

伏核内勿动蛋白 A 和降钙素基因相关肽 1 受体在炎性痛大鼠痛觉调制过程中的角色*

房春燕¹ 王 燕¹ 王亚南¹ 孟 蒂¹ 张广学¹ 李 宁^{1,2}

摘要

目的:探讨大鼠伏核内勿动蛋白 A(Nogo-A)和降钙素基因相关肽 1(CGRP1)受体在痛觉调制过程中的作用。

方法:健康雄性 SD 大鼠随机分为 4 组:空白对照组,伏核内注射生理盐水 1 μ l;炎性痛模型对照组、吗啡组和纳洛酮组。福尔马林致炎成功后,分别向其伏核内注射生理盐水、吗啡、纳洛酮各 1 μ l。采用 Western blot 法,观察各组大鼠伏核内 Nogo-A 和 CGRP1 受体蛋白表达的变化,分析炎性痛、吗啡、纳洛酮对大鼠伏核内 Nogo-A 和 CGRP1 受体蛋白表达的影响。

结果:正常大鼠伏核内有 Nogo-A 和 CGRP1 受体蛋白表达;福尔马林致炎后 Nogo-A 的蛋白表达量降低($P<0.05$),而 CGRP1 表达升高($P<0.05$);与炎性痛模型对照组比较,吗啡组大鼠伏核内 Nogo-A 的蛋白表达量增高($P<0.05$), CGRP1 降低($P<0.05$),而纳洛酮组 Nogo-A 降低($P<0.05$), CGRP1 增高($P<0.05$)。

结论:Nogo-A 和 CGRP 参与了炎症致痛敏大鼠伏核内的痛觉调制过程,且二者之间存在反向调节关系,内源性阿片系统可能参与并影响了该过程。

关键词 勿动蛋白-A;降钙素基因相关肽受体;吗啡;伏核;痛觉调制

中图分类号:R49 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2013)-01-0009-04

Role of neurite outgrowth inhibitor-A and calcitonin gene related peptide 1 receptor in pain modulation in nucleus accumbens of rats with inflammatory pain/FANG Chunyan, WANG Yan, WANG Yanan, et al. //Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2013, 28(1): 9—12

Abstract

Objective: To investigate the role of neurite outgrowth inhibitor-A(Nogo-A) and calcitonin gene related peptide 1 (CGRP1) receptor in pain modulation in nucleus accumbens of rats.

Method: Healthy male SD rats were randomly divided into four groups: blank control group (saline was injected to the nucleus accumbens for 1 μ l); inflammatory pain model control group (formalin was injected to rat's hindpaw to induce inflammatory pain); morphine group and naloxone group (after inflammatory pain models were prepared, morphine and naloxone were injected to nucleus accumbens for 1 μ l respectively). The Western blot technique was used for Nogo-A and CGRP1 receptor protein recording. The influence of inflammatory pain, morphine and naloxone on Nogo-A and CGRP1 receptor protein expression in nucleus accumbens were analyzed.

Result: Nogo-A and CGRP1 receptor proteins expressed in nucleus accumbens of normal rats; the expression of Nogo-A protein decreased significantly ($P<0.05$) and CGRP1 receptor protein increased significantly ($P<0.05$) after formalin-induced inflammation. Compared with inflammatory pain model control group, the expression of Nogo-A protein increased significantly ($P<0.05$) and CGRP1 receptor protein decreased significantly ($P<0.05$) in morphine group; the expression of Nogo-A protein decreased significantly ($P<0.05$) and CGRP1 receptor protein increased sig-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2013.01.003

*基金项目:山东省自然科学基金资助项目(ZR2009CL049)

1 潍坊医学院应用药理学实验室,261053; 2 通讯作者

作者简介:房春燕,女,讲师; 收稿日期:2012-05-16

nificantly($P<0.05$) in naloxone group.

Conclusion: Nogo-A and CGRP were both involved in pain modulation in nucleus accumbens of inflammatory pain rats, and the relationship between Nogo-A and CGRP was negative regulation. Endogenous opioid systems may be influence the role of Nogo-A and CGRP in pain modulation.

Author's address Pharmacology Laboratory of Weifang Medical College, 261053

Key word neurite outgrowth inhibitor-A; calcitonin gene related peptide receptor; morphine; nucleus accumbens; pain modulation

疼痛是临床疾病康复过程中经常遇到的一个现象,是一种与组织损伤或潜在损伤相关的不愉快的主观感觉和情绪体验,严重危害着人类健康,其调控是一个非常复杂的过程。伏核是参与痛觉调制的重要核团之一,多种神经递质共存于此。降钙素基因相关肽(calcitonin gene related peptide, CGRP)广泛分布于神经系统和许多外周组织,其在伏核内可通过激活其CGRP1受体发挥镇痛作用,传递伤害性信息^[1]。勿动蛋白(neurite outgrowth inhibitor, Nogo)是一种新发现的抑制受损中枢神经再生的基因,包括Nogo-A、Nogo-B和Nogo-C三种异构体^[2]。在与痛觉相关的脑区,如:中脑导水管周围灰质(periaqueductal gray, PAG)、伏核等均发现Nogo-A的表达^[3],提示Nogo-A可能也与痛觉调制过程密切相关。迄今为止,有关Nogo-A在中枢神经系统表达并参与抑制中枢神经再生的功能,已经得到广大科研工作者的认同,但它是否存在其他功能,是否还与其他疾病有关,与其他神经递质有无相互作用,尚不十分清楚。内源性阿片系统与痛觉调制密切相关,本研究拟通过福尔马林致炎模型模拟炎性疼痛,大鼠伏核内微量注射吗啡、纳洛酮,从蛋白表达的角度,探讨伏核内CGRP1受体和Nogo-A在痛觉调制中的作用及相互关系,以丰富痛觉调制理论,为临床疼痛的治疗提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 主要药物和试剂

硫酸吗啡(批号:20070417,青海制药厂);盐酸纳洛酮(批号:20081108,北京凯因科技股份有限公司);兔抗Nogo-A(武汉博士德);兔抗CGRP1(北京博奥森);鼠抗 β -actin、抗鼠IgG、抗兔IgG(Santa Cruz公司)。

1.2 实验动物及分组

健康成年SD大鼠32只(雄性,280—320g),由山东鲁抗医药股份有限公司动物中心提供(实验动物生产许可证号:SCXK鲁20080002)。实验期间单笼饲养,自由采食和饮水,自然光照,室温 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 。经热板测试训练后,随机分为空白对照组、炎性痛模型对照组、吗啡组和纳洛酮组^[4]。

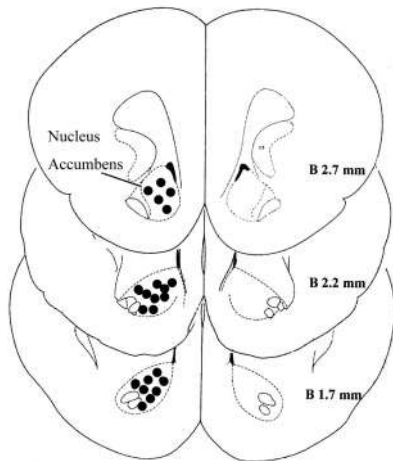
1.3 行为药理学实验

对大鼠进行热板测试5d,以训练其对伤害性刺激保持稳定反应,进行术前准备^[4-6]。麻醉大鼠后,固定于脑立体定位仪(SN-2,日本NARISHIGE公司),参照大鼠脑立体定位图谱(Paxinos G, Watson C. 1998),按要求调整大鼠头部位置,将一直径为0.8mm的不锈钢套管垂直插入右侧伏核上2mm(B 2.0, L 1.5, H 6.8mm),做脑内埋管手术。手术3d后制备炎症模型^[4-6]。除空白对照组外,向大鼠一侧后爪掌心皮下注射10g/L福尔马林0.1ml,5min后热板测试动物后爪缩退反射潜伏期(hindpaw withdrawal latency, HWL)时间(s)。造模3d后实施核团注射^[4-6],用直径为0.4mm的针管,通过套管分别向炎性痛模型对照组、吗啡组、纳洛酮组大鼠伏核内注射生理盐水、吗啡(1ml:10mg)、纳洛酮(1ml:0.4mg)各1 μl ,空白对照组伏核内注射生理盐水1 μl 。并在给药前以及给药后分别热板测试大鼠的HWL。

1.4 注射部位鉴定和获取伏核区域脑组织

为鉴定注射部位和准确取出伏核区域脑组织,麻醉大鼠后,固定于脑立体定位仪,按要求调整大鼠头部位置,用直径0.8mm的不锈钢针在鼠脑伏核前(B 3.0, L 1.5, H 8mm)、后(B 1.3, L 1.5, H 9mm)2个冠状面各做1个标记,迅速取出脑组织置于玻璃片上,沿标记做冠状切片,把包含伏核的脑片平铺在玻璃片上,脑片上可以看到伏核区域注射针头遗留的痕迹(见图1)。用内径小于伏核直径的薄壁玻璃管钻孔,取出孔芯即为伏核区域脑组织,置于

图1 伏核脑区定位示意图



液氮中备用^[4]。

1.5 Western blot法检测 Nogo-A 蛋白和 CGRP1 受体蛋白的表达

取各组样本 100mg,加入 RIPA 裂解液 400 μ l,冰浴下研磨匀浆,4 $^{\circ}$ C 12000r/min 离心取上清液,加入 5 $\times$ SDS 上样缓冲液,用 10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白,将蛋白转移到 PVDF 膜上;5%脱脂奶粉封闭 90min,一抗(兔抗 Nogo-A:1:300;兔抗 CGRP1:1:400;鼠抗 β -actin:1:3000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次,二抗(抗鼠 IgG:1:4000;抗兔 IgG 1:4000)室温振荡混匀 1h,TBST 洗膜 3 次;暗室发光、显影和定影,制成 X 光片。将各组光片扫描后采用 Quantity One 软件进行灰度分析,以 Nogo-A 蛋白与 β -actin 蛋白灰度值的比值、CGRP1 受体蛋白与 β -actin 蛋白灰度值的比值作为 Nogo-A 蛋白、CGRP1 受体蛋白的相对表达量。

1.6 统计学分析

所有实验数据用均数 $\pm$ 标准差表示,采用 SPSS13.0 统计软件进行分析。各组之间用单因素方差分析(ANOVA)进行显著性检验,以 $P<0.05$ 为差异有显著性意义的标准。

2 结果

2.1 痛敏大鼠行为学观察

大鼠单侧后爪掌心皮下注射福尔马林后,出现了舔咬和抬缩后肢、跳跃和肢体震颤等行为学反应,并依时间顺序而发生改变,表现为两个不同的时相,称为两期伤害性反应。随后注射侧后肢开始出现炎症反应,如红肿破溃、活动轻度受限等,说明出现了炎性痛及痛过敏,与文献报道相符^[4-6]。

2.2 大鼠 HWL 的变化

炎性痛模型组与空白对照组相比,大鼠后爪对热刺激的 HWL 明显缩短($P<0.05$),产生痛敏现象。吗啡组与炎性痛模型组对照,大鼠的 HWL 明显延长($P<0.05$);与炎性痛模型组比较,纳洛酮组大鼠的 HWL 无显著变化($P>0.05$)。

2.3 Nogo-A 蛋白和 CGRP1 受体蛋白的表达

Western blot 结果显示(见图 2),在 43kD、60kD、180kD 处均可见阳性条带,分别为 β -actin、CGRP1、Nogo-A 的表达,可见大鼠伏核内 Nogo-A 蛋白与 CGRP1 受体蛋白均有表达;炎性痛模型对照组 Nogo-A 的表达量与空白对照组相比明显降低($P<0.05$),而 CGRP1 的表达量比空白对照组明显升高($P<0.05$)。与炎性痛模型对照组比较,吗啡组 Nogo-A 的蛋白表达量显著增高($P<0.05$),CGRP1 显著降低($P<0.05$);而纳洛酮组 Nogo-A 的蛋白表达量明显降低($P<0.05$),CGRP1 增高($P<0.05$),见表 1。

表 1 大鼠伏核内 Western blot 产物分析

($\bar{x}\pm s$, n=8)

组别	Nogo-A	CGRP1	β -actin	Nogo-A/ β -actin	CGRP1/ β -actin
空白对照组	188.1225 $\pm$ 28.85431	167.2738 $\pm$ 16.46889	146.93 $\pm$ 17.80228	1.307 $\pm$ 0.158	1.184 $\pm$ 0.212
模型对照组	164.2713 $\pm$ 27.38624	203.556 $\pm$ 17.31609	153.2757 $\pm$ 16.80003	1.094 $\pm$ 0.159 ^①	1.365 $\pm$ 0.202 ^①
吗啡组	174.7975 $\pm$ 23.86396	165.6125 $\pm$ 13.66137	143.2814 $\pm$ 12.29369	1.251 $\pm$ 0.123 ^②	1.202 $\pm$ 0.194 ^②
纳洛酮组	145.6575 $\pm$ 24.83653	251.3613 $\pm$ 19.86619	158.21 $\pm$ 13.26144	0.939 $\pm$ 0.122 ^②	1.64 $\pm$ 0.216 ^②

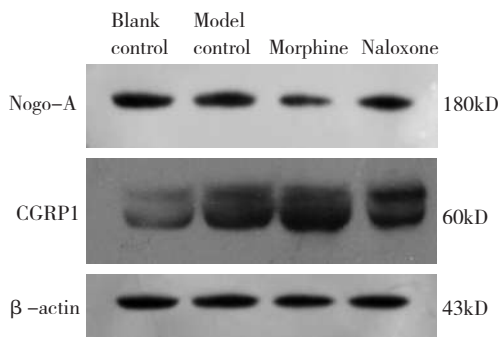
①与空白对照组比较 $P<0.05$;②与炎性痛模型组比较 $P<0.05$

3 讨论

痛觉是伤害性刺激引起的一种人类所特有的感觉,关于痛觉调制机制及参与痛觉调制相关递质的

研究已成为热点问题。福尔马林致炎模型是一个公认的、广泛用于伤害作用及疼痛机制的理想动物模型,表现为两期伤害性反应,之后是长期的痛觉过敏

图2 Western blot法检测各组大鼠伏核内 Nogo-A、CGRP1、 β -actin 的蛋白表达



状态,注射药物后1—3d增强,7—10d时达到高峰,随时间减弱,可持续4周,与中枢小胶质细胞敏化有关^[7]。

伏核位于基底核与边缘系统的交界处,是大脑重要的边缘结构。伏核有着广泛的神经纤维联系,与中脑导水管周围灰质之间存在“中脑边缘镇痛环路”,在痛觉信息整合过程中起重要作用。伏核作为参与痛觉调制的主要部位之一,存在着对伤害性刺激呈特异性反应的痛兴奋神经元和痛抑制神经元。当给予伤害性刺激时,痛兴奋神经元被兴奋同时痛抑制神经元出现抑制现象^[8]。有大量的痛觉相关神经递质及受体在伏核表达,如阿片肽及其受体^[9]、CGRP及其受体^[10]、Nogo-A^[4]等。

Li等^[10]的研究证实,伏核内注射CGRP可以延长大鼠对伤害性刺激的缩爪反应潜伏期,因此伏核是CGRP在脑内镇痛的重要环节。CGRP是一种与伤害性信息传导过程密切相关的生物活性肽,通过CGRP受体介导发挥其生物学功能。CGRP受体在体内存在CGRP1和CGRP2两种类型,其中CGRP1受体在脊髓水平和脊髓以上水平均发挥着明显的痛觉信息传导和调节作用^[11-12]。CGRP与内源性阿片系统之间的密切关系已经得到了广泛关注,并被反复验证。YU等^[13]研究发现,CGRP通过其受体介导,作用于从PAG到脊髓的下行镇痛通路,激活脊髓阿片系统发挥镇痛作用。伏核内注射CGRP可引起镇痛效应,且该效应可被随后注射的阿片受体阻断剂纳洛酮所阻滞,表明阿片受体参与了伏核内CGRP引起的镇痛效应^[14]。

Nogo基因是一种抑制受损中枢神经再生的基

因,在机体不同的发育阶段和不同的组织,可通过其各种异构体参与机体的生理和病理过程。存在于中枢髓鞘中的Nogo-A是轴突生长的主要抑制因子,主要由少突胶质细胞产生,并在发育的神经元的胞体和轴突表面髓鞘中表达。目前对Nogo-A的研究主要集中在抑制中枢神经系统损伤后的轴突再生方面。随着研究的不断深入,发现Nogo-A广泛分布于大鼠中枢神经系统的神经元及其纤维,在伏核、PAG、杏仁核、缰核等痛觉通路相关脑区均有Nogo-A的表达^[3]。这一发现提示Nogo-A可能参与了复杂的中枢痛觉调制过程。本实验结果显示:福尔马林致炎后大鼠伏核内Nogo-A的蛋白表达量发生了变化,显著低于空白对照组,说明Nogo-A也参与并影响伏核内痛敏的形成及痛觉信息的传递,并在痛觉的调制中发挥一定的作用。

Nogo-A的痛觉调制作用是否对CGRP和内源性阿片肽在痛觉调制方面的关系有影响呢?本实验从蛋白表达的角度证实了炎症导致痛敏发生时,CGRP和Nogo-A可能在伏核的痛觉调制中发挥一定作用,并且炎性痛大鼠伏核内Nogo-A的表达与CGRP1受体的表达水平相反,呈反向调节,即CGRP和Nogo-A在参与痛觉调制过程中可能是相互影响的,也进一步提示CGRP和Nogo-A与内源性阿片系统之间可能存在一定的联系,内源性阿片系统可能参与并影响伏核中CGRP和Nogo-A参与痛觉调制的过程。

尽管人们对疼痛的产生和镇痛有了一定认识,并取得了一些研究进展,由于痛觉在解剖、生理和心理过程中的复杂性,仍有许多问题亟待解决,如痛觉在中枢神经系统的传导途径、所需的神经递质,特别是痛觉的调制过程等。伏核中有多种神经递质共存,CGRP及其受体与Nogo-A在伏核中参与伤害性刺激反应,也是一个极其复杂的过程,其具体机制还需要进一步的研究。本实验深入研究探讨中枢神经系统中,CGRP及其受体与Nogo-A参与痛觉调制的作用及机制,为丰富炎症所致痛敏发病的中枢机制奠定了理论基础;可为寻找疼痛治疗的新途径、新方法,以及为新型药物靶点提供理论依据和新的研究方向,对疼痛患者的康复治疗具有重要意义。

(下转第82页)