

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00443

活性氧对背根神经节 P2X3 受体介导的痛信号功能的影响

吕 虎^{1△}, 徐娟娟^{1△}, 陈 辉¹, 许 华¹, 孙继虎², 蔡志扬³, 熊源长^{1*}

1. 第二军医大学长海医院麻醉科, 上海 200433
2. 第二军医大学基础部生理学教研室, 上海 200433
3. 武警 8710 部队医院麻醉科, 莆田 351133

[摘要] **目的** 探讨活性氧(reactive oxygen species, ROS)对 P2X3 受体介导的神经病理性疼痛作用的影响。**方法** 用成年雌性 SD 大鼠建立背根神经节慢性压迫(CCD)神经病理性疼痛模型, 建模成功后随机分为 4 组(每组 10 只), 经腹腔分别注射生理盐水(NS)、PBN 100 mg/kg、PBN 30 mg/kg、PBN 10 mg/kg, 给药 30 min 后, 经足底注射 P2X3 受体特异性激动剂 α , β -meATP 50 nmol, 体积为 50 μ L, 持续观察注射后 15 min 内的自发缩足次数和主动悬足时间, 并整合计算每 2 min 内的综合悬足时间(PLTPM)。**结果** PBN 能够剂量依赖性抑制由 α , β -meATP 引发的自发性痛行为, 与 NS 组比较, PBN 100 mg/kg 组在前 6 min 内能明显抑制自发性疼痛, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 而 PBN 30 mg/kg 组大鼠仅在 2 至 4 min 时间单位表现出差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 氧自由基清除剂可以有效缓解由 CCD 模型引发的神经病理性疼痛及 P2X3 受体激动剂诱发的自发痛, ROS 可能作为信号分子参与了 P2X3 受体介导的痛觉信息的传递。

[关键词] 活性氧; P2X3 受体; 背根神经节慢性压迫; 神经病理性疼痛; 自由基清除剂

[中图分类号] R 441.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)04-0443-04

Effect of reactive oxygen species on dorsal root ganglion P2X3 receptor-induced pain signal

LÜ Hu^{1△}, XU Juan-juan^{1△}, CHEN Hui¹, XU Hua¹, SUN Ji-hu², CAI Zhi-yang³, XIONG Yuan-chang^{1*}

1. Department of Anesthesiology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
3. Department of Anesthesiology, Hospital of No. 8710 Troop of Chinese People's Armed Police Forces, Putian 351133, Fujian, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of reactive oxygen species(ROS) on P2X3 receptor-mediated neuropathic pain. **Methods** Neuropathic pain model was induced in female Sprague Dawley rats by chronic compression of dorsal root ganglia (CCD), and the CCD rats were randomly divided into 4 groups (each group containing 10 rats): Saline group (NS group); PBN 100 mg/kg treatment group; PBN 30 mg/kg treatment group; and PBN 10 mg/kg treatment group. The specific agonist of P2X3 receptor, α , β -meATP (50 nmol in 50 μ L), was subcutaneously injected into the plantar surface of the right hind paws of each rat 30 min after PBN or NS injection. The spontaneous paw flinching times and withdrawing time were observed for 15 min after injection and the paw lift time per minute (PLTPM) in every 2 minutes was calculated. **Results** Pre-treatment with PBN inhibited α , β -meATP-induced spontaneous pain in a dose-dependent manner. Compared with the NS group, PBN 100 mg/kg group significantly inhibited flinching response during the first 6 min ($P < 0.05$), while the rats in PBN 30 mg/kg group only had significantly attenuated flinching response during the second to the fourth minute compared with NS group ($P < 0.05$). **Conclusion** Oxygen free radical scavenger can effectively alleviate the neuropathic pain caused by CCD and P2X3 receptor agonist-induced spontaneous pain. ROS may act as a messenger in P2X3 receptor-mediated pain signaling transmission.

[收稿日期] 2013-10-07 **[接受日期]** 2013-12-24

[基金项目] 国家自然科学基金(81070894). Supported by National Natural Science Foundation of China(81070894).

[作者简介] 吕 虎, 住院医师. E-mail: lvhu086@gmail.com; 徐娟娟, 硕士生. E-mail: xujuanjuan2011@163.com

[△]共同第一作者 (Co-first authors).

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-31161838, E-mail: ychxiong@sina.com

[Key words] reactive oxygen species; P2X3 receptor; chronic compression of dorsal root ganglia; neuropathic pain; free radical scavengers

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(4): 443-446]

慢性腰背痛是一种临床上常见的疾病,椎间盘突出是常见病因之一,但至今尚无明确机制解释这种神经病理性疼痛的形成和发展。椎间盘突出诱发外周背根神经节及邻近神经根敏感性增强,促使机体发生外周敏化。P2X3受体选择性表达于背根神经节和三叉神经节的中小直径感觉神经元之上,与痛觉信号的传递密切相关,在神经病理性疼痛时表达上调^[1]。近年来研究表明,活性氧(reactive oxygen species, ROS)在神经病理性疼痛中发挥重要作用,参与活化多种疼痛相关受体^[2-11],而应用非特异性的氧自由基清除剂苯亚甲基叔丁基氮氧化物(PBN)可产生镇痛作用^[12-13]。本研究将ROS与P2X3受体功能相联系,观察ROS是否参与P2X3受体介导的痛信号传递。

1 材料和方法

1.1 实验动物 健康雌性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,平均体质量(130±10) g,由第二军医大学实验动物中心提供,并在安静、温暖(20℃)、避强光的环境下饲养,自由饮水、摄食。

1.2 主要试剂及仪器 PBN(货号 B7263, Sigma 公司,美国), P2X3受体特异性激动剂 α , β -meATP(货号 M6517, Sigma 公司,美国), Von Frey 纤维丝(Stoelting 公司,美国)。

1.3 建立背根神经节慢性压迫(CCD)模型及实验分组 1%戊巴比妥钠(5 mL/kg)腹腔注射麻醉大鼠后,沿 L₄~L₆ 脊椎右缘切开皮肤,钝性分离肌肉并暴露右侧 L₄、L₅ 椎间孔,用弯成直角的 4# 针头试行探入椎间孔后退出。再将 2 根长 4 mm、直径 0.63 mm 的“L”形不锈钢柱沿针道各插入右侧 L₄ 及 L₅ 椎间孔,以形成对 L₄、L₅ 背根神经节及邻近神经根的固定压迫。分层缝合肌肉及皮肤,大鼠恢复知觉后送回动物房饲养。用 Von Frey 纤维丝测试大鼠术后 1~7 d 的机械痛缩足阈值(paw withdrawal mechanical threshold, PWMT)^[1],若 PWMT 下降超过 20 mN,表明建模成功。若达不到此标准,则剔除

此只大鼠。将建模成功的大鼠随机分为 4 组(每组 10 只):生理盐水(NS)组、PBN 100 mg/kg 组、PBN 30 mg/kg 组、PBN 10 mg/kg 组。

1.4 自发痛行为学测试 将建模后第 7 天的大鼠单个放在有机玻璃盒中,适应环境 20 min。按照 5 mL/kg 体积标准经腹腔给予各组相应剂量后 0.5 h,在大鼠背根神经节压迫侧足底注射 α , β -meATP 50 μ L(浓度 1 nmol/ μ L)。注射后立即将大鼠放回原先所在的盒子中继续观察,记录大鼠脚掌每分钟悬在空中的总时间(单次悬空时间大于 2 s)及自发性缩足次数。计算每 2 min 的综合悬足时间(paw lift time per minute, PLTPM),计算公式为:主动悬足时间 + 1/3 自发缩足次数,作为评价 α , β -meATP 引起自发痛行为强度的主要指标。

1.5 统计学处理 所得计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SigmaStat 3.5 统计软件包进行分析,组间比较、各不同时点间比较采用重复测量的方差分析,两两比较采用 Dunnett *t* 检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

CCD 大鼠在足底注射 α , β -meATP 后, PLTPM 显示缩足反应的最高点出现在注射后第一个 2 min,在注射后 10 min 时反应几乎消失;注射后第一个 2 min, NS 组大鼠 PLTPM 峰值明显高于 PBN 100 mg/kg 组($P < 0.05$),同时 2 倍高于 PBN 30 mg/kg 组($P < 0.05$),与 PBN 10 mg/kg 组差异无统计学意义($P > 0.05$);在注射后第二个和第三个 2 min 时间段, PBN 100 mg/kg 组与 NS 组相比,差异仍然具有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

3 讨论

临床上很多患者的腰背痛是由于突出的椎间盘压迫到脊神经根而引起的。利用不锈钢钢丝穿过椎间孔来固定压迫背根神经节(即 CCD 模型),模仿临床椎间盘突出患者的发病机制,可引起躯体感觉神经元兴奋性升高、自发性动作电位生成增多,导致痛

觉过敏、自发痛或机械性痛觉异常。

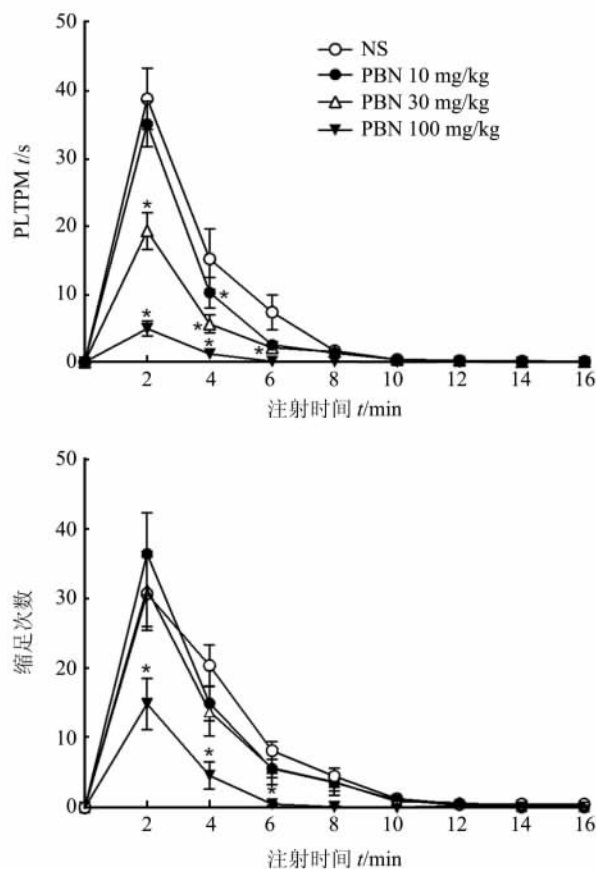


图1 腹腔注射 PBN 对 α , β -meATP 诱发痛行为的影响

PBN: 苯亚甲基叔丁基氮氧化物; PLTPM: 综合悬足时间。
* $P < 0.05$ 与 NS 组比较。 $n = 10$, $\bar{x} \pm s$

近年来研究表明, ROS 在神经病理性疼痛中发挥重要作用。脊神经结扎、辣椒素注射、吗啡耐受^[2]和化疗药物^[3-4]引起的机械性痛觉异常等多种动物疼痛模型中, ROS 生成量明显增多, 与热痛觉过敏程度一致, 而抗氧化剂如 PBN、TEMPOL、DMPO 以及维生素 E 等, 均能缓解机械性痛觉过敏程度。病理状态下 ROS 生成量增加, 不可逆地损害神经元细胞膜, 造成脂质过磷酸化, 改变细胞兴奋性^[5], 最后诱发疼痛相关受体活性增强, 促使伤害性刺激的传入, 促使机体产生痛觉过敏。例如, ROS 触发宽动力范围神经元释放兴奋性递质谷氨酸, 继而激活离子型谷氨酸受体 N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartate, NMDA), ROS 也可以直接通过 PKA 和 PKC 途径激活 NMDA 受体^[6-7]; 增加瞬时受体电位香草酸受体 1 (TRPV1 受体) 活性^[8], 或调控 TRPV1 受体释放多种致炎因子^[9-10]; 除此之外氧化应激产物还可刺激瞬间受体电位离子通道类 A 成员 1 受体

(TRPA1) 提高神经元兴奋性^[11]。

PBN 是一种非特异性 ROS 清除剂, 文献报道经鞘内、侧脑室注射通过抑制中枢敏化环节^[12], 经腹腔注射抑制外周敏化达到镇痛效果^[13], 这一系列作用减弱了痛觉的中枢敏感化和外周伤害性刺激的传递扩散, 使原发痛及继发痛在一定程度上得以缓解。本研究中 CCD 手术后第 7 天已达模型稳定期, 腹腔注射 PBN 不会对实验大鼠产生镇静作用, 与既往文献报道一致^[6, 14]。前期研究中我们曾选用 100 mg/kg 和 30 mg/kg 两种剂量来探索 PBN 的镇痛效果, 观察压迫侧后足 PWMT 在给药后 24 h 各时间点的变化, 证实 100 mg/kg PBN 注射后大鼠压迫侧后足 PWMT 明显升高, 结合低剂量组数据表明, PBN 在给药后 0.5 h 镇痛效果最佳, 作用时间至少为 2 h^[15]。在大鼠患侧足底皮下注射 50 nmol 的外源性 α , β -meATP 能够引起假手术组和 CCD 组大鼠 PLTPM 值均出现增加, 但 CCD 组显著高于假手术组, 并且其 PLTPM 的峰值大约是假手术组的两倍。因此本实验将足底注射的 α , β -meATP 固定为 50 nmol, 足底注射 α , β -meATP 前 0.5 h 通过腹腔给予不同剂量 PBN 进行预干预, 在体行为学发现高剂量 PBN (100 mg/kg) 能明显抑制由外周足底注射 P2X3 受体特异性激动剂 α , β -meATP 诱发的自发痛程度。

P2X3 受体是嘌呤能受体家族一员, 属于配体门控非选择性阳离子通道受体, 选择性表达在伤害性信息传递相关的初级传入感觉神经元的胞体、中枢端和外周端, 被 ATP 等激活后产生去极化动作电位引起疼痛, 参与多种急慢性疼痛的发生机制, 我们前期研究证实在 CCD 模型大鼠背根神经节神经元上 P2X3 受体数量表达上调、功能增强^[1], 而胞体中 P2X3 受体上调可导致其两端的神经突触表面上的 P2X3 受体表达的增加, 结果造成外周神经末梢 P2X3 受体表达增加, 从而增强机体对外源性 α , β -meATP 引起的痛反应, 目前国内外的实验结果表明 PGE2、NGF、SP 和谷氨酸都能增强 P2X3 受体激动剂激发的内向电流, 上调 P2X3 受体功能^[16]。但关于 ROS 是否参与 P2X3 受体的痛信号过程, 目前尚无文献报道。

本研究结果显示, 在背根神经节受到慢性压迫的大鼠, 足底给予 P2X3 受体激动剂 α , β -meATP 可

诱发出显著的自发性疼痛,提示可能存在 P2X3 受体介导的痛信号增强,而提前全身应用 ROS 清除剂 PBN,可剂量依赖性地减弱这一痛信号。因此推测 ROS 可能作为信号分子参与了 P2X3 受体介导的痛觉信息的传递。但本研究仅为动物在体实验,下一步我们将在细胞学层面上深入探讨 ROS 与 P2X3 痛信号通路之间的关系。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Xiang Z, Xiong Y, Yan N, Li X, Mao Y, Ni X, et al. Functional up-regulation of P2X3 receptors in the chronically compressed dorsal root ganglion [J]. *Pain*, 2008, 140:23-34.
- [2] Doyle T, Bryant L, Muscoli C, Cuzzocrea S, Esposito E, Chen Z, et al. Spinal NADPH oxidase is a source of superoxide in the development of morphine-induced hyperalgesia and antinociceptive tolerance [J]. *Neurosci Lett*, 2010, 483:85-89.
- [3] Fidanboylyu M, Griffiths L A, Flatters S J. Global inhibition of reactive oxygen species (ROS) inhibits paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e25212.
- [4] Kim H K, Zhang Y P, Gwak Y S, Abdi S. Phenyl N-tert-butyl nitrone, a free radical scavenger, reduces mechanical allodynia in chemotherapy-induced neuropathic pain in rats [J]. *Anesthesiology*, 2010, 112:432-439.
- [5] Gwak Y S, Hulsebosch C E. Neuronal hyperexcitability: a substrate for central neuropathic pain after spinal cord injury [J]. *Curr Pain Headache Rep*, 2011, 15:215-222.
- [6] Gao X, Kim H K, Chung J M, Chung K. Reactive oxygen species (ROS) are involved in enhancement of NMDA-receptor phosphorylation in animal models of pain [J]. *Pain*, 2007, 131:262-271.
- [7] 刘瀛瀛, 王锦琰. 动物痛模型中活性氧(ROS)参与促进 NMDA 受体磷酸化过程 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2008, 14:235-235.
- [8] Ibi M, Matsuno K, Shiba D, Katsuyama M, Iwata K, Kakehi T, et al. Reactive oxygen species derived from NOX1/NADPH oxidase enhance inflammatory pain [J]. *J Neurosci*, 2008, 28:9486-9494.
- [9] Ma F, Zhang L, Westlund K N. Reactive oxygen species mediate TNFR1 increase after TRPV1 activation in mouse DRG neurons [J]. *Mol Pain*, 2009, 5:531.
- [10] Westlund K N, Kochukov M Y, Lu Y, McNearney T A. Impact of central and peripheral TRPV1 and ROS levels on proinflammatory mediators and nociceptive behavior [J]. *Mol Pain*, 2010, 6:46.
- [11] Trevisani M, Siemens J, Materazzi S, Bautista D M, Nassini R, Campi B, et al. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104:13519-13524.
- [12] Lee I, Kim H K, Kim J H, Chung K, Chung J M. The role of reactive oxygen species in capsaicin-induced mechanical hyperalgesia and in the activities of dorsal horn neurons [J]. *Pain*, 2007, 133:9-17.
- [13] Barriere D A, Rieusset J, Chanteranne D, Busserolles J, Chauvin M A, Chapuis L, et al. Paclitaxel therapy potentiates cold hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetic rats through enhanced mitochondrial reactive oxygen species production and TRPA1 sensitization [J]. *Pain*, 2012, 153:553-561.
- [14] Gwak Y S, Hassler S E, Hulsebosch C E. Reactive oxygen species contribute to neuropathic pain and locomotor dysfunction via activation of CamK II in remote segments following spinal cord contusion injury in rats [J]. *Pain*, 2013, 154:1699-1708.
- [15] 吕虎, 陈辉, 王琦, 许华, 孙继虎, 熊源长. 氧自由基清除剂对背根神经节慢性压迫模型大鼠机械痛阈值的影响 [J]. *上海医学*, 2013, 36:536-540.
- [16] Ambalavanar R, Dessem D. Emerging peripheral receptor targets for deep-tissue craniofacial pain therapies [J]. *J Dent Res*, 2009, 88:201-211.

[本文编辑] 徐佳