



μ 型阿片受体参与CFA大鼠慢性炎性痛的外周调控

何晓芬, 蒋永亮, 尹小虎, 沈亚芳, 方剑乔

(浙江中医药大学第三临床医学院, 杭州 310053)

【摘要】 目的 观察大鼠慢性炎性痛时背根神经节(dorsal root ganglion, DRG) μ 型阿片受体(mu opioid receptor, MOR)表达的变化及炎症局部注射MOR激动剂和拮抗剂对痛阈的干预作用,探讨MOR在慢性炎性疼痛中的作用。方法 足底注射弗氏完全佐剂(complete freund's adjuvant, CFA)制备大鼠慢性炎性痛模型,采用免疫组化法检测DRG MOR阳性细胞的表达;经大鼠足跖背部分别注射MOR激动剂、拮抗剂,采用辐射热法检测给药前后大鼠痛阈的变化。结果 足底注射CFA诱导出大鼠慢性炎性痛,在造模后第18天,痛阈依然低于正常对照组;免疫组化结果表明,与正常对照组相比,CFA大鼠DRG MOR阳性细胞表达增多($P < 0.01$);足跖背部注射MOR激动剂减轻CFA大鼠的疼痛,对正常大鼠痛阈无影响;足跖背部注射MOR拮抗剂加重CFA大鼠的疼痛,对正常大鼠痛阈无影响。结论 DRG神经元MOR在慢性炎性痛时表达上调,参与慢性炎性痛的外周调控,可能有助于防止慢性痛的进一步加重。

【关键词】 外周; μ 型阿片受体;慢性痛;炎症;

【中图分类号】R332 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1671-7856(2015) 01-0030-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.001.005

The involvement of mu opioid receptor in peripheral regulation of chronic inflammatory pain induced by CFA in rats

HE Xiao-fen, JIANG Yong-liang, YIN Xiao-hu, SHEN Ya-fang, FANG Jian-qiao

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

【Abstract】 Objective To investigate the change of mu opioid receptor (MOR) in dorsal root ganglion (DRG) in rat chronic inflammatory pain model and the effect of MOR agonist and antagonist intraplantarly (i. pl.) injected on pain threshold, so as to determine the role of peripheral MOR in chronic inflammatory pain. **Methods** Chronic inflammatory pain model was established by i. pl. injection of CFA in rats. The expression of MOR in DRG was detected by immunohistochemistry. Pain threshold before and after i. pl. injection of MOR agonist and antagonist was measured by radiant heat method. **Results** Rats suffered from an intraplantar injection of CFA developed chronic inflammatory pain, and the pain threshold still reduced on 18 day after CFA injection compared to that in the normal group. Immunohistochemistry staining revealed that compared with the normal group, the expression of MOR in DRG of CFA rats was increased ($P < 0.01$). After the paw dorsal surface injection of MOR agonist, the pain threshold of CFA rats was increased, while that of normal rats exhibited no significant change. After the paw dorsal surface injection of MOR antagonist, the pain threshold of CFA rats was reduced, while that of normal rats had no significant change. **Conclusion**

【基金项目】国家自然科学基金资助项目(81072855, 81303039);浙江省自然科学基金资助项目(LY12H27015, Z2100979);国家中医药管理局重点学科(针灸学)建设经费资助(国中医药发[2009]30号)。

【作者简介】何晓芬(1986-),女,助理研究员。研究方向:针刺镇痛与免疫调节的相关性研究。E-mail: zjhxfl986@163.com。

【通讯作者】方剑乔(1961-),男,教授,博士生导师。研究方向:针刺镇痛与免疫调节的相关性研究。E-mail: fangjianqiao7532@163.com。

Under chronic inflammatory pain condition, DRG MOR expression is enhanced, which participates in the regulation of chronic inflammatory pain, and may contribute to the prevention of further more serious pain.

【Key words】 Periphery; Mu opioid receptor; Chronic pain; Inflammation

疼痛的慢性化是当前疼痛治疗的难点。传统的阿片类药物作为临床上最常用的镇痛药物之一^[1-2],主要通过激活中枢阿片受体发挥镇痛作用,但是除镇痛作用外,基于中枢神经系统的镇痛药物具有成瘾性、耐药性和呼吸抑制等中枢副作用^[3-4],因此,寻找能有效控制疼痛、减少毒副作用的新型镇痛药物已成为研究的热点。研究表明,阿片受体在背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)合成,转运至中枢和外周神经末梢^[5]。阿片受体是介导疼痛调节的重要受体之一,通过结合配体阿片肽发挥镇痛作用。在弗氏完全佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)诱导的急性炎性痛模型中,在造模后 2 h 和 96 h, DRG μ 阿片受体(mu opioid receptor, MOR)的 mRNA 表达水平明显增加^[6]。研究表明阿片受体参与早期炎性痛的调节^[7-8]。但目前尚不清楚慢性炎性痛时 DRG MOR 表达的变化情况,及是否也参与慢性炎性痛的调制。

本实验采用 CFA 制作大鼠慢性炎性痛模型,观察慢性炎性痛时大鼠 DRG MOR 表达的变化,观察炎症局部注射 MOR 激动剂、拮抗剂对慢性炎性痛的干预作用,探讨外周 MOR 受体是否参与慢性炎性痛的调节,为临床上阿片类药物的外周局部应用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选用清洁级雄性 Wistar 大鼠,体重为 190 ± 10 g,购自中国科学院上海实验动物中心【SCXK(沪)2008-0016】,由浙江中医药大学实验动物中心【SYXK(浙)2013-0184】饲养。

1.2 主要试剂和仪器

试剂:弗氏完全佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)由美国 Sigma 公司提供;MOR 抗体由美国 abcam 公司提供;生物素标记山羊抗兔 IgG 和辣根酶标记链霉卵白素均由北京中杉金桥生物技术有限公司提供;MOR 拮抗剂和 MOR 激动剂均由 Tocris 公司提供。

仪器:足底测量仪(意大利 UGO BASILE 公司)、DM2500 显微镜(德国徕卡)、Thermo 冰冻切片机(美国赛默飞世尔科技公司)等。

1.3 方法

1.3.1 慢性炎性痛模型的制备

除正常(normal)组大鼠外,其余各组大鼠在右后足足底内注射弗氏完全佐剂(CFA)0.1 mL/只,建立大鼠慢性炎性痛模型。正常组大鼠右后足足底内注射相同剂量生理盐水。

1.3.2 痛阈测定

采用足底测量仪检测各组大鼠患侧热缩腿阈值(paw withdrawal latency, PWLs)作为痛阈指标。具体操作如下:测量前,将大鼠置于透明塑料盒 30 min。待大鼠安静后,将聚焦的红外热源置于大鼠右后足中央,避开足垫,启动“START”按钮对足底进行热刺激,仪器自动记录大鼠缩足反应时的潜伏期和红外辐射强度。20 s 是刺激时间最上限,30 为最大热辐射强度。连续测量 3 次,每次间隔 5 min。

1.3.3 样本采集

大鼠用 10% 水合氯醛(0.35 mL/100 g)腹腔麻醉,开胸暴露心脏,经升主动脉用生理盐水 150 mL 快速灌注,再缓慢灌注 4% 多聚甲醛 150 mL,然后用 500 mL 4% 多聚甲醛溶液先快后慢滴注,快速取出大鼠 L₅ DRG,4% 多聚甲醛溶液中后固定 2 h,15%、30% 蔗糖溶液梯度脱水,液氮速冻, -80℃ 保存备用。

1.3.4 免疫组化检测 CFA 大鼠 L₅ DRG 的 MOR 阳性细胞表达

L₅ DRG 行冰冻切片(14 μ m),将切片贴于涂有多聚赖氨酸的载玻片上,PBS 洗 10 min \times 3 次;0.3% H₂O₂ 37℃ 孵育 30 min 以消除内源性过氧化物酶;5% 山羊血清 37℃ 孵育 30 min 以封闭非特异性位点;加兔抗大鼠 MOR 抗体(1:2500),4℃ 孵育过夜;生物素化山羊抗兔 IgG(1:750)中,37℃ 孵育 1 h;辣根酶标记链霉亲合素(1:400)中,37℃ 孵育 1 h;切片上滴加新鲜配置的 DAB 显色液,染色 30 s;双蒸水清洗 5 min,终止染色反应,自然风干;酒精脱水,二甲苯透明处理,中性树脂封片。每次孵育之间,切片用 PBS 清洗 10 min \times 3 次。显微镜下观察以细胞染成棕黄色,细胞轮廓清晰为阳性细胞。

1.3.5 足跖局部注射 MOR 激动剂试验

为进一步验证 DRG 上调的 MOR 是否参与慢性炎性痛的调节以及为临床局部应用阿片类药物提

供理论基础,在正常大鼠和 CFA 慢性炎性痛大鼠足跖局部注射 MOR 激动剂。实验分为模型 + 生理盐水组、模型 + MOR 激动剂组、正常 + MOR 激动剂组,模型 + MOR 激动剂组和正常 + MOR 激动剂组大鼠在造模后 D18 在大鼠足跖局部注射 4 μg MOR 激动剂,模型 + 生理盐水组大鼠足底内注射相同剂量 0.05 mL 生理盐水。检测注射生理盐水或 MOR 激动剂之前及注射后 30 min 的痛阈。

1.3.6 足跖局部注射 MOR 拮抗剂实验

为验证 DRG 上调的 MOR 是否参与慢性炎性痛的调节,我们在正常大鼠和 CFA 慢性炎性痛大鼠足跖局部注射 MOR 拮抗剂。实验分为模型 + 生理盐水组、模型 + MOR 拮抗剂组、正常 + MOR 拮抗剂组,模型 MOR 拮抗剂组和正常 + MOR 拮抗剂组大鼠在造模后第 18 天在大鼠足跖局部注射 4 μg MOR 拮抗剂,模型对照 + 生理盐水组大鼠足底内注射相同剂量 0.05 mL 生理盐水。检测注射生理盐水或 MOR 拮抗剂之前及注射后 30 min 的痛阈。

1.3.7 统计方法

统计分析采用 SPSS 16.0,实验数据以均数 \pm 标准误(mean \pm SEM)表示。两组比较采用 t 检验。实验处理前后的统计用配对 T 检验。 $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义的检验标准。

2 结果

2.1 CFA 大鼠痛阈水平

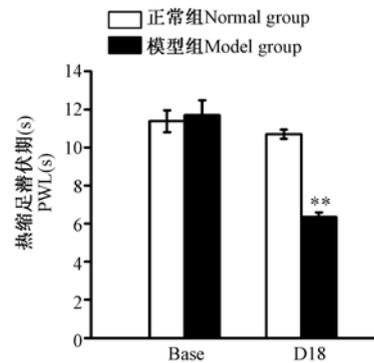
如图 1 所示,两组大鼠基础痛阈无显著差异($P > 0.05$)。CFA 足底注射后大鼠足跖出现明显红肿(彩插 4 图 2),CFA 注射后显著降低大鼠痛阈,在第 18 天,痛阈依然显著低于正常组大鼠($P < 0.01$)。

2.2 CFA 大鼠患侧 L₅ DRG MOR 阳性细胞表达水平

采用免疫组织化学法检测大鼠患侧 L₅ DRG MOR 阳性细胞表达。CFA 大鼠患侧 L₅ DRG MOR 阳性细胞表达情况(彩插 4 图 3)。如图 4 所示,与正常组比较,CFA 组大鼠患侧 L₅ DRG MOR 阳性细胞表达增多 44.79% ($P < 0.01$)

2.3 足跖背部注射 MOR 激动剂对大鼠痛阈的作用

如图 5A 示:在 CFA 造模后 18 d,足跖背部注射 MOR 激动剂之前,两组大鼠痛阈无显著差异($P > 0.05$);足跖背部注射 MOR 激动剂之后,与模型 +

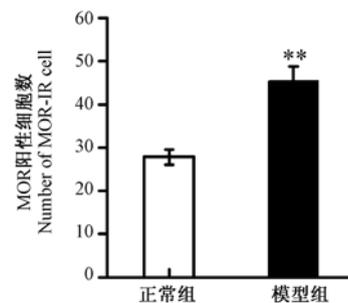


注:与正常组比较,** $P < 0.01$ 。

图 1 CFA 大鼠患侧 PWL 水平

Note: Compared with normal group, ** $P < 0.01$.

Fig. 1 Ipsilateral paw PWL level of CFA model rats



注:与正常组比较,** $P < 0.01$ 。

图 4 CFA 模型大鼠患侧 L₅ DRG MOR 阳性细胞表达水平

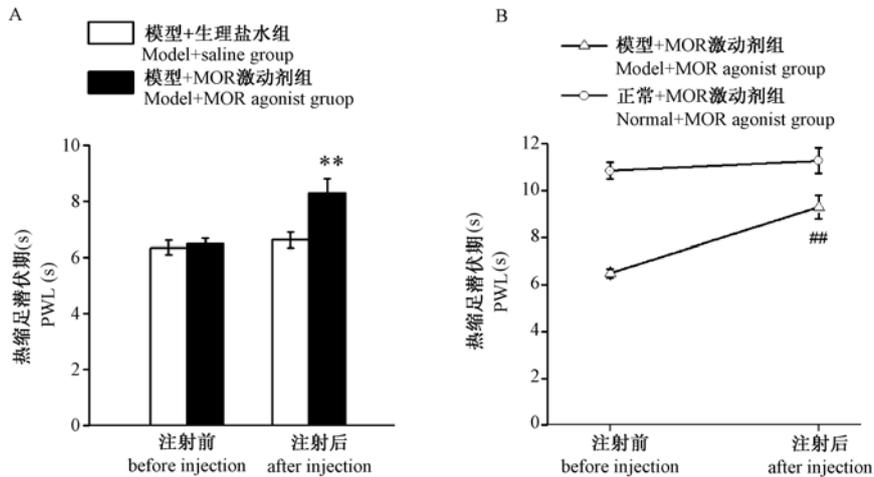
Note: Compared with normal group, ** $P < 0.01$.

Fig. 4 Ipsilateral L₅ DRG MOR expression of CFA model rats

生理盐水组比较,模型 + MOR 激动剂组大鼠痛阈显著提高 27.95% ($P < 0.01$)。如图 5B 示:在 CFA 造模后 18 d,CFA 模型大鼠足跖背部注射 MOR 激动剂能显著提高 CFA 模型大鼠的痛阈($P < 0.01$),正常大鼠足跖背部注射 MOR 激动剂则对正常大鼠痛阈无显著影响($P > 0.05$)。

2.4 足跖背部注射 MOR 拮抗剂对大鼠痛阈的作用

如图 6A 示:在 CFA 造模后 18 d,足跖背部注射 MOR 拮抗剂之前,两组大鼠痛阈无显著差异($P > 0.05$);足跖背部注射 MOR 拮抗剂之后,与模型 + 生理盐水组相比,模型 + MOR 拮抗剂组大鼠痛阈显著降低 29.21% ($P < 0.01$)。如图 6B:在 CFA 造模后 18 d,CFA 模型大鼠足跖背部注射 MOR 拮抗剂能显著降低 CFA 模型大鼠的痛阈($P < 0.01$),正常大鼠足跖背部注射 MOR 拮抗剂则对正常大鼠痛阈无明显影响($P > 0.05$)。



注: A:与模型 + 生理盐水组比较, ** $P < 0.01$;

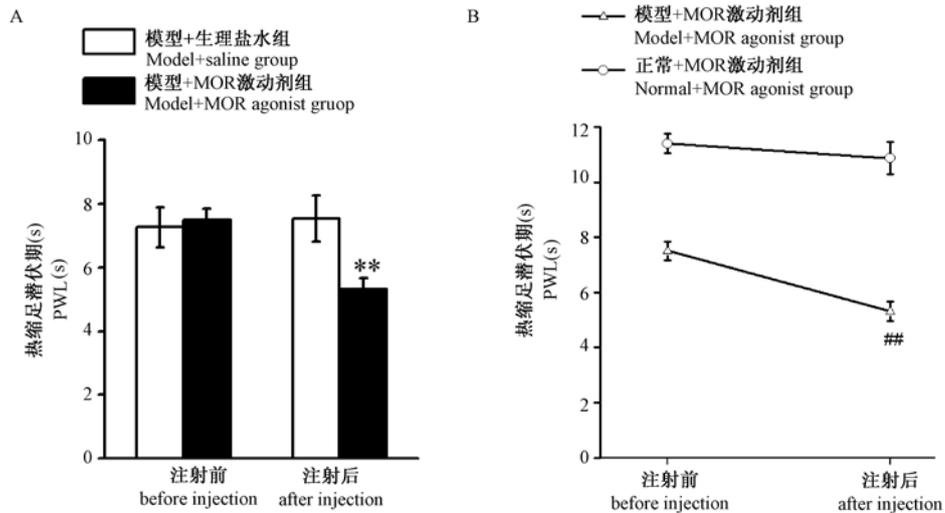
B:注射 MOR 激动剂之后与注射 MOR 激动剂之前比较, ## $P < 0.01$ 。

图 5 足跖背部注射 MOR 激动剂对大鼠痛阈的作用

Note: A. Compared with model + saline group, ** $P < 0.01$;

B. Compared with before injection of MOR agonist, ## $P < 0.01$.

Fig. 5 The effect of paw dorsal surface injection of MOR agonist on PWL



注: A:与模型 + 生理盐水组比较, ** $P < 0.01$;

B:注射 MOR 拮抗剂之后与注射 MOR 拮抗剂之前比较, ## $P < 0.01$ 。

图 6 足跖背部注射 MOR 拮抗剂对大鼠痛阈的作用

Note: A. Compared with CFA + saline group, ** $P < 0.01$;

B. Compared with before injection of MOR antagonist, ## $P < 0.01$.

Fig. 6 The effect of paw dorsal surface injection of MOR antagonist on PWL

3 讨论

CFA 模型是炎性痛的经典模型,在造模后 1 d 即可出现足跖局部的红、肿、热痛觉过敏等类似临床炎性痛的症状和体征^[9]。本研究中足底注射 CFA 18 d 后,模型大鼠热痛觉过敏依然存在;应用免疫组化方法发现造模 18 d 后模型大鼠患侧

L₅DRG 的 MOR 阳性细胞数明显高于正常对照组。阿片受体作为疼痛调节的重要受体之一,主要分布在较细的 DRG 神经元、C 纤维和 A δ 纤维^[10-11],与疼痛信号的产生、传递和调节密切相关,在炎性痛调制中起着重要作用。已有研究表明炎症时 DRG MOR 的表达增强^[13-15],通过轴突转运,阿片受体可从 DRG 转运至神经元末梢^[16-17]。这些表明,慢性

炎症本身可引起 DRG 神经元 MOR 的上调,这些神经可塑性变化是否对慢性炎性痛发挥着负反馈调节作用有待明确。

通过本研究证实,在炎症局部注射 MOR 激动剂可产生镇痛作用,注射 MOR 拮抗剂则使疼痛加剧,而在正常大鼠足跖局部注射 MOR 激动剂或拮抗剂对大鼠痛阈无明显影响。结果提示慢性炎症本身引起的 DRG 神经元 MOR 上调,可能有助于防止疼痛进一步加重,对炎性痛起着负反馈的调制作用。其可能机制是炎症上调 DRG MOR 表达,并促进阿片受体轴突转运至初级传入神经元末梢,使得内源性阿片类物质更易与初级传入神经元上的阿片受体接近,激活与阿片受体耦联的 Gi/Go 蛋白,抑制腺苷酸环化酶活性,使 cAMP 减少,或者通过抑制钙通道,从而使得 Ca^{2+} 内流减少, K^+ 外流增加,使得传导痛觉信息的神经元兴奋性降低,从而抑制疼痛传递^[18];或者进一步抑制感觉神经末梢释放 P 物质、降钙素基因相关肽和其它传递伤害性信息的神经递质,从而抑制疼痛进一步加重^[19]。

综上所述,慢性炎性痛时,DRG 神经元 MOR 表达上调,可能参与慢性炎性痛的负反馈调制。DRG 神经元中阿片受体的上调,为局部应用阿片激动剂产生镇痛作用提供基础。我们的研究结果将为临床上阿片类药物的外周局部用药以提示,更为重要的是阿片类药物的外周镇痛作用的发现使开发不透过血脑屏障、避免中枢副作用的镇痛作用成为可能。

参考文献:

- [1] White PF, Kehlet H. Improving postoperative pain management: what are the unresolved issues[J]? *Anesthesiology*, 2010, 112(1): 220-225.
- [2] Jensen MK, Thomsen AB, Hojsted J. 10-year follow-up of chronic non-malignant pain patients: Opioid use, health related quality of life and health care utilization[J]. *Eur J Pain*, 2005, 10(5): 423-433.
- [3] Marinangeli F, Ciccozzi A, Leonardi M, *et al.* Use of strong opioids in advanced cancer pain: a randomized trial[J]. *J Pain Symptom Manage*, 2004, 27(5): 409-416.
- [4] De Leon-Casasola OA. Current developments in opioid therapy for management of cancer pain[J]. *Clin J Pain*, 2008, 24: 3-7.
- [5] Coggeshall RE, Zhou S, Carlton SM. Opioid receptors on peripheral sensory axons[J]. *Brain Res*, 1997, 764(1-2): 126-132.
- [6] Puehler W, Rittner HL, Mousa SA, *et al.* Interleukin-1 beta contributes to the upregulation of kappa opioid receptor mRNA in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation[J]. *Neuroscience*, 2006, 141(2): 989-998.
- [7] Tanaka N, Sakahashi H, Sato E, *et al.* The efficacy of intra-articular analgesia after total knee arthroplasty in patients with rheumatoid arthritis and in patients with osteoarthritis[J]. *J Arthroplasty*, 2001, 16(3): 306-311.
- [8] Stein C, Hassan AH, Lehrberger K, *et al.* Local analgesic effect of endogenous opioid peptides[J]. *Lancet*, 1993, 342(8867): 321-324.
- [9] Yu L, Yang F, Luo H, *et al.* The role of TRPV1 in different subtypes of dorsal root ganglion neurons in rat chronic inflammatory nociception induced by complete Freund's adjuvant[J]. *Mol Pain*, 2008, 4: 61.
- [10] Coggeshall RE, Zhou S, Carlton SM. Opioid receptors on peripheral sensory axons[J]. *Brain Res*, 1997, 764(1-2): 126-132.
- [11] Zhang JQ, Nagata K, Iijima T. Scanning electron microscopy and immunohistochemical observations of the vascular nerve plexuses in the dental pulp of rat incisor[J]. *Anat Rec*, 1998, 251(2): 214-220.
- [12] Ji RR, Zhang Q, Law PY, *et al.* Expression of mu-, delta-, and kappa-opioid receptor-like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan-induced inflammation[J]. *J Neurosci*, 1995, 15(12): 8156-8166.
- [13] Schäfer M, Imai Y, Uhl GR, *et al.* Inflammation enhances peripheral mu-opioid receptor-mediated analgesia, but not mu-opioid receptor transcription in dorsal root ganglia[J]. *Eur J Pharmacol*, 1995, 279(2-3): 165-169.
- [14] Puehler W, Zöllner C, Brack A, *et al.* Rapid upregulation of mu opioid receptor mRNA in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation depends on neuronal conduction[J]. *Neuroscience*, 2004, 129(2): 473-479.
- [15] Puehler W, Rittner HL, Mousa SA, *et al.* Interleukin-1 beta contributes to the upregulation of kappa opioid receptor mRNA in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation[J]. *Neuroscience*, 2006, 141(2): 989-998.
- [16] Mousa SA, Cheppudira BP, Shaqura M, *et al.* Nerve growth factor governs the enhanced ability of opioids to suppress inflammatory pain[J]. *Brain*, 2007, 130(Pt 2): 502-513.
- [17] Hassan AH, Ableitner A, Stein C, *et al.* Inflammation of the rat paw enhances axonal transport of opioid receptors in the sciatic nerve and increases their density in the inflamed tissue[J]. *Neuroscience*, 1993, 55(1): 185-195.
- [18] Largent-Milnes TM, Guo W, Wang HY, *et al.* Oxycodone plus ultra-low-dose naltrexone attenuates neuropathic pain and associated mu-opioid receptor-Gs coupling[J]. *J Pain*, 2008, 9(8): 700-713.
- [19] Khasabova IA, Harding-Rose C, Simone DA, *et al.* Differential effects of CB1 and opioid agonists on two populations of adult rat dorsal root ganglion neurons[J]. *J Neurosci*, 2004, 24(7): 1744-1753.

[修回日期] 2014-11-21