

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00254

· 论 著 ·

去卵巢大鼠雌激素替代后背根神经节 P2Y₁ 受体表达增加

杜 狄, 王立鹏, 马 蓓*

第二军医大学基础部生理学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 考察痛觉敏感性与体内雌孕激素水平的可能关系。**方法** 将大鼠分为去卵巢组(8只)和去卵巢后雌激素替代组(8只),去卵巢组通过去卵巢手术降低大鼠体内卵巢激素水平,去卵巢后雌激素替代组在去卵巢手术后1周给予外源性雌激素替代。分别在两组大鼠足底注射 P2Y₁ 选择性激动剂 2-MeSADP,通过行为学实验观察对大鼠足底机械痛阈的影响,并通过实时定量 PCR 研究 2 组大鼠背根神经节(DRG)中 P2Y₁ 受体 mRNA 表达的差别。**结果** 与去卵巢组大鼠相比,雌激素替代组大鼠机械痛阈增高($P=0.014$);足底注射 P2Y₁ 选择性激动剂 2-MeSADP 后,去卵巢组大鼠在注射药物前后痛阈无统计学差异,而雌激素替代组大鼠出现痛觉增敏。实时定量 PCR 结果表明雌激素替代组大鼠 DRG P2Y₁ 受体 mRNA 的表达高于去卵巢组大鼠($P<0.05$)。**结论** 雌激素可能通过促进 DRG 上 P2Y₁ 受体的表达从而影响外周机械痛阈。

[关键词] 卵巢切除术;雌激素替代疗法;脊神经节;P2Y₁ 受体;痛觉过敏

[中图分类号] R 339.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)03-0254-04

Up-regulation of P2Y₁ receptors in dorsal root ganglion of ovariectomized rats after estradiol replacement

DU Di, WANG Li-peng, MA Bei*

Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To study the possible relation of pain perception with estrogen in rats. **Methods** A total of 16 rats were equally divided into two groups: an ovariectomization group (OVX) and an ovariectomization plus E₂-treatment group (OVX+E₂). Animals in OVX group were ovariectomized to decrease the ovarian hormone level, and those in the OVX+E₂ group were treated with estrogen one week after ovariectomization. 2-MeSADP, a selective agonist of P2Y₁ receptor, was injected into the hindpaw of the rats in both groups. The mechanical pain thresholds were observed by behavioral tests, and the expression of P2Y₁ in the dorsal root ganglia were examined by RT-PCR in the two groups. **Results** The mechanical pain threshold of rats in OVX+E₂ group was significantly increased compared with that of rats in OVX group ($P=0.014$). After 2-MeSADP injection, the mechanical pain threshold of rats in OVX group underwent no significant change, and that of rats in OVX+E₂ group was deceased. RT-PCR result showed that P2Y₁ mRNA expression in the DRG in OVX+E₂ group was significantly increased compared with that in OVX group ($P<0.05$). **Conclusion** Our findings indicate that estrogen may influence the peripheral mechanical pain threshold by increasing the expression of P2Y₁ receptors in DRG.

[Key words] ovariectomy; estrogen replacement therapy; spinal ganglia; P2Y₁ receptor; hyperalgesia

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(3):254-257]

文献报道卵巢激素与疼痛的调节有关。如,女性的痛觉在月经周期中有波动,黄体期比卵泡期痛觉加重,而在月经期进一步加重^[1]。怀孕时,增高的雌激素和孕激素水平也同样能对抗伤害反应^[2-3]。动情前期的大鼠因有高浓度的雌激素和孕激素水平,和雌孕激素水平较低的动情间期大鼠相比,对热辐射的甩尾和舔足反应潜伏期延长^[4-5]。在去卵巢大鼠注射雌二醇或孕酮可以减少伤害性反应^[6]。注射雌二醇可以

增加动物对热刺激和阴道膨胀反应的潜伏期^[7]。这提示雌激素对痛觉的转导或传递有抑制作用。然而,另一些研究表明雌激素对痛觉的转导或传递有正向的调制作用。如女性比男性更容易患肠激惹综合征、间质性膀胱炎、偏头痛、颞下颌关节紊乱等疾病^[8-10],研究发现,啮齿类动物对伤害性刺激的反应也有显著的性别差异,雌性比雄性的反应更强烈^[11]。

ATP 作为细胞外信号分子,可以调节神经元之

[收稿日期] 2010-08-10 **[接受日期]** 2010-12-05

[基金项目] 第二军医大学本科生创新基金(ZD2010015)。Supported by Science Foundation for Undergraduates of Second Military Medical University(ZD2010015)。

[作者简介] 杜 狄,第二军医大学临床医学系 2007 级本科生。E-mail: dudi_007@yahoo.cn

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-81870980-603, E-mail: mabei2004@yahoo.com.cn

间的联系。ATP的效应是由门控型阳离子通道 P2X 和 G 蛋白偶联型受体 P2Y 介导的,近年来发现 P2Y₁受体的激活与痛觉的产生及调节有关^[12-13]。P2Y₁受体广泛表达于神经系统,在初级感觉神经节(DRG)的大、中、小各类神经元中均有表达^[14],提示其可能参与了外周感觉的转导和传递。有报道发现,细胞外的 ATP 可以通过激活 P2Y₁受体加强 VR1 的反应,由于 VR1 受体是伤害性感受的特异性靶点,提示 P2Y₁受体与外周感觉神经元末梢的疼痛信号的产生和调节有关^[15]。此外,在大鼠外周神经的轴突切断而致神经性疼痛的模型中,DRG 上 P2Y₁受体的表达显著上调,提示 P2Y₁受体在调节神经病理性疼痛方面也起作用^[16]。

因而,我们通过痛觉行为学实验,观察大鼠去卵巢组(OVX)和去卵巢后雌激素替代组(OVX+E₂)大鼠足底皮肤痛觉的差别,并对2组大鼠注射特异性的 P2Y₁激动剂,以及分离提取背根神经节进行实时定量反转录聚合酶链式反应(QT-RT-PCR)实验,进一步观察 P2Y₁受体是否参与了雌激素对大鼠疼痛的外周调节。

1 材料和方法

1.1 实验动物 Sprague-Dawley(SD)雌性大鼠购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。实验开始前动物饲养4周,动物每个笼子放3~4只,提供充足的水和食物。大鼠随机分为2组,去卵巢组和去卵巢后雌激素替代组,每组8只。

1.2 去卵巢大鼠模型制备 用戊巴比妥(35 mg/kg)腹腔注射进行麻醉。去卵巢手术采用双侧、皮肤切口到达腹腔。输卵管用4-0棉线结扎来固定卵巢,切除卵巢。确定腹腔内无出血后,按层关闭伤口。大鼠手术后没有出现并发症。

1.3 雌激素替代 去卵巢手术后1周,去卵巢后雌激素替代组大鼠每日皮下注射雌二醇(E₂,剂量30 μg/kg,溶解在0.1 ml 芝麻油中),去卵巢组去卵巢大鼠仅每日注射0.1 ml 芝麻油(Sigma)。5周后用于以下实验。

1.4 行为学实验 机械性痛阈的测定:采用弗莱毛(Von Frey Hair,英国伦敦大学自主神经科学研究所)测痛法。即将测试大鼠置于特制笼中,熟悉环境30 min后,以弗莱毛刺激大鼠后足部,以大鼠抬起后肢为反应阳性。弗莱毛的强度分别为4(0.079 4 g)、5(0.132 g)、6(0.219 g)、8(0.603 g)、10(1.66 g)、11(2.75 g)、12(4.57 g)、13(7.58 g)、14(12.6 g)、15(20.9 g)、16(34.7 g)、17(57.5 g)。从细到粗,逐个进行左右足部刺激,每一强度的弗莱毛刺激左脚和右脚

各10次,记录反应率(10次刺激中发生缩腿反应的次数,用百分数表示),根据公式拟合出强度-反应率曲线,并且计算反应率为50%时弗莱毛的强度(PWT₅₀)。拟合公式为: $Y=A/[1+(K/X)^n]$, A是最大反应值, K是PWT₅₀, nH为拟合系数。

向大鼠施用2种药物2-MeSADP(Sigma)以及生理盐水,间隔时间为1周,给大鼠充分的恢复时间。试验者试验前不被告知使用药物次序(双盲)。将2组大鼠置于笼中适应30 min后测基础痛阈,完成后向大鼠左足底皮下注射药物,测出20、40、60、80 min时大鼠PWT₅₀。

1.5 QT-RT-PCR检测DRG上P2Y₁受体的表达

1.5.1 RNA分离和cDNA的合成 分别从2组大鼠分离出DRG,其中的总RNA用RNeasy Mini Kit(QIAGEN; Clifton Hill, Australia)抽提。用紫外分光光度计确定纯度(D₂₆₀/D₂₈₀)。2 μg RNA于25 μl体系中[dNTP 1 mmol/L, RNase抑制剂16 U, MLV RTase 2 U, Oligo(Dt) primer 20 pmol]反转录为cDNA,反应条件72℃ 5 min, 4℃ 5 min, 42℃ 60 min, 72℃ 10 min, 4℃ 5 min。反转录产物于-20℃冰箱中保存。

1.5.2 实时定量PCR 用SYBR Green实现实时定量PCR的放大,在20 μl反应液中使用Roto-gene RG3000。溶液包括1.0 ml稀释RT-PCR产物, 0.25 μmol/L各自的配对引物和10 ml real-time PCR SYBR Green Master Mix。P2Y₁受体的引物对序列是: 5'-CGG TCC GGG TTC GTC CT-3' (正义链); 5'-TAG TAA AAC TGG AAG CCC GTC TTG-3' (反义链)序列从GenBank下载(GenBank号码是U42030); PCR条件:将反应体系加热到95℃,持续2 min;进行40次扩增,95℃下进行20 s; 65℃下进行25 s; 72℃下进行25 s。β-actin的引物对序列是: 5'-ATG GTG GGT ATG GGT CAG AAG G-3' (正义链); 5'-TGG CTG GGG TGT TGA AGG TC-3' (反义链)。β-actin(对照基因)的PCR条件是:将反应体系加热到95℃,持续2 min,进行40次扩增95℃下进行20 s; 58℃下进行25 s; 72℃下进行25 s。产物的特异性通过溶解曲线以及琼脂糖凝胶电泳检测。每个样本中mRNA的绝对水平用标准曲线来计算:连续稀释特殊的已知量样本,它们分别对应每一轮扩增的初始剂量值,从而描绘出标准曲线。

1.6 统计学处理 实验数据为计量资料结果,均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据分析使用SPSS 13.0软件,作图采用Origin8。OVX组和OVX+E₂组大鼠在雌二醇替代5周后机械痛阈比较以及在注射P2Y₁选择性激动剂

2-MeSADP 和生理盐水后 2 组大鼠机械痛阈值的比较中,采用 two-way ANOVA 以及 univariate 方法统计分析。在 QT-RT-PCR 结果统计中采用非配对 *t* 检验方法进行统计学处理。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 雌激素对外周机械痛的影响 结果如图 1 所示,OVX 组 PWT₅₀为(12.0 ± 1.5) g,OVX+E₂组 PWT₅₀为(20.8±4.7) g。OVX 组的机械痛阈值低于 OVE+E₂组的机械痛阈值($n=9, P=0.014$),E₂替代可以改变去卵巢大鼠的外周机械痛阈,使痛阈值增高。

2.2 P2Y₁受体在雌激素调节大鼠外周痛觉中的作用 结果见表 1。OVX 组大鼠足底分别皮下注射 2-MeSADP 及生理盐水后,机械痛阈没有统计学差异($n=8, P=5.08$)。而在 OVX+E₂组大鼠足底皮下分别注射这 2 种药物后,机械痛阈有统计学差异($n=6, P=0.021$),在 40min 时,注射 2-MeSADP

后 PWT₅₀为(3.48 ± 0.39) g,注射生理盐水后 PWT₅₀为(5.25 ± 0.43) g ($n=6, P=0.057$)。到 60 min 时,差异无统计学意义($n=6, P=0.203$)。

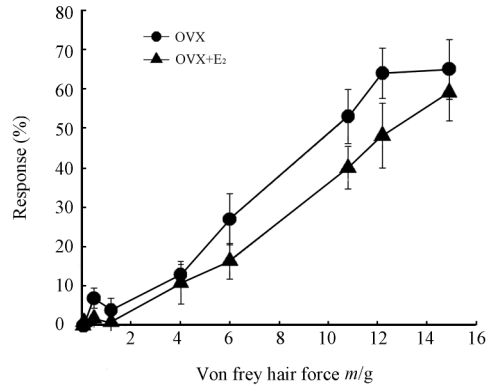


图 1 大鼠在雌二醇替代 5 周后机械痛阈比较
Fig 1 Mechanical pain threshold comparison between OVX group and OVX+E₂ group 5 weeks after E₂-treatment
 $n=9, \bar{x} \pm s$

表 1 OVX 和 OVX+E₂ 组大鼠足底注射 2-MeSADP 与生理盐水后机械痛阈(50%缩腿阈值)比较

Tab 1 Mechanical pain threshold (PWT₅₀) comparison after injection of 2-MeSADP or saline into hindpaw of OVX rats
(m/g, $\bar{x} \pm s$)

Time after injection t/min	OVX (n=8)		OVX+E ₂ (n=6)	
	2-MeSADP	Saline	2-MeSADP	Saline
Before injection	3.94 ± 0.50	4.72 ± 0.46	6.09 ± 0.48	6.59 ± 0.62
20	3.31 ± 0.20	3.91 ± 0.62	3.94 ± 0.44	5.23 ± 0.55
40	3.10 ± 0.55	3.68 ± 0.41	3.48 ± 0.39*	5.25 ± 0.43
60	2.52 ± 0.63	3.12 ± 0.38	3.76 ± 0.28	4.94 ± 0.42
80	2.75 ± 0.22	3.67 ± 0.50	3.55 ± 0.35	4.87 ± 0.65

* $P < 0.05$ vs saline group of OVX+E₂ group

2.3 DRG 上 P2Y₁受体的表达 结果表明,与去卵巢大鼠比较,雌激素替代组大鼠 DRG 中 P2Y₁ mRNA 表达增高(图 2, $P < 0.05$)。结果提示雌二醇可以促进 DRG 上 P2Y₁受体的表达。

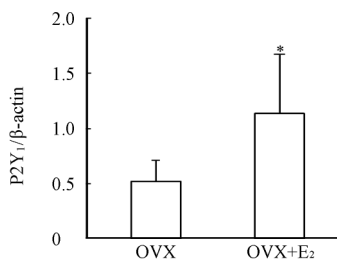


图 2 DRG 上 P2Y₁受体的表达
Fig 2 P2Y₁ mRNA expression in DRG

* $P < 0.05$ vs OVX group; $n=5, \bar{x} \pm s$

3 讨论

我们的结果显示,去卵巢大鼠雌激素替代后外周

机械痛阈增高,提示雌激素在维持外周机械痛阈敏感性方面起到重要作用。Stoffel 等^[17]的研究也表明,OVX 大鼠的伤害性痛觉阈值比假手术对照组低,雌二醇(低或高浓度)给药后疼痛阈值相比 OVX 组显著升高。Sanoja 等^[18]研究发现,小鼠去卵巢后腹部、后肢(不包括前肢)及远端尾部出现了机械性痛觉增敏和内脏感觉增敏,雌激素替代后痛觉增敏消失。此结果提示雌激素的调节作用可能局限在腰骶段脊髓或抵达该区域的初级传入神经元或其末梢。

P2 受体属于嘌呤受体的一种,广泛分布于全身各组织和系统中,根据其分子结构和信号转导机制的不同分为 P2X 和 P2Y 受体,中枢神经系统神经元中表达有对 ATP 敏感的 P2X 受体(配体门控离子通道)和 P2Y 受体(G 蛋白偶联受体)^[13]。与 P2X 受体介导轴突上对于 ATP 的快速反应相反,P2Y 受体不仅介导由于非突触释放的 ATP 引起的膜电位的缓慢变化,还介导与其他递质的受体的相互作用^[21]。已有研

究发现 P2Y₁受体与痛觉存在一定联系, P2Y₁mRNA 集中表达于 DRG 大神经元上, 释放到细胞外的 ATP 会激活 P2Y₁受体, 并参与外周轻触觉(light touch)的产生^[14]。在切除大鼠外周神经轴突引起的神经性疼痛的动物模型上发现, DRG 上 P2Y₁受体表达上调, 提示 P2Y₁受体可能参与神经性疼痛的形成^[16]。除此之外, P2Y₁受体的选择性激动剂 ADP-β-S 能抑制大鼠脊髓中 C 神经纤维介导的多突触的兴奋性突触后电位, 使大鼠甩尾实验的伤害性疼痛阈值升高。这些结果进一步证实, P2Y₁受体参与从感觉神经中枢末梢到脊髓神经元的兴奋性突触的传导^[22], 提示 P2Y₁受体在疼痛调节中发挥重要作用。

我们的实验发现, 与生理盐水对比, OVX 组大鼠注射 2-MeSADP 后外周机械痛阈无统计学差异; 而 OVX+E₂ 组大鼠注射 2-MeSADP 后外周机械痛阈下降。结果提示, 雌激素替代后 P2Y₁的作用增强。分子生物学结果进一步证实, 与 OVX 组大鼠相比, 去卵巢后雌激素替代的大鼠背根神经节上 P2Y₁ mRNA 明显上调, 提示体内雌激素水平可以影响外周背根神经节中 P2Y₁受体的表达, 表明雌激素调节疼痛可能与 P2Y₁受体的表达或功能改变有关。

以往的研究发现, DRG 神经元上表达 P2Y₁受体^[23-24], 提示雌激素作用的靶点可能是 DRG 神经元上的 P2Y₁受体。此外, 有很多报道神经胶质细胞也可表达 P2Y₁受体, 并且体外培养的大鼠脊髓背角星形胶质细胞大多表达 P2Y₁受体; P2Y 受体激动剂 ATP、ADP、ADP-βs 剂量依赖性促进星形胶质细胞 [Ca²⁺] 升高^[25], 我们尚不能排除背根神经节上神经胶质细胞中 P2Y₁受体的表达及参与痛觉行为的调节, 但根据注射 P2Y₁受体选择性激动剂 2-MeSADP 后 2 组大鼠之间的差异可以推测, DRG 中表达上调的 P2Y₁受体主要来源于神经元上的变化, 而且这种变化影响 DRG 神经元的外周端, 参与了雌激素替代后外周机械痛阈的改变。

[参 考 文 献]

[1] Riley J L 3rd, Robinson M E, Wise E A, Price D D. A meta-analytic review of pain perception across the menstrual cycle[J]. *Pain*, 1999, 81: 225-235.

[2] Gintzler A R, Bohan M C. Pain thresholds are elevated during pseudopregnancy[J]. *Brain Res*, 1990, 507: 312-316.

[3] Dawson-Basoa M, Gintzler A R. Nociceptin (Orphanin FQ) abolishes gestational and ovarian sex steroid-induced antinociception and induces hyperalgesia[J]. *Brain Res*, 1997, 750: 48-52.

[4] Butcher R L, Collins W E, Fugo N W. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat[J]. *Endocrinology*, 1974, 94: 1704-1708.

[5] Frye C A, Petralia S M, Rhodes M E. Estrous cycle and sex

differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3alpha, 5alpha-THP [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2000, 67: 587-596.

[6] Forman L J, Tingle V, Estilow S, Cater J. The response to analgesia testing is affected by gonadal steroids in the rat[J]. *Life Sci*, 1989, 45: 447-454.

[7] Bradshaw H B, Berkley K J. Estrogen replacement reverses ovariectomy-induced vaginal hyperalgesia in the rat[J]. *Maturitas*, 2002, 41: 157-165.

[8] Kim N N, Min K, Pessina M A, Munarriz R, Goldstein I, Traish A M. Effects of ovariectomy and steroid hormones on vaginal smooth muscle contractility[J]. *Int J Impot Res*, 2004, 16: 43-50.

[9] Thomas T N, Rhodin J A, Clark L, Garces A, Bryant M. A comparison of the anti-inflammatory activities of conjugated estrogens and 17-beta estradiol[J]. *Inflamm Res*, 2003, 52: 452-460.

[10] Berkley K J. Sex differences in pain[J]. *Behav Brain Sci*, 1997, 20: 371-380.

[11] Aloisi A M. Gonadal hormones and sex differences in pain reactivity[J]. *Clin J Pain*, 2003, 19: 168-174.

[12] Franke H, Illes P. Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS[J]. *Pharmacol Ther*, 2006, 109: 297-324.

[13] Kaivietis D, Aidietis A, Lip G Y. Pathophysiological insights into atrial fibrillation following cardiac surgery: implications for current pharmaceutical design[J]. *Curr Pharm Des*, 2009, 15: 3367-3383.

[14] Nakamura F, Strittmatter S M. P2Y₁ purinergic receptors in sensory neurons: contribution to touch-induced impulse generation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 10465-10470.

[15] Tominaga M, Wada M, Masu M. Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 6951-6956.

[16] Xiao H S, Huang Q H, Zhang F X, Bao L, Lu Y J, Guo C, et al. Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 8360-8365.

[17] Stoffel E C, Ulibarri C M, Craft R M. Gonadal steroid hormone modulation of nociception, morphine antinociception and reproductive indices in male and female rats[J]. *Pain*, 2003, 103: 285-302.

[18] Sanoja R, Cervero F. Estrogen-dependent abdominal hyperalgesia induced by ovariectomy in adult mice: a model of functional abdominal pain[J]. *Pain*, 2005, 118: 243-253.

[19] Bartok R E, Craft R M. Sex differences in opioid antinociception [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997, 282: 769-778.

[20] Craft R M, Bernal S A. Sex differences in opioid antinociception: kappa and 'mixed action' agonists[J]. *Drug Alcohol Depend*, 2001, 63: 215-228.

[21] Illes P, Alexandre Ribeiro J. Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system[J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 483: 5-17.

[22] Gerevich Z, Illes P. P2Y receptors and pain transmission[J]. *Purinergic Signal*, 2004, 1: 3-10.

[23] Kobayashi K, Fukuoka T, Yamanaka H, Dai Y, Obata K, Tokunaga A, et al. Neurons and glial cells differentially express P2Y receptor mRNAs in the rat dorsal root ganglion and spinal cord [J]. *J Comp Neurol*, 2006, 498: 443-454.

[24] Ruan H Z, Burnstock G. Localisation of P2Y₁ and P2Y₄ receptors in dorsal root, nodose and trigeminal ganglia of the rat[J]. *Histochem Cell Biol*, 2003, 120: 415-426.

[25] Zeng J W, Liu X H, Zhang J H, Wu X G, Ruan H Z. P2Y₁ receptor-mediated glutamate release from cultured dorsal spinal cord astrocytes[J]. *J Neurochem*, 2008, 106: 2106-2118.