

CB1R/BDNF 调控异相睡眠剥夺 诱发术后疼痛敏化的机制研究*

李文娟¹,周婷²,张杰¹,薛建军^{1△}

1 甘肃省中医院,甘肃兰州 730050; 2 荆门市人民医院,湖北荆门 448000

[摘要] 目的:评估大鼠延髓头端腹内侧部(rostral ventromedial medulla,RVM)内大麻素1型受体(cannabinoid type-1 receptor,CB1R)是否参与了术前异相睡眠剥夺(paradoxical sleep deprivation,PSD)诱导的切口疼痛敏化的调节,以及脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor,BDNF)和CB1R在调节该疼痛中的相互作用。方法:将96只雄性SPF级SD大鼠采用随机数字表法分为空白组(C组)、切口组(I组)、PSD组(P组)、PSD-切口组(P-I组)、PSD-切口+CB1R拮抗剂组(P-I+SR组)、PSD-切口+CB1R激动剂组(P-I+WIN组),每组16只,建立睡眠剥夺足底切口模型,P-I+SR组和P-I+WIN组大鼠于足底切开后第1天,向大鼠RVM内注射CB1R抑制剂或CB1R激动剂。使用免疫荧光染色、免疫印迹法(Western Blotting,WB)、qPCR等分子生物学方法检测RVM中BDNF和CB1R的蛋白和mRNA表达水平。结果:与I组相比,P-I组大鼠疼痛敏感性和术后疼痛持续时间增加($P < 0.05$)。与P-I组相比,P-I+WIN组大鼠术后1、4、7天CPS降低,PWT增加($P < 0.05$),P-I+SR组大鼠术后1、4、7天CPS增加,PWT降低($P < 0.05$)。结论:RVM内CB1R的激活降低了术前PSD诱导的切口疼痛敏化,CB1R-BDNF的相互作用可能在下游的促进调节中发挥作用。

[关键词] 异相睡眠剥夺;术后疼痛;延髓头端腹内侧部;大麻素1型受体;脑源性神经营养因子

[中图分类号] R749.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2096-9600(2025)06-0005-08

Study on the Regulatory Mechanism of CB1R/BDNF in Pain Sensitization after Paradoxical Sleep Deprivation

LI Wenjuan¹, ZHOU Ting², ZHANG Jie¹, XUE Jianjun^{1△}

1 Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China;

2 Jingmen People's Hospital, Jingmen 448000, China

Abstract Objective: To evaluate whether Cannabinoid type-1 receptor (CB1R) of RVM is involved in the regulation of incision pain sensitization induced by paradoxical sleep deprivation (PSD), and the interaction of BDNF and CB1R in the regulation of pain. Methods: All 96 male SPF-grade SD rats were divided into the blank group (C group), incision group (I group), and PSD group (P group), PSD-incision group (P-I group), PSD-

- 中Ca²⁺浓度和cAMP含量的影响[J]. 中国药理学通报,2009,25(1):51-55.
- [8] 龙正寅,朱慧志,朱舜之,等. 阳和平喘颗粒对哮喘大鼠血清TNF- α 和IL-6水平的影响[J]. 辽宁中医杂志,2016,43(7):1522-1524.
- [9] 孙卫,汪赛赛,贾倩倩,等. LC-MS/MS法同时测定中药注射剂中3种成分的含量[J]. 西北药学杂志,2021,36(1):25-28.
- [10] 王金艳,任静,陈世彬,等. HPLC法同时测定达原饮中芒果苷等6种成分的含量[J]. 天津中医药大学学报,2018,37(1):72-75.
- [11] 谭珍媛,邓家刚,张彤,等. 中药厚朴现代药理研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(22):228-234.
- [12] 魏泽英,朱培芳,孙海林,等. 云厚朴SFE-CO2萃取物中厚朴酚与和厚朴酚的热稳定性考察[J]. 重庆大学学报,2015,38(3):154-158.
- [13] 黄晓巍,李鑫,吴月征,等. 不同时间煎煮防风对防风散中有效成分含量及药效学的影响[J]. 长春中医药大学学报,2018,34(5):868-871.
- [14] 周茜雅,陈婧,范莉,等. 消炎退热颗粒清热解毒作用研究[J]. 中国医院药学杂志,2020,40(2):168-173.
- [15] 兰斌,张钰,龙睿,等. 小柴胡汤“去滓重煎”对LPS诱导发热白兔模型体温及血清IL-1 β ,IL-6和TNF- α 水平的影响[J]. 湖南中医药大学学报,2020,40(12):1468-1472.
- [16] 张林丽,王艳,刘莉. 细胞因子与炎症免疫疾病的研究进展[J]. 药学与临床研究,2020,28(3):202-205.
- [17] 任慧玲,严彪,梁之桃,等. 达原饮解热作用研究及UPLC-Q-TOF/MS分析[J]. 中成药,2015,37(1):131-137.
- [18] 金梁,李慧杰,齐元富. 中西医治疗癌性发热研究进展[J]. 西部中医药,2024,37(3):81-85.

收稿日期:2025-01-15

*基金项目:昆山市级科技专项项目(KJJKJZXS2020020).

作者简介:张雷(1981—),男,硕士学位,副主任中医师。研究方向:临床中药学、中药制剂质量研究。

 Δ 通讯作者:张聪(1986—),男,硕士学位,副主任中医师。研究方向:临床中药学。Email:52560679@qq.com。

incision+CB1R antagonist group (P-I+SR group), and PSD-incision+CB1R agonist group (P-I+WIN group), 16 rats in each group, sleep deprivation models with plantar incision were established, P-I+SR group, and P-I+WIN group accepted the injection of CB1R inhibitors or CB1R agonists into RVM of the rats on the first day after plantar incision. Immunofluorescence staining, WB, qPCR and other molecular biological methods were used to detect the expressions of BDNF and CB1R protein and mRNA in RVM. Results: Compared with I group, pain sensitization and the duration of postoperative pain were prolonged ($P<0.05$). Compared with P-I group, the decrease of CPS and the increase of PWT were found on the first, fourth and seventh day after the operation in P-I+WIN group ($P<0.05$), while the increase of CPS and the decrease of PWT were seen on the first, fourth and seventh day after the operation in P-I+SR group ($P<0.05$). Conclusion: Activation of CB1R in RVM reduces incision pain sensitization induced by preoperative PSD, and the interaction between CB1R and BDNF may play a role in promoting downstream modulation.

Keywords paradoxical sleep deprivation; postoperative pain; rostral ventromedial medulla; cannabinoid type-1 receptor; brain-derived neurotrophic factor

流行病学调查发现,41%的外科手术患者存在中度至重度的急性术后疼痛,且24%的患者术后疼痛未得到足够缓解^[1]。延髓头端腹内侧区(rostral ventromedial medulla,RVM)神经元在调节有害刺激相关行为反应和疼痛传递方面具有重要作用。研究发现,这些神经元含有大量抗痛觉过敏作用的大麻素1型受体(cannabinoid type-1 receptor,CB1R)^[2-3]。CB1R主要分布于中枢的不同疼痛调节区域,包括中央导水管周围灰质、RVM和脊髓背角^[2,4],急性疼痛刺激和应激能够增加这些区域CB1R表达水平^[5]。在神经病理性疼痛和炎性疼痛中,通过CB1R介导的突触可塑性改变参与中枢敏化,发挥镇痛或致痛作用^[6-7]。此外,CB1R还可参与睡眠调节,而药物阻断CB1R可能导致睡眠减少,增加觉醒程度^[8]。研究表明,脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor,BDNF)通过酪氨酸激酶受体B(tyrosine kinase receptor B,TrkB)诱导内源性大麻素释放,逆向激活突触前CB1R,抑制腺苷酸环化酶及蛋白激酶A,从而抑制钙内流^[9]。此外,BDNF还能触发内源性大麻素的动员和突触前膜CB1R激活,产生抑制性突触传递^[10]。目前,尚无研究证实CB1R与BDNF如何介导异相睡眠剥夺(paradoxical sleep deprivation,PSD)诱发的术后痛觉敏化。因此,本研究通过探讨BDNF和CB1R在术后疼痛敏化过程中的作用及其机制,以期预防和治疗术后疼痛及疼痛慢性化提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选取96只SPF级SD大鼠,雄性,体质量250~280 g,由甘肃中医药大学动物实验中心提供,实验动物合格证号:62001000000791。大鼠饲养于12小时光照/12小时黑暗循环环境中,室温保持在(21±2)℃,自由进食和饮水。本研究经甘肃中医药大学伦理委员会审核批准

(SY2022-711),并按照国际疼痛研究协会动物实验指南进行。

1.2 实验药品及试剂 CB1R抗体(批号:ab254349)、BDNF抗体(批号:ab108319)和GAPDH抗体(批号:ab109321)均购自美国Abcam公司;山羊抗兔二抗(批号:G1401)、山羊抗兔荧光二抗(批号:G1221)和山羊抗鼠二抗(批号:GB21302)均购自美国Affinity Bioscience公司;CB1R抑制剂(批号:SR141716,利莫那班)、CB1R激动剂[批号:Win 55212-2,(R)-(+)WIN 55212-2,甲磺酸盐]均购自甘肃鹏程生物科技发展有限公司。

1.3 实验仪器 Roche LightCycler® 96型荧光定量PCR仪(Roche LightCycle 96北京众力挽生物技术有限公司);Nanodrop2000型微量核酸检测仪(Thermo Fisher Scientific);Mini-PROTEAN® Tetra蛋白电泳仪电源(北京百晶生物技术有限公司);Wide Mini-Sub® Cell GT Basic System蛋白电泳槽(北京六一生物技术有限公司);Mini Trans-Blot® Cell Module转膜槽(北京六一生物技术有限公司);CHEMI DOC XRS化学发光凝胶图像系统(上海培清科技有限公司);Biofuge Stratos高速冷冻离心机(塞洛捷克公司);BCA-150电热恒温培养箱(上海圣科仪器设备有限公司);i3X酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司];VM-S涡旋振荡器(美国塞洛捷克公司);HH-S数显恒温水浴锅(HH-601双例双孔,江苏正基仪器有限公司);IX53倒置荧光显微镜(广州市明美光电技术有限公司);Pultton P200+型微量紫外分光光度计(美国Pultton公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 构建PSD动物模型 采用改良多平台水环境法建立PSD模型,使用直径和高度分别为50 cm和50 cm的水箱,并将直径6.5 cm、高度8 cm的小平台放在水箱内部中间。将实验大鼠放在平台

上,水箱水位低于平台高度2 cm。当大鼠经历异相睡眠时,骨骼肌放松,可能用鼻子接触水或掉进水里,大鼠立即从异相睡眠中醒来。从第1天上午12:00至第2天上午12:00进行24 h PSD。

1.4.2 建立足底切口动物模型 将大鼠放在密封塑料盒中,用5%异氟烷与氧气的混合物进行麻醉诱导,然后通过鼻锥向大鼠输送1.2%~1.5%的异氟烷来维持麻醉。右侧后爪碘伏消毒后,用11号刀片从足底近端0.5 cm处向趾部做长约1 cm的纵行切口,切开皮肤后,用眼科镊挑起足底肌肉并纵行切开,保持肌肉起止和附着完整。按压止血后,以5~0缝合线缝合皮肤。术后用碘伏消毒切口,并涂抹抗生素软膏以预防感染,同时将大鼠放入单独笼子中恢复。

1.4.3 脑内RVM区注射药物 用5%水合氯化物(300 mg/kg)麻醉大鼠,剃除头顶部毛发,将头部固定于脑立体定位仪(单臂脑立体定位仪)上,碘伏消毒头顶部皮肤,沿颅顶部正中切开皮肤,暴露颅骨,用棉签分离颅骨骨膜,充分暴露前囟及后囟,调平(大鼠前、后囟在同一平面上,误差不超过0.03 mm),将颅骨钻开一个小孔,按照大鼠脑立体定位图谱确定RVM区,坐标定为距离耳内线尾部2.3 mm和腹部0.2 mm。将26号导管置入RVM内,采用粘固剂将导管固定在颅骨上,大鼠切口周围皮下逐层浸润0.5%罗哌卡因1 mL用于术后镇痛。将置管大鼠单独置于笼中恢复7天。对术后表现出任何神经功能缺损或体质量减轻(>50 g)的大鼠实施安乐死。实验结束后,将亚甲蓝微量注射至RVM区,以验证微量注射部位,排除位置不正确的大鼠。于足底切开后第1天,向大鼠RVM内注射CB1R抑制剂或CB1R激动剂等,待大鼠清醒1 h后行疼痛行为学测试。脑内注射药物剂量分别为:CB1R抑制剂每只30 μg;CB1R激动剂每只30 μg。

1.4.4 实验分组 采用随机数字表法将96只SD大鼠分为6组,每组16只,见表1。

表1 大鼠分组干预方式情况

组别	简称	说明
对照组	C	不进行任何操作
切口组	I	建立足底切口模型
PSD组	P	术前24 h异相睡眠剥夺
PSD-切口组	P-I	睡眠剥夺后建立足底切口模型
PSD-切口+CB1R抑制剂组	P-I+SR	睡眠剥夺后建立足底切口, RVM注射CB1R抑制剂
PSD-切口+CB1R激动剂组	P-I+WIN	睡眠剥夺后建立足底切口, RVM注射CB1R激动剂

1.5 指标检测

1.5.1 大鼠疼痛行为学检测 于足底切口造模前1天(PSD前)、足底切口造模前即刻、足底切口造模后第1、4、7、9天分别检测大鼠疼痛行为学情况。

测量累积疼痛评分(cumulative pain scores, CPS):将不受约束的大鼠放在塑料室内高架塑料网状地板上,使其适应30 min。使用有角度放大镜检查切口后爪。每隔5 min,密切观察每只大鼠1 min,持续1 h。根据后爪位置与颜色,分别记0、1、2分。后爪足底部分发白或被网格扭曲,表示足部完全承重,得0分;后爪足底部分接触到网格而没有变白或变形,得1分;后爪完全脱离网格,得2分。共观察12次,计算每次得分之和(0~24分),即为累计疼痛评分。

机械痛阈值(paw withdrawal threshold, PWT)测试:将每只大鼠放在塑料室内高架网状地板上,让其适应30 min。使用校准的von Frey纤维丝,通过塑料室下面网状地板开口确定机械刺激时的缩爪阈值,从2.0规格的纤维丝开始,将细丝垂直施加到右侧后爪伤口附近区域,持续6 s或直到大鼠缩回后爪远离纤维丝尖端。右爪出现快速抬起、抖动或舔后爪行为都被认为是阳性反应,记为阳性,以“X”表示;若无反应,视为阴性,以“0”表示。每只大鼠重复测量至少3次,每次间隔5 min,取3次结果平均值,确定为机械疼痛阈值。

1.5.2 酶联免疫吸附试验(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 每组处死6只大鼠,收集大鼠RVM区脑组织(脑膜下8.30 mm至12.30 mm),立即用干冰冷冻,-80 °C储存备用。将RVM组织在缓冲液中解冻,并用Teflon匀浆器匀浆。在冰上进一步孵育30 min后,4 °C,离心半径15 cm,12 000 r/min离心10 min,将上清液转移到新试管中用于ELISA和蛋白质测定。缓冲液成分:20 mM Tris-HCl pH 7.4、100 mM NaCl、40 mM NaF、1 mM EDTA、1 mM EGTA、1 mM 原钒酸钠、25 mM α-甘油磷酸盐、5 mM 焦磷酸盐和10%甘油。在使用前加入蛋白酶抑制剂混合物,然后使用ELISA试剂盒从组织提取物中定量BDNF和2-AG。结果为总蛋白浓度,表示为每微克总蛋白质中的BDNF和2-AG含量。

1.5.3 蛋白免疫印迹试验(western blot, WB) 每组处死3只大鼠,取大鼠RVM组织,放入放射免疫沉淀法(radio immuno precipitation assay, RIPA)裂解缓冲液中与蛋白酶抑制剂混合,提取总蛋白,使用二喹啉甲酸(bicin-

chonic acid, BCA)试剂盒测定蛋白质浓度。根据蛋白质分子量大小选择5%~12%体系的SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白质,并转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上。室温下用5%的脱脂牛奶封闭2 h,然后与一抗(针对CB1R、BDNF)在4 °C下孵育过夜。第二天使用TBST洗膜3遍,再加入稀释好的二抗(1:8000),继续室温孵育2 h,最后将配置好的ECL发光液滴于PVDF膜上,放入全自动凝胶成像分析仪中曝光,得到WB条带。重复测量3次,以GAPDH作为内参,采用Image J软件分析条带灰度值。

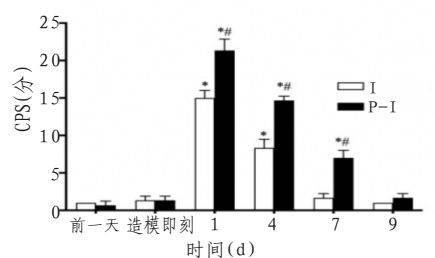
1.5.4 免疫荧光染色 每组取3只大鼠,麻醉大鼠后,经心脏使用4%多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA)灌注后立即取出大鼠RVM区脑组织,装入含有4% PFA的管中,4 °C下固定24 h。然后以递增浓度转移至20%和30%的蔗糖溶液逐层脱水直至组织沉没,使用冷冻切片机将RVM组织横向切面,厚度为10 μm,将组织切片收集并固定在载玻片上。使用柠檬酸钠进行抗原修复后,将切片与10%山羊血清在37 °C下孵育1 h,在切片上滴加PBS和一抗(CB1R、BDNF),4 °C下孵育过夜。第二天,滴加二抗后室温孵育2 h。然后将切片与4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)室温下孵育10 min。切片置于共聚焦激光扫描荧光显微镜下拍摄获取图片。应用Image J分析荧光强度。

1.5.5 RT-PCR法 参照大鼠大脑立体图谱,取大鼠延髓RVM区组织,使用RNA提取试剂盒从RVM组织中提取总RNA,用紫外分光光度计测定RNA纯度。配制逆转录反应体系混合液置于PCR仪中进行变性、退火反应合成cDNA。qRT-PCR按照试剂盒在热循环仪上测定CB1R和BDNF基因表达量。以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组相应mRNA表达量。CB1R、BDNF和GAPDH引物序列分别为:CB1R:5'-AGGAGA ACTTACTGTGAACAGGC-3'(正向),5'-GGTCTGTGGTGATGGTACGG-3'(反向);BDNF:5'-CTCAACCGAAGAGCTAAATAATG-3'(正向),5'-AACCCG-GTCTCATCAAAGCC-3'(反向);GAPDH:5'-GACATGCC-GCCTGGAGAAAC-3'(正向),5'-AGCCCAGGATGCCCTT-TAGT-3'(反向)。

1.6 统计学方法 采用SPSS 26.0、Graphpad Prism 9.0软件处理数据,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本t检验,当ANOVA检验显示存在显著差异时,采用Tukey事后检验法进行均值间两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

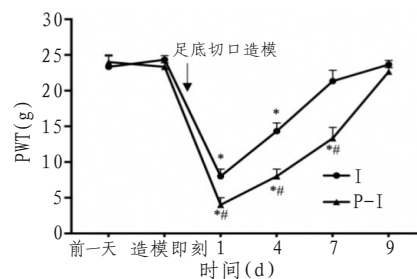
2.1 大鼠疼痛行为学情况 与I组相比,P-I组大鼠足底切口造模前1天和足底切口造模前即刻CPS无明显差异($P > 0.05$);足底切口造模后1天,两组大鼠CPS均升高($P < 0.05$)。P-I组大鼠足底切口术后第1、4、7天CPS高于I组($P < 0.05$),I组大鼠CPS于切口后7天逐渐恢复到足底切口造模前1天的CPS($P > 0.05$),P-I组大鼠于切口后9天逐渐恢复到足底切口造模前1天的CPS($P > 0.05$)。见图1。



注:*表示与足底切口造模前1天相比, $P < 0.05$;#表示与I相比, $P < 0.05$

图1 24 h PSD对足底切口大鼠CPS的影响

与I组相比,P-I组大鼠在足底切口造模前1天和足底切口造模前即刻PWT差异无统计学意义($P > 0.05$);足底切口造模后1天,两组大鼠PWT均降低($P < 0.05$)。与I组相比,P-I组大鼠在足底切口术后第1、4、7天的PWT更低($P < 0.05$);I组大鼠PWT于切口后第7天逐渐恢复到足底切口造模前1天的PWT($P > 0.05$),而P-I组大鼠于切口后9天逐渐恢复到足底切口造模前1天的PWT($P > 0.05$)。见图2。



注:*表示与足底切口造模前1天相比, $P < 0.05$;#表示与I相比, $P < 0.05$

图2 24 h PSD对足底切口大鼠PWT的影响

2.2 大鼠RVM区CB1R表达水平 与C组相比,I组大鼠术后第1、4天RVM区CB1R蛋白表达水平升高($P < 0.05$);P-I组大鼠术后第1、4、7天RVM区CB1R蛋白表达水平升高($P < 0.05$),于术后第9天恢复正常($P > 0.05$),见图3—4。与I组大鼠相比,P-I组大鼠术后第1、4、7天RVM区CB1R mRNA表达水平升高($P < 0.05$),见图5。

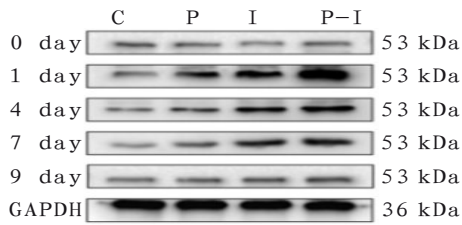
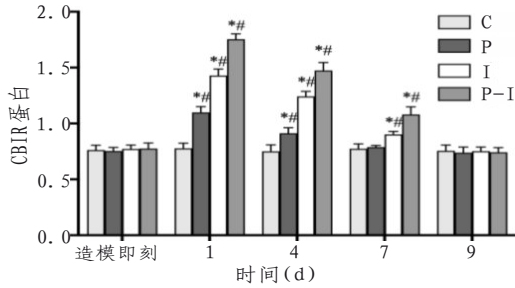
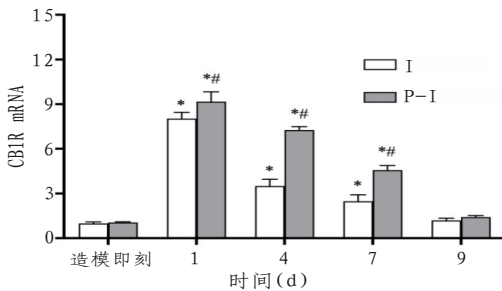


图3 大鼠RVM区CB1R蛋白表达条带图



注:*表示与足底切口造模即刻相比, $P < 0.05$; #表示与C组相比, $P < 0.05$

图4 大鼠RVM区CB1R蛋白表达水平比较



注:*表示与足底切口造模即刻相比, $P < 0.05$; #表示与I组相比, $P < 0.05$

图5 大鼠RVM区CB1R mRNA表达水平比较

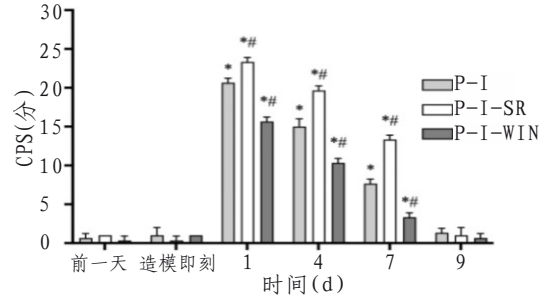
2.3 CB1R激动剂和抑制剂对大鼠疼痛行为学的影响

与P-I组相比,P-I+WIN组大鼠术后第1、4、7天CPS降低($P < 0.05$),P-I+SR组大鼠术后第1、4、7天CPS增加($P < 0.05$),并于术后第9天逐渐恢复正常($P > 0.05$),见图6。与P-I组相比,P-I+WIN组大鼠术后第1、4、7天PWT增加($P < 0.05$),P-I+SR组大鼠术后第1、4、7天PWT降低($P < 0.05$),并于术后第9天逐渐恢复正常($P > 0.05$),见图7。

2.4 CB1R表达对BDNF的影响

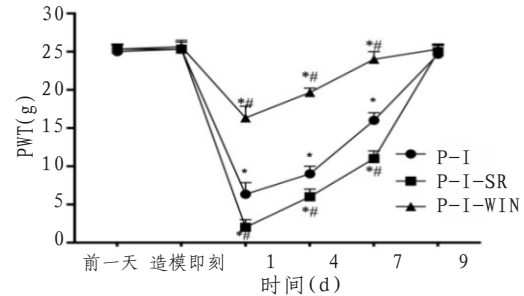
与P-I组相比,P-I+WIN组大鼠RVM内CB1R mRNA含量和蛋白表达均增加,P-I+SR组大鼠RVM内CB1R mRNA含量和蛋白表达均降低($P < 0.05$),见图8—10。与P-I组相比,P-I+WIN组大鼠RVM内BDNF mRNA含量和蛋白表达均增加($P < 0.05$),P-I+SR组大鼠RVM内BDNF的mRNA含量和蛋白表达均降低($P < 0.05$),见图11—13。与P-I组相比,P-I+WIN组大鼠术后第1天RVM内CB1R和BDNF表达均增加($P < 0.05$),P-I+SR组术后第1天RVM内CB1R和BDNF表达均降低($P < 0.05$),见图14—15,并于术后第9天逐渐恢

复正常,见图16—17。



注:*表示与足底切口造模前1天相比, $P < 0.05$; #表示与P-I组相比, $P < 0.05$

图6 CB1R激动剂和抑制剂对大鼠CPS的影响



注:*表示与足底切口造模前1天相比, $P < 0.05$; #表示与P-I组相比, $P < 0.05$

图7 CB1R激动剂和抑制剂对大鼠PWT的影响

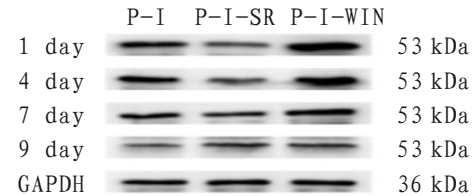
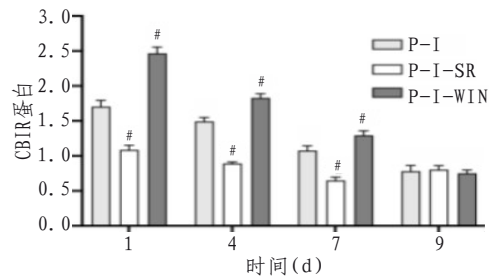
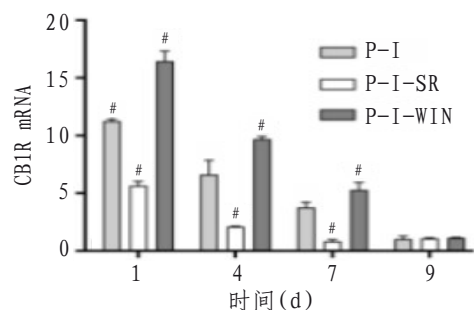


图8 大鼠术后CB1R蛋白表达条带图



注:#表示与P-I组相比, $P < 0.05$

图9 大鼠术后CB1R蛋白表达



注:#表示与P-I组相比, $P < 0.05$

图10 各组大鼠术后CB1R mRNA表达

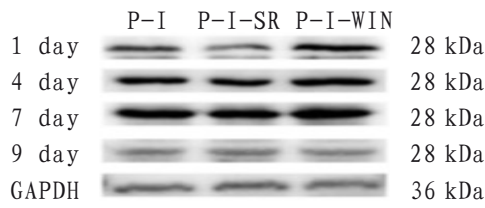
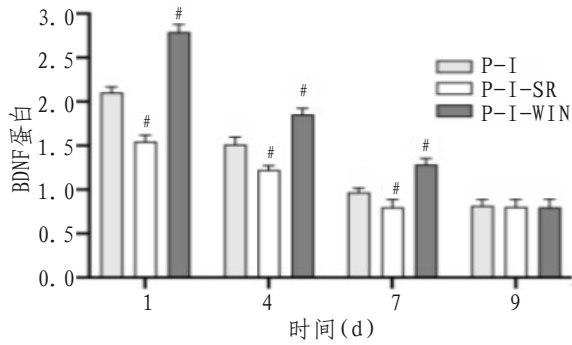
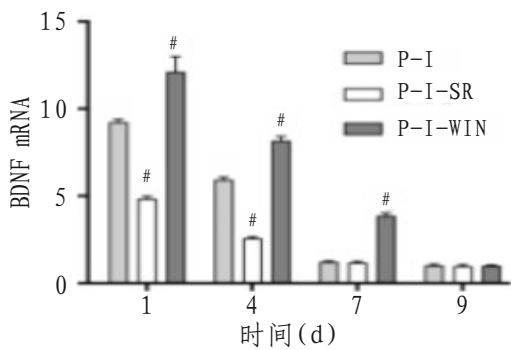


图11 各组大鼠术后BDNF蛋白表达条带图



注:#表示与P-I组相比, $P < 0.05$

图12 各组大鼠术后BDNF蛋白表达



注:#表示与P-I组相比, $P < 0.05$

图13 各组大鼠术后BDNF mRNA表达

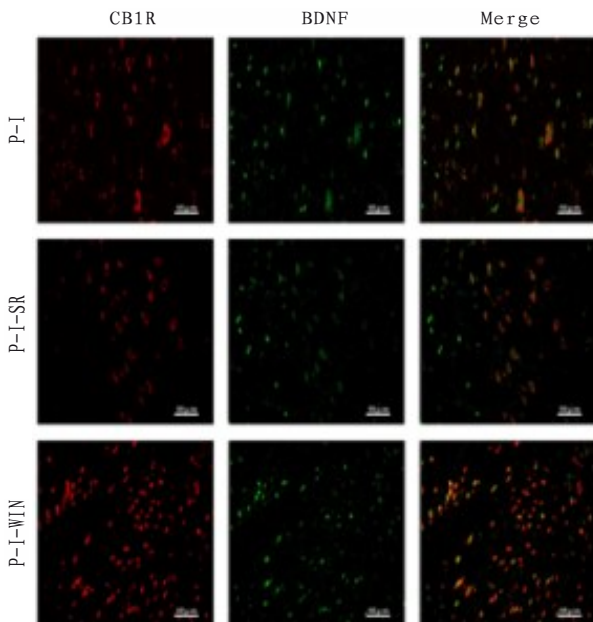
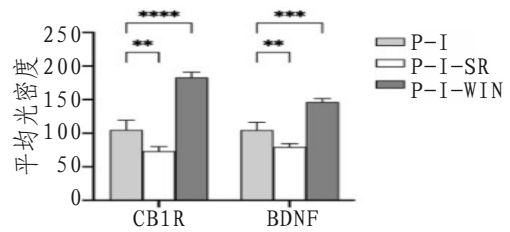


图14 大鼠术后第1天CB1R和BDNF蛋白表达免疫荧光图



注:**表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$, ****表示 $P < 0.0001$

图15 各组大鼠术后第1天CB1R和BDNF蛋白表达

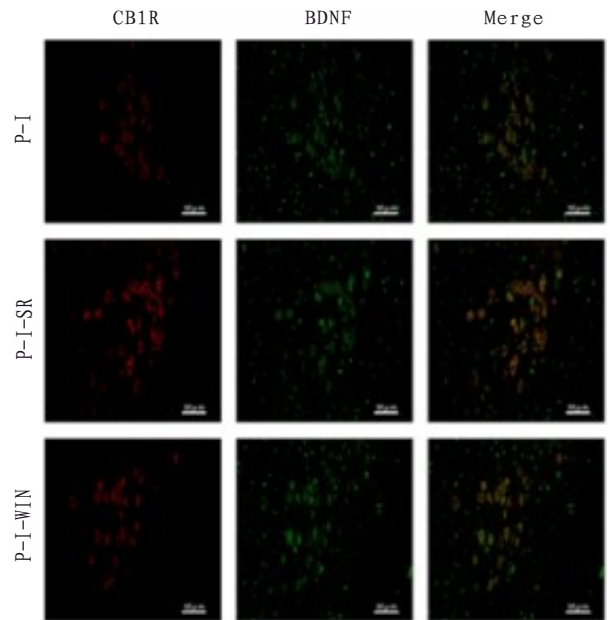


图16 各组大鼠术后第9天CB1R和BDNF蛋白表达免疫荧光图

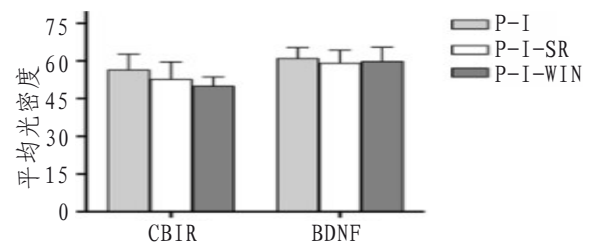


图17 大鼠术后第9天CB1R和BDNF蛋白表达

3 讨论

3.1 术前24 h PSD加重并延长切口诱发的术后痛觉过敏 多数手术患者术前经历短期睡眠障碍,且术前具有正常疼痛感觉^[11]。然而,急慢性睡眠障碍会增加术后疼痛的敏感性^[12-13]。睡眠剥夺后疼痛处理改变的大脑机制尚未明确。研究表明,急性睡眠剥夺放大了人类初级躯体感觉皮层内的疼痛反应性,削弱了纹状体和岛叶皮层高阶评估以及决策区域的疼痛反应性,并降低了疼痛阈值^[13]。为模拟临床术前睡眠障碍,本研究构建PSD动物模型,结果表明术前24 h PSD未改变术

前大鼠的基础痛觉,但加重了术后疼痛过敏,并延长了术后疼痛的持续时间。WANG等^[14]研究表明,手术前连续3天,每天6 h PSD,并不能改变大鼠对机械和热刺激的基础反应,但加剧了术后疼痛超敏反应。另一项研究报告,术前连续24或48 h PSD明显增加了福尔马林诱导的伤害感受,并降低了伤害感受机械缩爪阈值^[15]。研究发现,疼痛会影响术后睡眠质量,睡眠障碍也会影响疼痛感觉^[16-18],且疼痛对睡眠障碍的时间影响较睡眠障碍对疼痛强度的影响更强^[19]。

3.2 RVM区CB1R表达可调节PSD诱发切口疼痛程度 位于突触前膜的CB1R与应激、痛觉、记忆和情绪调节等功能密切相关^[20-21]。CB1R可改变突触可塑性,调节兴奋-抑制比,进而抑制或兴奋中枢敏化,发挥镇痛或致敏作用^[22]。逆向信号传导是CB1R介导突触可塑性的主要机制^[21]。研究表明,睡眠剥夺会增加下丘脑外侧结构中CB1R表达^[23],CB1R激动剂会通过抑制内脏感觉来减轻腹痛^[24]。表明CB1R参与了睡眠障碍和疼痛调节。在神经病理性疼痛、炎症性疼痛和其他急、慢性疼痛等疼痛模型中,CB1R激动剂已证明能缓解大鼠疼痛样行为,而CB1R抑制剂可增强大鼠的疼痛敏感性^[24-25]。在PSD24 h后,切口大鼠和正常大鼠RVM中CB1R的表达水平增加,且向RVM内微量注射CB1R激动剂可减轻PSD诱发的切口疼痛敏化,CB1R抑制剂可增强PSD诱发的切口疼痛敏化。研究表明,阻断和激活CB1R可以调控疼痛的下行调节系统,影响背角神经元和周围感觉神经元,从而引起疼痛敏感性变化^[21,25]。然而,BDNF信号转导的下游促进作用如何影响切口后疼痛敏感性的恶化和延长,以及BDNF和CB1R在术后疼痛敏感性调节中是否存在联系,目前仍未明确。

3.3 RVM区CB1R依赖式BDNF表达参与了PSD诱导术后疼痛敏化 研究证实,急性睡眠剥夺严重影响并增加了血清中神经营养因子水平,而这些影响可能是对睡眠剥夺引起的压力和中断的直接反应。并且急性睡眠剥夺随着神经营养因子水平的升高而引发了神经可塑性级联反应^[26]。目前,研究较多的神经营养因子包括BDNF和神经生长因子,它们具有调控突触、调节神经轴突生长等生理功能,BDNF异常增高亦可参与神经病理性疼痛的形成^[26]。BDNF和CB1R均可随神经元电活动变化而释放,是突触长期可塑性的关键调节因子^[27]。本研究证实RVM区域24 h睡眠剥夺可导致BDNF和CB1R表达增多。研究表明,BDNF在脊髓及皮质、海马等区域可介导长时程增强,可能是中枢敏

化的重要启动因素^[28]。CB1R可改变突触可塑性,调节兴奋-抑制比,进而抑制或兴奋中枢敏化,发挥镇痛或超敏化效果。但在中枢尤其在RVM水平,BDNF与CB1R如何相互作用调节疼痛敏化机制仍未明确。WU等^[9]研究证实,在兴奋性突触中,BDNF调节突触传递强度的逆向调控机制,即BDNF能够通过激活内源性大麻素系统,以负反馈方式调控神经递质释放,通过精确调控突触传递的强度来保护神经元免受兴奋性毒性的损伤;表明CB1R的激活受BDNF的调控且平衡其诱导的突触可塑性强度,但CB1R的激活也可上调BDNF表达^[29],而CB1R表达减少可能会导致BDNF水平降低^[30-31]。表明CB1R与BDNF在调节睡眠剥夺诱发的疼痛敏化机制方面具有复杂的相互作用。本研究表明,在睡眠剥夺后向切口大鼠RVM内注射CB1R激动剂会提高BDNF表达水平,而注射CB1R抑制剂会下调BDNF表达。表明RVM区域BDNF表达可能受CB1R依赖性调控,而这正是中枢在伤害性刺激下自我保护精准调控的机制之一,但RVM内存在on-cell、off-cell神经元,off-cell活性增加抑制伤害性信息传递产生镇痛效应,on-cell活性增加则加强伤害性信息传递产生疼痛易化效应,睡眠剥夺导致何种神经元兴奋或不同神经元集合式兴奋,激活CB1R和BDNF来调控疼痛以及具体的调控机制尚待进一步研究。

综上所述,术前24 h PSD加重并延长切口诱发的术后痛觉过敏;RVM区域CB1R表达可调节PSD诱发切口疼痛程度;RVM区域BDNF表达可能受CB1R依赖性调控,而这正是中枢在伤害性刺激下自我保护精准调控的机制之一。

参考文献

- [1] DOLIN S J, CASHMAN J N, BLAND J M. Effectiveness of acute postoperative pain management: I. evidence from published data[J]. Br J Anaesth, 2002, 89(3): 409-423.
- [2] AKOPIAN A N, RUPAREL N B, JESKE N A, et al. Role of ionotropic cannabinoid receptors in peripheral antinociception and antihyperalgesia[J]. Trends Pharmacol Sci, 2009, 30(2): 79-84.
- [3] MILLS E P, AKHTER R, DI PIETRO F, et al. Altered brainstem pain modulating circuitry functional connectivity in chronic painful temporomandibular disorder[J]. J Pain, 2021, 22(2): 219-232.
- [4] SVÍZENSKÁ I, DUBOVÝ P, SULCOVÁ A. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures: a short review[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2008, 90(4): 501-511.
- [5] SIEGLING A, HOFMANN H A, DENZER D, et al. Cannabinoid CB(1) receptor upregulation in a rat model

- of chronic neuropathic pain[J]. *Eur J Pharmacol*, 2001,415(1):5-7.
- [6] SELVAM R, YEH M L, LEVINE E S. Endogenous cannabinoids mediate the effect of BDNF at CA1 inhibitory synapses in the hippocampus[J]. *Synapse*, 2018,2018:22075.
- [7] ZHAO L, LEVINE E S. BDNF-endocannabinoid interactions at neocortical inhibitory synapses require phospholipase C signaling[J]. *J Neurophysiol*, 2014, 111(5):1008-1015.
- [8] PROSPÉRO-GARCÍA O, AMANCIO-BELMONT O, BECERRIL MELÉNDEZ A L, et al. Endocannabinoids and sleep[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2016,71:671-679.
- [9] WU Y, LIU Q, GUO B, et al. BDNF activates postsynaptic TrkB receptors to induce endocannabinoid release and inhibit presynaptic calcium influx at a calyx-type synapse[J]. *J Neurosci*, 2020, 40(42):8070-8087.
- [10] ZHAO L, YEH M L W, LEVINE E S. Role for endogenous BDNF in endocannabinoid-mediated long-term depression at neocortical inhibitory synapses[J]. *eNeuro*, 2015,2(2):2015.
- [11] DOLAN R, HUH J, TIWARI N, et al. A prospective analysis of sleep deprivation and disturbance in surgical patients[J]. *Ann Med Surg*, 2016,6:1-5.
- [12] LAUTENBACHER S, KUNDERMANN B, KRIEG J C. Sleep deprivation and pain perception[J]. *Sleep Med Rev*, 2006,10(5):357-369.
- [13] KRAUSE A J, PRATHER A A, WAGER T D, et al. The pain of sleep loss: a brain characterization in humans[J]. *J Neurosci*, 2019,39(12):2291-2300.
- [14] WANG P K, CAO J, WANG H, et al. Short-term sleep disturbance-induced stress does not affect basal pain perception, but does delay postsurgical pain recovery[J]. *J Pain*, 2015,16(11):1186-1199.
- [15] TOMIM D H, PONTAROLLA F M, BERTOLINI J F, et al. The pronociceptive effect of paradoxical sleep deprivation in rats: evidence for a role of descending pain modulation mechanisms[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(3):1706-1717.
- [16] ALEXANDRE C, LATREMOLIERE A, FERREIRA A, et al. Decreased alertness due to sleep loss increases pain sensitivity in mice[J]. *Nat Med*, 2017,23(6):768-774.
- [17] SCHRIMPF M, LIEGL G, BOECKLE M, et al. The effect of sleep deprivation on pain perception in healthy subjects: a Meta-analysis[J]. *Sleep Med*, 2015,16(11):1313-1320.
- [18] SELVANATHAN J, TANG N K Y, PENG P W H, et al. Sleep and pain: relationship, mechanisms, and managing sleep disturbance in the chronic pain population[J]. *Int Anesthesiol Clin*, 2022,60(2):27-34.
- [19] AMTMANN D, BAMER A M, ASKEW R, et al. Cross-lagged longitudinal analysis of pain intensity and sleep disturbance[J]. *Disabil Health J*, 2020,13(3):100908.
- [20] LLORENTE-BERZAL A, TERZIAN A L, DI MARZO V, et al. 2-AG promotes the expression of conditioned fear *via* cannabinoid receptor type 1 on GABAergic neurons[J]. *Psychopharmacology (berl)*, 2015, 232(15):2811-2825.
- [21] ZENG X, MAI J, XIE H, et al. Activation of CB1R alleviates central sensitization by regulating HCN2-pNR2B signaling in a chronic migraine rat model[J]. *J Headache Pain*, 2023,24(1):44.
- [22] HEMPEL B, XI Z X. Receptor mechanisms underlying the CNS effects of cannabinoids: CB₁ receptor and beyond[J]. *Adv Pharmacol*, 2022,93:275-333.
- [23] BELALI R, MARD S A, KHOSHNAME S E, et al. Anandamide improves food intake and orexinergic neuronal activity in the chronic sleep deprivation induction model in rats by modulating the expression of the CB1 receptor in the lateral hypothalamus[J]. *Neuropeptides*, 2023,101:102336.
- [24] YU Y, TSANG Q K, JARAMILLO-POLANCO J, et al. Cannabinoid 1 and mu-opioid receptor agonists synergistically inhibit abdominal pain and lack side effects in mice[J]. *J Neurosci*, 2022,42(33):6313-6324.
- [25] TRAN H, FENG Y, CHAO D, et al. Descending mechanism by which medial prefrontal cortex endocannabinoid signaling controls the development of neuropathic pain and neuronal activity of dorsal root ganglion[J]. *Pain*, 2024,165(1):102-114.
- [26] KHAN N, SMITH M T. Neurotrophins and neuropathic pain: role in pathobiology[J]. *Molecules*, 2015,20(6):10657-10688.
- [27] PARK H, POO M M. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2013,14(1):7-23.
- [28] NIJS J, MEEUS M, VERSIJPT J, et al. Brain-derived neurotrophic factor as a driving force behind neuroplasticity in neuropathic and central sensitization pain: a new therapeutic target? [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2015,19(4):565-576.
- [29] LUONGO L, MAIONE S, DI MARZO V. Endocannabinoids and neuropathic pain: focus on neuron-glia and endocannabinoid-neurotrophin interactions [J]. *Eur J Neurosci*, 2014,39(3):401-408.
- [30] ZHANG J, WANG N, CHEN B, et al. Blockade of Cannabinoid CB1 receptor attenuates the acquisition of morphine-induced conditioned place preference along with a downregulation of ERK, CREB phosphorylation, and BDNF expression in the nucleus accumbens and hippocampus[J]. *Neurosci Lett*, 2016,630:70-76.
- [31] SCHECHTER M, WELLER A, PITTEL Z, et al. Endocannabinoid receptor deficiency affects maternal care and alters the dam's hippocampal oxytocin receptor and brain-derived neurotrophic factor expression[J]. *J Neuroendocrinol*, 2013,25(10):898-909.

收稿日期: 2024-08-12

*基金项目: 甘肃省自然科学基金(21JR7RA586)。

作者简介: 李文娟(1984—), 女, 副主任护师。研究方向: 围术期护理与术后疼痛。

△通讯作者: 薛建军(1971—), 男, 硕士学位, 硕士研究生导师, 主任医师。研究方向: 围手术期器官保护。Email: xuejjebm0419@163.com。