论著

文章编号:1000-5404(2007)08-0658-05

福尔马林致痛大鼠脊髓去甲肾上腺素能神经元及其激活蛋白2α的表达变化

汪克建,孙善全,贺桂琼,陈 海,余维华 (重庆医科大学基础医学院神经生物学实验室,重庆 400016)

提 要: 目的 观察疼痛应激时,脊髓去甲肾上腺素(noradrenaline, NA)能神经元的形态、分布、数量和激活蛋白2α(AP-2α)的表达变化,以探讨NA参与痛觉调制的分子机制。**方法** 应用免疫组化、免疫荧光双标、Western blotting和计算机图像分析方法检测福尔马林诱导致痛模型大鼠脊髓多巴胺-β-羟化酶(dopamine-β-hydroxylase, DBH)和AP-2α的表达变化。**结果** 正常脊髓内NA能神经元主要分布于脊髓前角,模型鼠脊髓前角、中间带和后角均出现大量深染的DBH阳性神经元,3 d时达到高峰,至第7天时DBH阳性神经元数有所下降,但仍高于正常水平。图像分析和统计学分析表明,DBH阳性神经元的数量和染色强度明显增加,与对照组相比具有显著性差异($P<0.05$);Western blotting结果证实DBH不同时段的表达变化规律与上述形态学变化一致。AP-2α的表达变化与DBH的表达变化规律具有显著的相似性。免疫荧光双标显示DBH和AP-2α共存于脊髓神经元内。**结论** 在疼痛等应激状态下,脊髓前角NA能神经元内DBH表达明显增强;且中间带和后角新出现大量DBH阳性神经元,推测这些区域内一些神经元可能发生了化学性质的改变,由非NA能神经元转化为NA能神经元;而上述区域内AP-2α表达随着DBH表达增强而增加,提示NA与AP-2α在痛觉的调制和调控中发挥重要作用。

关键词: 多巴胺β羟化酶;激活蛋白2α;大鼠致痛模型;脊髓;神经元可塑性

中图法分类号: R322.81; R338.3; R441.1 **文献标识码**: A

Changes of dopamine-beta-hydroxylase and activator protein-2α expression in spinal cord of formalin-induced rat pain model

WANG Ke-jian, SUN Shan-quan, HE Gui-qiong, CHEN Hai, YU Wei-hua (Department of Neurobiology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of dopamine-β-hydroxylase (DBH) and activator protein 2-α (AP-2α) expression in spinal cord under the condition of stress or pain stimulation, so as to explore the mechanism for changes of noradrenergic (NA) neurons in the spinal cord of rat pain model. **Methods** Immunohistochemical staining, double immunofluorescent staining, Western blotting and computing-image analysis system were used to detect the changes of DBH/AP-2α expression in the spinal cord of formalin-induced rat pain model. **Results** A small number of DBH-positive neurons were sparsely distributed in the ventral horn of the normal spinal cord, while in the formalin-treated group, much more darkly-stained DBH-positive neurons appeared primarily in the ventral horn, intermediate zone, and the dorsal horn, which reached the highest level on day 3 after formalin-injection. The grey value and number of DBH-positive neurons on day 7 after injection began to decrease, but still higher than that in the control group. Compared with control group, the number of noradrenergic neurons in spinal cord of formalin-treated rat was increased significantly, which was also confirmed by Western blotting. Double immunofluorescent staining showed that DBH and AP-2α co-existed in the cells of the spinal cord. The changes of AP-2α expression were similarly to that of DBH in the spinal cord of rat pain model. **Conclusion** Our results indicated that some non-noradrenergic neurons with different chemical properties might convert into noradrenergic neurons under pain stimulation; noradrenaline may be involved in the formalin-induced pain and behavior regulation; As one of transcription factors, AP-2α may promote the DBH synthesis.

Key words: dopamine-β-hydroxylase; activator protein 2α; rat pain model; spinal cord; neuronal plasticity

基金项目:国家自然科学基金(30270437),教育部博士点基金(2003)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30270437) and the Doctorial Foundation by Ministry of Education (2003)

作者简介:汪克建(1971-),男,重庆市人,博士研究生,讲师,主要从事神经生物学方面的研究。电话:15923327093

通讯作者:孙善全,电话:(023)68485763, E-mail: sunsq2151@sohu.com

收稿日期:2006-10-18;**修回日期**:2007-03-05

疼痛是一种与组织损伤和潜在损伤相关的不愉快的主观感觉和情感体验。近 20 年来，随着生命科学的迅猛发展，有关疼痛与镇痛的基础和临床研究也取得了长足的进步。研究表明，在痛觉的调制过程中，去甲肾上腺素（noradrenaline，NA）发挥了非常重要的作用。哺乳动物脊髓内广泛存在 NA 能神经纤维，其末稍释放 NA，对痛觉、躯体自主功能和运动等有着重要的调节作用。多巴胺-β-羟化酶（dopamine-β-hydroxylase，DBH）是酪胺酸生成 NA 的催化酶，为 NA 能神经元的标志酶[1]。DBH 免疫反应阳性不仅可以确定 NA 能神经元的性质、分布，而且在一定程度上可根据免疫阳性产物量的多少及染色深浅来确定 NA 能神经元内 DBH 水平、NA 含量及其变化；实验研究表明，AP-2 对 NA 合成过程具有明显的调节作用[2,3]。本研究在制作福尔马林诱导的致痛模型基础上，运用免疫组化（IHC）、免疫荧光双标染色和 Western blotting 等技术，研究在疼痛等应激状态下，脊髓内 DBH 和 AP-2α 的表达变化，以期为疼痛的调制机制提供形态学依据，并为 NA 的表达调控提供实验基础。

1　材料与方法

1.1　主要试剂

兔抗鼠 DBH 抗体、AP-2α 抗体购自美国 Santa Cruz 公司，HRP 标记的羊抗兔 IgG、DAB 显色试剂盒、免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物工程公司，组织细胞裂解液购自碧云天生物有限公司。

1.2　动物分组及模型制备

成年健康 Wistar 大鼠 60 只，雌雄不拘，体质量 200～250 g，由本校实验动物中心提供。用随机数字表法分为对照组和实验组，实验组 50 只（各时间点 10 只）；对照组动物 10 只（各时间点 2 只）。按照 Dubuisson 等[4] 的方法，实验组动物在右侧后肢趾部皮下注射 3% 福尔马林 0.1 ml，参照 Mestre 等[5] 分级评分法，进行模型评估，合格的动物进入下一步实验；对照组注射等量的生理盐水，分别于注射后 1、6、24 h 和 3、7 d 取材。对照组和实验组动物分为 2 组，分别用于免疫组化和 Western blotting 检测。

1.3　疼痛行为学评分

方法采用 Mestre 等[5] 分级评分法分为 0～3 级。0 级：注射足无疼痛改变（足可平放在地面，趾伸展）；1 级：注射足只能少量或不能承受重力；2 级：注射足抬起，完全不能与地面接触；3 级：注射足舔拭、咬、抽动。于致痛后第 1 小时内每隔 5 min 及 3 h 和 24 h 观察动物反映，并记录评分，行为学评分低于 2 级的动物模型表明造模不成功，不进入下述实验步骤。

1.4　取材及切片

实验组动物（各时间点 5 只）和对照组动物（各时相点 1 只）在各时间点用 3% 的异戊巴比妥钠（200 mg/kg）经腹腔麻醉后，打开胸腔，200～300 ml 生理盐水（4 ℃）经左心室快速灌流冲洗血液，再用 400～500 ml 4% 多聚甲醛（4 ℃，pH 7.4，0.1 mol/L PBS 配制）行灌注固定 1 h。取完整脊髓放入相同固定液后固定 4 h（4 ℃），移入 20% 蔗糖过夜脱水（4 ℃），待组织沉底后，取 L_4～T_9、T_8～T_1、C_8～C_1，用冰冻切片机作连续冠状切片，片厚20 μm，每 2 张切片为 1 组，分别贴于 2 组经 APES 处理的载玻片上，用做 DBH 和 AP-2α 的免疫组化。

1.5　免疫组化染色

切片经 PBS 漂洗 30 min，0.3% 甲醇-H_2O_2，10～15 min，0.1 mol/L PBST 漂洗 10 min × 3 次；山羊血清封闭 20 min（37 ℃），适当稀释的一抗（DBH 1∶3 000 或 AP-2α 1∶400），4 ℃孵育过夜，0.1 mol/L PBS 漂洗 15 min ×3 次，二抗（生物素标记的羊抗兔 IgG）90 mim，37 ℃，0.1 mol/L PBS 漂洗 15 min × 3 次，1∶100 链霉素－生物素－抗生物素－辣根过氧化酶复合物（SABC）37 ℃，60 min，0.1 mol/L PBS 漂洗 15 min × 3 次，用含镍盐的 3，3′－二氨基联苯胺（DAB 显色剂配方：0.035% DAB，2.5% 硫酸镍铵，0.003% H_2O）显色 10 s 左右，光镜下控制显色时间，蒸馏水终止显色，逐级乙醇脱水，二甲苯梯度透明，中性树脂封片，光镜下观察。空白对照采用 PBS 代替一抗进行孵育。

1.6　免疫荧光双重标记

切片经 PBS 漂洗；山羊血清封闭 20 min，37 ℃，适当稀释的一抗（DBH 1∶3 000），4 ℃孵育过夜，PBS 漂洗，二抗（FITC 标记的羊抗兔 IgG）90 mim，37 ℃，PBS 漂洗，5% 山羊血清 + 3% 小牛血清白蛋白封闭 4 h，适当稀释的一抗（AP-2α 1∶400），4 ℃孵育过夜，PBS 漂洗，二抗（Cy3 标记的羊抗兔 IgG）90 mim，37 ℃，PBS 漂洗，水溶性封片剂封片，激光共聚焦显微镜下观察。空白对照采用 PBS 代替一抗进行孵育。

1.7　Western blotting 检测

实验组动物（各时间点 5 只）和对照组动物（各时间点 1 只）于相应时间点麻醉动物后，迅速取出脊髓，用细胞裂解液提取蛋白，Bradford 方法测蛋白浓度，取等量蛋白样品，SDS-PAGE 电泳分离蛋白，半干转移将蛋白条带转移至 PVDF 膜上，50 g/L 脱脂奶粉封闭 3 h，一抗（1∶200 的兔抗鼠 DBH 及 1∶200 兔抗鼠 AP-2α，内参为 1∶50 的兔抗鼠 β-actin）孵育过夜，4 ℃；1∶200的 HRP 标记的羊抗兔 IgG，37 ℃，2 h；DAB 法显色。利用北航 CM-2000B 型生物医学图像分析系统对染色条带进行测量，记录积分灰度值。

1.8　图像分析

随机选取每个动物脊髓颈段、胸段和腰段各 20 张切片，含前角、中间带和后角，在光镜下对每张切片 DBH 阳性神经元数量计数，并用北航 CM-2000B 型生物医学图像分析系统对 DBH 和 AP-2α 免疫组化切片进行平均灰度测量，去除背景，记录平均灰度值作为统计值。

1.9　统计学处理

所有数据用 $x \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行组间 t 检验。

2　结果

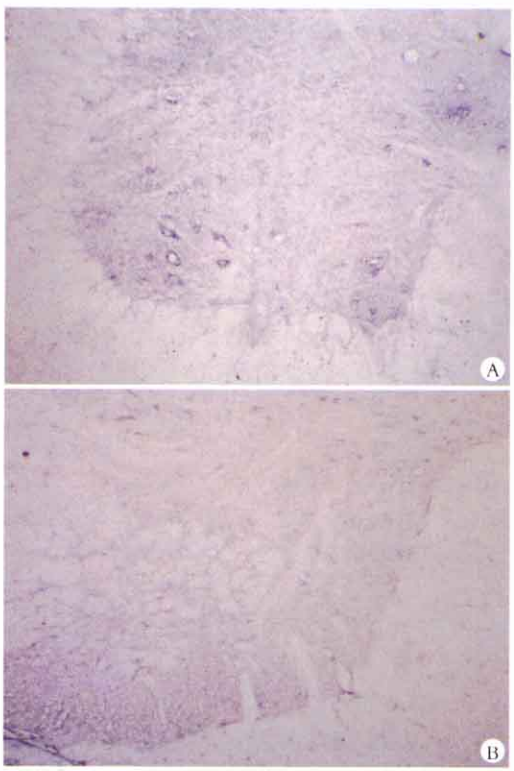
2.1　动物行为学观察

实验组动物注射福尔马林后，所有动物立即出现疼痛反

应，表现为舔咬注射足，并抬高注射足或者出现抽动。同时实验动物出现完整的两期伤害性反应：第1期伤害性反应出现在注射后头10 min，而第2期行为反应出现在注射后25 min后，动物行为反应更为明显，且持续时间较长。注射部位数分钟后出现红肿等炎性反应，炎性反应在注射后1～3 d为高峰，以后炎性反应逐渐减轻，到第7天时注射局部仍有明显的炎性反应，而正常对照组动物则无上述的行为和体表变化。

2.2 免疫组化染色结果

2.2.1 对照组 DBH阳性神经元分布在脊髓各节段前角，数量较少，平均(11±3)个，胞体大，直径24～30 μm，呈卵圆形或三角形，染色较浅，呈浅蓝黑色(图1A)；在DBH阳性神经元周围，分布有大量的DBH阳性纤维。而中间带和后角未见DBH阳性神经元，但有数量不等的DBH阳性纤维分布。在脊髓的前角、中间带和后角均可见AP-2α阳性神经元(图1B)。



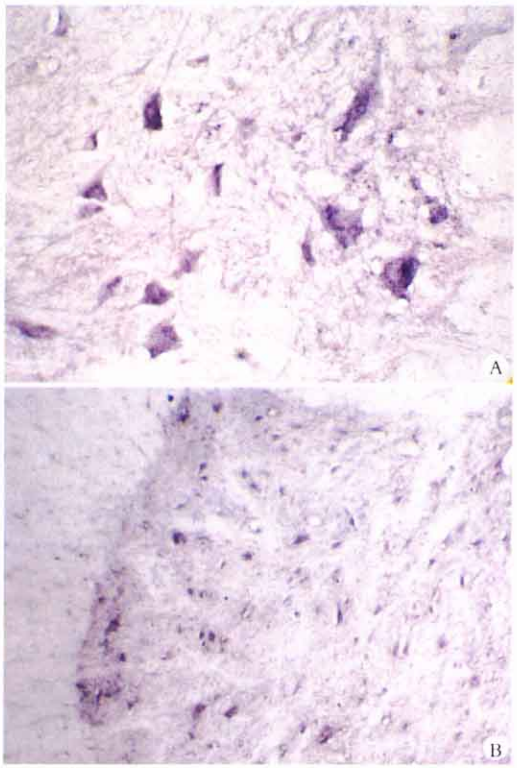
A：脊髓胸段前角；B：脊髓腰段后角及侧角

图1 对照组大鼠脊髓胸段前角、腰段后角及侧角免疫组化染色结果 (SABC ×200)

2.2.2 疼痛模型组 实验组大鼠脊髓各节段灰质各层神经元均有DBH表达，前角内可见DBH阳性神经元染色加强，数量增多，其胞体较大，直径为24～35 μm，呈圆形、三角形等多种形状(图2A)。后角各层可见以小细胞神经元为主的DBH阳性神经元分布，其直径为6～14 μm，形状主要为圆形或卵圆形；于中间带可见少量的DBH阳性神经元，其形状和大小与后角的DBH阳性神经元相似。AP-2α的表达范围和表达强度也明显增强(图2B)。

2.3 计算机图像分析及统计分析结果

分别取对照组和模型组脊髓颈段、胸段和腰段切片各20张，计数平均每张切片脊髓前角、中间带和后角内DBH阳性神经元数量及DBH和AP-2α蛋白表达的平均灰度值。具体数值见表1、2。



A：脊髓胸段前角；B：脊髓腰段

图2 实验组大鼠福尔马林致痛后3 d脊髓胸段前角及腰段免疫组化染色结果 (SABC ×200)

表1 大鼠脊髓后角、中间带、前角内DBH阳性神经元数量及平均灰度变化($x \pm s$)

组别	前角		中间带		后角	
	数量	平均灰度值	数量	平均灰度值	数量	平均灰度值
对照组	11±3	28±9	0±0	0±0	0±0	0±0
实验组						
1 h	23±6[a]	35±11[a]	21±4[a]	37±12[a]	26±5[a]	48±12[a]
6 h	27±5[a]	56±11[a]	30±6[a]	54±12[a]	32±7[a]	64±14[a]
24 h	33±7[a]	57±13[a]	34±11[a]	56±14[a]	36±12[a]	66±15[a]
3 d	36±5[a]	64±15[a]	38±8[a]	60±16[a]	40±9[a]	75±19[a]
7 d	26±4[a]	61±16[a]	30±7[a]	57±14[a]	32±8[a]	68±16[a]

a：$P<0.05$，与对照组比较

表2 大鼠脊髓灰质后角、中间带、前角内AP-2α阳性神经元平均灰度变化($x \pm s$)

组别	前角	中间带	后角
对照组	24±6	24±7	25±5
实验组			
6 h	36±8[a]	35±9[a]	37±7[a]
24 h	38±7[a]	41±11[a]	39±10[a]
3 d	46±12[a]	44±12[a]	47±13[a]
7 d	43±9[a]	39±11[a]	45±8[a]

a：$P<0.05$，与对照组比较

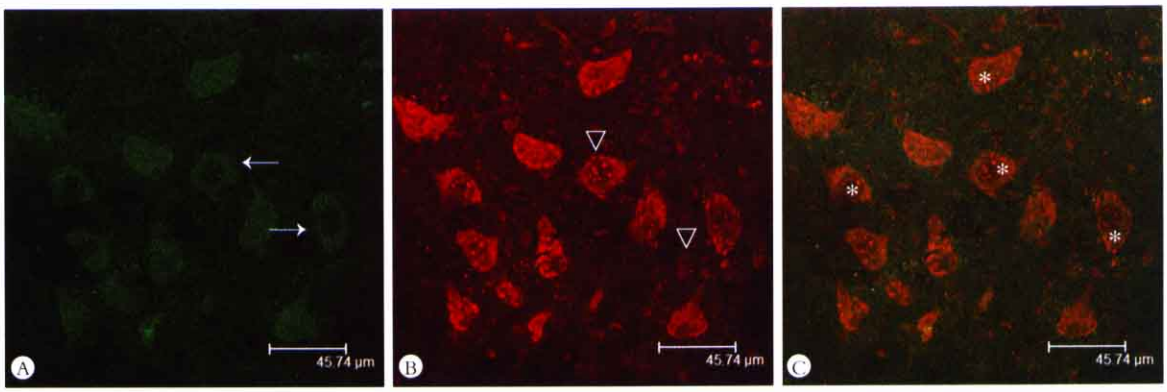
2.4 DBH和AP-2α在脊髓神经元中的共存

免疫荧光双标显示，DBH和AP-2α在脊髓内神经元均有

表达，DBH 表达阳性细胞均有 AP-2α 的表达，激光共聚焦显微镜下可以观察到 DBH 和 AP-2α 在神经元内有共存的情况（图 5）。

2.5　Western blotting 结果

从 5 个时间点获取的样本，在特定的位置均可见特异的免疫染色反应，将 Western blotting 目的条带与标准蛋白分子量相对比，DBH 目的条带的分子量为 78×10^3，AP-2α 目的条带的分子量为 47×10^3。福尔马林注射后各时间点，DBH 和 AP-2α 蛋白的表达量均增加，于 3 d 达到高峰，第 7 天时表达仍比正常为高（表 3）。



A：FITC 标记的 DBH 阳性神经元（↑）；B：Cy3 标记的 AP-2α 阳性神经元（△）；C：双标记的神经元（＊）

图 5　激光共聚焦显微镜观察福尔马林致痛后 3 d 大鼠脊髓腰段前角

表 3　福尔马林诱导疼痛大鼠脊髓腰段 DBH 和 AP-2α 蛋白检测结果（$x\pm s$）

组别	DBH	AP-2α	β-actin
实验组			
对照组	17.902 ± 0.649	21.004 ± 0.864	19.744 ± 0.708
1 h	24.214 ± 0.330[a]	22.801 ± 0.691[a]	19.610 ± 0.738
6 h	26.324 ± 0.065[a]	25.398 ± 0.149[a]	19.262 ± 0.106
24 h	30.324 ± 0.065[a]	27.312 ± 0.044[a]	19.926 ± 0.559
3 d	28.296 ± 0.656[a]	26.338 ± 0.117[a]	19.476 ± 0.622
7 d	25.502 ± 0.417[a]	24.971 ± 0.534[a]	19.361 ± 0.656

a：$P<0.05$，与对照组比较

3　讨论

疼痛是困扰人类的常见临床症状，疼痛的产生、调制以及镇痛一直是基础与临床的研究热点。福尔马林致痛模型可引起实验动物持续性躯体痛，是目前国内外以公认的可靠的动物疼痛模型，已普遍应用于疼痛机制研究及镇痛药物的评价。本实验结果显示大鼠注射福尔马林后，表现为舔、咬注射足和肢体抽动等反应，福尔马林注射组动物对伤害性刺激的反应表现为两个不同时期，与文献[6]报道一致。目前已证实，第 1 期急性伤害性反应是短暂的急性痛反应，是由于福尔马林刺激足底伤害性感受器所致。第 2 期是继发性炎症刺激反应，是大鼠外周炎症发展而引起的中枢性敏感化的结果。

研究表明，在疼痛过程中，SP、GABA、NO、NA 等多种因子参与了痛觉的产生和调控过程。NA 是下行疼痛调制系统中的最重要的神经递质之一，由 NA 能神经末梢释放，与其相应的受体结合后，参与神经系统的多种功能的调节，如痛觉的调制等。NA 不仅参与鸦片类物质及中枢刺激引起的镇痛过程，而且这一镇痛作用可能主要是通过肾上腺素能下行抑制通路实现的[7]。最近的研究表明，NA 可增强包括 P 物质介导的脊髓伤害性信息的传递抑制[8]；并可通过与中枢神经系统的 α_2 能肾上腺素受体结合，提高伤害性刺激的阈值和潜伏时间。Braganca 等[9]发现在应激过程中，体内儿茶酚胺类物质增加的主要原因是其合成酶增加，儿茶酚胺类物质含量的变化与其合成酶的变化是相平行的。本实验利用 Dubuisson 等[4]建立的福尔马林致痛模型基础上，运用免疫组化和 Western blotting 等技术观察福尔马林注射大鼠足底后，不同时间段大鼠脊髓 DBH 阳性神经元数量及蛋白水平的变化。结果表明，福尔马林注射大鼠足底 1 h 后，大鼠脊髓 NA 能神经元数量即开始增加，与对照组有明显的差异；至第 3 天，其数量明显增多，第 7 天时，NA 阳性细胞数虽有所回落，但仍较正常为多。

以往的研究及本实验的结果显示，在正常脊髓的前角内，可观察到少量染色浅淡的 DBH 阳性神经元，表明正常脊髓也存在极少量 NA 能神经元，而位于中间带和后角的某些神经元，可能因为 DBH 含量低或其他原因，导致染色浅或不着色[10]。因此，在正常脊髓，

中间带和后角神经元多数为非 NA 能神经元。本实验结果显示,福尔马林致痛模型大鼠脊髓内 DBH 不仅分布在脊髓前角,而且在其中间带和后角也有大量的 DBH 阳性神经元,这一结果提示在疼痛等应激状态下,脊髓中间带和后角某些神经元可能发生了化学性质改变,由非 NA 能神经元转变成 NA 能神经元。我们认为,这种变化是神经元化学可塑性的表现,是机体适应性反应的结果。图像分析和统计分析的结果说明,NA 合成量的变化与疼痛应激反应有关,表明 NA 参与了脊髓疼痛的调制过程。但 DBH 调控的分子机制如何,最近的研究提示,AP-2α 对 DBH 的表达可能具有调控作用。

AP-2α 属于 AP-2 家族,该家族由 AP-2α、AP-2β、AP-2γ 和 AP-2δ 共 4 个关系密切、结构保守的成员组成,其相对分子质量在(48 ~ 52) × 10^3 之间。AP-2 家族基因产物均具有脯氨酸和谷氨酰胺的转录激活结构域,并形成同源二聚体及 DNA 结合域的"helix-span-helix"基元(motif),三者能与 DNA 的 GC 富含区结合。AP-2 可通过激活蛋白激酶 C(PKC),蛋白激酶 A(PKA)和视黄酸等对基因表达进行调控[9]。研究表明,在许多具有重要生物学功能的基因序列上都具有 AP-2 结合位点[11]。AP-2 家族在多种组织和器官中都有表达,对细胞的增殖、分化、发育和肿瘤发生等方面起着极为重要的作用。DBH 的上游启动区含有多个蛋白质结合位点[2],其中Ⅲ区含有高度一致的 AP-2 基序[3],AP-2 能通过单一位点调节 DBH 启动子的活性,从而影响 DBH 的表达。但是,如果 AP-2 结合位点发生变异,由 AP-2 引起的 DBH 转录作用将消失[12]。本实验的结果显示,DBH 和 AP-2α 在脊髓神经元内共存。本实验的结果还表明,注射福尔马林后,伴随着体内某些刺激因素的作用,AP-2α 表达上调,激活 DBH 启动子,引起转录的 DBH mRNA 增多,DBH 合成增加,从而造成 NA 的合成和分泌增加。这一方面表现在脊髓各节段前角内 DBH 阳性神经元染色进一步加深;另一方面表现为在正常条件下后角和中间带的一些神经元可能由非 NA 能神经元转化为 NA 能神经元。我们认为,这是在疼痛应激条件下,脊髓内 NA 能神经元数量增加,分布更广的重要原因。

参考文献:

[1] Hartman B K. Immunofluorescence of dopamine-beta-hydroxylase. Application of improved methodology to the localization of the peripheral and central noradrenergic nervous system[J]. J Histochem Cytochem, 1973, 21(4): 312 - 332.

[2] Kim H S, Seo H, Yang C, *et al*. Noradrenergic-specific transcription of the dopamine beta-hydroxylase gene requires synergy of multiple cis-acting elements including at least two Phox2a-binding sites[J]. J Neurosci, 1998, 18(20): 8247 - 8260.

[3] Mitchell P J, Timmons P M, Hebert J M, *et al*. Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis[J]. Genes Dev, 1991, 5(1): 105 - 119.

[4] Dubuisson D, Dennis S G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats[J]. Pain, 1977, 4(2): 161 - 174.

[5] Mestre C, Pelissier T, Fialip J, *et al*. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats[J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 1994, 32(4): 197 - 200.

[6] Hao S, Takahata O, Iwasaki H. Intrathecal endomorphin-1 produces antinociceptive activities modulated by alpha 2-adrenoceptors in the rat tail flick, tail pressure and formalin tests[J]. Life Sci, 2000, 66(15): 195 - 204.

[7] Aston-Jones G, Shipley M T, Chouvet G, *et al*. Afferent regulation of locus coeruleus neurons: anatomy, physiology and pharmacology[J]. Prog Brain Res, 1991, 88: 47 - 75.

[8] Bourgoin S, Pohl M, Mauborgne A, *et al*. Monoaminergic control of the release of calcitonin gene-related peptide- and substance P-like materials from rat spinal cord slices[J]. Neuropharmacology, 1993, 32(7): 633 - 640.

[9] Braganca J, Eloranta J J, Bamforth S D, *et al*. Physical and functional interactions among AP-2 transcription factors, p300/CREB-binding protein, and CITED2[J]. J Biol Chem, 2003, 278(18): 16021 - 16029.

[10] Mouchet P, Manier M, Dietl M, *et al*. Immunohistochemical study of catecholaminergic cell bodies in the rat spinal cord[J]. Brain Res Bull, 1986, 16(3): 341 - 353.

[11] Zhang J, Brewer S, Huang J, *et al*. Overexpression of transcription factor AP-2alpha suppresses mammary gland growth and morphogenesis[J]. Dev Biol, 2003, 256(1): 127 - 145.

[12] Fujii T, Sakai M, Nagatsu I. Immunohistochemical demonstration of expression of tyrosine hydroxylase in cerebellar Purkinje cells of the human and mouse[J]. Neurosci Lett, 1994, 165(1 - 2): 161 - 163.

(编辑 王 红)