

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00244

• 论 著 •

骨癌痛模型大鼠脊髓背根神经节 P2X₃受体的表达变化

吴镜湘¹, 徐美英², 缪雪蓉¹, 李晓青¹, 俞卫锋^{1*}

1. 第二军医大学东方肝胆外科医院麻醉科, 上海 200438

2. 上海交通大学附属胸科医院麻醉科, 上海 200030

[摘要] **目的:**观察骨癌痛模型大鼠脊髓背根神经节中 P2X₃受体及其 mRNA 的表达变化,初步探讨其可能的意义。**方法:**60 只雌性 Wistar 大鼠随机分为 3 组(每组 $n=20$):空白对照(C)组;骨癌痛模型(CP)组,左胫骨内接种含 2×10^5 个 Walker-256 大鼠乳腺癌细胞的悬液 $10 \mu\text{l}$;假手术(S)组,左侧胫骨骨髓腔内注入等体积的生理盐水。在接种后第 4、7、10、14、17、21 天进行疼痛行为学测试,在第 14、21 天各组分选 10 只大鼠,取背根神经节,5 只行免疫组化染色,另 5 只抽提 RNA 行实时 PCR,检测背根神经节中 P2X₃受体及其 mRNA 的表达。**结果:**CP 组大鼠在胫骨内接种肿瘤后第 10 天开始出现痛觉过敏,第 14~21 天最为明显。CP 组接种肿瘤后第 14、21 天患侧背根神经节神经元中 P2X₃受体免疫阳性细胞率明显增高($P<0.05$),mRNA 表达水平显著增高($P<0.05$)。**结论:**骨癌痛模型大鼠存在痛觉敏化,可能与 P2X₃受体表达增高有关。

[关键词] 骨癌痛;背根神经节;嘌呤能受体;大鼠

[中图分类号] R 73 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)03-0244-05

Changes of P2X₃receptor expression in dorsal root ganglia in a rat model of bone cancer pain

WU Jing-xiang¹, XU Mei-ying², MIAO Xue-rong¹, LI Xiao-qing¹, YU Wei-feng^{1*}

1. Department of Anesthesiology, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

2. Department of Anesthesiology, Shanghai Chest Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030

[ABSTRACT] **Objective:**To observe the immunoreactive changes of P2X₃ receptor and examine P2X₃ receptor mRNA level in the dorsal root ganglia (DRG) in a rat model of bone cancer pain. **Methods:**Sixty female Wistar rats, weighing 150-200 g, were randomly allocated to three groups ($n=20$ each): group CP (cancer pain) received intra-tibial injection of Syngeneic Walker 256 mammary gland carcinoma cells (2×10^5), group S received intra-tibial injection of equal volume 0.9% sodium chloride, and group C received blank control. Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia tests were taken on 4, 7, 10, 14, 17, and 21 days after inoculation. On day 14 and 21, ten rats of each group were chosen for either immunohistochemistry or real-time RT-PCR to examine the changes of P2X₃ receptor and mRNA. **Results:**The rats in group CP began to display hyperalgesia on day 10 and the pain became most obvious between day 14 and 21. Immunohistochemistry showed that the proportion of DRG neurons positive of P2X₃receptor in group CP was significantly increased on 14 and 21 d($P<0.05$), and RT-PCR showed that the expression of P2X₃ receptor mRNA was also significantly increased. **Conclusion:**These results suggest that our rat model of bone cancer pain has hyperalgesia, which might be related to the increase of P2X₃ receptor expression.

[KEY WORDS] bone cancer pain; dorsal root ganglia; purine receptors; hyperalgesia

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(3):244-248]

P2X₃受体是 ATP 受体的一种亚型,属配体门控型离子通道,在神经系统中选择性分布在脊髓背根神经节(dorsal root ganglia, DRG)、三叉神经节初级感觉神经元胞体及突起内。P2X₃受体的主要功能是参与伤害性感受的产生和传递,在神经病理性疼痛和慢性炎性痛的形成和维持中发挥重要作用^[1-2]。

由于癌症痛的形成可能包含神经痛和炎性痛的成分,但与两者又有区别,骨癌痛模型中 P2X₃受体表达如何变化有待研究。

本研究拟在大鼠骨癌痛模型中观察 P2X₃受体及其 mRNA 在脊髓背根神经节中的表达变化,并探讨其可能的意义,为后续研究奠定基础。

[收稿日期] 2008-06-27

[接受日期] 2008-12-21

[作者简介] 吴镜湘, 博士生, 主治医师. E-mail: wjx1132@yahoo. com. cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81875231, E-mail: ywf808@sohu. com

1 材料和方法

1.1 实验动物和细胞株准备 60只雌性 Wistar 大鼠,体质量 150~200 g,购自上海中国科学院实验动物中心。饲养环境为 12 h 昼夜周期,环境温度为 (24±0.5)℃。实验所用 Walker-256 细胞为 Wistar 大鼠乳腺癌肉瘤细胞株,由上海医药工业研究院提供,按文献^[3]的方法建立大鼠胫骨癌痛模型。动物随机分为 3 组(每组 $n=20$):空白对照(C)组;骨癌痛模型(CP)组,左胫骨内接种 2×10^5 个 Walker-256 大鼠乳腺癌细胞;假手术(S)组,左侧胫骨骨髓腔内注入等体积的生理盐水。

1.2 模型的鉴定 模型的鉴定包括病理学及行为学检测。

1.2.1 病理学检测 在实验结束后经心脏 4%多聚甲醛灌注固定、修剪后肢并除去软组织,取大鼠胫骨,用甲酸复合脱钙液脱钙后进行石蜡切片、H-E 染色,观察有无骨质破坏和肿瘤生长。

1.2.2 行为学检测 为排除手术急性期的影响,疼痛行为学检测从造模第 4 天开始,每周 2 次,即第 4、7、10、14、17、21 天进行下述疼痛行为学测试。(1)大鼠自发性运动痛评分(spontaneous ambulatory pain score,SAPS):将大鼠放置在光滑平整台面上任意走动,观察接种侧后肢使用情况,后肢完全着地并负重为 0 分;着地但不负重为 1 分;不着地为 2 分。(2)机械性痛觉过敏的测量:实验动物测试在一组大小 22 cm×22 cm×30 cm 的笼中进行,动物适应 1 h 并处于安静状态后,用电子 von Frey 测痛仪(2390 系列:美国 IITC 公司,Woodland Hills)刺大鼠足底柔软部位,接触时间 2~3 s,出现缩足反应时的读数为机械痛阈,每次测试至少间隔 5 min,重复 3 次,取平均值。(3)热痛觉过敏实验:采用热敏测试仪 BME-410C(中国医学科学院生物医学工程研究所,天津)照射大鼠足底,记录开始照射至出现缩足逃避反应的潜伏期时间。光辐照强度事先用 6 只未行任何处理的空白对照大鼠调定至潜伏期 (15±3) s,“cut-off 时间”设定为 30 s,以避免造成大鼠足底热辐射损伤。每只大鼠测试间隔 10 min 以上,测试 3 次,取平均值。

1.3 免疫组织化学方法检测 P2X₃受体表达 在肿瘤细胞注射后第 14、21 天各组分别取 5 只大鼠,腹腔注射 10%水合氯醛 400 mg/kg 麻醉下开胸,经左心室插管至升主动脉,生理盐水冲净血液后以 4%多聚甲醛 400 ml 灌注固定。取 L₄~L₆背根神经节,标记后放入 4%多聚甲醛固定液中 4℃后固定过夜,

置入 30%蔗糖溶液中脱水至组织块沉底,OTC 包埋后行连续冠状冰冻切片,切片厚 7 μm,每张玻片贴 6 张切片(按 C 组、S 组、CP 组各 2 张)。切片用 0.01 mol/L PBS(pH7.4)漂洗 3 次,每玻片用 1:200 的 P2X₃兔多抗(Roche 公司,美国)室温孵育 24 h,以 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。用 Cy3 标记的驴抗兔二抗室温避光孵育 1 h,以 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次后封片,荧光镜下观察。计算阳性细胞率的方法是用 Hoechst 染色法标记所有神经元细胞核,于高倍镜(×400)下随机选取 4 个视野,计数 P2X₃阳性细胞率。

1.4 PCR 法测定背根神经节 P2X₃ mRNA 的表达 肿瘤细胞接种后第 14、21 天,各组随机选取 5 只大鼠颈椎脱臼法处死,迅速打开椎板,取 L₄~L₆ 部位脊髓背根神经节,置于 4℃ TRIzol 试剂(Invitrogen 公司,英国)中,匀浆后提取总 RNA,逆转录成为 cDNA 后,用实时 PCR 测定 P2X₃受体 mRNA 的表达。P2X₃引物序列为:5'-TTG AGG GTA GGG GAT GTG GT-3' (sense), 5'-AGT AGG GGT GGT AAT AGT CG-3' (anti-sense); β-actin (内参照)引物序列为 5'-AAG ATC CTG ACC GAG CGT GG-3' (sense), 5'-GGA GAT ACG GTT GTG TCA CGA C-3' (anti-sense)。扩增产物大小: P2X₃为 326 bp,β-actin为 327 bp。采用 RT-PCR 试剂盒(Promega 公司,美国)加入 P2X₃引物进行反应,反应条件:95℃预变性 5 min 后,按 95℃变性 45 s,58℃退火 45 s,72℃延伸 1 min,进行 40 个循环,末次循环 72℃延伸 10 min。应用 Rotor-gene6 软件绘制标准曲线,以该标准曲线相对定量样本 cDNA 浓度,用 P2X₃与 β-actin 的相对 cDNA 浓度比值反映 P2X₃受体 mRNA 表达量。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 11.0 软件进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示形式,行为学测试数据的比较采用重复测量资料的方差分析,免疫组化和 PCR 结果的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 大鼠骨癌痛模型的制备情况

2.1.1 行为学测试结果 CP 组大鼠在胫骨内接种肿瘤后第 10 天出现明显的自发痛,SPAS 评分增高 ($P<0.05$,图 1),在第 14~21 天可出现跛行或后肢不负重,部分大鼠对患侧足有自噬现象。CP 组大鼠在接种肿瘤后第 10 天出现机械痛阈降低 ($P<0.05$,图 2)。各组热痛觉过敏潜伏期差异无统计学

意义($P>0.05$,图 3)。与 C 组相比,S 组 SPAS 评分或机械痛阈差异均无统计学意义($P>0.05$)。结果表明此大鼠骨癌痛模型主要表现为自发痛和机械性痛觉过敏。而所有具有行为学改变的模型组大鼠经病理证实胫骨内均有肿瘤生长。

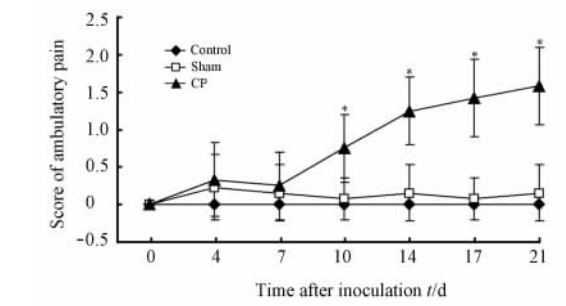


图 1 大鼠造模后自发运动性疼痛评分的变化
Fig 1 Changes of ambulatory score in normal rats and rats receiving intra-tibial inoculation of syngeneic Walker-256 mammary gland cells

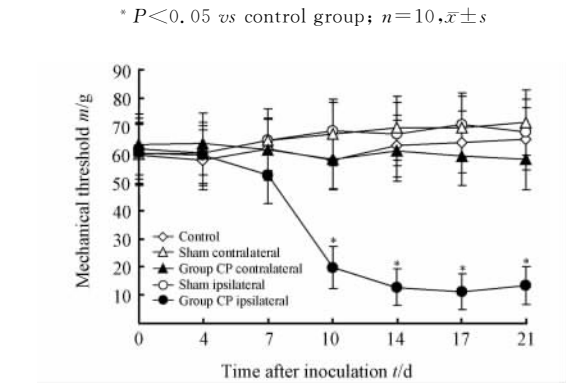


图 2 大鼠造模后机械痛阈的改变
Fig 2 Changes of mechanical response thresholds to von Frey hair of ipsilateral and contralateral paw in rats of different groups

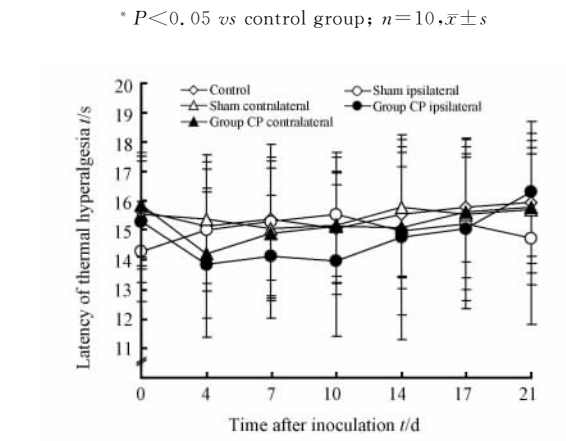


图 3 大鼠造模后热敏潜伏期的变化
Fig 3 Changes of time course of thermal hyperalgesia in rats of different groups

2.1.2 病理学检测结果 H-E 染色可见胫骨同时

存在骨质破坏和骨质增生两方面的改变,成骨和破骨同时存在,骨髓腔内大量蓝染的肿瘤细胞,胫骨结构紊乱(图 4)。以上结果表明大鼠骨癌痛模型成功建立,模型主要行为学特征为机械性痛觉过敏和自发性运动疼痛。

2.2 大鼠 DRG 免疫组化染色结果 P2X₃受体免疫反应主要存在于一些中、小直径神经元中,而大直径神经元缺乏 P2X₃受体免疫反应,CP 组患侧 P2X₃受体表达明显增高(图 5)。C 组、S 组、CP 组(注射后第 14、21 天)大鼠 L₄~L₆节段 DRG 神经元 P2X₃受体阳性神经元百分比分别为 30.71%、32.3%、48.78%和 46.27%,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 6A)。

2.3 大鼠 DRG P2X₃受体 mRNA 的表达变化 CP 组大鼠 DRG 神经元中 P2X₃受体 mRNA 的表达在胫骨内接种肿瘤后第 14、21 天时显著增多,明显高于 C 组和 S 组($P<0.05$,图 6B)。

3 讨论

外周神经元在神经传导通路中起着重要的作用,包括传导来自外周器官的感觉信息,传达来自中枢神经系统的指令以及对内部脏器的调控。DRG 是外周初级感觉神经元,近年来的研究^[4-5]表明在 DRG 中存在一些特异性分布的受体,与疼痛信号等伤害性感觉传递密切相关,其中引起学者关注的一类受体是 P2X 受体。P2X 受体属于配体门控性离子通道家族,可以被细胞外 ATP 激活。目前已克隆出 7 种亚基,P2X₁~P2X₇,可以形成同源或异源聚合体。P2X 受体广泛分布于中枢和外周神经系统,其中 P2X₃受体首先在新生大鼠 DRG 神经元中被克隆出来,高选择性地存在于一些感觉神经元,包括 DRG、三叉神经节和结状神经节等^[6],P2X₃受体兴奋后对 Na⁺、Ca²⁺通透性增加,并可通过细胞去极化开放电压门控的 Ca²⁺通道使细胞内 Ca²⁺增高,可使细胞的兴奋性发生变化或易化神经递质的释放^[7-8],有助于解释疼痛的外周敏化。

本研究发现骨癌痛模型大鼠胫骨内接种肿瘤后第 14、21 天后相应节段 DRG 神经元(L₄~L₆)P2X₃受体免疫反应显著增高,P2X₃ mRNA 表达上调。而疼痛行为学实验表明,接种后第 14~21 天正是骨癌痛痛觉过敏表现显著的时期,两者的变化在时间上具有一致性,提示骨癌痛的痛觉敏化可能与 P2X₃受体表达上调有关。这种表达的变化与神经病理性疼痛模型中获得的结果不同,Shi 等^[9]指出当坐骨神经轴突横断后,对应节段 DRG 神经元 P2X₃受体亚

单位表达水平降低约 50%。这说明骨癌痛的痛觉敏化可能有不同的机制。Gilchrist 等^[10]发现骨癌痛小鼠中 P2X₃受体从原来主要表达于非肽能神经纤维中转变到在肽能神经纤维表达也增多,提示可

能有部分“潜在的”或“寂静型”伤害感受神经元被激活转化为可以传递伤害性刺激的神经元,从而放大疼痛信号。

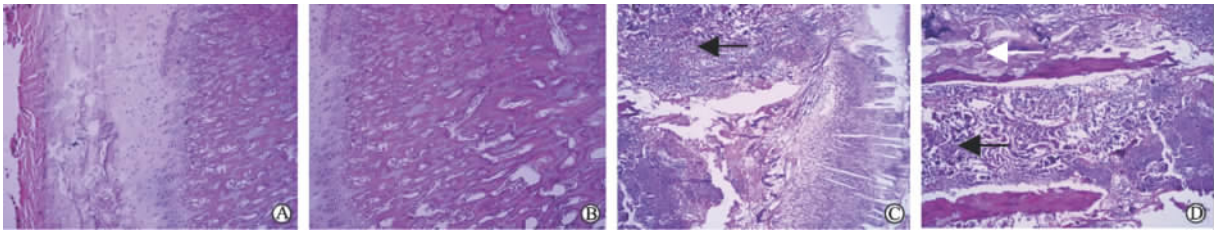


图 4 骨癌痛大鼠胫骨内接种肿瘤后第 21 天时胫骨 H-E 染色结果

Fig 4 Histology of tibial bone destruction 21 d after inoculation with tumor cells (Hematoxylin-eosin staining)

A: Control group; B: Sham group; C, D: Rats received intra-tibial inoculations of Walker 256 cells. C: Showing tumor growth and bone destruction (tumor cells are marked by black arrow); D: Showing newly formed bone (tumor cells are marked by black arrow while newly formed bone is marked by hollow arrow). Original magnification: $\times 100$

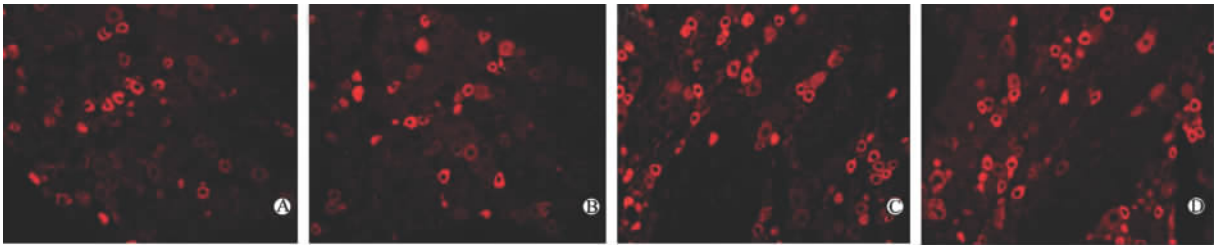


图 5 骨癌痛大鼠 DRG 神经元 P2X₃受体表达免疫组化染色结果

Fig 5 Increased expression of P2X₃ receptor in DRG neurons in bone cancer rats

A: Control; B: Sham; C: CP 14 d; D: CP 21 d. Original magnification: $\times 400$

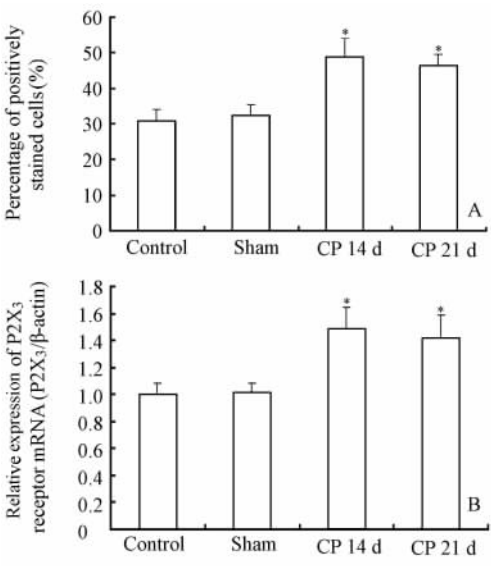


图 6 骨癌痛大鼠 DRG 神经元 P2X₃受体(A)及其 mRNA(B)表达的变化

Fig 6 Increased expression of P2X₃ receptor(A) and mRNA(B) in DRG neurons in bone cancer rats

* $P < 0.05$ vs control group; $n = 5, \bar{x} \pm s$

本研究中痛觉行为学结果显示模型组中热痛阈改变与机械痛阈的分离,与文献^[3]报道一致。这是由于热痛与机械痛有着不同的痛觉传递通路,热痛主要通过无髓的 C 类纤维传导,而机械痛主要是通过有髓鞘的 A δ 纤维和部分 A β 纤维传递,而 P2X₃受体主要与机械性痛觉密切相关,模型大鼠出现的这种痛觉分离现象提示骨癌痛可能主要通过激活 A 类纤维上的 P2X₃受体而产生的。

研究^[11]发现肿瘤生长部位组织 ATP 含量往往高于正常组织,胫骨内肿瘤生长后,可能通过以下途径使局部 ATP 增高堆积:(1)激活成骨细胞和破骨细胞引起局部骨质破坏释放 ATP;(2)支配肿瘤侵害局部的 DRG 神经元受到损害,细胞死亡溶解,胞内大量释放 ATP;(3)局部微血管被肿瘤侵犯,红细胞漏出到损伤部位,破裂后释放 ATP;(4)局部交感神经纤维激活,神经元释放 ATP。由于以上多种原因使得局部 ATP 持续释放,在胞外聚集,作用于 P2X₃受体兴奋初级传入神经纤维,传递痛觉信息。

正常情况下,细胞可以合成少量 ATP 并释放到细胞外,ATP 可在胞外核苷酸酶的作用下快速降解,转变成腺苷,腺苷作用于细胞表面 P1 受体,可负反馈调控细胞内 ATP 释放,限制 ATP 的胞外作用^[12]。但是肿瘤引起的 ATP 的胞外释放是一个病理的持续过程,不会像生理状态下那样被负反馈中断,反而会再次激发神经元的嘌呤能级联反应,使嘌呤能受体 P1 和 P2X 表达都增加,最终导致恶性循环。而 ATP 的堆积和 P2X₃受体的大量表达两方面的作用共同致使参与痛觉传递的神经元处于兴奋性增高的状态,疼痛信号不断被放大,从而产生痛觉敏化^[8,13]。

综上所述,骨癌痛可能通过上调 DRG 神经元 P2X₃受体 mRNA 表达,使 P2X₃受体表达增多而产生痛觉敏化。P2X₃受体可能是骨癌痛发生、发展的重要信号通路,针对该通路的干预治疗有可能成为一个新的治疗靶点。

[参考文献]

[1] Egan T M, Cox J A, Voigt M M. Molecular structure of P2X receptors[J]. Curr Top Med Chem, 2004,4:821-829.

[2] Dunn P M,Zhong Y,Burnstock G. P2X receptors in peripheral neurons[J]. Prog Neurobiol, 2001, 65:107-134.

[3] Mao-Ying Q L, Zhao J, Dong Z Q, Wang J, Yu J, Yan M F, et al. A rat model of bone cancer pain induced by intra-tibia inoculation of Walker 256 mammary gland carcinoma cells[J]. Biochem Biophys Res Commun,2006,345:1292-1298.

[4] Vulchanova L,Riedl M S,Shuster S J,Stone L S,Hargreaves K M,Buell G,et al. P2X₃ is expressed by DRG neurons that terminate in inner lamina II [J]. Eur J Neurosci, 1998, 10: 3470-

3478.

[5] Yiangou Y, Facer P, Birch R, Sangameswaran L, Eglen R, Anand P. P2X₃ receptor in injured human sensory neurons[J]. Neuroreport,2000,11:993-936.

[6] Bradbury E J, Burnstock G, McMahon S B. The expression of P2X₃ purinoreceptors in sensory neurons: effects of axotomy and glial-derived neurotrophic factor [J]. Mol Cell Neurosci, 1998, 12(4-5):256-268.

[7] Luo J, Yin G F, Gu Y Z, Liu Y, Dai J P, Li C, et al. Characterization of three types of ATP-activated current in relation to P2X subunits in rat trigeminal ganglion neurons[J]. Brain Res, 2006, 1115: 9-15.

[8] Wirkner K, Sperlagh B, Illes P. P2X₃ receptor involvement in pain states[J]. Mol Neurobiol, 2007,36:165-183.

[9] Shi T J, Tandrup T, Bergman E, Xu Z Q, Ulfhake B, Hökfelt T. Effect of peripheral nerve injury on dorsal root ganglion neurons in the C57BL/6J mouse: marked changes both in cell numbers and neuropeptide expression[J]. Neuroscience,2001, 105:249-263.

[10] Gilchrist L S, Cain D M, Harding-Rose C, Kov A N, Wendelschafer-Crabb G, Kennedy W R, et al. Re-organization of P2X₃ receptor localization on epidermal nerve fibers in a murine model of cancer pain[J]. Brain Res,2005,1044:197-205.

[11] Maehara Y,Kusumoto H, Anai H,Kusumoto T,Sugimachi K. Human tumor tissues have higher ATP contents than normal tissues[J]. Clin Chim Acta,1987,169(2-3):341-343.

[12] Park H C, Seong J, An J H, Kim J, Kim U J, Lee B W. Alteration of cancer pain-related signals by radiation: proteomic analysis in an animal model with cancer bone invasion[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys,2005,61:1523-1534.

[13] Burnstock G. Potential therapeutic targets in the rapidly expanding field of purinergic signalling[J]. Clin Med,2002,2:45-53.

[本文编辑] 贾泽军

+++++

• 读者 作者 编者 •

《第二军医大学学报》参考文献著录要求

作者引用前人或他人的观点、数据和材料等,要列出参考文献并注明出处。本刊参考文献采用“顺序编码标注法”,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序,并在文内引用处右上角加方括号注明文献序号。引用处如列作者姓名,序号应标注在文献作者姓名之后;若仅引用某文献中的论述,则序号标注在引文内容之后(即该论述的句末)。示例如下:

CRH 神经元和 CRH 受体广泛分布于海马,参与和影响了海马的众多生理功能^[1-3]。

Ireland 等^[6]研究证实,5-羟色胺受体和代谢型谷氨酸受体激活均能上调 NMDA 受体功能。

文后参考文献的著录项目应齐全,包括:作者姓名(列出前 6 位)、文题(书名)、期刊名称(出版社)、出版年、卷及起止页码。示例如下:

盛 慧,马 蓓,闫坚强,孙婷婷,倪 鑫. 促肾上腺皮质激素释放激素对原代培养海马神经元谷氨酸诱发电流的调节作用[J]. 第二军医大学学报,2009,30:233-237.

赵 斌,何绍江. 微生物学实验[M]. 北京:科学出版社,2002:38-158.