

论 著 基础研究

电压门控钠通道 Nav1.6 在骨癌痛模型大鼠背根神经节中的表达

范之丹¹, 马 柯¹, 季晓燕³, 程志军³

上海交通大学 医学院附属新华医院 1. 麻醉科, 2. 疼痛科, 上海 200092; 3. 上海交通大学 医学院附属新华医院崇明分院 麻醉科, 上海 202150

[摘要] 目的 建立大鼠胫骨癌痛模型,并观察电压门控钠通道亚型 Nav1.6 在其背根神经节(DRG)中的表达。方法 雌性 Wistar 大鼠随机分为3组:癌痛组($n=15$)大鼠左胫骨骨髓腔内注射 Walker256 乳腺癌细胞,假手术组($n=10$)注射生理盐水,以正常大鼠作为空白对照组($n=10$)。于造模后第4、8、12、16、20 d,观察大鼠体重变化,评估机械性痛觉过敏以及热痛觉过敏。造模后20 d,取接种侧胫骨做病理切片,观察肿瘤生长情况,real-time PCR 检测大鼠 $L_5 \sim L_6$ DRG 中 Nav1.6 mRNA 的表达。结果 癌痛组大鼠出现进行性加重的疼痛行为学改变,癌痛组大鼠 DRG 中 Nav1.6 mRNA 的表达量明显高于假手术组和空白对照组($P < 0.05$)。结论 Walker256 乳腺癌细胞制备的大鼠胫骨癌痛模型是骨转移瘤相关疼痛较可靠的模型。Nav1.6 mRNA 在骨癌痛模型大鼠 DRG 中的表达上调,提示该通道可能参与骨癌痛的发生过程。

[关键词] 骨癌痛;Nav1.6;钠通道;背根神经节

[DOI] 11.3969/j.issn.1674-8115.2015.03.006 **[中图分类号]** R441.1 **[文献标志码]** A

Expression of voltage-gated sodium channel Nav1.6 in dorsal root ganglions of rat model of bone cancer pain

FAN Zhi-dan¹, MA Ke², JI Xiao-yan³, CHENG Zhi-jun³

1. Department of Anesthesiology, 2. Pain Centre, Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China; 3. Department of Anesthesiology, Xinhua Hospital (Chongming), Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 202150, China

[Abstract] **Objective** To establish a rat model of bone cancer pain and observe the expression of voltage-gated sodium channel subtype Nav1.6 in dorsal root ganglions (DRG). **Methods** Female Wistar rats were randomly divided into 3 groups, i. e. the Walker256 group ($n=15$), sham group ($n=10$), and normal control group ($n=10$). The Walker256 group underwent intra-tibial injection of syngeneic Walker256 mammary gland carcinoma cells. The sham group received intra-tibial injection of normal saline. The normal Wistar rats served as normal controls. Changes of body weight were observed and pain thresholds of mechanical hyperalgesia and thermal hyperalgesia were assessed 4, 8, 12, 16, and 20 d after the rat pain model was established. Pathological sections of tibia that underwent the injection were prepared 20 d after the rat pain model was established. The development of the bone tumor was observed and the mRNA expression of Nav1.6 in $L_5 \sim L_6$ DRG was detected by real-time PCR. **Results** The Walker256 group showed gradual development of both mechanical and thermal hyperalgesia. The mRNA expression of Nav1.6 in DRG of the Walker256 group was significantly higher than those of the sham group and normal control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The rat model of bone cancer pain established by intra-tibial injection of syngeneic Walker256 mammary gland carcinoma cells is a reliable pain model of bone metastases. The mRNA expression of Nav1.6 in DRG increases, which suggests that

[基金项目] 上海市卫生和计划生育委员会基金(201440273)(Foundation of Municipal Commission of Health and Family Planning of Shanghai, 201440273);崇明县科委基金(CKY2012-05)(Chongming Science and Technology Committee Foundation, CKY2012-05)。

[作者简介] 范之丹(1980—),女,主治医师,硕士生;电子邮箱:fanzhidan56@126.com。

[通信作者] 马 柯,电子邮箱:marke72@163.com。

Nav1.6 may involve in the cancer-induced bone pain.

[Key words] bone cancer pain; Nav1.6; sodium channel; dorsal root ganglion

随着诊疗技术的不断进步,肿瘤患者生存时间延长;但肿瘤引发的疼痛严重影响了患者的生活质量。有统计结果显示,30%~50%的癌症患者有中度到重度的疼痛,晚期的癌症患者中,75%~95%会发生难以控制的慢性疼痛^[1]。目前,许多研究表明癌痛是有别于神经病理性疼痛及炎性痛的一种特殊的疼痛类型^[2-6],可能与肿瘤细胞和炎症细胞产生的致痛物质、破骨细胞的持续活化以及肿瘤生长引起的神经压迫与损伤等诸多因素有关,这些因素共同促成了神经系统的敏化。Nav1.6 是一种 TTX-S 的电压门控性钠离子通道,广泛分布于神经系统包括中枢神经系统和背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)神经元中。研究^[7-9]表明,Nav1.6 参与了疼痛的产生过程。本实验拟建立大鼠骨癌痛模型,并利用 real-time PCR 方法观察骨癌痛状态下 Nav1.6 的表达,探讨其在骨癌痛中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞与动物

Walker256 大鼠乳腺癌细胞购自复旦大学细胞库。Wistar 大鼠体质量 180~230 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,生产许可证号码为 SCXK(沪)2012-0002,使用许可证号码为 SYXK(沪)2014-0016。将 35 只大鼠随机分为空白对照组($n=10$)、假手术组($n=10$)和癌痛组($n=15$)。

1.2 主要仪器及试剂

Von-Frey filament 测痛仪(NC12775-99 Touch-Test Sensory Evaluators Set 20, North Coast Medical),热刺激仪(PL-200,成都泰盟科技),PCR 仪(C1000TM, Bio-Rad),荧光定量 PCR 仪(CFX96, Bio-Rad),电热恒温水浴锅(DK-8D,上海精宏实验设备)。

1.3 骨癌痛模型的建立

结合 Medhurst 等^[10]的造模方法并加以改进。以 10%的水合氯醛(450 mg/kg)腹腔注射麻醉,消毒左后肢皮肤,于胫骨中下 1/3 处切开皮肤约 1 cm,暴露胫骨,胫骨结节下外 5 mm 处与胫骨表面呈 30°~45°用微型手摇钻钻孔。用 25 μ g 微量注射器刺入骨髓腔,缓慢注入 15 μ L (10^6 个/mL) Walker256 大鼠乳腺癌细胞,用骨蜡封孔并逐层消毒缝合,术后予庆

大霉素注射液腹腔注射;假手术组则注入 15 μ L 生理盐水,其余处理同癌痛组。动物麻醉苏醒后,笼中常规饲养。剔除手术过程造成骨折以及术后因恶液质死亡的大鼠。术后连续观察 20 d,并于第 4、8、12、16、20 日测大鼠体质量,观察大鼠行走步态以及局部肿瘤生长情况,评估机械性痛觉过敏以及热痛觉过敏。

1.4 机械痛觉过敏评估

将大鼠置于透明有机玻璃罩中,罩子放在铁丝网上适应 15 min 后,采用“up-and-down”方法^[11]用不同压力的 Von-Frey filament 垂直刺激大鼠左足底柔软部位,接触 2~3 s,出现缩足反应后停止接触,重复 3 次,取平均值。每次测试之间间隔 5 min。

1.5 热痛觉过敏评估

将大鼠置于透明有机玻璃罩中,罩子放在透明玻璃表面,待大鼠不再走动后开始测试。采用热刺激仪照射大鼠左后足底柔软部位,记录开始照射至出现缩足逃避反应的时间,每只大鼠测 3 次,取平均值。每次测试之间间隔 10 min。

1.6 病理学检查

20 d 后,将癌痛组大鼠灌注固定,并收集接种 Walker256 大鼠乳腺癌细胞的胫骨,记录其病理改变。经甲酸复合脱钙处理后石蜡切片苏木精-伊红染色(H-E 染色),观察胫骨髓腔内有无肿瘤生长。根据病理学检查结果剔除造模失败的样本。

1.7 real-time PCR 检测 Nav1.6 mRNA 在大鼠 DRG 中的表达

将癌痛组、假手术组、空白对照组大鼠各 6 只用于 real-time PCR 检测。手术后 20 d 冰上取双侧 L₃~L₆ DRG 置于液氮中保存,待全部收集完毕后进行总 RNA 抽取(采用生工生物公司 Trizol 试剂盒),采用 TaKaRa 公司的 PrimeScriptTMRT reagent Kit 反转录合成 cDNA,得到的 cDNA 用 ddH₂O 稀释,用作后续反应模板。根据 NCBI 查询所得钠通道亚型的基因序列,用 Primer 6.0 软件设计得到特异性扩增引物。引物由上海英骏生物公司合成,序列见表 1。real-time PCR 使用 TaKaRa 公司的 SYBR 试剂。采用

反转录得到的 cDNA 作为模板,用设计的引物进行 PCR,每个样品做 3 个重复对照,上机扩增检测,利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。

表 1 RT-PCR 引物序列

Tab 1 Primer sequences of RT-PCR

基因	引物序列(5'→3')	产物长度/bp	温度/℃
GAPDH	GGCATCGTGGGAAGGGCTCATG	186	63.70
	GCCAGTGAAGCTTCCCGTTCAG		63.54
Nav1.6	AAGCTGGAGAATGGAGGCAC	76	61.14
	TGTCGTAAGAGGGGAGGGAG		61.72

1.8 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间差异分析采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠的一般情况

癌痛组从术后第 8 日开始体质量呈进行性下降,与假手术组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);假手术组大鼠术后体质量先下降之后呈缓慢增长的趋势,与空白对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);癌痛组大鼠体质量与空白对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$) (图 1)。

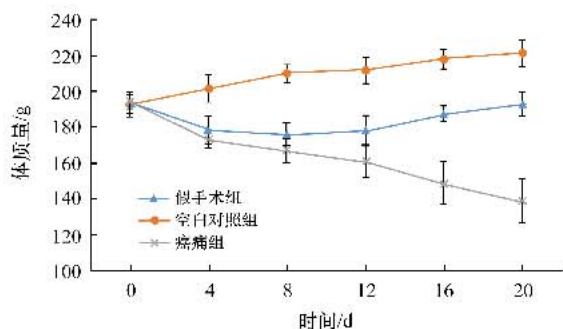


图 1 术后各组大鼠体质量变化 ($n=7$)

Fig 1 Changes of body weight of groups after surgery ($n=7$)

2.2 大鼠行为学改变

2.2.1 机械痛变化 与假手术组比较,癌痛组大鼠从术后第 12 日开始机械痛阈进展性下降 ($P < 0.01$);假手术组机械痛阈与空白对照组比较,仅在第 8 日的差异有统计学意义 ($P < 0.01$),其余观察时间点的差异无统计学意义 ($P > 0.05$);癌痛组与空白对照组比较,从第 4 日开始机械痛阈显著降低 ($P < 0.01$) (图 2)。

2.2.2 热痛觉变化 术后第 4 日及第 8 日,假手术组大鼠热痛敏阈值与空白对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),之后观察时间点的差异无统计学意义 ($P > 0.05$);癌痛组从术后第 8 日开始热痛敏阈值明显下降,与假手术组的差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。癌痛组与空白对照组比较,从术后第 4 日开始热痛敏阈值显著降低 ($P < 0.05$) (图 3)。

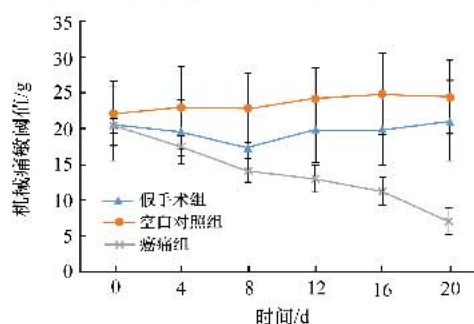


图 2 各组大鼠机械痛敏阈值 ($n=7$)

Fig 2 Thresholds of mechanical hyperalgesia of groups ($n=7$)

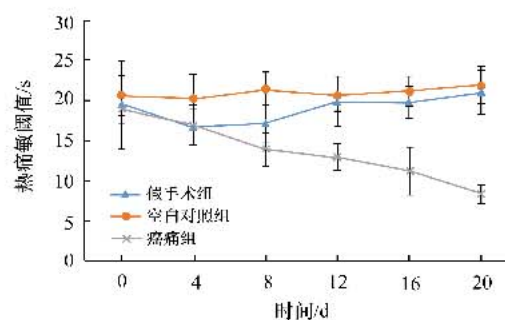


图 3 各组大鼠热痛敏阈值 ($n=7$)

Fig 3 Thresholds of thermal hyperalgesia of groups ($n=7$)

2.3 大鼠胫骨病理学改变

骨髓腔被肿瘤细胞占据,肿瘤细胞侵入骨质,细胞形态多样,细胞核深染,可见破骨细胞,符合成瘤表现 (图 4)。

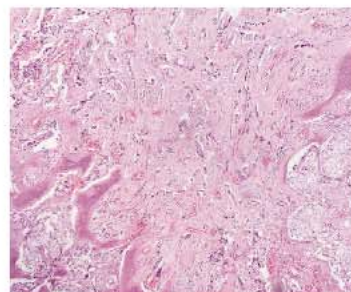


图 4 接种 Walker256 大鼠乳腺癌细胞 20 d 胫骨的病理学观察
H-E 染色 $\times 100$

Fig 4 Pathological observation of tibia 20 d after being inoculated with Walker256 mammary gland carcinoma cells H-E staining $\times 100$

2.4 Nav1.6 mRNA 在大鼠 DRG 中的表达

癌痛组大鼠 DRG 中 Nav1.6 mRNA 的表达明显高于假手术组及空白对照组 ($P < 0.05$); 假手术组与空白对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 5)。

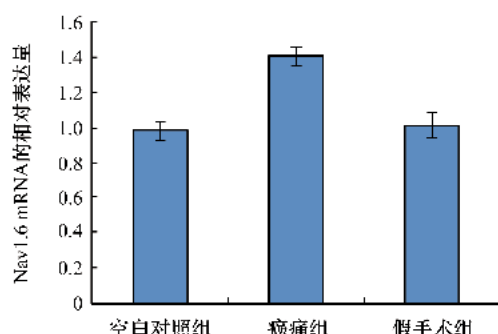


图 5 Nav1.6 mRNA 在大鼠 DRG 中的表达

Fig 5 The mRNA expression of Nav1.6 in rat DRG

3 讨论

癌痛是一种机制独特而复杂的慢性疼痛, 肿瘤造成的骨质破坏、神经压迫、局部和血液钙离子浓度升高及炎症介质释放等都可能引起疼痛。此外, 外周传入神经和中枢的敏化也可能是癌痛模型大鼠出现痛觉过敏的原因^[12]。因此, 有必要深入研究癌痛机制并探索有效的治疗方法。在临床病例观察中, 肿瘤细胞转移到骨或原发肿瘤在骨内, 都会出现剧烈的疼痛; 并且, 随着骨质的破坏, 疼痛程度加剧。通常, 易发生骨转移的肿瘤有肺癌、乳腺癌、前列腺癌和卵巢癌等。本课题组在预实验中也曾选取 A549 肺癌细胞株^[13], 但最终选择了 Walker256 大鼠乳腺癌细胞, 因为其具有稳定的成瘤率, 能表现出许多与人类骨癌相似的体征, 如自发痛、触发痛及痛觉过敏等, 并被广泛应用于建立肿瘤相关动物模型和骨转移瘤的研究中^[14-16]。本研究在大鼠胫骨内注射 Walker256 大鼠乳腺癌细胞后, 观察到进行性加重的行为学改变, 组织病理学检查也证实了肿瘤细胞在胫骨内的生长, 方法简单, 成功率高, 为骨转移瘤有关的疼痛研究提供了可靠的动物模型。

电压门控钠离子通道被认为在疼痛通路中起重要作用。Nav1.6 是一种 TTX-S 的电压门控性钠离子通道, 在成年大鼠中有表达, 分布于伤害性感觉神经元的胞体和轴突的起始端。Nav1.6 在 DRG 中的高表达可能使钠离子通道失活率降低及复活速度加快, 增加神经元的兴奋性, 从而参与异位放电的形成而引起病理性疼痛。另有实验结果显示: 选择性结

扎实验大鼠 L₅ 脊神经, 在损伤的神经元中 Nav1.6 表达下调, 而在未损伤的神经元中 Nav1.6 的表达增强^[7,8]; 同时, 有研究证实 Nav1.6 参与了 2 型糖尿病患者的病理性神经痛的发生过程^[9]。该通道在癌痛中的作用尚不明确, 在发生骨癌痛时 Nav1.6 在 DRG 中的表达研究未见报道。

本实验通过建立大鼠胫骨癌痛模型, 观察 Nav1.6 在 DRG 中的表达。结果表明, 在大鼠骨癌痛模型中, Nav1.6 在 DRG 中的表达升高, 提示了该基因的表达变化可能参与骨癌痛的发生过程。由于癌痛的形成是一个动态的、多因素的过程, 需要进一步观察骨癌痛状态下该通道的功能特性变化, 以明确各因素在癌痛形成过程中的作用。

【参考文献】

- [1] Caterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels[J]. *Neuron*, 2000, 26(1): 13-25.
- [2] Hummig W, Machado Kopruszinski C, Chieffo JG. Pregabalin reduces acute inflammatory and persistent pain associated with nerve injury and cancer in rat models of orofacial pain[J]. *J Oral Facial Pain Headache*, 2014, 28(4): 350-359.
- [3] Middlemiss T, Laird BJ, Fallon MT. Mechanisms of cancer-induced bone pain[J]. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2011, 23(6): 387-392.
- [4] Garg R, Bhatnagar S. Neuropathic pain in cancer survivors[J]. *Pain Manag*, 2014, 4(4): 309-316.
- [5] Tétreault P, Danseman MA, Doré-Savard L, et al. Weight bearing evaluation in inflammatory, neuropathic and cancer chronic pain in freely moving rats[J]. *Physiol Behav*, 2011, 104(3): 495-502.
- [6] Xie W, Strong JA, Ye L, et al. Knockdown of sodium channel Nav1.6 blocks mechanical pain and abnormal bursting activity of afferent neurons in inflamed sensory ganglia[J]. *Pain*, 2013, 154(8): 1170-1180.
- [7] Berta T, Peiró O, Pertin M, et al. Transcriptional and functional profiles of voltage-gated Na⁺ channels in injured and non-injured DRG neurons in the SNI model of neuropathic pain[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2008, 37(2): 196-208.
- [8] Fukuda T, Yamanaka H, Kobayashi K, et al. Re-evaluation of the phenotypic changes in L4 dorsal root ganglion neurons after L5 spinal nerve ligation[J]. *Pain*, 2012, 153(1): 68-79.
- [9] Ren YS, Qian NS. Sodium channel Nav1.6 is up-regulated in the dorsal root ganglia in a mouse model of type 2 diabetes[J]. *Brain Res Bull*, 2012, 87(2-3): 244-249.
- [10] Medhurst SJ, Walker K, Bowes M, et al. A rat model of bone cancer pain[J]. *Pain*, 2002, 96(1-2): 129-140.
- [11] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw[J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1): 55-63.

(下转第 347 页)

通过3组动物的实验结果显示,神经干细胞在治疗脊髓损伤中具有非常重要的作用,其作用机制可能是通过抑制脊髓组织中 Caspase-3 和 c-fos 蛋白表达,促进脊髓神经细胞自身修复,从而减少脊髓损伤后继发性损伤。

参考文献

- [1] Zhang J, Wei H, Lin M, et al. Curcumin protects against ischemic spinal cord injury: the pathway effect[J]. *Neural Regen Res*, 2013, 8(36): 3391-3400.
- [2] Abdenipour A, Tirahi T, Taberi T. Intraspinal transplantation of motoneuron-like cell combined with delivery of polymer-based glial cell line-derived neurotrophic factor for repair of spinal cord contusion injury[J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9(10): 1003-1013.
- [3] Lee K K, Lee M Y, Han D Y, et al. Effects of bladder function by early tamsulosin treatment in a spinal cord injury rat model[J]. *Ann Rehabil Med*, 2014, 38(4): 433-442.
- [4] Tang S, Liao X, Shi B, et al. The effects of controlled release of neurotrophin-3 from PCL scaffolds on the survival and neuronal differentiation of transplanted neural stem cells in a rat spinal cord injury model[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e107517.
- [5] Park J, Muratori B, Shi R. Acrolein as a novel therapeutic target for motor and sensory deficits in spinal cord injury[J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9(7): 677-683.
- [6] Margolis J M, Juneau P, Sadosky A, et al. Health care utilization and expenditures among medicaid beneficiaries with neuropathic pain following spinal cord injury[J]. *J Pain Res*, 2014, 7: 379-387.
- [7] Cavus G, Altas M, Aras M, et al. Effects of montelukast and methylprednisolone on experimental spinal cord injury in rats[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2014, 18(12): 1770-1777.
- [8] Lin H S, Ji Z S, Zheng L H, et al. Effect of methylprednisolone on the activities of caspase-3, -6, -8 and -9 in rabbits with acute spinal cord injury[J]. *Exp Ther Med*, 2012, 4(1): 49-54.
- [9] Kakimoto M, Kida K, Minamishima S, et al. Delayed paraplegia after spinal cord is chemie injury requires caspase-3 activation in mice[J]. *Stroke*, 2011, 42(8): 2302-2307.
- [10] Barr G A. Formalin-induced c-fos expression in the brain of infant rats[J]. *J Pain*, 2011, 12(2): 263-271.
- [11] Baek J M, Kim J Y, Cheon Y H, et al. Aconitum pseudo-laeve var. erectum inhibits receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand-induced osteoclastogenesis via the c-Fos/nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1 signaling pathway and prevents lipopolysaccharide-induced bone loss in mice[J]. *Molecules*, 2014, 19(8): 11628-11644.
- [12] Zheng W, Niu L, Zhang C, et al. Brain edema and protein expression of c-Fos and c-Jun in the brain after diffused brain injury[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(6): 2809-2817.
- [13] Mauty P W. Bone cancer pain: from mechanism to therapy[J]. *Curr Opin Support Palliat Care*, 2014, 8(2): 83-90.
- [14] 曹照文,袁拯忠,叶人,等. 自然铜和鹿衔草对裸鼠肺癌骨转移的抑制作用[J]. *中华中医药学刊*, 2012(1): 133-135.
- [15] Futakuchi M, Singh R K. Animal model for mammary tumor growth in the bone microenvironment[J]. *Breast Cancer*, 2013, 20(3): 195-203.
- [16] Mao-Ying Q L, Wang X W, Yang C J, et al. Robust spinal neuroinflammation mediates mechanical allodynia in Walker 256 induced bone cancer rats[J]. *Mol Brain*, 2012, 5: 16-21.

[收稿日期] 2014-11-02

[本文编辑] 王淑平

[收稿日期] 2014-11-16

[本文编辑] 吴 洋

(上接第336页)

- [12] Mauty P W. Bone cancer pain: from mechanism to therapy[J]. *Curr Opin Support Palliat Care*, 2014, 8(2): 83-90.
- [13] 曹照文,袁拯忠,叶人,等. 自然铜和鹿衔草对裸鼠肺癌骨转移的抑制作用[J]. *中华中医药学刊*, 2012(1): 133-135.
- [14] Xin H, Zhang D, Yang S, et al. Role of ATP-sensitive potassium channels in modulating nociception in rat model of bone cancer pain[J]. *Brain Res*, 2014, 1554: 29-35.