



doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2013.11.000

电压门控型钠离子通道 Nav1.8 在骨癌大鼠 DRG 神经元细胞膜上的表达上调*

杨静静 刘小旦 方东 刘敏 蔡捷 万有 韩济生 邢国刚[△]

(北京大学神经科学研究所 基础医学院神经生物学系 教育部和卫生部神经科学重点实验室, 北京 100191)

摘要 目的: 研究骨癌大鼠背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 神经元细胞膜上钠通道 Nav1.8 的表达及其在骨癌痛中的作用。**方法:** 首先将大鼠随机分为 PBS 对照组和骨癌痛组, 用 Western blotting 的方法检测 Nav1.8 在各组大鼠 DRG 神经元细胞膜上的蛋白表达。骨癌痛大鼠随机分为四组, 鞘内给予 Nav1.8 的阻断剂 A-803467 (50 nmol, 100 nmol 和 150 nmol) 或其溶剂对照来检测其对骨癌大鼠机械痛敏和热痛敏的影响。**结果:** (1) Nav1.8 的条带密度与内参的比值由 PBS 组的 0.79 ± 0.06 上升到骨癌痛组的 1.34 ± 0.12 ($P < 0.01$)。 (2) 与溶剂组比, 鞘内给予 A-803467 能够缓解骨癌大鼠的机械痛敏和热痛敏。 (3) 斜板实验显示给予 150 nmol A-803467 后, 骨癌痛大鼠的运动行为未受损。**结论:** Nav1.8 在骨癌大鼠 DRG 神经元细胞膜上的表达显著升高, 这种升高可能是引起骨癌大鼠外周敏化和骨癌痛的基础。

关键词 骨癌痛; 背根神经节; Nav1.8; 机械痛敏; 热痛敏

UPREGULATION OF VOLTAGE-GATED SODIUM CHANNEL NAV1.8 IN THE DRG NEURONS IN BONE CANCER RATS

YANG Jing-Jing, LIU Xiao-Dan, FANG Dong, LIU Min, CAI Jie, WAN You, HAN Ji-Sheng, XING Guo-Gang[△]

(Neuroscience Research Institute, Department of Neurobiology, School of Basic Medical Sciences, Peking University; Key Laboratory of Neuroscience, The Ministry of Education and Ministry of Public Health, Beijing 100191)

Abstract Objective: To investigate the membrane expression of voltage-gated sodium channel Nav1.8 in the dorsal root ganglion (DRG) neurons in bone cancer rats, and to explore the role of Nav1.8 in the development of bone cancer pain. **Methods:** Rats were randomly divided into two groups: PBS group and MRMT-1 group, and the membrane expression of Nav1.8 was detected by Western blotting. The rats with bone cancer pain were divided into four groups: A-803467 (a specific blocker of Nav1.8, 50 nmol, 100 nmol and 150 nmol) groups, or vehicle group. A-803467 or vehicle were injected intrathecally in each group to determine whether blockade of Nav1.8 by A-803467 could alleviate the mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in rats with bone cancer pain. **Results:** (1) The band density ratio of Nav1.8 to vehicle increased from 0.79 ± 0.06 in PBS group to 1.34 ± 0.12 in bone cancer pain group ($P < 0.01$). (2) Compared to vehicle, A-803467 significantly alleviated the mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in rats with bone cancer pain. (3) The inclined-plate test showed that intrathecal administration of 150 nmol A-803467 had no significant influence on the motor function in rats with bone cancer pain. **Conclusion:** The membrane expression of Nav1.8 in DRG neurons increased significantly in bone cancer rats. The upregulation of Nav1.8 in DRG neurons likely contributed to the development of peripheral sensitization and the cancer-induced bone pain.

Key words: Bone cancer pain; DRG; Nav1.8; Allodynia; Hyperalgesia

* 国家自然科学基金项目 (31171663, 81072951, 61027001), 北京市自然科学基金项目 (7112079), 中国科技部 973 项目 (2013CB531905)

[△] 通讯作者 ggxing@bjmu.edu.cn

骨是乳腺癌、前列腺癌和肺癌等晚期癌症癌细胞转移的好发部位。癌细胞转移到骨后继而导致明显的骨骼重塑、骨折、贫血和疼痛等。骨癌痛的发生严重影响着癌症患者的生活质量，然而临床上使用的镇痛药效果不尽理想并有显著的不良反应。因此，探寻骨癌痛产生的机制以及寻找新的药物靶点势在必行。目前，关于骨癌痛机制的研究主要集中在背根神经节（dorsal root ganglion, DRG）以及脊髓背角上。有报道^[1-3]指出，DRG中的辣椒素受体 TRPV1^[1]、P2X3 受体^[2]、KCNQ/M 钾离子通道^[3]等参与了骨癌痛的发生。我们实验室之前的研究^[4]发现，骨癌大鼠 DRG 伤害性特异神经元爆发动作电位的阈值明显降低，神经元放电频率明显升高。这种初级感觉神经元的兴奋性升高正是骨癌痛产生的基础。在动作电位的产生过程中，钠离子通道发挥了至关重要的作用。

目前有 10 种钠通道已经被发现，即 Nav1.1 ~ Nav1.9 和 Navx。这其中 Nav1.7、Nav1.8 和 Nav1.9 主要表达在外周神经系统中，而且 Nav1.8 特异性表达在 DRG 小神经元上。Nav1.8 通道介导一种河豚毒素（tetrodotoxin, TTX）不敏感的电位，这种电流失活较慢。Nav1.8 较 TTX 敏感的钠通道激活阈值高，主要介导动作电位的上升支，即动作电位产生过程中钠离子的内流^[5]。Nav1.8 在慢性痛的形成中有非常重要的作用。在角叉菜胶诱发的炎症痛模型中，Nav1.8 的 mRNA 及其对应的 TTX-R 电流都有明显的升高^[6]。Nav1.8 的 siRNA 也可以明显扭转 CFA 导致的大鼠的机械痛敏^[7]。在 CCI 神经病理痛模型中，将 Nav1.8 通道抑制后能明显的缓解机械痛^[8]。本研究旨在研究骨癌大鼠 DRG 神经元细胞膜上钠通道 Nav1.8 的表达及其在骨癌痛中的作用。由于 Nav1.8 发挥功能需要转运到细胞膜上才能进行，因此我们应用 Western blotting 的方法检测骨癌大鼠 DRG 神经元细胞膜上钠通道 Nav1.8 的表达，应用药理学的方法检测鞘内给与给予 Nav1.8 特异性阻断剂 A-803467^[9]对骨癌痛大鼠机械痛敏行为的缓解作用。

方 法

1. 实验动物

健康成年雌性 Sprague-Dawley 大鼠，体重约 150 ~ 180g，由北京大学医学部实验动物中心提供，实验动物许可证号：SCXK(京)2011-0012。

2. 骨癌痛大鼠模型的建立

参照 Medhurst 等^[10]的方法，向胫骨骨髓腔内注射 MRMT-1 大鼠乳腺癌细胞（ 4×10^4 ， $4 \mu\text{l}$ ），建立骨癌痛大鼠模型。术后 14 d 用 von Frey 纤维丝测定大鼠同侧后爪的 50% 缩足阈值（paw withdraw threshold, PWT）以检测造模是否成功。对照组注射等体积的磷酸盐缓冲液（phosphate-buffered saline, PBS）。

3. 机械痛行为测定

术后 14 d，按照 Chaplan 等^[11]报道的“up and down”方法，测定大鼠后足的 50% PTW，以 50% PTW 小于 5 g 作为出现机械痛敏的标准，并以此来评价骨癌痛大鼠模型的建立是否成功。

4. 辐射热痛行为测定

大鼠后足的热痛行为根据我们之前的方法^[12]来测定。待大鼠在 30℃ 恒温的玻璃板上适应至少 30 min 以后，将辐射热光源对准大鼠后足底。大鼠抬脚的潜伏期（paw withdraw latency, PWL）通过仪器上的计时器获取。当 PWL 大于 30 s 时，热源自动停止以减少对大鼠足底的伤害。每次测量间隔时间至少 5 min。

5. 膜蛋白提取以及 Western blotting

将大鼠随机分为 PBS 和骨癌痛组，分别检测造模后 0 d ($n = 6$)、7 d ($n = 6$) 和 21 d ($n = 6$) 大鼠 DRG 神经元细胞膜上 Nav1.8 的表达变化。具体步骤如下：将大鼠断头处死后，快速急性取 L₄ 和 L₅ DRG。按照 Black 等^[13]的方法进行超高速离心得到膜蛋白成分，之后用含有 1% Triton X-100 的 RIPA 裂解液（Applygen 公司，China）冰上裂解 1 h。匀浆液 12000 g 离心 15 min 后取上清，用 BCA 蛋白试剂盒（Pierce 公司，USA）定量。各组蛋白均取 10 μg 经变性后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，然后转膜到 PVDF 膜（Milipore 公司，USA）上。经过 5% 牛奶室温封闭 1 h 后孵育一抗，兔抗大鼠 Nav1.8（1:1000, Alomone, Israel）和转铁蛋白受体（transferrin receptor, TfR）（1:2000, Invitrogen 公司，USA），4℃ 孵育过夜。经过 TBST 缓冲液洗涤 3 次后孵育二抗（1:2000，山羊抗兔或山羊抗小鼠，Jackson 公司，USA）。蛋白条带通过 ECL 试剂盒（Pierce 公司，USA）检测。

6. 蛛网膜下腔插管及给药方法

大鼠经 10% 水合氯醛（300 mg/kg, i.p.）麻醉，背部剃毛消毒。触及 T₁₂、T₁₃ 脊椎棘突交界（腰髓 L₄₋₅ 水平）和髂棘（腰椎骨 L₄ 水平），分别划横线做标记，测量两线间距离，即为进管长度（对 250 g 大鼠而言，约 3.5 ~ 4.0 cm）。在髂棘水平正中线

纵向划开皮肤,用一长约 5 cm 的不锈钢管作为外套管(外径 0.9 mm,前端打磨成斜面,可容 PE-10 管通过),在 L₄ 和 L₅ 脊椎骨间隙垂直刺入椎管(此时动物的尾巴或后肢会出现轻微抽动),改变不锈钢管方向指向头端,将 PE-10 管(提前用 75% 乙醇消毒,无菌生理盐水冲洗)通过外套管送入蛛网膜下腔至腰髓 L₄₋₅ 水平,拔除钢管,褥式缝合,局部固定 PE-10 管。颈后皮肤剃毛剪小口,使 PE-10 管经皮下由此穿出,褥式缝合固定,外露约 2 cm 左右,用火机将 PE10 管头端烧熔,以防缩回背部皮下,缝合皮肤。术后腹腔注射青霉素 1 万单位以预防感染。大鼠恢复 5 d 后,20 μl 的 vehicle (5% DMSO) 或者 A-803467 (TOCRIS, UK) 用微量注射器通过 PE-10 管注射到鞘内。

7. Nav1.8 阻断剂 A-803467 对痛行为影响的测定

在机械痛敏行为测定中将骨癌痛大鼠随机分为 4 组: vehicle 组 ($n = 6 \sim 7$)、A-803467 50 nmol ($n = 7$)、100 nmol ($n = 5 \sim 7$) 和 150 nmol ($n = 6 \sim 8$) 组。在热痛敏行为测定中也将骨癌痛大鼠随机分为 4 组: vehicle 组 ($n = 8 \sim 9$)、A-803467 50 nmol ($n = 7$)、100 nmol 组 ($n = 5 \sim 7$) 和 150 nmol ($n = 6 \sim 7$) 组。分别测定各组 0、15、30、60、90 和 120 min 时大鼠的机械痛敏和热痛敏行为。

8. 斜板实验

给予骨癌痛大鼠 ($n = 7$) A-803467 150 nmol 后放在有一定倾斜度的斜板上,并以 5 度为单位增加或者降低斜板的倾斜角度。通过 Rivlin 等^[14]报

道的方法记录大鼠能稳定在斜板上 5 s 而不掉下的最大的斜板的倾斜角度。分别测量给药后 0、15、30、60、90 以及 120 min 时大鼠所能攀附的最大倾斜角度。

9. 统计学方法

所有的实验数据均采用 Prim 5.0 软件进行统计分析和处理。实验数据以均值 ± 标准误 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) 表示。各组间差异的分析采用方差分析 (one-way ANOVA) 并继之以 Dunnett 后检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。重复设计(各时间点两组数据)分析采用双因素方差分析 (two-way ANOVA) 并继之以 Bonferroni 后检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. Nav1.8 在骨癌大鼠 DRG 神经元上的膜蛋白表达增加

骨癌大鼠在造模第 21 天痛行为比较稳定,因此我们取造模 21 天后的 DRG 检测 Nav1.8 的变化。造模后 21 d,骨癌大鼠 DRG 中 Nav1.8 特异性的条带密度与内参 TfR 的条带密度比值明显上调,其比值由对照组的 0.79 ± 0.06 上升到骨癌痛组的 1.34 ± 0.12 ,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。而造模后 7 d,Nav1.8 特异性的条带密度与内参 TfR 的比值 (0.85 ± 0.14) 与对照组的比值 (1.09 ± 0.09) 相比,差异无统计学意义,详见图 1。

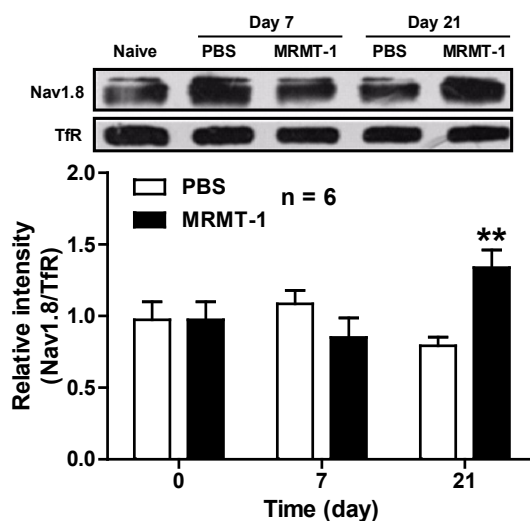


图 1 Nav1.8 在骨癌大鼠 DRG 神经元的膜蛋白表达明显升高。

** $P < 0.01$, 与 PBS 对照组相比, two-way ANOVA 继 Bonferroni 后检验, $n = 6$ 。

Fig.1 The membrane expression of Nav1.8 in DRG neurons increased significantly on day 21 after tumor cells inoculation in bone cancer rats.

** $P < 0.01$, compared with PBS control rats, two-way ANOVA followed by Bonferroni post-tests, $n = 6$ 。

2. Nav1.8 的阻断剂 A-803467 能够缓解骨癌大鼠的机械痛敏和热痛敏

为了进一步验证膜蛋白表达的结果, 我们通过鞘内给予 Nav1.8 的阻断剂来验证其对痛行为的影响。从图 2 可以看出, 在骨癌大鼠机械痛行为测定中, 给予大鼠 150 nmol 的 A-803467 15 和 30 min 后或给予大鼠 100 nmol 的 A-803467 30 和 60 min 后, 机械痛敏即可得到明显的缓解 ($P < 0.05$, $P < 0.001$, 图 2A), 给予大鼠 50 nmol 的 A-803467 并不能明显的缓解骨癌痛大鼠的机械痛敏行为 (图 2A)。在骨癌痛大鼠的热痛敏行为测定中, 给予大鼠 150 和 100 nmol 的 A-803467 15 min 后热痛敏行为即可以得到明显的缓解 ($P < 0.001$, $P < 0.05$, 图 2B), 并且可以持续到给药后 90 min ($P < 0.01$, 图 2B), 给予大鼠 50 nmol 的 A-803467 并不能明显的缓解骨癌痛大鼠的热痛敏行为 (图 2B)。大鼠痛行为的缓解程度与给药剂量呈正相关: 高剂量即 150 nmol 的 A-803467 镇痛效果最明显, 中间剂量即 100 nmol 的 A-803467 镇痛效果次之, 而低剂量的 A-803467 没有镇痛效果。

为了排除 A-803467 对大鼠运动能力的影响, 我们进行了斜板实验。在给予高剂量 A-803467 (150 nmol) 之后的 15、30、60、90 和 120 min 检测大鼠在斜板上所能停留的最大角度分别为 67.86 ± 1.84 、 69.29 ± 1.70 、 70.00 ± 1.89 、 72.14 ± 2.14 和 71.43 ± 2.36 度, 与给药前大鼠在斜板上所能停留的最大

角度 67.86 ± 1.844 度相比, 差异无统计学意义 (图 2C), 表明 A-803467 对大鼠运动能力无影响。

讨 论

本研究首先参照 Medhurst 等^[10]的方法建立大鼠骨癌痛模型。术后发现 MRMT-1 肿瘤细胞接种大鼠的 50% 缩足阈值 (50% PWT) 明显降低, 表明大鼠产生了机械痛敏, 骨癌痛模型建立成功。

目前的研究认为, 外周敏化和中枢敏化是慢性痛产生的基础。我们实验室之前的研究发现, 与对照组相比, 骨癌大鼠中 DRG 神经元的动作电位爆发频率明显增高, 表明骨癌大鼠中 DRG 神经元的兴奋性增高。由于在 DRG 神经元上, 动作电位爆发时大量的钠离子内流主要由 TTX 不敏感的钠通道 Nav1.8 介导的, 所以本研究主要集中在电压门控钠通道 Nav1.8 上。鉴于 Nav1.8 发挥功能需要转运到膜上, 所以检测 Nav1.8 在膜上的表达变化有助于了解其在骨癌痛中的作用。我们的结果发现, 与对照组相比, Nav1.8 在骨癌大鼠 DRG 神经元的膜表达明显升高。与之相对应的是, 给予 Nav1.8 特异性抑制剂 A-803467 能够剂量依赖性地缓解骨癌大鼠的机械痛敏和热痛敏。Nav1.8 在骨癌痛中的变化是有争议的, 有报道指出其在骨癌大鼠双侧 DRG 中的 mRNA 和总蛋白水平是下调的, 鞘内给予其反义寡核苷酸却能够缓解痛行为^[15]; 另外一项研究则发

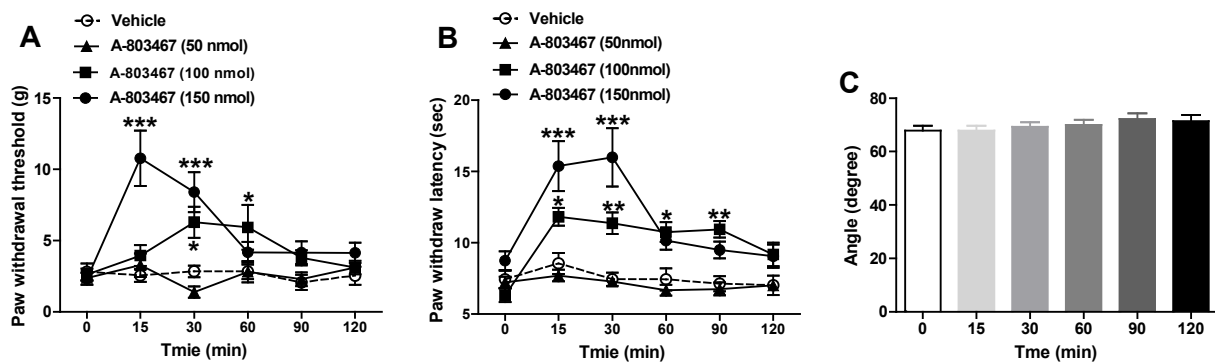


图 2 鞘内注射 A-803467 对骨癌大鼠机械痛敏和热痛敏的影响。A: 机械痛敏; B: 热痛敏。与给予溶剂组相比, 鞘内给予 A-803467 能够剂量依赖性地减轻骨癌大鼠的机械痛敏 (A) 和热痛敏 (B)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, two-way ANOVA 继 Bonferroni 后检验。C: A-803467 对大鼠运动能力无影响。与给药前相比, 给予 150 nmol A-803467 后大鼠在斜板上所停留的角度在各个时间点差异均无统计学意义。 $P > 0.05$, $n = 7$, one-way ANOVA 继 Dunnett 后检验。

Fig.2 Effects of intrathecal administration of A-803467 on the mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in bone cancer rats. A: mechanical allodynia; B: thermal hyperalgesia. Intrathecal administration of A-803467 could significantly alleviate the mechanical allodynia (A) and thermal hyperalgesia (B) in bone cancer rats.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, two-way ANOVA followed by Bonferroni post-tests. C: the inclined-plate test. A-803467 had no influence on the motor function of rats. $P > 0.05$, $n = 7$, one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test



现 Nav1.8 的 mRNA 和蛋白表达在骨癌大鼠明显升高^[16]。我们的研究发现, Nav1.8 在骨癌大鼠 DRG 神经元的膜蛋白表达上调, 并且给予 Nav1.8 特异性抑制剂 A-803467 可以明显减轻骨癌大鼠的机械痛敏和热痛敏。之后我们将会研究 Nav1.8 电流密度和通道特性在骨癌大鼠 DRG 神经元的变化, 以进一步确定 Nav1.8 在骨癌痛中的作用。

总之, 我们的研究表明, Nav1.8 在骨癌大鼠 DRG 神经元细胞膜上的表达增加可能参与骨癌痛的发生。

参 考 文 献

- [1] Ghilardi JR, Rohrich H, Lindsay TH, *et al.* Selective blockade of the capsaicin receptor TRPV1 attenuates bone cancer pain. *J Neurosci*, 2005, 25:3126 ~ 3131.
- [2] Kaan TK, Yip PK, Patel S, *et al.* Systemic blockade of P2X3 and P2X2/3 receptors attenuates bone cancer pain behaviour in rats. *Brain*, 2010, 133:2549 ~ 2564.
- [3] Zheng Q, Fang D, Liu M, *et al.* Suppression of KCNQ/M (Kv7) potassium channels in dorsal root ganglion neurons contributes to the development of bone cancer pain in a rat model. *Pain*, 2013, 154:434 ~ 448.
- [4] 郑琴, 方东, 刘敏, 等. 骨癌痛大鼠初级感觉神经元兴奋性的研究. *中国疼痛医学杂志*, 2011, 17:166 ~ 170.
- [5] Renganathan M, Cummins TR, Waxman SG. Contribution of Na(v)1.8 sodium channels to action potential electrogenesis in DRG neurons. *J Neurophysiol*, 2001, 86:629 ~ 640.
- [6] Tanaka M, Cummins TR, Ishikawa K, *et al.* SNS Na⁺ channel expression increases in dorsal root ganglion neurons in the carrageenan inflammatory pain model. *Neuroreport*, 1998, 9:967 ~ 972.
- [7] Joshi SK, Mikusa JP, Hernandez G, *et al.* Involvement of the TTX-resistant sodium channel Nav 1.8 in inflammatory and neuropathic, but not post-operative, pain states. *Pain*, 2006, 123:75 ~ 82.
- [8] Dong XW, Goregoaker S, Engler H, *et al.* Small interfering RNA-mediated selective knockdown of Na(V)1.8 tetrodotoxin-resistant sodium channel reverses mechanical allodynia in neuropathic rats. *Neuroscience*, 2007, 146:812 ~ 821.
- [9] Jarvis MF, Honore P, Shieh CC, *et al.* A-803467, a potent and selective Nav1.8 sodium channel blocker, attenuates neuropathic and inflammatory pain in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104:8520 ~ 8525.
- [10] Medhurst SJ, Walker K, Bowes M, *et al.* A rat model of bone cancer pain. *Pain*, 2002, 96:129 ~ 140.
- [11] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, *et al.* Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*, 1994, 53:55 ~ 63.
- [12] Qu XX, Cai J, Li MJ, *et al.* Role of the spinal cord NR2B-containing NMDA receptors in the development of neuropathic pain. *Exp Neurol*, 2009, 215:298 ~ 307.
- [13] Black JA, Liu S, Tanaka M, *et al.* Changes in the expression of tetrodotoxin-sensitive sodium channels within dorsal root ganglia neurons in inflammatory pain. *Pain*, 2004, 108:237 ~ 247.
- [14] Rivlin AS, Tator CH. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. *J Neurosurg*, 1977, 47:577 ~ 581.
- [15] Miao XR, Gao XF, Wu JX, *et al.* Bilateral downregulation of Nav1.8 in dorsal root ganglia of rats with bone cancer pain induced by inoculation with Walker 256 breast tumor cells. *BMC Cancer*, 2010, 10:216 ~ 225.
- [16] Qiu F, Jiang Y, Zhang H, *et al.* Increased expression of tetrodotoxin-resistant sodium channels Nav 1.8 and Nav1.9 within dorsal root ganglia in a rat model of bone cancer pain. *Neurosci Lett*, 2012, 512:61 ~ 66.