



P2X3 受体在糖尿病神经痛动物模型中的研究进展

魏骏骏, 寿升芸, 何晓芬, 蒋永亮, 方剑乔

(浙江中医药大学第三临床医学院, 杭州 310053)

【摘要】 糖尿病神经痛(diabetic neuropathic pain, DNP)作为临床上最常见的并发症之一,极大地影响了患者的生活质量,目前发病机制尚不明确,缺少有效的治疗方法。DNP与周围感觉神经兴奋性增强有关,涉及多种离子通道、受体表达、功能上调,已有研究表明P2X3受体参与DNP等多种神经病理痛的痛觉形成、传导和调节,本文将围绕DNP模型的建立及P2X3受体在DNP模型中的作用予以综述。

【关键词】 P2X3受体;糖尿病;神经痛;糖尿病神经痛

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015)05-0062-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.005.015

Progress of animal experimental research on P2X3 receptors in diabetes mellitus

WEI Jun-jun, SHOU Sheng-yun, HE Xiao-fen, JIANG Yong-liang, FANG Jian-qiao

(The Third Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

【Abstract】 Diabetic neuropathic pain(DNP) is one of the most common complications in clinical, which influenced patients' daily functions greatly, without clear mechanisms and effective methods. P2X3 receptors play a pivotal role in the formation, transmission and conduction of pain under neuropathic pain models, associated with peripheral sensory nerve excitability enhancement. This paper focuses on the establishment of DNP models, and the effects of P2X3 receptors in diabetes mellitus.

【Key words】 P2X3 receptors; Diabetes; Neuropathic pain; Diabetic neuropathic pain

据WHO统计,全球目前共有3.47亿人患有糖尿病^[1],糖尿病已是继肿瘤、心脑血管疾病之后第三位威胁人类健康的慢性非传染性疾病。糖尿病神经痛(diabetic neuropathic pain, DNP)是糖尿病最常见的并发症之一,发病率高达32.7%^[2],严重影响患者生存质量。DNP与周围感觉神经兴奋性增强有关,涉及多种离子通道、受体表达、功能上调^[3]。嘌呤受体P2X(purinergic P2X)家族是当前

生物医学研究领域的一个热点。近年来研究表明P2X3受体参与包括DNP多种神经病理痛过程。本文将就P2X3受体在DNP模型中介导疼痛的研究进展予以综述。

1 DNP动物模型

糖尿病神经痛的发病机制尚不明确,目前的治疗方案非常有限并且疗效欠佳。为了探讨DNP的

【基金项目】 国家自然科学基金(81303039);教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20133322120001);浙江省博士后基金(BSH1302083);浙江省高校重中之重一级学科(中医学)建设经费(浙教高科[2012]80号)。

【作者简介】 魏骏骏(1990-),女,硕士生,研究方向:针灸镇痛与免疫调节的相关性研究,E-mail: 476275735@qq.com。

【通讯作者】 方剑乔(1961-),男,博士生导师,研究方向:针灸镇痛与免疫调节的相关性研究,E-mail: fangjianqiao7532@163.com。蒋永亮(1981-),男,助理研究员、博士,研究方向:针灸镇痛与免疫调节的相关性研究,E-mail: jy12182@126.com。

发病机制以便于更好指导临床治疗,动物模型已成为研究该疾病重要手段。目前,国内外主要通过 Alloxan 注射法、STZ 注射法、单独高脂高糖饮食法以及高脂高糖饮食联合小剂量 STZ 注射法建立 DNP 模型。DNP 模型分为 1 型 DNP 模型(胰岛素依赖型)和 2 型 DNP 模型(非胰岛素依赖型)。

1.1 1 型 DNP 动物模型建立及其病理变化

1.1.1 Alloxan 诱导模型

四氧嘧啶(alloxan, ALX)是一种核酸及其衍生物,其原理是选择性地损伤胰岛素 β 细胞,使 β 细胞分泌胰岛素的功能减弱,因此 ALX 诱导的动物糖尿病模型近似于人类的 1 型糖尿病。其造模方式一般为腹腔或尾静脉注射。

研究发现单次^[4]注射 ALX 或多次^[5]注射 ALX,模型组分别于第 8 周、第 6 周痛阈下降;Jianbo L 等^[6]使用 ALX 发现 2 月后感觉神经传导速度(sensory nerve conduction velocity, SNCV)降低,皆表示 DNP 模型造模成功。而杨明华等^[7]使用尾静脉注射 ALX,发现 ALX 诱导模型血糖波动起伏较大,会增加实验结果假阴性或假阳性的几率。同时,由于 ALX 对胰岛细胞有很强的选择性杀伤作用^[8],因此目前使用 ALX 制备的 DNP 模型较少。

1.1.2 STZ 诱导模型

链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)是一种氨基葡萄糖-亚硝基脲,其作用原理是通过破坏 β 细胞 DNA 从而使胰腺减少胰岛素分泌^[9]。STZ 诱导的糖尿病模型相对简单,通过腹腔或尾静脉一次性注射 STZ 即可。因此,STZ 诱导的糖尿病大鼠模型广泛用于研究糖尿病神经病理痛的机制与治疗方法。

不同剂量的 STZ 引起胰腺中 β 细胞不同程度的损伤。文献中报道 STZ 注射量从 35 mg/kg 到 200 mg/kg 不等^[10]。目前认为小剂量(40 mg/kg 以下)STZ 引发胰岛 β 细胞凋亡,大剂量(50 mg/kg 以上)则引起胰岛 β 细胞坏死^[11]。单用 STZ 注射的动物模型与人类 1 型糖尿病(胰岛素依赖性)相似。已有研究表明 STZ 注射 72 h 后,大多数大鼠出现高血糖,胰岛素分泌下降以及葡萄糖耐受下降^[12]。研究发现 STZ 注射后 4.5 周,大鼠痛阈下降, DNP 模型建立成功^[13]。

糖尿病周围神经病变(diabetic peripheral neuropathy, DPN)具有多灶性轴突缺失的特征^[14]。光镜观察 1 型 DNP 大鼠坐骨神经纤维排列异常,多处变性及断裂,有髓神经纤维密度分布不均匀且显

著减少,髓鞘细胞肿胀坏死,有脱髓鞘现象^[15]。这些形态学改变伴随着神经内膜微血管病变,血栓形成、血管周围基底膜增厚以及外周细胞退化。

1.2 2 型 DNP 动物模型建立及其病理变化

1.2.1 高脂饮食模型

在饮食引起的糖尿病模型中,大鼠或小鼠引起的糖尿病均与肥胖密切相关。因为营养过盛,其表现与人类代谢综合症相似。其中沙鼠、栉鼠、非洲刺毛鼠是其中 2 型糖尿病模型的常用鼠种^[16]。C57BL/6 J 小鼠只用简单的喂养高脂饮食(热量为 45%~60%^[17-18])即可,此型的特点为持续肥胖,胰岛素抵抗,高胰岛素血症及血清总胆固醇水平增高。嗜沙肥鼠需喂养高能量饮食^[19],此型的特点为食欲过盛,肥胖,葡萄糖耐受不良及高胰岛素血症,最终引起 β 细胞退化甚至坏死,胰岛素减少;缺点为过度的高热量饮食及酮症的产生而引起死亡。

饮食导致的糖尿病动物模型也用于研究糖尿病神经病理痛。已有研究表明,高脂饮食小鼠表现为神经传导速度降低,小感觉神经纤维神经病变^[18]。这种方法主要局限于制备需要长期的喂养(16 周^[17]、34 周^[18])。

1.2.2 高脂高糖饮食结合 STZ 诱导模型

用高脂高糖喂养结合 STZ 建立的实验性 2 型糖尿病大鼠模型,具有超重、糖耐量减退、血脂升高、血清胰岛素水平升高及胰岛素受体结合力降低的特点,与临床上 2 型糖尿病的特征十分相似。一般采用高热量饮食 1 个月可诱导出胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)^[11]。大量的文献表明高脂饮食联合运用 STZ 注射建立糖尿病模型的方法具有明显优势,通过这种方法,可以更快速地建立糖尿病模型。目前有许多高脂饮食和 STZ 剂量的联合方案。

研究发现使用高脂饮食结合低剂量 STZ 注射(30%、15 mg/kg)^[20],需大量时间才能建立糖尿病模型;而低热量饮食喂养及高剂量 STZ 注射(7%、65 mg/kg),只需相对较少的的时间^[21]。Dang JK 等^[22]成功建立大鼠糖尿病模型后,于第 2 周检测机械痛阈及热痛阈皆下降,表明 DNP 模型成功;而胡明财等^[23]以坐骨神经病变作为 DNP 模型成功标准。

文献报道 STZ 诱导的大鼠末梢轴突变性与人类 DPN 病变相符^[24]。目前发现在 STZ 注射后不久,2 型 DNP 模型在病理上表现为轴突萎缩,退化

及缺失^[24];电镜下 DPN 组神经纤维髓鞘高度增厚,板层厚薄不一,呈波浪状或梅花状,毛细血管内皮肿胀增生^[25]。但这些病理改变在所有模型中并不保持一致。

2 P2X3 受体在实验性 DNP 中的作用

2.1 P2X3 受体

P2X3 受体为非选择性配体门控阳离子通道,在 CCI (chronic constriction injury)^[26]、炎性痛^[27]等模型的痛信号生成、传播中起重要作用,已成为疼痛领域中新的研究方向。

P2X3 受体主要分布于一些交感神经元、感觉神经元和孤束核^[28],以中、小型神经节细胞为主^[29],在细胞核上无明显表达,较少在大神经元与外周神经纤维上表达^[30]。P2X3 受体选择性表达于伤害感受器^[31],30%~40% P2X3 受体表达于皮肤和内脏的 DRG 神经元,只有 2% 表达于骨骼肌的 DRG 神经元^[32]。同时,P2X3 受体也表达于中枢神经系统,特别是背外侧 PAG^[33]。文献报道 P2X3 受体与凝集素 IB4、TRPV1、GDNF 或 SP 等都有共同表达^[34],并且 P2X3 受体表达上调或者活性增强时疼痛加重,表达下降或者脱敏时疼痛会相应减轻^[35],证明它是进行性疼痛的重要受体。

已有研究发现 P2X3 受体在疼痛信号传导,调节神经元兴奋性,引起伤害感觉神经元病理痛^[36]中起重要作用,P2X3 受体能够与胞外 ATP(一种主要的疼痛信号传递器^[37])选择性结合^[38],被 ATP 激活后可允许 Na⁺、K⁺、Ca²⁺ 离子通过^[39]。研究证实组织损伤后 ATP 从多种细胞中释放,作用于临近细胞的嘌呤受体^[40]。ATP 诱发 P2X3 受体去极化^[41],感觉信息从外周传导到脊髓背角^[42]。炎症或神经损伤时,P2X3 受体对 ATP 或其激动剂 α 、 β -methylene ATP (α 、 β -meATP) 起反应,产生剧烈的疼痛反应行为^[43]。P2X3 受体在机体疼痛时显著表达于 DRG 神经元^[3],并选择性地表达于初级传入感觉神经元如三叉神经节 (trigeminal ganglion) 和结状神经节上^[28]。研究证明在炎性或神经损伤的大鼠分离出的 DRG 神经元中,P2X3 受体介导的 ATP 电流增强^[44]。而敲除小鼠的 P2X3 受体后,小鼠丧失了对甲醛或 ATP 的疼痛反应,证明 ATP 激活 P2X3 受体参与组织的伤害性反应^[45]。

2.2 P2X3 受体在 DNP 中的作用

糖尿病大鼠的外周信号传导通路包括 ATP 和

嘌呤受体^[3,46]。研究发现 DNP 模型中,P2X3 受体在 DRG 神经元、脊髓背角和皮肤中都表达增多^[47]。Xing J 等^[48]发现在 STZ 诱导的糖尿病模型中,PAG P2X3 受体膜蛋白表达的下调可能损伤痛觉调控系统的下行抑制通路从而产生 DNP。P2X3 受体 mRNA 和蛋白水平在外周传入神经表达上调,并且 P2X3 受体拮抗剂抑制其机械痛超敏现象^[3,46]。Xiao Z 等^[33]发现大鼠背外侧 PAG 显微镜下注射 α 、 β -meATP 后,对照组和 STZ 组机械痛皆上升,STZ 组上升幅度、背外侧 PAG 上 P2X3 受体膜蛋白表达皆较对照组少,表明在 PAG 侧面注入 α 、 β -meATP 可引起镇痛效应。Migita K 等^[46]证明在 DNP 中,DRG 神经元中 P2X3 受体 mRNA 表达上升,而 P2X3 受体抑制剂阻滞了 STZ 诱导模型的触觉痛,表明 P2X3 受体在 DNP 中起了关键作用。Shi L 等^[49]发现在大鼠 DRG 神经元 P2X3 受体总蛋白表达虽未改变,但膜蛋白表达显著增高,表明 P2X3 受体在糖尿病神经病变情况下从胞质向胞膜转移。虽然在糖尿病模型中,DRG 神经元 P2X3 受体转移机制仍不明确,但 Xu GY^[50]发现电刺激钙/钙调素依赖性蛋白激酶 II (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, CaMKII) 可促使 P2X3 受体膜蛋白的表达。以上研究表明 P2X3 受体在 DNP 中外周 DRG 神经元表达增加,发挥致痛效应;在中枢 PAG 表达却减少,起镇痛作用。

3 总结

DNP 模型的制备成功率取决于动物对 STZ 的敏感性^[17],因此制备 DNP 模型需根据动物种属、年龄、体重及成模时间等不同情况而定。P2X3 受体在介导 DNP 中起着重要作用,进一步了解 P2X3 受体在 DNP 模型中发挥的作用与机制,有助于 P2X3 受体信号传导通路成为治疗 DNP 新的潜在靶点。

参考文献:

- [1] World Health Organization. Fact sheet N° 312. Available from <http://www.who.int>. Accessed 13 January 2013.
- [2] Candrilli SD, Davis KL, Kan HJ, *et al.* Prevalence and the associated burden of illness of symptoms of diabetic peripheral neuropathy and diabetic retinopathy [J]. *J Diabetes Complications*, 2007, 21(5): 306-314.
- [3] Xu GY, Li G, Liu N, *et al.* Mechanisms underlying purinergic P2X3 receptor-mediated mechanical allodynia induced in diabetic rats[J]. *Mol Pain*, 2011, 7: 60.
- [4] RaafatK, Aboul-ElaM, El-LakanyaA. Alloxan-induced diabetic

- thermal hyperalgesia, prophylaxis and phytotherapeutic effects of *Rheum ribes* L. in mouse model[J]. Arch Pharm Res, 2014.
- [5] RaafatK, SamyW. Amelioration of Diabetes and Painful Diabetic Neuropathy by Punicagranatum L. Extract and Its Spray Dried BiopolymericDispersions[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 2014:180495.
- [6] Jianbo L, Chengya W, Jiawei C, *et al.* The role of IGF-1 gene expression abnormality in pathogenesis of diabetic peripheral neuropathy[J]. Chin Med Sci J, 2002, 17(4): 204-209.
- [7] 杨明华,柴可夫,杨苏蓓. 四氧嘧啶致糖尿病大鼠模型血糖稳定性考察[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 08:482-484.
- [8] KangJ, Dai XS, Yu TB, *et al.* Glycogen accumulation in renal tubules, a key morphological change in the diabetic rat kidney [J]. ActaDiabetol, 2005, 42(2): 110-116.
- [9] Lenzen S. The mechanisms of allxan- and streptozotcin-induced diabetes[J]. Diabetologia, 2008, 51: 216-226.
- [10] Jafarnejad A, Bathaie SZ, Nakhjavani M, *et al.* Effect of spermine on lipid profile and HDL functionality in the streptozotocin-induced diabetic rat mode [J]. Life Sci 2008, 82, 301-307.
- [11] 胡玉焕,宁亚功,肖燕. 高热量饮食联合链脲佐菌素建立 2 型糖尿病大鼠模型的影响因素[J]. 江西中医学院学报, 2013, 01:70-73.
- [12] 党江坤,吴艳,曹红,等. II 型糖尿病神经病理性痛大鼠模型的建立[J]. 中国疼痛医学杂志, 2012, 04:234-237.
- [13] Gao F, Zheng ZM. Animal models of diabetic neuropathic pain [J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2014, 122(2): 100-106.
- [14] Jolivald CG, Jiang Y, Freshwater JD, *et al.* Dynorphin A, kappa opioid receptors and the antinociceptive efficacy of asimadoline in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Diabetologia, 2006, 49(11): 2775-2785.
- [15] Hernandez - Fonseca JP, Rincon J, Pedreanez A, *et al.* Structural and ultrastructural analysis of cerebral cortex, cerebellum, and hypothalamus from diabetic rats. Exp Diabetes Res, 2009, 2009: 329632.
- [16] Shafirir E. Diabetes in animals: Contribution to the understanding of diabetes by study of its etiopathology in animal models[J]. Diabetes mellitus, 2003, 231-255.
- [17] ObrosovaIG, Ilnytska O, Lyzogubov VV, *et al.* High-fat diet induced neuropathy of pre-diabetes and obesity: effects of "healthy" diet and aldose reductaseinhibition [J]. Diabetes, 2007, 56(10): 2598-1608.
- [18] VincentAM, Hayes JM, McLean LL, *et al.* Dyslipidemia-induced neuropathy in mice: the role of oxLDL/LOX-1 [J]. Diabetes, 2009, 58(10): 2376-2385.
- [19] Shafirir E, Ziv E, Mosthaf L. Nutritionally induced insulin resistance and receptor defect leading to beta-cell failure in animal models[J]. Ann NY AcadSci, 1999, 892:223-246.
- [20] Zhang F, Ye C, Li G, *et al.* The rat model of type 2 diabetic mellitus and its glycometabolismcharacters[J]. ExpAnim, 2003, 52:401-407.
- [21] Islam MS, Choi H. Nongenetic model of type 2 diabetes: a comparative study[J]. Pharmacology, 2007, 79: 243-249.
- [22] Dang JK, Wu Y, Cao H, *et al.* Establishment of a rat model of type II diabetic neuropathic pain[J]. Pain Med, 2014, 15(4): 637-646.
- [23] 胡明财,何建华,章卓,等. 六味地黄丸对 2 型糖尿病大鼠周围神经病变的影响[J]. Chinese Journal of New Drug, 2014, 23(3): 351-354.
- [24] Hoke A. Animal models of peripheral neuropathies [J]. Neurotherapeutics, 2012, 9(2): 262-269.
- [25] 殷娟,张明红,杨红英. 2 型糖尿病大鼠周围神经病变模型的建立及相关指标检测[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 01:1-2+5.
- [26] 许锦秀,马克涛,李思源. P2X 受体在 CCI 模型中介导疼痛的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2010, 14:2778-2780.
- [27] Di VirgilioF. P2X Receptors and Inflammation [J]. Curr Med Chem, 2015, 22(7): 866-877.
- [28] 赵聪,余剑波. P2X3 受体在神经病理性疼痛中的作用[J]. 中华临床医师杂志, 2011, 5:7056-7070.
- [29] Burnstock G. Acupuncture: a novel hypothesis for the involvement of purinergic signalling[J]. Med Hypotheses, 2009, 73(4): 470-472.
- [30] Tu WZ, Cheng RD, Cheng B, *et al.* Analgesic effect of electroacupuncture on chronic neuropathic pain mediated by P2X3 receptors in rat dorsal root ganglion neurons [J]. NeurochemInt, 2012, 60(4): 379-386.
- [31] Kobayashi K, Fukuoka T, Yamanaka H, *et al.* Differential expression patterns of mRNAs for P2X receptor subunits in neurochemically characterized dorsal root ganglion neurons in the rat[J]. J. Comp. Neurol, 2005, 481: 377-390.
- [32] Aoki Y, Takahashi Y, Ohtori S, *et al.* Distribution and immunocytochemical characterization of dorsal root ganglion neurons innervating the lumbar intervertebral disc in rats: a review[J]. Life Sci, 2004, 74(21): 2627-2642.
- [33] Xiao Z, Ou S, He WJ, *et al.* Role of midbrain periaqueductal gray P2X3 receptors in electroacupuncture-mediated endogenous pain modulatory systems[J]. Brain Res, 2010, 1330:31-44.
- [34] 赵浩,余庆,刘曾旭. P2X 受体介导的神经病理痛的研究进展 [J]. 南昌大学学报(医学版), 2013, 04:90-91+95.
- [35] Mo G, Peleshok JC, Cao CQ, *et al.* Control of P2X3 channel function by metabotropic P2Y2 utp receptors in primary sensory neurons[J]. MolPharmacol, 2013, 83(3): 640-647.
- [36] North RA, Verkhratsky A. Purinergic transmission in the central nervous system[J]. Pflugers Arch, 2006, 452:479-485.
- [37] North RA. The P2X3 subunit: a molecular target in pain therapeutics[J]. Curr Opin Investig Drugs, 2003, 4:833-840.
- [38] Fabbretti E, D'Arco M, Fabbro A, *et al.* Delayed upregulation of ATP P2X3 receptors of trigeminal sensory neurons by calcitonin gene-related peptide [J]. J Neurosci, 2006, 26(23): 6163-6171.
- [39] 张琪,谭颖颖. 低频电针刺对慢性痛大鼠背根神经节 P2X3 受体表达的影响[J]. 陕西中医学院学报, 2011, 34:74-75.

- [40] Wang S, Dai Y, Kobayashi K, *et al.* Potentiation of the P2X3 ATP receptor by PAR - 2 in rat dorsal root ganglia neurons, through protein kinase-dependent mechanisms, contributes to inflammatory pain[J]. *Eur J Neurosci*, 2012, 36 (3): 2293 - 2301.
- [41] Mo G, Grant R, O'Donnell D, *et al.* Neuropathic Nav1.3 - mediated sensitization to P2X activation is regulated by protein kinase C[J]. *Mol Pain*, 2011, 7:14.
- [42] Engelman HS, MacDermott AB. Presynaptic ionotropic receptors and control of transmitter release[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2004, 5:135 - 145.
- [43] Chen Y, Li GW, Wang C, *et al.* Mechanisms underlying enhanced P2X receptor-mediated responses in the neuropathic pain state[J]. *Pain*, 2005, 119: 38 - 48.
- [44] Wang C, Gu Y, Li GW, *et al.* A critical role of the cAMP sensor Epac in switching protein kinase signalling in prostaglandin E2 - induced potentiation of P2X3 receptor currents in inflamed rats [J]. *J Physiol*, 2007, 584(Pt 1):191 - 203.
- [45] 刘安东,雷洁,王元银,等. 三叉神经痛和 P₂X 受体的研究进展[J]. *国际口腔医学杂志*,2010,02:174 - 177.
- [46] Migita K, Moriyam T, Koguchi M, *et al.* Modulation of P2X receptors in dorsal root ganglion neurons of streptozotocin-induced diabetic neuropathy[J]. *NeurosciLett*, 2009, 452:200 - 203.
- [47] 崔媛媛,吴黄辉,王兰,等. 糖尿病机械性痛模型大鼠 P2X3 受体的时空表达[J]. *解剖学报*,2014,04:540 - 544.
- [48] Xing J, Lu J, Li J. Purinergic P2X receptors presynaptically increase glutamatergic synaptic transmission in dorsolateral periaqueductal gray[J]. *Brain Res*, 2008, 1208:46 - 55.
- [49] Shi L, Zhang HH, Hu J, *et al.* Purinergic P2X receptors and diabetic neuropathic pain[J]. *Sheng Li XueBao*, 2012, 64(5): 531 - 542.
- [50] Xu GY, Huang LY. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase ii potentiates ATP responses by promoting trafficking of P2X receptors [J]. *ProcNatlAcadSci*, 2004, 101 (32): 11868 - 11873.

[修回日期]2015 - 04 - 03