

研究论文

阻断炎症部位5-HT_{2A}受体对大鼠完全弗氏佐剂诱发炎症痛和脊髓背角神经肽Y表达的作用

黄冰晴, 吴冰, 洪炎国, 胡薇*

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: 炎症时组织释放5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT), 对炎症痛觉过敏的产生起重要作用。但炎症组织5-HT_{2A}受体在其中的意义尚不明确。本文旨在研究外周组织5-HT_{2A}受体在慢性炎症痛中的作用。大鼠后足底注射完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA), 在局部炎症部位给予选择性5-HT_{2A}受体阻断剂酮色林, 用行为学检测后足底对热和机械刺激的撤足反射, 用免疫组织化学方法检查脊髓背角和背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)中神经肽Y (neuropeptide Y, NPY)表达变化。结果显示, 炎症局部给予酮色林(20、40、80 μ g)能剂量依赖性地抑制CFA诱发的热痛觉过敏; 每日给予80 μ g酮色林, 在第三天即完全翻转CFA引起的热痛觉过敏, 以及部分地减轻触觉超敏。CFA诱发脊髓背角I~II层 NPY表达增加, 炎症组织局部注射酮色林能抑制脊髓背角NPY的表达增加, 但不改变DRG中NPY的表达。这些结果表明: 外周炎症组织5-HT_{2A}受体激活参与慢性痛觉过敏的发生; 阻断炎症部位5-HT_{2A}受体能缓解疼痛, 矫正与病理疼痛密切关联的脊髓背角细胞异常改变。因此, 外周5-HT_{2A}受体, 有望成为治疗慢性炎症性痛觉敏感性增高、不产生中枢神经系统副作用的药物靶点。

关键词: 酮色林; 5-HT_{2A}受体; 慢性炎症痛; 脊髓背角; 神经肽Y

中图分类号: Q426; R338.3

Effects of blockade of 5-HT_{2A} receptors in inflammatory site on complete Freund's adjuvant-induced chronic hyperalgesia and neuropeptide Y expression in the spinal dorsal horn in rats

HUANG Bing-Qing, WU Bing, HONG Yanguo, HU Wei*

Provincial Key Laboratory of Developmental Biology and Neuroscience, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China

Abstract: 5-hydroxytryptamine (5-HT) released in inflammatory tissues plays a pivotal role in pain hypersensitivity. However, it is not clear whether 5-HT_{2A} receptors in the inflamed tissues mediate this effect. The present study investigated the contribution of 5-HT_{2A} receptors in the periphery to chronic inflammatory pain. Complete Freund's adjuvant (CFA) was injected subcutaneously in the hind-paw of rats. The selective 5-HT_{2A} receptor antagonist ketanserin was given in the inflamed site. Paw withdrawal latency responding to heat or mechanical stimuli was measured. Expression of neuropeptide Y (NPY) in the spinal dorsal horn and dorsal root ganglia (DRG) was assayed using immunohistochemistry technique. The results showed that ketanserin administered in the inflamed site inhibited thermal hyperalgesia in a dose-dependent manner (20, 40 and 80 μ g) induced by the intraplantar injection of CFA. Ketanserin given once per day at a dose of 80 μ g abolished heat hyperalgesia and also attenuated mechanical allodynia on the third day. CFA injection increased the expression of NPY in superficial laminae of the spinal cord, but not in the DRG. The local treatment of ketanserin completely inhibited CFA-induced increase in NPY expression in superficial laminae of the spinal cord. These results indicated that activation of 5-HT_{2A} receptors in the inflamed tissues was involved in the pathogenesis of inflammatory pain and the blockade of 5-HT_{2A} receptors in the periphery could relieve pain hypersensitivity and normalize the cellular disorder in the spinal dorsal horn associated with pathological pain. The present study suggests that the peripheral 5-HT_{2A} receptors can be a promising target for pharmaceutical therapy to treat chronic inflammatory pain without central nervous system side effects.

Received 2015-04-08 Accepted 2015-06-12

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

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

Key words: ketanserin; 5-HT_{2A} receptor; chronic inflammatory pain; spinal dorsal horn; neuropeptide Y

炎性痛的特征是痛觉敏感性增高, 即伤害性刺激引起更大的疼痛 (痛觉过敏, hyperalgesia), 或非伤害性刺激引起疼痛 (痛觉超敏, allodynia)。其原因在于中枢 (如脊髓背角) 感觉神经元的兴奋性增加, 神经元和突触发生了重塑 (plasticity) 改变, 以致外周痛信息传入活动会更容易激活感觉神经元, 使痛信息传导加强^[1]。但是, 这一过程产生的第一步发生于炎症部位。炎症使组织释放许多离子和分子, 刺激位于传入神经末梢的多觉型感受器, 使其向中枢发放冲动, 引起疼痛感觉。5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 是炎症时组织释放的一种化学物质^[2], 不但直接刺激 c 纤维, 还能增强机械刺激^[3]、热刺激^[4]以及其他炎性因子 (P 物质, 去甲肾上腺素, 前列腺素 E₂, 缓激肽等) 的致痛效应^[5,6], 在炎性痛的发生中起着重要作用。5-HT 与外周的多种 5-HT 受体亚型结合引起伤害性感受, 其中 5-HT_{2A} 受体最重要。5-HT 引起的伤害性反应可特异性地被 5-HT_{2A} 受体拮抗剂抑制, 而阻断 5-HT_{1A} 和 5-HT₃ 受体并不能减轻 5-HT 引起的痛反应^[7,8]。外周 5-HT_{2A} 受体在疼痛中的作用已经在多种疼痛模型中得到证实, 如福尔马林^[9]、角叉菜胶^[10]引起的炎症模型和关节炎^[1], 其机制可能是 5-HT_{2A} 受体参与炎症时胞浆外渗^[11,12]、激活蛋白激酶 C 信号通路等^[13]。但是, 尚不清楚 5-HT_{2A} 受体是否参与慢性炎性疼痛的发生。

神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 是由 36 个氨基酸组成的多肽。在神经系统中分布较广, 包括脊髓背角。脊髓中 NPY 的作用是抑制痛信息传递^[14], 包括完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA) 诱发的炎性疼痛^[15], 故被认为是一种抑痛物质。有趣的是, 在炎性疼痛时 NPY 在脊髓背角的表达也上调^[16]。但这种上调和促痛介质上调的意义不一样, 实际上是一种机体的代偿性自我保护机制, 即对抗兴奋性信号的增加^[17], 抑制 P 物质的释放^[18]等; 而用敲除基因或鞘内注射 NPY 受体拮抗剂去除 NPY 活动, 均使痛敏感性大大增加^[19]。已知 5-HT_{2A} 受体阻断会抑制脊髓促痛介质的上调^[13,24], 但尚不知如何影响抑痛物质的上调。因此, 本研究旨在探讨 CFA 诱发慢性炎性痛的外周神经机制, 并检查镇痛作用对脊髓和背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 抑痛物质 NPY 表达的影响。

1 方法

1.1 动物和分组 雄性 Sprague-Dawley 大鼠 (220~300 g) 购自福建医科大学实验动物中心。每只动物笼容纳 3 只动物。为了维持其生物节律, 实验室每日晨 8:00 至 20:00 开灯, 20:00 至次日晨 8:00 熄灯 (22~26 °C)。行为实验均在 9:00 至 18:00 间进行。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认可。

1.2 材料 酮色林 (ketanserin) 和 CFA 购自美国 Sigma 公司, 二甲亚砜 (DMSO) 购自上海生工工程有限公司, 本实验还应用了热刺激仪 (四川成都泰盟科技有限公司, PL-200), 机械刺激仪 (意大利 UGO BASILE 仪器设备有限公司), 冰冻切片机 (MICROM HM 550, 德国美康公司), Olympus BX51 型显微镜和 Olympus DP70 型数码照相机 (日本), Image-Pro Plus 6.1 软件 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), 恒温摇床 (上海智诚分析仪器有限公司) 等仪器。酮色林先溶于 20% DMSO。此母液于应用前以生理盐水稀释。溶解酮色林的最后溶媒为 0.8% DMSO, 称为 vehicle。已知后足皮下注射此溶媒不影响疼痛阈值^[10]。

1.3 慢性炎性痛模型的建立 在大鼠右后足底皮下注入 150 μ L CFA。对照组在动物右后足底皮下注入 150 μ L 生理盐水 (saline)。

1.4 实验分组 大鼠随机分为 3 (行为) 或 4 (免疫组化) 组: (1) saline + vehicle 组: 右后足底注射生理盐水, 以后每日于同样部位注入 0.8% DMSO; (2) CFA + vehicle 组: 第一天右后足底注射 CFA, 以后每日于同样部位注入 0.8% DMSO; (3) CFA + 酮色林组: 第一天右后足底注射 CFA, 以后每日于同样部位注入 80 μ g/50 μ L 酮色林; (4) saline + 酮色林组: 第一天右后足底注射 saline, 以后每日于同样部位注入 80 μ g/50 μ L 酮色林 3 或 7 天 (见结果 2.1 和 2.2)。上述 4 组用于免疫组化实验。行为实验每组动物 6~7 只, 免疫组化实验每组动物 4 只。具体细节参见结果。

1.5 动物痛阈测试 动物在实验前一周, 每日分别放在热刺激仪和机械刺激仪中, 让其适应环境, 每次约 1 h。

热撤足反射潜伏期 (paw withdrawal latency, PWL):

将大鼠置于2 mm厚玻璃板上的透明有机玻璃箱(30 cm × 30 cm × 30 cm)中,并放置在高于实验台30 cm的架子上观察。应用光刺激仪照射大鼠足底,记录从照射开始至出现撤足反射的时间(s),此即为PWL;如大于20 s无反应则停止刺激,以避免导致足底组织发生损伤,痛阈记为20 s。以注射CFA前PWL为100%。

机械刺激阈值(mechanical threshold, MT):用up-down法检测。将一有机玻璃箱(30 cm × 30 cm × 30 cm)置于金属网上。待大鼠在箱中适应30 min后,用自动von Frey系统垂直刺激大鼠后肢足底中部,持续时间<5 s,大鼠出现抬足或舔足行为视为阳性反应,否则为阴性反应。测定首先从2 g开始,直至出现每10次刺激引起6次阳性反应。最大刺激强度设为50 g。

热和机械撤足反射均测试3次,每次间隔2 min,取平均值。

1.6 免疫组化材料制备 实验大鼠行为学测试结束后,腹腔注射5%戊巴比妥钠(50 mg/mL per kg)。待其麻醉后打开胸腔,左心室插管,连接灌注装置,剪开右心耳。先用磷酸盐缓冲液冲洗血液,然后用4%多聚甲醛缓慢灌流,固定。灌流结束后,暴露脊髓,取出腰脊髓膨大及注射侧L4~L6 DRG。放置于30%蔗糖溶液中,置4℃冰箱至组织下沉。用冰冻切片机冠状连续切片,脊髓片厚40 μm, DRG片厚10 μm,直接贴在经清洁处理的载玻片上,放入-80℃冰箱备用。

1.7 免疫组织化学染色(ABC法) 用PBS漂洗切片3次。用0.3%过氧化氢在室温下封闭30 min, PBS冲洗3次,滴加5%正常羊血清,封闭2 h。然后加抗NPY抗体(1:2 000, Abcam, 北京), 4℃孵育过夜。PBS冲洗3次。加生物素标记羊抗兔IgG二抗(1:400 10%羊血清), 室温孵育2 h。PBS冲洗3次。加ABC试剂(1:1 000), 室温孵育2 h。PBS冲洗3次,加DAB/H₂O₂进行呈色3~5 min后,用自来水冲洗终止其反应。脱水,透明,封片,镜检。每只大鼠随机取6片脊髓切片,用SPOT数码相机250倍放大倍数对脊髓背角I-II层拍照。用影像分析软件Image-Pro Plus 6.1对NPY染色的像素数进行定量分析。

1.8 统计学分析 各组数据以mean ± SEM表示,统计分析以Sigmastat软件采用单因素方差分析(one-way ANOVA)及Tukey's检验法,组间比较用 t

检验。以 $P < 0.05$ 认为有统计学显著差异。采用Sigmaplot软件绘制图表。

2 结果

2.1 酮色林对CFA诱发热痛觉过敏的影响

给大鼠足底部注射CFA 24 h后,该处热痛觉阈值降低,其数值减少到基础值的54%左右,在本实验所观察的时间内(96 h),痛阈值一直维持在低水平。注射CFA后24 h在大鼠炎症部位注入酮色林(20、40、80 μg/50 μL三个剂量)或0.8% DMSO(vehicle),每天一次,连续3天。如图1所示,40或80 μg酮色林均能不同程度抑制CFA诱发的热痛觉过敏。在80 μg酮色林组,大鼠PWL于第三天接近正常水平(92%)。炎症部位给予vehicle不改变CFA诱发的PWL降低,和单纯给予CFA的结果类似^[20,21]。

2.2 酮色林对CFA诱导触觉超敏的影响

研究显示,CFA诱导触觉超敏持续时间较长,最长可达4周以上^[22,23]。如图2所示,给大鼠足底注射生理盐水不改变撤足反射的MT,而注射CFA 24 h后大鼠撤足反射的MT从25 g降至12 g。注射CFA后24 h在炎症部位注射vehicle(50 μL),每天1次,共7天,撤足反射MT基本上一直处于类似

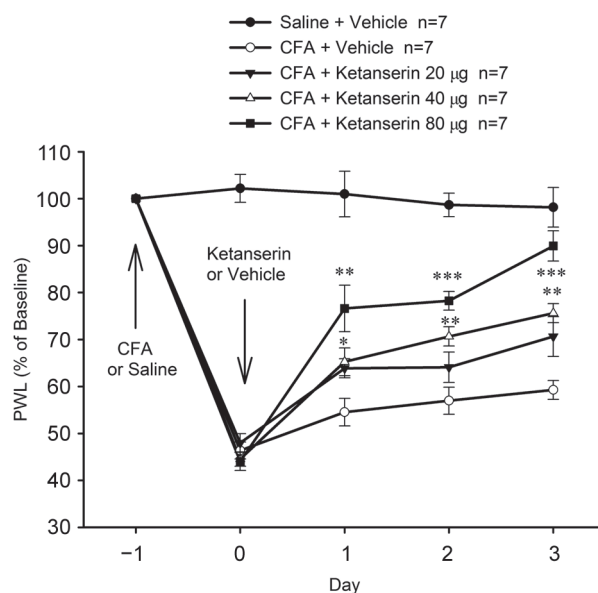


图 1. 局部给予酮色林对CFA诱发热痛觉过敏的作用
Fig. 1. Effect of local administration of ketanserin on CFA-induced heat hyperalgesia. PWL, paw withdrawal latency. Mean ± SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared to the CFA + Vehicle group.

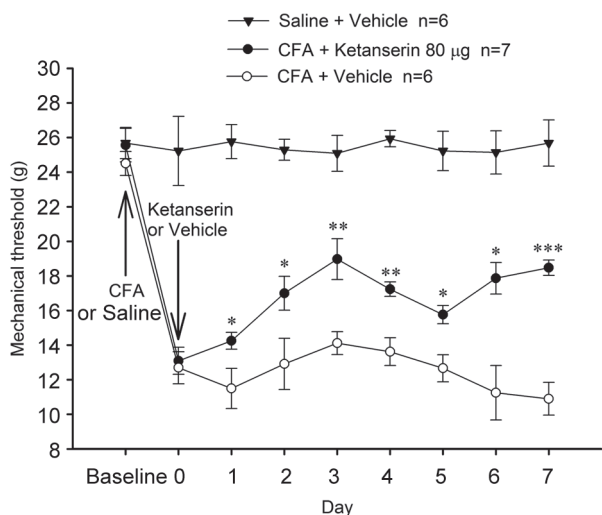


图 2. 局部给予酮色林对CFA诱发后足触觉超敏的作用
Fig. 2. Effect of local administration of ketanserin on CFA-induced mechanical allodynia in the rat hindpaw. Mean $\pm$ SEM. * P < 0.05, ** P < 0.01 and *** P < 0.001 compared to the CFA + Vehicle group.

水平, 和单纯给予 CFA 的结果一样^[24]。另一组注射 CFA 24 h 后在炎症部位注射酮色林 (80 μ g/50 μ L, 每天 1 次), 撤足反射的 MT 在给药第二天起就增加, 此后 7 天均一直高于 CFA + vehicle 组。统计学分析表明, 此阈值增加有显著性统计学意义 (P < 0.05, 0.01 或 0.001)。

2.3 酮色林对CFA诱发脊髓背角NPY表达的影响

如图 3 所示, saline + vehicle 组的脊髓背角 I~II 层呈 NPY 免疫阳性反应 (图 3A)。与 saline + vehicle 组相比, CFA + vehicle 组脊髓 NPY 免疫阳性反应增加 (图 3B、3E, P < 0.05)。但是, 在炎症部位给予酮色林 (80 μ g/50 μ L) 后, CFA 引起的脊髓 NPY 表达显著减少 (图 3C、3E)。而 saline + 酮色林处理并不改变脊髓 NPY 表达 (P > 0.05, 图 3D、3E)。

2.4 酮色林对CFA处理后大鼠DRG中NPY的表达的影响

过去研究证实, 正常和 CFA 处理后大鼠 DRG 中 NPY 表达均为阴性^[16]。故我们不再重复此实验, 而是比较注射 CFA + 酮色林和单纯给予 CFA 之间 NPY 表达的变化。图 4 示 CFA + vehicle 组 (图 4A, n = 4) 和 CFA + 酮色林组 (图 4B, n = 4) DRG 中 NPY 表达的代表图。结果显示, 炎症部位给予酮色林后, DRG 仍然不表达 NPY。

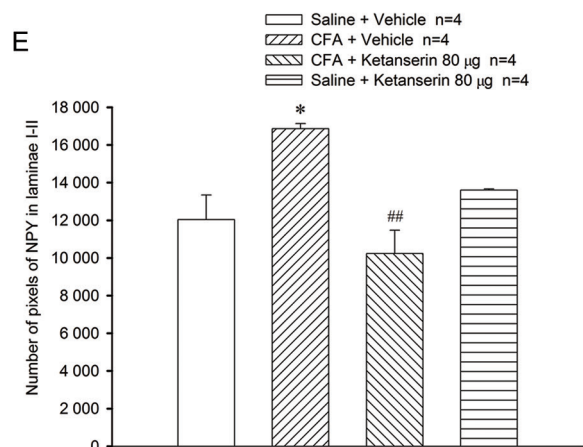
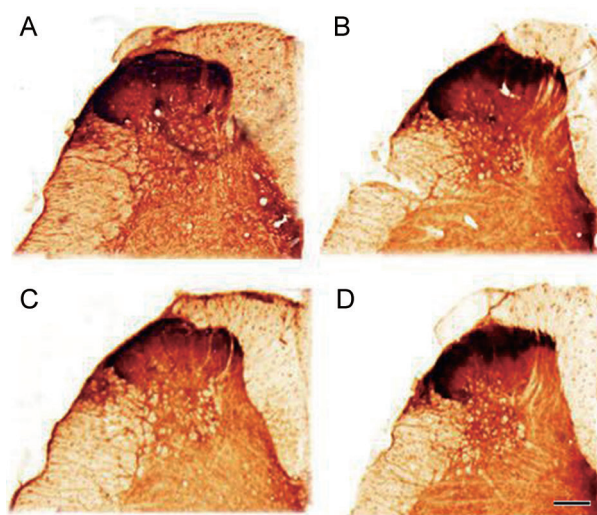


图 3. 局部给予酮色林对CFA诱发脊髓背角NPY-IR表达的影响

Fig. 3. Representative photomicrographs showing NPY-immunoreactive (IR) expression in the spinal dorsal horn following injection of CFA or saline on day 1 plus ketanserin or vehicle in inflamed site on days 2–7. A: Saline + Vehicle; B: CFA + Vehicle; C: CFA + Ketanserin; D: Saline + Ketanserin group. E: Histograms showing quantitative results. Mean $\pm$ SEM, n = 4 each. * P < 0.05 compared to the Saline + Vehicle group; ## P < 0.01 compared to the CFA + Vehicle group. Scale bar, 200 μ m.

3 讨论

给大鼠后足皮下注射 CFA 产生长时间持续性痛阈减低, 很类似于临床上慢性炎性痛状态, 是公认的慢性炎性痛模型^[25]。过去研究显示, 用 5-HT_{2A} 受体阻断剂 Sarpogrelate 能抑制 CFA 诱发的热痛觉过敏, 提示 5-HT_{2A} 受体参与炎性痛的发生^[26]。但因该阻断剂由全身注射 (systemic injection) 所给予, 不能确定是位于何处的 5-HT_{2A} 受体介导此作用。

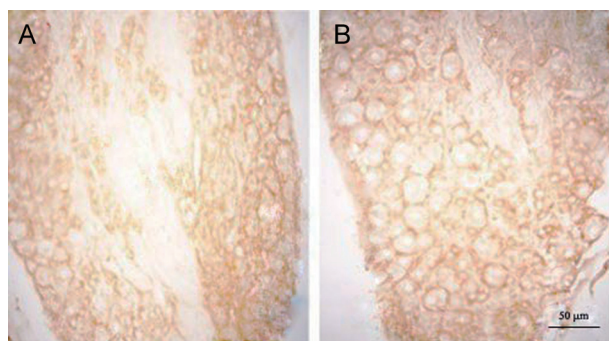


图 4. 炎症组织注射酮色林对CFA处理大鼠DRG中 NPY-IR 表达的影响

Fig. 4. Effect of ketanserin injection in inflamed site on the expression of NPY-immunoreactive (IR) expression in the dorsal root ganglia in the rat treated with CFA. A: CFA + Vehicle; B: CFA + Ketanserin. Scale bar, 50 μ m.

本项研究显示，在炎症部位注射高选择性 5-HT_{2A} 受体阻断剂酮色林^[27]，能剂量依赖性地抑制热痛觉过敏。酮色林 (80 μ g) 应用 3 天后即能使热痛阈恢复正常。相同的处理能部分减轻 CFA 诱发触觉超敏 (约减少 50%)，且继续用药至第 7 天一直能保持这一抑制幅度。提示炎症组织处 5-HT_{2A} 受体介导 CFA 诱发慢性炎性热痛觉过敏，而部分地介导慢性炎性机械痛敏感增高。这和文献报道一致，即有些痛介质并非等同地介导炎性热、冷和机械痛敏感增高，如白介素 -1^[28]、白介素 -17^[29]、Sigma-1 受体^[30] 等。有研究显示，正常皮肤的 5-HT_{2A} 受体不具备张力性活动，所以应用酮色林不改变正常大鼠的基础痛阈^[11,31]。5-HT_{2A} 受体在外周感觉纤维^[32] 和 DRG^[33] 中均有表达。外周炎症时 DRG 的 5-HT_{2A} 受体上调^[26]，提示 5-HT_{2A} 受体与炎性痛有密切关系。阻断炎症部位 5-HT_{2A} 受体产生有效镇痛，也恰恰说明 5-HT_{2A} 受体的激活在炎性痛的发生中起重要作用。酮色林在炎症组织的镇痛机制，按照我们过去的研究，是抑制了蛋白激酶 C 信号通路的激活^[13]，调制 DRG 中痛介质 CGRP 的表达，以及促进内源性阿片肽的合成^[34,35]。

机体内存在有两类介质：促痛类介质和抑痛类介质。前者有谷氨酸、CGRP、P 物质等，后者有阿片肽、大麻素、NPY 等。NPY 是脊髓背角的一种重要抑痛介质。在炎性痛时能表达上调，抑制痛敏感性的增加^[19]。过去研究证实，在阻断某炎性介质受体后，炎症诱发的某些促痛介质上调会得到抑制。但是，尚不清楚炎性痛受到抑制之后，抑痛类

介质的表达如何变化。如果其表达增加是疼痛所引起的结果 (如 NPY 增加显示机体保护性机制增强)，那么，在疼痛抑制后，增多的 NPY 可能不变，也可能恢复到原来低水平的表达。本实验显示 CFA 足底注射引致脊髓背角的 NPY 表达增加，但 L4、L5 DRG 中 NPY 表达仍是阴性。这与 NPY mRNA 水平的改变是一致的^[16]。显示炎性痛和神经病理性痛的机制不一样，后者 DRG 中 NPY 的表达呈阳性^[24,36]，提示神经损伤 (而不是炎症) 促使 DRG 神经元合成 NPY。给予酮色林阻断炎症部位的 5-HT_{2A} 受体后脊髓背角增加的 NPY 表达基本上恢复至正常水平，但 DRG 神经元仍无 NPY 表达，说明 DRG 神经元 NPY 表达阴性不是因为促痛分子表达占优势导致抑痛分子受抑制 (因酮色林的应用已经解除了促痛分子 CGRP 等的增加^[35])，而是炎症改变不能启动 DRG 神经元合成 NPY。近年来，国内外研究都指出：炎症时神经也受到损伤，而神经损伤导致神经病理性痛的机制也有炎症因素的参与，因而炎性痛和神经病理性痛有不少相似的病理机制。我们的工作则在提醒，炎性痛和神经病理性痛是不同性质的疾患。如神经损伤会使 DRG 神经元合成、表达 NPY^[24,36]；而本研究显示炎症还是不能使 DRG 神经元合成 NPY。应用酮色林后 DRG 中 NPY 的阴性结果，也提示其对脊髓背角的 NPY 表达改变的影响具有特异性。业已证实，炎症时，除 NPY 外，其它 dynorphin、enkephalin^[37] 和 BAM22^[38] 等抑痛类神经肽也是上调的。表明机体在炎症情况下，会动用体内的镇痛机制，这是一种自我保护性措施，因为可以减轻炎症痛的剧烈程度，使机体不至于过痛。但是，这种病理情况下的自主反应相对于正常生理状态来说，实际上还是一种非生理状态，即一种扰乱。应用酮色林阻断病变部位的 5-HT_{2A} 受体，不但抑制促痛类介质 (如 CGRP) 的增加^[35]，而且也缓解镇痛机制 (本实验中的 NPY) 的启动。因此，炎症局部应用酮色林能促使脊髓细胞恢复正常生理状态。

外周炎症时，局部组织释放的炎性介质损伤刺激外周感受器，经过复杂的正反馈机制导致外周和中枢敏化，是引起痛觉敏感性增高的主要机制。在这个过程中，炎性介质刺激外周感受器是第一步；其不断向中枢发放冲动是使中枢敏化维持的重要原因。本研究显示，阻断炎症部位的 5-HT_{2A} 受体，能完全或部分地抑制 CFA 诱发的慢性痛觉敏感性

增高,这和我们过去^[10,11,13]研究结果相一致,表明慢性炎症时,炎性组织部位的5-HT_{2A}受体活动的增强,在维持中枢敏化中起重要作用。我们还证实,阻断炎症部位的5-HT_{2A}受体,能矫正脊髓背角因外周炎症引起的生理功能非正常化。当外周应用酮色林多至10 mg/kg的剂量,该药也不会进入中枢神经系统^[39]。依此推断,本实验中局部应用酮色林(最大剂量为80 μg)是通过外周而不是中枢起作用的。由于目前镇痛药的主要副作用是扰乱中枢神经系统功能。故阻断局部5-HT_{2A}受体镇痛的优点之一是避免了这一副作用。目前镇痛药的镇痛作用基本上都以中枢神经系统的受体为靶点,可是普遍引起副作用,且其副作用的产生也是因为阻断或激活了中枢神经系统的受体。因此,本研究结果支持开发作用外周的新型镇痛药,因为不但能达到镇痛目的,而且不会产生中枢副作用。

参考文献

- Latremoliere A, Woolf CJ. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* 2009; 10: 895–926.
- Vinegar R, Truax JF, Selph JL, Johnston PR, Venable AL, McKenzie KK. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. *Fed Proc* 1987; 46: 118–126.
- Vinegar R, Truax JF, Selph JL, Johnston PR. Pharmacological characterization of the algescic response to the subplantar injection of serotonin in the rat. *Eur J Pharmacol* 1989; 164: 497–505.
- Rang HP, Bevan S, Dray A. Chemical activation of nociceptive peripheral neurones. *Br Med Bull* 1991; 47: 534–548.
- Hong Y, Abbott FV. Behavioural effects of intraplantar injection of inflammatory mediators in the rat. *Neuroscience* 1994; 63: 827–836.
- Khalil Z, Helme RD. Serotonin modulates substance P-induced plasma extravasation and vasodilatation in rat skin by an action through capsaicin-sensitive primary afferent nerves. *Brain Res* 1990; 527: 292–298.
- Doi-Saika M, Tokunaga A, Senba E. Intradermal 5-HT induces Fos expression in rat dorsal horn neurons not via 5-HT₃ but via 5-HT_{2A} receptors. *Neurosci Res* 1997; 29: 143–149.
- Tokunaga A, Saika M, Senba E. 5-HT_{2A} receptor subtype is involved in the thermal hyperalgesic mechanism of serotonin in the periphery. *Pain* 1998; 76: 349–355.
- Abbott FV, Hong Y, Blier P. Persisting sensitization of the behavioural response to formalin-induced injury in the rat through activation of serotonin_{2A} receptors. *Neuroscience* 1997; 77: 575–584.
- Wei H, Chen Y, Hong Y. The contribution of peripheral 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor to carrageenan-evoked hyperalgesia, inflammation and spinal Fos protein expression in the rat. *Neuroscience* 2005; 132: 1073–1082.
- Hong Y, Ji H, Wei H. Topical ketanserin attenuates hyperalgesia and inflammation in arthritis in rats. *Pain* 2006; 124: 27–33.
- Sawynok J, Zarrindast MR, Reid AR, Doak GJ. Adenosine A₃ receptor activation produces nociceptive behaviour and edema by release of histamine and 5-hydroxytryptamine. *Eur J Pharmacol* 1997; 333: 1–7.
- Chen X, Bing F, Dai P, Hong Y. Involvement of protein kinase C in 5-HT-evoked thermal hyperalgesia and spinal fos protein expression in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 2006; 84: 8–16.
- Smith PA, Moran TD, Abdulla F, Tumber KK, Taylor BK. Spinal mechanisms of NPY analgesia. *Peptides* 2007; 28: 464–474.
- Taiwo OB, Taylor BK. Antihyperalgesic effects of intrathecal neuropeptide Y during inflammation are mediated by Y₁ receptors. *Pain* 2002; 96: 353–363.
- Ji RR, Zhang X, Wiesenfeld-Hallin Z, Hokfelt T. Expression of neuropeptide Y and neuropeptide Y (Y₁) receptor mRNA in rat spinal cord and dorsal root ganglia following peripheral tissue inflammation. *J Neurosci* 1994; 14: 6423–6434.
- Munglani R, Bond A, Smith GD, Harrison SM, Elliot PJ, Birch PJ, Hunt SP. Changes in neuronal markers in a mononeuropathic rat model relationship between neuropeptide Y, pre-emptive drug treatment and long-term mechanical hyperalgesia. *Pain* 1995; 63: 21–31.
- Taylor BK, Fu W, Kuphal KE, Stiller CO, Winter MK, Chen W, Corder GF, Urban JH, McCarron KE, Marvizon JC. Inflammation enhances Y₁ receptor signaling, neuropeptide Y-mediated inhibition of hyperalgesia, and substance P release from primary afferent neurons. *Neuroscience* 2014; 256: 178–194.
- Solway B, Bose SC, Corder G, Donahue RR, Taylor BK. Tonic inhibition of chronic pain by neuropeptide Y. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 7224–7229.
- Hong Y, Liu Y, Chabot JG, Fournier A, Quirion R. Upregulation of adrenomedullin in the spinal cord and dorsal root ganglia in the early phase of CFA-induced inflammation in rats. *Pain* 2009; 146: 105–113.
- 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 Morgan JR, Gebhart GF. Characterization of a model of chronic orofacial hyperalgesia in the rat: contribution of NA(V) 1.8. *J Pain* 2008; 9: 522–531.
- 23 Ueda K, Hirose M, Murata E, Takatori M, Ueda M, Ikeda H, Shigemi K. Local administration of a synthetic cell-penetrating peptide antagonizing TrkA function suppresses inflammatory pain in rats. *J Pharmacol Sci* 2010; 112: 438–443.
- 24 Wang D, Chen T, Gao Y, Quirion R, Hong Y. Inhibition of SNL-induced upregulation of CGRP and NPY in the spinal cord and dorsal root ganglia by the 5-HT(2A) receptor antagonist ketanserin in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2012; 101: 379–386.
- 25 Stein C, Millan MJ, Herz A. Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation: alterations in behavior and nociceptive thresholds. *Pharmacol. Biochem Behav* 1988; 31: 445–451.
- 26 Okamoto K, Imbe H, Morikawa Y, Itoh M, Sekimoto M, Nemoto K, Senba E. 5-HT_{2A} receptor subtype in the peripheral branch of sensory fibers is involved in the potentiation of inflammatory pain in rats. *Pain* 2002; 99: 133–143.
- 27 Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 71: 533–554.
- 28 Ebbinghaus M, Uhlig B, Richter F, Von Banchet GS, Gajda M, Brauer R, Schaible HG. The role of interleukin-1 β in arthritic pain: main involvement in thermal, but not mechanical, hyperalgesia in rat antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2012; 64: 3897–3907.
- 29 Segond von BG, Boettger MK, Konig C, Iwakura Y, Brauer R, Schaible HG. Neuronal IL-17 receptor upregulates TRPV4 but not TRPV1 receptors in DRG neurons and mediates mechanical but not thermal hyperalgesia. *Mol Cell Neurosci* 2013; 52: 152–160.
- 30 de la Puente B, Nadal X, Portillo-Salido E, Sanchez-Arroyos R, Ovalle S, Palacios G, Muro A, Romero L, Entrena JM, Baeyens JM, Lopez-Garcia JA, Maldonado R, Zamanillo D, Vela JM. Sigma-1 receptors regulate activity-induced spinal sensitization and neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Pain* 2009; 145: 294–303.
- 31 Nitanda A, Yasunami N, Tokumo K, Fujii H, Hirai T, Nishio H. Contribution of the peripheral 5-HT_{2A} receptor to mechanical hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain. *Neurochem Int* 2005; 47: 394–400.
- 32 Carlton SM, Coggeshall RE. Immunohistochemical localization of 5-HT_{2A} receptors in peripheral sensory axons in rat glabrous skin. *Brain Res* 1997; 763: 271–275.
- 33 Chen JJ, Vasko MR, Wu X, Staeva TP, Baez M, Zgombick JM, Nelson DL. Multiple subtypes of serotonin receptors are expressed in rat sensory neurons in culture. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 287: 1119–1127.
- 34 Huang J, Cai Q, Chen Y, Hong Y. Treatment with ketanserin produces opioid-mediated hypoalgesia in the late phase of carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rats. *Brain Res* 2009; 1303: 39–47.
- 35 Huang J, Fan Y, Jia Y, Hong Y. Antagonism of 5-HT_{2A} receptors inhibits the expression of pronociceptive mediator and enhances endogenous opioid mechanism in carrageenan-induced inflammation in rats. *Eur J Pharmacol* 2011; 633: 39–47.
- 36 Ma W, Bisby MA. Partial sciatic nerve ligation induced more dramatic increase of neuropeptide Y immunoreactive axonal fibers in the gracile nucleus of middle-aged rats than in young adult rats. *J Neurosci Res* 2000; 60: 520–530.
- 37 Hunter JC, Woodburn VL, Durieux C, Pettersson EK, Poat JA, Hughes J. c-fos antisense oligodeoxynucleotide increases formalin-induced nociception and regulates preprodynorphin expression. *Neuroscience* 1995; 65: 485–492.
- 38 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.
- 39 Ebersberger A, Anton F, Tolle TR, Zieglsangberger W. Morphine, 5-HT₂ and 5-HT₃ receptor antagonists reduce c-fos expression in the trigeminal nuclear complex following noxious chemical stimulation of the rat nasal mucosa. *Brain Res* 1995; 676: 336–342.