

补体3干预补体3基因敲除鼠神经病理性疼痛模型的研究*

徐涛¹ 黄良库² 聂发传³ 魏安宁^{1,4}

摘要

目的:观察补体3(C3)在神经病理性疼痛模型中的作用。

方法:36只C3基因敲除小鼠随机分3组:A组:假手术组;B组:慢性坐骨神经结扎(CCI)模型组;C组:CCI模型干预组。测定小鼠的热痛阈值和机械痛阈值、脊髓SOD活力和MDA的组织含量。

结果:与A组相比,B、C组痛阈均明显下降, $P<0.05$;C组与B组相比,C组痛阈下降幅度更大,差异具有显著性。与A组相比,B组小鼠术后第3、7天脊髓组织SOD活力明显降低而MDA显著升高;C组SOD和MDA变化幅度显著大于B组;C组内第7天与第3天相比,SOD活力增加且MDA含量减少。

结论:C3显著增加了补体3基因敲除小鼠痛敏状态,促进和维持了神经病理性疼痛状态。

关键词 补体蛋白;神经病理性疼痛;补体3基因敲除小鼠

中图分类号:R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2011)-02-0139-04

Effects of complement 3 on neuropathic pain model in C3-gene knock mice/XU Tao,HUANG Liangku,NIE Fachuan,et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2011, 26(2): 139-142

Abstract

Objective:To observe the effects of complement 3(C3) on neuropathic pain (NPP) in mice.

Method: Thirty-six C3-gene knock out mice were divided randomly into 3 groups as following: group A received sham operation; group B received chronic sciatic constriction injury (CCI) operation; group C received CCI operation and C3 lateral ventricles injection postoperation.Pain threshold by thermal and mechanical stimulation were recorded respectively. And the levels of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in the related segments of spinal cord were detected.

Result:Compared with the mice in group A, pain thresholds of paw withdraw postoperation in group B and group C significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the mice in group B, those in group C showed more magnitude of changing range. Compared with the mice in group A, in group B SOD activity decreased and MDA level increased significantly in spine tissues.The change magnitudes of SOD and MDA in group C were obviously more than those in group B. In group C SOD activity increased and MDA level decreased on the 7th d more than those on the 3rd d.

Conclusion: The pain sensitivity increased significantly in CCI models of C3 gene knockout mice by exogenous C3 protein lateral ventricle injection, and it may be contribute to the promoting and maintaining of neuropathic pain.

Author's address The Second Hospital of Chongqing Medical University,400016

Key word complement protein; neuropathic pain; C3-gene knock out mice

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2011.02.012

* 基金项目:国家自然科学基金项目(面上项目,30772077)

1 重庆医科大学附属第二医院,重庆市渝中区袁家岗医学院路1号,400016; 2 重庆医科大学附属第二医院骨科; 3 第三军医大学附属第一医院疼痛中心; 4 通讯作者

作者简介:徐涛,女,硕士研究生; 收稿日期:2010-01-26

神经病理性疼痛(neuropathic pain, NPP)是临床上难治疗的疼痛,严重影响患者的生存质量,特别是在脊髓损害后发生的截瘫后神经痛,这类疼痛的机制一直不清楚。临床上有采用经皮电神经刺激配合磁热振疗法治疗脊髓损伤后疼痛,疼痛得到一定的缓解^[1]。于翠萍等^[2]采用双氯芬酸钠治疗 NPP 大鼠,显著减轻了疼痛状态。神经病理性疼痛机制复杂,朱雅斌等^[3]研究发现病理性疼痛的大鼠其海马细胞凋亡及胆碱乙酰转移酶表达降低。也有研究表明,NPP 大鼠出现脊髓背角补体异常活化,并且补体活化规律与痛觉过敏的形成时间基本吻合^[4]。王金保等^[5]曾采用补体抑制剂干预脊髓背角补体蛋白的表达,NPP 大鼠的热痛觉过敏和机械痛觉过敏被大部逆转。我们采用补体 3(complement 3, C3)基因敲除小鼠制作神经病理性疼痛的慢性坐骨神经结扎模型,用外源性 C3 蛋白实施干预,从另一个方面去观察 C3 在神经病理性疼痛模型的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年健康 C3 基因敲除 C57BL/6J 小鼠 36 只,体重 22—26g, 原代购于美国 Jackson 实验室, 饲养传代。小鼠随机分为 3 组:A 组:假手术组+侧脑室生理盐水注射;B 组:慢性坐骨神经结扎(chronic sciatic constriction injury, CCI)模型+侧脑室生理盐水注射;C 组:CCI 模型+侧脑室外源性 C3 注射。

1.2 动物模型制作

小鼠称重后,用 1%戊巴比妥钠腹腔注射(80mg/kg)。俯卧位固定于脑立体定位仪上,用眼科剪剪除头部和右后肢根部的毛发,用碘伏消毒两遍后,参照根据 Bennett 法^[6]建立右后肢 CCI 模型。A 组只做坐骨神经的暴露,不做神经结扎。然后剪开头皮,C 组小鼠在脑立体定位仪的固定下^[7],根据 Paxinos, Franklin(2001)小鼠脑图谱确定侧脑室位置(前囟后 0.5 mm,向右或左旁开 1.0mm,硬脑膜下 2.7 mm)。用微型电钻在此位置上方颅骨相应部位开一小孔,后用 10 μ l 的微量注射针抽取 1.9 μ l 的外源性 C3 蛋白(Calbiochem,货号:204885;浓度为 1.2mg/ml)注射入侧脑室内,5min 内注射完,留针 1min,缓慢退针。A、B 组侧脑室内注射 1.9 μ l 生理盐水。术后小鼠

平卧,置烤灯下取暖,苏醒后送动物房单笼喂养。

1.3 行为学测定

3 组小鼠分别于术前(第 0 天)、术后第 1、3、5、7 天,用热痛刺激仪和机械刺激仪测痛阈值。伤肢足跖热痛阈值按 Hargreaves 介绍的方法测定^[8]:先将小鼠放在热刺激仪的玻璃操作台上适应 20min,调节光强度,将光辐射焦点对准小鼠足跖底部,单次照射时间不超过 30s,以免造成热辐射损伤,每肢照射 5 次,去掉最大和最小值,记录小鼠的缩足平均时间。机械痛阈参照 Dixon 介绍的方法^[9]测定:将小鼠置于升高的金属网上,并盖以透明的有机玻璃罩,适应 20min,用不同压力的 von frey 纤维丝(从小到大)垂直刺激其足底 2、3 跖趾间皮肤敏感处,逐渐加压使之成为 S 形持续 6—8s,小鼠在刺激时间内或在移开 von frey 纤维时立即出现快速缩足记为阳性反应。每次间隔 5s,连续 10 次,诱发 4—6 次缩足反应作为 50%反应率,其压力值即为机械痛阈值。

1.4 脊髓匀浆超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde,MDA)的测定

术后第 3、7 天测完痛阈之后,各组随机处死 6 只实验小鼠,取其脊髓 L5、6 节段标本,称重后,按 1:9 比例加入冰盐水,制成 10%脊髓匀浆,4 $^{\circ}$ C 下离心,取上清液待测。MDA 采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法测定,SOD 测定采用黄嘌呤氧化酶法,组织匀浆总蛋白定量采用考马斯亮蓝法试剂盒。操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 12.0 软件进行统计分析,数据用均值 \pm 标准差表示,同一时点组间比较采用成组 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

3 组小鼠术前热刺激爪收缩阈值无差异;术后第 1 天,各组热刺激爪收缩阈值都显著下降,但 A 组迅速恢复。术后第 3 天,A 组基本恢复到术前的水平,而 B、C 两组继续下降,且 C 组下降程度明显大于 B 组($P < 0.05$),见表 1。

3 组小鼠术前机械痛阈差异无显著性。术后第 1 天,各组机械痛阈下降,B、C 组与 A 组相比较有显著性意义。后 A 组逐渐恢复到术前水平。B、D 组机

械阈值继续下降,且C组下降程度大于B组 ($P < 0.05$),见表2。

B、C组小鼠术后第3天和第7天,与A组相

比,脊髓组织SOD活力明显降低而MDA含量显著增加,且C组与B组相比,C组变化幅度更大,两者间有显著性差异。见表3。

表1 3组小鼠热痛阈值的变化比较

组别	第0天	第1天	第3天	第5天	第7天
A	18.85±0.88	13.51±1.26	16.31±0.62	17.76±0.96	18.34±1.05
B	18.58±0.87	11.05±0.85 ^{①③}	10.84±0.78 ^{①③}	11.16±0.94 ^{①③}	11.92±1.12 ^{①③}
C	18.43±0.53	9.17±0.56 ^{①②③}	8.20±0.60 ^{①②③}	9.10±0.59 ^{①②③}	10.32±0.89 ^{①②③}

与A组同时点比较,① $P < 0.05$;与B组同时点比较,② $P < 0.05$;与同组术前比较,③ $P < 0.05$ 。术后第5、7天测定各组随机剩下的6只实验小鼠。

表2 3组小鼠机械痛阈的变化比较

组别	第0天	第1天	第3天	第5天	第7天
A	14.4±2.6	13.3±1.4	13.6±1.1	13.5±1.8	13.1±1.3
B	13.9±2.2	8.0±1.3 ^{①③}	7.5±0.9 ^{①③}	7.2±1.5 ^{①③}	7.4±1.1 ^{①③}
C	13.5±2.7	5.5±1.3 ^{①②③}	4.4±1.4 ^{①②③}	4.8±1.9 ^{①②③}	5.3±1.4 ^{①②③}

与A组假手术组比较,① $P < 0.05$;与B组同时点比较,② $P < 0.05$;与同组术前的比较,③ $P < 0.05$ 。术后第5、7天测定各组随机剩下的6只实验小鼠。

表3 3组小鼠第3、7天两个时点脊髓SOD、MDA含量比较

组别	SOD(U/mgprot)		MDA(nmol/mgprot)	
	3天	7天	3天	7天
A	61.25±3.84	63.37±4.23	1.12±0.15	1.32±0.23
B	52.18±4.87 ^①	54.12±2.53 ^①	3.84±0.26 ^①	3.25±0.80 ^①
C	43.60±3.35 ^{①②③}	50.46±3.03 ^{①②}	6.35±0.52 ^{①②③}	4.23±0.64 ^{①②}

与A组同时点比较,① $P < 0.05$;与B组同时点比较,② $P < 0.05$;C组内第3天与第7天比较,③ $P < 0.05$ 。

3 讨论

SOD可清除过多的脂质过氧化物使机体免受损伤。MDA是体内主要的脂质过氧化产物,具有细胞毒性,其高低又可间接反映了机体细胞受自由基攻击的严重程度。内环境稳态的失衡将导致机体疾病发生和发展。机体氧化/抗氧化系统平衡是内环境稳态的重要指标之一。

近来有研究提示神经病理性疼痛患者和动物模型脑脊液MDA含量增高,SOD活性下降,二者呈负相关,提示脊髓背角脂质过氧化反应增强^[10-11]。原因可能为,神经病理性疼痛患者和动物模型脊髓背角胶质细胞活化激活了补体级联系统并释放大量细胞因子(如TNF α 、IL-1等)^[12-13],这些物质作用于靶细胞(背角神经元细胞和胶质细胞)可使其氧自由基合成增多,大量的氧自由基消耗SOD并使其活力下降,MDA作为脂质过氧化产物在脊髓内不断聚集,从而进一步加重了脊髓背角神经元损害^[14-15]。神经病理性疼痛患者和动物模型脑脊液MDA含量增高,补体系统的异常活化可能成为神经病理性疼痛

发生和维持的一种机制。

补体系统是非特异性免疫的重要组成部分之一,它的三条激活途径包括经典途径、凝集素途径和旁路途径,虽然启动途径不同,但最后都汇集于一点,即C3转化酶对C3的分解,并在分解之后的活化过程中产生许多具有炎症介质作用的活性片段,如C3a、C4a和C5a等,最后进入共同的末端通路,形成攻膜复合体(membrane attack complex,MAC),引起病原菌或组织细胞的损毁。可见C3在补体系统已知的三条激活途径中处于枢纽地位,是补体系统激活的必要条件。

本研究建立C3敲除小鼠的CCI模型,同时侧脑室内注射外源性C3蛋白,观察神经病理性模型的变化。结果显示外源性C3蛋白能导致小鼠痛阈明显降低,对疼痛更加敏感。这与本课题组研究结果相符,即用补体抑制剂眼睛蛇毒因子抑制补体系统的活性,可引起大鼠痛敏程度降低^[16]。CCI模型C3基因敲除小鼠的脊髓SOD活力较假手术组降低,MDA含量却增加,提示补体系统不是NPP致病因素的全部。C组小鼠外源性C3蛋白干预后第7天时SOD的活力升高,MDA含量下降,可能为注入小鼠体内的外源性的C3蛋白已耗尽,补体系统活化状态降低,从而引起的相关氧化炎症反应得到缓解。因此我们可以认为,利用外源性C3蛋白补充了补体系统激活的必要成分后,使脊髓补体系统异常激活成为可能,机体氧化/抗氧化失平衡是致使小鼠痛觉过敏的

效应发生途径之一。本研究的结果可以推测脊髓补体系统的异常激活,通过氧化炎症反应等一系列的直接、间接途径参与了神经病理性疼痛发生发展及维持,可以为神经病理性疼痛的诊断和开发新的治疗方法提供新的思路

参考文献

- [1] 王雪强,毕霞,戴敏辉,等.经皮电神经刺激配合磁热疗法对脊髓损伤中枢性疼痛的疗效观察[J].中国康复医学杂志,2009,24(9):797—799.
- [2] 于翠萍,王琦,何明伟,等.双氯芬酸钠对大鼠神经病理性疼痛的疗效及机制[J].中国康复医学杂志,2009,24(10):872—875.
- [3] 朱雅斌,石翊飒,丁力,等.病理性疼痛对老年雄性大鼠海马细胞凋亡和胆碱乙酰转移酶的影响[J].中国康复医学杂志,2009,24(4):348—351.
- [4] 王金保,聂发传,顾建腾,等.坐骨神经结扎大鼠脑脊液补体异常活化与痛觉过敏的关系[J].第三军医大学学报,2008,30(2):138—141.
- [5] 王金保,聂发传,易斌,等.眼镜蛇毒因子对神经病理性疼痛大鼠模型的干预效应[J].医学研究生学报,2008,21(2):129—133.
- [6] Bennett GJ,Xie YK.A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man[J].Pain,1988,33:87—107.

- [7] 沈新娥,王国卿,周希平,等.侧脑室注射阿片受体反义寡聚核苷酸对小鼠甲基苯丙胺行为敏化反应的影响[J].实验动物与比较医学,2007,27(3):155—160.
- [8] Hargreaves K,Dubner R,Brown F,et al.A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia[J].Pain,1988,32:77—88.
- [9] Dixon WJ.Efficient analysis of experimental observation[J].Ann Rev Pharmacol Toxicol,1980,20:441—462.
- [10] 王建秀,王业岗,孙秀珍.三叉神经痛患者脑脊液及血清中SOD测定的临床意义[J].中国疼痛医学杂志,2006,12(3):151—152.
- [11] 张前得,谈文峰.消纤痛颗粒对疼痛小鼠SOD、MDA、ATP的影响[J].南京中医药大学学报,2005,21(3):161—162.
- [12] 成浩,杨建平,张艳兵,等.鞘内注射米诺环素抑制脊髓小胶质细胞激活减轻炎性痛觉过敏[J].苏州大学学报,2007,27(1):14—17.
- [13] Robert SG, Michael C, Gary JB, et al. Complement induction in spinal cord microglia results in anaphylatoxin C5a-mediated pain hypersensitivity[J]. J Neurosci, 2007,27(32): 8699—8708.
- [14] Dworkin RH, Backonja M, Rowbotham MC, et al. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations[J]. Arch Neurol, 2003, 60:1524—1534.
- [15] Albrecht EA, Chinnaiyan AM, Varambally S, et al. C5a-induced gene expression in human umbilical vein endothelial cells[J]. Am J Pathol, 2004, 164:849—859.
- [16] 聂发传,王金保,苏东.补体抑制剂对大鼠神经病理性疼痛模型的作用研究[J].中国疼痛医学杂志,2009,15(4):240—242.

(上接第127页)

传导性.推拿手法作用于肌肉后,使热能的作用促进血管扩张,增加局部皮肤和肌肉的营养供应,可使肌肉弹性明显好转,促进肿胀挛缩消除,并使神经组织得到营养,使失神经而致的肌萎缩得以改善。

通过以上规范化康复治疗,尤其是低中频电疗结合运动功能训练以及推拿手法,在臂丛神经损伤术前术后起到了一定的疗效,对患者肩肘腕功能的改善有了明显的提高。而手内在肌的功能恢复不够理想,没有找到一定有效途径,但本研究证明了规范化康复治疗对促进神经再生和神经细胞修复、对防

止肌肉萎缩,促进肩、肘、腕、掌指关节、指间关节的关节活动范围增大起到了至关重要的作用。

参考文献

- [1] 中华医学会.临床技术操作规范手外科分册[M].第1版·北京:人民军医出版社,2005.166.
- [2] 顾玉东,王澍寰,侍德.手外科学[M].第1版.上海:上海科学技术出版社,2002.268,249.
- [3] 周俊明,徐文东,张丽银.上肢神经损伤的康复(自我训练及家庭护理)[M].第1版.上海:复旦大学出版社,2008.23—32,17,16,21.
- [4] 梁秉中,周俊明主编,实用骨科针灸推拿学[M].香港:香港中文大学中医中药研究所.2003:33—35.

(上接第134页)

参考文献

- [1] 张新,吴洪,冉春风,等.手外伤康复治疗的成本-效果研究[J].中国康复医学杂志,2009,24(1):33.
- [2] 王澍寰.手外科学[M].北京:人民卫生出版社,2002.466.
- [3] 许银礼,顾月霞,濮哲铭,等.功能支具在烧伤后畸形手功能恢复中的作用及其效果评价[J].中国临床康复,2004,8(35):7934—7935.
- [4] 崔益亮.手外伤后康复治疗的重要性[J].中国康复医学杂志,2005,20(10):797.
- [5] 燕铁斌.现代康复治疗技术[M].合肥:安徽科技出版社,

- 1994.59—66.
- [6] 胡文清,常利,常硕,等.早期康复对手外伤手部功能康复的影响[J].中国康复医学杂志,2006,21(12):1121—1122.
- [7] 陶泉.手部损伤康复[M].上海:上海交通大学出版社,2006.99.
- [8] 张纛,岳寿伟,寿奎水,等.手外伤后指关节僵硬的系统康复[J].中华物理医学与康复杂志,2003,25(2):98—100.
- [9] 易南,王冰水,朱雄翔,等.三种类型手夹板在预防和治疗烧伤后手畸形中的应用[J].中国康复医学杂志,2008,23(2):148—149.
- [10] 王子彬.引入康复理念,提高关节损伤的治疗效果[J].中国康复医学杂志,2005,20(2):83.