

骨癌痛大鼠脊髓背角 Nogo-A 及其受体 NgR1 表达的变化

潘昱辰 王存金 刘绪宏

225003 扬州, 武警江苏总队医院内一科(潘昱辰), 神经内科(刘绪宏); 225001 扬州, 江苏省苏北人民医院麻醉科 扬州大学临床医学院(王存金)

通信作者: 王存金, Email: banma.1980@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2018.02.002

【摘要】 目的 观察骨癌痛大鼠脊髓背角 Nogo-A 及其受体 NgR1 表达的变化。方法 雌性未交配 SD 大鼠 60 只, 体重 160 ~ 200 g, 采用随机数字表法将其分为两组($n=30$): 假手术组(S组)和骨癌痛组(BCP组)。BCP组于左侧胫骨骨髓腔内注射 5 μ l Walker256 乳腺癌细胞制备骨癌痛模型, S组左侧胫骨骨髓腔内注射生理盐水 5 μ l。选用 von Frey 纤维丝检测各组大鼠造模前 1 d 及造模后 3、7、14、21 d 机械缩足阈值(MWT), 评价疼痛行为学变化。于造模后 7、14、21 d 痛阈测定后取大鼠 L 4~5 脊髓背角, 采用 Western Blot 法测定 Nogo-A 及其受体 NgR1 的表达。结果 与 S 组比较, BCP 组肿瘤细胞接种后第 7 天 MWT $[(3.63 \pm 1.61)g]$ 、第 14 天 MWT $[(2.53 \pm 1.39)g]$ 、第 21 天 MWT $[(2.40 \pm 1.16)g]$ 降低($P < 0.05$); 与 S 组比较, BCP 组大鼠术后 7、14、21 d 脊髓背角 Nogo-A 及其受体 NgR1 表达上调($P < 0.05$)。结论 脊髓背角 Nogo-A 及其受体 NgR1 可能参与了骨癌痛机械痛敏的形成。

【关键词】 骨癌痛; 脊髓背角; Nogo-A; NgR1

基金项目: 国家自然科学基金项目(81500947); 江苏省青年医学重点人才项目(QNRC2016338)

Changes in expression of Nogo-A and its receptor NgR1 in the spinal dorsal horn in a rat model of tibial bone cancer pain Pan Yuchen, Wang Cunjin, Liu Xuhong

Department of Internal medicine I, Jiangsu Provincial Corps Hospital, Chinese People's Armed Police Force, Yangzhou 225003, China(Pan YC); Department of Anesthesiology, Subei People's Hospital of Jiangsu Province, Clinical Medical College of Yangzhou University, Yangzhou 225001, China(Wang CJ); Department of Neurology, Jiangsu Provincial Corps Hospital, Chinese People's Armed Police Force, Yangzhou 225003, China(Liu XH)

Corresponding author: Wang Cunjin, Email: banma.1980@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression of Nogo-A and its receptor NgR1 in the spinal dorsal horn in a rat model of tibial bone cancer pain. **Methods** A total of 60 female non-copulatory Sprague-Dawley (SD) rats weighting 160-200 g were randomly divided into two groups ($n=30$); sham operation group (Group S) and bone cancer pain group (Group BCP). Group BCP received injection of 5 μ l Walker-256 breast cancer cells in pulp cavity of left side of tibia, and Group S received injection of 5 μ l normal saline. The Mechanical Withdrawal Threshold (MWT) of rats in each group were measured using von Frey filaments to assess pain behavioral changes on 1d before operation and 3, 7, 14 and 21 d after operation. The rats were then sacrificed and L 4~5 segments of the spinal cord were removed for determination for Nogo-A and its receptor NgR1 expression in spinal dorsal horn by Western Blot after pain threshold measurement on 7, 14 and 21 d after operation. **Results** Compared with Group S, the MWT was significantly decreased at 7 d MWT $[(3.63 \pm 1.61)g]$, 14 d MWT $[(2.53 \pm 1.39)g]$ and 21 d MWT $[(2.40 \pm 1.16)g]$ in Group BCP ($P < 0.05$). Compared with Group S, the expression of Nogo-A and its receptor NgR1 was significantly increased at 7, 14 and 21 d in Group BCP ($P < 0.05$). **Conclusions** Nogo-A and its receptor NgR1 in the spinal dorsal horn may involve in the development of tibial bone cancer pain.

【Key words】 Bone cancer pain; Spinal dorsal horn; Nogo-A; NgR1

Fund programs: National Natural Science Foundation Project (81500947); Key Youth Medical Personnel Project of Jiangsu Province (QNRC2016338)

癌痛是临床晚期癌症患者常并发的一种难以控制的慢性、持续性疼痛,表现为自发痛、触诱发痛和痛觉过敏,严重影响患者的生活质量。目前针对骨癌痛动物模型的研究认为,疼痛发生的机制主要是在肿瘤生长过程中肿瘤细胞释放的物质和肿瘤本身压迫等原因引起的神经损伤,造成初级感觉神经元敏化,从而出现持续痛和痛觉超敏^[1]。如上所述神经损伤引起的神经病理痛是产生骨癌痛的重要机制之一。Nogo 最早是在脊髓中发现的一种抑制轴突生长的蛋白质。Nogo-A 是 Nogo 最主要的形式,是一种髓鞘相关轴突生长抑制因子,由少突胶质细胞和一些神经元产生^[2-4]。神经损伤后诱导神经元轴突的再生和重塑在治疗神经病理性疼痛中具有重要意义,相反 Nogo-A 抑制轴突生长的作用可能参与了神经损伤后疼痛的发生和维持^[5-6]。研究发现,Nogo-A 蛋白在外周神经损伤诱发的神经病理性疼痛大鼠脊髓背角表达上调^[7],随后发现 Nogo-A 在炎症痛的痛觉敏化过程中发挥重要作用,在脑内与降钙素基因相关肽(CGRP)和 P 物质(SP)等参与伤害性反应的调节^[8]。鉴于此,本研究拟通过观察骨癌痛大鼠脊髓背角 Nogo-A 及其受体表达的变化,进而评价其在胫骨癌痛(BCP)中的作用。

材料与方 法

1. 实验动物及分组:健康雌性未交配 Sprague-Dawley(SD)大鼠 60 只,体重 160~200 g,由扬州大学实验动物中心提供,饲养于空气过滤系统,自由进食、饮水。采用随机数字表法将实验大鼠分为两组:假手术组(S组)和骨癌痛组(BCP组),各 30 只。

2. 方法:(1)BCP 模型制备:参照文献^[5]制备 BCP 模型。在无菌条件下将 Walker256 乳腺癌细胞(上海生物医学工程研究所提供)0.66 ml(细胞浓度为 $2 \times 10^6/\text{ml}$)接种至雌性未交配 SD 大鼠腹腔内,7~10 d 出现大量腹水。备皮、局部消毒后从腹腔抽取 10 ml 腹水,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 1 ml 生理盐水重悬,洗涤沉淀后再次 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清获取沉淀,用生理盐水稀释至所需浓度($1 \times 10^5/\text{ml}$)制备成肿瘤细胞悬液,置于冰盒内备用。大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛(40 mg/kg)麻醉后,在左侧胫骨中上 1/3 处暴露胫骨骨面,使用 10 μl 微量注射器刺入骨髓腔内,BCP 组注入 5 μl 肿瘤细胞悬液,S 组注入等体积生理盐水。针孔使用无菌玻璃子体封闭后缝合伤口。(2)机械缩足阈值(mechanical withdrawal threshold, MWT)测定:在安静恒温的环境中,将一

有机玻璃箱(26 cm \times 20 cm \times 14 cm)置于金属筛网上,将造模后大鼠逐一放入箱中,待大鼠在有机玻璃箱中适应 30 min 后处于静止时,用 von Frey 细丝(Stoehing 公司,美国)垂直刺激大鼠手术侧后肢足底中部,大鼠出现抬足或舔足行为视为阳性反应,否则为阴性反应。每只大鼠进入箱中试验后用酒精喷洒箱体去除气味,再放入下一只进行实验。参照文献^[6]中介绍的方法计算大鼠 MWT。测各组大鼠造模前 1 d 及造模后 3、7、14、21 d MWT。(3)Western blot 法检测 Nogo-A 及其受体 NgR1 蛋白的表达:随机取 S 组造模和 BCP 组造模后 7、14、21 d 各 6 只大鼠处死后,取左侧 L4~L5 脊髓背角组织,立即置于液氮中,后转移至 -80°C 冰箱内保存。采用 Western blot 法测定脊髓背角 Nogo-A 及其受体 NgR1 蛋白表达,组织在细胞裂解缓冲液中匀浆,分离提取总蛋白溶液。初步测定总蛋白浓度后,以 75 μg 蛋白在 10%SDS-PAGE 胶上电泳分离后转印至 PVDF 膜上。用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h,加入用封闭液稀释的一抗(Nogo-A 抗体,1:1 000, BD 公司,美国;NgR1 抗体,1:1 000, BD 公司,美国; β -actin 抗体,1:1 000, Cell Signaling 公司,美国),4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜。洗膜 5 min \times 3 次,加入二抗,室温孵育 2 h,用 NBT/BCIP 检测反应条带,半定量分析。影像分析仪(ESCAN)进行条带扫描,运用 Adobe Photoshop 软件(Adobe, San Jose, CA)进行条带灰度值分析。以 β -actin 为内参,以各组的积分吸光度值(integrated absorbance, IA)与 β -actin 的 IA 的比值表示 Nogo-A 及其受体 NgR1 蛋白表达水平。

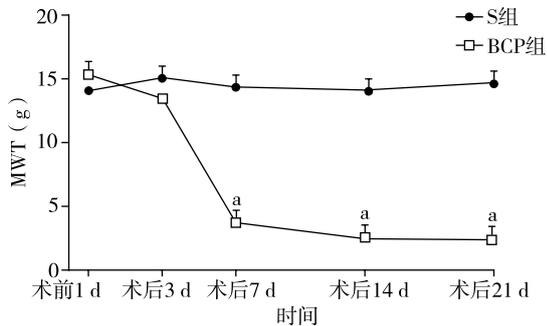
3. 统计学方法:采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,Western blot 各组间灰度值比较采用单因素方差分析,两组间不同时间点疼痛阈值比较采用双因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. BCP 大鼠 MWT 的变化:见图 1。两组大鼠肿瘤细胞接种前 MWT 比较差异无统计学意义($F=0.86, P > 0.05$);与 S 组比较,BCP 组肿瘤细胞接种后 7 d($F=580.3$)、14 d($F=710.6$)、21 d($F=715.9$) MWT 明显降低($P < 0.01$);S 组各时间点 MWT 差异无统计学意义($F=0.56, P > 0.05$)。

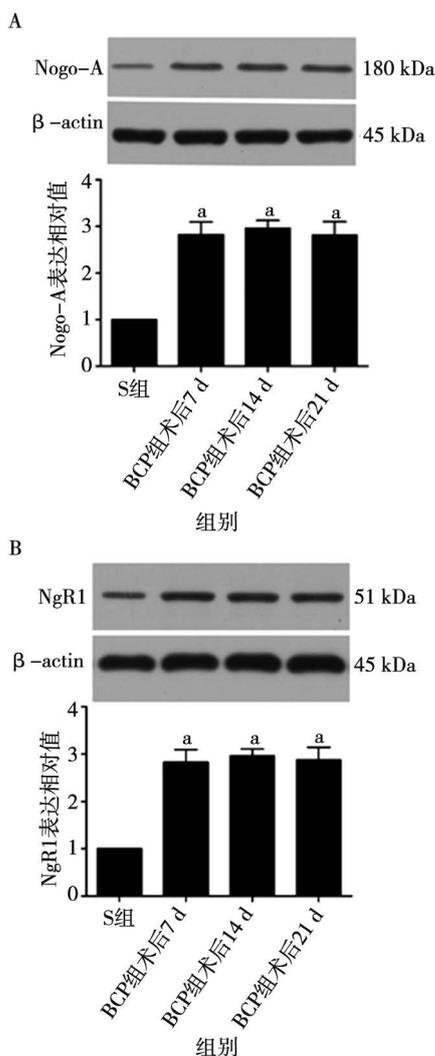
2. BCP 大鼠脊髓背角 Nogo-A、NgR1 蛋白表达水平的变化:见图 2。与 S 组比较,BCP 组大鼠脊髓背角 Nogo-A 蛋白表达水平在肿瘤细胞接种后 7 d 开始

升高一直持续到术后 21 d ($F=15.94, P < 0.05$), NgR1 表达水平升高趋势与之相同 ($F=32.55, P < 0.05$)。



注: ^a $P < 0.01$

图1 肿瘤细胞接种后不同时间点MWT比较



注: A, Nogo-A 表达水平比较; B, NgR1 表达水平比较; ^a $P < 0.01$

图2 肿瘤细胞接种后不同时间点脊髓背角Nogo-A、NgR1的表达情况

讨 论

根据参考文献 [5], 本研究采用胫骨骨髓腔内注射 Walker256 细胞的方法制备大鼠胫骨 BCP 模型,

模拟临床骨转移后导致的癌性疼痛。本研究结果显示, 与 S 组比较, BCP 组肿瘤细胞接种后 7 d、14 d、21 d MWT 明显降低提示疼痛模型制备成功。

Nogo 是近些年新发现的一种存在于中枢神经系统的轴突生长抑制物。Nogo 基因通过不同的启动子表达 Nogo-A、Nogo-B 和 Nogo-C3 种同分异构体。Nogo-A 是其中最主要的形式, 并且主要表达于中枢神经系统。其在中枢神经系统中由少突胶质细胞和一些神经元产生, 存在于髓鞘的内外环和少突胶质细胞的表面^[9]。目前有研究表明通过阻断 Nogo-A 蛋白与其受体的特异性结合, 可以封闭 Nogo-A 蛋白对损伤的中枢神经系统再生的抑制作用, 达到促进中枢神经再生的目的, 使中枢神经系统损伤得到痊愈。

以往的研究中主要针对脑、脊髓直接病理性损伤后观察 Nogo-A 在中枢的表达情况及其分布特点, 进一步验证其在各种中枢神经损伤模型中的轴突生长抑制作用^[10-11]。除此之外, 近年来 Nogo-A 及其受体在脑、脊髓与痛觉调制有关的区域也被发现, 提示它可能与中枢神经系统痛觉的调制过程密切相关, 但该领域的研究目前较少。许丹阳等^[7]研究发现, 在福尔马林致炎性痛大鼠模型中, 脊髓背角 Nogo-A 蛋白表达上调, 推测其机制可能与外周炎症发展引起的脊髓背角中枢敏化有关。癌痛是一种机制复杂的慢性疼痛, 在癌痛的形成过程中炎症机制发挥了重要作用。其机制具体为癌痛发生过程中脊髓组织中炎症反应增强, 炎症细胞因子表达增加会使脊髓背角胶质细胞激活, 释放兴奋性氨基酸、三磷酸腺苷等神经活性物质, 这些神经化学改变最终导致脊髓背角发生异常兴奋性神经损伤及神经可塑性改变^[12-14]。在癌痛晚期, 随着肿瘤生长引起的神经压迫、损伤外周神经, 从而影响感觉神经元, 造成初级感觉神经元的敏化, 出现持续性疼痛、触诱发痛及痛觉过敏。有研究发现, 在骨癌痛形成的过程中, 胫骨平台种植的癌细胞会不断侵犯股神经。股神经横断面免疫组织化学染色发现转录激活因子 3(ATF3) 阳性神经元数量增加, ATF3 作为一种受损神经元的标记物, ATF3 的表达增加表明神经组织受损。除此之外, 他们发现感觉传入神经组织中 CGRP 和神经丝蛋白-200(NF200) 表达降低, 更加说明了负责感觉传入的神经元随着肿瘤侵犯性生长发生严重受损^[15]。因此, 抑制这种神经损伤可能会缓解骨癌痛的发生发展。由于以往的研究发现 Nogo-A 及其受体系统能够抑制中枢神经系统再生, 那么在

上述骨肿瘤造成的神经损伤的过程中, Nogo-A 及其受体系统是否发挥作用? 基于以上研究进展, 在本研究中我们运用 Western blot 的方法观察骨癌痛大鼠脊髓背角 Nogo-A 及其受体表达的变化情况, 进而预测其在 BCP 发生、发展过程中的可能作用。实验结果表明, BCP 组大鼠脊髓背角 Nogo-A 及其受体 NgR1 蛋白表达水平在肿瘤细胞接种后 7d 开始升高一直持续到术后 21 d。这说明脊髓背角 Nogo-A 及其受体可能在骨癌痛大鼠痛觉过敏中发挥关键分子效应。

综上所述, BCP 大鼠脊髓背角 Nogo-A/NgR1 系统可能参与介导 BCP 大鼠机械痛觉过敏的产生, 特异性阻断其表达可能是治疗癌性疼痛的一种方法。

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 构思与设计、论文撰写、文献调研与整理为潘昱辰, 数据收集及分析为潘昱辰、刘绪宏, 论文修订为王存金

参 考 文 献

- [1] von MR, Costa L, Ripamonti CI, et al. Improving quality of life in patients with advanced cancer: Targeting metastatic bone pain[J]. *Eur J Cancer*, 2017, 71: 80-94. DOI: 10.1016/j.ejca.2016.10.021.
- [2] Lei HW, Wang JY, Dang QJ, et al. Neuropsychiatric involvement in lupus is associated with the Nogo-a/NgR1 pathway [J]. *J Neuroimmunol*, 2017, 311: 22-28. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2017.06.008.
- [3] Ineichen BV, Kapitzka S, Bleul C, et al. Nogo-A antibodies enhance axonal repair and remyelination in neuro-inflammatory and demyelinating pathology [J]. *Acta Neuropathol*, 2017, 134(3): 423-440. DOI: 10.1007/s00401-017-1745-3.
- [4] Zhang ZW, Jiang JJ, Luan MC, et al. Nogo-A antibody treatment enhances neuron recovery after sciatic nerve transection in rats [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(8): 1780-1786.
- [5] Gonzenbach RR, Gasser P, Zörner B, et al. Nogo-A antibodies and training reduce muscle spasms in spinal cord-injured rats [J]. *Ann Neurol*, 2010, 68(1): 48-57. DOI: 10.1002/ana.22009.
- [6] Maier IC, Ichiyama RM, Courtine G, et al. Differential effects of anti-Nogo-A antibody treatment and treadmill training in rats with incomplete spinal cord injury [J]. *Brain*, 2009, 132(Pt 6): 1426-1440. DOI: 10.1093/brain/awp085.
- [7] 许丹阳, 陈雪梅, 唐莹, 等. 炎性痛大鼠背根神经节和脊髓背角 Nogo-A 蛋白表达的变化 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2013, 33(1): 69-71. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1416.2013.01.018.
- [8] Xu DY, Chen XM, Tang Y, et al. Changes in expression of Nogo-A protein in dorsal root ganglion and spinal dorsal horn in a rat model of inflammatory pain [J]. *Chin J Anesthesiol*, 2013, 33(1): 69-71.
- [9] Li N, Fang CY, Meng D, et al. Changes of neurite outgrowth inhibitor-A and calcitonin gene-related peptide mRNA expression in periaqueductal gray of hindpaw inflammatory rats induced by formaldehyde [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2013, 27(4): 616-621. DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2013.04.002.
- [10] Willi R, Aloy EM, Yee BK, et al. Behavioral characterization of mice lacking the neurite outgrowth inhibitor Nogo-A [J]. *Genes Brain Behav*, 2009, 8(2): 181-192. DOI: 10.1111/j.1601-183X.2008.00460.x.
- [11] Chen H, Cao HL, Chen SW, et al. Neuroglobin and Nogo-a as biomarkers for the severity and prognosis of traumatic brain injury [J]. *Biomarkers*, 2015, 20(6-7): 495-501. DOI: 10.3109/1354750X.2015.1094138.
- [12] Lu C, Liu Y, Sun B, et al. Intrathecal Injection of JWH-015 Attenuates Bone Cancer Pain Via Time-Dependent Modification of Pro-inflammatory Cytokines Expression and Astrocytes Activity in Spinal Cord [J]. *Inflammation*, 2015, 38(5): 1880-1890. DOI: 10.1007/s10753-015-0168-3.
- [13] Yang Y, Li H, Li TT, et al. Delayed activation of spinal microglia contributes to the maintenance of bone cancer pain in female Wistar rats via P2X7 receptor and IL-18 [J]. *J Neurosci*, 2015, 35(20): 7950-7963. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5250-14.2015.
- [14] Fang D, Kong LY, Cai J, et al. Interleukin-6-mediated functional upregulation of TRPV1 receptors in dorsal root ganglion neurons through the activation of JAK/PI3K signaling pathway: roles in the development of bone cancer pain in a rat model [J]. *Pain*, 2015, 156(6): 1124-1144. DOI: 10.1097/j.pain.000000000000158.
- [15] Peters CM, Ghilardi JR, Keyser CP, et al. Tumor-induced injury of primary afferent sensory nerve fibers in bone cancer pain [J]. *Exp Neurol*, 2005, 193(1): 85-100. DOI: 10.1016/j.expneurol.2004.11.028.

(收稿日期: 2017-12-18)

(本文编辑: 赵静姝)