

## 抗神经生长因子抗体对大鼠慢性坐骨神经压迫损伤模型的脊髓胶质细胞激活的抑制作用

李 棋, 麻伟青, 王慧明, 董发团, 杨云丽, 李文锋  
(成都军区昆明总医院麻醉科, 云南 昆明 650032)

**[摘要]** **目的** 研究抗神经生长因子抗体 (anti-NGF) 蛛网膜下腔应用对大鼠坐骨神经病理性疼痛模型痛阈的影响, 并观察其对该模型星形胶质细胞激活的影响. **方法** 手术制作大鼠慢性坐骨神经压迫损伤 (chronic constriction injury, CCI) 模型. 实验大鼠采用随机数字表法分为 4 组: CCI+anti-NGF 组 (n=8): 手术后第 7 天开始每天单次腹腔注射 anti-NGF (10 mg/kg)、CCI 模型 + 生理盐水组 (n=8): 手术后第 7 天开始每天单次腹腔注射生理盐水、假手术给 anti-NGF 组 (n=8) 和假手术盐水组 (n=8). 各组均在术后隔天测定大鼠痛行为学观察术后 15 d 内大鼠机械和热痛阈的变化. 各组在手术后 15 d, 使用 4% 多聚甲醛灌注后, 进行免疫组化染色, 观察大鼠脊髓 L<sub>4-5</sub> 节段星形胶质细胞标记物 GFAP 表达情况. **结果** 手术盐水对照组的机械和热痛阈在 3 d 后出现明显下降, 在术后第 7 天达到高峰期. 术后第 7 天单次给予 anti-NGF 能短时间内拮抗 CCI 大鼠的机械和热痛阈下降, 连续给予 anti-NGF 7 d 后可以使大鼠的机械和热痛阈持续显著高于 CCI+ 盐水组. 15 d 时 CCI+anti-NGF 组大鼠脊髓 L<sub>4-5</sub> 节段的 GFAP 表达显著低于 CCI+ 生理盐水组. **结论** 腹腔注射 anti-NGF 能有效拮抗 CCI 大鼠模型机械和热痛阈的下降. 连续注射 anti-NGF 可以显著的持续改善 CCI 大鼠模型的机械和热痛阈的下降. CCI+anti-NGF 组脊髓 GFAP 表达显著低于 CCI+ 生理盐水组, 这可能与 anti-NGF 持续改善大鼠的痛行为有关.

**[关键词]** 神经病理性疼痛; 神经生长因子; 慢性坐骨神经压迫损伤模型; 星形胶质细胞  
**[中图分类号]** R392.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2012) 05-0018-05

## Anti-nerve Growth Factor Antibody Inhibits the Spinal Cord Glial Cell Activation in Rats Model of Chronic Constriction Injury

LI Qi, MA Wei-qing, WANG Hui-ming, DONG Fa-tuan, YANG Yun-li, LI Wen-feng  
(Dept. of Anesthesiology, Kunming General Hospital of Chengdu Military Region,  
Kunming Yunnan 650032, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of anti-nerve growth factor antibody (anti-NGF) on the pain behavior and the spinal astrocyte activation in rats model of chronic constriction sciatic nerve injury (CCI). **Methods** Chronic sciatic nerve compression injury (chronic constriction injury, CCI) model was prepared by surgery in rats. The experimental rats were randomly divided into four groups: the CCI + anti-NGF group (n=8). rats were given daily single intraperitoneal injection of anti-NGF (10 mg/kg) at 7th day after surgery; the CCI model + saline group (n=8): rats were given daily single intraperitoneal injection of saline at 7th day after surgery; sham operation anti-NGF group (n=8) and sham operation saline group (n=8). Mechanical and thermal pain behavior were observed in every another day after surgery within 15 days. 15 days after surgery, rats in each group was perfused by 4% paraformaldehyde, the expression of astrocyte cell marker GFAP in rats' L<sub>4-5</sub>-segment spinal cord was observed by immunohistochemical staining. **Results** Within 3 days after surgery, the CCI model + saline group's mechanical and thermal pain threshold decreased significantly and reached its peak after 7 days. At 7th day

**[基金项目]** 云南省应用基础研究计划项目 (2011FZ319)

**[作者简介]** 李棋 (1964~), 男, 云南玉溪市人, 医学学士, 副主任医师, 主要从事临床麻醉和临床科研工作.

after surgery, a single dose of anti-NGF antibody intraperitoneal injection shortly alleviated the mechanical and thermal pain threshold decrease in CCI rats, continuously injection of anti-NGF 7 days significantly improved the mechanical and thermal pain threshold of CCI rats, which was higher than rats in CCI + saline group. The spinal GFAP expression in CCI + anti-NGF group was significantly lower than the CCI + saline group at 15th day after surgery. **Conclusions** Intraperitoneal injection of anti-NGF antibody can effectively reverse the pain behavior of the CCI rat model. Continuous injection of anti-NGF can significantly improve the pain behavior in the CCI rat models. In the spinal cord of rats in CCI + anti-NGF group, GFAP expression is significantly lower than that of CCI + saline group, this may be related to continuous injection of anti-NGF.

[**Key words**] Neuropathic pain; Nerve growth factor; Chronic constriction injury model, Astrocytes

1991年 Garrison 等进行了脊髓胶质细胞激活与疼痛相关的最初报道。他们在坐骨神经慢性压迫模型 (chronic constriction injury, CCI) 大鼠上观察到损伤侧脊髓灰质 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 的免疫组化染色较对侧显著增强, 且增加的幅度与痛觉过敏的程度呈正相关, 这表明星形胶质细胞在脊髓的激活可能与神经病理性疼痛密切相关<sup>[1]</sup>。中枢神经系统内的胶质细胞活化后作为神经免疫细胞后, 可以合成和释放多种炎性细胞因子产生致痛作用, 其释放的细胞因子主要包括白细胞介素、TNF- $\alpha$ 、神经生长因子等<sup>[2-3]</sup>。神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 是对神经元的存活、生长发育、分化、再生和功能维持起调控作用的分子, 属神经营养因子家族, 其广泛分布于神经系统中。而且许多研究表明 NGF 参与疼痛的产生与调节。NGF 通过高亲和力受体 trkA 及低亲和力受体 p75 发挥生物学效应<sup>[4-5]</sup>。有报道表明外源性给予 NGF 可以导致大鼠持续的痛觉过敏, 这种作用可被抗 NGF 血清所阻断。NGF 促进致痛物质的表达而产生神经痛并且在损伤后改变神经元的可塑性 (包括出芽和再生)<sup>[6]</sup>。有实验表明 CCI 模型的脊髓星形胶质细胞活化而受损神经周围以及神经干和 DRG 中的大小神经元中 NGF 的表达长时间增加<sup>[7]</sup>, 针对这两种变化之间是否有直接的联系, 本实验希望通过给予 anti-NGF 后观察对 CCI 模型的疼痛行为改变和对星形胶质细胞的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

动物: 成年雌性 SD 大鼠 150 ~ 180 g, 由昆明医科大学动物中心提供, 所有动物都依照 NIH 的实验动物指南饲养。饲养环境为 12 h 昼夜周期, 环境温度 (24  $\pm$  0.5)  $^{\circ}\text{C}$ , 保证水和食物的充足, 实验开始前进行环境适应训练, 以排除应激干扰。按国际实验动物使用准则处理。

### 1.2 实验试剂

Anti-NGF: 单克隆抗 NGF-2.5S 抗体 (美国 SIGMA), 小鼠抗 GFAP 抗体 (美国 SIGMA), 生物素化的 2 抗 (美国 Vector), 抗生物素蛋白和辣根过氧化物酶复合体 ABC Kit (美国 Vector), 其余所用试剂均为分析纯试剂。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 疼痛模型的制备** CCI 模型的建立参照 Scholz 等<sup>[8]</sup>的方法。大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛 400 mg/kg 后, 手术暴露右侧坐骨神经, 在该神经主干部位, 用 4.0 铬制羊肠线松结扎 4 道, 每根羊肠线间隔 1 ~ 2 mm, 逐层缝合肌肉及皮肤, 术后给予青霉素 10 万 U, 将大鼠置于安静、温暖、避强光环境喂养。假手术组仅切开暴露坐骨神经, 余同手术组。

**1.3.2 动物分组及方法** 实验大鼠采用随机数字表法分为 4 组; CCI+anti-NGF 组 (n = 8): CCI 手术后第 7 天开始每天单次腹腔注射抗神经生长因子抗体 (10 mg/kg)、CCI 模型 + 生理盐水组 (n = 8): CCI 手术后第 7 天开始每天单次腹腔注射生理盐水、假手术 + anti-NGF 组 (n = 8) 和假手术 + 生理盐水组 (n = 8)。

**1.3.3 机械痛阈的测定** 以 von Frey 细丝法 (机械性痛觉过敏) 测定机械缩足反射阈值 (paw withdrawal threshold, PWT) 的变化。选用 von Frey filaments (North Coast Medical 公司, 美国); 测试前 10 min 将大鼠放在底面为铁丝网板, 4 周为 20 cm  $\times$  20 cm 的透明有机玻璃盒内, 顶端敞开, 待大鼠适应安静后, 使用 von Frey 纤毛刺激足底中外侧, 即坐骨神经分支和隐神经支配区, 以纤毛稍稍弯曲作为完全受力的标准。按照递增的顺序依次施加 von Frey 纤毛 (1, 1.4, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 26 g), 每次刺激持续 2 s, 间隔 15 s, 连续 5 次。若 3 次不抬腿, 换用更高克数的纤毛; 如 5 次中有 3 次抬腿, 则返回下一克数的纤毛, 直到每 5 次测试中有 3 次抬腿。能够引起 3/5 次抬腿的最低 von Frey 纤毛的

克数被定义为 PWT 值。

**1.3.4 热痛阈的测定** 以热伤害性刺激诱发的大鼠缩腿回避反射潜伏期作为热痛阈标准 (paw withdraw latency, PWL)。选用 RTY21 热辐射测痛仪 (第四军医大学), 测试前 10 min 将 CCI 模型大鼠安放在 20 cm × 20 cm 的透明有机玻璃盒内, 检测盒的底面为 2 mm 厚的普通玻璃板, 待大鼠适应安静后, 将热痛反应测定仪的辐射灯头以一定距离从玻璃板底面垂直对准大鼠一侧后肢跖部, 先以弱光对光斑位置进行仔细校正, 使其位于后肢足跖部中后 1/3 处, 再用强光照射, 记录大鼠双侧抬腿的 PWL。正常侧的 PWL 通过调节刺激强度通常控制在 12 ~ 16 s。当 PWL 超过 20 s 时, 仪器自动切断电源, 以免烫伤大鼠的皮肤, 测试 3 次 PWL 值, 每次间隔 15 min, 取其平均值为 PWL 值。本实验中, 行为学测试 (包括机械和热痛阈测定) 均选在下午 2 ~ 5 点内完成, 动物首先适应环境 3 d, 测基础值, 建立模型后第 1 天进行测试, 此后隔天进行测试至第 15 天。第 7 天后每次测试均在给药后 2 ~ 3 h 进行。

**1.3.5 免疫组织化学染色** 至第 15 天行为学测试结束, 将动物处死并使用 4% 多聚甲醛灌注, 取大鼠脊髓 L<sub>4-5</sub> 节段, 分别放入 10%、20%、30% 的蔗糖中脱水。见脊髓沉底后使用 ACT 胶水包埋, 冰冻切片, 每张脊髓薄片厚度为 30 μm, 将脊髓薄片置于切片保护液中。从切片保护液中随机挑取脊髓薄片, 每组处理的动物数量不少于 4, 每只动物的脊髓薄片样本 6 ~ 8 张。使用 PBS 清洗切片, 入 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 封闭切片 30 min, 10% 羊血清封闭 2 h, 入 1 抗 (mouse-anti-GFAP 1:1 000) 24 h, 然后入生物素化的 2 抗 (1:200) 孵育 2 h, 使用 AB 液 (抗生物素蛋白和辣根过氧化物酶复合体 1:200 ABC Kit) 孵育 2 h, 5% DAB 显色后 70%、85%、90%、95%、100% 酒精脱水后入二甲苯透明后使用树脂封闭。阴性对照是将切片不放入 1 抗中, 按照以上步骤所得到的结果显示没有阳性信号 (结果未显示)。

组织片使用 Leica 显微镜, 通过计算机软件及数码成像系统采集图像数据并用于统计。使用 ImageJ (美国 NIH) 软件将图像处理为 8bit 图像 (黑白图像), 调整适当阈值使染色的星形胶质细胞形态完全包括后, 计算其在脊髓背角 Lamina I - V 层中的面积百分比进行比较。

#### 1.4 统计学处理

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 使用 SPSS 统计软进行方差分析。两两比较采用 LSD 或 SNK 检验,  $P <$

0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CCI 手术对大鼠机械和热痛阈的影响

在手术同侧足, 盐水对照组 CCI 手术后 3 d 大鼠的 PWT 和 PWL 明显下降 (CCI 模型组与假手术组相比有统计学意义  $P < 0.05$  图中未标注), 7 d 后进入平台期, 一直维持到所测试的第 15 天, 说明 CCI 的模型是成功的, 在 7 d 后就形成了稳定的神经病理性疼痛; 而假手术组的 PWT 和 PWL 一直没有明显的变化, 见图 1、图 2。

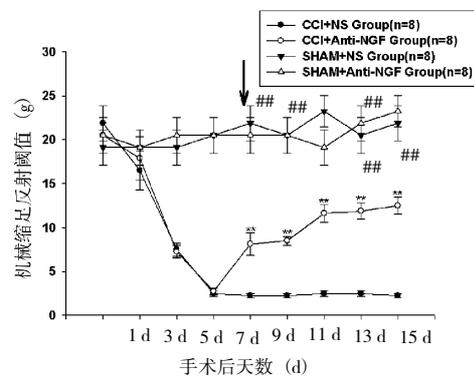


图 1 各组大鼠机械痛阈时间图

Fig. 1 The mechanical pain threshold time course of rats in each group

第 3 天起 CCI 组与假手术组痛阈有显著性差异, 箭头所指为第 7 天开始给药, 显著翻转 CCI 引起的痛阈降低, 假手术组之间无统计学意义。\* $P < 0.01$  (CCI+NS vs CCI+Anti-NGF), # $P < 0.01$  (CCI+NS vs SHAM+NS)。

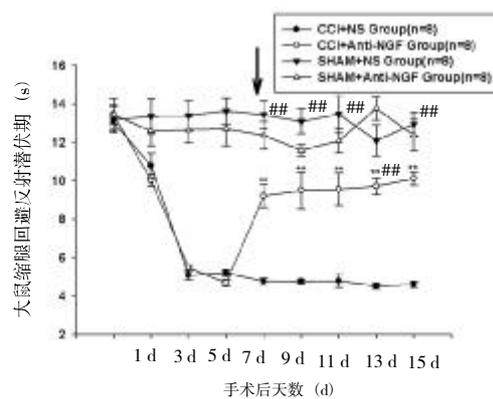


图 2 各组大鼠热痛阈时间图

Fig. 2 The thermal pain threshold time course of rats in each group

第 3 天起 CCI 组与假手术组痛阈有显著性差异, 箭头所指为第 7 天开始给药, 显著翻转 CCI 引起的痛阈降低, 假手术组之间无统计学意义。\* $P < 0.01$  (CCI+NS vs CCI+Anti-NGF), # $P < 0.01$  (CCI+NS vs SHAM+NS)。

### 2.2 CCI 手术后第 7 天持续给药对大鼠机械和热痛阈的影响

如图 1、2 所示, 在手术侧足, PWT 和 PWL 在 7 d 后进入平台期, 从第 7 天开始腹腔给予 anti-NGF 后, CCI 给药组较盐水组的机械和热痛阈显著上升 ( $P < 0.01$ ), 在假手术组, 给药和盐水组无统计学意义 ( $P > 0.05$ ). 连续给予 anti-NGF 后, CCI 给药组的机械和热痛阈持续升高 ( $P < 0.01$ ).

### 2.3 anti-NGF 对 CCI 模型脊髓 GFAP 表达的影响

如图 3 图 4 所示, 假手术组 (C 图和 G 图) 大鼠脊髓星形胶质细胞标志物 GFAP 只有较低程度的

基础表达. 而 CCI 模型组 15 d (A 图和 E 图) 时, 患侧脊髓全层呈现较强的 GFAP 免疫阳性反应, 高倍镜下观察到星形胶质细胞肥大增生, 脊髓背角 GFAP 免疫反应物质的平均密度明显增高 (其阳性反应物面积在背角中所占比例显著增高). 对侧脊髓仅 Lamina X 层出现较强的 GFAP 免疫阳性反应. 这说明 CCI 手术导致脊髓背角的星形胶质细胞激活.

如图 3 图 4 所示, 15 d 时 CCI+anti-NGF 组 (B 图和 F 图) 大鼠脊髓 L<sub>4-5</sub> 节段的 GFAP 表达显著低于 CCI 组, 且星形胶质细胞形态与假手术组相似未见明显的肥大. 这说明处理因素 anti-NGF 可能抑制了星形胶质细胞的激活, 降低了 GFAP 的表达.

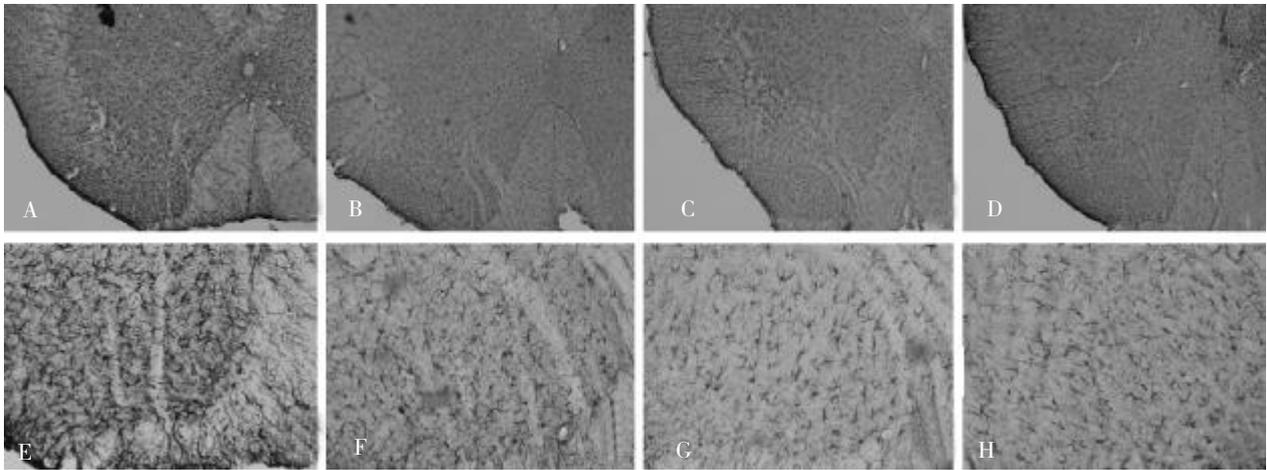


图 3 GFAP 阳性反应物质在脊髓背角 Lamina I - V 层中的面积百分比

Fig. 3 The area percentage of the positive marker GFAP in Lamina I - V layers of cornu dorsale medullae spinalis

注:A:CCI+生理盐水组 10 倍镜下手术同侧脊髓背角; B:CCI+anti-NGF 组组 10 倍镜下手术同侧脊髓背角; C:假手术 + 生理盐水组 10 倍镜下手术同侧脊髓背角; D:假手术 +anti-NGF 组 10 倍镜下手术同侧脊髓背角; E: CCI+生理盐水组 40 倍镜下手术同侧脊髓背角; F:CCI+anti-NGF 组组 40 倍镜下手术同侧脊髓背角; G:假手术 + 生理盐水组 40 倍镜下手术同侧脊髓背角; H:假手术 +anti-NGF 组 40 倍镜下手术同侧脊髓背角.

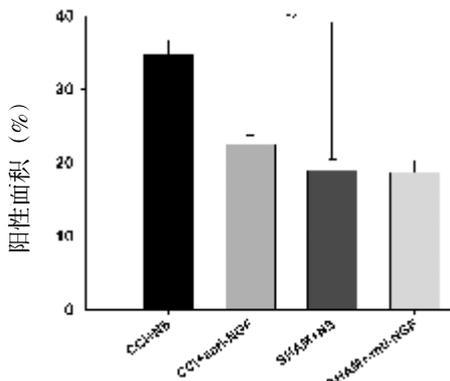


图 4 各组 GFAP 阳性反应物质在脊髓背角 Lamina I ~ V 层中表达密度的统计图

Fig. 4 The statistical chart of the expression density of GFAP in Lamina I - V layer of cornu dorsale medullae spinalis in each group

\*\* $P < 0.01$ , CCI+NS 组 vs CCI+Anti-NGF 组, CCI+NS 组 vs 假手术组. CCI+Anti-NGF 组与假手术组均无统计学意义, 假手术组之间无统计学意义.

### 3 讨论

CCI 模型是由 Bennett 和 Xie 于 1988 年首先建立的, Bennett 和 Xie 最早的工作发现大鼠在坐骨神经结扎后出现自噬和保护现象, 另外, 动物对机械、冷及热刺激的反应都有所加强<sup>[8]</sup>, 在本实验中观察到动物对机械和热刺激的痛阈降低, 但并未观察到自噬现象, 这可能与神经纤维的受损程度不同有关<sup>[9]</sup>.

通过免疫组化观察到 CCI 模型 GFAP 表达显著增强, 说明 CCI 模型的脊髓星形胶质细胞显著激活, 这与之前的报道一致<sup>[1]</sup>. 星形胶质细胞激活可能与其痛行为相关. 在病理状态下初级传入纤维

终末释放的神经递质、脊髓背角痛觉传递神经元释放的 NO、PGs、fractalkine 以及细菌和病毒均能激活胶质细胞。在激活的状态下,星形胶质细胞和小胶质细胞释放出大量的神经活性物质(如 ROS、NO、PGs、EAAs、ATP、NGF)和前炎性细胞因子(如 IL-1, IL-6, TNF),它们分别作用于突触前终末增强伤害性神经递质 SP、EAAs 的进一步释放,作用于突触后的背角痛觉传递神经元增强它的敏感性和反应性。被激活的星形胶质细胞和小胶质细胞释放的前炎性细胞因子还可以以自分泌和旁分泌的方式进一步加强自身的释放<sup>[10-12]</sup>。

NGF 诱导痛觉过敏的详细机制仍不十分清楚。通过大量的实验和分析,认为可能存在以下几种机制:NGF 可能易化了外周伤害性感受器,NGF 作为一种重要的免疫调节因子,引起大量的过敏性介质如五羟色胺和组胺引起外周伤害感受器敏感<sup>[13]</sup>。NGF 可能还参与感觉神经损伤后的交感神经出芽,引起痛觉过敏<sup>[6]</sup>。Anti-NGF 为 NGF 抗血清 IgG,有多克隆抗体和单克隆抗体,可与 NGF 特异结合。而与神经营养因子家族的其他成员无反应。本实验中使用 anti-NGF 可以显著的翻转 CCI 模型的痛行为。在持续给予 anti-NGF 后可以观察到 CCI 模型的痛阈的持续升高。可见 anti-NGF 拮抗了 NGF 的一系列作用,拮抗了 NGF 所引起的痛觉递质的释放和受体的改变。同时,本实验观察到 anti-NGF 对 CCI 模型的星形胶质细胞激活有显著的抑制作用,这可能是 anti-NGF 阻断了星形胶质细胞激活释放神经活性物质再引起星形胶质细胞激活的正反馈作用。这可能也解释了连续应用 anti-NGF 后所引起的 CCI 模型的痛阈持续性升高。

神经病理性疼痛在临床上是一种非常严重且很少有有效方法进行治疗的疾病,且目前的治疗手段和药物如 NSAIDs 和吗啡类药物对神经病理性疼痛效果都较差。本实验表明 anti-NGF 可以有效拮抗神经病理性疼痛,其在疼痛治疗方面可能具有广泛的应用前景,且在耐受性和副反应方面优于现有的一些止痛药。但该药的临床应用尚需要更多有关疗

效及安全性方面的研究。

#### [参考文献]

- [1] GARRISON C J. staining of glial fibrillary acidic protein (gfap) in lumbar spinal-cord increases following a sciatic-nerve constriction injury [J]. Brain Research, 1991,565(1):1-7.
- [2] 汤龙信,王金保. 胶质细胞与神经病理性疼痛[J]. 临床误诊误治,2009,22(4):77-79.
- [3] 刘健,李伟彦. 神经胶质细胞与神经病理性疼痛[J]. 医学研究生学报,2009,22(2):209-212.
- [4] SAH D Y W, FOPORRECA, OSSIPOV M H. Modulation of neurotrophic growth factors as a therapeutic strategy for neuropathic pain [J]. Drug Development Research, 2006,67(4):389-403.
- [5] NICOL G D, VASKO M R. Nerve growth actor in inflammation and pain [J]. Molecular Interventions, 2007,7(1):26-41.
- [6] INDO Y. Nerve growth factor, interoception, and sympathetic neuron: lesson from congenital insensitivity to pain with anhidrosis [J]. Autonomic Neuroscience-basic&Clinical, 2009,147(1-2):3-8.
- [7] RO L S. Effect of NGF and anti-NGF on neuropathic pain in rats following chronic constriction injury of the sciatic nerve[J]. PAIN, 1999,79(2-3):265-274.
- [8] BENNETT G J. Aa peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man [J]. Pain, 1988,33(1):87-107.
- [9] 周秋雯,徐建国. 慢性疼痛动物模型的研究进展[J]. 医学研究生学报,2008,21(6):638-642.
- [10] OHARA P T. Gliopathic pain: when satellite glial cells go bad[J]. Neuroscientist, 2009,15(5):450-463.
- [11] MILLIGAN E D, LRWATKINS. Pathological and protective roles of glia in chronic pain [J]. Nature Reviews Neuroscience, 2009,10(1):23-36.
- [12] CAO H, YZHANG. Spinal glial activation contributes to pathological pain states [J]. Neuroscience And Biobehavioral Reviews, 2008,32(5):972-983.
- [13] STEIN C. Peripheral mechanisms of pain and analgesia[J]. Brain Research Reviews, 2009,60(1):90-113.

(2012-03-14 收稿)