSNI 术后病理性疼痛慢性转化期星形胶质细胞活化的影响的实时和累积效应。数据表明,早期系统性给予 LNFPⅢ能够明显抑制 mSNI 术后 7 d 和 14 d 的大鼠手术侧脊髓灰质背角中星形胶质细胞的活化。虽然我们没有早期系统性给予 LNFPⅢ对 mSNI 术后更长时间的病理性疼痛的影响的观察数据,但本研究结果仍确证了早期系统性给予 LNFPⅢ能够导致 mSNI 术后病理性疼痛的持续性明显缓解。有报道表明本研究所用 LNFPⅢ的剂量方案仅能够维持 1 周的有效药物浓度^[13]。因此,慢性维持期(术后 14/15 d)的动物体内虽然没有有效药物浓度的 LNFPⅢ,却仍然能够观察到早期系统性给予 LNFPⅢ对 mSNI 术后病理性疼痛的明显缓解。这提示本研究中早期系统性给予 LNFPⅢ明显阻碍 mSNI 术后病理性疼痛的慢性转化过程(术后 5~10 d)。急性诱发期脊髓背角小胶质细胞的活化和慢性转化期脊髓背角中 CD4⁺ T 细胞浸润脊髓背

角均参与脊髓背角星形胶质细胞的活化和病理性疼痛的慢性转化^[3]。本研究没有分析早期系统性给予 LNFPⅢ对 mSNI 状态下特异性的外周炎症和免疫反应的直接影响,因此我们目前尚无法推断早期系统性给予 LNFPⅢ抑制病理性疼痛的慢性转化的具体机制。

本研究采用成年大鼠 mSNI 制备周围性神经病理性疼痛动物模型,以研究 LNFPⅢ对这种疼痛的影响及其机制。这种模型是周围性神经病理性疼痛 SNI 模型的一种变体,具有手术简单、病理性疼痛反应强烈而持续以及疼痛行为容易测试等优点^[14-15]。本研究结果表明 mSNI 后手术对侧后爪足底面的疼痛反应与该动物的基础值没有明显差别,这说明 mSNI 不会导致镜像痛。有研究表明 mSNI 的大鼠中保留的正常隐神经起源于股神经。与坐骨神经不同,股神经中感觉成分的细胞胞体位于 L3 背根神经节^[16]。因此,这些保留的正常隐神经和横断的胫神经在外周神经和背根神经节层次基本没有信息交流,而保留的正常腓肠神经和横断的胫神经在背根神经节而非外周神经层次存在明显的信息交流。这种解剖学上的差异将会导致动物后爪足底面隐神经和腓肠神经皮肤区域的病理性疼痛在机制上具有潜在的差异。因此,本研究分别分析了 LNFPⅢ对 mSNI 术后后爪足底面隐神经和腓肠神经皮肤区域的病理性疼痛的影响。值得注意的是,早期系统性给予 LNFPⅢ对隐神经和腓肠神经皮肤区域的机械性疼痛异常的缓解作用可能存在差异,提示这两个区域的机械性疼痛异常的发生机制也可能存在差异。

综上所述,本研究首次确证了早期系统性给予 LNFPⅢ会强烈抑制周围性神经病理性疼痛的急性诱发和慢性转化,在机制上可能与抑制相应时间窗口内脊髓背角胶质细胞的活化有关。早期系统性给予 LNFPⅢ的镇痛效应的量效关系、药物作用的长时程动态特征、药效性质和具体的细胞分子机制需要进一步详尽的系统性分析。LNFPⅢ对慢性维持期周围神经病理性疼痛的潜在逆转作用亦需进行研究。本研究可望为周围性神经病理性疼痛治疗的药物研发提供全新的先导化合物和基于蠕虫感染与免疫的药物发现新模式。

参 考 文 献

- [1] TOTH C, LANDER J, WIEBE S. The prevalence and impact of chronic pain with neuropathic pain symptoms in the general population. *Pain Med*, 2009, 10(5): 918-929.

- [2] SCHOLZ J, WOOLF CJ. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci*, 2007, 10(11): 1361-1368.
- [3] GRACE PM, ROLAN PE, HUTCHINSON MR. Peripheral immune contributions to the maintenance of central glial activation underlying neuropathic pain. *Brain Behav Immun*, 2011, 25(7): 1322-1332.
- [4] ZHANG J, SHI XQ, ECHEVERRY S, *et al*. Expression of CCR2 in both resident and bone marrow-derived microglia plays a critical role in neuropathic pain. *J Neurosci*, 2007, 27(45): 12396-12406.
- [5] JI RR, SUTER MR. p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain. *Mol Pain*, 2007(3): 33.
- [6] AUSTIN PJ, MOALEM-TAYLOR G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. *J Neuroimmunol*, 2010, 229(1/2): 26-50.
- [7] ZHANG X, WU Z, HAYASHI Y, *et al*. Peripheral role of cathepsin S in Th1 cell-dependent transition of nerve injury-induced acute pain to a chronic pain state. *J Neurosci*, 2014, 34(8): 3013-3022.
- [8] CAO L, PALMER CD, MALON JT, *et al*. Critical role of microglial CD40 in the maintenance of mechanical hypersensitivity in a murine model of neuropathic pain. *Eur J Immunol*, 2009, 39(12): 3562-3569.
- [9] GAO YJ, JI RR. Targeting astrocyte signaling for chronic pain. *Neurotherapeutics*, 2010, 7(4): 482-493.
- [10] WAMMES LJ, MPAIRWE H, ELLIOTT AM, *et al*. Helminth therapy or elimination: epidemiological, immunological, and clinical considerations. *Lancet Infect Dis*, 2014, 14(11): 1150-1162.
- [11] HARNETT W, HARNETT MM. Helminth-derived immunomodulators: can understanding the worm produce the pill? *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(4): 278-284.
- [12] LUNDY SK, LUKACS NW. Chronic schistosome infection leads to modulation of granuloma formation and systemic immune suppression. *Front Immunol*, 2013(4): 39 [2013-02-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3576626/>. doi:10.3389/fimmu.2013.00039.
- [13] BHARGAVA P, LI C, STANYA KJ, *et al*. Immunomodulatory glycan LNFPⅢ alleviates hepatosteatosis and insulin resistance through direct and indirect control of metabolic pathways. *Nat Med*, 2012, 18(11): 1665-1672.
- [14] LEE BH, WON R, BAIK EJ, *et al*. An animal model of neuropathic pain employing injury to the sciatic nerve branches. *Neuroreport*, 2000, 11(4): 657-661.
- [15] HOFMANN HA, DE VRY J, SIEGLING A, *et al*. Pharmacological sensitivity and gene expression analysis of the tibial nerve injury model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*, 2003, 470(1/2): 17-25.
- [16] COBIANCHI S, DE CRUZ J, NAVARRO X. Assessment of sensory thresholds and nociceptive fiber growth after sciatic nerve injury reveals the differential contribution of collateral reinnervation and nerve regeneration to neuropathic pain. *Exp Neurol*, 2014 (255): 1-11 [2014-02-16]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014488614000533>. doi:10.1016/j.expneurol.2014.02.008.
- [17] REN HY, DING YQ, XIAO X, *et al*. Behavioral characterization of neuropathic pain on the glabrous skin areas reinnervated solely by axotomy-regenerative axons after adult rat sciatic nerve crush. *Neuroreport*, 2016, 27(6): 404-414.
- [18] ATOCHINA O, HARN D. LNFP Ⅲ /LeX-stimulated macrophages activate natural killer cells via CD40-CD40L interaction. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2005, 12(9): 1041-1049.

(2016-05-03 收稿, 2016-06-17 修回)

编辑 余琳