

· 综 述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.13.040

胶质细胞参与癌痛的实验研究进展*

牛娟,刘培雯,黄杜娟,乐明霞,周瑞综述,曾俊伟[△]审校

(遵义医学院生理学教研室/贵州省麻醉与器官功能保护重点实验室,贵州遵义 563000)

[关键词] 癌痛;脊髓背角;胶质细胞

[中图分类号] R441.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)13-1845-03

世界卫生组织和国际疼痛研究协会将疼痛定义为:疼痛是组织损伤或潜在组织损伤所引起的不愉快感觉和情感体验。癌痛是中晚期肿瘤患者最常见的症状之一,常给患者造成巨大的痛苦、忧虑及不安。因此,癌痛的机制研究以及药物研发已成为目前疼痛医学的研究热点之一。各种癌痛动物模型的建立为探讨癌痛的机制、研究新的镇痛方法提供了参考。近年研究表明,脊髓背角胶质细胞的激活以及功能增强参与了多种实验动物的癌痛形成。

1 骨癌痛

骨癌痛模型是目前最常见的癌痛模型之一。早在 1999 年, Schwei 等^[1]将骨肉瘤细胞注射到小鼠股骨后,出现触诱发痛,且痛行为与骨质破坏程度呈正相关。随后, Medhurst 等^[2]将 Walker 256 乳腺癌细胞注射到大鼠胫骨骨髓腔造成胫骨骨癌痛模型。此外,将纤维肉瘤细胞注射到大鼠跟骨造成跟骨骨癌痛模型^[3],将溶骨性肉瘤细胞注入 C3H/HeJ 小鼠股骨骨髓腔造成股骨骨癌痛模型^[4]。目前研究表明,脊髓背角胶质细胞在骨癌痛的形成、发展中起了重要作用。

在 MRMT-1 细胞注射的骨癌痛大鼠,随注射后时间延长,骨质破坏增加,腰部脊髓背角 GFAP(星形胶质细胞标记物)和 Iba-1(小胶质细胞标记物)表达增强;在溶骨性肉瘤细胞注射的股骨骨癌痛模型,在脊髓可见 GFAP 表达上调^[4-5]。在 Walker 256 乳腺癌细胞注射的骨癌痛大鼠,背角 GFAP 和 OX-42 表达上调,在 7~21 d 均可见星形胶质细胞激活,但小胶质细胞激活在 14~21 d 更为明显^[6], ERK 磷酸化(存在于星形胶质细胞和小胶质细胞)以及 JNK 磷酸化(存在于星形胶质细胞)增强,伴有炎症因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)在 mRNA 水平表达上调^[7-8];鞘内注射星形胶质细胞代谢抑制剂氟代柠檬酸可明显减轻骨癌痛大鼠痛敏症状,背角炎症因子表达随之下降,星形胶质细胞和小胶质细胞 ERK 磷酸化明显减弱。在胫骨骨癌痛大鼠,背角神经元和星形胶质细胞可见 PI3K γ /Akt 磷酸化增强,通过下游 ephrinBs/EphBs 途径,参与脊髓水平伤害性信息的调制^[9]。

对于背角胶质细胞参与骨癌痛的机制,目前研究认为有多种炎症因子、神经活性物质或受体分子参与。鞘内注射 Toll 样受体-4 拮抗剂纳洛酮可以减轻胶质细胞激活与炎症因子表达,这提示 Toll 样受体-4 对胶质细胞激活起了重要的调节作用^[8,10]。Yan 等^[11]观察到,脂多糖可以激活背角小胶质细胞 Toll 样受体-4 并促进 IL-1 β 释放,通过突触前机制作用于背角神经元,抑制 GABA 受体活性。免疫荧光双标技术观察到,脂

氧素 A4 受体主要表达于背角星形胶质细胞,注射脂氧素 A4 可明显减轻 Walker256 乳腺癌细胞注射的骨癌痛大鼠痛敏症状,而且下调背角 IL-1 β 和 TNF- α 表达。此外,背角小胶质细胞嘌呤 P2X7 受体/p38MAPK 磷酸化/IL-18 途径也参与了 Walker256 乳腺癌细胞注射的骨癌痛大鼠痛敏行为^[6]。也有文献^[12]报道,在骨癌痛大鼠背角神经元和星形胶质细胞,降钙素基因相关肽 CGRP 的受体成分(CLR and RAMP1)表达上调, CGRP 促进星形胶质细胞释放 ATP,进一步促进胶质细胞激活和神经活性物质的释放。

在脊髓水平有多种趋化因子也参与了骨癌痛的发生过程。在 RM-1 前列腺癌细胞注射的骨癌痛小鼠,应用荧光定量 PCR 技术、免疫荧光双标以及免疫印迹技术观察到背角星形胶质细胞 CXCL1 表达上调,注射趋化因子 CXCL1 的中和抗体或核转录因子- κ B(NF- κ B)抑制剂可明显减轻癌痛小鼠的热痛敏和机械痛敏行为,同时使 CXCL1 表达下调;与此类似,离体实验观察到 TNF- α 可以通过活化 NF- κ B,促进培养的小鼠背角星形胶质细胞 CXCL1 表达上调^[13]。在骨癌痛大鼠, CXCL12 可以经背角星形胶质细胞缝隙连接通道 connexin 43(Cx43)释放,参与脊髓水平痛觉敏感化的形成^[14]。而且, CXCL10 的中和抗体以及相应的 CXCR3 受体拮抗剂也可以明显减轻 Walker 256 乳腺癌细胞注射的骨癌痛大鼠脊髓背角小胶质细胞激活^[15]。

2 面癌及口腔癌痛

Hidaka 等^[16]将 Walker256B 细胞注射到大鼠一侧触须部皮肤建立面癌痛模型,接种 3~4 d 后即可出现自发痛、机械痛敏和热痛敏反应。在面癌痛大鼠三叉神经节未见卫星细胞 GFAP 表达增多,但同侧延髓背角星形胶质细胞 GFAP 和小胶质细胞 Iba-1 表达上调。如果在接种 Walker256B 细胞之前腹腔内注射胶质细胞活性抑制剂丙戊茶碱,则可以明显抑制延髓背角星形胶质细胞和小胶质细胞激活。Sago 等^[17]观察到,在大鼠一侧触须部皮肤接种 Walker256B 细胞,肿瘤生长较为局限,感觉纤维投射向延髓而不是上部颈髓(框下区皮肤感觉纤维向颈髓投射),然而,在胡须部位和框下区皮肤均出现机械痛敏和热过敏反应,应用免疫荧光和免疫印迹技术均观察到,在三叉神经颈复合体星形胶质细胞和小胶质细胞在接种瘤细胞第 4 天即广泛激活,到接种 11 d 后逐渐降低,而在延髓背角星形胶质细胞主要在接种后第 4 天激活,随后范围扩大到上部颈髓背角。在接种瘤细胞第 4 天给予丙戊茶碱可以明显减轻痛敏行为和胶质细胞活化程度。

最近 Hironaka 等^[18]将鳞癌细胞 SCC-158 注入雌性大鼠

下牙龈造成牙龈癌痛模型,在 10~20 d 内,在下颌皮肤诱发明显的机械痛,在 16~28 d 内于相应触须根部皮肤亦可诱发机械痛。在接种 SCC-158 细胞 28 d 后,可观察到,在三叉神经节,那些包围大、中等直径神经元的卫星细胞数目明显增多,但延髓背侧星形胶质细胞和小胶质细胞数目没有明显增多。如将鳞癌细胞注入大鼠舌部造成舌癌痛模型,在浅麻醉状态下可诱发出机械痛敏和热痛敏行为,接种 14 d 后在延髓背侧小胶质细胞嘌呤 P2Y₁₂ 受体表达上调,脑池内注射或腹腔注射小胶质细胞活性抑制剂米诺环素或 P2Y₁₂ 受体拮抗剂 MRS2395 有可能通过抑制小胶质细胞活化进而抑制伤害性信息的传递,发挥镇痛效应^[19]。

3 其他癌痛模型

在临床上,由于肿瘤组织浸润或压迫外周神经组织常引起神经性癌痛。将 NCTC 2472 肉瘤细胞注射入 C57BL/6 小鼠坐骨神经近端制作神经性癌痛模型,随着肿瘤生长,可观察到机械痛敏现象,脊髓前角及背角小胶质细胞活化,Iba-1/OX-42 表达上调从第 8 天即可观察到,随后开始下降,到第 14 天不明显,此现象可以被腹腔注射神经生长因子抗体所抑制;从第 8 天即可观察到脊髓星形胶质细胞活化,到第 21 天活化最为明显^[20]。然而,在胰腺癌小鼠,外周卫星细胞的激活似乎通过抑制脊髓胶质细胞活化发挥镇痛作用^[21]。三磷酸鸟苷环水解酶抑制剂 DAHP 可以缓解 B6 黑色素瘤注射 C57BL6 小鼠足底后诱发的皮肤癌痛,同时背角小胶质细胞活化及 Iba-1 表达上调均减轻;DAHP 与吗啡合用则可以进一步加强吗啡的镇痛效应,但并不增强吗啡的不良反应,这提示 DAHP 有可能将来用于癌痛患者的治疗^[22]。

4 化疗痛

由奥沙利铂、长春新碱、紫杉醇、顺铂等抗肿瘤药物化疗时损伤神经系统所诱导的神经病理性疼痛,称为化疗痛,常表现为痛觉过敏或超敏反应。如奥沙利铂和 5-氟尿嘧啶及甲酰四氢叶联连用,常用于转移性结直肠癌、卵巢癌和胰腺癌的化疗,但奥沙利铂引起的化疗痛症状随剂量加大而加重。在腹腔注射奥沙利铂诱发的化疗痛大鼠,给予肌肉注射 α -conotoxin RgIA 阻断 α_9 、 α_{10} N 型乙酰胆碱受体,可以抑制背角星形胶质细胞活性,发挥镇痛效应^[23];在注射长春新碱诱发的化疗痛小鼠,也观察到背角星形胶质细胞和小胶质细胞激活^[24];硼替佐米是近年来用于骨髓瘤的化疗药物,也可以刺激大鼠产生化疗痛,背角星形胶质细胞激活,GFAP 和 connexin 43 表达上调,但此现象可以被鞘内注射米诺环素所抑制^[25]。但 Robinson 等^[26]实验观察到,在奥沙利铂、硼替佐米诱发的化疗痛大鼠,背角星形胶质细胞明显激活,但小胶质细胞激活并不明显。这些研究表明,脊髓胶质细胞的激活与化疗药物诱发的神经病理性疼痛密切相关。

在注射长春新碱诱发的化疗痛小鼠,鞘内注射血红素加氧酶 1(HO-1)的诱导剂可以明显减轻脊髓背角星形胶质细胞和小胶质细胞激活,抑制 p38MAPK 磷酸化,抑制肿瘤坏死因子- α 和单核细胞趋化蛋白-1 生成,从而发挥镇痛作用。但是,在注射长春新碱诱发的化疗痛大鼠,仅观察到脊髓背角星形胶质细胞激活而没有明显小胶质细胞激活;鞘内注射氟代柠檬酸可减轻其痛敏症状,而米诺环素则无此效应。进一步观察到,氧化应激可以促进大鼠脊髓星形胶质细胞激活,随后 IL-1 β 表达及释放增多,转而作用于背角神经元促进 NMDA 受体磷酸化,增强突触传递效能,这有可能是长春新碱诱发化疗痛的重要机制之一^[27]。

SOD 模拟化合物 MnL4 可以抑制奥沙利铂诱发的大鼠热痛敏和机械痛敏;进一步离体实验观察到,MnL4 可以抑制奥沙利铂刺激离体大鼠皮层星形胶质细胞脂质过氧化物产生,同时下调 caspase3/7 活性。MnL4 对于 ATP 诱发的皮层星形胶质细胞钙浓度上调同样表现抑制作用;但 MnL4 并不影响奥沙利铂对 HT-29 癌细胞的毒性作用,这提示 MnL4 或许将来能够用于化疗痛的治疗^[28]。

研究表明,在注射紫杉醇诱发的化疗痛大鼠,疼痛的发生机制与胶质细胞谷氨酸及 GABA 转运体活性变化有关。其背角 GABA 能神经元突触传递效能降低可以被 GABA 转运体 GAT-1 阻断剂改善,但不受 GAT-3 阻断剂影响;GAT-1(表达于突触前末梢和星形胶质细胞)表达上升而 GAT-3(主要表达于星形胶质细胞)下降,提示化疗痛的发生与 GABA 的重吸收增强有关^[29]。此外,糖原合酶激酶 3 β 活性增强促进了星形胶质细胞激活,IL-1 β 表达上调,谷氨酸转运体 GLT-1 活性下降,细胞外液中谷氨酸增多,导致神经元活性上调^[30]。这提示谷氨酸及 GABA 转运体可以作为化疗痛的药物作用靶点,以纠正星形胶质细胞谷氨酸重吸收减少、GABA 能神经元的脱抑制状态,进而缓解化疗痛的症状。此外,尚有报道紫杉醇可以刺激脊髓背角星形胶质细胞趋化因子单核细胞趋化蛋白-1 表达^[31]。

5 总 结

综上所述,在诸多动物癌痛模型中,脊髓背角胶质细胞活化,细胞表面受体蛋白表达发生相应变化、神经活性物质合成或释放增多,随后影响感觉神经元突触传递效能,这可能是癌痛发生与维持的重要机制之一。因此,抑制胶质细胞活化和后续的神经营活性物质释放成为治疗癌痛的重要思路。有关癌痛的研究机制的进展,以及一些药物在癌痛动物模型上体现出良好的镇痛效应,都将为癌痛的临床治疗带来新的希望。

参考文献

- [1] Schwei MJ, Honore P, Rogers SD, et al. Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain[J]. *J Neurosci*, 1999, 19(24): 10886-10897.
- [2] Medhurst SJ, Walker K, Bowes M, et al. A rat model of bone cancer pain[J]. *Pain*, 2002, 96(1/2): 129-140.
- [3] Cain DM, Wacnik PW, Turner M, et al. Functional interactions between tumor and peripheral nerve: Changes in excitability and morphology of primary afferent fibers in a murine model of cancer pain[J]. *J Neurosci*, 2001, 21(23): 9367-9376.
- [4] Honore P, Rogers SD, Schwei MJ, et al. Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons[J]. *Neuroscience*, 2000, 98(3): 585-598.
- [5] Dore-Savard L, Otis V, Belleville K, et al. Behavioral, medical imaging and histopathological features of a new rat model of bone cancer pain[J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): 73.
- [6] Yang Y, Li H, Li TT, et al. Delayed activation of spinal microglia contributes to the maintenance of bone cancer pain in female wistar rats via P2X7 receptor and IL-18

- [J]. *J Neurosci*, 2015, 35(20):7950-7963.
- [7] Wang LN, Ming Y, Yang JP, et al. Cancer-induced bone pain sequentially activates the ERK/MAPK pathway in different cell types in the rat spinal cord[J]. *Mol Pain*, 2011, 7(4):385.
- [8] Wang XW, Shan H, Mao QL, et al. Activation of c-jun N-terminal kinase in spinal cord contributes to breast cancer induced bone pain in rats[J]. *Mol Brain*, 2012, 5(1):1-7.
- [9] Guan XE, Fu QC, Xiong BR, et al. Activation of PI3K gamma/Akt pathway mediates bone cancer pain in rats[J]. *J Neurochem*, 2015, 134(3):590-600.
- [10] Mao QL, Wang XW, Yang CJ, et al. Robust spinal neuroinflammation mediates mechanical allodynia in walker 256 induced bone cancer rats[J]. *Mol Brain*, 2012, 5(1):1-11.
- [11] Yan X, Jiang E, Weng HR. Activation of toll like receptor 4 attenuates GABA synthesis and postsynaptic GABA receptor activities in the spinal dorsal horn via releasing interleukin-1 beta[J]. *J Neuroinflammation*, 2015, 12(1):1-14.
- [12] Hansen RR, Vacca V, Pitcher T, et al. Role of extracellular calcitonin gene-related peptide in spinal cord mechanisms of cancer-induced bone pain[J]. *Pain*, 2016, 157(3):666-676.
- [13] Xu J, Zhu MD, Zhang X, et al. NF κ B-mediated CXCL1 production in spinal cord astrocytes contributes to the maintenance of bone cancer pain in mice[J]. *J Neuroinflammation*, 2014, 11(1):1-13.
- [14] Hang LH, Li SN, Luo H, et al. Connexin 43 mediates CXCL12 production from spinal dorsal horn to maintain bone cancer pain in rats[J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(5):1200-1208.
- [15] Bu HL, Shu B, Gao F, et al. Spinal IFN-gamma-induced protein-10(CXCL10) mediates metastatic breast cancer-induced bone pain by activation of microglia in rat models[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 143(2):255-263.
- [16] Hidaka K, Ono K, Harano N, et al. Central glial activation mediates cancer-induced pain in a rat facial cancer model[J]. *Neuroscience*, 2011, 180(2):334-343.
- [17] Sago T, Ono K, Harano N, et al. Distinct time courses of microglial and astrocytic hyperactivation and the glial contribution to pain hypersensitivity in a facial cancer model[J]. *Brain Res*, 2012, 1457(2):70-80.
- [18] Hironaka K, Ozaki N, Hattori HA, et al. Involvement of glial activation in trigeminal ganglion in a rat model of lower gingival cancer pain[J]. *Nagoya J Med Sci*, 2014, 76(3/4):323-332.
- [19] Tamagawa T, Shinoda M, Honda K, et al. Involvement of microglial P2Y12 signaling in tongue cancer pain[J]. *J Dent Res*, 2016, 95(10):1176-1182.
- [20] Hald A, Nedergaard S, Hansen RR, et al. Differential activation of spinal cord glial cells in murine models of neuropathic and cancer pain[J]. *Eur J Pain*, 2009, 13(2):138-145.
- [21] Demir IE, Tieftrunk E, Schorn S, et al. Activated schwann cells in pancreatic cancer are linked to analgesia via suppression of spinal astroglia and microglia[J]. *Gut*, 2016, 65(6):1001-1014.
- [22] Pacini A, Micheli L, Maresca M, et al. The $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic receptor antagonist α -conotoxin RgIA prevents neuropathic pain induced by oxaliplatin treatment[J]. *Exp Neurol*, 2016, 282(1):37-48.
- [23] Yan S, Zhang ZJ, Zhu MD, et al. Exogenous induction of HO-1 alleviates vincristine-induced neuropathic pain by reducing spinal glial activation in mice[J]. *Neurobiol Dis*, 2015(79):100-110.
- [24] Robinson CR, Dougherty PM. Spinal astrocyte gap junction and glutamate transporter expression contributes to a rat model of bortezomib-induced peripheral neuropathy[J]. *Neuroscience*, 2015, 285(1):1-10.
- [25] Ji XT, Qian NS, Zhang T, et al. Spinal astrocytic activation contributes to mechanical allodynia in a rat chemotherapy-induced neuropathic pain model[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4):e60733.
- [26] Robinson CR, Zhang H, Dougherty PM. Astrocytes, but not microglia, are activated in oxaliplatin and bortezomib-induced peripheral neuropathy in the rat[J]. *Neuroscience*, 2014(274):308-317.
- [27] Mannelli LD, Zanardelli M, Landini IA, et al. Effect of the SOD mimetic MnL4 on in vitro and in vivo oxaliplatin toxicity: Possible aid in chemotherapy induced neuropathy[J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 93(1):67-76.
- [28] Yadav R, Yan XS, Maixner DW, et al. Blocking the GABA transporter GAT-1 ameliorates spinal GABAergic disinhibition and neuropathic pain induced by paclitaxel[J]. *J Neurochem*, 2015, 133(6):857-869.
- [29] Gao M, Yan X, Weng HR. Inhibition of glycogen synthase kinase 3beta activity with lithium prevents and attenuates paclitaxel-induced neuropathic pain[J]. *Neuroscience*, 2013, 254(7):301-311.
- [30] Zhang HJ, Boyette-Davis JA, Kosturakis AK, et al. Induction of monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1) and its receptor CCR2 in primary sensory neurons contributes to paclitaxel-induced peripheral neuropathy[J]. *J Pain*, 2013, 14(10):1031-1044.