

· 实验研究 ·

中脑导水管周围灰质腹外侧区 GABAA α_3 及 GABAB 受体在调节急性疼痛中的作用

娄超 王桂芝 于剑锋 迟文英 贾旺华 张春燕 孙万秋

【摘要】 目的 观察大鼠足底注射甲醛复制急性疼痛模型后大鼠中脑导水管周围灰质腹外侧区(vLPAG)处 GABAA α_3 及 GABAB 受体的变化,探讨 vLPAG 处 GABAA α_3 、GABAB 受体在疼痛信号传导中的作用。**方法** 健康清洁级雄性 SD 大鼠 12 只,体重 280~320 g,采用完全随机方法将大鼠分为生理盐水组(NS 组)和甲醛组(F 组),每组 6 只。NS 组足底注射无菌生理盐水 50 μ l, F 组足底注射 2% 甲醛 50 μ l。每隔 5 分钟记录 1 次疼痛评分(PIS 评分),每隔 10 分钟记录 1 次机械痛阈,每隔 15 分钟记录 1 次皮肤厚度、皮肤温度,总观察时间为 60 min。记录各项指标后处死大鼠,取中脑导水管周围灰质腹外侧区提取蛋白,采用 Western blot 法检测 GABAA α_3 及 GABAB 受体含量的变化。**结果** F 组大鼠注射甲醛后立即出现本模型的典型自发痛行为,各时点 PIS 评分明显高于 NS 组($P < 0.05$),且为典型的两相式。注射后 10~60 min F 组机械痛阈明显低于 NS 组($P < 0.05$)。注射后 15~60 min F 组皮肤温度和皮肤厚度明显高于 NS 组($P < 0.05$)。F 组大鼠 GABAA α_3 及 GABAB 受体含量明显高于 NS 组($P < 0.05$)。**结论** 中脑导水管周围灰质腹外侧区 GABAA α_3 及 GABAB 受体的表达上调与大鼠急性疼痛条件下痛阈降低有关。

【关键词】 急性疼痛;中脑导水管周围灰质腹外侧区;GABAA 受体 α_3 亚基;GABAB 受体

Role of GABAA α_3 and GABAB receptors in ventrolateral periaqueductal gray in rats with acute pain

LOU Chao, WANG Guizhi, YU Jianfeng, CHI Wenying, JIA Wanghua, ZHANG Chunyan, SUN Wanqiu. Department of Anesthesiology, Weifang Medical College, Weifang 261053, China

Corresponding author: WANG Guizhi, Email: wgz@wfmc.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the role of GABAA α_3 and GABAB receptors in the ventrolateral periaqueductal gray in the development of paw acute pain in rats. **Methods** Twelve male SD rats, weighing 280~320 g, were randomly divided into two groups: normal saline group (group NS), formaldehyde-induced pain group (group F), 6 rats in each group. In group F, rats were subcutaneously injected with 2% formaldehyde 50 μ l into the ventral surface of right hind paw to induce periphery inflammatory pain. In group NS, rats were subcutaneously injected with normal saline into the ventral surface of right hind paw. Mechanical threshold was assessed using von Frey hairs for every ten minutes. The rat pain behavior scores were recorded for every five minutes. The thickness of skin and skin temperature were recorded for every fifteen minutes. **Results** Mechanical hyperalgesia were induced in group F after formalin injection into right hind paw. Compared with group NS, rat pain behavior scores were increased significantly in group F at all time points after injection, mechanical threshold were decreased significantly in group F at 10-60 min after injection, the temperature of the skin and the skin thickness were increased significantly in group F at 15-60 min after injection ($P < 0.05$), the levels of the expression of GABAA α_3 and GABAB were significantly increased in group F ($P < 0.05$). **Conclusion** GABAA α_3 and GABAB receptors mediates formalin-induced hyperalgesia at ventrolateral portion of the PAG (vLPAG) of rats.

【Key words】 Acute pain; Ventrolateral periaqueductal gray; GABAA α_3 ; GABAB receptor

γ -氨基丁酸(GABA)是中枢神经系统中重要的抑制性神经递质,广泛参与脑内神经信号的传递,

在大鼠中脑 50% 的神经元是 GABA 能的。中脑导水管周围灰质(periaqueductal gray, PAG)抑制脊髓和脊髓上组织,对伤害性刺激作出反应,从而抑制脊髓背角疼痛刺激的传递。PAG 处多数 GABA 能神经元为具有紧张性抑制功能的中间神经元,参与调节 PAG 发出的内源性痛觉下行抑制系统的功

基金项目:潍坊医学院科技创新基金(K1301020)

作者单位:261053 潍坊医学院麻醉学系(娄超、王桂芝、于剑锋、贾旺华、张春燕、孙万秋);山东大学附属济南市中心医院麻醉科(迟文英)

通信作者:王桂芝,Email: wgz@wfmc.edu.cn

能^[1]。近年来研究表明 PAG 的腹外侧区(vLPAG)在疼痛的调制过程中也发挥重要作用。GABAA 受体和 GABAB 受体分别是 GABA 的离子通道型受体和代谢型受体。因此本实验采用大鼠足底皮下注射甲醛复制外周急性炎症性疼痛模型,观察急性疼痛不同时间段 GABAA α_3 及 GABAB 受体表达量的变化,为镇痛提供新的途径。

材料与方法

主要试剂和仪器 兔抗大鼠 GAPDH (WL01547)、山羊抗兔 IgG (WLA023a),兔抗大鼠 GABAA α_3 (AB21445)、兔抗大鼠 GABAB (AB33378),天能 5200 化学发光系统,ECL 发光试剂盒 (NCI5079),SDS-PAGE 凝胶试剂盒 (P1200-1)。

实验动物和分组 成年雄性 SD 大鼠 12 只,重量 280~320 g,由青岛派特福德白鼠养殖专业合作社提供。实验动物的使用和处理方法符合潍坊医学院动物实验伦理委员会要求,并尽量减少使用动物的数量。实验动物适应环境 1 周后采用完全随机法分为两组:生理盐水组(NS 组)和甲醛组(F 组),每组 6 只。生理盐水组:大鼠右侧后足底注射无菌生理盐水 50 μ l,观察记录各项指标 60 min;F 组:大鼠右侧后足底注射 2%甲醛 50 μ l,观察记录各项指标 60 min。

大鼠疼痛评分(PIS 评分) 采用双盲法对各组大鼠疼痛行为表现进行观察记录,并计算评分值。大鼠疼痛行为共分为 4 级:0 级:两足后足掌平放在地面,活动无异常;1 级:注射足掌轻微接触地面,活动时时有跛行;2 级:注射足抬起,不接触地面;3 级:大鼠舔咬或拍动注射足。实验数据自足底注射后每 5 分钟记录 1 次,PIS 计算方法为: $PIS = (T1 + 2 \times T2 + 3 \times T3) / (5 \times 60)$ 。T1、T2、T3 分别为 5 min 时段内出现的 1、2、3 级行为的时间^[2]。

机械疼痛阈值的测定 将大鼠单独置于透明的有机玻璃箱中,底部为 0.5 cm $\times$ 0.5 cm 孔径的铁丝网,室温 26 $^{\circ}$ C,待大鼠适应环境后,以不同压力的 von Frey 细丝分别刺激其右后足底。每 10 分钟测量 1 次,根据预实验结果选取 2.0 g 细丝为初始测量压力,测量时以 von Frey 细丝弯曲成 S 形即作为完全受力的标准,若不能引起缩足反应,则更换更高一级力度的细丝;如出现阳性反应则选择相邻低一级力度的细丝进行刺激,如此连续进行。持续刺激 5 s,以 15 s 为间隔,连续测量 5 次,如抬腿次数

>4 次,则认为该压力为有效阈值。

大鼠右后足底皮肤温度的测定 将大鼠固定于大鼠固定器内,采用数字显示电子温度计测定大鼠注射部位皮肤温度变化,首先记录大鼠实验前基础皮温,实验开始后每 15 分钟测定 1 次大鼠注射部位局部皮肤温度。

大鼠右后足底皮肤厚度的测定 将大鼠固定于大鼠固定器内,采用数显电子游标卡尺测定大鼠注射部位右后足的皮肤厚度,于实验前测定大鼠的基础皮肤厚度,实验开始,足底注射甲醛后每 15 分钟测定 1 次大鼠右后足注射部位的皮肤厚度。

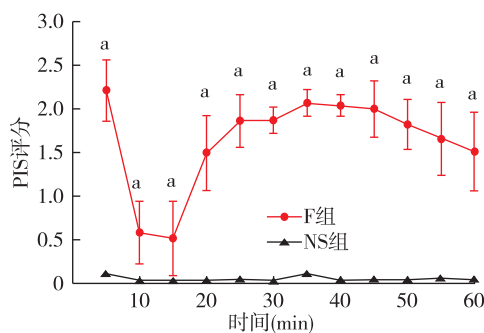
GABAA α_3 及 GABAB 受体表达水平的检测 痛阈测定结束后,腹腔注射 4%戊巴比妥钠深麻醉下,断头处死大鼠,参照大鼠脑立体定位图,准确切取中脑导水管周围灰质腹外侧区,制成组织匀浆,分离提取总蛋白,测定总蛋白浓度后,于 SDS-PAGE 上电泳分离,再转印至 PVDF 膜上。5%脱脂牛奶室温封闭 2 h,然后分别用兔抗大鼠 GABAA α_3 受体一抗溶液(1:750)及兔抗大鼠 GABAB 受体一抗溶液(1:1 500),4 $^{\circ}$ C 过夜;经 TBST 充分洗膜后,置于 HRP 标记的山羊抗兔二抗溶液(1:3 000)中,室温孵育 2 h;用 ECL 发光试剂盒显像,采用天能 5200 发光检测系统拍摄,采用 IPP 6.0 分析 GABAA α_3 及 GABAB 受体条带灰度值与 GAPDH 条带灰度值的比值反映 GABAA α_3 及 GABAB 受体的表达水平。

统计分析 采用 SPSS 20.0 软件进行统计学处理。正态分布计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组内比较采用重复测量的方差分析并以 $P > 0.05$ 作为满足“球假设”的标准,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

自发痛行为反应及 PIS 评分 大鼠右后足底注射 2%甲醛后约 1 min,即出现本模型的典型自发痛行为,如舔、摇和抬高注射足等,注射足疼痛行为表现存在明显的两相性,中间存在约 5~10 min 的间歇期,而且注射部位出现红、肿等明显的炎症。非注射足活动自如,无舔、摇和抬高等行为表现。F 组各时点 PIS 评分明显高于 NS 组($P < 0.05$)(图 1)。

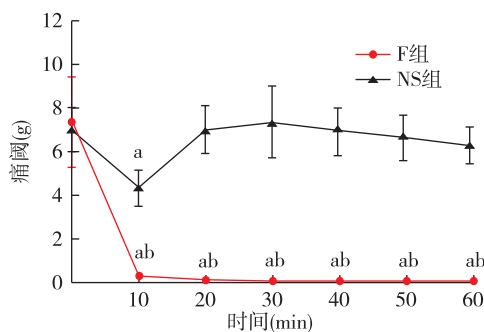
机械痛阈 与注射前比较,NS 组大鼠仅在注射后 10 min 时机械痛阈明显下降($P < 0.05$),其后各时点机械痛阈差异无统计学意义;F 组大鼠注射后各时点机械痛阈均明显降低($P < 0.05$)。注射后



注:与 NS 组比较, ^a $P < 0.05$

图 1 两组大鼠不同时点 PIS 评分的比较

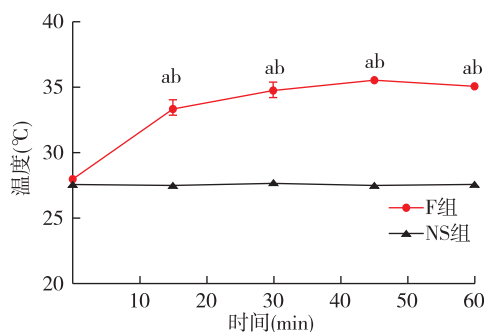
10~60 min F 组大鼠机械痛阈明显低于 NS 组 ($P < 0.05$) (图 2)。



注:与注射前比较, ^a $P < 0.05$; 与 NS 组比较, ^b $P < 0.05$

图 2 两组大鼠不同时点机械痛阈的比较

大鼠足底皮肤温度 与注射前比较,注射后各时点 NS 组大鼠足底皮肤温度差异无统计学意义;注射后 15~60 min F 组皮肤温度明显升高。注射后 15~60 min F 组皮肤温度明显高于 NS 组 ($P < 0.05$) (图 3)。

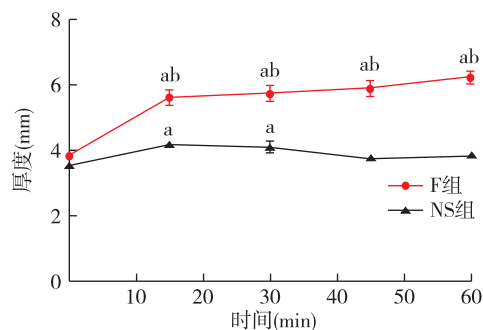


注:与注射前比较, ^a $P < 0.05$; 与 NS 组比较, ^b $P < 0.05$

图 3 两组大鼠不同时点足底皮肤温度的比较

大鼠足底皮肤厚度 与注射前比较,注射后 15、30 min NS 组大鼠足底皮肤厚度明显增加 ($P < 0.05$) (图 4)。

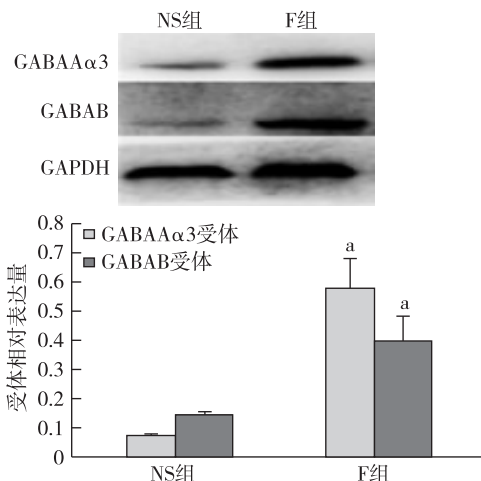
0.05); F 组注射后 15~60 min 皮肤厚度明显增加。与 NS 组比较,注射后 15~60 min F 组皮肤厚度明显高于 NS 组 ($P < 0.05$) (图 4)。



注:与注射前比较, ^a $P < 0.05$; 与 NS 组比较, ^b $P < 0.05$

图 4 两组大鼠不同时点足底皮肤厚度的比较

GABAA α_3 及 GABAB 受体表达含量 F 组 GABAA α_3 和 GABAB 表达量明显高于 NS 组 ($P < 0.05$)。



注:与 NS 组比较, ^a $P < 0.05$

图 5 两组大鼠 GABAA α_3 和 GABAB 受体表达量的比较

讨 论

PAG 作为上行痛觉传导及下行痛觉调节的重要组成部分,使得越来越多的疼痛机制的研究聚焦于 PAG。近年来由于影像技术的进步通过对疼痛患者 PAG 区结构及功能进行观察,明确 PAG 在疼痛发生及调节过程中发挥至关重要作用^[3]。而 vLPAG 由于其与多个疼痛调节核团密切的联系更成为疼痛研究的热点。有研究表明在 vLPAG 埋置刺激电极,进行深部脑刺激可对神经病理性疼痛模型大鼠产生良好的镇痛效果^[4]。然而 vLPAG 处疼痛

调节的分子机制尚不明确。

本实验采用的大鼠足底皮下注射甲醛诱导大鼠急性疼痛模型,在足底注射甲醛后 10 min 大鼠痛阈迅速降低并维持至 60 min 观察结束,说明在 60 min 内甲醛急性疼痛模型可提供刺激强度相近的持续疼痛刺激。GABAA α_3 、GABAB 受体在大鼠注射甲醛后 60 min 呈现高表达状态,可能是其调节疼痛信号的主要的分子生物学基础。研究表明 GABAA 受体参与脊髓以上水平的疼痛调节过程^[5]。GABAA 受体 α 亚单位对 GABAA 受体复合物的组装及功能可能起主要作用,并且 GABA 受体的 α 亚基在慢性疼痛的形成和维持中发挥作用^[2,6]。GABAB 受体介导的抑制效应既可调节突触前的神经递质的释放也可引起抑制性突触后电位,导致神经传递的长时程变化,由此影响神经元的反应性^[7]。有研究表明大鼠脊髓水平 GABAB、GABAA 受体参与调节大鼠的急慢性疼痛^[8,9]。但脊髓以上水平的有关 GABA 及其受体在疼痛调节通路中的作用的研究较少,因此通过本实验可推测 GABAA α_3 、GABAB 受体参与 vLPAG 在急性疼痛信号传递过程中的调节。

在疼痛信号的传导过程中除 GABA 能信号系统外,外周组织与中枢神经系统中升高的炎症因子也被认为参与痛觉信号的调制过程^[10]。有研究表明,PAG 处小胶质细胞、星形胶质细胞及细胞因子表达的增加可能与 CFA 诱导的外周炎性疼痛形成维持有关^[11]。本实验中大鼠足底注射甲醛皮肤厚度与温度较注射生理盐水的大鼠明显上升,说明局部炎症反应的发生与持续,因此推测在甲醛急性痛模型中炎症因子也参与了疼痛的产生与调节过程。对于 vLPAG 处炎症因子与 GABA 受体在疼痛调节中的相互作用的机制需在以后的研究中进一步探讨。

综上所述,本研究结果表明中脑导水管周围灰

质腹外侧区 GABAA α_3 和 GABAB 受体的表达上调与大鼠急性疼痛条件下痛阈降低有关,但该受体参与调解疼痛的具体机制仍需进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] McMullan S, Lumb BM. Spinal dorsal horn neuronal responses to myelinated versus unmyelinated heat nociceptors and their modulation by activation of the periaqueductal grey in the rat. *J Physiol*, 2006, 576 (Pt 2): 547-556.
- [2] Hortnagl H, Tasan RO, Wieselthaler A, et al. Patterns of mRNA and protein expression for 12 GABAA receptor subunits in the mouse brain. *Neuroscience*, 2013, 236: 345-372.
- [3] Linnman C, Moulton EA, Barmettler G, et al. Neuroimaging of the periaqueductal gray: state of the field. *Neuroimage*, 2012, 60(1): 505-522.
- [4] 王宁, 张婷, 苏园林, 等. 中脑导水管周围灰质电刺激与丘脑电刺激对大鼠伤害感知行为的差异调节(英文). *生理学报*, 2016, 68(2): 115-125.
- [5] Chen L, Wang W, Tan T, et al. GABA(A) receptors in the central nucleus of the amygdala are involved in pain-and itch-related responses. *J Pain*, 2016, 17(2): 181-189.
- [6] Bravo-Hernández M, Corleto JA, Barragán-Iglesias P. The $\alpha 5$ subunit containing GABAA receptors contribute to chronic pain. *Pain*, 2016, 157(3): 613-626.
- [7] 焦悦, 郭建友, 李守业, 等. 神经病理性疼痛的受体机制研究进展. *中国药理学通报*, 2012, 28(5): 593-597.
- [8] Sands SA, McCarson KE, Enna SJ. Differential regulation of GABA B receptor subunit expression and function. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 305(1): 191-196.
- [9] Peng F, Qu ZW, Qiu CY, et al. Spinal vasopressin alleviates formalin-induced nociception by enhancing GABAA receptor function in mice. *Neurosci Lett*, 2015, 593: 61-65.
- [10] del Rey A, Apkarian AV, Martina M, et al. Chronic neuropathic pain-like behavior and brain-borne IL-1 β . *Ann N Y Acad Sci*, 2012, 1262: 101-107.
- [11] 郁晓燕, 倪衡建, 高永静. 外周炎性疼痛刺激诱导大鼠中脑导水管周围灰质胶质细胞激活及细胞因子的表达. *解剖学报*, 2008, 39(4): 460-465.

(收稿日期:2016-09-30)