

doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2014.09.003

• 论 著 •

脊神经结扎诱导大鼠脊髓背角 SFKs-Y416p 和 GluN2B 表达增加 *

解新^{1#} 蔡捷^{1#} 万有¹ 崔彦军^{2Δ} 邢国刚^{1Δ}

(¹ 北京大学神经科学研究所基础医学院神经生物学系, 教育部和卫生部神经科学重点实验室, 北京 100191;

² 北京大学医院内科, 北京 100871)

摘要 目的: 研究脊神经结扎 (SNL) 后大鼠脊髓背角 SFKs-Y416p 和 GluN2B 的表达变化, 并探讨二者在维持神经病理性疼痛中的作用。**方法:** 按照双盲随机的原则, 将 20 只雄性 SD 大鼠随机分为 Naive 组 ($n = 4$), SNL 手术组 ($n = 8$) 和假手术组 ($n = 8$), 进行 Western blotting 实验, 检测神经病理性疼痛大鼠脊髓背角突触部位 SFKs-Y416p 和 GluN2B 的表达变化。**结果:** ① Western blotting 定量分析显示, 脊神经结扎能显著上调 SFKs-Y416p。SNL 后第 7 d, 脊髓背角突触部位的 SFKs-Y416p 由手术前的 (0.89 ± 0.07) 上调到 (1.27 ± 0.08) ($P < 0.01$); 然而在假手术组大鼠, 背角突触部位的 SFKs-Y416p 则没有明显的变化。② SNL 后第 7 d, 脊髓背角突触部位的 GluN2B 由术前的 (0.73 ± 0.05) 上调到 (1.45 ± 0.12) ($P < 0.01$); 然而在假手术组大鼠, 背角突触部位的 GluN2B 则没有明显变化。**结论:** 脊神经结扎可以上调脊髓背角突触部位 SFKs-Y416p 和 GluN2B 的蛋白表达, 且 SFKs-Y416p 和 GluN2B 升高的时间点神经病理性疼痛的第 7 天, 所以, SFKs-Y416p/GluN2B 信号通路可能参与维持外周神经损伤所引起的神经病理性疼痛的中枢机制。

关键词 SFKs-Y416p; GluN2B; 脊髓背角; 神经病理性疼痛; 突触小体; 脊神经结扎; 大鼠

UPREGULATION OF THE SRC FAMILY KINASES Y416p AND GluN2B IN THE SPINAL DORSAL HORN OF NEUROPATHIC RATS INDUCED BY SPINAL NERVE LIGATION*

XIE Xin^{1#}, CAI Jie^{1#}, WAN You¹, CUI Yan-Jun^{2Δ}, XING Guo-Gang^{1Δ}

(¹Neuroscience Research Institute and Department of Neurobiology, Peking University; Key Laboratory for Neuroscience of the Ministry of Education and the Ministry of Public Health, Beijing 100191; ²Department of internal Medicine, Peking university Hospital, Beijing 100871)

Abstract Objective: To investigate the changes of SFKs-Y416p and GluN2B content in the spinal dorsal horn in spinal nerve ligated (SNL) rats and to explore the role of spinal SFKs-Y416p and GluN2B in the maintenance of neuropathic pain. **Methods:** Twenty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into Naive group ($n = 4$), SNL-operated group ($n = 8$), and sham-operated group ($n = 8$). The changes of SFKs-Y416p and GluN2B in the spinal dorsal horn of SNL- or sham-operated rats were detected by Western blotting techniques. **Results:** ① The SFKs-Y416p content in the synapse measured by Western blotting was significantly increased after spinal nerve ligation. At seven days after surgery in SNL rats, SFKs-Y416p content in the synaptic area increased to (1.27 ± 0.08) from (0.89 ± 0.07) of pre-operation ($P < 0.01$). No significant changes in the SFKs-Y416p content were observed in sham rats. ② At seven days after surgery in SNL rats, the GluN2B content in the synaptic area was also increased significantly. The GluN2B content in the synaptic area increased to (1.45 ± 0.12) from (0.73 ± 0.05) of pre-operation ($P < 0.01$). No significant changes in the GluN2B content was observed in sham rats. **Conclusion:** Up-regulation of the synaptic SFKs-Y416p and

* 基金项目: 国家自然科学基金(81371237, 31171063), 科技部国家重点基础研究发展计划“973”资助项目(2013CB5131905), 卫生部行业专项基金(20130293-01)和北京市自然科学基金(7112079)资助。

Δ 通讯作者 崔彦军 cyj@pku.edu.cn; 邢国刚 ggxing@bjmu.edu.cn

共同第一作者

GluN2B content in the spinal dorsal horn occurred in SNL rats. Moreover, the increasing time of SFKs-Y416p and GluN2B is at seven days after spinal nerve ligation. Therefore, the SFKs-Y416p/GluN2B signaling plays an important role in the maintenance of neuropathic pain at the late stage of nerve injury.

Key words SFKs-Y416p; GluN2B; Spinal dorsal horn; Neuropathic pain; Synaptosomes; Spinal nerve ligation; Rats

疼痛分为急性痛和慢性痛,而慢性疼痛可以持续很长时间,是临床实践和基础科学的一大挑战。神经病理性疼痛(neuropathic pain)属于慢性痛的一种。目前的研究证实,脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)在神经病理性疼痛的形成过程中起重要作用。本实验室前期的实验显示, BDNF 表达量最大程度的增加是发生在神经损伤之后的 24 ~ 48 h (早期);而 GluN2B 表达量的峰值是在手术后较晚时期(3 ~ 14 days)^[3]。因此笔者认为, GluN2B 的激活可能在晚期参与神经病理性疼痛的维持。最近的研究显示,非受体蛋白 Src 酪氨酸激酶家族(Src family kinases, SFKs)上调 N-methyl-D-aspartate (NMDA)受体的功能不仅参与生理情况下谷氨酸能神经元的突触可塑性, SFKs 上调 NMDA 受体在病理状态下同样起着非常重要的作用。在脊髓背角,病理增加的 Src 上调 NMDA 受体在慢性神经病理性疼痛模型的痛觉过敏中起到至关重要的作用^[7]。但在神经病理性疼痛中, SFKs 是否磷酸化,以及 SFKs 磷酸化是否参与维持神经病理性疼痛的作用还不十分清楚。本实验应用 Western blot 的方法,研究腰 5 (L₅) 脊神经结扎(spinal nerve ligation, SNL)所诱发的神经病理性疼痛大鼠脊髓背角 SFKs-Y416p 和 GluN2B 的含量变化,旨在为进一步阐明 SFKs-Y416p 参与维持神经病理性疼痛的中枢机制提供依据。

方 法

1. 实验动物

20 只健康成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠,体重约 180 ~ 250 g,由北京大学医学部实验动物中心提供。

2. 神经病理性疼痛模型的制备

参照本实验室应用的方法^[6],先用水合氯醛(300 mg/kg, i. p.)麻醉动物,将左侧 L₅ 脊神经分离,并用 4 号丝线结扎,建立大鼠脊神经结扎(SNL)神经病理性疼痛模型。在假手术组大鼠,除脊神经不结扎外,其他手术过程与手术组大鼠相同。

术后所有动物均饲养于铺垫锯末的塑料盒内,室温维持在 20 ~ 25 °C,自然照明,自由饮水和摄食。在大鼠脊神经结扎后的第 7 d,按照 Chaplan 等人报道的“up and down”^[1]方法,用一系列标准化

的 von Frey 纤维丝(美国 Stoelting 公司)测定大鼠后足的 50% 缩足阈值(paw withdrawal threshold, PWT),以 50% 缩足阈值小于 4 g 作为出现机械痛敏的标准。按照双盲随机的原则,将 20 只大鼠随机分为 naive, SNL 手术组和假手术(sham)对照组: naive 组 4 只大鼠, SNL 和假手术每组各 8 只大鼠,进行 Western blotting 实验来检测神经病理性疼痛大鼠脊髓背角 SFKs-Y416p 和 GluN2B 的蛋白表达变化。

3. Western blotting 实验

实验动物断头处死后,迅速分离脊髓腰膨大部分(L₄ ~ L₆ 节段)的脊髓背角组织, -80 °C 保存备用。提取突触小体过程:将 Eppendorf 管置于冰上,每个脊髓背角用 500 μl 的 0.32 mM 蔗糖溶液^[2][0.32 Surcose, 10 HEPES, 2 EDTA, 1 PMSF (单位: mmol/L)],用匀浆器将组织充分研磨成不可见颗粒,此过程保持冰上操作;然后将组织匀浆液离心(1000 g, 4 °C, 10 min) 2 次,每次均取上清(P1),弃去沉淀;将 P1 离心(10 000 g, 4 °C, 15 min),取沉淀,得到突触小体(P2);每个 EP 管加入 40 μl TEVP 缓冲液[10 Tris-HCl, pH 7.4, 5 NaF, 1 EDTA, and 1 EGTA, 2 PMSF (单位: mmol/L), 1% SDS],冰上裂解 1 h;组织匀浆离心(15 000 g, 4 °C, 5 min),取上清。用 BCA(bicinchoninic acid)蛋白质测定试剂盒(美国 Peirece 公司)进行蛋白定量,在 Model 680 酶标仪(美国 BIO-RAD 公司)上读板,测量波长为 570 nm;以标准品浓度为横坐标,校正吸光度为纵坐标作标准曲线。按照标准曲线计算出蛋白浓度。将蛋白加入 8% 的 SDS-PAGE 凝胶中电泳,将分离出的蛋白 100 V 恒压转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。完毕,将有蛋白的 PVDF 膜用 3% BSA 室温封闭 1 h。取出封闭好的 PVDF 膜孵育相应一抗,4 °C 过夜。第 2 天,取出一抗反应结束的 PVDF 膜, TBST 洗 3 次,室温孵育相应二抗 1 h。结合二抗后的 PVDF 膜用 TBST 洗三次后显色观察蛋白表达的含量变化。

4. 统计学方法

蛋白灰度分析采用 Quantity One。采用 Prism 5.0 版软件进行数据的统计分析和处理。多组数据间差异用单因素方差分析(one-way ANOVA)并继之以 Bonferroni 检验数据,其结果用平均值 ± 标准误($\bar{x} \pm SEM$)表示。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. SNL 大鼠脊髓背角 SFKs-Y416p 含量的变化
脊神经结扎可以显著上调脊髓背角 SFKs-Y416p 的含量。脊神经结扎后，与正常组相比，SNL 组大鼠脊髓背角的 SFKs-Y416p 含量在 7 d 明显升高 ($P < 0.05$, One-way ANOVA 继 Bonferroni 检验, $n = 5$, 见图 1); 与正常组大鼠相比，假手术组大鼠，背角 SFKs-Y416p 的含量没有明显变化 ($P > 0.05$, $n = 5$, One-way ANOVA 继 Bonferroni 检验, $n = 5$, 见图 1)。

2. SNL 大鼠脊髓背角 GluN2B 含量的变化
脊神经结扎可以显著上调脊髓背角 GluN2B 的含量。脊神经结扎后，与正常组大鼠相比，手术组大鼠脊髓背角的 GluN2B 含量在 7 d 明显升高 ($P < 0.01$, $n = 3$, One-way ANOVA 继 Bonferroni 检验, 见图 1); 与正常组大鼠相比，假手术组大鼠脊髓背角 GluN2B 的含量没有明显变化 ($P > 0.05$, $n = 3$, One-way ANOVA 继 Bonferroni 检验, 见图 2)。

讨 论

研究证实，NMDA 受体参与 LTP (long-term

potentiation) 和 LTD (long-term depression) 的形成，在突触可塑性中起着重要作用^[4]。在 Naive 小鼠鞘内给予 NMDA 能增加脊髓背角突触部位 GluN2B 的浓度^[5]。本实验室前期的研究证实，脊髓背角部位 GluN2B 的激活参与神经损伤后持续痛的维持。我们的实验室结果发现脊髓背角的 GluN2B 在中枢敏化和神经病理性疼痛的发展中起重要作用，这种作用是通过引起脊髓背角伤害性突触传递的 LTP 来实现的^[6]。在脊神经结扎神经病理性疼痛模型，免疫组化染色结果显示，SNL 的大鼠的 GluN2B 表达从术后 48 h 才开始升高，一直持续到术后 14 d，术后 28 d 回到对照水平^[3]。本实验用 Western blotting 的方法也证实了在突触部位，SFKS-Y416p 和 GluN2B 在 SNL 后 7 d 均显著升高。以上的研究支持 GluN2B 在神经病理性疼痛的晚期发挥作用，即参与神经病理痛的维持。1994 年首次报道酪氨酸磷酸化调节 NMDA 受体功能，发现细胞内给予重组 Src 能增强 NMDA 的电流；相反，给予 PTKs 的抑制剂，NMDA 受体引起的全细胞电流和胞内钙反应均被削减，这使得 NMDA 受体成为中枢神经系统受 SFKs 调节的第一个离子通道^[7,8]。因此，Src 酪氨酸激酶是 NMDA 受体调节的“hub”分子被认

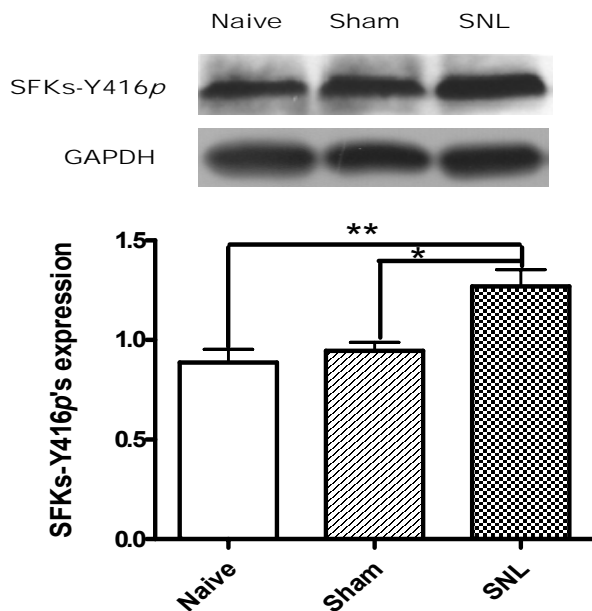


图 1 SNL 大鼠脊髓背角突触部位 SFKs-Y416p 的变化 (Western blotting 定量测定)。SNL 可以上调脊髓背角 SFKs-Y416p 的表达。 $*P < 0.05$ 。 $**P < 0.01$ ，与手术前相比，One-way ANOVA 继之以 Bonferroni 检验, $n = 5$ 。

Fig. 1 Changes of the SFKs-Y416p content in the spinal dorsal horn synaptosomes in SNL rats measured by Western blotting. Up-regulation of the SFKs-Y416p's expression in the spinal dorsal horn after SNL. $*P < 0.05$. $**P < 0.01$, compared with pre-operation. One-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test, $n = 5$

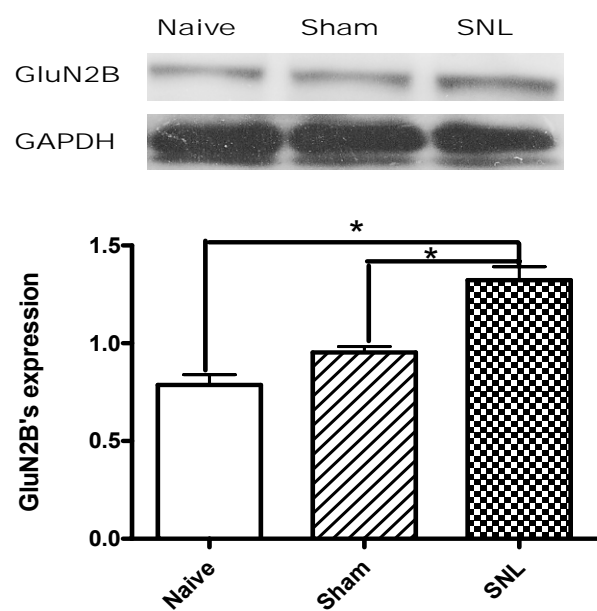


图 2 SNL 大鼠脊髓背角 GluN2B 含量的变化 (Western blotting 定量测定)。SNL 可以上调脊髓背角 GluN2B 的含量。SNL 可以上调脊髓背角的 GluN2B 含量。 $*P < 0.05$ ，与手术前相比，One-way ANOVA 继之以 Bonferroni 检验, $n = 3$ 。

Fig. 2 Changes of the GluN2B content in the spinal dorsal horn synaptosomes in SNL rats measured by Western blotting. Up-regulation of the GluN2B's expression in the spinal dorsal horn after SNL. $*P < 0.05$, compared with pre-operation. One-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test, $n = 3$

可。这些都为 SFKs-Y416p/GluN2B 信号通路参与神经病理性疼痛的维持提供了证据。然而, 目前所知 SFKs 家族有九个成员, 其中 Src, Fyn, Lck, Lyn 和 Yes 高表达于神经细胞^[10], 到底是哪个分子起主要作用现在仍不清楚。鞘内注射 SFKs 的抑制剂 PP2 能阻断 GluN2B 的酪氨酸磷酸化, 消除 NMDA 引起的 GluN2B 受体在突触部位的表达, 同时能减轻机械痛敏^[5]。本研究的结果显示: 在神经病理性疼痛晚期(即第 7 d) SFKs-Y416p 显著升高, 说明 SFKs 在神经病理性疼痛晚期发挥作用, 可能参与神经病理性疼痛的维持。这些研究表明, 在脊髓背角突触部位 NMDA 引起的 LTP 可能是通过 SFKs-Y416p 磷酸化 GluN2B 的某个或几个位点来实现的, 从而维持神经病理性疼痛。最近的研究显示: 在培养的神经元, 通过抑制 Src 家族激酶的激活或者用小干扰 RNA 减少 Fyn 来阻断 GluN2B Tyr-1336 位点的磷酸化(而不是阻断 Tyr-1472 位点的磷酸化)能明显衰减钙蛋白酶介导的 GluN2B 分裂^[9]。这也许给研究神经病理性疼痛提供了另一条新的线索。

参考文献

- [1] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, *et al.* Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*, 1994, 53:55 ~ 63.
- [2] Dunah AW, Standaert DG. Dopamine D1 receptor-depen-

dent trafficking of striatal NMDA glutamate receptors to the postsynaptic membrane. *J Neurosci*, 2001, 21:5546 ~ 5558.

- [3] Geng SJ, Liao FF, Dang WH, *et al.* Contribution of the spinal cord BDNF to the development of neuropathic pain by activation of the NR2B-containing NMDA receptors in rats with spinal nerve ligation. *Exp Neurol*, 2010, 222:256 ~ 266.
- [4] Lau CG, Zukin RS. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8:413 ~ 426.
- [5] Li S, Cao J, Yang X, *et al.* NR2B phosphorylation at tyrosine 1472 in spinal dorsal horn contributed to N-methyl-D-aspartate-induced pain hypersensitivity in mice. *J Neurosci Res* 2011, 89:1869 ~ 1876.
- [6] Qu XX, Cai J, Li MJ, *et al.* Role of the spinal cord NR2B-containing NMDA receptors in the development of neuropathic pain. *Exp Neurol*, 2009, 215:298 ~ 307.
- [7] Salter MW, Kalia LV. Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. *Nat Rev Neurosci*, 2004, 5:317 ~ 328.
- [8] Wang YT, Salter MW. Regulation of NMDA receptors by tyrosine kinases and phosphatases. *Nature*, 1994, 369:233 ~ 235.
- [9] Wu HY, Hsu FC, Gleichman AJ, *et al.* Fyn-mediated phosphorylation of NR2B Tyr-1336 controls calpain-mediated NR2B cleavage in neurons and heterologous systems. *J Biol Chem*, 2007, 282:20075 ~ 20087.
- [10] Yu XM, Groveman BR. Src family kinases in the nervous system. *FEBS J*, 2012, 279:1.

(上接第 615 页)

样本量进行评估。观察结果显示, 有 SFPN 的 FMS 较无 SFPN 的 FMS 更易发生于白种人 ($P=0.003$), 这一结果同样需要更大的样本量进行评估。然而, 尽管本研究的样本量较小, 但其人口统计学特征与大样本 FMS 相似。例如, 根据美国风湿病学会标准诊断的 258 例患者样本(女性占 92%, 平均年龄 55 岁, 87% 为非拉丁美洲白人)以及 10129 例 FMS 样本(女性占 63%, 平均年龄 46 岁, 种族未报道)与本研究的人口统计学特征相似。本研究的另一个局限性在于, 未明确皮肤活检及自主神经功能测试的敏感性和特异性。由于 SFPN 尚无诊断金标准, 所以两项检查的敏感度及特异度无从考量, 只能相互作为参照。尽管现有的最有效测试手段仍不完美, 但本研究中 13% 的对照者检出 AFT 结果异常(多为倾斜试验结果异常), 这与普通人群直立性低血压的发生率一致。本研究结果发现, 皮肤活检作为检测晚期轴突变性的手段, 在对照组中的特异度为 97%。本研究还有一个局限性在于, 我们

没有检查受试者是否存在其他类型的神经病变, 如脱髓鞘性多发性神经病、运动或大纤维感觉神经轴突病变、局灶性病变以及听觉神经病变等。大多数神经病变病例中, 不同类型的神经元均可受到不同程度的影响。尤其在严重或长期慢性病例中, 大纤维运动或感觉神经病变并不能成为排除并存小纤维多神经病变的依据。

总之, 本研究证实, FMS 样本中有近一半患者的 CWP 及其它症状存在神经性病病因——SFPN。SFPN 患者的血液检验结果显示, 年轻 SFPN 患者的病因(如免疫异常、遗传和感染)较成年 SFPN 患者的病因(如糖尿病、癌症、维生素缺乏和毒素)更常见, 同时我们还发现了一些可治疗或治愈的病因, 如丙型肝炎。今后, FMS 患者也许需要和他们的主治医生讨论, 进行 SFPN 及病因学检查是否有助于 FMS 的诊断和治疗。

(Anne Louise Oaklander, *Pain*, 2013, 154:2310 ~ 2316, 李银桥译, 罗艳校)