

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.06.002

脊髓 CXCL13 在大鼠骨癌痛形成中的作用*

吴艳琼,柯昌斌[△],许先成,孙艳玲,王贤裕
(湖北省十堰市太和医院麻醉科 442000)

[摘要] **目的** 探讨脊髓趋化因子 CXC 配体 13(CXCL13)在大鼠骨癌痛形成中的作用。**方法** 健康雌性 SD 大鼠 20 只,体重 160~200 g,分为 4 组($n=5$):假手术组(S 组)、骨癌痛组(BP 组)、小干扰 RNA(siRNA)阴性对照(NC-siRNA)组(NC 组)和 CXCL13-siRNA 组(CS 组)。S 组经骨髓腔内注射生理盐水,BP 组、NC 组和 CS 组均采用胫骨髓腔内注射等量 Walker-256 乳腺癌细胞的方法建立大鼠胫骨癌痛模型,NC 组和 CS 组分别鞘内注射 NC-siRNA 慢病毒和 CXCL13-siRNA 慢病毒 10 μ L。分别于造模前 1 d 及术后第 7、9、14、21 天时测定机械痛阈值,痛阈测定结束后处死大鼠,取脊髓和胫骨组织,采用免疫荧光双标染色检测脊髓 CXCL13、小胶质细胞特异性标记物(Iba-1)和神经元特异核蛋白(NeuN)的共表达情况;采用 Western-blot、RT-PCR 法测定脊髓 CXCL13、Iba-1 的蛋白及 mRNA 表达;采用 HE 染色光镜下观察胫骨骨结构破坏情况。**结果** 与 S 组比较,BP 和 NC 组接种后 7~21 d 机械痛阈下降($P<0.05$),CXCL13 在神经元中表达显著上调,小胶质细胞明显活化($P<0.05$),CXCL13 和 Iba-1 蛋白及 mRNA 水平明显升高($P<0.05$);与 NC 组比较,CS 组造模后 9~21 d 机械痛阈升高($P<0.05$),CXCL13 在神经元中表达明显下调,小胶质细胞活化减少($P<0.05$),CXCL13 和 Iba-1 蛋白及 mRNA 水平明显下降($P<0.05$);HE 染色显示 BP、NC 组、CA 组均出现骨髓腔内肿瘤生长且向外侵蚀破坏骨皮质,S 组未见异常。**结论** 脊髓 CXCL13 通过激活小胶质细胞参与大鼠骨癌痛的形成。

[关键词] CXC 配体 13;小胶质细胞;骨癌痛

[中图分类号] R363.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)06-0724-04

Role of spinal cord CXCL13 in formation of bone cancer pain in rats*

WU Yanqiong, KE Changbin[△], XU Xiancheng, SUN Yanling, WANG Xianyu

(Department of Anesthesiology, Taihe Hospital, Shiyan, Hubei 442000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role of spinal cord chemokine CXC ligand13(CXCL13) in the formation of rat bone cancer pain(BCP). **Methods** Twenty healthy female SD rats weighing 160–200 g were divided into four groups($n=5$): sham operation group(S), BCP group(BP), small interference RNA(siRNA) negative control(NC-siRNA) group(NC) and CXCL13-siRNA group(CS). Normal saline was given by tibial medullary cavity injection in the S group. The tibial BCP model was established by tibial medullary cavity injection of equivalent Walker-256 breast cancer cells in the group BP, NC and CS. NC-siRNA lentivirus and CXCL13-siRNA lentivirus were injected intrathecally in the group NC and CS respectively. The mechanical pain threshold was measured on 1 d before model construction and on postoperative 7, 9, 14, 21 d. The rats were killed after pain threshold measurement. The spinal cord and tibial tissue were taken. The co-expression of spinal CXCL13, microglia specific marker Iba-1 and neuron specific nucleoprotein NeuN was determined by using the immunofluorescence double standard staining, and expressions of CXCL13 and ionized calcium binding adaptor molecule-1(Iba-1) protein and mRNA in spinal cord were detected by Western blot and RT-PCR; the HE staining microscopy was adopted to observe the tibial bone structure destroy situation. **Results** Compared with group S, the mechanical pain threshold in the BP group and NC group was decreased on 7–21 d after inoculation, CXCL13 expression in neuron was significantly increased and microglia was obviously activated, the expression of CXCL13 and Iba-1 protein and mRNA was significantly elevated ($P<0.05$); compared with the NC group, the mechanical pain threshold on 9–21 d after model construction in the CS group was significantly increased, CXCL13 expression in neurons was significantly decreased, microglia activation was decreased and expression of CXCL13 and Iba-1 protein and mRNA was significantly decreased ($P<0.05$); HE staining showed that the model groups appeared the tumor growth in bone marrow cavity, moreover which was eroded outwards and destroyed bone cortex, but no abnormality was found in the S group. **Conclusion** Spinal cord CXCL13 is involved in the BCP formation in rats by activating microglia.

[Key words] CXC ligand 13; microglia; bone cancer pain

骨癌痛是一种复杂难治的慢性疼痛,其确切的发病机制尚 未明了。趋化因子 CXC 配体 13(CXCL13)是 CXC 趋化因子

的一种,主要参与机体的免疫及炎症反应。近年来研究发现, CXCL13 在神经系统中存在表达,并通过激活神经胶质细胞参与慢性疼痛的形成与维持,如神经病理性痛、炎性痛等^[1]。骨癌痛中小胶质细胞的激活已被证实^[2-4],其激活参与神经元结构与功能的重塑,介导痛觉过敏的产生和痛觉的持续状态,而 CXCL13 是否参与骨癌痛的病理、生理过程,有待探讨。因此,本研究拟观察胫骨癌痛大鼠 CXCL13 表达水平及小胶质细胞活化情况,评价 CXCL13 在骨癌痛中的作用。

1 材料与方

1.1 材料 健康成年雌性 SD 大鼠 120 只,体质量 160~200 g,实验室温、湿度分别保持为 22~24 °C 和 40%~60%,采用 12 h 昼夜周期光照,自由进食、饮水。阴性对照 siRNA 和 CXCL13-siRNA 均由上海吉凯基因化学技术有限公司合成。将 120 只大鼠分为 4 组:假手术组(S 组)、骨癌痛组(BP 组)、小干扰 RNA(siRNA)阴性对照(NC-siRNA)组(NC 组)和 CXCL13-siRNA 组(CS 组),每组 5 例。

1.2 方法

1.2.1 大鼠胫骨癌痛模型制备 将冻存于液氮中的 Walker-256 乳腺癌细胞复苏后,种植于传代用雌性 SD 大鼠腹腔,饲养 7 d 左右出现大量腹水,局部消毒后从腹腔抽取含肿瘤细胞的腹水 20 mL;经离心沉淀后,稀释至所需浓度约每毫升 1×10^8 个细胞,保存于冰上备用。腹腔注射氯胺酮 50 mg/kg 麻醉, BP 组、NC 组和 CS 组均采用胫骨髓腔内注射等量 Walker-256 乳腺癌细胞的方法建立大鼠胫骨癌痛模型,三组大鼠于左胫骨上段切开约 5 mm 小口,暴露胫骨,5 mL 注射器针头于骨上穿刺打孔,再用微量注射器缓慢注入肿瘤细胞悬浮液 5 μ L(1×10^4 个),骨蜡封堵针孔,冲洗并缝合皮肤,创口处涂青霉素钠粉未预防感染。S 组胫骨髓腔内注射等量生理盐水,其余处理同上。于造模即刻起,NC 组鞘内注射 NC-siRNA 慢病毒 10 μ L(10^8 TU/mL);CS 组鞘内注射 CXCL13-siRNA 慢病毒 10 μ L(10^8 TU/mL)。

1.2.2 机械痛阈检测 参照文献^[5]分别于造模前 1 d,术后 7、9、14、21 d 时采用 von FreyTM 动态足底触觉测量仪(意大利 UGO 公司)测定大鼠机械缩足阈值(MWT)。大鼠置于金属笼(10 cm×10 cm×15 cm),适应环境 20 min,处于静息状态时,开始测定,von Frey 丝由下向上垂直刺激右侧足底中部皮肤,设定 20 s 内刺激逐渐由 0 升高为 50 g,当出现快速缩足反应时,刺激自动停止,记录压力值,共测 3 次,间隔 5 min,取其平均值作为 MWT。

1.2.3 HE 染色观察骨结构破坏情况 取假手术和造模后大鼠胫骨。先用 4%多聚甲醛固定 1 周,再在含 10%乙二胺四乙酸(EDTA)的固定液中脱钙 4 周,石蜡切片。HE 染色,镜下观察肿瘤生长和骨结构的破坏情况。

1.2.4 免疫荧光双标检测 痛阈测定结束后,麻醉下迅速暴露心脏,用 4%多聚甲醛经左心室灌注,取 L4~L6 脊髓组织常规固定,30%蔗糖脱水至沉底,冰冻连续切片(厚 15 μ m),加入封闭液,室温孵育 30 min,PBS 漂洗后,同时加入 1:500 多克隆山羊抗大鼠 CXCL13 抗体(美国 Abcam 公司)和 1:1 000 单克隆小鼠抗大鼠 NeuN 抗体(美国 Millipore 公司),孵育 12 h 后,PBS 洗涤 3 次,加入相应荧光标记二抗,室温孵育 2 h 后,

PBS 洗涤 3 次,用 50%甘油封片。激光共聚焦荧光显微镜(德国 Zeiss 公司)观察 CXCL13 在神经元上的表达情况和小胶质细胞活化情况。

1.2.5 Western blot 检测 CXCL13 和 Iba-1 蛋白表达 取 L4~L6 脊髓,加组织裂解液,经冰浴匀浆后抽提总蛋白,用 BCA 法进行蛋白浓度定量,取上样蛋白 50 μ g(20 μ L),经 10% SDS-PAGE 凝胶分离蛋白转膜 2 h,5%脱脂牛奶室温封闭膜 1 h;用 TBST 洗膜 3 次,加入 β -actin(1:3 000,美国 Chemicon 公司)和 1:1 000 稀释的羊抗大鼠 CXCL13 抗体、1:1 000 稀释的兔抗大鼠 Iba-1 抗体,洗膜 3 次,再加二抗(美国 Jackson 公司),室温孵育 2 h,洗膜 3 次,加入 ECL 显色液显色。应用全自动凝胶图像分析系统对显影胶片进行扫描与分析,以 CXCL13 和 Iba-1 条带积分光密度值与 β -actin 条带吸光度值的比值反映 CXCL13 和 Iba-1 的蛋白表达。

1.2.6 RT-PCR 法检测 CXCL13 和 Iba-1 mRNA 表达 从组织标本提取总 mRNA,-70 °C 冻存。采用反转录试剂盒将 mRNA 反转录为 cDNA,遵循 PCR 引物设计原则,以 GAPDH 作为内参照,引物由上海生物工程公司合成,序列见表 1。扩增条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 30 s,54 °C 30 s,72 °C 20 s,共 45 个循环;72 °C 延伸 10 min。计算 CXCL13 和 Iba-1 与内参照 GAPDH 的比值作为目的基因的相对表达量。

表 1 RT-PCR 引物序列

基因	方向	引物序列
GAPDH	上游引物	5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3'
	下游引物	5'-ATGGTGGTGAAGACGCCACTA-3'
CXCL13	上游引物	5'-CTGCTCGGAATCTTAGTGT-3'
	下游引物	5'-GGTAATGCGTCTGCTTCT-3'
Iba-1	上游引物	5'-GGATGGGATCAACAAGCACT-3'
	下游引物	5'-GTTTCTCCAGCATTGCTTC-3'

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计学软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

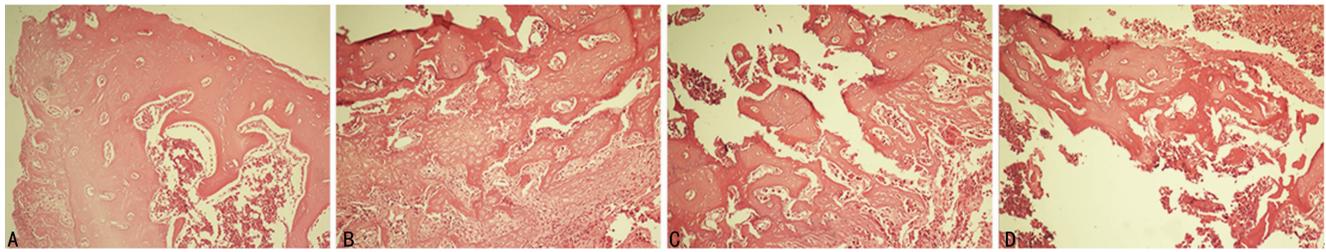
2.1 各组大鼠术后不同时点机械痛阈的比较 与 S 组比较,BP 和 NC 组接种后第 9 天机械痛阈显著下降,并持续至实验结束($P < 0.05$);与 BP 组比较,CS 组造模后第 9 天机械痛阈显著升高,并持续至实验结束($P < 0.05$),见表 2。

表 2 各组大鼠术后不同时点机械痛阈的比较($n=5, \bar{x} \pm s, g$)

组别	造模前	造模后			
	第 1 天	第 7 天	第 9 天	第 14 天	第 21 天
S 组	42±6	41±5	40±4	42±6	42±7
BP 组	41±4	39±6	31±4 ^a	22±3 ^a	19±3 ^a
NC 组	42±7	40±5	33±4	23±5	20±4
CS 组	39±4	37±5	34±6 ^b	31±5 ^b	30±3 ^b

^a: $P < 0.05$,与 S 组比较;^b: $P < 0.05$,与 N 组比较

2.2 HE 染色结果 光镜下观察显示 S 组骨髓腔内见各种正



A: S 组; B: 模型组术后 7 d; C: 模型组术后 14 d; D: 模型组术后 21 d

图 1 S 组与模型组骨结构病理学结果 ($\times 300$)

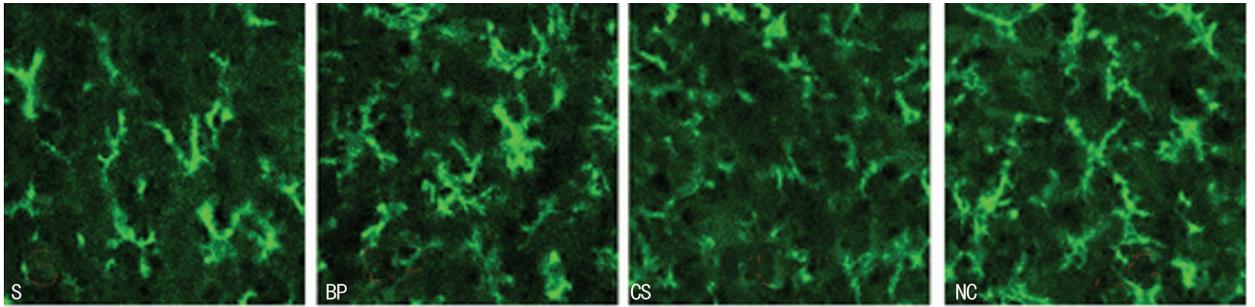


图 2 脊髓小胶质细胞在各组中的活化情况 ($\times 40$)

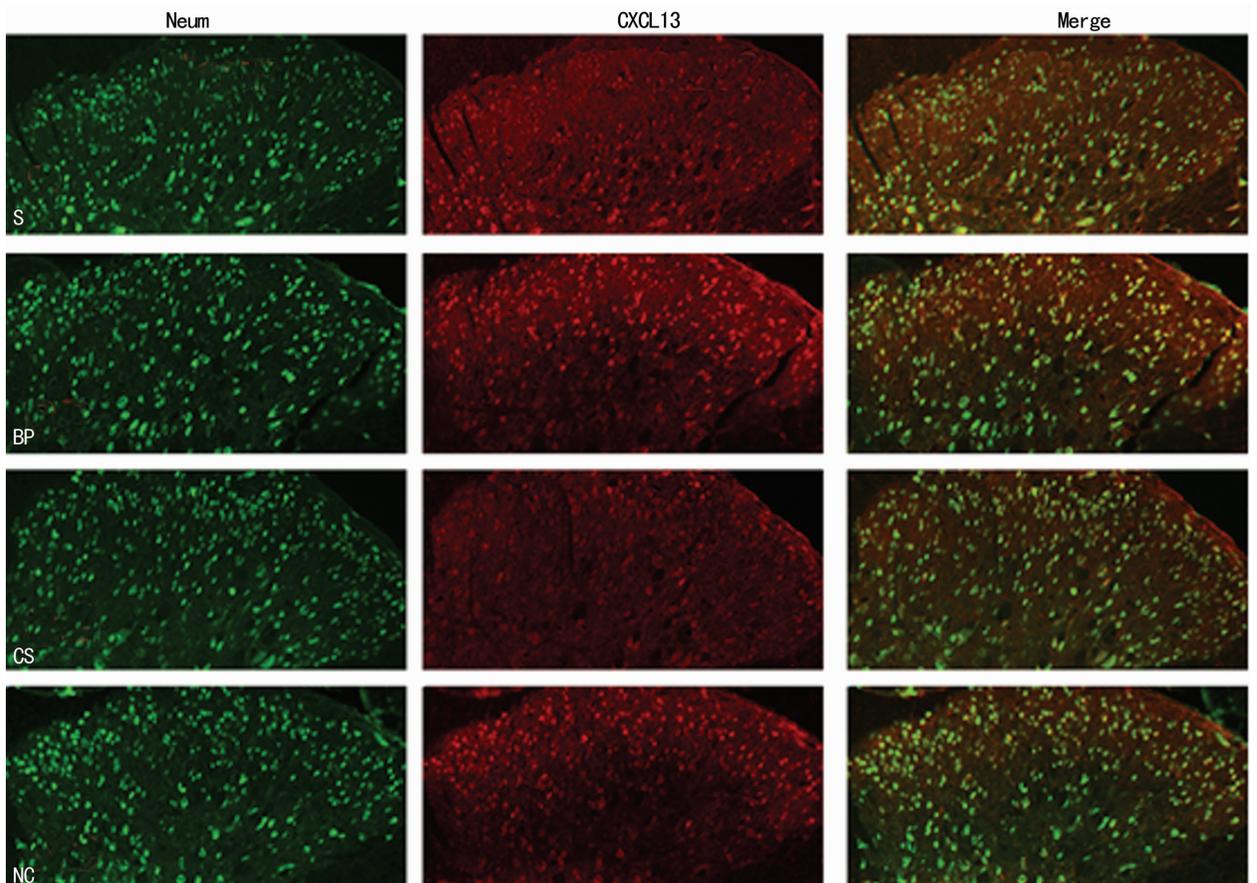


图 3 CXCL13 在各组大鼠脊髓中的表达分布 ($\times 20$)

常的骨髓细胞,无异常骨结构的改变,模型组术后 7 d 大鼠注射侧胫骨骨髓腔内及骨小梁间被大量肿瘤细胞填充,肿瘤细胞生长活跃,已穿破骨皮质,侵及周围肌肉及软组织,后期出现骨质破坏和病理性骨折,见图 1。

2.3 免疫荧光双标结果 骨癌痛大鼠脊髓小胶质细胞明显活化,CXCL13-siRNA 慢病毒脊髓注射则明显减少其活化(图

2);CXCL13 在神经元中存在表达,骨癌痛大鼠脊髓中 CXCL13 表达升高;CXCL13-siRNA 慢病毒脊髓注射则明显减少 CXCL13 的表达(图 3)。

2.4 CXCL13 和 Iba-1 蛋白及 mRNA 表达水平 与 S 组比较,BP 和 NC 组 CXCL13 和 Iba-1 蛋白及 mRNA 水平明显上调($P < 0.05$);与 BP 组比较,CS 组 CXCL13 和 Iba-1 蛋白及

mRNA 表达水平显著下调 ($P < 0.05$), 见表 4、5。

表 4 各组大鼠术后脊髓 CXCL13、Iba-1 蛋白表达的比较 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

项目	S 组	BP 组	NC 组	CS 组
CXCL13	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.2 ^a	0.8 ± 0.2 ^a	0.5 ± 0.1 ^b
Iba-1	0.8 ± 0.1	1.4 ± 0.4 ^a	1.5 ± 0.3 ^a	1.0 ± 0.2 ^b

^a: $P < 0.05$, 与 S 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 BP 组比较

表 5 各组大鼠术后脊髓 CXCL13、Iba-1 mRNA 表达的比较 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

项目	S 组	BP 组	NC 组	CS 组
CXCL13	1.1 ± 0.2	1.7 ± 0.3 ^a	1.8 ± 0.4 ^a	1.3 ± 0.3 ^b
Iba-1	1.5 ± 0.5	2.6 ± 0.4 ^a	2.8 ± 0.5 ^a	1.8 ± 0.4 ^b

^a: $P < 0.05$, 与 S 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 BP 组比较

3 讨论

本实验参照文献[6]建立大鼠胫骨癌痛模型, 该模型操作简单, 评价方法成熟, 与人类骨癌痛病理生理学特征相似, 已被广泛应用于骨癌痛的实验研究。本研究中, 模型组大鼠术后各测量时点机械痛阈降低, 并出现渐行性加重的自发痛行为, 胫骨 HE 染色显示骨质严重破坏, 假手术组未见明显异常, 行为学及骨破坏研究结果均提示该模型制备成功。

趋化因子 CXCL13 属 CXC 类趋化因子, 是定向趋化 B 细胞的主要调节因子, 与 B 细胞表面的相应受体发生特异性结合后可调控 B 细胞的定向趋化。在慢性疼痛、肿瘤、自身免疫性疾病及多种感染性疾病中, 各种 T、B、单核细胞都会大量聚集, 诱导 CXCL13 在脊髓及局部组织中大量表达, 从而导致疼痛、炎症的发生及局部组织器官的损伤^[7-8], 由此可见 CXCL13 的异常在许多疾病的发生和发展过程中有着重要作用。本研究结果表明, 鞘内注射 CXCL13-siRNA 慢病毒干扰后, CXCL13 在神经元的表达下调, 脊髓 CXCL13 表达亦下调, 大鼠对疼痛的耐受程度增强, 提示 CXCL13 参与了骨癌痛的发生与发展。

在脊髓水平, 胶质细胞不仅对神经元起营养与支持作用, 还参与了疼痛的调节和整合^[8]。研究证实, 小胶质细胞在慢性神经病理性疼痛的发病机制中发挥重要作用, 抑制小胶质细胞的活化, 可减少促炎因子的分泌, 抑制兴奋性氨基酸、一氧化氮等致痛物质的释放, 从而导致脊髓背角痛觉神经元的兴奋性降低^[9]。在骨癌痛研究中证实, 脊髓小胶质细胞大量激活是引起癌症患者产生疼痛的重要因素, 鞘内给予小胶质细胞抑制剂, 可使癌痛大鼠的痛阈显著增加, 明显减轻其痛行为^[10]。本研究中, 与 S 组比较, BP、NC 组术后各测量时点 Iba-1 蛋白表达上调, 同时脊髓背角小胶质细胞明显增生、肥大, 而 CS 组则出现小胶质细胞数目及突起数降低, 胞体皱缩, 提示小胶质细胞的活化参与了大鼠胫骨癌痛的形成。

本研究中, 通过检测小胶质细胞特异性标记物 Iba-1 的表达, 发现注射 CXCL13-siRNA 慢病毒后大鼠脊髓小胶质细胞

活化程度受到明显地抑制, CXCL13 的表达和小胶质细胞的活化具有同步性, 证实了 CXCL13 的活化是调节疼痛敏感的重要环节。其作用机制可能是癌痛产生后神经元通过自身合成分泌的免疫因子参与小胶质细胞活性的调控, 激活小胶质细胞, 从而增强突触后脊髓背角痛觉传递神经元的敏感性和反应性, 导致中枢敏化^[11], 加重骨癌痛。

综上所述, 脊髓 CXCL13 通过激活小胶质细胞参与了大鼠骨癌痛的形成与维持, 抑制 CXCL13 与小胶质细胞之间的活化通路, 能够有效地阻止或逆转疼痛的发生。

参考文献

- [1] FESTA ED, HANKIEWICZ K, KIM S, et al. Serum levels of CXCL13 are elevated in active multiple sclerosis [J]. *Mult Scler*, 2009, 15(11):1271-1279.
- [2] CAO H, ZHANG YQ. Spinal glial activation contributes to pathological pain states [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2008, 32(5):972-983.
- [3] OLSON JK. Immune response by microglia in the spinal cord [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2010, 1198(10):271-278.
- [4] MILLIGAN ED, WATKINS LR. Pathological and protective roles of glia in chronic pain [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2009, 10(1):23-36.
- [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] 姚明, 杨建平, 王丽娜, 等. 腹水传代与体外培养 Walker256 癌细胞株建立大鼠骨癌痛模型的可行性 [J]. *中华医学杂志*, 2008, 88(13):880-884.
- [7] WANG D, DUBOIS RN, RICHMOND A. The role of chemokines in intestinal inflammation and cancer [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2009, 9(6):688-696.
- [8] 商剑, 柯昌斌, 邱飞梅, 等. 脊髓趋化因子 CXC 配体 13 在大鼠神经病理性痛中的作用 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2013, 33(5):569-572.
- [9] WACNIK PW, KEHL LJ, TREMPER TM, et al. Tumor implantation in mouse humerus evokes movement-related hyperalgesia exceeding that evoked by intramuscular carrageenan [J]. *Pain*, 2003, 101(1/2):175-186.
- [10] TSUDA M, SHIGEMOTO-MOGAMI Y, KOIZUMI S, et al. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury [J]. *Nature*, 2003, 424(6950):778-783.
- [11] 申文, 孙玉娥, 苏小虎, 等. 鞘内注射氟代柠檬酸和/或米诺四环素对骨癌痛小鼠脊髓胶质细胞增殖及活化的影响 [J]. *肿瘤学杂志*, 2009, 15(10):903-907.