背根神经节 MMP-9 在瑞芬太尼引起的大鼠痛觉过敏中的作用

白 雪，肖 力，叶 柳，陈 宇，肖亮灿*
（中山大学附属第一医院麻醉科，广东 广州 510080）

摘 要：【目的】观察瑞芬太尼是否引起大鼠痛觉过敏并导致基质金属蛋白酶 9（MMP-9）在其背根神经节（DRG）中发生改变。【方法】成年雄性 SD 大鼠静脉输注瑞芬太尼建立痛觉过敏模型，分别利用 von Frey 及 Hargreaves 法检测瑞芬太尼输注后 2 h 至 5 d 的机械及热刺激撤足阈值变化。为观察 MMP-9 在瑞芬太尼诱导的痛觉过敏中的作用，在静脉输注瑞芬太尼前 30 min 预先鞘内注射 MMP-9 抑制剂。采用免疫荧光和免疫印迹方法观察背根神经节（DRG）中 MMP-9 的表达变化。【结果】静脉输注瑞芬太尼后，大鼠的痛觉阈值明显下降（$P < 0.01$），说明痛觉过敏形成，且痛觉过敏的程度及持续时间与瑞芬太尼输注时间有关；而预先鞘内注射 MMP-9 抑制剂可缓解瑞芬太尼输注引起的痛觉过敏。免疫荧光及免疫印迹结果显示瑞芬太尼输注可上调大鼠 DRG 中 MMP-9 的表达（$P < 0.01$）。【结论】持续输注瑞芬太尼可诱导形成痛觉过敏，使 DRG 中 MMP-9 表达增加，这可能是瑞芬太尼导致痛觉过敏的机制之一。

关键词：痛觉过敏；瑞芬太尼；MMP-9；背根神经节
中图分类号：R338.3 **文献标志码**：A **文章编号**：1672-3554(2015)04-0556-08

MMP-9 in Dorsal Root Ganglion Contributes to Remifentanil-induced Hyperalgesia in Rats

BAI Xue, XIAO Li, YE Liu, CHEN Yu, XIAO Liang-can*
(Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the expression of matrix metalloproteases 9 (MMP-9) in dorsal root ganglion (DRG) in remifentanil-induced hyperalgesia. 【Methods】 Hyperalgesia was induced by intravenous infusion of remifentanil 4 μg/kg/min for 0.5 ~ 2 h and MMP-9 inhibitor was intrathecally administered 30 min before remifentanil infusion. Nociception was assessed using Von Frey test and Hargreaves methods after remifentanil infusion from the 2nd hour to the 5th day and the expression of MMP-9 in dorsal root ganglion (DRG) was observed with immunohistochemistry and Western blot analysis. 【Results】 Intravenous infusion of remifentanil led to significant reduction of sensory threshold and pretreatment with MMP-9 inhibitor could attenuate hyperalgesia induced by remifentanil. Immunohistochemistry and Western blot results showed that MMP-9 expression was significantly upregulated in the DRG in remifentanil hyperalgesia rats. 【Conclusions】 High MMP-9 expression in DRG could be suggestive of a underlying mechanism of hyperalgesia induced by remifentanil.

Key words: remifentanil; hyperalgesia; matrix metalloproteases; dorsal root ganglion
[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2015, 36(4): 556-563]

瑞芬太尼是一种人工合成的超短效 μ 阿片受体激动剂。它具有镇痛作用强，起效迅速，代谢不依赖肝肾功能而由血浆非特异性酯酶降解，连续输注无药物蓄积等优点，现已广泛应用于全身麻醉。然而，目前大量临床观察发现，瑞芬太尼持续输注可能导致阿片类药物引起的痛觉过敏（opioid induced hyperalgesia, OIH），表现为停用瑞芬太尼后引起痛觉增强（hyperalgesia）和痛觉异常（allodynia），术后所需其他镇痛药物镇痛效应下降、镇痛作用时间缩短等[1]。因此，全身麻醉中瑞

收稿日期：2015-04-13
基金项目：广东省科技计划项目（2009B030801110）；广东省自然科学基金（S2012010010965）
作者简介：白雪，硕士研究生，住院医师，E-mail：baixue6496@sina.com；*通信作者：肖亮灿，硕士生导师，主任医师，E-mail：13802739273@163.com

芬太尼的广泛使用仍存在疑虑。瑞芬太尼导致痛觉过敏的机制目前尚不清楚,可能与 C 纤维(C-fiber)敏化、蛋白激酶 C(protein kinase C,PKC)、一氧化氮系统(nitric oxide,NO)、中枢 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体 (*N*-methyl-*D*-aspartate receptor,NMDAR)、丝裂原激活的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases,MAPK),脊髓强啡肽等多重中枢和外周通路相关[2]。Sun 等[3]的研究提示瑞芬太尼痛觉过敏的大鼠中, 致炎因子如肿瘤坏死因子(TNF-α)和白细胞介素 6(IL-6)表达水平显著增高。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteases,MMP) 是 Zn^{2+}依赖性的肽链内切酶, 其家族成员 MMP-9 在神经性炎症及神经病理性疼痛的进展中发挥着重要作用, 可通过调节外周及中枢胶质细胞的表型及增殖, 进而引起致炎因子的释放导致炎性疼痛的发生[4-5]。而 MMP-9 是否参与了瑞芬太尼诱导的痛觉过敏未见报道。本研究拟通过观察瑞芬太尼诱导的痛敏大鼠 DRG 神经元中 MMP-9 活性及表达的改变,并进一步通过特异性抑制剂分别对其活性和表达进行抑制, 明确 MMP-9 是否与瑞芬太尼导致的痛觉过敏有关,从而探讨瑞芬太尼导致痛觉过敏的机制。

1　材料与方法

1.1　实验动物和分组

清洁级 Sprague-Dawley (SD) 成年雄性大鼠 115 只,体质量 200~250 g,由中山大学北校区实验动物中心提供(国家级动物实验中心)。于 12 h 光照-黑暗循环、安静环境下单笼饲养,自由饮水摄食。室温(22 ± 0.2)℃。

实验大鼠随机分为 5 组,每组 16 只。对照组(C)、瑞芬太尼 0.5 h 组($R_{0.5h}$)、瑞芬太尼 2.0 h 组($R_{2.0h}$)、瑞芬太尼 2.0 h+鞘内生理盐水组 ($R_{2.0h}$+$S_{intrathecal}$ 组)、瑞芬太尼 2.0 h+鞘内 MMP-9i 组($R_{2.0h}$+$MMP\text{-}9i_{intrathecal}$ 组)。对照组经尾静脉持续输注混合生理盐水的静脉麻醉剂丙泊酚 2.0 h。瑞芬太尼 0.5 h 组经尾静脉持续输注瑞芬太尼 0.5 h。瑞芬太尼 2.0 h 组经尾静脉持续输注瑞芬太尼 2.0 h。瑞芬太尼 2.0 h+鞘内生理盐水组, 鞘内单次注射生理盐水 10 μL,30 min 后再经尾静脉持续输注瑞芬太尼 4 μg/(kg·min) 2.0 h。瑞芬太尼 2.0 h+鞘内 MMP-9i 组,鞘内单次注射 MMP-9 抑制剂 10 μL,30 min 后再经尾静脉持续输注瑞芬太尼 4 μg/(kg·min) 2.0 h。

1.2　瑞芬太尼尾静脉注射

大鼠适应饲养环境 1 周后开始实验。实验日称重,按 4 μg/(kg·min)的输注速率分别计算大鼠持续输注 0.5 h 或 2.0 h 所需的瑞芬太尼 (宜昌人福药业有限责任公司, 中国) 总量, 混合丙泊酚(AstraZeneca,英国,剂量 12 mg/(kg·h),并以生理盐水稀释至 $R_{0.5h}$ 组总容量 1 mL,$R_{2.0h}$ 组、$R_{2.0h}$+$S_{intrathecal}$ 组、$R_{2.0h}$+$MMP\text{-}9i_{intrathecal}$ 组总量各 4 mL 备用。对照组以生理盐水混合丙泊酚 12 mg/(kg·h)总量 4 mL 备用。

大鼠吸入七氟烷(丸石制药株式会社,日本)入睡后, 行尾静脉穿刺置入 24 G 静脉留置管,连接电子注射泵(ALARIS Asena PK,英国),按分组持续泵注制备的瑞芬太尼注射液,$R_{0.5h}$ 组 0.5 h 泵注完,其余各组 2.0 h 泵注完。术中予面罩给氧,维持自主呼吸。

1.3　鞘内单次注射

$R_{2.0h}$+$S_{intrathecal}$ 组和 $R_{2.0h}$+$MMP\text{-}9i_{intrathecal}$ 组大鼠瑞芬太尼尾静脉持续输注前 30 min 预先鞘内单次注射生理盐水 (中国大冢制药有限责任公司)或 MMP-9 抑制剂 (MMP-9 Inhibitor Ⅰ,Calbiochem,德国)。鞘内注射方法如下:七氟醚麻醉大鼠后,参考 Mestre [6] 描述的方法将大鼠俯卧, 定位脊柱 L4-L5 间隙,消毒,以微量注射器从间隙垂直缓慢进针, 尾巴出现颤动或突然侧向甩动为成功穿入鞘内的标志,这时缓慢注入实验药物。

1.4　行为学测试

实验前于行为学实验室分笼适应 3 d, 每天 2 h,使大鼠适应测试环境。药物输注前一天及输注结束后第 2、6 小时和第 1、3、5 天为行为学测试时间点。行为学测试包括机械性疼痛测试和热痛测试。

1.4.1　机械疼痛测试　采用 liu 等[7]描述的方法,选用电子 von Frey 测痛仪 (Almemo 2450, Anesthesiometer IITC) 行机械性疼痛测试(mechanical paw withdrawal treshold,MPWT)。用尖端直径约 0.2 mm 的圆柱形 PE 小针, 对大鼠右后肢足心外侧部进行机械性刺激。测试时 Hair 垂直,微弯,在大鼠足部停留 5 ~ 6 s,此期间或撤离 Hair 的瞬间若出现快速撤足为阳性反应, 读出引起撤足时压力值;若在刺激期间大鼠行走,为可疑

反应,须待大鼠安静后重新检测。每只大鼠测试 5 次,每次间隔 5 min,取 5 次的平均值为该试验点的机械痛阈值。

1.4.2 热痛测试 按 Hargreaves 热痛测试法(thermal paw withdrawal latency,TPWL)测试。使用热辐射刺激仪 (SERIES 8 Model 390G IITC Life Science,美国),设置参数:光强 30 V,基础光强:5 V,自动断电时间 15 s。照射大鼠右侧后足底正中处,记录从开始照射到出现抬脚的时间(s)。重复测量 3 次,每次间隔 5 min,取 3 次的平均值为该实验点的热痛阈值。

1.5 免疫组织化学

除 $R_{0.5h}$ 组,其余 4 组均以免疫荧光染色法检测了 MMP-9 在大鼠脊髓背根神经节(DRG)的表达。

1.5.1 冰冻切片 分别于瑞芬太尼输注后的第 1、3、5 天注射戊巴比妥麻醉 (100 mg/kg, 腹腔注射)处死大鼠。迅速行升主动脉插管,冷生理盐水快速灌注 2 min,待右心耳流出的液体转为无色透明时改为预冷的 40 g/L 多聚甲醛溶液灌注 40 min。随后仔细取出 L4 ~ L6 DRG,继续置入 40 g/L 多聚甲醛溶液 4 ℃固定 2 h; 转入 150 g/L 蔗糖溶液 4 ℃放置沉底,再转入 300 g/L 蔗糖溶液 4 ℃放置沉底。组织用 OCT 包埋,-22 ℃下使用 T9100 冰冻切片机 (LEICA, 德国) 行冰冻切片, 片厚 20 μm,收集于 0.01 mol/L PBS 的 24 孔板内。

1.5.2 免疫荧光染色 组织切片用 PBS (pH = 7.4)清洗 3 次,每次 5 min。室温下封闭液孵育 1 h。吸去封闭液分别加入混合一抗:抗 MMP-9 多克隆抗体(1:500,AB19016,Millipore 德国),抗 GFAP 单克隆抗体 (1:200,MAB360,Millipore 德国),抗 NeuN 多克隆抗体 (1:200,MAB377,Millipore 德国)。4 ℃孵育过夜。次日洗涤后用相应二抗 Cy3 标记 IgG(1:200,A0516,碧云天生物技术研究所)或 FITC 标记 IgG 抗体(1:200,A0568,碧云天生物技术研究所)室温下避光作用 1 h,再次 PBS 清洗 3 遍。随机挑选切片贴于载玻片上,立即于荧光显微镜(OLYMPUS BX51WI)下观察并拍照。

1.5.3 免疫荧光定量分析 每组各时间点取 4 只大鼠, 每只大鼠随机取 2 张切片于相同曝光时间下进行拍照。使用计算机图像分析系统(Image Pro Plus 6.0,Silver Spring,USA) 分别计算每张图片的累积荧光密度(IOD_{sum})和累积面积(A_{sum}),根据公式:meandensity =IOD_{sum}/A_{sum}, 求得平均荧光密度(mean density,MD), 取每组均值作为该组大鼠 MMP-9 阳性细胞的平均荧光密度。

1.6 Western blot 实验

取大鼠 L4~L6 DRG 剪碎称重加入 Tris 裂解液(含 PMSF),低温匀浆,超声破碎,4 ℃ 12 000 r/min 离心 30 min,取上清液。取等量蛋白样品加入上样缓冲液煮样 10 min。用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离目的蛋白并湿法电转至 PVDF 膜上。PVDF 膜在 5%脱脂奶粉溶液中室温下封闭 60 min 之后,用抗 MMP-9 多克隆抗体 (1∶1 000,AB19016,Millipore 德国)4 ℃下孵育过夜。次日 TBST 缓冲液清洗 3 次后用 HRP 标记的二抗 (1∶10 000,#84513,Jackson,美国)室温孵育 2 h。TBST 缓冲液再次清洗 3 次后至暗房曝光, 用 ECL 发光液(#34075,Thermo,美国)孵育 3 min 后在柯达自动洗片机中冲洗照片。结果使用 Image J 软件进行灰度分析,测定灰度值。GAPDH 作为内参。

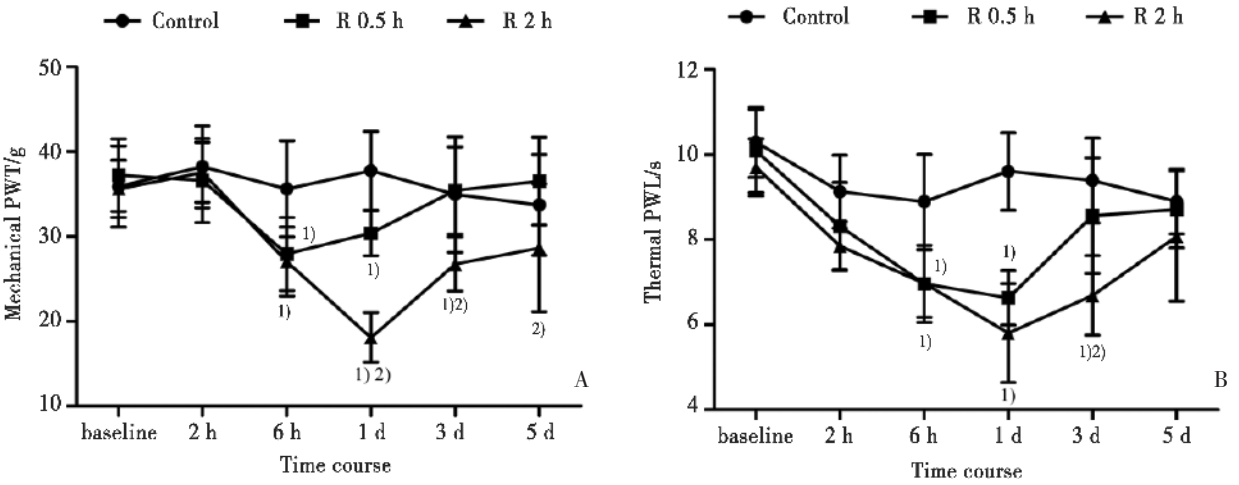
1.7 统计学分析

使用 SPSS 13.0 统计分析软件进行统计分析,实验结果以均数±标准误(mean ± SEM 表示。组间痛阈值以连续性重复测量方法比较, 并以单因素方差分析(one-way ANOVA)比较各组间及组内各时间点的差异。各组大鼠 MMP-9 平均荧光密度及相对灰度值以单因素方差分析比较。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 静脉输注瑞芬太尼可诱导形成大鼠痛觉过敏

行为学结果显示,C 组各时间点、及与 $R_{0.5h}$ 组、$R_{2.0h}$ 组基础阈值之间相比无统计学差异 ($P > 0.05$)。痛阈下降出现在输注后第 6 小时,输注后第 1 天降至最低: 机械痛阈值,$R_{0.5h}$ 组 MPWT = 30.4 ± 2.6,$R_{2.0h}$ 组 MPWT = 18.1 ± 2.9; 热痛阈值,$R_{0.5h}$ 组 TPWL = 6.6 ± 0.6,$R_{2.0h}$ 组 TPWL = 5.8 ± 1.2,$P < 0.01$,vs C 组,图 1 表明瑞芬太尼诱导大鼠痛觉过敏形成。且 $R_{2.0h}$ 组 MPWT 及 TPWL 均值显著低于 $R_{0.5h}$ 组,$P < 0.01$。$R_{2.0h}$ 组痛阈降低可持续至输注后第 5 天; 而 $R_{0.5h}$ 组则持续至输注后第 3 天,第 5 天基本恢复正常。$R_{0.5h}$ 组与 $R_{2.0h}$ 组相比,虽然痛阈值均下降, 但下降的程度 $R_{2.0h}$ 组较 $R_{0.5h}$ 组更为明显,且持续时间更长。鉴于输注瑞芬太尼



The time course of mechanical threshold （A） and thermal latency （B） on hind paws after continuous infusion of remifentanil 0.5 h or 2 h. Intravenous infusion of remifentanil could induce significant hyperalgesia. (n = 8/group. 1) $P < 0.01$, group Remifentanil on 2nd, 6th hour and day 1, 3, 5 vs group Control; 2) $P < 0.01$, group R_{2h} on 2nd, 6th hour and day 1, 3, 5 vs group $R_{0.5h}$)

图 1　瑞芬太尼输注各组行为学阈值比较

Fig.1　Hyperalgesia induced by remifentanil infusion

2 h 可诱导大鼠形成显著性痛觉过敏,因此,在之后的机制研究中均采用 $R_{2.0h}$ 组。

2.2 瑞芬太尼输注可上调大鼠 DRG 神经元中 MMP-9 的表达

MMP-9 免疫结果显示，持续输注瑞芬太尼 2 h,术后第 1 天 DRG 中 MMP-9 的表达水平即开始升高 MD = 0.063 ± 0.002,图 2,并于输注后第 3 天达到高峰 MD = 0.081 ± 0.002,$P < 0.01$,vs C 组,图 2，第 5 天则开始恢复正常 MD = 0.044 ± 0.003,$P > 0.05$,vs C 组,图 2。提示瑞芬太尼输注可上调大鼠 DRG 神经元中 MMP-9 的表达水平。

MMP-9 和 GFAP、NeuN 的双染结果表明：MMP-9 在神经元中表达,而在卫星细胞中仅部分表达(图 3)。

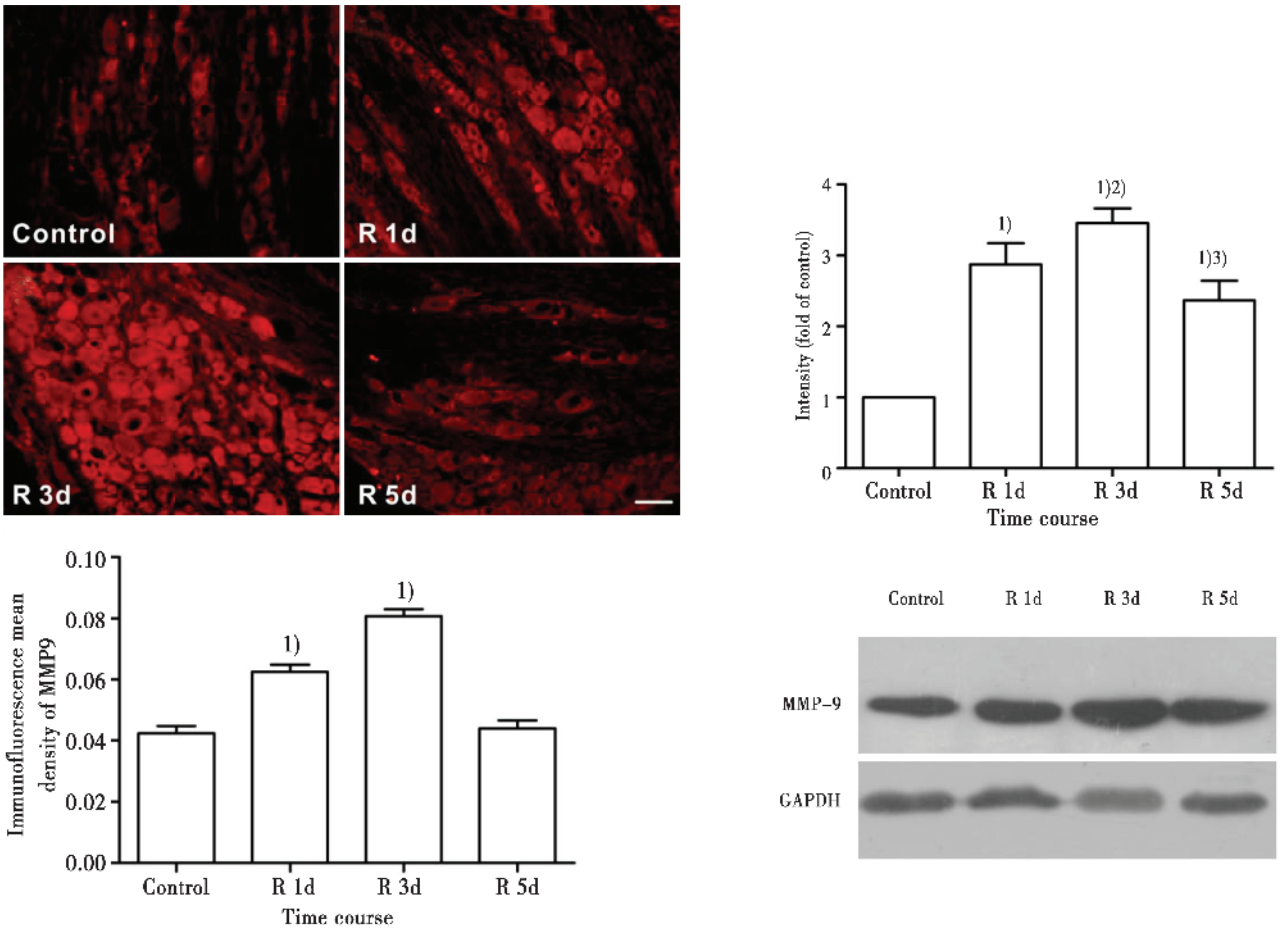
2.3 预先鞘内注射 MMP-9 抑制剂可缓解瑞芬太尼输注引起的痛觉过敏

行为学测试，鞘内单次注射生理盐水或 MMP-9 Inhibitor I 后痛阈值与基础阈值相比差异没有统计学意义($P > 0.05$),表明注射生理盐水或 MMP-9 Inhibitor I 不会引起疼痛阈值的变化。与 $R_{2.0h}$ + $S_{intrathecal}$ 组相比，预先鞘内注射 MMP-9 Inhibitor I 可明显减轻瑞芬太尼输注后引起的第 1 天机械痛及热痛的疼痛程度 $R_{2.0h}$+MMP-9$i_{intrathecal}$ 组：MPWT = 32 ± 4,TPWL = 9.0 ± 1.4($P < 0.01$,vs $R_{2.0h}$ + $S_{intrathecal}$ 组,图 4),且第 1 天即接近正常对照组水平 C 组：MPWT = 32.2 ± 2.6,TPWL = 10.0 ± 0.9($P > 0.05$,vs $R_{2.0h}$ + MMP-9$i_{intrathecal}$ 组,图 4)。

免疫结果显示,与 $R_{2.0h}$ + $S_{intrathecal}$ 组相比,R2.0h +MMP-9$i_{intrathecal}$ 组第 1 天及第 3 天 DRG 神经元中 MMP-9 的表达均降低（MD = 0.034 ± 0.0018,day 1;MD = 0.043 ± 0.0020,day 3,$P < 0.01$,vs $R_{2.0h}$ + $S_{intrathecal}$ 组,图 5)。本部分结果进一步证实背根神经节 MMP-9 在瑞芬太尼诱导的痛敏中发挥着重要作用。

3　讨　论

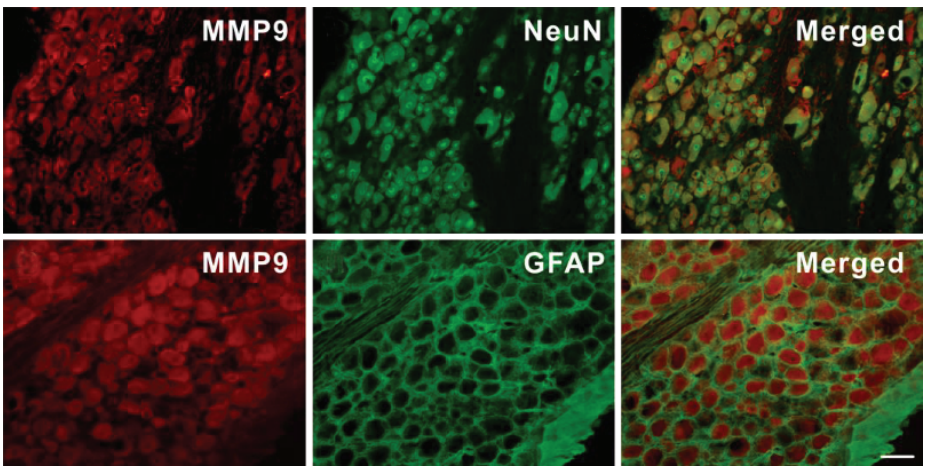
本研究发现连续输注瑞芬太尼可导致大鼠痛觉过敏,输注后第 6 小时大鼠痛阈值即下降,第 1 天下降最为明显。痛阈下降的程度及持续时间与瑞芬太尼输注时间有关,输注 0.5 h 组痛阈值下降持续 3 d,输注 2 h 组痛阈值下降更为明显且可持续 5 d。免疫荧光及免疫印迹结果则表明瑞芬太尼痛觉过敏的大鼠,DRG 中 MMP-9 的表达水平注射后第 1 天即上调,第 3 天达到高峰。预先鞘内注射 MMP-9 抑制剂,可明显抑制输注瑞芬太尼后大鼠 DRG 中 MMP-9 的表达上调，且明显减轻行为学测试中瑞芬太尼输注导致的痛阈下降。说明瑞芬太尼导致的痛觉过敏与 DRG 中 MMP-9 的水平增加有关。



Immunohistochemistry(left panel) and Western blot(right panel) show immunoreactivity of MMP-9 at day1,3,5 in remifentanil infusion group. MMP-9 activity was significantly increased following remifentanil infusion and peaked 3rd after infusion. $n = 4$/group; 1) $P < 0.01$, group R_{2h} on day 1, 3, 5 vs group Control

图 2 瑞芬太尼输注上调大鼠 DRG 神经元中 MMP-9 的表达

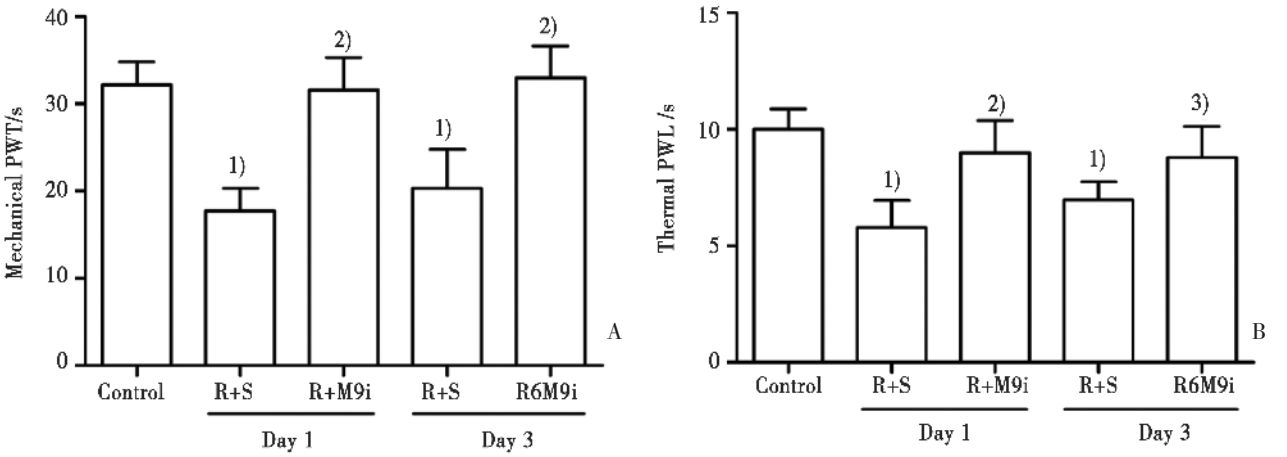
Fig.2 Remifentanil infusion up-regulates the expression of MMP-9 in DRG



Confocal images showed that distribution of MMP-9(red) and its colocalization with the neurons(NeuN, green, a marker of neurons) and satellite glial cells (GFAP, green, a marker of satellite glialcells).The increased MMP-9 immunoreactivity after remifentanil injection was colocalized primarily with neurons, while only a small amount of colocalization of MMP-9 with satellite glial cells.

图 3 瑞芬太尼输注后 DRGMMP-9 与神经元、卫星胶质细胞共染结果

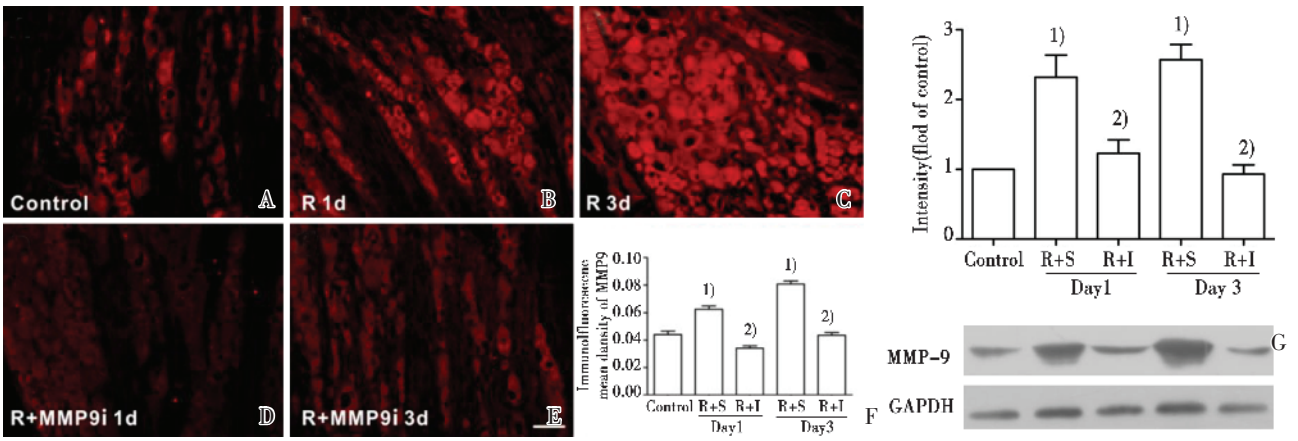
Fig.3 Colocalization of MMP-9 and NeuN or GFAP in dorsal root ganglion after injection of Remifentanil



Repetitive administration of MMP-9 inhibitor, but not saline, before remifentanil infusion can adverse behavioral thresholds compared with those in hyperalgesia rats induced by remifentanil, (n = 8/group, 1) $P < 0.01$, group $R_{2.0\,h}$ + $S_{intrathecal}$ on day 1, 3 vs group Control; 2) $P < 0.01$, group $R_{2.0\,h}$+MMP-$9_{iintrathecal}$ on day 1, 3 vs group $R_{2.0\,h}$ + $S_{intrathecal}$; 3) $P < 0.05$, group $R_{2.0\,h}$+MMP-$9i_{intrathecal}$ on day 1, 3 vs group $R_{2.0\,h}$ + $S_{intrathecal}$)

图 4　MMP-9 抑制剂缓解瑞芬太尼输注引起的痛觉过敏

Fig.4　MMP-9 inhibitor adverse remifentanil-induced hyperalgesia



Immunohistochemistry (Fig.5 A-F) and Western blot (Fig.5 G) results show that remifentanil infusionincreases levels of expression of MMP-9, which was significantly reduced by MMP-9 inhibitor.　n = 4/group, 1) $P < 0.01$, group $R_{2.0\,h}$ + $S_{intrathecal}$ on day 1, 3 vs group Control; 2) $P < 0.01$, group $R_{2.0\,h}$+MMP-$9i_{intrathecal}$ on day 1, 3 vs group $R_{2.0\,h}$ + $S_{intrathecal}$

图 5　MMP-9 抑制剂下调瑞芬太尼痛觉过敏大鼠 DRG 中 MMP-9 的表达

Fig.5　MMP-9 inhibitor adverse the increase expression of MMP-9 in DRG in remifentanil induced hyperalgesia rats

Lenz等[8]研究发现在临床中输注瑞芬太尼之后，可引起健康成人针刺痛过敏和冷升压试验阈值降低。Aguado 等[9]亦发现,静脉输注瑞芬太尼后给予小鼠同等程度疼痛刺激达到同等镇痛效应所需吸入麻醉剂的剂量增加，说明瑞芬太尼输注可导致小鼠痛阈下降。然而,也有一些研究未发现瑞芬太尼输注引起痛觉阈值下降，如 Martucci 等[10]在对 19 例健康志愿者的研究中发现,输注瑞芬太尼或生理盐水均导致了热痛觉过敏,因此他认为痛觉过敏是重复性的测试引起而与瑞芬太尼无关。同时,Ishii 等[11]的动物实验研究也认为持续性腹腔内注射瑞芬太尼并未引起小鼠的药物耐受和痛觉过敏。目前大部分大鼠实验采用腹腔或皮下注射瑞芬太尼的给药方式，与临床实际操作不符合，可能为瑞芬太尼是否导致痛觉过敏结果差异的原因。本实验模型首次模拟临床常用的丙泊酚和瑞芬太尼联合静脉麻醉，模拟临床瑞芬太尼输注方法即经静脉持续输注证实，输注瑞芬太尼可

以引起痛觉过敏，且痛觉过敏程度及持续时间与输注时程相关，与大部分的临床观察及动物实验结果相似。提示我们在临床使用瑞芬太尼麻醉时需注意使用的剂量及输注时间，并采取相应措施预防或减轻输注后痛觉过敏的产生。

阿片诱导的痛觉过敏是一种阿片药物暴露后产生的与镇痛效应相对的疼痛敏感状态，由于对疼痛刺激更加敏感，因而需要更大剂量的镇痛药物来缓解疼痛[1,12]。普遍认为多种信号转导途径、神经递质及神经胶质细胞等均参与到了瑞芬太尼诱导的痛觉过敏。如中枢神经系统敏化：阿片药物引起神经递质 SP 和降钙素释放，导致脊髓背角神经元敏化[13]；NMDA 受体介导的伤害性刺激增加[14]；脊髓强啡肽、细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinases，ERK1/2)、c-Fos 蛋白的表达增强[15]；脊髓下行疼痛易化机制的激活[16]等等从而导致神经元敏感化引起痛觉过敏。近期有关痛觉过敏的研究主要集中于趋化因子与炎性因子领域，促炎因子 TNF-α、IL-1β、IL-6、及趋化因子 CCL2 等都在疼痛模型中表达增加[17]。

MMP 属于金属蛋白酶超家族中的一员，目前已知有 26 种(MMP1-26)。MMP 几乎可以裂解细胞外基质的各种蛋白成分；亦能够裂解细胞因子前体从而释放出有活性的细胞因子如 IL-1β，从而参与多种病理性过程的发生，如关节炎、心血管系统疾病、肿瘤转移等[18]。在神经系统中，关于 MMP-2 以及 MMP-9 作用的研究更为深入。研究表明，MMP-9 与多种神经炎性疾病的发生密切相关[19-21]。Larsen[22]首次报道了在脊髓损伤后，中枢神经系统中 MMP-9 蛋白水平增高。最近研究发现，MMP-2 及 MMP-9 在 L5 脊神经结扎所造成的神经病理性疼痛的诱发及维持过程中分别发挥不同的重要作用[23]。Berta 认为急性的吗啡输注可以通过 MMP-9 引起 IL-1b 的激活，导致炎症的发生引起疼痛，而在用 Mmp9-/-基因敲除小鼠制作的大鼠疼痛模型中，IL-1b 并未被激活[4]。

我们的研究发现瑞芬太尼导致的痛觉过敏与 DRG 中 MMP-9 的表达水平增加相关，与行为学结果一致。而运用靶向性的 MMP-9 抑制剂可以抑制 MMP-9 的表达并阻止痛觉过敏的发生。因此我们推断，瑞芬太尼导致痛觉过敏的机制可能是，瑞芬太尼作用于 μ 阿片受体，引起神经元中 MMP-9 释放至胞外进而诱导卫星胶质细胞激活，引起炎性因子如：IL-1b 释放形成伤害性刺激来对抗阿片药物的镇痛作用导致痛觉过敏。这些推测有待脊髓炎性因子的测试进一步证实。

此外，我们还发现输注瑞芬太尼后可导致 DRG 中卫星胶质细胞(SGC)被激活。DRG 神经元是感觉传入的第一级神经元，在痛觉感知、调节和传导过程中起着重要的作用。SGC 和初级神经元通过缝隙连接紧密地连接在一起[24-26]，在神经损伤慢性炎症中，GFAP 适应性地上调参与到免疫反应的应答中。这种上调主要是依赖于神经元之间的相互作用和局部的炎症反应。

综上所述，本研究表明背根神经节 DRG 的 MMP-9 路径参与了瑞芬太尼诱导痛觉过敏的形成，为揭示瑞芬太尼痛觉过敏的机制提供了新的证据，并为临床上防治瑞芬太尼痛觉过敏提供了有效的措施。

参考文献

[1] Bekhit MH. Opioid-induced hyperalgesia and tolerance [J]. Am J Ther, 2010, 17(5): 498-510.

[2] Angst MS, Clark JD. Opioid-induced hyperalgesia: a qualitative systematic review [J]. Anesthesiology, 2006, 104(3): 570-587.

[3] Sun YE, Zhang W, Liu Y, et al. Intrathecal injection of JWH015 attenuates remifentanil-induced postoperative hyperalgesia by inhibiting activation of spinal glia in a rat model[J]. Anesth Analg, 2014, 118(4): 841-853.

[4] Berta T, Liu T, Liu YC, et al. Acute morphine activates satellite glial cells and up-regulates IL-1beta in dorsal root ganglia in mice via matrix metalloprotease-9[J].Mol Pain, 2012, 8: 18.

[5] Liu WT, Han Y, Liu YP, et al. Spinal matrix metalloproteinase-9 contributes to physical dependence on morphine in mice[J]. J Neurosci, 2010, 30(22): 7613-7623.

[6] Mestre C, Pelissier T, Fialip J, et al. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 1994, 32(4): 197-200.

[7] Liu WT, Han Y, Liu YP, et al. Spinal matrix metalloproteinase-9 contributes to physical dependence on morphine in mice[J]. J Neurosci, 2010, 30(22): 7613-7623.

[8] Lenz H, Raeder J, Draegni T, et al. Effects of COX inhibition on experimental pain and hyperalgesia during and after remifentanil infusion in humans [J]. Pain, 2011, 152(6): 1289-1297.

[9] Aguado D, Abreu M, Benito J, et al. Effects of naloxone on opioid-induced hyperalgesia and tolerance to remifentanil under sevoflurane anesthesia in rats [J]. Anesthesiology, 2013, 118(5): 1160-1169.

[10] Martucci KT, Eisenach JC, Tong C, et al. Opioid-independent mechanisms supporting offset analgesia and temporal sharpening of nociceptive information [J]. Pain, 2012, 153(6): 1232-1243.

[11] Ishii H, Petrenko AB, Kohno T, et al. No evidence for the development of acute analgesic tolerance during and hyperalgesia after prolonged remifentanil administration in mice[J]. Mol Pain, 2013, 9: 11.

[12] Lee M, Silverman SM, Hansen H, et al. A comprehensive review of opioid-induced hyperalgesia [J]. Pain Physician, 2011, 14(2): 145-161.

[13] Belanger S, Ma W, Chabot JG, et al. Expression of calcitonin gene-related peptide, substance P and protein kinase C in cultured dorsal root ganglion neurons following chronic exposure to mu, delta and kappa opiates[J]. Neuroscience, 2002, 115(2): 441-453.

[14] Celerier E, Laulin J, Larcher A, et al. Evidence for opiate-activated NMDA processes masking opiate analgesia in rats[J]. Brain Res, 1999, 847(1): 18-25.

[15] Campillo A, Gonzalez-Cuello A, Cabanero D, et al. Increased spinal dynorphin levels and phospho-extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 and c-Fos immunoreactivity after surgery under remifentanil anesthesia in mice[J]. Mol Pharmacol, 2010, 77(2): 185-194.

[16] Ossipov MH, Lai J, King T, et al. Antinociceptive and nociceptive actions of opioids[J]. J Neurobiol, 2004, 61(1): 126-148.

[17] Kawasaki Y, Zhang L, Cheng JK, et al. Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord[J]. J Neurosci, 2008, 28(20): 5189-5194.

[18] Chakraborti S, Mandal M, Das S, et al. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview [J]. Mol Cell Biochem, 2003, 253(1-2): 269-285.

[19] Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity[J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4(8): 617-629.

[20] Yong VW. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS [J]. Nat Rev Neurosci, 2005, 6(12): 931-944.

[21] Chattopadhyay S, Myers RR, Janes J, et al. Cytokine regulation of MMP-9 in peripheral glia: Implications for pathological processes and pain in injured nerve [J]. Brain Behav Immun, 2007, 21(5): 561-568

[22] Larsen PH, Wells JE, Stallcup WB, et al. Matrix metalloproteinase-9 facilitates remyelination in part by processing the inhibitory NG2 proteoglycan [J].J Neurosci, 2003, 23(35): 11127-11135.

[23] Kawasaki Y, Xu ZZ, Wang X, et al. Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain[J]. Nat Med, 2008, 14(3): 331-336.

[24] Hanani M, Huang TY, Cherkas PS, et al. Glial cell plasticity in sensory ganglia induced by nerve damage [J]. Neuroscience, 2002, 114(2): 279-283.

[25] Dublin P, Hanani M. Satellite glial cells in sensory ganglia: their possible contribution to inflammatory pain [J]. Brain Behav Immun, 2007, 21(5): 592-598.

[26] Zhang X, Chen Y, Wang C, et al. Neuronal somatic ATP release triggers neuron-satellite glial cell communication in dorsal root ganglia [J]. Proc NatI Acad Sci USA, 2007, 104(23): 9864-9869.

(编辑　刘清海)