

doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2014.04.004

利鲁唑对糖尿病神经病理性疼痛大鼠背根神经节 Nav1.7 表达的影响 *

苗 蓓[△] 殷 悦 周田田 邵翠杰 曹君利
(徐州医学院江苏省麻醉学重点实验室, 徐州 221004)

摘 要 目的: 探讨镇痛药利鲁唑 (riluzole) 对糖尿病神经病理性疼痛大鼠背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) Nav1.7 表达的影响。**方法:** 雄性 SD 大鼠 108 只, 采用随机数字表法, 将其分为 4 组 ($n = 27$): 对照组 (C 组)、模型组 (DNP 组)、10% 溶剂 DMSO 组 (DNP+DMSO 组) 和利鲁唑组 (DNP+riluzole 组)。观察 STZ 注射前 1 d 及注射后 3、7、10、14、21、28 d 测定缩足反射机械刺激阈值 (paw withdrawal mechanical threshold, PWMT) 和缩足反射热辐射潜伏期 (paw withdrawal thermal latency, PWTL)。10% DMSO 组和利鲁唑组于 STZ 注射 15 d 起分别腹腔注射 10% DMSO 或利鲁唑 4 mg/kg, 1 次/日, 连续 7 d, 于 21、28 d 测定 PWMT 和 PWTL。行为学测试完成后选择 21 d 大鼠用免疫荧光和 Western blot 方法检测大鼠 DRG 中 Nav1.7 的表达。**结果:** 与 C 组比较, DNP 组大鼠 PWMT 降低, PWTL 缩短, DRG 中 Nav1.7 的表达上调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 DNP 组比较, DNP+DMSO 组大鼠在腹腔注射 10% DMSO 后, PWMT、PWTL 和 Nav 1.7 的表达无明显改变, 与 DNP+DMSO 组和 DNP 组比较, DNP + riluzole 组大鼠在腹腔注射利鲁唑后, PWMT 明显升高, PWTL 明显延长, DRG 中 Nav 1.7 的表达下调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论:** 利鲁唑可通过抑制 DNP 大鼠 DRG 中 Nav 1.7 表达, 从而减轻大鼠 DNP。

关键词 利鲁唑; 糖尿病神经病理性疼痛; 背根神经节; Nav1.7

EFFECT OF RILUZOLE ON EXPRESSION OF Nav1.7 IN DORSAL ROOT GANGLION NEURONS IN RATS WITH DIABETIC NEUROPATHIC PAIN

MIAO Bei[△], YIN Yue, ZHOU Tian-Tian, SHAO Cui-Jie, CAO Jun-Li

(Key Laboratory of Anesthesiology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002)

Abstract Objective: To investigate the effect of riluzole, an analgesic on the expression of Nav1.7 in dorsal root ganglion (DRG) neurons in a rat model of diabetic neuropathic pain (DNP). **Methods:** 108 male SD rats weighing 200~220 g were randomly divided into 4 groups ($n = 27$ each): control group (group C), DNP group, DNP+DMSO group and DNP+riluzole group. Diabetes were induced with streptozocin (70 mg/kg) injected subcutaneously. Paw withdrawal mechanical threshold (PWMT) and paw withdrawal thermal latency (PWTL) were measured 1 day before and 3, 7, 10, 14, 21, 28 days after streptozocin injection. 10% DMSO and riluzole (4 mg/kg) were given intraperitoneally once a day for 7 consecutive days starting at day 15 after streptozocin injection in DNP+DMSO and DNP+riluzole groups respectively, and PWMT and PWTL were measured at day 21, 28 for the two groups. The expression of Nav1.7 in DRG neurons was determined at day 21 after streptozocin injection by immunofluorescent staining and Western blot after the ethology test was completed. **Results:** Compared with group C, PWMT and PWTL were significantly decreased, and Nav1.7 expression was significantly increased in DNP, DNP+DMSO and DNP+ riluzole groups ($P < 0.05$). Compared with DNP+DMSO and DNP groups, PWMT and PWTL were significantly increased, and Nav1.7 expression was significantly decreased in DNP+riluzole group after intraperitoneal injection of riluzole ($P < 0.05$). There

* 基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (81200861), 江苏省教育厅“青蓝工程”资助 (53041212), 江苏省高校自然科学基金重点项目 (10KJA310053), 徐州医学院振兴计划资助课题 (53631214)

[△] 通讯作者 kevinpsd@gmail.com

was no significant difference in the parameters mentioned above between DNP and DNP+DMSO groups.

Conclusion: Riluzole can attenuate DNP by inhibiting the expression of Nav1.7 in DRG neurons.

Key words Riluzole; Diabetic neuropathic pain; Dorsal root ganglion; Nav1.7

流行病学研究^[1,2]表明,约60%的糖尿病患者并发糖尿病神经病变,以糖尿病神经病理性疼痛(diabetic neuropathic pain, DNP)最为常见。DNP是临床最常见的神经病理性疼痛类型之一。患者可出现自发痛、痛觉过敏、触诱发痛和其他不典型感觉异常,严重影响生活质量^[3]。利鲁唑是苯噻唑类化合物,具有神经保护、减轻神经病理性疼痛等作用^[4]。然而迄今为止,利鲁唑镇痛作用的确切机制尚不完全清楚。近年来糖尿病神经病理性疼痛大鼠脊髓背根神经节在糖尿病神经病理性疼痛的发生和发展中起到重要的作用^[5]。本实验旨在观察利鲁唑对糖尿病神经病理性疼痛大鼠痛阈及初级传入神经元DRG中Nav 1.7蛋白表达的影响情况,为进一步了解利鲁唑的镇痛机制提供理论基础。

方 法

1. 试剂与材料

链脲佐菌素(streptozocin, 美国Sigma公司),利鲁唑(riluzole, 美国Sigma公司), Nav1.7兔单克隆一抗(一抗, Alomone labs公司, 以色列),碱性磷酸酶标记的山羊抗兔抗体(二抗, 南通碧云天公司), NBT/BCIP显色底物(南通碧云天公司), BCA蛋白分析试剂盒(南通碧云天公司), Alexa Fluor 488标记的驴抗兔荧光二抗(Invitrogen公司, 美国), 血糖仪(中国欧姆龙公司), von Frey Hairs(美国Stoeling公司), IITC series 8型热痛刺激仪(美国IITC公司)。

2. 动物及分组

雄性SD大鼠108只, 体重200~220 g, 由徐州医学院实验动物中心提供, 采用随机数字表法, 将其分为4组: 对照组(C组)、模型组(DNP组)、10% DMSO组(DNP+DMSO组)和利鲁唑组(DNP+riluzole组), 每组均为27只。

3. DNP模型制备及行为观察

参考文献^[6]制备DNP模型, 测基础痛阈后皮下注射STZ 70 mg/kg, 给药后7 d尾静脉血糖稳定且>16.7 mmol/L为糖尿病模型制备成功, 给药后14 d痛阈降低幅度>基础痛阈15%为DNP模型制备成功。STZ使用时溶于0.1 mol/L新鲜配制的枸橼酸/

枸橼酸钠缓冲液中(冰浴, pH 4.5, 对照组注射相同剂量的枸橼酸/枸橼酸钠缓冲液。测量STZ注射前一天、STZ注射后的3、7、10、14、21、28 d等时间点, 观察行为学指标; 参考文献^[7]腹腔注射给予利鲁唑, 10% DMSO组和利鲁唑组于STZ注射15 d起分别腹腔注射10% DMSO或利鲁唑4 mg/kg, 1次/日, 连续7 d, 于21、28 d测定PWMT和PWTL。热痛敏检测: 缩足反射热辐射潜伏期(paw withdrawal thermal latency, PWTL): 参考文献^[8], 室温保持在25℃左右, 将动物放在6 cm厚的有机玻璃板上20 min, 大鼠安静后, 后足接触玻璃板时, 将热痛敏刺激仪放在有机玻璃板下方, 使光源聚焦照射动物后肢足底掌心, 电子秒表记录从照射开始到引起后肢回缩反应时的时间作为痛觉观测指标。读数精确到0.01 s。取每只大鼠测量5次, 结果取均值为统计数据, 测量间隔时间为5 min。事先调节光照强度, 使平均潜伏期约15 s。上限为25 s, 以避免组织损伤。

机械性痛敏: 缩足反射机械刺激阈值(paw withdrawal mechanical threshold, PWMT)的检测: 参考文献^[9], 将一有机玻璃箱置于金属筛网上, 大鼠在有机玻璃箱内适应30 min后, 用不同压力标号的von Frey纤维丝从小到大, 垂直刺激大鼠后足底中部, 持续时间≤4 s, 若大鼠出现缩足或者舔足行为视为阳性反应, 否则为阴性反应, 更换相邻较大压力的von Frey细丝。连续测量5次, 每次间隔时间30 s, 当引起3次及以上的阳性反应时, 记录其压力数值。

4. Western blot

吸入1%异氟烷麻醉大鼠, 迅速将其断头处死, 冰上操作取L₃₋₅DRG, 放入-80℃冰箱保存备用。

蛋白提取: 组织从冰箱取出匀浆器冰上预冷, 加入RIPA裂解液(强)和酶抑制剂PMSF, 将组织块置于匀浆器中球状部位, 充分匀浆, 冰上裂解30 min后用移液器将裂解液转移至1.5 ml离心管中。4℃14000 g离心15 min, 取上清液, BCA试剂盒测定样本蛋白浓度后, 各组用裂解液配平。加入4×上样缓冲液后, 沸水变性10 min。取80 μg/20 μl样本蛋白在10%的SDS-PAGE凝胶系统中上样, 浓缩胶电压80 V, 分离胶电压120 V电泳。半干转法将目的蛋白转移至NC膜上。3%牛血清

封闭 4 h, 分别 Anti-Nav1.7 一抗 (1: 200), Anti- β -actin (1: 1000), 4 °C 孵育过夜; 复温 30 min 后 Washing Buffer 漂洗 3 次 \times 5 min, 加入碱性磷酸酶标记兔二抗 (1: 1000), 室温摇床孵育 2 h; Washing Buffer 漂洗 3 次 \times 5 min, 加入 NBT/BCIP 显色液, 待反应达到要求后, 流水洗涤终止反应。所得条带光密度分析, 统计分析数据。

5. 组织学观察

大鼠 1% 戊巴比妥钠腹腔注射 (40 mg/kg), 打开胸腔, 拨开心包膜, 暴露心脏, 经左心室灌注冰冷生理盐水 300 ml, 接着使用 4% 多聚甲醛 400 ml 灌注。取 L₃₋₅ DRG 先置 4% 多聚甲醛后固定 2 h, 后放入 30% 蔗糖溶液, 待其在蔗糖溶液沉底。沉底后冰冻切片, 将沉底组织用包埋剂固定于冻台, 冰冻横断切片。DRG 片厚 14 μ m, 切片连续置于明胶玻片上。切好的片子, 晾片过夜, 0.01 mol/L 的 PBS 漂洗 3 次。5% 驴血清封闭 2 h 后, 入一抗 Anti-Nav1.7(1:200) 孵育。一抗 4 °C 孵育 24 h。PBS 漂洗 3 次, 入二抗 Alexa Fluor 488 (donkey anti-rabbit IgG, 1:200), 室温孵育 2 h。PBS 漂洗 3 次后封片剂封片。FV 1000 共聚焦显微镜采集图像, 统计分析数据。Control 组执行同样流程。阴性对照实验中, 用 PBS 代替一抗或者二抗, 统计分析数据。Control 组执行同样流程。

6. 统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计软件对数据进行处理, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示, 组内比较采用配对 *t* 检验, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 行为学结果

为探讨利鲁唑 (riluzole) 对 DNP 大鼠糖尿病神经病理痛的影响, 我们在 STZ 注射前 1 d 及注射后 3、7、10、14、21、28 d 测定 PWMT 和 PWTL 的变化, 以及 10% DMSO 组和利鲁唑组于 STZ 注射 15 d 起分别腹腔注射 10% DMSO 或利鲁唑 4 mg/kg, 1 次/d, 连续 7 d, 于 21、28 测定 PWMT 和 PWTL。结果显示, 与基础痛阈比较, Control 组各时点 PWMT 和 PWTL 比较, 差异无统计学意义, DNP 组、DMSO 组和 riluzole 组随着时程的延长, PWMT 降低, PWTL 缩短, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 C 组比较, DNP 组、DMSO 组和 riluzole 组 PWMT 降低, PWTL 缩短, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 与 DNP 组比较, riluzole 组 PWMT 升高, PWTL 延长, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), DMSO 组差异无统计学意义 (见图 1)。

2. Western blot 与形态学结果

为进一步探讨利鲁唑减轻 DNP 大鼠糖尿病神经病理痛的分子机制, 我们检测河豚毒素敏感性钠通道 Nav 1.7 在大鼠 DRG 神经元的表达。我们选择 DNP 大鼠链脲佐菌素注射 21 d 时间点, Western blot 结果显示, 与 C 组相比较, DNP 大鼠 DRG 中, Nav 1.7 表达显著增加 ($P < 0.05$), 详见图 2。同样, 免疫荧光显示, DNP 模型大鼠的 DRG 神经元中的 Nav1.7 蛋白明显增加 ($P < 0.05$), 详见图 3。与 DMSO 组相比较, Western blot 与形态学结果均显示, riluzole 组 Nav 1.7 表达明显减少 ($P < 0.05$),

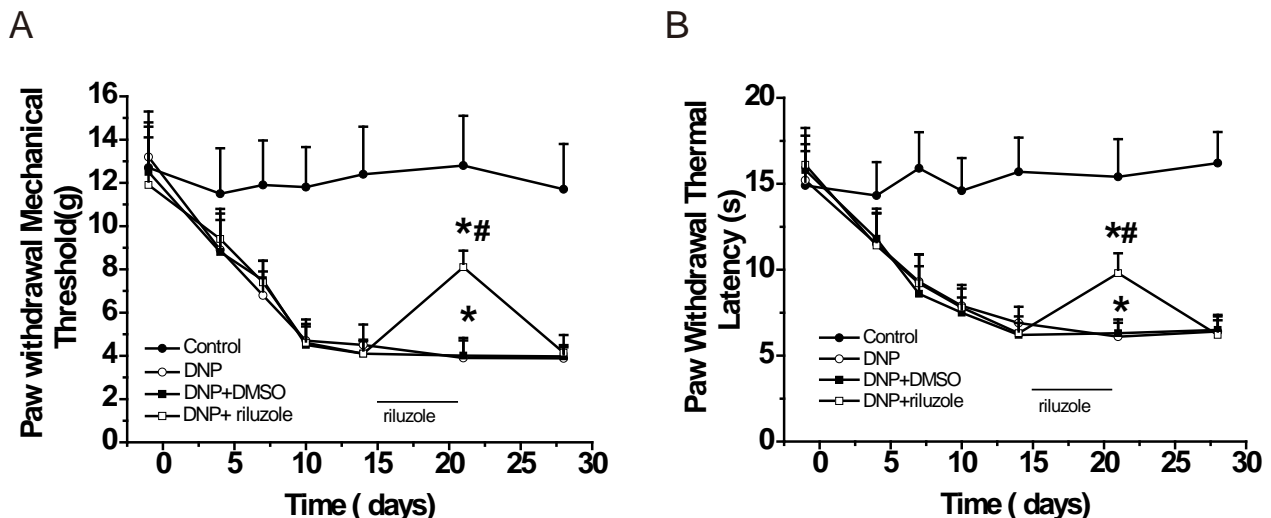


图 1 利鲁唑对 DNP 大鼠各时点 PWMT (A) 和 PWTL (B) 的影响。* $P < 0.05$, 与对照组相比较; # $P < 0.05$, 与 DNP+DMSO 组比较
Fig.1 The effects of riluzole on PWMT and PWTL in DNP rats.* $P < 0.05$, vs control; # $P < 0.05$, vs DNP+DMSO

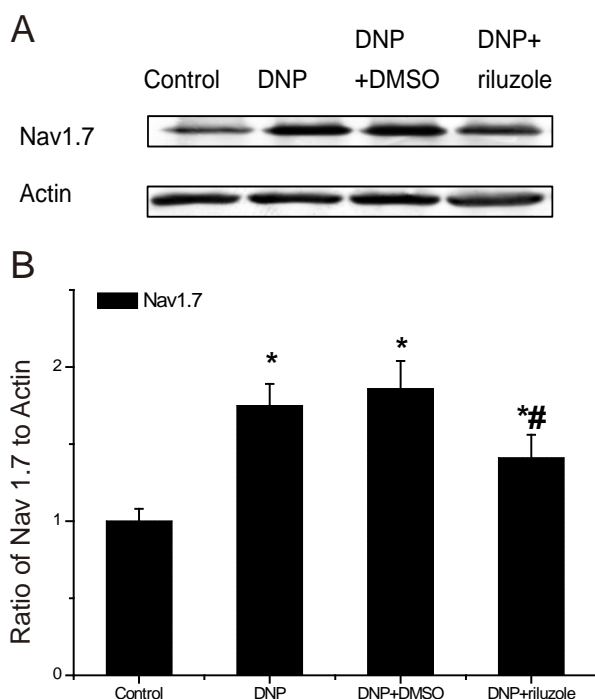


图2 Western blot 结果显示四组大鼠 DRG 神经元 Nav 1.7 表达的变化。* $P < 0.05$, 与对照组相比较; # $P < 0.05$, 与 DNP+DMSO 组比较

Fig.2 The changes of Nav1.7 expression in DRG by western blot in control, DNP, DNP+DMSO and DNP+riluzole groups. * $P < 0.05$, vs control; # $P < 0.05$, vs DNP+DMSO

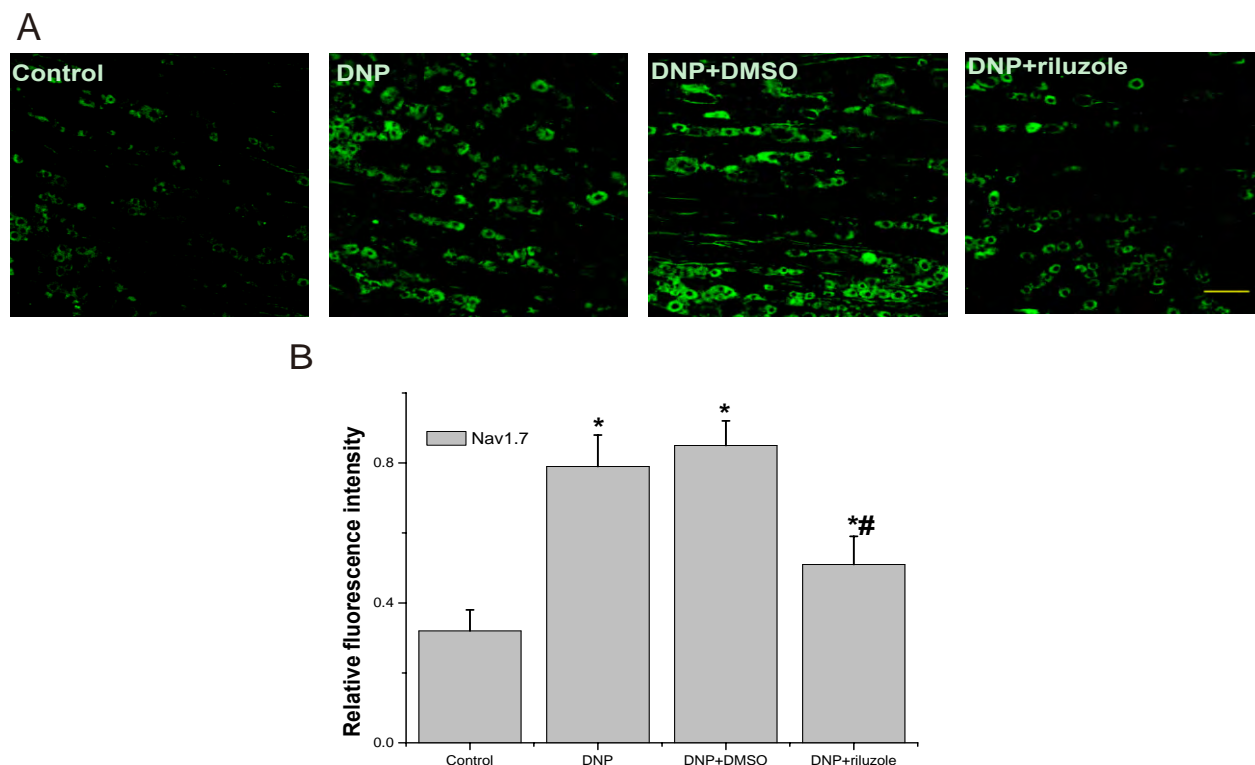


图3 形态学结果显示四组大鼠 DRG 神经元 Nav1.7 表达的变化。* $P < 0.05$, 与对照组相比较; # $P < 0.05$, 与 DNP+DMSO 组比较。scale bar = 100 μ m

Fig.3 The changes of Nav1.7 expression in DRG in control, DNP, DNP+DMSO and DNP+riluzole groups by immunofluorescence. * $P < 0.05$, vs control; # $P < 0.05$, vs DNP+DMSO; scale bar = 100 μ m

而 DNP 组与 DMSO 组相比较, Nav 1.7 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

讨 论

Riluzole 是一种苯噻唑类化合物, 为一种谷氨酸拮抗剂, 广泛用于治疗神经损伤及退行性疾病均有疗效^[4]。本研究选择利鲁唑进行实验, 结果表明, 给予利鲁唑后 DNP 大鼠痛阈明显升高, 表明利鲁唑减轻了大鼠 DNP。

在糖尿病神经病理痛大鼠, 神经元的兴奋性在糖尿病神经病理痛的发生发展中起重要作用, 持续钠电流 (Persistent sodium current, INaP) 在中枢神经元中主要参与神经元兴奋性及节律的产生^[10,11]。研究^[4]表明利鲁唑可以抑制慢性压迫模型 (chronic compression of dorsal root ganglion, CCD) 大鼠 (dorsal root ganglion, DRG) 神经元的 INaP, 同时, 有研究^[5]证实 Nav1.7 通道电流属于 (tetrodotoxin-sensitive, TTX-S) 通道电流, 是 INaP 电流的主要组成部分。Hong^[6]和笔者实验结果均发现 Nav 1.7 是伤害性感受器兴奋性增加的关键因素。在糖尿病神经病理性疼痛大鼠 DRG 神经元, Nav 1.7 表达增加,

提示可能是 DRG 神经元兴奋性大幅度提高的原因。本研究结果表明,与对照组比较,利鲁唑组 Nav 1.7 表达增加下调,说明腹腔注射利鲁唑减轻糖尿病神经病理性痛的机制与抑制 DRG 神经元 Nav 1.7 表达的表达有关。研究^[4]表明,利鲁唑可以显著降低 DRG 神经元的 INaP,说明阻断 INaP 可能是 riluzole 抑制 SMPO (subthreshold membrane potential oscillation SMPO),进而抑制异位放电的离子通道机制之一。Nav 1.7 离子通道电流属于 TTX-S 敏感的持续钠电流的主要成分。提示利鲁唑可能通过抑制 Nav 1.7 通道蛋白的表达上调,使 DRG 神经元的兴奋性降低,从而减轻糖尿病神经病理性痛。综上所述,腹腔注射利鲁唑可通过抑制大鼠 DRG 神经元 Nav 1.7 通道蛋白的表达减轻糖尿病神经病理性痛。本研究结果表明,大鼠皮下注射 STZ 可以诱导 DNP 模型,Nav 1.7 通道在 DNP 大鼠 DRG 神经元兴奋性增高和维持中起着重要作用。所以本研究观察利鲁唑对 DNP 的镇痛效果外,进一步探讨其对 Nav 1.7 表达的影响,探讨其镇痛作用机制,具有完善工作基础和可行性。

综上所述,本实验不仅是利鲁唑药理作用机制的完善,同时奠定利鲁唑治疗糖尿病神经病理性痛研究基础,但 Nav 1.7 通道及与其有关的 Nav 1.3、Nav 1.5 以及 ERK MAPK 等通路在 DNP 慢性痛觉发生发展中的作用底物还有待于明确,利鲁唑对其产生何种作用尚不明确,所以本研究仅作为初步研究,利鲁唑对其的影响需要进一步的深入研究。

参 考 文 献

- [1] Messinger RB, Naik AK, Jagodic MM, *et al.* In vivo silencing of the Ca (v) 3.2 T-type calcium channels in sensory neurons alleviates hyperalgesia in rats with streptozocin-induced diabetic neuropathy. *Pain*, 2009, 145: 184 ~ 195.
- [2] Harati Y. Diabetic neuropathies: unanswered questions. *Neurol Clin*, 2007, 25: 303 ~ 317.
- [3] Argoff CE, Cole BE, Fishbain DA, *et al.* Diabetic peripheral neuropathic pain: clinical and quality-of-life issues. *Mayo Clin Proc*, 2006, 81: S3 ~ S11.
- [4] Xie RG, Zheng DW, Xing JL, *et al.* Blockade of persistent sodium currents contributes to the riluzole-induced inhibition of spontaneous activity and oscillations in injured DRG neurons. *PLoS One*, 2011, 6: e18681.
- [5] Sun W, Miao B, Wang XC, *et al.* Reduced conduction failure of the main axon of polymodal nociceptive C-fibres contributes to painful diabetic neuropathy in rats. *Brain*, 2012, 135: 359 ~ 375.
- [6] Hong S, Morrow TJ, Paulson PE, *et al.* Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in tetrodotoxin-sensitive and resistant sodium channels in dorsal root ganglion neurons in the rat. *J Biol Chem*, 2004, 279: 29341 ~ 29350.
- [7] Sung B, Lim G, Mao J. Altered expression and uptake activity of spinal glutamate transporters after nerve injury contribute to the pathogenesis of neuropathic pain in rats. *J Neurosci*, 2003, 23: 2899 ~ 2910.
- [8] Hargreaves K, Dubner R, Brown F, *et al.* A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, 1988, 32: 77 ~ 88.
- [9] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, *et al.* Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*, 1994, 53: 55 ~ 63.
- [10] Pieri M, Carunchio I, Curcio L, *et al.* Increased persistent sodium current determines cortical hyperexcitability in a genetic model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol*, 2009, 215: 368 ~ 379.
- [11] Tazerart S, Vinay L, Brocard F. The persistent sodium current generates pacemaker activities in the central pattern generator for locomotion and regulates the locomotor rhythm. *J Neurosci*, 2008, 28: 8577 ~ 8589.

· 消 息 ·

《实用疼痛学》 出版发行

由刘延青、崔健君教授主编的《实用疼痛学》已于 2013 年 9 月由人民卫生出版社出版发行。本书由临床一线疼痛相关学科的专家教授们撰写而成,他们在各自颇有专长的领域撰写了精彩的内容,旨在为疼痛科医师以及骨科、麻醉科、神经内科、神经外科、肿瘤科、风湿免疫科、康复科和所有从事疼痛诊疗的医务工作者、提供一本可供选读、层次分明、内容翔实、图文并茂的实用型大型参考书。

购书联系方式: <http://www.pmph.com> 在线购书。购书热线: 010-59787592