

论著·基础研究

趋化因子 CCL2 对骨癌痛大鼠痛行为的影响及其外周机制

王丽娅¹, 高 坡², 周 晔¹

1. 上海交通大学医学院附属国际和平妇幼保健院妇产科, 上海市胚胎源性疾病重点实验室, 上海市临床重点专科(建设项目)——“强主体”妇产科, 上海 200030; 2. 上海交通大学医学院附属仁济医院麻醉科, 上海 200127

[摘要] **目的**·研究 CC 趋化因子配体 2 (CC chemokine ligand 2, CCL2) 对骨癌痛 (bone cancer pain, BCP) 大鼠痛行为的影响及其外周机制。**方法**·在 SD 大鼠右侧后肢胫骨骨髓腔内注入 Walker256 乳腺癌细胞, 建立 BCP 模型, 假手术组注射等体积的生理盐水。检测 BCP 大鼠机械痛阈值, 来判断 BCP 模型是否成功。采用免疫荧光染色的方法, 检测 2 组大鼠 L4 和 L5 背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 中 CCL2 的表达情况。术侧足底注射 CCL2 (500 ng, 25 μ L), 观察对 2 组大鼠术侧后肢抬腿和舔脚行为的影响。采用全细胞膜片钳的方法, 考察 CCL2 对 2 组大鼠急性分离培养的 DRG 神经元膜电位的影响。**结果**·术后 14 d, BCP 大鼠的机械刺激痛阈显著低于假手术组; 其术侧 L4 和 L5 DRG 中 CCL2 的表达明显高于假手术组; 足底注射 CCL2 后, BCP 大鼠右后肢的悬空时间显著多于假手术组; CCL2 引起 BCP 大鼠 DRG 神经元去极化的比例和幅度均显著高于假手术组。**结论**·CCL2 可易化 BCP 大鼠痛行为, 其外周机制可能由 CCL2 诱导 DRG 神经元去极化, 进而增强神经元兴奋性, 提示 CCL2 在 BCP 的发生发展中发挥重要作用。

[关键词] CC 趋化因子配体 2; 骨癌痛; 背根神经节; 膜电位; 去极化

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.05.005 **[中图分类号]** R739.96 **[文献标志码]** A

Effects of CC chemokine ligand 2 on pain behavior in a rat model of bone cancer pain and its underlying peripheral mechanism

WANG Li-ya¹, GAO Po², ZHOU Ye¹

1. Department of Gynaecology and Obstetrics, International Peace Maternity and Child Health Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; Shanghai Key Laboratory of Embryo Original Diseases; Shanghai Municipal Key Clinical Specialty, Shanghai 200030, China; 2. Department of Anesthesiology, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the effects of CC chemokine ligand 2 (CCL2) on pain behavior in a rat model of bone cancer pain (BCP) and the underlying peripheral mechanisms. **Methods**·BCP models were developed by inoculation of Walker256 mammary gland carcinoma cells into the tibia medullary cavities of right hind limbs SD rats. The same volume of saline was injected in sham operation (sham) group. The mechanical pain threshold was measured to judge the success of BCP model. Expression of CCL2 in L4 and L5 dorsal root ganglion (DRG) was detected by immunofluorescence staining. CCL2 (500 ng, 25 μ L) was injected into plantar of the operated side to observe its effects on leg-raising and foot-licking behaviors of hind paws in BCP and sham rats. Whole-cell patch-clamp recording was used to investigate the effects of CCL2 on membrane potential of acutely dissociated DRG neurons from the two groups. **Results**·Fourteen days after operation, the mechanical pain threshold in the right hind paws of BCP rats was significantly lower than that in sham rats. Compared with the Sham rats, the expression of CCL2 in L4 and L5 DRG of BCP rats was significantly higher. Plantar injection of CCL2 increased paw lift time in BCP rats. The rate and amplitude of depolarization induced by CCL2 in BCP DRG neurons were significantly higher than those in sham neurons. **Conclusion**·CCL2 facilitates pain behavior in BCP rats, and its peripheral mechanism maybe involves CCL2-induced neuron depolarization to enhance excitability of DRG neurons. These results indicate that CCL2 plays an important role in development of BCP.

[Key words] CC chemokine ligand 2; bone cancer pain; dorsal root ganglion; membrane potential; depolarization

乳腺癌、前列腺癌、肺癌、卵巢癌及子宫内膜癌等常常发生骨转移^[1]。肿瘤的侵袭和扩散往往造成骨癌痛 (bone cancer pain, BCP), 严重影响患者的生活质量, 但由于临床现有治疗方法的局限性以及治疗药物的不良反应, 依旧有高达约 45% 的骨肿瘤患者的疼痛症状没有得

到有效控制^[2]。因此, 研究 BCP 的发生、发展机制, 寻找缓解、治疗 BCP 的新方法, 提高患者生活质量, 已成为当前亟需解决的重要临床问题。

趋化因子是一类能趋化细胞定向移动的分型小分子蛋白。CC 趋化因子配体 2 (CC chemokine ligand 2,

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81800748) (National Natural Science Foundation of China, 81800748)。

[作者简介] 王丽娅 (1985—), 女, 住院医师, 硕士; 电子信箱: annya1985010@sina.com。

[通信作者] 周 晔, 电子信箱: victoriazhou66@163.com。



CCL2) 也称作单核细胞趋化因子-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1), 是被最早发现并广泛研究的趋化因子家族成员, 与其特异性受体 CC 趋化因子受体 2 (CC chemokine receptor 2, CCR2) 结合发挥生物学效应。CCL2 在脊髓背角和背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 中都有分布。已有研究^[3-5]表明在炎性疼痛和神经病理性疼痛模型中, CCL2 在 DRG 或脊髓的表达均增加。最近, Wang 等^[6]发现 BCP 大鼠脊髓中的 CCL2 在 mRNA 和蛋白水平的表达也显著升高, 而中和脊髓 CCL2 可显著缓解神经病理性疼痛模型大鼠痛觉过敏^[7]。这些研究结果表明 CCL2 是产生疼痛的重要分子, 但 CCL2 参与 BCP 发生、发展的外周机制目前尚未阐明。本研究旨在通过构建大鼠胫骨 BCP 模型, 利用行为学、形态学以及电生理的方法研究 BCP 大鼠 DRG 中 CCL2 表达分布情况以及 CCL2 对 BCP 大鼠痛行为和 DRG 神经元兴奋性的影响, 探讨 CCL2 参与 BCP 形成的外周机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 体质量 180 ~ 200 g 的雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 由上海交通大学医学院实验动物中心提供。动物生产许可证号为 SCXK (沪) 2012-0002, 动物使用许可证号为 SYXK (沪) 2013-0050。大鼠在清洁级动物房饲养, 4 只/笼, 自由摄食和饮水, 照明周期为 12 h/12 h, 温度控制在室温 (25 ± 1) °C。

1.1.2 主要试剂 Walker256 大鼠乳腺癌细胞购自复旦大学肿瘤研究所, CCL2 购自 R&D 公司, 兔源 CCL2 抗体购自 Millipore 公司, 植物凝集素 B4 (IB4) 抗体购自 Sigma 公司, 胶原酶 A、D 购自 Roche 公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠胫骨 BCP 模型的建立 根据文献^[8]报道的方法建立大鼠胫骨 BCP 模型。正常 SD 雄性大鼠经腹腔内注射戊巴比妥钠 (60 mg/kg) 麻醉后, 仰卧位固定于操作台上, 右后肢外侧剪去毛发, 碘伏消毒皮肤, 于胫骨中上 1/3 处做约 5 mm 切口, 暴露胫骨。取 5 号钢针, 于胫骨结节下外 5 mm 左右处于骨面呈 45° 朝身体侧进针, 行至明显突破感后拔出钢针, 用微量注射器抽取 Walker256 细胞悬液 10 μ L (约含 2×10^5 个细胞), 将细胞悬液接种至骨髓腔内。微量注射器退出后立即用医用骨蜡封口, 并分层缝合伤口, 碘伏消毒后涂抹适量红霉素软膏于

伤口表面。假手术组除了以注射等体积的生理盐水代替 Walker256 细胞悬液外, 所有操作一样。

1.2.2 模型建立成功标准及分组 按上述方法建立起胫骨 BCP 模型后, 分别在术前 (0 d) 及术后 1、3、5、7、10、14 d 测定术侧后爪的机械痛阈; 若机械痛阈逐渐下降并且术后 10、14 d 值与术前值的差异有统计学意义, 则表明模型建立成功。将大鼠分为 BCP 组和假手术组, 每组 8 只。

1.2.3 机械痛阈值的测定 测定方法参照相关文献报道^[9]。具体过程如下: 机械痛采用 von Frey 纤维丝测定大鼠右侧后爪的机械痛阈。行为测试前, 将大鼠放置于 18.0 cm \times 30.0 cm \times 12.5 cm 的有机玻璃盒内, 其底部留有 1.0 cm \times 1.0 cm 的网格状空隙, 以便于 von Frey 纤维丝的测试。大鼠在此盒内适应 30 min 后采用 6 点法测定大鼠右后爪的机械痛阈: von Frey 纤维丝一组共 8 个, 纤维丝弯曲至 1/3 半圆弧度时所产生的刺激强度分别为 0.5、1、2、4、6、8、10、12 g, 从 0.5 g 开始刺激大鼠足底 6 个位点, 直至 6 个位点全部有反应, 每一个位点的刺激时间约为 1 s, 大鼠有抬足反应记为 1, 没有反应记为 0。计算时应用 Hill 方程拟合曲线算出使 50% 的位点有反应的刺激重量, 换算成重力单位 (mN), 即为大鼠的机械痛阈。

1.2.4 疼痛行为学实验 将假手术组和 BCP 组大鼠 (每组 8 只) 放置于有机玻璃盒内室温适应 30 min 后, 观察记录 10 min 内 2 组大鼠后肢悬空和抬腿次数 (基线值)。之后在 2 组大鼠右后肢足底注射含 CCL2 500 ng 的生理盐水 25 μ L, 立即放回有机玻璃盒内, 记录给药侧后肢每 2 min 抬腿次数及悬空时间, 共记录 30 min。综合悬空时间 = 悬空时间 + 1/3 抬腿次数 (单位 s)。

1.2.5 免疫荧光染色 分别在术后 14 d 取假手术组和 BCP 组大鼠各 3 只, 用戊巴比妥钠 (60 mg/kg, 腹腔注射) 麻醉, 打开胸腔暴露心脏, 依次灌流生理盐水、4% 多聚甲醛溶液。取手术侧 L4 和 L5 DRG 依次进行 4% 多聚甲醛后固定、20% 蔗糖磷酸盐缓冲液溶液脱水、切片 (厚度为 10 μ m)。然后进行免疫荧光染色, 取 DRG 切片放入柠檬酸钠抗原修复液中在 92.5 °C 的水浴中煮 10 min, 从水浴中拿出 DRG 切片待其恢复至常温后, 用 0.05 mol/L PBS 漂洗 4 次, 每次 5 min, 加封闭液室温封闭 2 h。封闭结束后, 加 CCL2 (1:500) 和 IB4 (1:1 000) 一抗, 湿盒内 4 °C 过夜。PBS 漂洗 4 次后, 加入相应二抗, 室温湿盒内避光孵育 2 h。PBS 漂洗 4 次后即可封片, 在荧光显微镜 (Leica DM2500) 下观察、拍照。从每只大鼠 DRG 染色切片中随机选取 10 张, 对 CCL2 阳性细胞进行计数, 累计得出每只大鼠 CCL2 阳性细胞的数量。

1.2.6 DRG 神经元急性分离培养 取术后 14 d 的假手术组或 BCP 组大鼠, 解剖暴露腰骶段背根神经节 (L4 和 L5) 放置在预冷的解剖液 (配方: NaCl 137 mmol/L, KCl 5.3 mmol/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mmol/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3 mmol/L, sorbitol 25 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, pH 值 7.3 ~ 7.4) 中, 在解剖镜下剔除相连神经及周围结缔组织被膜。胶原酶 A 5 mg、EGTA 0.95 mg 加解剖液 5 mL 配制成消化液 A, 在消化液 A 中消化 25 min, $74 \times g$ 离心 2 min, 弃上清液; 胶原酶 D 5 mg、30 U/mL 木瓜蛋白酶、EGTA 0.95 mg 加 5 mL 解剖液配制成消化液 D, 继续消化 25 min, $74 \times g$ 离心 2 min, 弃上清液。加入 200 μL 由胰蛋白酶抑制剂、牛血清白蛋白加完全培养液配制成的终止液, 用不同口径的玻璃管机械吹打, 将分散的神经元种植在预先涂有 0.1 mg/mL 多聚鸟氨酸和 1 mg/mL 层粘连蛋白的盖玻片上, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱 (5% CO_2)。细胞贴壁 4 ~ 16 h 即可用于膜片钳实验。

1.2.7 全细胞膜片钳记录 将载有 DRG 神经元的玻片从 CO_2 孵箱中取出, 将其放入盛有记录所用的细胞外灌流液 (配方: NaCl 145 mmol/L, KCl 3 mmol/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2 mmol/L, 葡萄糖 10 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mmol/L, NaOH 调节 pH 值至 7.2 ~ 7.3) 的恒温槽中, 灌流速度 2 mL/min。使用 PC-10 拉制仪 (美国 Sutter 公司) 两步法拉制记录用玻璃电极, 电极内灌入电极内液 (配方: 葡萄糖酸钾 120 mmol/L, KCl 100 mmol/L, NaCl 5 mmol/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mmol/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2 mmol/L, EGTA 11 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, Mg-ATP 20 mmol/L, Li-GTP 1 mmol/L, 用 Tris-base 调节 pH 值至 7.2 ~ 7.3), 玻璃电极入水阻抗为 3 ~ 5 $\text{M}\Omega$ 。在倒置显微镜下, 选取中小直径的神经元 (破膜稳定后膜电容小于 30 pF) 进行封接、破膜, 首先借助放大器 (型号 700B, 美国 Axon 公司) 在电流钳模式下, 使用 Clampex 10.4 软件记录神经元的静息膜电位, 选取静息膜电位低于 -45 mV 的神经元进行实验。其次, 在电流钳模式下给予阶跃性电流刺激 (-40 pA 开始, 每步增加 10 pA), 将可被诱发产生动作电位的细胞, 即神经元用于实验。最后, CCL2 (100 nmol/L) 通过微灌流系统 DAD-12 (美国 ALA 公司) 给至神经元表面, 记录神经元给药前后膜电位的变化情况。采用 pClamp 10.4 软件对采集的数据进行分析。

1.3 统计学方法

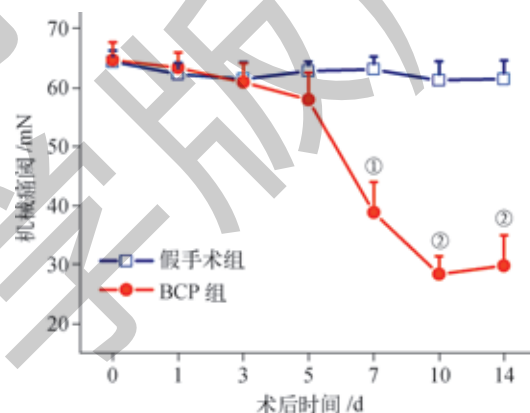
数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS16.0 软件对数据进行统

计分析。机械痛、疼痛行为学、形态学及电生理实验中 CCL2 引起假手术和 BCP 2 组神经元去极化幅度的差别采用独立样本 t 检验进行统计分析; 电生理实验中假手术和 BCP 2 组 DRG 神经元对 CCL2 的反应率采用 χ^2 检验进行统计分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 BCP 大鼠机械痛阈显著降低

对假手术组和 BCP 组大鼠进行机械痛阈的测定 (图 1), 术后假手术组大鼠的机械刺激痛阈没有明显变化, 而 BCP 组大鼠的机械痛阈在术后 7 d 时已显著低于假手术组大鼠 ($P=0.001$, $N=8$)。术后 14 d 时, BCP 组大鼠的机械痛阈已处于稳定阶段, 显著低于假手术组大鼠 ($P=0.000$, $N=8$)。此时的 BCP 组大鼠出现明显的间歇性跛行, 偶尔会有自发抬腿或舔脚等自发性疼痛行为, 提示 BCP 模型建立成功。



注: ^a $P=0.001$, ^b $P=0.000$, 与假手术组比较。

图 1 BCP 模型建立后大鼠右后足机械痛阈改变

Fig 1 Changes of mechanical pain threshold in right hind paw of BCP rats

2.2 CCL2 在 BCP 大鼠 DRG 中表达情况

已有文献^[3-5, 7]报道表明, CCL2 在疼痛的调节中发挥重要作用。因此, 我们采用免疫荧光的方法考察了 BCP 大鼠 DRG 中 CCL2 表达的变化情况。术后 14 d, BCP 大鼠 L4 和 L5 DRG 中 CCL2 阳性神经元数目 (293.67 ± 17.34) 显著多于假手术组大鼠 (133.00 ± 19.55 , $P=0.004$) (图 2)。CCL2 表达主要分布于中小直径 DRG 神经元, 且大部分 CCL2 与 IB4 共定位, 而 IB4 是感受伤害性刺激的初级感觉神经元的标志物, 表明 CCL2 表达在与疼痛调节密切相关的 DRG 神经元中, 为后续研究 CCL2 在 BCP 中的作用提供了形态学依据。

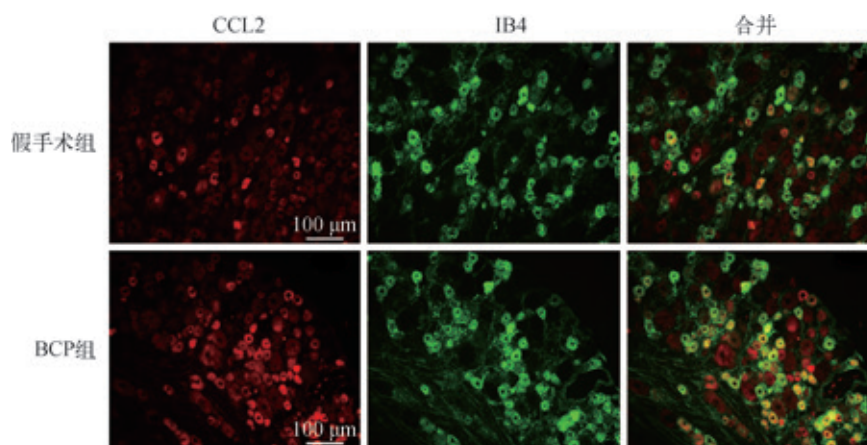
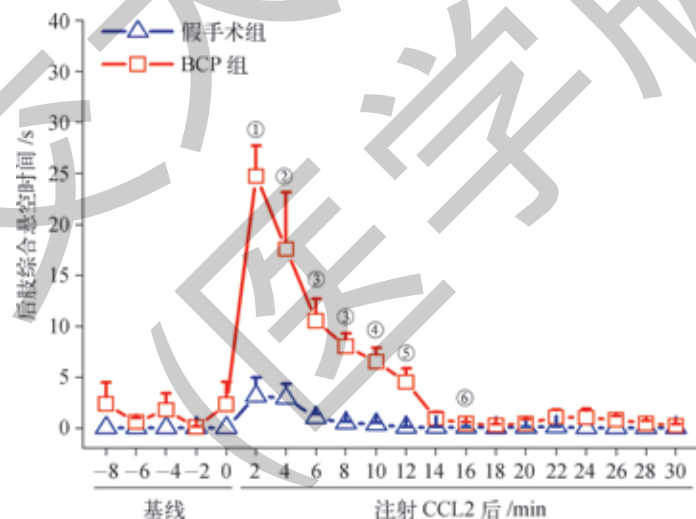


图2 BCP组和假手术组大鼠DRG中CCL2免疫荧光染色阳性细胞数
Fig 2 Number of CCL2-positive DRG neurons in BCP and sham-operation rats

2.3 外源性 CCL2 对 BCP 大鼠疼痛行为的影响

免疫荧光实验结果提示 CCL2 很可能参与了 BCP 的形成。因此, 为了进一步证明 CCL2 的确可以易化疼痛, 我们在术后 14 d 的假手术组和 BCP 组大鼠足底注射 CCL2 (500 ng, 25 μ L), 观察 2 组大鼠抬腿和舔脚的情况。假手术组大鼠在注射 CCL2 之前, 没有明显的自发性疼痛行为。当给予 CCL2 后, 在前 5 min 会有少量的抬腿

或舔脚情况出现, 5 min 后基本没有疼痛行为。而 BCP 大鼠在注射 CCL2 之前, 偶尔就会有自发的抬腿或者舔脚行为, 当足底注射 CCL2 后 2 min 有比较明显的舔脚和抬腿行为, 折合成综合悬空时间约为 (24.71 ± 3.02) s ($N=8$), 显著高于假手术组大鼠的 (3.13 ± 1.82) s ($P=0.000$, $N=8$)。且 BCP 大鼠的疼痛行为可以维持至 12 min 左右, 表明 CCL2 的确可以易化 BCP 大鼠的疼痛行为 (图 3)。



注: * $P=0.000$, ** $P=0.035$, *** $P=0.001$, * $P=0.003$, * $P=0.012$, * $P=0.043$, 与假手术组比较。

图3 足底注射 CCL2 易化 BCP 大鼠疼痛行为

Fig 3 Pain behavior of BCP rats facilitated by plantar injection of CCL2

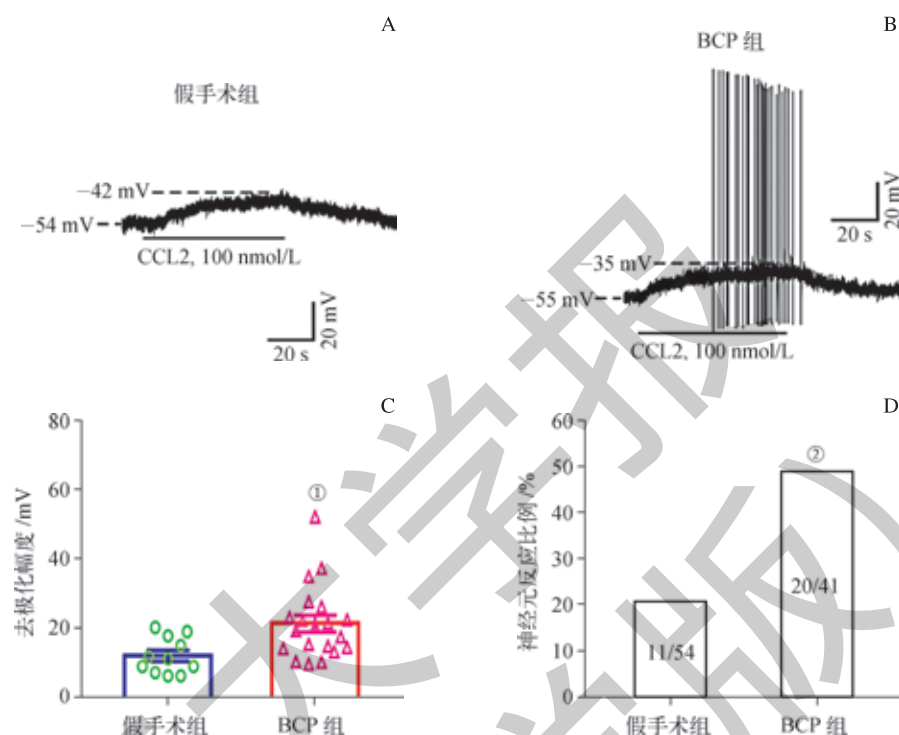
2.4 CCL2 对 BCP 大鼠 DRG 神经元兴奋性的影响

行为学结果已表明 CCL2 可增强 BCP 大鼠疼痛行为, 那么其外周机制又是什么呢? 接下来, 我们考察了 CCL2 对急性分离的假手术组和 BCP 组大鼠 DRG 神经元膜电位的影响。我们选取膜电容小于 30 pF 的中小直径 DRG 神经元进行实验, 2 组大鼠 DRG 神经元的膜电

容没有明显差异 [假手术组 vs BCP 组: (25.80 ± 0.47) pF vs (25.08 ± 1.22) pF, $P=0.549$]。CCL2 可引起少量假手术组大鼠 DRG 神经元发生明显的去极化反应, 平均反应幅度为 (11.90 ± 1.57) mV ($N=11$)。而在 BCP 组大鼠, CCL2 可以引起约 50% 的 DRG 神经元发生明显的去极化反应并伴随着动作电位的发放, 平均反应幅度为

(21.21 ± 2.36) mV ($N=20$), 去极化幅度显著高于假手术组大鼠 ($P=0.011$)。在对 CCL2 反应的比例上, 假手术组大鼠 54 个神经元只有 11 个对 CCL2 有反应, 比例为 20.37%; BCP 组大鼠 41 个神经元有 20 个对 CCL2 有反应, 比例为 48.78%, 显著高于假手术组大鼠 ($P=0.003$)

(图 4)。上述结果表明, CCL2 对 BCP 大鼠 DRG 神经元兴奋性的影响显著高于对假手术组大鼠的影响, 提示 BCP 大鼠疼痛行为的产生可能是由 BCP 大鼠 DRG 中上调表达的 CCL2 增强 DRG 神经元的兴奋性所介导。



注: A. CCL2 引起假手术组 DRG 神经元去极化例图; B. CCL2 引起 BCP 组 DRG 去极化例图; C. CCL2 引起 2 组大鼠 DRG 神经元去极化的幅度; D. 2 组大鼠 DRG 神经元对 CCL2 反应的比例。① $P=0.011$, ② $P=0.003$, 与假手术组比较。

图 4 CCL2 对假手术组和 BCP 组大鼠 DRG 神经元膜电位的影响

Fig 4 Effects of CCL2 on membrane potential of DRG neurons in sham-operation and BCP rats

3 讨论

本研究采用目前较为普遍的构建 BCP 模型的方法, 即将乳腺癌细胞 Walker256 注射至大鼠后肢胫骨处, 形成胫 BCP 模型。本研究行为学结果显示, 术后 7 d 时 BCP 大鼠术后侧肢的机械痛阈值已显著低于假手术组大鼠, 且术后 14 d 时 BCP 组大鼠的机械阈值基本达到了一个稳定值, 表明 BCP 模型建立成功。本研究后续的实验均选取术后 14 d 的大鼠进行实验, 因为此时 BCP 模型已比较稳定。

多项研究^[3-5, 10-11]表明, 在完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA) 诱导的炎性痛, 以及慢性压迫背根神经节 (chronic compression of DRG, CCD)、脊神经结扎 (spinal nerve ligation, SNL)、慢性坐骨神经缩窄损伤 (chronic constriction injury, CCI) 等诱发的神经病理性疼痛中, DRG 中 CCL2 的表达均上调, 提示 CCL2 是炎性痛、神经病理性疼痛产生和维持的重要介质。而

BCP 是一种机制较复杂的慢性疼痛, 兼具炎性痛和神经病理性疼痛的特点, 因此我们推测在 BCP 模型大鼠 DRG 中 CCL2 的表达也会上调。有研究^[12]表明 BCP 大鼠 DRG 中 CCL2 的 mRNA 表达相比对照组增加约 3 倍, 且脊髓 CCL2 在 mRNA 和蛋白水平的表达均显著上调; 鞘内给予 CCL2 引起痛觉过敏, 而鞘内给予 CCL2 中和抗体可部分逆转 BCP 行为^[13]。本研究的免疫荧光结果表明 BCP 大鼠 L4 和 L5 DRG 中 CCL2 的表达较假手术组大鼠显著上调, 且与痛觉神经元的标志物 IB4 大部分共标; 与上述研究结果一致, 提示 CCL2 参与 BCP 的发生。

本研究进一步考察了足底注射外源性 CCL2 对 BCP 和假手术组大鼠疼痛行为的影响。发现注射 CCL2 后, BCP 大鼠抬腿和舔脚的时间显著多于假手术组大鼠, 表明 CCL2 引起 BCP 疼痛行为明显强于对照组。Abbadie 等^[14]发现炎性痛或神经病理性疼痛大鼠 DRG 中 CCR2 mRNA 的表达显著上调, 因此我们推测上述行为学现象的外周机

制可能与BCP大鼠DRG中CCR2受体表达上调有关,但仍需进一步的实验来验证。

疼痛的发生往往是由于致痛因子如辣椒素、P物质等的释放,提高了外周神经元的兴奋性。以往的研究^[15]表明CCL2也可增强DRG神经元的兴奋性,如CCL2可增加慢性坐骨神经缩窄损伤模型(chronic constrictive injury, CCI)大鼠DRG神经元放电的数目;Sun等^[16]发现CCL2可引起慢性压迫背根神经节模型(chronic compression of DRG, CCD)大鼠DRG神经元发生去极化,降低诱导动作电位发放的阈电流。因此,我们考察了CCL2对BCP大鼠DRG神经元的兴奋性的影响。本研究的电生理结果表明,CCL2可引起BCP组大鼠DRG神经元发生去极化并伴随着动作

电位的发放,提示CCL2可增强BCP组DRG神经元兴奋性,这与上述文献报道是一致的。此外,我们还发现CCL2引起BCP组DRG神经元发生去极化的程度及反应率都显著高于假手术组,提示BCP组DRG神经元对CCL2的反应性明显增强,其中重要原因可能也是BCP大鼠DRG中CCR2表达显著上调。我们将在后续的研究中探究BCP大鼠DRG中CCR2表达变化情况。

综上所述,CCL2可易化BCP大鼠疼痛行为,增强BCP大鼠DRG神经元的兴奋性,提示BCP大鼠DRG神经元中上调表达的CCL2可能介导了BCP大鼠疼痛行为的产生,这可能是BCP形成的重要外周机制之一,具体的机制很可能与BCP大鼠DRG中CCR2表达上调有关。

参·考·文·献

- [1] Mundy GR. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(8): 584-593.
- [2] Meuser T, Pietruck C, Radbruch L, et al. Symptoms during cancer pain treatment following WHO-guidelines: a longitudinal follow-up study of symptom prevalence, severity and etiology[J]. Pain, 2001, 93(3): 247-257.
- [3] Jeon SM, Lee KM, Park ES, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 immunoreactivity in sensory ganglia and hindpaw after adjuvant injection[J]. Neuroreport, 2008, 19(2): 183-186.
- [4] Jeon SM, Lee KM, Cho HJ. Expression of monocyte chemo-attractant protein-1 in rat dorsal root ganglia and spinal cord in experimental models of neuropathic pain[J]. Brain Res, 2009, 1251: 103-111.
- [5] White FA, Sun J, Waters SM, et al. Excitatory monocyte chemoattractant protein-1 signaling is up-regulated in sensory neurons after chronic compression of the dorsal root ganglion[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(39): 14092-14097.
- [6] Wang Y, Ni H, Li H, et al. Nuclear factor κ B regulated monocyte chemoattractant protein-1/chemokine CC motif receptor-2 expressing in spinal cord contributes to the maintenance of cancer-induced bone pain in rats[J]. Mol Pain, 2018, 14: 1744806918788681.
- [7] Thacker MA, Clark AK, Bishop T, et al. CCL2 is a key mediator of microglia activation in neuropathic pain states[J]. Eur J Pain, 2009, 13(3): 263-272.
- [8] Yao P, Ding Y, Wang Z, et al. Impacts of anti-nerve growth factor antibody on pain-related behaviors and expressions of opioid receptor in spinal dorsal horn and dorsal root ganglia of rats with cancer-induced bone pain[J]. Mol Pain, 2016, 12. DOI: 10.1177/1744806916644928.
- [9] Xiang Z, Xiong Y, Yan N, et al. Functional up-regulation of P2X₃ receptors in the chronically compressed dorsal root ganglion[J]. Pain, 2008, 140(1): 23-34.
- [10] Tanaka T, Minami M, Nakagawa T, et al. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in the dorsal root ganglia in a rat model of neuropathic pain: possible involvement in the development of neuropathic pain[J]. Neurosci Res, 2004, 48(4): 463-469.
- [11] Van Steenwinckel J, Reaux-Le Goazigo A, Pommier B, et al. CCL2 released from neuronal synaptic vesicles in the spinal cord is a major mediator of local inflammation and pain after peripheral nerve injury[J]. J Neurosci, 2011, 31(15): 5865-5875.
- [12] Chen YJ, Huo YH, Hong Y. Effects of intrathecal administration of AM₂₂₋₅₂ on mechanical allodynia and CCL2 expression in DRG in bone cancer rats[J]. Acta Physiologica Sinica, 2017, 69(1): 70-76.
- [13] Hu JH, Zheng XY, Yang JP, et al. Involvement of spinal monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in cancer-induced bone pain in rats[J]. Neurosci Lett, 2012, 517(1): 60-63.
- [14] Abbadie C, Lindia JA, Cumiskey AM, et al. Impaired neuropathic pain responses in mice lacking the chemokine receptor CCR2[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(13): 7947-7952.
- [15] Serrano A, Paré M, McIntosh F, et al. Blocking spinal CCR2 with AZ889 reversed hyperalgesia in a model of neuropathic pain[J]. Mol Pain, 2010, 6: 90.
- [16] Sun JH, Yang B, Donnelly DF, et al. MCP-1 enhances excitability of nociceptive neurons in chronically compressed dorsal root ganglia[J]. J Neurophysiol, 2006, 96(5): 2189-2199.

[收稿日期] 2019-01-21

[本文编辑] 邵碧云