

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.20.001  
文章编号: 1005-8982(2020)20-0001-05

基础研究·论著

## LV-GlyT2 siRNA 对骨癌痛大鼠 吗啡耐受形成的影响\*

徐伟<sup>1</sup>, 王健<sup>2</sup>, 丁卓峰<sup>2</sup>, 李珍<sup>1</sup>, 张洁<sup>1</sup>

(1. 湖南省妇幼保健院 麻醉科, 湖南 长沙 410008; 2. 中南大学湘雅医院 麻醉科, 湖南 长沙 410008)

**摘要: 目的** 观察鞘内注射 GlyT2 siRNA 慢病毒载体 (LV-GlyT2 siRNA) 对骨癌痛大鼠吗啡耐受形成的影响。**方法** 将骨癌痛模型大鼠随机分为生理盐水组 (NS 组)、阴性对照病毒组 (LV-NC 组) 和阳性病毒组 (LV-GlyT2 siRNA 组), 每组 10 只。骨癌痛第 7 天, 3 组大鼠分别鞘内注射生理盐水、阴性对照病毒 (LV-NC) 及 GlyT2 siRNA 慢病毒载体 (LV-GlyT2 siRNA); 骨癌痛第 9 天开始大鼠均鞘内注射吗啡, 连续 7 d。分别于癌细胞接种前及接种后 7 d 测量大鼠术侧后肢机械缩足阈值 (MWT); 注射吗啡后 1 d、3 d、5 d、7 d 测量大鼠甩尾潜伏期, 并计算 %MPE 值; 注射吗啡第 7 天采用 Western blotting 检测脊髓 GlyT2 蛋白的表达。**结果** 3 组大鼠癌细胞接种前及接种后 7 d 的术侧后肢 MWT 在不同时间上有差异 ( $P < 0.05$ ), 不同组间及变化趋势无差异 ( $P > 0.05$ )。3 组大鼠接种后 7 d 的 MWT 较接种前下降 ( $P < 0.05$ )。3 组大鼠注射吗啡后 1 d、3 d、5 d、7 d 的 %MPE 在不同时间、不同组间及变化趋势上有差异 ( $P < 0.05$ ), 注射吗啡后 5 d 和 7 d, LV-GlyT2 siRNA 组大鼠 %MPE 值较其他组升高 ( $P < 0.05$ )。LV-GlyT2 siRNA 组 GlyT2 蛋白相对表达量低于 LV-NC 组和 NS 组 ( $P < 0.05$ )。**结论** 下调 GlyT2 表达可缓解骨癌痛大鼠吗啡耐受的形成。

**关键词:** 骨肿瘤; 疼痛; GlyT2; 慢病毒载体; 吗啡; 大鼠

**中图分类号:** R738.1

**文献标识码:** A

## Intrathecal injection of LV-GlyT2-RNA attenuates morphine tolerance of rats with bone cancer pain\*

Wei Xu<sup>1</sup>, Jian Wang<sup>2</sup>, Zhuo-feng Ding<sup>2</sup>, Zhen Li<sup>1</sup>, Jie Zhang<sup>1</sup>

(1. Department of Anesthesiology, Maternal and Child Health Care Hospital, Hunan Province, Changsha, 410008, China; 2. Department of Anesthesiology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan, 410008, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of intrathecal injection of lentiviral vector mediated GlyT2 siRNA on the development of morphine tolerance in bone cancer pain rats. **Methods** Female adult rats were used to establish bone cancer pain mode (BCP) by injecting Walker 256 breast tumor cell (TCI), normal saline, lentiviral vector mediated GlyT2 siRNA, negative control were intrathecally injected on 7 day post cell infusion. Morphine was intrathecally injected for 7 consecutive days to induce morphine tolerance from day 9 after cell infusion. Before BCP and 7 days after BCP modeling, the MWT was performed to assess the rats' pain behavioral changes and %MPE was calculated to evaluate the development of morphine tolerance, western blotting was used to detect the expression of GlyT2 protein. **Results** After TCI, the MWTs of all groups were significantly decreased on day 7, compared with day 1 ( $P < 0.05$ ). After intrathecal injection of morphine, the %MPE of LV-GlyT2-siRNA was increased significantly

收稿日期: 2020-08-31

\* 基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (No: 81901143)

[通信作者] 张洁, E-mail: zhangj0909@yeah.net

compared with other groups ( $P < 0.05$ ), and the GlyT2 expression was downregulated in the spinal cord of LV-GlyT2-siRNA ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Downregulation of GlyT2 can attenuate morphine tolerance of rats with bone cancer pain.

**Keywords:** bone cancer; pain; GlyT2; lentiviral vectors; morphine tolerance; rats

癌痛是恶性肿瘤患者最常见的症状之一。许多的恶性肿瘤,如前列腺癌、乳腺癌、肺癌常伴有骨转移,导致严重的骨破坏和癌性疼痛,严重影响患者的生活质量<sup>[1-3]</sup>。吗啡是目前临床上用来治疗中重度癌痛的常用药物<sup>[4]</sup>。但长期使用吗啡会带来许多不良反应,如便秘、搔痒及吗啡耐受等<sup>[5]</sup>。其中,吗啡耐受是影响临床上吗啡使用最主要的不良反应,目前其具体机制仍不明确<sup>[6-7]</sup>。甘氨酸转运体 2 (glycine transporter 2, GlyT2) 是调控突触间甘氨酸浓度的重要转运体。既往研究发现,鞘内注射 GlyT2 抑制剂或敲除 GlyT2 可以减轻骨癌痛,并增强单次注射吗啡的镇痛效能<sup>[8]</sup>。但目前尚未有研究探寻抑制 GlyT2 表达对大鼠骨癌痛吗啡耐受的影响。本研究拟复制骨癌痛模型,使用慢病毒载体部分敲除 GlyT2 表达,明确其对骨癌痛大鼠吗啡耐受形成的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与试剂

Walker 256 乳腺癌细胞购自北京鼎国昌盛生物公司。von Frey 纤维丝 (美国 Northcoast 公司), 7370 型热痛仪 (意大利 UGO 公司)。兔抗 GlyT2 抗体 (美国 Abcam 公司), 山羊抗兔辣根过氧化物酶标记 IgG 二抗 (美国 Jackson 公司), GlyT2 siRNA 慢病毒载体 (LV-GlyT2 siRNA) (上海吉凯基因化学技术有限公司)。

### 1.2 动物模型的复制与分组

清洁级成年雌性 SD 大鼠, 体重 180 ~ 220 g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 饲养于中南大学实验动物学部, 实验动物生产许可证号: SCXK (湘) 2019-0004。采用改良 Yaksh 法进行鞘内置管<sup>[9]</sup>, 将鞘内置管成功的 30 只大鼠随机分为鞘内注射生理盐水组 (NS 组)、鞘内注射阴性对照病毒组 (LV-NC 组) 及鞘内注射 GlyT2 siRNA 病毒组 (LV-GlyT2 siRNA 组), 每组 10 只。参照 MAO-YING 等<sup>[10]</sup>的方法复制骨癌痛模型, 在大鼠左侧后肢胫骨上段骨髓腔注入 Walker 256 乳腺癌细胞  $10\mu\text{l}$  ( $4 \times 10^5$  个/ml)。NS 组、LV-NC 组、LV-GlyT2 siRNA 组大鼠接种后

第 7 天分别鞘内注射生理盐水  $10\mu\text{l}$ , 阴性对照病毒  $10\mu\text{l}$  (滴度  $1 \times 10^9$  TU/ml), GlyT2 siRNA 阳性病毒载体  $10\mu\text{l}$  (滴度  $1 \times 10^9$  TU/ml)。接种后第 9 天开始 3 组大鼠均鞘内注射吗啡 (湖北宜昌人福药业, 批号: H21022436),  $10\mu\text{g}$ /次, 2 次/d, 连续 7 d。

### 1.3 疼痛相关行为学检测

**1.3.1 机械缩足阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT)** 3 组大鼠分别在癌细胞接种前及接种后 7 d 测定术侧后肢 MWT<sup>[11]</sup>。将 von Frey 纤维丝垂直伸向大鼠后肢足底, 当大鼠出现抬足或舔足时, 记录 von Frey 克数, 每次间隔 10 min。每组大鼠测定 3 次, 取最小值。

**1.3.2 最大可能效能百分比 (percent of the maximum possible effect, %MPE)** 3 组大鼠在吗啡注射前, 以及注射后 1 d、3 d、5 d、7 d 测量大鼠热痛阈尾潜伏期, 并计算 %MPE<sup>[12]</sup>。将大鼠尾部置于刺激仪辐射源正中, 刺激仪辐射强度设为  $54^\circ\text{C}$ , 临界值设为 20 s, 当尾部甩动时记录时间。测量 3 次取平均值, 每次间隔 10 min。以 %MPE 表示吗啡的镇痛效能, %MPE = (效应时间 - 基础时间) / (临界值 - 基础时间)  $\times$  100%。

### 1.4 Western blotting 检测大鼠脊髓 GlyT2 蛋白的表达

取大鼠脊髓腰膨大, 加入预冷的 RIPA 裂解液, 离心后取上清液, 利用 BCA 法测量蛋白浓度, 随后将各组  $50\mu\text{g}$  蛋白样品上样, 在 10% SDS-PAGE 凝胶中, 80 V 恒压电泳 30 min, 然后 120 V 电泳 60 min。随后恒流 280 mA, 60 min 转膜。转膜成功后, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入兔抗 GlyT2 多克隆抗体 (1 : 400), 兔抗 Tublin 抗体 (1 : 2 000)  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜, 第 2 天用 1% TBST 室温洗膜后加入生物素标记的山羊抗兔二抗 (1 : 5 000), 室温孵育 1 h, 清洗后用 ECL 发光液进行显色。

### 1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件。计量数据采

用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较用单因素方差分析或重复测量设计的方差分析, 进一步两两比较用 LSD-*t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 行为学结果

3 组大鼠在癌细胞接种前及接种后 7 d 的术侧后肢 MWT 比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间的大鼠 MWT 有差异 ( $F = 526.900, P = 0.000$ ); 各组大鼠癌细胞接种后术侧 MWT 均较接种前下降 ( $P < 0.05$ ), 说明骨癌痛模型复制成功。② 3 组大鼠 MWT 无差异 ( $F = 0.077, P = 0.926$ )。③ 3 组大鼠 MWT 变化趋势无差异 ( $F = 1.796, P = 0.185$ )。见表 1。

3 组大鼠注射吗啡后 1 d、3 d、5 d、7 d 的 %MPE 比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同

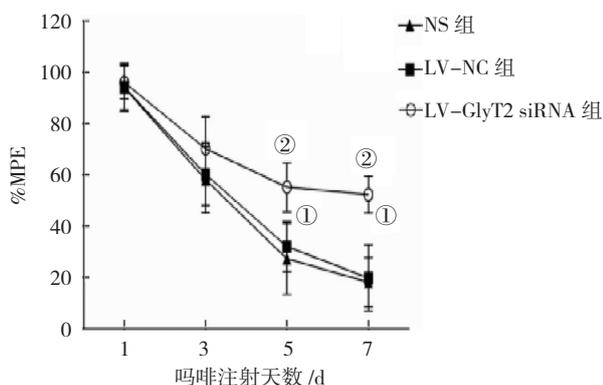
时间点大鼠 %MPE 有差异 ( $F = 575.280, P = 0.000$ )。② 3 组大鼠 %MPE 有差异 ( $F = 19.461, P = 0.000$ )。注射吗啡后 5 d 和 7 d, LV-GlyT2 siRNA 组 %MPE 高于其他两组 ( $P < 0.05$ ), 说明鞘内注射 LV-GlyT2 siRNA 可以缓解骨癌痛大鼠吗啡耐受。③ 3 组大鼠 %MPE 变化趋势有差异 ( $F = 15.25, P = 0.000$ )。见表 2 和图 1。

表 1 3 组大鼠癌细胞接种前后术侧后肢 MWT 比较 ( $n = 10, g, \bar{x} \pm s$ )

组别	接种前	接种后 7 d
NS 组	8.80 ± 1.39	2.42 ± 1.46
LV-NC 组	8.40 ± 1.26	3.20 ± 1.39
LV-GlyT2 siRNA 组	8.80 ± 1.03	2.60 ± 1.27

表 2 3 组大鼠不同时间点 %MPE 比较 ( $n = 10, \%, \bar{x} \pm s$ )

组别	1 d	3 d	5 d	7 d
NS 组	94.32 ± 8.58	58.09 ± 11.34	27.29 ± 12.24	18.20 ± 9.46
LV-NC 组	94.59 ± 7.93	60.20 ± 10.72	32.09 ± 8.65	19.86 ± 12.76
LV-GlyT2 siRNA 组	96.09 ± 5.71	70.61 ± 11.07	55.20 ± 8.35	52.34 ± 7.25



①与 LV-NC 组比较,  $P < 0.05$ ; ②与 NS 组比较,  $P < 0.05$ 。

图 1 3 组大鼠 %MPE 的变化趋势 ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

### 2.2 3 组大鼠 GlyT2 蛋白相对表达量比较

吗啡注射第 7 天, 3 组大鼠 GlyT2 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 53.880, P = 0.000$ ); LV-GlyT2 siRNA 组低于 LV-NC 组和 NS 组 ( $P < 0.05$ )。见图 2。



图 2 3 组大鼠吗啡注射后 7 d 脊髓腰膨大 GlyT2 蛋白的表达

## 3 讨论

本研究结果表明, 骨癌痛大鼠鞘内注射 LV-GlyT2 siRNA 后脊髓 GlyT2 表达下调, 在给予吗啡处理后的第 5 天和第 7 天, 大鼠 %MPE 较 LV-NC 组及 NS 组明显升高, 说明鞘内注射 GlyT2 siRNA 慢病毒载体能够延缓骨癌痛大鼠吗啡耐受的形成。

GlyT2 是调节突触间甘氨酸浓度的重要转运体, 其可以将突触间隙中的甘氨酸重新摄入突触前囊泡, 清除突触间隙中的甘氨酸<sup>[13-14]</sup>。甘氨酸是中枢神经系统重要的抑制性神经递质, 在突触可塑性形成及疼痛

信号传导中发挥重要作用<sup>[15-17]</sup>。甘氨酸在神经系统中的作用分为 2 种：一种是与体内甘氨酸受体结合，抑制神经冲动传导；另一种是与 NMDA 兴奋性受体上的甘氨酸-B 位点作用，协同激活 NMDA 受体，参与兴奋性神经传递<sup>[18-19]</sup>。研究发现，GlyT2 选择性抑制剂如 Org25543、ALX1393 及 GT-0198 可以减轻神经病理性疼痛<sup>[20-22]</sup>。最近有研究发现，鞘内注射 GlyT2 抑制剂或 GlyT2 siRNA 可以缓解骨癌痛相关的痛觉异常及痛觉过敏，并且可以增强单次给予吗啡的镇痛效能<sup>[8]</sup>。本实验中骨癌痛大鼠鞘内注射 GlyT2 siRNA 慢病毒载体后 GlyT2 表达下调，使用吗啡处理后，大鼠 %MPE 值仍维持在 50% 以上，说明抑制 GlyT2 表达能延缓吗啡耐受的形成。GlyT2 抑制剂有时难以透过血-脑屏障，且靶组织的渗透作用较弱，因此选择操作简便、效果可靠的给药方式保证 GlyT2 表达下调或功能抑制是研究及临床运用的关键。慢病毒载体介导的 LV-GlyT2 siRNA 可以相对局限地作用于注射部位，能够转染多种神经细胞，不良反应少，并且单次注射后可以长期且稳定地发挥生物学效应<sup>[23-24]</sup>。由于慢病毒载体注射入大鼠体内后一般 4 d 或 5 d 开始产生作用，并在 1 周左右达最大效应，因此本研究选择在接种癌细胞后第 7 天通过鞘内注射 GlyT2 siRNA 慢病毒载体，以期在吗啡发挥作用期间产生最佳效应。

LV-GlyT2 siRNA 缓解吗啡耐受的具体机制不明确，可能与增强甘氨酸能神经冲动有关。研究发现，给予 GlyT2 抑制剂可以延长脊髓 X 板层神经元中甘氨酸能 IPSPs 的衰减时间<sup>[25]</sup>，提示 GlyT2 抑制剂可以在感觉神经元中促进甘氨酸能神经传递，其认为抑制胶质细胞或神经元中甘氨酸转运体可以提高脊髓中甘氨酸浓度，并延长甘氨酸能电位的持续时间。WHITEHEAD 等<sup>[26]</sup>通过微透析的方法发现，给予大鼠 GlyT2 选择性抑制剂可以提高大鼠脊髓脑脊液中的甘氨酸浓度。笔者将在后续实验中测量脊髓脑脊液中的甘氨酸浓度，以明确 LV-GlyT2 siRNA 缓解吗啡耐受的具体机制。

综上所述，大鼠鞘内注射 GlyT2 siRNA 慢病毒载体可延缓骨癌痛大鼠吗啡耐受的形成。

#### 参 考 文 献:

- [1] ZAJĄCZKOWSKA R, KOCOT-KĘPSKA M, WORDLICZEK J, et al. Bone pain in cancer patients: mechanisms and current treatment[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(23): 6047.
- [2] 余慧芬, 唐李, 安家乐, 等. 骨癌痛发生机制的研究进展[J]. *吉林医药学院学报*, 2018, 39(5): 385-388.
- [3] 黄金路, 郭澄. 骨癌痛及其动物模型研究进展[J]. *生物技术通讯*, 2020, 31(2): 214-219.
- [4] 乔建玲, 秦飞. 吗啡控释片、双氯芬酸联合塞来昔布治疗转移性骨癌痛的临床疗效[J]. *中国保健营养*, 2020, 30(23): 14.
- [5] KOSHIMIZU TA, HONDA K, NAGAOKA-UOZUMI S, et al. Complex formation between the vasopressin 1b receptor,  $\beta$ -arrestin-2, and the  $\mu$ -opioid receptor underlies morphine tolerance[J]. *Nat Neurosci*, 2018, 21(6): 820-833.
- [6] 张博, 孙莉. 吗啡耐受机制的研究进展[J]. *北京医学*, 2020, 42(3): 239-241.
- [7] 赵诗雯, 田学馥. 吗啡耐受的形成机制及治疗进展[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2017, 23(3): 210-214.
- [8] MOTOYAMA N, MORITA K, SHIRAIISHI S, et al. Relief of cancer pain by glycine transporter inhibitors[J]. *Anesth Analg*, 2014, 119(4): 988-995.
- [9] JASMIN L, OHARA P T. Long-term intrathecal catheterization in the rat[J]. *J Neurosci Methods*, 2001, 110(1/2): 81-89.
- [10] MAO-YING Q L, ZHAO J, DONG Z Q, et al. A rat model of bone cancer pain induced by intra-tibia inoculation of walker 256 mammary gland carcinoma cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 345(4): 1292-1298.
- [11] WANG J, XU W, KONG Y, et al. SNAP-25 contributes to neuropathic pain by regulation of VGLuT2 expression in rats[J]. *Neuroscience*, 2019, 423(15): 86-97.
- [12] WENG Y Q, WU J, LI L, et al. Circular RNA expression profile in the spinal cord of morphine tolerated rats and screen of putative key circRNAs[J]. *Molecular Brain*, 2019, 12(1): 79.
- [13] ZEILHOFER H U, ACUÑA M A, GINGRAS J, et al. Glycine receptors and glycine transporters: targets for novel analgesics[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2018, 75(3): 447-465.
- [14] MARQUES B L, OLIVEIRA-LIMA O C, CARVALHO G A, et al. Neurobiology of glycine transporters: from molecules to behavior[J]. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2020, 118: 97-110.
- [15] 薛庆峰, 杨天德. 神经病理性疼痛大鼠脑脊液中 4 种氨基酸浓度变化及意义[J]. *重庆医学*, 2011, 40(32): 3242-3243.
- [16] 王亚利, 汪萌芽. 抑制性氨基酸受体及其递质对突触可塑性的影响[J]. *科技视界*, 2016(13): 276-277.
- [17] 王铖, 刘风雨. 在神经病理性疼痛大鼠中脊髓背角 III 层甘氨酸能神经元投射至 II 层放射状神经元的抑制性环路发生功能障碍[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2017, 23(2): 100.
- [18] NONG Y, HUANG Y Q, JU W, et al. Glycine binding primes NMDA receptor internalization[J]. *Nature*, 2003, 422(6929): 302-307.
- [19] de BARTOLOMEIS A, MANCHIA M, MARMO F, et al. Glycine signaling in the framework of dopamine-glutamate interaction

- and postsynaptic density. Implications for treatment-resistant schizophrenia[J]. *Frontiers in Psychiatry*, 2020,11(369): DOI: 10.3389/fpsy.2020.00369.
- [20] DOHI T, MORITA K, KITAYAMA T, et al. Glycine transporter inhibitors as a novel drug discovery strategy for neuropathic pain[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2009, 123(1): 54-79.
- [21] AL-KHRASANI M, MOHAMMADZADEH A, BALOGH M, et al. Glycine transporter inhibitors: a new avenue for managing neuropathic pain[J]. *Brain Res Bull*, 2019, 152: 143-158.
- [22] 郭云翻, 李祥, 米卫东. 侧脑室注射 Gt-0198 对坐骨神经慢性压迫性损伤大鼠的研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2018, 28(25): 6-10.
- [23] 赵铁军, 倪伟海, 郑有芳, 等. 慢病毒载体及其介导的 RNA 干扰在基因治疗中的应用研究 [J]. *浙江师范大学学报 (自然科学版)*, 2014, 37(2): 206-211.
- [24] 孙上钧, 丁辉, 韩双印. 慢病毒载体在肿瘤基因治疗中的研究进展 [J]. *中华实验外科杂志*, 2017, 34(2): 352-354.
- [25] BRADAIA A, SCHLICHTER R, TROUSLARD J. Role of glial and neuronal glycine transporters in the control of glycinergic and glutamatergic synaptic transmission in lamina X of the rat spinal cord[J]. *J Physiol*, 2004, 559(Pt 1): 169-186.
- [26] WHITEHEAD K J, PEARCE S M, WALKER G, et al. Positive N-methyl-D-aspartate receptor modulation by selective glycine transporter-1 inhibition in the rat dorsal spinal cord in vivo[J]. *Neuroscience*, 2004, 126(2): 381-390.

(童颖丹 编辑)

**本文引用格式:** 徐伟, 王健, 丁卓峰, 等. LV-GlyT2 siRNA 对骨癌痛大鼠吗啡耐受形成的影响 [J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(20): 1-5.