

论著·基础研究

脊髓趋化因子受体 2 介导大鼠骨癌痛维持的机制研究

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**· 研究脊髓趋化因子受体 2 (chemokine C-C motif receptor 2, CCR2) 介导大鼠骨癌痛 (bone cancer pain, BCP) 维持的机制。**方法**· 选取 54 只 SD 大鼠为研究对象, 将其分为 BCP 组、假手术组、BCP+INCB3344 (CCR2 特异性阻断剂) 组和 BCP+ 溶剂对照组。向 BCP 组大鼠胫骨骨髓腔内注入 Walker256 乳腺癌细胞, 建立骨癌痛模型; 假手术组则注射等量的生理盐水。BCP+INCB3344 组是在 BCP 模型建立第 14 日后, 向大鼠鞘内注射 INCB3344; BCP+ 溶剂对照组则注射等量的溶剂。通过检测 BCP 组大鼠和假手术组大鼠的机械痛阈值来判断鉴定 BCP 模型是否成功。采用蛋白质印迹检测假手术组和 BCP 组大鼠脊髓后角 CCR2 表达情况。通过机械痛行为的测试, 观察鞘内给予 INCB3344 对 BCP 模型大鼠机械痛阈的影响。通过全细胞膜片钳记录观察 BCP 组、BCP+INCB3344 组和 BCP+ 溶剂对照组大鼠脊髓胶状质层 (substantia gelatinosa, SG) 神经元自发兴奋性突触后电流 (spontaneous excitatory postsynaptic currents, sEPSCs)、 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸 (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid, AMPA) 电流和 N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartic acid, NMDA) 电流间的差异。**结果**· 与假手术组相比, 术后 14 d 时 BCP 组大鼠的机械痛阈下降且术侧脊髓后角 CCR2 的表达增加 ($P=0.000$, $P=0.009$), 而鞘内注射 INCB3344 4 h 时可显著升高 BCP 大鼠的机械痛阈 ($P=0.002$)。BCP 组大鼠 SG 神经元 sEPSCs 的频率和幅度、AMPA 电流和 NMDA 电流幅度均高于假手术组 (均 $P=0.000$), 而鞘内给予 INCB3344 可显著抑制 BCP 大鼠的上述指标 (均 $P<0.05$); 此外, 胞外给予 INCB3344 也可显著抑制 BCP 大鼠 SG 神经元 sEPSCs 的频率 ($P=0.001$) 和幅度 ($P=0.020$)。**结论**· 脊髓后角的 CCR2 可通过增强 AMPA 和 NMDA 受体功能来介导 BCP 大鼠脊髓后角兴奋性突触传递效能的增强, 该作用可能是 BCP 维持的重要机制。

[关键词] 趋化因子受体 2; 骨癌痛; 脊髓; 自发兴奋性突触后电流; 胶状质层

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.11.008 **[中图分类号]** R338.8 **[文献标志码]** A

Mechanism of spinal chemokine C-C motif receptor 2-mediated maintenance of bone cancer pain in rats

WANG Li-ya¹, GAO Po², ZHOU Ye¹

1. Department of Obstetrics, The International Peace Maternity & 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 mechanism of spinal chemokine C-C motif receptor 2 (CCR2)-mediated maintenance of bone cancer pain (BCP) in rats. **Methods**· Fifty-four SD rats were divided into BCP group, sham operation group, BCP+INCB3344 (CCR2 specific antagonist) group, and BCP+vehicle control group. Walker256 breast cancer cells were injected into the tibia medullary cavity of rats in the BCP group to establish the BCP model, while the rats in the sham operation group were injected with the same amount of saline. The rats in the BCP+INCB3344 group received intrathecal injection of INCB3344 on the 14th day after the establishment of BCP model, while the BCP+vehicle control group rats were injected with the same amount of vehicle. The mechanical pain thresholds of BCP group rats and sham operation group rats were measured to judge the success of BCP model. The expressions of CCR2 in the dorsal horn of spinal cord in the sham operation group rats and the BCP group rats were detected by Western blotting. The effects of intrathecal administration of INCB3344 on the mechanical pain threshold of BCP rats were observed by mechanical pain behavior test. Whole-cell patch-clamp recordings were used to investigate the differences of spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs), α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid (AMPA) and N-methyl-D-aspartic acid (NMDA)-induced currents of spinal substantia gelatinosa (SG) neurons of rats in the BCP group, the BCP+INCB3344 group and the BCP+vehicle control group. **Results**· Compared with the sham operation group, the mechanical pain threshold of BCP group rats reduced significantly on the 14th day after operation ($P=0.000$), and the expression of CCR2 in ipsilateral spinal cord of BCP group rats increased significantly ($P=0.009$). After intrathecal injection of INCB3344 for 4 h, the mechanical pain threshold of BCP+INCB3344 group rats was significantly increased ($P=0.002$). The frequency and amplitude of sEPSCs and the amplitude of AMPA and NMDA-induced currents in SG neurons of BCP group rats were significantly higher than those of the sham operation group rats (all $P=0.000$), while intrathecal administration of INCB3344 could significantly inhibit the above-mentioned indices in the BCP+INCB3344 group (all $P<0.05$). In addition, extracellular perfusion of INCB3344 could also significantly inhibit the frequency ($P=0.001$) and amplitude ($P=0.020$) of sEPSCs in SG neurons in BCP rats. **Conclusion**· CCR2 expressing in the spinal cord mediates the enhancement of excitatory synaptic transmission efficacy in the spinal dorsal horn of BCP rats by enhancing the functions of AMPA and NMDA receptors, which may be an important mechanism for the maintenance of BCP.

[Key words] chemokine C-C motif receptor 2 (CCR2); bone cancer pain (BCP); spinal cord; spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs); substantia gelatinosa (SG)

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81800748); 中国博士后科学基金 (2017M610257) (Youth Science Foundation of National Natural Science Foundation of China, 81800748; China Postdoctoral Science Foundation, 2017M610257)。

[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: victoriashou66@163.com。

临床上,多种常见的恶性肿瘤如肺癌、前列腺癌、卵巢癌及宫颈癌等的发展后期往往会向骨组织侵袭和扩散,从而导致骨癌的发生^[1-2]。骨癌的典型特征之一即为可引发患者异常剧烈的疼痛,给其生活及生存带来巨大痛苦。目前,临床上尚未找到特别有效的治疗骨癌痛 (bone cancer pain, BCP) 的手段和药物,依旧有约半数骨癌患者的疼痛症状不能得到有效控制^[3]。因此,阐明 BCP 维持的分子机制并寻找 BCP 潜在的治疗靶点,或将为临床实践中制定更有效的治疗措施提供理论依据。

趋化因子受体 2 (chemokine C-C motif receptor 2, CCR2) 是一种 7 次跨膜的 G 蛋白偶联受体,能够与 CC 趋化因子配体 2 (CC chemokine ligand 2, CCL2) 高选择性结合,而 CCL2/CCR2 信号在疼痛发生及维持过程中发挥了重要作用^[4]。研究^[5-6]表明,在 BCP 及神经病理性疼痛状态下,脊髓后角 CCL2 和 CCR2 的表达均显著增加,干预 CCL2/CCR2 信号可有效缓解大鼠机械痛敏反应,但有关脊髓后角 CCR2 介导 BCP 维持的分子机制尚未被阐明。von Hehn 等^[7]发现,脊髓后角在痛信号传递过程中可发挥重要作用,外周神经纤维末梢接收到的痛信号经初级感觉神经元传递至脊髓后角,换元后传递至高级中枢,最终在皮层形成痛觉。因此,脊髓及其以上中枢神经系统信息传递的异常对于 BCP 的维持至关重要。基于此,本研究通过构建大鼠胫骨癌痛模型,利用行为学、分子生物学以及电生理的方法对大鼠脊髓后角表达的 CCR2 在 BCP 维持阶段的作用进行研究,并就 CCR2 对 BCP 大鼠脊髓后角兴奋性突触传递效能的影响进行探讨,以明确 CCR2 介导 BCP 维持的脊髓机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、实验动物及分组 Walker256 乳腺癌细胞购自复旦大学肿瘤研究所。选取雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 54 只 [由上海交通大学医学院实验动物科学部提供,动物生产许可证号为 SCXK (沪) 2012-0002], 体质量为 180 ~ 200 g。大鼠饲养于上海交通大学医学院附属仁济医院动物中心清洁级动物房的标准笼中,5 只/笼,动物使用许可证号为 SYXK (沪) 2013-0050。大鼠饲以标准饲料,自由摄食、饮水。饲养条件如下:照明周期为 12 h/12 h,温度为 25 ℃ 左右,湿度为 50% ~ 60%,环境噪声控制在 60 dB 以下。本研究涉及的动物实验已通过上海交通大学医学院动物护理和使用委员会审批 (审批号: #SYXK-2013-0050)。

为研究大鼠在机械痛阈、脊髓后角 CCR2 表达、脊髓胶状质层 (substantia gelatinosa, SG) 神经元电生理活动

等方面的差异,以及脊髓后角的 CCR2 是否参与 BCP 的维持,随机将 54 只大鼠分为 BCP 组 (18 只)、假手术组 (14 只)、BCP+INCB3344 (CCR2 特异性阻断剂) 组 (14 只)、BCP+溶剂对照组 (8 只),而后进行建模或对照处理。

1.1.2 主要试剂 INCB3344 购自美国 MedChemExpress 公司,兔源 CCR2 抗体购自英国 Biorbyt 公司, β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体购自美国 Bioworld 公司,辣根过氧化物酶 (HRP) 标记二抗购自美国 Bio-Rad 公司,电生理所需试剂均购自德国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 BCP 模型的建立及组别处理 根据本课题组近期研究^[8]报道建立大鼠 BCP 模型,即向 BCP 组大鼠胫骨骨髓腔内注入 Walker256 乳腺癌细胞,假手术组则注射等量的生理盐水;BCP+INCB3344 组为在 BCP 模型建立第 14 日后向大鼠鞘内注射 INCB3344,而 BCP+溶剂对照组则注射等量的溶剂。在起初的模型建立中,BCP 组、BCP+INCB3344 组和 BCP+溶剂对照组大鼠共计 43 只,术后有 3 只发生死亡 (疑因恶病质死亡),故后期用于实验的大鼠为 40 只。另假手术组大鼠未出现死亡的情况。

1.2.2 模型建立成功的标准 分别在大鼠 BCP 模型建立的术前及术后 1、3、5、7、10、14 d 测定 BCP 组大鼠和假手术组大鼠术后足趾的机械痛阈,若术后 BCP 组大鼠机械痛阈逐渐下降且第 7、10、14 d 痛阈与假手术组大鼠间差异有统计学意义,则表明模型建立成功。

1.2.3 机械痛阈的测定 测定方法参照相关文献^[9]及课题组近期研究^[8]报道。测定 BCP 组大鼠 ($n=8$) 和假手术组 ($n=8$) 大鼠在术前及术后 1、3、5、7、10、14 d 时的机械痛阈,比较 2 组大鼠在上述时间点的机械痛阈的差异;测定 BCP+INCB3344 组大鼠和 BCP+溶剂对照组大鼠的机械痛阈,以考察鞘内给予 CCR2 特异阻断剂 INCB3344 对 BCP 模型大鼠机械痛阈的影响。

1.2.4 BCP 大鼠鞘内置管术 向接种 Walker256 乳腺癌细胞 7 d 的 BCP 模型大鼠 ($n=22$) 腹腔注射戊巴比妥钠 (60 mg/kg) 进行麻醉。沿脊椎中线切开皮肤,分离肌肉,找到 L5、L6 椎骨之间棘突根部缝隙连接,将无菌的 PE 导管插入髓鞘内约 1.5 cm,导管经皮下沿脊柱向上从颈部穿出,分层缝合肌肉、皮肤并固定导管,将导管尾部封闭,以防脑脊液外溢以及细菌进入脊髓腔感染大鼠。手术伤口涂抹红霉素软膏。以鞘内注射 10 μ L 利多卡因,后足出现明显瘫软反应作为置管成功的标准。实验时,在 BCP+INCB3344 组大鼠 ($n=14$) 和 BCP+溶剂对照组大鼠 ($n=8$) 清醒状态下,通过置留的导管向鞘内注射 INCB3344

或等量的溶剂, 取 2 组大鼠各 8 只用于机械痛阈检测, 其余 BCP+INCB3344 组大鼠用于后续全细胞膜片钳实验。

1.2.5 CCR2 蛋白的检测 取术后 14 d 的假手术组 ($n=6$) 和 BCP 组 ($n=6$) 大鼠肿瘤细胞接种侧的脊髓后角组织, 加入 200 μL 含蛋白酶抑制剂的裂解液, 进行超声裂解。于 4 $^{\circ}\text{C}$ 10 000 $\times g$ 离心 30 min 收集上清液, 即为所需。经 BCA 蛋白定量后, 进行蛋白质印迹法 (Western blotting) 检测: 取 25 μg 蛋白样品行 8% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离, 并用湿转装置进行转膜。用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 2 h 后, 依次孵育 CCR2 一抗 (工作浓度为 1:1 000)、HRP 标记二抗 (工作浓度为 1:2 000), 最后用 ECL 化学发光成像试剂反应并显影。由于 CCR2 与 β -actin 的相对分子质量相近, 因此在 CCR2 显色后, 聚偏氟乙烯膜经膜再生液处理后继续孵育 β -actin 一抗和相应二抗 (工作浓度均为 1:2 000) 并显色。通过 Image J 软件对 CCR2、 β -actin 蛋白条带灰度值进行半定量, 以 β -actin 的灰度值作为内参, CCR2 相对值以 CCR2 灰度值/ β -actin 灰度值进行计算。

1.2.6 脊髓切片的制备 取 BCP 组 ($n=10$, 其中 4 只大鼠用于胞外给予 INCB3344 实验)、假手术组 ($n=6$) 和 BCP+INCB3344 组 ($n=6$, 均为鞘内给予 INCB3344 4 h 后, 此时 INCB3344 的作用最强) 大鼠, 用七氟烷将大鼠深度麻醉, 迅速剪下腰骶膨大段脊柱置于冰解剖液 (配方为 NaCl 117 mmol/L、KCl 3.6 mmol/L、 CaCl_2 2.5 mmol/L、 MgCl_2 1.2 mmol/L、 NaH_2PO_4 1.2 mmol/L、 NaHCO_3 25 mmol/L、D-葡萄糖 11 mmol/L) 中冷却。然后剪去椎板, 取出脊髓并撕去表面的膜, 在手术侧脊髓边缘做一小切口, 以便于全细胞膜片钳记录时区分手术侧和对侧脊髓。将腰骶膨大段脊髓放入琼脂糖胶槽内, 采用振动切片仪进行切片, 切片厚度约 600 μm 。收集脊髓切片, 33 $^{\circ}\text{C}$ ~ 35 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 1 h, 即可进行全细胞膜片钳记录。

1.2.7 脊髓切片全细胞膜片钳记录 将孵育完成的脊髓切片放入记录槽中, 灌流速度 2 ~ 3 mL/min。使用 PC-10 拉制仪 (美国 Sutter 公司) 拉制记录电极, 电极内灌入电极内液 [配方为葡萄糖酸钾 120 mmol/L、KCl 10 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、乙二醇醚二胺四乙酸 (EGTA) 11 mmol/L、4-(2-羟乙基) 哌嗪-1-乙磺酸 (HEPES) 10 mmol/L、Mg-ATP 2 mmol/L、Li-GTP 1 mmol/L, 用 2-氨基-2-(羟甲基)-1,3-丙二醇 (Tris-base) 调节 pH 值至 7.2 ~ 7.3], 玻璃电极入水阻抗为 6 ~ 8 M Ω 。选取手术同侧 SG 区神经元进行封接、破膜。电压钳模式下, 记录 SG 神经元的自发兴奋性突触后电流 (spontaneous excitatory postsynaptic

currents, sEPSCs)、 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸 (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid, AMPA) 电流和 N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartic acid, NMDA) 电流。其中, 记录 sEPSCs 和 AMPA 电流时, 钳制电压为 -70 mV; 而记录 NMDA 电流时, 钳制电压为 -50 mV。全细胞膜片钳记录过程中所用到的药物如 INCB3344 (10 $\mu\text{mmol/L}$)、AMPA (10 $\mu\text{mmol/L}$) 和 NMDA (50 $\mu\text{mmol/L}$) 均通过多通道微灌流系统 DAD-12 (美国 ALA 公司) 胞外给至神经元表面。采用 Clampfit 10.4 软件对采集的数据进行分析。

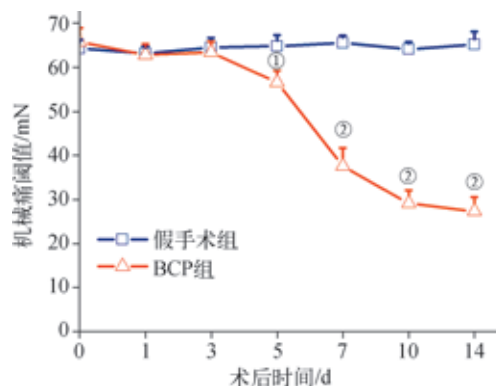
1.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件对研究数据进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用独立样本 t 检验对假手术组和 BCP 组大鼠的机械痛阈、CCR2 表达进行分析; 采用单因素方差分析对全细胞膜片钳实验中假手术组、BCP 组和 BCP+INCB3344 组的 sEPSCs 频率和幅度、AMPA 和 NMDA 电流幅度进行比较分析; 采用配对 t 检验对全细胞膜片钳实验中胞外给予 INCB3344 前后的 sEPSCs 频率和幅度进行比较。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 模型建立后 BCP 组和假手术组大鼠机械痛阈的比较

于不同时间点检测假手术组和 BCP 组大鼠的机械痛阈, 结果 (图 1) 显示: 术后假手术组大鼠后足的机械痛阈没有明显变化, 而在术后 5 d 时, BCP 组大鼠的机械痛阈已显著低于假手术组 ($P=0.043$); 术后 14 d 时, BCP 组大鼠的机械痛阈已处于相对稳定阶段, 且显著低于假手术组 ($P=0.000$)。该结果与本课题组前期研究^[8]相一致, 表明 BCP 模型建立成功。



注: * $P=0.043$, ** $P=0.000$, 与假手术组比较

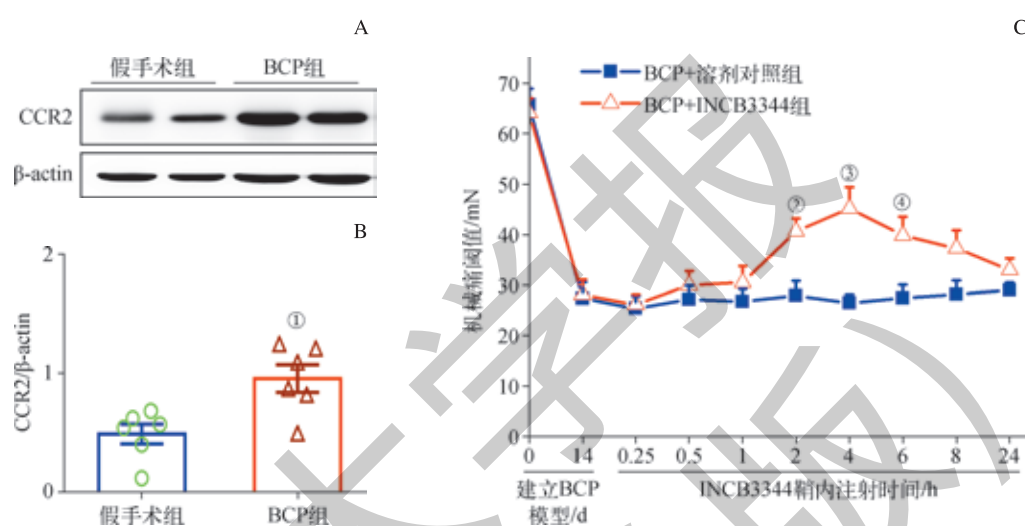
图 1 BCP 模型建立后 2 组大鼠的右后足机械痛阈变化

Fig 1 Changes of the mechanical pain thresholds in right hind paws of the two groups rats after establishment of BCP model

2.2 BCP 组大鼠与假手术组大鼠脊髓后角 CCR2 表达的差异及 INCB3344 对 BCP 大鼠机械痛阈的影响

采用 Western blotting 比较 BCP 组与假手术组大鼠脊髓后角 CCR2 表达水平的差异。结果 (图 2) 显示, 术后 14 d, BCP 组大鼠脊髓后角中 CCR2 的表达显著高于假手术组 (BCP 组为 0.96 ± 0.12 , 假手术组为 0.49 ± 0.08 ; $P=0.009$)。通过预先置留的导管鞘给予 CCR2 特异性阻断剂 INCB3344 (1 mmol/L, 25 μ L) 或等量的生理盐水

发现, 在鞘内注射 2 h 时 BCP+INCB3344 组大鼠的机械痛阈值已显著高于 BCP+溶剂对照组, 且在 4 h 时 2 组大鼠的机械痛阈值间差异最大 [BCP+INCB3344 组为 (45.22 ± 4.23) mN, BCP+溶剂对照组为 (26.42 ± 1.68) mN; $P=0.002$], 而在 24 h 时 BCP+INCB3344 组大鼠的机械痛阈值基本恢复至鞘内给药前水平。上述结果提示, 大鼠脊髓后角表达的 CCR2 可能参与了 BCP 的维持。



注: A、B. 术后 14 d, 2 组大鼠脊髓后角 CCR2 表达比较; C. 鞘内给予 INCB3344 或等量的生理盐水对 BCP 大鼠机械痛阈的影响。^① $P=0.009$, 与假手术组比较;
^② $P=0.006$, ^③ $P=0.002$, ^④ $P=0.017$, 与 BCP+溶剂对照组比较

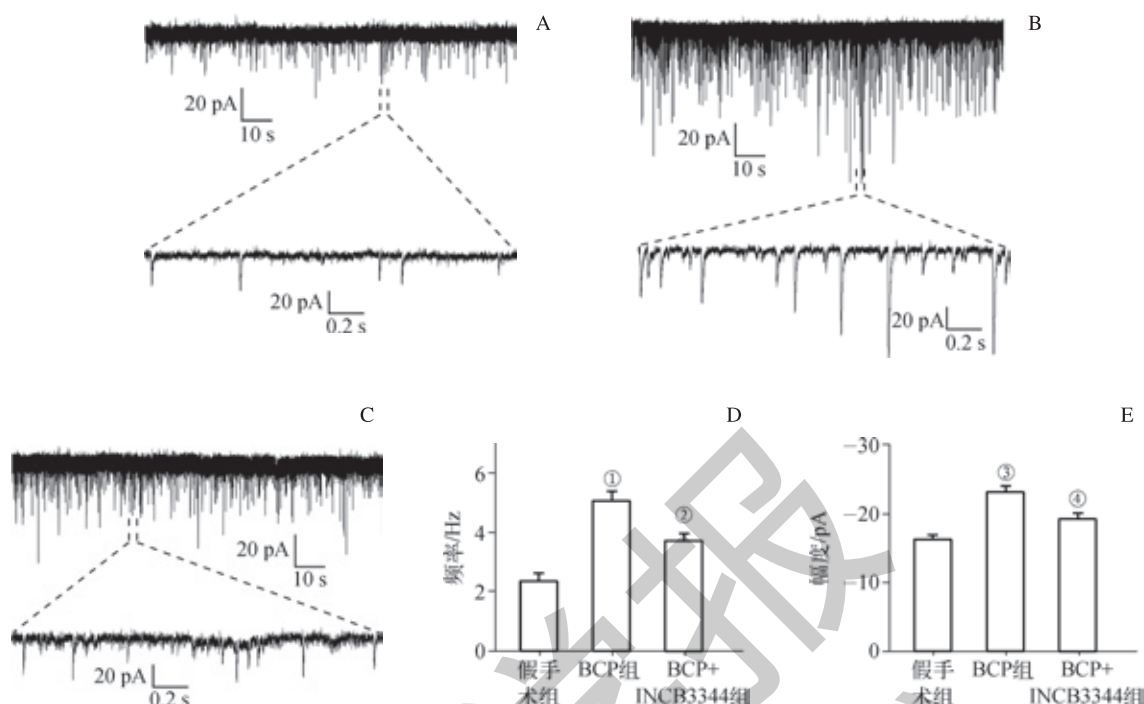
图 2 BCP 组大鼠与假手术组大鼠脊髓后角 CCR2 表达的差异及鞘内给予 INCB3344 对 BCP 大鼠机械痛阈的影响

Fig 2 Difference of CCR2 expression in the dorsal horns of spinal cords in the BCP group rats and the sham operation group rats, and the effects of intrathecal administration of INCB3344 on the mechanical pain threshold of BCP models

2.3 鞘内给予 INCB3344 对 BCP 大鼠脊髓 SG 神经元 sEPSCs 的影响

利用脊髓切片全细胞膜片钳技术观察 BCP 组、假手术组及 BCP+INCB3344 组大鼠脊髓后角 SG 神经元 sEPSCs 的频率和幅度间的差异。结果 (图 3) 显示, BCP 组大鼠脊髓切片中记录到的 48 个 SG 神经元 sEPSCs (即 $n=48$) 的频率 [(5.05 ± 0.32) Hz, $P=0.000$] 和幅

度 [(-23.10 ± 0.94) pA, $P=0.000$] 均显著高于假手术组 [$n=38$, 频率为 (2.37 ± 0.25) Hz, 幅度为 (-16.29 ± 0.62) pA]; 而 BCP+INCB3344 组大鼠中记录到的 SG 神经元 sEPSCs ($n=37$) 的频率 [(3.70 ± 0.30) Hz, $P=0.009$] 和幅度 [(-19.26 ± 0.85) pA, $P=0.010$] 均显著低于 BCP 组。上述结果提示, BCP 组大鼠脊髓 SG 神经元 sEPSCs 频率和幅度的升高可能是由 CCR2 介导。



注: A ~ C. 假手术组 (A)、BCP 组 (B)、BCP+INCB3344 组 (C) 大鼠脊髓 SG 神经元 sEPSCs 的典型全细胞膜片钳记录结果; D、E. 3 组大鼠 sEPSCs 频率 (D)、幅度 (E) 的统计结果。^① $P=0.000$, ^② $P=0.000$, 与假手术组比较; ^③ $P=0.009$, ^④ $P=0.010$, 与 BCP 组比较

图 3 鞘内给予 CCR2 特异性阻断剂 INCB3344 对 BCP 大鼠脊髓 SG 神经元 sEPSCs 的影响

Fig 3 Effects of intrathecal injection of CCR2 specific antagonist INCB3344 on sEPSCs of spinal SG neurons in BCP rats

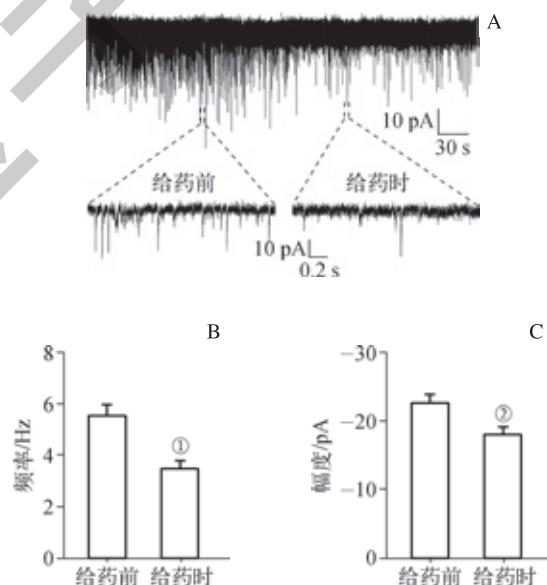
2.4 胞外给予 INCB3344 对 BCP 组大鼠脊髓 SG 神经元 sEPSCs 的影响

在离体脊髓切片上, 通过微灌流给药系统向 SG 神经元胞外给予 CCR2 特异性阻断剂 INCB3344 (10 $\mu\text{mol/L}$, 1 mL), 进一步观察 INCB3344 对 BCP 组大鼠 SG 神经元 sEPSCs 的影响。结果 (图 4) 显示, 在所记录到的 15 个 SG 神经元中, INCB3344 可明显抑制 sEPSCs 的频率 [给药前为 (5.54 ± 0.42) Hz, 给药时为 (3.52 ± 0.25) Hz, $P=0.001$] 和幅度 [给药前为 (-22.61 ± 1.32) pA, 给药时为 (-18.01 ± 1.05) pA, $P=0.020$]。上述结果提示, INCB3344 可抑制 BCP 组大鼠脊髓后角兴奋性突触传递的效能。

2.5 鞘内给予 INCB3344 对 BCP 大鼠脊髓 SG 神经元 AMPA 和 NMDA 电流的影响

对 BCP 组、假手术组和 BCP+INCB3344 组大鼠脊髓 SG 神经元 AMPA 和 NMDA 电流间差异进行分析。结果 (图 5) 显示, 在 BCP 组大鼠脊髓切片中所记录到的 SG 神经元 AMPA 电流的幅度 $[(-177.73 \pm 10.90)$ pA, $n=17$, $P=0.000$] 和 NMDA 电流的幅度 $[(-169.68 \pm 9.20)$ pA, $n=19$, $P=0.000$] 均显著高于假手术组 [AMPA 电流为 (-119.15 ± 10.34) pA, $n=20$; NMDA 电流为 (-115.28 ± 10.49) pA, $n=19$]; 而 BCP+INCB3344 组大鼠脊髓 SG 神经元 AMPA 电流幅度 $[(-138.93 \pm 9.27)$ pA,

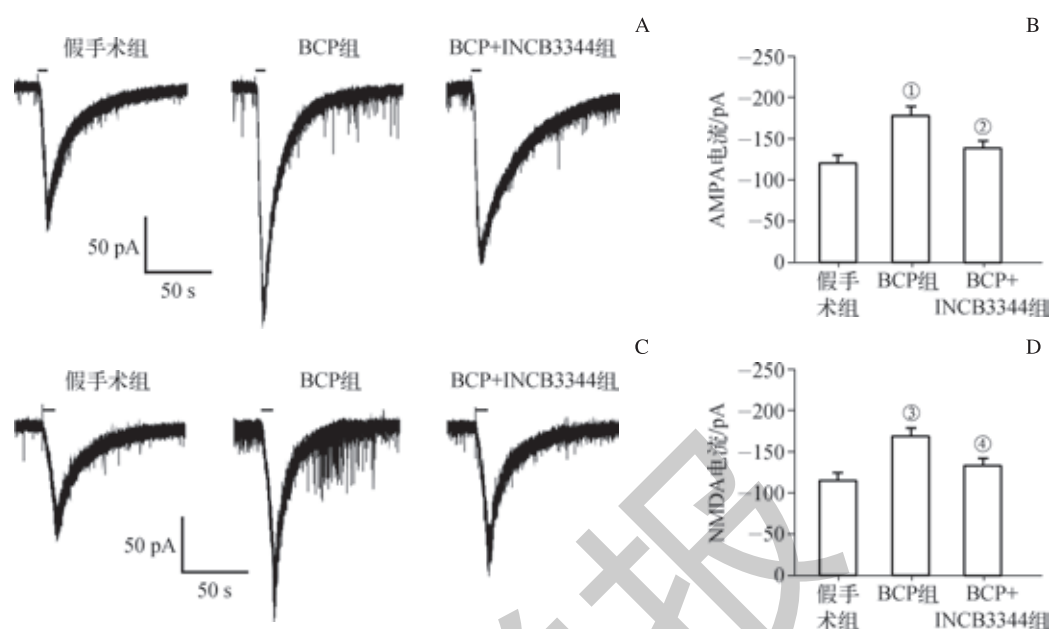
$n=14$, $P=0.041$] 和 NMDA 电流幅度 $[(-133.49 \pm 9.27)$ pA, $n=15$, $P=0.037$] 均显著低于 BCP 组大鼠。



注: A. 胞外给予 INCB3344 对大鼠脊髓 SG 神经元 sEPSCs 的影响的典型全细胞膜片钳记录结果; B、C. 统计分析给药前、给药时大鼠脊髓 SG 神经元 sEPSCs 的频率 (B) 和幅度 (C)。^① $P=0.001$, ^② $P=0.020$, 与给药前比较

图 4 胞外给予 CCR2 特异性阻断剂 INCB3344 对 BCP 组大鼠脊髓 SG 神经元 sEPSCs 的影响

Fig 4 Effects of extracellular perfusion of CCR2 specific antagonist INCB3344 on sEPSCs of spinal SG neurons in BCP group rats



注: A、C. 假手术组、BCP组和BCP+INCB3344组大鼠脊髓SG神经元AMPA(A)、NMDA(C)电流的典型全细胞膜片钳记录结果; B、D. 3组大鼠脊髓SG神经元AMPA(B)、NMDA(D)电流的统计结果。① $P=0.000$, ② $P=0.000$, 与假手术组比较; ③ $P=0.041$, ④ $P=0.037$, 与BCP组比较

图5 鞘内给予CCR2特异性阻断剂INCB3344对BCP大鼠脊髓SG神经元AMPA和NMDA电流的影响

Fig 5 Effects of intrathecal injection of CCR2 specific antagonist INCB3344 on AMPA and NMDA-induced currents of spinal SG neurons in BCP rats

3 讨论

外周及脊髓的CCL2/CCR2信号系统在BCP、神经病理性疼痛以及炎性痛的发生和维持过程中均发挥了重要作用^[4, 6, 10]。本研究发现, 胫骨接种Walker256乳腺癌细胞14 d后, BCP大鼠机械痛敏反应已处于较稳定阶段, 且其脊髓后角CCR2表达有显著增加, 提示脊髓后角表达的CCR2可能与BCP的维持密切相关; 随后, 经进一步研究发现, 鞘内注射CCR2特异性阻断剂INCB3344可显著提升BCP大鼠的机械痛阈, 提升幅度约为50%, 可维持的时间为4~6 h, 继而表明脊髓CCR2确实参与了BCP的维持过程。Yan等^[11]发现, 鞘内注射CCR2的另一阻断剂RS504393亦可显著缓解BCP大鼠机械痛敏行为, 而Kwiatkowski等^[12]则发现鞘内重复给予RS504393可部分逆转慢性坐骨神经缩窄损伤(chronic sciatic nerve constriction injury, CCI)大鼠的机械痛敏反应; 同时在他们的研究中, RS504393逆转BCP或神经病理性疼痛大鼠的机械痛阈的幅度也约为50%, 与本研究的结果相一致。

脊髓后角是处理痛觉信号传入的初级中枢, 也是整个神经系统调控痛觉信号传递的重要环节, 而其中SG层尤为重要^[13]。20世纪60年代, Melzack等^[14]提出“闸门控制学说”认为, 脊髓后角SG层中的某些神经元对痛觉信号向高级中枢的传递具有闸门式的调控作用, 且痛觉信号在脊髓后角神经元间突触传递效能的改变对于痛觉的长期

维持具有重要意义。

本研究利用全细胞膜片钳技术记录成年大鼠脊髓SG神经元sEPSCs的情况, 为研究BCP大鼠脊髓后角突触传递效能的改变提供了重要的手段。结果发现, 与假手术组相比, BCP大鼠脊髓SG神经元sEPSCs的频率和幅度均明显增加, 说明BCP大鼠脊髓后角突触前兴奋性神经递质的释放有所增加, 且突触后膜上表达的兴奋性神经递质受体的功能也有所增强。研究^[15]显示, 脊髓SG神经元sEPSCs主要是由兴奋性神经递质谷氨酸的2种促离子型受体(AMPA和NMDA受体)介导产生。同时, 本研究还发现BCP大鼠脊髓SG神经元的AMPA和NMDA电流幅度均显著高于假手术组, 继而进一步证实与假手术组相比, BCP大鼠脊髓后角兴奋性神经递质受体功能的增强。

有研究^[16]表明, 胞外给予正常小鼠脊髓切片CCL2可增强小鼠脊髓SG神经元的sEPSCs、AMPA和NMDA电流, 进而提示CCL2/CCR2信号系统可能介导脊髓处兴奋性突触传递的增强, 但目前尚缺乏关于疼痛状态下CCL2/CCR2信号系统影响脊髓突触传递效能的研究报道。本研究发现, 鞘内给予CCR2特异性阻断剂INCB3344可显著降低BCP大鼠脊髓SG神经元sEPSCs的频率、幅度以及AMPA电流和NMDA电流幅度, 表明BCP大鼠脊髓SG神经元sEPSCs的增强是由脊髓CCR2介导。此外, 本研究在离体脊髓切片中进一步验证INCB3344对脊髓SG神

经元 sEPSCs 的抑制作用, 结果提示脊髓 CCR2 介导兴奋性突触传递效能的增强是维持 BCP 的重要机制。

综上所述, BCP 组大鼠脊髓后角 CCR2 的表达较假手术组显著增加, 鞘内给予 CCR2 特异性阻断剂发现, 阻断脊髓 CCR2 的表达可明显缓解 BCP 大鼠机械痛敏行为; 同时, 本研究发现 BCP 大鼠脊髓 SG 神经元 sEPSCs、

AMPA 和 NMDA 电流的增强是由 CCR2 介导, 进一步提示脊髓 CCR2 可能是通过增强 AMPA 和 NMDA 受体的功能来介导 BCP 大鼠脊髓后角兴奋性突触传递效能的增强, 从而在 BCP 的维持中发挥重要作用。后续, 我们将继续探讨 CCL2/CCR2 信号系统在脊髓以上痛觉调控相关高级中枢对 BCP 形成和维持的影响。

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] Ghosh S, Rao PB. Osseous metastases in gynaecological epithelial malignancies: a retrospective institutional study and review of literature[J]. *J Clin Diagn Res*, 2015, 9(12): XC10-XC13.
- [3] 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.
- [4] Zhang ZJ, Jiang BC, Gao YJ. Chemokines in neuron-glia cell interaction and pathogenesis of neuropathic pain[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(18): 3275-3291.
- [5] Zhu X, Cao S, Zhu MD, et al. Contribution of chemokine CCL2/CCR2 signaling in the dorsal root ganglion and spinal cord to the maintenance of neuropathic pain in a rat model of lumbar disc herniation[J]. *J Pain*, 2014, 15(5): 516-526.
- [6] 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.
- [7] von Hehn CA, Baron R, Woolf CJ. Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms[J]. *Neuron*, 2012, 73(4): 638-652.
- [8] 王丽娅, 高坡, 周晔. 趋化因子 CCL2 对骨癌痛大鼠痛行为的影响及其外周机制 [J]. *上海交通大学学报 (医学版)*, 2019, 39(5): 463-468.
- [9] Xiang Z, Xiong Y, Yan N, et al. Functional up-regulation of P2X₂ receptors in the chronically compressed dorsal root ganglion[J]. *Pain*, 2008, 140(1): 23-34.
- [10] Takeda M, Nasu M, Kanazawa T, et al. Chemokine ligand 2/chemokine receptor 2 signaling in the trigeminal ganglia contributes to inflammatory hyperalgesia in rats[J]. *Neurosci Res*, 2018, 128: 25-32.
- [11] Yan Y, Liang Y, Ding T, et al. PI3K/Akt signaling pathway may be involved in MCP-1-induced P2X₄R expression in cultured microglia and cancer-induced bone pain rats[J]. *Neurosci Lett*, 2019, 701: 100-105.
- [12] Kwiatkowski K, Piotrowska A, Rojewska E, et al. The RS504393 influences the level of nociceptive factors and enhances opioid analgesic potency in neuropathic rats[J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2017, 12(3): 402-419.
- [13] Ikeda H, Heinke B, Ruscheweyh R, et al. Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neurons that mediate hyperalgesia[J]. *Science*, 2003, 299(5610): 1237-1240.
- [14] Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms: a new theory[J]. *Science*, 1965, 150(3699): 971-979.
- [15] Chen G, Zhang YQ, Qadri YJ, et al. Microglia in pain: detrimental and protective roles in pathogenesis and resolution of pain[J]. *Neuron*, 2018, 100(6): 1292-1311.
- [16] Gao YJ, Zhang L, Samad OA, et al. JNK-induced MCP-1 production in spinal cord astrocytes contributes to central sensitization and neuropathic pain[J]. *J Neurosci*, 2009, 29(13): 4096-4108.

[收稿日期] 2019-04-08

[本文编辑] 邢宇洋