

## · 实验研究 ·

# 脊髓电刺激对糖尿病神经痛大鼠脊髓胶质细胞谷氨酸转运体-1 和谷氨酸-天冬氨酸转运体的影响

黄翔 袁雅婷 李晓宏 李世杰 邓翠芬

**【摘要】目的** 观察脊髓电刺激对糖尿病大鼠痛性周围神经病变时脊髓胶质细胞谷氨酸转运体-1(GLT-1)和谷氨酸-天冬氨酸转运体(GLAST)表达的影响。**方法** 选择健康雄性 SD 大鼠 48 只,2 月龄,体重 250~300 g,采用随机数字表法将其分为四组:对照组(C 组)、糖尿病神经痛组(D 组)、假刺激组(N 组)和脊髓电刺激组(S 组),每组 12 只。D、N 和 S 组腹腔注射 1%链脲佐菌素 60 mg/kg 制备大鼠糖尿病痛性周围神经病变模型,C 组注射等容量枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液。N 组和 S 组于造模后 19 d 在硬膜外间隙置入电极,S 组于造模后 26~28 d 行脊髓电刺激。于造模前 1 d、造模后 2、7、14、28 d 测定机械缩足反应阈(MWT)。于造模后 28 d 测定痛阈后处死大鼠,取 L<sub>4-5</sub> 脊髓组织,采用荧光定量 PCR 法和 Western blot 法检测脊髓背角 GLT-1 和 GLAST mRNA 表达量和蛋白含量。**结果** 与 C 组比较,造模后 14、28 d D 组、N 组和 S 组 MWT 明显降低( $P < 0.05$ );造模后 28 d S 组胶质细胞 GLT-1 及 GLAST mRNA 表达量和蛋白含量明显增加( $P < 0.05$ )。与造模前 1 d 比较,造模后 14、28 d D、N、S 组 MWT 明显降低( $P < 0.05$ );与 D 组比较,造模后 28 d S 组 MWT 明显升高,脊髓胶质细胞 GLT-1 及 GLAST mRNA 表达量和蛋白含量明显增加( $P < 0.05$ )。**结论** 脊髓电刺激减轻糖尿病大鼠神经痛的机制可能与上调脊髓胶质细胞 GLT-1 及 GLAST 基因的表达有关。

**【关键词】** 脊髓;电刺激疗法;糖尿病神经病变;神经痛;谷氨酸转运体

**Effect of spinal cord stimulation on expression of spinal GLT-1 and GLAST in rats with diabetic neuropathic pain** HUANG Xiang, YUAN Yating, LI Xiaohong, LI Shijie, DENG Cuifen.

Department of Anesthesiology, The First People's Hospital of Foshan, Foshan 528000, China

Corresponding author: YUAN Yating, Email: leohuangxiang@163.com

**【Abstract】Objective** To observe the effect of spinal cord stimulation on expression of spinal GLT-1 and GLAST in rats with diabetic neuropathic pain. **Methods** Forty-eight healthy male SD rats, only 2 months old, weighting 250-300 g, using the random number table method, were divided into four groups ( $n=12$ ): the control group (group C), diabetes neuralgia group (group D), false stimulation group (group N) and spinal cord stimulation group (group S). The model of diabetes was induced by the pedtoneal injection of streptozocin (STZ), electrodes were placed into the epidural space 19 days after injection of STZ in groups N and S, in addition, group S was performed 26-28 days after injection of STZ. Mechanical contraction leg threshold (MWT) were determined one day before STZ injection, 2 d, 7 d, 14 d and 28 d after STZ injection. The rats were sacrificed, the lumbar spinal cord tissue were obtained for determination of GLT-1 and GLAST expression in spinal cord tissues on 28 d after measurement of MWT. **Results** Compared with group C, MWT was decreased 14 d and 28 d after STZ injection, and expression levels of GLT-1 and GLAST mRNA were increased on 14 d and 28 d ( $P < 0.05$ ); Compared with before STZ injection, MWT of group D, group N and group S was decreased on 14 d and 28 d ( $P < 0.05$ ); Compared with group D, MWT was increased, and expression levels of GLT-1 and GLAST mRNA were increased in group S on 28 d after STZ injection ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The mechanism of spinal cord stimulation reducing rats diabetes neuralgia may be related to elevating the expression of GLT-1 and GLAST.

**【Key words】** Spinal cord; Electrical stimulation therapy; Diabetic neuropathy; Neuralgia; Glutamate plasma membrane transport protein

DOI:10.12089/jca.2018.04.017

作者单位:528000 佛山市第一人民医院疼痛科(黄翔、李晓宏、李世杰、邓翠芬),超声科(袁雅婷)

通信作者:袁雅婷,Email: leohuangxiang@163.com

脊髓电刺激(spinal cord stimulation, SCS), 俗称镇痛起搏器, 是指将刺激电极置入椎管的硬膜外腔, 通过电流刺激脊髓后角感觉神经元及后柱传导束, 阻断疼痛信号传导, 以达到治疗疼痛的一种神经调控方法<sup>[1]</sup>。研究表明, SCS 可减轻多种原因诱发的神经病理性疼痛, 提高患者生活质量<sup>[2, 3]</sup>, 但其镇痛机制目前尚未明确。糖尿病神经痛是慢性神经病理性疼痛的一种, 具有神经病理性疼痛的特性, 但也有其特点。脊髓后角兴奋性氨基酸(谷氨酸和天冬氨酸)是传递伤害感受性信息的主要神经递质, 可通过激活多种谷氨酸受体参与兴奋性突触传递、突触可塑性等过程。突触间隙的兴奋性氨基酸转运体(EAATs)是神经末梢释放的谷氨酸清除和灭活的唯一途径<sup>[4]</sup>。胶质细胞中与疼痛相关性密切的主要为小胶质细胞和星型胶质细胞。小胶质细胞主要表达谷氨酸转运体-1(GLT-1)和谷氨酸-天冬氨酸转运体(GLAST), 星型胶质细胞主要表达 GLT-1<sup>[5]</sup>。目前, SCS 减轻糖尿病神经痛的机制尚不明确。本研究拟观察 SCS 对糖尿病神经痛大鼠胶质细胞 GLT-1 及 GLAST 基因表达的影响, 进一步探讨 SCS 减轻糖尿病神经痛的可能机制。

### 材料与方法

**实验动物与分组** 选择健康雄性 SD 大鼠 48 只, 2 月龄, 体重 250~300 g, 由广东省动物实验中心提供。采用随机数字表法将大鼠分成四组: 对照组(C 组)、糖尿病神经痛组(D 组)、假刺激组(N 组)和 SCS 组(S 组), 每组 12 只。

**模型制备** D、N 和 S 组腹腔注射 1%链脲佐菌素(STZ)(批号:L16337)60 mg/kg(溶解于 pH 值 4.5 的枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液中)制备大鼠糖尿病痛性周围神经病变模型。C 组注射等容量枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液。

造模后 19 d, S 组和 N 组参照文献<sup>[6]</sup>介绍的方法, 麻醉后将硬膜外刺激电极(华中科技大学控制科学与工程系研制)与导线置入 T<sub>10</sub>~L<sub>3</sub> 硬膜外间隙, 丝线固定于棘突, 刺激器接头与导线经皮下隧道用牙科骨水泥固定于颅骨表面, 然后逐层缝合, 分笼饲养。在弱电刺激下(频率 50 Hz、脉冲宽度 0.2 ms、强度 0.2~0.4 mA), 若出现后肢轻微抽动, 则表明 SCS 有效。造模后 26~28 d, S 组采用 BL420F 电刺激仪行电刺激, 总时程 30 min, 每天 1 次, 参数设定为: 频率 50 Hz、脉冲宽度 0.2

ms、强度 2/3 运动阈值(能够引起运动反应的最低强度)。

**血糖浓度的测定** 分别于造模前 1 d、造模后 2、7、14、28 d 采集大鼠尾静脉血样 0.1 ml, 采用血糖仪测定血糖浓度, 测定时间固定于上午 7:00~9:00。STZ 注射后 2 d 采集大鼠尾静脉血样, 测定血糖浓度, 血糖 $\geq$ 16.7 mmol/L 大鼠为 2 型糖尿病大鼠。

**机械缩足反应阈(MWT)的测定** 分别于造模前 1 d、造模后 2、7、14、28 d 将大鼠放在金属丝网眼垫上 30 min 后, 采用 von Frey 纤维丝刺激大鼠第 3、4 趾间皮肤。刺激力度依次为 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26 g, 初始刺激力度为 2 g。von Frey 纤维丝弯曲 90°而未出现缩足反应时, 更换相邻高一级力度纤维丝, 否则更换相邻低一级力度纤维丝, 每次刺激持续 4~6 s, 间隔 1 min, 共刺激 5 次, 至少诱发 3 次缩足反应的最小刺激力度为 MWT。造模后 14 d MWT 低于基础值 80%的大鼠为糖尿病神经痛大鼠。

**GLT-1 及 GLAST mRNA 表达量的测定** MWT 测定结束后, 大鼠断头处死, 置于冰板上取出脊髓 L<sub>4-5</sub>, 立即保存在液氮里, 随后采用 FQ-RT-PCR 法测定 GLT-1 mRNA 及 GLAST mRNA 表达量。引物合成: GLT-1、GLAST 和 GAPDH 基因引物序列均由 Primer Premier 5.0 软件自行设计, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。GLAST: 上游引物序列 5'-GGGTCTGTGAATGGGGTCAAT-3', 下游引物序列 5'-AAGAAGAGGATGCCAGAGGT-3', 扩增产物长度 181 bp; GLT-1: 上游引物序列 5'-TACAGCCCTITACGAAGCC-3', 下游引物序列 5'-TGATAGACAATCCCAGCCC-3', 扩增产物长度 319 bp; GAPDH: 上游引物序列 5'-ACAGCAACAGGGTGGTGGAC-3', 下游引物序列 5'-TFRGAGGGTG-CAGCGAACTY-3', 扩增产物长度 252 bp。将冻存的标本取出, 加入 Trizol 试剂提取总 RNA, 每个总 RNA 样品取 2  $\mu$ l 作为模板, 按逆转录试剂盒说明书进行操作合成 cDNA, 仪器为 ABI stepone plus PCR 仪, 反应条件为 37°C 1 h, 然后 95°C 3 min。待测样品均按以下体系反应: THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix 10  $\mu$ l、ROX 0.4  $\mu$ l、上下游引物各 0.4  $\mu$ l、模板 1  $\mu$ l, 剩余体积用无菌去离子水补齐 20  $\mu$ l。反应条件为: 95°C 1 min, 95°C 10 s, 60°C 30 s, 共 40 个循环, 在 0.4°C 时, 设定荧光检测点。仪器为: ABI stepone plus QPCR 仪。反应结束后, 电脑

自动分析荧光信号并将其转换为各目的基因的起始拷贝数和  $C_T$  值。为了控制样本间 mRNA 质量的变异,同时检测管家基因 GAPDH 的表达,将 GLT-1、GLAST 与 GAPDH 的起始模板数进行比较后分析。

**GLT-1 及 GLAST 蛋白含量的测定** 将脊髓组织匀浆,加蛋白裂解液,提取总蛋白,采用 BCA 法检测蛋白浓度。蛋白样品(每孔的蛋白上样量为 20  $\mu$ g)经聚丙烯酰胺进行凝胶电泳分离后,采用半干转法进行转膜,将蛋白转移至 PVDF 膜上。用 50 g/L 的牛血清白蛋白封闭液室温封闭 2 h,洗膜后先后加入兔抗大鼠 GLT-1 及 GLAST 单克隆抗体(稀释度 1:500)和小鼠抗兔二抗 IgG(稀释度 1:2 000)。暗室内加显色底物显色曝光、扫描。采用 Quantity One 软件进行分析,以 GLT-1 及 GLAST 灰度值与  $\beta$ -actin 内参灰度值的比值反映 GLT-1 及 GLAST 蛋白含量。

**统计分析** 采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计分析。正态分布计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析,组内比较采用重复测量设计的方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

**血糖浓度** 与造模前 1 d 和 C 组比较,造模后 2~28 d D、N、S 组血糖浓度明显升高( $P < 0.05$ )

表 1 四组大鼠不同时点血糖浓度的比较 (mmol/L,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	造模前 1 d	造模后 2 d	造模后 7 d	造模后 14 d	造模后 28 d
C 组	12	4.8 $\pm$ 0.6	4.9 $\pm$ 0.7	4.9 $\pm$ 0.5	5.0 $\pm$ 0.5	5.2 $\pm$ 0.8
D 组	12	4.9 $\pm$ 0.5	22.5 $\pm$ 1.9 <sup>ab</sup>	20.0 $\pm$ 1.2 <sup>ab</sup>	21.6 $\pm$ 1.7 <sup>ab</sup>	20.5 $\pm$ 1.5 <sup>ab</sup>
N 组	12	5.0 $\pm$ 0.7	22.8 $\pm$ 1.8 <sup>ab</sup>	21.4 $\pm$ 1.3 <sup>ab</sup>	20.3 $\pm$ 1.8 <sup>ab</sup>	23.5 $\pm$ 2.1 <sup>ab</sup>
S 组	12	4.9 $\pm$ 0.9	21.3 $\pm$ 1.6 <sup>ab</sup>	21.5 $\pm$ 1.7 <sup>ab</sup>	24.5 $\pm$ 2.2 <sup>ab</sup>	22.9 $\pm$ 2.2 <sup>ab</sup>

注:与造模前 1 d 比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 C 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

表 2 四组大鼠不同时点 MWT 的比较 (g,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	造模前 1 d	造模后 2 d	造模后 7 d	造模后 14 d	造模后 28 d
C 组	12	11.8 $\pm$ 1.6	11.9 $\pm$ 1.4	10.9 $\pm$ 1.5	11.0 $\pm$ 1.5	11.2 $\pm$ 1.8
D 组	12	10.9 $\pm$ 1.5	11.5 $\pm$ 1.9	10.1 $\pm$ 1.2	6.9 $\pm$ 0.7 <sup>ab</sup>	5.5 $\pm$ 1.5 <sup>ab</sup>
N 组	12	11.0 $\pm$ 1.7	11.8 $\pm$ 1.8	9.4 $\pm$ 1.3	7.0 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	5.7 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>
S 组	12	10.9 $\pm$ 0.9	11.3 $\pm$ 1.6	9.5 $\pm$ 1.7	6.8 $\pm$ 1.2 <sup>ab</sup>	8.9 $\pm$ 1.2 <sup>abc</sup>

注:与造模前 1 d 比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 C 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 D 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$

(表 1)。

MWT 与造模前 1 d 和 C 组比较,造模后 14、28 d D、N、S 组 MWT 明显降低( $P < 0.05$ );与 D 组比较,造模后 28 d S 组 MWT 明显升高( $P < 0.05$ ) (表 2)。

**GLT-1 及 GLAST mRNA 表达量** 与 C 组比较,D、N 组脊髓胶质细胞 GLT-1 及 GLAST mRNA 表达量明显减少( $P < 0.05$ );S 组脊髓胶质细胞 GLT-1 及 GLAST mRNA 表达量明显增加( $P < 0.05$ )。与 D 组比较,S 组脊髓胶质细胞 GLT-1 及 GLAST mRNA 表达量明显增加( $P < 0.05$ ) (表 3)。

**GLT-1 及 GLAST 蛋白含量** 与 C 组比较,D 组、N 组脊髓胶质细胞 GLT-1 及 GLAST 蛋白含量明显减少( $P < 0.05$ );S 组脊髓胶质细胞 GLT-1 及 GLAST 蛋白含量明显增加( $P < 0.05$ )。与 D 组比较,S 组脊髓胶质细胞 GLT-1 及 GLAST 蛋白含量明显增加( $P < 0.05$ ) (图 1)。

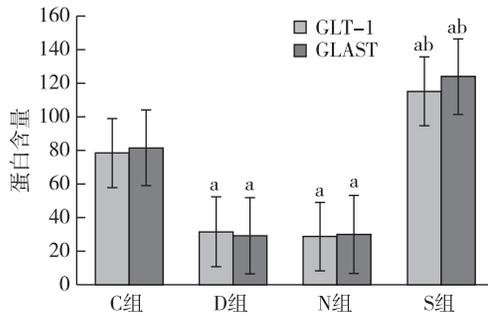
### 讨 论

糖尿病是由于胰岛素分泌缺陷和(或)胰岛素作用障碍所致的以高血糖为特征的代谢性疾病。30%~50%的糖尿病患者会出现糖尿病神经病理性疼痛<sup>[7]</sup>,表现为自发痛、痛觉过敏和异常性疼痛,这对患者的身心健康造成了很大危害。糖尿病神经痛是慢性神经病理性疼痛的一种,具有机械痛敏而无热痛敏是糖尿病神经痛的行为学特征之一。本

**表 3 四组大鼠脊髓胶质细胞 GLT-1 及 GLAST mRNA 表达量的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	只数	GLT-1 mRNA	GLAST mRNA
C 组	12	2.2 ± 0.4	2.3 ± 0.3
D 组	12	1.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.4 <sup>a</sup>
N 组	12	1.5 ± 0.3 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.3 <sup>a</sup>
S 组	12	3.8 ± 1.4 <sup>ab</sup>	3.7 ± 0.8 <sup>ab</sup>

注:与 C 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 D 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$



注:与 C 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 D 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

**图 1 四组大鼠脊髓胶质细胞 GLT-1 及 GLAST 蛋白含量的比较**

研究注射 STZ 后 2 d 大鼠血糖浓度  $> 16.7$  mmol/L,注射 STZ 后 14 d MWT 值低于注射 STZ 前的 80%,注射 STZ 后 28 d MWT 明显降低,提示大鼠糖尿病神经痛模型制备成功<sup>[8, 9]</sup>。本研究参考文献[6]选择电极置入方法、刺激参数设定,该方法能够较好地模拟临床应用的硬膜外电刺激技术。本研究结果提示 SCS 减轻了大鼠糖尿病神经痛。

研究表明,神经病理性痛大鼠脊髓背角 GLT-1 mRNA 和 GLAST mRNA 表达下调<sup>[10]</sup>。而 EAATs 表达明显下调可能与脊髓的可塑性改变有关<sup>[11]</sup>。本研究结果提示,SCS 减轻大鼠糖尿病神经痛的机制可能是通过上调胶质细胞 GLT-1 及 GLAST 的表达。脊髓内 EAATs 的表达可能与诸多因素有关,其中与中枢神经系统 N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)受体的关系最为密切。有研究表明,脊髓背角的 NMDA 受体表达上调在糖尿病神经痛中枢敏化的形成和维持中发挥重要作用<sup>[12]</sup>。根据本研究结果,推测 SCS 抑制 NMDA 受体的激活,脊髓内 EAATs 的表达上调,使胶质细胞中 GLT-1 及 GLAST 蛋白含量增加,灭活和清除神经末梢的兴奋性氨基酸,从而减轻大鼠糖尿病神经痛。但 SCS 对 NMDA 受体的作用目前尚未明确,

仍有待进一步研究。

综上所述,脊髓电刺激减轻大鼠糖尿病神经痛的机制可能与上调脊髓胶质细胞 GLT-1 及 GLAST 基因的表达有关。

**参 考 文 献**

- [1] Epstein LJ, Palmieri M. Managing chronic pain with spinal cord stimulation. Mt Sinai J Med, 2012, 79(1): 123-132.
- [2] Kumar K, Taylor RS, Jacques L, et al. The effects of spinal cord stimulation in neuropathic pain are sustained: a 24-month follow-up of the prospective randomized controlled multicenter trial of the effectiveness of spinal cord stimulation. Neurosurgery, 2008, 63(4): 762-770.
- [3] Taylor RS, Ryan J, O'Donnell R, et al. The cost-effectiveness of spinal cord stimulation in the treatment of failed back surgery syndrome. Clin J Pain, 2010, 26(6): 463-469.
- [4] 罗裕辉, 张德仁. 神经病理性疼痛脊髓背角 GLT-1 及 GLAST 表达的变化. 中国疼痛医学杂志, 2014, 20(3): 150-158.
- [5] 于洁, 冷玉芳, 吴小精, 等. 青藤碱对神经病理性痛大鼠脊髓 GLT-1 mRNA 和 GLAST mRNA 表达的影响. 中华麻醉学杂志, 2014, 34(10): 1211-1214.
- [6] Yang F, Carteret AF, Wacnik PW, et al. Bipolar spinal cord stimulation attenuates mechanical hypersensitivity at an intensity that activates a small portion of A-fiber afferents in spinal nerveinjured rats. Neuroscience, 2011, 29(199): 470-480.
- [7] 郭艳娇, 刘培雯, 牛娟, 等. 脊髓胶质细胞参与糖尿病神经病理性疼痛的研究进展. 重庆医学, 2016, 45(6): 826-828.
- [8] Mirshekar M, Roghani M, Khalili M, et al. Chronic oral pargolonidol alleviates streptozotocin-induced diabetic neuropathic hyperalgesia in rat: involvement of oxidative stress. Iran Biomed J, 2010, 14(12): 33-39.
- [9] Gong YH, Yu XR, Liu HL, et al. Antinociceptive effects of combination of tramadol and acetaminophen on painful diabetic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. Acta Anaesthesiol Taiwan, 2011, 49(1): 16-20.
- [10] Sung B, Lim G, Man J, et al. Altered expression and uptake activity of spinal glutamate transporters after nerve injury contribute to the pathogenesis of neuropathic pain in rats. J Neurosci, 2003, 23(7): 2899-2910.
- [11] 李鹏, 张美玉, 王丹巧, 等. 青藤碱对 SSNI 模型大鼠镇痛效应及脑内兴奋性氨基酸递质的影响. 中国药理学通报, 2012, 28(10): 1365-1368.
- [12] Wang XL, Zhang HM, Chen SR, et al. Altered synaptic inputs and GABAB receptor function in spinal superficial dorsal horn neurons in rats with diabetic neuropathy. J Physiol, 2007, 579(Pt 3): 849-861.

(收稿日期:2017-09-19)