

doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2020.09.005

## 骨髓间充质干细胞对树脂毒素介导的小鼠神经病理性疼痛模型镇痛作用及其机制\*

李楠琦<sup>1</sup> 徐雯雯<sup>1</sup> 汤洋<sup>2</sup> 安珂<sup>1△</sup> 万丽<sup>2△</sup>( <sup>1</sup> 中山大学附属第一医院麻醉科, 广州 510080; <sup>2</sup> 广州医科大学附属第二医院疼痛科, 广州 510260 )

**摘要 目的:** 探究骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSC) 对树脂毒素 (resiniferatoxin, RTX) 介导的神经病理性疼痛小鼠的镇痛作用及其机制。**方法:** 36 只 C57BL/6 小鼠随机均分为 3 组 (每组 12 只): 溶剂对照组 (Ctrl 组): 小鼠腹腔注射溶剂、RTX 神经痛组 (RTX 组): 腹腔注射树脂毒素建立 RTX 神经痛模型、骨髓间充质干细胞移植组 (BMSC 组): 骨髓间充质干细胞移植组于造模后 5 天经尾静脉输注骨髓间充质干细胞。在 RTX 注射后 1、5、10、15、20、25、30 天分别测量各组小鼠机械痛阈和热痛阈。在模型建立后 30 天分别对 3 组小鼠进行取材, 应用蛋白印迹检测 p38 MAPK 表达量的变化, 应用免疫荧光技术检测脊髓背角小胶质细胞活化及 BMSC 归巢情况, 同时应用高尔基染色观察 3 组小鼠脊髓背角树突棘可塑性变化。**结果:** RTX 组小鼠机械痛阈在第 5 天开始下降, 第 10 天及以后机械痛阈与对照组相比, 均有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); BMSC 组机械痛阈增加, BMSC 注射后第 20 天差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。RTX 处理后脊髓小胶质细胞标记物 CD11b 及 p38 MAPK 的表达显著高于对照组, RTX 组中小胶质细胞与 p38 MAPK 双染高度共定位。BMSC 注射后小胶质细胞激活减弱, p38 MAPK 蛋白表达降低。**结论:** 骨髓间充质干细胞移植在 RTX 介导的神经病理性疼痛模型中可定向迁移至脊髓背角部位, 可通过减轻小胶质细胞活化和 p38 MAPK 通路激活发挥镇痛作用。

**关键词** 骨髓间充质干细胞移植; 树脂毒素; 神经病理性疼痛; 小胶质细胞激活

### The analgesic effect of bone mesenchymal stem cells transplantation in resiniferatoxin-induced neuropathic pain in mice \*

LI Nan-Qi<sup>1</sup>, XU Wen-Wen<sup>1</sup>, TANG Yang<sup>2</sup>, AN Ke<sup>1△</sup>, WAN Li<sup>2△</sup>( <sup>1</sup> Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;<sup>2</sup> Department of Pain Management, The Second Affiliated Hospital, Guangzhou Medical University, State Key Clinical Specialty in Pain Medicine, Guangzhou 510260, China )

**Abstract Objective:** To elucidate the analgesic effect of bone mesenchymal stem cells (BMSC) transplantation on resiniferatoxin (RTX) induced neuropathic pain in mice and their potential mechanism related to microglia activation. **Methods:** Thirty-six C57BL/6 mice were randomly divided into 3 groups (12 in each group). Control group: intraperitoneal injection of vehicle; RTX neuralgia group: establishment of RTX neuralgia model by intraperitoneal injection of resiniferatoxin; Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation group (BMSC):  $1 \times 10^6$  BMSC was infused through tail vein 5 days after modeling. Mechanical threshold and thermal latency of mice in each group were measured at day 1, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 after administration. Three groups of mice were sampled 30 days after the establishment of the model. Changes of p38 MAPK expression were detected by western blot, microglia activation in spinal dorsal horn and BMSC tracing were detected by immunofluorescence, and plasticity of dendritic spines in spinal dorsal horn was observed by Golgi staining. **Results:** The mechanical withdrawal threshold (MWT) of mice in RTX group began to decline from day 5, since day 10, the difference between RTX and control group was significant ( $P < 0.05$ ). Mechanical withdrawal threshold increased in BMSC group, and the difference was significant at day 20 after BMSC injection ( $P < 0.05$ ). After RTX treatment, the expression of microglia markers CD11b and p38 MAPK

\* 基金项目: 国家自然科学基金 (81171468; 81771182); 广东省自然科学基金 (2018A03031300297)

△ 通讯作者 安珂 anke2002wh@126.com; 万丽 wanli5000cn@163.com



in the spinal cord upregulated than those in the control group, and CD11b in RTX group were co-localized with p38 MAPK. After BMSC injection, the activation of microglia was attenuated and p38 MAPK expression was decreased.

**Conclusion:** Systemic transplantation of BMSC can be directed to the spinal cord dorsal horn in RTX induced neuropathic pain model, and it can produce analgesic effect by reducing microglial activation and p38 MAPK level in RTX treated mice.

**Key words** BMSC transplantation; Resiniferatoxin (RTX); Neuropathic pain; Microglia activation

神经病理性疼痛 (neuropathic pain, NP) 为外周或中枢神经系统结构损伤或者功能紊乱所引起的疼痛。临床上大多数神经病理性疼痛缺乏有效治疗方法, 病人长期疼痛状态导致机体内环境紊乱、精神抑郁、甚至产生自杀的行为。胶质细胞是中枢神经系统内的重要支持细胞, 近年来, 大量的实验证据证明胶质细胞的活化在慢性疼痛的产生及痛觉中枢敏化中起重要作用。干预、逆转痛觉超敏状态, 尤其是中枢水平的痛觉敏化, 探究难治性神经病理性疼痛新的治疗方法是目前疼痛转化研究急待解决的问题<sup>[1]</sup>。骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSC), 为骨髓分离出的一类具有多向分化潜能的干细胞<sup>[2]</sup>, 近年来干细胞治疗也成为国家重点支持的治疗技术与研究方向。目前较多基础研究焦点关注原位移植 BMSC 对损伤的修复作用<sup>[3]</sup>, 但其通过静脉注射发挥免疫调控及治疗神经病理性疼痛的机制仍待进一步探究。本研究通过树脂毒素 (resiniferatoxin, RTX) 介导的新型神经病理性疼痛小鼠模型, 证实了小胶质细胞参与疼痛中枢敏化的形成, 并首次发现了静脉注射 BMSC 可抑制小胶质细胞活化, BMSC 可通过改善脊髓背角树突棘的形态转化改善痛觉过敏的机制, 为临床神经病理性疼痛提供更为理想的治疗方法。

## 方 法

### 1. 实验动物

健康雄性 C57/BL6 小鼠 36 只, 6~8 周龄, 质量 22~25 g, 均为 SPF 级, 购自广东省实验动物中心。实验过程中对动物处置参照国家科学技术部 2006 发布的《关于善待动物的指导性意见》的相关要求<sup>[4]</sup>。

### 2. 主要试剂及仪器

von Frey 纤毛仪购自美国 Stoelin 公司, C57/BL6 来源的 GFP-BMSC 购自 Cyagen Biosciences 广州公司; DMEM 低糖培养基、胎牛血清 Fetal Bovine Serum (FBS)、0.25% 胰蛋白酶、二甲基亚砜购自 Gibco 美国公司; CD11b 兔抗小鼠抗体、MAPK p38 鼠单克隆抗体, Alex488 羊抗兔, Cy3 羊抗鼠二抗购自 Abcam 公司。HRP 山羊抗兔二抗购自武汉

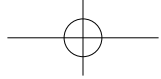
Proteintech 公司; FD Rapid GolgiStain™ Kit FD 快速高尔基染色试剂盒购自美国 ThermoFisher Scientific 公司; Western blot 电泳、转膜仪购自 Bio-Rad 公司, 荧光倒置显微镜购自日本 Leica 公司。

### 3. 动物模型的建立及分组

恒温清洁环境, 光照 12 h, 湿度 50%, 予充足饮水及食物, 每 3 天更换垫料, 饲养 1 周后随机分为 3 组, 每组 12 只: ①溶剂对照组 (Control 组): 一次性腹腔注射 200  $\mu$ l 溶解树脂毒素所用溶剂 10% 酒精 10% 吐温 80; ② RTX 神经痛组 (RTX 组): 腹腔注射树脂毒素 100  $\mu$ g/kg, 溶解于 10% 酒精加 10% 吐温 80 溶液中, 即每只造模剂量为 4  $\mu$ g。注射 RTX 后第 5 天注射 200  $\mu$ l PBS; ③骨髓间充质干细胞移植组 (BMSC 组): RTX 神经痛建立后 5 天, 每只小鼠单次尾静脉输注包含骨髓间充质干细胞  $1 \times 10^6$  个的 200  $\mu$ l 细胞悬液。每组小鼠行为学取 5 只进行作图统计。细胞移植剂量的选取根据文献<sup>[5]</sup>以及预实验。小鼠尾静脉注射使用 1 ml 刻度胰岛素注射针。各组小鼠在手术后第 30 天统一处理、取材, 并进行各指标的检测。

### 4. 行为学测试

机械痛阈 (mechanical withdrawal threshold, MWT) 测试时间固定于 10:00~12:00 进行, 测试前 30 min 将小鼠置于玻璃箱中适应环境。采用 von Frey filaments 测试, 使用 0.07 g~2 g 范围的纤维丝对小鼠右后足底进行 MWT 测定, 从 0.07 g 纤维丝开始, 刺激小鼠右后足底使纤毛稍弯曲呈 S 形, 持续时间  $\leq 5$  s, 小鼠出现舔足或足缩回的数值记为阳性反应。若 5 次测定中阳性反应不足 3 次则给予相邻大一级强度纤维丝的刺激<sup>[6]</sup>。两次刺激之间至少间隔 15 s。将出现 3 次以上阳性反应的最小纤维强度定为小鼠的 MWT。每只小鼠测试 5 次取 MWT 平均值, 每组统计 5 只小鼠。于 RTX 注射前 1 天测试基线值作自身对照, 以及注射 RTX 注射后 1、5、10、15、20、25、30 天测试小鼠右足底对机械刺激的反应。Hargreaves 热痛阈 (thermal withdrawal latency, TWL) 与 MWT 测试间隔 1 h, 小鼠置于 Hargreaves 热痛仪透明玻璃板上, 使用红外光斑照射右足, 记录出现缩足反应时间, cut-off 时间设置为 20 s 避免小鼠足底损伤。



### 5. GFP-骨髓间充质干细胞培养、扩增

取内含  $1 \times 10^6$  BMSC 的冻存细胞复苏, 接种于 T25 培养瓶中, 于  $37^\circ\text{C}$ , 体积分数 5%  $\text{CO}_2$  恒温培养箱中培养。使用含体积分数 10% 胎牛血清的 L-DMEM 完全培养基进行细胞培养, 次日更换培养基。2 天后细胞铺满瓶底约 90%, 加入 0.25% 胰酶 2 ml 消化 2~3 min, 800 rpm, 离心半径 12 cm, 离心 5 min, 按 1:2 比例传代。细胞传至第 8 代后用胰酶消化后离心, 细胞计数板计数后取  $1 \times 10^6$  BMSCs 重悬于 200  $\mu\text{l}$  PBS 中, 于 RTX 注射第 5 天, 用 1 ml 胰岛素注射器给小鼠尾静脉注射细胞, RTX 模型组注射 200  $\mu\text{l}$  0.1 M PBS。

### 6. 组织切片与染色

RTX 模型建立 30 天后, 每组小鼠于氯胺酮联合咪达唑仑深麻醉下, 开胸暴露心脏, 以 0.1 M PBS 从左心灌注冲净血液后以 4% 多聚甲醛灌注固定, 取腰段  $\text{L}_2\text{-L}_5$  脊髓组织, 每组 6 只, 4% 多聚甲醛后固定 48 h, 30% 蔗糖溶液脱水沉底后, 以 OCT 包埋于冰冻切片机作 25  $\mu\text{m}$  连续冠状切片, 进行免疫荧光染色观察。主要观察指标: 观察 3 组小鼠脊髓背角 CD11b 标记的小胶质细胞形态及激活情况, GFP 染色观察 BMSC 归巢情况。免疫荧光染色步骤: 冰冻切片用 0.1 M PBS 振荡清洗后加入 3% 山羊血清和 0.3% Triton100X 的封闭液室温封闭 2 h, 加入一抗 GFP (1:400), CD11b (1:400), p38 MAPK (1:200) 后  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜, 吸净一抗后加入 0.1 M PBS 清洗 10 min  $\times$  3 次, 滴加荧光二抗工作液 Alex488 (1:600), Cy3 (1:1000) 室温孵育 2 h, 0.1 M PBS 振荡冲清洗 10 min  $\times$  3 次, 50% 甘油封片, 荧光显微镜下观察, 激发波长为 550/565 nm 的 Cy3 呈红色荧光表示, 激发波长为 488 nm 的 Alex488 荧光显示为绿色, 两受体共存表达处显示黄色荧光。

7. 免疫印迹检测小鼠腰段脊髓 p38 蛋白的表达情况

RTX 模型建立 30 天后, 使用 RIPA 蛋白提取液提取 3 组小鼠  $\text{L}_2\text{-L}_5$  脊髓总蛋白, 每组 3 只。取出小鼠脊髓后以液氮速冻, 然后在冰上使用研磨器及超声破碎组织, 使用二喹啉酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量试剂盒对提取的蛋白进行定量。各组取 30  $\mu\text{g}$  等量总蛋白在 12% SDS-PAGE 上电泳 (电压 80 V 20 min, 120 V 1 h), 之后转移到 PVDF 膜上, 300 mA 转膜 2 h。5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 一抗  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜, 一抗分别为 GAPDH (1:10 000), p38 MAPK (1:2000) 用辣根过氧化物酶 (HRP) 共轭的二抗室温孵育 2 h, ECL 显影剂显影曝光。

### 8. 高尔基染色

RTX 模型建立 30 天后, 每组小鼠在氯胺酮联合咪达唑仑麻醉液 (100 mg/kg 氯胺酮 + 50 mg/kg 咪达唑仑) 深麻醉下处死小鼠后取出腰段脊髓, 每组取材 3 只。用蒸馏水冲净表面血液, 在冰冻震荡切片机上将脊髓切成 10 mm 的小块, 根据 Ramón Moliner, Glaser 和 Van der Loos 所阐述的方法原理设计的 FD Rapid GolgiStain<sup>TM</sup> Kit (FD 快速高尔基染色试剂盒) 操作指导进行染色, 统计每组小鼠脊髓背角浅层的至少三个独立神经元的完整树突上蘑菇形态树突棘密度。

### 9. 统计学分析

数据采集、统计及绘图分别使用 Excel、SPSS 和 Graphpad Prism 7.0 软件进行; 行为学测试结果用均数  $\pm$  标准误 ( $\bar{x} \pm SEM$ ) 表示。对于各组行为学痛阈和免疫荧光阳性细胞数、免疫印迹灰度值比较采用单因素重复测量方差分析 (One-way Repeated measurement ANOVA) 并对同一时间点进行组间比较,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

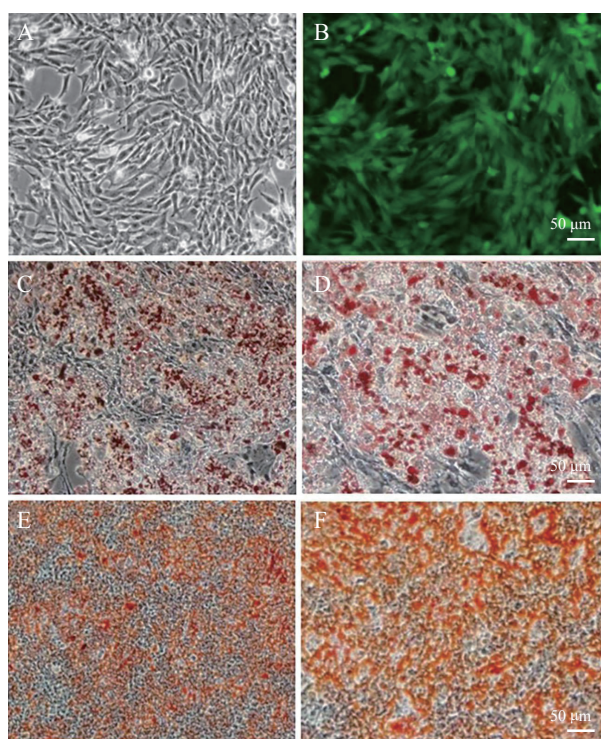
## 结 果

### 1. GFP-BMSC 的培养纯化

培养纯化的第 8 代骨髓间充质干细胞聚集度 80%,  $1 \times 10^6$  密度, 在倒置相差显微镜下, 呈簇状分布的梭形细胞聚集, GFP 标记的骨髓间充质干细胞在荧光显微镜下以 488 nm 光激发, 细胞轮廓清晰, 胞膜完整, 细胞呈绿色 (见图 1A)。成脂诱导分化细胞贴壁 100% 汇合后, 加入间质干细胞成脂诱导液, 成脂诱导 7 天后, 细胞内有小脂滴出现, 约 13 天后脂滴数量增加并相互融合, 细胞由长梭形变为圆形或多边形, 油红 O 染色显示有大量脂质沉淀 (见图 1B)。成骨诱导分化细胞贴壁约 70% 汇合后, 加入间质干细胞成骨诱导液, 诱导培养 15 天, 胞质内充满颗粒, 细胞呈集落样生长, 细胞间可见钙质沉积, 细胞结节中心的细胞逐渐融合失去细胞结构, 钙结节形成明显, 经茜素红染色呈红色结节 (见图 1C)。

### 2. 小鼠行为学分析

每组统计 5 只小鼠, RTX 组 MWT 在第 5 天开始下降, 第 10 天与溶剂对照组有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 且持续至 RTX 给药后 30 天。机械异常疼痛的改变提示 RTX 诱导神经性疼痛模型建立成功 (见图 2A)。BMSC 组于 RTX 注射后第 10 天 MWT 开始升高, 至第 25 天即 BMSC 注射后 20 天与



**图 1** (A, B) 显微镜下骨髓间充质干细胞梭形形态及在 488 nm 激光激发下呈绿色的 GFP 标记; (C, D) 100 倍及 200 倍放大观察 BMSC 的成脂诱导分化能力; (E, F) 观察 BMSC 的成骨诱导分化能力 标尺 = 50  $\mu\text{m}$

**Fig. 1** (A, B) Characterization of the morphological of BMSC were observed under the microscope; (C, D) The adipogenic differentiation abilities of BMSC; (E, F) The osteogenic differentiation abilities of BMSC. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$

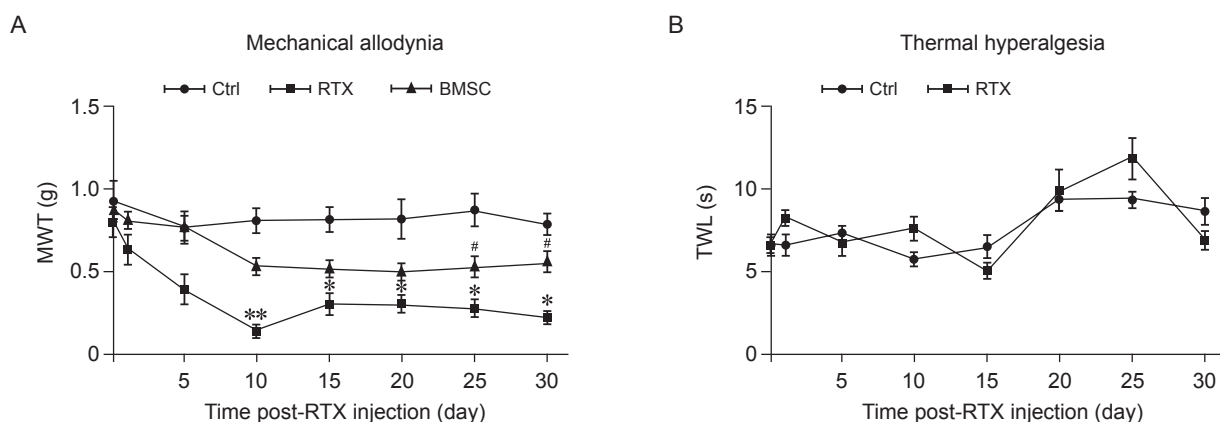
RTX 组差异有显著性并持续至第 30 天 ( $P < 0.05$ , 见图 2B)。对照组小鼠与 RTX 模型组小鼠 TWL 无显著性差异。

### 3. 荧光显微镜观察骨髓间充质干细胞标记情况

在 RTX 模型第 30 天, GFP 抗体染色的 BMSC 注射组小鼠腰段脊髓有绿色阳性细胞, 细胞轮廓清晰, DAPI 染色叠片显示完整细胞核, 且绿色荧光细胞大部分位于脊髓背角浅层, 说明 BMSC 定向归巢至小鼠脊髓背角 (见图 3)。

### 4. 对 RTX 注射 30 天后取材小鼠腰段脊髓进行荧光染色

在荧光显微镜下, 小胶质细胞标记物 CD11b 显示红色荧光, 小胶质细胞胞体明显, RTX 组较对照组 CD11b 阳性明显增加 ( $P < 0.05$ , 见图 4A 和图 5), 胞体肥大且突触增粗, 呈阿米巴样活化形态, BMSC 治疗组 CD11b 阳性表达较 RTX 组显著减少, ( $P < 0.01$ , 见图 4D 和图 5); 免疫印迹法检测 3 组小鼠脊髓 p38 MAPK 蛋白表达, RTX 组 p38 MAPK 蛋白表达明显上调, BMSC 注射组 p38 MAPK 表达下调 ( $P < 0.05$ , 见图 4C、4D 和图 5); Western blot 结果显示 RTX 组小鼠脊髓 MAPK p38 MAPK 蛋白表达显著上调, 而 BMSC 移植组 p38 MAPK 表达降低 (见图 4B 和 4C); 小胶质细胞标记物 CD11b 与 p38 MAPK 双染显示, 在 RTX 组 p38 MAPK 与小胶质细胞有高度共定位, 且 RTX 组 p38 MAPK 与 CD11b 双染阳性细胞与对照组相比增多, 而在 BMSC 组降低 (见图 5)。



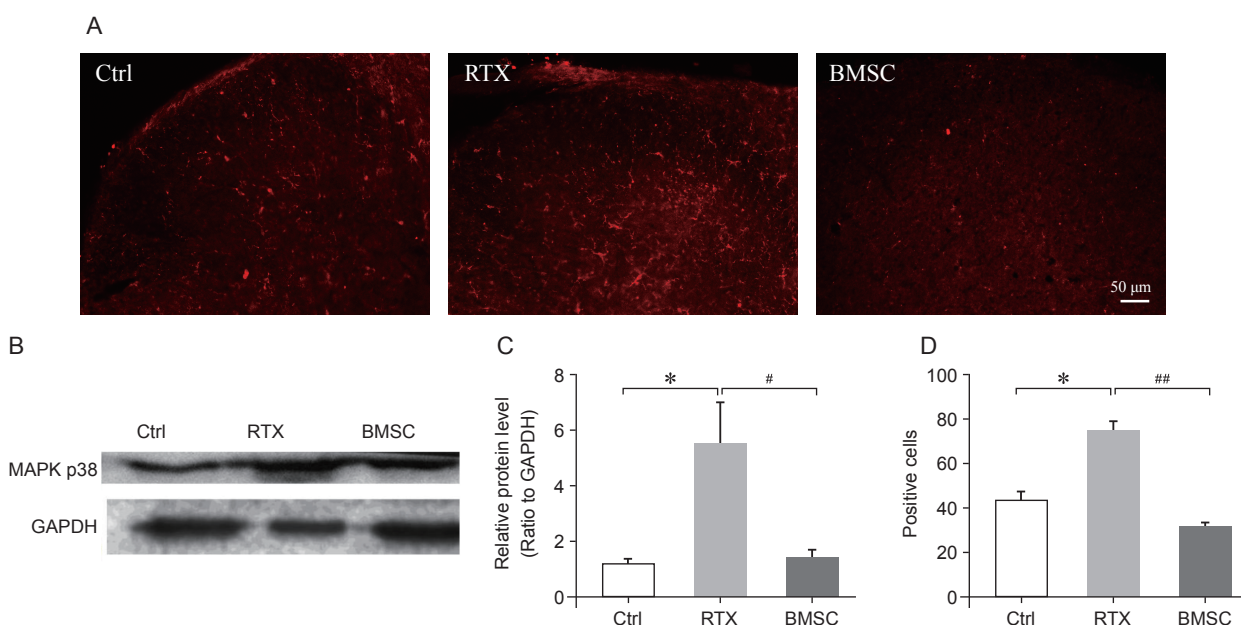
**图 2** 腹腔注射药物后 0、1、5、10、15、20、25、30 天各组小鼠 MWT 的比较 ( $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm SEM$ ) (A) 三组小鼠机械痛阈比较; (B) Ctrl 组与 RTX 组热痛阈比较 \* $P < 0.05$ , 与 Ctrl 组相比; # $P < 0.05$ , 与 RTX 组 MWT 值相比

**Fig. 2** Comparison of MWT at day 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 after the intraperitoneal injection of Ctrl, RTX and BMSC treatment ( $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm SEM$ ) (A) Comparison WMT of three groups of mice; (B) Comparison TWL of Ctrl and RTX group. \* $P < 0.05$ , compared with Ctrl group; # $P < 0.05$ , compared with group RTX.



**图 3** 注射 BMSC 后第 25 天, BMSC 组骨髓间充质干细胞在  $L_2-L_5$  脊髓背角的归巢情况  
脊髓背角 GFP 标记的骨髓间充质干细胞发出绿色荧光, DAPI 显示细胞核染色, 细胞核发出蓝色荧光。  
Ctrl 和 RTX 组为阴性染色 (结果未展示) 标尺 = 50  $\mu\text{m}$

**Fig. 3** Localization of GFP-BMSC by immunofluorescence on the surface of the  $L_2-L_5$  level spinal cord at day 25 after BMSC injection  
BMSC labeled with GFP in the spinal dorsal horn showed green fluorescence, DAPI showed nuclear staining, showing blue fluorescence. Ctrl and RTX were negative staining (the results were not shown). Scale bar = 50  $\mu\text{m}$



**图 4** (A) 三组小鼠  $L_2-L_5$  脊髓背角中小胶质细胞标记物 CD11b 表达的比较 (放大倍数为  $\times 200$  倍); (B) Western Blot 检测各组 p38 MAPK 蛋白条带图; (C) 柱状图对比各组免疫荧光染色 CD11b 阳性细胞数差异 ( $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm SEM$ ),  $*P < 0.05$ , 与 Ctrl 组相比;  $^{\#}P < 0.05$ , 与 RTX 组相比; (D) 各组 Western blot p38 MAPK 蛋白条带灰度差异 ( $n = 3$ ),  $*P < 0.05$ ,  $^{##}P < 0.01$ , 与 RTX 组相比

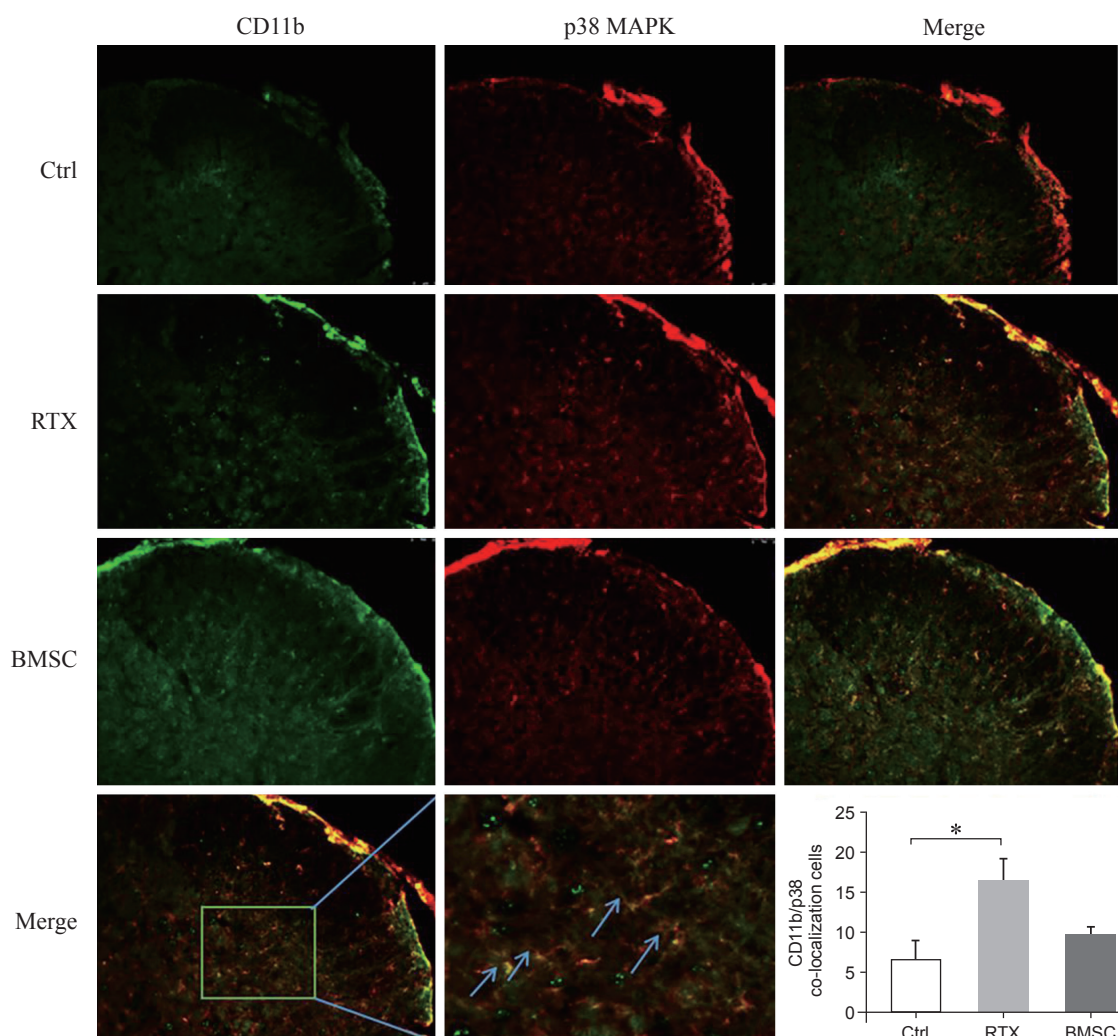
**Fig. 4** (A) The immunofluorescence of activated microglia in the spinal dorsal horn of three groups of mice. The red CD11b labeled the activated microglial; (B) MAPK p38 protein band image of each group detected by Western Blot; (C) Positive cells of CD11b in spinal dorsal horn of different group of mice ( $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm SEM$ ).  $*P < 0.05$ , compared with Ctrl group;  $^{\#}P < 0.05$ , compared with group RTX; (D) p38 protein relative content of each group ( $n = 3$ ).  $*P < 0.05$ ,  $^{##}P < 0.01$ , compared with group RTX.

#### 5. 通过对腰段脊髓的高尔基染色观察每组小鼠突触形态学变化

RTX 组树突上头宽大于颈长的蘑菇形态样树突棘明显增多 (见图 6)。提示蘑菇形态树突棘的形成与疼痛密切相关<sup>[7]</sup>。统计每组小鼠脊髓背角神经元树突上蘑菇形态树突棘密度发现, 与对照组相比 RTX 组蘑菇型树突棘密度增加 ( $P < 0.05$ ), BMSC 组蘑菇形态树突棘密度较 RTX 组降低 ( $P < 0.05$ )。

#### 讨 论

树脂毒素 (resiniferatoxin) 为辣椒素类似物的超强毒素衍合物、TRPV1 的激动剂、可导致无髓鞘的 C 类神经纤维丧失, 损伤有髓鞘 A $\delta$  神经纤维, RTX 介导的疼痛模型可使大鼠机械痛觉过敏, 并介导脊髓背角 P 物质、CGRP 致痛神经肽的释放。临床上带状疱疹后神经痛的病人可呈现机械性感觉异



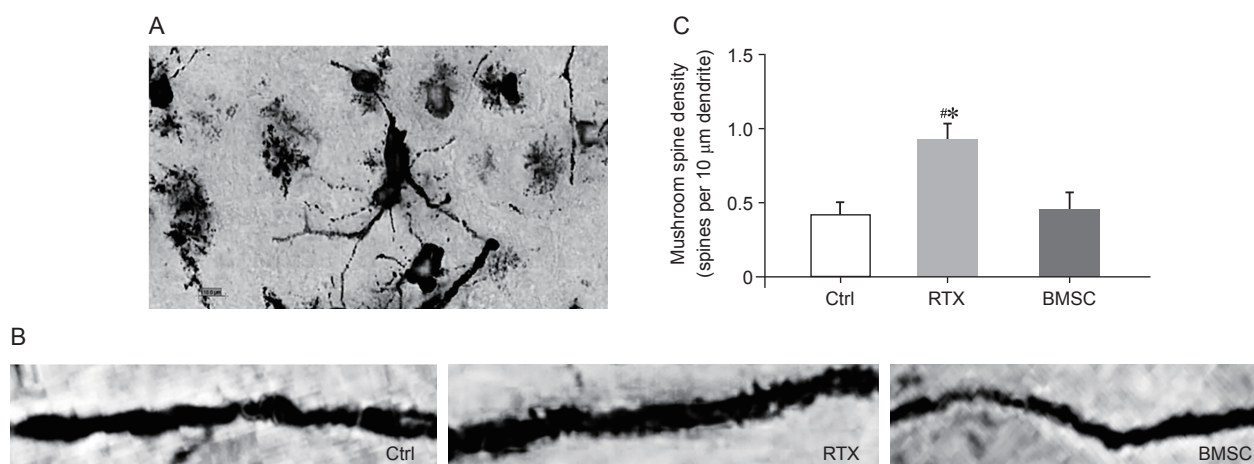
**图 5** 三组小鼠小胶质细胞标记物 CD11b 与 p38 MAPK 荧光双染共表达情况  
红色区域为脊髓背角 p38 MAPK 阳性表达, 绿色区域为小胶质细胞 CD11b 阳性表达, Merge 为融合后结果, 显示 p38 与小胶质细胞共表达; 箭头及方框内所示黄色区域为共表达部位 (放大倍数为  $\times 20$  倍); 柱状图对比各组 CD11b 与 p38 共定位细胞数差异 ( $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm SEM$ ). \* $P < 0.05$ , 与 RTX 组相比

**Fig. 5** Immunofluorescence image of microglial marker CD11b and p38 MAPK double staining in spinal dorsal horn of three groups  
Double-staining for p38 MAPK (red) and CD11b (green) reveals a yellow co-localization (arrows); Positive cells of CD11b co-localization with p38 MAPK in spinal dorsal horn of different group of mice ( $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm SEM$ ). \* $P < 0.05$ , compared with group RTX.

常, 大多数病人患区皮肤有痛觉超敏, 而热敏感度减退。有研究指出带状疱疹病人外周神经的出芽变性, 轴突缺失的病变与 RTX 诱导的病理神经性疼痛模型病理表现相似<sup>[8]</sup>, 其造成的机械痛觉超敏也较为贴近带状疱疹后神经痛的临床表现。因此, 本研究选择 RTX 模型小鼠作为研究对象, 探究神经病理性疼痛状态下小胶质细胞的激活与痛敏的关系。本研究发现, RTX 处理小鼠出现显著的机械痛觉过敏现象, 低机械痛阈可维持至第 30 天, 但注射 RTX 后热痛阈与对照组相比差异无显著性; 同时脊髓小胶质细胞活性明显增强, 说明小胶质细胞的激活与 RTX 诱导的机械痛敏密切相关, 与 Lei 等<sup>[9]</sup> 的研究

结果一致。

作为神经系统的吞噬细胞, 小胶质细胞在损伤后不仅介导炎症介质释放, 且是造成神经鞘膜脱髓鞘病变的重要致病机制<sup>[10]</sup>。近年来的研究支持胶质细胞活化引起疼痛敏化的观点, 当机体受到伤害性刺激时, 小胶质细胞由静息表型转化为活化表型, 激活一系列疼痛相关性通路以及炎症因子的释放, 导致疼痛的中枢敏化和疼信号的级联放大<sup>[11,12]</sup>。有研究发现, 小胶质细胞的拮抗剂虽然具有镇痛作用, 如非选择性拮抗剂米诺环素 (minocycline), 以及星状神经细胞拮抗剂氟代柠檬酸 (fluorocitra), 但这两者的镇痛作用持续时间短暂, 不仅对已经形成的迟



**图 6** 高尔基染色显示小鼠脊髓背角神经元及树突棘可塑性变化  
(A) 脊髓背角浅层完整神经元形态; (B) 各组小鼠神经元发出树突上树突棘形态, RTX 组蘑菇形态树突棘增加;  
(C) 各组蘑菇形态树突棘平均密度 ( $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm SEM$ )  
\* $P < 0.05$ , 与对照组相比;  $^{\#}P < 0.05$ , 与 BMSC 组相比

**Fig. 6** Golgi-stained coronal sections of spinal cord tissue

(A) Representative image of the dorsal horn with a wide-dynamic range (WDR) neuron located in laminae II; (B) Dendritic spines appear on neuronal dendrites and vary in density and morphology. RTX increased mushroom spine density and BMSC treatment decreased mushroom spine density in mice; (C) Mushroom spine density of each group ( $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm SEM$ )  
\* $P < 0.05$ , compared with group Ctrl;  $^{\#}P < 0.05$ , compared with group BMSC.

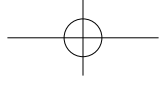
发神经病理性疼痛作用有限, 而且对损伤的神经鞘膜无修复作用, 并具有一定程度的神经毒性<sup>[13]</sup>。因此早期修复损伤的轴突, 控制小胶质细胞的激活, 可能为修复损伤的神经鞘膜带来契机。

干细胞治疗是近年来用于神经病理性疼痛的新方法, 既往研究焦点为干细胞通过分化为损伤部位同类细胞, 替代正常细胞所需的功能达到修复作用, 但最近的研究更关注于干细胞通过旁分泌机制调节机体免疫微环境的能力, 其特有的免疫抑制及调节能力可促使 M1 促炎型胶质细胞向 M2 抗炎胶质细胞的转化<sup>[14]</sup>, 从而抑制炎症反应及缓解疼痛。骨髓间充质干细胞作为研究较多的干细胞, 其具有自我更新、多向分化潜能的特点。体外实验证明, 骨髓间充质干细胞与小胶质细胞共培养, 可以抑制 TNF- $\alpha$  刺激后的小胶质细胞的激活<sup>[15]</sup>。但以往的细胞治疗研究侧重于原位移植骨髓间质干细胞于损伤部位, 通过 BMSC 自分泌的神经营养因子 BDNF 产生神经修复作用<sup>[16]</sup>。而本研究则是通过全身作用的方式对 BMSC 在神经病理性疼痛的修复机制进行了探讨。

由于疼痛中枢敏化在外周神经及中枢水平广泛存在, 因此本研究中采用尾静脉注射的方式, 直接干预痛觉敏化的外周及中枢各阶段, 观察 BMSC 的全身效应。根据前期预实验及相关文献, 选择  $1 \times 10^6$  作为小鼠细胞注射数量<sup>[5]</sup>。研究发现, 尾静

脉注射 BMSC 后第 10 天开始小鼠 MWT 开始升高, 但与 RTX 组对比无显著性差异, 直至 BMSC 注射后第 20 天, BMSC 组小鼠痛阈升高与对照组相比才具有显著差异, 说明 BMSC 在迁移至炎症部位前, 在外周发挥有限的免疫调节作用。既往通过尾静脉注射直接观察到骨髓间充质干细胞归巢的研究并不多, 有学者研究认为, 经过尾静脉注射的干细胞大多嵌顿于肺, 需耗时约 2 周才能从肺迁移到损伤部位, 且迁移至损伤部位的细胞数量少<sup>[17]</sup>。本研究中观察到, BMSC 经尾静脉注射后 20 天, BMSC 对 RTX 处理小鼠产生明显的抗痛敏作用, 提示经尾静脉注射, BMSC 可迁移至损伤部位, 且可通过调节脊髓背角突触可塑性, 对已经形成的慢性神经病理性疼痛发挥镇痛作用。此外, 相较于原位移植, 静脉注射干细胞侵入性损伤更小, 操作较为简便。虽然本研究对细胞迁移现象有所观察, 但对于促进这种现象发生涉及的趋化因子及迁移到脊髓的干细胞的转归还需更长期的研究和探讨。

慢性疼痛中枢敏化的最终结果是伤害神经信号的不断上传导致中枢水平突触可塑性变化。树突棘是微米级的树突突起, 可以调节突触传递的功效。树突棘可分为头宽大于颈长的蘑菇型树突和头宽小于颈长的细长型树突, 疼痛的形成与蘑菇型树突棘密度增加密切相关, 蘑菇型树突棘密度可以作为新



的协助支慢性疼痛确诊的生物标记物之一<sup>[18,19]</sup>。本研究中高尔基染色结果显示, RTX 小鼠脊髓背角神经元树突棘发生了形态学变化, RTX 组小鼠蘑菇型树突棘密度增加, 而 BMSC 治疗后, 蘑菇型树突棘密度降低(见图 6)。本研究结果证实了蘑菇型树突棘与神经病理性疼痛的相关性, BMSC 可以逆转慢性疼痛状态下已形成的树突棘形态改变, 对迟发性及慢性神经病理性疼痛产生治疗作用。

已有的研究提示, 胶质细胞活化后, 首先激活丝裂酶原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)典型的 p38 通路, 继而启动下游炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  的释放, 炎症因子更进一步促进 MAPK 信号的激活, 进而引发炎症级联反应, 导致损伤及修复性改变<sup>[11]</sup>。本研究中注射 RTX 后不仅 RTX 处理小鼠呈现显著的痛觉过敏行为, 且脊髓背角的小胶质细胞标志物 CD11b 及 p38 MAPK 表达显著增加, 说明 p38 MAPK 通路介导了小胶质细胞活化后的炎症损伤反应。而 BMSC 处理后显著干预了脊髓 p38 MAPK 蛋白表达水平, 表明 BMSC 可能通过干预 p38 MAPK 通路的免疫调节能力发挥镇痛作用。

综上所述, 小胶质细胞的活化及 p38 MAPK 参与了小鼠 RTX 介导的神经病理性疼痛的形成, 通过静脉注射骨髓间充质干细胞, 可显著改善 RTX 小鼠的机械痛敏, 骨髓间充质干细胞可能是通过迁移至脊髓背角抑制小胶质细胞活化、p38 MAPK 表达、改善树突棘可塑性改变而达到镇痛作用。本研究结果为干细胞应用于临床难治性神经病理性疼痛提供了理论依据。

### 参 考 文 献

- [1] Ji RR, Berta T, Nedergaard M. Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? [J]. *Pain*, 2013, 154(1):S10-S28.
- [2] Beggs KJ, Lyubimov A, Borneman JN, *et al*. Immunologic consequences of multiple, high-dose administration of allogeneic mesenchymal stem cells to baboons[J]. *Cell Transplant*, 2006, 15:711-721.
- [3] Watanabe S, Uchida K, Nakajima H, *et al*. Early transplantation of mesenchymal stem cells after spinal cord injury relieves pain hypersensitivity through suppression of pain-related signaling cascades and reduced inflammatory cell recruitment[J]. *Stem Cells*, 2015, 33:1902-1914.
- [4] 中华人民共和国科学技术部关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [5] Guo W, Wang H, Zou SP, *et al*. Bone Marrow Stromal Cells Produce Long-Term Pain Relief in Rat Models of Persistent Pain[J]. *Stem Cells*, 2011, 29:1294-1303.
- [6] Tan AM, Waxman SG. Dendritic spine dysgenesis in neuropathic pain[J]. *Neurosci Lett*, 2015, 601:54-60.
- [7] Pan HL, Khan GM, Alloway KD, *et al*. Resiniferatoxin induces paradoxical changes in thermal and mechanical sensitivities in rats: mechanism of action[J]. *J Neurosci*, 2003, 23:2911-2919.
- [8] Wu CH, Lv ZT, Zhao Y, *et al*. Electroacupuncture improves thermal and mechanical sensitivities in a rat model of postherpetic neuralgia[J]. *Mol Pain*, 2013, 9:188.
- [9] Lei Y, Sun Y, Lu C, *et al*. Activated Glia Increased the Level of Proinflammatory Cytokines in a Resiniferatoxin-Induced Neuropathic Pain Rat Model[J]. *Reg Anesth Pain Med*, 2016, 41:744-749.
- [10] Loyd AF, Davies CL, Miron VE. Microglia: origins, homeostasis, and roles in myelin repair[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2017, 47:113-120.
- [11] 王益敏, 易增兴, 林世清, 等. 脊髓背角胶质细胞及 p38 MAPK 参与介导髓核致炎大鼠神经根痛 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2018, 24(1):14-23.
- [12] 王伍超, 郭晓丽, 胡理. 神经胶质细胞活化在神经病理性疼痛中的作用研究进展 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2017, 23(7):549-597.
- [13] Sumitani M, Ueda H, Hozumi J, *et al*. Minocycline does not decrease intensity of neuropathic pain intensity, but does improve its affective dimension[J]. *J Pain Palliat Care Pharmacother*, 2016, 30:31-35.
- [14] Franco R, Fernández-Suárez D. Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system[J]. *Prog Neurobiol*, 2015, 131:65-86.
- [15] Yan K, Zhang R, Sun C, *et al*. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Maintain the Resting Phenotype of Microglia and Inhibit Microglial Activation[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e84116.
- [16] 郭凯凯, 徐龙河, 路桂军, 等. 骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠复杂性区域疼痛综合征 I 型的疗效及机制研究 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2019, 25(4):259-266.
- [17] Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, *et al*. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: The pulmonary first-pass effect[J]. *Stem Cells Dev*, 2009, 18:683-692.
- [18] Huganir RL, Nicoll RA. AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years[J]. *Neuron*, 2013, 80:704-717.
- [19] Zhao P, Hill M, Liu S, *et al*. Dendritic spine remodeling following early and late Rac1 inhibition after spinal cord injury: evidence for a pain biomarker[J]. *J Neurophysiol*, 2016, 115:2893-2910.