

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.18.002

文章编号: 1005-8982(2016)18-0006-05

论著

## 骨癌痛大鼠脊髓背根神经节主要组织相容复合物 II 表达变化的研究

李明<sup>1</sup>, 耿卫国<sup>2</sup>, 刘文明<sup>3</sup>

(1. 山东省东营市人民医院 护理部, 山东 东营 257091; 2. 山东省东营市立儿童医院, 山东 东营 257091; 3. 滨州医学院附属医院 烧伤整形外科, 山东 滨州 256603)

**摘要:** **目的** 建立大鼠胫骨的骨癌痛模型, 观察骨癌痛发生时脊髓背根神经节内主要组织相容复合物 II (MHC II) 的表达变化情况。**方法** 雌性 SD 大鼠 33 只, 随机分为正常组 (Naive 组,  $n=9$ )、假手术组 (Sham 组,  $n=12$ ) 和骨癌痛组 (骨癌痛组,  $n=12$ )。骨癌痛组右侧胫骨的骨髓腔内接种 Walker 256 乳腺癌细胞, Sham 组注射相等体积的 D-Hanks 液。于手术前 1 天及手术后 3、7、10 和 14 d 使用 von-Frey 丝测定手术侧的机械缩爪阈值; 于手术后 14 d 采集各组 ( $n=9$ ) 的 L<sub>3</sub>~L<sub>5</sub> 的右侧背根神经节, 每 3 只大鼠的背根神经节标本作为一组提取总的蛋白质, 采用蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 MHC II 的变化情况; 于手术后 14 d 多聚甲醛灌注 Sham 组 ( $n=3$ ) 和骨癌痛组 ( $n=3$ ) 大鼠, 取 L<sub>3</sub>~L<sub>5</sub> 的右侧背根神经节制作冷冻切片, 采用免疫荧光双标染色观察 MHC II 的变化情况以及与神经元和卫星细胞的关系。**结果** 手术前各组大鼠的机械缩爪阈值, 差异无统计学意义; 骨癌痛组在骨癌痛模型建立 7 d 后较基础值显著降低, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 且显著低于 Naive 组, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。免疫荧光染色显示 MHC II 表达于背根神经节的卫星细胞; 同时 Western blot 定量结果发现骨癌痛组的 MHC II 表达水平显著高于 Naive 组, 而 Sham 组变化差异无统计学意义。**结论** 骨癌痛大鼠背根神经节的 MHC II 表达升高, 可能参与骨癌痛的外周敏化。

**关键词:** 骨癌痛; 背根神经节; 主要组织相容复合物 II; 外周敏化

**中图分类号:** R-332

**文献标识码:** A

### Expression of major histocompatibility class II in spinal dorsal root ganglions of rats with cancerous bone pain

Ming Li<sup>1</sup>, Wei-guo Gen<sup>2</sup>, Wen-ming Liu<sup>3</sup>

(1. Department of Nursing, Dongying People's Hospital, Dongying, Shandong 257091, China; 2. Children Hospital of Dongying, Dongying, Shandong 257091, China; 3. Department of Burn and Aesthetic Plastic, the Affiliated Hospital, Binzhou Medical University, Binzhou, Shandong 256603, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the changes in the expression level of major histocompatibility class II (MHC II) in spinal dorsal root ganglions of rats with cancerous bone pain (CBP). **Methods** Thirty-three adult virgin female Sprague-Dawley rats weighing 200-220 g, were randomly divided into three groups: naive group ( $n=9$ ), sham group ( $n=12$ ), and CBP group ( $n=12$ ). Walker 256 rat mammary carcinoma cells were inoculated into the right tibial medullary canal to establish a CBP model, whereas the same volume of D-Hanks solution was injected in the sham group. Mechanical paw withdrawal threshold (MPWT) was examined 1 day before and 3, 7, 10 and 14 days

收稿日期: 2016-01-25

[通信作者] 刘文明, E-mail: [GWG1506@sina.com](mailto:GWG1506@sina.com)

after surgery using calibrated von-Frey filaments applied to the center of ipsilateral hind paw. The L3-L5 ipsilateral dorsal root ganglions (DRGs) were collected 14 days after surgery to test the expression level of MHC II by Western blot and immunofluorescent staining. **Results** The MPWT was not significantly different among the three groups before operation. In the CBP group the MPWT significantly decreased on the 7th day after surgery ( $P < 0.05$ ), and was significantly lower than that of the naive group ( $P < 0.05$ ). The immunofluorescent staining identified that MHC II was dominantly expressed by satellite cells in the DRGs of the CBP rats. Furthermore, Western blot results showed that expression level of MHC II was significantly increased in the CBP group, but not in the sham group, as compared with the naive group. **Conclusions** The changes in the expression level of MHC II in satellite cells of DRGs may be involved in the development of peripheral sensitivity under CBP.

**Keywords:** cancerous bone pain; dorsal root ganglion; major histocompatibility class II; peripheral sensitivity

2015 年我国预计新增癌症患者 429.2 万例,其中肺癌、结直肠癌、前列腺癌、乳腺癌等高转移性恶性肿瘤的发病率较高<sup>[1]</sup>。有资料指出,40%进展期及 90%终末期的癌症患者需要接受针对癌症诱发性疼痛的治疗<sup>[2]</sup>,其中骨癌痛(bone cancer pain,BCP)是治疗的重要部分<sup>[3]</sup>。BCP 作为慢性疼痛之一,通常表现为持续痛和爆发痛,严重影响患者的生活质量,目前治疗手段有限。主要组织相容复合物 II (major histocompatibility complex class II ,MHC II)是介导适应性免疫调节的重要分子,研究表明该分子也参与基础痛觉感知以及慢性疼痛的发生<sup>[4-6]</sup>。脊髓背根神经节(dorsal root ganglia,DRGs)作为外周感觉传入的关键部位<sup>[7]</sup>,其在骨癌痛发生时 MHC II 分子的表达变化情况目前尚不清楚。因此,本研究拟观察 BCP 大鼠 DRGs 的 MHC II 表达变化情况,为进一步探讨骨癌痛的发病机制提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物及分组

无特定病原(specific pathogen free,SPF)级健康成年雌性 SD 大鼠 33 只,体重 200 ~ 220 g,由滨州医学院附属医院代谢与神经精神疾病研究所提供。饲养环境:温度( $22 \pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度维持于 60%,自由进水进食。随机分为正常组(Naive 组, $n=9$ )、假手术组(Sham 组, $n=12$ )和骨癌痛组(BCP 组, $n=12$ )。

### 1.2 骨癌痛大鼠模型制备

将 Walker 256 大鼠乳腺癌细胞种植于成年雌雄 SD 大鼠腹腔,7 d 后在无菌条件下提取腹水,使用 D-Hanks 液反复洗涤至清亮,调整细胞浓度为  $4 \times 10^7$  个/ml,置于冰上备用。盐酸戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射,麻醉后固定大鼠于小动物手术台上,右后肢剃毛、消毒,沿胫骨上端前正中纵线纵向切开皮肤,

钝性分离肌肉筋膜等皮下软组织,暴露胫骨粗隆,于胫骨平台下方约 0.5 cm 处用 23 G 注射器针头钻孔至骨髓腔,针尖指向胫骨远端,两者间夹角约为  $30^{\circ}$ 。再使用 20  $\mu\text{l}$  微量注射器沿此孔道进针,向胫骨的髓腔内注射备用的 Walker 256 大鼠乳腺癌细胞 10  $\mu\text{l}$  (约  $4 \times 10^5$  个),注射完毕停留 2 min,退出注射器并迅速使用骨蜡封闭针孔,冲洗手术部位,消毒皮肤,依次缝合肌肉、皮肤。Sham 组大鼠胫骨髓腔内注射相等体积的 D-Hanks 液。

### 1.3 机械痛阈测定

于手术前 1 天以及手术后 3、7、10 和 14 d 的上午 9 : 00 测定大鼠的机械痛阈,即机械缩爪阈值(mechanical paw with drawal threshold,MPWT)。MPWT 测定参考文献的方法<sup>[8]</sup>。大鼠置于独立的玻璃箱内(10 cm  $\times$  10 cm  $\times$  15 cm)适应环境 20 min 后,使用校正后的系列 von-Frey 丝(0.4、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 和 15.0 g)垂直刺激大鼠右后足底中心无毛区域,起始测定值为 2.0 g,持续时间大约 6 ~ 8 s,每级力度重复 5 次,每次间隔 30 s,若 3 次均为阳性反应(快速缩爪、舔足)则降低一级力度测定,若为阴性则增加一级力度,如此反复进行,截断值为 15.0 g。

### 1.4 MHC II 免疫荧光染色

骨癌痛模型建立后 14 d,Sham 组( $n=3$ )和 BCP 组( $n=3$ )大鼠在盐酸戊巴比妥钠麻醉下解剖胸腔,行升主动脉插管,使用 4 $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水 300 ml 和 4%多聚甲醛 500 ml 依次灌注。取 L<sub>3</sub> ~ L<sub>5</sub> 的右侧 DRGs,4%多聚甲醛后固定 24 h,再 30%蔗糖脱水 48 h,行冷冻切片,厚度为 10  $\mu\text{m}$ 。磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline,PBS)缓冲液漂洗 5 次,每次 5 min,PBS 稀释的浓度为 5%的牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)封闭 45 min,随后加入小鼠抗大鼠

MHCII RT1B 抗体(1 : 100)与兔抗大鼠胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体(美国 Merck Millipore 公司, 商品编号:04-1062, 1 : 200),或者与兔抗大鼠 NeuN 抗体(美国 Merck Millipore 公司, 商品编号:MABN140, 1 : 200), 4℃ 孵育 24 h。PBS 缓冲液漂洗 5 次, 每次 5 min, 加入 Cy3- 和 Alexa 488- 标记的相应山羊抗小鼠和山羊抗兔的二抗(美国 Jackson Immuno Research 公司, 商品编号:115-165-003 和 111-545-003, 1 : 200 和 1 : 100) 室温下孵育 1 h, PBS 漂洗 5 min × 3 次, 50% 甘油封片, 荧光显微镜(德国 Leica 公司, DM2500)下观察并获取图像。

### 1.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测

在骨癌痛模型建立 14 d 后安乐死大鼠( $n=9$ ), 取右侧  $L_3 \sim L_5$  的 DRGs 置于冰上, 每 3 只大鼠的标本随机组合为一组, 使用蛋白裂解液(radio immunoprecipitation assay, RIPA) 裂解液提取组织总蛋白, 分光光度法测定蛋白浓度, 将 50  $\mu$ g 蛋白用 10% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移到聚偏氟乙烯膜上, 5% 的 BSA 室温下封闭 1 h, 4℃ 孵育小鼠抗大鼠 MHCII RT1B 一抗(英国 AbD Serotec 公司, 商品编号:MCA46R, 1 : 1 000)和兔抗大鼠  $\alpha$ -tubulin 一抗(英国 Abcam 公司, 商品编号:ab15246, 1 : 1 500) 过夜, 洗膜缓冲液(tris buffered saline with tween-20, TBST) 洗涤 10 min × 3 次, 辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP) 标记的相应二抗(武汉博士

德生物工程有限公司, 1 : 5 000) 室温下孵育 1 h, 再次 TBST 洗涤 10 min × 3 次后使用化学发光法与 HRP 发生反应, 利用 BIO-RAD Gel Doc 2000 凝胶成像系统获取条带图像数据并分析。

### 1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析, 计量资料采用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 不同时间点 MPWT 的变化用重复测量设计方差分析, 14 d 后 MHC II 蛋白表达水平的比较用随机设计方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MPWT 变化

骨癌痛模型建立前, Naive 组、Sham 组和 BCP 组大鼠肢体功能活动及感觉正常, MPWT 基础值在正常范围, 各组间比较差异无统计学意义。在骨癌痛模型建立 7 d 后, BCP 组大鼠 MPWT 较基础值明显下降( $P < 0.05$ ), 手术后 10 d 和 14 d 时更为显著, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ); 与 Naive 组比较, BCP 组在骨癌痛模型建立 7、10 和 14 d 后 MPWT 均显著降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); Sham 组大鼠在骨癌痛模型建立前后各时间点 MPWT 较基础值无显著变化, 与 Naive 组大鼠比较差异无统计学意义。以上结果提示胫骨髓腔内种植 Walker 256 乳腺癌细胞能够诱发异常疼痛, 类似于骨癌痛患者的临床表现, 说明骨癌痛大鼠模型制作成功。见表 1。

表 1 各组大鼠不同时间点 MPWT 的变化情况 ( $g, \bar{x} \pm s$ )

组别	术前 1 天	手术后时间/d			
		3	7	10	14
Naive 组( $n=9$ )	10.82 $\pm$ 4.25	12.01 $\pm$ 4.65	9.88 $\pm$ 5.21	9.40 $\pm$ 2.57	10.54 $\pm$ 3.93
Sham 组( $n=12$ )	10.82 $\pm$ 4.25	7.86 $\pm$ 1.51	9.58 $\pm$ 5.04	10.09 $\pm$ 2.62	10.05 $\pm$ 4.81
BCP 组( $n=12$ )	10.93 $\pm$ 3.95	8.35 $\pm$ 4.82	5.27 $\pm$ 4.96 <sup>1)2)</sup>	1.57 $\pm$ 0.58 <sup>3)4)</sup>	1.33 $\pm$ 1.13 <sup>3)4)</sup>

注: 1) 组内与术前 1 天比较,  $P < 0.05$ ; 2) 相同时间点与 Naive 组比较,  $P < 0.05$ ; 3) 组内与术前 1 天比较,  $P < 0.01$ ; 4) 相同时间点与 Naive 组比较,  $P < 0.01$

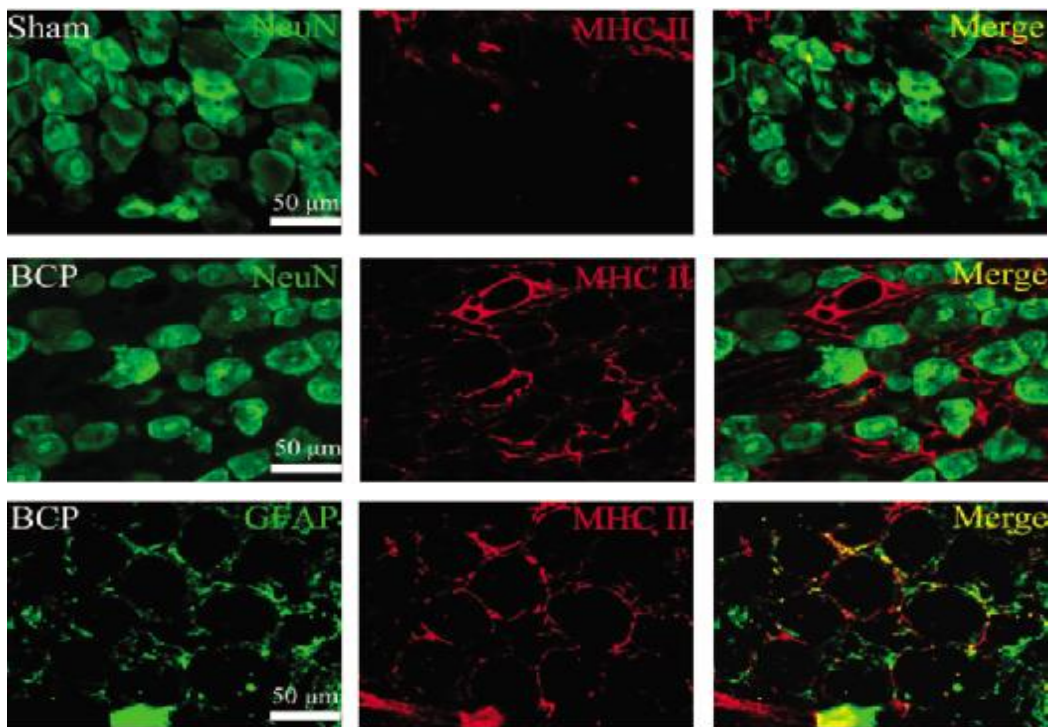
### 2.2 MHC II 在 DRGs 表达的细胞类型

收集骨癌痛模型建立 14 d 后的 BCP 组大鼠右侧  $L_3 \sim L_5$  的 DRGs 制作冷冻切片, 通过免疫荧光双标观察 MHC II 在 DRGs 表达的细胞类型, 发现 MHC II 与 GFAP 共定位, 而不与 NeuN 共定位, 提示骨癌痛病理情况下 DRGs 的 MHC II 由卫星细胞表达。见图 1。

### 2.3 MHC II 蛋白表达水平在 DRGs 的变化情况

在骨癌痛大鼠模型建立 14 d 后, 收集大鼠右侧  $L_3 \sim L_5$  的 DRGs, 利用 Western blot 方法检测 MHC II 的蛋白表达水平, 发现 BCP 组大鼠在手术后 14 d 时 MHC II 蛋白表达水平在该侧  $L_3 \sim L_5$  的 DRGs 表达较 Naive 组显著升高( $P < 0.05$ ), 而 Sham 组无显著变化。该结果提示 MHC II 可能参与骨癌痛的病理过程。见图 2 和表 2。





免疫荧光双标观察 MHC II (红色)分别于 NeuN(神经元标记物,绿色)或 GFAP(卫星细胞标记物,绿色)的共定位情况,发现 BCP 组大鼠 DRGs 的 MHC II 表达于神经元周围的卫星细胞上。标尺 =50 μ.m

图 1 MHC II 表达于 BCP 大鼠 DGRs 的卫星细胞

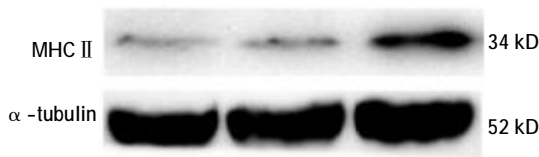


图 2 各组大鼠 MHC II 在 L<sub>3</sub>~L<sub>5</sub> 节段 DRGs 的表达情况

表 2 各组大鼠 MHC II 蛋白在 L<sub>3</sub>~L<sub>5</sub> 节段 DRGs 的相对表达量比较 (g,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	MHC II / $\alpha$ -tubulin 蛋白的表达量	F 值	P 值
Naive 组	1.000 $\pm$ 0.000		
Sham 组	1.336 $\pm$ 0.352		
BCP 组	3.168 $\pm$ 0.449 <sup>†</sup>	37.661	0.000

注:† 与 Naive 组比较,  $P < 0.05$

### 3 讨论

近年来,多种肿瘤细胞系和动物品系被用来制备 BCP 动物模型<sup>[9]</sup>,以模拟 BCP 患者的临床症状及病理生理机制,进而对 BCP 的发病机制进行研究,同时探索该疾病行而有效的治疗方案。本研究采用成熟的 BCP 模型制备方法,向大鼠右侧胫骨的髓腔内注射 Walker 256 大鼠乳腺癌细胞,在种植 7 d 后该侧肢体对 15 g 以下的系列 von-Frey 丝刺激(通常为无

害性触觉)表现异常疼痛,MPWT 呈时间依赖的显著性下降,表明骨癌痛大鼠模型制备成功。

骨癌痛发生于原发性骨骼肿瘤或其他部位恶性肿瘤(例如乳腺癌、前列腺癌、肺癌等)中晚期转移至骨骼,表现为进行性加重的持续痛,并伴有自发痛及活动诱发痛,严重影响患者的生活质量,发病机制复杂<sup>[10]</sup>。当恶性肿瘤发生于骨骼时,一方面肿瘤及其基质细胞产生并释放致痛物质,如缓激肽、内皮素、神经生长因子、IL-6、TNF- $\alpha$  等,它们参与敏化或直接兴奋初级传入纤维<sup>[11]</sup>;另一方面,肿瘤生长导致骨骼微环境的变化能够诱发骨骼重塑,该病理性改变兴奋支配骨骼的机械性压力感受器,表现为爆发痛(活动诱发痛)<sup>[12]</sup>;此外,当肿瘤细胞突破骨骼侵蚀至周围组织时,破坏感觉纤维的远端末梢,引起神经病理性疼痛<sup>[13]</sup>。以上论述说明外周感觉传入纤维的敏化在 BCP 的发生及维持中具有重要的作用。DRGs 是外周初级感觉传入纤维的细胞体所在,是外周敏化的关键部位,所以有理由认为 DRGs 的系列改变能够反映 BCP 发生时外周敏化的进展程度。利用逆行示踪技术发现,支配胫骨的感觉纤维主要来自于 L<sub>3</sub> 的 DRG,还有少部分来自于 L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub>、L<sub>4</sub> 和 L<sub>5</sub><sup>[7]</sup>。因此,本研究中采集右侧 L<sub>3</sub>~L<sub>5</sub> 的 DRGs 进行研究。

主要组织相容复合物在大鼠命名为 RT1 系统, 其中 MHC II 称为 RT1-B/D, 包含有  $\alpha$  链和  $\beta$  链, 基因定位于大鼠的 20 号染色体上<sup>[4]</sup>。通常认为 MHC II 参与适应性免疫反应的抗原递呈, 然而新近研究发现编码该分子的基因与基础痛觉的感知有关<sup>[6]</sup>, 甚至参与慢性疼痛发生的调控<sup>[9]</sup>, 更有证据表明该蛋白分子直接与神经病理性疼痛的发生存在一定关系<sup>[9]</sup>。有学者报道, 脊髓小胶质细胞表达 MHC II 与由外周血液趋化迁移而来的 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞相互作用并释放促炎症细胞因子和趋化因子, 介导神经病理性疼痛的中枢敏化<sup>[10]</sup>, 而抑制该分子的表达能够逆转神经损伤导致的相关疼痛行为<sup>[16]</sup>。在本研究中, 笔者观察到骨癌痛发生时大鼠 DRGs 的 MHC II 表达水平上调, 且定位于卫星细胞上, 据此推测 MHC II 参与骨癌痛外周敏化的发生过程。

在此项研究中, 笔者发现 BCP 大鼠的痛阈显著降低, DRGs 的 MHC II 表达显著升高, 提示 MHC II 可能参与 BCP 的外周敏化的病理过程, 在未来的工作中笔者将对该分子在转录及翻译水平进行有效干预, 进一步证实其在 BCP 病理过程中的作用, 为 BCP 治疗提供新的靶点。

#### 参 考 文 献:

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] PALEY C A, JOHNSON M I, TASHANI O A, et al. Acupuncture for cancer pain in adults [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2015, 10: DOI: 10.1002/14651858.CD007753.pub3.
- [3] CLOHISY D R, MANTYH P W. Bone cancer pain[J]. Cancer, 2003, 97(3 Suppl): 866-873.
- [4] MOGIL J S. Pain genetics: past, present and future[J]. Trends Genet, 2012, 28(6): 258-266.
- [5] GUO Y, YAO F R, CAO D Y, et al. The major histocompatibility complex genes impact pain response in DA and DA.1U rats[J]. Physiol Behav, 2015, 147: 30-37.
- [6] GUO Y, YAO F, LU S, et al. The major histocompatibility complex genes are associated with basal pain sensitivity differences between Dark-Agouti and novel congenic DA.1U rats[J]. Life Sci, 2010, 86(25-26): 972-978.
- [7] KAAAN T K, YIP P K, PATEL S, et al. Systemic blockade of P2X3 and P2X2/3 receptors attenuates bone cancer pain behaviour in rats[J]. Brain, 2010, 133(9): 2549-2564.
- [8] GUAN X H, FU Q C, SHI D, et al. Activation of spinal chemokine receptor CXCR3 mediates bone cancer pain through an Akt-ERK crosstalk pathway in rats[J]. Exp Neurol, 2015, 263: 39-49.
- [9] CURRIE G L, DELANEY A, BENNETT M I, et al. Animal models of bone cancer pain: systematic review and meta-analyses[J]. Pain, 2013, 154(6): 917-926.
- [10] LUGER N M, MACH D B, SEVCIK M A, et al. Bone cancer pain: from model to mechanism to therapy[J]. J Pain Symptom Manage, 2005, 29(5 Suppl): S32-46.
- [11] JULIUS D, BASBAUM A I. Molecular mechanisms of nociception[J]. Nature, 2001, 413(6852): 203-210.
- [12] MANTYH P W. Bone cancer pain: from mechanism to therapy[J]. Curr Opin Support Palliat Care, 2014, 8(2): 83-90.
- [13] OHTORI S, INOUE G, KOSHI T, et al. Characteristics of sensory dorsal root ganglia neurons innervating the lumbar vertebral body in rats[J]. J Pain, 2007, 8(6): 483-488.
- [14] HURT P, WALTER L, SUDBRAK R, et al. The genomic sequence and comparative analysis of the rat major histocompatibility complex[J]. Genome Res, 2004, 14(4): 631-639.
- [15] GRACE P M, ROLAN P E, HUTCHINSON M R. Peripheral immune contributions to the maintenance of central glial activation underlying neuropathic pain[J]. Brain Behav Immun, 2011, 25(7): 1322-1332.
- [16] SWEITZER S M, WHITE K A, DUTTA C, et al. The differential role of spinal MHC class II and cellular adhesion molecules in peripheral inflammatory versus neuropathic pain in rodents[J]. J Neuroimmunol, 2002, 125(1/2): 82-93.

(张蕾 编辑)