

紫杉醇诱导大鼠神经病理性疼痛模型的建立^①

银联飞, 韦婷婷, 黄容容, 杨璨瑜, 苏盈, 韦山, 沈让, 宾晓芸^②

(右江民族医学院, 广西 百色 533000 E-mail: 644592440@qq.com)

摘要: **目的** 建立紫杉醇致大鼠神经病理性疼痛模型。**方法** 40 只成年雄性 SD 大鼠随机分为 4 组, 每组 10 例, 每天测定大鼠的机械缩足反射阈值(MWT), 隔天腹腔注射紫杉醇, 剂量分别为 0、0.5、1.0、2.0 mg/(kg·d), 共 10 次, 第 20 d 显微镜观察神经结构。**结果** 腹腔注射紫杉醇 2.0 mg/kg 组大鼠最早在第 3 次注射后(第 6 d)出现机械痛敏, 并在第 4 次注射后(第 8 d)机械痛阈降到最低。腹腔注射紫杉醇 2.0 mg/kg 组大鼠的坐骨神经髓鞘肿胀, 部分髓鞘空泡变, 部分许旺细胞结构破坏, 许旺细胞核增多。**结论** 间断重复腹腔注射 2.0 mg/(kg·d) 紫杉醇可以成功建立 SD 大鼠外周神经病理性疼痛模型。

关键词: 紫杉醇; 神经病理性疼痛; 动物模型; 大鼠

中图分类号: R741.02

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2015)03-0357-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2015.03.004

Establishing a rat neuropathic pain mode induced by Paclitaxel

Yin Lianfei, Wei Tingting, Huang Rongrong, Yang Canyu, Su Ying, Wei Shan, Shen Rang, Bin Xiaoyun

(Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To establish a rat model of neuropathic pain induced by Paclitaxel. **Methods** Forty Sprague-Dawley adult male rats were randomly divided into 4 groups ($n=10$ each group). Paclitaxel [0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/(kg·d)] or vehicle was administered intraperitoneally every 2 days respectively until 10 injections had been given. Mechanical withdrawal threshold (MWT) of rats' hind paw were measured everyday. The microstructures of sciatic nerve were observed by using microscope on the 20th day after injection. **Results** Mechanical hyperalgesia of rats first appeared after the 3rd injection (on day 6) with 2.0 mg/kg Paclitaxel, then decreased to minimum after the 4th injection (on day 8). Rats of intraperitoneal injection with 2.0 mg/kg Paclitaxel group had sciatic nerve myelin swelling, parts of myelin showed vacuolar degeneration, parts of Schwann cell structures were destroyed, the number of Schwann cells was increased. **Conclusion** A SD rat peripheral neuropathy pain model induced by paclitaxel can be successively established by intraperitoneally injecting 2.0 mg/kg Paclitaxel with intermittent repetition.

Key words: Paclitaxel; neuropathic pain; animal model; rats

随着全球恶性肿瘤发病率的不断上升, 抗肿瘤药物的应用也日渐增多。紫杉醇(paclitaxel, Taxol)是一种从紫杉中提取的抗癌药物, 主要通过促进细胞内的微管蛋白发生聚合, 保持微管蛋白稳定, 抑制细胞的有丝分裂从而抑制肿瘤细胞的恶性增殖^[1], 广泛应用于实体瘤的治疗中。紫杉醇化疗后的两个严重不良反应是骨髓抑制和神经病理性疼痛。对于其骨髓抑制不良反应, 大多数患者通过给予粒细胞集落刺激因子能够有效抵抗中性粒细胞的减少。而紫杉醇所致的神经病理性疼痛主要表现为外周感觉性的痛觉超敏、灼痛、刺痛和麻木等症状, 此症状可持续至紫杉醇停药后数月甚至数年^[2], 是一种严重的难治性痛症, 基于对其机制认识的局限, 目前尚无特别有效的治疗措施。一些接受紫杉醇治疗的癌症病人甚至会因为严重的疼痛而不

得不中断治疗^[3]。因此紫杉醇的不良反应限制了化疗药物的使用, 影响肿瘤治疗效果和患者生存质量。本研究旨在探索构建紫杉醇诱导的大鼠神经病理性疼痛模型, 并评估其效果, 为阐明紫杉醇诱导的神经病理性疼痛的相关机制和相应药物的开发提供可靠的动物实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物 选择 40 只 SPF 级成年 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 雄性, 体重 200 g 左右, 由右江民族医学院实验动物中心提供, 室温 20~25 °C, 12 h 黑/白光照, 自由饮食。

1.2 动物分组及给药 随机将 40 只大鼠随机分为 4 组: 溶剂对照组(A 组)、紫杉醇 0.5 mg/kg 组(B 组), 紫杉醇 1.0 mg/kg 组(C 组), 紫杉醇 2.0 mg/kg 组(D

① 基金项目: 2014 年广西自然科学基金项目(2014GXNSFBA118154)

② 通讯作者, E-mail: bxy889@163.com

组), 每组 10 只。B、C、D 组注射相应剂量的紫杉醇(溶于 1 ml 生理盐水), A 组注射等体积的紫杉醇溶剂 DMSO(二甲基亚砷)(溶于 1 ml 生理盐水)。隔天注射, 共注射 10 次, 持续观察 20 d(首次注射为第 1 d)。紫杉醇注射液(paclitaxel, Taxol)和溶剂 DMSO(二甲基亚砷)均购于 Sigma Chemical 公司。

1.3 全身观察 每日测量大鼠体重, 观察大鼠的饮食、排泄、毛发、步态及活动等情况。

1.4 行为学测定 测定大鼠的机械缩足反射阈值(mechanical withdrawal threshold, MWT)。将大鼠置于透明的有机玻璃箱中, 底为 1 cm×1 cm 的铁丝网, 测定前使之适应 30 min, 以不同折力的 Von Frey 纤维刺激大鼠足底, 以大鼠出现缩足或舔足行为记为阳性反应, 否则为阴性反应。从 2 g 开始, 每个折力的 von Frey 纤维细丝均连续测定 10 次, 每次刺激间隔 30 s, up-down 法^[4]计算 50% 缩足反应阈值, 最大折力为 15 g, 大于此值时记为 15 g。所有大鼠给药前 2 d 测定基础痛阈, 之后每天测定 MWT 直至给药后第 20 d(停止给药后 1 d)。

1.5 组织学观察 给药后第 20 d, 每组取 5~6 只大鼠, 25% 乌拉坦(1 g/kg)深麻醉, 取大鼠双侧坐骨神经固定后, 石蜡包埋, 切片, 苏木精和伊红染色后, 光镜下观察。

1.6 统计学方法 使用 SPSS 18.0 统计软件, 数据采用重复测量方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠的一般情况 实验期间大鼠无死亡, 4 组大鼠均未出现脱毛、腹泻或运动失常等情况。给药前 4 组大鼠平均基础体重分别为(208.7±2.2)、(221.1±1.6)、(219.1±1.9)和(213.4±1.8) g, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。给药期间, 4 组大鼠体重均缓慢增长, 各组大鼠间平均体重差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 MWT 的测定 大鼠的后足 MWT 测量结果的显示, 给药前四组大鼠的基础痛阈相似, 后足平均 MWT 分别为(14.81±0.28)、(14.51±0.39)、(14.64±0.42)和(14.66±0.39) g, 差异无统计学意义($F = 0.427, P = 0.735 > 0.05$)。在实验过程的各观察时间点, 对照组大鼠的后肢 MWT 无明显变化($P > 0.05$)。D 组大鼠[紫杉醇 2.0 mg/(kg·d)]在第 3 次给药后 1 d(第 6 d), 后肢 MWT 与 A 组(对照组)相比差异有统计学意义($F = 0.126, P = 0.019 < 0.05$), 在第 4 次用药后 1 d(第 8 d), D 组大鼠后肢 MWT 降到最低点, 与 A 组(对照组)相比差异有统计学意义($F = 0.279, P = 0 < 0.01$), 并且基本稳定此数值左右直至第 20 d。B 组[紫杉醇 0.5 mg/(kg·d)]和 C 组大鼠[紫杉醇 1.0 mg/(kg·d)]都在第 5 次给药后 1 d(第 10 d), 后肢 MWT 与 A 组(对照组)相比差异有统计学意义($P < 0.05$), B 组大鼠后肢 MWT 则基本为此在该水平左右($F = 0.256, P = 0.012 < 0.01$), 而 C 组在第 15 d 之后与 A 组对比差异有统计学意义($F = 0.256, P = 0 < 0.01$), 见表 1。

表 1 各实验组各时间点大鼠 MWT 的变化 ($n = 10, \bar{x} \pm s, g$)

组别	时间(d)							
	1	3	6	8	10	15	18	20
A 组	14.81±0.28	14.64±0.24	14.60±0.57	14.63±0.41	14.54±0.69	14.92±0.42	14.13±0.58	14.29±0.64
B 组	14.51±0.39	13.46±0.35	12.01±0.54	10.52±0.67	9.35±0.47 ^a	9.21±0.44 ^a	9.08±0.56 ^a	9.14±0.68 ^a
C 组	14.64±0.42	12.27±0.62	10.38±0.38	9.57±0.35	8.03±0.51 ^a	7.95±0.41 ^b	7.88±0.61 ^b	7.90±0.37 ^b
D 组	14.66±0.39	10.71±0.26	8.38±0.42 ^a	7.32±0.52 ^b	7.35±0.36 ^b	7.34±0.56 ^b	7.38±0.38 ^b	7.35±0.45 ^b

注: 与 A 组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$

2.3 组织学观察 光镜下观察大鼠的坐骨神经显微结构, 与对照组相比, 可见紫杉醇处理组大鼠坐骨神经髓鞘肿胀, 部分髓鞘空泡变, 部分许旺细胞结构破坏, 许旺细胞核增多, 见图 1。

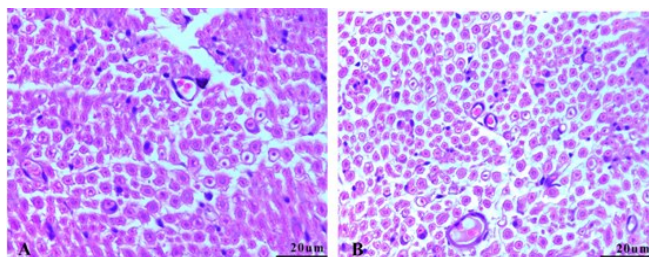


图 1 坐骨神经冠状切面结构, 紫杉醇 2.0 mg/kg(B)与对照组(A)比较(×400)

3 讨论

近年来, 医学分子生物学发展迅猛, 神经病理痛模型的建立也逐渐成熟, 如慢性坐骨神经缩窄损伤(chronic constriction injury of sciatic nerve, CCI)模型、脊神经结扎(spinal nerve ligation, SNL)模型, 坐骨神经分支损伤(spared nerve injury, SNI)模型, 以及糖尿病所致的神经病理痛模型等人们都进行了广泛的研究^[5], 但是国内对化疗药物引起的外周神经病理性疼痛模型的研究较少, 人们对紫杉醇引起的化疗痛的机制尚未研究透彻, 而且紫杉醇化疗痛对阿片类药物不敏感, 目前临床上缺乏有效方法来预防或减轻此种神经损害, 因此构建紫杉醇诱导的大鼠神经病理性疼痛模型, 为系统深入地研究其机制, 并寻求可靠的治疗方法, 设计有效的干预药物有着十分重要的意义。

本实验通过对大鼠重复间断地腹腔注射浓度分别

为 0.5、1.0、2.0 mg/(kg·d) 的紫杉醇观察到, 最早在第三次连续用药后(给药第 6 d), 剂量浓度为 2.0 mg/(kg·d) 的实验组中, 大鼠出现了机械痛敏, 在第 4 次给药后(用药第 8 d) 达到最小, 并且基本稳定在该水平。相对于本实验中注射紫杉醇剂量为 1.0 mg/(kg·d) 的大鼠, 2.0 mg/(kg·d) 剂量组的大鼠机械痛阈出现得更早, 更稳定。实验结果提示, 隔天腹腔注射 2.0 mg/(kg·d) 的紫杉醇建立稳定的致神经病理性疼痛模型。本研究的紫杉醇致痛敏最佳剂量低于 2000 年 Authier 等^[6] 的 32 mg/kg, 高于陈治军等^[7] 的 1.0 mg/(kg·d)。另外, 本研究隔天注射的频率高于 Authier 等^[6] 的一周一次, 而与陈治军等^[7]、Boyette 等^[8] 的剂量与注射频率相一致。另外, 本实验结果还提示, 重复间断腹腔注射 2.0 mg/(kg·d) 紫杉醇的实验组大鼠在用药 8 d 左右, 机械刺激疼痛阈值达到最低数值。

综合对注射紫杉醇后大鼠的机械阈值改变、组织学改变和一般情况观察与分析, 我们认为, 隔天腹腔注射 2.0 mg/(kg·d) 紫杉醇可以成功建立大鼠神经病理性疼痛模型, 表现为外周感觉神经的机械超敏, 且存在组织学的结构变化。用药 8 d 左右可以考虑作为下一阶段研究紫杉醇诱导的神经病理性疼痛机制的合理、有效时间段。本研究采用紫杉醇诱导的神经病理性疼痛动物模型构建方法简便可行, 成本不高, 神经病变确切, 可为紫杉醇诱导的神经病理性疼痛机制的研究, 开发治疗紫杉醇化疗痛的药物提供有价值的评价工具。

参考文献:

- [1] Ren K, Rouald Dubner. Neuron—glia crosstalk gets serious: role in pain hypersensitivity[J]. *Current Opinion in Anaesthesiology*, 2008, 21(5): 570—579.
 - [2] Kiya T, Kawamata T, Namiki A, et al. Role of satellite cell—derived l—serine in the dorsal root ganglion in paclitaxel—induced painful peripheral neuropathy[J]. *Neuroscience*, 2011, 174: 190—199.
 - [3] Kaplan JG, Einzig AI, Schumburg HH. Taxol causes permanent large fiber peripheral nerve dysfunction: a lesson for preventative strategies[J]. *J Neurooncol*, 1993, 16(2): 105—107.
 - [4] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw[J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1): 55—63.
 - [5] 毛庆祥, 杨天德. 神经病理性疼痛动物模型[J]. *中国医药指南*, 2008, 6(3): 13—14.
 - [6] Authier N, Gillet JP, Fialip J, et al. Description of a short—term taxol—induced nociceptive neuropathy in rats [J]. *Brain Res*, 2000, 887(2): 239—249.
 - [7] 陈治军, 田玉科, 罗放, 等. 紫杉醇致大鼠外周神经病理性疼痛模型的建立[J]. *华中科技大学学报: 医学版*, 2008, 37(6): 785—790.
 - [8] Boyette—Davis J, Xin W, Zhang H, et al. Intraepidermal nerve fiber loss corresponds to the development of taxol—induced hyperalgesia and can be prevented by treatment with minocycline[J]. *Pain*, 2011, 152(2): 308—313.
- 收稿日期: 2015—05—22; 修回日期: 2015—06—04
-
- (上接 354 页)
- [6] Bartley J. Vitamin D: emerging roles in infection and immunity[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2010, 8(12): 1359—1369.
 - [7] Miller J, Gallo RL. Vitamin D and innate immunity[J]. *Dermatol Ther*, 2010, 23(1): 13—22.
 - [8] 中华医学会儿科学分会呼吸学组, 中华儿科杂志编辑委员会. 儿童支气管哮喘诊断与防治指南[J]. *中华儿科杂志*, 2008, 46(10): 745—750.
 - [9] Brehm JM, Celedón JC, Soto—Quiros ME, et al. Serum vitamin D levels and markers of severity of childhood asthma in Costa Rica[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 179(9): 765—771.
 - [10] Brehm JM, Schuemann B, Fuhlbrigge AL, et al. Serum Vitamin D Levels and Severe Asthma Exacerbations in the Childhood Asthma Management Program Study[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 126(1): 52—58.
 - [11] Freishtat RJ, Iqbal SF, Pillai DK, et al. High Prevalence of Vitamin D Deficiency among Inner—City African American Youth with Asthma in Washington, DC[J]. *J Pediatr*, 2010, 156(6): 948—952.
 - [12] Sutherland ER, Goleva, Jackson LP, et al. Vitamin D Levels, Lung Function, and Steroid Response In Adult Asthma[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 181: 699—704.
 - [13] Erkkola M, Kaila M, Nwaru BI, et al. Maternal vitamin D intake during pregnancy is inversely associated with asthma and allergic rhinitis in 5—year—old children [J]. *Clin Exp Allergy*, 2009, 39(6): 875—882.
 - [14] 莫丽亚, 邓永超, 黄彩芝, 等. 哮喘儿童血清 25 羟维生素 D 与相关白介素水平分析[J]. *实用预防医学*, 2013, 20(11): 1291—1293.
 - [15] Augusto A, Liton J. Childhood asthma may be a consequence of vitamin D deficiency[J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2009, 9(3): 202—207.
 - [16] Baeke F, Korf H, Overbergh L, et al. Human T lymphocytes are direct targets of 1, 25—dihydroxyvitamin D₃ in the immune system[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010, 121(12): 221—227.
 - [17] 陈伟伟, 蔡栩栩, 田维敏, 等. RANTES 在哮喘大鼠肺组织中的表达及维生素 D 的干预作用[J]. *中国当代儿科杂志*, 2012, 14(11): 863—868.
- 收稿日期: 2015—04—17; 修回日期: 2015—05—13