

doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2014.02.009

# KCNQ/M (Kv7) 钾通道参与骨癌痛大鼠 中枢敏化的电生理学研究\*

蔡捷<sup>1</sup> 崔彦军<sup>2△</sup> 邢国刚<sup>1△</sup>

(<sup>1</sup>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;

<sup>2</sup>北京大学医院内科, 北京 100871)

**摘要 目的:** 研究骨癌痛大鼠脊髓背角广动力范围 (wide dynamic range, WDR) 神经元兴奋性的改变, 探讨 KCNQ/M (Kv7) 钾通道在骨癌痛中枢敏化中的作用。**方法:** 在雌性 SD 大鼠, 采用胫骨骨髓腔内注射 MRMT-1 乳腺癌细胞 ( $4 \times 10^4$ , 4  $\mu$ l) 的方法建立骨癌痛大鼠模型, 术后 14 天用 von Frey 纤维丝测定大鼠同侧后爪的 50% 缩足阈值 (paw withdrawal 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 (PBS 组)。造模后 14 天, 通过在体细胞外记录的电生理学方法, 观察造模前后脊髓背角 WDR 神经元的放电变化以及脊髓背表面给予 KCNQ 钾通道的激动剂瑞替加滨 (retigabine, RTG) 5 mM 对骨癌痛大鼠脊髓背角 WDR 神经元 C-纤维诱发放电的影响。**结果:** 建立模型后 14 天, (1) 与 PBS 组相比, 模型组 WDR 神经元的 C-纤维诱发放电明显增多 ( $P < 0.001$ ,  $n = 11$ ); (2) 与 DMSO 组相比, 脊髓背表面给予瑞替加滨可以显著抑制骨癌痛大鼠 WDR 神经元的 C-纤维诱发放电 ( $P < 0.001$ ,  $n = 14$ )。**结论:** 骨癌大鼠脊髓背角 WDR 神经元的兴奋性显著升高 (即发生了中枢敏化); KCNQ/M (Kv7) 钾通道的功能性下调可能与骨癌大鼠的中枢敏化和骨癌痛的发生有关。

**关键词** 骨癌痛; 脊髓背角; WDR 神经元; KCNQ/M (Kv7) 钾通道; 瑞替加滨

## CONTRIBUTION OF KCNQ/M (Kv7) POTASSIUM CHANNELS TO THE DEVELOPMENT OF CENTRAL SENSITIZATION IN RATS WITH BONE CANCER PAIN: AN ELECTROPHYSIOLOGICAL VALIDATION

CAI Jie<sup>1</sup>, CUI Yan-Jun<sup>2△</sup>, XING Guo-Gang<sup>1△</sup>

(<sup>1</sup>Neuroscience Research Institute and Department of Neurobiology, Peking University; Key Laboratory for Neuroscience of the Ministry of Education and the Ministry of Public Health, Beijing 100191; <sup>2</sup> Department of internal medicine, Peking University Hospital, Beijing 100871 )

**Abstract Objective:** To investigate the excitabilities of spinal wide dynamic range (WDR) neurons in a rat model of bone cancer pain, and to explore the role of KCNQ/M (Kv7) potassium channels in the development of central sensitization in bone cancer rats. **Methods:** (1) A rat model of bone cancer pain was established by intratibial injections of syngeneic MRMT-1 mammary gland carcinoma cells ( $4 \times 10^4$ , 4  $\mu$ l) in female Sprague-Dawley rats. The 50% paw withdrawal threshold (PWT) of rats were tested with von Frey filaments on 14 days after cancer cells inoculation to assess the mechanical allodynia, which indicated the success of bone cancer pain model. An equal volume of vehicle (phosphorylated buffer solution, PBS) was injected into the tibial bone cavity as controls. (2) The alterations of excitabilities of WDR neurons in bone cancer pain rats and the effects of retigabine on the C-fiber induced discharge of spinal wide dynamic range (WDR) neurons were examined through extracellular electrophysiological recording in vivo in bone cancer pain rats. **Results:** (1) The C-fiber responses of WDR neurons increased significantly in rats with bone cancer pain ( $P < 0.001$ ,  $n = 11$ ); (2) Spinal administration of retigabine (5 mM), a selective opener of KCNQ/M (Kv7) channels, showed significant inhibition on the C-fiber

\* 国家自然科学基金 (81371237, 31171063), 科技部国家重点基础研究发展计划“973”资助项目 (2013CB531905), 卫生部行业专项基金 (201302013-01) 和北京市自然科学基金 (7112079) 资助

△ 通讯作者 崔彦军 (cyj@pku.edu.cn); 邢国刚 (ggxing@bjmu.edu.cn)

evoked discharges of dorsal horn WDR neurons ( $P < 0.001$ ,  $n = 14$ ). **Conclusion:** Hypersensitivity of dorsal horn WDR neurons occurs in rats with bone cancer pain, which is highly related to the central sensitization and the pathogenesis of bone cancer pain. KCNQ/M (Kv7) potassium channels may underlie the occurrence of central sensitization and the development of bone cancer pain in rats.

**Key words** Bone cancer pain; Spinal dorsal horn; WDR neurons; KCNQ/M (Kv7) potassium channel; Retigabine

癌痛是临床恶性肿瘤患者最常见的症状之一,使患者的生活质量大大降低。在癌症引起的疼痛中最为常见也是让患者最难以忍受的是骨癌痛。有资料显示,超过90%的癌症患者通常都伴有骨癌痛的发生<sup>[1]</sup>。骨癌痛的发生机制目前仍不清楚。我们实验室前期的研究证明,KCNQ/M (Kv7)通道的功能性下调在骨癌大鼠背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)神经元的过度兴奋(即外周敏化)和骨癌痛的发生中起关键作用<sup>[2]</sup>。KCNQ/M (Kv7)通道是由Kv7.1至Kv7.5五个电压门控钾离子通道亚单位组成的一个钾通道家族<sup>[3]</sup>,其中KCNQ2和KCNQ3广泛表达于神经系统<sup>[4,5]</sup>。研究表明,KCNQ通道对正常细胞的兴奋性起到一种“刹车闸”样的控制作用,可以防止细胞的过度兴奋。在骨癌大鼠的DRG,由于KCNQ通道的功能性下调,导致控制神经元兴奋性的“刹车闸失灵”,从而出现DRG神经元的兴奋失控和骨癌痛的发生。因此,应用KCNQ通道的拮抗剂XE-991可以使DRG神经元的兴奋性增加,而KCNQ通道的激动剂瑞替加滨(retigabine, RTG)能够抑制DRG神经元的敏化,从而减轻骨癌痛大鼠的机械痛敏和热痛敏行为,提示KCNQ/M钾通道参与了骨癌痛外周敏化的形成<sup>[2]</sup>。本研究在骨癌痛模型大鼠,应用在体细胞外记录的电生理学方法,记录大鼠脊髓背角广动力范围(wide dynamic range, WDR)神经元的C-纤维诱发放电,同时在脊髓背表面给予KCNQ通道的激动剂瑞替加滨(retigabine, RTG)观察其对骨癌痛大鼠脊髓背角WDR神经元C-纤维诱发放电的影响。旨在探讨骨癌痛发生的中枢敏化机制,为骨癌痛的临床治疗寻找新的药物靶点。

## 方 法

### 1. 骨癌痛大鼠模型的建立及痛行为测定

(1) 实验动物:健康成年雌性Sprague-Dawley (SD)大鼠,体重200~220g由北京大学医学部实验动物科学部提供,实验动物许可证号:SYXK(京)2006-0025。

(2) 骨癌痛大鼠模型的建立:参照Medhurst SJ

等的方法<sup>[6]</sup>,向胫骨骨髓腔内注射MRMT-1大鼠乳腺癌细胞( $4 \times 10^4$ ,  $4 \mu\text{l}$ ,细胞收集后用PBS缓冲液溶解悬浮),建立骨癌痛大鼠模型,术后14天用von Frey纤维丝测定大鼠同侧后爪的50%缩足阈值(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(PBS组)。

### 2. 电生理实验

采用我室以往的方法<sup>[7]</sup>进行动物的手术与固定,用钨丝微电极记录大鼠脊髓背角WDR神经元的单位放电(电极阻抗为 $4 \text{ M}\Omega$ )。PBS组和模型组给予实验性电刺激(每5min施加1个串刺激,每串10个方波,强度为2倍C-纤维兴奋的阈强度)记录1h以观察模型组脊髓背角WDR神经元兴奋性的变化。在记录瑞替加滨对骨癌痛大鼠脊髓背角WDR神经元的作用过程中,首先给予6串实验性电刺激(每5min施加1个串刺激,每串10个方波,强度为2倍C-纤维兴奋的阈强度),诱发并记录WDR(wide dynamic range)神经元的放电,取其平均值作为基础对照值(100%),然后在脊髓背表面给予瑞替加滨(以DMSO为溶媒配成0.5M的stock液,用生理盐水配成5mM<sup>[8]</sup>的工作液)或DMSO(用生理盐水配成相同浓度的工作液),5min后再给予同样的实验性电刺激,记录给药后60min内WDR神经元C-纤维诱发放电的变化。记录到的单位放电经微电极放大器输入记忆示波器,同时输入Spike 2生物电信号采集与分析系统(英国CED公司)。叠加10次的放电绘制出刺激后序列密度直方图,进行数据统计和分析处理。

### 3. 数据处理及统计学分析

采用Prism 5版软件进行数据的统计分析和处理。实验数据以均数±标准误(mean±SEM)表示。两组间数据的差异应用t检验。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 post-hoc检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

### 1. 骨癌痛大鼠脊髓背角WDR神经元C-纤维

诱发放电的变化

与 PBS 对照组相比, 骨癌痛大鼠脊髓背角 WDR 神经元 C- 纤维诱发放电明显增多, (见图 1A, 1B)。在 0 ~ 60 min 内骨癌痛大鼠中每个串刺激诱发的 10 次放电的个数总和与 PBS 对照组相比均有显著性差异 ( $P < 0.001$ , two-way ANOVA,  $n = 9$  或  $n = 11$ )。相应地, 以 0 ~ 60 min C- 纤维诱发放电变化的曲线下面积 (area under curve, AUC) 反应骨癌痛大鼠脊髓背角 WDR 神经元 C- 纤维诱发放电增多的效应, 与 PBS 对照组 ( $4062 \pm 339.8$ ,  $n = 9$ ) 相比, 骨癌痛大鼠组的 AUC ( $11700 \pm 590.7$ ,  $n = 11$ ) 显著增多 ( $P < 0.001$ ,  $n = 9$  或  $n = 11$ , 见图 1C)。以上结果表明, 骨癌痛大鼠脊髓背角 WDR 神经元的兴奋性显著增加, 这种增强的 WDR 神经元兴奋性提示骨癌大鼠中枢敏化的发生。

2. 脊髓背表面应用瑞替加滨对脊髓背角 WDR 神经元 C- 纤维诱发放电的影响

与 DMSO 组相比, 脊髓表面应用瑞替加滨 (5 mM) 能显著抑制 WDR 神经元的 C- 纤维诱发放电 (见图 2A, 2B), 应用瑞替加滨 10 min 即出现明显的抑制作用, C- 纤维诱发放电降至给药前的

( $83.82 \pm 4.52$ )% ( $P < 0.01$ ,  $n = 14$ ), 而 DMSO 组仍然维持在 ( $102.44 \pm 2.82$ )% ( $P > 0.05$ ,  $n = 9$ )。应用瑞替加滨对放电产生的最大抑制效应出现在给药后 30 ~ 60 min, 在给药后的 60 min, C- 纤维诱发放电最低降至给药前的 ( $66.23 \pm 3.17$ )% ( $P < 0.001$ ), 而 DMSO 组维持在 ( $103.41 \pm 4.82$ )% ( $P > 0.05$ )。相应地, 以 -25 ~ 60 min C- 纤维诱发放电变化的曲线下面积 (area under curve, AUC) 反应脊髓表面应用瑞替加滨对 C- 纤维诱发放电的总体抑制效应, 与 DMSO 对照组 ( $8648 \pm 151.6$ ) 相比, 瑞替加滨组的 AUC ( $6978 \pm 148.5$ ) 显著减少 ( $P < 0.001$ ,  $n = 9$  或  $n = 14$ , 见图 2C)。以上结果表明, 脊髓背表面应用瑞替加滨对骨癌大鼠脊髓背角 WDR 神经元的 C- 纤维诱发放电具有显著的抑制作用。

讨论

本研究首先参照 Medhurst SJ 等的方法<sup>[6]</sup>建立大鼠骨癌痛模型。术后 14 天发现 MRMT-1 乳腺癌细胞接种大鼠的 50% PWT 明显降低, 表明大鼠产

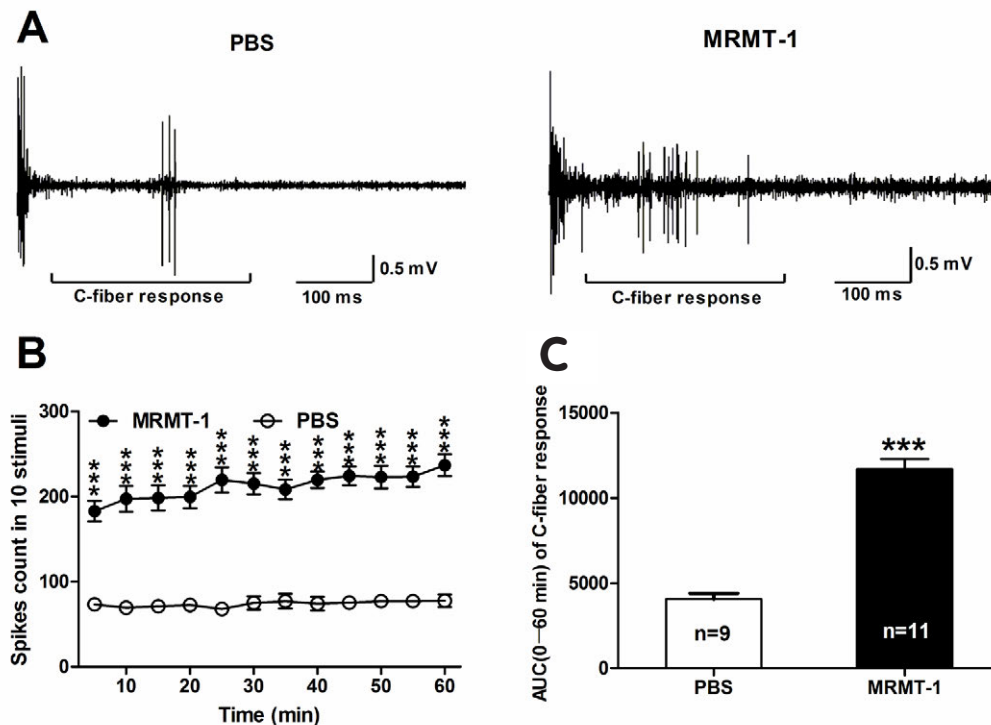


图 1 骨癌大鼠脊髓背角 WDR 神经元 C- 纤维诱发放电的变化。A: WDR 神经元 C- 纤维诱发放电的原始放电图; B: WDR 神经元 C- 纤维诱发放电的统计图; C: 0~60 min 内两组 WDR 神经元 C- 纤维诱发放电的曲线下面积 (AUC) 比较。\*\*\* $P < 0.001$ , 与 PBS 组相比, two-way ANOVA 与 two-tailed unpaired t-test,  $n = 9-11$ /组。

Fig. 1 Alterations of the C-fiber responses of dorsal horn WDR neurons in bone cancer rats. (A): The original recording on the C-fiber evoked discharges of a WDR neuron in bone cancer rat and sham rat, respectively. (B): The total spikes count of the electrically evoked C-fiber responses in 10 stimuli. \*\*\* $P < 0.001$ , compared with sham control, two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test,  $n = 9-11$ /group. (C): the AUC (0-60 min) of C-fiber response. \*\*\* $P < 0.001$ , bones cancer pain vs. sham, two-tailed unpaired t-test,  $n = 9-11$ /group.



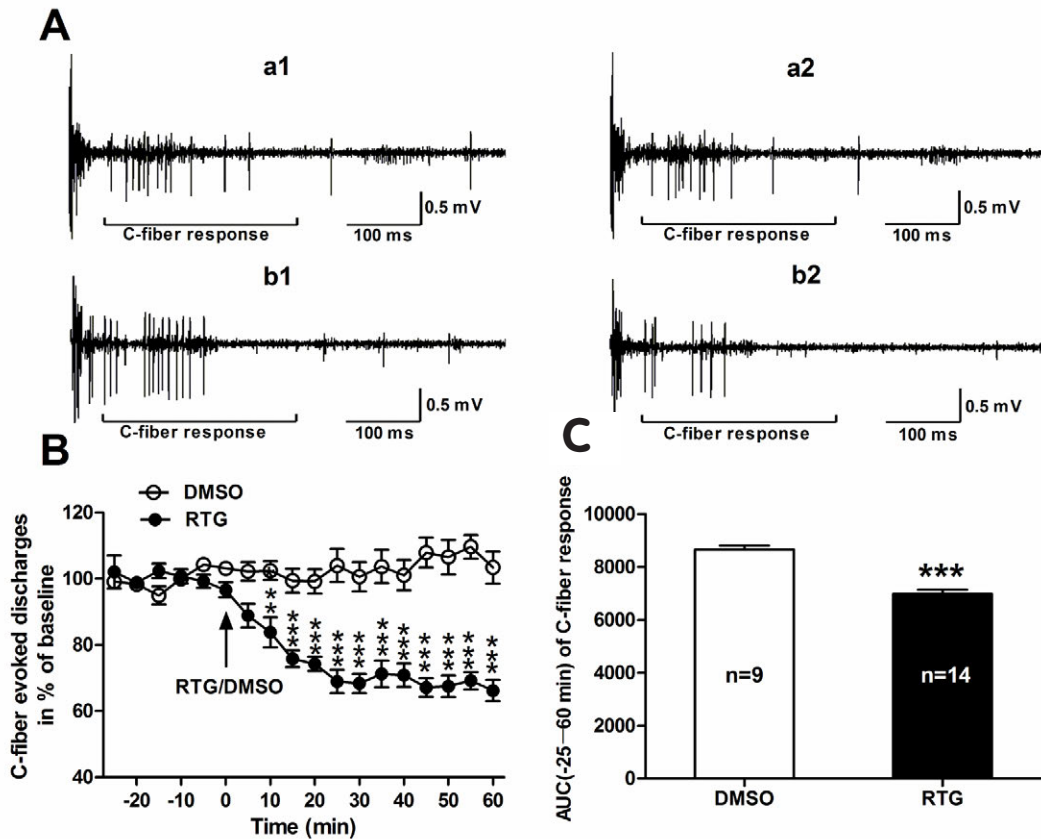


图2 脊髓背表面应用瑞替加滨 (5 mM) 对骨癌大鼠脊髓背角 WDR 神经元 C-纤维诱发放电的影响。A: 给药前后 WDR 神经元 C-纤维诱发反应的原始放电图; a1: 给 DMSO 前 (baseline); a2: 给 DMSO 后 30 min; b1: 给 RTG 前 (baseline); b2: 给 RTG 后 30 min; B: RTG 抑制 C-纤维诱发放电的统计图; C: -25 ~ 60 min 内 WDR 神经元 C-纤维诱发放电的曲线下面积 (AUC) 比较。\*\*\* $P < 0.001$ , 与 DMSO 组相比, two-way ANOVA 与 two-tailed unpaired t-test,  $n = 9-14$ /组。

Fig. 2 Effects of spinal administration of RTG (5 mM) on C-fiber responses of dorsal horn WDR neurons. A: The original recording on the C-fiber evoked discharges of a WDR neuron before and after drug administration; a1: before DMSO administration (baseline); a2: 30 min after DMSO administration; b1: before RTG administration (baseline); b2: 30 min after RTG administration; B: Effects of RTG on the C-fiber evoked discharges; C: Comparison of the AUC (-25 ~ 60 min of the analysis time) of the C-fiber responses after application of RTG with DMSO. \*\*\* $P < 0.001$ , compared with DMSO solution control, two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test, or two-tailed unpaired t-test,  $n = 9-14$ /group.

生了机械痛敏, 骨癌痛模型建立成功。对造模成功的骨癌痛大鼠进行在体细胞外记录脊髓背角 WDR 神经元 C-纤维诱发放电, 发现与 PBS 对照组相比, 骨癌痛大鼠脊髓背角 WDR 神经元 C-纤维诱发放电显著增多, 兴奋性明显增加, 这种增强的 WDR 神经元兴奋性提示骨癌大鼠中枢敏化的发生。我们实验室前期的研究发现, 在癌症痛大鼠, 小直径 DRG 神经元的兴奋性显著升高, 形成外周敏化<sup>[9]</sup>。结合本实验的研究结果, 我们推测, 这种外周敏化可以引起脊髓背角伤害性感觉神经元的兴奋性增加, 导致中枢敏化, 最终形成骨癌痛<sup>[10,11]</sup>。

我们前期的研究已经证明, KCNQ/M (Kv7) 通道的功能性下调在骨癌大鼠 DRG 神经元的过度兴奋 (及外周敏化) 和骨癌痛的发生中起关键作用<sup>[2]</sup>。

KCNQ 通道对正常细胞的兴奋性起到一种“刹车闸”样的控制作用, 可以防止细胞的过度兴奋。在骨癌大鼠的 DRG, 由于 KCNQ 通道的功能性下调, 导致控制神经元兴奋性的“刹车闸失灵”, 从而出现 DRG 神经元的兴奋失控和骨癌痛的发生。为了进一步证明 KCNQ 通道的功能性下调是否也可以导致骨癌大鼠中枢敏化的发生, 我们在脊髓背表面给予 KCNQ 通道的激动剂瑞替加滨 (retigabine, RTG), 观察增强 KCNQ 通道对骨癌大鼠脊髓背角 WDR 神经元 C-纤维诱发放电的作用。我们的实验结果发现, 与对照组相比, 脊髓表面应用瑞替加滨能够显著抑制骨癌大鼠 WDR 神经元 C-纤维反应的过度兴奋, 提示 KCNQ 通道的功能性下调的确可以导致骨癌大鼠中枢敏化的发生。

迄今为止, 已有大量研究证实, KCNQ/M (Kv7) 钾通道在疼痛传导通路的各级组织都有表达, 包括 DRG 和背角神经元<sup>[8,12-14]</sup>, 发挥着调节伤害性感觉传导的作用<sup>[8,15-17]</sup>。因此, KCNQ/M (Kv7) 钾通道的激动剂瑞替加滨在神经病理痛<sup>[15,17-19]</sup>、炎症痛<sup>[8,12,20]</sup> 和内脏痛<sup>[21-23]</sup> 中都能起到明显的镇痛作用。有报道表明, 瑞替加滨可以有效抑制脊神经结扎 (spinal nerve ligation, SNL) 大鼠脊髓背角神经元 C- 纤维和 A $\delta$ - 纤维的诱发放电<sup>[8]</sup>。根据本实验室前期的研究发现, 瑞替加滨能够抑制 DRG 神经元的 M 通道电流以及 DRG 神经元的自发放电频率, 从而抑制骨癌痛大鼠的外周敏化<sup>[2]</sup>, 我们从本实验的研究结果推测: KCNQ 通道的功能性下调可以导致骨癌大鼠外周敏化和中枢敏化的发生。所以, 应用 KCNQ 通道的激动剂 (瑞替加滨) 增强该通道的功能可以抑制骨癌大鼠的外周敏化和中枢敏化, 进而抑制骨癌痛的发生。

结论: 骨癌大鼠脊髓背角 WDR 神经元的兴奋性显著升高 (即发生了中枢敏化); KCNQ/M (Kv7) 钾通道的功能性下调可能与骨癌大鼠的中枢敏化和骨癌痛的发生有关。

### 参 考 文 献

- [1] 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. *Pain* 2001; 93: 247 ~ 257.
- [2] 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.
- [3] Wulff H, Castle NA, Pardo LA. Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8: 982 ~ 1001.
- [4] Biervert C, Schroeder BC, Kubisch C, *et al.* A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* 1998; 279: 403 ~ 406.
- [5] Klinger F, Gould G, Boehm S, *et al.* Distribution of M-channel subunits KCNQ2 and KCNQ3 in rat hippocampus. *Neuroimage* 2011; 58: 761 ~ 769.
- [6] Medhurst SJ, Walker K, Bowes M, *et al.* A rat model of bone cancer pain. *Pain* 2002; 96: 129 ~ 140.
- [7] 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.
- [8] Passmore GM, Selyanko AA, Mistry M, *et al.* KCNQ/M currents in sensory neurons: significance for pain therapy. *J Neurosci* 2003; 23: 7227 ~ 7236.
- [9] Zheng Q, Fang D, Cai J, *et al.* Enhanced excitability of small dorsal root ganglion neurons in rats with bone cancer pain. *Mol Pain* 2012; 8:24. doi: 10.1186/1744-8069-8-24.: 24 ~ 28.
- [10] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, *et al.* Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 1994; 53: 55 ~ 63.
- [11] Crozier RA, Ajit SK, Kaftan EJ, *et al.* MrgD activation inhibits KCNQ/M-currents and contributes to enhanced neuronal excitability. *J Neurosci* 2007; 27: 4492 ~ 4496.
- [12] Brown DA, Passmore GM. Neural KCNQ (Kv7) channels. *Br J Pharmacol* 2009; 156: 1185 ~ 1195.
- [13] Devaux JJ, Kleopa KA, Cooper EC, *et al.* KCNQ2 is a nodal K<sup>+</sup> channel. *J Neurosci* 2004; 24: 1236 ~ 1244.
- [14] Saganich MJ, Machado E, Rudy B. Differential expression of genes encoding subthreshold-operating voltage-gated K<sup>+</sup> channels in brain. *J Neurosci* 2001; 21: 4609 ~ 4624.
- [15] Blackburn-Munro G, Jensen BS. The anticonvulsant retigabine attenuates nociceptive behaviours in rat models of persistent and neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2003; 460: 109 ~ 116.
- [16] Fritch PC, McNaughton-Smith G, Amato GS, *et al.* Novel KCNQ2/Q3 agonists as potential therapeutics for epilepsy and neuropathic pain. *J Med Chem* 2010; 53: 887 ~ 896.
- [17] Munro G, Dalby-Brown W. Kv7 (KCNQ) channel modulators and neuropathic pain. *J Med Chem* 2007; 50: 2576 ~ 2582.
- [18] Dost R, Rostock A, Rundfeldt C. The anti-hyperalgesic activity of retigabine is mediated by KCNQ potassium channel activation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004; 369: 382 ~ 390.
- [19] Wickenden AD, McNaughton-Smith G, Wladyka CL, *et al.* Kv7 channels as targets for the treatment of pain. Kv7 channels contribute to the resting membrane potential in rat visceral sensory neurons. *J Physiol* 2006; 575: 175 ~ 189.
- [20] Linley JE, Rose K, Patil M, *et al.* Inhibition of M current in sensory neurons by exogenous proteases: a signaling pathway mediating inflammatory nociception. *J Neurosci* 2008; 28: 11240 ~ 11249.
- [21] Bi Y, Chen H, Su J, *et al.* Visceral hyperalgesia induced by forebrain-specific suppression of native Kv7/KCNQ/M-current in mice. *Mol Pain* 2011; 7:84. doi: 10.1186/1744-8069-7-84.: 84 ~ 87.
- [22] Hirano K, Kuratani K, Fujiyoshi M, *et al.* Kv7.2-7.5 voltage-gated potassium channel (KCNQ2-5) opener, retigabine, reduces capsaicin-induced visceral pain in mice. *Neurosci Lett* 2007; 413: 159 ~ 162.
- [23] Wladyka CL, Kunze DL. KCNQ/M-currents contribute to the resting membrane potential in rat visceral sensory neurons. *J Physiol* 2006; 575: 175 ~ 189.