

加巴喷丁对 SNL 模型大鼠损伤 DRG 神经元胞内 [Ca²⁺]_i 的影响

殷政¹, 朱敏敏^{1,2*}, 徐建国²

(¹南京医科大学附属无锡第二医院麻醉科, 江苏 无锡 214002; ²南京军区南京总医院博士后站, 江苏 南京 210002)

[摘要] 目的:探讨加巴喷丁对脊神经结扎(SNL)模型大鼠损伤背根神经节神经元胞内游离钙浓度的影响。方法:SD大鼠, 雄性35只, 4~6周龄, 采用左侧L5 SNL术制备大鼠神经病理性疼痛模型。于结扎后15d采用酶消化法急性分离损伤同侧L5背根神经节神经元(SNL组)和假手术组L5背根神经节神经元(Sham组)。采用流式细胞仪检测10、100和300 μmol/L浓度加巴喷丁对损伤侧L5背根神经节神经元基础及高K⁺激发胞内游离钙浓度的影响。结果:加巴喷丁剂量依赖性抑制高钾激发的胞内游离钙浓度的增加(P < 0.05 或 P < 0.01), 但对静息钙无作用。结论:加巴喷丁对神经病理性疼痛大鼠损伤背根神经节神经元高钾激发的钙内流的抑制作用, 可能与其抗伤害作用的外周机制相关。

[关键词] 加巴喷丁; 神经痛; 神经节; 神经元; 游离钙浓度

[中图分类号] R338.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)02-144-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20140204

Effects of gabapentin on free calcium concentration of injury dorsal root ganglion neurons in spinal nerve ligation rats

Yin Zhen¹, Zhu Minmin^{1,2*}, Xu Jianguo²

(¹Department of Anesthesiology, Wuxi No.2 Hospital affiliated to NJMU, Wuxi 214002; ²Post - doctoral Scientific Research Station in Nanjing General Hospital of Nanjing Military Region, Nanjing 210002, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of gabapentin (GBP) on free calcium concentration [Ca²⁺]_i of injury DRG in an experimental rat model with neuropathic pain following spinal nerve ligation. **Methods:** Thirty five male SD rats aged 4~6 weeks were used in this study. Left L5 spinal nerve was ligated between DRG and sciatic nerve and cut distal to the ligature to reproduce neuropathic pain model. On the 15th postoperative day, these animals were decapitated. L5 DRGs were isolated and the neurons in the ganglion were enzymatically dissociated in SNL group and Sham group. Flow cytometer was used to monitored the resting [Ca²⁺]_i and high K⁺(50 mmol/L)-evoked[Ca²⁺]_i with or without GBP in L5 DRG. **Results:** GBP attenuated high K⁺(50 mM)-evoked[Ca²⁺]_i in a dose-dependent manner (P < 0.05 or P < 0.01), but no effect on resting [Ca²⁺]_i. **Conclusion:** GBP significantly inhibited high K⁺-evoked [Ca²⁺]_i in injured DRG neurons in neuropathic pain rats, which may be a peripheral way of GBP which involved in the antinociception mechanism.

[Key words] gabapentin; neuralgia; ganglia; neurons; free calcium concentration

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(02): 144-147]

电压激活钙离子通道(voltage-activated calcium channel, VACC)在神经病理性疼痛的发生和维持中

起重要作用,因而成为药物的主要作用靶点^[1]。抗惊厥药加巴喷丁(gabapentin, GBP)是神经病理性疼痛的一线治疗药^[2], 研究发现位于脊髓背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)神经元胞膜上的VACC复合物的α₂δ₁亚单位是其关键的分子靶点^[3]。本课题组前期实验的结果表明GBP降低了SNL模型鼠损伤侧背根神经节神经元VACC的峰电流密度^[4]。

钙在细胞的生命活动中具有非常重要的作用,

[基金项目] 第四十三批中国博士后科学基金资助项目(20080431417); 第二届中国博士后科学基金重点资助项目(200902694); 南京医科大学重点资助项目(NJMUZ06); 南京军区南京总医院科研重点课题资助项目(Z2008046)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: mmzhummzhu@163.com

它在突触前末梢参与神经递质的释放和调节,作为第二信使参与突触后的跨膜信息转导^[5]。绝大部分胞内钙的增加来源于胞膜钙通道的开放,VACCs 可以将膜电位转化为胞内钙信号,直接调节胞内钙水平,从而调节细胞的很多功能。本研究通过流式细胞仪结合钙离子指示剂 Fluo-3/AM 荧光探针标记技术检测神经元胞内游离钙浓度,进一步探讨 GBP 对 SNL 模型鼠损伤 DRG 胞膜钙通道开放后的钙内流的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

清洁级,成年雄性 Sprague Damley(SD)大鼠 35 只,4~6 周龄(120~150 g),由南京军区总院实验动物中心提供[实验动物生产许可证,号:SCXK(军)2007-012;实验动物使用许可证,号:SYXK(军)2007-029]。

Trypsin (type I)、Collagenase (type I) EGTA、HEPES、KCl(Sigma 公司,美国);MgCl₂、CaCl₂、NaHCO₃、NaOH、D-glucose(国产分析纯);加巴喷丁原料药(徐州恩华公司提供,批号:20080503 干燥品含[C9H17NO₂]99.9%)。

DMEM 培养液:DMEM (高糖型)13.4 g/L, NaHCO₃ 3.7 g/L,pH 值 7.2,4℃保存。细胞外液(in mmol/L:140 NaCl,4.5 KCl,2 CaCl₂,1 MgCl₂,10 HEPES,10 glucose,NaOH 调节 pH 至 7.4);高 K⁺ 细胞外液(in mmol/L:94.5 NaCl,50 KCl,2 CaCl₂,1 MgCl₂,10 HEPES,10 glucose,NaOH 调节 pH 至 7.4)

电子 Von Frey 机械测痛仪及 Rigid Tips (Model 2391,400 g)(The II TC Model 2390 Electrovonfrey, IITC 公司,美国);BD FACS Calibur 流式细胞仪(BD 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 模型制备

实验动物选择:实验前剔除运动不协调(旋转轴运动时间<90 s)、痛感觉异常(异常痛<4 g)大鼠。大鼠造模前适应环境一周,造模前后采用相同的饲养环境:室温 22~25℃,12 h 昼夜节律,湿度 50%~60%,自由进饮和食物。采用本实验室常规应用的 L5 脊神经结扎切断(spinal nerve ligation and axotomy,SNL)模型模拟灼性神经痛。方法:大鼠腹腔注射 2%戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉后,俯卧捆绑固定,剪毛消毒,沿 L4-S1 脊椎中线切皮,钝性分离椎旁肌肉

组织,暴露左侧 L5~6 椎关节突,咬除约 1/3 大小,可见从椎间孔穿行出来的 L5 脊神经部分,弯头镍剥离神经纤维膜,用带线(6/0 surgilene nonabsorbable blue-monofilament polypropylene)弯针从后包绕神经,退去针,在背根神经节和形成坐骨神经的连接之间结扎 L5 脊神经,并在远端剪断,逐层缝合肌肉筋膜和皮肤。假手术组仅暴露神经,不做结扎处理,其余同模型组。于术后 1、3、7、14 d 时行机械刺激缩足反射阈值(paw withdrawal mechanical threshold,PWMT)测定。用 Rigid Tips (Model 2391,400 g)从铁丝网下方垂直刺激大鼠左、右侧第 4、5 跖底,逐渐加压至大鼠出现抬足行为时,读取测痛仪(electronic readout)上显示的最大数值(Measured High)作为 PWMT(单位 g)。每只动物重复测定 3 次,刺激间隔 5 min,取平均值。选取在连续几天测试中,其损伤侧足 PWMT 显著降低而对侧反应正常的模型鼠用于实验。

1.2.2 DRG 神经元的急性分离

于术后 15 d,腹腔注射戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉大鼠,断头,沿背部正中中线剪开皮肤,提剪脊柱(勿剪破内脏,下至骶部),留取腰段,沿椎管将其剪成两半(从正中剪开,勿偏)。小心地镊出脊髓,并挑除硬脊膜及神经索包膜,沿椎间孔挑夹出损伤同侧 L5 DRG(神经节两端均连有神经索),仔细分离、剪除相连的结缔组织后,挑放入预先充好氧气的冰冻 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)培养液 Invitrogen, Carlsbad, CA)的细胞培养皿(3.5 cm)中。用 DMEM 将 DRG 充分洗涤后,吸入盛有胶原酶(Collagenase,type I,2 mg/1 ml)和胰蛋白酶(Trypsin,type I,1.2 mg/1 ml)的玻璃试管中,再加 DMEM 定容至 1.5 ml。将试管放入恒温(定温至 36.8℃)水浴箱的试管架上,通入含 5% CO₂ 95% O₂ 的混合气体,孵育 25 min。用标准细胞外液(预先通入 100%的氧气 20 min)充分洗涤 DRG 以终止酶的消化。选择合适口径的玻璃吸管,轻柔吹打 DRG,使呈均匀的细胞悬液。

1.2.3 流式细胞仪结合钙离子指示剂 Fluo-3/AM 荧光探针标记技术检测活细胞内游离钙浓度

用配制的细胞外液重悬细胞沉淀,使细胞浓度为 1×10^6 个/ml,加入荧光染料 Fluo-3/AM 负载,(1 000 μ l 加入 6 μ l Fluo-3,浓度为 6 μ mol/L),避光,37℃恒温水浴振荡 25 min;1 500 r/min 离心 5 min,移去上清液,用细胞外液冲洗 2 次,洗去多余的染料,室温下避光静置 30 min。细胞沉淀加 200 μ l

细胞外液,加入 3 ml 聚乙烯试管中进机,测定时,用侧向角(SSC)F1(Fluo 3AM)散点图识别细胞,用 F1 直方图测定平均荧光强度 (Mean Fluorescent Intensity, MFI),采用 CellQuest 软件获取和分析数据。采用平均荧光强度来反应细胞内 Ca²⁺的浓度。

1.2.3.1 最大和最小荧光强度的测定

在各试管中加入 60 g/L Triton X100、5 mmol/L CaCl₂, 摇匀,静置 10 min,用流式细胞仪测定平均荧光强度,此乃最大荧光强度。用无钙的 Hepes 缓冲液重悬细胞沉淀,调其浓度为 2 × 10⁶/ml,加入 25 mmol/L EGTA (钙特异性络合剂),摇匀,静置 10 min,用流式细胞仪测定平均荧光强度,此乃最小荧光强度。

1.2.3.2 分组及药物给予

为了检测加巴喷丁对不同组(Sham,SNL,SNL+G1,SNL+G2,SNL+G3)静息状态下胞内游离钙浓度的影响,在染料负载冲洗后,五组加入不同终浓度(0、0.1、10、100 μmol/L)加巴喷丁的细胞外液,室温下静置 30 min,离心后,沉淀加液进样检测。

高钾激发钙内流:用快速(4 s)提高细胞外液 K⁺浓度 (in mmol/L:94.5 NaCl,50 KCl,2 CaCl₂,1 Mg-Cl₂,10 HEPES, 10 glucose,NaOH 调节 pH 至 7.4)诱导神经元立即产生细胞膜的去极化,反过来激发通过电压敏感性钙通道的钙内流,使胞内钙在瞬间大量的增加。为了检测加巴喷丁对高 K⁺诱发的钙内流的效果,采用如下刺激方案:给予 50 mmol/L K⁺细胞外液(4 s)刺激获得最初的反应;用加入不同浓度(0、0.1、10、100 μmol/L)加巴喷丁的细胞外液进行冲洗;间隔 5 min 后,用含上述浓度加巴喷丁的 50 mmol/L K⁺细胞外液给予再刺激,获得第 2 次的反应。

1.2.3.3 游离钙浓度的计算

根据公式 [Ca²⁺]_i=K_d×(F-F_{min})/(F_{max}-F)计算,式中 K_d 是 Ca²⁺结合 Fluo 3AM 的解离常数,为 204 nmol/L(37℃)。F 为各样本荧光强度的测定值。F_{max}和 F_{min} 分别是最大荧光强度和最小荧光强度的测定值。

1.3 统计学方法

数值参数以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计应用 SPSS13.0 软件进行分析,采用 one-way ANOVA 及 SNK 检验。以 P ≤ 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度加巴喷丁对胞内静息 [Ca²⁺]_i 的影响

与 Sham 组相比,其他组静息 [Ca²⁺]_i 值均下降,差异有统计学意义 (P < 0.05, 表 1); 与 SNL 组相比,3 个浓度加巴喷丁给药组胞内静息 [Ca²⁺]_i 无变化 (P > 0.05)。

表 1 不同浓度加巴喷丁对静息 [Ca²⁺]_i 的影响

Figure 1 Effects of GBP with different concentration on the resting [Ca²⁺]_i

Group	GBP Concentration (μmol/L)	[Ca ²⁺] _i (nmol/L) ($\bar{x} \pm s, n=7$)
Sham	-	97.72±20.27
SNL	-	59.41±22.83 [#]
SNL+G1	1	55.96±18.03 [#]
SNL+G2	10	59.93±18.08 [#]
SNL+G3	100	57.08±19.14 [#]

与 Sham 组比较, [#]P < 0.05。

2.2 不同浓度加巴喷丁对胞内高钾激发 [Ca²⁺]_i 的影响

与 Sham 组相比,其他组高钾激发 [Ca²⁺]_i 降低,差异有统计学意义 (P < 0.05, 表 2); 与 SNL 组相比,10 和 100 μmol/L 加巴喷丁给药组高钾激发 [Ca²⁺]_i 降低,差异有统计学意义 (P < 0.05 或 P < 0.01, 表 2)。

表 2 不同浓度加巴喷丁对高 K⁺激发 [Ca²⁺]_i 的影响

Figure 2 Effects of GBP with different concentration on high K⁺-evoked [Ca²⁺]_i

Group	GBP Concentration (μmol/L)	[Ca ²⁺] _i (nmol/L) ($\bar{x} \pm s, n=7$)
Sham	-	436.04 ±67.60
SNL	-	340.53±58.81 [#]
SNL+G1	1	274.71±67.20 [#]
SNL+G2	10	198.29±67.79 ^{##}
SNL+G3	100	123.67±49.43 ^{###}

与 Sham 组比较, [#]P < 0.05, ^{##}P < 0.01; 与 SNL 组比较, ^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01。

3 讨论

VACCs 是胞外钙离子内流的一个主要途径, HVA 钙通道激活后, Ca²⁺内流,进一步激发神经元去极化从而改变突触受体、细胞膜兴奋性及第二和第三信使浓度和基因表达。伤害性信息的传导、神经递质和内源性镇痛物质的释放都依赖于细胞内 Ca²⁺浓度^[5]。正常生理状态下,胞浆内游离的 Ca²⁺浓度比胞外液中的 Ca²⁺浓度低 4 个数量级。胞内钙浓度受到多种机制的严格调节,这些机制包括内流途径(离子通道)、外流途径(泵和交换体),摄取和胞内储存钙释放(线粒体、内质网)和钙结合蛋白。胞浆内 Ca²⁺度升高主要来源于细胞外经膜上的电压或配体门控的钙离子通道流入,也可从胞内钙池(如内质网、线粒体等)Ca²⁺释放等。前者受膜电位、受体、G 蛋白、

PKA等调控,后者受IP3作用而释放^[5]。本实验研究结果表明,SNL组静息 $[Ca^{2+}]_i$ 明显低于假手术组,这与Fuchs等^[6]的研究结果一致,可能与损伤轴突的HVA钙通道特性发生改变及钙通道的密度降低^[7]而通过的ICa降低相关联,还有研究指出损伤神经元消除了钙诱导的钙释放^[8],总的结果是损伤DRG神经元静息状态 $[Ca^{2+}]_i$ 降低。Meder在突触小体的研究中,发现GBP对基础钙释放无影响^[9],在本研究中,也观察到加巴喷丁对静息 $[Ca^{2+}]_i$ 无影响。静息钙反映了去极化诱导的电压门控钙通道的激活状态,说明加巴喷丁不影响非激活状态下HVACCs的特性。

快速提高细胞外 K^+ 浓度诱导立即的细胞膜的去极化,反过来激发通过电压敏感性钙通道的钙内流。高 K^+ 激发的钙瞬变反映了DRG兴奋性增高,也是静息膜电位去极化的基础。典型的去极化引起的钙升高起初是个峰值,继后是维持的平台相。研究报告,钙反应的峰值对N型钙通道阻滞剂敏感性而平台对P/Q通道阻滞剂敏感型^[10]。本研究通过测量DRG神经元中高钾诱发的钙瞬变的峰值变化,发现SNL模型鼠DRG神经元高钾激发的 $[Ca^{2+}]_i$ 峰值比假手术组低,说明轴突损伤对VACCs激活特性和(或)钙通道密度的变化,是导致其高 K^+ 激发的膜去极化反应下VACCs介导的钙内流减少的原因之一。本研究还发现10和100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的GBP对SNL模型鼠DRG神经元高钾激发的 $[Ca^{2+}]_i$ 峰值变化均有抑制作用,且呈剂量依赖性,这可能与GBP敏感性N型钙通道比例的增高有关^[4]。有研究也显示GBP可以剂量依赖性地抑制 K^+ 诱发皮层突触小体的 $[Ca^{2+}]_i$ 增加,其半数有效浓度为9.7 $\mu\text{mol/L}$,在100~1000 $\mu\text{mol/L}$ 浓度抑制率达到28.6%^[9]。大鼠海马和皮层纯化的突触小体激光共聚焦钙显像的研究,显示GBP抑制突触前膜高钾去极化激发的 $[Ca^{2+}]_i$ 反应的峰值和平台^[11]。

综上所述,GBP降低高钾去极化触发的SNL模型大鼠DRG神经元胞内钙浓度,这与其抑制通过VACCs的钙内流有关,而通过突触前膜钙通道的钙内流与突触传递和神经递质的释放密切相关^[12],因此,继续GBP对钙内流触发的突触传递和递质释放影响的研究和探讨,将可能是进一步揭示其抗伤害作用的重要机制之一。

[参考文献]

[1] Pexton T, Moeller-Bertram T, Schilling JM, et al. Target-

ing voltage-gated calcium channels for the treatment of neuropathic pain: a review of drug development [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2011, 20(9): 1277-1284

- [2] Kukkar A, Bali A, Singh N, et al. Implications and mechanism of action of gabapentin in neuropathic pain [J]. *Arch Pharm Res*, 2013, 36(2): 237-251
- [3] Jaggi AS, Singh N. Role of different brain areas in peripheral nerve injury-induced neuropathic pain [J]. *Brain Research*, 2011, 1381(2): 187-201
- [4] 孙晓迪,朱敏敏,陈晓东,等. 加巴喷丁对大鼠背根神经节神经元高电压激活钙电流的影响 [J]. *中华医学杂志*, 2011, 91(24): 1713-1717
- [5] Ji RR, Woolf CJ. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain [J]. *Neurobiol Dis*, 2001, 8(1): 1-10
- [6] Fuchs A, Lirk P, Stucky C, et al. Painful nerve injury decreases resting cytosolic calcium concentrations in sensory neurons of rats [J]. *Anesthesiology*, 2005, 102(6): 1217-1225
- [7] McCallum JB, Kwok WM, Mynlieff M, et al. Loss of T-type Calcium current in sensory neurons of rats with neuropathic pain [J]. *Anesthesiology*, 2003, 98(1): 209-216
- [8] Fuchs A, Rigaud M, Hogan QH. Painful nerve injury shortens the intracellular Ca^{2+} signal in axotomized sensory neurons of rats [J]. *Anesthesiology*, 2007, 107(1): 106-116
- [9] Meder WP, Dooley DJ. Modulation of K^+ -induced synaptic calcium influx by gabapentin [J]. *Brain Research*, 2000, 875(1-2): 157-159
- [10] Suszkiw JB, Murawsky MM, Shi M. Further characterization of phasic calcium influx in rat cerebrocortical synaptosomes: inferences regarding calcium channel type in nerve endings [J]. *J Neurochem*, 1989, 52(4): 1260-1269
- [11] Van Hoof JA, Dougherty JJ, Endeman D, et al. Gabapentin inhibits presynaptic Ca^{2+} influx and synaptic transmission in rat hippocampus and neocortex [J]. *Eur J Pharmacol*, 2002, 449(3): 221-228
- [12] Wilson SM, Schmutzler BS, Brittain JM, et al. Inhibition of transmitter release and attenuation of anti-retroviral-associated and tibial nerve injury-related painful peripheral neuropathy by novel synthetic Ca^{2+} channel peptides [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(42): 35065-35077

[收稿日期] 2013-07-29