

doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2024.10.004

• 论 著 •

右美托咪定通过脊髓 MrgC 受体参与调控小鼠
骨癌痛吗啡耐受 *易 珍¹ 倪云成² 胡 霞¹ 唐轶珣¹ 刘际童¹ 张 宇¹ 黄晓玲^{1△}(¹ 湖南省人民医院 湖南师范大学附属第一医院麻醉科, 长沙 410005, ² 中南大学湘雅三医院麻醉科, 长沙 410005)

摘 要 **目的:** 通过骨癌痛 (bone cancer pain, BCP) 小鼠模型明确右美托咪定是否参与吗啡耐受并探索其机制。**方法:** 使用 Lewis 肺癌细胞系制备 C57BL/6 小鼠股骨癌痛动物模型。对 BCP 小鼠进行鞘内置管, 连续 7 天注射吗啡诱导耐受产生。von Frey 纤维丝评估小鼠左后足 50% 机械刺激缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT)、热板法评估热缩足潜伏期阈值 (thermal withdrawal threshold, TWL)。给药第 7 天后取 L₃~L₅ 节段脊髓, 使用免疫组化实验和 Western Blotting (WB) 方法检测小鼠脊髓 Mas 相关基因 C 受体 (Mas-related gene C receptor, MrgC) 的表达。通过对吗啡耐受的 BCP 小鼠鞘内注射右美托咪定, 探索其可能的机制。**结果:** 自建模后第 7 天起, BCP 小鼠左后足 50% MWT 显著下降, TWL 明显缩短 ($P < 0.05$)。建模后第 14 天起鞘内给予吗啡, 给药的第 1~4 天, BCP 小鼠左后足 50% MWT 明显上升, TWL 明显增加 ($P < 0.05$), 给药的第 5 天开始 50% MWT 逐渐下降, TWL 明显缩短。但预先鞘内给予右美托咪定后, 给药的第 1~7 天 BCP 小鼠左后足 50% MWT 持续增高, TWL 持续延长 ($P < 0.05$), 且免疫组化和 WB 结果显示 MrgC 表达明显增加。**结论:** 右美托咪定可缓解 BCP 小鼠吗啡耐受的形成, 这一作用可能与右美托咪定促进 BCP 小鼠脊髓 MrgC 表达和活化有关。

关键词 骨癌痛; 吗啡耐受; MrgC 受体; 小鼠; 右美托咪定

Dexmedetomidine is involved in the regulation of morphine tolerance in mice with bone cancer through spinal MrgC receptor *YI Zhen¹, NI Yun-cheng², HU Xia¹, TANG Yi-xun¹, LIU Ji-tong¹, ZHANG Yu¹, HUANG Xiao-ling^{1△}(¹ Department of Anesthesiology, Hunan Provincial People's Hospital, The First Affiliated Hospital of Hunan Normal University, Changsha 410005, China; ² Department of Anesthesiology, Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410005, China)

Abstract **Objective:** To investigate whether dexmedetomidine is involved in morphine tolerance and to explore the mechanism in a mouse model of bone cancer pain (BCP). **Methods:** An animal model of femoral bone cancer pain in C57BL/6 mice was prepared using Lewis lung cancer cell line. Bone cancer pain mice were intrathecally catheterized and morphine was injected for 7 consecutive days to induce the development of tolerance. The 50% mechanical withdrawal threshold (MWT) and the thermal withdrawal threshold (TWL) of the left hind-foot were assessed by von Frey fiber and hot plate test. After the 7th day of administration of morphine, the L₃-L₅ spinal cord segments was taken in mice. The expression of Mas-related gene C receptor (MrgC) in the spinal cord was detected by immunohistochemistry and Western Blotting (WB). Possible mechanisms were explored by intrathecal injection of dexmedetomidine in morphine-tolerant mice with bone cancer pain. **Results:** From day 7 after modeling, BCP mice showed a significant decrease in 50% MWT and a significant shortening of TWL. With intrathecal administration of morphine from day 14 after BCP modeling, 50% MWT of the left hindfoot and TWL increased significantly from day 1 to day 4 after morphine administration, and 50% MWT gradually

* 基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金 (82101316); 湖南省卫生健康委员会项目 (20200708)

△ 通信作者 黄晓玲 411315860@qq.com



decreased and TWL shortened significantly from day 5 of morphine administration. However, after pretreatment of dexmedetomidine, BCP mice had a sustained increase in 50% MWT and a sustained prolongation of TWL from day 1 to day 7 of morphine administration, and immunohistochemistry and WB results showed a significant increase of MrgC expression. **Conclusion:** Dexmedetomidine attenuates the development of morphine tolerance in mice with bone cancer pain, which may be related to its promotion and activation of MrgC in the spinal cord of mice with bone cancer pain.

Keywords bone cancer pain; morphine tolerance; MrgC receptor; mice; dexmedetomidine

吗啡是临床上治疗骨癌痛 (bone cancer pain, BCP) 最主要且最常用的阿片类药物^[1], 长期使用会产生耐受, 但相关机制仍不清楚, 成为当前临床急需解决的问题^[2,3]。Mas 相关基因 C 受体 (Mas-related gene C receptors, MrgC) 是一种特异性分布于脊髓及背根神经节上的 G 蛋白偶联受体^[4,5], 它与人类 MrgX1 具有基本同源性^[6], 与痛觉产生和传导有关。因为 MrgC 受体主要分布于外周, 研究开发以其为靶点的镇痛药将会避免出现阿片类镇痛药的不良反应 (如药物依赖、恶心呕吐、腹泻、便秘等), 因此成为相关研究领域的热点。

右美托咪定 (dexmedetomidine, Dex) 是目前临床广泛应用的一种高选择性 α_2 肾上腺素受体激动剂, 具有镇静镇痛和抗炎抗焦虑作用^[7]。虽有文献报道右美托咪定可以缓解 BCP 大鼠吗啡耐受引起的痛觉过敏^[8,9], 但并未涉及相关机制研究。因此, 本研究通过 BCP 小鼠模型, 模拟临床吗啡用药, 诱导吗啡耐受, 观察右美托咪定对吗啡耐受的作用, 并探索其机制, 为临床治疗 BCP 吗啡耐受提供理论依据。

方 法

1. 实验材料

实验动物: 6~8 周龄成年雄性 C57BL/6 小鼠, 体重 18~22 g。购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司 (动物许可证号: SCXK (湘) 2019-0004), 饲养在温度 22~24℃、湿度 40%~60% 和光照 (12 h 光照/黑暗循环) 控制的环境中, 自由进食和饮水。饲养 1 周后用于实验。所有实验均符合动物实验伦理委员会的相关制度, 并通过湖南省人民医院动物伦理委员会审查 (动物伦理审批号: 伦理科 2022 第 51 号)。

主要仪器和试剂: 小鼠 Lewis 肺癌细胞 (长沙易登生物); von Frey 纤毛机械刺激针套件 (Aesthesio); BME-410C 型自动热痛刺激仪 (天津伯尔尼); 微量注射器 (25 μ l; 10 μ l; 上海高鸽, 平头); 0.32 mm×0.2 mm PE 管 (长沙迈越生物); BCA 蛋白

质测定试剂盒 (赛默飞世尔科技); 兔抗鼠抗 MrgC 多克隆抗体 (Biorbyt, ORB101320) 和 MRGPRX1 兔多克隆抗体 (Biorbyt, ORB540455)。

2. 实验方法

(1) BCP 模型制备: 造模方法与既往的实验相同^[10]。小鼠麻醉 (2% 戊巴比妥 40 mg/kg, 腹腔注射) 起效后, 仰卧, 左侧后肢剃毛, 络合碘消毒皮肤, 膝关节处沿股直肌肌腱方向作一长 0.5~1 cm 的皮肤切口, 暴露髁间窝伸面, 1 ml 注射器针头从近髁间窝位置进针, 沿股骨长轴方向钻孔进入股骨髓腔后, 换用微量注射器接种小鼠 Lewis 肺癌细胞, 留针片刻后退出针头, 骨蜡封针孔, 蒸馏水清洗伤口, 丝线缝合皮肤、皮下组织。金霉素软膏覆盖伤口, 待小鼠麻醉苏醒后放回鼠笼。

(2) 鞘内置管: 参照文献方法^[11], 小鼠麻醉后取俯卧位固定四肢, 两侧髂棘连线与脊柱交界点定位 L₆ 棘突, 沿脊柱于 L₅₋₆ 位置做一长约 1 cm 的纵向切口, 用 1 ml 注射器针头穿破椎体表面, 与脊柱成 20~30° 角度向头侧进针, 当小鼠出现一过性甩尾或后肢抽动表示已穿破硬脊膜, 退出针头, 将外径 0.32 mm PE 导管缓慢向蛛网膜下腔头端置入, 5-0 慕丝线分别于椎旁肌肉结扎固定导管, 缝合切口。

(3) 实验分组: 选用制备成功的骨癌痛模型小鼠 40 只, 于建模后第 14 天使用简单随机抽样方法分为 4 组, 每组 10 只, 进行鞘内置管, 连续 7 天给药诱导吗啡耐受产生^[12]。所有小鼠每日固定 2 次给药时间 (9:00 和 17:00)。右美托咪定 2.5 μ g/kg + 吗啡 10 μ g/kg 组: 先鞘内注射右美托咪定 2.5 μ g/kg (5 μ l), 30 min 后给予等容积吗啡 10 μ g/kg; 生理盐水 + 吗啡 10 μ g/kg 组: 先鞘内注射生理盐水 5 μ l, 30 min 后给予等容积吗啡 10 μ g/kg; 右美托咪定 2.5 μ g/kg + 生理盐水组: 先鞘内注射右美托咪定 2.5 μ g/kg (5 μ l), 30 min 后给予等容积生理盐水; Vehicle 组: 鞘内先后均注射生理盐水 5 μ l。每日上午给药后 30 min 进行 50% 机械刺激缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT) 和热缩足潜伏期阈值 (thermal paw withdrawal threshold, TWL) 测

定。实验流程图见图 1。

(4) 行为学检测: 50% MWT 测定: 将实验小鼠置于树脂玻璃笼 (30 cm×25 cm×25 cm) 中, 适应环境 10 min, 持 von Frey 呈对数增强的力度 (0.02、0.04、0.07、0.16、0.4、0.6、1.0 和 2.0 g) 由下向上垂直刺激左后足底皮肤, 持续 3~5 s, 每次测定间隔 30 s。刺激后小鼠快速缩足即为阳性反应, 实验从 0.6 g 开始, 若为阳性反应, 下一个刺激低于本次力度; 若为阴性反应, 下一个刺激高于本次力度。从第 1 次阳性反应开始连续测量 5 次, 记录实验结果, 并转换为 50% MWT, 按照公式计算: $50\% \text{ MWT} = 10^{(x+k\delta)}/10000$ 。X 为最后一次刺激力度, k 为该刺激方式的系数, δ 代表各刺激力度对数值的平均相邻间距。

TWL 测定: 在安静环境下, 环境温度维持在 20~25℃, 先将智能热板仪加热至 55℃, 再将实验小鼠放置在热板上, 记录该小鼠从其左后足足底部接触热板到开始舔足或抬足或跳跃逃离的时间, 即为 TWL 阈值。测量基础值时剔除 5 s 内舔左后足或抬足或跳跃逃离的小鼠以及 30 s 后不舔左后足的小鼠。

(5) HE 染色: 在接种 Lewis 肺癌细胞后第 21 天取出小鼠左侧股骨, 用 4% 多聚甲醛固定组织, 4℃ 过夜; 接着连续脱钙 3 周, 每周更换 1 次脱钙液, 以细针能够刺入为终止脱钙的标准。脱钙的股骨用 PBS 润洗后经石蜡包埋和连续切片, 切片经二甲苯脱蜡, 乙醇脱水; 然后对组织切片进行 HE 染色, 用中性树脂封片后, 在光镜下观察股骨的组织形态。

(6) Western Blot 检测: 小鼠深麻醉 (2% 戊巴比妥 50 mg/kg, 腹腔注射) 后, 收集 L₃~L₅ 节段脊髓保存在液氮中。取出后加入 RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂 (PMSF) 的混合液 (RIPA:PMSF = 100:1) 进行匀浆, 4℃ 下以 13,000 rpm 离心 10 min, 并除去上清液。BCA 蛋白质测定试剂盒 (Thermo Fisher Scientific) 按照生产商的说明测定蛋白质浓度。组织以湿转法转至 PVDF 膜上, 加入一抗兔抗鼠抗 MrgC 多克隆抗体 (1:1000 稀释; ORB101320; Biorbyt),

室温孵育 10 min, 放 4℃ 过夜。经过 TBST 洗膜后, 加入二抗 MRGPRX1 兔多克隆抗体 (1:1000 稀释; ORB540455; Biorbyt), 通过 ECL 检测系统获得蛋白条带, 使用图像分析系统进行数据分析。

(7) 免疫组织化学检测: 小鼠深麻醉后, 经心脏灌注生理盐水冲去血液, 再用 4% 多聚甲醛溶液灌注腰段脊髓 L₃~L₅ 节段。用 10% 正常山羊血清 (PBS 稀释) 封闭, 室温孵育 10 min。倾去血清, 勿洗, 滴加一抗 MrgC 多克隆抗体 (1:250 稀释; ORB101320; Biorbyt), 4℃ 温度下温育 48 h。经 PBS 冲洗后, 滴加二抗 MRGPRX1 兔多克隆抗体 (1:500 稀释; ORB540455; Biorbyt), 37℃ 孵育 30 min, PBS 冲洗, 密封后, 切片进行图像分析。为方便研究脊髓背角的免疫阳性神经元的分布, 每只实验小鼠的脊髓切片随机选取 3~4 张图片, 用 Image-J 软件分析光密度值, 计算阳性面积即免疫产物大小, 以此代表免疫阳性神经元数量。

3. 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件进行数据统计学分析。计量数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示, Western Blot 和免疫组化结果采用单因素方差分析, 疼痛行为学指标比较采用重复测量设计的方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 小鼠 BCP 模型制备与验证

BCP 小鼠接种 Lewis 肺癌细胞后第 7 天开始, 各组小鼠与接种前相比, 左后足 50% MWT 显著下降, TWL 明显缩短 ($P < 0.05$), 但组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 见图 2)。接种 21 天后, BCP 小鼠左股骨髓腔内可见骨质破坏区, 骨皮质变薄, 肿瘤细胞突破骨皮质, 侵犯周围软组织, 软组织密度增高 (见图 3)。同时取左后足作 HE 染色, 结果显示骨髓腔内大量肿瘤细胞浸润, 坏死组织堆积 (见图 4), 表明 BCP 小鼠模型制备成功。

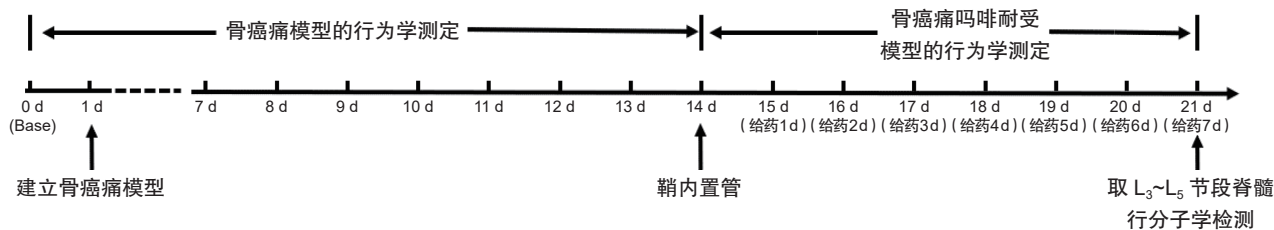


图 1 实验干预流程图

Fig. 1 Flow chart of experimental intervention

2. 诱导 BCP 小鼠模型吗啡耐受

选用制备成功的 BCP 小鼠，从建模后第 14 天开始，连续鞘内吗啡给药。与 Vehicle 组相比，生理盐水 + 吗啡 10 $\mu\text{g/kg}$ 组给药的第 1~4 天 50% MWT 明显上升，TWL 明显增加 ($P < 0.05$)，但从第 5 天开始 50% MWT 逐渐下降，TWL 明显缩短，第 6 天与 Vehicle 组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，表明吗啡耐受形成；右美托咪定 2.5 $\mu\text{g/kg}$ + 吗啡 10 $\mu\text{g/kg}$ 组给药第 1~7 天 50% MWT 持续升高和 TWL 持续延长，产生了明显的镇痛作用 ($P < 0.05$)；

右美托咪定 2.5 $\mu\text{g/kg}$ + 生理盐水组给药第 1~7 天 50% MWT 和 TWL 较 Vehicle 组差异均无统计学意义 ($P > 0.05$ ，见图 5)。

3. 鞘内注射右美托咪定增加脊髓 MrgC 受体表达水平

采用 Western Blot 印迹法确定 L₃~L₅ 脊髓中 MrgC 受体的蛋白表达水平。结果显示：右美托咪定 2.5 $\mu\text{g/kg}$ + 吗啡 10 $\mu\text{g/kg}$ 组脊髓 MrgC 蛋白表达较另外三组明显增加 ($P < 0.05$)；但生理盐水 + 吗啡 10 $\mu\text{g/kg}$ 组、右美托咪定 2.5 $\mu\text{g/kg}$ + 生理盐水组与

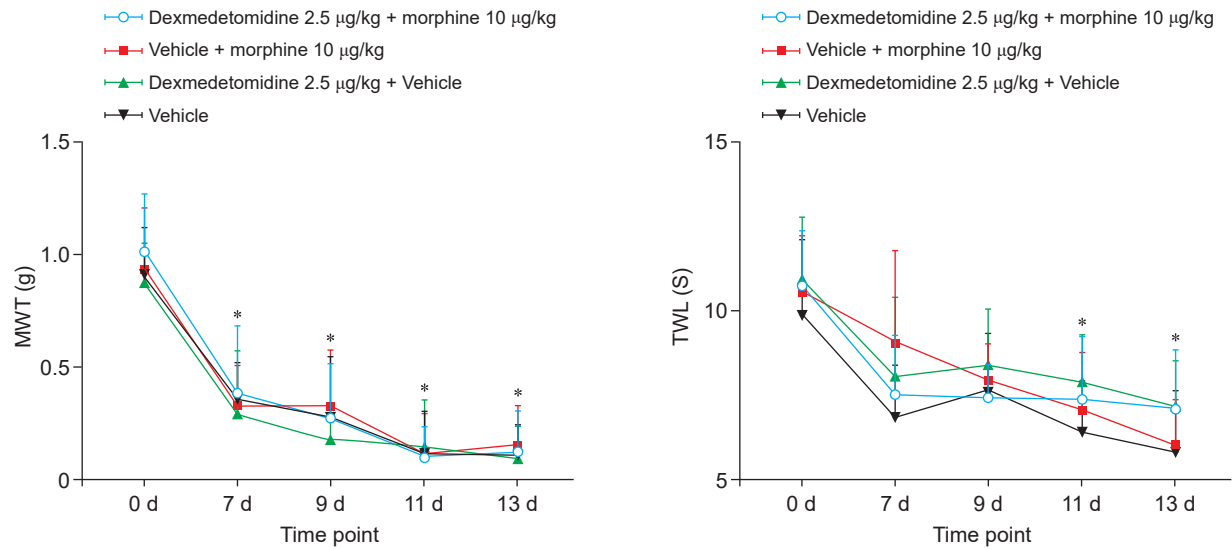


图 2 接种 Lewis 肺癌细胞 7 天后检测 50% MWT 和 TWL ($n = 10$, $\bar{x} \pm SD$)
* $P < 0.05$ ，各组不同时间点与基础值相比

Fig. 2 The 50% MWT and TWL were measured 7 days after inoculation of Lewis lung cancer cells ($n = 10$, $\bar{x} \pm SD$)
* $P < 0.05$, compared with the base value at different time in each group.

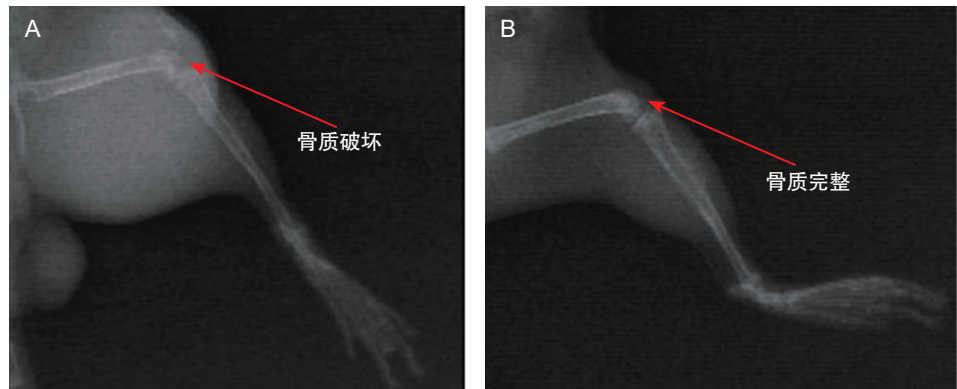


图 3 接种 Lewis 肺癌细胞 21 天的 BCP 小鼠左侧股骨影像学结果
(A) BCP 小鼠左侧股骨下段骨髓腔内可见穿凿状小斑点骨质破坏区，骨皮质变薄，伴小块缺损区，周围组织肿胀；
(B) Vehicle 组骨皮质完整

Fig. 3 X-ray results of the left femur in mice 21 days after inoculation of cancer cells
(A) The model group can see the penetration in the bone marrow cavity of the left lower femur Chiseled small spots in the bone destruction area, thinning of the bone cortex, with small defect area, surrounding tissue swelling; (B) Vehicle group bone cortex intact.

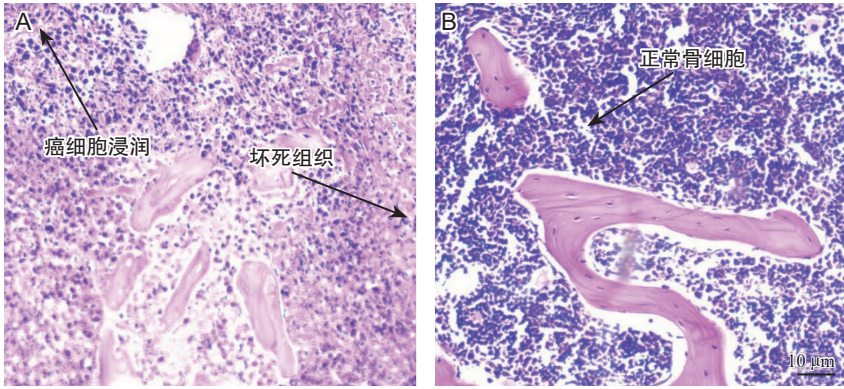


图 4 细胞接种 21 天小鼠左侧股骨 HE 染色结果 (HE ×400)
(A) BCP 小鼠骨髓腔可见大量肿瘤细胞浸润, 坏死组织堆积; (B) Vehicle 组未见肿瘤细胞浸润; 标尺 = 10 μm
Fig. 4 After 21 days of cell inoculation, the left femur of mice was stained with HE (HE ×400)
(A) In the bone cancer pain model group, a large number of tumor cells were infiltrated and necrotic tissue was accumulated; (B) No tumor cell infiltration was observed in the Vehicle group. Bar scale = 10 μm

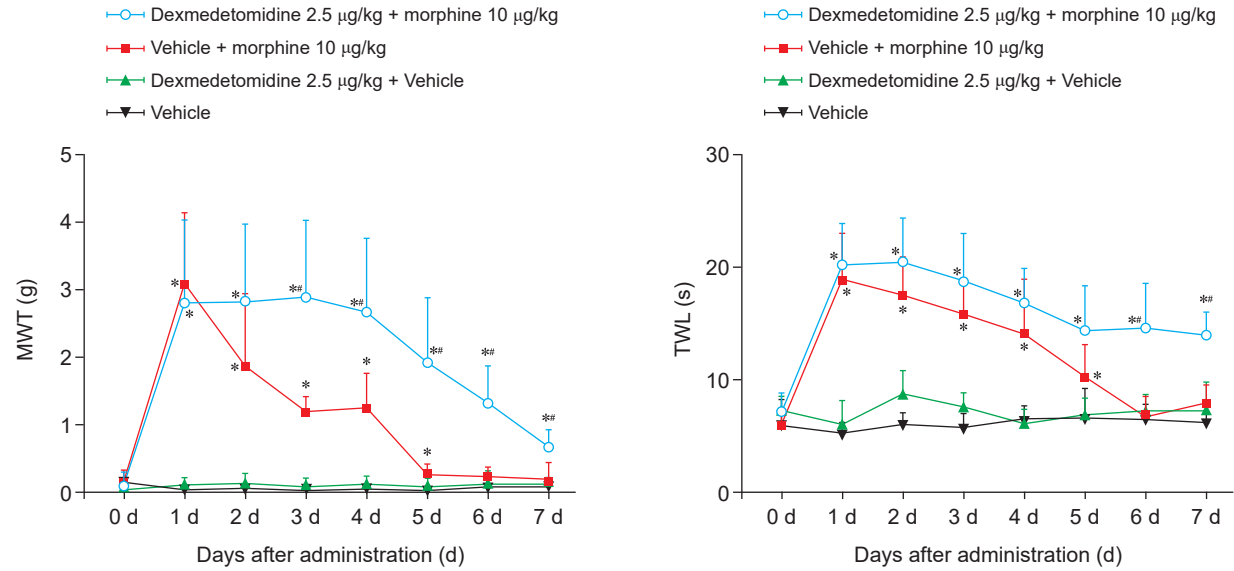


图 5 BCP 小鼠连续吗啡给药后左侧后足 50% MWT 和 TWL ($n = 10$, $\bar{x} \pm SD$)
* $P < 0.05$, 与 Vehicle 组相比; # $P < 0.05$, 与生理盐水 + 吗啡 10 μg/kg 组相比
Fig. 5 The 50% MWT and TWL of left hind paw in bone cancer pain mice after continuous morphine administration ($n = 10$, $\bar{x} \pm SD$)
* $P < 0.05$, compared with Vehicle group; # $P < 0.05$, compared with Vehicle + morphine 10 μg/kg group.

Vehicle 组相比, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$, 见图 6)。免疫组织化学检测结果显示右美托咪定 2.5 μg/kg + 吗啡 10 μg/kg 组与另外三组相比, 阳性面积明显增加 ($P < 0.05$), 生理盐水 + 吗啡 10 μg/kg 组、右美托咪定 2.5 μg/kg + 生理盐水组与 Vehicle 组相比, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$, 见图 7)。

讨 论

吗啡耐受由于发病机制尚不明确, 仍是临床上

无法解决的一个难题, 严重影响病人的生活质量^[13]。目前关于吗啡耐受发生机制的研究大都基于正常大鼠, 缺少临床相似的疼痛损伤, 与临床状况并不相符^[14]。而小鼠的肿瘤, 无论在组织发生、临床过程以及组织形态学上都与人类肿瘤有着相似之处^[10]。因此, 建立一种 BCP 小鼠吗啡耐受模型尤为重要。本研究利用 Lewis 肺癌细胞接种于 C57BL/6 小鼠股骨骨髓腔, 并从行为学、影像学和组织学三方面验证 BCP 模型的成功, 将其用于吗啡耐受机制的研究, 符合临床实际情况。

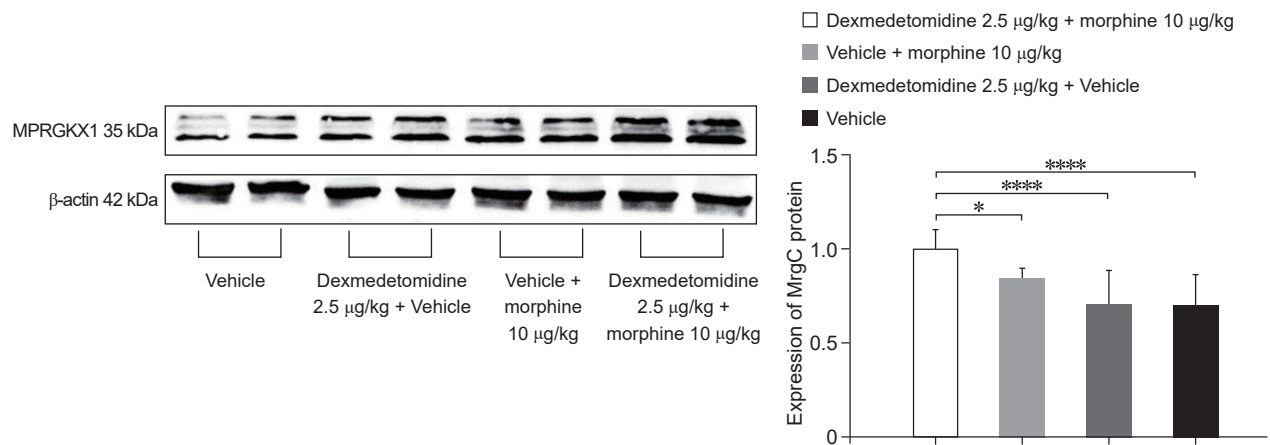


图 6 免疫印迹法检测各组小鼠脊髓 MrgC 受体蛋白表达的代表图 ($n = 10$, $\bar{x} \pm SD$)
* $P < 0.05$, 与生理盐水 + 吗啡 10 μ g/kg 组相比; **** $P < 0.0001$, 与右美托咪定 2.5 μ g/kg + 生理盐水组及 Vehicle 组相比
Fig. 6 The expression of MrgC receptor protein in spinal cord of mice in each group was detected by western blotting ($n = 10$, $\bar{x} \pm SD$)
* $P < 0.05$, compared with Vehicle + morphine 10 μ g/kg group; **** $P < 0.0001$, compared with Dexmedetomidine 2.5 μ g/kg + Vehicle group.

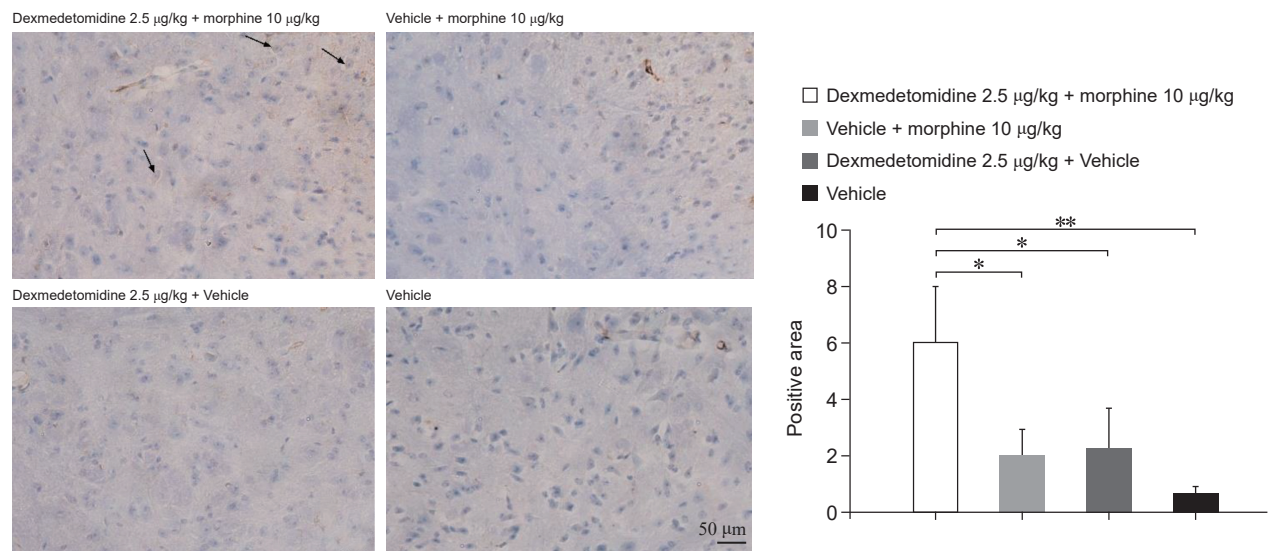
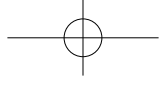


图 7 免疫组织化学检测各组小鼠脊髓 MrgC 受体蛋白表达的代表图 (箭头所指为阳性产物) ($n = 10$, $\bar{x} \pm SD$)
* $P < 0.05$, 与生理盐水 + 吗啡 10 μ g/kg 组及右美托咪定 2.5 μ g/kg + 生理盐水组相比; ** $P < 0.05$, 与 Vehicle 组相比; 标尺 = 50 μ m
Fig. 7 Immunohistochemical positive area of mice in each group was compared, the arrows in the figure indicate positive products ($n = 10$, $\bar{x} \pm SD$)
* $P < 0.05$, compared with Vehicle + morphine 10 μ g/kg group and dexmedetomidine 2.5 μ g/kg + Vehicle group; ** $P < 0.05$, compared with Vehicle group. Bar scale = 50 μ m

MrgC 受体属于 G 蛋白耦联受体家族的一员, 特异性地表达在脊髓、三叉神经节等小直径神经元上, 对疼痛感知和调节发挥着重要作用。本研究利用 BCP 小鼠模型, 从建模第 14 天 (模型稳定期) 开始模拟临床给药方案, 连续 7 天鞘内给予吗啡, 发现在给药的第 1~4 天 50% MWT 升高, TWL 阈值延长, 说明此时吗啡发挥了良好的镇痛作用, 但

从第 5 天开始 50% MWT 下降, TWL 阈值缩短, 第 6 天和第 7 天与 Vehicle 组比较已无明显差异, 吗啡的镇痛效果消失, 出现了耐受, 提示 7 天慢性吗啡给药成功诱发了吗啡耐受, 与文献报道结果一致^[15]。吗啡主要是通过激活 μ 阿片受体发挥镇痛作用, 但长期使用会减少 μ 受体与 Gi/o 蛋白耦联, 促进 μ 受体与 GS 蛋白耦联, 激活兴奋性信号通路, 释放炎



性介质, 对抗吗啡的镇痛效力, 从而产生耐受^[16]。本研究结果显示, 右美托咪定 2.5 $\mu\text{g/kg}$ + 吗啡 10 $\mu\text{g/kg}$ 组给药第 1~7 天 50% MWT 持续升高和 TWL 持续延长, 提示复合右美托咪定给药后, 可以抑制吗啡镇痛耐受的产生。此外其免疫组化和 WB 检测结果显示脊髓 MrgC 表达是四组中最高的, 且其余三组之间相比无明显差异, 进一步提示复合右美托咪定延缓和抑制吗啡镇痛耐受产生的原因可能与脊髓 MrgC 受体表达水平增加有关, 增加的 MrgC 受体蛋白可能降低 μ 阿片受体的耐药性。结合已有文献的报道: MrgC 受体和 μ 阿片受体在 DRG 神经元中大量共表达, 形成异源复合物 (MrgC-MOR), 并通过其 C 端结构域 (C-terminal domain, CTD) 与 μ 受体相互作用, 避免神经元持续性兴奋, 推测右美托咪定激活 MrgC 受体蛋白表达增加后, 进一步促进 MrgC 受体蛋白与 μ 阿片受体进入循环通路^[17], MrgC 受体蛋白可以恢复循环通路中 μ 受体耦联 Gi 蛋白的能力^[18], μ 受体与 Gi 蛋白耦联之后, 激活下游的 PKC 和 PKA 途径, 导致 μ 阿片受体耐药性降低^[19,20]。

右美托咪定是一种高选择性 α_2 -AR 激动剂, 具有起效快、作用时间短、无呼吸抑制与术中血流动力学稳定的优势而在临床广泛应用^[21]。临床使用中发现右美托咪定与阿片类药物联合使用可产生协同镇痛作用, 从而减少阿片类药物的使用剂量^[22]; 利用神经病理性疼痛大鼠模型, 观察到右美托咪定可以缓解吗啡耐受引起的痛觉过敏, 增强吗啡的镇痛效能, 这些与本研究结果基本一致。但本研究中发现仅用右美托咪定干预 BCP 小鼠时, 其左后足 50% MWT 与 TWL 以及脊髓 MrgC 受体蛋白表达均较 Vehicle 组无明显差异, 提示单用右美托咪定对 BCP 小鼠没有作用, 与已有的研究报道结果相悖^[23]。然而事实并非如此, 因为文献报道右美托咪定缓解神经病理性疼痛是与剂量相关的^[24], 而本研究本着安全有效的原则, 使用了文献报道的较小剂量 (2.5 $\mu\text{g/kg}$)^[12], 且为鞘内置管给药, 可能存在管道长度或冲管不标准等原因, 导致实际给予剂量小于设定剂量, 从而出现上述结果。在接下来的进一步研究中我们将规避这些误差。

综上所述, 吗啡诱导的镇痛作用可能与 BCP 小鼠脊髓 MrgC 受体蛋白的激活有关, α_2 -AR 激动剂右美托咪定可增加脊髓 MrgC 受体蛋白的表达水平, 增强吗啡镇痛作用且延缓甚至抑制 BCP 小鼠的吗啡耐受。这为临床解决 BCP 吗啡耐受提供了新思路 and 理论依据。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] 王昆. 骨转移癌痛的机制和治疗 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2011, 17(12):706-710.
- [2] Shu H, Wang Z, Ye F, *et al.* High-dose pentazocine antagonizes the antinociception induced by high-dose morphine[J]. Life Sci, 2015, 130:1-6.
- [3] Chiba S, Hayashida M, Yoshikawa M, *et al.* Inhibitory effect of low-dose pentazocine on the development of antinociceptive tolerance to morphine[J]. J Anesth, 2009, 23(1):99-107.
- [4] He SQ, Li Z, Chu YX, *et al.* MrgC agonism at central terminals of primary sensory neurons inhibits neuropathic pain[J]. Pain, 2014, 155(3):534-544.
- [5] Lembo PM, Grazzini E, Groblewski T, *et al.* Proenkephalin A gene products activate a new family of sensory neuron--specific GPCRs[J]. Nat Neurosci, 2002, 5(3):201-209.
- [6] Sun Y, Jiang M, Hou B, *et al.* Mas-related gene (Mrg) C activation attenuates bone cancer pain via modulating Gi and NR2B[J]. PLoS One, 2016, 11(5):e154851.
- [7] Lu Y, Lin B, Zhong J. The Therapeutic effect of dexmedetomidine on rat diabetic neuropathy pain and the mechanism[J]. Biol Pharm Bull, 2017, 40(9):1432-1438.
- [8] Farghaly HS, Abd-Ellatief RB, Mofteh MZ, *et al.* The effects of dexmedetomidine alone and in combination with tramadol or amitriptyline in a neuropathic pain model[J]. Pain Physician, 2014, 17(2):187-195.
- [9] Abdel-Ghaffar HS, Mohamed SA, Fares KM. Combined intrathecal morphine and dexmedetomidine for postoperative analgesia in patients undergoing major abdominal cancer surgery[J]. Pain Med, 2016, 17(11):2109-2118.
- [10] 黄东, 黄晓玲, 阎雪彬, 等. C57BL/6 小鼠骨癌痛模型的制备与评价 [J]. 中南大学学报 (医学版), 2008(2):115-120.
- [11] Wu WP, Xu XJ, Hao JX. Chronic lumbar catheterization of the spinal subarachnoid space in mice[J]. J Neurosci Methods, 2004, 133(1-2):65-69.
- [12] 张莹, 吴浩, 雷艺珊, 等. 鞘内注射吗啡联合右美托咪定对小鼠骨癌疼痛的影响 [J]. 江苏医药, 2019, 45(2):122-126.
- [13] 武思尹, 马柯. 癌痛治疗中阿片镇痛耐受的研究进展 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2022, 28(5):375-378.
- [14] Wang D, Xue Y, Chen Y, *et al.* Mas-related gene (Mrg) C receptors inhibit mechanical allodynia and spinal microglia activation in the early phase of neuropathic pain in rats[J]. Neurosci Lett, 2016, 618:115-121.
- [15] Liu Q, Su LY, Sun C, *et al.* Melatonin alleviates morphine analgesic tolerance in mice by decreasing NLRP3 inflammasome activation[J]. Redox Biol, 2020, 34:101560.

- [16] Jiao Y, Gao P, Dong L, *et al.* Molecular identification of bulbospinal on neurons by GPER, which drives pain and morphine tolerance[J]. *J Clin Invest*, 2023, 133(1):e154588.
- [17] Wang D, Chen T, Zhou X, *et al.* Activation of Mas oncogene-related gene (Mrg) C receptors enhances morphine-induced analgesia through modulation of coupling of mu-opioid receptor to Gi-protein in rat spinal dorsal horn[J]. *Neuroscience*, 2013, 253:455-464.
- [18] He SQ, Xu Q, Tiwari V, *et al.* Oligomerization of MrgC11 and mu-opioid receptors in sensory neurons enhances morphine analgesia[J]. *Sci Signal*, 2018, 11(535):eaao3134.
- [19] 李幼萍, 江剑平. 鞘内激活 MrgC 受体在病理性疼痛和吗啡耐受中的作用 [J]. *生理学报*, 2019, 71(5):741-748.
- [20] Corder G, Tawfik VL, Wang D, *et al.* Loss of mu opioid receptor signaling in nociceptors, but not microglia, abrogates morphine tolerance without disrupting analgesia[J]. *Nat Med*, 2017, 23(2):164-173.
- [21] Zhang P, Bu J, Wu X, *et al.* Upregulation of mu-opioid receptor in the rat spinal cord contributes to the alpha2-adrenoceptor agonist dexmedetomidine-induced attenuation of chronic morphine tolerance in cancer pain[J]. *J Pain Res*, 2020, 13:2617-2627.
- [22] 崔金花, 周晶, 张乙, 等. 鞘内注射大麻素受体激动剂与右美托咪定在大鼠骨癌镇痛中的相互作用 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2020, 19(12):1266-1270.
- [23] Yuan X, Wu J, Wang Q, *et al.* The antinociceptive effect of systemic administration of a combination of low-dose tramadol and dexmedetomidine in a rat model of bone cancer pain[J]. *Eur J Anaesthesiol*, 2014, 31(1):30-34.
- [24] Wang X, Liu Q. Dexmedetomidine relieved neuropathic pain and inflammation response induced by CCI through HMGB1/TLR4/NF- κ B signal pathway[J]. *Biol Pharm Bull*, 2021. doi:10.1248/bpb.b21-00329.

• 国际译文 •

自发性疼痛的神经机制——前边缘皮层存在特异性编码自发性疼痛的神经元群体

自发性疼痛是慢性疼痛病人的重要主诉,但其机制不甚清楚,缺乏有效治疗手段,严重影响病人的生活质量。既往研究发现,持续性的自发疼痛和内侧前额叶的活动相关。该研究目的在于探讨内侧前额叶神经元群体如何编码和调控自发性疼痛行为。主要结果:(1)慢性炎症痛模型大鼠出现自发性疼痛行为,表现为舔舐足底和抬足等。在体多通道电生理记录及分析显示,前边缘皮层 (prelimbic cortex, PL, 前额叶皮层亚区) 在自发性疼痛中发挥核心作用。(2)多种模态的刺激范式表明, PL 中存在编码自发性疼痛的神经元群。(3)采用 RAM (robust activity marking) 启动子标记策略,可以特异性标记炎症痛发生后初期活跃的神经元。该群神经元主要为锥体神经元。利用光遗传学或化学遗传学兴奋该群神经元,可以诱发自发性疼痛行为,系统性的镇痛药布洛芬能逆转这种调控作用。抑制该群神经元,可以减少自发性疼痛行为,并且改善炎症引起的诱发性疼痛痛敏的恢复。以上结果提示, PL 中存在特异性编码自发性疼痛的神经元群。(4)多脑区电生理结果提示,初级躯体感觉皮质 (primary somatosensory cortex, S1) 和边缘下皮质 (infralimbic cortex, IL) 对 PL 传入的信息增多。激活 S1-PL 的神经环路可以引起自发性疼痛相关神经元放电率的升高,产生自发性疼痛行为。然而,激活 IL-PL 的神经环路可以引起自发性疼痛相关神经元放电率的降低,抑制自发性疼痛行为。这提示了 PL 编码自发性疼痛的神经元可以被 S1 和 IL 脑区双向调节,进而影响自发性疼痛行为。结论: PL 中存在特异性编码自发性疼痛的神经元群体,该群神经元受到 S1 和 IL 脑区双向调节。

(Ma LY, Yue LP, Liu ST, *et al.* A distinct neuronal ensemble of prelimbic cortex mediates spontaneous pain in rats with peripheral inflammation. *Nature Commun*, 2024, 15(1):7922. 北京大学神经科学研究所, 刘风雨 译)