

# 吗啡对背根神经节 FcγR I 受体介导神经病理痛的作用及机制\*

宋阜彪<sup>1</sup>, 梁映霞<sup>1</sup>, 类维富<sup>2\*\*</sup>

(1. 潍坊医学院 麻醉系, 山东 潍坊 261053; 2. 山东大学齐鲁医院, 山东 济南 250012)

**[摘要]** 目的: 探讨吗啡对背根神经节 FcγR I 受体介导神经病理痛的作用及机制。方法: 60 只成年 SD 大鼠随机均分为模型组(肠线结扎法制作神经病理痛模型)和吗啡组(建神经病理痛模型后给予吗啡注射液干预1周), 比较干预前及干预后第3、7及14天时两组大鼠机械性缩足阈值(MWT)、右后爪热痛潜伏期(TWL), 比较干预前及干预后第14天时两组大鼠脊髓组织 FcγR I mRNA 及蛋白表达、背根神经节中生长相关蛋白43(GAP-43)及神经生长因子(NGF)表达。结果: 干预前, 两组大鼠 MWT 及 TWL 数值、脊髓 FcγR I mRNA 及蛋白表达水平、GAP-43 及 NGF 灰度值比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 干预后第3、7及14天时吗啡组 MWT 较模型组同时点显著升高, TWL 较同时点模型组显著降低( $P < 0.05$ ), 干预后第14天时吗啡组 FcγR I mRNA 及蛋白水平较模型组显著降低( $P < 0.05$ )、吗啡组 GAP-43、NGF 灰度值显著低于模型组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论: SD 大鼠神经病理痛与背根神经节 FcγR I 受体表达水平上调有关, 吗啡可作为神经病理痛的有效镇痛药物, 其机制可能为抑制背根神经节 FcγR I 受体、下调背神经根神经节内 GAP-43 及 NGF 表达有关。

**[关键词]** FcγR I 受体; 背根神经节; 神经病理痛; 吗啡; 基因表达; 生长相关蛋白43; 神经生长因子

**[中图分类号]** R587.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)03-0306-05

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.03.013

## Effects of Morphine on Neuropathic Pain Mediated by FcγR I Receptor in Dorsal Root Ganglion and Its Mechanism

SONG Fubiao<sup>1</sup>, LIANG Yingxia<sup>1</sup>, LEI Weifu<sup>2</sup>

(1. Department of Anesthesia, Weifang Medical College, Weifang 261053, Shandong, China;

2. Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of morphine on neuropathic pain induced by Fc-γ receptor type I (FcγR I) receptor in dorsal root ganglion and analyze its mechanism. **Methods:** 60 adult Sprague-Dawley rats were divided into the model group (neuropathic pain models were made by ligation of intestinal thread) and the treatment group (1 week of intervention with morphine injection was carried out after establishment of neuropathic pain models). The changes of mechanical contraction threshold (MWT) and the right hind paw thermal pain latency (TWL) before the intervention and on the 3rd, 7th and 14th day after intervention were compared between the two groups. Changes of the mRNA expression level of FcγR I receptor and FcγR I receptor protein, the expression of growth-associated protein 43 (GAP-43) and nerve growth factor (NGF) in dorsal root ganglion were compared between the two groups before the intervention and on the 14th day after intervention. **Results:** There was no significant difference in MWT, TWL, the mRNA expression level of FcγR I receptor and FcγR I receptor protein, and the gray values of GAP-43 and NGF between the two groups before intervention ( $P > 0.05$ ). On the 3rd, 7th and 14th day after intervention, the MWT of the treatment group was signif-

\*[基金项目] 山东省自然科学基金资助项目(ZR2012HL27)

\*\*通信作者 E-mail:1958440431@qq.com

网络出版时间:2019-03-23 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190323.1455.013.html>

icantly higher than that of model group, while the TWL in the treatment group was significantly lower than that of model group ( $P < 0.05$ ). On the 14th day after intervention, the mRNA expression level of FcγR I receptor and FcγR I receptor protein in the treatment group were significantly lower than those of model group. ( $P < 0.05$ ). The gray values of GAP-43 and NGF in the treatment group were significantly lower than those of model group after intervention, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Neuropathic pain is closely related to the up-regulation of FcγR I receptor in dorsal root ganglion. Morphine can be used as an effective analgesic for neuropathic pain. The possible mechanism may be effective inhibition of the expression of FcγR I receptor in dorsal root ganglion and down-regulation of the expression of GAP-43 and NGF in dorsal root ganglia.

[ **Key words** ] FcγR I receptor; dorsal root ganglion; neuropathic pain; morphine; gene expression; growth associated protein; nerve growth factor

神经病理痛是临床常见的疼痛类型,主要为神经损伤或病变所致的疼痛,常包含自发性疼痛及诱发性疼痛,以周围神经痛最为常见<sup>[1]</sup>,约有 8% 的人一生中经历过神经病理性疼痛,目前对神经病理痛的发病机制尚未完全明确<sup>[1-2]</sup>。早期研究发现 FcγR I 受体主要在免疫细胞膜上表达,而近期有研究指出 FcγR I 受体也表达于神经系统<sup>[3-4]</sup>。疼痛刺激可引发阿片受体、脑源性神经营养因子、细胞因子等多种与疼痛有关的物质水平发生变化<sup>[4]</sup>,吗啡作为临床常见阿片受体激动剂在疼痛治疗中作用显著<sup>[5]</sup>。生长相关蛋白 43 (GAP-43) 是一种神经可塑性标志分子,可用于研究神经生长发育以及损伤再生可塑性;神经生长因子 (NGF) 有神经营养作用并参与痛觉敏感调制,有研究证实 GAP-43 和 NGF 表达在神经源性疼痛中发挥重要作用<sup>[6]</sup>,本文对神经病理痛大鼠采用吗啡进行干预,比较干预前后大鼠背根神经节 Fc 段 γ 受体 I 型 (FcγR I) 受体基因表达水平及 GAP-43、NGF 水平变化情况,探讨吗啡对 FcγR I 受体介导神经病理痛的作用,并分析其作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

成年 SD 大鼠 60 只 (由学校实验动物中心提供),雌性 36 只、雄性 24 只,体质量 200 ~ 250 g、平均 (232.18 ± 10.17) g。大鼠置于安静的环境中分笼饲养,光照 12 h/d,自由进食、饮水,待大鼠适应环境 1 周后进行实验,采用随机数字表法将其分为神经病理痛模型组 (模型组) 和吗啡组,每组 30 例。

### 1.2 方法

**1.2.1 疼痛模型制作** 采用肠线结扎法<sup>[7]</sup>,两组大鼠均经腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉 (300 mg/

kg),待麻醉剃毛后对其右下肢进行常规消毒,切开皮肤及皮下组织,钝性分离肌肉组织,在股骨后找到坐骨神经主干,采用 4-0 线作 4 道结扎,每道间距 1 mm (强度以引起小腿肌肉轻度颤动为宜),逐层缝合皮肤,术后大鼠肌注青霉素 4 ~ 5 万单位以预防感染。

**1.2.2 干预** 吗啡组给予吗啡干预,在大鼠鞘内注射 10% 的吗啡 10 μg (东北制药集团公司沈阳第一制药厂,批号 111007-1),加入生理盐水溶解至 10 μL 后进行注射,注药后采用 10 μL 生理盐水冲管,1 次/d,连续给药 7 d。模型组给予等量生理盐水进行处理。

**1.2.3 机械性缩足阈值 (MWT) 及右后爪热痛潜伏期 (TWL)** 分别于干预前 (神经病理痛模型建立成功时) 及干预后第 3、7、14 天时测定,采用 E-electronic Von Frey 刺激仪 (中国医学科学院生物医学工程研究所提供) 检测大鼠右后肢 MWT,大鼠放置于特制透明有机玻璃隔窗适应 30 min,然后采用刺激针刺刺激术侧后爪足心部,一旦大鼠出现迅速缩足或躲避现象,记录仪器上所显示的数据,以 5 min 间隔对同一部位连续刺激 3 次,取平均值即为 MWT。采用 37370 型热刺激仪 (中国医学科学院生物医学工程研究所提供) 检测大鼠右后爪 TWL,将大鼠放在底为 3 mm 的厚玻璃板有机玻璃箱适应 30 min,采用热辐射刺激仪 (2450 型,50 W、12 V),发出 5 mm 光斑对大鼠足底进行照射,记录从照射开始到大鼠出现抬腿回避时间即为 TWL,照射时间 < 25 s,每只大鼠测试 5 次,照射间隔时间为 5 min,取平均值。

**1.2.4 标本采集** 分别于干预前及干预后第 14 天时每组各取两只大鼠麻醉后处死,取出脊髓,分为 3 份, -70 ℃ 保存,2 份分别用于 FcγR I 受体 mRNA

NA 及蛋白检测,第 3 份用于 GAP-43、NGF 检测。

**1.2.5 *FcγR I* mRNA 表达** 采用实时荧光定量 PCR 检测, *FcγR I* 上游引物为 5' CTGCCA-CAGAGGATGGAAAT3'、下游引物为 5' CTGCCA-CAGAGGATGGAAATG3'、扩增片段长度为 84 bp,  $\beta$ -actin 上游引物为 5' GCACTCTT-CCAGCCTTC-CTT3'、下游引物为 5' ACAGGTCTT-TGCCGAT-GTCC3'、扩增片段长度为 103 bp,引物由杭州宝赛生物公司合成。PCR 的反应条件为 94 ℃ 1 min, 95 ℃ 10 s、58 ℃ 10 s、72℃ 10 s(40 个循环), *FcγR I* mRNA 表达量采用  $2^{-\Delta\Delta ct}$  法计算。

**1.2.6 *FcγR I* 蛋白表达** 采用 Western blot 检测,每个泳道上样 80  $\mu$ g 蛋白,12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离,将其转移到 PVDF 膜上,50 g/L 脱脂奶粉室温封存 2 h,山羊抗 CD64 一抗(1:200) 4 ℃ 孵育过夜,采用 TBST 缓冲液将其充分洗涤,将膜放置在辣根酶标记兔抗山羊 IgG 二抗(1:3 000) 溶液中,37 ℃ 摇床孵育 90 min,采用 TBST 缓冲液充分洗涤后,采用 ECL 试剂盒显像,以小鼠抗  $\beta$ -actin 为内参蛋白,采用平均灰度值代表蛋白表达水平。

**1.2.7 GAP-43 及 NGF 表达** 采用免疫组化染色法,取出脊髓组织,采用甲醛固定,常规梯度(乙醇

脱水)—固定透明(二甲苯)—石蜡包埋—纵向切片(厚 4  $\mu$ m),置于干净载玻片上;苏木精轻度复染、脱水、透明、封片,显微镜下细胞胞质呈棕黄色记为阳性;磷酸盐缓冲液替代一抗作为阴性对照行免疫组织化学染色,病理图像分析系统(HMIAS-1000)分析免疫组织化学染色结果,400 倍视野下观察,对神经元胞体及神经纤维绝对灰度值进行测量,二者相减绝对值记为 GAP-43、NGF 相对灰度值。

1.3 统计学处理

实验数据以统计学软件 SPSS 20.0 进行分析和处理,计数资料采取率(%)表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验;计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用独立样本 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MWT 及 TWL

干预前,两组大鼠 MWT 及 TWL 比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );干预后第 3、7 及 14 天时吗啡组 MWT 较模型组同时点显著升高、TWL 较同时点模型组显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1。

表 1 干预前后两组大鼠 MWT 及 TWL 比较( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.1 Comparison of MWT and TWL of the two groups before intervention

时间	MWT(s)		TWL(s)	
	模型组	吗啡组	模型组	吗啡组
干预前	14.25 $\pm$ 1.08	14.19 $\pm$ 1.21	6.68 $\pm$ 0.33	6.71 $\pm$ 0.71
干预后第 3 天	7.92 $\pm$ 1.01 <sup>(1)</sup>	12.25 $\pm$ 1.11 <sup>(1)(2)</sup>	6.61 $\pm$ 0.81	4.92 $\pm$ 0.35 <sup>(1)(2)</sup>
干预后第 7 天	5.12 $\pm$ 1.00 <sup>(1)</sup>	8.16 $\pm$ 1.01 <sup>(1)(2)</sup>	6.76 $\pm$ 0.17	4.15 $\pm$ 0.33 <sup>(1)(2)</sup>
干预后第 14 天	4.21 $\pm$ 0.84 <sup>(1)</sup>	6.10 $\pm$ 0.96 <sup>(1)(2)</sup>	6.98 $\pm$ 0.18	3.72 $\pm$ 0.23 <sup>(1)(2)</sup>

<sup>(1)</sup> 与同组干预前比较,  $P < 0.05$ ; <sup>(2)</sup> 与同时点模型组比较,  $P < 0.05$

2.2 *FcγR I* mRNA 及蛋白表达水平

干预前,两组大鼠脊髓 *FcγR I* mRNA 及蛋白表达水平比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );干预后第 14 天时,吗啡组 *FcγR I* mRNA 及蛋白水平较模型组显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 2、图 1。

2.3 GAP-43 和 NGF 表达

干预前,两组大鼠脊髓组织 GAP-43、NGF 灰度值比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );干预第 14 天时,吗啡组脊髓组织 GAP-43、NGF 灰度值显著低于模型组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 2 和表 3。

表 2 干预前后两组大鼠脊髓组织匀浆 *FcγR I* mRNA 表达水平( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.2 Expression of *FcγR I* mRNA in spinal cord homogenate of two groups before and after intervention

组别	<i>FcγR I</i> mRNA	
	干预前	干预后第 14 天
模型组	0.310 $\pm$ 0.008	0.308 $\pm$ 0.007
吗啡组	0.311 $\pm$ 0.007	0.062 $\pm$ 0.015
<i>t</i>	0.515	81.399
<i>P</i>	0.608	0.000

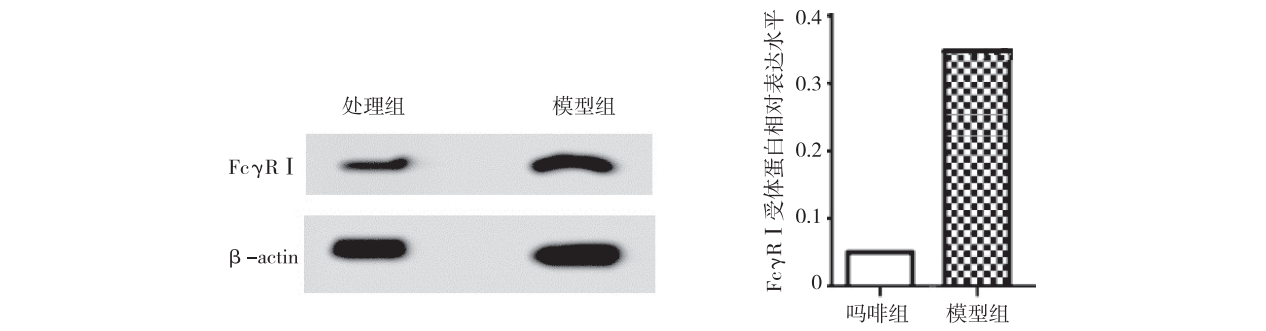
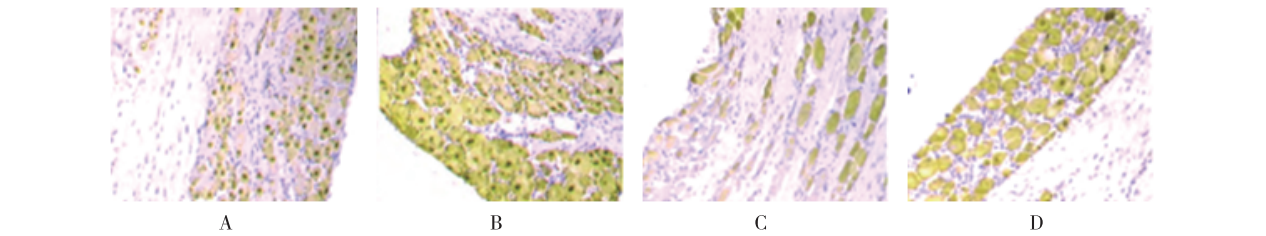


图1 干预前后两组大鼠脊髓组织匀浆 FcγR I 蛋白表达水平(Western blot)

Fig.1 Expression level of FcγR I receptor protein in spinal cord homogenate of two groups before and after intervention



注:A、B 为 GAP-43 表达,C、D 为 NGF 表达,A、C 为吗啡组,B、D 为模型组

图2 干预前后两组大鼠脊髓组织 GAP-43 和 NGF 表达(DAB, ×200)

Fig.2 Expression of GAP-43 and NGF in spinal cord of two groups before and after Intervention

表3 干预前后两组大鼠脊髓组织 GAP-43 和 NGF 表达( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.3 Expression of GAP-43 and NGF in spinal cord of two groups before and after intervention

组别	GAP-43		NGF	
	干预前	干预后第 14 天	干预前	干预后第 14 天
模型组	62.20 ± 2.49	135.26 ± 5.91	71.58 ± 3.50	117.25 ± 4.08
吗啡组	62.22 ± 2.50	63.20 ± 2.52	70.98 ± 3.48	71.03 ± 3.51
<i>t</i>	0.031	61.432	0.666	47.037
<i>P</i>	0.975	0.000	0.508	0.000

3 讨论

神经病理痛是由物理性机械损伤、代谢或营养性神经改变、病毒感染、神经毒性及神经递质功能障碍等所引起的一种慢性状态,其中神经元作为一个整体,周围神经轴突损伤引发神经元细胞发生变化,并参与到慢性疼痛中,因神经病理疼痛病机尚未完全明确,一直以来对其治疗也无有效药物方案,使其成为疼痛研究的重点内容<sup>[7]</sup>。相关研究认为神经病理疼痛是神经损伤后免疫细胞通过免疫监视、补体、激活抗体、T 淋巴细胞的一种炎症免疫,而炎症免疫在神经病理痛中发挥重要作用,其主要通过攻击背根神经节继而加重这一疼痛作

用<sup>[8]</sup>。背根部神经节是位于脊髓根部及脊神经之间的第一级痛觉传导中枢,其可将外周痛觉信息传递到神经中枢,在神经病理性痛外周敏化中发挥重要作用,在中枢敏化信息传导过程中发挥重要作用,而脊髓是第二痛觉传导中枢,背根神经节的痛觉信号往往需通过脊髓传导方可到达大脑中并产生疼痛信号<sup>[9]</sup>。FcγR I 受体在神经系统中主要分布在脊髓神经元以及背根神经节中,FcγR I 是免疫球蛋白-G(IgG)唯一的高亲和力受体,其在不少炎症和免疫反应中发挥重要作用,在中枢神经系统相关的免疫疾病中也发挥重要作用,近期文献报告表明其在神经病理痛中也发挥着重要作用<sup>[10]</sup>。已有研究指出背根神经节中的 GAP-43、NGF 在痛觉中发挥重要作用,其中 GAP-43 是神经可塑性标

志分子,可用于研究神经生长发育以及损伤再生可塑性,而 NGF 属于靶源性神经营养因子,有神经营养作用并参与痛觉敏感调制<sup>[6]</sup>。

本研究分析吗啡对神经病理痛大鼠的 FcγR I 受体的影响及其作用机制,结果显示,干预后第 3、7 及 14 天时,吗啡组 MWT 较模型组显著升高、TWL 较模型组显著降低;干预后第 14 天时,吗啡组 FcγR I mRNA 及蛋白水平较模型组显著降低,初步表明 FcγR I 受体上调是引发神经病理痛的关键,与王立凤等<sup>[6]</sup>观点相符,本次研究还发现干预后吗啡组 GAP-43、NGF 灰度值明显低于模型组,证实了啡可通过有效抑制背根神经节 FcγR I 受体表达从而下调 GAP-43、NGF 表达水平,明显减轻神经病理痛大鼠的痛觉,这与陈华等<sup>[11]</sup>学者指出鞘内应用啡对神经病理性疼痛大鼠有明显的镇痛作用观点一致。神经病理性痛大鼠往往存在神经元细胞损伤,受损伤的轴突神经元胞体发生可逆性损害,最终神经元胞体肿胀而胞浆内尼氏体溶解或消散,导致神经元坏死或可塑性变化,并且脑内以及脊髓内均有阿片受体,分布在痛觉传导区以及与情绪行为有关的区域,因而考虑阿片类药物可较好地发挥镇痛作用<sup>[12]</sup>;本次研究所用的啡是 μ 阿片受体激动剂,其作用于神经病理痛大鼠中,可较好地发挥镇痛作用,主要是其可激活阿片类受体(这些受体主要分布在与痛觉传导有关的区域)从而发挥镇痛作用<sup>[13]</sup>;正常生理条件下,FcγR I 受体可与神经源性 IgG 结合,从而增强细胞的吞噬作用、降低小胶质细胞释放肿瘤坏死因子从而对神经元进行保护,而在病理条件下,小胶质细胞表面所表达的 FcγR I 受体和神经源性 IgG 结合诱导小胶质细胞吞噬侵入体内的病原体,引发神经病理性痛,由此可推测 FcγR I 受体在神经病理痛中发挥重要作用<sup>[14]</sup>。而啡可有效激活神经病理痛大鼠体内阿片类受体,下调背根神经结处的 FcγR I 受体水平,并抑制神经源性疼痛发生过程中背神经根神经节内 GAP-43、NGF 高表达,从而达到镇痛的目的<sup>[15]</sup>。

综上所述,FcγR I 受体在神经病理痛中发挥重要作用,啡治疗神经病理痛的镇痛效果佳,可能机制与其可有效下调 FcγR I 受体以及抑制背神经根神经节内 GAP-43、NGF 高表达有关。

## 4 参考文献

[1] 金少举,任丽平,马奔晖,等. 槐果碱对神经病理性疼

痛小鼠 GABA 信号通路的影响[J]. 中药药理与临床, 2016, 26(3):24-28.

[2] 熊枫,颜冰,戴文玲,等. 左旋紫堇达明对神经病理性疼痛大鼠的镇痛作用及机制研究[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(1):70-75.

[3] 朱准,聂英坤. 免疫球蛋白 G 的 Fc 段受体 II B 在自身免疫病中的研究进展[J]. 中华风湿病学杂志, 2016(2):135-137.

[4] ZHAO N, MI L, ZHANG Y, et al. Altered human neutrophil FcγRI and FcγRIII but not FcγRII expression is associated with the acute coronary event in patients with coronary artery disease[J]. Coronary Artery Disease, 2016, 28(1):63-63.

[5] 董克军,隋世华,赵涛,等. 鞘内注射啡治疗直肠癌重度癌性疼痛的疗效分析[J]. 中华神经医学杂志, 2016, 15(8):835-838.

[6] 王立凤,张岩,赵钧慧,等. 神经病理性疼痛大鼠 FcγRI mRNA 表达量的变化[J]. 临床麻醉学杂志, 2014, 30(2):185-188.

[7] 王向东,万丽萍,李晴,等. 大鼠神经病理痛模型的两种不同制备方法效果比较[J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(8):707-709.

[8] 牛春晓,谭超,韩文娟,等. 神经病理痛状态下大鼠背根节神经元对痛信息传递的 A-C 交叉兴奋效应研究[J]. 神经解剖学杂志, 2016, 32(3):307-313.

[9] 李晴,刘怡果,王向东,等. 1,8-桉叶素对背根神经节内 P2X3 受体介导神经病理痛的作用[J]. 解剖学杂志, 2017, 40(4):429-432.

[10] 李真真,张月明,梁映霞. FcγRI 参与大鼠神经病理性疼痛的发生[J]. 中国疼痛医学杂志, 2015, 21(12):894-898.

[11] 陈华,孟凌新,崔健君. 鞘内注射啡-氯胺酮对慢性神经病理性疼痛大鼠背根神经节神经元超微结构的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2006, 26(2):191-192.

[12] 李晴,刘怡果,王向东,等. 1,8-桉叶素对背根神经节内 P2X3 受体介导神经病理痛的作用[J]. 解剖学杂志, 2017, 40(4):429-432.

[13] 彭静. 啡对神经病理性疼痛大鼠背根神经节 P2X 受体表达的影响[D]. 长沙:中南大学, 2007.

[14] 徐永明,张昕,浦少锋,等. 米诺环素、氟代柠檬酸和 B 型酪氨酸激酶受体/Fc 对维持期神经病理性疼痛大鼠脊髓背角脑源性神经营养因子表达的影响[J]. 上海医学, 2011, 34(6):414-417.

[15] 陈国强,赵欣,于布为. 啡对卵巢切除术后神经病理性疼痛模型大鼠的镇痛作用[J]. 上海医学, 2009, 32(6):479-482.

(2019-01-15 收稿,2019-03-07 修回)

中文编辑:吴昌学;英文编辑:雷妍