文章编号:1000-5404(2012)11-1079-04

论著

脊髓星形胶质细胞 FGFR3 在神经病理性疼痛中的表达改变及作用

谢科宇,胡新宇,李继元,杨天德 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院麻醉科)

[摘要] **目的** 观察成纤维细胞生长因子受体3(fibroblast growth factor receptor 3,FGFR3)在坐骨神经分支选择结扎后神经病理性疼痛中大鼠脊髓的表达变化。**方法** 40只SD雄性大鼠,分为假手术对照组(sham)和手术组(SNI),每组20只。使用坐骨神经分支选择结扎方式建立大鼠神经病理性疼痛模型,观察sham组和SNI组大鼠术前1 d以及术后1、3、5、7 d的行为学改变并检测2组大鼠的机械痛阈,采用免疫荧光双标观察2组大鼠术后7 d脊髓背角星形胶质细胞FGFR3和胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein,GFAP)的共表达,Western blot法检测SNI术后各时间点2组大鼠FGFR3蛋白表达。**结果** 术前1 d 2组大鼠机械痛阈无明显差异($P>0.05$),术后1、3、5、7 d SNI组大鼠机械痛阈值分别为(6.67±2.12)、(3.17±0.99)、(2.33±0.65)、(1.75±0.31),相应时间点sham组大鼠机械痛阈值分别为(12.75±2.83)、(12.33±2.84)、(12.08±2.57)、(11.50±2.65),SNI组大鼠机械痛阈在各时间点较sham组明显降低($P<0.05$);术后7 d患侧脊髓背角GFAP阳性表达的细胞,FGFR3也呈阳性表达;术后1、3、5、7 d sham组大鼠脊髓FGFR3蛋白表达分别为(0.192 8±0.013 0)、(0.213 6±0.021 4)、(0.294 6±0.025 1)、(0.266 4±0.027 3),相应时间点SNI组大鼠脊髓FGFR3蛋白表达分别为(0.280 4±0.015 3)、(0.328 2±0.026 3)、(0.567 7±0.027 0)、(0.528 8±0.032 8),与sham组比较,SNI组脊髓FGFR3蛋白表达随时间增长而上调($P<0.05$)。**结论** 在神经病理性疼痛过程中FGFR3表达下调并可能参与GFAP的激活,提示FGFR3在神经病理性疼痛的发生以及发展过程中可能发挥着重要的作用。

[关键词] 星形胶质细胞;受体,成纤维细胞生长因子,3型;神经病理性疼痛
[中图法分类号] R322.81;R363.21;R441.1 [文献标志码] A

Expression of fibroblast 3 growth factor receptor of spinal astrocytes in rats with neuropathic pain

Xie Keyu, Hu Xinyu, Li Jiyuan, Yang Tiande (Department of Anesthesiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] Objective To observe the expression of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) in spinal cord of rats with neuropathic pain after selective ligation of sciatic nerve branches. Methods Forty male SD rats were divided into control group ($n=20$) and surgery group ($n=20$). A rat neuropathic pain was established by ligation of sciatic nerve branches. Behaviors of rats in two groups were observed 1 d before and 1, 3, 5, and 7 d after operation. Mechanical pain threshold value in two groups was calculated. Co-expression of spinal astrocytes and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in two groups was detected with immunofluorescence in 7 d after operation. Expression of FGFR3 protein at different time points in two groups was detected by Western blotting. Results No significant difference was found in mechanical pain threshold value between the two groups in 1 d before operation ($P>0.05$). The mechanical pain threshold value was 6.67±2.12, 3.17±0.99, 2.33±0.65, and 1.75±0.31 respectively in surgery group and 12.75±2.83, 12.33±2.84, 12.08±2.57, and 11.50±2.65 respectively in control group in 1, 3, 5, and 7 d after operation ($P<0.05$). The GFAP was positively expressed while the FGFR-3 was negatively expressed in spinal astrocytes of rats in 7 d after operation. The expression of FGFR3 protein was 0.192 8±0.013 0, 0.214 6±0.021 4, 0.294 6±0.025 1, 0.266 4±0.027 3 respectively in control group and 0.280 4±0.015 3, 0.328 2±0.026 3, 0.567 7±0.027 0, 0.528 8±0.032 8 respectively in surgery group in 1, 3, 5, and 7 d after operation ($P<0.05$). Conclusion Down-regulation of FGFR3 expression in rats with pathological neuralgia may be involved in activation of GFAP, indicating that FGFR3 plays an important role in the occurrence and development of pathological neuralgia.

[**Key words**] astrocyte; receptor, fibroblast growth factor, type 3; pathological neuralgia

Corresponding author: Yang Tiande, E-mail:31011@sina.com

[通信作者] 杨天德,E-mail:31011@sina.com

近年来,神经病理性疼痛(neuropathic pain,NPP)的发病机制取得了新的突破,对于治疗NPP提供了重要依据。其中,星形胶质细胞的激活成为疼痛机制研究的新亮点,使NPP的研究跳出了局限于神经元研究的瓶颈,为NPP的治疗提供了新的靶点[1]。

成纤维细胞生长因子受体3(fibroblast growth factor receptor 3,FGFR3)在神经系统发育过程中发挥重要作用,并在神经系统广泛表达[2]。FGFR3是一种具有自身磷酸化活性的跨膜酪氨酸激酶受体,它与其配体结合后通过一系列的信号转导途径完成复杂的细胞内外信号转导从而完成神经发生,分化,树突分支及神经元存活等功能[3]。但是,FGFR3在星形胶质细胞上的表达水平以及是否参与星形胶质细胞的激活,能否作为NPP的治疗靶点尚未有研究证实。

因此,本实验拟采用坐骨神经分支选择结扎(partial sciatic never ligation,SNI)方式建立神经病理性疼痛模型,观察SNI大鼠神经损伤后的行为学变化,并检测脊髓背角星形胶质细胞激活情况以及FRFG3表达表达改变,探讨在NPP中FGFR3对于星形胶质细胞的激活是否存在作用,并探讨其可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组及模型制备

SD雄性大鼠40只,体质量180~220 g(新桥医院动物实验中心)。分为2组:假手术对照组(sham,$n=20$)、手术组(SNI,$n=20$)。参考文献[4]的方法造模。大鼠麻醉(0.2%戊巴比妥钠60 mg/kg,腹腔注射)后给SNI组大鼠行SNI手术:取俯卧位,备皮,消毒后切开大鼠右侧大腿后外侧,暴露坐骨神经及其分支,远端结扎并剪断腓总神经和胫神经,保留腓肠神经,最后逐层缝合肌肉和皮肤。sham组大鼠行假手术:在暴露分离坐骨神经2 min后,不结扎和剪断神经,直接缝合肌肉和皮肤。整个手术过程注意动作轻柔,术后大鼠均肌注青霉素预防感染。术后于22~25 ℃恒温动物房单笼饲养。自由进食和饮水,正常昼夜节奏,并避免刺激。

1.2 主要试剂和仪器

FGFR3兔多克隆抗体(Santa Cruz,American);FITC标记抗兔IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司);GFAP小鼠多克隆抗体(碧云天生物技术研究所);Cy5标记抗小鼠IgG(碧云天生物技术研究所);Hoechst细胞核染料以及防荧光淬灭封片剂(碧云天生物技术研究所);辣根过氧化物酶标记(HRP)二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);CM1900冰冻切片机及激光扫描共聚焦显微镜(德国,Leica公司);BCA蛋白分析试剂盒(碧云天生物技术研究所);ECL发光试剂盒(美国,Pierce公司);vonfrey纤维针(美国,Stoelting公司)。

1.3 机械痛阈值测定

在模型制作前测定每只大鼠右后肢基础痛阈。将大鼠放于底为筛状透明板有机玻璃罩内,适应环境30 min,用vonfrey纤维针从小刻度开始测量,垂直刺激大鼠后爪,每次刺激时间持续1.5 s,若大鼠出现抬腿、添足则为阳性反应。如果出现阳性反应,则在15 s后再开始下一次测量,注意每次刺激力度均等。每个刻度的纤维针每次测量10次,大于5次阳性反应的最小克数则为该大鼠的机械痛阈值。术后1、3、5、7 d再用以上方法分别测定每只大鼠的机械痛阈值。

1.4 组织制备及免疫荧光双标

术后7 d 2组大鼠各取4只,测痛后用3%戊巴比妥钠(60 mg/kg,腹腔注射)麻醉后将开胸腔,暴露心脏,从心尖插入灌注针头至主动脉并固定针尖以免脱落,并剪开右心耳作为灌注液排出通道。首先用生理盐水快速灌注直至排出清亮液体、肝脏变白(若灌注液从鼻腔流出则视为灌注失败)后用4%多聚甲醛缓慢灌注。取大鼠脊髓L_4~L_6段(注意取组织过程当中动作细腻轻柔以免破坏脊髓的形态和完整性),放置4%多聚甲醛4 ℃过夜,再放于30%蔗糖溶液中脱水后取出标本,用OTC包埋剂(Sakura finetek公司, USA)包埋,制作冰冻切片(20 μm),各标本分别取5张切片染色。丙酮固定后逐步进行以下步骤:PBS冲洗10 min×3次,滴加山羊血清封闭液37 ℃孵育30 min,滴加FGFR3一抗(1∶75)37 ℃孵育2 h,取出后再滴加GFAP一抗(1∶75),37 ℃孵育2 h后4 ℃过夜;第2日PBS冲洗10 min×3次,滴加FGFR3二抗FITC(1∶100)及GFAP二抗Cy5(1∶50)37 ℃水浴1 h后取出,PBS冲洗10 min×3次,Hoechst染核3 min,PBS冲洗10 min×3次,抗荧光淬灭剂封片。制作过程注意避光,滤纸吸干时注意勿损坏组织标本,注意轻柔,避免产生气泡。最后于激光共聚焦荧光显微镜下观察脊髓背角星形胶质细胞GFAP和FGFR3的表达情况。

1.5 Western blot法测定脊髓FGFR3蛋白表达

术后1、3、5、7 d分别处死大鼠($n=4$),分别取大鼠脊髓L_4~L_6段,加入0.2 ml RIPA和2 μl PMSF冰上研磨,避免起泡沫和发热。将样品移到1.5 ml的离心管中,4 ℃,20 000×g离心30 min,将上清液小心转移到干净无菌的1.5 ml的离心管中,BAC法测定蛋白质浓度,SDS-PAGE电泳,转膜,脱色,封闭2 h加入FGFR3一抗,7 ℃摇晃4 h,加HRP标记二抗,4 ℃过夜。ECL化学发光系统显色。Quantity One软件分析结果。

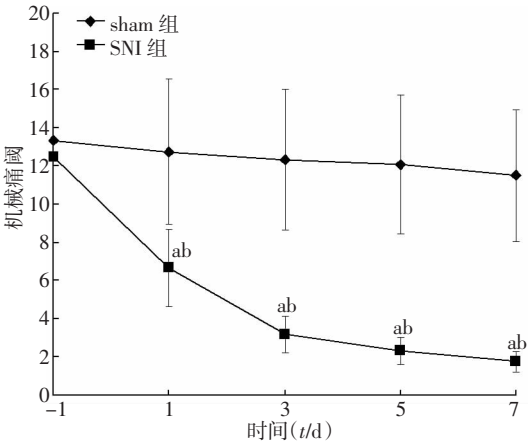
1.6 统计学分析

采用SPSS 11.0软件分析统计资料。组内连续变量改变比较采用重复测量方差分析,组间各指标的比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 术后行为学观察以及机械痛阈值的测定

2组大鼠术前机械痛阈差异无显著性($P>0.05$)。sham组大鼠行动基本正常,无内收畸形,而SNI组大鼠患侧后爪出现轻度内收和跛行。SNI组大鼠术后各时间点机械痛阈与术前1 d相比明显下降($P<0.05$);SNI组大鼠术后1、3、5、7 d阈值较sham组大鼠各时间点显著降低,2组大鼠机械痛阈在1、3、5、7 d有显著性差异($P<0.05$)。见图1。



a：$P<0.05$，与术前 1 d 比较；b：$P<0.05$，与 sham 组比较

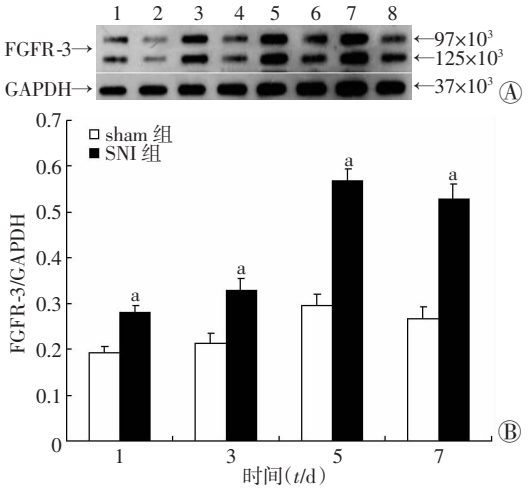
图 1　术前 1 d 与术后各时间点 2 组大鼠机械痛阈

2.2　脊髓星形胶质细胞 GFAP 和 FGFR3 的表达

SNI 组大鼠术后 7 d 患侧背角 GFAP 免疫荧光染色阳性细胞数胞体变大，星形突起增粗且亮度增强。同时，GFAP 呈阳性的细胞，FGFR3 也呈强阳性表达。sham 组中星形胶质细胞 GFAP 呈阳性的细胞，FGFR3 也呈阳性表达，但阳性细胞个数及荧光强度明显低于 SNI 组。见图 2。

2.3　脊髓 FGFR3 蛋白的表达

与 sham 组比较，SNI 组术后 1 d 脊髓 FGFR3 蛋白表达开始逐渐上升，直至术后 5 d 达到峰值（$P<0.05$），sham 组术后 1、3、5、7 d FGFR3 蛋白表达并无显著差异（$P>0.05$）。见图 3。



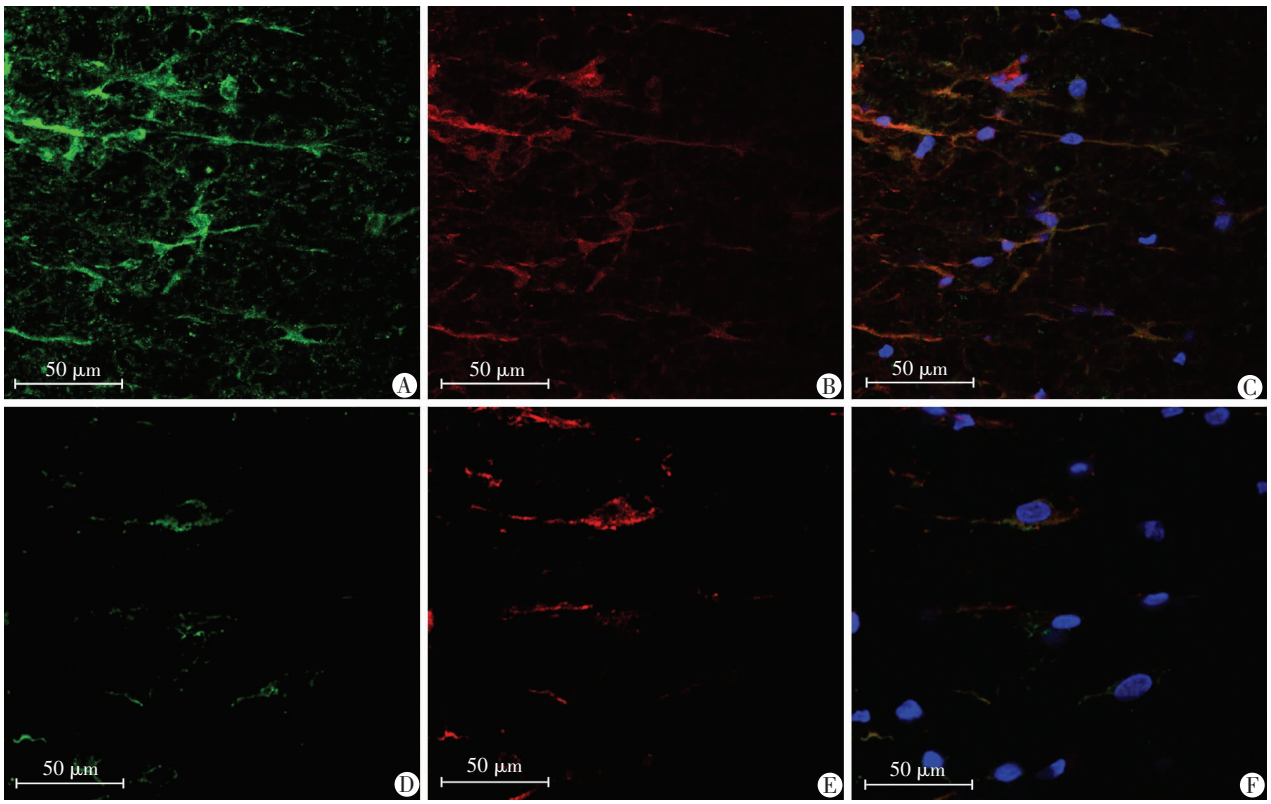
1、3、5、7 分别为 SNI 组术后 1，3，5，7 d；2、4、6、8 分别为 sham 组术后 1，3，5，7 d

A：Western blot；B：各组 FGFR-3 相对灰度值　a：$P<0.05$，与 sham 组比较

图 3　2 组大鼠脊髓 FGFR3 蛋白的表达

3　讨论

近年来神经胶质细胞在 NPP 中的作用引起研究者的高度重视。大量研究证实，神经病理性疼痛发生时，能激活星形胶质细胞，进而通过一系列信号通路释放大量的促炎性细胞因子如：IL-1、IL-6、IL-10、TNF-α、兴奋性氨基酸、NO、前列腺素，这些炎性因子均侵散至周围



A～C：分别为 SIN 组 FGFR3、GFAP、合成图；D～F：分别为 sham 组 FGFR3、GFAP、合成图

图 2　激光共聚焦荧光显微镜下观察术后 7 d 2 组大鼠 FGFR3 和 GFAP 表达

的神经元或小胶质细胞从而产生疼痛高敏状态[5]。且在NPP的发生与维持过程中,星形胶质细胞标志物GFAP蛋白和基因表达明显上调[6]。星形胶质细胞主要以炎症反应的方式诱发疼痛高反应性,参与了神经病理性疼痛。

神经损伤后多种营养因子分泌增加,如神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor ,BDNF)和神经胶质细胞源性营养因子(glia-derived neurotrophic factor, GDNF)。它们通过与一系列特殊的酪氨酸激酶受体介导来发挥作用,触发信号级联磷酸化调节和蛋白质合成以及神经元的兴奋性,选择性的对初级感觉神经元的存活和表型变化产生重要影响[4,7]。FGFRs(fibroblast growth factor receptors ,FGFRs)是一类具有自身磷酸化活性的跨膜酪氨酸激酶受体[8],目前已经确定了由4种独立基因编码的FGFRs成员,即FGFR1、FGFR2、FGFR3和FGFR4,在神经系统广泛表达。其中,FGFR3可以特异性结合其配体成纤维生长因子(fibroblast growth factor,FGFs),调节神经系统的特化与增殖[9]。FGFR3在成熟的中枢神经系统中在多种分散细胞表达。FGFR3阳性细胞在脑室内部与周围表达且观察到FGFR3表达星形胶质细胞瘤标记的谷氨酰胺合成酶。更有报道表明敲除大鼠FGFR3基因能观察到GFAP表达水平的显著增高,由此可见FGFR3的表达改变可能通过某些信号通路发生作用从而导致GFAP的改变[10]。

本实验通过分支选择结扎大鼠坐骨神经建立神经病理性疼痛模型,是目前国际上通用的实验模型之一。术后行为学观察SNI组大鼠术侧后爪轻微内收畸形,跛行,休息时偶有舔患足,符合SNI大鼠术后改变。NPP主要表现为痛觉过敏或异常疼痛,机械痛阈法可以很好地评估疼痛。本研究用vonfrey纤维针检测大鼠后肢机械痛阈发现,与sham组相比,SNI组大鼠机械痛阈术后1 d开始下降,到术后第7天下降到最低值,在每个时间点与sham组均有显著差异($P<0.05$)。以往研究中发现,与sham组相比,SNI大鼠术后7 d大鼠脊髓背角星形胶质细胞GFAP阳性细胞个数显著增多,而sham组GFAP阳性细胞个数并无明显差异。本研究选择在疼痛维持阶段,利用免疫双标法观察到两组大鼠术后7 d FGFR3与GFAP的表达情况:在患侧脊髓背角GFAP呈阳性的细胞,FGFR3也呈阳性表达,且SNI组GFAP和FGFR3表达的阳性细胞数目以及荧光强度均显著高于sham组。sham组中FGFR3与GFAP阳性细胞呈点灶状,明显少于SNI组中GFAP与FGFR3阳性细胞的弥散表达。由此可以推测,FGFR3在NPP过程中参与了星形胶质细胞的激活。同时,使用Western blot检测术后1、3、5、7 d大鼠FGFR3的蛋白表达变化结果显示:在各时间点SNI组FGFR3蛋白含量明显高于sham组($P<0.05$)。SNI组的FGFR3表达随时间逐步升高,并且维持在较高水平。结果显示FGFR3表达显著升高与GFAP的表达呈正相关,而与机械痛阈值呈负相关。

同时有也关于FGFR3与NPP的研究证实:在神经损伤后背根神经节中的FGFR3被激活[11];在坐骨神经损伤后FGFR3在雪旺细胞和巨噬细胞中表达,并检测到脊髓FGFR3 mRNA表达在背根神经节结扎后表达上调[12];更有研究报道FGFR3着成熟的脊髓灰质星形胶质细胞中抑制GFAP的表达,在早期促进少突胶质细胞的分化和髓鞘形成[13]。

综上,我们推测FGFR3可能参与NPP的发生以及维持,并在此过程中可能发挥重要作用。

参考文献:

[1] Watkins L R, Milligan E D, Maier S F. Glial activation: a driving force for pathological pain[J]. Trends Neurosci, 2001, 24(8): 450-455.

[2] Pringle N P, Yu W P, Howell M, *et al*. Fgfr3 expression by astrocytes and their precursors: evidence that astrocytes and oligodendrocytes originate in distinct neuroepithelial domains[J]. Development, 2003, 130(1): 93-102.

[3] Ford-Perriss M, Abud H, Murphy M. Fibroblast growth factors in the developing central nervous system[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2001, 28(7): 493-503.

[4] Decosterd I, Woolf C J. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain[J]. Pain, 2000, 87(2): 149-158.

[5] Cao H, Zhang Y Q. Spinal glial activation contributes to pathological pain states[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2008, 32(5): 972-983.

[6] 毛庆祥, 杨天德. 阿米替林抑制神经性疼痛大鼠脊髓星形胶质细胞的激活[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(7): 611-614.

[7] Ji R R, Samad T A, Jin S X, *et al*. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia[J]. Neuron, 2002, 36(1): 57-68.

[8] Jaye M, Schlessinger J, Dionne C A. Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases: molecular analysis and signal transduction[J]. Biochim Biophys Acta, 1992, 1135(2): 185-199.

[9] Kang K, Song M R. Diverse FGF receptor signaling controls astrocyte specification and proliferation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 395(3): 324-329.

[10] Chen F L, Dong Y L, Zhang Z J, *et al*. Activation of astrocytes in the anterior cingulate cortex contributes to the affective component of pain in an inflammatory pain model[J]. Brain Res Bull, 2012, 87(1): 60-66.

[11] Yamanaka H, Obata K, Kobayashi K, *et al*. Activation of fibroblast growth factor receptor by axotomy, through downstream p38 in dorsal root ganglion, contributes to neuropathic pain[J]. Neuroscience, 2007, 150(1): 202-211.

[12] Grothe C, Meisinger C, Claus P. *In vivo* expression and localization of the fibroblast growth factor system in the intact and lesioned rat peripheral nerve and spinal ganglia[J]. J Comp Neurol, 2001, 434(3): 342-357.

[13] Inglis-Broadgate S L, Thomson R E, Pellicano F, *et al*. FGFR3 regulates brain size by controlling progenitor cell proliferation and apoptosis during embryonic development[J]. Dev Biol, 2005, 279(1): 73-85.

(**收稿**:2012-02-27;**修回**:2012-03-22)

(编辑 邓强庭)