

## 脊髓PKC $\epsilon$ 和 $\mu$ 阿片受体参与瑞芬太尼诱导大鼠痛觉过敏

于萍<sup>1</sup>, 王晓娥<sup>2</sup>, 崔宇<sup>3</sup>, 陈元<sup>3</sup>

(中山大学 1. 中山医学院; 2. 附属第一医院麻醉科; 3. 医学院, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】在瑞芬太尼诱导痛觉过敏的大鼠脊髓组织中观察 PKC $\epsilon$ 和 $\mu$ 阿片受体(MOR)的表达水平变化,探讨 PKC $\epsilon$ 和MOR两者之间的关系。【方法】18只成年雄性SD大鼠随机平均分为3组(每组6只),分为空白对照组(C组)、生理盐水对照组(S组)和瑞芬太尼组(R组)。通过大鼠尾静脉输注瑞芬太尼4  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$ 给药2 h建立瑞芬太尼诱导的大鼠痛觉过敏模型。采用 Hargreaves 法观察瑞芬太尼输注后6、24 h的大鼠热刺激撤足阈值。通过荧光定量PCR和蛋白免疫印迹法检测大鼠脊髓组织中的PKC $\epsilon$ 和MOR的表达水平,并用免疫荧光观察PKC $\epsilon$ 和MOR在大鼠脊髓组织中的分布情况。瑞芬太尼输注前30 min预先鞘内注射不同的PKC抑制剂 Bisindolylmaleimide I(BIS, PKC广谱抑制剂)和G $\delta$ 6983(抑制PKC的亚型不包括PKC $\epsilon$ ),观察不同的PKC抑制剂预处理对瑞芬太尼诱导的大鼠痛觉过敏的影响以及检测大鼠脊髓组织MOR蛋白表达变化。【结果】输注瑞芬太尼24 h后可显著引起大鼠热痛阈值降低[PWTL=(5.31  $\pm$  0.87)s,  $P < 0.01$ ]。同时,蛋白免疫印迹和实时荧光定量PCR结果表明,PKC $\epsilon$ 表达上调( $P < 0.001$ )、MOR表达下降( $P < 0.001$ )。免疫荧光结果表明,在大鼠脊髓背角PKC $\epsilon$ 和MOR均与神经元存在共定位。预先鞘内注射BIS可以缓解大鼠痛觉过敏以及抑制MOR表达上调( $P < 0.001$ ),而注射G $\delta$ 6983则无影响( $P > 0.05$ )。【结论】脊髓背角神经元PKC $\epsilon$ 和MOR参与瑞芬太尼诱导大鼠痛觉过敏,且PKC $\epsilon$ 可能调控MOR表达水平变化,本研究将为探明瑞芬太尼诱导痛觉过敏机制提供新的理论依据。

**关键词:**瑞芬太尼;痛觉过敏;PKC $\epsilon$ ;  $\mu$ 阿片受体

中图分类号:R338.3

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2020)06-0850-08

## Roles of Spinal PKC and MOR in Remifentanil Induced Hyperalgesia in Rats

YU Ping<sup>1</sup>, WANG Xiao-e<sup>2</sup>, CUI Yu<sup>3</sup>, CHEN Yuan<sup>3</sup>

(1. Zhongshan School of Medicine; 2. Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital; 3. School of Medicine; Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: CHEN Yuan; E-mail: chen33@mail.sysu.edu.cn

**Abstract:**【Objective】To observe the expression of PKC $\epsilon$  and  $\mu$  opioid receptor (MOR) and explore their relationship in the spinal cord of rats with remifentanil-induced hyperalgesia (RIH). 【Methods】Eighteen adult male SD rats were randomly divided into control group, saline group and remifentanil group with 6 rats in each group. Hyperalgesia was induced by continuous infusion of 4  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$  remifentanil for 2 hours via vein tail. Pain sensitivity was assessed by the Hargreaves test to determine paw withdrawal latency to a thermal stimulus at 6 h and 24 h after remifentanil administration. Real-time fluorescent quantitative PCR and Western blot analysis were used to measure the expression levels of PKC $\epsilon$  and MOR in the spinal cord of rats and their distribution was detected by immunofluorescence. In order to observe the effect of inhibitors on RIH and the protein expression of MOR in the spinal cord of rats, we injected different PKC inhibitors including Bisindolylmaleimide I (BIS, inhibiting PKC $\epsilon$ ) and G $\delta$ 6983 (not inhibiting PKC $\epsilon$ ) intrathecally 30 mins prior to remifentanil infusion. 【Results】The results of behavioral experiment showed that the paw withdrawal thermal latency was significantly reduced at 24 h after remifentanil infusion [PWTL=(5.31  $\pm$  0.87) s,  $P < 0.01$ ]. Western blot and Real time PCR results revealed upregulated PKC $\epsilon$  expression ( $P < 0.001$ ) and downregulated MOR expression ( $P < 0.001$ ). Immu-

收稿日期:2020-05-07

基金项目:广东省重点领域研发计划项目(2018B030335001)

作者简介:于萍,硕士研究生,研究方向:神经生物学, E-mail: yuping1037245582@163.com; 陈元,通信作者,教授,研究方向:细胞与分子神经生物学, E-mail: chen33@mail.sysu.edu.cn

nofluorescence results indicated that PKC $\epsilon$  and MOR were colocalized with neurons in the dorsal horn of rat spinal cord. Preemptive intrathecal injection of BIS alleviated the hyperalgesia in rats and inhibited MOR expression ( $P < 0.001$ ), but injection of Gö6983 made no difference ( $P > 0.05$ ). [Conclusion] PKC $\epsilon$  and MOR in spinal dorsal horn neurons may be involved in RIH, and PKC $\epsilon$  may regulate the expression levels of MOR. This research provides a new theoretical mechanism for the prevention and treatment of RIH.

**Key words:** remifentanyl; hyperalgesia; PKC $\epsilon$ ;  $\mu$  opioid receptor (MOR)

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2020, 41(6): 850-857]

瑞芬太尼是一种超强效的 $\mu$ 阿片受体( $\mu$  opioid receptor, MOR)激动剂,具有作用时间短、起效快、消除作用迅速等优点,现已广泛应用于手术麻醉<sup>[1]</sup>。然而,大量研究发现,瑞芬太尼的长时间或大剂量输注可引起痛觉过敏(remifentanyl-induced hyperalgesia, RIH),表现为痛阈降低、痛感增强或痛觉异常<sup>[2]</sup>。以往研究表明,RIH涉及的分子机制可能有 MOR 表达水平下调和功能改变、NMDA 受体的激活、脊髓胶质细胞的活化等多方面<sup>[3]</sup>,但 RIH 的具体机制尚未明确。其中,MOR 水平下调和功能改变是 RIH 形成的重要原因<sup>[4]</sup>。蛋白激酶 C(PKC)属于多功能丝氨酸和苏氨酸酶,包含十余种亚型,尽管研究发现,阿片类药物诱导的 MOR 改变依赖于 PKC,但具体亚型尚未明确<sup>[5]</sup>。PKC $\epsilon$  在脊髓组织中表达丰富,参与多种疼痛调节<sup>[6-7]</sup>。研究发现,神经损伤后脊髓 PKC $\epsilon$  表达显著增加,抑制 PKC $\epsilon$  可以有效延缓痛觉过敏的发生,提示脊髓 PKC $\epsilon$  在慢性疼痛中具有重要作用<sup>[6-7]</sup>。然而,PKC $\epsilon$  是否参与 RIH 以及 PKC $\epsilon$  是否介导瑞芬太尼诱导的 MOR 改变目前未见报道。本研究拟通过观察 RIH 大鼠脊髓组织中 PKC $\epsilon$  和 MOR 的表达水平,并通过预先鞘内注射不同的 PKC 抑制剂观察大鼠行为学变化以及检测脊髓 MOR 蛋白表达变化,初步探究 RIH 大鼠模型中 PKC $\epsilon$  与 MOR 之间的关系。

## 1 材料与方

### 1.1 实验动物

本研究的实验动物均由中山大学实验动物中心提供,所有实验操作均符合中山大学动物实验中心伦理委员会要求并按照实验动物使用原则执行。18 只体质量为 220~250 g 的 SPF 级成年雄性 SD 实验大鼠随机均分成 3 组,即空白

对照组(C组)、生理盐水组(S组)、瑞芬太尼组(R组)。C组:大鼠正常饲养;R组:输注瑞芬太尼 4  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$  给药 2 h,丙泊酚 12  $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{h})$  给药 2 h;S组:实验大鼠经尾静脉持续输注 R 组同等剂量生理盐水和丙泊酚 12  $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{h})$  给药 2 h。第二批实验增加 R+BIS 组和 R + Gö6983 组;R+BIS 组:瑞芬太尼痛敏模型建立前 30 min 鞘内注射 BIS,之后经尾静脉持续输注瑞芬太尼 4  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$  给药 2 h、丙泊酚 12  $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{h})$  给药 2 h;R + Gö6983 组:瑞芬太尼痛敏模型建立前 30 min 鞘内注射 Gö6983,之后经尾静脉持续输注瑞芬太尼 4  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$  给药 2 h、丙泊酚 12  $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{h})$  给药 2 h<sup>[8]</sup>。SD 实验大鼠置于安静环境下单笼饲养,饲养条件包括:房间采用 12 h 明-暗交替且保持恒温( $22 \pm 0.5$ ) $^{\circ}\text{C}$ 、恒湿( $55 \pm 10$ )%、保证 SD 实验大鼠自由饮食。

### 1.2 实验方法

1.2.1 瑞芬太尼痛敏模型建立 生理盐水稀释瑞芬太尼(宜昌人福药业有限责任公司,中国)至终浓度 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  备用,生理盐水稀释丙泊酚(广东嘉博制药有限公司,中国)至终浓度 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  备用。SD 实验大鼠吸入七氟烷(上海恒瑞医药有限公司,中国)麻醉侧卧后,尾静脉置入静脉留置针,连接恒速电子注射泵,S 组输注生理盐水和丙泊酚 2 h。R 组持续输注瑞芬太尼和丙泊酚 2 h。大鼠术中保持自主呼吸。

1.2.2 鞘内注射生理盐水稀释 BIS(Sigma, 美国)和 Gö6983(Sigma, 美国)至终浓度分别为 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  和 1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  备用。采用 Mestre 法<sup>[9]</sup>进行大鼠鞘内注射。RIH 大鼠模型建立前 30 min,SD 实验大鼠吸入七氟烷麻醉俯卧后,备皮消毒 SD 大鼠脊柱,以 50  $\mu\text{L}$  微量注射器于 SD 实验大鼠脊柱 L4-15 椎间隙垂直进针,以大鼠尾巴出现抖动为成功进入髓鞘内信号,此时缓慢注入抑制剂 BIS 或 Gö6983 10  $\mu\text{L}$ 。

1.2.3 行为学测试 测试前 3 d,将 SD 实验大鼠

放于行为学测试室每天分笼适应2 h,适应行为学测试环境。尾静脉输注药物前24 h测试SD实验大鼠基础痛阈值,将输注结束后第6 h、24 h设为行为学测试时间点。SD实验大鼠在测试前1 h于行为学测试室适应环境,采用 Hargreaves<sup>[10]</sup>热痛测试法(thermal paw withdrawal latency, PWTL,以s为单位)进行行为学测试。设置热辐射刺激仪(SERIES 8 Model 390G IITC, Life Science, 美国)参数包括:基础光强:5 V;光强:30 V;自动断电时间:20 s。SD实验大鼠处于安静状态时用热辐射源照射SD实验大鼠右后足底正中处,记录从开始给予热刺激到大鼠出现反射性撤足的时间,每只大鼠重复测量3次,每次间隔5 min,取3次平均值为该SD实验大鼠的热痛阈值。

**1.2.4 免疫荧光染色** SD实验大鼠腹腔注射10%水合氯醛(上海生工,中国)进行深度麻醉。麻醉后暴露大鼠胸腔,剪开心尖后,针头经左心室至升主动脉并固定,剪右心耳,快速灌注预冷的生理盐水500 mL后改灌注500 mL预冷的40 g/L多聚甲醛40 min进行固定。灌注结束后,解剖取出SD实验大鼠脊髓腰椎膨大处,置于预冷的40 g/L多聚甲醛中后固定4 h,随后转入30%蔗糖溶液中4℃过夜。待脊髓组织沉底后用OCT包埋进行冰冻切片,片厚20 μm,直接贴片于载玻片上。

组织冰冻切片用1×PBS清洗3次,每次10 min。室温下封闭液封闭1 h。弃去封闭液后分别加入一抗(PKCε, 1:100, BD 美国; MOR, 1:200, abcam 英国; OX-42, 1:200, Cell Signaling TECHNOLOGY 美国; millipore 美国; GFAP, 1:200, NeuN, 1:200, abcam 英国), 4℃湿盒孵育过夜。之后,1×PBS洗3次,10 min/次,洗去一抗后,置于相应的二抗(1:1 000)中,室温避光孵育1 h,1×PBS清洗3次,10 min/次。洗去二抗。晾干后于正置荧光显微镜(Olympus BX63, 日本)下观察并拍照。

**1.2.5 实时荧光定量PCR** 应用TIANGEN试剂盒(TIANGEN, 中国)提取SD实验大鼠脊髓组织总RNA,采用两步法将RNA逆转录为cDNA,应用SYBR Green法(TAKARA, 日本)进行实时荧光定量PCR反应。设定GAPDH为内参:上游引物:TGCCACTCAGAAGACTGTGG;下游引物:TTCAGCTCTGGATGACCTT。PKCε上游引物:AACGAGTGTTTAGGGAGCGG;下游引物:GTTTCTTTAGCCAGCGCAC。MOR上游引物:CAACTTGTCCTCA-

CGTTGATG;下游引物:TCCAAAGAGGCCCACTACAC。扩增条件:95℃30 s;95℃5 s,60℃30 s,40个循环。实验重复3次。反应结束后根据Ct值,计算并统计分析结果。

**1.2.6 蛋白免疫印迹** 取SD实验大鼠脊髓组织称重后加入蛋白裂解液,采用KZ-11高速组织研磨仪(Servicebio, 中国)研磨,60 Hz, 60 s。4℃14 000 r/min离心25 min(离心机半径r=5 cm),取上清液。采用BCA法测定蛋白样品浓度,剩余蛋白加入上样缓冲液于95℃煮样10 min。采用10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离靶蛋白并以恒流250 mA电转90 min至PVDF膜上。电转后,体积分数5%脱脂奶粉溶液室温下封闭PVDF膜1 h。之后,4℃下水平摇床孵育一抗(PKCε, 1:1 000, BD 美国; MOR, 1:2 000, abcam 英国)过夜。次日,1×TBST缓冲液清洗PVDF膜3次,10 min/次。室温下孵育二抗(1:10 000)1 h,之后1×TBST缓冲液洗PVDF膜3次,10 min/次,曝光。结果使用Image J软件进行灰度分析,以Relative Density(以下简称RD)表示各组测定灰度值与C组比值,进行统计分析。

### 1.3 统计学分析

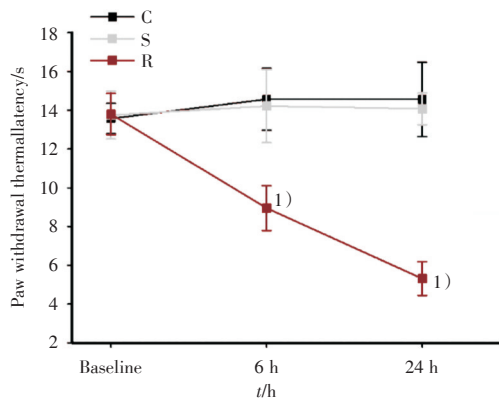
使用SPSS 26.0统计分析软件进行统计分析,实验结果以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。行为学结果采用重复测量方差分析,蛋白免疫印迹和实时荧光定量PCR结果采用单因素方差分析比较。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 尾静脉输注瑞芬太尼诱导大鼠热痛阈值降低

本实验通过构建RIH大鼠模型检测瑞芬太尼输注后大鼠热痛行为学变化,采用重复测量方差分析结果显示:各组大鼠热痛阈值满足球形分布( $\chi^2 = 4.12, P = 0.86; \chi^2 = 11.32, P = 0.26$ ),各组间差异有统计学意义( $F = 32.60, P < 0.001; F = 54.07, P < 0.001$ ),各组时间点差异有统计学意义( $F = 17.84, P < 0.001; F = 15.34, P < 0.001$ ),且组间和时间点有交互效应( $F = 13.53, P < 0.001; F = 12.47, P < 0.001$ )。大鼠尾静脉注射生理盐水后与C组相比各时间点PWTL差异均无统计学意义( $F = 0.78, P > 0.05$ ),而静脉注射瑞芬太尼6 h后,PWTL与C组比较明显降低[PWTL=(8.95±1.16)s,  $F = 27.43, P < 0.001$ ]。在给药后24 h大鼠的热痛觉阈值显著

下降[PWTL = (5.31 ± 0.87)s,  $F = 69.81, P < 0.001$ ], 见图1。



Continuous infusion of remifentanyl for 2 h induces thermal hyperalgesia at 6 h, 24 h. 1)  $P < 0.001$  compared with control;  $n = 6$  per group.

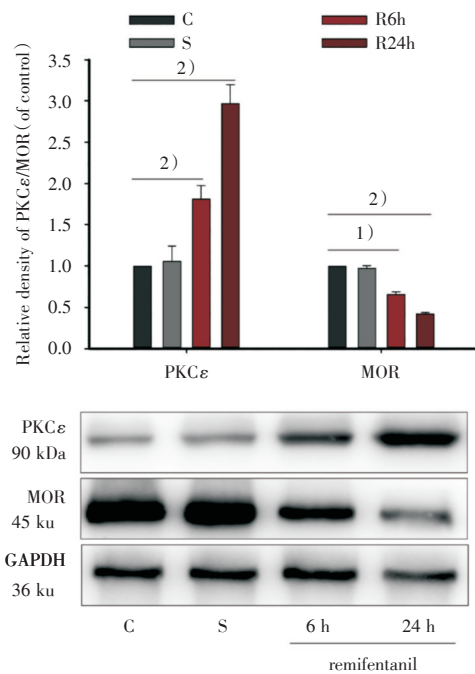
图1 静脉输注瑞芬太尼降低大鼠热痛阈值

Fig.1 Intravenous infusion of remifentanyl reduces PWTL in rats

## 2.2 瑞芬太尼诱导大鼠脊髓背角神经元中的PKCε表达增加、MOR表达减少

对PKCε蛋白印迹相对灰度值进行单因素方差分析结果显示差异具有统计学意义( $F = 118.736, P < 0.001$ ):与C组进行比较,PKCε在瑞芬太尼输注后的6 h蛋白表达水平增加(RD = 1.79 ± 0.08,  $P < 0.001$ ),且在瑞芬太尼输注后的24 h蛋白表达水平显著增加(RD = 3.01 ± 0.24,  $P < 0.001$ );我们对MOR蛋白印迹相对灰度值进行单因素方差分析结果显示具有统计学意义( $F = 144.303, P < 0.001$ ):与C组进行比较,MOR在输注后的6 h蛋白表达水平减少(RD = 0.68 ± 0.04,  $P < 0.001$ ),在输注后的24 h蛋白表达水平显著减少(RD = 0.43 ± 0.02,  $P < 0.001$ ),见图2。

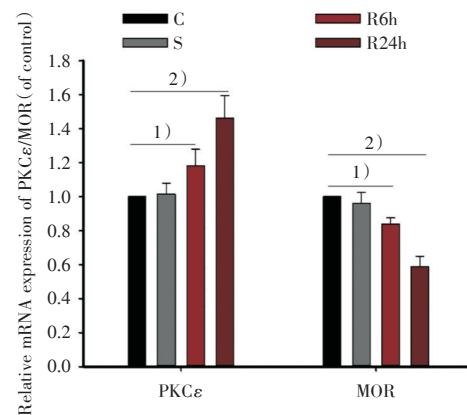
采用荧光定量PCR方法检测瑞芬太尼输注后大鼠脊髓组织中PKCε、MOR的mRNA的表达变化情况。与蛋白印迹结果一致的是PKCε的mRNA表达水平的单因素方差分析结果显示差异具有统计学意义( $F = 18.873, P < 0.001$ );与C组相比较,PKCε的mRNA在尾静脉输注瑞芬太尼后24 h表达显著增加( $P < 0.001$ );我们对MOR蛋白印迹相对灰度值进行单因素方差分析结果显示具有统计学意义( $F = 39.883, P < 0.001$ );与C组相比较,MOR的mRNA在输注后24 h表达显著降低( $P < 0.001$ ),见图3。



Western blot shows that remifentanyl infusion increases the expression of PKCε in the spinal cord.  $n = 3, F = 118.736, P < 0.001$ . 1)  $P < 0.05$ , 2)  $P < 0.001$  compared with control. Western blot shows that remifentanyl infusion decreases the expression of MOR in the spinal cord.  $n = 3, F = 144.303, P < 0.001$ . 1)  $P < 0.05$ , 2)  $P < 0.001$  compared with control.

图2 输注瑞芬太尼影响大鼠脊髓组织中PKCε、MOR的蛋白水平表达变化

Fig.2 Remifentanyl infusion affects the expression of PKCε and MOR protein levels in the spinal cord



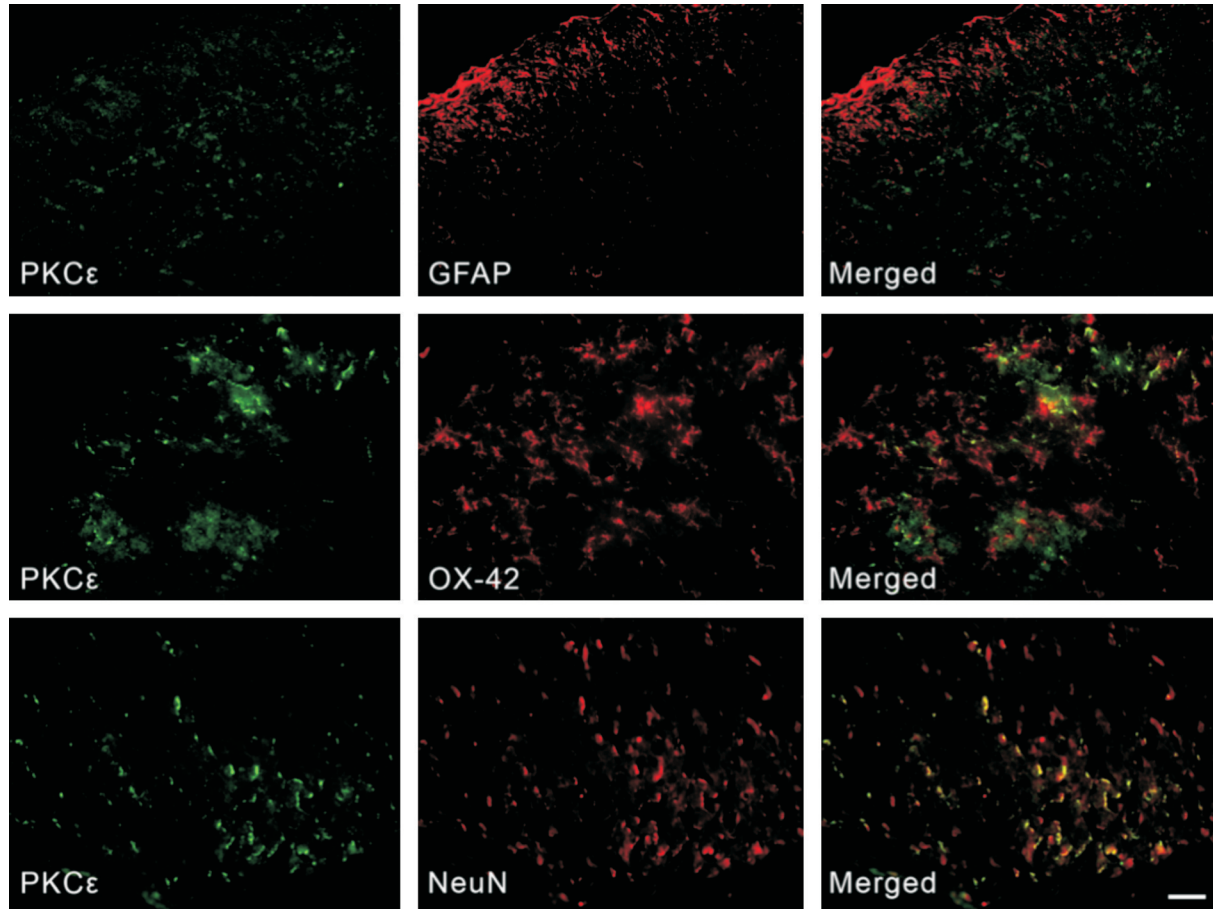
Real-time fluorescent quantitative PCR shows that remifentanyl infusion increases the expression of PKCε in the spinal cord.  $n = 3, F = 18.873, P < 0.001$ . 1)  $P < 0.05$ , 2)  $P < 0.001$  compared with control; Real-time fluorescent quantitative PCR shows that remifentanyl infusion decreases the expression of MOR in the spinal cord.  $n = 3, F = 39.883, P < 0.001$ . 1)  $P < 0.05$ , 2)  $P < 0.001$  compared with control.

图3 输注瑞芬太尼影响大鼠脊髓组织中PKCε、MOR的mRNA水平表达变化

Fig.3 Remifentanyl infusion affects the expression of PKCε and MOR mRNA levels in the spinal cord

为了观察和 PKC $\epsilon$  和 MOR 分布情况,我们利用免疫荧光化学染色方法将 R24h 组的 PKC $\epsilon$ 、MOR 分别与星形胶质细胞标记蛋白 GFAP、小胶质细胞标志蛋白 OX-42 和神经元标志蛋白 NeuN 共染。免疫荧光双染结果显示, PKC $\epsilon$  和 MOR 分

别主要在脊髓背角神经元分布(图4、5)。以上结果表明,瑞芬太尼诱导大鼠脊髓背角神经元中的 PKC $\epsilon$  蛋白表达增加、MOR 蛋白表达减少,提示 PKC $\epsilon$  和 MOR 参与 RIH。



Double immunofluorescence shows that PKC $\epsilon$  is mainly co-localized with NeuN in the spinal dorsal cord. Scale bar: 50  $\mu$ m.

图4 PKC $\epsilon$ 与星形胶质细胞、小胶质细胞和神经元双染结果

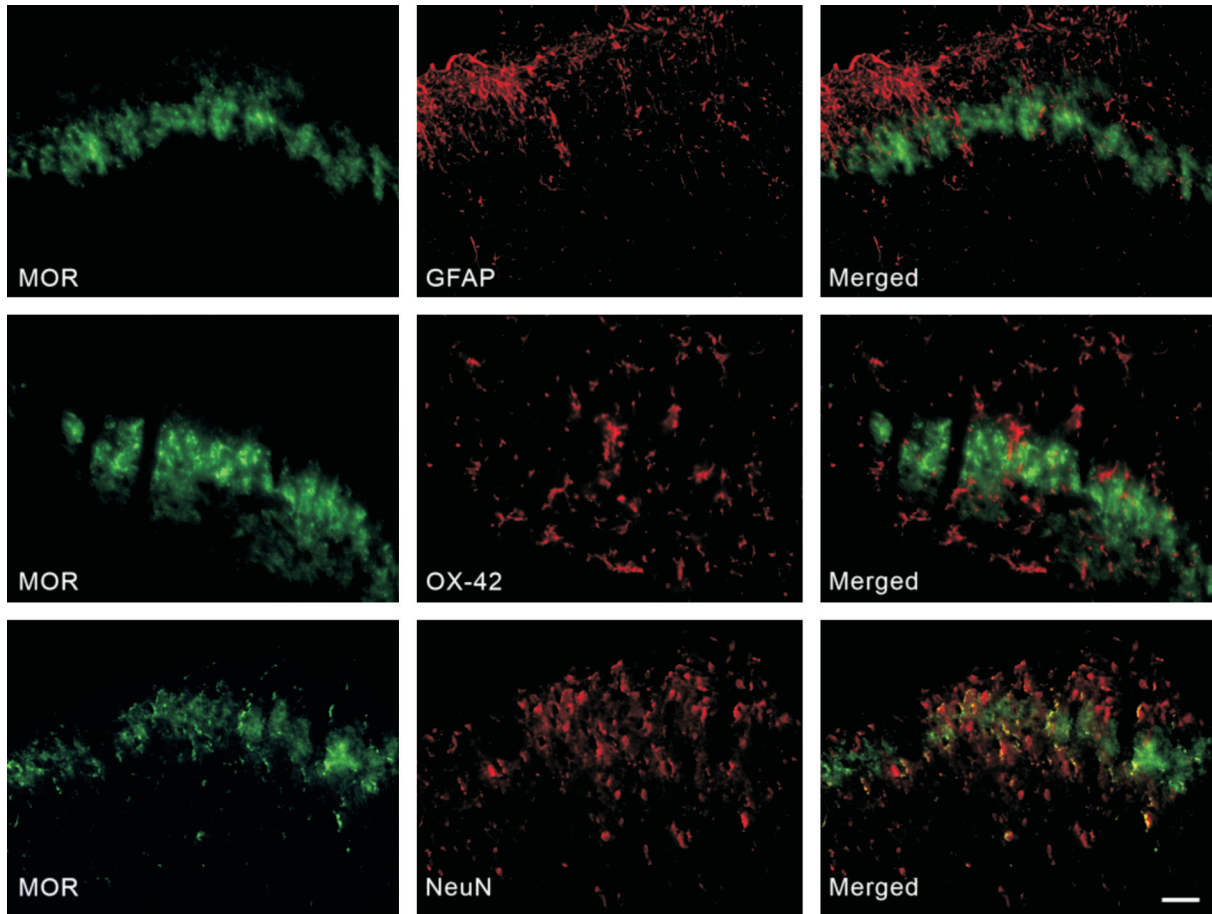
Fig.4 Co-localization of PKC $\epsilon$  and astrocyte, microglia or neuron in the spinal dorsal cord

### 2.3 预先鞘内注射不同的 PKC 抑制剂对瑞芬太尼诱导的大鼠痛觉过敏的影响

为进一步探究 PKC $\epsilon$  在瑞芬太尼引起的大鼠痛觉过敏中的作用,我们选用了两种不同的 PKC 相对抑制剂 BIS 和 G $\delta$ 6983。与 R 组 [PWTL = (11.93  $\pm$  0.07)s] 相比较,建立瑞芬太尼诱导的痛敏模型前 30 min 鞘内注射 BIS 后大鼠热痛过敏显著缓解,分别在输注瑞芬太尼后 6 h [PWTL = (12.52  $\pm$  0.07)s,  $P < 0.001$ ]、24 h [PWTL = (11.93  $\pm$  0.90)s,  $P < 0.001$ ] 的差异具有统计学意义。而预先鞘内注射 G $\delta$ 6983 与 C 组相比较不能缓解大鼠热痛过敏 ( $P > 0.05$ ),见图 6。

### 2.4 预先鞘内注射不同的 PKC 抑制剂对 MOR 蛋白表达影响

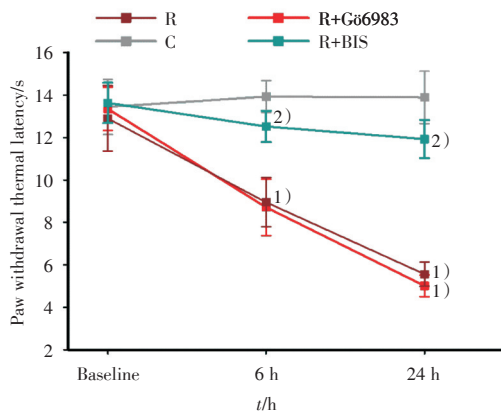
输注瑞芬太尼后 24 h, 分别对 C 组、R 组、R+BIS 组和 R+G $\delta$ 6983 组大鼠脊髓 MOR 蛋白进行单因素方差分析结果显示差异具有统计学意义 ( $F = 517.816, P < 0.001$ )。相较于 C 组, R+G $\delta$ 6983 组 MOR 蛋白表达水平降低 (RD = 0.52  $\pm$  0.01,  $P < 0.001$ ), 与 R 组 (RD = 0.49  $\pm$  0.01,  $P < 0.001$ ) 趋势一致。而相较于 R 组,由瑞芬太尼引起的 MOR 蛋白降低现象可以被 BIS (RD = 1.09  $\pm$  0.04,  $P < 0.001$ ) 所改变(图 7)。以上实验结果提示 PKC $\epsilon$  可能介导瑞芬太尼诱导痛敏模型中 MOR 下调。



Double immunofluorescence shows that MOR is mainly co-localized with NeuN in the spinal dorsal cord. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ .

图5 MOR与星形胶质细胞、小胶质细胞和神经元双染结果

Fig.5 Co-localization of MOR and astrocyte, microglia or neuron in the spinal cord



Continuous infusion of remifentanyl for 2 hours induces thermal hyperalgesia at 6 h and 24 h, which was significantly affected by different PKC inhibitors. 1)  $P < 0.001$  compared with control; 2)  $P < 0.001$  compared with the remifentanyl group;  $n = 6$  per group.

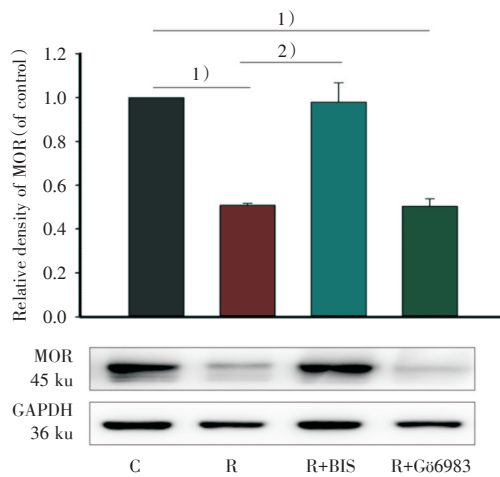
图6 不同的PKC抑制剂预处理影响瑞芬太尼诱导的大鼠热痛阈值

Fig.6 Effects of pretreatment with different PKC inhibitors on PWTL induced by remifentanyl in rats

### 3 讨论

本研究中我们首次发现了脊髓PKC $\epsilon$ 在RIH大鼠中的蛋白、mRNA表达增加,并且预先鞘内注射BIS可以有效缓解大鼠痛觉过敏,而使用Gö6983则无明显变化,BIS是PKC的广谱抑制剂,抑制包括PKC $\epsilon$ 在内的多种PKC亚型,而Gö6983仅抑制PKC $\alpha$ 、PKC $\delta$ 等亚型,不抑制PKC $\epsilon$ <sup>[11]</sup>。提示PKC $\epsilon$ 参与了RIH。同时,我们发现RIH大鼠脊髓MOR蛋白、核酸表达水平降低,且PKC $\epsilon$ 和MOR均与脊髓背角神经元共定位,我们进一步研究发现鞘内注射BIS可抑制瑞芬太尼引起的脊髓MOR蛋白表达水平降低,提示PKC $\epsilon$ 可能通过下调MOR介导RIH的病理生理过程。

瑞芬太尼作为一种人工合成的超强效的 $\mu$ 阿片受体激动剂比其他阿片类药物更容易诱导痛觉过敏,且RIH大鼠模型现被广泛应用于研究阿片类



Western blot shows that remifentanyl infusion at 24 h changes the expression of MOR in the spinal dorsal horn, which was significantly affected by BIS.  $n = 3$ ,  $F = 517.816$ ,  $P < 0.001$ . 1)  $P < 0.001$  compared with control; 2)  $P < 0.001$  compared with the remifentanyl group.

图7 不同的PKC抑制剂预处理抑制瑞芬太尼诱导的大鼠脊髓中MOR的蛋白表达降低

Fig.7 Pretreatment of different PKC inhibitors block the decreased expression of MOR protein levels induced by remifentanyl in rats

药物诱导痛觉过敏 (opioid-induced hyperalgesia, OIH) 的作用机制。本实验采用的  $4 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{min})$  输注剂量已被证实可用于成功构建瑞芬太尼诱导大鼠痛觉过敏模型<sup>[12]</sup>, 与Zhao等<sup>[13]</sup>研究一致。MOR被认为是临床上阿片类镇痛药物的主要作用靶点<sup>[14]</sup>。研究表明长时间输注MOR激动剂可以促进急性疼痛向慢性疼痛的转化<sup>[15]</sup>。研究发现输注瑞芬太尼可诱导大鼠脊髓背根神经节MOR表达下调, 与我们发现RIH大鼠脊髓MOR蛋白、核酸表达水平下调结果相似<sup>[16]</sup>。

据报道<sup>[5-6]</sup>, 激活的PKC $\epsilon$ 从细胞质中移位到细胞膜上磷酸化相应的下游底物, 增强外周神经细胞的兴奋性, 参与突触信息传递, 在伤害感受器致敏和机械痛觉过敏中发挥重要作用。Chu等<sup>[7]</sup>通过使用siRNA干扰明确了PKC $\epsilon$ 介导吗啡诱导的MOR表达下调改变且该实验通过诱导基因突变证实了在MOR信号转导复合物中, G $\alpha$ i2的Ser44、Ser144和Ser302被吗啡激活的PKC $\epsilon$ 磷酸化从而引起MOR表达下调, 进而导致吗啡耐受。然而瑞芬太尼引起的痛觉过敏中MOR表达水平改变的具体机制并不明确, 我们的研究发现, 脊髓MOR在预先鞘内注射BIS的RIH大鼠中的蛋白表达水平降低现象被抑制, 说明PKC $\epsilon$ 可能参与调控RIH中MOR的表达。

PKC $\epsilon$ 转位对于其发挥磷酸化具有重要意义, 然而, 瑞芬太尼诱导痛觉过敏模型中PKC $\epsilon$ 转位与MOR的改变的关系尚不清楚。我们推测: 瑞芬太尼输注后激活PKC $\epsilon$ 发生转位, 活化的PKC $\epsilon$ 可能通过直接磷酸化MOR或其他受体导致MOR内化, MOR内化后其中部分受体有可能在细胞质内被酶水解而使回到细胞膜上的MOR减少导致MOR脱敏, 进而产生痛觉过敏。因此, PKC $\epsilon$ 在瑞芬太尼引起的痛敏模型中的磷酸化作用以及作用靶点有待相关研究中进一步探究。

综上所述, 本研究结果表明脊髓背角神经元PKC $\epsilon$ 和MOR参与瑞芬太尼诱导大鼠痛觉过敏, 同时PKC $\epsilon$ 可能调控MOR表达水平变化。该结果为研究瑞芬太尼诱导痛觉过敏的发生机制提供了新的理论依据, 也为进一步研究瑞芬太尼痛觉过敏的防治提供了理论基础。

#### 参考文献

- [1] Santonocito C, Noto A, Crimi C, et al. Remifentanyl-induced postoperative hyperalgesia: current perspectives on mechanisms and therapeutic strategies[J]. Local Reg Anesth, 2018, 11: 15-23.
- [2] Yu EH, Tran DH, Lam SW, et al. Remifentanyl tolerance and hyperalgesia: short-term gain, long-term pain?[J]. Anaesthesia, 2016, 71(11): 1347-

1362.

- [3] Roeckel LA, Le Coz GM, Gaveriaux-Ruff C, et al. Opioid-induced hyperalgesia: cellular and molecular mechanisms[J]. Neuroscience, 2016, 338: 160-182.
  - [4] 刘艳, 么金明, 吕湘琪. 瑞芬太尼诱导术后痛觉过敏的机制及防治进展[J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(10): 2298-2303.
- Liu Y, Yao JM, LV XQ. Research progress on remi-

- fentanyl-induced hyperalgesia and its prevention and treatment[J]. *J Clin Pathol Res*, 2019, 39(10): 2298-2302.
- [5] Song C, Liu P, Zhao Q, et al. TRPV1 channel contributes to remifentanyl-induced postoperative hyperalgesia via regulation of NMDA receptor trafficking in dorsal root ganglion[J]. *J Pain Res*, 2019, 12: 667-677.
- [6] Zhang H, Cang CL, Kawasaki Y, et al. Neurokinin-1 receptor enhances TRPV1 activity in primary sensory neurons via PKCepsilon: a novel pathway for heat hyperalgesia [J]. *Neurosci*, 2007, 27(44): 12067-12077.
- [7] Chu J, Zheng H, Zhang Y, et al. Agonist-dependent mu-opioid receptor signaling can lead to heterologous desensitization [J]. *Cell Signal*, 2010, 22(4): 684-696.
- [8] 王晓娥,李琪,肖力,等. 脊髓CCL2在瑞芬太尼诱导的大鼠痛觉过敏中的作用机制[J]. *中山大学学报(医学版)*, 2019, 40(5): 706-714.
- Wang XE, Li Q, Xiao L, et al. Involvement of spinal CCL2 in remifentanyl-induced hyperalgesia in rats [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2019, 40(5): 706-714.
- [9] Mestre C, Pelissier T, Fialip J, et al. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats[J]. *Pharmacol Toxicol Methods*, 1994, 32(4): 197-200.
- [10] Hargreaves K, Dubner R, Brown F, et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia [J]. *Pain*, 1988, 32(1): 77-88.
- [11] Ren B, Li X, Zhang J, et al. PDLIM5 mediates PKCε translocation in PMA-induced growth cone collapse[J]. *Cell Signal*, 2015, 27(3): 424-435.
- [12] 白雪,肖力,叶柳,等. 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[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2015, 36(4): 556-563.
- Bai X, Xiao L, Ye L, et al. MMP-9 in dorsal root ganglion contributes to remifentanyl-induced hyperalgesia in rats[J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2015, 36(4): 556-563.
- [13] Zhao Q, Zhang L, Shu R, et al. Involvement of spinal pkmzeta expression and phosphorylation in remifentanyl-induced long-term hyperalgesia in rats[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2017, 37(4): 643-653.
- [14] Turnaturi R, Chiechio S, Salerno L, et al. Progress in the development of more effective and safer analgesics for pain management [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 183: 111701.
- [15] Wang D, Tawfik VL, Corder G, et al. Functional divergence of delta and mu opioid receptor organization in CNS pain circuits[J]. *Neuron*, 2018, 98(1): 90-108.
- [16] Song C, Liu P, Zhao Q, et al. TRPV1 channel contributes to remifentanyl-induced postoperative hyperalgesia via regulation of NMDA receptor trafficking in dorsal root ganglion [J]. *J Pain Res*, 2019, 12: 667-677.

(编辑 余菁)