

· 实验研究 ·

钙/钙调素依赖性蛋白激酶 II α 对阿片诱导痛觉过敏大鼠中央杏仁核抑制性突触后电流的影响

盛晴宇 张泽茹 罗放

【摘要】 目的 探讨钙/钙调素依赖性蛋白激酶 II α (CaMKII α) 对阿片诱导痛觉过敏 (OIH) 大鼠中央杏仁核 (CeA) 抑制性突触后电流的影响。方法 实验一: 取雄性 SD 大鼠 12 只, 随机分为对照组和 KN93 组, 每组右侧 CeA 立体定位置管恢复 1 周后经颈皮下注射芬太尼 (60 $\mu\text{g}/\text{kg} \times 4$ 次, 间隔 15 min) 造 OIH 模型, 随后对照组及 KN93 组大鼠 CeA 区分别注射 50% DMSO 0.5 μl 或 CaMKII α 抑制剂 KN93 10 nmol, 记录给药前后大鼠机械缩足反应阈 (MWT) 和热缩足潜伏期 (TWL)。实验二: 另取雄性 SD 大鼠 32 只, 随机分为 Con-1 组、Con-2 组、OIH-1 组和 OIH-2 组, 建模成功后制成脑片, 其中 Con-1 组与 OIH-1 组用膜片钳记录 CeA 区神经元自发抑制性突触后电流 (sIPSCs); Con-2 组和 OIH-2 组记录 CeA 区神经元微小抑制性突触后电流 (mIPSCs), 观察加用 KN93 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 前后上述电流幅值和频率的变化。结果 实验一: 与造模前比较, 造模后两组 MWT 和 TWL 均明显降低 ($P < 0.01$); 与造模后比较, 给药后 KN93 组 MWT 和 TWL 明显升高 ($P < 0.01$)。实验二: 与 Con-1 组比较, OIH-1 组 sIPSCs 幅值和频率明显降低 ($P < 0.05$), 给药后 OIH-1 组 sIPSCs 幅值和频率明显升高 ($P < 0.05$), 但对 Con-1 组无明显影响; 与 Con-2 组比较, OIH-2 组 mIPSCs 幅值和频率亦明显降低 ($P < 0.05$), 给药前后 OIH-2 组与 Con-2 组 mIPSCs 幅值和频率差异无统计学意义。结论 CaMKII α 可抑制 CeA 区自发抑制性突触后电流, 这可能是 CaMKII α 调制阿片诱导痛觉过敏的机制之一。

【关键词】 杏仁核; 阿片; 痛觉过敏; 钙/钙调素依赖性蛋白激酶 II α ; 抑制性突触后电流

Effects of calcium/calmodulin-dependent kinase II α on inhibitory postsynaptic currents in central amygdala in rats with opioid induced hyperalgesia SHENG Qingyu, ZHANG Zeru, LUO Fang. Department of Anesthesiology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: LUO Fang, Email: luofang0909@hotmail.com

【Abstract】 Objective To explore the effects of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II α (CaMKII α) on inhibitory postsynaptic currents in central amygdala (CeA) in rats with opioid induced hyperalgesia (OIH). **Methods** In experiment 1, 12 healthy male clean Sprague-Dawley rats, were randomly divided into 2 groups: control group and group KN93. After one-week recovery from catheterization in the right CeA, two groups were induced by fentanyl subcutaneous injection (60 $\mu\text{g}/\text{kg} \times 4$, 15 min interval). Then 50% DMSO (0.5 μl) or KN93 (10 nmol/L) were administrated through the CeA catheter to control group and group KN93 accordingly. Mechanical withdrawal threshold (MWT) and thermal withdrawal latency (TWL) were tested before and after OIH induction and post drug delivery through the CeA catheter. In experiment 2, another 32 healthy male clean Sprague-Dawley rats, were randomly divided into 4 groups: groups Con-1, Con-2, OIH-1 and OIH-2. OIH model was induced by previously described methods in OIH groups, same volume of saline was injected into the control groups. After success induction of OIH, brain slices were prepared, and the spontaneous inhibitory postsynaptic currents (sIPSCs) were recorded by whole-cell patch clamp in groups Con-1 and OIH-1. The miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs) were recorded in groups Con-2 and OIH-2 alternatively. Then the changes in amplitude and frequency of the IPSCs were monitored after KN93 (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) use. **Results** Experiment 1: MWT and TWL were significantly decreased after fentanyl induction in both groups ($P < 0.05$). Compared with modeling, MWT and TWL in group KN93 were significantly increased ($P < 0.01$). Experiment 2: Compared with group Con-1, amplitude and frequency of sIPSCs in group OIH-1 were decreased significantly ($P <$

DOI:10.12089/jca.2019.06.013

基金项目:国家自然科学基金(81771196)

作者单位:430030 武汉市,华中科技大学同济医学院附属同济医院麻醉科

通信作者:罗放, Email: luofang0909@hotmail.com

0.05), which could be reversed by KN93 ($P < 0.05$). Compared with group Con-2, amplitude and frequency of mIPSCs in group OIH-2 were decreased significantly ($P < 0.05$), which can't be modified by KN93.

Conclusion CaMKII α could inhibit the sIPSCs in the central amygdala in rats with OIH, which may contribute to the underlying mechanism of OIH.

【Key words】 Amygdala; Opioids; Hyperalgesia; Calcium calmodulin-dependent protein kinase II α ; Inhibitory postsynaptic currents

长期反复大量使用阿片类药物可导致痛觉敏感,即阿片诱导的痛觉过敏(opioid induced hyperalgesia, OIH)^[1],其机制尚未完全阐明。近年来研究发现,中央杏仁核(CeA)与疼痛调制密切相关^[2],而调制疼痛的重要分子钙/钙调素依赖性蛋白激酶 II α (CaMKII α)亦大量存在于杏仁核中^[3]。前期研究发现,OIH大鼠CeA区CaMKII α 被激活^[4],并能引起突触兴奋性增强^[5]。理论上,抑制性突触后电流(IPSCs)减弱会产生与突触兴奋性增强类似的效应。因此,本研究拟采用脑片膜片钳电生理技术,观察OIH时CeA区神经元IPSCs的变化,并探讨CaMKII α 对IPSCs是否有调制作用。

材料与方法

实验动物 健康雄性SD大鼠44只,体重80~100 g,由湖北省实验动物研究中心提供,室温下自由饮水和摄食,光照与黑暗12 h交替进行。所有动物实验均严格遵循国家卫生机构制定的实验室动物指南。

实验分组 实验一:取雄性SD大鼠12只,采用随机数字表法分为两组($n=6$):对照组和KN93组。两组均进行右侧杏仁核立体定位置管,待其恢复1周后制备OIH模型,模型成功后分别向对照组大鼠CeA区注射50% DMSO 0.5 μ l,KN93组给予CaMKII α 抑制剂KN93 10 nmol/L。

实验二:另取雄性SD大鼠32只,随机分为四组:Con-1组、Con-2组、OIH-1组和OIH-2组。OIH-1组和OIH-2组制备模型,Con-1组和Con-2组皮下注射生理盐水,6.5 h后制成脑片,其中Con-1组与OIH-1组用脑片膜片钳记录sIPSCs;Con-2组和OIH-2组记录mIPSCs,然后在记录过程中采用脑脊液持续灌注法将KN93 10 μ mol/L加入记录槽后观察上述电流幅值和频率的变化。

OIH动物模型建立 大鼠经颈皮下注射芬太尼(批号:1170407)制备痛觉过敏模型^[6],每次60 μ g/kg,间隔15 min,共4次,累计给药240 μ g/kg。

中央杏仁核区立体定位置管给药 大鼠腹腔内注射10%水合氯醛3 ml/kg麻醉后固定于脑立体

定位仪上,头顶备皮消毒后,暴露颅骨前囟和矢状缝,参大鼠脑立体定位图谱^[7]于右侧杏仁核(坐标:前囟后2.0 mm,中线旁开4.2 mm,颅骨下7.5 mm)植入带管芯的套管牙胶水泥固定后缝合皮肤。恢复1周后,将注射内管一端经导管插入杏仁核,另一端经PE管与微量注射器相连,用微量泵0.25 μ l/min缓慢给药0.5 μ l,待药物弥散后拔出注射内管装上导管帽。

疼痛行为学检测 于生理盐水或芬太尼注射后6.5 h测定机械缩足反应阈(MWT)和热缩足潜伏期(TWL)。机械痛阈采用von Frey纤维丝测定。将大鼠放入特制笼内适应30 min,从1.0 g开始,用不同压力von Frey纤维丝垂直作用于左足掌面,出现抬足舐足等行为为阳性反应,采用升降法计算MWT。热痛阈采用BME-410C测定。将大鼠静置于有机玻璃箱内适应30 min,将热源透过玻璃板照射于左足掌中央,自动记录TWL,防止热辐射损伤截断时间为15 s,照射间隔至少5 min,重复至少3次取平均值。

脑片制备 人工脑脊液(ACSF)于25 $^{\circ}$ C恒温水浴槽中充氧备用,解剖液置于冰上充氧备用,pH调至7.3~7.4。水合氯醛腹腔注射麻醉造模成功6.5 h的大鼠后,迅速取出脑组织置于4 $^{\circ}$ C解剖液中,快速修剪后用胶水固定右脑,用冰冻振动切片将右脑切成300 μ m的薄片,参照大鼠立体定位图谱^[7],选取含CeA的2~3张脑片迅速移入ACSF孵育槽内孵育1 h。单个脑片移至记录槽,蠕动泵以2 ml/min灌注ACSF。

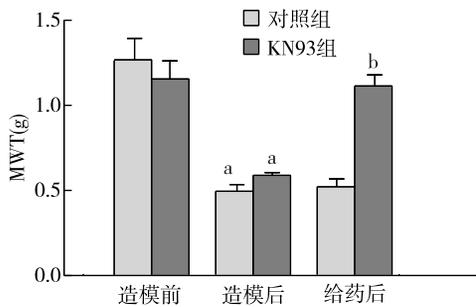
全细胞电压钳记录 硅胶玻璃电极(4~6 M Ω)内灌注电极内液,施加适量正压后,靠近状态良好的神经元,释放正压,封接(电阻值达到吉欧以上)上后,施加负压破膜,破膜后行快、慢电容补偿,全细胞状态下记录。钳制电压设定为-70 mV,记录稳定后,向灌流液中加入非NMDA受体拮抗剂(CNQX 10 μ mol/L)以阻断兴奋性电流记录sIPSCs,或加CNQX(10 μ mol/L)和动作电位阻断剂(TTX 1 μ mol/L)记录mIPSCs,再观测ACSF中加10 μ mol/L的KN93后sIPSCs和mIPSCs的幅值和频率变化。

采用 pCLAMP10 软件分析固定时长(5 min)的幅值和频率。

统计分析 采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行数据分析。正态分布计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 痛阈组间比较采用成组 *t* 检验, IPSCs 频率和幅值组间比较采用单因素方差分析, 组内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。

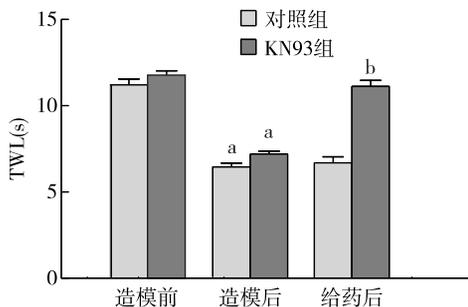
结 果

实验一 与造模前比较, 造模后对照组和 KN93 组 MWT 和 TWL 均明显降低 ($P < 0.05$); 与造模后比较, 给药后 KN93 组 MWT 和 TWL 明显升高 ($P < 0.01$) (图 1—2)。



注: 与造模前比较, ^a $P < 0.05$; 与造模后比较, ^b $P < 0.01$

图 1 两组大鼠 MWT 的比较



注: 与造模前比较, ^a $P < 0.05$; 与造模后比较, ^b $P < 0.05$

图 2 两组大鼠 TWL 的比较

实验二 与 Con-1 组比较, OIH-1 组 sIPSCs 幅值和频率明显降低 ($P < 0.05$); 给予 KN93 后, OIH-1 组 sIPSCs 幅值和频率明显升高 ($P < 0.05$), 但对 Con-1 组幅值和频率无明显影响 (图 3—5)。

与 Con-2 组比较, OIH-2 组 mIPSCs 幅值和频率明显降低 ($P < 0.05$); 给予 KN93 前后 OIH-2 组与 Con-2 组 mIPSCs 幅值和频率差异无统计学意义 (图 6—8)。

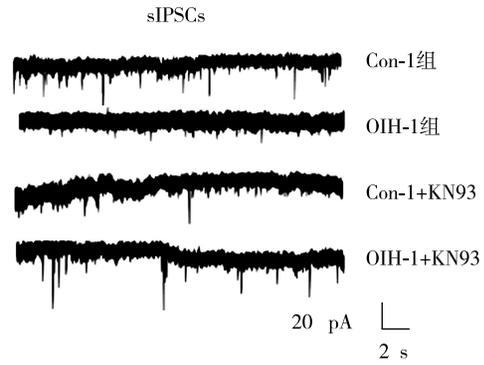
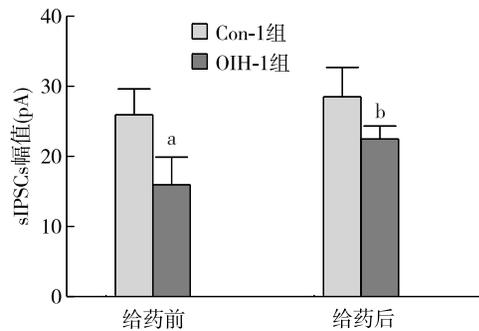
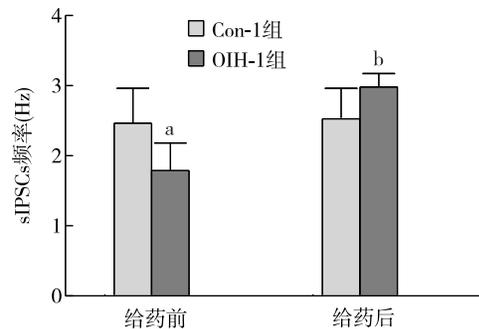


图 3 Con-1 组与 OIH-1 组钳制电位为 -70 mV 时的典型 sIPSCs 记录



注: 与 Con-1 组比较, ^a $P < 0.05$; 与加药前比较, ^b $P < 0.05$

图 4 CaMKIIα 抑制剂 KN93 对 OIH 大鼠 CeA 区神经元 sIPSCs 幅值的影响



注: 与 Con-1 组比较, ^a $P < 0.05$; 与加药前比较, ^b $P < 0.05$

图 5 CaMKIIα 抑制剂 KN93 对 OIH 大鼠 CeA 区神经元 sIPSCs 频率的影响

讨 论

本实验通过脑片膜片钳电生理技术, 观察到 OIH 时 CeA 区神经元抑制性突触后电流 (sIPSCs 和 mIPSCs) 减弱, 发现 CaMK IIα 对 sIPSCs 有调制作用。前期研究表明, OIH 大鼠 CeA 区 CaMKIIα 被激活后引起突触兴奋性增强^[4-5]。因此, CeA 区 CaMK IIα 对突触传递的调制是 OIH 的关键机制。

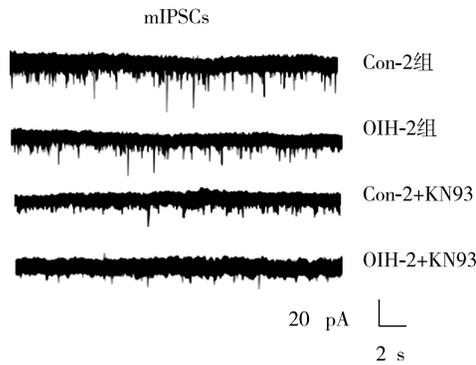
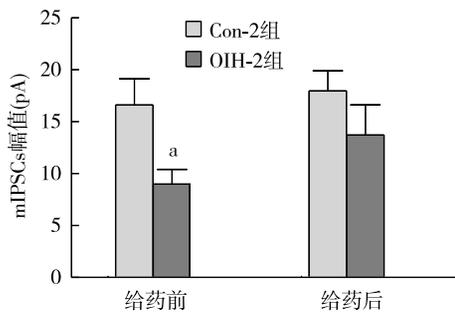
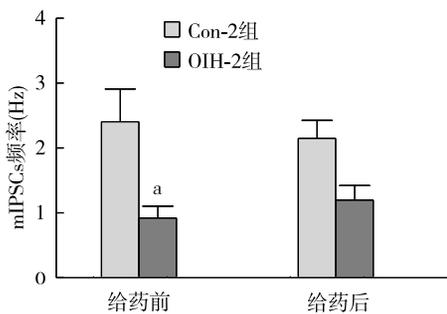


图 6 Con-2 组与 OIH-2 组钳制电位为 -70 mV 时的典型 mIPSCs 记录



注:与 Con-2 组比较, ^a*P*<0.05

图 7 CaMKII α 抑制剂 KN93 对 OIH 大鼠 CeA 区神经元 mIPSCs 幅值的影响



注:与 Con-2 组比较, ^a*P*<0.05

图 8 CaMKII α 抑制剂 KN93 对 OIH 大鼠 CeA 区神经元 mIPSCs 频率的影响

芬太尼诱导后,大鼠在 6.5 h 时痛阈最低,此时右侧 CeA 区 CaMKII α 明显激活^[4],因此本实验均选择在造模后 6.5 h 进行。另有文献也显示,只有右侧杏仁核参与了疼痛易化且可以产生与疼痛相关的突触可塑性变化^[8],由于存在强烈的对侧疼痛投射通路^[9],故本实验行为学测定均在大鼠左侧足底进行,而大鼠右侧足底并不会出现与左侧相同的行

为学变化。立体定位给药及脑片膜片钳电生理实验均采用右侧 CeA 区。

CaMKII 是一种功能丰富的蛋白激酶,在目前已发现的 5 种亚型中, α 和 β 大量存在于神经组织(如杏仁核)中,CaMKII α 参与细胞内 Ca^{2+} 水平调节,对神经元电活动及基因转录等均有调节作用^[10]。CaMKII α 被磷酸化后通过与其结合的 Ca^{2+} 与 NMDA 受体 NR2B 亚基结合,从而激活 NMDA 受体,后者又可进一步激活 CaMKII α ,形成正反馈,最终引起 OIH 大鼠外周和/或中枢长时程增强^[11]。本研究显示,OIH 时 IPSC 减弱,加入 KN93 后 sIPSCs 可恢复至正常,提示 CaMKII α 也可通过抑制 CeA 区 sIPSCs 参与 OIH 痛觉过敏的调制。结合前期研究 OIH 时 CeA 区 CaMKII α 的激活引起神经元兴奋性突触增强^[5],表明 OIH 状态下 CeA 区生理 EAAs(兴奋性氨基酸)/IAAs(抑制性氨基酸)的平衡被打破。这种失衡现象在 Gong 等^[12] 研究中也报道,他们发现在蜂毒痛模型中前扣带回神经元也表现为兴奋性突触后电流增强,抑制性突触后电流减弱。

GABA 是神经系统主要的抑制性递质^[13],GABA 与 GABA_A 受体结合后,可引起突触后膜 GABA_A 通道开放, Cl^{-} 内流增加,突触后膜超极化,产生快的 IPSCs,发挥突触后抑制效应,抑制神经元放电^[14]。本研究电生理结果显示,在 OIH 时 IPSCs 的频率和幅值均降低,表明 IPSCs 的抑制是 OIH 形成的重要机制之一。本研究仅观察到 CaMKII α 抑制剂 KN93 对 sIPSCs 的幅值和频率有明显影响,而对 mIPSCs 没有明显影响,这可能是由于 sIPSCs 是依赖于突触前动作电位的 GABA 释放,而 mIPSCs 是在阻断动作电位的基础上而记录的,其具体机制还有待进一步研究。

综上所述,CaMKII α 可抑制 CeA 区自发性抑制性突触后电流,这可能是 CaMKII α 调制阿片诱导痛觉过敏的机制之一。

参 考 文 献

[1] Lyons PJ, Rivosecchi RM, Nery JP, et al. Fentanyl-induced hyperalgesia in acute pain management. J Pain Palliat Care Pharmacother, 2015, 29(2): 153-160.

[2] Tran L, Keele NB. CaMK II α knockdown decreases anxiety in the open field and low serotonin-induced upregulation of GluA1 in the basolateral amygdala. Behav Brain Res, 2016, 303: 152-159.

[3] Narita M, Matsumura Y, Ozaki S, et al. Role of the calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in the morphine-

- induced pharmacological effects in the mouse. *Neuroscience*, 2004, 126(2): 415-421.
- [4] Li Z, Yin P, Chen J, et al. CaMKII α may modulate fentanyl-induced hyperalgesia via a CeLC-PAG-RVM-spinal cord descending facilitative pain pathway in rats. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0177412.
- [5] Li Z, Li C, Yin P, et al. Inhibition of CaMK II α in the central nucleus of amygdala attenuates fentanyl-induced hyperalgesia in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 2016, 359(1): 82-89.
- [6] Laboureyras E, Aubrun F, Monsaingeon M, et al. Exogenous and endogenous opioid-induced pain hypersensitivity in different rat strains. *Pain Res Manag*, 2014, 19(4): 191-197.
- [7] Ren W, Kiritoshi T, Grégoire S, et al. Neuropeptide S: a novel regulator of pain-related amygdala plasticity and behaviors. *J Neurophysiol*, 2013, 110(8): 1765-1781.
- [8] Kolber BJ, Montana MC, Carrasquillo Y, et al. Activation of metabotropic glutamate receptor 5 in the amygdala modulates pain-like behavior. *J Neurosci*, 2010, 30(24): 8203-8213.
- [9] Neugebauer V, Li W, Bird GC, et al. The amygdala and persistent pain. *J Neuroscientist*, 2004, 10(3): 221-234.
- [10] van Oort RJ, McCauley MD, Dixit SS, et al. Ryanodine receptor phosphorylation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II promotes life-threatening ventricular arrhythmias in mice with heart failure. *J Circulation*, 2016, 122(25): 2669-2679.
- [11] Cui W, Wang S, Han R, et al. CaMKII phosphorylation in primary somatosensory cortical neurons is involved in the inhibition of remifentanyl-induced hyperalgesia by lidocaine in male Sprague-Dawley rats. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2016, 28(1): 44-50.
- [12] Gong KR, Cao FL, He Y, et al. Enhanced excitatory and reduced inhibitory synaptic transmission contribute to persistent pain-induced neuronal hyper-responsiveness in anterior cingulate cortex. *Neuroscience*, 2010, 171(4): 1314-1325.
- [13] Rudolph U, Möhler H. Analysis of GABA_A receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2004, 44(44): 475-498.
- [14] Sieghart W, Sperk G. Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Curr Top Med Chem*, 2002, 2(8): 795-816.

(收稿日期:2018-07-27)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《临床麻醉学杂志》关于一稿两投问题的声明

为维护学术刊物的严肃性和科学性,也为了维护作者的名誉和向广大读者负责,本刊编辑部重申坚决反对一稿两投并采取以下措施:(1)作者和单位对来稿的真实性和科学性均应自行负责。刊出前需第一作者在校样首页亲笔签名,临床研究和实验研究来稿的通信作者也需亲笔签名。(2)来稿需附单位推荐信,应注明稿件无一稿两投,署名无争议,并加盖公章。(3)凡接到编辑部收稿回执后3个月内未接到退稿通知,系稿件仍在审阅中,作者欲投他刊,或将在他刊上发表,请先与编辑部联系撤稿,切勿一稿两投。(4)编辑部认为来稿有一稿两投嫌疑时,在认真收集有关资料和仔细核对后通知作者,并由作者就此问题作出解释。(5)一稿两用一经证实,将择期在杂志上刊出其作者单位和姓名以及撤销该文的通知;向作者所在单位和同类杂志通报;2年内拒绝发表该作者为第一作者所撰写的任何来稿。