

炎性痛敏触发术后持久伤害性敏化模型的建立

李坤河 李毅 牛丽君 杨广 赵晴 文志双 张劲军 安珂

【摘要】 目的 通过建立改良外周炎性痛敏触发切口痛后持久伤害性敏化的动物模型,动态观察术前痛敏对切口痛后持久伤害性敏化大鼠疼痛行为学及脊髓水平蛋白激酶 M ζ (PKM ζ) 的表达变化。**方法** 雄性SD大鼠28只,随机分为非触发组和触发组,各14只。非触发组大鼠脚底注射0.9%氯化钠溶液5 μ l,触发组大鼠脚底注射1%角叉菜胶5 μ l。两组分别于实验前、炎性痛敏后1~6 d以及切口痛后1~10 d观察大鼠对机械和伤害性热刺激的疼痛行为学变化;分别于切口痛前及后1、3、10 d观察脊髓PKM ζ 的表达。**结果** 实验前所有大鼠机械刺激缩爪阈值(MWT)和热刺激缩足反射潜伏期值(TWL)差异无统计学意义。触发组大鼠在注射1%角叉菜胶5 μ l后出现了短暂的痛阈降低,并于3 d后恢复到基础值;两组大鼠切口痛后均出现活动频繁、跛行、舔咬手术切口等异常行为,与术前比较,两组大鼠的MWT、TWL均明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。但在切口术后5 d,非触发组大鼠的MWT、TWL逐渐升高,于术后10 d恢复至术前水平,而触发组大鼠MWT、TWL在各时间点均低于非触发组,差异有统计学意义($P<0.05$),并且这种差异一直持续到观察结束。与非触发组及术前相比,触发组大鼠脊髓背角PKM ζ 含量迅速升高($P<0.05$),并一直维持较高水平至观察结束。非触发组大鼠脊髓背角中PKM ζ 含量与术前比较差异无统计学意义。术前大鼠脊髓背角中PKM ζ 免疫阳性细胞均有少量表达,主要分布于脊髓背角浅层。与非触发组及术前相比,术后10 d触发组大鼠脊髓背角浅层PKM ζ 的免疫阳性细胞数明显增加($P<0.05$),非触发组脊髓背角浅层PKM ζ 的免疫阳性细胞数虽有所增加,但数量明显低于触发组($P<0.05$)。**结论** 术前外周炎性痛敏可以触发切口痛后大鼠持久伤害性的敏化状态;脊髓背角PKM ζ 特异性抑制剂ZIP可以抑制这一敏化状态,这一作用与其特异性抑制脊髓水平PKM ζ 的表达有关。

【关键词】 蛋白激酶类;脊髓;模型;动物;持久伤害性敏化

Establishment of postoperative sustained injury sensitization model of inflammatory pain-sensitivity

Li Kunhe, Li Yi, Niu Lijun, Yang Guang, Zhao Qing, Wen Zhishuang, Zhang Jinjun, An Ke. Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

Corresponding author: An Ke, Email: anke2002wh@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of spinal PKM ζ on the maintenance of persistent nociceptive sensitization after plantar incision following peripheral inflammation in rats, adapting a modified hyperalgesia priming model that produces a state of sensitization closely resembling clinical situations with increased risk of development of persistent postoperative pain. **Methods** Twenty-eight healthy adult male Sprague-Dawley rats weighing 220–250 gram were randomly divided into two groups ($n=14$): NS+Surgery group which was induced by intraplantar injection of carrageenan (1%, 5 μ l), and Car.+Surgery group with NS (0.9%NaCl, 5 μ l) into one hindpaw in rats. Changes of pain behavior were assessed by withdrawal threshold to von Frey filament stimulation intensity, response latency of the hindpaw to radiant the thermal and a cumulative pain scores 1–6 d before incision as well as 1–10 d after incision. The expression of PKM ζ was measured in the spinal cord by Western blotting and immunohistochemical analysis at 1, 3, 10

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0793.2018.01.003

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81171468);教育部高等学校博士学科点专项科研金项目(200805581112);广东省科技计划项目(2012B031800105)

作者单位:510080 广州,中山大学附属第一医院麻醉科

通信作者:安珂, Email: anke2002wh@126.com

d after incision. **Results** There were no significant differences in the value of MWT and TWL before treatment and surgery. Compared with NS+ Surgery group, the MWT and TWL of Car.+Surgery group decreased significantly ($P<0.05$), which lasted about 3 d and returned to normal. All rats showed allodynia in response to innocuous mechanical stimulation. Compared with pre-incision, the MWT and TWL of two groups decreased significantly ($P<0.05$). While the MWT and TWL of NS+Surgery group increased thereafter and returned to normal by 6 d. Compared with pre-incision and NS+Surgery group, the MWT and TWL of Car.+Surgery group decreased significantly, lasting for 10 d ($P<0.05$). Compared with NS+Surgery group, the number of positive cells and the expression of spinal PKM ζ after incision remarkably increased in Car.+Surgery group ($P<0.05$). **Conclusion** Spinal PKM ζ involves in the development and maintenance of persistent nociceptive sensitization after plantar incision following peripheral inflammation pain in rats.

【Key words】 Protein kinases; Spinal cord; Models, animal; Persistent nociceptive sensitization

慢性术后疼痛(persistent postsurgical pain, PPP)也称为慢性手术后疼痛综合征^[1],即术后伤口愈合后出现痛觉异常症状持续2个月以上、且其他原因无法解释的慢性手术后疼痛综合征,是一种常见的临床症状,其发生率为10%~50%,如截肢术及冠脉搭桥术后慢性疼痛的发生率高达30%~50%,其中重度疼痛的发生率为5%~10%^[2]。由于缺乏有效的治疗方法,PPP严重影响患者的术后生活质量,其发生机制和治疗策略逐渐成为国内外学者关注的重点。研究发现,PPP与术后持续性伤害性敏化有关^[3],持续的伤害性感受器兴奋而引发的中枢敏化是主要原因之一,并且术前疼痛状态是术后是否发生慢性疼痛的重要因素^[4]。许多研究提示,中枢神经系统的神经可塑性变化在疼痛的发生和发展中起着重要作用^[5-8],脊髓水平伤害性神经元突触的长时程增强效应(long-term potentiation, LTP)似于大脑LTP的形成,这些成为慢性疼痛发生发展的基础。本研究采用外周炎性痛敏触发切口痛后持久伤害敏化动物模型,通过行为学、免疫组织化学和蛋白质印迹方法观察术后大鼠疼痛行为学及脊髓水平蛋白激酶M ζ (protein kinase M ζ , PKM ζ)的表达变化。

材料与方法

一、实验动物

采用成年SPF级雄性SD大鼠28只,体质量220~250 g,中山大学实验动物中心提供。动物分笼饲养,自由获取食物和水,动物在适应环境1周后在日间安静环境中进行实验,室温24~25℃,光照每日8:00~20:00。本实验严格遵守中山大学动物保护和规定。

二、大鼠外周炎性痛敏后术后持续性疼痛模型的建立

参照Aley等^[9]采用的方法建立改良hyperalgesic priming痛觉敏化触发模型。固定大鼠,在左脚掌掌

心注入1%角叉菜胶(购自Sigma公司)5 μ l。将注入角叉菜胶后的1~6 d作为炎症痛观察时间。

在大鼠炎性疼痛后第7天按Brennan法^[10]建立大鼠术后疼痛模型。

三、动物分组及给药

28只大鼠随机分为非触发组[0.9%氯化钠溶液(normal saline, NS)+Surgery组]及触发组[λ -卡拉胶(λ -Carrageenan, Car)+Surgery组],各14只,采用Aley等的方法建立角叉菜胶诱导外周炎性痛敏后切口痛大鼠持久伤害性敏化模型。非触发组大鼠脚底注射5 μ l 0.9%氯化钠溶液,6 d后吸入1.4%异氟醚5 min,按Brennan法建立大鼠术后疼痛模型。触发组脚底注射5 μ l 1%角叉菜胶,6 d后吸入1.4%异氟醚5 min,按Brennan法建立大鼠术后疼痛模型。

四、统计学处理

采用SPSS 13.0软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内比较采用 t 检验,组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

所有动物在切口痛模型术后恢复良好,后足切口部位未见明显的感染迹象。饮水、进食均正常,体质量无明显变化。

一、大鼠术前及术后机械刺激缩爪阈值(mechanical withdrawal threshold, MWT)的变化

术前所有大鼠后足MWT的基础值差异无统计学意义(表1)。触发组大鼠在注射1%角叉菜胶后出现了短暂的痛阈降低,并于3 d后恢复到基础值;两组大鼠切口痛后均出现活动频繁、跛行、舔咬手术切口等异常行为。与术前比较,两组大鼠的MWT均明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。但在切口术后3 d,非触发组大鼠的MWT逐渐升高,于术后10 d恢复至术前水平,而触发组大鼠MWT在各时间点均低于非触发组,差异有统计学意义($P<0.05$),并且这种差异一直持续到观察至

16 d (表 1、图 1)。

表 1 术后持续性疼痛大鼠术前及术后 MWT 的变化

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

时间点 (d)	非触发组	触发组	t 值	P 值
1	14.4±2.2	14.4±3.4	0.000	1.000
2	14.1±4.1	7.3±4.5	4.179	0.000
3	14.9±3.7	9.8±3.4	3.798	0.001
4	14.3±6.4	13.9±4.9	0.186	0.854
5	14.5±7.1	14.5±5.6	0.000	1.000
6	14.7±1.1	14.4±4.5	0.242	0.810
7	4.4±4.1	4.3±4.5	0.062	0.951
8	6.9±4.9	3.8±3.4	1.945	0.063
9	12.8±6.4	3.7±4.9	4.224	0.000
11	13.8±7.1	3.8±5.2	4.252	0.000
13	14.0±4.9	4.1±4.9	5.345	0.000
16	14.5±4.5	4.8±5.6	5.052	0.000

注:时间点 1~5 为术前,6~10 为术后

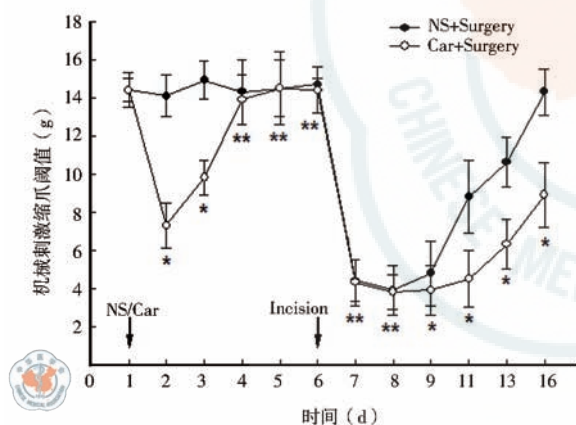


图 1 术后持续性疼痛大鼠术前及术后 MWT 的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=14$) 与 NS+Surgery 非触发组比较, * $P<0.05$, ** $P>0.05$

二、大鼠术前及术后热刺激缩足反射潜伏期 (thermal withdrawal latency, TWL) 的变化

所有大鼠后足术前 TWL 的基础值差异无统计学意义。与术前比较,触发组与非触发组大鼠的 TWL 均明显降低,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。但在切口术后 3 d,非触发组大鼠的 TWL 逐渐升高,于术后 10 d 恢复至术前水平,而触发组大鼠 TWL 在各时间点均低于非触发组,差异有统计学意义 ($P<0.05$),并且这种差异一直持续到观察至 16 d (表 2、图 2)。

三、外周炎性痛敏触发切口痛后持续伤害性敏化模型脊髓 PKM ζ 含量的变化

与非触发组及术前相比,触发组大鼠脊髓背角 PKM ζ 含量迅速升高 ($P<0.05$),并一直维持

表 2 术后持续性疼痛大鼠术前及术后 TWL 的变化

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

时间点 (d)	非触发组	触发组	t 值	P 值
1	15.5±4.5	15.5±1.9	0.000	1.000
2	15.5±4.5	8.8±3.7	4.303	0.000
3	14.8±3.7	10.9±3.4	2.904	0.007
4	15.1±5.2	15.0±6.0	0.047	0.963
5	14.8±4.9	15.1±5.6	-0.151	0.881
6	15.4±4.9	15.5±3.4	-0.063	0.950
7	8.2±6.4	7.8±5.6	0.176	0.862
8	12.6±5.2	5.5±6.4	3.222	0.003
9	14.2±5.6	6.1±7.1	3.352	0.002
11	14.9±3.7	6.2±6.4	4.403	0.000
13	14.6±6.7	6.9±6.0	3.203	0.004
16	14.8±6.4	7.2±6.0	3.241	0.003

注:时间点 1~5 为术前,6~10 为术后

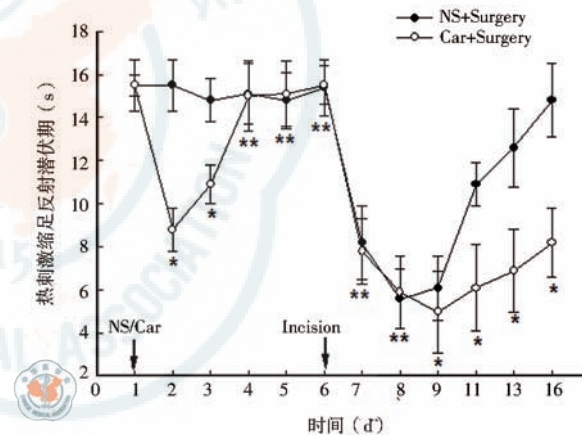


图 2 术后持续性疼痛大鼠术前及术后 TWL 的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=14$) 与 NS+Surgery 组比较, * $P<0.05$, ** $P>0.05$

较高水平至观察结束。非触发组大鼠脊髓背角中 PKM ζ 含量与术前比较差异无统计学意义 (表 3、图 3~4)。

四、外周炎性痛敏触发切口痛后持续伤害性敏化模型脊髓 PKM ζ 免疫阳性细胞的变化

术前大鼠脊髓背角中 PKM ζ 免疫阳性细胞均有少量表达,主要分布于脊髓背角浅层。与非触发组及术前相比,术后 10 d 触发组大鼠脊髓背角浅层 PKM ζ 的免疫阳性细胞数明显增加 ($P<0.05$),非触发组脊髓背角浅层 PKM ζ 的免疫阳性细胞数虽有所增加,但数量明显低于触发组阳性细胞数 ($P<0.05$) (表 4、图 5~6)。

讨 论

目前认为 PPP 的形成不仅与外周敏化有关,中

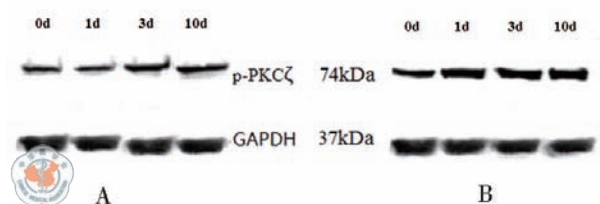


图3 Western blotting 显示各组脊髓 PKM ζ 蛋白质的表达 A 为 NS+ Surgery 非触发组; B 为 Car+Surgery 触发组

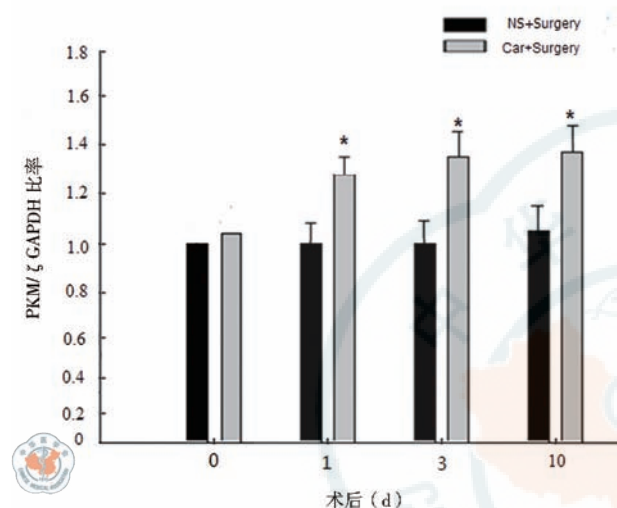


图4 外周炎性痛敏触发切口痛后持续伤害性敏化大鼠脊髓中 PKM ζ 表达的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=14$, 与 NS+ Surgery 非触发组比较, $*P<0.05$)

表3 外周炎性痛敏触发切口痛后持续伤害性敏化模型脊髓 PKM ζ 含量的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=14$)

组别	0 d	1 d	3 d	10 d
非触发组	0.92 \pm 0.24	0.80 \pm 0.25	0.91 \pm 0.23	0.92 \pm 0.34
触发组	0.93 \pm 0.12	1.24 \pm 0.11	1.32 \pm 0.32	1.38 \pm 0.34
t 值	-0.139	-6.236	-3.893	-3.579
P 值	0.890	0.000	0.001	0.001

表4 外周炎性痛敏触发切口痛后持续伤害性敏化模型脊髓 PKM ζ 免疫阳性细胞的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=14$)

组别	0 d	1 d
非触发组	50.4 \pm 8.8	48.3 \pm 9.4
触发组	49.8 \pm 9.9	105.6 \pm 9.0
t 值	0.170	-16.440
P 值	0.866	0.000

枢敏化也是疼痛形成的重要机制。外周和中枢敏化过程被认为在疼痛的发展和维持过程中起关键作用,由持续的伤害性感受器兴奋而引发的中枢敏化是 PPP 主要原因之一,并且术前疼痛状态是术后是否发生慢性疼痛的重要因素。痛觉传递系统包括外周感觉神经、脊髓到脑干和丘脑的神经网络以及丘脑和大脑皮层的相互联系。脊髓是痛

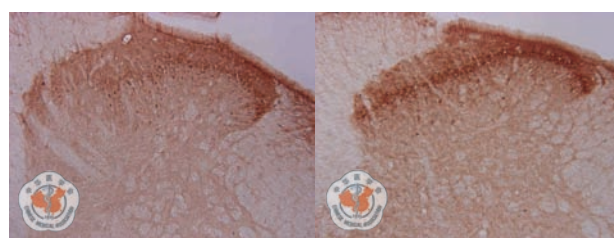


图5 非触发组术前及术后 10 d 大鼠脊髓背角 PKM ζ 免疫阳性细胞 (光学显微镜 $\times 200$)

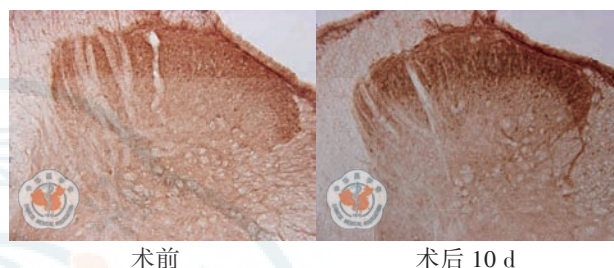


图6 触发组术前及术后 10 d 大鼠脊髓背角 PKM ζ 免疫阳性细胞 (光学显微镜 $\times 200$)

觉整合的重要中枢,脊髓背角通过中间神经元对伤害性信息进行节段性调节^[11]。所以我们在脊髓水平研究疼痛和药物作用机制。

中枢可塑性一直被认为是与诸如学习记忆有关的机制,比如成瘾性和慢性疼痛。Sandkuhler 发现, L5/L6 脊神经紧结扎的大鼠在高频、低强度的电刺激作用于坐骨神经即可诱导脊髓背角 C- 纤维诱发电位产生 LTP,而在正常大鼠,只有高频、高强度的电刺激才可诱导脊髓背角 C- 纤维诱发电位 LTP,表明脊神经结扎大鼠的脊髓背角 C- 纤维诱发电位 LTP 诱导阈值降低^[12]。这提示初级传入 C- 纤维与脊髓背角投射神经元间突触传递效能 LTP 很可能是中枢敏化及神经性痛的基础^[13]。周围神经损伤可以引发大脑皮层前扣带回 2/3 层神经元的兴奋性突触传递的 LTP,增强了突触前和突触后电流,这一过程涉及 AMPA 受体、ERK 及钙依赖腺苷酸环化酶 1 的活化。

LTP 这一生理模型被广泛用于对学习及记忆分子细胞机制的研究中。对与疼痛相关的突触 LTP 的研究进展得非常缓慢,由于复杂的神经组成,刺激脊髓后角的传入纤维经常得不到关于 LTP 的准确记录。后来膜片钳技术的使用大大加快了对脊髓 LTP 的认识^[14-15]。

PKC 是一类可使底物蛋白内丝氨酸 / 苏氨酸残基磷酸化的蛋白激酶超家族^[16]。目前认为 PKC 在各信使系统相互作用的过程中居中心地位,

PKM ζ 只是 PKC ζ 裂解的一部分。研究发现,在哺乳动物的大脑中,PKM ζ 并不是 PKC ζ 裂解得到的片断,而是经大脑中的 PKC ζ 基因转录生成特定的 mNR1 翻译而成的蛋白激酶。PKM ζ 是蛋白激酶 C ζ 独立催化结构域,因为缺乏蛋白激酶 C ζ 的自主调节域,所以具有自主活性。PKM ζ mRNA 被运送到神经元的树突处^[17],在 LTP 电位的诱导期,突触后密集区的 NMDA 受体的活化,一系列的信号蛋白,如 CaMK II、PI3K、MAPK、PKA 和 mTOR 等被激活,从而解除对 PKM ζ 合成的抑制^[18-19]。因此,PKM ζ 是在 LTP 形成的维持阶段唯一高表达的蛋白激酶,而近期研究提出 PKM ζ 也参与了脊髓中持续性伤害敏化的形成。

本实验通过建立外周炎性痛敏触发切口痛后持续伤害性敏化模型,同时连续观察动物的行为学变化,运用免疫组织化学法和 Western blotting 方法观察术后疼痛过程中大鼠脊髓中 PKM ζ 的含量变化,结果表明,术前大鼠脊髓中仅仅只有少量 PKM ζ ,术后脊髓中 PKM ζ 的含量急剧升高至 3 d 达峰值,此后仍维持在较高水平,与术前比较有统计学差异,结合行为学观察,与对照组比较,模型组术后所有大鼠手术侧后足均出现了痛觉超敏(MWT<4 g),并且一直持续至术后 7 d ($P<0.05$),这种变化趋势和脊髓中的 PKM ζ 含量变化相一致,充分表明脊髓中产生的 PKM ζ 参与术后持续伤害性敏化过程,特别是参与其形成和维持阶段。

参 考 文 献

- [1] Kehlet H, Jensen TS, Woolf CJ. Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention[J]. *Lancet*, 2006, 367(9522): 1618–1625.
- [2] Niraj G, Rowbotham DJ. Persistent postsurgical pain: where are we now?[J]. *Br J Anaesth*, 2011, 107(1): 25–29.
- [3] Johansen A, Romundstad L, Nielsen CS, et al. Persistent postsurgical pain in a general population: prevalence and predictors in the Tromsø study[J]. *Pain*, 2012, 153(7): 1390–1396.
- [4] Aasvang EK, Gmaehle E, Hansen JB, et al. Predictive risk factors for persistent postherniotomy pain[J]. *Anesthesiology*, 2010, 112(4): 957–969.
- [5] Hamalainen MM, Gebhart GF, Brennan TJ. Acute effect of an incision on mechanosensitive afferents in the plantar rat hindpaw[J]. *J Neurophysiol*, 2002, 87(2): 712–720.
- [6] Pogatzki EM, Gebhart GF, Brennan TJ. Characterization of Adelta- and C-fibers innervating the plantar rat hindpaw one day after an incision[J]. *J Neurophysiol*, 2002, 87(2): 721–731.
- [7] Vandermeulen EP, Brennan TJ. Alterations in ascending dorsal horn neurons by a surgical incision in the rat foot[J]. *Anesthesiology*, 2000, 93(5): 1294–1302, 6A.
- [8] Melosh HJ, Schneider NM, Zahnle KJ, et al. Ignition of global wildfires at the Cretaceous/Tertiary boundary[J]. *Nature*, 1990, 343(6255): 251–254.
- [9] Aley KO, Messing RO, Mochly-Rosen D, et al. Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the epsilon isozyme of protein kinase C[J]. *J Neurosci*, 2000, 20(12): 4680–4685.
- [10] Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain[J]. *Pain*, 1996, 64(3): 493–501.
- [11] Ling DS, Benardo LS, Sacktor TC. Protein kinase Mzeta enhances excitatory synaptic transmission by increasing the number of active postsynaptic AMPA receptors[J]. *Hippocampus*, 2006, 16(5): 443–452.
- [12] Asiedu MN, Tillu DV, Melemedjian OK, et al. Spinal protein kinase M ζ underlies the maintenance mechanism of persistent nociceptive sensitization[J]. *J Neurosci*, 2011, 31(18): 6646–6653.
- [13] 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.
- [14] Perkins FM, Kehlet H. Chronic pain as an outcome of surgery. A review of predictive factors[J]. *Anesthesiology*, 2000, 93(4): 1123–1133.
- [15] Stamford JA. Descending control of pain[J]. *Br J Anaesth*, 1995, 75(2): 217–227.
- [16] Kuner R. Central mechanisms of pathological pain[J]. *Nat Med*, 2010, 16(11): 1258–1266.
- [17] Sandkuhler J, Liu X. Induction of long-term potentiation at spinal synapses by noxious stimulation or nerve injury[J]. *Eur J Neurosci*, 1998, 10(7): 2476–2480.
- [18] Ikeda H, Stark J, Fischer H, et al. Synaptic amplifier of inflammatory pain in the spinal dorsal horn[J]. *Science*, 2006, 312(5780): 1659–1662.
- [19] Ikeda H, Heinke B, Ruscheweyh R, et al. Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neurons that mediate hyperalgesia[J]. *Science*, 2003, 299(5610): 1237–1240.

(收稿日期:2017-07-24)

(本文编辑:丁文珠)

李坤河,李毅,牛丽君,等.炎性痛敏触发术后持久伤害性敏化模型的建立[J/CD].中华普通外科学文献(电子版),2018,12(1):9–13.