

川芎嗪通过抑制脊髓小胶质细胞活化缓解吗啡耐受

陈璐¹, 李佳婕¹, 潘彩龙², 周丹丽¹, 刘文涛², 张广钦^{1*}(¹中国药科大学临床药理学教研室, 南京 211198; ²南京医科大学江苏省神经退行性疾病重点实验室, 南京 210029)

摘要 探讨川芎嗪对脊髓小胶质细胞活化和慢性吗啡耐受的影响并考察其作用机制。运用水浴甩尾法检测慢性吗啡耐受小鼠甩尾痛阈; 免疫荧光法检测小鼠脊髓水平小胶质细胞标记分子 (ionized calcium binding adapter molecule 1, IBA1) 的变化情况; Western blot 法检测 p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 磷酸化水平的改变, 以及 RT-PCR 法检测川芎嗪对慢性吗啡耐受过程中白细胞介素-1 β (IL-1 β) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) mRNA 表达水平的影响。实验结果发现, 川芎嗪 (15, 30, 60 mg/kg) 能够剂量依赖性地抑制吗啡引起的脊髓 IBA-1、p-p38 MAPK、p38、TNF- α 和 IL-1 β 水平的升高, 改善慢性吗啡耐受。研究结果表明, 川芎嗪能显著改善慢性吗啡耐受, 其机制可能与抑制小胶质细胞 p38 MAPK 信号通路有关。

关键词 川芎嗪; 吗啡; 慢性耐受; 小胶质细胞

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2015)02-0230-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150216

Tetramethylpyrazine attenuates morphine tolerance through suppressing spinal microglia activation in mice

CHEN Lu¹, LI Jiajie¹, PAN Cailong², ZHOU Danli¹, LIU Wentao², ZHANG Guangqin^{1*}¹Department of Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198;²Jiangsu Provincial Key Laboratory for Neurodegenerative Diseases, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Abstract The aim of the present study was to investigate the effects and possible mechanism of tetramethylpyrazine (TMP) on morphine-induced microglia activation and tolerance. The antinociception and morphine tolerance were assessed in mice using hot-water tail flick test. IBA-1 (ionized calcium binding adapter molecule 1), the marker of microglia, was detected by immunofluorescence method. The expression of p-p38 MAPK and total p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase, MAPK) was analyzed by Western blot; real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression level of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β). Results showed that TMP (15, 30, 60 mg/kg, ip) inhibited morphine-induced up-regulation of IBA-1, p-p38, TNF- α and IL-1 β in a dose-dependent manner, yet with no effect on the expression of total p38 MAPK. In conclusion, TMP significantly inhibited the activation of microglia evoked by morphine via p38 MAPK signaling pathway, thus attenuating morphine antinociception tolerance.

Key words tetramethylpyrazine; morphine; chronic tolerance; microglia

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81171044)

吗啡 (morphine) 为经典的阿片受体激动剂, 因其强大的镇痛作用成为临床广泛应用的强效镇痛药。然而, 吗啡耐受的发生发展严重限制了临床应用。吗啡耐受 (morphine tolerance) 是指长期应用吗

啡后其镇痛作用逐渐减弱, 必须增加剂量才能得到原来的药效。目前, 关于吗啡产生耐受作用的机制还未完全阐明清楚。越来越多的研究证实, 胶质细胞尤其是小胶质细胞的活化在吗啡耐受过程中发挥

了重要作用^[1]。吗啡可以直接或间接作用于小胶质细胞^[2-5],引起小胶质细胞活化的关键酶丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)p38的激活^[6-7],从而导致炎症因子(如TNF- α , IL-1 β)的合成和释放,这些炎症因子的释放可促进脊髓背角痛觉相关神经元表面相应受体的激活,从而促进中枢敏化,减弱吗啡的镇痛作用^[8-11]。基于此,寻找一种安全有效的可以抑制小胶质细胞活化的药物,并靶向p38 MAPK信号通路,对于治疗吗啡耐受具有非常重要的意义。

川芎嗪为中药川芎的有效成分,化学结构为四甲基吡嗪(tetramethylpyrazine, TMP),川芎嗪吸收到体内后,可有效透过血脑脊液屏障,且广泛的分布在大脑皮层、小脑、中脑、脑干、纹状体、海马等部位,具有改善循环、扩张血管、抗血小板聚集、改善脑血流等作用。最近有研究表明^[12],在大鼠背根神经节中,川芎嗪可以与ATP结合受体(P2X受体)结合,非竞争性地抑制ATP激活电流,从而发挥一定的镇痛作用。近年来研究发现,小胶质细胞中P2X受体在吗啡耐受中具有重要作用^[2],是吗啡引起小胶质细胞活化的一个关键调节因子,提示川芎嗪可能对吗啡引起的小胶质细胞活化具有抑制作用。本实验旨在研究川芎嗪对吗啡引起的脊髓水平小胶质细胞活化及其对吗啡耐受的影响,并探讨其分子机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

川芎嗪(纯度98%,南京泽朗植提技术有限公司);盐酸吗啡(沈阳第一制药厂);无菌生理盐水(北京双鹤药业股份有限公司);PrimeScript试剂盒(日本TaKaRa公司);IL-1 β 、TNF- α 和GAPDH引物(南京金斯瑞生物科技有限公司);多聚甲醛(纯度99%,美国Sigma公司);羊源IBA-1抗体(1:200稀释,美国Abcam公司);FITC标记的抗羊荧光二抗(1:300稀释,美国Millipore公司);兔源p-p38、p38抗体(1:1 000稀释)、羊抗兔二抗(1:4 000稀释)(美国Cell Signaling Technology公司);GAPDH抗体(1:8 000稀释,兔源,美国Sigma公司)。

1.2 动物

健康雄性ICR小鼠,清洁级,体重为18~22 g,由江苏省南京医科大学动物中心提供,许可证号为:SYXK(苏)2009-0007。

1.3 仪器

荧光显微镜(德国Leica公司);7300 Real-time PCR系统(英国Applied Biosystems公司);Mini-Protean 4电泳仪(美国Biorad公司)。

2 方法

2.1 热水浴法测定小鼠的基础痛阈

将雄性ICR小鼠分为空白对照组、模型组、模型给药组(15,30和60 mg/kg 3个剂量组)以及正常给药组(川芎嗪)。模型组(慢性吗啡耐受模型):皮下注射吗啡10 mg/kg,连续7 d,每天1次;模型给药组(慢性吗啡耐受+川芎嗪):在每天注射吗啡前提前15 min分别腹腔注射(ip)不同剂量的川芎嗪;正常给药组:在基础情况下每天腹腔注射高剂量60 mg/kg川芎嗪,连续7 d,每天1次。

于试验前及末次给药后0.5 h将小鼠尾1.5~3.0 cm浸入恒温水浴中(52 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$,用秒表记录鼠尾自浸入水中到出现甩尾动作的时间,作为甩尾反应的潜伏期(tail flick latency, TFL),为防止组织损伤,若小鼠10 s未甩尾,则TFL记为10 s。TFL用最大效应百分数(MPE)表示: $\text{MPE} = (\text{给药后 TFL} - \text{给药前 TFL}) / (10 - \text{给药前 TFL}) \times 100\%$ 。

2.2 Western blot法检测蛋白水平的表达

连续7 d皮下给予吗啡,于第7天给完吗啡后0.5 h取小鼠L4-L6脊髓节段,按一定比例加入裂解液,处理样品,经聚丙烯酰胺凝胶电泳,转移至PDVF膜上,6% BSA封闭液室温封闭2 h,加入抗p-p38、p38一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 摇晃过夜,TBST洗3次,每次10 min,加入二抗,室温孵育2 h,TBST洗3次,每次10 min,显色,采用Quantity One软件进行数据分析。

2.3 免疫荧光检测脊髓背角IBA-1表达

连续7 d皮下给予吗啡,于第7天给完吗啡后0.5 h,水合氯醛深麻下打开胸腔,经左心室向升主动脉插管快速灌注生理盐水20~30 mL冲洗血液,然后灌注4%多聚甲醛磷酸缓冲液20~30 mL,缓慢滴注持续10 min。取小鼠脊髓腰膨大部位放入上述4%多聚甲醛固定液中,24 h后转移至40%蔗糖溶液中4 $^{\circ}\text{C}$ 脱水至标本沉底3~5 d,OCT胶包埋,连续恒冷冰冻切片,片厚25 μm 。

将切片加入到IBA-1抗体溶液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育16~19 h,0.01 mol/L PBS漂洗3次,每次10 min,加入FITC标记的抗羊荧光二抗,室温孵育2 h,PBS漂洗

3 次,每次 10 min,50% 甘油封片后在荧光显微镜下观察,并用 Image pro-Plus 6.0 软件进行数据分析。

2.4 RT-PCR 测定炎症因子 IL-1β 和 TNF-α mRNA 的表达

收集脊髓样品(分组见“2.1”项),提取总 RNA,应用 TaKaRa PrimeScript 试剂盒的 SYBR Green Assay 完成逆转录反应。反转录反应条件为:37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s。采用三步法 PCR 扩增标准程序完成 cDNA 样品扩增。反应体系为:cDNA 模板 0.5 μL,上游引物 0.5 μL,下游引物 0.5 μL,ddH₂O 3.5 μL,ROX 5 μL,终体系 10 μL(引物序列见表 1)。

2.5 数据统计

结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.5 分析软件进行组间 *t* 检验,各组数据以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

Table 1 Primer sequences of some biological indicators in PCR	
Biological indicator	Primer sequence
IL-1β	Sense:TCATTGTGGCTGTGGAGAAG
	Antisense:AGGCCACAGGTATTTTGTCTG
TNF-α	Sense:CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA
	Antisense:TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
GAPDH	Sense:AACGACCCCTTCATTGAC
	Antisense:TCCACGACATACTCAGCAC

3 结果

3.1 对小鼠基础痛阈以及吗啡慢性耐受的影响

水浴甩尾法测定小鼠基础痛阈结果显示,川芎嗪和生理盐水对正常的雄性小鼠的甩尾反应潜伏期(TFL)潜伏期没有显著影响(图 1-A)。小鼠慢性吗啡耐受实验结果显示,川芎嗪可以剂量依赖性的改善吗啡耐受,其中高剂量的川芎嗪(60 mg/kg, ip)改善效果最为显著(图 1-B)。

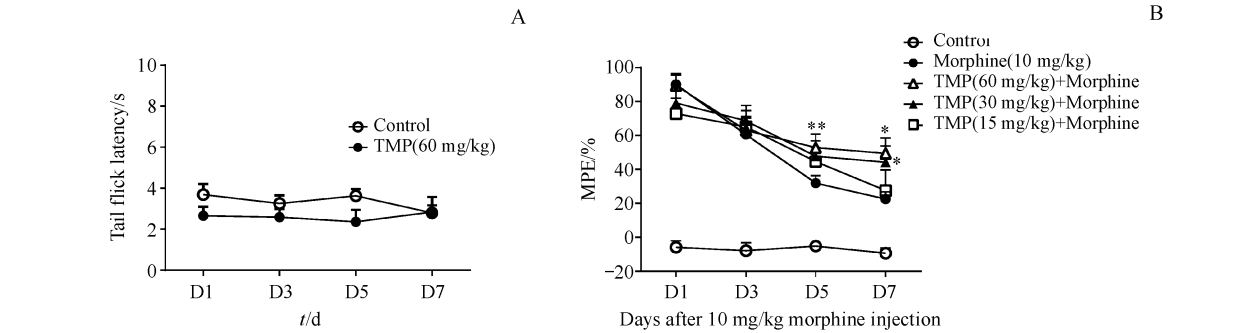


Figure 1 Tetramethylpyrazine(TMP) prevented the development of chronic morphine tolerance in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
A: Effect of TMP on the pain threshold of naive mice; B: Role of TMP on the development of chronic morphine tolerance in mice
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group

3.2 对慢性吗啡耐受小鼠脊髓水平炎症因子 TNF-α 和 IL-1β 的影响

结果(图 2)表明,空白对照组中 TNF-α 和 IL-1β mRNA 水平较低;慢性吗啡耐受后(模型组), TNF-α 和 IL-1β mRNA 水平显著上升(与空白对照组相比, $P < 0.05$),而川芎嗪可剂量依赖性地抑制慢性吗啡耐受后小鼠脊髓水平 TNF-α 和 IL-1β 的高表达(与模型组相比, $P < 0.05$),其中 60 mg/kg 川芎嗪抑制作用最为显著。

3.3 对慢性吗啡耐受小鼠脊髓小胶质细胞活化的影响

由图 3 可知,在慢性吗啡耐受模型中,IBA-1

表达水平显著升高(与空白对照组相比, $P < 0.001$);而川芎嗪(60 mg/kg, ip)能够显著抑制小鼠脊髓 IBA-1 的表达水平(与模型组相比, $P < 0.001$)。

3.4 对慢性吗啡耐受小鼠脊髓 p38 MAPK 磷酸化水平的影响

由图 3 可知,在慢性吗啡耐受模型组中,p38 MAPK 磷酸化水平显著上升(与空白对照组相比, $P < 0.05$);给予川芎嗪可以剂量依赖性地抑制小鼠脊髓 p38 MAPK 磷酸化水平的升高(与模型组相比, $P < 0.05$),并且对本底 p38 的表达无影响。

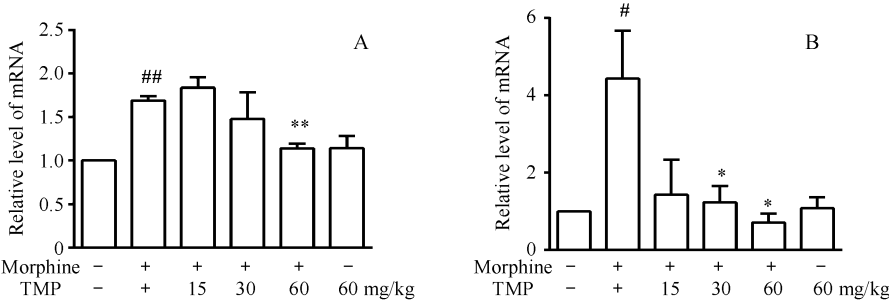


Figure 2 TMP inhibited chronic morphine-induced increased levels of TNF- α (A) and IL-1 β (B) in spinal cord in a dose dependent manner ($\bar{x} \pm s, n = 4$). A:mRNA levels of TNF- α in spinal cord analyzed by RT-PCR. B:mRNA levels of IL-1 β in spinal cord analyzed by RT-PCR
$P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group

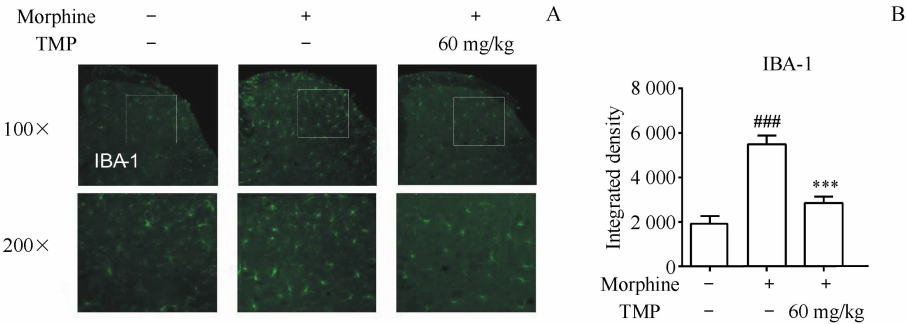


Figure 3 TMP significantly attenuated chronic morphine treatment- induced spinal microglia activation in mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
A:Microglia in spinal cord immunostained with an IBA1 antibody;B:Integrated density of microglia immunofluorescence in spinal cord.
$P < 0.001$ vs control group; *** $P < 0.001$ vs model group

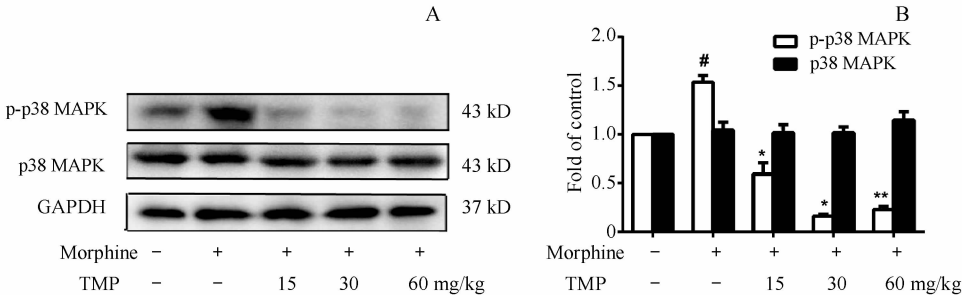


Figure 4 TMP suppressed chronic morphine treatment-induced up-regulated phosphorylation level of p38 MAPK in spinal cord, but had no effect on the total level of p38 MAPK ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
$P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group

4 讨 论

以往关于吗啡耐受机制的研究多集中于神经元上阿片受体(主要是 μ 受体)的失能、脱敏等方面,但这并不能很好地解释和解决吗啡耐受的问题。近 10 年来,中枢神经系统中以胶质细胞活化为特征的神经炎症与耐受间的关系,受到越来越多的重视和研究。大量研究表明,吗啡处理可以通过神经元表面的吗啡受体和小胶质细胞表面的 Toll-like receptor 4^[5] 间接或直接引起脊髓背角小胶质

细胞的显著活化,活化的小胶质细胞可以产生大量炎症因子(包括 TNF- α 和 IL-1 β),这些炎症因子与神经元表面的相应受体结合后,可促进 NMDA 受体的激活,促进钙离子内流,神经元兴奋性增强,从而加重中枢敏化,使吗啡镇痛效果降低^[11,13-15]。然而,给予小胶质细胞特异性抑制剂米诺环素,可以降低炎症因子的表达,吗啡耐受得以缓解^[1]。除此之外,利用 IL-1 抗体、IL-1 受体阻断剂、IL-1 基因敲除、IL-1 受体缺乏、IL-1 受体联合蛋白缺失等方法阻断炎症因子的作用受体,也能延缓吗啡耐

受的进程^[3,8]。与此一致的是,本实验结果发现,川芎嗪不仅可以剂量依赖性地延缓吗啡耐受,显著抑制吗啡引起的脊髓水平炎症因子的高表达,并且还能缓解脊髓背角小胶质细胞的活化。因此,本研究进一步探讨了川芎嗪抑制小胶质细胞活化,缓解吗啡耐受的可能机制。

大量研究表明,MAPK 家族在吗啡耐受过程中发挥了重要作用^[16-17]。在脊髓水平,吗啡可以细胞特异性地引起 MAPK 家族的激活,MAPK 家族主要有细胞外调节蛋白激酶(ERK),p38 MAPK,c-Jun 氨基末端激酶(JNK)和 ERK5。其中,p38 MAPK 的激活主要在脊髓背角的小胶质细胞中^[8],并且给予 p38 MAPK 抑制剂 SB203580 可以显著抑制吗啡导致的小胶质细胞活化及炎症因子释放,从而改善吗啡耐受^[7,18]。本实验结果显示,川芎嗪能够剂量依赖性地抑制吗啡引起的 p38 磷酸化水平的上调,并且对本底 p38 无影响。综上推测,川芎嗪可能通过调节小胶质细胞中 p38 MAPK 的磷酸化水平,抑制炎症因子的表达,从而缓解吗啡刺激引起的小胶质细胞活化,进而缓解吗啡耐受。但是,其详细的分子机制还有待于进一步探讨。

临床应用川芎嗪的剂型有磷酸川芎嗪片、注射用磷酸川芎嗪等,其药理作用广泛,主要用于心脑血管疾病的治疗。本研究首次阐明了川芎嗪可以通过小胶质细胞中 p38 信号通路抑制吗啡引起的神经炎症,并缓解慢性吗啡耐受。由于川芎嗪相对分子质量较小,可以较好地透过血脑脊液屏障,且临床应用具有良好的安全性,为将来应用川芎嗪治疗吗啡耐受提供了理论依据。

参考文献

- [1] Hutchinson MR, Northcutt AL, Chao LW, *et al.* Minocycline suppresses morphine-induced respiratory depression, suppresses morphine-induced reward, and enhances systemic morphine-induced analgesia[J]. *Brain Behav Immun*, 2008, **22**(8):1248-1256.
- [2] Horvath RJ, Romero-Sandoval EA, De Leo JA. Inhibition of microglial P2X4 receptors attenuates morphine tolerance, Iba1, GFAP and mu opioid receptor protein expression while enhancing perivascular microglial ED[J]. *Pain*, 2010, **150**(3):401-413.
- [3] Johnston IN, Milligan ED, Wieseler-Frank J, *et al.* A role for proinflammatory cytokines and fractalkine in analgesia, tolerance, and subsequent pain facilitation induced by chronic intrathecal morphine[J]. *J Neurosci*, 2004, **24**(33):7353-7365.
- [4] Zhou D, Chen ML, Zhang YQ, *et al.* Involvement of spinal microglial P2X7 receptor in generation of tolerance to morphine analgesia in rats[J]. *J Neurosci*, 2010, **30**(23):8042-8047.
- [5] Wang X, Loram LC, Ramos K, *et al.* Morphine activates neuroinflammation in a manner parallel to endotoxin[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, **109**(16):6325-6330.
- [6] Cui Y, Chen Y, Zhi JL, *et al.* Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia mediates morphine antinociceptive tolerance[J]. *Brain Res*, 2006, **1069**(1):235-243.
- [7] Wang Z, Ma W, Chabot JG, *et al.* Cell-type specific activation of p38 and ERK mediates calcitonin gene-related peptide involvement in tolerance to morphine-induced analgesia[J]. *FASEB J*, 2009, **23**(8):2576-2586.
- [8] Hutchinson MR, Coats BD, Lewis SS, *et al.* Proinflammatory cytokines oppose opioid-induced acute and chronic analgesia[J]. *Brain Behav Immun*, 2008, **22**(8):1178-1189.
- [9] Ferrini F, Trang T, Mattioli TA, *et al.* Morphine hyperalgesia gated through microglia-mediated disruption of neuronal Cl⁻ homeostasis[J]. *Nat Neurosci*, 2013, **16**(2):183-192.
- [10] Berta T, Liu T, Liu YC, *et al.* Acute morphine activates satellite glial cells and up-regulates IL-1beta in dorsal root ganglia in mice via matrix metalloproteinase-9[J]. *Mol Pain*, 2012, **8**:18.
- [11] Ji RR, Xu ZZ, Gao YJ. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, **13**(7):533-548.
- [12] Liang SD, Xu CS, Zhou T, *et al.* Tetramethylpyrazine inhibits ATP-activated currents in rat dorsal root ganglion neurons[J]. *Brain Res*, 2005, **1040**(1/2):92-97.
- [13] Hutchinson MR, Shavit Y, Grace PM, *et al.* Exploring the neuroimmunopharmacology of opioids: an integrative review of mechanisms of central immune signaling and their implications for opioid analgesia[J]. *Pharmacol Rev*, 2011, **63**(3):772-810.
- [14] Kawasaki, Zhang Y, Cheng JK, *et al.* Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord[J]. *J Neurosci*, 2008, **28**(20):5189-5194.
- [15] Benarroch EE. Central neuron-glia interactions and neuropathic pain: overview of recent concepts and clinical implications[J]. *Neurology*, 2010, **75**(3):273-278.
- [16] Ji RR. MAP kinase and pain[J]. *Brain Res Rev*, 2009, **60**(1):135-148.
- [17] Chen Y, Geis C Sommer. The role of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in morphine tolerance and dependence[J]. *Mol Neurobiol*, 2009, **40**(2):101-107.
- [18] Chen Y, Geis C Sommer. Activation of TRPV1 contributes to morphine tolerance; involvement of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway[J]. *J Neurosci*, 2008, **28**(22):5836-5845.