

doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2021.02.005

• 论 著 •

背根神经节血红素加氧酶 1 过表达缓解小鼠
神经病理性疼痛 *邵寒雨¹ 符元元¹ 王 娟¹ 赵林霞^{2,3} 高永静^{2,3} 张志军^{1,3 Δ}(¹ 南通大学医学院人体解剖学系, 南通 226001; ² 南通大学特种医学研究院, 南通 226019;³ 南通大学疼痛医学研究院, 南通 226019)

摘 要 目的: 探讨背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 中血红素加氧酶 1 (heme oxygenase 1, HO-1) 的表达分布及在 DRG 中过表达 HO-1 对神经病理性疼痛的作用。**方法:** 构建保留性坐骨神经损伤 (spared nerve injury, SNI) 诱导的神经病理性疼痛模型; 行为学检测机械性触诱发痛; 免疫荧光染色检测 DRG 中 HO-1 在神经元中表达和分布; 免疫印迹检测 DRG 中 HO-1 表达。**结果:** 免疫荧光染色显示 DRG 中 HO-1 阳性神经元在 SNI 后数量显著减少; DRG 中 HO-1 阳性神经元主要是 IB4 阳性的小型神经元 ($< 300 \mu\text{m}^2$); 连续 5 天腹腔注射原卟啉 IX 氯化钴 (cobalt protoporphyrin-IX, CoPP) 能增加神经病理性疼痛小鼠的机械缩足阈值; 鞘内注射过表达 HO-1 的腺病毒相关病毒 (adenovirus associated virus, AAV) 能特异性浸染 DRG 神经元, 并上调 HO-1 表达; 同时能有效提高神经病理性疼痛小鼠的机械缩足阈值, 此效应持续 21 天以上。**结论:** DRG 中 HO-1 主要表达在 IB4 阳性的小型神经元; 过表达 DRG 神经元中 HO-1 能有效缓解 SNI 诱导的神经病理性疼痛。

关键词 血红素加氧酶 1; 背根神经节; 神经元; 神经病理性疼痛; 小鼠

Overexpression of heme oxygenase 1 in dorsal root ganglion alleviates neuropathic pain in mice *SHAO Han-Yu¹, FU Yuan-Yuan¹, WANG Juan¹, ZHAO Lin-Xia^{2,3}, GAO Yong-Jing^{2,3}, ZHANG Zhi-Jun^{1,3 Δ}(¹ Department of Human Anatomy, School of Medicine, Nantong University, Nantong 226001, China; ² Institute of Special Environmental Medicine, Nantong University, Nantong 226019, China; ³ Institute of Pain Medicine, Nantong University, Nantong 226019, China)

Abstract Objective: To explore the expression and distribution of heme oxygenase 1 (HO-1) in the dorsal root ganglion (DRG), and the effects of HO-1 overexpression in the DRG on neuropathic pain in mice. **Methods:** The neuropathic pain was induced by the spared nerve injury (SNI) in mice. The mechanical allodynia was examined by behavioral test. The expression and distribution of HO-1 in DRG neurons was checked by immunofluorescence staining. Western blot was used to evaluate the HO-1 expression in the DRG. **Results:** Immunofluorescence staining showed HO-1⁺ neurons in the DRG were dramatically decreased after SNI. The double immunostaining and cell-size distribution analysis showed that most of HO-1⁺ neurons were IB4⁺ nonpeptidergic small-diameter neurons ($< 300 \mu\text{m}^2$) in the DRG. After consecutive intraperitoneal injection of cobalt protoporphyrin-IX (CoPP) for 5 days, the paw withdrawal threshold was increased in mice suffering from neuropathic pain. AAV-HO-1 specifically infected DRG neurons via intrathecal injection, increased the HO-1 expression in the DRG, and significantly increased the paw withdrawal threshold in the neuropathic pain mice. This increase of the mechanical withdrawal threshold by AAV-HO-1 was maintained for > 21 d. **Conclusion:** The HO-1 is mainly expressed in IB4⁺ small-size neurons in the DRG. Overexpression of HO-1 in DRG neurons can effectively

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31970938, 81571070); 江苏省自然科学基金面上项目 (BK20191448)

Δ 通讯作者 张志军 zhzhj@ntu.edu.cn

alleviate the neuropathic pain induced by SNI.

Key words Heme oxygenase 1; Dorsal root ganglion; Neurons; Neuropathic pain; Mice

神经病理性疼痛是指躯体感觉系统的损伤或疾病而直接造成的疼痛,是临床上难治性疾病,据流行病学统计,其影响7%~10%社会人口,我国的神经病理性疼痛病人约9000万人;神经病理性疼痛症状存在时间长,可在原发疾病治愈后,痛觉异常(痛觉过敏、触诱发痛和自发性疼痛)依然存在,甚至持续终生^[1,2];这种长期存在的痛觉异常会使病人痛苦不堪、精神异常,严重影响病人的躯体和社会功能,也给家庭和社会带来沉重的经济负担^[1]。目前,临床常用的镇痛药如阿片类药物、抗惊厥类药物、局部麻醉药、抗抑郁药等对神经病理性疼痛的治疗效果并不理想^[1,2]。深入了解神经病理性疼痛的机制,必将为临床治疗提供有力的依据。

血红素加氧酶1(heme oxygenase 1, HO-1)分子量为32 KD,位于微粒体内,是一种应激反应蛋白,能被多种氧化应激产物所诱导表达^[3]。HO-1是体内分解血红素(heme)的限速酶,分解产生CO、自由铁(Fe^{2+})和胆绿素,胆绿素随即被胆绿素还原酶还原成胆红素。HO-1也称为热休克蛋白32(heat shock protein 32, HSP32),作为保护性基因在多系统及组织细胞中被广泛研究,具有抗炎、抗氧化、抗凋亡、抗增殖等特性^[4]。HO-1在正常细胞内表达很少,但在炎症氧化应激下,HO-1可被诱导表达,因此在细胞炎症状态下,HO-1是关键分解血红素(heme)的限速酶^[5]。内源性的CO作为第二信使分子,影响细胞的炎症、增殖、凋亡;胆绿素和胆红素都具有抗氧化特性;铁离子能诱导细胞内铁蛋白表达增加,进而能有效清除细胞内的铁离子。HO-1基因缺失的人表现和HO-1基因敲除的小鼠表现相似,可表现为慢性炎症反应、组织中铁沉积、淋巴结病、白细胞增多以及细胞易受到氧化应激损伤^[6]。

接受皮肤痛觉信息的外周感觉神经元(peripheral sensory neurons)的胞体主要位于背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)和三叉神经节(trigeminal ganglion, TG)中^[7-9]。这些感觉神经元可以根据细胞大小和基因表达特征分为不同类型,如肽能和非肽能的中小直径神经元负责伤害性信息感受,而大直径神经元负责触觉和本体感受^[7,10]。本课题组前期的研究显示,外周神经损伤小鼠脊髓背角中HO-1诱导过表达后能缓解多种疾病诱导的神经病理性疼

痛^[11-13],但HO-1在DRG中表达和分布以及DRG中HO-1在外周神经损伤诱导的神经病理性疼痛中的作用还未见报道。外周神经损伤后可导致DRG中神经元炎症氧化应激^[7],为此,本研究将探讨DRG中的HO-1表达分布,以及在神经病理性疼痛中作用。本研究结果将为临床研发治疗神经病理性疼痛新药物提供新的策略和实验依据。

方 法

1. 实验动物

成年雄性ICR小鼠(25~35 g)购自南通大学实验动物中心。小鼠饲养于独立通风笼具,维持12 h/12 h的明暗光照循环,环境温度为 $22\pm 2^\circ$,相对湿度为40%~70%,保持食水充足。本研究中的动物实验依据国际疼痛学会的指南,并经南通大学动物伦理委员会批准进行。保留性坐骨神经损伤(spared nerve injury, SNI)诱导的神经病理性疼痛模型的构建是在腓窝中将坐骨神经的胫神经和腓总神经两大分支用6-0丝线紧紧结扎,并去除远侧端2 mm神经组织,手术过程中完整保留坐骨神经的腓肠神经分支^[14,15]。

2. 药物和给药途径

HO-1诱导剂原卟啉IX氯化钴(cobalt protoporphyrin-IX, CoPP)购自Santa Cruz公司,溶于含2% DMSO的0.01 M的PBS中。CoPP腹腔注射剂量为1 mg/kg和5 mg/kg两种剂量,首次于SNI造模后立即给药,连续给药5天;对照组注射相应的溶剂(含2% DMSO的0.01 M的PBS),注射时程与CoPP相同^[11,12]。

3. 疼痛行为学检测

小鼠在行为检测前两天适应测试环境,行为检测过程中环境温度和湿度保持相对稳定。机械性触诱发痛测试时,小鼠放置在金属网格架上方的塑料盒中适应30 min后开始检测^[11,12]。用系列von Frey细丝(0.02~2.56 g)刺激小鼠足底,垂直刺激5次,每次2~3 s。如果有3次以上的抬爪或舔爪反应,即为阳性反射。最终用机械缩足阈值表示,其数值根据Dixon的up-down计算方法得出,机械缩足阈值数值越低说明机械性触诱发痛越严重。

4. 免疫荧光染色

小鼠用异氟烷(深圳市瑞沃德生命科技有限公

司) 气体麻醉后, 从主动脉起始处灌注 0.01 M 的 PBS, 随后用 4% 多聚甲醛 (Sigma-Aldrich) 固定液灌注。DRG 和脊髓组织在固定液中固定 4° 过夜, 随后在 30% 蔗糖 (Sigma-Aldrich) 中脱水。冰冻切片机 (Leica) 中脊髓行 30 μm 漂片, DRG 行 15 μm 贴片。组织切片先用 5% 驴血清室温封闭 2 h, 随后孵育一抗 4° 过夜: HO-1 (rabbit, 1:1000, Enzo Life Sciences)、CGRP (mouse, 1:3000, Sigma-Aldrich)、NF200 (mouse, 1:1000, Millipore); 切片漂洗后加下列荧光试剂或二抗: IB4-FITC (1:200, Sigma-Aldrich)、Donkey anti-rabbit cy3 (1:1000, Jackson ImmunoResearch)、Donkey anti-rabbit 488 (1:1000, Jackson ImmunoResearch)、Donkey anti-mouse 488 (1:1000, Jackson ImmunoResearch)。切片的荧光信号用荧光显微镜拍摄 (Nikon Eclipse Ni-E), 并用 Image J 软件分析统计。

5. Western blot

小鼠 L_4 和 L_5 的 DRG 取材后用含蛋白酶抑制剂 (Sigma-Aldrich) 的蛋白裂解液 (RIPA, Millipore) 提取蛋白质, BCA 法测定蛋白质浓度 (BCA 购自 ThermoFisher scientific)。SDS-PAGE 凝胶电泳每孔加 30 μg 总蛋白, 电泳后转膜至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂牛奶封闭, 随后孵育一抗: HO-1 (rabbit, 1:1000, Enzo Life Sciences)、GAPDH (rabbit, 1:1000, Millipore); PVDF 膜漂洗后加下列荧光二抗: IRDye 800CW goat-anti-rabbit (1:10 000, LI-COR), 用 Odyssey CLx system 获取条带图片。条带的显色强度分析使用 Image J 软件。

6. 病毒鞘内注射

小鼠用异氟烷吸入麻醉后, 在小鼠 L_4 和 L_5 腰椎间隙中, 将过表达 HO-1 的 AAV (AAV2/9-hSyn-HO-1-mCherry) 和对照病毒 (AAV2/9-hSyn-MCS-mCherry) 行鞘内注射, 剂量为 10 μl , 病毒滴度为 $1.0\text{E} + 13 \text{ v.g./ml}$ 。小鼠苏醒后立即放回饲养笼中, 饲养 3 周后小鼠机械缩足阈值测定后行 SNI 模型, 在 SNI 后的设定时间点进行疼痛行为学检测。

7. 统计学分析

统计分析软件用 GraphPad Prism 8.0.1, 所有数据采用均数 $\pm$ 标准误 ($\bar{x} \pm SEM$) 表示。行为学数据用双因素重复测量方差分析 (Two-way repeated measures ANOVA), 如果有差异, 进一步用 Bonferroni's test 比较不同时间点差异。免疫荧光和 western blot 数值的两组比较用 Student's t test, 三组比较用 One-way ANOVA。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. SNI 诱导 DRG 中 HO-1 阳性神经元数量减少

本研究使用免疫荧光来检测 DRG 中 HO-1 的表达定位和分布, 免疫荧光染色显示结果: 在正常小鼠和手术对照组小鼠 DRG 中有大量的 HO-1 阳性神经元, 约占总神经元数量的 22% (见图 1 A, B, E); 而 SNI 造模后 3 天和 10 天时, HO-1 阳性神经元的数量较正常组大幅度下降, 分别为 9.6% 和 8.2% (见图 1 C-E)。

2. DRG 中 HO-1 阳性神经元的定位分布

DRG 感觉神经元根据胞体大小和基因表达模式分成几种类型: 非肽类神经元是 IB4 阳性并且是小直径无髓鞘的神经元; 肽类神经元是中直径的薄髓鞘的神经元表达 CGRP; 大直径神经元的髓鞘较厚, 表达 NF200^[10]。本研究用免疫荧光双标显示: HO-1 与 IB4 共标较多 (见图 2A-C), 统计显示 HO-1 阳性神经元中 93.4% 是 IB4 阳性神经元, IB4 阳性神经元中 96.5% 是 HO-1 阳性神经元 (见图 2J); 而 HO-1 与 CGRP 以及与 NF200 共标很少 (见图 2D-I), 统计显示 HO-1 阳性神经元中只有 1.5% 左右的 CGRP 神经元, 同样的 CGRP 阳性神经元中也只有 0.9% 的 HO-1 阳性神经元 (见图 2K); 另外, HO-1 阳性神经元中只有 1.3% 左右的 NF200 神经元, NF200 阳性神经元中也只有 1.1% 的 HO-1 阳性神经元 (见图 2L)。胞体大小分布统计显示 HO-1 阳性神经元主要集中在 300 μm^2 面积以下的小型细胞 (见图 2M)。

3. HO-1 诱导剂 CoPP 减轻 SNI 诱导的神经病理性疼痛

在 SNI 造模后立即腹腔注射 HO-1 诱导剂 CoPP, 每天 1 次, 连续注射 5 天 (见图 3A)。行为学结果显示, 在造模前各自的机械缩足基础阈值 (baseline, BL) 无显著性差异, 注射溶剂对照组的 SNI 小鼠在造模后 1 天机械缩足阈值就显著降低, 表明小鼠产生了机械性触诱发痛, 并且持续 21 天以上 (见图 3B); 连续注射高剂量的 CoPP (5 mg/kg) 后, SNI 诱导的机械性触诱发痛在 7 天时较溶剂对照组减轻, 疼痛缓解持续到造模后 14 天以上 (见图 3B); 连续注射低剂量的 CoPP (1 mg/kg) 后, SNI 诱导的机械性触诱发痛较溶剂对照组无显著性差异 (见图 3B)。

4. DRG 神经元过表达 HO-1 显著缓解 SNI 诱导的神经病理性疼痛

小鼠在测定机械缩足的基础阈值后, 鞘内注

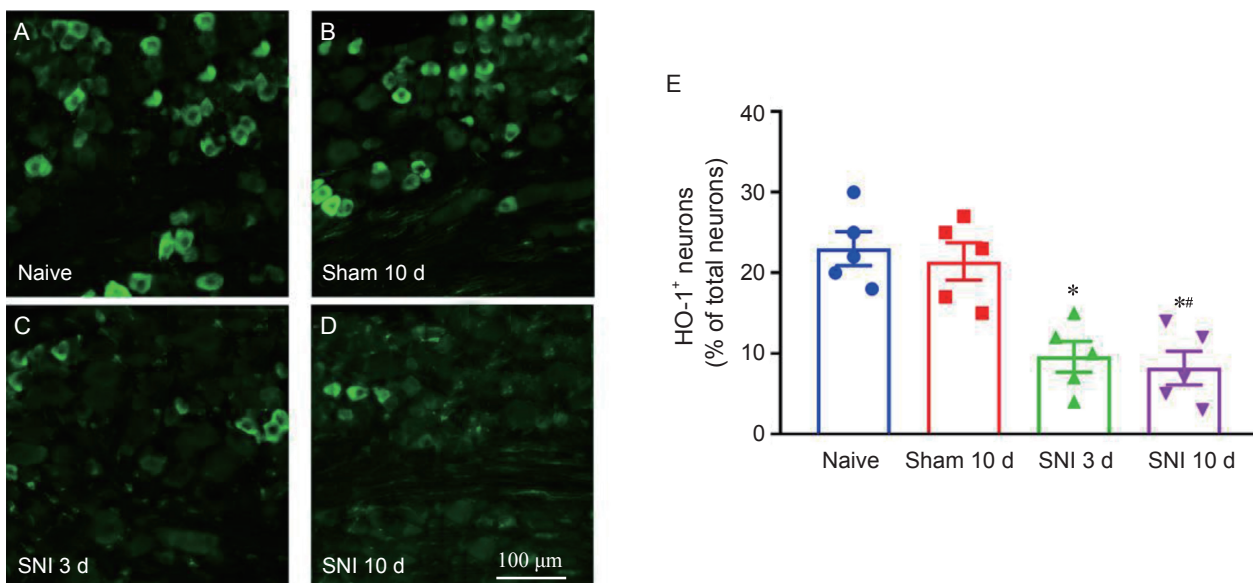


图1 免疫荧光染色显示 DRG 中 HO-1 阳性神经元在 SNI 后的变化 ($n = 5$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) 正常组 DRG 中 HO-1 阳性神经元; (B) 假手术 10 天组 DRG 中 HO-1 阳性神经元; (C) SNI 3 天组 DRG 中 HO-1 阳性神经元; (D) SNI 10 天组 DRG 中 HO-1 阳性神经元; (E) 各组 DRG 中 HO-1 阳性神经元占总神经元数量的百分比统计; * $P < 0.05$, 与正常组相比, # $P < 0.05$, 与假手术 10 天组相比

Fig. 1 Immunofluorescence staining shows the change of HO-1⁺ neurons in the DRG after SNI ($n = 5$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) DRG HO-1⁺ neurons in the Naive mice; (B) DRG HO-1⁺ neurons in the Sham 10 d mice; (C) DRG HO-1⁺ neurons in the SNI 3 d mice; (D) DRG HO-1⁺ neurons in the SNI 10 d mice; (E) Statistical data show the percentage of HO-1⁺ neurons in the DRG. * $P < 0.05$, compared with the Naive group; # $P < 0.05$, compared with the Sham 10 d group.

射过表达 HO-1 的 AAV 和对照病毒 (见图 4A), 21 天后行 SNI 造模, 造模前 1 天再测两组机械缩足的基础阈值。鞘内注射病毒 28 天后 DRG 组织切片显示 AAV 能浸染大部分 DRG 神经元 (见图 4B), 脊髓组织切片显示 AAV 能显示 DRG 神经元到达脊髓背角的末梢, 而未见 AAV 浸染脊髓神经元 (见图 4C)。Western blot 结果显示过表达 HO-1 的 AAV 较对照病毒能显著上调 DRG 中 HO-1 的表达, 上调幅度约 3 倍 (见图 4D, E)。免疫荧光染色显示对照 AAV 病毒浸染的神经元中约 50% 能表达内源性 HO-1, 而约 82% 内源性 HO-1 神经元能被 AAV 病毒浸染 (见图 4F-I)。行为学检测显示, 鞘内注射病毒前两组基础阈值没有差别, 注射病毒后 SNI 造模前的基础阈值也没有差异。SNI 造模后 3 天起过表达 HO-1 小鼠的机械性触诱发痛明显较对照 AAV 组缓解, 这种缓解能持续 21 天以上 (见图 4J)。

讨 论

本课题组前期研究的结果显示 HO-1 诱导剂 CoPP 能有效缓解骨癌痛^[13], 还能有效减轻长春新

碱诱导的化疗痛和脊神经结扎诱导的神经病理性疼痛。这与腹腔注射 CoPP 能上调脊髓部位的 HO-1 的蛋白和基因表达有关^[11-13]; 特异性在脊髓部位注射过表达 HO-1 的病毒能缓解长春新碱诱导的化疗痛和脊神经结扎诱导的神经病理性疼痛^[11,12]。免疫荧光定位结果显示化疗痛和外周神经损伤诱导的神经病理性疼痛的脊髓中 HO-1 主要表达于星形胶质细胞和小胶质细胞。上调表达脊髓中 HO-1 能使胶质细胞的激活减轻和炎症因子表达下调^[11,12]。然而外周感觉神经元, 如 DRG 中的 HO-1 表达情况还一无所知。本研究用免疫荧光染色显示 DRG 中有大量的 HO-1 神经元, 并且大部分与 IB4 阳性神经元共标, 胞体大小分布统计也显示 HO-1 阳性神经元主要为小型神经元。外周神经损伤后小型神经元较大型神经元容易损伤^[10]; 而且小型神经元是传导痛觉信息的神经元, 所以这些小型神经元的病变与神经病理性疼痛密切相关。因而, 这些结果提示小型神经元中 HO-1 表达可能与神经损伤后的病理性疼痛相关。

SNI 模型能诱导小鼠快速 (小于 24 h)、长时程 (大于 6 个月) 的机械性触诱发痛^[14]。本研究的

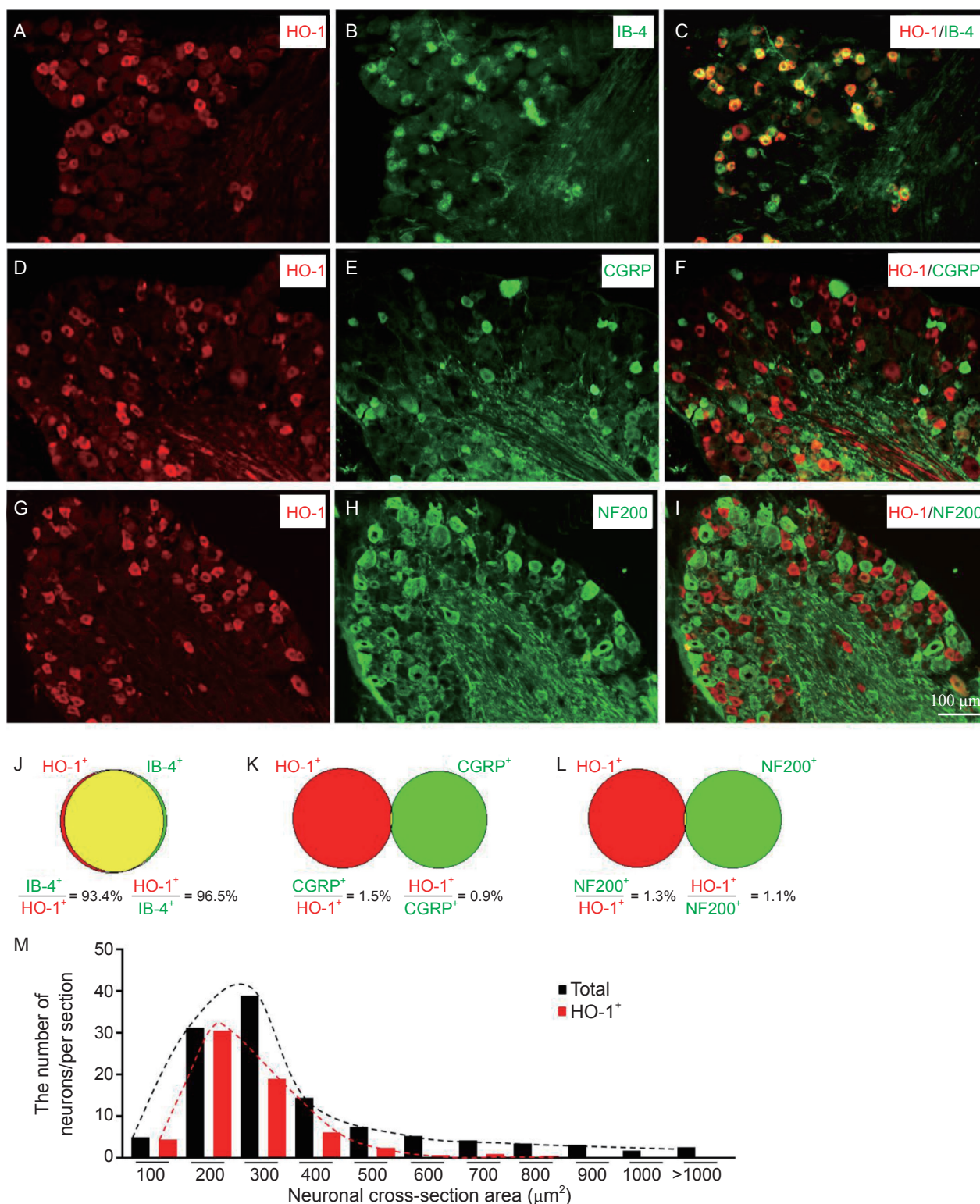


图 2 免疫荧光双标染色显示 DRG 中 HO-1 分别与 IB4、CGRP、NF200 共标以及 HO-1⁺ 神经元大小分布 (A-C) HO-1 与 IB4 免疫荧光共标染色; (D-F) HO-1 与 CGRP 免疫荧光共标染色; (G-I) HO-1 与 NF200 免疫荧光共标染色; (J-L) 韦恩图显示 DRG 中 HO-1⁺ 分别与 IB4⁺、CGRP⁺、NF200⁺ 神经元共标百分比; (M) DRG 中 HO-1⁺ 神经元和总神经元细胞大小分布频率统计

Fig. 2 The double immunostaining of HO-1 with IB4, CGRP, NF200 and the cell-size distribution of HO-1⁺ neurons in the DRG (A-C) The double immunostaining of HO-1 with IB4; (D-F) The double immunostaining of HO-1 with CGRP; (G-I) The double immunostaining of HO-1 with NF200; (J-L) The Venn diagrams showing the double immunostaining of HO-1⁺ with the IB4⁺, CGRP⁺, and NF200⁺; (M) The cell-size distribution frequency of HO-1⁺ neurons and total neurons in the DRG.

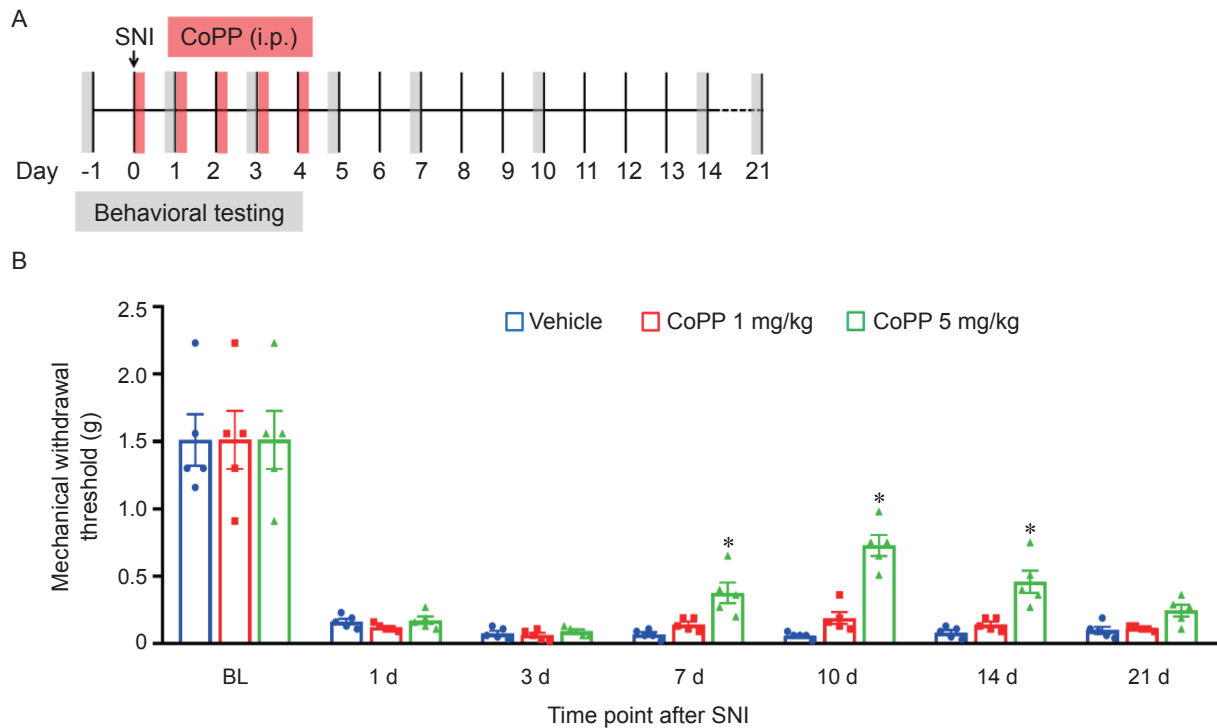


图 3 HO-1 诱导剂 CoPP 能缓解 SNI 诱导的机械性触诱发痛 ($n = 5$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) 行为学检测和 SNI 以及 CoPP 给药的时间流程图; (B) CoPP 缓解了 SNI 诱导的机械性触诱发痛; * $P < 0.05$, 与溶剂组相比

Fig. 3 HO-1 inducer CoPP alleviates SNI-induced mechanical allodynia ($n = 5$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) The timeline of behavioral test and SNI and CoPP treatments; (B) The CoPP attenuated SNI-induced mechanical allodynia. * $P < 0.05$, compared with the vehicle group.

行为学结果也同样显示小鼠在 SNI 后 1 天就能产生机械性触诱发痛, 并能持续 21 天 (观察时间点内) 以上。对于 SNI 后 3 和 10 天的 DRG 免疫荧光染色显示 HO-1 阳性神经元数量明显较正常组和对照组减少。此前大量文献报道了 HO-1 在氧化应激和炎症反应中作用^[5,6,16], 本课题组前期研究也揭示了脊髓中星形胶质细胞和小胶质细胞中过表达 HO-1 能缓解神经炎症反应^[11,12], 这些分子机制参与了慢性疼痛的进程。因而, 我们推断 SNI 后 DRG 神经元中的 HO-1 表达下调可能导致了或加强了神经病理性疼痛的发生和发展。对此, 本研究多个课题组发现腹腔注射 CoPP 后行为学检测结果表明诱导 HO-1 表达能缓解神经病理性疼痛, 然而腹腔注射 CoPP 是发挥全身作用, 也会影响脊髓和 DRG 中 HO-1 表达^[17,18]。

为了特异性检测 DRG 神经元中 HO-1 在神经病理性疼痛中的作用, 本研究使用了新的策略, 即在鞘内注射过表达 HO-1 的 AAV。形态学结果显示 AAV 能高效特异浸染 DRG 神经元, 并且这些 DRG

神经元的突起能进入脊髓背角, 进一步说明病毒感染的是 DRG 神经元。另外, 脊髓中并未观察到病毒感染的神经元, 这说明鞘内注射的病毒不会透过血脑屏障或者脑脊液屏障进入脊髓神经元。Western blot 结果显示过表达 HO-1 的 AAV 能使 DRG 中 HO-1 大幅度增加, 结合行为学结果显示, DRG 中过表达 HO-1 组的小鼠神经病理性疼痛能有效缓解, 持续缓解 21 天以上。在脊髓中, 已经证明了上调 HO-1 表达能缓解神经炎症反应, 如胶质细胞激活、炎症因子产生等^[11,12]。在外周, 我们课题组结果也显示 DRG 中神经炎症在神经病理性疼痛的发生发展中发挥了重要作用^[7,9,19]。因此, DRG 中 HO-1 在神经损伤后的表达减少可能与神经炎症发生有关, 而过表达 HO-1 可能通过减轻神经炎症反应进而缓解神经病理性疼痛, 但具体机制还需要深入研究。在临床上, 对 DRG 神经元的调控, 如电刺激等也能很好地缓解神经病理性疼痛^[20], 而这种临床治疗是针对 DRG 中所有神经元的调控。本研究中用 AAV 上调了 DRG 中几乎所有类型神经元中的 HO-1, 原因是

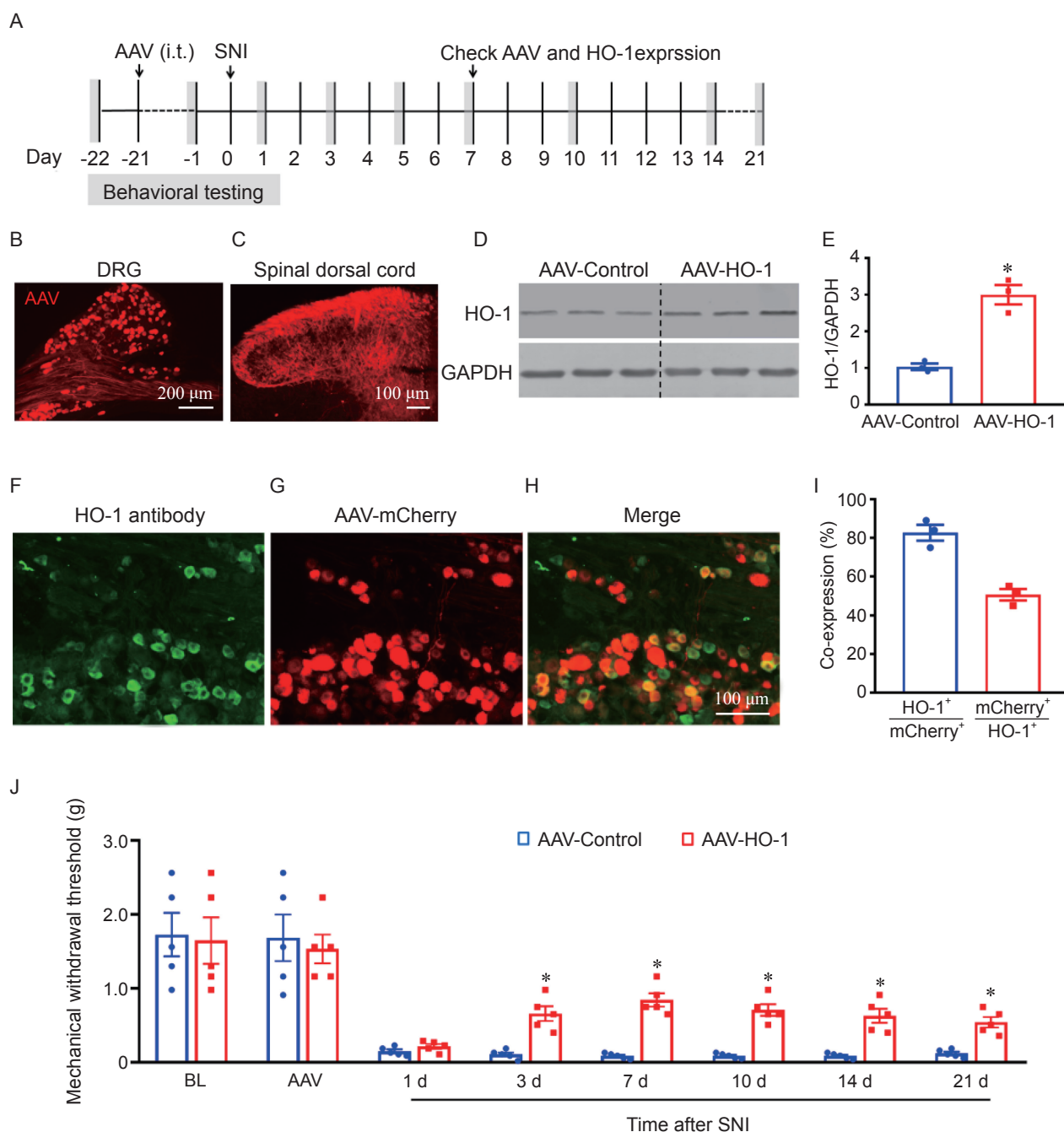


图 4 鞘内注射过表达 HO-1 病毒能长时程缓解 SNI 诱导的机械性触诱发痛 ($\bar{x} \pm SEM$)

(A) 行为学检测和 SNI 以及病毒给药的时间流程图; (B) 鞘内注射 AAV 后 mCherry 荧光蛋白表达在 DRG 神经元, (C) mCherry 荧光蛋白标记神经纤维在脊髓中的分布; (D, E) Western blot 结果显示 AAV-HO-1 鞘内注射后 DRG 中 HO-1 蛋白表达显著增加, $*P < 0.05$, 与对照 AAV 组相比 ($n = 3$); (F-I) 免疫荧光结果显示 HO-1 与对照 AAV 病毒的 mCherry 双染色及统计结果 ($n = 3$); (J) AAV-HO-1 鞘内注射后能持续缓解 SNI 诱导的机械性触诱发痛, 能持续 3 周以上, $*P < 0.05$, 与相对应的对照 AAV 组相比 ($n = 5$)

Fig. 4 SNI-induced mechanical allodynia is persistently attenuated by the intrathecal injection of AAV-HO-1 ($\bar{x} \pm SEM$)

(A) The timeline of behavioral test and SNI and intrathecal injection of AAV; (B) Representative fluorescence photomicrograph showing mCherry expression in DRG neurons; (C) The distribution of mCherry positive neuronal fibers in the spinal cord; (D, E) Western blot shows that HO-1 protein was significantly increased after intrathecal injection of AAV-HO-1. $*P < 0.05$, compared with the AAV-Control group ($n = 3$); (F-I) Immunostaining and statistical results show the double staining of HO-1 with mCherry ($n = 3$); (J) Intrathecal injection of AAV-HO-1 attenuated SNI-induced mechanical allodynia for more than 21 days. $*P < 0.05$, compared with the AAV-Control group ($n = 5$).

目前还没有特异感染 IB4 阳性神经元的 AAV, 但考虑到 HO-1 具有抗炎作用, 而外周神经损伤后 DRG 神经元几乎都会受到炎症氧化应激损伤^[7,21]。因此, 不管是 IB4 阳性还是阴性神经元中 HO-1 表达上调对神经病理性疼痛缓解是有利的。

综上所述, HO-1 作为一种抗炎症分子, 在神经损伤后 DRG 部位减少。上调 DRG 神经元中 HO-1 表达, 可能具有减轻神经炎症作用, 进而缓解了神经病理性疼痛。

参 考 文 献

- [1] Scholz J, Finnerup NB, Attal N, *et al.* The IASP classification of chronic pain for ICD-11: Chronic neuropathic pain[J]. *Pain*, 2019, 160:53-59.
- [2] 神经病理性疼痛诊疗专家组. 神经病理性疼痛诊疗专家共识 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2013, 19(11):705-710.
- [3] Nitti M, Piras S, Brondolo L, *et al.* Heme oxygenase 1 in the nervous system: Does It favor neuronal cell survival or induce neurodegeneration?[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(8):2260.
- [4] Gandini NA, Alonso EN, Fermento ME, *et al.* Heme oxygenase-1 has an antitumor role in breast cancer[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, 30: 2030-2049.
- [5] Chora AA, Fontoura P, Cunha A, *et al.* Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117:438-447.
- [6] Yachie A, Niida Y, Wada T, *et al.* Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency[J]. *J Clin Invest*, 1999, 103:129-135.
- [7] Zhang ZJ, Guo JS, Li SS, *et al.* TLR8 and its endogenous ligand miR-21 contribute to neuropathic pain in murine DRG[J]. *J Exp Med*, 2018, 215:3019-3037.
- [8] Guo JS, Jing PB, Wang JA, *et al.* Increased autophagic activity in dorsal root ganglion attenuates neuropathic pain following peripheral nerve injury[J]. *Neurosci Lett*, 2015, 599:158-163.
- [9] Zhang Q, Zhu MD, Cao DL, *et al.* Chemokine CXCL13 activates p38 MAPK in the trigeminal ganglion after infraorbital nerve injury[J]. *Inflammation*, 2017, 40:762-769.
- [10] Hu G, Huang K, Hu Y, *et al.* Single-cell RNA-seq reveals distinct injury responses in different types of DRG sensory neurons[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:31851.
- [11] Liu XM, Zhang ZJ, Cheng ZQ, *et al.* Spinal heme oxygenase-1 (HO-1) exerts antinociceptive effects against neuropathic pain in a mouse model of L₅ spinal nerve ligation[J]. *Pain Med*, 2016, 17:220-229.
- [12] Shen Y, Zhang ZJ, Zhu MD, *et al.* Exogenous induction of HO-1 alleviates vincristine-induced neuropathic pain by reducing spinal glial activation in mice[J]. *Neurobiol Dis*, 2015, 79:100-110.
- [13] Zhu MD, Shen Y, Wu XB, *et al.* Overexpression of heme oxygenase 1 in spinal cord alleviates bone cancer pain in mice[J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2015, 95:1341-1344.
- [14] Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: An animal model of persistent peripheral neuropathic pain[J]. *Pain*, 2000, 87:149-158.
- [15] Leibovich H, Buzaglo N, Tsuril S, *et al.* Abnormal reinnervation of denervated areas following nerve injury facilitates neuropathic pain[J]. *Cells*, 2020, doi:10.3390/cells9041007.
- [16] Schipper HM, Song W, Tavittian A, *et al.* The sinister face of heme oxygenase-1 in brain aging and disease[J]. *Prog Neurobiol*, 2019, 172:40-70.
- [17] Egea J, Rosa AO, Lorrio S, *et al.* Haeme oxygenase-1 overexpression via nAChRs and the transcription factor Nrf2 has antinociceptive effects in the formalin test[J]. *Pain*, 2009, 146:75-83.
- [18] Bijjem KR, Padi SS, Ial Sharma P. Pharmacological activation of heme oxygenase (HO)-1/carbon monoxide pathway prevents the development of peripheral neuropathic pain in Wistar rats[J]. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2013, 386:79-90.
- [19] Zhang ZJ, Jiang BC, Gao YJ. Chemokines in neuronal glial cell interaction and pathogenesis of neuropathic pain[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74:3275-3291.
- [20] 李慧莉, 王云. 脊髓和背根神经节电刺激治疗慢性疼痛机制研究进展 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2018, 24(1): 3-7.
- [21] 卜慧莲, 连一闻, 许继田, 等. 利塞膦酸钠对神经病理性疼痛大鼠模型的抗炎镇痛作用 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2019, 25(7):488-493.