

• 论 著 •

背根神经节 P2X3R 和 TRPV1 介导 CFA 致炎性痛
大鼠不同时期痛行为 *吴茗慧¹ 甄思佳¹ 徐 婷¹ 周 游¹ 应帅宇¹ 叶思婷¹ 杜俊英¹房军帆¹ 方剑乔^{1,2} 高 宏^{2,△} 梁 宜^{1,2,△}(¹ 浙江中医药大学第三临床医学院针灸神经生物学实验室 浙江省针灸神经病学重点实验室, 杭州 310053;² 浙江中医药大学附属第三医院针灸科, 杭州 310053)

摘 要 目的: 动态检测完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA) 诱导的炎性痛大鼠健侧足跖厚度、痛行为和背根神经节 (dorsal ganglia root, DRG) 中 P2X3 受体 (purinergic P2X3 receptor, P2X3R)、辣椒素受体 (transient receptor potential vanilloid type 1, TRPV1) 蛋白表达, 探索炎性痛不同时期痛行为差异及其可能机制。**方法:** 采用大鼠左侧足跖注射 CFA 建立炎性痛模型。将大鼠按随机数字表法分为对照组 (control, Con group) 和炎性痛组 (CFA group)。分别检测基线 (baseline, BL) 和造模后 1、3、7、14、28、42 天时大鼠双侧足跖厚度、热缩足反射潜伏期 (thermal withdrawal latency, TWL) 和机械刺激缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT); Western bolt 检测健 (contralateral, Contra) 患 (ipsilateral, Ipsi) 侧 L₄-L₆ DRG 中 P2X3R、TRPV1 蛋白表达。**结果:** CFA 大鼠患侧足跖厚度于造模后各时间点均显著高于 Con-Ipsi 组和 CFA-Contra 组。CFA 大鼠患侧 TWL 仅于造模后 1、3、7、14 天时显著低于同期 Con-Ipsi 组, 于造模后所有时间点均显著低于 CFA-Contra 组; CFA 大鼠健侧 TWL 各时间点与 Con-Contra 相比均无差异。CFA 大鼠患侧 MWT 于造模后所有时间点均显著低于同期 Con-Ipsi 组, 于造模后 1、3、7、14、28 天时显著低于同期 CFA-Contra 组; 与同期 Con-Ipsi 和 Con-Contra 组比, CFA 大鼠健侧 MWT 于造模后 28、42 天时出现明显降低。CFA 大鼠患侧 DRG 中 P2X3R、TRPV1 蛋白表达于造模后 1、14、28、42 天时均显著高于 Con-Ipsi 和 Con-Contra 组; CFA 大鼠健侧 DRG 中 P2X3R 蛋白表达于造模后 28、42 天时显著多于 Con-Contra 组, 而健侧 DRG 中 TRPV1 蛋白表达无差异。**结论:** CFA 致炎性痛大鼠患侧足跖热痛觉过敏和机械痛觉异常持续存在, 炎性痛后期可诱发出健侧足跖机械痛觉异常; P2X3R 和 TRPV1 可能参与 CFA 大鼠早期和晚期外周痛敏化发生和维持, 健侧背根神经节内 P2X3R 表达增加可能参与机械镜像痛的产生。

关键词 炎性痛; 热痛觉过敏; 机械痛觉异常; 背根神经节; P2X3R; TRPV1

Differential roles of P2X3R and TRPV1 in dorsal root ganglion contributed to pain behavior at diverse phases in rats with inflammatory pain *WU Minghui¹, ZHEN Sijia¹, XU Ting¹, ZHOU You¹, YING Shuaiyu¹, YE Siting¹, DU Junying¹, FANG Junfan¹, FANG Jianqiao^{1,2}, GAO Hong^{2,△}, LIANG Yi^{1,2,△}(¹ Department of Neurobiology and Acupuncture Research, the Third Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Key Laboratory of Acupuncture and Neurology of Zhejiang Province, Hangzhou 310053, China; ² Department of Acupuncture and Moxibustion, the Third Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Abstract Objective: To explore the differences in pain behavior at diverse phases of inflammatory pain and its underlying mechanism, by detecting the dynamic changes in ipsilateral and contralateral paw thickness and pain

* 基金项目: 浙江省自然科学基金 (LY19H270010); 国家级大学生创新创业训练集项目 (201910344056)

△ 通信作者 高宏; 梁宜



behavior as well as P2X3 and TRPV1 receptor protein expression in the dorsal root ganglion of CFA-induced inflammatory pain rats. **Methods:** Inflammatory pain model was established by injecting 0.1 ml of CFA into the plantar surface of rat's left hindpaw. Rats were randomly divided into control group (Con) and CFA-induced inflammatory pain group (CFA). The changes of ipsilateral and contralateral paw thickness, thermal withdrawal latency (TWL) and mechanical withdrawal threshold (MWT) of rats were detected at baseline, 1 d, 3 d, 7 d, 14 d, 28 d and 42 d after modeling; protein expression of P2X3R and TRPV1 in ipsilateral and contralateral L₄-L₆ DRG were detected by Western blot assay. **Results:** Compared with the Con-Ipsi group and CFA-Contra group at the same timepoint, the paw thickness in the ipsilateral side of CFA rats significantly increased at all timepoints. Ipsilateral TWL of CFA rats were significantly lower than those of Con-Ipsi rats at 1 d, 3 d, 7 d and 14 d after modeling and lower than those of CFA-contra rats at all timepoints observed. There is no significant difference in contralateral TWL between the CFA-Contra group and the Con-Contra group at all time points. Ipsilateral MWT of CFA rats was remarkably lower than those of the Con-Ipsi rats at all timepoint observed and lower than those of CFA-contra rats at 1 d, 3 d, 7 d, 14 d and 28 d after modeling. Compared with the Con-Ipsi and Con-Contra group at the same timepoint, contralateral MWT significantly decreased. Both P2X3R and TRPV1 protein expression in ipsilateral DRGs of CFA rats were higher than those of the Con-Ipsi and Con-Contra group at all timepoints. P2X3R protein expression in contralateral DRGs of CFA rats were significantly higher than those in Con-Contra group at 28 d and 42 d post-modeling, but TRPV1 protein remained unchanged. **Conclusion:** Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia existed persistently in ipsilateral inflamed paw of rats, and contralateral uninflamed paw demonstrated mechanical allodynia at the late phase of CFA-induced inflammatory pain. P2X3R and TRPV1 contributed to the occurrence and maintenance of peripheral sensitization in the early and late phases of CFA rats, and P2X3R in the contralateral DRGs might be involved in the evolution of mirror-image mechanical pain.

Keywords inflammatory pain; thermal hyperalgesia; mechanical allodynia; dorsal root ganglia; P2X3R; TRPV1

疼痛是临床最常见的症状，已被列为第五大生命指征^[1]。疼痛通常由特定疾病或损伤引起，几乎所有成年人都经历过疼痛^[2]，世界卫生组织已经将慢性疼痛列为一种疾病。新近流行病学调查结果表明，约 1/3 的人经历过慢性疼痛，老年人发病率呈年龄递增趋势^[3]。在我国，疼痛门诊中 30%~40% 的病人因患有慢性疼痛而就诊。炎性痛是目前临床上最为常见的病理性疼痛之一，严重干扰着人类的生活和工作，在美国每年有 1.16 亿人罹患过炎性疼痛^[4]。炎性痛伴随痛觉过敏（对伤害性刺激的反应增强）或痛觉异常（由正常无害刺激触发疼痛）现象，主要通过服用非甾体消炎镇痛药和糖皮质激素等药物治疗，然而这类药物具有多靶点特性，服用后常伴发胃肠道功能障碍、呼吸抑制、药物成瘾、慢性毒性等不良反应^[5]。因此，明确介导炎性痛的关键分子靶点，对于精准防治炎性痛具有重要意义。研究表明背根神经节中多种离子通道的激活参与了外周痛觉敏化的形成^[6]。DRG 神经元上表达的 TRPV1 和 P2X3R 作为感受外界伤害性刺激的主要受体，被认为与疼痛密切相关^[7-10]，抑制 DRG 中

P2X3R 和 TRPV1 表达可有效缓解炎性疼痛^[11,12]。深入研究炎性痛大鼠不同时期健患侧痛行为变化及其外周 P2X3R 和 TRPV1 表达差异，有助于进一步明确介导炎性痛的关键分子靶点和干预时间节点。

方 法

1. 实验材料

实验动物：雄性 Specific Pathogen Free 级健康 SD 大鼠 60 只，6 周龄，体重 200 g，由浙江中医药大学实验动物中心提供 [SYXK (浙) 2018-0012]。本实验所有操作均符合浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会实验伦理学要求（伦理审批号：IACUC-20190715-09）。

实验仪器：von Frey hairs test 触觉纤维丝、游标卡尺、足底热辐射测痛仪（37370，意大利 UGO BASILE）；超声波粉碎机（JY92-2，中国宁波新芝）；电泳-转印系统（美国 BioRad）；凝胶成像系统（Fluor Chem R，美国 Protein Simple）。

实验试剂和耗材：完全弗氏佐剂（F5881，美

国 Sigma)；P2X3R (APR016, 美国 Alomone)；TRPV1 (ACC030, 美国 Alomone)；GAPDH (3683, 美国 CST)；山羊抗兔 IgG H&L (ab6721, 美国 Abcam)；BCA 试剂盒 (P0010, 中国碧云天)；ECL 试剂盒 (P0018, 中国碧云天)。

2. 实验方法

分组：除对照组 (Control, Con group) 外，炎性痛大鼠均行炎性痛造模处理。Con 组仅于相同足跖位置注射相同剂量 0.9% 氯化钠溶液。所有实验大鼠按随机数字表法分为对照组 (Con group, $n = 12$) 和炎性痛 (CFA) 组 (inflammatory pain group, $n = 48$)，其中炎性痛大鼠按照造模后 4 个不同时间点分批取材，即 CFA 1 天 (炎性痛早期, $n = 12$)，CFA 14 天 ($n = 12$)、CFA 28 天 ($n = 12$)、CFA 42 天 ($n = 12$)，后 3 个时间点为炎性痛晚期；Con 大鼠于造模后 42 天取材。各组大鼠一半用于检测机械刺激缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT)、一半用于检测热缩足反射潜伏期 (thermal withdrawal latency, TWL)。

炎性痛模型制备：炎性痛组内每只大鼠于左后足足底皮下注射 CFA 原液每只 100 μ l，建立炎性疼痛模型。

3. 指标检测

主要检测实验大鼠不同时间点足跖部厚度、TWL 和 MWT 及各组大鼠双侧 L₄-L₆ DRG 中 P2X3R 和 TRPV1 蛋白表达情况；具体检测时间点见实验流程图 (见图 1)。

(1) 足跖部厚度 (paw thickness)：实验大鼠均处于室温 25℃ 且安静的环境中，固定大鼠的腿部使其充分暴露足跖部，使用游标卡尺分别连续读取 3 次大鼠健侧和患侧足跖部厚度 (足背高点与足底的

垂直高度)，取 3 次测量值均值为该足跖部厚度。

(2) 热缩足反射潜伏期 (TWL)：待实验大鼠适应环境 3 天后再进行痛行为学检测。将实验组各大鼠分别置于不同的透明箱中，环境温度需维持在 25±2℃ 内。待大鼠停止梳理毛发或舔足后，将足底热辐射测痛仪上的“十”字图案对准大鼠后足足底中央，分别用热辐射光照射大鼠左右两侧后足足底中央。开始照射时，仪器开始自动计时；大鼠出现抬腿后，仪器停止自动计时，记录的时间为大鼠的 TWL。共记录 5 次时间值，每次至少间隔 5 min，取中位数及其前后两个数值的均值为最终热痛阈值。为了避免大鼠足跖皮肤灼伤，设置照射最长时间为 20 s，最高温度为 35℃。

(3) 机械刺激缩足反射阈值 (MWT)：待实验大鼠适应环境 3 天后再进行痛行为学检测。测量时，放置大鼠方法同前。但透明箱安装于铁丝网上，方便暴露大鼠足底以供检测。从 4 g 刺激强度开始，使用不同力量的 von Frey 丝 (0.4、0.6、1、2、4、6、8、15、26 g) 垂直刺激大鼠两侧后跖足底中部，施加压力至 von Frey 丝轻微弯曲“S”形并持续 5 s，若大鼠出现缩腿或舔足反应则为阳性反应，记为“X”并给予相邻小一级力度的刺激；当该力度的 von Frey 纤维刺激不能引起阳性反应时，则记为“O”并给予相邻大一级力度刺激，每次刺激间隔 30 s。当出现第 1 次阳性反应后，再继续刺激 4 次，记录下反应序列，按照 Chaplan 等方法计算 MWT^[13]。

(4) Western Blot 蛋白检测：每组随机选择 6 只大鼠双侧 L₄-L₆ DRG，检测 P2X3R 和 TRPV1 蛋白表达情况。于 CFA 造模后 1 天、14 天、28 天、42 天检测完 MWT、TWL、足跖部厚度后进行取材。用 3% 戊巴比妥钠 (0.15 ml/100 g) 腹腔注射麻醉大

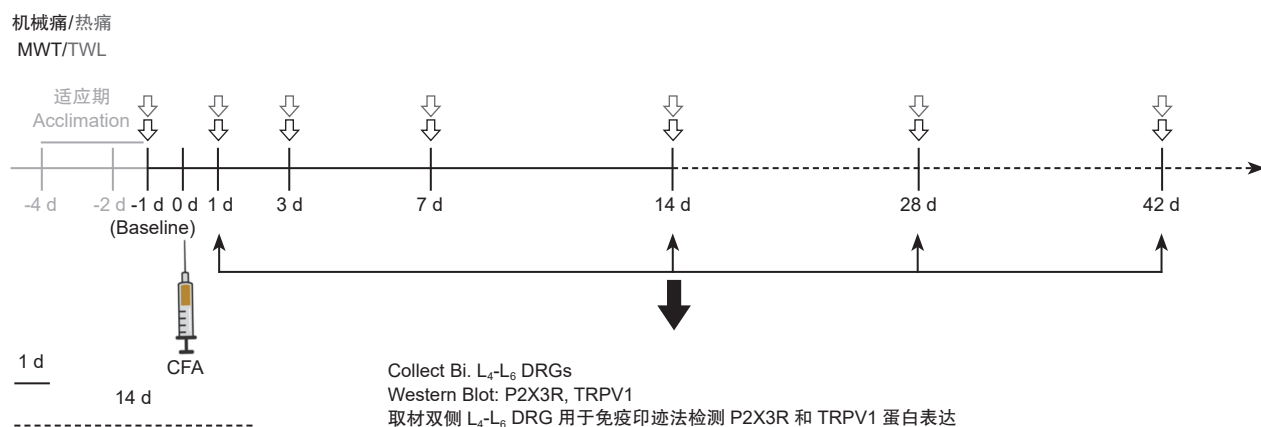


图 1 实验流程图

Fig. 1 Experimental flow chart

鼠, 开胸暴露心脏, 经左心室、升主动脉快速灌注 4℃ 预冷的生理盐水, 快速取出双侧 L₄-L₆ DRGs, 置入 -80℃ 冰箱中保存。将实验大鼠双侧 L₄-L₆ DRG 裂解后提取总蛋白, 测定蛋白浓度后进行蛋白变性。根据指标分子量选用 8% 分离胶、5% 浓缩胶进行电泳, 电泳后转印至甲醇激活的 PVDF 膜。使用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后, 分别使用 1X TBST 稀释后兔抗 P2X₃R (1:1000)、兔抗 TRPV1 (1:1000), 4℃ 孵育过夜。随后加入二抗, 室温摇动孵育 2 h。使用 ECL 发光试剂盒显色拍片。

4. 图像和统计学分析

使用 Image J 软件计算条带的灰度值, 均一化处理目的与内参条带的比值作为最终统计数据。采用 Graphpad 8.0 软件进行统计分析。所有计量数据均采用均数 ± 标准误 ($\bar{x} \pm SEM$) 表示。足趾厚度和行为学数据采用 Two-way ANOVA 分析, 免疫印迹结果多组间比较采用 One-way ANOVA 分析, 两组组间采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

1. 各组大鼠健患侧足跖厚度变化

检测大鼠健患侧不同时间点足跖厚度变化评估足跖局部炎症水肿状态。如图 2 所示, 两组大鼠健患侧基线 (BL) 足跖厚度并无差异。与同期 Con-Ipsi 组相比, CFA 大鼠患侧足跖厚度于造模后各时间点均显著增厚 ($P < 0.01$); 且 CFA 大鼠造模后各时间

点患侧足跖厚度均显著高于 CFA 大鼠健侧足跖 ($P < 0.01$); 两组大鼠健侧足跖厚度于造模后各时间点无明显差异。

2. 各组大鼠健患侧 TWL 变化

检测大鼠健患侧不同时间点足跖 TWL 判定热痛觉过敏。如图 3 所示, 两组大鼠健患侧基础 TWL 无显著差异。与同期 Con-Ipsi 组相比, CFA 大鼠患侧足跖 TWL 于造模后 1、3、7 天和 14 天四个时间点均显著降低 ($P < 0.01$), 造模后 28、42 天未出现统计学差异; 与 CFA-Contra 组相比, CFA 大鼠患侧足跖 TWL 于造模后各时间点均显著下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 两组大鼠健侧足跖 TWL 于造模后各时间点无明显差异。

3. 各组大鼠健患侧 MWT 变化

检测大鼠健患侧不同时间点足跖 MWT 判定机械痛觉异常。如图 4 所示, 两组大鼠健患侧基础 MWT 无显著差异。CFA 大鼠患侧足跖 MWT 造模后各时间点均显著低于同期 Con-Ipsi 组 ($P < 0.01$); 与 CFA-Contra 组相比, CFA 大鼠患侧足跖 MWT 于造模后 1、3、7、14 天和 28 天时均显著下降 ($P < 0.01$), 于造模后 42 天时无明显差异; 造模后 28 天和 42 天时, CFA 大鼠健侧足跖 MWT 显著低于同期 Con-Contra 组与 Con-Ipsi 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

4. 各组大鼠健患侧 L₄-L₆ DRG 中 P2X₃R 蛋白表达情况

如图 5 所示, 与 Con-Ipsi 组相比, CFA 大鼠患侧 L₄-L₆ DRG 中 P2X₃R 蛋白表达于造模后 1、14、28、42 天四个时间点均明显增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);

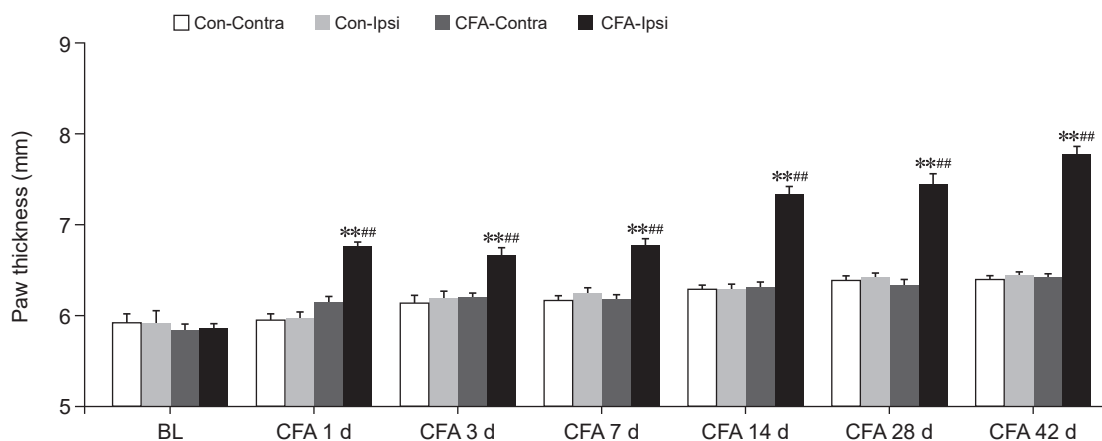


图 2 各组大鼠健患侧足跖厚度变化 ($n = 6$, $\bar{x} \pm SEM$)

** $P < 0.01$, 与 Con-Ipsi 组同一时间点相比; *** $P < 0.01$, 与 CFA-Contra 组同一时间点相比

Fig. 2 Changes of ipsilateral (Ipsi) and contralateral (Contra) paw thickness in rats ($n = 6$, $\bar{x} \pm SEM$)

** $P < 0.01$, compared with group Con-Ipsi at the same time point; *** $P < 0.01$, compared with group CFA-Contra at the same time point.

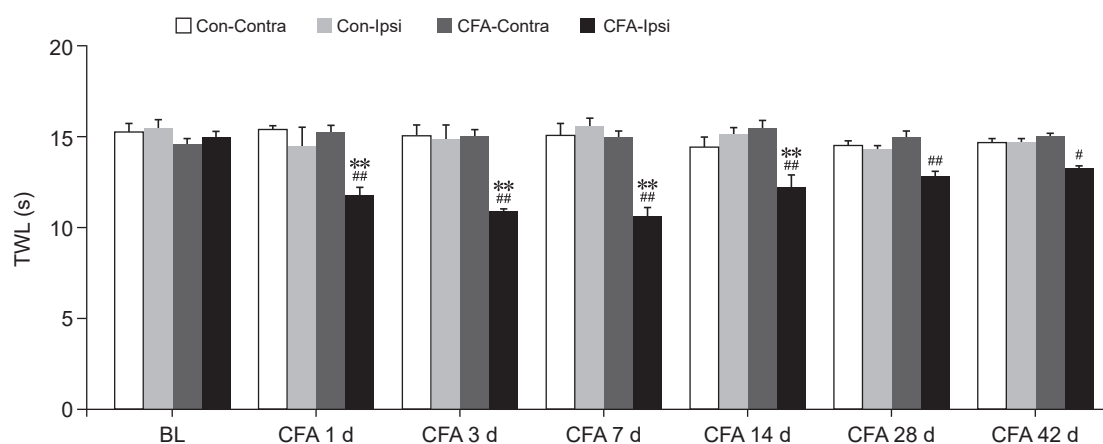


图3 各组大鼠患侧热缩足反射潜伏期变化 ($n=6$, $\bar{x} \pm SEM$)

** $P < 0.01$, 与 Con-Ipsi 组同一时间点相比; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与 CFA-Contra 组同一时间点相比

Fig. 3 Changes of ipsilateral (Ipsi) and contralateral (Contra) thermal withdrawal latency (TWL) in rats ($n=6$, $\bar{x} \pm SEM$)

** $P < 0.01$, compared with group Con-Ipsi at the same time point; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with group CFA-Contra at the same time point.

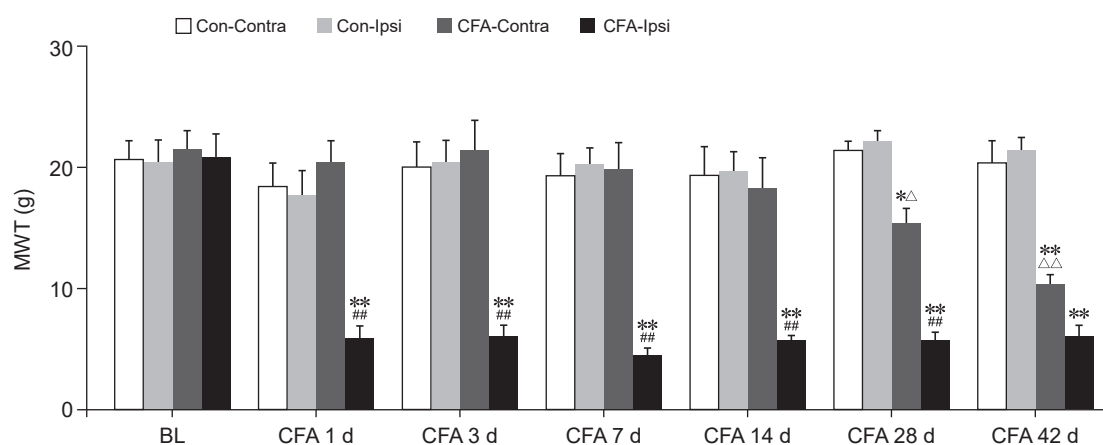


图4 各组大鼠患侧机械刺激缩足反射阈值变化 ($n=6$, $\bar{x} \pm SEM$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与 Con-Ipsi 组同一时间点相比; ## $P < 0.01$, 与 CFA-Contra 组同一时间点相比; Δ $P < 0.05$, ΔΔ $P < 0.01$, 与 Con-Contra 组同一时间点相比

Fig. 4 Changes of ipsilateral (Ipsi) and contralateral (Contra) mechanical withdrawal threshold (MWT) in rats ($n=6$, $\bar{x} \pm SEM$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with group Con-Ipsi at the same time point; ## $P < 0.01$, compared with group CFA-Contra at the same time point; Δ $P < 0.05$, ΔΔ $P < 0.01$, compared with group Con-Contra at the same time point.

造模后1天和14天时CFA大鼠患侧P2X3R蛋白表达明显高于同期CFA-Contra组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，造模后28天和42天时与同期CFA-Contra组无明显差异；与Con-Contra组相比，CFA大鼠健侧P2X3R蛋白表达于造模后1天、14天无明显差异，但于造模后28天、42天时表达明显增多 ($P < 0.05$)。

5. 各组大鼠健侧L₄-L₆ DRG中TRPV1蛋白表达情况

如图6所示，与Con-Ipsi组相比，CFA大鼠患侧L₄-L₆ DRG中TRPV1蛋白表达于造模后各时间点均

明显增加 ($P < 0.05$)；造模后各时间点CFA大鼠患侧TRPV1蛋白表达明显高于同期CFA-Contra组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，造模后28天时与同期CFA-Contra组无明显差异；与Con-Contra组相比，CFA大鼠健侧TRPV1蛋白表达各时间点均无明显变化。

讨 论

炎性痛是常见的病理性疼痛之一，主要表现为机械痛觉异常和热痛觉过敏等痛行为改变^[14]。本研

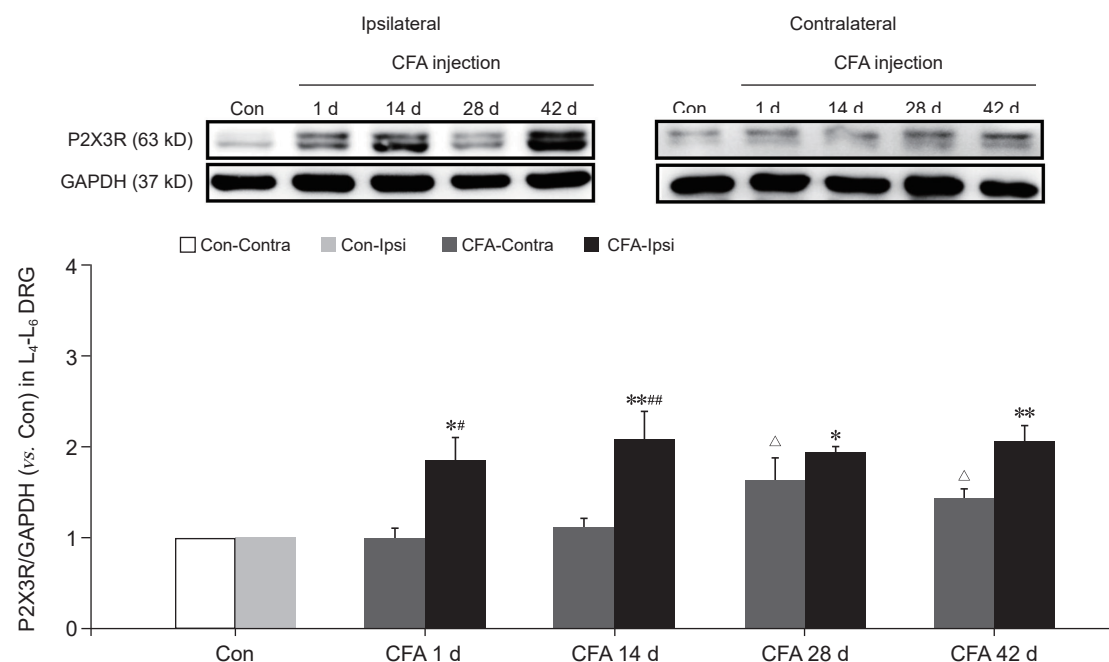


图 5 各组大鼠健侧 L_4-L_6 DRG 中 P2X3R 蛋白表达情况 ($n = 6$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) P2X3R 和 GAPDH Western Blot 条带图; (B) P2X3R 条带统计图

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与 Con-Ipsi 组相比; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$, 与 CFA-Contra 组同一时间点相比; Δ $P < 0.05$, 与 Con-Contra 组相比

Fig. 5 Changes of ipsilateral (Ipsi) and contralateral (Contra) P2X3R protein expression in L_4-L_6 DRG of rats ($n = 6$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) Representative band of P2X3R 和 GAPDH Western Blot; (B) The statistics for P2X3R band

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with group Con-Ipsi; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$, compared with group CFA-Contra at the same time point; Δ $P < 0.05$, compared with group Con-Contra.

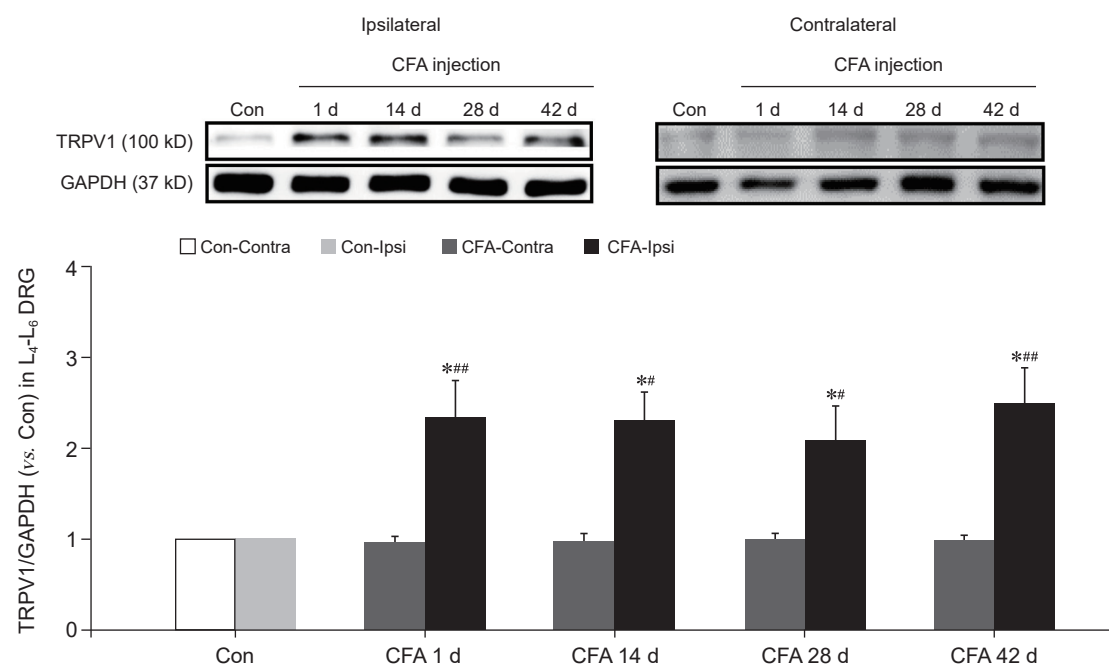


图 6 各组大鼠患侧 L_4-L_6 DRG 中 TRPV1 蛋白表达情况 ($n = 6$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) TRPV1 和 GAPDH Western Blot 条带图; (B) TRPV1 条带统计图

* $P < 0.05$, 与 Con-Ipsi 组相比; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$, 与 CFA-Contra 组同一时间点相比

Fig. 6 Changes of ipsilateral (Ipsi) and contralateral (Contra) TRPV1 protein expression in L_4-L_6 DRG of rats ($n = 6$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) Representative band of TRPV1 和 GAPDH Western Blot; (B) The statistics for TRPV1 band

* $P < 0.05$, compared with group Con-Contra; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$, compared with group CFA-Contra at the same time point.



究动态观察了 CFA 大鼠在炎性痛不同时期健侧足跖痛行为差异,首次观测到 CFA 造模后第 42 天;并进一步研究炎性痛不同时期 DRG 中 P2X3R 和 TRPV1 在介导健侧痛行为中的作用差异,初步揭示 CFA 致炎性痛大鼠健侧足跖痛行为表现存在时间差异,痛相关受体 P2X3R 和 TRPV1 介导痛行为角色有所不同。

本研究较系统观察了造模后 1 天至 42 天期间 CFA 大鼠健侧足跖炎症和痛行为变化情况。CFA 大鼠造模后各时间点患侧足跖厚度均明显增厚,提示 CFA 大鼠患侧足跖局部炎症在较长时间内持续存在。既往研究报道^[15,16],CFA 足底注射后足跖肿胀在 2~3 周内持续存在,而本研究结果提示 CFA 大鼠患侧足跖肿胀可至少持续 6 周。实验中还观察到 CFA 大鼠患侧足跖 TWL 于造模后 1 天开始下降并维持较低水平,炎性痛后期有所回升。已有研究与本研究结果类似,也观察到热痛觉过敏恢复现象,然而恢复时间稍有不同^[16-18]。如 Cui 等^[16]研究结果显示 CFA 足底注射后引起的热痛觉过敏在 31 天恢复;Zaratin 等^[17]研究报道 CFA 足底皮内注射诱导的单关节炎模型中,热痛觉过敏在 21 天恢复。本研究还观察到 CFA 大鼠患侧 MWT 于各时间点均显著降低,提示 CFA 诱发的患侧机械痛觉异常可在炎性痛早期和晚期持续存在。既往大部分炎性痛相关研究通常仅观察到 CFA 造模后 14 至 21 天^[19,20],本研究观察至造模后 6 周,更全面地呈现了炎性痛大鼠的长时程痛行为特征。CFA 诱导的痛行为特征在不同研究中有所差异,可能与其造模所用药物的成分以及注射剂量的不同有关。本研究采用大鼠左足底皮下注射 100 μ l CFA 原液(1 mg 结核分枝杆菌溶于 0.85 ml 石蜡油和 0.15 ml 甘露醇单油酸酯混合物),Cui 等^[16]注射 100 μ l CFA 原液与无菌生理盐水等比例稀释混合物进行造模;Zaratin 等^[17]则采用 150 μ l 以 0.1% 丁酸分枝杆菌为主要成分的 CFA 原液进行造模。研究还观察到 CFA 大鼠于造模后 28 天健侧足跖出现机械痛觉异常,表明 CFA 大鼠在炎性痛后期出现机械镜像痛。与本研究结果相似,既往研究报道也在神经病理性疼痛、炎性痛模型中观察到机械镜像痛现象^[20-23]。然而 CFA 大鼠健侧足跖 TWL 与同期 Con-Contra 组相比无明显差异,仍高于自身患侧足跖(见图 3)。高永静等^[19]研究表明,SD 大鼠足底注射 CFA 3 h 后即出现机械镜像痛,未诱发出镜像热痛觉过敏;Raghavendra 等^[22]和 Nagakura 等^[20]也观察到此类现象,但机械镜像痛出现的时间分别为 CFA 造模 14 天和 10 天。据此,

推测 CFA 致炎性痛可诱发机械镜像痛而非镜像热痛觉过敏,机械镜像痛在炎性痛早期和晚期均有报道,有待进一步研究明确。

P2X3R 和 TRPV1 均是介导炎症性疼痛的关键靶点^[24,25]。有研究表明,足底 CFA 注射可使 DRG 中小伤害性神经元中 P2X3R 表达显著增多^[25];足跖或 DRG 注射 P2X3R 拮抗剂可有效拮抗炎性痛^[7]。siRNA 转染、药理学下调或抑制 DRG 神经元 TRPV1 表达和激活可有效缓解炎性痛^[24,26]。为进一步揭示 P2X3R 和 TRPV1 在 CFA 致炎性痛不同时期中的作用差异,本研究观察到 CFA 大鼠于造模后各时间点患侧 DRG 中 P2X3R、TRPV1 蛋白表达明显多于 Con-Ipsi 组(见图 5);健侧 DRG 中仅 P2X3R 蛋白于造模后 28 天和 42 天时表达明显增多(见图 5),而健侧 TRPV1 蛋白表达无变化(见图 6)。以上结果表明,P2X3R 而非 TRPV1 介导 CFA 大鼠机械镜像痛的产生,但健侧 DRG 中 P2X3R 表达增多的内在机制尚不清楚。既往初步研究表明,抑制脊髓 P2X3R 表达可缓解蜂毒诱导的镜像痛^[27],患侧肌肉注射 P2X3R 拮抗剂 A-317491 可有效缓解 CFA 致咬肌炎症大鼠的机械镜像痛^[28]。鞘内注射 P2X3R 拮抗剂是否可以缓解 CFA 大鼠双侧足跖机械痛觉异常尚未有相关报道。考虑到鞘内注射存在药物扩散和脊髓腔内脑脊液回流现象,不能完全排除 P2X3R 抑制剂扩散至对侧 DRG 和脊髓背角的可能。目前本课题组正在探索单侧 DRG 注射技术,相关研究结果后续将进一步予以报道。关于镜像痛的发生机制仍不清楚,有研究认为疼痛信号可通过激活患侧胶质细胞传递至健侧,增强健侧神经元的兴奋性从而诱发镜像痛;抑制脊髓和 DRG 中胶质细胞活化则可缓解镜像痛^[29,30]。在脊神经结扎模型中,患侧 DRG 中 TNF- α 分泌增加并通过脑脊液向健侧扩散,健侧 DRG 中的卫星神经胶质细胞(satellite glial cell, SGC)被 TNF- α 激活,激活的 SGC 释放神经生长因子以增强伤害感受器兴奋性,从而诱导镜像痛^[31]。Krajewski 等^[32]的研究结果显示,在 CFA 诱导的炎性疼痛模型中,双侧 DRG 中 TNF- α 表达均显著升高。Jin 等^[33]认为 TNF- α 诱导的机械痛觉异常可能由 P2X3R 介导,TNF- α 可以使感觉神经元上 P2X3R 迅速致敏诱发疼痛。此外,CFA 大鼠患侧足跖热痛觉过敏于造模后 28 天有所回升,但患侧 DRG 中 TRPV1 蛋白表达仍处于较高水平。究其原因,认为 DRG 中 TRPV1 不仅参与热痛觉过敏过程,还介导机械痛觉异常的产生^[34,35]。与本研究结果相似,Xiao 等^[36]研究观察到,CFA 诱导的热痛觉过敏在

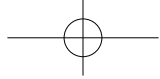
造模后 14 天恢复, 但患侧 DRG 中 TRPV1 蛋白表达在造模后 28 天仍高于空白对照组; 在 TRPV1 敲除小鼠中 CFA 或辣椒素诱导的热痛觉过敏和机械痛觉异常均得到有效缓解^[37,38]。P2X3R 与 TRPV1 之间存在相互作用, 两者可以相互促进对方的表达进而介导疼痛^[9]。

综上所述, CFA 诱导的炎性痛大鼠模型中, 患侧机械痛觉异常可至少维持 42 天, 患侧热痛觉过敏同步出现, 但于炎性痛后期恢复, 同时造模后 28 天出现机械镜像痛。CFA 大鼠患侧足跖外周痛敏化发生和维持, 与患侧 DRG 中 P2X3R 和 TRPV1 蛋白表达增加有关, 而机械镜像痛的产生可能与 DRG 中的 P2X3R 有关。背根神经元 P2X3R 或可成为深入研究炎性痛后期镜像痛的突破点。但本研究仅通过检测 P2X3R 和 TRPV1 的蛋白表达变化探索其在炎性痛维持和发生中的作用, 缺乏药理学干预等方法验证, 本课题组正在开展相关实验, 通过干预 P2X3R 和 TRPV1 表达进一步探究其对炎性痛大鼠痛行为的影响。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Rogers MP, Kuo PC. Pain as the fifth vital sign[J]. J Am Coll Surgeons, 2020, 231(5):601-602.
- [2] Tracey I, Bushnell MC. How neuroimaging studies have challenged us to rethink: is chronic pain a disease?[J]. Pain, 2009, 10(11):1113-1120.
- [3] Yong JZ, Ting JZ, Xiao GY, *et al.* A survey of chronic pain in China [J]. Libyan J Med, 2020, 15(1):1730550.
- [4] Rasu RS, Vouthy K, Crowl AN, *et al.* Cost of pain medication to treat adult patients with nonmalignant chronic pain in the United States[J]. J Manag Care Spec Pharm, 2014, 20(9):921-928.
- [5] Baral P, Udit S, Chiu IM. Pain and immunity: implications for host defence[J]. Nat Rev Immunol, 2019, 19(7):433-447.
- [6] Matsuda M, Huh Y, Ji RR. Roles of inflammation, neurogenic inflammation, and neuroinflammation in pain [J]. J Anesth, 2019, 33(1):131-139.
- [7] Teixeira JM, Bobinski F, Parada CA, *et al.* P2X3 and P2X2/3 receptors play a crucial role in articular hyperalgesia development through inflammatory mechanisms in the knee joint experimental synovitis[J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(8):6174-6186.
- [8] Honda K, Shinoda M, Kondo M, *et al.* Sensitization of TRPV1 and TRPA1 via peripheral mGluR5 signaling contributes to thermal and mechanical hypersensitivity[J]. Pain, 2017, 158(9):1754-1764.
- [9] 杜俊英, 房军帆, 项璇儿, 等. 基于 TRPV1 和 P2X3 交互作用的大鼠外周痛感觉调控机制 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(4):485-492.
- [10] 寿升芸, 魏骏骏, 何晓芬, 等. 低频电针对 2 型糖尿病神经痛大鼠 DRG P2X3 受体的抑制作用 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(1):54-59.
- [11] Liu Y, Du J, Fang J, *et al.* Electroacupuncture inhibits the interaction between peripheral TRPV1 and P2X3 in rats with different pathological pain[J]. Physiol Res, 2021, 70(4):635-647.
- [12] Wang Y, Wang RR, Sun W, *et al.* Analgesic effect of dl-THP on inflammatory pain mediated by suppressing spinal TRPV1 and P2X3 receptors in rats[J]. Front Biosci-Landmark, 2021, 26(5):1-10.
- [13] Cook AD, Christensen AD, Tewari D, *et al.* Immune cytokines and their receptors in inflammatory pain[J]. Trends Immunol, 2018, 39(3):240-255.
- [14] Baniasadi M, Manaheji H, Maghsoudi N, *et al.* Microglial-induced apoptosis is potentially responsible for hyperalgesia variations during CFA-induced inflammation[J]. Inflammopharmacology, 2020, 28(2):475-485.
- [15] Nasser B, Zaringhalam J, Daniali S, *et al.* Thymulin treatment attenuates inflammatory pain by modulating spinal cellular and molecular signaling pathways[J]. Int Immunopharmacol, 2019, 70:225-234.
- [16] Cui WQ, Sun WS, Xu F, *et al.* Spinal serotonin 1A receptor contributes to the analgesia of acupoint catgut embedding by inhibiting phosphorylation of the N-Methyl-d-Aspartate receptor GluN1 subunit in complete Freund's adjuvant-induced inflammatory pain in rats[J]. J Pain, 2019, 20(1): 16.e1-16.e16.
- [17] Zaratin P, Angelici O, Clarke GD, *et al.* NK3 receptor blockade prevents hyperalgesia and the associated spinal cord substance P release in monoarthritic rats[J]. Neuropharmacology, 2000, 39(1):141-149.
- [18] Wang JY, Gao YH, Qiao LN, *et al.* Repeated electroacupuncture treatment attenuated hyperalgesia through suppression of spinal glial activation in chronic neuropathic pain rats[J]. BMC Complement Altern Med, 2018, 18(1):74.
- [19] Gao YJ, Xu ZZ, Liu YC, *et al.* The c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in spinal astrocytes is required for the maintenance of bilateral mechanical allodynia under a persistent inflammatory pain condition[J]. Pain, 2010, 148(2):309-319.
- [20] Nagakura Y, Okada M, Kohara A, *et al.* Allodynia and hyperalgesia in adjuvant-induced arthritic rats: time course of progression and efficacy of analgesics[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 306(2):490-497.
- [21] Nuñez-Badinez P, Sepúlveda H, Diaz E, *et al.* Variable transcriptional responsiveness of the P2X3 receptor



- gene during CFA-induced inflammatory hyperalgesia[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(5):3922-3935.
- [22] Raghavendra V, Tanga FY, Deleo JA. Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS[J]. *Eur J Neurosci*, 2004, 20(2):467-473.
- [23] Shimizu K, Guo W, Wang H, *et al*. Differential involvement of trigeminal transition zone and laminated subnucleus caudalis in orofacial deep and cutaneous hyperalgesia: the effects of interleukin-10 and glial inhibitors[J]. *Mol Pain*, 2009, 5:75.
- [24] Xiang H, Liu Z, Wang F, *et al*. Primary sensory neuron-specific interference of TRPV1 signaling by AAV-encoded TRPV1 peptide aptamer attenuates neuropathic pain[J]. *Mol Pain*, 2017, 13:1744806917717040.
- [25] Jiang Q, Li WX, Sun JR, *et al*. Inhibitory effect of estrogen receptor beta on P2X3 receptors during inflammation in rats[J]. *Purinerg Signal*, 2017, 13(1):105-117.
- [26] Warwick CA, Shutov LP, Shepherd AJ, *et al*. Mechanisms underlying mechanical sensitization induced by complement C5a: the roles of macrophages, TRPV1, and calcitonin gene-related peptide receptors[J]. *Pain*, 2019, 160(3): 702-711.
- [27] Wang Y, Wang RR, Sun W, *et al*. Analgesic effect of dl-THP on inflammatory pain mediated by suppressing spinal TRPV1 and P2X3 receptors in rats[J]. *Front Biosci-Landmrk*, 2021, 26(5):1-10.
- [28] Tariba Kneževićp, Vukman R, Antonić R, *et al*. The role of P2X3 receptors in bilateral masseter muscle allodynia in rats[J]. *Croat Med J*, 2016, 57(6):530-539.
- [29] Ohara PT, Vit JP, Bhargava A, *et al*. Evidence for a role of connexin 43 in trigeminal pain using RNA interference in vivo[J]. *J Neurophysiol*, 2008, 100(6):3064-3073.
- [30] Huang XZ, Tu WF, Peng J, *et al*. Effect of preemptive local injection of ropivocaine with dexmedetomidine on mirror pain in rats and its mechanism[J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2015, 8(10):836-840.
- [31] Inglis JJ, Nissim A, Lees MD, *et al*. The differential contribution of tumour necrosis factor to thermal and mechanical hyperalgesia during chronic inflammation[J]. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7(4):R807-816.
- [32] Krajewski JL. P2X3-containing receptors as targets for the treatment of chronic pain[J]. *Neurotherapeutics*, 2020, 17(3):826-838.
- [33] Jin Y, Wei S, Liu TT, *et al*. Acute p38-mediated enhancement of P2X3 receptor currents by TNF- α in rat dorsal root ganglion neurons[J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14:2841-2850.
- [34] 周开升, 赵光海, 南伟, 等. TRPV1 通道在病理性疼痛中的研究进展 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2021, 27(11):841-850.
- [35] Hu M, Doyle AD, Yamada KM, *et al*. Visualization of trigeminal ganglion sensory neuronal signaling regulated by CDK5[J]. *Cell Rep*, 2022, 38(10):110458.
- [36] Xiao X, Zhao XT, Xu LC, *et al*. SHP-1 dephosphorylates TRPV1 in dorsal root ganglion neurons and alleviates CFA-induced inflammatory pain in rats[J]. *Pain*, 2015, 156(4):597-608.
- [37] Cavanaugh DJ, Chesler AT, Jackson AC, *et al*. TRPV1 reporter mice reveal highly restricted brain distribution and functional expression in arteriolar smooth muscle cells[J]. *J Neurosci*, 2011, 31(13):5067-5077.
- [38] Lu KW, Hsu CK, Hsieh CL, *et al*. Probing the effects and mechanisms of electroacupuncture at ipsilateral or contralateral ST36-ST37 acupoints on CFA-induced inflammatory pain[J]. *Sci Rep-UK*, 2016, 6:22123.