

· 实验研究 ·

伤害性杏仁核中 mGluR5 对芬太尼诱导痛觉过敏大鼠杏仁核神经通路兴奋性突触传递的影响

张泽茹 罗放

【摘要】 目的 探讨伤害性杏仁核(CeLC)中代谢型谷氨酸受体 5(mGluR5)对阿片诱导痛觉过敏(OIH)大鼠杏仁核神经通路兴奋性突触传递的影响。方法 实验一:取 SD 雄性大鼠 18 只,随机分为对照组(C 组)、痛觉过敏+DMSO 组(OIH+DMSO 组)和痛觉过敏+mGluR5 选择性拮抗剂组(OIH+MTEP 组),每组 6 只。三组大鼠均接受右侧 CeLC 置管,恢复 1 周后 OIH+DMSO 组和 OIH+MTEP 组经皮下注射芬太尼造 OIH 模型,芬太尼剂量为 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$,4 次,间隔时间 15 min,C 组皮下注射等容量生理盐水。6.5 h 后 OIH+DMSO 组大鼠 CeLC 区注射 10%二甲基亚砜(DMSO)0.5 μl ;C 组和 OIH+MTEP 组大鼠 CeLC 区注射 MTEP 15 μg 。观察造模前(T_0)、造模后(T_1)和给药后(T_2)大鼠机械缩足阈值(WMT)和热缩足反射潜伏期(TWL)。实验二:另取 10 只大鼠随机分为正常组(N 组)和痛觉过敏组(OIH 组),OIH 组注射芬太尼造 OIH 模型,N 组注射等容量生理盐水。使用双电极膜片钳技术分别记录使用 MTEP 前后两组大鼠基底外侧杏仁核(BLA)-CeLC 神经通路刺激诱发的兴奋性突触后电流(eEPSCs)的幅值。结果 实验一:与 T_0 时比较, T_1 时 OIH+DMSO 组与 OIH+MTEP 组大鼠 WMT 明显降低,TWL 明显缩短($P<0.05$);与 T_1 比较, T_2 时 OIH+MTEP 组大鼠 WMT 明显升高,TWL 明显延长($P<0.05$); T_2 时 OIH+MTEP 组 WMT 明显高于 OIH+DMSO 组,TWL 明显长于 OIH+DMSO 组($P<0.05$), T_2 时 OIH+MTEP 组和 C 组 WMT 及 TWL 差异无统计学意义。实验二:与 OIH 组使用 MTEP 前比较,OIH 组使用 MTEP 后 eEPSCs 幅值明显降低。N 组使用 MTEP 前和 N 组使用 MTEP 后 eEPSCs 幅值差异无统计学意义。OIH 组使用 MTEP 前 eEPSCs 幅值明显高于 N 组使用 MTEP 前($P<0.05$)。结论 激活 CeLC 中 mGluR5 可通过增强 BLA-CeLC 神经通路的兴奋性突触传递来参与调控芬太尼诱导的痛觉过敏。

【关键词】 痛觉过敏;代谢型谷氨酸受体 5;杏仁核;芬太尼;神经通路

Effect of mGluR5 in nociceptive amygdala on excitatory synaptic transmission in amygdaloid neural pathway in rats with fentanyl-induced hyperalgesia 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 investigate the effect of metabolic glutamate receptor 5 (mGluR5) in nociceptive amygdala (the laterocapsular division of central amygdala, CeLC) on excitatory synaptic transmission in amygdaloid neural pathway in rats with opioid-induced hyperalgesia (OIH). **Methods** Experiment 1: 18 male SD rats were randomly divided into the control group (group C), the hyperalgesia + DMSO group (group OIH + DMSO) and the hyperalgesia + mGluR5 selective antagonist group (group OIH + MTEP), with 6 rats in each group. All rats in the three groups received CeLC catheterization on the right side. After one week of recovery, group OIH+DMSO and group OIH+MTEP received subcutaneous injection of fentanyl to establish OIH model. The dose of fentanyl was 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 4 times, with an interval of 15 min. Group C was subcutaneously injected with saline of equal volume. After 6.5 h, rats in the group OIH+DMSO were injected with 10% DMSO 0.5 μl in the CeLC. Rats in the group C and group OIH+MTEP were injected with MTEP 15 μg in the CeLC. The changes of mechanical withdrawal threshold (WMT) and thermal withdrawal latency (TWL) were tested pre-OIH (T_0), post-OIH (T_1), and post-drug (T_2). Experiment 2: another 10 rats were randomly divided into 2 groups: the normal group (group N) and the hyperalgesia group (group OIH). Group OIH was injected with fentanyl to make OIH model, and group N was injected

DOI:10.12089/jca.2020.07.015

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

with normal saline of equal volume. The amplitude of evoked excitatory postsynaptic currents (eEPSCs) of the basolateral amygdala (BLA) - CeLC neural pathway before and after administration of MTEP was recorded by using double electrode patch clamp technique. **Results** Experiment 1: Compared with T_0 , WMT and TWL of rats in group OIH+DMSO and group OIH+MTEP were significantly decreased and shortened at T_1 . Compared with T_1 , WMT was significantly increased and TWL was significantly prolonged in rats of group OIH+MTEP at T_2 . Compared with group OIH + DMSO, WMT was significantly increased and TWL was significantly prolonged in group OIH+MTEP at T_2 ($P < 0.05$). There was no significant difference in WMT and TWL between group OIH + MTEP and group C at T_2 . Experiment 2: Compared with the group OIH pre-MTEP, the amplitude of eEPSCs in the group OIH was significantly decreased post-MTEP. There was no significant difference in eEPSCs amplitude between group N pre-MTEP and group N post-MTEP. The amplitude of eEPSCs in group OIH pre-MTEP was significantly higher than group N pre-MTEP ($P < 0.05$). **Conclusion** Activation of mGluR5 in the CeLC may be involved in the regulation of fentanyl-induced hyperalgesia by enhancing excitatory synaptic transmission in the BLA-CeLC neural pathway.

【Key words】 Hyperalgesia; Metabotropic glutamate receptor 5; Amygdala; Fentanyl; Neural pathway

阿片类药物是麻醉和中重度疼痛治疗的一线药物^[1-2]。近年来,阿片诱导的痛觉过敏(opioid-induced hyperalgesia, OIH)引起了临床和研究者的关注。基底外侧杏仁核(basolateral amygdala, BLA)与杏仁核中央核外侧包膜区(the laterocapsular division of central amygdala, CeLC)作为组成杏仁核的两个重要核团,其间的兴奋性突触传递增强可能是引起 OIH 的机制之一。因此,本研究拟通过记录刺激 BLA 时 CeLC 的兴奋性突触后电流(evoked excitatory postsynaptic currents, eEPSCs)的变化,并观察代谢型谷氨酸受体 5 (metabotropic glutamate receptor 5, mGluR5)是否通过此机制调控 OIH 大鼠的痛敏行为,从而为 OIH 的治疗提供方法和依据。

材料与方法

实验动物与分组 SD 雄性大鼠 28 只,体重 60 ~ 100 g。所有的动物均自由摄食饮水,动物饲养环境为(24±1)℃,光照/暗周期为 12 h(早 7:00—晚 7:00)。大鼠由华中科技大学同济医学院动物中心提供,动物实验经批准(TJ-A20171208)。采用随机数字表法将实验一大鼠分为对照组(C组)、痛觉过敏+DMSO组(OIH+DMSO组)和痛觉过敏+mGluR5 选择性拮抗剂组(OIH+MTEP组),将实验二大鼠分为正常组(N组)和痛觉过敏组(OIH组)。

实验方法 实验一向 C 组、OIH+DMSO 组和 OIH+MTEP 组大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛 3 ml/kg 将大鼠麻醉。随后,大鼠头部被固定于立体定位仪上,暴露颅骨的前囟中点后,在右侧 CeLC(坐标:中线旁开 4.2 mm,前囟中点 2.0 mm,深度 7.5 mm^[3])置入导管并用骨水泥固定,随后缝合切口,恢复 1 周后两组大鼠皮下注射芬太尼(批号:1161208),每次注射 60 μg/kg,4 次,每次间隔 15 min,总剂量为 240

μg/kg,建立 OIH 模型^[4-5]。在最后芬太尼注射后 6.5 h 向 C 组微量注射 0.5 μl 二甲亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO),向 C 组和 OIH+MTEP 组微量注射 15 μg MTEP, MTEP 临用前溶于 10% 的 DMSO 中。向 OIH+DMSO 组微量注射 0.5 μl DMSO。将 0.5 μl DMSO 和 MTEP 泵入导管内(0.25 μl/min)弥散至 CeLC 区。在造模前(T_0)、最后一次注射芬太尼后 6 h(T_1)和最后一次注射芬太尼后 6.5 h 给药,给药后 0.5 h(T_2)分别测定大鼠的机械缩足阈值(mechanical withdrawal threshold, WMT)和热缩足潜伏期(thermal withdrawal latency, TWL)。实验二 OIH 组大鼠注射芬太尼制作 OIH 模型, N 组大鼠接受皮下注射等容量生理盐水。随后将大鼠右脑制成 300 μm 厚的脑片并记录两组大鼠 CeLC 神经元在 MTEP(1 μM)给药前后的 eEPSCs 的幅值。

行为学测定 WMT 测定:根据“up-and-down 法”,采用 Von Frey 纤维丝(0.07~15 g)测定。将大鼠放入一个透明的底部为网格状的塑料箱中,适应 30 min,开始用 1.0 g VonFrey 纤维丝垂直刺激大鼠左后足底,力度以 Von Frey 丝轻度弯曲为准,若在规定时间内(最长 10 s,防止对大鼠足底损伤)内大鼠出现缩足反应或无反应,则更换相邻上级或下级纤维丝继续测试。TWL 测定:将大鼠放入塑料单元格箱中的透明玻璃板上,适应 30 min 后用合适的光强度垂直照射大鼠左后足掌面,观察大鼠出现明显的缩足或舔舐行为时停止照射,共测量 3 次,测量间隔时间为 5 min,计算 3 次测量时间的平均值即为 TWL。记录实验一 C 组、OIH+DMSO 组和 OIH+MTEP 组大鼠在 T_0 — T_2 的 WMT 和 TWL。

脑片制备和全细胞膜片钳记录 在 4℃ 解剖液中,用振动切片机将 N 组和 OIH 组的右侧脑组织切成 300 μm 的脑片。随后,将包含 CeLC 的脑片在

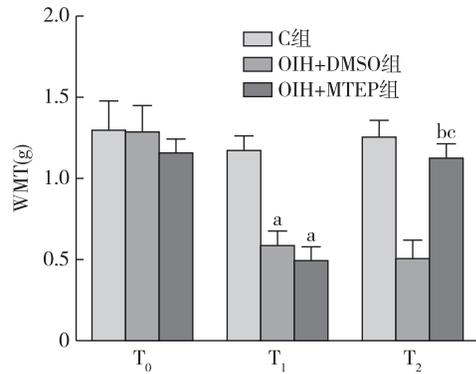
25 °C 的人工脑脊液中孵育 1 h。解剖液组成为 (mmol/L): 213 蔗糖, 10 葡萄糖, 5 MgCl₂, 1 NaH₂PO₄, 0.5 CaCl₂, 3 KCl 和 26 NaHCO₃。人工脑脊液由以下成分组成 (mmol/L): 10 葡萄糖, 125 NaCl, 2.6 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 1.2 NaH₂PO₄, 1.3 MgCl₂, 和 5 KCl。玻璃微电极的阻抗为 4~6 MΩ, 其内含有 1/3 电极内液, 电极内液组成为 (mmol/L): 145 KCl, 5 NaCl, 10 HEPES, 4 Mg-ATP, 5 EGTA 和 0.3 Na₃-GTP。施加适量正压后, 靠近状态良好的神经元, 释放正压, 封接电阻到 GΩ 以上后, 施加负压破膜, 破膜后行快、慢电容补偿, whole-cell 状态下记录。钳制电压设定为 -70 mV, 通过刺激电极 (CBAEB75, FHC) 在 BLA 区输入 0.1~1.0mA 的电流, 每次增加 0.1mA, 随后使用记录电极在 CeLC 区记录 N 组和 OIH 组大鼠在使用 MTEP 前和使用 MTEP 后 BLA-CeLC 通路 eEPSCs 的幅值。使用软件 Patchmaster v2x 73.2, 红外线微分干涉相差显微镜, 滤波器 dual 4-pole Bessel, 降噪器 Digidata 1322 interface, 膜片钳放大器 HEKAEPIC-10 和 pCLAMP10 来进行数据的采集与分析。

统计分析 采用 GraphPad Prism 5.0 软件对数据进行统计与分析。正态分布计量资料以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 组间比较采用双因素方差分析, 组内不同时间比较采用重复测量方差分析, 随后使用 Bonferroni 法进行两样本间的 post-hoc 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

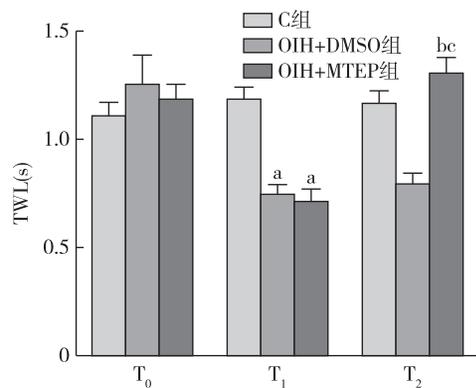
实验一 与 T₀ 时比较, T₁ 时 OIH+DMSO 组和 OIH+MTEP 组 WMT 明显降低 (P < 0.05)、TWL 明显缩短 (P < 0.05); 与 T₁ 时比较, T₂ 时 OIH+MTEP 组 WMT 明显升高 (P < 0.05)、TWL 明显延长 (P < 0.05)。T₁ 和 T₂ 时 OIH+DMSO 组 WMT 和 TWL 差异无统计学意义。T₂ 时 OIH+MTEP 组 WMT 明显高于 OIH+DMSO 组 (P < 0.05)、TWL 明显长于 OIH+DMSO 组 (P < 0.05), T₂ 时 OIH+MTEP 组和 C 组 WMT 及 TWL 差异无统计学意义 (图 1—2)。

实验二 与 OIH 组使用 MTEP 前比较, OIH 组使用 MTEP 后 eEPSCs 幅值明显降低 (P < 0.05)。N 组使用 MTEP 前和使用 MTEP 后 eEPSCs 幅值差异无统计学意义。OIH 组使用 MTEP 前 eEPSCs 幅值明显高于 N 组使用 MTEP 前 (P < 0.05) (图 3—4)。



注:与 T₀ 比较, ^aP < 0.05; 与 T₁ 比较, ^bP < 0.05; 与 OIH+DMSO 组比较, ^cP < 0.05

图 1 三组大鼠不同时点 WMT 的比较



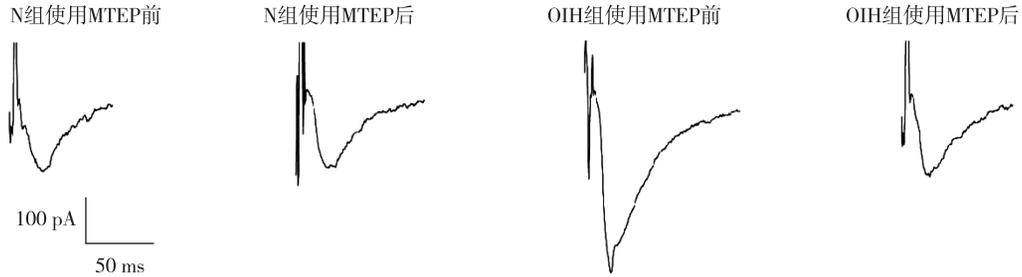
注:与 T₀ 比较, ^aP < 0.05; 与 T₁ 比较, ^bP < 0.05; 与 OIH+DMSO 组比较, ^cP < 0.05

图 2 三组大鼠不同时点 TWL 的比较

讨 论

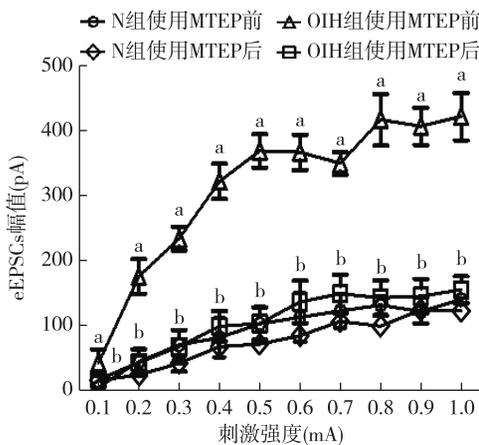
本研究首次报道了 mGluR5 拮抗剂对芬太尼诱导的痛觉过敏的镇痛作用, 并利用双电极全细胞电压膜片钳技术研究了大鼠伤害性杏仁核调控 OIH 的突触传递机制。在体内, 杏仁核注射 mGluR5 拮抗剂 MTEP 可完全逆转大鼠痛觉过敏行为。在体外, MTEP 可以恢复 OIH 大鼠 BLA-CeLC 神经通路增强的兴奋性突触传递。

mGluR5 作为代谢型谷氨酸受体 I 组的一个亚型, 它可参与杏仁核层面的多种疼痛如内脏痛、神经病理性疼痛及关节炎性痛等的调控^[6-8]。Kiritoshi^[9] 等发现, 阻断右侧杏仁核 mGluR5 的活化可以减轻福尔马林诱发的机械痛。在本研究中, 通过向 CeLC 微量注射 mGluR5 的选择性抑制剂 MTEP 15 μg, 发现 OIH 大鼠机械痛阈和热痛阈的下降均被恢复至正常水平。本实验结果显示, 抑制



注:与 T₀比较,^aP<0.05;与 T₁比较,^bP<0.05;与 OIH+DMSO 组比较,^cP<0.05

图 3 两组大鼠钳制电位在 -70 mV 时 eEPSCs 的典型记录



注:与 N 组使用 MTEP 前比较,^aP<0.05;与 OIH 组使用 MTEP 前比较,^bP<0.05

图 4 两组大鼠使用 MTEP 前和使用 MTEP 后 eEPSCs 幅值的变化

CeLC 中 mGluR5 的激活可以同时减轻芬太尼引起的机械痛觉过敏和热痛觉过敏。

BLA 作为杏仁核的一个重要组成部位,不只接受脊髓及脑干的伤害性信息的传入,它还接受经丘脑和皮层加工后的多模式(包括伤害性)信息的传入^[10-11]。BLA 负责与高位中枢的双向联络,同时将高位中枢的信息传递至杏仁核最主要的下行输出通路 CeLC。因此,BLA-CeLC 的突触传递可以部分反映从中枢向下行方向的调节。所以这种 BLA-CeLC 的兴奋性突触传递增强很有可能是 OIH 时 CeLC 突触可塑性增强的机制。CeLC 可参与多种疼痛的调制,因此被称为“伤害性杏仁核”。笔者前期研究发现 CeLC 神经元微小兴奋性突触后电流频率和幅值增加,提示 CeLC 神经元突触可塑性增强可能是调控 OIH 的关键机制^[12-13]。研究表明^[14]微小兴奋性突触后电流的频率可反映突触前膜神经递质释放的概率,而幅值则反映作用于突触后膜受体

的变化。MTEP 使幅值和频率的增加恢复至正常水平提示 mGluR5 可能通过增加突触前膜递质释放概率和突触后膜受体的表达从而导致 CeLC 神经元突触可塑性增强。在这些研究的基础上,研究进一步测定了从 BLA 到 CeLC 的兴奋性突触传递以探明杏仁核调控 OIH 的内部核团间的神经通路及中枢敏化机制。结果显示,OIH 时 BLA 传至 CeLC 的 eEPSCs 幅值增强,MTEP 可以逆转这一变化。因此,我们推断 OIH 时来自皮层高级中枢的疼痛信号可能通过增强 BLA-CeLC 通路的兴奋性突触传递,进而增强 CeLC 神经元的突触可塑性而形成中枢敏化,然后再进一步形成下行易化通路(CeLC-导水管周围灰质-延髓腹外侧核-脊髓^[3]),最终参与 OIH 的形成和维持。值得注意的是,MTEP 可逆转此变化提示了 mGluR5 的激活可参与增强 BLA-CeLC 通路的兴奋性突触传递,即 mGluR5 在 OIH 的调制中起着关键作用。

综上所述,CeLC 中 mGluR5 在芬太尼诱导的大鼠痛觉过敏中起重要作用。抑制 mGluR5 的激活后可以削弱 BLA-CeLC 神经通路的兴奋性传递,减轻芬太尼诱导的痛觉过敏症状,为 OIH 的治疗及临床疼痛治疗提供了科学依据和方法。

参 考 文 献

[1] Mauermann E, Filitz J, Dolder P, et al. Does fentanyl lead to opioid-induced hyperalgesia in healthy volunteers? A double-blind, randomized, crossover trial. *Anesthesiology*, 2016, 124(2): 453-463.

[2] Roeckel LA, Utard V, Reiss D, et al. Morphine-induced hyperalgesia involves mu opioid receptors and the metabolite morphine-3-glucuronide. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10406.

[3] Kang YJ, Vincler M, Li X, et al. Intrathecal ketorolac reverses hypersensitivity following acute fentanyl exposure. *Anesthesiology*, 2002, 97(6): 1641-1644.

[4] Li Z, Yin P, Chen J, et al. CaMKII α may modulate fentanyl-in-

- duced hyperalgesia via a CeLC-PAG-RVM-spinal cord descending facilitative pain pathway in rats. PLoS One, 2017, 12(5): e0177412.
- [5] Li Z, Yin P, Chen J, et al. Activation of the extracellular signal-regulated kinase in the amygdala modulates fentanyl-induced hypersensitivity in rats. J Pain, 2017, 18(2): 188-199.
- [6] Sadler KE, Gartland NM, Cavanaugh JE, et al. Central amygdala activation of extracellular signal-regulated kinase 1 and age-dependent changes in inflammatory pain sensitivity in mice. Neurobiol Aging, 2017, 56: 100-107.
- [7] Crock LW, Kolber BJ, Morgan CD, et al. Central amygdala metabotropic glutamate receptor 5 in the modulation of visceral pain. J Neurosci, 2012, 32(41): 14217-14226.
- [8] Ji G, Neugebauer V. CB1 augments mGluR5 function in medial prefrontal cortical neurons to inhibit amygdala hyperactivity in an arthritis pain model. Eur J Neurosci, 2014, 39(3): 455-466.
- [9] Kiritoshi T, Ji G, Neugebauer V. Rescue of impaired mGluR5-driven endocannabinoid signaling restores prefrontal cortical output to inhibit pain in arthritic rats. J Neurosci, 2016, 36(3): 837-850.
- [10] Seno M, Assis DV, Gouveia F, et al. The critical role of amygdala subnuclei in nociceptive and depressive-like behaviors in peripheral neuropathy. Sci Rep, 2018, 8(1): 13608.
- [11] Zhang Z, Gadotti VM, Chen L, et al. role of prelimbic GABAergic circuits in sensory and emotional aspects of neuropathic pain. Cell Rep, 2015, 12(5): 752-759.
- [12] 张泽茹, 罗放. 伤害性杏仁核中 mGluR5 在芬太尼诱导的大鼠痛觉过敏中的作用. 中南大学学报(医学版), 2019, 44(4): 364-369.
- [13] 罗放, 尹平平, 李珍. 杏仁核注射 U0126 对芬太尼诱发大鼠痛觉过敏的镇痛效应. 临床麻醉学杂志, 2016, 32(8): 794-797.
- [14] Ren W, Palazzo E, Maione S, et al. Differential effects of mGluR7 and mGluR8 activation on pain-related synaptic activity in the amygdala. Neuropharmacology, 2011, 61(8): 1334-1344.

(收稿日期:2019-05-28)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《临床麻醉学杂志》中英文摘要撰写规范

论著文章须有中、英文摘要,内容必须包括目的(Objective)、方法(Methods)、结果(Results)和结论(Conclusion)四个部分,目的主要是回答为什么进行此项研究,说明提出问题的理由,表明研究的范围和重要性。方法中应简要说明研究课题的基本设计,所用的原理,条件,对象,材料,设备,如何分组对照,研究范围精确度,观察的指标等。结果部分应写出本研究的主要数据,被确定的关系,观察结果,得到的效果,有何新发现。结论是结果内容的升华,是由结果推论而出,是结果的分析,研究的比较,评价,应用,假设,启发,建议及预测等。摘要应具有独立性,即不阅读全文就能获得必要的信息,采用第三人称撰写,不用“本文”、“作者”等主语,不加评论和解释,摘要中首次出现的缩略语、代号等,非公认公知者,须注明全称。考虑篇幅的限制,中文摘要可简略些,一般 300~500 字,英文摘要与中文摘要原则上相对应,考虑到国外读者的需要,可更详细,一般 500 个实词左右。英文摘要尚应包括文题(仅第一个字母大写)、所有作者姓名(姓在前,名在后;姓全大写,名字仅首字母大写)、第一作者单位名称和科室、所在城市名、邮政编码及国名。