

背根神经节内 GABA 重摄取改变在神经痛发生发展中的作用

让 凌¹, 谢晓芳¹, 冉 然¹, 薛 锐¹, 肖 昀¹, 郑 飞², 唐俊明²

摘要 目的 探讨神经损伤后背根神经节内 γ -氨基丁酸转运体 3 (GAT3) 的表达变化及其在神经痛发生发展中的作用。方法 制备慢性坐骨神经结扎损伤模型 (CCI) 通过测定后爪热刺激缩足反射潜伏期 (PWL) 并对比损伤侧和对侧 以确定造模成功。CCI 术后第 3 天, 分别运用 Western blot 法和实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 测定 Sham 组和 CCI 组动物腰 4 和腰 5 的背根神经节 (L₄-L₅ DRG) 中 GAT3 蛋白和 mRNA 的表达。在术后第 3 天, 通过 L₅ DRG 局部置管分别向 SNAP 组动物注射 GAT3 抑制剂 SNAP5114 [(S)-1-[2-[三(4-氨基苯基)甲氧基]乙基]]-3-哌啶甲酸 (200 μ g, 10 μ l) CCI 组动物注射二甲基亚砜 (DMSO 10 μ l) 行为学观察两组动物注射抑制剂后大鼠热痛阈的变化。结果 与 Sham 组比较, CCI 组大鼠损伤侧 PWL 明显缩短 ($P < 0.05$); 与 Sham 组比较, CCI 组动物术后第 3 天 L₄-L₅ DRG 中 GAT3 蛋白明显增加 ($P < 0.05$); RT-PCR 结果也显示 CCI 术后 L₄-L₅ DRG 内 GAT3 mRNA 表达明显增加 ($P < 0.05$); L₅ DRG 局部用药后, 与 CCI 组比较, SNAP 组动物损伤侧后爪痛阈明显升高, 并持续至注射后 24 h ($P < 0.05$)。结论 神经损伤后背根神经节内 GAT3 表达明显升高, DRG 局部给予 GAT3 抑制剂可短暂缓解神经痛的症状, L₅ DRG 内 GAT3 表达升高并非神经痛发病的主要因素。

关键词 神经痛; 背根神经节; GABA 重摄取; GABA 转运蛋白 3

中图分类号 R 363

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)10-1566-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.10.014

神经痛在临床上很常见, 如糖尿病性神经痛、带状疱疹后神经痛等, 因发生机制尚不清楚, 尚缺乏有效的治疗手段^[1]。神经系统的敏感性升高是神经痛的重要发生机制^[2-3]。 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyrate, GABA) 重摄取是释放入突触内的 GABA 作用被终止的主要方式, 其通过 GABA 转运蛋白 (GABA

transporter, GAT) 将释放入突触内的 GABA 转运入神经元胞体或胶质细胞内, 从而终止 GABA 的作用, 改变神经系统的兴奋性^[4]。研究^[5]已经证实, 背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 内有 GAT3 的表达, 但神经损伤后 GAT3 是否发生改变, 这些改变是否和神经痛的发生有关, 目前还没有研究涉及。该研究探讨了大鼠坐骨神经慢性束缚损伤 (chronic constriction injury, CCI) 模型上 GAT3 的改变, 并且运用 DRG 局部注射技术, 将 GAT3 抑制剂注射在 DRG 局部, 探讨其对神经痛症状的影响, 旨在为神经痛的发病机制和治疗寻找新的方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物 成年雄性 SD 大鼠 36 只, SPF 级, 体质量 170 ~ 220 g, 由湖北医药学院实验动物中心提供, 动物饲养室温为 (22 ± 2) °C, 湿度 40% ~ 70%, 12 h 昼夜交替, 自由进食水。所有实验方案经湖北医药学院动物保护和和使用委员会批准, 按照国际疼痛研究协会的指导原则进行。

1.2 CCI 模型 参照以往文献^[6-7] 动物水合氯醛 (30 ~ 40 mg/kg) 腹腔注射后在右大腿中部切开皮肤, 钝性分离股二头肌, 暴露坐骨神经干, 于坐骨神经分支近端处用 4/0# 羊肠线在坐骨神经上间隔 1 mm 做 4 个松结扎, 结扎强度以大腿产生 1 个小的短暂性抽搐为宜, 然后逐层缝合。术后单独饲养, 12 h 明暗交替光照, 行为学测定确定神经痛造模成功。

1.3 Western blot 动物用水合氯醛 (30 ~ 40 mg/kg) 腹腔注射麻醉后, 冰上快速取出 L₄、L₅ DRG, 置于液氮中保存, 经 RIPA 裂解液 (武汉 Antgene 公司) 裂解, 离心收集蛋白, 用 BCA 试剂盒测蛋白浓度。每个加样孔 30 μ g 蛋白样品, 10% SDS-PAGE 凝胶电泳后, 转移到 PVDF 膜上。用 TBS 配制的 5% 脱脂奶粉低速摇床封闭 1 h, 4 °C 下一抗孵育过夜, TBST 洗膜, 二抗室温孵育 2 h, TBST 洗膜后加入辣根过氧化物酶显色剂显色, Bio Rad 蛋白成像仪成像, 用 Image J 软件测灰度值进行半定量分析。所使用的抗体包括: α -Tubulin (小鼠抗大鼠, 抗体稀释比 1 : 1 000, 美国 Sigma 公司)、GAT3 一抗 (兔抗大鼠,

2019-05-31 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81341111); 湖北省自然科学基金 (编号: 2013CFC036)

作者单位: 十堰市人民医院 (湖北医药学院附属人民医院)¹ 麻醉科,² 临床研究所, 十堰 442000

作者简介: 让 凌, 女, 硕士研究生;

冉 然, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: ran-ran1145@163.com

抗体稀释比 1 : 750 (美国 Abcam 公司); GAT3 二抗 (山羊抗兔, 抗体稀释比 1 : 10 000)、内参二抗 (山羊抗小鼠, 抗体稀释比 1 : 10 000, 美国 Jackson 公司)。

1.4 RT-PCR 动物用水合氯醛 (30 ~ 40 mg/kg, ip) 麻醉后, 冰上快速取出 L₄、L₅ DRG, 置于液氮中研磨, TRIzol 法提取总 RNA, 采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 行分光光度计检测 RNA 浓度, 并逆转录为 cDNA, 按 SYBR PremixEx II 法行实时定量 PCR 反应, 检测 GAT3 的表达。引物序列见表 1。以 GAPDH 为内参, 使用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 mRNA 的差异倍数。

表 1 引物序列

引物	序列(5'-3')
GAPDH	上游: TGAAGTTCGGTGTGAACGGATTTG
	下游: AGCCTTGACTGTGCCGTTGAACTT
GAT3	上游: TGGGCATGAGTGAACACAGAGAA
	下游: AGGTTCCCGATGTGTTCAATGCCA

1.5 L₅ DRG 局部置管 参照文献^[8]方法, 动物经水合氯醛 (30 ~ 40 mg/kg) 腹腔注射麻醉后, 在大鼠背部 L₄-L₆ 右侧旁开 0.5 cm 处, 切开背部皮肤, 钝性分离皮下组织和椎旁肌肉, 暴露 L₅ 椎板, 在椎间孔内 2 mm 处钻 1 个 0.8 mm 的孔, 将预制的套管插入孔内 2 mm, 骨水泥固定, 连接 PE 10 聚丙烯管, 切口缝合。术后将大鼠分别安置在装有木质地板的塑料笼子中, 自由摄食和饮水, 每次实验前动物适应环境至少 24 h。

1.6 大鼠后爪热痛阈测定 参照文献^[8]方法, 用大鼠爪痛觉检测仪 (意大利 UGO 公司) 测定大鼠后爪热痛阈。将大鼠放在玻璃笼器内, 待大鼠适应安静后, 将光源对准大鼠后足掌心, 打开光源开关并自动开始计时, 直到大鼠因疼痛出现缩足反射, 计时结束, 此时记录的时间为后爪热痛缩退反应潜伏期 (paw withdrawal latency, PWL)。为防止皮肤灼伤, 设置最大强度 55%, 保护时间为 25 s。测量 5 次, 每次间隔 10 min, 取均值, 即为大鼠热痛阈值。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 组内比较采用重复测量方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCI 对大鼠痛阈的影响

SD 大鼠分为假手术组 (Sham 组 *n* = 6) 和 CCI 组 (*n* = 6), CCI 组动物实施坐骨神经结扎, Sham 组动物暴露坐骨神经, 但不做结扎; 与 Sham 组比较, 术后第 1 天开始, CCI 组大鼠 PWL 出现显著降低 ($F = 57.296, P < 0.05$), 这个改变持续到术后 7 d。见图 1。

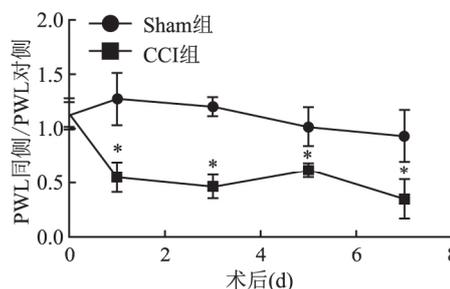


图 1 CCI 对大鼠痛阈的影响
与 Sham 组比较: * *P* < 0.05

2.2 CCI 对大鼠 DRG 内 GAT3 蛋白和 mRNA 表达的影响 与 Sham 组比较, CCI 组 DRG 内 GAT3 蛋白在术后第 3 天有所增加 ($t = 3.719, P < 0.05$), 见图 2。与 Sham 组比较, CCI 术后 DRG 内 GAT3 mRNA 表达明显增加 ($t = 5.369, P < 0.05$), 见图 3。

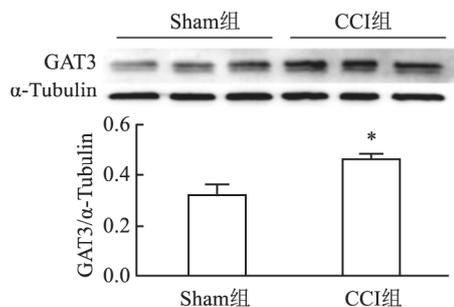


图 2 CCI 术后第 3 天 DRG 内 GAT3 的表达变化
与 Sham 组比较: * *P* < 0.05

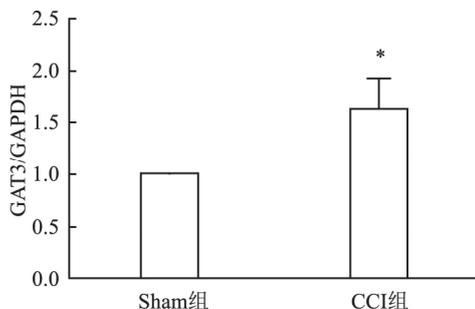


图 3 DRG 内 GAT3 mRNA 表达变化
与 Sham 组比较: * *P* < 0.05

2.3 L₅ DRG 局部注射 GAT3 抑制剂 SNAP5114 对大鼠痛阈的影响

SD 大鼠 12 只, 预先置入导管

并实施 CCI 手术,随机分为 CCI 组 ($n = 6$) 和 SNAP5114 治疗组 (SNAP 组, $n = 6$),在第 3 天分别通过导管给 CCI 组大鼠注射溶剂 DMSO ($10 \mu\text{l}$),给 SNAP 组大鼠 GAT3 抑制剂 [(S)-1-[2-[三(4-甲氧基苯基)甲氧基]乙基]-3-哌啶甲酸((S)-1-[2-[tris(4-methoxyphenyl) methoxy] ethyl]-3-piperidinecarboxylic acid, SNAP5114) ($200 \mu\text{g}$, $10 \mu\text{l}$),分别于注射前、注射后 30、60、120 min、24 h、48 h 测双侧后爪热痛阈值 PWL,对比双侧后爪 PWL。CCI 组注射 DMSO 后大鼠后爪痛阈值没有明显改变 ($P > 0.05$)。与 CCI 组 (0.369 ± 0.151) 比较,SNAP 组 (0.779 ± 0.095) DRG 局部注射 SNAP5114 120 min 后,患侧后爪热痛阈值明显上升 ($F = 10.822$, $P < 0.05$),持续至注射后 24 h [CCI 组: (0.616 ± 0.0501), SNAP 组: (0.859 ± 0.017); $F = 42.939$, $P < 0.05$]。见图 4。DRG 局部注射 SNAP5114 后 120 min,患侧后爪热痛阈值明显上升,持续至注射后 24 h; 箭头表示注射时间。

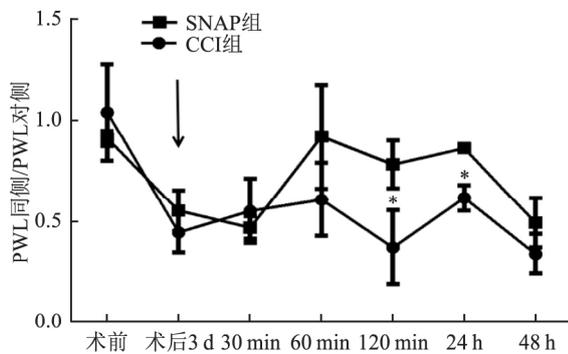


图 4 L₅ DRG 局部注射 GAT3 抑制剂 SNAP5114 对大鼠痛阈的影响
与 CCI 组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

本研究采用 CCI 神经痛模型,CCI 损伤后大鼠表现为自发痛(自发抬起损伤肢体,时而舔足、咬足或甩足,避免损伤侧的负重)、痛觉过敏(机械痛敏和热痛敏)^[6-9]。本研究中,与 Sham 组比较,CCI 模型组的大鼠在术后 1 d 热痛阈值明显下降,表现为热痛敏,并持续到术后 7 d,说明造模成功。

因为突触间隙中 GABA 不能被酶分解,所以突触中 GABA 清除需要 GAT 的再摄取^[10-11],GAT 位于神经元和星形胶质细胞的质膜上,这些转运蛋白将胞外 GABA 转运到细胞内。在中枢神经系统中,与疼痛有关的主要有 GAT1 和 GAT3^[10]。先前研

究^[12]显示用角叉菜胶注射诱发神经痛后,三叉神经脊束核的三叉神经元 GAT3 表达增加,并认为这种 GAT3 表达增加减少了脊髓三叉神经元突触内 GABA 的作用时间,导致 GABA 作用的减弱,从而引起神经系统致敏。但也有研究^[5]报道神经痛动物 GAT3 表达下降,在紫杉醇诱发的神经痛模型中,脊髓背角星形胶质细胞中 GAT3 的表达是减少的。还有研究^[13-15]表明,GAT3 在病理状态下后功能发生改变,出现逆转运,介导了 GABA 从神经突触末梢向突触内的逆向释放,这种逆向释放代偿了神经损伤后 GABA 作用的减弱,因此 GAT3 表达减少会导致神经痛的发生。总之,神经痛动物中 GAT3 的改变还存在争议。而本研究结果显示,与 Sham 组比较,术后第 3 天 DRG 内 GAT3 蛋白以及 GAT3 mRNA 均有所增加,进一步在 DRG 局部使用 GAT3 抑制剂后,CCI 大鼠的痛阈值明显升高,出现神经痛的缓解。这可能是神经损伤后 GAT3 的表达增加加速了神经突触中 GABA 清除,从而使突触中 GABA 浓度降低,作用时间缩短,GABA 能抑制信号减弱,导致机体痛觉过敏,是神经痛的发生机制。本研究只探讨了 GAT3 量的改变,GAT3 的功能是否在神经损伤后发生改变需要进一步的研究证实。

为特异性的研究 L₅ DRG 局部 GAT3 在神经病理性疼痛发生发展中的作用,术前给予大鼠 L₅ DRG 局部置管,排除管子脱落、麻醉等因素影响,在术后第 3 天通过导管将 GAT3 抑制剂 SNAP5114 局部注射在 DRG 附近,减少了 SNAP5114 吸收入血或入脑脊液产生副作用。结果表明,注射后 24 h 大鼠的疼痛有所缓解,提示抑制 GAT3 对大鼠神经病理痛有一定的镇痛作用。但连续测定显示,疼痛缓解的持续时间不长,注射后 48 h 和对照组痛阈无明显差异,说明 L₅ DRG 内 GAT3 表达的升高可能并非神经痛发病的主要因素,GAT3 升高可能是神经痛其他原发病因导致的结果,需要进一步探讨。

综上所述,神经损伤后 DRG 内 GAT3 表达明显升高,DRG 局部给予 GAT3 抑制剂可短暂缓解神经痛的症状,L₅DRG 内 GAT3 表达升高并非神经痛发病的主要因素。

参考文献

[1] Meacham K, Shepherd A, Mohapatra D P, et al. Neuropathic Pain: central vs. peripheral mechanisms [J]. Curr Pain Headache Rep, 2017, 21(6): 28.
[2] Basbaum A I, Bautista D M, Scherrer G, et al. Cellular and molecular mechanisms of pain [J]. Cell, 2009, 139(2): 267-84.

- [3] Ran R, Gu J, Fu J, et al. The role of the GABA-A receptor of the adjacent intact dorsal root ganglion neurons in rats with neuropathic pain [J]. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2014, 74(4): 405–14.
- [4] Zhou Y, Danbolt N C. GABA and glutamate transporters in brain [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2013, 4: 165.
- [5] Yadav R, Yan X, Maixner D W, et al. Blocking the GABA transporter GAT-1 ameliorates spinal GABAergic disinhibition and neuropathic pain induced by paclitaxel [J]. *J Neurochem*, 2015, 133(6): 857–69.
- [6] 解柔刚, 韩克威, 黄 萌, 等. 大鼠慢性背根节压迫诱致 DRG 大神经元兴奋性增强和 I_h 电流显著上调 [J]. *神经解剖学杂志*, 2017, 33(3): 259–64.
- [7] Kumar A, Kaur H, Singh A. Neuropathic pain models caused by damage to central or peripheral nervous system [J]. *Pharmacol Rep*, 2018, 70(2): 206–16.
- [8] Du X, Hao H, Yang Y, et al. Local GABAergic signaling within sensory ganglia controls peripheral nociceptive transmission [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(5): 1741–56.
- [9] Challa S R. Surgical animal models of neuropathic pain: pros and cons [J]. *Int J Neurosci*, 2014, 125(3): 170–4.
- [10] Scimemi A. Structure, function, and plasticity of GABA transporters [J]. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8: 161.
- [11] Minelli A, DeBiasi S, Brecha N C, et al. GAT-3, a high-affinity GABA plasma membrane transporter, is localized to astrocytic processes, and it is not confined to the vicinity of GABAergic synapses in the cerebral cortex [J]. *J Neurosci*, 1996, 16(19): 6255–64.
- [12] Ng C H, Ong W Y. Increased expression of gamma-aminobutyric acid transporters GAT-1 and GAT-3 in the spinal trigeminal nucleus after facial carrageenan injections [J]. *Pain*, 2001, 92(1–2): 29–40.
- [13] Heja L, Nyitrai G, Kekesi O, et al. Astrocytes convert network excitation to tonic inhibition of neurons [J]. *BMC Biol*, 2012, 10: 26.
- [14] Hernandez-Rabaza V, Cabrera-Pastor A, Taoro-Gonzalez L, et al. Neuroinflammation increases GABAergic tone and impairs cognitive and motor function in hyperammonemia by increasing GAT-3 membrane expression. Reversal by sulforaphane by promoting M2 polarization of microglia [J]. *J Neuroinflamm*, 2016, 13(1): 83.
- [15] Wu Z, Guo Z, Gearing M, et al. Tonic inhibition in dentate gyrus impairs long-term potentiation and memory in an Alzheimer's disease model [J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4159.

The role of the alteration of GABA transporter 3 in the injured DRG in the etiology and development of neuropathic pain

Rang Ling, Xie Xiaofang, Ran Ran, et al

(Dept of Anesthesiology, People's Hospital of Shiyan City, People's Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan 442000)

Abstract Objective To explore the expression of GAT3 in dorsal root ganglion (DRG) after nerve injury and its role in the occurrence and development of neuralgia. **Methods** SD rats were used to make chronic constriction injury (CCI) model. The paw withdrawal latency (PWL) was measured after operation to verify the success of the model by comparing operative side with non-operative side. On the 3rd day after operation, the expression of GAT3 protein and mRNA in L₄-L₅ DRG of Sham group and CCI group were detected by Western blot and real-time PCR. On the 3rd day after operation, GAT3 inhibitor (S)-1-[2-[tris(4-methoxyphenyl)methoxy]ethyl]-3-piperidine-carboxylic acid, SNAP5114 (200 μg, 10 μl) was injected into the SNAP group through catheters that pre-implanted on L₅ DRG, while DMSO (10 μl) was injected into CCI group. The changes of PWL were measured. **Results** Compared with the Sham group, the PWL in the CCI group was significantly shorter than that in the Sham group ($P < 0.05$). Compared with the Sham group, the expression of GAT3 protein in L₄-L₅ DRG was significantly increased in the CCI group ($P < 0.05$). The results of RT-PCR also showed that the expression of GAT3 mRNA in DRG was significantly increased ($P < 0.05$). Behavioral study showed that PWL in SNAP group was significantly longer than that in CCI group, and the effects maintain for 24 hours ($P < 0.05$). **Conclusion** GAT3 in DRG is up-regulated after nerve injury. L₅ DRG topical GAT3 antagonist can only transiently alleviate the symptom of neuropathic pain, which means up regulation of GAT3 of L₅ DRG is not the main factor for the occurrence of neuropathic pain.

Key words neuropathic pain; dorsal root ganglion; GABA uptake; GABA transporter 3