



DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2018.06.003  
[www.csumed.org/xbwk/fileup/PDF/201806589.pdf](http://www.csumed.org/xbwk/fileup/PDF/201806589.pdf)

## p38MAPK信号通路在大鼠幻肢痛中的作用

姜慧，陈永权，刘金涛

(皖南医学院第一附属医院弋矶山医院麻醉科，安徽 芜湖 241000)

**[摘要]** 目的：探讨p38MAPK信号通路在患有幻肢痛的大鼠脊髓和背根神经节内的激活情况，以及给予特异抑制剂后的影响。方法：取健康成年雄性SD大鼠( $n=48$ )麻醉下行一侧坐骨神经横断术建立幻肢痛模型，同时另取同窝健康大鼠作为假手术组(S组， $n=24$ )。术后观察大鼠咬噬情况，并进行咬噬评分。将成模后的幻肢痛大鼠随机分成2组：幻肢痛组(P组， $n=24$ )和幻肢痛p38MAPK通路抑制剂组(P+I组， $n=24$ )。成模后的每周一，P+I组大鼠静脉注射p38MAPK抑制剂SB203580 0.8 mg/kg，其余组静脉注射等量的生理盐水。于给药后第4周末(T1)、第6周末(T2)和第8周末(T3)分别从各组中随机取8只大鼠，分别检测脊髓和背根神经节(DRG)的磷酸化p38MAPK(P-p38MAPK)水平。结果：与S组比较，成模的幻肢痛组大鼠自术后第2天开始陆续发生咬噬，咬噬评分8~11分；在给予抑制剂后，P+I组的咬噬评分有所下降。与S组相比，P组和P+I组大鼠P-p38MAPK水平明显升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )；与P组比较，P+I组P-p38MAPK的表达水平明显降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。结论：p38MAPK信号通路参与大鼠幻肢痛的疼痛的调控。

**[关键词]** 幻肢痛；p38MAPK；脊髓；背根神经节

## Role of p38MAPK signaling pathway in rats with phantom limb pain

JIANG Hui, CHEN Yongquan, LIU Jintao

(Department of Anesthesiology, Yijishan Hospital, First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu Anhui 241000, China)

### ABSTRACT

**Objective:** To investigate the role of p38MAPK signal pathway in spinal cord and dorsal root ganglion (DRG) in rats with phantom limb pain and the effects of specific inhibitors.

**Methods:** Healthy adult male SD rats ( $n=48$ ) were cut off one side of the sciatic under anesthesia to establish a model of phantom limb pain. In addition, the healthy rats were taken as a sham group (group S,  $n=24$ ). The animals were scored by observing the action of chewing (0=no chewing, 13=the worst chewing) after the operation and were sacrificed on the following day after the operation. The successful model of phantom limb pain were randomly divided into 2 groups: a phantom limb pain group (group P,  $n=24$ ) and a phantom limb pain plus inhibitor group (group P+I,  $n=24$ ). SB203580 was given to the rat at 0.8 mg/kg on every Monday until the rats were

收稿日期(Date of reception): 2017-07-20

第一作者(First author): 姜慧, Email: 1054280356@qq.com, ORCID: 0000-0001-8438-5478

通信作者(Corresponding author): 陈永权, Email: chenyq263@163.com, ORCID: 0000-0001-5776-1298

sacrificed, the rest of the rats received an equal amount of saline. Eight rats from each group were randomly taken for the determination of levels of P-p38MAPK in spinal cord and DRG before administration and on the 4th, 6th, 8th weekend following the administration, respectively.

**Results:** In the sham group, no animal developed chewing. Meanwhile, rats in successful model of phantom limb pain group began chewing from the 2nd day after operation with scores at eight to eleven. The chewing scores in the P+I group were reduced after the treatment. Compared with group S, P-p38MAPK levels were elevated in groups of P and P+I ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). Compared with group P, P-p38MAPK level was decreased in the group P+I ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ).

**Conclusion:** P38MAPK signal pathway involves in the development of phantom limb pain.

## KEY WORDS

phantom limb pain; p38MAPK; spinal cord; dorsal root ganglion

幻肢痛(phantom limb pain, PLP)是一种常见的神经病理性疼痛，在截肢的患者中发病率为50%~80%<sup>[1-2]</sup>，此病理过程涉及到整个支配肢体运动的传入和传出神经系统，随之而来的逆行变化可能会影响周围神经系统及中枢神经系统<sup>[3]</sup>。丝裂酶原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)是细胞内重要的信号转导通路之一，参与诸多病理过程的发生。目前已有相关研究<sup>[4]</sup>证明p38MAPK信号通路参与糖尿病大鼠的神经病理性疼痛的形成与维持，但是p38MAPK信号通路是否参与幻肢痛的病理过程还不是很清楚。本实验拟研究p38MAPK信号通路在幻肢痛中的发生机制及作用，以便为幻肢痛提供新的治疗方向。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

清洁级健康成年雄性SD大鼠72只，体重220~300 g，由南京青龙山实验动物饲养公司提供。所有大鼠分笼饲养，自由进食饮水，昼夜交替，适应1周后进行实验。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物分组

随机分为3组：假手术组(S组,  $n=24$ )、幻肢痛组(P组,  $n=24$ )和幻肢痛抑制剂组(P+I组,  $n=24$ )，每组又随机分为4周、6周和8周3个亚组，每亚组8只。

#### 1.2.2 幻肢痛模型的制备

术前禁食8 h，自由饮水，腹腔注射1%的戊巴比妥钠(30~40 mg/kg)麻醉后，随机选择一侧坐骨神经，P组和P+I组在距离梨状肌下孔0.5 cm处切除0.5 cm的坐骨神经，远端翻转固定于肌肉中并逐层缝合，S组仅分离坐骨神经后逐层缝合。所有动物手术后在同一环境下饲养。

#### 1.2.3 咬噬程度评价

术后第2天开始观察大鼠的咬噬情况，当发生咬噬时开始进行咬噬程度的评分。评分标准可参照文献[5-6]的方法：一个或多个趾甲受损为1分，每一足趾远端一半的趾节受损为1分，远端一半的趾节全被咬噬为1分，近端趾节受损为1分，近端趾节全被咬噬为1分，最后取各项总和，最高13分。

#### 1.2.4 成模后处理

成模后的每周一，P+I组大鼠尾静脉注射p38MAPK特异性的抑制剂SB203580(0.8 mg/kg)，同时，S组和P组大鼠尾静脉注射等体积的生理盐水，一周1次，直至采集标本。分别于注射后的第4周末(T1)，第6周末(T2)，第8周末(T3)，从各组中随机取出8只大鼠，分别取出大鼠L<sub>4-6</sub>节段的脊髓和L<sub>4-5</sub>背根神经节，4%多聚甲醛浸泡固定12~48 h(4 °C)，石蜡包埋、切片。参照王茜等<sup>[7]</sup>的实验方法分别采用Western印迹和免疫组织化学法检测脊髓和背根神经节中的磷酸化p38MAPK(P-p38MAPK)水平。

#### 1.2.5 Western印迹

每组每个时间点8只大鼠中随机取3只行免疫蛋白印迹分析。麻醉后取出大鼠脊髓和背根神经节并将两者完全分开后分别实验。将组织置入细胞裂解液中低温匀浆，4 °C震荡作用30 min后，4 °C离心15 min，取上清，-80 °C保存备用。标本蛋白定量后加入4倍体积样本缓冲液，95 °C变性5 min。将样品轻轻加至凝胶孔中电泳后，以标准蛋白Marker为参照，依分子量大小切取条带，取相应条带加入P-p38—抗4 °C反应过夜，TBST冲洗后，与生物素标记的羊抗兔/小鼠IgG抗血清(1:200)室温震荡孵育2 h，TBST洗涤后，与卵白素-辣根过氧化物酶复合物室温下孵育0.5 h，DAB显色。

#### 1.2.6 免疫组织化学染色

每组每个时间点随机从8只大鼠中取3只行SP法免疫组织化学染色。组织切片常规脱蜡至水后，

用PBS漂洗3次，每次5 min；组织抗原行水浴法热修复；3%过氧化氢阻断内源过氧化物酶，PBS漂洗3次，每次5 min。滴加封闭液(5%BSA)，在湿盒中室温放置30 min。用滤纸擦去封闭液，勿洗。滴加适宜浓度的一抗置湿盒中4℃孵育过夜，再用PBS漂洗3次，每次5 min，洗去一抗，用滤纸擦去标本外的PBS。滴加生物素化二抗工作液，于室温置湿盒中孵育20 min，用PBS漂洗3次，每次5 min，洗去二抗，用滤纸擦去标本外的PBS。滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液，于室温置湿盒中孵育20 min，用PBS漂洗3次，每次5 min，用滤纸擦去标本外的PBS。DAB显色剂显色，自来水充分冲洗。再进行苏木精复染，脱水，透明，中性树胶封片，光镜下观察照相。

### 1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0统计软件进行分析，计量资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示，多组间比较采用单因素方差分析， $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 一般情况

所有SD大鼠手术后，健康状况良好，饮食和进水情况正常。P组和P+I组大鼠自术后第2天开始陆续发生咬噬，最高咬噬评分8~11分，其行为学与术前相比有显著的变化；在给予抑制剂后，P+I组大鼠的咬噬评分有所下降，其咬噬表现较前缓解。S组大鼠没有出现以上现象，行为学与术前基本无变化。

### 2.2 半定量结果分析

各部位半定量结果比较显示：P组和P+I组大鼠脊髓和背根神经节P-p38MAPK灰度值明显高于S组( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )；与P+I组比较，P组大鼠脊髓

和背根神经节P-p38MAPK灰度值明显升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ；图1，2)。

与S组大鼠相比，P组和P+I组大鼠脊髓及背根神经节中P-p38MAPK阳性表达水平在免疫组织化学检测下均明显升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ；表1)；与P+I组比较，P组脊髓和背根神经节在T1~T3时间点P-p38MAPK阳性表达水平均明显升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ；表1)。

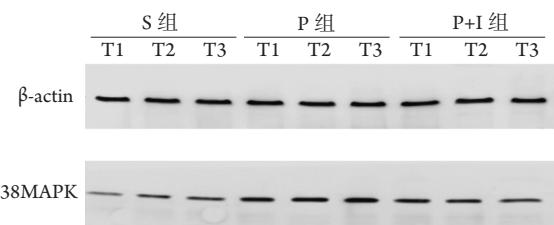


图1 各组背根神经节磷酸化p38MAPK的Western印迹检测结果( $n=3$ )

Figure 1 Western blot analysis for phosphorylation p38MAPK in the dorsal root ganglion (DRG) of different groups ( $n=3$ )

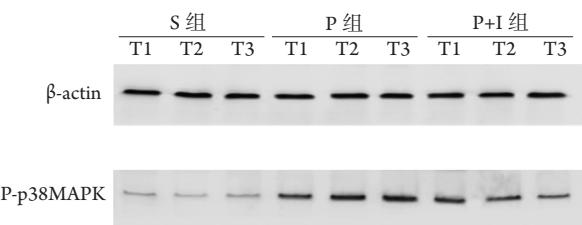


图2 各组脊髓磷酸化p38MAPK的Western印迹检测结果( $n=3$ )

Figure 2 Western blot analysis for phosphorylation p38MAPK in the spinal of different groups ( $n=3$ )

表1 3组各时间点脊髓和DRG中磷酸化p38MAPK水平的变化( $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$ )

Table 1 Changes of phosphorylation p38MAPK levels in spinal cord and DRG of the 3 groups at different time points ( $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$ )

部位	组别	T1	T2	T3
脊髓	S组	4.68±1.28	4.82±1.59	4.90±1.61
	P组	35.54±7.55**††	18.90±6.00*†	18.69±7.51*†
	P+I组	5.10±1.53*	6.50±2.17*	6.07±2.86*
DRG	S组	4.31±1.03	4.51±0.86	4.73±1.34
	P组	31.29±7.82**††	10.60±3.25*†	10.29±3.15*†
	P+I组	4.98±2.24*	5.82±2.02*	5.33±1.58*

与S组比较， $*P<0.05$ ， $**P<0.01$ ；与P+I组比较， $†P<0.05$ ， $††P<0.01$

### 3 讨 论

一侧坐骨神经横断后大鼠陆续发生咬噬，这种现象可作为去神经传入后疼痛综合征(如幻肢痛)模型的一种行为学表现<sup>[6]</sup>。本实验参照Wall等<sup>[5]</sup>的方法，为防止断端再修复，在切除0.5 cm的坐骨神经后，将远端坐骨神经翻转固定于肌肉中。结果显示大鼠坐骨神经横断后第3天开始有不同程度的咬噬现象，提示大鼠幻肢痛的模型制造成功。

背根神经节位于脊髓背根与脊神经之间，是痛觉传导的第一级中枢，能将外周的痛觉信息传递至中枢，在神经病理性疼痛的外周敏化中发挥重要作用，同时在中枢敏化的信息传递过程中亦发挥桥梁作用。脊髓是痛觉神经传导的第二级中枢，背根神经节的疼痛信号势必要经过脊髓的传导才可以进入大脑产生疼痛信号<sup>[8]</sup>。大鼠坐骨神经初级传入纤维主要投射至L<sub>4~5</sub>节段的脊髓背角<sup>[9]</sup>提示发生于L<sub>4~5</sub>节段脊髓背角的中枢神经系统可塑性改变可能与坐骨神经损伤有关。因此本研究取L<sub>4~6</sub>节段脊髓和背根神经节检测有关指标。

p38MAPK信号通路是细胞内重要的信号通路之一，参与调控细胞增殖和凋亡<sup>[10]</sup>。p38MAPK活化后通过对细胞转录、蛋白合成、受体表达等的调节，对组织炎症或神经损伤所致疼痛的产生及维持起重要作用<sup>[11~12]</sup>。p38MAPK可以通过转录调控诱导生成许多炎症介质，如环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)，IL-1β及诱导性一氧化氮合酶(induced nitric oxide synthase, iNOS)<sup>[13]</sup>，这些炎症介质可以促使伤害性传入纤维末梢递质的释放，诱导产生中枢敏化。另有研究<sup>[14]</sup>显示p38MAPK在背根神经节的激活，导致了足部切口后疼痛超敏。伤害性刺激所致的中枢敏化是一个极其复杂的过程，目前研究较深入的在脊髓水平。脊髓的反应性升高，导致伤害感受性通路神经元和环路功能增强，最终引起中枢敏化。本研究通过建立幻肢痛模型及成模后静脉注射p38MAPK信号通路特异性的抑制剂来观察各组相关蛋白的表达情况及通路抑制后的蛋白表达，发现p38MAPK信号通路在病理过程中发生了高度的激活，给予抑制剂后蛋白的表达水平下降。

SB203580是在许多基础实验研究中常用的p38MAPK磷酸化抑制剂。相关研究<sup>[15]</sup>显示：鞘内注射SB203580可以明显抑制坐骨神经慢性缩窄损伤(chronic constriction injury, CCI)热痛敏行为学表现。本研究选择给予SB203580后，抑制剂组大鼠脊髓和背根神经节中P-p38MAPK水平不管是Western印迹还是免疫组织化学检测均未恢复至假手术组的水平。因此推断幻肢痛的形成机制除了p38MAPK信号通路还

有其他因素参与。

综上所述，p38MAPK信号通路参与幻肢痛过程的形成，但幻肢痛的发生机制是极其复杂的病理过程，p38MAPK信号通路是其发展过程的一个重要组成部分。本研究为治疗幻肢痛提供了一个重要的研究方向。

### 参 考 文 献

- [1] Ahmed A, Bhatnagar S, Mishra S, et al. Prevalence of phantom limb pain, stump pain, and phantom limb sensation among the amputated cancer patients in India: A prospective, observational study[J]. Indian J Palliat Care, 2017, 23(1): 24-35.
- [2] Zanfir AM, Georgescu DI, Turturica SC, et al. Immersive VR in phantom limb pain therapy of amputee patients due to critical limb ischemia[J]. Acta Medica Marisiensis, 2017, 63(3): 115-120.
- [3] Flor H, Andoh J. Origin of phantom limb pain: A dynamic network perspective[J]. e-Neuroforum, 2017, 23(3): 111-116.
- [4] 柯昌斌, 黄晓霞, 许先成, 等. P38MAPK和PI3K/Akt信号通路在大鼠糖尿病神经病理性疼痛中的交互作用[J]. 中华麻醉学杂志, 2010, 26(9): 790-793.  
KE Changbin, HUANG Xiaoxia, XU Xiancheng, et al. Interaction of P38MAPK and PI3K/Akt signaling pathway in diabetic neuropathic pain in rats[J]. Chinese Journal of Anesthesiology, 2010, 26(9): 790-793.
- [5] Wall PD, Devor M, Inbal R, et al. Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa[J]. Pain, 1979, 7(2): 103-111.
- [6]Coderre TJ, Grimes R, Melzack R. Deafferentation and chronic pain in animals: an evaluation of evidence suggesting autotomy is related to pain[J]. Pain, 1986, 26(1): 61-84.
- [7] 王茜, 张辉, 刘名, 等. P38信号通路调控帕金森病小鼠黑质NF-κB和iNOS的表达[J]. 南方医科大学学报, 2014, 34(8): 1176-1180.  
WANG Qian, ZHANG Hui, LIU Ming, et al. P38 signaling pathway regulates the expression of NF-κB and iNOS in substantia nigra of Parkinson's disease mice[J]. Journal of Southern Medical University, 2014, 34(8): 1176-1180.
- [8] Qu LT, Zhang P, LaMotte RH, et al. Neuronal Fc-gamma receptor I mediated excitatory effects of 19G immune complex on rat dorsal root ganglion neurons[J]. Brain Behav Immun, 2011, 25(7): 1399-1407.
- [9] Shehab SA. Acute and chronic sectioning of fifth lumbar spinal nerve has equivalent effects on the primary afferents of sciatic nerve in rat spinal cord[J]. J Comp Neurol, 2009, 517(4): 481-492.
- [10] Johnson MD, Reeder JE, O'Connell M. p38MAPK activation and

- DUSP10 expression in meningiomas[J]. J Clin Neurosci, 2016, 30: 110-114.
- [11] Zhu S, Luo H, Liu H, et al. p38MAPK plays a critical role in induction of a pro-inflammatory phenotype of retinal Müller cells following Zika virus infection[J]. Antiviral Res, 2017, 145: 70-81.
- [12] Li L, Huang Z, Gillespie M, et al. p38 mitogen-activated protein kinase in beryllium-induced dendritic cell activation[J]. Hum Immunol, 2014, 75(12): 1155-1162.
- [13] Zhang DD, Zhang H, Lao YZ, et al. Anti-inflammatory effect of 1,3,5,7-tetrahydroxy-8-isoprenylxanthone isolated from twigs of garcinia esculenta on stimulated macrophage[J]. Mediators Inflamm, 2015, 2015(3): 1-11.
- [14] Mizukoshi K, Sasaki M, Izumi Y, et al. Activation of p38 mitogen-
- activated protein kinase in the dorsal root ganglion contributes to pain hypersensitivity after plantar incision[J]. Neuroscience, 2013, 234: 77-87.
- [15] 牛娟, 刘培雯, 黄杜娟, 等. 鞘内注射p38MAPK抑制剂SB203580对CCI大鼠脊髓背角多种嘌呤受体表达的影响[J]. 神经解剖学杂志, 2017, 33(1): 47-52.
- NIU Juan, LIU Peiwen, HUANG Dujuan, et al. Effect of intrathecal injection of p38MAPK inhibitor SB203580 on the expression of multiple purine receptors in spinal dorsal horn of CCI rats[J]. Neuroanatomy, 2017, 33(1): 47-52.

(本文编辑 彭敏宁)

**本文引用:** 姜慧, 陈永权, 刘金涛. p38MAPK信号通路在大鼠幻肢痛中的作用[J]. 中南大学学报(医学版), 2018, 43(6): 589-593.  
DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2018.06.003

**Cite this article as:** JIANG Hui, CHEN Yongquan, LIU Jintao. Role of p38MAPK signaling pathway in rats with phantom limb pain[J]. Journal of Central South University. Medical Science, 2018, 43(6): 589-593.  
DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2018.06.003