

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00179

孕酮对痛觉调节作用的实验研究

巩琦[△], 李惠君[△], 李喆[△], 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** 探讨孕酮对外周痛觉的调节作用。**方法** 雌性SD大鼠分为4组, 分别颈部皮下注射生理盐水、孕酮(500 μg)、RU38486(孕酮受体的拮抗剂, 20 μg)及孕酮(500 μg)+RU38486(20 μg)。采用弗莱毛测痛法分别测量大鼠给药前、给药后30 min及给药后60 min的外周痛阈。另取SD大鼠分为两组, 分别在足底注射生理盐水、孕酮(25 μg), 测量给药后15 min的外周痛阈, 观察孕酮的局部效应。**结果** 和对照组相比, 颈部皮下注射孕酮30 min后, 大鼠外周痛阈增高($P < 0.01$); 60 min后, 痛阈差异无统计学意义; 颈部皮下注射RU38486后30 min及60 min, 大鼠足底痛阈有显著性降低。颈部皮下同时注射孕酮和RU38486后30 min及60 min, 大鼠外周痛阈差异无统计学意义。足底注射孕酮15 min后, 大鼠外周痛阈与对照组相比明显提高。**结论** 孕酮对大鼠外周机械痛起到抑制作用, 而且这一作用可能是通过孕酮受体来完成的。

[关键词] 孕酮; 孕酮受体; 外周机械痛

[中图分类号] R 339.11

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2012)02-0179-04

Modulatory effect of progesterone on peripheral pain

GONG Qi[△], LI Hui-jun[△], LI Zhe[△], FAN Juan, MA Bei*

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

[Abstract] **Objective** To investigate the modulatory effect of progesterone on peripheral pain. **Methods** Female SD rats were divided into four groups, namely, a vehicle group, a progesterone (500 μg) group, an RU38486 (20 μg) group and a progesterone (500 μg) plus RU38486 (20 μg) group. Von-Frey hair test was adopted to determine the peripheral mechanical pain thresholds at the following 3 time points: preinjection, 30 min and 60 min after subcutaneous injection at the neck. Local effect of progesterone was also tested in SD rats by Von-Frey hair test 15 min after plantar injection of progesterone (25 μg) and normal saline (control). **Results** The peripheral mechanical pain threshold was significantly increased 30 min after subcutaneous injection of progesterone at the neck compared with the vehicle group, but the threshold was not significantly different 60 min after injection. RU38486 injection at the neck significantly decreased the pain threshold of plantar at 30 min and 60 min after injection, and the peripheral mechanical pain threshold was not significantly altered at 30 min and 60 min after co-injection of progesterone and RU38486. RU38486 could block the pain inhibiting effect of progesterone. The peripheral mechanical pain threshold was also increased 15 min after plantar injection of progesterone compared with the control group. **Conclusion** Our findings suggest that progesterone can inhibit the peripheral mechanical pain, which might be mediated by progesterone receptor.

[Key words] progesterone; progesteron receptor; peripheral mechanical pain

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(2):179-182]

疼痛是人体各部分受到损伤性刺激引起的不愉快的感觉, 它提供躯体受到威胁的警报信号, 是生命不可缺少的一种特殊保护功能, 因而了解疼痛产生

的机制, 寻找解除疼痛的方法, 是医学领域亟待解决的问题。临床观察注意到疼痛有明显的性别差异, 主要表现在两个方面: (1) 肠激惹综合征、间质性膀

[收稿日期] 2011-06-30

[接受日期] 2011-11-24

[基金项目] 国家自然科学基金(30570597), 第二军医大学大学生创新能力培养研究课题(MS21010084)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30570597), and the Foundation for Cultivating Undergraduate Innovative Ability of Second Military Medical University(MS21010084).

[作者简介] 巩琦, 助教。E-mail: zgongqi@yahoo.com.cn; 李惠君, 第二军医大学临床医学专业2007级学员。E-mail: scofield.smmu@hotmail.com; 李喆, 第二军医大学临床医学专业2007级学员。E-mail: lizheqq@hotmail.com

[△]共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81870981-803, E-mail: mabei2004@yahoo.com.cn

胱炎、颞下颌关节炎等病症多见于女性;(2)这些疾病发生和发展与月经周期相关。这些证据提示雌性激素可能参与痛觉的调节。

孕酮(progesterone, P4)主要由卵巢和胎盘产生,与雌激素共同维持女性的生理周期和生理特征。越来越多的研究表明,孕酮除了参与生殖功能外,还是神经系统中一种重要的信号分子。近年来临床、流行病学及实验室研究均发现疼痛存在性别差异,除了与雌激素水平紧密相关外,还与孕酮水平的差异有关,因而孕酮及其受体在疼痛调节中的可能作用及机制正日益受到更多的关注。

目前已发现,孕酮受体广泛分布于背根神经节(DRG)初级传入神经元和外周组织细胞,提示孕激素可能影响感觉信号在传入神经末梢的转导过程。

在本课题中,我们运用动物行为学实验方法,观察在生理条件下,孕酮对外周痛觉感受的调节作用。对于阐明疼痛的性别相关性,以及将来研制新一代的镇痛剂,具有重要的意义。

1 材料和方法

1.1 主要材料 弗莱毛(Von-Frey hair):第一组由英国伦敦大学自主神经科学研究所赠送。第二组为自制。

1.2 动物分组及处理 SD雌性大鼠(体质量200~250 g,6~8周龄)购自上海西普尔-必凯公司,分别进行两组实验。实验一,将48只大鼠随机分为4组(n=12),观察各组大鼠的基础痛阈。因个别大鼠毛色不佳,摄食少,剔除后每组挑出11只进行行为学实验。4组大鼠分别颈部皮下注射400 μl生理盐水、孕酮(500 μg)、RU38486(孕酮受体拮抗剂,20 μg)及孕酮(500 μg)+RU38486(20 μg)。实验二,将16只大鼠随机分为2组(n=8),第一组在左后足底注射20 μl生理盐水,第二组在左后足底注射20 μl孕酮(25 μg)。观察孕酮及其受体对机械刺激痛的调节作用。

1.3 弗莱毛测痛 将测试大鼠置于特制笼中,熟悉环境30 min后,再以弗莱毛刺激大鼠后足底,测试大鼠外周机械痛阈。实验一,弗莱毛的力量分别为:1(0.0229 g)、2(0.494 g)、3(2.05 g)、4(4.01 g)、5(6 g)、6(8 g)、7(10.8 g)、8(12.2 g)、9(14.9 g)。将弗莱毛由细到粗,每个力量刺激左足底和右足底各一次,以大鼠抬起后肢为反应阳性。分别测得能引起左后肢和右后肢阳性反应的最小弗莱毛对应的克数,取二者的均数,即为机械刺激痛阈。实验二,弗

莱毛的力量分别为:1(4.57 g)、2(7.58 g)、3(12.6 g)、4(20.9 g)、5(34.7 g)、6(57.5 g)。将弗莱毛由细到粗,每个力量的弗莱毛刺激每只大鼠左足底10次,以大鼠抬起后肢为反应阳性,计算50%缩足反应阈值(50%PWT),为机械刺激痛阈。

1.4 统计学处理 本实验所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行为学实验多组间差别用单因素方差分析(ANOVA)进行统计,组内两两比较用方差分析后的Student-Newman-Keuls检验。另一组采用Student-t检验。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 颈部皮下注射孕酮对大鼠外周机械刺激痛阈的影响 各组检测结果见图1。

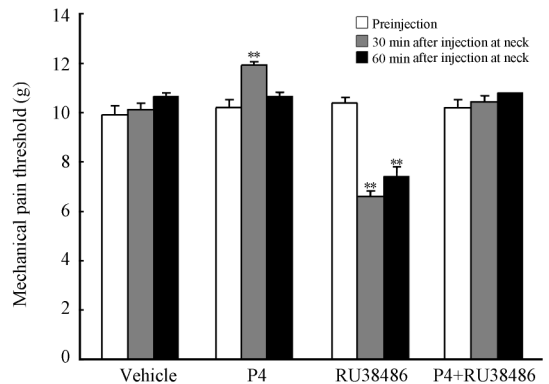


图1 4组大鼠在颈部皮下给药前、给药30及60 min足底机械痛阈的变化

Fig 1 Changes in mechanical pain threshold in vehicle (control), P4 (500 μg), RU38486 (20 μg) and P4 (500 μg) + RU38486 (20 μg) group at preinjection, 30 min and 60 min after subcutaneous injection of corresponding agents at the neck

** P<0.01 vs vehicle group. n=11, $\bar{x} \pm s$

给药前,4组大鼠足底部机械痛阈差异无统计学意义[F(76,3)=0.357, P>0.05]。给予孕酮30 min后,4组大鼠痛阈差异有统计学意义[F(76,3)=95.727, P<0.01],其中,给予孕酮组大鼠的机械痛阈与生理盐水组相比明显提高[(11.92±0.13) g vs (10.1±0.28) g, P<0.01],给予RU38486组大鼠的痛阈[(6.6±0.21) g]与生理盐水组相比显著降低(P<0.01),同时给予孕酮和RU38486组大鼠的痛阈 [(10.42±0.27) g]与生理盐水组相比差异无统计学意义。给药60 min后,4组大鼠痛阈差异有统计学意义[F(76,3)=57.352, P<0.01],孕酮组大鼠的痛阈与生理盐水组相比差异无统计学意义 [(10.66±0.14) g vs (10.66±0.14) g, P>0.05],

单独给予 RU38486 组大鼠的痛阈 $[(7.42 \pm 0.39) \text{ g}]$ 与生理盐水组相比仍然显著降低 ($P < 0.01$), 同时给予孕酮和 RU38486 组大鼠的痛阈 $[(10.8 \pm 0.0) \text{ g}]$ 与生理盐水组相比差异无统计学意义。

2.2 足底皮下注射孕酮对大鼠外周机械刺激痛阈的影响 比较足底局部注射 $20 \mu\text{l}$ 生理盐水或孕酮 ($25 \mu\text{g}$) 两组大鼠的机械痛阈, 发现给药后 15 min, 孕酮组大鼠痛阈与生理盐水组相比明显提高 $[(39.69 \pm 3.90) \text{ g vs } (28.23 \pm 2.86) \text{ g}, P < 0.05, \text{图 } 2]$ 。

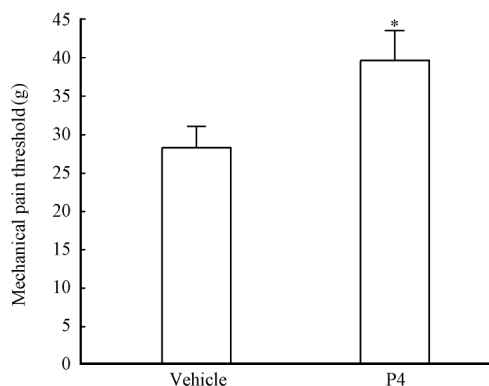


图2 足底注射生理盐水、孕酮 15 min 后, 大鼠足底机械痛阈的变化

Fig 2 Changes in mechanical pain threshold in vehicle (control) and P4 ($25 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$) rats at 15 min after plantar injection of normal saline and progesterone

* $P < 0.05$ vs vehicle group. $n = 8, \bar{x} \pm s$

3 讨论

本实验结果表明, 无论是系统还是局部给予孕酮都可以有效地提高外周机械痛阈, 减弱痛觉信号的传入。孕酮受体拮抗剂 RU38486 可以拮抗孕酮的作用, 说明孕酮的作用是通过其受体完成的。而孕酮受体拮抗剂 RU38486 单独给予时也可引起大鼠足底机械痛阈的降低, 提示内源性孕酮可能起到抑制痛觉的作用。

有报道发现在孕酮水平降低时动物的痛阈降低, 而当体内孕酮水平高而平稳时, 则痛觉缺失^[1-5]。给予孕酮可减轻腕管综合征女性患者的疼痛^[6]。人类颞下颌关节疼痛的增强与孕酮的低水平有关^[7]。孕酮可减轻大鼠的颞下颌关节疼痛^[8]。在注射长春新碱诱导的神经性痛大鼠模型中, 孕酮可阻断长春新碱所致的机械痛觉过敏和痛觉异常^[9]。Ren 等^[10]用弗氏佐剂足底致炎, 发现大鼠致炎后痛觉过敏可被注射孕酮所抑制, 提示孕酮有缓解炎性痛的作用。

Kuba 等^[11]也报道孕酮可以减轻足底福尔马林(甲醛)致炎试验中的疼痛反应。本实验结果与上述研究一致, 都表明孕酮具有镇痛作用。

孕酮的作用需要通过孕酮受体来完成。孕酮受体包括核受体和膜受体, 孕酮可以通过激活靶细胞核受体(即 PR_A 和 PR_B), 影响靶基因转录。这种作用往往牵涉到新蛋白的合成, 需要较长的潜伏期, 称为激素的基因组作用(需要至少 30 min)。另一方面, 孕酮还可以作用于细胞膜上的受体, 介导快速效应, 称为激素的非基因组作用。也有研究发现孕酮核受体除影响基因转录外, 也能介导细胞内快速效应^[12]。目前已发现, 孕酮核受体在神经系统广泛表达, 如脑、脊髓、DRG^[13-15]。孕酮膜受体(mPR)包括 3 个不同的亚型: α 、 β 和 γ ^[16]。其中 β 亚型表达于神经组织, 包括大脑皮质、下丘脑、脑垂体、脊髓^[17] 和 DRG^[18]。另外, 脊髓背角神经元上有孕酮膜受体的表达^[19]。这些结果提示孕酮受体可能与痛觉感受相关。但是目前无论是孕酮核受体还是膜受体, 其影响痛觉的传导和传递的具体机制尚不明了。

本实验中通过颈部注射观察到孕酮对外周痛觉感受的抑制作用, 由于孕酮经血液循环可以到达全身, 因而我们不能区分它是通过中枢还是外周的受体起作用。足底注射孕酮 15 min 时即发现其对外周痛觉感受也有抑制作用, 提示孕酮的作用还可以通过外周的受体来完成。颈部注射孕酮后 30 min 观察到孕酮提高外周痛阈, 而在 60 min 未观察到此现象, 而足底注射孕酮 15 min 时即产生作用, 提示孕酮可能是通过其膜受体介导的非基因组效应来完成这一快速效应的。

研究发现, 孕酮的代谢产物($5\alpha/\beta$ -reduced progesterone metabolites)可以通过阻断 T 型钙通道发挥镇痛作用^[20]。孕酮的代谢产物异孕烷醇酮(allo-pregnanolone)作为 GABA_A 受体的正性变构调节剂(positive allosteric modulator), 可以通过与中枢和外周神经系统的 GABA_A 受体作用, 抑制神经元的兴奋性^[21]。此外, 我们课题组前期结果发现孕酮对 $\text{P}2\text{X}_3$ 介导电流有快速抑制作用^[22]。这些发现也提示孕酮及其代谢产物可通过多种渠道抑制痛觉信号的传入。

作为孕酮受体的拮抗剂, RU38486 也能抑制糖皮质激素受体^[23]。有文献报道, 糖皮质激素可通过抑制 CGRP(降钙素基因相关肽)基因转录, 导致胞内 CGRP 合成减少, 抑制痛觉信息的传入^[24]。另有文献报道, RU38486 作为糖皮质激素受体拮抗剂可抑制神经病理性痛模型小鼠的机械异常性疼痛^[25]。关于糖皮质激素受体在生理条件下对大鼠的痛觉感

受中起何作用,尚不确定。本实验中,RU38486对大鼠足底机械痛阈的抑制作用不能完全排除糖皮质激素受体的参与,RU38486可以拮抗孕酮对外周机械痛阈的增高作用,提示孕酮受体参与了孕酮对痛觉的调节作用。

综上所述,在生理条件下,孕酮对大鼠外周机械痛起到抑制作用,这一作用可能是通过孕酮受体来完成的。

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] Gintzler A,Bohan M. Pain thresholds are elevated during pseudopregnancy[J]. *Brain Res*,1990,507:312-316.
- [2] Giamberardino M A,Affaitati G,Valente R,Iezzi S,Vecchiet L. Changes in visceral pain reactivity as a function of estrous cycle in female rats with artificial ureteral calculosis[J]. *Brain Res*,1997,774:234-238.
- [3] Frye C A,Bock B C,Kanarek R B. Hormonal milieu affects tail-flick latency in female rats and may be attenuated by access to sucrose[J]. *Physiol Behav*,1992,52:699-706.
- [4] McCarthy M M,Caba M,Komisurak B R,Beyer C. Modulation by estrogen and progesterone on the effect of muscimol on nociception in the spinal cord[J]. *Pharmacol Biochem Behav*,1990,37:123-128.
- [5] Carvalho B,Angst M S,Fuller A J,Lin E,Mathusamy A D,Riley E T. Experimental heat pain for detecting pregnancy-induced analgesia in humans[J]. *Anesth Analg*,2006,103:1283-1287.
- [6] Milani P,Mondelli M,Ginanneschi F,Mazzocchio R,Rossi A. Progesterone - new therapy in mild carpal tunnel syndrome? Study design of a randomized clinical trial for local therapy[J]. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj*,2010,5:11.
- [7] Kramer P R,Bellinger L L. The Effects of cycling levels of 17 β -estradiol and progesterone on the magnitude of temporomandibular joint-induced nociception [J]. *Endocrinology*,2009,150:3680-3689.
- [8] Fischer L,Torres-Chávez K E,Clemente-Napimoga J T,Jorge D,Arsati F,de Arruda Veiga M C F,et al. The influence of sex and ovarian hormones on temporomandibular joint nociception in rats[J]. *J Pain*,2008,9:630-638.
- [9] Meyer L,Patte-Mensah C,Taleb O,Mensah-Nyagan A G. Cellular and functional evidence for a protective action of neurosteroids against vincristine chemotherapy-induced painful neuropathy[J]. *Cell Mol Life Sci*,2010,67:3017-3034.
- [10] Ren K,Wei F,Dubner R,Murphy A,Hoffman G E. Progesterone attenuates persistent inflammatory hyperalgesia in female rats;involvement of spinal NMDA receptor mechanisms[J]. *Brain Res*,2000,865:272-277.
- [11] Kuba T,Wu H B,Nazarian A,Festa E D,Barr G A,Jenab S,et al. Estradiol and progesterone differentially regulate formalin-induced nociception in ovariectomized female rats[J]. *Horm Behav*,2006,49:441-449.
- [12] Zhu Y,Hanna R N,Schaaf M J. Candidates for membrane progesterin receptors—past approaches and future challenges [J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*,2008,148:381-389.
- [13] Monks D A,Arciszewska G,Watson N V. Estrogen-inducible progesterone receptors in the rat lumbar spinal cord;regulation by ovarian steroids and fluctuation across the estrous cycle[J]. *Horm Behav*,2001,40:490-496.
- [14] Jung-Testas I,Schumacher M,Robel P,Baulieu E E. Demonstration of progesterone receptors in rat Schwann cells[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*,1996,58:77-82.
- [15] Chan J R,Rodriguez-Waitkus P M,Ng B K,Liang P,Glaser M. Progesterone synthesized by schwann cells during myelin formation regulates neuronal gene expression[J]. *Mol Biol Cell*,2000,11:2283-2295.
- [16] Zhu Y,Bond J,Thomas P. Identification,classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor [J]. *PNAS*,2003,100:2237-2242.
- [17] Brinton R D,Thompson R F,Foy M R,Baudry M,Wang J,Finch C E,et al. Progesterone receptors;form and function in brain[J]. *Front Neuroendocrinol*,2008,29:313-339.
- [18] Cai Z,Stocco C. Expression and regulation of progesterin membrane receptors in the rat corpus luteum[J]. *Endocrinology*,2005,146:5522-5532.
- [19] Coronel M F,Labombarda F,Roig P,José Villar M,Federico De Nicola A,González S L. Progesterone prevents nerve injury-induced allodynia and spinal NMDA receptor upregulation in rats [J]. *Pain Med*,2011,12:1249-1261.
- [20] Todorovic S M,Pathirathna S,Brimelow B C,Jagodic M M,Ko S H,Jiang X,et al. 5beta-reduced neuroactive steroids are novel voltage-dependent blockers of T-type Ca²⁺ channels in rat sensory neurons *in vitro* and potent peripheral analgesics *in vivo* [J]. *Mol Pharmacol*,2004,66:1223-1235.
- [21] Dableh L J,Henry J L. Progesterone prevents development of neuropathic pain in a rat model; timing and duration of treatment are critical[J]. *J Pain Res*,2011,4:91-101.
- [22] Fan J,Lu Y,Yu L H,Zhang Y M,Ni X,Burnstock G,et al. Progesterone rapidly attenuates ATP-evoked transient currents in cultured rat dorsal root ganglion neurons [J]. *Pharmacology*,2011,87(1-2):36-44.
- [23] Gagne D,Pons M,Philibert D. RU 38486;a potent antiglucocorticoid *in vitro* and *in vivo* [J]. *Steroid Biochem*,1985,23:247-251.
- [24] Nohr D,Schäfer M K,Persson S,Romeo H,Nyberg F,Post C,et al. Calcitonin gene-related peptide gene expression in collagen-induced arthritis is differentially regulated in primary afferents and motoneurons; influence of glucocorticoids[J]. *Neuroscience*,1999,93:759-773.
- [25] Takasaki I,Kurihara T,Saegusa H,Zong S,Tanabe T. Effects of glucocorticoid receptor antagonists on allodynia and hyperalgesia in mouse model of neuropathic pain [J]. *Eur J Pharm*,2005,524:80-83.