



第二军医大学学报

Academic Journal of Second Military Medical University

ISSN 0258-879X, CN 31-1001/R

《第二军医大学学报》网络首发论文

题目：大麻素受体 2 通过抑制脊髓小胶质细胞活化减轻神经病理性疼痛的痛觉过敏
作者：孔二亮, 吴飞翔, 拜云虎, 张杨, 钟成跃, 凤旭东
收稿日期：2019-11-30
网络首发日期：2020-04-27
引用格式：孔二亮, 吴飞翔, 拜云虎, 张杨, 钟成跃, 凤旭东. 大麻素受体 2 通过抑制脊髓小胶质细胞活化减轻神经病理性疼痛的痛觉过敏. 第二军医大学学报.
<http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1001.R.20200427.1304.010.html>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

大麻素受体 2 通过抑制脊髓小胶质细胞活化减轻神经病理性疼痛的痛觉过敏

孔二亮¹, 吴飞翔², 拜云虎³, 张 杨¹, 钟成跃¹, 凤旭东¹✉

1. 中国人民解放军联勤保障部队第九八八医院麻醉科, 郑州 450042

2. 海军军医大学(第二军医大学)东方肝胆外科医院麻醉科, 上海 200438

3. 中国人民解放军联勤保障部队第九八八医院普通外科, 郑州 450042

✉通信作者 凤旭东, Tel: 0371-81653400, E-mail: xdfeng153@163.com

摘要 目的 探讨脊髓大麻素受体 2 (CB₂R) 与小胶质细胞活化对神经病理性疼痛小鼠痛觉过敏的影响。方法 采用脊神经结扎 (SNL) 方法建立神经病理性疼痛模型, 60 只健康雄性 C57/BL 小鼠随机分为 6 组: 假手术组、SNL 组、SNL+CB₂R 激动剂 (AM1241) 组、SNL+小胶质细胞抑制剂 (米诺环素) 组、SNL+CB₂R 小干扰 RNA (siRNA) 组 (SNL+siRNA 组)、SNL+CB₂R 小干扰 RNA+小胶质细胞抑制剂组 (SNL+siRNA+米诺环素组), 每组 10 只。采用蛋白质印迹法检测小鼠脊髓组织中 CB₂R 和小胶质细胞活化特异蛋白钙离子结合调节因子 1 (IBA-1) 的蛋白表达, Von Frey 纤维丝测定小鼠机械性痛阈, 免疫荧光观察脊髓背角 IBA-1 荧光定量表达, qRT-PCR 测定小鼠脊髓透析液中炎症因子释放水平, 电生理技术观察 CB₂R 激动剂对脊髓背角抑制性突触后电流 (sIPSC) 的影响。结果 与假手术组相比, SNL 组小鼠脊髓组织中 CB₂R 表达减少 (P<0.008 3), 痛阈降低 (P<0.008 3), IBA-1 荧光定量和蛋白表达均增高 (P 均<0.008 3), 炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 表达均增加 (P 均<0.008 3)。鞘内注射 CB₂R 激动剂 AM1241 或小胶质细胞抑制剂米诺环素后, 与 SNL 组相比, SNL+AM1241、SNL+米诺环素组小鼠的痛阈均升高 (P 均<0.008 3), IBA-1 荧光定量和蛋白表达均降低 (P 均<0.008 3), TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 表达均减少 (P 均<0.008 3)。siRNA 干扰 CB₂R 表达后, 与 SNL 组相比, SNL+siRNA 组小鼠的痛阈降低 (P<0.008 3), IBA-1 荧光定量和蛋白表达均增加 (P 均<0.008 3), TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 表达均增加 (P 均<0.008 3), 而鞘内注射米诺环素逆转了 siRNA 干扰 CB₂R 表达导致的上述变化 (P 均<0.008 3)。鞘内注射 AM1241 能够增强小鼠脊髓背角 sIPSC 的频率和振幅, 与注射前相比差异均有统计学意义 (P 均<0.008 3), 而米诺环素持续灌流抑制了 AM1241 对 sIPSC 的增强效应。结论 CB₂R 通过抑制脊髓小胶质细胞活化减轻神经炎症反应、增强抑制性电活动, 减轻神经病理性疼痛的痛觉过敏。

关键词 大麻素受体 2; 小胶质细胞; 神经病理性疼痛; 炎症反应; 脊髓

中图分类号 R441.1

Cannabinoid receptor 2 alleviates hyperalgesia in neuropathic pain by inhibiting spinal microglia activation

KONG Er-liang¹, WU Fei-xiang², BAI Yun-hu³, ZHANG Yang¹, ZHONG Cheng-yue¹, FENG Xu-dong¹✉

(1. Department of Anesthesiology, the No. 988 Hospital of Joint Logistic Support Force of PLA, Zhengzhou 450042, China;

2. Department of Anesthesiology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200438, China;

收稿日期: 2019-11-30

基金项目: 国家自然科学基金 (81671082)

作者简介: 孔二亮, 硕士, 主治医师. E-mail: kel1992@126.com

Fund: Supported by National Natural Science Foundation of China (81671082)

网络首发时间: 2020-04-27 13:27:30 网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1001.R.20200427.1304.010.html>

3. Department of Hepatobiliary Surgery, the No. 988 Hospital of Joint Logistic Support Force of PLA, Zhengzhou 450042, China)

Abstract Objective To investigate the effects of spinal cannabinoid receptor 2 (CB₂R) and microglia activation on hyperalgesia in neuropathic pain mice. Methods Neuropathic pain model was established by spinal nerve ligation (SNL), and sixty C57/BL mice were randomly divided into six groups: sham, SNL, SNL+CB₂R agonist AM1241 (SNL+AM1241), SNL+microglia inhibitor minocycline (SNL+minocycline), SNL+CB₂R small interfering RNA (SNL+siRNA), SNL+siRNA+minocycline groups. The expression of spinal CB₂R and microglia-specific protein ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA-1) were determined by Western blot, mechanical pain thresholds were measured by Von Frey, spinal microglia activation was observed by IBA-1 immunofluorescence, and the releases of inflammatory factors in spinal cord were determined by qRT-PCR. Electrophysiology was applied to observe the effect of CB₂R agonist on spontaneous inhibitory postsynaptic currents (sIPSC) in spinal dorsal horn. Results Compared with sham group, SNL mice acquired significantly decreased CB₂R expression, decreased pain thresholds, enhanced microglia activation and increased mRNA expression of inflammatory factors TNF- α , IL-1 β , IL-6 (all $P < 0.05$). After intrathecal injection of CB₂R agonist AM1241 or microglial inhibitor minocycline, SNL+AM1241 and SNL+minocycline groups acquired increased pain thresholds, weakened microglia activation and decreased mRNA expression of inflammatory factors TNF- α , IL-1 β , IL-6 compared with SNL group (all $P < 0.05$). Through interfering CB₂R expression by siRNA, SNL+siRNA group got significantly decreased pain threshold, enhanced microglia activation and increased mRNA expression of inflammatory factors TNF- α , IL-1 β , IL-6 compared with SNL group (all $P < 0.05$), while minocycline intrathecally reversed these changes. Electrophysiological results showed that AM1241 significantly enhanced the frequency and amplitude of sIPSC in spinal dorsal horn, while minocycline perfusion inhibited the effects of AM1241 (all $P < 0.05$). Conclusion CB₂R reduces neuroinflammatory responses and enhances inhibitory electrical activity in spinal cord by inhibiting spinal microglia activation, thereby alleviating hyperalgesia in neuropathic pain.

Key words Cannabinoid receptor 2; microglia; neuropathic pain; inflammatory response; spinal cord

神经病理性疼痛是由中枢或周围神经损伤诱发免疫炎症反应、激活细胞内信号转导通路导致痛觉过敏而引起的慢性疼痛,其严重影响患者生活质量。炎症反应、感染、肿瘤等因素造成的痛觉传导系统易化和抑制失衡在神经病理性疼痛的进展中发挥重要作用^[1],但目前尚无有效治疗方法。脊髓背角作为疼痛信号传递中继站,通过整合不同传入神经元的疼痛信息调控痛觉行为。小胶质细胞广泛存在于脊髓背角,其激活介导炎性因子、白血病抑制因子、生长因子等释放可改变神经元突触的结构和功能^[2]。大麻素受体2(cannabinoid receptor 2, CB₂R)主要表达于外周免疫细胞,参与免疫调节、抑制炎症反应和细胞迁移等生理过程,研究证实CB₂R在脊髓小胶质细胞中存在较多表达,介导内源性大麻类物质的生理功能,且CB₂R激动剂能够显著减轻吗啡戒断反应、炎性疼痛等痛觉过敏,但其机制尚不清楚^[3]。本研究通过脊神经结扎(spinal nerve ligation, SNL)技术建立神经病理性疼痛小鼠模型,用小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)高效抑制CB₂R表达,探讨脊髓内CB₂R表达和小胶质细胞对神经病理性疼痛的影响及作用机制,为临床缓解神经病理性疼痛提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物与试剂

健康雄性 C57/BL 小鼠(20~30 g) 60 只,购自海军军医大学(第二军医大学)实验动物中心[动物生产许可证号:SCXK(沪)2018-0006],恒温、恒湿条件下饲养。采用 SNL 方法建立神经病理性疼痛模型, CB₂R 选择性激动剂 AM1241(50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 美国 Sigma 公司)、小胶质细胞抑制剂米诺环素(minocycline, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 美国 Sigma 公司)均溶解于生理盐水后鞘内注射 10 μL 给药。蛋白质印迹法使用兔抗 CB₂R 一抗(稀释比例为 1:500)、兔抗钙离子结合调节因子 1(ionized calcium-binding adapter molecule 1, IBA-1)一抗(稀释比例为 1:1 000)均购自英国 Abcam 公司,兔抗 GAPDH 一抗(稀释比例为 1:5 000)、抗兔二抗(稀释比例为 1:5 000)均购自美国 CST 公司。免疫荧光使用兔抗 IBA-1 一抗(稀释比例为 1:500)购自日本 Wako 公司,山羊抗兔 IgG 荧光二抗(稀释比例为 1:1 000)购自美国 Invitrogen 公司。将 60 只小鼠随机分为假手术(sham)、SNL、SNL+AM1241、SNL+米诺环素、SNL+siRNA、SNL+siRNA+米诺环素组,每组 10 只。

1.2 鞘内置管

小鼠麻醉后腰中线备皮消毒,切开长 1~2 cm 小口,剪开筋膜,在 L₃ 棘突斜向 L₄ 方向向下剪开

肌肉，剪除部分 L₄ 棘突，暴露 L₃~L₄ 的三角间隙，用 5 mL 注射器针头刺破硬脊膜，夹取 PE-10 导管向尾端插入，插入时可见甩尾反射，置入约 1 cm 后见脑脊液流出即封闭管口。依次缝合切口，妥善固定导管于肌肉和皮肤，腹腔注射 0.3 mL 氨苄青霉素（100 g/L）预防感染，术后小鼠单笼饲养。

1.3 神经病理性疼痛小鼠模型的建立

将鞘内置管成功的小鼠麻醉，取俯卧位。沿中线切开皮肤，暴露 L₅~L₆ 椎体，用咬骨钳咬断左侧 L₅ 横突，6-0 丝线结扎 L₅ 脊神经，然后依次缝合肌肉与皮肤。腹腔注射 0.3 mL 氨苄青霉素（100 g/L）预防感染。假手术组小鼠仅暴露脊神经而不结扎，其余手术操作与 SNL 操作相同。

1.4 机械性痛阈测定

分别于 SNL 术前及术后 1、7、14 d 测定小鼠机械性痛阈。测定前将小鼠置于茶色、底部为金属网的丙烯酸树脂笼中，适应 1 h 后，用 Von Frey 纤维丝（美国 North Coast Medical 公司）刺激小鼠左后足五趾间柔软部位，缓慢加力，出现缩足反应后即停止接触，此时记为阳性。每两次刺激至少间隔 5 min，每个强度刺激 3 次取平均值，采用 up-down 法分析机械痛阈。为避免造成小鼠足底机械性损伤，实验中采用的 Von Frey 纤维丝最大值为 10 g，刺激时间为 5 s^[4]。

1.5 慢病毒携带 siRNA 靶向干扰 CB₂R 表达模型的建立

通过合成靶向调控小鼠 CB₂R 表达的 siRNA 序列并将其克隆至慢病毒载体 pLVX-shRNA2（美国 Clontech 公司），并将重组 pLVX-shRNA2 载体与 Lenti-XTM HTX 系统（美国 Clontech 公司）共同转染到 293T 细胞，形成慢病毒复合体。转染 48 h 后收获慢病毒复合体并通过鞘内注射至脊髓干扰 CB₂R 基因表达，并通过蛋白质印迹法验证干扰效果^[5]。

1.6 蛋白质印迹法检测蛋白表达

小鼠麻醉后迅速取出 L₄~L₅ 段脊髓组织，加入 200 μ l 裂解液超声匀浆，然后低温高速离心 15 min 取上清。用 BCA 法测定总蛋白浓度，并在 99 $^{\circ}$ C 条件下变性 10 min。取 30 μ g 蛋白样本进行 10% SDS-PAGE，采用湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜，经 5% 脱脂奶粉溶液封闭 2 h。分别加入兔抗 CB₂R、兔抗 IBA-1、兔抗 GAPDH 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次后，加入抗兔二抗室温孵育 2 h，进行化学发光显影。采用 Photoshop 软件测量条带的灰度值，目的蛋白的相对表达量为目的条带灰度值/GAPDH 灰度值。

1.7 免疫荧光

小鼠麻醉后依次用 0.1 mol/L PBS 和 4% 多聚甲醛溶液灌流。取 L₄~L₅ 段脊髓并用 4% 多聚甲醛溶液后固定，随后移入 30% 蔗糖溶液脱水。用冷冻切片机（德国 Leica 公司）20 μ m 切片，用 5% 山羊血清室温封闭 2 h，4 $^{\circ}$ C 条件下加入兔抗 IBA-1 孵育过夜，PBS 洗 3 次，加入山羊抗兔 IgG 荧光二抗孵育 2 h，用荧光显微镜观察并拍照。

1.8 qRT-PCR 检测炎症因子 mRNA 表达

小鼠麻醉后置于立体定位仪，于腰部中间皮肤切口，摘除椎板暴露部分脊髓，插入透析针，保持透析管同脊髓在同一平面并固定。打开微透析泵并填充透析液，平衡 2 h 后收集透析液，采用 Trizol 法提取脊髓透析液中总 RNA，分光光度计测量 RNA 浓度和纯度。37 $^{\circ}$ C 15 min、85 $^{\circ}$ C 15 s、4 $^{\circ}$ C 10 min 条件下反转录获得 cDNA，然后以 cDNA 为模板、以 GAPDH 为内参照进行扩增，引物序列见表 1，反应条件：95 $^{\circ}$ C 15 min，95 $^{\circ}$ C 15 s、60 $^{\circ}$ C 15 s、72 $^{\circ}$ C 40 s 循环 40 次。计算每个样本的 CT 值并比较相对表达量。

表1 实时定量聚合酶链反应引物序列

Tab 1 Primer sequences of quantitative real-time polymerase chain reaction

Gene	Primer sequence (5' -3')
<i>TNF-α</i>	Forward: CCC GGA ATG TCG ATG CCT GAG TG Reverse: CGC CCC GGC CTT CCA AAT AAA T
<i>IL-1β</i>	Forward: CTT CAT GAG TCA GCT TTG CAC CAG C Reverse: AGC TGA GAA AGC AGG CGG TAA GAA A
<i>IL-6</i>	Forward: TCT CGA GCC CAC CAG GAA CGA Reverse: AGGGAAGGCAGTGGCTGTCA
<i>GAPDH</i>	Forward: CCA CTC CTC CAC CTT TGA CG Reverse: TAG CCA AAT TCG TTG TCA TAC CAG G

TNF- α : Tumor necrosis factor α ; IL-1 β : Interleukin 1 β ; IL-6: Interleukin 6; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

1.9 电生理检测

小鼠麻醉后, 取 L₄~L₅ 段脊髓置于预冷人工脑脊液 (artificial cerebrospinal fluid, ACSF)。ACSF 组成: NaCl 117 mmol/L、KCl 3.6 mmol/L、CaCl₂ 2.5 mmol/L、MgCl₂ 1.2 mmol/L、NaH₂PO₄ 1.2 mmol/L、NaHCO₃ 25 mmol/L、葡萄糖 11 mmol/L, 用 95% O₂、5% CO₂ 混合气体将 ACSF 充分饱和。显微镜下清除软脊膜和神经根, 用振动切片机 400 μ m 切片, 转移至 Gibb 槽中 33 $^{\circ}$ C 恒温孵育 1 h。然后将脊髓片转移到 ACSF 持续灌注的记录玻片上, 用透明相差显微镜下找出半透明胶状质神经元, 随后将含有电极内液的电极移至细胞表面负压吸破细胞膜。电极内液组成: Cs₂SO₄ 110 mmol/L、CaCl₂ 0.5 mmol/L、MgCl₂ 2 mmol/L、乙二醇二乙醚二胺四乙酸 5 mmol/L、4-羟乙基哌嗪乙磺酸 5 mmol/L、三乙醇胺 5 mmol/L、ATP-Mg 5 mmol/L。通过 MultiClamp 700B 放大器和 pClamp 10.4 数据采集软件在 0 mV 电位下, 以电压钳模式记录抑制性突触后电流 (spontaneous inhibitory postsynaptic current, sIPSC)。首先记录 AM1241 灌流前后的 sIPSC 变化, 然后在米诺环素持续灌流条件下记录 AM1241 灌流前后的 sIPSC 变化^[6]。

1.10 统计学处理

应用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 事后两两比较采用 Bonferroni-t 检验 (检验水准 α' 为 0.008 3), 不同组别和时间点痛阈的比较采用多因素重复方差分析, 鞘内注射 CB₂R 激动剂 AM1241 前后 sIPSC 频率和振幅的比较采用配对 t 检验。电生理结果用 pClamp 10.4 软件进行分析, 电流频率和振幅在 AM1241 灌流前后比较采用配对 t 检验。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 SNL 小鼠脊髓组织中 CB₂R 表达变化

SNL 组小鼠脊髓组织中 CB₂R 表达低于假手术组 ($t=6.733$, $P<0.008 3$); 鞘内注射 siRNA 后, 假手术+siRNA 组小鼠脊髓组织中 CB₂R 表达低于假手术组 ($t=6.317$, $P<0.008 3$), SNL+siRNA 组 CB₂R 表达也低于 SNL 组 ($t=3.017$, $P=0.006 4$), 提示鞘内注射 siRNA 降低了脊髓组织中 CB₂R 的表达, 靶向干扰模型建立成功。见图 1。

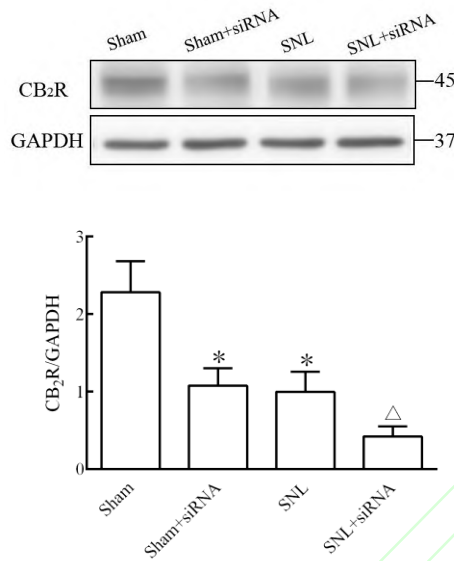


图 1 蛋白质印迹法检测小鼠脊髓组织中 CB₂R 表达变化
Fig 1 Expression of CB₂R protein in spinal cord of mice detected by Western blotting

CB₂R: Cannabinoid receptor 2; siRNA: Small interfering RNA; SNL: Spinal nerve ligation. *P<0.008 3 vs sham group, [△]P<0.008 3 vs SNL group, n=10, x±s

2.2 各组小鼠机械性痛阈改变

SNL 术后 1、7、14 d, SNL 组小鼠的痛阈均低于假手术组 ($t=6.254、7.854、7.294, P$ 均<0.008 3), 证明神经病理性疼痛的痛觉过敏模型建立成功。鞘内注射 AM1241 后 1、7、14 d, SNL+AM1241 组小鼠的痛阈与 SNL 组相比升高 ($t=6.574、7.025、6.842, P$ 均<0.008 3), 且在第 7 天时变化最明显, 因此后续实验均采用 SNL 术后 7 d 小鼠进行药物干预。与 SNL 组相比, SNL+AM1241、SNL+米诺环素组小鼠的痛阈升高 ($t=7.081、7.324, P$ 均<0.008 3), 而 SNL+siRNA 组小鼠的痛阈较 SNL 组降低 ($t=8.984, P<0.008 3$), 但鞘内注射米诺环素逆转了 SNL+siRNA 组小鼠的痛阈降低 ($t=3.208, P<0.008 3$), 提示脊髓 CB₂R 的表达水平影响神经病理性疼痛小鼠的痛觉过敏, 而抑制小胶质细胞能减轻其痛觉过敏症状。见图 2。

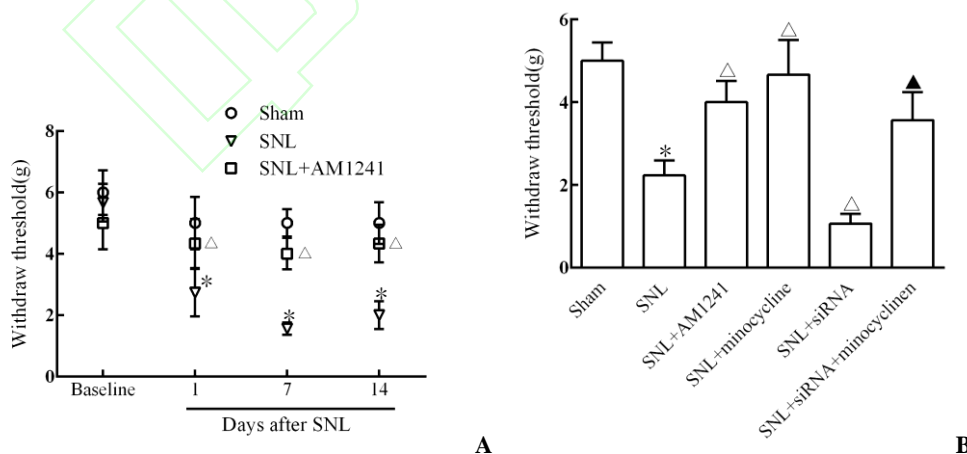


图 2 各组小鼠机械性痛阈
Fig 2 Mechanical pain thresholds of mice in each group

A: Changes of mechanical pain thresholds in different time points; B: Mechanical pain thresholds in six groups. AM1241 is a selective CB₂R agonist. Minocycline is a microglia inhibitor. CB₂R: Cannabinoid receptor 2; siRNA: Small interfering RNA; SNL: Spinal nerve ligation. *P<0.008 3 vs sham group, [△]P<0.008 3 vs SNL group, [▲]P<0.008 3 vs SNL+siRNA group. n=10, x±s

2.3 各组小鼠脊髓背角小胶质细胞活化变化

与假手术组相比, SNL 组小鼠脊髓背角组织中 IBA-1 荧光定量和蛋白表达均增高 ($t=15.00$ 、 7.76 , P 均 <0.0083); SNL+AM1241、SNL+米诺环素组小鼠脊髓背角组织中 IBA-1 荧光定量和蛋白表达与 SNL 组相比均降低 ($t=10.23$ 、 11.52 、 4.91 、 5.28 , P 均 <0.0083), 而 SNL+siRNA 组均增高 ($t=11.11$ 、 5.23 , P 均 <0.0083), 鞘内注射米诺环素逆转了 SNL+siRNA 组 IBA-1 荧光定量和蛋白表达的增加 ($t=14.73$ 、 7.95 , P 均 <0.0083), 提示小胶质细胞活化参与 SNL 痛觉过敏的产生, 而 CB₂R 激活后能抑制小胶质细胞活化。见图 3。

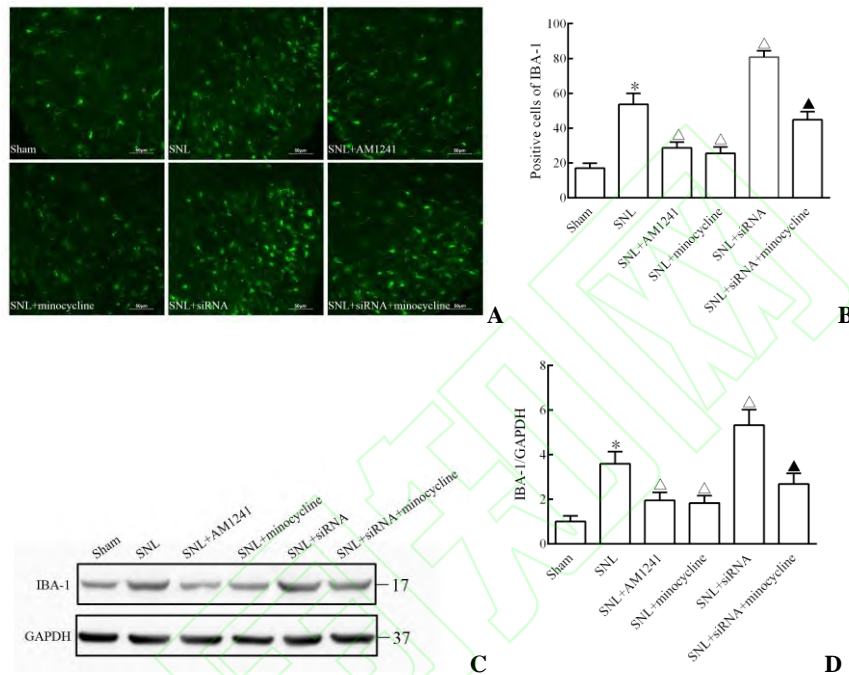


图 3 各组小鼠脊髓背角小胶质细胞活化改变

Fig 3 Changes of microglia activation in spinal cord of mice in each group

A: Immunofluorescent staining of IBA-1 in spinal dorsal horn; B: Quantitative analysis of positive cells of IBA-1 in spinal dorsal horn; C: Representative images of IBA-1 protein expression in spinal dorsal horn by Western blotting; D: Quantitative analysis of IBA-1 protein expression in spinal dorsal horn by Western blotting. AM1241 is a selective CB₂R agonist. Minocycline is a microglia inhibitor. CB₂R: Cannabinoid receptor 2; siRNA: Small interfering RNA; SNL: Spinal nerve ligation. * $P<0.0083$ vs sham group, $^{\Delta}P<0.0083$ vs SNL group, $^{\blacktriangle}P<0.0083$ vs SNL+siRNA group. $n=10$, $\bar{x} \pm s$

2.4 各组小鼠脊髓透析液中炎症因子释放

与假手术组相比, SNL 组脊髓透析液中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 表达均增加 ($t=12.22$ 、 12.49 、 9.88 , P 均 <0.0083); SNL+AM1241、SNL+米诺环素组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 表达均较 SNL 组降低 ($t=9.69$ 、 6.64 、 6.69 , 10.90 、 7.01 、 7.49 ; P 均 <0.0083), 但 SNL+siRNA 组均表达增加 ($t=7.17$ 、 5.97 、 6.36 , P 均 <0.0083), 鞘内注射米诺环素逆转了 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 表达的增加 ($t=6.85$ 、 6.73 、 10.10 , P 均 <0.0083), 提示脊髓内炎症反应参与 SNL 痛觉过敏的进展, CB₂R 激活或小胶质细胞抑制能够减轻脊髓内炎症反应。见图 4。

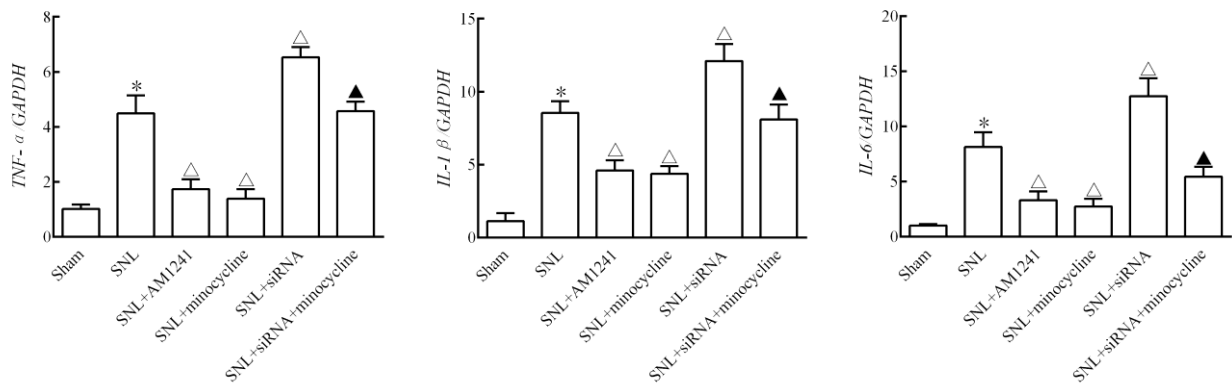


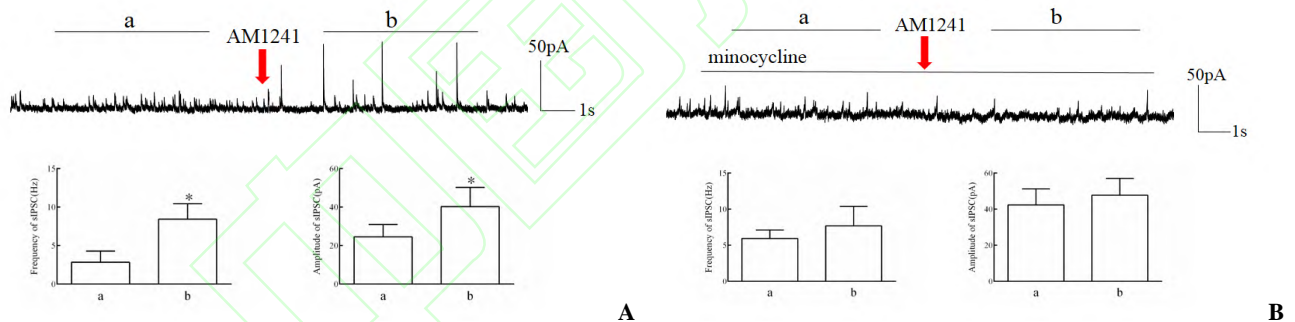
图4 qRT-PCR 检测各组小鼠脊髓透析液中炎症因子水平

Fig 4 Inflammatory factors in dialysate of spinal cord of mice in each group detected by qRT-PCR

AM1241 is a selective CB₂R agonist. Minocycline is a microglia inhibitor. qRT-PCR: Quantitative real-time polymerase chain reaction; SNL: Spinal nerve ligation; CB₂R: Cannabinoid receptor 2; siRNA: Small interfering RNA; TNF- α : Tumor necrosis factor α ; IL-1 β : Interleukin 1 β ; IL-6: Interleukin 6; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *P<0.008 3 vs sham group, Δ P<0.008 3 vs SNL group, \blacktriangle P<0.008 3 vs SNL+siRNA group. n=10, $\bar{x} \pm s$

2.5 鞘内注射 CB₂R 激动剂 AM1241 对小鼠脊髓背角 sIPSC 的影响

鞘内注射 CB₂R 激动剂 AM1241 能够增强小鼠脊髓背角 sIPSC 的频率和振幅，与注射前相比差异均有统计学意义 (t=7.396、2.741, P=0.000 7、0.040 8, 图 5A)；而在小胶质细胞抑制剂米诺环素持续灌流条件下，鞘内注射 AM1241 前后小鼠脊髓背角 sIPSC 的频率和振幅差异均无统计学意义 (t=1.313、1.172, P=0.246、0.294, 图 5B)，提示 CB₂R 通过抑制小胶质细胞活性增强脊髓抑制性电活动，从而减轻痛觉过敏。

图5 鞘内注射 CB₂R 激动剂 AM1241 对小鼠脊髓背角 sIPSC 的影响Fig 5 Effects of intrathecal injection of CB₂R agonist AM1241 on sIPSC in spinal dorsal horn of mice

AM1241 is a selective CB₂R agonist. Minocycline is a microglia inhibitor. CB₂R: Cannabinoid receptor 2; siRNA: Small interfering RNA; SNL: Spinal nerve ligation; sIPSC: Spontaneous inhibitory postsynaptic current. *P<0.05 vs a. n=10, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

神经病理性疼痛由于复杂的病因和病理生理学改变，常规镇痛药物治疗效果往往不佳。本研究结果显示，SNL 致神经病理性疼痛小鼠发生痛觉过敏，是由于脊髓 CB₂R 表达减少增强了小胶质细胞活化，进而介导神经炎症反应并减弱抑制性电活动，鞘内注射 CB₂R 激动剂 AM1241 或小胶质细胞抑制剂米诺环素可缓解其痛觉过敏症状。通过 siRNA 干扰 CB₂R 表达后，小鼠脊髓背角小胶质细胞活化增强，炎症因子释放增加，痛觉过敏症状加重，鞘内注射米诺环素能够逆转 siRNA 介导的这些变化。表明 CB₂R 通过抑制脊髓小胶质细胞活化减轻神经炎症反应、增强抑制性电活动，从而改善神经病理性疼痛的痛觉过敏。

CB₂R 在体内主要在免疫系统、周围神经系统及受损组织中表达，发挥调节免疫反应、抑制炎

症、调节能量代谢等作用^[7]。研究发现, CB₂R 在中枢神经系统亦有表达且发挥着重要作用, 分布在小胶质细胞、单核巨噬细胞和星形胶质细胞中的 CB₂R 激活可抑制炎症因子释放, 从而减弱白细胞的趋化和黏附作用, 进而减轻炎症反应^[8]。越来越多的研究证明, CB₂R 可通过调节部分与疼痛密切相关的神经活性物质及受体的功能, 间接影响中枢神经元的兴奋性, 参与神经病理性疼痛进展^[9-10]。CB₂R 属于 G 蛋白偶联受体超家族, 其激活能抑制腺苷酸环化酶的活性, 导致细胞内第二信使 cAMP 生成减少, 从而阻断依赖 cAMP 的信号通路, 延缓痛觉过敏的发展; 同时 CB₂R 能够增强细胞内 MAPK 的磷酸化水平, 引起内质网钙离子通道去极化, 导致库容性钙离子内流, 使细胞质内钙离子浓度升高, 影响细胞内信号转导, 减轻神经元突触敏化及突触重塑的发生^[11]。本研究也证明 CB₂R 激活能够抑制脊髓内炎症反应, 并增强神经元的抑制性电活动。

神经病理性疼痛与中枢神经系统疼痛信号传导的易化和抑制通路失衡有关。脊髓 I 板层可接受并传递外周伤害性刺激, 当周围神经受损伤后 γ -氨基丁酸表达被抑制, 导致其介导的抑制性突触传递作用减弱。脊髓 II 板层为胶状质层, 内含较多疼痛传递介质, TNF- α 、IL-1 β 等细胞因子能够在神经轴突内逆行或顺行运输, 增强兴奋性突触的传递并阻碍抑制性突触的传递^[12]。小胶质细胞在中枢神经系统分布广泛, 能够介导疼痛信号传导过程中的一系列变化, 其在疼痛过程中的作用已被广泛认可。中枢小胶质细胞对外界病理性损伤尤为敏感, 如感染、炎症、神经损伤等刺激都能够通过作用于小胶质细胞而改变神经元突触的结构和功能, 导致 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、白血病抑制因子、生长因子等释放对中枢产生多种效应。其中, 内源性 IL-1 β 能显著减少 γ -氨基丁酸能神经元的自发性抑制性突触后电流^[13]。CB₂R 作为脊髓内小胶质细胞表面重要的信号分子, 其激活通过细胞内第二信使激活 PI3K/Akt/脑源性神经营养因子通路降低小胶质细胞内一氧化氮、TNF- α 、IL-1 β 等生成, 降低细胞代谢率和减少细胞损伤, 从而减弱小胶质细胞活化^[14]; 同时, CB₂R 亦能通过减弱活性氧/NF- κ B 通路减缓细胞内的氧化反应, 从而降低葡萄糖消耗, 减少小胶质细胞的生理活动^[15]。CB₂R 激活后在脊髓背角能够抑制小胶质细胞活化, 减少小胶质细胞标志物 IBA-1 的过度表达, 缓解神经元凋亡, 一定程度上抑制突触重塑和长时程增强, 延缓痛觉过敏的进展, 尤其是通过鞘内给药直接作用于脊髓背角作用更显著^[16]。本研究通过鞘内注射 CB₂R 激动剂 AM1241 发现脊髓背角小胶质细胞活化减弱, 同时小胶质细胞介导的炎症因子释放减少; 而通过 siRNA 干扰 CB₂R 表达后小胶质细胞活化增强、炎症因子释放增加, 且小胶质细胞抑制剂米诺环素能逆转此现象, 进一步证明了 CB₂R 激活对小胶质细胞的抑制作用影响着神经病理性疼痛的进展。

综上所述, CB₂R 通过抑制脊髓小胶质细胞活化减轻神经炎症反应, 并增强脊髓背角抑制性电活动, 共同减轻神经病理性疼痛的痛觉过敏, 证实了 CB₂R 参与神经病理性疼痛痛觉过敏进展的作用机制, 为临床缓解或治疗神经病理性疼痛提供新的治疗靶点和研究思路。

[本文编辑] 杨亚红

[参 考 文 献]

- [1] Meyer L, Taleb O, Patte-Mensah C, Mensah-Nyagan A G. Neurosteroids and neuropathic pain management: Basic evidence and therapeutic perspectives [J/OL]. *Front Neuroendocrinol*, 2019, 55: 100795. doi: 10.1016/j.yfrne.2019.100795.
- [2] Shen Y, Ding Z, Ma S, Zou Y, Yang X, Ding Z, et al. Targeting aurora kinase B alleviates spinal microgliosis and neuropathic pain in a rat model of peripheral nerve injury [J]. *J Neurochem*, 2020, 152: 72-91.
- [3] Wu J, Hocevar M, Bie B, Foss J F, Naguib M. Cannabinoid type 2 receptor system modulates paclitaxel-induced microglial dysregulation and central sensitization in rats [J]. *J Pain*, 2019, 20: 501-514.
- [4] ZHAO Y, XIN Y, CHU H. MC4R is involved in neuropathic pain by regulating JNK signaling pathway after chronic constriction injury [J/OL]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 919. doi: 10.3389/fnins.2019.00919.
- [5] BIE C Q, LIU X Y, CAO M R, HUANG Q Y, TANG H J, WANG M, et al. Lentivirus-mediated RNAi knockdown of insulin-like growth factor-1 receptor inhibits the growth and invasion of hepatocellular carcinoma via down-regulating midkine expression [J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 79305-79318.
- [6] Maniezzi C, Talpo F, Spaiardi P, Toselli M, Biella G. Oxytocin increases phasic and tonic GABAergic transmission in CA1 region of mouse hippocampus [J/OL]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 178. doi: 10.3389/fncel.2019.00178.
- [7] Chen D J, Gao M, Gao F F, Su Q X, Wu J. Brain cannabinoid receptor 2: expression, function and modulation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38: 312-316.
- [8] Yuill M B, Hale D E, Guindon J, Morgan D J. Anti-nociceptive interactions between opioids and a cannabinoid receptor 2 agonist in inflammatory pain [J/OL]. *Mol Pain*, 2017, 13: 1744806917728227. doi: 10.1177/1744806917728227.
- [9] Donvito G, Nass S R, Wilkerson J L, Curry Z A, Schurman L D, Kinsey S G, et al. The endogenous cannabinoid system: a budding source of

- targets for treating inflammatory and neuropathic pain [J] . *Neuropsychopharmacology*, 2018, 43: 52-79.
- [10] Grenald S A, Young M A, Wang Y, Ossipov M H, Ibrahim M M, Largent-Milnes T M, et al. Synergistic attenuation of chronic pain using mu opioid and cannabinoid receptor 2 agonists [J] . *Neuropharmacology*, 2017, 116: 59-70.
- [11] Reyes-Resina I, Navarro G, Aguinaga D, Canela E I, Schoeder C T, Zaluski M, et al. Molecular and functional interaction between GPR18 and cannabinoid CB₂ G-protein-coupled receptors. Relevance in neurodegenerative diseases [J] . *Biochem Pharmacol*, 2018, 157: 169-179.
- [12] Sdrulla A D, Guan Y, Raja S N. Spinal cord stimulation: clinical efficacy and potential mechanisms [J] . *Pain Pract*, 2018, 18: 1048-1067.
- [13] Tsuda M, Koga K, Chen T, Zhuo M. Neuronal and microglial mechanisms for neuropathic pain in the spinal dorsal horn and anterior cingulate cortex [J] . *J Neurochem*, 2017, 141: 486-498.
- [14] Lin L, Yihao T, Zhou F, Yin N, Qiang T, Haowen Z, et al. Inflammatory regulation by driving microglial M2 polarization: neuroprotective effects of cannabinoid receptor-2 activation in intracerebral hemorrhage [J/OL] . *Front Immunol*, 2017, 8: 112. doi: 10.3389/fimmu.2017.00112.
- [15] Dos-Santos-Pereira M, Guimarães F S, Del-Bel E, Raisman-Vozari R, Michel P P. Cannabidiol prevents LPS-induced microglial inflammation by inhibiting ROS/NF- κ B-dependent signaling and glucose consumption [J] . *Glia*, 2020, 68: 561-573.
- [16] Shiue S J, Peng H Y, Lin C R, Wang S W, Rau R H, Cheng J K. Continuous intrathecal infusion of cannabinoid receptor agonists attenuates nerve ligation-induced pain in rats [J] . *Reg Anesth Pain Med*, 2017, 42: 499-506.