

不同作用机制的镇痛药对细胞缝隙连接通道蛋白 Cx43 的作用

何 波¹, 李 珏¹, 叶 华², 余庆梅¹

(中山大学附属第二医院 1. 麻醉科, 2. 外科, 广东 广州 510120)

摘 要:【目的】探讨不同作用机制的镇痛药对细胞缝隙连接通道功能的作用。【方法】天然表达 Cx43 的小鼠睾丸支持细胞 TM4 实验前用细胞诱导培养液培养使其表达形成有效的细胞缝隙连接(GJ), 细胞接种荧光示踪法测定镇痛药对表达 Cx43 的 TM4 细胞 GJ 功能的影响, 同时 Western blot 检测细胞缝隙连接通道蛋白之一 Cx43 的表达。【结果】吗啡不影响 TM4 细胞中 Cx43 的 GJ 功能, 曲马多和凯纷均抑制 TM4 细胞中 Cx43 的 GJ 功能, 但均不影响 Cx43 的表达。【结论】曲马多和凯纷均抑制由 Cx43 组成的细胞缝隙连接功能, 提示了一个新的镇痛机制: 即曲马多和凯纷可能通过抑制中枢神经元的 GJ 产生镇痛作用。

关键词: 缝隙连接; 镇痛药; Cx43

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2010)06-0802-04

Effects of Different Analgesics on Gap Junction Protein Cx43

HE Bo¹, LI Jue¹, YE Hua², YU Qing-mei¹

(1. Department of Anesthesiology, 2. Department of Surgery, The Second Affiliated Hospital,
Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 This study was designed to investigate the effects of analgesics with different mechanism on cell gap junction (GJ) function. Mouse TM4 cells expressing Cx43 were cultured with medium to inducing effective GJ. 【Methods】 The role of gap junctions in the modulation of TM4 cell line expressing Cx43 was explored by "Parachute" dye-coupling assay. Cx43 protein expression was detected by Western blot. 【Results】 Tramadol and flurbiprofen, but not Morphine, significantly reduced Cx 43 gap junction function, however this effect could not regulate Cx43 protein expression. 【Conclusion】 The results suggest that Tramadol and flurbiprofen depress function of Cx 43 gap junction activity, and Morphine have no effect on this gap junction. Tramadol and flurbiprofen inhibit the central nerve GJ to produce analgesia.

Key words: gap junction; analgesics; connexin 43

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2010, 31(6): 803-806]

细胞缝隙连接(gap junction, GJ)是细胞之间的一种蛋白质连接通道, 广泛存在于实质性脏器, 如心脏、肝脏、肾脏、中枢神经、皮肤、肌肉等组织中, 由特殊的通道蛋白——连接蛋白(connexin, Cx)组成。6个Cx环绕在一起组成一个“半通道”, 两个位于各自细胞膜上的“半通道”对接在一起形成一个GJ。GJ沟通相邻细胞的胞浆, 细胞浆中分子质量<1 ku的物质, 如离子、细胞信号分子

和代谢物质等可通过GJ扩散、转运到与其毗邻的细胞浆。GJ提供了一种细胞与细胞之间的直接联系通道, 是细胞之间信号传递的一种重要方式。现已证明GJ在同步细胞的活动、维持细胞内环境稳定、控制细胞的生长和发育等生命过程中发挥十分重要的作用。吗啡属阿片类麻醉性镇痛药。阿片类镇痛药的作用机制比较明确^[1-3]: 由内源性阿片肽和阿片受体共同组成机体的镇痛系统, 能减弱

收稿日期: 2010-07-20

基金项目: 广东省医学科研基金(A2010170)

作者简介: 何波, 硕士, 主治医师, E-mail: mzkhh2283@yahoo.com.cn

或阻滞痛觉信号的传递,产生镇痛作用。而非阿片类中枢性镇痛药镇痛机制尚未明了。曲马多是较常用的非阿片类中枢性镇痛药。研究表明曲马多虽可与阿片受体结合,但对 μ 受体的亲和力相当于吗啡的1/6 000,对 κ 受体亲和力则仅为 μ 受体的1/25,可完全拮抗吗啡抗伤害效应的剂量的纳洛酮只能使曲马多抗伤害效应减少45%^[4]。氟比洛芬酯属解热镇痛抗炎药,具解热、镇痛、抗炎、抗风湿作用,由于其抗炎作用与糖皮质激素不同,故又称为非甾体抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)。NSAIDs的镇痛作用主要是通过抑制外周及炎症组织的前列腺素(prostaglandins, PGs)合成,削弱PG对痛觉感受器的增敏和缓激肽、5-HT的致痛效应。有许多研究^[5]探讨了镇痛药对细胞间通讯(gap junctional inter-cellular communication, GJIC)的影响,而我们的研究^[6]首次证明了麻醉浓度的曲马多和氟比洛芬酯可抑制Hela细胞中由Cx32形成的GJ功能,而吗啡无此抑制作用。由于每一种缝隙连接蛋白的表达均有组织及细胞类型的特异性,大多数组织器官及各种细胞表达的缝隙连接蛋白也不止一种, Cx32和Cx43在大脑中均有丰富表达,故本文将进一步从细胞缝隙连接通道的角度来探讨不同化学结构的镇痛药(吗啡、曲马多和凯纷)对天然表达Cx43的小鼠睾丸支持细胞TM4 GJIC的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

天然表达Cx43的小鼠睾丸支持细胞TM4由本实验室保存;吗啡(morphine,沈阳第一制药厂制造);曲马多(tramadol,山东鲁抗辰欣药业有限公司);凯纷(flurbiprofen,北京泰德制药有限公司);荧光染料CM-Dil、calcein-AM(Molecular Probes)2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB, Calbiochem); G-418(Calbiochem);潮霉素(Hygromycin, Calbiochem);多西环素(Doxycycline, Calbiochem);DMEM粉(美国Gibco公司产品);PBS(pH 7.2)粉剂(美国Gibco公司产品);胎牛血清(FBS,美国Gibco公司产品);青-链霉素(Penicillin-Streptomycin,美国Gibco产品);胰蛋白酶(Typsin,美国Gibco公司产品);二甲亚砜(DMSO,美国Sigma公司产品)。其它常用试剂均为国产分析纯级。

1.2 表达Cx43的TM4细胞的培养传代

使用含体积分数50 mL/L马血清、25 mL/L小牛血清的DMEM/F12培养液,置于37℃、含体积分数5% CO₂及饱和湿度的细胞培养箱中培养。细胞常规培养于培养瓶中,2.5 g/L的胰蛋白酶消化法进行传代,一周传代2~3次,传代比例约为1:5~1:6。

实验前将表达Cx43的小鼠睾丸支持细胞TM4用细胞诱导培养液培养48 h,使其表达形成有效的GJ。

1.3 镇痛药对培养细胞GJ功能的影响

用细胞接种荧光示踪法(Parachute Assay)^[7-10]测定镇痛药对培养细胞GJ功能的影响。将表达有Cx43的TM4细胞与荧光指示剂calcein-AM和DiI-CM共同孵育,使calcein-AM和DiI-CM进入细胞。该细胞称为“供体细胞”(donor cell)。将“供体细胞”接种到表达有相同的Cx,已生长融合的表达Cx43的TM4细胞(“接受细胞”, receiver cells)上,培养4 h。待形成稳定的GJ后,用显微荧光系统观察,记录GJ功能。小分子的calcein(发绿色荧光)可以通过GJ进入相邻的“接受细胞”;但大分子的DiI不能自由通过GJ而留在“供体细胞”内,使之易于识别。计数一个“供体细胞”周围含有calcein的“接受细胞”作为GJ功能指标。我们以前的研究证明,2-APB能够直接作用于Cx,而抑制Cx43组成的TM4细胞GJ功能^[11]。因此,本实验用2-APB作为阳性对照药。

1.4 Western blot检测Cx43表达

表达Cx43的TM4细胞经冷PBS洗3次,加体积分数0.5% NP-40裂解液(50 mmol/L Tris.Cl pH 6.8、15 mmol/L NaCl、5 mol/L EDTA、0.5% NP-40、1 mmol/L PMSF)裂解细胞2 h,细胞裂解后用超声破碎仪破碎细胞,12 000 ×g,室温离心30 min取裂解液上清。然后用Bio-Rad蛋白定量试剂(Dc Protein Assay Reagent)定量。取蛋白30 μg与上样缓冲液混匀,100℃加热5 min变性,离心后上样,100 g/L SDS-PAGE(Bio-Rad)电泳分离,然后电转移至硝酸纤维素膜。用含5 g/L脱脂奶粉的TBST室温封闭1 h,加入鼠一抗抗HA(1:1 000, Sigma公司)4℃孵育过夜,用TBST洗去一抗后加入二抗(1:2 000, GE公司),室温孵育30 min。同一硝酸纤维素膜上免疫复合物经洗脱以后,再与抗actin抗体(1:10 000, Sigma公司)孵育,

Western blot 检测并以 actin 条带确定上样量。硝酸纤维素膜用增强型化学发光试剂盒(GE 公司)显影后于凝胶成像系统照像记录, 然后用 Imagetool 分析软件测定目的条带的灰度。实验重复 3 次, 蛋白表达水平用目的条带与内参的灰度比值表示。

1.5 统计分析

实验结果使用 SPSS 13.0 软件进行分析。两组之间计量资料比较进行 *t* 检验, 多组之间计量资料比较进行 ANOVA 分析, 组间比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 认为有统计学意义, 统计图表采用 Sigma Plot 绘制。

2 结 果

2.1 吗啡不影响细胞 GJ 功能

本研究在天然表达 Cx43 的 TM4 细胞, 用“细胞接种荧光示踪法”(Parachute Assay), 分别测定了 1、10 $\mu\text{g/mL}$ 吗啡对细胞 GJ 通透性的影响。吗啡加入细胞培养基中, 与供体细胞和接受细胞孵育 4 h 后开始测定。以“供体细胞”周围含有 calcine 的“接受细胞”作为 GJ 功能指标(图 1)。表 1 显示: 2-APB (2.3 $\mu\text{g/mL}$) 能够显著降低 calcine 通过 GJ 在细胞之间的传递, 其抑制率为 38%。吗啡(1 和 10 $\mu\text{g/mL}$) 对细胞 GJ 功能均无显著影响 ($P > 0.05$)。

2.2 曲马多能抑制细胞 GJ 功能

曲马多(1 和 10 $\mu\text{g/mL}$) 能够降低 calcine 通过 GJ 在细胞之间的传递, 抑制率分别为 20%、40%。10 $\mu\text{g/mL}$ 曲马多对 GJ 的抑制作用与 2-APB (2.3 $\mu\text{g/mL}$) 相当 ($P > 0.05$, 表 1)。

2.3 凯纷能抑制细胞 GJ 功能

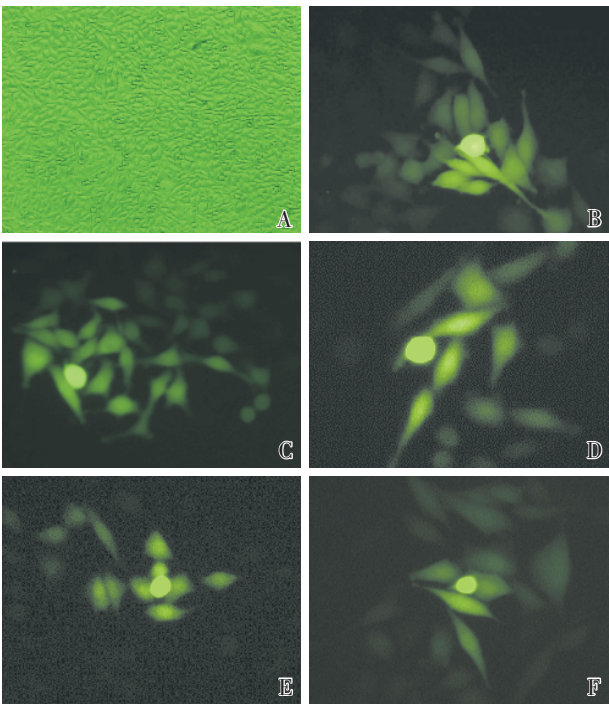


图 1 镇痛药对表达 Cx43 的 TM4 细胞 GJ 功能的影响
Fig.1 Effects of analgesics on dye coupling through GJ composed of Cx43 in transfected TM4 cells

A: The TM4 cell line expressing Cx43 were grown to confluence (Mag.100 $\times$); B: Control group as shown by parachute dye coupling assay ($\times 400$); C: Morphine group as shown by parachute dye coupling assay ($\times 400$); D: Tramadol group as shown by parachute dye coupling assay ($\times 400$); E: Flurbiprofen group as shown by parachute dye coupling assay ($\times 400$); F: 2-APB group as shown by parachute dye coupling assay ($\times 400$).

表 1 表明: 凯纷(1 和 10 $\mu\text{g/mL}$) 能够显著抑制 calcine 通过 GJ 在细胞之间的传递, 抑制率分别为 32% 和 50%。10 $\mu\text{g/mL}$ 凯纷对 GJ 的抑制作用强于 2.3 $\mu\text{g/mL}$ 2-APB ($P < 0.05$)。

表 1 镇痛药对表达 Cx43 的 TM4 细胞 GJ 的影响

Table 1 Rate of analgesics on dye coupling through GJ composed of Cx43 in transfected TM4 cells (Dye spread rate, %)

Control	2-APB	Morphine		Tramadol		Flurobiprofen	
	2.3 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}^{1)}$	10 $\mu\text{g/mL}^{1)2)}$	1 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}^{3)4)}$	1 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}^{3)5)}$
100%	62 $\pm$ 0.2	98 $\pm$ 0.1	96 $\pm$ 0.3	80 $\pm$ 0.3	60 $\pm$ 0.4	68 $\pm$ 0.3	50 $\pm$ 0.2

1) compared with control, $P > 0.05$; 2) compared with 1 $\mu\text{g/mL}$, $P > 0.05$; 3) compared with 1 $\mu\text{g/mL}$, $P < 0.05$; 4) compared with 2.3 $\mu\text{g/mL}$ 2-APB, $P > 0.05$; 5) compared with 2.3 $\mu\text{g/mL}$ 2-APB, $P < 0.05$

2.4 吗啡、曲马多、凯纷不影响 Cx43 的表达

与对照组相比, 10 $\mu\text{g/mL}$ 的吗啡与 10 $\mu\text{g/mL}$ 的曲马多及 10 $\mu\text{g/mL}$ 的氟比洛芬酯作用 1 h, 4 h

和 24 h 对 Cx43 蛋白表达均没有影响(图 2), 表明曲马多和氟比诺芬酯对 GJ 功能的影响并不是通过改变连接蛋白表达水平。

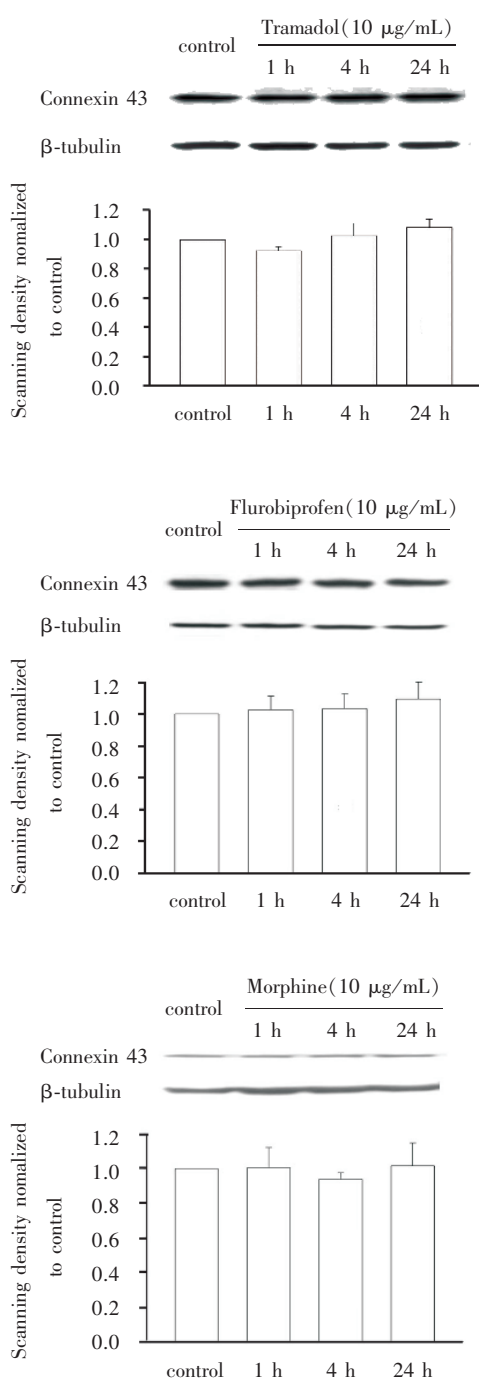


图 2 镇痛药对 TM4 细胞中 Cx43 表达的影响

Fig.2 Effects of analgesics on the expression of Cx43

Western blot probed with mouse anti-HA IgG showing the effects of analgesics on induction of Cx43 expression. Protein expression 1, 2, 4 h compared with control, $P > 0.05$.

3 讨 论

GJ广泛存在于神经细胞、神经胶质细胞、脑室管膜细胞和软脑膜细胞之间。细胞浆内的小分子

物质如重要无机离子(如 Na^+ , K^+ , H^+ 等)、代谢分子和第二信使物质(Ca^{2+} , IP_3 , cAMP 和 ATP)能够通过 GJ 在毗邻的细胞之间传递,从而实现细胞之间的生物信号和物质传递。GJ 在 CNS 的主要功能包括参与细胞间信息传递、神经脉冲传导和协调神经功能活动。GJ 具有传导快,阻抗低,延搁时间短的特点。GJ 允许带电离子在细胞之间直接交换,形成神经元的电突触。这种电突触联络是 CNS 重要的同步化机制,在呼吸节律、昼夜节律、脊髓前角运动神经元持续运动形式的产生与维持起重要作用。Mantz、Masaki 及 Wentlandt 等^[12-17]研究了吸入麻醉药和静脉麻醉药对星形胶质细胞 GJIC 的影响,发现七氟醚、安氟醚、异氟醚、氟烷以及丙泊芬、依托咪脂等麻醉药可不同程度地阻断 GJ,并推测这可能与麻醉作用机制有关。有报道在慢性神经痛大鼠的脊髓背角星形胶质细胞 Cx43 的表达明显增加^[18]。也有学者在大鼠一侧胫、腓骨骨折后,鞘内注射甘珀酸(GJ 阻断剂)后痛域升高,胶质原纤维酸性蛋白表达下降^[19]。均提示 GJ 在疼痛的发生和维持中起重要作用。然而,至今尚不清楚 GJ 在疼痛发生机制中有无作用,也很少有关于镇痛药对 GJ 影响的研究报道。Mantz 等^[12-13]等人研究了部分阿片受体激动药对神经细胞 GJIC 的影响,其结果表明,吗啡等该类镇痛药对星形胶质细胞的 GJIC 无明显的抑制作用。

本研究用“细胞接种荧光示踪法”测定了 3 种不同化学结构的镇痛药吗啡、曲马多和凯纷对由 Cx43 组成的 TM4 细胞 GJ 功能的影响。结果证明,吗啡对 GJ 功能没有明显影响。这一结果与 Mantz 等^[11]的报道符合。

本研究首次证明了麻醉浓度(1 ~ 10 µg/mL)的曲马多和凯纷可抑制由 Cx43 组成的 GJ 功能,而 Cx43 在大脑中丰富表达,并且研究表明慢性神经痛大鼠的脊髓背角星形胶质细胞 Cx43 的表达明显增加,这一结果提示了一个新的镇痛机制:镇痛药曲马多和凯纷可能通过抑制中枢神经元的 GJ 作用产生镇痛;但是它们对 GJ 功能的影响并不是通过改变连接蛋白表达水平。GJ 通道两端的开口都位于细胞内,药物主要通过以下两种机制影响 GJ 功能:影响 GJ 的通透性,以及改变 Cx 的结构、数量及分布。在“细胞接种荧光示踪”实验中,曲马多和凯纷作用于细胞的时间均不超过 4 h,

在这段时间内,曲马多和凯纷引起 GJ 功能的变化主要是通过改变 GJ 的“门控”功能,即通透性而产生的^[20]。本研究只观察了曲马多和凯纷对由 Cx43 组成的 GJ 功能的影响,它们对其他 Cx 组成的 GJ 有无作用,还有待于进一步研究证明。此外,曲马多和凯纷抑制 GJ 功能的机制,是直接作用还是通过改变细胞内其它因素,如膜电位、pH 值、离子浓度、Cx 的磷酸化状态等等而间接影响 GJ 的,都需要进一步研究证实。

综上所述,曲马多和凯纷可抑制由 Cx43 组成的 GJ 功能,这可能是它们新的镇痛作用机制。

参考文献:

- [1] Eisinger DA, Schulz R. Mechanism and consequences of delta-opioid receptor internalization [J]. *Crit Rev Neurobiol*, 2005, 17(1): 1-26.
- [2] Przewlocki R, Przewlocka B. Opioids in chronic pain [J]. *Eur J Pharmacol*, 2001, 429(1-3): 79-91.
- [3] Zhang X, Bao L, Guan JS. Role of delivery and trafficking of delta-opioid peptide receptors in opioid analgesia and tolerance [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2006, 27(6): 324-329.
- [4] Dayer P, Collart L, Desmeules J. The pharmacology of tramadol[J]. *Drugs*, 1994, 47 (1): 3-7.
- [5] Saez JC, Contreras JE, Bukauskas FF, et al. Gap junction hemichannels in astrocytes of the CNS [J]. *Acta Physiol Scand*, 2003, 179(1): 9-22.
- [6] He B, Tong X, Wang L, et al. Tramadol and Flubiprofen Depress the Cytotoxicity of Cisplatin via Their Effects on Gap Junction [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(18): 5803-5810.
- [7] Lin JH, Weigel H, Cotrina ML, et al. Gap-junction-mediated propagation and amplification of cell injury [J]. *Nature Neurosci*, 1998, 1(6): 494-500.
- [8] Krutovskikh VA, Piccoli C, Yamasaki H. Gap junction intercellular communication propagates cell death in cancerous cells[J]. *Oncogene*, 2002, 21(13): 1989-1999.
- [9] Kalvelyte A, Lmbrasaite A, Bukauskiene A, et al. Connexins and apoptotic transformation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 66(8): 1661-1672.
- [10] 位 静,甘小亮,罗晨芳,等. 内毒素对 NRK52E 细胞生长及细胞间缝隙连接功能的影响[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2010, 31(2): 249-252.
- [11] Tao L, Harris AL. 2-aminoethoxydiphenyl borate directly inhibits channels composed of connexin26 and/or connexin32 [J]. *Mol Pharmacol*, 2007, 71(2): 570-579.
- [12] Mantz J, Cordier J, Giaume C. Effects of general anesthetics on intercellular communications mediated by gap junctions between astrocytes in primary culture [J]. *Anesthesiology*, 1993, 78(5): 892-901.
- [13] Mantz J, Delumeau JC, Cordier J. Differential effects of propofol and ketamine on cytosolic calcium concentrations of astrocytes in primary culture[J]. *Br J Anaesth*, 1994, 72(3): 351-353.
- [14] Masaki E, Kawamura M, Kato F. Attenuation of gap-junction-mediated signaling facilitated anesthetic effect of sevoflurane in the central nervous system of rats [J]. *Anesth Analg*, 2004, 98(3): 647-652.
- [15] Wentlandt K, Samoilova M, Carlen PL, et al. General anesthetics inhibit gap junction in cultured organotypic hippocampal slices [J]. *Anesth Analg*, 2006, 102(6): 1692-1698.
- [16] Wentlandt K, Carlen PL, Kushnir M, et al. General anesthetics attenuate gap junction coupling in P19 cell line [J]. *J Neurosci Res*, 2005, 81(5): 746-752.
- [17] Wentlandt K, Kushnir M, Naus CC, et al. Ethanol inhibits gap-junctional coupling between P19 cells [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2004, 28(9): 1284-1290.
- [18] 许学兵,姚尚龙,余守章,等. 慢性神经痛大鼠脊髓背角星形胶质细胞缝隙连接蛋白 43 表达的变化[J]. *中华麻醉学杂志*, 2004, 24(10): 787-790.
- [19] 张 辉,段 丽,张光运,等. 鞘内注射甘珀酸对大鼠热痛刺激反应的影响[J]. *中国神经学杂志*, 2003, 19(2): 88-91.
- [20] Saez JC, Branes MC, Corvalan LA, et al. Gap junctions in cells of the immune system: structure, regulation and possible functional roles [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2000, 33(4): 447-455.

(编辑 刘清海)