

胰高血糖素样肽1受体在大鼠慢性炎性痛发生机制中的作用[△]

王健^{1*}, 牛云圃¹, 崔佳², 王磊², 樊婷婷², 张维^{2#} (1. 解放军94750部队医院门诊所, 福建连城 366200; 2. 空军军医大学西京医院药剂科, 西安 710032)

中图分类号 R441.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)19-2617-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.19.06

摘要 目的: 研究胰高血糖素样肽1受体(GLP-1R)在大鼠慢性炎性痛发生机制中的作用。方法: 取大鼠随机分为正常对照组、生理盐水1组和完全弗氏佐剂(CFA)1组, 另取大鼠随机分为生理盐水2组、CFA2组和(GLP-1R激动药)GLP-1组(5 μg/kg), 采用左后足趾侧注射CFA复制大鼠慢性炎性痛模型, 后3组大鼠建模后第7天腹腔注射相应药物, 连续给药1周。采用Hargreaves热痛仪测定前3组大鼠建模前1 d(-1 d)、建模当天(0 d)和建模后1、3、7、14 d的舔足潜伏期, 后3组大鼠建模后8、10、12、14 d的舔足潜伏期, 每个时间点6只大鼠。建模后第7天, 采用免疫荧光组织化学染色观察模型组大鼠GLP-1R分子的分布情况。采用Western blot法检测前3组大鼠建模后1、3、7、14 d背根神经节(DRG)中GLP-1R蛋白的表达水平, 后3组大鼠建模后14 d DRG中GLP-1R、肿瘤坏死因子α(TNF-α)、白细胞介素6(IL-6)及IL-1β蛋白的表达水平, 每个时间点3只大鼠。结果: 与正常对照组和生理盐水1组比较, CFA1组大鼠建模后1、3、7、14 d的舔足潜伏期明显缩短($P < 0.01$), DRG中GLP-1R蛋白表达水平明显降低($P < 0.01$), -1、0 d的舔足潜伏期差异无统计学意义($P > 0.05$)。GLP-1R分子与NeuN双重标记明显, 且与降钙素基因相关肽(CGRP)阳性神经元双重标记明显, 与植物凝集素B4(IB4)阳性神经元未见明显双重标记。与生理盐水2组比较, CFA2组大鼠建模后8、10、12、14 d的舔足潜伏期明显缩短($P < 0.01$), 建模后14 d DRG中GLP-1R蛋白表达水平明显降低($P < 0.01$), TNF-α、IL-6及IL-1β蛋白表达水平明显升高($P < 0.01$)。与CFA2组比较, GLP-1组大鼠建模后8、10、12、14 d的舔足潜伏期明显延长($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 建模后14 d DRG中GLP-1R蛋白表达水平明显升高($P < 0.01$), TNF-α、IL-6及IL-1β蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: GLP-1R分子主要表达于DRG中的CGRP阳性神经元, 其表达水平随慢性疼痛的发生与发展而逐渐降低, 且升高GLP-1R表达能够有效缓解慢性炎性痛, 其可能与降低DRG中炎症因子的表达有关。

关键词 胰高血糖素样肽1受体; 完全弗氏佐剂; 慢性炎性痛; 炎症因子; 大鼠

Role of Glucagon-like Peptide 1 Receptor on Chronic Inflammatory Pain Mechanism in Rats

WANG Jian¹, NIU Yunpu¹, CUI Jia², WANG Lei², FAN Tingting², ZHANG Wei² (1. Outpatient Clinic, Hospital of PLA 94750 Army, Fujian Liancheng 366200, China; 2. Dept. of Pharmacy, Xijing Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the role of glucagon-like peptide 1 receptor (GLP-1R) on chronic inflammatory pain mechanism in rats. METHODS: The rats were randomly divided into normal control group, normal saline group 1 and complete Freund's adjuvant (CFA) group 1. Other rats were randomly divided into normal saline group 2, CFA 2 group and (GLP-1R agonist) GLP-1 group (5 μg/kg). Chronic inflammatory pain model was induced by left hind toe side injection of CFA. The latter 3 groups were given relevant medicine intraperitoneally on the 7th day after modeling, for consecutive a week. The licking incubation of the former 3 groups were determined by Hargreaves thermal pain instrument 1 d before modeling (-1 d), on modeling day (0 d), 1, 3, 7, 14 d after modeling; the licking incubation of the latter 3 groups were determined 8, 10, 12, 14 d after modeling; those of each 6 rats were determined at each time point. 7 d after modeling, distribution of receptor GLP-1R molecule in model group was observed by immunofluorescence double labeling. Western blot method was used to detect the expression of GLP-1R protein in dorsal root ganglia (DRG) of rats in former 3 groups 1, 3, 7 and 14 d after modeling. The expression of GLP-1R, TNF-α, IL-6 and IL-1β protein in DRG of rats were also determined in latter 3 groups 14 d after modeling; those of each 3 rats were determined at each time point. RESULTS: Compared with normal control group and normal saline group 1, licking incubation of CFA group 1 was shortened significantly 1, 3, 7, 14 d after modeling ($P < 0.01$), and the protein expression of GLP-1R in DRG was decreased significantly ($P < 0.01$); there was no statistical significance in licking incubation -1 and 0 d ($P > 0.05$). GLP-1R molecules were double labeled with NeuN and calcitonin gene-related peptide (CGRP)-positive neurons no significant double marker was found between GLP-1R molecules and phytohemagglutinin B4 positive neurons. Compared with normal saline

[△] 基金项目: 国家自然科学基金青年项目(No.81603320); 西京医院助推计划项目(No.XJZT14M15)

* 医师。研究方向: 中药镇痛机制。E-mail: 15249273207@163.com

通信作者: 主管药师, 博士。研究方向: 镇痛性中药药效物质基础与机制。E-mail: 1358359@qq.com

group 2, licking incubation of CFA group 2 was shortened significantly 8, 10, 12, 14 d after modeling ($P < 0.01$); the protein expression of GLP-1R in RG was decreased significantly 14 d after modeling ($P < 0.01$); the protein expression of TNF-α, IL-6 and IL-1β were increased significantly ($P < 0.01$). Compared with CFA group 2, licking

incubation of GLP-1 group was prolonged significantly 8, 10, 12, 14 d after modeling ($P<0.05$ or $P<0.01$); the protein expression of GLP-1R in DRG was increased significantly 14 d after modeling ($P<0.01$), and the protein expression of TNF- α , IL-6 and IL-1 β were decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: GLP-1R molecule is mainly expressed in CGRP-positive neurons of DRG. The expression level of GLP-1 receptor gradually decreases with the occurrence and development of chronic pain. The increase of GLP-1R expression can effectively relieve chronic inflammatory pain, which is related with reducing reduce the expression of inflammatory factors in DRG.

KEYWORDS Glucagon-like peptide 1 receptor; Complete Freund's adjuvant; Chronic inflammatory pain; Inflammatory factor; Rat

疼痛(Pain)是许多疾病的并发症之一,尤其慢性痛的发生是当前困扰人类健康的顽疾,如组织损伤、神经长期压迫、慢性感染等导致的神经病理性痛和慢性炎性痛^[1-2]。然而目前在临床上对疼痛的治疗缺乏有效的手段^[3-4],严重影响了患者的生活质量和精神状况,既影响疾病预后,又加重患者思想负担,因此对慢性痛发生的机制研究迫在眉睫。既往研究表明,当慢性痛发生时,背根神经节(Dorsal root ganglion, DRG)内的卫星细胞会释放大量的促炎症细胞因子,如肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素1 β (IL-1 β)以及能够增强脊髓背角神经元兴奋性的神经生长因子(Nerve growth factor, NGF)、一氧化氮(NO)等,进而促进疼痛的发生和慢性化^[5-8]。

胰高血糖素样肽1受体(Glucagon-like peptide 1 receptor, GLP-1R)是一种G蛋白偶联受体,通过Ca²⁺和蛋白激酶A信号通路传递信息,并且在神经系统中广泛分布。新近研究表明,在脊髓背角,GLP-1R主要表达于小胶质细胞上,并且给予GLP-1R激动药如GLP-1能够有效缓解神经病理性痛、炎性痛和癌痛^[9]。亦有研究报道,鞘内给予GLP-1R激动药WB4-24能够促进 β -内啡肽的释放,激活内源性镇痛系统从而发挥镇痛作用^[10]。

DRG作为外界信息向中枢传递的枢纽,在慢性痛的发生与发展过程中扮演着重要的角色。DRG主要由神经元胞体组成,外面包绕卫星细胞。DRG中的神经元包括肽能神经元和非肽能神经元两类。在炎症、外周神经损伤等病理条件下,DRG(受损的或未受损的)内组胺受体、P2X家族受体等及通道的表达会发生相应变化。在炎性痛状态下^[11-12],DRG钠离子通道(如NaV1.3、NaV1.7~NaV1.9)以及瞬时感受器电位通道(TRP通道,如TRPV1、TRPA1等)均会出现显著的表达上调,给予这些通道相应的抑制剂或阻滞药均能够显著降低炎症诱导的疼痛行为学改变。已有研究证实,在基因敲除小鼠实验中,这些通道对于生理疼痛以及炎症疼痛的传递都发挥着极为关键的作用^[12]。新近研究表明^[13],DRG中卫星细胞分泌的基质细胞衍生因子1(SDF-1)与降钙素基因相关肽(CGRP)能与神经元上的趋化因子受体CXCR4结合,参与疼痛的演变。这些结果表明,DRG离子通道/受体对炎性痛有着重要的作用,但对于广泛分布于

DRG中的GLP-1R的研究尚无文献报道,因此本文将研究GLP-1R在慢性炎性痛发生机制中的作用,以期镇痛药的开发提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Hargreaves 热痛仪(美国 Stoeling 公司); Leica CM1950 冷冻切片机(德国 Leica 公司); 3K30 低温离心机(美国 Sigma 公司); BX-60 共聚焦激光显微镜(日本 Olympus 株式会社)。

1.2 试剂

完全弗氏佐剂(CFA)、GLP-1(粉末状晶体,批号:G8048,纯度:99.5%)、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)和小鼠抗 β -肌动蛋白(β -actin)免疫球蛋白G(IgG)均购自美国 Sigma 公司;小鼠抗神经元核抗原(NeuN) IgG和兔抗 GLP-1R IgG 均购自英国 Abcam 公司;山羊抗 CGRP IgG 和 Alexa488 结合的驴抗小鼠 IgG 均购自美国 Invitrogen 公司;Alexa594 结合的驴抗兔 IgG(美国 Jackson Immuno Research 公司);兔抗白细胞介素6(IL-6) IgG、羊抗 IL-1 β IgG 和小鼠抗 TNF- α IgG 抗体均购自美国 Santa Cruz 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的驴抗小鼠、兔、羊 IgG 均购自北京中杉金桥生物技建模有限公司;10%十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶(美国 Bio-Rad 公司);聚偏氟乙烯(PVDF)膜(美国 Millipore 公司)。

1.3 动物

SD 大鼠, δ , 体质量为 220~250 g,是由第四军医大学动物实验中心提供的二级清洁动物,实验动物生产许可证号:SCXK(军)2012-0007。所有大鼠均在 22~25 $^{\circ}$ C 的恒定温度下饲养,每天保证 12 h 的光照,可自由摄取水和食物。所有的实验均在第四军医大学伦理委员会批准下进行。

2 方法

2.1 分组与建模

2.1.1 GLP-1R 与慢性炎性痛的相关性实验 取大鼠随机分为正常对照组、生理盐水 1 组和 CFA1 组。正常对照组大鼠不作任何处理;CFA1 组大鼠在乙醚麻醉状态下于左后足趾侧注射 CFA 50 μ L 建立慢性炎性痛模型;生理盐水 1 组大鼠同法注射等量生理盐水。

2.1.2 机制研究实验 另取大鼠随机分为生理盐水2组、CFA2组和GLP-1组。前2组大鼠分别在乙醚麻醉状态下于左后足趾侧注射生理盐水或CFA 50 μ L。GLP-1组大鼠在CFA2组基础上,建模后第7天腹腔注射GLP-1,给药量为每天5 μ g/kg(前期研究确定的剂量),每天同一时刻给药,生理盐水2组和CFA2组同时腹腔注射同等剂量的生理盐水,均连续给药1周。

2.2 热痛行为学测试

采用行为学测试方法,测试前将Hargreaves热痛仪基础温度调至37 $^{\circ}$ C。于建模前1 d(-1 d)、建模当天(0 d)和建模后1、3、7、14 d,分别取正常对照组、生理盐水1组和CFA1组大鼠各6只,放入罩有玻璃罩的有机材料检测板上,待大鼠适应30 min后,将热光源对准大鼠左侧足底并开始计时,若大鼠出现缩足、舔足或撤足行为则被视为痛感阳性,否则视为痛感阴性。记录大鼠的舔足潜伏期,舔足潜伏期的误差值控制在0.1 s范围内,并且舔足时间不能超过30 s,以免损伤大鼠后足。同法记录生理盐水2组、CFA2组和GLP-1组大鼠建模后8、10、12、14 d的舔足潜伏期。

2.3 免疫荧光组织化学染色观察GLP-1R分布

建模后第7天,取CFA1组大鼠4只,腹腔注射水合氯醛(280 mg/kg)麻醉,用200 mL 0.01 mol/L的磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2~7.4)经主动脉冲洗血液至肝脏变白,之后灌注含4%多聚甲醛和50%饱和苦味酸的磷酸缓冲液(PB)。灌注完毕后立即取出大鼠腰椎L5 DRG,置于上述相同固定液中常温摇床后固定1 h,之后移至含30%蔗糖的PB溶液中4 $^{\circ}$ C脱水24 h直至组织块沉底,再经恒冷箱切片机横切背根节,片厚15 μ m,切片在PBS中漂洗3次(每次10 min)后,分别用一抗[(兔抗GLP-1R IgG、小鼠抗NeuN IgG), (兔抗GLP-1R IgG、山羊抗CGRP IgG), 兔抗GLP-1R IgG, 稀释比例均为1:200]于4 $^{\circ}$ C孵育切片36 h;随后PBS冲洗3次(每次10 min),滴加对应二抗[(Alexa 594结合的驴抗兔IgG、Alexa 488结合的驴抗小鼠IgG、DAPI)、Alexa 594结合的驴抗兔IgG、Alexa 488结合的驴抗羊IgG、DAPI)、(Alexa 594结合的驴抗兔IgG、IB4、DAPI), 稀释比例均为1:500],室温下孵育4 h;PBS冲洗3次(每次10 min)后,在暗光下裱片,待自然风干后使用荧光封片液封片,激光共聚焦显微镜拍照,所有的切片都在相同染色和拍照条件(红光波长:559 nm,绿光波长:488 nm,蓝光波长:405 nm)下进行。

2.4 Western blot法检测GLP-1R、IL-6、IL-1 β 和TNF- α 蛋白表达

建模后第7天,腹腔注射水合氯醛(280 mg/kg)麻醉大鼠,用200 mL 4 $^{\circ}$ C预冷的0.01 mol/L的PBS经左心室灌注,冲血完毕后,将大鼠于冰块上快速取出腰椎L5 DRG,加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的裂解液中,超声匀浆机将组织超声(1.5 Hz,间隔30 s)匀浆裂

解,将匀浆裂解液移入1.5 mL离心管,4 $^{\circ}$ C下12 000 r/min离心5 min,吸取上清液,用BCA法进行蛋白浓度测定,确定含10 μ g蛋白的上样量。蛋白样品采用10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离,加入预染标准物marker,根据预染marker的位置确定所需蛋白GLP-1R及 β -actin的位置,将胶上蛋白电转到PVDF膜上进行免疫杂交反应(PVDF膜预先在甲醇中浸泡1 min)。用含5%脱脂奶粉的封闭液封闭2 h,然后加入相应抗体[兔抗GLP-1R IgG(稀释比例为1:200)、兔抗IL-6 IgG(稀释比例为1:500)、小鼠抗IL-1 β IgG(稀释比例为1:500)、小鼠抗TNF- α IgG(稀释比例为1:500)、小鼠抗 β -actin IgG(稀释比例为1:500)],4 $^{\circ}$ C孵育过夜后使用TBST缓冲液洗膜3次(每次10 min),分别加入HRP标记的驴抗兔、小鼠IgG(稀释比例为1:1 000)室温下孵育1 h;TBST洗膜3次(每次10 min)后,使用化学发光液激发荧光并在Bio-Rad成像系统中进行荧光条带的扫描,分析光密度(OD)值,以目标蛋白与 β -actin的OD值之比计算各组大鼠目标蛋白的相对表达量。

2.5 统计学方法

所有数据均采用SPSS 17.0软件进行统计分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析比较各组大鼠热痛行为学数据及蛋白定量数据的差异,邦弗朗尼(Bonferro-ni)事后检定/检验法检验组间差异。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠建模后足底的热痛行为学变化

与正常对照组和生理盐水1组比较,CFA1组大鼠建模后1、3、7、14 d的舔足潜伏期明显缩短($P < 0.01$),而-1、0 d的舔足潜伏期差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠不同时间点的舔足潜伏期见表1。

表1 各组大鼠不同时间点的舔足潜伏期($\bar{x} \pm s, s$)

Tab 1 Licking incubation of rats at different time points in each group ($\bar{x} \pm s, s$)

组别	n	检测时间(建模后)					
		-1 d	0 d	1 d	3 d	7 d	14 d
正常对照组	6	14.56 \pm 1.47	14.23 \pm 2.15	15.00 \pm 2.06	14.88 \pm 2.03	14.65 \pm 2.06	14.69 \pm 2.06
生理盐水1组	6	15.43 \pm 3.14	15.11 \pm 2.39	14.27 \pm 1.18	14.72 \pm 2.11	14.63 \pm 2.05	14.67 \pm 2.03
CFA1组	6	14.87 \pm 1.53	14.69 \pm 2.19	2.79 \pm 0.19*	4.48 \pm 0.32*	3.69 \pm 0.28*	4.41 \pm 0.23*
F		0.244	0.231	148.838	73.672	84.394	75.182
P		0.787	0.797	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与正常对照组和生理盐水1组比较,* $P < 0.01$

Note: vs. normal control group and normal saline group 1, * $P < 0.01$

3.2 GLP-1R的分布

免疫荧光双标结果显示,GLP-1R与NeuN双重标记明显(见图1A),GLP-1R与CGRP神经元双重标记明显(见图1B),而GLP-1R在IB4阳性神经元中未见明显双重标记(见图1C)。GLP-1R与DRG神经元免疫荧光双重标记染色图见图1。

3.3 大鼠建模后DRG上GLP-1R蛋白表达水平

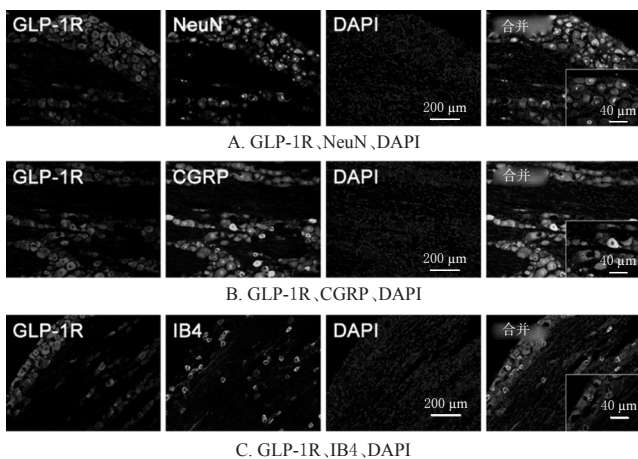


图1 GLP-1R与DRG神经元免疫荧光双重标记染色图

Fig 1 Immunofluorescence double labeling staining of GLP-1R and DRG neurons

与正常对照组和生理盐水1组比较,CFA1组大鼠建模后1、3、7、14 d的DRG上GLP-1R蛋白表达水平明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。各组大鼠DRG上GLP-1R蛋白表达的电泳图见图2,相对表达量检测结果见表2。

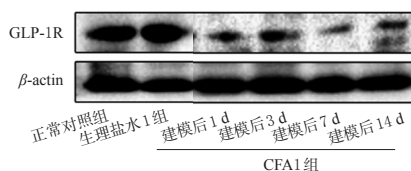


图2 各组大鼠DRG上GLP-1R蛋白表达的电泳图
Fig 2 Electrophorograms of protein expression of GLP-1R in DGR of rats in each group

表2 各组大鼠DRG上GLP-1R蛋白相对表达量的检测结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Protein relative expression of GLP-1R in DRG of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	n	GLP-1R/ β -actin
正常对照组		6	2.21 \pm 0.23
生理盐水1组		6	2.31 \pm 0.27
CFA1组	建模后1 d	6	1.25 \pm 0.14*
	建模后3 d	6	1.27 \pm 0.13*
	建模后7 d	6	0.96 \pm 0.15*
	建模后14 d	6	0.98 \pm 0.12*

注:与正常对照组和生理盐水1组比较,* $P < 0.01$

Note: vs. normal control group and normal saline group 1, * $P < 0.01$

3.4 GLP-1干预后大鼠痛感行为学变化

与生理盐水2组比较,CFA2组大鼠建模后8、10、12、14 d的舔足潜伏期明显缩短($P < 0.01$)。与CFA2组比较,GLP-1组大鼠建模后8、10、12、14 d的舔足潜伏期明显延长($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。GLP-1干预后各组大鼠不同时间点的舔足潜伏期见表3。

表3 GLP-1干预后各组大鼠不同时间点的舔足潜伏期($\bar{x} \pm s, s$)

Tab 3 Licking incubation of rats in each group after GLP-1 intervention at different time points ($\bar{x} \pm s, s$)

组别	n	检测时间(建模后)			
		8 d	10 d	12 d	14 d
生理盐水2组	6	14.32 \pm 1.55	15.02 \pm 2.16	14.72 \pm 1.67	14.92 \pm 1.68
CFA2组	6	4.19 \pm 0.87*	5.21 \pm 0.91*	4.58 \pm 0.65*	5.02 \pm 0.61*
GLP-1组	6	7.46 \pm 1.01#	10.72 \pm 1.83##	11.23 \pm 1.39##	11.52 \pm 1.71##
F		104.086	49.223	92.868	74.439
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与生理盐水2组比较,* $P < 0.01$;与CFA2组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$

Note: vs. normal saline group 2, * $P < 0.01$; vs. CFA group 2, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3.5 GLP-1干预后大鼠DRG上GLP-1R、IL-6、IL-1 β 和TNF- α 蛋白表达水平

与生理盐水2组比较,CFA2组大鼠建模后7 d DRG上GLP-1R蛋白表达水平明显降低,IL-6、IL-1 β 和TNF- α 蛋白表达水平明显提高($P < 0.01$)。与CFA2组比较,GLP-1组大鼠建模后7 d DRG上GLP-1R蛋白表达水平明显提高,IL-6、IL-1 β 和TNF- α 蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。GLP-1干预后各组大鼠DRG上GLP-1R、IL-6、IL-1 β 和TNF- α 蛋白表达的电泳图见图3,相对表达量的检测结果见表4。

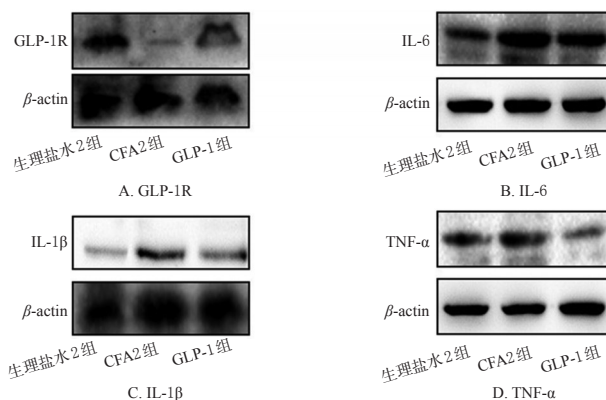


图3 GLP-1干预后各组大鼠DRG上GLP-1R、IL-6、IL-1 β 和TNF- α 蛋白表达的电泳图

Fig 3 Electrophorogram of protein expression of GLP-1R, IL-6, IL-1 β and TNF- α in DRG of rats in each group after GLP-1 intervention

4 讨论

本实验通过足底注射CFA构建慢性炎性痛模型,由结果可观察到CFA可以明显诱导大鼠建模侧后足痛敏;之后通过免疫荧光组织化学染色观察到在DRG中GLP-1R分子与NeuN存在大量共存,并且在DRG神经元中,GLP-1R分子主要表达于CGRP阳性神经元。Western blot结果显示,CFA可以明显诱导DRG中GLP-1R分子的低表达,给予GLP-1可以观察到DRG中

表4 GLP-1干预后各组大鼠DRG上GLP-1R、IL-6、IL-1 β 和TNF- α 蛋白相对表达量的检测结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 4 Protein relative expression of GLP-1R, IL-6, IL-1 β and TNF- α in DRG of rats in each group after GLP-1 intervention ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GLP-1R	IL-6	IL-1 β	TNF- α
生理盐水2组	6	2.53 \pm 0.26	1.22 \pm 0.22	0.94 \pm 0.12	1.35 \pm 0.15
CFA2组	6	0.86 \pm 0.10*	2.37 \pm 0.26*	1.87 \pm 0.16*	2.17 \pm 0.23*
GLP-1组	6	1.64 \pm 0.21**	1.54 \pm 0.24**	1.34 \pm 0.15*	0.95 \pm 0.11**
F		103.272	36.529	62.678	79.57
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与生理盐水2组比较,* $P < 0.01$;与CFA2组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. normal saline group 2, * $P < 0.01$; vs. CFA group 2, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

GLP-1R分子的表达水平明显增加,并且TNF- α 、IL-6及IL-1 β 表达水平明显降低。以上结果提示,GLP-1R分子在慢性炎性痛的发生与发展过程中扮演者重要的角色,因此,激活GLP-1R分子有望成为疼痛治疗的新靶点,为镇痛新药的研制提供了参考。

既往研究显示,当外周组织受到损伤或者炎症反应的持续刺激时,损伤区域会释放大量的炎症因子,如组胺、促炎症细胞因子(如IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等)以及趋化因子(CXCL家族)等,这些炎症因子会进一步引起DRG中神经胶质细胞的活化,激活的神经胶质细胞会不断向相邻的神经元释放炎症因子,促进DRG中神经元所处的微环境炎症化,改变神经元的感受性,促进疼痛的发生^[14-16]。本研究中,模型大鼠DRG中TNF- α 、IL-6及IL-1 β 水平明显降低,提示GLP-1R分子可能介导DRG中炎症反应,加剧了慢性痛信号的传递,但具体的机制还需进一步探究。

亦有研究表明,GLP-1R是一种内源性镇痛受体,其在脊髓主要表达于小胶质细胞和神经元上^[9]。当GLP-1与GLP-1R结合时,相当于内源性镇痛系统被激活,达到镇痛的目的。新近研究证实,鞘内给予GLP-1R的激动药WB4-24可以有效缓解大鼠慢性痛行为,其作用的机制可能与 β -内啡肽的释放有关^[10]。在本研究中,GLP-1R主要表达于DRG上的CGRP阳性神经元上,而CGRP阳性神经元作为DRG中的肽能小神经元,参与疼痛的发生与发展,由此可见,GLP-1R分子的下调可能与DRG中肽能神经元的功能改变密切相关。进一步研究发现,给予GLP-1可以观察到DRG中GLP-1R的表达水平明显增加,再结合促炎症细胞因子TNF- α 、IL-6及IL-1 β 表达水平的明显降低,提示上调GLP-1R的表达对逆转DRG中肽能小神经元的功能变化具有十分重要的意义。

参考文献

[1] SUN YG, CHEN ZF. A gastrin-releasing peptide receptor mediates the itch sensation in the spinal cord[J]. *Nature*, 2007, 448(7154): 700-703.

[2] KNABL J, WITSCHI R, HOSL K, et al. Reversal of pathological pain through specific spinal GABAA receptor subtypes[J]. *Nature*, 2008, 451(7176): 330-334.

[3] 程斌, 杨国浓, 郑小卫. 我院癌痛住院患者阿片类镇痛药使用动态分析[J]. *中国药房*, 2017, 28(11): 1462-1466.

[4] 李慧, 饶跃峰. 对2016年版美国《建模后疼痛管理指南》的药学解读[J]. *中国药房*, 2017, 28(35): 5007-5011.

[5] 李黎, 张海林. CCL2/CCR2参与神经病理性疼痛的多靶点作用机制[J]. *神经药理学报*, 2016, 6(1): 49-57.

[6] 王雪, 李文志. 电针治疗炎性疼痛作用机制的研究现状[J]. *针灸临床杂志*, 2016, 32(2): 93-95.

[7] 黄云, 康子瑶, 张广钦. 和厚朴酚对小鼠背根神经节河豚毒素敏感型钠电流的影响[J]. *中国药科大学学报*, 2016, 47(5): 609-613.

[8] 宋学军. 疼痛信号外周神经转导的分子生物学机制[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2016, 22(1): 2-7.

[9] ZHU B, GONG N, FAN H, et al. Lamiophlomis rotata, an orally available tibetan herbal painkiller, specifically reduces pain hypersensitivity states through the activation of spinal glucagon-like peptide-1 receptors[J]. *Anesthesiology*, 2014, 121(4): 835-851.

[10] FAN H, GONG N, LI TF, et al. The non-peptide GLP-1 receptor agonist WB4-24 blocks inflammatory nociception by stimulating beta-endorphin release from spinal microglia[J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172(1): 64-79.

[11] STEMKOWSKI P, GARCIA-CABALLERO A, DE MARIA GV, et al. TRPV1 nociceptor activity initiates USP5/T-type channel-mediated plasticity[J]. *Cell Rep*, 2017, 18(9): 2289-2290.

[12] STEMKOWSKI P, GARCIA-CABALLERO A, GADOT-TI VM, et al. TRPV1 nociceptor activity initiates USP5/t-type channel-mediated plasticity[J]. *Cell Rep*, 2016, 17(11): 2901-2912.

[13] YANG F, SUN W, YANG Y, et al. SDF1-CXCR4 signaling contributes to persistent pain and hypersensitivity via regulating excitability of primary nociceptive neurons: involvement of ERK-dependent Nav1.8 up-regulation[J]. *J Neuroinflammation*, 2015. DOI: 10.1186/s12974-015-0441-2.

[14] MAKKER PG, DUFFY SS, LEES JG, et al. Characterisation of immune and neuroinflammatory changes associated with chemotherapy-induced peripheral neuropathy[J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e170814.

[15] OLIVEIRA ME, SANTOS FM, BONIFACIO RP, et al. Low level laser therapy alters satellite glial cell expression and reverses nociceptive behavior in rats with neuropathic pain[J]. *Photochem Photobiol Sci*, 2017, 16(4): 547-554.

[16] 周蓓, 代娟丽, 肖礼祖, 等. A型肉毒毒素对神经病理性疼痛大鼠镇痛作用及作用途径的研究[J]. *中国药师*, 2009, 12(12): 554-556.

(收稿日期:2018-03-08 修回日期:2018-08-03)

(编辑:邹丽娟)