

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.25.002

文章编号: 1005-8982 (2018) 25-0006-05

侧脑室注射 GT-0198 对坐骨神经慢性压迫性损伤大鼠的研究

郭云翮, 李祥, 米卫东

(山西大同大学医学院 外科教研室, 山西 大同 037009)

摘要: **目的** 观察侧脑室注射选择性甘氨酸转运体-2 (GlyT2) 抑制剂 GT-0198 对大鼠慢性压迫损伤 (CCI) 神经病理性疼痛模型的镇痛作用。**方法** 实验大鼠随机分为正常对照组和 CCI 组。CCI 组大鼠进行坐骨神经压迫性损伤模型复制。采用旋转实验评估正常大鼠的运动功能。采用电子 Von Frey 实验、冷板实验和热痛刺激反应分别评估 CCI 大鼠机械、冷和热痛觉过敏。侧脑室注射 GT-0198 (10、50 和 100 μg) 后观察其镇痛作用。**结果** 正常对照组大鼠侧脑室注射 GT-0198 不影响其运动功能。GT-0198 抑制 CCI 组大鼠机械和冷痛觉过敏, 并呈剂量依赖性。GT-0198 (100 μg) 的镇痛作用可被侧脑室注射甘氨酸受体拮抗剂——士的宁 (STR) 完全逆转。**结论** 选择性 GlyT2 抑制剂 GT-0198 可用于治疗大鼠 CCI 神经病理性疼痛, 同时不影响运动功能。

关键词: 甘氨酸转运体-2 抑制剂; 慢性压迫性损伤; 神经病理性疼痛; 大鼠

中图分类号: R-332; R364

文献标识码: A

Study on the effect of intracerebroventricular injection of GT-0198 on chronic constriction injury of sciatic nerve in rats

Yun-he Guo, Xiang Li, Wei-dong Mi

(Department of Surgery, School of Medicine, Shanxi Datong University, Datong, Shanxi 037009, China)

Abstract: Objective To examine the antinociceptive effect of intracerebroventricular injection of the selective glycine transporter 2 (GlyT2) inhibitor GT-0198 on neuropathic pain in experimental rat model. **Methods** Chronic constriction injury (CCI) to the sciatic nerve was induced in rats. Normal rats were used to assess motor function with the rotarod test. The CCI rats were then used to assess mechanical, cold, and thermal hyperalgesia using the electronic von Frey test, cold plate test, and the plantar test, respectively. GT-0198 (10, 50, and 100 μg) was administered intracerebroventricularly to examine its effect on antinociception. **Results** Intracerebroventricular administration of GT-0198 in normal rats did not affect motor performance. In the CCI rats, GT-0198 inhibited mechanical and cold hyperalgesia in a dose-dependent manner. The antihyperalgesic effect of GT-0198 (100 μg) was reversed completely by pretreatment with a glycine receptor antagonist Strychnine. **Conclusions** These results suggest that the selective GlyT2 inhibitor is a promising candidate for the treatment of neuropathic pain without causing motor dysfunction.

Keywords: glycine transporter 2 inhibitor; chronic constriction injury; neuropathic pain; rat

甘氨酸是中枢神经系统主要的抑制性神经递质。脊髓背角中甘氨酸传递在各种疼痛进程中起着关键的

作用; 而鞘内注射甘氨酸在动物疼痛模型中具有镇痛作用^[1-2]。以往研究表明^[3], 侧脑室注射甘氨酸可通过

收稿日期: 2018-03-09

甘氨酸受体对急性热痛和化学伤害性刺激大鼠产生镇痛作用。细胞外液甘氨酸浓度受到甘氨酸转运体 (Glycine transporters, GlyT) 调控, GlyT 有 2 个亚型, GlyT1 和 GlyT2^[4]。其中 GlyT2 位于脊髓甘氨酸能神经元突触前膜, 可转运突触间隙中的甘氨酸, 抑制甘氨酸传递。最近研究表明^[5], 鞘内注射 GlyT2 抑制剂 ALX1393 对神经病理性疼痛动物模型具有镇痛作用。但是 GlyT2 抑制剂在脊髓以上区域伤害性传递中的作用仍不明确。近年有研究报道^[6], GT-0198 是一种结构新颖的 GlyT2 抑制剂, 具有很强的抑制 GlyT2 作用。因此, 本研究主要观察侧脑室注射选择性 GlyT2 抑制剂 GT-0198 对大鼠慢性压迫损伤 (chronic constriction injury, CCI) 神经病理性疼痛模型的镇痛作用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物与分组 35 只雄性 SD 大鼠, 体重 200 ~ 250 g, 购于山西医科大学实验动物中心, 动物许可证号: SCXK (晋) 2009-0001。室内温度保持在 25℃ 左右, 湿度在 50% 左右。明暗周期 12 h, 自由饮水和进食。将 SD 大鼠随机分成正常对照组和 CCI 组。CCI 组大鼠进一步分为 Sham 组、Vehicle+CCI 组、GT-0198 (10 μg)+CCI 组、GT-0198 (50 μg)+CCI 组、GT-0198 (100 μg)+CCI 组和 GT-0198 (100 μg)+士的宁 (Strychnine, STR) (10 μg)+CCI 组, 每组 5 只大鼠。

1.1.2 实验仪器和试剂 GT-0198 和 STR (美国 Sigma 公司), 脑立体定位仪 (北京智鼠多宝生物科技有限责任公司), ZH-RXZ 型柔性颅骨钻 (安徽正华生物仪器有限公司), 冷热板测痛仪 (北京米兰科技有限公司), Von Frey 针刺触觉测量套件 (深圳沃德生命科技有限公司), 热痛刺激仪 (上海玉研科学仪器有限公司), 大鼠旋转活动轮监测系统 (北京拜安吉科技有限公司)。

1.2 方 法

1.2.1 大鼠 CCI 模型复制 10% 水合氯醛麻醉 (150 ~ 200 mg/kg) 大鼠, 从大鼠左后肢大腿中后部切开皮肤, 然后钝性分离肌肉, 暴露大鼠坐骨神经, 在坐骨神经三根分叉上游主干部位游离神经 7 mm 左右, 在距神经起始处上方 2 mm, 用线结扎坐骨神经 4 道, 每道间隔约 1 mm^[7]。Sham 组除不结扎坐骨神经, 其余程序同 CCI。

1.2.2 侧脑室插管 在 CCI 模型复制同一天, 把麻醉大鼠固定于立体定位仪上。剪去大鼠头部毛发, 碘伏消毒。导管安装位置为: 前骨缝的交点处即前囟沿着中骨缝向前约 1.5 mm, 水平离中骨缝向右约 1.5 mm 的位置。使立体定位仪上方钢针的针头对准导管安装位置打孔。将导管慢慢插入侧脑室。专用胶水将导管固定于颅骨上, 然后缝合颅骨皮肤。腹腔注射适量青霉素钠以防止感染。在 CCI 手术后 7 d 侧脑室注射各种试剂, 注射量均为 5 μl, 且在 1 min 内完成。

1.2.3 电子 Von Frey 检测 主要是对大鼠缩足阈值 (paw withdrawal threshold, PWT) 进行测定。Von Frey 细丝 (1.0 ~ 15 g) 垂直刺激 CCI 大鼠后足中央处, 持续 5 ~ 10 s, 出现明显缩足、舔足及抬足行为为阳性反应, 重复 3 次, 间隔 5 min。

1.2.4 冷板实验 将 CCI 大鼠放置在冷板测试仪器上, 冷板温度为 4℃。观察并记录大鼠缩足反应潜伏期 (paw withdrawal latency, PWL)。重复 3 次, 间隔 5 min, 取平均值。

1.2.5 热刺激仪检测 采用热痛刺激仪记录 CCI 大鼠对热刺激的 PWL。为避免损伤, 30 s 为上限。重复 3 次, 间隔 5 min, 取平均值。

1.2.6 旋转实验 正常大鼠置于旋转滚筒上, 其速度为在 5 min 内从 4 增加到 40 r/min, 迫使其向前走, 避免跌下。记录大鼠跌下的时间。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 Kolmogorov-Smirnov 检验对数据进行正态性分析, 进一步两两比较采用 Bonferroni 法, 多组间比较采用方差分析和重复测量设计的方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 GT-0198 在 CCI 大鼠机械性痛觉过敏中的作用

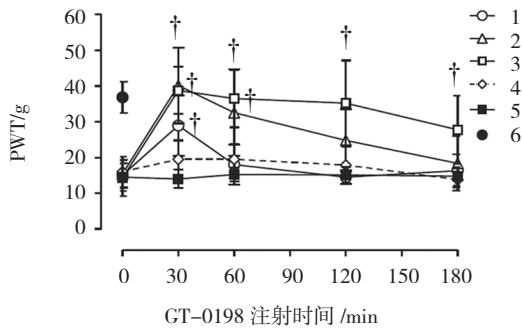
Vehicle+CCI 组大鼠左后肢 PWT 为 (15.2 ± 3.8) g, 而 Sham 组大鼠为 (36.8 ± 4.4) g, 差异有统计学意义 (*t* = 10.823, *P* = 0.000), Vehicle+CCI 组 PWT 降低。不同剂量 GT-0198 均可提高 CCI 大鼠 PWT, 经方差分析差异有统计学意义 (*F* = 21.865, *P* = 0.002), 且呈剂量依赖性。大鼠 PWT Vehicle+CCI 组与不同剂量 GT-0198+CCI 组比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结

果：①不同时间的 PWT 有差异 ($F=16.754, P=0.003$)；②多组间 PWT 有差异 ($F=21.305, P=0.000$)，Vehicle+CCI 组 PWT 低于不同剂量 GT-0198+CCI 组；③多组

PWT 变化趋势有差异 ($F=13.964, P=0.006$)。此外，GT-0198 (100 μg) 的效应可被 STR (10 μg) 完全逆转。见表 1 和图 1。

表 1 各组不同时间的 PWT 比较 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	0 min	30 min	60 min	120 min	180 min
Sham 组	39.0 \pm 6.7	39.0 \pm 6.7	39.0 \pm 6.7	39.0 \pm 6.7	39.0 \pm 6.7
Vehicle+CCI 组	14.3 \pm 4.5	13.6 \pm 4.0	15.7 \pm 5.1	16.3 \pm 5.6	15.4 \pm 5.0
GT-0198 (10 μg) +CCI 组	14.5 \pm 4.0	29.6 \pm 10.4	19.7 \pm 4.8	16.4 \pm 5.0	15.5 \pm 4.7
GT-0198 (50 μg) +CCI 组	14.4 \pm 4.1	39.5 \pm 14.8	36.3 \pm 13.6	33.8 \pm 12.4	27.3 \pm 11.8
GT-0198 (100 μg) +CCI 组	14.3 \pm 4.3	39.4 \pm 15.0	32.5 \pm 12.7	15.7 \pm 6.2	15.2 \pm 6.6
GT-0198 (100 μg) +STR (10 μg) +CCI 组	14.6 \pm 4.2	19.7 \pm 5.4	19.4 \pm 5.1	18.6 \pm 4.7	16.9 \pm 4.3



1: GT-0198 (10 μg) +CCI 组; 2: GT-0198 (50 μg) +CCI 组; 3: GT-0198 (100 μg) +CCI 组; 4: GT-0198 (100 μg) +STR (10 μg) +CCI 组; 5: Vehicle+CCI 组; 6: Sham 组。† 与 Vehicle+CCI 组比较, $P < 0.05$

图 1 侧脑室注射 GT-0198 对 CCI 大鼠机械性痛觉过敏的影响

2.2 GT-0198 在 CCI 大鼠冷痛觉过敏中的作用

Sham 组大鼠在观察期内未出现肢体移动和晃动，而 Vehicle+CCI 组大鼠基线后肢 PWL 为 (30.3 \pm 8.8) s，差异有统计学意义 ($t=11.247, P=0.000$)，Vehicle+CCI 组大鼠 PWL 降低。不同剂量 GT-0198 均可延长 CCI 大鼠 PWL，经方差分析差异有统计学意义

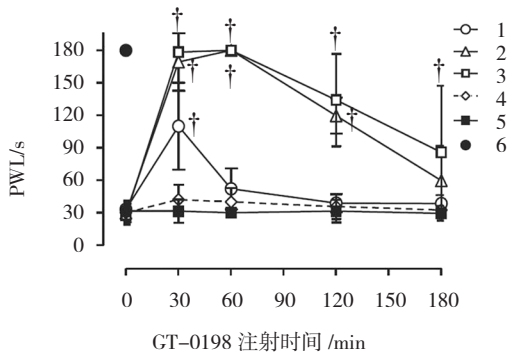
($F=16.632, P=0.004$)，且呈剂量依赖性。大鼠 PWL Vehicle+CCI 组与不同剂量 GT-0198+CCI 组比较，采用重复测量设计的方差分析，结果：①不同时间的 PWL 有差异 ($F=19.073, P=0.001$)；②多组 PWL 有差异 ($F=25.624, P=0.000$)，Vehicle+CCI 组 PWL 短于不同剂量 GT-0198+CCI 组；③多组 PWL 变化趋势有差异 ($F=12.861, P=0.007$)。此外，GT-0198 (100 μg) 的效应可被 STR (10 μg) 完全逆转。见表 2 和图 2。

2.3 GT-0198 在 CCI 大鼠热痛觉过敏中的作用

Vehicle+CCI 组大鼠基线后肢 PWL 为 (6.0 \pm 0.8) s，而 Sham 组大鼠 PWL 是 (9.8 \pm 1.1) s，差异有统计学意义 ($t=9.729, P=0.000$)，Vehicle+CCI 组大鼠 PWL 缩短。不同剂量 GT-0198 对 CCI 大鼠 PWL 均无显著影响 ($F=6.042, P=0.067$)。大鼠 PWL Vehicle+CCI 组与不同剂量 GT-0198+CCI 组比较，采用重复测量设计的方差分析，结果：①不同时间点的 PWL 无差异 ($F=5.847, P=0.074$)；②多组 PWL 无差异 ($F=3.305, P=0.153$)；③多组 PWL 变化趋势无差异 ($F=4.971, P=0.087$)。见表 3 和图 3。

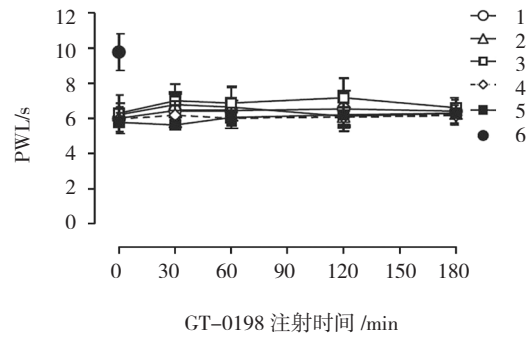
表 2 各组不同时间的 PWL 比较 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	0 min	30 min	60 min	120 min	180 min
Sham 组	180.0 \pm 0.0	180.0 \pm 0.0	180.0 \pm 0.0	180.0 \pm 0.0	180.0 \pm 0.0
Vehicle+CCI 组	30.6 \pm 14.4	29.3 \pm 15.0	28.7 \pm 15.3	30.3 \pm 15.6	29.4 \pm 15.2
GT-0198 (10 μg) +CCI 组	30.5 \pm 15.0	102.6 \pm 19.4	56.7 \pm 16.8	40.4 \pm 17.3	39.5 \pm 17.5
GT-0198 (50 μg) +CCI 组	30.4 \pm 14.2	165.6 \pm 21.8	176.3 \pm 20.7	118.8 \pm 18.6	59.5 \pm 17.0
GT-0198 (100 μg) +CCI 组	30.7 \pm 14.3	178.4 \pm 22.3	179.5 \pm 22.0	136.7 \pm 19.7	90.6 \pm 18.4
GT-0198 (100 μg) +STR (10 μg) +CCI 组	30.0 \pm 13.9	40.7 \pm 15.2	39.1 \pm 14.1	38.6 \pm 14.5	37.9 \pm 14.3



1: GT-0198 (10 µg)+CCI 组; 2: GT-0198 (50 µg)+CCI 组; 3: GT-0198 (100 µg)+CCI 组; 4: GT-0198 (100 µg)+STR (10 µg)+CCI 组; 5: Vehicle+CCI 组; 6: Sham 组。† 与 Vehicle+CCI 组比较, $P < 0.05$

图 2 侧脑室注射 GT-0198 对 CCI 大鼠冷痛觉过敏的影响 ($n=5$)

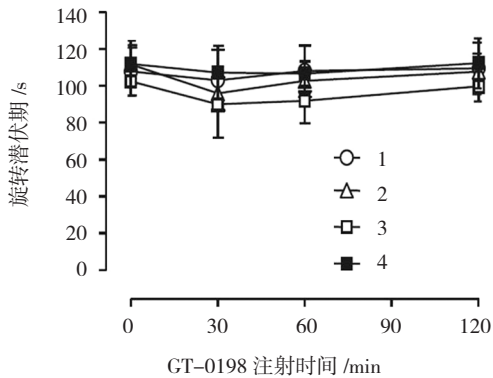


1: GT-0198 (10 µg)+CCI 组; 2: GT-0198 (50 µg)+CCI 组; 3: GT-0198 (100 µg)+CCI 组; 4: GT-0198 (100 µg)+STR (10 µg)+CCI 组; 5: Vehicle+CCI 组; 6: Sham 组

图 3 侧脑室注射 GT-0198 对 CCI 大鼠热痛觉过敏的影响

表 3 各组不同时间的 PWL 比较 ($n=5, s, \bar{x} \pm s$)

组别	0 min	30 min	60 min	120 min	180 min
Sham 组	9.4 ± 1.3	9.4 ± 1.3	9.4 ± 1.3	9.4 ± 1.3	9.4 ± 1.3
Vehicle+CCI 组	5.9 ± 0.5	5.6 ± 0.4	6.0 ± 0.5	6.1 ± 0.6	6.2 ± 0.6
GT-0198 (10 µg)+CCI 组	5.9 ± 0.4	5.7 ± 0.5	6.1 ± 0.4	6.4 ± 0.6	6.5 ± 0.7
GT-0198 (50 µg)+CCI 组	5.9 ± 0.4	6.3 ± 0.8	6.2 ± 0.6	6.6 ± 0.5	6.6 ± 0.6
GT-0198 (100 µg)+CCI 组	5.9 ± 0.5	6.4 ± 0.6	6.5 ± 0.7	7.1 ± 0.6	6.8 ± 0.6
GT-0198 (100 µg)+STR 组 (10 µg)+CCI 组	5.8 ± 0.5	5.7 ± 0.4	6.0 ± 0.5	6.2 ± 0.7	6.1 ± 0.5



1: GT-0198 (10 µg)+CCI 组; 2: GT-0198 (50 µg)+CCI 组; 3: GT-0198 (100 µg)+CCI 组; 4: Vehicle+CCI 组

图 4 侧脑室注射 GT-0198 对正常大鼠旋转功能的影响

表 4 各组不同时间的大鼠旋转功能比较 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	0 min	30 min	60 min	120 min
Vehicle+CCI 组	110.3 ± 14.6	108.5 ± 15.7	109.1 ± 15.3	110.8 ± 15.6
GT-0198 (10 µg)+CCI 组	109.5 ± 15.1	107.6 ± 14.6	108.7 ± 16.4	109.4 ± 15.3
GT-0198 (50 µg)+CCI 组	109.4 ± 14.8	106.5 ± 14.7	108.5 ± 13.9	108.9 ± 14.7
GT-0198 (100 µg)+CCI 组	103.3 ± 14.5	90.4 ± 13.1	92.5 ± 12.8	98.7 ± 13.2

2.4 GT-0198 对正常大鼠运动功能的影响

Vehicle+CCI 组大鼠基线旋转潜伏期是 (108 ± 12) s。不同剂量 GT-0198 对正常大鼠旋转潜伏期均无显著影响 ($F=7.184, P=0.059$)。大鼠旋转潜伏期 Vehicle+CCI 组与不同剂量 GT-0198+CCI 组比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点的旋转潜伏期无差异 ($F=3.769, P=0.145$); ②多组旋转潜伏期无差异 ($F=4.735, P=0.097$); ③多组旋转潜伏期变化趋势无差异 ($F=2.086, P=0.262$)。见表 4 和图 4。

3 讨论

GlyT2 在脊髓及脊髓上的甘氨酸能在神经元中表达, 在抑制甘氨酸传递调节中发挥重要作用^[8]。选择性 GlyT2 抑制剂可能是一种新型的镇痛药物, 可缓解不同类型的疼痛。全身或鞘内注射 GlyT2 抑制剂对急性、持续性和慢性疼痛具有镇痛作用^[9]。但是 GlyT2 抑制剂在脊髓以上中枢区域伤害性传递中的作用仍不明确。

GT-0198 剂量依赖性抑制 CCI 大鼠机械和冷痛觉过敏, 但对热痛觉过敏无影响。尽管甘氨酸在不同疼痛模型中传递方式不一样, 但不同疼痛模型中的镇痛效应仍不能完全解释。为了确认 GT-0198 介导的抗痛觉过敏是通过抑制脊髓上 GlyT2 及活化的甘氨酸受体, 因而侧脑室预先注射甘氨酸受体拮抗剂 STR。结果显示, STR 可完全逆转 GT-0198 对 CCI 大鼠机械和冷痛觉过敏的影响。GT-0198 是通过增强甘氨酸能传递而发挥作用的。脊髓上 GT-0198 的作用机制可能是激活疼痛抑制系统。延髓头端腹内侧髓质的甘氨酸神经元直接投射到脊髓, 有助于脊髓伤害性刺激的抑制^[10]。外源甘氨酸注入丘脑腹侧基底可减少躯体感觉神经元放电, 而联合应用 STR 可拮抗该作用^[11]。上述结果表明, 通过 GT-0198 增加丘脑甘氨酸水平可抑制伤害性传递。但是目前仍不明确中枢神经系统其他区域 GlyT2 表达是否与 GT-0198 镇痛作用相关。同时在大脑特定区域 GlyT1 抑制剂也可产生镇痛作用。GlyT1 抑制剂 (肌氨酸), 注入到前额叶皮层可减少神经病理性疼痛大鼠模型损伤足的机械敏感性^[12]。本研究发现, 虽然甘氨酸神经元在控制脊髓运动功能方面发挥重要的作用, 但它们在脑中的作用仍不明确。侧脑室注射甘氨酸不影响动物的运动功能^[13]。GlyT2 在脊髓中枢的生理作用仍不清楚。下丘脑室旁核微量注射甘氨酸可引起心率减慢, 尿量增加等, 而 STR 可抑制上述反应^[14]。下丘脑中 GlyT2 抑制剂可能对心血管和肾脏有影响。要明确 GlyT2 生理作用以及 GlyT2 抑制剂的药理作用, 需要 GT-0198 注射到中枢神经系统中特定区域。

综上所述, 脑室注射选择性 GlyT2 抑制剂 GT-0198 可减轻 CCI 大鼠模型机械和冷痛觉过敏, 而且对正常大鼠运动功能无影响。

参 考 文 献:

[1] ZEILHOFER H U, BENKE D, YEVENES G E. Chronic pain

states: pharmacological strategies to restore diminished inhibitory spinal pain control[J]. *Annual Review of Pharmacology*, 2012, 52(52): 111-133.

- [2] MACLEOD B A, WANG J T, CHUNG C C, et al. Analgesic properties of the novel amino acid, isovaline[J]. *Anesthesia & Analgesia*, 2010, 110(4): 1206.
- [3] CHENG W, YIN Q, CHENG M Y, et al. Intracerebroventricular or intrathecal injection of glycine produces analgesia in thermal nociception and chemical nociception via glycine receptors[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2009, 614(1-3): 44-49.
- [4] VANDENBERG R J, RYAN R M, CARLAND J E, et al. Glycine transport inhibitors for the treatment of pain[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2014, 35(8): 423-430.
- [5] HERMANN S H, MUTHSELBACH U, WILLIAMS R, et al. Differential effects of spinally applied glycine transporter inhibitors on nociception in a rat model of neuropathic pain[J]. *Neuroscience Letters*, 2008, 445(3): 214.
- [6] OMORI Y, NAKAJIMA M, NISHIMURA K, et al. Analgesic effect of GT-0198, a structurally novel glycine transporter 2 inhibitor, in a mouse model of neuropathic pain[J]. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2015, 127(3): 377-381.
- [7] 马艳, 张方博, 刘欣, 等. 慢性压迫性损伤模型制备因素及模型评价方法的研究进展 [J]. *医学研究杂志*, 2014, 43(7): 176-179.
- [8] VANDENBERG R J, RYAN R M, CARLAND J E, et al. Glycine transport inhibitors for the treatment of pain[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2014, 35(8): 423-430.
- [9] HARANISHI Y, HARA K, TERADA T, et al. The antinociceptive effect of intrathecal administration of glycine transporter-2 inhibitor ALX1393 in a rat acute pain model[J]. *Anesthesia & Analgesia*, 2010, 110(2): 615.
- [10] HOSSAINI M, GOOS J A, KOHLI S K, et al. Distribution of Glycine/GABA neurons in the ventromedial medulla with descending spinal projections and evidence for an ascending Glycine/GABA projection[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35293.
- [11] COOKE J E, MATHERS D E. Isovaline causes inhibition by increasing potassium conductance in thalamic neurons[J]. *Neuroscience*, 2009, 164(3): 1235-1243.
- [12] CENTENO M V, MUTSO A, MILLECAMP S M, et al. Prefrontal cortex and spinal cord mediated anti-neuropathy and analgesia induced by sarcosine, a glycine-T1 transporter inhibitor[J]. *Pain*, 2009, 145(1-2): 176-183.
- [13] CHENG W, YIN Q, CHENG M Y, et al. Intracerebroventricular or intrathecal injection of glycine produces analgesia in thermal nociception and chemical nociception via glycine receptors[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2009, 614(1-3): 44-49.
- [14] KROWICKI Z K, KAPUSTA D R. Microinjection of glycine into the hypothalamic paraventricular nucleus produces diuresis, natriuresis, and inhibition of central sympathetic outflow[J]. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*, 2011, 337(1): 247-255.

(张蕾 编辑)