

研究论文

MrgC受体激活翻转慢性应用吗啡诱发的谷氨酸转运体和nNOS改变

黄浩, 李琦, 洪炎国, 王冬梅*

福建师范大学生命科学学院, 福建省发育和神经生物学重点实验室, 福州 350108

摘要: 本研究旨在探讨激活MrgC受体(*Mas*-related gene C receptors)调制吗啡耐受的细胞学机制。对大鼠连续6天鞘内注射10 μ L生理盐水、吗啡(20 μ g)、吗啡+牛肾上腺髓质8-22 (bovine adrenal medulla 8-22, BAM8-22, 1 nmol, 隔天注射) 或(Tyr⁶)-2-MSH-6-12 (MSH, 5 nmol, 隔天注射); 用Western blot、免疫组织化学和实时荧光定量PCR的方法检测脊髓和背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)中与吗啡耐受相关分子的表达。结果显示: 鞘内给予选择性MrgC受体激动剂BAM8-22或MSH, 能抑制慢性应用吗啡所诱发的脊髓背角和/或DRG中谷氨酸转运体(GLAST、GLT-1、EAAC1)的减少和神经元型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)的增加。此外, 检测到MrgC受体样免疫活性表达于脊髓背角浅层; 慢性应用吗啡使脊髓背角MrgC受体样免疫活性和DRG中MrgC受体 mRNA水平都增加。这些结果提示, MrgC受体通过抑制慢性应用吗啡所诱发的脊髓和DRG中的痛介质增加, 而抑制吗啡耐受。

关键词: MrgC受体; 吗啡耐受; 谷氨酸转运体; 神经元型一氧化氮合酶

中图分类号: Q426

MrgC receptor activation reverses chronic morphine-evoked alterations of glutamate transporters and nNOS in rats

HUANG Hao, LI Qi, HONG Yan-Guo, WANG Dong-Mei*

Provincial Key Laboratory of Developmental and Neurological Biology, College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China

Abstract: This study was aimed to investigate the mechanisms underlying the modulation effect of *Mas*-related gene (Mrg) C receptors (MrgC) on morphine tolerance. Saline, morphine (20 μ g), morphine plus bovine adrenal medulla 8-22 (BAM8-22, 1 nmol) or (Tyr⁶)-2-MSH-6-12 (MSH, 5 nmol) were administered intrathecally in rats for 6 days. Pain-related molecules in the spinal cord and dorsal root ganglion (DRG) were examined using Western blot, immunocytochemistry and RT-PCR techniques. The results showed that intrathecal administration of the selective MrgC receptor agonists (BAM8-22 or MSH) remarkably attenuated or abolished chronic morphine-evoked reduction in glutamate transporters (GLAST, GLT-1 and EAAC1) in the spinal cord and increase in neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in the spinal cord as well as DRG. In addition, MrgC receptor-like immunoreactivity (IR) was detected in superficial laminae of the spinal cord. Chronic morphine induced significant increases in MrgC receptor-IR in the spinal cord and MrgC receptor mRNA levels in DRG. These results suggest that the modulation of pro-nociceptive mediators in the spinal cord and DRG underlies the inhibition of morphine tolerance by MrgC receptor activation.

Key words: *Mas*-related gene (Mrg) C receptors; morphine tolerance; glutamate transporter; neuronal nitric oxide synthase

临床上治疗疼痛、特别是创伤和癌症痛一类的阿片类镇痛药^[1]。但是, 重复应用吗啡会产生耐受而失效, 因而疼痛的治疗成为临床难题。

Received 2013-12-04 Accepted 2014-02-01

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31171072, 2014J05039).

*Corresponding author. Tel: +86-591-22868211; E-mail: dmwang@fjnu.edu.cn

MrgC 受体 (*Mas*-related gene C receptors) 是近年新发现的一种 G 蛋白耦联受体家族中的一员^[2], 该受体分布于背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 和三叉神经节与感觉相关的神经元中^[3], 其生理功能活动基本上不清楚。目前, 对 MrgC 受体功能的研究大都借助于 MrgC 受体的激动剂 (Tyr⁶)-2-MSH-6-12 (MSH) 和牛肾上腺髓质 8-22 (bovine adrenal medulla 8-22, BAM8-22) 进行。MSH 和 BAM8-22 的化学结构完全不一样, 但都对 MrgC 受体有高度选择的亲和性^[3]。我们前期的研究显示, 间断激活 MrgC 受体, 能够抑制吗啡耐受的产生, 但持续激活 MrgC 受体则无效^[4,5]。由于 MrgC 受体具有高度特异性分布的特点, 这就使得以其为靶点抑制吗啡耐受, 会没有副作用或副作用很小。因此, 研究 MrgC 受体抑制吗啡耐受的作用机理不但有助于弄清 MrgC 受体的生理作用, 也有临床意义。

脊髓谷氨酸的增多在吗啡耐受产生中起重要作用^[6,7]。正常情况下, 细胞外液的谷氨酸由谷氨酸转运体 (glutamate transporter) 转运清除, 而保持在低水平。已经证实, 重复使用吗啡会导致脊髓背角浅层谷氨酸转运体 [谷氨酸转运体 1 (glutamate transporter 1, GLT-1)、谷氨酸 / 天冬氨酸转运体 (glutamate/aspartate transporter, GLAST) 和兴奋性氨基酸载体 1 (excitatory amino acid carrier 1, EAAC1)] 表达减少^[8]; 应用谷氨酸转运体抑制剂能促进吗啡耐受的形成, 而应用其激动剂则抑制吗啡耐受^[8,9], 这都说明谷氨酸转运体的减少参与吗啡耐受的产生。另外, 炎性介质神经元型一氧化氮合酶 (neuronal nitric oxide synthase, nNOS) 上调也是吗啡耐受产生的重要细胞学机制^[10]。因此, 本研究检测间断激活 MrgC 受体对慢性应用吗啡诱发谷氨酸转运体和 nNOS 改变的作用, 以探讨 MrgC 受体抑制吗啡耐受产生的神经生物学机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 雄性 Sprague-Dawley 大鼠, 体重 250~300 g, 由福建医科大学动物实验中心提供。动物实验符合国家《实验动物管理条例》, 并经福建师范大学实验动物伦理委员会批准。

1.1.2 仪器、药物与试剂 主要仪器: 水浴锅, 凝胶成像分析仪 (GENEGENIUS 型, 英国 SYNGENE 公司), 垂直板电泳转移装置电泳仪 (525BR078973

型, 美国伯乐公司), 酶标仪 (美国 BioTeK, Synergy HT), HM550 型冷冻切片机 (Microm 美康, 德国), Olympus BX51 型显微镜 (日本), 荧光定量 PCR 仪 (7300, 美国 ABI)。

药物: 盐酸吗啡溶液购自沈阳第一制药厂, MSH 和 BAM8-22 由上海华大天源公司合成。盐酸吗啡溶液用无菌生理盐水稀释。MSH 和 BAM8-22 用无菌生理盐水溶解, 小剂量分装后储于 -20 °C, 用前取出融化。

主要试剂: GLAST、GLT-1、EAAC1、nNOS 和 β -actin 抗体均购自 Santa Cruz 公司, MrgC 抗体购自 Phoenix Biotech 公司, HRP 标记的二抗、浓缩型 DAB 试剂盒购自北京中山生物技术有限公司, BCA 蛋白定量试剂盒购自碧云天生物技术有限公司, ABC 试剂盒购自美国 Vector 公司, 动物组织总 RNA 提取试剂盒、Quant cDNA 第一链合成试剂盒和 RealMaster Mix (SYBR Green) 均购自北京天根生化科技有限公司, 引物由 Invitrogen 公司合成 (β -actin: 正向引物: 5'-CAC CCG CGA GTA CAA-CCT TC-3'; 反向引物: 5'-CCC ATA CCC ACC ATC-ACA CC-3'; MrgC 受体: 正向引物: 5'-ATG TAG-CAT TCC CTAT-3'; 反向引物: 5'-GGA CAG AAC-CCA GAT TAGA-3')。

1.2 方法

1.2.1 鞘内置管 根据国际通用手术方法进行鞘内置管^[2]。对大鼠给予戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 腹腔注射。剃除头颈部鼠毛, 酒精消毒, 切开头颈部皮肤, 分离肌肉, 暴露枕骨大孔, 轻轻挑破寰枕膜, 将 14 cm 长的 PE-10 细管向尾侧缓缓插入脊髓蛛网膜下腔, 进管约 7.5 cm。缝合伤口处的肌肉和皮肤, 并将 PE-10 管固定于浅层肌肉上。术后选择活动正常的大鼠进行后续实验。用微量进液器将药物通过 PE-10 管打入大鼠椎管。

1.2.2 实验分组 本实验旨在研究 MrgC 受体的功能作用。为了确认 MrgC 受体激活的特异性, 我们选用两种化学结构不同、但都对 MrgC 受体有高度选择性亲和力的激动剂 MSH 和 BAM8-22, 研究其对不同痛介质的作用。

将大鼠随机分为 3 组。第一组为生理盐水 (saline) 组, 每天鞘内注射生理盐水 10 μ L, 连续注射 6 天; 第二组为吗啡耐受组, 每天鞘内注射吗啡 20 μ g/10 μ L, 连续注射 6 天; 第三组为药物组 (即吗啡 + MSH 或 BAM8-22), 鞘椎管内注射 20 μ g 吗啡, 连

续6天,在第1、3、5天鞘内加注射MSH(5 nmol)或BAM8-22(1 nmol),即第1、3、5天注射20 μ g吗啡+5 nmol MSH或1 nmol BAM8-22/10 μ L,第2、4、6天注射20 μ g/10 μ L吗啡。共用动物74只,其中行为学实验共20只,每组6~7只,Western blot实验每组4只,共28只;免疫组织化学实验每组4只,共14只;实时荧光定量PCR实验每组6只,共12只。前期实验显示,鞘内注射BAM8-22^[4,5]和MSH^[20]本身不改变疼痛感受,故本研究不再设单独给予BAM8-22和MSH对照组。

无论是盐水组、吗啡组,还是药物组(即吗啡+MSH或BAM8-22),鞘内注射液体总容量均为10 μ L。然后再注入生理盐水10 μ L,以确保之前给的药物或生理盐水全部进入到脊髓鞘内。BAM8-22和MSH的剂量参照过去的研究结果^[4,5]。

1.2.3 行为学(甩尾反射时)实验 将大鼠放入行为测定特制容器中,每天适应至少1 h,重复4天,使大鼠完全适应容器环境。第5天测定大鼠的甩尾潜伏期。托住装有大鼠的容器,把大鼠尾部末端1/4放入恒温的热水中(热水温度保持在52 $^{\circ}$ C)。待大鼠尾巴甩动,记录从大鼠尾部入水到甩尾的时间,此时间为甩尾潜伏期。动物尾部在热水中停留最长时间为10 s(cut-off值),以免对尾部造成损伤。按上述方法连续测定3次,每次间隔2 min。每次给予吗啡注射前及注射后30 min分别测定甩尾潜伏期。将每次所测得的给药前潜伏期(基础值)和给药后潜伏期代入公式:最大镇痛效应百分比(the percentage of maximum possible effect, %MPE) = (给药后甩尾潜伏期 - 基础值)/(cut-off值 - 基础值) $\times$ 100%^[4,5]。

1.2.4 Western blot 法 断头取出大鼠脊髓(腰膨大)背角部分。将组织放入液氮中研磨致碎,加入裂解液提取蛋白。用BCA法对总蛋白进行定量。将蛋白95 $^{\circ}$ C水浴锅加热变性10 min,进行SDS-PAGE电泳2 h。将蛋白转移到NC膜上。封闭2 h,加一抗(GLAST、GLT-1、EAAC1浓度为1:400, nNOS抗体浓度为1:300, β -actin浓度为1:2 000),4 $^{\circ}$ C孵育过夜。TBST漂洗3次,加入二抗(1:2 000)室温振荡孵育2 h, TBST漂洗3次。显影、定影。用凝胶成像系统进行图像拍照,分析条带的光密度。

1.2.5 免疫组织化学反应(ABC法) 对大鼠进行麻醉后开胸,暴露心脏,经左心室插管。由该管注

入含4%多聚甲醛的磷酸盐缓冲液。灌流后取出脊髓腰膨大节段及L3、L4、L5双侧或DRG,放入4%多聚甲醛中固定4 h,换到30%蔗糖溶液中,置4 $^{\circ}$ C冰箱2~3天至组织下沉。用冰冻切片机对组织切片。免疫组化实验按以下步骤进行:(1) PBS冲洗3次,加入0.3%过氧化氢孵育45 min;(2) 蒸馏水冲洗, PBS浸泡10 min,滴加5%正常羊血清和5%牛血清,孵育4 h;(3) 孵育一抗:nNOS抗体(1:150)或MrgC抗体(1:100),4 $^{\circ}$ C冰箱过夜;(4) PBS冲洗3次,滴加生物素标记羊抗兔IgG(1:200),室温放置2 h;(5) PBS冲洗3次,加ABC试剂室温孵育2 h;(6) PBS冲洗3次,加DAB呈色5 min后,用PBS终止其反应。脱水,透明,封片,镜检。

1.2.6 实时荧光定量PCR(SYBR Green法) 将大鼠L4~L6 DRG取出。用动物组织总RNA提取试剂盒提取总RNA。将提取的RNA样品、随机引物、Rtmix(含Rnasin和DTT)、dNTP混合液、DEPC水按照逆转录体系比例配制反应体系。将模板RNA(50 ng~2 μ g)加入到混合液中,置于37 $^{\circ}$ C水浴中孵育120 min,合成cDNA。将125 μ L 20 $\times$ SYBR溶液加入1 mL 2.5 $\times$ RealMasterMix中混匀。配制反应体系。荧光定量PCR热循环扩增反应步骤:94 $^{\circ}$ C, 10 min $\rightarrow$ 95 $^{\circ}$ C, 15 s $\rightarrow$ 55 $^{\circ}$ C, 30 s $\rightarrow$ 68 $^{\circ}$ C, 35 s。

1.2.7 统计方法 对DRG细胞大小分型:面积小于600 μ m²的为小型细胞,在600 μ m²和1 200 μ m²之间的为中型细胞,大于1 200 μ m²的为大型细胞^[11]。所有报告的数据均以每组的mean $\pm$ SEM表示,使用Sigmastat软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA),进一步用Tukey方法检验两两之间的差异,以 $P < 0.05$ 为数据具有显著性差异。采用Sigmaplot等软件绘制图表。

2 结果

2.1 鞘内注射BAM8-22抑制吗啡耐受的形成

鞘内每天注射生理盐水,连续6天,最大镇痛效应百分比(%MPE)没有差异。每天向鞘内注射吗啡(20 μ g),在给药第1天吗啡的%MPE为(93.9 $\pm$ 1.9)%。以后,吗啡的%MPE值逐渐减小,到第6天%MPE为(12.7 $\pm$ 0.7)% ,与生理盐水组相比没有明显差异($P > 0.05$),表明已产生吗啡耐受。每天鞘内注射吗啡并在第1, 3, 5天隔天联合应用BAM8-22(1 nmol),第4~6天%MPE值分别为(78.4 $\pm$ 2.1)%、(73.8 $\pm$ 2.3)%和(73.7 $\pm$ 2.2)% ,与

吗啡耐受组相比有显著性差异 (分别为 $P < 0.01$, $P < 0.001$ 和 $P < 0.001$) (图 1)。

2.2 鞘内注射 MSH 对吗啡耐受脊髓背角谷氨酸转运体降低的影响

与生理盐水组相比, 连续鞘内注射吗啡 (20 μg) 6 天后, 脊髓背角三种谷氨酸转运体的表达都下降。GLAST、GLT-1 和 EAAC1 蛋白表达分别降为生理盐水组的 $(45.5 \pm 5.9)\%$ 、 $(59.9 \pm 6.6)\%$ 和 $(66.4 \pm 3.0)\%$ 。与生理盐水组相比, 都有显著性差异 (分别为 $P <$

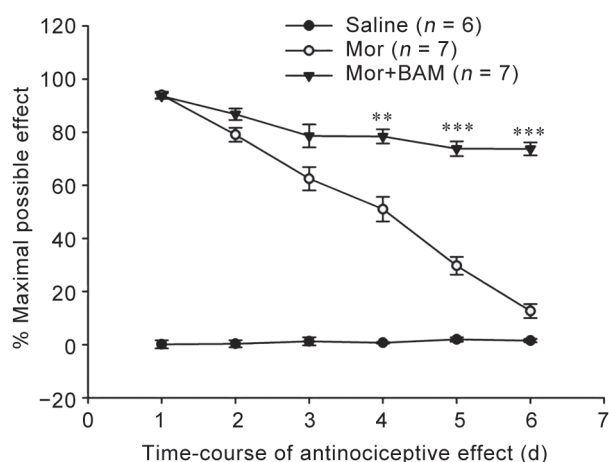


图 1. 鞘内注射 BAM8-22 对吗啡耐受的作用

Fig. 1. Effect of intrathecal (i.t.) administration of BAM8-22 on the development of morphine tolerance. Saline, morphine (20 μg) or morphine + BAM8-22 (1 nmol, given on days 1, 3 and 5) were administered once per day for 6 days. Tail-flick latency was measured, and was converted to the percentage of maximum possible effect (%MPE). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with morphine alone group.

0.001, $P < 0.05$, $P < 0.001$). 但是, 每天注射吗啡加隔天联合注射 MSH (5 nmol) 后, 谷氨酸转运体的表达都明显回升。GLAST、GLT-1 和 EAAC1 蛋白表达分别是生理盐水组的 $(93.4 \pm 12.6)\%$ 、 $(90.0 \pm 1.6)\%$ 和 $(92.8 \pm 1.4)\%$ 。这些数值与吗啡耐受组比较, 有显著性差异 (分别为 $P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.001$), 而与生理盐水组相比没有统计学差异 ($P > 0.05$) (图 2)。

2.3 鞘内注射 BAM8-22 对吗啡耐受诱发脊髓背角和 DRG 中 nNOS 增加的影响

重复鞘内注射吗啡 (20 μg) 6 天后, 脊髓背角 nNOS 的蛋白表达增加到生理盐水组的 $(119.9 \pm 1.0)\%$, 与生理盐水组比有显著性差异 ($P < 0.01$)。每天注射吗啡加隔天联合注射 BAM8-22 (1 nmol), nNOS 的蛋白表达变为生理盐水组的 $(98.8 \pm 1.6)\%$, 与吗啡耐受组比有显著性差异 ($P < 0.001$)。而每天注射生理盐水加隔天联合注射 BAM8-22 (1 nmol), nNOS 的蛋白表达约为生理盐水组的 $(101.3 \pm 0.7)\%$, 与生理盐水组相似 ($P > 0.05$) (图 3A)。连续鞘内注射吗啡 6 天后, DRG 中 nNOS 的蛋白表达增加到生理盐水组的 $(132.3 \pm 1.8)\%$, 与生理盐水组比有显著性差异 ($P < 0.001$)。每天注射吗啡并隔天联合注射 BAM8-22 后, nNOS 的蛋白表达变为生理盐水组的 $(104.6 \pm 5.1)\%$, 与吗啡耐受组比有显著性差异 ($P < 0.001$)。每天注射生理盐水加隔天联合注射 BAM8-22, nNOS 的蛋白表达约为生理盐水组的 $(98.2 \pm 6.0)\%$, 与生理盐水组相似 ($P > 0.05$) (图 3B)。

免疫组织化学染色显示, 生理盐水组 DRG 中小型和中型 nNOS 阳性神经元的比例分别为 $(50.1 \pm$

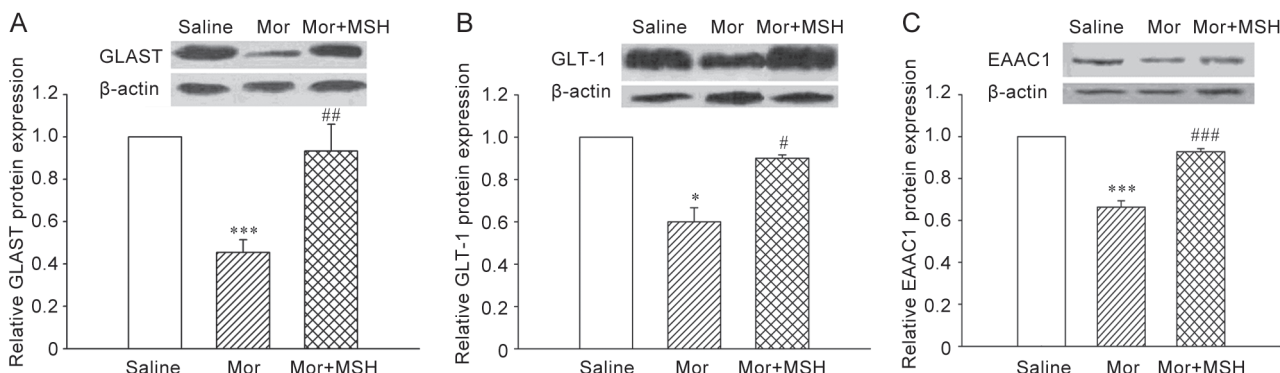


图 2. 鞘内间断给予 MSH 对慢性吗啡诱发脊髓背角 GLAST、GLT-1 和 EAAC1 减少的作用

Fig. 2. Effects of intermittent i.t. MSH on chronic morphine-evoked decreases in GLAST (A), GLT-1 (B) and EAAC1 (C) proteins in the spinal dorsal horn. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ compared with saline group. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ compared with morphine group. $n = 4$.

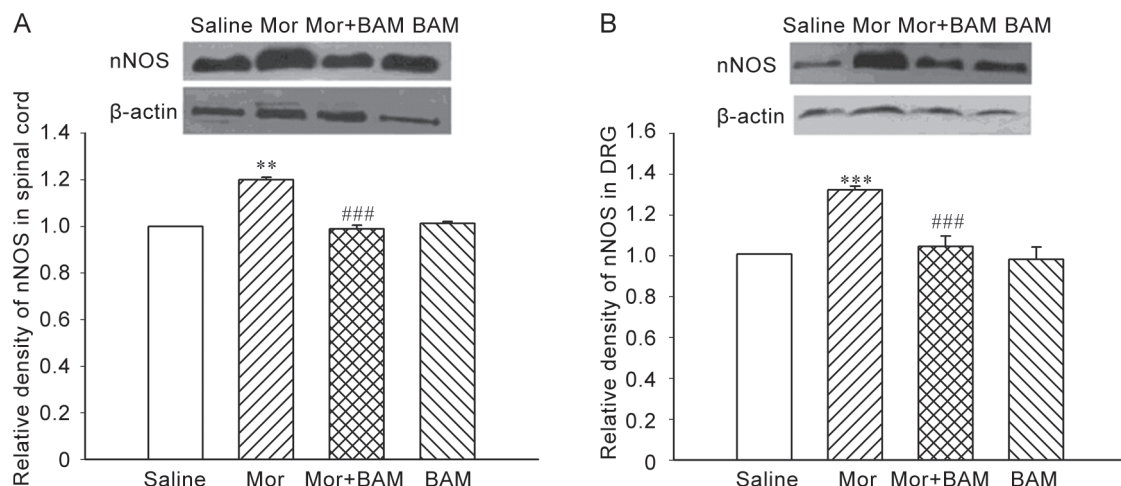


图 3. 鞘内间断给予BAM8-22对慢性吗啡诱发脊髓背角和DRG中nNOS蛋白表达增加的作用

Fig. 3. Effects of intermittent i.t. BAM8-22 on chronic morphine-evoked increase in nNOS protein in the spinal dorsal horn (A) and DRG (B). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with saline group. ### $P < 0.001$ compared with morphine group. $n = 4$.

1.3)% 和 $(17.1 \pm 0.9)\%$, 连续鞘内注射吗啡 6 天后, 比例分别增加为 $(70.7 \pm 1.5)\%$ 和 $(34.5 \pm 1.8)\%$, 与生理盐水组比有显著性差异 ($P < 0.001$)。每天注射吗啡加隔天联合注射 BAM8-22, 小型和中型 nNOS 阳性神经元的比例分别恢复为 $(52.8 \pm 3.3)\%$ 、 $(25.4 \pm 1.8)\%$, 与吗啡耐受组比较有显著性差异 ($P < 0.01$) (图 4)。

2.4 鞘内慢性注射吗啡对脊髓和 DRG 中 MrgC 受体表达的影响

免疫组织化学检查显示, 正常大鼠和吗啡耐受组大鼠脊髓背角浅层 (I~II 层) 有 MrgC 受体样免疫活性表达 (图 5A、B)。对 DRG 中 MrgC 受体的 mRNA 实时荧光定量 PCR 检测表明, 慢性应用吗啡后, DRG 中 MrgC 受体的 mRNA 为生理盐水组的 $(164.1 \pm 15.0)\%$, 具有显著性差异 ($P < 0.05$, 图 5C)。

3 讨论

本实验结果显示, 连续使用吗啡 6 天后, 脊髓背角谷氨酸转运体 GLAST、GLT-1、EAAC1 的表达降低, 脊髓背角和 DRG 中的 nNOS 表达增高。间隔鞘内注射 MSH 使三种谷氨酸转运体的下调抑制, 鞘内注射 BAM8-22 使脊髓背角和 DRG 中 nNOS 的上调受到抑制。慢性应用吗啡促使 DRG 中 MrgC 受体的合成和脊髓背角 MrgC 受体的表达增加。这些结果提示, 激活 MrgC 受体是通过遏制慢性应用吗啡诱发的谷氨酸转运体减少和 nNOS 增加, 抑制吗啡耐受。

MrgC 受体的分布很独特, 这类受体只分布于 DRG 中管理痛觉的小神经元^[2,3]。因此研究其生理功能有助于阐明痛觉机制。至今, 尚无 MrgC 受体的拮抗剂。为使 MrgC 受体受到特异性的激活, 本研究选用两种化学结构完全不一样的 MrgC 受体高选择性激动剂 MSH 和 BAM8-22 做隔日鞘内注射。结果显示, 连续 6 天应用吗啡后, 吗啡的镇痛效应基本消失。每日给予吗啡合并隔日加用 BAM8-22, 至第 6 日, 吗啡仍然能保持较高的镇痛效力, 表明吗啡耐受被抑制。这与过去所观察的结果一致^[4,5]。

谷氨酸从神经元释放后, 其在细胞间隙水平的保持依赖于谷氨酸转运体的及时清除。否则会在局部积聚, 引起细胞兴奋性升高。脊髓背角谷氨酸水平增多则使该处痛感受神经元兴奋性增高。脊髓谷氨酸转运体主要是来自星形胶质细胞的 GLT-1、GLAST 和来自神经元的 EAAC1^[13]。本结果显示, 连续使用吗啡 6 天后, 脊髓背角三种谷氨酸转运体 (GLAST、GLT-1、EAAC1) 的表达都降低, 这与文献结果一致^[8]。重要的是, 应用 MrgC 受体选择性激动剂 MSH 后, 慢性应用吗啡不再能降低脊髓背角 GLT-1、GLAST 和 EAAC1 的水平。由于谷氨酸转运体下降导致谷氨酸水平增高^[14], 而后者对抗吗啡的镇痛作用^[15], 恢复谷氨酸转运体水平则会降低细胞外液谷氨酸的浓度。本结果提示, 激活 MrgC 受体可能通过抑制吗啡引起的脊髓背角谷氨酸转运体的下调, 而抑制吗啡耐受。MrgC 受体对于谷氨酸转运体的调制机制, 目前并不清楚, 但这恰恰又

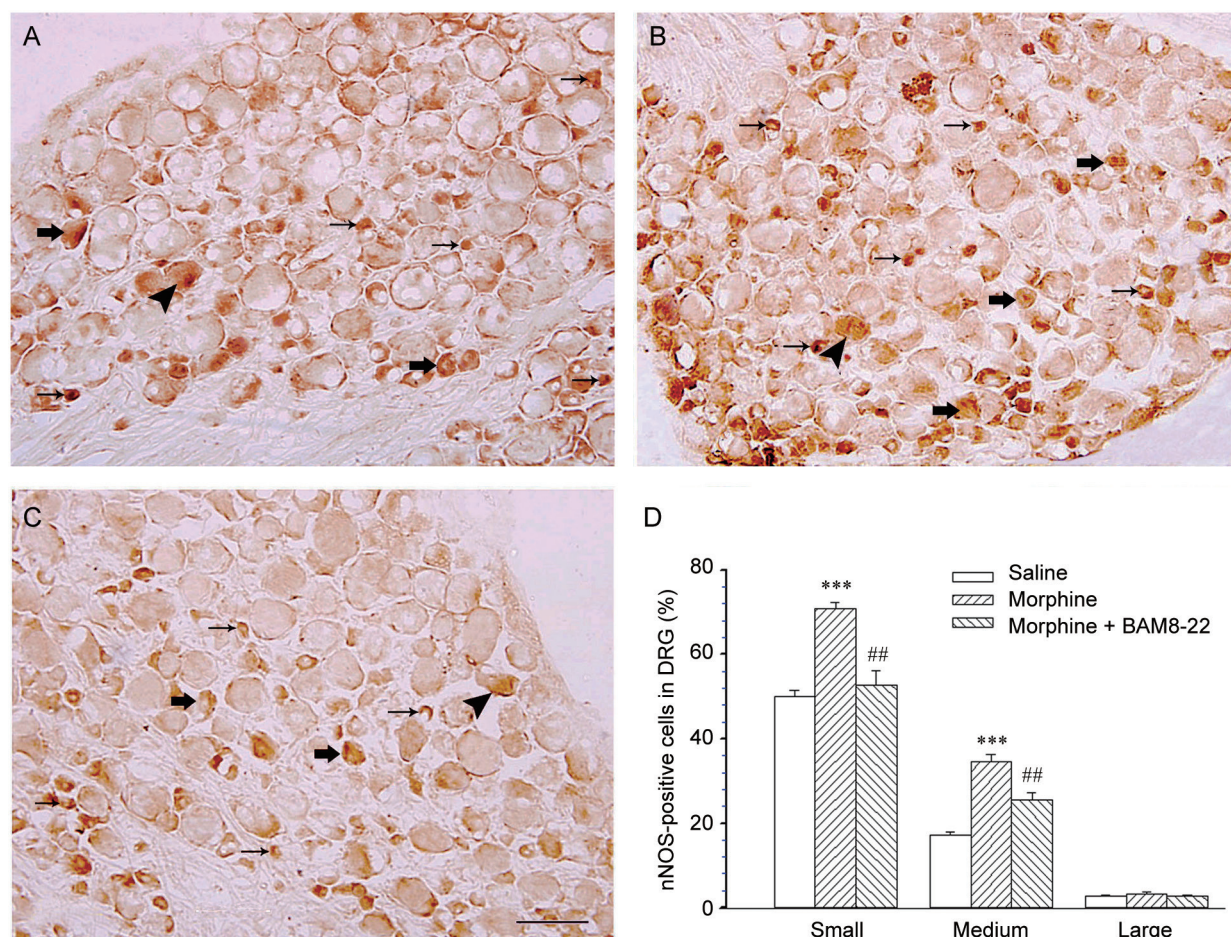


图 4. 鞘内间断给予BAM8-22对慢性吗啡诱发DRG神经元中nNOS表达增加的作用

Fig. 4. Effects of intermittent i.t. of BAM8-22 on chronic morphine-evoked increase in the expression of nNOS in DRG. Saline (A), morphine (20 μ g; B), or morphine + BAM8-22 (1 nmol, on days 1, 3 and 5; C) was administered i.t. once per day for 6 days. DRG (L3–5) were harvested on day 7. nNOS-like immunoreactivity was expressed in small (small arrow), medium (large arrow), and large (arrowhead) subtypes of DRG cells. D: Histograms (mean $\pm$ SEM) show the proportion of nNOS-IR-positive neurons over the total corresponding size subpopulations of DRG. *** P < 0.001 compared with saline group, ## P < 0.01 compared with morphine group. n = 4. Scale bar, 100 μ m.

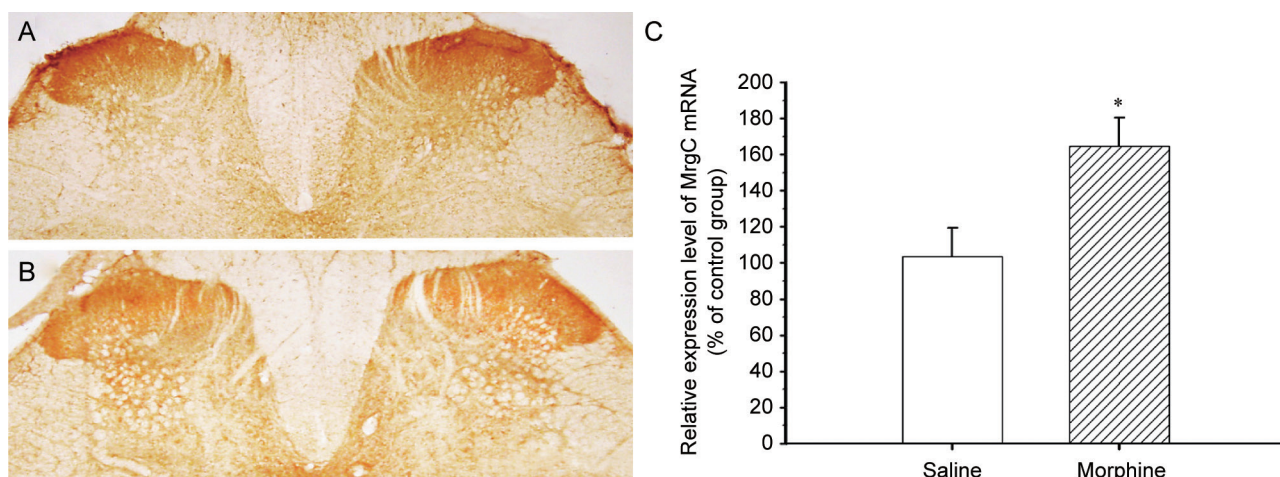


图 5. 慢性鞘内注射吗啡对脊髓背角MrgC受体和背根神经节MrgC mRNA表达的影响

Fig. 5. Effects of chronic administration of morphine on MrgC receptor-like immunoreactivity in the lumbar spinal dorsal horn (A: Chronic morphine, B: Naïve) and MrgC receptor mRNA levels in DRG (C). * P < 0.05 compared with saline group. n = 6.

是一个重要且很有趣的课题,有待将来研究。

除谷氨酸外,鞘内给予吗啡还引起 NO 释放^[16]。慢性应用吗啡促进 nNOS (NO 变化的指标) 的产生^[17];抑制 nNOS 的产生则减弱吗啡耐受形成^[18],表明 NO 参与吗啡耐受的产生。所以我们也检查了用 MrgC 受体激动剂 BAM8-22 对吗啡诱发 nNOS 改变的影响。鞘内慢性给予吗啡引起脊髓和 DRG 中 nNOS 蛋白上调,这和过去报道一致^[17,19]。鞘内间断应用 BAM8-22 后,吗啡不再能引起脊髓和 DRG 中 nNOS 蛋白增加,而单独用 BAM8-22 并不影响脊髓和 DRG 中 nNOS 蛋白的表达,说明 BAM8-22 对吗啡诱发 nNOS 增加的抑制具有药理特异性。应用 BAM8-22 后,吗啡不再能引起脊髓和 DRG 中 NO 的产生,意味着背角神经元兴奋性也就不会再升高,吗啡耐受就得到抑制。为了进一步证实 BAM8-22 抑制吗啡诱发 nNOS 上调,并探讨其调制的可能机制,我们又做了免疫组织化学检查。结果表明:吗啡诱发 nNOS 表达增加主要在 DRG 的中小神经元。而给予 BAM8-22 后,吗啡诱发的 nNOS 表达增加大大减少(中神经元)或不增加(小神经元)。我们和其他实验室的免疫组织化学检测显示,MrgC 受体也是位于 DRG 的中小神经元^[20,21],并且 MrgC 受体和 nNOS 在 DRG 的神经元中有并存^[21]。这种共存使 MrgC 受体调制 nNOS 的表达成为可能。这些组织学资料支持本工作所显示的:应用 BAM8-22 激活 MrgC 受体后,吗啡引起的中、小神经元 nNOS 表达增加得以显著抑制,提示抑制吗啡诱发的 DRG 中 nNOS 的增加,是 MrgC 受体抑制吗啡耐受的另—神经生物学机制。

受体结合实验在脊髓和皮肤细胞膜标本上检测到 MrgC 受体^[22],提示 DRG 神经元合成的 MrgC 受体^[3]沿神经轴突输送到脊髓和外周皮肤。我们的免疫组织化学标记则首次显示,MrgC 受体位于脊髓背角浅层。慢性应用吗啡,使 DRG 中 MrgC 受体的 mRNA 含量和脊髓背角 MrgC 受体的表达都显著增加。在神经病理性痛、慢性炎性痛、吗啡耐受等病理性状态下,多种兴奋性分子包括受体和配体,如谷氨酸、P 物质、CGRP 等都会上调,导致病理性疼痛,即痛觉过敏或痛觉超敏。其实,某些抑制性分子也会上调。研究显示,神经病理性痛或慢性炎性痛时,外周^[23]和脊髓^[24]的阿片肽以及脊髓、DRG 或足趾皮肤的^[25,26]阿片和 / 或大麻 (CB1、CB2) 受体上调。抑制性分子上调有利于减轻疼痛

剧烈程度,是机体的一种代偿性保护机制。本实验中显示的 DRG 和脊髓背角 MrgC 受体表达增加的确切意义,尚待进一步研究。但我们最近观察到,MrgC 受体的激活会增加 μ -阿片受体与抑制性 Gi 蛋白相耦联,从而增加提高阿片受体的镇痛功能^[27]。产生吗啡耐受的主要原因之一,在于 μ -阿片受体与 Gi 蛋白脱耦联^[28]。这结果提示,慢性应用吗啡导致的 MrgC 受体增加,会增加 μ -阿片受体与抑制性 Gi 蛋白相耦联的潜在可能,对于吗啡耐受使其脱耦联是一种对抗。MrgC 受体上调,会促进间断用 BAM8-22 或 MSH 激活 MrgC 受体的效应,使 μ -阿片受体与 Gi 蛋白相耦联增多,从而提高吗啡的镇痛效力,即抑制吗啡耐受。

本实验观察到间断激活 MrgC 受体能抑制吗啡诱发的脊髓背角和 / 或 DRG 谷氨酸转运体减少和 nNOS 增加,表明 MrgC 受体通过调制慢性应用吗啡诱发的痛介质——谷氨酸和 NO,而阻止痛感觉神经元的兴奋性升高,由此抑制吗啡耐受的产生。慢性应用吗啡导致的 MrgC 受体增加,在激活 MrgC 受体恢复吗啡的镇痛作用中也有促进作用。由于 MrgC 受体高度特异性分布的组织学特点,本研究结果有助于阐明 MrgC 受体功能活动的分子机理,为将 MrgC 受体激活剂作为辅助用药防治吗啡耐受奠定了基础。

* * *

致谢:本工作得到福建师范大学陈霆隽和李美丽的技术支持。

参考文献

- 1 Trescot AM, Glaser SE, Hansen H, Benyamin R, Patel S, Manchikanti L. Effectiveness of opioids in the treatment of chronic non-cancer pain. *Pain Physician* 2008; 11: S181-S200.
- 2 Dong X, Han S, Zylka MJ, Simon MI, Anderson DJ. A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell* 2001; 106: 619-632.
- 3 Lembo PM, Grazzini E, Groblewski T, O'Donnell D, Roy MO, Zhang J, Hoffert C, Cao J, Schmidt R, Pelletier M, Labarre M, Gosselin M, Fortin Y, Banville D, Shen SH, Strom P, Payza K, Dray A, Walker P, Ahmad S. Proenkephalin A gene products activate a new family of sensory neuron-specific GPCRs. *Nat Neurosci* 2002; 5: 201-209.
- 4 Cai Q, Jiang J, Chen T, Hong Y. Sensory neuron-specific receptor agonist BAM8-22 inhibits the development and expression of tolerance to morphine in rats. *Behav Brain Res*

- 2007;178: 154–159.
- 5 Chen P, Wang D, Li M, Zhang Y, Quirion R, Hong Y. Modulation of sensory neuron-specific receptors in the development of morphine tolerance and its neurochemical mechanisms. *J Neurosci Res* 2010; 88: 2952–2963.
- 6 Wen ZH, Chang YC, Cherg CH, Wang JJ, Tao PL, Wong CS. Increasing of intrathecal CSF excitatory amino acids concentration following morphine challenge in morphine-tolerant rats. *Brain Res* 2004; 995: 253–259.
- 7 Zeng J, Thomson LM, Aicher SA, Terman GW. Primary afferent NMDA receptors increase dorsal horn excitation and mediate opiate tolerance in neonatal rats. *J Neurosci* 2006; 26: 12033–12042.
- 8 Mao J, Sung B, Ji RR, Lim G. Chronic morphine induces downregulation of spinal glutamate transporters: implications in morphine tolerance and abnormal pain sensitivity. *J Neurosci* 2002; 22: 8312–8323.
- 9 Nakagawa T, Ozawa T, Shige K, Yamamoto R, Minami M, Satoh M. Inhibition of morphine tolerance and dependence by MS-153, a glutamate transporter activator. *Eur J Pharmacol* 2001; 419: 39–45.
- 10 Kolesnikov YA, Chereshev I, Criesta M, Pan YX, Pasternak GW. Opposing actions of neuronal nitric oxide synthase isoforms in formalin-induced pain in mice. *Brain Res* 2009; 1289: 14–21.
- 11 Gendron L, Lucido AL, Mennicken F, O'Donnell D, Vincent JP, Stroth T, Beaudet A. Morphine and pain-related stimuli enhance cell surface availability of somatic delta-opioid receptors in rat dorsal root ganglia. *J Neurosci* 2006; 26: 953–962.
- 12 Guan Y, Liu Q, Tang Z, Raja SN, Anderson DJ, Dong X. Mas-related G-protein-coupled receptors inhibit pathological pain in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 15933–15938.
- 13 Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 2001; 65: 1–105.
- 14 Tai YH, Wang YH, Wang JJ, Tao PL, Tung CS, Wong CS. Amitriptyline suppresses neuroinflammation and up-regulates glutamate transporters in morphine-tolerant rats. *Pain* 2006; 124: 77–86.
- 15 Hutchinson MR, Shavit Y, Grace PM, Rice KC, Maier SF, Watkins LR. Exploring the neuroimmunopharmacology of opioids: an integrative review of mechanisms of central immune signaling and their implications for opioid analgesia. *Pharmacol Rev* 2011; 63: 772–810.
- 16 Watanabe C, Sakurada T, Okuda K, Sakurada C, Ando R, Sakurada S. The role of spinal nitric oxide and glutamate in nociceptive behaviour evoked by high-dose intrathecal morphine in rats. *Pain* 2003; 106: 269–283.
- 17 Wong CS, Hsu MM, Chou YY, Tao PL, Tung CS. Morphine tolerance increases [3 H]MK-801 binding affinity and constitutive neuronal nitric oxide synthase expression in rat spinal cord. *Br J Anaesth* 2000; 85: 587–591.
- 18 Bhargava HN, Cao YJ. Effect of chronic administration of [D-Pen², D-Pen⁵] enkephalin on the activity of nitric oxide synthase in brain regions and spinal cord of mice. *Peptides* 1998; 19: 113–117.
- 19 Machelska H, Ziolkowska B, Mika J, Przewlocka B, Przewlocki R. Chronic morphine increases biosynthesis of nitric oxide synthase in the rat spinal cord. *Neuroreport* 1997; 8: 2743–2747.
- 20 Hager UA, Hein A, Lennerz JK, Zimmermann K, Neuhuber WL, Reeh PW. Morphological characterization of rat Mas-related G-protein-coupled receptor C and functional analysis of agonists. *Neuroscience* 2008; 151: 242–254.
- 21 Jiang J, Wang D, Zhou X, Huo Y, Chen T, Hu F, Quirion R, Hong Y. Effect of Mas-related gene (Mrg) receptors on hyperalgesia in rats with CFA-induced inflammation via direct and indirect mechanisms. *Br J Pharmacol* 2013; 170: 1027–1040.
- 22 Grazzini E, Puma C, Roy MO, Yu XH, O'Donnell D, Schmidt R, Dautrey S, Ducharme J, Perkins M, Panetta R, Laird JM, Ahmad S, Lembo PM. Sensory neuron-specific receptor activation elicits central and peripheral nociceptive effects in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 7175–7180.
- 23 Machelska H, Schopohl JK, Mousa SA, Labuz D, Schafer M, Stein C. Different mechanisms of intrinsic pain inhibition in early and late inflammation. *J Neuroimmunol* 2003; 141: 30–39.
- 24 Cai M, Chen T, Quirion R, Hong Y. The involvement of spinal bovine adrenal medulla 22-like peptide, the proenkephalin derivative, in modulation of nociceptive processing. *Eur J Neurosci* 2007; 26: 1128–1138.
- 25 Truong W, Cheng C, Xu QG, Li XQ, Zochodne DW. Mu opioid receptors and analgesia at the site of a peripheral nerve injury. *Ann Neurol* 2003; 53: 366–375.
- 26 Walczak JS, Pichette V, Leblond F, Desbiens K, Beaulieu P. Behavioral, pharmacological and molecular characterization of the saphenous nerve partial ligation: a new model of neuropathic pain. *Neuroscience* 2005; 132: 1093–1102.
- 27 Wang D, Chen T, Zhou X, Couture R, Hong Y. Activation of Mas oncogene-related gene (Mrg) C receptors enhances morphine-induced analgesia through modulation of coupling of mu-opioid receptor to Gi-protein in rat spinal dorsal horn. *Neuroscience* 2013; 253: 455–464.
- 28 Crain SM, Shen KF. Modulation of opioid analgesia, tolerance and dependence by Gs-coupled, GM1 ganglioside-regulated opioid receptor functions. *Trends Pharmacol Sci* 1998; 19: 358–365.