

长春新碱致神经病理性疼痛模型中胶质细胞及 IL-1、GDNF 表达的变化

李大鹏*, 于世英

Activation of Glial Cells and Expression Change of IL-1, GDNF in Vincristine-induced Neuropathic Pain

LI Da-peng*, YU Shi-ying

Department of Oncology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology Wuhan 430030, China(* Present: The First Affiliated Hospital of Soochow University)

Corresponding Author: YU Shi-ying

Abstract :Objective Glial cells play essential roles in creation and maintenance of pain state. This study was designed to explore the activation of glial cells in vincristine-induced neuropathic pain, and to find how glial cells influence pain threshold. **Methods** We adapted a model by using repeated intraperitoneal injection of vincristine. By immunohistochemical technique, the expression of specific activation markers of astrocytes and microglia, glial fibrillary acidic protein (GFAP) and OX-42 respectively, were examined in brain and lumbar intumescencia. Using RT-PCR analysis techniques, the expression of interleukine-1 (IL-1) and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in lumbar intumescencia were tested. **Results** Mechanical hyperalgesia appeared on the 8th day and thermal hyperalgesia appeared on the 5th day of vincristine treatment. Glial cells were obviously active in periaqueductal gray and spinal gray. IL-1 expression was increased in chemotherapy group, while GDNF was higher in control group. **Conclusion** Glial cells were active in Vincristine-induced neuropathic pain. The change of expression of IL-1 and GDNF were involved in neuropathic pain evoked by vincristine.

Key words: Vincristine; Pain; Glial cells; GDNF

摘要:目的 研究长春新碱致神经病理性疼痛中胶质细胞是否活化及其作用机制。方法 大鼠腹腔内重复注射长春新碱建立模型。免疫组化检测脑及脊髓中星形胶质细胞和小胶质细胞特异性活化标志物 GFAP 和 OX-42 的表达。RT-PCR 测定 IL-1 和 GDNF mRNA 在脊髓腰段的表达。结果 给药大鼠分别在第 8 天和第 5 天出现机械痛阈降低和热痛耐受时间降低。给药大鼠中脑导水管周围灰质及脊髓灰质中见明显胶质细胞的活化。给药组较对照组 IL-1 表达增加, GDNF 表达减少。结论 胶质细胞在长春新碱致神经病理性疼痛中明显活化。IL-1 及 GDNF 与长春新碱引起的神经病理性疼痛有关。

关键词: 长春新碱; 疼痛; 胶质细胞; 胶质细胞源性神经营养因子

中图分类号: R73 - 36 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2007)01-0093-03

0 引言

长春新碱是常用抗肿瘤药物,也是引起神经病理性疼痛的常见药物之一。近年发现胶质细胞在神经病理性疼痛中起重要作用^[1]。长春新碱引起的神经病理性疼痛中是否有胶质细胞的参与尚不清楚。本研究建立长春新碱致神经病理性疼痛大鼠模型,

检测其脑和脊髓腰段胶质细胞的活化,并检测脊髓腰段 IL-1、胶质细胞源性神经营养因子(Glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)的表达变化。探讨长春新碱致神经病理性疼痛的机制,为寻求新的治疗策略提供依据。

1 材料和方法

1.1 分组及建立动物模型

雄性 Sprague-Dwley (SD) 大鼠 20 只,体重 160g 左右,湖北中医学院实验动物中心,医动字第 19 - 052 号。UGO Basile 公司 37400 型 Dynamic Planter 机械测痛仪,37300 型热平板试验仪。

收稿日期:2006-01-16;修回日期:2006-07-03

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤中心(*现工作单位:215006 苏州大学附属第一医院肿瘤科)

通讯作者:于世英

作者简介:李大鹏(1980-),男,硕士,住院医师,主要从事肿瘤综合治疗及姑息医学研究

大鼠以随机数字法分为 2 组,测基础体重、机械痛阈和热痛耐受时间。以第 1 次注射长春新碱为第 1 天,给药组第 1~5 天和第 8~12 天腹腔注射 0.1 mg·(kg·d)⁻¹ 长春新碱注射液(以生理盐水稀释至 1ml),对照组注射 1ml 生理盐水。分别于第 3、5、8、10、12 天测大鼠体重、机械痛阈及热痛耐受时间,同时观察大鼠运动、饮食及脱毛等情况。测机械痛阈及热痛耐受时间时,先将大鼠置测试仪上 10~15min 待其安静,两次测定间隔 5min,左右足各重复 3 次,取平均值。

1.2 免疫组织化学检测胶质细胞活化

胶质纤维酸性蛋白(Glial fibrillary acidic protein, GFAP)多克隆抗体购自 Neuromarker 公司,1:100 稀释。小胶质细胞标志物 OX-42(CR3, CD11b)单克隆抗体购自 Serotec 公司,1:50 稀释。

第 12 天取大鼠脑部及脊髓腰膨大处(留 0.5cm 提取 RNA)。常规方法制成厚 30μm 冰冻切片,常规免疫组化 SP 法检测 GFAP 和 OX-42 的表达。光镜下检测棕黄色 DAB 染色阳性细胞。

结果判断:按 Colburn 等^[2]所述活化分级方法评分。评分(·):胶质细胞无活化,胶质细胞分支好。评分(+):胶质细胞仍分支但活化标志物表达增加,细胞密度增加。评分(++):胶质细胞分支减少,活化标志物表达明显增加,细胞有时重叠。评分(+++):胶质细胞分支粗短,活化标志物明显增加,细胞重叠明显。+~+++ 均为阳性。

1.3 RT-PCR 检测脊髓腰段中 GDNF mRNA 水平表达

Trizol 试剂盒购自华舜生物公司,逆转录试剂盒购自 Fermentas 公司,PCR 试剂盒购自 Promega 公司。

处死大鼠后迅速取腰膨大处约 0.5cm 脊髓加入匀浆器,参考 RNA 抽提说明书提取总 RNA。取 2μg 总 RNA,参考 RT 试剂盒说明合成 cDNA。

内参照 β -actin 上游引物:5'-aagatttggcaccacactttctac-3',下游引物:5'-acacttcatgatggaattgaatgt-3'; IL-1 上游引物:5'-TGA TGTCCCA TTA GACA GC-3',下游引物:5'-GA GGTGCTGATG TACCA GTT-3'; GDNF 上游引物:5'-CA G CATA TGTCACCA GA TAAACAA GCGGC GGCA CT-3',下游引物:5'-CA GGGATCCGGGT-CAGA TACA TCCACACCGTTTA GC-3',均由博亚生物公司合成。以 1μl cDNA 为模板,常规 PCR 50μl 体系反应。产物在溴乙锭处理的琼脂糖凝胶中电泳,将目的条带与内参照 β -actin 条带的吸光度比值作为其相对表达量,重复 3 次。

1.4 统计学方法

用 SPSS11.0 软件进行组间 t 检验。

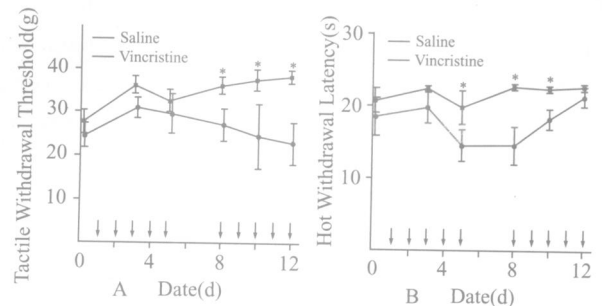
2 结果

2.1 长春新碱对大鼠一般情况的影响

大鼠未出现扭体,运动失常,脱毛等。给药组中有 3 只大鼠出现腹泻并有 4 只大鼠死亡,对照组大鼠未见异常。给药组和对照组大鼠基础平均体重分别为(156.3 ±4.6)g 和(160.6 ±5.4)g,无显著性差异(P=0.553)。给药组体重增长缓慢,至第 10 天,给药组与对照组体重差异具有显著性(P=0.038)。

2.2 机械痛阈和热痛耐受时间改变

给药组与对照组后肢基础平均机械痛阈及后肢基础平均热痛耐受时间均无显著性差异。给药组与对照组至第 8 天机械痛阈差异开始具有显著性,至第 12 天两组之间差异最大,分别为(25.1 ±4.6)g 和(38.3 ±2.0)g, P=0.001,给药组较对照组痛阈降低 35%,见图 1A。两组热痛耐受时间在第 5 天差异具有显著性,第 8 天差异达最大(P=0.001),第 12 天时两组差异消失,见图 1B。



A:机械痛阈变化;B:热痛耐受时间变化; *: P<0.01; :注射药物或生理盐水

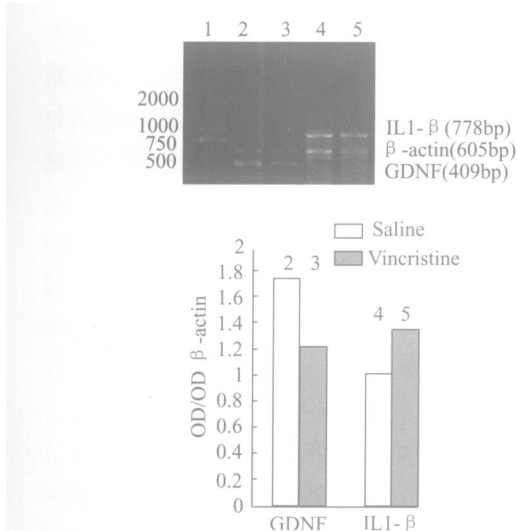
图 1 长春新碱对机械痛阈及热痛耐受时间的影响

2.3 胶质细胞的活化

给药组大鼠中脑导水管周围灰质及脊髓背角可见分别以 GFAP 和 OX-42 标记的活化星形胶质细胞和小胶质细胞,胶质细胞分支减少,活化标志物表达明显增加,细胞有时重叠,活化评分均达(++),对照组活化评分均为(·)。在脊髓中活化胶质细胞分布于整个脊髓灰质,主要分布在背角第 1~2 层,见图 2。

2.4 IL-1 与 GDNF 在脊髓腰段的表达变化

给药组与对照组 IL-1 与 β -actin 条带吸光度比值分别为 1.35 和 1.01,给药组 IL-1 表达增高。GDNF 条带与内参照 β -actin 条带的吸光度比值分别为 1.76 和 1.20,给药组表达降低。重复 3 次结果相同,见图 3。



1: Marker (2kb); 2,4:对照组; 3,5:给药组
图3 IL-1 和 GDNF 在脊髓腰段的表达

3 讨论

本模型符合神经病理性疼痛的基本特征。在神经病理情况下,痛觉产生与刺激时间和强度相关性消失,甚至在没有刺激的情况下也产生痛觉(如幻肢痛),这类疼痛称为神经病理性疼痛。临床常见引起神经损伤的药物主要有长春碱类、铂类及紫杉醇类药物,均可引起神经病理性疼痛。长春新碱半衰期 2.37h,然而临床可见患者停药后数月甚至数年仍有疼痛。本模型参照 Weng 等^[3]所述方法建立长春新碱致神经病理性疼痛模型。给药组痛阈值较对照组显著减少,较小刺激强度产生了痛觉,见图 1,即痛觉与刺激强度的相关性降低,符合神经病理性疼痛的基本特征。

胶质细胞参与了长春新碱致神经病理性疼痛,提示这类疼痛存在中枢敏化机制。长春新碱可导致指趾末端的麻木感、刺痛感,但很少表现为中枢神经受损的症状。目前,关于长春新碱致神经病理性疼痛的机制尚存在争议。长春新碱可使神经系统发生脱髓鞘改变;且其抗肿瘤机制是对肿瘤细胞微丝微管的干扰,故学者推测其机制是干扰神经的轴浆运输。但神经元大多数情况下处于非有丝分裂状态,微丝微管并不活跃;某些药物作用于微管,但并不产生相似的神经毒性症状。因此,轴浆运输的破坏不能完全解释其机制。近来发现原来被视作支持细胞的神经胶质细胞在神经病理性疼痛中起重要作用。Garrison 等^[4]率先观察到星形胶质细胞在神经病理性疼痛大鼠模型的脊髓背角活化,并且随疼痛增加活化增加。胶质细胞仅分布在中枢,故胶质细胞活化被认为是神经病理性疼痛中枢兴奋性增高的机制

之一。本实验中胶质细胞活化,提示长春新碱引起的神经损伤临床表现在外周,也存在胶质细胞中枢调节作用。从胶质细胞活化部位看,这种调节不仅发生在脊髓水平,也在脑水平。

胶质细胞活化后使前致炎因子释放,包括 IL-1、IL-6、TNF- 等,后者又激活胶质细胞和神经元,产生疼痛。这是较为认可的胶质细胞作用机制。本实验中给药组 IL-1 表达增加,也说明了这一点。

GDNF 与长春新碱引起的神经病理性疼痛有关。胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)是 1993 年 Lin 等从大鼠胶质细胞系中纯化的神经营养因子,它可以修复神经损伤并和疼痛有关。Boucher 等^[5]发现 GDNF 可保护坐骨神经部分结扎(PSL)及脊神经结扎(SNL)两种神经病理性疼痛模型中的神经损伤,减轻疼痛;而给予 NGF 及 NT3 则未起到效果。有作者假设,神经病理性疼痛中 GDNF 较 NGF 与疼痛的关系更密切^[6]。本研究中,药物组脊髓背角 GDNF 表达降低,提示 GDNF 与化疗引起的神经病理性疼痛有关,GDNF 可能是化疗引起的神经损伤中起神经修复作用的重要神经因子。但本模型中,GDNF 的分泌来源和部位需要进一步实验定位。

综上所述,长春新碱引起的神经病理性疼痛中,胶质细胞活化,这提示中枢敏化是这种疼痛的产生机制之一。其作用可能与胶质细胞释放炎症因子 IL-1 增加及脊髓背角 GDNF 减少有关。

(本文图 2 见插页)

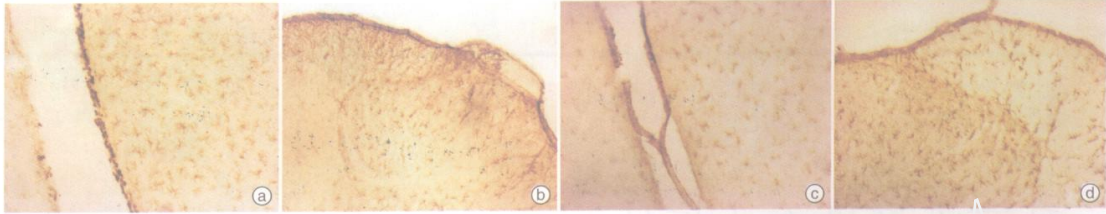
参考文献:

- [1] Wieseler-Frank J, Maier SF, Watkins LR. Glial activation and pathological pain[J]. *Neurochem Int*, 2004, 45(2-3):389-395.
- [2] Colburn RW, DeLeo JA, Rickman AJ, et al. Dissociation of microglial activation and neuropathic pain behaviors following peripheral nerve injury in the rat [J]. *J Neuroimmunol*, 1997, 79(2):163-175.
- [3] Weng HR, Cordella JV, Dougherty PM. Changes in sensory processing in the spinal dorsal horn, accompany vincristine-induced hyperalgesia and allodynia [J]. *Pain*, 2003, 103(1-2):131-138.
- [4] Garrison CJ, Dougherty PM, Carlton SM. GFAP expression in lumbar spinal cord of naive and neuropathic rats treated with MK-801 [J]. *Exp Neurol*, 1994, 129(2):237-243.
- [5] Boucher TJ, Okuse K, Bennett DL. Potent analgesic effects of GDNF in neuropathic pain states [J]. *Science*, 2000, 290(5489):124-127.
- [6] Snider WD, Mc Mahon SB. Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors[J]. *Neuron*, 1998, 20(4):629-632.

[编辑:安 凤]

长春新碱致神经病理性疼痛模型中胶质细胞及IL-1 β 、GDNF表达的变化

(正文见 93 页)



a. GFAP 在中央导水管周围灰质中的表达 b. GFAP 在脊髓背角中的表达
c. OX-42 在中央导水管周围灰质中的表达 d. OX-42 在脊髓背角中的表达

图2 给药组胶质细胞在中央导水管周围灰质及脊髓背角中的活化 (DAB \times 100)

应用自制组织芯片研究抑癌基因 PTEN 在口腔鳞癌中的表达

(正文见 100 页)

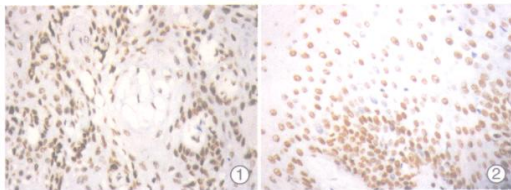


图1 PTEN 在口腔鳞癌中的表达 (SP \times 200)

图2 PTEN 在正常口腔粘膜中的表达 (SP \times 200)

脆性组氨酸三联体基因及 p53 基因在肺癌组织中的表达及意义

(正文见 109 页)

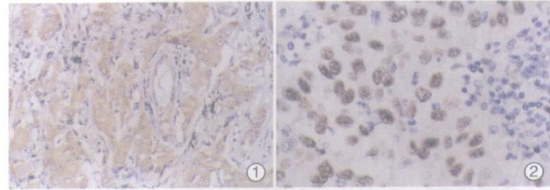


图1 FHIT 在肺癌组织中的表达 (SP \times 400)

图2 p53 在肺癌组织中的表达 (SP \times 400)

CD105、COX-2 和 VEGF 在结直肠癌中的表达及其与血管新生的关系

(正文见 125 页)

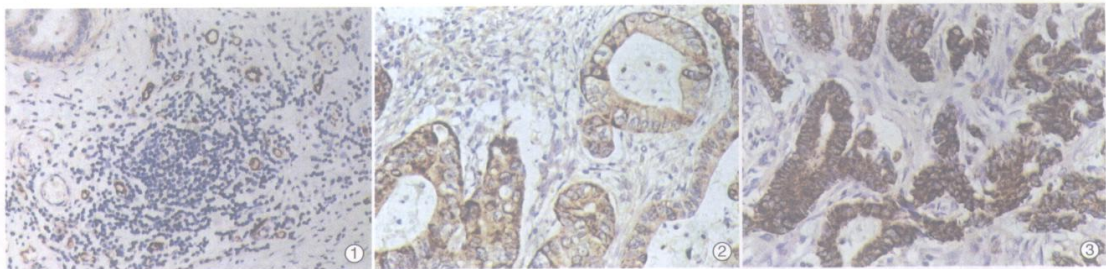


图1 CD105 在结直肠癌微血管中的表达 (SP \times 100)

图2 COX-2 在结直肠癌中的表达 (SP \times 200)

图3 VEGF 在结直肠癌中的表达 (SP \times 200)