

硫化氢通过 Nrf2/HO-1 对神经病理性疼痛的调控作用

田礼华¹, 韩焕芝², 张 杨³, 谢克亮³, 陈红光³

摘要 目的: 探讨 Nrf2/HO-1 在硫化氢减轻神经病理性疼痛中的调控作用。方法: 选择雄性 SD 大鼠 64 只, 采用随机数字表法随机分为对照组 (Con 组)、神经病理性疼痛组 (SNL 组)、神经病理性疼痛+NaHS 组 (SNL+NaHS 组) 和神经病理性疼痛+NaHS+Nrf2 siRNA 组 (SNL+siRNA+NaHS 组) 4 组。神经病理性疼痛模型采用脊神经结扎法 (SNL) 完成。Con 组、SNL 组和 SNL+NaHS 组接受处理后 7 d, 收集各组大鼠脊髓膨大处, 部分组织进行核蛋白和 RNA 的提取进行 Nrf2 的检测, 部分组织进行免疫荧光 IBA1 和 Nrf2 的共定位检测。4 组大鼠在给予处理后的 1、2、3、5 和 7 d 进行行为学的检测, 结束后收集大鼠脊髓膨大处进行 IBA1、Nrf2 和 HO-1 蛋白的检测, 部分组织匀浆进行炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 的检测。结果: 与 Con 组比较, SNL 大鼠机械痛敏减少, 热痛敏缩短, Nrf2 核蛋白和 mRNA 表达增加, 免疫荧光结果 Nrf2 和 IBA1 蛋白表达及共定位表达增加, 总蛋白 IBA1、Nrf2 和 HO-1 蛋白表达增加, TNF- α 和 IL-1 β 表达增加; 与 SNL 组相比, SNL+NaHS 组机械痛敏增加, 热痛敏延长, Nrf2 核蛋白和 mRNA 表达进一步增加, 免疫荧光结果示 Nrf2 和 IBA1 蛋白表达及共定位表达进一步增加, 总蛋白 IBA 蛋白表达减少, Nrf2 和 HO-1 蛋白表达进一步增加, TNF- α 和 IL-1 β 表达减少; 与 SNL+NaHS 组比较, SNL+siRNA+NaHS 组机械痛敏减少, 热痛敏缩短, 总蛋白 IBA1 蛋白表达增加、Nrf2 和 HO-1 蛋白表达减少, TNF- α 和 IL-1 β 表达增加。结论: NaHS 对 SNL 导致的神经病理性疼痛小胶质细胞的激活, 是通过调节 Nrf2/HO-1 信号通路实现的。

关键词: 神经病理性疼痛; 小胶质细胞; 硫化氢

中图分类号: R741.02 文献标识码: A 文章编号: 1007-6948(2019)02-0123-05

doi: 10.3969/j.issn.1007-6948.2019.02.001

Regulation of Neuropathic Pain by H₂S via Nrf2/HO-1 Pathway TIAN Li-hua, HAN Huan-zhi, ZHANG Yang, et al. *Department of Pain, Wuqing Hospital of Traditional Chinese Medicine of Tianjin City, Tianjin (301700), China*

Abstract: Objective To investigate the regulated role of Nrf2/HO-1 on H₂S alleviating the microglia activation in neuropathic pain in rats. **Methods** Sixty-four adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups: control group (group Con, $n=16$), neuropathic pain group (group SNL, $n=16$), neuropathic pain+NaHS group (group SNL+NaHS, $n=16$) and neuropathic pain+NaHS+Nrf2 siRNA group (SNL+siRNA+NaHS, $n=16$). The animal model of neuropathic pain was performed by spinal nerve ligation (SNL). The L5-6 spine cords were collected for the detection of Nrf2 protein and Nrf2 mRNA by Western blotting and RT-PCR and IBA1 and Nrf2 co-location by immunofluorescence after 7 d of administration in group Con, group SNL and group SNL+NaHS. After 1, 2, 3, 5 and 7 d of operation, MWT and TWL were measured, and after detection of behavioristics, the L5-6 spine cords were collected for the detection of IBA1, Nrf2 and HO-1 protein by Western blotting and cytokines TNF- α and IL-1 β by ELISA. **Results** Compared with group Con, MWT and TWL were reduced, Nrf2 nucleoprotein and mRNA, co-location of Nrf2 and IBA1 expression, total protein IBA1, Nrf2 and HO-1, and cytokines TNF- α and IL-1 β were increased in group SNL; compared with group SNL, MWT and TWL were improved in group SNL+NaHS; compared with group SNL+NaHS, MWT and TWL

were reduced, Nrf2 nucleoprotein and mRNA, the co-location of Nrf2 and IBA1 expression, total protein Nrf2 and HO-1, were reduced, and total protein IBA1, cytokines TNF- α and IL-1 β were increased in group SNL+NaHS+siRNA. **Conclusion** NaHS

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81601667)

1. 天津市武清区中医院疼痛科 (天津 301700)

2. 山东德州市人民医院麻醉科 (德州 253014)

3. 天津医科大学总医院麻醉科 (天津 300054)

通信作者: 谢克亮, E-mail: daguang521521@163.com

could alleviate the microglia activation by Nrf2/HO-1 pathway in neuropathic pain.

Key words: Neuropathic pain; microglia; H₂S

神经性疼痛是由周围神经系统或中枢神经系统的原发性损伤或功能障碍引起的,其临床表现以触诱发痛和痛觉过敏为主要特征,在人群中的患病率为 8%^[1]。周围神经损伤后的一系列症状和体征引起周围神经敏化,导致伤害性感受活动增强,疼痛阈值降低^[2]。炎症反应在神经病理性疼痛的发病过程中发挥重要的作用。神经病理性疼痛是一种神经免疫疾病,免疫和神经胶质细胞的激活导致受损神经中炎症因子的释放。核因子- κ B (nuclear factor, NF- κ B) 相关因子 2 (related factor 2, Nrf2) 是一种碱性亮氨酸拉链氧化还原敏感转录因子,是编码 II 期解毒/抗氧化酶基因表达的主要转录调控因子,其下游编码的蛋白包括血红素加氧酶-1 (HO-1) 等。据报道,Nrf2/HO-1 通路在脂多糖 (LPS) 诱导的巨噬细胞炎症反应中发挥重要调控作用^[3]。硫化氢作为一种医用治疗气体,在一系列疾病当中发挥重要调控作用,如高血压、炎症、心力衰竭等^[4]。研究报道,硫化氢通过减轻周围神经损伤炎症反应,改善神经病理性疼痛导致的痛觉过敏^[5]。本实验拟在上述理论基础上,通过对神经病理性疼痛大鼠研究,探讨硫化氢对脊神经结扎 (spinal nerve ligation, SNL) 大鼠小胶质细胞激活的影响,及其 Nrf2 信号通路在这一过程中的调控作用

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型制备 选择雄性 SD 大鼠 64 只,体质量 200~250 g,购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心。饲养在室温 20~25 °C 的 SPF 级动物房,自由进食水,适应环境 1 周。采用随机数字表法随机分为 4 组:对照组 (Con 组)、神经病理性疼痛组 (SNL 组)、神经病理性疼痛 +NaHS 组 (SNL+NaHS 组) 和神经病理性疼痛 +NaHS+Nrf2 siRNA 组 (SNL+siRNA+NaHS 组)。神经病理性疼痛模型采用 SNL 完成。参考文献 [6] 方法,动物俯卧位,腰背部皮肤消毒,钝性分离,暴露左侧腰椎。分离 L₅ 神经,用 4-0 丝线用力结扎,远端剪断神经后逐层缝合。术毕肌肉注射青霉素,预防感染。手术后继续喂养至术后第 7 d。

1.2 行为学 每组分别于 SNL 模型建立后 1、2、3、5 和 7 d 测定机械刺激缩足反应阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT) 和热缩足潜伏期

(thermal withdrawal latency, TWL)。

机械刺激缩足反应阈值:参考文献 [7],用 Von-Frey 纤维法进行机械痛阈检测。将大鼠放于透明玻璃笼中,玻璃底部有小孔。适应环境后,用不同力度值的 von-Frey 纤维丝 (Stoehing 公司,美国) 刺激大鼠左后爪足底,刺激力度以 von Frey 纤维丝轻微弯曲为准,直至出现缩足反应。缩足反应为阳性,记录力度为痛阈值,通过“up-and-down”的方法计算。

热缩足潜伏期:参考文献 [7],大鼠适应 30 min,使用热痛刺激仪 (UGO 公司,意大利),照射大鼠后足掌正中,自动记录缩足反应的潜伏期作为热痛阈。持续时间为 20 s 以内,以免造成足底损伤。每只大鼠测定 5 次,取 5 次平均值作为 TWL。

1.3 鞘内置管及 siRNA 处理 采用 Yaksh 法稍作修改行鞘内置管^[8]。麻醉,背部皮肤消毒。于 L₃~L₄ 椎间隙为穿刺点,向尾端蛛网膜下腔置入 PE-10 导管 2 cm。观察大鼠尾巴摆动及清亮脑脊液从导管内缓慢流出,为穿刺成功。固定导管,缝合伤口。出现肢体运动障碍者剔除。SNL+siRNA+NaHS 组鞘内转染试剂 2 μ g siRNA-NLRP3 加入 10 MI DEPC 水 +5 μ L Lipofectamine,进行鞘内注射。Nrf2 的 siRNA 序列由上海吉玛生物合成,Nrf2 siRNA 正义链 5'-AGAUUUAGAUCUAAUUGAAATT-3',反义链 5'-UUUCAAUUGAUCUAAAUCUTG-3'。

1.4 标本收集及准备 Con 组、SNL 组和 SNL+NaHS 组接受处理后 7 d,收集各组大鼠脊髓膨大处,部分组织进行核蛋白和 RNA 的提取进行 Nrf2 的检测,部分组织包埋进行免疫荧光 IBA1 和 Nrf2 的共定位检测。Con 组、SNL 组、SNL+NaHS 组和 SNL+siRNA+NaHS 组,给予处理后的 1、2、3、5 和 7 d 进行行为学的检测,于第 7 d 收集大鼠脊髓膨大处,进行蛋白的检测,部分组织匀浆,进行炎症因子的检测。

1.5 Western blotting 检测 采用 Western-blotting 法检测大鼠脊髓中蛋白的表达水平。蛋白经过 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离,转模到 PVDF 膜上。在室温下 5% 脱脂奶粉进行封闭 2 h,加入 Histone、Nrf2、IBA1、HO-1 和 β -actin 特异性一抗 (稀释比 1:200~1:1000,Abcam,美国),4 °C

孵育过夜。洗膜后，给予辣根过氧化物酶连接的二抗（稀释比 1:5000，北京中杉金桥公司）室温孵育 1 h。洗膜，用 ECL 液显色曝光。以相应的条带灰度值与内参条带灰度值之比作为结果对比。

1.6 RT-PCR 检测 脊髓组织经过 DEPC 水处理过，经过 Trizol、氯仿、异丙醇、75% 乙醇处理，得到总 RNA。进行逆转录合成 cDNA，然后扩增引物。参数为 95 °C 2 min, 95 °C 15 s, 52 °C 20 s, 60 °C 40 s, 45 个循环。读取 Ct，按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算出相对含量。大鼠 Nrf2 上游引物 5'GTGCCTTDAGTGTGCTTCTG-3'，下游引物 5'TCCTCTGCTGCCATTAGTCA-3'，以 GAPDH 为参照物，上游引物为 5'TCACCATCTTCCAGGAGCGAG-3'，下游引物 5'TGTCGCTGTTGAAGTCAGAG-3'。

1.7 免疫荧光 收集脊髓组织，进行冰冻切片，PBS 漂洗 3 次，室温封闭 2 h。IBA1 和 Nrf2 一抗（稀释比 1:200）4 °C 过夜，漂洗 3 次，FITC 对应二抗室温避光孵育 2 h。漂洗 3 次，DAPI 染色 5 min，漂洗，封片，荧光显微镜观察并拍照。

1.8 ELISA 检测 采用 ELISA 法检测 TNF- α 和 IL-1 β 的浓度，严格按照试剂盒（武汉博士德生物工程有限公司）说明书要求进行。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析。正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD 检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 Nrf2 核蛋白和 mRNA 表达情况 与 Con 组比较，SNL 大鼠 Nrf2 核蛋白和 mRNA 表达增加；与 SNL 组相比，SNL+NaHS 组 Nrf2 核蛋白和 mRNA 表达进一步增加，与 SNL+NaHS 组比较，SNL+siRNA+NaHS 组 Nrf2 蛋白表达减少。见图 1 和图 2。

2.2 各组 Nrf2 和 IBA1 蛋白表达情况 免疫荧光结果提示，与 Con 组比较，SNL 大鼠 Nrf2 和 IBA1 蛋白表达增加，且荧光结果显示 Nrf2 和 IBA1 重合表达增加；与 SNL 组相比，SNL+NaHS 组 Nrf2 和 IBA1 蛋白表达进一步增加，且荧光结果显示 Nrf2 和 IBA1 重合表达也进一步增加。见图 3。

2.3 各组 IBA、HO-1 蛋白表达 与 Con 组比较，SNL 大鼠 IBA 和 HO-1 蛋白表达增加；与 SNL 组相比，SNL+NaHS 组 IBA 蛋白表达减少和 HO-1

蛋白表达进一步增加；与 SNL+NaHS 组比较，SNL+siRNA+NaHS 组 IBA 蛋白表达增加和 HO-1 蛋白表达减少。见图 2。

2.4 模型建立后不同时间点大鼠行为学变化 与 Con 组比较，SNL 大鼠 MWT 减少，TWL 缩短；与 SNL 组相比，SNL+NaHS 组 MWT 增加，TWL 延长；与 SNL+NaHS 组比较，SNL+siRNA+NaHS 组 MWT 减少，TWL 缩短。见图 4。

2.5 各组 TNF- α 和 IL-1 β 表达情况 与 Con 组比较，SNL 大鼠 TNF- α 和 IL-1 β 表达增加，；与 SNL 组相比，SNL+NaHS 组 TNF- α 和 IL-1 β 表达减少；与 SNL+NaHS 组比较，SNL+siRNA+NaHS 组 TNF- α 和 IL-1 β 表达增加。见图 5。

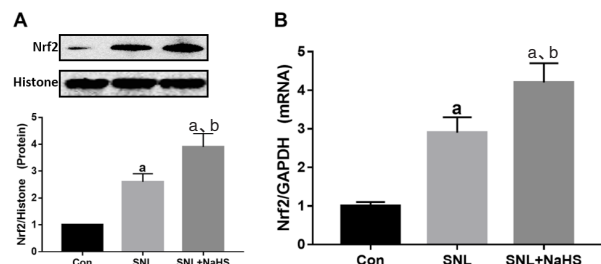


图 1 3 组大鼠 Nrf2 核蛋白和 mRNA 的表达变化

注：与 Con 组比较，^a $P < 0.001$ ；与 SNL 组比较，^b $P < 0.001$

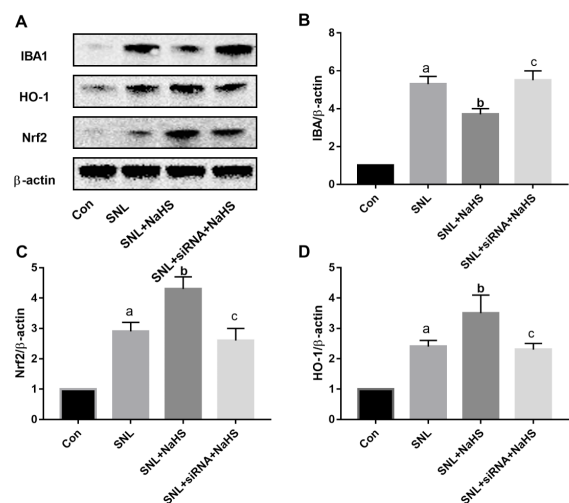


图 2 4 组大鼠脊髓组织 IBA1, Nrf2 和 HO-1 蛋白表达的比较

注：与 Con 组比较，^a $P < 0.001$ ；与 SNL 组比较，^b $P < 0.05$ ；与 SNL+NaHS 组比较，^c $P < 0.001$

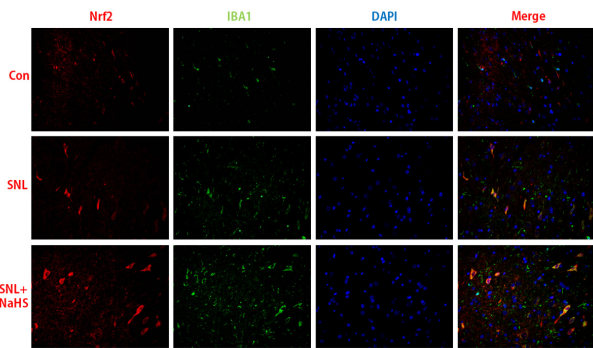


图 3 3 组大鼠脊髓背角免疫荧光 Nrf2 和 IBA1 表达变化的比较

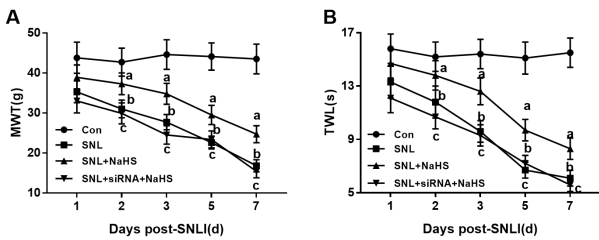


图 4 4 组大鼠行为学变化的比较

注：与Con组比较，^a $P < 0.001$ ；与SNL组比较，^b $P < 0.05$ ；与SNL+NaHS组比较，^c $P < 0.001$

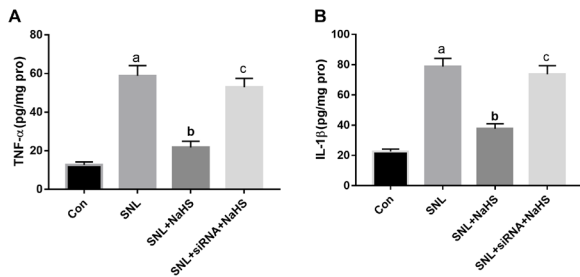


图 5 4 组大鼠脊髓组织 TNF- α 和 IL-1 β 表达的比较

注：与Con组比较，^a $P < 0.001$ ；与SNL组比较，^b $P < 0.05$ ；与SNL+NaHS组比较，^c $P < 0.001$

3 讨论

初级神经损伤引起的脊髓神经免疫和神经炎症活动增强，会导致并维持神经病理性疼痛的存在。外周神经受损可导致异常的免疫应答，导致外周或中枢神经系统过度的神经炎症。来自受损轴突发出的一种尚未确定的信号会激活细胞外信号调节激酶，即施万细胞中的丝裂原激活蛋白激酶信号通路，这是引发炎症介质过度表达和向受损神经招募免疫细胞的主要过程之一^[9]。据报道，神经性疼痛不仅可以诱发神经元激活，而且还可进一步激活免疫细胞的活性，如小胶质细胞激活^[10-12]。神经性疼痛治疗的目标为炎症反应，而小胶质细胞则为炎症介质释放主要效应器之一^[13]。本研究结果提示，SNL 可诱发神经免疫细胞—小胶质细胞的激活，表现为其标志物 IBA1 表达增加，小胶质细胞激活释放过量的炎症介质，TNF- α 和 IL-1 β 表达增加。这些促炎症介质的释放可调节神经元兴奋性和突触功能，致感觉系统的中枢和外周神经敏化^[14]。

研究发现，Nrf2 系统的激活与炎症反应关系密切^[15]。Nrf2 不仅对内源性防御系统各种细胞应激具有重要的调节作用，而且还被认为是脑损伤中调控炎症的重要调节因子^[15]。Nrf2 在神经系统中广泛的表达，并且在急性脑损伤和神经退行性疾病中发挥重要的调控作用^[16]。Nrf2 在受到有害刺激后发生胞浆到胞核的转位，与位于核内的 ARE 结合，调控下游蛋白的表达。因此，本实验也进行了脊髓组织 Nrf2 和其下游蛋白 HO-1 的表达变化，发现 SNL 导致 Nrf2 核内蛋白和 mRNA 表达增加，其下游蛋白 HO-1 表达增加，证明 Nrf2/HO-1 系统在脊髓组织中被激活。

NaHS 作为 H₂S 的传递载体，被广泛应用于医学研究^[17-18]。研究报道，H₂S 可抑制由炎症介质诱发的小胶质细胞的激活，减少炎症介质 TNF- α 、IL-6 和 CCL2 的表达。本研究结果与上述结论一致。NaHS 可以增加 SNL 大鼠脊髓组织 Nrf2 和其下游 HO-1 的表达，减少小胶质细胞的激活，减少炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 的表达，从而神经免疫炎症反应，进一步的可以改善大鼠机械痛敏和热痛敏，发挥对神经免疫反应和中枢敏化的保护作用。为了进一步研究 NaHS 对神经痛的调控作用是否通过激活 Nrf2 通路，本实验采用 siRNA 抑制 Nrf2 的表达。结果提示，抑制 Nrf2 表达之后，NaHS 失去了对炎症因子和痛敏的改善作用，不能

对神经免疫反应和中枢敏化进行调控。由此可见, NaHS 对神经病理性疼痛的保护作用是通过激活体内 Nrf2/HO-1 通路发挥作用的。

综上所述, NaHS 可以激活 Nrf2 通路, 增加 Nrf2 和 HO-1 的表达, 且 NaHS 对 SNL 导致的神经病理性疼痛小胶质细胞的激活是通过调节 Nrf2/HO-1 信号通路实现的。

参考文献:

- [1] Gilron I, Baron R, Jensen T. Neuropathic pain: principles of diagnosis and treatment[J]. Mayo Clin Proc, 2015,90(4):532-545.
- [2] Jaggi AS, Singh N. Role of different brain areas in peripheral nerve injury-induced neuropathic pain[J]. Brain Res, 2011,1381:187-201.
- [3] Jhang JJ, Cheng YT, Ho CY, et al. Monosodium urate crystals trigger Nrf2- and heme oxygenase-1-dependent inflammation in THP-1 cells[J]. Cell Mol Immunol, 2015,12(4):424-434.
- [4] Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed[J]. Physiol Rev, 2012,92(2):791-896.
- [5] Kida K, Marutani E, Nguyen RK, et al. Inhaled hydrogen sulfide prevents neuropathic pain after peripheral nerve injury in mice[J]. Nitric Oxide, 2015,46:87-92.
- [6] Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat[J]. Pain, 1992,50(3):355-363.
- [7] Chen Y, Chen H, Xie K, et al. H₂ Treatment Attenuated Pain Behavior and Cytokine Release Through the HO-1/CO Pathway in a Rat Model of Neuropathic Pain[J]. Inflammation, 2015,38(5):1835-1846.
- [8] Xu F, Li T, Zhang B. An improved method for protecting and fixing the lumbar catheters placed in the spinal subarachnoid space of rats[J]. J Neurosci Methods, 2009,183(2):114-118.
- [9] Napoli I, Noon L A, Ribeiro S, et al. A central role for the ERK-signaling pathway in controlling Schwann cell plasticity and peripheral nerve regeneration in vivo[J]. Neuron, 2012,73(4):729-742.
- [10] Rojewska E, Popiolek-Barczyk K, Jurga AM, et al. Involvement of pro- and antinociceptive factors in minocycline analgesia in rat neuropathic pain model[J]. J Neuroimmunol, 2014,277(1-2):57-66.
- [11] Popiolek-Barczyk K, Kolosowska N, Piotrowska A, et al. Parthenolide Relieves Pain and Promotes M2 Microglia/Macrophage Polarization in Rat Model of Neuropathy[J]. Neural Plast, 2015,2015:676473.
- [12] Dominguez E, Rivat C, Pommier B, et al. JAK/STAT3 pathway is activated in spinal cord microglia after peripheral nerve injury and contributes to neuropathic pain development in rat[J]. J Neurochem, 2008,107(1):50-60.
- [13] Popiolek-Barczyk K, Mika J. Targeting the Microglial Signaling Pathways: New Insights in the Modulation of Neuropathic Pain[J]. Curr Med Chem, 2016,23(26):2908-2928.
- [14] Ellis A, Bennett DL. Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain[J]. Br J Anaesth, 2013,111(1):26-37.
- [15] Innamorato NG, Rojo AI, Garcia-Yague AJ, et al. The transcription factor Nrf2 is a therapeutic target against brain inflammation[J]. J Immunol, 2008,181(1):680-689.
- [16] Rojo AI, Innamorato NG, Martin-Moreno AM, et al. Nrf2 regulates microglial dynamics and neuroinflammation in experimental Parkinson's disease[J]. Glia, 2010,58(5):588-598.
- [17] Wang R. Hydrogen sulfide: the third gasotransmitter in biology and medicine[J]. Antioxid Redox Signal, 2010,12(9):1061-1064.
- [18] Kimura H. Hydrogen sulfide: from brain to gut[J]. Antioxid Redox Signal, 2010,12(9):1111-1123.

(收稿: 2019-01-07 修回: 2019-03-13)

(审理专家: 于泳浩)

论 著 | 基础研究

胃肠道神经内分泌肿瘤的影像学表现与病理分级

周 冰¹, 苏 刚², 李 斌¹, 王省白¹

摘要 目的: 探讨胃肠道神经内分泌肿瘤的影像特征并预测病理分级的价值。**方法:** 回顾分析 14 例胃肠道神经内分泌肿瘤患者的影像学表现及临床资料。将肿瘤的病理分级分为神经内分泌瘤 NET 组 (包括 G1 级、G2 级) 及神经内分泌癌 NEC 组 (G3 级)。根据肿瘤的 CT 及 MRI 表现, 分析两组之间差别。**结果:** 肿瘤位于食管 1 例, 胃 2 例, 小肠 4 例, 阑尾 2 例, 结肠 3 例, 直肠 2 例。NET 组 10 例中 G1 级 6 例, G2 级 4 例; NEC 组 G3 级 4 例。**结论:** 胃肠道神经内分泌肿瘤有一定的影像学特征, 肿瘤大小、形状、边缘、均质程度、外侵和转移等可以在术前预测其病理分级。

1. 浙江省嘉兴市中医医院放射科 (嘉兴 314000)

2. 浙江省嘉兴市第二医院放射科 (嘉兴 314000)

通信作者: 王省白, E-mail: wsb6344@163.com