

doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2020.12.005

脊髓 Pellino1 在瑞芬太尼诱导的大鼠痛觉过敏中的作用及机制*

付宝军[△] 姜静静 黄玉琼 林宗航 李恒

(广州医科大学附属第六医院 清远市人民医院麻醉科, 清远 511518)

摘要 **目的:** 观察脊髓 Pellino1 (Peli1) 在瑞芬太尼诱导的痛觉过敏中的作用及可能机制。**方法:** 成年雄性 SD 大鼠随机平均分为 6 组 ($n=6$): 包括生理盐水组 (S 组)、瑞芬太尼组 (R 组)、生理盐水 + scrambled shRNA 组 (S + shscr 组)、瑞芬太尼 + scrambled shRNA 组 (R + shscr 组)、生理盐水 + Peli1 shRNA 组 (S + shPeli1 组)、瑞芬太尼 + Peli1shRNA 组 (R + shPeli1 组)。R 组、R+shscr 组、R + shPeli1 组大鼠通过尾静脉连续输注瑞芬太尼 4 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$ 2 h, 建立瑞芬太尼诱导的痛觉过敏模型; S + shscr 组、S + shPeli1 组、R + shscr 组、R + shPeli1 组于瑞芬太尼给药前连续 3 天鞘内注射 shscr 或 Peli1shRNA; 分别采用机械缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT) 和热缩足反射潜伏期 (thermal withdrawal latency, TWL) 评价大鼠机械痛敏和热痛敏; Western blotting 法和 RT-PCR 法检测 Peli1、Iba1、GFAP 蛋白及 mRNA 表达; ELISA 法检测 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 。**结果:** 与 S 组相比, R 组瑞芬太尼输注后 6 h、1 天、3 天 MWT 和 TWL 明显降低 ($P < 0.001$); 与 R + shscr 组相比, R + shPeli1 组大鼠瑞芬太尼输注后 6 h、1 天、3 天 MWT 和 TWL 明显升高 ($P < 0.05, P < 0.001$); 与瑞芬太尼输注前相比, R 组大鼠瑞芬太尼输注后 6 h、1 天、3 天脊髓 Peli1 蛋白及 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.001$); 与 S + shscr 组相比, R + shscr 组大鼠瑞芬太尼输注后 1 天 Iba1 蛋白及 mRNA 以及 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 表达明显升高 ($P < 0.001$); 与 R + shscr 组相比, R + shPeli1 组大鼠瑞芬太尼输注后 1 天 Iba1 蛋白及 mRNA 以及 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 表达明显降低 ($P < 0.001$)。**结论:** Peli1 参与瑞芬太尼诱发的痛觉过敏, 其机制可能与脊髓小胶质细胞激活及其炎症反应有关。

关键词 瑞芬太尼; 痛觉过敏; Pellino1; 小胶质细胞

The role of spinal Pellino1 in remifentanil-induced hyperalgesia in rats and its mechanism*

FU Bao-Jun[△], JIANG Jing-Jing, HUANG Yu-Qiong, LIN Zong-Hang, LI Heng

(Department of Anesthesiology, The Sixth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University; Qingyuan People's Hospital, Qingyuan 511518, China)

Abstract **Objective:** To observe the role of spinal Pellino1(Peli1) in hyperalgesia induced by remifentanil and its possible mechanism. **Methods:** Adult male SD rats were randomly divided into 6 groups with 6 rats in each group: saline group (S), remifentanil group (R), saline + scrambled shRNA group (S + shscr), remifentanil + scrambled shRNA group (R + shscr), saline + Peli1shRNA group (S + shPeli1), remifentanil + Peli1shRNA group (R + shPeli1). The model of remifentanil-induced hyperalgesia was established by continuous infusion of remifentanil 4 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$ for 2 h in groups of R, R + shscr, and R + shPeli1, and intrathecal injection of shScr or Peli1shRNA were performed in S + shscr, R + shscr, S + shPeli1, and R + shPeli1 groups for 3 consecutive days before remifentanil administration. Mechanical allodynia and heat hyperalgesia were evaluated by mechanical withdrawal threshold (MWT) and thermal withdrawal latency (TWL). Western blotting and RT-PCR were used to detect the protein and mRNA expression of Peli1, Iba1, and GFAP. The expression of TNF- α , IL-6, and IL-1 β were determined by ELISA. **Results:** Compared with group S, MWT and TWL were significantly decreased in group R on the 1st day and 3rd day after remifentanil infusion ($P < 0.001$). Compared

* 基金项目: 广东省医学科学技术研究基金项目 (A2019050); 清远市科技计划项目 (2018B066)

[△] 通讯作者 fubaojun2004@126.com

with R+ shscr group, MWT and TWL were markedly increased in R + shPeli1 group on the 1st day and 3rd day after remifentanil infusion ($P < 0.05$, $P < 0.001$). Compared with baseline, the protein and mRNA expression levels of Peli1 in the spinal cord were significantly increased in group R at 6 h, 1 day, and 3 days after remifentanil infusion ($P < 0.001$). Compared with S + shscr group, the protein and mRNA expression levels of Iba1 and the expression of TNF- α , IL-6, and IL-1 β in the spinal cord were obviously increased in group R at 1 day after remifentanil infusion ($P < 0.001$). In addition, compared with R + shscr group, the expression levels of Iba1 protein and mRNA and the expression of TNF- α , IL-6 and IL-1 β in the spinal cord were significantly decreased in R + shPeli1 group at 1 day after remifentanil infusion ($P < 0.001$). **Conclusion:** Peli1 is involved in the process of hyperalgesia induced by remifentanil, and its mechanism may be related to the activation of microglia and inflammatory reaction in rat spinal cord.

Key words Remifentanil; Hyperalgesia; Peli1; Microglia

瑞芬太尼作为一种强效的受体激动剂, 由于其半衰期短, 停药后迅速恢复, 因此, 广泛应用于全身麻醉病人术中镇痛维持。然而, 大量的临床观察发现, 瑞芬太尼在发挥其强大镇痛作用同时常常诱发痛觉过敏 (remifentanil-induced hyperalgesia, RIH), 表现为病人在瑞芬太尼给药后对疼痛刺激超敏现象^[1], 痛觉过敏是术中使用瑞芬太尼后面临的十分棘手的问题, 给术后疼痛管理带来了更大的挑战。迄今为止, 痛觉过敏的具体机制尚未阐明^[2], 现有的防治痛觉过敏药物有其自身局限性。胶质细胞尤其小胶质细胞在痛觉过敏中作用已经证实^[3,4], 但是在痛觉过敏中, 小胶质细胞活化调节机制仍不清楚; Peli 是一个新发现的 E3 泛素连接酶家族, 包括 Peli1、Peli2 和 Peli3^[5], Peli1 作为一种小胶质细胞特异性调节因子参与实验性自身免疫性脑脊髓炎^[6]、蛛网膜下腔出血^[7]和西尼罗河病毒脑炎的病理生理过程^[8]。更重要的是, Peli1 通过激活小胶质细胞参与坐骨神经压迫致痛觉过敏^[9]以及吗啡镇痛耐受导致痛觉过敏^[10]。然而 Peli 是否通过激活小胶质细胞参与痛觉过敏尚不清楚。本研究通过观察痛觉过敏大鼠脊髓 Peli1 表达变化以及预先鞘内注射特异 Peli1shRNA 对痛觉过敏大鼠脊髓小胶质细胞活化以及痛行为学影响, 首次探讨 Peli1 在痛觉过敏中作用及其可能机制, 为痛觉过敏发生机制提供新的理论依据, 同时也为开发防治痛觉过敏药物提供新的作用靶点。

方 法

1. 主要试剂及仪器

注射用瑞芬太尼购自宜昌人福药业有限责任公司; PCR 试剂盒购自武汉博士德生物科技有限公司; von Frey 细丝、热痛刺激仪购自 Stoelting 公司; 兔抗大鼠 Peli1 单克隆抗体、兔抗大鼠 Iba1 单克隆抗

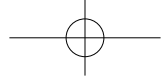
体购自 Abcam 公司; Trizol RNA 抽提试剂、BeyoR TTM cDNA 逆转录试剂盒、焦碳酸二乙酯购自上海碧云天生物技术有限公司南通分公司; PCR 引物购自天跟生化科技北京有限公司。

2. 实验动物和分组

雄性 SD 大鼠, 体质量 200~230 g, 由广州医科大学实验动物中心提供。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 \pm 0.5) $^{\circ}$ C, 湿度 55% \pm 10%。所有实验操作均符合清远市人民医院实验中心动物伦理要求并按照实验动物使用原则进行。36 只大鼠随机分成 6 组: 生理盐水对照组 (S 组), 瑞芬太尼组 (R 组), 生理盐水+鞘内注射 scrambled shRNA 组 (S + shscr 组), 生理盐水+鞘内注射 Peli1shRNA 组 (S + shPeli1 组), 瑞芬太尼+鞘内注射 scrambled shRNA 组 (R + shscr 组), 瑞芬太尼+鞘内注射 Peli1shRNA 组 (R + shPeli1 组), 每组 6 只。S 组: 经尾静脉持续输注生理盐水 2 h; R 组: 经尾静脉持续输注瑞芬太尼 4 μ g/(kg \cdot min) 2 h; S + shscr 组: 连续 3 天鞘内注射 scrambled shRNA 10 μ l 后经尾静脉持续输注生理盐水 2 h; R + shscr 组: 连续 3 天鞘内注射 scrambled shRNA 10 μ l (1×10^9 TU) 后经尾静脉持续输注瑞芬太尼 4 μ g/(kg \cdot min) 2 h; S + shPeli1 组: 连续 3 天鞘内注射 Peli1shRNA 5 μ g/10 μ l (2×10^8 TU) 后经尾静脉持续输注生理盐水 2 h; R + shPeli1 组: 连续 3 天鞘内注射 Peli1shRNA 5 μ g/10 μ l 后经尾静脉持续输注瑞芬太尼 4 μ g/(kg \cdot min) 2 h。

3. 方法

(1) shRNA 寡核苷酸链的设计合成: 根据 Peli1 miRNA 序列设计 shRNA 1、2、3 和阴性对照 (scrambled shRNA), 每条核苷酸链的中间添加茎环结构 TTCAAGAGA, 正、反义链的 5' 端分别引入 GATCC 和 AATTC, 分别与 BamH I 和 EcoR I 酶切



后的粘性末端互补,经 Blast 比对与人类其他基因编码序列无同源性,委托上海吉玛制药技术有限公司合成。

(2) Peli1 shRNA 慢病毒质粒构建:使用 BamH I 和 EcoR I 对慢病毒质粒进行双酶切,将 shRNA 寡核苷酸链退火形成双链 DNA 并与双酶切后的质粒连接,连接产物转化感受态 DH5 α 大肠杆菌,在氨苄青霉素琼脂培养基平板上培养,筛选阳性克隆后委托上海吉玛制药技术有限公司测序验证。Peli1 (shRNA1: 5'-GGATTTATGCTGCAGGGTTTG-3'; shRNA2: 5'-GGTGGTTGAAT ATACTCATGA-3'; shRNA3: 5'GGTTCACAGAAGACTCCAAAC-3') 和含 scrambled shRNA 慢病毒 (shscr: 5'-TTC TCCGAAC-GTGTCACGT-3')。

(3) 建立瑞芬太尼痛觉过敏模型:参照文献^[11]大鼠七氟烷(新晨药业,中国)吸入麻醉后,尾静脉穿刺置入 24 G 静脉留置针,连接电子注射泵(广西威力方舟科技有限公司,中国),根据分组持续泵注瑞芬太尼(宜昌人福药业有限责任公司,中国) 4 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$ 2 h,生理盐水组以相同速率泵注等体积生理盐水。术中大鼠面罩给氧,维持自主呼吸。

(4) 鞘内注射: S + shscr 组、S + shPeli1 组、R + shscr 组、R + shPeli1 组大鼠吸入七氟烷麻醉后,参照 Mestre 等^[12]描述的方法将大鼠俯卧,定位脊柱 L₄-L₅ 间隙,备皮,消毒,以微量注射器从椎间隙垂直缓慢进针,尾巴突然出现颤动或甩动,标志成功穿入鞘内,此时保持穿刺针位置不变并缓慢注入 scrambled shRNA 或 Peli1shRNA,其剂量参照文献^[9]。

(5) 机械缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT) 测定:用 von Frey 纤维丝按照 up-down 法推算 MWT:将一有机玻璃箱 (22 cm \times 22 cm \times 22 cm) 置于金属筛网上,大鼠在有机玻璃箱中适应 15 min 后,采用 IITC2390 系列电子 von Frey 垂直刺激大鼠后肢足底中部,持续时间 \leq 4 s,大鼠出现抬足或舔足行为视为阳性反应,每次刺激间隔 10 s,重复 5 次。

(6) 热缩足反射潜伏期 (thermal withdrawal latency, TWL) 测定:按文献方法测定大鼠足底的 TWL,即将大鼠置于底为光滑玻璃的有机玻璃格子内,适应 20 min 待大鼠安静后,从开始照射至出现缩足逃避反射的时间,以此表示热痛阈。单次光照射时间不超过 30 s,同一部位刺激的间隔时间为 5 min,连续测定 3 次,取平均值。

(7) Western blotting: 利用 BCA 蛋白测试盒

测出总蛋白。按照 35 μg 、15 μl 每孔上样,10% 聚丙烯酰胺电泳浓缩胶 40 V,分离胶 100 V 分离,切胶后将相应分子量条带上目的蛋白和内参照蛋白在 300 mA 条件下转到 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭 2 h,再分别加入 Peli1 抗体、Iba1 抗体、GFAP 抗体 (1:1000) 和 β -actin 抗体 (1:1000) 中,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,次日取出条带用 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,二抗 (1:5000) 室温孵育 2 h 后用 TBST 洗膜(同前)、ECL 曝光,采用 Quantity One Software 进行分析,以目的蛋白/ β -actin 的灰度比值作为目的蛋白表达的相对强度。

(8) PCR (RT-qPCR): 检测行为学后,断颈处死大鼠,分离腰椎,获取脊髓。提取总 RNA,反转录后检测 Peli1 mRNA 的表达。反应体系为 25 μl 体系,包括 2 μl cDNA 模板、上下游定量引物各 0.5 μl 、12.5 μl 反应缓冲液和 9.5 μl 超纯水。反应为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变 1 min,然后以 94 $^{\circ}\text{C}$ 变 15 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 60 s 的条件扩增 35 个循环,RT-qPCR 仪 (Bio-Rad) 检测并分析。引物序列如下: Peli1: TGCTAAGTGCTC-TAGCCGAG/CCCCAACAGTCAGCAAGAC; Iba1: ATGACCAAAGCA GG GAT/CTTCAAGTTTGAC-GGCA G; GFAP: GGTGTCCAGGCTGGTTTCTC/CAAGCCAGACCTCACAGCG; β -actin: CCACAC-CCGCCACCAGTTCG/TACAGCCCGG GGAG-CATCGT。

(9) ELISA: 大鼠深麻醉后在冰上迅速取出 L_{4,5} 脊髓节段,按每 g 净重组织与 9 ml 预冷的生理盐水稀释比例。匀浆后于 4 $^{\circ}\text{C}$,4000 rpm 下离心 15 min (离心半径 5 cm),提取上清液并在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。按 ELISA 试剂盒公司提供的方法检测蛋白并绘制标准曲线,重复 3 次计算出各组上清液 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 浓度。

4. 统计学分析

使用 SPSS 20.0 统计分析软件进行数据分析,实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示。MWT 和 TWL 比较采用重复测量方差分析,两两比较采用 Sidak 法; Western Blot、RT-PCR、ELISA 数据结果采用单因素方差分析,两两比较采用 Tukey 法; $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

1. 静脉输注瑞芬太尼诱导大鼠机械痛觉过敏和热痛觉过敏

通过分别测量大鼠 MWT 和 TWL 评价机械痛

敏和热痛敏, 各组基础 MWT 和 TWL 差异无统计学意义; 与 S 组相比, R 组大鼠在给瑞芬太尼后 6 h、1 天、3 天 MWT 和 TWL 明显降低 ($P < 0.001$), 表明痛觉过敏模型成功建立, MWT 和 TWL 于第 5 天恢复至对照水平 (见图 1)。

2. 静脉输注瑞芬太尼导致大鼠脊髓 Peli1 蛋白及 mRNA 表达增加

进一步探究静脉输注瑞芬太尼对大鼠脊髓 Peli1 表达水平的影响。对各组 Peli1 蛋白印迹相对灰度值以及 mRNA 相对表达进行单因素方差分析结果显示, 与 S 组相比, 瑞芬太尼输注后 6 h 大鼠脊髓 Peli1 蛋白及 mRNA 表达明显上调 ($P < 0.001$), 1 天

上调最为明显 ($P < 0.001$), 5 天基本恢复至对照水平 (见图 2)。

3. 鞘内注射 Peli1shRNA 减轻瑞芬太尼诱导的机械痛觉过敏和热痛觉过敏

为了进一步证实脊髓 Peli1 在瑞芬太尼诱导的痛觉过敏中作用, 于瑞芬太尼输注前预先鞘内注射 scrambled shRNA 或 Peli1shRNA 在基因水平阻断 Peli1 作用。鞘内注射 scrambled shRNA 或 Peli1shRNA 不影响静脉注射生理盐水大鼠的基础 MWT 和 TWL, 而与 R + shscr 组相比, R + shPeli1 组大鼠 TWL 和 MWT 在 6 h、1 天、3 天明显增加 ($P < 0.05, P < 0.001$, 见图 3)。

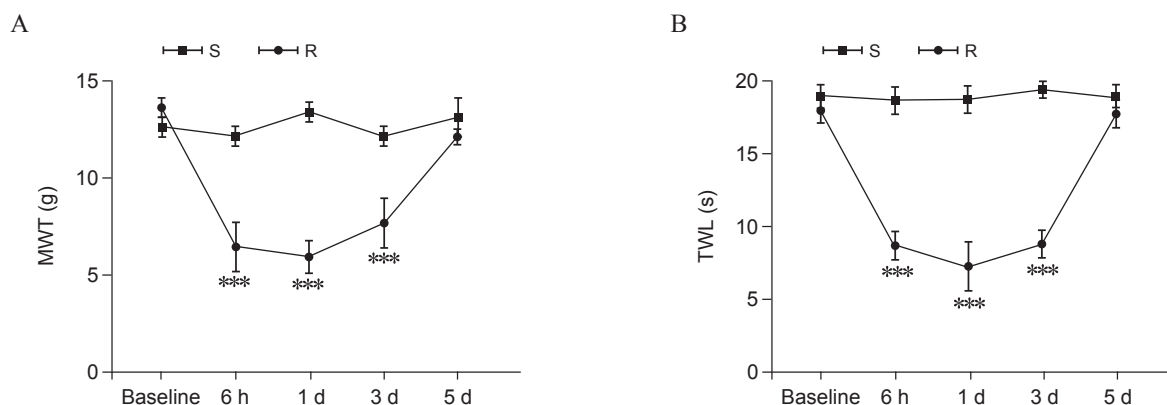


图 1 静脉输注瑞芬太尼诱导大鼠机械痛敏和热痛敏 ($n = 6, \bar{x} \pm SD$) (A) MWT 时程变化; (B) TWL 时程变化 *** $P < 0.001$, 与 S 组相比

Fig. 1 Intravenous infusion of remifentanyl induc mechanical allodynia and heat hyperalgesia in rats ($n = 6, \bar{x} \pm SD$) (A) The time course of MWT; (B) The time course of TWL. *** $P < 0.001$, compared with group S.

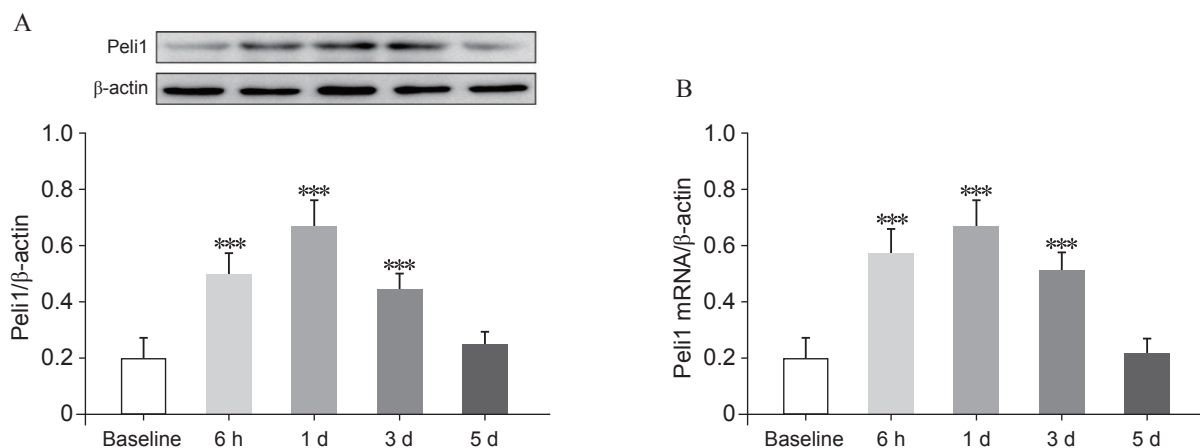


图 2 静脉输注瑞芬太尼增加大鼠脊髓 Peli1 蛋白及 mRNA 的表达 ($n = 3, \bar{x} \pm SD$) (A) 大鼠脊髓背角 Peli1 蛋白表达及定量分析; (B) 大鼠脊髓背角 Peli1mRNA 定量分析 *** $P < 0.001$, 与 Baseline 相比

Fig. 2 Remifentanyl infusion increases the protein and mRNA expression of Peli1 in the spinal cord of rats ($n = 3, \bar{x} \pm SD$) (A) The expression and quantitative analysis of Peli1 protein in the spinal dorsal horn; (B) Quantitative analysis of Peli1 mRNA in the spinal dorsal horn. *** $P < 0.001$, compared with Baseline.

4. 鞘内注射 Peli1shRNA 抑制瑞芬太尼诱导的小胶质细胞标志物 Iba1 蛋白表达

瑞芬太尼输注后第 1 天, 采用 Western blotting 分别对 S + shscr 组、S + shPeli1 组、R + shscr 组、R + shPeli1 组大鼠脊髓小胶质细胞标志物 Iba1 和星型胶质细胞标志物 GFAP 蛋白灰度 (relative density, RD) 进行单因素方差分析。结果显示与 S + shscr 组比较, R + shscr 组大鼠脊髓 Iba1 蛋白灰度增强 ($P < 0.001$), 说明瑞芬太尼输注激活大鼠脊髓小胶质细胞, 与 R + shscr 组比较, R + shPeli1 组大鼠脊

髓 Iba1 蛋白灰度降低 ($P < 0.001$); 各组大鼠脊髓 GFAP 蛋白灰度差异无统计学意义 (见图 4)。

5. 鞘内注射 Peli1shRNA 抑制瑞芬太尼诱导的小胶质细胞标志物 Iba1 mRNA 表达上调

瑞芬太尼输注后第 1 天, 采用 RT-PCR 分别对 S + shscr 组、S + shPeli1 组、R + shscr 组、R + shPeli1 组大鼠脊髓小胶质细胞标志物 Iba1 mRNA 和星型胶质细胞标志物 GFAP mRNA 进行单因素方差分析结果显示, 与 S + shscr 组比较, R + shscr 组大鼠脊髓 Iba1 mRNA 表达增强 ($P < 0.001$), 说明

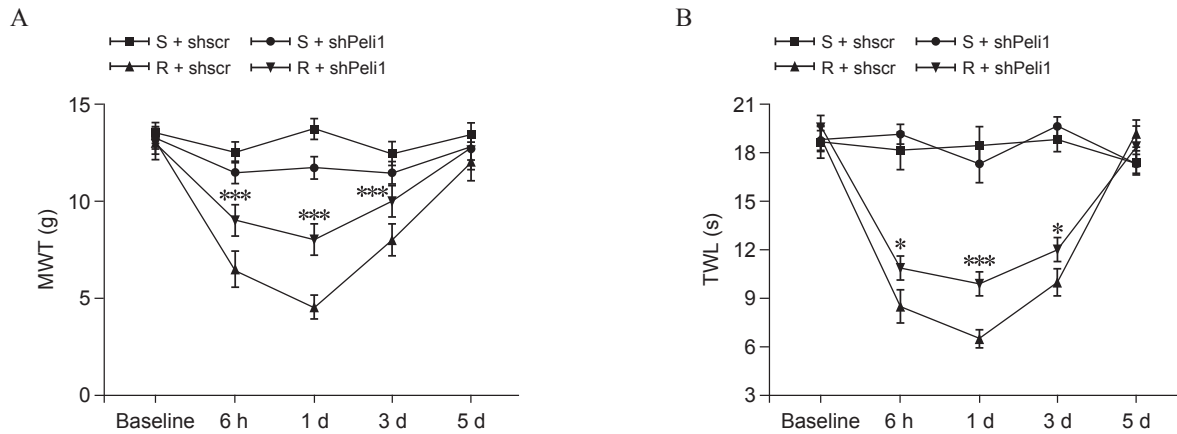


图 3 Peli1shRNA 处理减轻瑞芬太尼诱导的大鼠痛觉过敏 ($n = 6, \bar{x} \pm SD$)

(A) MWT 时程变化; (B) TWL 时程变化 * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, 与 R + shscr 组相比

Fig. 3 Pretreatment of Peli1shRNA attenuates hyperalgesia induced by remifentanyl in rats ($n = 6, \bar{x} \pm SD$)

(A) The time course of MWT; (B) The time course of TWL. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, compared with group R + shscr.

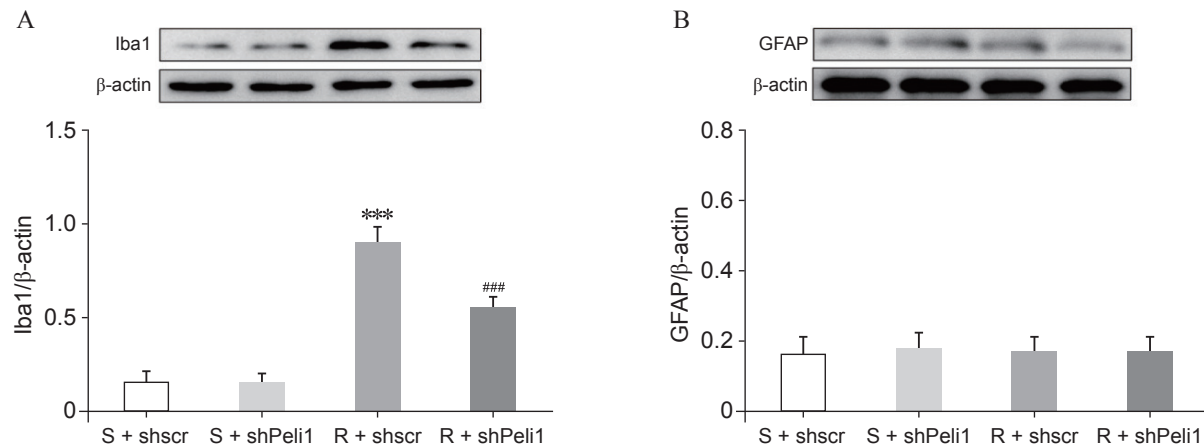


图 4 Peli1shRNA 预处理抑制瑞芬太尼诱导的脊髓背角小胶质细胞标志物 Iba1 表达上调 ($n = 3, \bar{x} \pm SD$)

(A) 大鼠脊髓背角 Iba1 蛋白表达及定量分析; (B) 大鼠脊髓背角 GFAP 蛋白表达及定量分析

*** $P < 0.001$, 与 S + shscr 组相比; ### $P < 0.001$, 与 R + shscr 组相比

Fig. 4 Pretreatment of Peli1shRNA prevents the upregulation of microglia marker Iba1 induced by remifentanyl in the spinal dorsal horn ($n = 3, \bar{x} \pm SD$)

(A) The expression and quantitative analysis of Iba1 protein in the spinal dorsal horn; (B) The expression and quantitative analysis of GFAP protein in the spinal dorsal horn.

*** $P < 0.001$, compared with group S + shscr; ### $P < 0.001$ compared with group R + shscr.

瑞芬太尼输注激活大鼠脊髓小胶质细胞。与 R + shscr 组比较, R + shPeli1 组大鼠脊髓 Iba1 mRNA 表达降低 ($P < 0.001$), 提示 Peli1shRNA 预处理能显著抑制瑞芬太尼所致的 Iba1 mRNA 表达增加。各组大鼠脊髓 GFAP mRNA 表达差异无统计学意义(见图 5)。

6. 鞘内注射 Peli1shRNA 抑制瑞芬太尼诱导的 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 表达

瑞芬太尼输注后第 1 天, 对 S + shscr 组、S + shPeli1 组、R + shscr 组、R + shPeli1 组大鼠脊髓 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的表达进行单因素方差分析。结果显示与 S + shscr 组相比, R + shscr 组大鼠脊髓 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 表达增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 说明瑞芬太尼输注诱导炎症细胞因子表达。与 R + shscr 组相比, R + shPeli1 组大鼠脊髓 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 表达明显降低 ($P < 0.001$, 见图 6)。

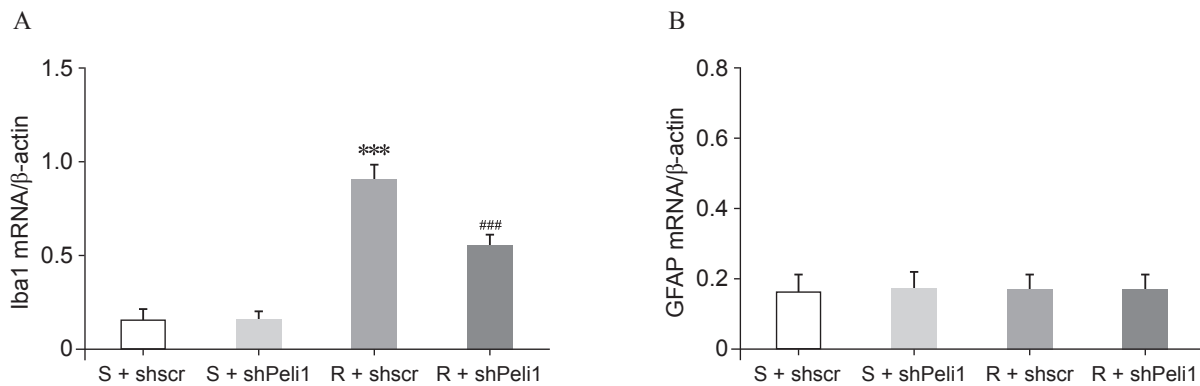


图 5 Peli1shRNA 预处理抑制瑞芬太尼诱导的脊髓背角小胶质细胞标志物 Iba1 mRNA 表达上调 ($n = 3, \bar{x} \pm SD$) (A) 大鼠脊髓背角 Iba1 mRNA 定量分析; (B) 大鼠脊髓背角 GFAP mRNA 定量分析
*** $P < 0.001$, 与 S + shscr 组相比; ### $P < 0.001$, 与 R + shscr 组相比

Fig. 5 Pretreatment of Peli1shRNA prevents the upregulation of microglia marker Iba1 mRNA induced by remifentanyl in the spinal dorsal horn ($n = 3, \bar{x} \pm SD$) (A) Quantitative analysis of Iba1 mRNA in the spinal dorsal horn; (B) Quantitative analysis of GFAP mRNA in the spinal dorsal horn.
*** $P < 0.001$, compared with group S + shscr; ### $P < 0.001$, compared with group R + shscr.

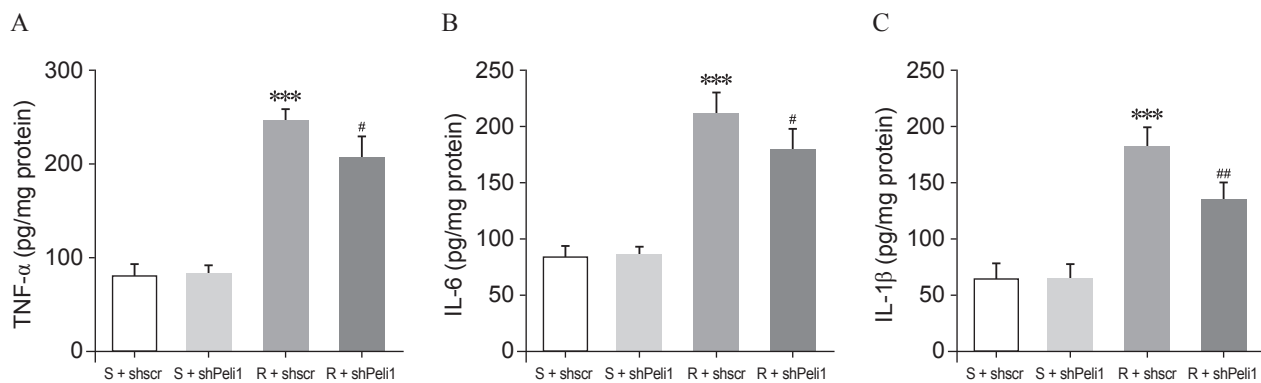
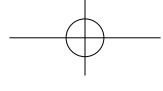


图 6 Peli1shRNA 预处理抑制瑞芬太尼诱导脊髓背角 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 表达 ($n = 3, \bar{x} \pm SD$) (A) 大鼠脊髓背角 TNF- α 表达定量分析; (B) 大鼠脊髓背角 IL-6 表达定量分析; (C) 大鼠脊髓背角 IL-1 β 表达定量分析
*** $P < 0.001$, 与 S + shscr 组相比; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与 R + shscr 组相比

Fig. 6 Pretreatment of Peli1shRNA prevents the expression of TNF- α , IL-6 and IL-1 β induced by remifentanyl in the spinal dorsal horn ($n = 3, \bar{x} \pm SD$) (A) Quantitative analysis of TNF- α expression in the spinal dorsal horn; (B) Quantitative analysis of IL-6 expression in the spinal dorsal horn; (C) Quantitative analysis of IL-1 β expression in the spinal dorsal horn.
*** $P < 0.001$, compared with group S + shscr; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with group R + shscr.



讨 论

瑞芬太尼作为一种人工合成强效 μ 阿片受体激动剂, 因其起效快, 作用时间短, 长期输注无蓄积等优点而被广泛应用于临床全身麻醉镇痛维持。但是近年来发现瑞芬太尼较其他阿片类药物更易诱发痛觉过敏^[13,14], 表现为痛阈下降、痛觉异常敏感甚至出现触诱发痛^[15]。本实验进一步显示瑞芬太尼输注可以诱导大鼠脊髓 Peli1 表达增加, 而且预先鞘内注射 Peli1shRNA 不仅可以明显抑制小胶质细胞的激活, 且能够缓解瑞芬太尼诱导的机械敏痛和热痛觉敏感。提示 Peli1 介导小胶质细胞活化可能参与瑞芬太尼诱发痛觉过敏。

1. 脊髓小胶质细胞活化介导瑞芬太尼诱导痛觉过敏

瑞芬太尼诱发痛觉过敏分子生物学机制复杂, 目前已知瑞芬太尼可以通过 μ 阿片受体的变异、长时程增强 (long-term potentiation, LTP)、NMDA 受体的激活和脊髓胶质细胞的活化等介导痛觉过敏, 且可能涉及离子通道、信号通路、细胞因子等多方面^[16]。然而脊髓小胶质细胞的活化介导瑞芬太尼痛觉过敏机制研究一直备受关注, 研究证实瑞芬太尼诱发痛觉过敏大鼠模型中, 脊髓活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 通过激活小胶质细胞和 N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartate, NMDA) 受体活化介导瑞芬太尼诱导的痛觉过敏^[4]。另外, 研究发现预先鞘内注射 CCL2 中和抗体可明显抑制痛敏大鼠脊髓小胶质细胞的激活, 提示 CCL2 通过激活小胶质细胞介导瑞芬太尼痛觉过敏的过程, 且在痛觉过敏中 CCL2 可能是神经元和小胶质细胞相互作用的媒介^[5]。与上述结果相一致, 本研究结果表明, 瑞芬太尼持续输注后 1 天大鼠脊髓小胶质细胞活化标志物 Iba1 蛋白及 mRNA 表达明显上调, 且此时大鼠痛敏行为学表现也最为明显, 以上提示, 小胶质细胞激活在瑞芬太尼诱导痛觉过敏机制中发挥重要作用, 但对瑞芬太尼导致痛觉过敏中小胶质细胞激活调节机制仍不清楚。

2. 脊髓 Peli1 激活小胶质细胞在瑞芬太尼诱导痛觉过敏中作用

Peli 分子形成了一个保守的 E3 泛素连接酶家族^[17]。在不同的 Peli 中, Peli1 尤其令人感兴趣, 因为与其他家族成员相比, Peli1 在 LPS 刺激下在小胶质细胞中大量表达^[18]。最近的研究表明, 脊髓 Peli1 在神经损伤和吗啡镇痛耐受导致痛觉过敏中发

挥了重要作用^[9,10]。本研究结果显示, 静脉输注瑞芬太尼导致大鼠脊髓 Peli1 蛋白及 mRNA 表达 6 h 上调, 1 天最为明显, 且变化趋势与大鼠痛觉行为学时程变化相吻合, 提示 Peli1 可能参与瑞芬太尼诱导痛觉过敏, 为了进一步验证 Peli1 在瑞芬太尼诱导痛觉过敏中的作用, 采用 RNA 干扰技术探讨 Peli1shRNA 对痛觉行为学影响, 实验发现鞘内注射 Peli1shRNA 明显抑制 Peli1 蛋白及 mRNA 表达, 证实 RNA 干扰技术对 Peli1 抑制有效性, 另外, 预先靶向抑制 Peli1 明显抑制瑞芬太尼导致的痛觉过敏; 进一步提示脊髓 Peli1 在瑞芬太尼诱发的痛觉过敏中发挥必要作用。为了进一步探讨脊髓 Peli1 介导痛觉过敏机制, 本研究观察鞘内注射 Peli1shRNA 对星形胶质细胞和小胶质细胞特异性标志表达的影响, 结果研究发现预先鞘内注射 Peli1shRNA 可明显抑制痛敏大鼠脊髓小胶质细胞活化标志物 Iba1 表达, 但星形胶质细胞活化标志物 GFAP 表达未受影响, 提示 Peli1 可能通过激活小胶质细胞介导瑞芬太尼痛觉过敏的过程。一般认为, 胶质细胞介导神经炎症在疼痛中枢敏化中发挥作用^[19,20], 活化胶质细胞释放促炎细胞因子, 如 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β , 其与感觉神经元表面受体结合, 增强神经元兴奋性, 诱发痛觉过敏^[21,22], 因此, 我们推测痛觉过敏形成过程中, Peli1 介导小胶质细胞激活, 活化小胶质细胞合成和释放炎症因子, 进而敏化脊髓神经元。本研究表明, 瑞芬太尼持续输注诱发大鼠痛觉过敏同时伴有脊髓 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 表达增加, 而预先鞘内注射 Peli1shRNA 可明显抑制痛觉过敏大鼠脊髓 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 表达。然而, 在瑞芬太尼诱发痛觉过敏中 Peli1 可能的细胞定位即 Peli1 原发生成部位还有待实验进一步证实。

3. 脊髓小胶质细胞 Peli1 参与瑞芬太尼诱导痛觉过敏可能的信号通路

最近的研究显示, 在吗啡镇痛耐受模型中, 脊髓 Peli1 通过激活小胶质细胞促进其产生和释放促炎因子如肿瘤坏死因子 (TNF- α)^[10], 而后者已被证实瑞芬太尼引起痛敏中发挥着重要作用^[23]; 此外, 脊髓 Peli1 通过丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路参与吗啡镇痛耐受相关痛觉过敏^[10,24] 并且脊髓背角 p38MAPK 激活有助于瑞芬太尼诱导大鼠术后痛敏; 在肿瘤坏死因子存在的情况下, si Peli1 转染细胞 NF- κ B RELA 转录活性降低^[25]。因此, 我们推测脊髓 Peli1 可能通过激活 p38MAPK 和 NF- κ B 信号通路诱发促炎因子参与瑞芬太尼诱发

痛觉过敏。另外, 研究表明, 在 LPS 刺激小胶质细胞中, miR590-5p 过表达靶向抑制 Peli1 基因表达^[26], 那么在脊髓水平, miR590-5p 是否靶向调控 Peli1 蛋白参与瑞芬太尼诱发痛觉过敏, 还有待后续实验进一步证实。

综上所述, 本研究结果表明脊髓 Peli1 通过激活小胶质细胞介导瑞芬太尼诱导的痛觉过敏, 本研究的结果为痛觉过敏的发生机制提供了新的理论依据, 同时也为开发防治痛觉过敏药物提供了新的作用靶点。

参 考 文 献

- [1] 黄晓玲, 邹毅, 单文燕, 等. 不同剂量右美托咪定对瑞芬太尼诱发的术后痛觉过敏影响 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2016, 22(9):655-658.
- [2] Kim SH, Stoicea N, Soghomonyan S, *et al.* Remifentanyl-acute opioid tolerance and opioid-induced hyperalgesia: a systematic review[J]. *Am J Ther*, 2015, 22(3):e62-e74.
- [3] Ye L, Xiao L, Bai X, *et al.* Spinal mitochondrial-derived ROS contributes to remifentanyl-induced postoperative hyperalgesia via modulating NMDA receptor in rats[J]. *Neurosci Lett*, 2016, 634:79-86.
- [4] 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.
- [5] Medvedev AE, Murphy M, Zhou H, *et al.* E3 ubiquitin ligases Pellinos as regulators of pattern recognition receptor signaling and immune responses[J]. *Immunol Rev*, 2015, 266(1):109-122.
- [6] Xiao Y, Jin J, Chang M, *et al.* Peli1 promotes microglia-mediated CNS inflammation by regulating Traf3 degradation[J]. *Nat Med*, 2013, 19(5):595-602.
- [7] Huang XP, Peng JH, Pang JW, *et al.* Peli1 contributions in microglial activation, neuroinflammatory responses and neurological deficits following experimental subarachnoid hemorrhage[J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10:398.
- [8] Luo H, Winkelmann ER, Zhu S, *et al.* Peli1 facilitates virus replication and promotes neuroinflammation during west nile virus infection[J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(11):4980-4991.
- [9] Wang L, Yin C, Liu T, *et al.* Pellino1 regulates neuropathic pain as well as microglial activation through the regulation of MAPK/NF-kappaB signaling in the spinal cord[J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1):83.
- [10] Wang L, Yin C, Xu X, *et al.* Pellino1 contributes to morphine tolerance by microglia activation via mapk signaling in the spinal cord of mice[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2020, 40(7):1117-1131.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] Fletcher D, Martinez V. Opioid-induced hyperalgesia in patients after surgery: A systematic review and a Meta-analysis[J]. *Br J Anaesth*, 2014, 112(6):991-1004.
- [14] Zhang L, Shu R, Zhao Q, *et al.* Preoperative butorphanol and flurbiprofen axetil therapy attenuates remifentanyl-induced hyperalgesia after laparoscopic gynaecological surgery: A randomized double-blind controlled trial[J]. *Br J Anaesth*, 2016, 117(4):504-511.
- [15] Hayhurst CJ, Durieux ME. Differential opioid tolerance and opioid-induced hyperalgesia: A clinical reality[J]. *Anesthesiology*, 2016, 124(2):483-488.
- [16] Roeckel LA, Le Coz GM, Gaveriaux-Ruff C, *et al.* Opioid-induced hyperalgesia: Cellular and molecular mechanisms[J]. *Neuroscience*, 2016, 338:160-182.
- [17] Moynagh PN. The roles of Pellino E3 ubiquitin ligases in immunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(2):122-131.
- [18] Xiao Y, Jin J, Chang M, *et al.* Peli1 promotes microglia-mediated CNS inflammation by regulating Traf3 degradation[J]. *Nat Med*, 2013, 19(5):595-602.
- [19] Doan RA, Monk KR. Glia in the skin activate pain responses[J]. *Science*, 2019, 365(6454):641-642.
- [20] Ji RR, Donnelly CR, Nedergaard M. Astrocytes in chronic pain and itch[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2019, 20(11):667-685.
- [21] Li QY, Xu HY, Yang HJ. Effect of Proinflammatory Factors TNF- α , IL-1 β , IL-6 on Neuropathic Pain[J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2017, 42(19):3709-3712.
- [22] Chen J, Cong X, Zhan X, *et al.* Effects of Parecoxib on pain threshold and inflammatory factors IL-1 β , IL-6 and TNF- α in spinal cord of rats with bone cancer pain[J]. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2019, 29(6):528-531.
- [23] Hong HK, Ma Y, Xie H. TRPV1 and spinal astrocyte activation contribute to remifentanyl-induced hyperalgesia in rats[J]. *Neuroreport*, 2019, 30(16):1095-1101.
- [24] Deng L, Zhang L, Zhao H, *et al.* The role of p38MAPK activation in spinal dorsal horn in remifentanyl-induced postoperative hyperalgesia in rats[J]. *Neurol Res*, 2016, 38(10): 929-936.
- [25] Lim R, Barker G, Lappas M. Pellino 1 is a novel regulator of TNF and TLR signalling in human myometrial and amnion cells[J]. *J Reprod Immunol*, 2018, 127:24-35.
- [26] Guo Q, Su H, He JB, *et al.* MiR-590-5p alleviates intracerebral hemorrhage-induced brain injury through targeting Peli1 gene expression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 504(1):61-67.