

## P2X4 受体在大鼠脊髓小胶质细胞中的表达

王慧明, 麻伟青, 黄章翔, 洪英才  
(成都军区昆明总医院麻醉科, 云南昆明 650032)

**[摘要]** **目的** 研究神经病理性疼痛大鼠脊髓小胶质细胞 P2X4 受体的表达及意义. **方法** 40 只健康 SD 大鼠随机分为脊神经结扎组 (SNL 组  $n=20$ ) 及对照组 (Con 组  $n=20$ ). SNL 组结扎腰 5 脊神经, 对照组仅暴露脊神经后不结扎立即缝合. 术后观测 2 组机械痛阈值的变化, SNL 组于术后第 1、7、14、21 d 处死 4 只大鼠, 取 L<sub>4-6</sub> 段脊髓, 用免疫组化及 Western 印迹法测定分析 P2X4 受体及 OX-42 的表达. **结果** SNL 组 P2X4 表达对照组显著增加. **结论** 神经病理性疼痛大鼠脊髓小胶质细胞 P2X4 受体表达明显增加.

**[关键词]** 神经病理性疼痛; P2X4 受体; 小胶质细胞

**[中图分类号]** R614.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 08-0016-04

## Expression of P2X4 Receptor in Microglia from Spinal of Rats with Neuropathic Pain

WANG Hui-ming, MA Wei-qing, HUANG Zhang-xiang, HONG Ying-cai  
(Dept. of Anesthesiology, Kunming General Hospital of Chengdu Military Command, Kunming Yunnan 650032, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expression of P2X4 receptor in microglia from spinal of rats with neuropathic pain. **Methods** Forty healthy male SD rats weighted 180 ~ 240 g were randomly divided into 2 groups ( $n=20$ ); SNL group, the spinal were ligated, the control group, the spinal nerve were exposed but not ligated. The PWT were measured in all rats. The rats of SNL group were killed separately on 1 day, 7 day, 14 day and 21 day after surgery. The L4-6 spinal samples were taken and the expression of P2X4 was detected by immunohistochemistry and Western blot. **Result** Compared with the control group, the expression levels of P2X4 receptor were increased significantly in SNL group. **Conclusion** In the rats with neuropathic pain, the expression of P2X4 receptor in spinal microglia is upregulated.

**[Key words]** Neuropathic pain; P2X4 receptor; Microglia

神经病理性疼痛是指由外周神经系统损伤或炎症后引发的疼痛、过敏、痛觉异常<sup>[1]</sup>. 在临床上发病率较高, 因其发病机制复杂, 迄今尚缺乏理想的治疗药物及手段, 因此, 神经病理性疼痛是一种严重影响人类健康的疾病. 近年研究表明小胶质细胞表达的 P2X4 受体在神经病理性疼痛的发生过程中起着重要作用<sup>[2-3]</sup>, 表现为发生神经病理性疼痛后, 活化的小胶质细胞中 P2X4 受体的表达显著增加, 提示 P2X4 受体可能参与引起神经病理性疼痛. 本实验研究旨在了解 P2X4 受体在神经病

理性疼痛大鼠脊髓小胶质细胞中的表达情况.

### 1 材料与方法

#### 1.1 模型制备

脊神经结扎 (spinal nerve ligation, SNL) 大鼠疼痛模型制备, 健康纯种 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 (昆明总医院动物科提供) 16 只, 雄性, 体重 180 ~ 240 g, 随机分为 2 组: 对照组 (Con 组,  $n=8$ ), 脊神经结扎组 (SNL 组,  $n=8$ ). 用 3% 戊巴

**[基金项目]** 云南省应用基础研究基金资助项目 (2011FZ319)

**[作者简介]** 王慧明 (1964~), 男, 云南昆明市人, 医学硕士, 副主任医师, 主要从事临床麻醉及疼痛工作.

比妥钠腹腔内 40 mg/kg 注射麻醉成功后按 Kim 和 Chung<sup>[4]</sup>的方法制作 SNL 动物模型. 麻醉成功后把大鼠置于俯卧位固定, 从大鼠背腰部开始, 剪去切口周围毛发并用安尔碘消毒, 行约 3 cm 的正中切口, 依次切开皮肤, 钝性分离左侧椎旁肌肉, 分离暴露左侧腰 5、6 关节突, 切除腰 5 横突, 钝性分离左腰 5 脊神经, 用 4-0 丝线结扎腰 5 脊神经. 用头孢硫咪涂洒在伤口内, 逐层缝合切口. 对照组操作步骤和 SNL 组一样, 只是分离出脊神经后不结扎, 逐层缝合. 大鼠麻醉清醒后分笼单独饲养, 自由饮水和摄食. 为保持大鼠手术创伤的一致性, 所有操作均由同一人完成.

### 1.2 疼痛测定

建模前 1 d 测定大鼠机械痛阈 (paw withdrawal threshold, PWT) 作为基础值, 建模后 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21 d 分别在同一时段用 Chaplam 等<sup>[5]</sup>报道的方法测定大鼠的 PWT 值. 测定方法: 将大鼠置于 20 cm × 20 cm × 25 cm 的透明有机玻璃箱内, 箱底有网格为 0.8 cm × 0.8 cm 的金属网制成, 用 Von Frey 纤维通过网格垂直刺激大鼠手术侧后脚掌中部皮肤, 持续时间 6 s 左右. 大鼠后肢出现躲避、抬足等动作即视为阳性反应, 若未出现则视为阴性. 笔者将出现阳性反应最小 Von Frey 纤维强度视为大鼠机械痛阈值. 2 组大鼠 PWT 测定值见图 1.

从图 1 可见, SNL 组建模后 PWT 值就开始下降, 至第 11 天后疼痛稳定直至第 21 天, 而对照组 PWT 值始终无明显变化. SNL 组的 PWT 值和对照组差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ). 提示笔者制作的 SNL 模型是成功的.

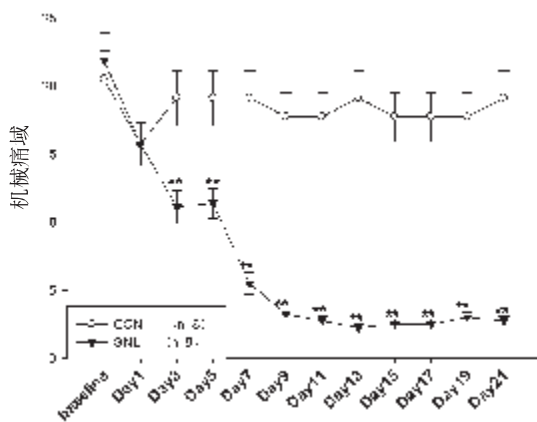


图 1 SNL 组术后第 1 天至第 21 天 PWT 值

Fig. 1 The PWT values on day 1 to day 21 after surgery in SNL group

与对照组比较, \*\* $P < 0.01$ .

### 1.3 免疫组化检测 P2X<sub>4</sub>、OX-42 蛋白表达

40 只大鼠随机分为 2 组, SNL 组 ( $n = 20$ ) 和对照组 ( $n = 20$ ), 结扎制作成神经病理性疼痛模型后 1、7、14、21 d, SNL 组分别随机抽取 4 只大鼠腹腔内注射 3% 戊巴比妥钠 60 mg/kg 使用甲醛经左心室插管持续灌注后分离大鼠脊髓组织, 取腰 4 到腰 6 节段脊髓, 经多聚甲醛固定, 蔗糖脱水切片后, 进行免疫组化分析, 使用 P2X<sub>4</sub> 受体和 OX-42 抗体分别检测 P2X<sub>4</sub> 受体和 OX-42 的表达.

### 1.4 Western 印迹测定 P<sub>2</sub>X<sub>4</sub> 受体的表达

将所取脊髓组织放入匀浆液中离心后取上清, 蛋白质经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 硝酸纤维素膜电转用考马斯亮蓝对凝胶进行染色, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 为内参来观察 P<sub>2</sub>X<sub>4</sub> 受体的表达情况.

### 1.5 统计学处理

采用 SPSS 软件包对数据进行统计学分析, 采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义.

## 2 结果

### 2.1 免疫组化

免疫组化染色结果显示, SNL 组 P<sub>2</sub>X<sub>4</sub> 表达较对照组显著增加, 主要表达在脊髓背角浅层的 I-II 层, 见图 2, SNL 组小胶质细胞较对照组显著增加, 见图 2, 通过两者共标显示 P<sub>2</sub>X<sub>4</sub> 受体主要表达在小胶质细胞上.

### 2.2 Western 印迹分析

从 Western 印迹上分析, SNL 组术后第 1 天即提示 P<sub>2</sub>X<sub>4</sub> 受体表达显著增加, 且持续至术后 21 d, 与对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 3.

## 3 讨论

近来越来越多的研究表明, 小胶质细胞在神经病理性疼痛的发生发展过程中起着重要作用, 发现在 SNL 模型大鼠脊髓小胶质细胞被激活<sup>[6]</sup>, 活化后的小胶质细胞释放出多种物质, 诸如神经生长因子和细胞因子 (BDNF、EAAS、IL-1、IL-6、TNF 等), 这些物质作用于突触前末梢, 产生病理性疼痛, 有研究提示在神经病理性疼痛过程中, 脊髓小胶质细胞表达的 P<sub>2</sub>X<sub>4</sub> 受体增加<sup>[7]</sup>, 用药物减少 P<sub>2</sub>X<sub>4</sub> 受体表达可减轻大鼠神经病理性疼痛, 提示 P<sub>2</sub>X<sub>4</sub> 受体在神经病理性疼痛的发生发展过程中起重要作用.

三磷酸腺苷 (ATP) 是机体内最直接也是最主

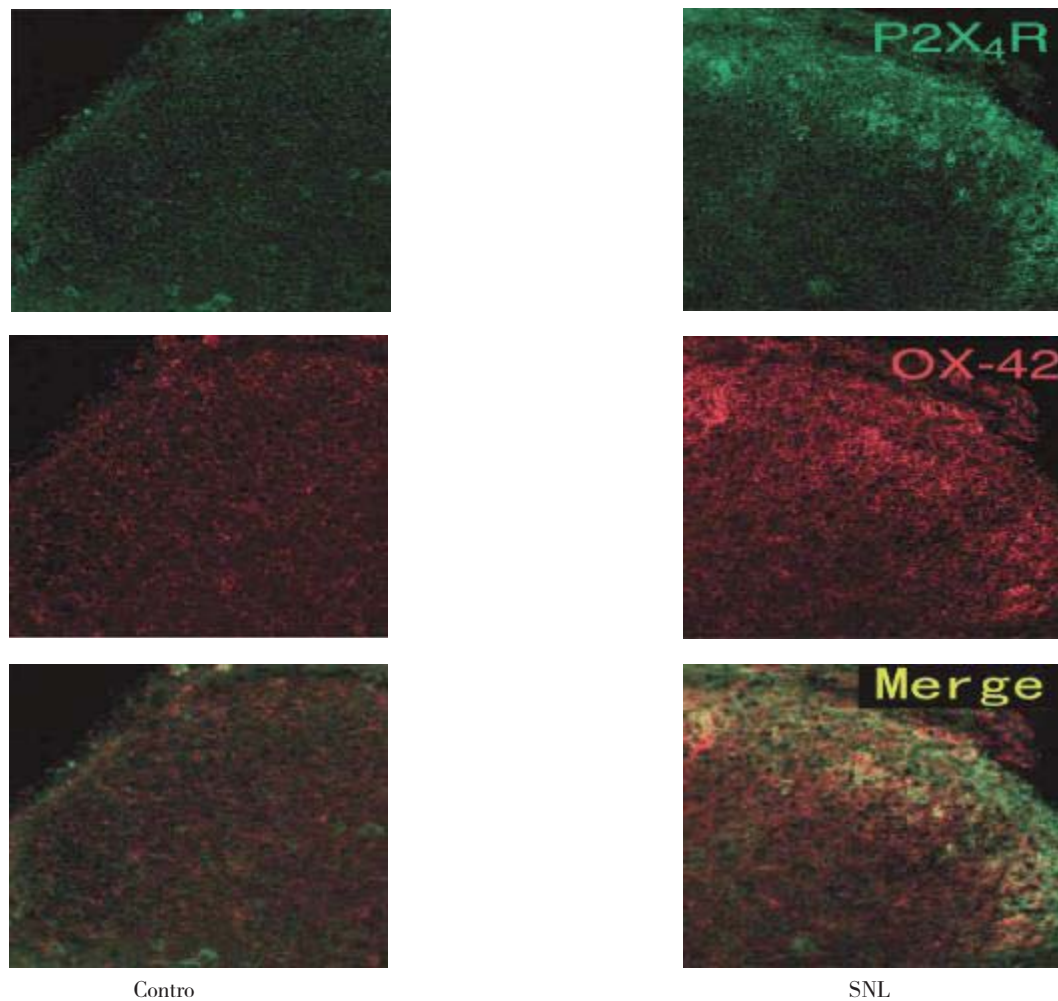


图 2 SWL 组 P2×4 表达

Fig. 2 P2×4 expression in SNL group

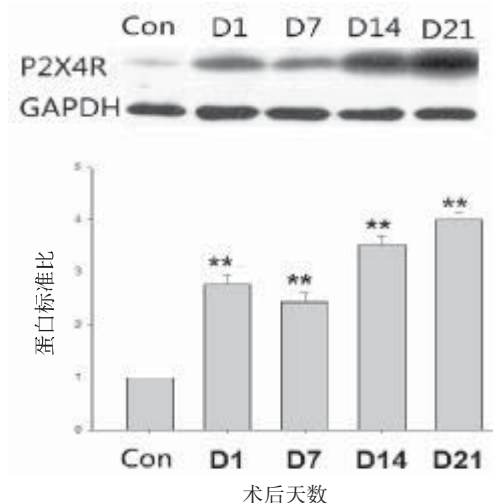


图 3 SNL 组术后第 1 天至第 21 天 P2X4 受体表达

Fig. 3 The expression levels of P2X4 receptor on day 1 to day 21 after surgery in SNL group

与对照组比较, \*\* $P < 0.01$ .

要的供能物质. ATP 可以作为重要的信号分子作用于激活的小胶质细胞表面, 通过嘌呤受体产生作用参与中枢和外周神经疼痛的发生机制. ATP 受体又分为 P1 和 P2 两大类, P1 又称腺苷受体; P2 受体又分为 P<sub>2X</sub> 和 P<sub>2Y</sub> 两大类.

小胶质细胞中的 P2 受体, 通过 ATP 受体激活小胶质细胞而起发细胞反应. Tsuda<sup>[3]</sup>研究发现, 小胶质细胞用 OX-42 标记, 结果发现表达 P<sub>2X4</sub> 受体标记上 OX-42 的小胶质细胞, 故提示 P<sub>2X4</sub> 受体只存在于小胶质细胞上, 而不存在神经元和星形细胞上.

近年研究提示, 脊髓中活化的小胶质细胞表达的 P<sub>2X4</sub> 受体参与了神经病理性疼痛的发生机制<sup>[2]</sup>, 鞘内注射 P<sub>2X4</sub> 受体拮抗剂后可下调 P<sub>2X4</sub> 受体表达, 从而减轻神经病理性疼痛<sup>[8,9]</sup>. 本研究结果表明, SNL 组大鼠从术后第 1 天开始, P<sub>2X4</sub> 受体的表达就显著高于对照组, 且一直持续至术后 21 d, 免疫组化结果和动物疼痛行为基本一致, 提示 P<sub>2X4</sub> 受体

在神经病理性疼痛大鼠脊髓小胶质细胞中表达明显升高, P<sub>2</sub>X<sub>4</sub> 受体参与了大鼠的神经病理性疼痛的发生发展, 这为神经病理性疼痛的发生机制提示了一个新的可能机制, 为其治疗提供了新的靶点<sup>[10,11]</sup>.

神经病理性疼痛大鼠脊髓小胶质细胞 P<sub>2</sub>X<sub>4</sub> 受体的表达明显增加, P<sub>2</sub>X<sub>4</sub> 受体参与了神经病理性疼痛的发生发展.

### [参考文献]

- [1] TSUDA M, INOVEK, SALTE M W. Neuropathic pain and spinal microglia a big problem from molecules in "small" glia[J]. Trends Neurosci, 2005, 28(2):107.
- [2] ZHANG Z, ZHANG Z Y, FAUSERU, et al. Mechanical allodynia and pinal up regulation of P2X4 receptor in experimental auto immune neuritis rats[J]. Neuroscience, 2008, 152(2):495 - 501.
- [3] TSUDA M, INJOUE K. Neuropathic pain and ATP receptors in spinal microglia [J]. Brain Nerve, 2007, 59(9): 953 - 959.
- [4] KIM S H, CHURG M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat[J]. Pain, 1992, 50: 355 - 363.
- [5] CHAPLAN S R, BACH F W, POGREL J W, et al. Quantitive assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. J Neurosci Methods, 1994, 53(1):55 - 63.
- [6] 彭伟, 张咸伟, 田学慷, 等. 永生小鼠小胶质细胞 P2X4 siRNA 靶点的筛选[J]. 华中科技大学学报:医学版, 2008, 37(5):657 - 660.
- [7] SWEITZE S M, SCHUBERT P, DELEO J A. Propentofylline, a glial modulating agent, exhibits antiallodynic properties in rat model of neuropathic pain [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2009, 297(3):1 210 - 1 217.
- [8] INOUE K, TSUDA M, KOIZUMI S. ATP- and adenosine-mediated-signaling in the central nervous system: chronic pain and microglia: involvement of the ATP receptor P2X4 [J]. J Pharmacol Sci, 2004, 94:112 - 114
- [9] MULLER C E. Emerging structures and ligands for P2X3 and P2X4 receptors—towards novel treatments of neuropathic pain [J]. Purinergic Signal, 2010, 6(2):259 - 269.
- [10] 陈灏, 杜小波. 双嘧达莫对多发性硬化症的治疗作用及机制的研究 [J]. 海南医学院学报, 2014, 20(4): 453 - 457.
- [11] 于熙, 田国刚, 田毅. 乌司他丁的脑保护作用研究进展 [J]. 海南医学院学报, 2010, 16(7):948 - 950. (2014 - 06 - 14 收稿)
- [1] 过氧化氢损伤的作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2):216.
- [9] 王颖, 张桂芳, 赵亮, 等. 葡萄籽提取物原花青素对糖尿病小鼠的抗氧化作用[J]. 中国老年学杂志, 2014, 1(34):433 - 435.
- [10] GOODARZI M T, NAVIDI A A, REZAEI M, et al. Oxidative damage to DNA and lipids: correlation with protein glycation in patients with type 1 diabetes [J]. J Clin Lab Anal, 2010, 24(2):72 - 76.
- [11] 李爱琴, 陆环, 徐文静, 等. 氧化应激与 2 型糖尿病的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(12):2 371 - 2 378.
- [12] DANIELLE M P H J, BOESTEN, ALVIN BERGER, et al. Multi-Targeted Mechanisms Underlying the Endothelial Protective Effects of the Diabetic-Safe Sweetener Erythritol [J]. POLS ONE, 2013, 8(6):1 - 12.
- [13] INAN OLMEZ, HUSEYIN OZYURT. Reactive oxygen species and ischemic cerebrovascular disease [J]. Neurochemistry International, 2012, 60(2):208 - 212. (2014 - 05 - 11 收稿)

(上接第 11 页)