

## 紫杉醇致神经病理性疼痛大鼠脊髓背角 GLT-1 的表达变化<sup>①</sup>

宾晓芸<sup>1</sup>, 韦耀东<sup>1</sup>, 黄俊<sup>2</sup>, 杨璨瑜<sup>3</sup>, 韦婷婷<sup>4</sup>, 黄蓉蓉<sup>5</sup>, 苏盈<sup>4</sup>, 沈让<sup>6</sup>, 银联飞<sup>1②</sup>

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

2. 右江民族医学院 2011 级医学检验技术本科, 广西 百色 533000;

3. 右江民族医学院 2011 级护理学本科, 广西 百色 533000;

4. 右江民族医学院 2012 级临床医学本科, 广西 百色 533000;

5. 右江民族医学院 2013 级护理学本科, 广西 百色 533000;

6. 右江民族医学院 2013 级医学检验技术本科, 广西 百色 533000)

**摘要:** **目的** 观察紫杉醇诱导的神经病理性大鼠脊髓背角谷氨酸转运体-1(GLT-1)的含量变化。**方法** 雄性 SD 大鼠 45 只, 随机分成正常对照组(A 组), 紫杉醇处理组(B 组)和紫杉醇溶剂组(C 组), A 组不作任何处理, B 组隔天注射 2 mg/1 000 g 体重的紫杉醇, C 组隔天注射与 B 组容积相等的紫杉醇溶剂二甲基亚砜。每天检测大鼠的机械缩足阈值(MWT)。注射的第 5 d、7 d、9 d 各组均处死 5 只大鼠, 取脊髓背角组织, 采用蛋白印迹方法检测各组大鼠 GLT-1 的表达。**结果** B 组大鼠的机械缩足阈值在注射第 6 d 时显著降低( $P < 0.05$ ), 并且明显低于 A、C 组( $P < 0.05$ )。A、C 两组的 MWT 值无变化。B 组大鼠 GLT-1 的表达在注射第 5 d 起明显低于 A、C 两组( $P < 0.05$ )。B 组大鼠的 GLT-1/ $\beta$ -actin 的比值与机械缩足阈值呈显著性正相关( $r = 0.820, P < 0.05$ )。**结论** 紫杉醇诱导的神经病理性疼痛大鼠机械痛敏明显增加, 脊髓背角 GLT-1 表达下调, GLT-1 可能参与了紫杉醇致神经病理性疼痛的发生。

**关键词:** 紫杉醇; 神经病理性疼痛; 谷氨酸转运体-1

**中图分类号:** R714.02 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2016)02-0136-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2016.02.003

### The variation of glutamate transporter-1 expression in spinal cord dorsal horns of paclitaxel induced neuropathic pain rats

Bin Xiaoyun<sup>1</sup>, Wei Yaodong<sup>1</sup>, Huang Jun<sup>2</sup>, Yang Canyu<sup>3</sup>, Wei Tingting<sup>4</sup>,  
Huang Rongrong<sup>5</sup>, Su Ying<sup>4</sup>, Shen Rang<sup>6</sup>, Yin Lianfei<sup>1</sup>

(1. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China E-mail: 644592440@qq.com; 2. Undergraduate Student of Grade 2011, College of Laboratory Medicine, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China; 3. Undergraduate Student of Grade 2011, College of Nursing, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China; 4. Undergraduate Student of Grade 2012, College of Clinical Medicine, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China; 5. Undergraduate Student of Grade 2013, College of Nursing, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China; 6. Undergraduate Student of Grade 2013, College of Laboratory Medicine, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the changes of glutamate transporter-1(GLT-1) expression in spinal cord dorsal horns of paclitaxel (Taxol) induced neuropathic pain rats. **Methods** All the 45 male SD rats

① 基金项目: 2014 年广西自然科学基金项目(2014GXNSFB118154); 2014 年广西大学生创新创业训练项目(20140599046)

② 通讯作者, E-mail: bxy889@163.com

in this study were divided into 3 groups randomly: control group (Group A), Taxol group (Group B) and vehicle group (Group C). No administration was given to animals in group A. Animals in group B were injected intraperitoneally with Taxol 2 mg/1000g body weight every other day. Animals in group C were injected intraperitoneally with Taxol solvent DMSO with the same volume as group B at the same time. Mechanical withdrawal thresholds (MWT) of the rats were measured every day. The spinal cord dorsal horn tissues were taken from 5 rats in each group on day 5, day 7 and day 9 after injection respectively. Western blotting was employed to detect the expressions of GLT-1. **Results** MWTs declined ( $P < 0.05$ ), and compared with group A and group C, MWTs in group B decreased ( $P < 0.05$ ) since day 6 after injection, while MWTs showed no significant change in group A or group C. Compared with groups A and C, expression of GLT-1 in group B decreased since day 5 after injection ( $P < 0.05$ ). The ratio of GLT-1/ $\beta$ -actin showed positive significant correlation with MWT ( $r = 0.820$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Mechanical hyperalgesia and downregulation of GLT-1 expressions were found in paclitaxel induced neuropathic pain rats, which implied that GLT-1 may play a role in the pathogenesis of neuropathic pain induced by paclitaxel.

**Key words:** paclitaxel; neuropathic pain; glutamate transporter-1

紫杉醇 (paclitaxel, Taxol) 是一种从紫杉中提取的抗癌药物, 主要适用于实体瘤的治疗。但是紫杉醇化疗产生的外周神经毒性副作用表现为外周感觉性的痛觉超敏、灼痛、刺痛和麻木等症状, 限制了其临床上的使用, 并且对于患者生存质量产生了较大影响<sup>[1]</sup>。紫杉醇化疗后神经毒性的机制目前还不明确, 更缺乏有效方法来预防或减轻此种神经损害。而谷氨酸转运体-1 (glutamate transporters, GLT-1) 表达改变是神经疼痛的发生和延续的一个重要的基础<sup>[2]</sup>。正常情况下, 谷氨酸被释放到突触间隙, 与谷氨酸受体结合, 从而传递动作电位。而谷氨酸转运体逆浓度梯度地从胞外将谷氨酸摄入神经元和胶质细胞内, 适时中止突触部位的谷氨酸能传递, 并使胞外谷氨酸浓度保持在较低水平。如果谷氨酸转运体的功能异常, 不能有效地清除谷氨酸, 将会导致细胞外谷氨酸含量的增加, 过量的谷氨酸会对神经元产生毒性兴奋作用<sup>[3]</sup>, 是一些包括神经病理性疼痛在内的神经性疾病如慢性神经疼痛、阿尔海默茨症 (Alzheimer's disease, AD)、帕金森症 (Parkinson's disease, PD) 等发生和发展过程中的一个重要因素<sup>[4]</sup>。但脊髓背角 GLT-1 含量变化在慢性疼痛中的作用尚未明确。本研究拟观测紫杉醇诱导的神经病理性疼痛大鼠的脊髓背角 GLT-1 含量的变化, 以探讨 GLT-1 在紫杉醇致神经病理性疼痛发生和延续中的作用。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物 SPF 级成年雄性 SD 大鼠 45 只, 体重约 200 g, 由右江民族医学院实验动物中心提供, 室温 20 °C ~ 25 °C, 12 h 黑/白光照, 自由饮食。

1.2 动物分组及给药 将 45 只大鼠随机分为 3 组: 正常对照组 (A 组,  $n = 15$ ): 不做任何处理; 紫杉醇组 (B 组,  $n = 15$ ) 大鼠: 第 1 d、3 d、5 d、7 d、9 d 按照 2

mg/1 000 g 体重的标准腹腔注射紫杉醇; 溶剂对照组 (C 组,  $n = 15$ ): 与 B 组在相同时间注射等容积的紫杉醇溶剂二甲基亚砷 (DMSO)。紫杉醇和溶剂 DMSO 均购于 Sigma Chemical 公司。

1.3 行为学测定 用 Von Frey 纤维丝测定大鼠机械缩足阈值 (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。从 2 g 开始, 最大折力为 15 g, 用 up-down 法<sup>[5]</sup> 刺激大鼠足底 10 次, 计算 50% 缩足反应阈值。给药前 2 d 测定所有大鼠的基础痛阈, 之后每天测定 MWT。

1.4 组织提取 在注射药物第 5 d、7 d、9 d 各组分别取 5 只动物取材。在戊巴比妥钠 (60 mg/kg, 腹腔注射) 麻醉下进行椎管摘除手术, 迅速取脊髓 L<sub>4</sub>、L<sub>5</sub> 段脊髓背角移至液氮保存。提取总蛋白, 定量。

1.5 Western Blot 各组取等量蛋白样品 30  $\mu$ g 样本加至 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶恒压电泳, 半干法转移至硝酸纤维素膜。5% 牛奶封闭 1 h。分别加一抗 GLT-1、 $\beta$ -actin (1 : 2 000), 4 °C 孵育过夜。TBST 冲洗, 加入碱性磷酸酶标记的二抗 (1 : 5 000), Super-signal West Pico 试剂盒检测反应条带。利用 ImageJ 软件对 Western Blot 条带进行定量分析。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 18.0 统计学软件进行统计处理, 计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较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 MWT 的测定 与给药前相比, B 组大鼠的 MWT 值从给药后第 6 d 开始显著降低 ( $P < 0.05$ ), 并且持续至注射第 9 d 降到最低值。A 组、C 组大鼠在整个实验过程 MWT 值变化差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。B 组大鼠的 MWT 值在注射第 6 d 时显著

低于 A 组、C 组 ( $P < 0.05$ ) 见表 1, 见图 1。

表 1 各组大鼠机械缩足痛阈值(MWT)的变化 ( $\bar{x} \pm s, g, n = 10$ )

组别	第 0 d	第 1 d	第 3 d	第 5 d	第 6 d	第 7 d	第 8 d	第 9 d
A 组	14.85±0.29	14.74±0.34	13.80±0.57	13.26±0.39	14.04±0.63	13.52±0.49	14.53±0.53	14.69±0.44
B 组	14.76±0.36	14.61±0.46	12.32±0.52	10.72±0.46	9.35±0.38 <sup>abc</sup>	7.34±0.56 <sup>abc</sup>	6.82±0.62 <sup>abc</sup>	6.80±0.45 <sup>abc</sup>
C 组	14.89±0.42	14.27±0.62	13.38±0.36	13.57±0.35	14.23±0.51	14.55±0.41	13.68±0.61	13.60±0.37

注:与 A 组相比,a:  $P < 0.05$ ;与 C 组相比,b:  $P < 0.05$ ;与注射前相比,c:  $P < 0.05$

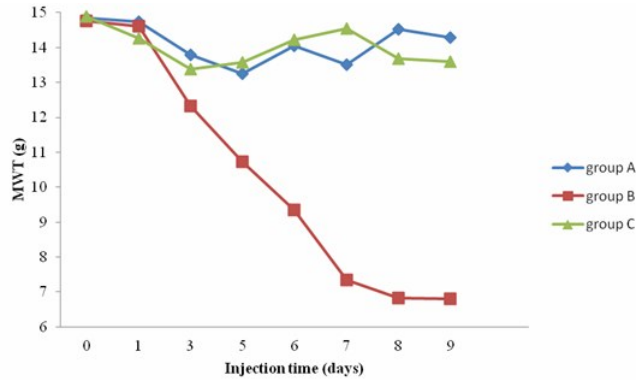


图 1 各组大鼠 MWT 的表达变化

2.2 GLT-1 表达的测定 Western blot 结果显示, A 组、C 组大鼠的脊髓背角的 GLT-1 表达无明显变化。B 组大鼠脊髓背角 GLT-1 蛋白表达明显下调, 表现为 GLT-1 与  $\beta$ -actin 的 IOD 比值降低 ( $P < 0.05$ )。与 A 组、C 组相比, B 组大鼠在注射紫杉醇的第 5 d、7 d 和 9 d 时, GLT-1 表达与 A 组、C 组差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 其中, 注射 7 d 以后, B 组 GLT-1 表达与 A 组、C 组的差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。B 组大鼠的的脊髓背角 GLT-1/ $\beta$ -actin 的比值与机械缩足阈值呈显著性正相关 ( $r = 0.820, P < 0.05$ ), 见图 2。

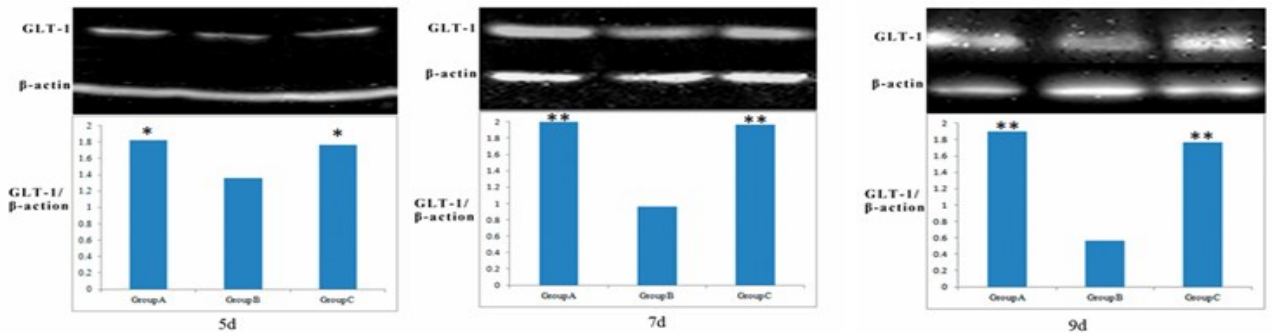


图 2 各组大鼠 GLT-1 蛋白表达水平

与 B 组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

### 3 讨论

本研究使用 SD 大鼠重复间断腹腔注射 2.0 mg/(kg·d) 紫杉醇的方法可成功诱发的外周神经病理痛模型, 表现为机械超敏的外周感觉神经病变。该方法制作简便, 效果稳定, 成本低廉, 有助于紫杉醇化疗痛机制的研究<sup>[6]</sup>。

本实验的大鼠机械缩足痛阈值测定结果显示, 注射紫杉醇第 6 d 起, 大鼠出现明显的机械性痛觉过敏, 机械缩足反射阈值开始降低, 到第 9 d 达到最低点。同时, Western Blotting 结果表明, 注射紫杉醇第 5 d 开始, 大鼠脊髓背角 GLT-1 的表达出现明显下调。本研究观察到, B 组大鼠的脊髓背角 GLT-1 的表达与机械缩足阈值呈显著性正相关, 实验大鼠的痛行为变化与 GLT-1 表达的下调具有相似的时间特征。

这个表明紫杉醇诱导的神经病理性疼痛大鼠的机械痛敏程度随 GLT-1 表达的降低而加重, 提示实验大鼠 GLT-1 表达的下调可能参与紫杉醇致神经病理性疼痛的发病机制。已有研究表明, GLT-1 参与病理性疼痛的产生和维持<sup>[7]</sup>, 如在 CCI<sup>[8]</sup>、脊神经结扎<sup>[9]</sup>、吗啡耐受<sup>[10]</sup>等诱发的痛觉过敏中, 均伴有 GLT-1 蛋白表达的下调和其摄取功能的降低。本研究进一步支持了上述观点。中枢神经系统内谷氨酸的稳态主要依靠谷氨酸转运体系统实现<sup>[11]</sup>。因此, GLT-1 表达的异常参与多种疾病的发生发展<sup>[12-13]</sup>, 但其在神经病理性疼痛发生中的具体作用, 尚有待进一步研究。

综上所述, 紫杉醇诱导的神经病理性疼痛大鼠机械缩足痛敏明显增加, 脊髓背角 GLT-1 表达显著下

(下转第 142 页)

检测与Z组较为接近,较少的炎性细胞浸润,气道皱襞、黏膜下平滑肌增厚均不明显。同时,A2组TGF- $\beta$ 1的蛋白表达量与Z组无异,而显著低于X组。Z组、A2组、X组三组实验动物的肺泡灌洗液中TGF- $\beta$ 1的含量变化也与免疫组织化学中TGF- $\beta$ 1的表达量变化趋势一致,即X组均最高,而Z组最低,A2组居中。此外,两个用药组,即地塞米松组和六味地黄颗粒组相比,六味地黄颗粒能够更显著地降低哮喘大鼠模型肺组织的TGF- $\beta$ 1表达量。这表明,六味地黄颗粒能够促使哮喘大鼠模型的气道上皮细胞进行正常修复,减轻气道黏膜下平滑肌的增厚,进而防止哮喘大鼠模型的气道重塑。

#### 参考文献:

- [1] Robinson DS. Th-2 cytokines in allergic disease[J]. Br Med Bull,2000,56(4):956-968.
- [2] Komai M, Tanaka H, Masuda T, et al. Role of Th2 re-

sponses in the development of allergen-induced airway remodelling in a murine model of allergic asthma[J]. Br J Pharmacol,2003,138(5):912-920.

- [3] Pohunek P, Warner JO, Turzikova J, et al. Markers of eosinophilic inflammation and tissue re-modelling in children before clinically diagnosed bronchial asthma[J]. Pediatr Allergy Immunol,2005,16(1):43-51.
- [4] 黄小琪,陈晶,梁丽英. 六味地黄颗粒对哮喘大鼠转化生长因子- $\beta$ 1影响的研究[J]. 广西医科大学学报,2010,27(5):675-677.
- [5] 陈晶,黄小琪,梁丽英. 生理盐水激发卵白蛋白诱发的哮喘大鼠模型与正常大鼠肺部病理检查的比较与研究[J]. 现代预防医学,2011,38(20):4223-4228.
- [6] 钟李英,王力宁,张程和,等. 中医分期序贯治疗对哮喘大鼠气道重构基质金属蛋白酶-9及其抑制剂表达影响的研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2014,16(12):2622-2629.

收稿日期:2015-12-04;修回日期:2016-01-20

(上接第138页)

调,两者呈显著性正相关,其变化在时间上的特征较为一致。特异性上调脊髓GLT-1的表达,增强其摄取谷氨酸的能力可能成为临床治疗和预防神经病理性痛的一个研究靶点。

#### 参考文献:

- [1] 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.
- [2] Ren K, Dubner R. Neuron-glia crosstalk gets serious: role in pain hypersensitivity[J]. Current opinion in anaesthesiology,2008,21(5):570-579.
- [3] Danbolt NC. Glutamate uptake[J]. Progress in neurobiology,2001,65(1):101-105.
- [4] Maragakis NJ, Rothstein JD. Glutamate transporters: animal models to neurologic disease[J]. Neurobiology of disease,2004,15(3):461-473.
- [5] 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.
- [6] 银联飞,韦婷婷,黄容容,等. 紫杉醇诱导大鼠神经病理性疼痛模型的建立[J]. 右江民族医学院学报,2015,37(3):357-359.
- [7] Maeda S, Kawamoto A, Yatani Y, et al. Gene transfer of

GLT-1, a glial glutamate transporter, into the spinal cord by recombinant adenovirus attenuates inflammatory and neuropathic pain in rats[J]. Mol Pain,2008,4:65-67.

- [8] 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]. J Neurosci,2003,23(7):2899-2910.
- [9] Tawfik VL, Regan MR, Haenggeli C, et al. Propentofylline-induced astrocyte modulation leads to alterations in glial glutamate promoter activation following spinal nerve transection[J]. Neuroscience,2008,152(4):1086-1092.
- [10] Tai YH, Wang YH, Tsai RY, et al. Amitriptyline preserves morphine's antinociceptive effect by regulating the glutamate transporter GLAST and GLT-1 trafficking and excitatory amino acids concentration in morphine-tolerant rats[J]. Pain,2007,129(3):343-354.
- [11] Mao J. Glutamate transporter: an unexpected target for some antibiotics[J]. Mol Pain,2005,1:5.
- [12] 周华荣,徐恩. 谷氨酸转运体-1与脑缺血[J]. 国际脑血管病杂志,2013,21(12):942-946.
- [13] Rothstein JD, Patel S, Regan MR, et al. Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression[J]. Nature,2005,433(7021):73-77.

收稿日期:2016-03-08;修回日期:2016-03-17