

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00095

雌激素对直肠炎大鼠背根神经节 P2X₃ 受体 mRNA 表达的影响

Effect of estrogen on P2X₃ receptor mRNA expression in dorsal root ganglion of colitis rats

余立华, 樊娟, 马蓓*

第二军医大学基础部生理学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的:**观察结直肠三硝基苯磺酸(TNBS)致炎条件下,改变大鼠体内雌激素和孕激素水平对背根神经节(DRG)中 P2X₃ 和 P2X₂ mRNA 表达的影响。**方法:**SD 大鼠分为 4 组:假手术组、去卵巢组、去卵巢加雌激素替代组、去卵巢加雌孕激素替代组,每组手术完成后饲养 5 周,再行 TNBS 致炎,5~7 d 后用于实验。实时定量 RT-PCR 法检测各组 P2X₃ 和 P2X₂ mRNA 的表达。**结果:**去卵巢组大鼠 DRG 中 P2X₃ mRNA 表达明显低于假手术组,差异有统计学意义(1.08 ± 0.35 vs 1.66 ± 0.66 , $P < 0.05$, $n = 4$),雌激素替代组有明显上升(2.06 ± 0.58),明显高于去卵巢组($P < 0.01$, $n = 5$),而雌孕激素同时替代组明显低于单独添加雌激素组(2.06 ± 0.58 vs 0.87 ± 0.28 , $P < 0.01$, $n = 5$)。各组大鼠 DRG 中 P2X₂ mRNA 表达无统计学差异。**结论:**结直肠 TNBS 致炎条件下,雌激素可促进大鼠 DRG 中 P2X₃ mRNA 表达,但对 P2X₂ mRNA 无明显影响;孕激素的作用可能与雌激素正好相反。炎性条件下,雌孕激素可能通过影响 P2X₃ 受体的表达发挥调节炎症性痛作用。

[关键词] 雌激素;孕激素;P2X₃受体;结肠炎;炎症性痛

[中图分类号] R 339.1 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2009)01-0095-03

ATP 不仅是一种能量物质,而且是细胞间信息传递物质,几乎存在于全身各个器官系统,参与机体的多种功能^[1]。ATP 受体包括 P2X 和 P2Y 受体,前者为配基门控阳离子通道受体,包括 P2X₁₋₇ 亚型;后者为 G 蛋白偶联受体,包括 P2Y₁₋₇ 亚型^[2]。其中, P2X_{2/3} 异聚体和 P2X₃ 同聚体在外周疼痛的形成中起到重要作用^[3]。ATP 作为炎症递质,可以与 ATP 受体结合,参与炎症痛觉的信号转导与传递^[4],在 P2X₂ 和 P2X₃ 基因敲除小鼠,炎症性躯体痛觉明显低于对照小鼠,表明 P2X₂ 和 P2X₃ 亚基组合成的受体参与了炎症性痛觉的信号转导和传递^[5]。

疼痛的性别差异近年来引起较多的关注。流行病学资料^[6]显示,女性相对于男性而言,痛阈低,疼痛发生频率高,对疼痛刺激耐受差,需要使用更多的镇痛药物。我们前期研究^[7]也发现卵巢激素可能抑制大鼠外周机械性痛敏的形成。临床观察也发现,女性比男性更容易患肠激惹综合征、间质性膀胱炎等病症,提示雌激素与炎症痛的产生可能有着内在的联系。但雌激素与 P2X 受体介导的炎症性痛觉之间有什么样的联系尚不清楚。因此,本研究以三硝基苯磺酸(TNBS)灌注大鼠直肠,制备结肠炎大鼠模型;应用实时定量 RT-PCR 法观察, TNBS 致炎条件下,不同雌孕激素水平对大鼠体内背根神经节(DRG)细胞上 P2X₃ 和 P2X₂ mRNA 表达的影响,进一步探讨炎症条件下雌孕激素对 ATP 介导的内脏感觉信号转导的调节作用。

1 材料和方法

1.1 动物分组及处理 雌性大鼠来源于上海西普儿-毕凯公司,体质量 275 g,随机分为 4 组:假手术组、去卵巢组、去卵巢加雌激素替代组、去卵巢加雌孕激素替代组,每组 10 只。假手术组:大鼠乙醚麻醉,仰卧位,剃毛,打开腹腔,沿下腹部中央侧脂肪剪掉一小块,搅动肠道,缝合腹腔及皮肤。术后 1 周,每日皮下注射生理盐水 0.4 ml,正常饲养,持续 5 周。去卵巢组大鼠:大鼠乙醚麻醉,仰卧位,剃毛,打开腹腔,沿下腹部中央侧脂肪分别向上寻找卵巢,找到后分别在上下侧结扎、剪离卵巢,缝合腹腔及皮肤。术后 1 周,每日皮下注射生理盐水 0.4 ml,正常饲养,持续 5 周。去卵巢加雌激素替代组大鼠:去卵巢大鼠饲养 1 周后,每日皮下注射雌激素 30 μg/kg,溶液体积 0.4 ml,持续 5 周。正常饲养。去卵巢加雌孕激素替代组:去卵巢大鼠饲养 1 周后,每日皮下注射雌激素 30 μg/kg,孕激素 50 μg/kg,溶液体积 0.4 ml,持续 5 周。正常饲养。

所有大鼠饲养 6 周前 5~7 d 行大鼠直肠致炎,方法如下:乙醚麻醉,俯卧位,经肛门插入导管约 6~8 cm,缓缓注入 30% TNBS(溶于乙醇,按 80 mg/kg 体质量),5~7 d 后用于实验。

1.2 实时定量 RT-PCR 检测 P2X₃ 和 P2X₂ mRNA 表达 P2X₃ 基因正义引物:5'-TGG CGT TCT GGG TAT TAA GAT CGG-3';反义引物 5'-CAG TGG CCT GGT CAC TGG CGA-3',反应条件为:95℃, 2 min, 95℃, 25 s; 65℃, 25 s;

[收稿日期] 2008-06-30 **[接受日期]** 2008-07-16

[基金项目] 国家自然科学基金(30570597)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30570597)。

[作者简介] 余立华, 硕士, 助理实验师。E-mail: yu_ljhua@126.com

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 021-81870309-609, E-mail: mabei2004@yahoo.com.cn

72℃, 25 s。P2X₂ 基因正义引物: 5'-GAA TCA GAG TGC AAC CCC AA-3'; 反义引物: 5'-TCA CAG GCC ATC TAC TTG AG-3', 反应条件为: 95℃, 2 min, 95℃, 25 s; 58℃, 25 s; 72℃, 25 s。为标准化 PCR 反应中各样本目的基因 cDNA 含量, 减少各样本间因个体差异对结果分析的影响, 同时对各样本的管家基因 β-actin 进行了扩增, 正义引物为: 5'-ATG GTG GGT ATG GGT CAG AAG G-3'; 反义引物为: 5'-TGG CTG GGG TGT TGA AGG TC-3', 反应条件为: 95℃, 2 min; 95℃, 25 s; 63℃, 25 s; 72℃, 25 s。

1.3 统计学处理 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据分析和作图使用 SPSS 11.0 软件, 参数分析采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 进行统计分析, 显著性水平为 0.05。

2 结果

2.1 炎性大鼠 DRG 中 P2X₃ mRNA 的表达 结果显示, 与假手术组相比, 去卵巢后 DRG 中 P2X₃ mRNA 明显下降 (1.66 ± 0.66 vs 1.08 ± 0.35 , $P < 0.05$, $n = 4$), 而雌激素替代以后 P2X₃ mRNA 明显上升 (2.06 ± 0.58), 与去卵巢组比较有统计学差异 ($P < 0.01$, $n = 5$)。雌孕激素同时替代组与单独添加雌激素组也有统计学差异 (2.06 ± 0.58 vs 0.87 ± 0.28 , $P < 0.01$, $n = 5$)。具体见图 1。

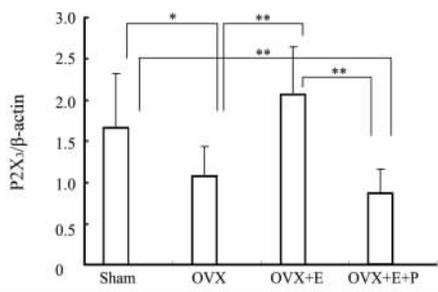


图 1 各组大鼠 DRG 中 P2X₃ mRNA 的表达

Sham: 假手术组; OVX: 去卵巢组; OVX+E: 去卵巢组加雌激素替代组; OVX+E+P: 去卵巢组加雌孕激素替代组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 炎性大鼠 DRG 中 P2X₂ mRNA 的表达 假手术组、去卵巢组、去卵巢加雌激素替代组、去卵巢加雌孕激素替代组大鼠 DRG 中 P2X₂ mRNA 的表达分别为 1.14 ± 0.19 、 1.02 ± 0.38 、 1.21 ± 0.18 、 1.01 ± 0.23 , 组间均无统计学差异 (图 2)。

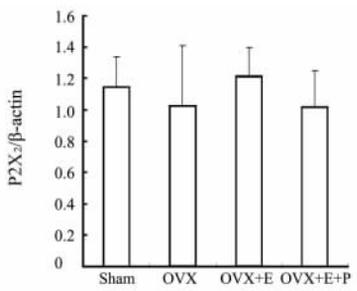


图 2 各组大鼠 DRG 中 P2X₂ mRNA 的表达

Sham: 假手术组; OVX: 去卵巢组; OVX+E: 去卵巢组加雌激素替代组; OVX+E+P: 去卵巢组加雌孕激素替代组

3 讨论

TNBS 是一种有机弱酸, 属化学性半抗原, 溶于乙醇后与肠道组织蛋白结合, 形成完全抗原, 引起一系列免疫反应, 导致肠道的炎症^[8]。虽然 TNBS 诱发肠道炎症的确切机制尚未阐明, 但由于其诱导的大鼠肠道炎症模型具有简便易行、易于复制、与人类肠道激惹综合征 (IBS) 相似等优点, 因而是目前制备 IBS 模型的首选致炎方法。因此, 本实验采用 TNBS 进行大鼠结直肠致炎。

很多内脏传入神经都有感知伤害刺激的能力^[9], 内脏感觉信号传导过程中信号的放大或改变就会引起痛觉过敏。由于传入神经致敏, 结肠对刺激物的敏感性增高, 微弱的刺激在健康人不能引起明显反应, 却使炎症患者的肠管剧烈收缩而引起腹痛和排便异常。在 TNBS 诱发的大鼠炎症模型上, 结直肠传入神经的基础放电频率增加, 结肠充盈所引起的传入神经活动也较对照动物显著增加; 同时结肠充盈引起的 ATP 释放增加, 背根神经节 (L₁、L₂、S₁、S₂) P2X₃ 表达增加, P2X 受体拮抗剂如 PPADS 和 TNP-ATP 可明显抑制结肠充盈所引起的传入神经活动^[10], 提示 P2X₃ 和 P2X_{2/3} 受体参与了内脏炎症的伤害性感觉传导。在其他致炎模型中, 如弗氏佐剂 (CFA) 致炎的大鼠, 给予 P2X₃ 反义寡核苷酸^[11] 可以减轻疼痛过敏, 给予 P2X₃ 和 P2X_{2/3} 的阻断剂 TNP-ATP^[12]、A-317491^[13] 而非 IP₃I 也会有相似结果。CFA 致炎后, 神经元上 P2X₂ 和 P2X₃ 受体表达都上调, 也证明了 P2X 受体在炎症反应中起重要作用^[14]。当外周组织处于炎症时, 活化的 P2X 受体会继而导致 ERK 的激活^[12]。当大鼠后肢处于炎症反应时, 给予机械刺激, ERK 的激活水平显著增强, 而且它的增强需要 P2X 受体的激活, 可能与外周内源性 ATP 释放有关^[15]。这些结果都提示, 外周炎症导致了神经元上 P2X 受体在数量和功能上的明显上调, 而内源性 ATP 的释放增强了 P2X 受体的反应, 最终在内脏机械性感觉信号转导和内脏感觉过敏中起到重要的作用。

IBS 患者女性居多, 发病率随年龄增大而递减^[16], 绝经后妇女接受雌激素替代疗法发病率增高^[17], 结合型雌激素 (倍美力) 可特异性地引起结肠炎^[18]。这些结果提示雌激素在女性 IBS 患者中有重要意义。但也有报道结肠炎早期 (2 h), 雌激素可以通过降低 IL-β 和 TNF-α 的水平, 进而抑制 MIF 水平, 从而抑制结肠对炎症的敏感性^[19], 提示雌激素对肠道炎症具有保护作用。雌激素影响内脏炎症痛上存在的较大差异, 可能与采用了不同的实验性炎症模型有关^[20], 如有报道在二硝基苯磺酸 (DNBS) 和丁二酸二辛酯磺酸 (DSS) 诱导的结肠炎模型上, 17β-雌二醇分别起到了抗炎和促炎的作用^[21]。本实验在炎症条件下, 对不同处理组大鼠的 DRG 中 P2X₃ mRNA 含量进行比较, 结果表明 OVX 组大鼠 DRG 中 P2X₃ mRNA 含量较对照组有显著降低, 而在给予雌激素替代后又恢复, 提示炎症条件下, 大鼠体内雌激素浓度是维持 P2X₃ mRNA 含量的重要因素, 并且 P2X₃ 受体可能与雌激素促进肠道对炎症的敏感性有关。

卵巢分泌的另一种激素孕激素在炎症反应中可能也起着重要作用。孕激素可以减少促炎症因子的释放^[22-23], 从而

能减低炎症导致的疼痛过敏^[24],起到抗炎效果。本实验中,与单独给予雌激素相比,同时注射孕激素和雌激素 P2X₃ mRNA 含量显著降低,提示孕激素对于 P2X₃ mRNA 的调节作用可能与雌激素相反,即孕激素(主要为孕酮)对炎症条件下大鼠 DRG 中 P2X₃ mRNA 的表达起抑制作用。Crowley 等^[25]也发现孕激素可以逆转或阻断雌激素的部分作用,支持我们的结果。本实验中还发现同时给予雌孕激素组和假手术组也有统计学差异,这可能是由于给予雌激素和孕激素的浓度均高于生理浓度所致,也可能与卵巢中其他一些激素(如抑制素)的作用有关,具体机制尚待进一步研究。本实验中由于采用了长期改变大鼠体内雌孕激素浓度的方法来研究 DRG 中 P2X₃ mRNA 的表达,因而还不能排除在整个实验过程中下丘脑-垂体-靶腺(H-P-A)轴的作用,其中包括垂体促性腺激素和下丘脑促性腺激素释放激素的可能作用,其中的机制尚需进一步研究。

此外,本实验还发现各处理组中 DRG P2X₂ mRNA 的表达都没有显著性差异,提示在炎症条件下雌激素和孕激素水平的改变对 P2X₂ mRNA 没有明显的调节作用,其对炎症条件下内脏伤害性感觉信号传导的调节作用可能与 P2X₂ 无直接的关系。

综上所述,我们的结果表明,在结直肠 TNBS 致炎时,雌激素促进大鼠 P2X₃ mRNA 的表达,但对 P2X₂ mRNA 无明显影响;孕激素的作用可能与雌激素正好相反。提示炎症条件下雌孕激素可能通过调节 P2X₃ 受体的表达影响炎性痛。

[参考文献]

- [1] 姚 泰. 生理学[M]. 6版. 北京:人民卫生出版社,2006:290.
- [2] Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission[J]. *Physiol Rev*,2007,87:659-797.
- [3] Donnelly-Roberts D, McGaraughty S, Shieh C C, Honore P, Jarvis M F. Painful purinergic receptors[J]. *J Pharmacol Exp Ther*,2008,324:409-415.
- [4] Burnstock G. The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules[J]. *Neuropharmacology*,1997,36:1127-1139.
- [5] Burnstock G. Purine-mediated signalling in pain and visceral perception[J]. *Trends Pharmacol Sci*,2001,22:182-188.
- [6] Riley J L 3rd, Robinson M E, Wise E A, Myers C D, Fillingim R B. Sex differences in the perception of noxious experimental stimuli: a meta-analysis[J]. *Pain*,1998,74(2-3):181-187.
- [7] 樊 娟, 韩 红, 余立华, 徐明娟, 马 蓓, 倪 鑫. 去性腺大鼠外周痛阈的改变[J]. *第二军医大学学报*,2008,29:353-356.
- [8] Günel O, Oktar B K, Özçinar E, Sungur M, Arbak S, Yeğen B. Estradiol treatment ameliorates acetic acid-induced gastric and colonic injuries in rats[J]. *Inflammation*,2003,27:351-359.
- [9] Delvaux M, Louvel D, Lagier E, Scherrer B, Abitbol J L, Frexinos J. The kappa agonist fedotozine relieves hypersensitivity to colonic distention in patients with irritable bowel syndrome[J]. *Gastroenterology*,1999,116:38-45.
- [10] Wynn G, Ma B, Ruan H Z, Burnstock G. Purinergic component of mechanosensory transduction is increased in a rat model of colitis[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*,2004,287:G647-G657.
- [11] Honore P, Kage K, Mikusa J, Watt A T, Johnston J F, Wyatt J R, et al. Analgesic profile of intrathecal P2X₃ antisense oligonucleotide treatment in chronic inflammatory and neuropathic pain states in rats[J]. *Pain*,2002,99(1-2):11-19.
- [12] Dai Y, Fukuoka T, Wang H, Yamanaka H, Obata K, Tokunaga A, et al. Contribution of sensitized P2X receptors in inflamed tissue to the mechanical hypersensitivity revealed by phosphorylated ERK in DRG neurons[J]. *Pain*,2004,108:258-266.
- [13] Wu G, Whiteside G T, Lee G, Nolan S, Niosi M, Pearson M S, et al. A-317491, a selective P2X₃/P2X_{2/3} receptor antagonist, reverses inflammatory mechanical hyperalgesia through action at peripheral receptors in rats[J]. *Eur J Pharmacol*,2004,504(1-2):45-53.
- [14] Xu G Y, Huang L Y. Peripheral inflammation sensitizes P2X receptor-mediated responses in rat dorsal root ganglion neurons[J]. *J Neurosci*,2002,22:93-102.
- [15] Koizumi S, Fujishita K, Inoue K, Shigemoto-Mogami Y, Tsuda M, Inoue K. Ca²⁺ waves in keratinocytes are transmitted to sensory neurons: the involvement of extracellular ATP and P2Y₂ receptor activation[J]. *Biochem J*,2004,380(Pt 2):329-338.
- [16] Saito Y A, Schoenfeld P, Locke G R 3rd. The epidemiology of irritable bowel syndrome in North America; a systematic review[J]. *Am J Gastroenterol*,2002,97:1910-1915.
- [17] Ruigómez A, García Rodríguez L A, Johansson S, Wallander M A. Is hormone replacement therapy associated with an increased risk of irritable bowel syndrome[J]? *Maturitas*,2003,44:133-140.
- [18] Deana D G, Dean P J. Reversible ischemic colitis in young women. Association with oral contraceptive use[J]. *Am J Surg Pathol*,1995,19:454-462.
- [19] Houdeau E, Moriez R, Leveque M, Salvador-Cartier C, Waget A, Leng L, et al. Sex steroid regulation of macrophage migration inhibitory factor in normal and inflamed colon in the female rat[J]. *Gastroenterology*,2007,132:982-993.
- [20] Verd E F, Deng Y, Bercik P, Collins S M. Modulatory effects of estrogen in two murine models of experimental colitis[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*,2002,283:G27-G36.
- [21] Leventhal L, Brandt M R, Cummons T A, Piesla M J, Rogers K E, Harris H A. An estrogen receptor-beta agonist is active in models of inflammatory and chemical-induced pain[J]. *Eur J Pharmacol*,2006,553(1-3):146-148.
- [22] He J, Evans C O, Hoffman S W, Oyesiku N M, Stein D G. Progesterone and allopregnanolone reduce inflammatory cytokines after traumatic brain injury[J]. *Exp Neurol*,2004,189:404-412.
- [23] Kuebler J F, Yokoyama Y, Jarrar D, Toth B, Rue L W 3rd, Bland K I, et al. Administration of progesterone after trauma and hemorrhagic shock prevents hepatocellular injury[J]. *Arch Surg*,2003,138:727-734.
- [24] Uchida H, Mizuno K, Yoshida A, Ueda H. Neurosteroid-induced hyperalgesia through a histamine release is inhibited by progesterone and p,p'-DDE, an endocrine disrupting chemical[J]. *Neurochem Int*,2003,42:401-407.
- [25] Crowley W R, Jacobs R, Volpe J, Rodriguez-Sierra J F, Komisaruk B R. Analgesic effect of vaginal stimulation in rats; modulation by graded stimulus intensity and hormones[J]. *Physiol Behav*,1976,16:483-488.