网络出版时间:2023-10-09 08:50:47 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20230929.1227.006

内吗啡肽2对神经病理性痛大鼠背根神经节内μ-阿片受体表达的影响

谢雨杉,刘海帆,孙 駷,万法萍

摘要 目的 探讨在内吗啡肽2(EM2)的镇痛过程中,μ-阿片受体(MOR)的表达变化及胞内囊泡转运对其变化的影响。**方法** 成年雄性SD大鼠,随机分为3组:正常对照组、病理性痛组和药物组,病理性痛为坐骨神经分支选择性损伤(SNI)诱导的神经病理性痛(NP)。药物组为鞘内注射EM2的NP大鼠。采用免疫荧光单标染色和免疫印迹方法检测MOR总蛋白和磷酸化蛋白以及Rab7蛋白表达量的变化,采用免疫荧光双标染色方法检测MOR/Rab7和MOR/LAMP1免疫阳性标志物的表达变化。**结果** 与正常对照组比较,病理性痛组大鼠背根神经节(DRG)内MOR总蛋白和磷酸化蛋白的表达量降低($P<0.05$),Rab7蛋白的表达量明显增高($P<0.05$);MOR/Rab7免疫阳性标志物占Rab7或MOR、MOR/LAMP1免疫阳性标志物占LAMP1或MOR阳性标志物的比例均增高($P<0.05$)。鞘内多次注射EM2后,病理性痛大鼠的后足缩足反应阈值明显增高($P<0.01$),DRG内MOR总蛋白和磷酸化蛋白的表达量增高($P<0.05$),Rab7的表达量降低($P<0.05$)。MOR/Rab7阳性双标产物占Rab7或MOR阳性标志物、MOR/LAMP1阳性双标产物占LAMP1或MOR阳性标志物比例均降低($P<0.05$)。**结论** 在镇痛过程中,EM2抑制SNI的NP大鼠DRG内Rab7的表达,减少MOR向溶酶体运输,促进MOR复敏。

关键词 内吗啡肽-2;μ-阿片受体;背根神经节;神经病理性痛;囊泡运输

中图分类号 R 745.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)11-1833-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.11.006

神经病理性痛(neuropathic pain,NP)是神经系统原发性损伤或功能障碍所引起的疼痛,阿片类药物对NP的治疗效果不理想[1]。研究[1]表明,背根神经节(dorsal root ganglion,DRG)中μ-阿片受体(μ-opioid receptor,MOR)表达下调是阿片类药物疗效不佳的主要原因之一。MOR属于G蛋白偶联受体,与配体结合后,发生受体内化和脱敏现象[1]。研究[2]表明,Rab7是胞内运输的关键调控因子,与疼痛状态下的MOR表达量降低有关。

内吗啡肽-2(endomorphin-2,EM2)是MOR的内源性激动剂,参与病理性痛的形成[3]和镇痛过程[4]。研究[5]表明,EM2可诱导MOR羧基末端第375位丝氨酸(Ser^{375})发生快速磷酸化,此过程在其复敏中发挥重要作用。糖尿病性痛大鼠脊髓中,EM2不仅增加了磷酸化MOR的表达量,还促进MOR的表达[3],提示在镇痛过程中,EM2可促进MOR的功能恢复。因此,该研究以NP模型为研究对象,初步探讨在EM2介导的镇痛过程中,大鼠DRG内MOR的表达变化及胞内囊泡转运对其表达的影响,以加深对内源性镇痛系统功能的理解。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 健康成年SD大鼠,雄性,初始体质量200~220 g,由徐州医科大学实验动物中心提供。大鼠随机分为正常对照组(Control组)、病理性痛组(SNI-NS组)和药物组(SNI-EM2组),每组10只。动物饲养和实验操作均符合徐州医科大学动物伦理委员会的要求和规定(伦理号:202208S027)。

1.2 主要仪器与试剂

1.2.1 主要仪器 Von Frey纤维丝购自美国Stoelting公司,PE-10导管(i.d. 0.28 mm,o.d. 0.64 mm)购自美国Scientific Industries公司,荧光共聚焦显微镜(型号:STELLARIS 5)购自日本Olympus公司,微量进样针购自上海高鸽工贸有限公司。

1.2.2 主要试剂 MOR抗体(货号:ab17394,ab10275)、Rab7抗体(货号:ab137029)购自美国Abcam公司,Ser^{375}MOR抗体(货号:CSB-PA168551)购自武汉华美生物工程有限公司,actin抗体(货号:20536-1-AP)购自武汉三鹰生物技术有限公司,山羊抗兔IRDye 800CW二抗(货号:V926-32211)购自徐州微科曼得生物工程有限公司,溶酶体相关膜蛋白

2023-07-06 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81801104)

作者单位:徐州医科大学人体解剖学教研室,徐州 221004

作者简介:谢雨杉,女,硕士研究生;

万法萍,女,讲师,硕士生导师,责任作者,E-mail:fapingwan@163.com

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1(lysosome-associated membrane proteins 1,LAMP1)抗体(货号:bs-1970R)购自北京博奥森生物技术有限公司,Alexa488 驴抗豚鼠 IgG(货号:706-545-148)购自美国 Jackson 公司,Alexa594 驴抗兔 IgG(货号:#8889)购自美国 Cell Signaling Technology 公司,EM2(货号:GC10059)购自美国 GlpBio 公司。

1.3 方法

1.3.1 病理性痛模型的制备 该研究参照 Decosterd et al[6]的方法,制备坐骨神经分支选择性损伤(spared nerve injury,SNI)诱导的 NP 模型。大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉后,切开左侧大腿背侧皮肤,钝性分离股二头肌,暴露坐骨神经及其 3 个分支:胫神经、腓总神经和腓肠神经,双重结扎并离断胫神经和腓总神经,保留并避免牵拉腓肠神经,逐层缝合手术切口。术后对切口进行常规消毒抗炎处理直至愈合。

1.3.2 后足缩足反应阈值(paw withdrawal threshold,PWT)的测定 测试前 3 天,将大鼠放入行为学测试平台适应环境,每天 1 h。手术当天、术后 1、3、5、7 d 以及给药后 1、3、5、7、9 d 使用校准的不同强度的 Von Frey 纤维丝测定大鼠的 PWT 值。测定时,待大鼠安静后,从最低刺激强度开始,用纤维丝垂直刺激大鼠足底外侧皮肤,持续 3 ~5 s,当大鼠出现抬足、舔足或躲避等行为视为阳性反应。每个刺激强度重复测试 5 次,相邻两次刺激时间间隔 5 min 以上,以能引起 3 次以上阳性反应的最低刺激强度作为 PWT 值。

1.3.3 鞘内置管和给药 大鼠麻醉后,以两侧髂前上棘连线中点为中心,沿脊柱两侧作纵向切口,钝性分离肌肉,暴露并去除第 6 腰椎棘突,将 PE-10 导管由腰 5 与腰 6 棘突间隙刺入蛛网膜下隙并向头端推入约 2 cm,置管过程中可见导管内有清亮的脑脊液流出。固定导管,依次缝合肌肉和皮肤。置管术后的大鼠需分笼单独饲养。

鞘内给药时用微量注射器将 5 μl 药液或无菌生理盐水缓慢推入 PE-10 导管内,推注结束后再推入 10 μl 无菌生理盐水,使药物充分注射至蛛网膜下隙。推入过程以使大鼠一直保持安静状态为宜。

1.3.4 Western blot 实验 大鼠麻醉后,迅速取出腰 4 ~6 节段的 DRG。提取蛋白后,采用 BCA 法检测上清液中的蛋白浓度。使用聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳后将蛋白转移到 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 30 min 后,将 PVDF 膜置于一抗中:MOR 抗体(1∶1 000)、Rab7 抗体(1∶1 000)、Ser^{375} MOR 抗体(1∶1 000)或 actin 抗体(1∶1 000),4 ℃摇床过夜。TBST 漂洗 3 次,每次 10 min。滴加相应的二抗(1∶15 000),摇床上避光反应 2 h 后,TBST 漂洗 3 次,每次 10 min。使用双红外激光成像系统扫描成像。

1.3.5 免疫荧光组织化学染色 大鼠麻醉后,经左心室、升主动脉灌注 200 ml 生理盐水后,灌注 400 ml 4% 多聚甲醛溶液,取腰 4 ~6 节段 DRG 后固定 24 h,经 30% 蔗糖溶液脱水后行冰冻切片。10% FBS 室温封闭 30 min 后,滴加一抗:MOR 抗体(1∶500)、Rab7 抗体(1∶200)或 LAMP1 抗体(1∶200),4 ℃孵育 48 h,0.1 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 10 min。滴加二抗:Alexa488 驴抗豚鼠 IgG(1∶500)和 Alexa594 驴抗兔 IgG(1∶500),室温避光孵育 4 h,0.1 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 10 min,荧光封片剂封片后,荧光共聚焦显微镜拍照采集图像。

1.4 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.4 软件对实验数据进行统计分析与图形制作。Western blot 结果采用 Image J 软件进行灰度值分析。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,PWT 值比较采用双因素重复测量方差分析,其他数据的组间比较采用 One-way ANOVA,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SNI 对大鼠 PWT 值的影响 坐骨神经分支选择性损伤诱导的 NP 模型,可产生持久的机械痛行为学表现,是研究 NP 常用的模型之一。该实验 SNI 模型大鼠在术后第 3 天术侧 PWT 值与正常对照组比较明显降低(分组,$F=430.8$,$P<0.01$),术后第 7 天降低至最低水平,且至少持续至术后第 21 天。手术对侧的 PWT 值与正常对照组比较差异无统计学意义(图 1)。

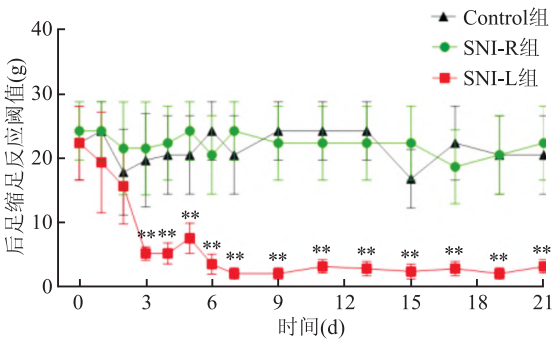

图 1 SNI 模型大鼠后足 PWT 的测定($n=6$)

与 Control 组比较:**$P<0.01$

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 三组大鼠后足缩足反应阈值比较($\bar{x} \pm s, n=6$, g)

组别	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d
Control	24.17 ± 4.491	24.17 ± 4.491	21.50 ± 7.148	24.17 ± 4.491	24.17 ± 4.491	22.33 ± 5.680
SNI-NS	2.23 ± 0.898**	2.57 ± 1.134**	3.33 ± 1.033**	3.00 ± 1.095**	2.57 ± 1.134**	3.00 ± 1.095**
SNI-EM2	3.33 ± 1.633	22.33 ± 5.680##	22.33 ± 5.680##	20.50 ± 6.025##	24.16 ± 4.491##	22.33 ± 5.680##
F 值	113.60	48.06	44.77	21.28	34.41	28.87
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

与 Control 组比较：** $P<0.01$；与 SNI-NS 组比较：## $P<0.01$

2.2 EM2 的镇痛作用 该实验使用 SNI 术后 7 d 的 NP 大鼠，鞘内注射不同剂量（1、5、10、20、40 μg）的 EM2，给药后每隔 10 min 测定大鼠术侧后足 PWT 值，研究 EM2 作用的时程和量效变化。结果显示，鞘内注射 1、5、10 μg 的 EM2 对 SNI 的 NP 大鼠未产生明显的镇痛作用，20 和 40 μg EM2 的镇痛效果和时程变化相似，即 EM2 给药 10 min 后的镇痛效应最显著（时间，$F=88.44$，$P<0.01$），给药 20 min 后药效降低，给药 30 min 后，EM2 的镇痛效应消失，大鼠 PWT 值恢复至给药前水平（图 2）。选择达到镇痛效应的最小剂量作为多次给药剂量，该实验 EM2 长期给药剂量为 20 μg。

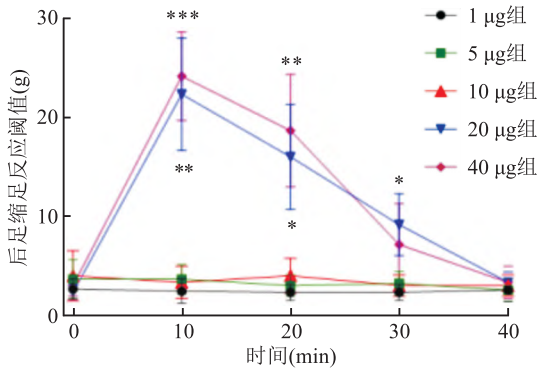

图 2 鞘内注射 EM2 对 SNI 的 NP 大鼠镇痛作用的时程和量效变化

与 0 min 比较：* $P<0.05$，** $P<0.01$，*** $P<0.001$

病理性痛组和药物组大鼠于术后第 7 天开始进行鞘内注射，每天 1 次，连续 10 d，每隔 1 天于注射结束 10 min 后测定大鼠的 PWT 值。与注射前比较，鞘内注射生理盐水对 NP 大鼠 PWT 值没有明显的影响。与病理性痛组比较，鞘内注射 EM2 后，大鼠的 PWT 值明显升高（分组，$F=376.8$，$P<0.01$），连续给药 10 d，EM2 仍可有效缓解 SNI 的 NP，且多次鞘内注射 EM2，未见明显的镇痛效果降低现象（表 1 和图 3）。

2.3 EM2 对 SNI 的 NP 大鼠 DRG 内 MOR 表达的影响 免疫荧光染色结果显示，MOR 免疫阳性产物主要分布于 DRG 的中、小直径神经元胞体和部分神经纤维中（图 4A）。NP 后，大鼠 DRG 内 MOR 阳性细胞数量明显降低（$F=26.19$，$P<0.001$）（图 4A、B），鞘内注射 EM2 后，MOR 阳性细胞数量明显升高（$F=26.19$，$P<0.001$），Western blot 结果与形态学结果变化相似，与正常对照组比较，病理性痛组大鼠 DRG 内 MOR 的表达量下降（$F=7.749$，$P<0.05$）（图 4C、D），药物组大鼠 DRG 内 MOR 蛋白的表达量升高（$F=7.749$，$P<0.05$）（图 4C、D）。该实验进一步检测 MOR 磷酸化表达量的变化，结果显示，病理性痛组大鼠 DRG 内 Ser^{375} MOR 蛋白的表达量较正常对照组降低（$F=9.679$，$P<0.05$），药物组大鼠 DRG 内 Ser^{375} MOR 蛋白的表达量较病理性痛组升高（$F=9.679$，$P<0.05$）（图 4E、F）。

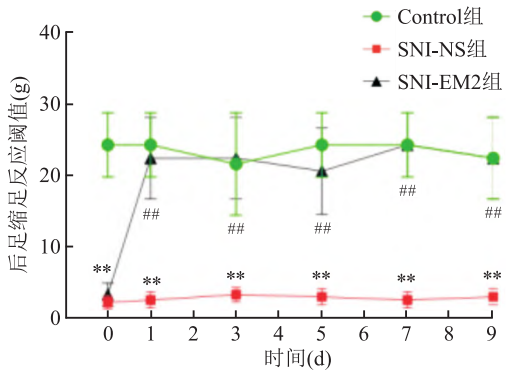

图 3 EM2 对 SNI 的 NP 大鼠后足 PWT 值的影响

与 Control 组比较：** $P<0.01$；与 SNI-NS 组比较：## $P<0.01$

2.4 胞内转运机制对 EM2 镇痛过程中的 MOR 表达变化的影响 该实验使用免疫荧光单标染色和 Western blot 方法，研究了正常对照组、病理性痛组及药物组大鼠 DRG 内 Rab7 的表达变化。结果显示，与正常对照组比较，病理性痛组中 Rab7 的表达量明显增高（$F_{IF}=22.67$，$P<0.05$；$F_{Western\ blot}=12.19$，$P<0.01$）。鞘内注射 EM2 后，药物组中的 Rab7 的表达量较病理性痛组降低（$F_{IF}=22.67$，$P<0.01$；$F_{Western\ blot}=12.19$，$P<0.05$）（图 5）。进一步对 3 组大鼠 DRG 神经元进行 MOR 与 Rab7 免疫荧

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

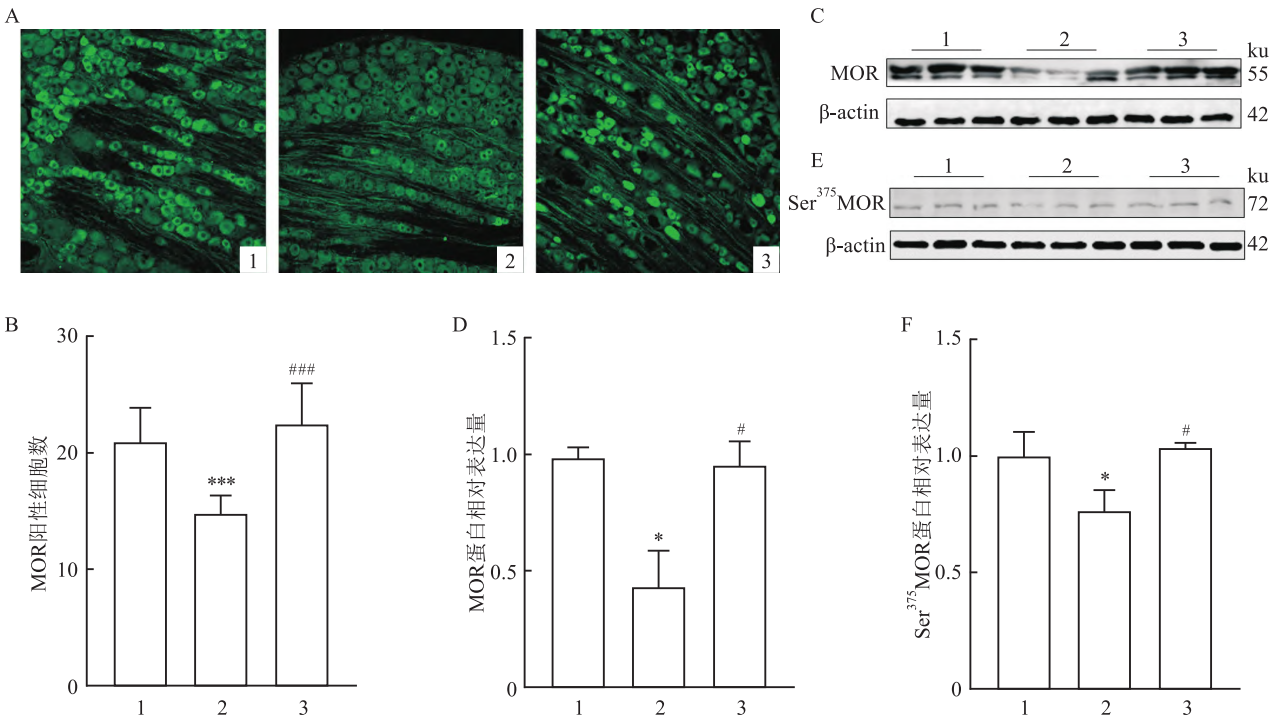

图 4　EM2 对 SNI 的 NP 大鼠 DRG 内 MOR 表达的影响

A：大鼠 DRG 内 MOR 的免疫荧光染色 ×200；B：对免疫阳性神经元数量进行统计学分析（$n=4$）；C：Western blot 方法研究上述 3 组大鼠 DRG 内 MOR 蛋白的表达变化；D：对 Western blot 结果进行统计学分析；E：Western blot 方法研究上述 3 组大鼠 DRG 内 Ser^{375}MOR 蛋白的表达变化；F：对 Western blot 结果进行统计学分析（$n=3$）；1：Control 组；2：SNI-NS 组；3：SNI-EM2 组；与 Control 组比较：$^{*}P<0.05$，$^{***}P<0.001$；与 SNI-NS 组比较：$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#\#}P<0.001$

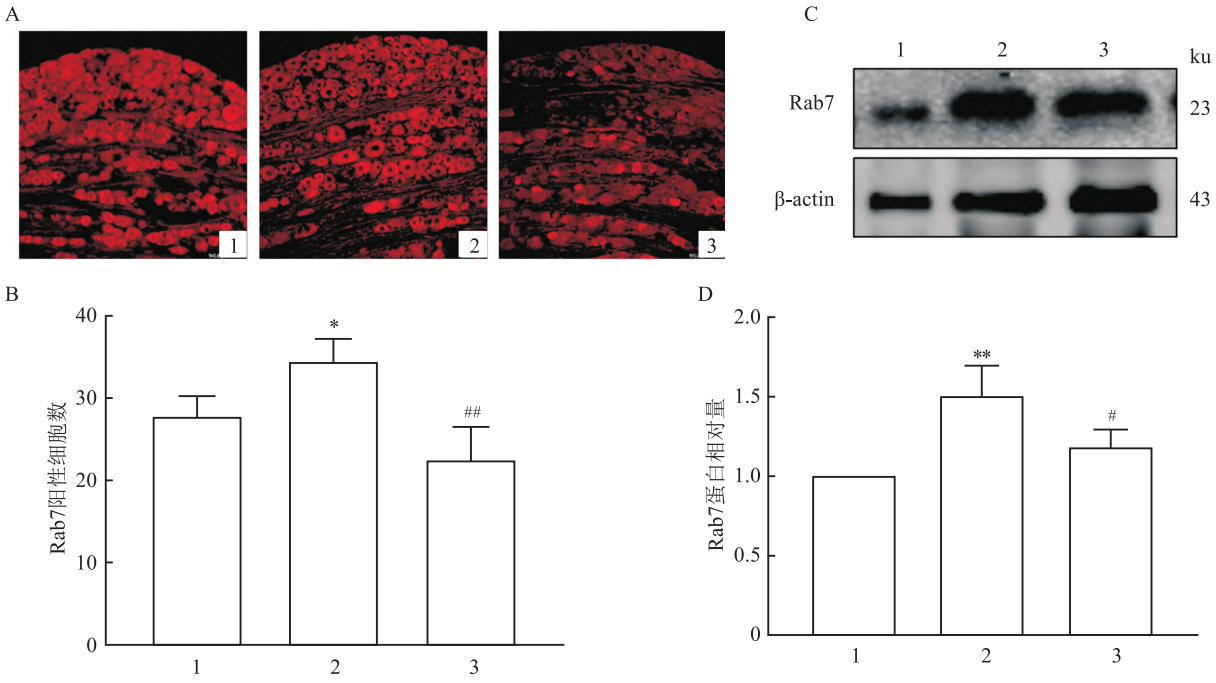

图 5　EM2 对 SNI 的 NP 大鼠 DRG 内 Rab7 表达的影响

A：大鼠 DRG 内 Rab7 的免疫荧光染色 ×200；B：对免疫阳性神经元数量进行统计学分析（$n=4$）；C：Western blot 方法研究上述 3 组大鼠 DRG 内 Rab7 蛋白的表达变化；D：对 Western blot 结果进行统计学分析（$n=3$）；1：Control 组；2：SNI-NS 组；3：SNI-EM2 组；与 Control 组比较：$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与 SNI-NS 组比较：$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

光双重标记染色。结果显示:SNI 的 NP 大鼠 DRG 内 MOR/Rab7 免疫双标阳性产物占 Rab7 阳性标志物或 MOR 阳性标志物的比例较正常对照组均明显升高(F_{Rab7} = 10.76, P < 0.01; F_{MOR} = 5.08, P < 0.05),当给予 EM2 处理后,MOR/Rab7 免疫双标阳性产物占 Rab7 阳性标志物或 MOR 阳性标志物的比例较病理性痛组均明显降低(F_{Rab7} = 10.76, P < 0.05; F_{MOR} = 5.08, P < 0.05)(图 6)。

溶酶体相关膜蛋白 1(lysosomal associated membrane protein 1,LAMP1)分布于自噬细胞器和内溶酶体细胞器,可作为溶酶体标志物。免疫荧光双标染色结果显示:与正常对照组比较,病理性痛组大鼠 DRG 内 MOR/LAMP1 免疫双标阳性产物占 LAMP1 或 MOR 免疫阳性产物的比例均增高(F_{LAMP1} = 6.215, P < 0.05; F_{MOR} = 7.681, P < 0.01)。鞘内注射 EM2 后,与病理性痛组比较,药物组大鼠 DRG 内 MOR/LAMP1 免疫双标阳性产物占 LAMP1 或 MOR 免疫阳性产物的比例均明显降低(F_{LAMP1} = 6.215, P < 0.05; F_{MOR} = 7.681, P < 0.05)(图 7)。

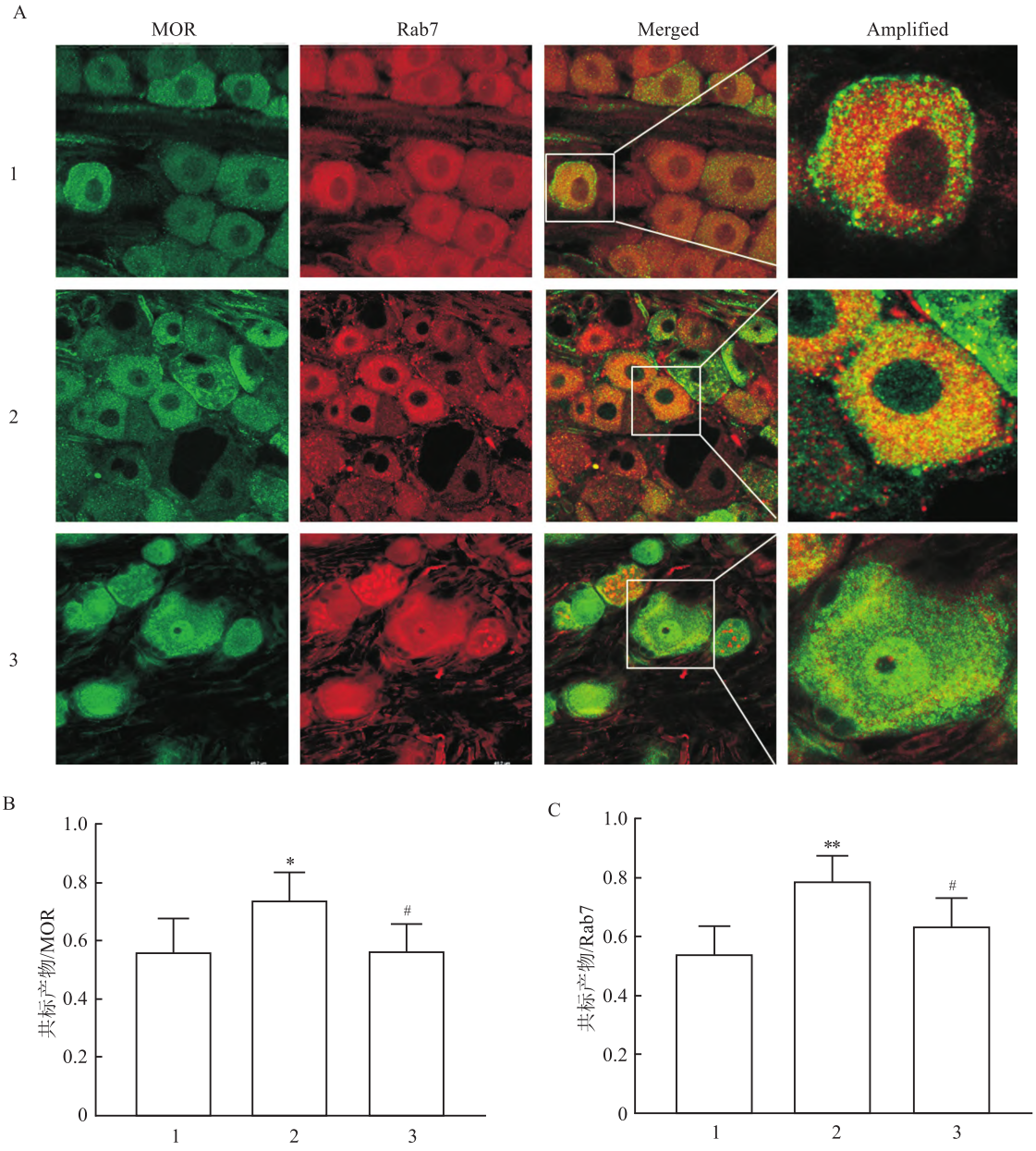

图 6 免疫荧光双标染色检测 MOR 与 Rab7 双标阳性产物

A:DRG 中 MOR 与 Rab7 进行免疫荧光双重标记染色 ×630;B、C:对免疫荧光染色结果进行统计学分析;1:Control 组;2:SNI-NS 组;3:SNI-EM2 组;与 Control 组比较:$^{*}P$ < 0.05, $^{**}P$ < 0.01;与 SNI-NS 组比较:$^{\#}P$ < 0.05

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

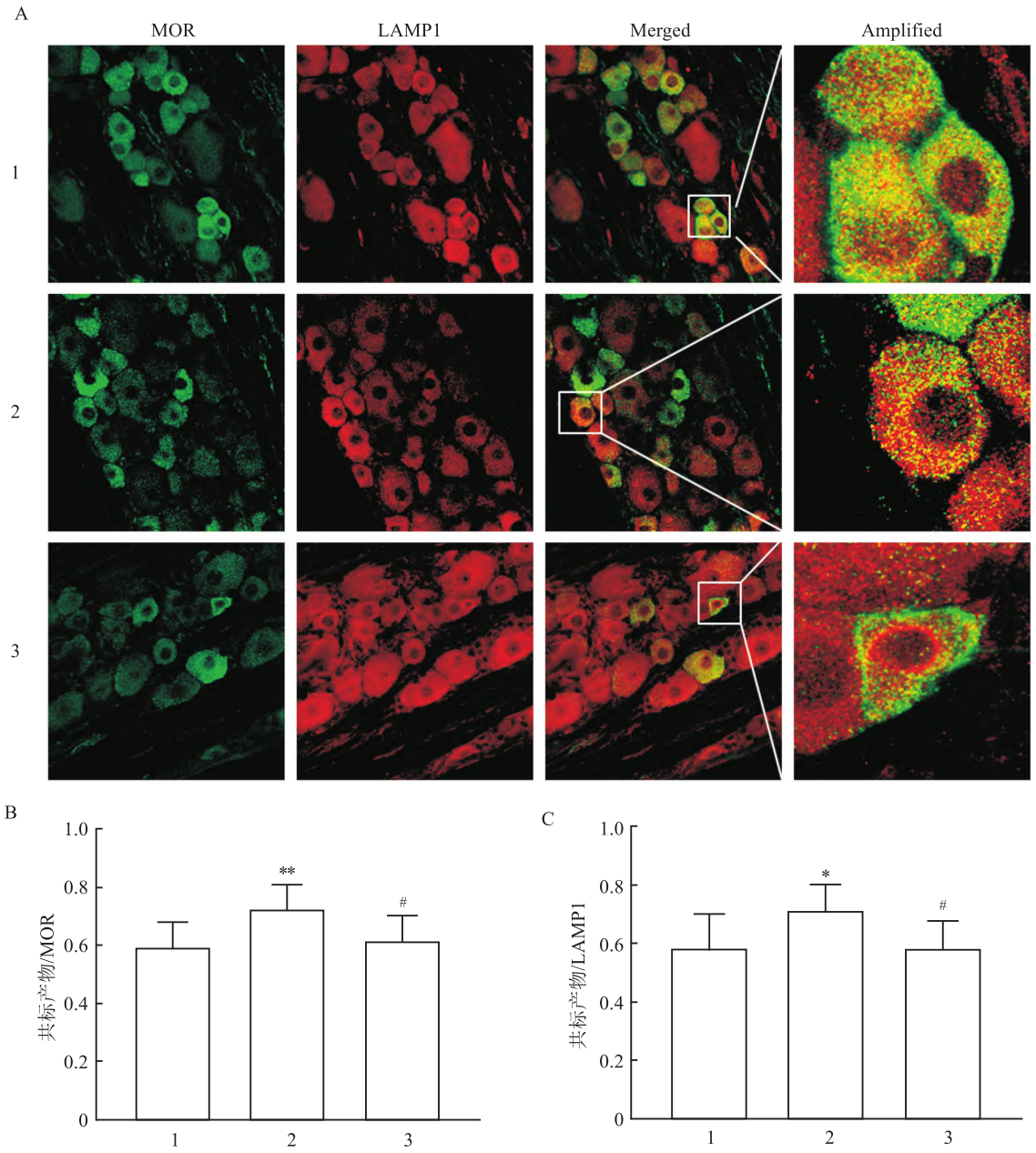

图 7　免疫荧光双标染色检测 MOR 与 LAMP1 双标阳性产物

A：DRG 中 MOR 与 LAMP1 进行免疫荧光双重标记染色 ×630；B、C：对免疫荧光染色结果进行统计学分析；1：Control 组；2：SNI-NS 组；3：SNI-EM2 组；与 Control 组比较：$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与 SNI-NS 组比较：$^{\#}P<0.05$

3　讨论

DRG 是外周感觉性信息传递至中枢的第一站。DRG 神经元内的 MOR，是内源性阿片系统的重要组成部分，也是临床上阿片类药物作用的主要受体。既往研究[7]表明，在阿片类药物治疗效果欠佳的 NP 和糖尿病 NP 等动物模型 DRG 神经元内 MOR 的表达量降低，但是在阿片类物质镇痛效果较好的炎性痛模型中，脊髓背角和 DRG 神经元内 MOR 的表达量增加，提示 MOR 的表达量与阿片类药物的镇痛疗效密切相关。

作为 MOR 的天然的内源性配体，EM2 能有效缓解炎性痛、癌性痛和 NP[8]，尤其对传统镇痛药物不敏感的糖尿病 NP 具有较好的镇痛效果[3]。该实验显示多次注射 EM2 未见明显的药效降低。Wu et al[9]研究显示，鞘内注射携带 EM2 的重组腺病毒对 SNI 的 NP 具有较好的镇痛效应，且没有成瘾和耐受等副作用，以上结果与该研究结果一致，但是作者未研究 DRG 或脊髓中 MOR 的表达与 EM2 介导的镇痛效应之间的关系。体外研究显示，EM2 可对人神

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y[10] 和人乳腺癌细胞 MCF7[11] 中 MOR 的 mRNA 表达产生正向和负向的调节作用,推测这种调节的差异性是由于 EM2 对不同亚型腺苷酸环化酶活性的作用不同,抑制或促进 cAMP 表达,从而对基因转录水平产生不同影响。然而文中未探究 EM2 介导的 MOR 蛋白表达变化。研究[12]表明,在炎症、神经病变或骨损伤等病理状态下,外周阿片受体的数量增加是阿片类药物镇痛作用增强的原因之一。该实验在体研究中显示,药物组 DRG 内 MOR 的表达量明显升高,提示 MOR 的表达增加可能是 EM2 多次注射未见明显药效降低的原因。

MOR 蛋白结构内大约有 20 个潜在的磷酸化位点有助于受体脱敏和胞吞作用。研究[13]显示,EM2 对 MOR 具有高亲和力,其与 MOR 结合后,可使 Ser^{375}MOR 发生快速磷酸化[14]。该实验连续鞘内注射 EM2 明显增加 SNI 大鼠 DRG 内 Ser^{375}MOR 蛋白的含量,与上述结果一致。磷酸化后的受体与 β-抑制蛋白 2(β-arrestin 2)结合,形成 MOR-β-arrestin 2 复合体内吞进入胞内。Rab 蛋白是一类小分子调节蛋白,广泛存在于细胞质膜和细胞器膜中,其中 Rab7 是将内吞囊泡运输至晚期溶酶体的关键调节蛋白,可作为受体降解失活的指标[15]。该研究表明,SNI 的 NP 大鼠 DRG 内 Rab7 的表达增加,且 MOR/Rab7 和 MOR/LAMP1 免疫荧光双标产物占 Rab7 阳性标志物或 LAMP1 阳性标志物的比例增高。提示 SNI 的 NP 后 DRG 内 Rab7 表达上调,MOR 进入溶酶体发生降解,导致受体数量减少。这与 Mousa et al[2] 在糖尿病 NP 大鼠 DRG 的观察的结果一致。鞘内注射 EM2 后,药物组大鼠 DRG 内 Rab7 的表达较病理性痛组降低,MOR/Rab7 和 MOR/LAMP1 免疫荧光双标产物占 Rab7 阳性标志物或 LAMP1 阳性标志物的比例降低。提示 EM2 作用后,内吞的受体囊泡进入溶酶体降解途径减少,这可能是药物组大鼠 DRG 神经元中 MOR 表达增加的原因之一。

神经 – 免疫 – 内分泌环路是存在于动物和人体内重要的调节网络,维持机体稳态平衡。神经生长因子(nerve growth factor,NGF)是神经元的营养物质,由外周组织合成,逆行运输至脊髓和 DRG 的神经元中。外周神经损伤可阻断 NGF 的运输,从而降低其在脊髓和 DRG 神经元中的表达。EM2 作为内源性阿片肽,除了发挥镇痛作用,在神经系统的保护和分化过程中均发挥着重要的作用。阿片肽可促进 NGF 的表达[16]。外源性 NGF 可增加初级神经元 MOR 的表达[17],而 Mousa et al[2] 在糖尿病性痛大鼠 DRG 内显示 NGF 可以抑制胞内 Rab7 的表达,由此推测,SNI 的 NP 状态下,神经体液因素可能也参与了 EM2 与 MOR 结合后的受体胞内转运过程。

参考文献

[1] Li L, Chen J, Li Y Q. The downregulation of opioid receptors and neuropathic pain [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(6): 5981.

[2] Mousa S A, Shaqura M, Khalefa B I, et al. Rab7 silencing prevents μ-opioid receptor lysosomal targeting and rescues opioid responsiveness to strengthen diabetic neuropathic pain therapy [J]. Diabetes, 2013, 62(4): 1308 – 19.

[3] Kou Z Z, Wan F P, Bai Y, et al. Decreased endomorphin-2 and μ-opioid receptor in the spinal cord are associated with painful diabetic neuropathy [J]. Front Mol Neurosci, 2016, 9: 80.

[4] Bedini A, Spampinato S. Innovative opioid peptides and biased agonism: novel avenues for more effective and safer analgesics to treat chronic pain [J]. Curr Med Chem, 2018, 25(32): 3895 – 916.

[5] Qiu Y, Law P Y, Loh H H. Mu-opioid receptor desensitization: role of receptor phosphorylation, internalization, and representation [J]. J Biol Chem, 2003, 278(38): 36733 – 9.

[6] Decosterd I, Woolf C J. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain [J]. Pain, 2000, 87(2): 149 – 58.

[7] Mousa S A, Machelska H, Schäfer M, et al. Immunohistochemical localization of endomorphin-1 and endomorphin-2 in immune cells and spinal cord in a model of inflammatory pain [J]. J Neuroimmunol, 2002, 126(1 – 2): 5 – 15.

[8] Gu Z H, Wang B, Kou Z Z, et al. Endomorphins: promising endogenous opioid peptides for the development of novel analgesics [J]. Neurosignals, 2017, 25(1): 98 – 116.

[9] Wu F, Xu X, Miao X, et al. Effect of recombinant adenovirus coding for endomorphin-2 on neuropathic pain in rats [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2012, 5(9): 914 – 23.

[10] Yu X, Mao X, Blake A D, et al. Morphine and endomorphins differentially regulate micro-opioid receptor mrna in shsy-5y human neuroblastoma cells [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 306(2): 447 – 54.

[11] Gach K, Piestrzeniewicz M, Fichna J, et al. Opioid antagonist-induced regulation of the mu-opioid receptor expression in mcf-7 breast cancer cell line [J]. Endocr Regul, 2009, 43(1): 23 – 8.

[12] Stein C, Schäfer M, Machelska H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids [J]. Nat Med, 2003, 9(8): 1003 – 8.

[13] Varamini P, Blanchfield J T, Toth I. Endomorphin derivatives with improved pharmacological properties [J]. Curr Med Chem, 2013, 20(22): 2741 – 58.

[14] Williams J T, Ingram S L, Henderson G, et al. Regulation of μ-

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

opioid receptors: desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance [J]. Pharmacol Rev, 2013, 65(1): 223 - 54.
[15] Guerra F, Bucci C. Multiple roles of the small gtpase rab7 [J]. Cells, 2016, 5(3): 34.
[16] Lin Y M, Tang Y, Fu Y, et al. An opioid receptor-independent mechanism underlies motility dysfunction and visceral hyperalgesia in opioid-induced bowel dysfunction [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2021, 320(6): G1093 - 104.
[17] Shaqura M, Khalefa B I, Shakibaei M, et al. Reduced number, g protein coupling, and antinociceptive efficacy of spinal mu-opioid receptors in diabetic rats are reversed by nerve growth factor [J]. J Pain, 2013, 14(7): 720 - 30.

Effect of endomorphin 2 on expression of μ-opioid receptors in the dorsal root ganglion in rats with neuropathic pain

Xie Yushan, Liu Haifan, Sun Tao, Wan Faping
(*Dept of Human Anatomy, Xuzhou Medical University, Xuzhou* 221004)

Abstract ***Objective*** To explore the expression of the μ-opioid receptor (MOR) and the effects of intracellular vesicle transport on the MOR expression during endomorphin 2 (EM2) analgesia. ***Methods*** Adult male SD rats were randomly divided into 3 groups: control (naive) group, neuropathic pain group and drug group. Spared nerve injury (SNI) induced neuropathic pain rats were employed as the pain model. The drug group rats were the SNI pain ones intrathecally injected with EM2. The methods of immunofluorescence single staining and Western blot were used to detect the expression of MOR total protein, phosphorylated protein and Rab7 protein. Immunofluorescence double staining was used to detect the expression of MOR/Rab7 and MOR/LAMP1 co-labeled immunoreactivity. ***Results*** Compared with the control group, the expression of total MOR protein and phosphorylated protein in the dorsal root ganglion (DRG) of the SNI pain rats decreased ($P<0.05$), and the expression of Rab7 significantly increased ($P<0.05$). The expression of MOR/Rab7 co-labeled immunoreactivity in Rab7 and MOR immunoreactive (-ir) products and MOR/LAMP1 co-labeled immunoreactivity in MOR and LAMP1-ir products both increased ($P<0.05$). Multiple intrathecal injection of EM2 significantly increased paw withdrawal threshold in the SNI neuropathic pain rats ($P<0.01$), the expression of MOR protein and phosphorylated protein in DRG was increased ($P<0.05$), while the expression of Rab7 decreased ($P<0.05$). Compared with the control group, the expression of MOR/Rab7 positive products in Rab7 and MOR positive ones decreased, and the expression of MOR/LAMP1 positive products in LAMP1 and MOR positive markers decreased ($P<0.05$). ***Conclusion*** In the process of analgesia, EM2 inhibits the expression of Rab7 in the DRG of SNI neuropathic pain rats, reduces the transport of MOR to lysosomes, and promotes the re-sensitization of MOR.

Key words endomorphin 2; μ-opioid receptor; dorsal root ganglion; neuropathic pain; vesicle transport

(上接第 1832 页)

brain regions on the right side of TBI, and the only brain regions that spilled over to the contralateral side (left) were cortical region 1 and midbrain regions. RT-qPCR results showed that GFAP mRNA was highly expressed in all brain regions on the right side of TBI, affecting the contralateral cortex and midbrain regions. Western blot results showed that GFAP protein was highly expressed in all brain regions on the right side of TBI, and it spread to the contralateral midbrain regions. ***Conclusion*** TBI can cause the activation of astrocytes and increase GFAP expression in the right brain regions, while also affecting the contralateral (left) cortex 1 and midbrain regions.

Key words traumatic brain injury; astrocyte; GFAP; cortex; midbrain; rats

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net