

·论著·

胃饥饿素在糖尿病神经病理性疼痛中的作用及对大鼠脊髓P2X4/NLRP3表达的影响

刘康,周芳,赵博,黄亚医,王雅枫

摘要 目的:探讨胃饥饿素(Ghrelin)在糖尿病神经病理性疼痛中的作用及对大鼠脊髓嘌呤受体2X-4/NOD样受体-3(P2X4/NLRP3)表达的影响。方法:健康成年雄性SD大鼠40只,随机分为5组,每组8只:正常+Ghrelin组(NG组)、正常+[D-Lys3]-GHRP-6组(ND组)、糖尿病组(D组)、糖尿病+Ghrelin组(DG组)、糖尿病+Ghrelin+[D-Lys3]-GHRP-6组(DGD组)。 $[D-Lys3]-GHRP-6$ 为Ghrelin特异性抑制剂。NG组腹腔注射Ghrelin 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 6周,ND组腹腔注射 $[D-Lys3]-GHRP-6$ 50 mg/kg 6周。腹腔注射1%链脲佐菌素-柠檬酸盐缓冲液 60 mg/kg 制备大鼠糖尿病模型,造模成功后3 d,腹腔注射Ghrelin 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 6周,DGD组腹腔注射Ghrelin 200 $\mu\text{g}/\text{kg}+[D-Lys3]-GHRP-6$ 50 mg/kg 6周。分别于第2,4,6周测定大鼠机械痛阈(MWT)及坐骨神经导速率(MNCV);6周后处死大鼠,尼氏染色观察脊髓病理学变化,电镜观察腓肠神经病理学改变,Western blot法检测脊髓Ghrelin、P2X4、NLRP3和IL-1 β 表达水平。**结果:**与NG组比较,ND组脊髓Nissl染色和腓肠神经电镜显示细胞结构正常,MWT和MNCV无明显变化,P2X4、NLRP3、IL-1 β 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$);D组脊髓Nissl染色和腓肠神经电镜显示细胞部分受损,MWT、MNCV显著降低;Ghrelin表达降低,P2X4、NLRP3、IL-1 β 显著升高($P<0.05$)。与D组比较,DG组中脊髓Nissl染色和腓肠神经电镜显示细胞结构相对正常,MWT和MNCV明显升高,Ghrelin表达升高,P2X4、NLRP3、IL-1 β 表达降低($P<0.05$)。与DG组比较,DGD组中脊髓Nissl染色和腓肠神经电镜细胞结构破坏严重,MWT和MNCV明显降低,Ghrelin表达降低,P2X4、NLRP3、IL-1 β 表达升高($P<0.05$)。**结论:**Ghrelin可能通过P2X4/NLRP3通路参与了糖尿病神经病理性疼痛的调控。

关键词 胃饥饿素;糖尿病神经病理性疼痛;嘌呤受体2X-4;NOD样受体-3

中图分类号 R741;R741.02 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2019.08.001

刘康,周芳,赵博,等.胃饥饿素在糖尿病神经病理性疼痛中的作用及对大鼠脊髓P2X4/NLRP3表达的影响[J].神经损伤与功能重建,2019,14(8):379-382.

作者单位

武汉大学人民医院
麻醉科

武汉 430060

基金项目

湖北省自然科学基金
(No.2017CFB267)
中央高校基本科研
业务费专项基金
(No.2042018kf0161)

收稿日期

2018-11-26

通讯作者

刘康

Liuk997@126.com

Role of Ghrelin on Diabetic Neuropathic Pain and Its Effect on P2X4/NLRP3 Expression in Spinal Cord of Rats LIU Kang, ZHOU Fang, ZHAO Bo, HUANG Ya-yi, WANG Ya-feng. Department of Anesthesiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Abstract Objective: To evaluate the role of ghrelin on diabetic neuropathic pain and its effect on the expression of purinergic receptor 2X-4/NOD-like receptor-3 (P2X4/NLRP3). **Methods:** Forty male Sprague-Dawley rats were randomly allocated into 5 groups ($n=8$ each): normal+ghrelin group (group NG), normal+[D-Lys3]-GHRP-6 group (group ND), diabetes group (group D), diabetes+ghrelin group (group DG), and diabetes+ghrelin+[D-Lys3]-GHRP-6 group (group DGD). [D-Lys3]-GHRP-6 served as a ghrelin-specific inhibitor. Group NG received intraperitoneal injections of 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ghrelin for 6 weeks, and group ND received intraperitoneal injections of 50 mg/kg [D-Lys3]-GHRP-6 for 6 weeks. Diabetes mellitus was induced by intraperitoneal injections of 60 mg/kg 1% streptozotocin. Three days after establishment of diabetes model, group DG was intraperitoneally given 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ghrelin and group DGD given 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ghrelin plus 50 mg/kg [D-Lys3]-GHRP-6 for 6 weeks. Mechanical withdrawal threshold (MWT) and motor nerve conduction velocity (MNCV) were measured at 2, 4, and 6 weeks. After 6 weeks the rats were sacrificed. Rat spinal cords were examined for pathology change by Nissl staining and pathology change of the sural nerve by electron microscopy (EM). Expression of ghrelin, P2X4, NLRP3, and IL-1 β in the spinal cord was detected by western blot. **Results:** Compared with group NG, group ND spinal Nissl staining and sural nerve EM showed normal spinal cell structure; there was no significant change in MWT and MNCV and no significant difference in the expression of P2X4, NLRP3, and IL-1 β ($P>0.05$). Spinal Nissl staining and sural nerve EM of group D showed partial cellular damage, decreased MWT and MNCV, down-regulated expression of ghrelin, and up-regulated expression of P2X4, NLRP3, and IL-1 β ($P<0.05$). Compared with group D, group DG showed normal spinal cell structure, increased MWT and MNCV, up-regulated expression of ghrelin, and down-regulated expression of P2X4, NLRP3, and IL-1 β ($P<0.05$). Compared with group DG, group DGD showed severe cell structure damage, decreased MWT and MNCV, down-regulated expression of ghrelin, and up-regulated expression of P2X4, NLRP3, and IL-1 β ($P<0.05$). **Conclusion:** Ghrelin may be involved in diabetic neuropathic pain through the

P2X4/NLRP3 signaling pathway.

Key words ghrelin; diabetic neuropathic pain; P2X4; NLRP3

胃饥饿素(Ghrelin)是一种由28个氨基酸组成的内源性脑肠肽,具有抑制胰岛素分泌、调节血糖、调节胃肠道反应、改善心功能、促进胚胎发育等作用^[1]。研究表明 Ghrelin 可以调控糖尿病引起的相关神经病变,对各类疼痛也具有一定的调控作用^[2,3],但对糖尿病神经病理性疼痛尚未有具体研究。糖尿病神经病理性疼痛是糖尿病患者最为常见的并发症,多以痛觉过敏、自发性痛及异常疼痛为特征^[4]。研究证实激活后的小胶质细胞表达的嘌呤受体 2X-4 (purine receptor 2-X4, P2X4)在痛觉超敏形成中起重要的作用^[5]。而 P2X4 可激活 NOD 样受体蛋白 3 (nucleotide binding oligomerization domain-like receptors-3, NLRP3)炎症体,并通过激活细胞因子的成熟和分泌,参与了周围神经损伤介导的神经病理性疼痛^[5,6]。

Ghrelin 是否对糖尿病神经病理性疼痛具有调控作用,其是否通过 P2X4/NLRP3 通路调控作用? 本研究拟观察 Ghrelin 在糖尿病神经病理性疼痛中的作用及对大鼠脊髓 P2X4/NLRP3 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物、分组及造模

清洁级健康成年雄性 SD 大鼠 40 只,体质量 200 ~ 220 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。采用随机数字表法将大鼠随机分为 5 组,每组 8 只:正常+Ghrelin 组(NG 组)、正常+[D-Lys3]-GHRP-6 组(ND 组)、糖尿病组(D 组)、糖尿病+Ghrelin 组(DG 组)、糖尿病+Ghrelin+[D-Lys3]-GHRP-6 组(DGD 组)。 $[D-Lys3]-GHRP-6$ 为 Ghrelin 特异性抑制剂。参照文献^[7]的方法,NG 组腹腔注射 Ghrelin 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (PROSPE 公司)6 周,ND 组腹腔注射 $[D-Lys3]-GHRP-6$ 50 mg/kg (PROSPE 公司)6 周。腹腔注射 1%链脲佐菌素-柠檬酸盐缓冲液(Sigma 公司),剂量为 60 mg/kg ,3 d 后于尾静脉采血检测血糖,血糖 $\geq 16.7 \text{ mmol}/\text{L}$ 为大鼠糖尿病模型制备成功,饲养周期为 6 周。DG 组于糖尿病模型制备成功后第 3 天,腹腔注射 Ghrelin 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 6 周, DGD 组腹腔注射 Ghrelin 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ +[D-Lys3]-GHRP-6 50 mg/kg 6 周。

1.2 方法

①大鼠机械痛阈(mechanical withdrawal threshold, MWT)测定。将大鼠置于底带孔的有机玻璃笼中, Von Frey 测痛仪(Stoelting 公司)刺激大鼠后肢足底中

部 2 s,出现缩足反应时计数,重复 3 次取平均值。分别于第 2, 4, 6 周测定大鼠 MWT。②大鼠坐骨神经传导率(sciatic nerve conduction velocity, MNCV)测定。将双针电极置于大鼠右侧坐骨切迹处,于同侧踝关节坐骨神经经过部位和大鼠足趾第一骨间肌肉处分别放置双针电极,采用单脉冲方波刺激,逐渐增加刺激电压,测定刺激阈值,后以 1.5 倍刺激阈值进行测定,重复 3 次取平均值。分别于第 2, 4, 6 周测定大鼠 MNCV。③大鼠腓肠神经超微结构观察。6 周后每组取 4 只大鼠深麻醉下开胸,心尖部穿刺行主动脉灌流,4%多聚甲醛灌注固定,取 L₄₋₆ 脊髓节段行 Nissl 染色,光镜下($\times 400$)观察脊髓组织病理学结果;取腓肠神经,2.5%戊二醛固定后再用 1%四氧化锇固定,梯度丙酮脱水后,环氧树脂包埋,制成超薄切片,醋酸双氧铀及柠檬酸铅双重染色,透射电镜下观察腓肠神经超微结构。④western blot 法测定大鼠脊髓 Ghrelin、P2X4、NLRP3、IL-1 β 蛋白表达水平。6 周后每组余下 4 只大鼠处死后取 L₄₋₆ 脊髓,裂解液提取蛋白,测定蛋白浓度。电泳分离目的蛋白,转膜后,脱脂奶粉室温封闭。分别加入 Ghrelin、P2X4、NLRP3、IL-1 β 抗体(1:1 000, CST 公司)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日二抗(1:10 000, LI-COR 公司)孵育 1 h 后 TBST 清洗,扫膜后读取灰度值,用 Odyssey 软件进行数据分析。以目的蛋白条带灰度值与内参条带灰度值的比值反映目的蛋白表达水平。

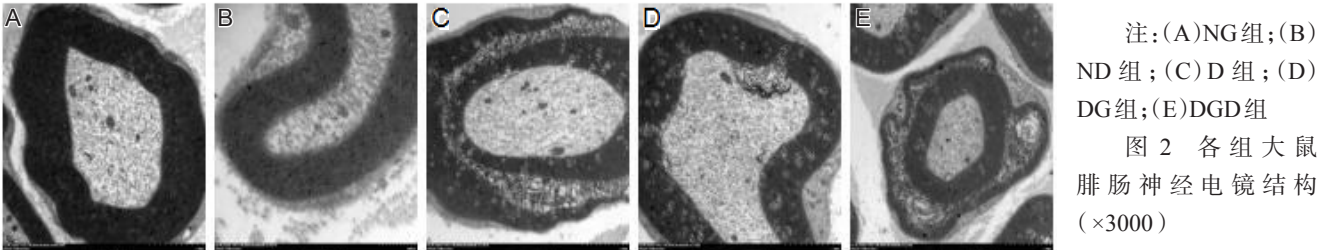
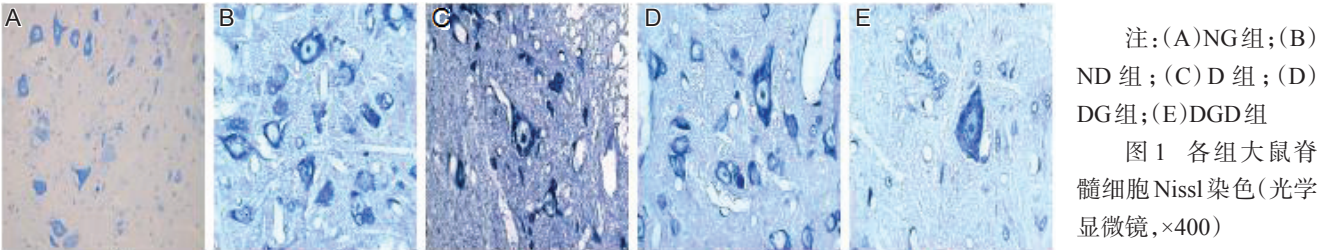
1.3 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件进行分析,符合正态分布以及方差齐性的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

脊髓 Nissl 染色显示:NG 组及 ND 组神经细胞排列均匀,细胞器结构清晰;D 组神经细胞排列较为均匀,细胞器结构比较清晰,部分神经细胞缩小,组织局灶性水肿;DG 组神经细胞排列均匀,胞质、胞核和细胞器结构清晰;DGD 组部分神经细胞胞体缩小,部分核周染色质溶解伴水肿,见图 1。

腓肠神经电镜显示:NG 组及 ND 组髓鞘排列均匀,轴突内可见正常形态的线粒体;D 组髓鞘排列均匀,局部排列紊乱,轴突内可见正常形态线粒体,脱髓鞘程度轻微;DG 组髓鞘排列均匀,轴突内可见正



常形态的线粒体;DGD组部分脱髓鞘明显,排列局部紊乱,少部分轴突变性,Schwann细胞增生,见图2。

与NG组比较,ND组MWT、MNCV差异无统计学意义($P>0.05$),D组MWT在2周后阈值显著降低,MNCV在6周后显著降低($P<0.05$);与D组比较,DG组MWT在4周后阈值明显升高,MNCV在6周后仍高于D组($P<0.05$);与DG组比较,DGD组MWT在4周后明显降低,MNCV在6周后显著降低($P<0.05$),见表1。

与NG组比较,ND组Ghrelin表达降低($P<0.05$),P2X4、NLRP3、IL-1 β 表达差异无统计学意义($P>0.05$),D组Ghrelin表达降低,P2X4、NLRP3、IL-1 β 表达显著升高($P<0.05$);与D组比较,DG组Ghrelin表达升高,P2X4、NLRP3、IL-1 β 表达降低($P<0.05$);与DG组比较,DGD组Ghrelin表达降低,P2X4、NLRP3、IL-1 β 表达升高($P<0.05$),见表2、图3。

表1 各组大鼠MWT和MNCV比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	MWT/g		
		2 w	4 w	6 w
NG组	8	13.2±1.9	13.6±1.6	14.4±1.8
ND组	8	13.6±1.2	14.0±1.4	14.2±1.6
D组	8	6.0±2.1 ^①	3.3±2.3 ^①	1.8±1.7 ^①
DG组	8	6.2±1.9	10.2±1.6 ^②	9.7±1.5 ^②
DGD组	8	5.8±1.8	3.4±2.1 ^③	1.9±1.3 ^③

组别	MNCV/(m/s)		
	2 w	4 w	6 w
NG组	52.6±1.8	51.9±2.3	52.8±3.1
ND组	52.7±1.5	52.0±2.1	52.3±2.5
D组	51.6±1.2	50.0±1.9	42.2±3.3 ^①
DG组	52.2±1.4	50.3±2.3	47.3±3.1 ^②
DGD组	52.0±1.3	49.7±2.1	41.8±3.5 ^③

注:与NG组比较,^① $P<0.05$;与D组比较,^② $P<0.05$;与DG组比较,^③ $P<0.05$

表2 各组大鼠Ghrelin、P2X4、NLRP3和IL-1 β 表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	Ghrelin	P2X4
NG组	4	1.107±0.083	0.105±0.017
ND组	4	0.520±0.049 ^①	0.098±0.011
D组	4	0.570±0.064 ^①	0.992±0.007 ^①
DG组	4	1.278±0.071 ^②	0.487±0.013 ^②
DGD组	4	0.576±0.069 ^③	0.983±0.011 ^③

组别	NLRP3	IL-1 β
NG组	0.218±0.065	0.120±0.030
ND组	0.203±0.036	0.142±0.037
D组	0.855±0.093 ^①	0.617±0.125 ^①
DG组	0.574±0.082 ^②	0.268±0.073 ^②
DGD组	0.848±0.096 ^③	0.622±0.134 ^③

注:与NG组比较,^① $P<0.05$;与D组比较,^② $P<0.05$;与DG组比较,^③ $P<0.05$

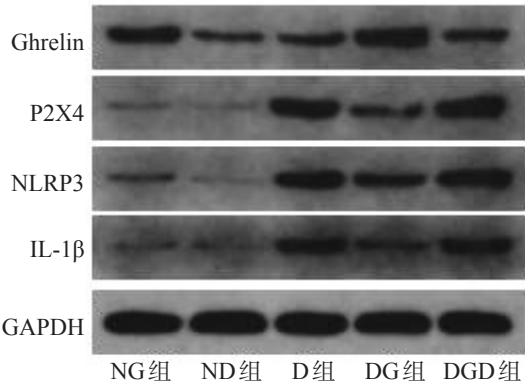


图3 各组大鼠Ghrelin、P2X4、NLRP3、IL-1 β western blot电泳条带

3 讨论

本研究采用腹腔注射链脲佐菌素的方法制备大鼠糖尿病模型,并在饲养2周后通过检测大鼠MWT确定糖尿病神经病理性疼痛模型制备成功^[8]。运动神经传

导速度测定作为糖尿病周围神经病变中客观且具有定位功能的诊断手段,需要6周甚至更长时间才会有差别^[9]。而作为金标准的脊髓Nissl染色及腓肠神经电镜均从细胞结构进一步证实模型制备成功^[10]。本研究中,糖尿病大鼠造模成功后2周,检测MWT与正常对照组相比有所下降,提示痛敏形成。在造模成功后4周及6周仍持续,且有进一步下降趋势;在造模成功后6周时,与对照组相比MNCV有所下降。这些结果表明,在本研究中大鼠糖尿病神经病理性疼痛模型制备成功且稳定、持续。

Ghrelin广泛存在于胃粘膜泌酸腺样细胞、神经胶质细胞等,具有显著的抗炎,降低血糖的作用^[1]。P2X4广泛分布于神经元、胶质细胞等,主要介导神经传递及炎症的发生发展。P2X4激活后能加快炎症反应进程^[11],通过活化介导ATP等内源性危险相关分子模式感受器(danger-associated molecular patterns, DAMPs)激活NLRP3炎性体,调控促炎细胞因子IL-1 β 的成熟与分泌。在本实验中,我们采用一次性腹腔注射较大剂量链脲霉素成功诱导大鼠糖尿病模型,模型建造成功痛敏尚未形成时即开始腹腔注射Ghrelin及Ghrelin特异性抑制剂[D-Lys3]-GHRP-6,通过检测MWT、MNCV、脊髓Nissl染色及腓肠神经电镜,了解糖尿病大鼠神经病理性疼痛的病变情况。结果表明,外源性给与Ghrelin 6周后大鼠MWT和MNCV升高,而且脊髓及腓肠神经病理改变较糖尿病组有所好转。而同时给予Ghrelin特异性抑制剂[D-Lys3]-GHRP-6后,其病变程度与糖尿病组无显著差异。这些结果提示Ghrelin参与了糖尿病神经病理性疼痛的发生。

进一步研究发现,糖尿病大鼠脊髓Ghrelin的代偿性增加,伴随P2X4与NLRP3表达明显增高;外源性给予Ghrelin后,P2X4与NLRP3表达均降低。提示外源性Ghrelin减轻糖尿病神经病理性疼痛可能与抑制P2X4与NLRP3表达有关。我们推测,Ghrelin可能通

过抑制P2X4、NLRP3的表达从而减少炎症因子活化。在给予Ghrelin特异性抑制剂[D-Lys3]-GHRP-6后,P2X4、NLRP3与IL-1 β 表达均升高,这进一步提示Ghrelin通过抑制P2X4/NLRP3通路参与糖尿病神经病理性疼痛。

综上所述,Ghrelin可能通过P2X4/NLRP3介导的炎性因子通路参与了糖尿病大鼠神经病理性疼痛的进展,增加Ghrelin的表达或外源性注入Ghrelin可能是减轻糖尿病大鼠神经病理性疼痛的有效方法之一。

参考文献

[1] Fields D, Miranpuri S, Miranpuri G, et al. The multifunctional and multi-system influence of Ghrelin in the treatment of diabetic and spinal cord injury induced Neuropathy[J]. Ann Neurosci, 2011, 18: 118-122.

[2] Haam J, Halmos KC, Di S, et al. Nutritional state-dependent ghrelin activation of vasopressin neurons via retrograde trans-neuronal-glia stimulation of excitatory GABA circuits[J]. J Neurosci, 2014, 34: 6201-6213.

[3] Liu FY, Zhang MM, Zeng P, et al. Study on the molecular mechanism of antinociception induced by ghrelin in acute pain in mice[J]. Peptides, 2016, 83: 1-7.

[4] Tsuda M. Microglia in the spinal cord and neuropathic pain[J]. J Diabetes Investig, 2016, 7: 17-26.

[5] Tsuda M, Masuda T, Tozaki-Saitoh H, et al. P2X4 receptors and neuropathic pain[J]. Front Cell Neurosci, 2013, 7: 191.

[6] Grace PM, Strand KA, Galer EL, et al. Morphine paradoxically prolongs neuropathic pain in rats by amplifying spinal NLRP3 inflammasome activation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113: E3441-3450.

[7] Huang HJ, Zhu XC, Han QQ, et al. Ghrelin alleviates anxiety- and depression-like behaviors induced by chronic unpredictable mild stress in rodents[J]. Behav Brain Res, 2017, 326: 33-43.

[8] Chen FF, Huo FQ, Xiong H, et al. Analgesic effect of total flavonoids from Sanguis draxonis on spared nerve injury rat model of neuropathic pain[J]. Phytomedicine, 2015, 22: 1125-1132.

[9] Visnagri A, Kandhare AD, Chakravarty S, et al. Hesperidin, a flavanoglycone attenuates experimental diabetic neuropathy via modulation of cellular and biochemical marker to improve nerve functions[J]. Pharm Biol, 2014, 52: 814-828.

[10] Prada V, Capponi S, Ursino G, et al. Sural nerve biopsy and functional studies support the pathogenic role of a novel MPZ mutation[J]. Neuropathology, 2015, 35: 254-259.

[11] Chen L, Liu YW, Yue K, et al. Differential expression of ATP-gated P2X receptors in DRG between chronic neuropathic pain and visceralgia rat models[J]. Purinergic Signal, 2016, 12: 79-87.

(本文编辑:唐颖馨)