



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104013974 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 03

(21) 申请号 201410258665. 2

(22) 申请日 2014. 06. 11

(71) 申请人 中国人民解放军军事医学科学院放射与辐射医学研究所

地址 100850 北京市海淀区太平路 27 号

(72) 发明人 张庆林 胡春生 程晓晨 卢育新 吴祖泽

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

代理人 吴贵明 张永明

(51) Int. Cl.

A61K 48/00 (2006. 01)

A61P 29/00 (2006. 01)

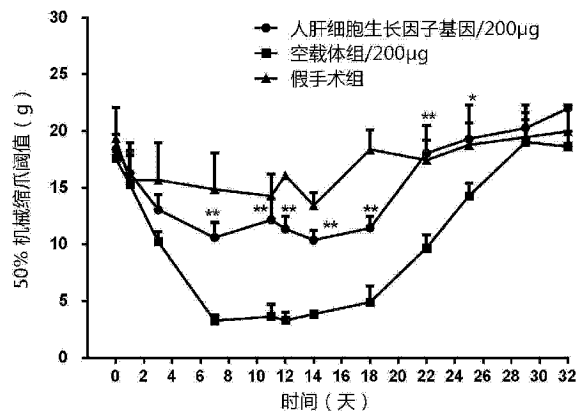
权利要求书1页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

肝细胞生长因子基因在制备用于预防和 / 或治疗疼痛药物中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种肝细胞生长因子基因在制备用于预防和 / 或治疗疼痛的药物中的应用。该应用能够显著缓解皮肤损伤引起的疼痛、肌肉损伤引起的疼痛或者由神经损伤引起的神经病理性疼痛。本发明的这种应用具有重要的应用前景和实际意义。



1. 肝细胞生长因子基因在制备用于预防和 / 或治疗疼痛的药物中的应用。
2. 根据权利要求 1 所述的应用, 其特征在于, 所述疼痛包括由皮肤损伤引起的疼痛、肌肉损伤引起的疼痛或者由神经损伤引起的神经病理性疼痛中的至少一种。
3. 根据权利要求 2 所述的应用, 其特征在于, 所述由皮肤损伤或肌肉损伤引起的疼痛包括创伤性急性疼痛和创伤性慢性疼痛。
4. 根据权利要求 3 所述的应用, 其特征在于, 所述创伤性急性疼痛包括皮肤或肌肉的弹片伤、刺伤、撕裂伤引起的急性疼痛以及术后急性疼痛; 优选所述术后急性疼痛包括颈部手术、乳房手术、腹壁手术、腹腔手术、胃 / 十二指肠手术、小肠手术、结肠手术、肝脏手术、胰腺手术或血管手术中任一种术后急性疼痛。
5. 根据权利要求 3 所述的应用, 其特征在于, 所述创伤性慢性疼痛包括烧烫伤、冻伤、放射伤引起的慢性疼痛以及术后慢性疼痛; 优选所述术后慢性疼痛包括截肢术、乳腺手术、开胸手术、腹股沟斜疝修补术、冠脉搭桥术或剖宫产术中任一种术后慢性疼痛。
6. 根据权利要求 2 所述的应用, 其特征在于, 所述神经损伤引起的神经病理性疼痛包括坐骨神经痛或糖尿病神经病变所引起的疼痛。
7. 根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的应用, 其特征在于, 所述肝细胞生长因子基因为人肝细胞生长因子基因。
8. 根据权利要求 7 所述的应用, 其特征在于, 所述人肝细胞生长因子基因由载体携带, 且所述载体在哺乳动物细胞中能够表达人肝细胞生长因子蛋白, 优选所述载体为真核表达质粒载体、病毒载体、基因表达框或微环 DNA。
9. 根据权利要求 8 所述的应用, 其特征在于,
所述真核表达质粒载体为超螺旋质粒 DNA, 所述超螺旋质粒 DNA 包括: 真核细胞启动子、人肝细胞生长因子基因、多聚腺苷酸尾巴、细菌复制序列以及抗生素抗性基因;
所述病毒载体为逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、疱疹病毒载体或牛痘病毒载体;
所述基因表达框包括: 真核细胞启动子、人肝细胞生长因子基因以及多聚腺苷酸尾巴;
所述微环 DNA 为超螺旋闭环 DNA, 所述超螺旋闭环 DNA 包括: 真核启动子、人肝细胞生长因子基因、多聚腺苷酸尾巴以及部分重组酶的识别序列。
10. 根据权利要求 9 所述的应用, 其特征在于, 所述药物为局部注射剂、喷雾剂、涂抹剂或生物可降解的包埋剂, 优选当所述药物为注射剂时, 所述药物通过局部肌肉注射、基因枪或导管介导转移的方法将人肝细胞生长因子基因转移到哺乳动物细胞中表达出人肝细胞生长因子蛋白。

肝细胞生长因子基因在制备用于预防和 / 或治疗疼痛药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,具体而言,涉及一种肝细胞生长因子基因在制备用于预防和 / 或治疗疼痛药物中的应用。

背景技术

[0002] 疼痛是最普遍的疾病的并发症之一,现在大多数医院将疼痛作为第五生命体征。疼痛主要包括急性疼痛和慢性疼痛,其中慢性疼痛包括炎性和神经性的疼痛及癌痛。炎性疼痛与组织损伤和感染引起的免疫反应有关,由多种疾病引起,如类风湿或关节炎、胰腺炎、炎症性肠病、间质性膀胱炎或膀胱的慢性盆腔疼痛综合征等;神经性疼痛由原发病灶或神经系统功能障碍引起的疼痛,由神经组织损伤产生。术后疼痛是人体对组织损伤和修复过程的一种复杂的生理心理反应,如术后处理不及时,可发生呼吸功能不全、心肌梗死等并发症,严重者可导致休克甚至死亡。

[0003] 目前,临床上虽然已有阿片类、吗啡类镇痛药及非甾体类抗炎镇痛药,但这些药物为患者所提供的选择性还是比较少,因此,仍需要开发新的治疗疼痛的药物。

发明内容

[0004] 本发明旨在提供一种肝细胞生长因子基因在制备用于预防和 / 或治疗疼痛的药物中的应用,为肝细胞生长因子基因提供了一种新的应用。

[0005] 为了给疼痛患者提供更多的药物选择,根据本发明的一个方面,提供了一种肝细胞生长因子在制备用于预防和 / 或治疗疼痛的药物中的应用。

[0006] 进一步地,上述疼痛包括由皮肤损伤或肌肉损伤引起的疼痛及神经损伤引起的神经病理性疼痛。

[0007] 进一步地,上述由皮肤损伤或肌肉损伤引起的疼痛包括创伤性急性疼痛和创伤性慢性疼痛。进一步地,创伤性急性疼痛包括皮肤或肌肉的弹片伤、刺伤、撕裂伤引起的急性疼痛以及术后急性疼痛。优选上述术后急性疼痛包括颈部手术、乳房手术、腹壁手术、腹腔手术、胃 / 十二指肠手术、小肠手术、结肠手术、肝脏手术、胰腺手术和血管手术等术后急性疼痛。

[0008] 进一步地,创伤性慢性疼痛包括烧烫伤、放射伤、冻伤引起的慢性疼痛以及术后慢性疼痛,优选上述术后慢性疼痛包括截肢术、乳腺手术、开胸手术、腹股沟斜疝修补术、冠脉搭桥术和剖宫产术等术后的慢性疼痛。

[0009] 进一步地,上述神经损伤引起的神经病理性疼痛包括坐骨神经痛或糖尿病神经病变所引起的疼痛。

[0010] 进一步地,上述肝细胞生长因子基因为人肝细胞生长因子基因。

[0011] 进一步地,上述人肝细胞生长因子基因由载体携带,且所述载体在哺乳动物细胞中能够表达人肝细胞生长因子蛋白。

[0012] 进一步地,优选上述载体为真核表达质粒载体、病毒载体、基因表达框或微环 DNA。

[0013] 进一步地,当上述载体为真核表达质粒载体时,真核表达质粒载体为超螺旋质粒 DNA,其中包括:真核细胞启动子、人肝细胞生长因子基因、多聚腺苷酸尾巴、细菌复制序列以及抗生素抗性基因;当上述载体为病毒载体时,病毒载体为逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、疱疹病毒载体或牛痘病毒载体;当上述载体为基因表达框时,基因表达框包括:真核细胞启动子、人肝细胞生长因子基因以及多聚腺苷酸尾巴;当上述载体为微环 DNA 时,微环 DNA 为超螺旋闭环 DNA,其中包括:真核启动子、人肝细胞生长因子基因、多聚腺苷酸尾巴以及部分重组酶的识别序列。

[0014] 进一步地,当上述药物为注射剂时,所述药物通过局部肌肉注射、基因枪或导管介导转移的方法将人肝细胞生长因子基因转移到哺乳动物细胞中表达出人肝细胞生长因子蛋白。

[0015] 应用本发明的技术方案人肝细胞生长因子基因在制备用于治疗疼痛的药物中的应用。本发明首次将人肝细胞生长因子基因作为一种基因治疗的手段应用于疼痛疾病药物的制备中,不仅能够达到镇痛的目的,而且这种基因治疗的方法没有依赖性、成瘾性等副作用,因此具有广阔的应用前景。

附图说明

[0016] 构成本申请的一部分的说明书附图用来提供对本发明的进一步理解,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。在附图中:

[0017] 图 1 示出了在本发明的实施例 2 中肝细胞生长因子基因对 SD 大鼠足底切口机械疼痛缩爪阈值随时间变化曲线;

[0018] 图 2 示出了在本发明的实施例 2 中肝细胞生长因子基因对 SD 大鼠足底切口热疼痛缩爪阈值随时间变化曲线;

[0019] 图 3 示出了在本发明的实施例 3 中人肝细胞生长因子基因对 SD 大鼠皮肤/肌肉切口牵拉疼痛机械缩爪阈值随时间变化曲线;以及

[0020] 图 4 示出了在本发明的实施例 4 中肝细胞生长因子对 C57 小鼠 SNI 神经病理性疼痛机械缩爪阈值随时间的变化曲线。

具体实施方式

[0021] 需要说明的是,在不冲突的情况下,本申请中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。下面将参考附图并结合实施例来详细说明本发明。

[0022] 肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 最初作为一种肝细胞有丝分裂原,从肝部分切除的大鼠的血清中分离得到。HGF 是体内广泛分布的一种多功能生长因子,具有细胞迁移、增殖和促进胚胎期各器官形态发生的作用,对胚胎发育、组织器官再生、伤口愈合和血管新生起到重要的调节作用。它通过与其特异性膜受体 c-met 结合而发挥多样性的生物学作用,是间质和上皮/内皮细胞间相互作用的重要信息分子,对胚胎发育、组织器官再生、伤口愈合和血管发生起着重要的调节作用。同时研究发现,HGF 是一种神经营养因子,对神经具有营养和保护作用。

[0023] 一次偶然的的机会,发明人发现这种肝细胞生长因子对于疼痛有明显的抑制作用,

并首次大胆地提出了将 HGF 基因作为一种基因治疗的手段应用于疼痛疾病药物的制备中。通过本发明的上述应用,通过局部应用肝细胞生长因子基因不仅能够达到镇痛的目的,而且众所周知,肝细胞生长因子蛋白不作用于阿片受体,相比现有的治疗疼痛的药物,具有无依赖性、无成瘾性的优点,具有重要的应用前景和实际意义。

[0024] 在本发明的上述药物所适用的疼痛类型中包括各种临床上常见的各种疼痛,尤其在应用于皮肤损伤或肌肉损伤引起的疼痛,或者由神经损伤引起的神经病理性疼痛。不论是皮肤损伤或肌肉损伤引起的创伤性急性疼痛还是皮肤损伤或肌肉损伤引起的创伤性慢性疼痛,还是神经损伤引起的神经病理性疼痛,缓痛效果都非常明显。

[0025] 在本发明的一种优选的实施方式中,上述药物适用于包括皮肤或肌肉的弹片伤、刺伤、撕裂伤引起的急性疼痛以及术后急性疼痛在内的创伤性急性疼痛;其中,术后急性疼痛包括颈部手术、乳房手术、腹壁手术、腹腔手术、胃/十二指肠手术、小肠手术、结肠手术、肝脏手术、胰腺手术和血管手术中任一种术后急性疼痛。应用上述药物能够更加明显地缓解上述创伤的伤口的疼痛。对上述术后引起的急性疼痛的镇痛机制可能是 HGF 能抑制创伤处炎性因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、PGE2 的表达,降低周围神经冲动的传递,从而减少中枢胶质细胞的激活。

[0026] 在本发明中,上述创伤性慢性疼痛包括烧烫伤、冻伤、放射伤引起的慢性疼痛以及术后慢性疼痛,本发明的药物通过涂抹或注射的方式使 HGF 基因在创伤处表达,均能有效地缓解上述慢性疼痛。本发明的药物也所适用的术后慢性疼痛包括截肢术、乳腺手术、开胸手术、腹股沟斜疝修补术、冠脉搭桥术和剖宫产术等。在本发明的上述术后慢性疼痛是指伤口已经愈合,但疼痛依旧持续。因此,在伤口愈合之前或/和之后应用上述药物不仅能够缓解疼痛的剧烈程度,还能缩短相应的疼痛时长。上述对术后慢性疼痛的抑制可能的作用机制是 HGF 逆轴突运输作达到中枢神经系统,通过与神经胶质细胞 c-met 受体结合抑制 p38MAPK、NF-KB 信号通路抑制炎性因子的表达,降低神经胶质细胞激活。HGF 从周围组织到中枢神经系统通过抗炎活性起到镇痛作用。

[0027] 在本发明的上述药物所适用的神经损伤引起的神经病理性疼痛的应用中,神经损伤引起的神经病理性疼痛包括坐骨神经痛或糖尿病神经病变所引起的疼痛。在本发明的一种典型的实施方式中,上述应用能够有效缓解上述神经损伤引起的神经病理性疼痛。HGF 对神经损伤导致的神经病理性疼痛的镇痛机制可能是通过局部肌肉多次注射 HGF 基因逆轴突运输到达中枢神经系统,抑制伤害感受 P₂X、P₂Y 受体及炎性因子 IL-6 的表达,同时对周围损伤神经具有修复作用,从而达到镇痛的作用。

[0028] 在本发明的上述应用中,是将 HGF 基因以载体携带的形式进行应用的。载体的作用是将 HGF 基因运送到细胞中,并在细胞中表达出人肝细胞生长因子蛋白,从而使 HGF 蛋白能在细胞内发挥缓解疼痛的作用。

[0029] 在本发明的上述应用中,上述载体并无特殊要求,常规的真核表达质粒载体、病毒载体、基因表达框或微环 DNA 都适用于本发明,只要能够将 HGF 基因运送到细胞内并表达出 HGF 蛋白即可。

[0030] 在本发明一种优选的实施例中,当上述载体为真核表达质粒载体时,真核表达质粒载体为超螺旋质粒 DNA,其中包括:真核细胞启动子、人肝细胞生长因子基因、多聚腺苷酸尾巴、细菌复制序列以及抗生素抗性基因。当上述载体为病毒载体时,本发明所适用的载

体包括逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、疱疹病毒载体或牛痘病毒载体。当上述载体为基因表达框时,基因表达框包括:真核细胞启动子、人肝细胞生长因子以及多聚腺苷酸尾巴。当上述载体为微环 DNA 时,微环 DNA 为超螺旋闭环 DNA,其中包括:真核细胞启动子、人肝细胞生长因子、多聚腺苷酸尾巴以及部分重组酶的识别序列。

[0031] 本发明的上述载体不仅均能将 HGF 基因运送到细胞内并在细胞内表达出 HGF 蛋白,起到缓解疼痛的疗效;而且还具有稳定性高、易纯化、生产周期短以及成本低的优点,从而有利于工业化生产,进一步优选使用真核表达质粒载体,这种载体的安全性更高,疗效也更好。

[0032] 本发明的上述携带人肝细胞生长因子基因的载体能够单独或与其他可药用的赋形剂制成各种临床上使用的剂型,只要能使携带 HGF 基因的上述载体能够安全、稳定地在细胞内表达 HGF 蛋白即可。本发明优选制成局部注射剂、喷雾剂、涂抹剂或生物可降解的包埋剂。注射剂、喷雾剂、和涂抹剂可以按照药学领域的常规方法制备,成品于 4℃ 保存。而喷雾剂、涂抹剂直接在伤口处涂抹即可,使用方便。包埋剂因使用生物可降解材料,包埋材料能够直接被人体吸收,无需后续处理。

[0033] 上述各种剂型的制剂包括足以治疗或减轻疼痛的治疗或预防疼痛的有效量的携带 HGF 基因的载体。“治疗有效量”指在必要的剂量和时间期限内,有效实现所希望的治疗结果,如疼痛减轻的量。在一个具体的实施方案中,可以通过调节剂量以提供最佳治疗应答剂量,减少携带 HGF 基因的载体的治疗有效量可以根据如下因素而变:个体的疾病状态、年龄、性别、体重以及制剂在个体中引起所希望的应答的能力。治疗有效量还是治疗有益效果超过其毒性或者有害效果的量。“预防有效量”指在必要的剂量和时间期限内,有效实现所希望的预防结果,如预防或抑制疼痛发作的量。可以根据上述对治疗有效量的描述确定预防有效量。对于任何具体受试者,可以根据个体需要和施用人的职业判断随时间调节特定剂量。

[0034] 当本发明上述药物的剂型为注射剂时,优选上述药物通过局部肌肉注射、基因枪或导管介导转移的方法将人肝细胞生长因子转移到人的肌肉细胞中表达出人肝细胞生长因子蛋白。

[0035] 下面将进一步结合实施例来说明本发明的有益效果。

[0036] 需要说明的是,下列实施例中的实验方法,如无特别说明,均为常规方法。

[0037] 实施例 1

[0038] 携带人肝细胞生长因子基因的重组质粒载体的获得

[0039] 一、菌体制备

[0040] 自行构建的携带人肝细胞生长因子基因的质粒,含有 CMV 启动子、人肝细胞生长因子基因、p_{loyA} 尾的线性表达框。宿主菌为大肠杆菌 DH5 α ,按照常规方法进行发酵,离心后获得菌体,-20℃ 保存备用。

[0041] 二、碱裂解破碎细胞提取质粒 DNA

[0042] 按照专利号为 ZL201110089982.2(授权公告日为 2013 年 8 月 28 日,专利名称为制备质粒 DNA 的碱裂解系统及组合系统)中公开的裂解细胞提取质粒 DNA 的方法和装置进行质粒 DNA 的提取,其中的改进步骤如下:

[0043] 1. 通过连续碱裂解过程获得的澄清碱裂解液通过截留分子量为 300KDa 的超滤柱

进行超滤浓缩。

[0044] 2. 获得的超滤浓缩液经 Sepharose 6 Fast Flow 填料 (GE 公司, 货号 :17-0159-01) 将携带人干细胞生长因子基因的质粒 DNA 与 RNA 分离。

[0045] 3. 将获得的质粒 DNA 溶液经 Plasmidselect Xtra 填料 (GE 公司, 货号 :28-4024-02) 将超螺旋与开环的质粒 DNA 分离, 获得超螺旋质粒 DNA。

[0046] 4. 将获得的超螺旋质粒 DNA 经 Source 15Q 填料 (GE 公司, 货号 :17-0947-05) 进一步精制, 获得纯度更高的质粒 DNA。

[0047] 5. 将获得的纯度高的质粒 DNA 经乙醇沉淀, 无菌空气干燥, 将固体质粒 DNA 冻存于 -20°C 。

[0048] 三、不同剂型的配置

[0049] 按 2 或 3mg/ml 配置成注射剂、喷雾剂、涂抹剂或生物可降解包埋剂等剂型。注射液的配方含有 Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 组成的缓冲液, 以及 EDTA、NaCl 等保护剂。涂抹剂是在注射剂基础上添加卡波姆制成膏状。喷雾剂是在注射剂基础上添加苯扎氯铵。可降解包埋剂是在注射剂基础上添加聚乳酸-羟基乙酸等。配置好的剂型存于 4°C , 备用。

[0050] 实施例 2

[0051] 人肝细胞生长因子基因对 SD 大鼠皮肤肌肉切口导致急性疼痛的镇痛作用

[0052] 一、动物模型

[0053] SPF 级雄性 SD 大鼠 210 ~ 230g, 腹腔注射戊巴比妥钠 (45mg/kg) 麻醉, 将大鼠左后足消毒, 使用 11 号手术刀片从爪底近端 0.5cm 处向趾部做长约 1.0cm 的纵向切口, 切开皮肤后, 用眼科镊挑起爪底肌肉并纵行钝性分离, 但保持肌肉起止和附着完整。按压止血后, 以 5-0 尼龙线缝合皮肤共两针。缝合的要求是切口皮肤不能重叠、内翻、裂开。术后注射 0.1ml 庆大霉素。

[0054] 该模型能够引起大鼠出现自发性疼痛、机械性和热痛觉过敏以及触诱发疼痛, 这些疼痛行为表现持续 4 至 7 天, 这些疼痛行为和持续时间与临床上急性创伤疼痛状态有相似之处, 该模型能够用于模拟皮肤或肌肉的弹片伤、刺伤、撕裂伤引起的急性疼痛以及颈部手术、乳房手术、腹壁手术、腹腔手术、胃 / 十二指肠手术、小肠手术、结肠手术、肝脏手术、胰腺手术和血管手术中任一种术后急性创伤引起的周围神经痛敏。

[0055] 二、给药方式

[0056] 将携带人肝细胞生长因子基因的重组质粒配置成浓度为 4mg/ml, 用微量注射器分别对术后的 6 只大鼠进行给药, 每只大鼠的给药体积为 $50\ \mu\text{l}$ 。注射部位是 6 只大鼠的爪底肌肉; 每只大鼠的给药次数均为一次。对照组给予相同体积相同浓度的质粒空载体。

[0057] 三、疼痛的测定

[0058] 疼痛测定采用 50% 机械缩爪阈值 (g) 来体现, 其中, 50% 机械缩爪阈值 (g) 按以下公式进行计算:

[0059] $50\% \text{ 机械缩爪阈值 (g)} = (10[X_f + k\delta]) / 10000$, 其中, X_f 为最后一次 Von Frey 强度值; k 为表列值 (参考文献: Chaplan, S. R., F. W. Bach, J. W. Pogrel, et al., Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. J Neurosci Methods, 1994, 53(1):55-63.); δ 为刺激的平均差 (0.224)。该公式计算得出的缩爪阈值表示用该强度的 von Frey 细丝刺激大鼠爪底可引起 50% 的缩爪反应。实验中该值的大小

反应出对疼痛的剧烈程度,该值比基础值越低说明疼痛越剧烈。

[0060] 3.1 机械痛阈值的测定:分别于术前连续3天以及术后6h,1d,2d,3d,5d,7d在室温,安静环境中,将大鼠置于金属网格中,使大鼠适应、安静15~30min;用一套带有不同弯曲压力的Von Frey细丝刺激大鼠左后爪掌底部中间靠近切口的区域或术前与之相同的区域。从4.0g开始,当Von Frey Hair弯曲90度、时间大于8S大鼠仍无缩爪反应时,更换相邻稍大压力的Von Frey Hair;若有缩爪反应(或添爪或后肢悬空等),选择相邻稍小压力的Von Frey Hair,如此连续进行,直至出现第一次阳(阴)性反应值时,再连续测定四次。每次触压间隔大于15S,为防止组织损伤,最高阈值设为26g。

[0061] 3.2 热痛缩爪阈值的测定:分别于术前连续3天以及术后6h,1d,2d,3d,5d,7d在室温,安静环境中,将大鼠置于测试架玻璃板上的透明有机玻璃箱中,待其安静下来,应用刺激仪校准光照取大鼠足底固定部位(切口中间),换刺激强光,记录从强光照射开始至出现缩爪逃避的反射时间(S),即为缩爪阈值;如果超过20S仍无缩爪反应则停止照射,以免导致足底组织热损失。重复测定5次,每次间隔5min。

[0062] 四、效果评价

[0063] 机械痛阈值的效果见图1,图中*表示 $P < 0.05$ 时,人肝细胞生长因子组相比空载体组具有显著差异;**表示 $P < 0.01$ 时,肝细胞生长因子组相比空载体组具有极显著差异。图1结果表明,术后给予200 μ g携带人肝细胞生长因子基因的质粒DNA组在转基因后6h至第5日均比给予空质粒载体组的触诱发机械缩爪阈值极显著提高。在给药后6h就具有镇痛作用,明显早于修复作用,因此,说明HGF能起到镇痛的作用,而不是因修复作用而达到镇痛的效果。

[0064] 热痛缩爪阈值的效果见图2,图中*表示 $P < 0.05$ 时,人肝细胞生长因子组相比空载体组具有显著差异;**表示 $P < 0.01$ 时,肝细胞生长因子组相比空载体组具有极显著差异。图2结果表明,术后给予200 μ g携带人肝细胞生长因子基因的质粒DNA组在转基因后第2天至第5日均比给予空质粒载体组的热疼痛缩爪阈值显著提高,且具有统计学差异,第2,3天 $P < 0.01$,第5天 $P < 0.05$ 。

[0065] 以上结果表明,人肝细胞生长因子基因对急性创伤导致的皮肤或肌肉的弹片伤、刺伤、撕裂伤引起的急性疼痛以及周围神经痛敏包括颈部手术、乳房手术、腹壁手术、腹腔手术、胃/十二指肠手术、小肠手术、结肠手术、肝脏手术、胰腺手术和血管手术中任一种术后急性疼痛具有镇痛作用。

[0066] 实施例3

[0067] 人肝细胞生长因子基因对SD大鼠皮肤/肌肉切口牵拉导致的中枢过敏疼痛的镇痛作用

[0068] 一、动物模型

[0069] SPF级雄性SD大鼠210~230g,腹腔注射戊巴比妥钠(45mg/kg)麻醉,仰卧位固定,在右后肢大腿中部隐静脉内侧4mm处做一长1.5~2cm的皮肤切口,暴露腿部肌肉,然后于浅层肌肉(股薄肌)做一长7~10mm切口,钝性分离浅层肌肉,见白色的内收肌群肌腱筋膜后,切口内置入显微牵开器。将显微牵开器尖头置入浅层肌肉下方,拉开皮肤肌肉至2cm,暴露内收肌群筋膜,持续牵拉1h。在牵拉过程中,隐神经被牵开器拉伸并移位,但由于其处于肌肉表层而并没有受坚硬物体如骨头等的压迫。牵拉期间用无菌生理盐水纱布覆盖

大鼠切口处保湿、保温, 牵拉 1h 后缝合皮肤肌肉, 术后常规给予 0.1ml 庆大霉素抗感染治疗。

[0070] 该模型在术后第 3 天就可以观察到机械性痛觉过敏, 在术后第 10 至 13 天尤其显著, 至少持续到术后 22 天, 并直到术后 32 天完全消失。其异常疼痛行为反应主要表现为痛觉过敏、触诱发痛。该模型用于模拟人的创伤性慢性疼痛包括烧烫伤、冻伤、放射伤引起的慢性疼痛以及术后持续疼痛、难愈合创伤导致的中枢神经痛敏, 包括截肢术、乳腺手术、开胸手术、腹股沟斜疝修补术、冠脉搭桥术和剖宫产术等引起的慢性疼痛。

[0071] 二、给药方式

[0072] 将携带人肝细胞生长因子基因的重组质粒配置成浓度为 2mg/ml, 给药体积为 100 μ l, 通过微量注射器直接在 6 只 SD 大鼠切口部位肌肉局部 5 点注射重组质粒 200 μ g, 每点 40 μ g。对照组给予相同体积相同浓度的质粒空载体。

[0073] 三、疼痛的测定

[0074] 机械痛阈值 (计算方法同实施例 2) 的测定: 分别于术前连续 3 天, 术后 1d, 4d, 7d, 11d, 12d, 18d, 25d, 28d, 32d 在室温, 安静环境中, 将大鼠置于金属网格中, 使大鼠适应、安静 15 ~ 30min; 用一套带有不同弯曲压力的 von Frey 细丝刺激大鼠右后爪掌底部中间靠近切口的区域或术前与之相同的区域。从 4.0g 开始, 当 Von Frey Hair 弯曲 90 度、时间大于 8S 大鼠仍无抬足反应时, 更换相邻稍大压力的 Von Frey Hair; 若有缩爪反应 (或添爪或后肢悬空等), 选择相邻稍小压力的 Von Frey Hair, 如此连续进行, 直至出现第一次阳 (阴) 性反应值时, 再连续测定四次。每次触压间隔大于 15S, 为防止组织损伤, 最高阈值设为 26g。

[0075] 四、效果评价

[0076] 效果见图 3, * 表示 $P < 0.05$ 时, 肝细胞生长因子组相比空载体组具有显著差异; ** 表示 $P < 0.01$ 时, 肝细胞生长因子组相比空载体组具有极显著差异。图 3 结果表明, 术后第 3 天, 大鼠开始出现机械痛敏, 并在 11、12 天中枢痛敏最严重, 通过在创伤局部肌肉多点注射携带人肝细胞生长因子的重组质粒后, 从第 7 天开始, 与注射空载体组相比大鼠机械缩爪阈值显著提高 ($P < 0.01$)。

[0077] 从对大鼠的观察可知, 在术后第 7 天创伤处皮肤已经完全愈合, 然而此时出现中枢痛敏, 说明修复并没有起到止痛的作用。而给予人肝细胞生长因子后能抑制中枢痛敏。可见, 上述抑制疼痛的效果并不是由于创伤的修复而引起的, 而是由于给予 HGF 而引起的。因此, HGF 对具有上述中枢痛敏的烫伤、冻伤、放射伤引起的慢性疼痛以及截肢术、乳腺手术、开胸手术、腹股沟斜疝修补术、冠脉搭桥术和剖宫产术等创伤性慢性疼痛具有镇痛作用。

[0078] 实施例 4

[0079] 人肝细胞生长因子基因对 C57BL/6J 小鼠坐骨神经分支选择性损伤 (SNI) 模型的镇痛作用

[0080] 一、动物模型

[0081] SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 16 ~ 18g, 腹腔注射戊巴比妥钠 (50mg/kg) 麻醉。将小鼠侧卧位固定在操作台上, 碘伏消毒后将小鼠右后肢上缘皮肤切开, 分离肌肉, 暴露坐骨神经的主干和 3 个分支 (胫神经、腓总神经和腓肠神经), 分别结扎并剪断腓总神经和腓肠神经, 保留胫神经并避免牵拉, 依次缝合肌肉和皮肤; 假手术组小鼠仅暴露手术侧的坐骨神经, 不结扎, 依次缝合肌肉和皮肤。

[0082] 该模型在临床上可模拟神经损伤引起的疼痛,如坐骨神经痛、糖尿病神经病变所引起的疼痛疾病的治疗。

[0083] 二、疼痛的测定

[0084] 取 8 只小鼠,手术前测定小鼠的机械刺激基础阈值,手术后 1d、3d、5d 测定小鼠的机械刺激痛觉超敏。给药后 1d、3d、5d、7d、8d、10d、12d、14d、17d、21d、24d、28d、32d 测定小鼠的机械痛阈值(计算方法同实施例 2)。在室温,安静环境中,将大鼠置于金属网格中,使大鼠适应、安静 15—30min;用一套带有不同弯曲压力的 Von Frey 细丝刺激小鼠左后足掌外侧。从 0.04g 开始,当 Von Frey Hair 弯曲 90 度、时间大于 8S 小鼠仍无抬足反应时,更换相邻稍大压力的 Von Frey Hair;若有缩爪反应(或添爪或后肢悬空等),选择相邻稍小压力的 Von Frey Hair,如此连续进行,直至出现第一次阳(阴)性反应值时,再连续测定四次。每次触压间隔大于 15S,为防止组织损伤,最高阈值设为 2.0g。

[0085] 三、给药方式

[0086] 在小鼠形成痛觉超敏时(术后第 5d 给予 pUDK-HGF 治疗)。将小鼠分成① pUDK-HGF 创伤局部肌肉注射组(100 μ g);② pUDK-HGF 鞘内给药组(10 μ g);③空载体创伤局部肌肉注射组。

[0087] 四、效果评价

[0088] 实验结果见图 4。在图 4 中,*表示 $P < 0.05$ 时,肝细胞生长因子基因鞘内注射组相比空载体组有显著差异;**表示 $P < 0.01$ 时,肝细胞生长因子基因鞘内注射组相比空载体组有极显著差异;#表示 $P < 0.05$ 时,肝细胞生长因子基因肌肉注射组相比空载体组具有显著差异;##表示 $P < 0.01$ 时,肝细胞生长因子基因肌肉注射组相比空载体组具有极显著差异。

[0089] 从图 4 可以看出,SNI 小鼠在术后第 3 天开始出现机械疼痛超敏现象,在术后第 5 天第一次给药,给药后发现小鼠机械缩爪阈值有所提高并且给药后第 2 天机械缩爪阈值 HGF 组比给予生理盐水组具有显著性差异($P < 0.05$),1 周后第二次给药,给药后发现鞘内给药的镇痛效果明显优于损伤神经局部给药,这种优势一直持续到实验结束。

[0090] 上述鞘内给药组直接证明 HGF 对疼痛具有镇痛作用,而与修复无关。因此,pUDK-HGF 对小鼠神经损伤引起的神经病理性疼痛具有镇痛作用。通过鞘内注射 pUDK-HGF 可能是 HGF 对胶质细胞激活的抑制作用,从而起到镇痛作用;通过损伤神经局部肌肉注射 pUDK-HGF 可能抑制局部炎症因子的释放抑制神经冲动的传递缓解周围神经痛敏,据文献报道(Tsuchihara, T., S. Ogata, K. Nemoto, et al. Nonviral retrograde gene transfer of human hepatocyte growth factor improves neuropathic pain-related phenomena in rats. *Mol Ther*, 2009, 17(1):42-50.),局部肌肉注射的重组质粒可被神经元通过逆轴突运输方式进入脊髓中,从而 pUDK-HGF 被逆轴突运输至中枢神经系统对胶质细胞激活起到抑制作用,起到镇痛作用。

[0091] 从以上的描述中,可以看出,在本发明上述实施例 2 的大鼠爪底切口疼痛模型中,给予携带人肝细胞生长因子的重组质粒后 6h 就出现了镇痛作用并持续到大鼠恢复至术前水平。可见,人肝细胞生长因子对术后急性疼痛具有明显的镇痛作用,而且这种止痛效果与伤口的修复无关。同时,在实施例 3 的大鼠皮肤/肌肉切口牵拉术导致中枢痛敏的疼痛模型中,通过在创伤局部肌肉多点注射上述质粒可以抑制中枢痛敏,而给予空质粒的大鼠出

现中枢痛敏,并且术后第 10 至 13 天中枢痛敏最严重,通过大体观察大鼠皮肤在术后第 7 天已经愈合,这与发生疼痛发生时程不一致,也表明本发明的 HGF 具有的止痛作用与创伤的修复止痛没有关系。从上述结果可以看出,人肝细胞生长因子对术后慢性疼痛具有镇痛的作用。在实施例 4 的小鼠坐骨神经分支损伤疼痛模型中,通过鞘内注射上述质粒可以起到明显的镇痛效果,由此可见人肝细胞生长因子对神经损伤引起的神经病理性疼痛具有镇痛作用。由上述各实施例结果可知,通过利用本发明 HGF 基因治疗的方法,能够显著缓解皮肤损伤或肌肉损伤引起的急性的外周神经疼痛、慢性的中枢神经痛敏以及神经损伤引起的神经病理性疼痛。

[0092] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

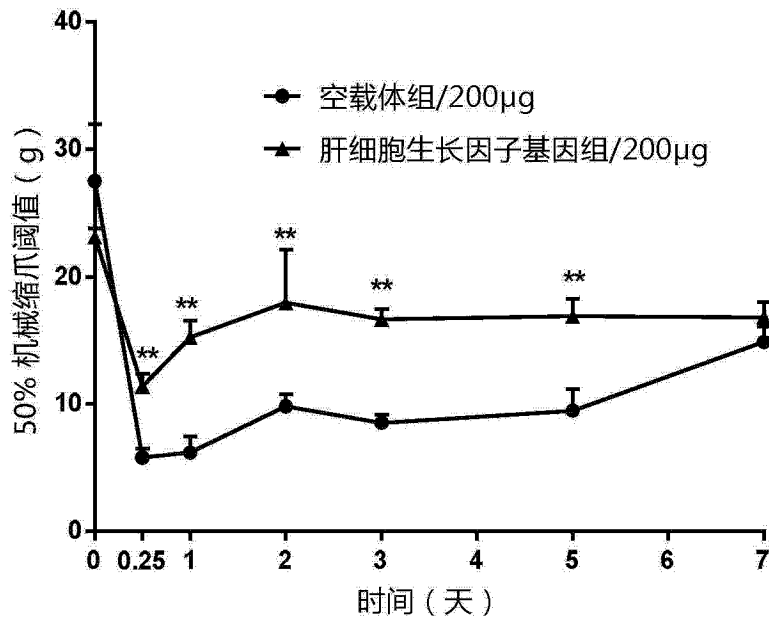


图 1

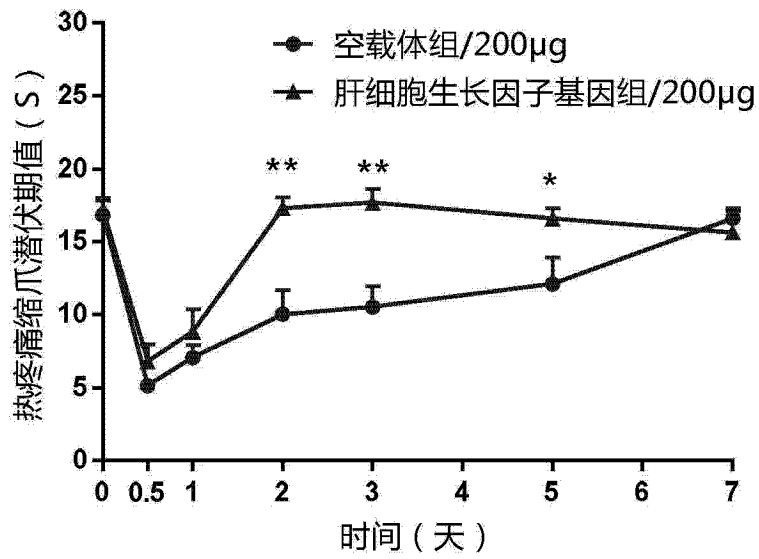


图 2

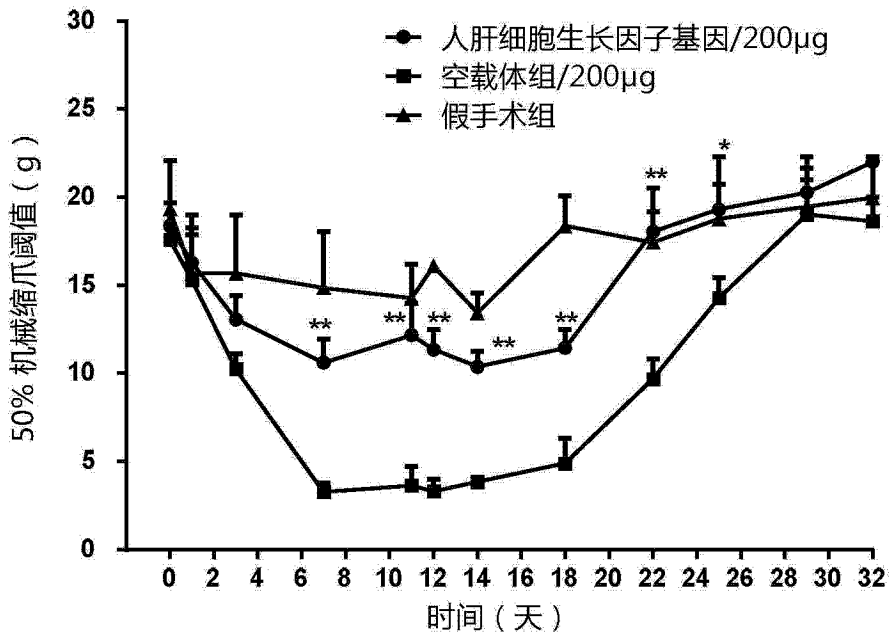


图 3

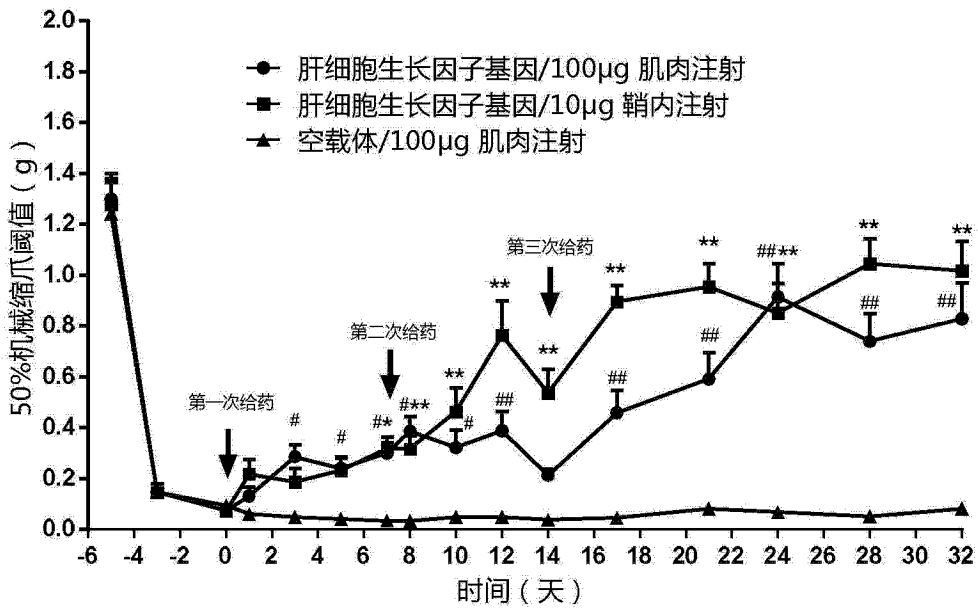


图 4